

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Charakterizace retence v podmínkách
ternárních mobilních fází v HILIC
chromatografii**

Diplomová práce

2024

Bc. Sára Mrvková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Sára Mrvková
Osobní číslo: C22292
Studijní program: N0531A130028 Analytická chemie
Téma práce: Charakterizace retence v podmínkách ternárních mobilních fází v HILIC chromatografii
Téma práce anglicky: Characterization of retention with ternary mobile phases in HILIC chromatography
Zadávající katedra: Katedra analytické chemie

Zásady pro vypracování

1. V teoretické části podejte přiměřený úvod do problematiky chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC). Zpracujte literární rešerši zahrnující separaci vybraných polárních látek (nukleosidy, nukleové báze, sulfonamidy, barbituráty apod.) v HILIC systému.
2. Na vybraných kolonách proměřte v HILIC systému retenční chování vybraných látek. Charakterizujte vybrané kolony pomocí izokratických a gradientových retenčních dat v ternárních mobilních fázích obsahujících acetonitril, methanol a vodné roztoky vybraných těkavých aditiv.
3. Získaná data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Barbora Tošovská**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem charakterizace retence v podmínkách ternárních mobilních fází v HILIC chromatografii jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne: 5.5. 2024

Bc. Sára Mrvková v.r.

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D za cenné rady, ochotu a trpělivost, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Barboře Tošovské za pomoc a trpělivost při práci v laboratoři a při zpracování diplomové práce.

ANOTACE

Diplomová práce je věnována výzkumu a optimalizaci podmínek ternárních (třísložkových) mobilních fází a gradientů v HILIC chromatografii (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography). Cílem bylo posoudit potenciální dopad kombinace methanolu s mobilními fázemi acetonitrilu a vodného pufru. Z recentní literatury vyplývá, že kombinace acetonitrilu a methanolu v mobilní fázi může ovlivňovat charakter difuzní vodné vrstvy na povrchu HILIC stacionární fáze a mít vliv na selektivitu separace. Jako modelové analyty byly zvoleny nukleové báze, nukleosidy, barbituráty a sulfonamidy, které patří do kategorie polárních látek vhodných pro separaci. Bylo proměřeno retenční chování v gradientech s acetonitrem a methanolem a byly určeny parametry retenčního modelu z gradientových dat. Na základě parametrů predikovaných retenčních časů jsou diskutovány vlivy uvedených organických rozpouštědel.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ternární mobilní fáze, chromatografie hydrofilních interakcí

TITLE

Characterization of retention with ternary mobile phases in HILIC chromatography

ANNOTATION

The diploma thesis is devoted to the research and optimization of the conditions of ternary (three-component) mobile phases and gradients in HILIC chromatography (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography). The aim was to assess the potential impact of combining methanol with mobile phases of acetonitrile and aqueous buffer. Recent literature shows that the combination of acetonitrile and methanol in the mobile phase can influence the nature of the diffuse aqueous layer on the surface of the HILIC stationary phase and influence the selectivity of the separation. Nucleic bases, nucleosides, barbiturates and sulfonamides, which belong to the category of polar substances suitable for separation, were chosen as model analytes. The retention behavior in gradients with acetonitrile and methanol was measured and the parameters of the retention model were determined from the gradient data. Based on the parameters of the predicted retention times, the effects of the listed organic solvents are discussed.

KEYWORDS

Ternary mobile phases, chromatography of hydrophilic interactions

Obsah

ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1. Nukleové kyseliny	15
1.1.1. DNA	15
1.1.2. RNA	17
1.1.3. Nukleové báze	17
1.1.4. Nukleosidy a nukleotidy	18
1.2. Barbituráty	24
1.2.1. Účinky	26
1.2.2. Klinické aspekty	28
1.2.3. Farmakokinetika	29
1.3. Sulfonamidy	30
1.3.1. Mechanismus účinku sulfonamidů	33
1.3.2. Toxikologický účinek	33
2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	35
2.1. HILIC chromatografie	36
2.1.1. Retenční mechanismus	38
2.1.2. Stacionární fáze	38
2.1.3. Separace vybraných látek v HILIC	44
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
3.1. Chemikálie	47
3.1.1. Analyzované vzorky	47
3.2. Přístrojové vybavení	48
3.2.1. Kapalinový chromatograf s DAD detekcí	48
3.2.2. Kapalinový chromatograf s UV/VIS detekcí	48

3.2.3. Kolony	49
3.3. Pracovní postup.....	49
3.3.1. Příprava standardů	49
3.3.2. Zpoždění gradientu	49
3.3.3. HPLC analýza standardů	50
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	51
4.1. Zpoždění gradientu	51
4.2. Stanovení retenčního modelu v gradientové eluci dat	53
4.2.1. Retenční model s obsahem acetonitrilu	53
4.2.2. Retenční model s obsahem methanolu.....	65
4.3. Analýza standardů pomocí ternárních MF.....	69
5. ZÁVĚR	73
6. LITERATURA	74
7. PŘÍLOHY	85

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A PŘÍLOH

Obrázek 1: Počáteční návrh struktury DNA od Jamese Watsona a Francise Cricka, který byl doprovázen návrhem prostředků replikace.....	16
Obrázek 2: Struktura nukleových bází.....	18
Obrázek 3: Struktura nukleosidu a nukleotidu	19
Obrázek 4: Struktura adenosinu.....	20
Obrázek 5: Struktura guanosinu	21
Obrázek 6: Struktura cytidinu.....	22
Obrázek 7: Struktura uridinu	22
Obrázek 8: Struktura 5-methyluridinu.....	23
Obrázek 9: Kyselina barbiturová	24
Obrázek 10: Struktura barbituratů	25
Obrázek 11: Základní struktura sulfonamidů	31
Obrázek 12: Struktura sulfonamidů.....	32
Obrázek 13: Instrumentace HPLC	35
Obrázek 14: Struktura nemodifikovaného silikagelu	39
Obrázek 15: Struktura aminopropylové stacionární fáze	40
Obrázek 16: Struktura amidové stacionární fáze.....	41
Obrázek 17: Struktura diolové stacionární fáze.....	42
Obrázek 18: Struktura cyklodextrinové stacionární fáze.....	43
Obrázek 19: Struktura zwitteriontových stacionárních fází	44
Obrázek 20: Průběh signálu při měření zpoždění gradientu; měřeno při průtoku 0,4 ml/min .	52
Obrázek 21: Separace guanosinu (profil gradientu: 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 15 min, 254 nm).....	54
Obrázek 22: Separace barbitalu (profil gradientu: 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 15 min, 210 nm)	54

Obrázek 23: Separace ftalazolu (profil gradientu: 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 15 min, 284 nm)	55
Obrázek 24: Gradientní průběh vybraných látek (profil gradientu: 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 10 min, 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 15 min, 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 20 min, 210 nm, 254 nm, 284 nm).....	56
Obrázek 25: Gradientní a simulovaný průběh, strmost gradientu 0,1 ml ⁻¹	61
Obrázek 26: Simulovaný a gradientní průběh, strmost gradientu 0,1 ml ⁻¹	64
Obrázek 27: Gradientní průběh vybraných látek (profil gradientu: 100 – 70 % C (MeOH) od 0 do 10 min, 100 – 70 % C (MeOH) od 0 do 15 min, 100 – 70 % C (MeOH) od 0 do 20 min, 210 nm, 254 nm, 284 nm).....	65
Obrázek 28: Simulovaný a gradientní průběh, strmost gradientu 0,1 ml ⁻¹	67
Obrázek 29: Simulovaný a gradientní průběh, strmost gradientu 0,1 ml ⁻¹	69
Obrázek 30: Gradientní průběh číslo 4, strmost gradientu 0,1 ml ⁻¹	72
Obrázek 31: Gradientní průběh číslo 5, strmost gradientu 0,1 ml ⁻¹	72
Tabulka 1: Profil zpoždění gradientu.....	51
Tabulka 2: Naměřené časy zpoždění gradientu a korespondující objemy pro různé průtoky a směrodatné odchylky ze tří experimentů	53
Tabulka 3: Vstupní hodnoty proměnných	58
Tabulka 4: Retenční model s obsahem acetonitrilu	59
Tabulka 5: Retenční model s obsahem acetonitrilu	63
Tabulka 6: Retenční model s obsahem methanolu	66
Tabulka 7: Retenční model s obsahem methanolu	68
Tabulka 8: Gradient číslo 1.....	70
Tabulka 9: Gradient číslo 2.....	70
Tabulka 10: Gradient číslo 3.....	70
Tabulka 11: Gradient číslo 4.....	71
Tabulka 12: Gradient číslo 5.....	71

Příloha 1: Gradientová eluce pomocí kolony Luna® Omega SUGAR	85
Příloha 2: Gradientová eluce pomocí kolony InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z.....	86
Příloha 3: Gradientová eluce pomocí kolony SeQuant® ZIC-HILIC	87
Příloha 4: Gradientová eluce pomocí kolon YMC-Triart Diol-HILIC	88
Příloha 5: Gradientová eluce pomocí kolony Ascentis® Express HILIC	89
Příloha 6: Skript - izokratický lineární model	90
Příloha 7: Skript - izokratický nelineární retenční model.....	92
Příloha 8: Gradientní profily 1-5 s obsahem acetonitrilu, methanolu a vodného pufru	94

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATP	adenosintrifosfát
CD	cyklodextriny
CNS	centrální nervová soustava
DAD	detektor diodového pole
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MF	mobilní fáze
mRNA	messenger RNA
NP-LC	kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
PABA	kyselina p-aminobenzoová
RNA	ribonukleová kyselina
RP-LC	kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
rRNA	ribosomální RNA
SF	stacionární fáze
SN	sulfonamidy
tRNA	transferová RNA
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast záření

ÚVOD

V moderní analytické chemii hraje chromatografie klíčovou roli v separaci, identifikaci a kvantifikaci látek v komplexních směsích. S narůstajícím zájmem o analýzu biomolekul a farmaceutik roste i potřeba optimalizovat podmínky separace s cílem dosáhnout co nejvyšší citlivosti a selektivity. V tomto směru se v poslední době stále více uplatňuje hydrofilní interakční chromatografie (HILIC chromatografie Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography), která se osvědčuje při separaci polárních a hydrofilních látek.

Tato práce se zabývá zkoumáním a optimalizací podmínek separace pomocí ternárních mobilních fází a gradientové eluce v HILIC chromatografii. Hlavním cílem je nalézt ideální podmínky pro separaci čtyř typů modelových směsí, jako jsou nukleové báze, nukleosidy, barbituráty a sulfonamidy. Tyto látky byly zvoleny pro svou důležitost v biochemických a farmaceutických aplikacích a zároveň pro svou různorodost v polaritě a rozpustnosti.

Experimentální část práce zahrnovala přípravu gradientové eluce a izokratické eluce, které byly optimalizovány pro každou zkoumanou látku. Pro měření izokratické eluce bylo nezbytné provést kalibraci a nastavení zpoždění gradientu, aby bylo možné získat přesné a spolehlivé výsledky. Změny ve složení mobilní fáze (acetonitril, methanol, voda a octan amonný) byly sledovány s cílem porozumět jejich vlivu na separaci a retenci zkoumaných látek.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou přírodní sloučeniny, které se skládají z dusíkaté báze (purinu a pyrimidinu), pentózy a kyseliny fosforečné. Nukleové kyseliny slouží jako primární nosiče genetické informace v buňkách a určují dědičné znaky všech živých organismů tím, že řídí syntézu proteinů. Deoxyribonukleová kyselina (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA) jsou dva hlavní typy nukleových kyselin [1]. Vykazují různé biologické aktivity, včetně inhibice agregace krevních destiček [2], antiarytmických, antioxidačních, proti epileptickým záchvatům a protinádorových účinků. V důsledku toho tyto sloučeniny v poslední době získaly významnou pozornost ve vědecké komunitě. Mnohé z nich byly identifikovány v léčivých bylinách a potravinách (*Panax notoginseng*, *Fritillaria cirrhosa*, *Mactra veneriformis*) a houbách (*Cordyceps sinensis*, *Ganoderma Lucidum*) [3].

Objevy v technikách syntézy nukleových kyselin vedl k pozoruhodnému pokroku v nanotechnologii, terapiích a diagnostických metodách založených na nukleových kyselinách [4,5,6]. Například, nanostruktury odvozené z nukleových kyselin našly využití v oblasti léčiv [7].

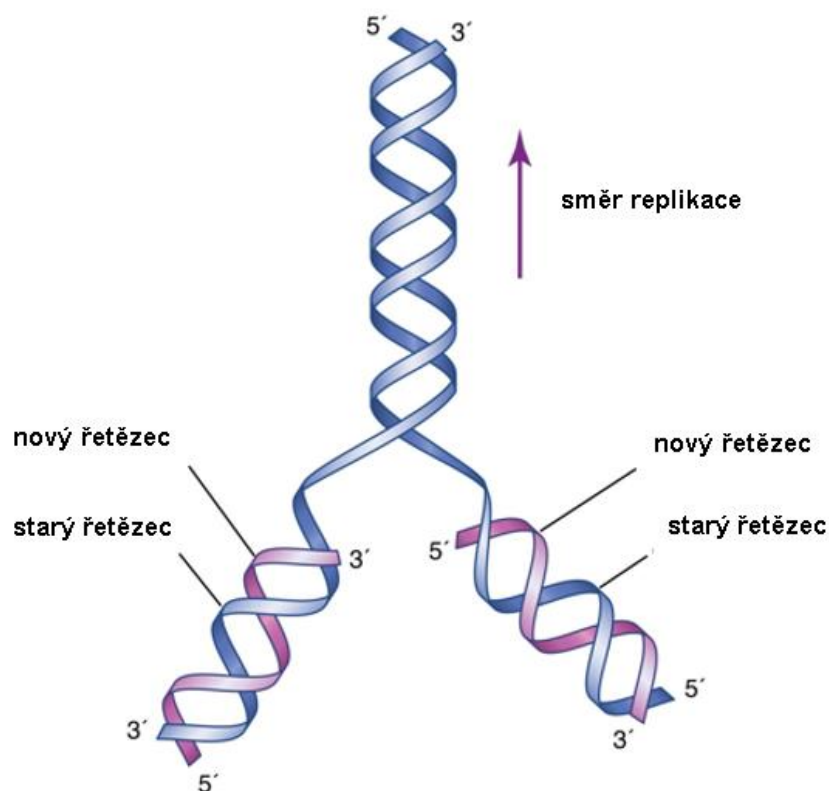
1.1.1. DNA

DNA představuje nositelku genetické informace ve všech živých organismech kromě některých nebuněčných forem, které využívají k tomuto účelu RNA, zejména RNA viry. DNA je pro život velmi důležitou látkou, která prostřednictvím své struktury kóduje genetický program buněk. U eukaryotních organismů, jako jsou rostliny a živočichové, tvoří DNA hlavní složku chromatinu, komplexu nukleových kyselin a proteinů, a je umístěna převážně v buněčném jádře. Zatímco u prokaryotických organismů, jako jsou bakterie a archea, se nachází volně v cytoplazmě [1].

V roce 1869 švýcarský biochemik Friedrich Miescher narazil na objev DNA, když zkoumal chemické složení bílých krvinek známých jako leukocyty. Tyto buňky extrahoval z hnisu nalezeného na čerstvě použitých chirurgických obvazech. Zpočátku se Miescher zabýval všemi složkami buňky, ale rychle se zaměřil na jádro. Všiml si, že když jádro vystavil kyselému prostředí, poskytlo sraženinu, kterou nazval „nuklein“. Tento experiment, izolující DNA z buněk, je základem v laboratořích molekulární biologie. Miescher se spolu s Richardem

Altmannem a Albrechtem Kosselom ponořil hlouběji do charakterizace „nukleinu“ a nakonec jej přejmenoval na nukleovou kyselinu. Kosselova následná práce odhalila, že nukleová kyselina obsahuje purinové a pyrimidinové báze, cukr a fosfát. [8].

V roce 1953 James Watson a Francis Crick navrhl strukturní model pro DNA založený na omezených rentgenových krystalografických datech a nálezích Erwina Chargaffa, které ukázaly stejné podíly párů bází adenin-thymin a guanin-cytosin v přirozené DNA. Jejich model naznačoval, že DNA se skládá ze dvou propletených polynukleotidových řetězců tvořících dvojistou šroubovici, viz obrázek 1. Tato vlákna, i když jsou identická ve složení, probíhají v opačných směrech v důsledku uspořádání fosfodiesterových vazeb od 5' do 3'. Cukrové fosfátové kostry jsou umístěny na vnější straně šroubovice, zatímco dusíkaté báze jsou umístěny uvnitř a tvoří vodíkové vazby s komplementárními bázemi na opačném vlákně. Watsonovi a Crickovi byla v roce 1962 udělena Nobelova cena za jejich průlomovou práci [1].



Obrázek 1: Počáteční návrh struktury DNA od Jamese Watsona a Francise Cricka, který byl doprovázen návrhem prostředků replikace, upraveno [1]

1.1.2. RNA

RNA je jednovláknová nukleová kyselina složená z dusíkatých bází adeninu, cytosinu, guaninu a uracilu. Tyto báze jsou dohromady spojeny pomocí řetězce, který tvoří zbytek fosfátu a ribózového cukru. RNA působí jako zprostředkovatelská molekula při překládání genetické informace z DNA do proteinů, které jsou životně důležité pro buněčné funkce. Některé typy RNA navíc hrají přímou roli v buněčném metabolismu. Syntéza RNA, tzv. transkripce, zahrnuje kopírování specifického segmentu dvouvláknové DNA, známého jako gen, do jednovláknové molekuly RNA. Tento proces katalyzuje enzym zvaný RNA polymeráza [1]. RNA je méně stabilní než DNA a většina molekul RNA netvoří stabilní sekundární struktury [8]. Podle funkce můžeme RNA rozdělit do tří základních skupin – messenger RNA, ribozomální RNA a transferová RNA.

Messenger RNA (mRNA) slouží k přenosu genetické informace z DNA do ribozomu pro syntézu proteinů. Tato RNA vzniká procesem transkripce z DNA a následným sestřihem, známým jako splicing. Po vytvoření je transportována z jádra do cytoplazmy, kde spolupracuje s ribozomy při syntéze bílkovin při translaci [1,9].

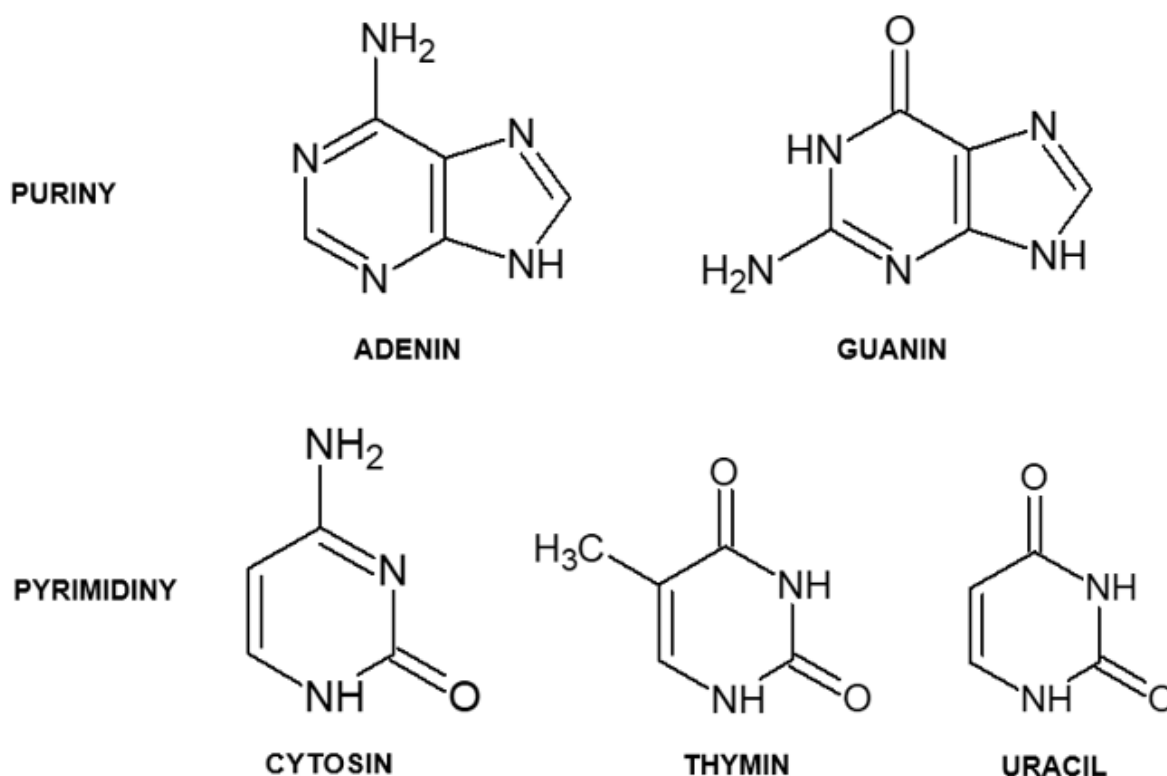
Ribozomální RNA (rRNA) tvoří strukturální složku ribozomu a aktivně se účastní syntézy proteinů [10]. Umožňuje vytváření rozsáhlých sekundárních struktur a usnadňuje rozpoznávání důležitých částí mRNA a tRNA. V eukaryotických buňkách jsou geny rRNA vytrženy z chromozomálních vláken a spojeny v nukleolu pro přepis a sestavování ribozomů [1].

Transferová RNA (tRNA) přenáší jednotlivé aminokyseliny do ribozomu pro sestavení polypeptidového řetězce během syntézy proteinů. Jejich charakteristická struktura "jetelového listu" je tvořena 70 až 80 nukleotidy. Každá aminokyselina má svou vlastní specifickou tRNA, která umožňuje přesný přenos aminokyselin do ribozomu, což je klíčový krok pro tvorbu proteinů [1,11].

1.1.3. Nukleové báze

Nukleové báze, znázorněné na obrázku 2, jsou specifické aromatické heterocyklické sloučeniny odvozené buď od purinu, nebo pyrimidinu, v nichž jsou obsaženy atomy dusíku. V molekulách DNA a RNA jsou hlavními purinovými bázemi adenin a guanin a pyrimidinovými bázemi thymin a cytosin v DNA a uracil a cytosin v RNA. Kromě těchto bází existují i méně časté minoritní báze, které se převážně vyskytují v molekulách RNA, jako je dihydrouracil, hypoxantin nebo 1-methylguanin. Báze se mohou párovat mezi sebou pomocí dvou nebo tří

vodíkových můstků, přičemž párování probíhá vždy mezi bází purinovou a pyrimidinovou. V DNA jsou to dvojice adenin = thymin a guanin \equiv cytosin, zatímco v RNA jsou to dvojice adenin = uracil a guanin \equiv cytosin. Tento systém párování, nazývaný komplementarita bází, hraje významnou roli při vytváření sekundární struktury nukleové kyseliny a přenosu genetické informace. Volné báze mají zásaditý charakter a jsou málo rozpustné ve vodě [12,13,14]. Při neutrálním pH se objevují jako nenabitá, ale při pH hodnotách nižších než 3 přecházejí do formy kationtu [15].

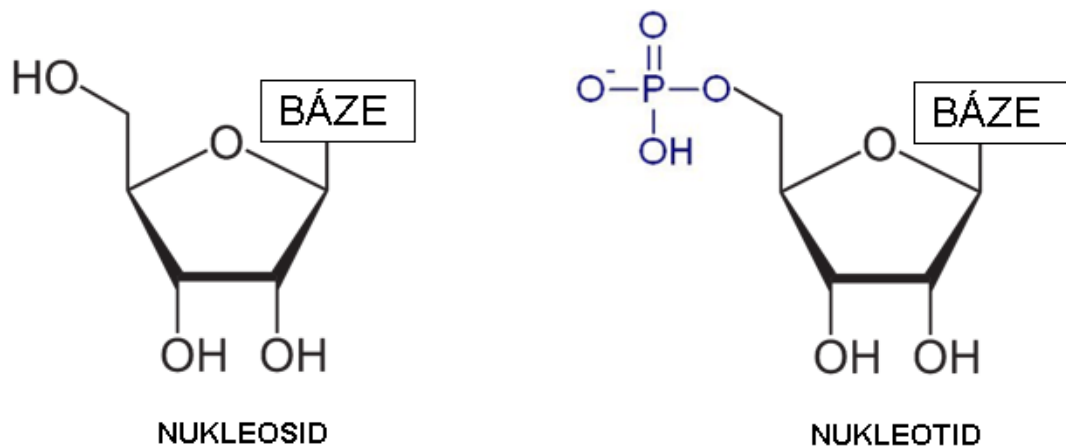


Obrázek 2: Struktura nukleových bází

1.1.4. Nukleosidy a nukleotidy

Při spojení pětiuhlíkatého cukerného základu s bází vzniká struktura nazývaná nukleosid. Nukleosidy se projevují jako bílé krystalické látky, které jsou ve vodě lépe rozpustné než samotné báze, díky přítomnosti cukerné složky, která je buď D-ribózou (v RNA) nebo 2-deoxy-D-ribózou (v DNA). Hydroxylová skupina na C1' uhlíku pentózy je spojena s dusíkem na pozici N9 purinové báze nebo s dusíkem na pozici N1 pyrimidinové báze prostřednictvím β -N-glykosidové vazby. Stejně jako nukleové báze, i nukleosidy nemají žádný náboj při neutrálním pH a vyskytují se jako kationty v prostředí s pH nižším než 3 [14,15,16].

Když je nukleosid spojen esterovou vazbou s kyselinou fosforečnou, vzniká struktura zvaná nukleotid. Nukleotid je základní stavební jednotkou nukleových kyselin [17]. Zbytek kyseliny fosforečné je navázán na C5' uhlíku pentózy a dodává nukleotidům kyselý charakter, což zlepšuje jejich rozpustnost ve vodě. Nukleotidy nesou záporný náboj v širokém rozmezí hodnot pH [18]. Struktura nukleosidu a nukleotidu je znázorněna na obrázku 3.



