

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKEJ CHÉMIE A FARMACEUTICKEJ ANALÝZY



# IZOLÁCIA METABOLITOV TRYPTOFÁNU Z BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Diplomová práca

**Pavol Beca**

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Celá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové dňa 8.5.2020

Pavol Beca

## Pod'akovanie

Chcel by som sa pod'akovať PharmDr. Petrovi Kastnerovi, PhD. za pomoc, cenné rady, pripomienky a odborné vedenie, ktoré mi pomohli pri vypracovaní tejto diplomovej práce.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CIEĽ .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČASŤ.....</b>	<b>10</b>
3.1	L-TRYPTOFÁN A JEHO METABOLITY.....	10
3.1.1	<i>L-Tryptofán</i> .....	11
3.1.2	<i>Serotonín</i> .....	13
3.1.3	<i>Kyselina 5-hydroxyindol-3-octová</i> .....	15
3.1.4	<i>Melatonín</i> .....	16
3.1.5	<i>Kynurenín</i> .....	18
3.1.6	<i>Kyselina kynurenová</i> .....	19
3.2	FYZIKÁLNE-CHEMICKÉ VLASTNOSTI TRYPTOFÁNU A JEHO METABOLITOV .....	21
3.3	ÚPRAVA VZORKY PRED ANALÝZOU .....	23
3.3.1	<i>LLE</i> .....	23
3.3.2	<i>SPE</i> .....	26
3.3.3	<i>Deproteinizácia</i> .....	29
3.4	VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA .....	30
3.5	VALIDÁCIA.....	33
3.5.1	<i>Správnosť (Accuracy)</i> .....	33
3.5.2	<i>Presnosť (Precision)</i> .....	33
3.5.3	<i>Selektivita (Specificity)</i> .....	34
3.5.4	<i>Linearita (Linearity)</i> .....	34
3.5.5	<i>Rozsah (Range)</i> .....	34
3.5.6	<i>Citlivosť (Sensitivity)</i> .....	34
3.5.7	<i>Robustnosť (Robustness)</i> .....	35
3.6	PUBLIKOVANÉ ŠTÚDIE .....	35
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>37</b>
4.1	CHEMIKÁLIE, PRÍSTROJE A POMÔCKY.....	37
4.2	VŠEOBECNÉ POSTUPY .....	39
4.2.1	<i>Príprava roztokov</i> .....	39
4.2.2	<i>Príprava mobilnej fázy a HPLC systému</i> .....	40
4.3	EXTRAKCIA KVAPALINA-KVAPALINA (LLE) .....	41
4.4	EXTRAKCIA Z PEVNEJ FÁZY (SPE).....	42
4.4.1	<i>SPE extrakcia KYN, KYNA, TRP, 5-HIAA</i> .....	42
4.4.2	<i>SPE extrakcia 5-HT</i> .....	42

4.5	DEPROTEINIZÁCIA.....	43
4.5.1	<i>Deproteinizácia pomocou kyselín .....</i>	43
4.5.2	<i>Deproteinizácia pomocou metanolu a acetonitrilu .....</i>	43
4.6	PRÍPRAVA ROZTOKOV PRE VALIDÁCIU METÓDY PODĽA SMERNICE EMA .....	45
4.6.1	<i>Správnosť, presnosť .....</i>	45
4.6.2	<i>Selektivita .....</i>	46
4.6.3	<i>Linearita, rozsah .....</i>	46
4.6.4	<i>Citlivosť .....</i>	47
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>48</b>
5.1	LLE.....	48
5.1.1	<i>Extrakcia s etylacetátom.....</i>	48
5.1.2	<i>Vplyv rozpúšťadla na analyzované látky.....</i>	49
5.2	SPE .....	52
5.3	DEPROTEINIZÁCIA .....	53
5.3.1	<i>Deproteinizácia pomocou kyselín .....</i>	53
5.3.2	<i>Deproteinizácia pomocou metanolu a acetonitrilu .....</i>	53
5.4	VALIDÁCIA .....	57
5.4.1	<i>Správnosť .....</i>	57
5.4.2	<i>Presnosť .....</i>	58
5.4.3	<i>Selektivita .....</i>	61
5.4.4	<i>Linearita, rozsah .....</i>	61
5.4.5	<i>Citlivosť .....</i>	62
5.4.6	<i>Robustnosť.....</i>	62
<b>6</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>64</b>

# 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  $\mu\text{l}$  zásobného roztoku všetkých látok o koncentrácii 10  $\mu\text{g/ml}$  a 122,5  $\mu\text{l}$  králičej plazmy. Samotná deproteinizácia bola prevedená pridaním 500  $\mu\text{l}$  metanolu, pretrepaním a centrifugáciou pri 9000 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Následne bolo odobraných 400  $\mu\text{l}$  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 A, 150 x 3 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{l}$ . 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.

# Abstract

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

**Student:** Pavol Beca

**Supervisor:** PharmDr. Petr Kastner, PhD.

**Title of diploma thesis:** Isolation of tryptophan metabolites from biological material

The topic and aim of this diploma thesis was to develop the most effective sample preparation before analysis for isolation of L-tryptophan and its metabolites (serotonin, melatonin, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, L-kynurenine, kynurenic acid) from biological material, in this case from rabbit plasma.

Basic methods of sample preparation prior to analysis, namely liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE) and deproteinization, were successively tested, with the latter yielding the highest yield.

Isolation was performed by mixing a 2.5 µl stock solution of all substances at a concentration of 10 µg/ml and 122.5 µl rabbit plasma. Deproteinization was performed by adding 500 µl of methanol, shaking and centrifuging at 9000 rpm for 5 minutes. Subsequently, 400 µl of supernatant was collected and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

The method developed in the diploma thesis "HPLC evaluation of L-tryptophan and its metabolites in biological material" (Kateřina Málková, 2019) was used for the chromatographic analysis. It was performed on a Kinetex EVO C18 silica gel column (100 Å, 150 x 3 mm, 5 µm) with an OPTI-GUARD 1 mm C18 precolumn at 30 °C with a flow rate of 0.5 ml / min. Mobile phase A was an acetate buffer at pH 4.5 with methanol in a ratio of 97:3. Mobile phase B was methanol. The optimal sample injection volume was 10 - 15 µl. The separation was performed by gradient elution and the analysis time was 30 minutes. The detectors used were spectrophotometric and fluorimetric.

The method was validated according to the EMA guideline. An external standard method was used to determine the substances. The validation parameters evaluated were accuracy, precision, selectivity, linearity, sensitivity. All values found were within a reasonable range.

# 1 ÚVOD

Táto diplomová práca sa zameriava na úpravu vzorky a jej izoláciu z biologického materiálu pred HPLC analýzou.

L-tryptofán patrí medzi aminokyseliny bežne prítomné v organizme a on samotný, ako aj jeho metabolity (serotonín, kyselina 5-hydroxyindol-3-oxalová, melatonín, L-kynurenín a kyselina kynurenová) môžu ovplyvňovať priebeh mnohých neurologických, psychických či iných ochorení. Ich podrobnejší popis a funkcia v organizme, ako aj metabolizmus, sú uvedené v teoretickej časti tejto diplomovej práce.

Teoretická časť tejto práce je okrem popisu týchto látok a metabolickej cesty venovaná aj popisu základných izolačných metód látok z biologického materiálu, a to extrakcie kvapalina-kvapalina (LLE), extrakcie z pevnej fázy (SPE) a deproteinizácie, ich vývoja a najmodernejšieho prevedenia a venuje sa takisto analýze pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie, čo je v súčasnosti najvyužívanejšia metóda pre separáciu širokého spektra látok.

Metóda bola validovaná podľa oficiálnych smerníc a použitá pre izoláciu a následné stanovenie spomínaných látok z králičej krvnej plazmy.



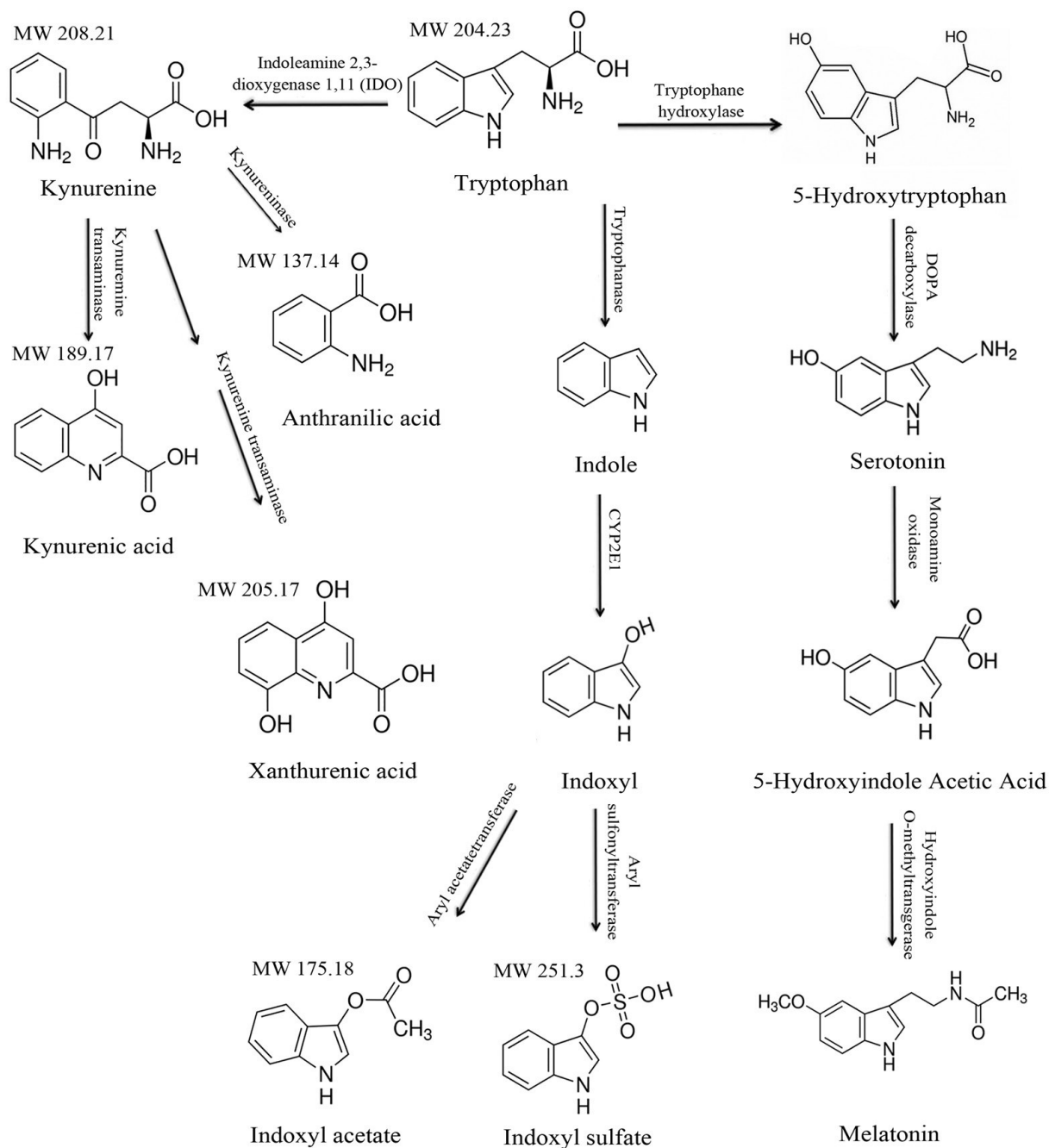
## 2 CIEĽ

Cieľom tejto diplomovej práce je nájsť najvýhodnejšiu metódu s najväčšou výťažnosťou pre izoláciu L-tryptofánu a jeho metabolitov z králičej krvnej plazmy, pričom výskum by mal pokračovať implementáciou tejto metódy pri izolácii z krvnej plazmy človeka.

Chromatografické podmienky boli určené v prechádzajúcom výskume a v prvom rade je potrebné stanoviť a vybrať najúčinnjšiu úpravu vzorky spomedzi troch základných, a to LLE, SPE a deproteinizácie. Následná analýza prebehne pomocou overených podmienok HPLC chromatografie. Validácia bude prevedená podľa oficiálnych smerníc Európskej liekovej agentúry (EMA) a hodnotené parametre budú správnosť, presnosť, selektivita, linearita a citlivosť.

# 3 TEORETICKÁ ČASŤ

## 3.1 L-Tryptofán a jeho metabolity



Obr. 1 Metabolické cesty L-tryptofánu<sup>1</sup>

### 3.1.1 L-Tryptofán

Systematický názov: *kyselina (S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propánová*<sup>2</sup>

Sumárny vzorec:  $C_{11}H_{12}N_2O_2$ <sup>2</sup>

L-tryptofán (TRP) je jedna z ôsmich esenciálnych aminokyselín. Jeho celková koncentrácia v plazme je 54217 – 67456 nM<sup>3</sup> (11072 – 13777 ng/ml), čo je najnižšia koncentrácia zo všetkých aminokyselín.<sup>4</sup>

Bežná dávka je približne 900 – 1000 mg denne, čo približne dva až trikrát prevyšuje jeho skutočnú dennú potrebu.<sup>4</sup>

Bežné zdroje TRP v potrave sú ovos, banány, sušené slivky, tuniak, syr, chlieb, kuracie a morčacie mäso, arašidy alebo čokoláda.<sup>4</sup>

Prvýkrát bol syntetizovaný v roku 1949, ale na začiatku osemdesiatych rokov bola jeho syntéza nahradená fermentáciou, čím sa zvýšila jeho výťažnosť.<sup>4</sup>

Tryptofán sa v tele zúčastňuje rôznych metabolických procesov. Jeho hlavnými úlohami sú syntéza bielkovín, kynurenínu, serotonínu, melatonínu a ďalších látok, ako napríklad tryptamín alebo niacín.<sup>4</sup>

Po vstrebaní sa TRP z veľkej časti viaže na bielkoviny plazmy, konkrétne na albumín, ale má vysokú afinitu k transportéru v hematoencefalickej bariére, preto sa dokáže v jej blízkosti z albumínu disociovať a dostať sa aj do mozgu.<sup>4</sup>

L-tryptofán sa metabolizuje na 5-hydroxytryptofán, ktorý sa potom premieňa na neurotransmitter serotonín. Na základe tejto premeny boli študované jeho účinky na depresiu a rôzne iné poruchy, ako poruchy spánku, schizofréniu a sezónne afektívne poruchy. Exogénne podávanie tryptofánu je stredobodom záujmu mnohých klinických výskumov. Tieto výskumy vyvolali často sľubné, ale nie úplne presvedčivé výsledky.<sup>4</sup>

V rámci liečby depresie sa ukázalo, že zlepšuje miernu až stredne ťažkú depresiu, avšak u vážnejšej formy nemá účinky. Dobrá účinnosť bola zaznamenaná v niektorých štúdiách, kde bol podávaný pacientom spoločne s inhibítormi monoaminoxidázy, no napriek tomu boli výsledky väčšinou nejednoznačné, pretože zároveň je pri tom riziko vyvolania serotonínového syndrómu.<sup>4</sup>

Lepšie účinky boli zaznamenané v liečbe sezónnej afektívnej poruchy, resp. „sezónnej depresie“, kde boli porovnávané s terapiou svetlom. Zistilo sa, že jeho štvortýždňové podávanie môže byť rovnako efektívne ako dvojtýždňová svetelná terapia.<sup>4</sup>

Ďalšie jeho účinky boli zaznamenané napríklad pri liečbe príznakov predmenštruačného syndrómu, kde nastávalo výrazné zníženie dysfórie, zmien nálad a podráždenosti, čo sa pripisovalo zvýšenej syntéze kynurenínu.<sup>4</sup>

U porúch spánku sa predpokladá jeho mechanizmu prostredníctvom mechanizmov melatonínu a na rozdiel od liečiv bežne podávaných v terapii spánku, sa pri ňom neobjavujú kognitívne poruchy a iné spánkové poruchy. Významne tiež ovplyvnil spánok u pacientov s obštrukčnou spánkovou apnoe. U pacientov s centrálnou spánkovou apnoe efekt nemal.<sup>4</sup>

Jeho efekt bol vyskúšaný aj pri odvykaní od fajčenia, kde v kombinácii s diétou s vysokým obsahom sacharidov dokázal zmierniť úzkosť a abstinenčné príznaky.<sup>4</sup>

