

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Extrakce 6-sulfatoxymelatoninu na pevné fázi II

Diplomová práce

Vypracovala:

Hana Štumpoltová

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Michaela Hamerníková Ph.D.

Hradec Králové 2007

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Michaely Hamerníkové, Ph.D. s použitím uvedené literatury.

V Hradci Králové, květen 2007

.....

Děkuji vedoucí diplomové práce RNDr. Michaela Hamerníkové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, cenné rady a věčný optimismus.

Seznam zkratek

SaMT	6-sulfatoxymelatonin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
SPE	extrakce na pevné fázi
CE	kapilární elektroforéza
HaMT	6-hydroxymelatonin
DMF	dimethylformamid
EIA	enzymová imunoanalýza
RIA	radioimunoanalýza
GC-MS	plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
LC-MS	kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
ACN	acetonitril
THF	tetrahydrofuran
TEA	triethylamin

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl práce	8
3. Teoretická část	9
3.1 Melatonin	9
3.1.1. Funkce melatoninu v organismu	9
3.1.2. Syntéza a vylučování melatoninu	10
3.1.3. Způsob stanovení melatoninu	12
3.1.4. 6-sulfatoxymelatonin	12
3.1.5. Syntéza standardu 6-sulfatoxymelatoninu	12
3.1.6. Metody stanovení SaMT	13
3.2. Stanovení SaMT pomocí HPLC	14
3.2.1. Komplikace při stanovení SaMT	14
3.2.2. Optimalizace podmínek stanovení SaMT	15
3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	16
3.3.1. Představení HPLC	16
3.3.1.1. Přehled základních druhů sorbentů	16
3.3.1.2. Detektory pro HPLC	17
3.3.1.3. Eluční parametry	18
3.3.1.4. Faktory ovlivňující HPLC na reverzních fázích	18
3.3.2. Optimalizace chromatografických podmínek analýzy SaMT	19
3.3.2.1. Zr Carbon C18	19
3.3.2.2. ABZ ⁺ Supelcosil	20
3.3.2.3. Discovery Cyano	21
3.3.2.4. C18 Supelcosil	21
3.3.2.5. Závěr	21
3.4. Extrakce z kapaliny do kapaliny	22
3.4.1. Představení metody	22
3.4.2. Zakoncentrování SaMT ve vodné fázi	22
3.5. Extrakce na pevné fázi	24
3.5.1. Představení metody	24
3.5.1.1. Přehled hlavních interakčních mechanismů	24
3.5.1.2. Přehled základních druhů sorbentů	25
3.5.1.3. Faktory ovlivňující SPE	25
3.5.2. SPE vodného roztoku SaMT	27
3.5.2.1. Supelco NH ₂	27
3.5.2.2. Discovery DSC- Diol	28
3.5.2.3. Discovery DSC-Si	28
3.5.2.4. Accu Bond II Florisi	28
3.5.2.5. Separcol Alu OH	29

3.5.2.6. Accu Bond II ODS-C18	29
3.5.2.7. Discovery DSC-Ph	29
3.5.2.8. Waters Oasis HLB	30
3.5.2.9. Discovery DSC-SAX	30
3.5.2.10. Strata NH ₂	30
3.5.2.11. Závěr	31
3.5.3. SPE moči s přídavkem SaMT	31
3.5.3.1. Discovery DSC-SAX	31
3.5.3.2. Supelco NH ₂	32
3.5.3.3. Amberlite XAD-2	32
3.5.3.4. Závěr	33
3.6. Kapilární elektroforéza	34
3.6.1. Představení metody	34
3.6.2. Kapilární elektroforéza vodného roztoku SaMT	34
3.7. Diskuze a závěr teoretické části	36
4. Experimentální část	37
4.1. Přístroje a ostatní vybavení	37
4.1.1. Chemikálie	37
4.1.2. Přístrojové vybavení	37
4.1.3. Chromatografické podmínky	37
4.1.4. Příprava mobilní fáze	37
4.1.5. Příprava vzorku SaMT	38
4.1.6. Příprava vzorku moči.....	38
4.1.7. Podmínky separace na kolonkách	38
4.1.8. Vyhodnocení HPLC záznamů.....	38
4.2. SPE moči s přídavkem SaMT	39
4.7.1. Discovery DSC-MCAX	39
4.7.2. Discovery DSC-CN	39
4.7.3. Waters Oasis HLB	40
4.7.4. Strata NH ₂	41
5. Diskuse	43
6. Závěr	45
7. Obrazová příloha	46
8. Seznam použité literatury	51

1. Úvod

Stále častěji se odborná i laická veřejnost setkává s pojmem anti-aging medicine. Tento nový medicínský směr si dává za cíl zkoumat možnosti zpomalení procesu stárnutí a prodloužení kvalitně prožitého života. Látkou, která je v této souvislosti často diskutována a která by svými účinky mohla přispět ke zpomalení stárnutí, je i hormon melatonin. Při velkém zájmu o tuto látku bylo přesvědčivě dokázáno, že melatonin působí jako chronobiotikum. Jeho účinků se dnes v některých zemích využívá v terapii nespavosti. Lze očekávat, že budou nalezeny a seriózně potvrzeny i další účinky melatoninu na lidský organismus. O melatoninu se dokonce spekuluje jako o zázračném léku 21. století.

Většimu využití melatoninu v praxi zatím brání absence jednoduché a finančně nenáročné metody stanovení této látky. O nalezení takové metody se snaží rovněž pracovníci Katedry biofyziky a fyzikální chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, kde je předmětem intenzivního studia stanovení melatoninu pomocí jeho majoritního metabolitu 6-sulfatoxymelatoninu.

2. Cíl práce

Cílem teoretické části diplomové práce je podat ucelený přehled výsledků, kterých bylo v posledních letech dosaženo při studiu analytických vlastností 6-sulfatoxymelatoninu (SaMT) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na půdě Katedry biofyziky a fyzikální chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Teoretická část je členěna do několika oddílů. Po úvodním seznámení s problematikou melatoninu a komplikacemi při stanovení SaMT následuje kapitola věnovaná HPLC, představení metody a především pak optimalizaci chromatografických podmínek analýzy SaMT. Práce dále informuje o možnostech předčištění moči jako biologického materiálu a srovnává metodu extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) s extrakcí na pevné fázi (SPE) z hlediska vhodnosti pro zakoncentrování SaMT. Přičemž větší pozornost je věnována SPE, neboť pochopení jejich teoretických základů je nezbytné pro experimentální část. Závěr teoretické části představuje kapilární elektroforézu (CE) jako velmi perspektivní metodu stanovení SaMT.

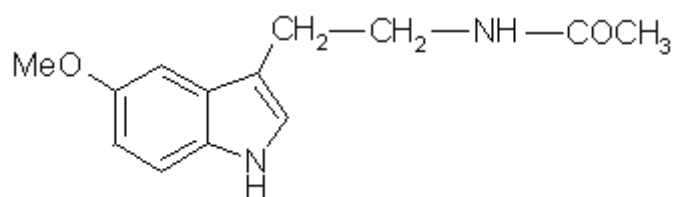
Cílem experimentální části této práce bylo pomocí SPE připravit vzorek moči tak, aby byl použitelný pro následnou kvalitativní a kvantitativní HPLC, resp. CE analýzu SaMT. Snažila jsem se nalézt buď sorbent, který by umožnil selektivní sorpci SaMT z moči, jeho zakoncentrování a následnou kvantitativní eluci, nebo sorbent, který by naopak zadržel balastní látky a samotný SaMT by protekl a byl zakoncentrován na další kolonce.

V návaznosti na práce V. Košíkové a S. Pišové a K. Klimánkové jsem se zaměřila na ty SPE kolonky, které se osvědčily při extrakci standardu SaMT z vodného roztoku a ještě nebyly testovány se vzorkem reálné moči (Waters Oasis HLB a Strata NH₂) a rovněž na nové, ještě netestované kolonky (Supelco DSC-CN a Supelco DSC-MCAX).

3. Teoretická část

3.1 Melatonin

Melatonin je látka s mediačním působením na centrální nervovou soustavu. Poprvé byl izolován v roce 1958 A. Lernerem a spol. z hovězí epifýzy¹. Byl nalezen také v rostlinách a obsahují ho bezobratlí, plazi, ptáci, savci i člověk. Již dlouho jsou intenzivně zkoumány jeho vlastnosti a úloha v organismu. Podmínkou jeho možného terapeutického využití je ovšem nalezení jednoduché a rychlé metody stanovení. Kvantitativní stanovení melatoninu je však omezeno jeho nízkými fyziologickými hladinami (pg/ml). Proto se do popředí zájmu dostává stanovení pomocí jeho metabolitu 6-sulfatoxymelatoninu (SaMT), který je obsažen v ranní moči v množství řádově desítek µg.



Obr. 1: Strukturní vzorec melatoninu

3.1.1. Funkce melatoninu v organismu

Melatonin je hormon, jehož tvorba podléhá výrazné cirkadiální rytmitič. V organismu se uplatňuje jednak hormonálním působením na hypofýzu a hypotalamus, čímž moduluje endokrinní systém a ovlivňuje tak tvorbu a uvolňování dalších hormonů, a jednak přímým působením na tkáň a buňky. Prokázána je účinnost melatoninu jako chronobiotika. Hraje důležitou roli v udržování normálního biorytmu organismu, zejména cyklu spaní a bdění. Je používán k ošetření poruch spánku způsobených posunem časových pásem při transkontinentálních letech². Taktéž pozitivně ovlivňuje proces stárnutí stimulací imunitního systému, kardioprotektivními vlastnostmi, podporou reparačních procesů a stabilizací biologických rytmů³.

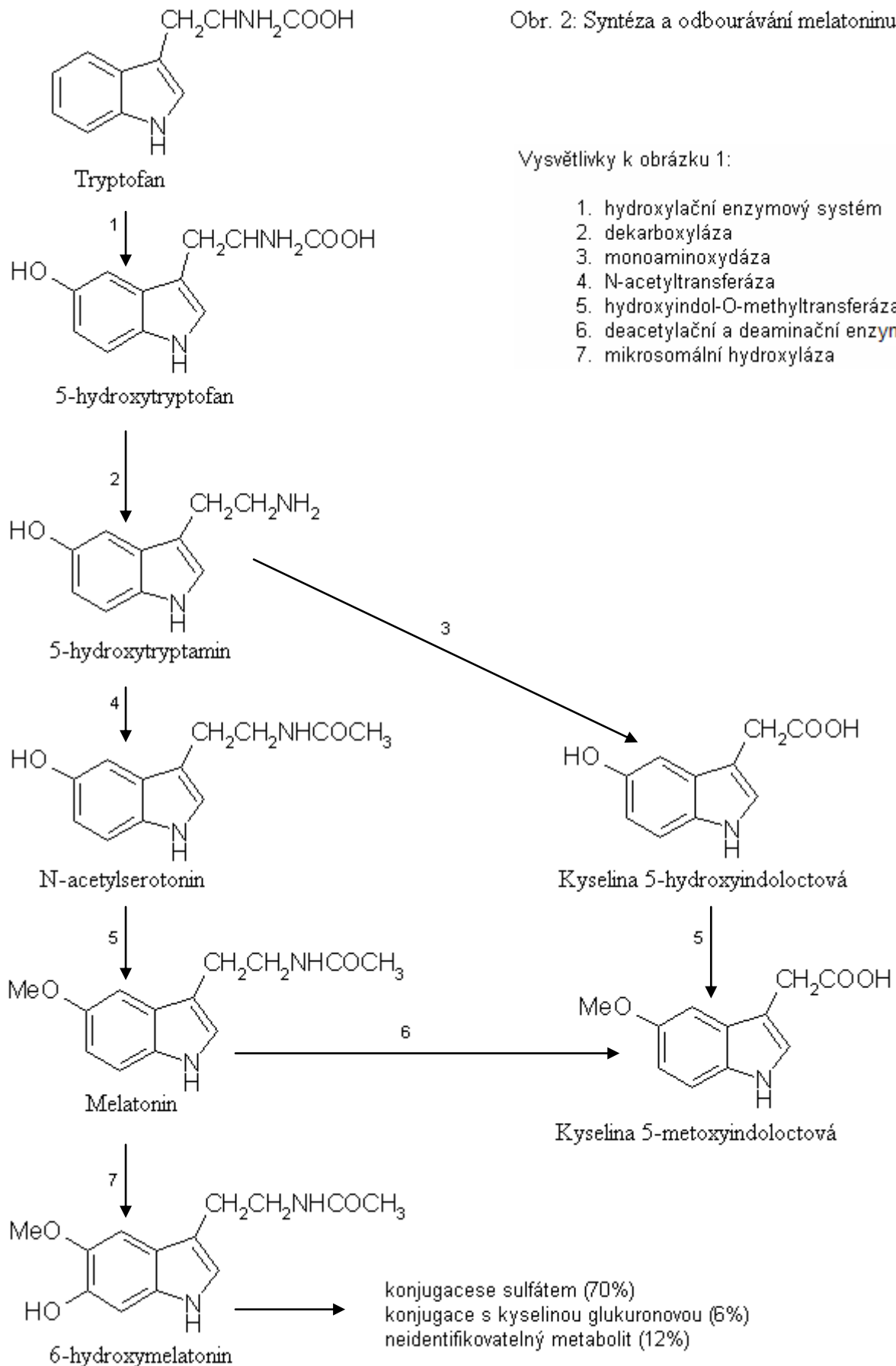
3.1.2. Syntéza a vylučování melatoninu

Melatonin je sloučenina idolové struktury, N-acetyl-5-hydroxytryptamin. Jeho biosyntéza začíná tryptofanem, který vstupuje z cirkulace do pinealocytů, kde je hydroxylován tryptofanhydroxylázou na 5-hydroxytryptamin (serotonin, 5-HT). Serotonin je acetylován N-acetyltransferázou na N-acetylserotonin. Metylací N-acetylserotoninu enzymem hydroxyindol-O-metyltransferázou vzniká melatonin, přičemž donorem metylu je S-adenosylmethionin⁴.

Syntéza melatoninu probíhá v epifyze, následně dochází k jeho uvolnění do krve a mozkomíšní tekutiny. Sekrece melatoninu je mnohonásobně vyšší v noci než ve dne a produkce je inhibována světlem. Je to dáno aktivitou enzymu N-acetyltransferázy, která vykazuje výrazný diurnální rytmus s maximem v tmavé periodě⁴.

Melatonin je z 90% metabolizován v játrech na hlavní metabolit 6-hydroxymelatonin (HaMT) a částečně na N-acetylserotonin. Metabolity jsou z organismu vylučovány téměř výhradně močí a to ve formě svých konjugátů, majoritního sulfátu a minoritního glukuronidu⁴ (viz. Obr. 2).

