

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

SVETLANA VORSLOVA

**SOLVĀTU SORBCIJAS MODEĻA EFEKTIVITĀTES IZPĒTE  
GRADIENTA REŽĪMĀ APGRIEZTĀS FĀZES ŠĶIDRUMA  
HROMATOGRĀFIJAS METODES IZSTRĀDEI UN OPTIMIZĀCIJAI**

Promocijas darbs

Zinātniskais vadītājs:

*Dr. chem., prof. Arturs Vīksna*

Konsultante:

*Dr. chem. Jeļena Goluško*

Rīga, 2017

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē sadarbībā ar Institute of Chromatography laika posmā no 2011. gada līdz 2017. gadam.

**Darba forma:**

promocijas darbs ķīmijas zinātnes nozarē, analītiskās ķīmijas apakšnozarē

**Darba zinātniskais vadītājs:**

*Dr. chem.*, prof. Arturs Vīksna (Latvijas Universitāte)

**Darba konsultante:**

*Dr. chem.* Jeļena Goluško (Institute of Chromatography)

**Recenzenti:**

*Dr. chem.* Dzintars Začs (Zinātniskais institūts "BIOR")

*Dr. chem.* Helēna Kažoka (Latvijas Organiskās Sintēzes institūts)

*Dr. habil. chem.*, prof. Māris Kļaviņš (Latvijas Uninersitāte)

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē 2017. gada 30. augustā plkst. 16.00 Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē Jelgavas iela 1, Rīgā.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Daudznozaru bibliotēkā, Raiņa bulvārī 19.

## SATURS

DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI .....	5
KOPSAVILKUMS .....	7
ABSTRACT .....	8
IEVADS.....	9
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	15
1.1. Komerciāli pieejamie modeļu darbības principi.....	15
1.2. Solvātu sorbcijas modeļa teorija .....	18
1.3. Lineārā šķīdinātāja spēka ( <i>linear solvent strength</i> ) modeļa teorija .....	23
1.4. Paraugu izvēle solvātu sorbcijas modeļa prognozēšanas efektivitātes izpētei .....	25
1.5. Augstefektīvas šķīdumu hromatogrāfijas apstākļu izvēle .....	28
1.5.1. Kustīgās fāzes izvēle .....	30
1.5.2. Nekustīgās fāzes izvēle.....	31
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA.....	35
2.1. Darbā izmantotā aparatūra un programnodrošinājums.....	35
2.2. Darbā izmantotie reaģenti un materiāli.....	38
2.3. Darba šķīdumu sagatavošana.....	39
2.3.1. Aminoskābju maisījums .....	39
2.3.2. Hidrolīzes šķīdums .....	45
2.3.3. Derivatizācijas šķīdums .....	46
2.3.4. Kustīgās fāzes AEŠH.....	46
2.4. Aminoskābju paraugu sagatavošana.....	46
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS .....	48
3.1. Sorbcijas parametru prognozēšana, izmantojot „ <i>nulles tuvinājuma</i> ” metodi.....	51
3.2. Sorbcijas parametru prognozēšana, izmantojot „ <i>pirmā tuvinājuma</i> ” metodi.....	65
3.3. Sorbcijas parametru prognozēšana, izmantojot „ <i>otrā tuvinājuma</i> ” metodi.....	76
3.4. Solvātu sorbcijas modeļa un lineārā šķīdinātāja spēka modeļa sorbcijas parametru salīdzināšana. ....	81
3.5. Aminoskābju fenilzotiocianātu maisījuma atdalīšanas optimizācija segmentētā gradienta apstākļos.....	89
3.6. Solvātu sorbcijas modeļa praktiska pielietošana metodes izstrādē aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka asins serumā.....	98

3.7.	Metodes validācija aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka asins serumā.....	115
3.7.1.	Specifiskums (selektivitāte, matricas efekts).....	115
3.7.2.	Linearitāte.....	117
3.7.3.	Precizitāte.....	118
3.7.4.	Atgūstamība.....	121
3.7.5.	Pareizība.....	123
3.7.6.	Detektēšanas robeža un kvantitatīvās noteikšanas robeža.....	125
3.7.7.	Metodes nenoteiktība.....	128
3.7.8.	Robustums.....	132
3.8.	Izstrādātās aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu noteikšanas metodes cilvēka bioloģiskajos materiālos salīdzinājums ar laboratorijā izmantojamo “WATERS” metodi.....	137
	SECINĀJUMI.....	145
	LITERATŪRAS SARAKSTS.....	147
1.	PIELIKUMS.....	158
2.	PIELIKUMS.....	167
3.	PIELIKUMS.....	171
4.	PIELIKUMS.....	173
5.	PIELIKUMS.....	189
6.	PIELIKUMS.....	190
7.	PIELIKUMS.....	191
8.	PIELIKUMS.....	192
9.	PIELIKUMS.....	193
10.	PIELIKUMS.....	206
11.	PIELIKUMS.....	208
12.	PIELIKUMS.....	222
13.	PIELIKUMS.....	223
14.	PIELIKUMS.....	225
15.	PIELIKUMS.....	226
16.	PIELIKUMS.....	252
17.	PIELIKUMS.....	256
18.	PIELIKUMS.....	270

## DARBĀ IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

Aab –  $\alpha$ -amino-n-sviestskābe

Aad –  $\alpha$ -aminoadipīnskābe

ACN – acetonitrils

AEŠH – apgrieztās fāzes augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija

Ala – alanīns

Alloisoleuc – alloizoleicīns

Arg – arginīns

Arginino-succinic – argininosukcīnskābe

Asn – asparagīns

Asp – asparagīnskābe

$\beta$ Aib –  $\beta$ -aminoizosviestskābe

Cit – citrulīns

Cys – cisteīns

DL – detektēšanas robeža (angļu val. Detection Limit)

F – fluorescējoša gaisma

FITC – fenilizotiocianāts

$\gamma$ Aba –  $\gamma$ -aminosviestskābe

Gly – glicīns

Gln – glutamīns

Glu – glutamīnskābe

Hcy(Ala) – cistationīns

His – histidīns

Hyp – hidroksiprolīns

I.D. – iekšējais diametrs

Ile – izoleicīns

IS – iekšējais standarts

Leu – leicīns

Lys – lizīns

MeOH – metanols

Met – metionīns

OMIM – tiešsaiste cilvēka pārmantotībai pēc Mendeļa likumiem (angļu val. Online Mendelian Inheritance in Man)

Orn – ornitīns

Phe – fenilalanīns

Pro – prolīns

QL – kvalitatīvās noteikšanas robeža (angļu val. Quantification Level)

Saharop - saharopīns

Sarkoz – sarkozīns

Ser – serīns

Tau – taurīns

TEA – trietilamīns

THF - tetrahidrofurāns

Thr – treonīns

Tyr – tirozīns

Trp – triptofāns

Val – valīns

## KOPSAVILKUMS

**Solvātu sorbcijas modeļa efektivitātes izpēte gradienta režīmā apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfijas metodes izstrādei un optimizācijai.** Svetlana Vorslova, zinātniskais vadītājs: *Dr. chem., prof. Arturs Viksna*. Promocijas darbs, 157 lappuses, 65 attēli, 30 tabulas, 134 literatūras avoti, 18 pielikumi. Latviešu valodā.

SOLVĀTU SORBCIJAS MODELIS, APGRIEZTĀS FĀZES AUGSTEFEKTĪVĀ ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJA, OPTIMIZĀCIJAS METODES, GRADIENTA DARBA REŽĪMS, AMINOSKĀBJU FENILIZOTIOCIANĀTA ATVASINĀJUMI.

Darbā ir izpētīta solvātu sorbcijas modeļa efektivitāte daudzkomponentu maisījuma sorbcijas un selektivitātes prognozēšanai augstefektīvajā šķidrums hromatogrāfijā. Noskaidrota solvātu sorbcijas modeļa efektivitāte polāru savienojumu divdesmit piecu aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu sorbcijas prognozēšanā. Noskaidrota modeļa efektivitāte, pielietojot apgrieztās fāzes augstefektīvajā šķidrums hromatogrāfijā izmantojamās deviņas hromatogrāfijas kolonnas ar dažādām nekustīgajām fāzēm un divām plaši pielietojamām kustīgajām fāzēm. Modeļa efektivitātes pētījuma rezultāti, iegūtie lineārā gradienta režīmā, salīdzināti ar rezultātiem, iegūtiem, izmantojot komerciāli plaši zināmo lineāro šķīdinātāja spēka modeli. Iegūtie rezultāti apliecina solvātu sorbcijas modeļa augstu efektivitāti, kas var būtiski paplašināt tā izmantošanas iespējas hromatogrāfijas jomā. Pētīta solvātu sorbcijas modeļa efektivitāte segmentētā gradienta režīmā. Sasniegtie rezultāti apliecina modeļa augstu efektivitāti, izmantojot ne tikai lineāro, bet arī segmentētu gradienta režīmu. Ir panākta segmentētā gradienta optimizācija, kas nodrošina īsāku hromatogrāfijas izdalīšanas laiku un labāku analizējamo vielu izšķiršanu. Izmantojot solvātu sorbcijas modeli un darbā iegūtos pētījuma rezultātus, ir izstrādāta augstefektīvā šķidrums hromatogrāfijas metode aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu noteikšanai bioloģiskajā materiālā.

## ABSTRACT

**Study of efficiency of solvatic sorption model in gradient reversed-phase liquid chromatography for method development and optimization.** Svetlana Vorslova, supervisor: *Dr. chem.* prof. Arturs Viksna. PhD thesis, 156 pages, 65 figures, 30 tables, 134 literature references, 18 appendices. In Latvian.

SOLVATIC SORPTION MODEL, REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, OPTIMIZING METHODS, GRADIENT ELUTION, PHENYLISOTHIOCYANATE DERIVATIVES OF AMINO ACIDS.

During this research the efficiency of the solvatic sorption model for prediction of the sorption and selectivity of a multicomponent mixture in the gradient mode of reversed-phase high-performance liquid chromatography was studied. The main aim of this research was to determine the efficiency of the solvatic sorption model for polar compounds, twenty-five phenylisothiocyanate derivatives of amino acids, and sorption prediction. Also was aimed to determine the efficiency of the model by using nine columns with different stationary phases and the two most popular mobile phases using in reversed-phase high-performance liquid chromatography. The results of the model efficiency study obtained using linear gradient elution were compared with results achieved with a widely used commercial linear solvent-strength model. The data obtained confirm the high efficiency of the solvatic sorption model. It could significantly expand the possibilities for model usage in the field of practical application of chromatography. The solvatic sorption model efficiency was studied using multi-step gradient elution. The results achieved confirm the high efficiency of the solvatic sorption model not only for linear gradient elution, but also for multi-step gradient elution. Multi-step gradient optimization is achieved, which provide shorter retention time and better analyzing compound resolution. Utilizing the solvatic sorption model a superior method was developed for the detection of phenylisothiocyanate derivatives of amino acids in biological materials.

## IEVADS

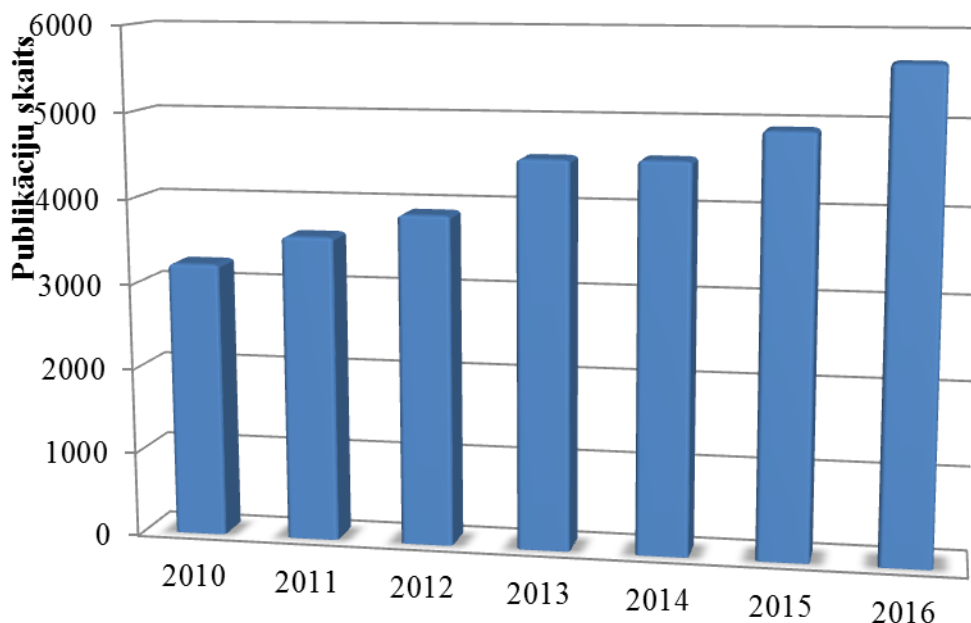
Apgrieztās fāzes augstefektīvā šķidrumu hromatogrāfija (AEŠH) ir viena no plašāk lietojamām fizikāli ķīmiskajām organisko savienojumu analīzes metodēm dažādās zinātniskajās un rūpnieciski orientētajās nozarēs. Plaši zināms fakts, ka jaunas AEŠH metodes izstrāde un optimizācija ir darbietilpīgs un laikietilpīgs process, kas prasa ievērojamu eksperimentu skaitu un iegūto rezultātu apstrādi. Mūsdienās aizvien pieaugošās konkurences apstākļos farmācijas un citās nozarēs pastāv liels pieprasījums pēc ātras AEŠH metodes izstrādes. Iespēja prognozēt analizējamo savienojumu izdalīšanas parametrus (izdalīšanas laiks un joslu izšķiršana) un hromatogrāfiskās analīzes apstākļus, balstoties uz analizējamās vielas struktūrformulas īpašībām un nekustīgās un kustīgās fāzes fizikāli ķīmiskajām īpašībām, var ievērojami samazināt veicamo eksperimentu skaitu un līdz ar to arī izmaksas, kas nepieciešamas daudzkomponentu maisījumu atdalīšanas metodes izstrādei un optimizācijai.

Kopš 1990. gada zinātniskajā literatūrā strauji pieaug dažādu matemātiski pamatotu modeļu pētījumi analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanai. Šī tēma nav zaudējusi savu aktualitāti līdz šim brīdim. Promocijas darbā ir aprakstītas solvātu sorbcijas modeļa izmantošanas iespējas daudzkomponentu savienojumu izdalīšanas parametru prognozēšanai. Modelis tiek uzskatīts par piemērotāko sorbcijas un selektivitātes prognozēšanas modeli apgrieztās fāzes šķidruma hromatogrāfijā. Izdalīšanas parametru prognozēšana ir balstīta uz analizējamo vielu struktūras uzbūvi, nekustīgās fāzes sorbentu ķīmiskajām īpašībām un kustīgās fāzes fizikāli ķīmiskajām īpašībām. Tas ievērojami palielina modeļa izmantošanas efektivitāti, salīdzinot ar citiem zināmajiem matemātiskajiem modeļiem, kuru darbības princips pamatojas, galvenokārt, uz eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem. Par pētāmajiem savienojumiem izvēlēti 25 aminoskābju fenilizotiocianāta (FITC) atvasinājumi. Modeļa izpētei tika izvēlētas deviņas apgrieztajā fāzē izmantojamas hromatogrāfijas kolonnas ar dažādām sorbcijas īpašībām. Kā kustīgā fāze izmantoti metanols un acetonitrils. Darbā solvātu sorbcijas modelis ir salīdzināts ar komerciāli pieejamo lineāra šķīdinātāja spēka „*linear solvent strength*” modeli.

### Tēmas aktualitāte

Zināms fakts, ka AEŠH metodes izstrāde un optimizācija ir laikietilpīgs process, kas prasa augsti kvalificētu speciālistu ieguldījumu. Augstas konkurences un cilvēku dzīves kvalitātes dēļ daudzās dzīves sfērās, kā, piemēram, farmācijā, klīnisku pētījumu, uztura

zinātnes pētījumu speciālisti nevar atļauties veltīt daudz laika jaunas metodes izstrādei. Līdz ar to mūsdienās viena no aktuālākajām hromatogrāfijas problēmām ir vielu izdalīšanas parametru un hromatogrāfijas apstākļu prognozēšanas iespējas. Tā no 2010. gada publikāciju skaits par analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanas iespējam pēc starptautiskās *ScienceDirect* datu bāzes datiem ir 30 382. Katru gadu publikāciju skaits un interese par šo tēmu pieaug. 2010. gadā publikāciju skaits bija 3 242, bet 2016. gadā to skaits bija 5 660. Publikāciju skaits *ScienceDirect* datu bāzē laikā periodā no 2010. līdz 2016. gadam ir redzams 1. attēlā [1].



**1. att. Publikāciju skaits par analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanas iespējam pēc starptautiskās *ScienceDirect* datu bāzes datiem.**

Zinātniskajā periodikā ir aprakstīti pētījumi par solvātu sorbcijas modeļa izmantošanu dažādu apgrieztās fāzes sorbentu raksturošanai izokrātiskajā (nemainīgās) un lineārā gradienta (mainīgās) kustīgās fāzes režīmā ar kustīgās fāzes sastāvu metanols/ūdens un acetonitrils/ūdens noteiktās attiecībās [2-5]. Aprakstīta arī solvātu sorbcijas modeļa izmantošana sākotnējo analīzes apstākļu prognozēšanai 6-(2,3-dihlorofenil)-1,2,4-triazīn-3,5-diamīnam (lamotrigīns) un tā atvasinājumiem, aromātiskiem savienojumiem, triazīna un fenilurīnvielas atvasinājumiem [2-6]. Normālos hromatogrāfijas izdalīšanas apstākļos šie savienojumi pārsvarā ir neitrāli. Literatūrā nav atrodami dati par solvātu sorbcijas modeļa izmantošanas iespējam augsti polāru savienojumu izdalīšanas parametru prognozēšanai. Nav pieejami dati par modeļa izmantošanas iespējām darbā ar segmentētu gradienta (mainīgās) kustīgās fāzes režīmu.

Praktiski ir ļoti vērtīgi izprast modeļa izmantošanas iespējas analizējamo parametru prognozēšanai darbā ar izdalīšanas gradienta režīmu. Apgrieztās fāzes AEŠH izmanto divus izdalīšanas gradienta veidus: lineāro un segmentēto. Mūsdienās lineārais izdalīšanas gradienta režīms ir izmantots visplašāk. Tas var būt aprakstīts ar vienkāršām teorētiskām likumsakarībām, tomēr tas nav piemērots savienojumu analīzei ar plašu polaritātes diapazonu. Atšķirībā no lineārā izdalīšanas gradienta režīma dotais gradients dod iespēju analizēt vielu maisījumu ar plašu polaritātes diapazonu un sorbcijas īpašībām viena eksperimenta laikā. Šī iespēja dod priekšroku segmentētā izdalīšanas gradienta vielu maisījumu analīzei daudzās hromatogrāfijas sfērās. Tēmas nozīmību nosaka ne tikai solvātu sorbcijas modeļa pielietojamības apraksts zinātniskajā literatūrā, bet arī komerciālā interese, kas teorētiski var paplašināt *ChromSword* programmatūras izmantošanu, kuras pamatā ir solvātu sorbcijas modelis.

### **Darba mērķis**

Promocijas darba mērķis ir izpētīt solvātu sorbcijas modeļa izmantošanas iespējas polāru savienojumu sorbcijas prognozēšanai apgrieztās fāzes AEŠH lineārā un segmentētā izdalīšanas gradienta režīma apstākļos.

### **Darba uzdevumi**

Darba mērķa sasniegšanai ir izvirzīti un veikti sekojoši darba uzdevumi:

1. Veikt solvātu sorbcijas modeļa efektivitātes izpēti izdalīšanas parametru prognozēšanai polāru savienojumu grupai, 25 aminoskābju FITC atvasinājumiem, kustīgās fāzes lineārā izdalīšanas gradienta režīmā.
2. Izvērtēt solvātu sorbcijas modeļa iespējas hromatogrāfisko apstākļu piemeklēšanai un sorbcijas parametru prognozēšanai polāru savienojumu grupai kustīgās fāzes segmentētā izdalīšanas gradienta režīmā.
3. Salīdzināt solvātu sorbcijas modeļa un lineārā šķīdinātāja spēka modeļa izdalīšanas parametru prognozēšanas iespējas.
4. Izstrādāt un validēt AEŠH metodi aminoskābju FITC atvasinājumu noteikšanai bioloģiskajos paraugos.

## **Promocijas darba zinātniskā novitāte**

Pirmo reizi pasaulē izpētīta aminoskābju FITC atvasinājumu (polāru savienojumu grupas) sorbcijas prognozēšana, izmantojot lineārā un segmentētā izdalīšanas gradienta režīmus, strādājot ar solvātu sorbcijas modeļi. Ir izpētītas solvātu sorbcijas modeļa izmantošanas priekšrocības hromatogrāfijas apstākļu piemeklēšanai jaunas segmentētā gradienta metodes izstrādei, kuras rezultātā ir izstrādāta un validēta jauna AEŠH metode aminoskābju FITC atvasinājumu noteikšanai cilvēka bioloģiskajos paraugos.

## **Praktiskā nozīmība**

Pētījuma rezultātā izpētīta solvātu sorbcijas modeļa prognozēšanas spēja polāro savienojumu (aminoskābju FITC atvasinājumu) noteikšanai. „Pirmā tuvinājumā” metodes prognozēšana veikta, pamatojoties vienīgi uz analizējamo vielu struktūru, nekustīgās un kustīgās fāzes fizikāli ķīmiskajām īpašībām. Tas ļauj iegūt analīzei pieņemamus sākotnējo izdalīšanas faktorus. Izmantojot „pirmā tuvinājumā” metodes iegūtos datus, veikta segmentētā gradienta hromatogrāfijas izdalīšanas parametru prognozēšana. Veiksmīga sākotnējā izdalīšanas parametru prognozēšana turpmāk dotu iespēju ietaupīt organiskos šķīdinātājus un optimizācijai nepieciešamo laiku gan lineārā gradienta režīmā, gan arī segmentētā gradienta režīmā. Noskaidrots, ka modelis vienlīdz labi darbojas prognozēšanai, izmantojot dažāda tipa nekustīgās fāzes sorbentus, kā arī populārākos, hromatogrāfijā izmantojamus, kustīgās fāzes organiskos modificētājus – metanolu un acetonitrilu. Pamatojoties uz to, ka modeļa darbības pamatprincips ir balstīts uz nosakāmo savienojumu un kustīgās un nekustīgās fāzes fizikāli ķīmiskajām īpašībām, var apgalvot, ka modelim ir liela praktiska nozīme jauno AEŠH metožu izstrādei. Balstoties uz veiktajiem pētījumiem, ir izstrādāta un optimizēta aminoskābju noteikšanas metode cilvēka bioloģiskajos materiālos (asins serums, asins plazma un urīns). Izstrādāta metode ir ļoti efektīvā ātrai aminoskābju acidūriju un/vai acidēmiju selektīvam skrīningam, kas ļauj laicīgi uzstādīt diagnozi un uzsākt attiecīgo terapiju. Izstrādāta metode ir pārbaudīta starplaboratoriju prasmes pārbaudēs un ir ieviesta VSIA „Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas” Ģenētiskās bioķīmijas laboratorijas ikdienas praksē.

## **Pētījumu rezultātu aprobācija**

Promocijas darba rezultāti ir atspoguļoti 5 zinātniskajās publikācijās. Pētījuma rezultāti ir prezentēti 6 starptautiskajās zinātnes konferencēs un 4 Latvijas mēroga konferencēs.

#### Zinātniskās publikācijas:

1. Golushko, J., Vorslova, S., Galushko, S., Viksna, A., Edolfa, K. (2014) Prediction of Retention in Gradient Reversed-Phase Liquid Chromatography for Phenylisothiocyanate-Derivatives of Amino Acids. American Chemical Science Journal, 4, 14-23.
2. S.Vorslova, J.Golushko, S.Galushko, A.Viksna. (2014) Prediction of Retention Parameters in Gradient Reversed-Phase Liquid Chromatography for Phenylisothiocyanate-Derivatives of Amino Acids Using Methanol as Organic Modifier. Latvian J Chem 1: 61-70.
3. Vorslova S, Golushko J, Galushko S, Viksna A (2015) Application of the Solvatic Model for Prediction of Retention in RP–LC for Multi-Step Gradient Profiles. Chromatographia, 78 (13), 899-908.
4. S. Vorslova, J. Golushko, S. Galushko, A. Viksna (2015) Efficiency of Solvatic Sorption Model for Predicting the Retention in Multi-Step Gradient RP-LC with Different Stationary Phases. American Chemical Science Journal, 9 (1), 1-11.
5. S. Vorslova, J. Golushko, S. Galushko, A. Viksna (2016) Efficiency of a solvatic sorbtion model for prediction of retention times in linear gradient reversed-phase liquid chromatography working with different stationary phases. Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, 65, 1, 37-49.

#### Starptautisko konferenču tēzes:

1. Silina S., Golushko J., Viksna A. Uses of salvation sorbtion model to predict retention for twenty five amino acids. In Book of Abstracts, The 29<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography. September 9-12, 2012, Torun, Poland, p. 37.
2. Silina S., Golushko J., Viksna A. The prediction of retention parameters of small and medium molecules by solvation sorbtion model using methanol as organic modifier. In Book of Abstracts, 17th Interenational conference „EcoBalt2012” October 18-19, 2012, Riga, Latvia, p. 75.
3. Vorslova S., Golushko J., Galushko S., Viksna A. Efficiency of Solvatic Sorbtion Model for Prediction of Multi-Step Gradient Elution in Reversed-Phase Liquid Chromatography. In Book of Abstract, 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC2013. June, 14-16, 2013. Netherlands, Amsterdam, p. 140.

4. Vorslova S., Golushko J., Viksna A. Opportunity of using Solvatic Sorbtion Model for Prediction of Multi-Step Gradient Elution in Reversed-Phase Liquid Chromatography. In Book of Abstract, 1st International Conference Modern aspects and applications of chromatography in education, research and industry. October 16-18, 2013, Daugavpils, Latvia, p. 2.
5. Vorslova S., Golushko J., Viksna A. Efficiency of Solvatic Sorbtion Model for Prediction of Highly Polar and Charged Analytes Working with Different Stationary Phases. In Book of Abstract, 20th International Symposium on Separation Sciences. August, 30- September, 2, 2014. Prague, Czech Republic, p. 68.
6. Vorslova S., Golushko J., Viksna A. Application of the Solvatic Model for Prediction of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography for Multi-Step Gradient Profiles. In Book of Abstract, International conference EcoBalt 2014. October, 8-10, Riga, Latvia, p. 63.

#### Ziņojumi konferencēs:

Pētījuma rezultāti ir ziņoti četrās Latvijas Universitātes konferencēs, Ķīmijas fakultātes Analītiskās un fizikālās ķīmijas sekcijās.

#### **Pateicības**

Promocijas darba autore izsaka vislielāko pateicību zinātniskā darba vadītājam *Dr. chem., prof. Arturam Vīksnam* (Latvijas Universitāte, Ķīmijas fakultāte) par atbalstu un sniegtajām zināšanām vairāku gadu garumā, kā arī zinātniskā darba konsultantei *Dr. chem. Jeļenai Goluško* (Institute of Chromatography) par doto iespēju veikt šo pētījumu, par sniegtajām konsultācijām un padomiem, kuri veicināja darba izstrādi. Autore pateicas LU Ķīmijas fakultātes Analītiskās ķīmijas katedru kolektīvam par veiksmīgu sadarbību.

Autore izsaka vissirsnīgāko pateicību VSIA „Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas” Ģenētiskās bioķīmijas laboratorijas vadītājai Pārslai Vēverei un visam kolektīvam par atbalstu, pacietību un sapratni.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

Apgrieztās fāzes augstefektīvā šķidrumu hromatogrāfija ir visplašāk lietotā fizikāli ķīmiskā metode organisko savienojumu analīzei. Izšķir divus kustīgās fāzes darba režīmus: izokrātisko (nemainīgo) un gradienta režīmu (mainīgo). Izokrātiskajā darba režīmā kustīgās fāzes koncentrācija (B%) darba laikā nemainās. Tas ir piemērots paraugu analīzei ar samērā šauru polaritātes un izdalīšanas laika diapazonu. Izdalīšanas gradienta režīmā kustīgās fāzes koncentrācija (B%) laikā pieaug. Tas nozīmē, ka savienojumu izdalīšanas laiks samazinās, palielinoties organiskās vielas koncentrācijai kustīgajā fāzē [7-9]. Plaši zināms fakts, ka AEŠH gradienta režīma izstrāde un optimizācija ir sarežģīts process, kas prasa lielu eksperimentu skaitu, un līdz ar to process ir dārgs. Sakarā ar to hromatogrāfijas speciālisti izvēlējās izmantot izdalīšanas gradienta režīmu, ja ir iespēja izmantot izokrātisko režīmu [7,8]. Turklāt jaunas izdalīšanas gradienta metodes pārnese starp dažādām hromatogrāfijas kolonnām, instrumentiem un telpām ir daudz sarežģītāks process nekā izokrātiskās metodes pārnese [10-12]. Neskatoties uz to, izdalīšanas gradienta režīms ir efektīvs paņēmiens sarežģītu daudzkomponentu maisījumu atdalīšanai un analīzei [7-9,13-16].

Matemātiskā sorbcijas procesa modulēšana ar uzstādītiem hromatogrāfijas apstākļiem un optimizācijas iespēja dod priekšroku klasiskai „*mēģinājumu un kļūdu*„ metodei. Pašlaik plaši tiek izmantoti matemātiskie modeļi, kuru uzdevums ir optimizēt hromatogrāfijas apstākļus darbā ar izdalīšanas izokrātisko režīmu [17-19]. Paralēli tiek veikti ievērojami pētījumi matemātiska sorbcijas procesa modulēšanai darbā ar gradienta režīmu [19-26]. Neskatoties uz to, ka pašlaik ir komerciāli pieejami dažādi datoru programnodrošinājumi hromatogrāfijas metožu vienkāršošanai un optimizācijai, vēl joprojām tiek veikti plaši pētījumi par šo jautājumu dažādās zinātnes nozarēs [8, 26-33].

## 1.1. Komerciāli pieejamie modeļu darbības principi

Klasiskā hromatogrāfijas metodes izstrāde notiek, izvērtējot katru iegūto hromatogrammu. Veicot pirmo eksperimentu, apstrādā iegūtos rezultātus un piemeklē hromatogrāfijas apstākļus nākamajam eksperimentam. Tādā veidā tiek apstrādāta katra nākamā hromatogramma, līdz ir iegūts optimāls rezultāts. Šī hromatogrāfijas apstākļu optimizācijas metode prasa lielu eksperimentu skaitu, kā arī katras iegūtās hromatogrammas rūpīgu apstrādi. [7-8, 34, 35].

Efektīva metodes izstrāde un optimizācija pamatojas uz labu hromatogrāfijas procesa saprašanu un daudzu hromatogrāfijas likumu zināšanām, kuri apraksta vielu izšķiršanu, mainoties hromatogrāfijas apstākļiem. Daudzi no šiem likumiem ir kvantitatīvi, līdz ar to precīzi aprēķini var veicināt labāku hromatogrāfijas apstākļu piemeklēšanu nākamajiem eksperimentiem [36-38].

Iespēja veikt analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanu, balstoties uz minimālo eksperimentāli iegūto rezultātu skaitu, kļūst arvien populārāka jaunas metodes izstrādes procesā. Prognozēšanas pieejas bieži izmanto tādos gadījumos, ja jaunas metodes izstrādei ir nepieciešams liels eksperimentu skaits. Tas ir raksturīgs vielu maisījumu sadalīšanai, kuri satur vairāk nekā desmit ķīmiski līdzīgu savienojumu. Šādos gadījumos datoru programmnodrošinājums ir ļoti noderīgs instruments. Sākot ar labi izvēlētiem rezultātiem, iegūtiem no minimālā eksperimentu skaita, balstoties uz precīziem aprēķiniem vai empīriskām likumsakarībām, var veikt analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanu citos eksperimenta apstākļos.

Komerčiāli pieejamās AEŠH metožu izstrādes programmas var klasificēt atkarībā no to funkciju potenciāla. Atsevišķas programmu paketes, kas nav saistītas ar hromatogrāfijas sistēmu, visi dati par hromatogrāfijas apstākļiem un iegūtajiem rezultātiem ir jāievada manuāli. Integrētās programmas ir savienojamas ar hromatogrāfijas sistēmu, visi dati no iegūtajiem eksperimentiem tiek automātiski pārsūtīti uz metodes izstrādes programmu, kur notiek datu apkopošana un apstākļu piemeklēšana. Šīs programmas veids ir daudz ērtāks izmantošanā, toties izmaksas ir samērā augstas, kā arī to nav iespējams izmantot atsevišķi no AEŠH sistēmas [27-28, 39-43]. Mūsdienās plašāk zināmo un izmantojamo datoru programmnodrošinājumu darbības principi ir:

- Izmainot vienu reizi izdalīšanas parametra mainīgo lielumu, var prognozēt vielu izšķiršanu kā funkciju no šī mainīgā lieluma. Prognozēšanai ir nepieciešami divu eksperimentu izdalīšanas parametri, iegūti noteiktos hromatogrāfijas apstākļos – kolonnas izmēri, kustīgās fāzes, plūsmas ātrums un izdalīšanas režīma parametri. Mainot kādu no parametriem, var veikt prognozēšanu. Metode ļauj strādāt gan izokrātiskajā, gan gradient režīmā. Modernākie datoru programmnodrošinājumi ļauj darboties arī ar citiem hromatogrāfijas parametriem, tādiem kā organiskā modificētāja tips, kustīgās fāzes pH, kolonnu temperatūra u.c. [7, 9, 27, 44-47].
- Izmainot vienu reizi vienu vai vairākus mainīgos lielumus, veic vielu izšķiršanas prognozēšanu kā funkciju no šiem mainīgajiem. Programmas izmanto vienas-, divu- vai trīs- dimensiju modelēšanu. Viena dimensija atbilst vienam parametram.

Eksperimentāli iegūtie rezultāti attēloti demonstrēšanas kartē „*resolution map*”, ar kuras palīdzību empīriski var noteikt katra savienojuma izdalīšanas parametrus. Plašāku izmantošanu šī metode ir guvusi organiskā modificētāja tipa optimizācijai. Metodes lielākais trūkums ir liels eksperimentālu rezultātu skaits, kas ir nepieciešams demonstrēšanas kartes attēlošanā. Tā divdimensiju demonstrēšanas kartes modulēšanai ir nepieciešami 10-15 eksperimentāli iegūtie dati. Ātrākai datu apstrādei modelis darbojas kā integrētais datoru programmnodrošinājums savienojumā ar hromatogrāfijas sistēmu [7, 9,39-40, 48-51].

- Nekustīgās fāzes parametru maiņa, analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšana tiek veikta jebkurai nekustīgajai fāzei. Metodes darbībai ir nepieciešami divu eksperimentu izdalīšanas parametri, veikti noteiktos hromatogrāfijas apstākļos – kolonnas izmēri, kustīgās fāzes, plūsmas ātrums un izdalīšanas režīma parametri. Analizējamo paraugu izdalīšanas parametru prognozēšanu var veikt, mainot hromatogrāfijas kolonnas izmērus (garums, iekšējais diametrs, daļiņu izmērs, poru izmērs) [7, 9, 26, 40, 46-48, 50].
- Kustīgās fāzes izmaiņas, izdalīšanas gradienta režīma maiņa ļauj veikt prognozēšanu citos kustīgās fāzes izdalīšanas režīmos. Datorsimulācijas metode gradienta režīma optimizācijai ir ļoti lietderīga jaunas AEŠH metodes izveidei. Izdalīšanas gradienta režīmā organiskā modificētāja koncentrācija nav pastāvīga, kā arī gradienta slīpums un forma var būt dažāds. Jaunas metodes izveide prasa lielu eksperimentu skaitu, datorsimulācijas programmas ļauj veikt analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanu empīriski. Sākuma parametri ir divi eksperimentu rezultāti noteiktos hromatogrāfijas apstākļos [7-9, 26, 40, 46-48, 50].
- Metodes izstrāde, mainot vienu vai vairākus hromatogrāfijas apstākļus, tādā veidā piemeklējot labāku analizējamo vielu izšķiršanu. Metode nav paredzēta analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanai, bet vairāk kā hromatogrāfijas apstākļu piemeklēšana, pamatojoties uz lielu eksperimentu skaitu dažādos hromatogrāfijas apstākļos. Darbā ar šo modeli ir nepieciešams hromatogrāfijas sistēmā integrētais automātiskais datoru programmnodrošinājums, kas nosaka lielas izmaksas [7, 8, 41].
- Eksperta metodes, kuras veic labāko analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanu, balstoties uz analizējamās vielas ķīmisko struktūrformulu un hromatogrāfijas sākuma apstākļiem. Atšķirībā no visām pārējām hromatogrāfijas apstākļu optimizēšanas metodēm, šī pieeja neprasa eksperimenta datus. Optimizācijas procesā piemeklē labākus hromatogrāfijas apstākļus, pamatojoties uz analizējamo

vielu ķīmisko struktūrformulu un kustīgās un nekustīgās fāzes fizikāli ķīmiskiem raksturlielumiem. Dotās prognozēšanas mērķis ir sasniegt labāku izšķiršanas faktoru ( $0,5 < k < 20$ ) pirmajam eksperimentam. Šai pieejai ir divi trūkumi: 1) analizējamo vielu struktūrformulas nav vienmēr zināmas, it īpaši paraugos ar sarežģītu matricu, kura atstāj negatīvu efektu uz joslu izšķiršanu, 2) prognozētais izdalīšanas laiks ir ļoti aptuvens, īpaši tas attiecas uz savienojumiem ar sarežģītu struktūru vai arī optiskiem izomēriem. Labāku rezultātu sasniegšanai ir ieteicams izmantot arī eksperimentāli iegūtos datus. Programmas var izmantot kā atsevišķas paketes, veicot optimizāciju manuāli, kā arī kā integrētu programmu savienojumu ar hromatogrāfijas sistēmu. Integrētajai sistēmai ir augstākas izmaksas, toties to ir lietderīgi izmantot sarežģīto matricu paraugiem ātrai AEŠH metodes izstrādei. [7, 8, 27, 42, 52-56].

Analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanas iespējas ir teorētiski un praktiski interesanta problēma, kas jau ilgstošu laiku ir pētīta hromatogrāfijas nozarē. Katrai metodei ir savas priekšrocības un trūkumi. Metodes, kuras balstās uz divu eksperimentāli iegūto rezultātu datiem, ir plašāk zināmas, labi aprakstītas zinātniskajā literatūrā un ir plaši izmantotas hromatogrāfijas apstākļu optimizēšanā. Metodes lielākais trūkums: veiksmīgai optimizācijai ir nepieciešama labi piemeklētu eksperimentālo datu izmantošana. Šis ierobežojums var prasīt lielu eksperimentu skaitu, līdz prasība ir sasniegta, un tikai tad var veikt optimizāciju. Metode balstās uz lineāro šķīdinātāja spēka modeli.

Prognozēšanu, pamatojoties uz analizējamās vielas struktūrformulu, stipri ierobežo metodes izmantošanas sfēras. Ir jāzina analizējamo maisījumu komponenti un to struktūrformulas, turklāt prognozēšana nav pietiekami precīza. Tā ir lietderīga organiskā modificētāja daudzuma aprēķināšanai, kā arī analizējamo vielu kopējā izdalīšanas laika noteikšanai. Precīzākai prognozēšanai ir nepieciešami eksperimentāli iegūtie dati. Labus rezultātus var sasniegt, izmantojot viena eksperimenta rezultātus. Neskatoties uz trūkumiem, hromatogrāfijas speciālisti turpina nodarboties ar analizējamās vielas sorbcijas laika un molekulas ķīmiskās struktūrformulas savstarpējas sakarības pētījumiem. Šī metode balstās uz solvātu sorbcijas modeli.

## 1.2. Solvātu sorbcijas modeļa teorija

Lai izstrādātu metodi selektivitātes un sorbcijas noteikšanai apgrieztās fāzes AEŠH, ir nepieciešams izmantot vairākus jēdzienus par sorbcijas procesu, analizējamās vielas (sorbāta) struktūru, kā arī par sorbāta mijiedarbību ar kustīgo un nekustīgo fāzi. Pašlaik ir iegūts

pietiekošs daudzums teorētisko un eksperimentālo pierādījumu tam, ka ķīmiski saistīto ogļūdeņražu virsmas kārtu var uzskatīt par starpposmu, kurš izveidojas starp savdabīgu sūkli no alkilgrupām un kondensēta šķīduma monoslāni, kurā ir spējīgas ieurbties sorbāta molekulas, tādā veidā atstājot ievērojamu ietekmi uz virsmas slāņa īpašībām [57, 58]. Līdz ar to, palielinot kustīgās fāzes hidrofobās īpašības, palielinās arī sorbāta daļiņu pāreja nekustīgajā fāzē. Ir pierādīts, ka apgrieztās fāzes AEŠH vienlaicīgi notiek vairāki procesi: atdalīšanas procesi, kā arī konkurējošie adsorbcijas procesi. Šajā gadījumā atdalīšanas process ir dominējošais un virsmas slānim ir raksturīgas kvazi-šķidrums īpašības [57, 59-61]. Sorbcijas un selektivitātes aptuvenai izvērtēšanai ir ieteicams izmantot divu slāņu hromatogrāfiskās sistēmas modeli:

1. Sorbenta modificētā virsma apgrieztās fāzes AEŠH ir virsmas slānis, kas sastāv no ogļūdeņraža slāņa un kustīgās fāzes vairākiem komponentiem;
2. Virsmas slāni var uzskatīt par kvazi-šķidrumu ar vairākiem raksturlielumiem: virsmas spraigums ( $\gamma_s$ ), dielektriska konstante ( $\epsilon_s$ ), kuri mainās kopā ar kustīgās fāzes un sorbenta īpašību izmaiņām;
3. Sorbāta molekulas iespiežas virsmas slānī.

Sorbciju nosaka starpība starp molekulas solvatācijas enerģiju kustīgajā fāzē un virsmas slānī.

Pastāv uzskats, ka virsmas slānis nav uzskatāms par šķidru ogļūdeņražu slāni, bet ir īpašs alkilgrupu stāvoklis. Alkilgrupas ir saistītas ar virsmu, starp kurām atrodas zināms kustīgās fāzes komponentu daudzums. Pašsaprotams, ka šāda modificēta slāņa īpašības krietni atšķirās no ogļūdeņražu īpašībām.

Pieņemot, ka virsmas slānim piemīt noteikti vidēji raksturlielumi un sorbāta daļiņas var ieurbties šajā slānī, var izmantot vienkāršu pieeju sorbcijas parametru noteikšanai. Galvenā matemātiskā izteiksme sorbcijas parametru noteikšanai ir redzama 1.1. vienādojumā:

$$\ln k = \frac{-\Delta G}{RT} + \phi \quad (1.1.)$$

kur  $\phi$  – fāžu attiecība. Sorbcijas lielumu nosaka solvatācijas enerģijas starpības sadalījums sistēmā.

$$\Delta G = \Delta G_{solv.s.} - \Delta G_{solv.m.} \quad (1.2.)$$

$$\Delta G_{solv.} \approx \Delta G_c + \Delta G_{int.} \quad (1.3.)$$

$$\Delta G = \Delta G_{c.s.} - \Delta G_{c.m.} + \Delta G_{int.s.} - \Delta G_{int.m.} \quad (1.4.)$$

Kur  $\Delta G_{c.s.}$  un  $\Delta G_{c.m.}$  ir enerģija, kas ir nepieciešama molekulu izmēra dobumu veidošanai virsmas slānī un kustīgajā fāzē.  $\Delta G_{int.s.}$  un  $\Delta G_{int.m.}$  ir molekulas iedarbības enerģija ar apkārtējo vidi, atrodoties virsmas slānī un kustīgajā fāzē [62-64].

Vienkāršākais variants ir redzams 1.5. vienādojumā.

$$\Delta G_c = NA\gamma + NA_1\gamma(k_1^e - 1) \quad (1.5.)$$

$N$  – ir Avogadro skaitlis,  $A$  – šķidrums dobuma virsma,  $\gamma$  – virsmas spraigums (ūdenim  $\gamma=72,6 \cdot 10^{-3} \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ ),  $A_1$  – šķīdinātāja molekulas laukums un  $k_1^e$  katram šķīdumam raksturīga konstante (ūdenim  $k_1^e=1,277$ ) [62, 64]. Aptuvena  $A$  lieluma noteikšanai izmanto Van der Waalsa rādīsu, pieņemot, ka molekulai ir sfēriska forma. Tādā veidā var noteikt molekulas aptuveno virsmas laukumu. Precīzākai noteikšanai var izmantot dobuma laukumu, kuru sorbāta molekulas veido šķīdinātājā. Praktiski precīzāk un vienkāršāk dobuma laukumu var noteikt, izmantojot eksperimentāli iegūtos dažādu savienojumu parciālos mola tilpumus šķīdinātājā. Mūsdienu metodes parciālos mola tilpumus ļauj noteikt ar precizitāti līdz  $0,1 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$  [65]. Parciālos mola tilpumus dažādām vielu grupām (spirti, ogļūdeņraži, aminoskābes) var atrast literatūrā. Eksperimentālie dati ir pierādījuši, ka atsevišķo molekulu fragmentu ieguldījums aditivitātes principa izmantošanā ir pieņemams tuvinājums mola tilpuma aprēķināšanai. Līdz ar to, uzskatot, ka dobumam ir sfēriska forma, var pieņemt 1.6. vienādojumu.

$$A = N^{-2/3} \times 4,836 (\sum_i V_i)^{2/3} \quad (1.6.)$$

Kur  $V_i$  – molekulu fragmentu parciālo mola tilpumu pieaugums šķīdinātājā. Liels eksperimentāli noteikto parciālo mola tilpumu skaits dažādiem savienojumiem ļauj noteikt  $\sum V_i$  vērtības gandrīz ikvienam savienojumam. Turklāt ir ieteiktas vienkāršas sakarības  $V_i$  noteikšanai ar pietiekami augstu precizitāti. Ņemot to vērā,  $\Delta G_c$  aprēķināšanai var izmantot 1.7. vienādojumu [64, 66].

$$\Delta G_c = N^{1/3} \gamma \times 4,836 [(\sum_i V_i)^{2/3} + v_m^{2/3} (k_m^e - 1)] \quad (1.7.)$$

Kur  $v_m$  – kustīgās fāzes mola tilpums.

Aprēķinu vienkāršošanai tiek izmantots parciālais mola tilpums ūdenī, pieņemot, ka dobumu raksturojošiem parametriem gan virsmas slānī, gan kustīgajā fāzē ir jābūt ar tuvām

vērtībām. Svarīgs faktors ir pareiza sorbāta iedarbības potenciāla formas izvēle ar apkārtējo vidi,  $\Delta G_{\text{int}}$ . [66]. Solvafobas iedarbības teorijā tiek izmantota Van der Vaalsa un elektrostatiskās iedarbības summa.

$$\Delta G_{\text{int.}} \approx \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{e.s.}} \quad (1.8.)$$

Lieluma  $\Delta G_{\text{e.s.}}$  noteikšanai tiek izmantots Onzagera reaktīva lauka kontinuuma modelis [62, 63, 66]. Kā jau iepriekš minēts, dotā lieluma noteikšanai ir nepieciešami raksturlielumi, kuri nav zināmi un ir grūti iegūstami. Turklāt ir jāpiebilst, ka visas Van der Vaalsa iedarbības enerģijas aprēķinu metodes ir tuvinātas, un to noteikšanai ir nepieciešams liels vielu raksturlielumu skaits vai arī liels empīrisku parametru skaits. Mūsdienu kontinuuma teorijas, kurās tiek izmantotas tikai elektrostatiskās iedarbības, tiek izmantotas aptuvenai solvatācijas enerģijas aprēķināšanai. Pastāv uzskats, ka vielas molekula sastāv no dipoliem, kuri neatkarīgi iedarbojas uz to apkārtesošo kontinuumu [65, 67-70]. Šajā gadījumā tiek izmantots 1.9. vienādojums.

$$\Delta G_{\text{int.}} \approx \Delta G_{\text{e.s.}} = -\frac{1}{2} \frac{2(\varepsilon - 1)}{(2\varepsilon + 1)} \sum_j \frac{\mu_j^2}{a_j^3} \quad (1.9.)$$

Kur  $\mu_j$  ir saišu dipola moments,  $a_j$  – iedomājāmās sfēras efektīvais rādiuss, kurā atrodas dipoli,  $\varepsilon$  – apkārtesošā kontinuuma dielektriskā caurlaidība.

Aprakstītajā pieejā nav nepieciešamības izmantot kvantu ķīmijas metodes atomu lādiņa noteikšanai. Dipolu momenti ir noteikti gandrīz visām saitēm un dažādos savienojumos atšķiras minimāli. Konkrētāk, katrs dipols nav aptverts ar pilnīgi noslēgto šķīdinātāja molekulu sfēru, līdz ar to precīzāk ir runāt par lodes segmentiem. Ieteicamā metode pamatojas uz pieņēmumu, ka dažādos savienojumos lodes segmenta parametri, kuros atrodas vienādi dipoli, mainās šaurā diapazonā. No tā izriet, ka elektrostatiskās enerģijas aprēķināšanai doto parametru aptuveni var izteikt ar sfēras efektīvo rādiusu ( $a_i$ ). Ievietojot vienādojumus 1.8. un 1.10. izteiksmē 1.5., tiek iegūts 1.10. vienādojums.

$$-\Delta G = N^{1/3} \times 4,836 (\gamma_m - \gamma_s) \left( \sum_i V_i \right)^{2/3} + v_m^{2/3} (k_m^e - 1) \gamma_m - v_s^{2/3} (k_s^e - 1) \gamma_s + [f(\varepsilon_s) - f(\varepsilon_m)] \sum_j \frac{\mu_j^2}{a_j^3} \quad (1.10.)$$

$$\text{kur } f(\varepsilon) = \frac{(\varepsilon - 1)}{(2\varepsilon + 1)}$$

Šis vienādojums tika iegūts, izmantojot dažus nezināmus virsmas slāņa parametrus  $k_s^e$ ,  $f(\varepsilon_s)$ ,  $\gamma_s$  un  $v_s$ . Pastāv iespēja noteikt kolonnas un sorbenta virsmas slāņa parametrus attiecībā pret standartvielu, piemēram, benzolu. Šajā gadījumā izmanto 1.11. izteiksmi.

$$\ln k_x = \frac{1}{RT} \{ N^{1/3} \times 4,836(\gamma_m - \gamma_s) \left[ \left( \sum_i V_i \right)^{2/3} - (V_{st})^{2/3} \right] + [f(\varepsilon_s) - f(\varepsilon_m)] \left( \sum_j \frac{\mu_j^2}{a_j^3} - \sum_{j.st.} \frac{\mu_{j.st.}^2}{a_{j.st.}^3} \right) \} + \ln k_{st} \quad (1.11.)$$

Izmantojot standartvielu, nav nepieciešamības noteikt  $\sigma$ ,  $v_s$  un  $k_s^e$  lielumus, kas stipri vienkāršo aprēķinu. Tādā veidā 1.11. izteiksmi var vienkāršot un rezultātā iegūt 1.12. izteiksmi.

$$\ln k_x = \ln k_{st.} + 16,48(\gamma_m - \gamma_s) \left[ \left( \sum_i V_i \right)^{2/3} - (V_{st.})^{2/3} \right] + 0,8234 [f(\varepsilon_m) - f(\varepsilon_s)] \left( \sum_j \Delta G_{e.s.j.H_2O} - \Delta G_{e.s.st.H_2O} \right) \quad (1.12.)$$

Dotajā izteiksmē  $\Delta G_{e.s.j.H_2O}$  un  $\Delta G_{e.s.st.H_2O}$  palielina  $\Delta G_{e.s.}$  ietekmi uz molekulas  $x$  dipolu  $j$ , kā arī  $(\Delta G)_{e.s.}$  ietekmi uz standartvielām ūdenī. Ņemot vērā 1.13. izteiksmi,

$$\sum_j \frac{\mu_j^2}{a_j^3} = \frac{-\Delta G_{e.s.j.H_2O}}{f(\varepsilon_{H_2O})} \quad (1.13.)$$

Šajā gadījumā  $\Delta G$  ir izteikts  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $\gamma$  izteikts  $\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$  un  $V \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ .  $\gamma_s$  un  $f(\varepsilon_s)$  lielumus ir viegli izteikt, izmantojot standartu un dažas referentās vielas.

Izteiksmi 1.12. ir viegli vienkāršot līdz 1.14. izteiksmei, ņemot vērā, ka  $\Delta G_{e.s.st.H_2O}$  ir standartvielas  $x$  mijiedarbības enerģija ar ūdeni,  $V_{st.}$  ir dotās vielas parciālais mola tilpums ūdenī.  $\gamma_m$  un  $\varepsilon_m$  ir virsmas spraigums un kustīgās fāzes dielektriskā caurlaidība.  $k_x$  un  $k_{st}$  ir savienojuma  $x$  un standartvielas izmantošanas koeficienti. Līdz ar to modelis ir balstīts uz to, ka izmaiņas kustīgajā fāzē un virsmas slānī veicina vielas virsmas spraiguma un dielektriskās caurlaidības izmaiņas.

$$\ln k_x = a \left( \sum_i V_i \right)^{2/3} + b \left( \sum_j \Delta G_{e.s. jH_2O} \right) + c, \text{ kur} \quad (1.14.)$$

$a = 16,48(\gamma_m - \gamma_s)$  un  $b = 0,8234 \times a(\epsilon_m) - a(\epsilon_s)$ , un parametrs  $c$  ietver sevī  $\phi$  un pārējos kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumus. No tā izriet, ka katru kolonnu kvantitatīvi var raksturot ar trim ( $a$ ,  $b$  un  $c$ ) dotiem parametriem, kuri nosaka izdalīšanos un selektivitāti.

Lai noteiktu hromatogrāfiskās sistēmas parametrus izvēlētam kolonnas sorbentam un organiskā modificētāja koncentrācijai, ir nepieciešams veikt references materiāla sorbcijas noteikšanu dažādos apstākļos. Precīzākai parametru noteikšanai vēlams izmantot vielas ar pēc iespējas tālākām  $\Delta G_c$  un  $\Delta G_{e.s.}$  vērtībām un polaritātēm. Palielinot salīdzināmo vielu skaitu, samazinās noteikšanas kļūda  $a$ ,  $b$  un  $c$  parametriem [7, 24-25, 71-74].

### 1.3. Lineārā šķīdinātāja spēka (*linear solvent strength*) modeļa teorija

Populārākās šķīduma sistēmas, izmantojamās AEŠH ir bināras, ūdens–organiskais šķīdums. Liels pētījumu skaits apliecina, ka darbā ar apgrieztās fāzes AEŠH izmaiņas binārajā šķīdumu sistēmā izraisa analizējamo vielu izdalīšanas parametru izmaiņas, kuras var aprakstīt ar lineāro šķīdinātāja spēka modeli [21, 75-81]. Modelī analizējamā savienojuma izdalīšanas logaritma koeficients  $\log k$  ir lineāri saistīts ar organiskā modificētāja tilpuma daļu binārajā sistēmā. Lineāro šķīdinātāja spēka modeli apraksta ar 1.15. vienādojumu.

$$\log k = \log k_w - S\phi \quad (1.15.)$$

Vienādojumā izmantotais  $\log k_w$  lielums ir ekstrapolēta  $\log k$  vērtība, kad kustīgās fāzes sastāvā ir 100% ūdens ( $\phi = 0$ ). Lielums  $S$  ir konstantes lielums, raksturīgs konkrētai hromatogrāfijas sistēmai un konkrētām analizējamām vielām. Lielums  $\phi$  ir organiskā modificētāja ( $B$ ) tilpuma daļa kustīgās fāzes sastāvā ( $\phi = B\%/100$ ).

Analizējamo vielu izdalīšanas parametru noteikšanai ir nepieciešama sistēmas kalibrēšana, eksperimentālo rezultātu dati, kuri iegūti divos praktiskos eksperimentos. Neskatoties uz to, izmantojot šo modeli, var ievērojami samazināt jaunas metodes izstrādes laiku [75, 77, 82].

Veicot metodes izstrādi izokrātiskajā režīmā, modeli ir nepieciešams kalibrēt divās dažādās organiskā modificētāja koncentrācijās. Pamatojoties uz 1.15. vienādojumu, lielums  $\log k_w$  tiek atvasināts, ekstrapolējot to no  $\log k$  vērtības attiecības pret organiskā modificētāja tilpuma daļu. Kalibrēto lineāro šķīdinātāja spēka modeli var izmantot

analizējamo vielu izdalīšanas parametru noteikšanai, izmantojot gan šo, gan citus organiskos modificētājus [76]. Labākai izdalīšanas parametru prognozēšanai lineāro šķīdinātāja spēka modeli ir nepieciešams kalibrēt ar katru organisko modificētāju, kurš tiek izmantots darbā [21,75,78, 82-85].

Lielāka interese hromatogrāfijas jomā ir saistīta ar analizējamo vielu prognozēšanas un metodes izstrādes iespējām izdalīšanas gradienta režīmā. Lineārais šķīdinātāja spēka modelis ļauj veikt prognozēšanu lineārā izdalīšanas gradienta režīmā. Modeļa kalibrēšanu veic, izmantojot divus izdalīšanas gradienta režīmā eksperimentāli iegūtos datus. Šajā gadījumā ir jāņem vērā organiskā modificētāja koncentrācijas maiņu laikā  $\phi_b$ , kura lineāri tiek paaugstināta analīzes laikā. Organiskā modificētāja koncentrācijas izmaiņu var aprakstīt ar 1.16. vienādojumu.

$$\phi_b = \phi_0 + \phi_t', \quad (1.16.)$$

kur  $\phi_0$  ir organiskā modificētāja daudzums kustīgās fāzes sastāvā analīzes sākumā,  $\phi_t' = \frac{d\phi_b}{d\phi_t}$  ir kustīgās fāzes sastāva izmaiņa laikā. Lineāro šķīdinātāja spēka modeli lineāra gradienta apstākļos apraksta 1.17. vienādojums [75].

$$\log k' = (\log k_w - S\phi_0) - S\phi_t', \quad 1.17.$$

kur  $(\log k_w - S\phi_0)$  ir atbilstošs sākuma apstākļiem  $\log k_0$ , un faktors  $S\phi_t'$  atbilst  $b/t_0$ .

Pamatojoties uz eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem no diviem dažādiem izdalīšanas gradienta režīmu laikiem,  $t_G$ , var veikt cita izdalīšanas gradienta režīma analizējamo vielu izdalīšanas laika  $t_R$  noteikšanu, kā arī  $\log k_w$  un  $S$  parametrus. Tas ir iespējams, pateicoties 1.18. vienādojumam [75].

$$t_R = \left( \frac{t_0}{b} \right) \log(2,3k_0b + 1) + t_0 + t_D \quad 1.18.$$

Vienādojumā izmantotie lielumi ir  $t_0$  - tukšais laiks „*dead time*”, t.i., laiks, kādā no kolonnas izdalās kustīgā fāze vai vielas, kuras dotajos apstākļos nesorbējas,  $k_0$  ir lieluma  $k$  izokrātiskā vērtība izdalīšanas gradienta režīma sākumpunktā,  $t_D$  ir izdalīšanas gradienta laiks „*delay time*”, t.i., laiks, kādā hromatogrāfijas sistēmā notiek pāreja no izdalīšanas izokrātiskā režīma uz izdalīšanas gradienta režīmu, un  $b$  lielums ir gradienta slīpuma parametrs, kuru var raksturot ar 1.19. vienādojumu [75,77].

$$b = \frac{t_0 \Delta \phi S}{t_G} = \frac{V_m \Delta \phi S}{t_G F} \quad 1.19.$$

$V_m$  ir kolonnas tukšie tilpumi „*dead volume*”, t.i., tilpumi AEŠH iekārtā, kuri ietekmē vielu atdalīšanu (injektora, kapilāru un detektora ķivetes tilpumi).  $\Delta \phi$  ir kustīgās fāzes sastāva maiņa,  $t_G$  ir izdalīšanas gradienta laiks,  $F$  ir plūsmas ātrums un  $S$  ir koeficients, kas nosaka savstarpējo attiecību starp  $\log k$  un organiskā šķīduma  $\phi$  tilpuma daļu [75, 77].

#### 1.4. Paraugu izvēle solvātu sorbcijas modeļa prognozēšanas efektivitātes izpētei

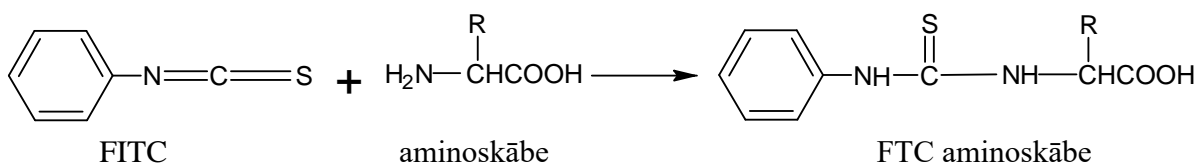
Zināšanas par aminoskābju sastāvu dažādos objektos ir pietiekami svarīgas, lai uzsāktu to pētīšanu un identifikāciju, novērtējot to īpašības un kvantitatīvo saturu. Aminokābju sastāva noteikšana ir svarīga daudzās jomās, tā, piemēram, peptīdu sintēzē, pārtikas produktu un dzērienu analīzē, kā arī medicīnā – aminoskābju sastāva noteikšanā bioloģiskajos materiālos.

Aminoskābju noteikšanai cilvēka bioloģiskajos materiālos ir svarīga nozīme metabolo slimību diagnostikā. Tā aminoskābju paaugstinātas vai pazeminātas koncentrācijas var norādīt uz vairākām iedzimtām metabolām saslimšanām. Metabolisma procesa traucējumu rezultātā notiek aminoskābju un to atvasinājumu uzkrāšanās organismā, kas izraisa toksisko vielu akumulāciju. Šī iemesla dēļ metabolās slimības ir simptomātiskas agrīnā vecumā un izpaužas kā psihomotorās un intelektuālās attīstības atpalcība. Var novērot arī neiroloģiskās izpausmes, kas var novest pie straujas dzīves kvalitātes samazināšanās, līdz pat agrīnai nāvei savlaicīgi nediagnosticētiem pacientiem. Metabolo slimību gadījumā attiecīgo aminoskābju aizvietojošā diēta var uzlabot pacienta dzīves kvalitāti, samazinot vai pat novēršot slimības izpausmes simptomus [86-88].

Pietiekoši daudz darba ir ieguldīts aminoskābju enantiomēru atdalīšanai. Pētījumu rezultātā ir zināms, ka lielākajai brīvo aminoskābju daļai ir zems UV molārās absorbcijas koeficients. Mūsdienās izmantotās aminoskābju analīzes metodes pamatojas uz aminoskābēs esošo aminogrupu reakcijām, kuru rezultātā tiek iegūti UV spektra redzami vai fluorescējošie atvasinājumi. Pirmajā gadījumā šos atvasinājumus var iegūt pirms aminoskābju sadalīšanas (pirmskolonnas derivatizācija), kad derivatizācijas procesu veic ārpus hromatogrāfijas sistēmas. Otrajā gadījumā derivatizācijas procesu veic pēc aminoskābju atdalīšanas, tas ir, pirms ievadīšanas detektorā (pēc kolonnas derivatizācija), kas notiek

hromatogrāfijas sistēmas ietvaros. AEŠH metodes aminoskābju noteikšanai ir ierobežotas ar derivatizācijas reaģenta un pirms vai pēc kolonnas derivatizācijas izvēli. Līdz šim visinteresantākie pētījumi AEŠH aminoskābju noteikšanas jomā tika veikti, pamatojoties uz dažādiem derivatizācijas reaģentiem, to izvēli un optimizāciju [89,90].

Fenilizotiocianāts (FITC; *phenylisothiocyanate*), tāpat zināms kā *Edmana reaģents*, pašlaik ir visplašāk lietotais pirmskolonnas derivatizācijas reaģents aminoskābju noteikšanai. Aminokābes tiek pārveidotas par feniltiokarbamila (FTC) atvasinājumiem (1.1. attēls). Reakcijā piedalās gan pirmējās, gan sekundārās aminokābes, veidojot FTC atvasinājumus, kurus var noteikt, izmantojot UV detektoru (240-255 nm) ar detektēšanas robežu 5 – 500 pmol [91-94].



### 1.1. att. Fenilizotiocianāta reakcija pirmējām aminokābēm.

Visas aminokābes veido mono-FTC atvasinājumus, izņēmumi ir lizīns un cisteīns, kuri veido bis-FTC formas. Iegūtie atvasinājumi ir pietiekoši stabili, tomēr nelielas izmaiņas var izraisīt nepietiekoši laba pH kontrole, tas ir FTC atvasinājumu pārveidošanās par FTH feniltiohidratācijas atvasinājumiem. FTC aminoskābju atvasinājumu iznākumu var negatīvi ietekmēt arī dažu divvērtīgo katjonu vai metālu klātbūtne. Veicot pētījumus, tika pierādīts, ka amonija acetāts, nātrija acetāts un nātrija hlorīds neatstāj nekādu ietekmi uz FTC atvasinājumu noteikšanu [89, 91-99].

Otrs plaši izmantojams aminoskābju derivatizācijas reaģents ir ninhidrīns (*ninhydrin*). Tas ļauj noteikt gan pirmējās, gan otrējās aminokābes. Dotās reakcijas rezultātā aminoskābju atdalīšanu un noteikšanu ir jāveic pie diviem viļņa garumiem. Pirmējo aminoskābju ātra Ruhemana violetā (*Ruhemann's violet*) kompleksa veidošanās nedod iespēju šo metodi izmantot pēc kolonnas derivatizācijai. Izmantojot ninhidrīna derivatizācijas metodi, var panākt 100 pmol zemu jutību, kas ir diezgan zema salīdzinājumā ar citām derivatizācijas metodēm, tomēr nodrošina labu analīžu atkārtotamību un pareizību [89,90,99-100].

Nākamā populārā aminoskābju derivatizācijas metode ir o-ftaldialdehīda (OFA; *ortho-phthaldialdehyde*) derivatizācija. Tā tiek uzskatīta par ninhidrīna alternatīvu pēc kolonnas derivatizācijas metodē, kuras jutība ir krietni augstāka. Ne tik plaši kā pēc kolonnas derivatizācijas reaģents, OFA ir zināms arī kā pirmskolonnas derivatizācijas reaģents.

Izmantojot OFA kā pirmskolonnas derivatizācijas reaģentu, ir jānodrošina spēcīgo katjonu apmaiņas hromatogrāfijas metodes izmantošanu. Galvenais OFA derivatizācijas reaģenta trūkums ir tā nespēja reaģēt ar otrējām aminoskābēm. Šo problēmu var atrisināt, izmantojot oksidāciju ar hloramīnu-T vai hipohlorītu. Neskatoties uz minētajiem trūkumiem, šī pirmskolonnas derivatizācijas metode ir diezgan bieži izmantota aminoskābju noteikšanai, jo tā ir daudz jutīgāka un prasa daudz mazāk laika nekā pārējās AEŠH metodes. O-ftaldialdehīda derivatizācijas metode ir ieguvusi plašu pielietojumu klīniskajā sfērā [89,90, 101].

Aminoskābju derivatizācijai izmanto arī fluoreskamīnu (*fluorescamine*). To var izmantot kā ninhidrīna alternatīvu pēckolonnas derivatizācijā. Līdzīgi kā OFA tas nereaģē ar otrējiem kamīniem. Neskatoties uz to, fluoreskamīna derivatizāciju vēl joprojām izmanto peptīdu un proteīnu marķēšanai. Kā risinājums fluoreskamīna izmantošanai reakcijā ar otrējiem amīniem ir oksidācijas aģentu izmantošana, piemēram, hloramīns-T, hipohlorīts vai N-hlorosukcinamīds. [89, 90].

Mazāk populārie aminoskābju derivatizācijas reaģenti ir dansila hlorīds (DNS-Cl; *1-dimetilaminaftalen-5-sulfonyl chloride*) un dabsila hlorīds (DABS-Cl; *dimethylaminoazobenzenesulfonyl chloride*). Dansila hlorīds reaģē gan ar pirmējiem, gan ar otrējiem amīniem, veidojot fluorescējošu atvasinājumu. DNS-Cl derivatizācijas metodes galvenie trūkumi ir blakusproduktu veidošanās derivatizācijas reakcijas laikā, kā arī samērā garš reakcijas laiks. Dabsila hlorīds stājas reakcijā gan ar pirmējiem, gan ar otrējiem amīniem, veidojot derivatizācijas produktus ar augstu absorbciju redzamā gaismā, kas ir šīs metodes lielākā priekšrocība [89,90, 102].

9-Fluorenilmetil hlorformāts (FMOC-Cl; *9-fluorenylmethyl chloroformate*), reaģējot ar aminogrupām, veido stipri fluorescējošu un stabilu atvasinājumu. Minētais reaģents stājas reakcijā ar visām aminoskābēm sārmainā pH vidē istabas temperatūrā, veidojot stabilu aminoskābju atvasinājumu [89,90,103].

6-Aminokunolil-n-hidroksisukcinimidilkarbamāts (AKK; *6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate*) reakcijā ar aminoskābēm veido stipri fluorescējošu atvasinājumu. AKK derivatizācijas reaģents stājas reakcijā gan ar pirmējām, gan ar otrējām aminoskābēm, veidojot ļoti stabilu atvasinājumu, līdz 48 h. AKK izmanto pirmskolonnas derivatizācijas reakcijā. Šo aminoskābju derivatizācijas reaģentu izmanto gan AEŠH, gan ultra efektīvajā šķidrums hromatogrāfijā [89,90, 104-105].

Aminoskābju derivatizācijai izmantojamo reaģentu salīdzinājumu var apskatīt 1.1. tabulā.

**Aminoskābju noteikšanai izmantoto derivatizācijas reaģentu salīdzinājums**

Salīdzināmie parametri	Pirmskolonnas derivatizācija					Pēckolonnas derivatizācija		
	OFA	FITC	DABS- Cl	FMOC- Cl	AKK	Ninhidrīns	OFA	OFA/ hloramīns- T
Noteikšanas metode	UV/F	UV	VIS	UV/F	F	VIS	F	F
Detektēšanas robeža, pmol	1000(UV) < 1(F)	5-50	2-10	<1 (F)	-	50-100	3-5	10-100
Otrējo amīnu noteikšana	-	+	+	+	+	+	-	+

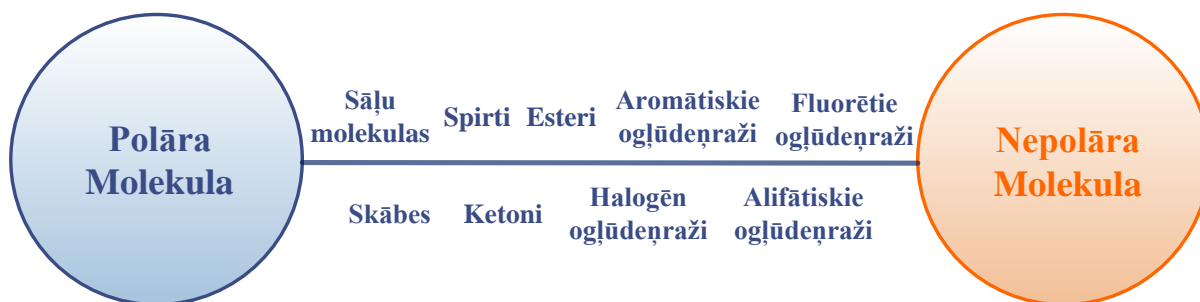
OFA – o–ftaldialdehīds; FITC – fenilizotiocianāts; DABS–Cl – dabsila hlorīds; FMOC–Cl – 9–Fluorenilmetil hlorformāts; AKK – 6–Aminokunolil–n–hidroksisukcinimidilkarbamāts; UV – ultravioletā gaismā; F – fluorescējošā gaismā; VIS – redzamā gaismā.

Pirmskolonnas vai pēckolonnas derivatizācijas izvēli aminoskābju noteikšanai nosaka vairāki faktori: 1) nepieciešamā detektēšanas jutība, 2) pieejamais parauga daudzums, 3) parauga tips (peptīdu/proteīnu izmērs, nespecifisku aminoskābju klātbūtne paraugā), 4) parauga matrica, 5) analīzes ātrums un atkārtojamība, 6) ekonomiski apsvērumi (instrumentu un reaģentu izmaksas). Gan pēckolonnas derivatizācijai, gan pirmskolonnas derivatizācijai ir gan savas priekšrocības, gan arī trūkumi. Pēckolonnas derivatizācijai nav jānodrošina atvasinājumu stabilitāti, kā arī pilnīgu reakcijas pabeigšanu. Sistēma ir automātiska un neprasa laika ieguldījumu paraugu sagatavošanā, līdz ar to nav arī paraugu zudumu. Lielākais trūkums šai metodei ir sarežģītāka hromatogrāfijas sistēma, kā arī kolonnas ātrāka bojāšanās derivatizācijas reaģenta ietekmē, kas noved pie pakāpeniskas detektēšanas jutības samazināšanās. Pirmskolonnas derivatizācijas prasība ir atvasinājuma stabilitāte, turklāt ir jānodrošina derivatizācijas reakcijas pilnīga norise, lai nerastos zudumi paraugu sagatavošanas laikā, toties hromatogrāfijas sistēma ir vienkāršāka [89-91, 104-106].

### 1.5. Augstefektīvas šķidrums hromatogrāfijas apstākļu izvēle

Augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas analīžu apstākļu izvēle ir atkarīga no analizējamo vielu raksturīpašībām. Kopumā pastāv trīs galvenās ķīmisko savienojumu īpašības, kuras nosaka izmantojamo AEŠH veidu: 1) polaritāte, 2) jonu lādiņš un 3)

molekulas izmērs. Apgrieztās fāzes augstefektīvo šķidrumu hromatogrāfiju izmanto, lai atdalītu organiskos savienojumus ar dažādu polaritāti. Molekulas struktūru, aktivitāti un fizikāli ķīmiskās īpašības nosaka atomu un saišu izvietojums molekulā. Molekulā esošās funkcionālās grupas nosaka speciālās īpašības un iespējamās pārvērtības, kuras var notikt ar molekulu. Šīs funkcionālās grupas arī nosaka, vai molekulai ir polāras vai nepolāras īpašības. Organisko savienojumu molekulas ir sadalītas vairākās klasēs atkarībā no tajās esošajām funkcionālajām grupām. Izmantojot organisko savienojumu atdalīšanu, pamatojoties uz to polaritāti, relatīvo hromatogrāfijas izdalīšanas laiku dažādiem organiskajiem savienojumiem nosaka molekulā esošo funkcionālo grupu daba un izvietojums. Dažādas molekulu klases un to hromatogrāfijas izdalīšanas spektrs pēc molekulas polaritātes ir redzams 1.2. attēlā.



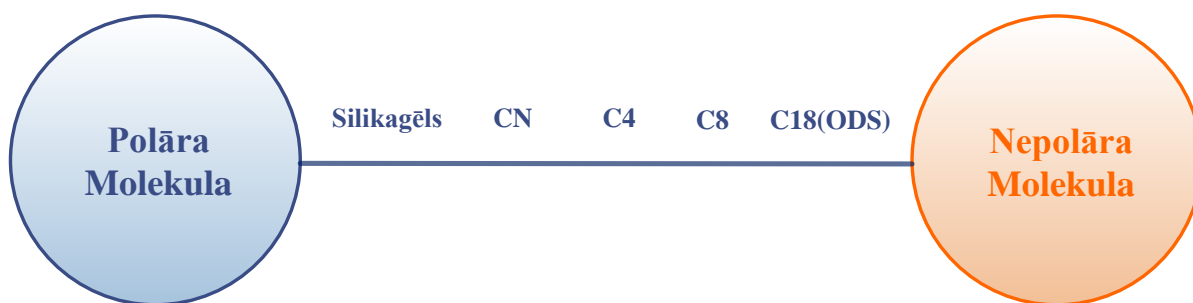
**1.2.att. Hromatogrāfijas izdalīšanas spektrs pēc analītu funkcionālajām grupām.**

Apgrieztās fāzes AEŠH izmanto polāro kustīgo fāzi un nepolāro nekustīgo fāzi. Analizējamie savienojumi, kuru polaritāte ir tuva nekustīgās fāzes polaritātei, vairāk piesaistās nekustīgajai fāzei un ir izdalīti no kolonnas vēlāk, nekā analizējamie savienojumi, kuru polaritāte ir tuvāka kustīgajai fāzei. Tādā veidā, pamatojoties uz analizējamo savienojumu polaritāti un tieksmi piesaistīties kustīgajai vai nekustīgajai fāzei, var mainīt analizējamo savienojumu izdalīšanas ātrumu. Hromatogrāfijā izmantojamo kustīgo un nekustīgo fāžu polaritātes spektrus var redzēt 1.3. un 1.4. attēlos.



**1.3. att. Kustīgās fāzes hromatogrāfijas polaritātes spektrs.**

Attēlā ir skaidri redzams, ka ūdens pieder pie polāriem organiskiem šķīdinātājiem, savukārt, heksāns ir vismazāk polārs organiskais šķīdinātājs. Ūdens piesaistīs polāras analizējamās vielas molekulas un virzīs uz priekšu ātrāk, nekā mazāk polāras analizējamās vielas molekulas.



1.4.att. Nekustīgās fāzes hromatogrāfijas polaritātes spektrs.

Veicot augstefektīvās šķīdumu hromatogrāfijas apstākļu izveidi, hromatogrāfijas speciālistam ir jāizvēlas labāku kustīgās un nekustīgās fāzes kombināciju ar pretējām polaritātēm [7, 8, 107-118].

### 1.5.1. Kustīgās fāzes izvēle

Apgrieztās fāzes augstefektīvā šķīdumu hromatogrāfijā kā kustīgo fāzi izmanto šķīdinātājus, kuri ir individuāli savienojumi vai arī to maisījumus. Kustīgajai fāzei ir izvirzītas noteiktas prasības: 1) tā spēj šķīdināt dažādas vielas, veidojot ar tām viendabīgas sistēmas; 2) tai jāpiemīt labai šķīdības spējai, jābūt ķīmiski inertai attiecībā pret šķīdināmo vielu un aparāturu; 3) kustīgajai fāzei ir jābūt samērā drošai un lētai [107-109].

Šķīdinātājus, ko izmanto kustīgās fāzes sagatavošanai, var iedalīt organiskajos un neorganiskajos. Tie atšķiras pēc polaritātes, kā arī pēc to sastāvā ietilpstošo savienojumu savstarpējās mijiedarbības. Neorganiskie šķīdinātāji ir izplatītāki, tā viens no plašāk lietotajiem un universālākajiem šķīdinātājiem ir ūdens. Ūdenim piemīt ļoti stipras ūdeņraža saites, līdz ar to tas nav līdzīgs saviem analogiem. Ūdens molekulu mijiedarbības dēļ tam ir visaugstākā viršanas temperatūra. Ūdenī šķīst sāļi, skābes un citi polāri savienojumi. Pie neorganiskajiem šķīdinātājiem pieder amonjaks, kā arī fosforu un sēru saturošie šķīdinātāji.

Organiskajiem šķīdinātājiem ir liela nozīme mūsdienu rūpniecībā. Tos var iedalīt dažādās grupās atkarībā no to raksturlielumiem: viršanas temperatūras, iztvaicēšanas ātruma, polaritātes.

Organiskos šķīdinātājus plaši lieto AEŠH, tos klasificē pēc polaritātes indeksiem, viskozitātes un viršanas temperatūras. Šķīdinātāju polaritātes indekss ( $P'$ ) ir atkarīgs no šķīdinātāja molekulu kvantu mehāniskajām īpašībām. Jāzina, vai šķīdinātāja molekulas veido

ūdeņraža saites, kā notiek vielas molekulas mijiedarbība ar šķīdinātāja molekulām, vai vielas molekulā ir nedalīti elektronu pāri.

Polārās vielas šķīst polārajos šķīdinātājos un otrādi – nepolārajā šķīdinātājā šķīst nepolārās vielas. Polaritātes indeksi parāda, cik šķīdinātājs ir polārs attiecībā pret citu šķīdinātāju. Kopumā polārie šķīdinātāji mēdz būt elektronu donori, elektronu akceptori vai ar divējādām īpašībām [109]. AEŠH plašāk izmantoto organisko šķīdinātāju polaritātes īpašības ir atspoguļotas 1.2. tabulā.

1.2. tabula.

### Metanola un acetonitrila polaritātes īpašību salīdzinājums

Salīdzināmie raksturlielumi	MeOH	ACN
$P'_{xe}$ (protona-akceptora miiedarbība)	2,448	1,798
$P'_{xm}$ (dipola-dipola mijiedarbība)	1,581	2,436
$P'_{xd}$ (protona-donora mijiedarbība)	1,122	1,566
$P'$ (polaritātes indekss)	5,1	5,8

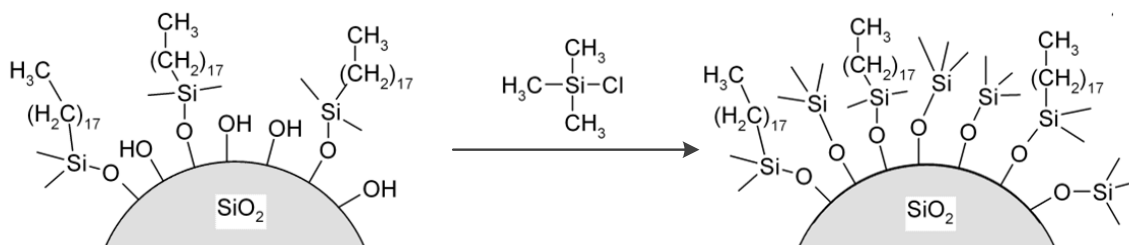
AEŠH šķīdinātājiem jābūt ar mazu viskozitāti un mazgaistošiem. Lietojot šķīdinātājus ar lielu viskozitāti, tiek pārslogota hromatogrāfiskā sistēma, izmantojot augstu spiedienu. Lai samazinātu spiedienu, jāpaaugstina kolonnas temperatūra. Lietojot gaistošus šķīdinātājus, pastāv iespēja sistēmā veidoties burbuļiem, jo sūkņa darbības rezultātā šķīdinātājs var iztvaikot, veidojot gāzes burbuļus. Šķīdinātājiem jābūt pietiekami tīriem, lai hromatogrammā nebūtu lieko joslu. Izmantojot UV detektorus, šķīdinātājiem jābūt minimālai absorbcijai izvēlētajā viļņu garumu diapazonā [109, 111].

#### 1.5.2. Nekustīgās fāzes izvēle

Apgrieztās fāzes augstefektīvā šķīdumu hromatogrāfijā analītiskiem nolūkiem kā nekustīgo fāzi visbiežāk izmanto kolonnas ar iekšējo diametru no 2 līdz 5 mm. Kolonnas parasti ir 5, 10, 15, 25 vai 30 cm garas. Plašāk lietotie sorbenta daļiņu diametri ir no 3 līdz 5  $\mu$ m. Kolonnas pildījumam izvēlas dažādas vielas atkarībā no lietošanas nolūka. Visplašāk izmanto silikagēlu un tā modificētās formas, rezultātā iegūstot silikagēlu ar dažādām fizikāli ķīmiskām īpašībām. Silikagēla sorbenta priekšrocība ir augsta stabilitāte plašā pH diapazonā.

Viens no plašāk lietotiem sorbentiem apgrieztās fāzes AEŠH ir silikagēls ar pievienotām alkilķēdēm, oktadecil (C18) un oktil (C8) grupām. Tāpat var izmantot silikagēlu ar pievienotām butil- (C4), ciano (CN) un amino (NH<sub>2</sub>) grupām. Šobrīd liela daļa komerciāli

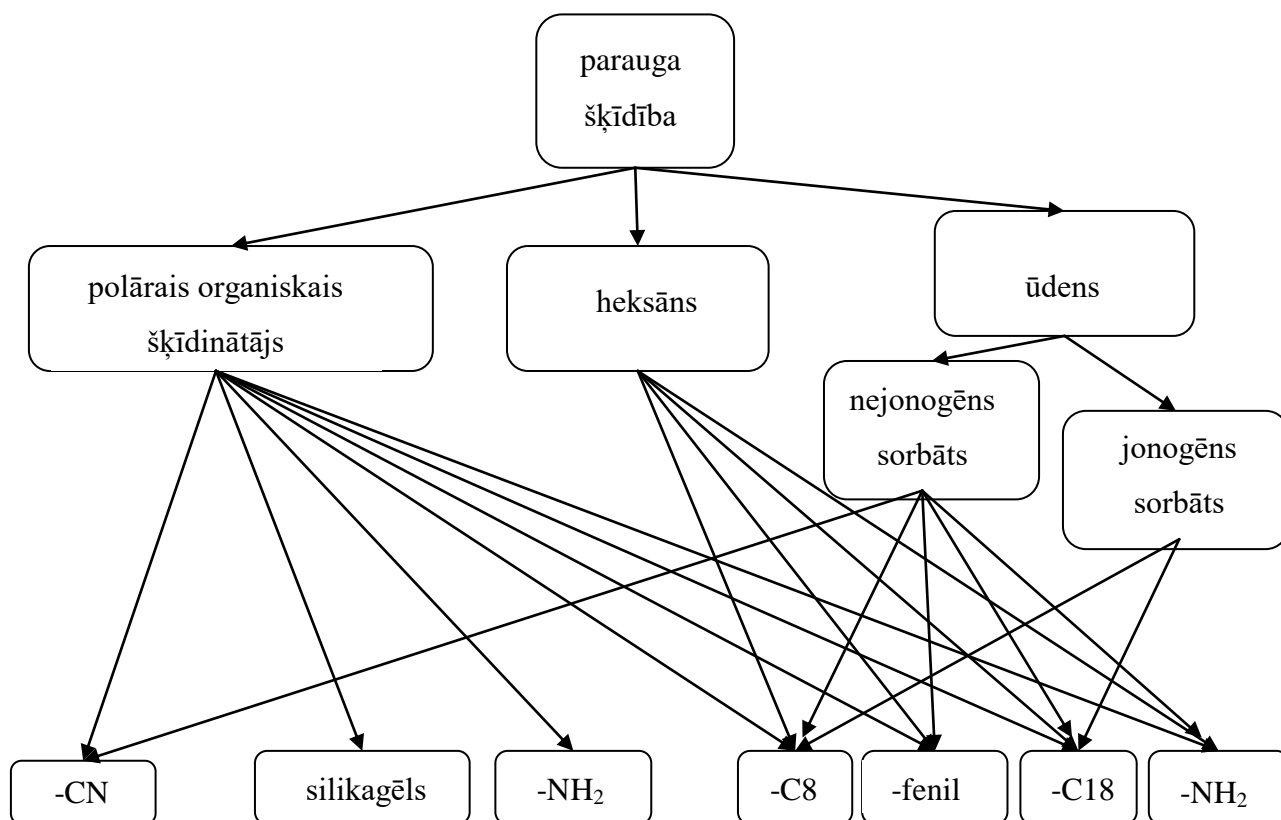
nopērkamo kolonnu ir ar aizsargātām „*end-capped*” silanol ( $-\text{Si}-\text{OH}$ ) grupām. Kolonnu silanolgrupas aizsardzības mehānisms ir attēlots 1.5. attēlā. Tas palīdz pasargāt nekustīgo fāzi no nevēlamām blakus reakcijām ar analizējamo paraugu vai tā sastāvdaļām ar bāziskajām īpašībām, kā arī kontrolēt mijiedarbību starp nekustīgo fāzi, kustīgo fāzi un analizējamo paraugu, kas nodrošina labāku selektivitāti un analītu atdalīšanu.



1.5. att. Nekustīgās fāzes silanol ( $-\text{Si}-\text{OH}$ ) grupas aizsardzības „*end-capped*” mehānisms [112].

Jāpiemin, ka veicot silanolgrupas aizsardzību, tā nenotiek ar visām silanolgrupām. Gadījumā, ja visas silanolgrupas būtu pilnībā aizsargātas, tas samazinātu kolonnas stabilitāti. Skābās kustīgās fāzes apstākļos ( $\text{pH} < 2$ ), pievienotās aizsardzības procesā grupas sāktu atdalīties. Kolonnas stabilitāti skābos apstākļos palīdz saglabāt arī alkilgrupas garums. Tā nekustīgās fāzes, saturošas C8 un C18, ir stabilas apstākļos, kuri var sagraut aizsargātas grupas. Gadījumā, ja kolonna ir „*end-capping*”, C8 un C18 grupas ir aizsargātas no hidrolīzes. Savukārt, aizsargātās grupas samazina neaizsargāto silanolgrupu reaģētspēju. Tā rezultātā šīs nekustīgās fāzes atrada plašu pielietojamību bioķīmijas, farmakoloģijas, bioloģijas un medicīnas jomās [113].

Veicot jaunas apgrieztās fāzes augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas metodes izstrādi, ir jāizvēlas kustīgo un nekustīgo fāzi. Izvēloties nekustīgo fāzi, ir jāzina analizējamo vielu īpašības. Viens no galvenajiem kritērijiem ir vielas polaritāte, jo tā nosaka analizējamās vielas šķīdību dažādos šķīdinātājos. Otrs galvenais parametrs, ko jāņem vērā, ir sorbenta spēja mainīt savas īpašības atkarībā no kustīgās fāzes sastāva. Veiksmīgākai nekustīgās fāzes izvēlei hromatogrāfijas speciālisti piedāvā izmantot shēmu, kas atspoguļota 1.3. attēlā [114].



1.6. att. **Apgrieztās fāzes augstefektīvās šķīdumu hromatogrāfijas nekustīgās fāzes izvēles shēma [111].**

Mazpolārie organiskie savienojumi, tādi kā ogļūdeņraži, to halogēnatvasinājumi un skābekli saturošie savienojumi ar lieliem alifātiskiem radikāļiem, labāk šķīst heksānā. Vielas, kas pieder pie šīm grupām, netiek sadalītas uz silikagēla, tām ir vajadzīgas mazpolāras kustīgās fāzes, jo silikagēls ar šādiem šķīdinātājiem ilgi stabilizējas. Tāda tipa sorbātiem ir rekomendējama apgrieztās fāzes hromatogrāfija. Kā kustīgo fāzi labāk izmantot šķīdumus, kuri satur no 0 līdz 30% acetonitrila vai metanola šķīduma ūdenī.

Organiskie savienojumi ar vidēju polaritāti labi šķīst esteros, spirtos un hloroformā. Šo vielu sastāvā ir funkcionālās grupas, kuras spēj mijiedarboties ar silanola grupām silikagēlā un ar polārām funkcionālajām grupām ķīmiski modificētā silikagēlā. Kustīgā fāze tāda tipa sorbentiem ir rekomendējama ar 2 – 50% polāro organiska šķīdinātāja maisījumu ar mazpolāro šķīdinātāju.

Daudzi polārie organiskie šķīdinātāji šķīst ūdenī, tāpēc tos izmanto apgrieztās fāzes hromatogrāfijā. Kustīgā fāze satur 0 – 50% organiskā šķīdinātāja (metanols, acetonitrils) ūdenī. Apgrieztās fāzes hromatogrāfijā vielas izdalās no kolonnas polaritātes samazināšanās secībā. Ja sorbātus jonizē ūdens šķīdumos, lai uzlabotu hromatogrammas smailes formu un

rezultātu atkārtojamību, tad kustīgajai fāzei pievieno sāļus, skābes un buferšķīdumus, lai uzturētu pH vērtību [114-118].

## 2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

### 2.1. Darbā izmantotā aparatūra un programnodrošinājums

**Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfijas iekārta** Waters 2695 (Waters, ASV) komplektā ar Waters 2487 UV detektoru, termostatu kolonnas temperatūras kontrolei un automātisku paraugu ievadīšanas iekārtu, kura nodrošināta ar temperatūras regulēšanas sistēmu. Darbā izmantotie augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfa (AEŠH) pamata darba režīmi ir apkopoti 2.1. tabulā.

2.1. tabula

**Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfa Waters 2695 darba režīms**

Raksturlielumi	Parametri
Kolonnas termostata temperatūra	46 °C
Ievadīto paraugu tilpums	10 µL
Kustīgās fāzes plūsmas ātrums	1 mL·min <sup>-1</sup>
Automātiskās paraugu ievadīšanas iekārtas temperatūra	6 °C
Detektora viļņa garums	254 nm

**Paraugu sagatavošanas darba stacija** Pico·Tag (Waters, ASV). Nodrošina paraugu koncentrēšanu – žāvēšanu istabas temperatūrā vakuumā. Darba režīms no 0 līdz 101 325 Pa.

**Analītiskie svāri** BOECO (BOECO, Vācija), maksimālā vērtība 120g, d±0,1mg.

**pH metrs** – milivoltmetrs OAKTON (Oakton Instruments, Vernon Hills, IL ASV) pH diapazons no 1 līdz 14, iedaļas vērtība 0,01 pH vienība.

**Mikrocentrifūga** Sigma 1-14 (Sigma, Vācija), 14800 max apgr.·min<sup>-1</sup>.

**Automātiskās mikropipetes** FINNPIPETTE (Thermo Fisher Scientific, Inc., ASV), darba diapazoni no 20 līdz 100 µL, no 30 līdz 300 µL, no 100 līdz 1000 µL, no 1 mL līdz 5 mL.

**Ūdens destilācijas iekārta** Direct-Q ūdens Millipore sistēmas (Millipore, Vācija), 18,2 MΩcm

Visa darbā izmantotā aparatūra bija verificēta un kalibrēta.

**Proteīnu saistošs filtrs.** Amicon Ultra 0.5 (Millipore, Vācija), ar nominālu molekulas masas ierobežojumu 3000 g·mol<sup>-1</sup>, tilpums 0,5 mL.

**Proteīnu saistošs, hidrofilis sīkporu membrānfiltrs** Millex-LH (Millipore, Vācija), poru izmērs 0,45 μm, filtra garums 4 mm, filtra tilpums 0,1 mL.

**Programmnodrošinājums** Empower 2 (Waters, ASV) eksperimentu rezultātu apstrādei un analīzei.

**Programmnodrošinājums** ChromSword simulācijas datora programmnodrošinājums, versija 4.8.3.2010 (ChromSword, Vācija), izmantots analizējamo savienojumu izdalīšanas parametru prognozēšanai, rezultātu analīzei un apstrādei.

**Apgrieztās fāzes augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfijas kolonnas.** Solvātu sorbcijas modeļa prognozēšanas iespēju izpēti polāro savienojumu grupai veica ar dažādām apgrieztās fāzes kolonnām. Pētījumā izmantotās apgrieztās fāzes AEŠH kolonnas ir apkopotas 2.2. tabulā.

## Apgrieztās fāzes AEŠH kolonnas, izmantotas solvātu sorbcijas modeļa izpētei

Kolonna	Nekustīgā fāze	Iekšējais diametrs, mm	Garums, mm	Daļiņu izmērs, $\mu\text{m}$	Poru diametrs, $\text{Å}$	Ražotājs
Pico Tag C18	Silica/C18	3,9	300	4	60	Waters, ASV
SunFire C18	Silica/C18	4,6	250	5	100	Waters, ASV
Zorbax CN	Silica/CN	4,6	250	5	60	Agilent Technologies, ASV
Zorbax SB-C8	Silica/C8	4,6	150	5	80	Agilent Technologies, ASV
Nucleosil 100 C8	Silica/C8	4,6	250	5	100	MACHERY-NAGEL GmbH & Co, Vācija
Alltima C8	Silica/C8	4,6	250	5	100	GRACE, ASV
YMC-Pack C4	Silica/C4	4,6	150	5	300	YMC, ASV
Mixed Mode RP-C18/Cation	Polymer/C18/Cation	4,6	250	5	100	GRACE, ASV
Mixed Mode RP-C8/Cation	Polymer /C8/Cation	4,6	250	5	100	GRACE, ASV

Neskatoties uz to, ka pētījumā izmantotas kolonnas ar vienādām nekustīgajām fāzēm, kolonnu fizikāli ķīmiskās īpašības ir atšķirīgas. Apgrieztajā fāzē izmantojamā kolonna *SunFire C18* atšķirībā no *Pico Tag C18* kolonnas –Si–OH (silanol) grupas ir aizsargātas „*end-capped*” no nevēlamām blakus reakcijām ar analizējamo paraugu vai tā sastāvdaļām ar bāziskajām īpašībām.

Izmantojot kolonnas ar labi aizsargātām silanolgrupām, var kontrolēt mijiedarbību starp nekustīgo fāzi, kustīgo fāzi un analizējamo paraugu, kas nodrošina labāku selektivitāti un analītu atdalīšanu [117, 118]. Mūsdienās ražotāji arvien biežāk sāk ražot kolonnas ar aizsargātām silanolgrupām.

Veicot oktilgrupu saturošu kolonnu salīdzinājumu, tika izmantotas divas kolonnas ar neaizsargātu silanolgrupu *Zorbax SB-C8* un *Nucleosil 100 C8* un viena kolonna ar aizsargātu silanolgrupu *Alltima C8*. *Zorbax SB-C8* un *Nucleosil 100 C8* kolonnām ir dažāds poru diametrs, kā arī oglekļa pildījums „carbon load”. Tā *Zorbax SB-C8* kolonnai oglekļa pildījums ir 5,5%, bet *Nucleosil 100 C8* kolonnai oglekļa pildījums ir 8,5%.

Solvātu sorbcijas modeļa izpētei izmantotas arī kolonnas, kuras plašāk pielieto normālajā fāzē, tādas kā ciano- un butilsaturošas grupas.

## 2.2. Darbā izmantotie reaģenti un materiāli

L- $\alpha$ -Aminosviestskābe, Sigma Aldrich,, Lot 126H2622, CAS 1492-24-6;  
L- $\alpha$ -Amino adipīnskābe, Sigma Aldrich, Lot 124H5801, CAS 1118-90-7;  
DL-Alanīns, 99%, Sigma Aldrich, Lot 104H0260, CAS 302-72-7;  
DL-Arginīns, 98%, Sigma Aldrich, Lot 30H0274, CAS 32042-43-6;  
DL-Asparagīns, 98%, Sigma Aldrich, Lot 84H0553, CAS 3130-87-8;  
DL-Asparagīnskābe, 99%, Sigma Aldrich, Lot 100H0412, CAS 617-45-8;  
 $\beta$ -Aminoizosviestskābe, 98%, Sigma Aldrich, Lot S18926-034, CAS 62-57-7;  
DL-Citrulīns, 99%, Sigma Aldrich, Lot 38F1124, CAS 627-77-0;  
 $\gamma$ -Aminosviestskābe, 99%, Sigma Aldrich, Lot 083K0020, CAS 56-12-2;  
L-Glutamīns, 99%, Sigma Aldrich, Lot 116H0038, CAS 56-85-9;  
DL-Glutamīnskābe, 98%, Sigma Aldrich, Lot 52H0297, CAS 19285-83-7;  
Glicīns, 99%, Sigma Aldrich, Lot 84H0543, CAS 56-40-6;  
DL-Histidīns, 99% Sigma Aldrich, Lot 82H0415, CAS 123333-71-1;  
DL-Izoleicīns, 98%, Sigma Aldrich, Lot 73H02921, CAS 443-79-8;  
DL-Leicīns, 98%, Sigma Aldrich, Lot 94H2511, CAS 328-39-2;  
DL-Metionīns, 99%, Sigma Aldrich,, Lot 24H0465, CAS 820-10-0;  
DL-Ornitīns, 99%, Sigma Aldrich, Lot 82H0286, CAS 1069-31-4;  
DL-Fenilalanīns, 98%, Sigma Aldrich, Lot 93H0252, CAS 150-30-1;  
DL-Prolīns, 99%, Sigma Aldrich, Lot 83H0019, CAS 609-36-9;  
DL-Serīns, 98%, Sigma Aldrich, Lot 102H0341, CAS 302-84-1;

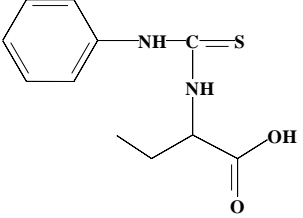
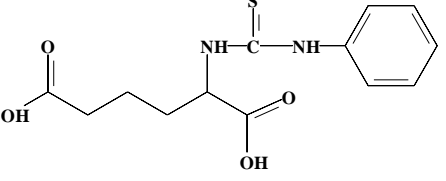
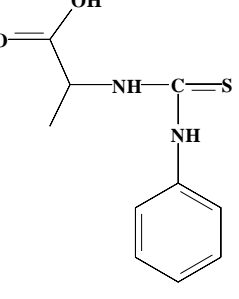
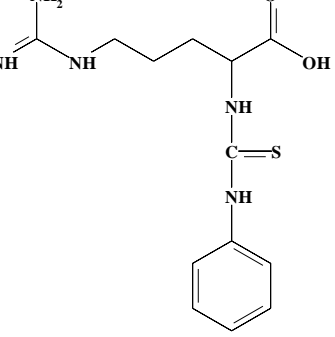
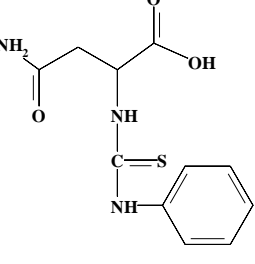
Taurīns, 99% Lot 55H0286, CAS 107-35-7;  
DL-Treonīns, 98%, Sigma Aldrich, Lot 104H0094, CAS 80-68-2;  
DL-Triptofāns, 98%, Sigma Aldrich, Lot 21H0731, CAS 54-12-6;  
DL-Tirozīns, 98% Sigma Aldrich, Lot 24H0862, CAS 556-03-6;  
DL-Valīns, 98% Sigma Aldrich, Lot 24H3303, CAS 516-06-3;  
Nātrija acetāta trihidrāts, analītiski tīrs, Penta, CAS 6131-90-4;  
6M Sālsskābe, fiksānāls, Penta, CAS 7647-01-0;  
DL-Metionīnsulfons, Sigma Aldrich, Lot 069H2506, CAS 820-10-0;  
Etiķskābe, ledus, Penta, CAS 64-19-7;  
Trietilamīns,  $\geq 99,7\%$ , Fluka, CAS 121-44-8;  
Fenilizotiocianāts,  $\geq 99\%$ , GC tīrības pakāpe, Sigma Aldrich, CAS 103-72-0;  
Acetonitrils, AEŠH tīrības pakāpe, LabScan, CAS 75-05-8;  
Metanols, AEŠH tīrības pakāpe, LabScan, CAS 67-56-1;  
Control Amino Acids, lyophilized human serum, MCA Laboratory.

## **2.3. Darba šķīdumu sagatavošana**

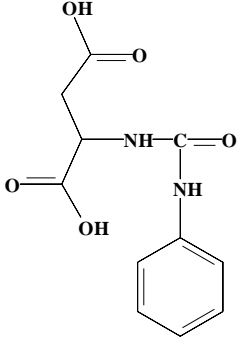
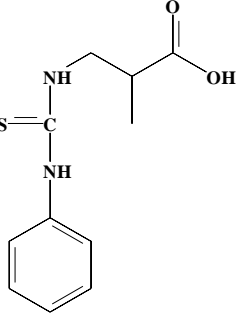
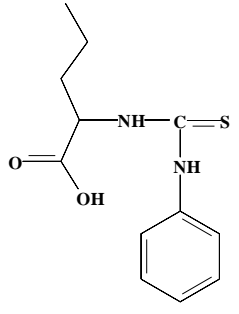
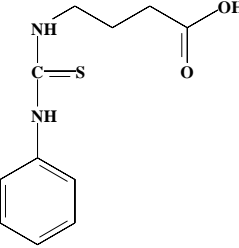
### **2.3.1. Aminokābju maisījums**

Kā pētījuma objekts šajā darbā ir izmantots laboratorijā sagatavots aminokābju maisījums, izšķīdināts 0,1 M HCl šķīdumā. Aminokābju maisījums sastāv no 25 komerciāli pieejamajiem aminokābju standartiem ar tīrības pakāpi ne mazāku kā 98%. Darbā izmantojamo aminokābju saraksts un saīsinājumi atbilstoši IUPAC nomenklatūrai ir atspoguļoti 2.3. tabulā [119]. Aptuvena katras atsevišķas aminokābes koncentrācija ir  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Tas nodrošina pietiekamu FITC atvasinātu aminokābju joslu augstumu, kuras ir noteiktas ar UV detektoru. Pētījumā izmantojot vienādas koncentrācijas analītus, ir izslēgts joslu pārklāšanas tracējošais faktors, kas varētu rasties izmantojot aminokābju maisījumu ar dažādu analītu koncentrācijām. Sagatavotais aminokābju maisījums ir izmantots visos darbā veiktajos eksperimentos. Labākai parauga stabilitātes saglabāšanai tas tika sadalīts mazākās daļās un sasaldēts ( $-18 \div -25^\circ\text{C}$ ). Katram eksperimentam izmantoja atkausētu aminokābju maisījuma daļu, kura netika sasaldēta un izmantota atkārtoti.

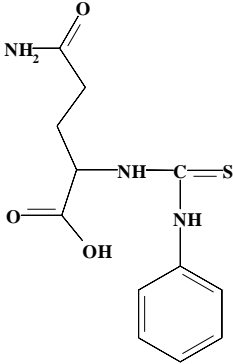
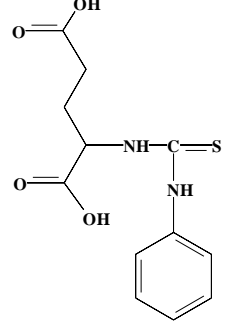
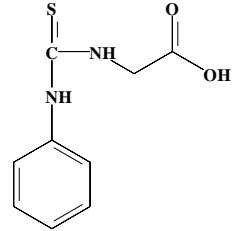
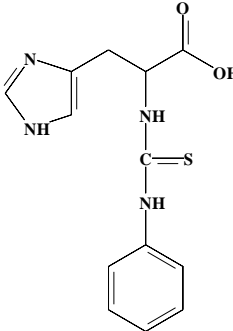
## Pētījumā izmantotās aminoskābes un to saīsinājumi

Nr. p.k.	Aminoskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Saīsinājumi	FITC atvasinātu aminoskābju struktūrformula
1.	$\alpha$ -Aminosviestskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Aab	
2.	$\alpha$ -Amino adipīnskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Aad	
3.	Alanīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Ala	
4.	Arginīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Arg	
5.	Asparagīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Asn	

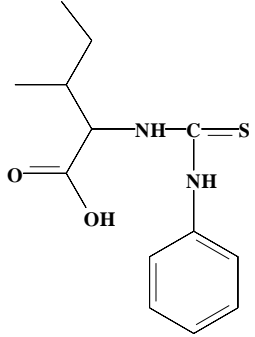
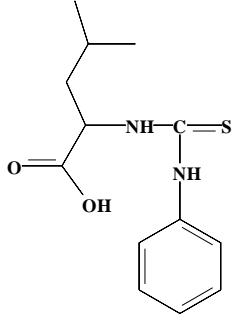
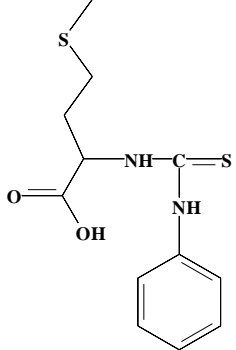
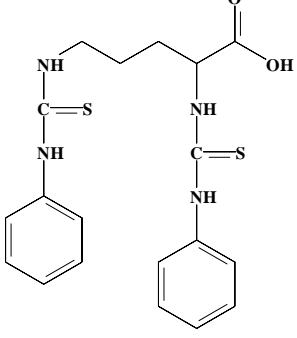
## Pētījumā izmantotās aminoskābes un to saīsinājumi

Nr. p.k.	Aminoskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Saīsinājumi	FITC atvasinātu aminoskābju struktūrformula
6.	Asparagīnskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Asp	
7.	$\beta$ -Aminoizosviestskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	$\beta$ Aib	
8.	Citrulīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Cit	
9.	$\gamma$ -Aminosviestskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	$\gamma$ Aba	

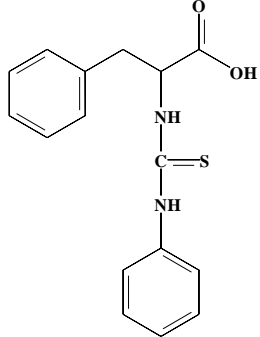
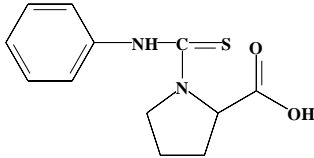
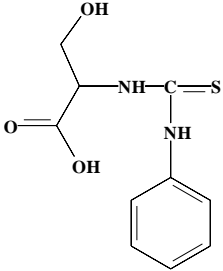
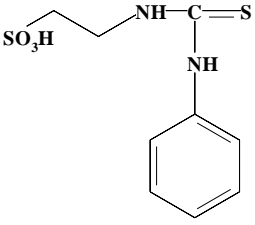
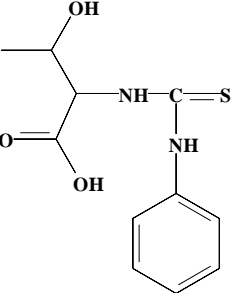
## Pētījumā izmantotās aminoskābes un to saīsinājumi

Nr. p.k.	Aminoskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Saīsinājumi	FITC atvasinātu aminoskābju struktūrformula
10.	Glutamīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Gln	
11.	Glutamīnskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Glu	
12.	Glicīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Gly	
13.	Histidīna fenilizotiocianāta atvasinājums	His	

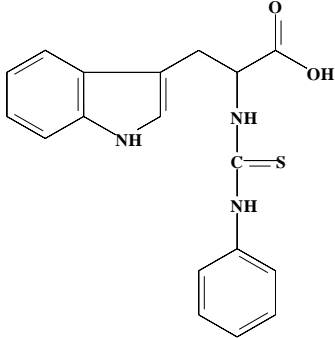
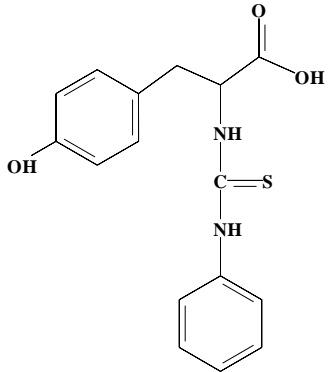
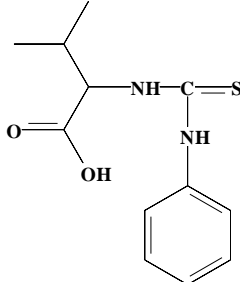
## Pētījumā izmantotās aminoskābes un to saīsinājumi

Nr. p.k.	Aminoskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Saīsinājumi	FITC atvasinātu aminoskābju struktūrformula
14.	Izoleicīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Ile	 <p>The structure shows the FITC group (2,4,6-trichlorophenylisothiocyanate) attached to the epsilon-amino group of isoleucine. The isoleucine side chain is a sec-butyl group.</p>
15.	Leicīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Leu	 <p>The structure shows the FITC group attached to the epsilon-amino group of leucine. The leucine side chain is an isobutyl group.</p>
16.	Metionīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Met	 <p>The structure shows the FITC group attached to the epsilon-amino group of methionine. The methionine side chain is a 2-(methylsulfanyl)ethyl group.</p>
17.	Ornitīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Orn	 <p>The structure shows the FITC group attached to the epsilon-amino group of ornithine. The ornithine side chain is a 3-aminopropyl group.</p>

## Pētījumā izmantotās aminoskābes un to saīsinājumi

Nr. p.k.	Aminoskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Saīsinājumi	FITC atvasinātu aminoskābju struktūrformula
18.	Fenilalanīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Phe	
19.	Prolīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Pro	
20.	Serīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Ser	
21.	Taurīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Tau	
22.	Treonīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Thr	

## Pētījumā izmantotās aminoskābes un to saīsinājumi

Nr. p.k.	Aminoskābes fenilizotiocianāta atvasinājums	Saīsinājumi	FITC atvasinātu aminoskābju struktūrformula
23.	Triptofāna fenilizotiocianāta atvasinājums	Trp	
24.	Tirozīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Tyr	
25.	Valīna fenilizotiocianāta atvasinājums	Val	

## 2.3.2. Hidrolīzes šķīdums

Hidrolīzes šķīdumu gatavo, sajaucot metanolu, 1M nātrija acetātu un TEA attiecībā 2:1:1. Sagatavoto hidrolīzes šķīdumu var uzglabāt ledusskapī (+2 ÷ +8 °C) ne ilgāk par mēnesi.

### 2.3.3. Derivatizācijas šķīdums

Derivatizācijas šķīdumu gatavo, sajaucot metanolu, trietilamīnu, ūdeni un fenilizotiocianāta reaģentus attiecībā 7:1:1:1. Derivatizācijas reaģentu izmanto ne vēlāk kā 1 stundas laikā no sagatavošanas brīža.

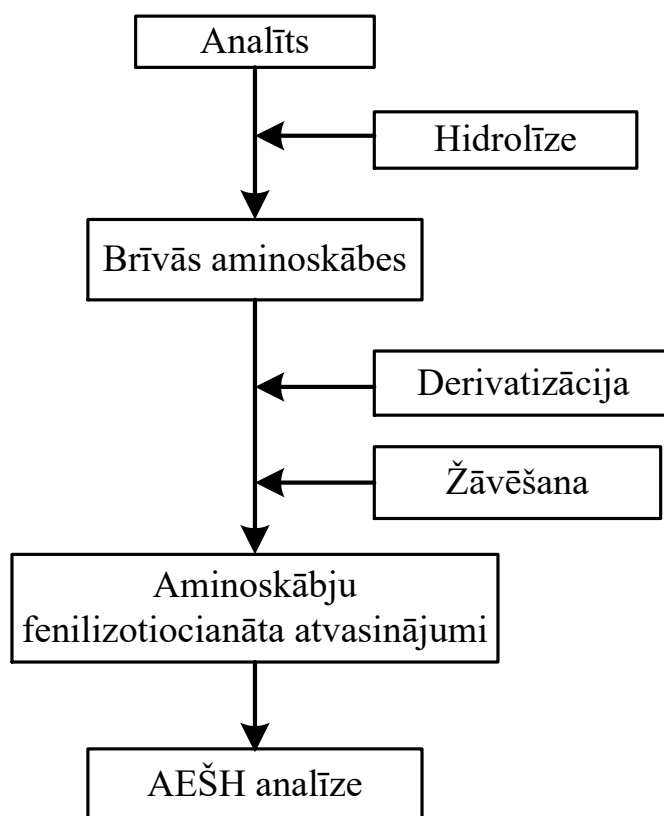
### 2.3.4. Kustīgās fāzes AEŠH

Katrs kustīgās fāzes maisījums sagatavots atsevišķi. Pirmā kustīgā fāze sagatavota sekojoši: 19,0 g nātrija acetāta trihidrātu izšķīdina 1 L Milli-Q ūdenī, pievieno 0,5 mL TEA, samaisa un titrē ar ledus etiķskābi līdz pH 6,4. Šķīdumu filtrē caur 0,45 µm filtru. 940 mL iegūtam šķīdumam pievieno 60 mL organisko modificētāju (metanols vai acetonitrils). Otrā kustīgā fāze gatavota, sajaucot organisko modificētāju (metanols vai acetonitrils) ar ūdeni attiecībā 3:2. Otrā kustīgo fāzi degazē. Katrai eksperimentu sērijai sagatavo svaigu kustīgo fāzi.

## 2.4. Aminokābju paraugu sagatavošana

Pētījumā aminokābju paraugu sagatavošanai ir izvēlēta aminokābju derivatizācija ar fenilizotiocianātu. Šīs paraugu sagatavošanas metodes priekšrocība ir iespēja strādāt ar vienkāršāku hromatogrāfijas sistēmu, jo izmanto pirmskolonnas derivatizāciju, kā arī sagatavotais paraugs ir stabils 48 stundas, uzglabājot +5 °C ÷ +8 °C [94, 97-98].

