

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Optimalizace chromatografických podmínek pro
HPLC stanovení biologicky aktivních látek**

Diplomová práce

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 15. 5. 2012

.....

Eva Kotíková

Na tomto místě bych ráda poděkovala konzultantce PharmDr. Ivaně Pasákové, Ph.D. a vedoucímu diplomové práce PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za trpělivost, odborné rady, pomoc a čas strávený se mnou v laboratořích a následně při zpracovávání získaných výsledků.

Tato práce vznikla za podpory projektu SVV 265 001.

Abstrakt

Optimalizace chromatografických podmínek pro HPLC stanovení biologicky aktivních látek

Diplomová práce

Eva Kotíková

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Adenosintrifosfát (ATP), adenosindifosfát (ADP), adenosinmonofosfát (AMP), kreatin (C) a fosfokreatin (CP) jsou polární látky s velkým významem nejen v lidském organismu. V této práci se podařilo vyvinout HPLC/UV metodu, která umožňuje separaci všech těchto látek za izokratické eluce. Jako vhodná stacionární fáze byla vybrána zirkoniová kolona, jejíž hlavní předností oproti klasickým silikagelovým kolonám je stabilita v celé škále pH a při teplotách až do 200°C.

Nejlepší separace tak bylo dosaženo na koloně ZirChrom[®]- PHASE, s použitím dvousložkové mobilní fáze s průtokem 1 ml/min – složka A: 10mM hydrogenufosforečnanový pufr, pH 7 a složka B: 100% acetonitril. Detekce byla prováděna pomocí UV detektoru při vlnových délkách 254 nm pro ATP, ADP, AMP, cAMP a při 215 nm pro C a CP. Výsledné retenční časy při těchto podmínkách byly: cAMP = 2,1 min, C = 3,7 min, AMP = 4,7 min, CP = 6,4 min, ADP = 10,7 min, ATP = 27,9 min. Při analýze srdeční tkáně byl vzorek nejprve mechanicky homogenizován s 57 µl 100mM EDTA a následně přidán 0,5 ml 0,66M chlazené HClO₄. Po deproteinaci byl přidán 1 ml 0,66M K₂HPO₄ a vzorek centrifugován 5 min při 10000 otáčkách. Supernatant byl odebrán a 20 µl nastříknuto na kolonu. Pro zajištění dostatečné stability vzorku bylo nezbytné po celou dobu úpravy vzorku udržovat teplotu 4°C.

Abstract

Optimalization of HPLC conditions for determination of biological active compounds

Diploma thesis

Eva Kotíková

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosin monophosphate (AMP), creatine (C) and phosphocreatine (CP) are polar substances of great importance not only for the human body. In this work HPLC / UV method which allows the separation of these substances in isocratic elution was developed. As a suitable stationary phase zirconia column was chosen. The main advantage in comparison with the traditional silica columns is stability in the whole range of pH as well as at temperatures up to 200 °C.

The best separation was achieved on a ZirChrom[®] - PHASE column by using a binary mobile phase with flow rate 1 ml/min - Part A: 10 mM hydrogenphosphate buffer, pH 7 and Part B: 100% acetonitrile. The detection was performed by using a UV detector at wavelengths of 254 nm for ATP, ADP, AMP, cAMP and 215 nm for C and CP. The final retention time values under these conditions were: cAMP = 2.1 min, C = 3.7 min, AMP = 4.7 min, CP = 6.4 min, 10.7 min = ADP, ATP = 27.9 min. In the analysis of cardiac tissue the sample was mechanically homogenised with 57 µl of 100mM EDTA first and then 0.5 ml icecold 0.66M HClO₄ was added. 1 ml 0.66 M K₂HPO₄ was added after the proces of deproteination and then the sample was centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. Afterwards a supernatant was removed and 20 µl of this supernatant were injected onto the column. Adequate stability of the sample was provided by the maintenance of temperature 4°C throughout the whole proces of the sample preparation.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část	11
2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	12
2.1.1 Princip HPLC	12
2.1.2. Kolony	14
2.1.3 Detektory	15
2.2 Kolony na bázi oxidu zirkoničitého	17
2.2.1 Fyzikální vlastnosti ZrO ₂	18
2.2.2 Chemické vlastnosti.....	19
2.3 Stanovované látky	20
2.3.1 Adenosin-5´ -trifosfát = ATP	21
2.3.2 Adenosin-5´-difosfát = ADP	22
2.3.3 Adenosinmonofosfát = AMP.....	23
2.3.4 Cyklický adenosin-3´,5´-monofosfát = cAMP.....	24
2.3.5 Kreatin = C	25
2.3.6 Fosfokreatin = kreatinfosfát = CP	26
2.4 Přehled vybraných metod pro stanovení adeninribonukleotidů, kreatinu a fosfokreatinu	27
3. Cíl práce.....	29
4. Experimentální část.....	31
4.1 Použité chemikálie	32
4.2 Přístrojové vybavení.....	33
4.2.1 Chromatografický systém.....	33
4.2.2 Ostatní použité přístroje a pomůcky.....	33

4.3 Vývoj chromatografických podmínek.....	34
4.3.1 Optimalizace chromatografických podmínek.....	34
4.3.2 Příprava mobilní fáze	34
4.3.3 Příprava roztoků standardů.....	34
4.3.4 Detekce	35
4.3.5 Úprava reálných vzorků myokardu	35
5. Výsledky a diskuze	36
6. Závěr	53
7. Literatura.....	55

Seznam zkratek

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

ACN – acetonitril

MeOH – methanol

ATP - Adenosintrifosfát disodný

ADP - Adenosindifosfát sodný

AMP - Adenosinmonofosfát sodný

cAMP - Cyklický adenosinmonofosfát

CP - Creatinfosfát

C - Creatin

MF – mobilní fáze

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

PBD - polybutadien

RP- reverzní fáze

1. Úvod

Adenosintrifosfát (ATP), adenosindifosfát (ADP), adenosinmonofosfát (AMP), kreatin (C) a fosfokreatin (CP) jsou polární látky s velkým významem nejen v lidském organismu. Cílem této práce bylo vyvinout HPLC/UV metodu, která by umožnila separaci všech těchto látek.

Většina dosavadních analýz byla realizována na tzv. reverzních fázích (chemicky vázané stacionární fáze) ze silikagelu, na jehož povrchových hydroxylových skupinách jsou chemickou reakcí navázány různé radikály. Silikagel je nejrozšířenějším polárním sorbentem pro svoji relativní chemickou stabilitu, vysoký stupeň reprodukovatelnosti, velký výběr velikostí částic, průměru pórů a ploch povrchů. Tento sorbent má však také svá omezení, a to zejména nestabilitu při vyšších teplotách a v širším rozmezí pH. Při zvýšení teploty nad 60°C dochází ke kondenzaci hydroxylových skupin, a tím ke změně vlastností kolony (např. selektivita, ztráta celistvosti kolony). Při $\text{pH} \geq 8,0$ dochází k rozpouštění sorbentu a odštěpování navázaných skupin a při $\text{pH} \leq 2,0$ dochází k hydrolyze hydroxylových vazeb. Z tohoto hlediska jsou výhodnější zirkoniové kolony, které jsou stabilní v celém rozmezí pH a při teplotách až do 200°C.

Stanovované látky (adeninribonukleotidy, kreatin a fosfokreatin) mají velký význam pro lidský organismus. Podílí se na celé řadě metabolických procesů. Díky své důležitosti byly tyto látky v poslední době často předmětem studií. Stanovuje se např. množství těchto látek za patologických stavů (např. po akutním infarktu myokardu či mozkové ischemii). Žádná z těchto analýz ale nebyla dosud provedena na zirkoniové koloně.

V teoretické části této diplomové práce je stručně popsána problematika a instrumentace HPLC, vlastnosti oxidu zirkoničitého, základní informace o významu stanovovaných látek a stručný souhrn metod, které již byly použity pro separaci těchto látek.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na vývoj chromatografických podmínek vhodných pro současné stanovení ATP, ADP, AMP, cAMP, C a CP na zirkoniové koloně a následnou aplikaci této metody při analýze reálného vzorku králíčího myokardu.

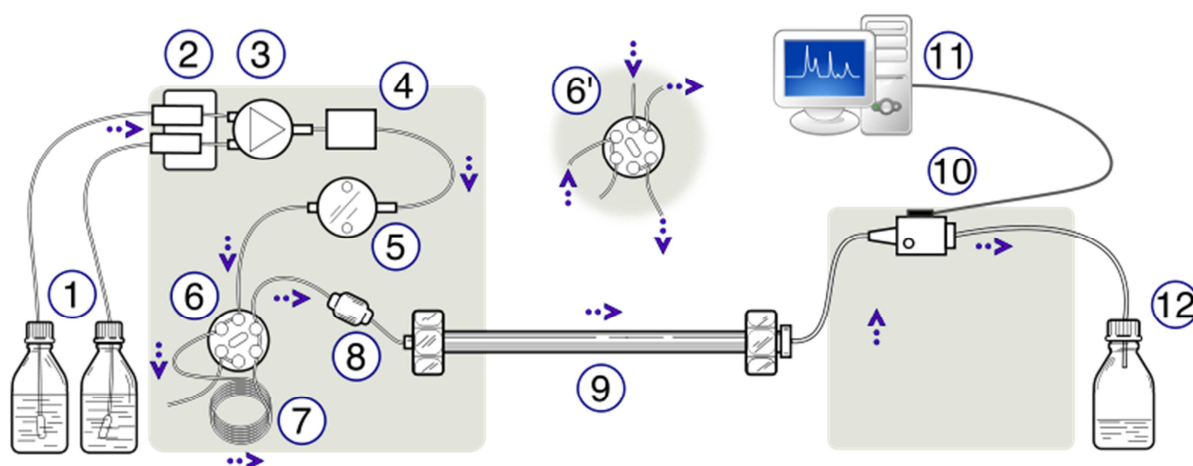
2. Teoretická část

2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je jedna z nejprogresivnějších analytických metod, která umožňuje jak kvantitativní (plocha chromatografického píku) tak kvalitativní (retenční čas) hodnocení látek. Tato metoda je vhodná pro dělení netěkavých a polárních látek, jejichž analýza příbuznou plynovou chromatografií bývá často obtížná. Přístroj, na kterém se analýzy provádí, je kapalinový chromatograf (viz obr. 1) ^{(1), (2), (3)}.

2.1.1 Princip HPLC

Podobně jako při papírové a tenkovrstvé chromatografii, je dělení založeno na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Proudění mobilní fáze probíhá za vysokého tlaku, který urychluje průtok. Během separace dochází k mnoha typům interakcí (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu). Díky těmto interakcím je možné selektivně a účinně dělit směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech ^{(1), (3)}.



Obr. 1 **Schéma kapalinového chromatografu** ⁽⁴⁾: 1. zásobníky mobilní fáze, 2. degasser (odplyňovač), 3. ventil pro vytvoření gradientu, 4. míšící nádoba MF, 5. vysokotlaké čerpadlo (pumpa), 6. spínací ventil v poloze „Inject“, 6'. spínací ventil v poloze „Load“, 7. dávkovací zařízení (autosampler), 8. předkolona, 9. analytická kolona, 10. detektor, 11. vyhodnocovací zařízení, 12. odpadní nádoba

Grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram. Počátek chromatogramu je kladen do okamžiku nástřiku vzorku na kolonu. Každé rozdělené složce analytu odpovídá na chromatogramu jeden pík, který má v ideálním případě tvar Gaussovy křivky. Poloha jejího vrcholu se nazývá retenční čas - t_R . Předpokladem úspěšné analýzy je optimalizace chromatografických podmínek tak, aby jednotlivé separované složky analytu měly ostré a symetrické chromatografické píky, rozdělené až na základní linii ^{(2), (5)}.

Mobilní fáze

Mobilní fáze musejí být velmi čisté a zbavené rozpuštěných plynů (probubláváním heliem, působením ultrazvuku nebo vakua). K získání přiměřených separačních vlastností je nutný vhodný výběr mobilní fáze. Podle eluční účinnosti jsou rozpouštědla rozdělena do eluotropní řady. Pro zlepšení separace analyzovaných látek se do mobilní fáze může přidat malé množství kyseliny, alkálie nebo pufru.

Při použití reverzních fází se nejčastěji používá jako mobilní fáze směs vody a methanolu nebo acetonitrilu. Eluotropní řada zde platí v obráceném pořadí a methanol tak má vyšší eluční účinnost než voda ⁽¹⁾.

Pumpy

Moderní přístroje umožňují pracovat s tlaky až 130 MPa. Důležitá je velká přesnost a reprodukovatelnost průtoků v celé škále pracovních tlaků. Čerpadla jsou rozdělována na pulzní a bezpulzní. Používají se pístová, membránová nebo pístově membránová. Konstrukční řešení v kombinaci s automatickým ovládáním obvykle uspokojivě řeší minimalizaci pulzů. Materiálem pro výrobu čerpadel v HPLC je nejčastěji nerezová ocel, titan a keramika. V kapalinové chromatografii se využívá dvou módů čerpání mobilních fází. Jedná se o mód isokratický, kdy je za neměnného průtoku čerpána jedna mobilní fáze (jednosložková nebo vícesložková předem smíchaná), alternativně lze čerpat zároveň ze dvou až čtyř rezervoárů při konstantním poměru složek a konstantním průtokem. A dále je to gradientový mód, kdy v průběhu jedné analýzy lze měnit složení i průtok mobilní fáze. Kvalitní chromatografické zařízení slaďuje činnost ventilů a čerpadel tak, aby gradientový profil byl reprodukovatelný ^{(2), (6)}.