Medzi najčastejšie nežiaduce účinky patria bolesť hlavy, nevoľnosť, hnačka, citlivosť svalov a sedácia. Medzi ďalšie udalosti hlásené pri dávkach až 15 g / deň patrila eufória, sucho v ústach, rozmazané videnie a nystagmus. Účinky sa zdali byť závislé od dávky. V 80-tych rokoch bol zaznamenaný nárast prípadov so syndrómom eozinofília-myalgia pri zvýšenom podávaní tryptofánu.<sup>5</sup>

L-tryptofán zvyšuje dostupnosť serotonínu v CNS a môže spôsobiť „serotonínový syndróm“, keď sa užíva samostatne (zriedkavo) alebo častejšie v kombinácii s MAOI alebo serotonergnými látkami (napr. fluoxetínom). Príznaky sa vyznačujú myoklonom, pokojným chvením, nepokojom, nestabilnou chôdzou, hyperreflexiou, diaforézou a hypertermiou.<sup>5</sup>

### 3.1.2 Serotonín

Systematický názov: *3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol*<sup>6</sup>

Sumárny vzorec:  $C_{10}H_{12}N_2O$ <sup>6</sup>

Serotonín (=5-hydroxytryptamín, 5-HT) je monoamínový neurotransmitter a v tele sa syntetizuje z tryptofánu v serotonergných neurónoch v centrálnom nervovom systéme (CNS) a v enterochromafínových bunkách v gastrointestinálnom trakte (GIT).<sup>7</sup>

Normálna hladina v plazme je 97 – 289 nM, čo je 17 – 51 ng/ml.<sup>3</sup>

Asi 95 % periférneho serotonínu je syntetizovaných a uchovávaných v GIT. Je metabolizovaný monoaminoxidázou (MAO) na kyselinu 5-hydroxyindol-3-octovú, ktorá sa následne vylučuje močom.<sup>7</sup>

Existuje najmenej sedem veľkých rodín serotoninových receptorov, označujú sa ako 5-HT<sub>1</sub> až 5-HT<sub>7</sub> a väčšina z nich má viac podtypov.<sup>7</sup>

Ovplyvňovanie koncentrácie serotonínu v organizme, resp. pôsobenie na serotonínové receptory sa v farmácii využíva pri liečení niektorých ochorení, ako napríklad depresia, migréna, gastrointestinálne poruchy.<sup>7</sup>

Serotonín moduluje nervovú aktivitu a je široko využiteľný v neurológii a psychiatrii. Väčšina serotonínu sa ale nachádza mimo centrálného nervového systému (CNS) a prakticky všetky serotonínové receptory sú exprimované tak isto v periférii ako v CNS.<sup>8</sup>

Medzi jeho funkcie patrí regulácia veľkého množstva biologických procesov, ako kardiovaskulárne funkcie, črevná motilita alebo funkcia močového mechúra, najnovšie sa zistil vplyv aj na agregáciu krvných doštičiek.<sup>8</sup>

V poslednej dobe sa výskum najviac zamerail na skúmanie serotonínových receptorov a z hľadiska farmácie na vývoj liečiv, ktoré sú pre jednotlivé receptory selektívne.<sup>8</sup>

Z hľadiska behaviorálnych a neuropsychologických procesov môže serotonín ovplyvňovať náladu, hnev, agresiu, chuť do jedla, pamäť, sexualitu či pozornosť.<sup>8</sup>

Vaskulárne účinky serotonínu sú kontrola cievneho odporu a krvného tlaku a ovplyvňovanie hemostázy a funkcie krvných doštičiek. Serotonín spôsobuje vazokonstrikciu alebo vazodilatáciu v závislosti od konkrétnych receptorov. Príkladom

môže byť vazodilatácia mozgových ciev pôsobením na 5-HT<sub>1B</sub> receptor, čo sa využíva ako mechanizmus účinku triptanov, ktoré sa používajú na potlačenie bolesti pri migréne.<sup>8</sup>

Ďalšie funkcie serotonínu sú napríklad regulácia srdcových funkcií či remodelácia srdca po infarkte myokardu (IM). Vysoké hladiny serotonínu sú napríklad spájané s fibriláciou predsiení, čo vedie k dysrytmiam. Na druhej strane ovplyvňovanie niektorých receptorov môže mať významný účinok pri liečbe vazospastickej anginy pectoris alebo pri liečbe bolesti po IM.<sup>8</sup>

Serotonín pomáha takisto regulovať dýchanie prostredníctvom účinku na dýchacie centrum, či ovplyvňovaním vaskulárnych funkcií. V tomto kontexte je možné vyvinúť liečivá, ktoré by mohli byť klinicky účinné pri liečbe skorej pľúcnej hypertenzii a takisto sa uvažuje o využití pri opioidmi indukovanému útlmu dýchacieho centra, zatiaľ čo by opioidná analgézia zostávala nepotlačená. Vplyv serotonínu na respiračný systém dokazujú aj zistené abnormality v hladinách serotonínu u detí, ktoré predčasne zomreli na syndróm náhleho úmrtia dojčiat.<sup>8</sup>

Serotonín má vplyv na hypothalamo-hypofyzárnu os a nadobličky a priamo reguluje vývoj mliečnych žliaz a tiež energetický a glukózový metabolizmus, čo môže byť užitočné v liečbe obezity alebo diabetu. Mimo tohto hrá dôležitú úlohu v ovplyvňovaní rýchlosti metabolizmu (deficit serotonínu spôsobuje hypotermickú reakciu), stresovej reakcie cez nadobličky, reguláciu uvoľňovania mlieka z mliečnych žliaz.<sup>8</sup>

Pri príjme potravy sa aktivujú chuťové bunky, čo spôsobuje zvýšené vylučovanie serotonínu a tým prenášanie chuťových informácií do CNS. Má na svedomí aj peristaltiku a sekréciu pankreatických enzýmov. Tieto funkcie sa využívajú u liekov na liečbu syndrómu dráždivého čreva a jeho vplyv na nervus vagus sa využíva u setronov, ktoré sú účinnými antiemetikami.<sup>8</sup>

Medzi ďalšie funkcie serotonínu patrí modulácia vnímania bolesti, čo sa využíva na liečbu neuropatickej bolesti a migrény a pri anestézii.<sup>8</sup>

Niektoré inhibítory spätného vychytávania serotonínu (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI) sú predpisované na liečbu predčasnej ejakulácie alebo stresovej inkontinencie.<sup>8</sup>

Zvýšená hladina serotonínu v sére je u tehotných žien a tieto hladiny korelujú so zvýšeným rizikom výskytu preeklampsie.<sup>8</sup>

### 3.1.3 Kyselina 5-hydroxyindol-3-octová

Sumárny vzorec:  $C_{10}H_9NO_3$ <sup>9</sup>

U ľudí je zapojená do metabolizmu tryptofánu. V chemickej analýze vzoriek moču sa kyselina 5-hydroxyindol-3-octová (=5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-HIAA) používa na stanovenie hladín serotonínu v tele.<sup>10</sup>

Jej normálna hladina v plazme je 25 – 53 nM (5 – 10 ng/ml).<sup>3</sup>

Mimo ľudského tela bola zistená, ale nie kvantifikovaná kyselina 5-HIAA v niekoľkých rôznych potravinách, ako sú čierne maliny, čínske gaštany, čierne moruše.<sup>10</sup>

Zistilo sa, že 5-HIAA je spojená s niekoľkými chorobami, ako je epilepsia, hereditárna spastická paraplégia a Crohnova choroba.<sup>10</sup>

Pacienti trpiaci psychickými poruchami, ako depresia so samovražednými sklonmi či schizofrénia vykazujú zníženú hladinu 5-HIAA v mozgomiechovom moku a naopak jej zvýšené hladiny v plazme. Tieto hladiny navyše na základe týchto štúdií korelujú so závažnosťou ochorenia, takže stanovenie jej hladín v telových tekutinách by mohlo prispieť k diagnostike týchto ochorení a k podrobnejšiemu určeniu ich závažnosti.<sup>11</sup>

Karcinoidné nádory môžu spôsobiť zvýšené vylučovanie tryptofánu, ako aj serotonínu. Serotonín a následne 5-HIAA sú produkované v prebytku väčšiny karcinómov, ktoré majú za následok jej zvýšené vylučovanie. Je potrebné zároveň vylúčiť zvýšený príjem tryptofánu z potravy, čo môže viesť k zvýšenému vylučovaniu 5-HIAA a následne nepresnej diagnostike. Jej hladina v moči je 12 - 35  $\mu\text{mol}/\text{deň}$ .<sup>12</sup>

### 3.1.4 Melatonín

Systematický názov: *N*-[2-(5-metoxy-1*H*-indol-3-yl)etyl]acetamid<sup>13</sup>

Sumárny vzorec:  $C_{13}H_{16}N_2O_2$ <sup>13</sup>

Melatonín (MLT) je hormón produkovaný epifýzou. Podľa niektorých štúdií boli hlásené aj iné zdroje ako napríklad bunky kostnej drene, lymfocyty, krvné doštičky, koža alebo GIT stavovcov (kde sa môže aj syntetizovať v enterochromafínových bunkách).<sup>14</sup>

Jeho hladina sa reguluje externým príjmom tryptofánu a je obvykle najvyššia v GIT, pričom nižšia hladina (asi 10 až 100-krát) je v krvi a najnižšia v epifýze. TRP sa hydroxyluje na 5-hydroxytryptofán, potom nastáva dekarboxylácia a vzniká serotonín. V epifýze sa serotonín metabolizuje na *N*-acetylserotonín a následne sa metyluje na melatonín. Niektoré enzýmy v tomto procese podporuje aktivita noradrenalínu.<sup>14</sup>

Jeho syntéza a vylučovanie sa zvyšuje počas tmy a sú tlmené svetlom, takže u ľudí sa zvyšujú po západe slnka, vrchol nastáva v noci a postupne sa znižuje.<sup>15</sup> Koncentrácie v sére sú rôzne a pohybujú sa medzi 80 a 120 pg/ml, pričom počas dňa sú koncentrácie nízke (10 – 20 pg/ml).<sup>14</sup>

MLT je metabolizovaný na 6-hydroxymelatonín, po ktorom nastáva konjugácia s kyselinou sírovou. Vzniká 6-sulfatoxymelatonín (6-SM) a nasleduje vylúčenie močom. Tento hlavný metabolit odráža plazmatické koncentrácie melatonínu.<sup>14</sup>

Melatonín účinkuje pôsobením na melatonínové receptory (MT-1 a MT-2). Melatonínové receptory sa našli v niekoľkých centrálnych, ale aj v periférnych tkanivách vrátane srdca a tepien, nadobličiek, obličiek, pľúc, pečene, žlčníka, tenkého čreva, adipocytov, vaječníkov, maternice, prs, prostaty, kože a tiež v T- a B-lymfocytoch.<sup>14</sup>

MT-1 receptor je zodpovedný za navodenie spánku, MT-2 receptor reguluje cirkadiánne rytmy. MT-3 receptor je vo fáze skúmania, ale je pravdepodobne zodpovedný za antioxidantné účinky.<sup>15</sup>

Jeho fyziologické účinky sú regulácia cirkadiánnych rytmov, ďalej má neuroendokrinné účinky a reguluje telesnú teplotu. V súvislosti s narušenými cirkadiánnymi rytmi sú výkyvy jeho hladín spojené s niektorými psychickými ochoreniami a neurologickými poruchami, čo je pozorovateľné hlavne u detí ako jeho nedostatok pri týchto ochoreniach. Má vplyv aj na neuronálny vývoj plodu.<sup>14</sup>



Mimo tohto účinku má vplyv na kardiovaskulárny systém, reguláciu imunity (stimulácia tvorby interleukínov) a takisto prostredníctvom MT-3 receptoru sa zúčastňuje ako antioxidant na ochrane CNS a GIT pred oxidatívnym stresom. MLT ďalej zabraňuje zvyšovaniu telesného tuku, podporuje tvorbu kolagénu a diferenciáciu osteoblastov a inhibuje resorpciu kostí.<sup>14</sup>

MLT spôsobuje zníženie telesnej teploty a zmenu hladín monoamínov v mozgu, čo môže vyvolať ospalosť. Bol navrhnutý ako terapia porúch spánku vrátane nespavosti a jet lag syndrómu, ale v Českej republike nebol pre túto indikáciu schválený.<sup>16</sup>

Vzhľadom na antioxidačnú aktivitu má potenciál v liečbe rakoviny, u pacientov s hypertenziou pomáha znižovať krvný tlak.<sup>14</sup>

Znížená nočná sekrécia melatonínu bola pozorovaná u pacientov, ktorí zároveň trpeli ťažkou depresiou, schizofréniou, bipolárnou poruchou alebo autizmom. Pri liečbe pacientov s depresiou bolo pozorované následné zvýšenie hladiny melatonínu a jeho veľký potenciál sa preukazuje pri liečbe Alzheimerovej choroby, Parkinsonovej choroby, Huntingtonovej choroby či amyotrofickej laterálnej sklerózy (ALS).<sup>14</sup>

Má viaceré účinky vrátane somnolencie a predpokladá sa, že hrá úlohu pri regulácii cyklu spánku a bdenia. Melatonín sa považuje za výživový doplnok a je voľne predajný vo viacerých generických formách. Nachádza sa tiež v mnohých bylinných a výživových doplnkových zmesiach. Bežná dávka je 10 mg jedenkrát denne užívaná perorálne jednu až tri hodiny pred časom spánku. Vedľajších účinkov je málo, ale môžu zahŕňať dennú spavosť a bolesti hlavy.<sup>16</sup>

### 3.1.5 Kynurenín

Systematický názov: *kyselina 2-amino-4-(2-aminofenyl)-4-oxobutánová*<sup>17</sup>

Sumárny vzorec:  $C_{10}H_{12}N_2O_3$ <sup>17</sup>

L-Kynurenín patrí do triedy organických zlúčenín známych ako alkylfenylketóny.<sup>18</sup>

Normálna hladina kynurenínu v krvnej plazme človeka je 1792 – 2552 nM, čo odpovedá zhruba 373 – 531 ng/ml.<sup>3</sup>

Je prítomný u všetkých eukaryotov, vrátane človeka. U ľudí sa L-kynurenín podieľa na metabolizme tryptofánu. Dôkazy naznačujú, že jeho zvýšená produkcia môže vyvolať depresívne symptómy spojené s interferónovou liečbou hepatitídy C. Kognitívne deficity pri schizofrénii sú spojené s nerovnováhou v enzýmoch, ktoré ho štiepia.<sup>18</sup>

Kynurenín je syntetizovaný enzýmom tryptofan dioxygenáza (pečeň) a indolamín 2,3-dioxygenáza (imunitná reakcia). Zvýšená syntéza kynurenínu bola objavená pri niektorých typoch rakoviny.<sup>18</sup>

Deficit kynurenín-3-monooxygenázy je spojený s poruchami mozgu (napríklad schizofrénia) a pečene.<sup>18</sup>

Dysfunkčné stavy rôznych krokov kynurenínovej dráhy v metabolizme tryptofánu boli opísané pri mnohých poruchách, ako napríklad demencia, Tourettov syndróm, schizofrénia, depresia, roztrúsená skleróza, Huntingtonova choroba a ďalších.<sup>18</sup>

Mimo ľudského tela bol objavený v niekoľkých rôznych potravinách, napríklad v kravskom mlieku. Vďaka tomu by sa L-kynurenín mohol stať potenciálnym biomarkerom pre spotrebu týchto potravín.<sup>18</sup>

### 3.1.6 Kyselina kynurenová

Systematický názov: *kyselina 4-oxo-1,4-dihydro-chinolínkarboxylová*<sup>19</sup>

Sumárny vzorec:  $C_{10}H_7NO_3$ <sup>19</sup>

Kyselina kynurenová (KYNA) je produktom metabolizmu tryptofánu cez kynurenínovú dráhu. Boli komplexne zdokumentované jej vplyvy na neurofyziologické a neuropatologické procesy a takisto sú skúmané jej protizápalové a imunosupresívne funkcie.<sup>20</sup>

Prvýkrát bola KYNA preukázaná v moči, ale viac preskúmaná bola až koncom minulého storočia. Zo začiatku bola študovaná hlavne kvôli účinkom v CNS, ale v poslednej dobe sa študujú viac jej účinky na periférii. V GIT boli študované jej antiulcerózne a protizápalové vlastnosti, keď bola zvýšená jej hladina pri zápalových ochoreniach GIT, ale pri funkčných bola normálna.<sup>21</sup>

