

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

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**METABOLITY MELATONINU II**

**Bakalářská práce**

**Vypracovala: Jana Spáčilová**

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

**Hradec Králové , 2006**

Prohlašuji , že jsem bakalářskou práci na téma Metabolity melatoninu II vypracovala samostatně pod odborným dohledem vedoucího bakalářské práce za použití uvedené literatury.

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

## **Obsah**

<b>1 Úvod .....</b>	<b>5</b>
<b>2 Metody používané ke zpracování biologického materiálu .....</b>	<b>7</b>
2.1 Extrakce na pevných fázích .....	8
<b>3 Cíl práce .....</b>	<b>20</b>
<b>4 Výsledky experimentální části .....</b>	<b>21</b>
4.1 Extrakce na pevných fázích .....	21
<b>5 Závěr .....</b>	<b>26</b>
<b>6 Příloha .....</b>	<b>27</b>
<b>7 Literatura .....</b>	<b>34</b>

# 1 Úvod

Melatonin byl objeven koncem padesátých let Lernerem a spolupracovníky. Zpočátku se předpokládalo, že se jedná o fylogeneticky archaickou látku, která u nižších obratlovců, zejména obojživelníků, řídí zbarvení kůže, a která u savců nemá žádnou významnější funkci. Postupně se ukázalo, že melatonin má prakticky u všech skupin obratlovců roli látky, která řídí biorytmy. V posledních několika letech byl prokázán vliv melatoninu na proces stárnutí.

Melatonin je důležitý neurohormon, jež hraje úlohu v regulaci neuroendokrinního systému, kontrolujícího např. metabolismus, pohlavní touhu, chuť k jídlu, spánek, reprodukci, rovnováhu a svalovou koordinaci. Melatonin pomáhá také imunitnímu systému v boji proti bakteriím, virům, toxickým chemikáliím a nadměrnému působení volných radikálů.

V současné době je možné odpovědně prohlásit pouze to, že melatonin působí jako chronobiotikum. Při velkém zájmu o tuto látku a při výskytu vysoce afinitních receptorů pro melatonin na různých strukturách je možné očekávat, že v budoucnu budou seriózně nalezeny a potvrzeny další účinky melatoninu na lidský organismus. Nikdy však zřejmě melatonin nebude zázračným všelékem, za který je některými příliš nedočkavými a málo odpovědnými badateli prohlašován, ani nutným doplňkem výživy, neboť tělo si jej samo tvoří.

Melatonin je derivát hydroxyindolu, obdobně jako serotonin, přesně *N*-acetyl-5-methoxytryptamin. Pro jeho fyziologické působení je podstatná jak methoxy skupina na aromatickém jádru, tak i acetyl skupina vázaná na aminu postranního řetězce; indolové jádro naopak nezbytné není a může být nahrazeno jiným aromatickým jádrem, např. naftalenem. Melatonin se tvoří výhradně v noci, je to tedy jakýsi signál noci, který předává do organismu informaci o denní době. Denní rytmus v tvorbě je poháněn rytmem v aktivitě enzymu arylalkylamin *N*-acetyltransferázy, který katalyzuje acetylaci serotoninu na *N*-acetylserotonin, prekursor melatoninu.

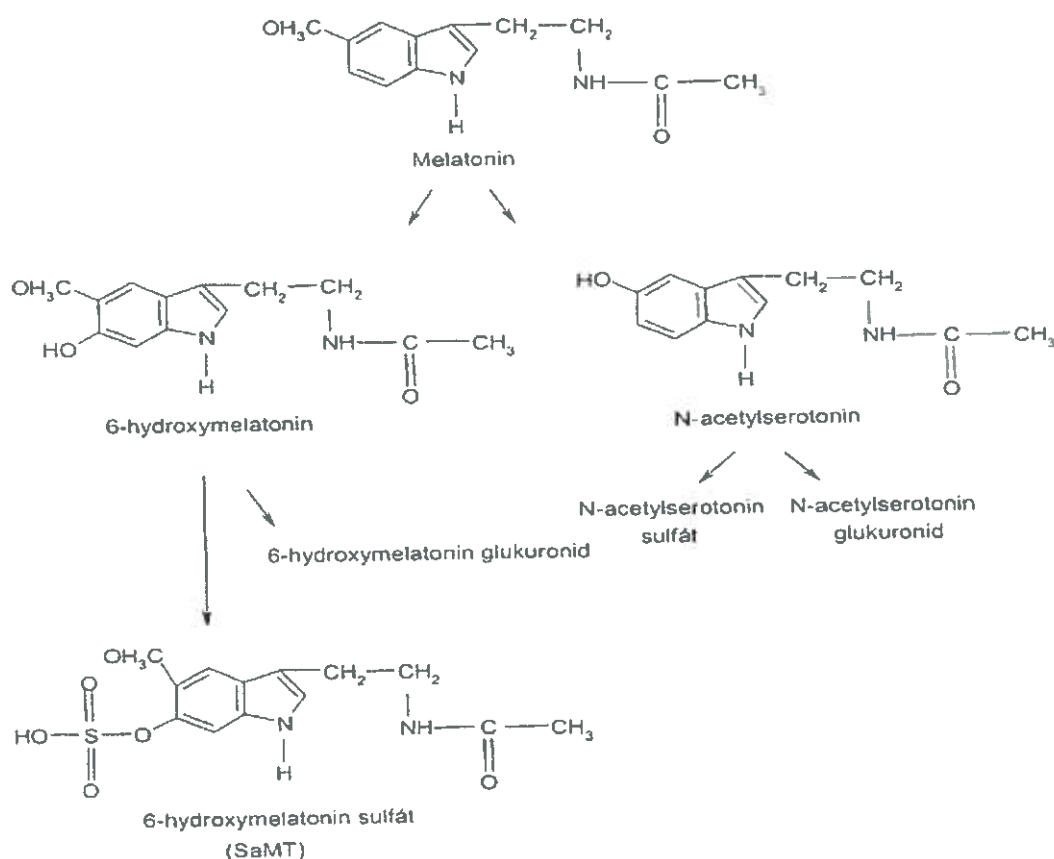
Melatonin je většinou metabolizován hydroxylací za tvorby 6-hydroxymelatoninu (6-HaMT) a dále také demethylací, při které se tvoří *N*-acetylserotoninu (NAS).

Metabolity jsou vylučovány téměř výlučně močí ve formě konjugátů s kyselinou glukuronovou nebo jako sulfáty<sup>1,2,3</sup>. Metabolismus melatoninu viz obr.1.

V současné době je melatonin studován např. v souvislosti s terapií nádorových forem, dále sehrává důležitou roli jako odstraňovač volných radikálů, hraje klíčovou úlohu v obranném systému těla atd. Pro jeho nízké fyziologické hladiny (pg/ml) je možnost jeho stanovení omezená. Do popředí zájmu na katedře biofyziky a fyzikální chemie farmaceutické fakulty se dostává problematika stanovení melatoninu pomocí jeho hlavního metabolitu 6- sulfatoxymelatoninu (SaMT). Cílem mé bakalářské práce bylo prozkoumat možnost izolace SaMT z moče pomocí extrakce na pevných fázích (SPE) a následně stanovit přímo SaMT metodou HPLC s UV detekcí.

Cílem teoretické části práce bylo shrnout a podat přehled metod používaných ke zpracování biologického materiálu před analýzou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ( HPLC ) s důrazem na extrakci na pevných fázích ( SPE ).

obr.1



## 2 Metody používané ke zpracování biologického materiálu

Příprava vzorku patří k základním úkonům při analýze biologických vzorků. Na jejím provedení záleží celkový úspěch analytického stanovení - a to jak z kvalitativního, tak i z kvantitativního hlediska. Typické biologické vzorky zahrnují plazmu, sérum, plnou krev, moč, sliny, stolici, kožní adnexy apod. Cílem zpracování je upravit vzorek do formy vhodné pro následnou analýzu látky. Sledované analyty jsou ve vzorcích obsaženy v malých množstvích, a aby mohly být dále analyzovány, ať už pro identifikaci či kvantifikaci, je nutná jejich co nejúplnější izolace z matrice. Volbou vhodné metody přípravy vzorku tedy rozhodujeme nejenom o přesnosti stanovení dané látky (analytu), ale vůbec o možnosti jejího stanovení. V mnoha případech se musí použít i několik metod. Příprava vzorku obvykle představuje nejvíce pracnou, časově náročnou a nejméně spolehlivou část celého postupu a může ovlivnit celkové výsledky analýzy.

