

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra Analytické chemie**

**Analytické možnosti stanovení methylsulfonylmethanu
v potravních doplňcích**

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Viktor Kubala

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, řádně cituji. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citovaná dle platných norem

datum

podpis

Zde bych chtěl velmi rád poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Daliboru Šatinskému PhD. za vstřícné jednání, trpělivost a pomocné rady, které mi poskytl při psaní mé bakalářské práce.

Abstrakt

Záměrem práce bylo zjistit a shromáždit informace o methylsulfonyl metanu, od jeho vzniku přes možnosti příjmu do lidského těla až po jeho léčivé účinky. Zejména léčivé účinky na onemocnění spojené s bolestí a záněty kloubů a kostí. Druhá část bakalářské práce se zabývá problematikou stanovení methylsulfonylmethanu pomocí analytických metod, kde prioritní metodou byla technika plynové chromatografie. V třetí části jsou zahrnuty komerční přípravky s obsahem methylsulfonylmethanu s popisem jejich složení a doporučeními pro léčebné využití.

Abstract

The aim of the thesis was to find out and collect the information about MSM from its origin through the possibilities of coming into human body to its healing effects. Especially healing effects on the disease connected with the pain and inflammation of joints and bones. The second part of the thesis deals with the problematic of determination of methylsulfonylmethane with the help of analytic methods. The priority method was the technique of gas chromatography. The third part concentrates on commercial products with content Methylsulfonylmethane, on their description and recommendations for pharmacotherapy.

Obsah

1 Seznam zkratk	7
2 Úvod	8
3 Cíl a popis zadání práce	9
4 Teoretická část	10
4.1 Vznik MSM, přechod a funkce v těle	10
4.2 Osteoartritida	11
4.2.1 Osteoartróza jako onemocnění	11
4.2.1.1.1 Názvosloví onemocnění	12
4.2.1.1.2 Patofyziologie OA	12
4.2.1.1.3 Projevy OA napomáhající diagnostice	13
4.2.1.1.4 Léčba OA	14
4.2.2 MSM a jeho vlastnosti na OA	15
4.3 Toxikologické vlastnosti MSM	16
5 Analytická část	17
5.1 Chromatografie	17
5.1.1 Plynová chromatografie	17
5.1.1.1 Složení chromatografu	18
5.1.1.2 Kolony a stacionární fáze	18
5.1.1.2.1 Náplňové kolony	18
5.1.1.2.2 Kapilární kolony	19
5.1.1.3 Detektory	19
5.1.1.3.1 Tepelně vodivostní detektor	19
5.1.1.3.2 Ionizační detektory	20
5.1.1.4 Chromatogram	20
5.2 Metody stanovení MSM pomocí GC	21
5.2.1 Stanovení MSM pomocí GC- popis metody	21
5.2.2 Stanovení klíčových sloučenin síry v atmosféře a oceánech	24
5.2.3 Stanovení dimethylsulfoxidu a dimethyl sulfonu v moči	25
5.2.4 Stanovení MSM za účelem kontroly kvality potravních doplňků	26
6 Přípravky obsahující MSM	28
6.1 Přípravky určené lidem	28
6.2 Veterinární přípravky	29
7 Závěr	31
8 Citovaná literatura	32

1 Seznam zkratek

CHS	Chondroitin sulfát
DMP	2,2- dimthoxypropan
DMS	dimethylsulfid
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DMSO2	Dimethylsulfon=MSM
GC	Plynová chromatografie
GS	Glukosamin sulfát
ILS	Izotopicky značené standardy
MA-HCl	Methamamfetamin-hydroxidchlorid
MSM	Methylsulfonylmethan=DMSO2
NSA	Nestereoidní antirevmatika
OA	Osteoartróza
S	Síra
SYSADOA	Symptomaticky pomalu působících léky

2 Úvod

Osteoartróza je onemocnění postihující starší lidi bez rozdílu rasy a pohlaví. Trpí jím většina lidí, proto se osteoartróza považuje za civilizační onemocnění. Dodnes nebyla nalezena léčba, která by OA vyléčila. OA je bolestivé onemocnění, které degeneruje klouby, zejména kyčelní, kolenní, prstů, páteře, ale postihuje i ostatní klouby. K léčbě se používají analgetika pro zmírnění bolesti. Využívá se také cvičení, které má za úkol zpevnit svaly v oblasti nemocí zasažených kloubů. Podpůrná léčba, která zpomaluje degeneraci kloubů, je tvořena přípravky, které se nazývají chondroprotektiva. Kromě známých chondroprotektiv jako jsou chondroitin sulfát a glukosamin, se k nim řadí i MSM.

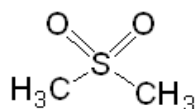
MSM není tak známá látka a bylo provedeno pouze velmi málo studií, ovšem v provedených studiích byly prokázány účinky a zlepšení stavu při léčení pohyblivosti nemocných. MSM je uváděno jako netoxická látka. Při používání léku u OA však dávky MSM výrazně přesahují doporučené hodnoty dávek na den.

3 Cíl a popis zadání práce

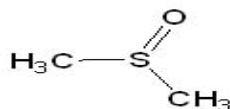
Cílem a zadáním předložené bakalářské práce bylo shromáždit informace týkající se methylsulfonylmethanu, jeho možností při využití v léčbě různých typů osteoartrózy a získat dostupné informace o současných metodách a možnostech, které slouží k analytickému stanovení MSM v potravních doplňcích či jiných matricích.

4 Teoretická část

Původní název methylsulfonylmethanu(MSM) byl dimethylsulfon (DMSO₂) a přestal se používat kvůli možnosti spletení zkratky s prekurzorem MSM, který má název dimethylsulfid (DMSO). Kvůli tomu byl zaveden název MSM, i když tento název by mohl svádět k nakreslení molekuly CH₃-SO₂-O-CH₃, ale používá se pro molekulu MSM.