Obrázek 3: Struktura nukleosidu a nukleotidu

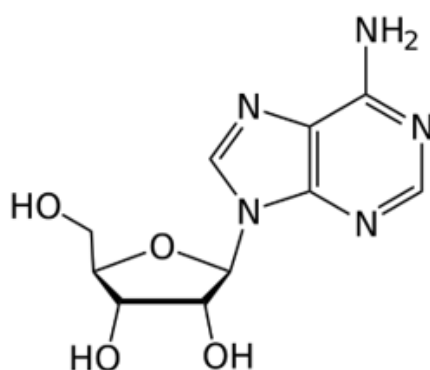
Nukleosidy a nukleotidy může tělo získávat externě konzumací potravy. Lidské tělo má schopnost absorbovat a využívat tyto sloučeniny. Za určitých okolností existuje zvýšená poptávka po nukleosidech a nukleotidech, která převyšuje endogenní produkci těla, takže jejich požití je zásadní pro udržení normálních fyziologických funkcí. Tato potřeba může nastat během období nemoci, jako jsou střevní léze, při sníženém příjmu proteinů, aktivaci imunitního systému během fází rychlého růstu nebo v přítomnosti regulačních a vývojových faktorů, které inhibují plnou kapacitu endogenní syntézy [19]. Četné studie prokázaly, že zahrnutí těchto sloučenin do stravy přináší příznivé účinky na imunitní odpověď, absorpci železa, metabolismus lipidů, střevní mikroflóru, střevní a jaterní strukturu a funkci [20].

Nukleosidy a nukleotidy jsou všudypřítomné složky v jakékoli potravine obsahující živé buňky, přičemž vyšší koncentrace se typicky nacházejí v potravinách s vyšší hustotou buněk nebo pocházejících z metabolicky aktivních tkání. Obecně platí, že potraviny živočišného původu obsahují více těchto sloučenin ve srovnání s potravinami rostlinného původu, s výjimkou luštěnin a jiných semen, které vykazují relativně vysoké hladiny. Výzkum ukazuje, že vnitřní orgány zvířat, jako jsou játra, ledviny, srdce, stejně jako malé ryby a korýši,

jsou obzvláště bohaté na nukleosidy a nukleotidy. Tyto sloučeniny jsou také přítomny, i když v menší míře, v houbách a zelenině [20].

Adenosin je purinový nukleosid tvořený kombinací adeninu a ribózy prostřednictvím glykosidické vazby a slouží jako prekursor i metabolit adeninových nukleotidů. Struktura adenosinu je znázorněna na obrázku 4. Protože buňky využívají energii získanou rozkladem adenosintrifosfátu (ATP) pro různé buněčné funkce, jako je syntéza, sekrece, kontrakce a transport iontů, adenosin mohou generovat všechny buňky. Mnohé z těchto buněk produkujících adenosin mají také receptory, které mohou interagovat s adenosinem. Po aktivaci tyto receptory často indukují snížení buněčné a orgánové činnosti a spotřeby kyslíku. Například adenosin může snižovat glomerulární filtraci, což vede ke snížení zátěže ledvin, a také může snížit frekvenci srdečních sinoatriálních buněk, což vede ke snížení srdeční frekvence a zátěže srdce. Tento vzájemný vztah mezi produkcí adenosinu a jeho účinky na buněčnou činnost vedl ke koncepci adenosinu jako „odvetného metabolitu“. V tomto rámci tvorba adenosinu signalizuje nerovnováhu mezi tkáňovou potřebou a nabídkou kyslíku, což vyvolává reakce, jako je vazodilatace a snížení aktivit spotřebovávajících ATP, aby se obnovila rovnováha [21].

Úloha adenosinu jako modulátoru negativní zpětné vazby energetické poptávky a spotřeby buněk a orgánů je základním aspektem biologie adenosinu [21,22,23]. Navzdory existenci různých sloučenin, které interagují s adenosinovými receptory, zůstává adenosin jako jediný se současnými klinickými aplikacemi [24].

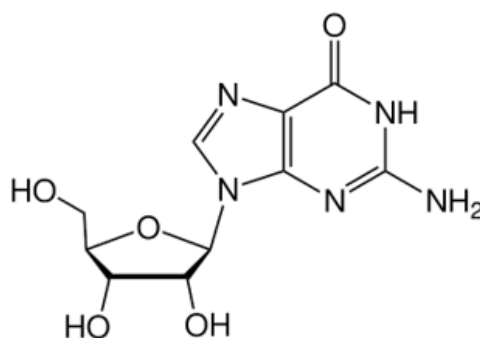


Obrázek 4: Struktura adenosinu

Guanosin je purinový nukleosid složený z guaninu a ribózy, viz obrázek 5. Prostřednictvím fosforylace může být guanosin přeměněn na guanosinmonofosfát, guanosindifosfát

a na guanosintrifosfát. Tyto různé formy mají zásadní roli v různých biochemických procesech, včetně syntézy nukleových kyselin a proteinů [25,26,27].

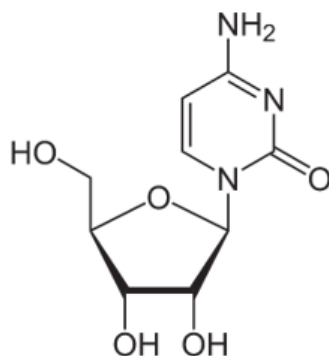
Guanosin hraje významnou roli v buněčném metabolismu a má ochrannou funkci proti degenerativním onemocněním a zraněním. Během posledního desetiletí došlo k významnému pokroku v pochopení extracelulárního působení guanosinu v centrálním nervovém systému (CNS). Studie využívající modely hlodavců a buněčné kultury poskytly důkazy o různých neurotrofických a neuroprotektivních účincích guanosinu, zmírňujících nepříznivé výsledky spojené se záchvaty, poraněním míchy, bolestí, poruchami nálad a nemocemi souvisejícími s věkem, jako je ischemie, Parkinsonova a Alzheimerova choroba. Účinky purinů nebo derivátů na bázi guaninu působící mimo buňky jsou pozorovány převážně v CNS. Tyto účinky jsou úzce spojeny s regulací glutamátergního systému, což je hlavní excitační neurotransmiterový systém v mozku [28].



Obrázek 5: Struktura guanosinu

Cytidin je pyrimidinový nukleosid, který se skládá z cytosinu spojeného s pětiuhlíkovým cukrem D-ribózou, viz obrázek 6. Fosforylací může být cytidin přeměněn na cytidinmonofosfát, cytidindifosfát a na cytidintrifosfát [29,30]. Cytidin hraje zásadní roli v regulaci cyklování glutamátu mezi neurony a gliovými buňkami. Tato regulace ovlivňuje metabolismus mozkových fosfolipidů, syntézu katecholaminů a fungování mitochondrií [31].

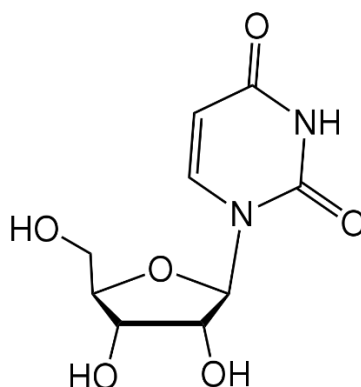
Cytidin byl studován jako doplněk k valproátu v dvojitě zaslepeném, 12ti týdenním placebem kontrolovaném testu s 35 jedinci trpícími bipolární poruchou. Tento přípravek způsobil dřívější zlepšení depresivních symptomů u skupiny s aktivním složením, a toto zlepšení bylo přímo spojeno se snížením hladiny glutamátu a glutaminu v přední části mozku. Studie naznačuje, že doplnění cytidinem má terapeutické účinky u bipolární poruchy, potenciálně prostřednictvím snížení hladiny glutamátu a glutaminu v mozku [31].



Obrázek 6: Struktura cytidinu

Uridin je chemická sloučenina skládající se z pyrimidinové nukleové báze uracilu a pětiuhlíkatého cukru ribózy. Tyto dvě základní složky jsou spojeny glykosidovou vazbou typu β -N1, viz obrázek 7. Fosforylací uridinu vzniká uridinmonofosfát, uridindifosfát nebo uridintrifosfát [32].

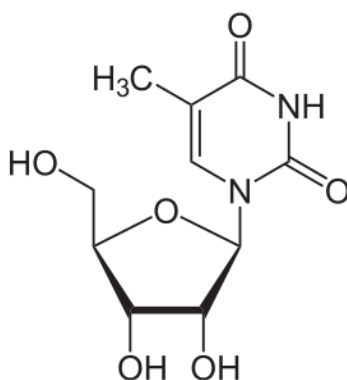
Uridin působí jako neuroaktivní molekula, která ovlivňuje nervové funkce nad rámec své metabolické role. Ukazuje potenciál při podpoře spánku, prevenci záchvatů, modulaci nálady, zlepšení paměti a ovlivnění plasticity neuronů. Jeho účinky jsou pravděpodobně zprostředkovány prostřednictvím různých receptorů a membránových interakcí. Pochopení přesné role pyrimidinových receptorů ve funkci mozku a distribuci složek metabolismu pyrimidinu však zůstává omezené. Díky své netoxické povaze a schopnosti pronikat do mozku je uridin příslibem pro vývoj léků pro CNS [33].



Obrázek 7: Struktura uridinu

5-methyluridin, známý jako ribothymidin je chemická sloučenina složená z pyrimidinové báze thyminu a pětiuhlíkatého cukru ribózy, viz obrázek 8 [34]. Tyto dvě základní složky jsou propojeny glykosidovou vazbou.

Jako jedna z často se vyskytujících modifikací RNA bylo nedávno prokázáno, že 5-methyluridin hraje zásadní roli v různých biologických funkcích a patogenezí onemocnění, jako je reakce na stres a rozvoj rakoviny prsu. Přesná identifikace míst 5-methyluridinu na RNA je nezbytná pro pochopení regulačních mechanismů, kterými se řídí biologie RNA [35].



Obrázek 8: Struktura 5-methyluridinu

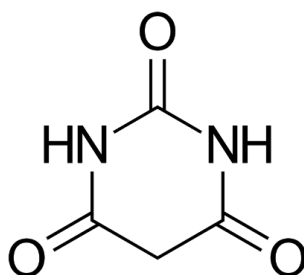
Vzhledem k významné roli nukleosidů a nukleotidů je jejich analýza vysoce ceněna v různých vědeckých oblastech včetně chemie, biochemie, medicíny, genetiky, metabolomiky a environmentálních studií [36,37,38]. Jejich chromatografická separace představuje významnou výzvu vzhledem k jejich podobným strukturám a polárním charakteristikám. Oddělení vysoce hydrofilních a negativně nabitých nukleotidů je zvláště obtížné kvůli adsorpční povaze multifosforylovaných druhů. Navíc přítomnost dalších polárních sloučenin z komplexních vzorkových matic dále komplikuje analýzu. Standardní metody kapalinové chromatografie v systému obrácenými fázemi (RP-LC) často nedokážou tyto sloučeniny účinně zadržet. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) nabízí řešení těchto problémů, přičemž pro analytické účely jsou preferovány komerčně dostupné aminové a amidové kolony. Tato preference je zřejmá z publikovaných studií, které zdůrazňují úspěšné spojení HILIC s hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací [3].

Nicméně nedávné rozšíření aplikačního rozsahu zwitteriontových stacionárních fází kovalentně vázaných na porézní kolony oxidu křemičitého pro analýzu reálných vzorků znamená slibný vývoj v této oblasti [39].

1.2. Barbituráty

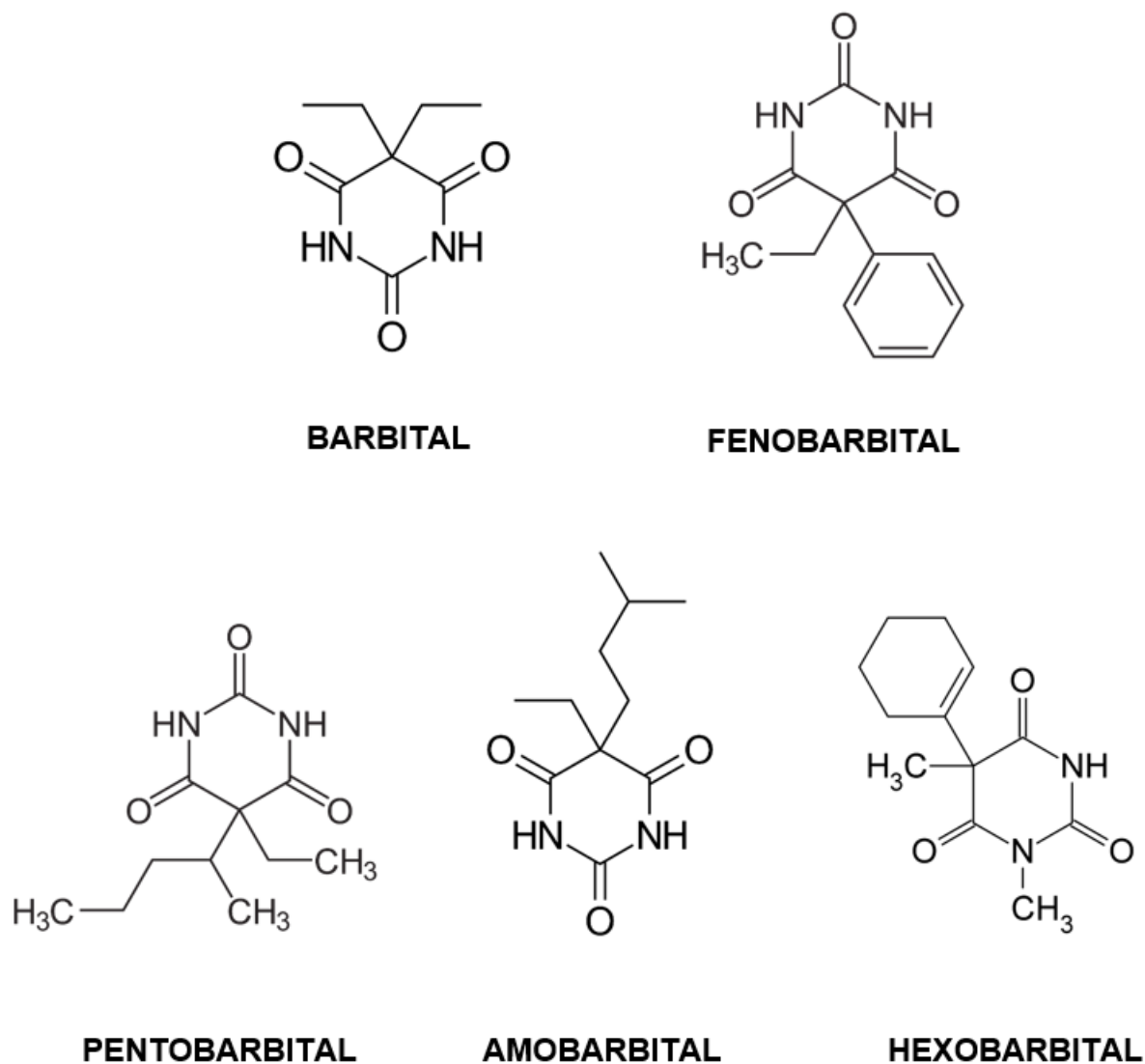
Barbituráty spadají do kategorie sedativních a hypnotických léků používaných při léčbě řady neurologických stavů, jako jsou záchvatové poruchy, novorozenecká abstinence, nespavost, předoperační úzkost a navození kómatu při řešení zvýšeného intrakraniálního tlaku. Kromě toho hrají roli při usnadnění anestezie [40].

Kyselina barbiturová (malonylmočovina) byla syntetizována německým chemikem Adolfem von Baeyerem v roce 1864, viz obrázek 9 [41]. K objevu došlo 4. prosince, v den svátku svaté Barbory, který inspiroval název sloučeniny [42]. Kyselina barbiturová sloužila jako základ pro řadu derivátů patentovaných společností Bayer. Nicméně, vzhledem k nedostatku lipofility, kyselina barbiturová nevykazuje vlastní aktivitu na CNS. K řešení tohoto problému byl vyvinut lipofilní derivát kyseliny barbiturové, známý jako barbital (kyselina 5,5-diethylbarbiturová), který se osvědčil při navození spánku u psů [41].



Obrázek 9: Kyselina barbiturová

Kyselina barbiturová slouží jako základ pro přípravu celé škály barbiturátů, které ovlivňují činnost nervového systému a vykazují tlumivé účinky. Deriváty kyseliny barbiturové, které jsou použité v této práci jsou uvedeny na obrázku 10.



Obrázek 10: Struktura barbiturátů

V roce 1912 učinil německý psychiatr Alfred Hauptmann významný objev, když identifikoval antikonvulzivní vlastnosti fenobarbitalu, který rychle nahradil bromidy jako bezpečnější a účinnější léčbu epilepsie. Úspěch těchto raných barbiturátů vedl v následujících desetiletích k syntéze více než 2 500 sloučenin, z nichž asi 50 nakonec našlo klinické aplikace. Kromě jejich role jako perorálně podávaných sedativ, hypnotik a antiepileptik, vývoj parenterálního podávání pro intravenózní anestezii zahrnoval ve vodě rozpustné sodné soli více lipofilních barbiturátů [41].

Sek-butyl-(2-brom-allyl)-barbiturát sodný (Pernocton), představený v roce 1927 německým porodníkem Bummem, se stal prvním systematicky používaným barbiturátem v anestezii. Průkopníci v této oblasti, jako John S. Lundy z Mayo Clinic, představili amobarbital sodný

v roce 1929 a pentobarbital sodný v roce 1930 pro účely anestezie. Přidání sirmé skupiny k pentobarbitalu významně zvýšilo lipofilitu, což vedlo v roce 1935 k vývoji krátkodobě působících thiobarbiturátů pro účely anestezie. Výrazné farmakokinetické vlastnosti umožnily praktickou klinickou klasifikaci založenou na délce jejich farmakologického účinku [41].

Klinické použití amythalu sodného (amobarbitalu) bylo zahájeno před více než sto lety v roce 1904 pod vedením lékaře Williama Bleckwenna, který v roce 1930 propagoval intravenózní podávání barbiturátů při narkóze. Bleckwenn léčil psychotické pacienty amobarbitalem, čímž dosáhl stavu známého jako narkóza. Pacienti vykazovali koherenci a vzhled do svého stavu těsně před spánkem. Na základě práce Bleckwenna prováděl Erich Linderman experimenty se subanestetickými dávkami amythalu sodného. Zjistil, že pacienti, kteří podstoupili rozhovory za užití amythalu sodného, vykazovali větší tendenci diskutovat o osobních problémech, což lékařům pomohlo lépe porozumět etiologii symptomů. V poslední době se amythal sodný a podobná činidla používají při diagnostice refrakterní epilepsie, zejména prostřednictvím intrakarotidního amythalového testu neboli Wada testu, který hodnotí lateralizaci jazyka. I když se Wada test ukázal jako cenný, byly hlášeny negativní behaviorální reakce a problémy s pamětí, což vyžaduje opatrnost při jeho aplikaci [43].

Thiopental byl představen v roce 1934 pro uvedení do celkové anestezie. Sloužil jako primární intravenózní anestetikum, dokud nebyl nahrazen propofolem [40,44]. V případech refrakterního status epilepticus Cochrane Review stanovil, že thiopental byl při kontrole záchvatové aktivity stejně účinný jako propofol. Hlavní dodavatel thiopentalu ve Spojených státech se však kvůli svému zapojení do protokolů smrtících injekcí rozhodl v roce 2011 ukončit výrobu, čímž se stal v USA nedostupným [45].

Hexobarbital se používal jako anestetikum v chirurgii ve 40. a 50. letech 20. století. Jeho použití se omezilo kvůli problémům s regulací úrovně sedace, což vedlo k jeho nahrazení bezpečnějšími alternativami, jako je thiopental [46].

1.2.1. Účinky

Barbituráty uplatňují své účinky prostřednictvím zvýšení postsynaptické aktivity γ -aminomáselné kyseliny (GABA) interakcí s podjednotkami alfa a beta receptoru GABA-A [47]. Tato interakce vede ke zvýšení toku chloridových iontů, což vede k postsynaptické hyperpolarizaci a depresi CNS. Fenobarbital a pentobarbital vykazují na dávce závislou odezvu při ovlivnění receptorů GABA-A, aktivaci chloridových kanálů při vyšších mikromolárních

koncentracích spojených s hladinami anestetika [41]. Barbituráty i benzodiazepiny se zapojují do receptorů GABA-A, ale barbituráty vynikají svou jedinečnou schopností potencovat receptory GABA-A a zvyšovat příliv chloridových iontů i při velmi nízkých koncentracích neurotransmiteru GABA [48].

Tradičně jsou barbituráty klasifikovány jako dlouhodobě působící, střednědobě působící, krátkodobě a ultrakrátce působící. Fenobarbital je prototypem dlouhodobě působícího barbiturátu. Po perorálním požití se téměř úplně vstřebá, přičemž maximální plazmatické hladiny se objevují za 6 až 18 hodin. Doba působení fenobarbitalu je asi 24 hodin, s poločasem asi 86 hodin u dospělých a 50 hodin u dětí. Dlouhodobě působící barbituráty mají nízký potenciál zneužití. Protože jim trvá určitou dobu, než se dostanou do CNS a ovlivní mozek, tedy nevyvolávají požadovaný pocit opojení [49,50].

Krátkodobě působící barbituráty, jako je sekobarbital, pentobarbital byly zpočátku používány jako hypnotika. Krátkodobě působící barbituráty jsou mnohem lépe rozpustné v tucích, což umožňuje rychlý přechod hematoencefalickou bariérou, která způsobuje sedaci a snížení úzkosti během 30 minut po požití. Toto jsou preferované drogy. Například pentobarbital má nástup účinku za 15 až 30 minut, přičemž maximální plazmatické koncentrace nastávají 1 až 2 hodiny po požití [41,49].

Ultrakrátce působící barbituráty, jako je thiopental a methohexital, jsou tak lipofilní a působí tak rychle, že se používají jako anestetika. Při intravenózním podání se látky rychle absorbují do mozku a indukují spánek během několika sekund. Protože se však krátkodobě působící barbituráty poměrně rychle redistribuují z krve do jiných tělesných tkání, především do tuku, mají při poklesu koncentrací v mozku relativně krátký klinický účinek. Doba trvání klinického účinku závisí na době redistribuce, nikoli na době eliminace. Eliminační čas nebo poločas, který zahrnuje metabolismus a vylučování, je delší. Průměrný poločas krátce působících barbiturátů se pohybuje od 4 do 38 hodin v závislosti na léku [41,49,51].

Barbituráty podléhají jaternímu metabolismu a jsou vylučovány močí. Dlouhodobě působící barbituráty jsou minimálně vázány na bílkoviny, což umožňuje, aby byla značná část přímo vylučována ledvinami. Například přibližně 25 % fenobarbitalu je eliminováno ledvinami, zatímco 75 % je metabolizováno v játrech. Naopak krátkodobě působící barbituráty jsou vysoce vázané na proteiny a rychle redistribuovány do tkání, jako jsou svaly, játra a ledviny, ale také mohou být redistribuovány do mozku. Například pouze 3 až 6 % sekobarbitalu je vylučováno ledvinami. Tyto rozdíly ovlivňují léčbu předávkování, protože léky vázané na proteiny nelze

snadno odstranit dialýzou. Navíc jaterní metabolismus vede k prodlouženému poločasu barbiturátů u starších osob a pacientů s onemocněním jater [49].

Chronické užívání barbiturátů způsobuje indukci jaterních enzymů, čímž zvyšuje metabolismus léků, jako jsou perorální antikoncepce a kortikosteroidy. Tolerance se vyvíjí při dlouhodobém užívání, což vyžaduje vyšší dávky pro konzistentní účinky. To je částečně způsobeno zrychleným metabolismem (farmakokinetická tolerance) a desenzibilizací receptorů (farmakodynamická tolerance). K toleranci smrtelných dávek však nedochází a předávkování je mezi závislými běžné kvůli užšímu terapeutickému indexu [49].

1.2.2. Klinické aspekty

Barbituráty jsou často zneužívány perorálně, s rychlou absorpcí především ve střevě. Jejich účinky, podobné alkoholové intoxikaci, závisí na očekávání uživatele a okolí. Například užívání 200 mg sekobarbitalu před spaním obvykle vyvolává ospalost, zatímco stejná dávka při společenské akci může způsobit vzrušení a dezinhibici. Vyšší dávky v mírně toxickém rozmezí mají za následek příznaky připomínající opilost, včetně vrávorání, nezřetelných řečí, zmatenosti a emoční nestability. Toxické dávky přesahující 1 g mohou vést ke kómatu nebo smrti. Barbituráty byly často vybírány pro pokusy o sebevraždu v 60. a 70. letech [49,51].

Chronická denní dávka 600 až 800 mg po dobu 1 měsíce nebo déle krátkodobě působícího barbiturátu, jako je sekobarbital, způsobí fyziologickou závislost. Čím vyšší denní dávka, tím silnější závislost a závažnější abstinenční syndrom. Náhlé ukončení užívání krátkodobě působících barbiturátů u jedince, který je závislý, vyvolá během 24 hodin menší abstinenční příznaky, přičemž život ohrožující příznaky se objeví mezi druhým a osmým dnem. Tento časový rámec se prodlužuje, pokud jde o závislost na dlouhodobě působících barbiturátech, jako je fenobarbital. Barbiturátový abstinenční syndrom je podobný deliriu tremens, syndromu z odnětí alkoholu. Počáteční drobné příznaky zahrnují obavy, svalovou slabost, třes, anorexii, nespavost, pocení, hyperreflexii a ortostatickou hypotenzi. Mezi hlavní abstinenční příznaky patří psychóza s dezorientací, neklid, bludy, zrakové halucinace, záchvaty grand mal a hypertermie [49].

Úpadek barbiturátové terapie začal v posledních desetiletích, zejména s klinickým zavedením benzodiazepinů na konci 50. let 20. století, které jsou známé pro svůj zlepšený bezpečnostní profil. Zatímco na trhu zůstává pouze několik barbiturátů, fenobarbital je nadále široce

používán jako antikonvulzivní, sedativní a hypnotická droga, zejména v rozvojových zemích [41].

1.2.3. Farmakokinetika

Fenobarbital podléhá rychlé absorpci a dosahuje maximální koncentrace během 2-4 hodin. Biologická dostupnost fenobarbitalu je přibližně 90 % u dospělých, ale nižší u novorozenecké populace [50]. Sodné soli barbiturátů se vstřebávají rychleji a přítomnost potravy může při perorálním podání barbiturátů oddálit nástup účinku. Intravenózní cesta je typicky vyhrazena pro léčbu status epilepticus (pomocí fenobarbitalu sodného) nebo pro navození nebo udržování celkové anestezie (methohexital, thiopental). Thiopental sleduje kinetiku prvního řádu v nízkých dávkách 5 mg/kg bolusů. Při vysokých dávkách nebo prodloužených infuzích se však může objevit nelineární kinetika v důsledku progresivní saturace enzymatických systémů [52].