Dávkovací zařízení

Automatické dávkovače (autosamplery) jsou spojené se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny malé nádobky na vzorky (vialky), uzavřené pryžovým septem. Je několik druhů konstrukčního spojení injekční stříkačky dávkovače se zásobníkem vzorků. Může se jednat o typ, kdy je injekční stříkačka dávkovače fixní a pohybuje se pouze zásobník vzorku pod zvednutou jehlou stříkačky nebo je fixní zásobník vzorků a pohybuje se raménko injekční stříkačky dávkovače nebo zásobník i injekční stříkačka dávkovače jsou fixní a vialka je roboticky dopravena pod zvednutou jehlu injekční stříkačky dávkovače ⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

2.1.2. Kolony

Kolony pro HPLC jsou ocelové, plastové nebo skleněné trubice o délce 5-30 cm a o vnitřním průměru 2,1-4,6 mm. Jsou naplněny vhodnou stacionární fází (tzv. sorbent), která musí být naprosto homogenní a rovnoměrná. Spojení mezi kolonou, dávkovačem a detektorem jsou kapilární (vnitřní průměr 0,5 mm) nejčastěji z nerez oceli. Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně ^{(1), (2), (6)}

Stacionární fáze

Separční účinnost HPLC je významně ovlivněna velikostí, tvarem, porozitou, strukturou, ale i homogenitou částic stacionární fáze. Čím menší a homogennější částice jsou, tím větší je účinná plocha a separační účinnost. Pro separaci látek na základě adsorpce se využívá nemodifikovaný silikagel, který má na svém povrchu volně přístupné skupiny Si-OH a na něž se polární látky adsorbují pomocí vodíkových můstků. Oxid hlinitý je vhodnějším adsorbentem pro méně polární látky. Při rozdělovací chromatografii se v současné době velmi často používají chemicky modifikované stacionární fáze, u kterých jsou pomocí silylace na povrch silikagelu navázány různé radikály, které modifikují vlastnosti fáze, zejména její polaritu. V případě navázání polárních skupin, jako je např. - CN, se výsledná polarita výrazně zvyšuje. Nejčastěji se však jedná o navázání nepolárních, uhlíkatých řetězců, obsahující 8-18 uhlíkových atomů. Jedná se tak o obrácený systém, tzv. reverzní fáze (RP).

Silikagel je nejrozšířenějším polárním sorbentem pro svoji relativní chemickou stabilitu, vysoký stupeň reprodukovatelnosti, velký výběr velikostí částic, průměru pórů a ploch povrchů. Tento sorbent má však také svá omezení, a to zejména nestabilitu při vyšších teplotách a v širším rozmezí pH. Při zvýšení teploty nad 60°C dochází ke kondenzaci hydroxylových skupin, a tím ke změně vlastností kolony (např. selektivita, ztráta celistvosti kolony). Při $\text{pH} \geq 8,0$ dochází k rozpouštění sorbentu a odštěpování navázaných skupin a při $\text{pH} \leq 2,0$ dochází k hydrolýze hydroxylových vazeb.

Pro dělení ve vodě rozpustných látek iontového charakteru jsou určeny stacionární fáze s vlastnostmi iontoměničů.

K dělení vysokomolekulárních sloučenin (např. bílkovin, polysacharidů) jsou vhodné polymerní gely. Zvláštní pozornost také zasluhují tzv. chirální stacionární fáze, které umožňují separaci optických izomerů ^{(1), (2)}.

2.1.3 Detektory

K detekci separovaných látek se většinou využívá obecných nebo specifických vlastností, kterými se tyto látky odlišují od mobilní fáze. Na této bázi se také rozlišují univerzální a selektivní detektory. Na detektory pro HPLC jsou obecně kladeny vysoké nároky, především na citlivost, reprodukovatelnost, linearitu odezvy, nezávislost odezvy na změně složení MF při gradientové eluci a univerzálnost (detekce všech oddělených složek vzorku) ^{(1), (6)}.

Spektrofotometrické detektory

Jsou to nejčastěji používané detektory při HPLC analýze látek, které mají značnou citlivost (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze je používat při gradientové eluci.

Většina organických látek absorbuje v oblasti UV záření, některé i ve viditelné oblasti světla. Při měření je možnost vybrat několik vlnových délek (filtrové), nebo jsou detektory opatřeny monochromátorem a pracují na principu spektrofotometru v rozsahu 190 - 400 nm. Proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami analytu, které protékají celou detektorem ^{(1), (2), (6)}.

DAD (diode array detector) – spektrofotometr s diodovým polem – je řízený počítačem a snímá celé absorpční spektrum eluátu v každé sekundě. Hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách a porovnává poměry absorbancí. Výsledkem je trojrozměrný chromatogram (závislost absorpce na vlnové délce a na čase). Z tohoto chromatogramu lze rychle identifikovat látky a posoudit i jejich čistotu ^{(1), (2)}.

Fluorimetrické detektory

Používají se s výhodou u látek, kdy analyt vykazuje fluorescenci, nebo u látek, u kterých je možno provést derivatizaci vhodnými činidly a převést je na fluoreskující deriváty. Tyto detektory jsou proto méně univerzální než UV detektory, ale mají vyšší citlivost (10^{-9} až 10^{-12} g/ml) a jsou selektivnější ^{(2), (6)}.

Elektrochemické detektory

Tyto detektory umožňují zjistit velmi nízké koncentrace látek v eluentu v případě, že tyto látky jsou elektrochemicky aktivní (redukovatelné nebo oxidovatelné). Měří se proud protékající mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. Detektor pracuje buď jako polarografický se rtuťovou kapkovou elektrodou, nebo s tuhou elektrodou zhotovenou např. z grafitu ^{(1), (2), (6)}.

Refraktometrické detektory

Tyto detektory měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a mobilní fází s analytem vytékajícím z kolony. Jsou univerzální, vyhodnotí jakoukoliv látku, ale jsou používané spíše výjimečně kvůli svým nevýhodám. Mezi ty největší lze zařadit malou citlivost (10^{-6} g/ml), nutnost termostátování a možnost použití pouze isokratické eluce ^{(1), (2)}.

Hmotnostní spektrometr (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která převádí molekuly na ionty a tyto ionty následně rozlišuje podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a zaznamenává relativní intenzitu jednotlivých spekter. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí, a to z iontového zdroje (převádí neutrální molekuly analytu na nabitě částice – tzv. ionizace), hmotnostního analyzátoru (rozděluje ionty v plynné fázi za vysokého vakua podle m/z) a detektoru (detekce iontů po jejich separaci podle m/z a určení relativní intenzity jednotlivých iontů) ^{(2), (8)}.

Po výstupu z HPLC kolony se musí odstranit přebytek mobilní fáze a molekuly analytu v plynném stavu jsou ionizovány v hmotnostním spektrometru. Je několik ionizačních technik, které se využívají. Jednou z nich je elektronová ionizace (EI), která patří mezi tzv. tvrdé ionizační techniky, při které dochází k výrazné fragmentaci molekuly. Pro spojení s HPLC se však nejčastěji používají měkké neboli šetrné ionizační techniky, kdy získá ionizovaná molekula mnohem menší množství energie oproti EI a vzniká tak minimum fragmentovaných iontů. Jedná se o ionizace za atmosférického tlaku, tzv. API: elektrosprej - ESI, chemická ionizace za atmosférického tlaku - APCI, fotoionizace za atmosférického tlaku - APPI). Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní a citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci i kvantifikaci látek ^{(2), (8), (9)}.

2.2 Kolony na bázi oxidu zirkoničitého

Rozpustnost silikagelu při vyšším pH mobilní fáze vedlo k vývoji alternativních HPLC kolon na bázi oxidů kovů, zejména oxidu zirkoničitého (ZrO_2). Oxid zirkoničitý lze připravit v podobě monodisperzních porézních kulových částic. Takto připravené kolony vykazují srovnatelnou efektivitu se silikagelovými kolonami ⁽⁷⁾.

Oxid zirkoničitý existuje v amorfni a v mnoha krystalografických formách. Tento materiál má zajímavé vlastnosti a má četné aplikace v moderní technologii ⁽¹⁰⁾.

Největší výhodou oxidu zirkoničitého je jeho chemická a tepelná stabilita. Oxid zirkoničitý je stabilní v celém rozsahu pH, při vysokém tlaku a snese teploty až do 200°C. Tato velká stabilita je výhodná hlavně proto, že tyto kolony mohou být použity za extrémních podmínek (např. čištění kolony), prodlužuje se tím jejich životnost a doba analýzy se za vysokých teplot a průtoku může zkrátit až osmnáctkrát bez výrazného snížení rozlišení oproti běžným podmínkám. Také se snižuje cena za analýzu a rozšiřují se možnosti použití různých chromatografických podmínek ^{(7), (11), (12)}.

2.2.1 Fyzikální vlastnosti ZrO₂

Precipitace ZrO₂

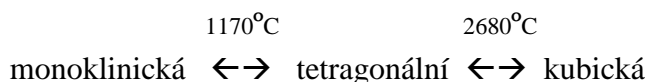
ZrO₂ může být připravován precipitací ze zirkonia, jeho solí nebo alkoxidů. Metoda přípravy silně ovlivňuje vlastnosti precipitátu ^{(10), (13), (14), (15), (16), (17)}.

Mechanismus krystalizace závisí na pH a čase. Je založen na tetramerní struktuře zirkoniových sloučenin nacházejících se v pevné fázi a v roztoku. Pomalý proces krystalizace při extrémních hodnotách pH upřednostňuje vznik tetragonální struktury, zatímco rychlá precipitace vede ke vzniku amorfni sraženiny či monoklinické fáze (tu podporuje zahřívání) ^{(18), (19), (20)}.

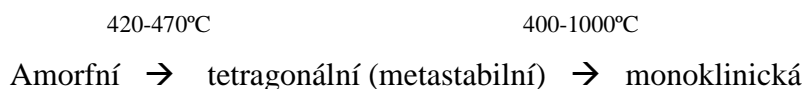
Krystalinita

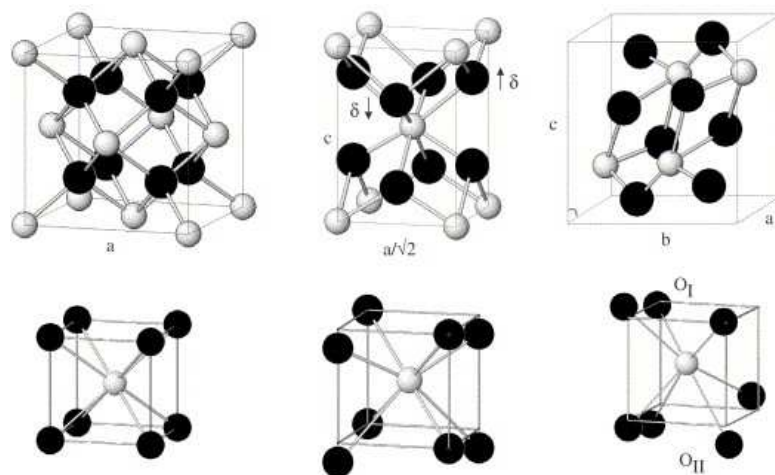
ZrO₂ existuje ve čtyřech formách – amorfni, tetragonální, kubická a monoklinická (viz obr. 2). Optické, tepelné, mechanické a elektrické vlastnosti ZrO₂ závisí na jeho struktuře ^{(11), (21), (22)}.

Krystalografické formy se mění z jedné na druhou následovně:



Nicméně, všechny tyto krystalické formy lze získat při mnohem nižších teplotách. Například monoklinická fáze se dá získat pomalým vysrážením z hydratovaného hydroxidu zirkoničitého a odstraněním kalu z původního roztoku. Kubickou fázi lze získat podobně. Amorfni sraženiny se obvykle přemění při tepelném zpracování na metastabilní tetragonální fázi a tu lze převést na monoklinickou fázi. Stupeň konverze nezávisí jen na teplotě, ale i na době trvání tepelného působení ^{(14), (23), (24)}.





Obr. 2 Struktury ZrO_2 ⁽¹¹⁾ : Atomová struktura (nahore) a koordinační jednotky Zr a O (dole) u nízkotlakých polymorfů ZrO_2 : Kubický (vlevo), tetragonální (uprostřed) a monoklinický (vpravo). Tmavé kruhy označují kyslíkový atom a světlé kruhy Zr.

2.2.2 Chemické vlastnosti

Pozoruhodná stabilita ZrO_2 může být alespoň částečně chápána na základě monoklinické struktury. V monoklinické struktuře je na každý atom zirkonia vázáno sedm atomů kyslíku. Na rozdíl od silikagelu, kde každý atom křemíku má pouze čtyři kyslíky. Tato vlastnost způsobuje velkou chemickou stabilitu ZrO_2 . Chemická stabilita byla měřena v extrémních podmínkách pH v porovnání s oxidem hlinitým a silikagelem. V eluátu byly po použití extrémních hodnot pH hledány rozpuštěné částice stacionárních fází. ZrO_2 bylo na rozdíl od ostatních látek stabilní v celé škále pH ^{(25), (26)}.

Oxid zirkoničitý má jako jediný oxid kovu čtyři chemické povrchové vlastnosti - kyselé, bazické, oxidující a redukující. S těmito povrchovými vlastnostmi souvisí i vysoká katalytická aktivita a selektivita ZrO_2 pro konkrétní reakce ⁽¹⁰⁾.