Obr. 1: Struktura molekuly methylsulfonylmethanu

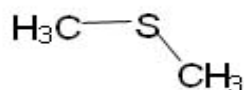


Obr 2: Struktura molekuly dimethylsulfoxidu

4.1 Vznik MSM, přechod a funkce v těle

MSM vzniká přirozeně v atmosféře naší planety. Vzniká díky oxidaci dimethylsulfidu (DMS), který se uvolňuje z mořského fytoplanktonu do vody. DMS je velmi těkavá látka, která se dostává do atmosféry. Příspěvek síry pomocí DMS do atmosféry je 10-30% celkové hodnoty síry v atmosféře. DMS se v atmosféře oxiduje pomocí ultrafialového záření (UV) a hydroxylových radikálů (OH). Při této reakci nejdříve vzniká DMSO, které se díky dalším OH radikálům oxiduje na MSM(1).





Obr. 3: Struktura molekuly dimethylsulfidu

MSM se v atmosféře rozpustí ve vodě a při dešťových přeháňkách se dostává do půdy a vod. Díky tomu se MSM dostává do rostlin (ovoce, zelenina a obilniny). Kvůli tepelně neupravované potravě a tekutinám se MSM dostává do našeho organismu, kde figuruje zejména jako zdroj síry (S) pro lidský organismus. U tepelně upravovaného jídla MSM nenajdeme z důvodů těkavosti látky při vyšší teplotě. Síra je potřebná například pro tvorbu aminokyselin jako cystein a methionin, které mají ve svém postraním řetězci síru (2). 15% celkového lidského MSM, se v těle metabolizuje z DMSO (1).

MSM je přirozeně se vyskytující organosírová molekula lidského těla a předpokládaný donor methylu. Nedávná studie ukázala, že MSM byl nalezen v lidské cerebrospinální tekutině a plazmě v koncentraci 0-25 $\mu\text{mol/l}$. Kvůli obsahu síry je MSM používán tělem k udržování normálních pojivových tkání (1).

4.2 Osteoartritida

Osteoartróza je hlavní příčinou nepohyblivosti, která limituje každodenní aktivity lidí, a je spojena s omezením kvality života (1).

4.2.1 Osteoartróza jako onemocnění

Osteoartróza (OA) je nejčastější onemocnění kloubů, které se vyskytuje převážně u starších osob, u lidí nad 65 let až u 60% vyšetřovaných. OA postihuje muže i ženy stejně, ale s jinými specifickými postiženími, zejména v

místě působení bolesti (3). U mužů nacházíme postižení horního pólu kloubu, u žen naopak postižení mediálního (středního) pólu. Postižení horního pólu kloubu znamená, upřesnění místa poškození kloubu. Pokud budeme mluvit o koncentrickém poškození, nalezneme poškozený kompletně celý kloub(4).

4.2.1.1.1 Názvosloví onemocnění

Onemocnění dělíme podle počtu postižení kloubů. Pokud je postižen jeden kloub, tak se jedná o mono-, dva až čtyři oligo-, více než 4 polyartikulární artróza. Dále podle postižení kloubu, jeho latinským názvem např. kloub oblasti palce ruky – risartróza, kolena – gonartróza, kyčle – koxartróza, páteře – spondylartróza atd. (4,5). Další velmi důležité rozdělení je na primární (idiopatickou) a sekundární OA. V případě primární OA jsou příčiny degenerativních změn neznámé. Naopak u sekundární OA známe příčiny, které se podílejí na vzniku onemocnění, příčiny mohou existovat vnitřní nebo vnější. Mezi důvody sekundárních onemocnění patří: trauma (zejm. intraartikulární, mikrotraumatizace), kongenitální a vývojové vady (vrozená dysplazie kloubu), metabolické nemoci (dna), endokrinní choroby (akromegalie, diabetes mellitus), mechanické faktory (změny osového postavení kostí, nestejná délka končetin, hypermobilita), krvácení do kloubu (hemofilie), zánětlivá onemocnění kloubní (revmatoidní artritida) (3,4,5).

4.2.1.2 Patofyziologie OA

OA je zapříčiněna poškozením kloubní chrupavky. Poškození kloubní chrupavky je způsobeno celkovým působením genetických, metabolických, biochemických a biomechanických faktorů se sekundární zánětlivou komponentou. Jedná se o proces zahrnující degradační a reparační změny chrupavky, synovie a kostí (3).

Nejdůležitějšími buňkami ovlivňujícími OA jsou chondrocyty, které při

onemocnění vykazují velké množství abnormálních metabolických změn. Z důvodu těchto změn mají chondrocyty zvýšenou proliferaci syntetizujících a degradačních aktivit. Za fyziologických podmínek je chrupavka v rovnovážném stavu katabolických a syntetizujících procesů. Degradace chrupavky vzniká při poškození rovnováhy, při degradaci se uvolňují matrixové molekuly a jejich fragmenty a degradační enzymy chondrocytů. Složky jsou uvolňovány do nitrokloubního prostoru, kde vyvolávají nepřiměřenou reparativní odpověď. Významně působí také změna produkce proteoglykanů, jak kvalitativní, tak kvantitativní. Zvýšena je produkce metaloproteináz a jiných proteolytických enzymů, také se uvolňují cytokiny jako interleukin 1 a tumor nekrotizující faktor alfa. Význam v patogenezi představuje i změna tvorby kolagenu II, jde o změnu exprese genů pro syntézu i produkci kolagenu II (3).