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na stanovení hlavního metabolitu melatoninu, 6-sulfatoxymelatoninu (SaMT) v moči. Moč je jedním z nejvíce studovaných biologických materiálů, hlavně pro její jednoduchou možnost sběru a obsah mnoha látek nebo jejich metabolitů, které jsou vylučovány právě močí<sup>4</sup>.

Ke zpracování a detekci SaMT jsem ve své práci využila následující metody:

1. *Extrakce na pevných fázích* (solid phase extraction, SPE )
2. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie* (high performance liquid-chromatography, HPLC)

## 2.1 Extrakce na pevných fázích

Extrakce na tuhou fázi (Solid phase extraction, dále jen SPE) je technika přípravy vzorků, jejíž význam neustále roste. Při použití SPE se lze vyhnout řadě problémů, které jsou již tradičně spojovány s další metodou přípravy vzorků, s extrakcí kapalina-kapalina. Pro extrakci na pevné fázi se používají organické rozpouštědla s různou polaritou či mobilní fázi přímo. To znamená, že pro extrakci organické sloučeniny v hydrofilní (vodné) matrici by měla být použita nepolární pevná fáze (reverzní fáze)<sup>7</sup>. SPE je technika, ve které se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalné. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpuštěn. Při sorpci dochází k transportu částic z jedné fáze do druhé, což je doprovázeno snížením volné energie.

Nejčastěji se využívá jako pevná fáze silikagel či alumina (polární fáze) nebo reverzní fáze C<sub>18</sub> (nepolární fáze). Použití pevné fáze pro předseparaci vzorku má dvě přednosti – 1. můžeme zbavit extrakt nežádoucích látek, které by mohly rušit stanovení dané látky (matrix efekt), nebo látek, které mají velký retenční objem 2. můžeme extrakt zakoncertovat.

### 2.1.1 Postup provedení extrakce na pevných fázích

Typický SPE postup zahrnuje pět základních kroků:

1. *Aktivace sorbentu*
2. *Úprava sorbentu*
3. *Aplikace vzorku*
4. *Promývání sorbentu*
5. *Uvolnění analytu*



## **1. Aktivace sorbentu**

Pokud má sorbent v SPE kolonce zadržovat analyty, je nezbytné kolonku smočit a vytvořit na pevné fázi vrstvičku kapaliny. Tento solvatační proces je obvykle první krok extrakce a zahrnuje promytí kolonky rozpouštědlem. Toto rozpouštědlo zajišťuje solvataci sorbentu a tím interakci s matricí vzorku.

Aktivace kolonky se provádí rozpouštědlem, které je svou chemickou povahou vhodné pro daný vzorek. Pokud je extrakt vzorku v organickém rozpouštědle, potom může být kolonka uvedena do rovnováhy stejným organickým rozpouštědlem. Aktivace může zvyšovat retenci analytů. Typický objem pro aktivaci je 2-3 ml na 100 mg sorbentu.

## **2. Úprava sorbentu**

Zajišťuje odstranění nadbytku aktivačního rozpouštědla a získání vhodného prostředí pro adsorpci analytu. Nadbytečné promytí může vést k nedostatečnému zvlhčení sorbentu a tím ke snížení celkové výtěžnosti.

U reverzních fází se na promytí používá voda nebo pufr, u iontoměničového provedení pufr o pH, při kterém analyt a vázané funkční skupiny mají opačný náboj.

## **3. Adsorpce**

Musí být zajištěna dostatečně dlouhá doba kontaktu vzorku se sorbentem. Příliš rychlý průtok vzorku kolonkou může způsobit snížení výtěžnosti. V průběhu děje dochází k zadržení stanovované látky na pevné fázi.

## **4. Promývání sorbentu**

Po aplikaci vzorku musí být kolonka promyta rozpouštědlem. Smyslem tohoto kroku je selektivně eluovat nežádoucí sloučeniny ze sorbentu, aniž by byly vyplaveny sledované analyty. K tomuto účelu se nejlépe hodí rozpouštědla, ve kterých analyty nejsou rozpustné. Je zde nezbytná kontrola průtoku, příliš vysoký průtok může zapříčinit, že výsledný extrakt nedosahuje požadované čistoty.

## **5. Eluce**

Poslední krok SPE je vymývání (eluce) analytů vhodným rozpouštědlem do sběrné nádoby. Často dochází k tomu, že požadavky na eluční rozpouštědlo splňuje více rozpouštědel. Potom je konečná selekce rozpouštědla ovlivněna jeho odpařitelností a kompatibilitou s konečnou analytickou technikou. Také zde je významná kontrola průtoku.

### **2.1.2 Přehled hlavních interakčních mechanismů**

Při separaci se uplatňují různé mechanismy zachycování látek spočívající v odlišných molekulárních interakcích mezi analytem a sorbetem. Mezi běžně se vyskytující interakce patří tyto:

#### **1. Van der Waalsovy síly („ nepochární “ interakce)**

Jsou nespecifické přitažlivé síly, mezi nepolárními skupinami se označují jako hydrofobní interakce. Jedná se o slabé síly, jejichž působení lze zvýšit v polárním prostředí.

#### **2. Polární interakce**

Zahrnují vodíkové vazby, interakce dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól. Význam těchto sil se zvyšuje v nepolárním prostředí.

#### **3. Elektrostatické přitažlivé síly („ iontové interakce “)**

Vyskytují se na iontoměničových sorbentech . K jejich potlačení dochází změnou pH (v případě slabých elektrolytů) nebo přidáním kompetitivního iontu do roztoku.

#### **4. Kovalentní vazby**

Tyto vazby se při SPE tvoří vzácně. Možná je i koordinační vazba mezi atomem kovu zabudovaným ve struktuře sorbentu a analytu.

Každý sorbent nabízí specifickou směs těchto vlastností. Hlavní interakci využívanou pro extrakci analytu označujeme jako primární, vedlejší působící interakce jako sekundární. Při extrakci na pevných fázích je výhodné posílit interakci analyt-sorbent, zatímco interakce analyt-matrice a matrice-sorbent potlačit<sup>5,6</sup>. Snížení nežádoucích interakcí může být dosaženo zředěním roztoku, deproteinizací nebo filtrací. Změnou pH nebo polaritu zkoušeného vzorku se dosáhne posílení adsorpce. Vazba polární sloučeniny na polární sorbent se zlepši snížením polaritu adsorpčního prostředí a vazba nepolární sloučeniny na nepolární sorbent zvýšením polaritu adsorpčního prostředí. Pro eluci jsou podmínky zpravidla opačné než vyžaduje adsorpce. Pokud adsorpce analytu vyžaduje vysokou polaritu prostředí, tak eluci naopak usnadní snížení polaritu. Eluční rozpouštědlo zajistí roztržení vazebných sil analyt-sorbent a uvolnění analytu z pevné fáze. Disperzní síly zadržující analyt na nepolárním sorbentu mohou být přerušeny pomocí nepolárního rozpouštědla. Změnou pH dochází k uvolnění analytu z iontoměničové pevné fáze. Jinou možností je zvýšení iontové síly rozpouštědla a vytlačení analytu z pevné fáze<sup>5</sup>.

Z interakčních mechanismů uvedených výše vyplývá, že provedení SPE je poměrně komplikovaná záležitost a k dosažení co nejlepších výsledků je třeba provést optimalizaci jednotlivých kroků SPE.

### **2.1.3 Přehled základních druhů sorbentů**

Při volbě vhodného sorbentu zvažujeme podstatu analytu, vyžadovaný stupeň jeho čistoty, vlastnosti matrice a hlavních kontaminantů a finální analytický postup. Jednotlivé typy sorbentů se mezi sebou mohou kombinovat za účelem zlepšení vlastností SPE.

*1. Nepolární vázané fáze (reverzní fáze: uhlíkové, polymerní, fáze vázané na SiO<sub>2</sub>)*

*2. Polární vázané fáze (normální fáze)*

*3. Iontoměničové sorbenty*

*4. Speciální sorbenty*

## 1. Nepolární vázané fáze (reverzní fáze)

Nepolární vázané fáze se vyznačují hydrofobními vlastnostmi. Lze je využít pro extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin. Nepolární interakce je zprostředkována van der Waalsovými silami. Eluční rozpouštědla jsou organická, k nejpoužívanějším patří acetonitril a metanol.

