

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Věra Pavlů

STANOVENÍ TRYPTOFANU, SEROTONINU A
MELATONINU V ROSTLINNÉM MATERIÁLU POMOCÍ
HPLC

Determination of tryptophan, serotonin and melatonin in plants
by using HPLC

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18.6.2021

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, odbornou pomoc, za cenné rady a v neposlední řadě také za věnovaný čas a trpělivost. Dále děkuji RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za odborné rady a technickou podporu při práci s přístrojem a jeho softwarem.

Závěrem bych chtěla vyjádřit vděčnost celé své rodině za podporu, kterou mi během celého mého studia poskytovala.

Abstrakt

Tato práce se zabývá vývojem a optimalizací metody pro stanovení tryptofanu a jeho metabolitů – serotoninu a melatoninu – v rostlinném materiálu, konkrétně ve vinné révě, v průběhu jedné analýzy. Využívá k tomu analytickou metodu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

V teoretické části je nejprve pojednáno o tryptofanu. Je představen jeho metabolismus a základní vlastnosti metabolitů – serotoninu a melatoninu. Diskutován je jeho výskyt ve vinné révě. Jsou zde také uvedeny analytické techniky, pomocí nichž lze tyto analyty stanovit. Dále pak jsou zahrnuty informace o moderních stacionárních fázích, které jsou vhodné pro tento druh analýzy.

Experimentální část tvoří optimalizace metody, měření kalibračních závislostí a reálných vzorků. Je měřeno metodou reverzní chromatografie, kdy jako stacionární fáze je nejprve použita kolona C18 s náplní core-shell, poté kolona BEH Phenyl. Jako mobilní fáze je použita směs 10 mM octanového pufru o pH = 4,5 a methanolu. Je využita UV detekce při vlnové délce 254 nm, pro větší citlivost pak hmotnostní detekce. Byly stanoveny základní podmínky experimentu. Na počátku analýzy obsahuje mobilní fáze 95 % (v/v) pufru a 5 % (v/v) methanolu. Poté je obsah methanolu od druhé do šesté minuty lineárně zvyšován na hodnotu 80 % (v/v), kde je mezi šestou a osmou minutou konstantně udržován. V čase od osmé do deváté minuty je obsah methanolu lineárně snížen na počáteční hodnotu. Čas analýzy je jedenáct minut.

Bylo zjištěno, že při použití UV detekce vykazuje závislost odezvy detektoru na koncentraci analytů velmi dobrou linearitu. Limity UV detekce LOD resp. LOQ byly stanoveny takto: pro serotonin 0,17 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. 0,57 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro tryptofan a melatonin shodně 0,23 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. 0,77 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Bohužel chromatogramy obsahují velké množství interferentů a navíc je v rostlinném materiálu pouze stopové množství analytů, proto je UV detekce nedostatečná. Naproti tomu, tandemová hmotnostní detekce je metoda vysoce citlivá, ale pro serotonin není kalibrační závislost lineární. Pro spolehlivou kvantifikaci by bylo nutné použít izotopicky značené vnitřní standardy. Mez detekce LOD a mez kvantifikace LOQ byly odhadnuty – pro serotonin 0,05 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. 0,17 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro tryptofan 0,25 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. 0,84 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro melatonin 0,01 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. 0,05 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. V hroznové šťávě byly úspěšně detegovány všechny tři analyty, ve víně pouze tryptofan a melatonin.

Klíčová slova

tryptofan, serotonin, melatonin, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Obsah

1	Cíl práce.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Tryptofan.....	9
2.1.1	Tryptofan v lidském organismu.....	10
2.2	Serotonin	12
2.3	Melatonin	13
2.4	Přítomnost analytů ve vinné révě	14
2.5	Metody pro stanovení tryptofanu, serotoninu a melatoninu	14
2.5.1	Stanovení ve vinné.....	15
2.6	Možnosti stacionární fáze.....	17
3	Experimentální část	19
3.1	Použité chemikálie	19
3.2	Úprava reálných vzorků	20
4	Výsledky a diskuze.....	21
4.1	Izokratická eluce	21
4.2	Gradientová eluce.....	22
4.2.1	Vliv složení mobilní fáze	22
4.2.2	Vliv stacionární fáze	33
4.3	UV kalibrační závislost	34
4.3.1	Reálné vzorky	35
4.4	MS detekce.....	36
4.4.1	MS kalibrace	49
4.4.2	Reálné vzorky	50
4.4.3	Opakovatelnost	51
5	Závěr.....	52
6	Použitá literatura.....	54

Seznam použitých symbolů a zkratek

BEH.....	hybridní stacionární fáze obsahující ethylenové můstky (z <i>angl. ethylen bridge hybrid</i>)
E, CE.....	kolizní energie
F.....	detekce pomocí fluorescence
HPLC.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z <i>angl. high pressure liquid chromatography</i>)
M.....	melatonin
MRM.....	monitorování vícenásobných reakcí (z <i>angl. multiple reaction monitoring</i>)
MS.....	hmotnostní spektrometrie (z <i>angl. mass spectrometry</i>)
PDA.....	detektor s diodovým polem (z <i>angl. photodiode array detector</i>)
S.....	serotonin
T.....	tryptofan
UHPLC.....	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z <i>angl. high-pressure liquid chromatography</i>)

1 Cíl práce

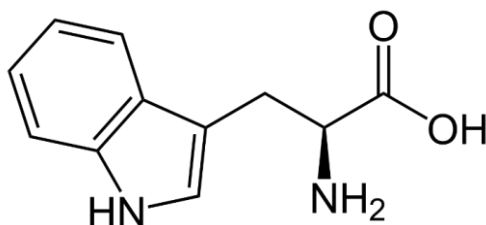
Cílem práce bylo vypracovat metodu kapalinové chromatografie, díky které budou moci být stanoveny tryptofan, serotonin a melatonin vedle sebe v průběhu jedné analýzy. Práce se zabývá analýzou rostlinného materiálu. V návaznosti na spolupráci s Katedrou biochemie je práce zaměřena především na analýzu částí rostliny *Vitis vinifera* a jejích plodů, případně produktů z nich.

2 Teoretická část

2.1 Tryptofan

Tryptofan je bílý (téměř bílý) krystalický nebo amorfní prášek. Je jednou z dvaceti proteinogenních aminokyselin. Tryptofan, přesněji řečeno jeho L-forma, byl objeven roku 1901 anglickým biochemikem Frederickem Hopkinsem [1]. Ten zjistil, že tryptofan patří do skupiny devíti aminokyselin, které jsou pro člověka esenciální. Znamená to tedy, že lidský organismus neumí tryptofan endogenně syntetizovat a ten musí být do těla dodáván skrze potravu. Tryptofan byl poprvé uměle syntetizován v roce 1949, ale počátkem 80. let byla chemická syntéza nahrazena fermentačními postupy, které výrazně zvýšily výtěžky, čímž se staly tryptofanové potravní doplňky více dostupné [2].

Tryptofan je neutrální aminokyselinou, jejíž systematický název je kyselina (2*S*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl) propanová. Tryptofan je jedinou aminokyselinou odvozenou od indolu, bicyklické struktury tvořené benzenovou a pyrrolovou skupinou, která je spojena s α -uhlíkem aminokyseliny pomocí skupiny $-\text{CH}_2$. Přítomnost indolového kruhu v chemické struktuře dává této molekule hydrofobní vlastnosti. Struktura tryptofanu je ukázána na Obr. 1 [3].



Obrázek 1: Struktura L-tryptofanu. Zdroj: vlastní zpracování.

Tryptofan je metabolizován za vzniku biologicky aktivních indolových sloučenin, které mají velký vliv na životní funkce. Kromě biotransformace v lidském organismu, která je popsána níže, je tryptofan metabolizován nejen živočichy, ale i rostlinami. Vznikají tak například rostlinné hormony auxiny, obranné sloučeniny indolylglukosinoláty a indolový alkaloid nebo přírodní halucinogen dimethyltryptamin. Bylo zjištěno, že zejména auxiny souvisí se specifickou metabolickou cestou tryptofanu, která se podílí na fotopercepci a vývoji rostlin. Indolaminy, jako je serotonin a melatonin, byly v rostlinách detekovány a jejich funkce v nich jsou předmětem dalšího výzkumu [4,5].

2.1.1 Tryptofan v lidském organismu

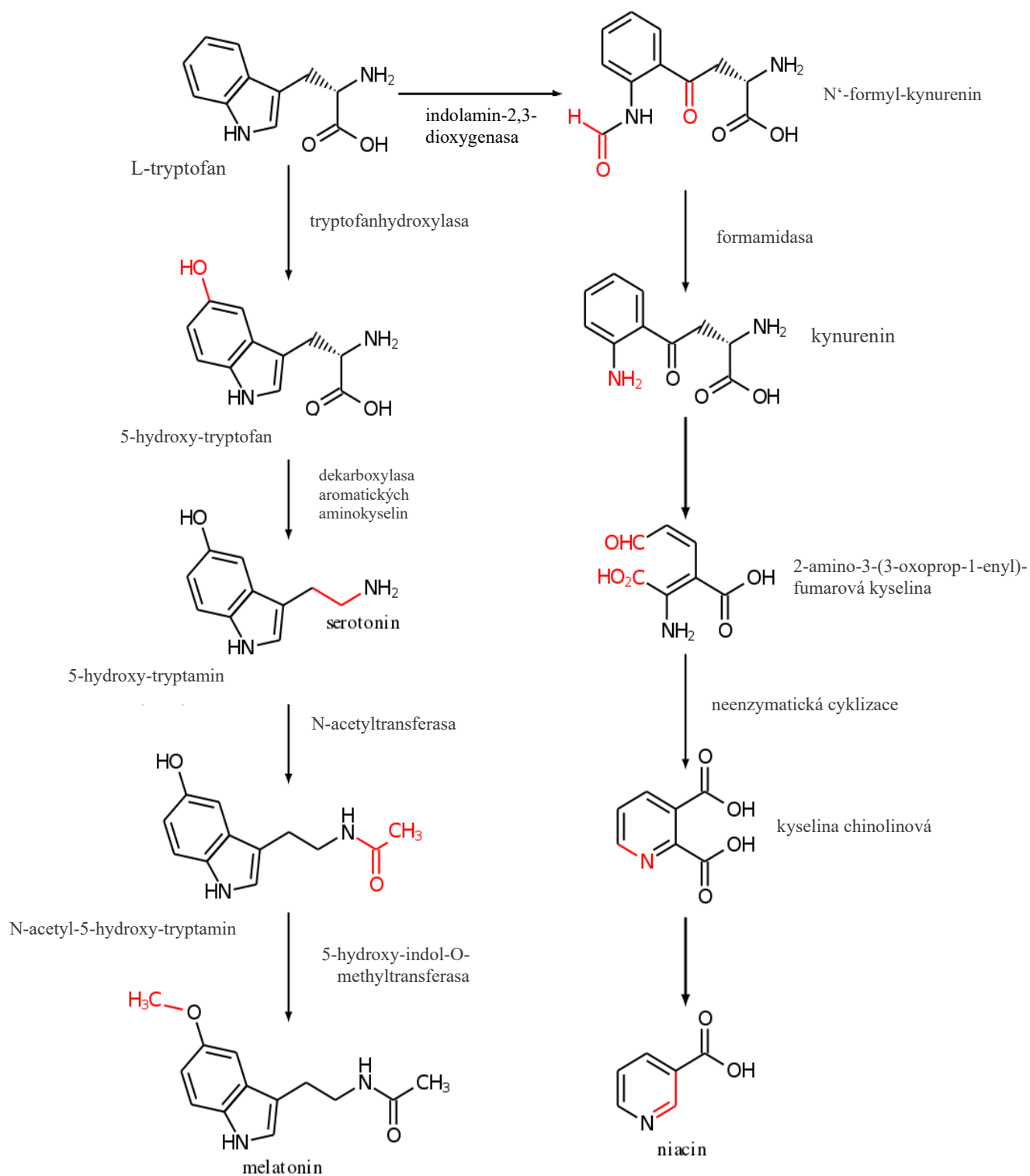
V lidském těle se tryptofan ukládá obtížně a také jeho koncentrace je nejnižší ze všech aminokyselin. Do organismu se tryptofan dostává především ze stravy bohaté na bílkoviny, a to jak živočišného, tak rostlinného původu. Potraviny s vyšším obsahem tryptofanu jsou však většinou živočišného původu – mléko a mléčné výrobky, vejce, maso a mořské plody. Nižší obsah mají brambory, cizrna, sója, kakaové boby a ořechy. V souvislosti se získáním tryptofanu z potravy se diskutuje také to, jakou roli v něm hraje střevní mikrobiom [6,7].

2.1.1.1 Biotransformace tryptofanu

Ačkoli je množství tryptofanu v organismu malé, jedná se o molekulu velmi důležitou. Jeho nedostatek může zapříčinit řadu neuropsychologických onemocnění jako je například demence [6]. Tryptofan se účastní syntézy proteinů a je prekurzorem pro řadu pro život nezbytných sloučenin. Stojí na začátku dvou podstatných metabolických cest – serotoninové a kynureninové dráhy (viz Obr. 2).

Serotoninová dráha zahrnuje metabolismus tryptofanu jen asi z 3 až 10 %. Nejprve dochází k hydroxylaci tryptofanu pomocí enzymu tryptofanhydroxylasy za vzniku 5-hydroxytryptofanu. Tato hydroxylace je rychlost určující reakce. Následně vzniká dekarboxylací 5-hydroxytryptamin, triviálním názvem serotonin. Ten je odbouráván na 5-hydroxyacetaldehyd působením monoaminoxidasy-a a následně oxidován na kyselinu 5-hydroxyindol-3-oxalovou pomocí aldehyddehydrogenasy. Acetylací serotoninu transferasou vzniká N-acetyl-serotonin, který je následně přeměněn pomocí transferasy na melatonin. Při této katalýze se uvolňuje NADH.

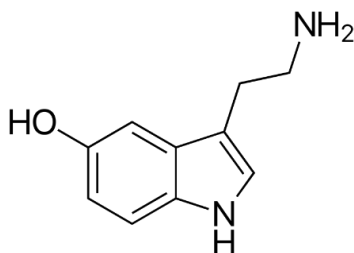
Druhá cesta biotransformace tryptofanu vede ke vzniku kyseliny kynurenové, L-kynureninu a kyseliny chinolinové. Koncovým produktem této dráhy je kyselina pyridin-3-karboxylová, jinak též kyselina nikotinová, niacin nebo vitamin B₃. Je to vitamin rozpustný ve vodě, nutný pro uvolňování energie z potravy. Je využíván buňkami k syntéze NAD(P)⁺. V této dráze hrají roli dva klíčové enzymy: tryptofan-2,3-dioxygenasa přítomná v játrech a indolamin-2,3-dioxygenasa přítomná v extrahepatálních tkáních jako jsou centrální nervový systém, plíce nebo placenta [8].



Obrázek 2: Metabolismus tryptofanu – serotoninová a kynureninová dráha. Převzato z [7] a upraveno.

2.2 Serotonin

Serotonin, systematickým názvem 5-hydroxytryptamin (viz Obr. 3), je bílá, krystalická nebo amorfnní látka. Řadí se do skupiny tzv. biogenních aminů, tedy aminů, které vznikly biotransformací aminokyselin. Objev serotoninu je spojen s více vědci. Ital Vittorio Erspamer v roce 1937 izoloval látku, která působila na stahy hladkého svalstva trávicí trubice, a nazval ji enteramin. V roce 1948 objevili američtí biochemici Maurice M. Rapport, Arda A. Green a Irvine H. Page látku v krevním séru, která měla vliv na změny napětí hladkého svalstva, nazvali ji serotonin [9]. V roce 1952 bylo zjištěno, že enteramin a serotonin jsou stejné látky [10].



Obrázek 3: Struktura serotoninu. Zdroj: vlastní zpracování.

Je tedy vidět, že serotonin může mít v lidském těle mnoho různých funkcí. Především působí jako neurotransmiter. Dále je odpovědný za kontrakce některých cév a zvyšuje permeabilitu krevních kapilár. Ovlivňuje kontrakci střev a brzdí sekreci žaludečních šťáv. Také stimuluje sekreci histaminu a katecholaminů. Ve výsledku se dá říci, že serotonin ovlivňuje téměř vše – emoce a náladu (proto je nazýván hormonem štěstí), paměť, spánek, žilní systém, gastrointestinální trakt a chuť k jídlu. V poslední době je diskutován i jeho vliv na imunitu organismu [11,12].

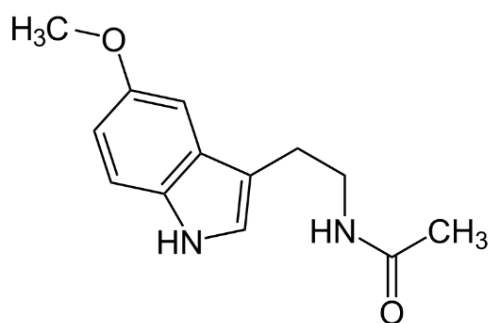
Serotonin lze nalézt v krevních destičkách, v gastrointestinálním traktu a v mozku. Biosyntéza a hladina serotoninu v organismu je ovlivňována mnoha faktory. Ve zvýšené míře mohou být přijímány jeho prekurzory skrze stravu a syntézu také ovlivňuje dostupnost některých minerálních látek, jako jsou vápník a hořčík. Mezi potraviny podporující produkci serotoninu patří maso (zejména drůbeží), dále ryby, tvrdé sýry, vejce, ořechy, celozrnné pečivo, listová zelenina a banány. Pro doplnění serotoninu lze využít i některé adaptogeny jako například rozchodnici růžovou [13].

2.3 Melatonin

Melatonin, systematickým názvem N-[2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl]acetamid, je neurohormon, který se vytváří v epifyze. Poprvé byl izolován v roce 1958 americkým lékařem Aaronem B. Lehrerem [14]. Melatonin se vyplavuje do krve především v noci, proto se mu také přezdívá hormon spánku nebo hormon dne a noci. Jeho hladina se v organismu mění jak v průběhu jednoho dne (v tzv. cirkadiánním rytmu), tak v průběhu celého života organismu. Produkce melatoninu je závislá na světle, proto nejnižší hladiny dosahuje melatonin ráno při probuzení, nejvyšší je naopak v noci mezi jednou a třetí hodinou ranní [15,16].