4.2.1.3 Projevy OA napomáhající diagnostice

Jedním z hlavních příznaků je bolest kloubů. Z počátků onemocnění se jedná o takzvanou startovací bolest, ta se projevuje při prvních pohybech kloubů, po jejich rozhýbání se mírní nebo úplně vytrácí. S postupným zhoršováním OA bolest přetrvává i po dobu celého pohybu. U nejpokročilejších stádií se bolest projevuje trvale i během klidu a noci, takzvaná dekompenzovaná OA (3,4,5).

Dalším projevem bývá ztuhlost, projevující se po době klidu. Je zřetelně vidět složité rozhýbání kloubu, trvající 10-15 minut, výjimečně až 30 minut. Ztuhlost však není nutným projevem OA.

Při gonartróze bývají cítit drásoty kolenního kloubu. Zjistíme je přiložením dlaně na kloub, kdy ucítíme takzvané „vrzání“(4).

Dalšími příznaky jsou změna postavení kloubu, zejména u těžších forem OA. Velmi často se můžeme setkat s omezeným rozsahem pohybu kloubu. Pokud se v kloubu objeví zánět, tak dochází k proteplení a otoku kloubu (3,4,5).

4.2.1.4 Léčba OA

Léčba je velmi různorodá, není známa žádná kauzální léčba, která by odstranila onemocnění. Proto má léčba OA hlavní cíl a to je zlepšení kvality života.

U počátečních stádií OA se využívá zejména nefarmakologické léčby, do které se řadí zejména posilování svalů pomocí cviků určených fyzioterapeutem. Další pohybové aktivity doporučené lékařem mohou být krátké nenáročné procházky. Plavání, nenáročné na klouby, a cyklistika, při které také není velká zátěž na koleno. Doktor také může doporučit doplňkovou léčbu, mezi tu řadíme elektroléčbu, akupunkturu, laseroterapii, magnetoterapii. Hojně se také využívají různé ortézy, berle, ortopedické vložky, speciální boty. Proti bolesti se používají teplé nebo kryogenní zábaly (3,5).

Jednou z možností jsou různá analgetika, která snižují bolest. Zejména se používají takzvané nestereoidní antirevmatika (NSA). U NSA známe dostatečně jejich analgetické a protizánětlivé účinky. Výběr druhu NSA je založen na více aspektech, ať už ceny či vedlejších účinků. V neposlední řadě se rozhoduje podle délky užívání léku. Krátký až středně dlouhý biologický poločas je u léků, které by se neměly používat dlouho (např. Ibuprofen). Pro dlouhodobé používání jsou doporučena NSA s dlouhým biologickým poločasem, zejména u chronických onemocnění (např. Piroxikam) (3).

Léčba OA, která započala v 90.letech, byla směřována na využití symptomaticky pomalu působících léků (SYSADOA). Tyto léky mají velmi pomalý účinek nástupu, obvykle během 3 až 8 týdnů, a jejich účinnost trvá až dva měsíce po jejich vysazení. SYSADOA jsou ve většině případů schváleny jako léky nebo potravní doplňky. Do této skupiny patří látky jako je např. glukosamin sulfát (GS). Exogenním podáváním GS je získáván základní substrát pro syntézu proteoglykanů chondrocyty, zároveň má také katabolický účinek tím, že inhibuje tvorbu proteolytických enzymů. GS je také schopen ovlivňovat lyzozomální enzymy, účinkující při degradaci chrupavky, a má i své vlastní protizánětlivé účinky. Další látkou patřící do skupiny SYSADOA je látka s názvem chondroitin sulfát (CHS) a jedná se v tomto případě o sulfonovaný

glykosamin. CHS má schopnost zpomalit apoptózu chondrocytů a také má svůj protizánětlivý účinek. Kyselina hyaluronová (KH) je nesulfonovaný glykosaminoglykan, nachází se mezi chrupavkou a synoviální tekutinou, v těchto místech tvoří extracelulární matrix, její úkol v lidském těle je zachovávat viskoelasticitu. Mezi látky ze skupiny SYSADOA se řadí i MSM a v komerčních přípravcích je většinou dodáván právě v kombinaci s GS nebo CHS(3).

4.2.2 MSM a jeho vlastnosti na OA

MSM v současné době patří mezi dietní suplementy, jež jsou stále více využívány v oblasti léčby osteoartritidy. Užívání MSM bývá nejčastěji doporučeno v kombinaci s GS a CHS, tyto látky mají na rozdíl od MSM četné zkoušky účinnosti podporující jeho užívání v OA. MSM je populárně používán pro zmírnění artritických a revmatických bolestí. MSM může vykazovat protizánětlivou aktivitu, chemopreventivní vlastnosti, utlumuje syntézu prostacyklinu (PGI₂), může působit anti-ateroskleroticky, má prospěšný efekt na eikosanoidní metabolismus. V myších modelech bylo při použití MSM prokázáno, že funguje jako látka ovlivňující zánětlivé podmínky jako jsou revmatoidní artritida a lupus (1).

Náhodný kontrolovaný pokus MSM na léčbu OA byl publikován Usjo a Naidusem. V tomto případě se jednalo o 15-týdenní pokus se 118 pacienty. Pacienti s prokázanou OA kolene dostávali buď 1,5 g MSM, nebo 1,5 g GS, nebo kombinací 1,5 g MSM s GS, a nebo placebo. Výsledek této pilotní studie ukazoval na snížení Lequesneho indexu u skupiny pacientů s MSM, GS a u jejich kombinace. Autoři uvedli až 33% snížení bolesti ve skupinách zkoumaných pacientů s MSM. Bylo také pozorované zlepšení kloubního pohybu, markantní pokles otoku, celkové hodnocení a doba chůze se také zlepšily. MSM v této studii a v komerčních přípravcích byl syntetizován reakcí DMSO a peroxidu vodíku. Výsledným produktem stávající reakce, vzniká MSM a voda (1).