### a) Uhlíkové sorbenty

Řadí se sem aktivní uhlík, porézni a grafitový uhlík a uhlíkové pryskyřice<sup>6,8</sup>. Do popředí se dostává vysoká sorpční kapacita a termální stabilita aktivního uhlíku, modifikované uhlíkové sorbenty se vyznačují pak i stálostí při širokém rozmezí pH<sup>6</sup>.

### b) Polymerní sorbenty

K této skupině patří:

-**Styren-divinylbenzen kopolymerové pryskyřice (ST-DVB)** zprostředkovávají extrakci relativně lipofilních, ale ve vodě rozpustných organických sloučenin<sup>7</sup>. Retence vzrůstá s rostoucí molekulovou hmotností analytu. S rostoucí polaritou retence klesá.

-**Akrylové polymery** se vyznačují vyšší polaritou a afinitou k polárním sloučeninám.

-**Tenax GC**, nebo-li poly-(2,6-difenyl-p-fenyleneoxid), který se používá ke stanovení těkavých látek z důvodu jeho vysoké teplotní stability.

-Mezi polymerní sorbenty se zařazují i polyuretanové, polypropylenové a polytetrafluoroethylenové (PTFE) fáze<sup>6</sup>.

### c) Fáze vázané na SiO<sub>2</sub>

Tyto sorbenty jsou nejvíce používané. Skládají se z alkylové nebo arylové skupiny vázané na silanol silikagelového základu. Pro výhodu vysoké kapacity se nejčastěji využívá oktadecylové skupiny<sup>6,8</sup>. Dále se vyskytující vázané fáze jsou např. oktylové, fenylové, cyklohexylové..

## 2. Polární vázané fáze (normální fáze)

Polární vázané fáze jsou selektivní pro polární sloučeniny. Vazba se uskutečňuje slabými interakcemi typu dipól-dipól, vodíkovými vazbami nebo  $\pi$ - $\pi$  interakcemi. Z pevné fáze je analyt uvolňován rozpouštědlem s vyšší eluční silou např. metanolem. Pro SPE se používají aminopropylové, propyldiolové a kyanopropylové vázané fáze. Kyanopropylové skupiny zachycují nepolární i polární sloučeniny a mohou je extrahovat z vodných roztoků. Dále mohou zachycovat polární molekuly z méně polárních rozpouštědel dipól-dipólovou interakcí mezi kyanoskupinou a polární skupinou analytu.

## 3. Iontoměničové sorbenty

Umožňují selektivní extrakci sloučenin s nábojem. Z matrice je analyt extrahován vysokoenergetickou iontovou interakcí se sorbentem. V závislosti na podmínkách ionizace existují dvě skupiny iontoměničových sorbentů:

**a) Silné iontoměniče:** při každém pH jsou výměnná místa ionizována

**b) Slabé iontoměniče:** jejich ionizace je na pH závislá

Podle druhu měněného iontu se rozlišují další dva typy iontoměničových sorbentů:

**a) Katexy:** iontoměniče pro výměnu kationtů. Benzensulfonová i propansulfonová kyselina jsou silnými iontoměniči pro výměnu kationtů. Karboxypropylová skupina je slabým iontoměničem typu katexu.

**b) Anexy:** iontoměniče pro výměnu aniontů. Trimethylamoniumpropylchloridová fáze je silným iontoměničem pro výměnu aniontů z vodných i nevodných roztoků náhradou za svůj chloridový anion.

Při extrakci je pH nastaveno na hodnotu, při níž je molekula analytu ionizována. Tím je analyt adsorbován na opačně nabitě skupiny sorbentu a pro eluci se musí změnit pH, čímž skupiny přestanou být nabitě a umožní uvolnění látky z pevné fáze (je-li analytem slabý elektrolyt, jehož disociace je závislá na pH).

## 4. Speciální sorbenty

### *a) Sorbenty s atomem kovu*

Atom kovu je imobilizován v polymerním nebo silikagelovém sorbentu pomocí kovalentní vazby mezi vnitřními orbitály kovu a funkčními skupinami sorbentu. Analyt je uvolňován z vazby změnou pH.

### *b) Sorbenty založené na rozpoznání molekul*

Na základu  $\text{SiO}_2$  mají kovalentní vazbou vázány protilátky. Extrakci lze vysvětlit zkříženou reakcí protilátek.

### *c) Smíšená a vícezpůsobová SPE*

Jde o způsob uspořádání sorbentu, ne o druhu sorbentu.

-**Smíšené sorbenty** obsahují jak nepolární, tak i iontoměničové funkční skupiny. Tím je analyt držen dvěma mechanismy, čehož se využívá pro extrakci lipofilních sloučenin s ionizovatelnou funkční skupinou.

-**Vícezpůsobová SPE** je založena na principu použití dvou a více pevných fází najednou.

## 2.1.4 Přehled hlavních forem SPE

Pro extrakci, zakoncentrování a čištění sledovaných analytů v SPE uspořádání je možné použít jednotlivé druhy sorbentů v různých formách uspořádání. K dispozici máme velké množství, uvedeny jsou nejčastěji používané.

*1. Kolonky*

*2. Zásobníky*

*3. Disky*

*4. 96-jamkové extrakční desky*

*5. SPE pipetky*

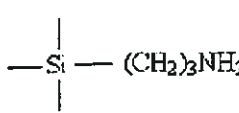
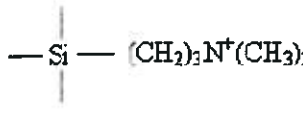
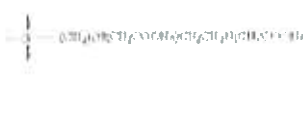
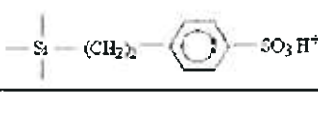
### 1. Kolonky

Sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu nebo polyethylenového obalu tvaru injekční stříkačky uspořádaný mezi dvě polyethylenové frity. Sorbent

je uložen v trubičkách (v kolonkách), které mohou být skleněné i teflonové. Kapacitu sorbentu, jako je specifický povrch, velikost pórů a celkový objem pórů je určen maximálním množstvím analytu, které je sorbent schopen zadržet. Obsah analytů, které mají být zachyceny by neměl být větší než 5% hmotnosti sorbentu (pokud použijeme 100 mg v 1 ml trubičce, vzorek by měl obsahovat maximálně 5 mg analytů). Ke zvýšení průtoku rozpouštědla kolonkou se používá vakuum.

Ve své bakalářské práci jsem použila kolonky Discovery firmy Supelco, proto se o nich zmíním podrobněji. SPE kolonky **DISCOVERY** jsou speciálně testovány tak, že je zaručena shodnost chromatografických vlastností mezi kolonkami z jedné i více výrobních šarží. Testují se parametry ovlivňující reprodukovatelnou kapacitu sorbentu. SPE kolonky se silikagelem Discovery jsou určeny pro aplikace z oblasti farmacie, biochemie, analýzy potravin, analýz životního prostředí, petrochemie, agrochemie .