Obr. 2: Syntéza a odbourávání melatoninu



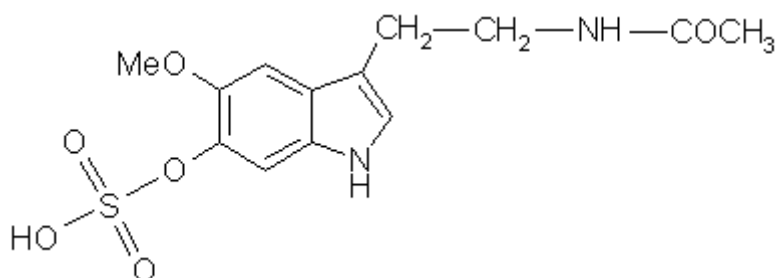
3.1.3. Způsob stanovení melatoninu

Stanovení melatoninu z biologického materiálu je spojeno s řadou problémů. Limitujícím faktorem stanovení jsou především jeho velmi nízké fyziologické hladiny (řádově desítky pg/ml) a také jeho rychlá metabolizace. Dalším problémem je určení doby odběru vzorku, neboť maximum jeho sekrece nastává v noci mezi 24.-3. hodinou a porovnání takto získaných vzorků různých jedinců může být díky tomu poněkud zkresleno.

Je však prokázáno⁴, že množství 6-sulfatoxymelatoninu (SaMT), neboli sulfátového konjugátu 6-hydroxymelatoninu, v ranní moči dobře koreluje s celkovým množstvím melatoninu vyloučeného za noc epifýzou. Více než 80% denní produkce SaMT je vyloučeno v první ranní moči po probuzení.⁵ Díky korelaci mezi množstvím melatoninu a 6-sulfatoxymelatoninu se pozornost přesouvá zejména ke stanovení tohoto metabolitu.

3.1.4. 6-sulfatoxymelatonin (SaMT)

Sulfatoxymelatonin je ester kyseliny sírové s hydroxymelatoninem. SaMT je silný elektrolyt. Jeho pK se pohybuje kolem hodnoty 1 a je plně disociovaný v celé oblasti pH.



Obr.3: Strukturní vzorec 6-sulfatoxymelatoninu

3.1.5. Syntéza standardu 6-sulfatoxymelatoninu

Syntéza SaMT vychází z 6-hydroxymelatoninu^{6,7}, který reaguje při 0°C s kyselinou chlorsulfonovou v prostředí dimethylformamidu (DMF). Vzniklý sulfát je okamžitě izolován sloupcovou chromatografií na florisilu. Při přípravě vlastního SaMT je největším problémem nestabilita produktu za podmínek izolace sloupcovou chromatografií.

3.1.6. Metody stanovení SaMT

Rutinní Stanovení SaMT v moči je popsáno zejména imunologickými metodami (RIA)^{8,9,10} a (EIA)¹¹. Takové stanovení je nákladné a dostupné jen na specializovaných pracovištích. Možné je i užití chromatografických metod (GC-MS)^{6,12} a (LC-MS)¹³ po předchozí dekonjugaci.

Přímé stanovení SaMT pomocí HPLC není dosud popsáno. Vyvinutí takového postupu by znamenalo zásadní průlom ve studiu melatoninu, neboť HPLC je metoda relativně levná a dostupná ve všech laboratořích. Na rozdíl od výše zmíněných metod by současně se SaMT umožnila sledovat prekurzory, respektive další metabolity.

V současnosti se do popředí zájmu dostává rovněž stanovení SaMT prostřednictvím kapilární elektroforézy (CE)^{14,15}.

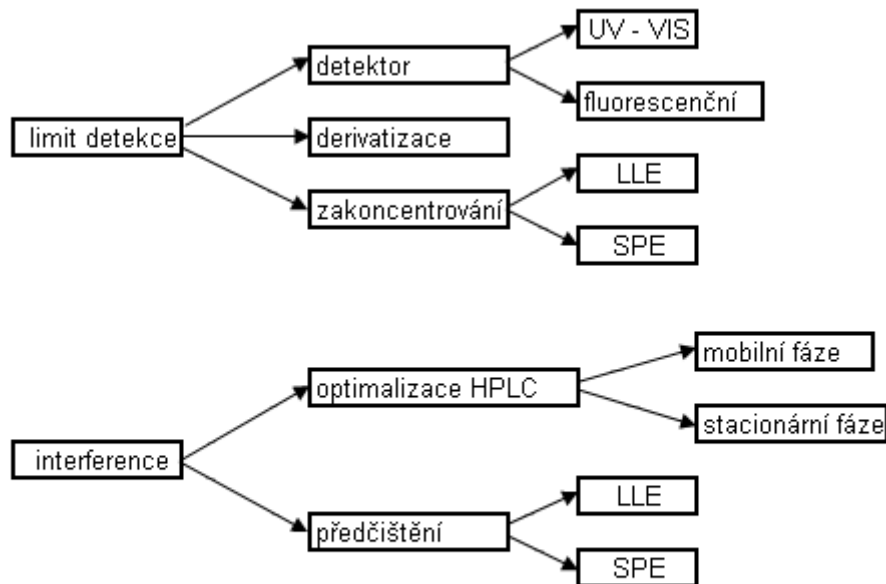
3.2. Stanovení SaMT pomocí HPLC

V úvodu je nutno zdůraznit, že HPLC analýza vysoce polárních látek, tedy i SaMT je problematická. Komplikace působí především nízká retence těchto látek na reverzních fázích. Byly však publikovány práce, které pomocí HPLC stanovily látky obdobné polarity jako SaMT, např. práce¹⁶. Stanovení SaMT má však i jiná úskalí.

3.2.1. Komplikace při stanovení SaMT

■ **Nízké koncentrace SaMT v moči** jsou zásadním problémem, neboť se pohybují na hranici, respektive pod hranicí limitu detekovatelnosti na UV i fluorescenčním detektoru. Poněvadž pokusy o derivatizaci idolového kruhu nebyly úspěšné a vedly jen k malému zvýšení citlivosti detekce¹⁷, je nutné pro HPLC stanovení SaMT zakonzentrovat vzorek před analýzou pomocí LLE či SPE.

■ **Interference s polárními látkami v moči** vede ke hledání vhodné stacionární a mobilní fáze a použití LLE či SPE pro odstranění balastu.

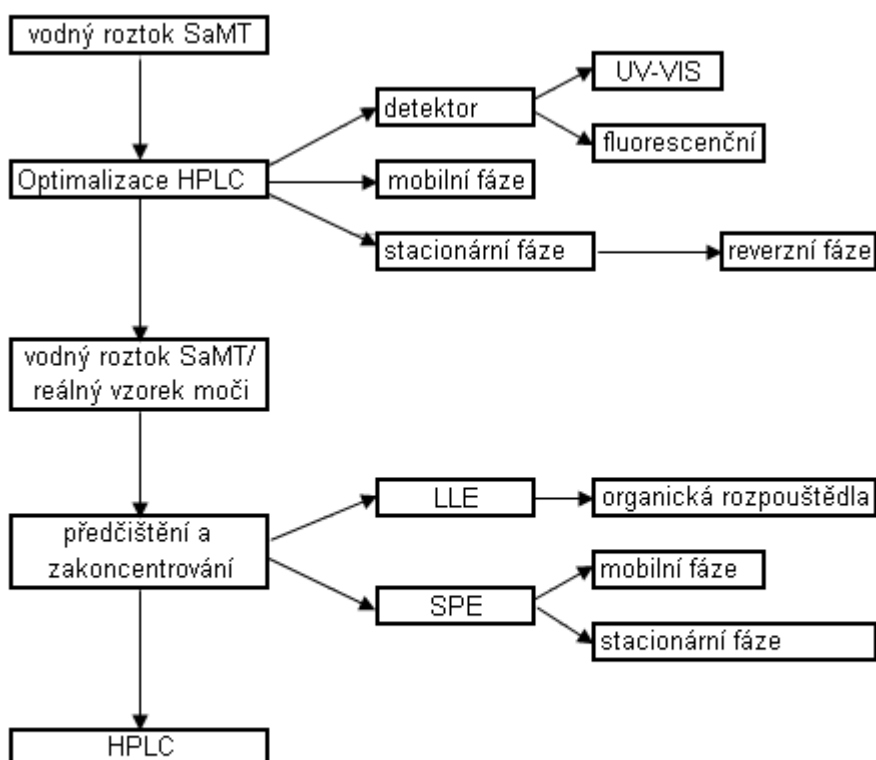


Obr. 4: Komplikace při HPLC stanovení SaMT

3.2.2. Optimalizace podmínek stanovení SaMT

■ **Nalezení vhodných chromatografických podmínek** je prvním krokem k detekci SaMT pomocí HPLC. Je nutné nalézt takovou stacionární a mobilní fázi, které zajistí vysokou retenci SaMT na koloně, rozumný retenční čas SaMT a symetrický pík SaMT.

■ **Nalezení vhodné metody předčištění moči a zakoncentrování SaMT** před HPLC analýzou tak, aby byl na chromatografickém záznamu detekovatelný, jasně rozeznatelný a s ničím neinterferující pík SaMT, který kvantitativně odpovídá obsahu SaMT v moči.



Obr. 5: Postup optimalizace chromatografických podmínek HPLC stanovení SaMT

3.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

3.3.1 Představení HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda, při které dochází k rozdělení složek analyzované směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Pevná, stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé složky analytu. Kapalná mobilní fáze tyto složky ze stacionární fáze eluuje a odnáší ve směru toku. Při chromatografickém procesu se tak ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze. Analyzovaná směs je protlačovaná kolonou tlakem mobilní fáze a látky, které se váží pevněji na sorbent stacionární fáze, prostupují kolonou pomaleji než slabě se adsorbující sloučeniny. K oddělení složek mezi fázemi lze využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu).

Díky těmto možnostem lze nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsí převážně většiny organických látek. HPLC ovšem klade velké nároky na optimalizaci chromatografických podmínek umožňujících rozdělení směsí látek v komplikovaném biologickém materiálu.

3.3.1.1. Přehled základních druhů sorbentů

Sorbent je nejdůležitější součástí SPE, umožňuje rozdělení analyzovaného vzorku mezi pevnou a kapalnou fází. Účinnost separace při HPLC závisí především na typu použitého sorbentu.

■ Chromatografie na reverzních fázích

Chromatografie na reverzních fázích je v současnosti nejpoužívanější metodou. Využívá se k zachycení polárních organických látek na nepolární sorbent, kterým je silikagel s navázanými alkylovými řetězci. Nejčastěji se jedná o oktadecylové skupiny, dále se používají skupiny oktylové. Mobilní fází jsou polární organická rozpouštědla, nejčastěji methanol, acetonitril a tetrahydrofuran.

■ Chromatografie na normálních fázích

Normální fáze slouží k zachycení polárních látek z nepolární mobilní fáze pomocí adsorpce na polární stacionární fázi. Široce používaným sorbentem je silikagel. Na principu chromatografie na normálních fázích fungují např. i kyanokolony či diolkolony, které jsou tvořeny silikagelem se zabudovanou polární funkční skupinou. Jako mobilní fáze se využívá směs nepolárních rozpouštědel, např. izopropylalkohol-hexan. Kyanokolony mohou být použity rovněž jako reverzní fáze.

■ Iontově výměnná chromatografie

Iontoměničové sorbenty jsou určeny pro analýzu látek iontové povahy. K adsorpci dochází díky elektrostatickým přitažlivým silám mezi opačně nabitými funkčními skupinami analytu a sorbentu.

Kationické iontoměniče zachycují kladně nabitě sloučeniny. Silné iontoměniče obsahují sulfonovou skupinu, slabé pak skupinu karboxylovou. Anionické iontoměniče zachycují záporně nabitě sloučeniny. Silné iontoměniče nesou kvarterní amoniiovou skupinu a slabé sekundární aminovou skupinu nebo skupinu aminopropylovou. Volba mobilní fáze je empirická (obvykle 10-100mM pufrů).

■ HILIC chromatografie

The Hydrophilic Interaction Chromatography je nepříliš rozšířená metoda založená na principu hydrofilní interakce. Základním principem je rozdělení analytů do povrchové vrstvy stacionární fáze, která je vysoce obohacena vodou.

3.3.1.2. Detektory pro HPLC

Pro HPLC analýzu je charakteristická vysoká citlivost detekce. Na katedře biofyziky a fyzikální chemie jsou používané níže uvedené detektory, které jsou schopné stanovit látky přítomné v řádu μg až ng/ml .

- **UV-VIS detekce** patří mezi nejběžnější metody
- **fluorescenční detekce** se upřednostňuje při analýze látek o nízkých koncentracích

3.3.1.3. Eluční parametry

■ **Retenční čas (t_R)** je doba, za kterou látka od okamžiku nástřiku prostoupí kolonu a je zaznamenána detektorem v podobě chromatografického píku. Hodnota t_R je v daném systému stacionární-mobilní fáze závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu.

■ **Mrtvý čas (t_M)** je označení pro retenční čas látky, která se nesorbuje a prostupuje kolonou stejně rychle jako mobilní fáze.

■ **Retenční faktor (R)** je poměr mrtvého retenčního času a retenčního času látky A. může nabývat hodnot 0 až 1, přičemž pro chromatografickou separaci je účelné, aby se R pohybovalo mezi 0,2 – 0,8.

■ **Faktor symetrie píku (A_S)** závisí na výšce a šířce chromatografického píku. Ideální symetrie píku je dosažena při hodnotě 1,0. Pokud je faktor symetrie menší než 1,0 znamená to, že pík frontuje. V případě, že je faktor symetrie větší než 1,0 hovoříme o chvostování.

3.3.1.4. Faktory ovlivňující HPLC na reverzních fázích

■ **Kvalita sorbentu**, tj. jeho velikost, stejnoměrnost, tvar a porozita částic ovlivňují separační účinnost kolony. Čím menší a stejnoměrnější jsou částice stacionární fáze, tím větší je účinná plocha kolony.

■ **Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou** ovlivňuje dobu analýzy. Mobilní fáze je čerpána vysokotlakým čerpadlem, které musí umožnit konstantní bezpulzní tok mobilní fáze o malé rychlosti (0,1-10 ml/min) za vysokého tlaku až 40 MPa. Zvýšením průtoku mobilní fáze kolonou dojde ke zkrácení doby analýzy.

■ **Složení mobilní fáze** má vliv na retenci látky na koloně. Retenční čas analytu na reverzní fázi je možno zvýšit redukcí objemu organické složky v mobilní fázi. Při dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší, se používá izokratická eluce s konstantním složením mobilní fáze. Gradientová eluce je pak vhodná pro separaci látek s rozdílnými elučními parametry.