4.3 Toxikologické vlastnosti MSM

Klinické studie MSM na toxicitu a bezpečnost u lidí nebyly publikovány. Studie byly prováděny pouze na zvířatech. Test na akutní toxicitu byl prováděn jednoduchou dávkou 2 g/kg MSM, u testu na subchronickou toxicitu byla použita dávka 1,5 g/kg MSM po dobu 90 dní. Provedené testy neukázaly žádné vedlejší účinky, ani patologii jakýchkoliv orgánů nebo úmrtnost testovaných živočichů. Dávky testované v rámci akutní a subchronické toxicity jsou považovány za 5 až 7-krát větší než je maximální dávka užívaná u lidí. MSM je všeobecně považována za bezpečnou sloučeninu a je uvedena v Arthritis Foundation's Guide jako alternativní či doplňkový způsob léčby pro OA, ale s výstražnou poznámkou. Tato výstražná poznámka je zde uvedena z důvodu nedostatečného výzkumu.

Byly zmíněny nepotvrzené zprávy o mírných vedlejších účincích při orálním užívání MSM včetně gastrointestinálních symptomů, bolestí hlavy, zesílených účinků drog ředících krev, jejichž výsledkem je snadné tvoření modřin a krev ve stolici, zvýšení krevního tlaku, či zvýšení hladiny jaterních enzymů. Pokud se MSM užívá v rámci léčby OA před spaním, vyskytuje se i nespavost. Klinické studie na vedlejší účinky MSM a změny v rozboru krve nebyly dosud nikdy provedeny.

Dostupnost MSM v prodejnách zdravé výživy a na internetu je až příliš velká na malé poučení o bezpečnosti a způsobu užívání. Dávky MSM předepisované lékaři při léčbě OA jsou obvykle vyšší než dávky užívané v dávkách obvykle předepsaných praktickými lékaři a konzumenty k léčení OA, které jsou vyšší než dávkování užívané v Ushasově studii (1).

5 Analytická část

MSM je využíván v mnoha doplňkových přípravcích a stanovuje se nejčastěji pomocí plynové chromatografie.

5.1 Chromatografie

Chromatografie patří mezi metody, které oddělují od sebe složky obsažené ve směsných a komplexních vzorcích. Jedná se o takzvané separační metody. Chromatografie se používá pro kvalitativní i kvantitativní analýzu vzorků.

Základem všech chromatografických metod je stacionární a mobilní fáze. Stacionární fáze díky různým typům interakcí separuje od sebe jednotlivé složky vzorku. Vzorek na stacionární fázi přivádí fáze mobilní, která složky vzorku zároveň ze stacionární fáze vymývá.

5.1.1 Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie (gas chromatography- GC) nese svůj název podle používané mobilní fáze, tedy plynu. Mobilní fázi nazýváme nosný plyn, který unáší vzorek na kolonu, která zastupuje stacionární fázi. Po opuštění složek vzorku z kolony, přicházejí složky postupně do detektoru. Detektor po průchodu jednotlivých složek vzorku vydává signál, na jehož základě se určuje kvalitativní a kvantitativní zastoupení složek ve vzorku. Měřicí přístroj se nazývá chromatograf a vydávané výsledky se jmenují chromatogram. Podmínkou pro analýzu pomocí GC je přeměna analytu na plyn. Proto je možné separovat látky, které mají dostatečně nízkou teplotu varu, teplotou stálost a menší relativní molekulovou hmotnost než 1000.

5.1.1.1 Složení chromatografu

Tlaková láhev je zdrojem nosného plynu. Nosný plyn je zvolen tak, aby byl inertní vůči složkám analytu. Nesmí mít přímý vliv na separaci. Používané plyny jsou dusík, helium, argon a vodík. S často používaným vodíkem hrozí nebezpečí z důvodu jeho fyzikálních a chemických vlastností jako jsou hořlavost a explozivnost

Pro záchyt nečistoty a vlhkosti v nosném plynu je na chromatografu zabudované čistící zařízení. Hlavním úkolem je z nosného plynu odstraňovat stopy reaktivního kyslíku. Reaktivní kyslík má schopnost nevratně poškodit stacionární fázi.

Regulační systém nastavuje průtok nosného plynu podle vyhovujících parametrů analyzovaného vzorku.

Zavedení vzorku do nosného plynu zajišťuje dávkovač. Použitá technika dávkování zajišťuje co nejkratší odpar vzorku do mobilní fáze. Dávkovačem bývá injekční stříkačka, která je plynotěsná nebo obtokové dávkovací kohouty. Dávkuje se od 0,1 – 10 µl vzorku.

Důležitou částí GC je kolona, ve které je umístěna stacionární fáze.

Detektor úzce souvisí s vyhodnocovacím zařízením. Detektor vysílá signály vyhodnocovacímu zařízení, které díky informacím vytváří chromatogram.

Při chromatografické analýze je velmi důležitá kontrola teploty. Tu zajišťuje termostat a separace může probíhat v isokratickém a nebo častěji používaném gradientovém módu. Výška teploty musí udržovat vzorek v plynné fázi.

5.1.1.2 Kolony a stacionární fáze

5.1.1.2.1 Náplňové kolony

Jedná se o železné nebo skleněné kolony o vnitřním průměru 2-3 mm a

délce 1-3 m, vyplněné sorbentem, který je pokryt na povrchu kapalnou fází. Pro adsorbční GC využíváme silikagel, grafitované saze a oxid hlinitý (alumina) jako adsorbenty v koloně. Přípoužití molekulových sít využíváme hlinito křemičitany.