### SPE Discovery iontové výměnné fáze

<b>DSC-NH<sub>2</sub></b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>polymerně vázaný aminopropyl</i></li> <li>- fáze je s výhodou používána ve dvou modech, tedy jako normální fáze nebo slabý ionex</li> <li>- chová se jako slabý anex s pK<sub>a</sub> 9,8. Při pH 7,8 nebo nižším je funkční skupina pozitivně nabitá. Iontově výměnná kapacita je 0,43 meq/g.</li> <li>- jako slabý ionex je s výhodou používána pro silné anionty, které jsou na silných anexech zadržovány příliš silně</li> </ul>
<b>DSC-SAX</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>polymerně vázaný quarternární amin</i></li> <li>- fáze je silný anex s iontové výměnnou kapacitou 0,14 meq/g</li> <li>- používá se pro extrakci slabých aniontů, jako jsou třeba karboxylové kyseliny, které nejsou na slabých anexech zadržovány dostatečně</li> </ul>
<b>DSC-WCX</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>polymerně vázaný karboxypropyl</i></li> <li>- chová se jako slabý katex s pK<sub>a</sub> 4,8. Při pH 6,8 nebo vyšším je funkční skupina negativně nabitá. Iontově výměnná kapacita je 0,15 meq/g</li> <li>- nejčastěji je používána pro silné kationty, které jsou na silných katexech zadržovány příliš silně</li> </ul>
<b>DSC-SCX</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>polymerně vázaná kyselina benzensulfonová</i></li> <li>- chová se jako silný katex s pK<sub>a</sub> &lt; 1,0. s iontové výměnnou kapacitou 0,8 meq/g</li> </ul>

### SPE Supelclean normální fáze

<b>LC-CN</b>	<i>monomerně vázaná kyanopropyllová fáze, (7 %C) encappovaná</i>
<b>LC-NH<sub>2</sub></b>	<i>polymerně vázaný aminopropyl, (5 % C)</i>
<b>LC-DIOL</b>	<i>polymerně vázaný 2,3 dihydroxypropoxypropyl (7 %C)</i>

### SPE Supelclean adsorbenty

<b>LC-Si</b>	<i>silikagel</i>
<b>LC-FLORISIL</b>	<i>křemičitan hořečnatý, 100/120 MESH</i>
<b>LC-ALUMINA-N</b>	<i>oxid hlinitý, pro neutrální pH (~ 6,5), 60/325 MESH</i>
<b>LC-ALUMINA-A</b>	<i>oxid hlinitý, pro kyselé pH (~ 5), 60/325 MESH</i>
<b>LC-ALUMINA-B</b>	<i>oxid hlinitý, pro bazické pH (~ 8,5), 60/325 MESH</i>

### SPE Supelclean iontové výměnné fáze

<b>LC-SAX</b>	<i>- polymerně vázaný quarternární amin</i>
<b>LC-WCX</b>	<i>- polymerně vázaný karboxypropyl</i>
<b>LC-SCX</b>	<i>- polymerně vázaná kyselina benzensulfonová</i>



## **2.Zásobníky**

Jsou tvořeny polypropylenovým tělem. Mají značné nevýhody. Zpracování vzorků je pomalé a často dochází k ucpání nosiče<sup>8</sup>.

## **3.SPE disky**

Vyznačují se mnoha výhodami ve srovnání s kolonkami či zásobníky. Mají velký povrch, čímž dovolují vyšší průtok rozpouštědla. Užitím rozměrnějšího disku lze tento průtok ještě zvýšit a tím se omezuje riziko ucpání. V současné době existuje a je používáno několik typů extrakčních disků:

### ***a)Extrakční membrány***

Skládají se z částic vsazených do sítě z inertních polytetrafluoroetylenových vláken. Mohou se také používat jako náplně v kolonách, pipetkách nebo 96-jamkových discích. Výhoda spočívá v použití malého množství elučního rozpouštědla při uvolňování analytu z membrány, dále dovoluje vyšší průtok rozpouštědla, čímž zrychlují analýzu. Jedna z nevýhod je možnost ucpání membrány částicemi z matrice.

### ***b)Disky ze skleněných vláken***

Obsahují na SiO<sub>2</sub> chemicky vázané částice, které jsou začleněné do matrice ze skleněných vláken.

### ***c)Speedisky***

Sorbent je přítomný v tenké vrstvě mezi dvěma filtry ze skleněných vláken.

### ***d)Memsep disky***

Jsou tvořené celulózovými vrstvami stlačenými do souvislého sorbentu.

## **4. 96-jamkové extrakční disky**

Skládají se z polystyrénových nebo polypropylenových vrstev s 96 kolonkami. Jsou to 96 pozicové destičky, které obsahují 25, 50 a nebo 100 mg sorbentu v jedné jamce.

## **5.SPE pipetky**

Mohou se charakterizovat jako běžné pipety naplněné SPE diskem.

## 2.1.5 Důležité pojmy a faktory ovlivňující provedení SPE

Následuje shrnutí některých významných okolností, které by se měly zvážit před započítím a v průběhu úpravy vzorku pomocí SPE. Při výběru vhodného provedení SPE bychom měli brát v úvahu tyto hlediska:

- chemická povaha látky, kterou chceme stanovit tzn. její funkční skupiny, schopnost ionizace, rozpustnost
- koncentraci stanovované látky ve vzorku
- vlastnosti matrice - vodná nebo organická povaha matrice, pH, iontová síla
- stupeň koncentrace a čistoty, které je třeba dosáhnout
- mez detekce a citlivosti

Další hledisko při výběru vhodného provedení SPE jsou faktory, které ji ovlivňují.

### **Kapacita SPE kolonky**

Je definována jako maximální množství látky ze vzorku, které může být zadrženo daným množstvím sorbentu. Množství sorbentu musí být dostatečné pro retenci veškerého analytu ve vzorku<sup>8</sup>. Kapacita kolonky závisí na počtu aktivních míst sorbentu, jeho typu a objemu. Důsledkem vysokého měrného povrchu částic sorbentu je vysoká kapacita této fáze. Fáze zadrží takové množství analytu (včetně nečistot), které odpovídá 6 až 15% hmotnosti sorbentu (tj. 200 mg kolonka je schopna absorbovat přibližně 20 mg celkové hmotnosti vzorku).

### **Výběr elučního rozpouštědla**

Eluční rozpouštědlo musí mít dostatečnou eluotropní sílu, která umožní rozvolnění vazby mezi analytem a sorbentem, a dostatečný objem k uvolnění celého množství analytu ze sorbentu. Poměr objemů vzorku ( $V_1$ ) a eluční fáze ( $V_2$ ) se vyjadřuje jako *koncentrační faktor*  $f^6$ :

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

### ***Průtok rozpouštědla kolonkou***

Díky vysoké kapacitě zádrže je menší i potřebné množství sorbentu v SPE kolonce. Tím se též zvyšuje rychlost průtoku v kolonce. Pokud je rozložení částic pravidelné proudí vzorek i rozpouštědlo skrz vrstvu sorbentu rovnoměrně a dotyk vzorku se sorbentem je maximální. Díky tomu je průtok optimální a výtěžnost maximální, bez interferencí.

### **Nejčastěji uváděné výhody SPE metody**

- rychlá, selektivní, reprodukovatelná
- relativně jednoduchá
- malá spotřeba rozpouštědel
- zlepšuje kvalitativní a kvantitativní analýzy
- umožňuje jednoduchou změnu matrice vzorku
- možnost současného zpracování 12, 24 a 96 vzorků
- snižuje nároky na analytický systém
- univerzálně použitelná

### 3 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo ověření retence a eluce 6-sulfatoxymelatoninu (SaMT) na pevné fázi na bázi silného iontoměniče. SaMT je silný elektrolyt ve vodném roztoku je plně disociován a na silném iontoměniči je nevratně zadržen. Jako eluční činidlo byl zvolen vodný roztok síranu sodného  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Původním záměrem mé bakalářské práce bylo porovnat kolonky pro extrakci na pevné fázi:

- 1) LC-SAX
- 2) DSC-SAX

## 4 Výsledky experimentální části

Ve své experimentální části bakalářské práce jsem navazovala na výsledky práce diplomantů katedry biofyziky a fyzikální chemie. Navazovala jsem již na dříve stanovené podmínky pro izolaci SaMT pomocí extrakce na pevné fázi a na analytické podmínky při HPLC.

### Použité přístroje a chemikálie:

1. Při izolaci SaMT pomocí SPE a jeho HPLC analýze jsem použila tyto uvedené přístroje a vybavení:

Vysokotlaké čerpadlo HPP 5001 , Laboratorní přístroje

UV detektor LCD 2040 , Laboratorní přístroje

Kolona Supelcosil™ ABZ+PLUS ,Supelco

SPE kolonka LC-SAX kolona, Supelco

2. Použité chemikálie:

Acetonitril pro HLPC , Sigma - Aldrich

Methanol Chromasolv pro HPLC, Sigma - Aldrich

Octan amonný, p. a., Lachema

Tetrahydrofuran Chromasolv pro HPLC, Sigma - Aldrich

## 4.1 Extrakce na pevných fázích

### 1) Kolonka LC-SAX

K extrakci jsem zkoušela druh sorbentu LC-SAX, která patří mezi iontovýměnné fáze s polymerně navázaným kvarterním aminem. Působí silně anionvýměnným mechanismem s výměnnou kapacitou 0,14 meq/g

(miliekvivalent na gram). Dovolují extrakci polárních a kyselých látek, v našem případě SaMT, z biologických tekutin. Při adsorpci dochází ke třem interakcím: k anionvýměnným, k nepolárním a k polárním. K eluci je výhodné zvýšení iontové síly nebo přidání protiiontu s vysokou afinitou k iontovýměnné fázi do rozpouštědla, následkem je vytlačení analytu ze sorbentu. Jako eluční činidlo byl použit vodný roztok síranu sodného  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Síranový aniont má ke kvarternímu aminu pravděpodobně podobnou afinitu jako sulfátový aniont SaMT.