Normálne hladiny KYNA v plazme sú 17 – 26 nM (3 – 5 ng/ml).<sup>3</sup>

Najnovšie poznatky zistili, že *Escherichia coli* je schopná ju produkovať a v nízkych dávkach má KYNA stimulačný efekt na rast určitých baktérii, ale vo vysokých má antibakteriálne vlastnosti.<sup>21</sup>

KYNA je endogénny antagonista excitačných receptorov glutamátu NMDA a nikotínových cholinergných receptorov. U zvierat boli preukázané jej neuroprotektívne a antikonvulzívne aktivity. Vzhľadom k tomu býva spájaná s niektorými prejavmi starnutia. Abnormality jej funkcie v CNS boli hlásené pri niektorých významných ochoreniach, či už išlo o jej zvýšený metabolizmus (Alzheimerova choroba, Downov syndróm) alebo o zvýšenie funkcie počas skorého štádia Huntingtonovej choroby.<sup>22</sup>

Zvýšená produkcia KYNA môže takto pôsobiť ako kompenzačná reakcia na neurotoxicitu. Pri niektorých ochoreniach, ako schizofrénia alebo amyotrofická laterálna skleróza, sú jej znížené hladiny v periférii vysvetľované jej vznikom z tryptofánu a kynurenínu predovšetkým v mozgu.<sup>20</sup>

Modulácia NMDA receptorov kyselinou kynurenovou hrá kľúčovú úlohu u schizofrénie. V nízkych dávkach môže blokovať nikotínové receptory, čo môže vysvetľovať psychotické symptómy a zhoršenie kognitívnej aktivity pri jej zvýšenej

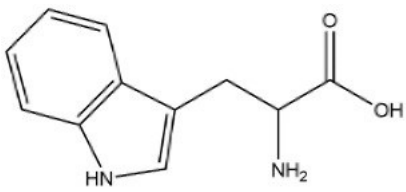
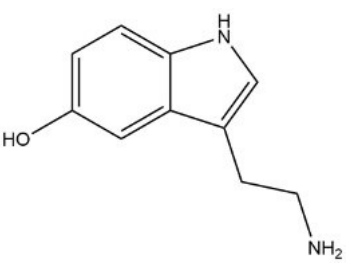
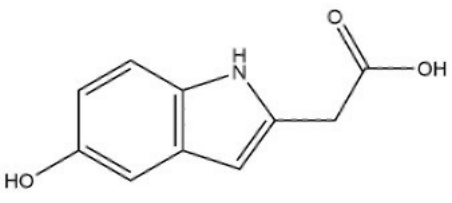
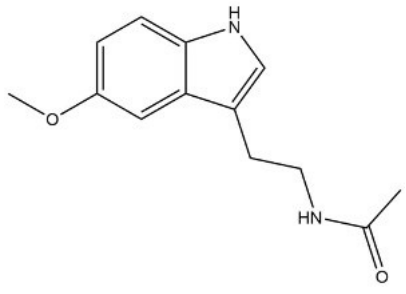
hladine u schizofrenikov. Hladiny KYNA sa opisujú ako vyššie v mozgovomiechovom moku a v kritických oblastiach CNS schizofrenikov v porovnaní s kontrolami.<sup>23</sup>

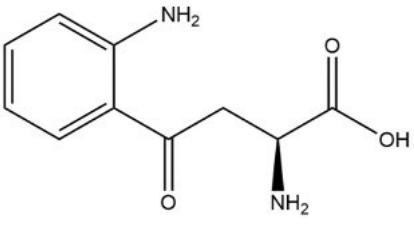
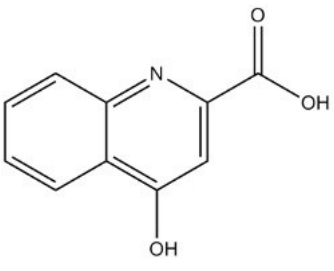
Zvýšené hladiny KYNA boli experimentálne zistené pri rôznych zápalových procesoch (reumatoidná artritída), u diabetikov 2. typu, pacientov s roztrúsenou sklerózou, pri obličkových ochoreniach, pri niektorých nádorových ochoreniach (u niektorých naopak znížená), ale aj v slinách pacientov trpiacich odontogénnymi abscesmi.<sup>20</sup>

Kyselina kynurenová sa vstrebáva z potravy a medzi potraviny, ktoré ju obsahujú patria napríklad rôzne druhy mäsa, brokolica alebo zemiaky. Vyššie koncentrácie sa nachádzajú v rastlinách ako ľubovník bodkovaný, žihľava, breza, baza alebo mäta.<sup>21</sup>

## 3.2 Fyzikálne-chemické vlastnosti tryptofánu a jeho metabolitov

Tab. 1: Nakreslené štruktúrne vzorce a vypočítané Mr, pKa a logP u metabolitov tryptofánu pomocou programu ChemDraw 18.0 s výnimkou pKa melatonínu

	Mr (g/mol)	pKa	logP
<p><b>TRYPTOFÁN</b></p> 	204,23	10,012 2,094	0,32
<p><b>SEROTONÍN</b></p> 	176,22	9,741 10,456	0,51
<p><b>KYSELINA 5-HYDROXYINDOL-3-OCTOVÁ</b></p> 	191,19	3,937 -4,935	0,74
<p><b>MELATONÍN</b></p> 	232,28	16,51 -0,69 <sup>13</sup>	0,71

	<b>Mr (g/mol)</b>	<b>pKa</b>	<b>logP</b>
<p><b>KYNURENÍN</b></p> 	208,22	2,087 9,076	-0,82
<p><b>KYSELINA KYNURENOVÁ</b></p> 	189,17	2,958 7,659	1,71

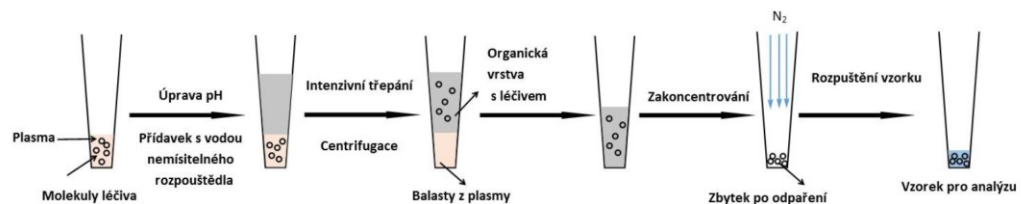
### 3.3 Úprava vzorky pred analýzou

Cieľom úpravy vzorky pred samotnou analýzou je získať vzorku, ktorá je relatívne bez interferujúcich látok, je kompatibilná s analytickou metódou a jej výtťažnosť je čo najvyššia, pričom dochádza k zakoncentrovaniu. Voľba tejto techniky závisí na štruktúre analytu, jeho stabilite, výtťažnosti a afinite k proteínom.<sup>24</sup>

Hlavné metódy úpravy vzorky pred analýzou sú liquid-liquid extrakcie (LLE), solid-phase extrakcie (SPE) a precipitácia proteínov (deproteinácia). Ďalšie metódy vychádzajú zo spomenutých.<sup>24</sup>

#### 3.3.1 LLE

Princípom je separácia vzorky na základe Nernstovho distribučného zákona medzi dvomi fázami, z ktorých jedna je lipofilná a druhá hydrofilná. Prakticky sa jedná o prenos analytov z biologickej tekutiny do organického rozpúšťadla.<sup>24</sup>



Obr. 2 Princíp LLE<sup>25</sup>

Lipofilnú fázu najčastejšie tvorí organické rozpúšťadlo, ktoré by malo byť nemiesiteľné s vodou, obdobne polárne ako analyt a malo by s ním interagovať, ale nie reagovať. Ďalej by malo byť prchavé a dostatočne čisté.<sup>24</sup>

Biologická tekutina (plazma, sérum, celá krv alebo moč) sú vodné vzorky. Upravením pH pridaním tlmivého roztoku, resp. kyseliny alebo zásady sa zabezpečí účinná extrakcia analytu a následne sa pridáva organické rozpúšťadlo, ktoré je s vodnou zložkou nemiesiteľné a tak sa vytvorí dvojfázový systém. Nasleduje pretrepávanie po určitú dobu, aby sa fázy dostatočne premiešali.<sup>24</sup>

Rozpúšťadlo sa volí na základe molekulárnej štruktúry analytu, aby sa čo najviac uľahčil vznik interakcie medzi molekulami analytu a daného rozpúšťadla. Interakcie medzi nimi môžu byť rôzneho typu, a to hydrofóbne, rozptylové, dipól-dipól interakcie

a interakcie na základe vodíkových väzieb a znalosti o týchto interakciách uľahčujú výber vhodného rozpúšťadla.<sup>24</sup>

Pre veľmi nepolárne analyty, ktoré sú látkami podobnými uhl'ovodíkom bez žiadnych alebo obsahujúcich len veľmi málo funkčných skupín, je hlavná hydrofóbna interakcia, kedy analyt a rozpúšťadlo sú hydrofóbne, takže sa volí nepolárne rozpúšťadlo, ako napríklad uhl'ovodíky alifatické alebo cyklické.<sup>24</sup>

V prípade analytov s nízkou až strednou polaritou alebo v prípade analytov s aromatickým charakterom sú účinné aromatické rozpúšťadlá (toluén, p-xylén). S toluénom a p-xylénom sa môžu vyskytovať disperzné interakcie.<sup>24</sup>

Pre ešte viac polárne analyty by sa malo zvoliť polárnejšie rozpúšťadlo, ale stále nie príliš polárne, pretože rozpúšťadlo by nemalo byť miešateľné s vodou, aby sa vytvoril dvojfázový systém.<sup>24</sup>

Pre polárne analyty sú vysoko účinné rozpúšťadlá s vysokými dipólovými momentmi, keď dochádza k rozpúšťaniu dipólovými interakciami. Príklady populárnych rozpúšťadiel s dobrými dipólovými vlastnosťami sú dichlórmetán a etylacetát.<sup>24</sup>

Na extrakciu bazických analytov sú výhodné rozpúšťadla s donorovými vlastnosťami viazucimi sa na vodík, napríklad chloroform, a na extrakciu kyslých zlúčenín sa naopak používajú akceptorové rozpúšťadlá, ktoré vodík viažu, a to je napríklad diethyléter.<sup>24</sup>

Relatívne často sa kvôli nevýhodným vlastnostiam jednotlivých rozpúšťadiel používajú ich zmesi, napríklad zmesi alkoholov ako propan-1-ol alebo butan-1-ol s nepolárnymi rozpúšťadlami. V týchto prípadoch je možné modifikovať polaritu tak, aby sa zjednodušilo získavanie analytov.<sup>24</sup>

Ako bolo uvedené, hodnota pH vo vzorke je dôležitá pre extrakciu kyslých a zásaditých látok. Doporučuje sa mať hodnoty pH minimálne dve jednotky od hodnoty pKa analytu. Kyslé analyty sa preto najúčinnnejšie extrahujú z roztokov okyslených na hodnotu pH dve jednotky pod hodnotou pKa kyselín a bazické analyty zase z roztokov o pH hodnote vyššej o dve jednotky ako hodnota pKa zásad. Pri upravovaní hodnôt pH treba dávať pozor na extrémne hodnoty, pretože môže dôjsť k zrážaniu zložiek biologických tekutín, resp. k degradácii analytov.<sup>24</sup>

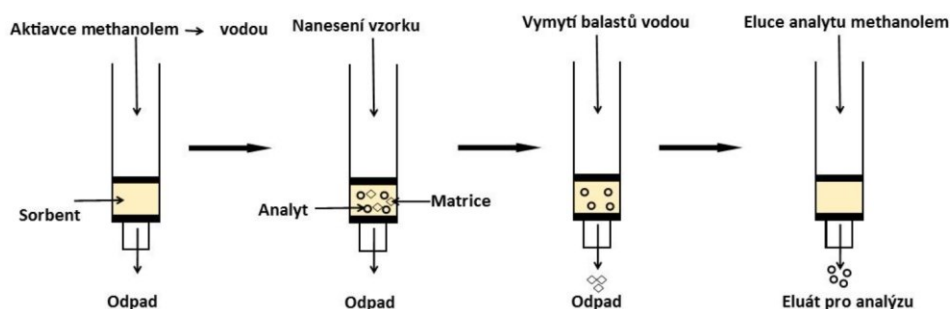


V posledných rokoch sa do popredia dostáva takzvaná superkritická fluidná extrakcia (SFE) s využitím na izoláciu a výrobu rôznych látok, najčastejšie výhodná pre izoláciu látok z rastlinného materiálu, pretože konvenčné metódy ako destilácia alebo macerácia majú veľké množstvo nevýhod. SFE je považovaná za „zelenú technológiu“, ktorá ponúka vyššiu selektivitu a kratšiu dobu extrakcie. Ako rozpúšťadlo sa používajú superkritické tekutiny pri teplote a tlaku nad kritickými hodnotami, najbežnejšie superkritický oxid uhličitý ( $scCO_2$ ), ktorý je hydrofóbny a nepolárny, preto sa v ňom ľahko rozpúšťajú malé nepolárne molekuly. Charakteristické je, že rozpúšťadlo vykazuje vlastnosti aj kvapaliny (hustota) aj plynu (viskozita, povrchové napätie). Všetky vlastnosti  $scCO_2$  určujú v konečnom dôsledku vysokú výťažnosť aj selektivitu tejto metódy.<sup>26</sup>

V posledných rokoch sa výskum LLE zameriava na vývoj rôznych mikroextrakčných techník, pri ktorých extrakcia prebieha z malého množstva média do nemiesiteľného organického rozpúšťadla ako pri klasickej LLE, ale ich výhody sú minimálna spotreba rozpúšťadiel, výhodné zakoncentrovanie, malé množstvá vzoriek a sú bez rizika tvorby emulzie. Medzi tieto mikroextrakčné techniky založené na princípe LLE patria extrakcie s využitím dutého vlákna („Hollow fiber“ – HF-LPME, „Electromembrane extraction“ – EME), extrakcie do kvapky organického rozpúšťadla („Single drop“ – SD-LPME) alebo disperzné mikroextrakcie („Dispersive“ – DLPME).<sup>27</sup>

### 3.3.2 SPE

Solid-phase extrakcia, resp. extrakcia na pevnej fáze sa používa na prípravu vzoriek biologických tekutín, ako plazma, sérum a moč. Využíva malú extrakčnú kolónu, ktorá je naplnená stacionárnou fázou, je obvykle jednorázová a celý proces prebieha v štyroch krokoch. Prvým je *kondicionácia* kolóny premytím kvapalinou, čoho účelom je pripraviť stĺpec na aplikáciu vzorky. Druhým krokom je *nanesenie* vzorky, pri čom sa analyty zadržávajú v kolóne pomocou interakcií so stacionárnou fázou a balastné látky sa vymývajú zo stĺpca. V treťom kroku, pri tzv. *premyvaní* sa preplachuje kolóna a vymývajú sa ďalšie balastné látky, zatiaľ čo analyt stále ostáva na sorbente kvôli silným interakciám so stacionárnou fázou. Posledným krokom je *elúcia*, kedy sa tzv. eluent prepláchnu kolónou, prerušia sa interakcie medzi analytom a stacionárnou fázou. Konečný roztok, ktorý sa nazýva eluát, obsahuje analyt bez zlúčenín matrice a používa sa na konečnú analýzu.<sup>24</sup>



Obr. 3 Princíp SPE<sup>25</sup>

Na SPE sa používa relatívne jednoduché zariadenie, ktorého súčasťou je stĺpec a vákuový rozdeľovač, ktorý vytvára vákuum na výstupe z kolóny a tlačí tekutiny cez ňu. Zapína sa pri pretekaní kvapaliny a medzi jednotlivými krokmi sa vypína, aby sa zabránilo vyschnutiu kolóny.<sup>24</sup>