Existují také mikronáplňové kolony, které jsou modernější a mají vyšší účinnost separace než náplňové kolony. Vyznačují se malým průměrem a obsahem velmi malých částic, průměr těchto částic se pohybuje kolem 10 μm .

5.1.1.2 Kapilární kolony

Kapilární kolony jsou vyráběny převážně z taveného křemene, vnitřní stěna je nosičem stacionární fáze, s vnitřním průměrem 0,1-0,6 mm. Tloušťka stacionárního filmu, jež pokrývá vnitřní stěnu je 0,25-5 μm , délka kapiláry je od 15 do 60 m, obvykle postačuje délka do 30 m. Z vnějšku je kapilára pokryta polyimidovou vrstvou. Tato vrstva dodává křehké kapiláře pružnost a chrání jí i před zlomením.

5.1.1.3 Detektory

Pro detekci je důležitá citlivost. Citlivost je posuzována podle nejmenší detekovatelné koncentrace stanovované složky, která dojde pomocí mobilní fáze na detektor. Na detektory je kladen také nárok na vysokou selektivitu.

5.1.1.3.1 Tepelně vodivostní detektor

Detektor je založen na proudění mobilní fáze s analytem kolem rozžhaveného vlákna, vlákno je žhaveno stalým elektrickým proudem. Změnu napětí ovlivní daný analyt. Při použití tohoto detektoru je velmi důležité, aby analyt měl rozdílnou tepelnou vodivost na rozdíl od mobilní fáze.

5.1.1.3.2 Ionizační detektory

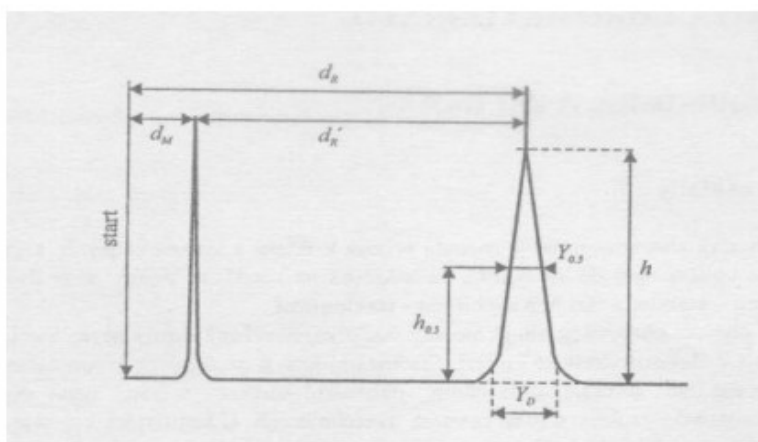
Detektory jsou založeny na vedení elektrického proudu nosným plynem. Aparatura detektoru je tvořena dvěma kovovými deskami, tvořícími elektrody v izolované nádobě.

Jednou z variant je plamenový ionizační detektor. Molekuly se ionizují v kyslíkovodíkovém plameni, tím vedou proud mezi elektrodami. Přítomnost analyzované složky zvyšuje elektrický proud. Má vysokou citlivost až v pikogramech

V současnosti je běžné i spojení GC s hmotnostním spektrometrem, analyzátořem se stává kvadrupól.

5.1.1.4 Chromatogram

Chromatogram je tvořen dvěma osami, na ose x je čas a osa y značí signál detektoru. Složky vzorku pak tvoří píky. Vrchol píku udává hodnotu retenčního času. Retenční čas je čas (d viz. Obr. č.4), za který projde daná složka kolonou. Určuje nám kvalitativní hodnotu analytu. Plocha (y základna trojúhelníku) nebo výška (h) píku rozhoduje poté o kvantitativní hodnotě analytu. Vzhled chromatogramu můžeme vidět na obrázku číslo 4.



5.2 Metody stanovení MSM pomocí GC

5.2.1 Stanovení MSM pomocí GC- popis metody

Vyvinutá metoda byla aplikována k určení obsahu methamfetamin-hydroxidchloridu (MA-HCl) a MSM v krystalickém MA zadrženém v Japonsku od října 2006 do září 2007. 127 vzorků z 29 kriminálních případů bylo podrobena analýze.

GC analýza byla provedena na Chromatografu Agilent 7890A GC systému (Agilent, Palo Alto, CA, USA) používající plameno-ionizační detektor a automatický dávkovač Agilent 7683B. Byla použita kapilární kolona DB-17- úzká kapilární kolona (Agilent, 0,1 mm x 5 m, tloušťka filmu 0,1 μ m). Teplota termostatu byla naprogramována od 100-175 °C při gradientu 50°C/min. Teplota injektoru a detektoru byla nastavena na 240 °C a 250 °C v daném pořadí. Nosným plynem bylo použito helium za konstantního průtoku kolonou 0,5 ml/min. Objem vzorku dávkovaný na kapilární kolonu byl 1 μ l extraktu.

