

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Semen Gogulin

Extrakce tryptofanu a jeho metabolitů z rostlinného materiálu a jejich
separace micelární elektrokinetickou chromatografií

Extraction of tryptophan and its metabolites from plant material and its
separation by micellar electrokinetic chromatography

Bakalářská práce

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

Praha, 2019

Prohlášení

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

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

V Praze dne 15. srpna 2019.

.....

Semen Gogulin

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování této práce. Také bych rád poděkoval doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za poskytnutý biologický materiál a Mgr. Ondřeji Hodkovi za pomoc při provedení experimentální části.

Zvlášť bych chtěl poděkovat své středoškolské učitelce Světlaně G. Tokranové, která mě poprvé uvedla na cestu poznání chemie a tím výrazně ovlivnila průběh celého mého následného života.

Obsah

Seznam zkratk.....	6
Seznam symbolů.....	7
Úvod a cíl práce.....	8
1. Teoretická část.....	9
1.1. Tryptofan a jeho metabolity	9
1.2. Metody stanovení tryptofanu a jeho metabolitů.....	10
1.3. Kapilární elektroforéza	11
1.3.1. Přístrojové uspořádání CE.....	11
1.3.2. Teoretické aspekty CE.....	13
1.3.3. Separační pufry v CE.....	15
1.3.4. Detekce v CE	16
1.4. Micelární elektrokinetická chromatografie	17
2. Experimentální část	21
2.1. Použité chemikálie.....	21
2.2. Přístrojové vybavení.....	21
2.3. Pracovní podmínky CE.....	21
2.4. Příprava roztoků	22
2.4.1. Příprava základního elektrolytu.....	22
2.4.2. Příprava roztoků standardů analyzovaných látek	22
2.4.3. Příprava pomocného roztoku thiomocoviny.....	23
2.5. Pokusy se standardy	23
2.5.1. Určení migračního pořadí.....	23
2.5.2. Optimalizace pH základního elektrolytu a koncentrace SDS v něm.....	23
2.5.3. Zkoumání vlivu matrice vzorku	23
2.6. Extrakce rostlinného materiálu	24
2.6.1. Extrakce bez odpaření extrakčního činidla.....	24
2.6.2. Extrakce s odpařením extrakčního činidla.....	24
3. Výsledky a diskuze.....	26
3.1. Určení migračního pořadí.....	26
3.2. Optimalizace koncentrace SDS v základním elektrolytu	28
3.3. Optimalizace pH základního elektrolytu	30
3.4. Zkoumání vlivu matrice vzorku	32

3.5. Extrakce bez odpaření extrakčního činidla.....	34
3.6. Extrakce s odpařením extrakčního činidla.....	37
4. Závěr.....	40
Seznam použitých zdrojů.....	41

Seznam zkratek

BGE (angl. **background electrolyte**) – základní elektrolyt

CE (angl. **capillary electrophoresis**) – kapilární elektroforéza

CMC (angl. **critical micelle concentration**) – kritická micelární koncentrace

EOF (angl. **electroostotic flow**) – elektroosmotický tok

HPLC (angl. **high-performance liquid chromatography**) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IEC (angl. **ion-exchange chromatography**) – iontově výměnná chromatografie

M – melatonin

MEKC (angl. **micellar electrokinetic chromatography**) – micelární elektrokinetická chromatografie

S – serotonin

SDS (angl. **sodium dodecylsulfate**) – dodecylsíran sodný

T – tryptofan

TU (lat. **thiourea**) – thiomočovina

UV (angl. **ultraviolet**) – ultrafialové záření

Seznam symbolů

A – absorbance (bezrozměrná veličina, někdy však má umělou jednotku [AU])

c [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] – koncentrace látky

E [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$] – intenzita elektrického pole

L [cm] – optická dráha záření

L_c [m] – celková délka separační kapiláry

L_d [m] – vzdálenost mezi vstupem do separační kapiláry a detektorem

P [W] – intenzita záření

T – transmitance (bezrozměrná veličina)

t_m [s], [min] – migrační čas

V [l] – objem

v [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$] – rychlost pohybu

v/v [%] – procentuální objemový podíl

U [V] – napětí

ϵ_λ [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$] – molární absorpční koeficient při vlnové délce záření λ

λ [nm] – vlnová délka záření

μ [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] – elektroforetická mobilita

μ_{eff} [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] – vlastní elektroforetická mobilita látky

μ_{eof} [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] – elektroforetická mobilita elektroosmotického toku

μ_{poz} [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$] – pozorovaná elektroforetická mobilita

Úvod

Tryptofan jako jedna z proteinogenních aminokyselin je nezbytnou součástí každého živého organismu na Zemi. Mimoto, jeho metabolity, k nimž patří serotonin a melatonin, jsou důležitými regulačními molekulami, které se vyskytují v přírodě skoro stejně často jako jejich prekurzor. Stanovení tryptofanu, serotoninu a melatoninu je proto běžným analytickým úkolem, který se plní v rámci základního a aplikovaného výzkumu v nejrůznějších oblastech přírodních věd, především v biologii, biochemii, biomedicíně, farmacii, farmakologii a fyziologii.

Stanovení tryptofanu, serotoninu a melatoninu v reálných vzorcích biologického materiálu nezbytně vyžaduje aplikaci metod moderní analytické chemie, a hlavně metod separačních. Právě k nim patří kapilární elektroforéza, která se dnes běžně používá k řešení mnoha analytických problémů. Díky své výborné kompatibilitě s absorpční spektrofotometrickou detekcí má kapilární elektroforéza nízkou experimentální náročnost a relativně nízké náklady na provoz v praxi. Mimoto, kapilární elektroforéza může být jednoduše modifikována pro účely konkrétního stanovení: příkladem takové modifikace může být micelární elektrokinetická chromatografie, která ještě výrazněji rozšiřuje oblast možných aplikací kapilární elektroforézy.

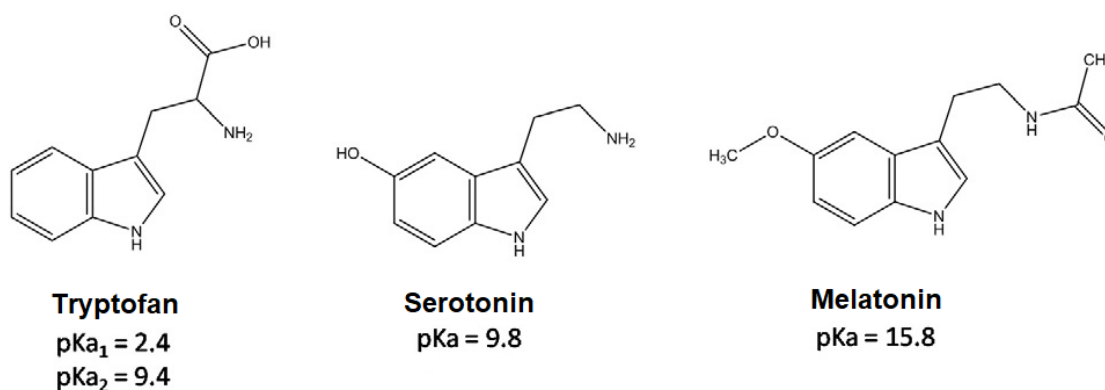
Cílem této práce je vyvinout kapilární elektroforetickou metodu pro separaci a detekci tryptofanu, serotoninu a melatoninu ve vzorcích lyofilizovaných listů rostliny *Nicotiana tabacum* pro účely základního biochemického výzkumu. Úkolem práce je určení migračního pořadí a migračních časů jednotlivých analytů v rámci pokusů se standardy látek, optimalizace separačních parametrů, jako je hodnota pH a složení základního elektrolytu včetně přídavku detergentu pro vytvoření micelárního systému, vývoj techniky extrakce stanovovaných látek z biologického materiálu pomocí různých extrakčních činidel a konečně vyzkoušení vyvinuté metody po všech krocích od začátku do konce.

1 Teoretická část

1.1 Tryptofan a jeho metabolity

Tryptofan je jednou z kódovaných proteinogenních aminokyselin vyskytujících se v živých organismech, přičemž jeho relativní zastoupení je nejnižší ve srovnání s ostatními aminokyselinami [1]. Pro člověka je tryptofan také esenciální aminokyselinou, která nemůže být syntetizována v organismu, a proto se musí přijímat s potravou [2]. V buňkách se tryptofan nezúčastňuje pouze biosyntézy proteinů, ale je také prekurzorem řady dalších molekul, které mají především regulační funkci [3]. Mezi ně patří serotonin a melatonin [1].

Chemické struktury tryptofanu, serotoninu a melatoninu jsou zobrazeny na *Obr. 1*. Základem všech molekul je indolový kondenzovaný cyklus. Serotonin obsahuje navíc aminoskupinu, díky níž má bazický charakter. Tryptofan má vedle aminoskupiny kyselou karboxylovou skupinu, a je proto zwitterionogenní látkou. Melatonin neobsahuje žádné kyselé ani bazické skupiny.



Obr. 1. Tryptofan, serotonin a melatonin. Převzato z [4] a upraveno.

Serotonin je u člověka a živočichů neurotransmiterem, který se podílí na mnoha fyziologických procesech hlavně nervové činnosti, jako je například paměť, učení se a kladné emoční stavy, proto je široce znám jako „molekula štěstí“ [5]. Melatonin je také nezbytný pro nervovou činnost, podílí se na regulaci cirkadiálního rytmu neboli cyklu spánku a bdění [6], a proto se často nazývá „molekulou tmy“.

I když se o serotoninu a melatoninu mluví nejčastěji v kontextu fyziologie člověka, obě tyto látky se vyskytují také i v dalších organismech. U rostlin se serotonin

podílí na regulaci růstu jednotlivých částí [7], a také má antioxidační účinky [8]. Role melatoninu není úplně dobře známa [9], přesto některé studie ukazují na jeho funkci účinného antioxidantu [10] a látky ovlivňující cirkadiální rytmus rostliny [11].

1.2 Metody analýzy tryptofanu a jeho metabolitů

Jelikož jsou tryptofan, serotonin a melatonin látkami poměrně rozšířenými v živých organismech, tyto analyty se často stanovují v nejrůznějších biologických vzorcích. Stanovení serotoninu a melatoninu jako významných regulačních molekul se provádí pro účely biochemického a biomedicínského výzkumu [12–23], tryptofan se také stanovuje pro tyto účely [12], [13], nebo v oblasti výzkumu složení potravin, hlavně jako součást proteinů [24], [25]. Díky svému působení konkrétně na lidský organismus jsou tryptofan, serotonin a melatonin častými složkami léků a potravinových doplňků, proto jsou tyto analyty stanovovány i v rámci farmaceutických analýz [14], [26], [27].

Většina analytických metod stanovení tryptofanu, serotoninu a melatoninu jak simultánně, tak zvlášť, je založena na použití analytických separačních technik. Nejrozšířenějšími způsoby stanovení těchto látek jsou techniky chromatografické, přičemž se jedná hlavně o iontově výměnnou chromatografii, IEC [15], [25], nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, HPLC [16], [24], a také techniky elektroforetické.

Mezi elektroforetické techniky vhodné ke stanovení tryptofanu, serotoninu a melatoninu v biologických a farmaceutických vzorcích patří jak standardní kapilární elektroforéza, CE, tak její modifikovaná varianta micelární elektrokinetická chromatografie, MEKC. Obě metody používají standardní křemenné kapiláry, které však mohou být přímo v laboratoři modifikovány. Základním elektrolytem ve všech případech může být jak běžný fosfátový nebo tetraboritanový pufr, tak pufr tvořený dalšími méně častými látkami, například kyselinou 2-(N-morfolino)ethansulfonovou, nebo směsí několika látek, například kyseliny citronové a alaninu nebo kyseliny octové a γ -aminomaselné. Hodnota pH použitého základního elektrolytu je velmi variabilní. Do základního elektrolytu se v případě aplikace MEKC přidává dodecylsírany sodný neboli SDS, mohou být také přidávány chirální selektory jako cyklohextriny a další pomocné látky jako acetonitril. Vzorek se dává nejčastěji hydrodynamicky, i když existuje i možnost elektrokinetického dávkování. Detekce je nejčastěji absorpční spektrofotometrická, existuje také možnost fluorescenční spektrofotometrické,

elektrochemické nebo hmotnostně spektrometrické detekce – v posledním případě je nutné použít těkavé složky základního elektrolytu, například octan nebo mravenčan amonný. Absorpční spektrofotometrická detekce se vzhledem k absorpčním vlastnostem indolového cyklu ve struktuře tryptofanu, serotoninu a melatoninu provádí v UV oblasti při vlnové délce záření okolo 220 nm. Předúprava biologických vzorků kromě kroků homogenizace, sonifikace, rozpouštění a promíchání materiálu často potřebuje vhodnou extrakční techniku, buď jednoduchou extrakci organickou fází, nebo prekoncentraci na pevné fázi. Doby elektroforetických analýz tryptofanu, serotoninu a melatoninu se pohybují v rozmezí několika minut [4], [14], [17]–[23], [26], [27].