### **1. Aktivace**

K aktivaci kolonky jsem používala 2 ml methanolu a 2 ml ultračisté vody.

### **2. Adsorpce**

Adsorbovala jsem SaMT na iontovýměnný sorbent. U LC-SAX kolonky jsem adsorbovala 1 ml standardního roztoku SaMT o koncentraci 1 mM.

### **3. Eluce**

Eluce adsorbovaného standardu z pevné fáze jsem se pokoušela dosáhnout použitím elučního rozpouštědla. Při eluci jsem vycházela z 1 ml roztoku SaMT adsorbovaného na předem aktivovanou pevnou fázi. Jako eluční rozpouštědlo jsem použila již zmíněný roztok síranu sodného o koncentraci 100 mM. Po HPLC analýze získaného roztoku se na chromatogramu objevil pík s  $t_r$  7,09 min., který odpovídal SaMT.

**Postup práce:** Sorbent kolonky jsem před každým použitím aktivovala promytím 2 ml MeOH a 2 ml vody. Standardní roztok SaMT jsem připravila rozpuštěním SaMT ve vodě. Adsorpce standardu na sorbent probíhala bez použití vakua při průtokové rychlosti standardu 1 ml/min. Všechny kroky postupu jsem ověřovala na HPLC analýzou sebraných podílů. Po počátečním promytí vodou eluce probíhala výše uvedenými rozpouštědly, jednotlivé frakce jsem jímala po 1 ml podílech, každou získanou část vody a eluátu jsem opět

proměřila pomocí HPLC. Žádoucí eluční rychlost se pohybovala okolo 1 ml/min, při nedostatečné rychlosti jsem k usnadnění eluce používala vakuum. Mezi jednotlivými nanesenými podíly rozpouštědla nesmělo dojít k vyschnutí sorbentu. Po skončení eluce jsem kolonku ještě promyla vodou.

*Příprava elučního rozpouštědla:* Jako eluční rozpouštědlo jsem použila 100 mM roztok  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Příprava roztoku spočívala v rozpuštění 1,42 g naváženého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ve 100 ml ultračisté vody v odměrné baňce a jeho přefiltrování.

*Příprava standardního roztoku SaMT:* Připravila jsem si standardní roztok o koncentraci 11,7mg/25ml. K přípravě standardního roztoku o objemu 3 ml a koncentraci  $1,4 \cdot 10^{-3}$  mol/l jsem použila zásobní roztok standardního roztoku.

*Příprava mobilní fáze:* Mobilní fázi pro HPLC analýzu jsem připravila roztok smícháním THF: ACN:  $\text{NH}_4\text{Ac}$  v poměru 0,1:1:10. Danou mobilní fázi jsem získala pomocí 100mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  o objemu 500 ml, THF o objemu 5 ml a ACN o objemu 50 ml. Připravený roztok octanu amonného jsem přefiltrovala a pak postupně přidala roztok tetrahydrofuran a acetonitril.

Všechny analýzy se uskutečnily za následujících chromatografických podmínek: mobilní fáze 100mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  : ACN : THF 10:1:0,1, odplyněné heliem, UV detekce při 225 nm, kolona ABZ+Plus, průtok mobilní fáze 1 ml/min, objem nástřiku 20  $\mu\text{l}$  smyčka, teplota 20 °C. Výsledky viz.tabulka č.1.

## 2) Kolonka DSC-SAX

Tato druhá kolonka pro SPE patří také mezi iontově výměnné fáze s polymerně vázaným kvarterním aminem. Je silným anexem s iontově výměnnou kapacitou 0,14 meq/g (miliekvivalent na gram). Používá se pro extrakci slabých aniontů, jakou jsou např. karboxylové kyseliny, které nejsou na slabých anexech zadržovány dostatečně. U této kolonky jsem opět použila stejné eluční činidlo a to síran sodný.

K aktivaci kolonky bylo použito stejných činidel jako u kolonky LC-SAX, methanol a ultračistá voda. K adsorbci jsem použila 5 ml standardního roztoku SaMT o koncentraci 2,8 $\mu$ g/ml. Použila jsem i stejné eluční činidlo 100mM roztoku síranu sodného.

**Postup práce:** Kolonku DSC-SAX jsem nejdříve aktivovala 2 ml roztoku MeOH a 2ml vody. Sorbce standardním roztokem SaMT probíhala za použití vakua při průtokové rychlosti standardu 1ml/min. Standardní roztok SaMt jsem tímto způsobem aplikovala 5krát po 1 ml. Po adsorbci následovala eluce, která byla provedena také 5 krát. Dané získané frakce jsem proměřila pomocí HPLC analýzy. Po ukončení práce jsem kolonku promyla vodou.

*Příprava standardního roztoku SaMT:* K přípravě standardního roztoku jsem rozpustila 7,7  $\mu$ g v 10 ml ultračisté vody. Z tohoto roztoku jsem odpipetovala 2 ml do 500 ml odměrné baňky a doplnila po risku. Vznikla nám celková koncentrace 2,8 $\mu$ g/ml.

*Příprava mobilní fáze pro HPLC analýzu:* Jako mobilní fázi jsem užila 100 mM NH<sub>4</sub>Ac : MeOH v poměru 4:1.

Všechny analýzy se uskutečnily za následujících chromatografických podmínek: mobilní fáze 100mM 100 mM NH<sub>4</sub>Ac : MeOH 4:1, odplyněné heliem, fluorescenční detekce při 225 nm, kolona Discovery Supelco HS C18, průtok mobilní fáze 1 ml/min, objem nástřiku 20  $\mu$ l smyčka, teplota 20 °C.



Tabulka č.1: SPE SAMT pomocí LC-SAX kolonky - průběh eluce roztokem síranu sodného, jímány frakce o objemu 1 ml

číslo frakce	plocha píku (mV.s)	t <sub>r</sub> (min)
4	125	6,95
5	449	6,95
6	820	6,93
7	1005	6,92
8	793	6,91
9	461	6,93
10	136	6,87
11	140	6,94
12	93	6,88
13	51	6,85
standard	4252	7,09

Odpovídající chromatografy jsou uvedeny v příloze 1-12.

## 5 Závěr

V teoretické část své bakalářské práci jsem shrnula nejdůležitější vlastnosti melatoninu a jeho metabolitu SaMT. V další části jsem popisovala jeho izolaci pomocí extrakce na pevné fázi a jeho stanovení pomocí HPLC.

V praktické části jsem se zabývala ověřením retence a eluce 6-sulfatometoxymelatoninu (SaMT).

U SPE jsem použila iontovýměnnou kolonu LC-SAX a DSC-SAX s polyměrně vázaným kvarterním aminem.

**LC-SAX:** Na kolonku byl nanesen 1 ml vzorku, retence probíhala kvantitativně, eluce proběhla v rozmezí 4.-13. frakce (celkově 10 frakcí po 1 ml). Místo očekávaného zakoncentrování tedy došlo k rozmytí vzorku. Výtěžnost u této kolonky byla 95,79 %.

**DSC-SAX:** Na kolonku byl nanesen 5x1 ml vzorku, retence byla kvantitativní. Průběh eluce nemohl být z časových a technických důvodů vyhodnocen, nedošlo tedy k zamýšlenému porovnání obou kolonek.