Shematisku paraugu sagatavošanas procedūru var redzēt 2.1. attēlā. Mēģenē pievieno 50 µL aminokābju maisījumu (2.3.1.), tālāk mēģeni ievieto reakcijas traukā, kuru savieno ar PicoTag darba staciju. Paraugus žāvē istabas temperatūrā, līdz vakuums sasniedz 9 Pa. Mēģenē pievieno 20 µL hidrolīzes šķīdumu (2.3.2) un atkārtoti žāvē PicoTag darba stacijā, līdz vakuums sasniedz 9 Pa. Paraugiem pievieno 20 µL svaigi sagatavotu derivatizācijas šķīdumu (2.3.3.), paraugus samaisa un derivatizē 20 min noslēgtā reakcijas traukā istabas temperatūrā. Reakcijas trauku savieno ar darba staciju un paraugus žāvē līdz 9 Pa. Derivatizētus paraugus izšķīdina 100 µL pirmajā AEŠH buferšķīdumā (2.3.4.), centrifugē caur 0,45 µm membrānfiltru un ievieto automātiskajā paraugu ievadīšanas iekārtā. Paraugu izdalīšanos no hromatogrāfijas sistēmas detektē pie 254 nm.



**2.1. att. Shematiskais attēlojums aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu sagatavošanai.**

Darbā izmantojamās FITC atvasinātu aminoskābju struktūrformulas un nosaukumu saīsinājumi saskaņā ar IUPAC nomenklatūru ir redzami 2.3. tabulā.

### 3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Promocijas darbā pētītas solvātu sorbcijas modeļa vielu prognozēšanas iespējas. Kā pētījuma objekts izvēlēts 25 aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu maisījums. Solvātu sorbcijas modelis izpētīts, izmantojot dažādas apgrieztās fāzes augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas nekustīgās fāzes un divus plašāk lietotus organiskos modificētājus – metanolu un acetonitrilu.

Vielu sorbcijas noteikšanai solvātu sorbcijas modelis balstās uz trim parametriem: 1) analizējamo vielu struktūrformulām, kuras apraksta ar sorbāta parciālo mola tilpumu  $V$  ( $\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) un sorbāta mijiedarbības enerģiju ar ūdeni  $\Delta G_w$  ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), 2) kustīgās fāzes raksturlielumiem un 3) nekustīgās fāzes raksturlielumiem. Kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumus apraksta ar  $a$ ,  $b$  un  $c$  parametriem. Vienkāršota matemātiskā sakarība, kura apraksta modeli, ir redzama 3.1. vienādojumā [24,25,74].

$$\ln k = a(V)^{2/3} + b(\Delta G_w) + c \quad (3.1.)$$

Solvātu sorbcijas modeļa veiksmīgai lietošanai ir nepieciešams zināt sorbāta tilpuma parametrus un iedarbības enerģiju ar ūdeni. Šo parametru noteikšanai ir nepieciešams veikt kolonnas sorbcijas spējas kvantitatīvu raksturošanu. Kolonnas sorbcijas raksturošanai izmanto  $a$ ,  $b$  un  $c$  koeficientus, kurus nosaka apgrieztās fāzes sorbents un izmantotā kustīgā fāze. Koeficientu  $a$  var definēt kā sorbenta izmēra selektivitāti ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Tas nosaka kolonnas spēju noteiktos apstākļos atdalīt savienojumus ar vienādu polaritāti, bet dažādiem virsmas laukumiem. Parametrs  $b$  nosaka kolonnas polaritātes selektivitāti ( $\text{mol} \cdot \text{kJ}^{-1}$ ), spēju noteiktos apstākļos atdalīt vienāda izmēra sorbātus ar atšķirīgu polaritāti. Parametrs  $c$  ir kolonnas konstante noteiktos apstākļos, kuru nosaka fāžu attiecība un virsmas slāņa vidējais mola tilpums [74].

Pirms apgrieztās fāzes AEŠH kolonnas izmantoja solvātu sorbcijas modeli prognozēšanas pētījumiem, veica kolonnu kalibrēšanu. Hromatogrāfijas kolonnas kalibrēšanai izmantoti sekojoši savienojumi: benzols, fenols, toluols, hlorbenzols, metilparabēns, 4-hidrosibenzaldehīds. Kolonnas kalibrēja, izmantojot abus darbā izmantojamajos organiskos modificētājus (acetonitrils, metanols). Izmantojamo savienojumu hromatogramas uzņemtas izdalīšanas izokrātiskajā režīmā 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 un 90 % organiskā modificētāja koncentrācijā. Kolonnas temperatūra 30°C, detektēšanas viļņa garums 210 nm. Kustīgās fāzes plūsmas ātrums 1 mL·min<sup>-1</sup>.

Kalibrēšanas procesā iegūtie  $a$ ,  $b$  un  $c$  parametri ievadīti *ChromSword* simulācijas programmnodrošinājuma datu bāzē. Noteiktie koeficienti metanolā un acetonitrilā atspoguļoti 3.1 tabulā.

3.1. tabula.

**Apgrieztās fāzes kolonnu raksturlielumi, iegūti kolonnu kalibrēšanas procesā.**

Sorbents	Acetonitrils			Metanols		
	$a$ , $mol \cdot cm^{-2}$	$b$ , $mol \cdot kJ^{-1}$	$c$	$a$ , $mol \cdot cm^{-2}$	$b$ , $mol \cdot kJ^{-1}$	$c$
Pico Tag C18	0,2447	0,04661	-2,11	0,319	0,04792	-3,16
SunFire C18	0,1650	0,03115	-1,013	0,2487	0,03452	-2,054
Zorbax CN	0,0408	0,00863	-0,316	0,0617	0,00814	-0,575
Zorbax SB-C8	0,16	0,0285	-1,11	0,298	0,0324	-3,52
Nucleosil 100 C8	0,17	0,030	-1,046	0,292	0,034	-2,3
Alltima C8	0,157	0,0265	-1,3	0,265	0,031	-2,7
YMC-Pack C4	0,198	0,0371	-2,10	0,285	0,04	-3,46
Mixed Mode RP-C18/Cation	0,26	0,0449	-1,9	0,4	0,053	-4,01
Mixed Mode RP-C8/Cation	0,1415	0,02482	-1,031	0,212	0,0315	-2,851

3.1. tabulā atspoguļotie dati norāda uz lietoto kolonnu īpašību atšķirību. Var secināt, ka *Mixed Mode RP-C18/Cation* un *Pico Tag C18* kolonnām ir labākas sorbenta izmēra selektivitātes un polaritātes selektivitātes abās kustīgajās fāzēs. Ievērojami zemākas sorbenta izmēra un polaritātes selektivitātes abās kustīgajās fāzēs ir *Zorbax CN* kolonnai. Šīs kolonnas mazie sorbenta izmēri un polaritātes selektivitātes rādītāji var būt saistīti ar kolonnas nepiemērotību izmantošanai apgrieztās fāzes hromatogrāfijā. Oktilgrupu saturošām kolonnām, *Zorbax SB-C8* un *Alltima C8*, sorbenta izmēra selektivitāte un polaritātes selektivitāte acetonitrilā ir ļoti tuvas. Savukārt, metanolā sorbenta izmēra selektivitāte un polaritātes selektivitāte ir tuva citām oktilgrupu saturošām kolonnām, *Zorbax SB-C8* un *Nucleosil 100 C8*.

Dati par analizējamo aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu aprēķinātiem parciāliem mola tilpumiem un mijiedarbības enerģijām ar ūdeni, kas aprēķināti pēc vielu struktūrformulām ar *ChromSword* programmnodrošinājuma palīdzību ir apkopotā 3.2. tabulā.

**Analizējamo aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu parciālais mola tilpums un mijiedarbības enerģija ar ūdeni (aprēķini pēc struktūrformulas)**

Nr. p.k.	Analizējamās vielas	V, (cm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> )	ΔG <sub>w</sub> , (kJ·mol <sup>-1</sup> ).
1.	Aab	161,7	-153,6
2.	Aad	189,7	-222,3
3.	Ala	146,1	-150,7
4.	Arg	187,3	-255,6
5.	Asn	165,7	-223,3
6.	Asp	164,0	-241,9
7.	βAib	161,7	-153,6
8.	Cit	177,4	-156,4
9.	γAba	162,2	-153,6
10.	Gln	181,4	-226,1
11.	Glu	174,0	-219,5
12.	Gly	130,8	-147,9
13.	His	191,9	-196,4
14.	Ile	192,7	-159,2
15.	Leu	192,7	-159,2
16.	Met	184,6	-163,4
17.	Orn	256,8	-232,7
18.	Phe	209,8	-168,6
19.	Pro	166,6	-147,8
20.	Ser	146,5	-200,1
21.	Tau	163,5	-187,4
22.	Thr	161,8	-202,9
23.	Trp	231,9	-190,8
24.	Tyr	214,8	-199,4
25.	Val	177,0	-156,4

Apgrieztās fāzes AEŠH metodes izstrāde jebkuram vielu maisījumam ietver sevī divus etapus: 1) izdalīšanas laika optimizācija, 2) analizējamo savienojumu atdalīšanas optimizācija. Izdalīšanas laika optimizāciju var sākt kā nulles tuvinājuma metodi, izmantojot tikai analizējamo savienojumu, kustīgās un nekustīgās fāzes parametrus. Tālāk, izmantojot sākotnēji iegūtos izdalīšanas laika rezultātus, var turpināt ar “*pirmo tuvinājuma*” un “*otro tuvinājuma*” metodēm, kuras dod precīzākus rezultātus, tādā veidā optimizējot analizējamo savienojumu atdalīšanu.

### **3.1. Sorbcijas parametru prognozēšana, izmantojot „*nulles tuvinājuma*” metodi**

Solvātu sorbcijas modelis ir piemērots analizējamo savienojumu sākotnējo apstākļu prognozēšanai, balstoties tikai uz vielas struktūrformulu un kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumiem. „*Nulles tuvinājuma*” metodei ir pusempīriskā pieeja, eksperimentāli iegūtie rezultāti nav nepieciešami. Līdz ar to ir sagaidāma ievērojama prognozēto rezultātu novirze no eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem. „*Nulles tuvinājuma*” metodes mērķis nav precīzi prognozēt analītu izdalīšanas laiku. Izdalīšanas izokrātiskās metodes gadījumā nulles tuvinājums ļauj prognozēt organiskā modificētāja koncentrāciju kustīgajā fāzē, kas, savukārt, ļauj iegūt analīzei pieņemamus izdalīšanas faktoros. Hromatogrāfijas speciālisti iesaka izmantot izdalīšanas izokrātisko metodi, ja analizējamo savienojumu skaits ir zem 10 [14]. Mūsu gadījumā izdalīšanas izokrātisko metodi izmantot nav ieteicams. Izdalīšanas gradienta “*nulles tuvinājuma*” metode ļauj aptuveni prognozēt analizējamo vielu izdalīšanas laiku, organiskā modificētāja koncentrāciju un analīzes kopējo laiku. Abos hromatogrāfijas darba režīmos solvātu sorbcijas modelī izmantotais nulles tuvinājums palīdz samazināt metodes optimizācijai nepieciešamo organisko šķīdinātāju daudzumu, tādā veidā samazinot izmaksas, kā arī optimizācijai nepieciešamo laiku.

Izmantojot šo tuvinājumu, veikta aminoskābju fenilizotiocianātu atvasinājumu izdalīšanas parametru prognozēšana visām nekustīgajām fāzēm. Darbā noteikti naturālie logaritmi no sorbcijas faktora ( $\ln k$ ) katram savienojumam. Sorbcijas faktors aprēķināts ekstrapolācijas veidā no analizējamo savienojumu izdalīšanas faktora, pamatojoties uz izmantotās nekustīgās fāzes raksturlielumiem un organiskā modificētāja sastāvu kustīgā fāzē, no 10% v/v organiskā modificētāja satura līdz 90% v/v organiskā modificētāja saturam. Kā aprēķinu piemērs ir izmantots nemainīgs 50% v/v organiskā modificētāja saturs. Iegūtie dati

atspoguļoti 3.3. tabulā, kur 50% v/v acetonitrils kā organiskais modificētājs, un 3.4. tabulā, kur 50% v/v kā organiskais modificētājs - metanols.

3.3. tabula

**Naturālā logaritma sorbcijas faktora (ln k) vērtības, organiskais modificētājs -  
acetonitrils (ACN/H<sub>2</sub>O 50% v/v)**

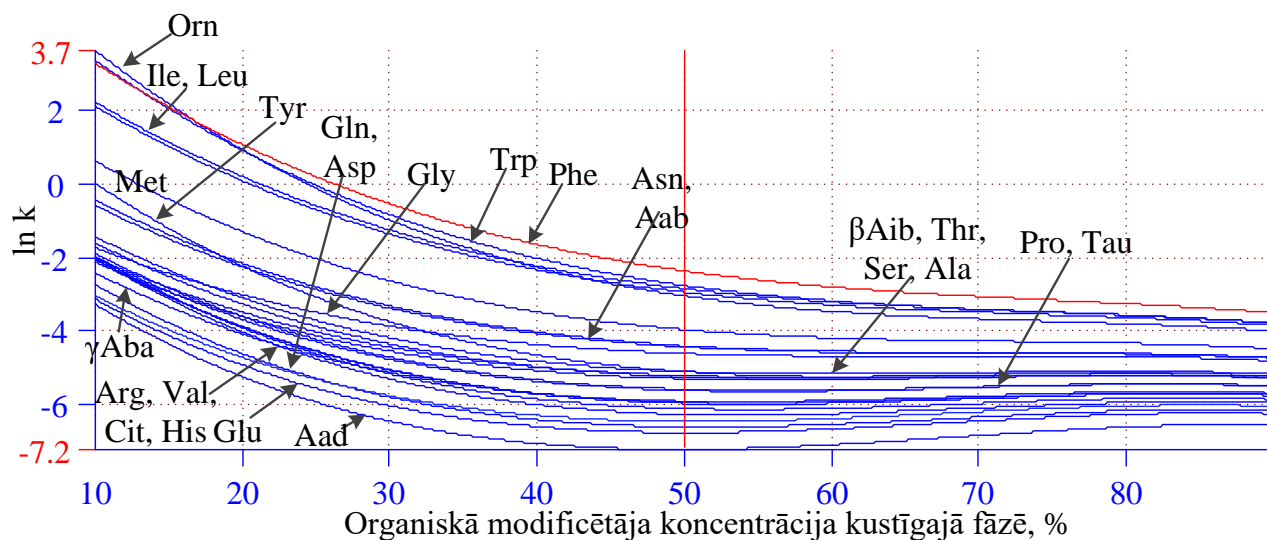
Nr. p.k	Analīts	Pico Tag C18	SunFire C18	Zorbax CN	Zorbax SB-C8	Nucleosil 100 C8	Alltima C8	YMC-Pack C4	Mixed Mode RP-C18/Cation	Mixed Mode RP-C8/Cation
1.	Aab	-3,71	-2,07	-0,75	-1,77	-1,65	-1,68	-3,27	-2,71	-3,45
2.	Aad	-6,83	-4,35	-1,45	-3,65	-3,59	-3,39	-5,74	-5,64	-5,85
3.	Ala	-3,83	-2,18	-0,77	-1,87	-1,76	-1,78	-3,37	-2,87	-3,57
4.	Arg	-5,50	-3,37	-1,15	-2,84	-2,75	-2,64	-4,68	-4,36	-4,81
5.	Asn	-5,32	-3,26	-1,11	-2,76	-2,67	-2,59	-4,55	-4,25	-4,71
6.	Asp	-6,44	-4,09	-1,36	-3,44	-3,39	-3,23	-5,44	-5,34	-5,59
7.	βAib	-4,35	-2,54	-0,89	-2,17	-2,06	-2,04	-3,78	-3,33	-3,95
8.	Cit	-5,31	-3,24	-1,11	-2,73	-2,65	-2,55	-4,54	-4,21	-4,68
9.	γAba	-4,56	-2,70	-0,94	-2,30	-2,20	-2,16	-3,95	-3,53	-4,12
10.	Gln	-5,81	-3,61	-1,22	-3,03	-2,96	-2,83	-4,93	-4,68	-5,06
11.	Glu	-6,61	-4,21	-1,40	-3,53	-3,48	-3,30	-5,57	-5,47	-5,70
12.	Gly	-3,78	-2,16	-0,76	-1,86	-1,75	-1,79	-3,34	-2,88	-3,57
13.	His	-5,91	-3,67	-1,24	-3,08	-3,00	-2,86	-5,01	-4,74	-5,12
14.	Ile	-2,82	-1,38	-0,56	-1,19	-1,03	-1,10	-2,55	-1,76	-2,69
15.	Leu	-2,72	-1,30	-0,54	-1,13	-0,97	-1,05	-2,47	-1,67	-2,61
16.	Met	-3,34	-1,77	-0,67	-1,52	-1,38	-1,42	-2,97	-2,29	-3,12
17.	Orn	-3,01	-1,46	-0,61	-1,23	-1,06	-1,08	-2,67	-1,77	-2,73
18.	Phe	-2,55	-1,16	-0,50	-1,01	-0,84	-0,92	-2,33	-1,46	-2,45
19.	Pro	-4,37	-2,55	-0,90	-2,17	-2,06	-2,04	-3,79	-3,33	-3,96
20.	Ser	-4,51	-2,68	-0,93	-2,29	-2,19	-2,17	-3,92	-3,53	-4,11
21.	Tau	-4,68	-2,79	-0,97	-2,37	-2,27	-2,23	-4,04	-3,64	-4,21
22.	Thr	-4,47	-2,63	-0,92	-2,24	-2,14	-2,11	-3,87	-3,44	-4,04
23.	Trp	-2,74	-1,28	-0,55	-1,10	-0,92	-0,98	-2,47	-1,58	-2,56
24.	Tyr	-4,73	-2,78	-0,99	-2,34	-2,22	-2,15	-4,06	-3,55	-4,16
25.	Val	-3,37	-1,80	-0,68	-1,55	-1,41	-1,45	-2,99	-2,33	-3,15

Naturālā logaritma sorbcijas faktora ( $\ln k$ ) vērtības, organiskais modificētājs - metanols  
(MeOH/H<sub>2</sub>O 50% v/v)

Nr. p.k	Analīts	Pico Tag C18	SunFire C18	Zorbax CN	Zorbax SB-C8	Nucleosil 100 C8	Alltima C8	YMC-Pack C4	Mixed Mode RP-C18/Cation	Mixed Mode RP-C8/Cation
1.	Aab	-2,50	-1,03	-0,21	-0,84	-0,79	-0,80	-1,74	-2,12	-2,14
2.	Aad	-5,57	-3,25	-0,76	-2,58	-2,72	-2,58	-3,78	-5,23	-4,33
3.	Ala	-2,81	-1,31	-0,29	-1,17	-1,10	-1,08	-2,02	-2,50	-2,43
4.	Arg	-4,16	-2,20	-0,49	-1,69	-1,77	-1,71	-2,79	-3,76	-3,28
5.	Asn	-4,20	-2,29	-0,53	-1,90	-1,93	-1,85	-2,92	-3,89	-3,40
6.	Asp	-5,42	-3,21	-0,77	-2,71	-2,77	-2,62	-3,79	-5,18	-4,32
7.	βAib	-3,19	-1,55	-0,34	-1,28	-1,26	-1,24	-2,22	-2,84	-2,66
8.	Cit	-4,06	-2,16	-0,49	-1,71	-1,76	-1,70	-2,77	-3,70	-3,25
9.	γAba	-3,42	-1,72	-0,39	-1,43	-1,42	-1,38	-2,38	-3,08	-2,83
10.	Gln	-4,55	-2,52	-0,58	-2,00	-2,07	-1,99	-3,10	-4,20	-3,60
11.	Glu	-5,49	-3,24	-0,76	-2,67	-2,76	-2,61	-3,79	-5,21	-4,34
12.	Gly	-2,93	-1,44	-0,34	-1,39	-1,28	-1,24	-2,18	-2,69	-2,59
13.	His	-4,55	-2,49	-0,56	-1,91	-2,01	-1,93	-3,05	-4,16	-3,56
14.	Ile	-1,22	0,01	0,08	0,25	0,28	0,16	-0,70	-0,65	-1,06
15.	Leu	-1,12	0,09	0,10	0,32	0,35	0,23	-0,62	-0,54	-0,98
16.	Met	-1,87	-0,49	-0,06	-0,24	-0,22	-0,28	-1,19	-1,36	-1,57
17.	Orn	-0,80	0,49	0,24	1,02	0,92	0,73	-0,14	0,01	-0,51
18.	Phe	-0,76	0,40	0,19	0,69	0,69	0,54	-0,30	-0,11	-0,65
19.	Pro	-3,16	-1,51	-0,33	-1,22	-1,21	-1,19	-2,18	-2,79	-2,61
20.	Ser	-3,54	-1,85	-0,43	-1,64	-1,60	-1,54	-2,54	-3,27	-2,98
21.	Tau	-3,53	-1,80	-0,41	-1,49	-1,48	-1,44	-2,45	-3,19	-2,90
22.	Thr	-3,32	-1,65	-0,37	-1,37	-1,35	-1,32	-2,31	-2,98	-2,75
23.	Trp	-0,75	0,47	0,22	0,86	0,82	0,65	-0,20	-0,02	-0,56
24.	Tyr	-3,06	-1,31	-0,24	-0,76	-0,86	-0,88	-1,90	-2,51	-2,36
25.	Val	-1,97	-0,59	-0,09	-0,37	-0,33	-0,39	-1,29	-1,50	-1,68

Apgrīztās fāzes AEŠH analizējamo savienojumu sorbcijas parametru atkarība no organiskā modificētāja koncentrācijas nav lineāra, to apraksta ar otrās pakāpes kvadrātiskajiem vienādojumiem. Kā jau minēts iepriekš, izmantotais *ChromSword* programnodrošinājums ļauj prognozēt analītu izdalīšanas parametrus, veidojot izšķiršanas karti ar organiskā modificētāja satura maiņu no 10% v/v līdz 90% v/v. Izšķiršanas kartes

piemērs ar *YMC-Pack C4* kolonnu, organiskais modificētājs – acetonitrils, ir attēlots 3.1. attēlā.

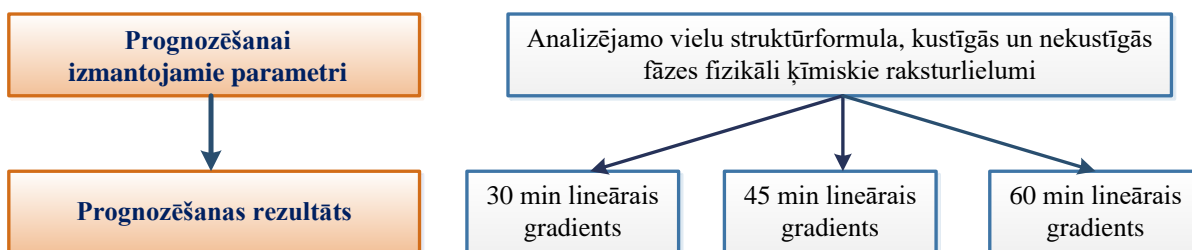


3.1. att. Pētāmo savienojumu (1-25 skat. 3.3 tab.) izšķiršanas karte *YMC-Pack C4* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot acetonitrilu kā organisko modificētāju.

Izšķiršanas karte palīdz noskaidrot optimālus analizējamo savienojumu atdalīšanas apstākļus, parādot izdalīšanas faktora atkarību no organiskā modificētāja satura kustīgajā fāzē katram maisījumā esošajam analītam. *YMC-Pack C4* kolonnas piemērā var redzēt, ka analizējamās vielas Phe (fenilalanīna fenilizotiocianāts) izšķiršana ir zema, ja organiskā modificētāja saturs kustīgajā fāzē ir no 10 līdz 20%. Palielinoties organiskā modificētāja saturam, analizējamā savienojuma izšķiršana kļūst labāka. Analizējamo savienojumu izdalīšanas parametru prognozēšanai un datorsimulācijas uzsākšanai solvātu sorbcijas modelis balstās uz iegūtajiem izšķiršanas kartes vienādojumiem. Izšķiršanas kartes citām darbā izmantojamām nekustīgajām fāzēm ir apskatāmas 1. pielikumā.

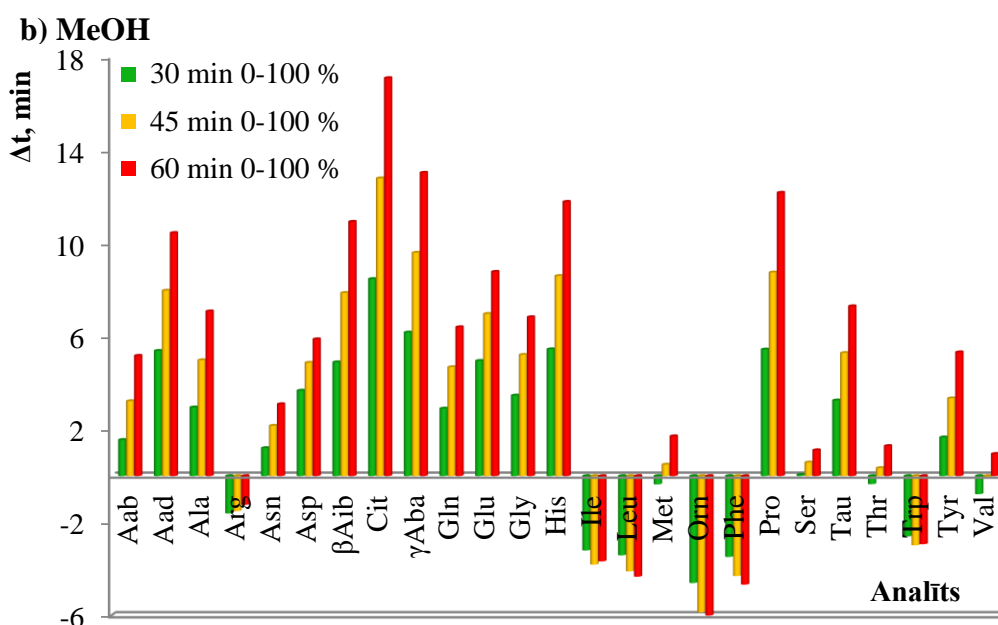
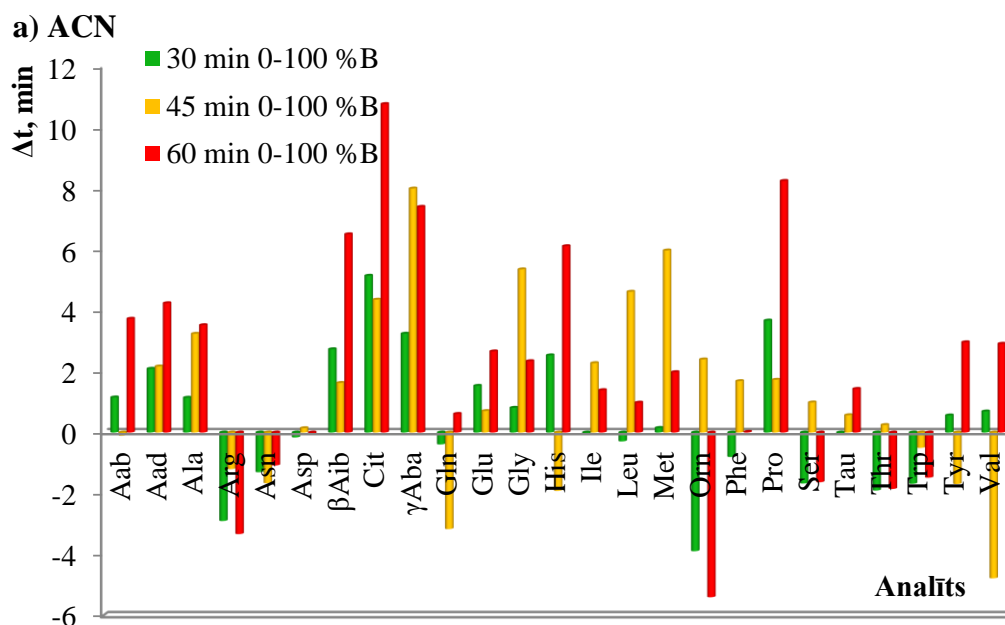
Solvātu sorbcijas modeļa analizējamo vielu prognozēšana tiek veikta, izmantojot izdalīšanas faktoru atkarību no organiskā modificētāja koncentrācijas. Zinot visus nepieciešamos parametrus, var veikt analizējamo savienojumu izdalīšanas laika datorsimulāciju.

Sākotnējo apstākļu prognozēšanai izvēlēti trīs lineārie gradienta režīmi 30 min, 45 min un 60 min no 0 līdz 100 % ACN un MeOH kustīgās fāzes sastāvā. Darba shēma ir parādīta 3.2. attēlā.



**3.2.att. Darba shēma sorbcijas parametru prognozēšanai, izmantojot analītu ķīmiskās struktūrformulas un kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumus.**

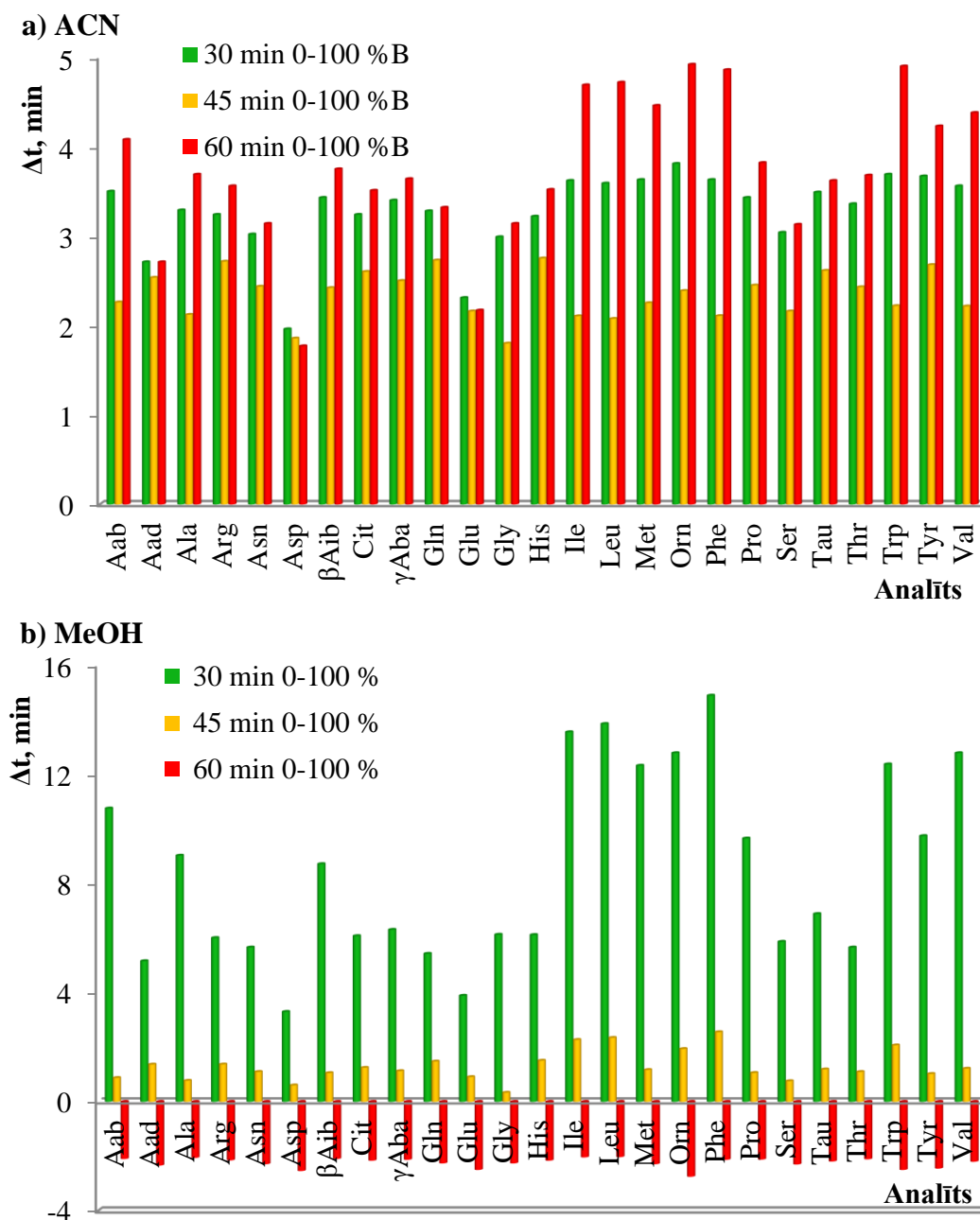
Prognozēšanas rezultātā iegūtie dati salīdzināti ar eksperimentāli iegūtajiem datiem. Iegūtie rezultāti *Pico Tag C18* nekustīgajai fāzei atspoguļoti 3.3. attēlā, kur a) organiskais modificētājs - acetonitrils un b) organiskais modificētājs - metanols. Iegūtie dati norāda, ka lielāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir ilgākam gradientam (60 min). Abu organisko modificētāju gadījumā lielāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir Cit (citrulīna fenilzotiocianātam). Acetonitrila gadījumā izdalīšanas laika atšķirība ir 10,77 minūtes un metanola gadījumā tā ir 17,11 minūtes.



**3.3. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto izdalīšanas laiku salīdzinājums aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumiem *Pico Tag C18* nekustīgajai fāzei, kur a) kustīgās fāzes sastāvā - acetonitrils un b) kustīgās fāzes sastāvā - metanols.**

Prognozēšanas rezultātu un eksperimentāli iegūto datu salīdzinājums lineārajiem gradienta režīmiem atspoguļoti 3.4. attēlā *SunFire C18* nekustīgajai fāzei, 3.5. attēlā *Zorbax CN* nekustīgajai fāzei, 3.6. attēlā *Zorbax SB-C8* nekustīgajai fāzei, 3.7. attēlā *Nucleosil 100 C8* nekustīgajai fāzei, 3.8. attēlā *Alltima C8* nekustīgajai fāzei, 3.9. attēlā *YMC-Pack C4* nekustīgajai fāzei, 3.10. attēlā *Mixed Mode RP-C18/Cation* nekustīgajai fāzei un 3.11. attēlā *Mixed Mode RP-C8/Cation* nekustīgajai fāzei, kur a) organiskais modificētājs - acetonitrils un

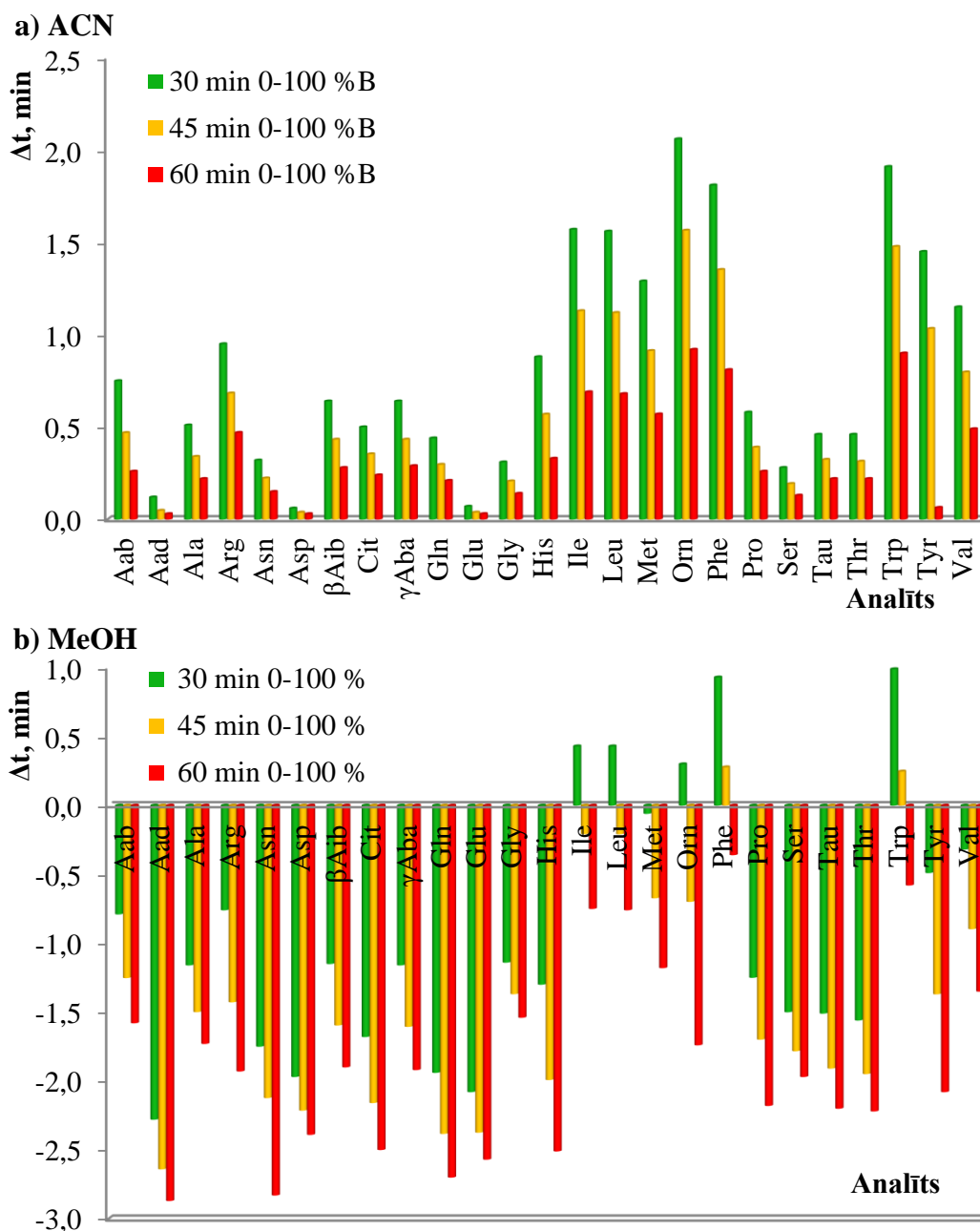
b) organiskais modificētājs - metanols. Prognozēšana veikta, balstoties uz analizējamo vielu struktūrformulu un kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumiem.



**3.4. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto izdalīšanas laiku salīdzinājums aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumiem *SunFire C18* nekustīgajai fāzei, kur a) kustīgās fāzes sastāvā acetonitrils un b) kustīgās fāzes sastāvā metanols.**

*SunFire C18* nekustīgajai fāzei (3.4. attēls) iegūtie dati norāda, ka lielāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem (14,9 min) ir 30 min lineārajam gradientam, kur metanols kā organiskais modificētājs. Abu organisko modificētāju

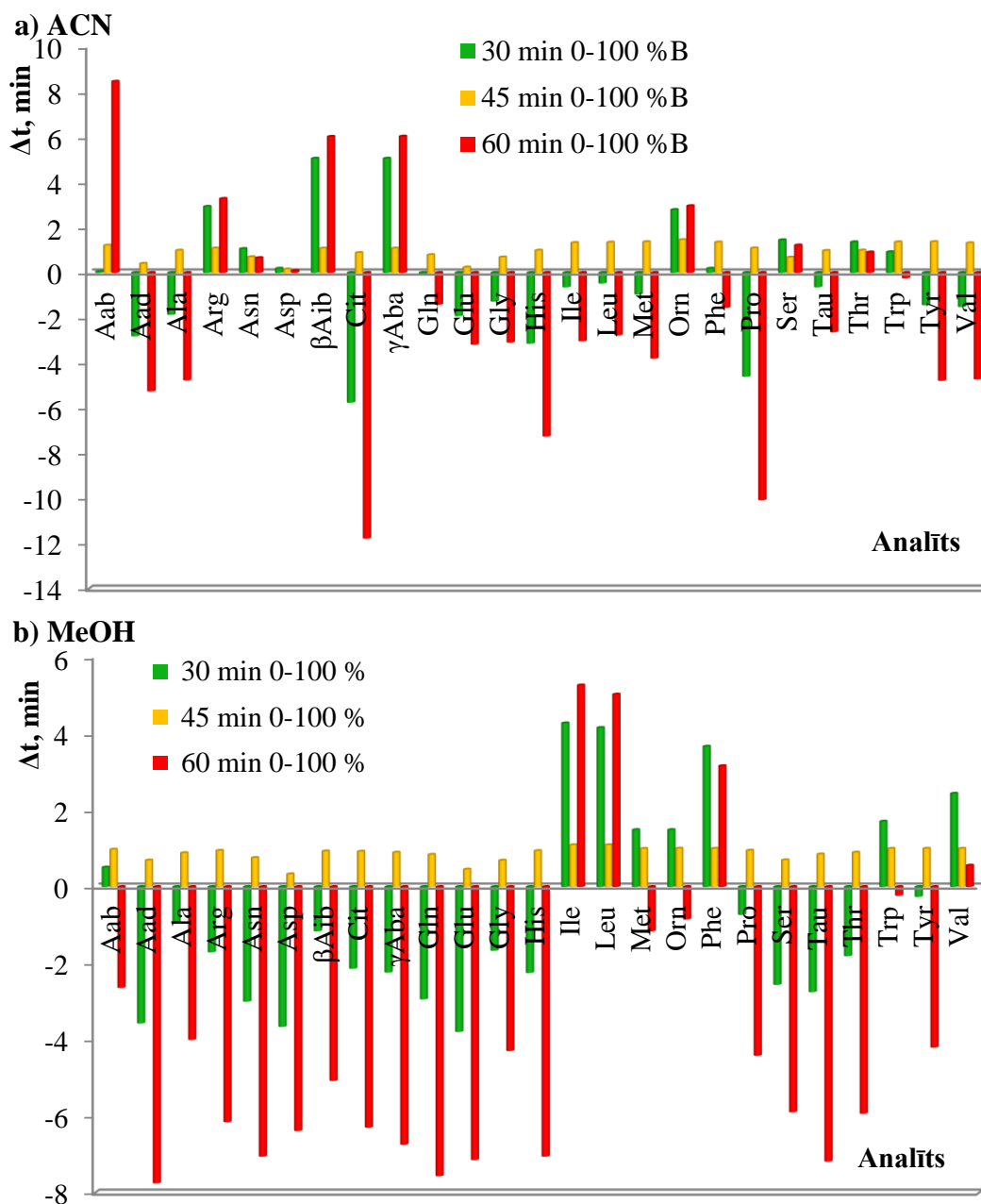
gadījumā mazākas atšķirības starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir 45 min lineārā gradienta režīmā.



**3.5. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto izdalīšanas laiku salīdzinājums aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumiem Zorbax CN nekustīgajai fāzei, kur a) kustīgās fāzes sastāvā - acetonitrils un b) kustīgās fāzes sastāvā - metanols.**

Zorbax CN nekustīgajai fāzei (3.5. attēls) atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir daudz mazāka salīdzinājumā ar octadecil- grupu saturošajām kolonnām. 30 min lineārajam gradientam, kur acetonitrils kā organiskais modificētājs, tā ir 2,06 minūtes un 60 min lineārajam gradientam, kur metanols kā organiskais

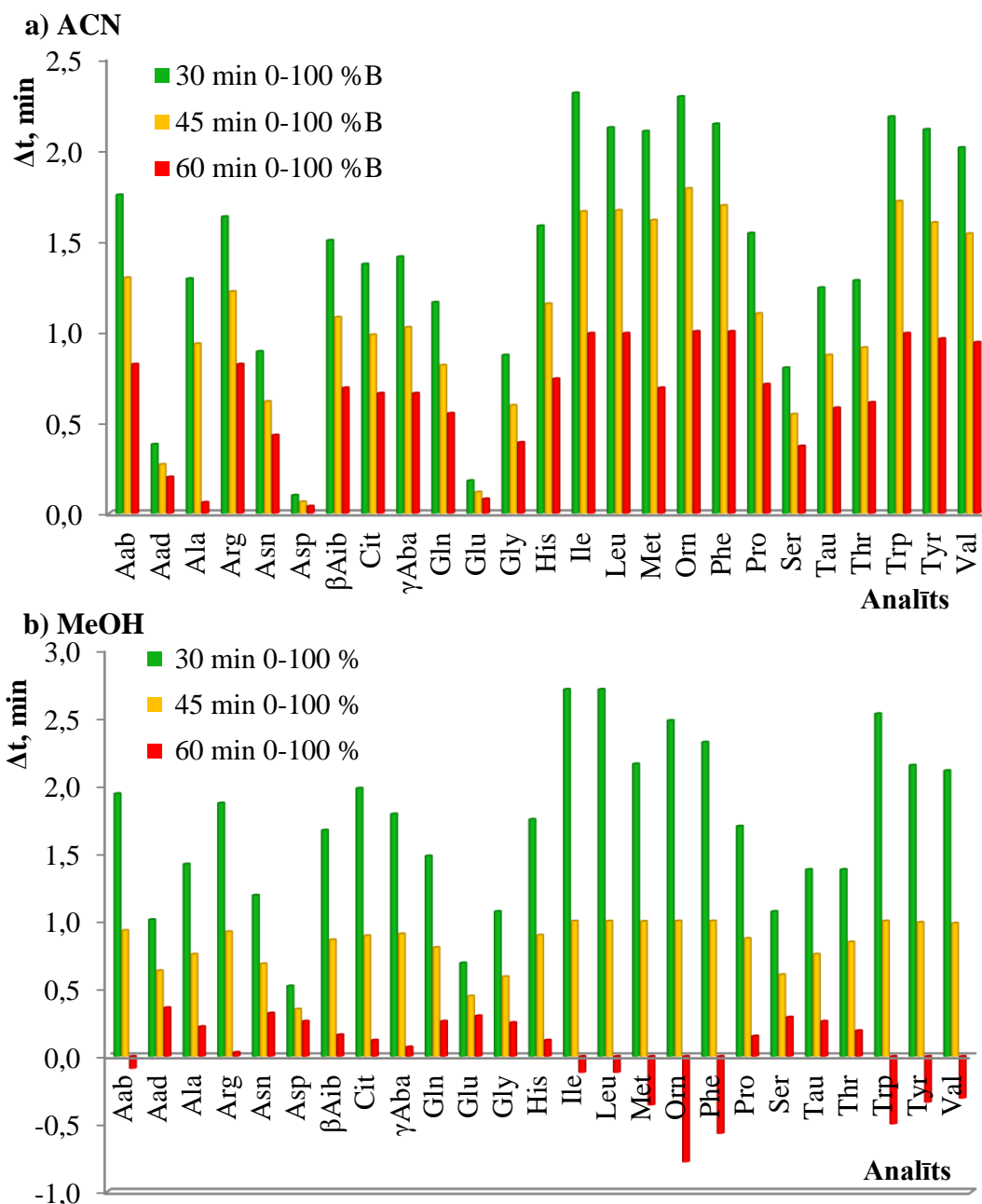
modificētājs tā ir 2,87 minūtes. Korelācija starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem un gradienta ilgumu starp izmantotajiem organiskajiem modificētājiem nav novērojama.



3.6. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto izdalīšanas laiku salīdzinājums aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumiem Zorbax SB-C8 nekustīgajai fāzei, kur a) kustīgās fāzes sastāvā - acetoniitrils un b) kustīgās fāzes sastāvā - metanols.

Zorbax SB-C8 nekustīgajai fāzei (3.6. attēls) iegūtie dati norāda, ka lielāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir ilgākajam gradientam (60 min). Organiskā modificētājā acetoniitrila gadījumā tā ir 11,77 minūtes, bet organiskā

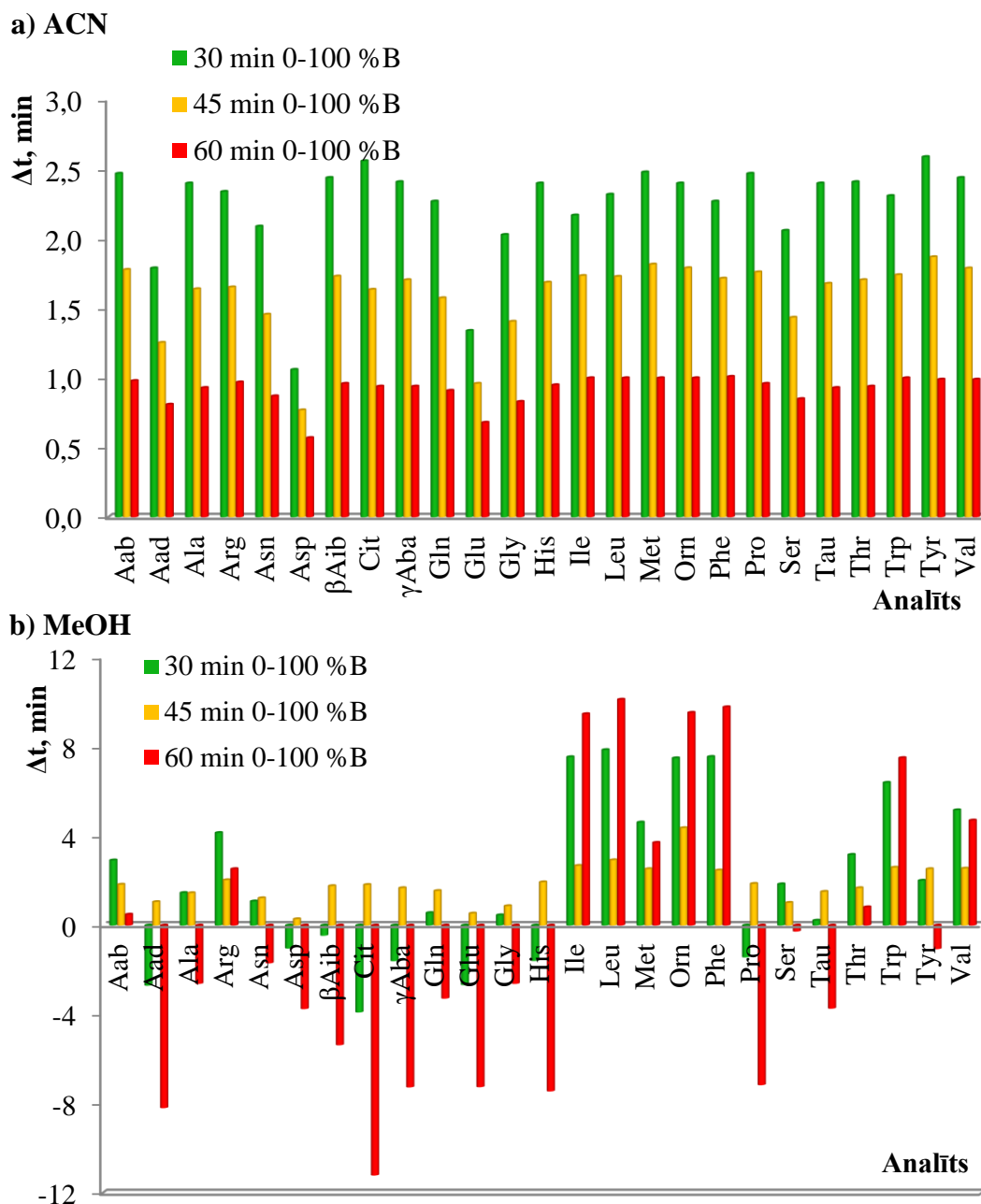
modificētāja metanola gadījumā 7,75 minūtes. Mazāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir 45 min gradientam. Organiskā modificētāja acetonitrila gadījumā tā ir 1,46 minūtes un metanola gadījumā 1,09 minūtes.



**3.7. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto izdalīšanas laiku salīdzinājums aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumiem *Nucleosil 100 C8* nekustīgajai fāzei, kur a) kustīgās fāzes sastāvā - acetonitrils un b) kustīgās fāzes sastāvā - metanols.**

*Nucleosil 100 C8* nekustīgajai fāzei (3.7. attēls) iegūtie dati norāda, ka lielāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir 30 min lineārajam gradientam. Organiskā modificētāja acetonitrila gadījumā tā ir 2,31 minūtes, organiskā

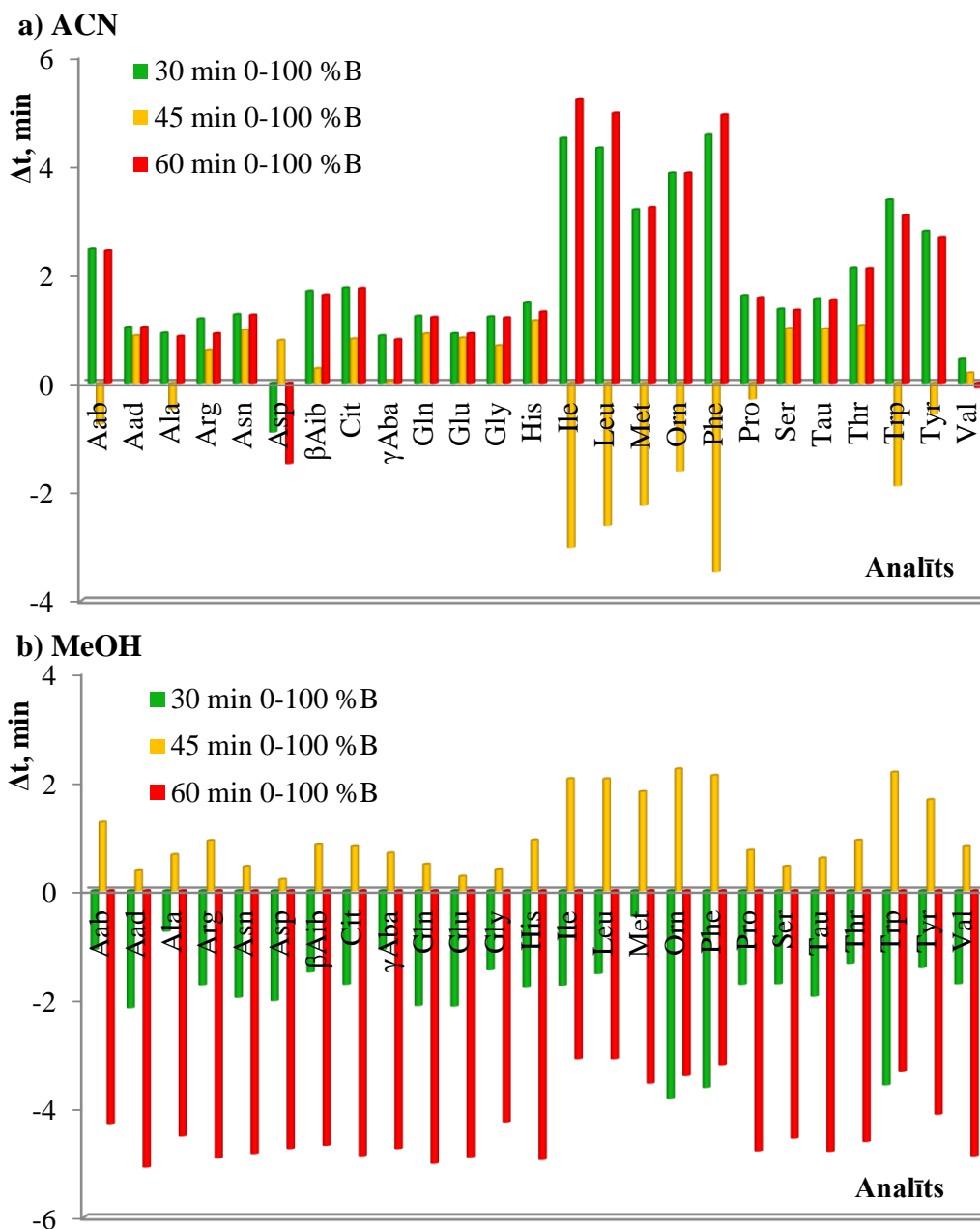
modificētāja metanola gadījumā tā ir 2,71 minūtes. Mazāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir 60 min gradientam. Organiskā modificētāja acetonitrila gadījumā tā ir 1,00 minūtes, organiskā modificētāja metanola gadījumā tā ir 0,78 minūtes.



3.8. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto izdalīšanas laiku salīdzinājums aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumiem Alltima C8 nekustīgajai fāzei, kur a) kustīgās fāzes sastāvā - acetonitrils un b) kustīgās fāzes sastāvā - metanols.

Alltima 100 C8 nekustīgajai fāzei (3.8. attēls) lielāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem 30 min lineārajam gradientam, organiskā modificētāja

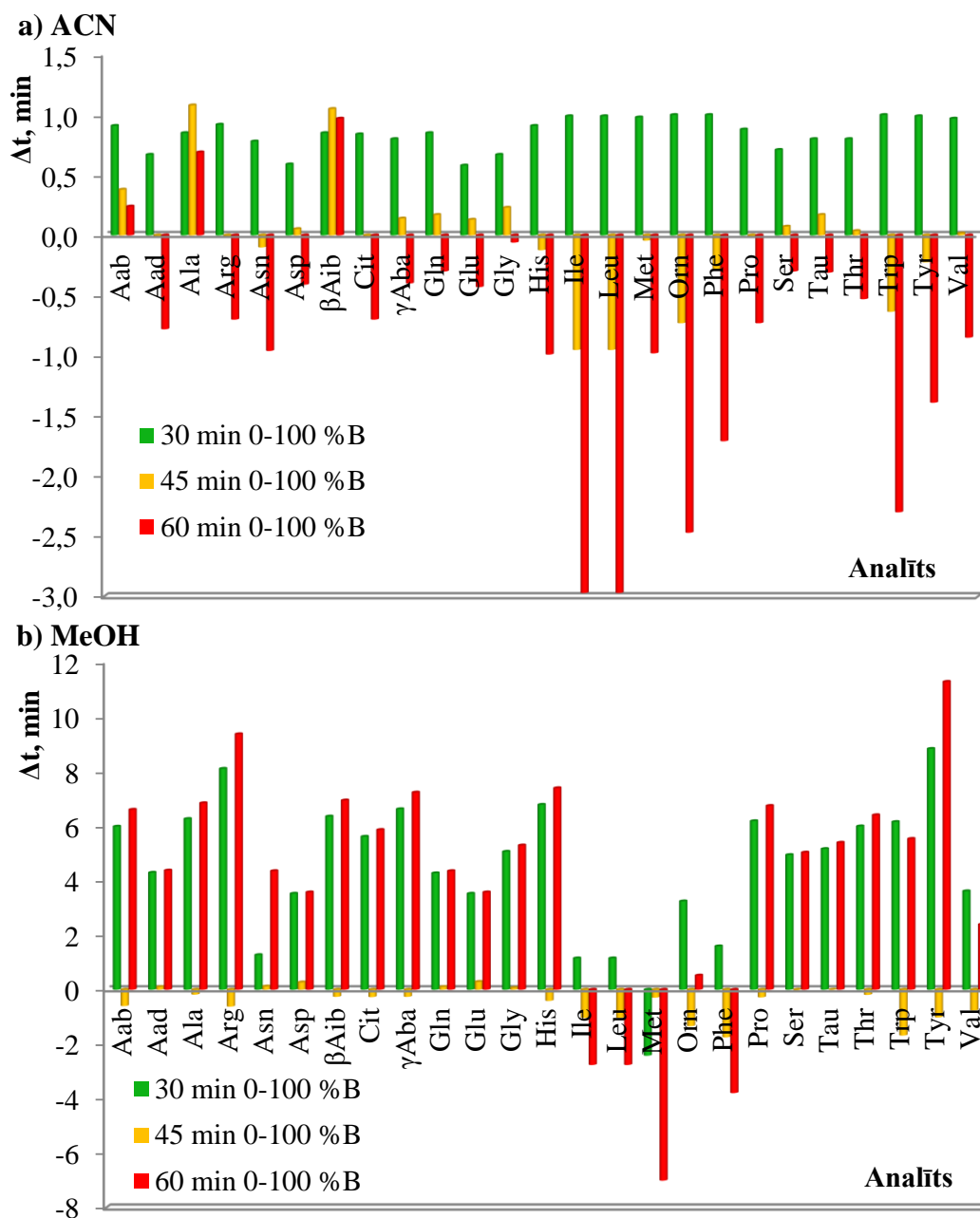
acetonitrila gadījumā ir 2,48 minūtes. Organiskā modificētāja metanola gadījumā 60 min lineārajam gradientam tā ir 11,21 minūtes.



3.9. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto izdalīšanas laiku salīdzinājums aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumiem YMC-Pack C4 nekustīgajai fāzei, kur a) kustīgās fāzes sastāvā - acetonitrils un b) kustīgās fāzes sastāvā - metanols.

YMC-Pack C4 nekustīgajai fāzei (3.9. attēls) iegūtie dati norāda, ka lielāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir 60 min lineārajam gradientam. Organiskā modificētāja acetonitrila gadījumā tā ir 5,22 minūtes, organiskā modificētāja metanola gadījumā tā ir 5,08 minūtes. Mazāka atšķirība starp prognozētajiem un

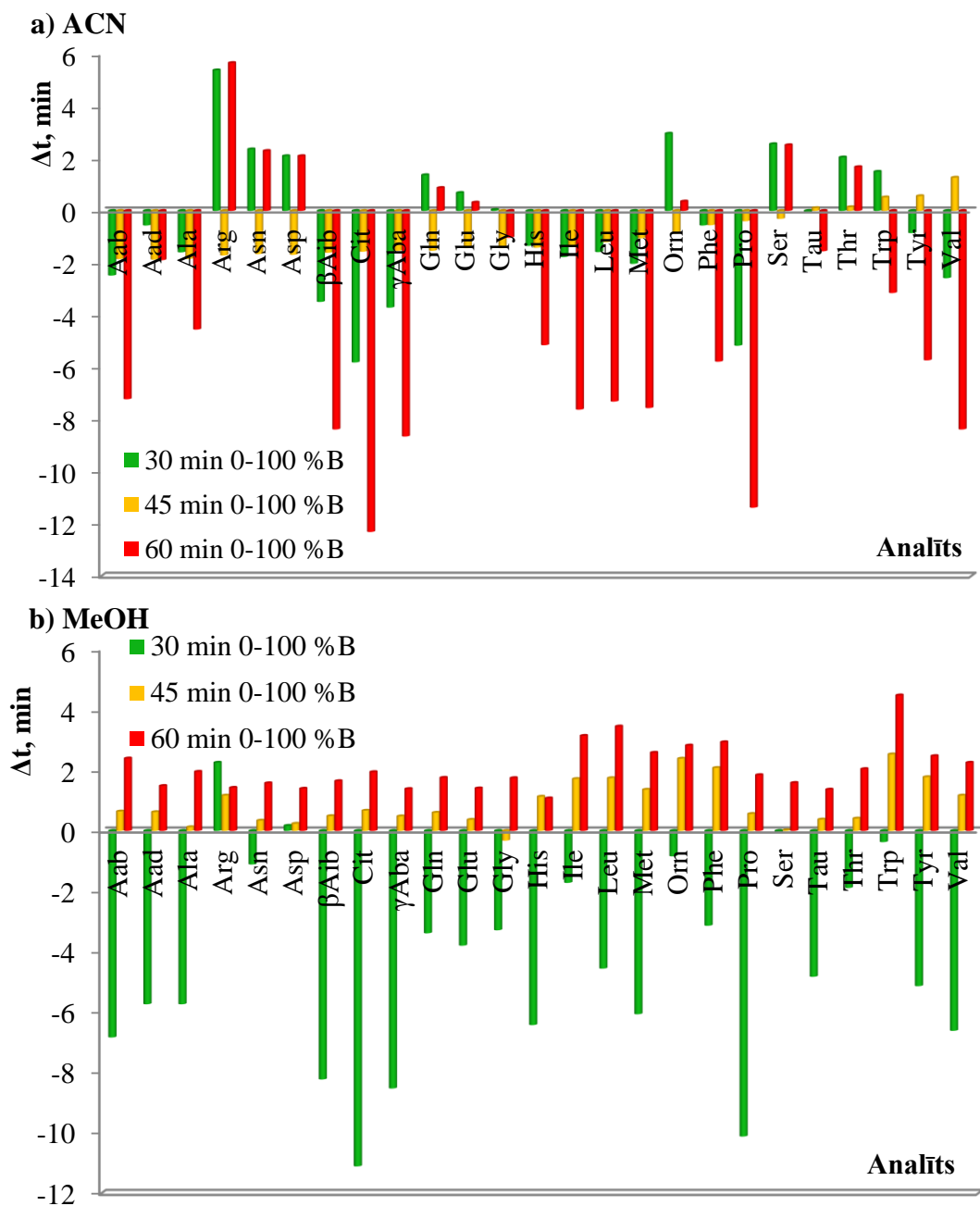
eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir 45 min gradientam. Organiskā modificētāja acetonitrila gadījumā tā ir 3,46 minūtes un organiskā modificētāja metanola gadījumā tā ir 2,24 minūtes.



3.10. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto izdalīšanas laiku salīdzinājums aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumiem *Mixed Mode RP-C18/Cation* nekustīgajai fāzei, kur a) kustīgās fāzes sastāvā - acetonitrils un b) kustīgās fāzes sastāvā - metanols.

*Mixed Mode RP-C18/Cation* nekustīgajai fāzei (3.10. attēls) iegūtie dati norāda, ka lielāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir 60 min lineārajam gradientam. Organiskā modificētāja acetonitrila gadījumā tā ir 2,98 minūtes,

organiskā modificētāja metanola gadījumā tā ir 11,29 minūtes. Mazāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, izmantojot organisko modificētāju acetonitrilu, 30 min gradientam ir 1,0 minūtes. Izmantojot organisko modificētāju metanolu, 45 min gradientam tā ir 1,75 minūtes.



3.11. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto izdalīšanas laiku salīdzinājums aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumiem *Mixed Mode RP-C8/Cation* nekustīgajai fāzei, kur a) kustīgās fāzes sastāvā - acetonitrils un b) kustīgās fāzes sastāvā - metanols.

*Mixed Mode RP-C8/Cation* nekustīgajai fāzei (3.11. attēls) iegūtie dati norāda, ka lielāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, izmantojot organisko modificētāju acetonitrilu, 60 min lineārajam gradientam ir 12,31 minūtes. Izmantojot organisko modificētāju metanolu, 30 min lineārajam gradientam tā ir 11,11 minūtes. Mazāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir 45 min lineārajam gradientam. Organiskā modificētāja acetonitrila gadījumā tā ir 1,87 minūtes. Organiskā modificētāja metanola gadījumā tā ir 2,54 minūtes.

Analizējot prognozēšanas rezultātā iegūtos datus, var apgalvot, ka korelācija starp analizējamo vielu izdalīšanas laikiem un prognozēšanai izmantotā lineārā gradienta laiku nav novērojama. Eksperimenta rezultātā iegūtie dati apliecina, ka prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu starpība lielāka par 5 minūtēm ir 2% aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumiem, izmantojot acetonitrilu un 26% analītiem, izmantojot metanolu 30 min lineārajam gradientam. 45 min lineārajam gradientam prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu starpība lielāka par 5 minūtēm ir 1,5% analītiem, izmantojot organisko modificētāju acetonitrilu, un 4%, izmantojot organisko modificētāju metanolu. Lineārajam gradientam ar kopējo laiku 60 min rezultātu starpība lielāka par 5 minūtēm ir 13% analītiem, kā organisko modificētāju izmantojot acetonitrilu un 26%, izmantojot metanolu. Mazāka atšķirība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem izdalīšanas laikiem ir *Zorbax CN* un *Nucleosil 100 C8* kolonnām - mazāk par 3 minūtēm, organiskais modificētājs gan acetonitrils, gan metanols, neskatoties uz to ka *Zorbax CN* kolonnai ir zemākas sorbenta izmēra un polaritātes selektivitātes rādītāji (skat. 3.1.tabula).

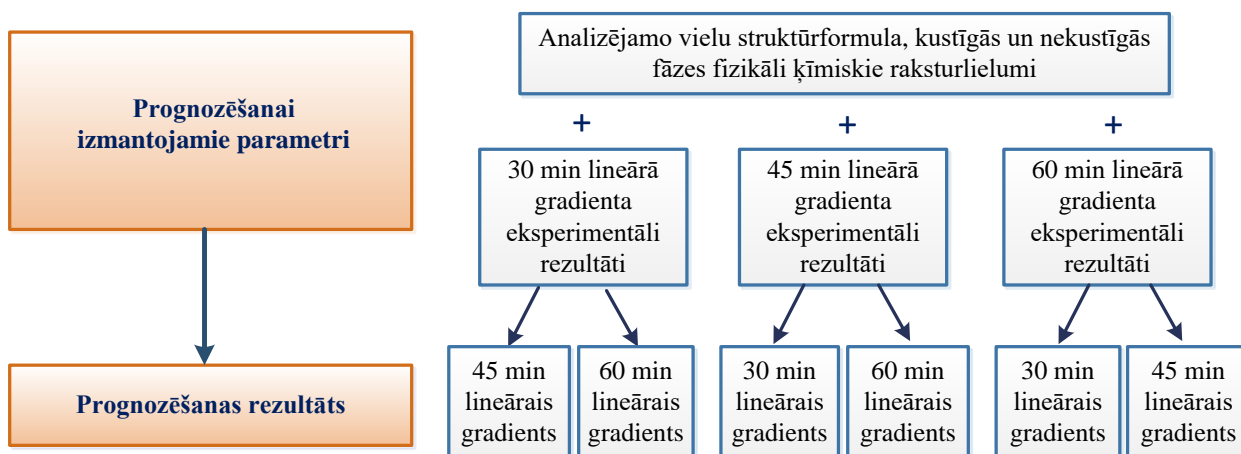
„*Nulles tuvinājuma*” metodi nevar uzskatīt par pietiekami precīzu analizējamo vielu izdalīšanas laika prognozēšanas metodi, toties var uzskatīt, ka to var pieņemt par labu metodi sākotnējo parametru prognozēšanai. Tā ļauj noteikt aptuvenu analīzes laiku un analīzei nepieciešamo organiskā modificētāja daudzumu.

### **3.2. Sorbcijas parametru prognozēšana, izmantojot „*pirmā tuvinājuma*” metodi**

„*Pirmā tuvinājuma*” metode ietver sevī analizējamo vielu prognozēšanu, pamatojoties uz vielu ķīmisko struktūrformulu, kustīgās un nekustīgās fāzes fizikāli ķīmiskajām īpašībām un viena eksperimenta iegūtajiem izdalīšanas laika rezultātiem. Šī tuvinājuma mērķis ir iegūt precīzākus izdalīšanas laikus. Izmantojot „*pirmā tuvinājuma*”metodes iegūtos rezultātus, var turpināt veikt izdalīšanas laika optimizāciju vai arī pāriet pie analizējamo savienojumu

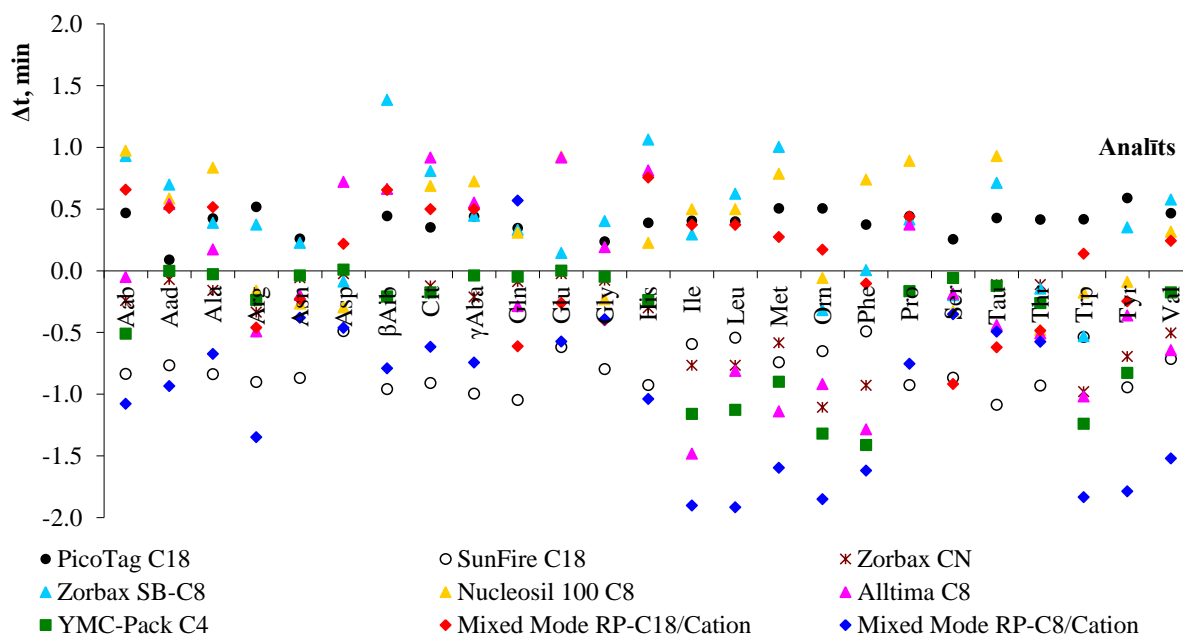
atdalīšanas optimizācijas atkarībā no iegūtajiem datiem. Zinot viena eksperimenta izdalīšanas laikus, operējot ar vielu struktūru un nekustīgās fāzes raksturīpašībām (3.1. vienādojums), ir iespēja koriģēt sākotnējās sorbāta mijiedarbības enerģijas ( $\Delta G_w$ ) un sorbāta parciālā mola tilpuma  $V$  vērtības. Izmainītās vērtības tiek izmantotas tālākai prognozēšanai un optimizācijai izmantojot matemātisko iterāciju.

Darba shēma sorbcijas parametru prognozēšanai, izmantojot analītu ķīmiskās struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumus un viena eksperimenta iegūtos rezultātus, ir parādīta 3.12. attēlā.

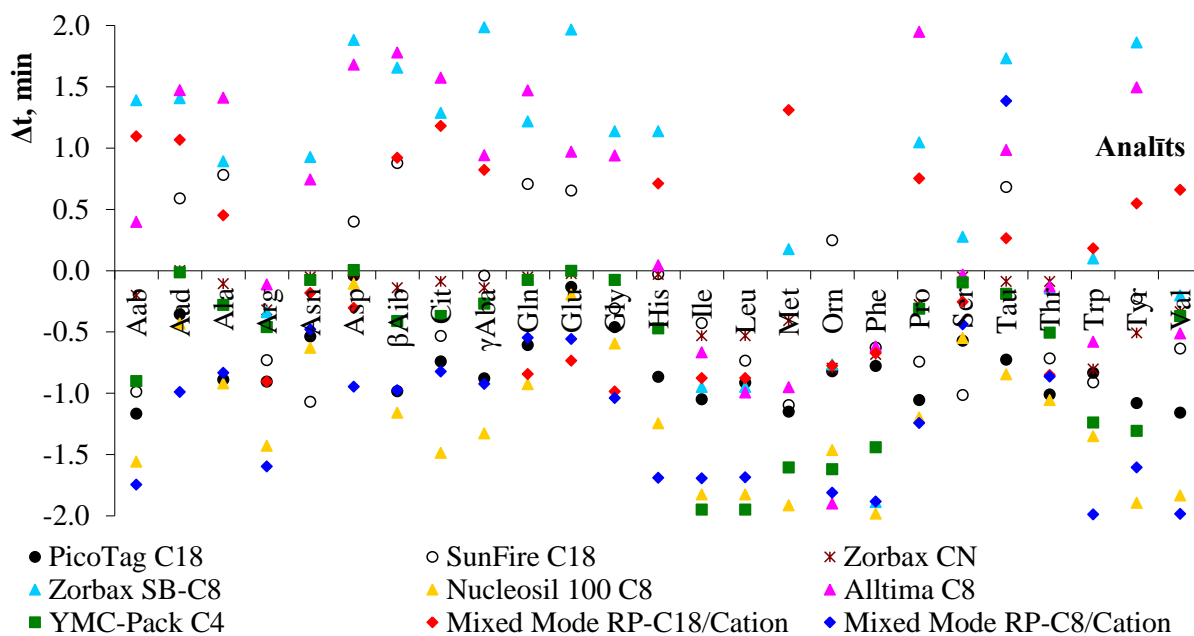


**3.12.att. Darba shēma sorbcijas parametru prognozēšanai, izmantojot analītu ķīmiskās struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumus un viena eksperimenta iegūtos rezultātus.**

Izmantojot „*pirmā tuvinājuma*” metodi, veikta aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu izdalīšanas laika prognozēšana 30 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B). Prognozēšanai izmantotas aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu (2.2. tabula) struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības (3.1. tabula) un 60 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B) eksperimentāli iegūtie rezultāti. Prognozēšana veikta īsākajiem gradienta režīmiem, kas dod iespēju saīsināt analīzes laiku. Prognozēšanas rezultāti salīdzināti ar eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, iegūtie dati ir atspoguļoti 3.13. attēlā, izmantojot acetoniitrilu kā organisko šķīdinātāju un 3.14. attēlā, izmantojot metanolu kā organisko šķīdinātāju.



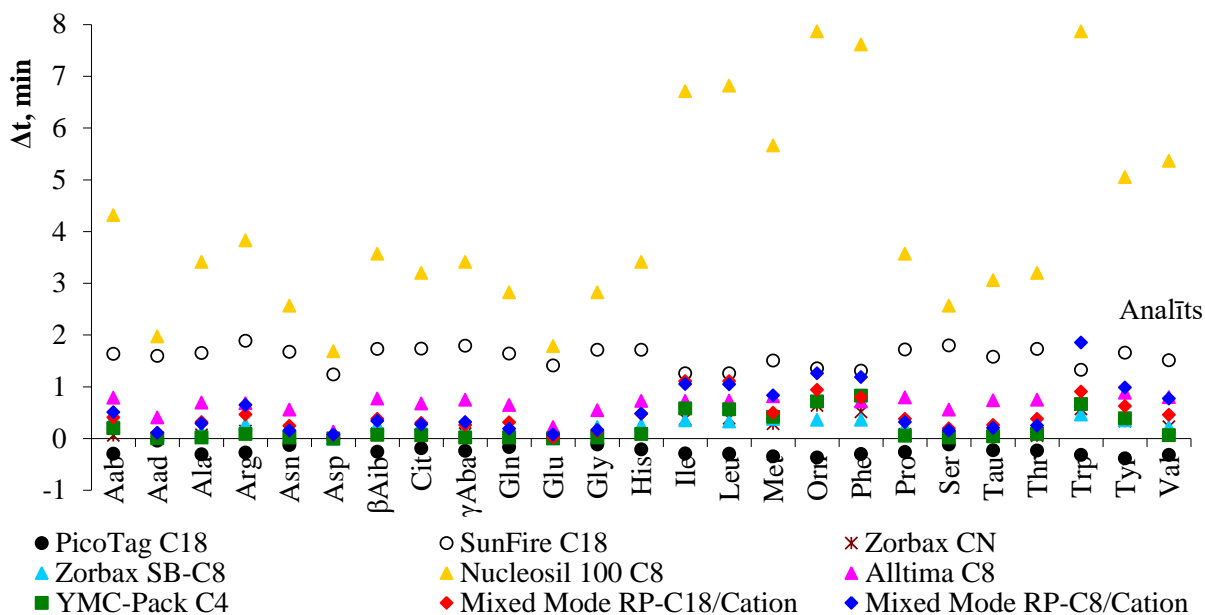
3.13. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B), organiskais modificētājs – acetonitrils, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B).



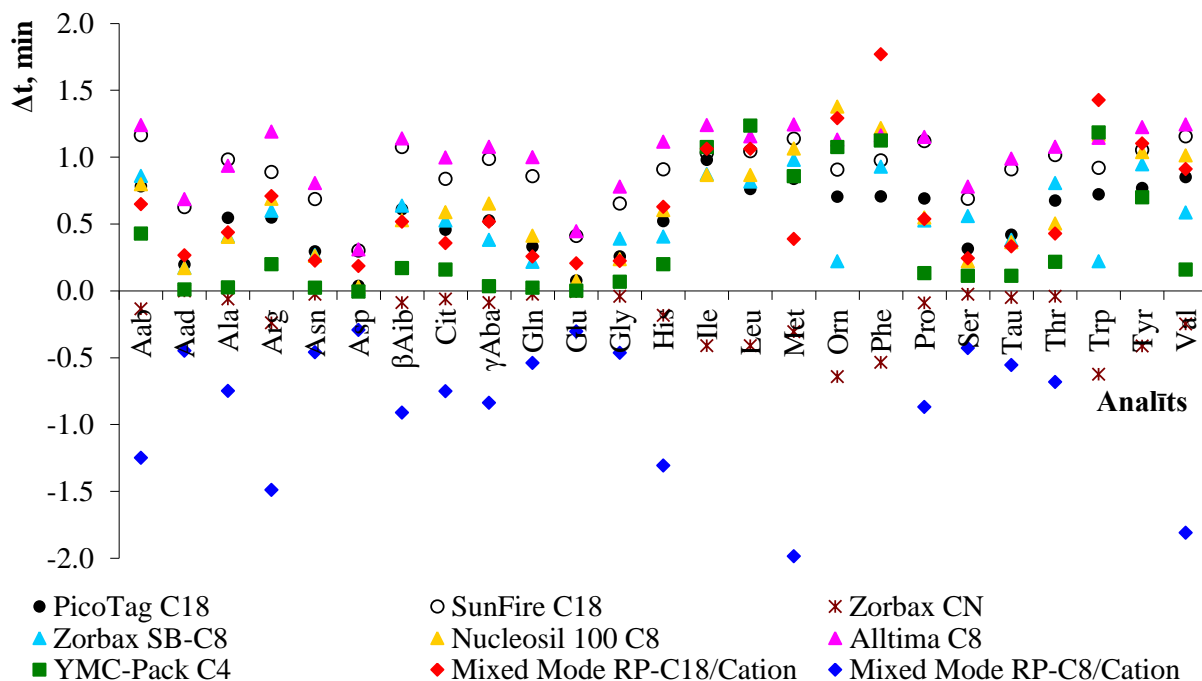
3.14. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B), organiskais modificētājs – metanols, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B).

Izmantojot acetonitrilu, prognozēšanas rezultātā iegūtie dati ir tuvāki eksperimentāli iegūtajiem datiem, nekā izmantojot metanolu kā organisko modificētāju. Abu organisko modificētāju gadījumā lielāka rezultātu atšķirība novērojama *Mixed Mode RP-C8/Cation* kolonnai. Lielāka starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem novērojama Ile, Leu, Met, Orn un Phe savienojumiem ar relatīvi vidēju polaritāti. Starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem nepārsniedz 2 minūtes.

Līdzīgi veikta aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu izdalīšanas laika prognozēšana 45 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B). Prognozēšanai izmantotas aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu (2.2. tabula) struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības (3.1. tabula) un 60 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B) eksperimentāli iegūtie rezultāti. Prognozēšanas rezultāti salīdzināti ar eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem un iegūtie dati ir atspoguļoti 3.15. attēlā, izmantojot acetonitrilu kā organisko šķīdinātāju un 3.16. attēlā, izmantojot metanolu kā organisko šķīdinātāju.



3.15. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), organiskais modificētājs – acetonitrils, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B).



3.16. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), organiskais modificētājs – metanols, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B).

Izmantojot organisko modificētāju acetonitrilu, *Nucleosil 100 C8* kolonnai starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ievērojami lielāka nekā citām nekustīgajām fāzēm, līdz 7,87 minūtēm (Orn). Pārējām nekustīgajām fāzēm starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem nepārsniedz 2 minūtes. Izmantojot organisko modificētāju metanolu, starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem nepārsniedz 2 minūtes.

Starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem pārējiem gradientiem ir apskatāma 2. pielikumā. Prognozēšanai izmantotas aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības un viena lineārā gradienta eksperimentāli iegūtie rezultāti. Eksperimenta rezultātā iegūtie dati apliecina, ka sliktāki dati starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem ir *Nucleosil 100 C8* kolonnai, organiskais modificētājs - acetonitrils. Pārējām kolonnām eksperimentāli iegūto un prognozēto rezultātu starpība korelē sava starpā. Prognozēšana īsākajam gradientam, balstoties uz ilgākā gradienta datiem, ir tuvāka eksperimentāli iegūtajiem datiem. Veicot prognozēšanu 30 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B), pamatojoties uz 45 min lineārā gradienta (0,0 min 0% B, 45,0

min 100% B) eksperimentāli iegūtajiem datiem, lielākā starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem ir 4,89 minūtes (Met), izmantojot acetonitrilu un 1,86 minūtes (Phe), izmantojot metanolu. Savukārt, veicot prognozēšanu ilgākajam gradientam, balstoties uz īsākā gradienta iegūtajiem datiem, starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem ir lielāka.

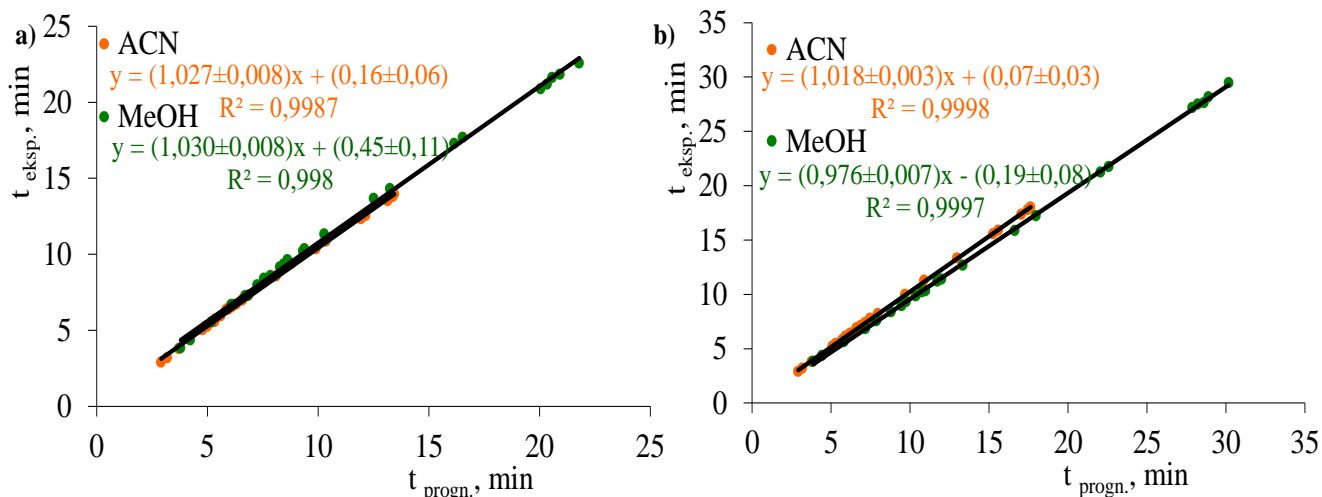
Prognozējot analizējamo vielu izdalīšanas laikus 45 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), pamatojoties uz 30 min lineārā gradienta (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B) eksperimentāli iegūtajiem datiem, lielāka starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem ir 7,40 minūtes (Trp), izmantojot acetonitrilu un 4,75 minūtes (Phe), izmantojot metanolu.

Prognozējot 60 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), pamatojoties uz 30 min lineārā gradienta (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B) eksperimentāli iegūtajiem datiem, lielāka starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem ir 9,74 minūtes (Trp), izmantojot acetonitrilu un 6,47 minūtes (Ile), izmantojot metanolu.

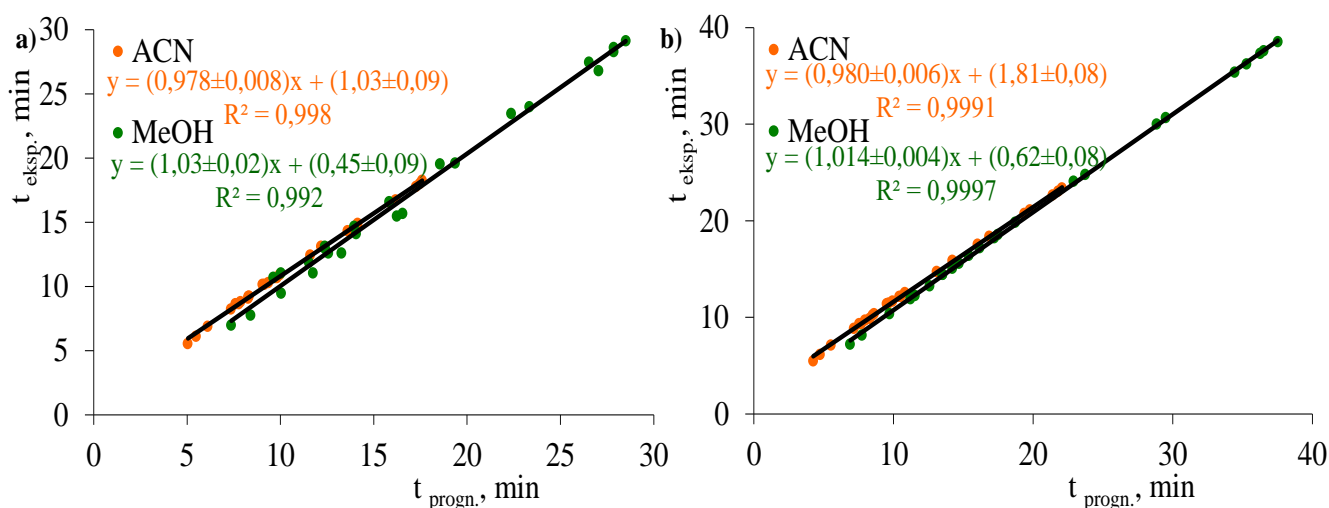
Veicot prognozēšanu 60 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), pamatojoties uz 45 min lineārā gradienta (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B) eksperimentāli iegūtajiem datiem, lielāka starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem ir 5,37 minūtes (Val), izmantojot acetonitrilu un 2,32 minūtes (Phe), izmantojot metanolu.

Iegūtie rezultāti apliecina, ka, izmantojot abus organiskos modificētājus, solvātu sorbcijas modelis ir piemērots analizējamo savienojumu izdalīšanas laika prognozēšanai.

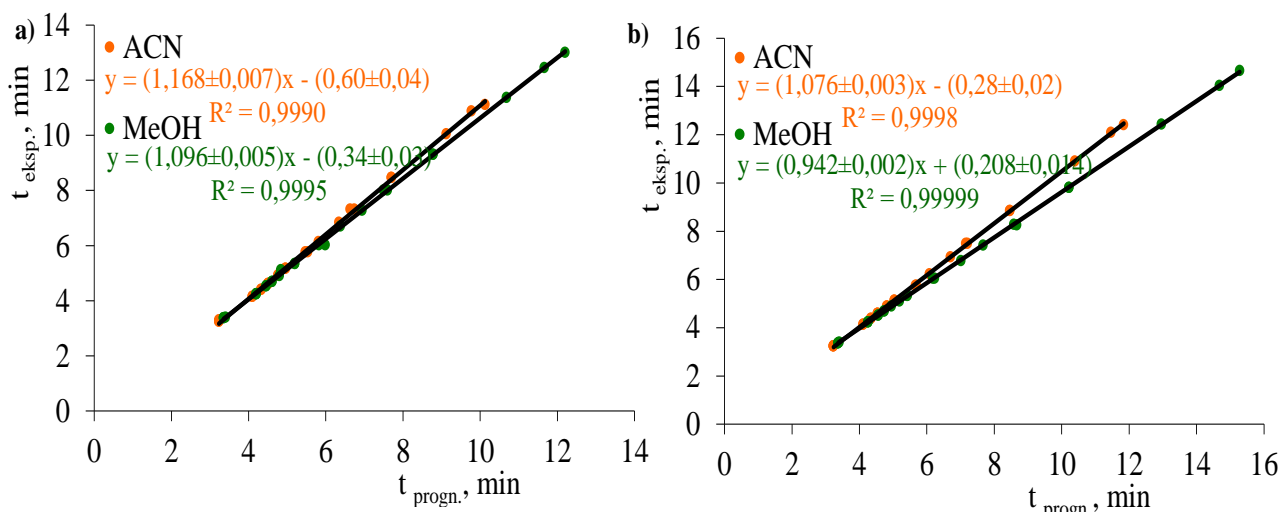
Analizējamo savienojumu izdalīšanas secība atbilst prognozētajiem rezultātiem. Iegūtie korelācijas koeficienti, veicot prognozēšanu gan 30 min, gan 45 min lineārajam gradientam, balstoties uz 60 min lineārā gradienta eksperimentāli iegūtajiem datiem, abiem organiskajiem modificētājiem ir atspoguļoti 3.17. attēlā *Pico Tag C18* kolonnai, 3.18. attēlā *SunFire C18* kolonnai, 3.19. attēlā *Zorbax CN* kolonnai, 3.20. attēlā *Zorbax SB-C8* kolonnai, 3.21. attēlā *Nucleosil 100 C8* kolonnai, 3.22. attēlā *Alltima C8* kolonnai, 3.23. attēlā *YMC-Pack C4* kolonnai, 3.24. attēlā *Mixed Mode RP-C8/Cation* kolonnai un 3.25. attēlā *Mixed Mode RP-C18/Cation* kolonnai.



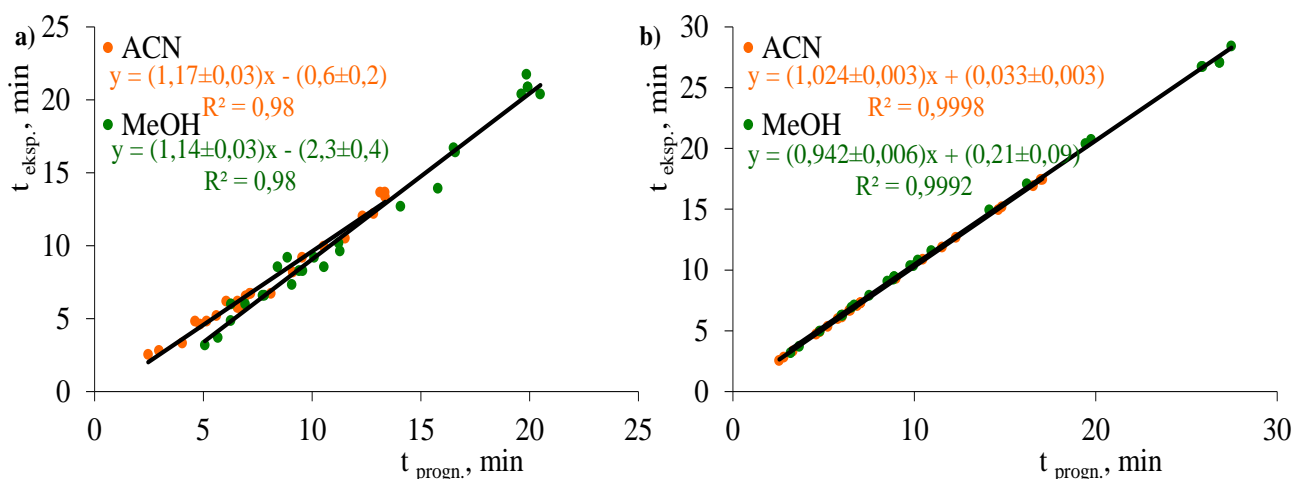
3.17. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija *Pico Tag C18* kolonnai a) 30 min lineārajam gradientam un b) 45 min lineārajam gradientam, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), analītu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības.



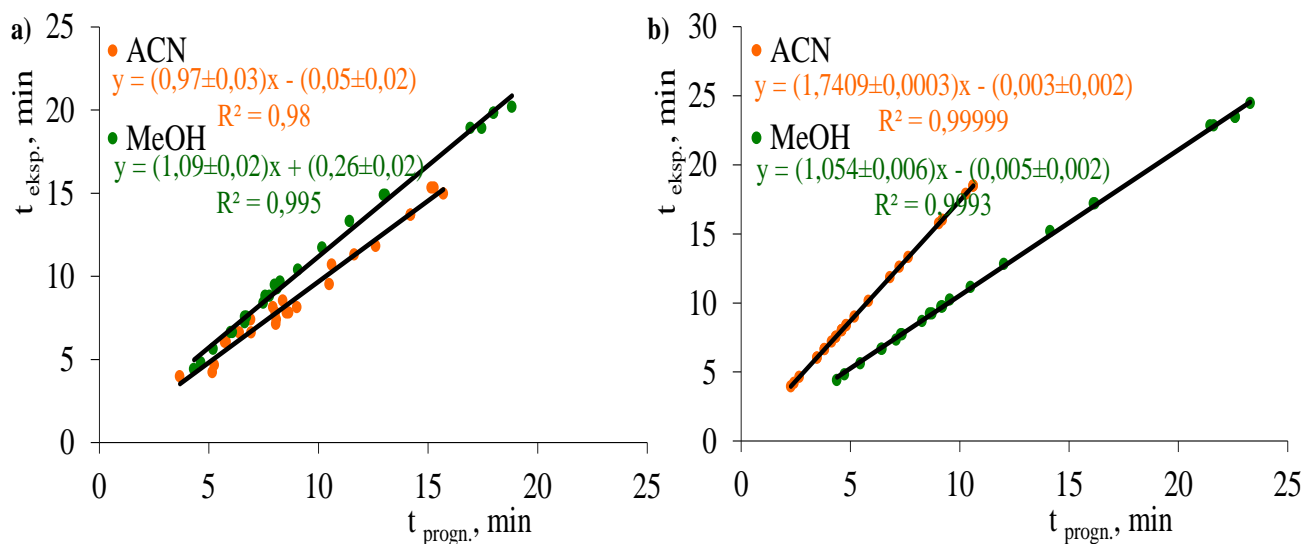
3.18. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija *SunFire C18* kolonnai a) 30 min lineārajam gradientam un b) 45 min lineārajam gradientam, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), analītu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības.



3.19. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija Zorbax CN kolonnai a) 30 min lineārajam gradientam un b) 45 min lineārajam gradientam, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), analītu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības.

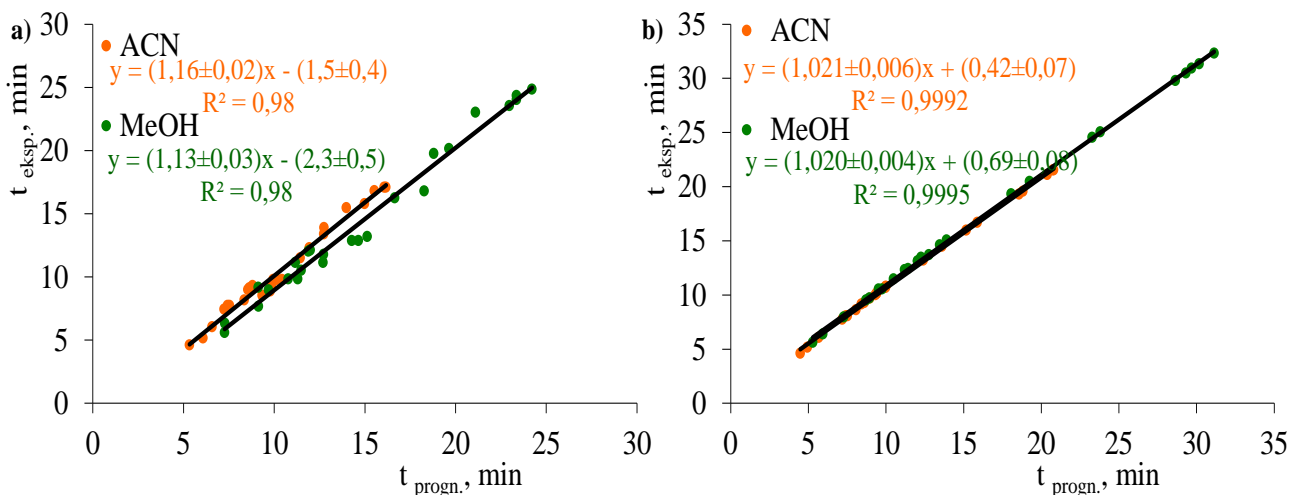


3.20. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija Zorbax SB-C8 kolonnai a) 30 min lineārajam gradientam un b) 45 min lineārajam gradientam, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), analītu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības.



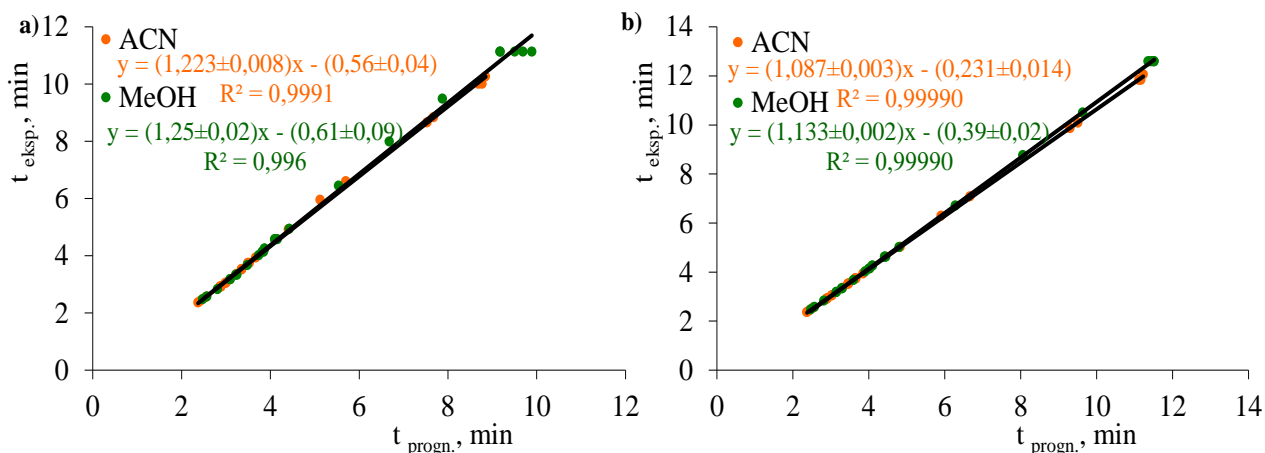
3.21. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija *Nucleosil 100 C8*

kolonnai a) 30 min lineārajam gradientam un b) 45 min lineārajam gradientam, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), analītu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības.

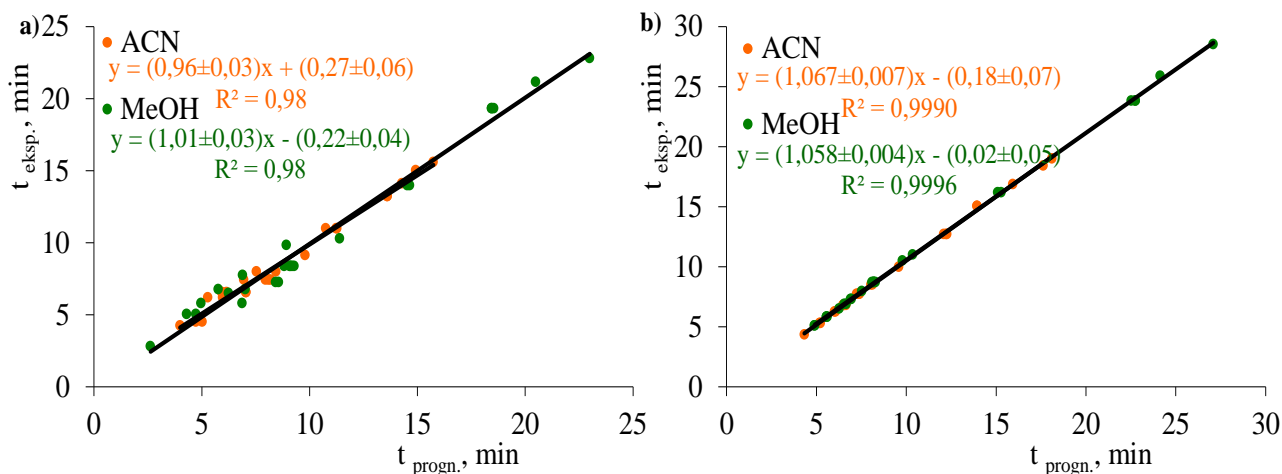


3.22. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija *Alltima C8* kolonnai a)

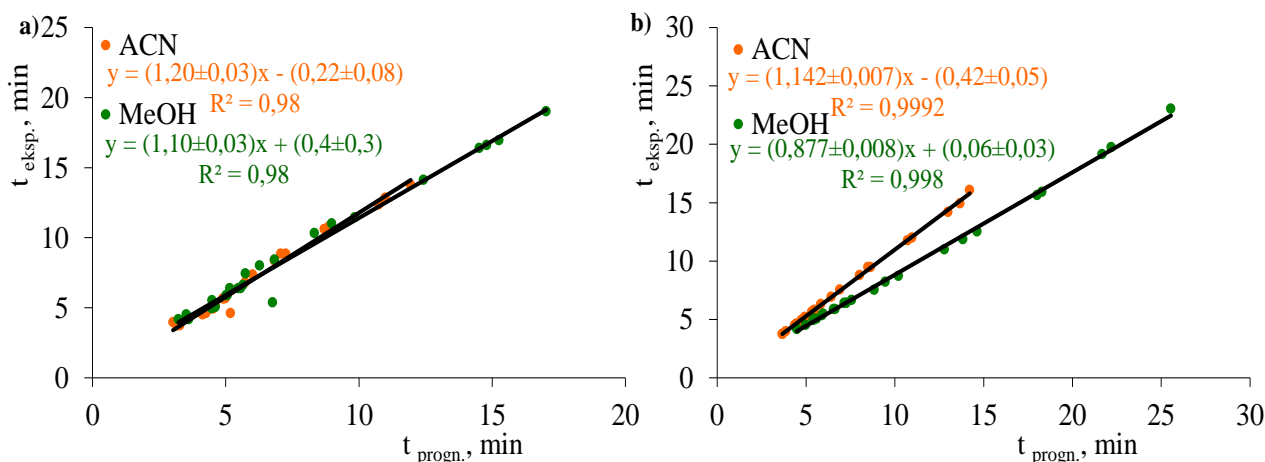
30 min lineārajam gradientam un b) 45 min lineārajam gradientam, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), analītu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības.



3.23. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija *YMC-Pack C4* kolonnai a) 30 min lineārajam gradientam un b) 45 min lineārajam gradientam, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), analītu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības.



3.24. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija *Mixed Mode RP-C18/Cation* kolonnai a) 30 min lineārajam gradientam un b) 45 min lineārajam gradientam, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), analītu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības.



3.25. att. Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija *Mixed Mode RP-C8/Cation* kolonnai a) 30 min lineārajam gradientam un b) 45 min lineārajam gradientam, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), analītu struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālās īpašības.

Analizējot iegūtos datus, var redzēt, ka izdalīšanas laiks, izmantojot acetoniitrilu kā organisko modificētāju, ir īsāks, nekā izmantojot metanolu. Šī tendence ir novērojama visām kolonnām, izņemot *YMC-Pack C4* kolonnu, kur 45 min lineārajam gradientam izdalīšanas laiki abiem modificētājiem ir ļoti līdzīgi. 30 min lineārajam gradientam, izmantojot organisko modificētāju acetoniitrilu, izdalīšanas laiks ir nedaudz īsāks nekā izdalīšanas laiks, izmantojot metanolu.

Labi novēroto tendenci, ka korelācija starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem 30 min lineārajam gradientam ir sliktāka nekā 45 min lineārajam gradientam, var izskaidrot ar to, ka prognozēšanai izmantots 60 min lineārais gradients, kas ir tuvāks 45 min gradientam.

Korelācijas koeficienti starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, veicot analizējamo vielu izdalīšanas laika prognozēšanu 30 un 45 min lineārajam gradientam, balstoties uz 60 min lineāro gradientu, nav mazāki par 0,98 *Zorbax SB-C8*, *Alltima C8*, *Mixed Mode RP-C18/Cation* un *Mixed Mode RP-C8/Cation* kolonnām, izmantojot gan acetoniitrilu, gan metanolu kā organisko modificētāju. *Nucleosil 100 C8* kolonnai korelācijas koeficients 0,98 ir acetoniitrila gadījumā.

Eksperimenta rezultātā iegūtos korelācijas koeficientus visiem prognozēšanā izmantojamajiem lineārajiem gradientiem var apskatīt 3. pielikumā. Var novērot tendenci, ka mazāki korelācijas koeficienti ir AEŠH kolonnām ar oktilgrupām snekustīgajā fāzē un nekustīgajām fāzēm ar polimēra bāzi. Korelācija starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, veicot prognozēšanu īsākam gradienta režīmam, balstoties uz ilgāka

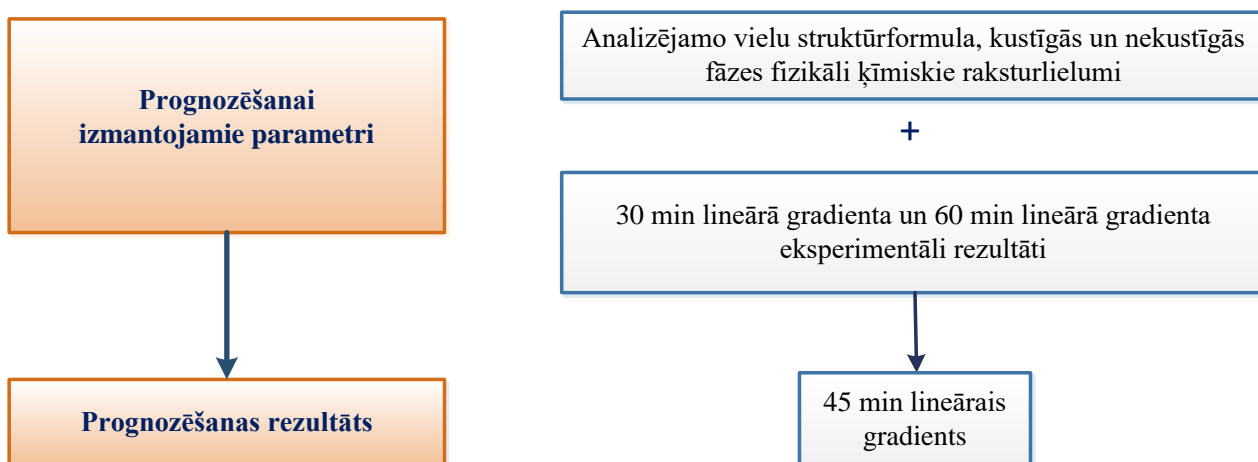
gradienta iegūtajiem datiem, ir veiksmīgāka, nekā, ja prognozēšana veikta ilgākam gradientam, balstoties uz īsāka gradienta datiem.

Analizējot iegūtos rezultātus, var uzskatīt, ka prognozēšana, izmantojot analizējamo vielu ķīmisko struktūrformulu, kustīgās un nekustīgās fāzes fizikāli-ķīmiskās īpašības un viena eksperimenta iegūtos izdalīšanas laika rezultātus, ir veiksmīga. Izmantojot iegūtos datus, tika turpināta izdalīšanas laika optimizācija ar “*otrā tuvinājuma*” metodi.

### 3.3. Sorbcijas parametru prognozēšana, izmantojot „*otrā tuvinājuma*” metodi

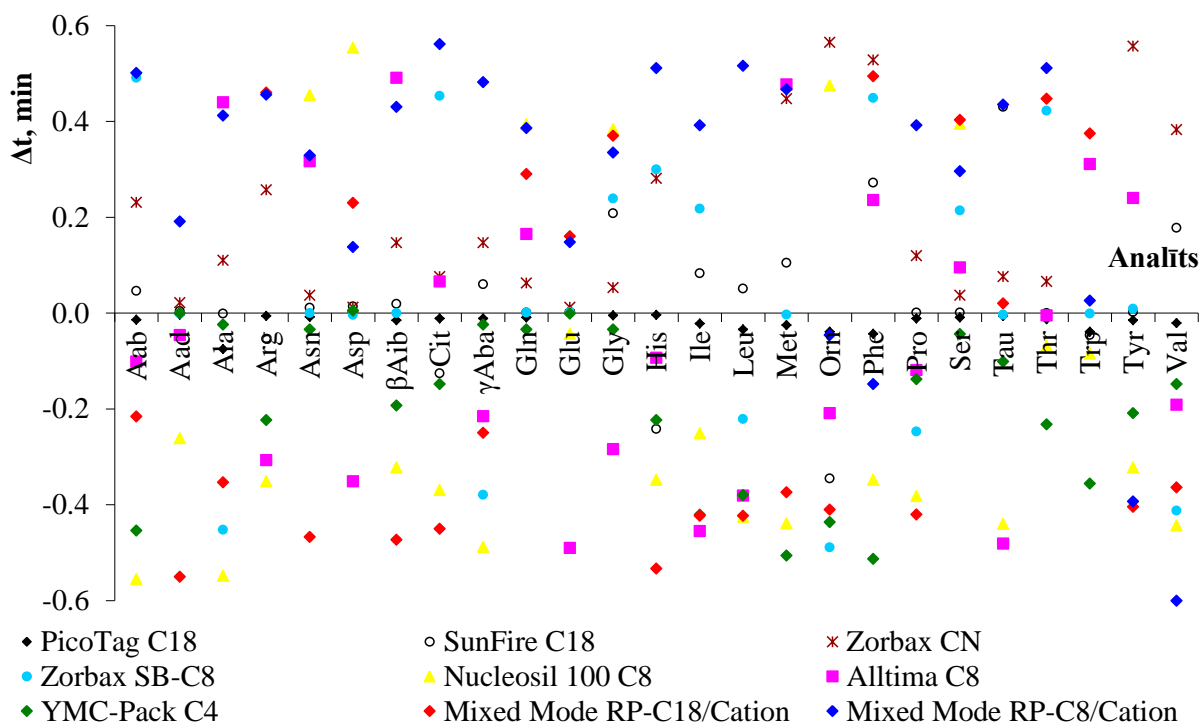
„*Otrā tuvinājuma*” metodes pieejai sorbcijas parametru optimizācijai nepieciešams: analizējamo vielu struktūrformulas, abu fāžu raksturlielumi un divu eksperimentāli iegūto rezultātu dati. Šis tuvinājums ļauj iegūt daudz precīzākus datus, ar kuru palīdzību var sākt analizējamo vielu atdalīšanas optimizāciju.

Izdalīšanas laika prognozēšana veikta, izmantojot iepriekš iegūtos izdalīšanas datus 60 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B) un 30 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B), kā arī analītu ķīmiskās struktūrformulas un kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumus. Prognozēšana veikta 45 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B). Darba shēma sorbcijas parametru prognozēšanai ir atspoguļota 3.26. attēlā.

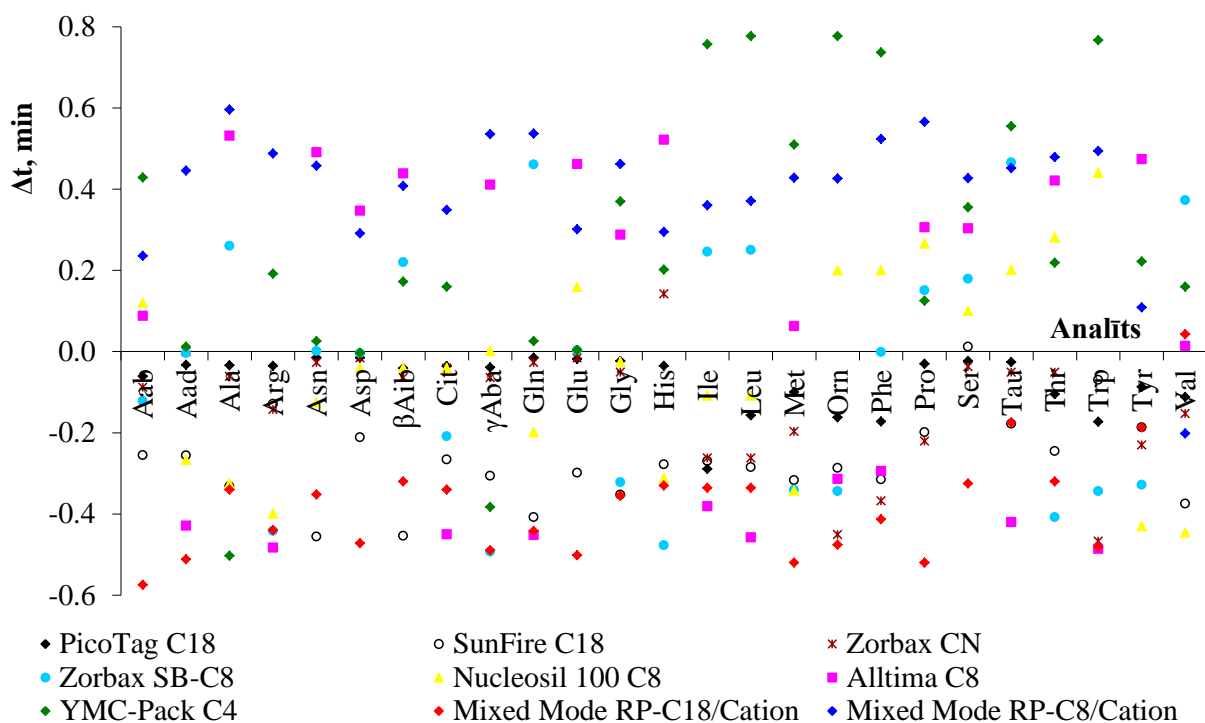


3.26.att. Darba shēma sorbcijas parametru prognozēšanai, izmantojot analītu ķīmiskās struktūrformulas, kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumus un divus eksperimentāli iegūtos rezultātus.