Barbituráty, které vykazují vysokou rozpustnost v lipidech, rychle pronikají hematoencefalickou bariérou, ale také podléhají rychlé redistribuci z CNS do periferních tkání [50]. Po intravenózní injekci dochází u léků jako thiopentalu a methohexitalu k rychlé redistribuci do méně vaskulárních tkání, jako jsou svaly a tuk. Tento proces vede ke snížení koncentrace barbiturátů jak v plazmě, tak v mozku. Ukončení účinku jednorázové bolusové intravenózní injekce thiopentalu je primárně připisováno této redistribuci z centrálního kompartmentu do periferních kompartmentů [53].

Primární biotransformací odpovědnou za ukončení biologické aktivity barbiturátů je oxidace. Kromě toho hraje n-glykosylace klíčovou roli v metabolismu fenobarbitalu. Fenobarbital podléhá rozsáhlému metabolismu zprostředkovanému cytochromem P450 a k dozrávání této rodiny enzymů dochází především během novorozeneckého období. Opakované podávání fenobarbitalu má za následek zkrácení jeho poločasu v důsledku indukce mikrosomálních enzymů. Samovolně vyvolané zvýšení metabolismu barbiturátů částečně přispívá k rozvoji tolerance. Dále při dlouhodobém užívání dochází ke zvýšení hladiny enzymu δ -aminolevulát syntetázy. Vliv barbiturátů na enzym δ -aminolevulát syntetázu může vést k potenciálně nebezpečným exacerbacím onemocnění u pacientů s porfyrií. Primidon podléhá metabolismu na fenylethylmalonamid a fenobarbital; účinnost primidonu při léčbě esenciálního třesu je však nezávislá na jeho metabolitu fenobarbitalu [45].

Zhruba 25 % fenobarbitalu je vyloučeno z těla, aniž by došlo ke změnám, když je vylučován močí. Renální vylučování může být zvýšeno metodami, jako je osmotická diuréza nebo alkalizace moči. Metabolické odstranění barbiturátů je rychlejší u mladších jedinců ve srovnání se staršími lidmi a kojenci. Byly pozorovány změny farmakokinetiky související s věkem, které se u starších osob vyznačují pomalejší clearance, což vede ke zvýšeným sérovým koncentracím při relativně menších dávkách léčiva [45]. U dětí je kratší poločas eliminace připisován zvýšené clearance [53]. Navíc při chronickém podávání se poločas fenobarbitalu snižuje přibližně o 4,6 hodiny denně [45].

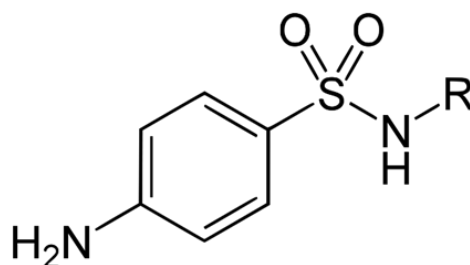
Různorodé farmakologické účinky barbiturátů jsou závislé na podané dávce, což vede k rostoucí depresi CNS se zvýšenými koncentracemi v mozku. V důsledku toho, jak se dávky eskalují, všechny barbituráty vykazují antikonvulzivní a anxiolytické účinky, sedaci, hypnózu, celkovou anestezii a v případě předávkování mohou vést k úmrtí v důsledku respirační deprese. Tato respirační deprese tvoří základ pro aplikaci barbiturátů při veterinární a humánní eutanazii, stejně jako pro trest smrti [41].

Různé farmakologické účinky barbiturátů představují výzvu při zkoumání mechanismů specifických farmakologických účinků, jako je ochrana před záchvatu nebo anestezie. Jeden přístup k rozlišení mezi antikonvulzivními a anestetickými mechanismy zahrnuje studium fenobarbitalu a pentobarbitalu v systémech in vitro v koncentracích relevantních pro konkrétní sledované chování. Přestože oba barbituráty kvalitativně vykazují stejné farmakologické účinky při zvyšujících se koncentracích, pentobarbital vykazuje přibližně 13krát vyšší lipofilitu než fenobarbital [41].

1.3. Sulfonamidy

Sulfonamidy (SN) nebo také sulfanilamidy patří do důležité třídy syntetických antimikrobiálních léčiv, která se farmakologicky používají jako široké spektrum pro léčbu bakteriálních infekcí lidí a zvířat [54]. SN jsou odvozeny od sulfanilamidu (p-aminobenzensulfonamidu) [55].

Ve veterinární praxi jsou široce využívány v krmivech pro zvířata a v akvakultuře pro preventivní i terapeutické účely. Všechny SN sdílejí společnou chemickou strukturu, která je znázorněna na obrázku 11. Soutěžením s kyselinou p-aminobenzoovou v enzymatické syntéze kyseliny dihydrolistové brání SN růstu a reprodukci bakterií. SN vykazují aktivitu proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím [55].

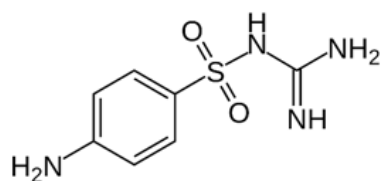


Obrázek 11: Základní struktura sulfonamidů

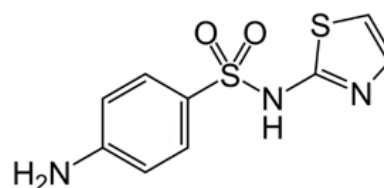
Primární sulfonamidová skupina se nachází v řadě léků běžně používaných v klinické praxi, včetně diuretik (jako je furosemid, indapamid, chlorthalidon a thiazidy), inhibitorů karboanhydrázy (které zahrnují acetazolamid, dichlorfenamid, dorzolamid a brinzolamid), antiepileptik (jako zonisamid a sulthiam), antipsychotických sulpiridů a inhibitorů cyklooxygenázy 2 (celekoxib a valdecoxib). Nedávno byly představeny nové léky jako apricoxib a pazopanib, které také obsahují tuto strukturní skupinu [56].

Způsoby klasifikace SN nejsou jednotné. V zásadě jsou antibiotika této skupiny rozdělována na látky, které se dobře vstřebávají z trávicího traktu a mají celkové účinky. Dále na ty, které se užívají perorálně a nejsou absorbovány z gastrointestinálního traktu, a nakonec na lokálně aplikované přípravky. Celkově působící SN se dále dělí podle doby účinku nebo rychlosti eliminace na přípravky s krátkodobým, střednědobým, dlouhodobým a velmi dlouhodobým účinkem [57].

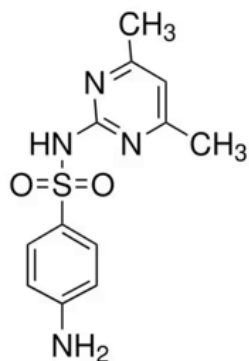
SN vykazují zajímavé vlastnosti v pevném stavu, mezi které patří schopnost mnoha těchto léčiv existovat ve dvou nebo více polymorfních formách. Vlastnosti SN v pevném stavu studovali Yang a Guillory. Předpokládali, že tendence k vytváření vodíkových můstků v přítomnosti různých donorů a akceptorů vodíkových vazeb může vést k polymorfismu [58]. Grafická podoba SN použitá v této práci je zachycena na obrázku 12.



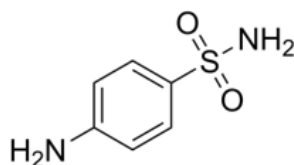
SULFAGUANIDIN



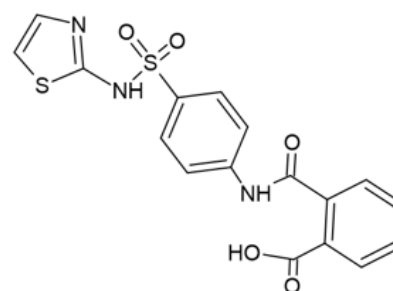
SULFATHIAZOL



SULFADIMIDIN



SULFANILAMID



FTALAZOL

Obrázek 12: Struktura sulfonamidů

V roce 1932 německý lékař Gerhard Domagk publikoval studii o antibakteriálních vlastnostech sulfachrysoidinů, která byla založena na jeho výzkumu selektivně působících barviv. Tři roky poté byl sulfachrysoidin uveden na trh pod názvem Prontosil [55]. Ačkoli byl sulfanilamid poprvé syntetizován v roce 1900, jeho účinnost byla prokázána při kontrole bakteriálních infekcí až v roce 1936, po zjištění, že se jedná o lidský metabolit Prontosilu [59]. Od té doby bylo vyvinuto více než 5000 sulfanilamidových derivátů [60]. Mezi nimi více než 150 sulfonamidů, které se liší svou heterocyklickou kruhovou strukturou, bylo použito v humánní a veterinární medicíně jako bakteriostatická léčiva [61].

Nicméně SN, aktivní sloučeniny, které jako antimikrobiální látky působí prostřednictvím blokády syntézy kyseliny listové, mají mnoho dalších lékařských aplikací. Používají se jako antidiabetika, diuretika nebo antidepresiva. Mají protizánětlivé, antikonvulzivní, antihypertenzní, a dokonce i herbicidní účinky [62]. V současnosti je nejběžněji používaným sulfonamidovým antibiotikem pro kontrolu lidských infekcí sulfamethoxazol, především v kombinaci s trimethoprimem, antimikrobiálním lékem, který také zasahuje do syntézy kyseliny listové [63]. Jiné SN používané v humánní antibioterapii (sulfadimethoxin

a sulfamethizol) byly popsány především v některých evropských zemích [64]. Naopak sulfatiazol, sulfamethazin a sulfadiazin se používají hlavně v profylaxi, metafylaxi a terapii v chovu zvířat a veterinární medicíně [65]. Kromě toho jsou SN také často používány jako stimulanty růstu při chovu zvířat v oblastech světa, kde je tato praxe stále povolena [66].

1.3.1. Mechanismus účinku sulfonamidů

Antibiotika jsou chemoterapeutická činidla používaná k inhibici růstu nebo usmrcení bakterií. SN jsou kompetitivními antagonisty a strukturními analogy kyseliny p-aminobenzoové (PABA), která je důležitá při syntéze kyseliny listové. Kyselina listová, označovaná také jako folát nebo vitamín B9 je nezbytná pro další produkci DNA v bakteriích [67].

Podobnost mezi strukturami SN a PABA umožňuje SN inhibovat enzym dihydropteroát syntetázu a nahradit PABA při její vazbě, což má za následek inhibici tvorby dihydrofolátu, tetrahydrofolátu a následně i růstu bakteriální DNA a buněčné dělení nebo replikaci [68].

SN léky spolu s trimethoprimem se používají k prevenci syntézy tetrahydrofolátu. Replikace DNA je omezená jeho nedostatkem. Účinky léku vedou k překážkám v buněčném dělení, takže SN léky jsou spíše bakteriostatické než baktericidní [69, 70]. SN léky nezpůsobují narušení procesů v živočišných buňkách, protože nejsou schopné syntetizovat folát. Kyselina listová plní své funkce až po přeměně na kyselinu tetrahydrofolovou pomocí dihydrofolát reduktázy [71].

Kyselina listová je nezbytná pro růst a vývoj tělesných buněk u lidí, protože je nezbytná pro syntézu, opravu a metylaci DNA [72]. V důsledku toho je kyselina listová kriticky důležitá pro ženy během těhotenství pro zdravý plod a také pro muže pro zlepšení počtu spermií a motility [73].

1.3.2. Toxikologický účinek

Jakýkoli lék může způsobit vedlejší účinky. Antibiotika se někdy užívají způsobem, který nepřináší žádné výhody a může potenciálně ublížit (např. při použití proti určitým virovým infekcím, jako je běžné nachlazení). Tyto antibiotika nejsou vždy preferovaným řešením, jelikož související toxikologické vedlejší účinky mohou pacienta vystavit zbytečnému riziku. Mezi faktory ovlivňující toxikologický účinek SN léků patří délka užívání a dávkování léku, existence heterocyklického kruhu v N1 substituovaném SN, jeho rozpustnost v krvi a v jiných biologických tekutinách, stav ledvin, věk a nutriční stav pacienta [74].

Bylo zjištěno, že SN vykazují určitou míru toxicity vůči krevním buňkám. Sulfanilamid se ukázal jako poměrně toxický ve srovnání s ostatními sloučeninami SN, zatímco sulfadiazin byl hlášen jako nejméně škodlivý. Kromě toho mohou léky obsahující SN vyvolat těžkou akutní hemolytickou anémii, což způsobuje destrukci červených krvinek a vede k agranulocytóze, to může negativně ovlivnit tvorbu krevních destiček [75].

Sulfonamidy jsou široce rozšířené kontaminanty životního prostředí. Vzhledem k jejich intenzivní výrobě a využití se odhadovalo, že v průměru může být ročně uvolněno do biosféry více než 20 000 tun sulfonamidů s bakteriostatickými vlastnostmi. V důsledku toho byly SN a jejich metabolity detekovány v široké škále složek a matric životního prostředí [61].

Sulfonamidová antibiotika jsou po konzumaci vylučována převážně ledvinami, jsou eliminována močí [76]. Tyto znečišťující látky lze tedy nalézt ve vysokých koncentracích nejen v odpadních vodách farmaceutického průmyslu, v odpadních vodách nemocnic, ale také v hnoji [77].

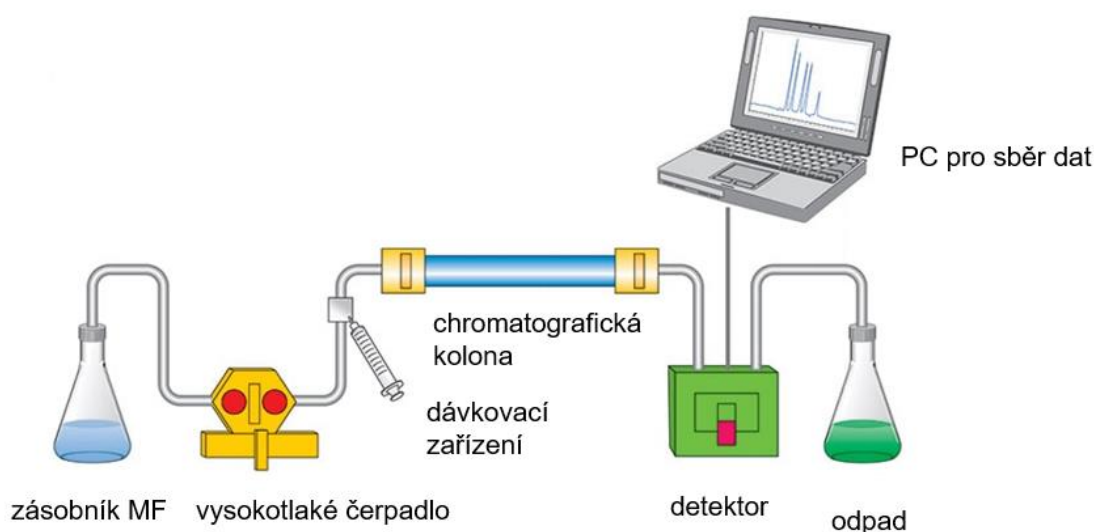
SN jsou hydrofilní molekuly vykazující amfoterní vlastnosti, snadno rozpustné ve vodě a vykazující minimální absorpci na půdu nebo aktivní uhlí [61]. V důsledku toho se na rozdíl od jiných hydrofobních xenobiotických látek nepředpokládá, že by tyto léky prošly významnou biomagnifikací v rámci potravního řetězce. Studie však ukázaly, že SN se hromadí v medu, různých rostlinách (jako je salát), mořských plodech, rybách a hospodářských zvířatech a podléhají biomagnifikaci v mořských ekosystémech [61,78].

2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je analytická technika určená pro separaci, identifikaci a kvantifikaci složek ve směsi [79]. Jedná se o nejpoužívanější techniku v chemické analýze různých materiálů, ale i pro odhad různých fyzikálně-chemických charakteristik molekul a pro popis určitých procesů separace. Díky široké škále kombinací mobilních (MF) a stacionárních fází (SF) je schopna oddělit různorodé látky [80]. HPLC se vyznačuje vysokou efektivitou, spolehlivostí a opakovatelností, což ji činí vhodnou metodou pro separaci organických látek, které jsou rozpustné ve vodě, organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách [81].

Separace spočívá v odlišné afinitě separovaných látek ke dvěma vzájemně nemísitelným fázím – pohyblivé MF a nepohyblivé SF. SF je umístěna v koloně a obvykle představuje pevnou látku nebo kapalinu fixovanou na povrchu pevného materiálu, označovanou jako sorbent nebo chromatografické lože MF, kterou tvoří kapalina, proudí skrz sorbent a unáší separované látky [81, 82].

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku MF, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, detektoru, odpadní láhve a PC pro hodnocení a sběr dat. Instrumentace HPLC je znázorněna na obrázku 13. Mezi nejpoužívanější detektory patří spektrofotometrický detektor v ultrafialové a viditelné oblasti záření (UV/VIS detektor), detektor diodového pole (DAD), hmotnostní spektrometr, fluorescenční detektor a elektrochemický detektor [83].



Obrázek 13: Instrumentace HPLC, upraveno [79]

V oblasti HPLC se v současné době využívá několik různých způsobů separace. Kapalinová chromatografie, která využívá nepolární SF, a naopak polární MF, se nazývá kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi (RP-LC). Běžně se jako SF používá silikagel modifikovaný alkylovými skupinami, např. oktylovými (C8) nebo oktadecylovými (C18) skupinami. MF obvykle tvoří směs jednoho nebo více organických rozpouštědel (převážně acetonitrilu nebo methanolu) s vodou nebo vodným pufrům. RP-LC se často využívá k separaci nepolárních a lipofilních látek. Retence těchto látek obvykle klesá s rostoucí polaritou a zvyšujícím se obsahem organického rozpouštědla v MF [84].

Další alternativou je kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi (NP-LC), kde je používaná SF s vyšší polaritou než MF. SF může být silikagel modifikovaný polárními skupinami nebo nemodifikovaný silikagel. MF může obsahovat látky jako je chloroform nebo hexan v kombinaci s alkoholy. NP-LC se používá zejména pro separaci polárních látek, u nichž se retence zvyšuje s jejich vzrůstající polaritou a polaritou SF a s klesající polaritou MF. Nepolární látky mají naopak retenci velmi malou nebo žádnou [85]. NP-LC byla dominantní separační technika do 70. letech 20. století. Nahrazena byla RP-LC z důvodu lepší reprodukovatelnosti retenčních časů [86].

Látky s nízkou nebo střední polaritou lze oddělit buď pomocí RP-LC nebo NP-LC, často s opačným pořadím eluce. Velmi hydrofilní sloučeniny, jako jsou sacharidy nebo malé silně polární látky, mají v RP-LC příliš malou retenci. Naopak v systému NP-LC mají tyto látky retenci vysokou nebo se mohou špatně rozpouštět v nepolárních nebo slabě polárních organických rozpouštědlech. Přidáním vody do MF, která se imobilizuje na povrchu SF, lze často zlepšit separaci těchto látek. Tento způsob separace byl zaveden Alpertem pod názvem hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) [87].

2.1. HILIC chromatografie

HILIC je cennou alternativou k separacím polárních, slabě kyselých nebo zásaditých vzorků, kde tradiční chromatografie nestačí [87, 88]. V zásadě lze tento separační způsob charakterizovat jako NP-LC s využitím polárních SF a vodně-organických MF bohatých na organická rozpouštědla (obvykle acetonitril) [87, 89].

Nejpoužívanější kombinací MF je acetonitril a voda. Do MF je možné přidat aditivum (pufr). Mezi nejběžněji používané pufrů patří mravenčan amonný a octan amonný, díky jejich dobré rozpustnosti v organických MF a kompatibility s hmotnostní detekcí [90]. Alternativně lze

využít i jiné látky, jako je hydrogenuhličitan amonný, chloristan sodný nebo triethylaminfosfát [91].

Vysoce organické MF v HILIC obvykle zesilují ionizaci v elektrosprejovém iontovém zdroji hmotnostního spektrometru ve srovnání s MF s vyššími koncentracemi vody používanými při separacích polárních nebo iontových sloučenin v RP-LC, což je další důvod pro rostoucí popularitu této techniky [87, 89].

HILIC byla nedávno propagována jako nový chromatografický způsob pro separaci široké škály polárních a hydrofilních látek. Separace pomocí HILIC, podobným způsobem jako NP-LC, závisí na hydrofilních interakcích mezi rozpuštěnými látkami a hydrofilní SF. Rozpuštěné látky jsou eluovány z kolony za účelem zvýšení hydrofility (snížení hydrofobnosti). Pořadí eluce rozpuštěných látek v HILIC by tedy mělo být opačné než pořadí získané při RP-LC, která odděluje rozpuštěné látky na základě hydrofobních interakcí [92].

Metoda je založena na distribuci vzorku mezi polárním povrchem adsorbentu (silikagel, diolové, aminopropylové a zwitteriontové fáze) a vodnou fází bohatou na organické rozpouštědlo [93].

Původně se HILIC používala především pro stanovení sacharidů, aminokyselin a peptidů [92]. Zájem o techniku HILIC byl v posledních letech podpořen rostoucími požadavky na analýzu polárních léčiv, metabolitů a biologicky významných sloučenin v proteomice, glykomice a klinické analýze [94]. HILIC postupně našla užitečné aplikace při analýze různých malých polárních sloučenin, jako jsou léčiva, toxiny, rostlinné extrakty a další sloučeniny důležité pro potravinářský a farmaceutický průmysl [94,95].

Počet přehledových článků o HILIC se zvyšuje. Nejpodrobnější z nich pokrývá nedávný pokrok ve vývoji polárních SF a v pochopení mechanismu HILIC [96]. Další novější přehledy se zaměřují na specifické aspekty této techniky, jako je vliv provozních podmínek (MF, teplota) na HILIC separace [97], separační účinnost různých HILIC kolon [98], vývoj HILIC metody, propojení HILIC systémů s hmotnostní spektrometrií a tandemovou hmotnostní spektrometrií a implementace HILIC systémů v dvourozměrných separačních režimech [87].

2.1.1. Retenční mechanismus

I když je HILIC často využívanou analytickou metodou, její retenční mechanismus zatím není plně objasněn [90]. Původně byl retenční mechanismus HILIC vysvětlován pomocí retenčního mechanismu NP-LC. Předpokládalo se, že dochází k interakci hydroxylových skupin polárních látek s polárními skupinami na povrchu SF, což by vedlo k jejich adsorpci. Tato teorie však byla považována za vhodnou pouze pro analyty obsahující hydroxylové skupiny ve své struktuře a nenachází proto širší uplatnění [99].

Naopak, složitější retenční mechanismus HILIC, který byl představen Alpertem v jeho práci z roku 1990, je stále široce uznávaný. Jeho základní princip spočívá v rozdělování polárních analytů mezi dvě kapalné fáze – hydrofobní část MF a hydrofilní vodnou vrstvou, která je sorbována na povrchu polární SF [100]. Na funkčních skupinách SF s vyšší polaritou se přednostně adsorbuje voda, což vede k vytvoření difúzní vrstvy s postupným snižováním obsahu vody směrem od adsorpčního povrchu SF do MF [101]. Úroveň adsorpce vody roste s nižším obsahem vody v MF, přičemž minimální množství vodné složky v MF by mělo být alespoň 2,5 % objemu [102]. Retence polárních analytů je tedy vyšší při jejich zvýšené polaritě [100].

Hemström a Irgum ve svém výzkumu formulovali zjištění, že s narůstajícím množstvím vodné složky v MF se zvyšuje podobnost této fáze s vodnou vrstvou, která je sorbována na povrchu SF. Tato podobnost má za následek zvýšení rozpustnosti polárních látek v MF a současně nižší retenci těchto látek. Retence je tedy přímo úměrná polaritě látek a SF, a zároveň nepřímo úměrná polaritě MF, jejíž polarita roste s obsahem vodné složky [103].

V HILIC nezávisí separace a retence analytů pouze na mechanismu rozdělování. V závislosti na podmínkách separace mohou na retenci také působit slabé nevalebné interakce, jako jsou vodíkové vazby, interakce dipól-dipól a elektrostatické interakce [104, 105]. Rozsah, v němž každý z těchto mechanismů přispívá, závisí na typu použité SF, organického rozpouštědla a vodné složky MF, včetně typu separovaných látek [101].

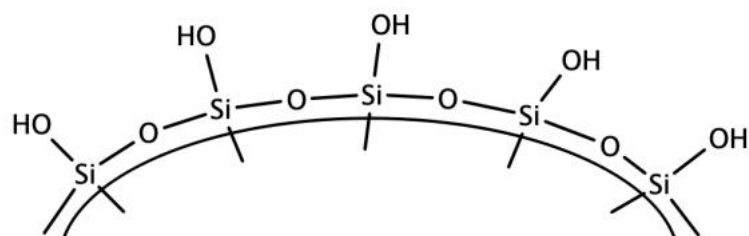
2.1.2. Stacionární fáze

Pro provádění separací v systému HILIC je možné využít libovolnou chromatografickou kolonu, která obsahuje polární SF se schopností adsorpce vodné vrstvy na svém povrchu [90]. SF, která je nejčastěji v HILIC využívána, zahrnuje nemodifikovaný silikagel nebo silikagel s chemicky vázanými polárními skupinami, jako jsou kyanové, diolové, aminoskupiny atd.

Tyto skupiny mohou být buď chemicky vázány na povrch silikagelu nebo mohou tvořit celé molekuly, jako například cyklodextrin nebo polyethylenglykol. Alternativně lze využít polárních kolon obsahujících iontové nebo neiontové polární skupiny, které jsou vázány na povrch silikagelu nebo organické polymerní matrice [87].

Nemodifikovaný silikagel

V HILIC je SF z nemodifikovaného silikagelu běžně využívanou komponentou. Několik výrobců vyvinulo kolony s touto specifickou SF, přizpůsobené právě pro potřeby HILIC [106]. Je však důležité zdůraznit, že v závislosti na technologii výroby mohou komerčně dostupné SF z nemodifikovaného silikagelu vykazovat odlišnou čistotu, což může ovlivnit retenci, účinnost a tvar píků [87]. Obrázek 14 zobrazuje strukturu nemodifikovaného silikagelu.