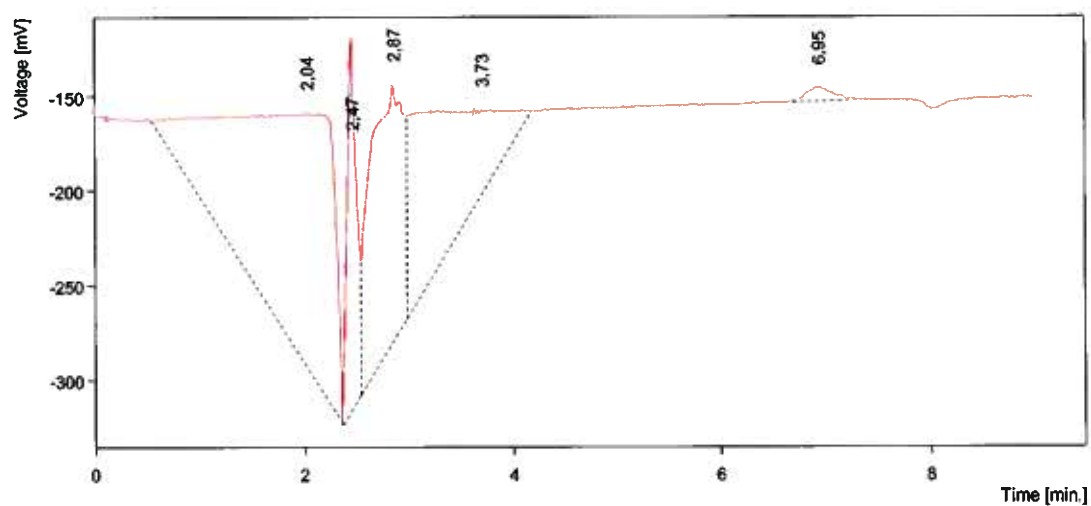
SPE s následným HPLC stanovení je kvalitativní metoda pro stanovení SaMT v moči. SPE s navázaným kvartérním aminem by se po příslušných úpravách mohla i nadále využívat k izolaci SaMT po optimalizaci jeho kvantitativního stanovení.

## 6 Přílohy

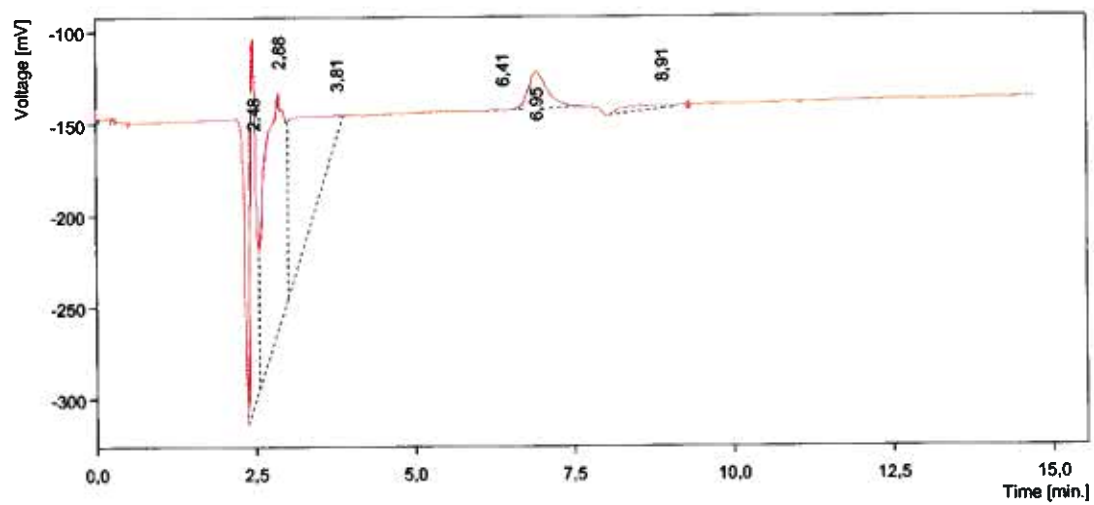
### Příloha č. 1

Provedení SPE SaMT: První eluce, kde se objevil SaMT, frakce č. 4.

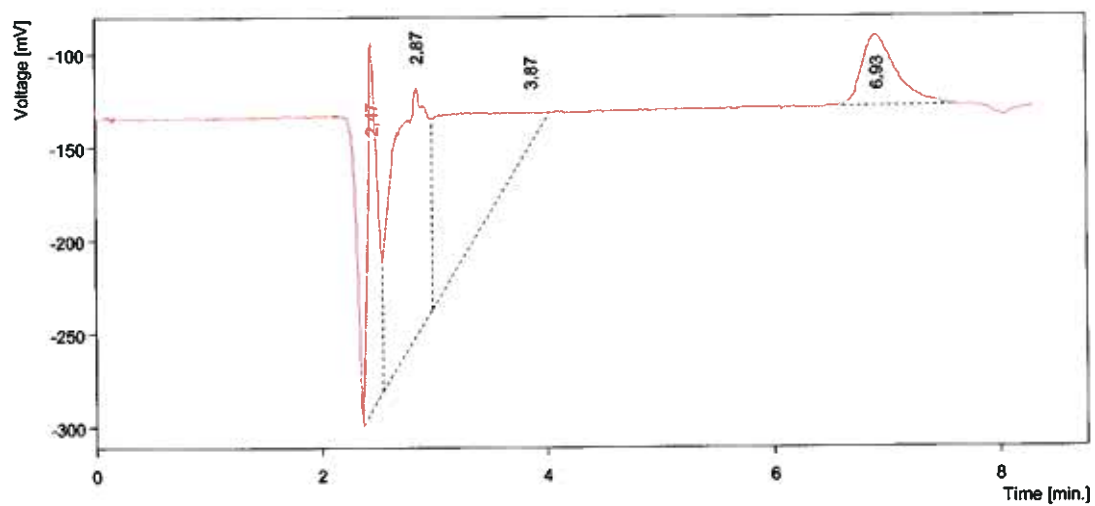
Chromatografické podmínky: kolona supelcosil™ ABZ+Plus, mobilní fáze směs THF:ACN:NH<sub>4</sub>Ac 0,1:1:10, odplyněná heliem, UV detekce při vlnové délce 225nm, průtok mobilní fáze 1,0ml/min., smyčka o objemu 20 µl, teplota 20°C.