Prognozēšanas rezultāti salīdzināti ar eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, iegūtie dati ir atspoguļoti 3.27. attēlā, izmantojot acetonitrilu kā organisko šķīdinātāju un 3.28. attēlā, izmantojot metanolu kā organisko šķīdinātāju.



3.27. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), organiskais modificētājs – acetonitrils, prognozēšanai izmantojot 30 min un 60 min lineāros gradientus.



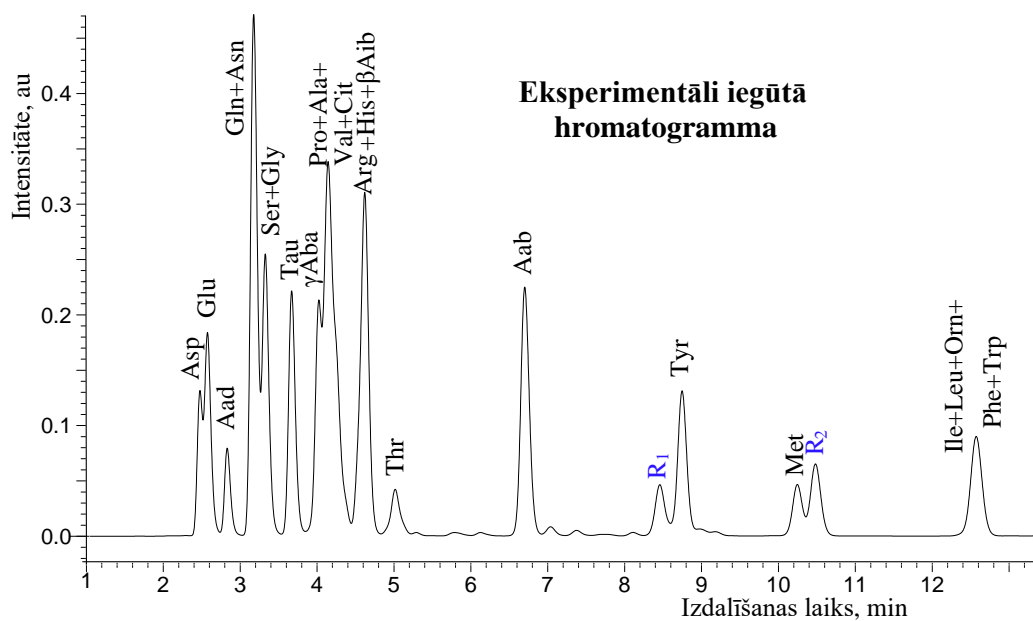
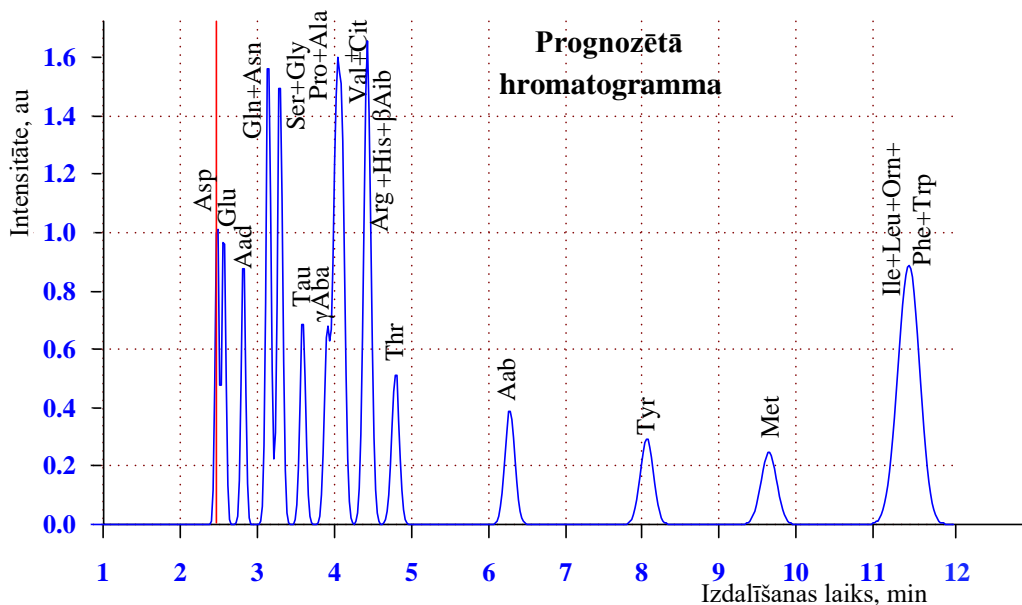
3.28. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), organiskais modificētājs – metanols, prognozēšanai izmantojot 30 min un 60 min lineāros gradientus.

No iegūtajiem datiem (3.27. un 3.28. att.) redzams, ka kļūda starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem nepārsniedz 0,6 minūtes (ACN) un 0,8 minūtes (MeOH). Korelācija nav zemāka par 0,9922 (*Mixed Mode RP-C18/Cation* kolonna, organiskais modificētājs - ACN). Iegūtie korelācijas koeficienti ir atspoguļoti 3.5. tabulā.

**Korelācijas koeficienti starp prognozētajiem un eksperimentāli noteiktajiem rezultātiem, prognozēšanu veicot, pamatojoties uz divu eksperimentu datu rezultātiem, analītu struktūrformulām un kustīgās un nekustīgās fāzes raksturlielumiem.**

Sorbents	Korelācijas koeficients ( $R^2$ )	
	ACN	MeOH
Pico Tag C18	0,99990	0,99999
SunFire C18	0,9992	0,99999
Zorbax CN	0,9991	0,9996
Zorbax SB-C8	0,996	0,9999
Nucleosil 100 C8	0,994	0,9986
Alltima C8	0,997	0,998
YMC-Pack C4	0,9992	0,997
Mixed Mode RP-C18/Cation	0,992	0,9997
Mixed Mode RP-C8/Cation	0,994	0,9991

Solvātu sorbcijas modelis ir piemērots izdalīšanas laika prognozēšanai. Viens piemērs - prognozētās un eksperimentāli iegūtās hromatogrammas 45 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), *YMC-Pack C4* kolonnai, organiskais modificētājs – metanols, ir atspoguļots 3.29. attēlā. Analizējamo savienojumu prognozētā izdalīšanas secība, izdalīšanas laiki un izšķiršana ir tuvas eksperimentāli iegūtajiem datiem.

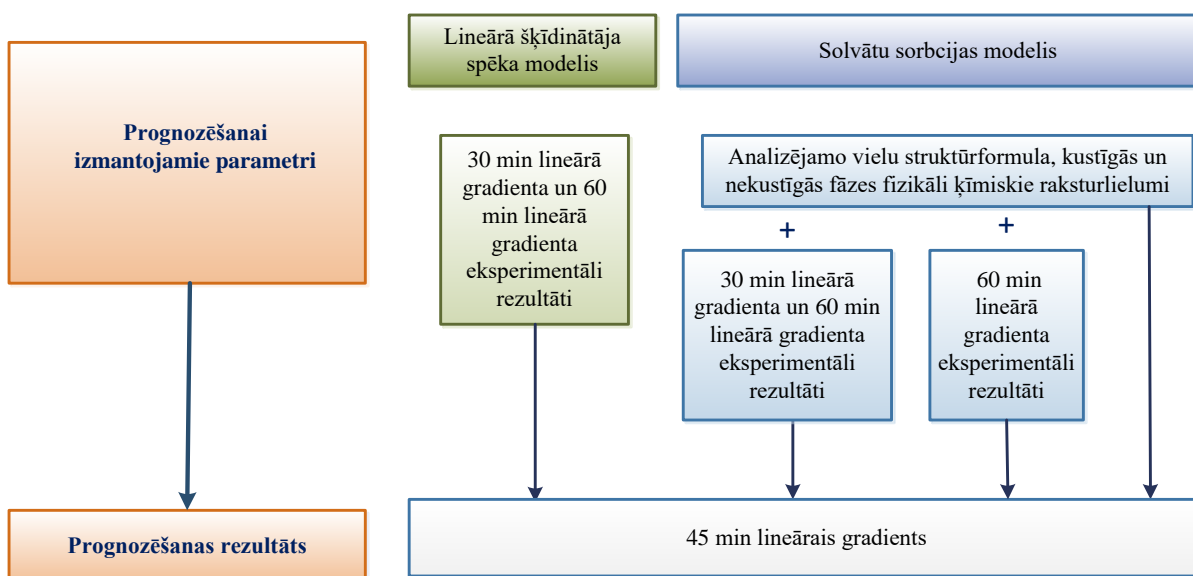


3.29. att. Eksperimentāli iegūtās un prognozētās hromatogrammas salīdzinājums 45 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), YMC-Pack C4 kolonnai, organiskais modificētājs – metanols. R<sub>1</sub> un R<sub>2</sub> derivatizācijas reakcijas rezultātā liekie reaģenta piemaisījumi.

Eksperimentu rezultātā iegūtie dati ļauj secināt, ka solvātu sorbcijas modeļa „otrajā tuvinājumā” metodes pieeja ir efektīva analizējamo savienojumu izdalīšanas laika optimizācijai. Turpmākos pētījumos iegūtos datus var izmantot analizējamo savienojumu atdalīšanas optimizācijai.

### 3.4. Solvātu sorbcijas modeļa un lineārā šķīdinātāja spēka modeļa sorbcijas parametru salīdzināšana.

Solvātu sorbcijas modeļa prognozētie rezultāti salīdzināti ar komerciāli plaši izmantoto lineāro šķīdinātāja spēka modeli. Tā princips ir balstīts uz divu vai vairāku eksperimentu izdalīšanas laikiem ar nosacījumu, ka eksperimentāli iegūtie rezultāti ir veiksmīgi. Detalizēti lineārais šķīdinātāja spēka modelis aprakstīts 1.3. promocijas darba nodaļā un ir balstīts uz 1.15. matemātisko vienādojumu. Prognozēšanas rezultāti iegūti ar lineāro šķīdinātāja spēka un solvātu sorbcijas modeļiem, kā arī eksperimentālajiem rezultātiem. Visi iegūtie dati salīdzināti savā starpā. Darba shēma sorbcijas parametru prognozēšanai ir atspoguļota 3.30. attēlā.



3.30.att. Darba shēma sorbcijas parametru prognozēšanai, izmantojot lineāro šķīdinātāja spēka modeli un solvātu sorbcijas modeli.

Prognozēšana veikta 45 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B). Iegūto rezultātu piemēri vienai *YMC-Pack C4* kolonnai ir atspoguļoti tabulās 3.6. - ar acetonitrilu un 3.7. - ar metanolu. Visu pētījumā izmantoto sorbentu vidējo noviržu absolūto vērtību salīdzinājums starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem ir atspoguļots 3.31. attēlā (ACN organiskais modificētājs) un 3.32. attēlā (MeOH organiskais modificētājs). Apkopojot rezultātus, visiem mērījumiem aprēķināts drošības intervāls, kas veidots, ievērojot iegūto rezultātu (noviržu) vidējo aritmētisko lielumu. Drošības intervālu aprēķina pēc (3.2.) formulas:

$$\bar{t} \pm \frac{t_{p,n} \times Sn}{\sqrt{n}} \quad (3.2.)$$

kur:

$\bar{t}$  – iegūtais rezultāts, min;

$n$  – mērījumu skaits;

$t_{p,n}$  – Stjudenta koeficients ( $p=0,95$ ,  $n=5$ );

$Sn$  – standartnovirze;

Veicot eksperimentāli iegūto un ar dažādām pieejām prognozēto rezultātu salīdzinājumu, var secināt, ka iegūtie rezultāti, izmantojot lineāro šķīdinātāja spēka modeli, ir labāki. Rezultātu (noviržu) vidējais aritmētiskais lielums norāda, ka precīzāka prognozēšana ir veikta, pamatojoties uz diviem eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, (skat. 3.6. un 3.7. tabulas). Labi prognozēšanas rezultāti ir iegūti, veicot prognozēšanu, pamatojoties uz analizējamo vielu struktūrformulām un diviem eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem. Šie rezultāti ir ļoti līdzīgi, veicot prognozēšanu, pamatojoties uz analizējamo vielu struktūrformulām un tikai vienu eksperimentāli iegūto rezultātu. Kā bija sagaidāms prognozēšana, pamatojoties tikai uz analizējamo vielu struktūrformulām, nav tik optimāli. Prognozētā vielu izdalīšanas secība daļēji neatbilst eksperimentāli iegūtajai vielu izdalīšanas secībai, toties šis prognozēšanas veids ir ļoti lietderīgs visu analizējamo vielu kopējā izdalīšanas laika prognozēšanai.

**Eksperimentāli iegūto un prognozēto izdalīšanas laiku salīdzinājums 45 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B) YMC-Pack C4 kolonnai, izmantojot acetoniitrilu**

Nr.p.k	Analīts	YMC-Pack C4								
		t eksp., min	t <sup>a</sup> prognoz., min	Δt <sup>a</sup> , min	t <sup>b</sup> prognoz., min	Δt <sup>b</sup> , min	t <sup>c</sup> prognoz., min	Δt <sup>c</sup> , min	t <sup>d</sup> prognoz., min	Δt <sup>d</sup> , min
1.	Aab	5,03	5,02	-0,01	5,48	0,45	4,83	-0,20	5,62	0,59
2.	Aad	2,55	2,55	0,00	2,55	0,00	2,55	0,00	2,95	0,40
3.	Ala	2,92	2,91	-0,01	2,94	0,02	2,90	-0,02	3,35	0,43
4.	Arg	3,74	3,75	0,01	3,96	0,22	3,65	-0,09	4,08	0,34
5.	Asn	2,92	2,91	-0,01	2,95	0,03	2,90	-0,02	3,30	0,38
6.	Asp	2,37	2,37	0,00	2,36	-0,01	2,37	0,00	2,85	0,49
7.	βAib	3,74	3,75	0,01	3,93	0,19	3,67	-0,07	4,15	0,41
8.	Cit	3,52	3,53	0,01	3,67	0,15	3,46	-0,06	3,86	0,34
9.	γAba	2,92	2,91	-0,01	2,94	0,02	2,90	-0,02	3,30	0,38
10.	Gln	2,92	2,92	0,00	2,95	0,03	2,90	-0,02	3,26	0,34
11.	Glu	2,43	2,43	0,00	2,43	0,00	2,43	0,00	2,89	0,46
12.	Gly	3,05	3,05	0,00	3,08	0,03	3,03	-0,02	3,52	0,47
13.	His	3,74	3,75	0,01	3,96	0,22	3,65	-0,09	4,07	0,33
14.	Ile	10,09	10,11	0,02	10,51	0,42	9,51	-0,58	11,23	1,14
15.	Leu	9,86	9,88	0,02	10,24	0,38	9,30	-0,56	10,96	1,10
16.	Met	7,08	7,09	0,01	7,59	0,51	6,67	-0,41	7,96	0,88
17.	Orn	11,83	11,87	0,04	12,27	0,44	11,12	-0,71	13,01	1,18
18.	Phe	12,06	12,00	-0,06	12,57	0,51	11,23	-0,83	13,33	1,27
19.	Pro	3,52	3,53	0,01	3,66	0,14	3,47	-0,05	3,89	0,37
20.	Ser	3,05	3,05	0,00	3,09	0,04	3,03	-0,02	3,48	0,43
21.	Tau	3,35	3,36	0,01	3,45	0,10	3,31	-0,04	3,72	0,37
22.	Thr	3,94	3,94	0,00	4,17	0,23	3,85	-0,09	4,37	0,43
23.	Trp	11,83	11,87	0,04	12,19	0,36	11,17	-0,66	12,99	1,16
24.	Tyr	6,30	6,30	0,00	6,51	0,21	5,91	-0,39	7,01	0,71
25.	Val	3,52	3,53	0,01	3,67	0,15	3,46	-0,06	3,86	0,34
Vidēja novirze				0,01		0,20		0,20		0,59

<sup>a</sup> Prognozēšana veikta, pamatojoties uz divu eksperimentāli iegūto rezultātu datiem (30 un 60 min lineārais gradients), lineārais šķīdinātāja spēka modelis

<sup>b</sup> Prognozēšana veikta, pamatojoties uz struktūrformulu un divu eksperimentāli iegūto rezultātu datiem (30 un 60 min lineārais gradients), solvātu sorbcijas modeļa "otrā tuvinājuma" metode

<sup>c</sup> Prognozēšana veikta, pamatojoties uz struktūrformulu un vienu eksperimentāli iegūto rezultātu (60 min lineārais gradients), solvātu sorbcijas modeļa "pirmā tuvinājuma" metode

<sup>d</sup> Prognozēšana veikta, pamatojoties uz analizējamās vielas struktūru, solvātu sorbcijas modeļa "nulle tuvinājuma" metode

**Eksperimentāli iegūto un prognozēto izdalīšanas laiku salīdzinājums 45 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B) YMC-Pack C4 kolonnai, izmantojot metanolu**

Nr.p.k	Analīts	YMC-Pack C4								
		t eksp., min	t <sup>a</sup> prognoz., min	Δt <sup>a</sup> , min	t <sup>b</sup> prognoz., min	Δt <sup>b</sup> , min	t <sup>c</sup> prognoz., min	Δt <sup>c</sup> , min	t <sup>d</sup> prognoz., min	Δt <sup>d</sup> , min
1.	Aab	6,71	6,71	0,00	6,28	-0,43	6,28	-0,43	5,45	-1,26
2.	Aad	2,83	2,83	0,00	2,82	-0,01	2,82	-0,01	2,46	-0,37
3.	Ala	3,33	4,14	0,81	3,83	0,50	3,30	-0,03	3,47	0,14
4.	Arg	4,62	4,62	0,00	4,43	-0,19	4,42	-0,20	3,70	-0,92
5.	Asn	3,18	3,19	0,01	3,15	-0,03	3,15	-0,03	2,73	-0,45
6.	Asp	2,48	2,47	-0,01	2,48	0,00	2,48	0,00	2,27	-0,21
7.	βAib	4,62	4,62	0,00	4,45	-0,17	4,45	-0,17	3,79	-0,83
8.	Cit	4,26	4,25	-0,01	4,10	-0,16	4,10	-0,16	3,45	-0,81
9.	γAba	3,33	4,02	0,69	3,71	0,38	3,29	-0,04	3,33	0,00
10.	Gln	3,18	3,19	0,01	3,15	-0,03	3,15	-0,03	2,69	-0,49
11.	Glu	2,57	2,57	0,00	2,57	0,00	2,57	0,00	2,31	-0,26
12.	Gly	3,67	3,34	-0,33	3,30	-0,37	3,60	-0,07	2,93	-0,74
13.	His	4,62	4,62	0,00	4,42	-0,20	4,42	-0,20	3,69	-0,93
14.	Ile	12,60	12,61	0,01	11,84	-0,76	11,52	-1,08	10,54	-2,06
15.	Leu	12,60	12,61	0,01	11,82	-0,78	11,36	-1,24	10,54	-2,06
16.	Met	10,50	10,51	0,01	9,99	-0,51	9,64	-0,86	8,68	-1,82
17.	Orn	12,60	12,61	0,01	11,82	-0,78	11,52	-1,08	10,36	-2,24
18.	Phe	12,60	12,61	0,01	11,86	-0,74	11,47	-1,13	10,48	-2,12
19.	Pro	4,15	4,14	0,00	4,02	-0,13	4,01	-0,14	3,41	-0,73
20.	Ser	4,03	3,34	-0,69	3,67	-0,36	3,91	-0,12	2,88	-1,15
21.	Tau	4,15	3,68	-0,46	3,59	-0,56	4,03	-0,11	3,07	-1,08
22.	Thr	5,02	5,02	0,00	4,80	-0,22	4,80	-0,22	4,09	-0,93
23.	Trp	12,60	12,61	0,01	11,83	-0,77	11,41	-1,19	10,42	-2,18
24.	Tyr	8,76	8,76	0,00	8,54	-0,22	8,06	-0,70	7,10	-1,66
25.	Val	4,26	4,25	-0,01	4,10	-0,16	4,10	-0,16	3,45	-0,81
Vidēja novirze				0,12	0,34		0,38		1,05	

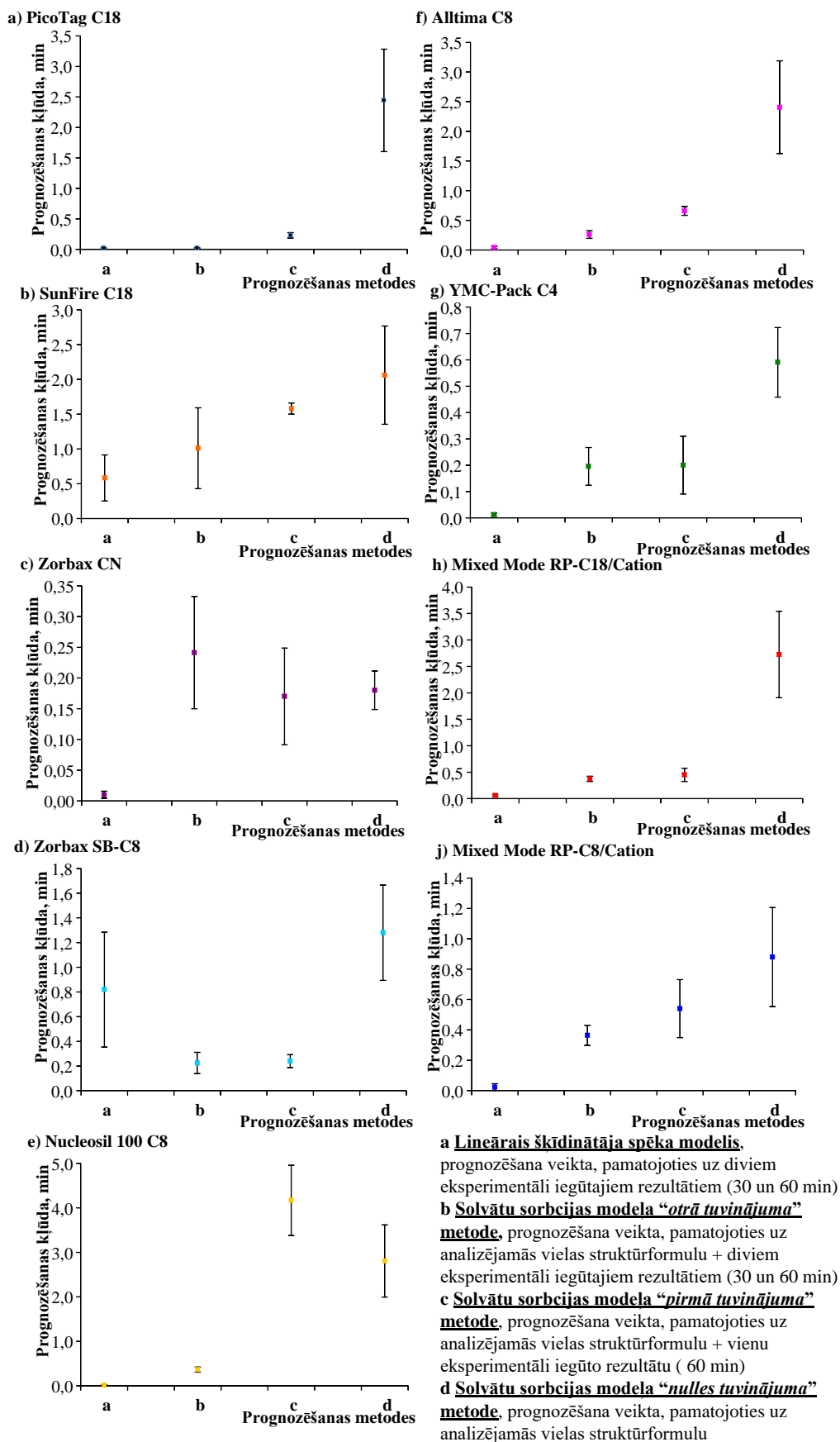
<sup>a</sup> Prognozēšana veikta, pamatojoties uz divu eksperimentāli iegūto rezultātu datiem (30 un 60 min lineārais gradients), lineārais šķīdinātāja spēka modelis

<sup>b</sup> Prognozēšana veikta, pamatojoties uz struktūrformulu un divu eksperimentāli iegūto rezultātu datiem (30 un 60 min lineārais gradients), solvātu sorbcijas modeļa "otrā tuvinājuma" metode

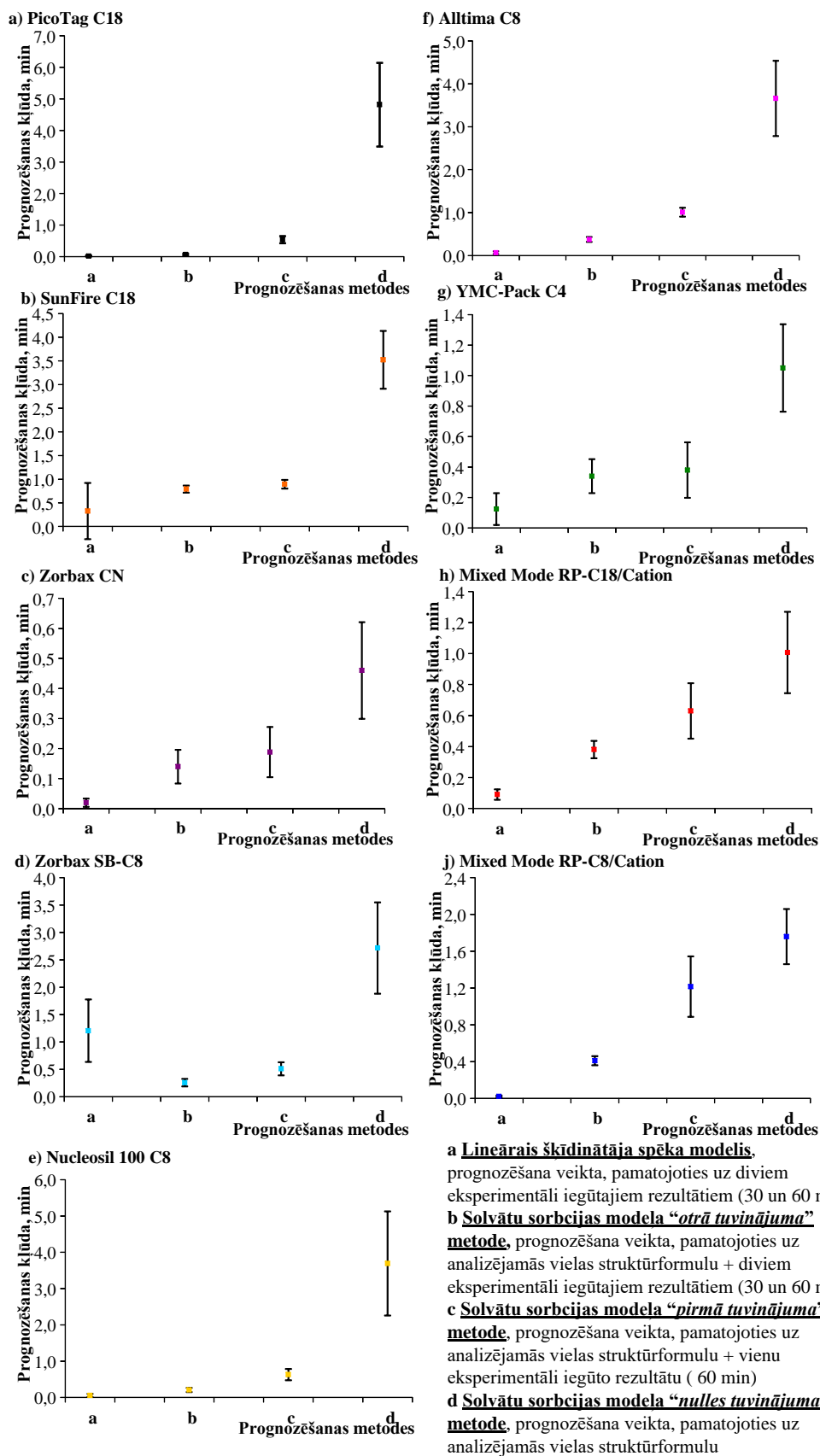
<sup>c</sup> Prognozēšana veikta, pamatojoties uz struktūrformulu un vienu eksperimentāli iegūto rezultātu (60 min lineārais gradients), solvātu sorbcijas modeļa "pirmā tuvinājuma" metode

<sup>d</sup> Prognozēšana veikta, pamatojoties uz analizējamās vielas struktūru, solvātu sorbcijas modeļa "nulles tuvinājuma" metode

Salīdzinot iegūtos rezultātus, izmantojot acetonitrilu un metanolu kā organiskos modificētājus, var redzēt, ka rezultātu vidējās aritmētiskās vērtības ir mazākas, izmantojot acetonitrilu, kas ir atspoguļots 3.31. un 3.32. attēlos. Pamatojoties uz apgrieztās fāzes AEŠH izmantojamo organisko vielu klasifikāciju, metanolam un acetonitrilam ir līdzīgs izdalīšanas stiprums [110]. Saskaņā ar literatūras datiem, polaritātes vērtības ir  $P'_{\text{MeOH}}=5,1$  un  $P'_{\text{ACN}}=5,8$ , dielektriskās konstantes vērtības ir  $\epsilon_{\text{MeOH}}=32,7$  un  $\epsilon_{\text{ACN}}=37,5$ . Neskatoties uz to, ka metanols un acetonitrils pieder pie dažādām selektivitātes grupām, to parciālās polaritātes vērtības, iegūtas, reizinot to ar protonu akceptoru enerģiju, ir  $P'_{x_{\text{eMeOH}}}=2,448$  un  $P'_{x_{\text{eACN}}}=1,798$ , parciālās polaritātes vērtības, iegūtas, reizinot to ar protonu donoru enerģiju, ir  $P'_{x_{\text{dMeOH}}}=1,122$  un  $P'_{x_{\text{dACN}}}=1,566$  un parciālās polaritātes vērtības, iegūtas, reizinot to ar dipola-dipola mijiedarbības enerģiju, ir  $P'_{x_{\text{mMeOH}}}=1,581$  and  $P'_{x_{\text{mACN}}}=2,436$  [117-118, 120-121]. Ņemot vērā šos datus, var apgalvot, ka iedarbība ar metanolu ir izskaidrojama ar protonu akceptoru mijiedarbību, savukārt, acetonitrilam atbilst dipola-dipola mijiedarbība. Neskatoties uz dažādiem organisko modificētāju iedarbības veidiem uz analizējamajiem savienojumiem, prognozēšanas rezultāti ir apmierinoši abos gadījumos.



3.31. att. Prognozēto vērtību vidējo noviržu salīdzinājums dažādām prognozēšanas metodēm, organiskais modificētājs - acetonitrils.



3.32. att. Prognozēto vērtību vidējo noviržu salīdzinājums dažādām prognozēšanas metodēm, organiskais modificētājs - metanols.

Neskatoties uz acīmredzami labākiem rezultātiem, prognozēšanai izmantojot lineāro šķīdinātāja spēka modeli, nedrīkst aizmirst, ka optimizācijas veikšanai modelim ir nepieciešami divu eksperimentu rezultāti ar nosacījumu, ka iegūtajiem rezultātiem ir jābūt ar labu analizējamo vielu joslu izšķiršanu. Mūsu gadījumā prognozēšana veikta, izmantojot divus lineāros gradientus, kur pirmā gradienta laiks (30 min) bija mazāks nekā prognozētais gradienta laiks (45 min) un otrā gradienta laiks bija lielāks (60 min), kas ir ļoti labvēlīgi apstākļi lineārajam šķīdinātāja spēka modelim. AEŠH kolonnai *Zorbax SB-C8* prognozēšanas rezultāti, izmantojot lineāro šķīdinātāja spēka modeli, ir sliktāki, nekā rezultāti, kuri iegūti ar solvātu sorbcijas modeli un vienu vai divu eksperimentālo rezultātu datiem gan ar acetoniitrilu, gan ar metanolu kā organisko modificētāju.

Korelācija starp prognozētajiem un eksperimentālajiem rezultātiem ir apskatāma 3.8. tabulā.

3.8. tabula

**Prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu korelācija 45 min lineārajam gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B). Prognozēšana balstās uz a) divu eksperimentālo rezultātu datiem, b) struktūrformulu un divu eksperimentālo datu rezultātiem, c) struktūrformulu un vienu eksperimentāli iegūto rezultātu, d) analizējamās vielas struktūrformulu**

Sorbents	Korelācijas koeficients ( $R^2$ )							
	ACN				MeOH			
	a	b	c	d	a	b	c	d
Pico Tag C18	0,99998	0,9998	0,99998	0,64	0,99998	0,99998	0,9997	0,7
SunFire C18	0,97	0,9992	0,9991	0,96	0,98	0,9998	0,9997	0,99998
Zorbax CN	0,99998	0,9991	0,99998	0,9992	0,99998	0,9996	0,99998	0,9995
Zorbax SB-C8	0,91	0,996	0,9998	0,91	0,95	0,99998	0,9992	0,89
Nucleosil 100 C8	0,99998	0,994	0,99998	0,65	0,99998	0,9986	0,9993	0,4
Alltima C8	0,99998	0,997	0,9992	0,74	0,99998	0,9998	0,9995	0,8
YMC-Pack C4	0,99998	0,9992	0,99998	0,99998	0,994	0,997	0,99998	0,994
Mixed Mode RP-C18/Cation	0,9997	0,992	0,9990	0,62	0,99998	0,9997	0,9996	0,998
Mixed Mode RP-C8/Cation	0,9997	0,994	0,9992	0,998	0,999989	0,9991	0,998	0,9989

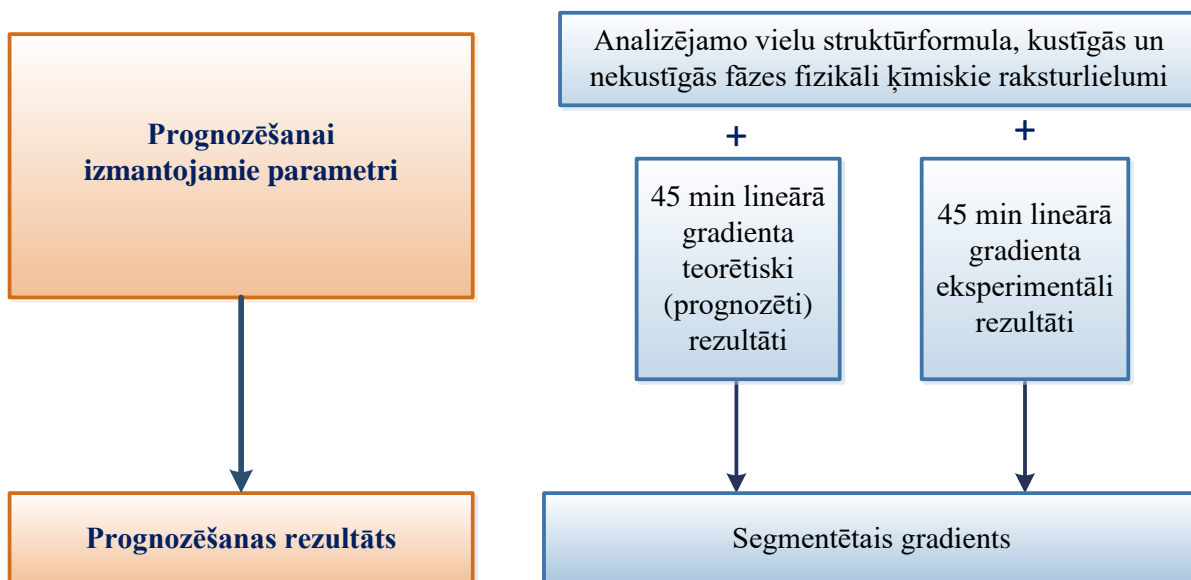
Solvātu sorbcijas modeļa iegūtie rezultāti, veicot prognozēšanu, izmantojot analizējamās vielas struktūrformulu un viena vai divu eksperimentu datus, ir salīdzināmi ar plaši zinātniskajā literatūrā aprakstītu lineāro šķīdinātāja spēka modeli. Prognozēšana, kas balstīta tikai uz analizējamo vielu ķīmisko struktūrformulu, nav tik precīza, toties iegūtos rezultātus var izmantot aptuvenai analīzes laika un nepieciešamā organiskā modificētāja daudzuma aprēķināšanai.

### **3.5. Aminokābju fenilzotiocianātu maisījuma atdalīšanas optimizācija segmentētā gradienta apstākļos.**

Segmentētā gradienta darba režīmā organiskā modificētāja koncentrācija mainās nevienmērīgi, kas ļauj panākt visu savienojumu atdalīšanu. Tā tiek plaši pielietota AEŠH, jo dod iespēju samazināt vielu izdalīšanas laikus un uzlabot analītu izšķiršanu. Segmentētā gradienta metode dod iespēju sadalīt vielas ar plašu polaritātes diapazonu un izdalīšanas īpašībām vienā hromatogrammā. Tā ir lielāka metodes priekšrocība salīdzinājumā ar izdalīšanas izokrātiskās un lineārā gradienta metodēm.

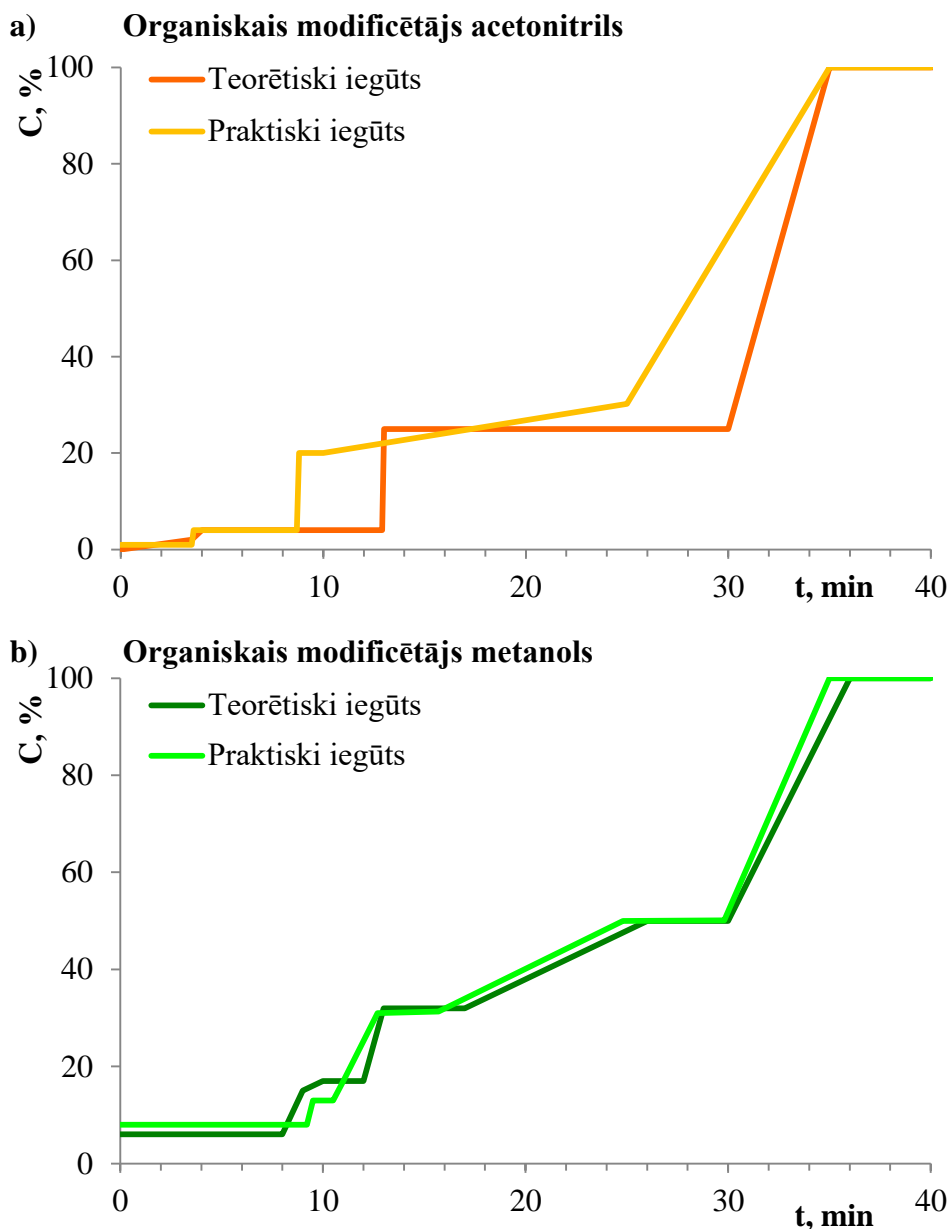
Labi zināms fakts, ka segmentētā gradienta izstrāde un optimizācija ir laikietilpīgs un darbietilpīgs process, kas prasa lielu eksperimentu skaitu. Toties tā ir nozīmīga hromatogrāfijas speciālistiem, kuru uzdevums ir sadalīt visas maisījumā esošās vielas iespējami mazākā laika periodā. Solvātu sorbcijas modelis dod iespēju veikt segmentētā gradienta izstrādi un optimizāciju, kas var būtiski samazināt metodes izstrādes laiku un līdz ar to arī izmaksas.

Izmantojot solvātu sorbcijas modeli, veiktas divas segmentētā gradienta izstrādes un optimizācijas pieejas, kuras ir salīdzinātas savā starpā. Darbā izmantotā shēma ir redzama 3.33. attēlā.



**3.33.att. Darba shēma segmentētā gradienta izstrādei aminoskābju fenilizotiocianātu maisījuma atdalīšanai.**

Pirmajā gadījumā segmentētā gradienta izstrādei izmantoto analizējamo vielu struktūra un analizējamo vielu izdalīšanas parametri, kuri iegūti prognozēšanas ceļā 45 min (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B) lineārajam gradientam ar „*nulles tuvinājuma*” metodi, kas ir aprakstīta darba 3.1. nodaļā. Šī pieeja dod iespēju veikt segmentētā gradienta izstrādi, neveicot nevienu eksperimentu – teorētiski iegūts. Otrajā gadījumā segmentētā gradienta izstrādei izmantojam analizējamo vielu struktūru un eksperimentāli iegūtos analizējamo vielu izdalīšanas parametrus 45 min (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B) lineārajam gradientam – praktiski iegūts. Kā viens no piemēriem 3.34. attēlā ir atspoguļots segmentētais gradients, iegūts *Pico Tag C18* kolonnai. Teorētiski iegūts ir gradients, kurš iegūts no teorētiskajiem datiem, neveicot nevienu praktisko eksperimentu un praktiski iegūts ir gradients, kurš iegūts, pamatojoties uz praktiskajiem datiem.



3.34. att. Segmentētie gradienti, iegūti *Pico Tag C18* kolonnai optimizācijas procesā abiem organiskajiem modificētājiem.

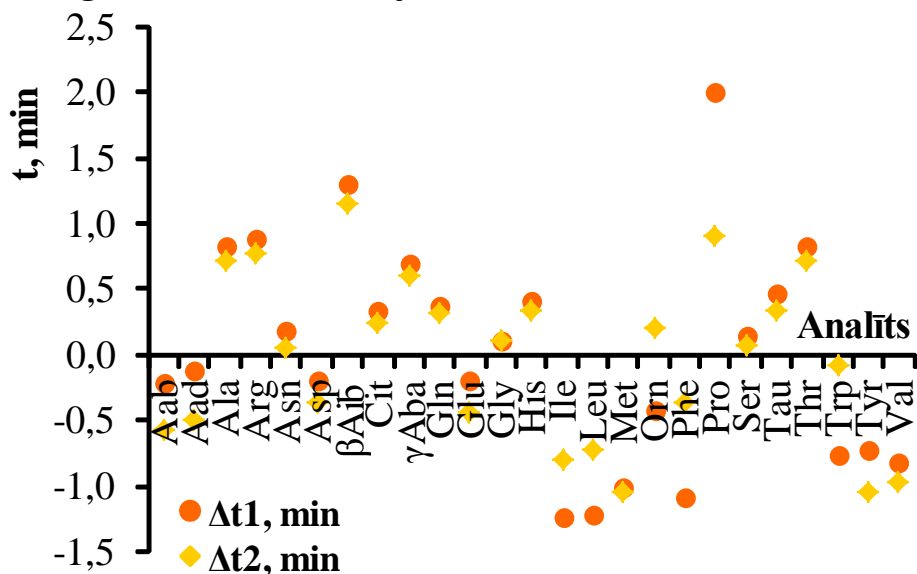
Salīdzinot segmentētos gradientus, iegūtus teorētiskā un praktiskā ceļā, to formu un ilgumu, var apgalvot ka *Pico Tag C18* nekustīgajai fāzei gradienti ir līdzīgi. To kopējais vielu izdalīšanas laiks (gradienta ilgums) ir vienāds, gradientu slīpums un formas arī ir tuvas.

Optimizācijas rezultātā iegūtie segmentētie gradienti katrai kolonnai atsevišķi ar abiem organiskajiem modificētājiem ir atspoguļoti 4. pielikumā. Būtiski gradienta kopējais ilgums starp teorētiski iegūto un praktiski iegūto atšķiras *SunFire C18*, *YMC-Pack C4* un *Mixed Mode RP-C8/Cation* kolonnām, izmantojot acetoniitrilu, kur praktiski iegūtā gradienta ilgums ir gandrīz divas reizes mazāks nekā teorētiski iegūtā gradienta ilgums. *Zorbax SB-C8*

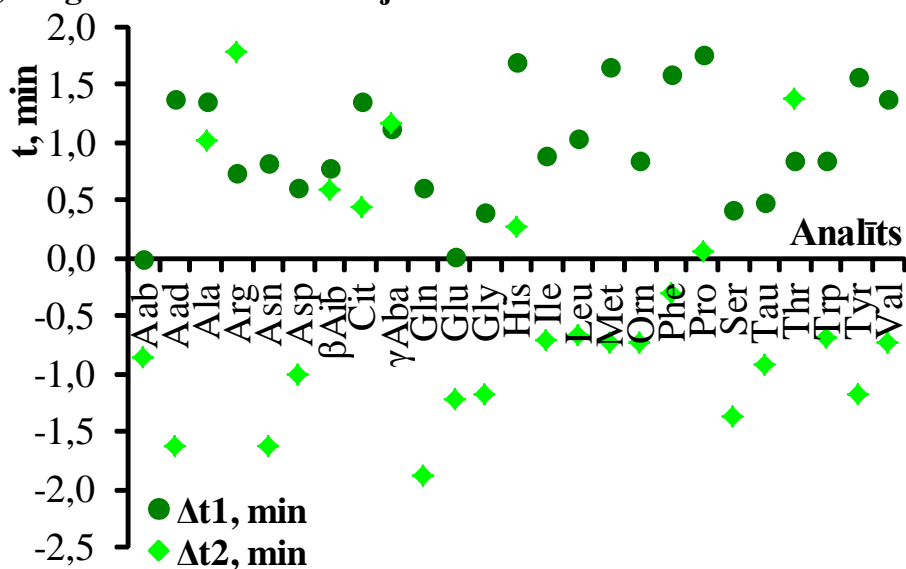
kolonnai, izmantojot metanolu, praktiski iegūtais gradients arī ir gandrīz divreiz īsāks. Var secināt, ka teorētiski iegūto segmentēto gradientu laiki, iegūti, balstoties uz analizējamo vielu struktūrām un analizējamo vielu izdalīšanas parametriem, iegūtiem prognozēšanas ceļā 45 min (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), kopumā ir ilgāki par gradientu laikiem, iegūtiem, balstoties uz eksperimentāli iegūto rezultātu vērtībām.

Veicot segmentētā gradienta optimizāciju, iegūti aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu simulēti izdalīšanas laiki. Šie rezultāti salīdzināti ar eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, izmantojot dotos segmentētos gradientus. Izdalīšanas laika vērtību starpības starp prognozētajiem izdalīšanas parametriem, izmantojot solvātu sorbcijas modeli un eksperimentāli iegūtajiem izdalīšanas parametriem gan teorētiski iegūtajam gradientam, gan praktiski iegūtajam gradientam, ir atspoguļotas 3.35. attēlā *Pico Tag C18* nekustīgajai fāzei.

a) Organiskais modificētājs acetonitrils



b) Organiskais modificētājs metanols



3.35. att. Izdalīšanas laiku starpība teorētiskajiem ( $\Delta t_1$ ) un praktiski iegūtajiem ( $\Delta t_2$ ) datiem segmentētajam gradientam *Pico Tag C18* nekustīgajai fāzei.

Iegūtā izdalīšanas laika starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem datiem diviem dažādiem segmentētā gradienta režīmiem *Pico Tag C18* kolonnai liecina, ka izdalīšanas laiki ir tuvi. Starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem nepārsniedz 2,01 minūtes, izmantojot acetonitrilu un 1,88 minūtes, izmantojot metanolu. Starpība starp rezultātiem, iegūtiem, izmantojot teorētiski iegūto gradienta režīmu un praktiski iegūto gradienta režīmu, ir 1,10 minūtes (Pro), izmantojot acetonitrilu un 3,02 minūtes (Tyr), izmantojot metanolu. Lielāka starpība starp rezultātiem, iegūtiem, izmantojot

teorētiski iegūto gradienta režīmu un praktiski iegūto gradienta režīmu, ir 7,84 minūtes (Orn) *YMC-Pack C4* kolonnai, izmantojot acetonitrilu. Šādu rezultātu atšķirību var izskaidrot ar praktiskā un teorētiskā gradienta laikiem, kuru ilgums atšķiras divas reizes. Izmantojot metanolu, tā ir 17,57 minūtes (Cit) *Nucleosil 100 C8* kolonnai. Mazāka starpība starp rezultātiem, iegūtiem, izmantojot teorētiski iegūto gradienta režīmu un praktiski iegūto gradienta režīmu, ir *Zorbax CN* kolonnai. Izmantojot acetonitrilu, tā ir 0,46 minūtes (His) un, izmantojot metanolu, tā ir 0,66 minūtes (Trp).

Analizējot iegūtos rezultātus, var apgalvot, ka precīzāka analizējamo vielu izdalīšanas parametru noteikšana ir iespējama, veicot segmentētā gradienta optimizāciju, pamatojoties uz analizējamo vielu struktūrformulu un eksperimentāli iegūtajiem izdalīšanas parametru datiem. Šī sakarība ir acīmredzama abiem organiskajiem modificētājiem. Tomēr nevar noliegt, ka iegūtie izdalīšanas parametri, izmantojot segmentēto gradientu, optimizētu tikai pēc struktūrformulas un prognozēšanas rezultātā iegūtajiem analizējamo savienojumu izdalīšanas parametriem, respektīvi neveicot nevienu eksperimentu, ir salīdzināmi ar iegūtajiem rezultātiem, izmantojot eksperimentālos datus.

Solvātu sorbcijas modeļa segmentētā gradienta optimizācijas un analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanas iespējas var raksturot ar korelācijas koeficientiem starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem. Aprēķinātie korelācijas koeficienti ir atspoguļoti 3.9. tabulā.

Korelācijas pārbaudei izmantoti eksperimentāli iegūtie dati un dati, kuri iegūti prognozēšanas rezultātā: 1) prognozēšanai izmantojot analizējamās vielas struktūrformulu un prognozēšanas rezultātā iegūtos izdalīšanas parametrus 45 min lineārajam gradientam; 2) prognozēšanai izmantojot analizējamās vielas struktūrformulas un eksperimentāli iegūtos izdalīšanas parametrus 45 min lineārajam gradientam. Korelācijas koeficienti ir apskatāmi 3.9. tabulā.

**Korelācijas koeficienti starp prognozētajiem un eksperimentāli noteiktajiem rezultātiem  
segmentētajam gradientiem**

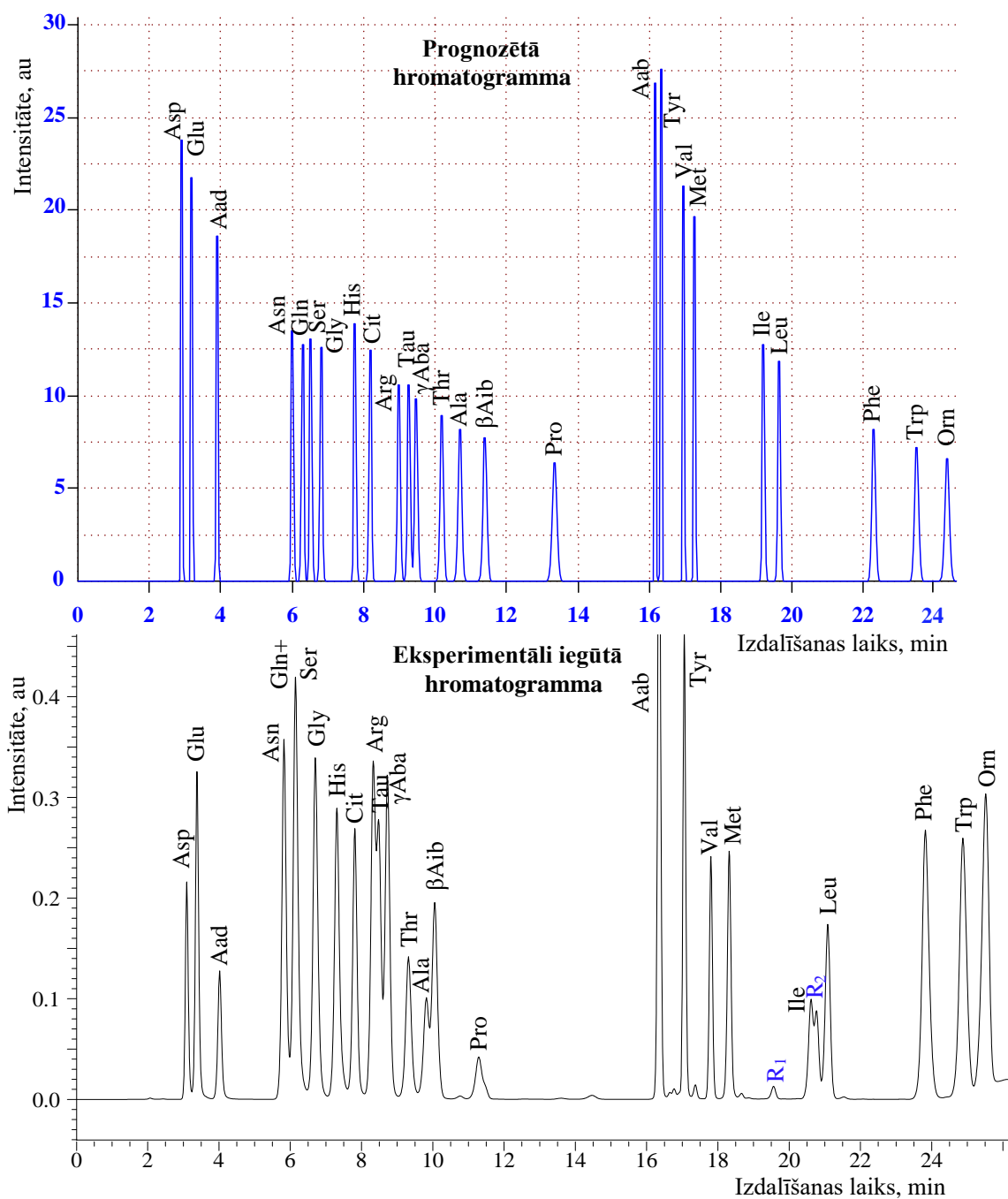
Sorbents	<sup>1</sup> Korelācijas koeficients (R <sup>2</sup> )		<sup>2</sup> Korelācijas koeficients (R <sup>2</sup> )	
	ACN	MeOH	ACN	MeOH
Pico Tag C18	0,990	0,998	0,990	0,991
SunFire C18	0,97	0,997	0,995	0,998
Zorbax CN	0,998	0,9993	0,996	0,994
Zorbax SB-C8	0,95	0,997	0,995	0,998
Nucleosil 100 C8	0,995	0,87	0,9990	0,9987
Alltima C8	0,997	0,997	0,992	0,997
YMC-Pack C4	0,95	0,93	0,996	0,9990
Mixed Mode RP-C18/Cation	0,95	0,993	0,988	0,993
Mixed Mode RP-C8/Cation	0,9989	0,997	0,997	0,9997

<sup>1</sup> Aprēķināts korelācijas koeficients prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, prognozēšanai izmantojot analizējamās vielas struktūrformulu un prognozēšanas rezultātā iegūtos izdalīšanas parametrus 45 min lineārajam gradientam

<sup>2</sup> Aprēķināts korelācijas koeficients prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, prognozēšanai izmantojot analizējamās vielas struktūrformulu un eksperimentāli iegūtos izdalīšanas parametrus 45 min lineārajam gradientam

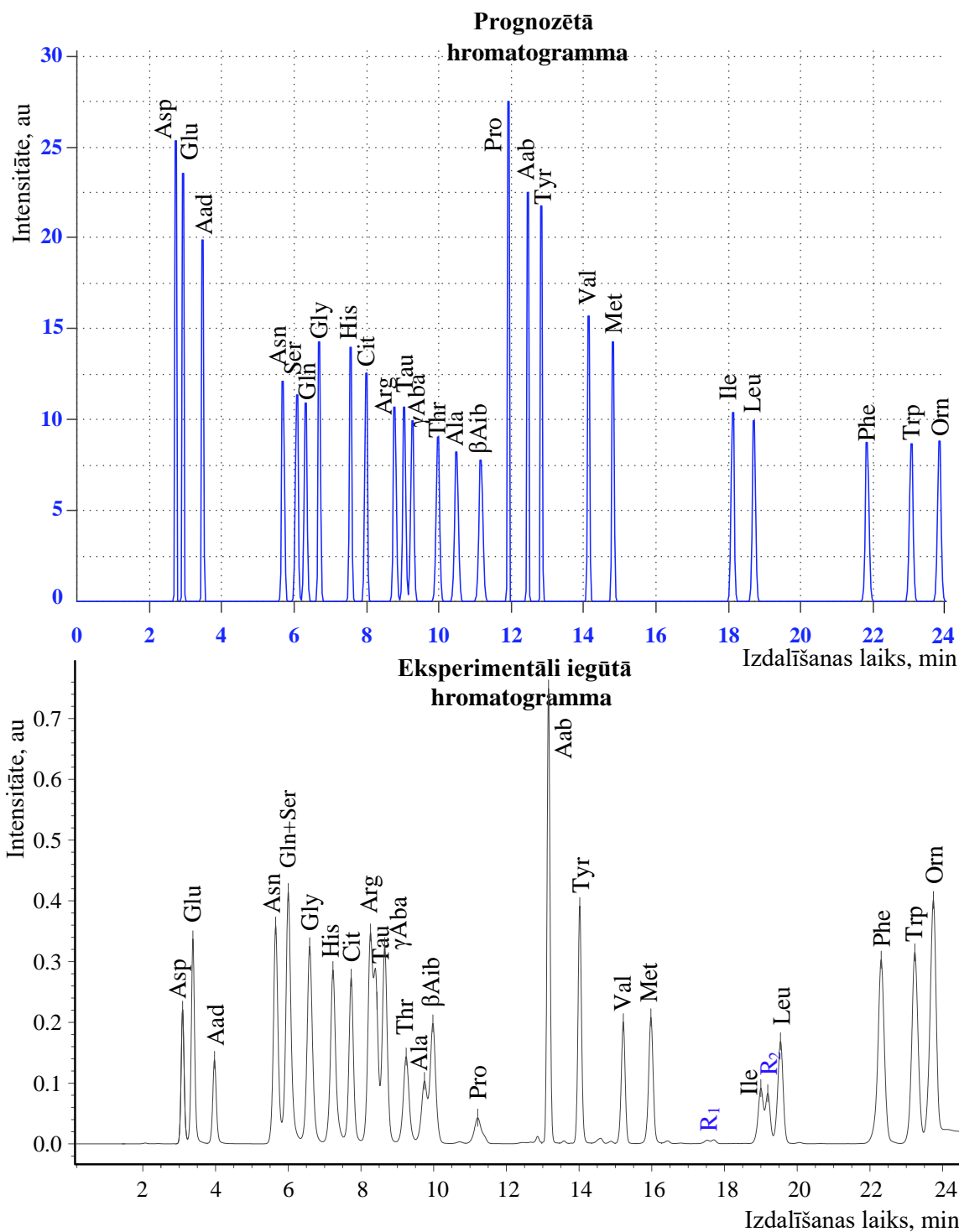
Solvātu sorbcijas modelis ir piemērots segmentētā gradienta optimizācijai, labāki rezultāti un analizējamo vielu izšķiršana ir sagaidāma, veicot optimizāciju, pamatojoties uz vielu struktūru un eksperimentāliem datiem. Analizējot iegūtos rezultātus, mēs konstatējam, ka labāka analizējamo vielu izšķiršana ir sasniegta ar *Pico Tag C18* kolonnu un acetonitrilu kā organisko modificētāju. Šī kolonna satur oktadecil grupu nekustīgajā fāzē, kas ir piemērota apgrieztās fāzes hromatogrāfijai, kā arī salīdzinājumā ar citām kolonnām tai ir augstāka polaritātes selektivitāte un augsta sorbenta izmēra selektivitāte.

Prognozētās un eksperimentāli iegūtās hromatogrammas salīdzinājums *Pico Tag C18* kolonnai, strādājot ar teorētiski iegūto segmentēto gradientu, ir atspoguļots 3.36. attēlā. Segmentētā gradienta optimizācijai izmantotas analizējamo vielu struktūrformulas un prognozēšanas rezultātā iegūtie izdalīšanas parametri 45 min lineārajam gradientam.



3.36. att. Eksperimentāli iegūtās un prognozētās hromatogrammas salīdzinājums, strādājot ar optimizētu segmentēto gradientu, pamatojoties uz analizējamo vielu struktūrformulu un prognozēšanas rezultātā iegūtajiem izdalīšanas parametriem 45 min lineārajam gradientam, *Pico Tag C18* kolonnai, organiskais modificētājs – acetonitrils. R<sub>1</sub> un R<sub>2</sub> derivatizācijas reakcijas rezultātā liekie reagenta piemaisījumi.

3.37. attēlā ir atspoguļotas prognozētās un eksperimentāli iegūtās hromatogrammas salīdzinājums *Pico Tag C18* kolonnai, izmantojot praktiski iegūto segmentēto gradientu. Segmentētā gradienta optimizācijai izmantotas analizējamo vielu struktūrformulas un eksperimentāli iegūtie izdalīšanas parametri 45 min lineārajam gradientam.



3.37. att. Eksperimentāli iegūtās un prognozētās hromatogrammas salīdzinājums, strādājot ar optimizētu segmentēto gradientu, pamatojoties uz analizējamo vielu struktūrformulu un eksperimentāli iegūtajiem izdalīšanas parametriem 45 min lineārajam gradientam, *Pico Tag C18* kolonnai, organiskais modificētājs – acetonitrils. R<sub>1</sub> un R<sub>2</sub> derivatizācijas reakcijas rezultātā liekie reaģenta piemaisījumi.

Eksperimenta rezultātā ir panākta laba analizējamo savienojumu izšķiršana samērā īsā hromatogrammas izdalīšanas laikā, izmantojot gan teorētiski, gan praktiski iegūtos datus. No tā var secināt, ka solvātu sorbcijas modelis ir piemērots segmentētā gradienta optimizācijai.

Solvātu sorbcijas modeļa praktiskā lietderība ir izpētīta, veicot metodes izstrādi un labāku apstākļu optimizāciju aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu noteikšanai cilvēka bioloģiskajos materiālos.

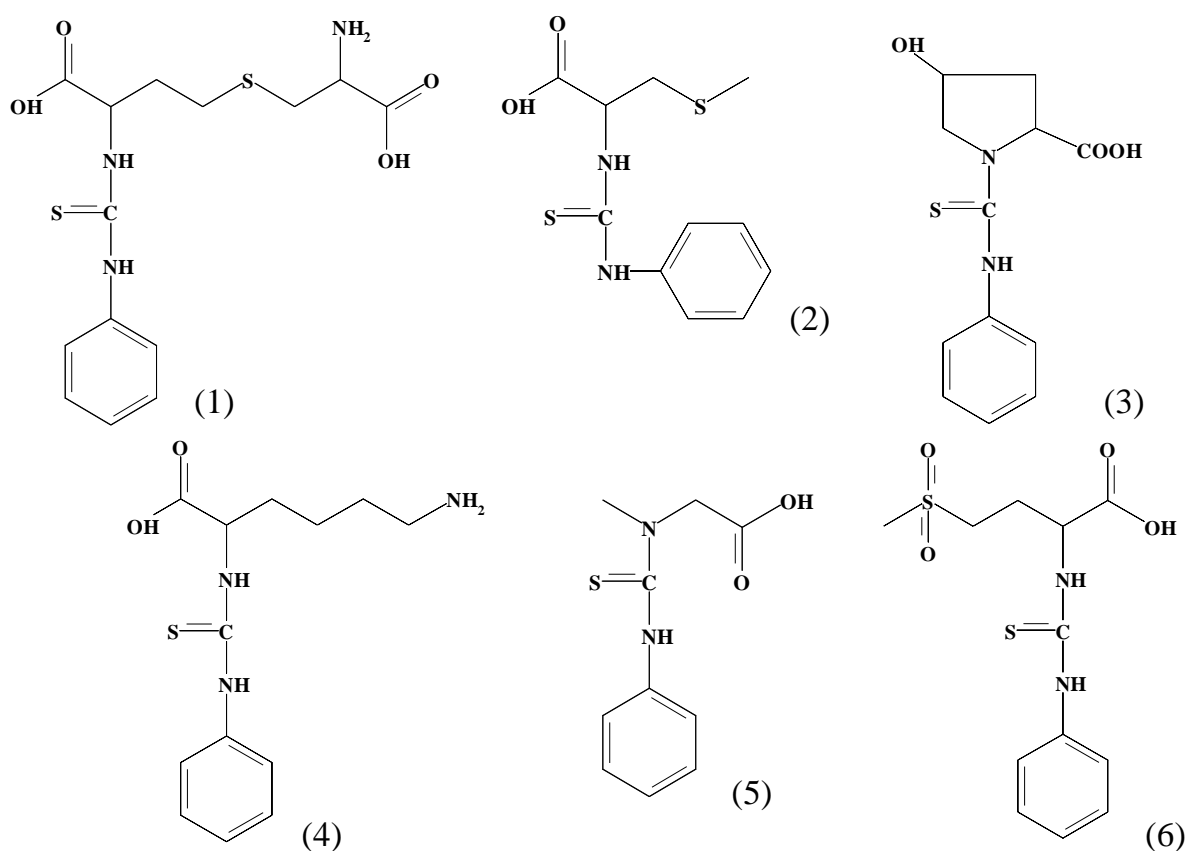
### **3.6. Solvātu sorbcijas modeļa praktiska pielietošana metodes izstrādē aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka asins serumā.**

Zināšanas par aminoskābju sastāvu cilvēka bioloģiskajā materiālā ir svarīgas metabolo patoloģiju diagnostikā. Zinot aminoskābju koncentrācijas, var noteikt vairākas metabolas patoloģijas, kuru savlaicīga ārstēšana var ievērojami uzlabot pacientu dzīves kvalitāti. Vesela cilvēka aminoskābju kvantitatīvs un kvalitatīvs sastāvs bioloģiskajos materiālos ir zināms, līdz ar to aminoskābju metodes izstrādei un optimizācijai var izmantot solvātu sorbcijas modeli [122-125]. Salīdzinājumā ar citiem bioloģiskajiem materiāliem (asins plazma un urīns) cilvēka asins serums ir paraugs ar vieglāku matricu. Asins seruma parauga ņemšanas stobrs nesatur nekādas piedevas. Savukārt, urīns ir paraugs ar vissarežģītāko matricu, jo ar urīnu no organisma tiek izvadītas nevajadzīgās un kaitīgās vielas. Līdz ar to darbā kā analizējamais paraugs ir izmantots references materiāls (liofilizēts cilvēka asins serums), kuru var pielīdzināt sertificētam references materiālam ar zināmu aminoskābju sastāvu. Izmantotajā references materiālā aminoskābju koncentrācijas un sastāvs ir atbilstošs vesela cilvēka normas vērtībām vecuma grupā pēc 18 gadiem. References materiālā esošo aminoskābju sastāvs ir attēlots 3.10. tabulā.

**Izmantotā asins seruma references materiāla sastāvs un molārā koncentrācija (C) ar  
absolūtu nenoteiktības vērtību**

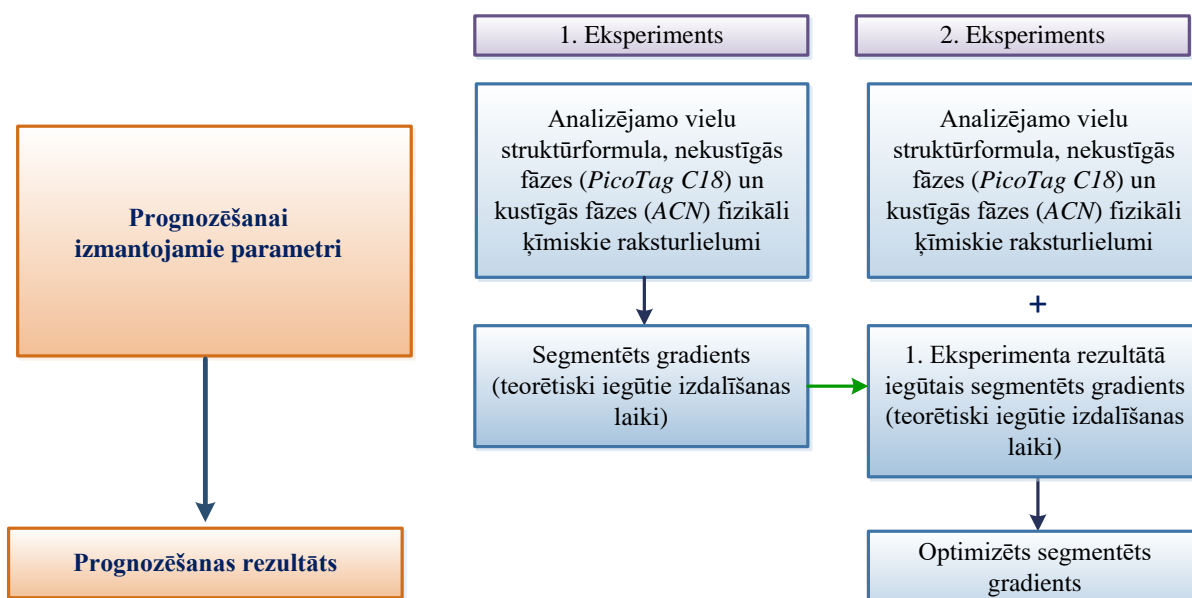
<b>Nr.p.k.</b>	<b>Aminoskābes</b>	<b>Saīsinājumi</b>	<b>C, <math>\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}</math></b>
1.	$\alpha$ -Aminosviestskābe	Aab	33,4±0,6
2.	Alanīns	Ala	371±4
3.	Arginīns	Arg	316±4
4.	Asparagīns	Asn	116±3
5.	Asparagīnskābe	Asp	47,9±1,1
6.	Citrulīns	Cit	120±2
7.	Cistationīns	Hcy(Ala)	32,9±1,1
8.	Cistīns	Cys	41,4±0,6
9.	Glutamīns	Gln	785±10
10.	Glutamīnskābe	Glu	93,5±1,5
11.	Glicīns	Gly	511±6
12.	Histidīns	His	154±2
13.	Hidroksiprolīns	Hyp	60,6±1,4
14.	Izoleicīns	Ile	255±3
15.	Leicīns	Leu	396±5
16.	Lizīns	Lys	171±2
17.	Metionīns	Met	273±3
18.	Ornitīns	Orn	327±4
19.	Fenilalanīns	Phe	350±4
20.	Prolīns	Pro	243±3
21.	Sarkozīns	Sarkoz	79,2±1,8
22.	Serīns	Ser	150±2
23.	Taurīns	Tau	140±2
24.	Treonīns	Thr	160±1
25.	Triptofāns	Trp	35,6±1,4
26.	Tirozīns	Tyr	82,6±0,4
27.	Valīns	Val	386±3

Atšķirībā no laboratorijā sagatavota aminoskābju maisījuma, kuru izmantoja solvātu sorbcijas modeļa pētījumam, references materiāls nesatur  $\alpha$ -aminoadipīnskābi,  $\beta$ -aminoizosviestskābi un  $\gamma$ -aminosviestskābi. Papildus iepriekš analizētajām aminoskābēm references materiāls satur cistationīnu, cisteīnu, hidroksiprolīnu, lizīnu un sarkozīnu. Lai varētu veikt ne tikai kvalitatīvo, bet arī kvantitatīvo aminoskābju noteikšanu, paraugiem tika pievienots iekšējais standarts (IS). Metionīnsulfons izvēlēts kā iekšējais standarts, jo tas nav raksturīgs cilvēka bioloģiskajam materiālam. Šo aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu struktūrformulas ir apskatāmas 3.38. attēlā. Paraugu sagatavošanai references materiāla (liofilizēts cilvēka asins serums) paraugam pievienoja iekšējo standartu ar tilpuma attiecību 1:1. Iekšējais standarts sagatavots tieši tāpat kā visi pārējie darbā izmantotie aminoskābju šķīdumi (2.3.1.). Pirms references materiāla paraugu izmantoja derivatizācijas reakcijai, tas tika centrifugēts caur proteīnu saistošo filtru, lielmolekulāro savienojumu  $>3000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  atdalīšanai.



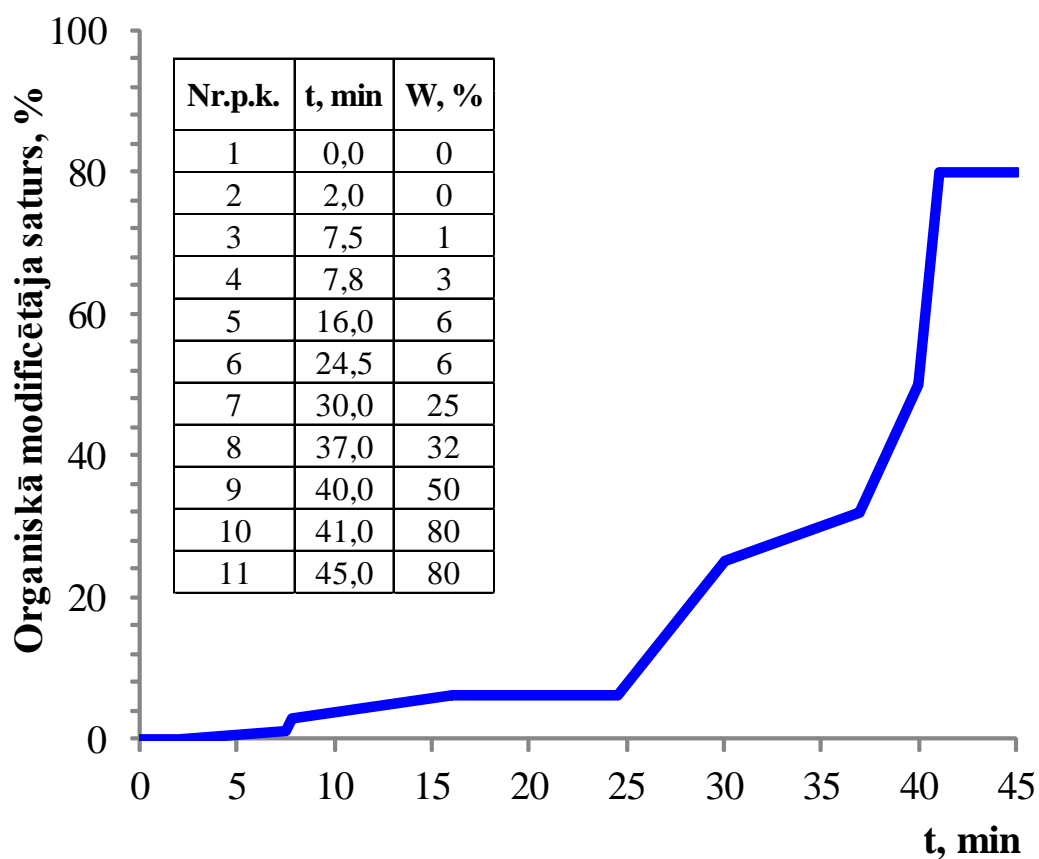
3.38. att. Analizējamo aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu struktūrformulas: (1) cistationīns; (2) cisteīns; (3) hidroksiprolīns; (4) lizīns; (5) sarkozīns (6) metionīnsulfons.

Veicot solvātu sorbcijas modeļa efektivitātes izpēti augsti polāru savienojumu izdalīšanas parametru prognozēšanai, ir konstatēts, ka labāki rezultāti ir sasniedzami ar apgrieztajai fāzei piemērotāku oktadecil (C18) nekustīgo fāzi ar lielākiem sorbenta izmēra selektivitātes un polaritātes selektivitātes rādītājiem. Aminorskābju fenilizotiocianātu atvasinājumu praktiskai metodei izstrādei un optimizācijai ir izvēlēta *Pico Tag C18* kolonna (3,9x300mm, 4,0µm), jo tai ir labāki sorbenta izmēra selektivitātes un polaritātes selektivitātes parametri (3.1. tabula). Kustīgās fāzes sastāvā organiskais modificētājs – acetonitrils. Darbā izmantotā shēma solvātu sorbcijas modeļa praktiskai pielietošanai metodei izstrādei aminorskābju fenilizotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka asins serumā ir redzama 3.39. attēlā.



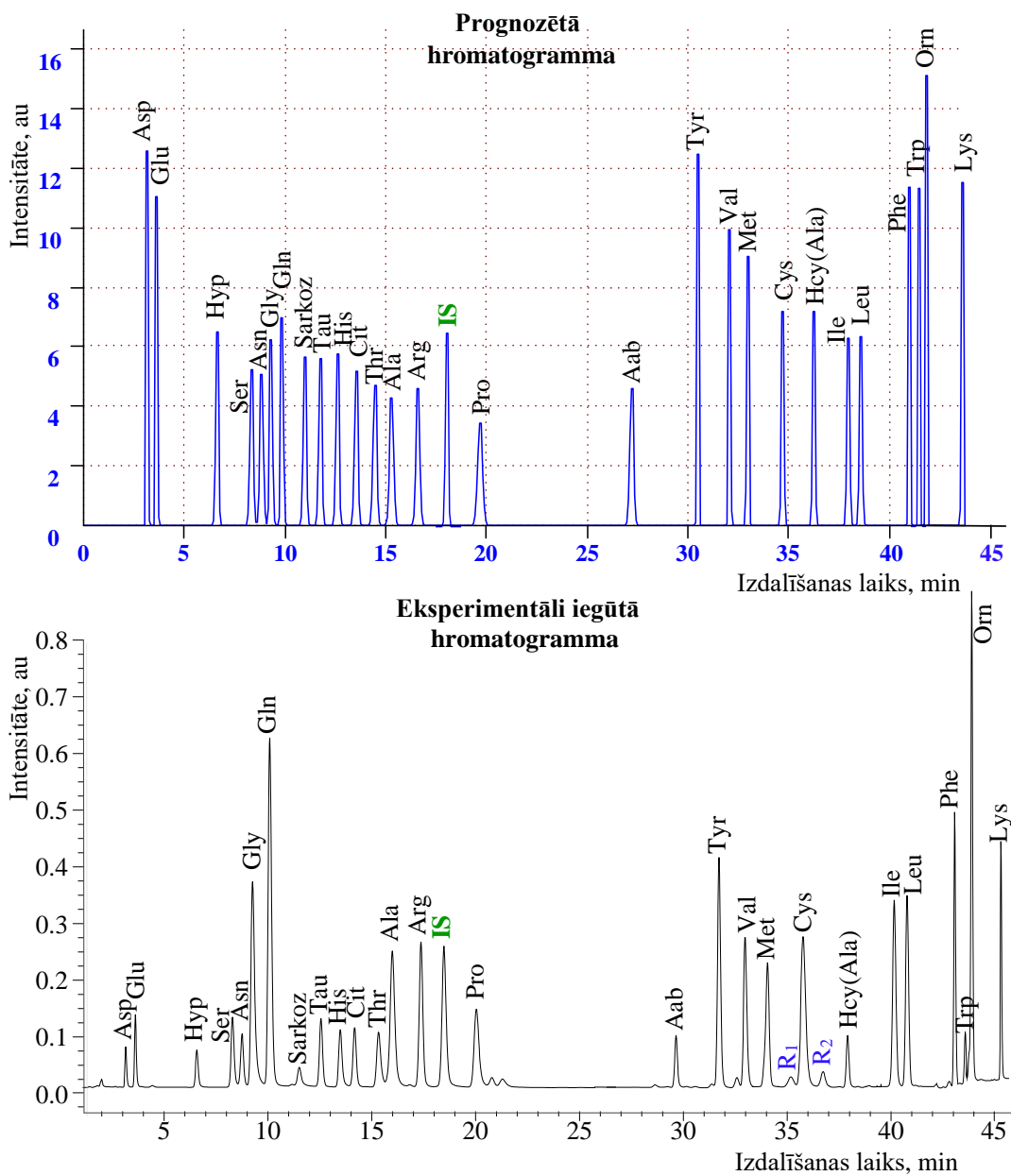
**3.39.att. Darba shēma solvātu sorbcijas modeļa praktiskas pielietošanas metodei izstrādei un optimizācijai aminorskābju fenilizotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka asins serumā.**

Izmantojot analizējamo vielu struktūrformulas, veikta „nulle tuvinājuma” metodei prognozēšana. Prognozēšanas rezultātā ir iegūts segmentētais gradients, kurš nodrošina labāku analizējamo vielu izšķiršanu. Prognozēšanas procesā iegūtais segmentētais gradients ir redzams 3.40. attēlā.



3.40. att. Segmentētais gradients, iegūts prognozēšanas ceļā, balstoties uz analizējamo vielu struktūrformulām.

Solvātu sorbcijas modeļa izpētei veikts eksperiments, izmantojot teorētiski iegūto segmentēto gradientu (3.40 att.). Teorētiski iegūtā analizējamo vielu hromatogramma ir salīdzināta ar praktiski iegūto hromatogrammu, izmantojot piedāvāto segmentēto gradientu. Hromatogrammu salīdzinājumu var apskatīt 3.41. attēlā.



3.41. att. Eksperimentāli iegūtās un prognozētās hromatogrammas salīdzinājums. Segmentētais gradients izveidots, balstoties uz analizējamās vielas struktūrformulu. R<sub>1</sub> un R<sub>2</sub> derivatizācijas reakcijas rezultātā liekie reaģenta piemaisījumi.

Kā var redzēt, analizējamo vielu izdalīšanas secība hromatogrammā, iegūta prognozēšanas ceļā, pilnīgi atbilst analizējamo vielu izdalīšanas secībai, iegūtai eksperimentālos apstākļos. Starpība starp prognozētajiem izdalīšanas laikiem un eksperimentāli iegūtajiem izdalīšanas laikiem nepārsniedz 2,5 minūtes (Aab), kas sastāda 5,6%. Diviem aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumiem starpība starp prognozētajiem izdalīšanas laikiem un eksperimentāli iegūtajiem izdalīšanas laikiem ir 2,2 minūtes (4,9%), trim aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumiem tā ir 2,1 minūtes (4,7%). Starpība starp

prognozētajiem izdalīšanas laikiem un eksperimentāli iegūtajiem izdalīšanas laikiem no 1,0 līdz 2,0 minūtēm ir 4 aminoskābju fenilizotiocianātu atvasinājumiem. Pārējiem 18 analītiem tā ir mazāka par 1,0 minūti. Izdalīšanas laika starpību, iegūtu starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, var redzēt 3.11. tabulā.

3.11. tabula

**Analizējamo vielu izdalīšanas laika salīdzinājums prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem**

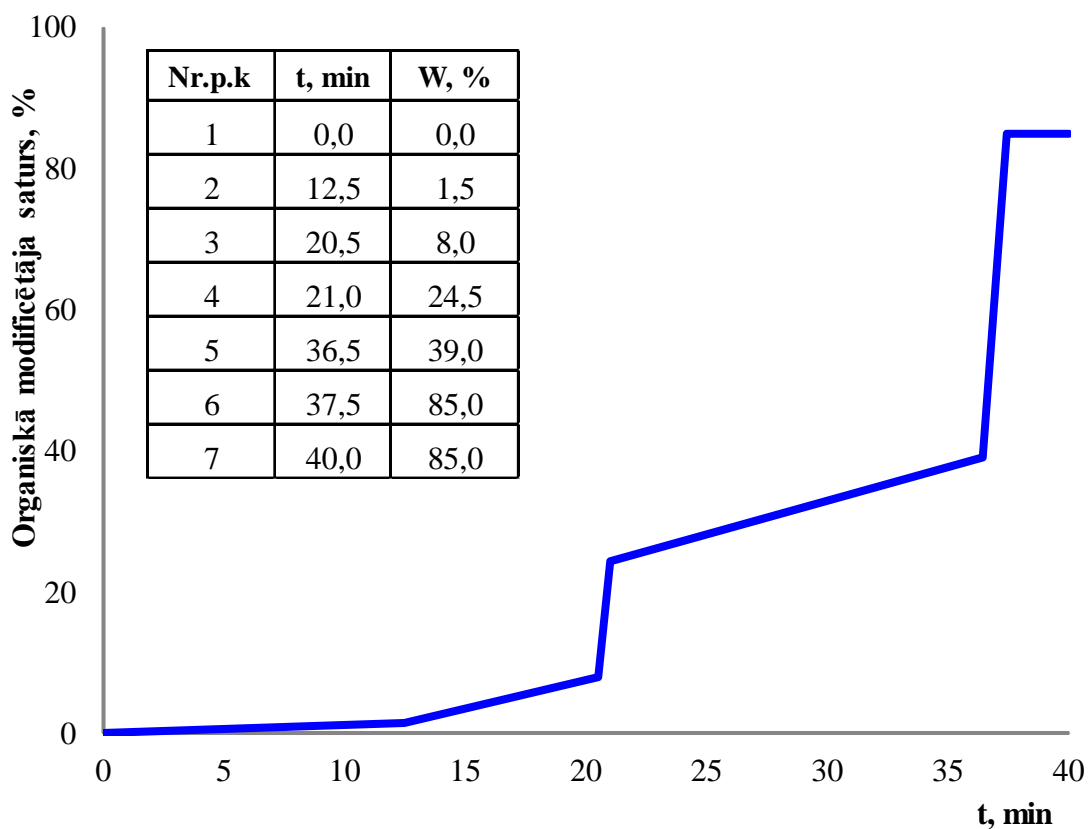
Nr.p.k	Analīts	t <sub>prognoz., min</sub>	t <sub>eksp., min</sub>	Δt, min
1.	Asp	3,17	3,17	0,0
2.	Glu	3,63	3,62	0,0
3.	Hyp	6,62	6,55	0,1
4.	Ser	8,34	8,24	0,1
5.	Asn	8,84	8,70	0,1
6.	Gly	9,31	9,19	0,1
7.	Gln	9,86	10,02	-0,2
8.	Sar	10,98	11,42	-0,4
9.	Tau	11,75	12,45	-0,7
10.	His	12,60	13,37	-0,8
11.	Cit	13,53	14,05	-0,5
12.	Thr	14,46	15,20	-0,7
13.	Ala	15,30	15,85	-0,5
14.	Arg	16,60	17,22	-0,6
15.	IS	18,50	18,31	0,2
16.	Pro	19,68	19,85	-0,2
17.	Aab	27,21	29,69	-2,5
18.	Tyr	30,48	31,75	-1,3
19.	Val	32,08	33,00	-0,9
20.	Met	32,96	34,13	-1,2
21.	Cys	34,71	33,75	1,0
22.	Hcy(Ala)	36,25	37,91	-1,7
23.	Ile	37,97	40,19	-2,2
24.	Leu	38,59	40,74	-2,2
25.	Phe	41,00	43,06	-2,1
26.	Trp	41,62	43,69	-2,1
27.	Orn	41,82	43,89	-2,1
28.	Lys	43,61	45,20	-1,6

Var novērot tendenci, ka starpība starp prognozētajiem izdalīšanas laikiem un eksperimentāli iegūtajiem izdalīšanas laikiem palielinās līdz ar pieaugošo analītu skaitu un attiecīgi hromatogrammas ilgumu. Pēc literatūras datiem maksimālais komponentu skaits,

izmantojams solvātu sorbcijas modeļa darbības aprakstīšanai, bija 10 komponentu sistēma [5]. Līdz ar to var pieņemt, ka viens no solvātu sorbcijas modeļa darbības ierobežojumiem ir komponentu skaits. Tomēr šī apgalvojuma pārbaudei ir jāveic atsevišķs pētījums, izmantojot gan citus savienojumus, gan arī citus hromatogrāfijas apstākļus.

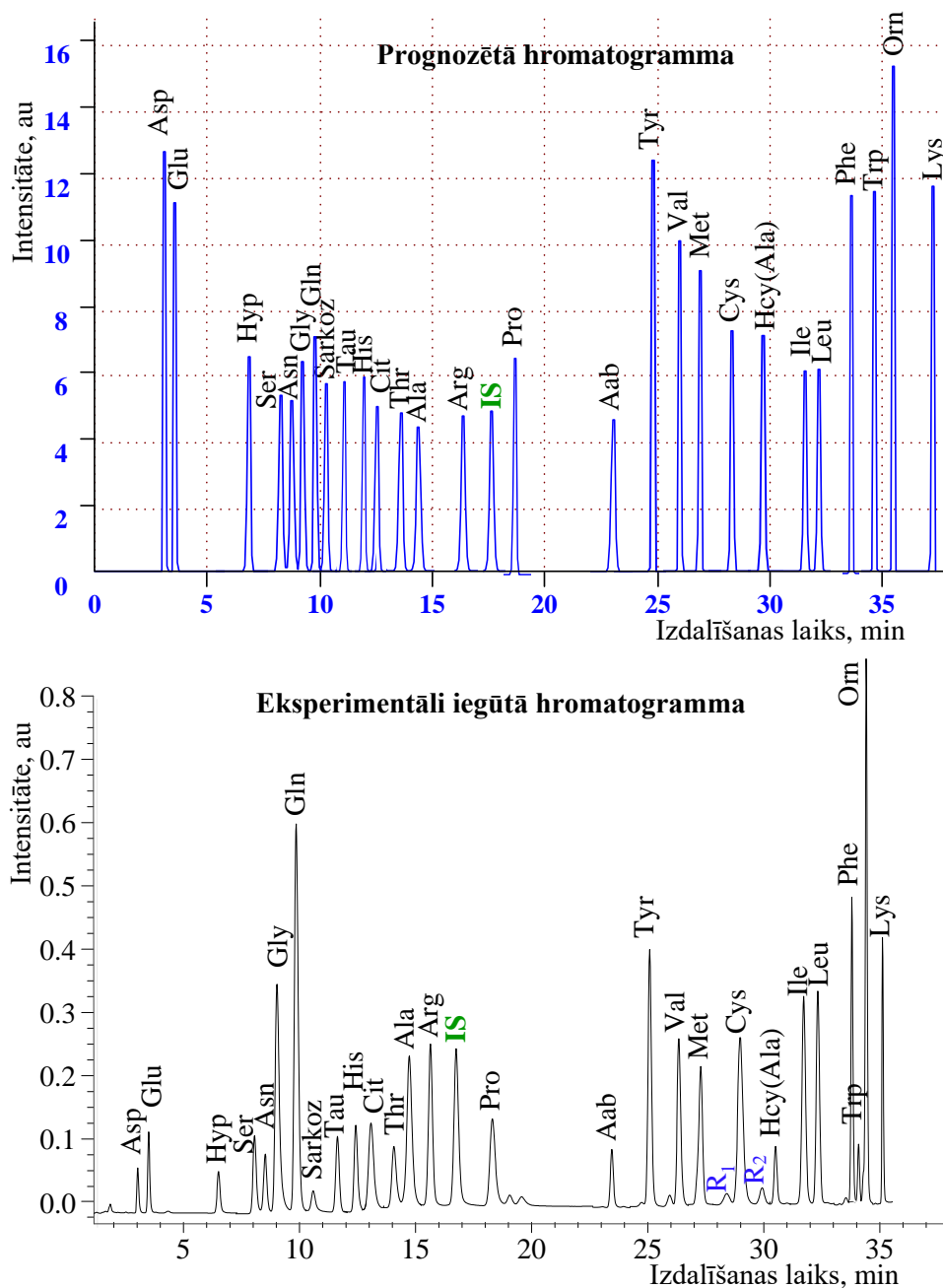
Izmantojot segmentēto gradientu, modulētu, pamatojoties tikai uz analizējamo vielu struktūrformulām, analizējamo vielu joslu izšķiršana ir apmierinoša. Kopējais 28 analizējamo vielu izdalīšanas laiks ir 45,2 minūtes. Iegūtos datus var izmantot aminoskābju spektra noteikšanai cilvēka bioloģiskajā materiālā. Savukārt veicot segmentētā gradienta optimizāciju, var mēģināt samazināt analizējamo vielu izdalīšanas laiku, ar nosacījumu, ka joslu izšķiršana nesamazināsies.

Segmentētā gradienta optimizācijai izmantota solvātu sorbcijas modeļa „*pirmā tuvinājuma*” metode. Optimizācijai izmantotas analizējamo vielu struktūrformulas un „*nulles tuvinājuma*” metodes pārbaudei izmantoti eksperimentāli iegūtie analizējamo vielu izdalīšanas laiki. Optimizāciju var veikt arī izmantojot matemātisko iterāciju, kur prognozēšanai izmanto „*nulles tuvinājuma*” metodes rezultātā iegūtos datus. „*Pirmā tuvinājuma*” metodes rezultātā iegūto segmentēto gradientu var redzēt 3.42. attēlā.



3.42. att. Segmentētais gradients, iegūts „*pirmā tuvinājuma*” metodes rezultātā.

Kā var redzēt „*pirmā tuvinājuma*” metodes prognozēšanas rezultātā, iegūtais segmentētais gradients ir vienkāršāks par segmentēto gradientu, iegūtu „*nulles tuvinājuma*” metodes rezultātā. Izmantojot jauniegūto segmentēto gradientu (3.42. att.), ir veikts eksperiments. Prognozēšanas un eksperimentāli iegūto hromatogrammu salīdzinājums ir redzams 3.43. attēlā.



3.43. att. Eksperimentāli iegūtās un prognozētās hromatogrammas salīdzinājums. Segmentētais gradients izveidots, balstoties uz analizējamās vielas struktūrformulu un viena eksperimentāli iegūtā izdalīšanas laika datiem. R<sub>1</sub> un R<sub>2</sub> derivatizācijas reakcijas rezultātā liekie reaģenta piemaisījumi.

Iegūtie rezultāti apliecina, ka aminoskābju izdalīšanas secība atbilst prognozētajai aminoskābju izdalīšanas secībai. Gradianta optimizācijas rezultātā kopējais eksperimentāli iegūtais aminoskābju izdalīšanas laiks samazinājās par 10 minūtēm, kas sastāda 21%, saglabājot darbam atbilstošu joslu izšķiršanu. Analizējamo vielu joslu izšķiršana ir atspoguļota 3.12. tabulā.

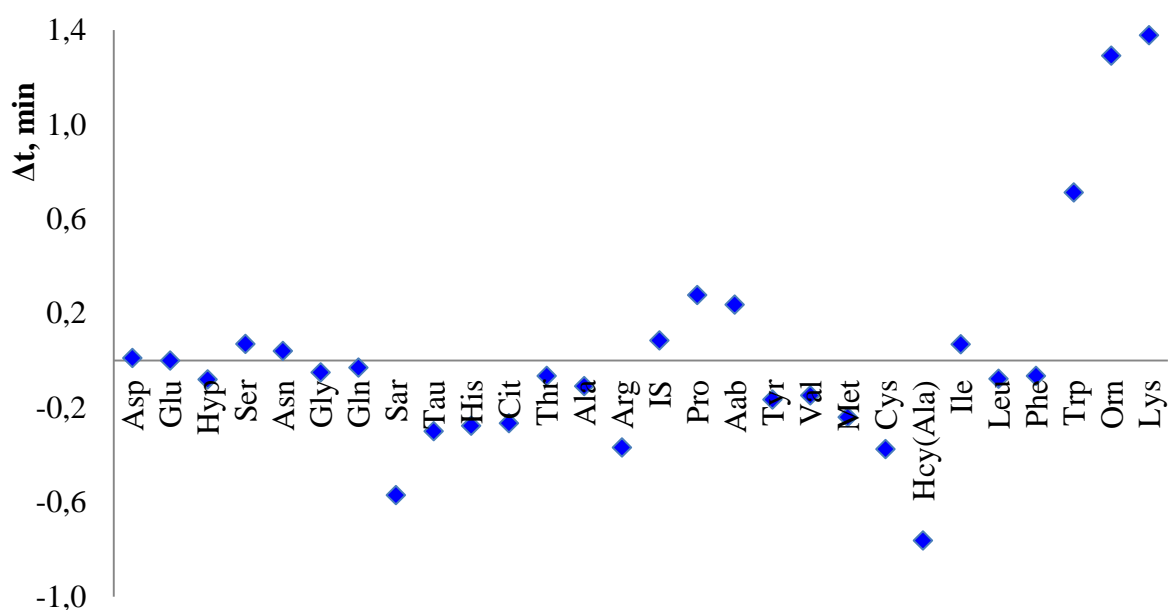
3.12. tabula

**Analizējamo aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu joslu izšķiršana bioloģiskajā materiālā, iegūta optimizētam gradientam**

Nr.p.k	Analīts	R (joslu izšķiršana)
1.	Asp	
2.	Glu	1,3
3.	Hyp	6,5
4.	Ser	3,5
5.	Asn	1,3
6.	Gly	1,0
7.	Gln	2,0
8.	Sar	1,5
9.	Tau	2,3
10.	His	1,8
11.	Cit	1,4
12.	Thr	1,5
13.	Ala	1,1
14.	Arg	1,6
15.	IS	2,0
16.	Pro	3,0
17.	Aab	9,0
18.	Tyr	3,2
19.	Val	1,6
20.	Met	1,6
21.	Cys	3,2
22.	Hcy(Ala)	2,6
23.	Ile	1,6
24.	Leu	1,5
25.	Phe	2,0
26.	Trp	1,0
27.	Orn	1,3
28.	Lys	1,4

Joslu izšķiršana (R) zemāka par 1 nav novērojama nevienam aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumam. Joslu izšķiršana 1 ir novērojama starp asparagīna (Asn) un glicīna (Gly) fenilzotiocianāta atvasinājumiem, kā arī fenilalanīna (Phe) un triptofāna (Trp) fenilzotiocianāta atvasinājumiem. Augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas metodei ieteicamā joslu izšķiršana ir lielāka vai vienāda ar 1,5 [7, 8]. Veicot daudzkomponentu maisījuma atdalīšanu, joslu izšķiršanas parametri samazinās, turklāt jāatceras, ka, palielinot joslu izšķiršanu, analīzes laiks tiek pagarināts. Šādu joslu izšķiršanu (R=1) var uzskatīt par pietiekošu daudzkomponentu maisījuma kvantitatīvai analīzei.

Izdalīšanas laika starpību starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem izdalīšanas laikiem var apskatīt 3.44. attēlā.



3.44. att. Izdalīšanas laika starpība starp prognozētajiem un eksperimentāli iegūtajiem rezultātiem, izmantojot segmentēto gradientu, iegūtu pēc „pirmā tuvinājuma” metodes.

Izdalīšanas laika starpība nepārsniedz 1,38 minūtes (Lys), turklāt eksperimentāli iegūtais analizējamo vielu izdalīšanas laiks ir mazāks, nekā prognozētais izdalīšanas laiks. Veicot prognozēšanu, tiek pieņemts, ka analizējamo vielu koncentrācijas ir vienādas. Faktiskajā analizējamajā paraugā (cilvēka asins seruma references materiāls) aminoskābju koncentrācijas ir dažādas. Tas varētu izskaidrot prognozēto un eksperimentāli iegūto rezultātu izdalīšanas laika starpību.

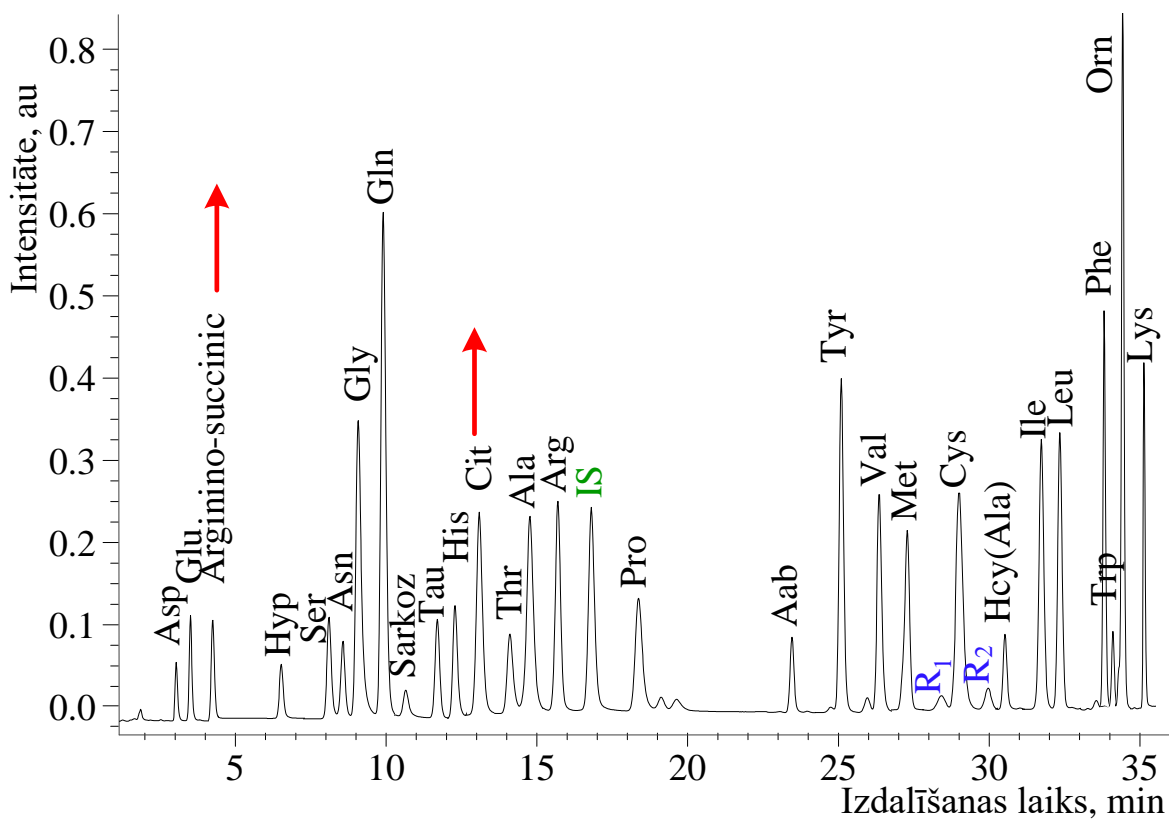
Kā var secināt no iegūtajiem rezultātiem, segmentētais gradients, iegūts tikai no analizējamo vielu struktūrformulas, ļauj panākt visu analizējamo vielu atdalīšanu. Izmantojot segmentēto gradientu, kas pamatojas uz analizējamo vielu struktūrformulām un viena

eksperimenta datiem, ir panākta kopējā analīzes laika samazināšanās, saglabājot visu analizējamo vielu atdalīšanu.

Veicot kvantitatīvo cilvēka bioloģiskā materiāla analīzi, ir jāņem vērā, ka vairāku metabolo patoloģiju gadījumā mainās ne tikai bioloģiskā materiāla kvantitatīvais, bet arī kvalitatīvais sastāvs. Tā Argininosukcinskābes acidūrijas (OMIM nr. 207900) gadījumā organismā netiek izstrādāta argininosukcinliāze, kura, savukārt, urea cikla metabolajā ceļā nepārveido argininosukcinskābi (IUPAC: *N-[[[(4S)-4-amino-4-carboxybutyl]amino](imino)methyl]-L-aspartic acid*) par arginīnu. Tā rezultātā organismā uzkrājas argininosukcinskābe, kurai veselā cilvēka organismā nav jābūt, kā arī ievērojami palielinās citrulīna koncentrācija [127-128]. Mūsu gadījumā ir svarīgi saprast, vai izstrādātais un optimizētais segmentētais gradients aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu noteikšanai ir efektīvs reālā darbā ne tikai veselu cilvēku bioloģiskā materiāla analīzei, bet arī aminoskābju acidūriju un/vai acidēmiju selektīvam skrīningam. No praktiskā viedokļa ir svarīgi pārbaudīt, vai, izmantojot doto metodi, ir iespējams noteikt arī citus aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumus, kuri nav raksturīgi vesela cilvēka aminoskābju spektram.

Izmantojot izstrādāto metodi un optimizēto segmentēto gradientu (3.42. att.), veiktas vairākas cilvēka bioloģisko materiālu analīzes ar zināmām aminoskābju patoloģijām. Par analizējamiem paraugiem ir izmantoti laboratorijā pieejamie references materiāli (asins plazma un urīns) no Eiropas pētniecības shēmas par iedzimto vielmaiņas traucējumu skrīninga novērtēšanu un uzlabošanu, diagnosticēšanu un ārstēšanu (*European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism ERNDIM QUALITATIVE SCHEMES*) [126].

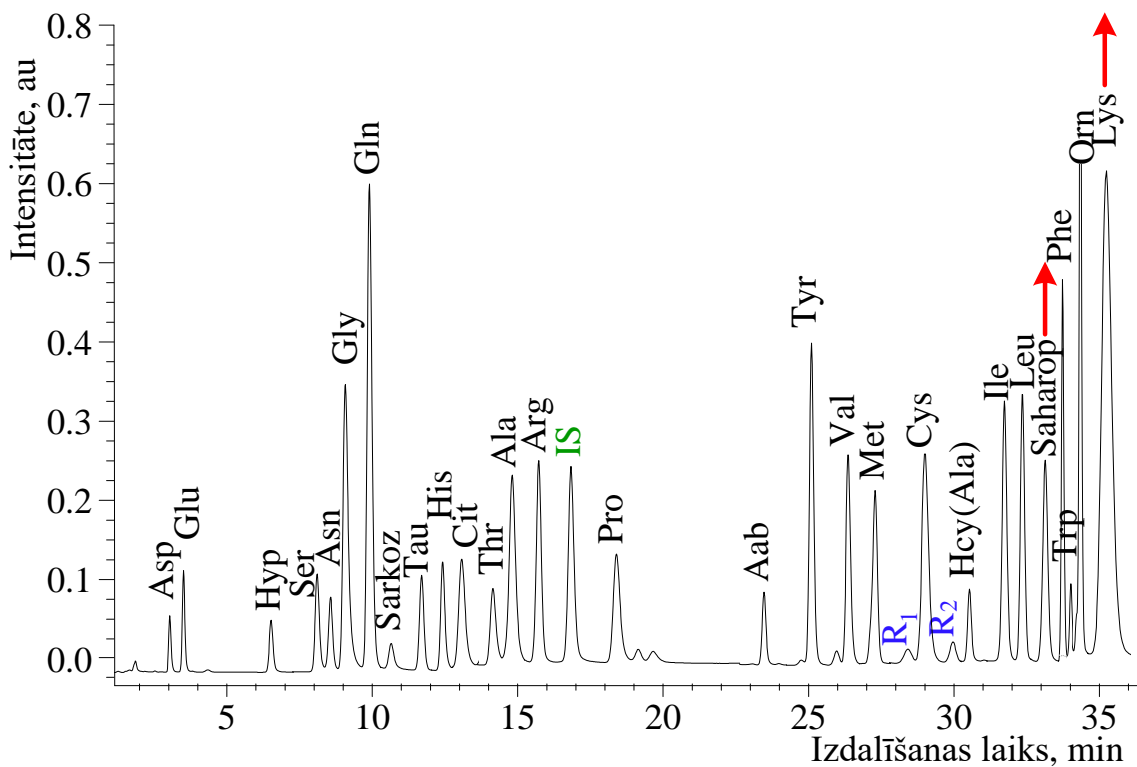
Iegūtā aminoskābju hromatogramma pacientam (vecums 24 gadi) ar Argininosukcinskābes acidūriju ir redzama 3.45. attēlā.



3.45. att. Eksperimentāli iegūtā hromatogramma pacientam ar diagnosticētu Argininosukcinskābes acidūriju. R<sub>1</sub> un R<sub>2</sub> derivatizācijas reakcijas rezultātā liekie reaģenta piemaisījumi

Argininosukcinskābes acidūrijas diagnostika balstās uz sekojošām laboratorijas atradnēm: paugstinātas amonija, citrulīna un argininosukcinskābes koncentrācijas asins plazmā. Tālākai diagnozes apstiprināšanai veic gēna analīzi [128,129]. Kā var redzēt 3.45. attēlā, izmantojot izveidoto segmentēto gradientu (3.42. att), var labi atdalīt argininosukcinskābi, kura nav raksturīga vesela cilvēka aminoskābju spektram, kā arī saglabājas pietiekoši laba joslu izšķiršana citrulīnam, neskatoties uz ievērojami paaugstinātu koncentrāciju (virs 3 reizēm no normas augstākās robežas).

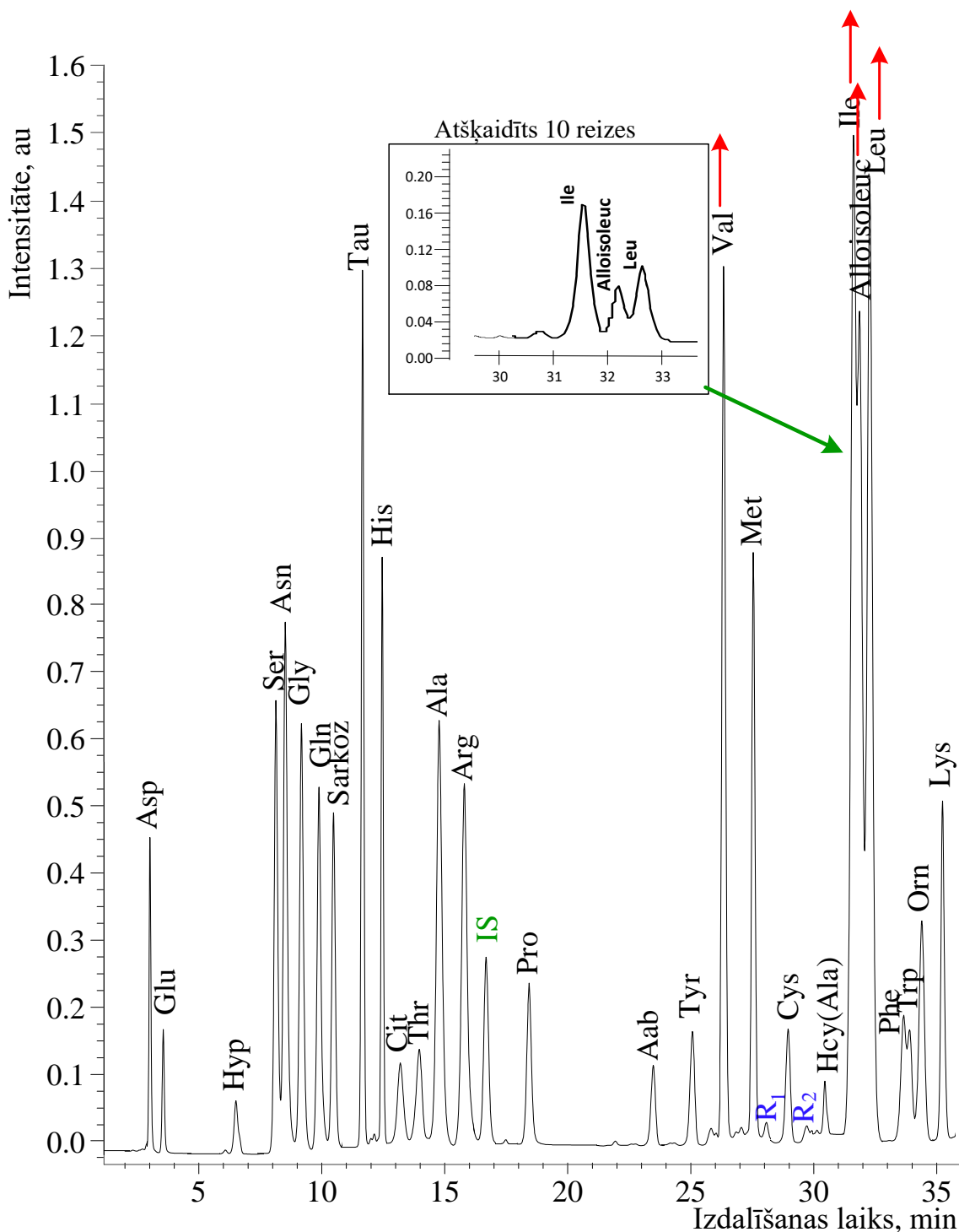
Nākamā cilvēka bioloģiskajam materiālam neraksturīga aminoskābe ir saharopīns (IUPAC: *2-[(5-Amino-5-carboxypentyl)amino]pentanedioic acid*). Saharopīns veidojas bifunkcionālā enzīma alfa-aminoadipinsemialdehīda sintetāzes darbības traucējuma dēļ. Tā rezultātā organismā uzkrājas saharopīns un lizīns [128, 129]. Aminoskābju spektru pacientam (vecums 22 gadi), kuram ir diagnosticēta Saharopinūrija (OMIM nr. 268700), var redzēt 3.46. attēlā.



3.46. att. Eksperimentāli iegūtā hromatogramma pacientam ar diagnosticētu Saharopinūriju.  $R_1$  un  $R_2$  derivatizācijas reakcijas rezultātā liekie reaģenta piemaisījumi

Kā var redzēt no iegūtās hromatogrammas, saharopīna joslu izšķiršana ir laba. Lizīns, kura koncentrācija pārsniedz normas augstāko vērtību vairāk nekā 7 reizes, arī ir pietiekami atdalīts no ornitīna, neskatoties uz joslas platumu.

Vēl viena metabolā patoloģija, kura atstāj iespaidu uz aminoskābju spektru, ir Kļavu lapas sīrupa slimība (OMIM nr. 248600). Pacienta hromatogramma, kuram ir konstatēta Kļavu lapas sīrupa slimība, ir redzama 3.47. attēlā.

