

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy

Študent: Pavol Beca

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Petr Kastner, PhD.

Názov diplomovej práce: Izolácia metabolitov tryptofánu z biologického materiálu

Témou a cieľom tejto diplomovej práce bolo vyvinutie najúčinnnejšej úpravy vzorky pred analýzou na izoláciu L-tryptofánu a jeho metabolitov (serotonín, melatonín, kyselina 5-hydroxyindol-3-octová, L-kynurenín, kyselina kynurenová) z biologického materiálu, v tomto prípade z králičej plazmy.

Postupne boli vyskúšané základné metódy úpravy vzorky pred analýzou, a to extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE), extrakcia z pevnej fázy (SPE) a deproteinizácia, pričom najvyššiu výťažnosť poskytovala posledná spomínaná.

Izolácia prebehla zmiešaním 2,5 μl zásobného roztoku všetkých látok o koncentrácii 10 $\mu\text{g/ml}$ a 122,5 μl králičej plazmy. Samotná deproteinizácia bola prevedená pridaním 500 μl metanolu, pretrepaním a centrifugáciou pri 9000 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Následne bolo odobraných 400 μl supernatantu, ktoré sa podrobili analýze pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).

Pre vlastnú chromatografickú analýzu bola použitá metóda vyvinutá v diplomovej práci „HPLC hodnocení L-tryptofanu a jeho metabolitů v biologickém materiálu“ (Kateřina Málková, 2019). Prebehla na silikagélovej kolóne Kinetex EVO C18 (100 Å, 150 x 3 mm, 5 μm) s predkolónou OPTI-GUARD 1 mm C18 pri teplote 30 $^{\circ}\text{C}$ s prietokovou rýchlosťou 0,5 ml/min. Mobilná fáza A bol octanový pufer s pH 4,5 s pridaným metanolom v pomere 97:3. Mobilná fáza B bola metanol. Optimálny objem nástreku vzorky bol 10 - 15 μl . Použitá elúcia bola gradientová a čas analýzy 30 minút. Použité detektory boli spektrofotometrický a fluorimetrický.

Metóda bola validovaná podľa EMA smernice. Pre stanovenie látok bola používaná metóda vonkajšieho štandardu. Hodnotené validačné parametre boli správnosť, presnosť, selektivita, linearita, citlivosť. Všetky nájdené hodnoty boli v primeranom rozsahu.