Další významnou roli hraje melatonin jako antioxidant. Vychytává volné radikály a reguluje expresi a aktivitu antioxidantních enzymů. Kromě toho je dokázán i synergický efekt s ostatními antioxidanty, například resveratrolem. Ten je znám jako přírodní antioxidant obsažený ve víně. Společně jsou účinným nástrojem na ochranu poškození DNA a dávky běžně přijímané ve víně zajišťují kardioprotektivní efekt. Antioxidačně působí i metabolity, na které je melatonin odbouráván [17,18].

Strukturně je melatonin indolaminem (viz Obr. 4), podobným kyselině indol-3-octové, která je prvním objeveným fytohormonem patřícím do skupiny auxinů. Pravděpodobně je tedy melatonin využíván rostlinami k růstu, stejně jako ostatní auxiny. Jeho funkce však zatím není dostatečně prozkoumána. Také není jasné, kde v rostlinách syntéza melatoninu probíhá. Živočichové syntetizují hormony ve žlázách s vnitřní sekrecí, ale rostliny žádný aparát pro syntézu nemají. Existují teorie, že jsou rostliny vybaveny speciálním enzymatickým mechanismem pro biosyntézu hormonů, nacházejícím se ve všech částech rostliny [19].



Obrázek 4: Struktura melatoninu. Zdroj: vlastní zpracování.

2.4 Přítomnost analytů ve vinné révě

Tryptofan, serotonin a melatonin lze nalézt ve vinné révě ve všech fázích jejího životního cyklu – ať už je to v zelených částech rostliny nebo ve zpracovaných plodech. Během procesu alkoholového kvašení se uvolňuje tryptofan, který přispívá k rozvoji typické vůně [20]. Serotonin je ve víně vytvářen mikroorganismy, a to jak kvasinkami, tak bakteriemi mléčného kvašení. Pro výrobu vína se nejčastěji využívají kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Melatonin se přirozeně vyskytuje v hroznech, ale vzniká i během procesu kvašení. Při procesu fermentace dochází k významným změnám v koncentraci tryptofanu a jeho metabolitů. Syntéza těchto sloučenin závisí na mnoha faktorech, ať už jde o odrůdu hroznů, způsob nebo oblast pěstování vinné révy, přes druh použitých kvasinek až po obsah cukru v hroznech i hotovém víně [21–24].

2.5 Metody pro stanovení tryptofanu, serotoninu a melatoninu

Tryptofan, serotonin a melatonin jsou významné, biologicky a biochemicky aktivní sloučeniny, proto jsou objektem mnoha různých analýz. Intenzivně se touto problematikou v tématu analýzy vinné révy zabývají především vědci z oblastí, kde se víno pěstuje a zpracovává. Víno se těší oblibě nejen kvůli svým sensorickým vlastnostem, ale v neposlední řadě je to i kvůli jeho vysoké nutriční hodnotě a zdravotním benefitům.

Aby bylo možné vyvinout metodu pro jejich stanovení, je nutné znát vlastnosti daných analytů. Jsou to aromatické molekuly, jejichž základem je indolový kondenzovaný kruh. Tryptofan jako aminokyselina obsahuje bazickou aminoskupinu $-NH_2$ a kyselou karboxylovou skupinu $-COOH$. Podle pH prostředí tak může existovat ve všech formách – kladně nebo záporně nabitý nebo v podobě obojetného iontu. Tryptofan je mírně rozpustný ve vodě. Serotonin obsahuje oproti tryptofanu hydroxylovou skupinu, tím se stává polárnější, a proto je ve vodě lépe rozpustný. Dále také obsahuje aminoskupinu $-NH_2$, díky které může být v prostředí s nižším pH, než je jeho pK_a , nabit kladně. Melatonin je ze všech těchto molekul nejméně polární a nejvíce lipofilní, díky methoxyskupině $-OCH_3$ navázané na základním indolu. Pro jeho fyziologické působení je podstatná jak methoxyskupina, tak i acetylskupina vázaná na aminu postranního řetězce.

2.5.1 Stanovení ve víně

Jsou popsány různé analytické techniky, které se využívají pro stanovení tryptofanu a jeho metabolitů. Lze použít iontově výměnnou chromatografii [25], chromatografii na tenké vrstvě [26] nebo například kapilární elektroforézu. Tam lze pracovat s klasickou elektroforézou [27] nebo použít micelární elektrokinetickou chromatografii [28], která umožní migraci i nenabitých forem analytu díky jejich rozdělování mezi vodnou fázi a pseudofázi nabitých micel. K identifikaci analytů se používá i imunochemická metoda ELISA, tato technika však v případě vinné révy není příliš spolehlivá [29,30]. Nejčastěji je používána pro stanovení těchto látek vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií [31].

Byly vyvinuty metody kapalinové chromatografie s různými podmínkami separace (viz Tab. 1). Shodují se v tom, že jsou prováděny na reverzní fázi, tedy s nepolární stacionární fází. Jako mobilní fázi využívají roztoky s velkým obsahem vodné fáze, organická je v menšině, ať už se jedná o methanol nebo acetonitril. Složky mobilní fáze jsou často okyseleny mravenčí nebo trifluoroctovou kyselinou. Kromě jedné metody jsou analýzy prováděny v režimu gradientové eluce, protože analyty se velmi liší svou polaritou, proto pro eluci potřebují rozdílné složení mobilní fáze. Pro detekci se jako nejjednodušší se jeví použití UV spektrometrie, kdy lze využít schopnosti aromatických analytů absorbovat toto záření. V takovém případě bylo měřeno při vlnové délce 254 nm. Tato metoda však není velmi citlivá, proto je ve většině metod použita hmotnostní spektrometrie, v několika případech fluorescenční detekce. Tam se pracuje s excitační vlnovou délkou 280 nm a emisní vlnovou délkou 350 nm. Časy analýz se velmi liší, což je dáno počtem a druhem analytů, které byly v dané metodě stanovovány. Kromě tryptofanu, serotoninu a melatoninu se jedná o nejznámější sloučeninu obsaženou ve víně – resveratrol, jeho derivát piceid, dále pak tryptofanethylester a jiné izomery melatoninu.

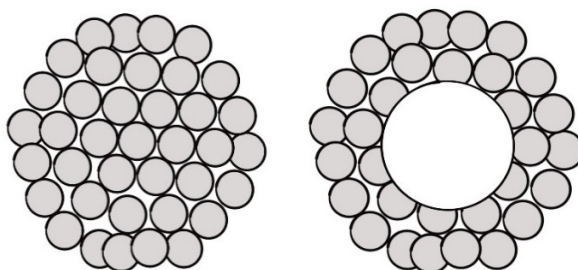
Tabulka 1: Vybrané metody pro stanovení tryptofanu a jeho metabolitů v hroznech, případně ve víně.

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Analyt	Detekce	Čas analýzy	Citace
Onyx Monolithic C18 100 × 3 mm, 2 μm	0,1 % (v/v) HCOOH v ACN 0,1 % (v/v) HCOOH v H ₂ O	S, M	MS	55 min	[32]
BEH C18 100 × 2,1 mm, 1,7 μm	0,1 % (v/v) HCOOH v H ₂ O 0,1 % (v/v) HCOOH v MeOH	T, M	MS, F	25 min	[33]
Accucore C18 100 × 3 mm, 2,7 μm	0,1 % (v/v) HCOOH v H ₂ O ACN	T, M	MS	10,5 min	[33]
BEH Phenyl C18 50 × 2,1 mm, 1,7 μm	0,1 % (v/v) HCOOH v H ₂ O 0,1 % (v/v) HCOOH v ACN	M	MS	5 min	[34]
Zorbax RRHD SB-C18 100 × 2,1 mm, 1,8 μm	0,1 % (v/v) HCOOH v H ₂ O 0,1 % (v/v) HCOOH v MeOH	S, T, M	MS	15 min	[35]
BEH Phenyl C18 150 × 2,1 mm, 1,7 μm	0,05 % (v/v) TFA v H ₂ O 0,05 % (v/v) TFA v ACN	M	MS	2,1 min	[36]
Phenomenex Luna C18 250 × 4,6 mm, 5 μm	40 % (v/v) H ₂ O s 0,05 % HCOOH 60 % (v/v) MeOH	M	F	9 min	[37]
BEH Phenyl C18 150 × 2,1 mm, 1,7 μm	0,05 % (v/v) HCOOH v H ₂ O 0,05 % (v/v) HCOOH v ACN	M	MS	7,1 min	[38]
Nucleosil 120-3 C18 250 × 4 mm	0,1 % (v/v) TFA v H ₂ O 0,1 % (v/v) TFA v ACN	T	F	45 min	[20]
Phenomenex Luna C18 50 × 4,6 mm, 5 μm	5 % (v/v) HCOOH v H ₂ O 5 % (v/v) HCOOH v ACN	S, T, M	MS	12 min	[39]
Zorbax SB-C18 50 × 3 mm, 1,8 μm	25 mM CH ₃ COONH ₄ , pH = 5,8 ACN	S, T	UV	28,5 min	[40]
Atlantis C18 50 × 4,6 mm, 5 μm	10 mM HCOONH ₄ , pH = 3,4 ACN	S, T	F	32 min	[41]
BEH C18 150 × 2,1 mm, 1,7 μm	0,05 % (v/v) TFA v H ₂ O 0,05 % (v/v) TFA v ACN	S, T	MS	3,1 min	[38]

2.6 Možnosti stacionární fáze

Společně s tím, jak se vyvíjí a roste zastoupení vysokoúčinné kapalinové chromatografie v různých odvětvích, zvyšuje se i potřeba vyvinout moderní stacionární fáze, které budou splňovat různorodé požadavky. Obecně je trendem především miniaturizace systému a zrychlování analýz.

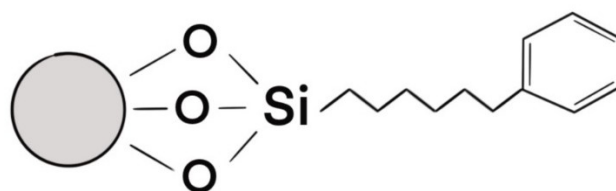
Jednou z možností moderní náplně kolony jsou částice s pevným jádrem, tzv. core-shell. Nejsou porézní v celém svém objemu jako klasické částice silikagelu, ale mají pórovitý pouze povrch (viz Obr. 5). Díky tomu molekuly analytu pronikají pouze do malé hloubky částice sorbentu a kolona tak poskytuje nižší zpětný tlak, čímž dojde i ke zrychlení analýzy. Zároveň dochází k potlačení vířivé difuze a zrychlí se přenos hmoty, čímž se zvedne i účinnost analýzy [42].



Obrázek 5: Srovnání struktury částice plně porézní (vlevo) s částicí s pevným jádrem, tzv. core-shell částice. Zdroj: vlastní zpracování dle [42].

Aby bylo dosaženo ještě větší rychlosti analýzy, využívá se ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie UHPLC (z angl. *ultra-high pressure liquid chromatography*). Ta pracuje s kolonami, které obsahují částice s průměrem menším než 2 μm . S klesající velikostí částic roste účinnost separace, ale zároveň vzrůstá tlak na koloně. Ten je přímo úměrný průtoku, viskozitě mobilní fáze a délce kolony a nepřímo úměrný druhé mocnině velikosti částic a průměru kolony [43].

Pro použití UHPLC byla vyvinuta další moderní stacionární fáze s označením BEH (z angl. *ethylen bridge hybrid*). Tato hybridní stacionární fáze byla vytvořena vložením ethylenových můstků do silanolových skupin silikagelu (viz Obr. 6). To vede ke zpevnění stacionární fáze, která je díky tomu odolnější vůči vyšším tlakům. Zároveň dochází k odstínění možných interakcí mezi analyty a silanolovými skupinami. Tato náplň má také vyšší teplotní stabilitu a lze s ní pracovat ve větším rozmezí hodnot pH (1-12). [44]



Obrázek 6: Struktura stacionární fáze kolony BEH Phenyl. Zdroj: vlastní zpracování dle [44].

3 Experimentální část

Praktická část práce byla měřena na přístroji Shimadzu LCMS-8045 (Kjóto, Japonsko), pro separaci byly použity separační kolona InfinityLab Poroshell 120 SB-Aq od firmy Agilent Technologies (Waldbronn, Německo) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 2,7 μm a separační kolona Acquity UPLC BEH Phenyl od firmy Waters (Milford, USA) o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 10,0 cm s velikostí částic 1,7 μm . Nejprve probíhala detekce spektrometricky při vlnové délce 254 nm, dále byla použita hmotnostní detekce. Průtok nebulizačního plynu byl 3 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, průtok sušícího plynu 10 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplota vnitřního prostoru 300 $^{\circ}\text{C}$. Prostor kolony byl termostatován na teplotu 40 $^{\circ}\text{C}$, teplota autosampleru byla 5 $^{\circ}\text{C}$. Pokud není stanoveno jinak, probíhala separace při průtoku 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a 0,01M octanového pufru. Pufř byl připraven přidáním 143 μl kyseliny octové do 250 ml deionizované vody. Za použití pH metru bylo upraveno pH pufru na požadovanou hodnotu přidáním roztoku hydroxidu amonného.

Pro měření byly nejprve použity již namíchané zásobní roztoky standardů analytů, všechny o koncentraci 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. V průběhu práce byly připraveny čerstvé zásobní roztoky, taktéž všechny o koncentraci 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vznikly rozpuštěním 25,7 mg tryptofanu ve 25 ml deionizované vody, 10,7 mg serotonin hydrochloridu v 10 ml deionizované vody a 11,7 mg melatonin hydrochloridu v 10 ml methanolu.

3.1 Použité chemikálie

- tryptofan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- serotonin hydrochlorid ≥ 98 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo)
- melatonin hydrochlorid ≥ 97 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo)
- methanol $\geq 99,9$ % (Honeywell Riedel-de Haen, Charlotte, NC, USA)
- acetonitril $\geq 99,9$ % (Honeywell Riedel-de Haen, Charlotte, NC, USA)
- kyselina octová 100 % (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- hydroxid amonný 25 % (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- deionizovaná voda (VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Francie)

3.2 Úprava reálných vzorků

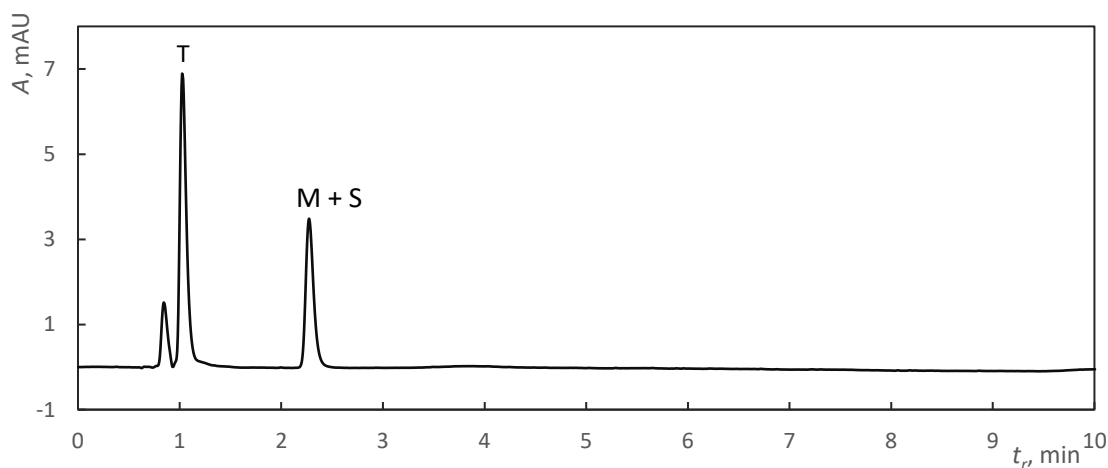
Byly změřeny reálné vzorky hroznů a vína jako alkoholického nápoje. Šťáva z hroznů a vzorek vína byly zředěny v poměru 1:1 s methanolem, poté byl vzorek odstředěn na centrifuze 10 minut při 14 500 otáčkách za minutu (tj. 14 100×g).

4 Výsledky a diskuze

Na základě literární rešerše byly stanoveny obecné podmínky měření. Experimenty byly prováděny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi. To znamená, že byla použita kolona C18 s polární mobilní fází.

4.1 Izokratická eluce

Prvotní experimenty byly provedeny v režimu izokratické eluce, aby bylo zjištěno, jakou retenci analyty vykazují za zvolených separačních podmínek. Nejprve byl změřen vzorek tryptofanu o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Mobilní fáze obsahovala 97 % (v/v) octanového pufru (pH = 4,48) a 3 % (v/v) methanolu. Čas analýzy byl nastaven na 5 minut, pík tryptofanu eluoval v čase 1,8 minut. Tryptofan je velmi polární molekula, u které v tomto pH převažuje kladný náboj, proto je jeho retence velmi slabá. Dále byl ke vzorku přidán melatonin o téže koncentraci. Pro tento analyt se však čas analýzy ukázal jako nedostatečný, proto byl prodloužen na 10 minut. Melatonin, jako málo polární látka, však stále neeluoval, tudíž bylo přistoupeno ke zvýšení obsahu methanolu v mobilní fázi na 20 % (v/v), respektive 40 % (v/v). Také byl zvýšen průtok z $0,25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ na $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Retenční čas melatoninu byl 2,3 minut. Následně byl do směsi přidán serotonin o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Serotonin eluoval ve shodném čase jako melatonin, protože jeho pík byl dvakrát větší oproti předchozímu měření (viz Obr. 7).



Obrázek 7: Chromatogram za podmínek izokratické eluce. Separace probíhala s mobilní fází ve složení: 60 % (v/v) octanového pufru (pH = 4,48) a 40 % (v/v) methanolu. Detekce při vlnové délce 254 nm ukázala tři píky – 1. pík mrtvého času, 2. pík tryptofanu (T) a 3. pík melatoninu a serotoninu (M+S).

Aby bylo dosaženo účinné separace – oddělení píků melatoninu a serotoninu – bylo v dalších experimentech využito výhod gradientové eluce. V případě, že analyzujeme směs více látek s různou polaritou, prakticky nelze najít vyhovující podmínky izokratické separace. Zároveň lze předpokládat, že díky novým podmínkám se pík tryptofanu posune dále od mrtvého času, čímž bude dostatečně separován od polárních složek matrice, které eluují společně s mrtvým časem.