Obrázek 14: Struktura nemodifikovaného silikagelu [107]

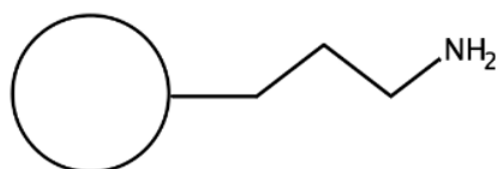
U kolon obsahujících nemodifikovaný silikagel může na retenčním mechanismu participovat iontová výměna, rozdělování a adsorpce v závislosti na složení MF, vlastnostech silikagelu a chemických charakteristikách separovaných látek [108]. V případě použití pufru s vyšším pH dochází k ionizaci povrchových silanolových skupin, což způsobuje, že iontová výměna se stává významným retenčním mechanismem, zejména při separaci nabitých látek. Retence pozitivně nabitých analytů výrazně narůstá díky kationtovým výměnným interakcím, zatímco u negativně nabitých analytů dochází k redukci retence v důsledku elektrostatické repulze [90].

Mezi výhody SF z nemodifikovaného silikagelu patří jejich větší chemická stabilita ve srovnání s fázemi, které byly chemicky modifikovány. Tato vlastnost má zvláštní výhodu při kombinaci s hmotnostní detekcí, kde nedochází k nechtěné kontaminaci hmotnostního spektra nebo uvolňování ligandů [109]. Naopak nevýhodou může být nezvratná adsorpce pozitivně

nabitých analytů [110], nereprodukovatelné výsledky [101], nebo snadná saturace kolony chromatografickým materiálem [103].

Aminové stacionární fáze

První chemicky vázanou SF, použitou v HILIC, byla aminopropylová fáze [93]. Dodnes se tato fáze často využívá pro separaci aminokyselin, peptidů, cukrů, nukleosidů, karboxylových kyselin a některých léčiv [87]. Aminové SF různých výrobců mohou poskytovat rozdíly v retenci a selektivitě [111]. Struktura aminopropylové SF je znázorněna na obrázku 15.



Obrázek 15: Struktura aminopropylové stacionární fáze, upraveno [87]

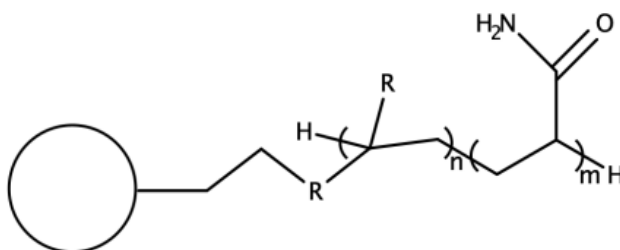
Zatímco nenabité polární látky jsou obvykle zadržovány na SF silikagelu modifikovaných aminoskupinami především díky rozdělovacímu mechanismu, u kyselých látek dochází ke zvýšené retenci při nízkých hodnotách pH vodné složky MF [90]. Toto zvýšení retence je výsledkem kombinace rozdělovacího a iontově výměnného mechanismu, přičemž příspěvek iontově výměnného mechanismu k retenci se snižuje se zvyšující se iontovou silou MF [106].

Aminopropylové SF nabízejí výhodu ve zvýšené rychlosti mutarotace anomerů, což eliminuje vznik dvojitého píku monosacharidových diastereomerů během separace sacharidů [103]. Nicméně byly zaznamenány určité nevýhody při používání těchto kolon. Mezi ně patří výskyt nevratné adsorpce negativně nabitých analytů [98], dlouhá doba potřebná k dosažení rovnováhy [90], omezená stabilita ve vodných eluentech s možným uvolňováním ligandů a narušením symetrie chromatografických píků [103]. Tyto vlastnosti mohou způsobit kontaminaci hmotnostního spektra při kombinaci s hmotnostní detekcí [112].

Amidové stacionární fáze

Amidové SF mají amidovou skupinou, která je připojena na povrch silikagelu prostřednictvím krátkého alifatického řetězce, viz obrázek 16. Na rozdíl od aminových SF nemají amidové SF bazické vlastnosti, což minimalizuje vliv iontově výměnných interakcí na retenci ionizovaných analytů. Tím pádem je ireverzibilní adsorpce vzorku méně pravděpodobná, což vede k větší stabilitě po dlouhou dobu [96]. Amidové kolony často nepotřebují iontové MF, což znamená, že do hmotnostního spektrometru vstupuje méně solí, které by jinak mohly ovlivnit proces ionizace vzorku [113].

Tyto kolony jsou často využívány při separaci peptidů. Hydrofilní peptidy jsou silněji zadržovány na amidových SF než hydrofobní peptidy. Amidové kolony jsou vhodné i pro separace jiných vzorků, jako jsou oligosacharidy, glykoproteiny nebo různé glykosidy. Některé z těchto amidových SF byly speciálně navrženy pro HILIC aplikace, například karbamoyl-silika HILIC TSK-gel Amide-80, který je oblíbený pro separace mono- a oligosacharidů, derivátů cukrů, peptidů a aminokyselin [87]. Amid-80 vykazuje vyšší retenci pro mnoho polárních sloučenin ve srovnání s holým silikagelem a jinými polárními SF za stejných podmínek [106].



Obrázek 16: Struktura amidové stacionární fáze, upraveno [87]

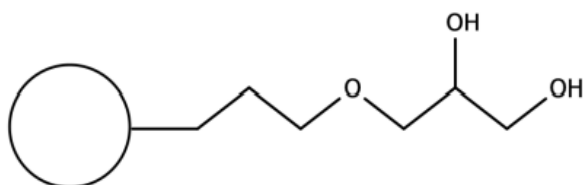
Diolové stacionární fáze

Diolové fáze, chemicky vázané na povrch silikagelu, obvykle obsahují neutrální hydrofilní 2,3-dihydroxypropyl ligandy, viz obrázek 17. Jejich příprava zahrnuje navázání glycidoxypropyltrimethoxysilanu na silikagel s následnou hydrolýzou epoxidových skupin. Tyto fáze jsou vysoce polární a vykazují vlastnosti vodíkových vazeb, podobně jako samotný oxid křemičitý. Neobsahují žádné jiné ionizovatelné skupiny kromě nezreagovaných silanolů,

kteře mohou být částečně blokovány silylačním činidlem k prevenci ireverzibilní adsorpce polárních sloučenin [87,114].

Diol-silika kolony byly původně využívány pro HILIC separace proteinů, avšak nedávno se začaly používat i pro separace nízkomolekulárních fenolických sloučenin, jak v režimu RP-LC s nízkým obsahem organického rozpouštědla, tak i v režimu HILIC s vysokým obsahem organického rozpouštědla. SF s undecyl-1,2-diolovými ligandy navázanými na silikagelu obsahují dlouhý hydrofobní alkylový řetězec s polární diolovou funkční skupinou na konci, což umožňuje duální RP-LC/HILIC retenční mechanismus [87].

Diolové kolony byly úspěšně použity pro stanovení dvojí strukturní distribuce v neiontových tenzidech na bázi ethoxylovaných alkoholů v režimu RP-LC a HILIC. Diolové kolony mohou pomalu uvolňovat navázanou fázi za kyselých podmínek, a na rozdíl od aminopropylových fází jsou schopny štěpit anomery a různé cyklické formy monosacharidů, což umožňuje sledovat rychlost přechodu mezi jednotlivými formami (mutarotace) [87,115,116].



Obrázek 17: Struktura diolové stacionární fáze, upraveno [87]

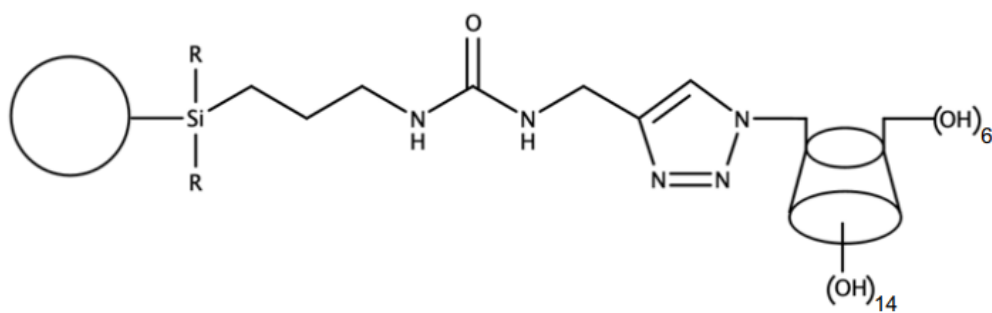
Stacionární fáze s vázanými cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou kruhové oligosacharidy, které se skládají ze šesti (α -CD), sedmi (β -CD) nebo osmi (γ -CD) D-glukózových jednotek uspořádaných do toroidních kruhových struktur s hydrofobními dutinami. Tyto CD vykazují chirální rozpoznávací vlastnosti, díky čemuž jsou cenné jako chirální selektory přidávané do MF v HPLC nebo pracovních elektrolytů v kapilární elektroforéze. Kromě toho slouží jako chemicky vázané funkční skupiny v chirálních SF pro enantioselektivní separace. Chirální SF na bázi silikagelu s vázanými CD, připravené imobilizací prostřednictvím aminových, uretanových nebo etherových vazeb, jsou účinné pro chromatografické separace enantiomerů v podmínkách RP-LC. Používají se také

v režimu HILIC pro separaci cukerných alkoholů, monosacharidů a oligosacharidů s 1–8 monosacharidovými jednotkami za použití 70% acetonitrilu jako MF [87,117].

Retence se zvyšuje s rostoucím počtem monosacharidových jednotek, což je přisuzováno spíše interakcím s hydrofilní vodnou vrstvou na vnější straně molekul CD než pronikáním vzorku dovnitř dutiny. Kolony s vázanými CD vykazují lepší retenci aminokyselin a dalších polárních vzorků ve srovnání s fází TSKgel Amide 80 a jsou stabilnější než aminové SF [9,118].

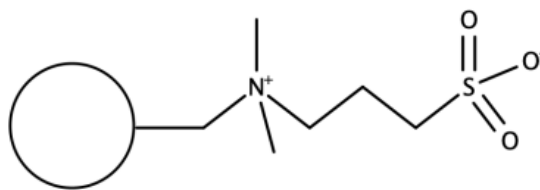
β -CD fáze s vlastnostmi chirálního rozpoznávání za podmínek HILIC byla syntetizována pomocí click chemie připojením azidu modifikovaného β -CD na alkyne modifikované částice silikagelu, viz obrázek 18 [9].



Obrázek 18: Struktura cyklodextrinové stacionární fáze, upraveno [87]

Zwitteriontové stacionární fáze

Zwitteriontové SF byly původně navrženy pro iontově-výměnné separace. Výzkumný tým pod vedením Irguma zavedl sulfobetainové SF pro HILIC separace zaměřené na anorganické soli, malé organické iontové sloučeniny a proteiny [87,119,120,121]. Aktivní vrstva, navázaná na silikagelu se širokými póry nebo na polymerním nosiči, obsahuje jak silně kyselé skupiny sulfonové kyseliny, tak silně bazické kvartérní amoniové skupiny oddělené krátkým alkylovým řetězcem, viz obrázek 19. Tato konfigurace umožňuje současnou separaci aniontových a kationtových sloučenin. Molární poměr 1:1 dvou opačně nabitých skupin vede k velmi nízkému čistému negativnímu povrchovému náboji navázané vrstvy, což je připisováno větší vzdálenosti sulfonových skupin od povrchu silikagelu. Účinného stínění zbytkových silanolových skupin je dosaženo samoasociací opačně nabitých funkčních skupin [106].



Obrázek 19: Struktura zwitteriontových stacionárních fází, upraveno [87]

2.1.3. Separace vybraných látek v HILIC

Rodríguez-Gonzalo a kol. provedli studii zaměřenou na chromatografické chování modifikovaných nukleosidů a nukleových bází s využitím různých SF obsahujících funkční skupiny polární povahy, které jsou kompatibilní s vodně-organickými MF. Ve studii byly zkoumány tři typy SF: pentafluorofenylpropylová pro RP-LC separaci a další dvě pro HILIC separaci (Luna-HILIC a ZIC-HILIC). Jako cílové analyty bylo vybráno šest modifikovaných nukleosidů a nukleových bází, včetně hydroxylovaných a methylovaných derivátů. Při hodnocení bylo bráno v úvahu chromatografické rozlišení a citlivost detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Výsledky ukázaly, že ZIC-HILIC kolona byla nejvhodnější pro separaci těchto analytů. Z analýzy různých parametrů ovlivňujících separaci vyplývá, že v ZIC-HILIC koloně je separace založena především na mechanismu rozdělování a interakcí prostřednictvím slabých elektrostatických sil [122].

Philibert a kol. dosáhli úspěšné separace nukleosidů a jejich monofosfátových nukleotidů s vysokým rozlišením za pouhých 8 minut s použitím kapalné MF se zvýšenou fluiditou pomocí superkritické fluidní chromatografie. Různé poměry rozpouštědla acetonitrilu a methanolu vedly k rozdílům v pořadí eluce, selektivitě a retenčním faktoru. To naznačuje rozšíření intervalu eluce při použití CO₂ v MF. Přidání 1,5-diazabicyklo[4.3.0]non-5-en se ukázalo jako výhodné pro zlepšení tvaru píku. Přestože MF methanol/voda jsou v HILIC méně běžné kvůli zvýšené viskozitě a nižší selektivitě ve srovnání s acetonitrilem/voda, přidání soli se ukázalo jako výhodné při vytváření vodou obohacené vrstvy, umožňující selektivní dělení analytů. V kombinaci s CO₂, který snižuje viskozitu a zvyšuje změny entropie u mnoha analytů, byla selektivita významně zvýšena. Studie ukázala, že směs CO₂/methanol/voda představuje zajímavou alternativu k acetonitrilu/vodě jako MF v HILIC, zejména pro separaci sloučenin s významnými rozdíly v polaritě. Je důležité poznamenat, že zatímco optimalizovaná MF není kompatibilní s hmotnostní spektrometrií, směs nabízí výhody methanolu, včetně zvýšené

rozpuštěnosti pufrů a analytů, změněného pořadí eluce, snížení nákladů a ekologické likvidace odpadu, bez nevýhod nedostatečné retence a separace [123].

Staňková a kol. zkoumali retenční chování barbiturátů při HILIC chromatografii pomocí polymethakrylátové zwitteriontové monolitické mikrokolony. Kyselina barbiturová, nejpolarnější ze zkoumaných látek, projevila minimální retenci v pufované vodně-organické MF s obsahem vody 50 %, což naznačuje nízký příspěvek hydrofobních interakcí. Substituované barbituráty vykazují menší polaritu a jsou méně zadržované při vyšších koncentracích acetonitrilu (>50 %). Fenobarbital, pentobarbital, amobarbital a hexobarbital vykazují podobné retenční charakteristiky, zatímco barbital, který má menší uhlovodíkové substituenty, projevil nejnižší retenci. V 95% pufovaném acetonitrilu se pentobarbital, amobarbital a hexobarbital korelují, zatímco fenobarbital a barbital jsou částečně separovány. Pořadí eluce se mění v závislosti na složení MF, což ovlivňuje selektivitu separace. V 60% pufovaném acetonitrilu není dosaženo základní separace, ale pořadí eluce se liší od pořadí v 30% pufovaném acetonitrilu, což podtrhuje vliv složení MF na retenci a separaci [124].

West a jeho tým zkoumali eluci čtyř barbiturátů (hexobarbital, mephobarbital, fenobarbital a 5-methyl-5-fenylhydantoin) na všech jedenácti kolonách: Atlantis HILIC, XBridge HILIC, Kinetex HILIC, Accucore HILIC, XBridge Amide, TSK-gel Amid-80, YMC-Pack PVA-Sil, Luna HILIC, YMC-Pack Polyamin II, Kosmosil HILIC a Luna NH₂. Spolu s popisem struktur těchto látek zkoumali i jejich retenční chování. Zdá se, že silikagelové a amidové fáze nejsou schopny separovat hexobarbital a mephobarbital. Fenobarbital a 5-methyl-5-fenylhydantoin jsou lépe zadržovány než tyto dvě látky, díky dalšímu vazebnému centru NH, což umožňuje větší možnosti pro vodíkové vazby. Kromě toho jsou pozorovány určité rozdíly v pořadí eluce: fenobarbital je eluován před 5-methyl-5-fenylhydantoinem na křemičitých a amidových fázích, zatímco na diolové fázi a základních fázích je to naopak [125].

Staňková a kol. provedli studii zaměřenou na retenci SN v různých MF pomocí polymethakrylátové zwitteriontové monolitické mikrokolony. Většina SN prokazuje retenci při jak vysokých, tak nízkých koncentracích acetonitrilu, s výjimkou sulfacetamidu a sulfadimidinu, které nejsou zadržovány v MF obsahujících méně než 20 % acetonitrilu. Tyto SN se řídí duálním retenčním mechanismem, který kombinuje jak HILIC chromatografii, tak RP-LC, přičemž významný přechod nastává při obsahu vody 15–35 %. Sulfanilamid a sulfathiazol projevují omezenou separační selektivitu v HILIC režimu, avšak jejich retence výrazně roste v MF s 40 % a více vodné složky, což více vyhovuje RP-LC. V RP-LC režimu vykazují sulfathiazol nejvyšší retenci, zatímco sulfacetamid má nejnižší retenci mezi SN.

Naopak sulfadimidin a ftalazol vykazují neuspokojivou separační selektivitu a eluují v rámci RP-LC. Avšak jsou účinně odděleny v HILIC režimu v závislosti na složení MF. Zvláště ftalazol a sulfaguanidin projevují nejvyšší selektivitu separace v HILIC retenčním režimu [124].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie

Acenaften (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Aceton (pro HPLC, Acros Organics, USA)

Acetonitril (pro HPLC, $\geq 99,9$ % Sigma Aldrich Steinheim, Německo)

Deionizovaná voda připravená zařízením Milli-Q® (Merck, Německo)

Kyselina octová (≥ 99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Metanol (pro HPLC, Merck, Německo)

Octan amonný ($\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich, USA)

Hydroxid amonný (Lach-Ner, Česká republika)

3.1.1. Analyzované vzorky

Adenin (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Adenosin (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Amobarbital (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Barbital (ze zásob Univerzity Pardubice)

Cytidin (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Cytosin (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Fenobarbital (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Ftalazol (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Guanin (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Guanosin (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Hexobarbital (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Pentobarbital (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Sulfadimidin (ze zásob Univerzity Pardubice)

Sulfaguanidin (ze zásob Univerzity Pardubice)

Sulfanilamid (ze zásob Univerzity Pardubice)

Sulfathiazol (ze zásob Univerzity Pardubice)

Thymin (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Uracil (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

3.2. Přístrojové vybavení

Analytické digitální váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)

Mikropipety (Thermo Fisher Scientific, USA)

Ultrazvuková lázeň (Fisherbrand, FB15052)

Vortex (Vortex, USA)

3.2.1. Kapalinový chromatograf s DAD detekcí

Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), který se skládal z:

- Autosampleru s integrovaným termostatem kolon G7129C
- Kvartérního čerpadla s vestavěným vakuovým degaserem G7104C
- Detektor diolového pole G7115A

3.2.2. Kapalinový chromatograf s UV/VIS detekcí

Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), který se skládal z:

- Degaseru G4225A
- Binárního čerpadla G1312B
- Autosampleru s integrovaným termostatem kolon G7129B
- UV/VIS detektoru G7114B

3.2.3. Kolony

Ascentis® Express, HILIC (3 × 150 mm, velikost částic 2,7 μm, Supelco, USA)

InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z (2,1 × 150 mm, velikost částic 2,7 μm, Agilent Technologies, USA)

Luna® Omega SUGAR 100 Å (3 × 150 mm, velikost částic 3 μm, Phenomenex, USA)

SeQuant®, ZIC-HILIC (2,1 3 × 150 mm, velikost částic 3,5 μm, Merck KGaA, Danstadt Německo)

YMC-Triart, Diol-HILIC (2,0 × 150 mm, velikost částic 5 μm, YMC, Japonsko)

3.3. Pracovní postup

3.3.1. Příprava standardů

Standardy byly připraveny o celkové koncentraci 1 mg/ml. Do skleněné vialky byl navážen 1 mg látky, který byl rozpuštěn v 1 ml demineralizované vody. Kromě sulfathiazolu, který byl rozpuštěn v acetonu, ftalazolu, kteý byl rozpuštěn v methanolu, guaninu a guanosinu, které byly rozpuštěny v NH₄OH. Z takto připravených zásobních roztoků byly připraveny roztoky standardů o koncentraci 100 μg/ml. A celkový objem byl doplněn acetonitrem na objem 1 ml.

3.3.2. Zpoždění gradientu

Zpoždění gradientu bylo měřeno při průtoku 0,5 ml/min a tlaku 36 bar, 0,4 ml/min a tlaku 29 bar a při 0,2 ml/min a tlaku 16 bar. Pro toto měření byly použity dvě MF. První obsahovala čistou demineralizovanou vodu a druhá demineralizovanou vodu s přídatkem 1% acetonu. MF byly připraveny ve 200 ml zásobních lahví. Měření probíhalo bez kolony, která byla nahrazena kovovou spojkou. K detekci byl využit UV/VIS detektor při vlnové délce 260 nm. Profil gradientu byl následující: 100 % čisté demineralizované vody od 0 do 2 min; 0-100 % demineralizované vody s 1% acetonem od 2 do 7 min.

3.3.3. HPLC analýza standardů

MF A byla tvořena demineralizovanou vodou s 5 mM octanem amonným. MF B byla tvořena 98% acetonitrilem s přídavkem 5 mM octanu amonného. MF C byla tvořena 98% methanolem s přídavkem 5 mM octanu amonného. MF byly připraveny do 500 ml zásobních lahví. Průtok MF byl 0,18; 0,2 a 0,4 ml/min podle typu kolony, aby byl zachován konstantní lineární průtok 5,67 cm/min. Dávkovaný objem standardu byl nastaven na 1 μ l. Teplota kolony byla udržována na hodnotě 25 °C. Detekce probíhala za použití detektoru DAD a UV/VIS a vlnová délka byla zvolena podle typu látky. Nukleové báze a nukleosidy byly detekovány při 254 nm. Barbituráty a sulfonamidy při 210 nm, kromě ftalazolu a sulfathiazolu, které byly detekovány při 284 nm.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Zpoždění gradientu

Gradientové zpoždění v chromatografii je stěžejním parametrem ovlivňujícím separaci a eluci analytů. Představuje časový interval mezi změnou složení MF a jejím příchodem do detekčního zařízení. Tato změna ve složení může být provedena postupně (gradient) nebo náhle (kroková změna). Správné nastavení zpoždění gradientu umožňuje dosažení optimálních podmínek pro separaci analytu.

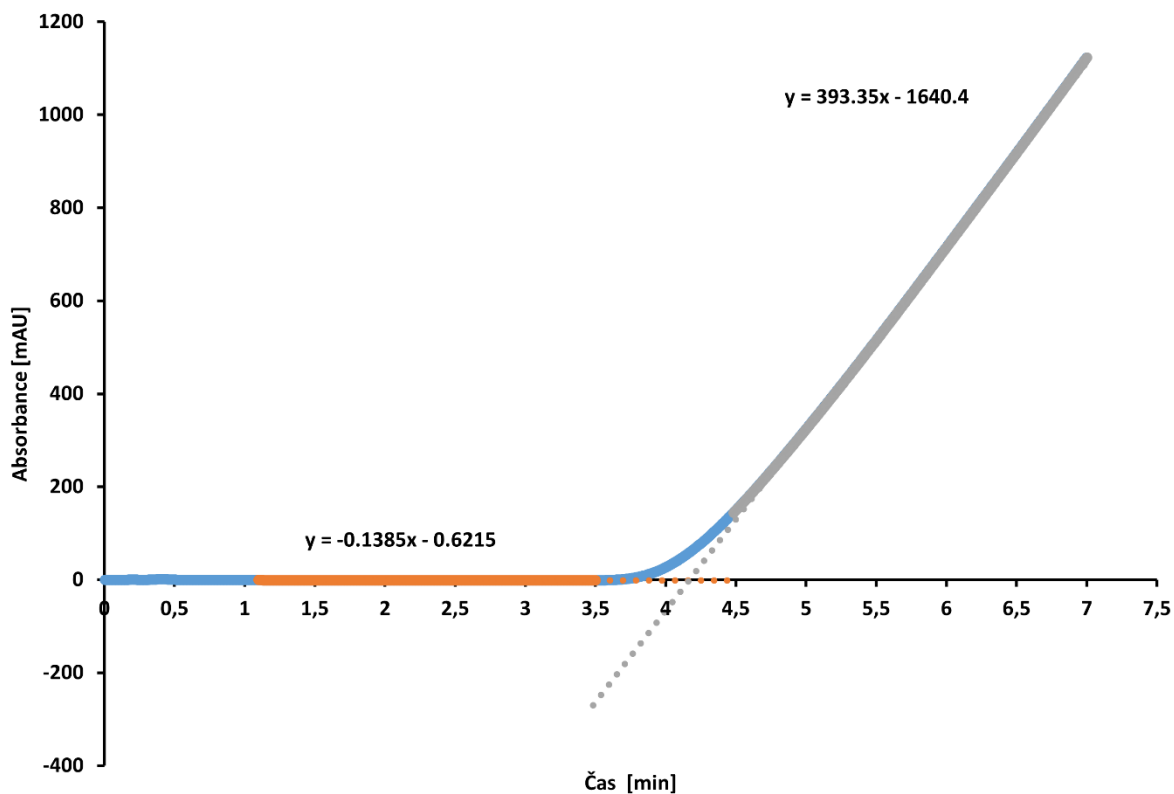
Rychlá změna ve složení MF může vést k eluci analytu mimo rozsah gradientu, zatímco pomalá změna může prodloužit celkovou dobu analýzy. Vysoké zpoždění gradientu může způsobit výrazně odlišné retenční chování v porovnání s předpovězenými daty a zároveň znesnadňuje převod gradientových metod mezi různou instrumentací.

V první fázi bylo provedeno měření zpoždění gradientu při 260 nm na kapalinovém chromatografu, který se dále použil v diplomové práci. Pro provedení této analýzy byly použity dvě MF (A a B). MF A představovala čistou demineralizovanou vodu a MF B demineralizovanou vodu s přídavkem 1% acetonu. Profil gradientu je znázorněn v tabulce 1.

Tabulka 1: Profil zpoždění gradientu

Čas [min]	MF A [%]	MF B[%]
0 - 2	100	0
2 - 7	0	100

Z každého experimentu byl vytvořen graf závislosti absorpance na čase. Pro identifikaci zpoždění gradientu byl odečten zlom na křivce, který byl proložen tečnami. Na obrázku 20 je patrný průběh signálu a odečtení hodnoty zpoždění gradientu, které bylo měřeno při průtoku 0,4 ml/min.