Oxid zirkoničitý má na svém povrchu oproti silanolovým skupinám silikagelu adsorpční centra charakteru Lewisových kyselin. Kvůli tomu se do mobilních fází musí přidávat puffry, aby kompenzovaly silné interakce těchto center s hydroxylovými, fosfátovými či karboxylovými skupinami v molekulách látek ^{(7), (27), (28)}.

Nemodifikovaný oxid zirkoničitý se používá v systému s normálními fázemi (ZirChrom[®] - PHASE). Častější je použití oxidu zirkoničitého v reverzním módu kdy se povrch oxidu zirkoničitého modifikuje tenkou vrstvou polybutadienu (ZirChrom[®] - PBD), polystyrenu (ZirChrom[®] -PS) nebo pyrolyticky vyloučeného uhlíku (ZirChrom[®] - CARB) ⁽⁷⁾.

Selektivita zirkoniových fází v normálním módu je lepší než u alkylsilikagelových fází hlavně s ohledem na separace stereoisomerů a velmi podobných sloučenin lišící se polaritou (steroidy). V reverzním módu je lepší při separaci silně polárních látek ⁽⁷⁾.

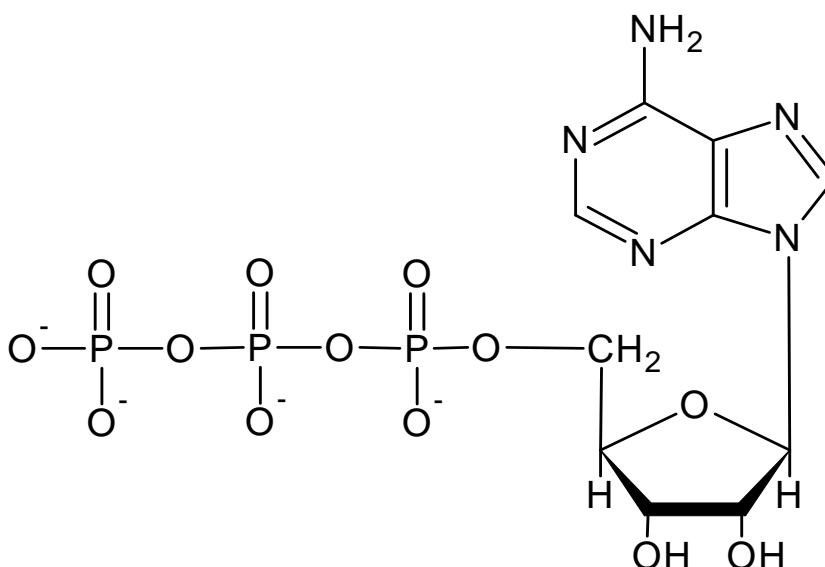
2.3 Stanovované látky

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci chromatografických podmínek pro analýzu následných analytů: Adenosin-5'-trifosfát (ATP), Adenosin-5'-difosfát (ADP), Adenosinmonofosfát (AMP), Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát (cAMP), Kreatin (C), Fosfokreatin (PC). Jedná se o látky polární a velice významné pro mnoho funkcí v organismu.

Z těchto látek jsou pro organismus (živočišný i rostlinný) nejdůležitější adenosinfosfáty (neboli adeninribonukleotidy) = ATP, ADP, AMP a cAMP. ATP je nejdůležitější energetický metabolit buněk, komplexně zapojený do metabolismu adenosinfosfátů, zajišťuje skladování a přenos chemické volné energie v buňce, jeho štěpením (nejčastěji kinázami, ATPázami a ligázami) vzniká ADP nebo AMP. Význam adenosinfosfátů pro energetické poměry je zásadní. Energetický stav buňky se vyjadřuje tzv. energetickým nábojem, který je možno vypočítat z aktuálních intracelulárních koncentrací ATP, ADP a AMP. Adenosinfosfáty slouží také jako významné aktivátory nebo inhibitory regulačních enzymů. ATP je inhibitorem katabolických drah (hlavně citrátového cyklu a glykolýzy), ADP a AMP bývají naopak aktivátory těchto drah ⁽²⁹⁾.

2.3.1 Adenosin-5' -trifosfát = ATP

ATP je nukleotid, jehož molekula se skládá ze tří složek (viz obr. 3). Ve středu je molekula cukru - ribóza, která je navázána na adenin a vytváří spolu adenosin a z druhé strany cukru je navázán řetězec tří fosfátových skupin (zbytky od kyseliny fosforečné), který je klíčový pro aktivitu ATP⁽³⁰⁾.



Obr. 3: Struktura ATP

Význam ATP:

Všechny živé organismy, rostliny a zvířata, vyžadují neustálý přísun energie, aby fungovaly. Energie se používá pro všechny procesy, které udržují organismus naživu. K některým z těchto procesů dochází neustále, jako je metabolismus potravy, syntéza velkých biologicky důležitých molekul (např. proteinů a DNA) a transport molekul a iontů v celém organismu. Další procesy se vyskytují pouze v určitých obdobích, jako je svalová kontrakce a další buněčné pohyby. Zvířata získávají svou energii oxidací potravin, rostliny vycytají pomocí chlorofylu sluneční světlo ve formě fotonů. Nicméně předtím, než energie může být použita, je nejprve transformována do podoby, kterou organismus zvládne snadno využít. Tento speciální nosič energie je molekula adenosintrifosfátu - ATP^{(29), (30), (31)}.

ATP vzniká hlavně při oxidaci látek v koncovém oxidačním řetězci. Tento řetězec je sledem redoxních dějů, které probíhají na vnitřní membráně mitochondrií při procesu buněčného dýchání a fotosyntézy. Energie se ukládá do makroergní vazby mezi fosfáty.

Tato vazba vratně uchová až 50 kJ energie. Pomocí enzymů (např. hydrolázy, transferázy) je pak v místě potřeby molekula ATP rozložena na ADP nebo AMP a fosfáty za uvolnění energie ^{(29), (31)}.

Enzymy jako katalyzátory pro uvolnění energie z ATP:

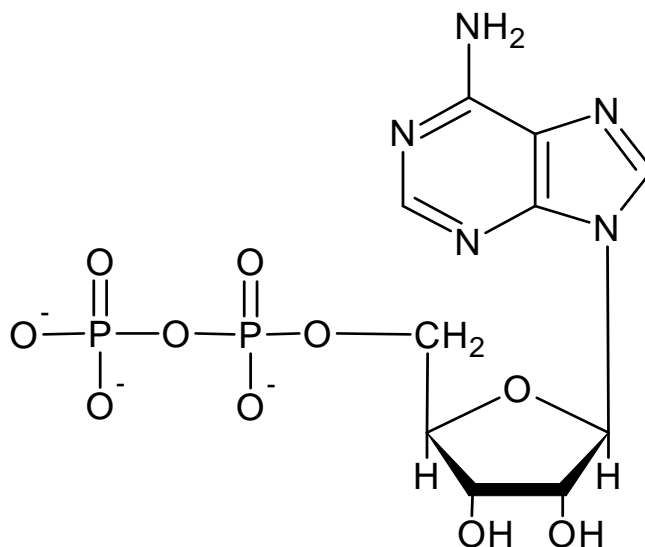
- Ligázy – štěpí ATP na ADP nebo AMP a uvolněná energie se uplatní při vzniku nových kovalentních vazeb;
- Hydrolázy (ATPázy) – energie vzniklá při těchto reakcích se využívá pro pohyb nebo aktivní transport;
- Transferázy – přenášejí některou část z molekuly ATP na další substrát; přenášenou částí může být fosfát, ADP, AMP nebo adenosin ⁽²⁹⁾

Jen menší část ATP se spotřebuje k mechanickému pohybu, mnohem víc molekul ATP se spotřebuje k uskutečňování aktivních transmembránových transportů (př.: Na⁺,K⁺-pumpa), syntéze proteinů a synaptickému přenosu v nervové tkáni ⁽³²⁾.

Stanovení adeninových nukleotidů a energetického stavu buněk má význam i při charakterizaci poškození při ischemii mozku a post-ischemické obnovy ⁽³³⁾.

2.3.2 Adenosin-5'-difosfát = ADP

ADP je nukleotid tvořený třemi složkami (viz obr. 4). Jsou to cukr – ribóza, adenin a dvě fosfátové skupiny (zbytky od kyseliny fosforečné). ADP je produkt defosforylace ATP, vznikají v případě, že organismus potřebuje energii ⁽³⁴⁾.



Obr. 4: Struktura ADP

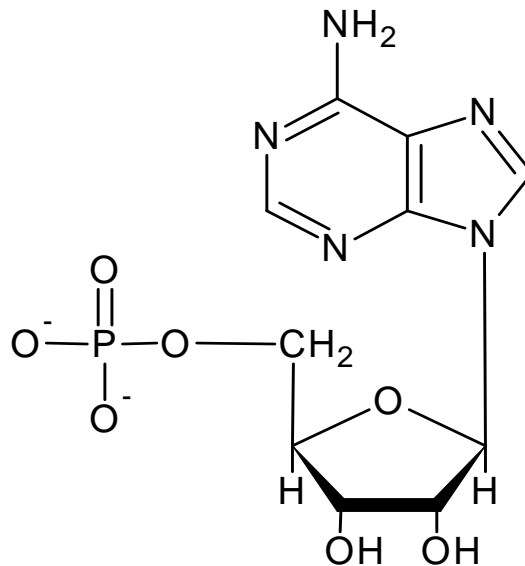
Význam ADP:

Po ATP je dalším možným zdrojem energie, vzhledem ke svému obsahu jedné makroergické vazby. Potom z něj vniká AMP a fosfát. A naopak z ADP se vytváří pomocí ATPázy ATP, kdy k ADP se připojí další fosfátová skupina. Tato reakce probíhá při fotosyntéze a při buněčné respiraci ⁽³²⁾.

ADP je důležitý fyziologický agonista, který hraje významnou roli při normální homeostáze a u tvorby trombů. ADP totiž aktivuje krevní destičky přes 3 purinergní receptory pro změnu tvaru destiček, čímž dochází k jejich shlukování a další kaskádě dějů, vedoucích ke vzniku trombů při krvácení. Pochopení funkce a významu těchto receptorů vedlo k vývoji léků, jako je klopidogrel a tiklopidin, které jsou dnes úspěšně využívány v léčbě trombotických poruch. Klopidogrel blokuje vazbu ADP na destičkový receptor, a tím zabraňuje agregaci trombocytů. Je podáván u dospělých jako prevence proti aterotrombotickým příhodám ^{(35), (36)}.

2.3.3 Adenosinmonofosfát = AMP

AMP je nukleotid, který je tvořen z molekuly ribózy, adeninu a jednoho fosfátu (viz obr. 5).



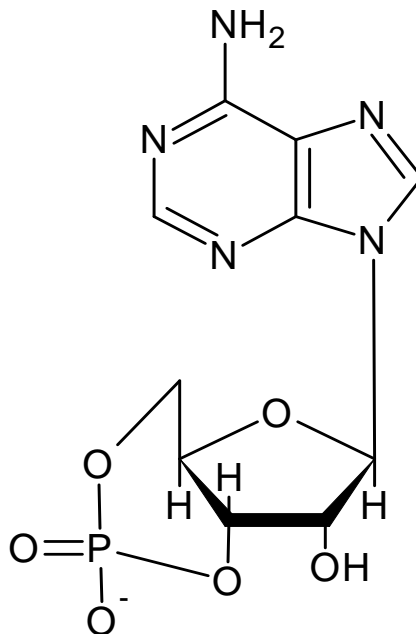
Obr. 5: Struktura AMP

Význam AMP:

AMP neboli kyselina adenylová je nukleotid vznikající štěpením ATP pomocí ligáz a hydrolytickým štěpením cAMP pomocí fosfodiesterázy. Jeho množství v buňkách roste při energetickém vyčerpání. Při zvyšování koncentrací se aktivují katabolické procesy (zejména citrátový cyklus a glykolýza) a začne doplňování hladiny ATP⁽²⁹⁾.

2.3.4 Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát = cAMP

cAMP vzniká z ATP působením membránového enzymu adenylátcyklázy (viz obr. 6).



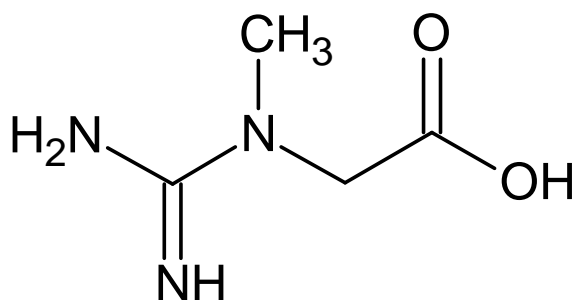
Obr. 6: Struktura cAMP

Význam cAMP:

Tato látka zastává důležitou funkci druhého posla v mnoha signálních drahách. Jeho působením dochází k aktivaci proteinkináz, které nadále aktivují či inhibují klíčové enzymy nitrobuněčného metabolismu. Pomocí specifických fosfodiesteráz je hydrolyzována fosfodiesterová vazba cAMP a dochází tak k rozkladu cAMP na AMP. Fosfodiesterázy se tak podílejí na úpravě hladiny těchto druhých poslů v buňkách⁽²⁹⁾,⁽³⁷⁾.

