

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

METABOLITY MELATONINU I.

Bakalářská práce

Vypracovala: Aneta Bažantová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Michaela Hamerníková, Ph.D.

Hradec Králové, 2006

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a pouze s použitím uvedené literatury.

Děkuji RNDr. Michaele Hamerníkové, Ph.D. za vedení a pomoc při praktickém provádění analýz i při sestavování bakalářské práce.

Obsah

1	ÚVOD	5
2	INDOLOVÉ SLOUČENINY-TRYPTOFAN	7
	2.1 METABOLISMUS TRYPTOFANU.....	7
3	PŘEDÚPRAVA VZORKŮ PŘI ANALÝZE BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	10
	3.1 SPE – EXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI.....	11
	3.1.1 <i>Výhody SPE oproti LLE</i>	11
	3.1.2 <i>Průběh SPE</i>	12
	3.1.3 <i>Hlavní interakce v průběhu SPE</i>	14
	3.1.4 <i>Přehled druhů sorbentů v SPE</i>	16
	3.1.5 <i>Konstrukce a doplňky pro SPE</i>	25
	3.1.6 <i>Hlavní faktory ovlivňující provedení SPE</i>	27
4	CÍL PRÁCE	29
5	VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI A DISKUZE	30
	5.1 IZOLACE SaMT Z ROZTOKU.....	30
	5.1.1 <i>Extrakce na pevné fázi</i>	31
	5.2 HPLC ANALÝZA SaMT.....	31
	5.3 NAMĚŘENÉ HODNOTY, ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ, DISKUSZE.....	32
6	ZÁVĚR	33
7	SEZNAM LITERATURY	34
8	GRAFICKÁ PŘÍLOHA	36

1 Úvod

Melatonin je hormon produkovaný epifýzou s maximem sekrece v noci během spánku, jehož tvorba podléhá výrazné cirkadiální rytmicitě a je inhibována světlem. Je to derivát hydroxyindolu, obdobně jako serotonin, přesně N-acetyl-5-methoxytryptamin. Pro jeho fyziologické působení, je podstatná jak methoxy skupina na aromatickém jádru, tak i acetyl skupina vázaná na aminu postranního řetězce, indolové jádro naopak nezbytné není a může být nahrazeno jiným aromatickým jádrem, např. naftalenem.

Melatonin byl poprvé izolován v roce 1958 A. B. Lernerem^[1] a jeho kolegy z hovězích epifýz, malých endokrinních žláz s tehdy ještě nerozpoznanou úlohou. Od té doby byl melatonin nalezen ve všech dosud zkoumaných živých organismech, od jednobuněčné mořské řasy *Gonyaulax polyedra* až po vyšší rostliny, např. merlík lékařský, bazobratlé živočichy, jako jsou ploštěnky, a oratlovce-plazy, ptáky i savce, včetně člověka. Melatonin byl tedy během vývoje druhů zakonzervován.

Podstatné je, že u všech živých organismů, ať už jsou aktivní ve dne jako člověk, či v noci jako malí hlodavci, se melatonin tvoří výhradně v noci, je to tedy jakýsi signál noci, který předává do organismu informaci o denní době^[1]. Denní rytmus v tvorbě je poháněn rytmem v aktivitě enzymu arylalkylamin *N*-acetyltransferázy, který katalizuje acetylaci serotoninu na *N*-acetylserotonin, prekursor melatoninu (aktivita tohoto enzymu v epifýze potkana je např. v noci až stonásobně i mnohem vyšší než ve dne). Tento robustní rytmus je řízen biologickými hodinami, které se nacházejí v mozku ve dvou shlucích nervových buněk uložených blízko křížení, tj. chiasmatu, optických drah a nazýván proto suprachiasmatická jádra. K 24-hodinovému dnu jsou biologické hodiny a tudíž i rytmická tvorba melatoninu synchronizovány pravidelným střídáním světla a tmy, zejména světlou periodou dne.

Melatoninový signál, tj. vysoká hladina v tělních tekutinách v noci, nepřenáší pouze signál o denní době, ale též o délce dne, tj. o roční sezóně. Je tudíž součástí řízení denního i ročního programu savčího organismu.

Vysoká noční hladina melatoninu v krvi se pohybuje řádově v koncentraci 10^{-10} M, lze tedy předpokládat, že melatonin bude fyziologicky působit při takto nízkých hladinách. Tomu odpovídají i hodnoty nalezených disociačních konstant pro vazbu

melatoninu na vysoce afinitní receptory na povrchu buněk, a to v rozmezí 10^{-11} až 10^{-10} M^[2]. Tyto melatoninové receptory byly u savců nalezeny přímo v biologických hodinách v suprachiasmatických jádrech, kde navázaný melatonin může ovlivňovat roční cykly, např. v reprodukční aktivitě, a sporadicky v různých částech mozku v závislosti na živočišném druhu. Mimo mozek byly u savců tyto receptory nalezeny i v oční sítnici, kde se melatonin též tvoří, a dále v cévách, slezině a ledvinách.

Kromě výše zmíněných chronobiologických účinků, které jsou zřejmě zprostředkovány vazbou melatoninu na specifické receptory, se melatonin připisuje ještě četné další působení, které není většinou ještě probádáno u lidí a jen nedostatečně u savců. Melatonin údajně působí proti nádorovému bujení a stárnutí. Tento účinek, pokud by byl skutečně dostatečně prokázán, by mohl souviset se schopností melatoninu zbavovat organismus volných radikálů s nespárovaným valenčním elektronem, které mohou dlouhodobě poškozovat velké molekuly jako jsou např. bílkoviny nebo nukleové kyseliny. Tento „čistící“ účinek melatoninu by se však zřejmě mohl projevovat jen při farmakologických dávkách. Ani posilující účinek melatoninu na uměle zeslabený imunitní systém savců nebyl zcela ještě prověřen. Ostatní účinky připisované melatoninu, např. zvýšení sexuální potence, zabránění početí, prodloužení délky života, ochrana kardiovaskulárními onemocněními apod. jsou zatím spíše vysloveným přáním než výsledkem hlubokého bádání.

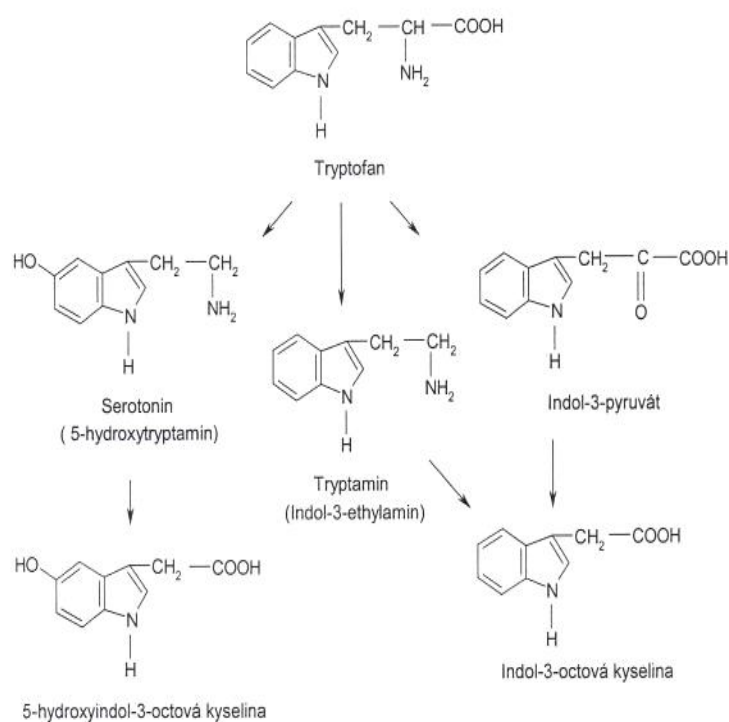
V současné době je možné odpovědně prohlásit pouze to, že melatonin působí jako chronobiotikum.