Obrázek 20: Průběh signálu při měření zpoždění gradientu; měřeno při průtoku 0,4 ml/min

Ke zjištění zpoždění času gradientu byly použity rovnice z grafu (příklad výpočtu), kde výsledná hodnota času zpoždění gradientu byla 2,17 min.

$$-0,1385x - 0,6215 = 393,35x - 1640,4$$

$$x = 4,1672 \rightarrow x = 2 + 2,1672$$

$$t_D = 2,17 \text{ min}$$

kde: t_D – čas zpoždění.

Z vypočteného času byl následně přepočítán objem zpoždění dle rovnice 1:

$$V_D = t_D \times F_m \quad (1)$$

$$V_D = 2,17 \times 0,4 = 0,87 \text{ ml}$$

kde: V_D – objem zpoždění, F_m – objemový průtok MF.

Výsledky zpoždění gradientu stanovené pro jednotlivé průtoky jsou uvedeny v souhrnné tabulce 2. Z naměřených dat je patrná mírná závislost stanoveného zpoždění na použitém průtoku MF, který ovšem může být zvláště u nejnižší hodnoty průtoku ovlivněn pracovním tlakem čerpadla a správnou funkcí ventilků. Pro další výpočty byla použita hodnota zpoždění gradientu 0,87 ml, protože většina experimentů byla realizována právě při průtoku 0,4 ml/min.

Tabulka 2: Naměřené časy zpoždění gradientu a korespondující objemy pro různé průtoky a směrodatné odchylky ze tří experimentů

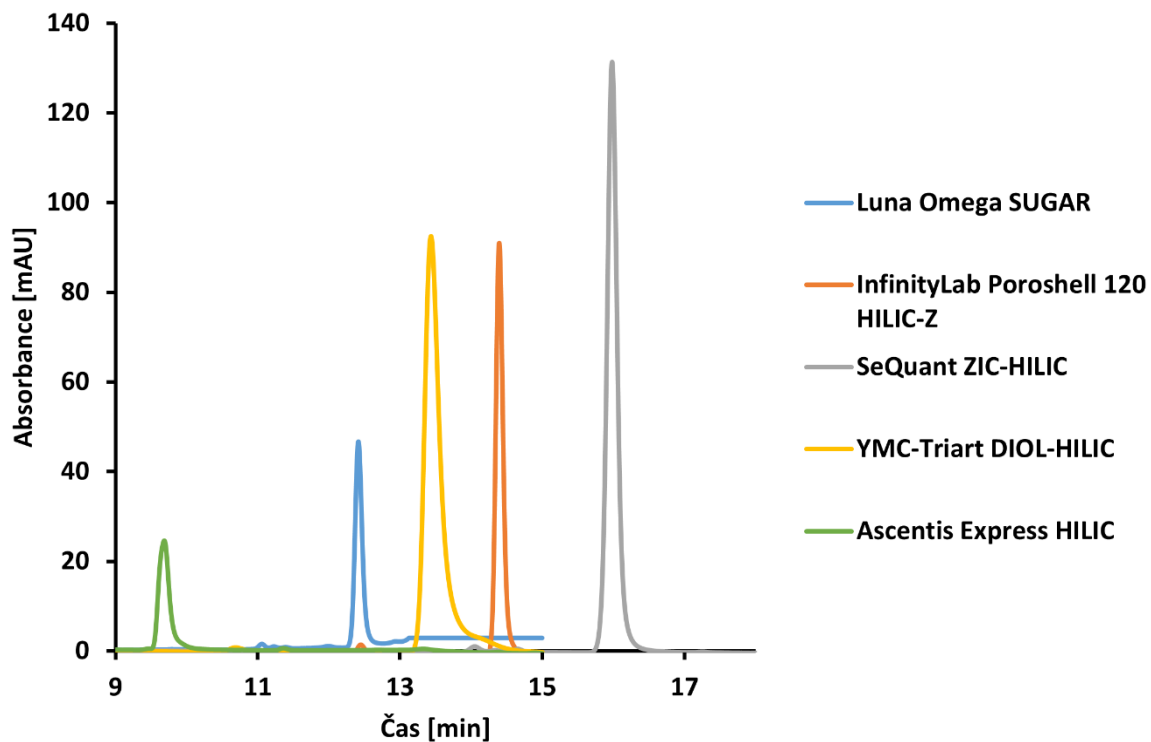
Průtok [ml/min]	V_D [ml]	t_D [min]	σ^2 [min]
0,5	0,90	1,81	0,004
0,4	0,87	2,17	0,009
0,2	0,77	3,85	0,045

4.2. Stanovení retenčního modelu v gradientové eluci dat

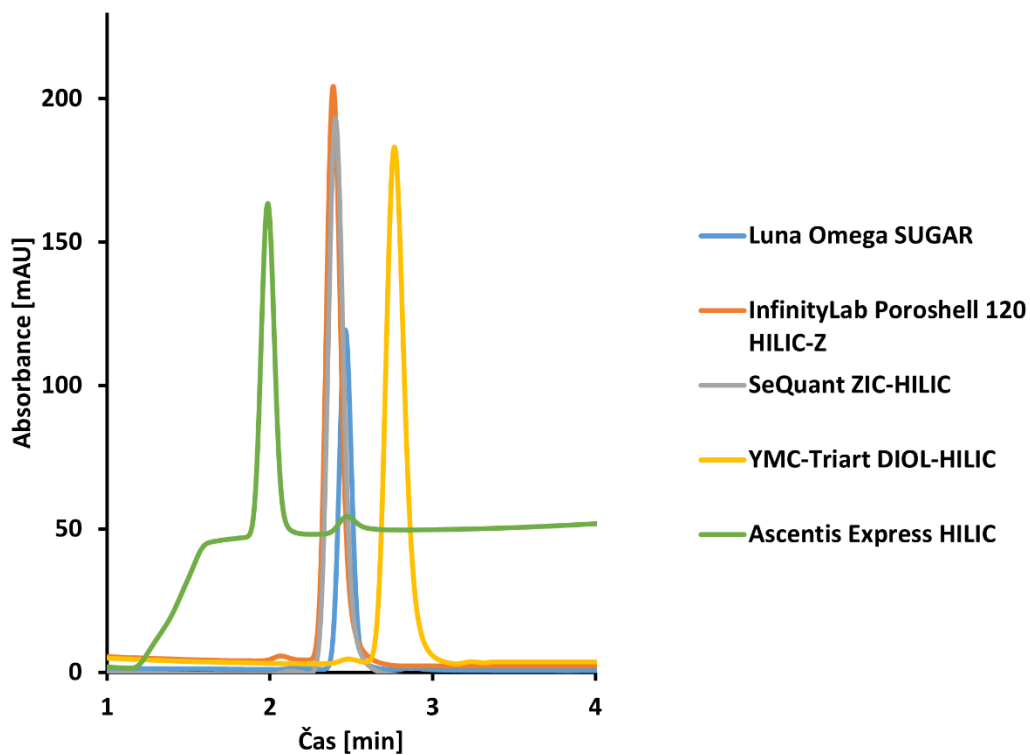
4.2.1. Retenční model s obsahem acetonitrilu

Pomocí gradientové eluce byly změřeny retenční charakteristiky ve třech gradientech s odlišnou strmostí v systému HILIC. Gradientová eluce se měřila na pěti kolonách a experimentální data (retenční časy, retenční objemy vypočtené podle rovnice (1)) jsou uvedeny v přílohách (příloha 1-5). Použité kolony byly porovnány z hlediska retence látek a dále selektivity separace, přičemž jako nejlepší byla vybrána ZIC-HILIC kolona, u které bylo zaznamenáno v rámci použitých gradientů nejlepší dělení standardů (nejvyšší rozlišení) a nejvyšší účinnost.

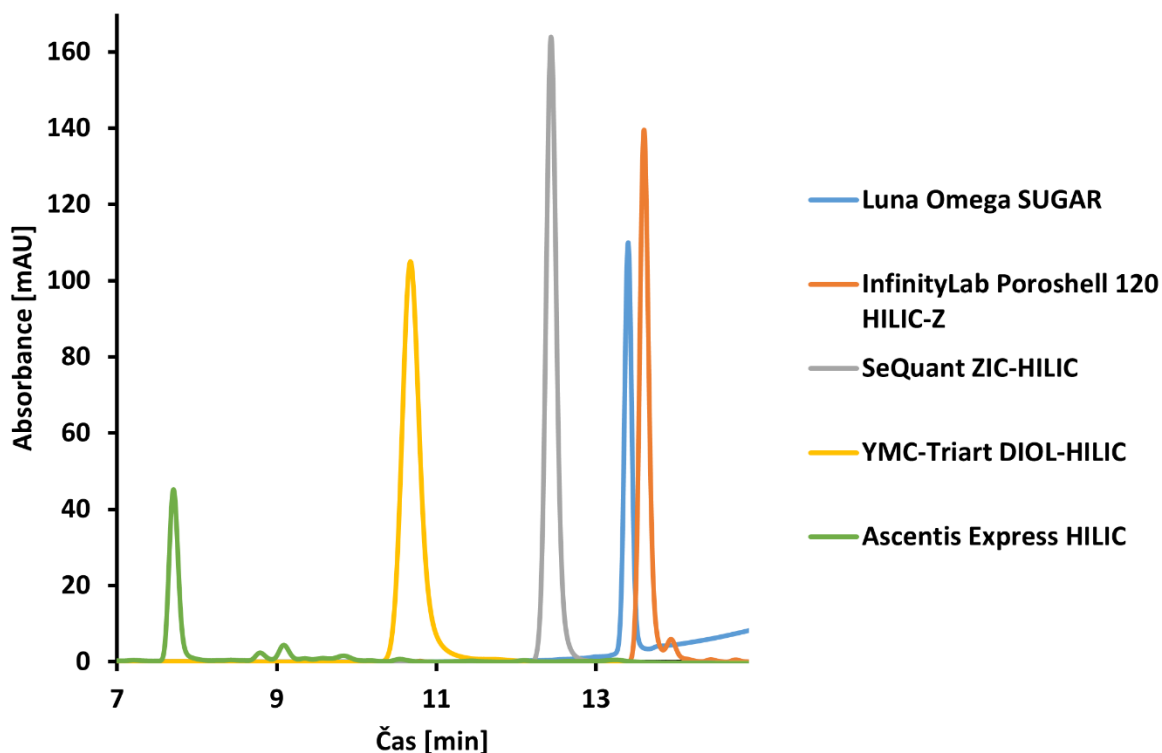
Na obrázku 21-23 lze vidět porovnání separace vybraných látek (guanosin, barbital a ftalazol) na všech pěti kolonách. Lze vidět, že ZIC-HILIC kolona je nejen vhodná pro separaci polárních sloučenin (jak u nukleových kyselin, tak i u sulfonamidů byla zaznamenána vysoká retence), ale také poskytuje nejméně chvostující píky z testované sady kolon. Díky své schopnosti zadržovat polární sloučeniny umožňuje efektivní separaci, což vede v důsledku k vyšší pravděpodobnosti rozdělení směsí analytů v reálných maticích a k lepším parametrům kvantitativní analýzy.



Obrázek 21: Separace guanosinu (profil gradientu: 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 15 min, 254 nm)



Obrázek 22: Separace barbitalu (profil gradientu: 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 15 min, 210 nm)

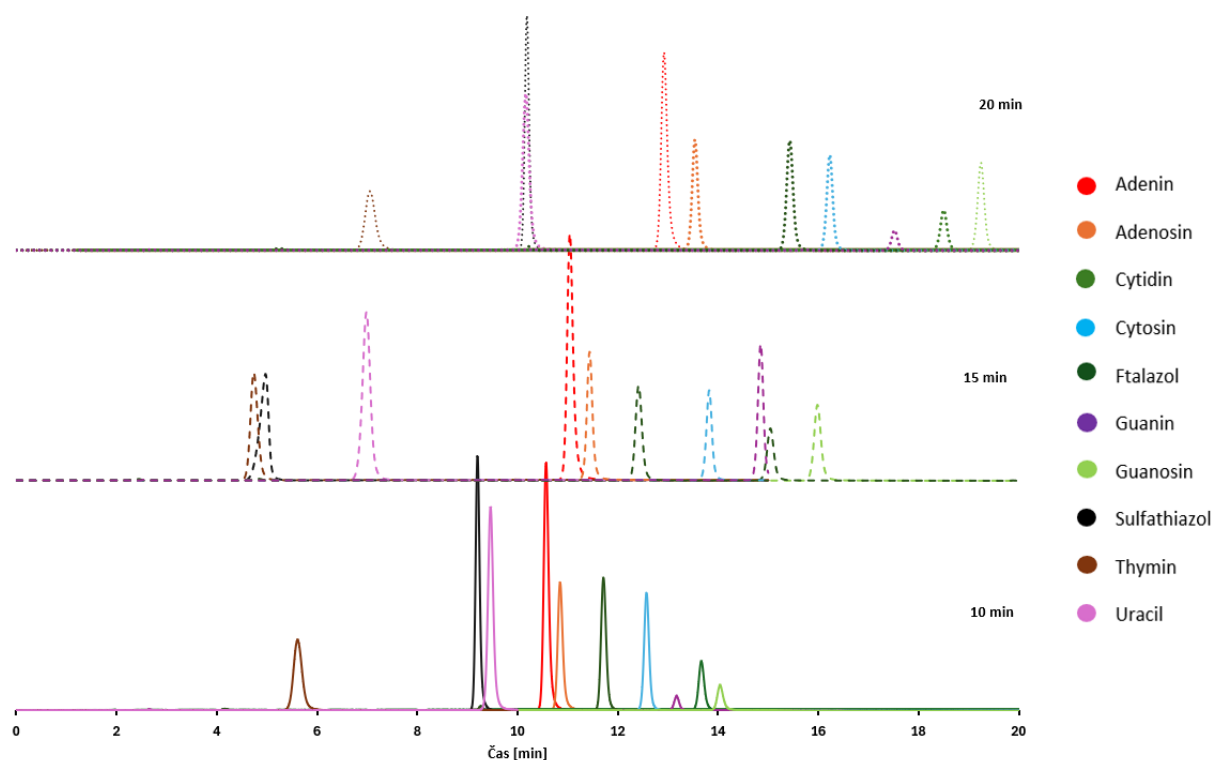


Obrázek 23: Separace ftalazolu (profil gradientu: 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 15 min, 284 nm)

Díky nejlepším výsledkům dosaženým na koloně ZIC-HILIC byla na této koloně následně proměřena série gradientů s různou strmostí, danou průběhem gradientu v časech 10, 15 a 20 minut. Porovnání profilů píku při jednotlivých strmostech gradientů je uvedeno na obrázku 24.

Na základě analýzy chromatografických dat lze na obrázku jednoznačně identifikovat ustálené pořadí eluce látek, které se nemění při různých časových gradientech. Během analýzy s využitím 10 minutového gradientu došlo pouze k částečné separaci sledovaných látek, přičemž v tomto časovém úseku (v době gradientu 10 min) stačily eluovat pouze thymín, sulfathiazol a uracil. Ostatní látky nebyly v tomto krátkém časovém intervalu efektivně eluovány z chromatografické kolony a proto bylo nutné pokračovat v průběhu gradientu se stejnou strmostí. Při 15 minutovém gradientu se projevilo, že některé látky, konkrétně cytidin a guanosin, dosahují eluce později než ostatní. Tato pozorovaná zpoždění naznačují, že jejich eluce je více závislá na specifických podmínkách gradientu. Během 20 minutového gradientu došlo k úspěšné separaci všech sledovaných látek s výjimkou uracilu a sulfathiazolu, které vykazovaly překrývání píků. To naznačuje, že při delším časovém gradientu nedochází k dostatečnému rozlišení těchto látek. Změna retenčního chování dvojice sulfathiazol/uracil

se změnou strmosti gradientu může být důsledkem nelineárního retenčního chování (tj. nelineárního izokratického retenčního modelu).



Obrázek 24: Gradientní průběh vybraných látek (profil gradientu: 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 10 min, 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 15 min, 100 – 70 % B (ACN) od 0 do 20 min, 210 nm, 254 nm, 284 nm)

Ze separace gradientovou elucí a z nastaveného průběhu gradientu byla dále vypočtena koncentrace MF v bodě eluce analyzovaných látek. Uvedená koncentrace by teoreticky měla odpovídat izokratickému složení MF, při které je dosaženo stejných retenčních charakteristik. Koncentrace v bodě eluce (ϕ_e) byla vypočítaná dle rovnice 2:

$$\phi_e = A - B \times (t_R - t_D) \quad (2)$$

kde: A – počáteční koncentrace, B – strmost gradientu, t_R – retenční čas látky, t_D – čas zpoždění.

Strmost byla vypočítaná podle rovnice 3:

$$B = \frac{\delta\phi}{\delta t} \quad (3)$$

kde: $\delta\phi$ – změna koncentrace v gradientu, δt – čas analýzy.

Vypočtené hodnoty koncentrace MF v bodě eluce jsou uvedeny v příloze 1 a 3. Na základě této koncentrace byly připraveny MF o stejném složení a byly realizovány izokratické experimenty s naměřením izokratických retenčních časů t_e na dvou kolonách a to ZIC-HILIC a Luna Omega SUGAR. Tyto časy byly následně porovnány s gradientovými retenčními časy. Retenční časy t_e určené pomocí izokratické eluce byly výrazně nižší než při gradientové eluci.

Dále byl na základě gradientových experimentů vytvořen izokratický retenční model. Protože nelze pouze na základě gradientových retenčních časů nebo objemů explicitně matematicky vyjádřit rovnice pro jednotlivé parametry izokratického retenčního modelu, a to ani v případě nejjednodušších lineárních modelů v souřadnicích $\log k$ vs. koncentrace silnější složky MF, bylo nutné k určení parametrů izokratického modelu využít iterační postup. Veškeré výpočty uvedené v následující části byly provedeny prostřednictvím programovacího jazyka Python 3.12.3, viz příloha 6. Skript pro výpočet v Pythonu byl vytvořen ve spolupráci s panem doc. Ing. Petrem Česlou, Ph.D., a byl následně aktivně využíván v diplomové práci. Hodnota V_R byla vypočtena podle následující rovnice 4 [126,127]:

$$V_R = \frac{1}{m \times B} \times \log_{10}(2,31 \times m \times B \times (V_M \times 10^{(a-m \times A)} - V_D) + 1)) + V_M + V_D \quad (4)$$

kde: V_R – retenční objem, a , m – parametry křivky, B – strmost gradientu, V_M – mrtvý objem, A – počáteční koncentrace, V_D – objem zpoždění.

Výše uvedená rovnice 4 popisuje retenční objem v gradientu se započítaným zpožděním pro případ lineárního průběhu gradientu a pro lineární izokratický retenční model v souřadnicích $\log k$ vs. ϕ , který je běžnější spíše pro systém s obrácenými fázemi.

Pro nalezení optimálních hodnot parametrů a a m bylo využito iteračního postupu, který probíhal ve 100 000 opakováních. V tabulce 3 jsou uvedeny konstantní hodnoty vstupních proměnných společných pro všechny látky. Proměnné B byly vypočítány dle rovnice 3.

Tabulka 3: Vstupní hodnoty proměnných

PROMĚNNÁ	HODNOTA
V_M	0,384 ml
V_D	0,435 ml
A	0,02
B1	0,15 ml ⁻¹
B2	0,1 ml ⁻¹
B3	0,075 ml ⁻¹

V tabulce 4 jsou zobrazeny optimální parametry a a m . Pro ověření, že retenční data splňují podmínku linearitu izokratického modelu byly stanovené parametry a a m použity k výpočtu retenčního faktoru v bodě eluce ϕ_e dle rovnice 5 a 6.

$$\ln(k) = a - m \times \phi_e \quad (5)$$

$$k = e^{\ln(k)} \quad (6)$$

kde: k – retenční faktor, a , m – parametry křivky, ϕ_e – koncentrace v bodě eluce.

Výpočet retenčního času byl proveden podle rovnice 7:

$$t_R = (k + 1) \times t_D \quad (7)$$

kde: t_R – retenční čas, k – retenční faktor, t_D – čas zpoždění.

Gradientní retenční čas byl vypočítán dle rovnice 8:

$$t_{Rg} = \frac{V_{Rg}}{F_m} \quad (8)$$

kde: t_{Rg} – gradientní retenční čas, V_{Rg} – gradientní retenční objem, F_m – objemový průtok MF.

Tabulka 4: Retenční model s obsahem acetonitrilu (a , m – vypočítané parametry rovnice 5, ϕ_e – koncentrace v bodě eluce vypočítaná z rovnice 2, $\ln(k)$, k – izokratický retenční faktor vypočítaný z rovnice 5 a 6 na základě parametrů a, m , t_R – izokratický retenční čas vypočítaný z rovnice 7 pro koncentraci v bodě eluce, t_{Rg1} - t_{Rg3} – gradientové retenční časy predikované pomocí rovnice 4 a 8 pro experimentálně proměřené profily gradientů, viz obrázek 24)

NÁZEV	a	m	ϕ_e	$\ln(k)$	k	t_R	t_{Rg1}	t_{Rg2}	t_{Rg3}
Adenin	0,690	0,215	0,85	0,508	1,66	11,58	10,90	11,01	11,07
Cytosin	0,810	0,190	0,79	0,660	1,93	12,76	13,62	13,82	13,92
Uracil	0,605	0,460	0,93	0,179	1,20	9,55	9,09	9,22	9,29
Guanin	0,850	0,210	0,77	0,688	1,99	13,01	14,58	14,84	14,98
Thymin	0,433	0,180	0,97	0,258	1,29	9,98	6,26	6,27	6,27
Adenosin	0,715	0,290	0,84	0,472	1,60	11,32	11,26	11,43	11,52
Cytidin	0,880	0,410	0,77	0,566	1,76	12,01	14,54	15,04	15,31
Guanosin	0,915	0,410	0,75	0,609	1,84	12,35	15,43	16,01	16,33
Barbital	-0,425	0,205	1,02	-0,634	0,53	6,66	2,61	2,62	2,62
Fenobarbital	-0,256	0,125	1,02	-0,383	0,68	7,32	2,96	2,96	2,96
Pentobarbital	-0,615	0,205	1,02	-0,825	0,44	6,26	2,35	2,36	2,37
Amobarbital	-0,640	0,190	1,02	-0,835	0,43	6,24	2,33	2,34	2,34
Hexobarbital	-0,799	0,205	1,03	-1,009	0,36	5,94	2,19	2,20	2,20
Sulfadimidin	-0,355	0,180	1,02	-0,538	0,58	6,89	2,74	2,75	2,70
Sulfanilamid	0,345	0,165	0,99	0,182	1,20	9,57	6,22	6,13	6,13
Ftalazol	0,770	0,380	0,82	0,459	1,58	11,23	12,14	12,42	12,57
Sulfaguanidin	0,655	0,230	0,86	0,457	1,58	11,22	10,22	10,32	10,37
Sulfathiazol	0,575	0,155	0,97	0,425	1,53	11,00	8,97	9,01	9,04

Na obrázku 25 je zobrazen gradientní průběh, který byl měřen při 15 minutách. Simulovaný graf, který je zobrazen nad ním, slouží jako modelová vizualizace očekávaného průběhu separace vybraných látek. Tato simulace umožňuje představit si, jak by měl gradientní průběh

ideálně vypadat. Simulovaný chromatogram byl vytvořen na základě parametrů izokratického modelu vypočtených iteračním postupem (parametry a, m) a uvedený výpočet je popsán v následujícím textu.

Hodnoty parametru a a m , stejně jako $t_{Rg1} - t_{Rg3}$, získané z tabulky 4, byly klíčové pro další výpočty, které nám umožnily sestavit simulovaný graf. Z těchto hodnot byla vypočítána koncentrace v bodě eluce (ϕ_e), dle rovnice 9:

$$\phi_e = A + B \times (t_{Rg} - t_D) \quad (9)$$

kde: A – počáteční koncentrace, B – strmost gradientu, t_{Rg} – gradientní retenční čas látky, t_D – čas zpoždění.

Následně pomocí rovnice 10 a 11, byl vypočítán retenční faktor k_e :

$$\log(k_e) = a - m \times \phi_e \quad (10)$$

$$k_e = 10^{\log(k_e)} \quad (11)$$

kde: k_e – retenční faktor, a, m – parametry křivky, ϕ_e – koncentrace v bodě eluce.

Pro výpočet teoretického patra N , rovnice 12, byl využit acenaften, který sloužil jako mrtvý retenční čas:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_M}{w}\right)^2 \quad (12)$$

kde: N – počet teoretických pater, t_M – mrtvý čas kolony, w – šířka píku při základně.