2.3.5 Kreatin = C

Kreatin je dusíkatá organická kyselina (viz obr. 7), která se běžně nachází ve svalech všech obratlovců. V rostlinách obsažen není.



Obr. 7: Struktura C

Význam kreatinu:

Jeho funkcí je především zásobení svalů energií. V době klidu je kreatin reverzibilně fosforylován na kreatinfosfát pomocí kreatinkinázy a při intenzivní svalové práci, kdy klesá koncentrace ATP, se přenosem fosfátu z kreatinfosfátu na ADP tvoří ATP^{(29), (38)}.

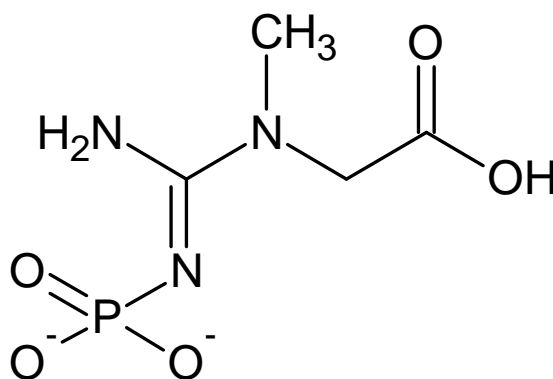
Výchozími látkami pro syntézu jsou glycin a arginin. Je odbouráván na kreatinin, jednu z hlavních dusíkatých složek moči^{(29), (38)}.

Kreatin je hojně využíván ke zvýšení sportovní výkonnosti, k urychlení rehabilitace a byl úspěšně zkoušen v léčbě neurologických, neuromuskulárních a aterosklerotických onemocnění. Hraje také klíčovou roli v homeostáze mozkové energie a podílí se tak na časové a prostorové paměti^{(39), (40), (41), (42)}.

Je však mnohem důležitější pro mozek než pro svaly. Osoby s deficitem kreatinu trpí závažnými nedostatky, jakými jsou např. problémy s řečí, či epilepsie. Nedostatek může být také hlavní příčinou mentální retardace⁽⁴³⁾.

2.3.6 Fosfokreatin = kreatinfosfát = CP

Kreatinfosfát je fosforylovaná molekula kreatinu (viz obr. 8). Fosfát je navázán makroergickou vazbou, která se snadno štěpí v době potřeby ⁽²⁹⁾.



Obr. 8: Struktura CP

Význam kreatinfosfátu:

Je součástí intracelulárního systému hospodaření s energií. Neurony a svalové buňky mají velké a kolísavé energetické požadavky. Ve snaze zmírnit náhlé energetické náročnosti na ATP-ADP systém, tyto buňky používají zálohu, kterou je PC-C systém. Kreatin totiž může v době klidu převzít vysokou energii fosfátové skupiny z ATP a uložit ji jako kreatinfosfát. V případě potřeby poté naopak může rychle vrátit vysokou energii fosfátu ADP a vytvořit jednu molekulu ATP. Tato kapacita umožňuje uložit další energii do buňky, zvýšit ATP generaci na krátké časové období, a tlumit tak dopady náhlé vysoké poptávky po ATP ^{(43), (44)}.

Reverzibilní fosforylace kreatinu je katalyzována několika kreatinkinázami, které se nejvíce nacházejí v kosterním a srdečním svalu a dále v mozkové tkáni. Mitochondriální kreatinkinázy, spolu s cytosolickými izoenzymy kreatinkinázy a vysoce difúzní kreatinkinázou katalyzují vznik kreatinfosfátu a poskytují tím čas a prostor pro udržení buněčné energetické homeostázy. Přítomnost kreatinkinázy v plazmě je známkou poškození tkáně a v některých případech je používán v diagnostice infarktu myokardu ^{(43), (44), (45)}.

2.4 Přehled vybraných metod pro stanovení adeninribonukleotidů, kreatinu a fosfokreatinu

Díky velkému významu těchto látek, především ATP, byla publikována řada studií a článků, které se zabývají způsobem separace a analýzy těchto látek z biologických materiálů a jejich kvantitativním stanovením. Nicméně publikací zabývajících se současnou analýzou všech těchto analytů mnoho není.

Ke stanovení byly například použity tyto metody:

- luminiscenční stanovení ATP v bakteriích ⁽⁴⁶⁾
- mechanismus iontové výměny v HPLC ^{(47), (48), (49)}
- HPLC s gradientovou elucí ⁽⁵⁰⁾
- ion-pair RP chromatografie ^{(51), (52), (53), (54)}
- stanovení CP enzymatickým převedením na ekvivalentní množství ATP a změření tohoto nárůstu ⁽⁵⁵⁾

Současnou analýzou C, CP, AMP, ADP, ATP a hypoxantinu v izolované prokrvené srdeční tkáni pomocí HPLC publikoval např. Volonté a kol. (2004) za následujících chromatografických podmínek: kolona C 18, mobilní fáze obsahovala 215mM KH_2PO_4 , 2,3mM hydrogensíranu tetrabutylamonného, 4% acetonitrilu a 0,4% hydroxidu sodného za průtoku 1 ml/min a teplotou 25°C, nástřikovým objemem 20 μl a detekcí na UV při vlnové délce 220 nm. Analyzovaná srdeční tkáň byla mechanicky homogenizována s 5 ml 0,4M HClO_4 . Po vysrážení s 0,8 ml 2M KOH se tkáň centrifuguje při 0°C 10 min. Supernatant byl nastříknut na kolonu. Tato metoda poskytla dobré chromatografické výsledky při délce analýzy 19 minut ⁽⁵⁶⁾.

Další metodou bylo současné stanovení adeninových nukleotidů a kreatinových sloučenin v myokardu pomocí HPLC na reverzní fázi. Stacionární fází byla kolona C18, detekce na UV detektoru při 210 nm a režim gradientové eluce. Mobilní fáze A byla složena z 0,2M KH_2PO_4 o pH 5 a mobilní fáze B z vody, ACN a methanolu v poměru 50/25/25. Před prvním nástřikem byla kolona ekvilibrována 1% B. V čase 1-4 min gradient začal stoupat z 1%B až na 35%B. V čase 4,2 minut se vrátil gradient zpět ke složení 1%B. Kolona byla ekvilibrována ještě 3,8 minut a celková doba analýzy tak byla 8 minut. Srdeční tkáň byla homogenizována s 2 ml ledové 0,66M HClO_4

a centrifugována (5 min při 3000g, 4°C). 1 ml supernatantu byl zneutralizován přidáním 0,66M K₂HPO₄⁽⁵⁷⁾.

Mezi další metody stanovení purinových bází a nukleotidů, kreatinu a fosfokreatinu v srdeční tkáni patří iontově výměnná kapalinová chromatografie na reverzních fázích. Jako stacionární fáze byla použita kolona s navázanými C18. Byla použita gradientová eluce s dvousložkovou mobilní fází. Složka A byla tvořena 35mM KH₂PO₄, 6mM hydrogensulfátem tertabutylamonným o pH 6 a 125mM EDTA. Složka B byla tvořena směsí složky A s ACN v poměru 50:50. Gradientový profil analýzy byl: 0-10 min. 98% A, 10-20 min se složení MF lineárně měnilo až do složení 45% A: 55% B. Toto složení bylo udržováno po zbytek analýzy. Celková doba analýzy byla 22 minut. Zmrzlá srdeční tkáň byla homogenizována s ledovou 0,4M HClO₄ a 0,5mM EGTA (ethylenglykoltetraoctová kyselina) a po deseti minutách na ledu byl přidán 0,5M K₂CO₃ až do pH 6,8. Po té bylo centrifugováno a supernatant nastříknut⁽⁵⁰⁾.

V další publikaci autoři využili titanové kolony pro současné stanovení souboru nukleotidů: AMP, ADP, ATP, UMP (uridinmonofosfát), UDP (uridindifosfát), UTP (uridintrifosfát), GMP (guanosinmonofosfát), GDP (guanosindifosfát), GTP (guanosintrifosfát), CMP (cytidinmonofosfát) a CTP (cytidintrifosfát). Zároveň byly stanovovány některé jejich meziprodukty, a to NAD (nikotinamid adenin dinukleotid), NADH (nikotinamid adenin dinukleotid v redukované formě), UDP-Glu (uridindifosfát glukózy) a UDP-GluNAc (uridindifosfát N -acetylglukosamin). Bylo využito UV detekce při 254 nm, analýza probíhala 26 minut a použita byla jednokroková gradientová eluce s průtokem 1 ml/min. Mobilní fáze byla dvousložková, složka A: 10mM fosforečnanu sodného, složka B: ACN⁽⁵⁸⁾.

3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout vhodné chromatografické podmínky pro současnou separaci ATP, ADP, AMP, cAMP, C a CP na alternativní stacionární fázi a následně tuto metodu aplikovat při analýze reálného vzorku.

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

Methanol, Cromasolv[®] gradient grade, for HPLC, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Německo

Acetonitril (ACN), Cromasolv[®] gradient grade, for HPLC, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Německo

Natrium dihydrogenphosphoricum, Lachner, Česká republika

Sodium hydroxide pellets, puris p.a., Sigma-Aldrich, Německo

Voda čištěná reverzní osmózou

Perchloric acid, Sigma-Aldrich, Německo

Kyselina ethylendiamintetraoctová, Sigma-Aldrich, Německo

Kalium hydrogenphosphoricum, Lachner, Česká republika

Králičí plazma, Zoo Servis Dvůr Králové nad Labem

Myokard králíka, Lékařská fakulta UK v Hradci Králové, Katedra farmakologie

ATP – Adenosin 5'-triphosphate disodium salt, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Německo

ADP - Adenosin 5'-diphosphate sodium salt, $\geq 98,5\%$, Sigma-Aldrich, Německo

AMP - Adenosin 5'-monophosphate sodium salt, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Německo

cAMP – Adenosin 5'-cyklophosphoric acid, $\geq 99\%$, Sigma - Aldrich, Německo

CP – Phosphocreatine disodium salt hydrate enzymatic, $\geq 98\%$, Sigma- Aldrich

C – Creatine monohydrate $\geq 99\%$, Sigma Aldrich, Rakousko

4.2 Přístrojové vybavení

4.2.1 Chromatografický systém

Měření byla prováděna na HPLC sestavě LC 20A Prominence (Shimadzu, Duisburg, Německo), která se skládá z degasseru, dvou pump (A, B), automatického dávkovače vzorků (autosampleru), termostatovaného prostoru pro kolonu, detektoru UV/VIS a komunikačního modulu.

Systém je řízen počítačovým softwarem LC solution software, verze 1.21 SP1 (Shimadzu, Duisburg, Německo).

Chromatografické kolony:

ZirChrom[®] - PHASE, 150 x 4,6 mm i. d.; 5 µm, ZirChrom Separation, Inc., USA

ZirChrom[®] - PBD, 150 x 4,6 mm i. d.; 5 µm, ZirChrom Separation, Inc., USA

LiChroCART[®] (C18), 50 x 3,0 mm i. d.; 5 µm, Merck, Německo

Předkolona:

ProTain[®] Systém, 20 x 2,1 mm i. d., ZirChrom Separation, Inc., USA

4.2.2 Ostatní použité přístroje a pomůcky

Vakuové filtrační zařízení s filtrem o velikosti pórů 0,45 µm

Ultrazvuková lázeň, Kraintek, Slovensko

Acidimetr, Eutech Instruments pH510, Nizozemí

Analytické váhy, Sartorius, ČR

Centrifuga, IEC CL 31R Multispeed, Francie

Vortex, VELP Scietifica, P-LAB a.s., ČR

Thermomixer comfort, eppendorf, Německo

Mikropipety

Laboratorní sklo

4.3 Vývoj chromatografických podmínek

4.3.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Složení mobilní fáze bylo optimalizováno tak, aby došlo k separaci všech šesti analyzovaných látek (ATP, ADP, AMP, cAMP, CP, C) pomocí HPLC/UV. Optimalizován byl druh a síla MF, její pH a průtoková rychlost.

Byla použita izokratická eluce s MF složenou ze dvou částí – ACN a pufru, které byly míchány v požadovaném poměru chromatografickým systémem. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min.

Kolony byly termostatovány na teplotu 25°C. Teplota v autosampleru byla nastavena na 8°C, aby byla zachována stabilita vzorku před vlastní analýzou. Nástřikový objem vzorku byl 20 µl.

4.3.2 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze vždy obsahovala ACN a pufr o různé síle a v různém poměru.

Nejdříve byl připraven 50mM pufr Na₂HPO₄ bezvodý. Do odměrné baňky bylo naváženo příslušné množství Na₂HPO₄ a doplněno po rysku destilovanou vodou. Pufr byl poté zředěn destilovanou vodou na příslušnou koncentraci, přefiltrován pomocí vakuové filtrace a pH upraveno na požadovanou hodnotu pomocí zředě. H₃PO₄. ACN byl vždy použit přímo ze zásobní láhve a nebyl nijak upravován.

V tabulce č. 1 je uveden přehled zkoušených mobilních fází - jejich různé poměry, pH či síly pufrů.

4.3.3 Příprava roztoků standardů

Při vývoji chromatografických podmínek byly používány zásobní roztoky analytů o koncentraci 1 mg/ml. Do 5ml odměrné baňky bylo naváženo příslušné množství standardu a vodou doplněno po rysku. Roztoky byly následně zředěny 50% ACN na koncentraci 30 µg/ml pro cAMP, AMP, ADP, C a CP a pro ATP byl zředěn na 60 µg/ml. Tyto roztoky byly poté nástřikovány na kolonu. Po odebrání příslušného množství analytu byly zásobní roztoky zamrazeny, aby se zamezilo jejich rozkladu.