4.2 Gradientová eluce

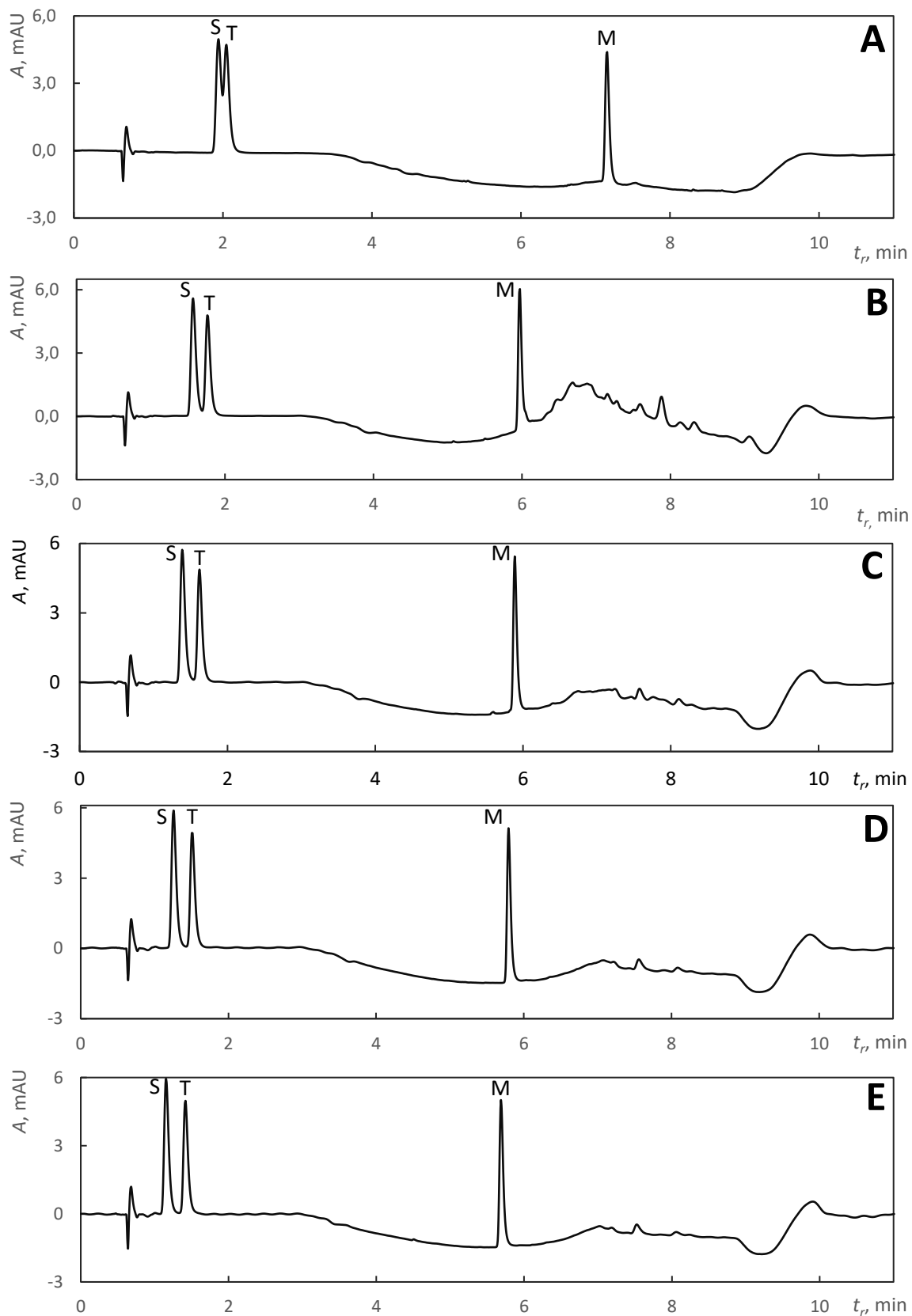
Gradientová eluce je často využívaná metoda, díky které může být dosaženo lepší selektivity. Dochází při ní ke změně složení mobilní fáze v průběhu analýzy, což se projeví jako změna eluční síly. Na počátku gradientové eluce má mobilní fáze nízkou eluční sílu, takže může dojít k silnější retenci, a tím i separaci málo zadržovaných látek. Zvýšení eluční síly v průběhu eluce vede naopak ke zkrácení příliš dlouhých retenčních časů silně zadržovaných látek. Čas analýzy se tak výrazně zkrátí.

Byla vyvinuta metoda, kdy na počátku obsahovala mobilní fáze z větší části složku pufru a jen málo procent organické fáze. Mezi druhou a šestou minutou se obsah organické fáze lineárně zvyšoval na hodnotu v rozmezí 20 až 80 %, v závislosti na daném experimentu. Tento obsah byl udržován konstantně po dobu dvou minut, poté byl mezi osmou a devátou minutou jeho obsah lineárně snižován na počáteční hodnotu. Jako organická složka mobilní fáze byl ve většině experimentů použit methanol.

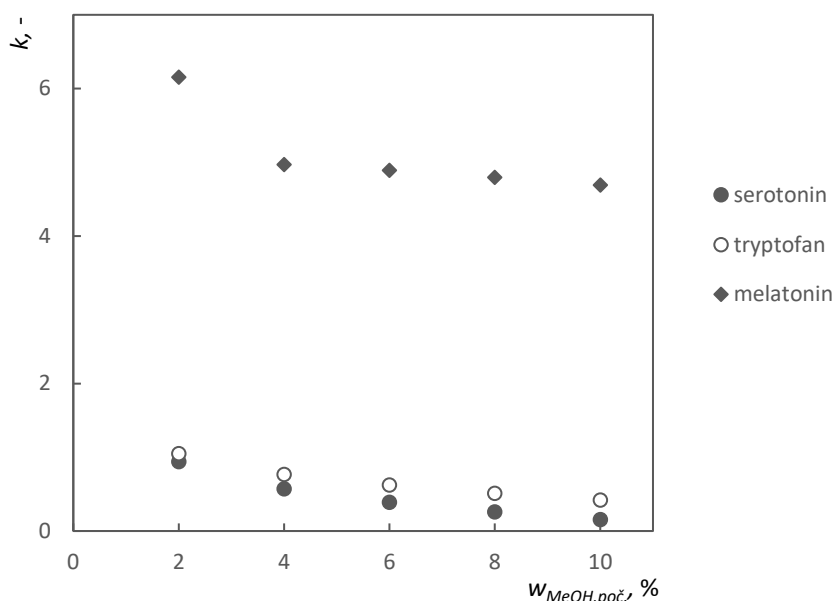
4.2.1 Vliv složení mobilní fáze

4.2.1.1 *Obsah organické složky na počátku*

Nejprve byl zkoumán vliv množství methanolu na počátku analýzy. Postupně byl proměřen směsný vzorek tryptofanu, serotoninu a melatoninu s počátečními obsahy methanolu v mobilní fázi 2, 4, 6, 8 a 10 % (v/v). Mezi druhou a šestou minutou byl obsah methanolu lineárně zvýšen na 60 % (v/v), kde byl mezi šestou a osmou minutou konstantně udržován. Mezi osmou a devátou minutou byl opět lineárně snižován na počáteční hodnotu. Chromatogramy jsou znázorněny na Obr. 8.



Obrázek 8: Chromatogramy při různém obsahu methanolu na počátku analýzy. Na počátku a na konci analýzy (tj. mezi 0. a 2. minutou a mezi 9. a 11. minutou) byl obsah methanolu v mobilní fázi: **A**...2 %, **B**...4 %, **C**...6 %, **D**...8 %, **E**...10 %. Mezi šestou a osmou minutou byla udržována hladina methanolu na 60 % (v/v). Pořadí piků je ve všech případech následující: 1. pik mrtvého času, 2. pik serotoninu (S), 3. pik tryptofanu (T) a 4. pik melatoninu (M).



Obrázek 9: Graf závislosti retenčního faktoru k_r jednotlivých analytů na obsahu methanolu na počátku analýzy. Měření bylo prováděno s počátečními obsahy methanolu v mobilní fázi 2, 4, 6, 8 a 10 % (v/v). Mezi druhou a šestou minutou byl obsah methanolu lineárně zvýšen na 60 % (v/v), kde byl mezi šestou a osmou minutou konstantně udržován. Mezi osmou a devátou minutou byl opět lineárně snížen na počáteční hodnotu.

Zvyšování obsahu methanolu v mobilní fázi na počátku se projevilo sníženou retencí všech analytů (viz Obr. 9). Způsobilo posun serotoninu a tryptofanu směrem k mrtvému času. V případě serotoninu je však toto snížení prudší než v případě tryptofanu, což vede ke zvětšování rozdílu jejich retenčních faktorů a rozlišení.

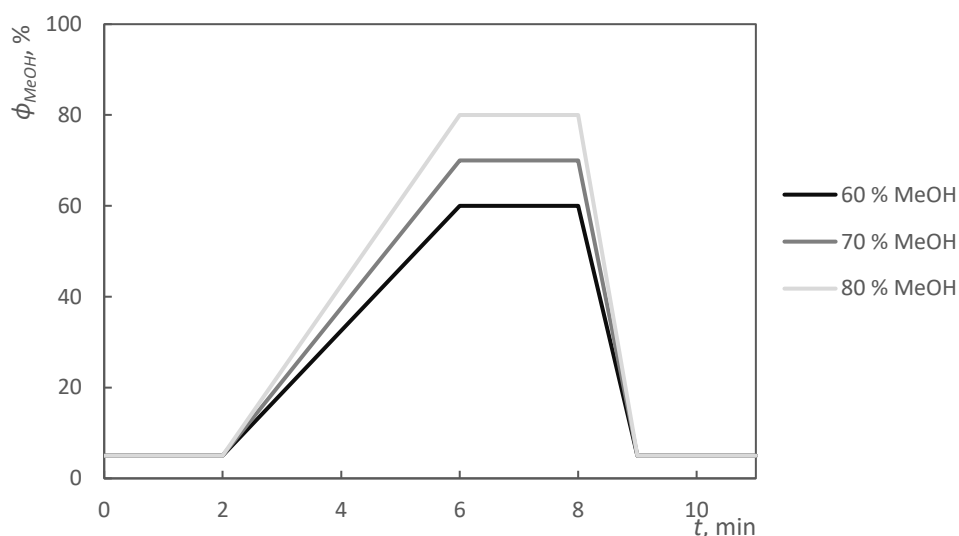
Tabulka 2: Rozlišení pík serotoninu a tryptofanu v závislosti na obsahu methanolu v mobilní fázi na počátku analýzy.

$\phi_{\text{poč., MeOH}}$ %	R -
2	0,61
4	1,37
6	1,70
8	1,88
10	1,98

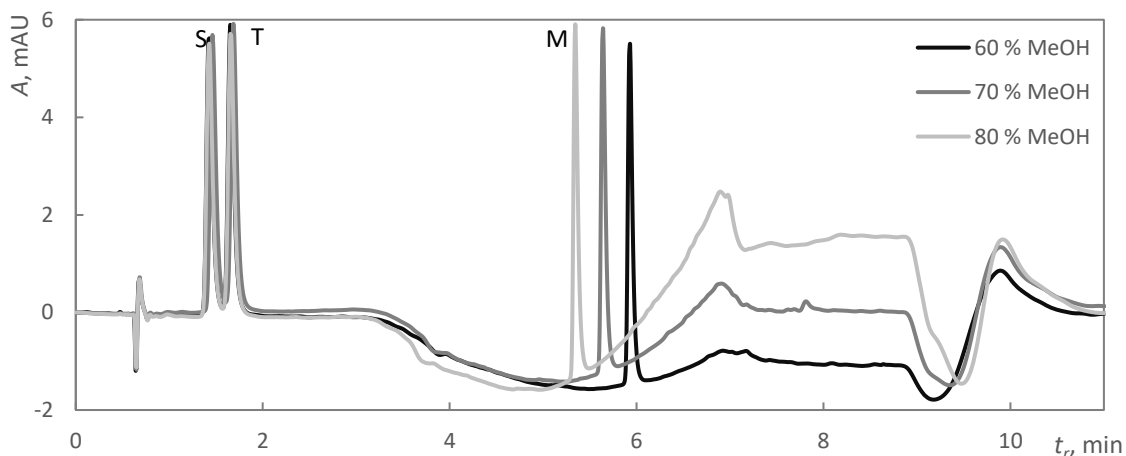
Tab. 2 ukazuje, jakých hodnot nabývá rozlišení mezi píky serotoninu a tryptofanu. Je dokladem toho, že jako optimální se jeví mobilní fáze o počátečním složení 95 % (v/v) pufru a 5 % (v/v) methanolu, protože tehdy je rozlišení mezi analyty dostatečné, přibližně 1,5. Zároveň analyty neelují ještě příliš blízko mrtvému času.

4.2.1.2 Obsah methanolu v průběhu gradientu

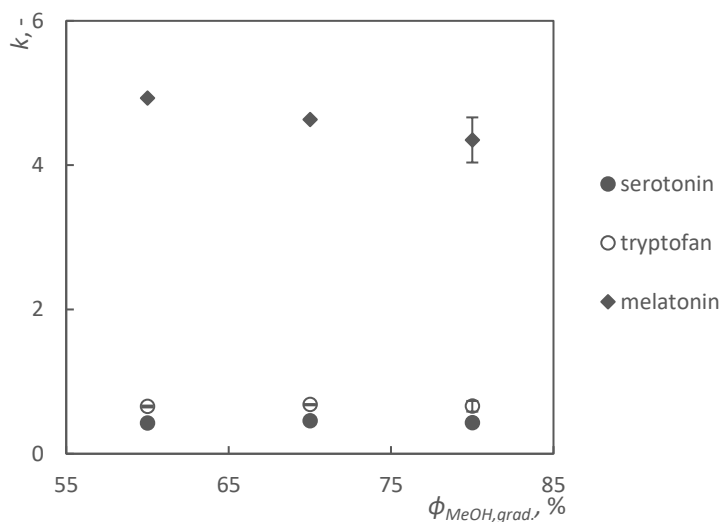
Dále byly změřeny experimenty, které upravují množství methanolu v průběhu gradientu. Jejich cílem bylo zjistit, zda tato změna bude mít vliv na retenci melatoninu, který v předchozích experimentech eluoval ke konci gradientu v době, kdy může docházet k hromadnému vymývání nepolárních složek matrice. Gradient vypadal takto: na počátku a na konci analýzy mobilní fáze obsahovala 95 % (v/v) pufru a 5 % (v/v) methanolu, mezi šestou a osmou minutou měla mobilní fáze různé složení, obsah methanolu byl 60, 70 a 80 % (v/v) (viz Obr. 10).



Obrázek 10: Profil gradientu s různým obsahem methanolu v průběhu analýzy. Na počátku bylo složení mobilní fáze 95 % (v/v) octanového pufru (pH = 4,50) a 5 % (v/v) methanolu. V době mezi 2. a 6. minutou se obsah methanolu zvyšoval na konečných 60, 70 nebo 80 % (v/v), kde se další dvě minuty konstantně udržoval. Poté následoval návrat na počáteční hladiny obou složek.



Obrázek 11: Chromatogramy při různém obsahu methanolu v průběhu gradientu. Na počátku a na konci analýzy (tj. mezi 0. a 2. minutou a mezi 9. až 11. minutou) bylo složení mobilní fáze 95 % (v/v) octanového pufru (pH = 4,50) a 5 % (v/v) methanolu. V době mezi 6. a 8. minutou bylo složení konstantně udržováno na hladinách 60, 70 resp. 80 % (v/v) methanolu.



Obrázek 12: Závislost retenčního faktoru k' jednotlivých analytů na obsahu methanolu v průběhu gradientu. Na počátku a na konci analýzy (tj. mezi 0. a 2. minutou a mezi 9. až 11. minutou) bylo složení mobilní fáze 95 % (v/v) octanového pufru ($pH = 4,50$) a 5 % (v/v) methanolu. V době mezi 6. a 8. minutou bylo složení konstantně udržováno na hladinách 60, 70 resp. 80 % (v/v) methanolu.

Jak z chromatogramů (viz Obr. 11), tak i ze závislosti retenčního faktoru jednotlivých analytů na obsahu methanolu v průběhu gradientu (viz Obr. 12) lze vidět, že retence melatoninu se snižuje. Z této skutečnosti vyplývá, že melatonin neeluuje blízko před koncem gradientu a je tedy dobře oddělen od nečistot, které se na konci separace mohou vyskytnout. Zároveň se složení mobilní fáze na začátku separace nemění, takže separace serotoninu a tryptofanu není touto změnou nijak ovlivněna.

Na základě optimalizace složení mobilní fáze byly stanoveny základní podmínky experimentu (viz Tab. 3). Na počátku analýzy obsahovala mobilní fáze 95 % (v/v) pufru a 5 % (v/v) methanolu až do druhé minuty. Poté byl obsah methanolu až do šesté minuty lineárně zvyšován na hodnotu 80 % (v/v). Mezi šestou a osmou minutou bylo udržováno konstantní složení mobilní fáze 20 % (v/v) pufru a 80 % (v/v) methanolu. V čase od osmé do deváté minuty byl obsah methanolu snižován na počáteční hodnotu, kde byl až do ukončení analýzy v jedenácté minutě udržován.