Podstatou mé bakalářské práce bylo izolovat hlavní metabolit melatoninu- 6-sulfátokymelatoninu (SaMT) extrakcí na pevné fázi (SPE) a následně detekovat SaMT metodou HPLC s fluorescenční detekcí.

2 INDOLOVÉ SLOUČENINY- TRYPTOFAN

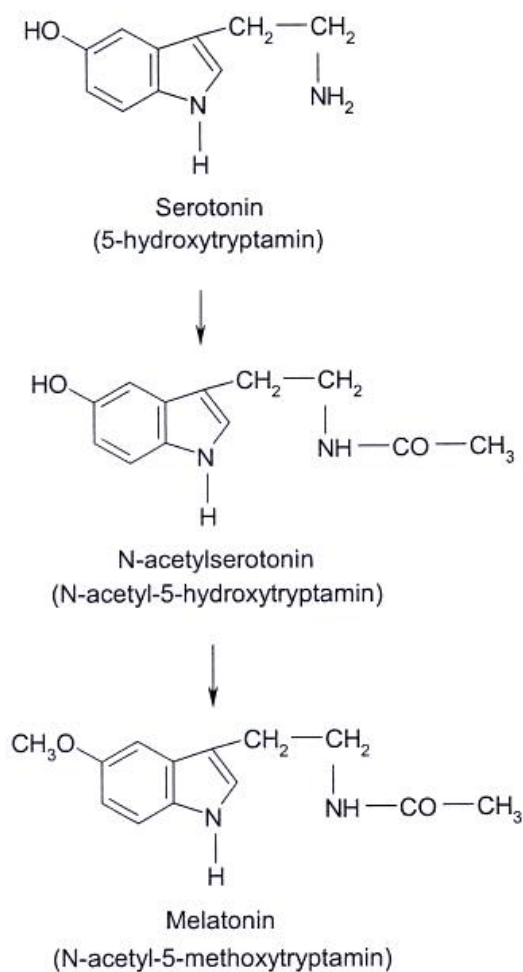
Jedná se o heterocyklické aminosloučeniny, jejichž základ struktury je tvořen indolovým kruhem složeným z benzenového jádra spojeného s pětičlenným kruhem obsahujícím dusík^[3].

2.1 Metabolismus tryptofanu



Tryptofan je jedním z prekurzorů významných biologicky aktivních látek. Metabolismus tryptofanu probíhá přes 3-hydroxyantranilovou kyselinu a cestou indolových derivátů, která dává vzniknout dvěma významným biogenním aminům: tryptaminu (indol-3-ethylaminu) a serotoninu (5-hydroxytryptaminu) [3,4].

Serotonin je neurotransmiterem v mozku i periferních tkáních a funguje též jako lokální hormon. Tvoří se hydroxylací a dekarboxylací z tryptofanu a jeho sekrece podléhá cirkadiálnímu rytmu s nárůstem v průběhu v noci. Serotonin se podílí na příjmu potravy, regulaci krevního tlaku a také má vazokonstrikční účinky. Dále má vliv na vědomí, spánek, smyslové vnímání a též motorickou aktivitu.

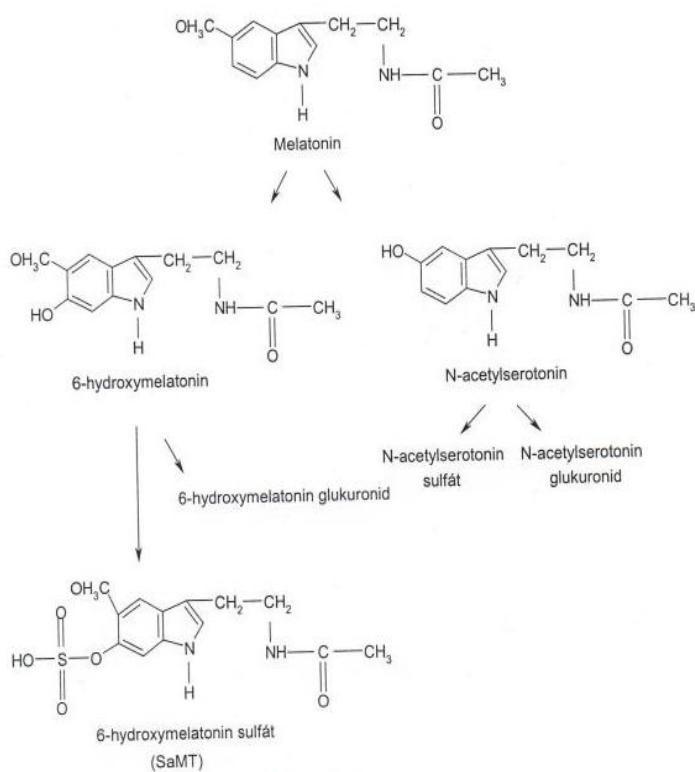


Pomocí enzymu monoaminoxidázy (MAO-A) a aldehyddehydrogenázy je serotonin inaktivován a v podobě kyseliny 5-hydroxyindolctové vylučován močí. Měření močové exkrece 5-hydroxyindolctové kyseliny se využívá

k diagnostice karcinoidu (patologické, přesahuje-li množství 8 μmol (15mg) za den) ^[3,5]. Na udržení činnosti CNS se též podílí i tryptamin.

Serotonin je prekurzorem dalšího významného metabolitu tryptofanu - melatoninu (*N*-acetyl-5-methoxytryptaminu). Melatonin je pomocí metabolické aktivity enzymu arylalkylamin *N*-acetyltransferázy syntetizován acetylací ze serotoninu. Metabolismus melatoninu podléhá hydroxylaci za tvorby 6-hydroxymelatoninu (6-HaMT) a také demethylaci, při které se tvoří *N*-acetylserotonin (NAS).

Z důvodů nízkých fyziologických hladin (pg/ml) melatoninu, je výhodnější jeho stanovení pomocí měření jeho hlavního metabolitu 6-sulfatoxymelatoninu (SaMT) v moči. 6-sulfatoxymelatonin slouží jako hlavní ukazatel množství melatoninu tvořeného epifýzou ^[6].