Veľkosť stacionárnych častíc v kolóne je obvykle v rozmedzí 40-50  $\mu\text{m}$ . Typická kolóna SPE pre 1 ml vzorky obsahuje 30-100 mg stacionárnej fázy, ktorá je založená buď na časticiach oxidu kremičitého alebo na organických polyméroch. To znamená, že funkčné skupiny sú súčasťou tejto fázy. Častice na báze kremíka sú vysoko porézne a jednotlivé nízkomolekulárne látky sa môžu v póroch veľmi efektívne zadržiavať, narozdiel od makromolekúl, ako napríklad proteíny, takže tieto sa z kolóny rýchlo vypláchnu.<sup>24</sup>

Prvým krokom SPE je kondicionácia. Kolóny sa dodávajú v suchom stave, v ktorom sú funkčné skupiny neaktívne, takže musia byť solvatované, čo sa zabezpečí polárnym organickým rozpúšťadlom, najčastejšie metanolom. Methanol sa takisto dokáže na kolóne zadržiavať, preto sa v druhej časti procesu odstraňuje prepláchnutím vodou alebo vodnými puframi. Kondicionácia je výhodná aj z dôvodu odstránenia nečistôt súvisiacich s výrobou kolóny.<sup>24</sup>

Jedným z často používaných typov solid-phase extrakcie, je SPE s reverznou fázou, ktorá je založená na hydrofóbných interakciách založených na van der Waalsových silách medzi väzbami vodík-uhlík a používa sa ideálne na extrakciu relatívne nepolárnych analytov z vodných roztokov. Silne hydrofóbné sú kolóny C18, tým zadržiavajú väčšie množstvo látok a tým je horšia selektivita tejto metódy. Zvýšenie selektivity sa zabezpečí použitím menej hydrofóbných fáz, napr. kolóny C8. U kyslých alebo zásaditých analytov môže byť výhodne zriedenie vzorky tlmivým roztokom, pretože lepšia retencia sa dosahuje v nenabitom stave. Na premývanie sa pri tomto type extrakcie používa čistá voda alebo iné 100% vodné roztoky, resp. ak sú analyty dobre zadržané, môže sa použiť účinnejší roztok, ktorý obsahuje 10-20 % methanolu. Nakoniec pri elúcii sa používa 100% methanol alebo zmes methanolu a vody v malých objemoch, pretože potlačujú hydrofóbné interakcie a tým spôsobujú elúciu analytov z kolóny. Tu sa môže upraviť pH pri kyslých alebo zásaditých zlúčeninách, aby došlo k ich nabitíu a ďalšiemu zníženiu hydrofóbných interakcií.<sup>24</sup>

Špeciálnym typom SPE je ionovýmienná, ktorá sa využíva pri kyselinách a zásadách a je založená na iónových interakciách stacionárnej fázy a analytu. Katióny sa extrahujú pomocou katexov, ktoré sú záporne nabité a anióny pomocou anexov, ktoré sú nabité kladne.<sup>24</sup>

Katiónové ionomeniče sa rozdeľujú na silné, ktoré sú ionizované v celom rozsahu pH a typicky obsahujú kyselinu sulfónovú ako iónovú funkčnú skupinu, a slabé, ktoré sa ionizujú iba v istom rozsahu pH, tam je často prítomná karboxylová skupina. Aniónové ionomeniče sa takisto rozdeľujú na silné, ktorých základom sú kvartérne amóniové skupiny, a slabé, kde sú prítomné sekundárne alebo terciárne aminoskupiny.<sup>24</sup>

Pri premývání sa najčastejšie používa voda alebo tlmivé roztoky, prípadne je výhodne premývať aj metanolom, pretože nenaruša interakcie medzi analytom a stacionárnou fázou, ale odstraňuje neutrálne zlúčeniny s nízkou polaritou. Je dôležité, aby analyt ostal ionizovaný aj počas premývania a nedošlo k jeho strate.<sup>24</sup>

Elúcia je založená na tzv. „vypnutí“ iónových interakcií, čo sa pri silných ionomeničoch zrealizuje potlačením náboja analytu a pri slabých samotným „vypnutím“ ionomeniča, čo sa vo všetkých prípadoch zabezpečuje vhodným pH eluentu.<sup>24</sup>

SPE môže byť aj kombinovaná, čo je vlastne prepojenie techniky s reverznou fázou a ionomeničovej SPE.<sup>24</sup>

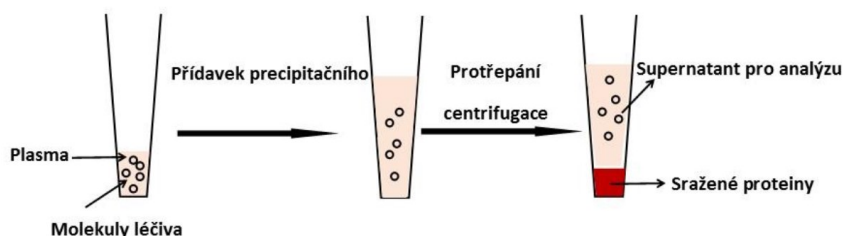
SPE s normálnou fázou sa používa menej často a je určená na izoláciu analytov prítomných v nevodných roztokoch. Pri tomto type sa zachytávajú analyty v kolóne pomocou polárnych interakcií so stacionárnou fázou, čo môžu byť vodíkové väzby, dipólové interakcie atď. Vzorka je rozpustená v nepolárnom alebo slabo polárnom organickom rozpúšťadle, čo je napríklad n-hexán a na elúciu sa používa polárnejšie rozpúšťadlo, najčastejšie metanol, ktorý potláča vodíkové interakcie.<sup>24</sup>

### 3.3.3 Deproteinizácia

Plazma obsahuje asi 8 % bielkovín. Jej priame vstrekovanie do analytických prístrojov sa neodporúča, pretože proteíny sa zrážajú, tým sa výkonnosť rýchlo znižuje a kolóna sa môže upchať.<sup>24</sup>

Zámerom deproteinizácie je odstránenie proteínov z plazmy alebo séra. Jej princípom je prídanie precipitačného činidla do plazmy, čo je najčastejšie acetonitril, ale môže sa jednať aj o iné organické rozpúšťadlá alebo kyseliny, ióny, či soli, ktoré sú miešateľné s vodnou plazmou. Pri pridávaní precipitačného činidla záleží na jeho množstve a type.<sup>24</sup>

Po dôkladnom pretrepaní sa vytvorí zmes, kde sa proteíny po styku s týmto činidlom vyzrážajú, pretože nastáva denaturácia znížením dielektrickej konštanty plazmatických proteínov, čo zvyšuje elektrostatické interakcie medzi nimi. Takisto organické rozpúšťadlo vytesňuje molekuly vody spojené s hydrofóbnymi oblasťami proteínov. Následne sa zmes odstredí pri vysokých otáčkach pomocou centrifúgy, proteíny sa usadia a číra tekutina (supernatant) je pripravený na analýzu.<sup>24</sup>



Obr. 4 Princíp deproteinizácie<sup>25</sup>

Deproteinizácia nie je extrakčnou metódou, pretože analyty sa neprenášajú zo vzorky do iného média, ale zostávajú vo vodnom médiu plazmy. Je rýchla, minimálne nákladná na vybavenie, jednoduchá, ale nevýhodou môže byť, že pri tejto metóde zostáva komplexná zmes ďalších látok stále v supernatante a pridaním precipitačného činidla sa vzorka zriedi, čo spôsobí zníženie koncentrácie cieľového analytu.<sup>24</sup>

Mimo klasických techník deproteinizácie sú dnes používané aj niektoré moderné techniky ako ultrafiltrácia, čo je membránová separácia proteínov často urýchľovaná tlakom piestu, stlačeným vzduchom alebo centrifugáciou a umožňuje stanoviť viazanosť liečiva na proteíny plazmy.<sup>28</sup>

### 3.4 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC = z angl. High-performance liquid chromatography) je separačná metóda založená na rozdieloch v distribúcii látok medzi dvoma nemiesiteľnými fázami. Mobilnou fázou je kvapalina, ktorá prestupuje stacionárnu fázou naplnenou do kolóny.<sup>24</sup>

Prístroj sa skladá z čerpaceho systému, dávkovacieho zariadenia, chromatografickej kolóny, detektoru a zariadenia na spracovanie dát. Mobilná fáza je pumpovaná z jedného alebo viacerých zásobníkov a preteká konštantnou rýchlosťou kolónou a detektorom.<sup>24</sup>

Čerpacie systémy sú potrebné pre privádzanie mobilnej fázy konštantnou rýchlosťou. Musí byť zabezpečené čo najmenšie kolísanie tlaku, čo je zabezpečené zariadením na tlmenie pulzov. Hadičky a všetky spoje musia tomuto tlaku odolávať. Ďalej môžu byť čerpacie systémy vybavené zariadením pre odstraňovanie vzduchových bublín. Čerpacie systémy ovládané mikroprocesormi sú schopné privádzať mobilnú fázou buď s konštantným zložením (izokratická elúcia), alebo so zložením, ktoré sa v priebehu analýzy mení (gradientová elúcia), čo je zabezpečené v tomto prípade viacerými zásobníkmi.<sup>24</sup>

Dávkovacie zariadenie je schopné pracovať pri vysokom tlaku a môže byť ručné, ktorého nevýhodou je horšia presnosť, alebo automatické. Jeho funkciou je dávkovanie roztoku vzorku na horný koniec kolóny alebo v jej blízkosti.<sup>24</sup>

V HPLC sa používa veľké množstvo stacionárnych fáz, ako napríklad oxid kremičitý, oxid hlinitý alebo porézny grafit v chromatografii s normálnymi fázami, polyméry alebo živice s kyslými alebo zásaditými skupinami pri ionomienicovej chromatografii, porézny oxid kremičitý alebo polyméry vo vylučovacej chromatografii, chemicky modifikovaný oxid kremičitý, polyméry alebo porézny grafit v chromatografii s reverznými fázami, a tiež deriváty celulózy alebo amyulózy, bielkoviny a peptidy atď. pre separáciu enantiomérov.<sup>24</sup>

Väčšina separácií je založená na mechanizme rozdeľovania a využíva chemicky modifikovaný oxid kremičitý a polárne organické rozpúšťadlá, takže sa jedná o reverzný typ chromatografie.<sup>24</sup>

Pre analytické separácie sa väčšinou využíva veľkosť častíc 3-10  $\mu\text{m}$ . Môžu mať guľovitý alebo amorfný tvar, rôznu pórovitosť a špecifický povrch. V prípade obrátených fáz hrá rolu jej druh, obsah viazaného uhlíku, údaj o prípadnom odstránení povrchových silanolových skupín. Ak totiž obsahuje stacionárna fáza zvyškové silanolové skupiny, môže dochádzať k „chvostovaniu“ pík. <sup>24</sup>

Kolóny sú vyrobené z nerezovej ocele, majú rôzne dĺžky a vnútorné priemery. Ak majú vnútorný priemer menší než 2 mm, sú označované ako mikrokolóny. Väčšina separácií je uskutočňovaná pri teplote miestnosti, ale kolóny sa môžu aj zahrievať pre zvýšenie účinnosti. Pre udržiavanie teploty je veľmi často používaný termostat kvôli reprodukovateľnosti retenčného času. Odporúča sa nezahrievať na viac ako 60 °C, kvôli nebezpečenstvu degradácie stacionárnej fázy alebo zmien v zložení mobilnej fázy. <sup>24</sup>

Ako mobilné fázy sa v normálnej chromatografii používajú menej polárne rozpúšťadlá kontrolované na prítomnosť vody, v reverznej chromatografii sú to vodné mobilné fázy, buď s alebo bez organického rozpúšťadla. Zložky mobilných fáz sa filtrujú, aby sa predišlo kontaminácii časticami väčšími ako 0,45  $\mu\text{m}$ . Pred čerpaním do systému sa mobilné fázy prebublávajú héliom, v ultrazvukovom kúpeli alebo sa používajú membránové či vákuové zariadenia, ktoré zabraňujú tvorbe bublín v cele detektoru. <sup>24</sup>

Najčastejšie používané detektory sú spektrofotometre pre meranie v ultrafialovej a viditeľnej oblasti (UV/VIS), vrátane detektorov s diódovým poľom. Ďalej sa používajú fluorimetrické, elektrochemické detektory, hmotnostné spektrometre atď. <sup>24</sup>

Fluorimetrický detektor je založený na fluorescencii analytu a meraní sekundárneho žiarenia. Je citlivejší a selektívnejší ako spektrofotometrický detektor, ale používa sa len pre látky, ktoré vykazujú fluorescenciu. Xenónová výbojka generuje žiarenie, ktoré prechádza cez monochromátor, ktorý ho filtruje. Molekuly analytu absorbujú excitačné žiarenie a časť energie je vyžiarená vo forme emisného žiarenia, ktoré má vyššiu vlnovú dĺžku. <sup>29</sup>

Pre vlastné kvantitatívne hodnotenie látok je základom plocha, resp. výška chromatografického píku. Najčastejšie sa používajú dve metódy stanovenia:

1. *Metóda vonkajšieho štandardu*, kedy sa analyzuje roztok analytu a samostatne sa analyzuje roztok vonkajšieho štandardu o známej koncentrácii skúmanej zlúčeniny. Koncentrácia stanovovaných zložiek zmesi sa vypočíta z priemeru plôch (výšok) píku jednotlivých stanovovaných látok a plochy píku vonkajšieho štandardu.<sup>24</sup>
2. *Metóda vnútorného štandardu*, kedy sa k známemu objemu roztoku vzorku aj štandardu pridá definovaný objem roztoku vhodného vnútorného štandardu, ktorý by mal byť štruktúrne podobný stanovovanému analytu, musí byť eluovaný v blízkosti píku tohto analytu, musí byť chemicky inertný a mať podobnú koncentráciu ako látky, ktorých obsah je stanovovaný.<sup>24</sup>
3. *Metóda normalizácie* – obsah stanovovanej látky sa vyjadří ako percentuálny podiel z plôch všetkých pík na chromatograme. Zanedbané sú píky rozpúšťadiel a píky pod limitom zanedbateľnosti. Využíva sa pri hodnotení stability a čistoty.<sup>30</sup>
4. *Kalibračný postup* – určuje sa závislosť medzi koncentráciou a odozvou detektoru, z ktorej sa vypočíta kalibračná funkcia. Princíp je rovnaký ako pri validácii analytickej metódy.<sup>30</sup>
5. *Metóda štandardného prídavku* – využíva sa pri kvantitatívnom stanovení vo vzorkách, kde nie je dostupný blank (napríklad kvantifikácia inzulínu v krvnej plazme). Kvôli tomu sa pripravuje analyzovaná vzorka a vzorka s pridaným známym množstvom analytu. Porovnaním plôch oboch vzoriek sa potom dopočíta koncentrácia stanovovaného analytu v neznámej vzorke.<sup>30</sup>

Pred analýzou sa zisťuje spôsobilosť chromatografického systému. Tento test spôsobilosti zaisťuje že parametre predpísané liekopisom alebo iným predpisom sú na požadovanej úrovni pre správne stanovenie obsahu. Tieto parametre sú účinnosť, kapacitný faktor, rozlíšenie, relatívna retencia a faktor symetrie. V prípade, že nejaký parameter nezodpovedá, dochádza k úprave chromatografických podmienok. Rozsah je uvedený v príslušnej liekopisnej monografii alebo predpise.<sup>24</sup>



## 3.5 Validácia

Cieľom validácie je určiť podmienky, pri ktorých je skúšobná metóda použiteľná a zaistiť rovnakú spoľahlivosť pre použitie v rôznych laboratóriách. Zistené hodnoty validačných parametrov sa spracovávajú do validačného protokolu, ktorý musí obsahovať patričnú dokumentáciu (napr. chromatogramy). Pre validáciu bioanalytických metód sa využívajú smernica Amerického úradu pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) a smernica Európskej liekovej agentúry (EMA).<sup>31 32</sup>

Jednotlivé validačné parametre sú správnosť, presnosť, selektivita, citlivosť, linearita, rozsah a robustnosť.