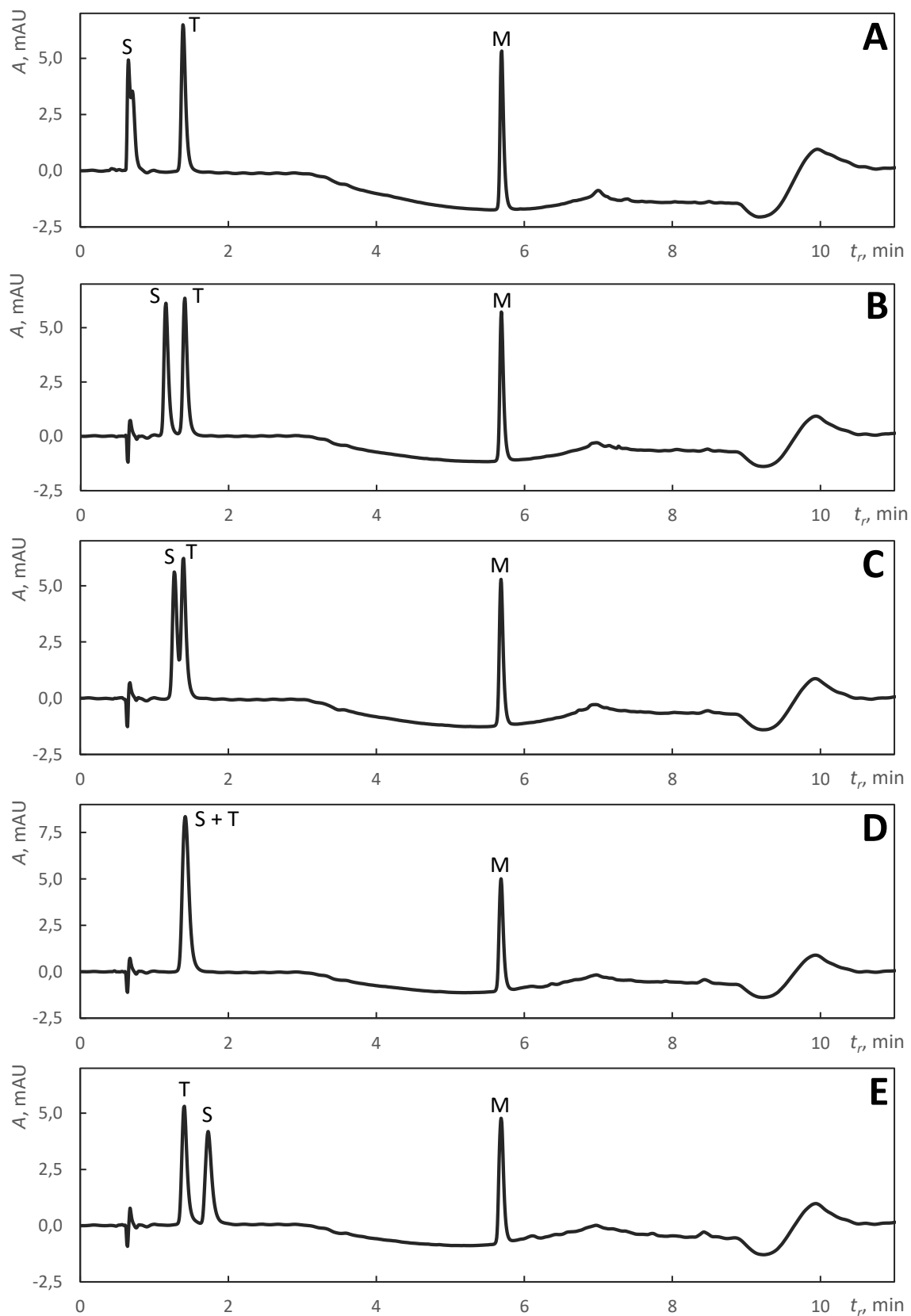
Tabulka 3: Základní podmínky experimentu. Průběh gradientu.

t min	ϕ_{MeOH} %	ϕ_{pufr} %
0	5	95
2	5	95
6	80	20
8	80	20
9	5	95
11	5	95

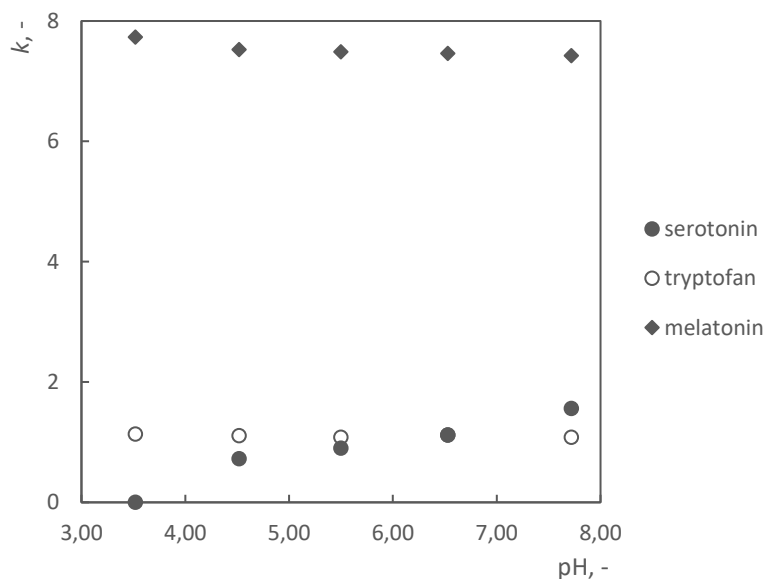
4.2.1.3 Změna pH pufru

Dalším parametrem, který může ovlivnit separaci, je změna pH octanového pufru, který je jednou ze složek mobilní fáze. Podle funkčních skupin, které analyty obsahují, a jejich hodnot disociačních konstant bylo měření provedeno v pufru o hodnotách pH 3,52, 4,52, 5,50, 6,53 a 7,52. Hodnota pK_a rozhoduje o formě, v jaké se analyt vyskytuje, a tím i o jeho retenci při chromatografické separaci.

Analyty, jejichž náboj se s pH mění, jsou serotonin a tryptofan. Melatonin neobsahuje žádnou ionizující se skupinu. Serotonin obsahuje aminoskupinu ($pK_{a,1} = 9,97$) a hydroxyskupinu ($pK_{a,2} = 10,73$). Tryptofan jako aminokyselina má ve své molekule karboxylovou skupinu ($pK_{a,1} = 2,4$) a aminoskupinu ($pK_{a,2} = 9,4$). Ve vodném prostředí by u tryptofanu převažoval kladný náboj do $pH = pI_T = 5,9$, u serotoninu až do $pH = pI_S = 10,35$. Analýzy jsou však prováděny v prostředí s obsahem methanolu, proto se nábojové stavy molekul mohou lišit.



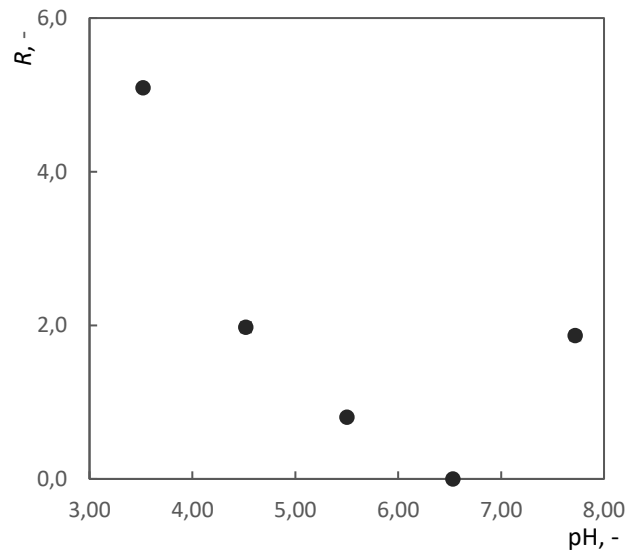
Obrázek 13: Chromatogramy při různém pH octanového pufru. Měřeno za základních podmínek experimentu (viz Tab.3, str. 26). **A**...pH=3,52, **B**...pH= 4,52, **C**...pH=5,50, **D**...pH=6,53, **E**...pH=7,52.



Obrázek 14: Graf závislosti retenčního faktoru k analytů na pH. Měřeno za základních podmínek experimentu (viz Tab.3, str. 26)

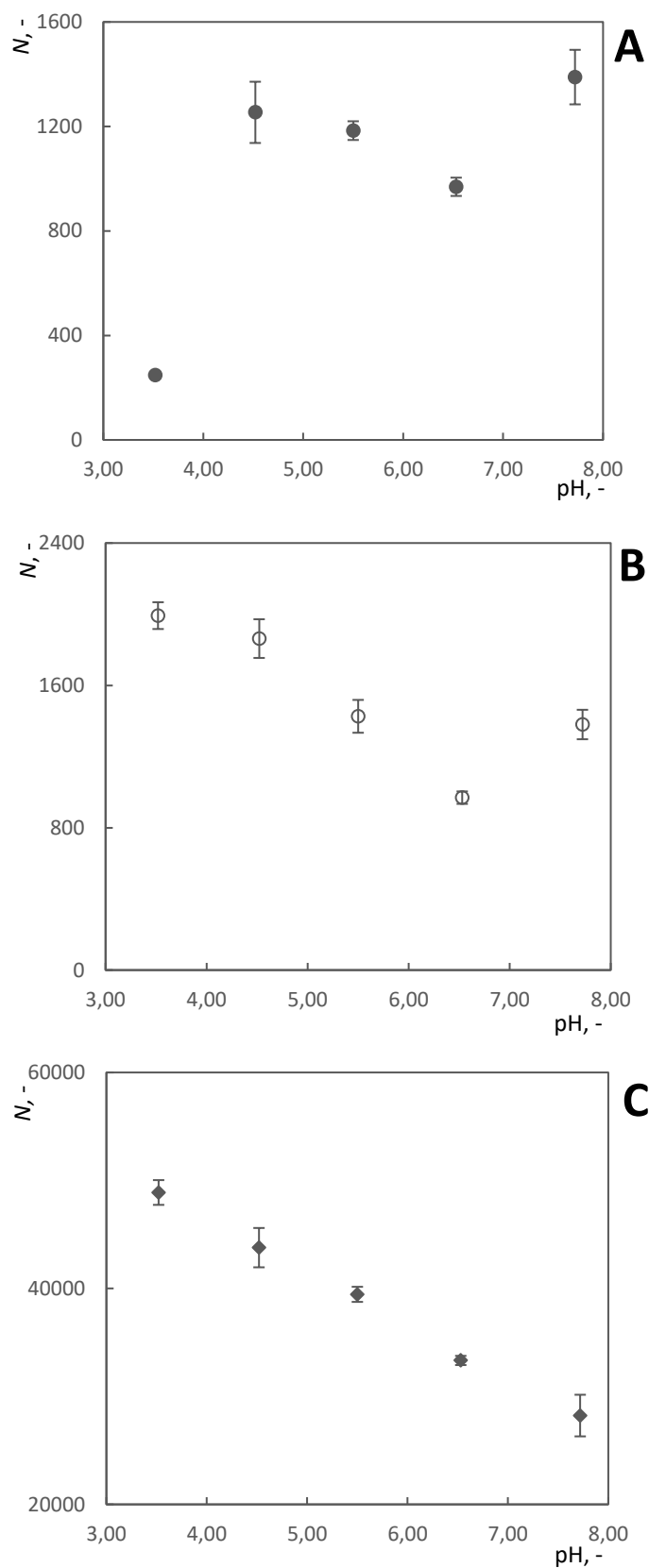
Na základě chromatogramů (viz Obr. 13) a grafu závislosti retenčního faktoru na pH (viz Obr. 14) lze konstatovat, že retence melatoninu a tryptofanu se téměř nezměnila. Hodnota pH pufru má však významný vliv na retenci serotoninu. Pravděpodobně dochází k tomu, že při $\text{pH} = 7,52$ je serotonin méně protonován, to znamená, že menší frakce jeho molekul má náboj, a proto se celkově jeví jako méně polární. Díky tomu je více zadržován na koloně. S klesajícím pH roste podíl nabitě protonované formy, tudíž i jeho polarita. Proto retence serotoninu klesá až k nule, kdy při $\text{pH} 3,52$ eluuje společně s mrtvým časem.

Rozlišení serotoninu a tryptofanu je znázorněno na obrázku Obr. 15. Při nejnižším pH jsou od sebe serotonin a tryptofan nejvíce separovány. Se zvyšujícím se pH dochází k přibližování píků až do momentu okolo $\text{pH} = 6,5$, kdy splynou v jeden pík. Poté mezi nimi dojde k výměně pořadí a jejich rozlišení se opět zvýší.



Obrázek 15: Graf závislosti rozlišení serotoninu a tryptofanu na pH. Měřeno za základních podmínek experimentu (viz Tab.3, str. 26).

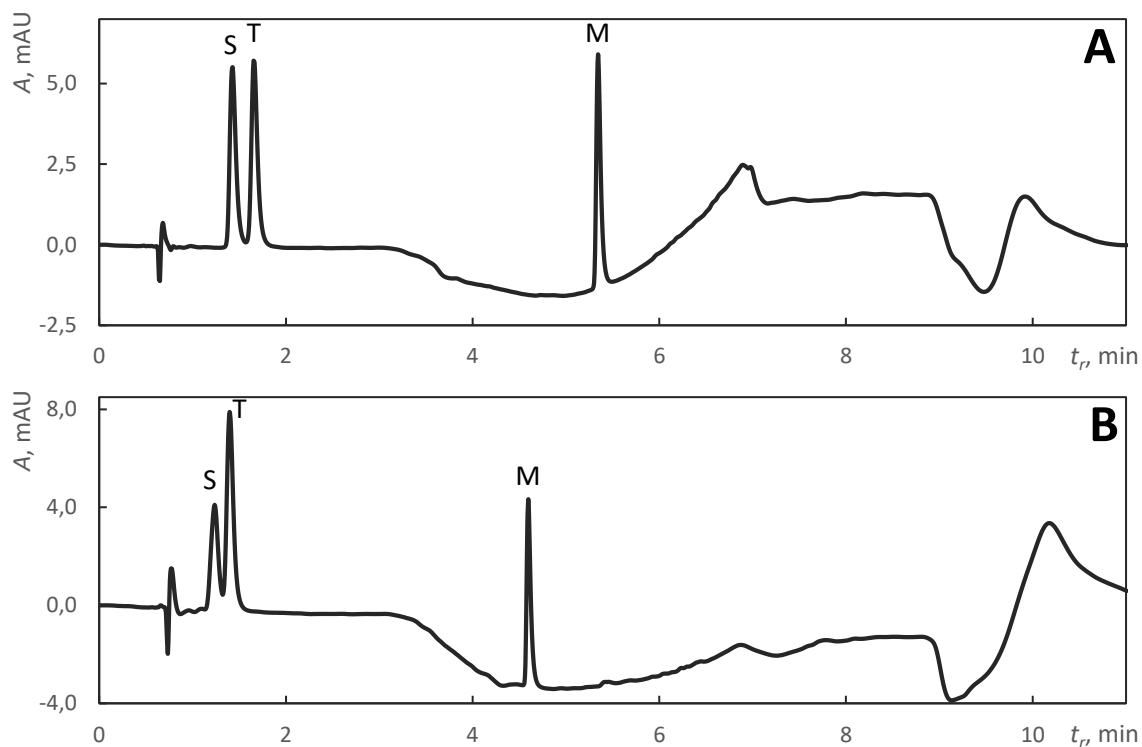
Dále byla pro tento případ zkoumána účinnost separace pro jednotlivé analyty (viz Obr. 16). Zatímco v případě tryptofanu a melatoninu se účinnost se zvyšujícím se pH téměř lineárně snižuje, u serotoninu bohužel žádnou pravidelnou závislost, ze které by bylo možné dojít k nějakému závěru, vidět nelze. Což může být dáno změnami v nábojovém stavu molekuly. Nicméně vysoké účinnosti nabývají všechny analyty při hodnotě pH pufru 4,5, se kterou bylo měřeno i v předchozích experimentech. Bylo v ní tedy pokračováno i nadále.



Obrázek 16: Účinnost separace v závislosti na pH. Grafy (A...serotonin, B...tryptofan, C...melatonin) ukazují závislosti počtu teoretických pater N jednotlivých analytů na pH. Měřeno za základních podmínek experimentu (viz Tab. 3, str. 26).

4.2.1.4 Organická složka mobilní fáze

Mezi nejpoužívanější organické složky mobilní fáze patří methanol a acetonitril. Byla tedy provedena měření s oběma těmito látkami, jinak za základních podmínek experimentu (viz Tab. 3, str. 26).

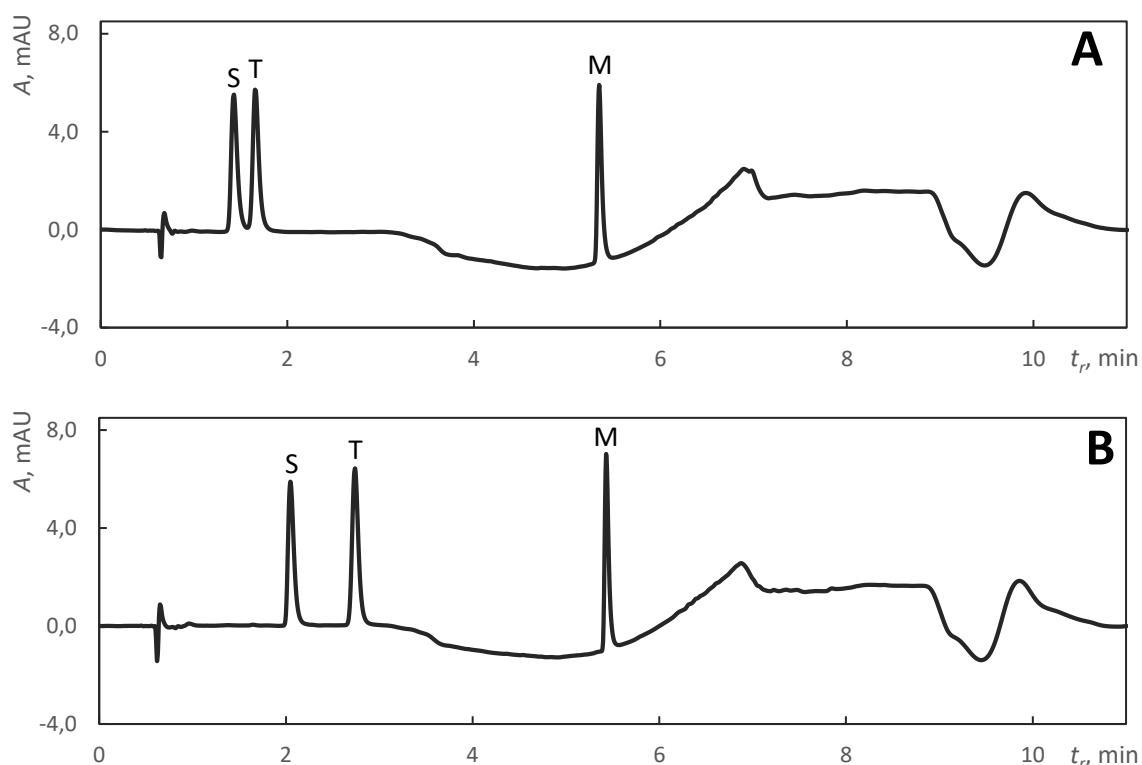


Obrázek 17: Porovnání chromatogramů – různá organická složka mobilní fáze. První chromatogram (A) znázorňuje měření v prostředí methanolu, druhý (B) v prostředí acetonitrilu. Pořadí píků je v obou případech následující: 1. pik mrtvého času, 2. pik serotonin (S), 3. pik tryptofan (T) a 4. pik melatonin (M). Měřeno za základních podmínek experimentu (viz Tab. 3, str. 26).