3 PŘEDÚPRAVA VZORKŮ PŘI ANALÝZE BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Při analýze biologického materiálu je nutná předúprava vzorků, neboť se jedná o složitý systém obsahující velké množství vysokomolekulárních, ale i nízkomolekulárních látek. Sledované analyty jsou ve vzorcích obsaženy v malých množstvích (ppb-ppm), a aby mohly být dále analyzovány, ať už pro identifikaci či kvantifikaci, je nutná jejich co nejúplnější izolace z matrice. Cílem izolace je tedy upravit vzorek do formy vhodné pro následnou analýzu látky. Ve většině případů je nutné, vzhledem k detekčnímu limitu dostupné analytické instrumentace, sledovaný analyt zároveň zakoncentrovat. Při úpravě vzorku je třeba brát v úvahu i stabilitu analytů, tj. jejich sklon k degradaci (tepelné, chemické, enzymatické apod.). Při úpravě biologických vzorků se ve většině případů používá:

- 1) *Extrakce z kapaliny do kapaliny* (liquid-liquid extrakce, LLE)
- 2) *Extrakce na pevných fázích* (solid phase extraction, SPE)

Úprava vzorku (extrakce) před samotným stanovením sledovaného analytu je nejdůležitější úkon, který vede ke konečnému zjištění obsahu látky v matrici. Ideální extrakční metoda by měla být rychlá, levná a nenáročná na provedení. Měla by poskytovat dostatečný a reprodukovatelný výtěžek sledovaných analytů bez jejich ztráty a degradace a dále by měla poskytovat extrakt ihned použitelný k analýze bez dalších koncentračních a čistících kroků. Jak vyplynulo ze statistického výzkumu, který prováděl časopis LC/GC v roce 1991, na přípravu vzorku a zpracování dat se spotřebuje přibližně 85% času spojeného s chromatografickou analýzou^[12]. Proto je třeba tomuto kroku věnovat odpovídající pozornost.

3.1 SPE-extrakce na pevné fázi

Podstata

SPE se skládá z přivedení kapalného nebo plynného zkoušeného vzorku (roztoku) do kontaktu se sorbentem, v důsledku čehož je analyt selektivně adsorbován na povrch pevné fáze. Následuje oddělení sorbentu od roztoku a přidání dalších rozpouštědel (kapalných nebo pevných) s různou funkcí. První rozpouštědlo v pořadí má funkci promývací a jeho úkolem je odstranit adsorbované složky matrice, zatímco druhé, eluční rozpouštědlo způsobuje selektivní desorpci analytu^[8].

SPE je technika, ve které se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalné. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpuštěn.

SPE je nejčastěji používaná při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích látek, rušících následná analytická stanovení. Po extrakci na tuhou fázi je analyt v roztoku, obsahuje minimum interferujících látek a je v dostatečné koncentraci.

3.1.1 Výhody SPE oproti LLE

Extrakce na pevné fázi (SPE) je stále více a více používaná technika k přípravě vzorků, důvodem je široká řada vysoce kvalitních a nyní běžně dostupných materiálů. Při použití SPE se lze vyhnout řadě problémů, které jsou již tradičně spojovány s další metodou přípravy vzorků, s extrakcí kapalina-kapalina (LLE).

Mezi nejdůležitější výhody SPE oproti LLE patří snížení spotřeby organických rozpouštědel, která jsou často řazena mezi látky jedovaté, ničící ozónovou vrstvu, ale i jinak nebezpečné.

SPE umožňuje automatizaci celého postupu a tím lze dosáhnout požadovaného výsledku snadno a rychle. A v neposlední řadě, regenerace SPE kolony dovoluje opětovné použití, čímž klesá i cena procesu.

LLE vyžaduje drahé speciální laboratorní sklo a automatizace procesu je zde obtížně proveditelná a tím i časová náročnost je podstatně vyšší. Mezi další nevýhodu LLE patří tvorba emulzí a nízká citlivost.

3.1.2 Průběh SPE

Celý proces SPE se dělí do pěti po sobě jdoucích kroků:

- Aktivace sorbentu (wetting)
- Úprava sorbentu (conditioning)
- Aplikace vzorku (adsorption)
- Promývání sorbentu (washing)
- Uvolnění analytu (elution)

1. Aktivace sorbentu

Aktivace sorbentu se provádí pro zajištění maximálního vzájemného kontaktu mezi kapalnou a pevnou fází při adsorpci. Při zvlhčení vhodným rozpouštědlem jsou vázané alkylové řetězce sorbentu solvatovány, což zlepšuje podmínky adsorpce. Nedostatečné provedení až vynechání tohoto kroku vede k e snížení výtěžnosti.

Podle druhu sorbentu se volí vhodné rozpouštědlo. Pro normální fázi se obvykle využívá nepolárního rozpouštědla. U nepolárních a iontoměničových sorbentů je vhodné použít s vodou mísitelné rozpouštědla (např. methanol).

2. Úprava sorbentu

Princip úpravy sorbentu spočívá v odstranění nadbytku aktivačního rozpouštědla a příprava sorbentu pro následnou adsorpci analytu.

U reverzních fází se jako promývací rozpouštědlo používá voda nebo vodný roztok pufru, u iontoměničového sorbentu lze použít pufr o pH, při kterém se vyskytují vázané funkční skupiny a analyt s opačným nábojem.

Normální fáze jsou obvykle promývány organickými rozpouštědly, v kterých je daný vzorek rozpuštěn.

Pokud dojde k vysušení sorbentu před tím než je aplikován vzorek, je nutné opět zopakovat promytí sorbentu.

3. Aplikace vzorku-adsorpce

Při průchodu zkoumaného roztoku sorbentem dochází k zadržování stanovované látky na sorbentu. Přiměřený průchod roztoku vzorku skrz extrakční kolonku lze optimalizovat pomocí vakua nebo pozitivního tlaku. Stupeň průtoku má určitý vliv na zadržování určitých sloučenin ve vzorku. Obecně zvýšení průtoku nad určitou kritickou hodnotu má za následek pokles *zlomového objemu* (vyjadřuje maximální množství vzorku, které může být aplikováno na kolonku než dojde k saturaci sorbentu a vymytí analytu^[10]), nižší výtěžnost a eluční objem. Průtok rozpouštědla kolonkou je ovlivněn jejím výběrem. Obvykle by stupeň průtoku u iontoměničové fáze neměl přesahovat 2 ml/min a pro ostatní SPE fáze se uvádí 5 ml/min. U disků rychlost průtoku lze být až 50 ml/min.

Nejvhodnější je odkapávací způsob průtoku, pokud faktorem není čas.

4. Promývání sorbentu

Při promývání sorbentu je požadováno, aby analyt zůstal absorbován a nežádoucí složky matrice byly vhodným rozpouštědlem odstraněny. Jako rozpouštědlo lze použít ten samý roztok, ve kterém je rozpuštěn vzorek nebo jiné rozpouštědlo, které nebude odstraňovat požadované sloučeniny.

Obvyklý objem promývacího roztoku se volí tak, aby nepřesahoval celkový objem extrakční kolonky a u SPE disků se objem pohybuje v rozmezí 5–10 ml.

5. Eluce

Eluce je posledním krokem kompletní SPE metody. Má za úkol uvolnění analytu z pevné fáze elucí analytu za použití vhodného rozpouštědla.

U elučního rozpouštědla je nutná jeho dostatečná eluotropní síla, která způsobí rozrušení vazby analyt – sorbent. Rovněž objem rozpouštědla musí stačit k uvolnění celého množství analytu ze sorbentu^[10]. Při použití menšího objemu elučního rozpouštědla, než byl původní objem vzorku nanesený na sorbent, umožní zkoncentrování stanovované látky^[10]. Poměr objemů vzorků (V_1) a eluční fáze (V_2) nám udává *koncentrační faktor* f .

$$f = \frac{V_1}{V_2}$$

Tab.1 Charakteristika běžně používaných rozpouštědel v SPE

polarita			rozpouštědlo	mísitelnost s vodou
nepolární	silná	slabá	hexan	ne
↓	převrácená	normální	isooktan	ne
↓	fáze	fáze	chloroform	ne
↓	↑	↓	dichlormethan	ne
↓	↑	↓	tetrahydrofuran	ano
↓	↑	↓	diethyl eter	ne
↓	↑	↓	ethyl acetát	mírně
↓	↑	↓	aceton	ano
↓	↑	↓	acetonitril	ano
↓	↑	↓	isopropylalkohol	ano
↓	↑	↓	methanol	ano
polární	slabá	silná	voda	ano
	převrácená	normální	kyselina octová	ano
	fáze	fáze		

3.1.3 Hlavní interakce v průběhu SPE

Při extrakci na pevných fázích se mohou vyskytovat různé interakce mezi analytem a sorbentem, analytem a složkami matrice nebo mezi maticí a

sorbentem^[8]. Je výhodné posílit interakce analyt-sorbent, zatímco interakce analyt-matrice a matrice sorbent potlačit^[8].