### 3.5.1 Správnosť (Accuracy)

Vyjadruje zhodu medzi získaným výsledkom a správnou hodnotou, tzn. medzi koncentráciou získanou použitím analytickej metódy a reálnou koncentráciou. Správna hodnota sa zisťuje buď inou metódou s overenou správnosťou alebo sa pripraví modelová vzorka so známym prídavkom štandardu. FDA hodnotí správnosť na troch koncentračných úrovniach (najnižšia, stredná a najvyššia). EMA stanovuje na základe štyroch koncentračných úrovní (LLOQ, trojnásobok LLOQ, koncentrácia na úrovni 50 % a 75 % kalibračnej krivky).<sup>31 32</sup>

Obvykle sa správnosť zisťuje analýzou najmenej piatich vzoriek a priemer analyzovanej koncentrácie musí byť v rozmedzí  $\pm 15\%$  od reálnej hodnoty. Výnimka je LLOQ, kde je tolerovaných  $\pm 20\%$ .<sup>32</sup>

### 3.5.2 Presnosť (Precision)

Označuje mieru zhody medzi jednotlivými výsledkami jednej metódy opakovane získanými zo vzoriek z jednej homogénnej matrice. Podobne ako u presnosti je stanovovaná na viacerých koncentračných úrovniach a vyjadruje sa ako relatívna smerodatná odchýlka (RSD) koncentrácií nameraných u vzoriek na rovnakej koncentračnej úrovni. Podľa FDA je výsledok presný v rozmedzí  $\pm 15\%$  zase s výnimkou u LLOQ, kde je tolerované rozmedzie  $\pm 20\%$ .<sup>31</sup>

Presnosť sa ďalej rozdeľuje na:

1. presnosť v rámci jednej série analýz (within-run precision) – v jeden deň
2. presnosť medzi rôznymi sériami analýz (between-run precision) – rôzne dni<sup>31</sup>

### 3.5.3 Selektivita (Specificity)

Znamená správne a špecifické meranie danej látky a jej odlišenie v prítomnosti iných látok, ktoré môžu byť prítomné, napríklad ďalšie účinné látky, nečistoty, pomocné látky, rozkladné produkty a zvyškové rozpúšťadlá. Tento parameter sa doloží výsledkami analýzy štandardu, a ďalej napríklad vzorkou bez analyzovanej látky obsahujúcou všetky ostatné spomínané látky (blank).<sup>31</sup>

### 3.5.4 Linearita (Linearity)

Vyjadruje závislosť odozvy detektoru na koncentráciu látky. Obvykle je stanovovaných minimálne päť koncentrácií v rozmedzí 50 – 150 % deklarovaného obsahu a pracuje sa s roztokmi štandardu. Na vyhodnocovanie sa používa kalibračná krivka a smernica. Koncentrácia všetkých hodnotených vzoriek musí ležať v rozmedzí kalibračnej krivky. Pre popis linearity sa využíva kalibračná funkcia. Najvýhodnejšie použitie má rovnica priamky:  $y = ax + b$ . Dostatočná spoľahlivosť kalibračnej krivky je hodnotená na základe vypočítaného korelačného koeficientu R. Čím viac sa hodnota R blíži číslu 1, tým je metóda lineárnejšia.<sup>31</sup>

### 3.5.5 Rozsah (Range)

Odvodzuje sa od linearity a sú to hranice koncentrácií, pre ktoré môže byť metóda použitá. Dolný limit môže byť LOD a horný limit je určený odozvou detektoru, pri ktorej prekročení už prístroj nepracuje presne.<sup>31</sup>

### 3.5.6 Citlivosť (Sensitivity)

Citlivosť metódy vyjadrujú detekčný limit (limit of detection, LOD) a kvantitatívny limit (limit of quantitation, LOQ). V prvom prípade ide o najnižšiu detekovateľnú koncentráciu látky, a v druhom prípade o najnižšiu koncentráciu látky s prijateľnou presnosťou a správnosťou. LOD sa overuje analýzou príslušnej

koncentrácie vzorky. LOQ má obyčajne limitujúcu smerodajnú odchýlku 10 %, preto je možné ho vyjadriť ako koncentráciu, býva to obvykle trojnásobok LOD.<sup>31</sup>

### 3.5.7 Robustnosť (Robustness)

Vyjadruje mieru vplyvu premenných podmienok na výsledky analýzy, napríklad zloženie mobilnej fázy, pH vodnej zložky mobilnej fázy, teplota na kolóne, rýchlosť prietoku, stabilita vzoriek, rozdiely medzi kolónami rôznych šarží a výrobcov.<sup>31</sup>

## 3.6 Publikované štúdie

Tab. 2 SPE extrakcia KYN, TRP, KYNA, 5-HIAA<sup>33</sup>

<b>Kolóna</b>	Sep-Pak Plus C <sub>18</sub>
<b>Kondicionácia</b>	5 ml MeOH 2 ml 0,01M dodecylsulfát sodný (SDS, pH 2,1)
<b>Premývanie</b>	1 ml 0,01M SDS 1 ml MeOH : SDS (5:95)
<b>Vzorky</b>	vzorky plazmy + 5% kys. sulfosalicylová pretrepané a centrifugované 1800 g na 15 min. supernatant alkalizovaný na pH 5 (2 M hydroxid sodný) doplnený do 1 ml tlmivým roztokom (pH = 4,5)
<b>Elúcia</b>	4 ml 1 M amoniak : MeOH (80:20)
<b>Rozpustenie po odparení</b>	500 µl MeOH
<b>Analýza</b>	HPLC – UV detektor

Tab. 3 SPE extrakcia 5-HT<sup>34</sup>

<b>Kolóna</b>	WCX $\mu$ Elution (96-jamková)
<b>Kondicionácia</b>	200 $\mu$ l MeOH 200 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
<b>Vzorky</b>	10 $\mu$ mol/l (1.76 mg/l) serotonín v 1% kys. octovej (174 mmol/l) + deuterizovaný serotonín (IS) vo vode
<b>Premývanie</b>	200 $\mu$ l 20 mmol/l octan amónny 200 $\mu$ l MeOH
<b>Elúcia</b>	100 $\mu$ l MeOH : HCOOH : H <sub>2</sub> O (30:5:65)
<b>Analýza</b>	HPLC-MS

Tab. 4 Deproteinizácia pomocou kyseliny chloristej<sup>35</sup>

<b>Vzorky</b>	krvná plazma
<b>Precipitačné činidlo</b>	2,4 M kyselina chloristá
<b>Centrifugácia</b>	10 000 g na 3 minúty
<b>Analýza</b>	supernatant analyzovaný pomocou HPLC

Tab. 5 Deproteinizácia pomocou kyseliny trichloroctovej<sup>36</sup>

<b>Vzorky</b>	krvná plazma
<b>Precipitačné činidlo</b>	10% kys. trichloroctová
<b>HPLC analýza</b>	TRP, KYN – UV detektor KYNA – fluorimetrický detektor

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Chemikálie, prístroje a pomôcky

#### Chemikálie

- acetonitril for HPLC, gradient grade – Sigma Aldrich, Nemecko
- amoniak 1M – Penta s.r.o., Česká republika
- dichlórmetán – Penta s.r.o., Česká republika
- dodecylsulfát sodný – Sigma Aldrich, Nemecko
- etylacetát – Penta s.r.o., Česká republika
- hydroxid sodný 0,1M – ČL 2017
- hydroxid sodný koncentrovaný RS – ČL 2017
- chloroform p.a. – Penta s.r.o., Česká republika
- králičia plazma
- Krebsov živný roztok
- kyselina 5-hydroxyindol-3-octová – Sigma Aldrich, Nemecko
- kyselina chloristá – Penta s.r.o., Česká republika
- kyselina chlorovodíková 0,1M – ČL 2017
- kyselina kynurenová – Sigma Aldrich, Nemecko
- kyselina mravčia – Sigma Aldrich, Nemecko
- kyselina octová 99% – Penta s.r.o., Česká republika
- kyselina trifluoroctová – Fluorochem, UK
- kyselina trichlóroctová – Sigma Aldrich, Nemecko
- L-kynurenín – Sigma Aldrich, Nemecko
- L-tryptofán – Sigma Aldrich, Nemecko
- melatonín – Sigma Aldrich, Nemecko
- metanol – vWR Chemicals, USA
- serotonin – Sigma Aldrich, Nemecko
- voda čistená reverznou osmózou

#### Krebsov živný roztok

Krebsov živný roztok bol poskytnutý už nariadený z Katedry farmakológie a toxikológie a uchovávaný v chladničke.

Tab. 6 Krebsov zásobný roztok – zloženie na 100 ml

<b>NaCl</b>	6,90 g
<b>KCl</b>	0,35 g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	2,10 g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O</b>	0,14 g
<b>Glukóza</b>	1,00 g

## HPLC

- HPLC jednotka: Shimadzu, Japonsko
- riadiaca jednotka: CBM-20A
- degasser: DGU-20A<sub>3</sub>
- čerpadlo: LC-20AD
- autosampler: SIL-20AC
- predkolóna: OPTI-GUARD 1 mm C18
- kolóna: Kinetex EVO, C18, 100A, 150 × 3 mm
- termostat kolóny: CTO-20AC Shimadzu
- detektory: UV-VIS SPD-20A, FLUORESCENCE RF-10A<sub>XL</sub>
- PC program: Lab Solutions, version 5.85

## Prístroje

- analytické váhy
- pH meter
- magnetická miešačka
- vodná výveva
- trepačka
- ultrazvukový kúpeľ
- centrifúga
- koncentrátor
- spektrofotometer
- fluorimeter
- manifold na SPE kolóny

## **Laboratórne pomôcky**

Digestor, Eppendorf skúmavky, Erlenmayerove banky, filtračné banky, filtre, frity, injekčné striekačky, kadičky, SPE kolóny, kopistky, kyvety, laboratórne lyžičky, miešadlo, miska s ľadom, odmerné valce, automatické pipety + špičky, skúmavky, stojan na skúmavky, strička, sklenené tyčinky, vialky, viečka, septá, zátky (sklenené).

## **4.2 Všeobecné postupy**

### **4.2.1 Príprava roztokov**

#### **Zásobný roztok štandardov**

Roztoky tryptofánu a jeho biologických metabolitov (kynurenín, kyselina kynurenová, serotonin, melatonín, kyselina 5-hydroxyindol-3-oxalová) boli pripravené navážením 1 mg týchto látok do 1 ml metanolu. Takto vzniklo 6 roztokov a výsledná koncentrácia tohto riedenia bola 1 mg/ml.

Zo všetkých zásobných roztokov látok o koncentrácii 1 mg/ml bolo odobraných 100 µl a doplnené boli metanolom do 1 ml. Bol pripravený jeden roztok tryptofánu a jeho metabolitov o koncentrácii 0,1 mg/ml.

Ďalšie riedenie prebiehalo odobraním 50 µl z tohto roztoku o koncentrácii 0,1 mg/ml a doplnením do 500 µl metanolom. Takto bol pripravený finálny zásobný roztok štandardov o koncentrácii 10 µg/ml, ktorý bol používaný na ďalšiu analýzu. Všetky tieto roztoky boli uchovávané v mrazničke.

#### **Roztok štandardov k HPLC analýze**

Vzorka štandardov bola pripravená odobraním 2,5 µl zo zásobného roztoku štandardov a doplnená bola do 1 ml vodou. Vznikol roztok štandardov pripravený k analýze a jeho koncentrácia bola 25 ng/ml.

## 4.2.2 Príprava mobilnej fázy a HPLC systému

Mobilná fáza pre analýzu bola pripravená zmiešaním 1000 ml vody a 7,5 ml kyseliny octovej 99%. Následne bolo pomocou pH metru a koncentrovaného roztoku hydroxidu sodného upravené pH za súčasného miešania na hodnotu 4,5. Roztok sa potom prefiltraval a k 970 ml takto pripraveného roztoku bolo pridaných 30 ml metanolu.

Pri každej zmene mobilnej fázy bola kolóna ekvilibrovaná po dobu 15-20 minút.

Tab. 7 HPLC – vyvinutá metóda podľa Málkovej<sup>37</sup>

<b>Rozmery kolóny</b>	dĺžka 150 mm, ID 3 mm
<b>Stacionárna fáza</b>	silikagel C18 (veľkosť častíc 5 µm, veľkosť pórov 100 Å)
<b>Predkolóna</b>	OPTI-GUARD C18, dĺžka 1 mm
<b>Mobilná fáza A</b>	voda + octanový tlmivý roztok 0,1 M pH 4,5 + MeOH 97+3
<b>Mobilná fáza B</b>	čistý metanol
<b>Teplota</b>	30 °C
<b>Prietoková rýchlosť</b>	0,5 ml/min
<b>Detekcia</b>	spektrofotometrický detektor: 220 nm, 280 nm, 300 nm (TRP, 5-HT, 5-HIAA), 364 nm (KYN), 330 nm (KYNA) fluorimetrický: TRP, 5-HT, 5-HIAA: Ex 297 nm, Em 344 nm KYNA: Ex 330 nm, Em 390 nm KYN: Ex 364 nm, Em 480 nm
<b>Elúcia</b>	gradientová
<b>Celková doba analýzy</b>	30 minút
<b>Objem nástreku</b>	100 µl



### 4.3 Extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE)

Vzorky boli pripravené odobraním 15  $\mu\text{l}$  zo zásobného roztoku štandardov a doplnené do 3 ml Krebsovým živným roztokom. Následne bolo z tohto roztoku päťkrát odobraných 2,5  $\mu\text{l}$  do piatich Eppendorf skúmaviek a bolo upravené pH na požadované hodnoty pomocou kyseliny chlorovodíkovej 0,1M a hydroxidu sodného 0,1M (Tab. 8). Výsledná koncentrácia bola 25ng/ml. Po úprave pH sa roztoky pretrepali na trepačke a následne boli doplnené etylacetátom/dichlórmetánom do 1 ml. Potom sa trepali ešte päť minút na trepačke vortex a následne centrifugovali po dobu ďalších päť minút pri otáčkach 10000 za minútu.

Po oddelení vrstiev bolo z vrchnej organickej vrstvy odobraných 400  $\mu\text{l}$  do vialiek a následne odparených dusíkom dosucha. Bolo pridaných po 1 ml vody do každej vialky a takto bolo pripravených 5 vzoriek na HPLC analýzu.

Spolu so vzorkami po odparovaní organickej vrstvy boli analyzované aj vzorky vodnej vrstvy po extrakcii.

Súbežne bolo pripravených obdobným spôsobom päť slepých vzoriek a spolu so vzorkami bol analyzovaný aj roztok štandardov k HPLC analýze.

Zároveň bol pripravený odobraním 2,5  $\mu\text{l}$  zo zásobného roztoku štandardov, pridaním 1 ml etylacetátu a následným odparením a rozpustením vo vode aj štandard týchto látok v etylacetáte a takisto bol analyzovaný spolu s ostatnými vzorkami. Rovnako boli pripravené štandardy látok v chloroforme a dichlórmetáne.

Jedna vzorka bola analyzovaná po odparení 2,5  $\mu\text{l}$  zásobného roztoku štandardov a následnom rozpustení v 1 ml vody. Spolu bolo pre túto fázu pripravených 44 analytov.

*Tab. 8 Hodnoty pH a pridávané objemy pre LLE s etylacetátom*

<b>pH</b>	<b>objem kyseliny/zásady</b>
3	125 $\mu\text{l}$ HCl
4	110 $\mu\text{l}$ HCl
7	0
10	80 $\mu\text{l}$ NaOH
11	170 $\mu\text{l}$ NaOH

## 4.4 Extrakcia z pevnej fázy (SPE)

### 4.4.1 SPE extrakcia KYN, KYNA, TRP, 5-HIAA

Extrakčná kolóna bola Discovery SPE REVERSED-PHASE 500mg/3ml. Dohromady boli extrahované tri roztoky:

1. 2,5  $\mu$ l zásobného roztoku štandardov bolo doplnených do 0,5 ml plazmou a potom deproteinizovaných 500  $\mu$ l MeOH
2. 2,5  $\mu$ l zásobného roztoku štandardov bolo doplnených do 0,5 ml metanolom
3. blank: 0,5 ml plazmy

Na kondicionáciu bolo použitých 5 ml MeOH a následne 2 ml 0,01M roztoku dodecylsulfátu sodného (SDS). Následne boli nanesené vzorky. Po nanesení vzoriek nastalo premytie, ktoré bolo uskutočnené 1 ml 0,1M SDS a potom 1 ml zmesi MeOH:SDS (5:95). Samotná elúcia prebiehala so 4 ml zmesi 1M amoniak:MeOH (80:20) a eluáty boli na koncentrátore odparené dusíkom a rozpustené v 500  $\mu$ l vody.

### 4.4.2 SPE extrakcia 5-HT

Použitá kolóna bola Discovery SPE Ion-Exchange 500mg/3ml. Vzorky boli pripravené obdobne ako pri prvej SPE extrakcii.