Vzhledem k tak velkému počtu možností využití elektroforetických technik bylo rozhodnuto věnovat se vývoji metody stanovení tryptofanu, serotoninu a melatoninu v rostlinném materiálu právě v oblasti kapilární elektroforézy, hlavně pro její rychlost a experimentální nenáročnost.

1.3 Kapilární elektroforéza

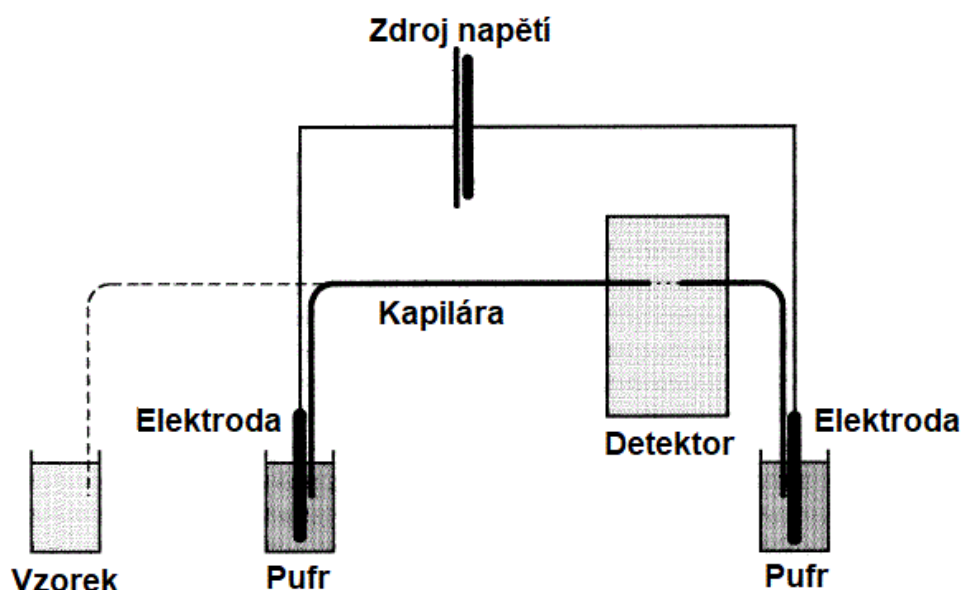
1.3.1 Přístrojové uspořádání CE

Kapilární elektroforéza neboli CE je separační analytickou metodou, jejíž separační princip je založen na využití rozdílného chování nabitých částic a jimi tvořených zón v roztoku vlivem vloženého elektrického napětí. Separace se provádí v křemenné kapiláře pokryté polyimidem o vnitřním průměru řádu desítek mikrometrů a celkové délce řádu desítek centimetrů [28].

Přístrojové uspořádání typické soustavy CE je znázorněno na *Obr. 2, str. 12*. Základními součástmi jsou dvě elektrody napojené na zdroj napětí, dvě nádoby naplněné roztokem separačního pufru, z nichž jedna je vstupní a druhá výstupní, separační kapilára ústící do obou nádob, detektor umístěný nedaleko výstupního konce kapiláry, a také nádobka se vzorkem, který se na začátku analýzy dávkuje do vstupního konce kapiláry [29].

Polyimidové pokrytí se zpravidla odstraňuje z kapiláry v malé oblasti, kde je umístěn detektor, hlavně v případě použití optické detekce – na kapiláře se vytvoří takzvané detekční okénko [28]. Velmi důležitou součástí CE přístroje je také termostatický systém, protože kapilární zónová elektroforéza je velmi citlivá na výchylinky teploty. Kapilára se zahřívá i během vlastní separace vznikem takzvaného Joulova tepla

způsobeného proudem, protože hodnoty napětí používané v CE jsou značně velké, až do desítek kilovoltů [29].



Obr. 2. Schéma přístroje CE. Kapilára ústí do dvou nádob se separačním pufrem, na něž je pomocí elektrod vkládáno napětí. Detektor je připojen na detekční okénko na kapiláře umístěné u výstupního konce, vzorek se dávkuje do jejího vstupního konce. Převzato z [28] a upraveno.

Vnitřní objem kapiláry je vzhledem k jejímu průměru velmi malý, takže se optimální objem dávkovaného vzorku pohybuje v rozmezí desítek nanolitů [28]. Dávkování vzorku do kapiláry proto je zásadním krokem CE analýzy a může být provedeno několika způsoby.

Hydrodynamický způsob dávkování je založen na pohybu kapaliny vlivem rozdílu tlaku na koncích kapiláry. V praxi se toho docílí buď za využití gravitace umístěním konců kapiláry v různých výškách od povrchu země, nebo vytvořením tlakového rozdílu uměle přímo v přístroji [30].

Elektrokinetický způsob dávkování je založen na vložení napětí mezi nádobku se vzorkem, do níž je ponořen vstupní konec kapiláry, a nádobku se základním elektrolytem, do níž je ponořen konec výstupní. Elektrokinetické dávkování tím pádem využívá chování jednotlivých molekul v elektrickém poli, které není stejné pro všechny látky, takže tento způsob často neumožňuje reprezentativní dávkování vzorku [30].

Konvenčním uspořádáním kapiláry v CE je umístění anody u jejího vstupního a katody u výstupního konce z důvodu využití fyzikálních jevů, které se odehrávají během separace [28].

1.3.2 Teoretické aspekty CE

Jak v elektrokinetickém dávkování, tak během vlastní separace se v kapilární elektroforéze využívá takzvané *elektroforetické mobility* jednotlivých látek. Označuje se většinou řeckým písmenem μ s různými indexy a je veličinou popisující chování iontu v elektrickém poli. Elektroforetická mobilita μ [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] je obecně definována jako

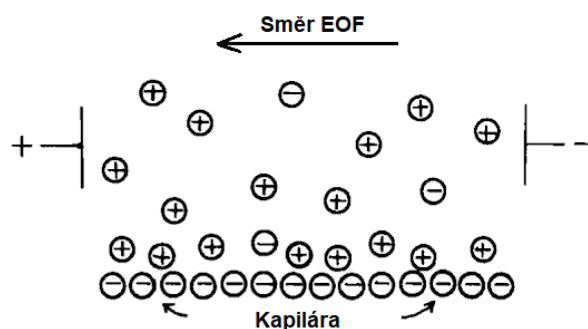
$$\mu = v / E,$$

kde je v [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$] – rychlost pohybu iontu (nebo odpovídající zóny) v kapiláře, E [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$] – intenzita elektrického pole. Jelikož intenzita E odpovídá podílu vloženého napětí U [V] a celkové délky kapiláry L_c [m], a rychlost pohybu podílu vzdálenosti od vstupního konce kapiláry do detektoru L_d [m] a migračního času zóny t_m [s], během něž zóna doputovala do detektoru, mobilitu lze vyjádřit jako

$$\mu = (L_d / t_m) / (U / L_c) = L_d \cdot L_c / (t_m \cdot U),$$

přičemž migrační čas analytu je druhým základním parametrem charakterizace látky v kapilární elektroforéze [31].

Mobilita molekuly je ovlivněna ještě jedním zásadním jevem uvnitř kapiláry. Tento jev se jmenuje *elektroosmotický tok* neboli EOF a je způsoben vlastním materiálem kapiláry: ten obsahuje na povrchu silanolové skupiny Si–OH, které jsou za vyšších hodnot pH deprotonovány [28]. Důsledkem jejich deprotonace je vytvoření záporného náboje na vnitřním povrchu kapiláry, který elektrostaticky přitahuje solvované kationty z roztoku separačního pufru. Po vložení separačního napětí začnou kationty v této vrstvě migrovat směrem ke katodě a vlivem viskozity s sebou strhávají veškerý roztok uvnitř kapiláry [31]. Schematicky je vznik EOF zobrazen na *Obr. 3, str. 14*.



Obr. 3. Elektroosmotický tok v křemenné kapiláře. *Kladně nabitě ionty jsou jednak přitahovány ke stěně kapiláry, jednak migrují ke katodě vlivem separačního napětí. Částice rozpouštědla jsou elektroosmoticky unášeny ke katodě spolu s kationty a veškerým ostatním obsahem kapiláry. Převzato z [31] a upraveno.*

Z toho plyne, že pozorovaná elektroforetická mobilita zóny, která se v tuto chvíli označí jako μ_{poz} , se skládá z dvou příspěvků, a to z vlastní, takzvané efektivní mobility dané molekulou μ_{eff} a mobility způsobené elektroosmotickým tokem μ_{eof} , neboli

$$\mu_{poz} = \mu_{eof} + \mu_{eff} [29].$$

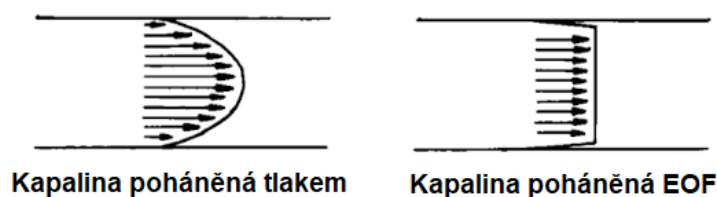
Jelikož efektivní mobilita závisí na vlastní částici a je parametrem spojeným s jejími fyzikálními vlastnostmi, v případě konvenčního uspořádání kapiláry s anodou u vstupního a katodou u výstupního konce mají kationty efektivní mobilitu kladnou, anionty zápornou a nenabitě látky nulovou, a proto migrují pouze vlivem elektroosmotického toku všechny v jedné zóně [31].

Velikost příspěvku EOF je za běžných podmínek elektroforézy větší, proto i anionty jsou ve výsledku unášeny ke katodě, i když dávkování vzorku se provádí zpravidla do konce kapiláry, který je bližší k anodě. Rychlost EOF je možné různě upravovat nebo úplně potlačit, hlavně volbou pH, zvětšením iontové síly nebo viskozity roztoku v kapiláře, a také přidáním látek, které se mohou reverzibilně nebo kovalentně navázat na její vnitřní povrch, například polyakrylamidu, polyethylenglykolu, polyvinylalkoholu a jiných. Existuje možnost i zcela obrátit směr EOF sorpcí kationogenních činidel na povrch kapiláry [28].

Hodnotu μ_{eof} lze změřit pomocí nadávkování takzvaného markeru EOF, což je modelová neutrální látka, jejíž efektivní mobilita μ_{eff} je za daných podmínek nulová. Jako

marker EOF se může použít například dimethylformamid, dimethylsulfoxid [29] a thiomocovina.

Důležitou a zajímavou vlastností elektroosmotického toku je jím tvořený profil proudu kapaliny v kapiláře, který je téměř plochý na rozdíl od parabolického profilu kapaliny poháněné tlakem. Plochý profil proudu mnohem méně přispívá k rozšíření separovaných zón, a proto zajišťuje lepší účinnost separace [28], [31]. Profily proudu toku kapaliny jsou zobrazeny na *Obr. 4*.



Obr. 4. Parabolický a plochý profil proudění kapaliny v kapiláře. Parabolický profil je typický pro chromatografii, kde se využívá tlakových pump. Převzato z [31] a upraveno.

1.3.3 Separační pufrů v CE

Separace v CE se odehrává v roztoku základního elektrolytu neboli BGE. Pufrační schopnost BGE je základní podmínkou, protože stabilita pH v kapiláře je nezbytná pro zachování stabilního elektroosmotického toku, a spolu s ním mobilita a migračních časů analytů [28]. Nejběžnějšími BGE jsou jednoduché anorganické pufrů, jako je pufr fosfátový a pufr tetraboritanový, mohou se použít také pufrů na základě organických kyselin: citronové, mravenčí, jantarové, nebo organických bází: tris(hydroxymethyl)aminomethanu, imidazolu a morfolinu [30].

Důležitou podmínkou volby BGE je také to, že jeho přítomnost by neměla vadit použitému způsobu detekce. Vzhledem k tomu, že se v CE nejčastěji používá absorpční spektrofotometrická detekce, BGE by neměl vykazovat vysokou absorpenci při pracovní vlnové délce [30]. Dalším parametrem určujícím volbu BGE je jeho koncentrace: týká se to hlavně anorganických pufrů, protože velké koncentrace solí nejsou doporučeny v kapilární elektroforéze kvůli zvětšení vodivosti a následně proudu a teploty v kapiláře. Mobilita analytů je ovlivněna také viskozitou prostředí BGE [28].

1.3.4 Detekce v CE

Detekce v kapilární elektroforéze je představena několika typy detektorů. Nejpoužívanějším je absorpční spektrofotometrický detektor, který se instaluje na detekční okénko kapiláry. Kromě něj existuje možnost použít v CE fluorescenční spektrofotometrické, elektrochemické vodivostní a hmotnostně spektrometrické detekce [32].