■ **Hodnota pH mobilní fáze** významně ovlivňuje disociaci kyselých a zásaditých látek. Pro analýzu kyselých sloučenin je vhodné nízké pH 2-3, při kterém je potlačena jejich disociace a jsou tak snadněji zadrženy v systému reverzních fází. Analýza bazických látek na reverzních fázích si žádá hodnoty $\text{pH} > 8$.

3.3.2. Optimalizace chromatografických podmínek analýzy SaMT

S cílem najít takovou stacionární a mobilní fázi, které by umožnily co nejlepší sorpci standardu SaMT z vodného roztoku byly na katedře biofyziky a fyzikální chemie testovány kolony **Zr Carbon C18**, **ABZ⁺ Supelcosil**, **Discovery Cyano**, **C18 Supelcosil**. Touto problematikou se zabývaly diplomové a rigorózní práce S. Píšové¹⁸, H. Staňkové¹⁹, A. Mareškové²⁰ a K. Klimánkové²¹.

3.3.2.1. Zr Carbon C18

Tato kolona se skládá z oktadecylového řetězce vázaného na ZrO₂. Na rozdíl od reverzní C18 se Zr Carbon C18 vyznačuje kombinací reverzní fáze a iontovýměnného mechanismu. Atom Zr má volné elektronové d-orbitaly, a interaguje proto s donorem elektronů, kterým mohou být fosforečnanové aniony mobilní fáze. Na adsorbované fosforečnanové aniony jsou pak iontovýměnným mechanismem poutány kationy analytu. Na rozdíl od silikagelové kolony je možné zirkonovou kolonu využít v celém rozsahu pH a při mnohem vyšších teplotách.

S. Píšová ve své rigorózní práci¹⁸ testovala za fluorescenční detekce mobilní fázi **20 mM K₃PO₄:ACN 1:1** a dále mobilní fázi **20 mM K₃PO₄:ACN:THF** o poměrech **50:45:5** a **120:36:4** a **20:1:1** vždy o pH 11,15. SaMT byl eluován s mrtvým objemem, ale zároveň výrazně chvostoval.. Snižování pH na hodnoty 4,41 a 1,87 nevedlo k prodloužení retenčního času. Neperspektivní se ukázaly rovněž mobilní fáze **20 mM K₃PO₄:MeOH** v poměrech **1:1**, **1,5:1** a **2:1** vždy o pH 11,15 a **20 mM K₃PO₄:THF** v poměrech **10:1**, **20:1** a **100:1** o pH 11,15. Chvostování píku nebylo omezeno ani za zvýšené teploty. Zvyšování teploty nemělo rovněž vliv na tvar píku SaMT u mobilních fází **20 mM Na₂B₄O₇:ACN 1:1** o pH 9,43, **20 mM Na₂B₄O₇:THF 1:1** o pH 9,43 a **20 mM KHCO₃:ACN 1:1** o pH 8,57.

Na hledání optimální mobilní fáze navázala diplomová práce A. Mareškové²⁰. Při použití **20 mM K₃PO₄:THF 4:1** o pH 10,4 se SaMT opět eluoval v mrtvém čase. Při změně poměru 20 mM K₃PO₄:THF na **10:3** a **13:1** došlo k prodloužení retenčního času SaMT za cenu chvostování píku. Zvýšení teploty poněkud omezilo chvostování, ale se vzrůstající teplotou se zkracoval retenční čas SaMT.

Při testování mobilní fáze **20 mM KHCO₃:THF 4:1** o pH 8,85 se SaMT eluoval již v mrtvém čase. Po změně poměru na **6:1** a **15,6:1** docházelo ke chvostování píků. Tomu bylo zabráněno zvýšením teploty, ale za cenu zkracování retenčních časů.

Kolona Zr Carbon se pro HPLC analýzu SaMT ukázala být zcela nevhodnou. Zásadním problémem byl příliš krátký retenční čas analytu a chvostování píků. Ke zlepšení retence nevedlo ani zvýšení teploty a úprava pH.

3.3.2.2. ABZ⁺ Supelcosil

ABZ⁺ Supelcosil je kolona na bázi silikagelu s nepolárním uhlíkatým řetězcem C18 se zabudovanou amidovou skupinou. Jedná se o reverzní fázi.

Při hledání optimálního přídatku pufru do mobilní fáze byly K. Klikánkovou²¹ za UV detekce testovány následující směsi: **ACN:KH₂PO₄ 1:6**, **ACN:KH₂PO₄+TEA 1:18**, **ACN:H₂O 2:3** a **MeOH:H₂O 1:6**, přičemž ani u jedné z nich nebyla dosažena potřebná retence analytu.

Sledování vlivu pH a přídatku THF do mobilní fáze proběhlo u **ACN:(NH₄)₂HPO₄ 1:18** o pH 8,2; **ACN:(NH₄)₂HPO₄+TEA 1:18** o pH 7,9; **ACN:(NH₄)₂HPO₄:THF 1:18:0,1** o pH 8,2. Potvrdilo se, že malá změna pH nemá vliv na separaci. Přídavek THF snížil retenci a zlepšil asymetrii píku i účinnost analýzy.

Ke studiu vlivu přídatku THF a MeOH do mobilní fáze byly použity **ACN:CH₃COONH₄ 1:10**, **ACN:CH₃COONH₄ 1:18**, **ACN:CH₃COONH₄:THF 1:18:0,1** a **ACN:CH₃COONH₄:MeOH 1:18:0,1**. Se snižujícím se podílem ACN se zvyšovala retence analytu, přičemž však nedocházelo ke změně asymetrie a účinnosti. Přídavek THF výrazně zlepšil asymetrii a účinnost a zároveň nedošlo k výrazným diferencím v retenci.

Vliv koncentrace pufru v mobilní fázi na separaci SaMT byl sledován u **10mM (NH₄)₂HPO₄** o pH 8,07, **100mM (NH₄)₂HPO₄** o pH 8,13 a **300mM (NH₄)₂HPO₄** o pH 8,09. Se zvyšující se koncentrací pufru se zlepšovala symetrie píků a současně mírně rostla účinnost separace. Retence analytu na koloně zůstala beze změny.

Jako nejlepší mobilní fáze byla posouzena směs **100 mM (NH₄)₂HPO₄:ACN 18:1** a s ní provedena analýza reálného vzorku moči.

3.3.2.3. Discovery Cyano

Tuto kolonu obsahující kyanopropylové skupiny vázané na SiO₂ lze podle typu mobilní fáze použít jak pro HPLC na normální, tak na reverzní fázi. Jako ostatní kolony plněné silikagelem je určena pro rozmezí pH 2-8.

Mobilní fáze **100mM KH₂PO₄:MeOH** v poměru **18:1** a **10:1** vždy s přidavkem 1% kyseliny octové nevedly k zadržení SaMT¹⁸. Rovněž mobilní fáze **100mM NH₄Ac:MeOH** v poměru **5:1** s přidavkem kyseliny octové, úspěšně využívaná při separaci indolových derivátů na C18 vázaných fázích¹⁹, se neosvědčila, neboť SaMT se nezadržel²⁰. Při použití **50 mM NH₄Ac:MeOH 18:1** o pH 4,3 byl retenční čas SaMT 8,8 min²⁰. Při několikrát opakovaných pokusech se však měnil tvar píku. Těchto výsledků bylo dosaženo za UV detekce.

Z provedených měření se jako nejvhodnější, ne však zcela uspokojivé jevílo použití mobilní fáze **50 mM KH₂PO₄ :MeOH 18:1** o pH 4,3.

3.3.2.4. C18 Supelcosil

Použitím **50mM NH₄Ac:MeOH 5:1** nebylo dosaženo přesvědčivých výsledků¹⁸. Mobilní fáze **100mM NH₄Ac:MeOH 5:1** a přinesla dílčí úspěch, když byl retenční čas SaMT 14,29 min. Obdobného výsledku bylo dosaženo při použití UV i fluorescenční detekce¹⁸.

3.3.2.5. Závěr

Kolona Zr Carbon C18 se vůbec neosvědčila, neboť SaMT se na koloně zdržoval jen minimálně, látky v moči prakticky nebyly separovány a zároveň docházelo k výraznému chvostování píků. Při použití ABZ⁺ Supelcosil, Discovery Cyano a C18 Supelcosil bylo dosaženo separace látek obsažených v moči, poměrně uspokojivé retence SaMT a poněkud lepšího tvaru píku SaMT než na koloně Zr Carbon C18, nicméně vzhledem k nedostatečné citlivosti a specifičnosti UV i fluorescenční detekce bylo možné za těchto podmínek provést pouze kvalitativní stanovení SaMT ve vzorku ranní moči.

Kolona	Mobilní fáze	Detektor	t _R SaMT
ABZ ⁺ Supelcosil	100mM (NH ₄) ₂ HPO ₄ :ACN 18:1	UV	13 min
Discovery Cyano	50mM KH ₂ PO ₄ :MeOH 18:1	UV	8,8 min
C18 Supelcosil	100mM NH ₄ Ac:MeOH 5:1	UV	14,3 min

Tab. 1: Srovnání jednotlivých HPLC kolon pro stanovení SaMT v moči

3.4. Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)

3.4.1. Představení metody

Tato metoda je založená na rozdělení látek obsažených v matrix mezi dvě vzájemně nemísitelná rozpouštědla na základě jejich rozdílné rozpustnosti v obou rozpouštědlech²². Obvykle se jedná o vytřepání vodného biologického materiálu organickým rozpouštědlem.

Účinnost extrakce závisí především na rozdělovacím koeficientu látky v obou fázích, přičemž při hodnotách vyšších než 1 přechází látka spontánně do organické fáze. Významným faktorem je rovněž pH vodné matrix. Při hodnotách nižších než pH 5 přecházejí do organického rozpouštědla mnohé kyselé látky, jejichž disociace je za těchto podmínek potlačena. Obdobně je extrakce alkálií usnadněna při pH vyšším než 7.

Nevýhodou LLE je nutnost použití velkých objemů extrakčních rozpouštědel, nízká citlivost, tvorba emulzí, časová náročnost a obtížná automatizace. Nízká citlivost metody může být zvýšena odpařením části rozpouštědla, tento krok však často vede ke ztrátám analytu²³.

3.4.2. Zakoncentrování SaMT ve vodné fázi

Předpokladem pro použití této metody je fakt, že při vytřepání moči jako vodného biologického materiálu organickým rozpouštědlem nepřechází vysoce polární molekula SaMT na rozdíl od méně polárních složek do organické fáze a zůstává ve fázi vodné. Tímto postupem je proto možné zbavit moč méně polárních nečistot, které částečně přejdou do organické fáze. Vhodně zvolenou směsí organických rozpouštědel je navíc možné docílit toho, že tato rozpouštědla pojmu i část vody, a dojde tak ke snížení objemu vodné fáze a zakoncentrování SaMT ve zbylé vodné fázi.

A. Marešková²⁰ se ve své diplomové práci snažila najít optimální poměr organických rozpouštědel **acetonitril, ethylacetát a butanol**.

Praktické provedení

K analýzám A. Marešková²⁰ používala denní moč s přidavkem standardu SaMT o různé koncentraci. Ke 3 ml tohoto roztoku byly postupně přidávány **acetonitril, ethylacetát a butanol** v níže uvedených poměrech. Spojené vodné výtřepky byly následně centrifugovány. Organické fáze byly vakuově odpařeny a suchý produkt rozpuštěn v methanolu.

Následovala HPLC analýza obou frakcí při těchto chromatografických podmínkách: mobilní fáze 50 mM KH_2PO_4 :MeOH (18:1) o pH 4,35, kolona Discovery Cyano, průtok mobilní fáze 1,0 ml/min, detekce UV detektorem o vlnové délce 225 nm.

V organické fázi nebyla ani při jedné detekci zjištěna přítomnost SaMT, a proto se následující výsledky vztahují k analýzám fáze vodné.

Při použití rozpouštědel **acetonitril, ethylacetát a butanol** v poměru **0,5:5:3** a následném zvýšení objemu acetonitrilu na **1:5:3** nedošlo ke snížení objemu vodné fáze.

Při hledání optimálního objemu butanolu od poměru **1,5:15:3** přes **1,5:15:6** po **1,5:15:9** bylo pozorováno postupné ubývání objemu vodné fáze. Opakování pokusů v poměrech **0,5:15:3**, **0,5:15:6** a **0,5:15:9** potvrdilo předchozí zjištění, tj. snížení množství vodné fáze se vzrůstajícím objemem použitého butanolu vedoucí až k úplné ztrátě vodné fáze při objemu 9 ml.

Posledním obměňovaným rozpouštědlem byl ethylacetát. Mezi poměry **0,5:5:3** a **0,5:5:6** v porovnání s **0,5:15:3** a **0,5:15:6** nebyly výraznější rozdíly.

Závěr

Jedná se obtížně reprodukovatelnou a na provedení náročnou metodou, která se pro úpravu moči nehodí. Bylo docíleno jen k nepatrného snížení objemu vodné fáze. Sice byly odstraněny některé méně polární balasty, ale zároveň docházelo k rozkladu SaMT v použitých rozpouštědlech.

3.5. Extrakce na pevné fázi

3.5.1. Představení metody

Extrakce na pevné fázi (SPE) je separační technika založená na stejném principu jako LLE, tj. na rozdělení složek matrice mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Při extrakci jsou látky obsažené ve vzorku rozděleny mezi pevnou a kapalnou fázi, přičemž je analyzovaná látka selektivně adsorbována na povrch sorbentu. Před vlastní aplikací vzorku je nutno sorbent aktivovat vhodným rozpouštědlem, aby byl zajištěn maximální kontakt mezi oběma fázemi. Na pevné fázi se vedle analytu zadrží i další sloučeniny, a proto následuje promývání sorbentu s cílem odstranit nežádoucí součásti vzorku. Za pomoci vhodného rozpouštědla dochází k opětovnému uvolnění balastních látek, zatímco analyt musí zůstat adsorbován. Ve finálním kroku se vhodným rozpouštědlem selektivně eluuje analyzovaná sloučenina.

SPE je metodou jednoduchou a rychlou. Výhodou je potřeba pouze malých objemů vzorků a rozpouštědel a možnost automatizace celého procesu. Mezi nevýhody patří především přítomnost kompetitivních procesů v systému vzorek-sorbent, které mohou vést až k přetížení a ucpání kolonky. Rozdílné vlastnosti stejných typů sorbentů od různých dodavatelů nebo dokonce odlišnosti stejných serií od jednoho dodavatele snižují v některých případech významně reprodukovatelnost.