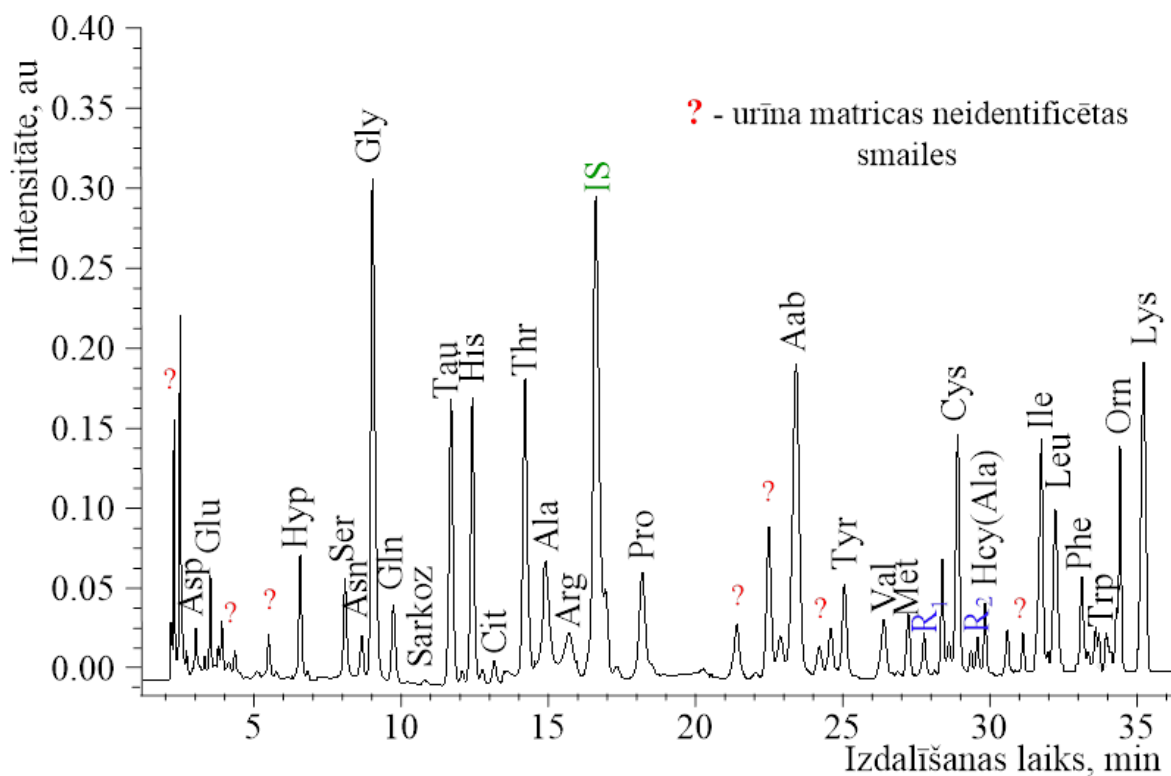


3.47. att. Eksperimentāli iegūtā hromatogramma pacientam ar diagnosticētu Kļavu lapu sīrupa slimību. R<sub>1</sub> un R<sub>2</sub> derivatizācijas reakcijas rezultātā liekie reaģenta piemaisījumi

Kā var redzēt no iegūtās hromatogrammas, visu aminoskābju smaīļu intensitātes ir lielākas nekā iepriekš apskatītajos gadījumos. Tas ir izskaidrojams ar pacienta vecumu (2 gadi). Atbilstoši vecuma grupai, bērniem visu aminoskābju koncentrācijas ir augstākas nekā pieauguša cilvēka aminoskābju koncentrācijas. Neskatoties uz to, visas analizējamās vielas ir atdalītas. Kļavu lapas sīrupa slimības gadījumā cilvēka asins plazmā var redzēt zaroto ķēžu

aminoskābju (valīns, leicīns un izoleicīns) paaugstinātas koncentrācijas. Diagnosticējošā aminoskābe, kura nav vesela cilvēka bioloģiskajā materiālā, ir aloizoleicīns (IUPAC: *(2S,3R)-2-Amino-3-methylpentanoic acid*). Kā var redzēt 3.47. attēlā, aloizoleicīns (31,75 min) izdalās starp izoleicīnu (31,24 min) un leicīnu (32,07). Šajā gadījumā var redzēt, ka joslu atdalīšana nav augsta, tomēr to var uzskatīt par pietiekošu Kļavu lapas sīrupa slimības selektīvajam skrīningam, ņemot vērā, ka visu šo aminoskābju koncentrācijas ir ievērojami paaugstinātas. Nepieciešamības gadījumā, ja aminoskābju koncentrācijas ir pārāk augstas, kvantitatīvai noteikšanai un/vai labākai joslu atdalīšanai veic parauga atšķaidīšanu. Šajā gadījumā paraugs tika atšķaidīts 10 reizes, lai varētu aprēķināt zaroto ķēžu aminoskābju kvantitatīvo sastāvu.

Veiktie eksperimenti pierāda, ka izstrādātā aminoskābju fenilizotiocianātu atvasinājumu noteikšanas metode ir aktuāla ne tikai darbā ar asins serumu, kurš tika izmantots iepriekšējos eksperimentos metodes izstrādei un optimizācijai, bet arī veicot analīzi, strādājot ar asins plazmu, kura atšķirībā no seruma satur fibrinogēnus (recēšanas aģentus). Vēl viens no plašāk analizējamajiem cilvēka bioloģiskajiem materiāliem ir urīns. Kā jau iepriekš minēts, tas ir paraugs ar sarežģītāku matricu. Praktiski ir svarīgi saprast, vai izstrādātā metode ir efektīva arī aminoskābju spektra analīzei urīna paraugā, kas ir ar stipri atšķirīgu matricu salīdzinājumā ar asins plazmas/seruma matricu. Par analizējamo paraugu ir izmantots laboratorijā pieejams references materiāls (urīns) no Eiropas pētniecības shēmas par iedzimto vielmaiņas traucējumu skrīninga novērtēšanu un uzlabošanu, diagnosticēšanu un ārstēšanu (*European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism ERNDIM QUALITATIVE SCHEMES*) [126]. Izmantotais materiāls ir urīns ar uzstādīto diagnozi Izobaldriānskābes acidūrija (OMIM nr. 243500). Pacienta vecums 6 gadi. Šī iedzimtā slimība ir saistīta ar izmaiņām organisko skābju metabolismā, neatstājot būtiskas izmaiņas uz aminoskābju spektru. Šajā gadījumā ir svarīgi redzēt, vai izstrādātā metode ir izmantojama urīna analīzes veikšanai. Iegūtais aminoskābju spektrs urīna paraugam ir redzams 3.48. attēlā.



**3.48. att. Eksperimentāli iegūtā hromatogramma pacientam ar diagnosticētu Izobaldriānskābes acidūrijas slimību. R<sub>1</sub> un R<sub>2</sub> derivatizācijas reakcijas rezultātā liekie reaģenta piemaisījumi**

Izobaldriānskābes acidūrijas gadījumā pacientu ārstēšanai izmanto karnitīna un glicīna terapiju, kā arī zemu proteīnu diētu ar leicīna izslēgšanu no uztura. Terapijas ietekmi uz aminoskābju spektru var redzēt iegūtajā aminoskābju hromatogrammā. Tajā ir konstatēta paaugstināta glicīna koncentrācija, kā arī vairāki neidentificēti metabolīti, kuri, iespējams, ir medikamentozas izcelsmes. Urīna paraugam atšķirībā no asins plazmas un seruma ir daudz sarežģītāka matrica, kura arī atstāj negatīvu iespaidu uz urīna hromatogrammu. Precīzākai aminoskābju kvantitatīvai noteikšanai būtu ieteicams veikt urīna attīrīšanu, izmantojot cietfāzes ekstrakciju. Toties veicot aminoskābju spektra skrīninga analīzes metabolo patoloģiju noteikšanai, nav tik būtiski noteikt precīzas aminoskābju koncentrācijas. Aminoskābju acidūrijas/acidēmijas gadījumā trūkstošā enzīma dēļ notiek kādas noteiktas aminoskābes vai aminoskābju grupas uzkrāšanās organismā, kas izraisa tās ievērojami paaugstinātu koncentrāciju bioloģiskajos materiālos.

Apkopojot iegūtos datus, var apgalvot, ka izstrādātā un optimizētā aminoskābju fenilizotiocianātu atvasinājumu noteikšanas metode cilvēka asins serumā ir lietderīga dažādu metabolo patoloģiju selektīvajam skrīningam. To var izmantot gan kvantitatīvajai, gan kvalitatīvajai aminoskābju spektra noteikšanai.

### **3.7. Metodes validācija aminoskābju fenilizotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka asins serumā.**

Analītiskās metodes validācijas mērķis ir pierādīt, ka izstrādātā metode atbilst visām uzstādītajām prasībām un ir piemērota izvirzītajam uzdevumam. Analītiskās metodes validācija dod iespēju acīmredzami dokumentāli pierādīt, ka šī metode nodrošina augstu precizitātes līmeni, ka tā ir atkārtojama un to var izmantot ne tikai citi analītiķi, bet arī citas laboratorijas. Galvenie parametri, kuri nodrošina analītiskās metodes ticamus rezultātus, ir pareizi izveidota un robusta metode, pareizi apstrādāti un dokumentēti dati, laboratorijā izmantoti sertificēti references materiāli, kalibrēti laboratorijas instrumenti, kvalificēts un pieredzējis laboratorijas personāls, kā arī dalība dažādās starplaboratoriju prasmes pārbaudēs. Šo parametru izpilde dod iespēju veikt metodes validāciju [130,131].

Veiksmīgai metodes izstrādei un īstenošanai ir nepieciešams izstrādāt plānu un skaidri saprast validācijai nepieciešamos parametrus. Galvenie dotās metodes validācijas parametri ir: specifiskums (selektivitāte, matricas efekts), linearitāte, precizitāte, atgūstamība, pareizība, detektēšanas robeža, kvantitatīvā noteikšanas robeža, mērījumu nenoteiktība, kā arī robustums [130-132].

#### **3.7.1. Specifiskums (selektivitāte, matricas efekts).**

Specifiskums raksturo metodes selektivitāti, respektīvi, cik lielā mērā ir iespēja neapšaubāmi novērtēt kādas vielas esamību paraugā citu komponentu klātbūtnē. Lai varētu novērtēt, vai metode ir specifiska jeb pietiekami selektīva, ir jāpārbauda sekojošus sistēmas komponentus:

- šķīdināšanas vide (tukšais paraugs);
- standartparaugs;
- analizējamais paraugs.

Aminoskābju fenilizotiocianātu atvasinājumu noteikšanas metode asins serumā ir specifiska attiecībā pret nosakāmajiem komponentiem. Metodes specifiskumu nodrošina paraugu sagatavošanas metode – fenilizotiocianāta derivatizācija. 5., 6. un 7. pielikumā var redzēt tukšā parauga, standartšķīduma un analizējamā bioloģiskā parauga (sertificēts references materiāls) hromatogrammas. Precīzākai kvantitatīvu rezultātu noteikšanai visiem paraugiem ir pievienots iekšējais standarts. 3.13. tabulā ir apkopoti standartšķīduma ( $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), analizējamā bioloģiskā parauga (sertificēts references materiāls) un analizējamā

bioloģiskā parauga ar pievienotām aminoskābju standartpiedevām ( $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) izdalīšanas laiki.

3.13.tabula

**Standartšķīduma, analizējamā parauga un analizējamā parauga ar standartpiedevu izdalīšanas laiki**

<b>Nr. p.k.</b>	<b>Analīts</b>	<b>Standartšķīdums t, min</b>	<b>Analizējamais paraugs t, min</b>	<b>Analizējamais paraugs ar standartpiedevu t, min</b>
1.	Asp	3,47	3,45	3,45
2.	Glu	3,92	3,90	3,97
3.	Hyp	6,60	6,68	6,62
4.	Ser	8,05	8,11	8,26
5.	Asn	8,51	8,52	8,51
6.	Gly	9,43	9,22	9,12
7.	Gln	10,25	9,99	9,90
8.	Sar	10,80	10,68	10,68
9.	Tau	11,73	11,62	11,54
10.	His	12,58	12,47	12,43
11.	Cit	13,21	13,16	13,07
12.	Thr	14,18	14,09	13,86
13.	Ala	14,84	14,74	14,55
14.	Arg	15,68	15,78	15,43
15.	IS	17,05	17,08	17,05
16.	Pro	18,51	18,55	18,75
17.	Aab	23,09	23,08	23,19
18.	Tyr	24,96	24,84	24,88
19.	Val	26,32	26,12	25,85
20.	Met	27,70	27,20	27,05
21.	Cys	28,99	28,96	28,97
22.	Hcy(Ala)	30,80	30,40	30,41
23.	Ile	31,97	31,66	31,67
24.	Leu	32,53	32,32	32,05
25.	Phe	33,58	33,81	33,82
26.	Trp	33,96	34,01	34,01
27.	Orn	34,35	34,34	34,35
28.	Lys	35,17	35,18	35,18

Iegūtie rezultāti apliecina, ka standartšķīduma un analizējamā bioloģiskā materiāla izdalīšanas laiki ir salīdzināmi, kas liecina par to, ka smaiļu identitāte hromatogrammā ir atbilstoša. Tā kā analizējamais paraugs ir bioloģiskais materiāls ar sarežģītu matricu hromatogrammā, parādās smailes, kuras neatbilst standartšķīduma parauga hromatogrammai. Līdz ar to kontrolei tika sagatavots asins seruma paraugs (sertificēts references materiāls) ar standartšķīduma standartpiedevu, kas ļauj noteikt, vai visas smailes ir pietiekoši labi atdalītas un atbilstošas. Tas arī papildus apstiprinātu iegūtos rezultātus. 8. pielikumā var redzēt asins seruma parauga un parauga ar pievienotu standartpiedevu hromatogrammu pārklājumu. Kā redzams, smailes sakrīt un kļūda starp analizējamā parauga izdalīšanas laiku un analizējamā parauga ar standartpiedevu izdalīšanas laiku nepārsniedz 2,3% (Arg), kas apliecina smaiļu identitāti, analizējot sarežģītus bioloģiskos materiālus.

### 3.7.2. Linearitāte

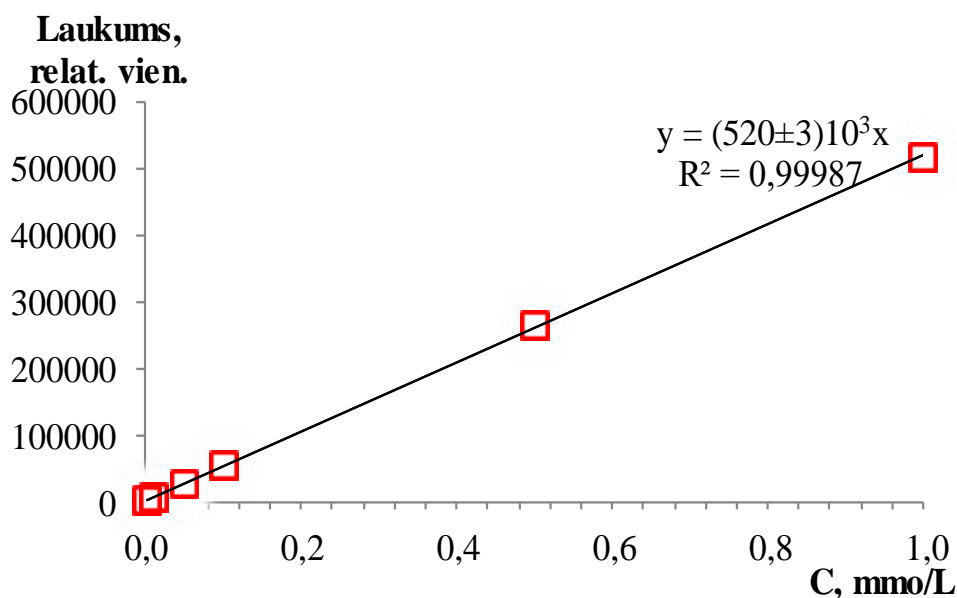
Linearitāte ir tieši proporcionāla sakarība starp analīta signālu un analizējamās vielas koncentrāciju paraugā noteiktā intervālā. Linearitātes atkarību izsaka (3.3) vienādojums:

$$y = ax + b \quad (3.3.)$$

a – taisnes virziena koeficients;

b – brīvais loceklis.

Linearitātes novērtēšanai izmanto arī korelācijas koeficientu, kuram nav jābūt mazākam par 0,990 ( $R^2$ ). Linearitātes pārbaudei ir vairāki iemesli, piemēram, vielu sliktā šķīdība, slikta detektoru jutība zemā koncentrācijā vai arī augstā koncentrācijā. Linearitātes pārbaudei tika sagatavoti seši standartšķīdumi ar dažādām aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu koncentrācijām, sākot ar koncentrāciju detektēšanas robežas intervālā  $0,002 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  līdz koncentrācijai, patoloģiskai cilvēka asins serumam  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Kā vienu no piemēriem 3.49. attēlā var redzēt asparagīnskābes kalibrācijas taisni.



3.49. att. Asparagīnskābes kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.

Visu aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu kvantitatīvai noteikšanai izmantots lineārais kalibrācijas grafiks caur nulles punktu. Visiem analīzes rezultātā noteiktajiem analītiem korelācijas koeficients atbilst uzstādītajām prasībām, kas ir lielāks par 0,990. Visu aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu kalibrācijas grafikus var redzēt 9. pielikumā.

### 3.7.3. Precizitāte

Precizitāte ļauj novērtēt sagaidāmo rezultātu izkliedi starp vairākiem paraugiem analīžu sērijā. Precizitātes noteikšanu var sadalīt divās daļās - aparatūras precizitāte un metodes precizitāte.

Aparatūras precizitātes noteikšanai veic vairākus paralēlus standartšķīduma mērījumus. Aprēķinot rezultātu vidējos lielumus un standartnovirzi, nosaka aparatūras precizitāti. Novērtējot aparatūras precizitāti, kļūda nedrīkst būt lielāka par 1,0 %.

Hromatogrāfa pārbaudei izmantoti standartšķīduma paraugi ar trim dažādām molārām koncentrācijām. Pirmo izmantoja standartšķīdumu ar molāro koncentrāciju tuvu detektēšanas robežai -  $0,002 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , otru ar vidējo koncentrāciju -  $0,100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  un trešā izmantotā parauga koncentrācija ir patoloģiska bioloģiskajam materiālam -  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Katras koncentrācijas standartšķīdumam veiktas desmit paralēlās injekcijas ( $n=10$ ). Kā vienu no piemēriem - asparagīnskābes standartšķīduma smaiļu laukumus - var redzēt 3.14. tabulā.

**Aparatūras precizitātes pārbaude, izmantojot dažādas koncentrācijas standartšķīdumus  
(asparagīnskābe)**

Nr.p.k.	Smailes laukums, relatīvas vērtības		
	0,002 mmol·L <sup>-1</sup>	0,100 mmol·L <sup>-1</sup>	1,000 mmol·L <sup>-1</sup>
1.	1058	53047	51985
2.	1029	53242	52005
3.	994	52857	52485
4.	1047	53894	51786
5.	1008	52984	51427
6.	1068	53227	51687
7.	1032	53409	52088
8.	1057	53024	51851
9.	1021	53878	51628
10.	995	53505	52867
Vidējais	1031	53307	51981
Sn	27	363	425
Sn,r, %	2,6	0,7	0,8

Iegūtie rezultāti apliecina, ka doto aparatūru var uzskatīt par precīzu. Standartnovirze pie vidējas un augstas koncentrācijas nepārsniedz 1,0%, toties strādājot zemās koncentrācijās, aparatūras precizitāte samazinās, kas liecina par to, ka dotā koncentrācija atrodas detektēšanas robežas intervālā un to var tikai konstatēt, nevis noteikt kvantitatīvi. Līdzīga tendence ir novērojama arī pārējiem analīzes rezultātā noteiktajiem aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumiem.

Metodes precizitātes noteikšanai veic vairākas neatkarīgas paraugu paralēlās analīzes, sākot no paraugu sagatavošanas procesa līdz rezultātu iegūšanai. Aprēķina rezultātu vidējos lielumus, standartnovirzi, tādā veidā nosakot metodes precizitāti un atkārtojamību. Lai varētu apgalvot, ka metode ir precīza un sagatavošanas process ir atkārtojams, kļūda nedrīkst pārsniegt 10%.

Metodes precizitātes noteikšanai tika veiktas 10 neatkarīgas bioloģiskā materiāla (sertificēts references materiāls) paraugu analīzes, sākot no paraugu sagatavošanas līdz rezultātu iegūšanai.

Paraugu dublikāti ir nepieciešami nenoteiktības noteikšanai. 10. pielikumā var redzēt visus bioloģiskajā materiālā (sertificēts references materiāls) noteiktos aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumus un iegūtos analīzes rezultātus, kā arī vidējo rezultātu no

diviem paralēliem mērījumiem. 3.15. tabulā ir parādīti analīzes rezultāti bioloģiskajā materiālā: noteikto aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu vidējās koncentrācijas un aprēķinātā standartnovirze.

3.15. tabula

**Metodes precizitātes rezultāti bioloģiskajā materiālā**

Nr.p.k.	Analīts	C vid., $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Sn	Sn, r. %
1.	Asp	47,4	1,8	4
2.	Glu	92,6	2,1	2,3
3.	Hyp	61,2	1,9	3
4.	Ser	151	2,0	1,3
5.	Asn	115	2,4	2,1
6.	Gly	516	8	1,6
7.	Gln	787	6	0,8
8.	Sarkoz	80,3	1,8	2,2
9.	Tau	142	1,7	1,2
10.	His	154	3	2,0
11.	Cit	122	3	2,1
12.	Thr	161	3	1,6
13.	Ala	372	4	1,0
14.	Arg	317	3	0,9
15.	Pro	243	3	1,2
16.	Aab	32,5	1,3	4
17.	Tyr	83,1	1,1	1,4
18.	Val	388	5	1,2
19.	Met	274	3	1,1
20.	Cys	40,0	1,0	2,4
21.	Hcy(Ala)	31,9	1,1	3
22.	Ile	254	3	1,1
23.	Leu	393	4	1,1
24.	Phe	353	5	1,3
25.	Trp	34,1	3	7
26.	Orn	325	4	1,3
27.	Lys	170	3	2

Iegūtie dati apliecina, ka visu neatkarīgi sagatavoto bioloģiskā materiāla paraugu iegūtās vērtības ir līdzīgas, ko apliecina aprēķinu rezultātā iegūtās standartnovirzes. Dati ļauj apgalvot, ka metode ir precīza un sagatavošanas process ir atkārtojams, jo kļūda nevienam no analītiem nepārsniedz 10%. Iegūtie dati ir salīdzināmi ar izmantotajā references materiālā esošajām aminoskābju koncentrācijām, kuras ir atspoguļotas 3.10. tabulā.

#### 3.7.4. Atgūstamība

Atgūstamība ir analīzes rezultātu atbilstība reālam analīta saturam paraugā visā darba koncentrāciju diapazonā. Metodes atgūstamību aprēķina, salīdzinot paraugā pievienotus un atgūtus analizējamās vielas daudzumus. Parasti atgūstamības aprēķinam pagatavo trīs koncentrāciju mākslīgos maisījumus ar zināmām pievienoto analītu koncentrācijām. No iegūtajiem lielumiem aprēķina vidējo atgūstamību pēc 3.4. izteiksmes.

$$A_{vid.} = \frac{A_{atrastais}}{A_{patiesais}} \cdot 100\% \quad (3.4.)$$

$A_{atrastais}$  – analīzes rezultātā iegūtais daudzums;

$A_{patiesais}$  – analīta patiesais daudzums.

Veicot metodes atgūstamības pārbaudi bioloģiskajam materiālam, tika pievienotas standartpiedevas ar zināmām koncentrācijām. Lai iegūtie rezultāti būtu ticami, izvēlētas standartpiedevas ar trīs dažādām koncentrācijām, kuras atradās visā lineārajā diapazonā. Izvēlētas standartpiedevas koncentrācijas ir  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Atgūstamības pārbaudei katram paraugam veiktas 10 neatkarīgas analīzes. 11. pielikumā var redzēt visiem analītiem veiktos atgūstamības aprēķinus. Iegūtos vidējos atgūstamības aprēķinus var redzēt 3.16. tabulā.

**Metodes atgūstamības rezultāti bioloģiskajā materiālā, izmantojot dažādu koncentrāciju standartpiedevas**

Nr.p.k.	Analīts	Atgūstamība, %		
		5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1.	Asp	103	102	101
2.	Glu	104	103	102
3.	Hyp	102	99	101
4.	Ser	105	106	99
5.	Asn	111	105	102
6.	Gly	111	105	104
7.	Gln	104	103	89
8.	Sarkoz	109	103	101
9.	Tau	104	104	102
10.	His	105	107	102
11.	Cit	107	104	102
12.	Thr	93	104	99
13.	Ala	101	104	103
14.	Arg	102	103	101
15.	Pro	99	105	99
16.	Aab	88	98	102
17.	Tyr	103	104	101
18.	Val	101	102	102
19.	Met	101	102	102
20.	Cys	88	104	101
21.	Hcy(Ala)	94	104	100
22.	Ile	102	98	99
23.	Leu	102	104	98
24.	Phe	101	99	101
25.	Trp	83	98	100
26.	Orn	108	102	99
27.	Lys	101	104	100

Atgūstamības kritērijs daudzkomponentu maisījumam ar zemām analītu koncentrācijām ir 80-120%, ar augstām analītu koncentrācijām ir 90-110%.

Veicot atgūstamības pārbaudi, svarīgāk ir izvērtēt rezultātus, iegūtus, izmantojot standartpiedevas šķīdumu ar koncentrāciju  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , jo šī koncentrācija ir tuvāka bioloģiskā parauga normas vērtībai, līdz ar to atspoguļo metodes pareizību. Iegūtie rezultāti apliecina, ka salīdzinoši zema atgūstamība 83% ir vienam analītam, triptofāna fenilizotiocianāta atvasinājumam. Diviem analītiem tā ir 88% un diviem 111%. Pārējiem analītiem atgūstamība nepārsniedz 10%.

Salīdzinoši zemo atgūstamību var izskaidrot ar zemu analītu koncentrāciju. Triptofāna koncentrācija bioloģiskajā paraugā ir  $35,6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\alpha$ -aminosviestskābes koncentrācija ir  $33,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un cistīna koncentrācija ir  $41,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Šīs vērtības ir kalibrācijas taisnes sākumpunktā, kas var ietekmēt iegūtos rezultātus. Neskatoties uz to, aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu atgūstamība atbilst uzstādītajiem kritērijiem daudzkomponentu maisījumam ar zemām analītu koncentrācijām.

Labāka atgūstamība ir paraugiem, izmantojot standartpiedevas šķīdumus ar koncentrācijām  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , jo šo koncentrāciju paraugi atradās kalibrācijas taisnes vidusdaļā. Izņēmums ir L-glutamīns, kura koncentrācija bioloģiskajā paraugā ir  $785 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , līdz ar to, izmantojot standartpiedevas šķīdumus ar koncentrācijām  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , analīta koncentrācija krietni pārsniedz kalibrācijas taisnes augstāko koncentrāciju. Glutamīnam atgūstamība ir 89%. Pārējiem analītiem, izmantojot standartpiedevas šķīdumus gan ar koncentrāciju  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , gan ar koncentrāciju  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , atgūstamība nav zemāka par 98%. Nepieciešamības gadījumā paraugu atšķaida linearitātes diapazona ietvaros. Izvērtējot iegūtos datus, varam apgalvot, ka analītu atgūstamība ir piemērota izstrādātajai metodei.

### 3.7.5. Pareizība

Analītiskās metodes pareizība ir analīzes rezultātā iegūtās vērtības atbilstība vērtībai, kura ir atzīta konkrētajam analītam. Metodes pareizību var noteikt, izmantojot vairākas iespējas:

1. sertificēts references materiāls, kuru ir jāizmanto ar atbilstošu matricu;
2. analīzei izmantotās analītiskās metodes iegūto rezultātu salīdzināšana ar rezultātiem, kuri iegūti ar citu analītisko metodi pie nosacījuma, ka metodei nav traucējošo faktoru ietekmes;
3. starplaboratoriju salīdzinošā testēšana, vienu paraugu analizē vairākas dažādas laboratorijas.

Tā kā bioloģiskā parauga analīzei izmantots sertificēts references materiāls, veicot metodes validāciju pareizības pārbaudei, izvēlēta starplaboratoriju salīdzinošā testēšana. Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā piedalījās 257 laboratorijas no dažādām Eiropas valstīm, kur analītu koncentrācijas noteikšanai izmantoja 10 dažādas kvantitatīvas aminoskābju noteikšanas metodes. Izmantotās metodes ir jonu-apmaiņas hromatogrāfija ar un bez iekšējā standarta, gāzes hromatogrāfija, tandēma masspektrometrija un citas metodes [126]. Viena analīta -  $\alpha$ -aminoizosviestskābes starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas

rezultātu izvērtējumu var redzēt 12. pielikumā. Rezultātu izvērtējuma pārskatā ir atspoguļotas visas izmantojamās metodes un iegūtie rezultāti, strādājot ar tām. Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā izmantojamais paraugs sastāv no 28 analītiem, kuri ir sagatavoti uz bioloģiskā materiāla matricas bāzes. No 28 iekļautajiem analītiem rezultāti netika aprēķināti 4 analītiem (aloizoleicīns, homocitrulīns, fosforetanolamīns un saharopīns), jo tie netika iekļauti metodes izstrādē. Starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas apkopotos rezultātus var redzēt 13. pielikumā. Starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultātu salīdzinājumu ar validējamās metodes iegūtajiem rezultātiem var redzēt 3.17. tabulā.

3.17. tabula

### Starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas (SST) rezultātu izvērtējums

Nr. p.k.	Aminoskābes	Iegūtie rezultāti, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SST rezultāti*, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SST rezultātu sniegtās z-vērtības*	Relatīvā kļūda, %
1.	$\alpha$ -Aminosviestskābe	22,7	22,8 – 29,4	0,4	13
2.	Alanīns	173	149 – 173	1	7
3.	Arginīns	60,3	51,2 – 60,8	1	8
4.	Asparagīns	200	163 – 223	0,3	4
5.	Asparagīnskābe	139	108 – 140	0,9	12
6.	Citrulīns	255	222 – 258	0,8	5
7.	Cistīns	36,3	35,7 – 42,0	0,4	7
8.	Glutamīns	1166	986 – 1206	0,7	6
9.	Glutamīnskābe	250	221 – 291	0,9	13
10.	Glicīns	472	402 – 474	1	8
11.	Histidīns	144	133 – 159	0,1	1
12.	Hidroksiprolīns	64,3	52,2 – 65,8	0,8	9
13.	Izoleicīns	419	416 – 496	1	8
14.	Leicīns	1018	1016 – 1212	1	9
15.	Lizīns	60,1	57,8 – 66,2	0,4	3
16.	Metionīns	36,9	5,80 – 52,2	0,2	27
17.	Ornitīns	29,1	25,4 – 30,6	0,3	4
18.	Fenilalanīns	27,7	22,1 – 27,9	1,4	11
19.	Prolīns	224	173 – 227	1,3	12
20.	Serīns	22,1	20,8 – 25,2	0,3	4
21.	Taurīns	147	138 – 160	0,2	1
22.	Treonīns	159	119 – 348	4,3	21
23.	Tirozīns	241	222 – 244	0,6	3
24.	Valīns	294	267 – 310	0,3	2

\* Starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas sniegtie rezultāti

Izvērtējot iegūtos rezultātus, var redzēt, ka diviem analizējamajiem analītiem metionīnam un treonīnam relatīvā kļūda starp laboratorijā iegūtajiem rezultātiem un starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas vidējiem rezultātiem ir ievērojama: 27% un 21% atbilstoši. Tomēr neskatoties uz to, rezultāti iekļaujas divu standartnoviržu robežās. Tas nozīmē, ka rezultātu izkliede starp visām laboratorijām ir liela, ko arī palielina sniegtās z-vērtības (treonīns 4,3). Pieciem analītiem relatīvā kļūda svārstās no 11% līdz 13%. Pārējiem 17 analītiem relatīvā kļūda ir zem 9%. Visi iegūtie rezultāti iekļaujas divu standartnoviržu robežās. Iegūtie dati ļauj secināt, ka, izmantojot doto analītisko metodi, iegūtie rezultāti ir kvantitatīvi pareizi.

### 3.7.6. Detektēšanas robeža un kvantitatīvās noteikšanas robeža

Detektēšanas robeža (DL) ir mazākā mērāmā lieluma vērtība (koncentrācija, daudzums), kuru var noteikt ar attiecīgo testēšanas metodi, bet nevar novērtēt kvantitatīvi. Savukārt, kvalitatīvās noteikšanas robeža (QL) ir zemākā analizējamās vielas koncentrācija, kuru var noteikt ar pieņemamu metodes precizitāti un pareizību.

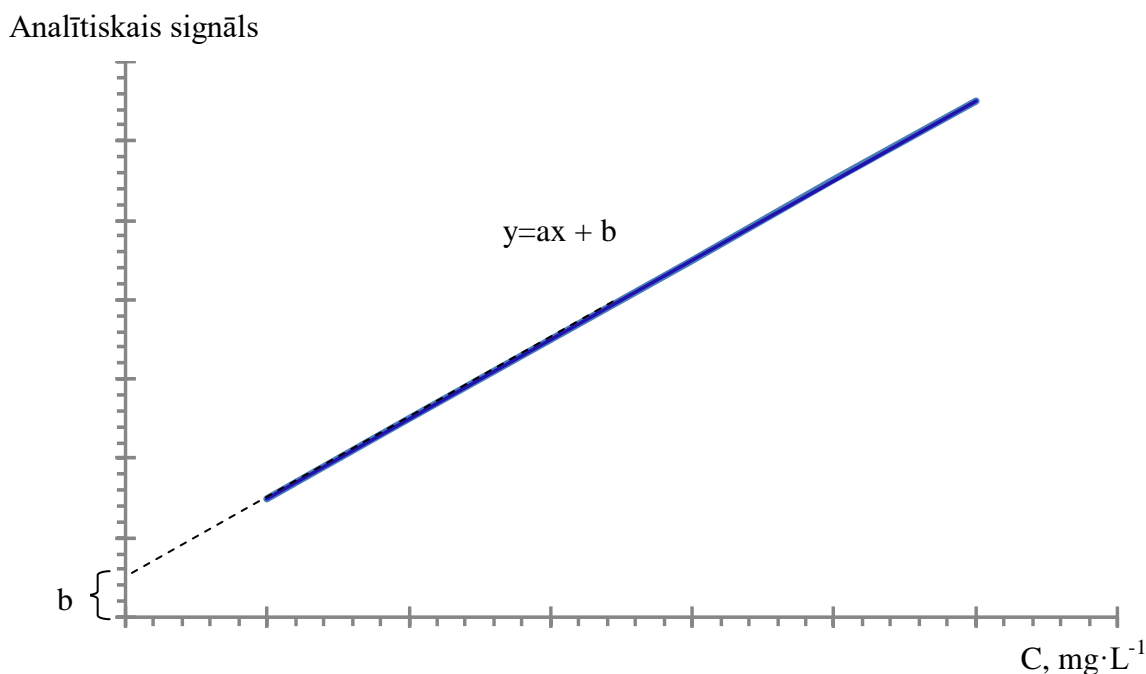
Detektēšanas robežu var noteikt, izmantojot vairākus veidus:

1. Viena no detektēšanas robežas noteikšanas metodēm ir vairāku tukšo paraugu mērīšana. Tukšo paraugu mērīšanu detektēšanas robežas noteikšanai var izmantot tikai tajos gadījumos, ja tukšo paraugu mērījumu standartnovirze nav vienāda ar nulli [132]. Detektēšanas robeža ir trīs tukšo paraugu standartnovirzes, aprēķinu var redzēt 3.5. vienādojumā.

$$DL = 3 \cdot S_n \quad (3.5.)$$

$S_n$  – tukšā parauga standartnovirze

2. Otrā metode ir bāzes līnijas trokšņa un signāla savstarpējā attiecība. Doto metodi var izmantot tajos gadījumos, ja analīzei izmanto metodi, kura uzrāda bāzes līnijas hromatogrammš. Bāzes līnijas trokšņa un signāla attiecību nosaka, salīdzinot parauga signālus ar zemām analītu koncentrācijām un tukšo paraugu signālus, tādā veidā nosakot mazāku noteikšanas koncentrāciju, kuras attiecība ir signāls pret bāzes līnijas troksni attiecībā 3:1. Aprēķināto detektēšanas robežu pārbauda ar noteiktas koncentrācijas standartšķīdumu [132].
3. Nākamā metode detektēšanas robežas noteikšanai ir standartšķīdumu kalibrācijas grafika ekstrapolācija. Šīs metodes darbības princips ir redzams 3.50. attēlā.



3.50. att. Kalibrācijas taisnes ekstrapolācija detektēšanas robežas noteikšanai.

Kalibrācijas grafika konstruēšanai kā pirmo punktu izmanto standartšķīdumu ar koncentrāciju, kura ir pēc iespējas tuvāka detektēšanas robežai. Kalibrācijas taisnes brīvā locekļa  $b$  novirzi no sākumpunkta, kā ir redzams 3.46. attēlā, var uzskatīt par bāzes līnijas troksni. Detektēšanas robežu aprēķina, pareizinoš bāzes līnijas troksni ar trīs. Aprēķināto detektēšanas robežu ir nepieciešams pārbaudīt ar attiecīgās koncentrācijas standartšķīdumu.

4. Plažāk lietota metode detektēšanas robežas noteikšanai ir, izmantojot kalibrācijas taisnes standartnovirzi un kalibrācijas taisnes slīpumu. Kalibrācijas taisne tiek konstruēta, izmantojot punktu, kas atrodas pēc iespējas tuvāk detektēšanas robežai. Šī punkta standartnovirze arī tiek ņemta detektēšanas robežas aprēķināšanai. Detektēšanas robežu aprēķina pēc vienādojuma 3.6.

$$DL = \frac{3,3 \cdot S_n}{a} \quad (3.6.)$$

$S_n$  – standartnovirze;

$a$  – kalibrācijas grafika slīpums.

Kvantitatīvās noteikšanas robežas aprēķināšanai izmanto tās pašas metodes kā detektēšanas robežas noteikšanai. Ir pieņemts, ka kvantitatīvās noteikšanas robeža ir trīs reizes lielāka par detektēšanas robežu. Kvantitatīvās robežas aprēķins redzams 3.7. vienādojumā.

$$QL = \frac{10 \cdot S_n}{a} \quad (3.7.)$$

Detektēšanas robežas aprēķināšanai izmantota tukšā parauga metode. Katrā paraugu sērijā veikta tukšā parauga analīze, kas ļauj pārbaudīt reaģentu un analīzes darba gaitas ienestos piesārņojumus. Tukšie paraugi sagatavoti un analizēti identiski bioloģiskajiem paraugiem. Tukšo paraugu mērījumu rezultāti izmantoti metodes detektēšanas robežas un kvantitatīvās noteikšanas robežas aprēķināšanai. 14. pielikumā var redzēt desmit neatkarīgus tukšo paraugu mērījumus. Balstoties uz tiem, aprēķinātas detektēšanas robežas un kvantitatīvās noteikšanas robežas. 3.18. tabulā var redzēt detektēšanas robežas un kvantitatīvās noteikšanas robežas iegūtos rezultātus.

3.18. tabula

**Metodei noteiktas detektēšanas robežas (DL) un kvantitatīvās noteikšanas robežas (QL)**

Nr.p.k.	Analīts	DL, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	QL, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
1.	Asp	2,1	7
2.	Glu	3	8
3.	Hyp	1,3	4
4.	Ser	2,0	7
5.	Asn	1,9	6
6.	Gly	0,7	2
7.	Gln	1,7	6
8.	Sarkoz	1,0	3
9.	Tau	1,7	6
10.	His	2,0	7
11.	Cit	1,0	3
12.	Thr	4	14
13.	Ala	3	8
14.	Arg	1,7	6
15.	Pro	1,0	3
16.	Aab	1,2	4
17.	Tyr	3	9
18.	Val	1,7	6
19.	Met	3	10
20.	Cys	1,9	6
21.	Hcy(Ala)	1,7	6
22.	Ile	1,5	5
23.	Leu	3	9
24.	Phe	2,3	8
25.	Trp	1,7	6
26.	Orn	3	10
27.	Lys	2,4	8

### 3.7.7. Metodes nenoteiktība

Metodes nenoteiktība ir ar mērījumu rezultātu saistīts parametrs, kuru var attiecināt uz mērāmo lielumu un kas raksturo tā vērtības izkliedi. Šis parametrs var būt mērījumu rezultātu standartnovirze vai drošības intervāls. Metodes nenoteiktības aprēķini ļauj novērtēt kļūdas avotus, kuri ir pieļauti analīzes laikā, tas ir, pārbaudīt precizitāti paraugu sērijā un identificēt instrumentu radīto novirzi. Viena no metodes relatīvās standarta nenoteiktības aprēķināšanas iespējām ir, izmantojot iekšējās kvalitātes kontroles materiālu. Aprēķināšanai ir nepieciešami vismaz desmit neatkarīgi kontroles materiāla paralēli mērījumi [133]. Aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka asins serumā izmantots asins seruma references materiāls, kur analītu vērtības ir atspoguļotas 3.10. tabulā. Vienādojums 3.8. atspoguļo relatīvu standarta nenoteiktības aprēķinu.

$$u = 2 \cdot CV \quad (3.8.)$$

kur  $u_c$  – metodes relatīvā standarta nenoteiktība;

CV – variācijas koeficients novērtēts pēc relatīvās izkļiedes dienā;

Variācijas koeficientu aprēķina pēc 3.9. vienādojuma

$$CV = \frac{r}{d_2} \quad (3.9.)$$

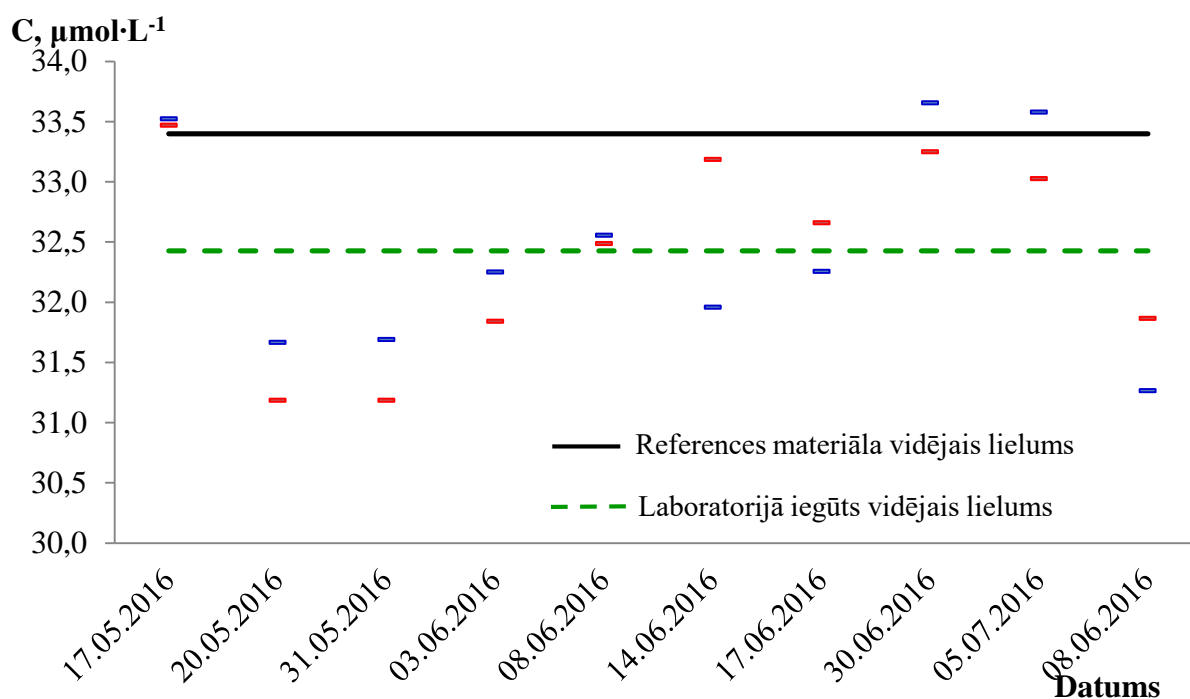
kur  $r$  – relatīvā kļūda diviem paralēliem mērījumiem, %

$$r = \frac{x_1 - x_2}{x_{vid.}} \cdot 100\% \quad (3.10.)$$

$$x_{vid.} = \frac{x_1 + x_2}{2} \quad (3.11.)$$

kur  $d_2$  – divu paralēlu mērījumu koeficients ( $d_2 = 1,128$ )

Izstrādātajai metodei tika aprēķināta relatīvā standarta nenoteiktība, jo lielākajai daļai nosakāmo analītu vērtības ir ar vidējām vai augstām koncentrācijām. Metodes nenoteiktības aprēķinam katrā paraugu sērijā veiktas paraugu dublikātu analīzes. Kā piemēru  $\alpha$ -aminosviestskābes R-grafiku var redzēt 3.51. attēlā.



3.51. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam –  $\alpha$ -aminosviestskābei.

Dotais R – grafiks labi atspoguļo analīta izkliedi starp paralēliem mērījumiem. Metodes relatīvā standarta nenoteiktība aprēķināta pēc 3.12 vienādojuma, vienu piemēru var apskatīt zemāk.

$$C_{vid.} = \frac{33,521\mu\text{mol} / L + 33,469\mu\text{mol} / L}{2} = 33,495\mu\text{mol} / L \quad (3.12)$$

$$r = \frac{33,521\mu\text{mol} / L - 33,469\mu\text{mol} / L}{33,495\mu\text{mol} / L} \cdot 100\% = 0,157\% \quad (3.13)$$

$$CV = \frac{0,157\%}{1,128} = 0,139\% \quad (3.14)$$

$$u_c = 2 \cdot 0,139\% = 0,278\% \quad (3.15)$$

$\alpha$ -Aminosviestskābes relatīvās standarta nenoteiktības aprēķinus var secīgi apskatīt 3.19. tabulā.

**$\alpha$ -Aminosviestskābes nenoteiktības aprēķini**

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	33,5	33,5	33,5	0,16	0,3	2,6
20.05.2016	31,7	31,2	31,4	1,5	3	
31.05.2016	31,7	31,2	31,4	1,6	3	
03.06.2016	32,2	31,8	32,0	1,3	2	
08.06.2016	32,6	32,5	32,5	0,21	0,4	
14.06.2016	32,0	33,2	32,6	4	7	
17.06.2016	32,3	32,7	32,5	1,3	2	
30.06.2016	33,7	33,2	33,5	1,2	2	
05.07.2016	33,6	33,0	33,3	1,7	3	
08.06.2016	31,3	31,9	31,6	1,9	3	

Tādā pašā veidā tika aprēķinātas arī citu analītu relatīvās standarta nenoteiktības bioloģiskajā materiālā. Aprēķinātās relatīvās standarta nenoteiktības un paplašinātās nenoteiktības ir redzamas 3.20. tabulā

**Metodes nosakāmo analītu iegūtās relatīvās standarta ( $u_c$ ) un paplašinātās (U)  
nenoteiktības bioloģiskajā materiālā**

Nr.p.k.	Aminoskābes	$u_c$ vid, %	U, %
1.	Asp	2,1	4
2.	Glu	2,1	4
3.	Hyp	2,8	6
4.	Ser	2,5	5
5.	Asn	2,3	5
6.	Gly	2,6	5
7.	Gln	2,9	6
8.	Sarkoz	3,5	7
9.	Tau	3,2	6
10.	His	3,4	7
11.	Cit	4,7	9
12.	Thr	2,4	5
13.	Ala	3,6	7
14.	Arg	3,5	7
15.	Pro	3,7	7
16.	Aab	2,6	5
17.	Tyr	2,5	5
18.	Val	2,7	5
19.	Met	2,6	5
20.	Cys	2,7	5
21.	Hcy(Ala)	6,3	13
22.	Ile	3,1	6
23.	Leu	3,6	7
24.	Phe	2,8	6
25.	Trp	2,8	6
26.	Orn	2,9	6
27.	Lys	3,0	6

Kā redzams 3.20. tabulā, iegūtās analītu relatīvās standarta nenoteiktības ir nedaudz lielākas par references materiāla sniegtajām absolūtajām nenoteiktības vērtībām (3.10. tabula), tomēr tās ir salīdzināmas. Veicot metodes validāciju, ievērojami augstākas nenoteiktības vērtības ir iegūtas četriem aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumiem:  $\alpha$ -aminosviestskābei, cistationīnam, cistīnam un tirozīnam. To var izskaidrot ar šo analītu zemo koncentrāciju, kā arī references materiāla zemām nenoteiktības vērtībām. Iegūto mērījumu nenoteiktību cēloņi varēja rasties hromatogrāfijas eluentu gatavošanas procesā, paraugu derivatizācijas procesā, protams, jāņem vērā arī izpildījuma nenoteiktība.

Tā kā metodes validācijai izmantots tikai asins seruma references materiāls, turpmāk veicot rutīno paraugu analīzi, nenoteiktības būs jāaprēķina, izmantojot dažādus cilvēka bioloģiskā materiāla paraugus (asins plazma un urīns) dažādām vecuma grupām. Izmantojot R- grafiku, varēs aprēķināt nenoteiktību, kura būs labāk piemērota izstrādātajai analīzes metodei.

### 3.7.8. Robustums

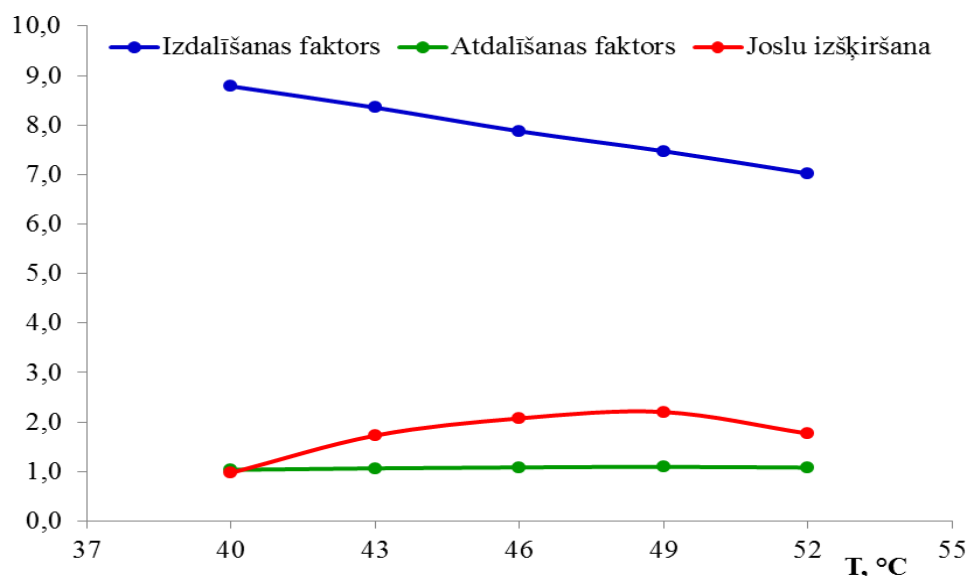
Robustums raksturo analīzes metodes drošību, spēju analīzes metodei palikt stabilai, mainoties dažiem parametriem, kas var rasties darba gaitā. Izveidojot metodi, ir jāpārbauda parametri, kuri var mainīties ikdienas darbā. Tipiskie parametri robustuma pārbaudei hromatogrāfijas metodei ir:

- kustīgās fāzes pH;
- kolonnas temperatūra;
- detektēšanas viļņa garums (izmantojot UV detektoru);
- paraugu stabilitāte uzglabāšanas laikā;
- hromatogrāfijas sistēmā ievadītā parauga daudzums [130-132].

Metodes pārbaudei aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka asins serumā veikti vairāki robustuma testi.

Kolonnas temperatūras izmaiņu ietekmi pārbaudīja, izmantojot iepriekš izvēlētos hromatogrāfijas apstākļus: *Pico Tag C18* 3,9 mm x 300 mm kolonna, daļiņu izmērs 4 μm, plūsmas ātrums 1 mL·min<sup>-1</sup>, detektēšana pie 254 nm, ievadīto paraugu tilpums 10 μL, A eluents nātrija acetāta trihidrāta bufferšķīdums pH 4,6, B eluents 3/2 (v/v) (acetonitrils/ūdens) (2.3.4. nodaļa), segmentētais gradients atspoguļots 3.42. attēlā. 16. pielikumā var redzēt asins seruma standarta references materiālā uzņemtās hromatogrammas, strādājot ar dažādām kolonnas temperatūrām; 40 °C, 43°C, 49 °C un 52 °C. Asins seruma references materiāla hromatogramma, strādājot ar kolonnas temperatūru 46°C, ir redzama 7. pielikumā. Robustuma pārbaudei veikti katra mērījuma trīs atkārtojumi.

Izmantojot iegūtos datus, veikti aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības aprēķini atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām. Viena aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājuma, α-aminosviestskābes iegūtos rezultātus var redzēt 3.52. attēlā.



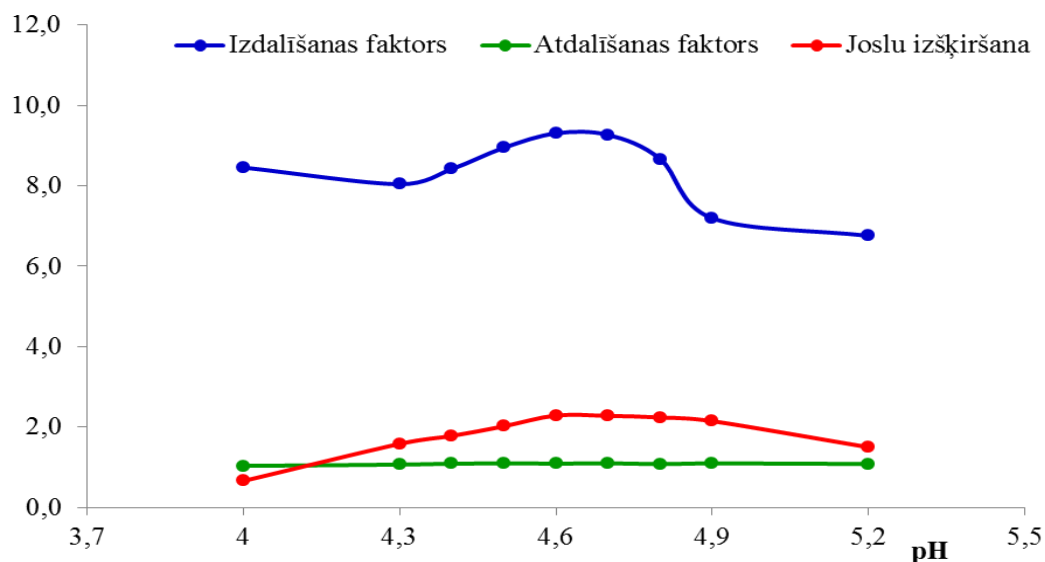
**3.52.att.  $\alpha$ -Aminosviestskābes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.**

Pārējo aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu iegūto izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības aprēķinu atkarība no kolonnas temperatūras izmaiņām ir redzama 17. pielikumā. Kā redzams no iegūtajiem datiem, kolonnas temperatūras izmaiņas atstāj vismazāko iespaidu uz atdalīšanas faktoru, kurš būtiski nemainās atkarībā no kolonnas temperatūras svārstībām. Savukārt, var novērot tendenci, ka izdalīšanas faktors samazinās, paaugstinoties kolonnas temperatūrai. Joslu izšķiršana ir atkarīga no kolonnas temperatūras svārstībām, tomēr vienota tendence nav novērojama. Temperatūras svārstības atstāj dažādu iespaidu uz katru aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu. Pēc literatūras datiem, labai metodes joslu izšķiršanai starp vienādas koncentrācijas smailēm ir jābūt virs 1,5, starp dažādas koncentrācijas smailēm - vienādei ar 2 [7]. Aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu kvantitatīvajai aprēķināšanai ir izmantota iekšējā standarta metode. Līdz ar to ir būtiski pārbaudīt iekšējā standarta izdalīšanas parametrus atkarībā no dažādām svārstībām. Veicot robustuma testu, var redzēt, ka iekšējā standarta joslu izšķiršana ar arginīna joslu, paaugstinoties temperatūrai, palielinās, toties pēc izmantotās metodes rekomendējamās temperatūras 46 °C tā ir 1,73. Ņemot vērā, ka joslu koncentrācijas ir tuvas, joslu izšķiršana starp iekšējo standartu un arginīnu ir apmierinoša. Paaugstinoties temperatūrai, joslu izšķiršana starp iekšējo standartu un prolīnu, tieši pretēji, samazinās. Pie temperatūras 46 °C tā ir 5,73.

Nākamajā eksperimentā tika veikts pētījums, kā hromatogrāfijas parametrus ietekmēs eluentu pH vērtības. Hromatogrāfijas apstākļi: *Pico Tag C18* 3,9 mm x 300 mm kolonna,

daļiņu izmērs 4  $\mu\text{m}$ , plūsmas ātrums 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , detektēšana pie 254 nm, ievadīto paraugu tilpums 10  $\mu\text{L}$ , kolonnas temperatūra 46  $^{\circ}\text{C}$ . Hromatogrāfijas izdalīšanas parametru izmaiņas pārbaudītas, mainot eluentu pH vērtības no 4,0 līdz pH 5,2. Robustuma pārbaudei veikti katra mērījuma trīs atkārtējumi.

3.53. attēlā var redzēt  $\alpha$ -aminosviestskābes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām. Pārējo aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarība no eluenta pH vērtības ir atspoguļotas 18. pielikumā.

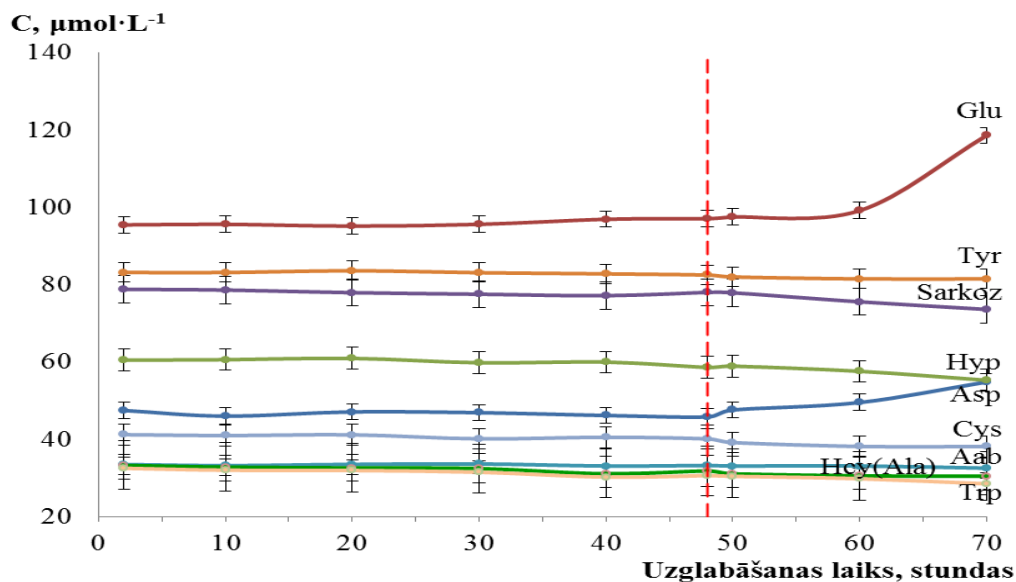


3.53. att.  $\alpha$ -Aminosviestskābes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.

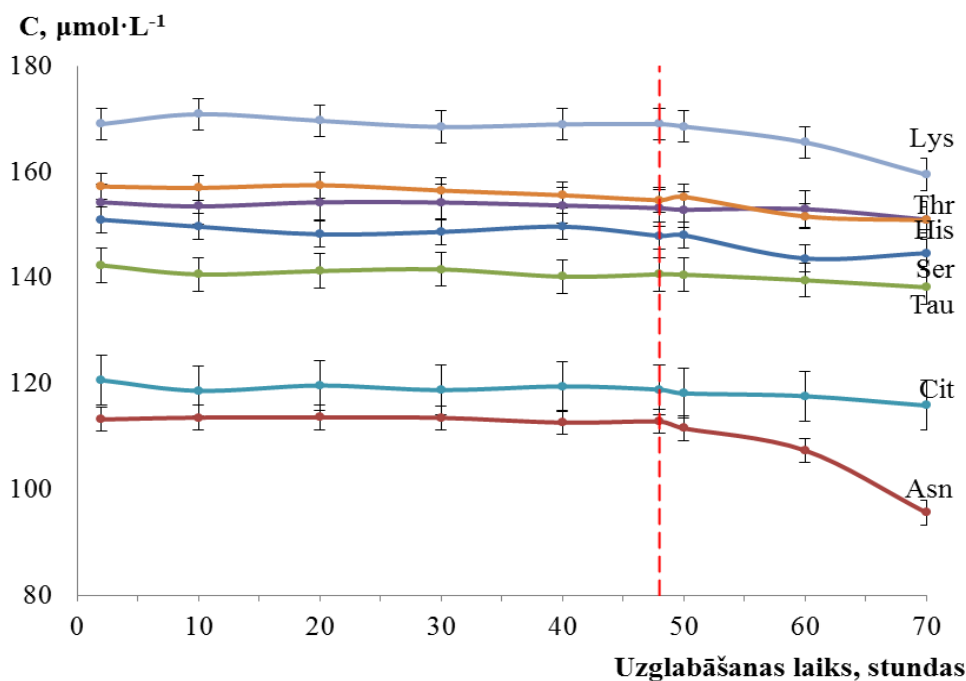
Iegūtie dati apliecina, ka eluentu pH izmaiņas atstāj lielāku iespaidu uz izdalīšanas faktoru, kura vērtība pārsvarā visiem aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumiem izteikti pieaug pie eluentu pH vērtības 4,6. Mazāku iespaidu pH vērtība atstāj uz joslu izšķiršanu, toties tendence rāda, ka tā ir lielāka pie pH 4,6. Uz atdalīšanas faktoru, tāpat kā kolonnas temperatūra, arī eluentu pH vērtība neatstāj būtisku iespaidu. Iekšējā standarta un arginīna smaiļu joslu izšķiršana ir 1,90 un iekšējā standarta un prolīna joslu izšķiršana ir 5,89. Iegūtie dati apliecina, ka izstrādāta metode ir izmantojama aminoskābju fenilizotiocianāta derivātu kvantitatīvajai noteikšanai.

Nākamais robustuma tests ir parauga stabilitātes pārbaude. Strādājot ar fenilizotiocianāta derivatizācijas metodi, prognozējamā parauga stabilitāte ir līdz 48 stundām, uzglabājot paraugu +2  $^{\circ}\text{C}$  - +8  $^{\circ}\text{C}$ . Analītu stabilitāte, uzglabājot paraugu ilgāk par 48

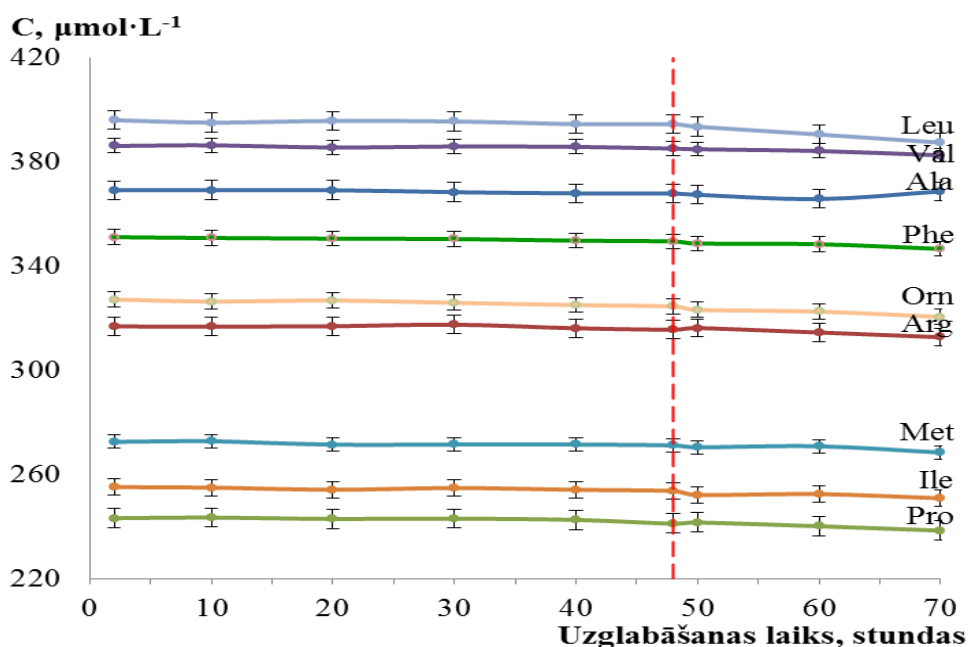
stundām, ar koncentrāciju zem  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ir redzama 3.54. attēlā, ar koncentrāciju no  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  līdz  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ir redzama 3.55. attēlā, ar koncentrāciju no  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  līdz  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ir redzama 3.56. attēlā un 3.57. attēlā ir redzama ar koncentrāciju virs  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .



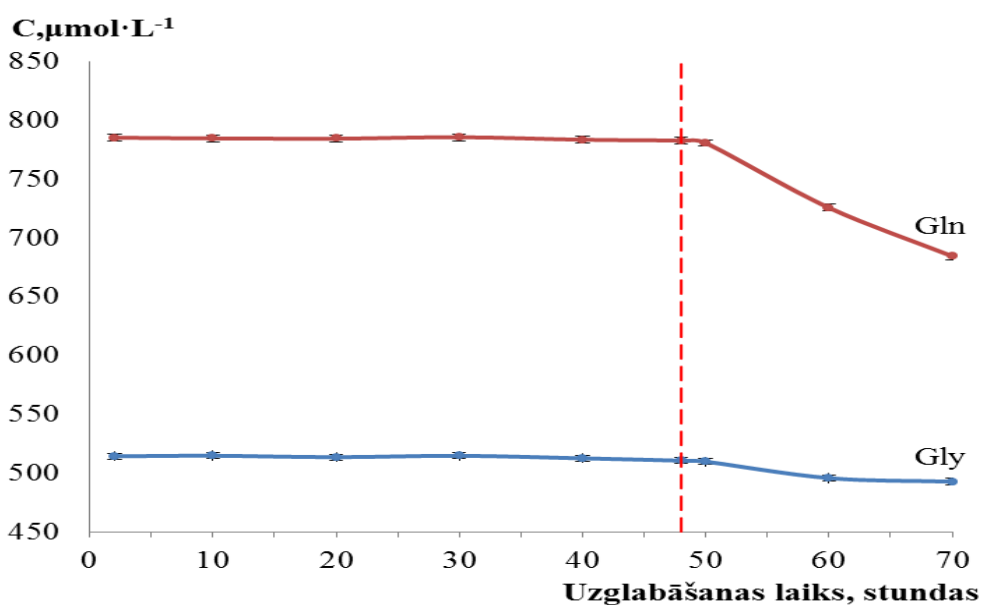
3.54. att. Aminokābju fenilizotiocianāta atvasinājumu koncentrāciju izmaiņas asins seruma references materiālā, uzglabājot sagatavoto paraugu ilgāk par 48 stundām (analītu koncentrācijas zem  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).



3.55. att. Aminokābju fenilizotiocianāta atvasinājumu koncentrāciju izmaiņas asins seruma references materiālā, uzglabājot sagatavoto paraugu ilgāk par 48 stundām (analītu koncentrācijas no  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  līdz  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).



3.56 att. Aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu koncentrāciju izmaiņas asins seruma references materiālā, uzglabājot sagatavoto paraugu ilgāk par 48 stundām (analītu koncentrācijas no  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  līdz  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).



3.57. att. Aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu koncentrāciju izmaiņas asins seruma references materiālā, uzglabājot sagatavoto paraugu ilgāk par 48 stundām (analītu koncentrācijas virs  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Kā redzams no iegūtajiem datiem, dažiem aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumiem stabilitāte krasi mainās, uzglabājot paraugu ilgāk par 48 stundām. Krasi samazinās asparagīna un glutamīna koncentrācijas, savukārt, paaugstinās asparagīnskābes un glutamīnskābes koncentrācijas. Pēc literatūras datiem, uzglabājot paraugu ilgāku laiku,

asparagīns pārveidojas par asparagīnskābi un glutamīns par glutamīnskābi, ko var redzēt arī dotajā pētījumā [126-129]. Ir manāma arī treonīna un lizīna ievērojamāka koncentrācijas samazināšanās. Pārējo aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu koncentrācijas izmaiņas nav tik būtiskas, tomēr neliela analītu koncentrācijas samazināšanās ir manāma, ko var izskaidrot ar aminoskābju fenilzotiocianāta atvasinājumu degradāciju. No tā var secināt, ka analīzei izmantojamajam bioloģiskajam materiālam ir jābūt svaigi ņemtam, kā arī pareizi transportētam un uzglabātam laboratorijā.

Analizējot robustuma testa iegūtos rezultātus var secināt, ka lielāku iespaidu uz analīzes metodi atstāj paraugu nepareiza uzglabāšana, kuras rezultātā dažu atsevišķu aminoskābju koncentrācijas strauji samazinās, savukārt citu aminoskābju koncentrācijas palielinās. Kolonnas temperatūras svārstības un eluentu pH līmeņa svārstības lielāku iespaidu atstāj uz analītu izdalīšanas faktoru. Apkopotus robustuma testa rezultātus var redzēt 3.21. tabulā.

3.21. tabula

#### Robustuma testa iegūto rezultātu apkopojums

Analizētie parametri	Iegūtais rezultāts
AEŠH kolonnas temperatūras	46 °C
Izmantotu eluentu pH vērtība	pH 4,6
Parauga stabilitāte	48 stundas

Iegūtie rezultāti apliecina, ka metode nav robusta un ir nepieciešams ievērot uzstādītas prasības. Paraugu stabilitāte 48 stundu laikā ir augsta, kas ļauj izmantot izstādāto metodi testēšanas laboratorijās.

### 3.8. Izstrādātās aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu noteikšanas metodes cilvēka bioloģiskajos materiālos salīdzinājums ar laboratorijā izmantojamo “WATERS” metodi

Mūsdienās aizvien plašāk augstefektīvā šķidrumu hromatogrāfija tiek aizvietota ar jaunākām tehnoloģijām un iespējam. Viena no tām ir ultra efektīvā šķidruma hromatogrāfijas metode, kurai ir vairākas priekšrocības: īsāks analīzes laiks, labāka jūtība, selektivitāte u.c. Zinātniskajā literatūra ir pietiekoši plaši aprakstīta aminoskābju noteikšana izmantojot ultra efektīvās šķidruma hromatogrāfijas iespējas. Strādājot ar bioloģisko materiālu, ir jāņem vērā ka tā kvantitatīvs un kvalitatīvs sastāvs ir mainīgs. Analizējamo vielu skaits ir pietiekoši liels,

kā arī paša materiāla matrica ir sarežģīta, tāpēc ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija netiek izmantota aminoskābju sastāva noteikšanai cilvēka bioloģiskajos materiālos. To apliecina arī Eiropā esošo laboratoriju praksē [126]. Izmantojamās analīzes metodes ir redzamas 12. Pielikumā. Vēsturiski VSIA „Bērnu klīniskās universitātes slimnīcas” Ģenētiskās bioķīmijas laboratorija aminoskābju fenilizotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka bioloģiskajos materiālos izmanto firmas “WATERS” piedāvāto metodi [134].

Pētījuma laikā izstrādātajai metodei ir vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar “WATERS” piedāvāto metodi gan no analīžu veikšanai patērētā laika viedokļa, gan no analīžu izmaksu viedokļa.

Pirmkārt, lai varētu salīdzināt metožu raksturlielumus, tika salīdzināti svarīgākie metodes validācijas parametri. Otrkārt, salīdzināta pati hromatogrāfijas metode un tās darba režīmi.

#### Metožu raksturlielumi:

- Metodes specifiskums: abos gadījumos metodes specifiskumu nodrošina paraugu sagatavošanas metode – fenilizotiocianāta derivatizācija, kura abām metodēm notiek pēc vienāda algoritma - aprakstīta eksperimentālajā daļā (2.4.).
- Linearitāte: abām metodēm ir uzstādītas vienādas prasības attiecībā uz linearitāti. Aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu kvantitatīvajai noteikšanai izmantots lineārais kalibrācijas grafiks caur nulles punktu ar korelācijas koeficientu ne mazāku par 0,990. Izstrādātās metodes iegūtie korelācijas koeficienti un “WATERS” metodes korelācijas koeficienti ir atspoguļoti 3.22. tabulā. Kā var secināt no iegūtajiem datiem, abu metožu analītu linearitātes ir salīdzināmas.

## Izstrādātās metodes un "WATERS" metodes linearitātes salīdzinājums

Nr.p.k.	Analīts	Izstrādātās metodes korelācijas koeficienti	"WATERS" metodes korelācijas koeficienti
1.	Aab	0,998	0,995
2.	Ala	0,9986	0,997
3.	Arg	0,993	0,998
4.	Asn	0,9996	0,9992
5.	Asp	0,9998	0,9992
6.	Cit	0,9986	0,9987
7.	Cys	0,998	0,9993
8.	Gln	0,9994	0,998
9.	Glu	0,9997	0,996
10.	Gly	0,997	0,992
11.	Hcy(Ala)	0,9987	0,9994
12.	His	0,9998	0,9986
13.	Hyp	0,9998	0,9987
14.	Ile	0,9991	0,996
15.	Leu	0,9998	0,9988
16.	Lys	0,997	0,998
17.	Met	0,9994	0,995
18.	Orn	0,997	0,997
19.	Phe	0,9996	0,9987
20.	Pro	0,9993	0,9991
21.	Sarkoz	0,995	0,998
22.	Ser	0,9986	0,9991
23.	Tau	0,9992	0,9989
24.	Thr	0,997	0,996
25.	Trp	0,9994	0,9992
26.	Tyr	0,998	0,9986
27.	Val	0,9991	0,9987

- Precizitāte: "WATERS" metodes uzstādītās prasības pret rezultātu precizitāti ir 15%. Izstrādātajā metodē tika izvirzītas divas precizitātes prasības, tas ir, aparatūras precizitāte, kura nedrīkst pārsniegt 1,0 % un metodes precizitāte, kura nedrīkst pārsniegt 10%. Iegūtie izstrādātās metodes precizitātes rezultāti bioloģiskajā materiālā salīdzinājumā ar "WATERS" metodes precizitātes rezultātiem ir redzami 3.23. tabulā.

## Izstrādātās metodes un "WATERS" metodes precizitātes salīdzinājums.

Nr.p.k.	Analīts	Izstrādātās metodes precizitāte, %	"WATERS" metodes precizitāte, %
1.	Aab	4	4
2.	Ala	2,3	3
3.	Arg	3	3
4.	Asn	1,3	5
5.	Asp	2,1	5
6.	Cit	1,6	4
7.	Cys	0,8	2,4
8.	Gln	2,2	6
9.	Glu	1,2	8
10.	Gly	2,0	6
11.	Hcy(Ala)	2,1	4
12.	His	1,6	7
13.	Hyp	1,0	4
14.	Ile	0,9	4
15.	Leu	1,2	9
16.	Lys	4	4
17.	Met	1,3	4
18.	Orn	1,1	6
19.	Phe	1,1	1,4
20.	Pro	2,4	4
21.	Sarkoz	3	3
22.	Ser	1,1	4
23.	Tau	1,1	4
24.	Thr	1,3	5
25.	Trp	7	12
26.	Tyr	1,3	3
27.	Val	1,6	4

Abos gadījumos metodes precizitāte tika aprēķināta, izmantojot references materiālu (liofilizētu cilvēka asins serumu). Iegūtie izstrādātās metodes precizitātes rezultāti ir salīdzināmi ar "WATERS" metodes precizitātes rezultātiem. "WATERS" metodes precizitātes rezultātu izkliede ir nedaudz lielāka, ko varētu izskaidrot ar lielāku paraugu skaitu un ilgāku laika periodu metodes validācijas procesā, kurā nedaudz mainījās dažādi hromatogrāfijas apstākļi, kā, piemēram, kolonnas. Kopumā abu metožu aprēķinātās precizitātes atbilst izvirzītajām prasībām.

- Atgūstamība: izstrādātās un “WATERS” metodes atgūstamību nav korekti salīdzināt, jo “WATERS” metodes atgūstamības aprēķināšanai izmantoti starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas paraugi, kuri pēc būtības ir bioloģiskais materiāls ar pievienotu zināmās koncentrācijas analītu daudzumu, savukārt izstrādātajā metodē izmantoti standartšķīdumi. Turklāt izstrādātās metodes atgūstamība tika pārbaudīta, izmantojot trīs dažādas koncentrācijas standartpiedevas. Tomēr jāatzīst, ka abu metožu aprēķinātās atgūstamības atbilst uzstādītajiem kritērijiem, atbilstoši kuriem daudzkomponentu maisījumam ar zemām analītu koncentrācijām atgūstamībai ir jābūt 80-120%, ar augstām analītu koncentrācijām - 90-110%.
- Pareizība: abu metožu pareizības aprēķināšanai izmantoti starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas rezultāti. Starplaboratoriju salīdzinošajā testēšanā piedalījās 257 laboratorijas no dažādām Eiropas valstīm. Izstrādātās metodes un “WATERS” metodes pareizības rezultāti ir redzami 3.24. tabulā. Izmantojamo analītu secība atbilst to koncentrācijas palielināšanai.

## Izstrādātās metodes un "WATERS" metodes pareizības salīdzinājums

Nr.p.k.	Aminoskābes	Izstrādātās metodes relatīvā kļūda, %	"WATERS" metodes relatīvā kļūda, %
1.	Ser	1	4
2.	Aab	13	5
3.	Phe	11	8
4.	Orn	4	3
5.	Cys	7	5
6.	Met	30	12
7.	Lys	3	3
8.	Arg	8	2
9.	Hyp	9	5
10.	Asn	4	4
11.	His	1	3
12.	Tau	1	5
13.	Thr	21	19
14.	Ala	7	3
15.	Asp	12	16
16.	Pro	12	6
17.	Tyr	3	1
18.	Gln	6	5
19.	Cit	5	5
20.	Val	2	3
21.	Ile	8	7
22.	Gly	8	4
23.	Leu	9	11
24.	Glu	13	19

Kā var redzēt, relatīvās kļūdas abu metožu pareizības rezultātiem ir salīdzināmas, kas liecina par to, ka izstrādātās metodes iegūtie rezultāti ir kvantitatīvi pareizi.

- Detektēšanas un kvantitatīvās noteikšanas robežas: veicot aminoskābju noteikšanu bioloģiskajā materiālā, metodes detektēšanas un kvantitatīvās noteikšanas robežas nav tik būtiskas, jo vesela cilvēka aminoskābju koncentrācijas ir salīdzinoši augstas. Iedzimto metabolo traucējumu gadījumā kādas atsevišķas aminoskābes vai aminoskābju grupas koncentrācijas ievērojami palielinās. Līdz ar to būtiskāk noteikt metodes kvalitatīvās noteikšanas robežu, jo tā ir zemākā analizējamās vielas koncentrācija, kuru var noteikt ar pieņemamu metodes precizitāti un pareizību. Izstrādātās metodes aprēķinātās kvalitatīvās noteikšanas robežas (3.18. tabula) ir

ievērojami zemākas par vesela cilvēka aminoskābju normas zemāko vērtību. “WATERS” metodei kvantitatīvās noteikšanas robežas netika aprēķinātas.

- Metodes nenoteiktība: izstrādātās metodes un “WATERS” metodes paplašinātās nenoteiktības ir atspoguļotas 3.25. tabulā. Metožu nenoteiktību starpība visiem analītiem nepārsniedz 2 %, izņemot Arginīnu (3,9 %) un Citrulīnu (12,9 %).

3.25. tabula.

**Izstrādātās metodes un “WATERS” metodes paplašinātās nenoteiktības bioloģiskajā materiālā**

Nr. p.k.	Aminoskābes	Izstrādātās metodes paplašinātā nenoteiktība, %	“WATERS” metodes paplašinātā nenoteiktība, %
1.	Aab	4	5
2.	Ala	4	4
3.	Arg	6	2
4.	Asn	5	
5.	Asp	5	3
6.	Cit	5	18
7.	Cys	6	5
8.	Gln	7	7
9.	Glu	7	7
10.	Gly	7	13
11.	Hcy(Ala)	9	11
12.	His	5	7
13.	Hyp	7	6
14.	Ile	7	6
15.	Leu	7	6
16.	Lys	5	4
17.	Met	5	4
18.	Orn	6	5
19.	Phe	5	6
20.	Pro	5	4
21.	Sarkoz	13	11
22.	Ser	6	6
23.	Tau	7	5
24.	Thr	6	6
25.	Trp	7	4
26.	Tyr	8	5
27.	Val	6	5

Tā kā izstrādātās metodes validācija veikta asins serumā, turpmāk veicot rutīnu paraugu analīzi, metodes validāciju būs jāpapildina, izmantojot dažādus reālus cilvēka

bioloģiskā materiāla paraugus (asins plazma un urīns) dažādām vecuma grupām. Toties, izvērtējot izstrādātās metodes validācijas parametru salīdzinājumu ar “WATERS” izmantojamo metodi, var apgalvot, ka analīžu mērījumu kvalitāte izstrādātajai metodei ir atbilstoša testēšanas laboratorijas prasībām un ir salīdzināma ar “WATERS” metodes datiem. To var izmantot praktiskiem nolūkiem, aizvietojot esošo “WATERS” metodi.

#### Hromatogrāfijas metode un tās apstākļi

Veicot izstrādātās un “WATERS” metodes salīdzinājumu no hromatogrāfijas aspekta, var redzēt vairākas nepārprotamas priekšrocības. Izstrādātās metodes hromatogrāfijas laiks ir gandrīz uz pusi īsāks. Ja “WATERS” metodes hromatogrāfijas laiks ir 65 min, tad izstrādātās metodes hromatogrāfijas laiks ir 35 min. Tā kā abās metodēs ir izmantojamas vienādas hromatogrāfijas kolonnas, kopējais aminoskābju spektra noteikšanas laiks ir samazinājies par 30 minūtēm. Attiecīgi arī patērēto eluentu daudzums uz vienu analīzi, ar plūsmu  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , ir par 30 mL mazāks. Šīs izmaksas var skaitīt ne tikai no patērēto eluentu daudzuma uz vienu analīzi, bet arī jāņem vērā, ka ir mazāks eluentu daudzums ķīmisko atkritumu utilizācijai.

Strādājot ar “WATERS” metodi, ir izmantojami oriģināli “WATERS” komerciāli nopērkami eluenti, kas ir nepārprotami dārgāki nekā eluenti, kas gatavoti laboratorijā. Tā kā uz hromatogrāfijas eluentiem nav standartvielas un tiem nav nepieciešama izsekojamība, medicīniskajās laboratorijās tos var gatavot uz vietas. Apkopojot pētījuma rezultātā izstrādātās un “WATERS” metodes priekšrocības un trūkumus, var apgalvot, ka izstrādātās metodes - aminoskābju fenilzotiocianātu atvasinājumu noteikšanai cilvēka bioloģiskajos materiālos (asins serums, plazma un urīns) - analīžu kvalitāte atbilst “WATERS” metodes analīžu kvalitātei, toties izstrādātā metode ir ātrāka un izmaksas uz vienu analīzi ir ievērojami mazākas. Turpmāk praktiski aizvietojot “WATERS” metodi ar izstrādāto izmaksas uz vienu analīzi varēs samazināt vairāk nekā uz pusi.

## SECINĀJUMI

1. Veikta solvātu sorbcijas modeļa efektivitātes izpēte augstefektīvās šķidrums hromatogrāfijas izdalīšanas parametru prognozēšanai polāru savienojumu grupai, 25 aminoskābju FITC atvasinājumiem. Efektivitātes izpētei izmantotas deviņas apgrieztajā fāzē izmantojamas hromatogrāfijas kolonnas ar dažādām ķīmiski fizikālajām īpašībām un divi organiskie modificētāji. Eksperimentālie rezultāti pierādīja, ka modelis ir efektīvs analizējamo vielu izdalīšanas parametru prognozēšanai, pamatojoties ne tikai uz eksperimentāli iegūtajiem datiem, bet papildus izmantojot analizējamo savienojumu struktūrformulas.
2. Ņemot vērā pētījuma rezultātus, var apgalvot, ka prognozēšanu, kas balstīta uz analizējamo savienojumu struktūrformulām (*“nulle tuvinājuma”* metode), nevar uzskatīt par pietiekami precīzu analizējamo vielu izdalīšanas laika prognozēšanas metodi, toties to var pieņemt par labu metodi sākotnējo parametru prognozēšanai. Prognozēšana, kas balstīta uz analizējamo savienojumu struktūrformulām un viena eksperimenta rezultātiem (*“pirmā tuvinājuma”* metode), ir piemērota analizējamo savienojumu izdalīšanas laika prognozēšanai. Prognozēšana, kas balstīta uz analizējamo savienojumu struktūrformulām un divu eksperimentu rezultātiem (*“otrā tuvinājuma”* metode), ir efektīva analizējamo savienojumu izdalīšanas laika optimizācijai. Prognozēšanas rezultātus, kas iegūti, balstoties uz analizējamo savienojumu struktūrformulām un viena vai divu eksperimentu rezultātiem, var izmantot AEŠH metodes izveidei un optimizācijai.
3. Pētījuma rezultātā iegūtie dati apliecina, ka solvātu sorbcijas modelis ir piemērots hromatogrāfisko apstākļu piemeklēšanai un sorbcijas parametru prognozēšanai polāru savienojumu grupai 25 aminoskābju FITC atvasinājumiem kustīgās fāzes segmentētā izdalīšanas gradienta režīmā.
4. Pierādīts, ka solvātu sorbcijas modeļa iegūtie rezultāti, veicot prognozēšanu, izmantojot analizējamās vielas struktūrformulu un viena vai divu eksperimentu datus, ir salīdzināmi ar plaši zinātniskajā literatūrā aprakstītu lineāro šķīdinātāja spēka modeli strādājot ar 25 aminoskābju FITC atvasinājumiem. Izmantojot solvātu sorbcijas modeli, var būtiski samazināt metodes izstrādes laiku un izmaksas. Prognozēšana, kas balstīta tikai uz analizējamo vielu ķīmisko struktūrformulu, nav tik precīza, toties iegūtos rezultātus var izmantot aptuvenai analīzes laika un nepieciešamā organiskā modificētāja daudzuma aprēķināšanai, kā arī šos datus var izmantota matemātiskai iterācijai.

5. Darba rezultātā ir izstrādāta un validēta AEŠH metode aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu noteikšanai cilvēka asins serumā. Pierādīts, ka šo metodi var izmantot arī citu bioloģisko materiālu (asins plazma un urīns) analīzei ar sarežģītāku matricu. Izmantojot doto metodi, reālā praksē var noteikt patoloģisko analīžu rezultātus, kurus izmanto iedzimto metabolo patoloģiju selektīvajam skrīningam. Salīdzinājumā ar pašreiz eksistējošo metodi aminoskābju spektra noteikšanai, izstrādātai metodei ir vairākas priekšrocības: īsāks analīzes laiks un ievērojami mazākas izmaksas.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. ScienceDirect is Elsevier's leading scientific database for researchers, teachers, students, health care professionals and information professionals, pieejams Internetā: <http://www.sciencedirect.com/>, [atsauce 07.01.2017.].
2. **Golushko J., Mekšs P., Shishkina I., Galushko S.** Prediction of conditions in reverse-phase liquid chromatography using chemical structure and column characteristics. *Latvian J. Chem.*, **2006**, 4, 356 p.
3. **Golushko J., Mekšs P., Shishkina I., Galushko S.** Computer-aided method for characterization and comparison of reverse-phase HPLC columns. I theory. *Latvian J. Chem.*, **2007**, 1, 43-48 p.
4. **Golushko J., Mekšs P., Shishkina I., Galushko S.** Computer-aided method for characterization and comparison of reverse-phase HPLC columns. II. Column characterization. *Latvian J. Chem.*, **2007**, 2, 147-154 p.
5. **Golusko J., Mekšs P., Shyshkina I., Galushko S.** Prediction of Retention in Gradient Reversed –Phase Liquid Chromatography Using Chemical Structure and Column Characteristics. *Latvian J. Chem.*, **2008**, 2, 132-142 p.
6. **Golushko J., Mekšs P., Shishkina I., Galushko S.** Separation of triazine, phenylurea and some other herbicides by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Latvian J. Chem.*, **2005**, 4, 357-363 p.
7. **Snyder L.R., Kirkland J.J., Gajch J.L.** *Practical HPLC method development*. 2nd edition, **1997**, John Wiley&Sons, New York. 800 p.
8. **Snyder L.R., Dolan J.W.** *High-Performance Gradient Elution–The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*. **2007**, Wiley–Interscience, John Wiley&Sons, Inc., Hoboken, NJ. 544 p.
9. **Dolan J.W.** Starting out right, Part 6 – The scouting gradient alternative. *LC-GC*, **2000**, 13, 388-394 p.
10. **Dolan L.W.** The Hazards of Adjusting Gradients. *LC-GC*, **2002**, 20, 940-946 p.
11. **Patterson S.D.** Use of solvent selectivity optimization procedures for high-performance liquid chromatographic method development. *J Chromatogr. A*, **1992**, 592, 43-49 p.
12. **Dolan J.W.** The hazards of adjusting gradients. *LC-GC*, **2002**, 20, 940-946 p.
13. **Horvath C.G., Lipsky S.R.** Peak capacity in chromatography. *Anal Chem.*, **1967**, 39, 1893-1893 p.

14. **Schellinger A.P., Carr P.W.** Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *J Chromatogr. A*, **2006**, 1109, 253–266 p.
15. **Gilroy J.J., Dolan, J.W.** Gradient performance checks. *LC-GC*, **2004**, 22, 982-988 p.
16. **Guiochon.G.** Preparative liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 965, 129-161 p.
17. **Jandera P., Churáček J.** Gradient Elution in Column Liquid Chromatography: Theory and Practice. Chapter 2 Retention Characteristics In Isocratic Elution Chromatography. *Journal of Chromatography Library*, **1985**, 31, 39–52 p.
18. **Guiochon G., Shirazi S.G., Katti A.M.** *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. **1994**, Academic Press, Boston, MA 701 p.
19. **Gritti F., Felinger A., Guiochon G.** Overloaded gradient elution chromatography on heterogeneous adsorbents in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1017, 45-61 p.
20. **Jandera P.** Gradient elution in normal-phase high-performance liquid chromatographic systems. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 965, 239-261 p.
21. **Wang A., Carr P.W.** Comparative study of the linear solvation energy relationship, linear solvent strength theory, and typical-conditions model for retention prediction in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 965, 3-23 p.
22. **Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W.** The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1060, 77-116 p.
23. **Nikitas P., Pappa-Louisi A.** New approach to linear gradient elution used for optimisation in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1068, 279-287 p.
24. **Galushko S.V.** Calculation of retention and selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1991**, 552, 91-102 p.
25. **Galushko S.V.** The calculation of retention and selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Methanol-water eluents. *Chromatographia*, **1993**, 36, 39-42 p.
26. Molnár-Institute for applied chromatography focuses on new strategies for improving the efficiency and success of modern high performance liquid chromatography through method development software, pieejams Internetā: [www.molnar-institute.com](http://www.molnar-institute.com), [atsauce 20.06.2013.].

27. ChromSword have been developing innovative software products to support method development in liquid chromatography, pieejams Internetā: [www.chromsword.com](http://www.chromsword.com), [atsauce 20.06.2013.].
28. Advanced Chemistry provides comprehensive and innovative industry-standard software solutions to help accelerate research and strengthen competitive position, pieejams Internetā: [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), [atsauce 20.06.2013.].
29. **Kromidas S.** *HPLC Made to Measure. A Practical Handbook for Optimization.* **2006**, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 753 p.
30. **Wang L., Zheng J., Gong X., Hartman R., Antonucci V.** Efficient HPLC method development using structure-based database search, physico-chemical prediction and chromatographic simulation. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2015**, 104, 49-54 p.
31. **Fasoula S, Zisi Ch., Gika H., Pappa-Louisi A., Nikitas P.** Retention prediction and separation optimization under multilinear gradient elution in liquid chromatography with Microsoft Excel macros. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1395, 109–115 p.
32. **Mizera M., Talaczyńska A., Zalewski P., Skibiński R., Cielecka-Piontek J.** Prediction of HPLC retention times of tebipenem pivoxyl and its degradation products in solid state by applying adaptive artificial neural network with recursive features elimination. *Talanta*, **2015**, 137, 174–181 p.
33. **Balkatzopoulou P., Fasoula S., Gika H., Nikitas P., Pappa-Louisi A.** Retention prediction of highly polar ionizable solutes under gradient conditions on a mixed-mode reversed-phase and weak anion-exchange stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1396, 72–76 p.
34. **Shabir G.A.** HPLC Method Development and Validation for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Technology Europe*, **2004**, 34, 207-213 p.
35. **Ahuja S., Rasmussen H.** *HPLC Method Development for Pharmaceuticals.* 1st edition, **2007**, Academic Press, 532 p.
36. **Baczek T., Kaliszan R., Claessens H.A, Staten M.A.** Computer-Assisted Optimization of Reversed-Phase HPLC Isocratic Separation of Neutral Compounds. *LC-GC Europe*, **2001**, 2-6 p.
37. **Wolcott R.G., Dolan J.W., Snyder L.R.** Computer simulation for the convenient optimization of isocratic reversed-phase liquid chromatographic separations by varying temperature and mobile phase strength. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 869, 3–25 p.

38. **Barmpalexis P., Kanaze F.I., Georgarakis E.** Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2009**, 49, 1192–1202 p.
39. **Rasmussen H.T., Li W., Redlich D., Jimidar M.I.** 6 HPLC method development. *Separation Science and Technology*, **2005**, 6, 145-190 p.
40. Hewlett-Packard automated chromatographic method development software, pieejams Internetā: <http://www.hpl.hp.com>, [atsauce 20.06.2013.].
41. **Glajch J.L., Snyder L.R.** *Computer-Assisted Method Development for High-Performance Liquid Chromatography*. **1990**, Elsevier, Amsterdam, 485 p.
42. Perkin-Elmer solvent optimization system, pieejams Internetā: [goo.gl/m1bvqG](http://goo.gl/m1bvqG), [atsauce 20.06.2013.].
43. CompuDrug software corporation specialized in developing and generating ADME and drug discovery softwares, pieejams Internetā: <http://www.compudrug.com/>, [atsauce 20.06.2013.].
44. **Hodges R.S., Parker J.M., Mant C.T., Sharma R.R.** Computer simulation of high-performance liquid chromatographic separations of peptide and protein digests for development of size-exclusion, ion-exchange and reversed-phase chromatographic methods. *J Chromatogr. A*, **1988**; 458, 147-67 p.
45. **Snyder L.R., Dolan J.W., Lommen D.C.** Drylab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development: I. Isocratic elution. *J.Chromatogr. A*, **1989**, 485, 65-89 p.
46. **Outinen K., Vuorela H., Hiltunen R.** Optimization of HPLC separation by computer-assisted optimization methods. Comparison of three methods. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1996**, 4, 199–210 p.
47. **Andrighetto L.M., Stevenson P.G., Pearson J.R., Henderson L.C., Conlan X.A.** DryLab® optimised two-dimensional high performance liquid chromatography for differentiation of ephedrine and pseudoephedrine based methamphetamine samples. *Forensic Science International*, **2014**, 244, 302–305 p.
48. **Dolan J.W., Lommen D.C., Snyder L.R.** Drylab® computer simulation for high-performance liquid chromatographic method development: II. Gradient Elution. *J.Chromatogr. A*, **1989**, 485, 91–112 p.

49. **Dolan J.W., Lommen D.C., Snyder L.R.** High-performance liquid chromatographic computer simulation based on a restricted multi-parameter approach: I. Theory and verification. *J.Chromatogr. A*, **1990**, 535, 55-74 p.
50. Fusion Method Development Software, pieejams Internetā: <http://tinyurl.com/zxs7g7f>, [atsauce 20.06.2013.].
51. **Bowman P.B., Marr J.G.D., Salvat D.J., Thompson B.E.** Automated HPLC optimization — not all systems are the same. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1993**, 11, 1303–1315 p.
52. **Snyder L.R., Dolan J.W., Lommen D.C.** High-performance liquid chromatographic computer simulation based on a restricted multi-parameter approach: II. Applications. *J.Chromatogr. A*, **1990**, 535, 75-92 p.
53. **Solfrizzo M., Forbes-Smith M., Strange R.N., Visconty A.** Separation of chlamydosporol epimers by reversed-phase HPLC using commercial solvent optimization software. *Chromatographia*, **1994**, 39, 443-447 p.
54. **Wang L., Zheng J., Gong X., Hartman R., Antonucci V.** Efficient HPLC method development using structure-based database search, physico-chemical prediction and chromatographic simulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2015**, 104, 49–54 p.
55. **Galushko S.V., Kamenchuk A.A., Pit G.L.** Calculation of retention in reversed-phase liquid chromatography. IV. ChromDream software for selection of initial conditions and for simulating chromatographic behavior. *J.Chromatogr. A*, 1994, 660, 47-59 p.
56. **Galushko S.V., Kamenchuk A.A., Pit G.L.** Software for method development in reversed-phase liquid chromatography. *Am. Lab.*, **1995**, 27, 421-432 p.
57. **Santos-Montez A., Gasco-Lopez A.I., Izquierdo-Hornillos R.** Optimization of the high-performance liquid chromatographic separation of a mixture of natural and synthetic corticosteroids. *J.Chromatogr. B, Biomedical Sciences and Applications*, **1993**, 620, 15-23 p.
58. **Hamoir T., Massart D.L., King W., Kokot S., Douglas K.** Prediction of initial chromatographic conditions in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr. Sci.*, **1993**, 31, 393-400 p.
59. **Fekete J., Morovjan G., Csizmadia F., Darvas F.** Method development by an expert system advantages and limitations. *J. Chromatogr. A*, **1994**, 660, 33-46 p.

60. **Martire D.E., Boehm R.E.** Unified theory of retention and selectivity in liquid chromatography. 2. Reversed-phase liquid chromatography with chemically bonded phases. *J Phys. Chem.*, **1983**, 87, 1045-1062 p.
61. **Gilpin R.K., Gangoda M.E., Krishen A.E.** Effect of conditioning solvent on the orientation of bonded hydrocarbon moieties in totally aqueous mobile phases *J. Chromatogr. Sci.* **1982**, 20, 345-348 p.
62. **Lochmuller C.H., Wilder D.R.** The sorption behavior of alkyl bonded phases in reversed-phases high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, **1979**, 17, 574-579 p.
63. **Colin H., Guiochon G.** Introduction to reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1977**, 141, 289-312 p.
64. **Knox J., Pryde A.** Performance and selected applications of a new range of chemically bonded packing materials in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1975**, 112, 171-188 p.
65. **Horvath C.S., Melander W., Molnar I.** Liquid Chromatography of Ionogenic Substances with Nonpolar Stationary Phases. *Anal. Chem.*, **1977**, 49, 142-154 p.
66. **Sinanoglu O.** *In Molecular Interaction*. Vol. 3, **1982**, Wiley, NY, 284 p.
67. **Sinanoglu O.** The solvophobic theory for the prediction of molecular conformations and biopolymer bindings in solutions with recent direct experimental tests. *International Journal of Quantum Chemistry*, **1980**, 18, 381-392 p.
68. **Белоусов В.** *Термодинамика водных растворов неэлектролитов*. Химия. **1983**, Ленинград, 264 p.
69. **Teresawa S., Itsuki H., Arakawa S.** Contribution of hydrogen bonds to the partial molar volumes of nonionic solutes in water. *J.Phys. Chem.*, **1975**, 79, 2345-2351 p.
70. **Rein R., Renugopalakrishnan V., Nir S., Swissler T.** Theoretical Studies on the Conformations of Peptides in Solution. I. Conformation of NN-acetyl glycine N-methyl amide in solution. *Int. J., Quantum Chem. Quantum Biol. Symp.*, **1975**, 2, 99-107 p.
71. **Klopman G.** Solvations: a semi-empirical procedure for including solvation in quantum mechanical calculations of large molecules, *Chem. Phys. Lett.*, **1967**, 1, 200-202 p.
72. **Constanciel R.** The Virtual Charge Model of a polarizable medium as a basis for Hückel calculations with the  $\omega$ -technique. *Theoret. Chem. Acta.*, **1980**, 54, 123-130 p.
73. **Минкин В., Осипов О., Жданов Ю.** *Дипольные моменты в органической химии*. Химия. **1963**, Ленинград, 248 p.

74. **Goluško J.** Solvātu sorbcijas modeļa izmantošana sorbcijas prognozēšanai apgrieztās fāzes augsti efektīvajā šķidrums hromatogrāfijā. Promocijas darbs. **2007**, Rīga, 80 p, pieejams Internetā: <http://tinyurl.com/zakevyt> [atsauce 20.06.2013.].
75. **Smith R.M.** Retention and Selectivity in Liquid Chromatography: Prediction, Standardisation and Phase Comparisons. *J. Chromatogr. Library*, **1995**, 57, 462 p.
76. **Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R.** Gradient elution in high-performance liquid chromatography : I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *J.Chromatogr. A*, **1979**, 165, 3-30 p.
77. **Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R.** Gradient elution in high-performance liquid chromatography : II. Practical application to reversed-phase systems. *J.Chromatogr. A*, **1979**, 165, 31-58 p.
78. **Baczek T., Kaliszan R.** Combination of linear solvent strength model and quantitative structure–retention relationships as a comprehensive procedure of approximate prediction of retention in gradient liquid chromatography. *J.Chromatogr.A*, **2002**, 962, 41-55 p.
79. **Snyder L.R., Dolan J.W.** The linear solvent strength model of gradient elution. *Adv.Chromatogr.*, **1998**, 38, 115-187 p.
80. **Vua H., Spicera v., Gotfrida A., Krokhinb O.V.** A model for predicting slopes S in the basic equation for the linear-solvent-strength theory of peptide separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.A*, **2010**, 1217, 489-497 p.
81. **Ford J.C., Ko J.** Comparison of methods for extracting linear solvent strength gradient parameters from gradient chromatographic data. *J.Chromatogr.A*, **1996**, 727, 1-11 p.
82. **Quarry M.A., Grob R.L., Snyder L.R.** Prediction of precise isocratic retention data from two or more gradient elution runs. Analysis of some associated errors. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 907-917 p.
83. **Vua H., Spicera V., Gotfrida A., Krokhin O.V.** A model for predicting slopes S in the basic equation for the linear-solvent-strength theory of peptide separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.A*, **2010**, 1217, 489–497 p.
84. **Wang A., Tan L.C., Carr P.W.** Global linear solvation energy relationships for retention prediction in reversed-phase liquid chromatography. *J.Chromatogr.A*, **1999**, 848, 21-37 p.
85. **Baczek T.** Computer-Assisted Optimization of Liquid Chromatography Separations of Drugs and Related Substances. *Current Pharmaceutical Analysis*, **2008**, 4, 151-161 p.

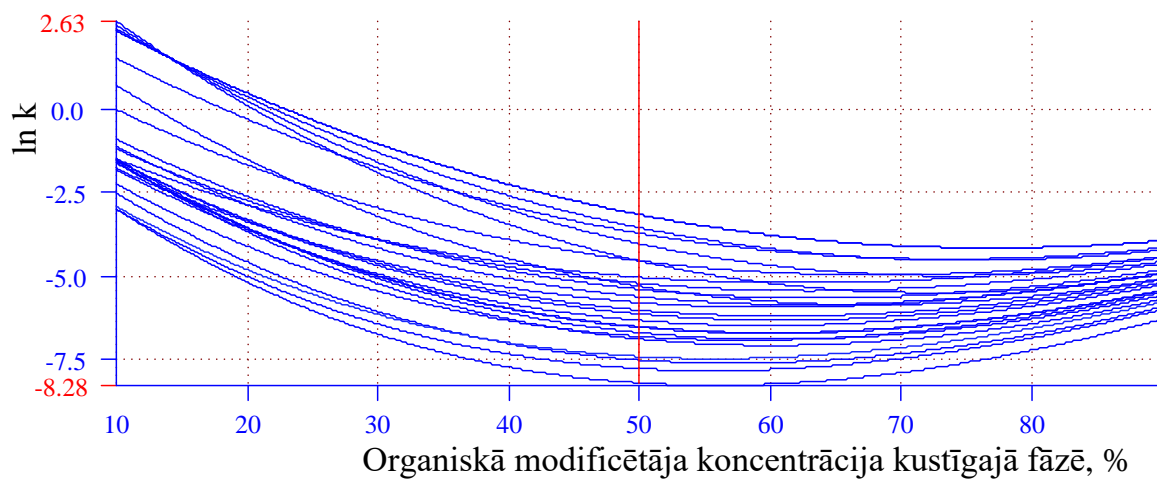
86. **Blau N., Duran M., Gibson K.M.** *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. 2008, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 888 p.
87. **Lee B., Scaglia F.** *Inborn Errors of Metabolism. From neonatal screening to metabolic pathways*. 2015, Oxford University Press, 384 p.
88. **Bamshad J.C.** *Medical Genetics*. 4th Edition. 2010, Mosby Inc., Elsevier Inc., 363 p
89. **Mant C.T., Zhou N.E., Hodges R.S.** *Amino Acids and Peptides. In Chromatography and Related Differential Migration Methods – Part B: Applications*. Chapter 13. 1992, E. Hefmann (Ed.), Elsevier, Amsterdam. B75-B119 p.
90. **Ishida Y.** Liquid Chromatography in Biomedical Analysis. Amino Acids. *Journal of Chromatography Library*, 1991, 50, 47-80 p.
91. **Janssen S.L., van Nispen J.W., Melgers P.A.T.A., van den Bogaart H.W.M, Hamelinck R.L.A.E., Goverde B.C.** HPLC Analysis of Phenylthiocarbamyl (PTC) Amino Acid. I. Evaluation and Optimization of the Procedure. *Chromatographia*, 1986, 22, 345-350 p.
92. **Ebert R.F.** Amino Acid Analysis by HPLC: Optimized Conditions for Chromatography of Phenylthiocarbamyl Derivatives. *Analytical Biochemistry*, 1986, 154, 431-435 p.
93. **Robert L.H., Stephen C.M.** Amino Acid analysis by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn derivatization with Phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 1984, 136, 65-74 p.
94. **Hughes A.B.** *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*. Volume 4. 2011, John Wiley&Sons Ltd., 552 p.
95. **Hughes A.B.** *Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry. Analysis and function of amino acids and peptides*. Volume 5. 2011, John Wiley&Sons Ltd., 508 p.
96. **Mant C.T., Zhou N.E., Hodges R.S.** Amino Acids and Peptides. *J Chromatogr.*, 1992, 13, B76-B87 p.
97. **Thomas M.D.** *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 7th ed., 2010, John Wiley&Sons Ltd., 1240 p.
98. **Heinrikson R.L., Meredith S.C.** Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 1984, 136, 65-74 p.
99. **Boucher J.L., Charret C., Coudray-Lucas C., Giboudeau J., Cynober L.** Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clinical Chemistry*, 1997, 43, 1421-1428 p.

100. **Schwarz E.L., Roberts W.L., Pasquali M.** Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clin. Chim. Acta*, **2005**, 354, 83–90 p.
101. **Molnár-Perl I.** Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 1241–1269 p.
102. **Minocha R., Long S.** Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid chromatography run using dansyl derivatization. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1035, 63–73 p.
103. **Ou K., Wilkins M.R., Yan J.X., Gooley A.A., Fung Y., Sheumack D., Williams K.L.** Improved high-performance liquid chromatography of amino acids derivatised with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 723, 219–225 p.
104. **Ward M.** Amino Acid Analysis Using Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-n-Hydrxysuccinimidyl Carbamate. *The Protein Protocols Handbook*. **1996**, 461 – 465 p.
105. **Cohen S., DeAntonis K., Michaud D.P.** Compositional protein Analysis using 6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate, a novel derivatising agent. *Thechniques in Protein Chemistry IV*, **1993**, Academic, San Diego, CA. 289–306 p.
106. **Cabooter D., Wuyts B., Desmet G., Van Schepdael A., Lynen F.** Variable column length method development strategy for amino acid analysis in serum samples of neonates with metabolic disorders. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1292, 229–238 p.
107. **Rafferty J.L., Siepmann J.I., Schure M.R.** Mobile phase effects in reversed-phase liquid chromatography: A comparison of acetonitrile/water and methanol/water solvents as studied by molecular simulation. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 2203–2213 p.
108. **Ranatunga R.P.J., Carr, P.W.** A study of the enthalpy and entropy contributions of the stationary phase in reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. **2000**, 72, 5679–5692 p.
109. **Nikitas P., Pappa-Louisi A., Agrafiotou P.** New insights on the retention mechanism of non-polar solutes in reversed-phase liquid chromatographic columns. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1034, 41–54 p.
110. **Rosset R., Caude M., Jardy A.** *Chromatographies en Phases liquide et Supercritique*, **1991**, Masson, Paris.
111. **Scott R.P.W., Beesley T.E.** Optimum Operating Conditions for Chiral Separations in Liquid Chromatography. *Analyst*, **1999**, 124, 713–719 p.
112. The worlds largest e-Learning website for analytical scientists. Pieejams Internetā: <http://www.chromacademy.com/>, [atsauce 14.04.2015.].

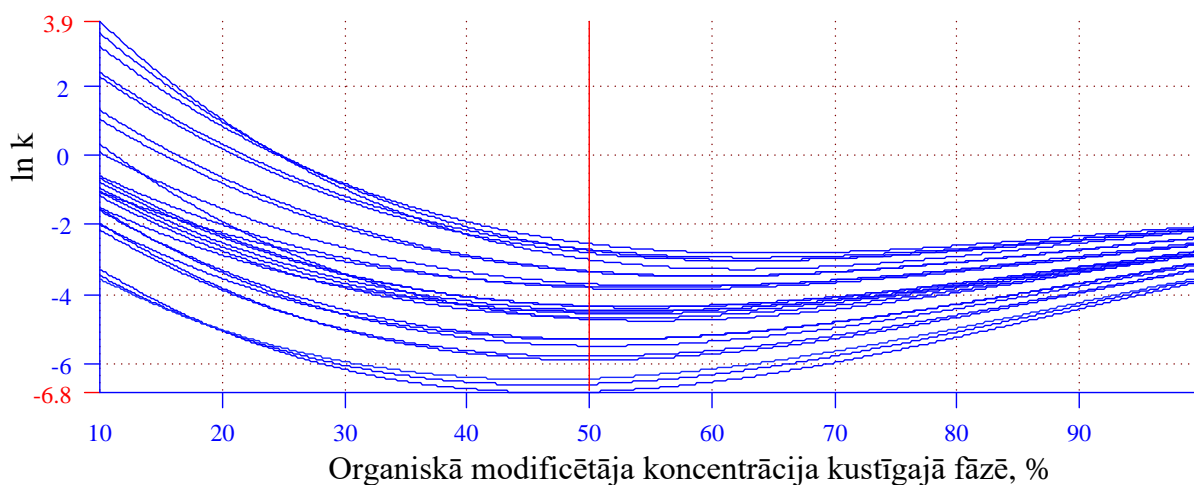
113. Separation Science. Leading online resource for learning information pertaining to the fundamentals, best practice, troubleshooting and application of chromatographic and mass spectroscopic techniques. John Dolan. HPLC Solutions #36: End-capping. Pieejams Internetā: <http://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/321-/HPLC-Solutions-36-End-capping>, [atsauce 14.04.2015.].
114. **Tanaka N., Kimata K., Hosoya K., Miyanishi H., Araki T.** Stationary phase effects in reversed – phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1993**, 656, 265–287 p.
115. **Cruz E., Euerby M.R., Johnson C.M., Hackett C.A.** Chromatographic classification of commercially available reverse-phase HPLC columns. *Chromatographia*, **1997**, 44, 151-161 p.
116. **Galea C., Mangelings D., Vander Heyden Y.** Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC – a review. *Analytica Chimica Acta*, 2015. Pieejams Internetā: <http://datubazes.lanet.lv:2074/science/article/pii/S0003267015004742>, [atsauce 09.04.2015.].
117. **Pesek, J.J., Matyska, M.T., Raymond J.Y.** Synthesis and Characterization of Endcapped C18 Stationary Phases using a Silica Hydride Intermediate. *J. Chromatogr A*, **2002**, 947, 195-203 p.
118. **Uwe D.N., Kim V.T., Pamela C.I., Bonnie A.A.** Characterization of HPLC Packings. *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, 174-186 p.
119. **IUPAC Compendium of Chemical Terminology**, pieejams Internetā: <http://www.iupac.org/publications/pac/1984/pdf/5605x0595.pdf>, [atsauce 14.11.2011.].
120. **Rohrschneider L.J.** Characterization of stationary phases by retention data and solvation parameters. *Sep. Sci.*, **2001**, 24, 3-9 p.
121. **Mapihan K.L., Vial J., Jardy A.J.** Reversed-phase liquid chromatography column testing and classification: Physicochemical interpretation based on a wide set of stationary phases. *J Chromatogr A*, **2007**, 1144, 183-196 p.
122. **Blau N., Duran M., Blaskovics M.E.** *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. **1996**, Chapman & Hall Medical. 494 p.
123. **Blau N., Duran M., Gibson K.M.** *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. **2008**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 888 p.
124. **Thomas M.D.** *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Fourth Edition, **1997**, John Wiley&Sons Ltd. 1186 p.
125. Metabolic and Genetic Information Center, database of metabolic disease, diagnostic and treatment, [atsauce 10.06.2015.]. Pieejams Internetā: <http://www.metagene.de>.

126. ERNDIM Schiemes European Biochemical Genetics Centres on releable and standardised procedures for diagnostis, treatment and monitoring of inherited metabolic diseases. [atsauce 20.06.2016.]. Pieejams Internetā: [www.erndimqa.nl](http://www.erndimqa.nl)
127. **Blau N., Duran M., Gibson K.M.** *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. **2008**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 860 p.
128. **Bilbert P.** *The A-Z Reference Book of Syndromes and Inherited Disorders*. 2nd edition, **1996**, Originally published by Chapman and Hall, London. 378 p.
129. **Lee B., Scaglia F.** *Inborn errors of metabolism from neonatal screening to metabolic pathways*. **2015**, Oxford University Press. 393 p.
130. **Alison E., Bretnall and Graham S. Clake.** *Separation Science and Technology, Validation of analytical test method, Volume 10*, **2011**, 429 p. [atsauce 15.06.2016.]. Pieejams Internetā: <http://www.sciencedirect.com>
131. **Esther Trullols, Itzir Ruisanchez, F. Xavier Rius.** Validation of qualitative analytical method. *Trends Anal. Chem.* **2004**, 23 (2), 137-145. [atsauce 20.06.2016.]. Pieejams Internetā: <http://www.sciencedirect.com>
132. Unated Nations. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. New York, **2009**, p. 76. [atsauce 20.06.2016.]. Pieejams Internetā: [https://www.unodc.org/documents/scientific/validation\\_E.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf)
133. **S. Trapman, M. Burns, H. Broll, R. Macarthur, R. Wood, J. Zel.** Guidance Document on Measurement Uncertainty for Testing Laboratories. Joint Redearch Centre-Institute for Reference Materials and Measurements, **2009**, p.48. [atsauce 20.12.2016]. Pieejams Internetā: <https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/eur22766en.pdf>
134. **Cohen S.** *Pico-Tag Amino Acid Analysis System. Operator`s Manual*. **1984**, Waters Corporation. 66 p.