Absorpční spektrofotometrická detekce jako taková je založena na interakci molekul analytu s elektromagnetickým zářením viditelné a ultrafialové oblasti, když dochází k pohlcení tohoto záření určitými částmi daných molekul [33]. První základní veličinou absorpční spektrofotometrie je *transmittance* definovaná jako

$$T = P / P_0,$$

kde je P [W] – intenzita paprsku záření prošlého prostředím a P_0 [W] – intenzita paprsku záření před průnikem do prostředí [34]. Jinými slovy, *transmittance* představuje podíl záření, které nebylo prostředím absorbováno. Další veličinou je *absorbance* definovaná jako

$$A = -\log T,$$

takže jako záporný dekadický logaritmus *transmittance* [34], a matematicky vázaná s koncentrací absorbující látky přes Lambertův-Beerův zákon

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot L \cdot c,$$

kde je ε_λ [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] – molární absorpční koeficient pro danou látku při dané vlnové délce záření λ , L [cm] – optická dráha záření uvnitř prostředí, c [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] – koncentrace absorbující látky [28].

V kapilární elektroforéze je možné použít vlnové délky v ultrafialové oblasti nad 200 nm a přes celé viditelné spektrum díky transparentním vlastnostem křemenné stěny kapiláry, což umožňuje detekovat velké množství nejrůznějších molekul. Konstrukčně se to většinou řeší tak, že se detektor napojí na detekční okénko na kapiláru, a paprsek záření je ke kapiláru veden v kolmém směru. Nevýhodou takového umístění je krátká optická

dráha rovná průměru separační kapiláry, což následně snižuje hodnotu měřené absorpce a tím omezuje citlivost detekce [32]. Zvětšení optické dráhy je možné docílit například vysláním paprsku záření podél osy kapiláry, přes bublinovou komoru nebo přes celou mající tvar písmena „Z“ [28].

Pro látky, které nevykazují značnou absorpční vlnovky v rozsahu použitelných vlnových délek absorpčního spektrofotometru, existuje v CE možnost nepřímé spektrofotometrické detekce přidáním látky dobře absorbující při dané vlnové délce do základního elektrolytu, což má za následek vznik záporných píků analytů při průchodu odpovídajících zón detekčním okénkem [32].

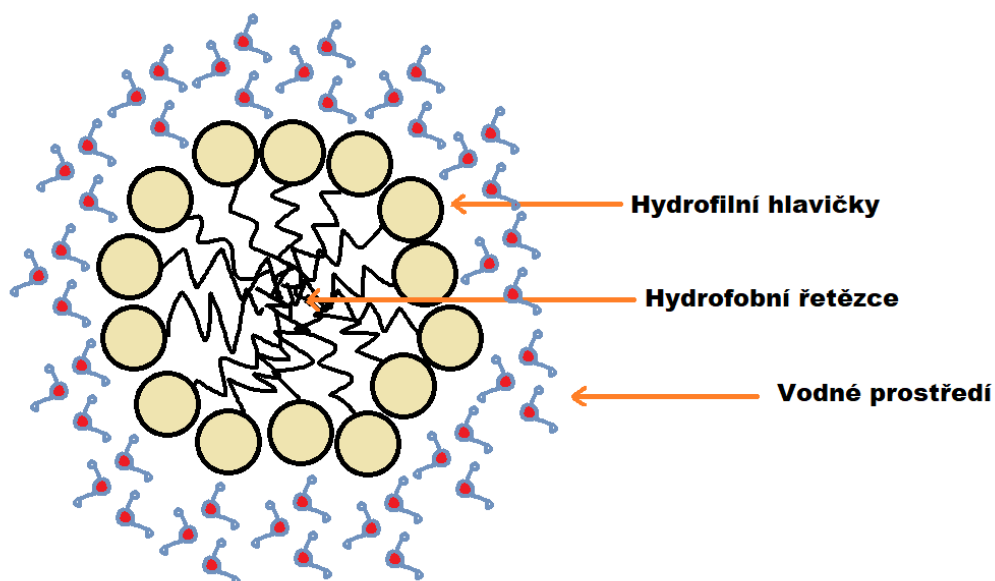
Stanovované analyty v rámci této práce mají vhodné absorpční vlastnosti a jsou běžně detekovány v ultrafialové oblasti při vlnových délkách blízko 200 nm [4], [14], [17], [19], [21], [26], [27]. Snižená schopnost ionizace melatoninu je však méně vhodná pro stanovení pomocí konvenční kapilární zónové elektroforézy, proto bylo pro vlastní separaci zvoleno použití modifikované elektroforetické techniky známé jako micelární elektrokinetická chromatografie.

1.4 Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie neboli MEKC je instrumentální analytická separační metoda, která se nachází na pomezí chromatografických a kapilárních elektroforetických technik. Stejně jako v kapilární elektroforéze, separace v MEKC se odehrává v křemenné kapiláře naplněné roztokem elektrolytu vlivem vysokého napětí, které separuje látky podle jejich rozdílné mobility. Hlavní odlišností MEKC je však přítomnost určité koncentrace detergentní látky v základním elektrolytu schopné tvořit v separačním prostoru micelární systém, který lze považovat za obdobu chromatografické stacionární fáze [35]. Tento systém se v MEKC jmenuje pseudostacionární fáze a díky fyzikálním vlastnostem micel detergentu v prostředí vodného pufru dokáže určitým způsobem přispívat k separaci analytů, jejichž mobilita za podmínek konvenční kapilární elektroforézy neposkytuje účinnou separaci [36].

Princip separace analytů za spoluúčasti micelárního systému detergentu spočívá v rozdílné distribuci molekul analytu mezi vodné prostředí separačního pufru a hydrofobní vnitřní prostředí micel [37]. Micely jako takové jsou nadmolekulárními útvary [38], které vznikají po přesažení určité koncentrace detergentu v roztoku tím, že

se jeho molekuly shlukují do agregátů, v nichž jsou uspořádány hydrofobními částmi dovnitř a hydrofilními ven [36]. Schematicky je micela znázorněna na *Obr. 5*.



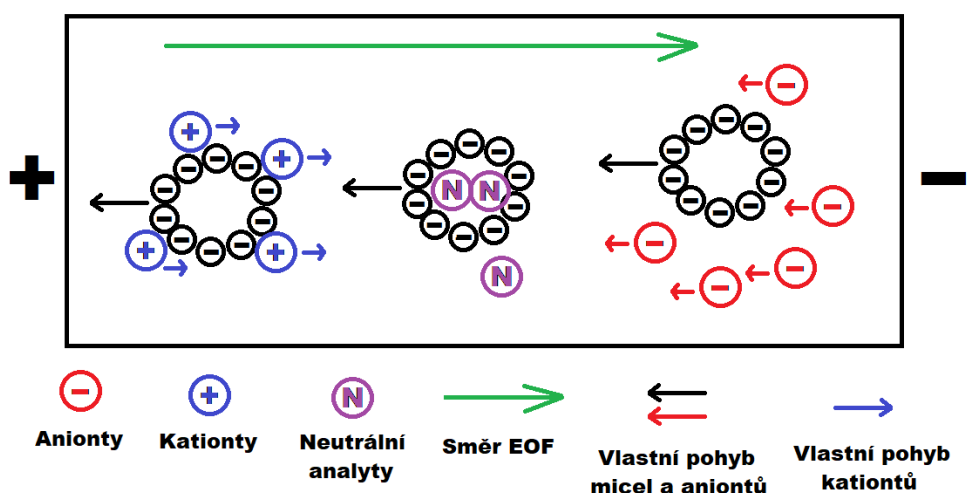
Obr. 5. Micela

Koncentrace, při níž začíná detergent tvořit micely v roztoku, se jmenuje kritická micelární koncentrace neboli CMC [38]. Vzniklé micely mohou v závislosti na typu detergentu mít na povrchu kladný či záporný náboj, nebo zůstat nenabitě, ale jejich vnitřní prostředí je pokaždé nepolární, proto se během MEKC separace uplatňuje mechanismus obdobný jako u chromatografie s obrácenými fázemi, což umožňuje ovlivnit migrační chování neutrálních analytů [36].

Nejčastěji používaným detergentem v MEKC je dodecylsírán sodný neboli SDS [39], jehož hodnota kritické micelární koncentrace činí $8,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ [40]. Jedná se o anionogenní látku, takže micely SDS mají záporně nabitý povrch a v kapiláře migrují směrem k anodě proti směru pohybu elektroosmotického toku, a v případě, že EOF není potlačen, díky jeho větší rychlosti zjevná elektroforetická pohyblivost micel stejně jako všech ostatních aniontů v kapilární elektroforéze je kladná, což znamená, že jsou micely elektroosmotickým tokem unášeny ke katodě bez ohledu na náboj povrchu [36].

Přesto jsou micely zpožděny oproti EOF. Mezi jejich vnitřním prostředím a vnějším vodným pufrům se pro každý neutrální analyt ustavuje určitá rovnováha, podle níž jedna z frakcí analytu proniká do micel, zatímco druhá zůstává v roztoku. Každá látka

v závislosti na fyzikálních vlastnostech interaguje s micelami vlastní cestou, proto poměr frakcí a zpožďovací efekt je pro každou látku jiný, čímž dochází k separaci jednotlivých neutrálních analytů, které by za podmínek kapilární elektroforézy bez micelárního systému migrovaly všechny spolu vlivem pouze EOF [28]. Přítomnost micel SDS ovlivňuje i migraci nabitých analytů, protože dochází k elektrostatickým interakcím. Kationtové analyty, i když nejsou dostatečně hydrofobní, aby pronikly dovnitř micel, jsou přitahovány k jejich záporně nabitému povrchu, čímž jsou také zpomalovány, zatímco aniontové analyty jsou od micel odpuzovány [40]. Celá situace v separační kapiláře za přítomnosti micelárního systému SDS je znázorněna na Obr. 6.



Obr. 6. Interakce jednotlivých typů analytů s micelárním systémem SDS uvnitř separační kapiláry. Aniontové analyty buď nejsou ovlivněny micelami, nebo jejich vzájemné odpuzování vede až ke zvýšení zjevné pohyblivosti aniontů. Neutrální látky pronikají dovnitř micel za ustavení rovnováhy mezi frakcí uvnitř a frakcí venku, což odlišuje jejich pohyblivost od pohyblivosti EOF. Kationtové analyty interagují s povrchem micel, proto jsou zpomaleny oproti své normální elektroforetické pohyblivosti.

Čím větší frakce neutrální látky proniká do micely, tím výraznější je rozdíl elektroforetické pohyblivosti a migračního času dané látky a pohyblivosti a času EOF. Migrační čas látky, která je zcela inkorporována do micel, je možné považovat za migrační čas micel, zatímco migrační čas látky, která do micel neproniká, přestože je neutrální, za migrační čas EOF. Rozdíl mezi těmito časy se může označovat jako okno

migračního času [36]. Jako markery okna migračního času lze například použít methanol, který prakticky neinteraguje s micelami, a barvivo Sudan III, které naopak nemá téměř žádnou volnou frakci vně micel [41].

Kromě SDS existují i další detergenty použitelné v MEKC. Vhodný detergent by měl být dobře rozpustný v základním elektrolytu, vytvářet stabilní micelární systém a nevykazovat značnou absorpenci v případě UV detekce, která je běžná u kapilárních elektroforetických technik. Roztok detergentu by měl také mít nízkou viskozitu [40]. Dalšími rozšířeními, i když méně než SDS, detergenty pro účely MEKC jsou anionogenní soli žlučových kyselin, kationogenní cetyltrimethylammoniumbromid neboli CTAB a neionogenní detergent Tween [39].

MEKC se díky svým výjimečným vlastnostem aplikuje v nejrůznějších oblastech analytické chemie, hlavně ve farmaceutické analýze, a to například k analýze různých druhů antibiotik a dalších farmaceutik [40]. Také může být MEKC použita v analýze životního prostředí, například ke stanovení nenabitých pesticidů [42], nebo v biologických analýzách ke stanovení nejrůznějších přírodních látek a metabolitů, například terpenů a alkoholů v rostlinách [43] nebo indolů v živočišných [14], lidských [19] a rostlinných [4] vzorcích. Poslední možnost rozhodla pro využití MEKC k řešení úkolů této práce.

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Tetraboritan sodný p. a., kyselina boritá krystalická čistá (Lachema, ČR), hydroxid sodný 1 mol·l⁻¹ (Agilent Technologies, Německo), dodecylsírán sodný 98%, tryptofan 98%, serotonin 98%, melatonin 97%, thiomocovina 99% (Sigma Aldrich, USA), kyselina chlorovodíková 35%, ethanol 96%, methanol p.a. (Lachner, ČR), kyselina mravenčí 98-100% (Merck, Německo), kalibrační pufr pro pH-metr o pH 4,0 a 7,0 (Honeywell Fluka, USA), deionizovaná voda připravená systémem Premier MFG'D Systems (USA).