3.5.1.1. Přehled hlavních interakčních mechanismů

K zadržení zkoumané látky dochází díky níže zmíněným interakcím mezi analytem a sorbentem:

- **Van der Waalovy síly** jsou nescifické přitažlivé síly vzájemně působící mezi nepolárními funkčními skupinami. Označují se též jako hydrofobní a jejich sílu lze zvýšit v polárním prostředí.
- **Polární interakce** zahrnují vodíkové vazby, interakce dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól. Jsou silnější než nepolární interakce. Jejich působení roste v nepolárním prostředí.
- **Elektrostatické síly** patří velmi silné interakce uplatňující se u iontových sloučenin.
- **Kovalentní vazby** jsou nejsilnější vazby a při SPE se tvoří vzácně.

3.5.1.2. Přehled základních druhů sorbentů

Sorbent je nejdůležitější součástí SPE, umožňuje rozdělení analyzovaného vzorku mezi pevnou a kapalnou fází a následné selektivní uvolnění předčištěného a zakoncentrovaného analytu z pevné fáze. Jednotlivé druhy sorbentů se mezi sebou mohou kombinovat pro zlepšení vlastností SPE.

Reverzní fáze

Reverzní fáze se používají k zachycení organických látek z polární kapalné fáze na nepolární sorbent na základě působení slabých Van der Waalsových sil. Eluční rozpouštědla jsou organická, především methanol.

- **uhlíkaté sorbenty:** aktivní uhlík, porézni a grafitový uhlík, uhlíkové pryskyřice. Jsou stálé v širokém rozmezí pH a lze je využít i pro extrakci velmi polárních látek.

- **polymerní sorbenty:** kopolymer styren-divinylbenzen má vysokou afinitu k nepolárním látkám, akrylátové polymery mají díky vyšší polaritě vyšší afinitu k polárním sloučeninám, polyuretany mají charakter slabých iontoměničů, konkrétně anexů.

- **fáze vázané na SiO₂** jsou nejvíce používanými sorbenty pro SPE. Vznikají navázáním příslušné alkylové nebo arylové skupiny na silanolovou funkční skupinu silikagelu. Nejčastěji vázanou fází tvoří oktadecylové skupiny, dále se vyskytují oktylové, cyklohexylové, fenylové a kyanopropylové fáze. Fáze vázané na SiO₂ jsou vhodné pro extrakci polárních i nepolárních látek, jsou stabilní vůči organickým rozpouštědlům i kyselým roztokům.

Normální fáze

Normální fáze slouží k extrakci polárních látek rozpuštěných v nepolárním rozpouštědle pomocí adsorpce na polární sorbent. Vazba je zprostředkována interakcemi dipól-dipól, vodíkovými vazbami nebo π - π interakcemi. Analyt je uvolněn rozpouštědlem a vyšší eluční silou, např. methanolem.

- **oxid hlinitý, oxid křemičitý a křemičitan hořečnatý** na sebe ireversibilně vážou polární látky.

- **SiO₂ s vázanými fázemi** je typ sorbentu, u kterého je eluce analytu možná. Proto se pro extrakci velmi polárních analytů upřednostňuje tato skupina. Pro SPE na normálních fázích se využívají aminopropylové, kyanopropylové a propyldiolové vázané fáze.

Iontoměničové sorbenty

Iontoměničové sorbenty jsou určeny pro extrakci sloučenin s nábojem. K adsorpci dochází díky elektrostatickým přitažlivým silám mezi opačně nabitými funkčními skupinami analytu a sorbentu. Eluce je umožněna změnou pH, kdy funkční skupiny ztratí náboj a mohou být uvolněny ze sorbentu, možné je i vytěsnění kompetitivním iontem. V závislosti na podmínkách ionizace se rozlišují dva typy iontoměničových sorbentů:

- **silné iontoměniče**, kde jsou funkční skupiny ionizovány nezávisle na hodnotě pH.
- **slabé iontoměniče**, u kterých je ionizace funkčních skupin závislá na hodnotě pH, se používají, pokud je analyt k silnému iontoměniči přitahován tak silně, že eluce není možná.

Podle charakteru měněného iontu dělíme iontoměničové sorbenty do dvou skupin:

- **kationické iontoměniče** zachycují kladně nabitě sloučeniny. Silné iontoměniče obsahují sulfonovou skupinu, slabé pak skupinu karboxylovou.
- **anionické iontoměniče** zachycují záporně nabitě sloučeniny. Silné iontoměniče nesou kvarterní amoniiovou skupinu a slabé sekundární aminovou skupinu nebo skupinu aminopropylovou.

3.5.1.3. Faktory ovlivňující SPE

Pro úspěšnou extrakci na pevné fázi je důležitá znalost chemické povahy analytu (funkční skupiny, ionizovatelnost) a vlastností matrice (pH, iontová síla, vodná nebo organická matrice). Na základě toho přistupujeme k výběru vhodného sorbentu, promývacího a elučního rozpouštědla. Na provedení SPE má mimo jiné vliv i :

- **kapacita SPE kolonky**, kdy množství sorbentu musí být dostatečné pro retenci veškerého analytu ve vzorku. Po obsazení všech vazebných míst pevné fáze se analyt již nezadržuje a protéká ven spolu s ostatními částmi matrix.
- **výběr elučního rozpouštědla** o dostatečné eluotropní síle a objemu postačujícímu k uvolnění celého množství analytu z vazby na sorbent.
- **průtok elučního rozpouštědla kolonkou**, který, pokud je příliš vysoký, snižuje výtěžnost eluce a zvyšuje eluční objem.
- **reprodukovatelnost** může být v některých případech významně snížena rozdílnými vlastnostmi stejných typů sorbentů od různých výrobců nebo dokonce v rámci stejné série od jednoho producenta.

3.5.2. SPE vodného roztoku SaMT

Cílem výzkumu na katedře biofyziky a fyzikální chemie bylo nalézt vhodný sorbent, který by nejprve selektivně zadržel SaMT obsažený ve větším objemu vzorku a následně by byl SaMT kvantitativně uvolněn malým množstvím elučního rozpouštědla. Tak by došlo k zakoncentrování SaMT v malém objemu elučního rozpouštědla. Protože se jedná o vysoce polární látku, bylo pravděpodobné, že se zachytí na iontovýměnných fázích. Vzhledem k retenci steroidních sulfátů na reverzních fázích²⁴ byly zkoušeny i reverzní fáze. Touto problematikou se zabývaly A. Marešková²⁰ a následně V. Košíková²⁵. Ta v návaznosti na článek, který popisoval retenci polárního analytu z vodného prostředí na normální fázi²⁶, testovala i normální fáze. Problematice SPE se věnovala i K. Klimánková (dosud nepublikováno).

3.5.2.1. Supelco NH₂

Kolonka obsahuje jako sorbent silikagel s navázanými aminopropylovými skupinami. Jedná se o slabý anionický iontoměnič. Tato stacionární fáze je vhodná pro extrakci záporně nabitých látek.

Aktivaci sorbentu provedla A. Marešková²⁰ 2×2ml methanolu a ke kondicionaci sorbentu byly použity 2×2ml vody. Po nanesení 1 ml vodného roztoku SaMT na sorbent došlo k zachycení veškerého SaMT. K eluci bylo nanášeno vždy po 1 ml a proteklé frakce jímány.

HPLC analýza probíhala za těchto chromatografických podmínek: mobilní fáze 50 mM KH₂PO₄:MeOH (18:1) o pH 4,35, kolona Discovery Cyano, průtok mobilní fáze 1,0 ml/min, detekce UV detektorem o vlnové délce 225 nm.

Jako eluční rozpouštědla byly nejprve bezúspěšně vyzkoušeny **methanol, acetonitril a tetrahydrofuran**. Směs **50 mM KH₂PO₄:MeOH** v poměrech **1:1** a **1:3** a **3:1** o pH 4,35 se rovněž neosvědčila. Ale při použití **100mM KH₂PO₄:MeOH 1:1** o pH 4,35 se podařilo desorbovat přibližně 50% SaMT.

Po nanesení **100mM NH₄Ac:MeOH 1:1** o pH 5,25 se SaMT neeluoval. Následné okyselení na pH 3,62 a posléze na pH 2,9 vedlo ke zvýšení eluce, ale výtěžnost i tak nepřekročila 45%. Při použití **50mM CH₃COOH:MeOH 1:1** o pH 2,90 byla eluční výtěžnost 35%.

Pomocí **100 mM KH₂PO₄:ACN 1:1** k uvolnění SaMT nedošlo, ale po změně poměru složek směsi **100 mM KH₂PO₄:ACN** na **3:1** byla eluční výtěžnost 98%. Výtěžnosti přibližně

60 % bylo dosaženo i při použití směsi **100 mM KH₂PO₄:MeOH 3:1** o pH 4,35 a směsi **100 mM KH₂PO₄: THF 3:1**.

Pro další níže uvedené nosiče, které zkoušela V. Košíková²⁵ platí, že na kolonku bylo vždy naneseno celkem 5ml vodného roztoku SaMT, a to postupně po objemech 1ml. Po 1ml byla nanášena i eluční rozpouštědla.

Detekce proběhla za následujících chromatografických podmínek: mobilní fáze 100mM NH₄Ac:MeOH 4:1, kolona C18 HS (Supelco), průtok mobilní fáze 1ml/min, detekce fluorescenčním detektorem 303/393 nm.

3.5.2.2. Discovery DSC- Diol

Pevnou fázi kolonky tvoří SiO₂, na který jsou navázány krátké alkylové řetězce s polárními hydroxylovými funkčními skupinami. Tento typ sorbentu patří mezi normální fáze zadržující polární analyty ze středně polární až nepolární matrix.

Po aktivaci sorbentu 2×2ml methanolu a kondicionaci sorbentu 2×2ml vody bylo postupně naneseno 5×1 ml vzorku a následně po frakcích jímána prošlá část. Z provedené HPLC analýzy těchto frakcí vyplývá, že SaMT se na tomto typu sorbentu téměř nezadržoval. Zadržel se pouze SaMT z prvního naneseného ml.

3.5.2.3. Discovery DSC-Si

Funkční skupiny účastníci se adsorpce mají charakter volných hydroxylových skupin. Jedná se opět o normální fázi zadržující polární látky.

Na sorbent aktivovaný 2×2ml methanolu a upravený promytím 2×2ml vody bylo postupně naneseno 5×1 ml roztoku SaMT a jímány prošlé jednomililitrové frakce. Analýza prokázala, že došlo k zadržení SaMT pouze z prvního nanesení, zatímco další nanesený SaMT protekl.

3.5.2.4. Accu Bond II Florisil

Je kolonka s křemičitanem hořečnatým jako pevnou fází. Tento vysoce polární materiál silně poutá polární sloučeniny z nepolární matrix. Stejně jako předchozí sorbenty se řadí mezi normální fáze.

Aktivace kolonky byla provedena 2×2ml methanolu a kondicionace 2×2ml vody. Po aplikaci 5×1 ml vzorku a zachycení jednotlivých proteklých frakcí se pomocí HPLC zjistilo, že SaMT se téměř vůbec neadsorboval a objevil se dokonce již v první frakci.

3.5.2.5. Separcol Alu OH

Tento typ sorbentu je tvořen oxidem hlinitým a může být kyselý, neutrální nebo zásaditý. Zde byl užit zásaditý typ vhodný pro extrakci polárních látek. Patří mezi normální fáze.

Jako v předchozích případech byly k aktivaci použity 2×2ml methanolu a ke kondicionaci sorbentu 2×2ml vody. Pevnou fází se nechalo protéci 5×1 ml roztoku SaMT. Pět najímaných frakcí bylo podrobena HPLC analýze se zjištěním, že vůbec nedošlo k zadržení SaMT na daném sorbentu.

3.5.2.6. Accu Bond II ODS-C18

Tato kolonka má sorbent tvořený oktadecylovými uhlíkatými řetězci, které jsou navázané na silikagel. Na rozdíl od výše zmíněných se jedná o reverzní fázi, která se využívá k zachycení organické látky z polární fáze na nepolární sorbent.

Pevnou fází aktivovanou 2×2ml methanolu a upravenou 2×2ml vody se nechal projít vzorek SaMT. Chromatogramy pěti proteklých frakcí ukázaly, že ve všech z nich byl obsažen SaMT, který se tedy na této kolonce téměř neadsorboval.

3.5.2.7. Discovery DSC-Ph

Je kolonka obsahující jako pevnou fází silikagel s navázanými fenylovými skupinami. Je vhodná k extrakci středně polárních nebo nepolárních látek z polární matrice. Použitý sorbent patří mezi reverzní fáze.

Aktivace sorbentu byla jako obvykle provedena 2×2ml methanolu a ke kondicionaci sorbentu byly použity 2×2ml vody. Na kolonku bylo postupně nanášeno po 1 ml roztoku SaMT. HPLC analýza ukázala, že k SaMT nebyl přítomen pouze v první najímané frakci, což znamená, že se SaMT na daném sorbentu příliš nezadržoval.

3.5.2.8. Waters Oasis HLB

Tato kolonka obsahuje jako pevnou fázi kopolymer s hydrofilně-lipofilně vyváženými vlastnostmi. Jedná se o univerzální sorbent, navržený pro zadržení jak polárních tak nepolárních analytů.

Sorbent byl aktivován 2×2ml methanolu a kondicionace sorbentu byla provedena 2×2ml vody. Na kolonku bylo postupně aplikováno po 1 ml vzorku SaMT. Z výsledku analýzy vyplynulo, že se SaMT zadržel na sorbentu. Eluce vodou nebyla úspěšná, SaMT se eluoval až při použití methanolu.

3.5.2.9. Discovery DSC-SAX

Pevná fáze obsažená v této kolonce patří mezi silné iontoměničové sorbenty. Je tvořena alifatickými kvarterními skupinami navázanými na povrch silikagelu. Tyto skupiny jsou silné baze a mají kladný náboj. Sorbent se hodí pro izolaci látek s opačně, tedy záporně nabitými funkčními skupinami.

Jako v ostatních případech byl sorbent aktivován 2×2ml methanolu a dále upraven 2×2ml vody. Na sorbent bylo v pěti krocích naneseno celkem 5 ml roztoku SaMT. Veškerý SaMT se zadržel na kolonce.

K eluci byla neúspěšně zkoušena následující rozpouštědla: **voda, methanol, roztok amoniaku v methanolu a roztok kyseliny mravenčí**. SaMT se uvolnil až při použití roztoku **10 mM Na₂SO₄**. Na kolonku bylo naneseno pětkrát po 1ml Na₂SO₄ a SaMT byl detekován již v první eluční frakci. Pokus byl ještě jednou zopakován s 100 mM roztokem Na₂SO₄ jako elučním rozpouštědlem. Veškerý SaMT se zachytil na sorbentu a při eluci se uvolnil ve druhé, třetí a čtvrté frakci.