Zředěním roztoku, deproteinizací nebo filtrací se dosáhne snížení nežádoucích interakcí. Změnou pH nebo polaritu zkoušeného roztoku se posílí adsorpce. Zvýšením polaritu adsorpčního prostředí se zlepší vazba nepolární sloučeniny na nepolární sorbent a snížením polaritu adsorpčního prostředí napomáhá k vazbě polární sloučeniny na polární sorbent^[8]. Eluce zpravidla vyžaduje opačné podmínky, než které vyžaduje adsorpce. To znamená, když adsorpce analytu probíhá v prostředí o vysoké polaritě, snížením polaritu se usnadní eluce. K roztržení vazebných sil analyt-sorbent a uvolnění analytu z pevné fáze zajišťuje eluční rozpouštědlo, které se zpravidla volí na základě jeho eluotropní síly a sloučitelností s následnou analytickou metodou např. u HPLC, eluotropní síla rozpouštědla by měla být menší nebo rovna síle použité mobilní fáze^[8]. U iontoměničové pevné fáze se dosáhne uvolnění analytu zvýšením iontové síly rozpouštědla nebo změnou pH, což způsobí, že skupiny slabých elektrolytů, které jsou vázané na sorbentu přestanou být nabitě. Disperzní síly působící na analyt na nepolárním sorbentu se přeruší působením nepolárního rozpouštědla.

Lze konstatovat, že provedení SPE je poměrně komplikovaná záležitost, která vyžaduje důkladnou optimalizaci jednotlivých kroků, hlavně adsorpce a eluce^[8].

Přehled hlavních interakčních mechanismů v závislosti na druhu použité pevné fáze:

1) Obrácená fáze

(polární kapalná fáze, nepolární modifikovaná fáze)

Hydrofóbní interakce:

- nepolární-nepolární interakce
- van der Waalsovy nebo disperzní síly

(jedná se o slabé síly, zvýšení se projeví v polárním prostředí)

2) Normální fáze

(nepolární kapalná fáze, polární modifikovaná fáze)

Hydrofilní interakce:

- polární-polární interakce
- vodíkové vazby
- π - π interakce
- dipol-dipol interakce
- dipol-indukovaný dipol interakce

3) Ionovýměnná fáze

Elektrostatické síly

- přitažlivost mezi nabitými skupinami sloučeniny-nabitými skupinami povrchu sorbentu
(k potlačení dochází změnou pH nebo přidáním kompetitivního iontu do roztoku)

4) Adsorpce

- interakce sloučenin s nemodifikovanými materiály

3.1.4 Přehled druhů sorbentů v SPE

Nejdůležitějším krokem SPE je volba správného sorbentu. Před výběrem je třeba zjistit co nejvíce dat o vzorku, to znamená:

- *Chemická povaha stanovované látky*- její funkční skupiny, schopnost ionizace, rozpustnost
- *Vlastnosti matrice*- pH, iontová síla, vodná nebo organická povaha matrice
- *Koncentrace analytu ve vzorku*
- *Mez detekce a citlivosti*
- *Stupeň koncentrace a čistoty*, které je potřeba dosáhnout

Na základě těchto znalostí lze zvolit typ fáze a velikost kolony.

Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou velice podobné. Používají se:

1. reverzní fáze – uhlíkové, polymerní, na bázi silikagelu
2. normální fáze
3. iontově výměnné fáze

a celá řada dalších sorbentů.

Jednotlivé druhy sorbentů se mezi sebou mohou kombinovat.

1. Reverzní fáze

Organická rozpuštěná látka je adsorbována z polární fáze na nepolární sorbent. K eluci se využívají organická rozpouštědla (např. methanol).

a) *Uhlíkové sorbenty*

- aktivní uhlík, vyznačující se vysokou sorpční kapacitou a termální stabilitou
- porézní a grafitový uhlík
- uhlíkové pryskyřice

Uhlíkový povrch se skládá z atomů v hexagonální kruhové struktuře, vzájemně propojených a navrstvených v grafitových plochách. Hexagonální kruhová struktura je silně selektivní pro planární aromatické nebo hexagonální kruhové molekuly. Zadržování analytu je spíše závislé na jeho struktuře (tvar a velikost) než na interakcích funkčních skupin analytu s povrchem sorbentu.

b) *Polymerní sorbenty*

Řadí se vedle fází vázaných na SiO_2 mezi nejvíce používané.

- **Styren-divinylbenzen kopolymerové pryskyřice (ST-DVB)**

se používají k extrakci relativně lipofilních, ale ve vodě rozpustných organických sloučenin. ST-DVB lze také používat ve směsi s **akrylátovými pryskyřicemi**, které se vyznačují vyšší polaritou a tudíž vyšší afinitou pro polární sloučeniny.

Mezi další polymérní sorbenty lze zařadit i polyuretanové, polypropylenové a polytetrafluorethylenové fáze.

c) Fáze vázané na SiO₂

Patří mezi nejvíce používané sorbenty. Obsahují alkylové nebo arylové skupiny substitovaného silanolu vázaného k silikagelovému základu. Výhodou je vysoká kapacita a časté použití v HPLC kolonách, což tvoří kompatibilitu mezi SPE kolonkou a HPLC kolonkou.

Příklady SPE Discovery na obrácených fázích

SPE kolonky se silikagelem DISCOVERY jsou určeny pro aplikace z oblasti farmacie, biochemie, analýzy potravin, analýz životního prostředí, petrochemie a agrochemie.

DSC-18

Polymerně vázaná oktadecylová fáze, (18% C), endcappovaná. Vysoké procento vázaného uhlíku zvyšuje sorpční kapacitu a zaručuje zvýšené výťažky. Používá se pro analýzy organických látek z vodných matric.

DSC-18Lt

Monomerně vázaná oktadecylová fáze, (11% C), endcappovaná. Nízké procento vázaného uhlíku zvyšuje retenci slabě polárních hydrofobních molekul. Zároveň snižuje retenci velkých hydrofobních molekul, které jsou zadržovány na běžné fázi C18 příliš silně. Sorbent nabízí celou řadu nových možností především v analýzách biologických dostupností, kdy selektivně separuje jednotlivé metabolity. Nižší retence zrychluje tento předseparační krok.

DSC-8

Monomerně vázaná oktylová fáze, (9% C), endcappovaná. Pro eluci lze následně použít slabší organická rozpouštědla v nižší koncentraci nebo anorganické pufrů s odpovídající iontovou silou.

DSC-Ph

Monomerně vázaná fenylová fáze, (7% c), endcappovaná. Polarita je podobná jako u fáze oktylové. Při retencích se uplatňují specifické vlastnosti aromatického cyklu a tedy i zvýšená afinita sorbentu pro aromatické molekuly.