Optimalizace metody

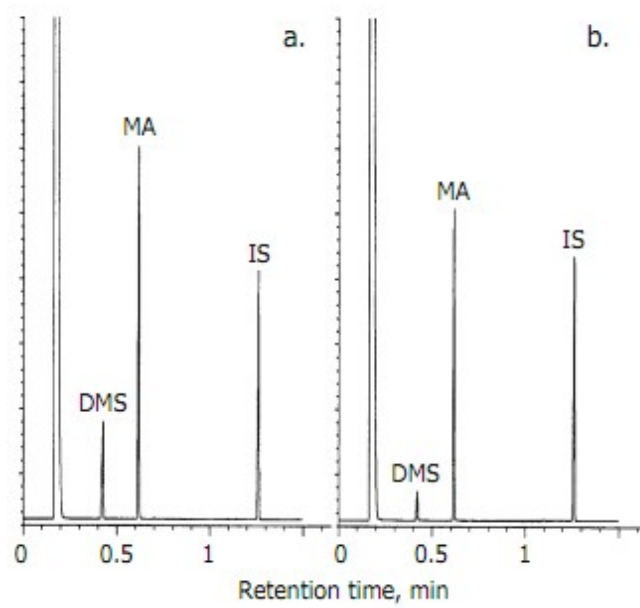
K optimalizaci extrakční procedury bylo použito 25 μ l methanického MA a MSM o koncentraci 10 mg/ml k němuž bylo přidáno k 0,475 ml destilované vody. Po přidání 0,5 ml všech pufrů (pH 4,0, 0,2 M pufru citrátu, pH 6,9, 0,2 M fosfátového pufru; pH 8,0 a 9,0, 0,5 M pufru Tris-HCl, pH 10,5, 0,2 M pufru uhličitanu) nebo alkalické roztoky MA a MSM byly extrahovány s 1 ml každého z různých organických rozpouštědel s 0,2 g soli a bez soli. Po centrifugaci byl supernatan extraktu podroben GC analýze. Výtěžnosti extrakce v (%) byly vypočítány z ploch píků extraktů proti těm z neextrahovaného methanolového roztoku standardů.

Výsledky účinku pH na extrakci MA a MSM ukázaly, že MA byl účinně extrahován dichlormetanem za silně alkalických podmínek, ale výtěžnosti extrakce MSM zůstaly na hodnotě 35% bez ohledu na pH vodné vrstvy. Různá organická rozpouštědla pak byla zkoumána pro účinnější extrakci analytu. N-hexan neextrahuje MSM a diethylether stejně jako butylchlorid extrahovaly pouze malé procento MSM. Mezi testovanými organickými rozpouštědly bylo shledáno, že dichlormetan: 2-propanol v poměru (3:1) extrahuje MSM neúčinněji, ačkoli účinnost byla pouze 50% při smíchání stejného objemu organické rozpouštěcí směsi se silným alkalickým roztokem (1 M hydroxidu sodného). MA byl účinně extrahován za těchto podmínek všemi testovanými organickými rozpouštědly. K dalšímu zlepšení účinnosti extrakce MSM bylo zkoumáno několik kombinací alkalických roztoků a organických rozpouštědel v přítomnosti a absenci různých solí. Použití uhličitanu draselného dramaticky zvýšilo účinnost extrahování MSM; přidání chloridu sodného pozitivní vliv nevykázalo.

Validace metody

Použití kapilární kolony poskytlo rychlou a kompletní separaci tří komponentů za pouhých 1,3 min. (Obr. 1) . Retenční časy MSM, MA a vnitřního standardu byly v daném pořadí 0,43, 0,62 a 1,26 min. Na chromatogramu se neobjevily žádné píky poukazující na nečistoty extraktu zadrženého vzorku (Obr. 1b). Jeden cyklus teplotně naprogramované analýzy požaduje méně než 3 min k realizování detekce.

Kalibrační křivky pro oba MA a MSM byly lineární v celém zkoumaném rozsahu (0,01-2,4 mg/ml, ekvivalentní k 0,5 % - 120 % v práškových vzorcích). Nižší limity detekce byly určeny 0,001 mg/ml pro MA a 0,003 mg/ml pro MSM (6).



Obr. 5: Chromatogram GC stanovení MSM, MA a IS

5.2.2 Stanovení klíčových sloučenin síry v atmosféře a oceánech

Bandy, Thornton, Ridgeway a Blomquist stanovili pomocí GC a hmotnostního spektrometru klíčové sloučeniny síry v ovzduší a oceánech.

Metody GC/MS s využitím mezinárodně izotopicky značených standardů (GC/MS/ILS) jsou popsány pro určení atmosférického oxidu siřičitého, dimethylsulfidu (DMS), sirouhlíku, dimethylsulfoxidu (DMSO), MSM, karbonyl sulfidu a vodné fáze dimethylsulfidu a dimethylsulfoxidu. GC/MS/ILS je robustní vůči změnám ve způsobu odběru vzorků a změnám v citlivosti detektoru. Použití nízkoteplotního zakoncentrování a integračního času tří minut snižuje limity detekce pod jednu částici na trilion pro plynné fáze. Dolní limity detekce pro měření vodní fáze jsou nižší než 1 pmol. Přesnost měření je limitována buď nižším limitem detekce nebo opakovatelností přidáním standardu. Přesnost je determinována primárně přesností standardů. U GC/MS/ILS je nutné dbát na citlivost a přesnost měření tak, aby se v reálném čase správně změřil počet izotopů(7).

Podmínky analýzy nebyly součástí abstraktu a přístup k plnému zdroji nebylo možné získat.

5.2.3 Stanovení dimethylsulfoxidu a dimethyl sulfonu v moči

Metoda pro rutinní určení DMSO a MSM v lidské moči byla vyvinuta za použití GC/MS. Vzorek moči byl upraven 2,2- dimthoxypropanem (DMP) a kyselinou chlorovodíkovou pro účinné odstranění vody, která degraduje úroveň vakua na MS a zkracuje životnost kolony. Experimentální parametry reakce DMP, jako je koncentrace kyseliny chlorovodíkové, podíl DMP v moči, reakční teplota a čas, byly optimalizovány pro moč. Hexadeuterovaný DMSO byl použit jako vnitřní standard. Výtěžek DMSO a MSM z moči byly 97-104 % a 98-116 % v daném pořadí. Kalibrační křivky vykazovaly linearitu v rozsahu 0,15-54,45 mg/L pro DMSO a 0,19-50,10 mg/L pro MSM. Limity detekce DMSO a MSM byly 0,04 a 0,06 mg/l v uvedeném pořadí. Relativní směrodatné odchylky stanovení v průběhu dne byly 0,2 – 3,4 % pro DMSO a 0,4 – 2,4 % pro MSM. Navržená metoda může být užitečná pro biologické monitorování dělníků vystavených DMSO v jejich pracovním prostředí. Podrobnější podmínky analýzy nebyly součástí abstraktu a přístup k plnému zdroji nebylo opět možné získat

5.2.4 Stanovení MSM za účelem kontroly kvality potravních doplňků

Bylo analyzováno několik potravních doplňků např. Arthrostop Plus od firmy Walmark a dalších 5 firem.