3.5.2.10. Strata NH₂

Zde obsažená pevná fáze je tvořena aminoskupinami navázanými na silikagel. Tento typ je vhodný pro zadržení polárních látek buď pomocí vodíkových vazeb nebo jako slabý anionický iontoměnič.

Na sorbent aktivovaný 2 ml MeOH a upravený promytím 2 ml 50mM CH₃COOH o pH 5 byl nanesen 1 ml roztoku SaMT o pH 2. Došlo k zadržení veškerého SaMT.

Následovalo promytí 2 ml 10 mM HCOOH a promytí 2 ml MeOH. K eluci bylo pětkrát použito po 2 ml **200 mM NH₄Cl ve 20% MeOH** o pH 12, přičemž SaMT se

kvantitativně eluoval již v první frakci. Pokus byl proveden celkem třikrát a pokaždé se stejnými výsledky (K. Klimánková – dosud nepublikováno).

Detekce proběhla za následujících chromatografických podmínek: mobilní fáze 100mM NH₄Ac:MeOH 4:1, kolona C18 HS (Supelco), průtok mobilní fáze 1ml/min, detekce fluorescenčním detektorem 303/393 nm.

3.5.2.11. Závěr

Normální fáze se pro zadržení polární molekuly SaMT neosvědčily. Jako potencionálně perspektivní se jevila univerzální Waters Oasis HLB. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo s iontovýměnnými Discovery DSC-SAX a Strata NH₂. K zadržení SaMT došlo i na iontovýměnné Supelco NH₂.

SPE Kolonka	Eluce	Množství eluátu	SaMT ve frakci číslo
Waters Oasis HLB	MeOH	5 x 1 ml	2, 3, 4
Discovery DSC-SAX	100mM Na ₂ SO ₄	5 x 1 ml	2, 3, 4
Strata NH ₂	200 mM NH ₄ Cl ve 20% MeOH	5 x 2 ml	1
Supelco NH ₂	100mM KH ₂ PO ₄ :ACN 3:1	5 x 1 ml	1

Tab. 2: Srovnání SPE kolonek pro eluci standardního roztoku SaMT

3.5.3. SPE moči s přidavkem SaMT

Cílem bylo ověřit výsledky získané s vodným roztokem SaMT, dosáhnout kvantitativní sorpce a kvantitativní eluce SaMT vedoucí k jeho zakoncentrování v elučním rozpouštědle. Vzhledem k vysokému obsahu interferujících látek v moči bylo cílem rovněž odstranění těchto balastů. Protože se výše zmíněné práce A. Mareškové²⁰ a V. Košíkové²⁵ touto problematikou zabývaly jen okrajově, nebyly některé nadějně kolony doposad se vzorkem moči testovány. Pro níže uvedené analýzy byl používány vzorky čerstvé ranní moči s přidavkem standardu SaMT o určité koncentraci.

3.5.3.1. Discovery DSC-SAX²⁵

Aktivace sorbentu byla V. Košíkovou²⁵ provedena 2×2ml methanolu a ke kondicionaci sorbentu byly použity 2×2ml vody. Na kolonku bylo pětkrát nanášeno po 1 ml neupravené moči s přidavkem SaMT. Došlo k zachycení veškerého SaMT na sorbentu.

Jako eluční činidlo byl použit **100 mM roztok Na₂SO₄** nanosený šestkrát po 1 ml. HPLC analýza ukázala, že převážná většina SaMT se eluovala v třetí najímané frakci. Retenční čas SaMT se pohyboval kolem 11. minuty.

HPLC detekce proběhla za následujících chromatografických podmínek: mobilní fáze 100mM NH₄Ac s methanolem v poměru 4:1, kolona C18 HS (Supelco), průtok mobilní fáze 1ml/min, detekce fluorescenčním detektorem 303/393 nm.

3.5.3.2. Supelco NH₂

A. Marešková²⁰ po aktivaci sorbentu 2×2ml methanolu a kondicionaci sorbentu 2×2ml vody na kolonky nanasla po 5 ml moči s přidavkem standardu SaMT. Veškerý SaMT se sorboval na pevné fázi. K eluci bylo nanášeno vždy po 1 ml rozpouštědla

Použití směsi **100 mM KH₂PO₄:ACN 3:1** o pH 4,33 vedlo pouze k částečnému eluci SaMT v první frakci(23%). Po okyselení moči pomocí HCl na pH 2,12 a nanesení na kolonu bylo stejným rozpouštědlem desorbováno v první frakci 21% a druhé frakci 51% SaMT. Při úpravě pH moči pomocí H₃PO₄ na pH 2,35 však k uvolnění SaMT nedošlo a pro jeho eluci musela být použita směs **100 mM KH₂PO₄:MeOH 3:1** o pH 4,33. Uvolnilo se 39% SaMT ve druhé a 22% ve třetí frakci. Zcela nevhodným bylo zalkalizování moči na pH 10,84 pomocí 10 mM roztoku triethylaminu, neboť SaMT se jen omezeně sorboval.

Chromatografické podmínky analýzy byly tyto: mobilní fáze 50 mM KH₂PO₄ : MeOH (18:1) o pH 4,35, kolona Discovery Cyano, průtok mobilní fáze 1,0 ml/min, detekce UV detektorem o vlnové délce 225 nm.

3.5.3.3. Amberlite XAD-2²⁰

Tento typ byl naplněn pevnou fází pryskyřicového charakteru. Stejně jako předešlá kolonka patří mezi iontoměničové sorbenty, má však vyšší afinitu k nepolárním látkám.

Sorbent A. Marešková²⁰ aktivovala patnáctiminutovým stáním v methanolu, následně byl na 10 minut ponořen do vody a pak jím naplněna kolonka. Na takto upravenou pevnou fázi se nanaslo 15 ml zředěné moči (10 ml moči a 5 ml vody) obohacené o standard SaMT (4,8 µg/ml).

V souladu s postupem uvedeným v literatuře⁵ byla kolonka postupně promývána 30 ml vody, 50 ml methanolu, 60 ml vody, 10 ml triethylamonium sulfátu a 30 ml vody, aby se odstranily balastní látky. K eluci SaMT bylo následně použito 50 ml methanolu. Jímaly se frakce o objemu 10 ml.

Na použitém sorbentu nedošlo k dostatečnému zadržení SaMT, který se vymýval ve všech krocích. Tato skutečnost se projevila až analýzou vzorků zakoncentrovaných na vakuové odparce, neboť při HPLC analýze neupravených frakcí bylo množství SaMT pod hranicí detekce. Tato stacionární fáze není vhodná pro izolaci SaMT z moči.

HPLC analýza proběhla za těchto podmínek: mobilní fáze 50 mM KH_2PO_4 : MeOH (18:1) o pH 4,35, kolona Discovery Cyano, průtok mobilní fáze 1,0 ml/min, detekce UV detektorem o vlnové délce 225 nm.

3.5.3.4. Závěr

Pro SPE vzorku SaMT z moči se z testovaných kolonek jako nejvhodnější ukázala být Discovery DSC-SAX, kdy došlo ke kvantitativnímu zadržení SaMT na sorbentu a následně k jeho eluci 100 mM roztokem Na_2SO_4 , přičemž byl SaMT zakoncentrován ve třetí frakci. Užití Supelco NH_2 a Amberlite XAD-2 se potýkalo s průběžným uvolňováním SaMT a nejsou pro další využití příliš perspektivní.

3.6. Kapilární elektroforéza

3.6.1. Představení metody

Elektroforéza je separační metoda umožňující rozdělení nabitých částic na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli, a to buď přímo ve vodném roztoku elektrolytu nebo v nosném médiu jako např. gelu. Pokud je elektrolytem či médiem naplněna kapilára, hovoříme o kapilární elektroforéze (CE).

Rychlost migrace nabité částice kapilárou je přímo úměrná intenzitě elektrického pole, která je funkcí aplikovaného napětí a délky kapiláry. Konstantou úměrnosti je tzv. pohyblivost. Jedná se o veličinu charakteristickou pro daný ion a prostředí. Platí, že malé a více nabité částice mají větší pohyblivost než velké a málo nabité látky.

Významným faktorem ovlivňujícím separaci je množství dávkovaného vzorku. Při příliš velkých objemech dochází ke snížení rozlišení i účinnosti. Naopak malé množství vzorku vede ke zředění analytu a obtížné detekovatelnosti. V praxi se injektuje objem v řádu nl a dávkovaná množství jsou úměrná objemu kapiláry. Na průběh CE má vliv i doba nástřiku vzorku, teplota uvnitř kapiláry, pH roztoku a interakce mezi analytem a stěnou kapiláry.

Detekce analytů v CE se příliš neliší od metod užívaných v HPLC. Mezi nejběžnější metody patří UV-VIS detekce. Při analýze látek o nízkých koncentracích se pak upřednostňují fluorescenční detekce a laserem indukovaná fluorescenční detekce.

Tato metoda se vyznačuje vysokou citlivostí, účinností a reprodukovatelností srovnatelnou s HPLC. Umožňuje separaci až stovek sloučenin v jednom vzorku. Nespornou výhodou je i potřeba minimálního množství vzorku a analytických činidel stejně jako snadná automatizace. Problémem zůstává nutnost předčištění biologického materiálu před analýzou.

3.6.2. Kapilární elektroforéza vodného roztoku SaMT

Předpokladem pro využití CE pro analýzu SaMT je vysoká polarita této molekuly. V literatuře zatím nejsou popsány postupy pro přímé stanovení SaMT touto metodou. Optimalizací podmínek detekce SaMT kapilární elektroforézou se zabývala pouze K. Klimánková ve své rigorózní práci¹⁵.

Praktické provedení

Pro analýzu byl využíván vodný roztok standardu SaMT o určité koncentraci. Kapilární elektroforéza proběhla za těchto podmínek: elektrolyt 100 mM Na₃PO₄, nepokrytá fused-silica kapilára o efektivní délce 20 cm a celkové délce 27 cm, teplota systému 25 °C, detekce UV detektorem diodového pole v rozmezí 190-300 nm.

Výsledky

Prvním krokem bylo zjištění vlivu pH na separaci SaMT. Základním elektrolytem byl zvolen 100 mM Na₃PO₄. Testovalo se pH v rozmezí 1,8 až 3,0. Optimální separace bylo dosaženo při pH 2,2. Pufř měl při této hodnotě největší pufrační kapacitu.

Následovalo zkoumání vlivu napětí na separaci SaMT. Bylo testováno napětí v rozmezí 4-14 kV. S rostoucím napětím se zkracovala doba analýzy a zvyšovala účinnost separace. Optimální napětí bylo stanoveno na 10 kV. Tato hodnota se vyznačovala nejkratším časem analýz a stabilní základní linií. Při napětí vyšším než 10 kV byl systém nestabilní z důvodu vysoké provozní teploty kapiláry.

Hledala se rovněž vhodná délka nástřiku vzorku. Při pH 2,2 a napětí 10 kV byla testována injekce v rozmezí 1-30 s. Bylo zjištěno, že doba injekce pro testované roztoky standardu může být až 30 s, od 20 s však klesá separační účinnost. Limit detekce se pohyboval kolem hodnoty 100 nmol/l. Pro reálné vzorky byla doba injekce stanovena na 6-10 s a limit detekce na 1,5 μmol/l.

Závěr

Tato metoda se jeví jako velmi perspektivní. Je však nutné další testování se vzorky reálné moči.

3.7. Diskuse teoretické části

Při optimalizaci HPLC chromatografických podmínek analýzy SaMT bylo na katedře biofyziky a fyzikální chemie na kolonách ABZ⁺ Supelcosil, Discovery Cyano, C18 Supelcosil dosaženo obdobných výsledků. V dalších pracech pak byla používána především kolona **C18 Supelcosil** s mobilní fází **100mM NH₄Ac:MeOH 4:1**, kterou lze považovat za konečné řešení.

Pro předčištění moči a zakoncentrování SaMT se zcela nevhodnou metodou ukázala být LLE. Vedla jen k částečnému odstranění píků balastních látek s delšími retenčními časy a nevýznamnému zkrácení délky analýzy. Především však došlo k rozkladu SaMT v použitých organických rozpouštědlech. Tato nestabilita byla zjištěna i při syntéze, resp. preparativní sloupcové chromatografii na florisilu s použitím methanolu a chloroformu.

Naopak vhodnou extrakční metodou se ukázala být SPE. Při SPE poskytly nejlepší výsledky iontovýměnné kolonky Discovery DSC-SAX a Strata NH₂. U silného iontoměniče **Discovery DSC-SAX** je k eluci používán **100 mM roztok Na₂SO₄**, a protože síranové anionty nelze odpařit a zůstávají v roztoku se SaMT, kde zvyšují jeho iontovou sílu, není tato kolonka pro HPLC ani CE stanovení SaMT příliš vhodná. V případě slabého iontoměniče **Strata NH₂** je elučním rozpouštědlem **200 mM NH₄Cl ve 20% MeOH o pH 12**, jehož složky mohou být snadno odpařeny a nijak tedy neinterferují při analýze SaMT. Tato kolona je proto mnohem vhodnější. Perspektivní se jeví i **Waters Oasis HLB**.

Kolonky Strata NH₂ a Waters Oasis HLB však doposud nebyly otestovány pro retenci SaMT ze vzorku reálné moči. Moč je komplikovaný materiál obsahující mnoho balastů, které mohou obsadit i vazebná místa sorbentu, která při SPE vodného roztoku obsadil SaMT. To se stalo v případě Supelco NH₂. Ta se osvědčila při retenci SaMT z vodného roztoku, ale potýkala se s průběžným uvolňováním SaMT při nanesení vzorku SaMT v moči.

Velmi perspektivní je stanovení SaMT pomocí CE. Předností této metody je především její vysoká selektivita. Ukázalo se, že použitím vhodného pufru v kyselé oblasti pH lze přispět k větší selektivě analýz. Za těchto podmínek většina kationtů migruje k opačné elektrodě a jen málo anionických sloučenin může interferovat se SaMT. Mobilita SaMT v závislosti na pH zůstává konstantní díky silně záporně nabitě sulfatoxy- skupině. Zjištěné skutečnosti se vztahují k vodnému roztoku standardu SaMT a bude nutné jejich ověření na reálných vzorcích moči. Aby nedocházelo k interferencím na záznamu CE a zanášení kapiláry balastními látkami, zůstává i zde nutnost SPE předčištění moči.

