

Abstrakt

Úkolem tohoto diplomového projektu bylo nalézt vhodné podmínky pro stanovení dvou běžných nukleotidů adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a provést jejich analýzu v reálných vzorcích citrusových plodů a extraktů z rostlin. Dalším cílem bylo zjistit limity detekce a stanovení obou nukleotidů při těchto optimalizovaných podmínkách měření a pomocí těchto limitů porovnat citlivost používaných detektorů.

K zjištění zkoumaných nukleotidů byly využity instrumentace HPLC-UV, kapilární HPLC-DAD a HPLC-MS. Pomocí HPLC s UV detekcí a kapilární HPLC s detektorem diodového pole byly proměřeny kalibrační závislosti směsi analytů a určeny limity detekce a stanovení adenosindifosfátu a adenosintrifosfátu. K rozdělení analytů až na základní linii pomocí HPLC-UV a kapilární HPLC-DAD došlo za podmínek iontově párové chromatografie. Vhodnou kolonou byla kolona C₁₈. Mobilní fáze obsahovala fosfátový pufr, acetonitril a tetrabutylamonium bisulfát jako iontově párové činidlo. Dělení probíhalo při gradientové eluci. U LC-MS byly zjišťovány podmínky analýzy ADP a ATP. Při vysokoúčinné kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí bylo dosaženo rozdělení analytů na koloně C₁₈, fenyl-hexylové koloně a koloně Zic HILIC. Mobilní fáze protékající kolonou C₁₈ obsahovala 99:1 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný o pH = 6,7. Vhodnou mobilní fází k fenyl-hexylové koloně byl 95:5 (v/v) acetonitril/mravenčan amonný (pH = 6,7). Kolonou Zic HILIC protékala směs 70:30 (v/v) acetonitril/octan amonný o pH = 5,35.

Nalezli jsme podmínky HPLC, při kterých lze analyzovat ADP a ATP v reálných vzorcích. Dále jsme posoudili citlivost jednotlivých detektorů a srovnali ji s literaturou. Pomocí optimalizované metody se zjistilo, že nalezené LOD a LOQ jsou srovnatelné nebo nepatrně vyšší než uvádí literatura, zabývající se velmi podobnými metodami pro stanovení ADP a ATP. Citlivost UV detektoru a detektoru diodového pole dosahují podobných hodnot, zatímco citlivost hmotnostního spektrometru se jeví ve srovnání s nimi jako vyšší.