Následně byla vypočítána šířka píku pro jednotlivé látky, dle rovnice 13 a 14:

$$w_g = \frac{4 \times t_M}{\sqrt{N}} \times (1 + k_e) \quad (13)$$

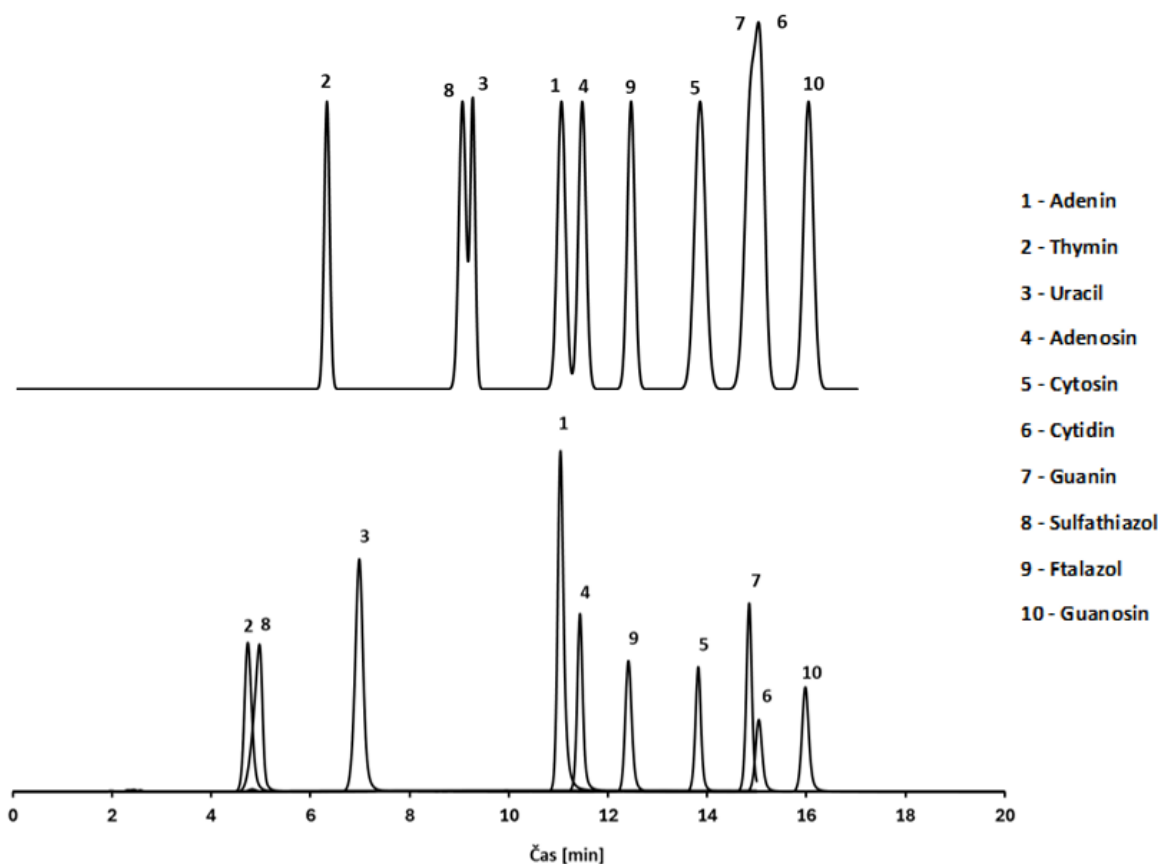
$$w_g = 4 \times \sigma_t \quad (14)$$

kde: w_g – šířka píku v gradientu při jeho základně, t_M – mrtvý čas kolony, k_e – retenční faktor v bodě eluce.

Směrodatná odchylka byla vypočítána dle rovnice 15:

$$\sigma_t = \frac{w_g}{4} \quad (15)$$

kde: σ_t – směrodatná odchylka eluční zóny, která má Gaussovský průběh, w_g – šířka píku v gradientu při jeho základně.



Obrázek 25: Gradientní a simulovaný průběh, strmost gradientu $0,1 \text{ ml}^{-1}$

Z porovnání simulovaného gradientu, uvedeného na obrázku 25, a experimentálně naměřeného chromatogramu je zjevné, že použití izokratického retenčního modelu v souřadnicích $\ln(k) = f(\phi)$ není zcela korektní. Uvedený model umožňuje přesnou predikci retenčních dat polárnějších látek (látky 1, 4-7, 9, 10), ale pro látky méně polární (a tedy s nízkou retencí) je správně určeno eluční pořadí, ale retenční časy jsou nadhodnocené. Z tohoto důvodu byl dále otestován druhý izokratický retenční model, který reflektuje chování v systému s normálními fázemi a zobrazuje retenci v souřadnicích $\ln(k) = f(\ln(\phi))$.

Následující výpočty byly prováděny pomocí programovacího jazyka Python 3.12.3, viz příloha 7. Hodnota V_R byly vypočtena podle následující rovnice 16 [126,128]:

$$V_R = \frac{1}{B} \times [(m + 1) \times B \times (k_0 \times V_M - V_D \times A^m) + A^{(m+1)}] \frac{1}{1+m} - \frac{A}{B} + V_M + V_D \quad (16)$$

kde: V_R – retenční objem, k_0 , m – parametry křivky, B – strmost gradientu, V_M – mrtvý objem, A – počáteční koncentrace, V_D – objem zpoždění.

Pro nalezení optimálních hodnot parametrů k_0 a m byl použit iterativní přístup, který proběhl v 100 000 opakováních. Vstupní hodnoty byly stejné jako v tabulce 3. Proměnné B byly vypočítány podle rovnice 3.

V tabulce 5 jsou zobrazeny optimální parametry k_0 a m , které byly použity pro výpočet retenčního faktoru k dle rovnice 17 a 18.

$$\log(k) = \log(k_0) - m \times \log(\phi_e) \quad (17)$$

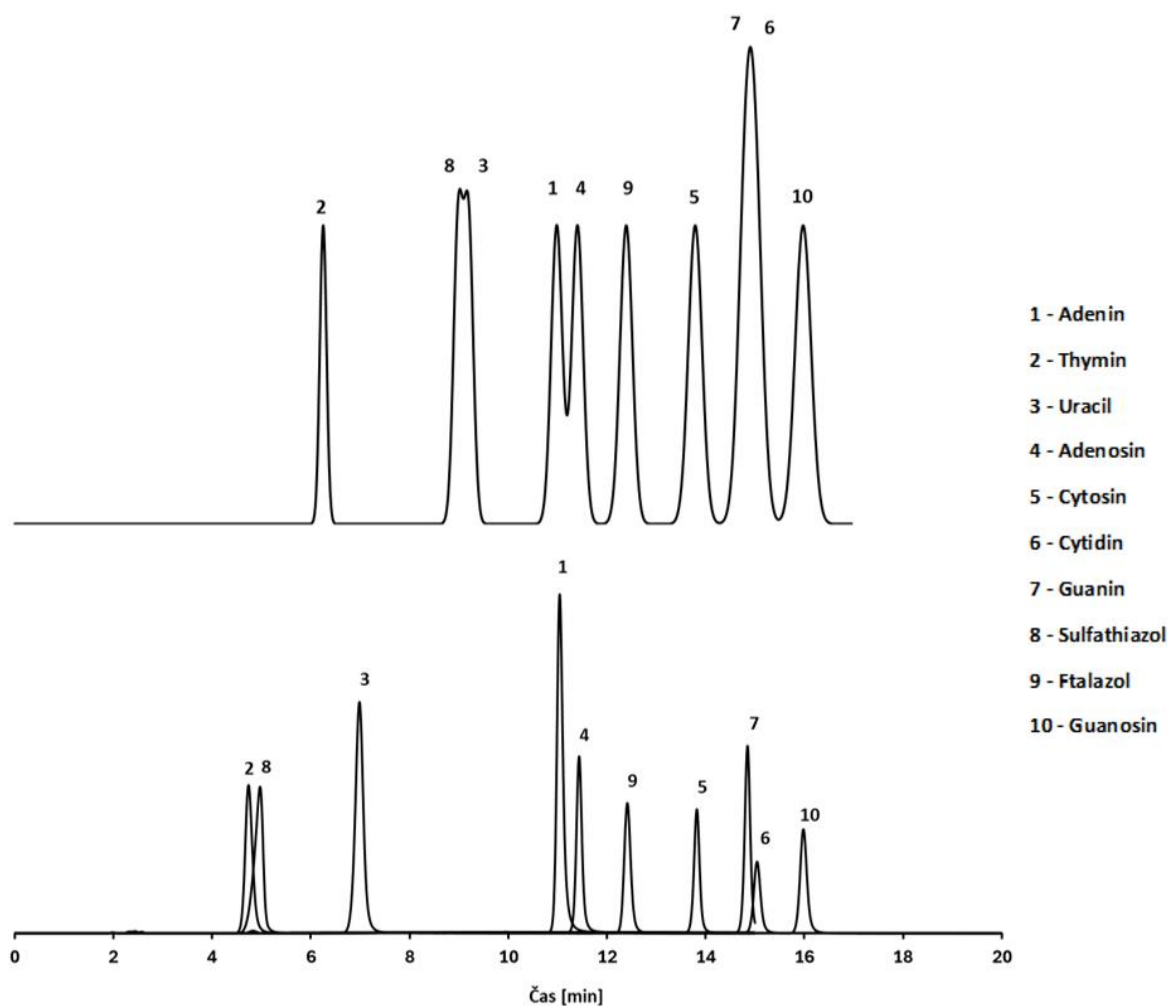
$$k = 10^{\log(k)} \quad (18)$$

kde: k – retenční faktor, k_0 , m – parametry křivky, ϕ_e – koncentrace v bodě eluce.

Tabulka 5: Retenční model s obsahem acetonitrilu (k_0 , m – vypočítané parametry rovnice 5, ϕ_e – koncentrace acetonitrilu v bodě eluce vypočítaná z rovnice 2, $\log(k)$, k – izokratický retenční faktor vypočítaný z rovnice 17 a 18 na základě parametrů k_0 , m , t_R – izokratický retenční čas vypočítaný z rovnice 7 pro koncentraci v bodě eluce, t_{Rg1} - t_{Rg3} – gradientové retenční časy predikované pomocí rovnice 16 a 8 pro experimentálně proměřené profily gradientů, viz obrázek 24)

NÁZEV	k_0	m	ϕ_e	$\log(k)$	k	t_R	t_{Rg1}	t_{Rg2}	t_{Rg3}
Adenin	2,725	0,200	0,85	0,508	1,66	11,58	10,90	11,01	11,07
Cytosin	3,740	0,200	0,79	0,660	1,93	12,76	13,62	13,82	13,92
Uracil	2,109	0,200	0,93	0,179	1,20	9,55	9,09	9,22	9,29
Guanin	4,140	0,200	0,77	0,688	1,99	13,01	14,58	14,84	14,98
Thymin	1,130	0,200	0,97	0,258	1,29	9,98	6,26	6,27	6,27
Adenosin	2,850	0,200	0,84	0,472	1,60	11,32	11,26	11,43	11,52
Cytidin	4,215	0,200	0,77	0,566	1,76	12,01	14,54	15,04	15,31
Guanosin	4,595	0,200	0,75	0,609	1,84	12,35	15,43	16,01	16,33
Barbital	0,255	0,200	1,02	-0,634	0,53	6,66	2,61	2,62	2,62
Fenobarbital	0,500	0,020	1,02	-0,383	0,68	7,32	2,96	2,96	2,96
Pentobarbital	0,225	-9,88E-17	1,02	-0,825	0,44	6,26	2,35	2,36	2,37
Amobarbital	0,215	-9,88E-17	1,02	-0,835	0,43	6,24	2,33	2,34	2,34
Hexobarbital	0,140	-9,88E-17	1,03	-1,009	0,36	5,94	2,19	2,20	2,20
Sulfadimidin	0,260	0,195	1,02	-0,538	0,58	6,89	2,74	2,75	2,70
Sulfanilamid	1,090	0,200	0,99	0,182	1,20	9,57	6,22	6,13	6,13
Ftalazol	3,210	0,200	0,82	0,459	1,58	11,23	12,14	12,42	12,57
Sulfaguanidin	2,501	0,200	0,86	0,457	1,58	11,22	10,22	10,32	10,37
Sulfathiazol	2,065	0,200	0,97	0,425	1,53	11,00	8,97	9,01	9,04

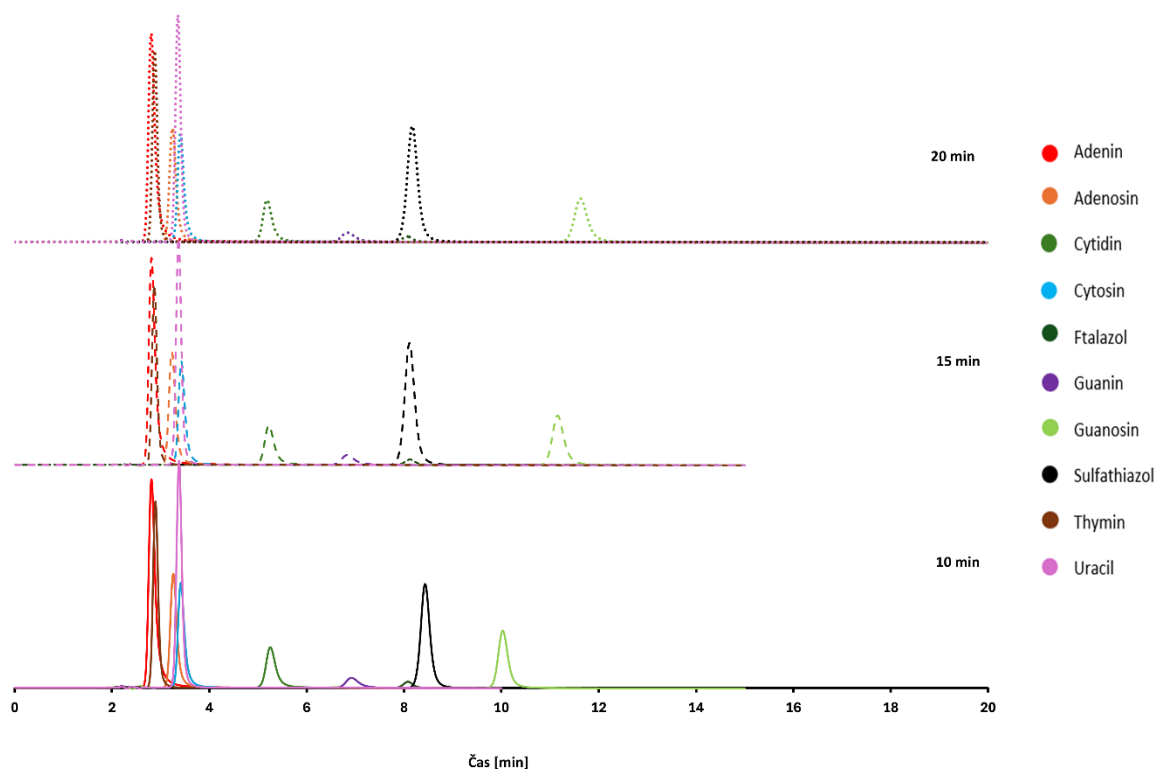
V porovnání mezi simulovaným gradientem, který je zobrazen na obrázku 26 a experimentálně získaným chromatogramem je zřejmé, že použití izokratického retenčního modelu $\ln(k) = f(\Phi)$ není úplně přesné. Tento model dobře předpovídá retenční chování pro látky s vyšší polaritou (například látky 1, 4-7, 9, 10), ale pro látky s nižší polaritou (a tedy s nižší retencí) určuje správně pořadí eluce, avšak retenční časy jsou nadhodnocené.



Obrázek 26: Simulovaný a gradientní průběh, strmost gradientu $0,1 \text{ ml}^{-1}$

4.2.2. Retenční model s obsahem methanolu

Protože cílem práce bylo prostudovat vlivy tříložkové MF kombinující acetonitril, methanol a vodnou fázi na retenci polárních látek, byly provedeny také experimenty s MF s obsahem methanolu. Na obrázku 27 je znázorněn gradientní průběh nejlépe separovaných látek při čase gradientu 10, 15 a 20 minut (stejný průběh gradientu jako u acetonitrilu).



Obrázek 27: Gradientní průběh vybraných látek (profil gradientu: 100 – 70 % C (MeOH) od 0 do 10 min, 100 – 70 % C (MeOH) od 0 do 15 min, 100 – 70 % C (MeOH) od 0 do 20 min, 210 nm, 254 nm, 284 nm)

Z porovnání průběhu gradientové separace polárních látek v MF s methanolem je evidentní, že při použití methanolu je retence látek výrazně nižší než v případě MF s obsahem acetonitrilu. Uvedený jev může být připsán rozdílu v obou rozpouštědlech, kdy acetonitril představuje aprotické rozpouštědlo, zatímco methanol je svými vlastnostmi bližší polárnější vodné složce MF (methanol i voda jsou protická rozpouštědla). Další významný efekt použití methanolu je prakticky téměř nezávislá retence látek na použitém profilu gradientu. Na druhou stranu je dosažená selektivita separace odlišná od separací v MF s obsahem acetonitrilu (viz obrázek 24).

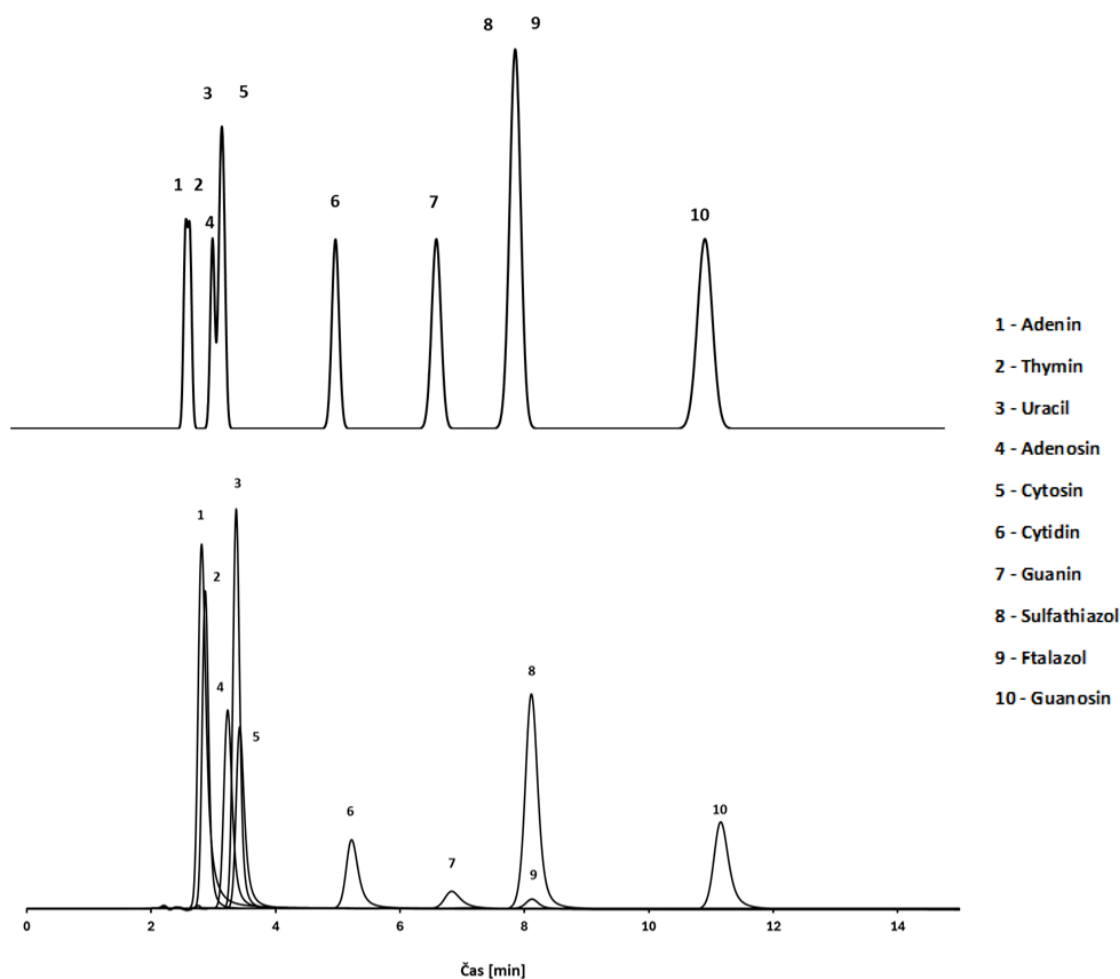
Retenční model s obsahem methanolu, viz tabulka 6 byl vypočten za stejných vstupních hodnot jako u modelu s obsahem acetonitrilu, pouze hodnota V_M byla 0,415 ml.

Tabulka 6: Retenční model s obsahem methanolu (a , m – vypočítané parametry rovnice 5, ϕ_e – koncentrace methanolu v bodě eluce vypočítaná z rovnice 2, $\ln(k)$, k – izokratický retenční faktor vypočítaný z rovnice 5 a 6 na základě parametrů a, m , t_R – izokratický retenční čas vypočítaný z rovnice 7 pro koncentraci v bodě eluce, t_{Rg1} - t_{Rg3} – gradientové retenční časy predikované pomocí rovnice 4 a 8 pro experimentálně proměřené profily gradientů, viz obrázek 27)

NÁZEV	a	m	ϕ_e	$\ln(k)$	k	t_R	t_{Rg1}	t_{Rg2}	t_{Rg3}
Adenin	-0,439	0,235	1,01	-0,677	0,51	6,561	2,80	2,81	2,81
Cytosin	-0,185	0,155	1,00	-0,340	0,71	7,447	3,42	3,42	3,42
Uracil	-0,199	0,220	1,00	-0,419	0,66	7,211	3,37	3,37	3,37
Guanin	0,370	0,305	0,93	0,086	1,09	9,092	6,81	6,84	6,85
Thymin	-0,405	0,159	1,01	-0,566	0,57	6,821	2,87	2,88	2,88
Adenosin	-0,245	0,180	1,00	-0,425	0,65	7,193	3,24	3,24	3,24
Cytidin	0,185	0,250	0,96	-0,056	0,95	8,464	5,21	5,22	5,22
Guanosin	0,655	0,210	0,84	0,478	1,61	11,364	11,04	11,15	11,21
Barbital	-0,885	0,200	1,02	-1,089	0,34	5,814	2,31	2,32	2,33
Fenobarbital	-0,469	0,225	1,01	-0,697	0,50	6,517	2,75	2,76	2,76
Pentobarbital	-1,485	0,200	1,02	-1,690	0,18	5,153	2,11	2,12	2,12
Amobarbital	-1,565	0,185	1,02	-1,755	0,17	5,102	2,10	2,11	2,11
Hexobarbital	-1,305	0,205	1,02	-1,515	0,22	5,306	2,14	2,15	2,16
Sulfadimidin	-0,315	0,210	1,01	-0,526	0,59	6,920	3,06	3,06	3,06
Sulfanilamid	0,475	0,145	0,90	0,344	1,41	10,486	8,17	8,19	8,21
Ftalazol	0,470	0,155	0,90	0,330	1,39	10,399	8,08	8,11	8,12
Sulfaguanidin	0,725	0,190	0,81	0,571	1,77	12,046	12,56	12,71	12,79
Sulfathiazol	0,470	0,180	0,91	0,307	1,36	10,264	8,07	8,10	8,12

Na obrázku 28 jsou prezentovány výsledky měření gradientního průběhu, který byl měřen po dobu 15 minut. Nad tímto grafem je zobrazena simulace očekávaného průběhu separace na vybraných látkách.

Srovnání mezi simulovaným gradientem a výsledky z experimentálně naměřeného chromatogramu jednoznačně naznačuje, že použití izokratického retenčního modelu $\ln(k) = f(\Phi)$ poskytuje na rozdíl od acetonitrilu zcela přesná data.



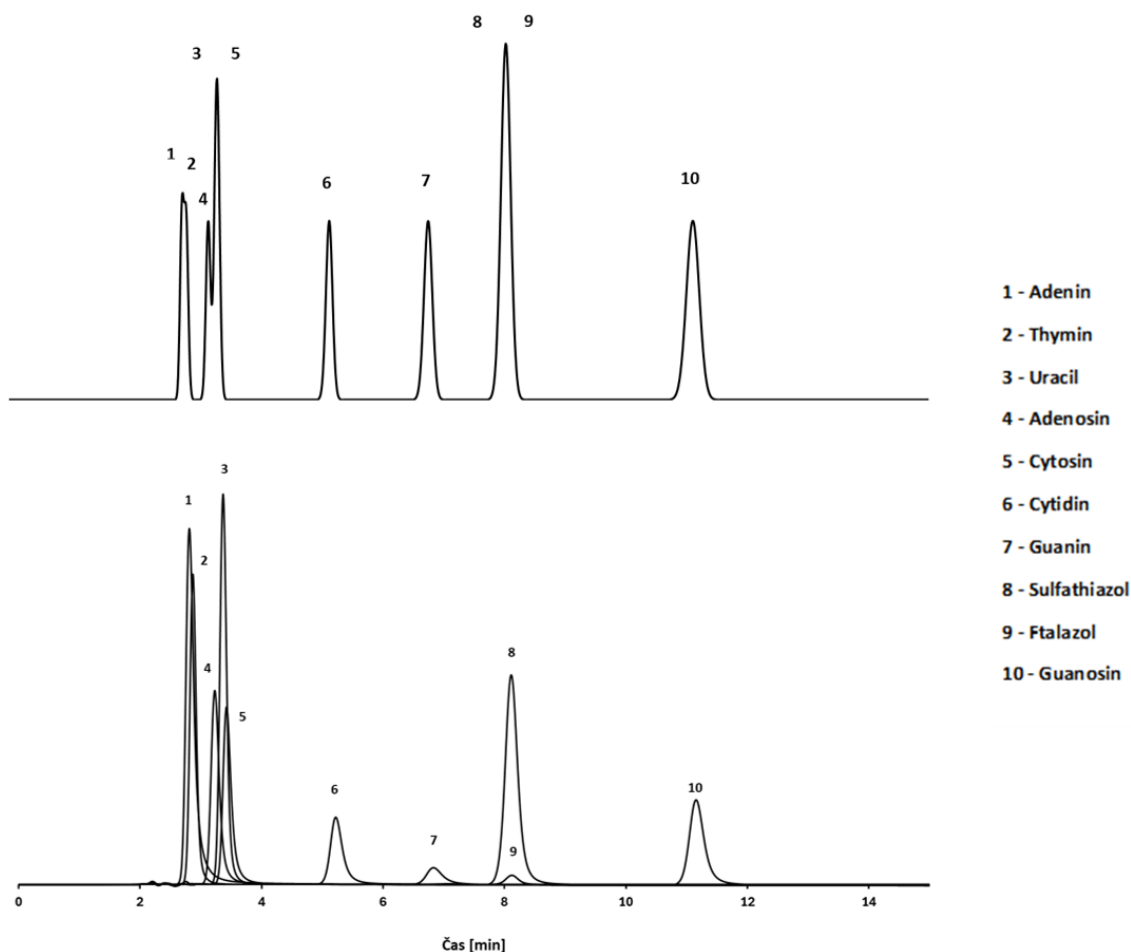
Obrázek 28: Simulovaný a gradientní průběh, strmost gradientu $0,1 \text{ ml}^{-1}$

Protože byl u izokratického retenčního modelu s obsahem acetonitrilu otestován i druhý izokratický retenční model, který reflektuje chování v systému s normálními fázemi a zobrazuje retenci v souřadnicích $\ln(k) = f(\ln(\Phi))$, byl proto proveden tento výpočet i s obsahem methanolu.