2.2 Přístrojové vybavení

Kapilární elektroforéza CE 1600 s detektorem s diodovým polem (Agilent Technologies, Německo), nepokrytá křemenná kapilára o celkové délce 50,0 cm, efektivní délce 41,5 cm a vnitřním průměru 75 µm (Polymicro Technologies, USA), analytické váhy 262 SMA-FR (Precisa, Švýcarsko), ultrazvuková lázeň Elmasonic S15 (Elma, Německo), třepačka Vibramax 100 (Heidolph, Německo), centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Německo), odpařovací centrifuga miVac DNA concentrator (Genevac, Velká Británie), pH-metr 3540 pH & Conductivity Meter (Jenway, Velká Británie).

2.3 Pracovní podmínky CE

Měření byla prováděna za trvale udržované teploty 25 °C. Na začátku laboratorního dne byla kapilára promývána 2 až 5 min 1M roztokem hydroxidu sodného, poté 2 až 5 min deionizovanou vodou. Před každou separací byla kapilára vždy promývána základním elektrolytem 1 min do výstupní nádoby s odpadem a poté ještě 1 min do výstupní nádoby naplněné základním elektrolytem. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 5 kPa po dobu 3 s. Separační napětí činilo 30 kV a bylo vkládáno lineárně během 0,1 min po nadávkování vzorku. Absorpční spektrofotometrická detekce byla prováděna při vlnové délce záření 214 nm. Po skončení práce byla kapilára promývána 2 min deionizovanou vodou, poté 2 min 1M roztokem hydroxidu sodného, poté ještě 1 min deionizovanou vodou a byla uchovávána naplněná deionizovanou vodou do dalšího laboratorního dne.

2.4 Příprava roztoků

2.4.1 Příprava základního elektrolytu

Základním elektrolytem byl 10 mM roztok tetraboritanu sodného [4] s různými přísadkami dodecylsíranu sodného, aby jeho koncentrace činila $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Také bylo upravováno pH připravovaných roztoků na hodnotu 8,60; 9,10 a 9,60.

Před přípravou vlastních roztoků byla připravena 0,5M kyselina boritá v deionizované vodě odvážením přesného množství tuhé krystalické látky na analytických vahách s přesností na 0,1 mg. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky, doplněna deionizovanou vodou po rysku a důkladně promíchána až do úplného rozpuštění všech krystalů.

Na začátku každého laboratorního dne, když bylo plánováno měření pH, byl pomocí příslušných kalibračních pufrů kalibrován pH-metr.

Vlastní 10 mM roztok tetraboritanu sodného byl připravován z tuhé krystalické látky odvážením přesného množství na analytických vahách s přesností na 0,1 mg. Navážka byla kvantitativně převáděna do kádinky a doplňována malým množstvím deionizované vody. Po rozpuštění tetraboritanu bylo na pH-metru měřeno pH vzniklého roztoku, následně byl roztok titrován 1M hydroxidem sodným nebo 0,5M kyselinou boritou do ustavení požadované hodnoty pH. Po úpravě pH bylo na analytických vahách odvažováno přesné množství tuhé krystalické dodecylsíranu sodného a kvantitativně převáděno do odměrné baňky spolu s předpřipraveným roztokem tetraboritanu sodného. Poté byl obsah odměrné baňky doplňován deionizovanou vodou po rysku a promícháván do rozpuštění všech pevných částic.

2.4.2 Příprava roztoků standardů analyzovaných látek

Standardní roztoky tryptofanu, serotoninu a melatoninu vždy o koncentraci $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly připravovány z tuhých krystalických látek odvážením přesného množství na analytických vahách s přesností na 0,1 mg. Navážky byly kvantitativně převáděny do odměrných baněk a doplňovány po rysku deionizovanou vodou.

Melatonin byl z důvodu nižší rozpustnosti ve vodě na začátku přímo v odměrné baňce rozpuštěn v malém přísadku 96% ethanolu, pak byla baňka doplněna vodou.

2.4.3 Příprava pomocného roztoku thiomochoviny

Roztok thiomochoviny byl použit pro zjištění účinnosti separace neutrálních látek micelárním systémem. Přesná koncentrace daného roztoku nebyla podstatná, šlo jenom o koncentraci dostatečnou pro zajištění výrazného píku na elektroferogramu.

K vlastní přípravě bylo odváženo 10 mg tuhé krystalické thiomochoviny, navážka byla převedena do kádinky, rozpuštěna v 10 ml deionizované vody, a vzniklý roztok byl důkladně promíchán.

2.5 Pokusy se standardy

2.5.1 Určení migračního pořadí

K určení migračního pořadí byla připravena elektroforetická plastová nádobka naplněná 300 μl základního elektrolytu, do níž bylo postupně přidáváno vždy 50 μl standardního roztoku tryptofanu, serotoninu a melatoninu o koncentraci 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a také pomocného roztoku thiomochoviny o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po každém přidavku bylo spuštěno měření, a nově objevený pík byl přiřazen nově přidané látce.

2.5.2 Optimalizace pH základního elektrolytu a koncentrace SDS v něm

Byly vyzkoušeny základní elektrolyty o koncentraci SDS 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ při hodnotě pH 9,10; 8,60 a 9,60.

Při výměně základního elektrolytu byla kapilára vždy znovu promývána hydroxidem sodným, deionizovanou vodou a příslušným základním elektrolytem podle schématu uvedeného v kapitole 2.3.

Pokaždé bylo do plastové elektroforetické nádobky pipetováno 50 μl všech standardních roztoků analytů o koncentraci 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pomocného roztoku thiomochoviny o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 300 μl příslušného základního elektrolytu o dané koncentraci SDS a hodnotě pH. Měření bylo ukončeno buď po zaznamenání všech čtyř očekávaných píků, nebo po cca 10 minutách od začátku analýzy.

2.5.3 Zkoumání vlivu matrice vzorku

Bylo vyzkoušeno dávkování standardů v prostředí deionizované vody a 8,2 mM kyseliny chlorovodíkové [44] jako rozpouštědla místo základního elektrolytu, a také v již optimalizovaném BGE pro srovnání.

Vždy 50 μl všech standardních roztoků stanovovaných analytů a pomocného roztoku thiomocoviny bylo pipetováno do plastových elektroforetických nádobek spolu s 300 μl zkoumané matrice. Měření bylo prováděno v již optimalizovaném BGE do zaznamenání všech čtyř očekávaných píků.

2.6 Extrakce analytů z rostlinného materiálu

2.6.1 Extrakce bez odpaření extrakčního činidla

V této řadě extrakcí byla jako extrakční činidlo vyzkoušena 8,2 mM kyselina chlorovodíková [44] a 50% (v/v) roztok methanolu v deionizované vodě. Výsledné extrakty byly dávkovány přímo po ukončení extrakce bez odpaření použitého rozpouštědla.

Lyofilizované listy byly rozetřeny v třecí misce na jemný prášek. V plastové centrifugační mikrozkušavce bylo odváženo 100 mg prášku, následně k němu byl přidán 1 ml příslušného extrakčního činidla. Uzavřená zkumavka byla ponechána v ultrazvukové lázni po dobu 10 min, poté přenesena na laboratorní třepačku a ponechána třepat dalších cca 10 min při cca 1000 otáčkách za minutu. Po třepání byla zkumavka umístěna v centrifuze a ponechána centrifugovat 7 min při 14500 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a zfiltrován přes filtrační zkumavku, a 40 μl filtrátu bylo odebráno do plastové elektroforetické nádoby, ze které byl vzorek dávkován do kapiláry.

Po změření vlastního extraktu a získání příslušného elektroferogramu byly do měřeného filtrátu přidávány vždy 4 μl standardního roztoku tryptofanu, melatoninu a serotoninu o koncentraci 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro zjištění polohy píků jednotlivých analytů, a měření bylo spuštěno podruhé.

2.6.2 Extrakce s odpařením extrakčního činidla

V této řadě extrakcí byl jako extrakční činidlo vyzkoušen 5% (v/v) roztok kyseliny mravenčí v methanolu a 100% methanol. Extrakční činidlo bylo po extrakci odpařováno a suchý zbytek byl rozpouštěn v základním elektrolytu, po čemž bylo puštěno měření.

Začátek postupu extrakce byl stejný jako v kapitole 2.6.1. Po centrifugaci však byl supernatant odebrán do čisté plastové mikrozkušavky a přenesen na odpařovací centrifugu, kde byl odpařován do úplného vysušení za vakua při teplotě cca 35 $^{\circ}\text{C}$ po

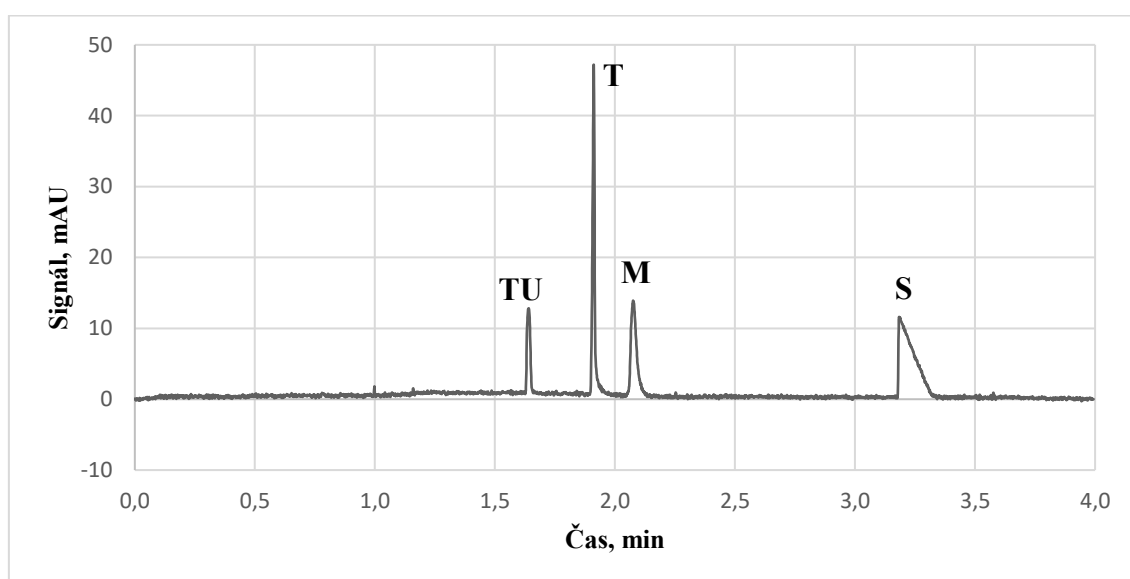
dobu přibližně 40 min. Do suchého zbytku v mikrozkušavce byl přidán 1 ml základního elektrolytu, následně byla uzavřená zkumavka ponechána v ultrazvukové lázni po dobu 10 min a na třepačce při cca 1000 otáčkách za minutu po dobu 10 min, poté byla zkumavka centrifugována při 14500 otáčkách za minutu po dobu 5 min. Supernatant byl odebrán a zfiltrován přes filtrační zkumavku, 40 μl filtrátu bylo odebráno do elektroforetické nádoby a následně dávkováno k analýze.

Po změření vlastního extraktu a získání elektroferogramu bylo do měřeného filtrátu přidáváno vždy 8 μl standardního roztoku stanovovaných analytů o koncentraci 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro zjištění polohy jejich píků, a měření se opakovalo.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Určení migračního pořadí analytů

Separace modelové směsi standardů tryptofanu, melatoninu a serotoninu s přídavkem thiomocoviny byla provedena podle kapitoly 2.5.2. za pracovních podmínek uvedených v kapitole 2.3. Základním elektrolytem byl 10 mM tetraboritanový pufr o pH 9,10 [4], zvolená počáteční koncentrace SDS v základním elektrolytu byla $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Časové trvání analýzy bylo nastaveno na 4 minuty, tento čas byl zcela postačující. Proud v systému byl cca $30 \text{ }\mu\text{A}$. Výsledný elektroferogram obsahující píky všech tří stanovovaných analytů a také pík thiomocoviny je ukázán na Obr. 7.



Obr. 7. Migrační pořadí stanovovaných analytů a thiomocoviny. Písmeny TU je označen pík thiomocoviny, T – tryptofanu, M – melatoninu, S – serotoninu. Separace probíhala v 10 mM tetraboritanovém pufru o pH 9,10 a koncentraci SDS $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ při napětí 30 kV. Absorpční spektrofotometrická detekce byla prováděna při vlnové délce záření 214 nm, koncentrace thiomocoviny činila $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a tryptofanu, serotoninu a melatoninu $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Separace proběhla úspěšně. Všechny píky jsou dobře oddělené až na základní linii, hodnota rozlišení mezi píky thiomocoviny a tryptofanu činí 5,3; tryptofanu a melatoninu 2,5 a melatoninu a serotoninu 11,0. Základní linie je stabilní během celé doby analýzy.