DSC-CN

Monomerně vázaná kyanopropylová fáze, (7% C), endcappovaná. Fáze je s výhodou používána ve dvou modech, tedy jako normální i obrácená fáze. Jako obrácená fáze se používá pro předseparace silně hydrofobních látek, které jsou na jiných sorbentech zadržovány příliš silně.

DPA-6S

Polyamidová pryskyřice. Používá se pro sorpci polárních látek, které obsahují OH skupiny (fenoly), ale i celou řadu přírodních látek (taniny, chlorofyl, huminové kyseliny, farmakologicky aktivní terpenoidy, flavonoidy, kyselina gallová, aromatické karboxylové kyseliny apod.).

Příklady SPE Supelclean ENVI obrácené fáze

SPE kolony Supelclean s označením ENVI byly speciálně vyvinuty a testovány pro aplikace z oblasti životního prostředí podle požadavků US EPA.

ENVI-18

Polymerně vázaná oktadecylová fáze, (18% c), endcappovaná. Vysoké procento vázaného uhlíku zvyšuje sorpční kapacitu a zároveň zaručuje lepší stabilitu sorbentu při práci v extrémních podmínkách pH.

ENVI-8

Monomerně vázaná oktylová fáze, (14% c),m encappovaná.

Hisep

Je hydrofóbní nosič, pokrytý hydrofilním polymerem. Porézní polymer zabraňuje adsorpci velkých nežádoucích molekul do silikátového povrchu. Do pórů v polymeru mohou vnikat pouze malé hydrofóbní molekuly, např. léčiva, zatímco velké interferující molekuly, např. proteiny, nejsou zachyceny.

Supelclean grafitizovaný neporézni uhlík

ENVI-Carb – plocha specifického povrchu 100 m²/g

ENVI-Carb C - plocha specifického povrchu 10 m²/g

ENVI-Carb X - plocha specifického povrchu 250 m²/g

ENVI-Carb Y - plocha specifického povrchu 25 m²/g

Neporézni struktura uhlíkové fáze umožňuje rychlé analýzy.

ENVI-Chrom P

Styren/divinylbenzenový kopolymer, vysoce zesíťovaný, s velikostí částic 80-160 µm. Fáze je používána i jako adsorbent. Vysoce rezistentní k extrémním hodnotám pH. Nejčastěji se používá k extrakcím aromatických a fenolických látek.

ENVI-Florisil

Křemičitan hořečnatý, vysoce polární materiál silně adsorbuje polární látky z nepolárních matric.

LC-18 – polymerně vázaná oktadecylová fáze, (10% C)

LC-8 – monomerně vázaná oktylová fáze, (9% C)

LC-4 – endcappovaná, méně hydrofobní než LC-18 a LC-8

LC-Ph – monomerně vázaná fenylová fáze, (5,5% C)

2. Normální fáze

Slouží k extrakci polárních sloučenin rozpuštěných v nepolárním rozpouštědle pomocí adsorpce na polární sorbent. Rozpouštědlo k uvolnění analytu z pevné fáze je obvykle více polární než analyt, s vyšší eluční silou. Pro SPE na normálních fázích se používají aminopropilové, kyanopropylové a propyldiolové fáze^[10].

Přehled SPE Discovery normální fáze

DSC-Si

Nemodifikovaný kyselý praná silikagel patří mezi nejpolárnější sorbent používaný jako normální fáze. Používá se pro separace strukturně podobných molekul postupnou elucí rozpouštědly se stoupající polaritou.

DSC-Diol

Polymerně vázaný 2,3 dihydroxypropoxypropyl (7% C). Je to polární sorbent, velmi často používaná stacionární fáze, u které se s výhodou využívá tvorby vodíkových můstků.

DSC-CN

Monomerně vázaná kyanopropylová fáze (7% C), endcappovaná. Fáze je s výhodou používána ve dvou modech, tedy jako normální i obrácená fáze. Jako normální fáze je používána pro analyty, které jsou na fázích diolových a na silikagelu zadržovány příliš silně.

DSC-NH₂

Polymerně vázaný aminopropyl. Fáze je též používána i jako slabý ionex. Fáze je velmi polární s možností tvorby vodíkových můstků.

Přehled SPE Supelclean normální fáze

LC-CN, LC-Diol, LC-NH₂

3. Iontoměničové sorbenty

Umožňují selektivní extrakci sloučenin s nábojem^[9]. Hlavní mechanismus extrakce analytu z matrice je založen na vysokoenergetické iontové interakci se sorbentem. Polární sloučeniny proto mohou být extrahovány z vody a z polárních organických rozpouštědel.

Při extrakci je pH na takové hodnotě, při níž je molekula analytu ionizována. Analyt je adsorbován na opačně nabitě skupiny sorbentu. Změnou pH dochází k eluci, čímž skupiny přestanou být nabitě a umožní uvolnění látky z pevné fáze. Další možností eluce je zvýšení síly kompetitivního iontu^[10].

V závislosti na podmínkách ionizace se iontoměničové sorbenty dělí do dvou skupin:

- a) **Silné iontoměniče:** výměnná místa jsou ionizována při každém pH.
- b) **Slabé iontoměniče:** jejich ionizace je na pH závislá.

Slabé iontoměniče se používají tehdy, když je analyt, tak mocně přitahován k silnému iontoměniči, že eluce není možná.

Podle druhu měněného iontu se iontoměničové sorbenty rozlišují do dvou typů:

- a) **Katexy:** silné obsahují sulfonovou skupinu, slabé pak skupinu karboxylovou.
- b) **Anexy:** silné obsahují kvartérní aminovou skupinu, slabé sekundární aminovou nebo aminopropylovou skupinu.

Vysoká selektivita iontoměničových sorbentů je dána širokou škálou dostupných materiálů. Selektivita je ovlivněna pH, iontovou silou a průtokem^[10].

V mé praktické části jsem SPE prováděla na iontoměničovém sorbentu, konkrétně na koloně LC-SAX.

Přehled SPE Supelclean iontoměničů

Anexy:

LC-SAX

Skládá se z alifatické kvartérní amino skupiny vázané na silikátovém povrchu. Kvartérní amino skupina je silná báze a vyskytuje se jako pozitivně nabitý kation, který vyměňuje nebo přitahuje aniontové skupiny v roztoku – odtud termín silný anion měnič (SAX- strong anion exchanger). pKa kvartérního aminu je velmi vysoké (vyšší než 14), což způsobuje, že ve vodném roztoku jsou vázané funkční skupiny nabity při každé hodnotě pH. LC-SAX se tedy používá k izolaci silných aniontů (velmi nízké pKa, <1) nebo slabých aniontů (středně nízké pKa, >2) z roztoku o takovém pH, při kterém analyt nese náboj. Při

extrakci kyselých aniontů, pH roztoku musí být o dvě jednotky vyšší, než pKa, při kterém daný analyt nese náboj. Zkoumaný analyt je v mnoha případech silně nebo slabě kyselý. Z důvodu tak silných vznikajících vazeb, LC-SAX se k extrakci silných aniontů používá jen tehdy, když následná eluce silného aniontu není vyžadována. Slabé anionty lze izolovat z LC-SAX, protože je lze eluovat pomocí kyselého roztoku o pH, při kterém jsou slabé anionty zneutralizovány (o dvě jednotky pH níže než jeho pKa).

Pro eluci silných aniontových skupin se používá kolona LC-NH₂.