Na kondicionáciu kolón bolo použitých 200  $\mu$ l MeOH a následne 200  $\mu$ l vody. Po nanesení vzorky sa premýva kolóna 200  $\mu$ l 20mM octanom amónnym a 200  $\mu$ l MeOH. Ako eluačné činidlo bolo použitých 100  $\mu$ l zmesi MeOH:kys. mravčia:voda (30:5:65).

## **4.5 Deproteinizácia**

### **4.5.1 Deproteinizácia pomocou kyselín**

Prvá deproteinizácia bola vyskúšaná odobratím 7,5  $\mu\text{l}$  zo zásobného roztoku štandardov a nariadením do 3 ml Krebsovým živným roztokom. Potom bolo odobraných trikrát 500  $\mu\text{l}$  do troch Eppendorf skúmaviek. Samotná deproteinizácia prebehla pridaním 100  $\mu\text{l}$  10% kyseliny trichloroctovej do prvej vzorky, 100  $\mu\text{l}$  10% kyseliny trifluoroctovej do druhej vzorky a 125  $\mu\text{l}$  25% kyseliny chloristej do tretej vzorky. Suspenzie boli pretrepané na trepačke a chladené na ľade po dobu 5 minút a potom centrifugované pri 10 000 otáčkach za minútu po dobu ďalších 5 minút. Po oddelení vrstiev sa odobralo 400  $\mu\text{l}$  supernatantu a analyzovalo pomocou HPLC.

Zároveň boli pripravené slepé vzorky a analyzovaný bol aj štandard.

### **4.5.2 Deproteinizácia pomocou metanolu a acetonitrilu**

Zo zásobného roztoku štandardov bolo odobraných 2,5  $\mu\text{l}$  do štyroch Eppendorf skúmaviek, bolo pridaných 122,5  $\mu\text{l}$  králičej plazmy a následne metanol/acetonitril. Po pretrepaní na trepačke vortex (2 minúty) sa centrifugovalo pri 9000 otáčkach za minútu po dobu 5 minút. Odobraných bolo 400  $\mu\text{l}$  supernatantu.

Jedna samostatná vzorka bola pripravená tým istým spôsobom vrátane deproteinizácie s 500  $\mu\text{l}$  metanolu. Táto vzorka bola po odobraní supernatantu odparená a následne rozpustená v 0,5 ml vody.

Zároveň sa pripravil aj štandard a slepé vzorky. V tejto fáze deproteinizácie bolo analyzovaných dohromady 10 vzoriek (kompletné riedenie vzoriek v Tab. 9)

Tab. 9 Príprava vzoriek deproteinovaných metanolom/acetónitriľom

<b>Zásobný roztok štandardov</b>	<b>Králíčia plazma</b>	<b>Metanol</b>	<b>Acetonitril</b>	<b>poznámka</b>
2,5 µl	0 µl	0 µl	0 µl	+ 0,5 ml vody (štandard)
2,5 µl	122,5 µl	500 µl	0 µl	
2,5 µl	122,5 µl	1200 µl	0 µl	
2,5 µl	122,5 µl	0 µl	500 µl	
2,5 µl	122,5 µl	0 µl	1200 µl	
0 µl	125 µl	500 µl	0 µl	blank
0 µl	125 µl	1200 µl	0 µl	blank
0 µl	125 µl	0 µl	500 µl	blank
0 µl	125 µl	0 µl	1200 µl	blank

## **4.6 Príprava roztokov pre validáciu metódy podľa smernice EMA**

Validácia bola prevedená na deproteinizovaných vzorkách serotonínu, pretože všetky látky sa v krvnej plazme do istej miery vyskytovali a predpokladalo sa, že bude so serotonínom poskytovať presnejšie výsledky.

### **4.6.1 Správnosť, presnosť**

Správnosť a presnosť bola testovaná na deproteinizovaných vzorkách 5-HT v plazme o koncentracii 200 ng/ml, 100 ng/ml, 6 ng/ml a 2 ng/ml. Od každej tejto koncentrácie bolo pripravených 5 vzoriek pre správnosť.

Na začiatku bol pripravený roztok 5-HT o koncentracii 1 mg/ml. Z tohto roztoku bolo odobraných 100  $\mu$ l a doplnených 900  $\mu$ l MeOH. Výsledná koncentrácia bola 0,1 mg/ml.

Ďalej sa odobralo 50  $\mu$ l a doplnilo sa MeOH do 500  $\mu$ l. Takto bol pripravený zásobný roztok 5-HT o koncentracii 10  $\mu$ g/ml a z neho boli potom pripravené dva ďalšie roztoky o koncentraciách:

1. 20 ng/ml – odobraním 2  $\mu$ l a doplnením 998  $\mu$ l MeOH
2. 1  $\mu$ g/ml – odobraním 100  $\mu$ l a doplnením 900  $\mu$ l MeOH

Ďalší postup prípravy vzoriek je uvedený v tabuľke 10.

Tab. 10 Príprava vzoriek pre stanovenie správnosti a presnosti

<b>Cieľová koncentrácia serotonínu</b>	<b>Objem pridaného zásobného roztoku</b>	<b>Objem pridanej plazmy</b>	<b>Objem MeOH</b>
<b>2 ng/ml</b>	12,5 µl z roztoku o konc. 20 ng/ml	112,5 µl	500 µl
<b>6 ng/ml</b>	37,5 µl z roztoku o konc. 20 ng/ml	87,5 µl	500 µl
<b>100 ng/ml</b>	12,5 µl z roztoku o konc. 1 µg/ml	112,5 µl	500 µl
<b>200 ng/ml</b>	25 µl z roztoku o konc. 1 µg/ml	100 µl	500 µl

#### 4.6.2 Selektivita

Selektivita bola sledovaná na štandarde vo vode, blanku a vzorke pripravenej rovnakým spôsobom ako pri deproteinizácii 500 µl MeOH. Postup prípravy je uvedený v kapitole 4.5.2. Deproteinizácia pomocou metanolu a acetonitrilu.

Hodnotili sa tieto tri vzorky po nástreku na kolónu v objeme 15 µl.

#### 4.6.3 Linearita, rozsah

Pre linearitu boli pripravené roztoky serotonínu o šiestich rôznych koncentráciách podľa tabuľky 11.

Postup prípravy zásobných roztokov bol rovnaký ako v prípade presnosti a správnosti a s výnimkou roztokov o koncentracii 2 ng/ml a 100 ng/ml, bol u všetkých ostatných použitý ako základný roztok s koncentraciou serotonínu 10 µg/ml.

Tab. 11 Príprava vzoriek pre stanovenie linearity

<b>Výsledna koncentrácia serotonínu</b>	<b>Objem pridaného zásobného roztoku</b>	<b>Objem pridanej plazmy</b>	<b>Objem MeOH</b>
<b>2 ng/ml</b>	12,5 µl z roztoku o konc. 20 ng/ml	112,5 µl	500 µl
<b>50 ng/ml</b>	6,25 µl	118,75 µl	500 µl
<b>100 ng/ml</b>	12,5 µl z roztoku o konc. 1 µg/ml	112,5 µl	500 µl
<b>150 ng/ml</b>	18,75 µl	106,25 µl	500 µl
<b>200 ng/ml</b>	25 µl	100 µl	500 µl
<b>250 ng/ml</b>	31,25 µl	93,75 µl	500 µl

#### 4.6.4 Citlivosť

Pre serotonín bol spočítaný pomer signálu k šumu (S/N). Z toho bola odhadnutá hladina LOQ (2 ng/ml). Pôvodne bolo v pláne pripraviť 6 vzoriek s LOQ a každý analyzovať dvakrát.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.1 LLE

#### 5.1.1 Extrakcia s etylacetátom

Najprv sme na základe publikovanej štúdie vyskúšali celú extrakciu vrátane zmeny hodnoty pH s etylacetátom ako organickým rozpúšťadlom. Analyzovaný bol aj štandard vo vode a štandard v etylacetáte bez prevedenej LLE. Výsledky plôch jednotlivých látok po HPLC analýze vrátane výťažnosti sú uvedené v tabuľke 12.

Tab. 12 LLE extrakcia s použitím etylacetátu – uvedené hodnoty plôch a vypočítaná výťažnosť

	5-HT	TRP	5-HIAA	MLT	KYN	KYNA
<b>STD</b>	6844653	2230636	3777198	702591	9584	70796
<b>STD v EtOAc</b>	1588602 23,2 %	692872 31,1 %	913182 24,2 %	259133 36,9 %	1104 11,5 %	19796 28,0 %
<b>pH = 3</b>	33080 0,5 %	49497 2,2 %	1187972 31,5 %	323397 46,0 %	0 0,0 %	4207 5,9 %
<b>pH = 4</b>	11653 0,2 %	12984 0,6 %	1122326 29,7 %	310525 44,2 %	0 0,0 %	1339 1,9 %
<b>pH = 7</b>	47538 0,7 %	27898 1,2 %	1199093 31,7 %	349895 49,8 %	0 0,0 %	0 0,0 %
<b>pH = 10</b>	23438 0,3 %	34684 1,6 %	1010549 26,8 %	337888 48,1 %	0 0,0 %	0 0,0 %
<b>pH = 11</b>	55253 0,8 %	63698 2,9 %	688220 18,2 %	342768 48,8 %	0 0,0 %	0 0,0 %

Po tejto analýze sme zistili, že výťažnosť je u serotonínu a tryptofánu veľmi nízka, rovnako v prípade kynurenínu a kynurenovej kyseliny. Približne 30% výťažnosť bola zaznamenaná u kyseliny 5-hydroxyindol-3-octovej a približne polovičná u melatonínu.



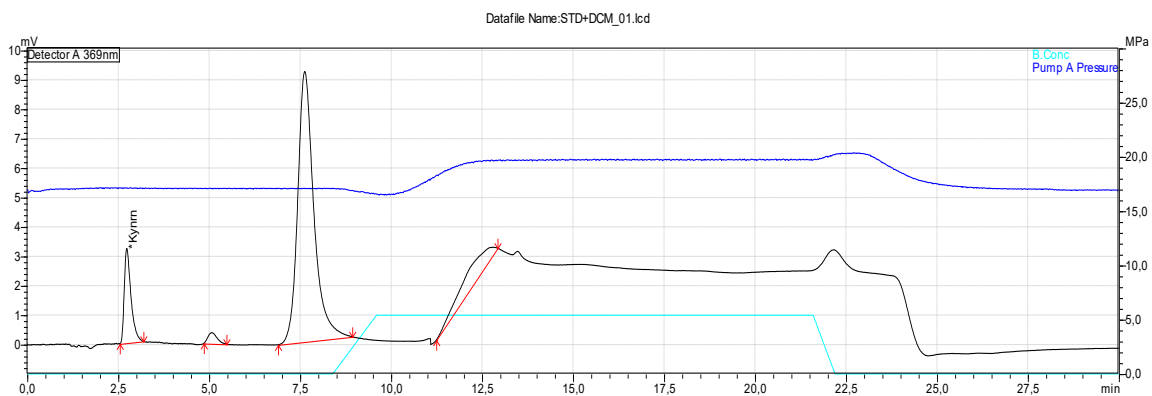
### 5.1.2 Vplyv rozpúšťadla na analyzované látky

Touto analýzou sme potrebovali zistiť, či má nejaký vplyv na tieto látky samotné rozpúšťadlo bez extrakcie. Na základe výsledku predchádzajúcej analýzy sme potrebovali zistiť vplyv iných rozpúšťadiel na tieto látky, a to konkrétne chloroformu (CHF), dichlórmetánu (DCM) a etylacetátu (EtOAc) a takisto bola analyzovaná vzorka po odparení a následnom rozpustení vo vode.

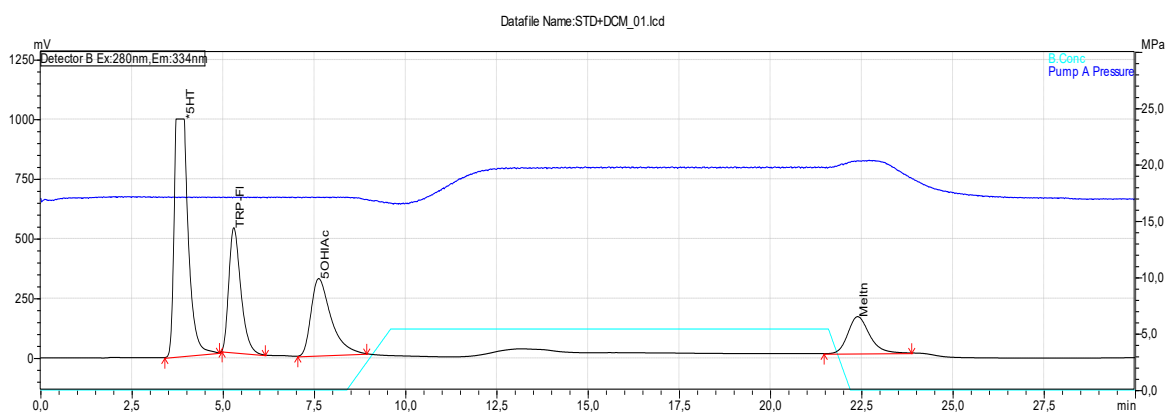
Analýza prebehla na HPLC systéme a výsledky ukazujú na dichlórmetán ako najvýhodnejšie rozpúšťadlo s najvyššou výťažnosťou. (Tab. 13)

Tab. 13 Hodnoty plôch a vypočítaná výťažnosť stanovovaných látok po analýze v rôznych organických rozpúšťadlách

	<b>STD_1</b>	<b>CHF</b>	<b>DCM</b>	<b>EtOAc</b>	<b>STD odp.</b>
<b>5-HT</b>	26543606	20447188 77 %	<b>26645569</b> <b>100 %</b>	9207216 35 %	<b>26877307</b> <b>101 %</b>
<b>TRP</b>	11330453	7733883 68 %	<b>11898673</b> <b>105 %</b>	3506040 31 %	<b>11864502</b> <b>105 %</b>
<b>5-HIAA</b>	10997196	7734351 70 %	<b>12220461</b> <b>111 %</b>	3864625 35 %	<b>12302808</b> <b>112 %</b>
<b>MLT</b>	4707056	3880519 82 %	<b>6290582</b> <b>134 %</b>	3117175 66 %	<b>6144069</b> <b>131 %</b>
<b>KYN</b>	37672	26990 72 %	<b>41039</b> <b>109 %</b>	10407 28 %	<b>40140</b> <b>38 %</b>
<b>KYNA</b>	255338	186048 73 %	<b>284400</b> <b>111 %</b>	96970 38 %	<b>277862</b> <b>109 %</b>



Obr. 5 HPLC analýza KYN a KYNA v DCM – detektor A



Obr. 6 HPLC analýza TRP, 5-HT, 5-HIAA a MLT v DCM – detektor B

Ďalšia LLE extrakcia prebiehala s dichlórmetánom ako rozpúšťadlom podľa postupu uvedeného v kapitole 4.3. a zisťovali sme zároveň aj vplyv pH a ostatných parametrov na samotnú extrakciu látok v tomto organickom rozpúšťadle. Zatiaľ nebol použitý biologický materiál, aby sa vo výsledkoch dalo jednoduchšie orientovať. Analyzovaný bol aj zvyšok vodnej vrstvy po extrakcii. Výsledky sú uvedené v tabuľkách 14 a 15.

Vzhľadom k tomu, že sa látky mimo melatonínu neextrahovali do organickej vrstvy a prevažne zostávali vo vodnej, sme vyhodnotili LLE extrakciu ako nedostatočnú metódu pre ich izoláciu z biologického materiálu vzhľadom na to, že krvná plazma a ostatné biologické tekutiny by v takomto prípade predstavovali vodnú vrstvu. Preto sme pristúpili k extrakcii z pevnej fázy.