Migrační pořadí je zřejmě dáno jak vlastní migrací analytů, tak jejich interakcí s micelárním systémem. Serotonin má hodnotu $pK_A = 9,8$, z čehož plyne, že by při hodnotě pH 9,10 základního elektrolytu měl být z větší části kladně nabitý a částečně nenabitý, melatonin má $pK_A = 15,8$, měl by tedy být nenabitý, a tryptofan ($pK_{A,1} = 2,4$; $pK_{A,2} = 9,4$) by měl existovat jako směs zwitteriontu a aniontu. Micely anionogenního SDS by měly za zvolených separačních podmínek migrovat směrem k anodě, takže proti směru elektroosmotického toku a pryč od detektoru, proto látky nejintenzivněji interagující s micelami by měly být více zpomalovány a mít větší hodnoty migračního času. Záporně nabitě analyty se svou vlastní migrací v systému pohybují směrem od detektoru, což prodlužuje jejich migrační časy, látky kladně nabitě se pohybují ve směru EOF a tato migrace jejich migrační časy zkracuje.

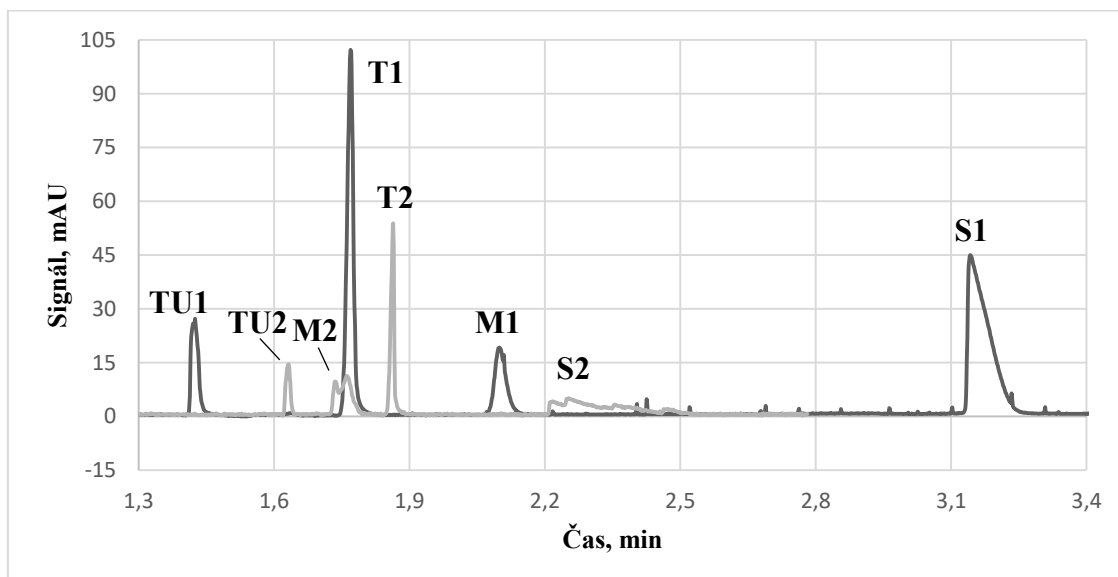
Podle získaného elektroferogramu se dá říct, že serotonin sice má za zvolených podmínek částečně kladný náboj a vykazuje vlastní migraci ke katodě, ale přesto je zpomalován interakcí se záporně nabitými micelami SDS, a proto je opožděn oproti tryptofanu a melatoninu bez ohledu na svou efektivní mobilitu. Melatonin jako neutrální molekula neinteragoval se záporně nabitým povrchem micel, proto není tak značně zadržen, ale přesto mohl pronikat dovnitř do jejich hydrofobního prostředí. Tryptofan přítomný v roztoku jako směs výsledně nenabitého zwitteriontu a aniontu mohl být jak odpuzován od povrchu micel, tak pronikat dovnitř, protože má hydrofobní aromatický kruh, jeho interakce s micelami však byla zřejmě slabší než v případě melatoninu a serotoninu, protože i přes svůj částečný záporný náboj měl tryptofan nejkratší migrační čas.

Tvar píku thiomocoviny je téměř zcela symetrický, analyty ale mají píky nesymetrické. Pík tryptofanu je velmi intenzivní a relativně málo nesymetrický v sestupné části. K tomu mohlo dojít například v důsledku sorpce tryptofanu na povrch kapiláry. I přesto je pík tryptofanu zcela vyhovující cíli práce, proto další úpravy jeho tvaru prováděny nebyly. Pík melatoninu je také dostatečně symetrický, i když má menší intenzitu. Migrační časy tryptofanu a melatoninu jsou poměrně blízké, zatímco pík serotoninu je oproti nim značně opožděn. Pík serotoninu má relativně nízkou intenzitu a velmi nesymetrický tvar trojúhelníkového typu, což se běžně pozoruje u píků ovlivněných elektrodisperzí. Pro odstranění elektrodisperze by bylo dobré zkusit například snížit koncentraci serotoninu nebo zvolit základní elektrolyt s jinou mobilitou kationtů, ale vzhledem k cíli práce a nemožnosti odhadnout odpověď micelárního systému a účinnosti

separace ostatních analytů na případné změny v BGE byl tvar píku serotoninu prohlášen za vyhovující, a další úpravy se neprováděly.

3.2 Optimalizace koncentrace SDS v základním elektrolytu

Pro zjištění vlivu koncentrace SDS na separaci tryptofanu, melatoninu serotoninu a thiomocoviny byla následně modelová směs standardů separována v 10 mM tetraboritanovém pufru o hodnotě pH 9,10 a koncentraci SDS $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, takže dvakrát menší a dvakrát větší než při určení migračního pořadí v kapitole 3.1. Ostatní pracovní podmínky se neměnily, analýza trvala do zaznamenání všech čtyř očekávaných píků. Dva výsledné elektroferogramy jsou ukázány na Obr. 8.



Obr. 8. Elektroferogramy separace tryptofanu, melatoninu, serotoninu a thiomocoviny při koncentraci SDS v základním elektrolytu $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Světlejší čarou je proložen signál měření při koncentraci SDS $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, tmavší čarou signál při koncentraci $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ostatní podmínky separace jsou stejné jako u Obr. 7. Písmeny TU je označen pík thiomocoviny, T – tryptofanu, M – melatoninu, S – serotoninu.

Koncentrace $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ je nižší než kritická micelární koncentrace SDS, zatímco $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ je více než dvakrát větší [40]. V důsledku toho lze říct, že v základním elektrolytu s 5 mM SDS micelární systém nevznikl nebo byl zcela nestabilní, což zmenšilo účinnost separace neutrálních látek a ovlivnilo jejich migrační pořadí,

migrační časy, tvar a intenzitu píků a další parametry. Proud při měření v 5 mM SDS nebyl vyšší než 30 μA . V základním elektrolytu s 20 mM SDS byla koncentrace micel vysoká, což na jednu stranu zajistilo účinnou separaci, ale na druhou stranu přispělo k ustavení vysoké hodnoty proudu až cca 85 μA . Základní linie po celou dobu obou měření zůstala stabilní, píky v obou případech jsou dostatečně dobře rozlišeny mezi sebou.

Separace provedená při 5 mM koncentraci SDS a znázorněná na *Obr. 8, str. 28* světlejší čarou poskytla všechny čtyři očekávané píky. Pík T2 byl přiřazen tryptofanu podle typicky větší intenzity a migračního času, který je zhruba stejný jako čas při separaci v 10 mM SDS. To je v souladu i s předpokladem, že částečně záporně nabitý tryptofan interaguje s micelami velmi slabě, proto jeho migrační čas není značně ovlivněn stavem micelárního systému, ale především jeho vlastní migrací. Pík T2 má vyhovující tvar, i když je mírně nesymetrický v sestupné části.

Pík TU2 patří podle migračního času a tvaru thiomocovinně a je symetrický, zatímco pík M2 patří zřejmě melatoninu. Pík M2 má kratší migrační čas a jiné migrační pořadí, než měl melatonin při separaci v 10 mM SDS, a také má značně zhoršený tvar, což se projevilo tím, že se u píku objevily dva vrcholy. Je pravděpodobné, že k tomu došlo v důsledku menší rozpustnosti melatoninu ve vodném prostředí separačního pufru, v němž při koncentraci SDS 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ není dostatečný micelární systém, který by přispěl k solubilizaci celé zóny melatoninu jako v případě 10 mM SDS. To se projevilo dvěma vrcholy píku jedné zóny. Zkrácení migračního času melatoninu je zřejmě způsobeno nízkou koncentrací SDS, protože nepřítomnost stabilních micel v roztoku neumožnila průnik melatoninu do jejich vnitřního hydrofobního prostředí, a proto micelární systém nepřispěl k zpomalování zóny tohoto analytu jako v případě 10 mM SDS.

Pík S2 patří serotoninu a rozhodně nemá vyhovující tvar, má několik vrcholů a je velmi rozšířen po ose času. Jelikož při separaci v 10 mM SDS bylo prokázáno, že serotonin velmi intenzivně interaguje s micelami, a proto je značně zadržován a zpoždován, je možné říct, že k zhoršení tvaru píku přispěla nedostatečná koncentrace SDS v základním elektrolytu. Migrační čas serotoninu je značně zkrácen stejně jako v případě melatoninu, což opět ukazuje na velký vliv micelárního systému na chování serotoninu během separace. Vzhledem k tomu, že migrační čas serotoninu je stále nejdelší ze všech analytů, dochází i zde k jeho interakcím s anionty SDS, kvůli nepřítomnosti

micel však tato interakce způsobuje výrazně menší zpoždování serotoninu za EOF, než systému s micelami.

Při separaci směsi analytů a thiomocoviny v základním elektrolytu s 20 mM SDS, která je označena na *Obr. 8, str. 28* tmavší čarou, byly opět detekovány všechny čtyři píky. Pouze pík thiomocoviny TU1 migroval mírně rychleji než v 10 mM SDS, píky tryptofanu T1, melatoninu M1 a serotoninu S1 migrovaly v očekávaných migračních časech blízkých migračním časům zjištěným při separaci v 10 mM SDS. Zvýšená koncentrace micel neměla tedy na chování analytů výrazný vliv. Migrační pořadí analytů se proto také nezměnilo, všechny čtyři píky mají očekávané tvary. K zvětšení intenzity všech píků došlo zřejmě v důsledku toho, že tato separace byla provedena v jiné kapiláře než všechny ostatní. Hlavní odlišností separace v 20 mM SDS byla vysoká hodnota proudu až nad 80 μA . Vzhledem k tomu, že chování všech analytů je přibližně stejné jak v 10 mM, tak v 20 mM SDS, vzhledem k vysoké hodnotě proudu je koncentrace SDS 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ méně vhodná.

Jelikož koncentrace SDS 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ neposkytla požadovanou kvalitu separace, a koncentrace 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ji poskytla, ale přesto přispěla k nežádoucímu zvýšení proudu, všechny následné pokusy byly provedeny vždy za použití BGE o koncentraci SDS 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.3 Optimalizace pH základního elektrolytu

Celkem byly provedeny dvě úpravy pH základního elektrolytu, z hodnoty 9,10 na 8,60 a na 9,60. Koncentrace SDS ve všech případech byla 10 mM, postupovalo se podle kapitoly 2.5.2. za pracovních podmínek uvedených v kapitole 2.3. Obě měření trvala cca 4 min. Výsledné elektroferogramy jsou uvedeny na *Obr. 9, str. 32*.

V obou případech separace zachovala stabilní základní linii a poskytla všechny čtyři očekávané píky. Všechny získané píky jsou rozděleny na základní linii nezávisle na podmínkách, hodnoty rozlišení zaznamenané během separace při pH 8,60 a 9,60 jsou uvedeny v *Tab. 1, str. 31* spolu s hodnotami rozlišení separace při pH 9,10 pro srovnání.

Separace znázorněná na *Obr. 9, str. 32* světlejší čarou proběhla při pH 8,60. Migrační pořadí se nezměnilo oproti separaci v BGE o pH 9,10; rozlišení mezi píky tryptofanu T1 a melatoninu M1 se však zvětšilo. Pík serotoninu S1 je také dobře oddělen od ostatních píků, jeho migrační čas je očekávaně dlouhý. Pík T1 má výborný tvar a velkou intenzitu, pík M1 má intenzitu očekávaně nižší a je mírně nesymetrický v sestupné

části, což však může být tolerováno. Pík S1 má trojúhelníkový tvar, zřejmě je i v tomto případě ovlivněn elektrodisperzí.