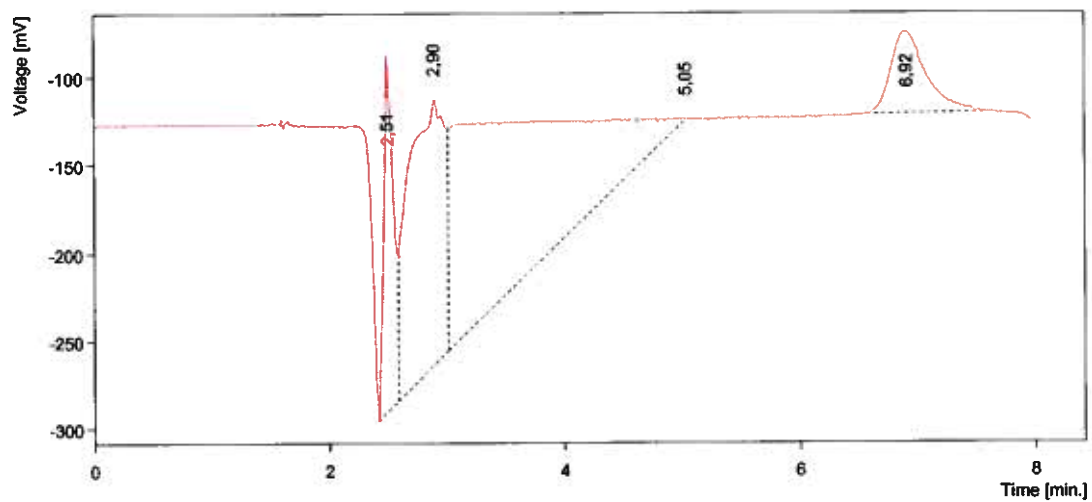
## Příloha č. 2



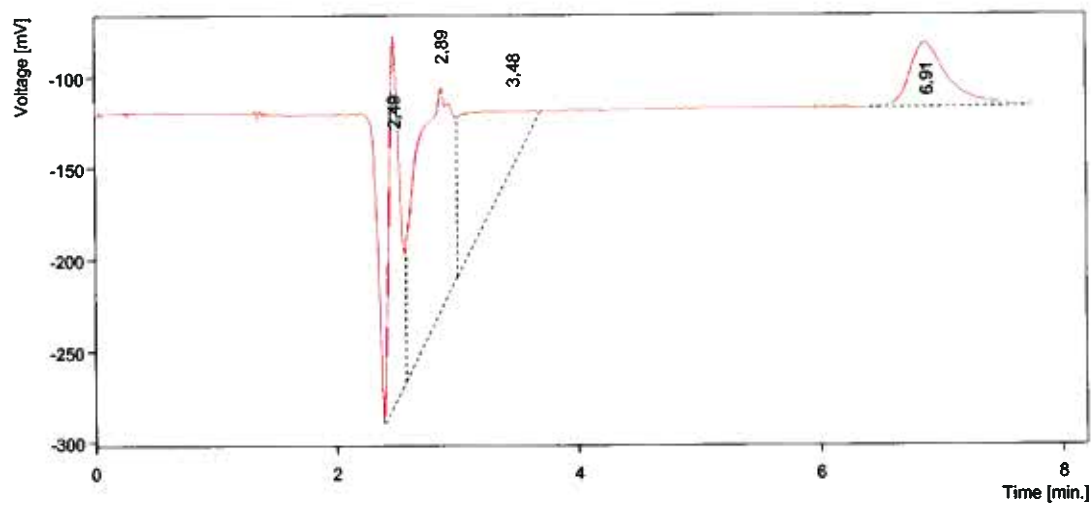
## Příloha č. 3



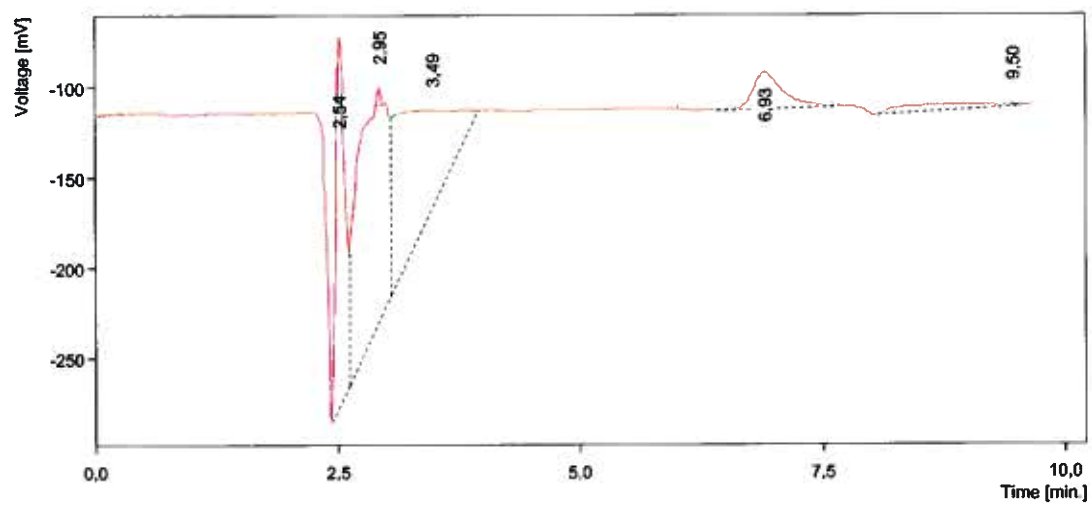
#### Příloha č. 4



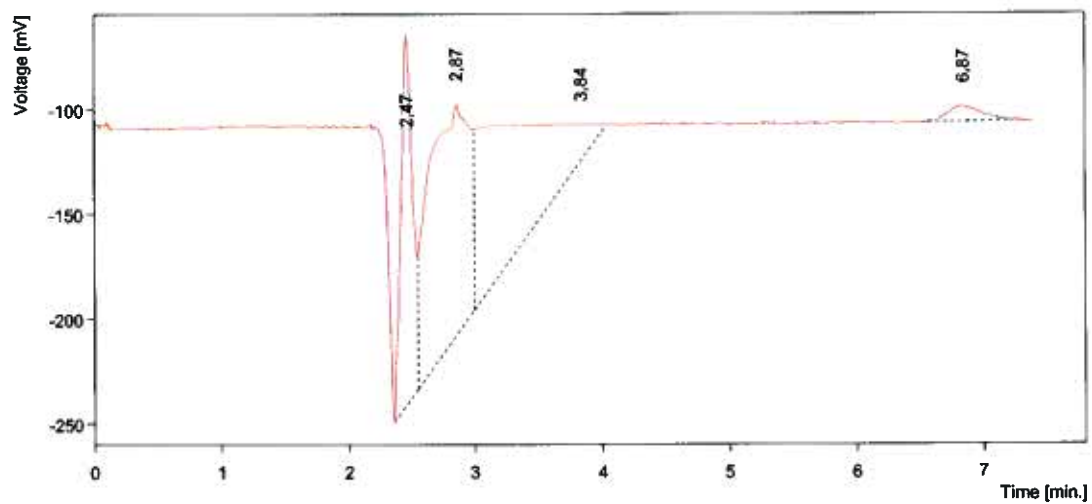
#### Příloha č. 5



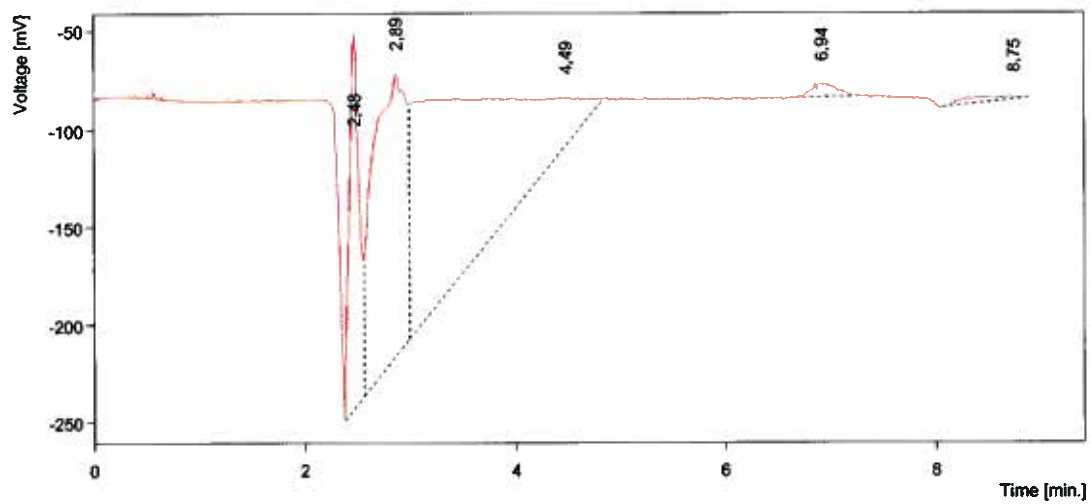
## Příloha č. 6



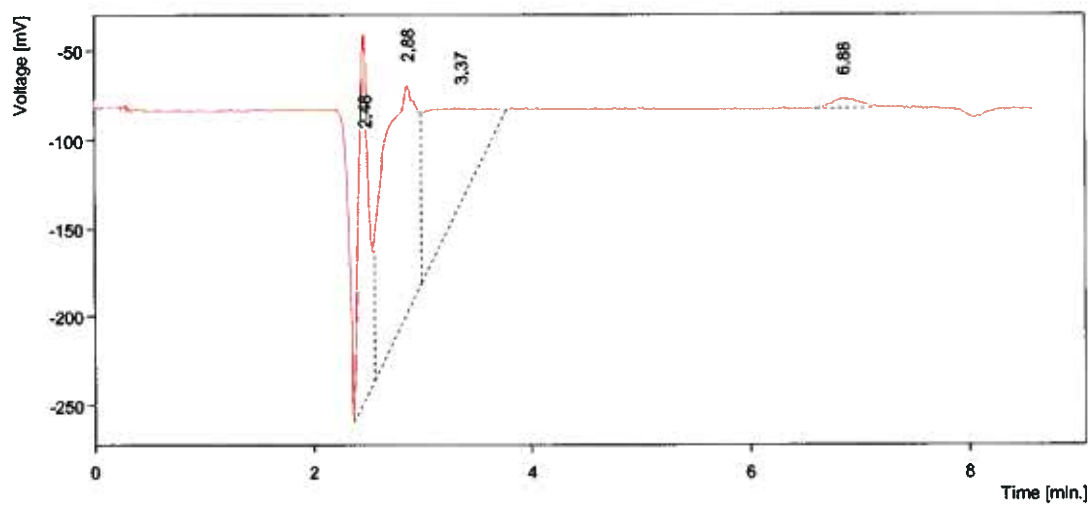
## Příloha č. 7



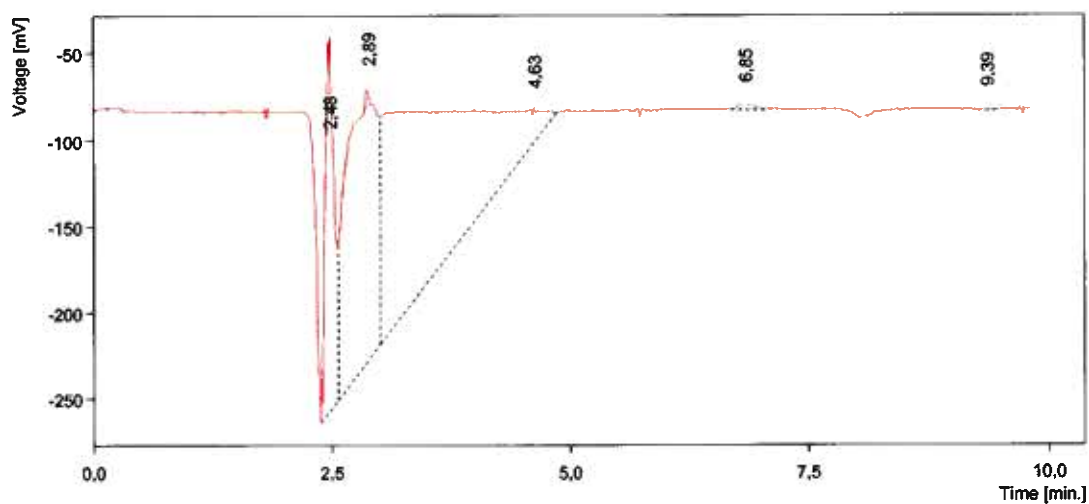
### Příloha č. 8



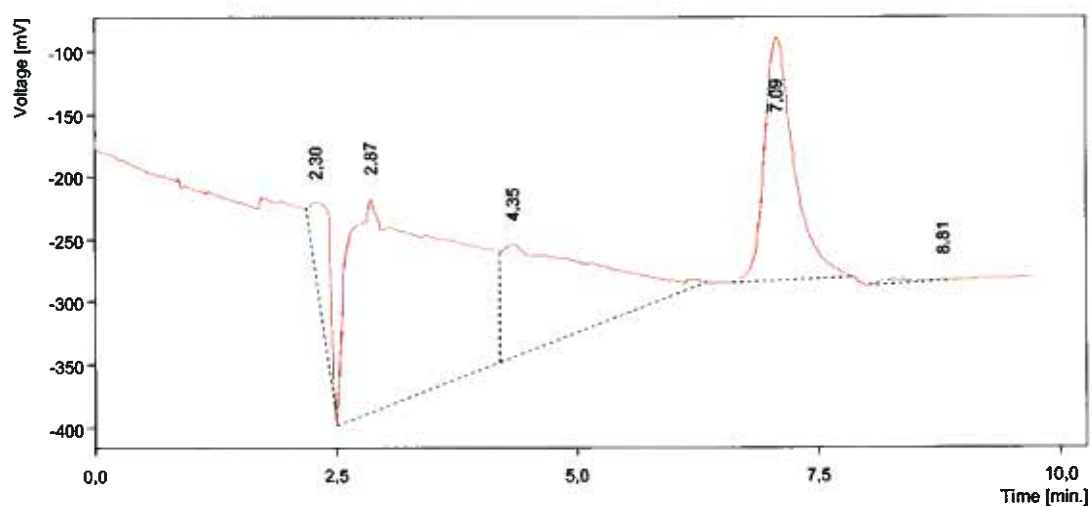
### Příloha č. 9



### Příloha č. 10

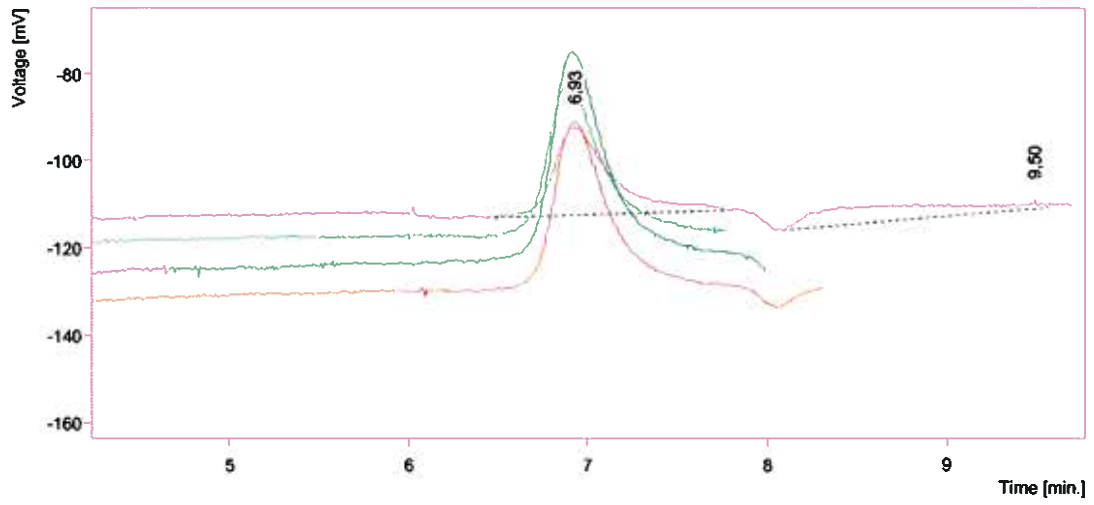


### Příloha č. 11 Standard





## Příloha č. 12



## 7 Seznam literatury

1. A.J. Fellenberg, G. Phillipou , R.F. Seemark: Quantitation of Urinary 6- Hydroxymelatonin Sulphate by GAs Chromatography Mass Spectrometry, *Biomed.Mass Spectrom.* 84-87, 1980
- 2.A. M. Leone, P. I. Francis, R. E. Silman: The izolation, Purification and Characterisation of the Principal Urinary Metabolites of Melatonin, *J. Pinael Research* 4 , 23-256, 1987.
- 3.I.M. Young, R. M. Leone, P. Francis, P. Stovell, R. E. Silman: Melatonin Is Metabolized to N-acetyl Serotonin and 6-Hydroxymelatonin in Man, *J. Clin. Endocrinol.Metabol.* 60, 114-119, 1985