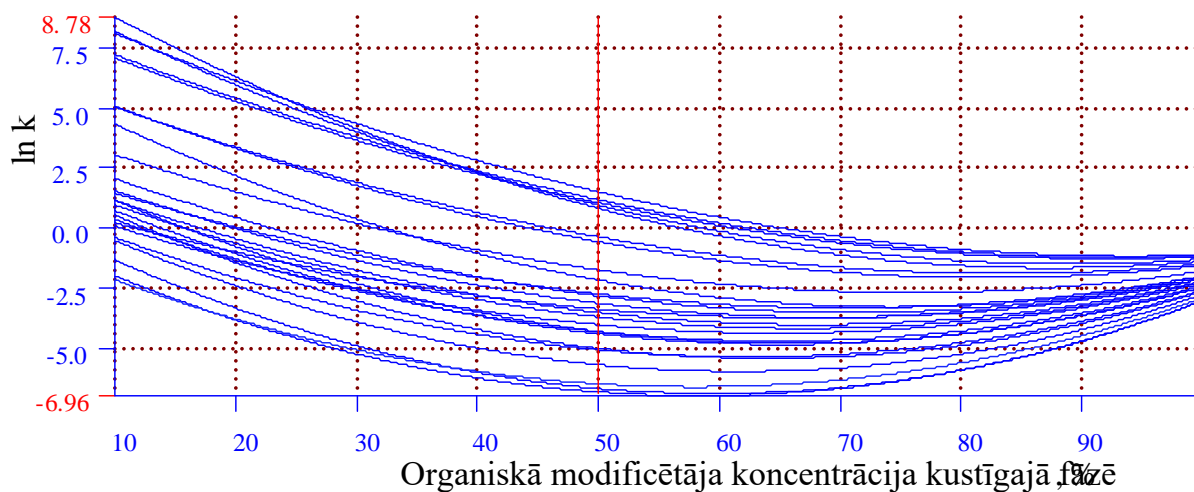
# 1. PIELIKUMS



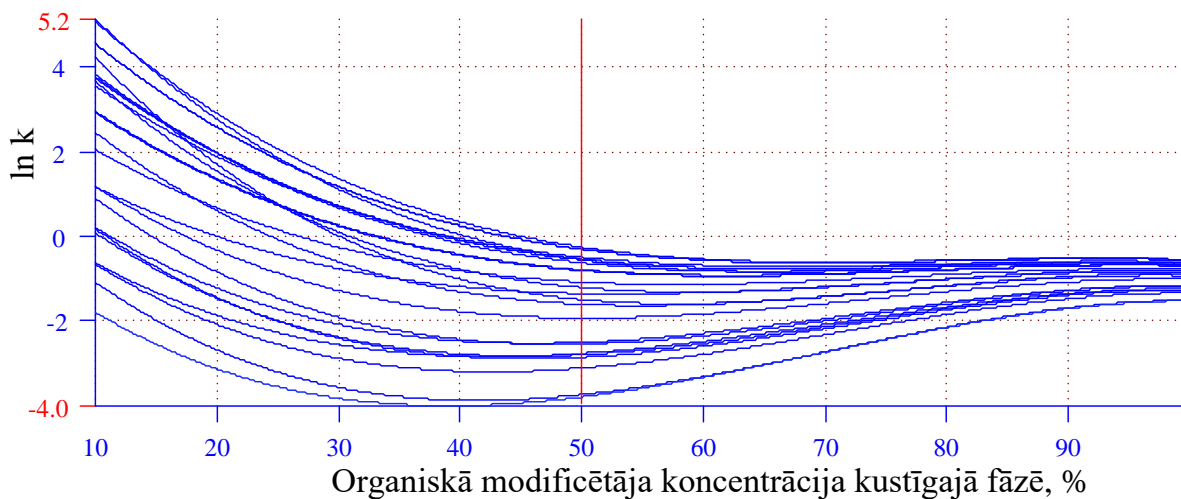
1.1.att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte *YMC-Pack C4* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot metanolu kā organisko modificētāju.



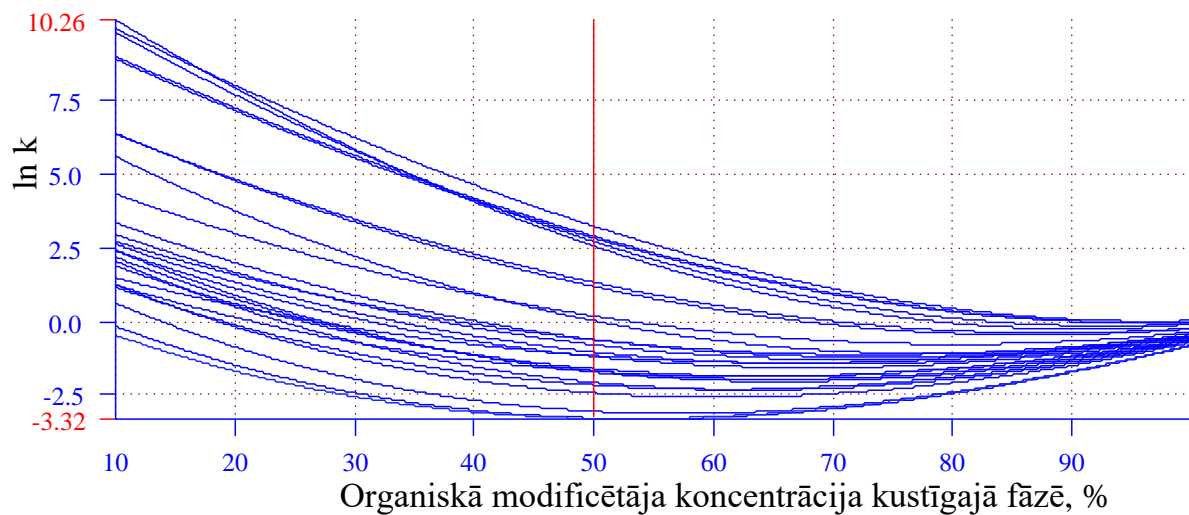
1.2. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte *Pico Tag C18* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot acetonitrilu kā organisko modificētāju.



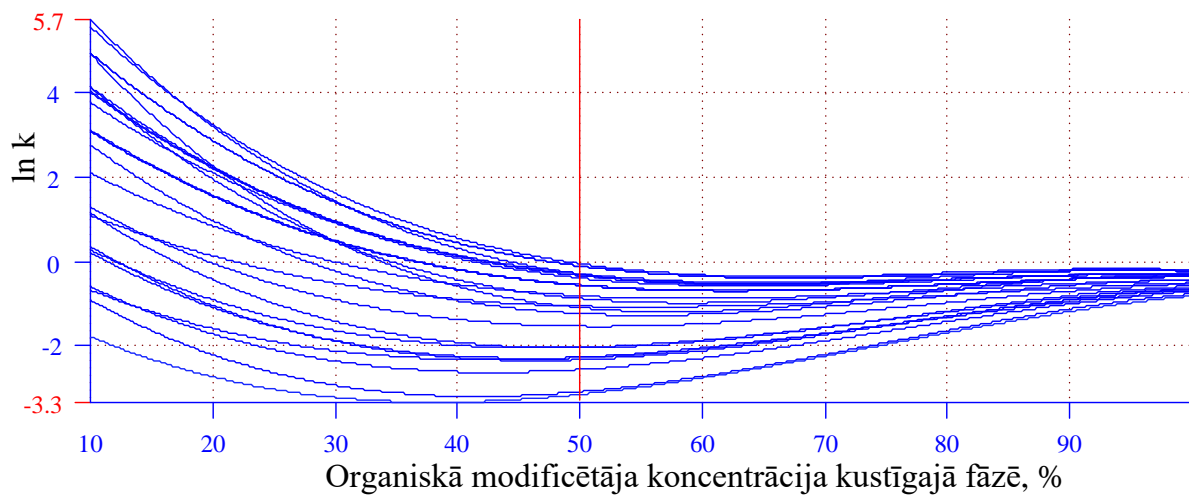
1.3. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte *Pico Tag C18* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot metanolu kā organisko modificētāju.



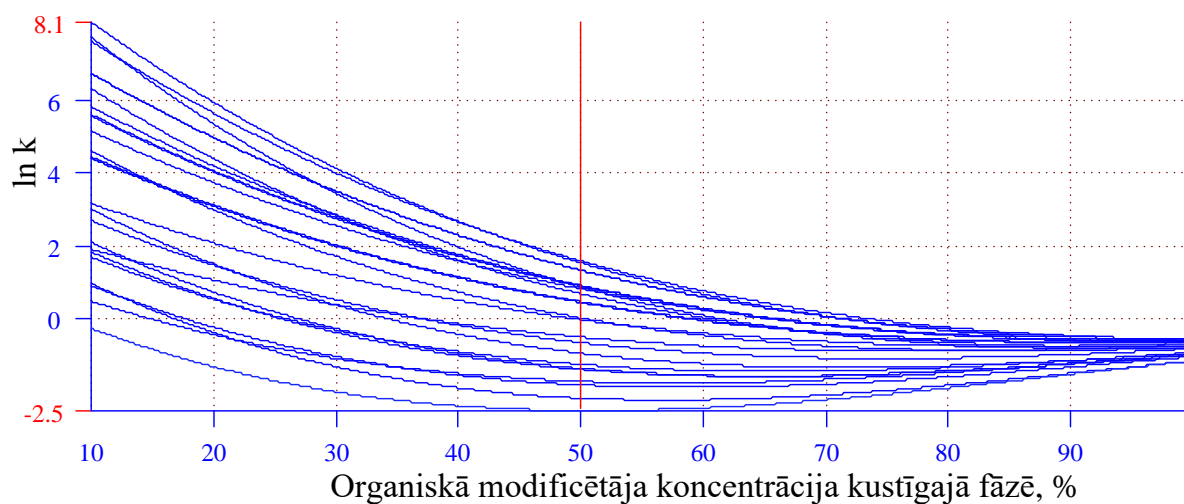
1.4. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte *SunFire C18* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot acetoniitrilu kā organisko modificētāju.



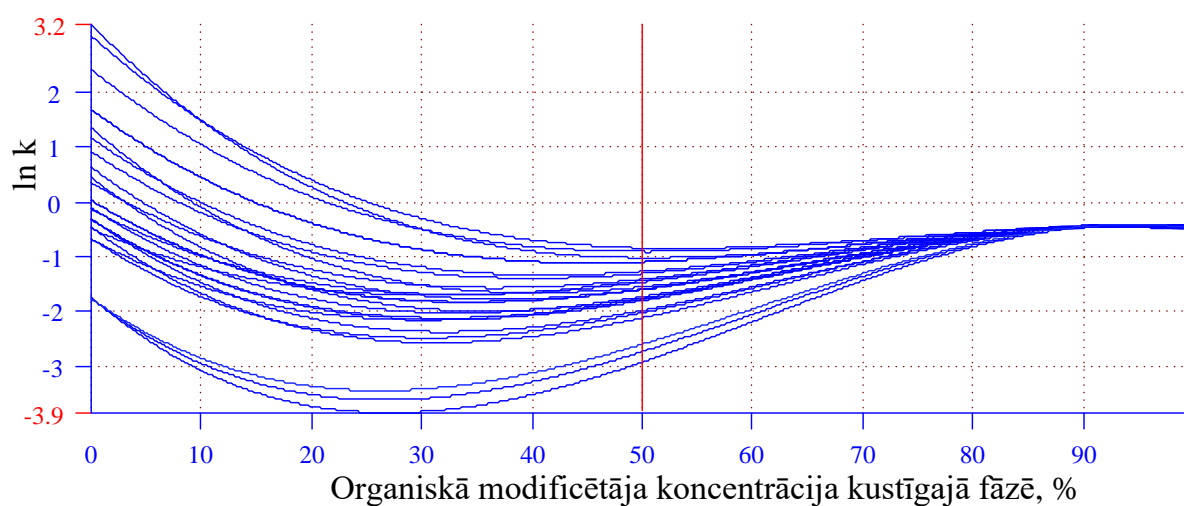
**1.5. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte SunFire C18 hromatogrāfijas kolonnai, lietojot metanolu kā organisko modificētāju.**



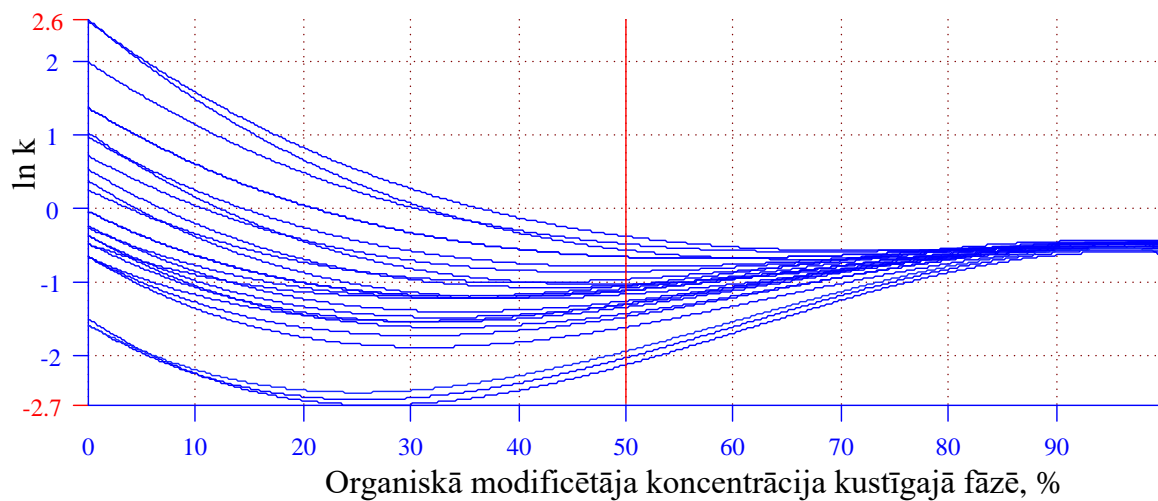
**1.6. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte Nucleosil 100 C8 hromatogrāfijas kolonnai, lietojot acetonitrilu kā organisko modificētāju.**



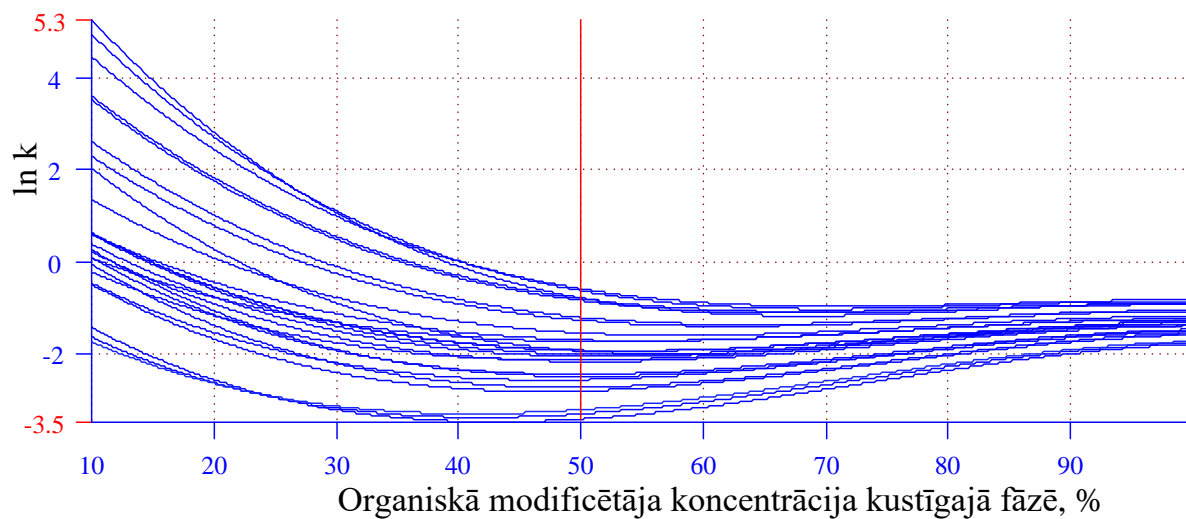
**1.7. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte Nucleosil 100 C8 hromatogrāfijas kolonnai, lietojot metanolu kā organisko modificētāju.**



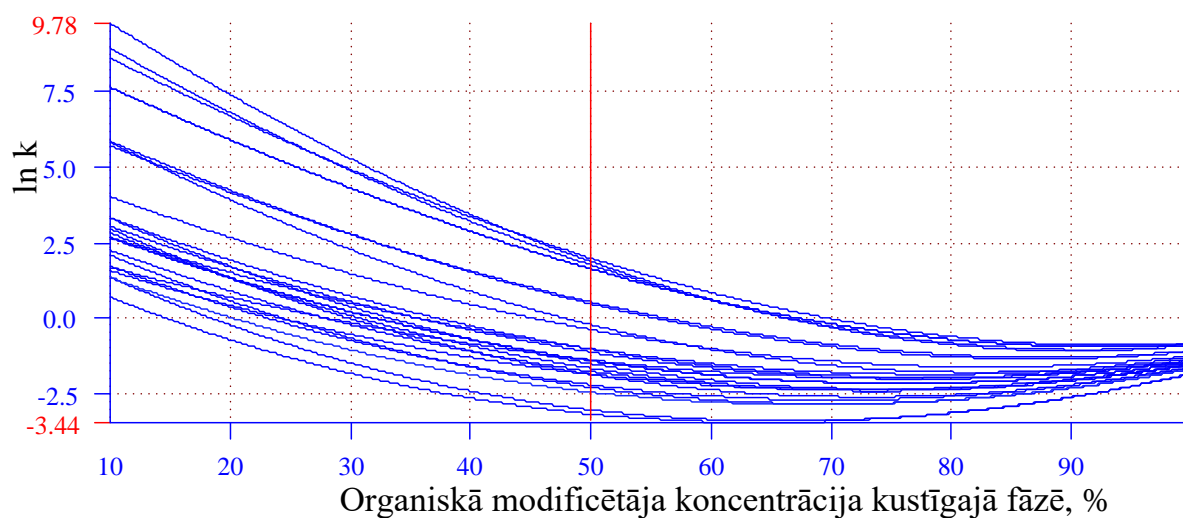
**1.8. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte Zorbax CN hromatogrāfijas kolonnai, lietojot acetonitrilu kā organisko modificētāju.**



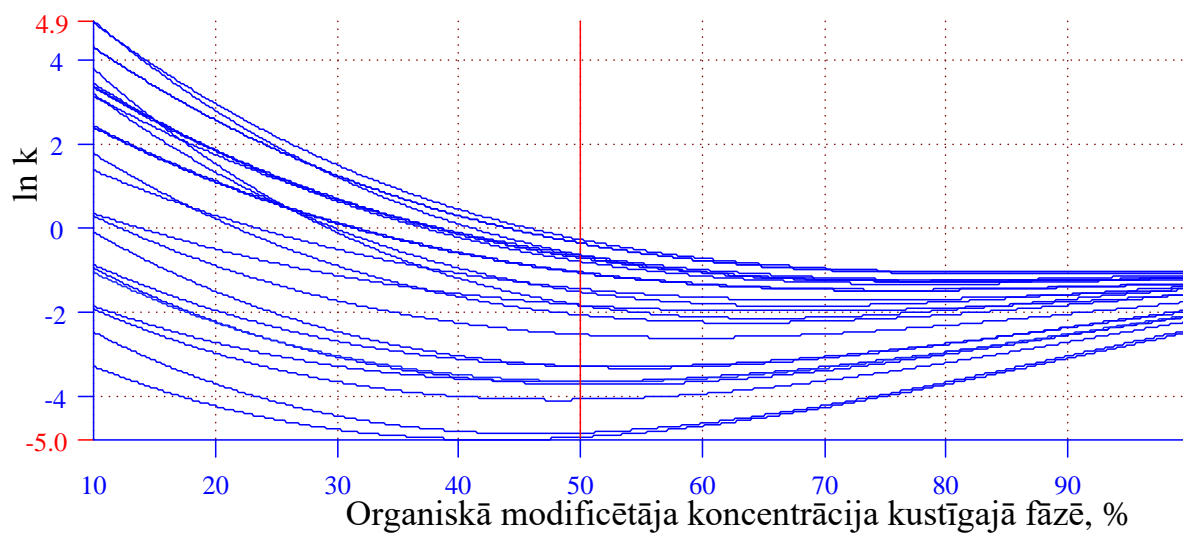
1.9. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte Zorbax CN hromatogrāfijas kolonnai, lietojot metanolu kā organisko modificētāju.



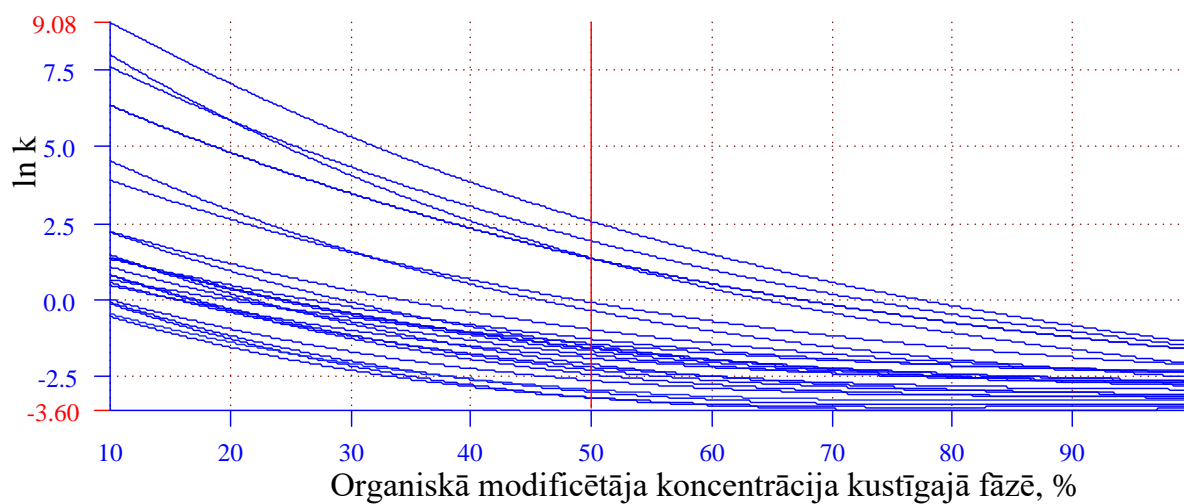
1.10. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte Zorbax SB-C8 hromatogrāfijas kolonnai, lietojot acetonitrilu kā organisko modificētāju.



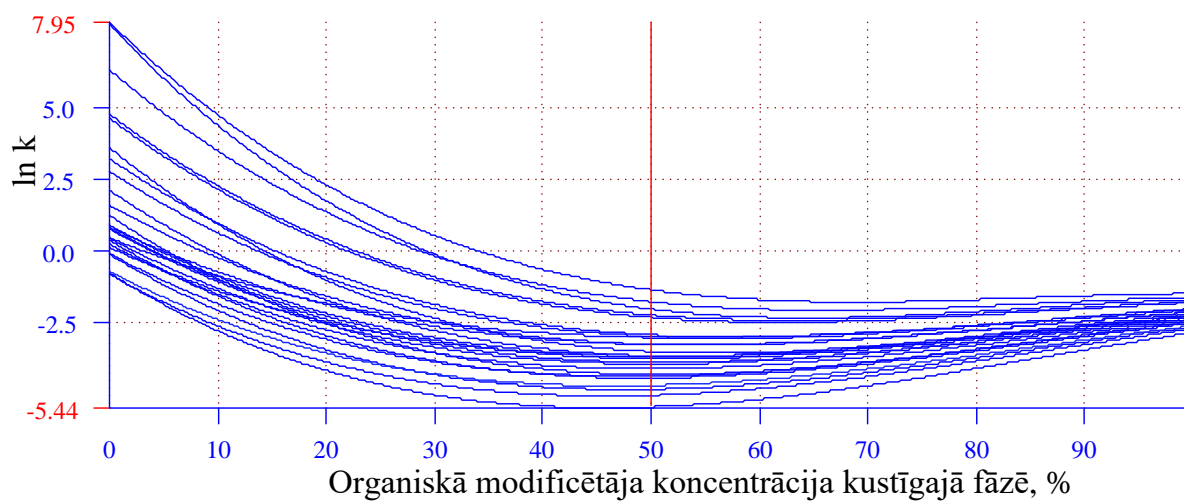
**1.11. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte Zorbax SB-C8 hromatogrāfijas kolonnai, lietojot metanolu kā organisko modificētāju.**



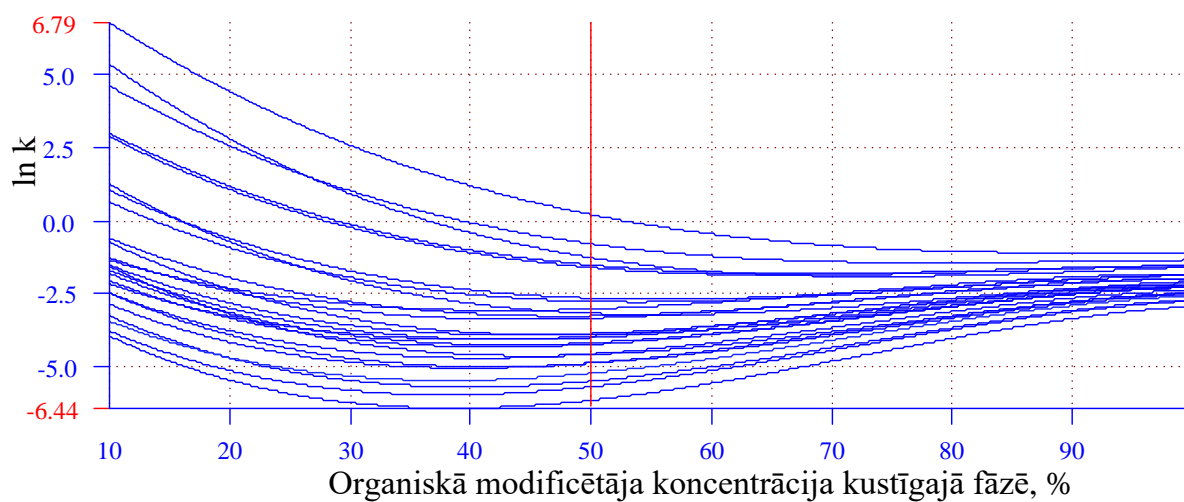
**1.12. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte Mixed Mode RP-C18/Cation hromatogrāfijas kolonnai, lietojot acetonitrilu kā organisko modificētāju.**



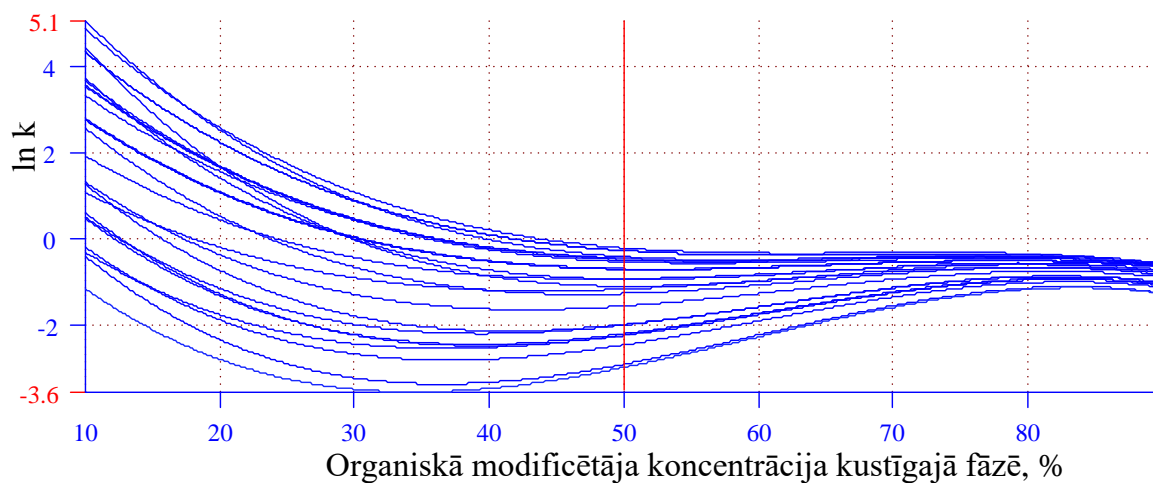
**1.13. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte *Mixed Mode RP-C18/Cation* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot metanolu kā organisko modificētāju.**



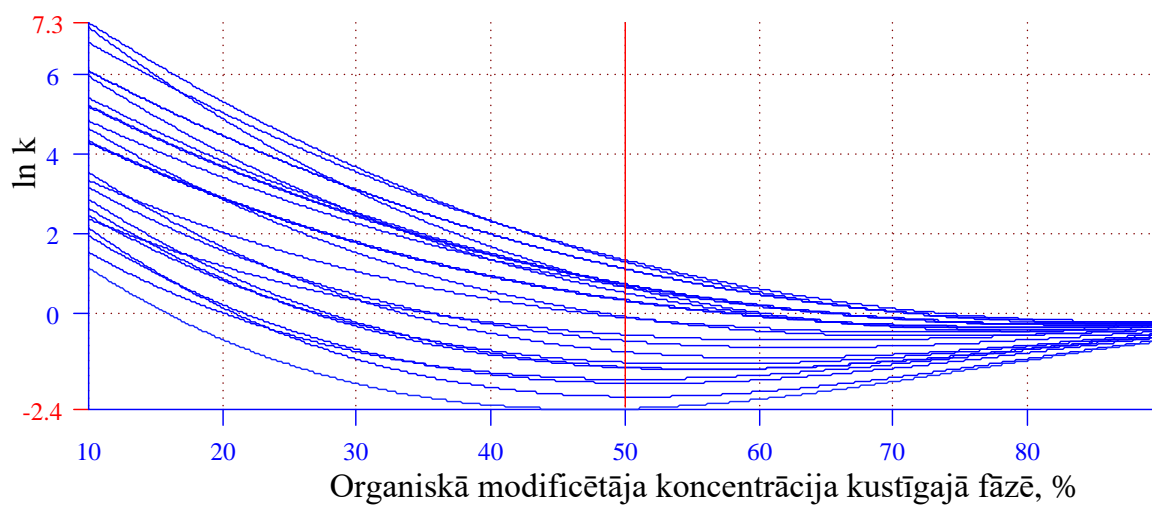
**1.14. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte *Mixed Mode RP-C8/Cation* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot acetonitrilu kā organisko modificētāju.**



1.15. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte *Mixed Mode RP-C8/Cation* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot metanolu kā organisko modificētāju.

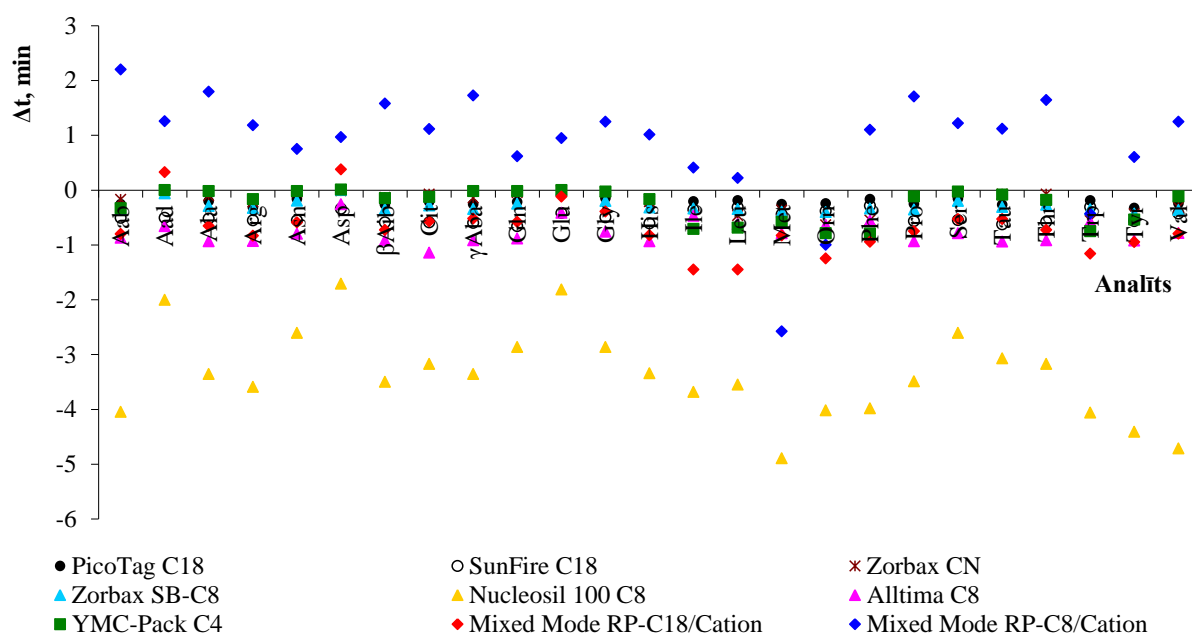


1.16. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte *Alltima C8* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot acetonitrilu kā organisko modificētāju.

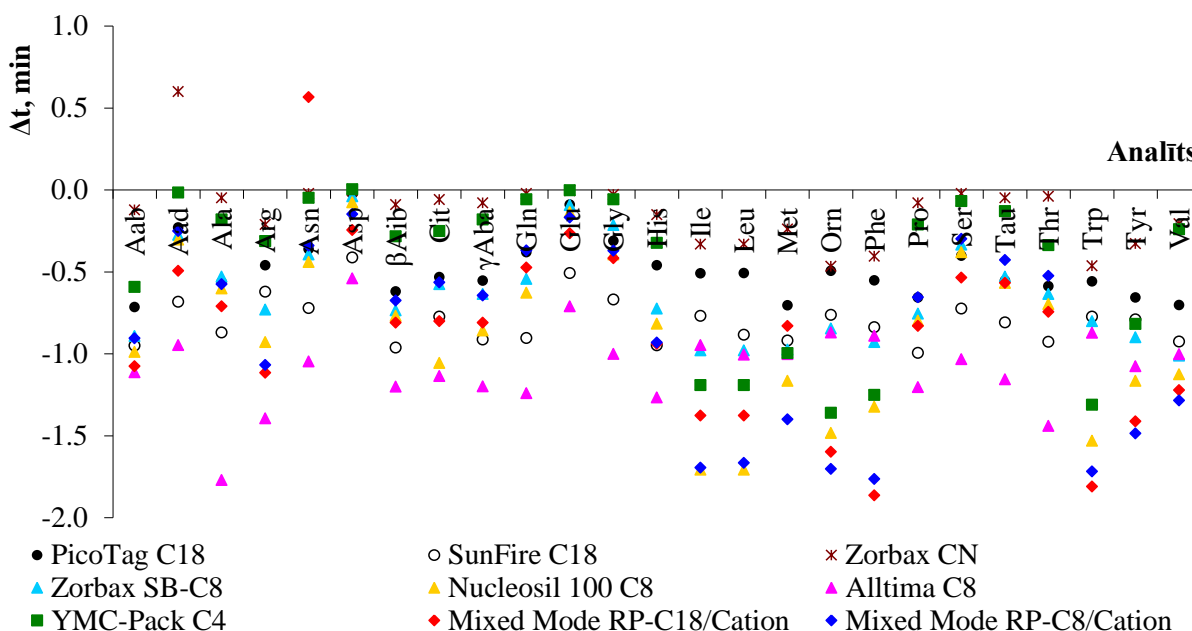


**1.17. att. Pētāmo savienojumu izšķiršanas karte *Alltima C8* hromatogrāfijas kolonnai, lietojot metanolu kā organisko modificētāju.**

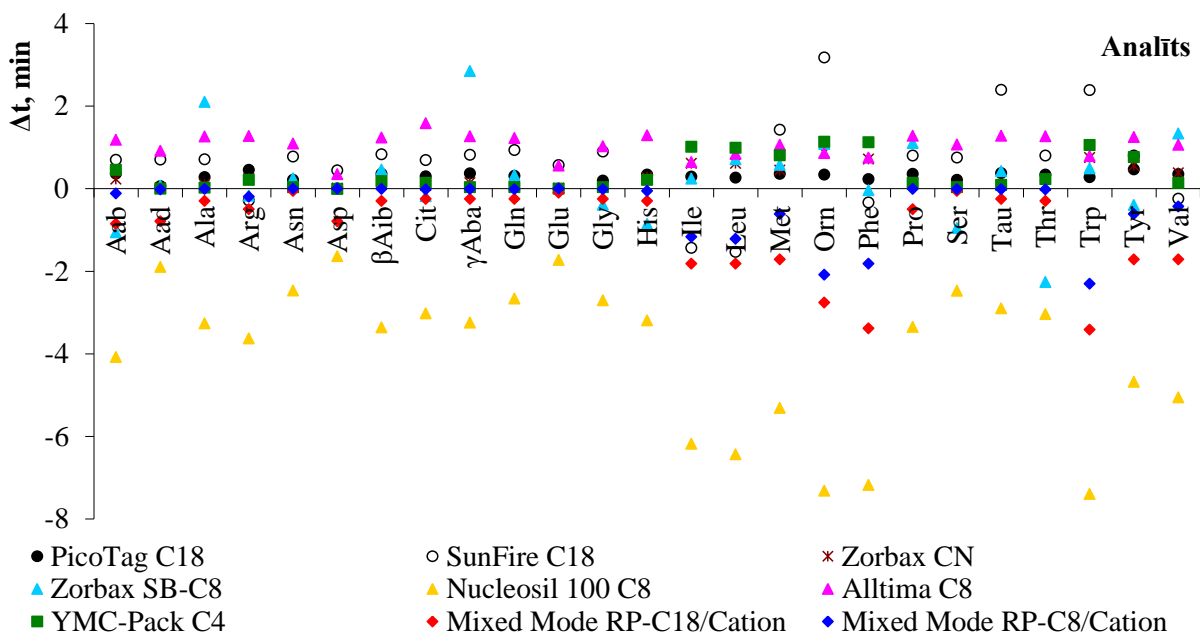
## 2. PIELIKUMS



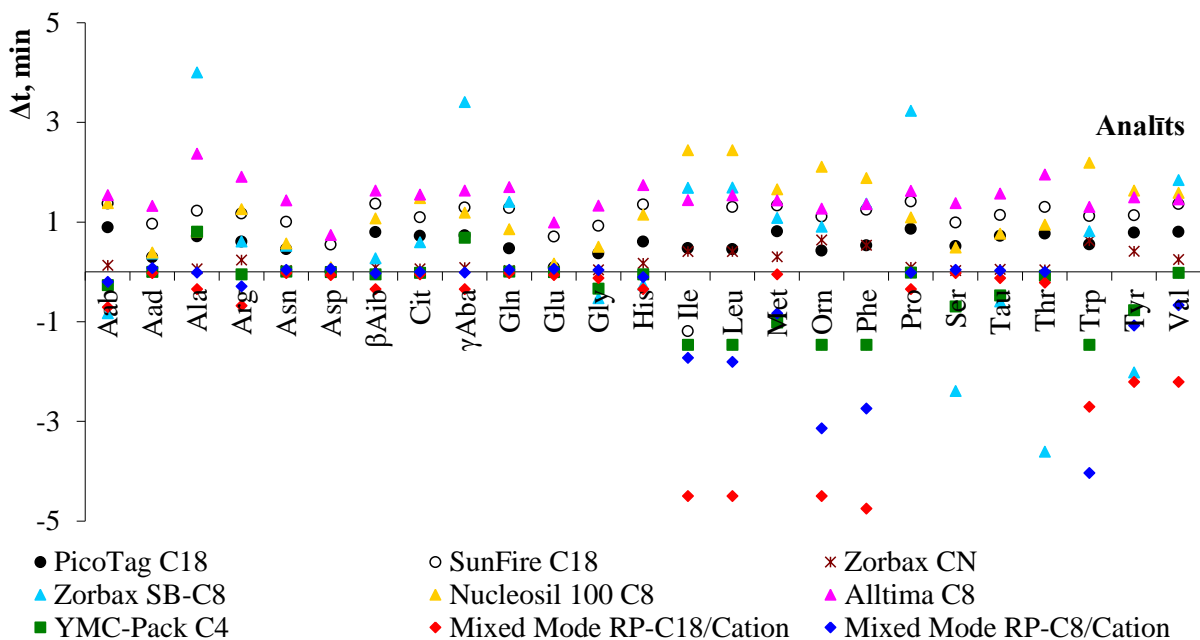
2.1.att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem datiem lineāram gradientam (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B), organiskais modificētājs – acetonitrils, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B).



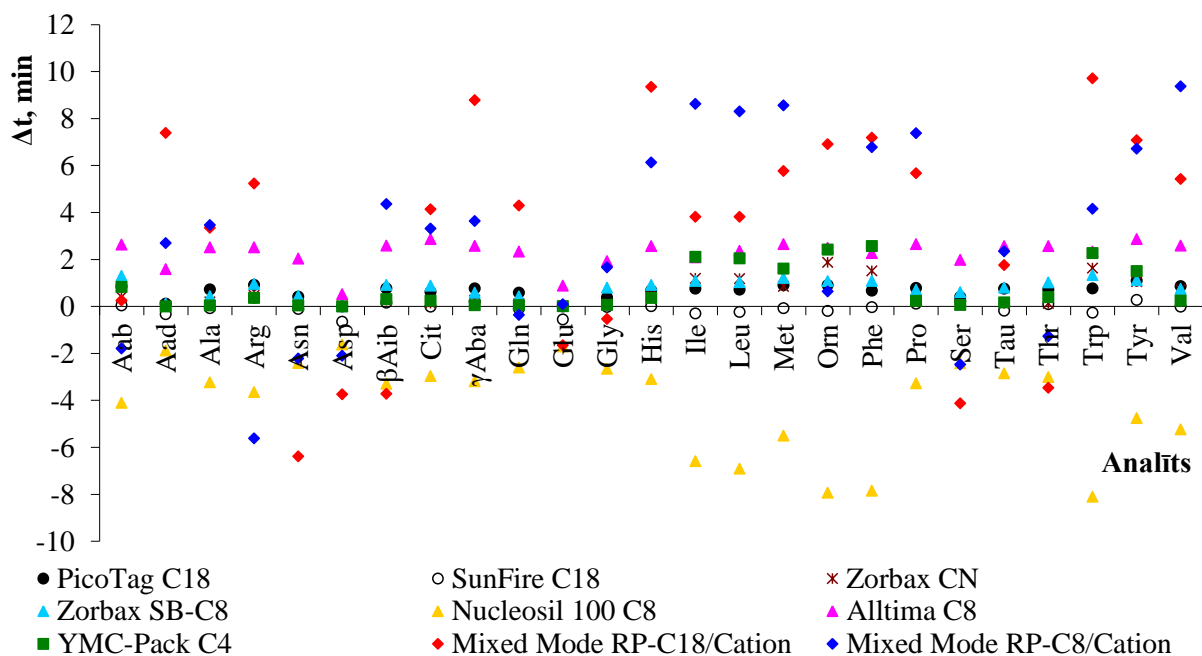
2.2. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem datiem lineāram gradientam (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B), organiskais modificētājs – metanols, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B).



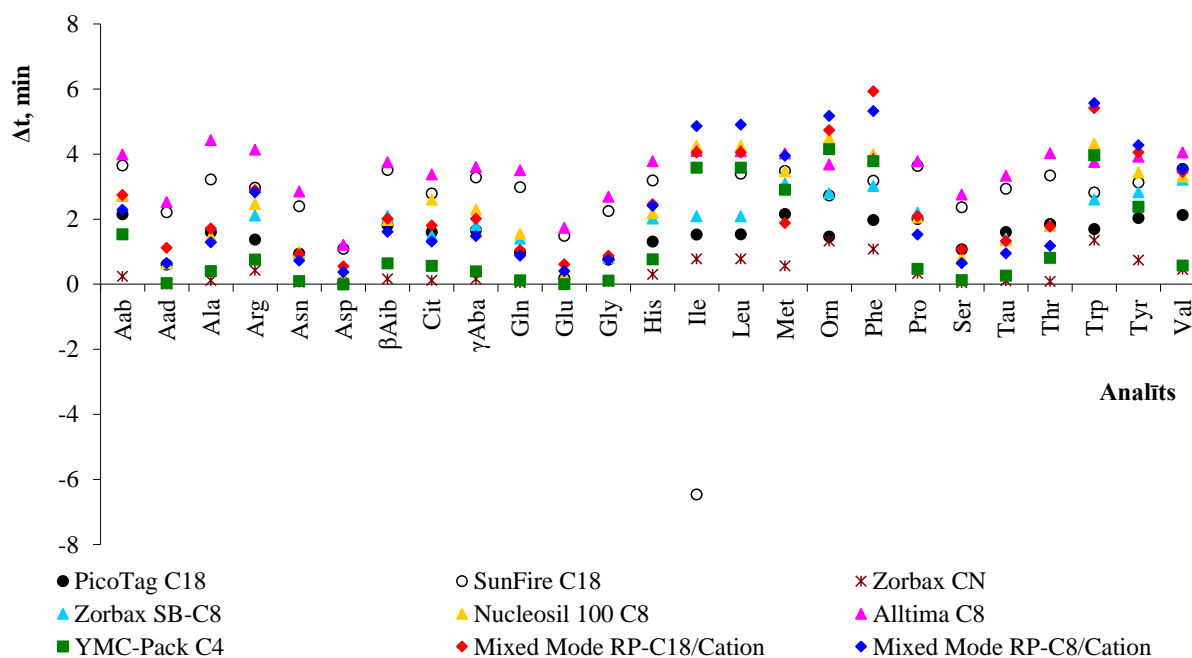
2.3. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem datiem lineāram gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), organiskais modificētājs – acetonitrils, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B).



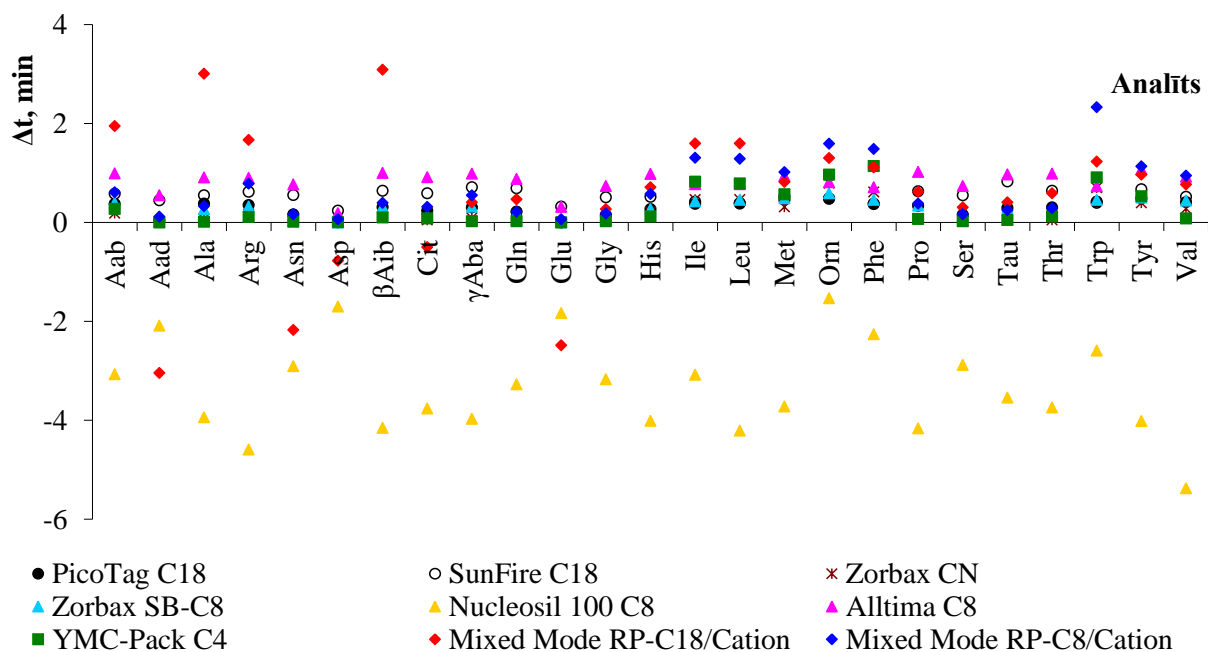
2.4. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem datiem lineāram gradientam (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B), organiskais modificētājs – metanols, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B).



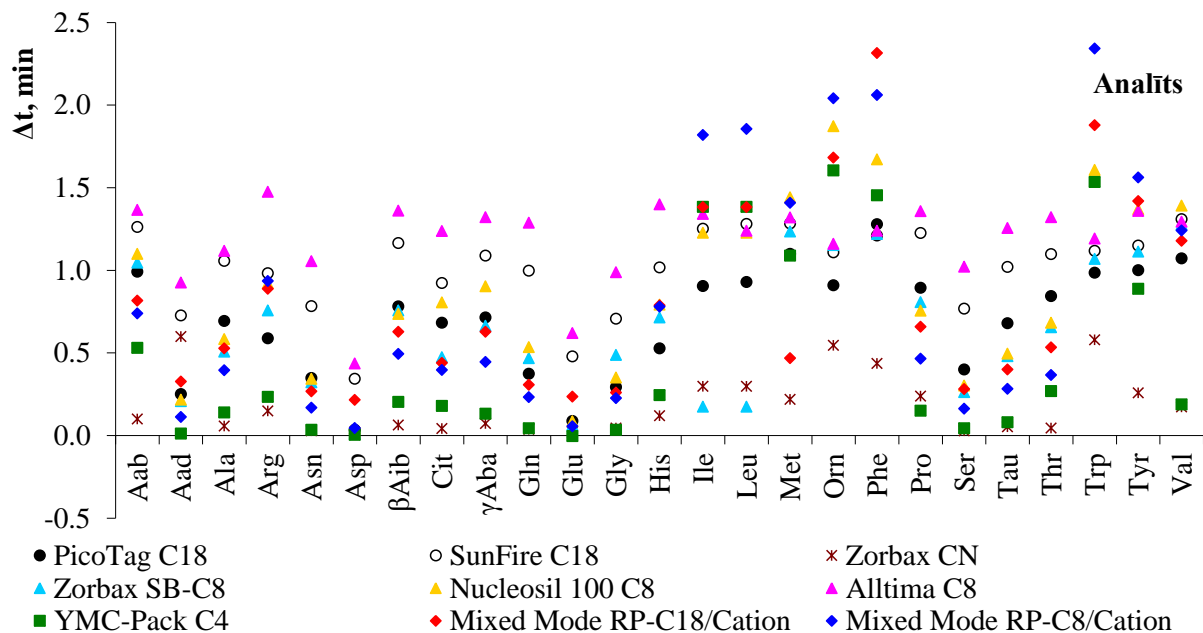
2.5. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem datiem lineāram gradientam (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), organiskais modificētājs – acetonitrils, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B).



2.6. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem datiem lineāram gradientam (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), organiskais modificētājs – metanols, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 30,0 min 100% B).



2.7. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem datiem lineāram gradientam (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), organiskais modificētājs – acetonitrils, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B).



2.8. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem datiem lineāram gradientam (0,0 min 0% B, 60,0 min 100% B), organiskais modificētājs – metanols, prognozēšanai izmantojot lineāro gradientu (0,0 min 0% B, 45,0 min 100% B).

### 3. PIELIKUMS

3.1.tabula

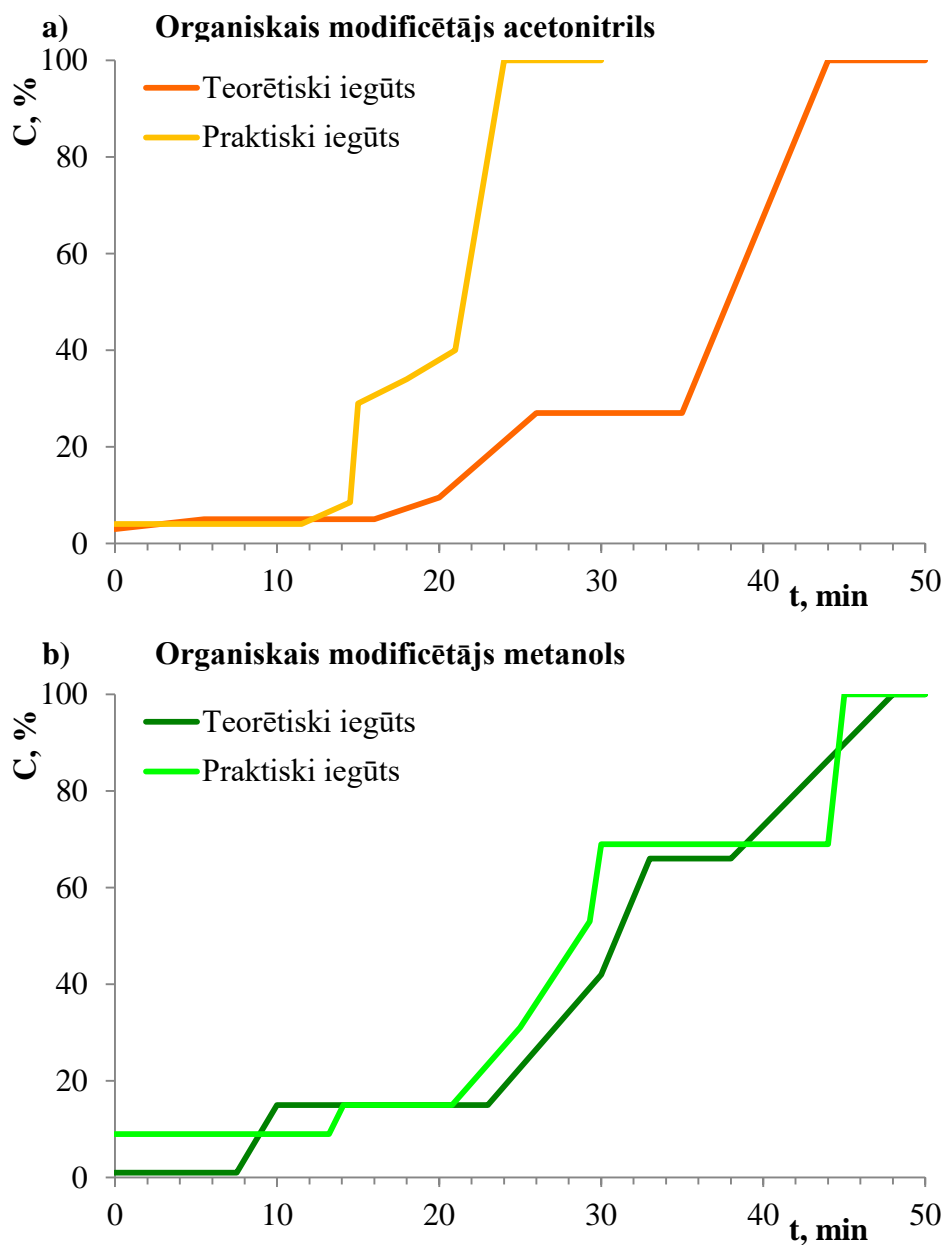
Korelācijas koeficients starp prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem rezultātiem, veicot prognozēšanu, pamatojoties uz aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu struktūrformulām, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālām īpašībām un vienā eksperimentā iegūtiem rezultātiem lineārā gradienta režīmā.

Prognozēšanas dati	Pico Tag C18		SunFire C18		Zorbax CN		Zorbax SB-C8		Nucleosil 100 C8	
	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH
Prognozēts 30 min no 60 min	0,9987	0,998	0,998	0,992	0,9990	0,9995	0,98	0,98	0,98	0,995
Prognozēts 30 min no 45 min	0,9995	0,9994	0,9995	0,9996	0,9996	0,998	0,9994	0,9993	0,97	0,9992
Prognozēts 45 min no 60 min	0,9987	0,9997	0,9991	0,9997	0,9998	0,99998	0,9998	0,9992	0,99998	0,9993
Prognozēts 45 min no 30 min	0,9995	0,9993	0,96	0,997	0,9996	0,99998	0,95	0,96	0,9998	0,9992
Prognozēts 60 min no 30 min	0,9986	0,998	0,9988	0,98	0,9991	0,9998	0,9986	0,997	0,9997	0,998
Prognozēts 60 min no 45 min	0,9998	0,9997	0,9996	0,9998	0,99998	0,9989	0,9998	0,9990	0,97	0,9993

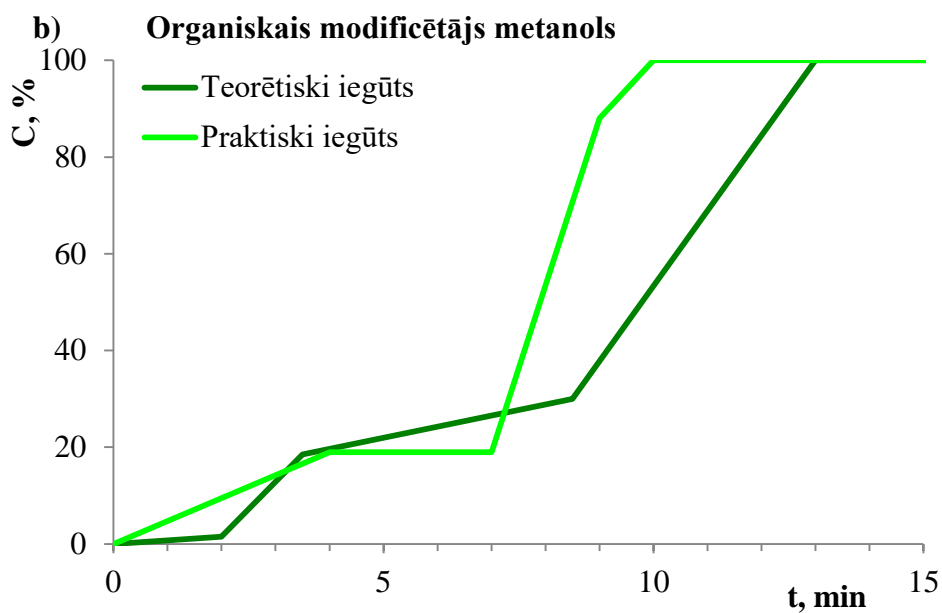
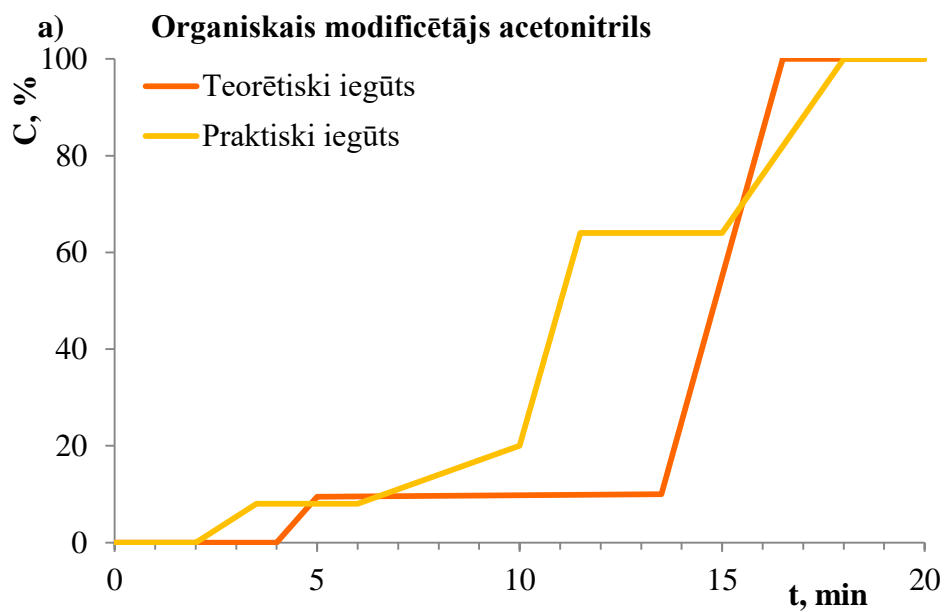
Korelācijas koeficients starp prognozētiem un eksperimentāli iegūtiem rezultātiem, veicot prognozēšanu, pamatojoties uz aminoskābju fenilizotiocianāta atvasinājumu struktūrformulām, kustīgās un nekustīgās fāzes ķīmiski fizikālām īpašībām un vienā eksperimentā iegūtiem rezultātiem lineārā gradienta režīmā.

Prognozēšanas dati	Alltima C8		YMC-Pack C4		Mixed Mode RP-C18/Cation		Mixed Mode RP-C8/Cation	
	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH	ACN	MeOH
Prognozēts 30 min no 60 min	0,98	0,98	0,9991	0,996	0,98	0,98	0,98	0,98
Prognozēts 30 min no 45 min	0,997	0,998	0,9995	0,9998	0,9993	0,998	0,90	0,998
Prognozēts 45 min no 60 min	0,9992	0,9995	0,99999	0,99998	0,9990	0,9996	0,9992	0,998
Prognozēts 45 min no 30 min	0,997	0,9987	0,9994	0,992	0,991	0,992	0,997	0,997
Prognozēts 60 min no 30 min	0,994	0,997	0,9987	0,9996	0,79	0,998	0,72	0,996
Prognozēts 60 min no 45 min	0,9990	0,9996	0,9998	0,99998	0,93	0,9996	0,9992	0,9994

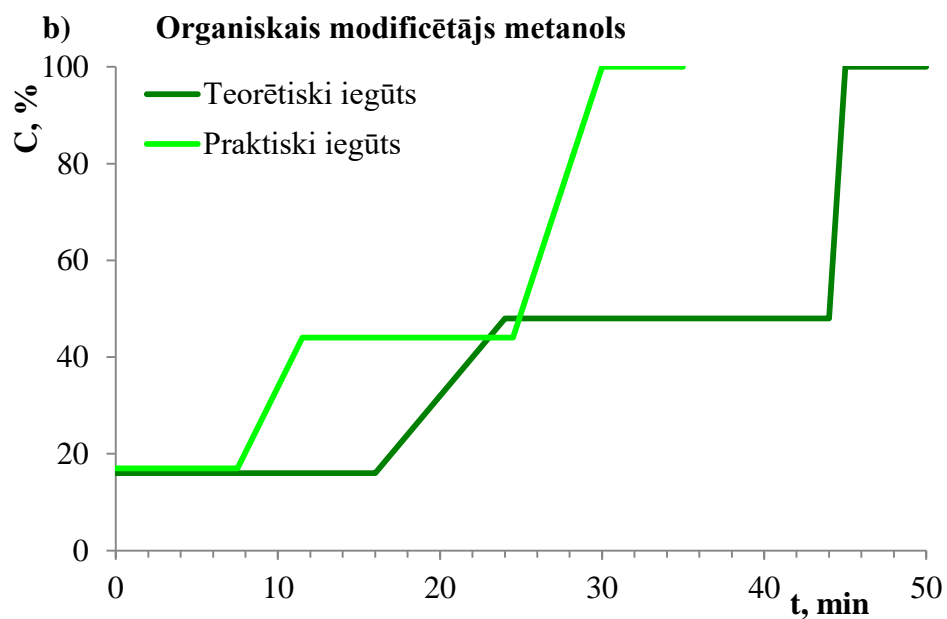
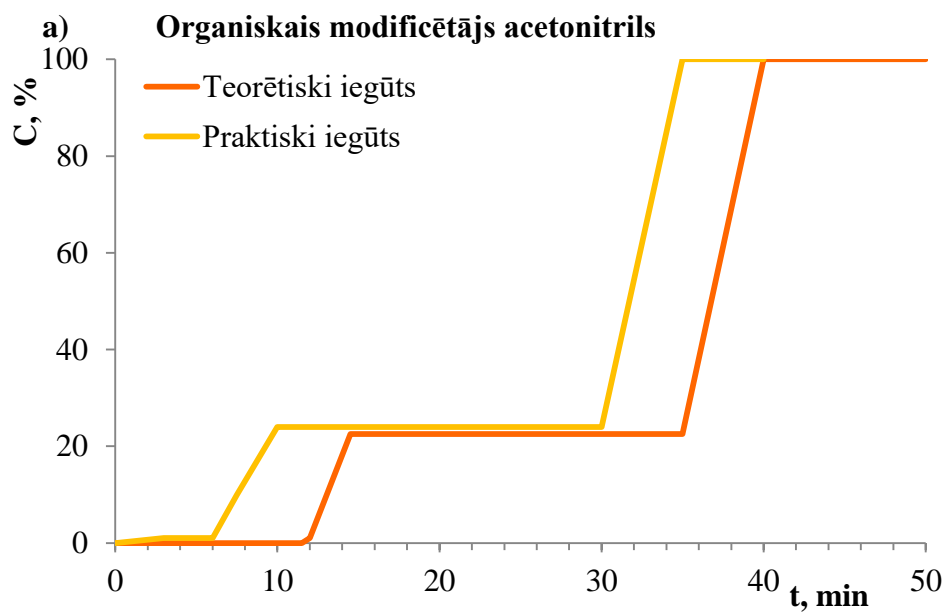
## 4. PIELIKUMS



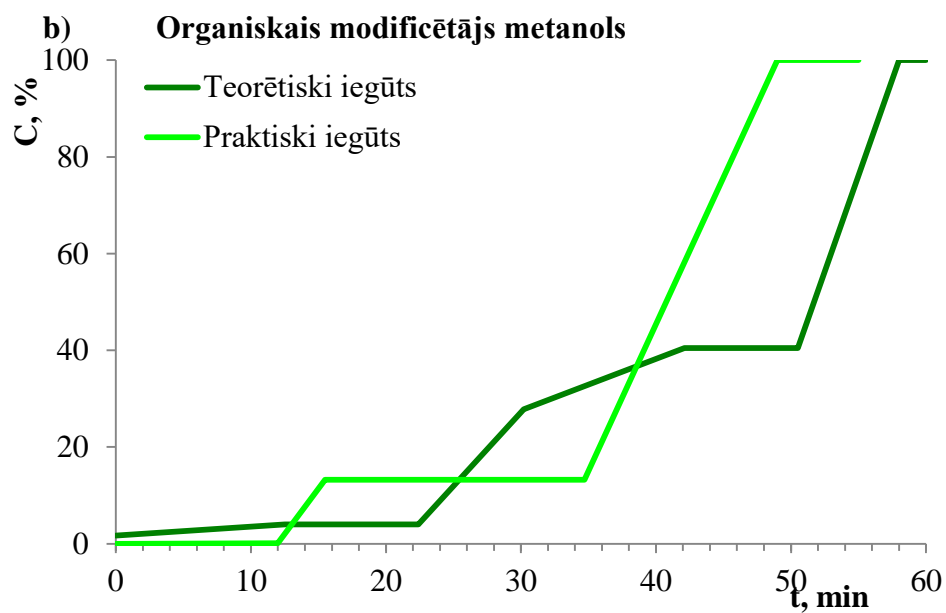
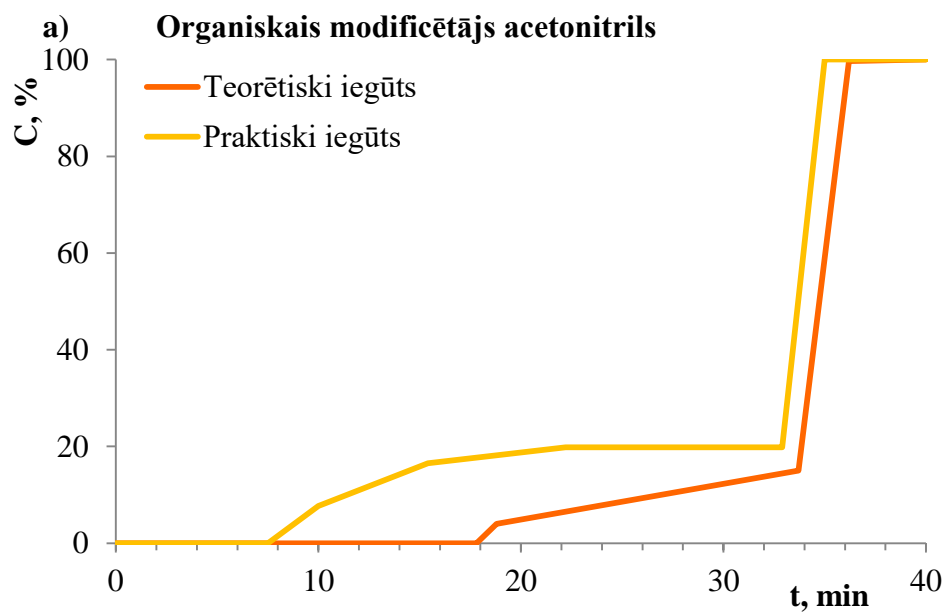
4.1. att. Segmentēti gradienti, iegūtie *SunFire C18* kolonnai optimizācijas procesā abiem organiskiem modificētājiem.



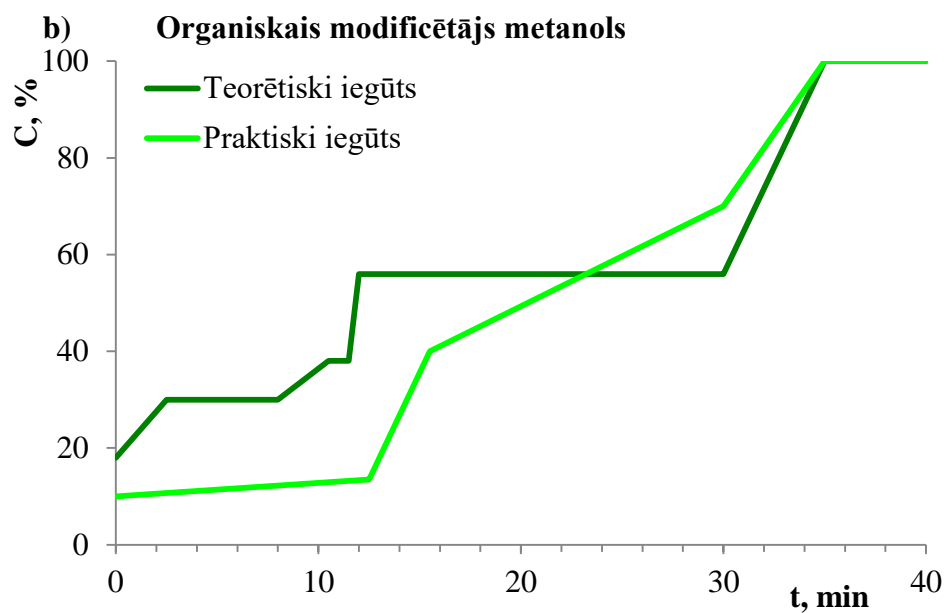
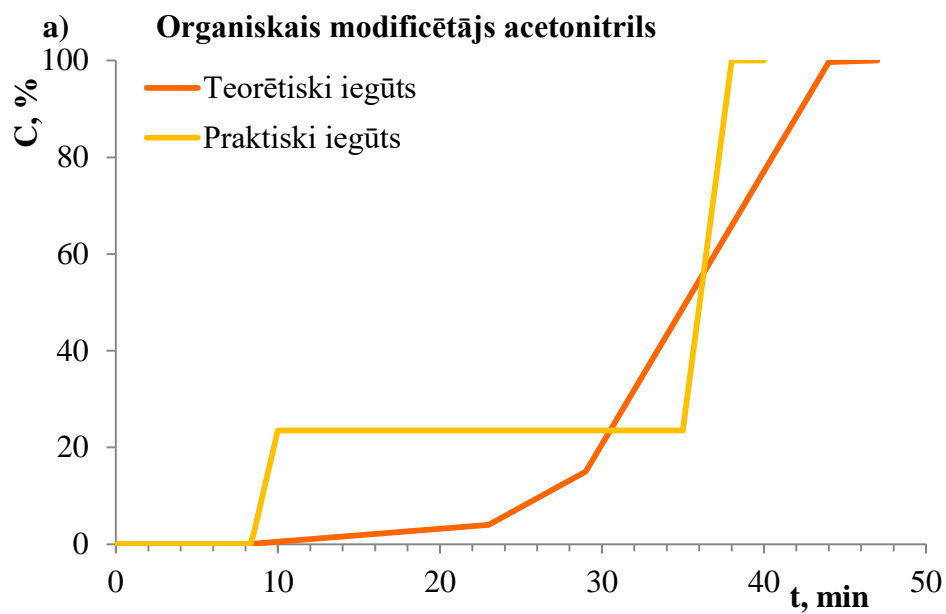
4.2. att. Segmentēti gradienti, iegūtie Zorbax CN kolonnai optimizācijas procesā abiem organiskiem modificētājiem.



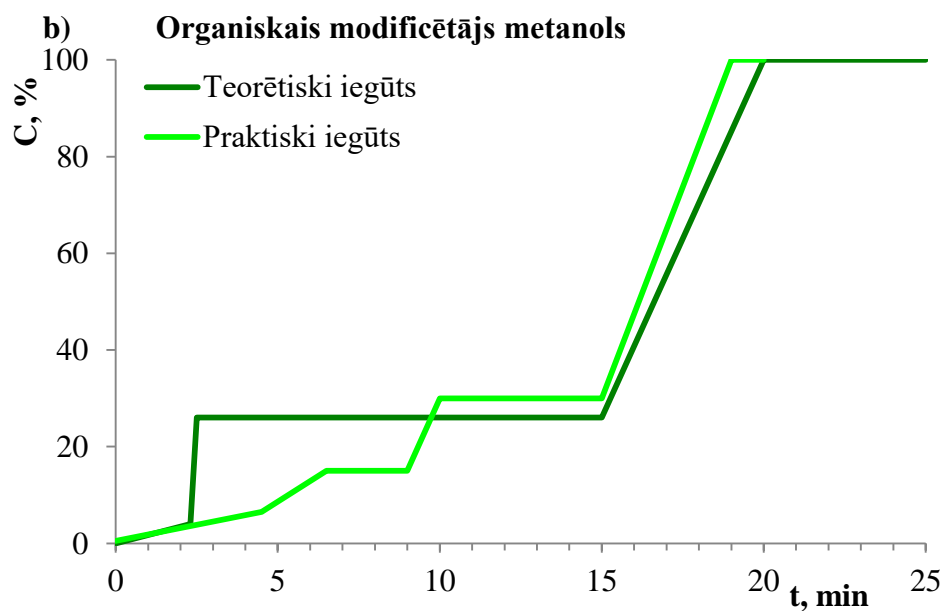
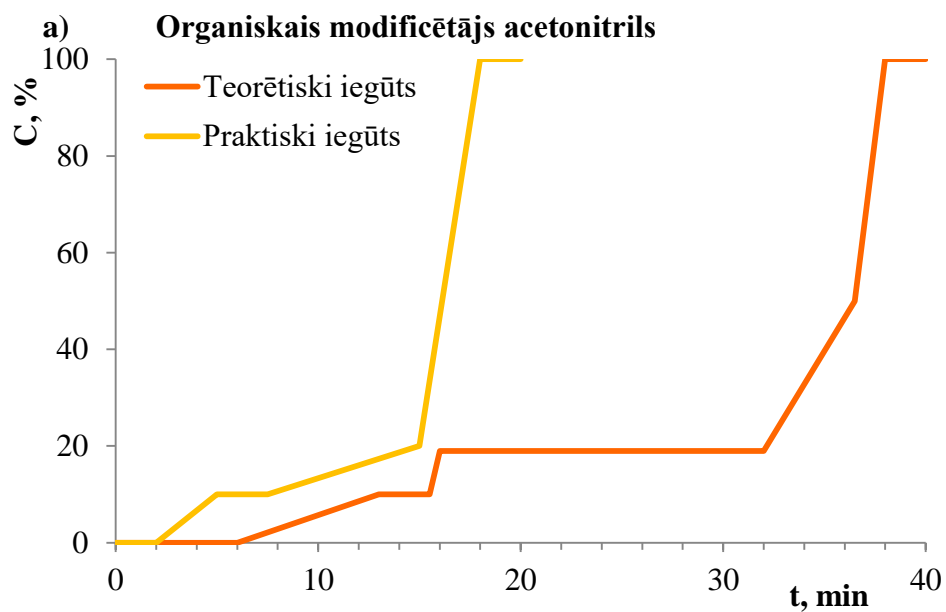
4.3. att. Segmentēti gradienti, iegūtie *Zorbax SB-C8* kolonnai optimizācijas procesā abiem organiskiem modificētājiem.



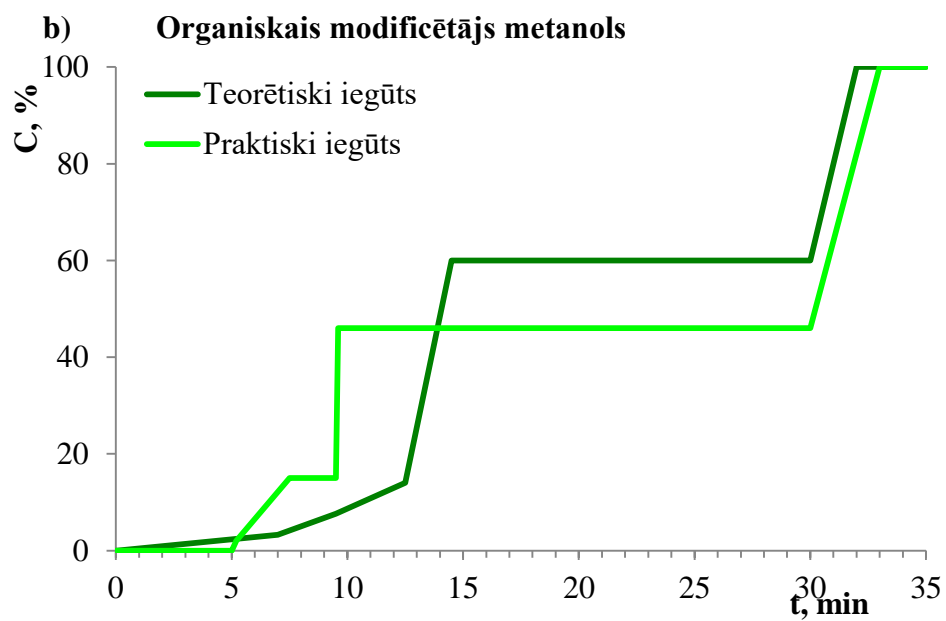
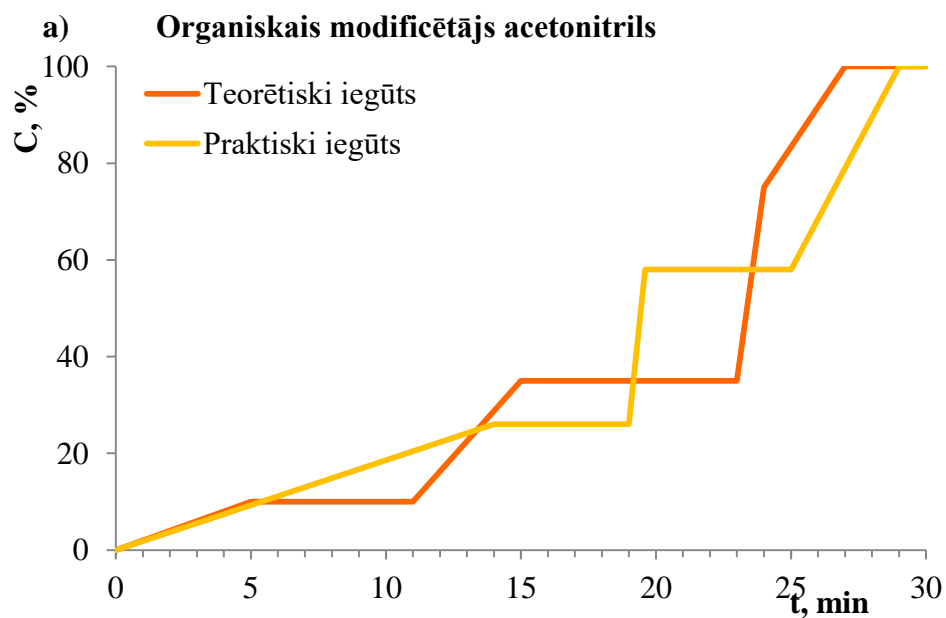
4.4. att. Segmentēti gradienti, iegūtie *Nucleosil 100 C8* kolonnai optimizācijas procesā abiem organiskiem modificētājiem.



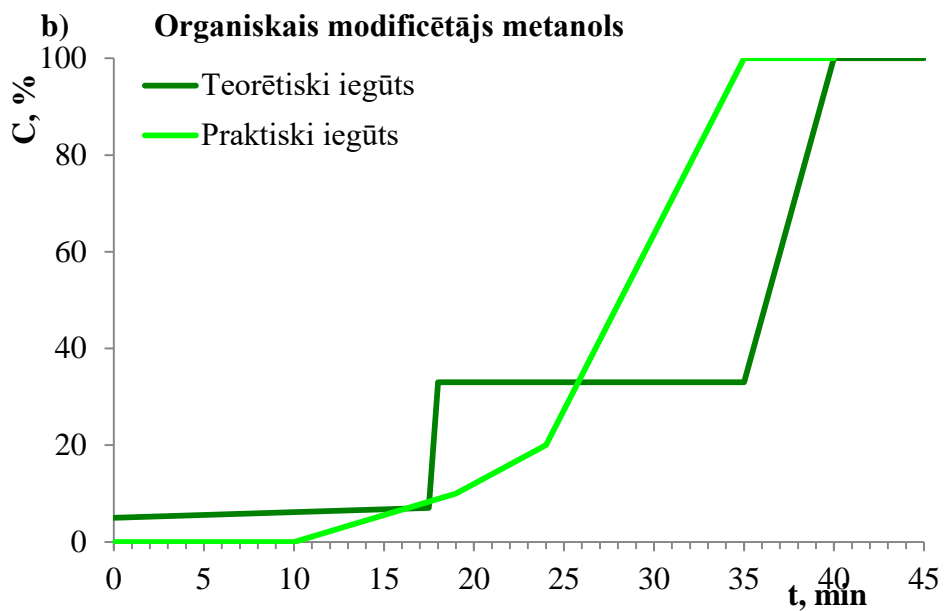
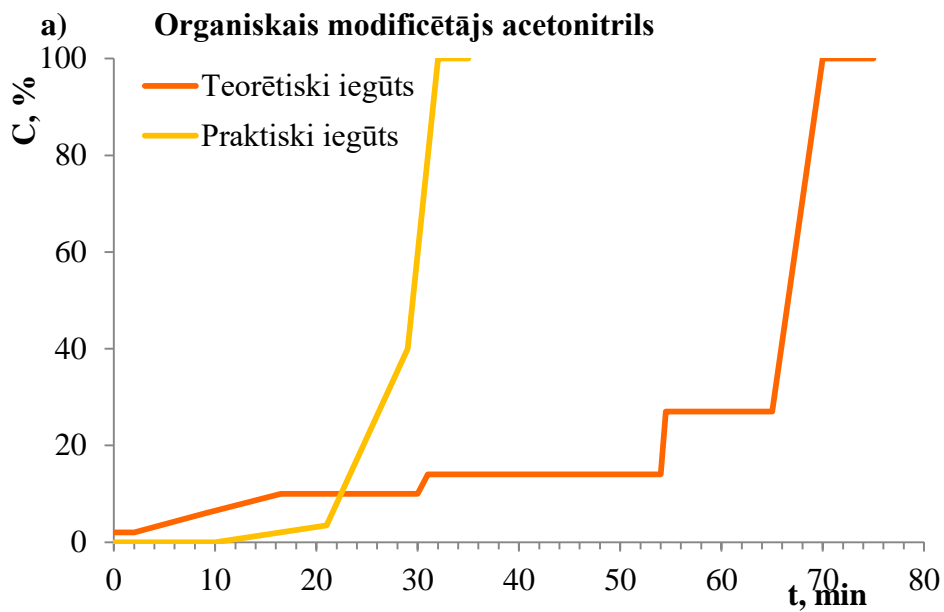
4.5. att. Segmentēti gradienti, iegūtie *Alltima C8* kolonnai optimizācijas procesā abiem organiskiem modificētājiem.



4.6. att. Segmentēti gradienti, iegūtie YMC-Pack C4 kolonnai optimizācijas procesā abiem organiskiem modificētājiem.

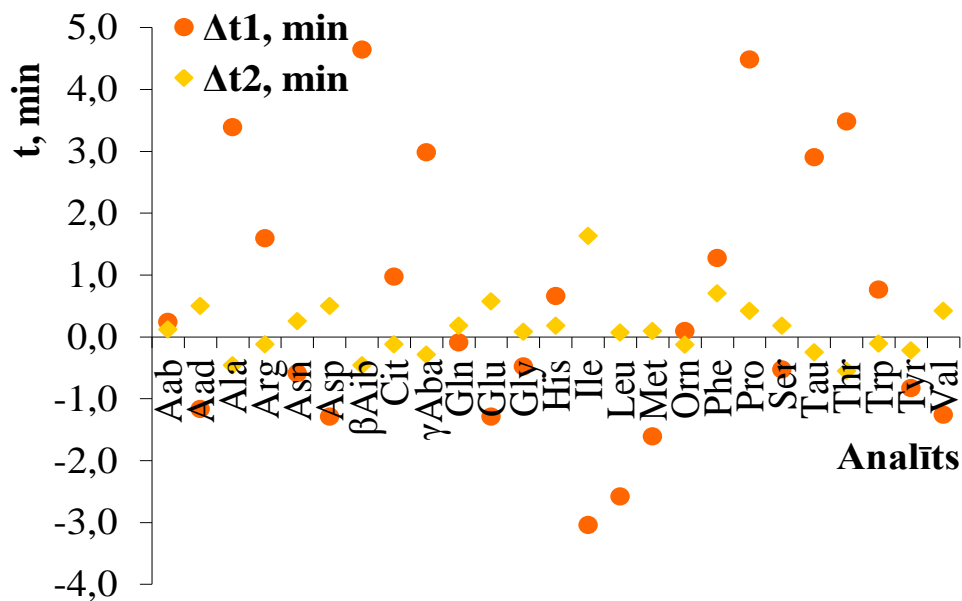


4.7. att. Segmentēti gradienti, iegūtie *Mixed Mode RP-C18/Cation* kolonnai optimizācijas procesā abiem organiskiem modificētājiem.

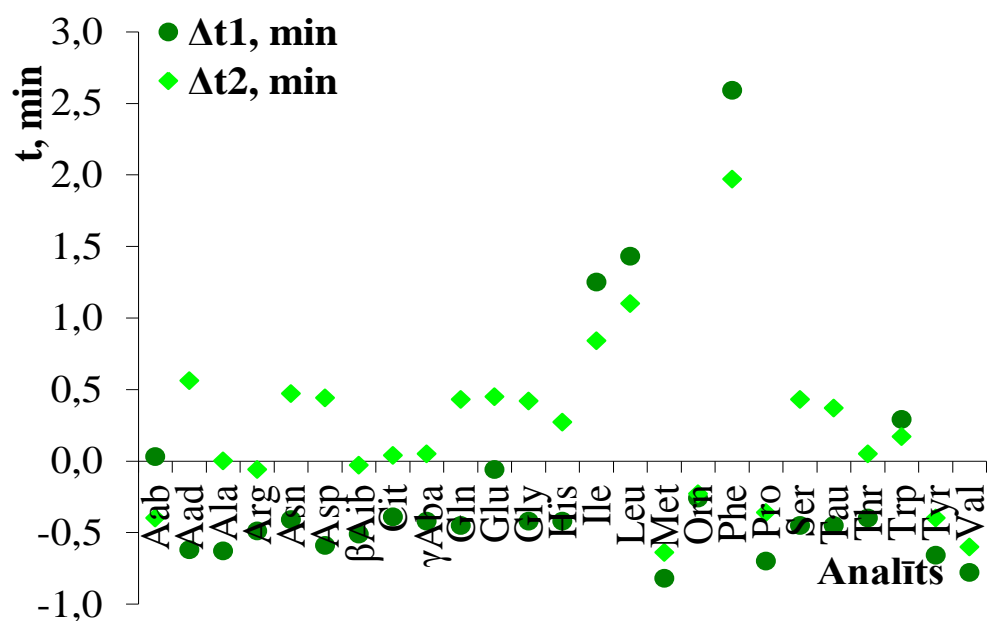


4.8. att. Segmentēti gradienti, iegūtie *Mixed Mode RP-C8/Cation* kolonnai optimizācijas procesā abiem organiskiem modificētājiem

a) Organiskais modificētājs acetonitrils

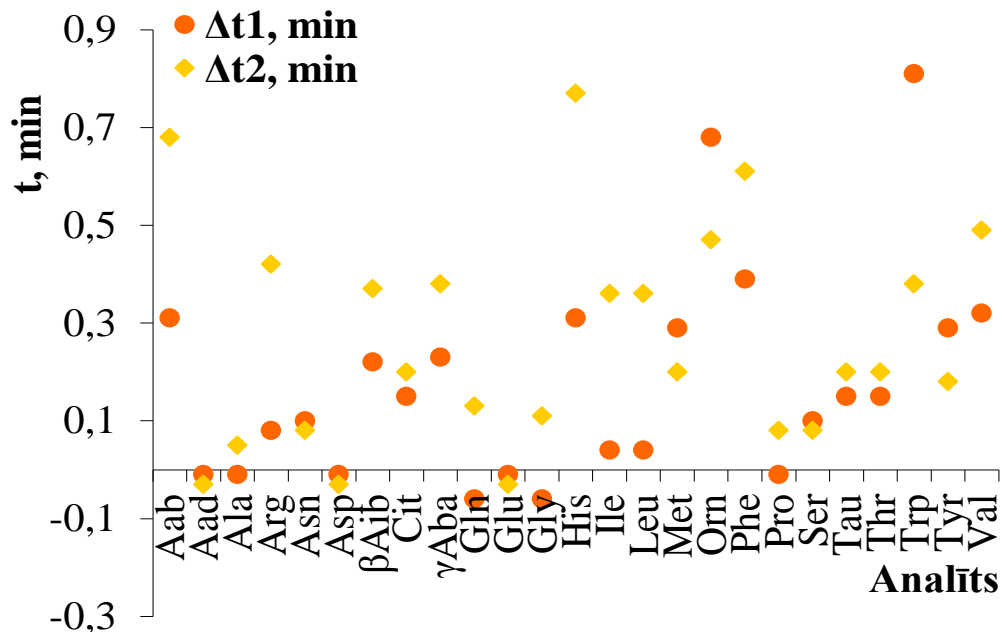


b) Organiskais modificētājs metanols

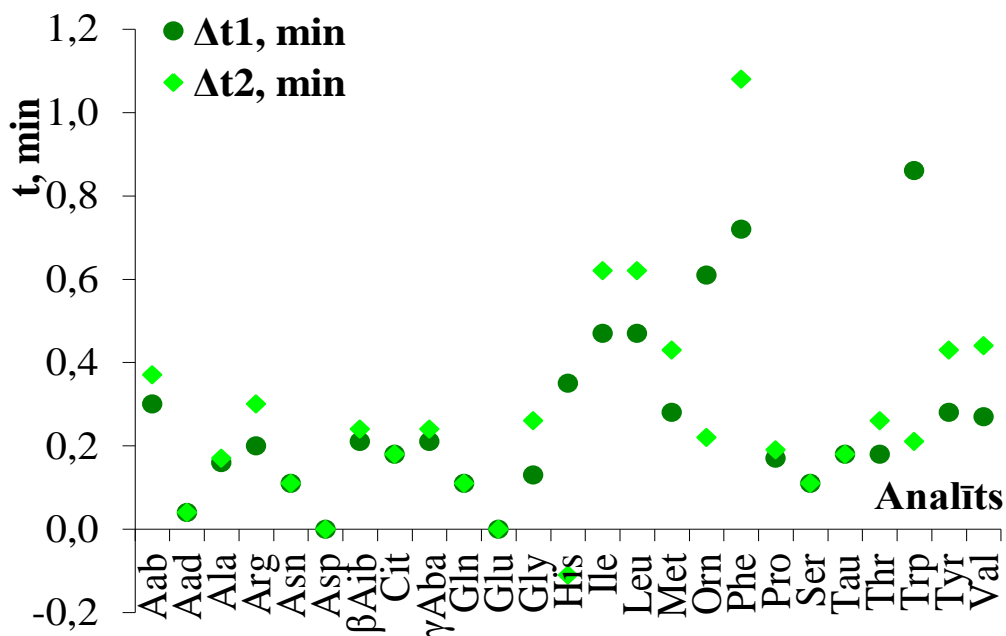


4.9. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem ( $\Delta t_1$ ) un eksperimentāli iegūtiem ( $\Delta t_2$ ) datiem segmentētām gradientam *SunFire C18* nekustīgai fāzei.

a) Organiskais modificētājs acetonitrils

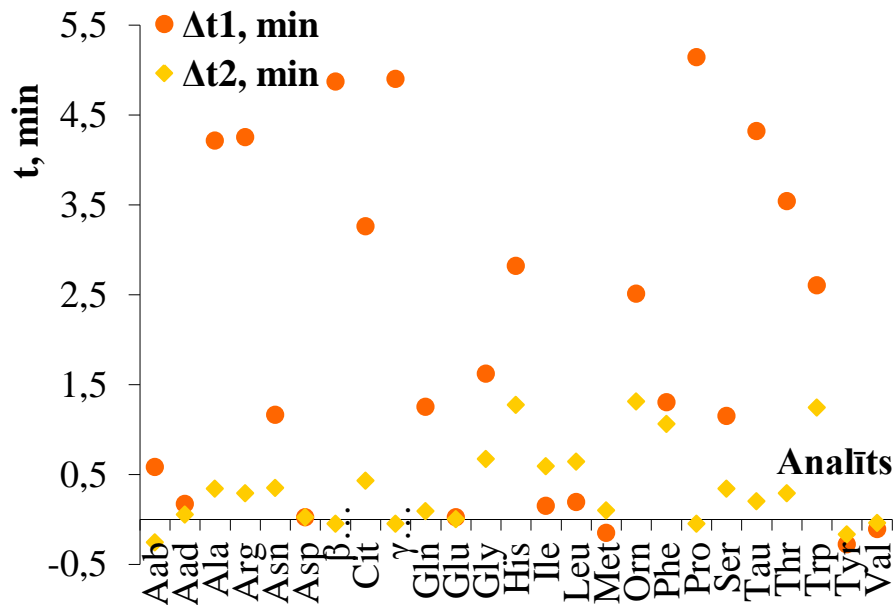


b) Organiskais modificētājs metanols

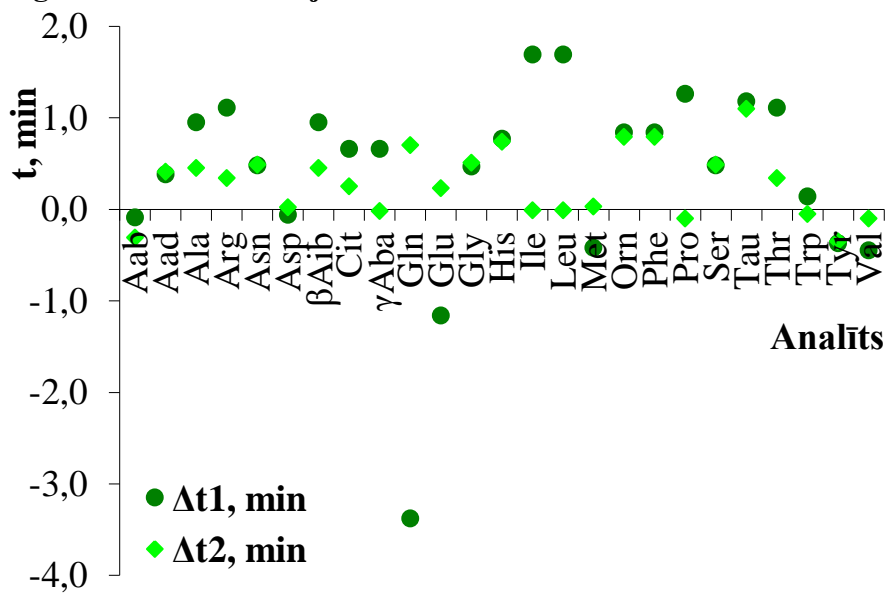


4.10. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem ( $\Delta t_1$ ) un eksperimentāli iegūtiem ( $\Delta t_2$ ) datiem segmentētām gradientam Zorbax CN nekustīgai fāzei.

a) Organiskais modificētājs acetonitrils

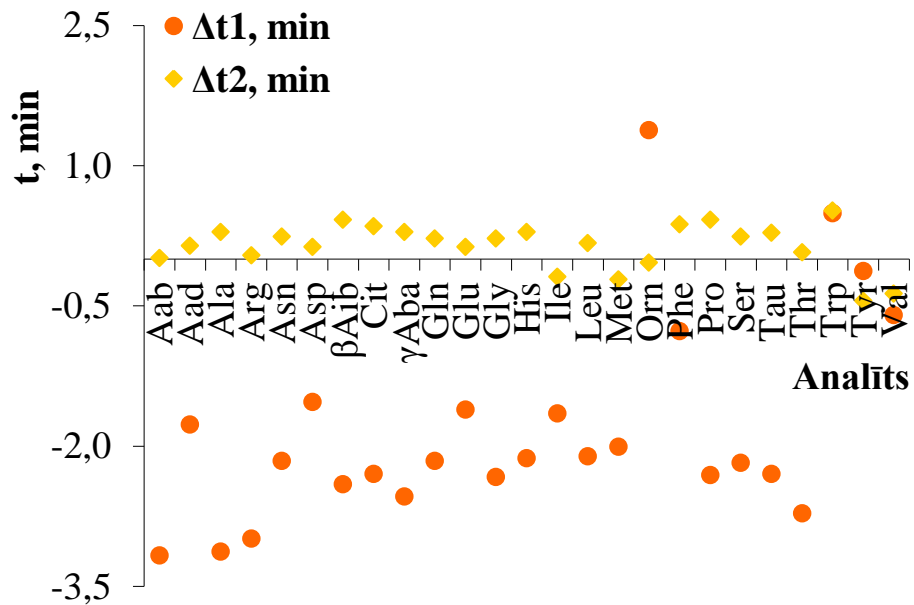


b) Organiskais modificētājs metanols

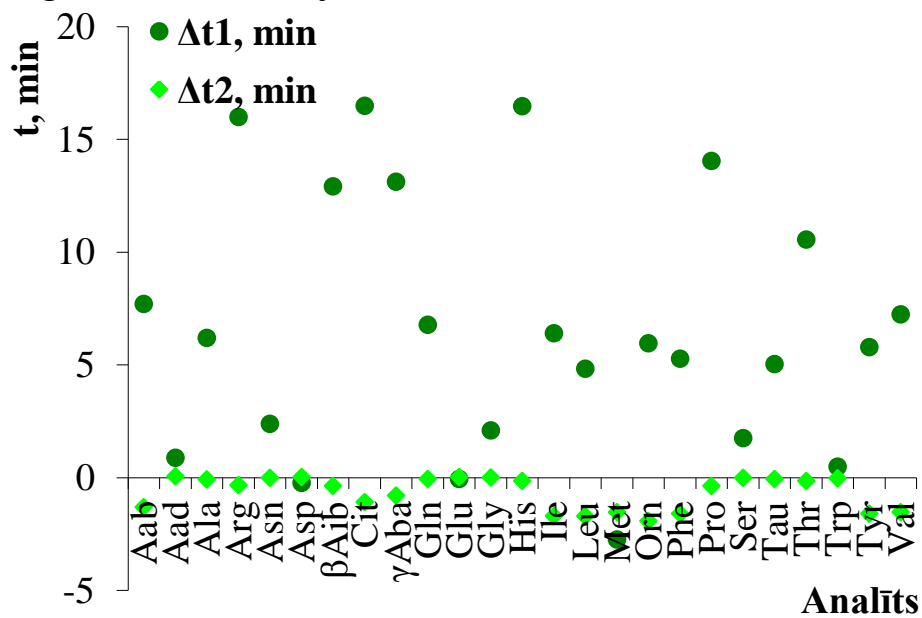


4.11. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem ( $\Delta t_1$ ) un eksperimentāli iegūtiem ( $\Delta t_2$ ) datiem segmentētām gradientam Zorbax SB-C8 nekustīgai fāzei.

a) Organiskais modificētājs acetonitrils

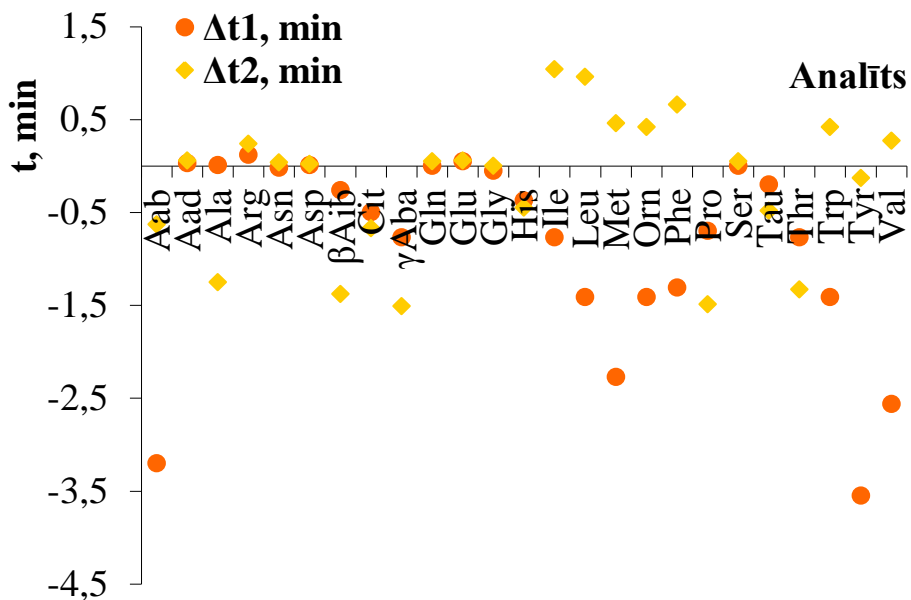


b) Organiskais modificētājs metanols

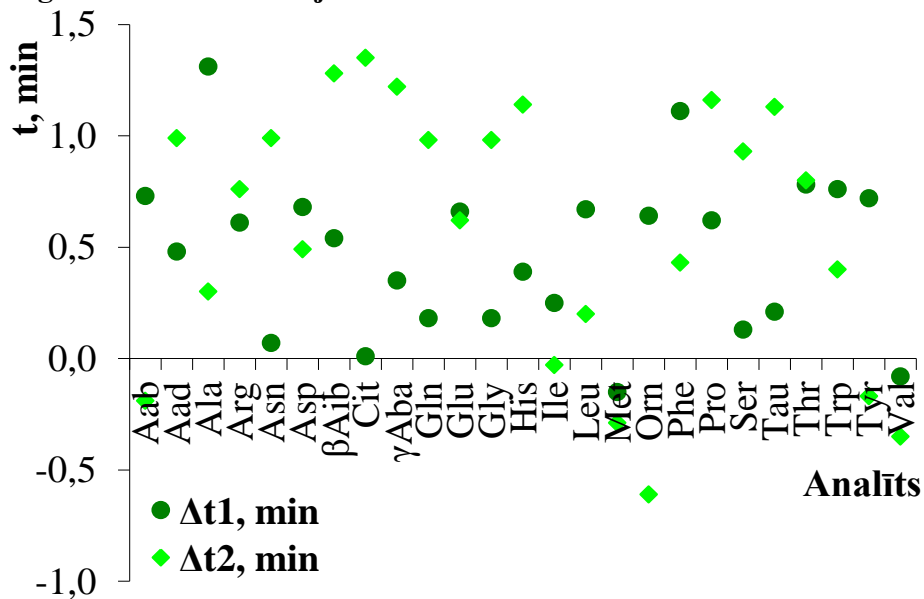


4.12. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem ( $\Delta t_1$ ) un eksperimentāli iegūtiem ( $\Delta t_2$ ) datiem segmentētām gradientam *Nucleosil 100 C8* nekustīgai fāzei.

a) Organiskais modificētājs acetonitrils

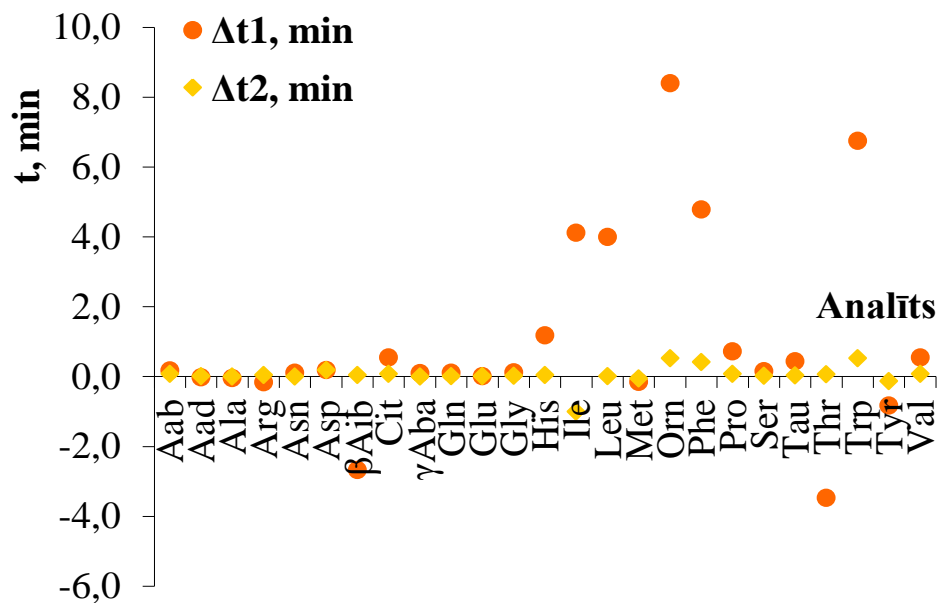


b) Organiskais modificētājs metanols

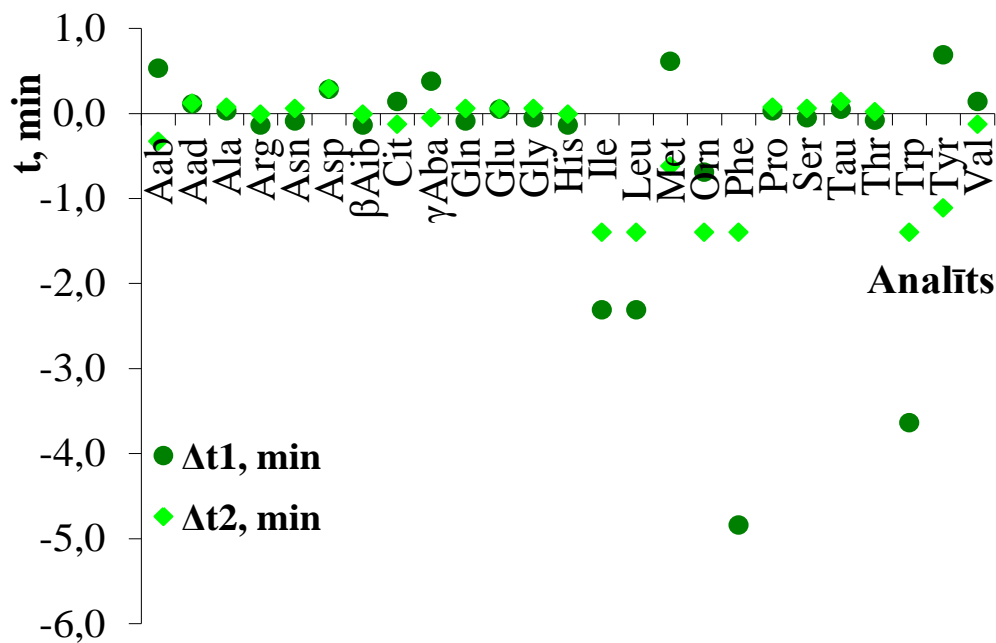


4.13. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem ( $\Delta t_1$ ) un eksperimentāli iegūtiem ( $\Delta t_2$ ) datiem segmentētām gradientam *Alltima C8* nekustīgai fāzei.

a) Organiskais modificētāis acetonitrils

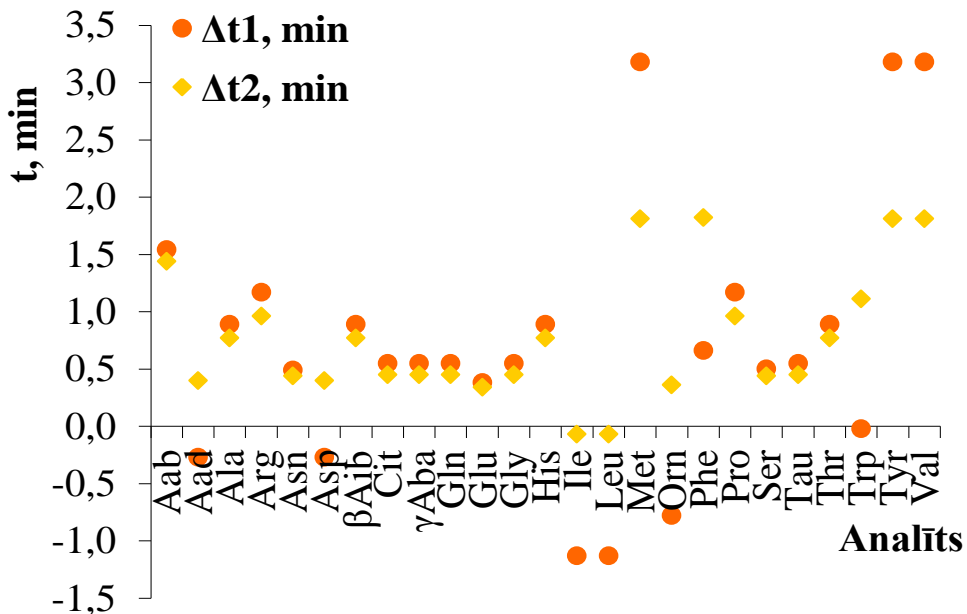


b) Organiskais modificētājs metanols

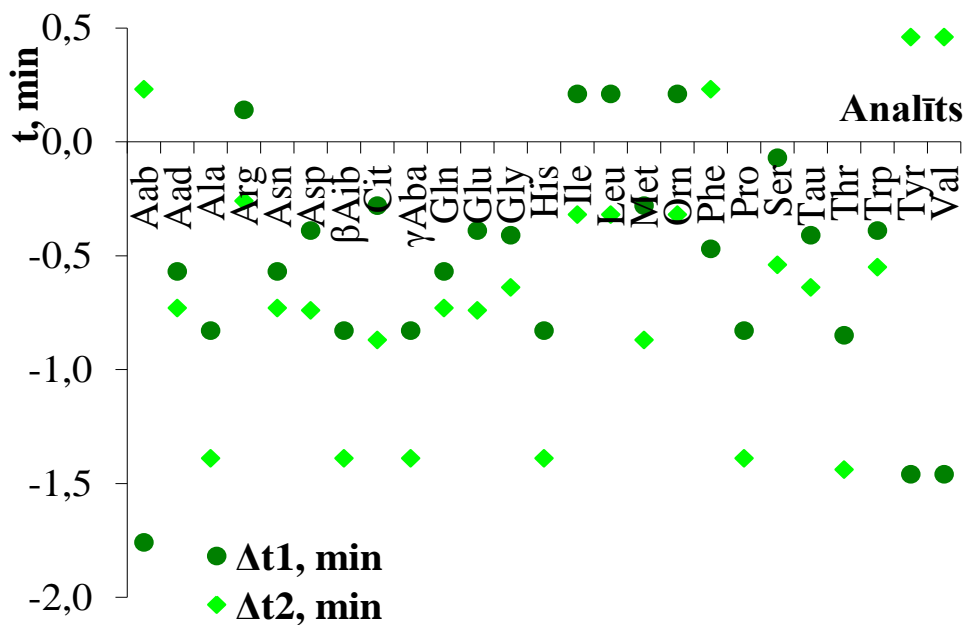


4.14. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem ( $\Delta t_1$ ) un eksperimentāli iegūtiem ( $\Delta t_2$ ) datiem segmentētām gradientam YMC Pack C4 nekustīgai fāzei.

a) Organiskais modificētājs acetonitrils

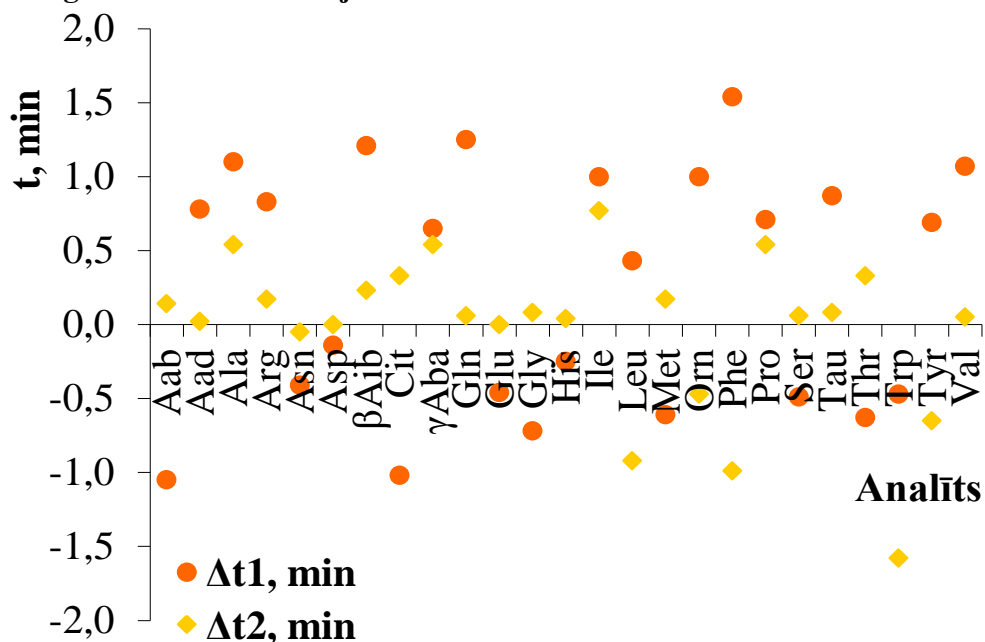


b) Organiskais modificētājs metanols

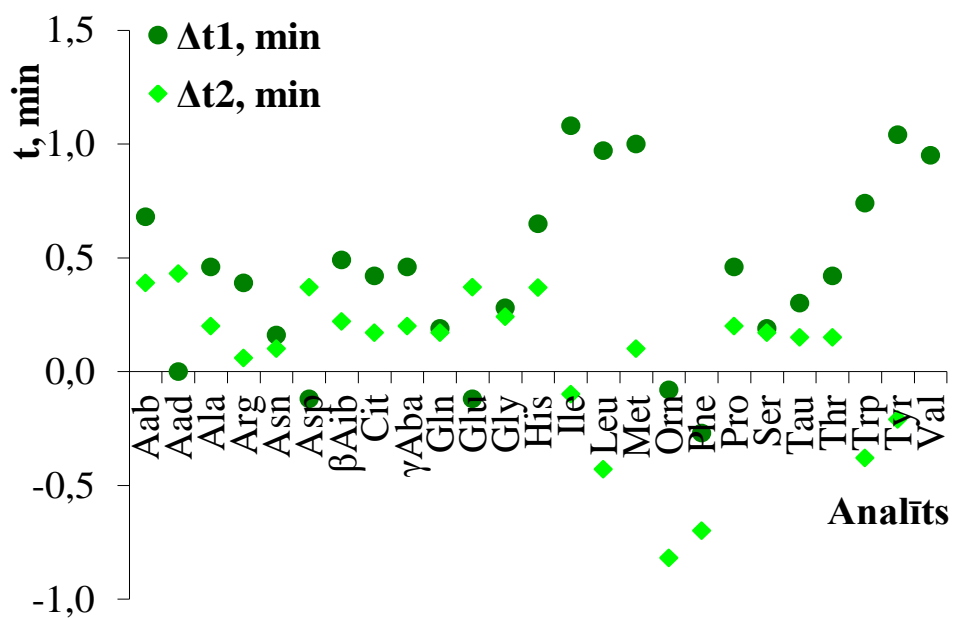


4.15. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem ( $\Delta t_1$ ) un eksperimentāli iegūtiem ( $\Delta t_2$ ) datiem segmentētām gradientam *Mixed Mode RP-C18/Cation* nekustīgai fāzei.

a) Organiskais modificētājs acetonitrils



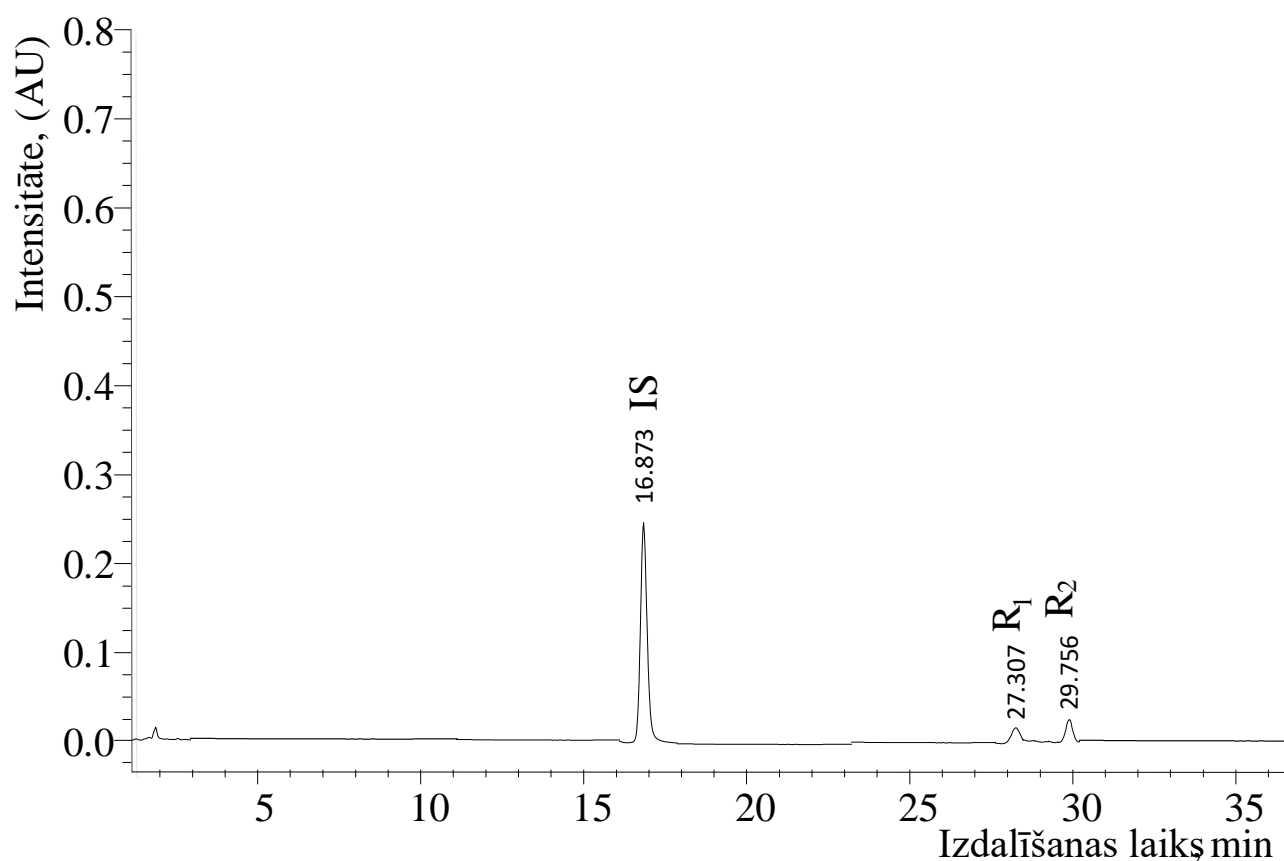
b) Organiskais modificētājs metanols



4.16. att. Izdalīšanas laiku starpība prognozētiem ( $\Delta t_1$ ) un eksperimentāli iegūtiem ( $\Delta t_2$ ) datiem segmentētām gradientam *Mixed Mode RP-C8/Cation* nekustīgai fāzei.