Z obou chromatogramů (viz Obr. 17) lze vidět, že lepšího rozlišení mezi píky serotoninu a tryptofanu bylo dosaženo při měření za použití methanolu. Tyto píky jsou v tomto prostředí užší a vyšší, z čehož vyplývá, že i účinnost separace byla vyšší. Také lze pozorovat mírně zvýšenou retenci melatoninu, která ale nemá na analýzu zásadní vliv. Měření tedy byla dále prováděna v prostředí methanolu.

4.2.2 Vliv stacionární fáze

Na eluci analytů má bezesporu vliv i výběr vhodné stacionární fáze. Dosud byla měření prováděna na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB–Aq, která obsahuje stacionární fázi C18 a je vhodná pro analýzy s větším obsahem vodné složky mobilní fáze. Další možností je využití modifikované stacionární fáze, která je náplní v koloně Acquity UPLC BEH Phenyl. Je to hybridní stacionární fáze, která je selektivní pro aromatické analyty díky π – π interakcím mezi analytem a fenylovými skupinami stacionární fáze. Bylo tedy provedeno měření na jiné koloně za základních podmínek experimentu (viz Tab. 3, str. 26).



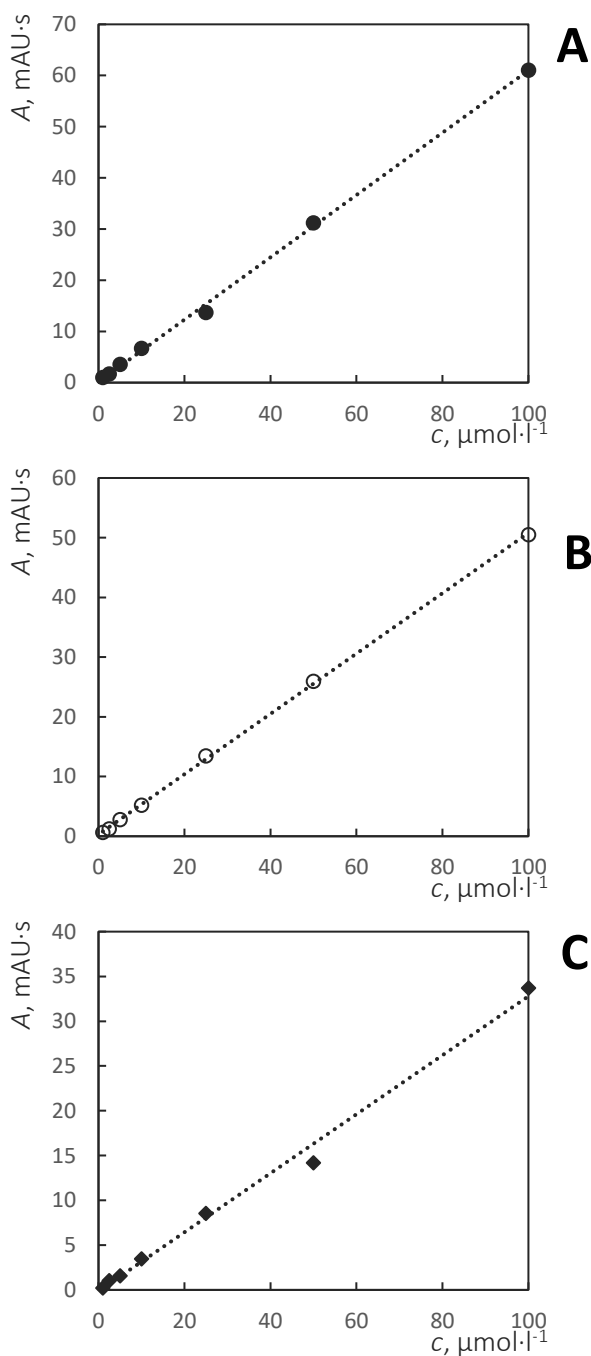
Obrázek 18: Porovnání chromatogramů – různé typy kolon. První chromatogram (A) znázorňuje měření na koloně Poroshell, druhý (B) za použití kolony BEH Phenyl. Pořadí píků je v obou případech následující: 1. pik mrtvého času, 2. pik serotonin (S), 3. pik tryptofan (T) a 4. pik melatonin (M). Měřeno za základních podmínek experimentu (viz Tab. 3, str. 26)

Z chromatogramů (viz Obr. 18) je jasně zřetelné, že modifikovaná kolona BEH Phenyl vykazuje výrazně lepší rozlišení mezi píky serotoninu a tryptofanu. S tím se pojí i výrazné zvýšení retenčních faktorů obou analytů. To je v případě reálných vzorků výhodné, neboť v blízkosti mrtvého času se u nich často vyskytují polární interferenty z matrice vzorku. Zvýšením retence analytů se riziko interference složek matrice snižuje. V dalších experimentech se tedy používala fenylová kolona.

4.3 UV kalibrační závislost

Aby bylo možné určit množství analytů v reálných vzorcích, je třeba sestavit kalibrační závislosti, dle kterých lze kvantitu analytu vypočítat.

Nejprve byla proměřena kalibrační závislost pomocí detektoru s diodovým polem. Protože jsou všechny analyty aromatické, tím pádem absorbují UV záření, probíhalo měření při 254 nm. Tato forma detekce není velmi citlivá, proto bylo pracováno s roztoky o vyšších koncentracích. Byly připraveny roztoky standardů serotoninu, tryptofanu a melatoninu v rozmezí koncentrací od 0,1 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



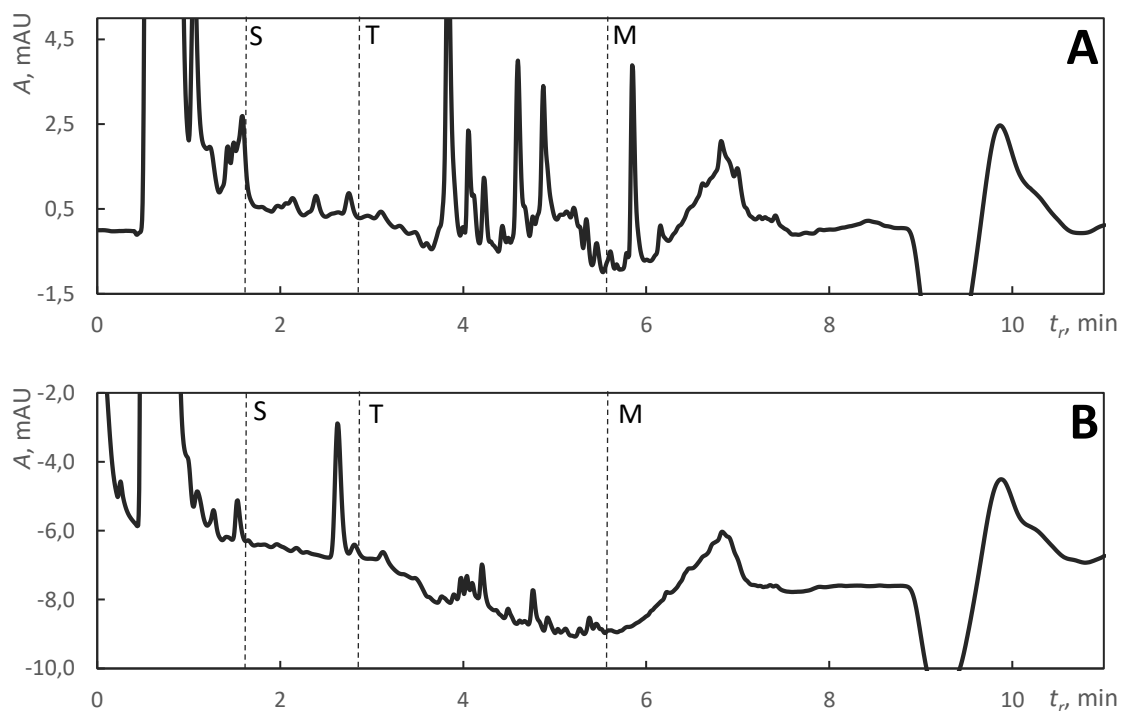
Obrázek 19: PDA kalibrace. Grafy ukazují závislost plochy piku A na koncentraci c pro jednotlivé analyty: A...serotonin, B...tryptofan, C...melatonin. Měřeno za základních podmínek experimentu (viz Tab.3, str. 26).

Ze závislosti plochy píku na koncentraci (viz Obr. 19) lze vidět, že všechny analyty vykazují velmi dobrou linearitu v celém měřeném rozsahu koncentrací, což dokládají hodnoty koeficientů determinace, které byly – pro serotonin 0,9988, pro tryptofan 0,9997 a pro melatonin 0,9933.

Ze závislostí výšky píku na koncentraci a z hodnoty výšky šumu, byly vypočítány parametry metody – mez detekce LOD a mez kvantifikace LOQ. Pro serotonin byla hodnota LOD, resp. LOQ stanovena na 0,17 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. 0,57 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro tryptofan a melatonin shodně 0,23 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. 0,77 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.3.1 Reálné vzorky

Pro ověření použitelnosti metody pomocí PDA detekce byly změřeny reálné vzorky hroznové šťávy a alkoholického nápoje vína.

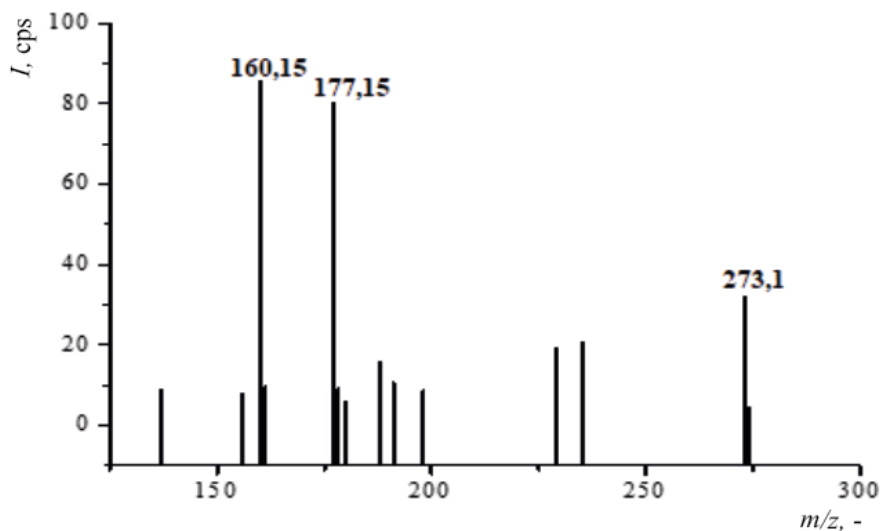


Obrázek 20: Chromatogramy vinné révy (A...víno, B...šťáva z hroznů). Přerušovanými čarami jsou naznačeny časy, ve kterých eluují jednotlivé analyty (S...serotonin, T...tryptofan, M...melatonin). Měřeno za základních podmínek experimentu (viz Tab. 3, str. 26)

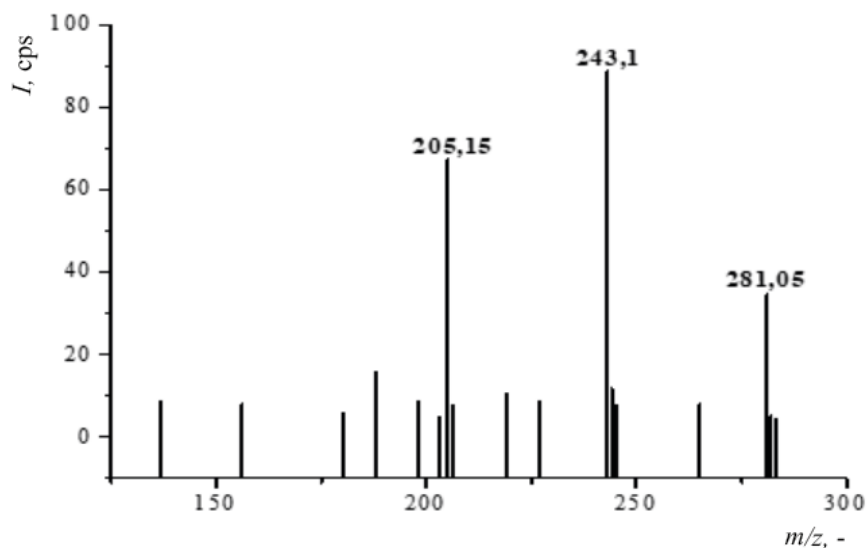
Chromatogramy (viz Obr. 20), které obsahují hodně interferencí, dokazují, že pomocí PDA detekce nelze určit, zda vybraný materiál obsahuje dané analyty. Pro důkaz přítomnosti serotoninu, tryptofanu a melatoninu ve vzorcích byla proto použita citlivější hmotnostní detekce.

4.4 MS detekce

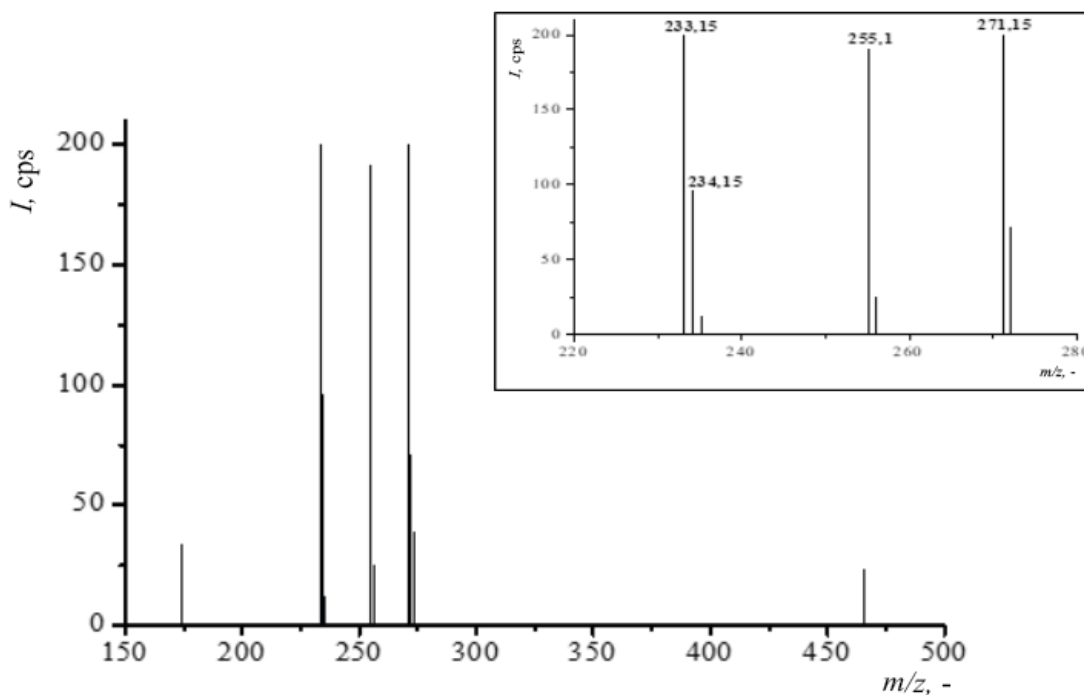
Nejprve bylo měřeno pomocí tzv. „Scanu“, kdy systém pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu. Ten propustí na detektor všechny ionty, které se ve vzorku vyskytují a tím se získá celkové hmotnostní spektrum. Na Obr. 21–23 jsou znázorněna hmotnostní spektra serotoninu, tryptofanu a melatoninu, která byla získána skenováním hodnot m/z od 0 do 600 v časech eluce jednotlivých analytů měřením směsného vzorku standardů o koncentraci $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obrázek 21: Hmotnostní spektrum serotoninu.



Obrázek 22: Hmotnostní spektrum tryptofanu.



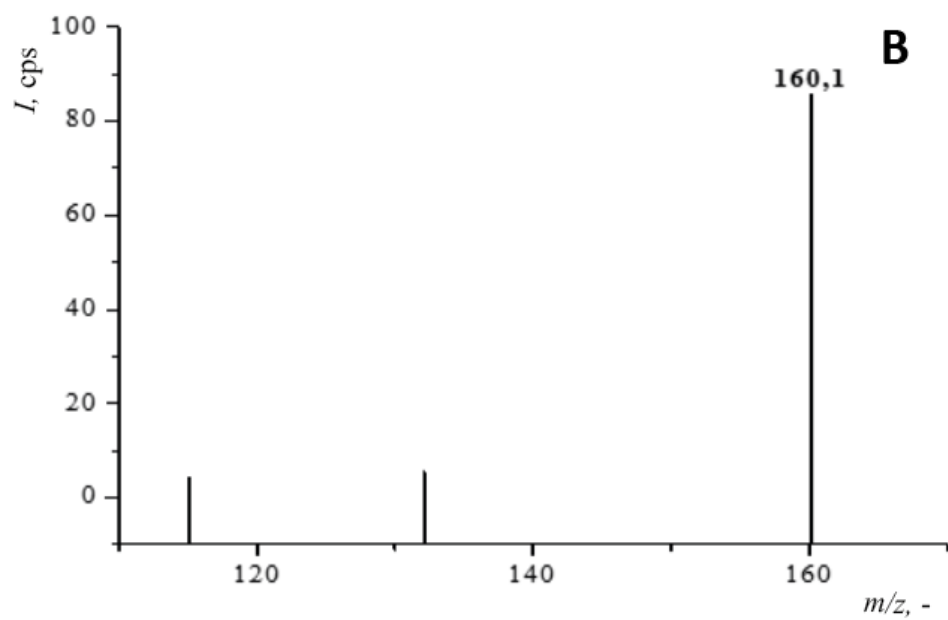
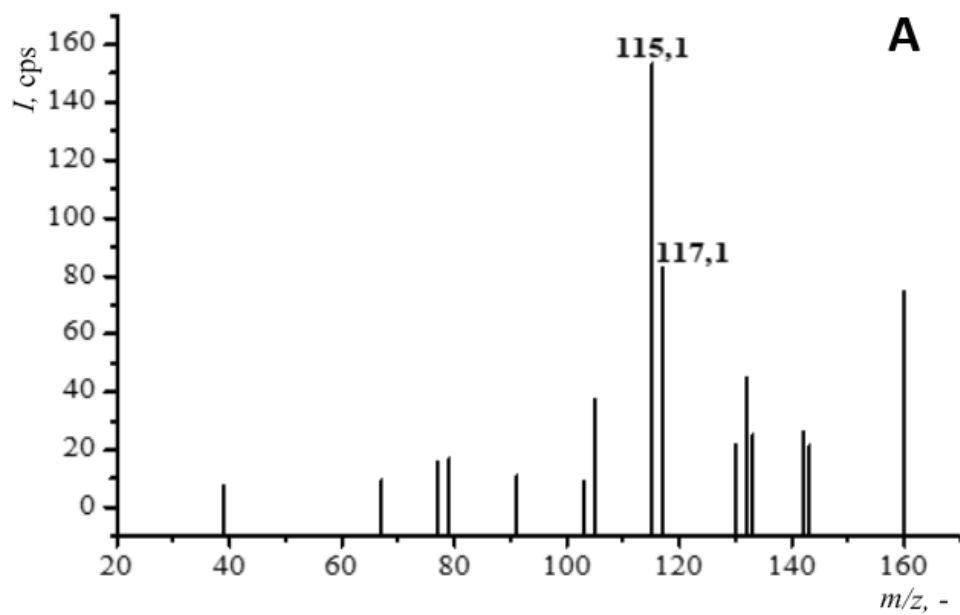
Obrázek 23: Hmotnostní spektrum melatoninu.