Tabulka 7: Retenční model s obsahem methanolu (k_0 , m – vypočítané parametry rovnice 5, ϕ_e – koncentrace methanolu v bodě eluce vypočítaná z rovnice 2, $\log(k)$, k – izokratický retenční faktor vypočítaný z rovnice 17 a 18 na základě parametrů k_0 , m , t_R – izokratický retenční čas vypočítaný z rovnice 7 pro koncentraci v bodě eluce, t_{Rg1} - t_{Rg3} – gradientové retenční časy predikované pomocí rovnice 16 a 8 pro experimentálně proměřené profily gradientů viz obrázek 27)

NÁZEV	k_0	m	ϕ_e	$\log(k)$	k	t_R	t_{Rg1}	t_{Rg2}	t_{Rg3}
Adenin	0,355	9,88E-17	1,01	-0,450	0,355	5,894	2,810	2,815	2,815
Cytosin	0,315	0,200	1,00	-0,502	0,315	5,721	3,345	3,405	3,445
Uracil	0,301	0,200	1,00	-0,521	0,301	5,659	3,325	3,370	3,420
Guanin	1,145	0,200	0,93	0,065	1,162	9,403	6,730	6,835	6,900
Thymin	0,230	0,200	1,01	-0,639	0,230	5,349	2,990	2,885	2,875
Adenosin	0,295	0,200	1,00	-0,530	0,295	5,633	3,255	3,245	3,335
Cytidin	0,701	0,200	0,96	-0,151	0,706	7,423	5,195	5,220	5,235
Guanosin	2,489	0,200	0,84	0,411	2,575	15,551	10,800	11,155	11,400
Barbital	0,115	9,88E-17	1,02	-0,939	0,115	4,850	2,315	2,315	2,315
Fenobarbital	0,325	9,88E-17	1,01	-0,488	0,325	5,764	2,750	2,750	2,750
Pentobarbital	0,020	9,88E-17	1,02	-1,699	0,020	4,437	2,115	2,115	2,115
Amobarbital	0,015	9,88E-17	1,02	-1,824	0,015	4,415	2,105	2,105	2,105
Hexobarbital	0,039	9,88E-17	1,02	-1,409	0,039	4,520	2,160	2,160	2,160
Sulfadimidin	0,255	0,190	1,01	-0,594	0,255	5,458	3,050	2,615	3,030
Sulfanilamid	1,545	0,200	0,90	0,198	1,577	11,209	8,015	8,195	8,315
Ftalazol	1,520	0,200	0,90	0,191	1,551	11,096	7,935	8,110	8,230
Sulfaguanidin	3,015	0,200	0,81	0,497	3,143	18,020	12,250	12,700	13,020
Sulfathiazol	1,515	0,200	0,91	0,189	1,546	11,073	7,920	8,095	8,205

Samotné porovnání mezi simulovaným gradientem a výsledky z experimentálně naměřeného chromatogramu, který je znázorněn na obrázku 29, jednoznačně ukazuje, že použití izokratického retenčního modelu $\ln(k)$ jako funkce (ϕ) poskytuje také přesné predikce retenčních dat.



Obrázek 29: Simulovaný a gradientní průběh, strmost gradientu $0,1 \text{ ml}^{-1}$

4.3. Analýza standardů pomocí ternárních MF

Na chromatografu Agilent 1260 Infinity II s DAD detekcí (kap. 3.2.1.) byly provedeny testy analýz standardních látek s použitím gradientové eluce na koloně vybrané na základě gradientových dat s acetonitrilem v MF (ZIC-HILIC), viz příloha 8. Pro gradientovou eluci byla vybrána kolona, na které byly naměřeny nejvyšší retenční faktory během gradientových analýz a zároveň nedocházelo k eluci před, nebo s mrtvým objemem. Analytické experimenty probíhaly v režimu gradientové eluce a konkrétní profily gradientů jsou uvedeny v tabulce 8-12. Profily gradientů byly voleny tak, aby byla celková změna koncentrace organických

rozpouštědel vždy konstantní pro danou sadu gradientů (gradient 1-3 = změna na 70 % organického rozpouštědla, gradient 4 a 5 = změna na 60 % organického rozpouštědla). Použité profily gradientů, popsané v tabulkách 8-12, byly dále navrženy tak, aby začínaly se 100% acetonitrem a lišily se tedy v poměru koncových koncentrací acetonitril/methanol. Pro každou gradientovou eluci byl zachován čas analýzy 15 minut s post-time 10 minut.

Tabulka 8: Gradient číslo 1

Čas (min)	Roztok pufru (%, v/v)	Acetonitril (%, v/v)	Methanol (%, v/v)
0	0	100	0
15	30	70	0
Post-time		10 min	

Tabulka 9: Gradient číslo 2

Čas (min)	Roztok pufru (%, v/v)	Acetonitril (%, v/v)	Methanol (%, v/v)
0	0	100	0
15	30	40	30
Post-time		10 min	

Tabulka 10: Gradient číslo 3

Čas (min)	Roztok pufru (%, v/v)	Acetonitril (%, v/v)	Methanol (%, v/v)
0	0	100	0
15	30	55	15
Post-time		10 min	

Tabulka 11: Gradient číslo 4

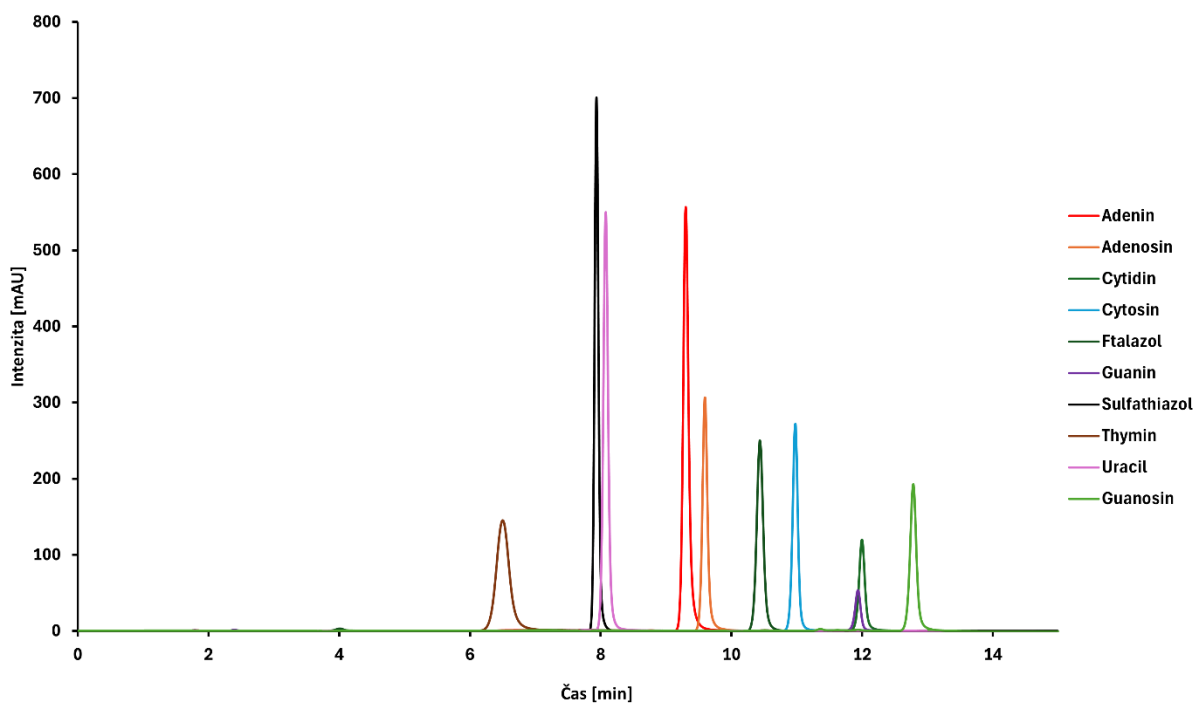
Čas (min)	Roztok pufru (%, v/v)	Acetonitril (%, v/v)	Methanol (%, v/v)
0	0	100	0
15	40	47	13
Post-time		10 min	

Tabulka 12: Gradient číslo 5

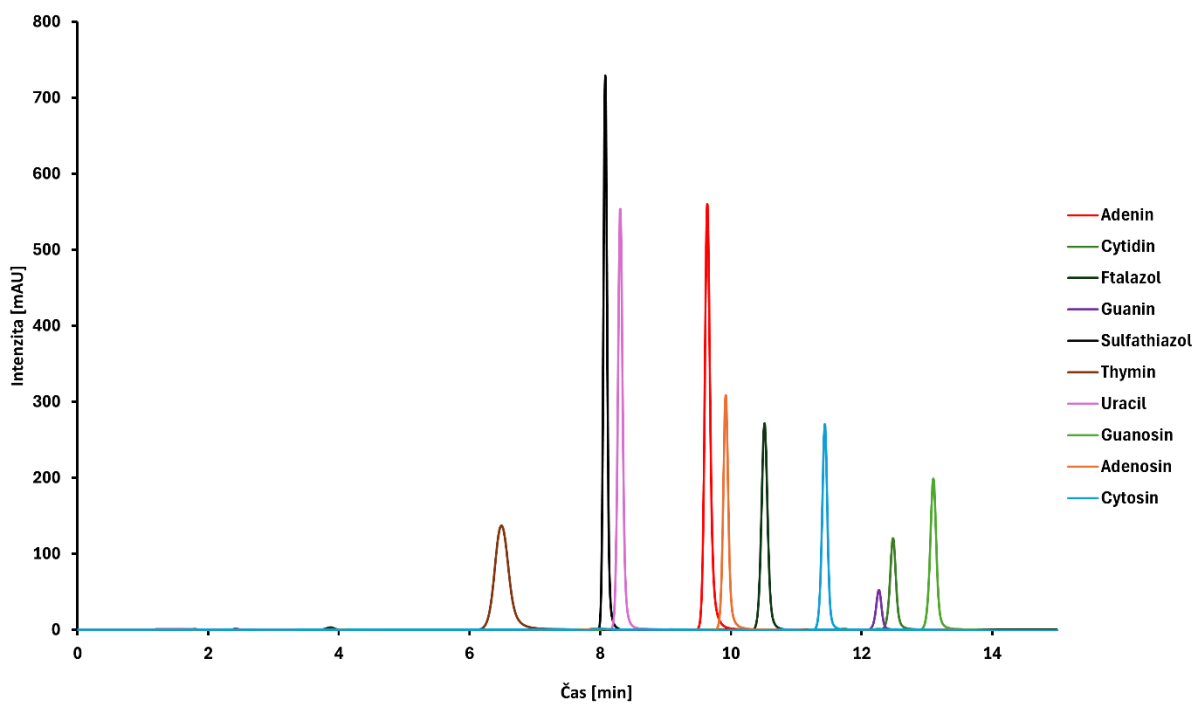
Čas (min)	Roztok pufru (%, v/v)	Acetonitril (%, v/v)	Methanol (%, v/v)
0	0	100	0
15	40	35	25
Post-time		10 min	

Na obrázku 30 a 31 je jako příklad porovnání různé kombinace acetonitril/methanol zobrazena separace vybraných látek pomocí gradientního profilu číslo 4 a 5.

Na obrázku 30 je patrné, že sulfathiazol a uracil vzájemně koelují, avšak guanin a cytidin prakticky nejsou v tomto gradientu odděleny. Na obrázku 31 je vidět, že se všechny látky úspěšně rozdělily. Retenční časy zůstávají mezi gradientními profily 4 a 5 téměř neměnné, ovšem pro některé dvojice látek dochází ke změně selektivity. Při použití gradientního profilu 4 jsou píky ftalazolu a cytosinu mnohem blíže u sebe než u gradientního profilu 5 (nižší rozlišení). Přidáním methanolu lze tedy upravit selektivitu pomocí parametrů gradientu. Pro detailnější popis by však bylo vhodné vypracovat matematický model pro tříložkový systém. Tato úprava by také následně vyžadovala další podrobné experimenty. Nicméně, tato další studie přesahuje rozsah diplomové práce.



Obrázek 30: Gradientní průběh číslo 4, strmost gradientu $0,1 \text{ ml}^{-1}$



Obrázek 31: Gradientní průběh číslo 5, strmost gradientu $0,1 \text{ ml}^{-1}$

5. ZÁVĚR

Závěr této práce jasně ilustruje význam gradientového zpoždění v chromatografii jako klíčového faktoru ovlivňujícího úspěšnost separace analytů. Experimenty provedené na kapalinovém chromatografu podtrhly důležitost správného určení tohoto parametru pro dosažení optimálních výsledků analýzy. Získaná data naznačují, že délka gradientu má zásadní vliv na efektivitu separace, přičemž delší gradienty poskytují lepší rozlišení mezi analyty.

Podrobná analýza experimentů na různých kolonách potvrdila, že ZIC-HILIC kolona je nejvhodnější pro separaci polárních sloučenin díky své schopnosti zadržovat tyto látky a poskytovat tak vyšší účinnost separace. Následné experimenty s různými strmostmi gradientů na této koloně prokázaly, že délka gradientu má vliv na pořadí eluce látek. Kratší gradienty vedly k nedostatečné separaci analytů, zatímco delší gradienty poskytovaly lepší rozlišení mezi látkami.

Retenční data byla zpracována pomocí dvou izokratických modelů iteračním postupem. Na základě stanovených parametrů byly predikovány výsledky gradientové separace, přičemž se ukázalo, že v MF s acetonitrilem hraje významnější roli použitý model.

Byly otestovány tříložkové gradienty MF, které potvrdily možnost využít kombinaci acetonitrilu a methanolu v gradientu pro cílené nastavení selektivity separace.

Celkově lze tedy konstatovat, že poznatky z této práce mají dopad na vývoj gradientových metod v chromatografii a poskytují užitečné informace pro optimalizaci analytických procesů, zejména při práci s polárními sloučeninami. Pro vypracování modelu separace v tříložkovém systému však bude potřeba další experimentální práce přesahující rámec této diplomové práce, která však pro tyto studie může poskytnout významný základ.

6. LITERATURA

- [1] ROBERTS, R. J. "nucleic acid". *Encyclopedia Britannica*, **2024**.
- [2] ANFOSSI, G., RUSSO, I., MASSUCCO, P., MATTIELLO, L., CAVALOT, F., BALBO, A., TROVATI, M. Adenosine increases human platelet levels of 3', 5'-cGMP through nitric oxide: Possible role in its antiaggregating effect. *Thrombosis Research*, **2002**, 105 (1), str. 71-78.
- [3] GUO, S., DUAN, J. A., QIAN, D., WANG, H., TANG, Y., QIAN, Y., SHANG, E. Hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry for determination of nucleotides, nucleosides and nucleobases in Ziziphus plants. *Journal of Chromatography A*, **2013**, 1301, str. 147-155.
- [4] KULKARNI, J. A., WITZIGMANN, D., THOMSON, S. B., CHEN, S., LEAVITT, B. R., CULLIS, P. R., VAN DER MEEL, R. The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nature nanotechnology*, **2021**, 16 (6), str. 630-643.
- [5] HUNTER, P. Nucleic acid-based nanotechnology: The ability of DNA and RNA to fold into precise and complex shapes can be exploited for applications both in biology and electronics. *EMBO reports*, **2018**, 19 (1), str. 13-17.
- [6] KUMAR KULABHUSAN, P., HUSSAIN, B., YÜCE, M. Current perspectives on aptamers as diagnostic tools and therapeutic agents. *Pharmaceutics*, **2020**, 12 (7), str. 646.
- [7] XU, F., XIA, Q., WANG, P. Rationally designed DNA nanostructures for drug delivery. *Frontiers in Chemistry*, **2020**, 8, str. 751.
- [8] MINCHIN, S., LODGE, J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem.* **2019**;63 (4), str. 433-456.
- [9] Messenger RNA (mRNA). *National Human Genome Research Institute*.
- [10] Overview of ribosomal RNA (rRNA). *CD Genomics*.
- [11] Transfer RNA (tRNA). *National Human Genome Research Institute*.
- [12] CALLAHAN, M. P., SMITH, K. E., CLEAVES, H. J., RUZICKA, J. STERN, J. C., GLAVIN, D. P., HOUSE, CH. H., DWORKIN, J. P. Carbonaceous meteorites contain a wide range of extraterrestrial nucleobases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2011**, 108 (34), str. 13995-13998.

- [13] RODWELL, V. W., BENDER, D., BOTHAM, K. M. *Harper's illustrated biochemistry*. McGraw-Hill, **2018**.
- [14] OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R., BOBKOVÁ, K. *Základy biologie a genetiky člověka*. Charles University in Prague, Karolinum Press, **2021**.
- [15] GARCÍA-GÓMEZ, D.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2013**, 47, str. 111-128.
- [16] Nucleosides: structure, metabolism, functions, and analytical techniques. *Creative Proteomics*.
- [17] Nucleotide. *National Human Genome Research Institute*.
- [18] HENDERSON, J. F., PATERSON, A. R. P. Nucleotide metabolism: an introduction. *Academic Press*, **2014**.
- [19] VAN BUREN, CH. T., RUDOLPH, F. Dietary nucleotides: a conditional requirement. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **1997**, 13 (5), str. 470-472.
- [20] DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J., MATEOS-VIVAS, M., RODRÍGUEZ-GONZALO, E., GARCÍA-GÓMEZ, D., BUSTAMANTE-RANGEL, M., ZAMARREÑO, M. D., CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Determination of nucleosides and nucleotides in food samples by using liquid chromatography and capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2017**, 92, str. 12-31.
- [21] NEWBY, A. C. Adenosine and the concept of 'retaliatory metabolites'. *Trends in Biochemical Sciences*, **1984**, 9 (2), str. 42-44
- [22] BELARDINELLI, L., SHRYOCK, J. C. Does adenosine function as a retaliatory metabolite in the heart? *Physiology*, **1992**, 7 (2), str. 52-56.
- [23] BRUNS, R. F. Adenosine receptors. *AD-239 8201! I ll II// IAD*, **1990**, 211.
- [24] SHRYOCK, J. C., BELARDINELLI, L. Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *The American journal of cardiology*, **1997**, 79 (12), str. 2-10.
- [25] Guanosine 5'-monophosphate disodium salt hydrate. | *Sigma-Aldrich. Merck | Germany*.
- [26] Guanosine 5'-diphosphate disodium salt. | *Sigma-Aldrich. Merck | Germany*.

- [27] Guanosine-5'-triphosphate. *National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information*, **2004**.
- [28] LANZMASTER, D., DAL-CIM, T., PIERMARTIRI, T. C., TASCA, C. T. Guanosine: a neuromodulator with therapeutic potential in brain disorders. *Aging and disease*, **2016**, 7 (5) 657-679.
- [29] Cytidine 5'-monophosphate. | *Sigma-Aldrich. Merck | Germany*.
- [30] Cytidine 5'-diphosphate sodium salt hydrate. / *Sigma-Aldrich. Merck | Germany*.
- [31] MACHADO-VIEIRA, R, SALVADORE, G., DiazGRANADOS, N., IBRAHIM, L., LATOV, D., WHEELER-CASTILLO, C., BAUMANN, J., HENTER, I. D., ZARATE, C. A. New therapeutic targets for mood disorders. *The scientific world journal*, **2010**, 10, str. 713-726
- [32] Uridine 5'-triphosphate trisodium salt dihydrate .| *Sigma-Aldrich. Merck | Germany*.
- [33] DOBOLYI, A., JUHÁSZ, G., KOVÁCS, Z., KARDOS, J. Uridine function in the central nervous system. *Current topics in medicinal chemistry*, **2011**, 11(8), str. 1058-1067.
- [34] ISHII, K. J., AKIRA, S. Nucleic acids in innate immunity. *CRC Press*, **2008**.
- [35] JIANG, J, Song, B., Tang, Y., Chen, K., Wei, Z., Meng, J. m5UPred: a web server for the prediction of RNA 5-methyluridine sites from sequences. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, **2020**, 22, str. 742-747.
- [36] STUDZIŃSKA, S., BUSZEWSKI, B. Effect of mobile phase pH on the retention of nucleotides on different stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **2013**, 405, str. 1663-1672.
- [37] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. Garland science, **2017**.
- [38] YEUNG, P., DING, L., CASLEY, W. L. HPLC assay with UV detection for determination of RBC purine nucleotide concentrations and application for biomarker study in vivo. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **2008**, 47(2), str. 377-382.
- [39] GARCÍA-GÓMEZ, D.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry method with on-line polar extraction for the analysis of urinary nucleosides. Potential application in clinical diagnosis. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218 (50), str. 9055-9063.

- [40] SNEYD, J.R. Thiopental to desflurane – an anaesthetic journey. Where are we going next? *Anaesth.* **2017**, 119 (1), str. 144-152.
- [41] LÖSCHER, W., ROGAWSKI, M.A. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia.* **2012**, 53 (8), str. 12-25.
- [42] COZANITIS, D.A. One hundred years of barbiturates and their saint. *J. R. Soc Med.* **2004**, 97 (12), str. 594-598.
- [43] NICHOLS L. L., ZASLER, N. D., MARTELLI, M. Sodium amobarbital: historical perspectives and neurorehabilitation clinical caveats. *NeuroRehabilitation.* **2012**;31(2), str. 95-106.
- [44] BROWN, T.C. Thiopentone and its challengers. *Paediatr Anaesth.* **2013**, 23(10), str. 957-968.
- [45] SKIBISKI, J., ABDIJADID, S. Barbiturates. **2023**, StatPearls. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*, 2024.
- [46] Hexobarbital. *American Chemical Society*, **2012**
- [47] CHAU, P.L. New insights into the molecular mechanisms of general anaesthetics. *Br J Pharmacol.* **2010**, 161 (2), str. 288-307.
- [48] MARTONE, C.H., NAGELHOUT, J., WOLF, S.M. Methohexital: a practical review for outpatient dental anesthesia. *Anesth Prog.* **1991**, 38 (6), str. 195-199.
- [49] COUPEY, S. M. Barbiturates. *Pediatrics in Review*, **1997**, 18(8), str. 260-265.
- [50] MARK, L. C. Archaic classification of barbiturates. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **1969**, 10(3), str. 287-291.
- [51] LÓPEZ-MUÑOZ, F., UCHA-UDABE, R., ALAMO, C. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatric disease and treatment*, **2005**, 1(4), str. 329-343.
- [52] STANSKI, D.R., MIHM, F.G., ROSENTHAL, M.H., KALMAN, S.M. Pharmacokinetics of high-dose thiopental used in cerebral resuscitation. *Anesthesiology.* **1980**, 53 (2), str. 169-171.
- [53] SORBO, S., HUDSON, R.J., LOOMIS, J.C. The pharmacokinetics of thiopental in pediatric surgical patients. *Anesthesiology.* **1984**, 61 (6), str. 666-670.

- [54] SEYDEL, J. K. Sulfonamides, structure-activity relationship, and mode of action: structural problems of the antibacterial action of 4-aminobenzoic acid (PABA) antagonists. *Journal of pharmaceutical sciences*, **1968**, 57(9), str. 1455-1478.
- [55] TOLIKA, E.P., SAMANIDOU, V.F., PAPADOYANNIS, I.N. Development and validation of an HPLC method for the determination of ten sulfonamide residues in milk according to 2002/657/EC. *Journal of Separation Science*. **2011**, 34(14), str. 1627-1635.
- [56] CARTA, F., SCOZZAFAVA, A., SUPURAN, C. T. Sulfonamides: a patent review (2008–2012). *Expert opinion on therapeutic patents*, **2012**, 22(7), str. 747-758.
- [57] BENEŠ, J. Antibiotika – systematika, vlastnosti, použití. *Grada Publishing*, **2018**, str. 600. ISBN: 9788027106363, 8027106362
- [58] ADSSMOND, D. A., GRANT, D.J.W. Hydrogen bonding in sulfonamides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2001**, 90 (12), str. 2058-2077
- [59] SHAMBAUGH, G. E. History of sulfonamides. *Archives of Otolaryngology*, **1966**, 83(1), str. 1-2.
- [60] RANG, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Moore, P. K. Pharmacology, 5th edn. Churchill Livingstone. *Edinburgh, Scotland*, **2003**.
- [61] BARAN, W., ADAMEK, E., ZIEMIAŃSKA, J., SOBCZAK, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *Journal of hazardous materials*, **2011**, 196, str. 1-15.
- [62] SHOAI B. A. S., RIVERA, G., ASHFAQ, M. Recent advances in medicinal chemistry of sulfonamides. Rational design as anti-tumoral, anti-bacterial and anti-inflammatory agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **2013**, 13(1), str. 70-86.
- [63] VAN BOECKEL, T. P., GANDRA, S., ASHOK, A., CAUDRON, Q., GRENFELL, B. T., LEVIN, S. A., LAXMINARAYAN, R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet infectious diseases*, **2014**, 14(8), str. 742-750.
- [64] GELBAND, Hellen, MILLER, P., PANT, S., LEVINSON, J., BARTER, D. The state of the world's antibiotics 2015. *Wound healing southern africa*, **2015**, 8(2), str. 30-34.

- [65] BAPTISTE, K. E., KYVSGAARD, N. CH. Do antimicrobial mass medications work? A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials investigating antimicrobial prophylaxis or metaphylaxis against naturally occurring bovine respiratory disease. *Pathogens and disease*, **2017**, 75(7).
- [66] GARCÍA-GALÁN, M. J., DÍAZ-CRUZ, M. S., BARCELÓ, D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2008**, 27(11), str. 1008-1022.
- [67] ZESSEL, Katrin, MOHRING, S., HAMSCHER, G., KIETZMANN, M., STAHL, J. Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. *Chemosphere*, **2014**, 100, str. 167-174.
- [68] PAREEK, A., RANI, P., KISHORE, D. A short review on: Sulphonamides. *Int J Pharm Bio Sci*, **2013**, 4(1), str. 812-820.
- [69] BÖHNI, E. Bacteriostatic and bactericidal activity of two trimethoprim-sulfonamide combinations. *Chemotherapy*, **1976**, 22(3-4), str. 262-273.
- [70] NEMETH, J., OESCH, G., KUSTER, S. P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2015**, 70(2), str. 382-395.
- [71] BAILEY, S. W., AYLING, J. E. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2009**, 106(36), str. 15424-15429.
- [72] MAHMOOD, L. The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *Journal of Health Research and Reviews (In Developing Countries)*, **2014**, 1(1), str. 5-9.
- [73] DUNLAP, Beth, SHELKE, K., SALEM, S. A., KEITH, L. G. Folic acid and human reproduction—ten important issues for clinicians. *Journal of experimental & clinical assisted reproduction*, **2011**, 8.
- [74] SHMUKLER, B. E., BRUGNARA, C., ALPER, S. L. Structure and genetic polymorphism of the mouse KCC1 gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, **2000**, 1492(2-3), str. 353-361.
- [75] KRACKE, R. The effects of sulfonamide drugs on the blood. **1944**.