Jako standard byl použit MSM, dodaný firmou Orling. Jako další chemikálie byl použit nitrobenzen, aceton, helium, vodík a syntetický vzduch.

Přístroje použité pro stanovení GC: Sestava Schimadzu GC 17a AOC 20i, kolona Altech (30m x 0,32mm x 1,8 μ m). Stacionární fázi byl kyanopropylfenylpolysiloxan. Vyhodnocení proběhlo na chromatografické stanici CSW 1.7 Data Apex, Praha, ČR

Příprava vzorků

Do 10 ml baňky bylo naváženo určité množství přípravku obsahujícího MSM, doplněno po rysku 0,1% roztokem vnitřního standardu (nitrobenzen v acetonu), po vyjmutí z ultrazvukové lázně přefiltrováno přes 0,45 μ m teflonový filtr, poté se roztok dávkuje na kolonu.

Standard tvoří 500 mg MSM doplněných do 50 ml baňky roztokem vnitřního standardu.

Optimalizace podmínek

Teplota byla optimalizována pomocí měření standardu, při různých teplotách a porovnáváním jednotlivých chromatogramů. Měřené teploty byly 165 °C, 170 °C, 180 °C, 190 °C, 200 °C a 210 °C. Z těchto teplot byla vybrána jako optimální teplota 190 °C. Mobilní fází bylo helium, průtoková rychlost byla 0,7 ml/min a dávkovaný objem 1 μ l, teplota 190 °C byla nastavena u injektoru, detektoru i kolony.

Výsledek studie

Studie shledala většinu výrobků, jako výrobky neobsahující deklarované množství MSM. Jeden výrobek byl ve správném rozmezí látky 95-105 %, dva se velmi blížily a zbylé tři měly své informace o obsahu MSM nesprávné (9).

6 Přípravky obsahující MSM

MSM je využíváno nejen jako potravní doplněk pro lidi, ale působí stejně i na zvířecí klouby. Proto existuje i velmi hodně veterinárních přípravků s MSM.

6.1 Přípravky určené lidem

Firma Nutrend vyrábí s MSM přípravek Flexit Drink. Jedná se o prášek který se smíchá s vodou v poměru 20 g na 250 ml vody a vzniká nápoj s příchutí. Nabízené příchutě na trhu jsou pomeranč, broskev a jahoda. Firma má doporučené dávkování, pro ochranu kloubů 10 g za den a při léčbě poškozených kloubů 20 g na den, přípravek se má vždy používat ráno na lačno. Přípravek obsahuje kromě MSM 1500 mg/100 g výrobku i glukonát hořečnatý, glukonát vápenatý, L-prolin, GS 1500 mg/100 g, CHS 750 mg/100 g, vitamin C, kyselinu hyaluronovou (sodná sůl), vitamin B6, vitamin D

Firma PREMIUM QUALITY PRODUCT, STONEY CREEK ONTAR vyrábí výrobek Barny's MSM + Glukosamin sulfát. Balení obsahuje 60 tablet. V přípravku najdeme MSM a GS. Výrobce uvádí pouze hodnotu denních dávek MSM 1000 mg a GS 1500 mg denně. Výrobce doporučuje 2 tablety denně jednu ráno a druhou večer, klade důraz na dodržování pitného režimu. Takovéto užívání by nemělo přesahovat 30 dní a další opakování kúry by mělo přijít nejdříve po třech měsících.

Výrobek Colafit plus MSM od firmy DACOM PHARMA, S.R.O. Výrobek obsahuje jako účinné látky vitamin C, MSM a lyofilizovaný kolagen. Jedna tobolka obsahuje 30, 500 a 4 mg v daném pořadí. Doporučené jsou dvě tobolky denně, první ráno a druhá večer.

Firma TROPHIC CANADA LTD uvádí u svého výrobku Tropic MSM+Glukosamine tbl. pouze v názvu účinné látky a kromě dávkování, které je 3 tobolky denně, se nezmiňuje vůbec o ničem.

Přípravek značky Chondrotin MSM 2600 cps.168 od výrobce Orling opět informuje o složce léku pouze z názvu ale má detailněji popsané dávkování 6 tablet denně, požívání by

nemělo přesahovat 2 měsíce a opakování této kúry je doporučeno 2-3krát do roka. Daleko známější a užívanější nutriční doplněk je Geladrink forte, tento doplněk je vyráběn v podobě kapslí nebo rozpustného prášku.. Rozpustný prášek je vyráběn v příchutích jahoda, ananas a pomeranč. Nápoj se připravuje jako 1 odměrka (14 g), kterou dolijeme vodou, minerálkou nebo čajem. Podává se jedenkrát denně. Doporučené dávkování kapslí je dvakrát denně po 6 kapslích nebo jedenkrát po 12. První výsledky zlepšení pohybu se objevují během druhého týdne, výrazné zlepšení přijde po 6 týdnech. Účinné látky obsaženy v geladrinku jsou klasická chondroprotektiva CHS (800 mg v denní dávce) a GS (1500 mg), MSM, kolagení peptidy (8000 mg), boswellia serrata extrakt ze stromu obsahující kys. boswellovou proti zánětům (100 µg), selen (50 µg), vitamín C (100 mg), vitamín E (50 mg) a mangan (2 mg).