Při měření reálných vzorků plazmy byly používány roztoky standardů o koncentraci 0,2 mg/ml. V případě ATP a C byla použita koncentrace 2 mg/ml.

4.3.4 Detekce

Na základě předchozích měření byla zvolena detekce pomocí UV detektoru. Díky rozdílným hodnotám absorpčních maxim jednotlivých analytů, byly pro detekci zvoleny dvě vlnové délky – 215 nm a 254 nm⁽⁵⁹⁾.

Pro CP a C je vhodnější vlnová délka 215 nm, ostatní analyty lépe absorbují při 254 nm.

4.3.5 Úprava reálných vzorků myokardu

Reálné vzorky myokardu byly upravovány dvěma způsoby.

Metoda č. 1: Ke vzorku myokardu (cca 50 mg) bylo přidáno 0,5 ml 0,66M chlazené kyseliny chloristé (HClO_4), promícháno pomocí vortexu a přidán 1 ml 0,66M hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4) a zcentrifugováno 5 min při 4°C a 10000 otáčkách. Po stočení byl odebrán 1 ml do vialky a nastříknuto 20 μl na kolonu.

Metoda č. 2: Ke vzorku myokardu (cca 50 mg) bylo přidáno 57 μl 100mM kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) a 0,5 ml 0,66M chlazené HClO_4 , promícháno pomocí vortexu a přidán 1 ml 0,66M K_2HPO_4 . Po centrifugaci za stejných podmínek jako u předešlé metody, byl opět odebrán 1 ml do vialky a nastříknuto 20 μl na kolonu.

5. Výsledky a diskuze

Při optimalizaci stacionární fáze byly zkoušeny tři různé chromatografické kolony. První byla vyzkoušena reverzní stacionární fáze C18, na které byly ověřeny podmínky separace z předešlé diplomové práce. Hlavním nedostatkem byla špatná reprodukovatelnost metody, která se ani po další optimalizaci nepodařilo zlepšit. Z tohoto důvodu byla zvolena alternativní, zirkoniová, stacionární fáze. Optimalizace probíhala nejprve na koloně ZirChrom[®]- PHASE. Pro srovnání byly nakonec nejvhodnější podmínky přeneseny na třetí kolonu ZirChrom[®]- PBD, kde nedošlo ke zlepšení podmínek, a proto nebyla dále používána.

Při optimalizaci složení mobilní fáze pro separaci analytů byly zkoušeny různé typy pufrů, různé poměry pufru a organického rozpouštědla, síla pufru, pH a průtok mobilní fáze. Níže, v tabulce 1, je uveden přehled zkoušených mobilních fází. Bylo poměrně náročné optimalizovat metodu tak, aby separace všech látek byla uspokojivá. Nejčastějším problémem byla nedostatečná separace píků, špatný tvar píků, nebo příliš dlouhý čas analýzy.

Tabulka 1: Použité mobilní fáze

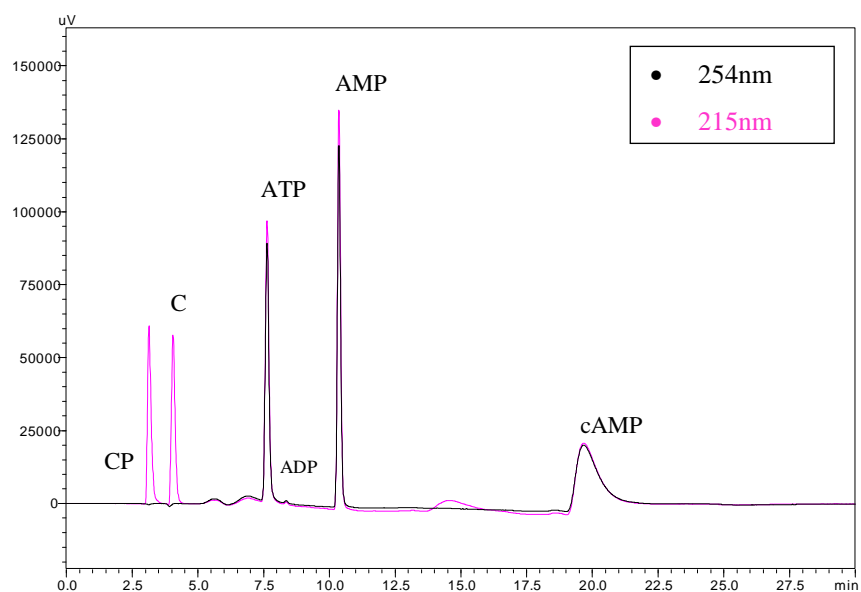
Anorganická složka MF	Organická složka MF – acetonitril (ACN)	Efekt
10mM pufr (NH ₄) ₂ HPO ₄ – 35 %, pH 7, průtok 1 ml/min	65 %	Nedostatečná separace, po delší době stání vypadávají krystaly pufru
8mM pufr Na ₂ HPO ₄ – 35 %, pH 7, průtok 1 ml/min	65 %	Špatná reprodukovatelnost, (výrazné rozdíly v rozlišení)
9mM pufr Na ₂ HPO ₄ – 40 %, pH 7, průtok 1 ml/min	60 %	Nedostatečná separace
9mM pufr Na ₂ HPO ₄ – 30 %, pH 7, průtok 1 ml/min	70 %	Vypadávají krystaly pufru
10mM pufr Na ₂ HPO ₄ – 35 %, pH 7, průtok 1 ml/min	65 %	Dobrá separace i reprodukovatelnost

10mM pufr Na_2HPO_4 - 35 %, pH 7, průtok 0.8 ml/min	65 %	Separace špatná, a ATP detekováno až po 30min
10mM pufr Na_2HPO_4 - 35 %, pH 7, průtok 0.9 ml/min	65 %	Separace špatná, koeluce píků
10mM pufr Na_2HPO_4 - 35 %, pH 5.7, průtok 1 ml/min	65 %	Nedostatečná separace
10mM pufr Na_2HPO_4 - 33 %, pH 7, průtok 1 ml/min	67 %	Separace i reprodukovatelnost velmi dobrá, ATP ve 27. min

Vliv stacionární fáze na separaci

Nejprve byla zkoušena kolona se stacionární fází **RP- C18 LiChroCART®**

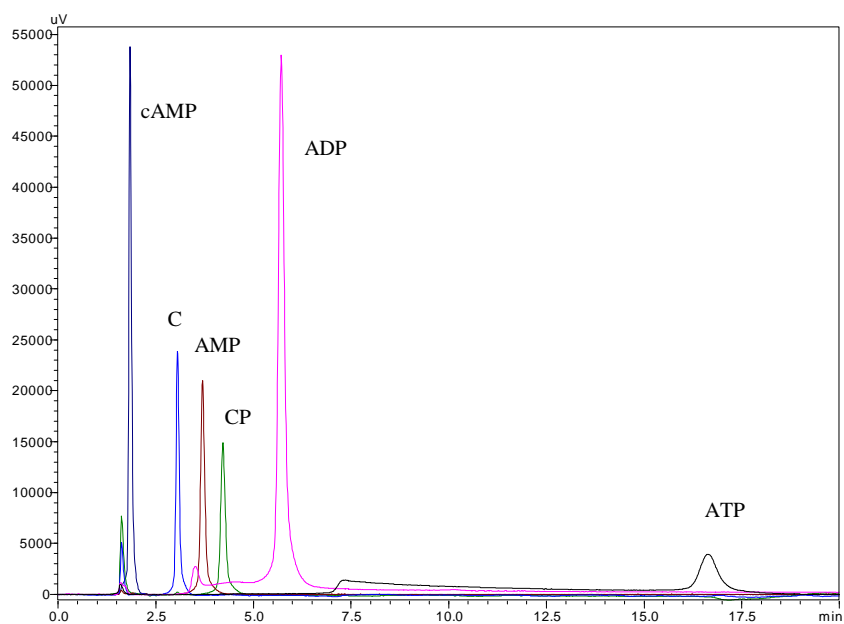
Při složení mobilní fáze 35 % 10mM hydrogenfosforečnanu disodného (pH 7) a 65 % ACN a průtoku 1 ml/min došlo k separaci všech analytů. ADP však za těchto podmínek dosahovala jen velmi malé citlivosti ve srovnání s ostatními analyty a pík cAMP měl špatný tvar (viz obr. 9). Hlavní nevýhodou však byla nereprodukovatelnost metody.



Obr. 9: Chromatogram - Vliv stacionární fáze - LiChroCART®

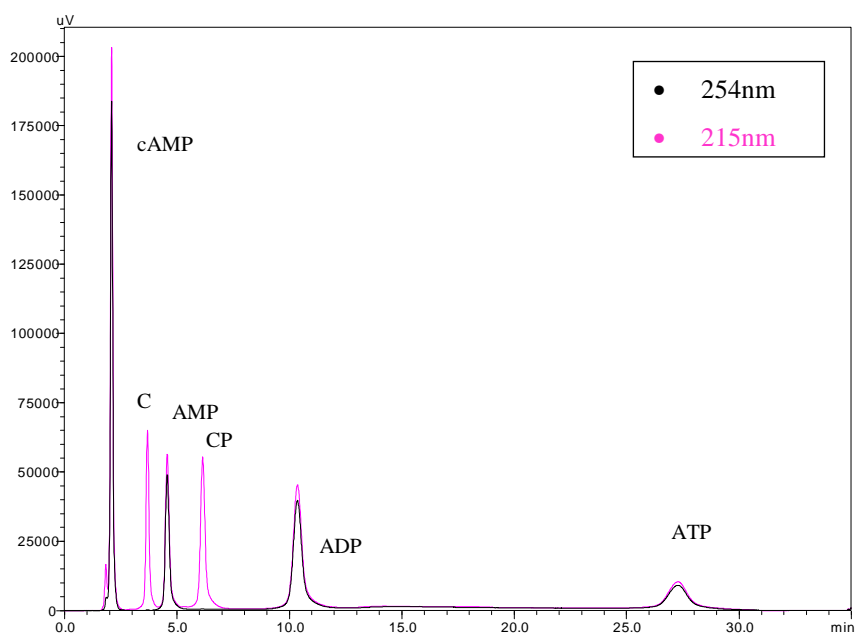
Složení mobilní fáze: 35 % 10mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 65 % ACN, průtok 1 ml/min

Jako druhá stacionární fáze tak byla použita zirkoniová fáze **ZirChrom®- PHASE** (viz obr. 10). Optimalizace metody probíhala nejprve bez použití předklonky, nicméně vzhledem k použití metody pro biologické vzorky byla následně vybrána předkolumna ProTain® Systém, která umožňuje analýzu biologických vzorků i na zirkoniových kolumnách (viz obr. 11).



Obr. 10: Chromatogram - Vliv stacionární fáze - ZirChrom® - PHASE

Složení mobilní fáze: 35 % 10mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 65 % ACN, průtok 1 ml/min

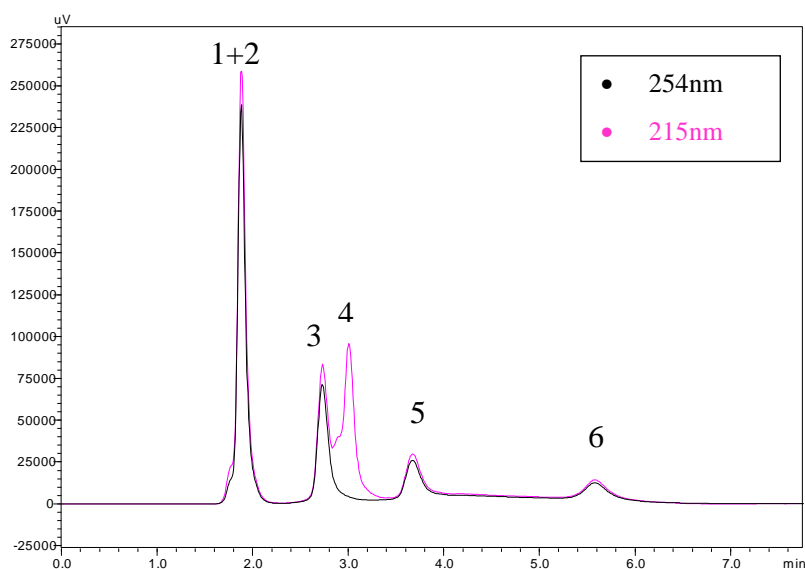


Obr. 11: Chromatogram - Vliv stacionární fáze - ZirChrom® - PHASE + předkolumna ProTain®

Složení mobilní fáze: 33 % 10mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 67 % ACN, průtok 1 ml/min

Vliv druhu pufru

Byla vyzkoušena řada pufrů, které jsou vhodné pro analýzu na zirkoniových kolonách, (např. hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, hydrogenfosforečnan disodný bezvodý – mezi nimi nebyl rozdíl v separaci a hydrogenfosforečnan amonný). Při použití pufru hydrogenfosforečnanu amonného došlo ke koeluci analytů cAMP a C a zároveň i AMP a CP (viz obr. 12). Navíc po delší době stání pufru docházelo k vypadávání krystalů pufru a hrozilo ucpání kolony. Výrazně lepší separace všech analytů bylo dosaženo za použití pufru hydrogenfosforečnanu disodného (viz obr. 11), kde však musela být výrazně optimalizována síla pufru, aby taktéž nedocházelo k vypadávání pufru.