Tab. 1. Rozlišení píků thiomocoviny, tryptofanu, melatoninu a serotoninu při separaci v 10 mM SDS o pH 8,60; 9,10 a 9,60

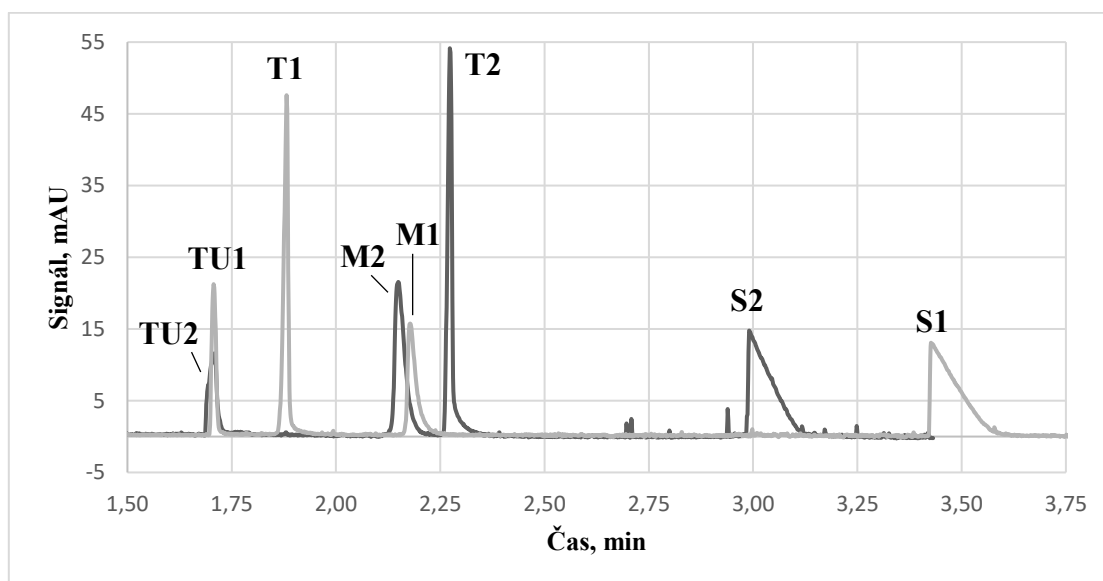
pH 8,60	<i>Píky</i>	TU – T	T – M	M – S
	<i>Rozlišení</i>	4,5	6,4	11,5
pH 9,10	<i>Píky</i>	TU – T	T – M	M – S
	<i>Rozlišení</i>	5,3	2,5	11,0
pH 9,60	<i>Píky</i>	TU – M	M – T	T – S
	<i>Rozlišení</i>	7,7	1,7	9,3

Separace provedená v BGE o pH 9,60 a označená na Obr. 9, str. 32 tmavší čarou také poskytla přijatelné výsledky. Změnilo se migrační pořadí tryptofanu a melatoninu, avšak jejich píky T2 a M2 jsou stále rozlišeny na základní linii, i když hodnota jejich rozlišení je menší než při separaci při pH 8,60 a 9,10. Oba píky T2 a M2 jsou nesymetrické v sestupné části, pravděpodobně opět v důsledku sorpce na povrch kapiláry. Tvar píky serotoninu S2 je očekávaně trojúhelníkový, ale má kratší migrační čas než při separaci při jiných pH.

V obou pokusech nedošlo ke změně migračních časů thiomocoviny a melatoninu, což odpovídá předpokladu, že tyto látky jsou neutrální, a proto jejich migrace není ovlivněna změnou pH prostředí. Naopak, píky tryptofanu T1 a T2 mají výrazně odlišné migrační časy, což ukazuje na značný vliv pH na stupeň ionizace tryptofanu. Podle hodnot $pK_{A,2}$ tryptofanu 9,4 [4] by v BGE o pH 9,60 měla tato látka existovat převážně jako aniont a migrovat k anodě proti směru elektroosmotického toku, což je příčinou zmenšení výsledné mobility a prodloužení migračního času. Píky serotoninu S1 a S2 se také výrazně liší migračním časem, a to lze vysvětlit s ohledem na hodnotu pK_A serotoninu 9,8 [4]: při vyšším pH 9,60 se snižuje podíl kladně nabitých molekul serotoninu, tím se zeslabuje jeho interakce se záporně nabitými micelami, a proto je zdržování a zpoždování serotoninu v tomto případě méně výrazné.

Celkově je možné říct, že obě hodnoty pH BGE jak 8,60, tak 9,60 stejně jako původní pH 9,10 vyhovují cíli práce a poskytují přijatelně účinnou separaci. Avšak vzhledem k větší hodnotě rozlišení mezi píky tryptofanu a melatoninu bylo rozhodnuto pro další aplikace používat BGE o pH 8,60 a koncentraci SDS 10 mM, jak bylo stanoveno

v předcházející kapitole 3.2. Očekávaná hodnota migračního času tryptofanu je v tomto BGE v rozmezí 1,8 až 2,0 min, melatoninu cca 2,2 min a serotoninu okolo 3,5 min.



Obr. 9. Elektroferogramy separace tryptofanu, melatoninu, serotoninu a thiomocoviny v BGE o pH 8,60 a 9,60. Separace při pH 8,60 je znázorněna světlejší čarou, separace při pH 9,60 tmavší. Koncentrace SDS v BGE činila $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ostatní podmínky separace jsou stejné jako u Obr. 7. Písmeny TU jsou označeny píky thiomocoviny, T – tryptofanu, M – melatoninu, S – serotoninu.

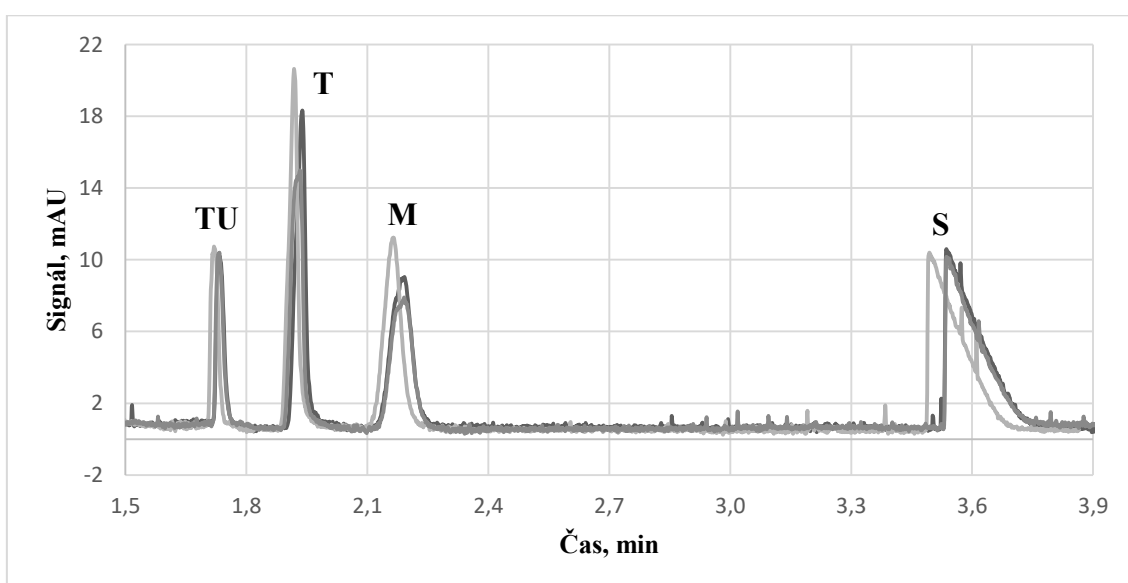
3.4 Zkoumání vlivu matrice vzorku

V této řadě experimentů bylo vyzkoušeno dávkování roztoku tryptofanu, serotoninu, melatoninu a thiomocoviny v rozpouštědlech jiných než základní elektrolyt, a to v destilované vodě a 8,2 mM kyselině chlorovodíkové, která byla v dalších experimentech použita jako extrakční činidlo. Roztoky standardů a thiomocoviny byly připravovány podle kapitoly 2.5.3 za pracovních podmínek uvedených v kapitole 2.3. Jako základní elektrolyt byl použit výše otestovaný 10 mM tetraboritanový pufr o pH 8,60 s přídavkem SDS o koncentraci $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Všechny tři analýzy trvaly 4 min, výsledné elektroferogramy jsou zobrazeny na Obr. 10, str. 33.

Základní linie všech tří měření byly stabilní, separace byla vždy účinná a poskytla všechny čtyři očekávané píky s odpovídajícími migračními časy. Z elektroferogramů je patrné, že jednoduché matrice nemají téměř žádný vliv na separaci

analytů. Migrační pořadí se nezměnilo, migrační časy jsou velmi podobné, i když nejkratší časy poskytla separace směsi v BGE. Také při separaci směsi v BGE mají všechny analyty největší intenzity píků. Nejmenší intenzity poskytla separace v kyselině chlorovodíkové, separace v deionizované vodě je prakticky „průměrná“ mezi dvěma ostatními. Relativní změna intenzit píků je uvedena v *Tab. 2, str. 34*.

Ze získaných výsledků je vidět, že jednoduché matrice neovlivňují výrazně intenzity zkoumaných analytů. Pokles intenzit píků tryptofanu a melatoninu v kyselině chlorovodíkové je menší než o jednu třetinu, což bylo zhodnoceno jako přijatelné, a proto se dále pokračovalo k vývoji extrakční techniky bez omezení extrakčních činidel.



Obr. 10. Elektroferogramy separace standardů tryptofanu, melatoninu, serotoninu a thiomocoviny v různých matricích. Světlejší čarou je proložen signál separace v BGE, středně tmavou čarou signál v 8,2 mM kyselině chlorovodíkové a nejtmaší čarou signál v deionizované vodě. Separace probíhaly v BGE o pH 8,60 a koncentraci SDS $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ostatní podmínky jsou stejné jako u Obr. 7. Písmeny TU jsou označeny píky thiomocoviny, T – tryptofanu, M – melatoninu, S – serotoninu.

Tab. 2. Vliv matrice dávkovaného vzorku na intenzitu píků analytů a thiomocoviny

		TU	T	M	S
BGE	Výška, mAU	10,9	20,6	11,5	10,1
H₂O	Výška, mAU	10,5	18,1	9,0	10,1
	Změna, %	-3,7	-12,1	-21,7	0,0
8,2 mM HCl	Výška, mAU	9,9	14,5	8,0	10,0
	Změna, %	-9,2	-29,6	-30,4	-1,0

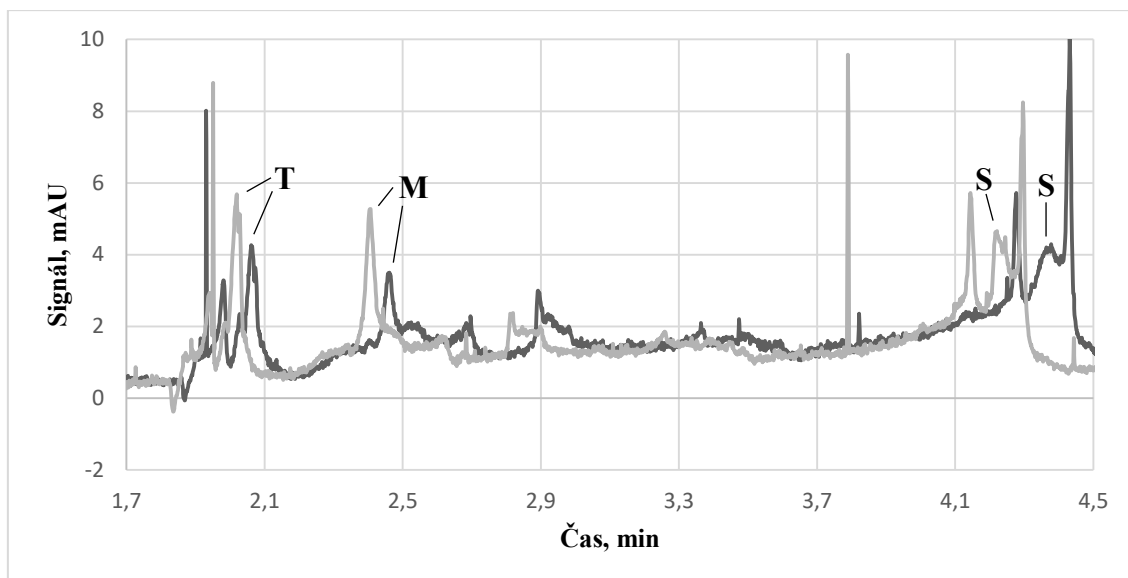
3.5 Extrakce bez odpaření extrakčního činidla

Dvě extrakce byly provedeny podle kapitoly 2.6.1. za neměnných pracovních podmínek z kapitoly 2.3. Použita byla jednak 8,2 mM kyselina chlorovodíková [44] jako anorganické extrakční činidlo a 50% roztok methanolu v deionizované vodě jako činidlo organické. Extrakty byly dávkovány ihned po přípravě bez dalších úprav a odpaření. Bylo provedeno vždy měření připraveného extraktu a následně extraktu s přidavkem roztoků standardů tryptofanu, melatoninu a serotoninu pro zjištění polohy píků stanovovaných analytů na elektroferogramu.