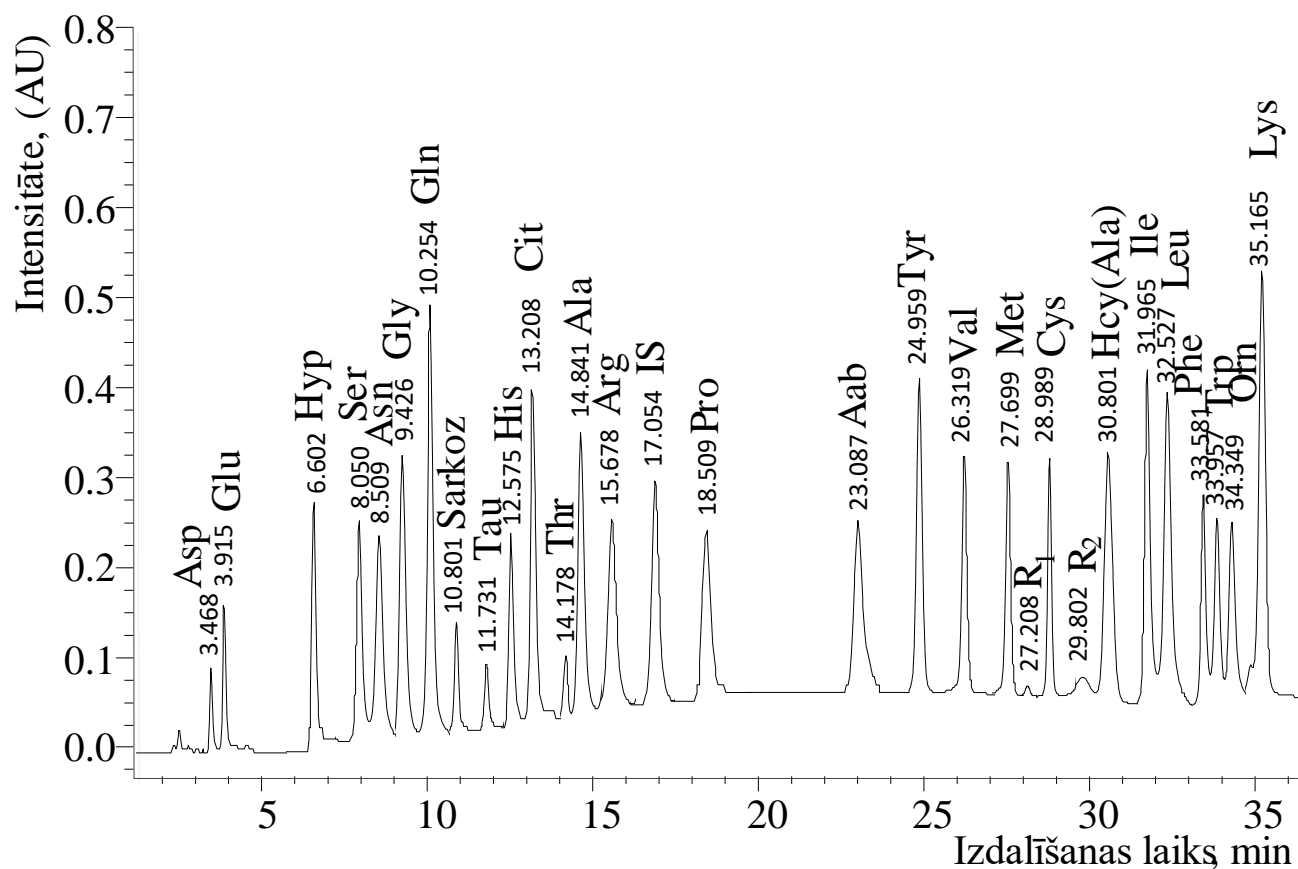
## 5. PIELIKUMS

Tukša parauga hromatogramma. *Hromatogrāfijas apstākļi: Pico Tag C18 3,9 mm x 300 mm kolonna, daļiņu izmērs 4 μm; kolonnas temperatūra 46 °C; plūsmas ātrums 1 mL·min<sup>-1</sup>; detektēšana pie 254 nm; ievadīto paraugu tilpums 10 μL; A eluents nātrija acetāta trihidrāta buferšķīdums pH 4,6; B Eluents 3/2 (v/v) (acetonitrils/ūdens) (2.3.4. nodaļa); segmentēts gradients no 100/0 % līdz 98,5/1,5 % A/B no 0 min līdz 12,5 min, no 98,5/1,5 % līdz 98/8 % A/B no 12,5 min līdz 20,5 min, no 98/8 % līdz 75,5/24,5 % A/B no 20,5 min līdz 21 min, no 75,5/24,5 % līdz 61/39 % A/B no 21 min līdz 36,5 min, no 61/39 % līdz 85/15 % A/B no 36,5 min līdz 40 min (3.42. att.)*



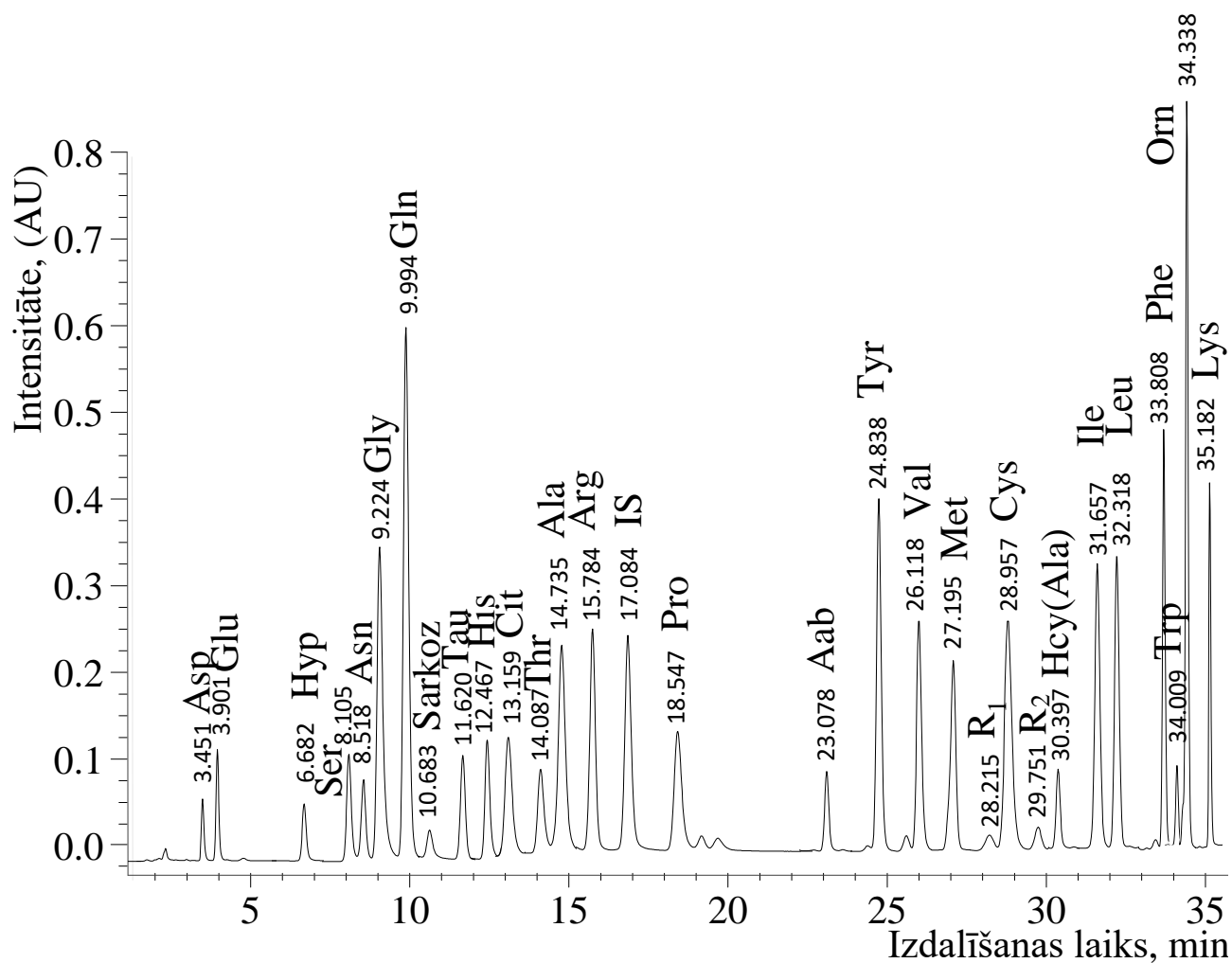
## 6. PIELIKUMS

Standartšķīduma (0,2  $\mu\text{mol/mL}$ ) hromatogramma. *Hromatogrāfijas apstākļi: Pico Tag C18 3,9 mm x 300 mm kolonna, daļiņu izmērs 4  $\mu\text{m}$ ; kolonnas temperatūra 46  $^{\circ}\text{C}$ ; plūsmas ātrums 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; detektēšana pie 254 nm; ievadīto paraugu tilpums 10  $\mu\text{L}$ ; A eluents nātrijs acetāta trihidrāta buferšķīdums pH 4,6; B Eluents 3/2 (v/v) (acetonitrils/ūdens) (2.3.4. nodaļa); segmentēts gradients no 100/0 % līdz 98,5/1,5 % A/B no 0 min līdz 12,5 min, no 98,5/1,5 % līdz 98/8 % A/B no 12,5 min līdz 20,5 min, no 98/8 % līdz 75,5/24,5 % A/B no 20,5 min līdz 21 min, no 75,5/24,5 % līdz 61/39 % A/B no 21 min līdz 36,5 min, no 61/39 % līdz 85/15 % A/B no 36,5 min līdz 40 min (3.42. att.)*



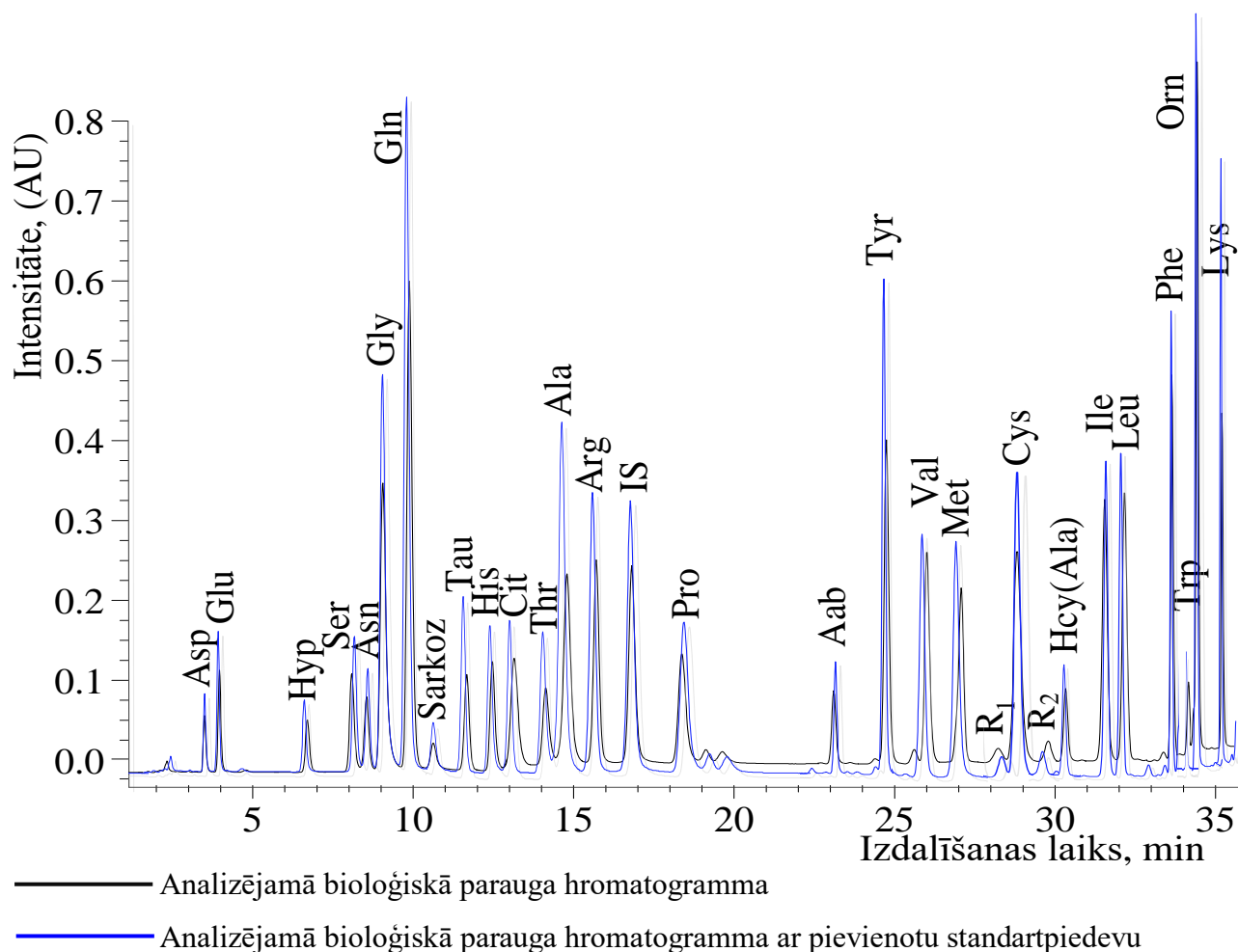
## 7. PIELIKUMS

Analizējamā bioloģiskā parauga hromatogramma. *Hromatogrāfijas apstākļi: Pico Tag C18 3,9 mm x 300 mm kolonna, daļiņu izmērs 4 μm; kolonnas temperatūra 46 °C; plūsmas ātrums 1 mL·min<sup>-1</sup>; detektēšana pie 254 nm; ievadīto paraugu tilpums 10 μL; A eluents nātrija acetāta trihidrāta buferšķīdums pH 4,6; B Eluents 3/2 (v/v) (acetonitrils/ūdens) (2.3.4. nodaļa); segmentēts gradients no 100/0 % līdz 98,5/1,5 % A/B no 0 min līdz 12,5 min, no 98,5/1,5 % līdz 98/8 % A/B no 12,5 min līdz 20,5 min, no 98/8 % līdz 75,5/24,5 % A/B no 20,5 min līdz 21 min, no 75,5/24,5 % līdz 61/39 % A/B no 21 min līdz 36,5 min, no 61/39 % līdz 85/15 % A/B no 36,5 min līdz 40 min (3.42. att.)*

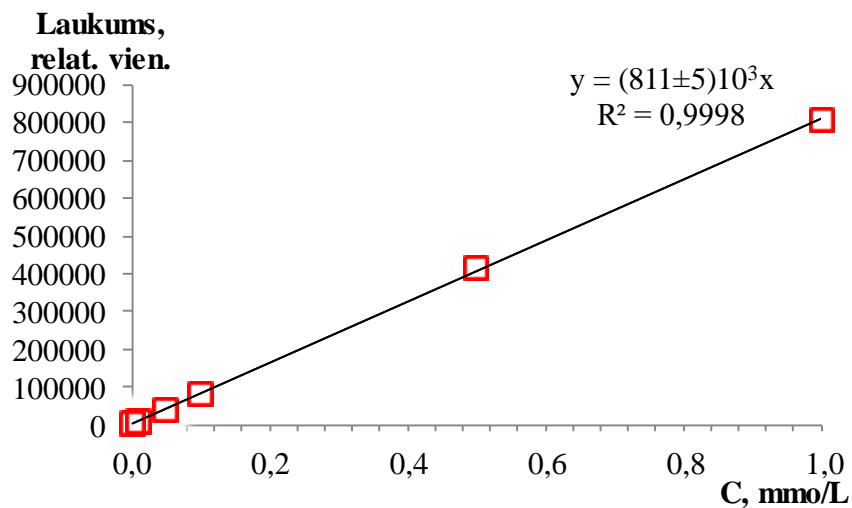


## 8. PIELIKUMS

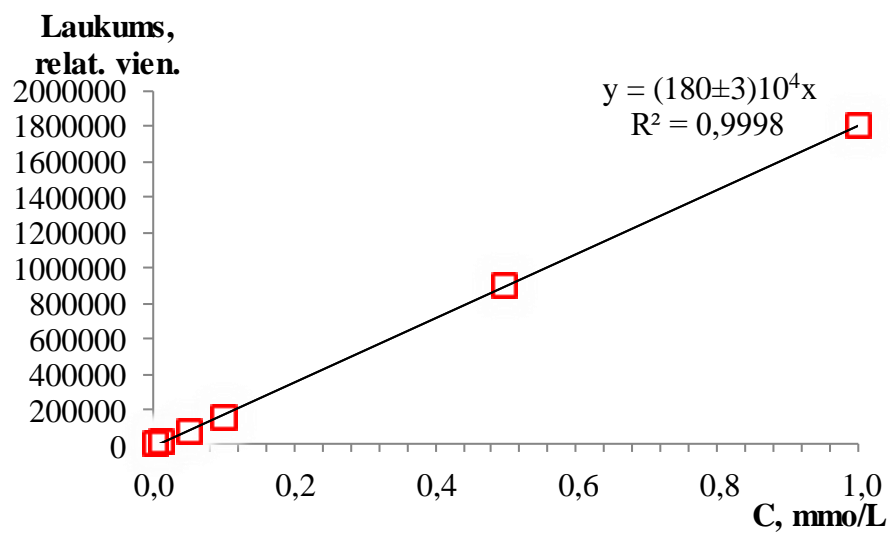
Analizējamā bioloģiskā parauga un analizējamā bioloģiskā parauga ar pievienotu standartpiedevu hromatogrammu pārklājums. *Hromatogrāfijas apstākļi: Pico Tag C18 3,9 mm x 300 mm kolonna, daļiņu izmērs 4 μm; kolonnas temperatūra 46 °C; plūsmas ātrums 1 mL·min<sup>-1</sup>; detektēšana pie 254 nm; ievadīto paraugu tilpums 10 μL; A eluents nātrija acetāta trihidrāta buferšķīdums pH 4,6; B Eluents 3/2 (v/v) (acetonitrils/ūdens) (2.3.4. nodaļa); segmentēts gradients no 100/0 % līdz 98,5/1,5 % A/B no 0 min līdz 12,5 min, no 98,5/1,5 % līdz 98/8 % A/B no 12,5 min līdz 20,5 min, no 98/8 % līdz 75,5/24,5 % A/B no 20,5 min līdz 21 min, no 75,5/24,5 % līdz 61/39 % A/B no 21 min līdz 36,5 min, no 61/39 % līdz 85/15 % A/B no 36,5 min līdz 40 min (3.42. att.)*



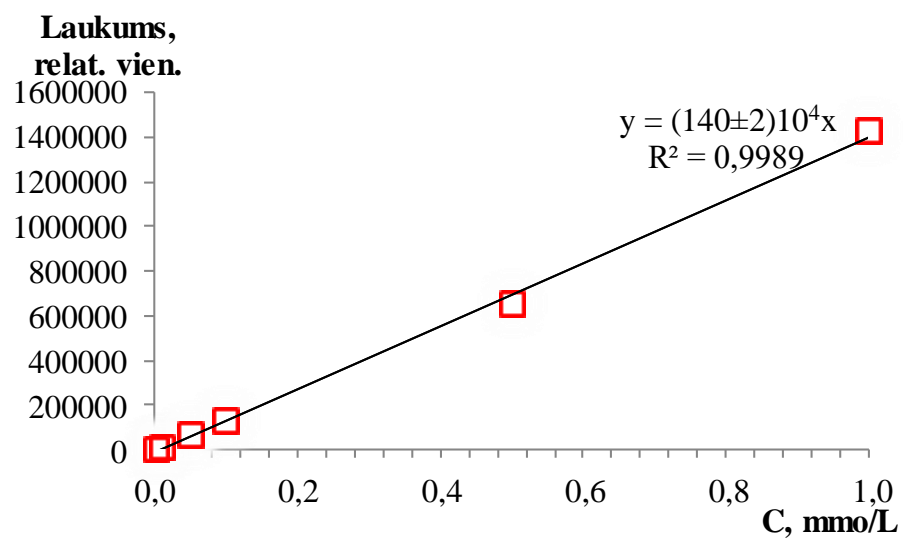
## 9. PIELIKUMS



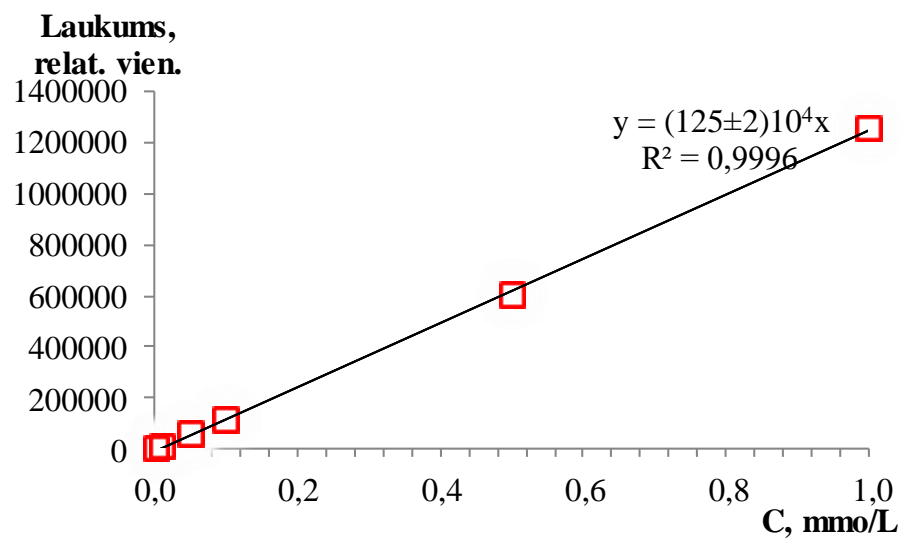
9.1. att. Glutamīnskābes kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



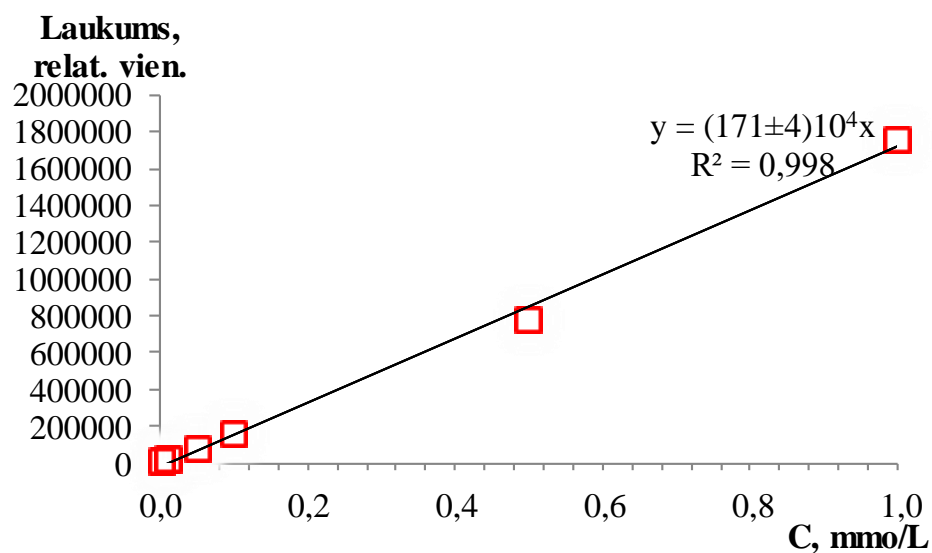
9.2. att. Hidroksiprolīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



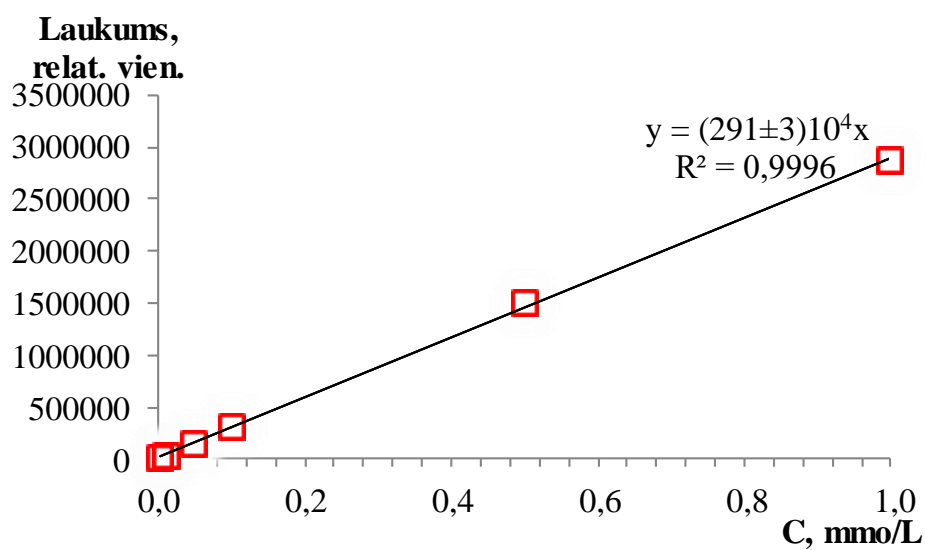
9.3. att. Serīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



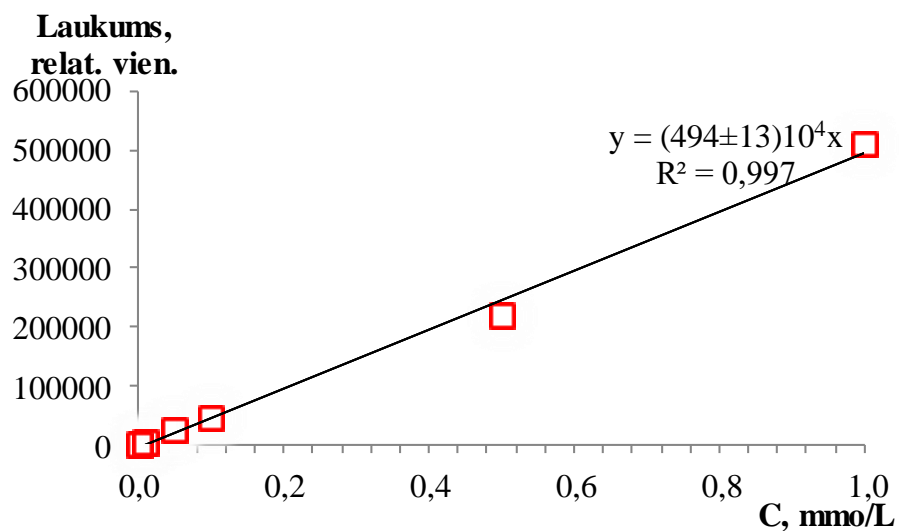
9.4. att. Asparagīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



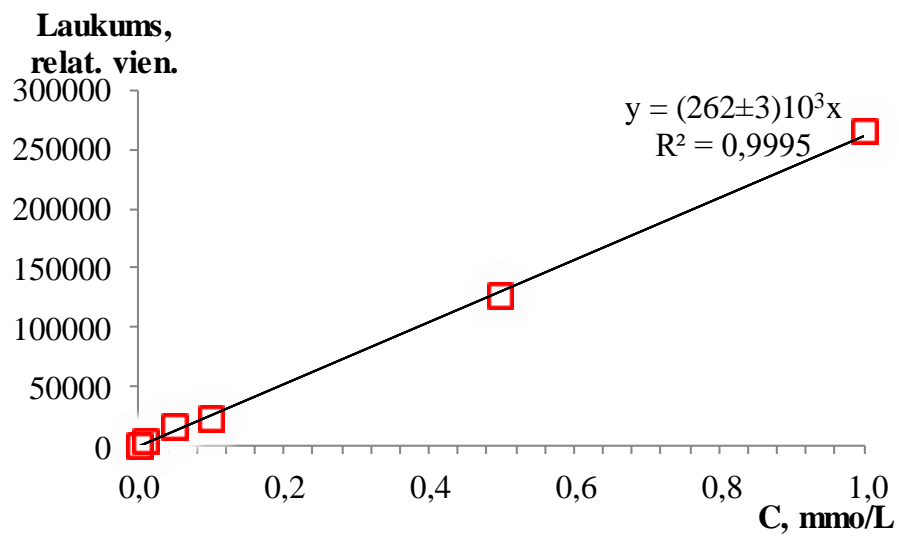
9.5. att. Glicīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



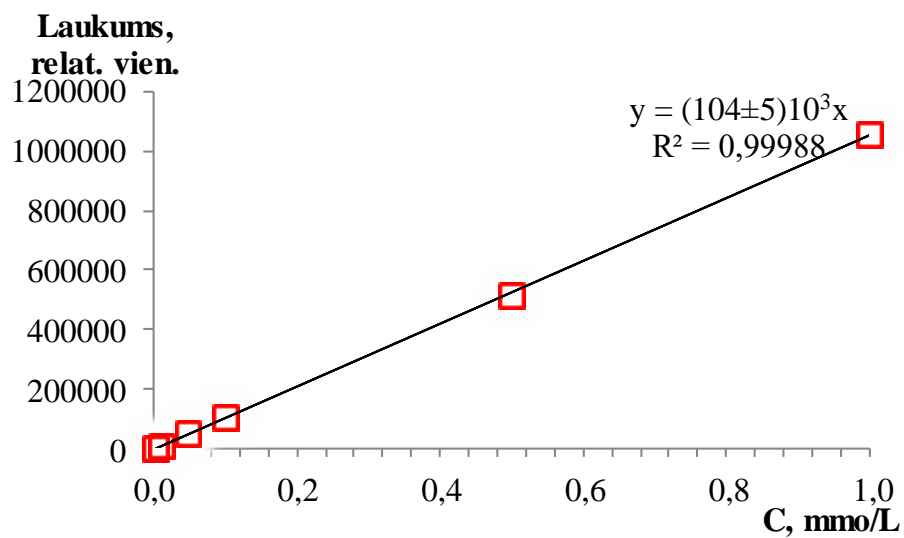
9.6. att. Glutamīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



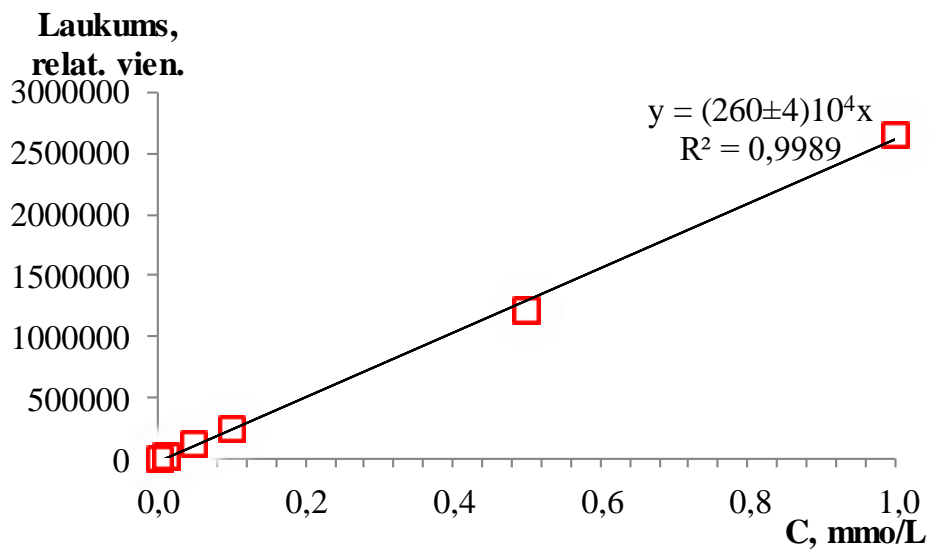
9.7. att. Sarkozīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



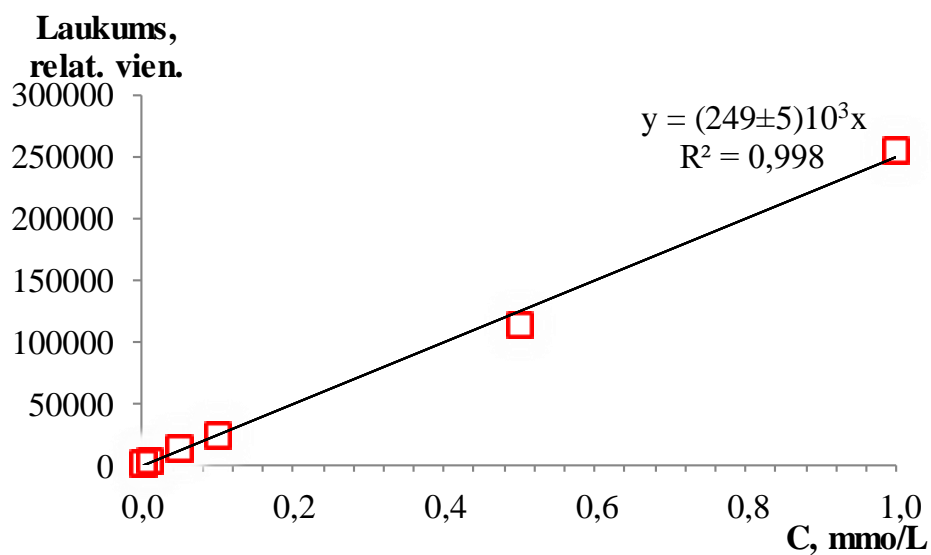
9.8. att. Taurīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



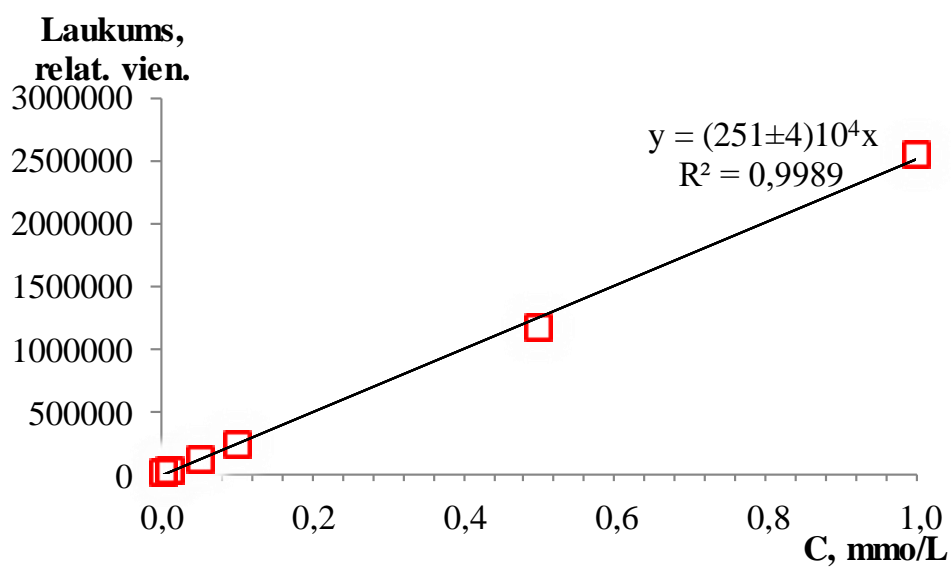
9.9. att. Histidīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



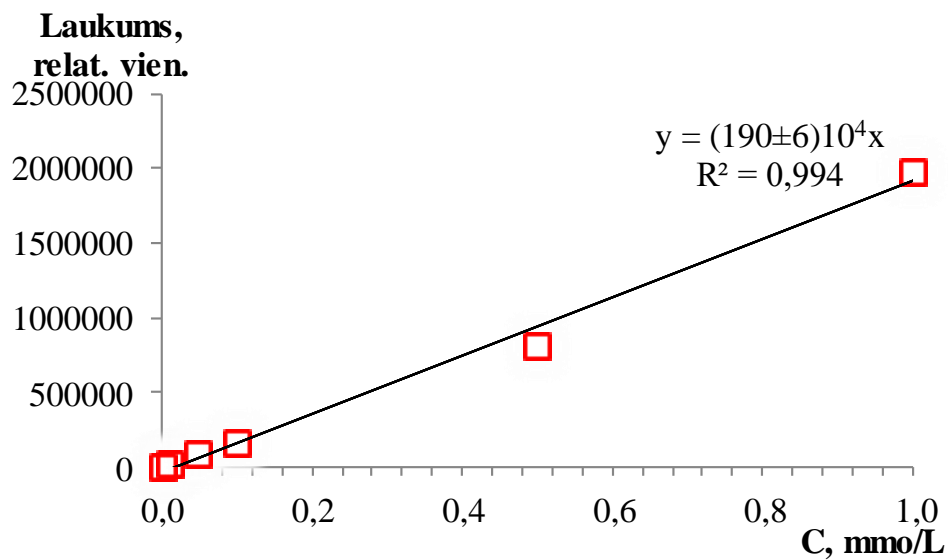
9.10. att. Citrulīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



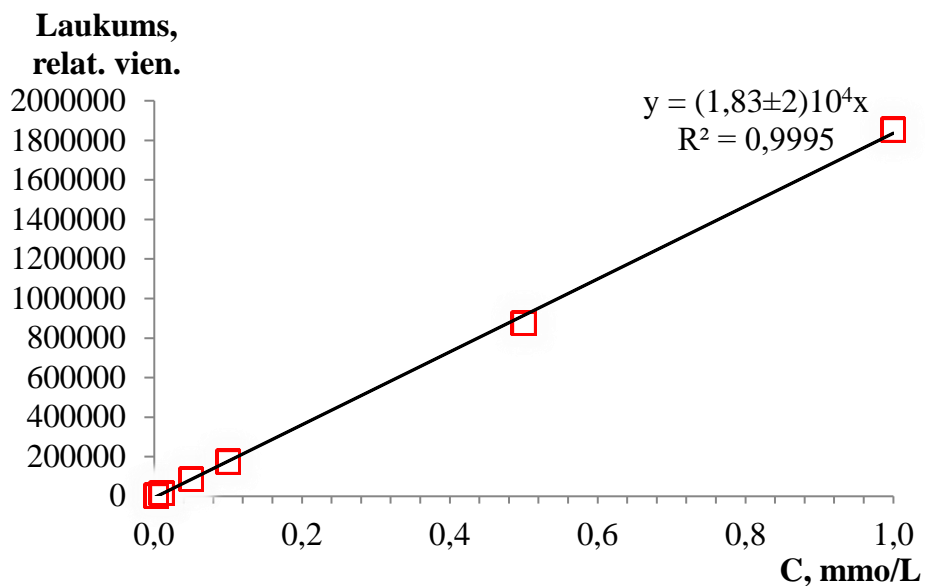
9.11. att. Treonīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



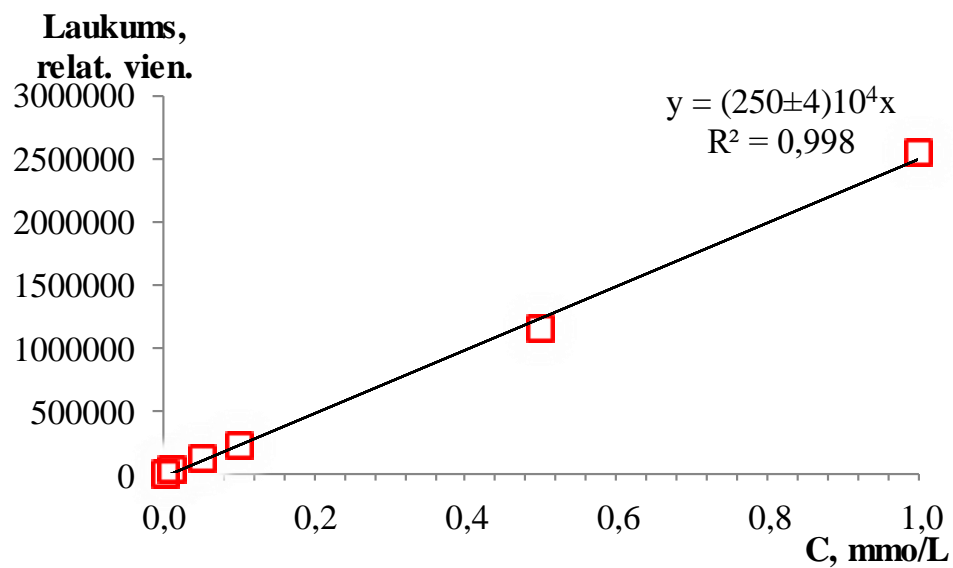
9.12. att. Alanīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



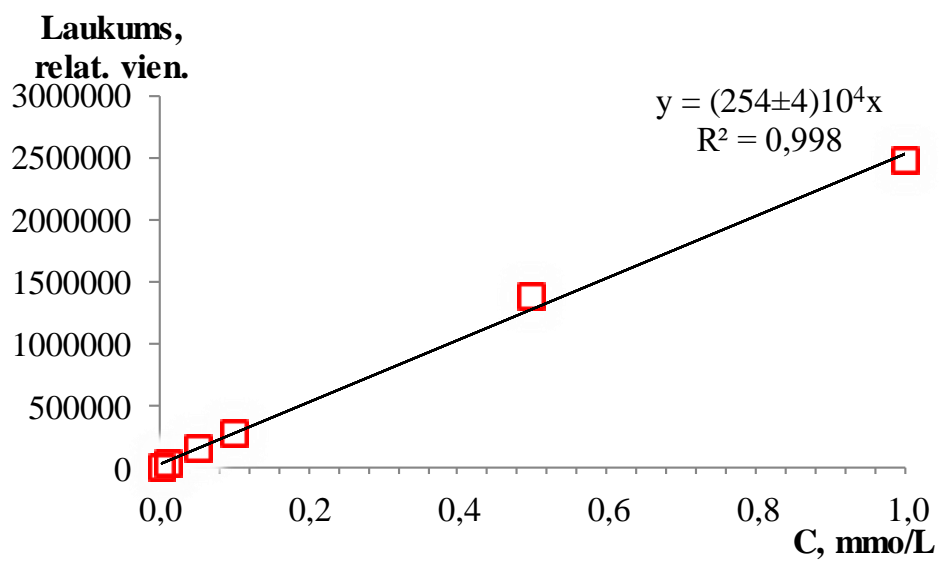
9.13. att. Arginīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



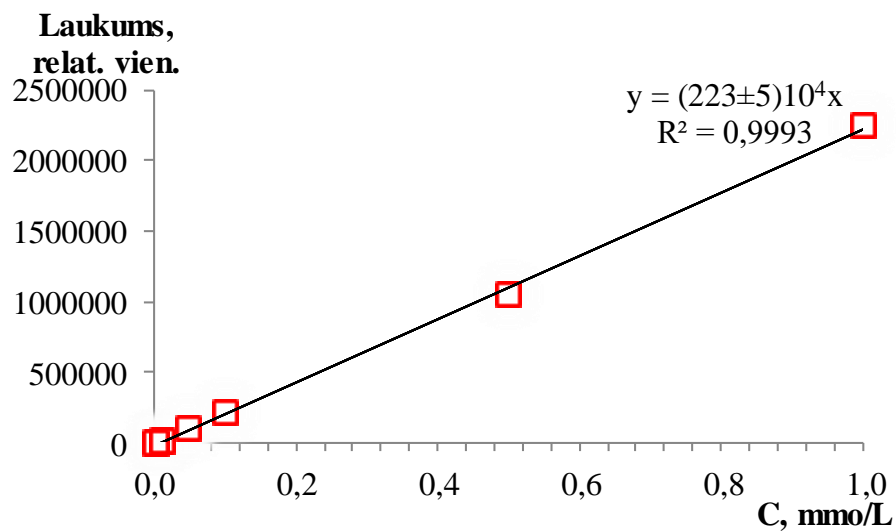
9.14. att. Prolīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



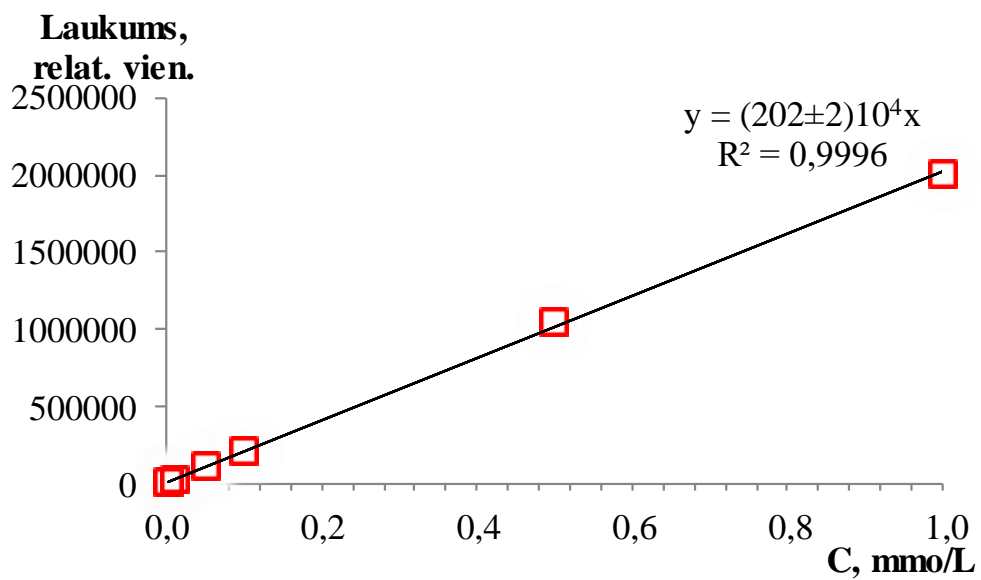
9.15. att.  $\alpha$ -Aminosviestskābes kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



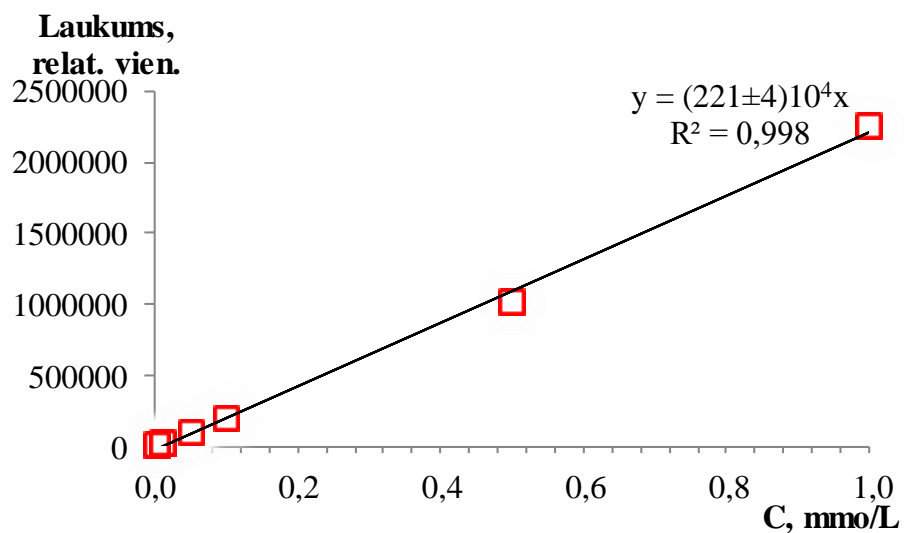
9.16. att. Tirozīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



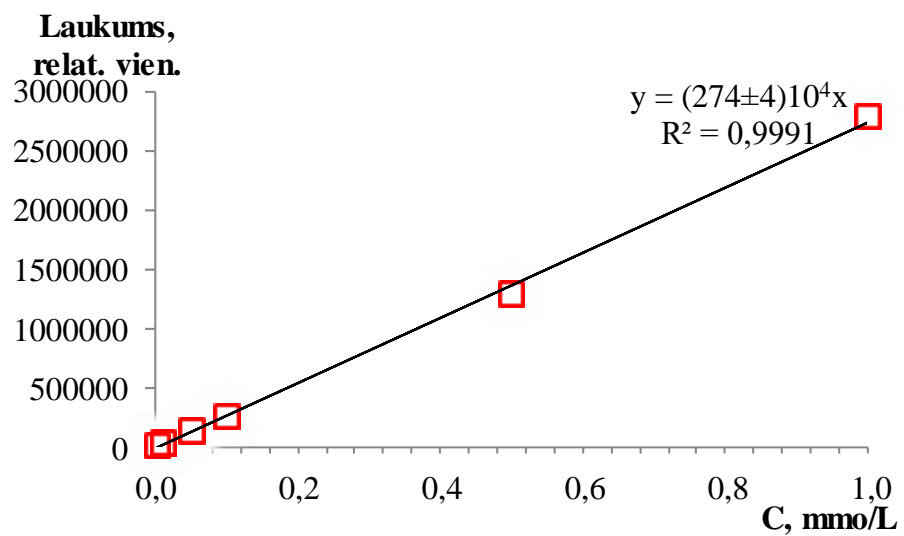
9.17. att. Valīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



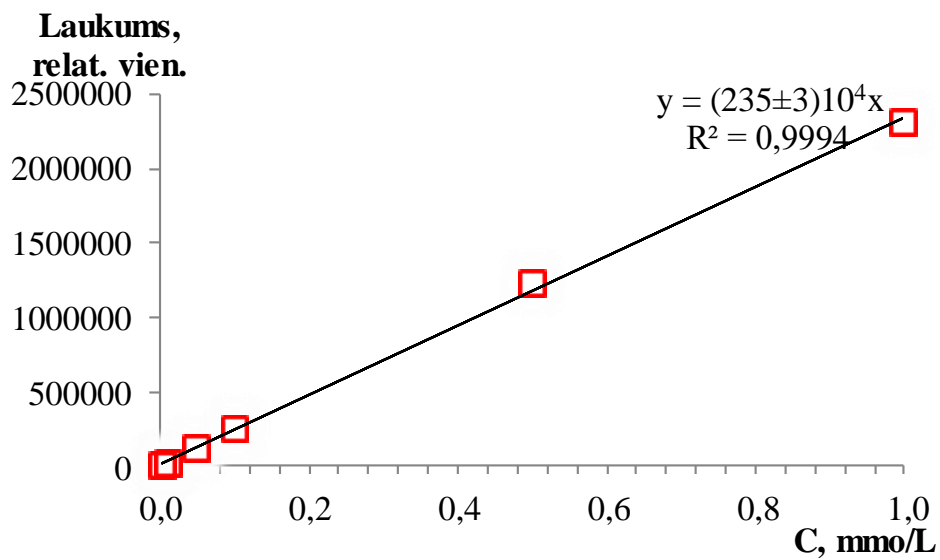
9.18. att. Metionīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



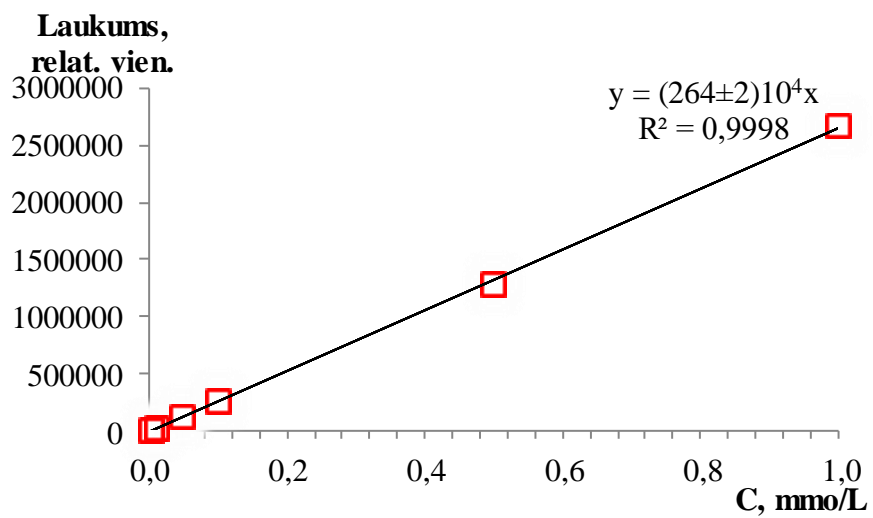
9.19. att. Cistīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



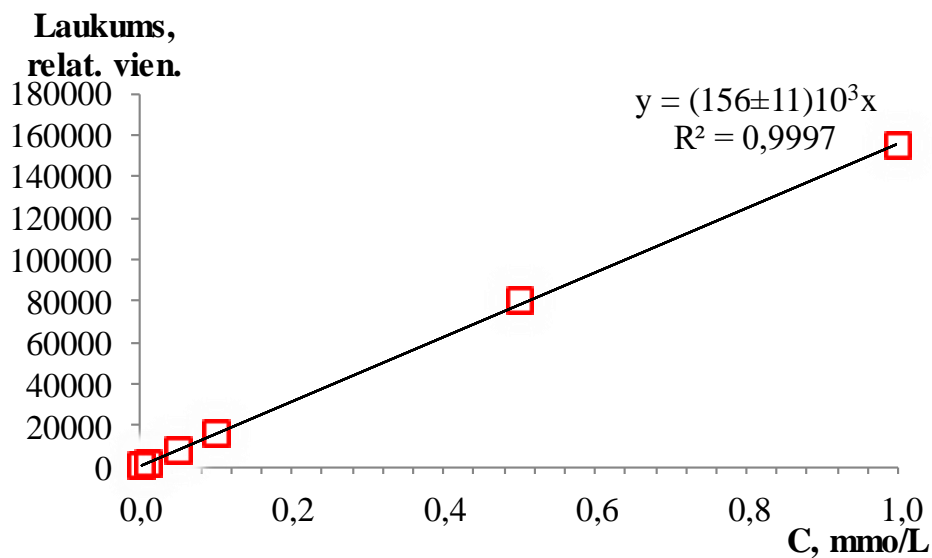
9.20. att. Cistationīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



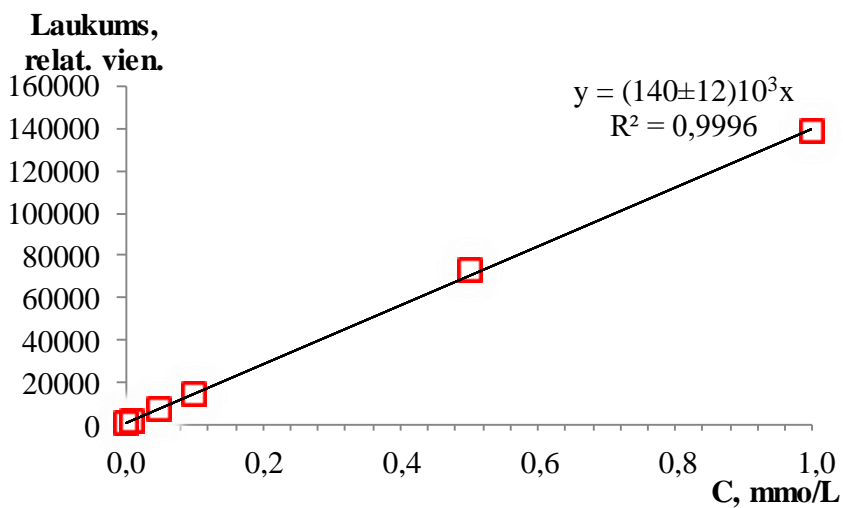
9.21. att. Izoleicīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



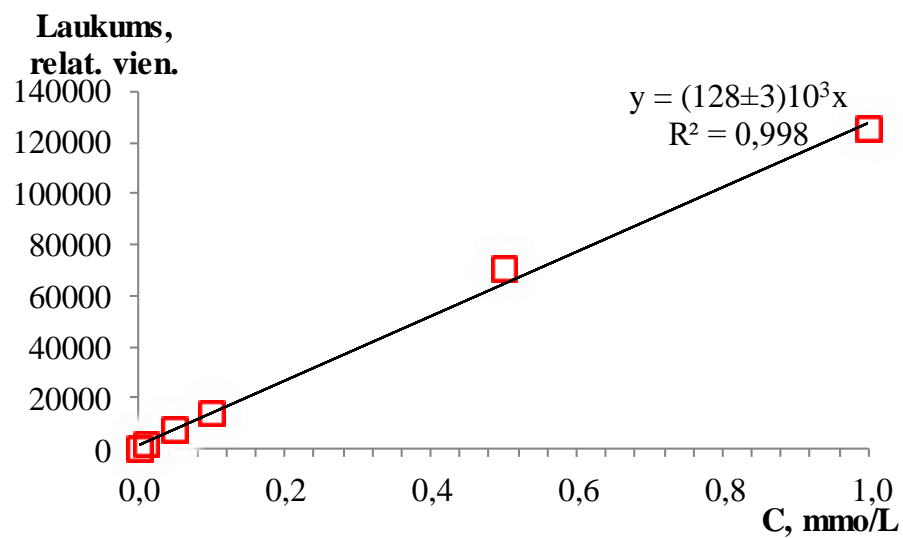
9.22. att. Leicīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



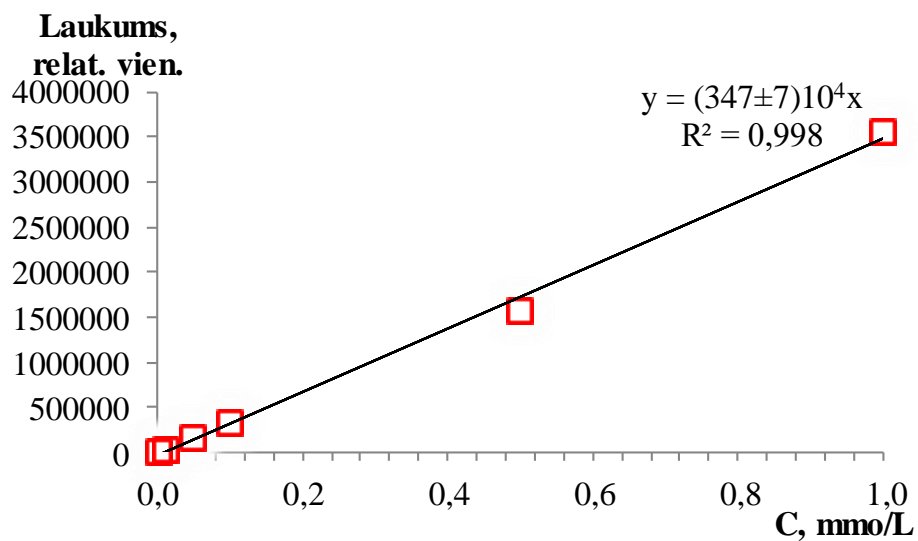
9.23. att. Fenilalanīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



9.24. att. Triptofāna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



9.25. att. Ornīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.



9.26. att. Lizīna kalibrācijas taisne linearitātes pārbaudei.

Nr.p. k.	Analīts	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>3</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>4</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>5</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>6</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>7</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>8</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>9</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>10</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C vid., μmol·L <sup>-1</sup>	Sn	Sn, r. %
1	Asp	46,5	47,2	48,2	49,2	49,0	48,2	45,1	47,2	44,0	49,2	47,4	1,76	3,72
2	Glu	95,5	92,7	92,5	93,1	89,8	90,2	90,5	92,3	93,2	96,1	92,6	2,09	2,26
3	Hyp	60,5	58,9	61,0	65,0	61,3	64,0	59,7	60,3	60,3	60,9	61,2	1,88	3,07
4	Ser	151,0	151,6	151,7	152,0	149,2	149,4	147,2	150,3	151,6	154,6	150,9	2,00	1,32
5	Asn	113,3	114,3	112,2	114,4	114,6	119,4	116,5	116,3	111,3	116,3	114,9	2,36	2,05
6	Gly	514,2	526,3	515,2	512,3	504,0	509,8	525,3	519,4	528,3	509,6	516,4	8,10	1,57
7	Gln	785,2	784,4	775,2	782,3	789,7	783,1	790,2	795,3	790,4	795,2	787,1	6,24	0,79
8	Sarkoz	78,9	78,3	81,4	78,3	79,7	79,4	83,5	80,4	81,2	82,1	80,3	1,75	2,18
9	Tau	142,3	141,3	144,6	139,5	140,3	143,6	142,6	140,2	140,3	141,3	141,6	1,66	1,17
10	His	154,2	155,7	157,2	150,3	148,4	151,3	157,2	156,3	154,3	153,3	153,8	3,02	1,96
11	Cit	120,6	126,5	122,7	122,6	122,6	123,2	124,2	119,7	118,3	119,0	122,0	2,55	2,09
12	Thr	157,2	158,2	158,4	159,6	159,3	160,3	164,2	164,2	162,0	162,6	160,6	2,50	1,56
13	Ala	369,2	370,2	371,0	365,2	370,7	371,3	375,7	372,0	376,1	378,0	371,9	3,73	1,00
14	Arg	316,9	314,0	315,1	315,1	314,0	318,6	319,5	312,6	319,7	320,8	316,6	2,83	0,90
15	Pro	243,2	241,1	238,2	241,3	246,2	238,2	245,7	244,2	243,3	245,7	242,7	2,94	1,21
16	Aab	33,5	32,5	31,7	32,0	31,6	30,0	33,2	33,7	33,0	34,2	32,5	1,27	3,90
17	Tyr	83,2	83,7	81,2	84,0	81,3	84,0	84,0	82,2	84,0	83,3	83,1	1,12	1,35
18	Val	386,2	387,1	381,2	385,2	382,2	387,9	389,2	391,5	396,7	388,4	387,6	4,45	1,15
19	Met	272,6	275,7	268,3	278,6	271,2	273,6	274,6	271,3	275,7	274,4	273,6	2,89	1,06
20	Cys	41,2	40,2	40,0	41,3	38,7	39,6	40,7	38,7	40,2	39,	40,0	0,96	2,40

Metodes precizitātes pārbaudes rezultāti bioloģiskajā materiālā.

## 10. PIELIKUMS

Nr. p.k.	Analīts	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>3</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>4</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>5</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>6</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>7</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>8</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>9</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>10</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C vid., μmol·L <sup>-1</sup>	Sn	Sn,r. %
21	Hcy(Ala)	33,3	32,6	32,7	32,7	30,3	31,5	30,3	31,3	31,7	32,7	31,9	1,05	3,28
22	Ile	255,2	254,3	258,7	254,1	253,3	258,3	250,2	254,3	251,3	252,4	254,2	2,72	1,07
23	Leu	396,1	398,2	388,4	397,3	386,3	390,6	391,2	399,7	392,6	393,7	393,4	4,39	1,12
24	Phe	351,2	351,3	343,3	352,6	348,3	354,3	358,7	352,6	356,6	357,9	352,7	4,63	1,31
25	Trp	32,6	33,2	36,3	32,0	31,1	37,0	37,6	36,7	31,3	33,3	34,1	2,51	7,37
26	Orn	327,2	320,3	321,6	321,6	323,4	323,6	322,6	326,5	330,3	333,0	325,0	4,16	1,28
27	Lys	169,0	165,3	168,3	168,3	169,7	172,4	173,5	173,3	172,2	171,3	170,3	2,66	1,56

10. PIELIKUMS (turpinājums)  
Metodes precizitātes pārbaudes rezultāti bioloģiskajā materiālā.

11.1. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti asparagīnskābei bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		52,9	53,2	53,1	53,0	52,9	53,2	52,8	53,2	53,0	53,2	103
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,0	5,3	5,2	5,1	5,0	5,3	4,9	5,3	5,1	5,3	
	A, %		99,2	106,3	103,1	101,2	99,4	105,1	98,6	106,3	102,5	105,2	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		98,2	98,5	98,3	98,6	98,5	98,3	99,6	99,6	99,1	98,7	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		50,3	50,6	50,4	50,7	50,6	50,4	51,7	51,7	51,2	50,8	
	A, %		100,5	101,2	100,7	101,3	101,3	100,7	103,4	103,4	102,4	101,6	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		551,2	552,7	553,3	552,3	551,4	553,7	553,2	552,6	552,3	554,7	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		503,3	504,8	505,4	504,4	503,5	505,8	505,3	504,7	504,4	506,8	
	A, %		100,7	101,0	101,1	100,9	100,7	101,2	101,1	100,9	100,9	101,4	

11.2. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti glutamīnskābei bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		98,9	98,8	98,5	98,8	99,0	98,8	98,7	98,6	98,6	98,7	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,4	5,3	5,0	5,3	5,5	5,3	5,2	5,1	5,1	5,2	
	A, %		107,1	106,4	100,9	105,1	109,2	105,7	103,2	101,7	101,6	103,7	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		145,2	145,3	145,0	145,0	144,9	144,4	145,9	145,3	144,9	144,4	103
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		51,7	51,8	51,5	51,5	51,4	50,9	52,4	51,8	51,4	50,9	
	A, %		103,4	103,6	103,1	102,9	102,7	101,8	104,7	103,5	102,7	101,7	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		598,3	599,7	602,5	605,9	609,6	601,3	601,5	599,4	599,9	600,0	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		504,8	506,2	509,0	512,4	516,1	507,8	508,0	505,9	506,4	506,5	
	A, %		101,0	101,2	101,8	102,5	103,2	101,6	101,6	101,2	101,3	101,3	

11.3. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti hidroksiprolīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		65,9	65,7	65,7	65,9	66,0	65,7	65,6	66,0	65,3	65,5	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,3	5,1	5,1	5,3	5,4	5,1	5,0	5,4	4,7	4,9	
	A, %		105,7	101,2	102,4	105,5	107,2	101,2	101,0	107,7	93,7	97,7	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		109,9	110,3	110,9	110,0	110,4	111,0	109,7	109,4	110,8	110,3	99
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		49,3	49,7	50,3	49,4	49,8	50,4	49,1	48,8	50,2	49,7	
	A, %		98,5	99,3	100,5	98,8	99,5	100,7	98,1	97,5	100,5	99,3	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		565,2	568,3	569,3	568,2	567,3	568,4	569,5	561,3	560,3	560,0	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		504,6	507,7	508,7	507,6	506,7	507,8	508,9	500,7	499,7	499,4	
	A, %		100,9	101,5	101,7	101,5	101,3	101,6	101,8	100,1	99,9	99,9	

11.4. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti serīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		155,3	154,9	156,0	154,3	155,0	155,7	155,0	155,3	155,2	155,6	105
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,3	4,9	6,0	4,3	5,0	5,7	5,0	5,3	5,2	5,6	
	A, %		105,6	97,6	119,7	85,1	100,5	113,2	100,6	106,6	104,4	113,0	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		201,5	200,7	203,2	201,1	204,7	205,5	206,2	206,3	201,9	200,2	106
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		51,5	50,7	53,2	51,1	54,7	55,5	56,2	56,3	51,9	50,2	
	A, %		103,1	101,3	106,4	102,1	109,3	111,1	112,4	112,7	103,8	100,3	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		645,3	644,3	649,6	643,3	649,2	643,3	644,3	645,3	641,0	641,1	99
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		495,3	494,3	499,6	493,3	499,2	493,3	494,3	495,3	491,0	491,1	
	A, %		99,1	98,9	99,9	98,7	99,8	98,7	98,9	99,1	98,2	98,2	

11.5. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti asparaginam bioloģiskajā materiālā ar standartpievevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpieveva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		121,6	121,1	121,2	121,5	121,5	122,0	122,0	121,5	121,5	121,5	111
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,6	5,1	5,2	5,5	5,5	6,0	6,0	5,5	5,5	5,5	
	A, %		111,7	101,1	104,2	111,0	111,0	120,3	119,2	109,7	110,9	111,0	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		168,2	165,2	168,9	169,0	169,6	169,9	168,6	168,8	167,7	169,0	105
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		52,2	49,2	52,9	53,0	53,6	53,9	52,6	52,8	51,7	53,0	
	A, %		104,4	98,4	105,7	105,9	107,2	107,7	105,2	105,6	103,4	105,9	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		624,6	625,4	621,0	625,3	623,3	626,0	627,7	628,9	627,5	621,3	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		508,6	509,4	505,0	509,3	507,3	510,0	511,7	512,9	511,5	505,3	
	A, %		101,7	101,9	101,0	101,9	101,5	102,0	102,3	102,6	102,3	101,1	

11.6. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti glicīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpievevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpieveva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		516,6	516,5	516,4	516,2	516,6	516,7	516,8	516,6	516,6	516,2	111
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,6	5,5	5,4	5,2	5,6	5,7	5,8	5,6	5,6	5,2	
	A, %		113,0	111,0	108,3	105,0	111,6	113,8	116,9	111,7	113,0	104,9	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		567,2	562,1	564,0	562,2	563,9	563,2	561,2	562,9	562,4	564,2	105
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		56,2	51,1	53,0	51,2	52,9	52,2	50,2	51,9	51,4	53,2	
	A, %		112,4	102,1	106,0	102,3	105,8	104,3	100,5	103,7	102,7	106,4	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		1024,3	1028,7	1025,2	1029,7	1027,5	1028,6	1030,3	1031,3	1029,9	1031,2	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		513,3	517,7	514,2	518,7	516,5	517,6	519,3	520,3	518,9	520,2	
	A, %		102,7	103,5	102,8	103,7	103,3	103,5	103,9	104,1	103,8	104,0	

11.7. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti glutamīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		790,1	790,5	790,1	790,2	790,0	790,0	790,2	790,3	790,7	790,1	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,1	5,5	5,1	5,2	5,0	5,0	5,2	5,3	5,7	5,1	
	A, %		101,1	110,1	101,2	104,3	100,3	101,0	103,3	105,3	113,2	101,7	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		834,7	834,7	833,3	835,2	834,3	854,7	834,7	835,7	833,3	834,0	103
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		49,7	49,7	48,3	50,2	49,3	69,7	49,7	50,7	48,3	49,0	
	A, %		99,3	99,3	96,5	100,4	98,5	139,4	99,3	101,3	96,5	98,0	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		1225,3	1234,3	1245,7	1241,3	1228,5	1224,7	1220,4	1234,3	1238,5	1224,3	89
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		440,3	449,3	460,7	456,3	443,5	439,7	435,4	449,3	453,5	439,3	
	A, %		88,1	89,9	92,1	91,3	88,7	87,9	87,1	89,9	90,7	87,9	

11.8. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti sarkozīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		85,0	84,6	84,0	84,2	84,4	85,0	85,0	85,0	84,9	84,3	109
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,8	5,4	4,8	5,0	5,2	5,8	5,8	5,8	5,7	5,1	
	A, %		116,5	108,0	96,6	100,3	103,2	116,4	116,5	115,2	113,1	102,6	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		131,3	132,5	129,6	130,0	129,1	129,1	128,7	130,3	132,0	133,1	103
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		52,1	53,3	50,4	50,8	49,9	49,9	49,5	51,1	52,8	53,9	
	A, %		104,1	106,7	100,8	101,6	99,7	99,7	99,1	102,1	105,6	107,8	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		589,0	584,3	587,1	574,2	572,0	581,7	581,2	585,7	586,7	579,9	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		509,8	505,1	507,9	495,0	492,8	502,5	502,0	506,5	507,5	500,7	
	A, %		102,0	101,0	101,6	99,0	98,6	100,5	100,4	101,3	101,5	100,1	

11.9. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti taurīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeava, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits										A vid, %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	145,3	144,2	145,3	145,0	145,3	146,0	145,2	144,3	145,3	146,2	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5,3	4,2	5,3	5,0	5,3	6,0	5,2	4,3	5,3	6,2	
	A, %	105,0	84,0	105,8	99,2	105,6	120,7	104,3	85,2	105,2	124,3	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	195,3	192,3	193,3	187,5	189,7	192,2	191,5	190,9	195,6	193,6	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	55,3	52,3	53,3	47,5	49,7	52,2	51,5	50,9	55,6	53,6	
	A, %	110,5	104,5	106,5	95,1	99,4	104,3	103,1	101,7	111,3	107,1	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	650,2	648,3	645,6	648,5	654,2	652,2	652,7	650,3	648,5	647,2	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	510,2	508,3	505,6	508,5	514,2	512,2	512,7	510,3	508,5	507,2	
	A, %	102,0	101,7	101,1	101,7	102,8	102,4	102,5	102,1	101,7	101,4	

11.10. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti histidīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeava, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits										A vid, %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	159,2	159,8	159,0	158,7	158,6	159,7	160,6	159,3	158,6	159,2	105
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5,2	5,8	5,0	4,7	4,6	5,7	6,6	5,3	4,6	5,2	
	A, %	104,2	116,0	99,2	94,6	91,6	113,6	131,6	105,6	93,0	104,1	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	208,3	209,4	207,7	206,4	204,2	203,6	208,7	206,6	208,6	209,5	107
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	54,3	55,4	53,7	52,4	50,2	49,6	54,7	52,6	54,6	55,5	
	A, %	108,5	110,8	107,4	104,8	100,3	99,2	109,3	105,2	109,2	111,1	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	658,2	664,3	660,6	662,2	670,2	668,6	668,0	672,4	654,9	668,7	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	504,2	510,3	506,6	508,2	516,2	514,6	514,0	518,4	500,9	514,7	
	A, %	100,8	102,1	101,3	101,6	103,2	102,9	102,8	103,7	100,2	102,9	

11.11. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti citrulīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeava, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ / Mērījumu skaits		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	124,6	124,6	125,4	125,7	125,0	124,6	125,7	126,1	126,2	125,7	107
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	4,6	4,6	5,4	5,7	5,0	4,6	5,7	6,1	6,2	5,7	
	A, %	91,7	91,7	107,4	113,8	100,8	91,6	113,2	121,2	124,3	113,0	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	174,3	174,3	173,6	173,7	172,1	168,5	168,0	168,5	170,5	174,5	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	54,3	54,3	53,6	53,7	52,1	48,5	48,0	48,5	50,5	54,5	
	A, %	108,5	108,7	107,2	107,4	104,1	97,1	95,9	97,1	101,1	109,1	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	631,1	625,5	630,2	629,5	625,2	626,4	633,5	629,5	631,1	629,5	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	511,1	505,5	510,2	509,5	505,2	506,4	513,5	509,5	511,1	509,5	
	A, %	102,2	101,1	102,0	101,9	101,0	101,3	102,7	101,9	102,2	101,9	

11.12. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti treonīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeava, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ / Mērījumu skaits		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	165,3	164,2	164,6	165,2	164,2	165,0	164,6	164,3	164,0	165,2	93
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5,3	4,2	4,6	5,2	4,2	5,0	4,6	4,3	4,0	5,2	
	A, %	105,0	84,3	91,8	104,3	84,3	99,6	91,6	85,7	79,2	104,4	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	212,5	212,7	211,5	211,0	209,6	210,5	211,7	213,0	213,5	212,2	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	52,5	52,7	51,5	51,0	49,6	50,5	51,7	53,0	53,5	52,2	
	A, %	105,1	105,3	103,1	102,1	99,2	101,1	103,3	106,0	107,1	104,4	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	658,3	665,2	652,2	654,8	652,3	659,4	649,7	652,1	654,8	655,3	99
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	498,3	505,2	492,2	494,8	492,3	499,4	489,7	492,1	494,8	495,3	
	A, %	99,7	101,0	98,4	99,0	98,5	99,9	97,9	98,4	99,0	99,1	

11.13. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti alanīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		376,3	376,2	375,2	376,0	376,1	376,3	375,8	375,8	376,0	376,5	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,3	5,2	4,2	5,0	5,1	5,3	4,8	4,8	5,0	5,5	
	A, %		105,2	104,3	84,4	100,6	102,6	105,1	96,8	95,2	100,6	111,0	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		425,2	424,3	420,6	421,5	423,7	424,6	424,2	423,6	421,6	421,5	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		54,2	53,3	49,6	50,5	52,7	53,6	53,2	52,6	50,6	50,5	
	A, %		108,4	106,5	99,2	101,1	105,3	107,2	106,3	105,1	101,1	101,1	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		887,3	880,5	885,2	887,2	878,7	883,9	882,0	884,3	890,5	880,5	103
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		516,3	509,5	514,2	516,2	507,7	512,9	511,0	513,3	519,5	509,5	
	A, %		103,3	101,9	102,8	103,2	101,5	102,6	102,2	102,7	103,9	101,9	

11.14. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti arginīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		321,1	321,7	320,5	321,5	321,0	320,9	321,1	321,5	321,1	320,6	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,1	5,7	4,5	5,5	5,0	4,9	5,1	5,5	5,1	4,6	
	A, %		101,1	113,2	90,5	109,7	99,2	97,6	101,1	111,0	101,3	92,3	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		367,6	368,0	368,1	367,4	368,1	369,0	365,1	369,5	366,6	367,0	103
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		51,6	52,0	52,1	51,4	52,1	53,0	49,1	53,5	50,6	51,0	
	A, %		103,2	104,0	104,1	102,8	104,1	106,1	98,1	107,1	101,2	102,0	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		821,2	812,6	815,3	814,3	819,5	821,0	820,5	823,6	820,6	821,5	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		505,2	496,6	499,3	498,3	503,5	505,0	504,5	507,6	504,6	505,5	
	A, %		101,0	99,3	99,9	99,7	100,7	101,0	100,9	101,5	100,9	101,1	

11.15. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti prolinam bioloģiskajā materiālā ar standartpievevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpieveva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		248,1	248,2	247,4	247,7	248,3	247,9	248,0	248,2	248,2	248,0	99
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,1	5,2	4,4	4,7	5,3	4,9	5,0	5,2	5,2	5,0	
	A, %		101,2	103,2	87,2	93,2	105,1	97,8	99,2	103,4	103,4	101,0	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		294,3	294,1	293,1	295,1	296,5	294,3	294,9	295,6	298,2	298,6	105
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		51,3	51,1	50,1	52,1	53,5	51,3	51,9	52,6	55,2	55,6	
	A, %		102,7	102,1	100,2	104,1	107,1	102,6	103,8	105,3	110,5	111,3	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		733,7	734,6	735,6	738,5	741,3	740,5	739,6	734,2	738,7	737,5	99
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		490,7	491,6	492,6	495,5	498,3	497,5	496,6	491,2	495,7	494,5	
	A, %		98,1	98,3	98,5	99,1	99,7	99,5	99,3	98,2	99,1	98,9	

11.16. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti  $\alpha$ -aminosviestskābei bioloģiskajā materiālā ar standartpievevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpieveva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		37,5	37,3	37,7	38,1	37,7	38,5	38,2	37,2	37,7	38,1	88
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		4,1	3,9	4,3	4,7	4,3	5,1	4,8	3,8	4,3	4,7	
	A, %		83,0	77,2	85,2	93,1	85,2	103,0	96,3	76,3	86,0	93,3	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		83,3	83,5	83,1	81,5	82,7	81,5	83,2	81,7	82,7	82,7	98
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		49,9	50,1	49,7	48,1	49,3	48,1	49,8	48,3	49,3	49,3	
	A, %		99,7	100,3	99,3	96,3	98,5	96,1	99,6	96,5	98,6	98,5	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		527,3	547,2	539,7	534,7	529,0	554,5	544,7	539,7	537,5	568,6	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		493,9	513,8	506,3	501,3	495,6	521,1	511,3	506,3	504,1	535,2	
	A, %		98,8	102,8	101,3	100,3	99,1	104,2	102,3	101,3	100,8	107,0	

11.17. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti tirozīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		88,0	88,1	87,7	87,9	87,3	87,2	87,7	88,2	88,1	87,5	103
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,4	5,5	5,1	5,3	4,7	4,6	5,1	5,6	5,5	4,9	
	A, %		108,5	109,3	101,2	106,6	94,5	92,9	101,0	111,2	109,4	97,2	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		135,6	135,2	134,3	133,1	135,5	134,3	135,7	135,2	133,5	134,8	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		53,0	52,6	51,7	50,5	52,9	51,7	53,1	52,6	50,9	52,2	
	A, %		106,1	105,3	103,3	100,9	105,8	103,3	106,2	105,3	101,9	104,3	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		594,2	590,5	584,3	587,3	590,7	590,9	587,7	587,2	588,2	589,7	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		511,6	507,9	501,7	504,7	508,1	508,3	505,1	504,6	505,6	507,1	
	A, %		102,3	101,6	100,3	100,9	101,6	101,7	101,0	100,9	101,1	101,4	

11.18. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti valīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		391,5	391,0	391,2	391,0	390,3	391,6	391,5	391,1	391,2	390,2	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,5	5,0	5,2	5,0	4,3	5,6	5,5	5,1	5,2	4,2	
	A, %		110,9	100,5	104,3	99,7	85,1	111,4	111,0	102,3	104,3	84,9	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		435,7	437,6	437,9	437,2	436,9	436,2	435,1	435,7	439,6	436,6	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		49,7	51,6	51,9	51,2	50,9	50,2	49,1	49,7	53,6	50,6	
	A, %		99,3	103,2	103,7	102,4	101,9	100,4	98,2	99,3	107,3	101,2	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		895,7	895,7	895,7	896,5	894,4	897,6	899,7	894,5	893,7	895,4	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		509,7	509,7	509,7	510,5	508,4	511,6	513,7	508,5	507,7	509,4	
	A, %		101,9	101,9	101,9	102,1	101,7	102,3	102,7	101,7	101,5	101,9	

11.19. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti metionīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits										A vid, %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	278,4	278,0	278,5	277,2	278,0	278,1	278,1	278,0	278,0	278,2	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5,4	5,0	5,5	4,2	5,0	5,1	5,1	5,0	5,0	5,2	
	A, %	108,0	99,2	111,0	84,8	99,7	103,0	101,3	100,9	100,7	104,3	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	325,5	324,7	325,6	321,5	325,7	323,3	325,0	321,5	323,3	324,6	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	52,5	51,7	52,6	48,5	52,7	50,3	52,0	48,5	50,3	51,6	
	A, %	105,1	103,3	105,3	97,1	105,3	100,5	103,9	97,1	100,7	103,2	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	781,2	780,1	780,5	780,7	779,6	778,7	781,5	782,5	781,5	779,7	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	508,2	507,1	507,5	507,7	506,6	505,7	508,5	509,5	508,5	506,7	
	A, %	101,6	101,4	101,5	101,5	101,3	101,1	101,7	101,9	101,7	101,3	

11.20. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti cistinam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits										A vid, %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	46,3	46,0	46,1	45,2	45,3	45,7	45,7	46,3	45,0	46,6	88
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	4,9	4,6	4,7	3,8	3,9	4,3	4,3	4,9	3,6	5,2	
	A, %	97,2	91,2	94,5	76,4	77,2	85,2	85,2	97,2	71,2	103,8	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	92,6	93,6	92,5	93,7	93,6	94,1	94,0	93,7	93,7	94,5	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	51,2	52,2	51,1	52,3	52,2	52,7	52,6	52,3	52,3	53,1	
	A, %	102,3	104,3	102,3	104,5	104,3	105,3	105,3	104,5	104,5	106,3	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	543,7	542,7	544,5	541,3	546,3	542,3	544,9	543,7	545,2	545,6	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	502,3	501,3	503,1	499,9	504,9	500,9	503,5	502,3	503,8	504,2	
	A, %	100,5	100,3	100,6	100,0	101,0	100,2	100,7	100,5	100,8	100,8	

11.21. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti cistationīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		38,5	38,2	37,6	37,2	36,5	37,5	37,3	38,2	37,6	37,5	94
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,6	5,3	4,7	4,3	3,6	4,6	4,4	5,3	4,7	4,6	
	A, %		113,0	106,1	93,4	86,3	73,0	91,2	87,3	106,3	93,4	92,3	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		84,6	85,2	85,1	84,6	84,3	85,1	85,1	84,5	84,3	85,2	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		51,7	52,3	52,2	51,7	51,4	52,2	52,2	51,6	51,4	52,3	
	A, %		103,4	104,6	104,3	103,4	102,9	104,3	104,3	103,3	102,7	104,7	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		534,3	534,3	536,5	533,2	534,2	542,3	534,7	532,2	532,6	538,7	100
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		501,4	501,4	503,6	500,3	501,3	509,4	501,8	499,3	499,7	505,8	
	A, %		100,3	100,3	100,7	100,1	100,3	101,9	100,4	99,9	99,9	101,2	

11.22. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti izoleicinam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		260,3	260,2	259,7	260,0	259,7	260,1	260,2	260,3	260,2	260,5	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,3	5,2	4,7	5,0	4,7	5,1	5,2	5,3	5,2	5,5	
	A, %		106,5	104,9	93,2	99,3	93,2	101,1	103,2	106,5	103,1	111,0	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		306,2	304,5	304,6	304,0	303,3	303,7	303,5	303,7	303,2	302,2	98
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		51,2	49,5	49,6	49,0	48,3	48,7	48,5	48,7	48,2	47,2	
	A, %		102,4	99,0	99,2	98,0	96,7	97,3	97,1	97,3	96,4	94,3	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		751,2	750,2	752,9	750,5	751,5	752,6	754,2	754,4	754,2	752,5	99
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		496,2	495,2	497,9	495,5	496,5	497,6	499,2	499,4	499,2	497,5	
	A, %		99,2	99,0	99,6	99,1	99,3	99,5	99,8	99,9	99,8	99,5	

11.23. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti leicinām bioloģiskajā materiālā ar standartpievevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpieveva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits										A vid, %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	401,3	401,0	401,3	401,0	401,0	400,9	401,0	401,3	400,9	401,3	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5,3	5,0	5,3	5,0	5,0	4,9	5,0	5,3	4,9	5,3	
	A, %	105,4	99,2	106,5	100,5	99,2	97,2	100,7	106,6	98,4	105,2	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	448,5	448,2	447,9	447,1	446,3	445,5	448,6	447,7	448,3	449,7	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	52,5	52,2	51,9	51,1	50,3	49,5	52,6	51,7	52,3	53,7	
	A, %	104,9	104,4	103,7	102,1	100,5	99,0	105,1	103,4	104,7	107,3	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	885,7	884,5	885,7	886,3	883,2	884,7	885,6	884,3	886,7	886,5	98
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	489,7	488,5	489,7	490,3	487,2	488,7	489,6	488,3	490,7	490,5	
	A, %	97,9	97,7	97,9	98,1	97,4	97,7	97,9	97,7	98,1	98,1	

11.24. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti fenilalanīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpievevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpieveva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits										A vid, %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	355,2	355,3	355,0	355,1	355,2	355,3	355,0	354,6	354,9	354,8	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5,2	5,3	5,0	5,1	5,2	5,3	5,0	4,6	4,9	4,8	
	A, %	104,3	105,2	99,2	102,5	104,3	105,2	99,3	92,4	97,2	95,7	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	401,2	398,7	399,7	400,7	399,7	399,8	398,6	399,7	400,3	399,3	99
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	51,2	48,7	49,7	50,7	49,7	49,8	48,6	49,7	50,3	49,3	
	A, %	102,5	97,3	99,3	101,3	99,3	99,5	97,2	99,3	100,5	98,6	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	851,3	854,7	852,7	852,7	853,3	855,0	855,7	852,3	853,0	854,0	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	501,3	504,7	502,7	502,7	503,3	505,0	505,7	502,3	503,0	504,0	
	A, %	100,3	100,9	100,5	100,5	100,7	101,0	101,1	100,5	100,6	100,8	

11.25. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti triptofānam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		39,6	39,9	40,1	39,6	39,7	40,9	39,5	39,7	39,2	39,1	83
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		4,0	4,3	4,5	4,0	4,1	5,3	3,9	4,1	3,6	3,5	
	A, %		81,0	86,9	90,6	79,7	81,1	105,0	77,7	81,1	72,3	70,5	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		84,5	85,0	84,8	84,8	84,9	84,8	84,1	84,3	84,8	84,1	98
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		48,9	49,4	49,2	49,2	49,3	49,2	48,5	48,7	49,2	48,5	
	A, %		97,9	98,7	98,3	98,3	98,5	98,3	97,1	97,3	98,3	97,1	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		535,5	534,6	534,5	533,7	533,6	533,6	534,7	533,2	534,5	534,7	100
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		499,9	499,0	498,9	498,1	498,0	498,0	499,1	497,6	498,9	499,1	
	A, %		100,0	99,8	99,8	99,6	99,6	99,6	99,8	99,5	99,8	99,8	

11.26. tabula

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti ornitīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		332,2	332,1	332,3	331,3	332,7	333,2	333,5	332,7	332,2	332,2	108
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,2	5,1	5,3	4,3	5,7	6,2	6,5	5,7	5,2	5,2	
	A, %		103,1	102,5	105,2	85,2	113,8	124,9	129,1	113,2	103,0	104,3	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		378,7	378,2	378,0	378,2	378,1	378,1	378,2	377,5	378,6	378,6	102
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		51,7	51,2	51,0	51,2	51,1	51,1	51,2	50,5	51,6	51,6	
	A, %		103,3	102,3	101,9	102,4	102,3	102,3	102,5	101,1	103,3	103,3	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		821,5	823,7	822,7	824,7	824,7	823,7	822,5	823,7	823,5	822,5	99
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		494,5	496,7	495,7	497,7	497,7	496,7	495,5	496,7	496,5	495,5	
	A, %		98,9	99,3	99,1	99,5	99,5	99,3	99,1	99,3	99,3	99,1	

Metodes atgūstamības pārbaudes rezultāti lizīnam bioloģiskajā materiālā ar standartpiedevas koncentrācijām  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  
 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  un  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Standartpiedeva, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		Mērījumu skaits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	A vid, %
5	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		176,3	175,9	176,2	176,0	176,0	175,9	175,6	175,9	176,3	176,2	101
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		5,3	4,9	5,2	5,0	5,0	4,9	4,6	4,9	5,3	5,2	
	A, %		106,0	98,6	104,3	100,5	100,7	98,5	93,0	98,9	106,4	104,8	
50	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		223,2	222,6	222,7	222,0	223,7	223,7	222,7	222,7	222,2	223,2	104
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		52,2	51,6	51,7	51,0	52,7	52,7	51,7	51,7	51,2	52,2	
	A, %		104,4	103,2	103,3	102,0	105,3	105,4	103,4	103,4	102,3	104,3	
500	$C_{\text{paraugs+st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		670,8	668,2	669,7	670,2	669,7	669,3	669,9	668,7	668,2	669,8	100
	$C_{\text{st. pied.}} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		499,8	497,2	498,7	499,2	498,7	498,3	498,9	497,7	497,2	498,8	
	A, %		100,0	99,4	99,7	99,8	99,7	99,7	99,8	99,5	99,4	99,8	

## 12. PIELIKUMS



### ERNDIMQA - ANALYTE IN DETAIL

#### Amino acids 2016

**Lab Name :** ERN0258 - University Children's Hospital - Medical Genetics Clinic, biochem.lab

**Method Set :** PCR258

**Sample :** 2016.03

**Analyte :** 2-Aminobutyric acid

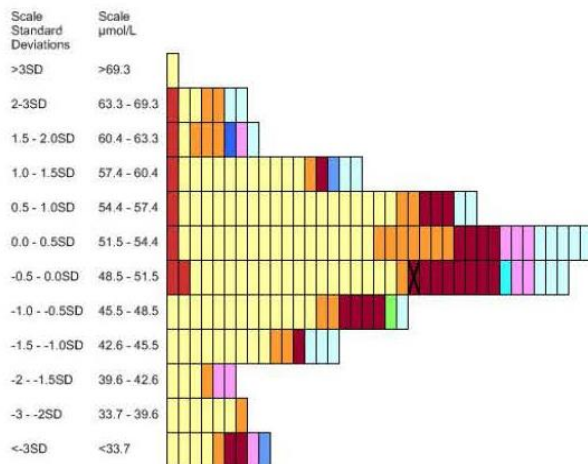
**Deadline :** 03/06/2016

**Unit :**  $\mu\text{mol/L}$

**Your Method :** 6. Reverse phase HPLC

**Your Result :** 48.7

Parameter	Method Results	All Labs Results
n :	23	190
Mean :	51.5	51.5
Median :	50.9	51.9
SD :	5.19	5.93



- 1. Ion-exchange chrom Ninhydrin 0 Int. Std
- 2. Ion-exchange chrom Ninhydrin 1 Int. Std
- 3. Ion-exchange chrom Ninhydrin 2 Int. Std
- 4. Gas chromatography
- 5. Gas chromatography/Mass spectrometry
- 6. Reverse phase HPLC
- 7. Tandem MS
- 8. Other
- GC or GC/MS
- IEC-other derivatization
- Your Lab



# 13. PIELIKUMS



## ERNDIMQA - CYCLE REVIEW

### Amino acids 2016

Lab Name : ERN0258 - University Children's Hospital - Medical Genetics Clinic, biochem.lab

Sample : 2016.01

Methodset : PCR258

Analyte	Your Lab	Med All Labs	n	ZScore	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
2-Aminobutyric acid	27.7	26.1	197	0.4										
Alanine	173	161	258	1										
Alloisoleucine		153	177											
Arginine	60.3	56.0	253	1										
Asparagine	200	193	237	0.3										
Aspartic Acid	139	124	247	0.9										
Citrulline	255	240	252	0.8										
Cystine	36.3	39.0	228	0.4										
Glutamic acid	250	221	257	0.9										
Glutamine	1166	1096	248	0.7										
Glycine	472	438	256	1										
Histidine	144	146	252	0.1										
Homocitrulline		130	96											
Hydroxyproline	64.3	59.0	215	0.8										
Isoleucine	419	456	257	1										
Leucine	1018	1114	261	1										
Lysine	60.1	62.0	255	0.4										
Methionine	36.9	29.0	241	0.2										
Ornithine	29.1	28.0	258	0.3										
Phenylalanine	27.7	25.0	261	1.4										
Phospho ethanolamine		0	134											
Proline	224	200	242	1.3										
Saccharopine		29.0	85											
Serine	22.1	23.0	255	0.3										
Taurine	147	149	242	0.2										
Threonine	159	233	254	4.3										
Tyrosine	241	233	262	0.6										
Valine	294	288	262	0.3										

	Score	Cumulative Score	
< 10%	7%	< 10%	7%
10% - 90 %	93%	10% - 90 %	93%
> 90 %	0%	> 90 %	0%

The following comment was added :

04-22-2016      Advisor

### 13. Pielikums (*turpinājums*)



ERNDIMQA - CYCLE REVIEW

Amino acids 2016

Lab Name : ERN0258 - University Children's Hospital - Medical Genetics Clinic, biochem.Lab

Sample : 2016.01

**The following comment was added :**

Returns were obtained from up to 257 labs. Greater than 90% of labs returned results for 21 amino acids. Low returns were for allo-isoleucine (69%); saccharopine (33%); homocitrulline (37%).

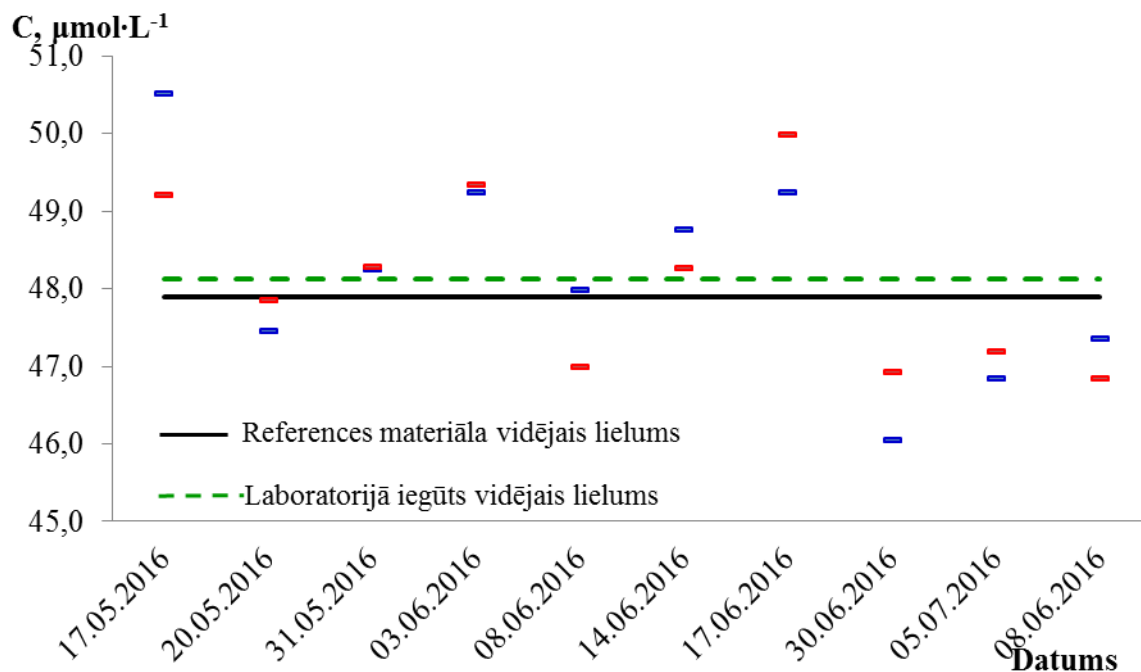
Comparison of returned values with added amounts shows an overall good agreement except for expected losses of phosphoethanolmine and cystine.

The higher than expected methionine value reflects interference from homocitrulline, as noted in previous distributions. Approximately 50 labs reported a methionine value  $> 3SD$ .

It is unclear why reporting rates are lower for allo-isoleucine and saccharopine since they can be adequately separated and standards are available for both compounds. For homocitrulline modification of the ion-exchange method programme allows full separation of this compound as described in the annual report for 2015.

Nr.p.k.	Analīts	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>3</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>4</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>5</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>6</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>7</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>8</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>9</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>10</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	Sn	DL, μmol·L <sup>-1</sup>	QL, μmol·L <sup>-1</sup>
1	Asp	1,026	1,269	2,087	0,880	0,000	0,259	0,255	0,000	0,000	1,219	0,708	2,1	7
2	Glu	1,659	1,688	0,250	2,055	0,000	0,000	0,000	0,125	0,585	1,253	0,818	2,5	8
3	Hyp	0,958	0,489	0,679	0,260	0,000	0,625	0,000	0,160	0,000	1,158	0,418	1,3	4
4	Ser	1,158	1,146	0,158	0,000	0,152	0,259	0,541	1,500	1,874	1,149	0,654	2,0	7
5	Asn	0,215	0,258	1,495	1,689	0,398	0,985	1,785	1,484	0,155	0,842	0,649	1,9	6
6	Gly	0,000	0,000	0,000	0,541	0,000	0,186	0,485	0,000	0,000	0,542	0,247	0,7	2
7	Gln	1,587	1,585	0,548	0,875	0,148	1,000	1,106	1,259	0,486	0,000	0,556	1,7	6
8	Sarkoz	0,842	0,875	0,286	0,574	0,021	0,190	0,542	0,652	0,000	0,842	0,337	1,0	3
9	Tau	1,489	1,588	1,149	2,048	2,149	2,149	2,484	1,987	1,746	0,587	0,559	1,7	6
10	His	0,248	0,874	1,985	1,587	2,485	2,485	1,878	1,486	1,542	1,698	0,680	2,0	7
11	Cit	1,249	1,579	1,485	2,159	2,066	2,015	2,159	1,579	1,850	1,459	0,330	1,0	3
12	Thr	2,699	3,587	3,485	0,875	4,595	5,146	1,158	2,015	3,146	1,489	1,441	4,3	14
13	Ala	1,898	2,026	1,149	1,485	0,489	1,485	0,000	0,000	0,000	0,158	0,827	2,5	8
14	Arg	0,158	0,485	1,588	1,026	0,587	1,485	0,450	0,085	0,000	1,148	0,577	1,7	6
15	Pro	0,014	0,000	0,450	0,000	0,584	0,000	0,541	0,854	0,000	0,000	0,328	1,0	3
16	Aab	1,574	0,988	0,874	0,589	0,852	0,742	1,146	1,850	1,079	0,585	0,411	1,2	4
17	Tyr	1,742	2,148	2,182	1,875	0,000	0,874	1,485	0,149	0,000	1,485	0,874	2,6	9
18	Val	1,874	1,485	2,575	2,149	1,059	0,984	0,942	1,149	1,016	1,054	0,577	1,7	6
19	Met	0,785	1,584	0,486	3,148	2,015	2,488	2,485	0,452	0,485	1,541	0,977	2,9	10
20	Cys	0,325	0,842	0,480	1,490	1,485	1,499	0,035	0,000	0,179	1,247	0,629	1,9	6
21	Hcy(Ala)	0,485	0,000	0,000	1,148	0,000	0,159	0,485	0,284	1,149	1,574	0,568	1,7	6
22	Ile	0,790	1,090	1,105	1,248	1,785	0,149	0,987	0,485	0,274	1,000	0,488	1,5	5
23	Leu	1,845	0,000	1,144	1,148	2,059	0,158	0,000	0,000	1,840	0,000	0,880	2,6	9
24	Phe	0,159	0,384	1,641	1,489	0,000	0,485	0,578	1,988	1,587	0,000	0,761	2,3	8
25	Trp	0,249	0,479	1,587	1,105	1,048	1,875	1,052	0,850	0,985	0,000	0,570	1,7	6
26	Orn	0,000	0,000	1,285	2,159	2,687	0,000	1,019	0,285	0,000	0,000	1,007	3,0	10
27	Lys	2,015	2,015	1,587	1,456	1,585	0,000	0,000	0,248	1,874	1,245	0,812	2,4	8

## 15. PIELIKUMS

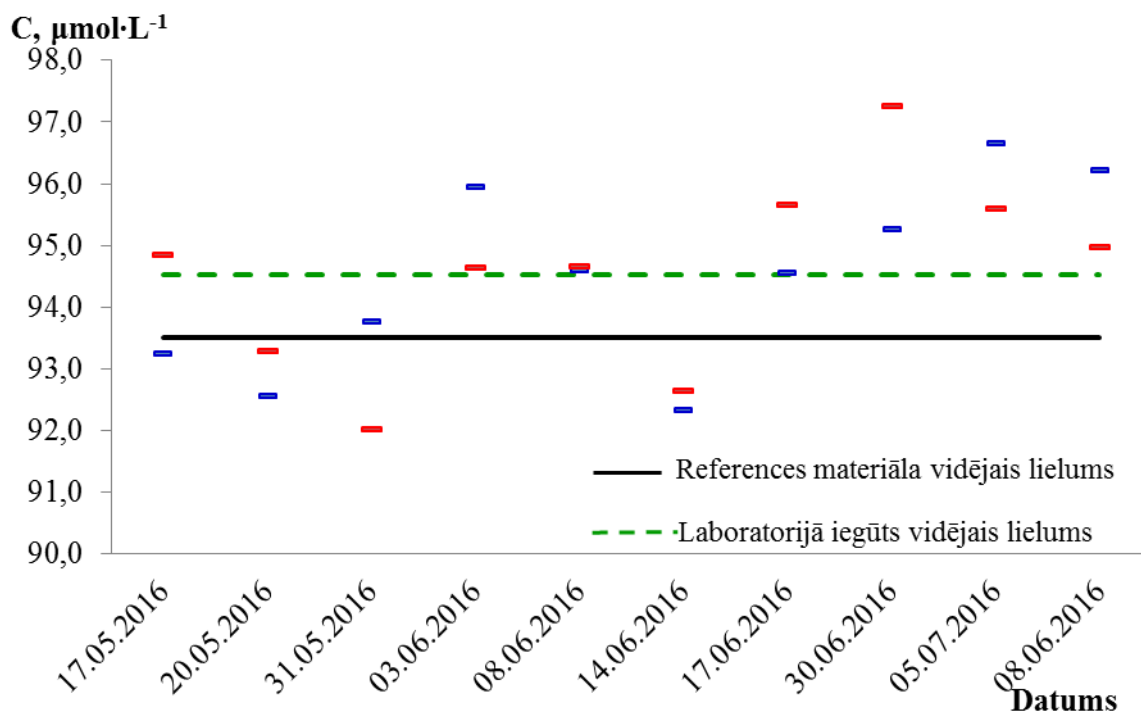


15.1. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – asparagīnskābei.

15.1. tabula

### Asparagīnskābes nenoteiktības aprēķini

Datums	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	50,5	49,2	49,9	2,6	5	2,1
20.05.2016	47,5	47,9	47,7	0,8	1,5	
31.05.2016	48,3	48,3	48,3	0,1	0,12	
03.06.2016	49,2	49,3	49,3	0,2	0,4	
08.06.2016	48,0	47,0	47,5	2,1	4	
14.06.2016	48,8	48,3	48,5	1,0	1,8	
17.06.2016	49,2	50,0	49,6	1,5	3	
30.06.2016	46,1	46,9	46,5	1,9	3	
05.07.2016	46,9	47,2	47,0	0,7	1,3	
08.06.2016	47,4	46,9	47,1	1,1	1,9	

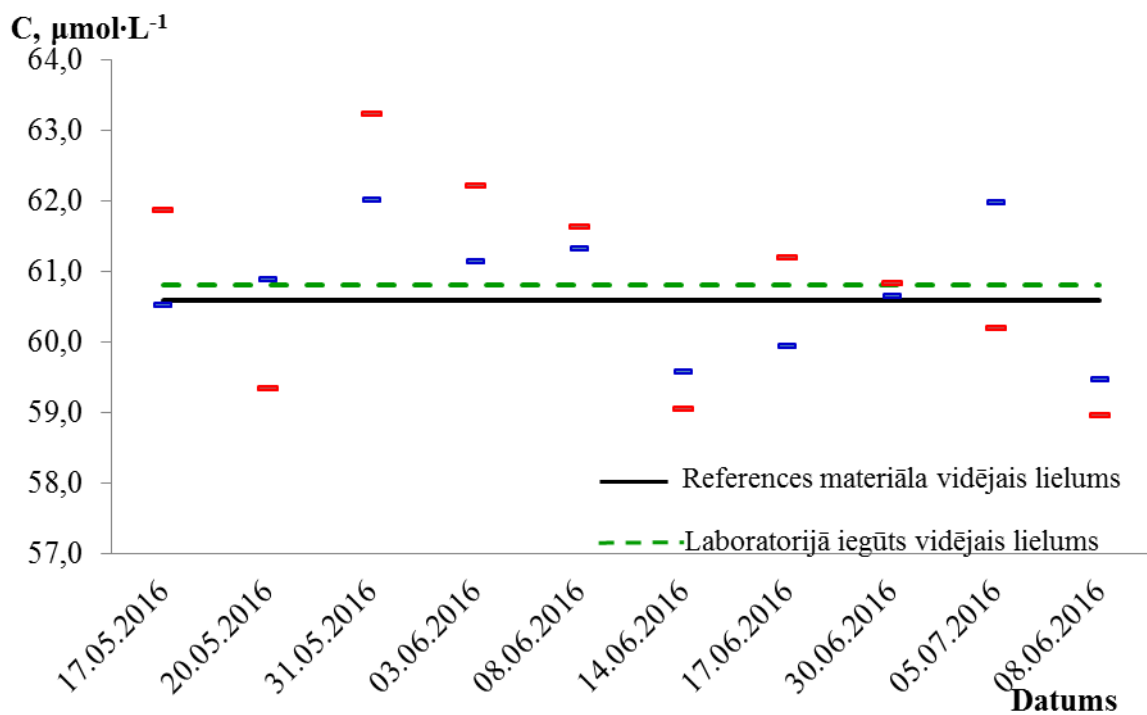


15.2. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – glutamīnskābei.

15.2. tabula

Glutamīnskābes nenoteiktības aprēķini

Datums	C <sub>1</sub> , µmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , µmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , µmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	93,3	94,8	94,1	1,7	3	2,1
20.05.2016	92,6	93,3	92,9	0,8	1,4	
31.05.2016	93,8	92,0	92,9	1,9	3	
03.06.2016	96,0	94,6	95,3	1,4	2	
08.06.2016	94,6	94,7	94,6	0,0	0,15	
14.06.2016	92,3	92,7	92,5	0,4	0,6	
17.06.2016	94,5	95,7	95,1	1,2	2	
30.06.2016	95,3	97,3	96,3	2,1	4	
05.07.2016	96,7	95,6	96,1	1,16	2	
08.06.2016	96,2	95,0	95,6	1,3	2	

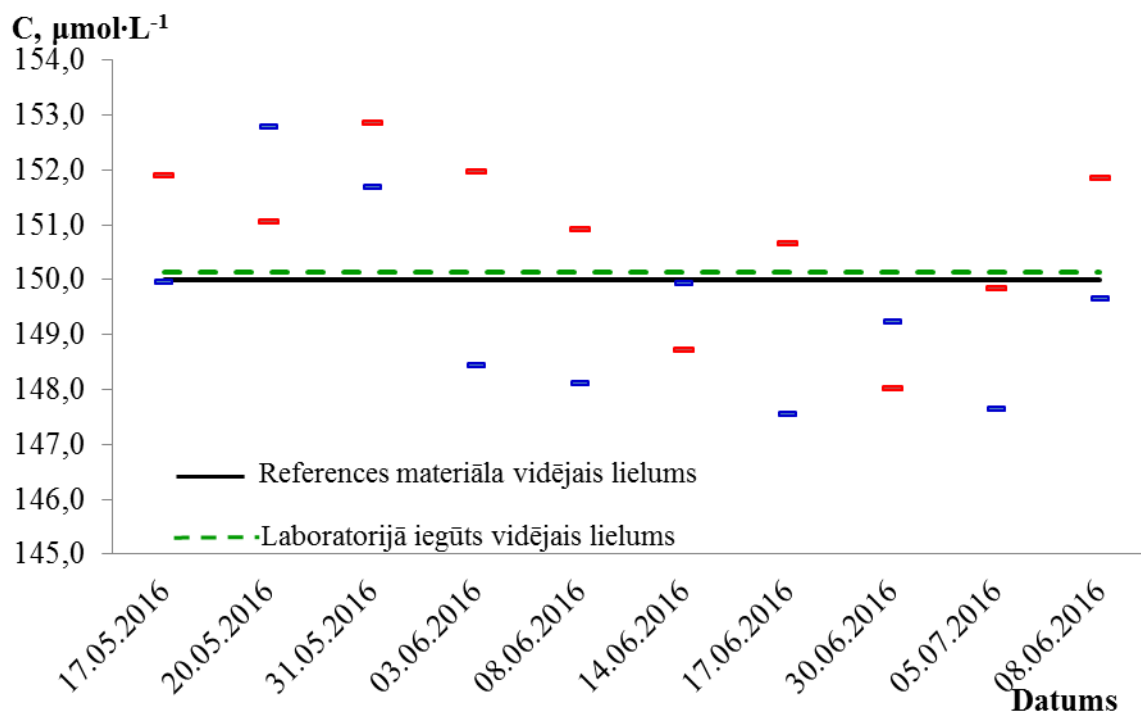


15.3. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – hidroksiprolīnam.

15.3. tabula

#### Hidroksiprolīna nenoteiktības aprēķini

Datums	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	60,5	61,9	61,2	2	4	2,8
20.05.2016	60,9	59,3	60,1	3	5	
31.05.2016	62,0	63,2	62,6	1,9	3	
03.06.2016	61,2	62,2	61,7	1,7	3	
08.06.2016	61,3	61,6	61,5	0,5	0,9	
14.06.2016	59,6	59,1	59,3	0,9	1,6	
17.06.2016	60,0	61,2	60,6	2	4	
30.06.2016	60,7	60,9	60,8	0,3	0,6	
05.07.2016	62,0	60,2	61,1	3	5	
08.06.2016	59,5	59,0	59,2	0,9	1,6	

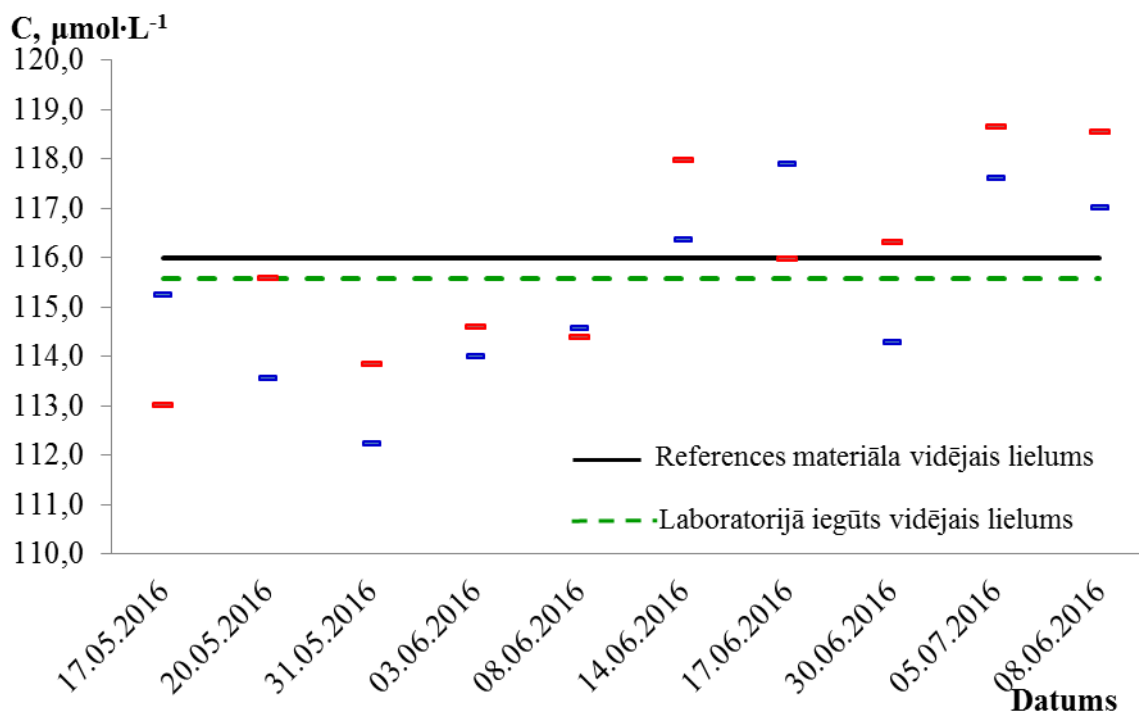


15.4. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – serīnam.