4. Experimentální část

4.1. Přístroje a ostatní vybavení

4.1.1. Chemikálie

6-sulfatoxymelatonin, katedra biofyziky a fyzikální chemie, FaF, ČR

Ultračistá voda pro HPLC, FaF, ČR

Methanol Chromasolv pro HPLC, Sigma-Alrich, Germany

Octan amonný, Lachema, ČR

Acetonitril, Sigma-Alrich, Germany

Kyselina mravenčí p.a., Lachema, ČR

Kyselina octová p.a., Lachema, ČR

Fosforečnan draselný, Lachema, ČR

Fosforečnan sodný dihydrát, Lachema, ČR

Chlorid amonný, Lachema, ČR

Hydroxid sodný, Lachema, ČR

4.1.2. Přístrojové vybavení

Používaný HPLC systém se skládal z fluorescenčního detektoru RF-A_{XL} (Shimadzu) ve spojení s vysokotlakým čerpadlem LC-10AD_{VP} (Shimadzu) a integrátořem stanicí CSW 1.7 (Data Appex). K nástřiku byl používán injektor Rheodyne s 20 µl smyčkou (Supelco).

4.1.3. Chromatografické podmínky

6-sulfatoxymelatonin byl detekován za těchto chromatografických podmínek: kolona Discovery C18 HS (Supelco), mobilní fáze 100 mM NH₄AC:MeOH 4:1, průtok mobilní fáze 2 ml/min, detekce fluorescenčním detektorem 303/393 nm. Na konci pracovního dne byla soustava 20 minut promývána směsí H₂O:MeOH 4:1.

4.1.4. Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze 100 mM NH₄AC:MeOH 4:1 vznikla smísením obou kapalin v daném poměru. Roztok 100 mM NH₄AC byl připraven rozpuštěním pevného NH₄AC v ultračisté vodě a následným přefiltrováním membránovým filtrem s velikostí pórů 0,45 nm (Supelco). Před a v celém průběhu analýzy byla mobilní fáze probublávána heliem s cílem odstranit v ní rozpuštěné plyny.

4.1.5. Příprava vzorku SaMT

Pro všechna měření byl používán zásobní roztok SaMT o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l připravený rozpuštěním standardu synteticky vyrobeného pevného 6-sulfatoxymelatoninu v ultračisté vodě pro HPLC. Zásobní roztok byl uchováván v chladničce.

4.1.6. Příprava vzorku moči

V rámci HPLC detekce SaMT byla použita čerstvá první ranní moč, která byla částečně předčištěna centrifugací (centrifuga Janetzky T24).

Pro potřeby SPE byla používána koncentrovaná moč, moč desetinásobně zředěná ultračistou vodou a moč s přídavkem standardu SaMT o výsledné koncentraci SaMT $0,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tento vzorek byl připraven smísením zásobního roztoku SaMT a moči v požadovaných poměrech. Případně bylo pH vzorku upraveno přídavkem vhodného pufru.

4.1.7. Podmínky separace na kolonkách

Pokusy probíhaly souběžně vždy na dvou a více typově shodných kolonkách. Pro zajištění snazšího průtoku rozpouštědla sorbentem byly kolonky umístěny ve vakuovém manifoldu (Dorcus). Podtlaku bylo využíváno k dosažení doporučené průtokové rychlosti 1-2 ml/min při aktivaci a kondicionaci sorbentu. Nanesení vzorku a eluce proběhly bez vakua. Jednotlivé frakce byly po průchodu sorbentem jímány do zkumavek a analyzovány.

4.1.8. Vyhodnocení HPLC záznamů

Před začátkem SPE testování každé kolonky byla provedena HPLC analýza vodného roztoku SaMT o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l a toho dne používané moči a moči bez s přídavkem SaMT. S jejich chromatogramy se následně srovnávaly s HPLC záznamy jednotlivých frakcí po SPE.

4.2. SPE moči s přidavkem SaMT

4.7.1. Discovery DSC-MCAX

U této kolonky se jedná o kombinaci reverzní fáze a iontoměniče. Využívá dvou retenčních mechanismů, hydrofóbních a elektrostatických interakcí k zadržení kyselin, bazí, neutrálních látek a amoniových solí z vodné matrix. Po nanesení vzorku o pH 3-6 jsou ionizované baze a sole zadrženy elektrostatickou interakcí zatímco kyselá látka, u které je ionizace potlačena jsou poutány hydrofobně. Promytí fosforečnanovým pufrům o pH 3-6 uvolní nebazické hydrofilní složky. Následuje promytí methanolem, které uvolní hydrofobně vázané látky. Baze a amoniové sole jsou eluovány 5% NH₄OH v MeOH.

Úprava sorbentu

K aktivaci sorbentu bylo použito 2×1 ml methanolu. Kondicionace sorbentu proběhla 2×1 ml pufru o pH 6 tvořeného 10mM KH₂PO₄.

Sorpce a eluce

Na kolonku byly nanášeny 2 ml vzorku koncentrované moči s přidavkem SaMT (0,5·10⁻⁴ mol/l). Při SPE došlo k zadržení jen nemnoha balastních látek s retenčními časy kolem 20. minuty a SaMT stejně jako drtivá většina ostatních látek protekl. Úprava moči na pH 2,10 pomocí 10 mM fosforečnanového pufru vedla k obdobným výsledkům.

Závěr

Testovaná SPE kolonka se nehodí pro izolaci SaMT ani pro zachycení v moči přítomných balastů, neboť se na ní téměř nic z matrix nezachytilo. Okyselení vzorku nemělo na retenci vliv.

4.7.2. Discovery DSC-CN

Tato kolonka obsahuje sorbent tvořený kyanopropylovými skupinami navázanými na silikagel. Může být použita jako normální fáze pro izolaci polárních látek z nepolární matrix nebo jako reverzní fáze k zachycení organických látek z polární vodné fáze.

Úprava sorbentu

Aktivace sorbentu proběhla 2×2 ml methanolu. Následovalo promytí 2×2 ml vody.

Sorpce

Na kolonku byly nanесeny 4 ml vzorku koncentrované moči s přidavkem SaMT ($0,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l). Veškerý SaMT se sorboval na pevné fázi stejně jako látky s retenčními časy vyššími než SaMT. Protekly balasty s retenčními časy do 10. minuty (viz. příloha Obr.1).

Úprava moči na pH 2,90 pomocí H_3PO_4 neměla na sorpci zásadní vliv. Opět došlo k zadržení veškerého SaMT a protečení látek s krátkými retenčními časy. Zcela nevhodným se ukázalo být zalkalizování moči na pH 7,95 pomocí 10 mM fosforečnanového pufru, neboť nedošlo k zadržení SaMT ani balastních látek.

Eluce

Po nanесení 1 ml vody došlo k částečnému uvolnění SaMT a látek s kratšími retenčními časy do 16. minuty. Nanесení 1 ml methanolu vedlo k eluci zbytku SaMT a současnému uvolnění předních balastů (viz přílohy Obr.2). Součet obsahu SaMT v obou elučních frakcích přibližně odpovídá celkovému obsahu SaMT.

Závěr

Na kolonce došlo k zadržení veškerého SaMT a jeho uvolnění po nanесení 1 ml vody a 1 ml methanolu. Současně se však ve všech krocích uvolňovaly ostatní složky matrix.

4.7.3. Waters Oasis HLB

Tato kolonka obsahuje jako pevnou fázi kopolymer s hydrofilně-lipofilně vyváženými vlastnostmi. Jedná se o univerzální sorbent, navržený pro zadržení jak polárních tak nepolárních analytů.

Úprava sorbentu

Aktivace sorbentu byla provedena 2×2 ml methanolu, následovala kondicionace nanесením 2×2 ml vody.

Sorpce

Na kolonky byly nanесeny 4 ml vzorku zředěné moči s přidavkem SaMT ($0,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) a 4 ml koncentrované moči s přidavkem SaMT ($0,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l). V obou případech došlo ke kvantitativní sorpci SaMT a rovněž velké části balastních látek. Protekla jen malá

frakce látek s krátkými retenčními časy do 5. minuty (viz. přílohy Obr. 3). Zvýšení objemu nanášeného vzorku zředěné i koncentrované moči na 10 ml vedlo opět k úplné sorpci SaMT i mnoha balastů a protečení látek s krátkými retenčními časy. Snížení pH moči na hodnotu 2,97 nemělo na sorpci látek na koloně zásadní vliv.

Eluce

K eluci byl nanášen 10×1 ml vody. V žádné z prošlých frakcí se neeluoval SaMT. Uvolnily se pouze látky s krátkými retenčními časy (viz přílohy Obr. 4). To platilo pro moč zředěnou i koncentrovanou i moč s nízkým pH, u které se navíc uvolnila část látek s retenčními časy kolem 9. minuty. Stejných výsledků bylo dosaženo opakovanými pokusy.

Následovalo nanášení methanolu v objemu 1 ml. Již v první frakci došlo ke kvantitativní eluci SaMT a rovněž k uvolnění převážné většiny ostatních látek s kratšími i delšími retenčními časy než SaMT (viz přílohy Obr. 4). Část balastů se eluovala i v druhé methanolové frakci, nikoli však SaMT (viz přílohy Obr. 4). Zopakování pokusu vedlo ke stejným výsledkům.

Závěr

Stejně jako při SPE vodného roztoku SaMT¹⁸ došlo i při SPE SaMT z moči k jeho kvantitativnímu zadržení a následnému kvantitativnímu uvolnění a zakoncentrování v 1 ml methanolu. Zároveň však byly zachyceny mnohé balastní látky, které se z velké části eluovaly v první methanolické frakci stejně jako SaMT. pH matrix nemělo na průběh SPE výrazný vliv.

Několikerým opakováním pokusu se ukázalo, že sorpce jednotlivých složek matrix velmi výrazně závisí na rychlosti průtoku vzorku kolonkou. Analýzy vyžadovaly naprosto stejné podmínky pro všechny kolonky. Tato metoda je těžko reprodukovatelná.

4.7.2. Strata NH₂

Zde obsažená pevná fáze je tvořena aminoskupinami navázanými na silikagel. Tento typ je vhodný pro zadržení polárních látek buď pomocí vodíkových vazeb nebo jako slabý anionický iontoměnič.

Úprava sorbentu

Aktivace kolonky proběhla 4 ml methanolu. Ke kondicionaci sorbentu byly zvoleny 4 ml pufru o pH 5 tvořeného 50mM kyselinou octovou. Následovalo nanesení 4 ml vzorku moči o pH 5, promytí 4 ml 10 mM kyseliny mravenčí a promytí 6 ml methanolu. K eluci byl použit 200 mM NH₄Cl ve 20% MeOH o pH 11,25.

Sorpce

Po nanesení vzorku o obvyklé koncentraci SaMT ($0,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na kolonku, se ukázalo, že část SaMT se na kolonce nezachytila. Protékla i část nečistot s retenčním časem do 15 minut.

S cílem zjistit limitní koncentraci SaMT, při které ještě dochází k jeho kvantitativnímu zadržení ze vzorku reálné moči, byla vytvořena koncentrační řada o těchto koncentracích SaMT: $0,05 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $0,1 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $0,2 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $0,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l, $0,4 \cdot 10^{-4}$ mol/l a $0,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Pouze při koncentraci $0,05 \cdot 10^{-4}$ mol/l a $0,1 \cdot 10^{-4}$ mol/l došlo k jeho plnému zachycení na sorbentu (viz přílohy Obr. 5).

Eluce

Promytí 4 ml 10 mM kyseliny mravenčí a promytí 6 ml methanolu nevedlo k uvolnění SaMT (viz. přílohy Obr.6). Následně byl nanesen 3×1 ml roztoku amoniaku v methanolu, přičemž SaMT se eluoval pouze v první a druhé frakci (viz. přílohy Obr.7). Současně však došlo k eluci mnoha balastů před i za píkem SaMT. Stejných výsledků bylo dosaženo i při zopakování celého postupu.

Závěr

Na rozdíl od SPE vzorku vodného roztoku SaMT (K. Klimánková – dosud nepublikováno), kde došlo ke kvantitativnímu uvolnění SaMT v první eluční frakci, byl zde uvolněn v prvním a rovněž druhém mililitru eluátu. Ovšem při koncentracích SaMT $0,2 \cdot 10^{-4}$ mol/l a vyšších již nedošlo k jeho úplnému zadržení a uvolňoval se ve všech krocích. Současně se SaMT se uvolňovaly i nečistoty.

5. Diskuse

V experimentální části diplomové práce jsem navázala zejména na výsledky výzkumu A. Mareškové²⁰, V. Košíkové²⁵ a K. Klimánkové (dosud nepublikováno), které se na katedře biofyziky a fyzikální chemie zabývaly problematikou SPE vodného roztoku SaMT. Cílem mé práce bylo, kromě testování dalších kolonek, ověřit tyto výsledky při SPE reálné moči s přídatkem SaMT.

Protože SaMT je vysoce polární látkou, bylo pravděpodobné, že se zachytí na iontovýměnné **Strata NH₂**. Pro univerzálnost k zadržení jak polárních tak nepolárních analytů jsem testovala **Discovery Oasis HLB**. Obě kolonky se již dříve osvědčily při SPE vodného roztoku SaMT^{20,25}. Vzhledem k v literatuře publikované retenci steroidních sulfátů na reverzních fázích²⁴ byla testována **Discovery DSC-CN**, která může být použita jako reverzní nebo normální fáze. Velké naděje byly vkládány do **Discovery DSC-MCAX**, která je kombinací reverzní fáze a iontoměniče a patří k jednomu z nejselektivnějších SPE systémů.

Stejně jako u předešlých prací se ukázalo, že výsledky dosažené s vodným roztokem SaMT mnohdy neplatí pro reálnou moč. V případě **Strata NH₂** se balastní látky z moči navázaly i na ta vazebná místa, která při SPE vodného roztoku obsadil SaMT. SaMT se tak sorboval jen částečně a z vazby na sorbent byl postupně uvolňován ve všech dalších krocích. Při koncentraci SaMT $0,1 \cdot 10^{-4}$ mol/l a nižších však došlo k jeho kvantitativnímu zadržení ze vzorku moči a následnému uvolnění v první a druhé eluční frakci **200 mM NH₄Cl ve 20% MeOH** o pH 11,25.

V případě **Waters Oasis HLB** se všechen SaMT sorboval i při koncentraci SaMT $0,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Ukázalo se však, že kvantitativní sorpce je docílena pouze při velmi nízké a konstantní rychlosti průtoku vzorku sorbetem. Na rozdíl od SPE vodného roztoku²⁵, byl ale SaMT kvantitativně eluován díky koncentrační síle moči již v první methanolické frakci.

Díličího úspěchu bylo dosaženo rovněž s **Discovery DSC-CN**. Na rozdíl od dříve testovaných reverzních fází, kde nedošlo k zadržení SaMT²⁵, byl na **Discovery DSC-CN** SaMT kvantitativně sorbován. Menší část SaMT se eluovala první vodné frakci a zbylé množství pak v první methanolické frakci.