Zatímco v případě serotoninu a tryptofanu je pík molekulového iontu $[M+H^+]$ (177,15, resp. 205,15) až druhý nejintenzivnější v pořadí, v případě melatoninu dosáhne nejvyšší intenzity právě pík molekulového iontu s hodnotou m/z 233,15.

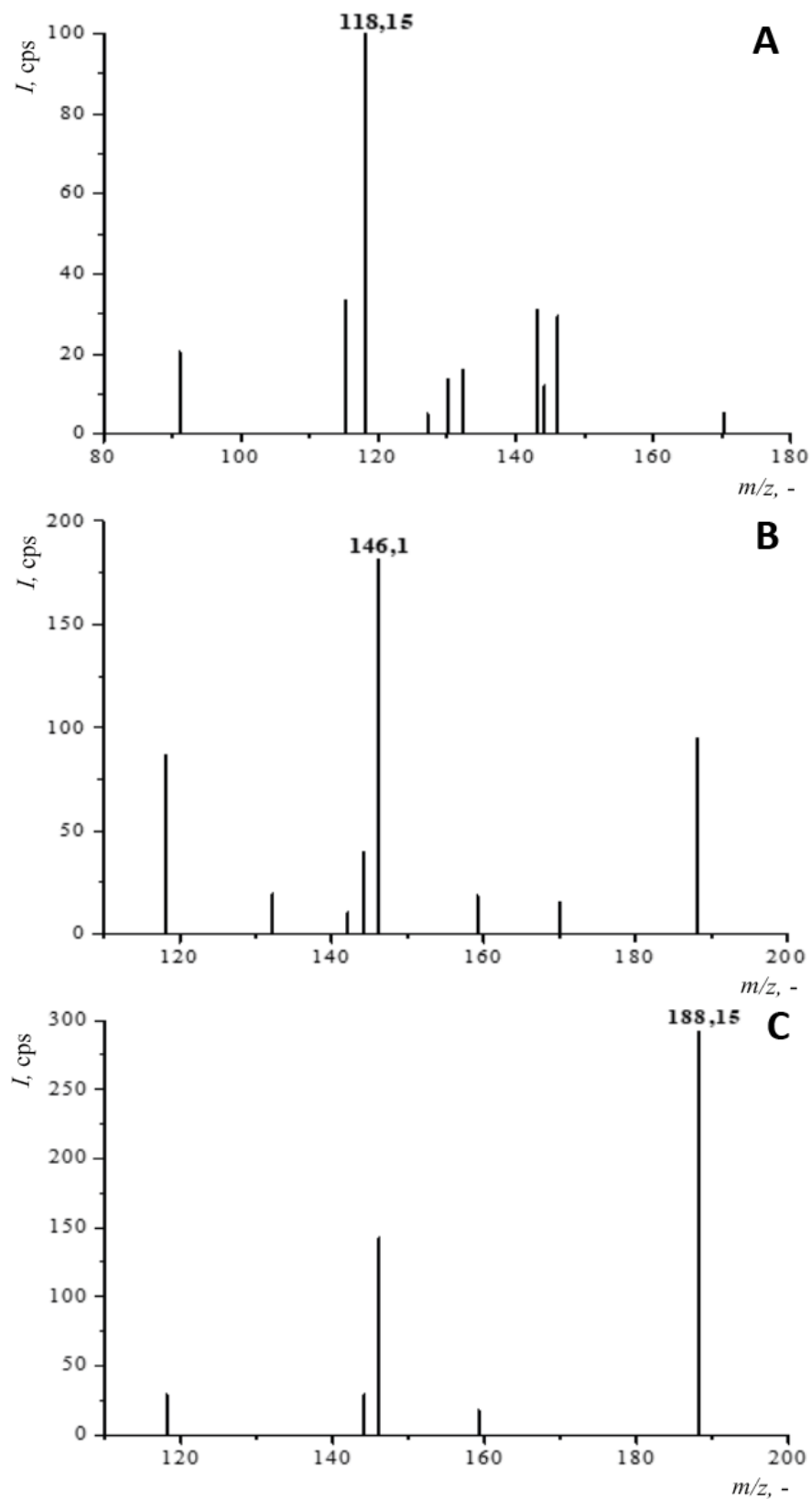
Při dalším způsobu měření byl použit mód MRM (z angl. *multiple reaction monitoring* = *monitorování vícenásobných reakcí*), který je více citlivý a selektivní. Původní molekula se díky vysoké kolizní energii rozdělí na fragmenty. Tento mód slouží pro pozorování přechodů mezi prekurzorovým a produktovým iontem. Víme tak, na jaké části molekul se analyt štěpí. Pro každý analyt byl uplatněn následující postup.

Nejprve byla zadána hodnota m/z molekulového iontu. Přístroj provedl tzv. ladění prekurzoru, kdy okolo zadané hodnoty proměřil po kroku 0,1 m/z s největší intenzitou. Pro serotonin byla určena hodnota 177,1, pro tryptofan 205,1 a pro melatonin 233,1.

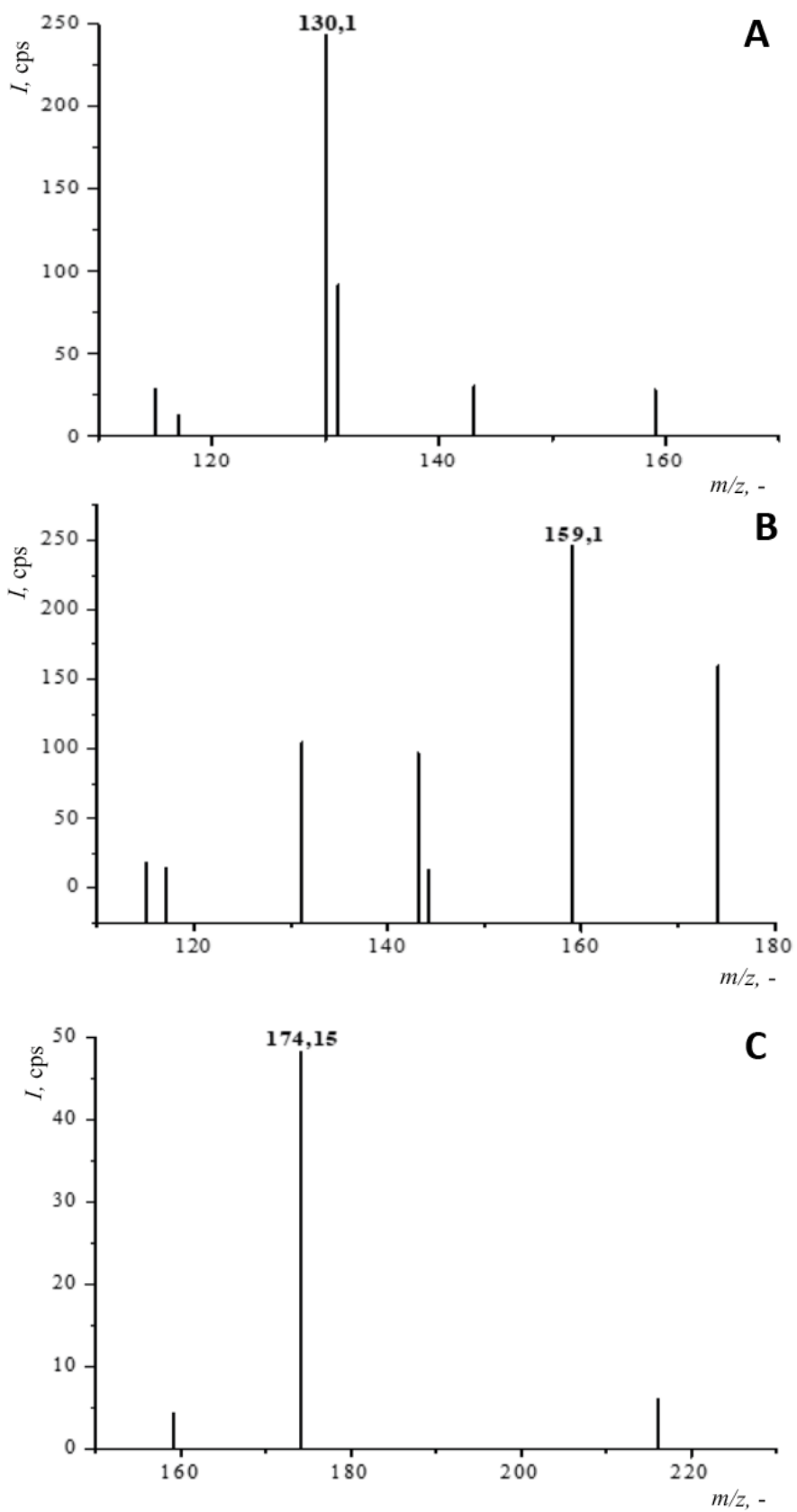
Dále byly měřena fragmentační spektra při různých kolizních energiích v rozmezí od -50 do -10 V. Tímto způsobem byly vybrány produktové ionty. Hmotnostní spektra fragmentů při určitých kolizních energiích jsou znázorněna na Obr. 24–26.



Obrázek 24: Hmotnostní spektra serotoninu – hledání produktového iontu. Hodnoty kolizní energie byly -30 V (A) a -15 V (B).

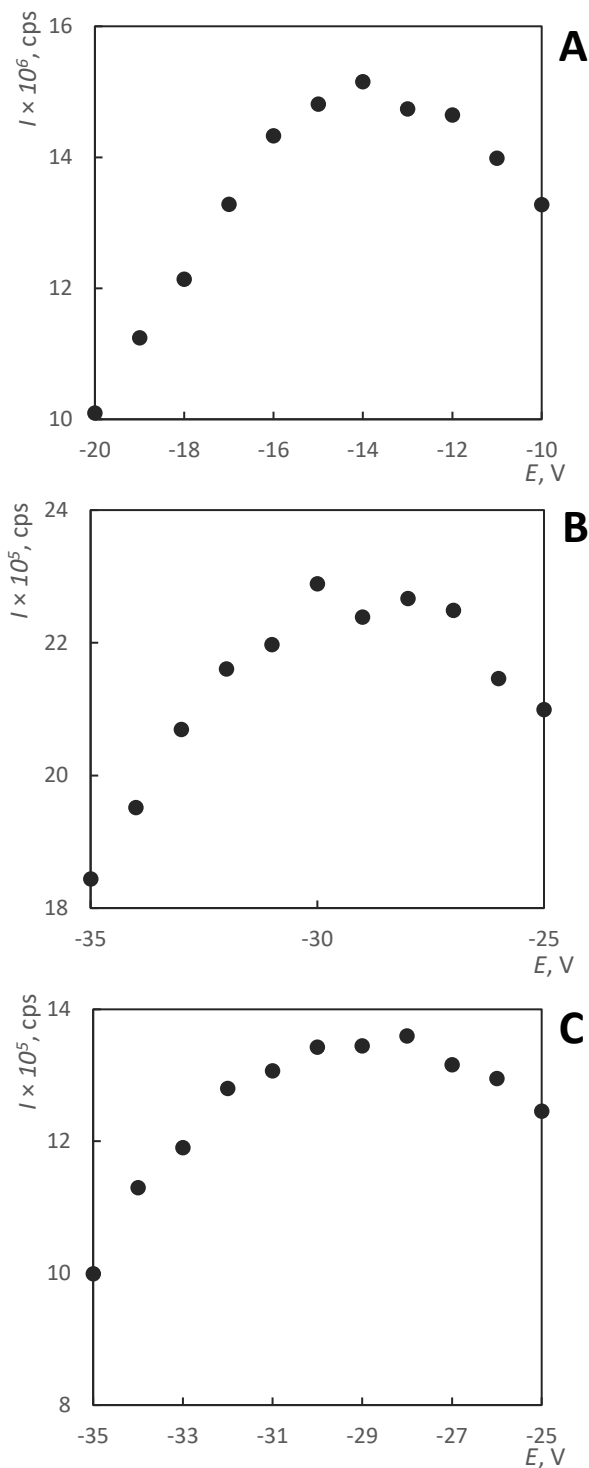


Obrázek 25: Hmotnostní spektra tryptofanu – hledání produktového iontu. Hodnoty kolizní energie byly -30 V (A), -20 V (B) a -15 V (C).

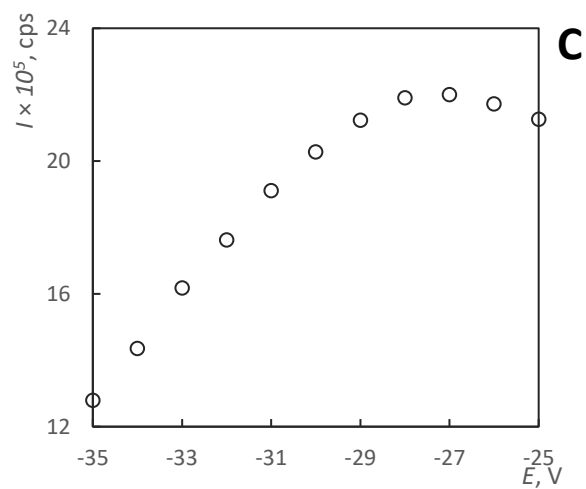
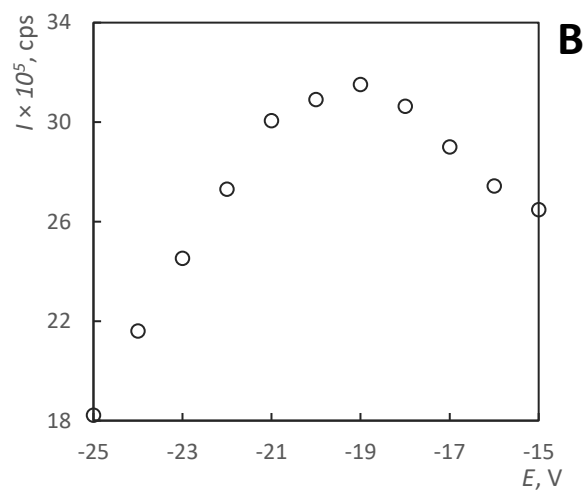
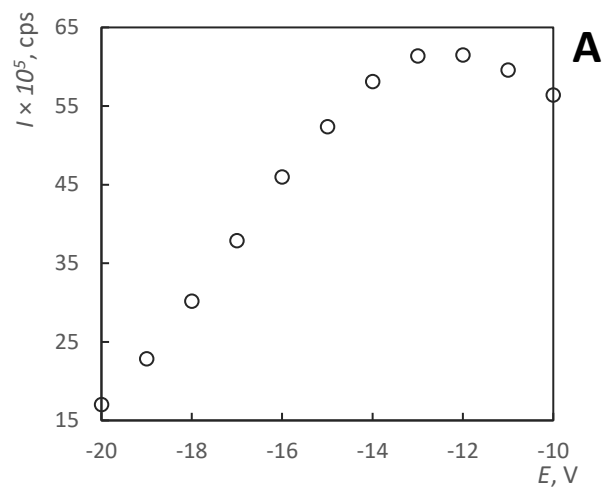


Obrázek 26: Hmotnostní spektrum melatoninu – hledání produktového iontu. Hodnoty kolizní energie byly -45 V (A), -30 V (B) a -15 V (C).

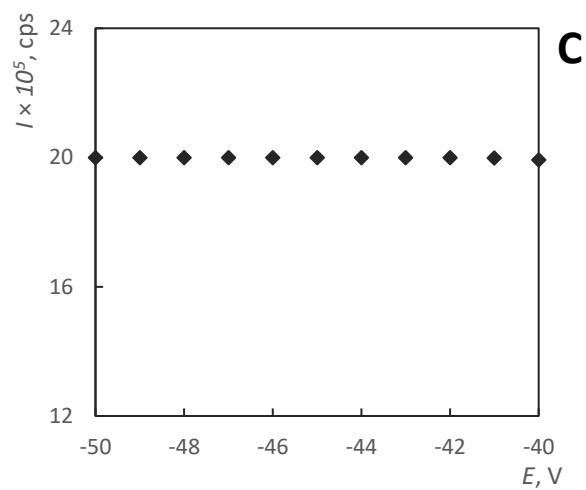
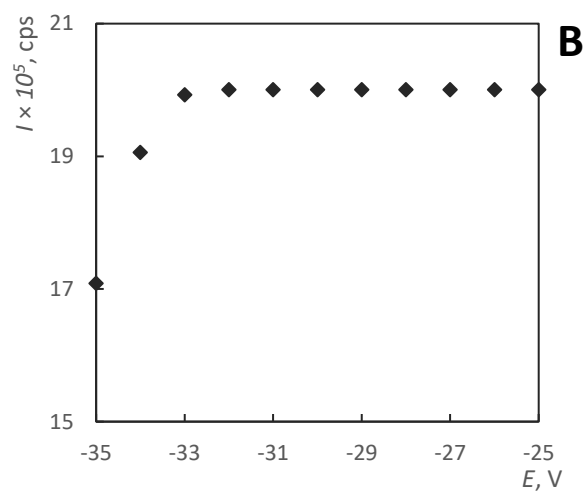
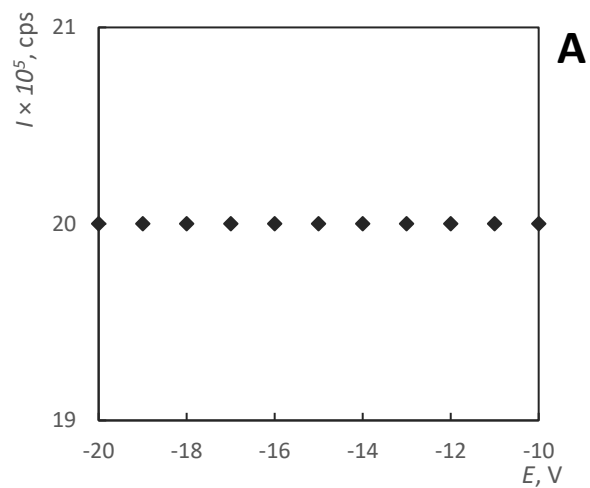
Pro každý produktový iont bylo provedeno detailní skenování kolizní energie, aby byla nalezena ta optimální, při které je produktový iont nejintenzivnější. Závislost intenzity na kolizní energii je pro serotonin na Obr. 27, pro tryptofan na Obr. 28 a pro melatonin na Obr. 29.