Obr. 12: Chromatogram - Vliv druhu pufru – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Složení mobilní fáze: 35 % 10mM hydrogenfosforečnan amonný (pH 7), 65 % ACN, průtok 1 ml/min

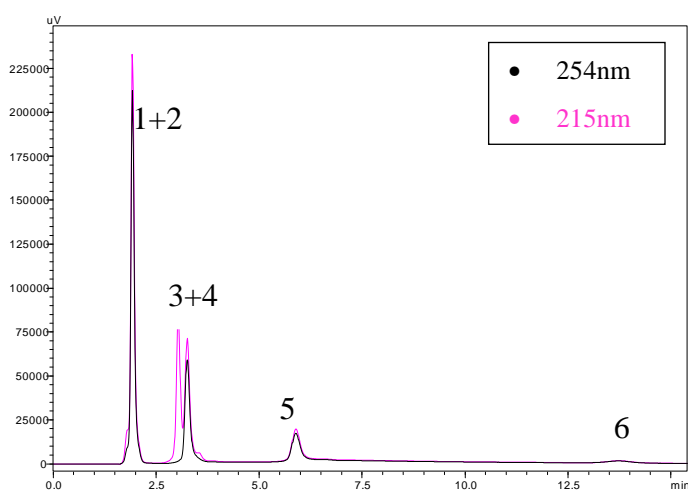
Špatná separace píků – 1. cAMP, 2. C, 3. AMP, 4. CP, 5. ADP, 6. ATP

Vliv molarity pufru

Jak již bylo zmíněno, síla pufru měla výrazný vliv na separaci analytů. Čím byl pufr slabší, tím horší byla separace i reprodukovatelnost. S klesající silou pufru klesal i retenční čas jednotlivých analytů, čímž se však zhoršovala separace. Jako nejvhodnější síla pufru byl vybrán 10mM hydrogenfosforečnan disodný při dodržení ostatních podmínek analýzy.

8mM pufr

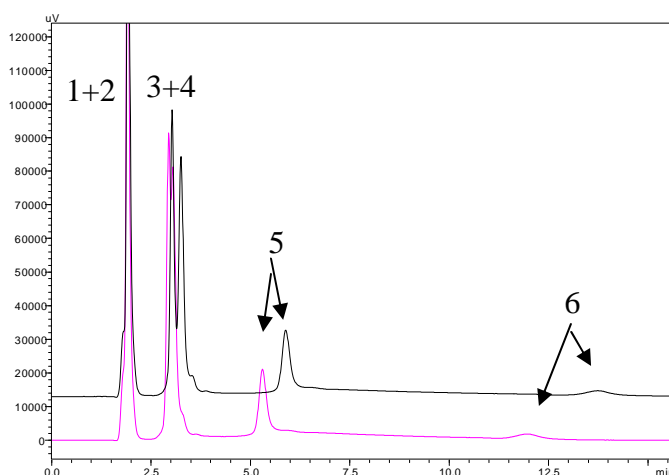
Při použití 8mM pufru nedošlo k dostatečnému oddělení píků jednotlivých analytů (viz obr. 13) a také byla velice špatná reprodukovatelnost (viz obr. 14).



Obr. 13: Chromatogram - Vliv molarity pufru – 8 mM

Složení mobilní fáze: 35 % 8mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 65 % ACN, průtok 1 ml/min

Špatná separace píků – 1. cAMP, 2. C, 3. AMP, 4. CP, 5. ADP, 6. ATP



Obr. 14: Chromatogram - Vliv molarity pufru – 8 mM

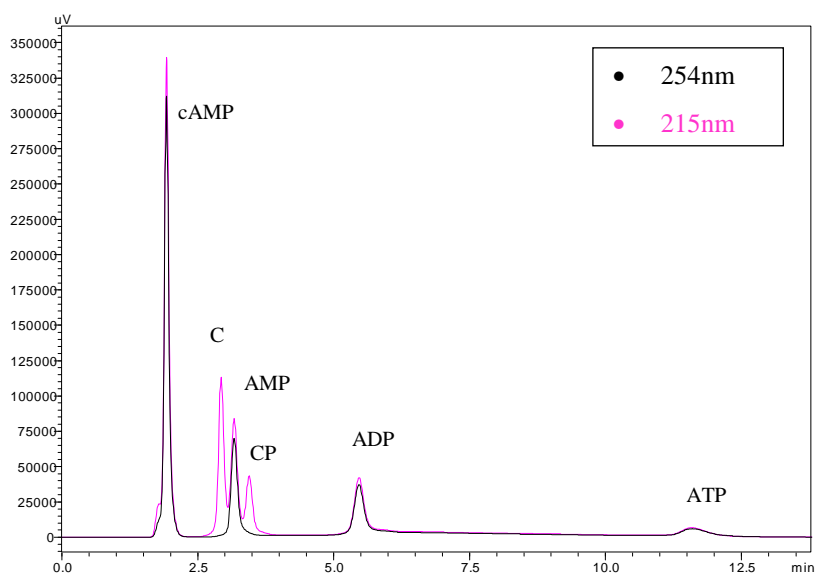
Složení mobilní fáze: 35 % 8mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 65 % ACN, průtok 1 ml/min

Černě je znázorněna detekce při prvním měření, fialově při opakovaném měření, oboje při 254 nm.

1. cAMP, 2. C, 3. AMP, 4. CP, 5. ADP, 6. ATP

9mM pufr

Ani při použití pufru o síle 9 mM se píky jednotlivých analytů dostatečně neseperoaly (viz obr. 15) a také nebylo možné analýzy zreprodukovat.

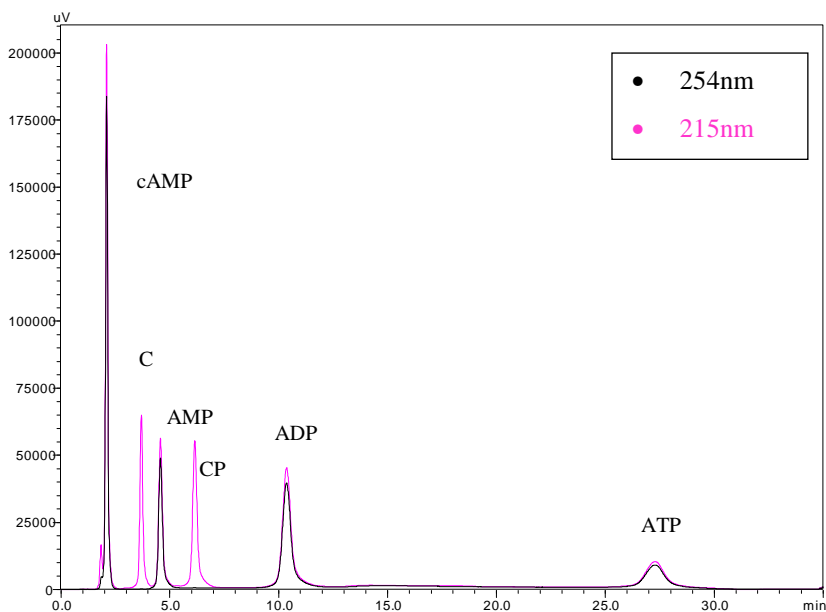


Obr. 15: Chromatogram - Vliv molarity pufru – 9 mM

Složení mobilní fáze: 40 % 9mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 60 % ACN, průtok 1 ml/min.

10mM pufr

Pufr o síle 10 mM byl vybrán jako nejvhodnější vzhledem k dostatečné separaci jednotlivých analytů a zároveň dostatečné reprodukovatelnosti (viz obr. 16).

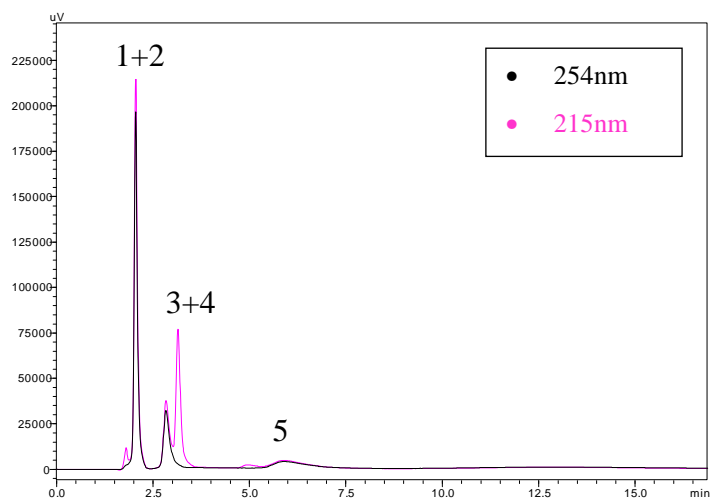


Obr. 16: Chromatogram - Vliv molarity pufru – 10 mM

Složení mobilní fáze: 33 % 10mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 67 % ACN, průtok 1 ml/min

Vliv pH pufru

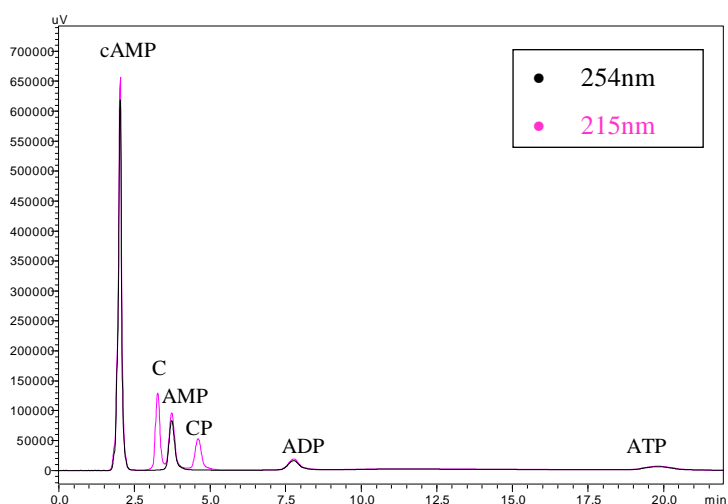
Vliv pH na separaci analytů je výrazný. Nižší pH způsobilo zkrácení retenčních časů, vyšší pH naopak retenční časy zvyšuje a zlepšuje separaci. pH je důležité také pro stabilitu biologických materiálů a funkčnost kolony a předkolony. Ke zkoušení vhodného pH jsme zvolily rozmezí pH nejvhodnější pro kolonu a předkolonu při použití fosfátových pufrů stanovené výrobcem (pH 5-7). Při pH 5,7 nedochází k dostatečné separaci analytů a ATP nemělo žádnou odezvu (viz obr. 17). Při pH 7 dochází k dostatečné separaci (viz obr. 18).



Obr. 17: Chromatogram - Vliv pH pufru – 5,7

Složení mobilní fáze: 35 % 10mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 5,7), 65 % ACN, průtok 1 ml/min

Špatná separace píků – 1. cAMP, 2. C, 3. AMP, 4. CP, 5. ADP



Obr. 18: Chromatogram - Vliv pH pufru – 7

Složení mobilní fáze: 35 % 10mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 65 % ACN, průtok 1 ml/min

Vliv průtoku mobilní fáze

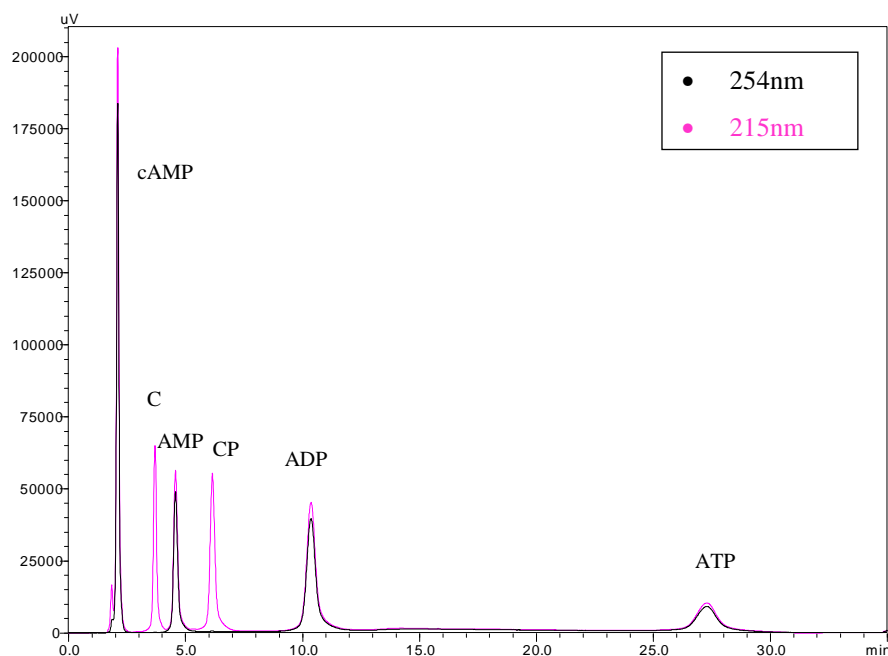
Při hledání nejvhodnější průtokové rychlosti byly použity tyto podmínky: ACN: 10mM pufr hydrogenfosforečnan disodný, pH 7, průtok 0,8 ml/min, průtok 0,9 ml/min a 1 ml/min.

Při průtoku 0,8 ml/min i 0,9 ml/min byla velice špatná separace. V obou případech docházelo ke koeluci píku cAMP s C a CP s AMP.