Neosvědčila se **Discovery DSC-MCAX**. Překvapivě na ní nedošlo k zadržení téměř žádných složek matrix. Kromě vysoce polárního SaMT, jehož pK se pohybuje kolem hodnoty 1 a je plně disociovaný v celé oblasti pH, obsahuje moč zřejmě mnoho dalších kyselých látek, jejichž ionozace nebyla úpravou pH potlačena, a nedošlo tak k jejich sorpci na nepolární části tohoto směsného sorbentu.

Analýza tak komplikovaného biologického materiálu jako je moč měla mnohá úskalí. Problematickou se jevila již samotná délka analýzy, která se díky přítomnosti velkého množství látek, a to i při průtoku mobilní fáze 2 ml/min, pohybovala kolem 45 minut. Retenční čas SaMT přitom byl kolem 13.minuty. Vzájemná interference jednotlivých balastů někdy vedla i k překrytí píku SaMT a nemožnosti ho detekovat. Úprava pH s cílem potlačit disociaci slabých kyselin a ovlivnit tak jejich retenci na kolonkách neměla na množství interferujících látek žádný vliv.

6. Závěr

Cílem teoretické části diplomové práce bylo podat ucelený přehled výsledků, kterých bylo v posledních letech dosaženo při studiu analytických vlastností 6-sulfatoxymelatoninu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na půdě Katedry biofyziky a fyzikální chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Cílem experimentální části této práce bylo navázat na výsledky předchozích prací a pomocí SPE připravit vzorek moči tak, aby byl použitelný pro následnou kvalitativní a kvantitativní HPLC analýzu SaMT, tedy zakoncentrovat a předčistit. Testovala jsem kolony **Discovery DSC-MCAX, Discovery DSC-CN, Discovery Oasis HLB a Strata NH₂**.

Snahy o zakoncentrování SaMT byly úspěšné. Na **Discovery Oasis HLB** došlo ke kvantitativnímu zadržení a následnému zakoncentrování SaMT v 1 ml methanolu. Problémem byla obtížná reprodukovatelnost sorpce, která byla příliš závislá na rychlosti průtoku vzorku sorbentem. Velmi perspektivní se jeví **Strata NH₂**. Při opakovaných pokusech byl všechen SaMT zadržen na kolonce a uvolněn 2 ml 200 mM NH₄Cl ve 20% MeOH o pH 11,25.

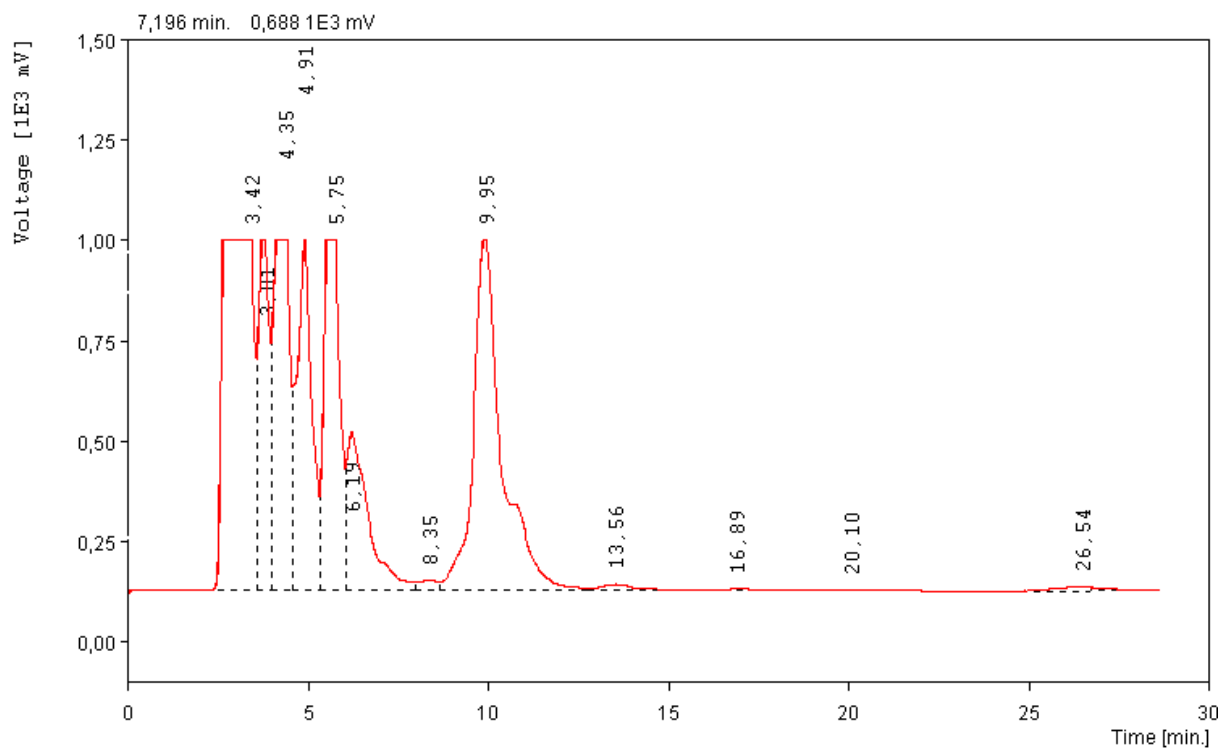
Předčištění vzorku bylo velmi problematické. U všech kolonek byly balasty uvolňovány ve všech krocích. Eluce SaMT vždy vedla k současnému uvolnění látek s kratšími i delšími retenčními časy než SaMT.

SPE metoda, která by dokázala předčistit a zároveň zakoncentrovat SaMT na jedné kolonce nebo kombinací kolonek, kde by první zachytila nečistoty a na druhé došlo k zakoncentrování SaMT, tak dosud nebyla vyvinuta.

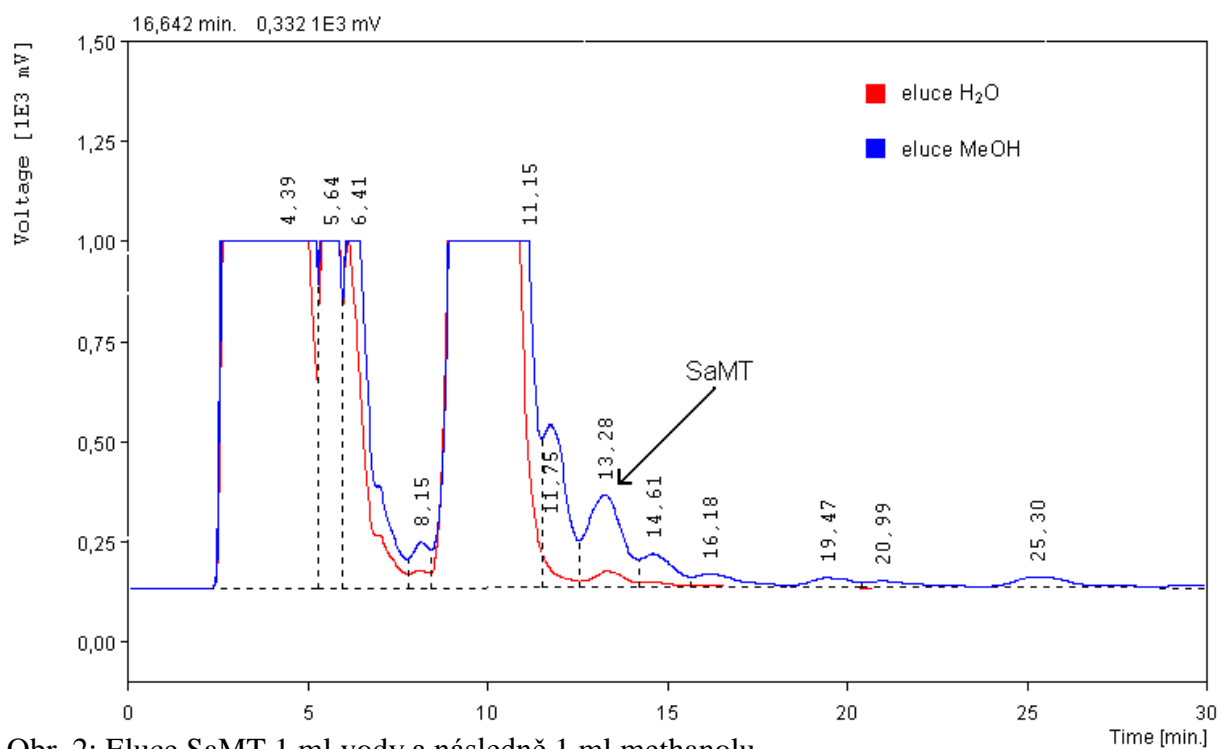
Tato práce opět potvrdila, že HPLC stanovení SaMT v moči je téměř neproveditelné. Jako konečné řešení se jeví stanovení SaMT pomocí CE. I v případě této metody zůstává nutnost SPE předčištění vzorku.

7. Obrazová příloha

Discovery DSC-CN

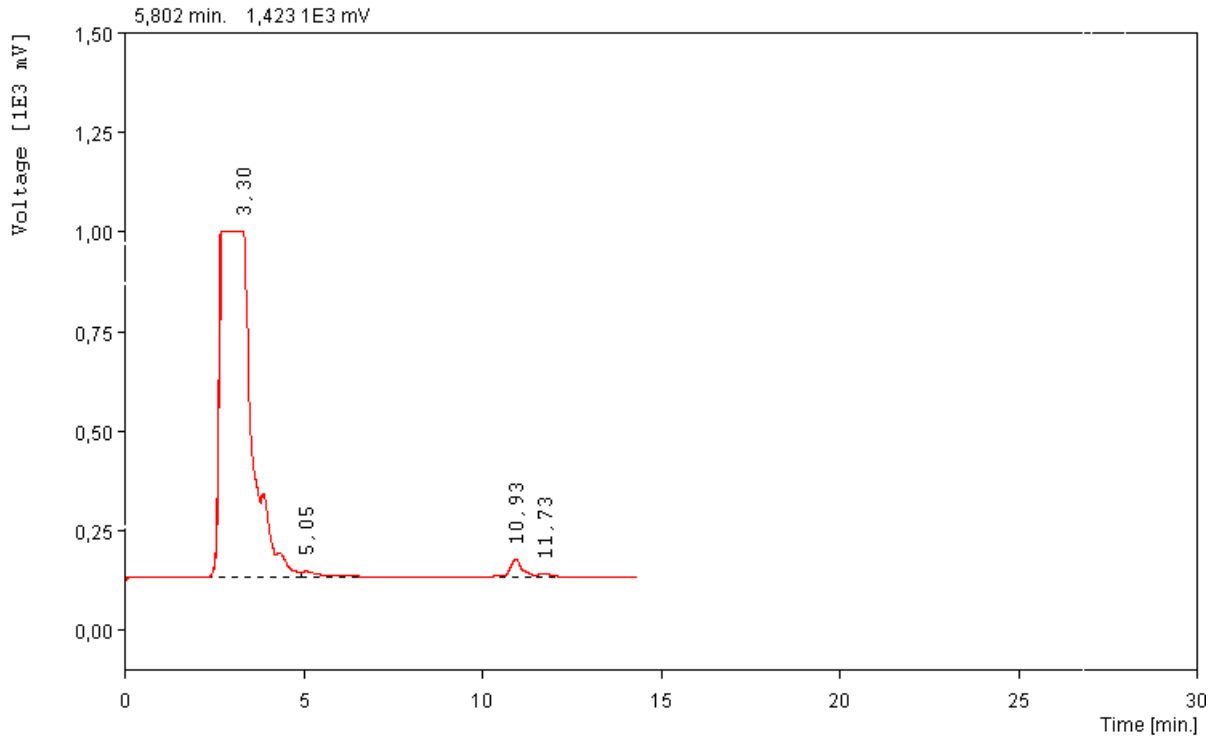


Obr. 1: Sorpce 4 ml koncentrované moči s přidavkem SaMT ($0,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l)