Elektroferogram měření extraktu v 8,2 mM kyselině chlorovodíkové je zobrazen na *Obr. 11, str. 35* spolu s elektroferogramem měření stejného extraktu s přidavky standardních roztoků. Měření trvalo celkem cca 8 min, i když po 4,5 min docházelo pouze k zanedbatelně malým změnám signálu.

Výsledek měření není zcela uspokojivý, zaznamenané píky analytů v čistém extraktu a po přidavku standardů analyzovaných látek nemají vyhovující tvar ani rozlišení. Základní linie je značně nestabilní a zvýšená nad nulovou hodnotou signálu. Měření s přidavky standardů z neznámých důvodů poskytlo mírně kratší migrační časy, ale celkově je typický průběh zachován.

Pík T patří zřejmě tryptofanu podle migračního času a tvaru, a také protože se zvětšil po přidavku standardu. Pík M ze stejných důvodů patří nejspíše melatoninu. V oblasti migračního času 3,5 min, kde by se očekávala migrace zóny serotoninu, se žádný pík neobjevil. Je pravděpodobné, že serotonin migroval opožděně a poskytl signál v oblastech migračního času 4,2 až 4,5 min, kde je zaznamenán pík S, který se zvětšil po přidavku standardu. Tvar píku S po přidavku standardu připomíná také trojúhelník typický pro serotonin. Každopádně tento pík není přijatelný pro jakékoliv další analytické použití kvůli rozlišení a tvaru.



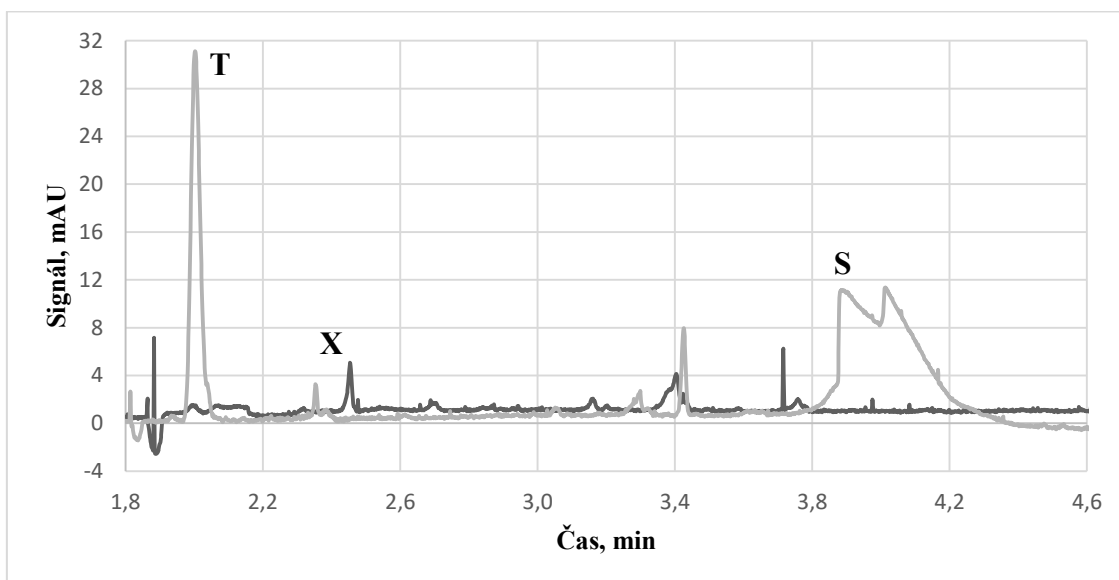
Obr. 11. Elektroferogramy měření extraktu lyofilizovaných listů rostliny *Nicotiana tabacum* v 8,2 mM kyselině chlorovodíkové. Tmavší čarou je proložen signál měření čistého extraktu, světlejší čarou signál extraktu s přidavky 0,5 mM standardních roztoků analytů. Separace probíhaly v BGE o pH 8,60 a koncentraci SDS $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ostatní podmínky jsou stejné jako u Obr. 7. Písmenem T je označen pík tryptofanu, M – melatoninu, S – serotoninu. Úsek po 4,5 min je prázdný a není zobrazen pro přehlednost.

Jelikož anorganické extrakční činidlo neposkytlo uspokojivý výsledek pro extrakci serotoninu, byla následně vyzkoušena extrakce činidlem s polovičním obsahem organického rozpouštědla, a to 50% roztokem methanolu v deionizované vodě. Výsledný elektroferogram je zobrazen na Obr. 12, str. 36 opět spolu s elektroferogramem měření extraktu s přidavky standardů analytů. Měření trvalo cca 6 min, prázdný úsek pokračoval od cca 4,5 min.

Ve srovnání s extraktem v kyselině chlorovodíkové poskytl extrakt v methanolu méně intenzivní signál v celém průběhu. Obecných nečistot bylo detekováno méně, základní linie byla stabilnější a blízká nulové hodnotě signálu. Očekávané píky analytů se však v tomto případě vůbec neobjevily, jen částečně až po přidavku standardních roztoků.

Na elektroferogramu na Obr. 12, str. 36 byl po přidavku detekován výrazný a intenzivní pík tryptofanu T jak podle migračního času, tak podle tvaru. V extraktu bez

přídavku je na tomto místě signál také lehce zvýšen, ale toto zvýšení nelze prohlásit za pík. Dá se říct, že vodný roztok methanolu jako extrakční činidlo buď nebyl úplně vhodný pro extrakci tryptofanu z rostlinného materiálu, nebo negativně ovlivnil možnosti detekce. Je také možné, že konkrétní materiál neobsahoval tryptofan v detekovatelném množství.



Obr. 12. Elektroferogramy měření extraktu *N. tabacum* v 50% roztoku methanolu v deionizované vodě. Tmavší čarou je proložen signál měření čistého extraktu, světlejší čarou signál extraktu s přídavky 0,5 mM standardních roztoků analytů. Separace probíhaly v BGE o pH 8,60 a koncentraci SDS 10 mmol·l⁻¹, ostatní podmínky jsou stejné jako u Obr. 7. Písmenem T je označen pík tryptofanu, S – serotoninu. Úsek po 4,6 min neobsahoval změny signálu a není zobrazen pro přehlednost.

V oblasti X se jak v čistém extraktu, tak po přídavku objevil pík, který se však v druhém případě nezvětšil, ale naopak se zmenšil. V tomto čase by se očekávala migrace zóny melatoninu, a proto je možné, že methanol ovlivnil i možnosti detekce tohoto analytu. Typický trojúhelníkový pík serotoninu S se objevil jen po přídavku, kde v čistém extraktu nebylo detekováno nic. Pík serotoninu mimoto má dva vrcholy, což ukazuje na značné ovlivnění separačního chování methanolem i u tohoto analytu, stejně jako u ostatních.

Extrakce v kyselém prostředí 8,2 mM kyseliny chlorovodíkové umožnila detekci píků všech tří stanovovaných látek, přičemž píky tryptofanu a melatoninu mají v podstatě vyhovující parametry, zatímco extrakce methanolem zajistila lepší pozadí, i když jinak nebyla úspěšná. Z toho důvodu byl postup úpravy vzorku modifikován krokem odpaření použitého extrakčního činidla a opětovného rozpuštění suchého zbytku v základním elektrolytu pro eliminaci možných vlivů rozpouštědla na chování analytů.

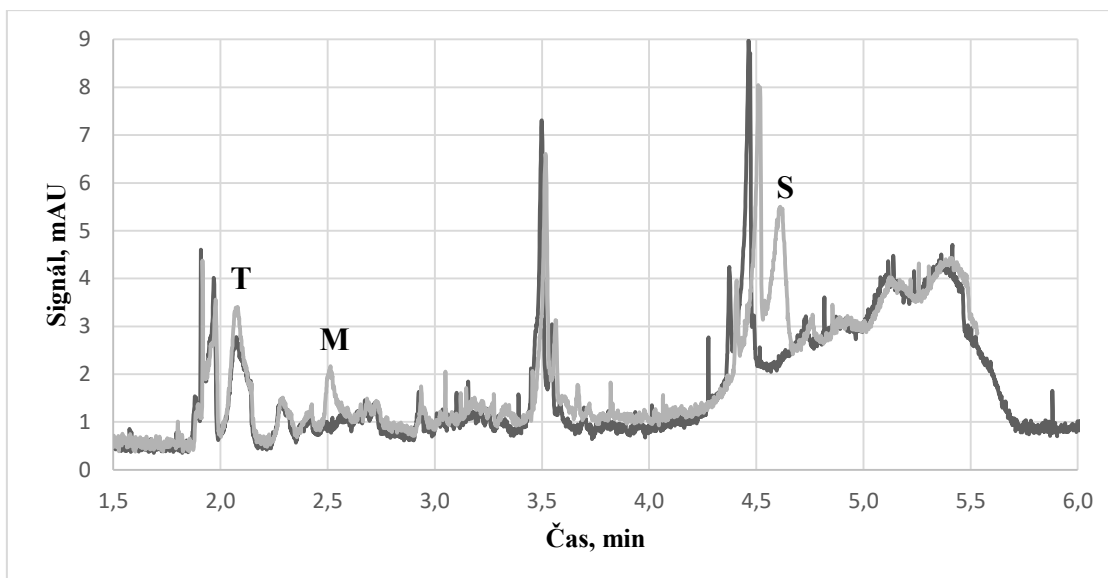
3.6 Extrakce s odpařením extrakčního činidla

Byly provedeny dvě extrakce, methanolem okyseleným 5% kyseliny mravenčí a pak 100% methanolem s následným odpařením extrakčního činidla a rozpuštěním suchého zbytku v základním elektrolytu přímo před nástřikem vzorku. Jako kyselé aditivum do methanolu byla zvolena kyselina mravenčí pro svou těkavost, která umožňuje relativně rychlé odpaření. Vzorky byly připravovány podle kapitoly 2.6.2. a měřeny za pracovních podmínek z kapitoly 2.3. Po analýze samotného extraktu bylo vždy provedeno měření stejného extraktu s přidavkem standardních roztoků tryptofanu, melatoninu a serotoninu pro zjištění umístění příslušného píku na získaném elektroferogramu. Jako první extrakční činidlo byl vyzkoušen okyselený methanol. Analýzy trvaly cca 6 min, výsledné elektroferogramy jsou zobrazeny na *Obr. 13, str. 38*.

Důvodem provedení zkoušky s extrakcí okyseleným methanolem byl předpoklad, že spíše bazické analyty budou preferovat kyselé extrakční činidlo, jak se již ukázalo při extrakci kyselinou chlorovodíkovou v kapitole 3.5, a tím se výtěžnost extrakce zvýší. V případě okyseleného methanolu se předpoklad však spíše nesplnil.

Extrakce byl účinná pouze pro tryptofan, protože i v extraktu bez přidavku standardní látky byl pozorován intenzivní pík T. Po přidavku se pík T zvětšil, v obou případech je dostatečně rozlišen od sousedních píků a má celkem přijatelný tvar, i když je podezřelý z obsahu nečistoty v sestupné části, kde je zvláště nesymetrický. Píky M a S melatoninu a serotoninu v čistém extraktu bez přidavku standardů detekovány nebyly, ale po přidavku se objevily v očekávaných oblastech migračního času. Pík serotoninu je mimoto v oblasti, kde je základní linie výrazně zvýšena, migroval společně s velkou směsnou zónou nejasného složení, což zřejmě značně snížilo citlivost detekce.

Základní linie měření jako taková byla v tomto měření nestabilní, zřejmě kvůli velkému množství nečistot v extraktu. Tím pádem se extrakce methanolem s 5% kyselinou mravenčí a odpařením ukázala jako celkově nevhodná.