LC-NH₂

Využívá se hlavně při SPE na normální fázi, ale lze i použít jako slabý iontoměnič (WAX – weak anion exchanger) při extrakci z vodných roztoků. Skládá se z alifatické aminopropylové skupiny vázané k silikátovému povrchu. pKa primární amino funkční skupiny je kolem 9,8. Jako anex lze LC-NH₂ použít pouze v případě, že extrakce probíhá z roztoků o pH alespoň o dvě jednotky nižší než 9,8. pH opět musí mít takovou hodnotu, při které aniontové skupiny analytu nesou náboj. LC-NH₂ se tedy používá k izolaci jak silných, tak slabých aniontů, protože funkční amino skupina na silikátovém povrchu může být zneutralizována a anionty eluovány.

Katexy:

LC-SCX

Skládá se z kyselých alifatických skupin (např. kyselina benzensulfonová) vázaných na silikátový povrch. Sulfonová skupina je silně kyselá (pKa <1) a přitahuje nebo vyměňuje skupiny kationtů v roztoku – odtud termín silný kationtoměnič (SCX-strong cation exchanger). Vázaná funkční skupina nese náboj v celém rozmezí pH, proto lze izolovat silné nebo slabé kationty, pokud pH roztoku odpovídá pH, ve kterém analyt nese náboj. Pro eluci silných kationtů se musí použít LC-WCX.

LC-SCX má největší využití v extrakci silných nebo slabých bází.

LC-WCX

Skládá se z kyselých alifatických karboxylových skupin (např. karboxypropyl) vázaných na silikátový povrch. pKa má kolem 4,8, v roztoku bude negativně nabitá při pH, které je alespoň o dvě jednotky vyšší než tato hodnota. LC-WCX se tedy využívá k izolaci a eluci slabých i silných kationtů, protože kyselá karboxylová funkční skupina může být zneutralizována a kation eluován.

Přehled SPE Discovery iontově výměnné fáze

DSC-NH₂

Polymerně vázaný aminopropyl. Fáze je s výhodou používána ve dvou modech, tedy jako normální fáze nebo slabý ionex. Chová se jako slabý anion s pKa 9,8. Při pH 7,8 nebo nižším je funkční skupina pozitivně nabitá. Jako slabý ionex je s výhodou používána pro silné anionty, které jsou na silných anexech zadržovány příliš silně.

DSC-SAX

Polymerně vázaný kvartérní amin. Používá se pro extrakci slabých aniontů, jako jsou třeba karboxylové kyseliny, které nejsou na slabých anexech zadržovány dostatečně.

DSC-WCX

Polymerně vázaný karboxypropyl. Chová se jako slabý katex s pKa 4,8. Při pH 6,8 nebo vyšším je funkční skupina negativně nabitá. Nejčastěji se používá pro silné kationty, které jsou na silných katexech zadržovány příliš silně.

DSC-SCX

Polymerně vázaná kyselina benzensulfonová. Chová se jako silný katex s pKa < 1,0.

4. Ostatní sorbenty

a) *Sorbenty s atomem kovu*

Atom kovu je imobilizován v polymerním nebo silikagelovém sorbentu pomocí kovalentní vazby mezi funkčními skupinami sorbentu a vnitřními orbitály kovu. Ostatní volné orbitály váží ligandy z mobilní fáze. Analyt je uvolněn z vazby změnou pH nebo přítomností takového ligandu v mobilní fázi, který vytváří s atomem kovu pevnější vazbu^[11].

b) *Sorbenty založené na rozpoznání molekul*

Na základu tvořeném SiO₂ mají kovalentní vazbou vázány protilátky.

c) *Smíšená a víceúčelová SPE*

Jedná se pouze o způsob uspořádání, nikoliv o druh sorbentu.

- Smíšené sorbenty disponují jak nepolárními, tak i iontoměničovými funkčními skupinami. Analyt je zadržován na pevné fázi oběma mechanismy.

- Víceúčelová SPE používá dvou nebo více pevných fází najednou. Účelem je zlepšit vyčištění vzorku^[10].

3.1.5 Konstrukce a doplňky pro SPE

Kapalný vzorek prochází SPE kolonou působením různých sil, které závisí na dané konstrukci použitého přístroje. Zařízení pro provedení SPE se různě liší od jednoduchých až po složitější konstrukce zpracovávající více vzorků najednou.

1. *Jednoduchý kolonový procesor*

Kapalný vzorek je vpraven na SPE kolonku a volně protéká skrz sorbent nebo pomocí stříkačky napojené přes adapter na SPE kolonku se vytvoří dostatečný pozitivní tlak, jehož silou kapalina prochází skrz kolonku. Pozitivní tlak lze získat pomocí vzduchu nebo dusíku.

2. Vakuová nádoba s gumovou zátkou

SPE kolonka se vzorkem je napojena přes gumovou zátku na vakuovou nádobu, která pomocí vakua nasává vzorek skrz kolonku. Vzorek je jímán do zkumavky umístěné ve vakuové nádobě.

3. Centrifuga

SPE kolonka se vzorkem je umístěna do zkumavky, která je vpravena do centrifugy. Pomocí sil vznikajících rotací vzorek prochází skrz kolonku do zkumavky.

4. Zařízení na současné zpracování 12 a 24 vzorků – Vacuum Manifold

Mezi nejznámější se řadí dva typy Visiprep™ SPE Vacuum Manifold – supelco.

Zařízení se skládá z víka se šroubovacími ventily, kontrolujícími průtok a ocelovou jehlou, skleněné nádoby z manometrem na měření vakua a víceúčelového stojánku pro: 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml odměrné baňky.

Visiprep DL Disposable LINER SPE Vacuum Manifold

Je speciální typ, který je používán s teflonovými hadičkami opatřenými polypropylenovým luer zakončením, do kterého se vkládají SPE kolonky. Teflonová hadička se mění před každou analýzou, aby nedošlo ke kontaminaci z předchozích vzorků.

Dolpňky:

Zařízení na vysušení sorbentu – Visidry Drying Attachment

Je sušící zařízení (umístěné v horní části přístroje), které lze používat jednak na vysušení SPE kolonek pro případ používání nemísících se rozpouštědel a nebo pro odpařování vzorků. Napojí se na zdroj inertního plynu, nejčastěji dusíku, který je potom veden jednotlivými kolonkami.

SPE Vacuum Pump Trap Kit

Je nádobka, která se používá na zachycování všech rozpouštědel, kterými se promývá i vymývá, aby byla ochráněna vakuová pumpa.

3.1.6 Hlavní faktory ovlivňující provedení SPE

Cílem této kapitoly je obecné shrnutí významných okolností, které by se měli brát vždy v úvahu, jak před započítím, tak i v průběhu SPE, aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků. Mnohé již bylo uvedeno v předchozích kapitolách.

1) **Výběr elučního rozpouštědla** (viz.eluce)

2) **Průtok rozpouštědla kolonkou během SPE** (viz.adsorpce)

3) **Kapacita SPE kolonky**

Je definována jako maximální množství látky (analytu a ostatních složek matrice) ze zkoušeného roztoku, které může být zadrženo daným množstvím sorbentu^[8].

Množství sorbentu musí být dostatečné pro retenci veškerého analytu ve vzorku. Kapacita kolonky závisí na počtu aktivních míst sorbentu, jeho typu a objemu^[10].