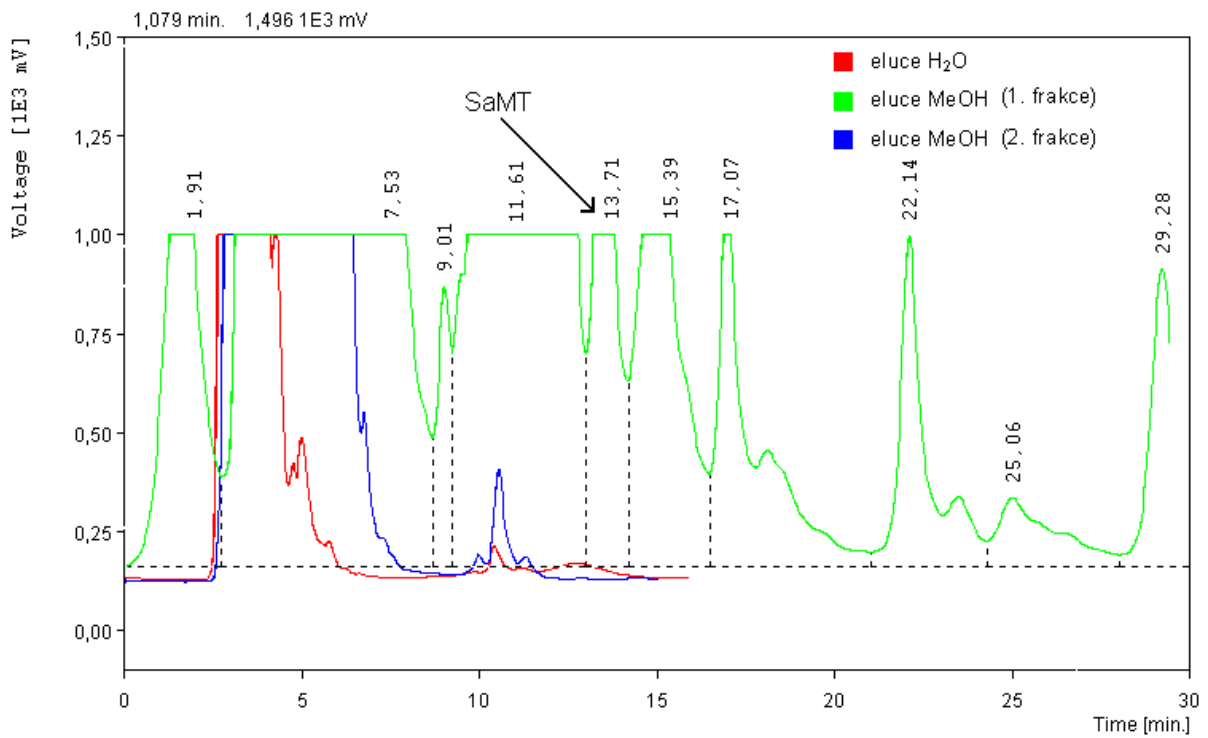


Obr. 2: Eluce SaMT 1 ml vody a následně 1 ml methanolu

Waters Oasis HLB

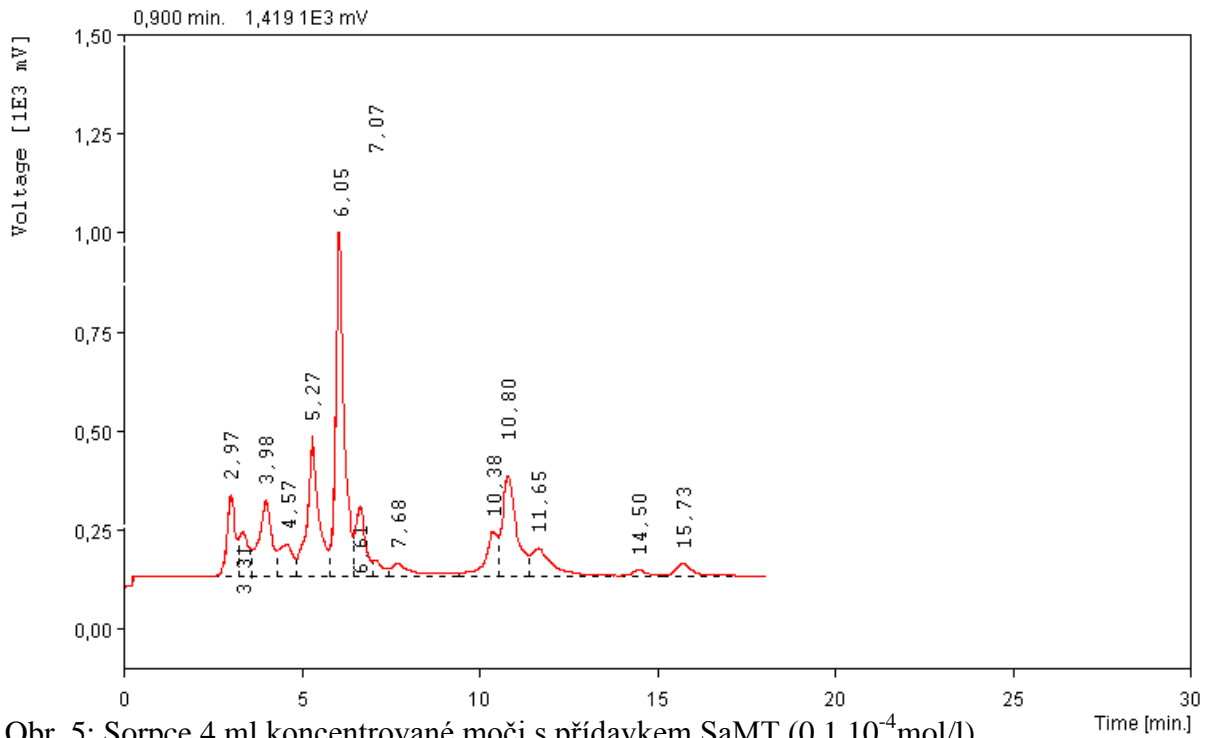


Obr. 3: Sorpce 4 ml koncentrované moči s přidavkem SaMT ($0,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l)

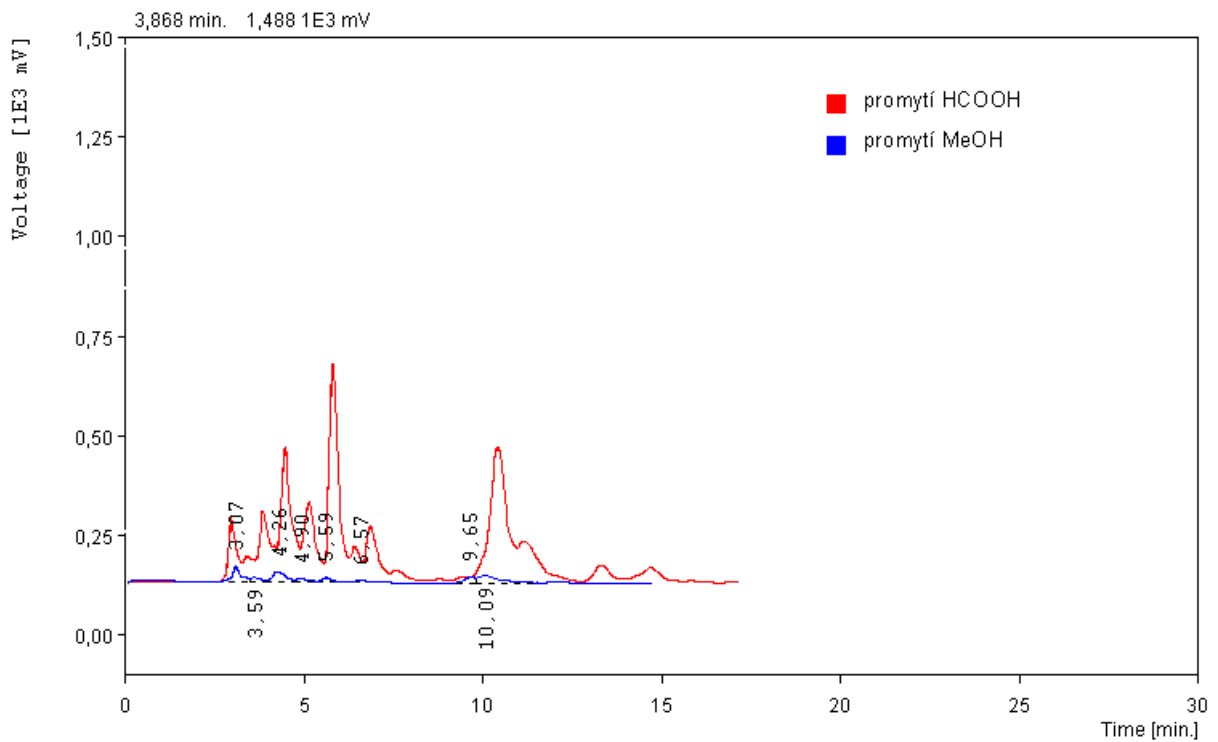


Obr. 4: Eluce SaMT v první methanolické eluční frakci

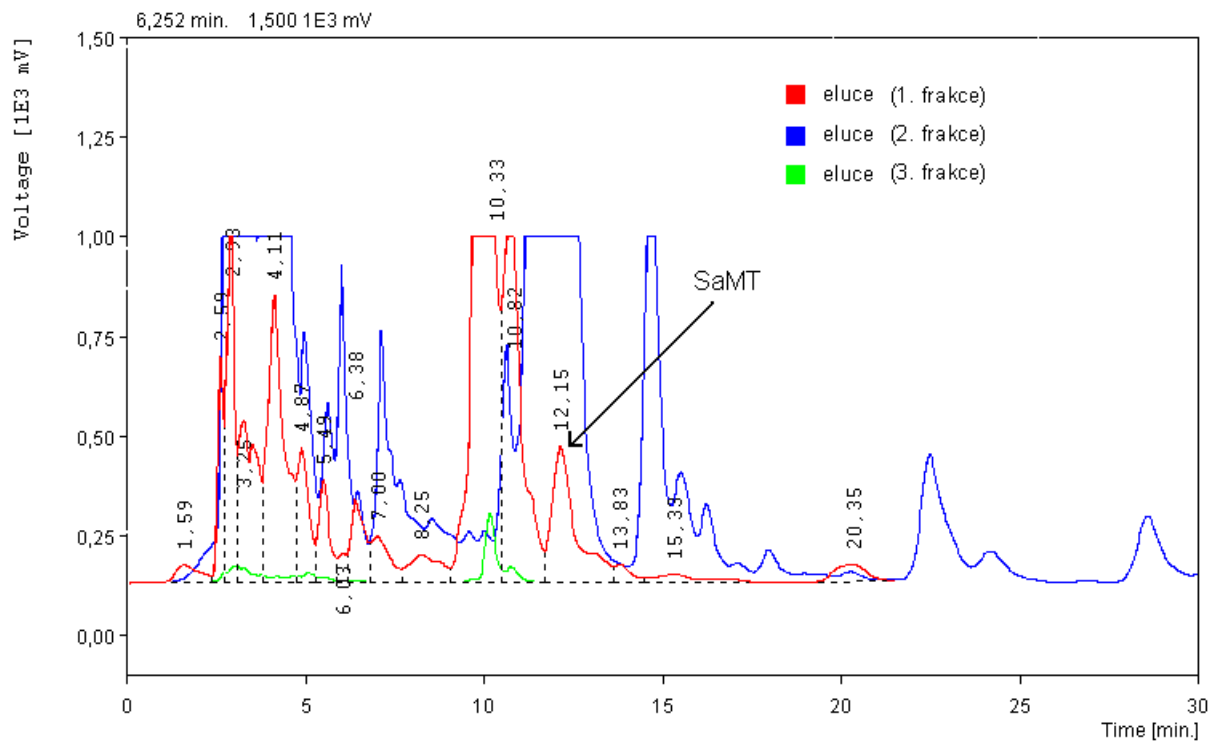
Strata NH₂



Obr. 5: Sorpce 4 ml koncentrované moči s přidavkem SaMT ($0,1 \cdot 10^{-4}$ mol/l)



Obr. 6: Promytí 4 ml kyseliny mravenčí 6 ml methanolu



Obr. 7: Eluce SaMT v první a druhé eluční frakci 200 mM NH₄Cl ve 20% MeOH o pH 11,25

8. Literatura

1. M. Vokurka, J. Hugo: Velký lékařský slovník, *Maxdorf, Praha 2006*.
2. F. Iinuma, K. Hamase, S. Matsubayashi, M. Watanabe, K. Zaitso: Sensitive determination of melatonin by precolumn derivatization and reversed phase high performance liquid chromatography; *J. Chromatogr. A. 835 (1999); 67-72*.
3. J. Reiter, Acuma-Castroviejo, D. X. Tan, S. Burkhardt: Free radical mediated molecular damage: mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system; *N. Y. Ann. Acad. Sci. 939 (2001); 200-215*.
4. C. Bojkowsky, J. Arendt, M. C. Shih, S. P. Marley: Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite 6-sulphatoxymelatonin; *Clin. Chem. 33 (1987); 1343-1348*.
5. A. J. Fellenberg, G. Phillipou, R. F. Seamark: Specific quantification of urinary 6-sulphatoxymelatonin sulphate by gas chromatography mass spectrometry; *Biomed. Mass. Spectrom. 7 (1980); 84-87*.
6. A. M. Leone, P. L. Francis, B. Mc Kenzie-Gray; Rapid and simple synthesis for the sulphate esters of 6-hydroxymelatonin and N-acetylserotonin; *J. Pineal. Res. 5 (1988); 367-371*.
7. C. A. Street, W. L. Di, J. F. Peniston-Bird, S. Patel, P. Sadler, R. E. Silman: The purification and characterization of biological 6-sulphatoxymelatonin and comparison with synthetic 6-sulphatoxymelatonin; *J. Pineal. Res. 20 (1996); 98-114*.
8. J. Arendt: Assay of melatonin and its metabolites, results in normal and unusual environments; *J. Neural. Trans. Suppl. 21 (1986); 11-33*.
9. B. Manz, A. Seidel, H. Alexander, L. Vollrath, B. Wagner, G. Zimmermann: Estimation of melatonin in pharmaceutical formulations; *J. Clin.Chem. Biochem. 27(1989) 797-802*.
10. R. C. Zimmermann, S. Schroder, S. Baars, M. Schumacher, H. C. Weise: Melatonin and the ovulatory luteinizing hormone surge; *Ferti. Steril. 54 (1990) 606-612*.
11. B. Ferrua, R. Massay: Immunoassay of melatonin with enzyme-labeled antibodies; *J. Immunoassay 6 (1985) 79-94*.
12. I. M. Young, Leone R. M., Silman R. E.: The mass spectrometric analysis of the urinary metabolites of melatonin and its deuterated analogues, confirming their identity as N-acetylserotonin and 6-hydroxymelatonin; *Biomed. Mass. Spectrom. 12 (1985) 319-337*.
13. S. Harter, S. Morita, K. Bodin, C. Ursing, G. Tybring, L. Bertilsson: Determination of exogenous melatonin and its 6-hydroxy metabolite in human plasma by liquid chromatography mass spectrometry; *Therapeutic Drug Monit. 23 (1980) 282-286*.

14. K. Klimánková, M. Hamerníková, D. Friedecký: CE determination of 6-sulfatoxymelatonin; *11th International Symposium on Separation Sciences, Pardubice 2005, Book of Abstracts IBSN 80-7194-771-7*.
15. K. Klimánková: Stanovení 6-sulfatoxymelatoninu kapilární elektroforézou, *rigorózní práce, FaF 2006*.
16. P. Jandera: Liquid chromatography separation of organic acidic compounds; *Chromatographia 13 (1980) 18*.
17. M. Hamerníková, O. Koubská: Derivatizace indolu a melatoninu pro zvýšení citlivosti UV detekce; *Chem. Listy 96 (2002) 402-403*.
18. S. Píšová: HPLC 6-sulfatoxymelatoninu, *rigorózní práce, FaF 2004*.
19. H. Staňková: Modelové struktury pro metabolitů melatoninu, *diplomová práce, FaF 2003*.
20. A. Marešková: Analytické vlastnosti metabolitů tryptofanu, *diplomová práce, FaF 2003*.
21. K. Klimánková: HPLC stanovení polárních látek, *diplomová práce, FaF 2005*.
22. A. Hrabálek, J. Kuneš, V. Klimešová, M. Macháček, L. Opletal, K. Palát, M. Roman, J. Vinšová: Chemická laboratorní technika pro farmaceuty, *Karolinum, Praha 1998*.
23. V. F. Samanidou, I. P. Imamidou, I. N. Papadoyannis: Evaluation of solid phase extraction protocols for isolation of analgesic compounds from biological fluids prior to HPLC determination; *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 25 (2002); 185*.
24. A. M. Leone, P. L. Francis, R. E. Silman: The isolation, purification and characterization of the principal urinary metabolites of melatonin; *J. Pineal. Res. 4 (1987) 253-266*.
25. V. Košíková: SPE a HPLC metabolitů melatoninu, *diplomová práce, FaF 2006*.
26. Weng Naidong, Wilson Shou, Yu Luan Chen, Xiangyu Juany: Novel liquid chromatography tandem mass spectrometric methods using silica columns and aqueous organic mobile phases for quantitative analysis of polar ionic analytes in biological fluids; *J. Chromatogr. 754 (2001) 387-399*.