V případě prováděných analýz byla jako nejlepší průtoková rychlost zvolena 1 ml/min, při které bylo dosaženo nejlepší separace při vhodné délce analýzy.

Finální podmínky pro separaci

Na základě optimalizace jednotlivých chromatografických podmínek byly nakonec vybrány následující podmínky umožňující separaci všech hodnocených analytů: Stacionární fází byla kolona ZirChrom[®]- PHASE s předkolonou ProTain[®] Systém, mobilní fáze obsahovala 33 % 10mM hydrogenfosforečnanu disodného (pH7) a 67 % ACN při průtoku 1 ml/min. Na obr. 19 je uveden finální chromatogram, který dokládá dostatečnou separaci všech hodnocených analytů: t_R cAMP = 2,1 min, C = 3,7 min, AMP = 4,7 min, CP = 6,4 min, ADP = 10,7 min, ATP = 27,9 min.



Obr. 19: Chromatogram - Finální podmínky

Testy stability

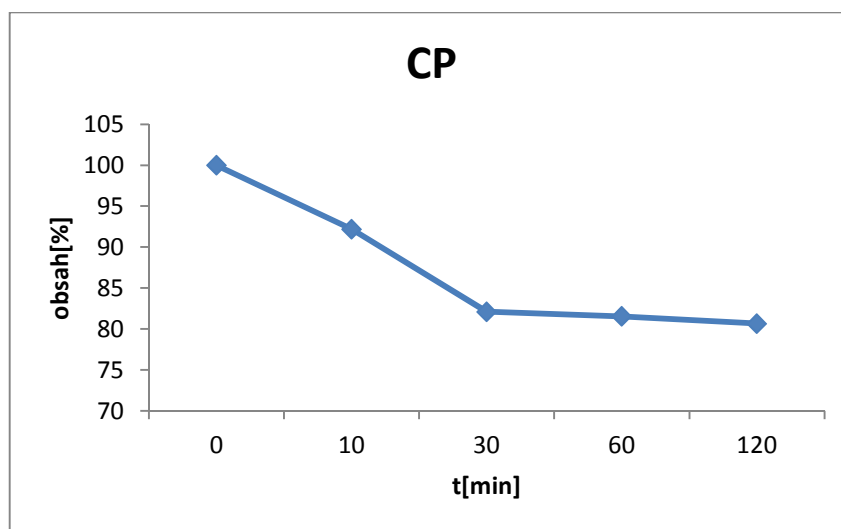
Z důvodu zjištěného rozkladu některých analytů při delším stání za běžných laboratorních podmínek, bylo nutné provést test stability, aby byly zajištěny co nejvhodnější podmínky při úpravě reálného vzorku.

Vzhledem k tomu, že tkáň myokardu nebylo k dispozici velké množství, byla pro test stability použita plazma. Do té bylo přidáno přesné množství standardu ATP a CP, tedy látek, které mají největší tendenci se rozkládat. Pro určení stability těchto analytů byla využita metoda č. 1 (viz kapitola 4.3.5) pro zpracování vzorku a vzorky hodnoceny při dvou teplotách, a to 4°C a 25°C. Tyto teploty byly dodržovány po celou dobu práce se vzorkem.

Připravené vzorky byly analyzovány v čase přípravy ($t=0$) a poté v 10., 30., 60. a 120. minutě.

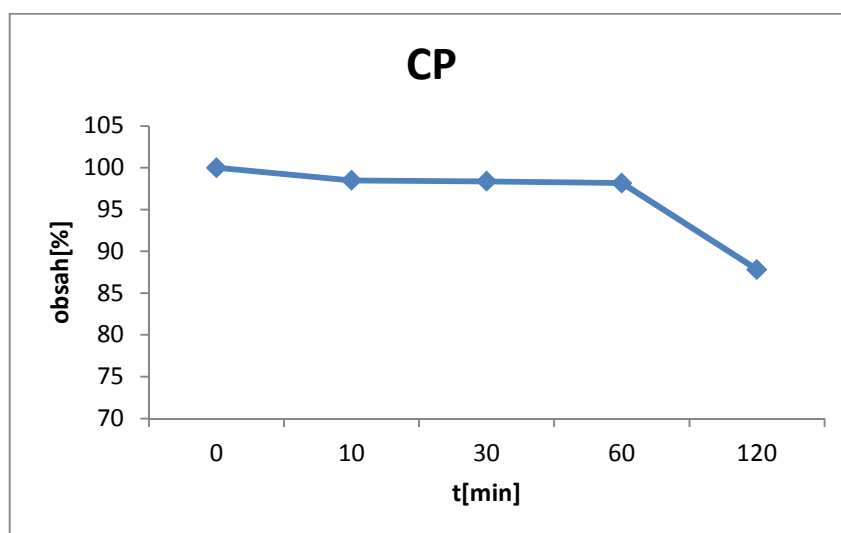
CP

Na obr. 20 je zřetelné, že degradace analytu při teplotě 25°C probíhá velmi rychle. Již po 30 minutách kleslo množství CP téměř o 20 %. Při měření reálných vzorků by tedy kvantifikace mohla být nepřesná, proto byla zvolena pro práci se vzorky teplota 4°C.



Obr. 20: Stabilita CP při 25°

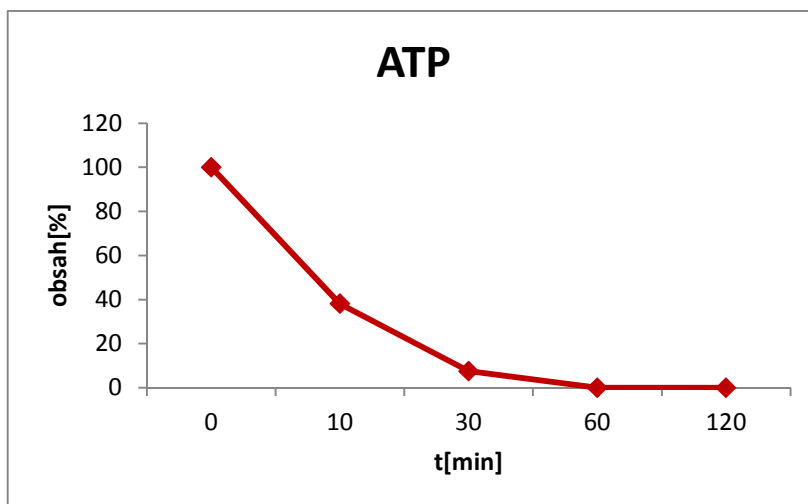
Při teplotě 4°C byl rozklad analytu viditelně pomalejší. Po 30 minutách bylo ve vzorku 98 % a po 120 minutách stále ještě okolo 87 % CP (viz obr. 21).



Obr. 21: Stabilita CP při 4°C

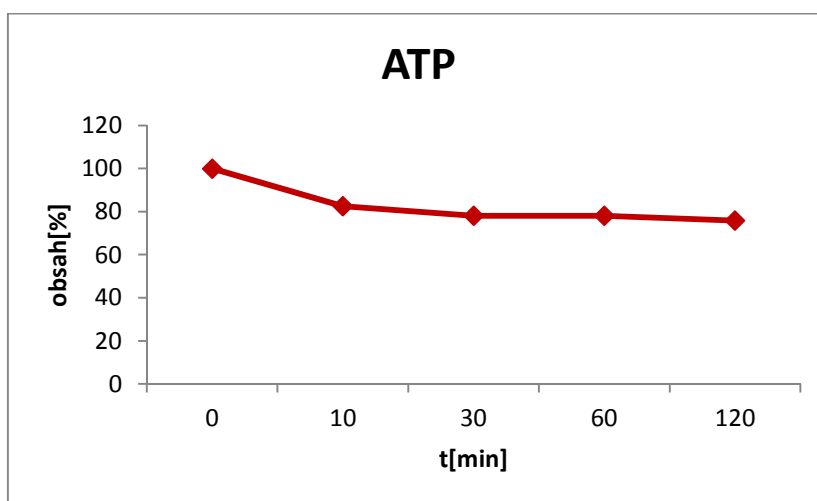
ATP

U ATP byl rozklad při 25°C ještě výraznější, v 10. minutě vzorek obsahoval pouze 40 % původního obsahu a po 60 minutách se již ATP ve vzorku nedal detekovat (viz obr. 22). Proto není tato teplota vhodná pro analýzu reálných vzorků.



Obr. 22: Stabilita ATP při 25°C

Při teplotě 4°C byl rozklad viditelně pomalejší. V 10. minutě bylo ve vzorku ještě asi 80% a ani po 120 minutách nedošlo, na rozdíl od laboratorní teploty, k tak dramatickému rozkladu ATP ve vzorku (viz obr. 23).



Obr. 23: Stabilita ATP při 4°C

Tabulka 2.: Porovnání obsahu analytů (v procentech) v čase (v minutách) při daných teplotách.

látka	CP		ATP	
teplota	4°C	25°C	4°C	25°C
Čas (min)	Obsah (%)	Obsah (%)	Obsah (%)	Obsah (%)
0	100	100	100	100
10	98,5	92,2	82,5	38,1
30	98,3	82,1	78,1	7,5
60	98,1	81,5	78,0	0
120	87,8	80,6	75,8	0

Reálné vzorky myokardu

Reálné vzorky myokardu byly ihned po odebrání tkáně zamrazeny na -80°C . Těsně před analýzou byly vyjmuty z mrazáku a po celou dobu zpracování vzorku byly uloženy na ledu, aby bylo dosaženo stálé teploty do 4°C . Zmrazené vzorky byly homogenizovány mixérem a po té zpracovány dvěma metodami:

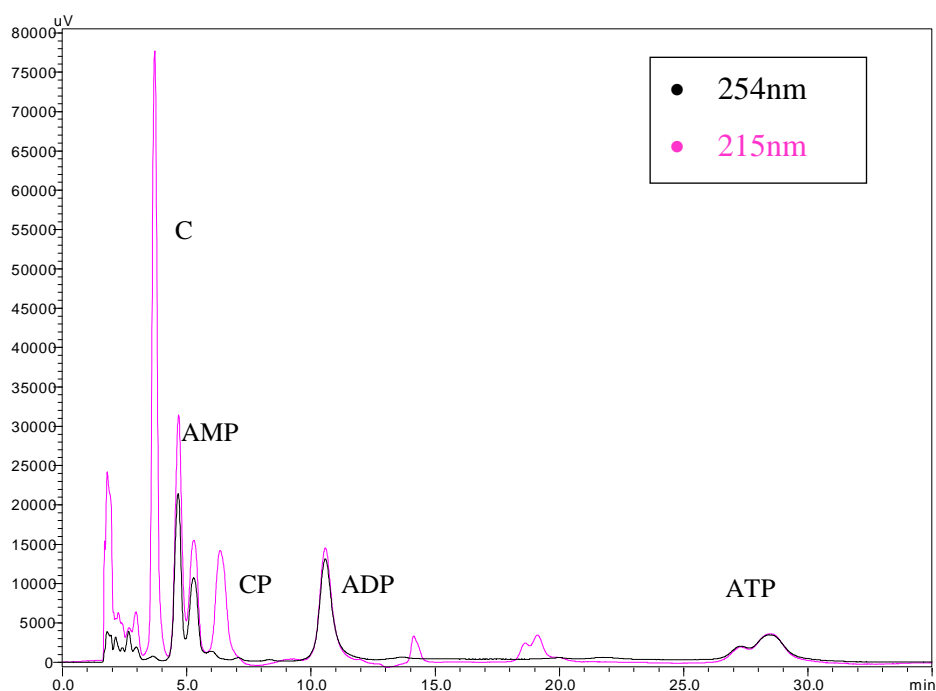
Metoda č. 1: Ke vzorku myokardu (cca 50 mg) bylo přidáno 0,5 ml 0,66M chlazené kyseliny chloristé (HClO_4), promícháno pomocí vortexu a přidán 1 ml 0,66M hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4) a zcentrifugováno 5 min při 4°C a 10000 otáčkách. Po stočení byl odebrán 1 ml do vialky a nastříknuto 20 μl na kolonu.

Metoda č. 2: Ke vzorku myokardu (cca 50 mg) bylo přidáno 57 μl 100mM kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) a 0,5 ml 0,66M chlazené HClO_4 , promícháno pomocí vortexu a přidán 1 ml 0,66M K_2HPO_4 . Po centrifugaci za stejných podmínek jako u předešlé metody, byl opět odebrán 1 ml do vialky a nastříknuto 20 μl na kolonu.

Po nastříknutí reálného vzorku na kolonu byly na čele píky látek z biologického materiálu. Bohužel došlo ke koeluci cAMP s látkami biologického materiálu na začátku chromatografu, takže v reálném vzorku nemůže být obsah cAMP hodnocen.

U vzorku zpracovaného metodou č. 2 došlo k lepší separaci hodnocených analytů od pozadí biologického materiálu, a proto je tato metoda výhodnější pro kvantifikaci zkoumaných látek.