Obrázek 27: Grafy závislosti intenzity píků produktových iontů serotoninu na kolizní energii. Hodnoty m/z produktových iontů jsou 115,1 (A), 117,1 (B) a 160,1 (C).



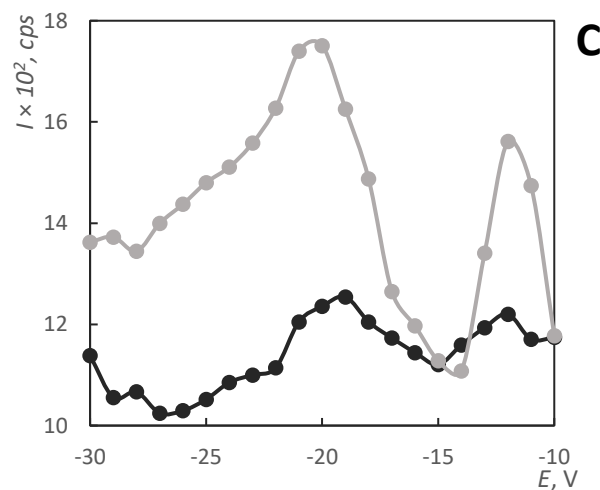
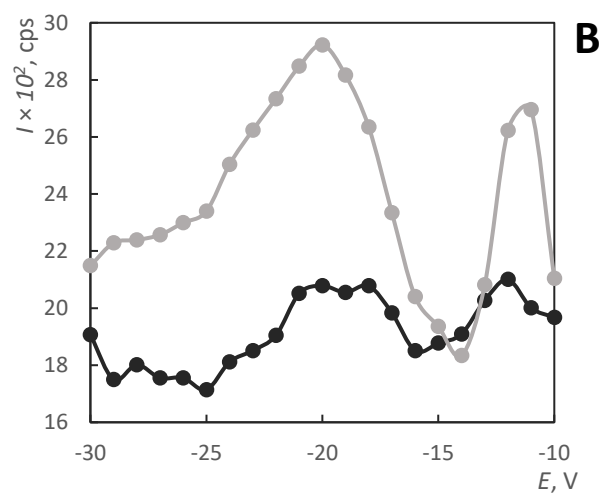
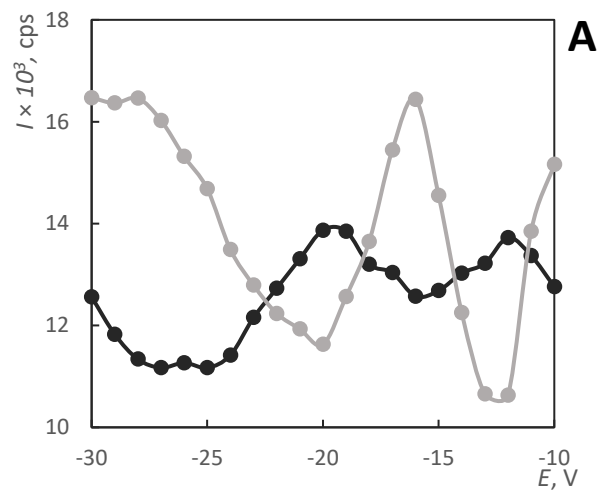
Obrázek 28: Grafy závislosti intenzity píků produktových iontů tryptofanu na kolizní energii. Hodnoty m/z produktových iontů jsou 118,15 (A), 146,1 (B) a 188,05 (C).



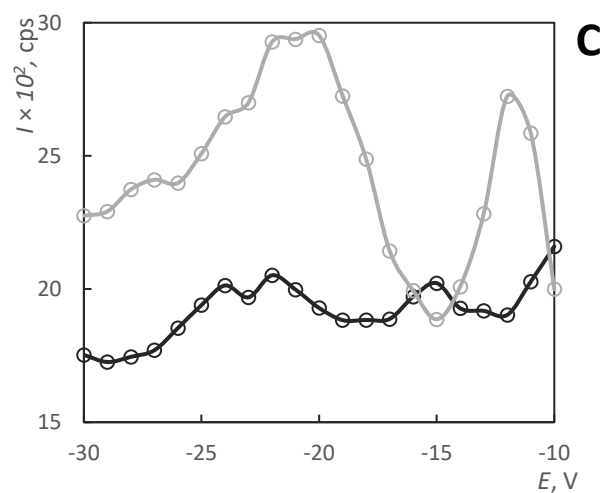
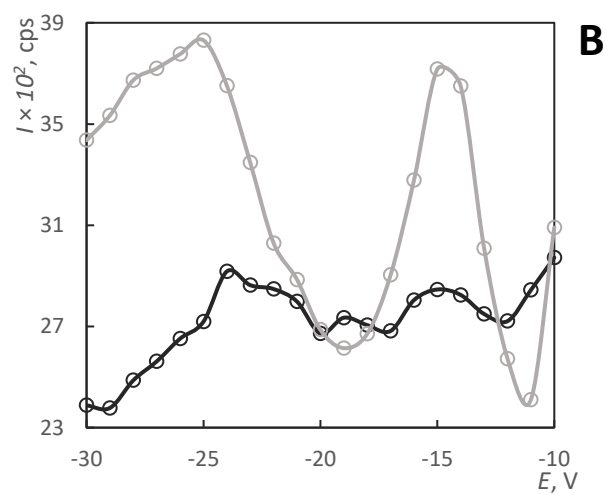
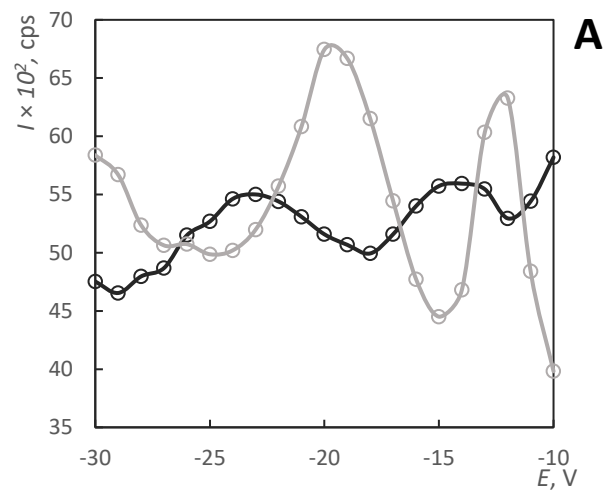
Obrázek 29: Grafy závislosti intenzity píků produktových iontů tryptofanu na kolizní energii. Hodnoty m/z produktových iontů jsou 130,1 (A), 159,0 (B) a 174,05 (C).

Stejně jako v případě prekurzoru i u produktových iontů byly detailně po kroku 0,1 zmapovány hodnoty m/z , aby byla určena přesná hodnota.

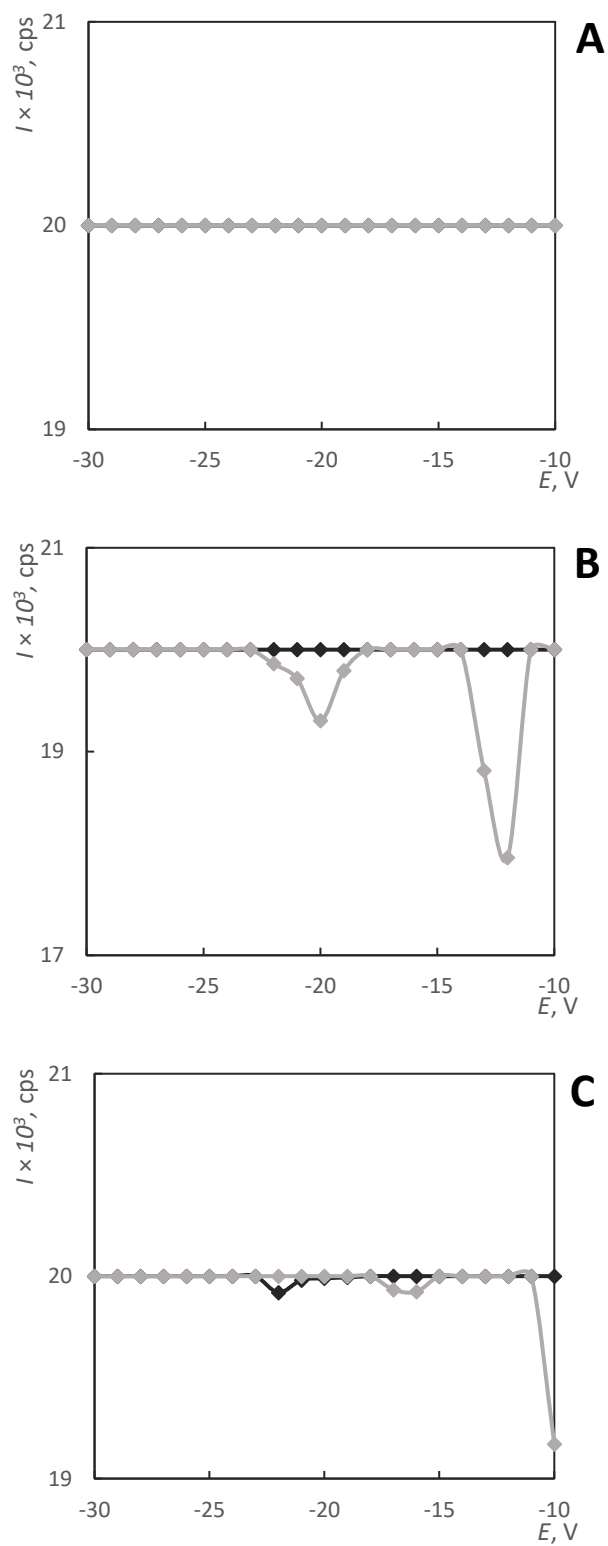
Další analýza, kterou systém provedl, slouží k volbě optimálního nastavení iontové optiky před prvním (Q1 Pre-bias) a třetím kvadrupólem (Q3 Pre-bias). Závislosti pro každý přechod jsou znázorněny na Obr. 30–32.



Obrázek 30: Grafy závislosti intenzity na kolizní energii pro serotonin. Jeho produktové ionty jsou 115,1 (A), 117,1 (B) a 160,1 (C). Černě je znázorněn Q1 Pre-bias a šedou barvou Q3 Pre-bias.



Obrázek 31: Grafy závislosti intenzity na kolizní energii pro tryptofan. Jeho produktové ionty jsou 118,15 (A), 146,1 (B) a 188,05 (C). Černě je znázorněn Q1 Pre-bias a šedou barvou Q3 Pre-bias.



Obrázek 32: Grafy závislosti intenzity na kolizní energii pro melatonin. Jeho produktové ionty jsou 130,1 (A), 159,0 (B) a 174,05 (C). Černě je znázorněn Q1 Pre-bias a šedou barvou Q3 Pre-bias.

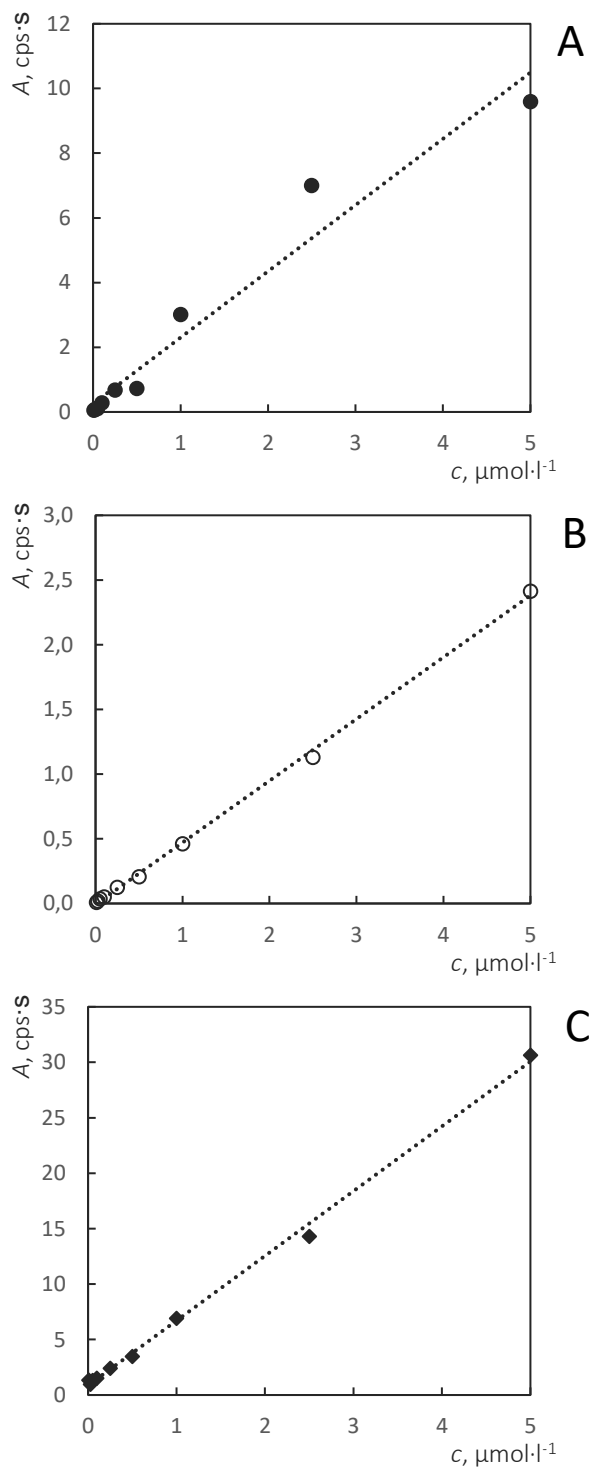
Pro každý analyt byly nalezeny tři produktové ionty. Jejich hodnoty m/z a hodnoty kolizních energií, při kterých mají nejvyšší intenzitu, a optimální hodnoty nastavení iontové optiky Q1 Pre-bias a Q3 Pre-bias jsou uvedeny v Tab. 4.

Tabulka 4: Hodnoty m/z prekurzorových a produktových iontů, hodnoty kolizních energií při nejvyšší intenzitě iontu a hodnoty ideálního nastavení iontové optiky Q1 a Q3 Pre-bias.

analyt	m/z		CE	Q1 Pre-bias	Q3 Pre bias
	prekurzor	produkt	V	V	V
serotonin	177,10	115,10	-14,0	-19,0	-20,0
		117,10	-30,0	-12,0	-20,0
		160,10	-28,0	-20,0	-30,0
tryptofan	205,10	118,15	-12,0	-10,0	-20,0
		146,10	-19,0	-10,0	-25,0
		188,05	-27,0	-10,0	-20,0
melatonin	233,10	130,10	-15,0	-18,0	-22,0
		159,00	-29,0	-20,0	-23,0
		174,05	-46,0	-20,0	-20,0

4.4.1 MS kalibrace

Pomocí hmotnostní detekce v MRM módu byly změřeny kalibrační závislosti. Tato metoda je citlivější a dokáže zachytit i velmi malé množství analytu. Rovněž je výrazně selektivnější než UV detekce. Byly měřeny roztoky standardů analytů v rozmezí koncentrace od 0,01 do 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kalibrační závislosti jsou vyneseny v Obr. 33.

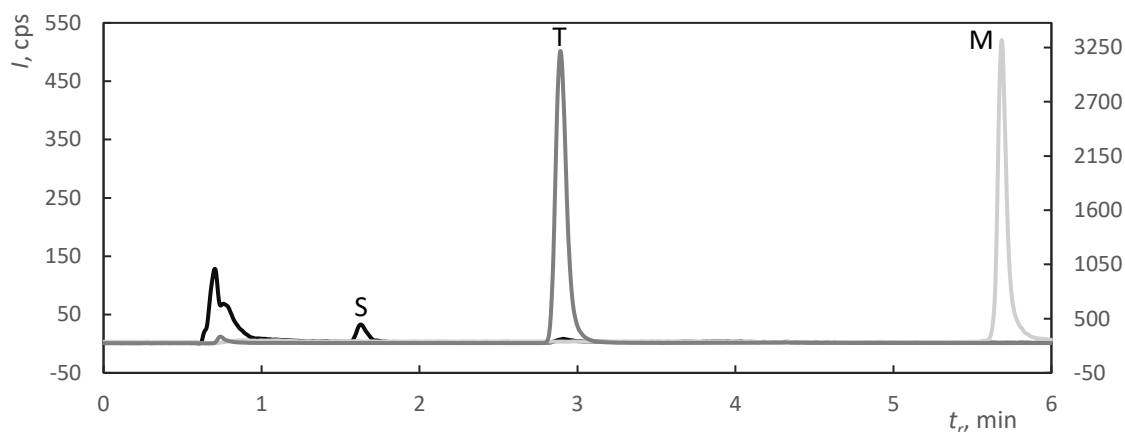


Obrázek 33: MS kalibrace. Grafy ukazují závislost plochy piku A na koncentraci c pro jednotlivé analyty: *A*...serotonin, *B*...tryptofan, *C*...melatonin. Měřeno za základních podmínek experimentu (viz Tab. 3, str. 26).