15.4. tabula

Serīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	150,0	151,9	150,9	1,3	2	2,5
20.05.2016	152,8	151,1	151,9	1,1	2	
31.05.2016	151,7	152,9	152,3	0,8	1,4	
03.06.2016	148,5	152,0	150,2	2	4	
08.06.2016	148,1	150,9	149,5	1,9	3	
14.06.2016	149,9	148,7	149,3	0,8	1,5	
17.06.2016	147,6	150,7	149,1	2	4	
30.06.2016	149,2	148,0	148,6	0,8	1,5	
05.07.2016	147,7	149,9	148,8	1,5	3	
08.06.2016	149,7	151,9	150,8	1,5	3	

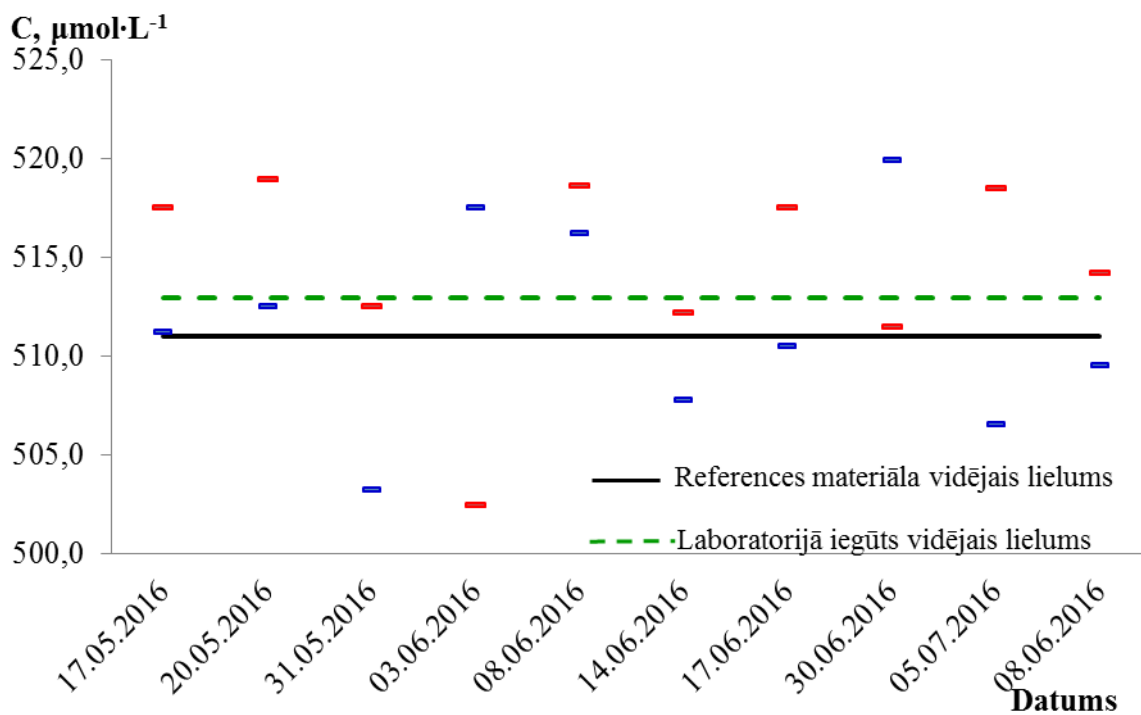


15.5. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – asparagīnam.

15.5. tabula

**Asparagīna nenoteiktības aprēķini**

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	115,3	113,0	114,1	2,	4	2,3
20.05.2016	113,6	115,6	114,6	2	4	
31.05.2016	112,2	113,9	113,1	1,4	3	
03.06.2016	114,0	114,6	114,3	0,5	0,9	
08.06.2016	114,6	114,4	114,5	0,2	0,3	
14.06.2016	116,4	118,0	117,2	1,4	2	
17.06.2016	117,9	116,0	116,9	2	3	
30.06.2016	114,3	116,3	115,3	2	4	
05.07.2016	117,6	118,7	118,1	0,9	1,6	
08.06.2016	117,0	118,6	117,8	1,3	2	

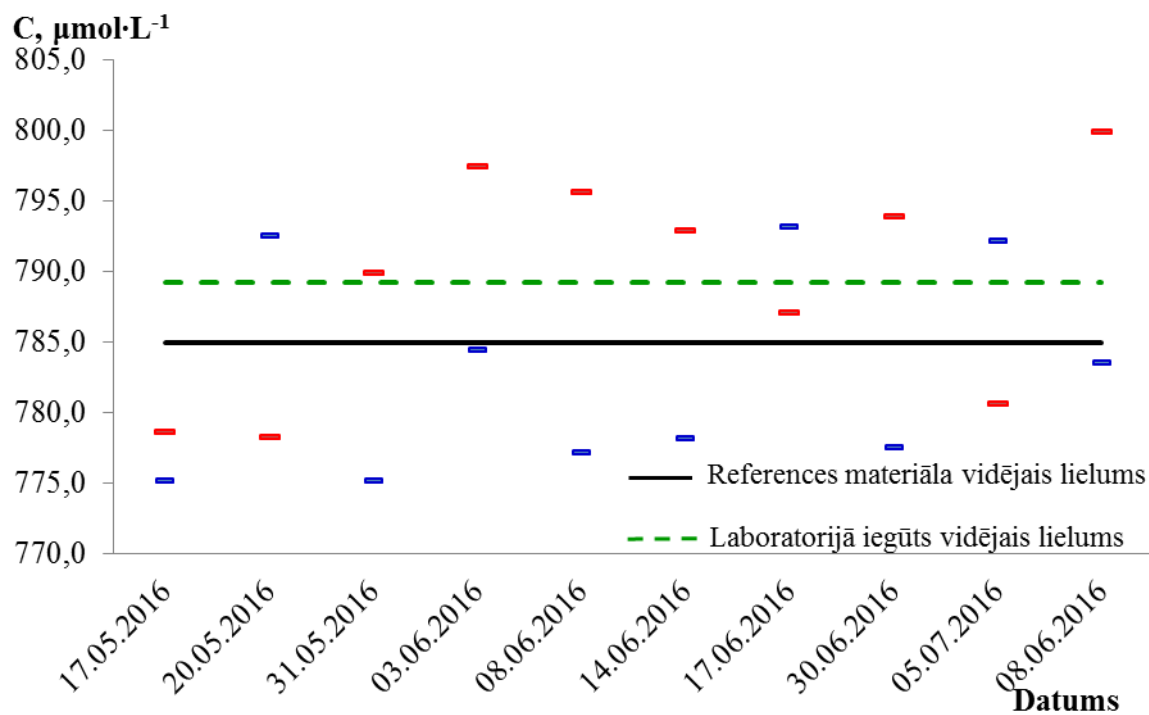


15.6. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – glicīnam.

15.6. tabula

Glicīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	511,2	517,6	514,4	1,2	2	2,6
20.05.2016	512,5	519,0	515,8	1,2	2	
31.05.2016	503,3	512,6	507,9	2	3	
03.06.2016	517,5	502,5	510,0	3	5	
08.06.2016	516,3	518,7	517,5	0,5	0,8	
14.06.2016	507,8	512,3	510,0	0,9	1,5	
17.06.2016	510,5	517,6	514,1	1,4	2	
30.06.2016	520,0	511,5	515,8	1,6	3	
05.07.2016	506,6	518,5	512,6	2	4	
08.06.2016	509,6	514,2	511,9	0,9	1,6	

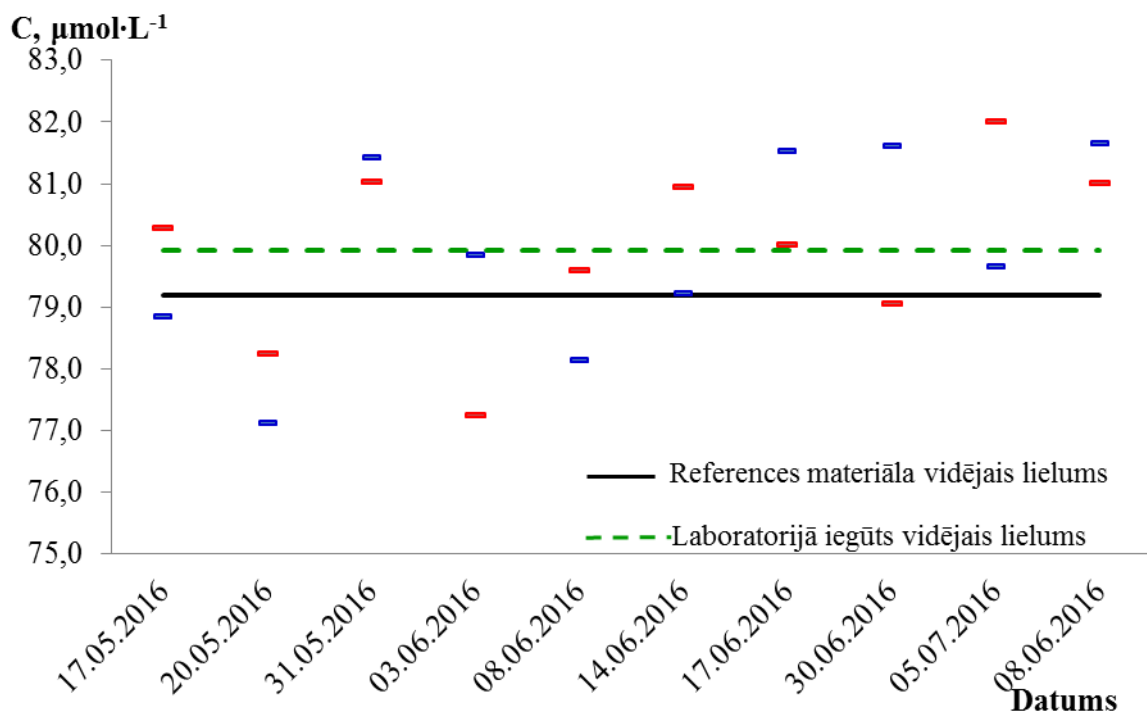


15.7. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – glutamīnam.

15.7. tabula

**Glutamīna nenoteiktības aprēķini**

Datums	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	775,2	778,7	777,0	0,4	0,8	2,9
20.05.2016	792,6	778,3	785,4	2	3	
31.05.2016	775,2	789,9	782,6	2	3	
03.06.2016	784,5	797,5	791,0	2	3	
08.06.2016	777,2	795,7	786,5	2	4	
14.06.2016	778,2	793,0	785,6	2	3	
17.06.2016	793,2	787,1	790,2	0,8	1,4	
30.06.2016	777,5	794,0	785,8	2	4	
05.07.2016	792,2	780,7	786,4	1,5	3	
08.06.2016	783,6	800,0	791,8	2	4	

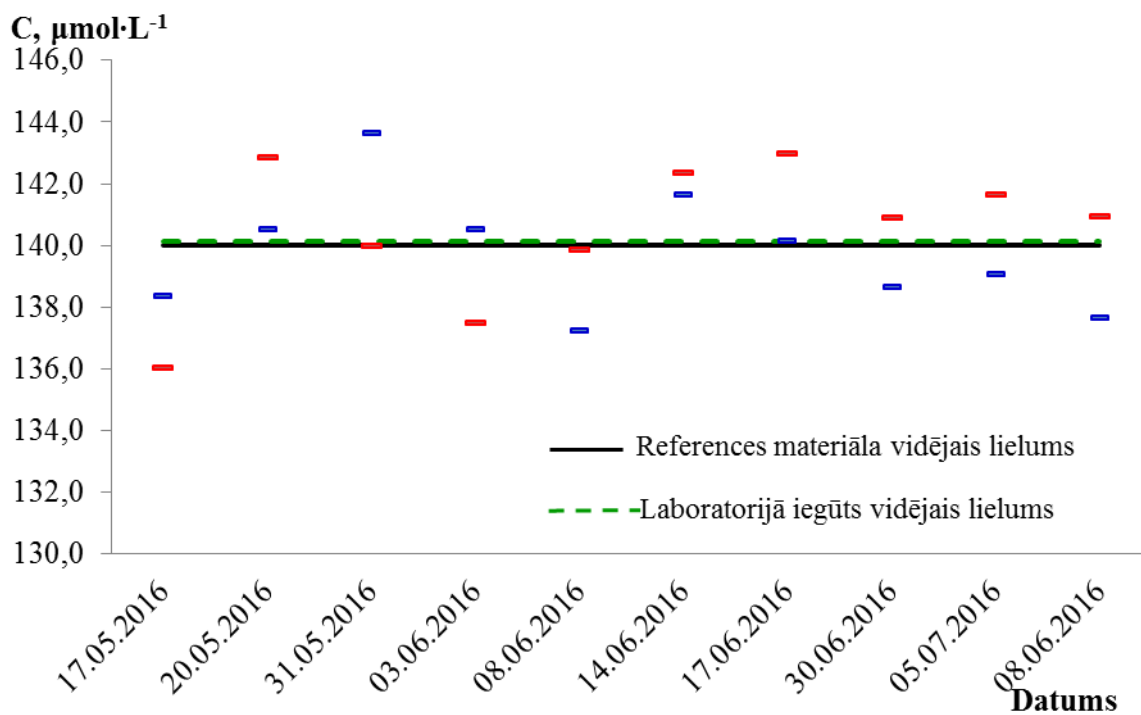


15.8. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – sarkozīnam.

15.8. tabula

Sarkozīna nenoteiktības aprēķini

Datums	C <sub>1</sub> , µmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , µmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , µmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	78,9	80,3	79,6	2	3	3,5
20.05.2016	77,1	78,2	77,7	1,4	3	
31.05.2016	81,4	81,0	81,2	0,5	0,9	
03.06.2016	79,8	77,2	78,5	3	6	
08.06.2016	78,2	79,6	78,9	2	3	
14.06.2016	79,2	81,0	80,1	2	4	
17.06.2016	81,5	80,0	80,8	2	3	
30.06.2016	81,6	79,1	80,3	3	6	
05.07.2016	79,7	82,0	80,8	3	5	
08.06.2016	81,7	81,0	81,3	0,8	1,4	

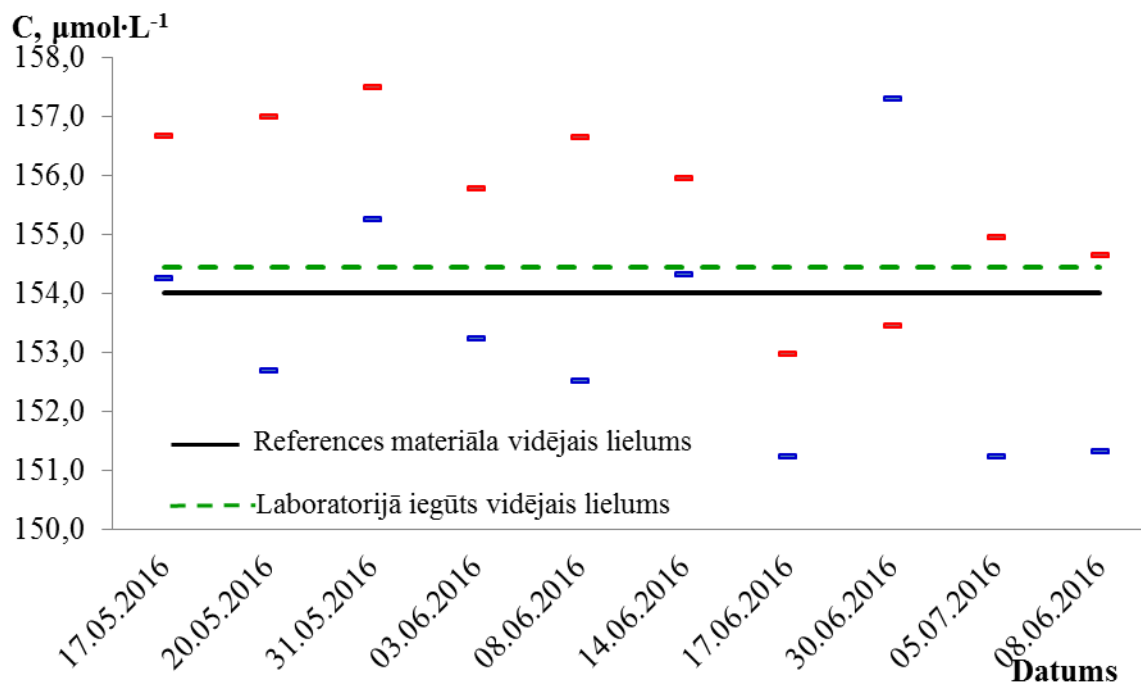


15.9. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – taurīnam.

15.9. tabula

**Taurīna nenoteiktības aprēķini**

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	138,4	136,0	137,2	1,7	3	3,2
20.05.2016	140,5	142,9	141,7	1,6	3	
31.05.2016	143,7	140,0	141,8	3	5	
03.06.2016	140,5	137,5	139,0	2	4	
08.06.2016	137,2	139,9	138,6	1,9	3	
14.06.2016	141,7	142,4	142,0	0,5	0,9	
17.06.2016	140,2	143,0	141,6	2	4	
30.06.2016	138,7	140,9	139,8	1,6	3	
05.07.2016	139,1	141,7	140,4	1,8	3	
08.06.2016	137,7	141,0	139,3	2	4	

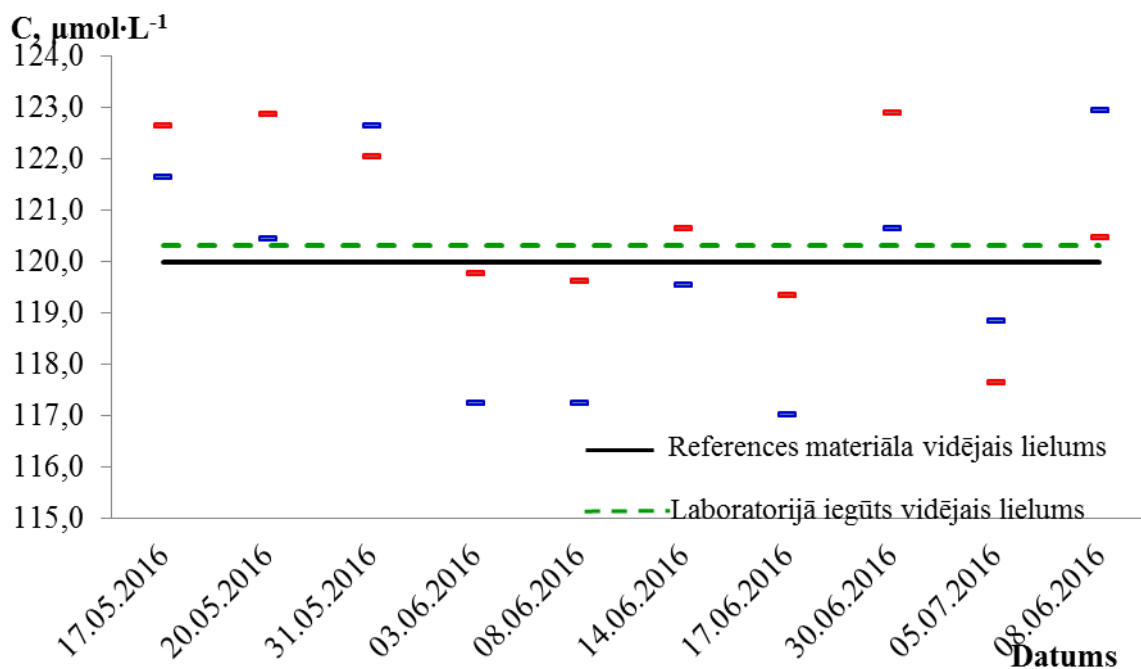


15.10. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – histidīnam.

15.10. tabula

#### Histidīna nenoteiktības aprēķini

Datums	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	154,3	156,7	155,5	1,5	3	3,4
20.05.2016	152,7	157,0	154,8	3	5	
31.05.2016	155,2	157,5	156,4	1,4	3	
03.06.2016	153,2	155,8	154,5	1,6	3	
08.06.2016	152,5	156,7	154,6	3	5	
14.06.2016	154,3	156,0	155,1	1,01	1,9	
17.06.2016	151,2	153,0	152,1	1,1	2	
30.06.2016	157,3	153,5	155,4	3	4	
05.07.2016	151,2	155,0	153,1	2	4	
08.06.2016	151,3	154,7	153,0	2	4	

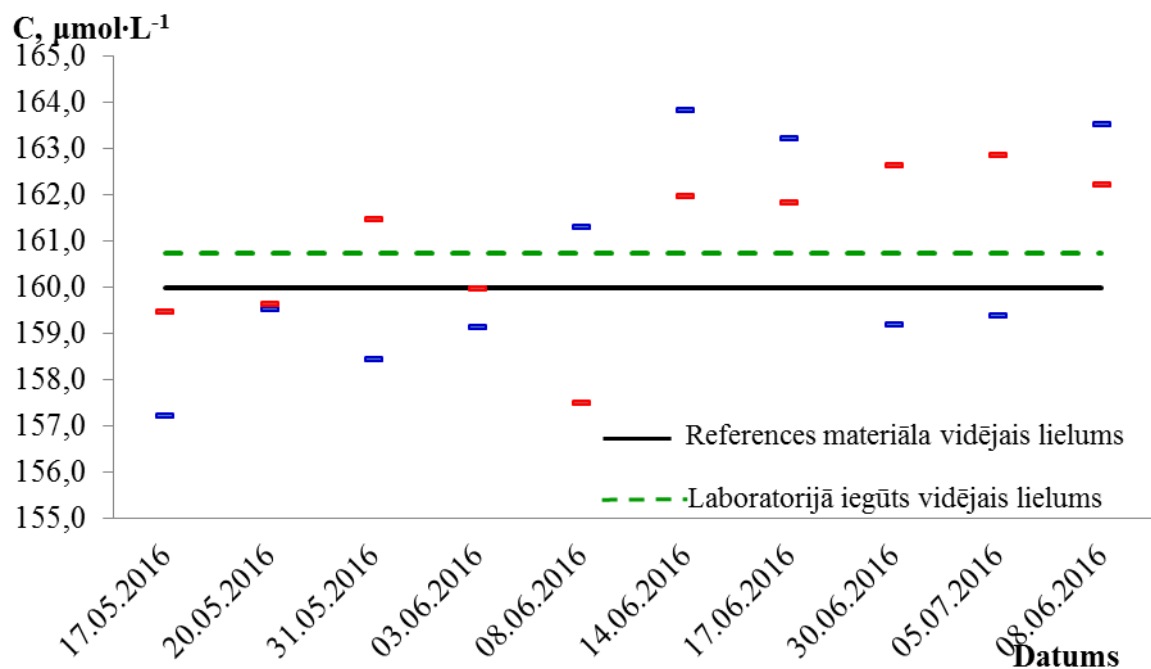


15.11. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – -citrulīnam.

15.11. tabula

#### Citrulīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	121,7	122,7	122,2	0,8	1,5	2,7
20.05.2016	120,5	122,9	121,7	2	4	
31.05.2016	122,7	122,1	122,4	0,5	0,9	
03.06.2016	117,3	119,8	118,5	2	4	
08.06.2016	117,2	119,6	118,4	2	4	
14.06.2016	119,6	120,7	120,1	0,9	1,6	
17.06.2016	117,0	119,4	118,2	2	4	
30.06.2016	120,7	122,9	121,8	1,9	3	
05.07.2016	118,9	117,7	118,3	1,0	1,8	
08.06.2016	123,0	120,5	121,7	2	4	

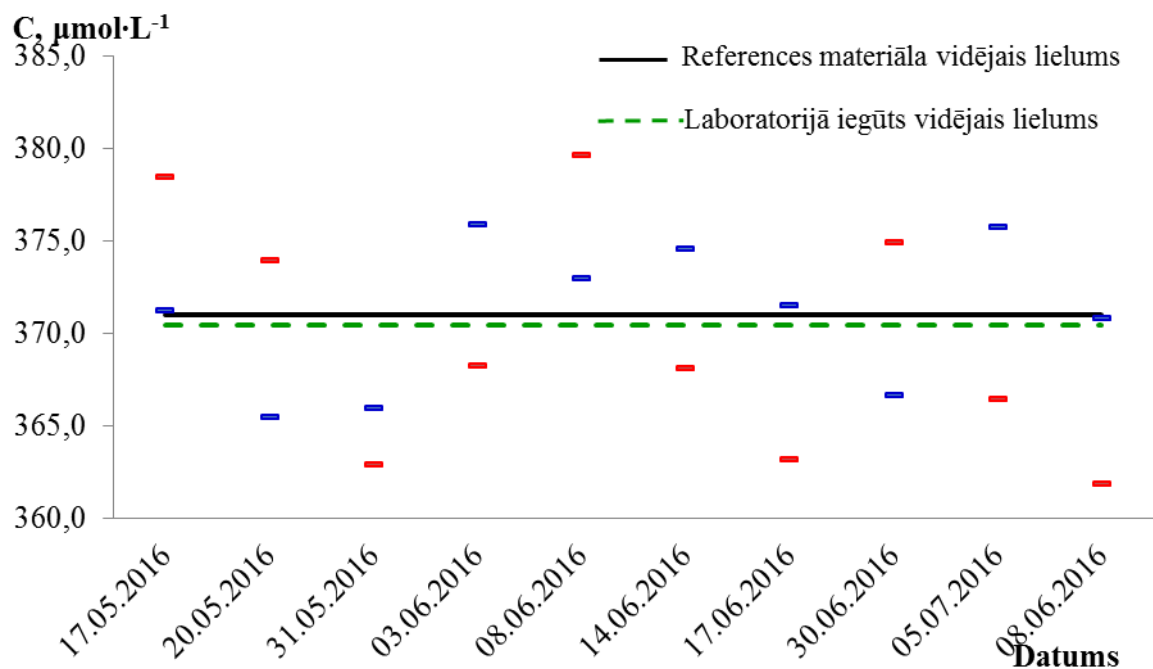


15.12. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – Treonīnam.

15.12. tabula

#### Treonīna nenoteiktības aprēķini

Datums	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	157,2	159,5	158,4	1,4	3	2,4
20.05.2016	159,5	159,7	159,6	0,12	0,15	
31.05.2016	158,5	161,5	160,0	1,9	3	
03.06.2016	159,2	160,0	159,6	0,5	0,9	
08.06.2016	161,3	157,5	159,4	2	4	
14.06.2016	163,9	162,0	162,9	1,1	2	
17.06.2016	163,2	161,9	162,5	0,9	1,5	
30.06.2016	159,2	162,7	160,9	2	4	
05.07.2016	159,4	162,9	161,1	2	4	
08.06.2016	163,5	162,2	162,9	0,8	1,4	

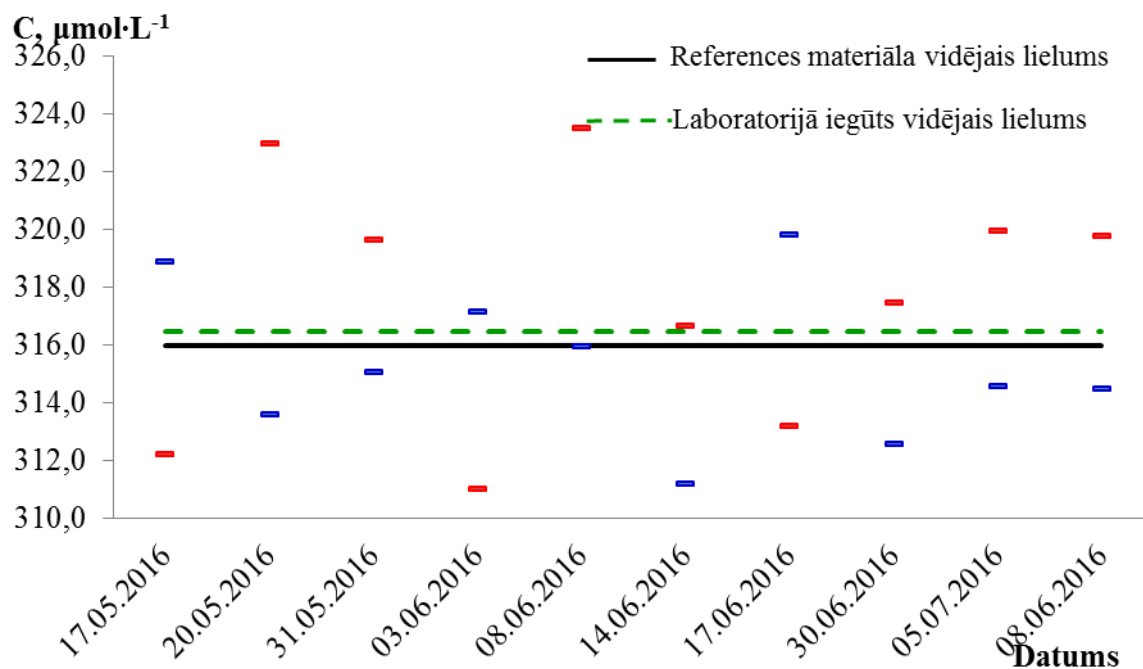


15.13. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – alanīnam.

15.13. tabula

#### Alanīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	371,2	378,5	374,9	1,9	3	3,6
20.05.2016	365,5	374,0	369,8	2	4	
31.05.2016	366,0	362,9	364,5	0,8	1,5	
03.06.2016	376,0	368,2	372,1	2	4	
08.06.2016	373,0	379,7	376,3	1,8	3	
14.06.2016	374,6	368,1	371,4	1,7	3	
17.06.2016	371,6	363,2	367,4	2	4	
30.06.2016	366,7	375,0	370,8	2	4	
05.07.2016	375,8	366,5	371,1	3	4	
08.06.2016	370,9	361,9	366,4	3	4	

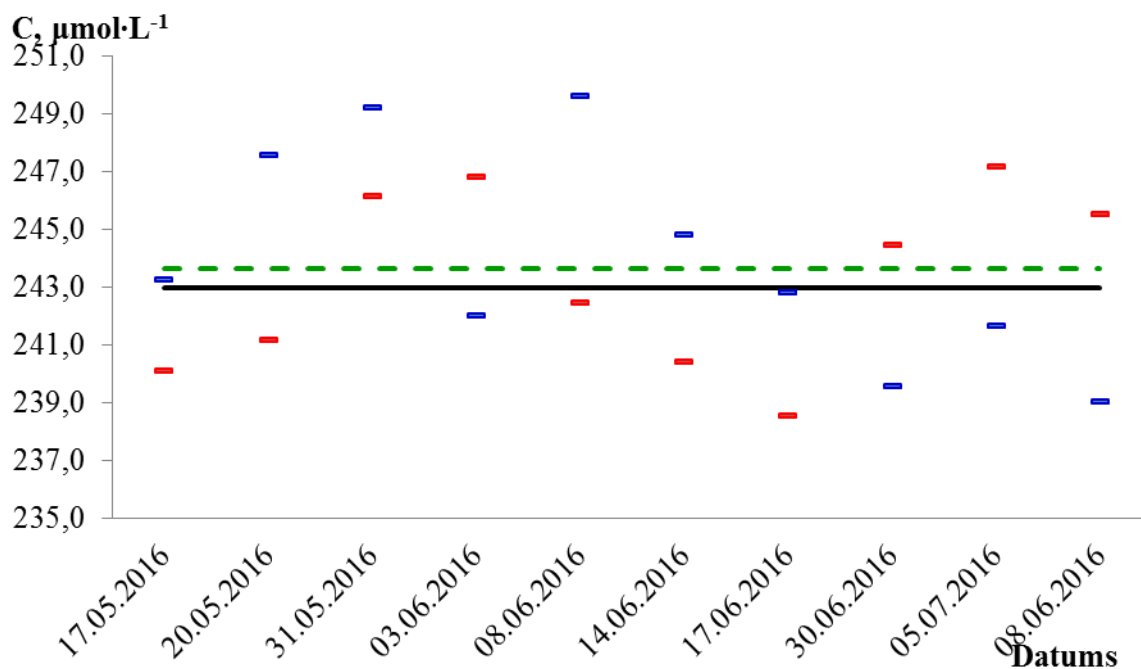


15.14. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – arginīnam.

15.14. tabula

#### Arginīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	318,9	312,2	315,6	2	4	3,5
20.05.2016	313,6	323,0	318,3	3	5	
31.05.2016	315,1	319,7	317,4	1,5	3	
03.06.2016	317,2	311,0	314,1	2	4	
08.06.2016	316,0	323,5	319,8	2	4	
14.06.2016	311,2	316,7	313,9	1,7	3	
17.06.2016	319,9	313,2	316,5	2	4	
30.06.2016	312,6	317,5	315,0	1,5	3	
05.07.2016	314,6	320,0	317,3	1,7	3	
08.06.2016	314,5	319,8	317,1	1,7	3	

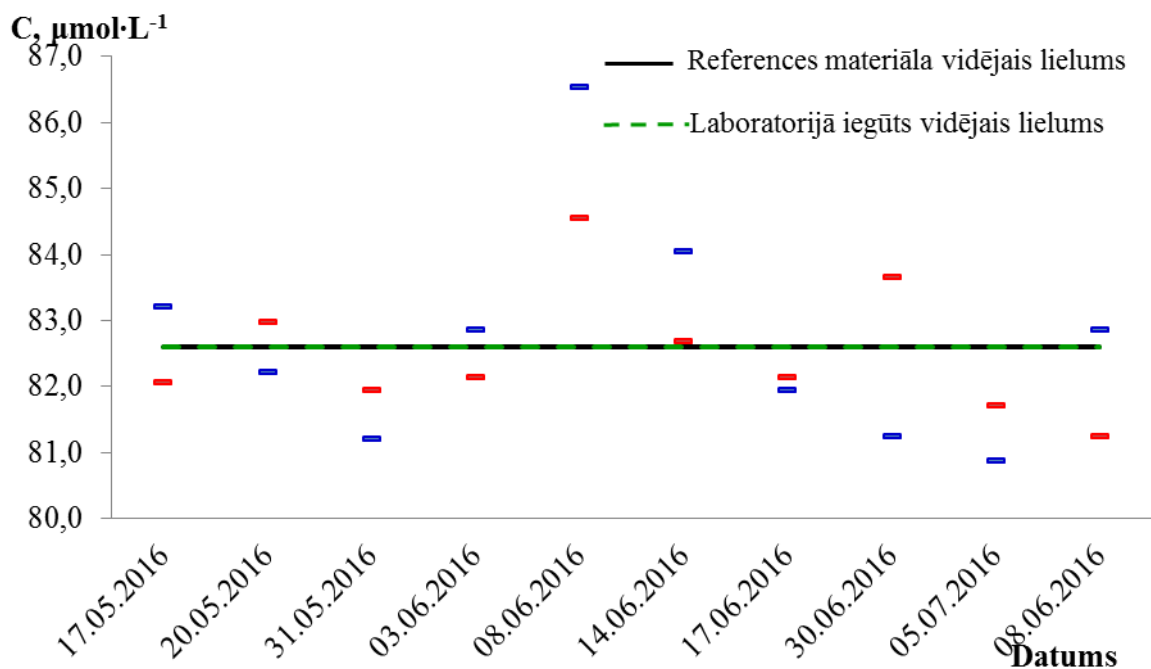


15.15. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – prolīnam.

15.15. tabula

**Prolīna nenoteiktības aprēķini**

Datums	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	243,3	240,1	241,7	1,3	2	3,7
20.05.2016	247,6	241,2	244,4	3	5	
31.05.2016	249,3	246,2	247,7	1,3	2	
03.06.2016	242,0	246,9	244,4	2	4	
08.06.2016	249,6	242,5	246,1	3	5	
14.06.2016	244,9	240,4	242,6	1,8	3	
17.06.2016	242,9	238,5	240,7	1,8	3	
30.06.2016	239,6	244,5	242,0	2	4	
05.07.2016	241,7	247,2	244,4	2	4	
08.06.2016	239,1	245,5	242,3	3	5	

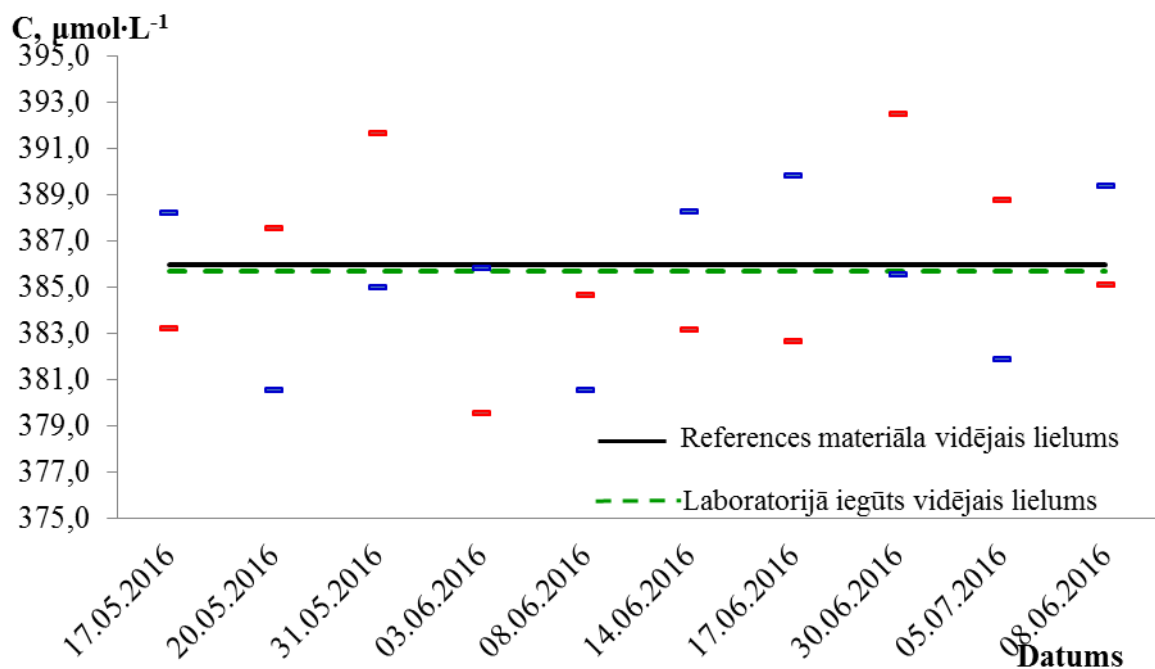


15.16. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – tirozīnam.

15.16. tabula

#### Tirozīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	83,2	82,1	82,6	1,4	3	2,5
20.05.2016	82,2	83,0	82,6	0,9	1,6	
31.05.2016	81,2	82,0	81,6	0,9	1,6	
03.06.2016	82,9	82,1	82,5	0,9	1,5	
08.06.2016	86,5	84,5	85,5	2	4	
14.06.2016	84,1	82,7	83,4	1,6	3	
17.06.2016	82,0	82,1	82,1	0,2	0,4	
30.06.2016	81,2	83,7	82,5	3	5	
05.07.2016	80,9	81,7	81,3	1,0	2	
08.06.2016	82,9	81,2	82,1	2	4	

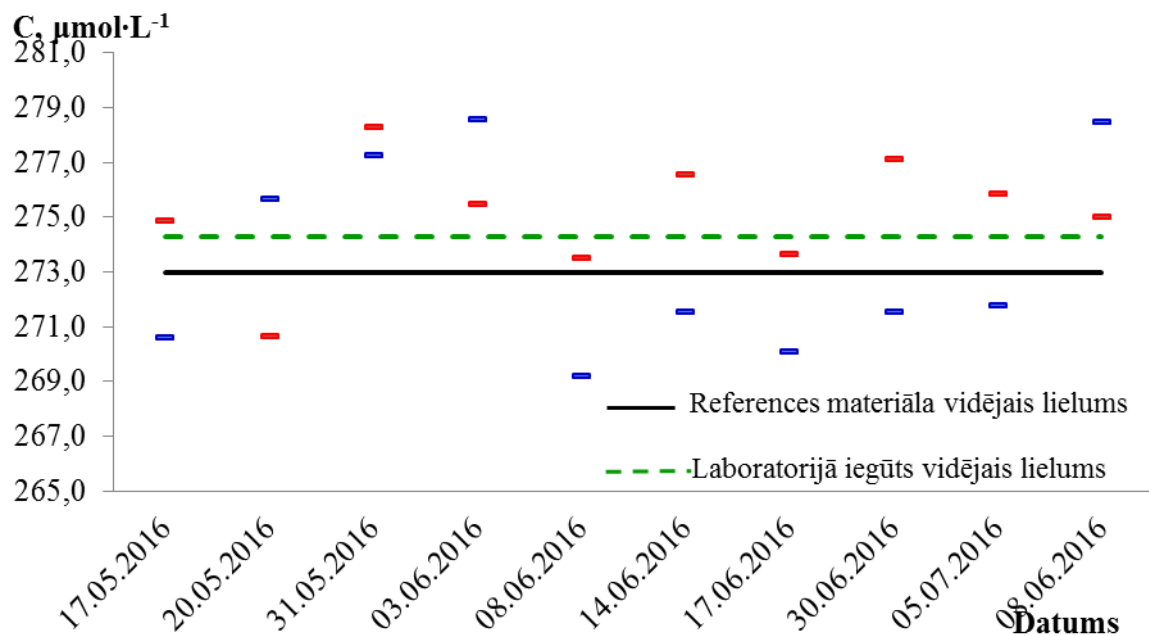


15.17. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – valīnam.

15.17. tabula

#### Valīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	388,3	383,2	385,8	1,3	2	2,7
20.05.2016	380,6	387,6	384,1	1,8	3	
31.05.2016	385,0	391,7	388,3	1,7	3	
03.06.2016	385,8	379,5	382,7	1,6	3	
08.06.2016	380,6	384,7	382,6	1,1	1,9	
14.06.2016	388,3	383,2	385,7	1,3	2	
17.06.2016	389,9	382,7	386,3	1,9	3	
30.06.2016	385,5	392,5	389,0	1,8	3	
05.07.2016	381,9	388,8	385,3	1,8	3	
08.06.2016	389,4	385,1	387,3	1,1	1,9	

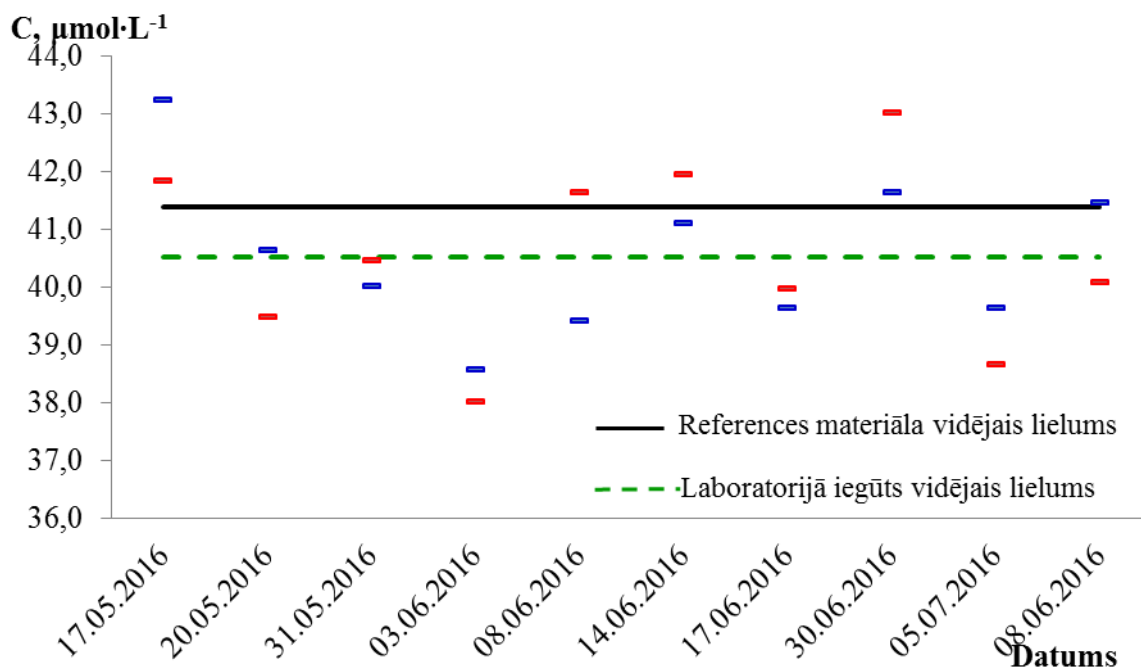


15.18. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – Metionīnam.

15.18. tabula

Metionīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	270,6	274,9	272,7	1,6	3	2,6
20.05.2016	275,7	270,7	273,2	1,8	3	
31.05.2016	277,3	278,3	277,8	0,4	0,6	
03.06.2016	278,6	275,5	277,0	1,1	2	
08.06.2016	269,2	273,5	271,4	1,6	3	
14.06.2016	271,6	276,6	274,1	1,8	3	
17.06.2016	270,1	273,7	271,9	1,3	2	
30.06.2016	271,5	277,1	274,3	2	4	
05.07.2016	271,8	275,9	273,8	1,5	3	
08.06.2016	278,5	275,0	276,8	1,2	2	

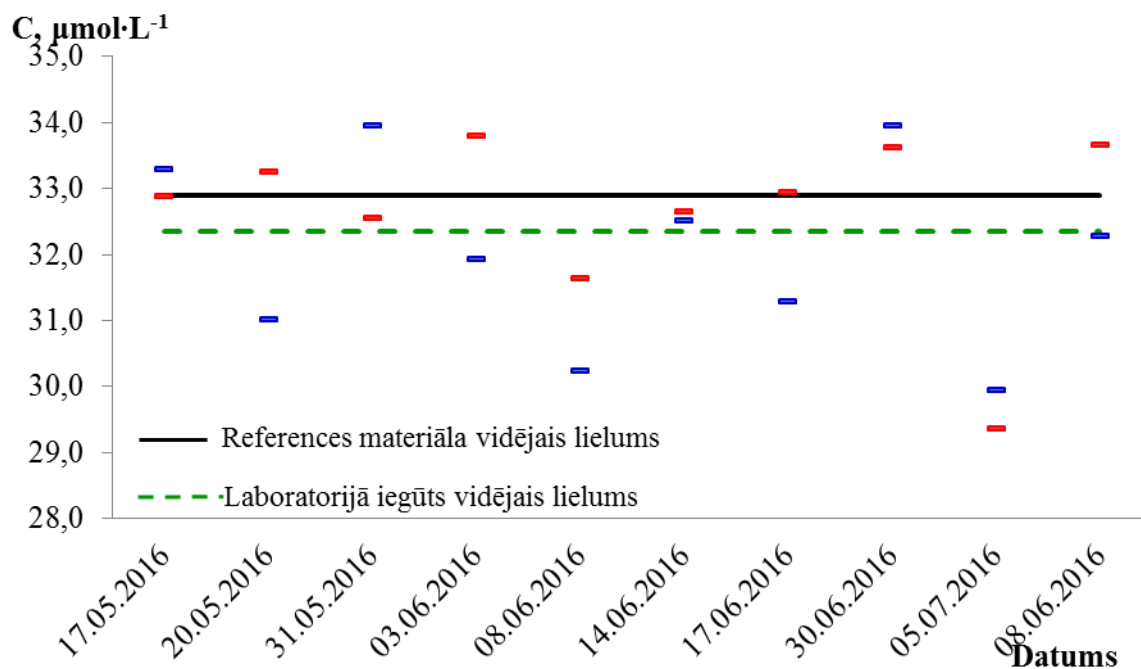


15.19. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – cistīnam.

15.19. tabula

**Cistīna nenoteiktības aprēķini**

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	43,3	41,9	42,6	3	6	4,7
20.05.2016	40,7	39,5	40,1	3	5	
31.05.2016	40,0	40,5	40,3	1,1	1,9	
03.06.2016	38,6	38,0	38,3	1,5	3	
08.06.2016	39,4	41,7	40,5	6	10	
14.06.2016	41,1	42,0	41,5	2	4	
17.06.2016	39,7	40,0	39,8	0,8	1,4	
30.06.2016	41,7	43,0	42,3	3	6	
05.07.2016	39,7	38,7	39,2	3	5	
08.06.2016	41,5	40,1	40,8	3	6	

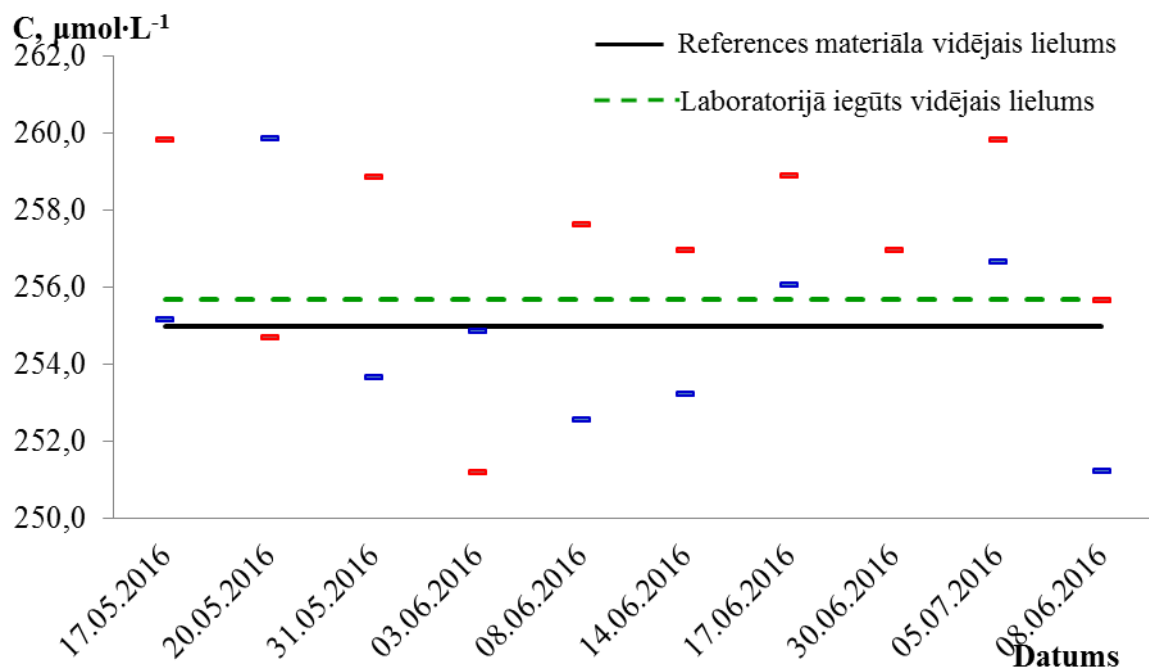


15.20. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – cistationīnam.

15.20. tabula

**Cistationīna nenoteiktības aprēķini**

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	33,3	32,9	33,1	1,2	2	6,3
20.05.2016	31,0	33,3	32,1	7	12	
31.05.2016	34,0	32,5	33,3	4	8	
03.06.2016	31,9	33,8	32,9	6	10	
08.06.2016	30,2	31,6	30,9	5	8	
14.06.2016	32,5	32,7	32,6	0,4	0,7	
17.06.2016	31,3	33,0	32,1	6	9	
30.06.2016	34,0	33,6	33,8	1,0	1,8	
05.07.2016	30,0	29,4	29,7	2	4	
08.06.2016	32,3	33,7	33,0	4	7	

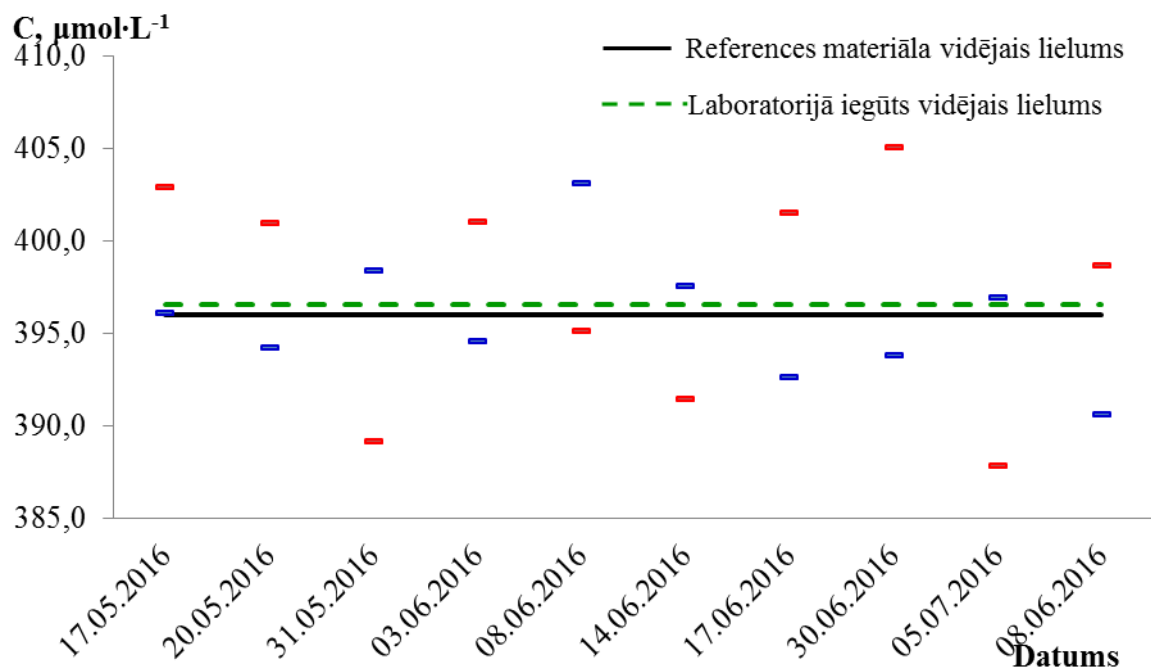


15.21. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – izoleicīnam.

15.21. tabula

Izoleicīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	255,2	259,8	257,5	1,8	3	3,1
20.05.2016	259,9	254,7	257,3	2	4	
31.05.2016	253,7	258,9	256,3	2	4	
03.06.2016	254,9	251,2	253,0	1,4	3	
08.06.2016	252,6	257,7	255,1	2	4	
14.06.2016	253,3	257,0	255,1	1,5	3	
17.06.2016	256,1	258,9	257,5	1,1	2	
30.06.2016	250,0	257,0	253,5	3	5	
05.07.2016	256,7	259,9	258,3	1,2	2	
08.06.2016	251,2	255,7	253,5	1,7	3	

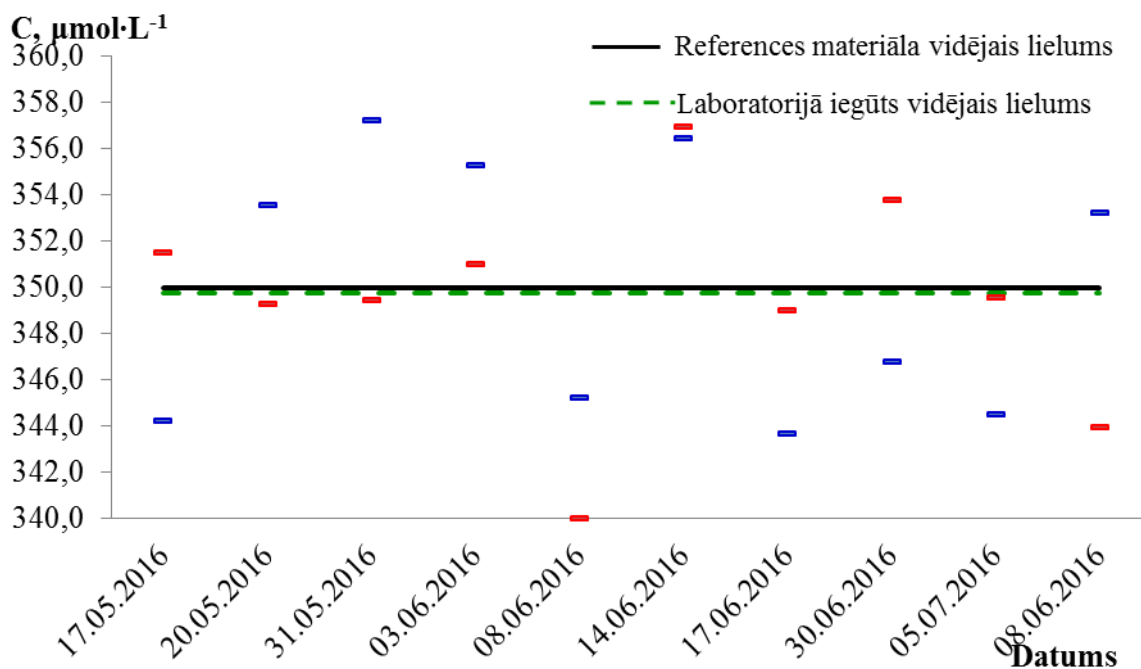


15.22. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – leicīnam.

15.22. tabula

Leicīna nenoteiktības aprēķini

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	396,1	403,0	399,6	1,7	3	3,6
20.05.2016	394,3	401,0	397,6	1,7	3	
31.05.2016	398,5	389,1	393,8	2	4	
03.06.2016	394,6	401,0	397,8	1,6	3	
08.06.2016	403,1	395,1	399,1	2	4	
14.06.2016	397,6	391,5	394,5	1,5	3	
17.06.2016	392,7	401,5	397,1	2	4	
30.06.2016	393,8	405,1	399,5	3	5	
05.07.2016	397,0	387,8	392,4	2	4	
08.06.2016	390,7	398,7	394,7	2	4	

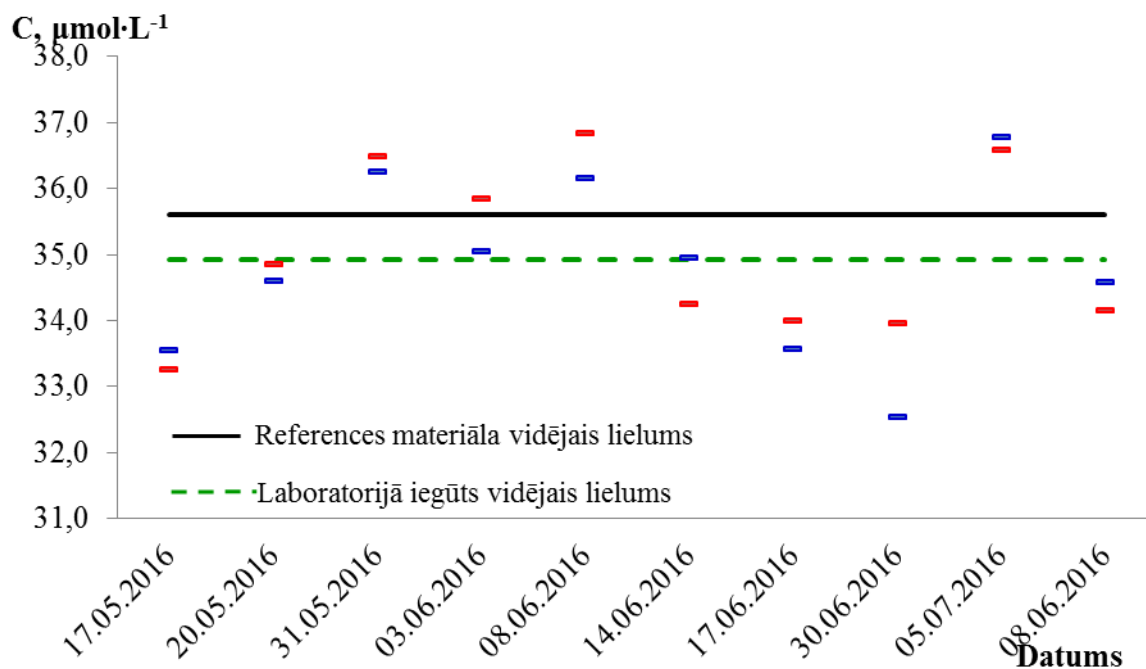


15.23. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – fenilalanīnam.

15.23. tabula

Fenilalanīna nenoteiktības aprēķini

Datums	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	344,2	351,5	347,9	2	4	2,8
20.05.2016	353,6	349,3	351,4	1,2	2	
31.05.2016	357,3	349,5	353,4	2	4	
03.06.2016	355,3	351,0	353,2	1,2	2	
08.06.2016	345,3	340,0	342,6	1,5	3	
14.06.2016	356,5	357,0	356,7	0,1	0,2	
17.06.2016	343,7	349,0	346,3	1,5	3	
30.06.2016	346,8	353,8	350,3	2	4	
05.07.2016	344,5	349,5	347,0	1,5	3	
08.06.2016	353,2	344,0	348,6	3	5	

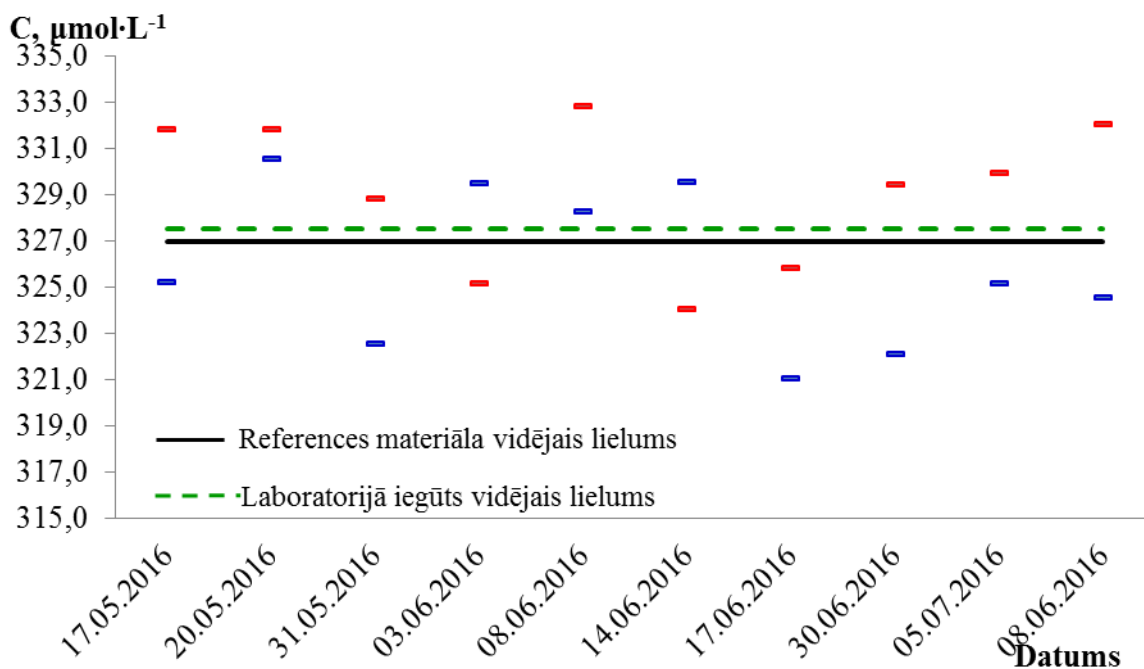


15.24. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – triptofānam.

15.24. tabula

#### Triptofāna nenoteiktības aprēķini

Datums	C <sub>1</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>2</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	C <sub>vid.</sub> , μmol·L <sup>-1</sup>	r, %	u, %	u <sub>vid.</sub> , %
17.05.2016	33,6	33,3	33,4	0,9	1,6	2,8
20.05.2016	34,6	34,9	34,7	0,7	1,3	
31.05.2016	36,3	36,5	36,4	0,6	1,1	
03.06.2016	35,1	35,9	35,5	2	4	
08.06.2016	36,2	36,8	36,5	1,9	3	
14.06.2016	35,0	34,2	34,6	2	4	
17.06.2016	33,6	34,0	33,8	1,3	2	
30.06.2016	32,5	34,0	33,3	4	8	
05.07.2016	36,8	36,6	36,7	0,6	1,0	
08.06.2016	34,6	34,2	34,4	1,2	2	

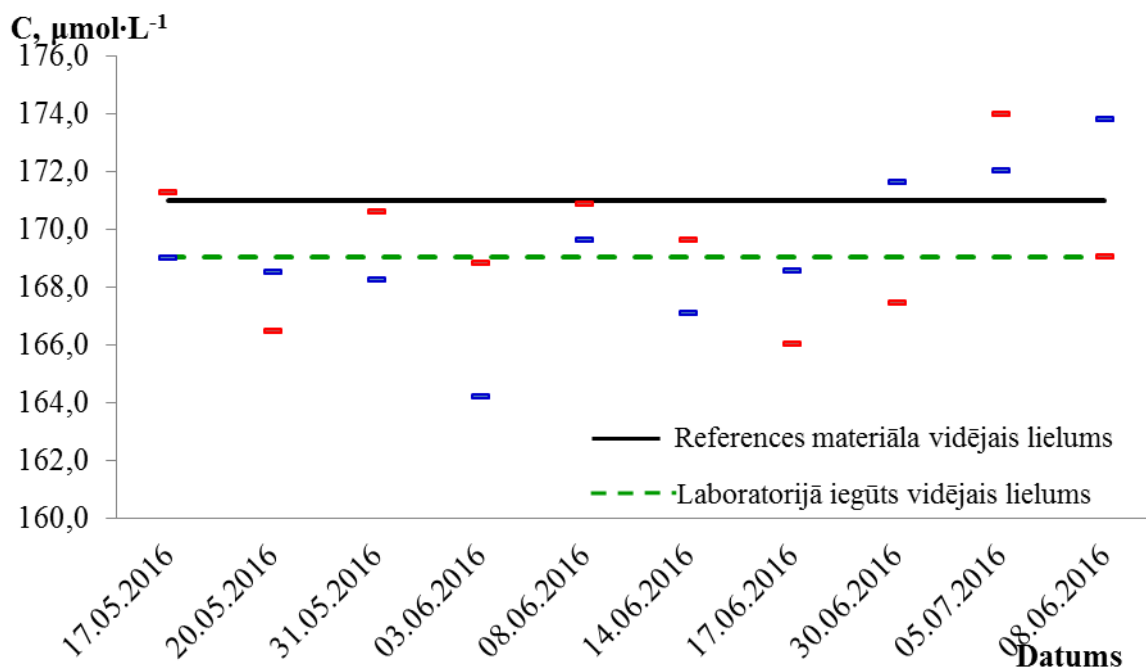


15.25. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – ornitīnam.

15.25. tabula

**Ornitīna nenoteiktības aprēķini**

Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	325,3	331,8	328,6	2	4	2,9
20.05.2016	330,6	331,9	331,2	0,4	0,7	
31.05.2016	322,6	328,9	325,7	1,9	3	
03.06.2016	329,5	325,2	327,4	1,3	2	
08.06.2016	328,3	332,9	330,6	1,4	2	
14.06.2016	329,6	324,0	326,8	1,7	3	
17.06.2016	321,0	325,9	323,4	1,5	3	
30.06.2016	322,1	329,5	325,8	2	4	
05.07.2016	325,2	330,0	327,6	1,5	3	
08.06.2016	324,5	332,1	328,3	2	4	



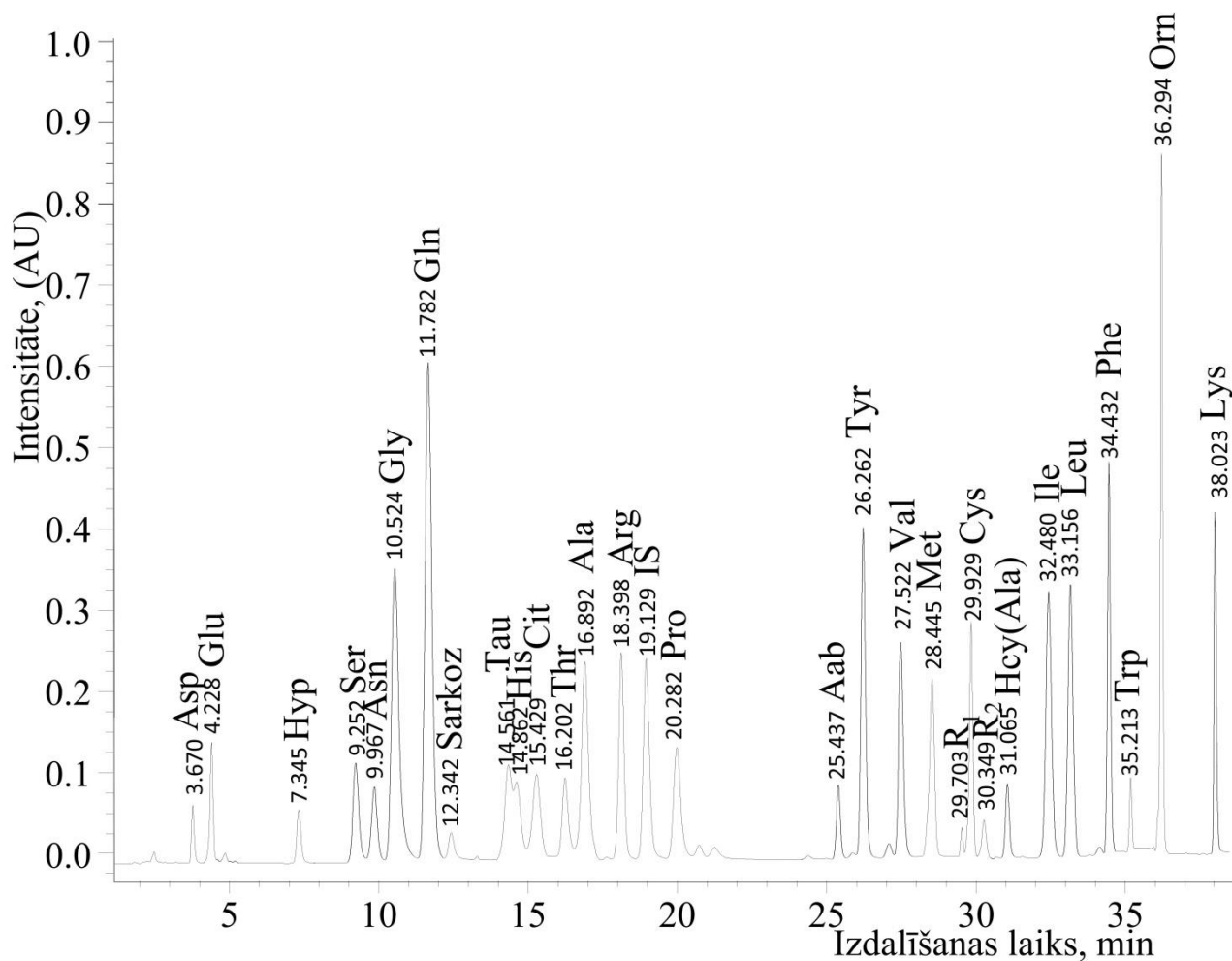
15.26. att. R - grafiks bioloģiskajā materiālā noteiktam analītam – lizīnam.

15.26. tabula

Lizīna nenoteiktības aprēķini

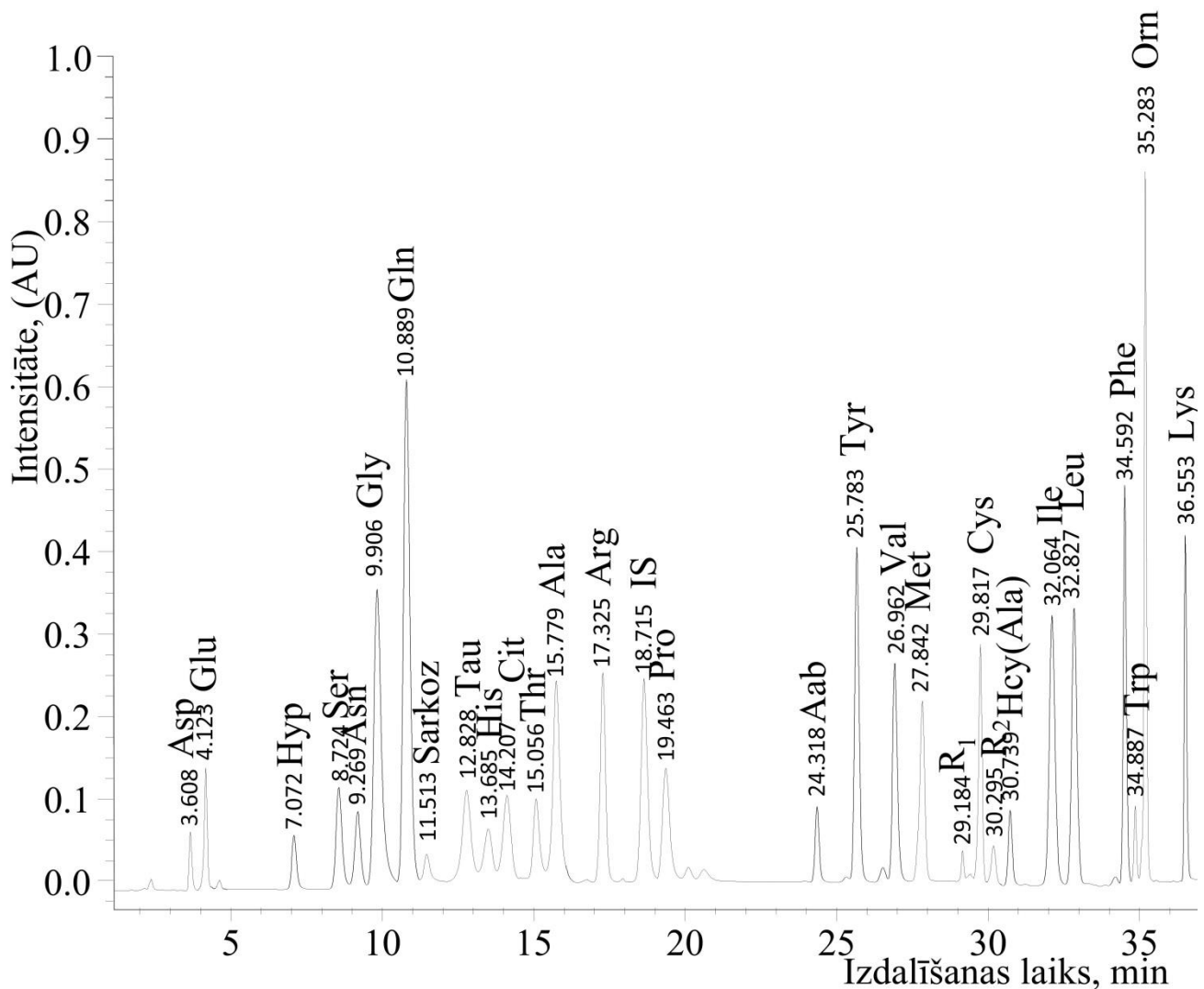
Datums	$C_1, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_2, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$C_{\text{vid.}}, \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	r, %	u, %	$u_{\text{vid.}}, \%$
17.05.2016	169,0	171,3	170,2	1,3	2	3,0
20.05.2016	168,6	166,5	167,5	1,2	2	
31.05.2016	168,3	170,6	169,5	1,4	3	
03.06.2016	164,2	168,8	166,5	3	5	
08.06.2016	169,7	170,9	170,3	0,7	1,3	
14.06.2016	167,1	169,7	168,4	1,5	3	
17.06.2016	168,6	166,0	167,3	1,5	3	
30.06.2016	171,7	167,5	169,6	3	4	
05.07.2016	172,0	174,0	173,0	1,1	2	
08.06.2016	173,9	169,1	171,5	3	5	

## 16. PIELIKUMS



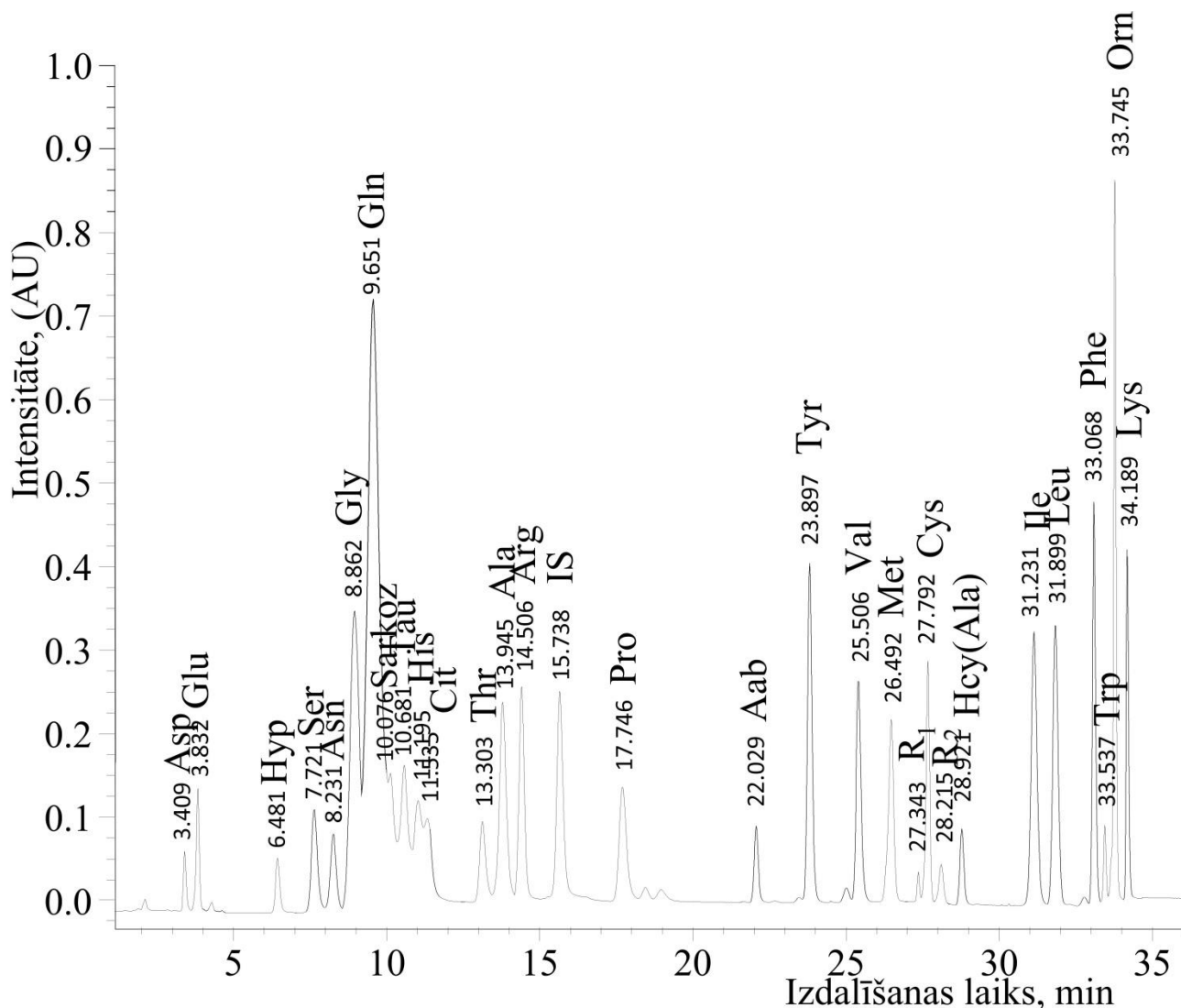
16.1. att. Robustuma pārbaude, izmantojot kolonnas temperatūru 40 °C.

Hromatogrāfijas apstākļi: *Pico Tag C18* 3,9 mm x 300 mm kolonna, daļiņu izmērs 4 μm; plūsmas ātrums 1 mL·min<sup>-1</sup>; detektēšana pie 254 nm; ievadīto paraugu tilpums 10 μL; A eluents nātrija acetāta trihidrāta buferšķīdums pH 4,6; B Eluents 3/2 (v/v) (acetonitrils/ūdens) (2.3.4. nodaļa); segmentēts gradients no 100/0 % līdz 98,5/1,5 % A/B no 0 min līdz 12,5 min, no 98,5/1,5 % līdz 98/8 % A/B no 12,5 min līdz 20,5 min, no 98/8 % līdz 75,5/24,5 % A/B no 20,5 min līdz 21 min, no 75,5/24,5 % līdz 61/39 % A/B no 21 min līdz 36,5 min, no 61/39 % līdz 85/15 % A/B no 36,5 min līdz 40 min (3.42. att.)



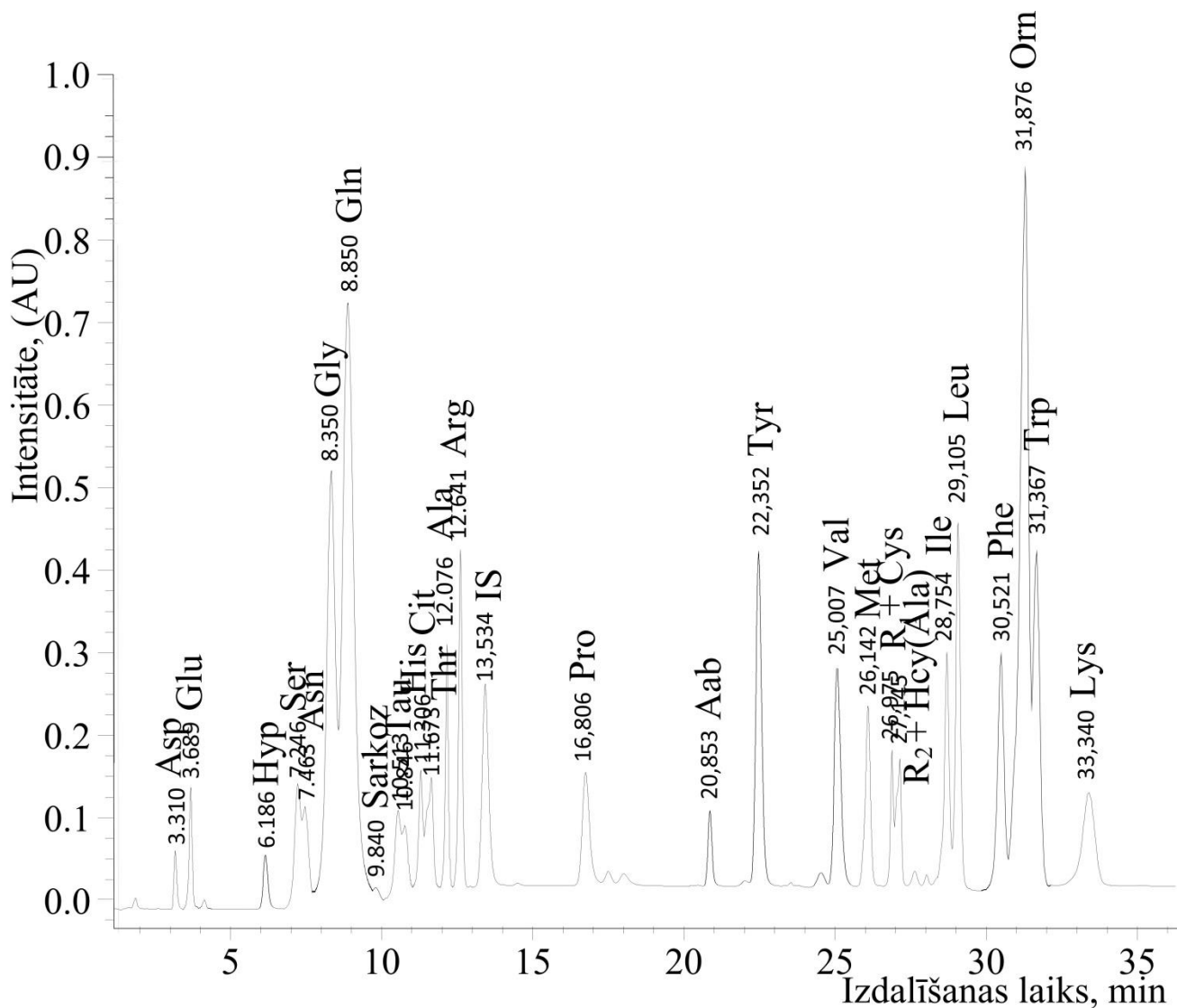
16.2. att. Robustuma pārbaude, izmantojot kolonnas temperatūru 43 °C.

Hromatogrāfijas apstākļi: *Pico Tag C18* 3,9 mm x 300 mm kolonna, daļiņu izmērs 4 μm; plūsmas ātrums 1 mL·min<sup>-1</sup>; detektēšana pie 254 nm; ievadīto paraugu tilpums 10 μL; A eluents nātrija acetāta trihidrāta buferšķīdums pH 4,6; B Eluents 3/2 (v/v) (acetonitrils/ūdens) (2.3.4. nodaļa); segmentēts gradients no 100/0 % līdz 98,5/1,5 % A/B no 0 min līdz 12,5 min, no 98,5/1,5 % līdz 98/8 % A/B no 12,5 min līdz 20,5 min, no 98/8 % līdz 75,5/24,5 % A/B no 20,5 min līdz 21 min, no 75,5/24,5 % līdz 61/39 % A/B no 21 min līdz 36,5 min, no 61/39 % līdz 85/15 % A/B no 36,5 min līdz 40 min (3.42. att.)



**16.3. att. Robustuma pārbaude, izmantojot kolonnas temperatūru 49 °C.**

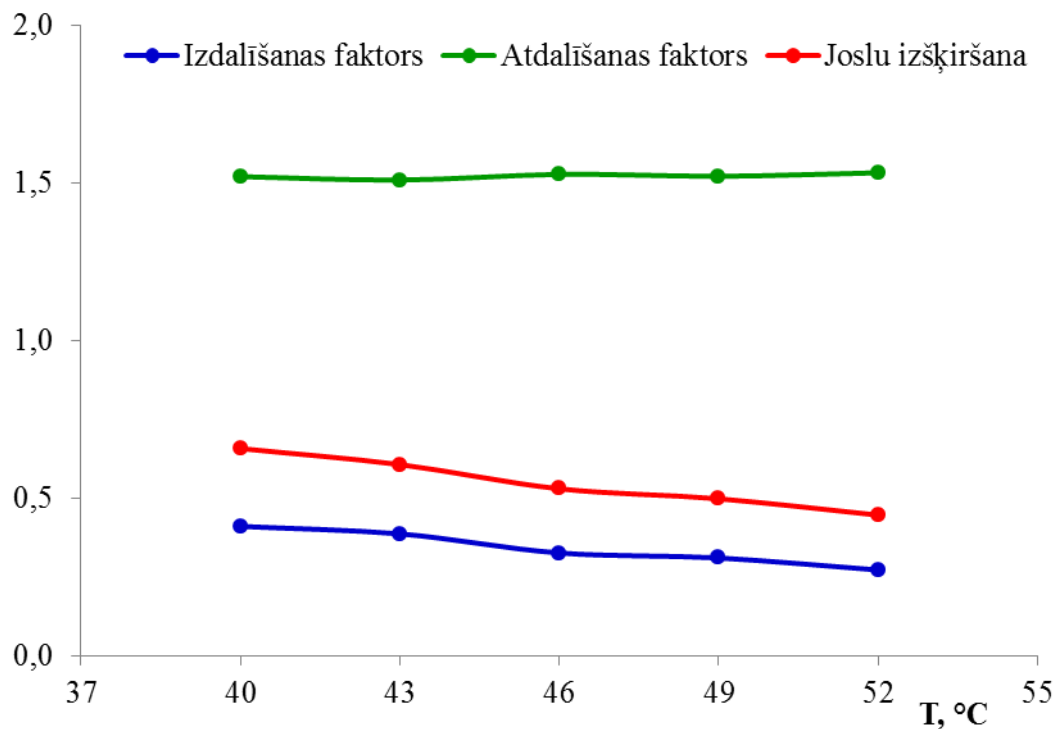
**Hromatogrāfijas apstākļi:** *Pico Tag C18* 3,9 mm x 300 mm kolonna, daļiņu izmērs 4 μm; plūsmas ātrums 1 mL·min<sup>-1</sup>; detektēšana pie 254 nm; ievadīto paraugu tilpums 10 μL; A eluents nātrija acetāta trihidrāta buferšķīdums pH 4,6; B Eluents 3/2 (v/v) (acetonitrils/ūdens) (2.3.4. nodaļa); segmentēts gradients no 100/0 % līdz 98,5/1,5 % A/B no 0 min līdz 12,5 min, no 98,5/1,5 % līdz 98/8 % A/B no 12,5 min līdz 20,5 min, no 98/8 % līdz 75,5/24,5 % A/B no 20,5 min līdz 21 min, no 75,5/24,5 % līdz 61/39 % A/B no 21 min līdz 36,5 min, no 61/39 % līdz 85/15 % A/B no 36,5 min līdz 40 min (3.42. att.)



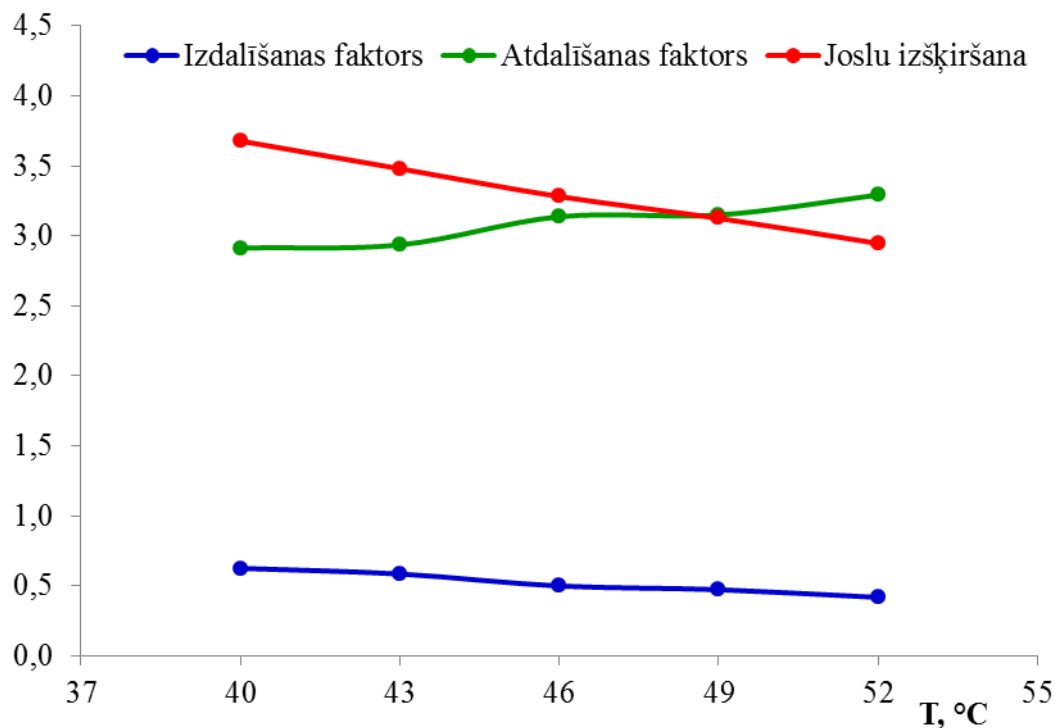
16.4. att. Robustuma pārbaude, izmantojot kolonnas temperatūru 52 °C.

Hromatogrāfijas apstākļi: Pico Tag C18 3,9 mm x 300 mm kolonna, daļiņu izmērs 4 μm; plūsmas ātrums 1 mL·min<sup>-1</sup>; detektēšana pie 254 nm; ievadīto paraugu tilpums 10 μL; A eluents nātrija acetāta trihidrāta buferšķīdums pH 4,6; B Eluents 3/2 (v/v) (acetonitrils/ūdens) (2.3.4. nodaļa); segmentēts gradients no 100/0 % līdz 98,5/1,5 % A/B no 0 min līdz 12,5 min, no 98,5/1,5 % līdz 98/8 % A/B no 12,5 min līdz 20,5 min, no 98/8 % līdz 75,5/24,5 % A/B no 20,5 min līdz 21 min, no 75,5/24,5 % līdz 61/39 % A/B no 21 min līdz 36,5 min, no 61/39 % līdz 85/15 % A/B no 36,5 min līdz 40 min (3.42. att.)

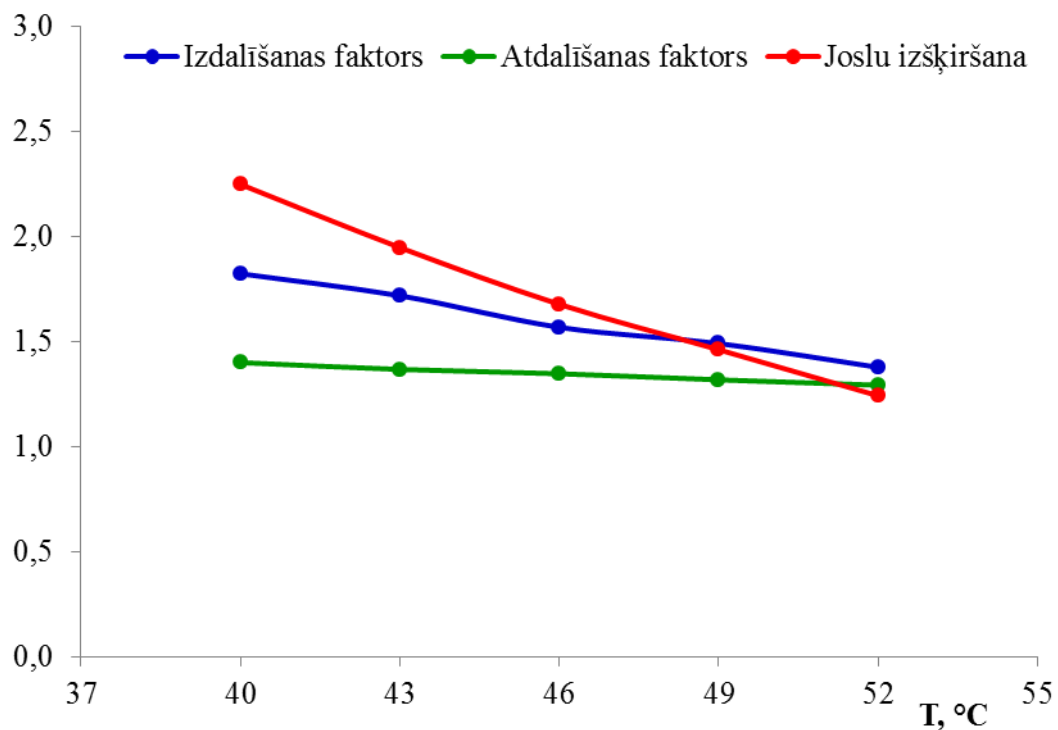
## 17. PIELIKUMS



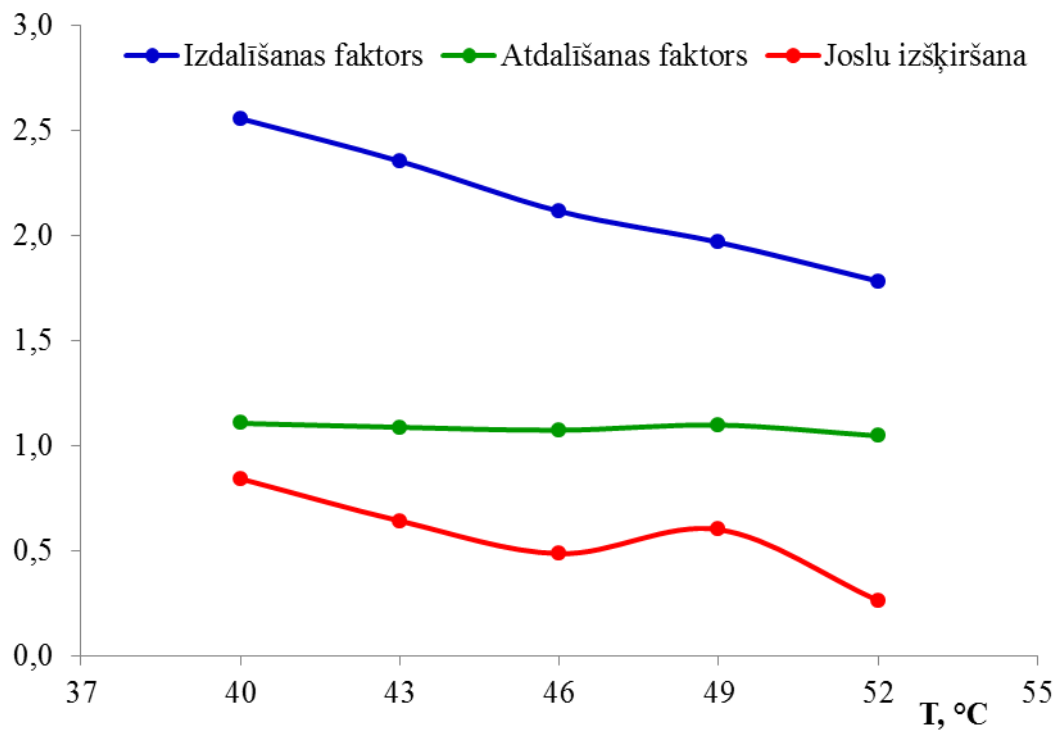
17.1. att. Asparagīnskābes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



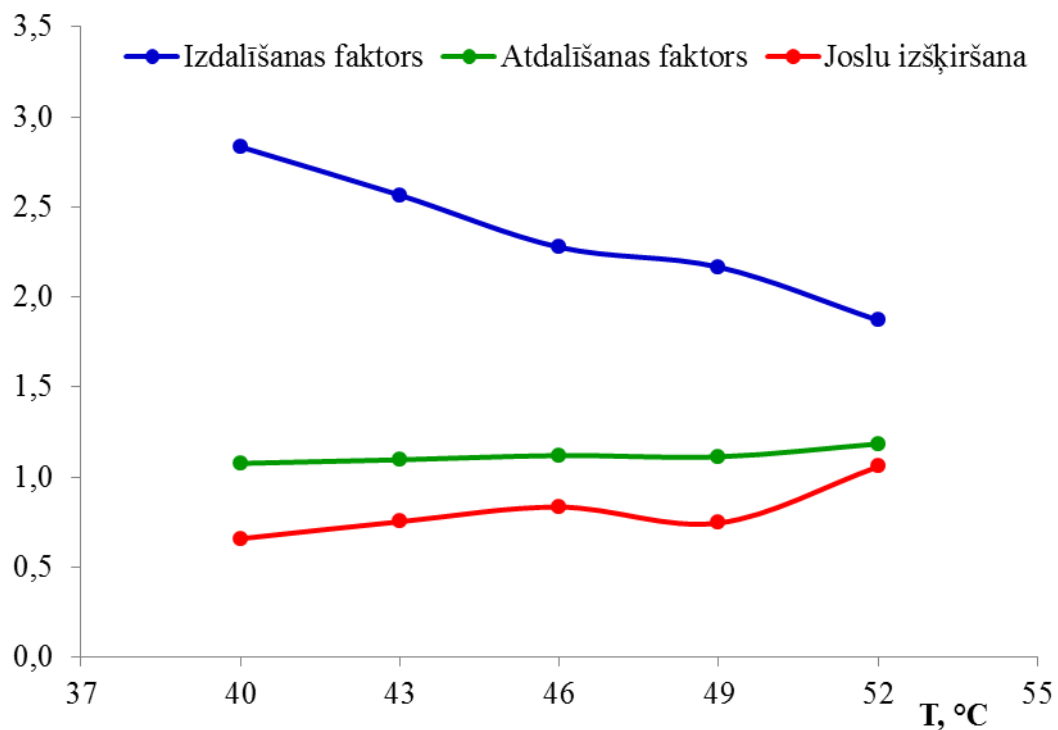
17.2. att. Glutamīnskābes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



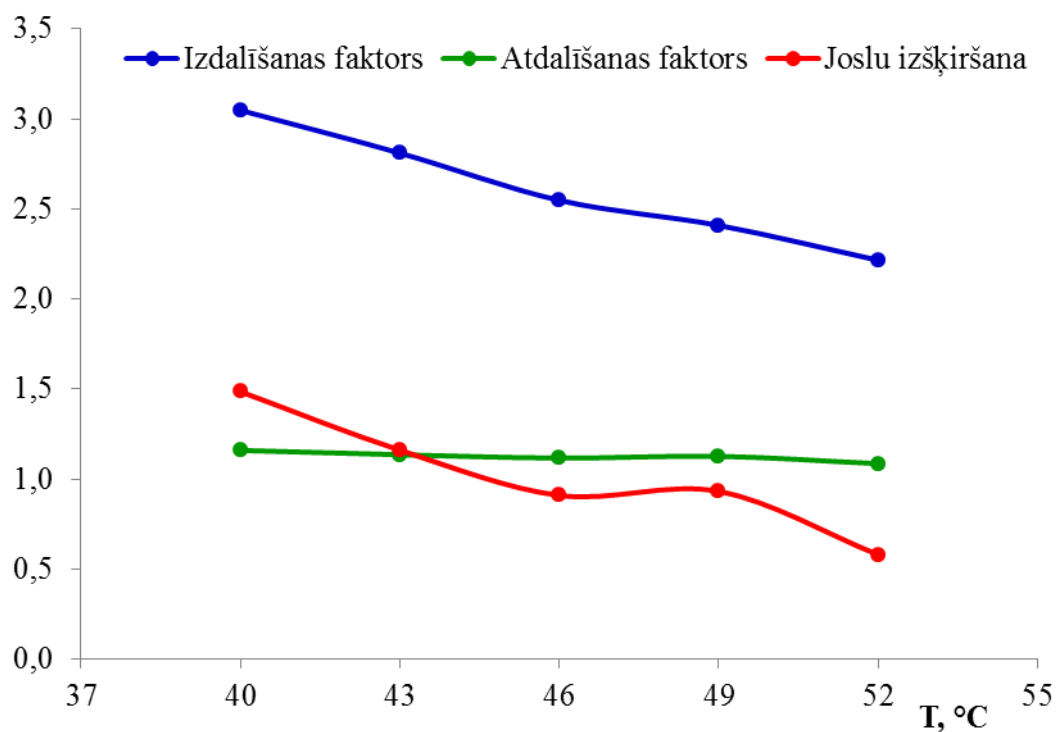
17.3. att. Hidroksiprolīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



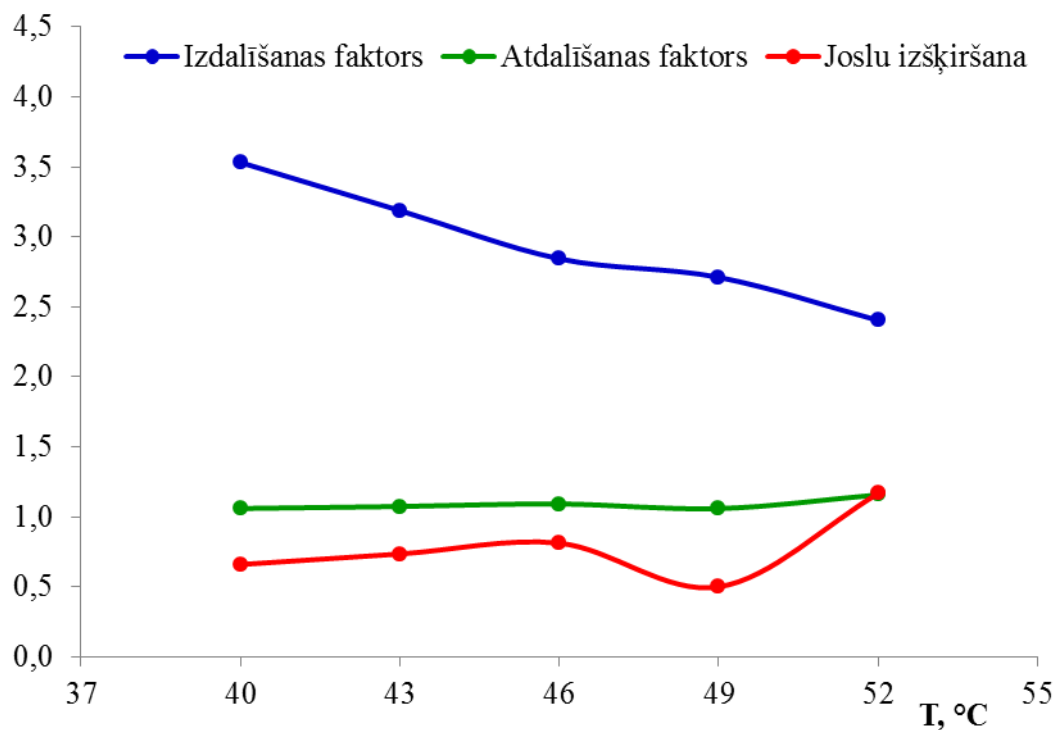
17.4. att. Serīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



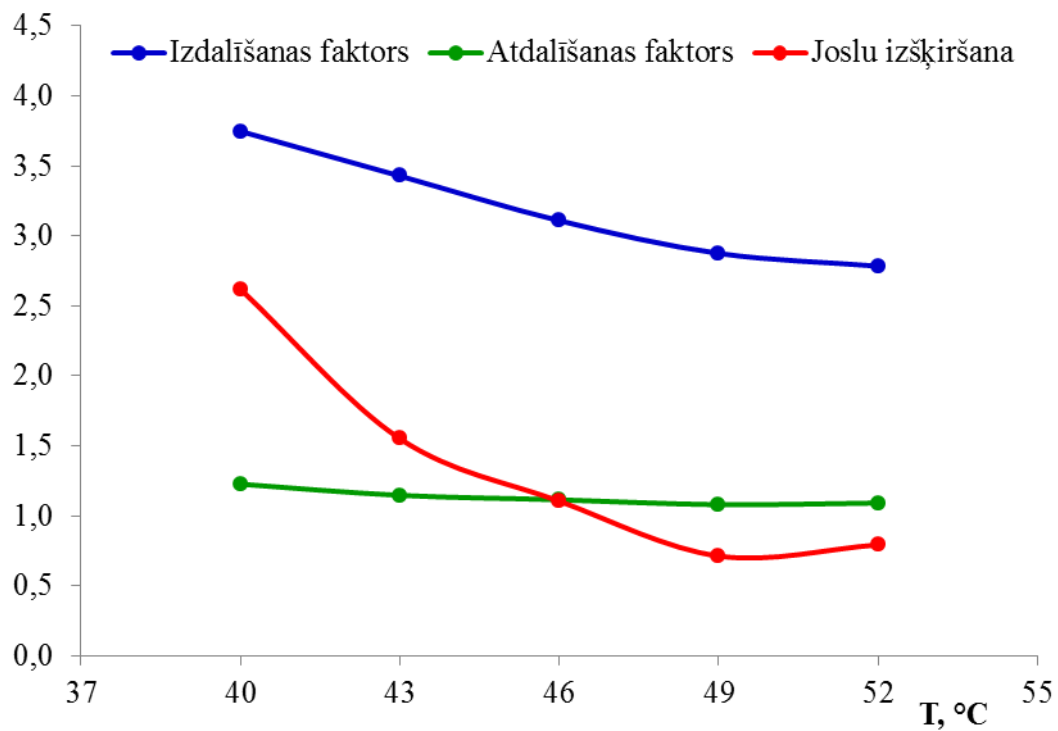
17.5. att. Asparagīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



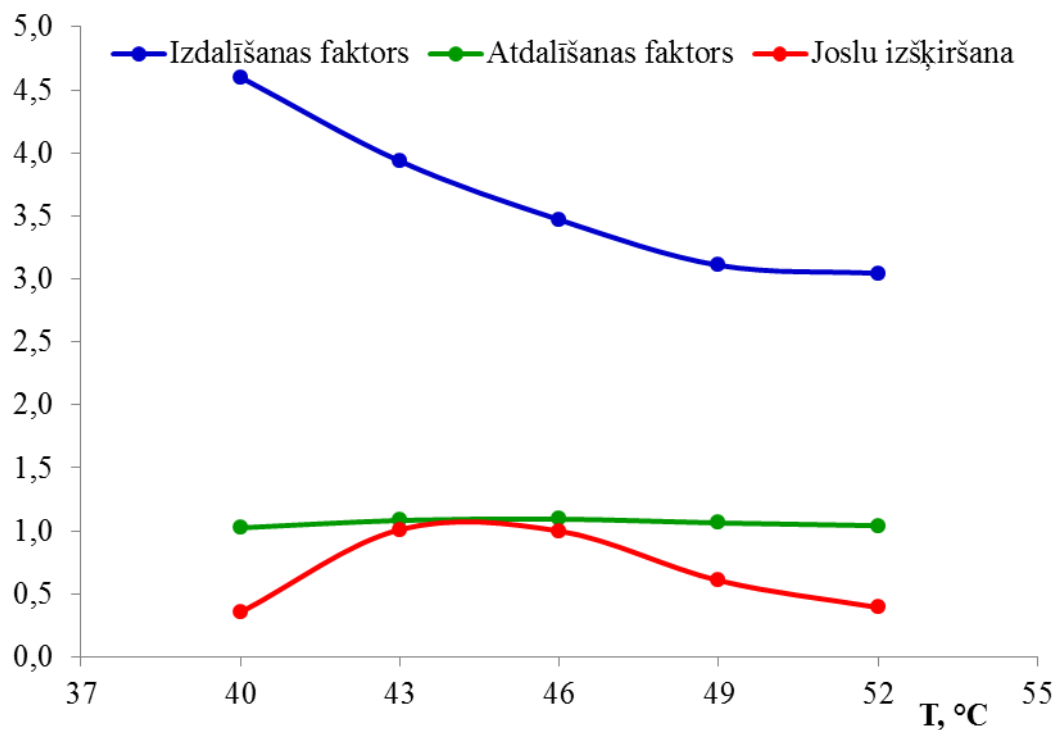
17.6. att. Glicīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



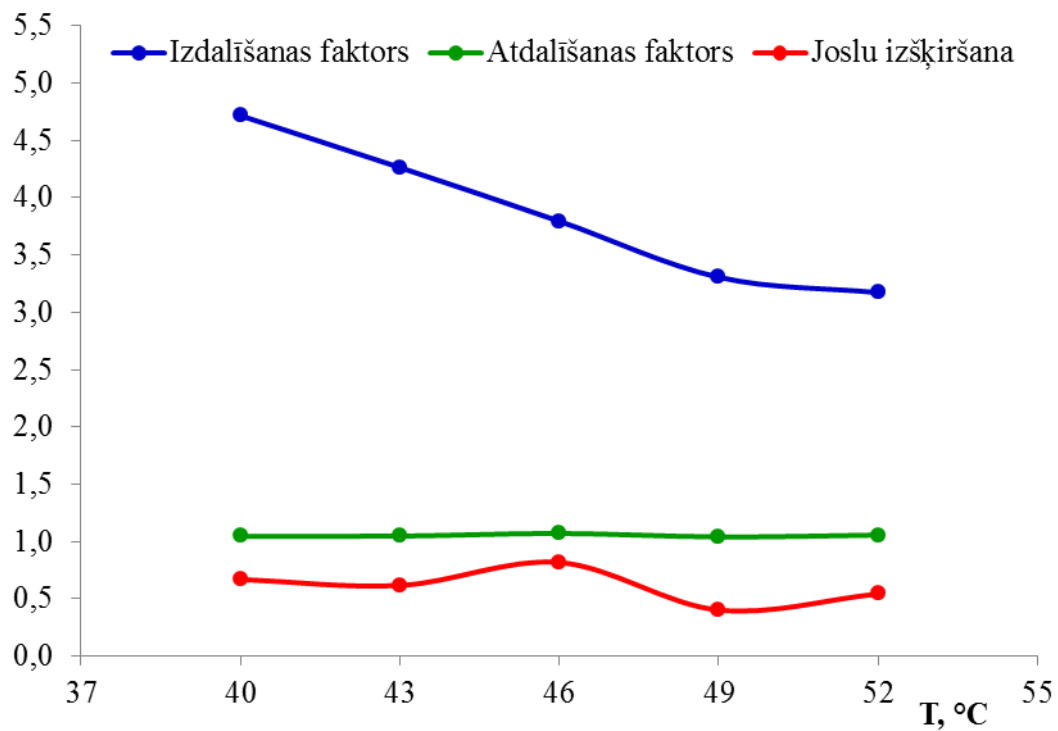
17.7. att. Glutamīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



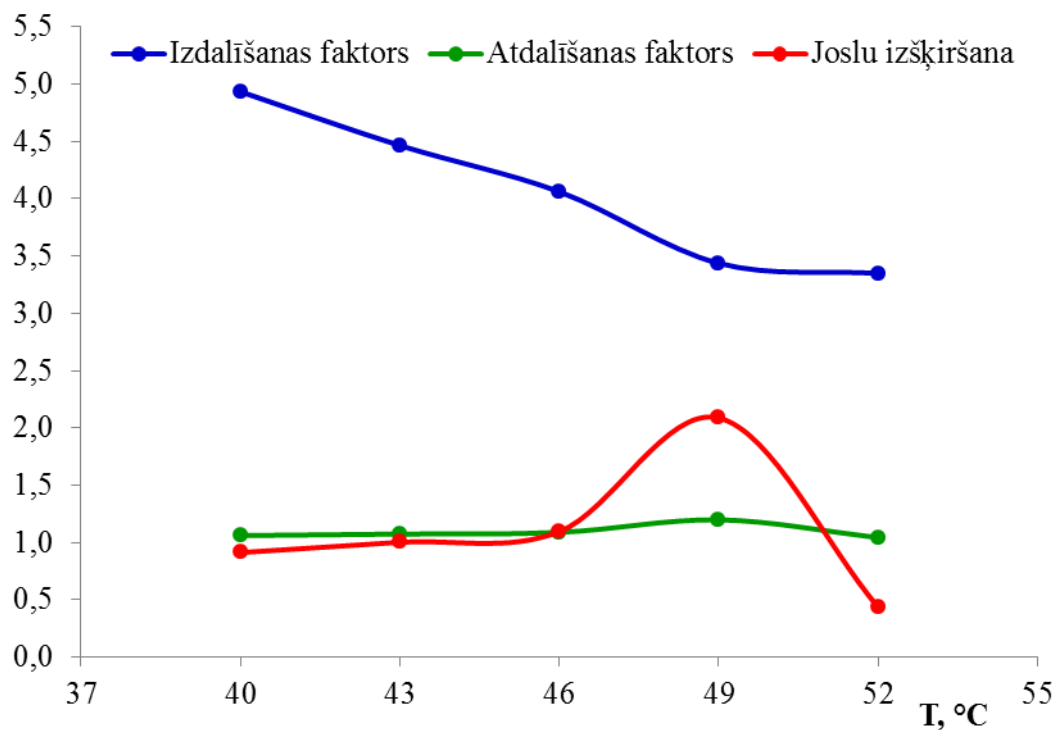
17.8. att. Sarkozīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