Množství sorbentu, které má být použito, se řídí poměrně jednoduchými pravidly:

- a) Obrácená a normální fáze, adsorbenty-obsah analytů, které mají být zachyceny, by neměl být větší než 5% hmotnosti sorbentu (pokud použijeme 100 mg v 1 ml trubičce, vzorek by měl obsahovat maximálně 5 mg analytů).
- b) Iontoměniče – je třeba počítat s iontově výměnnou kapacitou sorbentu.

Pro volbu velikosti kolonky platí následující tabulka:

Množství vzorku	Velikost kolonky/průměr disku	Množství sorbentu
< 1 ml	1 ml	50 mg/100 mg
1 ml-250 ml, pomalá rychlost extrakce	3 ml	500 mg
10 ml-250 ml rychlé extrakce	6 ml	500 mg
10 ml-250 ml, velká kapacita sorbentu	6, 12, 20, 60 ml	1, 2, 10 g
< 1 litr	6, 12, 20, 60 ml	1, 2, 10 g
100 ml-1 litr	47 mm disk	-
> 1 l, velká kapacita sorbentu	90 mmdisk	-

4) Regenerace kolonky

Pro opětovnou potřebu lze sorbent po použití opět zregenerovat. Iontoměničové se promývají kyselým nebo zásaditým roztokem, hydrofobní sorbenty se obnovují promytím organickým rozpouštědlem. Při opětovném použití sorbentu se musí dbát na to, aby nedošlo k tzv. „paměťovému efektu“, který způsobuje zvýšení výtěžnosti analytu na regenerované kolonce. Proto se doporučuje používat sorbent pouze jedenkrát^[8,11].

4 CÍL PRÁCE

Katedra biofyziky se již dlouho zabývá nalezením vhodných podmínek při stanovení SaMT metodou HPLC s následnou ~~spektrofotometrickou~~-UV nebo fluorimetrickou detekcí a jeho izolací z biologického materiálu, tedy z moči, kde se melatonin vyskytuje ve velmi nízkých fyziologických hladinách (pg/ml), což značně stěžuje možnosti stanovení. Hlavním předpokladem úspěšnosti práce je úprava vzorku (extrakce) před samotným stanovením a vzhledem k detekčnímu limitu SaMT sledovaný analyt zároveň zakoncentrovat.

Cílem bakalářské práce je provedení SPE pomocí kolonky **Supelclean LC-SAX** a zjistit na HPLC s fluorescenční detekcí, zda došlo k požadované sorpci, eluci a v neposlední řadě k dostačujícímu zakoncentrování SaMT z roztoku, při použití Na_2SO_4 jako elučního činidla. Posoudit, zda kolonka LC-SAX je vyhovující pro danou analýzu.

Vhodnost použití SPE kolonky **Supelclean LC-SAX** jsem předpokládala pro její podobné vlastnosti (polymerně vázaný kvartérní amin) s kolonkou Discovery DSC-SAX, která byla na katedře biofyziky zkoumána a osvědčila se jako vhodná pro danou analýzu za daných podmínek¹.

SPE kolonka Discovery a Supelclean se však liší v mechanismu navázání kvartérní amino skupiny na silikagel, což může mít značný vliv na odlišnou kompetici mezi sorbentem-analytem- elučním rozpouštědlem Na_2SO_4 a tím i vliv na požadovanou sorpci, eluci a konečné zakoncentrování SaMT z roztoku.

¹ Hamerníková M., Klimánková K., Košíková V. : Nепublikované výsledky.

5 VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI A DISKUSE

V experimentální části bakalářské práce jsem se zaměřila na předúpravu vzorku při analýze biologického materiálu, konkrétně na extrakci na pevné fázi pomocí kolonky LC-SAX. Snažila jsem se zjistit, zda kolonka Supelclean LC-SAX je též vhodná pro tuto analýzu jako osvědčená kolonka Discovery DSC-SAX.

Analýzu jsem prováděla pouze na zředěném standardním roztoku SaMT, na vzorku moči jsem analýzu po zhodnocení dosažených výsledků dále neprováděla.

Použité přístroje a chemikálie

Při HPLC analýze SaMT a jeho izolaci z roztoku jsem použila:

1. Přístroje a vybavení

Vysokotlaké čerpadlo LC-10 AD_{VP}, Sehimadzu

Fluorescenční detektor RF-10A_{XL}, Sehimadzu

Kolona Supelco-Discovery HS C₁₈ (15 cm * 4,6 mm * 5 μm)

SPE kolonka Supelclean LC-SAX (500 mg, 3ml), Supelco

2. Chemikálie

Octan amonný, ~~HPLC~~, Sigma-Aldrich

6-Hydroxymelatonin, připraven na Katedře biofyziky a fyz. chem. ~~Aldrich~~

Methanol Chromasolv pro HPLC, Sigma-Aldrich

Síran sodný, p. a. Lachema

Ultračistá voda pro HPLC, Faf

5.1 Izolace SaMT z roztoku

Cílem bylo izolovat SaMT z roztoku vzorku za použití extrakce na pevné fázi pomocí SPE kolonky Supelclean LC-SAX. Snažila jsem se získat SaMT ve formě vhodné pro další analytické měření.

5.1.1 Extrakce na pevné fázi

1. Adsorpce

Adsorbovala jsem SaMT na iontovýměnný sorbent. K adsorpci jsem použila 1 ml ~~zředěného~~ roztoku standardu SaMT. Získaný chromatogram ukázal, že došlo k zachycení SaMT na sorbentu při dané koncentraci.

2. Eluce

Eluce adsorbovaného roztoku standardu SaMT z pevné fáze jsem se pokoušela dosáhnout přidáním 1 ml Na₂SO₄ jako elučního rozpouštědla. Z chromatogramu jsem zjistila, že po čtyřikrát opakovaném přidání 1 ml elučního činidla začalo docházet ~~došlo k částečné~~ eluci SaMT ze sorbentu. Eluce byla skončena po přidání **kolika** ml elučního činidla.

Naformátováno: zvýrazněné

Postup práce: Sorbent kolonky jsem před použitím nejprve aktivovala promytím 2 ml MeOH a 2 ml ultračisté vody. Roztok SaMT o koncentraci $1,4 \cdot 10^{-4}$ mol/ml určený pro analýzu jsem připravila smísením 0,3 ml roztoku SaMT (o koncentraci $1,4 \cdot 10^{-3}$ mol/ml) s 3 ml ultračisté vody. Adsorpce vzorku na sorbent probíhala za použití vakua při průtokové rychlosti 0,5 ml/min. Všechny kroky postupu jsem následně ověřovala HPLC analýzou sebraných jednotlivých podílů.

Eluci jsem prováděla promytím sorbentu 1 ml 100 mM Na₂SO₄. Žádoucí eluční rychlost se pohybovala kolem 0,5 ml/min. Jednotlivé frakce jsem jímala do zkumavek a následně opět měřila pomocí HPLC. Promývání elučním činidlem jsem opakovala až do té doby, kdy chromatogramy již zůstaly bez detekční odezvy (došlo k úplné eluci SaMT ze sorbentu).

Mezi jednotlivými nanesenými podíly rozpouštědla jsem dbala na to, aby nedošlo k vyschnutí sorbentu.

5.2 HPLC analýza SaMT

V této části jsem se zabývala detekcí jednotlivých frakcí jímaných při extrakci na pevné fázi.

Postup práce: Nejprve jsem proměřila čistý roztok standardu SaMT ~~přímým nástřikem na HPLC kolonu~~, poté jsem aplikovala jednotlivé frakce sorbce a eluce jímané při extrakci na pevné fázi.