- 4.V. F. Samanidou, I. P. Imamidou, I. N. Papadoyannis: Evaluation of Solid Phase Extraction Protocols for Isolation of Analgesic from Biological Fluids Prior to HPLC Determination, *J.Liq.Chromat. Rel. Technol.* 25 , 185-204, 2002
- 5.M. Moors, D. L. Massart, R. D. McDowall: Analyte Isolation by Solid Phase Extraction (SPE) on Silica-Bonded Phases, *Pure Appl.Chem.* 66, 277-304, 1994
- 6.I. Liška, J. Krupčík, P. A. Leclercq: Tha Use of Solid Sorbents for Direct Accumulation of Organic Compounds from Water Matrice- A Review of Solid-Phase Extraction Techniques, *J.High Resolut. Chromatogr.* 12, 577-590, 1989
- 7.H. Lingeman, S. J. F. Hoekstra-Oussoren: Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean-up in bioanalysis, *J. Chromatogr. B* 689, 221-237, 1997
8. V. Walker, G. A. Mills: Solid-Phase extraction in clinical biochemistry , *Assoc. Clin. Biochem.* 39, 464-477, 2002.
9. A.Hrabálek, J. Kuneš, V. Klimešová, M. Macháček, L. Opletal, K. Palát, M. Roman, J. Vinšová: Chemická laboratorní technika pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998.

10. A.Marešková: Analytické vlastnosti metabolitů tryptofanu,  
Diplomová práce, FaF 2005

11. Pavel Kouda: Moderní analytické metody, Pavel Kouda, Ostrava  
2003.