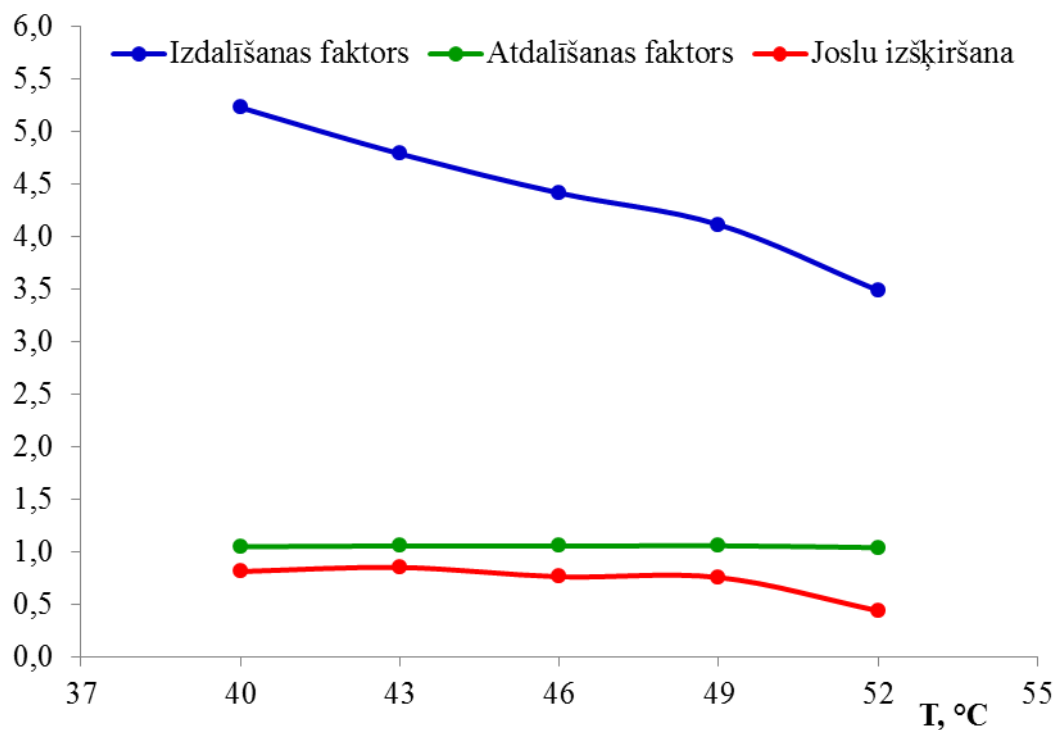
17.9. att. Taurīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



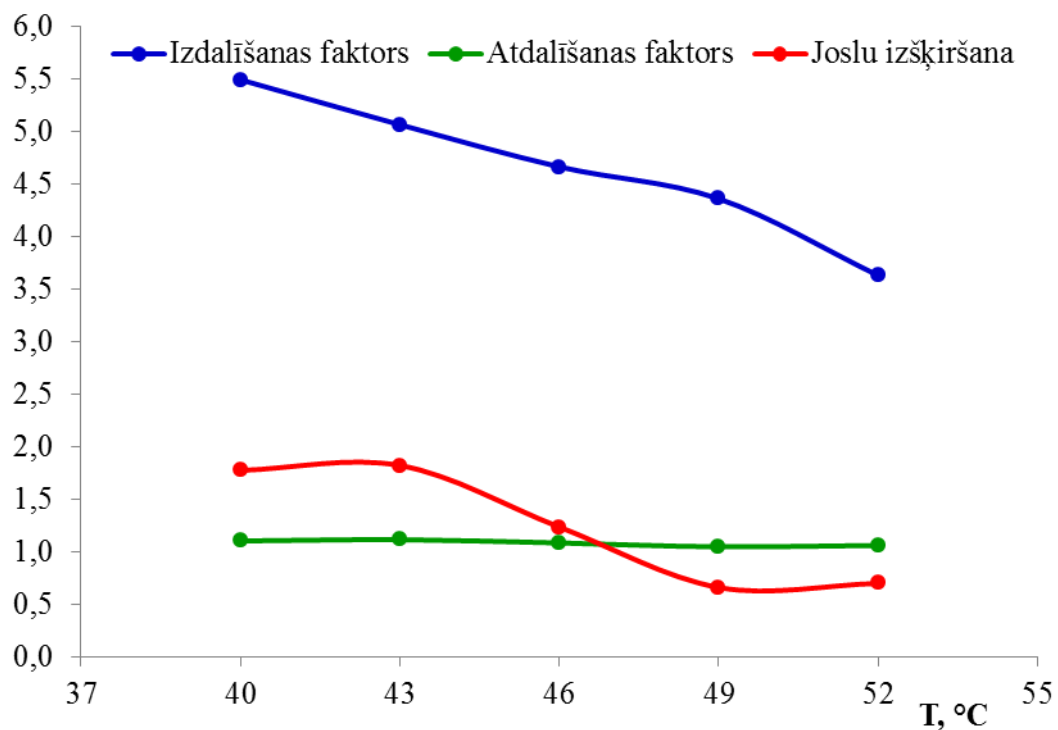
17.10. att. Histidīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



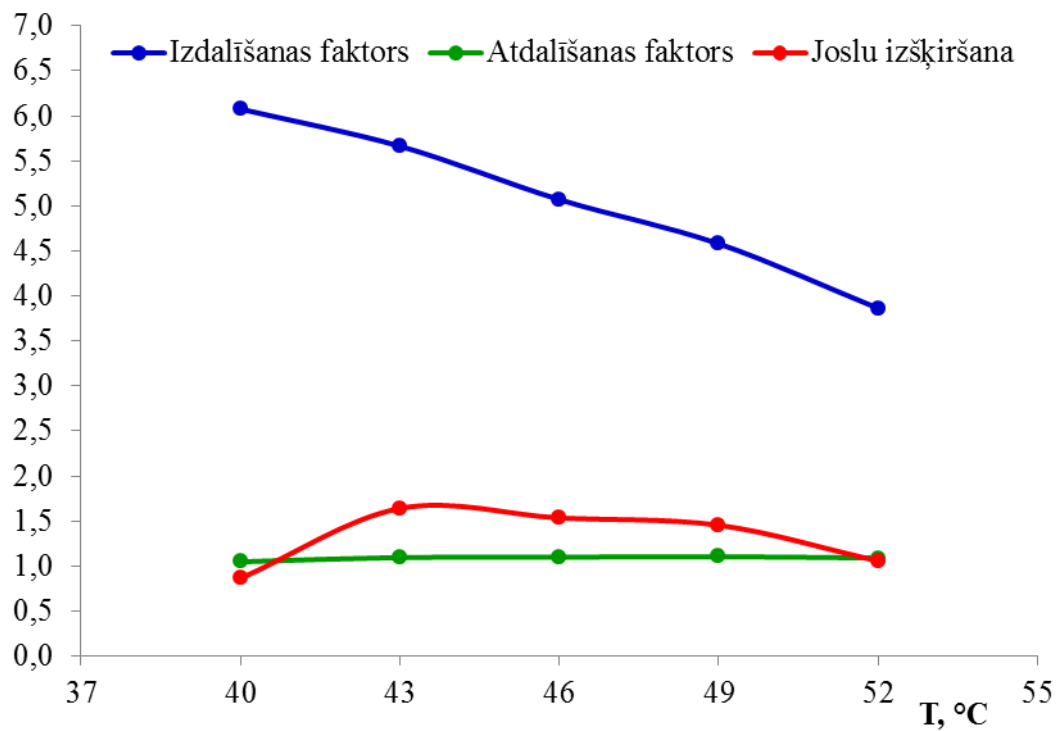
17.11. att. Citrulīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



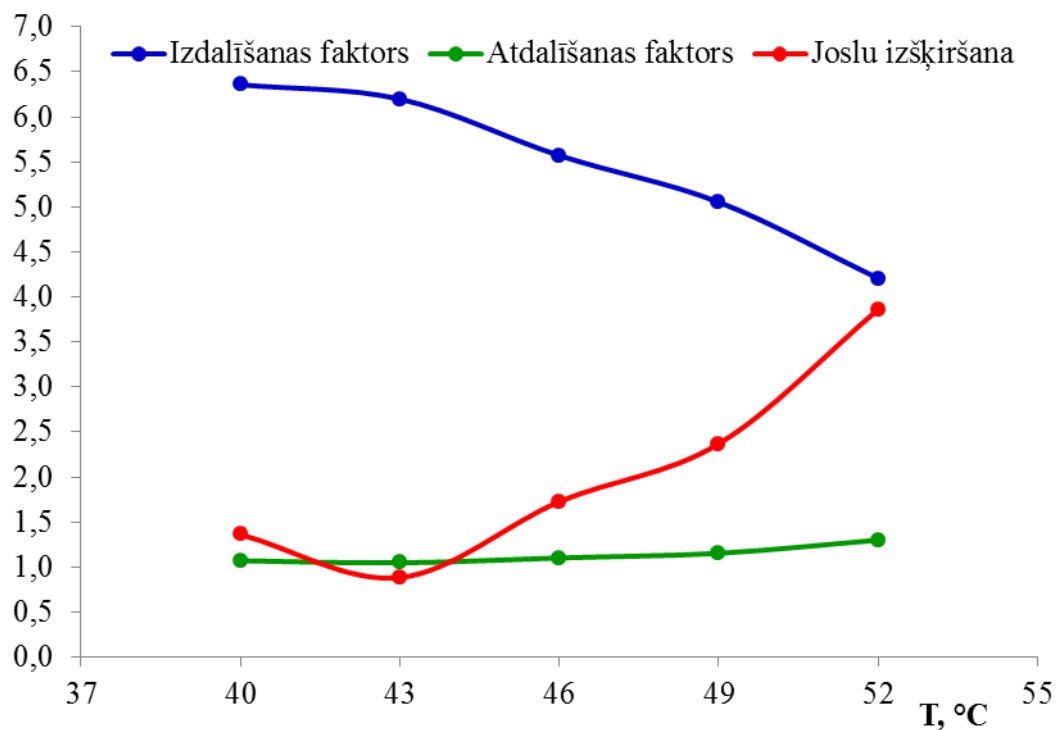
17.12. att. Treonīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



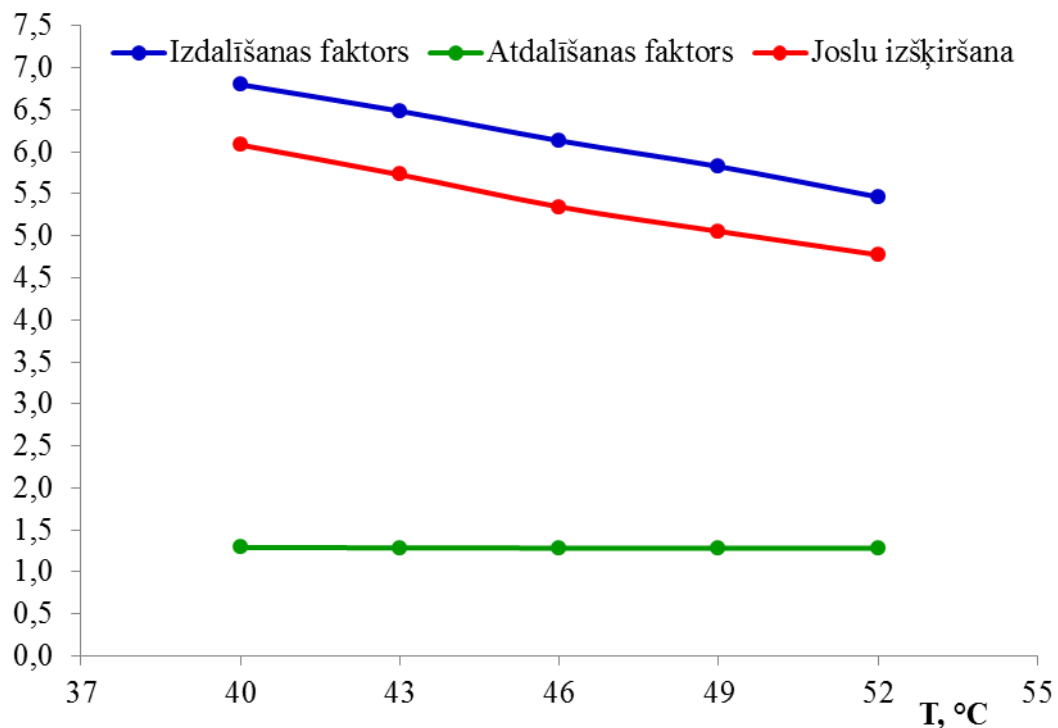
17.13. att. Alanīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



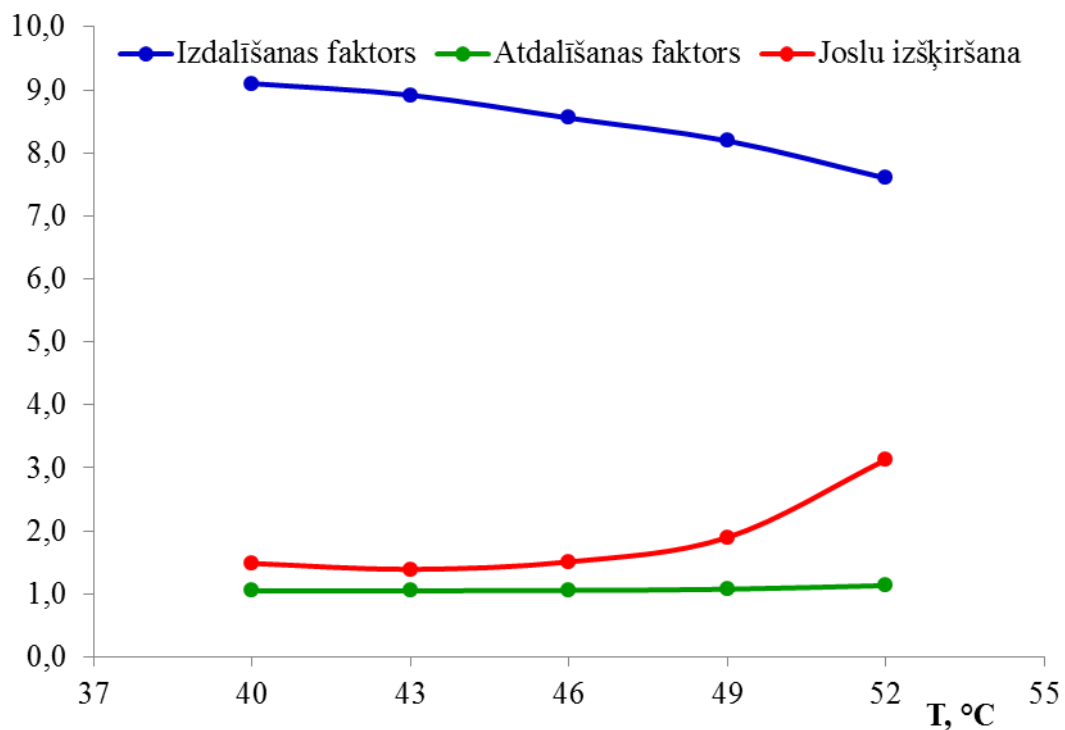
17.14. att. Arginīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



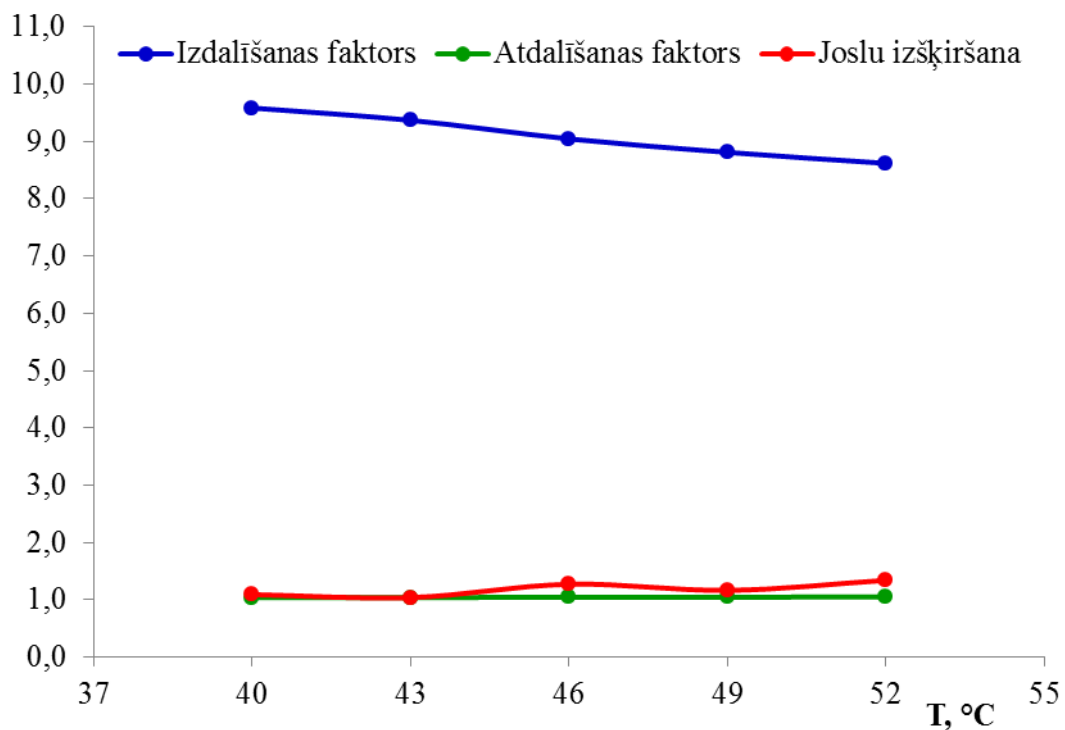
17.15. att. Iekšējas standarta izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



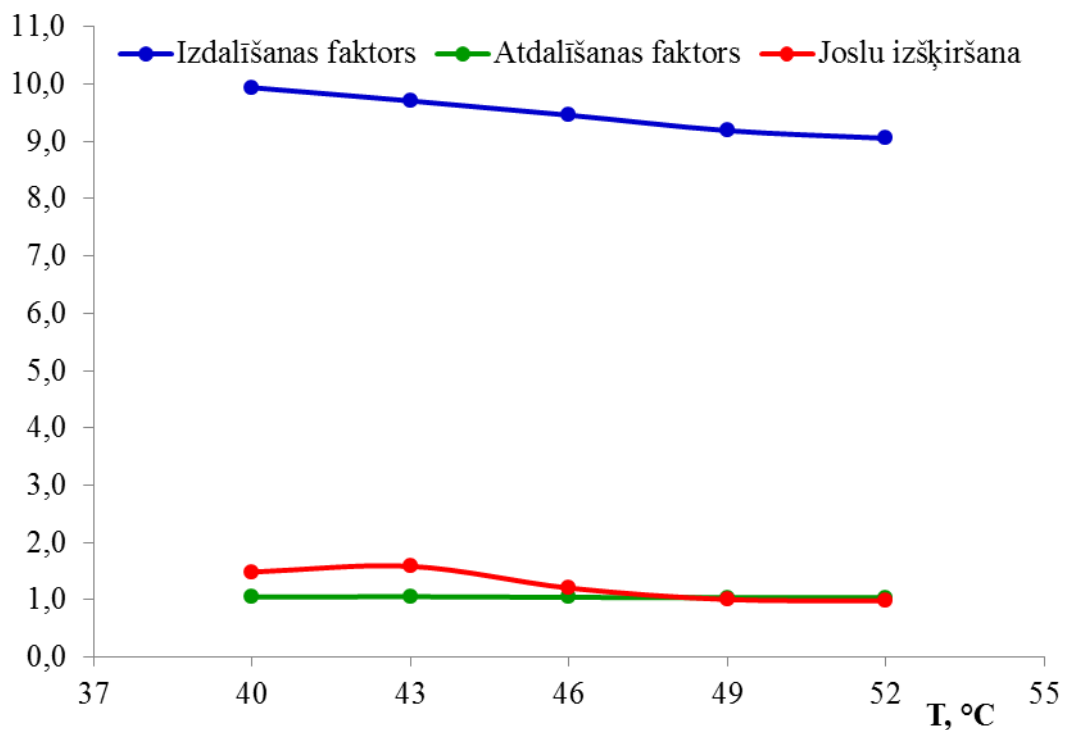
17.16. att. Prolīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



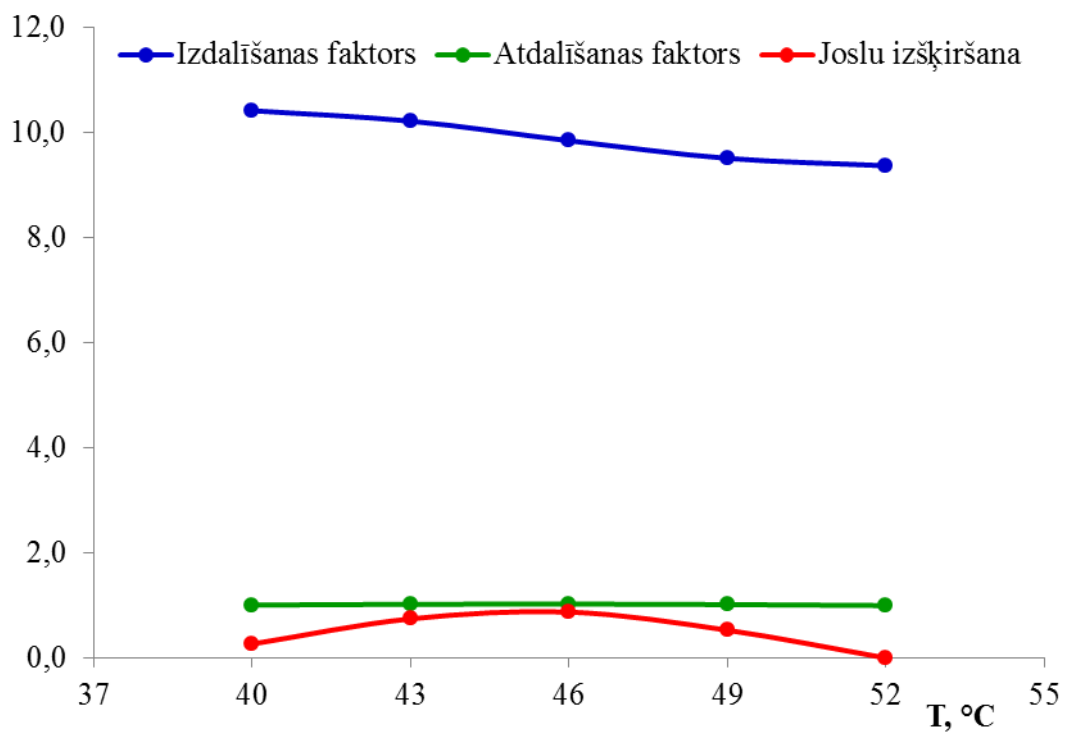
17.17. att. Tirozīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



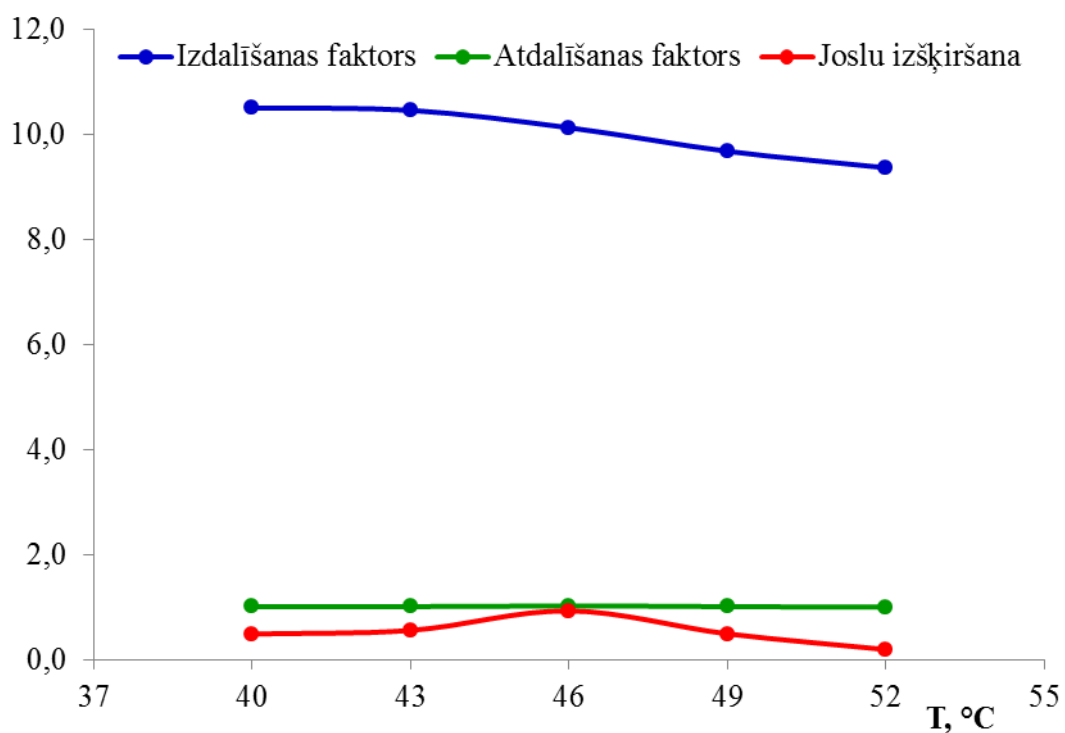
17.18. att. Valīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



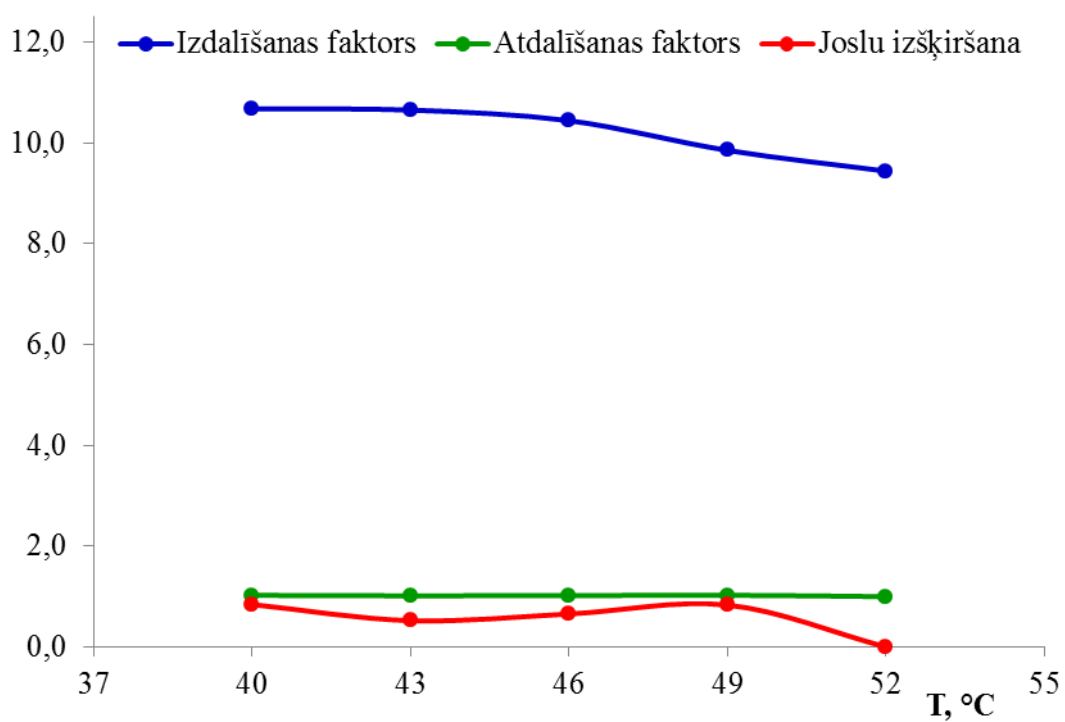
17.19. att. Metionīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



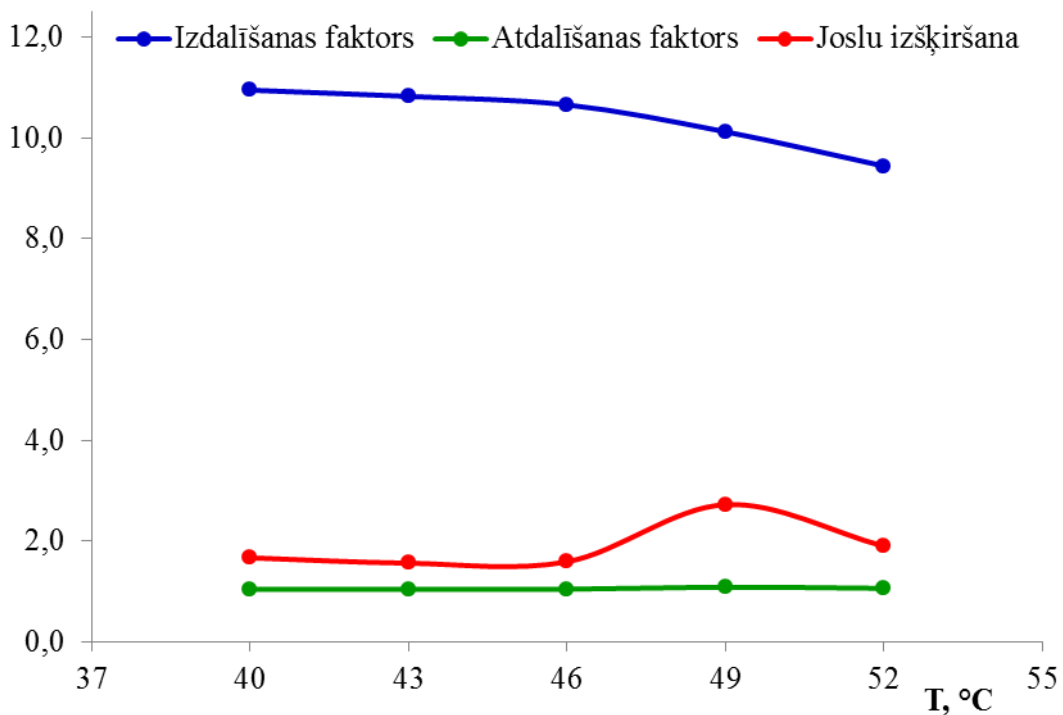
17.20. att. Pirmā reaģenta smailes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



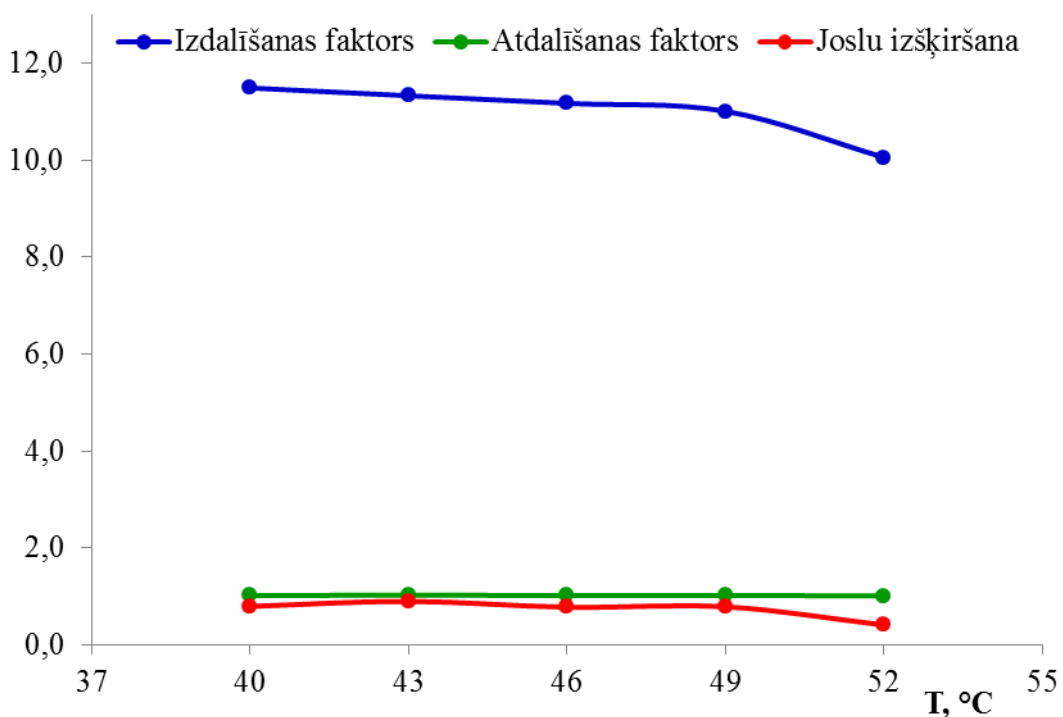
17.21. att. Cistīns izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



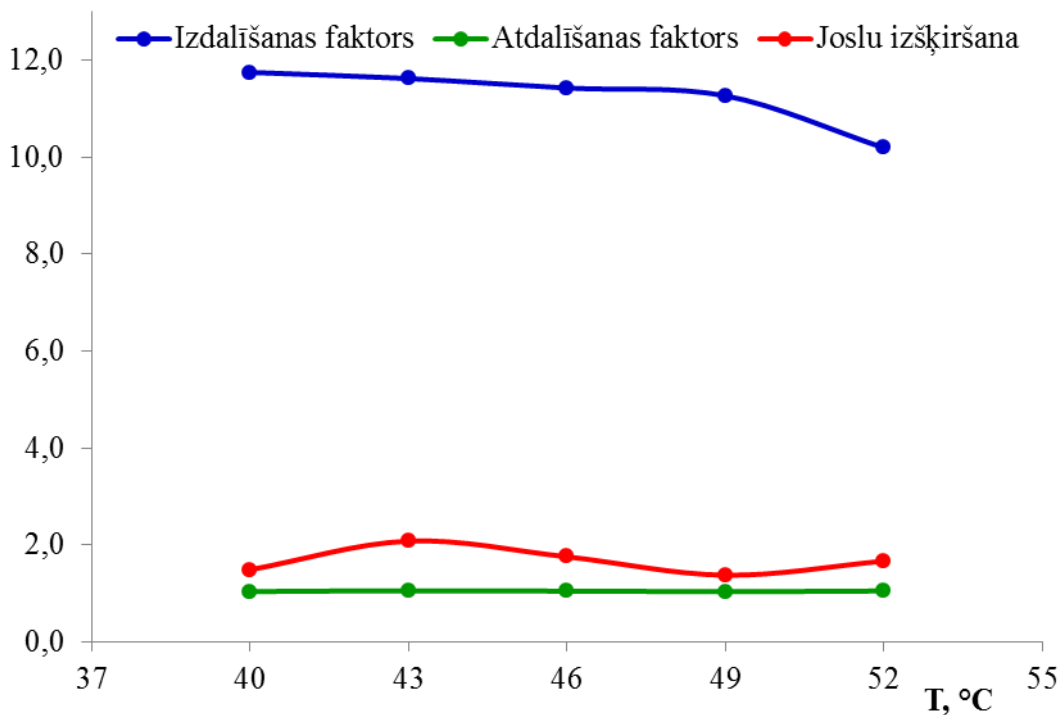
17.22. att. Otrā reaģenta smailes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



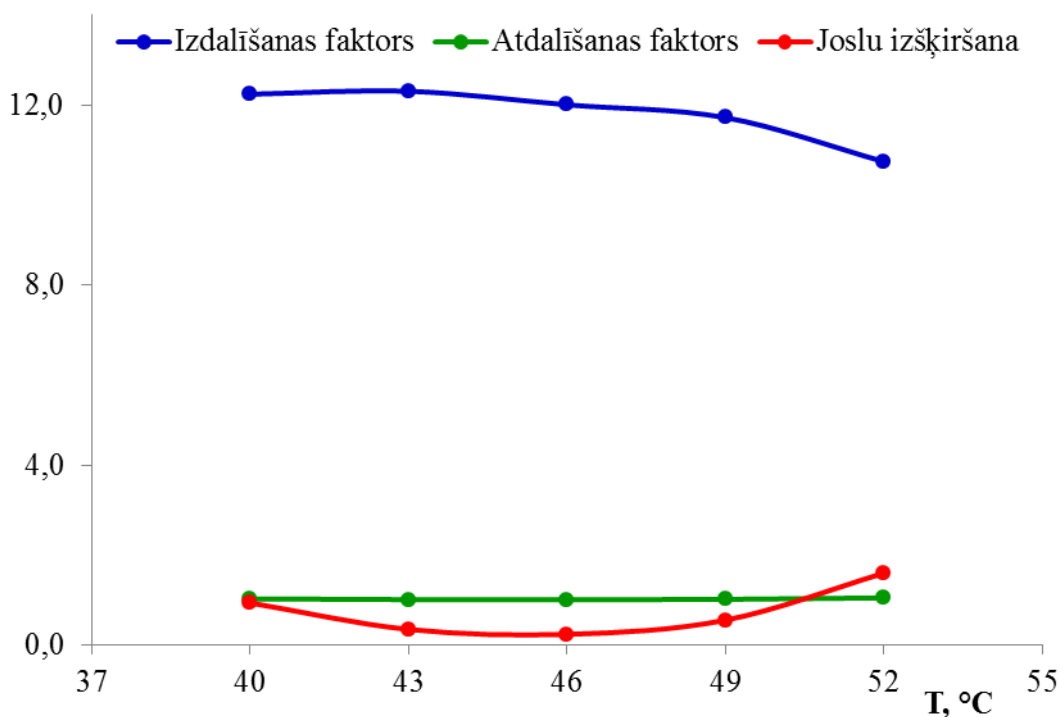
17.23. att. Cistationīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



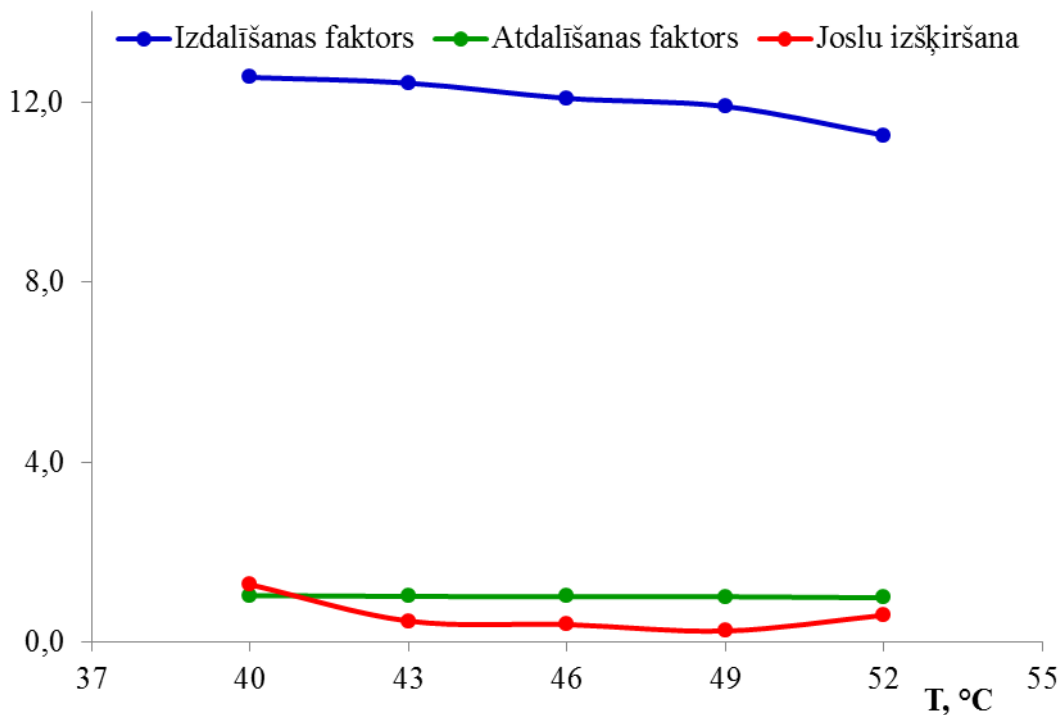
17.24. att. Izoleicīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



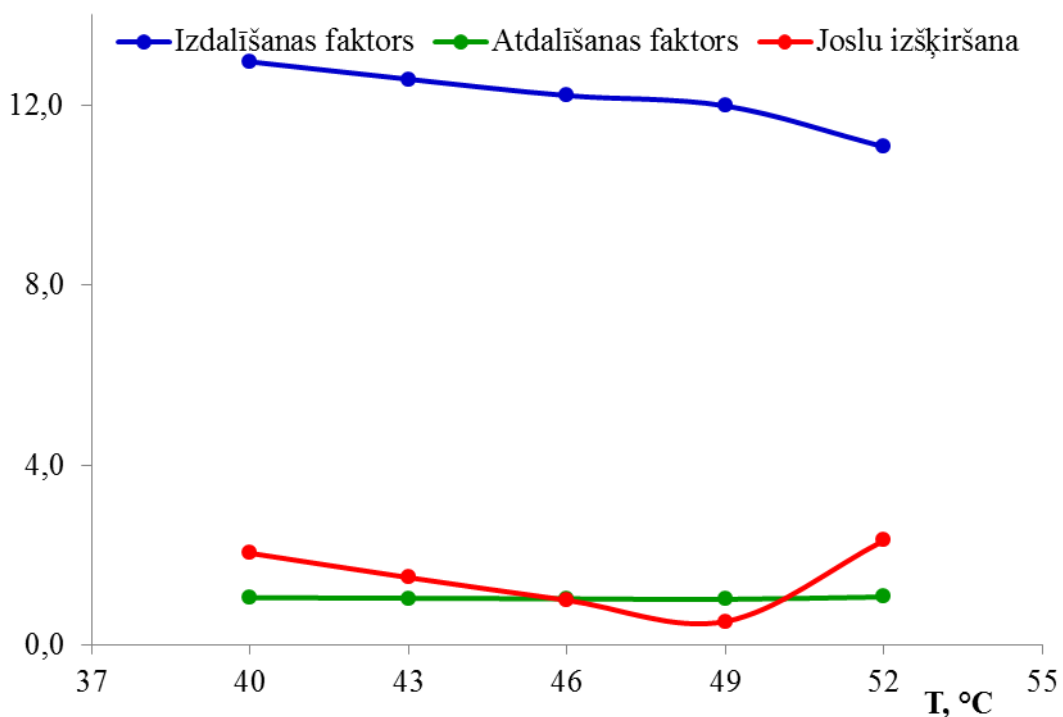
17.25. att. Leicīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.



17.26. att. Fenilalanīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.

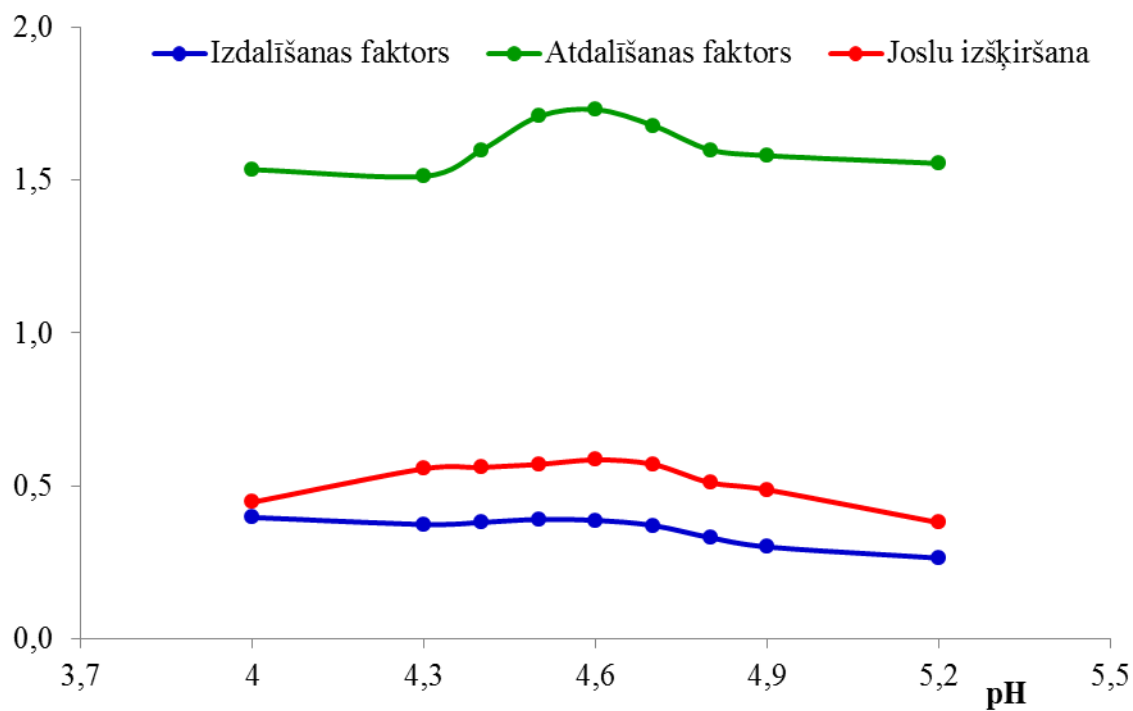


17.27. att. Triptofāna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.

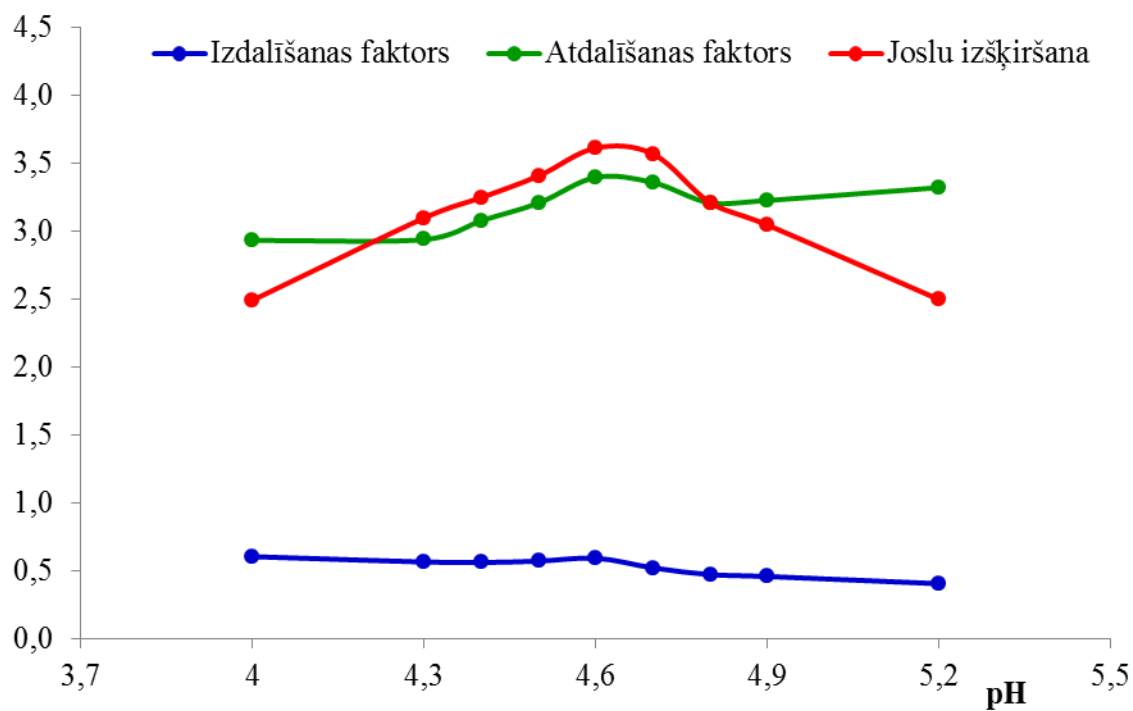


17.28. att. Ornitīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no kolonnas temperatūras izmaiņām.

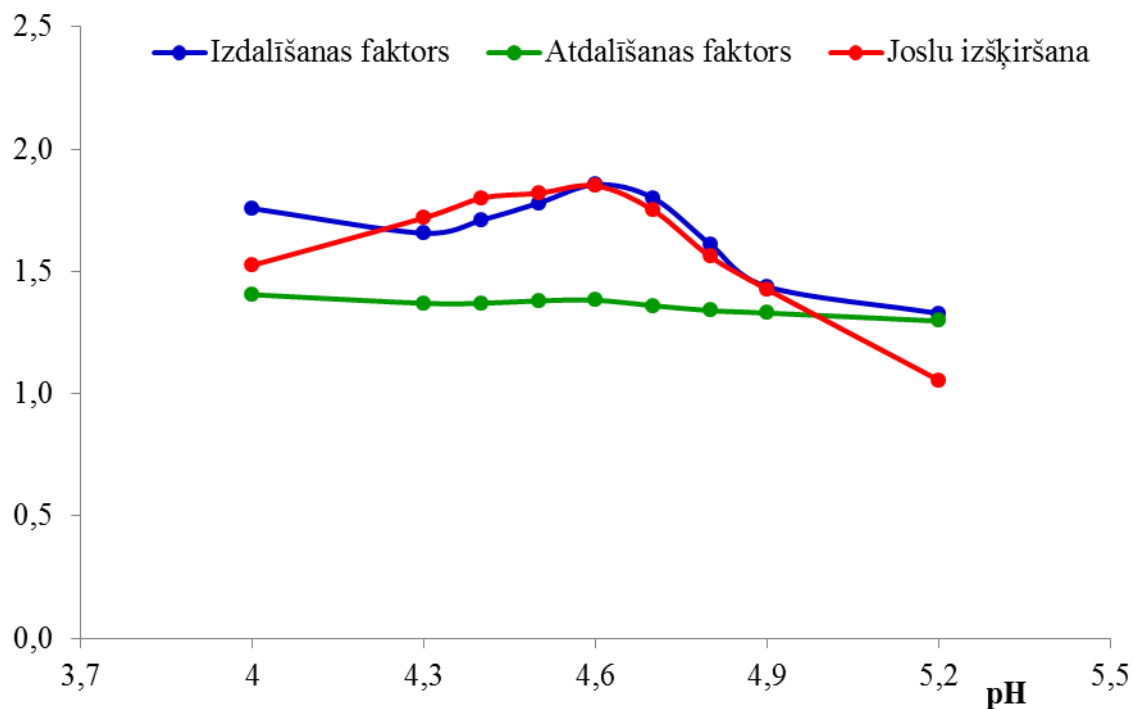
## 18. PIELIKUMS



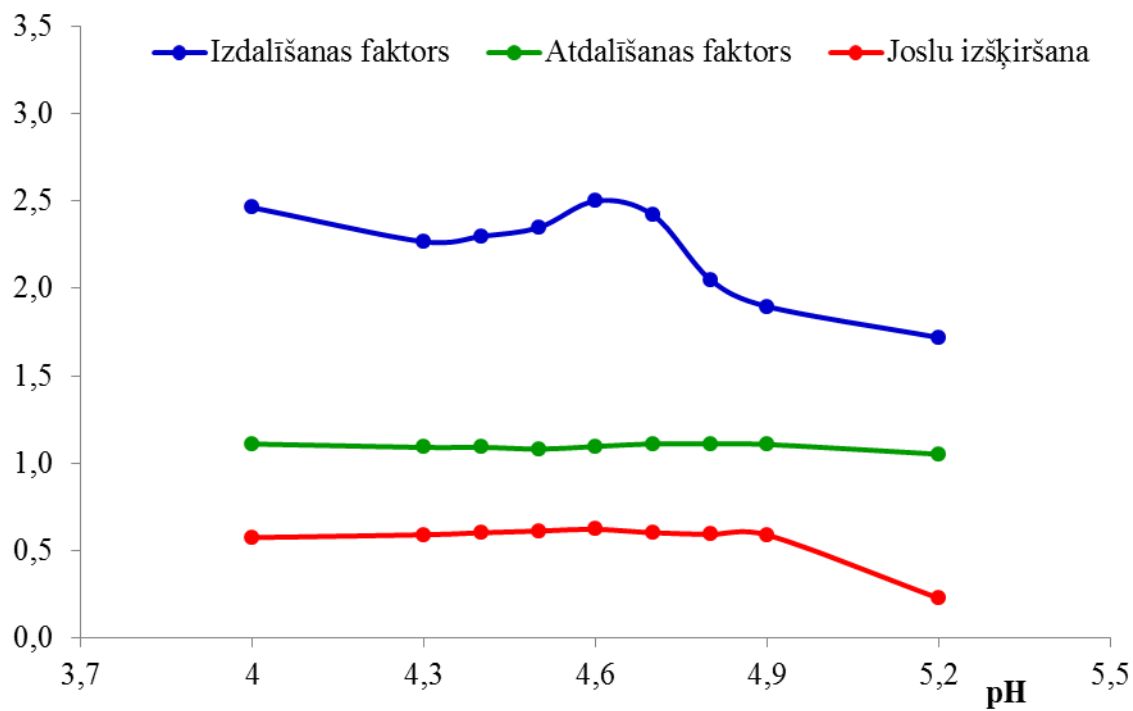
18.1. att. Asparagīnskābes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



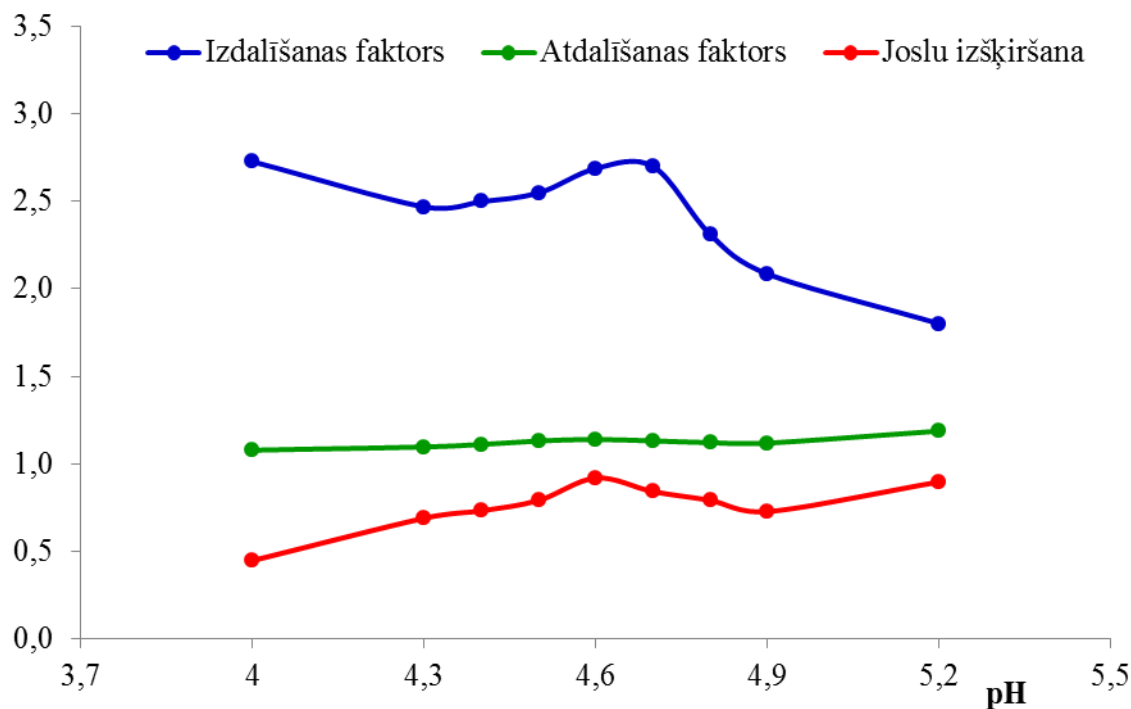
18.2. att. Glutamīnskābes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



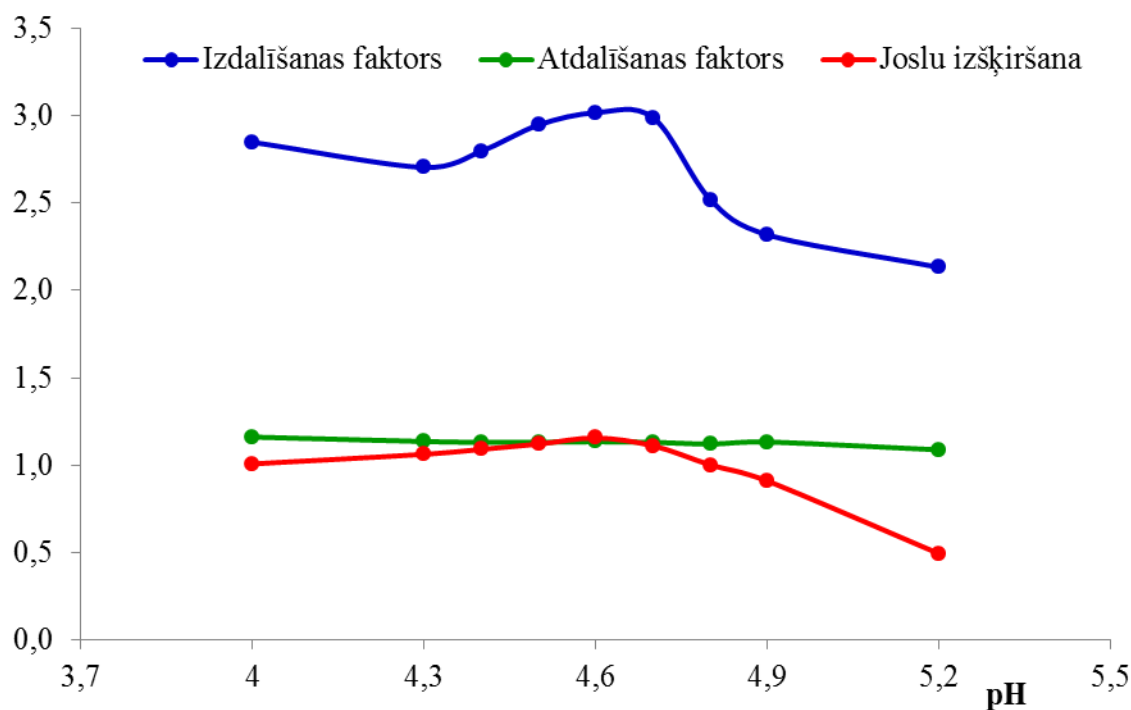
18.3. att. Hidroksiprolīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



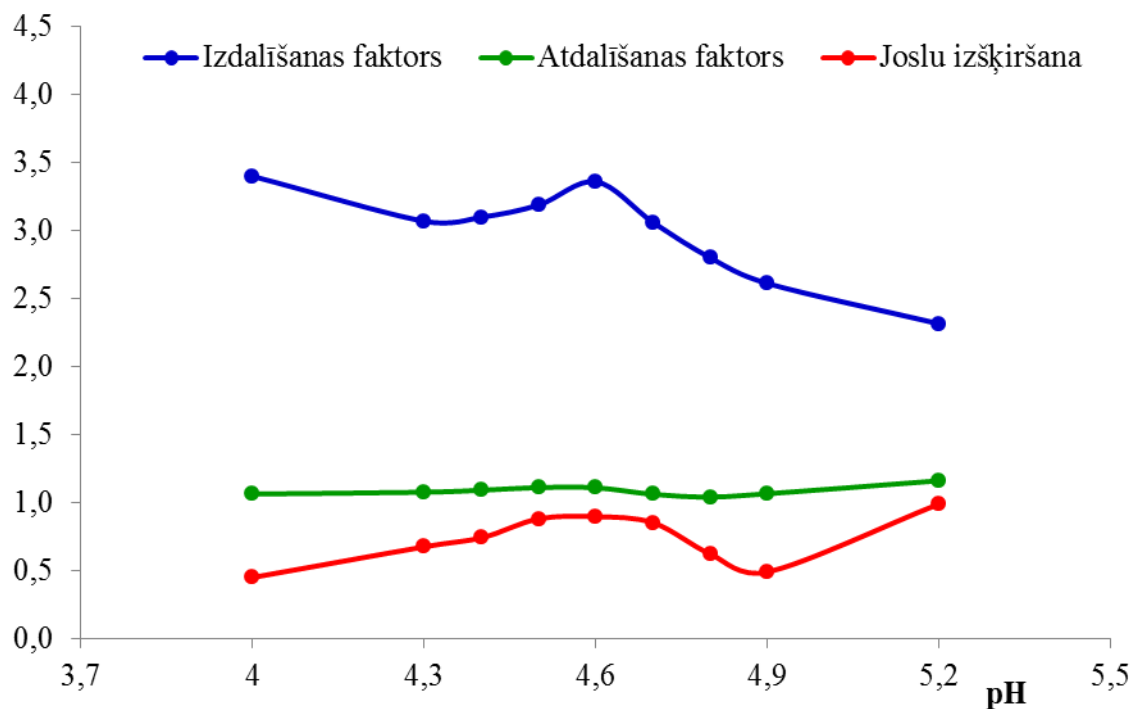
18.4. att. Serīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



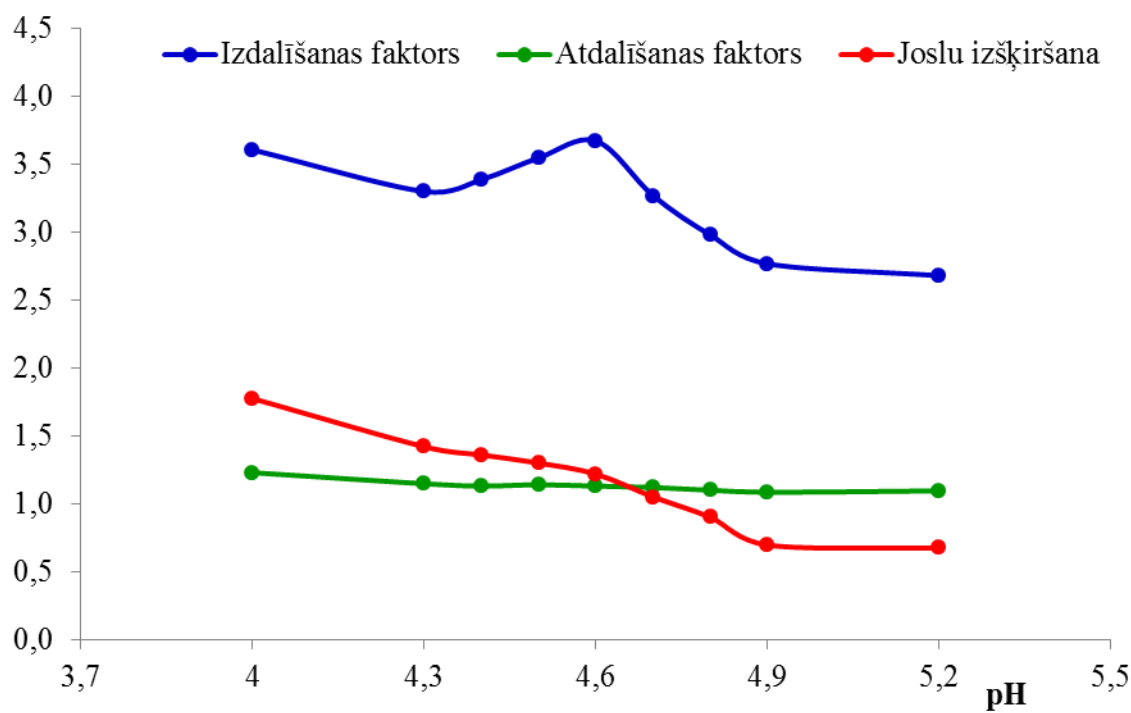
18.5. att. Asparagīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



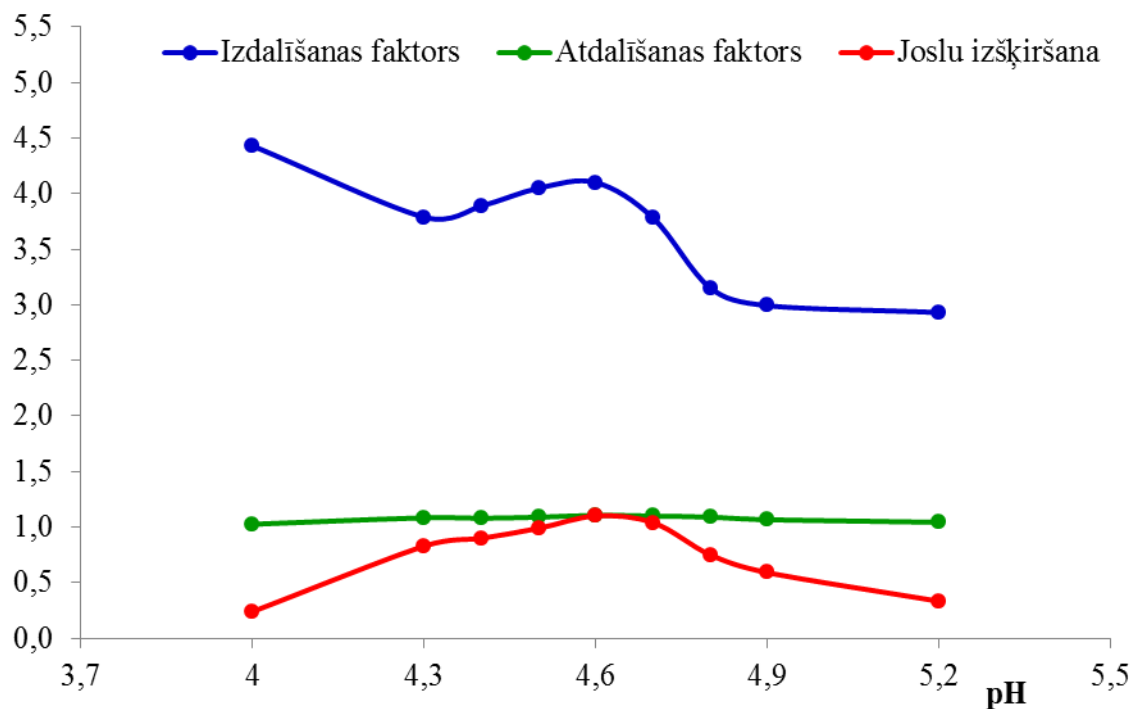
18.6. att. Glicīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



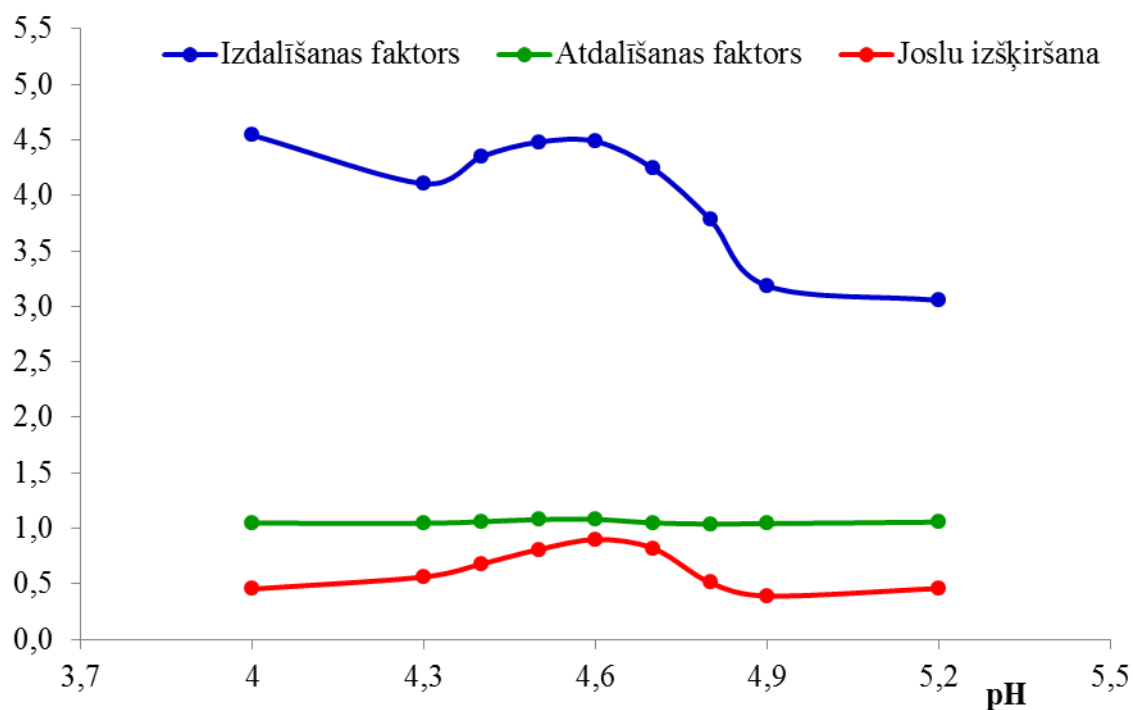
18.7. att. Glutamīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



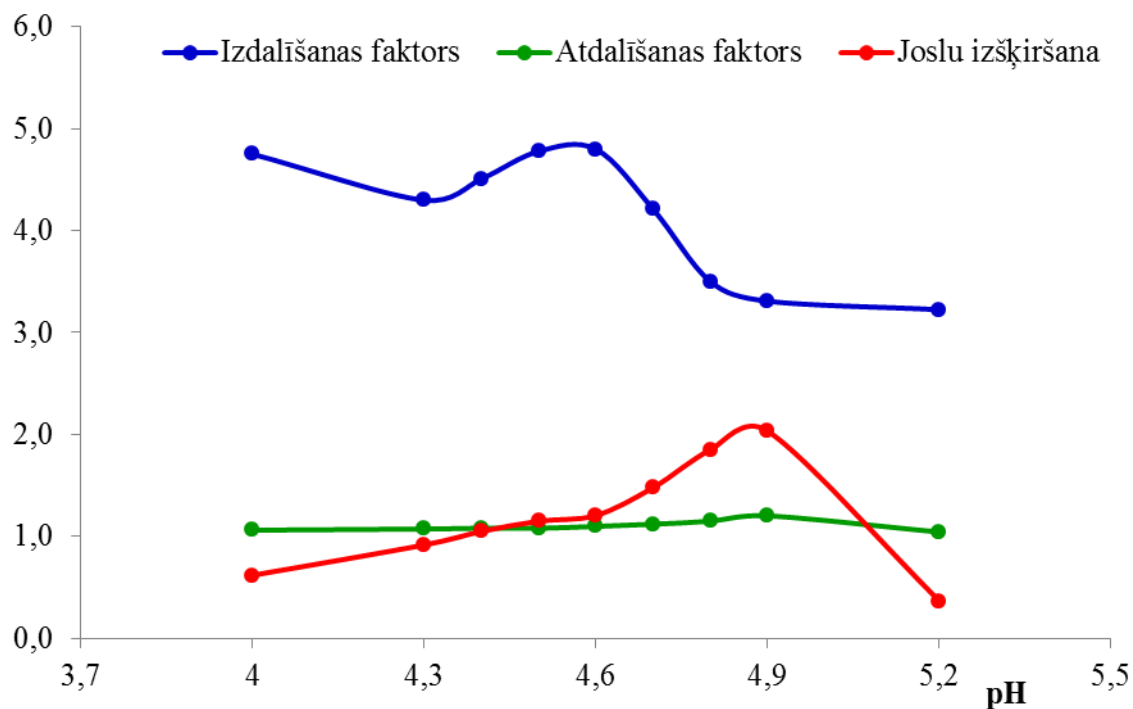
18.8. att. Sarkozīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



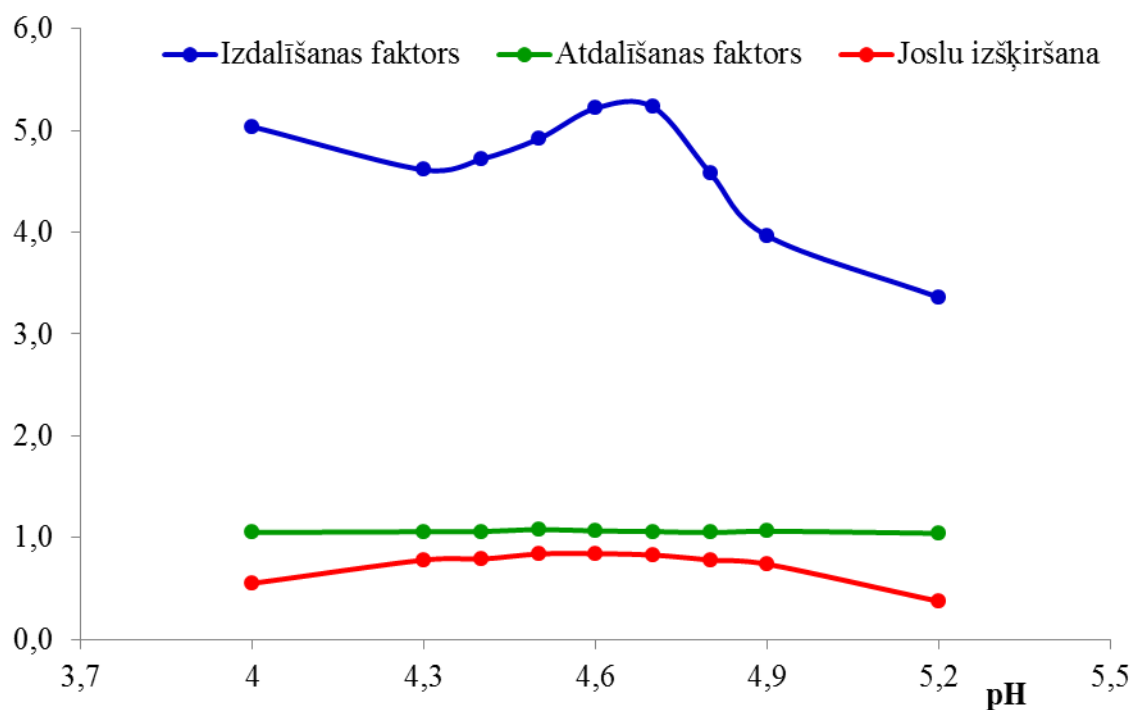
18.9. att. Taurīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



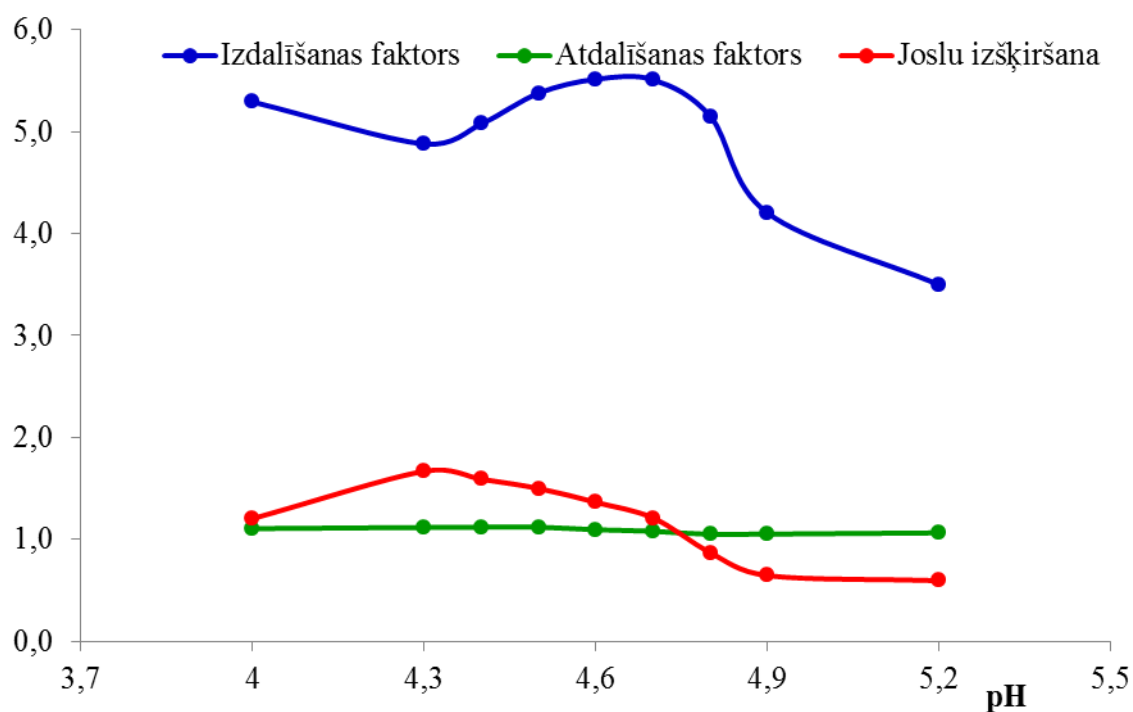
18.10. att. Histidīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



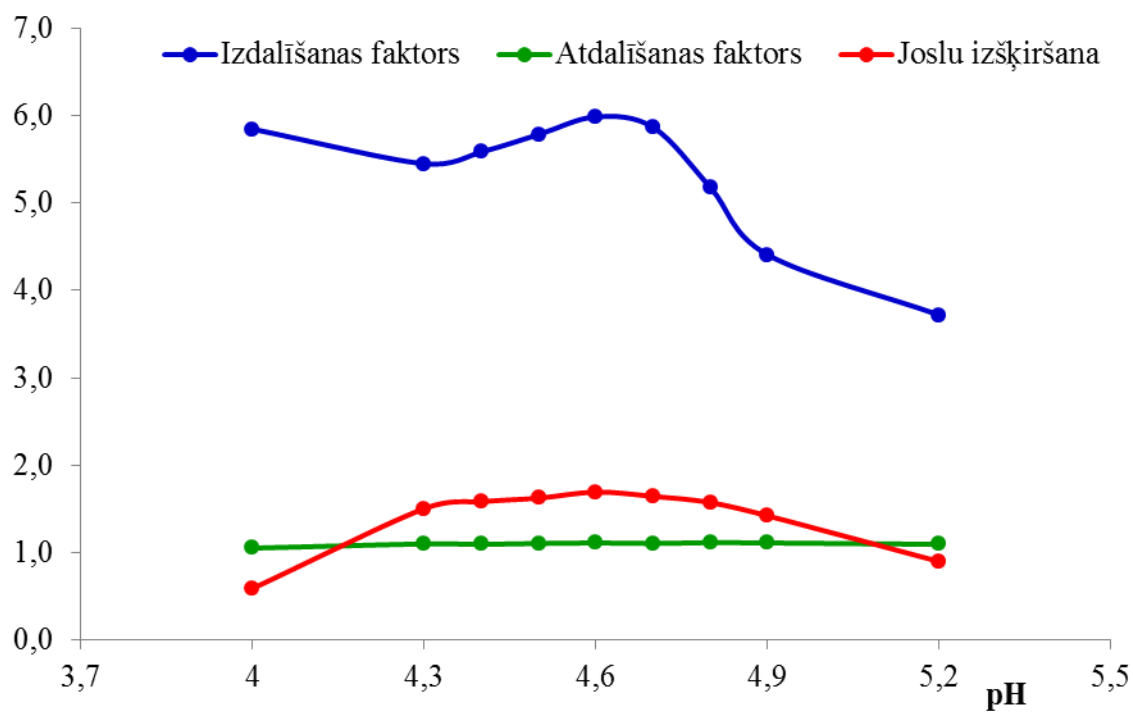
18.11. att. Citrulīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



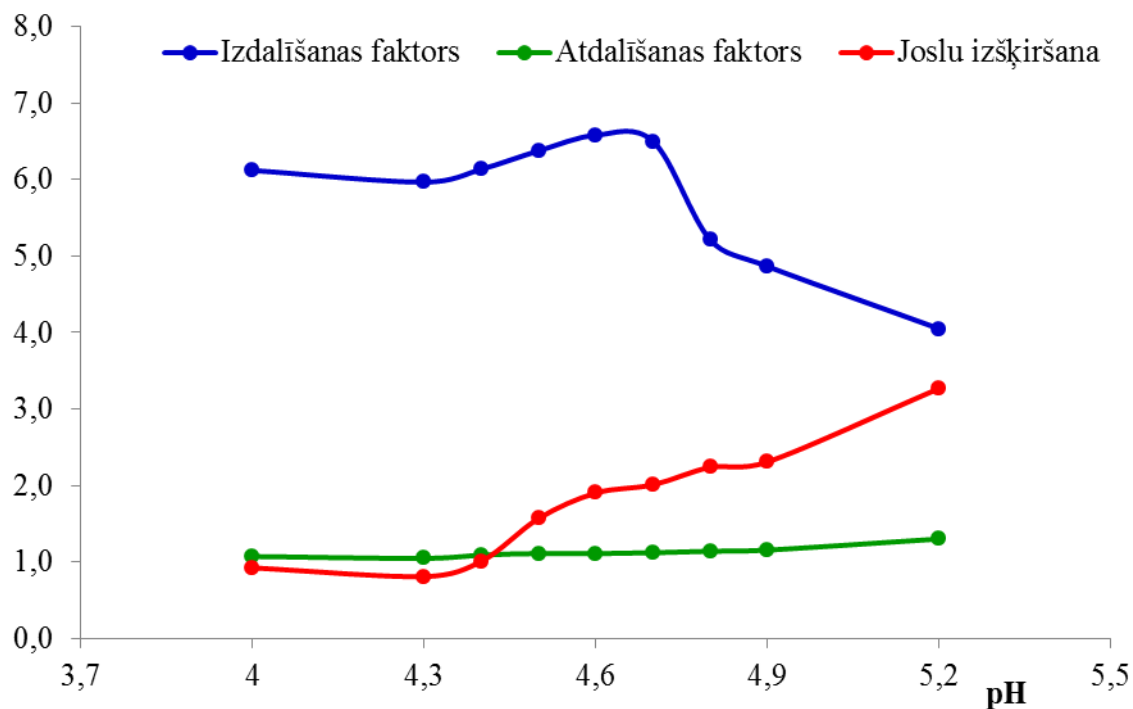
18.12. att. Treonīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



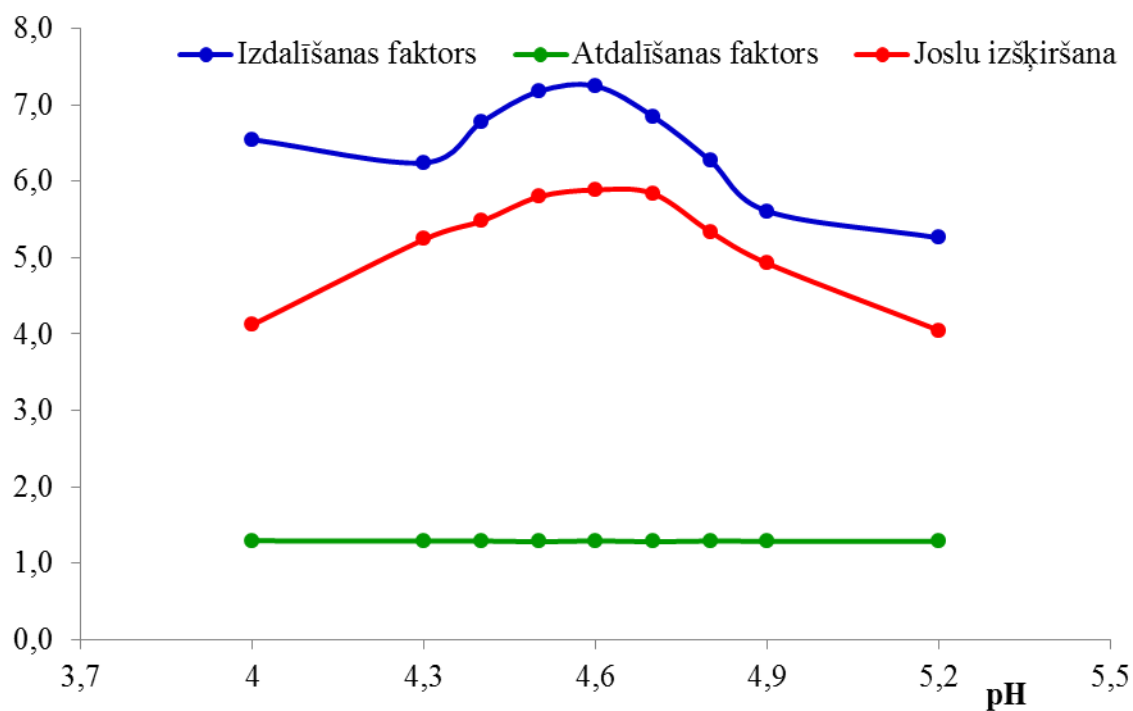
18.13. att. Alanīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



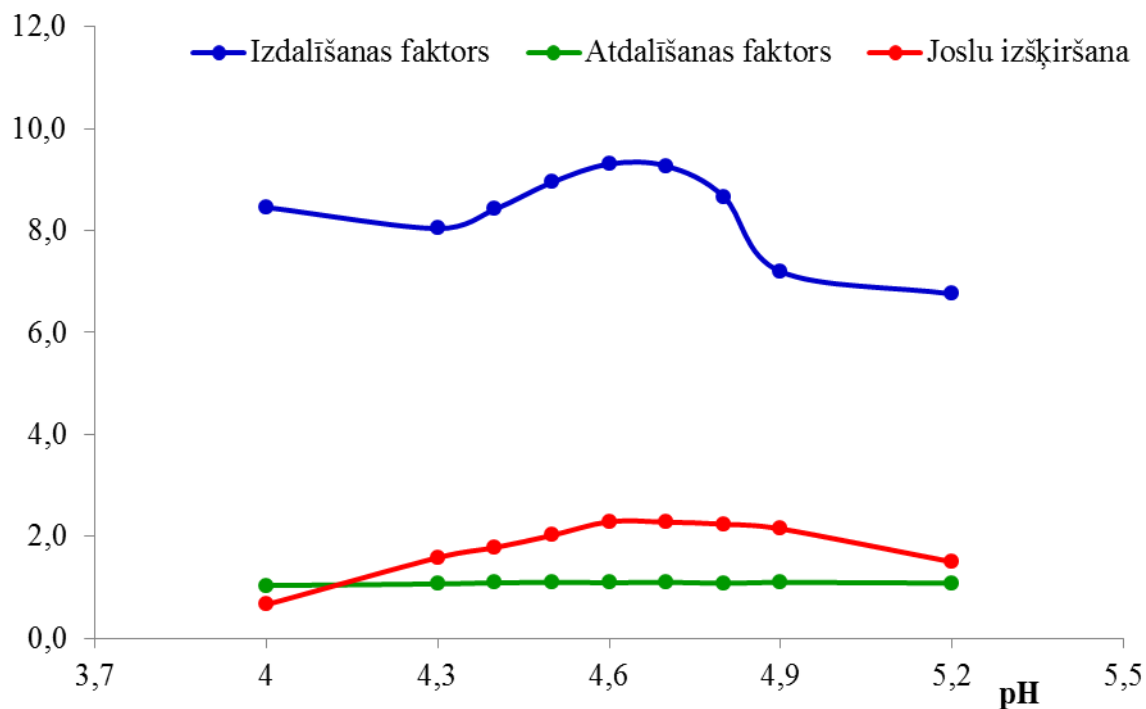
18.14. att. Arginīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



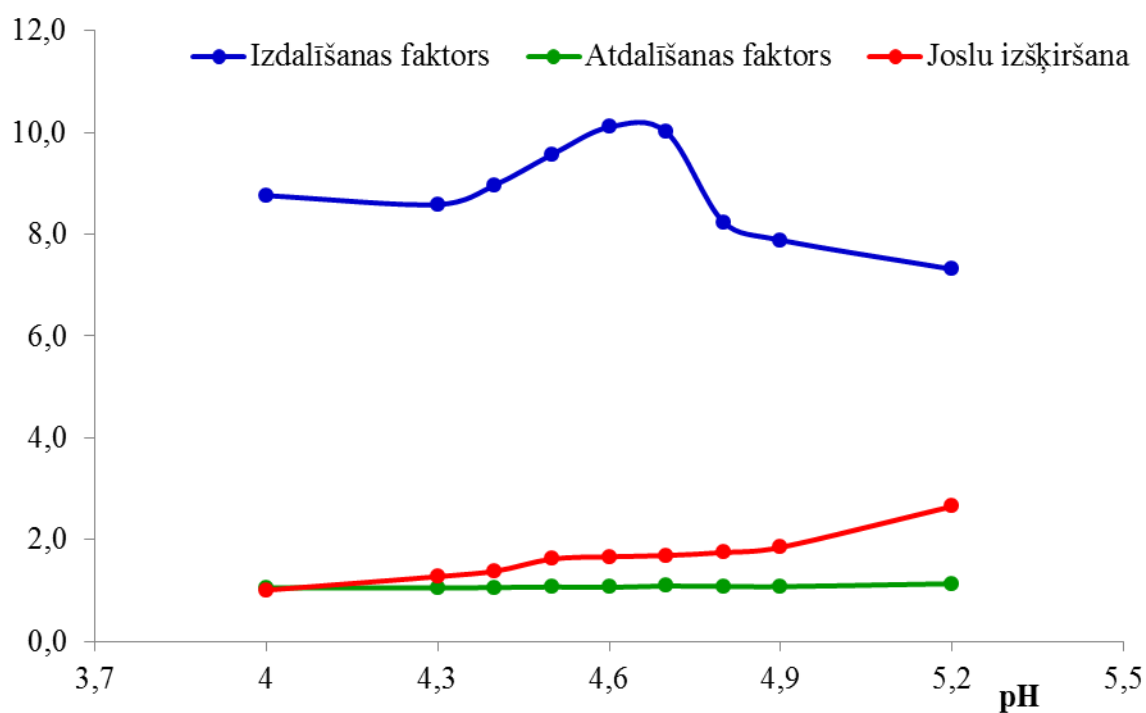
18.15. att. Iekšēja standarta izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



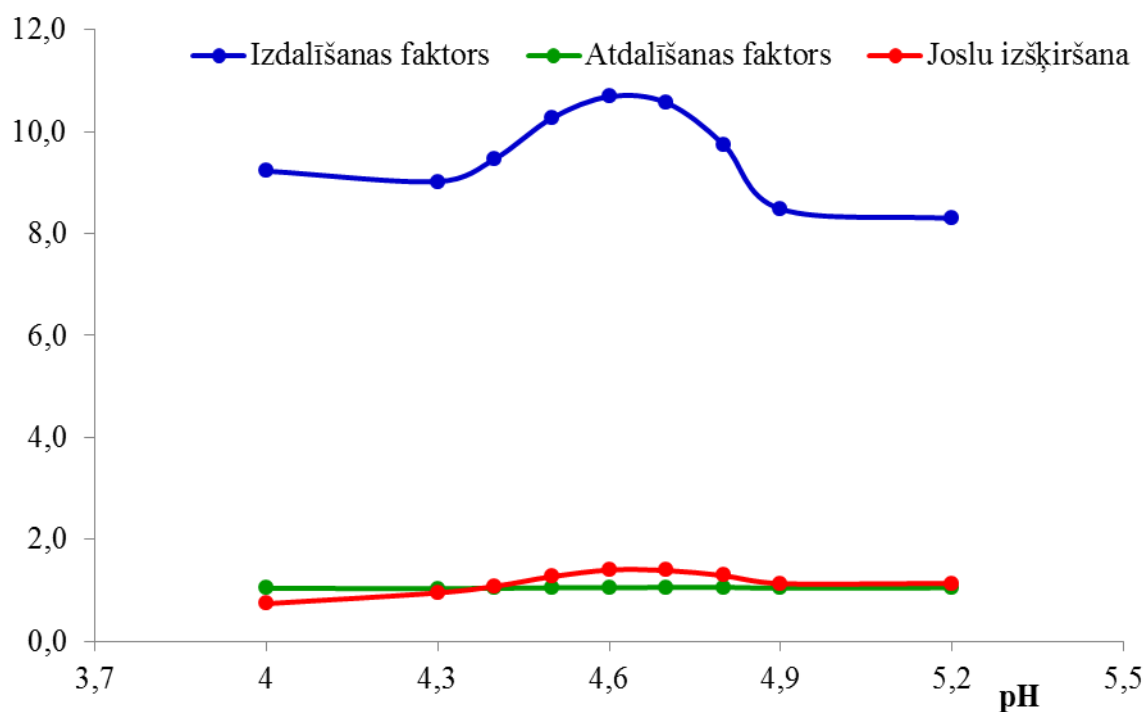
18.16. att. Prolīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



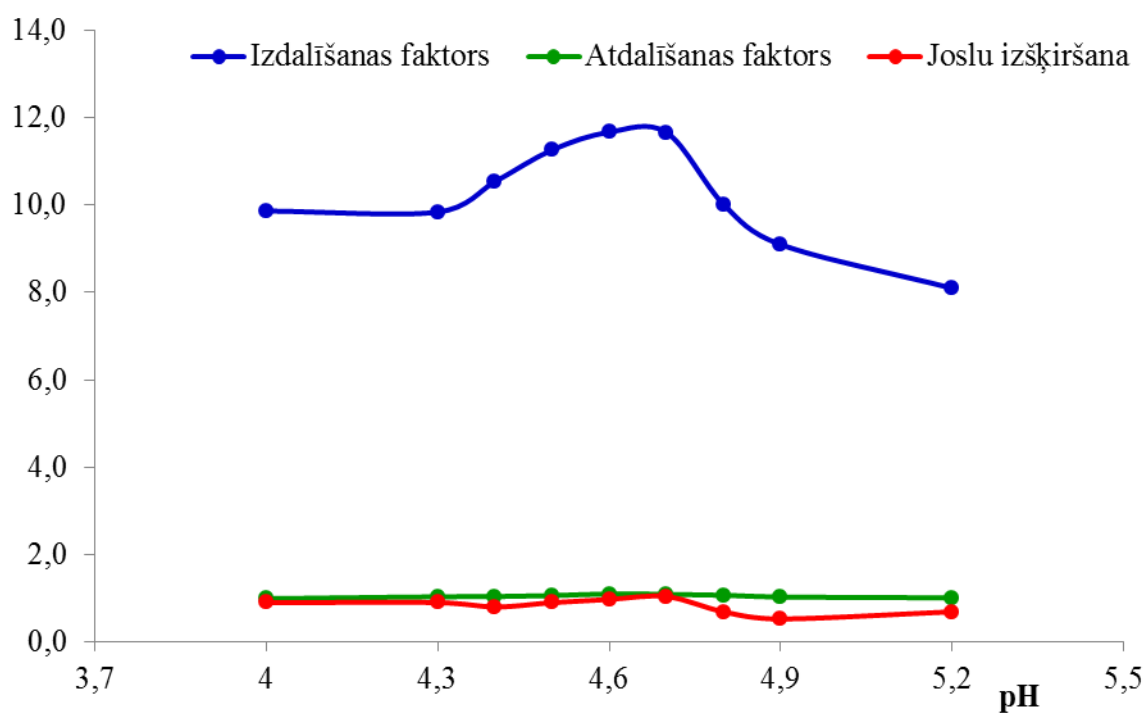
18.17. att. Tirozīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



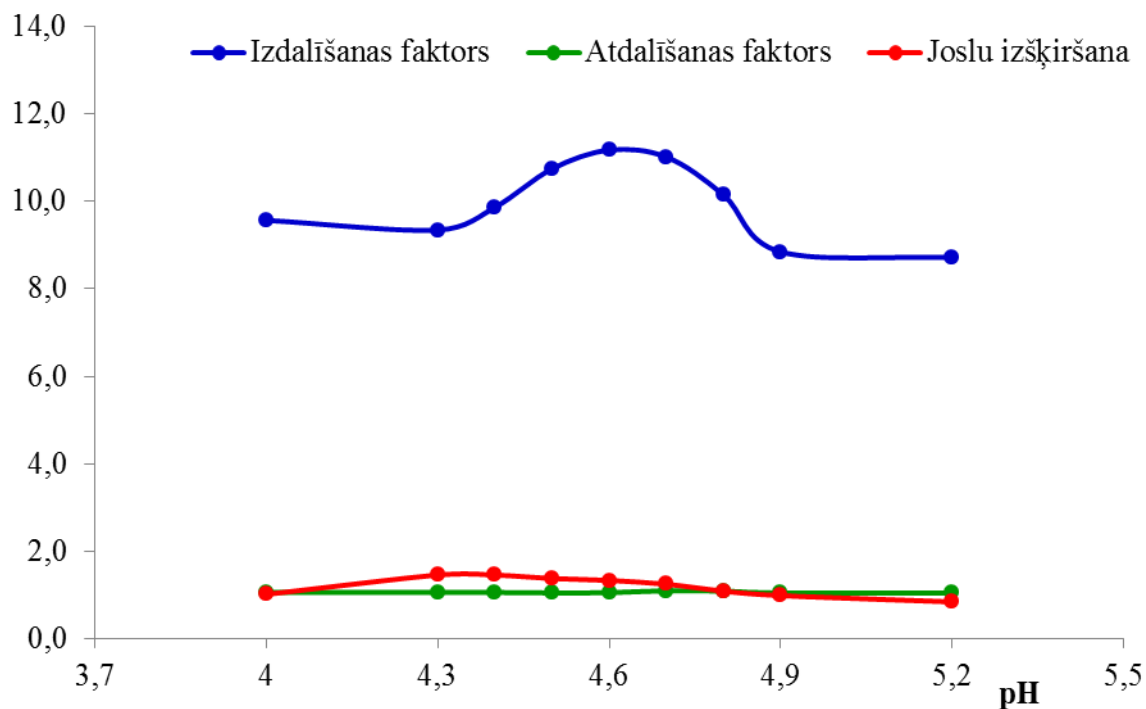
18.18. att. Valīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



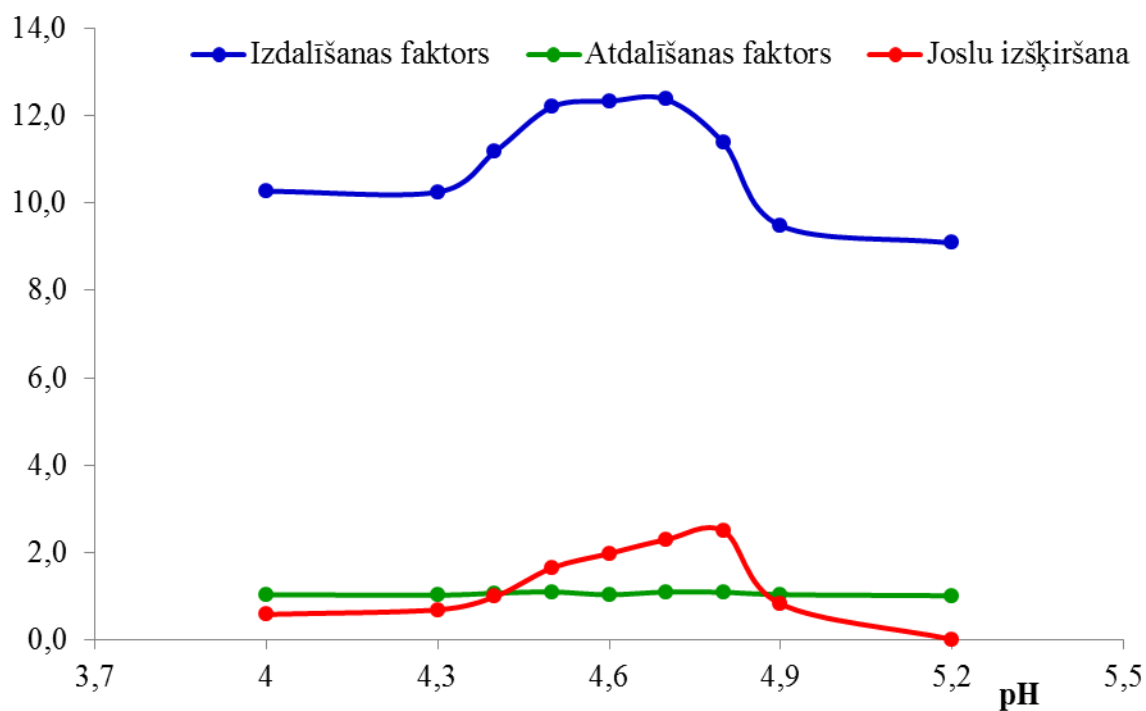
18.19. att. Metionīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



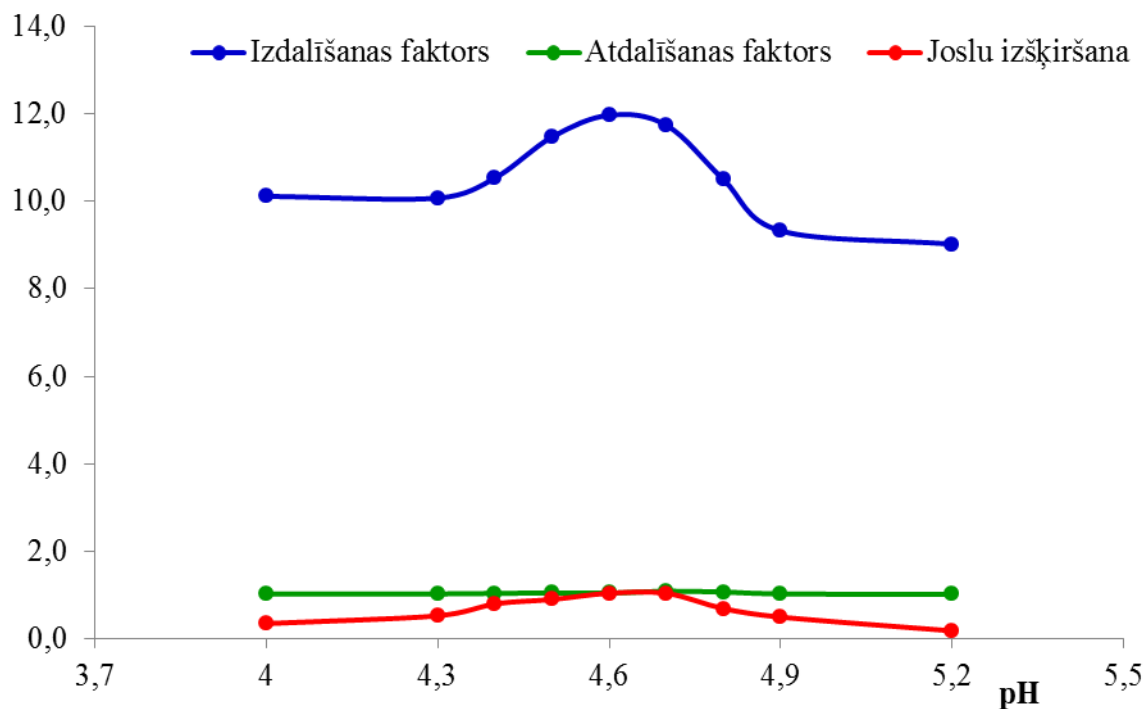
18.20. att. Pirmā reaģenta izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



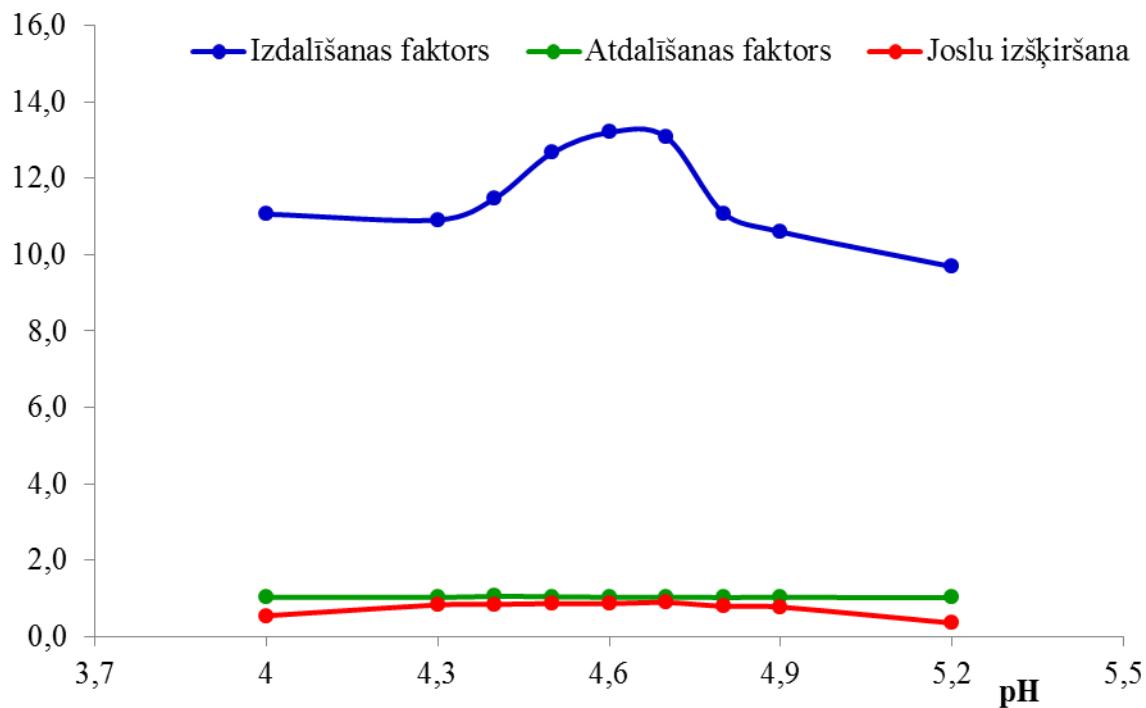
18.21. att. Cistīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



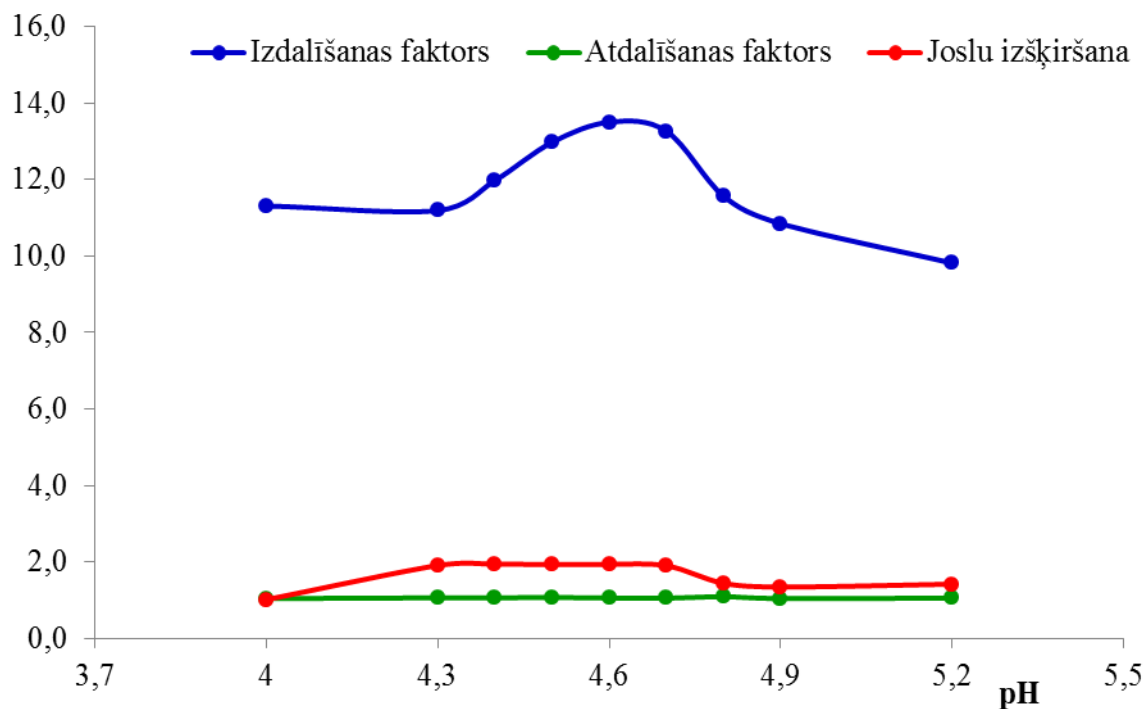
18.22. att. Otrā reaģenta smailes izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



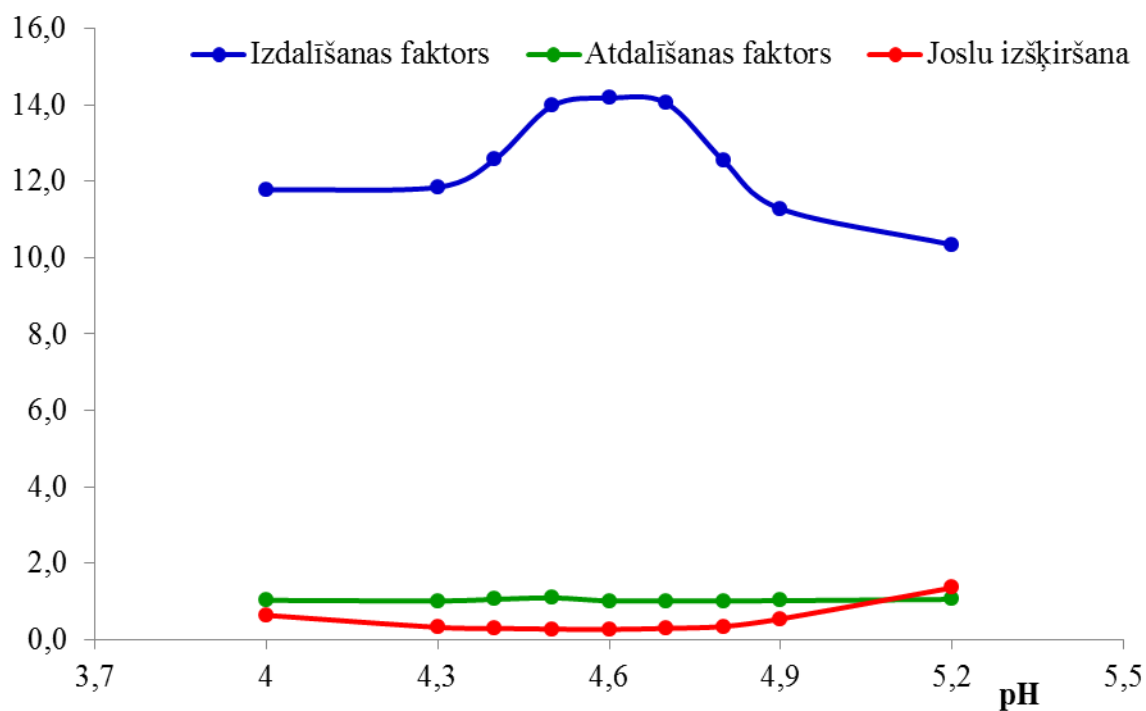
18.23. att. Cistationīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



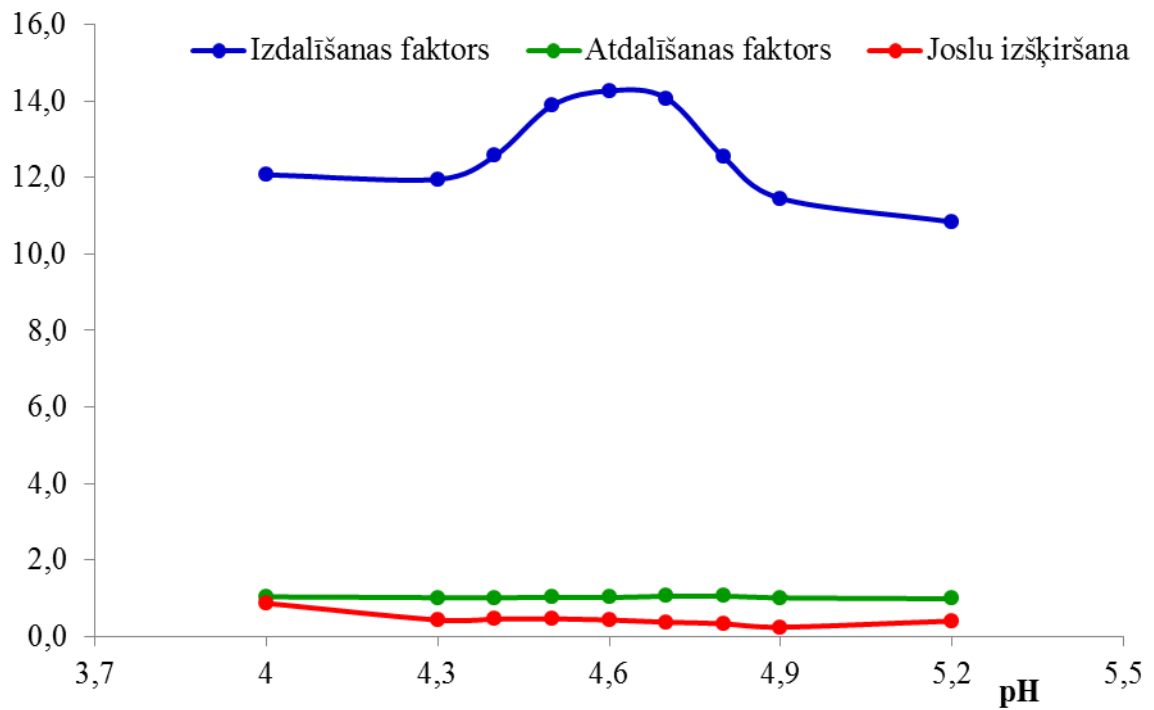
18.24. att. Izeleicīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



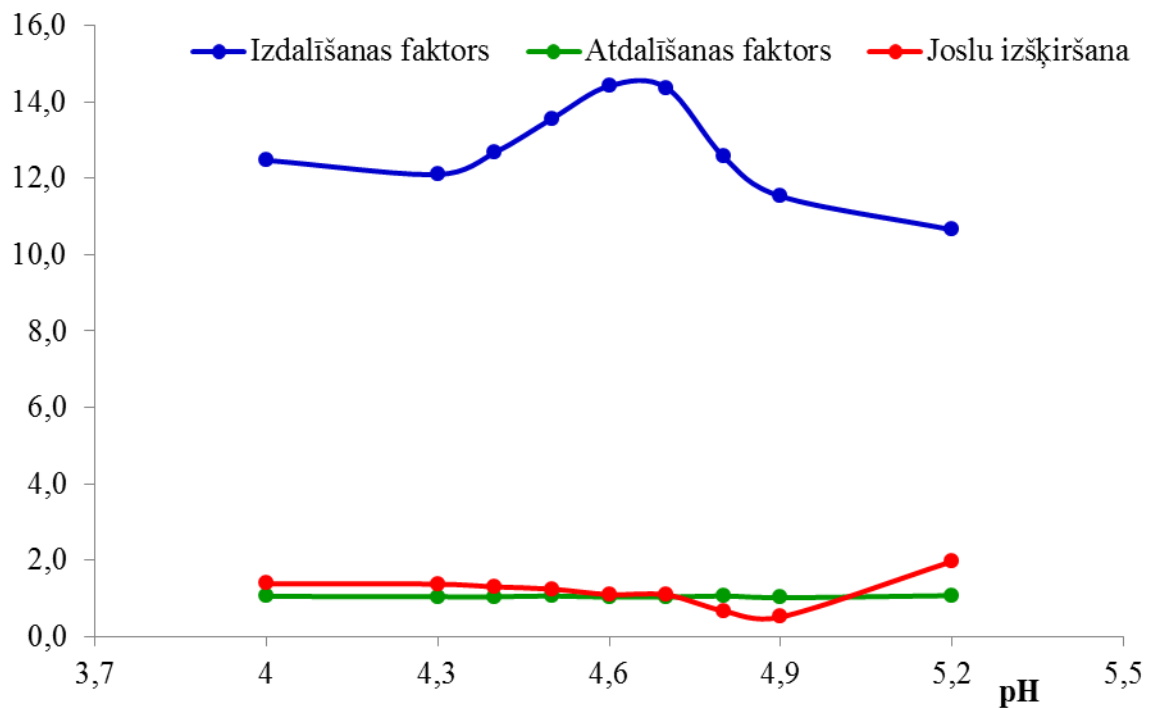
18.25. att. Leicīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



18.26. att. Fenilalanīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



18.27. att. Triptofāna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.



18.28. att. Ornitīna izdalīšanas faktora, atdalīšanas faktora un joslu izšķiršanu vidējās vērtības atkarībā no eluentu pH izmaiņām.

Promocijas darbs „Solvātu sorbcijas modeļa efektivitātes izpēte gradienta režīmā apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfijas metodes izstrādei un optimizācijai” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē Analītiskās ķīmijas katedrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantojot tikai tajā norādītos informācijas avotus un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: Svetlana Vorslova

Paraksts: \_\_\_\_\_ /S.Vorslova/

Rekomendēju darba aizstāvēšanai:

Zinātniskais vadītājs: *Dr. chem., prof.* Arturs Vīksna \_\_\_\_\_ /A. Vīksna/

Darbs iesniegts:

LU ĶĪMIJAS NOZARES Promocijas padomē

Padomes sekretārs: \_\_\_\_\_ /J. Logins/

Darbs aizstāvēts Promocijas padomes sēdē

\_\_\_\_\_ Protokols Nr. \_\_\_\_\_

Padomes sekretārs: \_\_\_\_\_ /J. Logins/