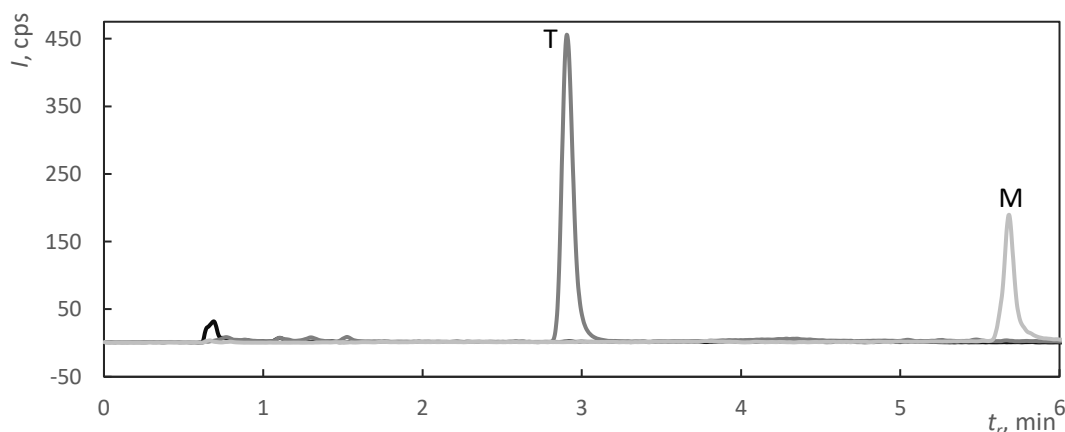
Stejně jako pro UV kalibraci, i zde byly vypočteny parametry metody LOD a LOQ a zhodnocena linearita. Kalibrační závislosti ukazují, že velmi dobrou linearitu mají tryptofan a melatonin s koeficienty determinace 0,9988 a 0,9974. Hodnota 0,9551 pro serotonin dokládá, že kalibrační závislost pro tento analyt není příliš spolehlivá. Pro přesnou kvantifikaci by proto bylo vhodné použít izotopicky značené standardy. Limity detekce a kvantifikace byly stanoveny ze závislosti výšky píku na koncentraci. Hodnoty LOD resp. LOQ jsou – pro serotonin 0,05 nmol·l⁻¹ resp. 0,17 nmol·l⁻¹, pro tryptofan 0,25 nmol·l⁻¹ resp. 0,84 nmol·l⁻¹ a pro melatonin 0,01 nmol·l⁻¹ resp. 0,05 nmol·l⁻¹.

4.4.2 Reálné vzorky

Pomocí hmotnostní detekce byly změřeny reálné vzorky hroznové šťávy a vína (viz Obr. 34 a Obr. 35).



Obrázek 34: Chromatogram hroznové šťávy. Měřeno v MRM módu. Vedlejší osa slouží pro pík tryptofanu.



Obrázek 35: Chromatogram vína. Měřeno v MRM módu.

Jak lze vidět z obou chromatogramů, pík tryptofanu je velmi intenzivní. Naproti tomu pík serotoninu má velmi nízkou intenzitu a ve vzorku vína vůbec nebyl detegován. Pík melatoninu je vidět v obou chromatogramech, ale v hroznech je jeho intenzita přibližně třikrát vyšší.

4.4.3 Opakovatelnost

Vzorky hroznové šťávy a vína byly proměřeny pětkrát, aby mohla být stanovena mez opakovatelnosti. Protože ve vzorku vína nebyl detegován serotonin, byl přidán jeho standard tak, že ve výsledném vzorku o objemu 1 ml byla jeho koncentrace $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Získaná a vypočtená data jsou znázorněna v tabulce Tab. 5 a 6. Hodnoty relativní směrodatné odchylky se pohybují do 10 % s výjimkou melatoninu ve vzorku hroznové šťávy, kde je to 15 %. Použití izotopicky značených vnitřních standardů by s největší pravděpodobností vedlo k zvýšení opakovatelnosti.

Tabulka 5: Vzorek vína. Měřeno 5x za základních podmínek experimentu. V tabulce je uveden medián plochy píku \tilde{A} , relativní směrodatná odchylka s_r a mez opakovatelnosti r vypočtena na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

analyt	\tilde{A} cps·s	s_r %	r cps·s
serotonin	4 258 012	7,10	356 574
tryptofan	2 480 175	1,07	31 329
melatonin	1 066 517	6,91	86 913

Tabulka 6: Vzorek hroznové šťávy. Měřeno 5x za základních podmínek experimentu. V tabulce je uveden medián plochy píku \tilde{A} , relativní směrodatná odchylka s_r a mez opakovatelnosti r vypočtena na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

analyt	\tilde{A} cps·s	s_r %	r cps·s
serotonin	157 274	6,00	11 129
tryptofan	16 700 037	9,24	1 819 588
melatonin	2 335 016	14,92	410 813

Na základě měření opakovatelnosti a kalibrační závislosti byl odhadnut obsah analytů v reálných vzorcích. Jak již bylo řečeno, pro serotonin není kalibrační závislost spolehlivá, proto vypočítaná koncentrace ve vzorcích vykazovala záporné hodnoty. Obsah dalších dvou analytů – tryptofanu a melatoninu – ve vzorcích byl stanoven přibližně na $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ tryptofanu a $35 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ melatoninu pro víno a vzorek hroznové šťávy pak obsahoval $35 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ tryptofanu a $252 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ melatoninu.

5 Závěr

V rámci této diplomové práce byla vyvinuta a optimalizována metoda pro stanovení tryptofanu a jeho metabolitů serotoninu a melatoninu v rostlinném materiálu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Práce byla zaměřena na analýzu rostliny *Vitis vinifera*.

V první fázi byly na základě literární rešerše stanoveny počáteční podmínky experimentu, které byly dále pomocí optimalizace upravovány. Na základě vlastností analytů bylo rozhodnuto, že bude měřeno pomocí reverzní chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs 10 mM octanového pufru a methanolu. Byly vyzkoušeny různé poměry obou složek mobilní fáze, a to jak na počátku, tak v průběhu gradientové analýzy a různé pH pufru. Taktéž bylo vyzkoušeno měření s jinou organickou složkou mobilní fáze – acetonitrilem. Ten však poskytoval výrazně horší rozlišení píků. Byly rovněž vyzkoušeny dvě stacionární fáze. Tou první byla stacionární fáze C18 s core-shell částicemi, druhou pak hybridní stacionární fáze BEH Phenyl. Ta umožnila lepší separaci analytů, díky π - π interakcím mezi náplní kolony a analyty aromatické povahy.

Základní podmínky experimentu byly stanoveny takto: na počátku analýzy obsahovala mobilní fáze 95 % (v/v) 10 mM octanového pufru o pH = 4,5 a 5 % (v/v) methanolu až do druhé minuty. Poté byl obsah methanolu až do šesté minuty lineárně zvyšován na hodnotu 80 % (v/v). Mezi šestou a osmou minutou bylo udržováno konstantní složení mobilní fáze 20 % (v/v) pufru a 80 % (v/v) methanolu. V čase od osmé do deváté minuty byl obsah methanolu snižován na počáteční hodnotu, kde byl až do ukončení analýzy v jedenácté minutě udržován.

Dále bylo přistoupeno k měření kalibrační závislosti, nejprve pomocí UV detekce. Pro jednotlivé analyty byla zhodnocena linearita a parametry mez detekce a mez kvantifikace. Hodnota LOD resp. LOQ byla stanovena takto: pro serotonin 0,17 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. 0,57 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro tryptofan a melatonin shodně 0,23 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. 0,77 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V další fázi byly změřeny reálné vzorky. Jejich chromatogramy však obsahovaly velké množství interferencí. A protože je tato metoda málo citlivá a předpokládalo se, že v rostlinném materiálu bude pouze stopové množství analytů, bylo přistoupeno k měření pomocí hmotnostní detekce. Zde byla nejprve naměřena spektra standardů analytů. Dále pak pomocí techniky MRM byly nalezeny hodnoty m/z prekuzorových a produktových iontů a stanovena optimální kolizní energie, při které mají ionty nejvyšší intenzitu.

Ty byly vybrány a bylo provedeno měření kalibrační závislosti. Toto měření ukázalo, že pro tryptofan a melatonin má závislost velmi dobrou linearitu, na rozdíl od serotoninu, jehož koeficient determinace byl nižší. Hodnoty meze detekce LOD a kvantifikace LOQ pro jednotlivé analyty byly odhadnuty: pro serotonin $0,05 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. $0,17 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro tryptofan $0,25 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. $0,84 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro melatonin $0,01 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. $0,05 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Měření reálných vzorků hroznové šťávy a vína pomocí hmotnostní detekce ukázalo, že analyty jsou ve vzorku přítomny, kromě serotoninu, který nebyl ve víně detegován. Metoda je tedy dostatečně citlivá pro stanovení všech tří analytů ve vzorcích hroznové šťávy a pro stanovení tryptofanu a melatoninu ve vzorcích vína. Jako poslední krok byl pomocí kalibrační závislosti odhadnut obsah analytů ve vzorcích. Bylo stanoveno, že vzorek vína obsahuje přibližně $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ tryptofanu a $35 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ melatoninu a vzorek hroznové šťávy pak $35 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ tryptofanu a $252 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ melatoninu. Pro serotonin není kalibrační závislost lineární, proto vypočítaná koncentrace ve vzorcích vykazovala záporné hodnoty. Pro spolehlivou kvantifikaci serotoninu by bylo nutné použít izotopicky značený vnitřní standard. Relativní směrodatná odchylka ploch pík se pohybovala od 1 do 15 %, což jsou uspokojivé hodnoty, nicméně je nutné doporučit použití izotopicky značených standardů pro všechny tři analyty, čímž by se pravděpodobně zvýšila i opakovatelnost měření.

6 Použitá literatura

- [1] Hopkins F. G., Cole S. W.: A contribution to the chemistry of proteids, Part I. A preliminary Study of a hitherto undescribed Product of Tryptic Digestion. *The Journal of physiology*, 1901:27, 418–28 (1901)
- [2] Richard D. M., Dawes M. A., Mathias C. W., Acheson A., Hill-Kaptureczak N., Donald M Dougherty: L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications, *International Journal of Tryptophan Research*, 2009:2, 45–60 (2009)
- [3] Ministerstvo zdravotnictví České republiky: *Český lékopis 2009*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009
- [4] Friedman M.: Analysis, Nutrition, and Health Benefits of Tryptophan, *International Journal of Tryptophan Research*, 11, 1–12 (2008)
- [5] Paredes S. D., Barriga C., Reiter R. J., Rodríguez A. B.: Assessment of the Potential Role of Tryptophan as the Precursor of Serotonin and Melatonin for the Aged Sleep-wake Cycle and Immune Function: *Streptopelia Risoria* as a Model, *International Journal of Tryptophan Research*, 2, 23–36 (2009)
- [6] Horáček J., Závěšická L., Tintěra J., Dockery C., Platilová V., Kopeček M., Španiel F., Bubeníková V., Höschl C.: The Effect of Tryptophan Depletion on Brain Activation Measured by Functional Magnetic Resonance Imaging during the Stroop Test in Healthy Subjects, *Physiological Research*, 54, 235–244 (2005)
- [7] Palego L., Betti L., Rossi A., Giannaccini G.: Tryptophan biochemistry: Structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans, *Journal of Amino Acids*, 2016, 18–31 (2016)
- [8] Bellmaine S., Schnellbaecher A., Zimmer A.: Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins, *Free Radical Biology and Medicine*, 160 696–718 (2020)
- [9] Rapport M. M., Green A. A., Page I. H.: Crystalline Serotonin, *Science*, 108, 329–330 (1948)
- [10] Whitaker-Azmitia P.M.: The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience, *Neuropharmacology*, 21, 305–312 (1999)
- [11] Wu H., Denna T. H., Storkersen J. N., Gerriets V. A.: Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity, *Pharmacological Research*, 140, 100–114 (2019)

- [12] Ravishankar G. A., Ramakrishna A.: *Serotonin and melatonin: their functional role in plants, food, fytomedicine and human health*. Boca Raton: CRC Press, 2017
- [13] Amsterdam J. D., Panossian A. G.: *Rhodiola rosea L.* as a putative botanical antidepressant, *Phytomedicine*, 23, 770–783 (2016)
- [14] Lerner A. B., Case J. D., Takahashi Y., Lee T. H., Wataru M.: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes, *Journal of American Chemical Society*, 80, 2587 (1958)
- [15] Beneš L., Wilhelm Z.: Melatonin, *Praktické lékařství*, 12:2e, 10–18 (2016)
- [16] Claustrata B., Lestonb J.: Melatonin: Physiological effects in humans, *Neurochirurgie*, 61, 77–84 (2015)
- [17] Juhnevica-Radenkova K., Moreno D. A., Ikase L., Drudze I., Radenkovs V.: Naturally occurring melatonin: Sources and possible ways of its biosynthesis, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 4008–4030 (2020)
- [18] Tan D.-X.: Melatonin and plants, *Journal of Experimental Botany*, 66:3, 625–626 (2015)
- [19] Dun-Xian Tan D.-X., Hardeland R., Manchester L. C., Ahmet Korkmaz A., Ma S., Rosales-Corral S., Reiter R. J.: Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science, *Journal of Experimental Botany*, 63: 2, 577–597 (2012)
- [20] Hoenicke K., Simat T. J., Steinhart H., Köhler H. J., Schwab A.: Determination of Free and Conjugated Indole-3-Acetic Acid, Tryptophan, and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5494–5501 (2001)
- [21] Rodriguez-Naranjo M. I., Ordóñez J. L., Callejón R. M., Cantos-Villar E., Garcia-Parrilla M.C.: Melatonin is formed during winemaking at safe levels of biogenic amines, *Food and Chemical Toxicology*, 57, 140–146 (2013)
- [22] Vigentini I., Gardana C., Fracassetti D., Gabrielli M., Foschino R., Simonetti P., Tirelli A., Iriti M.: Yeast contribution to melatonin, melatonin isomers and tryptophan ethyl ester during alcoholic fermentation of grape musts, *Journal of Pineal Research*, 58, 388–396 (2015)
- [23] Rodriguez-Naranjo M. I., Gil-Izquierdo A., Troncoso A. M., Cantos E., Garcia-Parrilla M. C.: Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chemistry*, 126b, 1608–1613 (2011)
- [24] Mas A., Guillamon J. M., Torija M. J., Beltran G., Cerezo A. B., Troncoso A. M.,

- Garcia-Parrilla C.: Bioactive Compounds Derived from the Yeast Metabolism of Aromatic Amino Acids during Alcoholic Fermentation, *BioMed Research International*, 2014, 848–857 (2014)
- [25] Luo W., Wei P., Chen H., Fan L., Huang L., Huang J., Xu Z., Cen P.: Kinetics and optimization of L-tryptophan separation with ion-exchange chromatography, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28:5, 1280–1285 (2011)
- [26] Kato N., Kojima T., Yoshiyagawa S., Ohta H., Toriba A., Nishimura H., Hayakawa K.: Rapid and sensitive determination of tryptophan, serotonin and psychoactive tryptamines by thin-layer chromatography/fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1145, 229–233 (2007)
- [27] Pobozy E., Michalski A., Sotowska-Brochocka J., Trojanowicz M.: Determination of melatonin and its precursors and metabolites using capillary electrophoresis with UV and fluorometric detection, *Journal of Separation Science*, 28:16, 2165–2172, (2005)
- [28] Gomez F. J. V., Hernández I. G., Cerutti S., Silva M. F.: Solid phase extraction/cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography for the analysis of melatonin and related indole compounds in plants, *Microchemical Journal*, 123, 22–27 (2015)
- [29] Puerta C., Carrascosa-Salmoral M. P., García-Luna P. P., Lardone P. J., Herrera J. L., Fernández-Montesinos R., Guerrero J. M., Pozo D.: Melatonin is a phytochemical in olive oil, *Food Chemistry*, 104, 609–612 (2007)
- [30] Rodriguez-Naranjo M. I., Gil-Izquierdo A., Troncoso A. M., Cantos E., Garcia-Parrilla M. C.: Melatonin: A new bioactive compound in wine, *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 603–608 (2011)
- [31] Huang X., Mazza G.: Application of LC and LC-MS to the Analysis of Melatonin and Serotonin in Edible Plants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:4, 269-284 (2011)
- [32] Huang X., Mazza G.: Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218, 3890–3899 (2011)
- [33] Fracassetti D., Vigentini I., Lo Faro A. F. F., De Nisi P., Foschino R., Tirelli A., Orioli M., Iriti M.: Assessment of Tryptophan, Tryptophan Ethylester, and Melatonin Derivatives in Red Wine by SPE-HPLC-FL and SPE-HPLC-MS Methods, *Foods*, 8, 99–111 (2019)

- [34] Gomez F. J. V., Raba J., Cerutti S., Silva M. F.: Monitoring melatonin and its isomer in *Vitis vinifera* cv. Malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle, *Journal of Pineal Research*, 52, 349–355 (2012)
- [35] Fernández-Cruz E., Álvarez-Fernández M. A., Valero E., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C.: Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic fermentation by different wine yeast strains, *Food Chemistry*, 217, 432–437 (2017)
- [36] Fernández-Cruz E., Álvarez-Fernández M. A., Valero E., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C.: Validation of an Analytical Method to Determine Melatonin and Compounds Related to L-Tryptophan Metabolism Using UHPLC/HRMS, *Food Analytical Methods*, 9, 3327–3336 (2016)
- [37] Vitalini S., Gardana C., Zanzotto A., Fico G., Faoro F., Simonetti P., Iriti M.: From vineyard to glass: agrochemicals enhance the melatonin and total polyphenol contents and antiradical activity of red wines, *Journal of Pineal Research*, 51, 278–285 (2011)
- [38] Vitalini S., Gardana C., Fico G., Simonetti P., Iriti M.: Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity, *Journal of Pineal Research*, 54, 322–333 (2013)
- [39] Albu C., Radu L. E., Radu G. L.: Assessment of Melatonin and Its Precursors Content by a HPLC-MS/MS Method from Different Romanian Wines, *ACS Omega*, 5, 27 254–27 260 (2020)
- [40] Ya-Qin W., Dong-Qing Y., Bao-Qing Z., Guang-Feng W., Chang-Qing D.: Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect, *Food Chemistry*, 163, 6–15 (2014)
- [41] Islam J., Shirakawa H., Nguyen T. K., Aso H., Komai M.: Simultaneous analysis of serotonin, tryptophan and tryptamine levels in common fresh fruits and vegetables in Japan using fluorescence HPLC, *Food Bioscience*, 13, 56–59 (2016)
- [42] Agilent Technologies: *Agilent Poroshell 120 Columns for HPLC and UHPLC, Perform rugged, fast LC with confidence*, 2015
- [43] Nováková L., Douša M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi (1. díl)*, vydáno vlastním nákladem, 2013
- [44] Waters Corporation: *Acquity uplc column*, 2015