Obr. 6 a 7: Geladrink forte nápoj (6) a kapsle (7)

Přípravek ,který má popsán ve svém příbalovém letáku všechny podstatné složky, je od firmy Virdespol s.r.o., Ortomax tob.90. Výrobek obsahuje na jednu tabletku 500 mg GS, 125 mg CHS, 125 mg MSM, 127 mg hydrolyzovaného kolagenu, 15 mg kyseliny askorbové. Výrobek má ve svém letáku i doporučené dávkování, pro dospělé 2 tablety denně a popis, že lze užívat dlouhodobě. Další výrobek této firmy je UNIVERSAL MSM gel, jediný popis k této masti je k tomu, na co se dá použít. Mast se používá na otoky, zmírňuje záněty a chrání suchou kůži, změkčuje ztvrdlou a zrohovatělou kůži na nohou, působí proti akné.

6.2 Veterinární přípravky

Firma PHARMA UNITED, KANADA se zaměřuje na veterinární výrobky. Ať už jsou to výrobky pro psy či koně, pod názvem Alavis. Alavis pro koně obsahuje pouze MSM - doporučení výrobku je pro všechny koně bez rozdílu zaměření počáteční dávka je 5g po dobu 10 dní, poté se užívá udržovací dávka 2-3 g prášku. Alavis pro psy obsahuje Glukosamin sulfát 454 000 mg, ALAVIS™ MSM 303 000 mg, olej z brutnáku lékařského 15 150 mg a základní směs (farmaceutická želatina, zázvor obecný, kurkuma dlouhá, boswelie) 45 450 mg , všechny látky jsou uvedené na kg přípravku



Obr. 8 a 9: Alavis pro psy (8) a pro koně (9)

Firma BIOFAKTORY vyrábí přípravky s MSM pro psy s názvem Canvit Chondro Super. Výrobky jsou prodávány v baleních 250, 500 a 1000 g a jsou vhodné pro psy. Výrobek podle výrobce obsahuje GS, CHS a MSM. Minimální doba léčby je 8-10 týdnů.

7 Závěr

Práce je rozdělena na tři hlavní části. V první části je zpracována teorie od vzniku až po transport methylsulfonylmethanu do těla a jeho toxicitu. Dále je v této kapitole popsána osteoartróza, onemocnění týkající se bolesti a zánětů kloubů. Popis osteoartrózy od popisu symptomů přes možnou léčbu až po spojení s methylsulfonylmethanem.

Druhá část je zaměřena na analytické možnosti stanovení MSM. Methylsulfonylmethan se stanovuje výhradně pomocí plynové chromatografie. Množství nalezených prací zabývajících se stanovením MSM v odborné literatuře je mizivé a některé práce nebylo možné získat v plnéverzi, ale pouze ve formě abstraktů. Množství informací je v tomto ohledu tedy značně omezené.

Ve třetí části jsou zahrnuty přípravky, ve kterých je obsažen methylsulfonylmethan s popisem jejich složení a praktických informací pro aplikaci.

Celkově lze závěrem práce zhodnotit, že bylo popsáno velmi málo informací o methylsulfonylmethanu. Vzhledem k tomu, že je běžně methylsulfonylmethan součástí lidského organismu, je velmi málo popsán v knížkách a v odborných člancích. Z tohoto důvodu není řádně popsána ani jeho toxicita.

Obecně se předpokládá, že jako lék na osteoartrózu má své uplatnění v kombinaci s ostatními chondroprotektivy jako jsou glukosamin a chondroitin

8 Citovaná literatura

1. **Kim,LS; Axelrod, LJ; Howard, P; Buratovich, N; Waters, RF.** Efficacy of methylsulfonylmethane (MSM) in osteoarthritis pain of the knee: a pilot clinical trial. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14. 2006. Stránky 286-294
2. **Magnuson, BA; Appleton, J; Ryan, B; Matulka, RA.** Oral developmental toxicity study of methylsulfonylmethane in rats *Food and Chemical Toxicolog*, 45. 2007 Stránky 977-984
3. **Horčíčka, V.** INTERNÍ MEDICÍNA PRO PRAXI, 5. 2004 stránky. 238-243
4. <http://old.lf3.cuni.cz/studium/materialy/revmatologie/degenerativni.html>, Duben 2011
5. <http://www.artroza.com/artroza.html>, Duben 2011
6. **Inoue,H; Kuwayama,K; Iwata, YT; Kanamori,T; Tsujikawa,K; Miyaguchi,H.** Simple and simultaneous detection of methamphetamine and seizures by fast gas chromatography. *Forensic Toxicol* 26. 2008 stránky 19-22
7. **Bandy, AR; Thornton, DC; Ridgeway, RG; Blomquist, BW.** Key sulfur-containing-compounds in the atmosphere and ocean-Determination by gas-chromatography mass-spectrometry and isotopically labeled internal standards. *ACS Sympsosius series*, 502.1992 stránky 409-422
8. **Takeuchi, A; Yamamoto, S; Narai, R; Nishida, M; Yashiki, M; Sakui, N; Namera, A.** Determination of dimethyl sulfoxide and dimethylsulfone in urine by gas chromatography-mass spectrometry after preparation using 2,2-dimethoxypropane. *BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY*, 24(5). 2010 stránky 465-471
9. **Pazourková,L.** Diplomová práce, Stanovení methylsulfonylmethanu v potravních doplňcích metodou plynové chromatografie, 2010 stránky 26-32, 44-45
10. **Klouda,P** ,Moderní analytické metody, 2003. stránky 10-23