- [76] VREE, T. B.; HEKTER, Y. A. Renal excretion of sulfonamides. In: *Pharmacokinetics of sulfonamides revisited*. Karger Publishers, **1985**, str. 66-120.
- [77] DENG, Y., LI, B., ZHANG, T. Bacteria that make a meal of sulfonamide antibiotics: blind spots and emerging opportunities. *Environmental science & technology*, **2018**, 52(7), str. 3854-3868.
- [78] LIU, S., ZHAO, H., LEHMLER, H. J., CAI, X., CHEN, J. Antibiotic pollution in marine food webs in Laizhou Bay, North China: trophodynamics and human exposure implication. *Environmental science & technology*, **2017**, 51(4), str. 2392-2400.
- [79] SAGAR, A. HPLC: Principle, Parts, Types, Uses, Diagram. *Microbe Notes*, **2023**.
- [80] NGUYEN D., GUILLARME, D., RUDAZ, S., VEUTHEY, J. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *Journal of Separation Science* 29, **2006**, str. 1836-1848.
- [81] HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). *Laboratorní metody*. Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola, Hradec Králové.
- [82] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Hradec Králové: Nováková Lucie, **2013**.
- [83] SWARTZ, M. HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2010**, 33(9-12), str. 1130-1150.
- [84] JANDERA, P., HÁJEK, T. Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction – reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. *Journal of Separation Science*, **2017**, 41(1), str. 145-162.
- [85] YOSHIDA, T. Peptide Separation in Normal Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. **1997**, 69(15), str. 3038-3043.
- [86] SHERMA, J., WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. CRP Press. **2010**, 102. ISBN 978-1-4200-9260-8
- [87] JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica chimica acta*, **2011**, 692(1-2), str. 1-25.

- [88] SNYDER, L. R. Principles of gradient elution. *Chromatographic Reviews*, **1965**, 7, str.1-51.
- [89] Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Merck*.
- [90] TARAJI, M., HADDAD, P. R., AMOS, R. I., TALEBI, M., DOLAN, J. W., SZUCS, R., POHL, C. A. Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta 1000*, **2018**, str. 20–40.
- [91] BOERSEMA, P. J., MOHAMMED, S., HECK, A.J.R. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **2008**, 391, str. 151-159.
- [92] ZHU, B.Y., HODGES, R.S., MANT, C.T. Hydrophilic-interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns. *Journal of Chromatography*. **1991**, 48(1-2), str, 13-24.
- [93] LINDEN, J., LAWHEAD, C., CHARLES, L. *Liquid chromatography of sacharides*. **1975**, 105(1), str. 125-133.
- [94] STREGE, M. Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. **1998**, 70, str. 2439-2445.
- [95] TOLSÍKOV, V., FIEHN, O. Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. **2002**, 301(2), str. 298-307.
- [96] HEMSTRÖM, P., IRGUM, K. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of separation science*, **2006**, 29(12), str. 1784-1821.
- [97] HAO, Z., XIAO, B., WENG, N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *J Sep Sci*. **2008**, 31(9), str. 1449-64.
- [98] IKEGAMI, T., TOMOMATSU, K., TAKUBO, H., HORIE, K., TANAKA, N. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography*, **2008**, 1184 (1-2), str. 474-503.

- [99] BOUMAHRAZ, M., DAVYDOV, V. Y., KISELEV, A. V. Separation of Carbohydrates by Liquid Chromatography on Silica Gel, Adding Adsorption Modifiers to the Eluent. *Chromatographia*, **1982**, 15(12), str. 751–756.
- [100] ALPERT, A. J., Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic-acid and other polar compound. *Journal of Chromatography*, **1990**, 499, str. 177-196.
- [101] BUSZEWSKI, B., NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**, 402(1), str. 231–247.
- [102] McCALLEY, D. V., NEUE, U. D. Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1192, str. 225–229.
- [103] HEMSTRÖM, P., IRGUM, K. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of 60 Separation Science*, **2006**, 29, str. 1784–821.
- [104] McCALLEY, D. V. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, str. 3408–3417.
- [105] KALÍKOVÁ, K., KOZLÍK, P., GILAR, M., TESAŘOVÁ, E. Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns. *Journal of Separation Science*, **2013**, 36, str. 2421–2429.
- [106] GUO, Y. GAIKI, S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1074, str. 71–80.
- [107] VACLOVÁ, J. Charakterizace nových HILIC stacionárních fází. **2022**.
- [108] CHAUVE, B., GUILLAME, D., CLÉON, O., VEUTHEY, J. L. Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds. *Journal of Separation Science*, **2010**, 33, str. 752–764.
- [109] DEJAEGHER, B., HEYDEN, Y. V. HILIC methods in pharmaceutical Analysis. *Journal of Separation Science*, **2010**, 33, str. 698–715.

- [110] LI, R., HUANG, J. Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2014**, 1041, str. 163–169.
- [111] OLSEN, B. A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 913, str. 113–122.
- [112] IKEGAMI, T., TOMOMATSU, K., TABUKO, H., HORIE, K., TANAKA, N. Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1184, str. 474–503.
- [113] YOSHIDA, T. Peptide Separation in Normal Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. **1997**, 69(15), str. 3038-3043.
- [114] REGNIER, F. E., NOEL, R. Glycerolpropylsilane bonded phases in the steric exclusion chromatography of biological macromolecules. *Journal of chromatographic science*, **1976**, 14(7), str. 316-320.
- [115] LIU, X., POHL, Ch. New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants. *Journal of chromatography A*, **2008**, 1191(1-2), str. 83-89.
- [116] PAZOUREK, Jiří. Monitoring of mutarotation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography. *Journal of separation science*, **2010**, 33(6-7), str. 974-981.
- [117] ARMSTRONG, D. W., JIN, H. L. Evaluation of the liquid chromatographic separation of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides, deoxysaccharides and sugar alcohols with stable cyclodextrin bonded phase columns. *Journal of Chromatogr*, **1989**, 13 (462), str. 219-232.
- [118] RISLEY, D. S., STREGE, M. A. Chiral separations of polar compounds by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *Analytical chemistry*, **2000**, 72(8), str. 1736-1739.
- [119] JIANG, W., IRGUM, K. Covalently bonded polymeric zwitterionic stationary phase for simultaneous separation of inorganic cations and anions. *Analytical Chemistry*, **1999**, 71(2), str. 333-344.
- [120] VIKLUND, C., IRGUM, K. Synthesis of porous zwitterionic sulfobetaine monoliths and characterization of their interaction with proteins. *Macromolecules*, **2000**, 33(7), str. 2539-2544.

- [121] JIANG, Wen; IRGUM, Knut. Tentacle-type zwitterionic stationary phase prepared by surface-initiated graft polymerization of 3-[N, N-dimethyl-N-(methacryloyloxyethyl)-ammonium] propanesulfonate through peroxide groups tethered on porous silica. *Analytical chemistry*, **2002**, 74(18), str. 4682-4687.
- [122] RODRÍGUEZ-GONZALO, E., GARCÍA-GÓMEZ, D., CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Study of retention behaviour and mass spectrometry compatibility in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography for the separation of modified nucleosides and nucleobases. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218(26), str. 3994-4001.
- [123] PHILIBERT, G. S., OLESIK, S. V. Characterization of enhanced-fluidity liquid hydrophilic interaction chromatography for the separation of nucleosides and nucleotides. *Journal of Chromatography A*, **2011**, 1218(45), str. 8222-8230.
- [124] STAŇKOVÁ, M., JANDERA, P. Dual retention mechanism in two-dimensional LC separations of barbiturates, sulfonamides, nucleic bases and nucleosides on polymethacrylate zwitterionic monolithic micro-columns. *Chromatographia*, **2016**, 79(11), str. 657-666.
- [125] WEST, C., KHATER, S., LESELLIER, E. Characterization and use of hydrophilic interaction liquid chromatography type stationary phases in supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2012**, 1250, str. 182-195.
- [126] JANDERA, P., CHURÁČEK, J. Gradient elution in liquid chromatography: II. Retention characteristics (retention volume, band width, resolution, plate number) in solvent-programmed chromatography—Theoretical considerations. *Journal of Chromatography A*, **1974**, 91, str. 223-235.
- [127] JANDERA, P., CHURÁČEK, J., SVOBODA, L. Gradient elution in liquid chromatography: X. Retention characteristics in reversed-phase gradient elution chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1979**, 174(1), str. 35-50.
- [128] JANDERA, P., KUČEROVÁ, M. Prediction of retention in gradient-elution normal-phase high-performance liquid chromatography with binary solvent gradients. *Journal of Chromatography A*, **1997**, 759(1-2), str. 13-25.

7. PŘÍLOHY

Příloha 1: Gradientová eluce pomocí kolony Luna® Omega SUGAR

NÁZEV	t _{R1} [min]	t _{R2} [min]	t _{R3} [min]	t _R průměr [min]	V _R [ml]	φ _e	t _e [min]
Acenaften	2,019	2,021	2,023	2,021	0,808	0,98	
Adenin	8,983	8,976	8,978	8,979	3,592	0,84	3,607
Cytosin	10,465	10,462	10,463	10,463	4,185	0,81	4,126
Uracil	4,497	4,497	4,505	4,500	1,800	0,93	3,507
Guanin	11,218	11,224	11,218	11,220	4,488	0,80	4,104
Thymin	3,980	3,981	3,984	3,982	1,593	0,94	3,495
Adenosin	8,867	8,870	8,864	8,867	3,547	0,85	4,066
Cytidin	12,031	12,034	12,037	12,034	4,814	0,78	4,322
Guanosin	12,415	12,413	12,404	12,411	4,964	0,78	4,303
Barbital	2,467	2,463	2,465	2,465	0,986	0,97	2,402
Fenobarbital	2,518	2,517	2,517	2,517	1,007	0,97	2,398
Pentobarbital	2,251	2,254	2,251	2,252	0,901	0,98	2,258
Amobarbital	2,249	2,247	2,251	2,249	0,900	0,98	2,273
Hexobarbital	2,177	2,173	2,176	2,175	0,870	0,98	2,191
Sulfadimidin	3,109	3,1	3,102	3,104	1,241	0,96	2,400
Sulfanilamid	2,317	2,315	2,314	2,315	0,926	0,98	2,365
Ftalazol	13,389	13,408	13,403	13,400	5,360	0,76	2,394
Sulfaguanidin	3,876	3,871	3,871	3,873	1,549	0,95	3,340
Sulfathiazol	6,713	6,711	6,708	6,711	2,684	0,89	2,789

Příloha 2: Gradientová eluce pomocí kolony InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z

NÁZEV	t _{R1} [min]	t _{R2} [min]	t _{R3} [min]	t _R průměr [min]	V _R [ml]
Acenaften	1,934	1,936	1,938	1,936	0,387
Adenin	8,916	8,848	8,844	8,869	1,774
Cytosin	11,505	11,497	11,497	11,500	2,300
Uracil	4,125	4,123	4,123	4,124	0,825
Guanin	12,770	12,771	12,771	12,771	2,554
Thymin	3,625	3,623	3,618	3,622	0,724
Adenosin	9,546	9,543	9,562	9,550	1,910
Cytidin	13,697	13,697	13,691	13,695	2,739
Guanosin	14,395	14,394	14,398	14,396	2,879
Barbital	2,399	2,389	2,386	2,391	0,478
Fenobarbital	2,369	2,379	2,375	2,374	0,475
Pentobarbital	2,160	2,160	2,160	2,160	0,432
Amobarbital	2,146	2,150	2,151	2,149	0,430
Hexobarbital	2,070	2,069	2,067	2,069	0,414
Sulfadimidin	2,379	2,377	2,377	2,378	0,476
Sulfanilamid	2,759	2,757	2,759	2,758	0,552
Ftalazol	13,640	13,602	13,604	13,615	2,723
Sulfaguanidin	6,615	6,610	6,611	6,612	1,322
Sulfathiazol	4,124	4,088	4,084	4,099	0,820

Příloha 3: Gradientová eluce pomocí kolony SeQuant® ZIC-HILIC

NÁZEV	t _{R1} [min]	t _{R2} [min]	t _{R3} [min]	t _{R průměr} [min]	V _R [ml]	Φ _e	t _e [min]
Acenaften	1,922	1,918	1,918	1,919		0,98	
Adenin	11,042	11,003	11,004	11,016	2,203	0,85	3,900
Cytosin	13,819	13,816	13,822	13,819	2,764	0,79	4,373
Uracil	6,984	6,985	6,987	6,985	1,397	0,93	4,541
Guanin	14,851	14,849	14,853	14,851	2,970	0,77	4,205
Thymin	4,737	4,746	4,743	4,742	0,948	0,97	3,566
Adenosin	11,436	11,434	11,434	11,435	2,287	0,84	3,510
Cytidin	15,042	15,044	15,042	15,043	3,009	0,77	4,566
Guanosin	15,832	16,219	15,981	16,011	3,202	0,75	4,082
Barbital	2,404	2,396	2,402	2,401	0,480	0,98	2,522
Fenobarbital	2,377	2,379	2,379	2,378	0,476	0,98	2,651
Pentobarbital	2,124	2,123	2,129	2,125	0,425	0,98	2,272
Amobarbital	2,107	2,106	2,11	2,108	0,422	0,98	2,252
Hexobarbital	2,049	2,048	2,05	2,049	0,410	0,98	2,147
Sulfadimidin	2,373	2,379	2,375	2,376	0,475	0,98	2,594
Sulfanilamid	3,864	3,863	3,856	3,861	0,772	0,98	4,290
Ftalazol	12,438	12,413	12,411	12,421	2,484	0,82	2,981
Sulfaguanidin	10,324	10,311	10,315	10,317	2,063	0,86	3,234
Sulfathiazol	5,038	4,965	4,971	4,991	0,998	0,97	3,563

Příloha 4: Gradientová eluce pomocí kolonz YMC-Triart Diol-HILIC

NÁZEV	t _{R1} [min]	t _{R2} [min]	t _{R3} [min]	t _R průměr [min]	V _R [ml]
Acenaften	2,356	2,361	2,359	2,359	0,425
Adenin	12,386	12,351	12,386	12,374	2,227
Cytosin	12,774	12,741	12,781	12,765	2,298
Uracil	4,285	4,286	4,288	4,286	0,772
Guanin	13,386	13,392	13,394	13,391	2,410
Thymin	4,140	4,139	4,139	4,139	0,745
Adenosin	11,254	11,233	11,241	11,243	2,024
Cytidin	12,949	12,942	12,939	12,943	2,330
Guanosin	13,474	13,435	13,477	13,462	2,423
Barbital	2,772	2,765	2,764	2,767	0,498
Fenobarbital	2,695	2,689	2,689	2,691	0,484
Pentobarbital	2,620	2,625	2,625	2,623	0,472
Amobarbital	2,599	2,594	2,597	2,597	0,467
Hexobarbital	2,511	2,515	2,51	2,512	0,452
Sulfadimidin	2,816	2,816	2,816	2,816	0,507
Sulfanilamid	2,685	2,689	2,691	2,688	0,484
Ftalazol	10,744	10,676	10,693	10,704	1,927
Sulfaguanidin	3,783	3,785	3,787	3,785	0,681
Sulfathiazol	3,253	3,247	3,247	3,249	0,585

Příloha 5: Gradientová eluce pomocí kolony Ascentis® Express HILIC

NÁZEV	t _{R1} [min]	t _{R2} [min]	t _{R3} [min]	t _R průměr [min]	V _R [ml]
Acenaften	1,798	1,797	1,799	1,798	0,719
Adenin	8,953	8,945	8,945	8,948	3,579
Cytosin	10,084	10,083	10,086	10,084	4,034
Uracil	3,268	3,269	3,269	3,269	1,307
Guanin	9,476	9,474	9,479	9,476	3,791
Thymin	3,071	3,072	3,078	3,074	1,229
Adenosin	8,126	8,120	8,124	8,123	3,249
Cytidin	10,203	10,203	10,203	10,203	4,081
Guanosin	9,685	9,690	9,682	9,686	3,874
Barbital	1,987	1,986	1,985	1,986	0,794
Fenobarbital	1,891	1,890	1,891	1,891	0,756
Pentobarbital	1,872	1,873	1,870	1,872	0,749
Amobarbital	1,864	1,865	1,864	1,864	0,746
Hexobarbital	1,874	1,877	1,878	1,876	0,751
Sulfadimidin	2,015	2,012	2,012	2,013	0,805
Sulfanilamid	1,944	1,944	1,945	1,944	0,778
Ftalazol	7,719	7,708	7,706	7,711	3,084
Sulfaguanidin	2,557	2,554	2,554	2,555	1,022
Sulfathiazol	2,206	2,202	2,202	2,203	0,881

Příloha 6: Skript - izokratický lineární model

```

1 import cmath
2 import time
3
4 def retencniobjemgrad(aactual, mactual):
5     VRgrad = ((1/(mactual*B1))*cmath.log10(2.31*mactual*B1*(Vm*(10**(aactual-mactual*A))-
6     VD)+1))+Vm+VD
7     VRgrad2 = ((1/(mactual*B2))*cmath.log10(2.31*mactual*B2*(Vm*(10**(aactual-mactual*A)
8     ))-VD)+1))+Vm+VD
9     VRgrad3 = ((1/(mactual*B3))*cmath.log10(2.31*mactual*B3*(Vm*(10**(aactual-mactual*A)
10    ))-VD)+1))+Vm+VD
11    return VRgrad, VRgrad2, VRgrad3
12
13 def iterror(Vrg1, Vrg2, Vrg3):
14     relchyba1 = abs(VR1-Vrg1)/VR1
15     relchyba2 = abs(VR2-Vrg2)/VR2
16     relchyba3 = abs(VR3-Vrg3)/VR3
17     sumarelchyba = relchyba1 + relchyba2 + relchyba3
18     return sumarelchyba
19
20 Vm = float(input("Vm = "))
21 VD = float(input("VD = "))
22 A = float(input("A = "))
23 B1 = float(input("B1 = "))
24 B2 = float(input("B2 = "))
25 B3 = float(input("B3 = "))
26
27 VR1 = float(input("VR1 = "))
28 VR2 = float(input("VR2 = "))
29 VR3 = float(input("VR3 = "))
30
31 ainit = float(input("a initial = "))
32 minit = float(input("m initial = "))
33
34 kolikit = input("How many iterations:")
35 ite = 0
36
37 print("Optimizing a and m parameter, please wait!")
38 aoptim = []
39 moptim = []
40 aoptim.append(ainit)
41 moptim.append(minit)
42 procenta = 0
43
44 while ite < int(kolikit):
45     if ite == 0:
46         casovyudaj = time.time()
47         print(retencniobjemgrad(ainit, minit))
48         print(iterror(retencniobjemgrad(ainit, minit)[0], retencniobjemgrad(ainit, minit)
49         )[1], retencniobjemgrad(ainit, minit)[2]))
50         dobatrvani = time.time() - casovyudaj
51         print("Estimated time of iteration: %s s per one step" % dobatrvani)
52         print()
53         print("Iteration in progress (%):")
54         print("0-----20-----40-----60-----80-----100")
55
56     progress = int((100*ite/int(kolikit)))
57     while progress > procenta:
58         print("*", end='')
59         procenta = procenta + 4
60
61     initeror = iterror(retencniobjemgrad(aoptim[ite], moptim[ite])[0], retencniobjemgrad
62     (aoptim[ite], moptim[ite])[1], retencniobjemgrad(aoptim[ite], moptim[ite])[2])

```

```

55     anewhi = aoptim[ite]+0.005
56     anewlow = aoptim[ite] - 0.005
57     mnewhi = moptim[ite] + 0.005
58     mnewlow = moptim[ite] - 0.005
59     if initererror > iterror(retencniobjemgrad(anewhi, moptim[ite])[0], retencniobjemgrad(
anewhi, moptim[ite])[1], retencniobjemgrad(anewhi, moptim[ite])[2]):
60         aoptim.append(anewhi)
61         moptim.append(moptim[ite])
62     elif initererror > iterror(retencniobjemgrad(anewlow, moptim[ite])[0],
retencniobjemgrad(anewlow, moptim[ite])[1], retencniobjemgrad(anewlow, moptim[ite])[2]):
63         aoptim.append(anewlow)
64         moptim.append(moptim[ite])
65     else:
66         aoptim.append(aoptim[ite])
67         if initererror > iterror(retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnewhi)[0],
retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnewhi)[1], retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnewhi)[2]):
68             moptim.append(mnewhi)
69         elif initererror > iterror(retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnewlow)[0],
retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnewlow)[1], retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnewlow)[2]):
70             moptim.append(mnewlow)
71         else:
72             moptim.append(moptim[ite])
73     ite = ite + 1
74
75 print()
76 print("a = ", aoptim[ite])
77 print("m = ", moptim[ite])
78 print("error = ", initererror)
79 print("VR,g = ", retencniobjemgrad(aoptim[ite], moptim[ite]))

```

Příloha 7: Skript - izokratický nelineární retenční model

```

1 import time
2
3 def retencniobjemgrad(aactual, mactual):
4     VRgrad = ((1/B1)*(((mactual+1)*B1*(aactual*Vm-VD*(A**mactual)))+(A)**(mactual+1))*
5     1/(1+mactual))))-(A/B1)+Vm+VD
6     VRgrad2 = ((1/B2)*(((mactual+1)*B2*(aactual*Vm-VD*(A**mactual)))+(A)**(mactual+1)
7     ))*(1/(1+mactual))))-(A/B2)+Vm+VD
8     VRgrad3 = ((1/B3)*(((mactual+1)*B3*(aactual*Vm-VD*(A**mactual)))+(A)**(mactual+1)
9     ))*(1/(1+mactual))))-(A/B3)+Vm+VD
10    return VRgrad, VRgrad2, VRgrad3
11
12 def iterror(Vrg1, Vrg2, Vrg3):
13     relchyba1 = abs(VR1-Vrg1)/VR1
14     relchyba2 = abs(VR2-Vrg2)/VR2
15     relchyba3 = abs(VR3-Vrg3)/VR3
16     sumarelchyba = relchyba1 + relchyba2 + relchyba3
17     return sumarelchyba
18
19 Vm = float(input("Vm = "))
20 VD = float(input("VD = "))
21 A = float(input("A = "))
22 B1 = float(input("B1 = "))
23 B2 = float(input("B2 = "))
24 B3 = float(input("B3 = "))
25
26 VR1 = float(input("VR1 = "))
27 VR2 = float(input("VR2 = "))
28 VR3 = float(input("VR3 = "))
29
30 ainit = float(input("a initial = "))
31 minit = float(input("m initial = "))
32
33 kolikit = input("How many iterations:")
34 ite = 0
35 print("Optimizing a and m parameter, please wait!")
36 aoptim = []
37 moptim = []
38 aoptim.append(ainit)
39 moptim.append(minit)
40 procenta = 0
41 while ite < int(kolikit):
42     if ite == 0:
43         casovyudaj = time.time()
44         print(retencniobjemgrad(ainit, minit))
45         print(iterror(retencniobjemgrad(ainit, minit)[0], retencniobjemgrad(ainit, minit)
46         )[1], retencniobjemgrad(ainit, minit)[2]))
47         dobatrvani = time.time() - casovyudaj
48         print("Estimated time of iteration: %s s per one step" % dobatrvani)
49         print()
50         print("Iteration in progress (%):")
51         print("0-----20-----40-----60-----80-----100")
52         progress = int((100*ite/int(kolikit)))
53         while progress > procenta:
54             print("*", end="")
55             procenta = procenta + 4
56             initererror = iterror(retencniobjemgrad(aoptim[ite], moptim[ite])[0], retencniobjemgrad
57             (aoptim[ite], moptim[ite])[1], retencniobjemgrad(aoptim[ite], moptim[ite])[2]))
58             anewhi = aoptim[ite]+0.005
59             anewlow = aoptim[ite] - 0.005
60             mnewhi = moptim[ite] + 0.005
61             mnewlow = moptim[ite] - 0.005
62             if initererror > iterror(retencniobjemgrad(anewhi, moptim[ite])[0], retencniobjemgrad(
63             anewhi, moptim[ite])[1], retencniobjemgrad(anewhi, moptim[ite])[2]):

```

```

58     aoptim.append(anevhi)
59     moptim.append(moptim[ite])
60     elif initererror > iterror(retencniobjemgrad(anevlow, moptim[ite])[0],
61     retencniobjemgrad(anevlow, moptim[ite])[1], retencniobjemgrad(anevlow, moptim[ite])[2]):
62         aoptim.append(anevlow)
63     moptim.append(moptim[ite])
64     else:
65         aoptim.append(aoptim[ite])
66         if initererror > iterror(retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnevhi)[0],
67         retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnevhi)[1], retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnevhi)[2]):
68             moptim.append(mnevhi)
69         elif initererror > iterror(retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnevlow)[0],
70         retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnevlow)[1], retencniobjemgrad(aoptim[ite], mnevlow)[2]):
71             moptim.append(mnevlow)
72         else:
73             moptim.append(moptim[ite])
74     ite = ite + 1
75
76 print()
77 print("a = ", aoptim[ite])
78 print("m = ", moptim[ite])
79 print("error = ", initererror)
80 print("VR,g = ", retencniobjemgrad(aoptim[ite], moptim[ite]))

```

Příloha 8: Gradientní profily 1-5 s obsahem acetonitrilu, methanolu a vodného pufru

GRADIENTNÍ PROFIL	1	2	3	4	5
NÁZEV	tr1 průměr [min]	tr2 průměr [min]	tr3 průměr [min]	tr4 průměr [min]	tr5 průměr [min]
Acenaften	1,787	1,788	1,790	1,801	1,789
Adenin	10,860	9,585	10,062	9,301	9,645
Cytosin	13,385	11,494	12,216	10,977	11,437
Uracil	8,810	8,119	8,375	8,081	8,305
Guanin	14,305	12,900	13,448	11,939	12,265
Thymin	6,446	6,563	6,487	6,500	6,486
Adenosin	11,274	9,967	10,453	9,595	9,918
Cytidin	14,975	12,844	13,605	11,995	12,480
Guanosin	15,526	14,059	14,550	12,782	13,102
Barbital	2,546	2,638	2,575	2,611	2,585
Fenobarbital	2,904	3,027	2,924	2,988	2,944
Pentobarbital	2,208	2,284	2,228	2,260	2,233
Amobarbital	2,174	2,249	2,193	2,223	2,198
Hexobarbital	2,013	2,050	2,023	2,039	2,027
Sulfadimidin	2,614	2,651	2,604	2,626	2,607
Sulfanilamid	6,419	6,430	6,399	6,406	6,456
Ftalazol	12,247	11,728	11,826	10,435	10,514
Sulfaguanidin	10,384	10,141	10,205	9,517	9,553
Sulfathiazol	8,577	8,073	8,235	7,935	8,075