Metoda č. 1

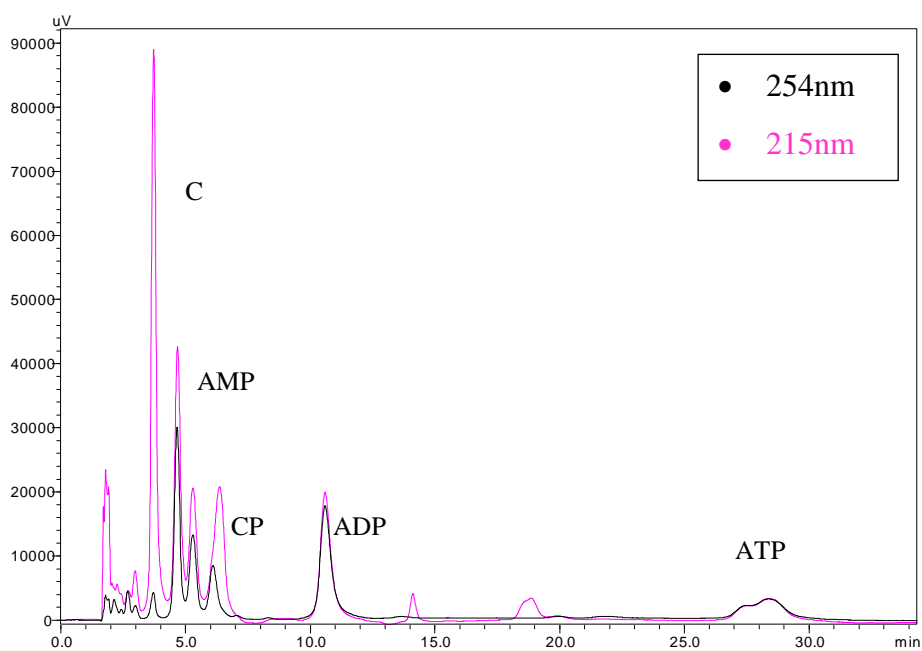


Obr. 24: Chromatogram - Zpracování vzorku myokardu metodou č. 1 (viz kapitola 4.3.5)

ZirChrom® - PHASE + ProTain®

Složení mobilní fáze: 33 % 10mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 67 % ACN, průtok 1 ml/min

Metoda č. 2



Obr. 25: Chromatogram - Zpracování vzorku myokardu metodou č. 2 (viz kapitola 4.3.5)

ZirChrom® - PHASE + ProTain®

Složení mobilní fáze: 33 % 10mM hydrogenfosforečnan disodný (pH 7), 67 % ACN, průtok 1 ml/min

Aby bylo možné kvantifikovat obsah zkoumaných látek v reálném vzorku, bylo využito standardního přídávku zkoumaných látek o známé koncentraci. Po přidání standardů a opětovném nastříknutí vzorku byla vypočítána koncentrace v původním vzorku ze zvětšené plochy pod píkem a známé koncentrace standardního přídávku.

Tabulka 3:

Stanovovaná látka	λ [nm]	t_R [min]	c_1 [$\mu\text{g/ml}$]	c_2 [$\mu\text{g/ml}$]
ATP	254	28,4	86,09	93,94
ADP	254	10,6	75,50	55,33
AMP	254	4,6	65,50	55,54
cAMP	254	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
C	215	3,7	270,94	181,35
CP	215	6,3	98,90	53,84

λ – vlnová délka v nm, při které byla látka měřena

t_R – retenční čas látky v minutách

c_1 – koncentrace látky ve vzorku myokardu v $\mu\text{g/ml}$ vypočítaná podle standardního přídávku, vzorek upravován metodou č. 1

c_2 – koncentrace látky ve vzorku myokardu v $\mu\text{g/ml}$ vypočítaná podle standardního přídávku, vzorek upravován metodou č. 2

Z výsledků uvedených v tabulce 3 je patrné, že při zpracování vzorku metodou 2 nedochází k tak velkému rozkladu jednotlivých látek, a je tedy vhodnější pro kvantifikaci analytů. Poměry adeninribonukleotidů a poměr C a CP vyšly rozdílně při úpravě vzorků dvěma metodami. Při úpravě metodou 1 byl poměr ATP: ADP: AMP 1,31: 1,14: 1 a C: CP 2,74: 1. V případě metody 2, tedy s přídatkem EDTA, byl poměr ATP: ADP: AMP 1,69: 1: 1 a C: CP 3,37: 1. Pro další použití by tedy byla vhodná optimalizace metody 2 pro úpravu reálných vzorků.

6. Závěr

V této diplomové práci byla popsána optimalizace vhodných chromatografických podmínek pro současnou separaci ATP, ADP, AMP, cAMP, C a CP na zirkoniové koloně. Nejprve byla okrajově zmíněna separace na LiChroCART[®] koloně, na které se nepodařilo najít vhodné podmínky. Následně byl popsán vývoj chromatografických podmínek na koloně ZirChrom[®] - PHASE. Cílem práce bylo vyvinout podmínky, které by umožnily současnou analýzu všech stanovovaných látek.

Největší problémy byly spojeny s výběrem vhodné mobilní fáze, protože velmi často docházelo k vysrážení pufru. Zároveň bylo potřeba, aby byl dostatečně silný a došlo k separaci analyzovaných látek. Výsledná eluce tak byla zvolena izokratická, s mobilní fází obsahující 33 % složky A: 10mM fosforečnanový pufr o pH 7 a 67 % složky B: acetonitril. Detekce probíhala při 215 nm pro C a CP a při 254 nm pro ATP, ADP, AMP a cAMP. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Při těchto podmínkách se podařilo dosáhnout dobré separace všech analytů a metoda byla reprodukovatelná.

Výsledné retenční časy při finálních podmínkách byly: cAMP = 2,1 min, C = 3,7 min, AMP = 4,7 min, CP = 6,4 min, ADP = 10,7 min, ATP = 27,9 min

Vyvinutá metoda byla úspěšně aplikována při analýze reálného vzorku myokardu. Podařilo se kvantifikovat všechny hodnocené analyty až na cAMP, který bohužel koeluoval s čelem píků látek z biologického materiálu.

7. Literatura

1. **Karlíček, R. et al.**, *Analytická chemie pro farmaceuty*, Praha : Karolinum, 2009, ISBN 978-80-246-1453-3.
2. **Klimesš, J. a kol.**, *Kontrola léčiv I*, Praha : Karolinum, 2002, ISBN 80-246-0419-1.
3. **Tesařová, E.**, Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, [online], [cit: 21. 2. 2012.], Dostupné z: <<http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>>.
4. Lab 2: High Performance Liquid Chromatography – Introduction, [online], [cit: 21. 2. 2012.], Dostupné z: <http://chemwiki.ucdavis.edu/Wikitexts/UCD_Chem_115_Lab_Manual/Lab_2%3A_High_Per>.
5. **Sýkora, D. a Fahrnich, J.**, Kapalinová chromatografie a absorpční UV spektrofotometrie, [online], [cit: 21. 2. 2012.], Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf>.
6. **Vávrová, J.**, Abstrakt MZČR, [online], [cit: 21. 2. 2012.], Dostupné z: <<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200720/hypertext/AJALB.htm>>.
7. **Douša, M.**, Teorie HPLC, [online], [cit: 21. 2. 2012.], Dostupné z: <<http://www.hplc.cz/>>.
8. **Holčapek, M.**, Výuka - Hmotnostní spektrometrie v organické analýze, [online], [cit: 20. 4. 2012.], Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS01_Uvod.pdf>.
9. **Holčapek, M.**, Ionizační techniky, [online], [cit: 2012. 4. 28.], Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS02_03_Ionizacni_techniky.pdf>.
10. **Tanabe, K.**, *Mater Chem Phys.*, **13**, (1985), 347-364.
11. **Aiken, B., Hsu, W. P. a Matijević, E.**, *J Mater Sci.*, **25**, (1990), 1886-1894.
12. **Jianwei, L., Yue, H. a Carr, P. W.**, *Anal Chem.*, **69**, (1997), 3884-3888.
13. **Wang, H. C. a Lin, K. L.**, *J Mater Sci.*, **27**, (1991), 2501.
14. **Ayral, T., et al.**, *J Mater Sci.*, **25**, (1990), 1268.

15. **Bensitel, M., et al.**, *Spectrochim Acta Part A.*, **43**, (1987), 1487.
16. **Bensitel, M., et al.**, *Mater Chem Phys.*, **17**, (1987), 249.
17. **Lavalley, J. C., et al.**, *J Mol Struct.*, **175**, (1988), 453.
18. **Cleafield, A.**, *J Mater Res.*, **5**, (1990), 161.
19. **Muha, G. H. a Vaughan, P. A.**, *J Chem Phys.*, **33**, (1960), 194.
20. **Jones, S. L. a Norman, C. J.**, *J Am Ceram Soc.*, **71**, (1988), C190.
21. **Buchanan, R. C. a Pope, S.**, *J Elektrochem Soc.*, **130**, (1983), 962.
22. **Masaki, T.**, *J Am Ceram Soc.*, **69**, (1986), 519.
23. **Clearfield, A.**, *Inorg Chem.*, **3**, (1964), 91.
24. **Mercera, P. D. L., et al.**, *Appl Catal.*, **57**, (1990), 127.
25. **Kawahara, M., Nakamura, H. a Nakajima, T.**, *J Chromatogr.*, **515**, (1990), 149.
26. **Rigney, M. P., Funkenbusch, E. F. a Carr, P. W.**, *J Chromatogr.*, **499**, (1990), 291.
27. **Blackwell, J. A. a Carr, P. W.**, *J Liq Chromatogr.*, **14**, (1991), 2875-2889.
28. **Janečková, L., et al.**, *J Sep Sci.*, **33**, (2010), 3043-3051.
29. **Kodíček, M.**, *Biochemické pojmy - výkladový slovník.*, Praha : Vydavatelství VŠCHT, 2004, ISBN 80-7080551-X.
30. **May, P.**, Adenosine Triphosphate – ATP, *Bristol University*, [online], [cit: 22. 2. 2012.], Dostupné z: <<http://www.bris.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/atp/atp1.htm>>.
31. Vznik a význam ATP, [online], [cit: 22. 2. 2012.], Dostupné z: <<http://www.gvi.cz/files/chemie/atp.pdf>>.
32. **Ledvina, M., et al.**, *Biochemie pro studující medicíny.*, Praha : Karolinum, 2009, 66-79, ISBN 978-80-246-1414-4.

33. **Chen, Y., et al.**, *Biomed Chromatogr.*, **21**, (2007), 628-634.
34. Adenosine Diphosphate ADP - definition from Biology-Online.org, [online], [cit: 22. 2. 2012.], Dostupné z: <http://www.biology-online.org/dictionary/Adenosine_Diphosphate_ADP>.
35. **Murugappa, S. a Kunapuli, S. P.**, *Frontiers in bioscience.*, **11**, (2006), 1977-1986.
36. Souhrn údajů o přípravku Clopidogrel Actavis. Actavis Group PTC ehf, [online], [cit: 12. 12. 2010], Dostupné z: <www.sukl.cz>.
37. **Niederhoffer, E. C.**, Chime Square BMB Purines, Pyrimidines, Nucleosides, Nucleotides, [online], [cit: 22. 2. 2012.], Dostupné z: <http://www.siumed.edu/~eniederhoffer/web_lessons/bmb_na.htm>.
38. **Kvasnicová, V.**, Abstrakt MZČR, [online], [cit: 23. 2. 2012.], Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJDJX.htm>.
39. **Rae, C., et al.**, *The Royal Society B: Biological Sciences.*, **270**, (2003), 2147-2150.
40. **Kreider, R. B.**, *Mol Cell Biochem.*, **244**, (2003), 89-94.
41. **Wallimann, T., et al.**, *BioFactors.*, **8**, (1998), 229-234.
42. **Gordon, A., et al.**, *Cardiovascular Research.*, **30**, (1995), 413-418.
43. **Schutz, P. W.**, The Science Creative Quarterly » CREATINE: FROM MUSCLE TO BRAIN, [online], [cit: 25. 2. 2012.], Dostupné z: <<http://www.scq.ubc.ca/creatine-from-muscle-to-brain/>>.
44. HMDB: Showing Phosphocreatine, [online], [cit: 25. 2. 2012.], Dostupné z: <<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB01511>>.
45. **Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M. a Wallimann, T.**, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1762**, (2006), 164-180.
46. **Marková, R.**, Diplomová práce, Masarikova Univerzita Brno, 2008.
47. **Childs, K. F., Xue-Han, N. a Bolling, S. F.**, *J Chromatogr B.*, **678**, (1996), 181-186.

48. **Harmsen, E., De Tombe, P. a De Jong, J. W.,** *J Chromatogr.*, **230**, (1982), 131-136.
49. **Carter, A. J. a Muller, R. E.,** *J Chromatogr.*, **527**, (1990), 31-39.
50. **Ally, A. a Park, G.,** *J Chromatogr-Biomed.*, **575**, (1992), 19-27.
51. **Van doorn, J. E., Goormachtig, P. F. J. a Van Haan, A.,** *J Chromatogr.*, **496**, (1989), 441-449.
52. **Cordis, G. A., Engelman, R. M. a Das, D. K.,** *J Chromatogr.*, **386**, (1987), 283-288.
53. **Juengling, E. a Kammermeier, H.,** *Anal Biochem.*, **102**, (1980), 358-361.
54. **Victor, T., et al.,** *J Chromatogr.*, **389**, (1987), 339-344.
55. **Sarin, M., et al.,** *J Chromatogr.*, **563**, (1991), 129-133.
56. **Volonté, M. G., et al.,** *J Pharmaceut Biomed.*, **35**, (2004), 647-653.
57. **Teerlink, T., et al.,** *Anal Biochem.*, **214**, (1993), 278-283.
58. **Zhou, T. a Lucy, C. A.,** *J Chromatogr A.*, **1187**, (2008), 87-93.
59. **Brychová, A.,** Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2010.