Tab. 14 Výsledky analýzy po LLE v DCM – uvedené plochy a výťažnosť látok

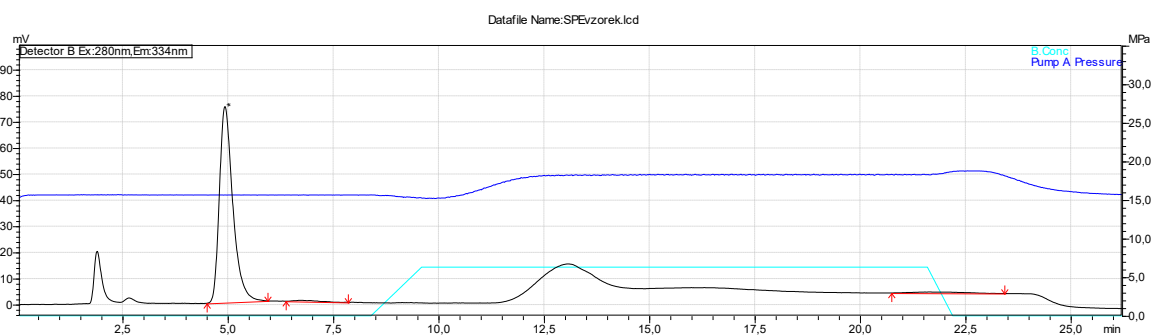
	<b>5-HT</b>	<b>TRP</b>	<b>5-HIAA</b>	<b>MLT</b>	<b>KYN</b>	<b>KYNA</b>
<b>STD</b>	3188954	1136454	1220707	<b>584183</b>	4109	27959
<b>pH = 3</b>	0 0,0 %	0 0,0 %	32830 2,7 %	<b>418675</b> <b>71,7 %</b>	0 0,0 %	965 3,5 %
<b>pH = 4</b>	0 0,0 %	0 0,0 %	22761 1,9 %	<b>443294</b> <b>75,9 %</b>	0 0,0 %	923 3,3 %
<b>pH = 7</b>	119292 3,7 %	42365 3,7 %	41521 3,4 %	<b>590042</b> <b>101,0 %</b>	0 0,0 %	901 3,2 %
<b>pH = 10</b>	73055 2,3 %	0 0,0 %	0 0,0 %	<b>481989</b> <b>82,5 %</b>	0 0,0 %	0 0,0 %
<b>pH = 11</b>	21092 0,7 %	0 0,0 %	0 0,0 %	<b>424050</b> <b>72,6 %</b>	0 0,0 %	0 0,0 %

Tab. 15 Analýza vodnej vrstvy po LLE v DCM

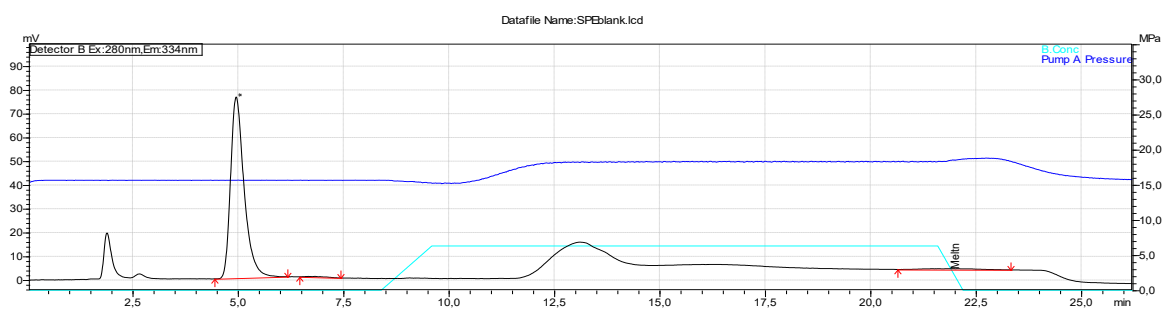
	<b>5-HT</b>	<b>TRP</b>	<b>5-HIAA</b>	<b>MLT</b>	<b>KYN</b>	<b>KYNA</b>
<b>STD</b>	3188954	1136454	1220707	584183	4109	27959
<b>pH = 3</b>	5592787 87,7 %	2154394 94,8 %	1723215 70,6 %	35329 3,0 %	4286 52,2 %	48430 86,6 %
<b>pH = 4</b>	5797329 90,9 %	2150720 94,6 %	1883871 77,2 %	3209 0,3 %	6188 75,3 %	50192 89,8 %
<b>pH = 7</b>	5177023 81,2 %	2624867 115,5 %	2236131 91,6 %	68017 5,8 %	7776 94,6 %	54721 97,9 %
<b>pH = 10</b>	4826825 75,7 %	3790893 166,8 %	430866 17,6 %	60144 5,1 %	6146 74,8 %	43278 77,4 %
<b>pH = 11</b>	3460748 54,3 %	3167066 139,3 %	344547 14,1 %	68426 5,9 %	6000 73,0 %	13680 24,5 %

## 5.2 SPE

Píky, ktoré vyšli pri obidvoch analýzách extrahovaných vzoriek boli takmer rovnaké ako vo vzorke blanku (Obr. 7 a 8). Ani jedna z dvoch použitých metód nevykazovala vhodné podmienky pre izoláciu týchto látok., preto sme metódu zhodnotili ako nevhodnú.



Obr. 7 Extrakcia KYN, KYNA, TRP, 5-HT – na chromatograme je z analyzovaných látok vidieť len pík tryptofánu (plocha = 1669363)



Obr. 8 Analyzovaný blank – viditeľný pík tryptofánu (plocha = 1706227)

## 5.3 Deproteinizácia

### 5.3.1 Deproteinizácia pomocou kyselín

Postup tejto deproteinizácie bol opísaný v kapitole 4.5.1. Použitie kyselín bolo vyhodnotené ako neefektívne, pretože sa neizolovali látky buď vôbec (MLT, KYN, KYNA), alebo len v obmedzenej miere (5-HT cca 8 %, TRP cca 12 %, 5-HIAA cca 4 %).

### 5.3.2 Deproteinizácia pomocou metanolu a acetonitrilu

Najprv bola vyskúšaná deproteinizácia použitím MeOH aj acetonitrilu (ACN) ako precipitačného činidla.

Tab. 16 Deproteinizácia pomocou MeOH a ACN – nástrek vzorky bol 1 ul

		<b>5-HT</b>	<b>TRP</b>	<b>5-HIAA</b>	<b>MLT</b>	<b>KYN</b>	<b>KYNA</b>
<b>STD</b>		114548	35947	60613	8746	0	498
<b>MeOH</b>	500	69092	1297319	83991	0	906	1141
	60 %	3609 %	139 %	0 %	-----	229 %	
	1250	26078	604413	28879	38733	605	589
	23 %	1681 %	48 %	443 %	-----	118 %	
<b>ACN</b>	500	64347	1094592	53066	0	857	786
	56 %	3045 %	88 %	0 %	-----	158%	
	1250	20969	350481	12723	38938	0	0
	18 %	947 %	21 %	445 %	-----	0 %	

Ukázalo sa, že pri takom malom množstve nastreknutého objemu nie je možné v štandarde detekovať KYN. Jeho detekcia v deproteinizovaných vzorkách je vyššia kvôli tomu, že plazma sama o sebe podľa výsledkov analýzy slepých vzoriek všetky látky obsahuje.

Rozhodli sme sa preto nastreknúť objemy 10 µl, 15 µl a 20 µl, pričom boli takto nestreknuté štandardy, vzorky, blanky a takisto deproteinizovaná vzorka blanku

s pridaným štandardom po odparení. Výsledky sú uvedené v tabuľkách 17, 18 a 19. Výťažnosti sú uvedené v tab. 20, pričom boli vypočítané pomocou plochy vzorky a plochy blanku s pridaným štandardom.

*Tab. 17 Zaznamenané plochy jednotlivých látok po deproteinizácii pomocou 500  $\mu$ l MeOH – nástrek vzorky bol 10  $\mu$ l*

	<b>5-HT</b>	<b>TRP</b>	<b>5-HIAA</b>	<b>MLT</b>	<b>KYN</b>	<b>KYNA</b>
<b>STD</b>	1651344	536429	885403	146518	1361	11820
<b>VZORKA</b>	796912	11785812	711406	108696	10335	12307
<b>BLANK</b>	26674	13313584	349349	74619	10987	7040
<b>BLANK + STD</b>	1194893	12574853	891267	121506	10683	14477

*Tab. 18 Zaznamenané plochy jednotlivých látok po deproteinizácii pomocou 500  $\mu$ l MeOH – nástrek vzorky bol 15  $\mu$ l*

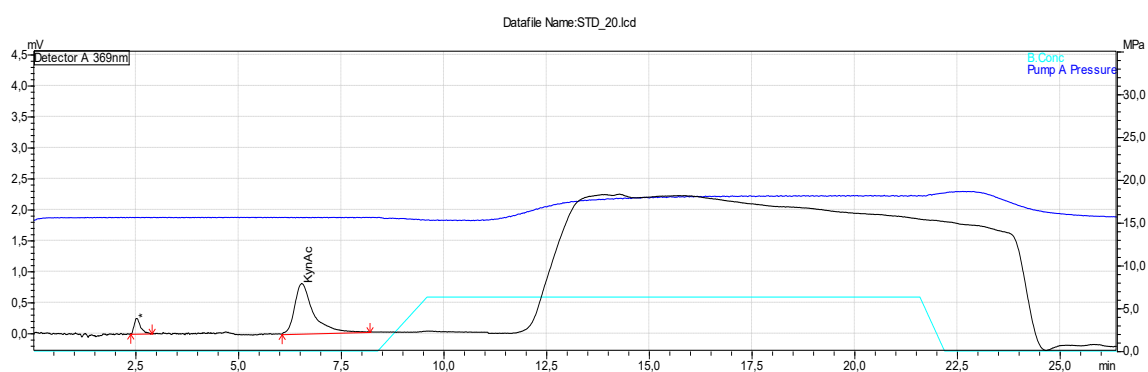
	<b>5-HT</b>	<b>TRP</b>	<b>5-HIAA</b>	<b>MLT</b>	<b>KYN</b>	<b>KYNA</b>
<b>STD</b>	2541076	834607	1348834	184921	2070	17871
<b>VZORKA</b>	1239579	19021805	1182072	149672	15374	18912
<b>BLANK</b>	39464	21462474	501435	72813	16458	9799
<b>BLANK + STD</b>	1860908	19940053	1457445	173279	16159	21906

Tab. 19 Zaznamenané plochy jednotlivých látok po deproteinizácii pomocou 500 ul MeOH – nástrek vzorky bol 20 µl

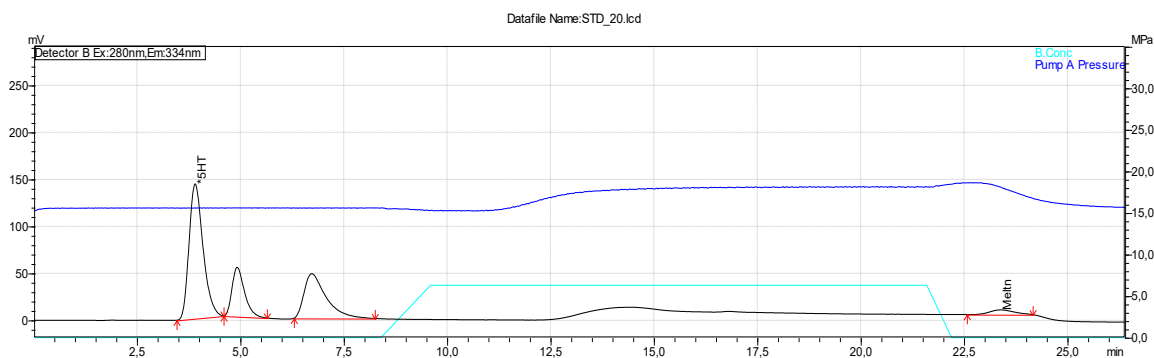
	<b>5-HT</b>	<b>TRP</b>	<b>5-HIAA</b>	<b>MLT</b>	<b>KYN</b>	<b>KYNA</b>
<b>STD</b>	3374211	1102383	1752598	206055	2479	25262
<b>VZORKA</b>	1599621	23916115	1412583	201070	19942	25080
<b>BLANK</b>	50977	26215378	659208	59897	21733	13074
<b>BLANK + STD</b>	2518377	25752668	1954186	243068	22408	28683

Tab. 20 Vypočítaná výťažnosť po deproteinizácii látok pri troch rôznych nástrekoch

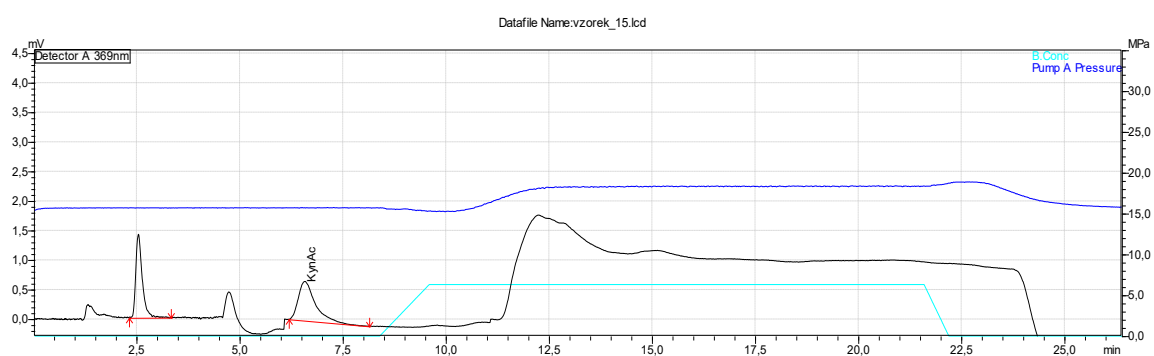
	<b>5-HT</b>	<b>TRP</b>	<b>5-HIAA</b>	<b>MLT</b>	<b>KYN</b>	<b>KYNA</b>
<b>10 µl</b>	<b>67 %</b>	94 %	80 %	<b>89 %</b>	<b>97 %</b>	85 %
<b>15 µl</b>	<b>67 %</b>	<b>95 %</b>	<b>81 %</b>	86 %	95 %	86 %
<b>20 µl</b>	64 %	93 %	72 %	83 %	89 %	<b>87 %</b>



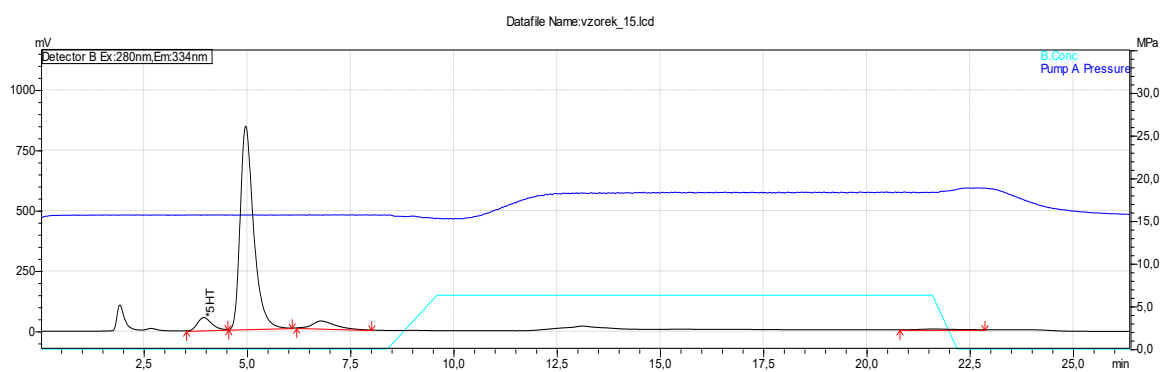
Obr. 9 HPLC analýza štandardu látok pri nástreku 20 ul – detektor A (KYN, KYNA)



Obr. 10 HPLC analýza štandardu látok pri nástreku 20 ul – detektor B (TRP, 5-HT, MLT, 5-HIAA)



Obr. 11 HPLC analýza KYN, KYNA po deproteinizácii 500 ul MeOH – nástrek 15 ul



Obr. 12 HPLC analýza TRP, 5-HT, 5-HIAA, MLT po deproteinizácii 500 ul MeOH – nástrek 15 ul

Záver: Ako najvýhodnejšia metóda zo všetkých vyskúšaných sa ukázala byť podľa výťažnosti deproteinizácia 500  $\mu$ l MeOH, pričom výťažnosť sa významne nelíšila medzi jednotlivými objemami nástrekov. Preto sme sa rozhodli pre validáciu tejto metódy s nástrekom 15  $\mu$ l.