Analýzy proběhly za následujících chromatografických podmínek:

mobilitní fáze 100 mM NH₄Ac : MeOH (4:1), před začátkem měření odplynění pomocí helia, kolona Supelco-Discovery HS C₁₈, fluorescenční detekce (excitační vlnová délka 303, emisní vlnová délka 393 nm), smyčka 20 μm, průtok mobilní fáze 1ml/min, teplota 20°C.

5.3 Naměřené hodnoty, zhodnocení výsledků a diskuse

Analýza prvních tří jímaných elučných frakcí prokázala přítomnost pouze balastních látek, SaMT zůstal bez detekční odezvy, ve čtvrté frakci se odhalil kromě píků balastních látek pík patřící SaMT v oblasti t_r 12,4 min, což odpovídalo t_r standardu SaMT. Chromatogram obsahoval pík patřící SaMT až do deváté frakce, další měření frakcí zůstala v oblasti t_r SaMT bez detekční odezvy (viz. příloha č.1)

Výtěžnost se zdá být stoprocentní, integraci však nelze provést přesně, z důvodu interference píků SaMT se sousedním píkem, který nebyl identifikován (viz. příloha č.2).

Při HPLC analýze sebraných frakcí se daná kolonka Supelclean LC-SAX neosvědčila, jako při použití kolonky Discovery DSC-SAX. V průběhu eluce došlo k rozmytí vzorku SaMT do šesti frakcí, tedy nedošlo k požadovanému zakoncentrování.

Výsledky, kterých jsem dosáhla, nelze kvantitativně vyhodnotit. Vzhledem k těsnému sousedství nečekaného mohutného píku neznámého původu se nepodařilo na CSW stanici spolehlivě integrovat plochu pod píkem SAMT. Z časových důvodů nebyl tento interferující pík zkoumán, pravděpodobně nějakým omylem došlo ke znečištění roztoku standardu.

6 ZÁVĚR

V poslední době se hojně mluví a píše o melatoninu jako o možném zázračném léku konce 20. století. V zahraničí, zejména ve Spojených státech, lze melatonin koupit, obdobně jako vitamíny, nebo-li jako doplněk výživy. Co to melatonin vlastně je, jak se v živých organismech tvoří, jaké mohou být mechanismy jeho molekulárního působení a k léčbě jakých poruch by bylo možné jej používat, jsem shrnula v úvodu teoretické části bakalářské práce. Dále jsem se zaměřila na izolaci hlavního metabolitu melatoninu 6-sulfatoxymelatoninu (SaMT) z biologického materiálu metodou [sorpee-extrakce](#) na tuhé fázi (SPE). Snažila jsem se shrnout nejdůležitější kroky provázející předúpravu biologického materiálu před analýzou. Podala jsem přehled nejběžněji používaných sorbentů a rovněž přehled konkrétních kolonek Supelclean a Discovery používaných v SPE.

Kolonka Supelclean LC-SAX byla předmětem navazující praktické části bakalářské práce, kde jsem prováděla stanovení SaMT ze vzorku podle již známé a spolehlivé metody analýzy, která umožňuje získat zakoncentrovaný a vyčištěný analyt, pomocí kolonky Discovery DSC-SAX.

Vzhledem k odlišné úpravě a čištění vzorku na kolonce Supelclean jsem dosáhla jiných výsledků. Nepodařilo se mi daný analyt zakoncentrovat, čímž se kolonka LC-SAX neosvědčila při tomto způsobu analýzy, za použití Na_2SO_4 (100 mM) jako elučního rozpouštědla.

V případě pokračování analýz SaMT na kolonce Supelclean LC-SAX bude pravděpodobně nutné použít vhodnější eluční rozpouštědlo.

7 SEZNAM LITERATURY

1. Illnerová, H. v Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock, ed. Klein, D.C., Moore, R. Y. a Reppert, S. M., Oxford Univ. Press, New York, str. 197-216 (1991).
2. Morgan P. J. et al.: Neurochem. Int. 10, 010-146 (1994)
3. P. M.M. van Haard, S. Pavel: Chromatography of Urinary Indole Derivatives, J. Chromatogr. 429, 59-94, 1988.
4. E. Marklová, A. Fojtášková, H. Makovičková: HPLC Methods for Determination of Tryptophan and its Metabolites.
5. D. Lincová, H. Farghali: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén, Karolinum, Praha 2002.
6. A. J. Fellenberg, G. Philipou, R. F. Seamark: Specific Quantitation of Urinary 6-Hydroxymelatonin Sulphate by Gas Chromatography Mass Spectrometry, Research 4, 253-256, 1987.
7. A. M. Leone, P. I. Francis, R. E. Silman: The Isolation, Purification and Charakterisation of the Principal Urinary Metabolites of Melatonin, J. Pineal Research 4, 253-256, 1987.
8. M. Moors, D. L. Massart, R. D. McDowall: Analyte Isolation by Solid Phase Extraction (SPE) on Silica-Bonded Phases, Pure Appl. Chem. 66 (2), 277-304, 1994.
9. H. Ingeman, S. J. F. Hoekstra-Oussoren: Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis, J. Chromatogr. B 689, 221-237, 1997.

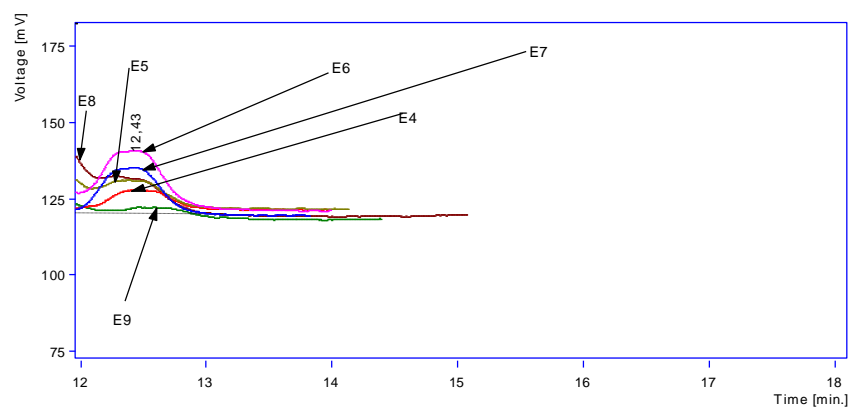
10. V. Walker, G. A. Mills: Solid-phase extraction in clinical biochemistry, Assoc. Clin. Biochem. 39, 464-477, 2002.
11. I. Liška, J. Krupčík, P. A. Leclercq: The Use of Sorbents for Direct Accumulation of Organic Compounds from Water Matrice- A Review of Solid-Phase Extraction Techniques, J. High Resolut. Chromatogr. 1ě, 577-590, 1989.
12. R. Major: LC-GC (9), No. 1, 1991.

Další literatura:

- A.Marešková: Analytické vlastnosti metabolitů tryptofanu, Diplomová práce, FAF 2005.
- RNDr. D. Procházková: Extrakce na tuhou fázi, Laboratorní technika Sigma-Aldrich s.r.o., Praha.
- Bulletin 910: Guide to Solid Phase Extraction, Supelco.

8 GRAFICKÁ PŘÍLOHA

Příloha č. 1: Průběh eluce SaMT



Legenda:

E: eluce SaMT

4-9: pořadové číslo jímáné frakce

t_r SaMT: 12,34 min

Příloha č. 2: Interference SaMT piků s neidentifikovaným pikem v těsné blízkosti, nelze provést přesnou integraci.