## 5.4 Validácia

### 5.4.1 Správnosť

Tab. 21 Stanovenie správnosti pre serotonín

Koncentrácia (ng/ml)	Plocha serotonínu	Vypočítaná koncentrácia (ng/ml)	Priemerná koncentrácia (ng/ml)	Odchýlka (%)
<b>200</b>	663317	199,40	200,36	+ 0,18 %
	633510	190,44		
	727008	218,55		
	666729	200,43		
	641887	192,96		
<b>100</b>	326741	98,25	95,13	- 4,87 %
	342456	102,98		
	255995	76,98		
	323219	97,19		
	333462	100,27		
<b>6</b>	25918	6,82	6,31	+ 5,17 %
	23096	6,08		
	21725	5,71		
	25594	6,73		
	23679	6,23		
<b>2</b>	13922	1,88	1,86	- 7 %
	12073	1,63		
	15337	2,07		
	12548	1,69		
	15072	2,03		

Odchýlka by pri správnosti mala byť v rozmedzí  $\pm 15$  %, pričom pri LLOQ je tolerovaných  $\pm 20$  %. Vzhľadom k tomu a po porovnaní s výsledkami považujeme metódu za dostatočne správnu.

## 5.4.2 Presnosť

Tab. 22 Stanovenie presnosti pre serotonín (within-run precision) – 1. deň

Koncentrácia (ng/ml)	Plocha serotonínu	Vypočítaná koncentrácia (ng/ml)	Priemerná koncentrácia (ng/ml)	Relatívna smerodatná odchýlka
<b>200 ng/ml</b>	663317	199,40	200,36	+ 5 %
	633510	190,44		
	727008	218,55		
	666729	200,43		
	641887	192,96		
<b>100 ng/ml</b>	326741	98,25	95,13	+ 11 %
	342456	102,98		
	255995	76,98		
	323219	97,19		
	333462	100,27		
<b>6 ng/ml</b>	25918	6,82	6,31	+ 7 %
	23096	6,08		
	21725	5,71		
	25594	6,73		
	23679	6,23		
<b>2 ng/ml</b>	13922	1,88	1,86	+ 11 %
	12073	1,63		
	15337	2,07		
	12548	1,69		
	15072	2,03		

Tab. 23 Stanovenie presnosti pre serotonin (within-run precision) – 1. deň

Koncentrácia (ng/ml)	Plocha serotonínu	Vypočítaná koncentrácia (ng/ml)	Priemerná koncentrácia (ng/ml)	Relatívna smerodatná odchýlka
<b>200 ng/ml</b>	637232	191,56	196,84	+ 3 %
	666587	200,39		
	654872	196,86		
	677754	203,74		
	637481	191,64		
<b>100 ng/ml</b>	311758	109,38	112,32	+ 8 %
	322974	113,32		
	280843	98,53		
	342958	120,33		
	342186	120,06		
<b>6 ng/ml</b>	25815	6,79	6,29	+ 5 %
	23559	6,20		
	22520	5,92		
	24402	6,42		
	23225	6,11		
<b>2 ng/ml</b>	13699	1,85	1,69	+ 8 %
	11919	1,61		
	11391	1,54		
	13552	1,83		
	12123	1,63		

Tab. 24 Stanovenie presnosti pre serotonín (between-run precision) – 2. deň

Koncentrácia (ng/ml)	Plocha serotonínu	Vypočítaná koncentrácia (ng/ml)	Priemerná koncentrácia (ng/ml)	Relatívna smerodatná odchýlka
<b>200 ng/ml</b>	593910	178,54	176,94	+ 4 %
	612102	184,01		
	604263	181,65		
	572779	172,19		
	559841	168,30		
<b>100 ng/ml</b>	297431	104,35	103,24	+ 7 %
	297431	104,35		
	322080	113,00		
	261880	91,88		
	292486	102,62		
<b>6 ng/ml</b>	25452	6,70	5,45	+ 22 %
	23345	6,14		
	21014	5,53		
	13604	3,58		
	20091	5,29		
<b>2 ng/ml</b>	9528	1,28	1,54	+ 15 %
	10204	1,38		
	11687	1,58		
	13942	1,88		
	11934	1,61		

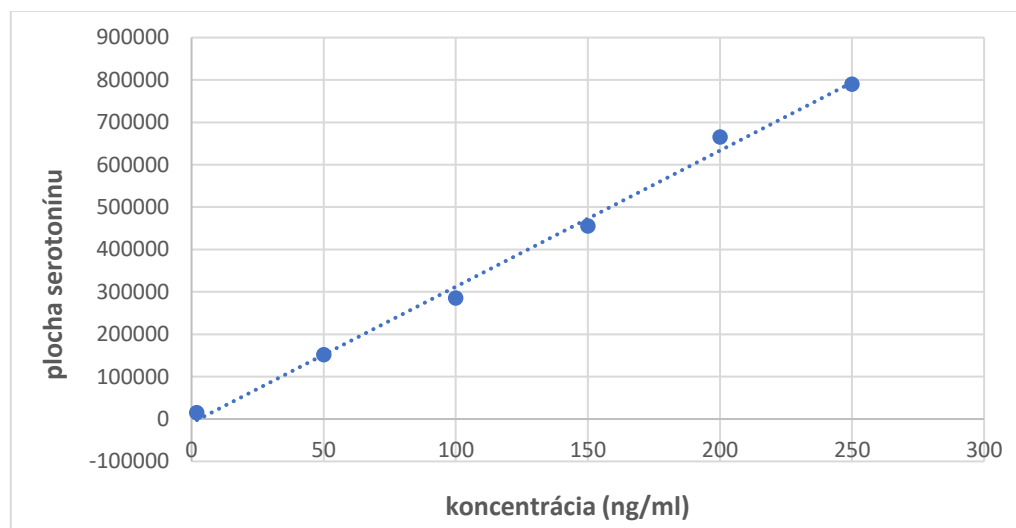
Takmer všetky hodnoty smerodatných odchýliek vyhovovali kritériám, preto sme zhodnotili metódu ako dostatočne presnú. Mierne odchýlky v druhý deň merania by mohli byť vysvetlené tým, že metóda nie je dostatočne robustná alebo nastala chyba pri príprave vzoriek. Pôvodne bolo v pláne tento validačný parameter domerať ešte raz, ale kvôli koronavírusovej situácii to nebolo možné.

### 5.4.3 Selektivita

Selektivita bola hodnotená z analýzy pri nástreku 15  $\mu$ l deproteinizovaných vzoriek a podrobné výsledky sú uvedené v kapitole 5.3.2. Vzhľadom na to, že nedošlo k žiadnym interakciám látok medzi sebou a píky boli dostatočne rozdelené sme uznali metódu ako dostatočne selektívnu pre ďalšie použitie.

### 5.4.4 Linearita, rozsah

Koncentrácia 5-HT (ng/ml)	Plocha serotonínu
2	14 838
50	151 017
100	285 019
150	455 166
200	665 304
250	789 615



Obr. 13 Graf závislosti plochy serotonínu na jeho koncentrácii

regresná rovnica:  $y = 3211,7x - 9034,9$

koeficient determinácie:  $R^2 = 0,9947$ ; koeficient korelácie:  $R = 0,9973$

Kalibračnú krivku sme zhodnotili na základe R ako dostatočne spoľahlivú.

### **5.4.5 Citlivosť**

Podľa postupu v kapitole 4.6.4 bola plánovaná analýza citlivosti metódy, avšak kvôli koronavírusovej situácii mi to v súčasnej dobe nebolo umožnené, avšak táto metóda sa podľa výsledkov ostatných analýz a podľa výsledku analýzy pri linearite zdala byť dostatočne citlivá.

### **5.4.6 Robustnosť**

Vzhľadom k výsledkom stanovenia presnosti by sa dalo predpokladať, že metóda nie je dostatočne robustná, preto je vhodné analyzovať tieto látky bezprostredne po príprave vzorky deproteinizáciou, keďže po istom čase sa začínajú výsledky ukazovať ako nepresné. Ostatné parametre robustnosti neboli hodnotené z dôvodov, ktoré boli uvedené pri citlivosti.

## 6 ZÁVER

V tejto diplomovej práci bola nájdená najvhodnejšia metóda izolácie L-tryptofánu a jeho metabolitov (serotonín, melatonín, kyselina 5-hydroxyindol-3-octová, kyselina kynurenová, L-kynurenín) z krvnej plazmy a následne sme zisťovali, či je táto metóda dostatočne spoľahlivá pre túto izoláciu.

V teoretickej časti boli opísané jednotlivé látky vrátane ich metabolickej cesty z tryptofánu, ich funkcií v organizme a ich vlastností. Ďalej boli predstavené jednotlivé metódy, ako LLE, SPE a deproteinizácia a takisto jednotlivé parametre validácie metódy.

V experimentálnej časti sme sa venovali príprave roztokov a jednotlivým metódam úpravy vzoriek, pričom každá metóda bola následne overená pomocou kvapalinovej chromatografie.

V rámci skúšania jednotlivých postupov sa zistilo, že z hľadiska výťažnosti je najvhodnejšia deproteinizácia za špecifických podmienok, bližšie uvedených v kapitole 5.3.2.

Vyvinutá metóda bola validovaná podľa oficiálnej smernice EMA a je možné ju použiť pre izoláciu všetkých vyššie uvedených látok, ale vzhľadom k práci s biologickým materiálom je nutné dodržiavať presné podmienky tejto izolácie.

## 7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- (1) Zhang, A.; Rijal, K.; Ng, S. K.; Ravid, K.; Chitalia, V. A Mass Spectrometric Method for Quantification of Tryptophan-Derived Uremic Solutes in Human Serum. *J. Biol. Methods* **2017**, *4* (3), 75. <https://doi.org/10.14440/jbm.2017.182>.
- (2) *Český Lékopis 2017*; Grada Publishing: Praha, 2017.
- (3) Colle, R.; Masson, P.; Verstuyft, C.; Fève, B.; Werner, E.; Boursier-Neyret, C.; Walther, B.; David, D. J.; Boniface, B.; Falissard, B.; Chanson, P.; Corruble, E.; Becquemont, L. Peripheral Tryptophan, Serotonin, Kynurenine, and Their Metabolites in Major Depression: A Case–Control Study. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **2020**, *74* (2), 112–117. <https://doi.org/10.1111/pcn.12944>.
- (4) Richard, D. M.; Dawes, M. A.; Mathias, C. W.; Acheson, A.; Hill-Kapturczak, N.; Dougherty, D. M. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int. J. Tryptophan Res.* **2009**, *2* (1), 45–60. <https://doi.org/10.4137/ijtr.s2129>.
- (5) Micromedex. *Tryptophan. In: Clinical Effects [Database on the Internet]*.; Greenwood Village (Colorado), USA, 2020.
- (6) PubChem. Serotonin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5202>.
- (7) Jonnakuty, C.; Gragnoli, C. What Do We Know about Serotonin? *J. Cell. Physiol.* **2008**, *217* (2), 301–306. <https://doi.org/10.1002/jcp.21533>.
- (8) Berger, M.; Gray, J. A.; Roth, B. L. The Expanded Biology of Serotonin. *Annu. Rev. Med.* **2009**, *60* (1), 355–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>.
- (9) PubChem. 5-Hydroxyindole-3-acetic acid <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1826>.
- (10) FooDB. Showing Compound 5-Hydroxyindole-3-acetic acid <https://foodb.ca/compounds/FDB001403>.
- (11) Mitani, H.; Shirayama, Y.; Yamada, T.; Kawahara, R. Plasma Levels of Homovanillic Acid, 5-Hydroxyindoleacetic Acid and Cortisol, and Serotonin Turnover in Depressed Patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2006**, *30* (3), 531–534. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.11.021>.



- (12) Joy, T.; Walsh, G.; Tokmakejian, S.; Van Uum, S. H. M. Increase of Urinary 5-Hydroxyindoleacetic Acid Excretion but Not Serum Chromogranin A Following over-the-Counter 5-Hydroxytryptophan Intake. *Can. J. Gastroenterol.* **2008**, *22* (1), 49–53. <https://doi.org/10.1155/2008/472159>.
- (13) PubChem. Melatonin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/896>.
- (14) Tordjman, S.; Chokron, S.; Delorme, R.; Charrier, A.; Bellissant, E.; Jaafari, N.; Fougerou, C. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Curr. Neuropharmacol.* **2017**, *15*, 434–443. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666161228122>.
- (15) Doležal, M. *Farmaceutická Chemie Léčiv Působících Na Centrální Nervový Systém*; Karolinum: Praha, 2013.
- (16) Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug- Induced Liver Injury.
- (17) PubChem. L-Kynurenine <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Kynurenine>.
- (18) Human Metabolome Database. Showing metabocard for L-Kynurenine <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000684>.
- (19) PubChem. Kynurenic acid <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kynurenic-acid>.
- (20) Wirthgen, E.; Hoeflich, A.; Rebl, A.; Günther, J. Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions. *Front. Immunol.* **2018**, *8* (JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01957>.
- (21) Turski, M. P.; Turska, M.; Paluszkiewicz, P.; Parada-Turska, J.; Oxenkrug, G. F. Kynurenic Acid in the Digestive System—New Facts, New Challenges. *Int. J. Tryptophan Res.* **2013**, *6*, IJTR.S12536. <https://doi.org/10.4137/ijtr.s12536>.
- (22) Keplinger, B.; Baran, H.; Kainz, A.; Ferraz-Leite, H.; Newcombe, J.; Kalina, P. Age-Related Increase of Kynurenic Acid in Human Cerebrospinal Fluid - IgG and B2-Microglobulin Changes. *NeuroSignals* **2005**, *14* (3), 126–135. <https://doi.org/10.1159/000086295>.

- (23) Müller, N.; Schwarz, M. Schizophrenia as an Inflammation-Mediated Dysbalance of Glutamatergic Neurotransmission. *Neurotox. Res.* **2006**, *10* (2), 131–148. <https://doi.org/10.1007/BF03033242>.
- (24) Hansen, S.; Pedersen-Bjergaard, S. *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons: Chichester, West Sussex, United Kingdom, 2015.
- (25) Kovaříková, P.; Stariat, J. Využití HPLC v Analýze Léčiv v Biologickém Materiálu, Úprava Vzorku. No. 1, 1–5.
- (26) Wrona, O.; Rafińska, K.; Możeński, C.; Buszewski, B. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials. *J. AOAC Int.* **2017**, *100* (6), 1624–1635. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0232>.
- (27) Sarafraz-Yazdi, A.; Amiri, A. Liquid-Phase Microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003>.
- (28) Feins, M.; Sirkar, K. K. Highly Selective Membranes in Protein Ultrafiltration. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86* (6), 603–611. <https://doi.org/10.1002/bit.20069>.
- (29) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*; 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470508183>.
- (30) Kovaříková, P. Kvalitativní a Kvantitativní Analýza, Vývoj Analytické Metody. No. 1.
- (31) FDA, F. and D. A. Bioanalytical Method Validation Guidance. *Food Drug Adm.* **2018**, *1043* (May), 25.
- (32) Smith, G. European Medicines Agency Guideline on Bioanalytical Method Validation: What More Is There to Say? *Bioanalysis* **2012**, *4* (8), 865–868. <https://doi.org/10.4155/bio.12.44>.
- (33) Marklová, E.; Makovičková, H.; Krákorová, I. Screening for Defects in Tryptophan Metabolism. *J. Chromatogr. A* **2000**, *870* (1–2), 289–293. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00973-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00973-5).
- (34) Lindström, M.; Tohmola, N.; Renkonen, R.; Hämäläinen, E.; Schalin-Jäntti, C.; Itkonen, O. Comparison of Serum Serotonin and Serum 5-HIAA LC-MS/MS Assays in the Diagnosis of Serotonin Producing Neuroendocrine Neoplasms: A

- Pilot Study. *Clin. Chim. Acta* **2018**, 482 (January), 78–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.03.030>.
- (35) Kudo, Y.; Boyd, C. A. R.; Sargent, I. L.; Redman, C. W. G. Decreased Tryptophan Catabolism by Placental Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2003**, 188 (3), 719–726. <https://doi.org/10.1067/mob.2003.156>.
- (36) Murthi, P.; Wallace, E. M.; Walker, D. W. Altered Placental Tryptophan Metabolic Pathway in Human Fetal Growth Restriction. *Placenta* **2017**, 52, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.013>.
- (37) Málková, K. HPLC Hodnocení L - Tryptofanu a Jeho Metabolitů v Biologickém Materiálu Kateřina Málková. **2019**.