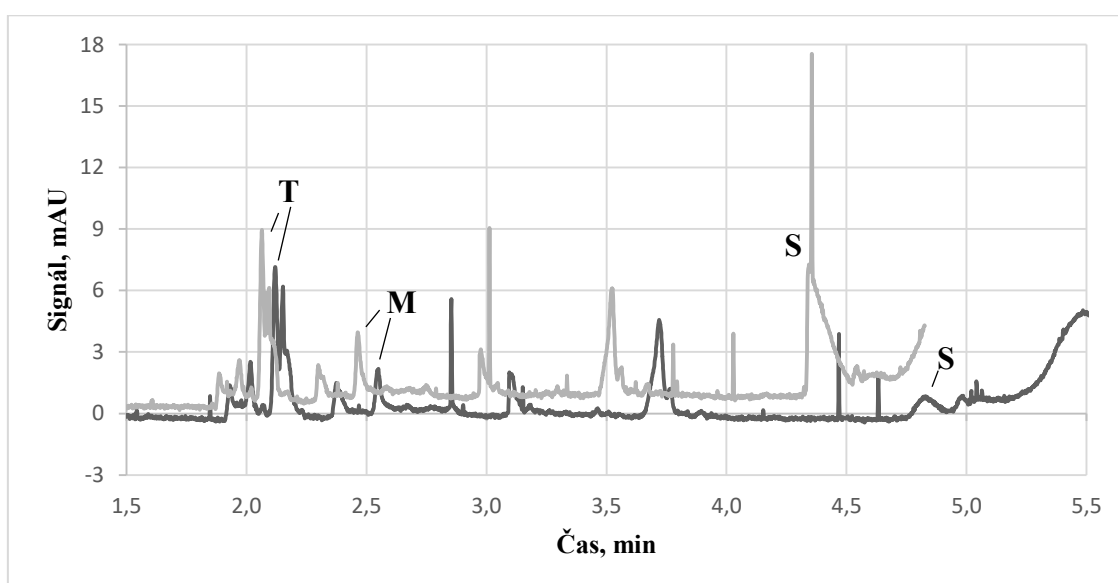
Obr. 13. Elektroferogramy extraktu *N. tabacum* pomocí methanolu okyseleného 5% kyselinou mravenčí s následným odpařením. Tmavší čarou je proložen signál čistého extraktu, světlejší čarou extraktu s přidavky 0,5 mM standardních roztoků stanovovaných analytů. Separace probíhaly v BGE o pH 8,60 a koncentraci SDS $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, ostatní podmínky jsou stejné jako u Obr. 7. Písmenem T je označen zjištěný pík tryptofanu, M – melatoninu, S – serotoninu.

Odpařovací technika se ukázala jako nenáročná na provedení, extrakt po odpaření obsahoval velký počet píků a byl informačně obsažný. Vzhledem k tomu, že po přidavku standardů bylo možné detekovat píky všech tří látek v očekávaných časech a s očekávaným tvarem, odpaření methanolu zřejmě eliminovalo jeho negativní vliv na separaci a detekci analytů, který se projevil na Obr. 12, str. 36. Proto bylo rozhodnuto nadále pokračovat v extrakcích s odpařením. Vzhledem k tomu, že methanol v předcházejícím pokusu bez odpaření zajistil poměrně nízké pozadí, i když výrazně potlačil intenzity všech píků vůbec, byla vyzkoušena extrakce 100% methanolem bez aditiv a jeho odpaření před nástřikem.

Postupovalo se opět podle kapitoly 2.6.2. za podmínek uvedených v kapitole 2.3. Analýza trvala cca 5,0 až 5,5 min, výsledné elektroferogramy analýzy čistého extraktu a extraktu s přidavky roztoků standardů stanovovaných látek jsou zobrazeny na Obr. 14, str. 39.

Měření s přidavky mělo zvýšenou základní linii a z neznámého důvodu poskytlo kratší migrační časy, přesto bylo možné identifikovat jednotlivé píky podle celkového průběhu signálu a prokázat píky zájmových analytů, které se po přidavku zvětšily.

Bezprostředně po druhé minutě prošel detektorem tryptofan, jeho pík T je dostatečně intenzivní, ale je zřejmě znehodnocen v sestupné části nečistotou, jejíž přítomnost se předpokládala ještě při extrakci okyseleným methanolem. Pík melatoninu M migroval v čase cca 2,5 min, je dobře rozlišen a má na rozdíl od tryptofanu přijatelný tvar. Pík serotoninu S migroval očekávaně opožděně, a po přidavku měl velmi charakteristický trojúhelníkový tvar.



Obr. 14. Elektroferogramy měření extraktu *N. tabacum* v 100% methanolu bez aditiv s odpařením před nástřikem. Tmavší čarou je proložen signál čistého extraktu, světlejší čarou signál extraktu s přidavkem 0,5 mM standardních roztoků analytů. Separace probíhaly v BGE o pH 8,60 a koncentraci SDS 10 mmol·l⁻¹, ostatní podmínky jsou stejné jako u Obr. 7. Písmenem T jsou označeny píky tryptofanu, M – melatoninu, S – serotoninu.

Separace extraktu v 100% methanolu s odpařením a rozpuštěním v BGE byla přijatelně účinná hlavně pro serotonin a umožnila splnění cíle práce. Pro stanovení tryptofanu by bylo vhodnější použít 8,2 mM kyselinu chlorovodíkovou a postupovat bez odpaření. Melatonin se dá poměrně dobře extrahovat oběma metodami.

4 Závěr

V této práci byla vyvinuta kapilární elektroforetická metoda separaci a detekci tryptofanu, melatoninu a serotoninu ve vzorcích lyofilizovaných listů rostliny *Nicotiana tabacum* pro účely základního biochemického výzkumu.

Po provedení literární rešerše aktuálních článků v oblasti instrumentální analytické chemie bylo rozhodnuto využít techniky micelární elektrokinetické chromatografie s použitím dodecylsíranu sodného jako detergentní složky základního elektrolytu tvořeného tetraboritanem sodným o koncentraci $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Pomocí zkoušek se standardy tryptofanu, melatoninu a serotoninu bylo zjištěno jejich migrační pořadí a zaznamenány přibližné migrační časy. Při separaci směsi standardů látek tryptofan migroval jako první v čase cca 1,8 min, následoval melatonin v cca 2,2 min, a poslední byl serotonin v cca 3,5 min. Píky tryptofanu a melatoninu mají vyhovující tvar, zatímco serotonin má typický tvar trojúhelníku.

Byla provedena optimalizace koncentrace dodecylsíranu sodného v základním elektrolytu pro účely zlepšení výsledků separace zájmových látek, výsledně použitá hodnota činila $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Následně byla provedena optimalizace pH základního elektrolytu, výsledně použitá hodnota činila 8,60.

Byla vyvinuta extrakční technika pro předúpravu původního rostlinného materiálu, byly vyzkoušeny postupy jak bez odpaření extrakčního činidla před nástřikem vzorku, tak s odpařením pro odstranění případného negativního ovlivnění separace extrakčním činidlem.

Extrakce s odpařením se ukázaly jako nenáročné a efektivní, obzvláště při přítomnosti methanolu v extrakčním činidle. Pro simultánní separaci a detekci melatoninu a serotoninu se jako vhodné extrakční činidlo ukázal 100% methanol s následným odpařením, pro separaci a detekci tryptofanu a melatoninu je však vhodnější 8,2 mM kyselina chlorovodíková, přičemž je v tomto případě možné postupovat bez odpařovacího kroku.

Použití těkavých organických složek extrakčního činidla umožňuje provádět jeho relativně rychlé odpaření v řádu desítek minut. Jednotlivé elektroforetické analýzy tryptofanu, melatoninu a serotoninu podle vyvinuté metody jsou velmi rychlé, netrávají více než 5 min. Detekovatelné koncentrace všech tří analytů se pohybují v řádu desetin milimolů na litr.

Seznam použitých zdrojů

- [1] D. M. Richard, M. A. Dawes, C. W. Mathias, A. Acheson, N. Hill-Kaptureczak, a D. M. Dougherty, „L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications", *Int. J. Tryptophan Res. IJTR*, roč. 2, s. 45–60, bře. 2009.
- [2] T. B. Osborne, L. B. Mendel, A. J. Wakeman, a E. L. Ferry, „Amino-Acids in Nutrition and Growth", *J. Biol. Chem.*, roč. 17, č. 3, s. 325–349, led. 1914.
- [3] L. Palego, L. Betti, A. Rossi, a G. Giannaccini, „Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans", *J. Amino Acids*, roč. 2016, s. 8952520, 2016.
- [4] F. J. V. Gomez, I. G. Hernández, S. Cerutti, a M. F. Silva, „Solid phase extraction/cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography for the analysis of melatonin and related indole compounds in plants", *Microchem. J.*, roč. 123, s. 22–27, lis. 2015.
- [5] S. N. Young, „How to increase serotonin in the human brain without drugs", *J. Psychiatry Neurosci. JPN*, roč. 32, č. 6, s. 394–399, lis. 2007.
- [6] F. Auld, E. L. Maschauer, I. Morrison, D. J. Skene, a R. L. Riha, „Evidence for the efficacy of melatonin in the treatment of primary adult sleep disorders", *Sleep Med. Rev.*, roč. 34, s. 10–22, srp. 2017.
- [7] G. Csaba a K. Pál, „Effects of insulin, triiodothyronine, and serotonin on plant seed development", *Protoplasma*, roč. 110, č. 1, s. 20–22, úno. 1982.
- [8] M. Odjakova a C. Hadjiivanova, „Animal neurotransmitters in plants", *Bulg J Plant Physiol*, roč. 23, č. 1–2, s. 94–102, 1997.
- [9] S. J. Murch, S. KrishnaRaj, a P. K. Saxena, „Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants", *Plant Cell Rep.*, roč. 19, č. 7, s. 698–704, čer. 2000.
- [10] M. M. Posmyk a K. M. Janas, „Melatonin in plants", *Acta Physiol. Plant.*, roč. 31, č. 1, s. 1, zář. 2008.
- [11] J. Kolář *et al.*, „Melatonin: Occurrence and daily rhythm in *Chenopodium rubrum*", *Phytochemistry*, roč. 44, č. 8, s. 1407–1413, dub. 1997.

- [12] B. Widner, E. R. Werner, H. Schennach, H. Wachter, a D. Fuchs, „Simultaneous Measurement of Serum Tryptophan and Kynurenine by HPLC", *Clin. Chem.*, roč. 43, č. 12, s. 2424–2426, pro. 1997.
- [13] A. Laich, G. Neurauder, B. Widner, a D. Fuchs, „More Rapid Method for Simultaneous Measurement of Tryptophan and Kynurenine by HPLC", *Clin. Chem.*, roč. 48, č. 3, s. 579–581, bře. 2002.
- [14] E. Pobozy, A. Michalski, J. Sotowska-Brochocka, a M. Trojanowicz, „Determination of melatonin and its precursors and metabolites using capillary electrophoresis with UV and fluorometric detection", *J. Sep. Sci.*, roč. 28, č. 16, s. 2165–2172, lis. 2005.
- [15] M. H. Mills, D. C. Finlay, a P. R. Haddad, „Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interaction chromatography with fluorescence detection", *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, roč. 564, č. 1, s. 93–102, bře. 1991.
- [16] R. M. W. Chau a B. A. Patel, „Determination of serotonin, melatonin and metabolites in gastrointestinal tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection", *Biomed. Chromatogr.*, roč. 23, č. 2, s. 175–181, 2009.
- [17] Y.-O. Kim *et al.*, „Determination of melatonin in biological samples by capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, roč. 850, č. 1, s. 369–374, čvc. 1999.
- [18] G. Chen, J. Cheng, a J. Ye, „Application of a novel micro-injector in the determination of indole derivatives in the rat pineal gland by capillary electrophoresis with electrochemical detection", *Fresenius J. Anal. Chem.*, roč. 370, č. 7, s. 930–934, srp. 2001.
- [19] J. Musijowski, E. Pobozy, a M. Trojanowicz, „On-line preconcentration techniques in determination of melatonin and its precursors/metabolites using micellar electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr. A*, roč. 1104, č. 1–2, s. 337–345, úno. 2006.
- [20] N. Benturquia *et al.*, „Analysis of serotonin in brain microdialysates using capillary electrophoresis and native laser-induced fluorescence detection", *ELECTROPHORESIS*, roč. 26, č. 6, s. 1071–1079, 2005.
- [21] Z. D. Peterson, M. L. Lee, a S. W. Graves, „Determination of serotonin and its precursors in human plasma by capillary electrophoresis–electrospray ionization–

- time-of-flight mass spectrometry", *J. Chromatogr. B*, roč. 810, č. 1, s. 101–110, říj. 2004.
- [22] C. A. Dailey, N. Garnier, S. S. Rubakhin, a J. V. Sweedler, „Automated method for analysis of tryptophan and tyrosine metabolites using capillary electrophoresis with native fluorescence detection", *Anal. Bioanal. Chem.*, roč. 405, č. 8, s. 2451–2459, bře. 2013.
- [23] M. L. Gostkowski, J. B. McDoniel, J. Wei, T. E. Curey, a J. B. Shear, „Characterizing Spectrally Diverse Biological Chromophores Using Capillary Electrophoresis with Multiphoton-Excited Fluorescence", *J. Am. Chem. Soc.*, roč. 120, č. 1, s. 18–22, led. 1998.
- [24] H. K. Nielsen a R. F. Hurrell, „Tryptophan determination of food proteins by h.p.l.c. after alkaline hydrolysis", *J. Sci. Food Agric.*, roč. 36, č. 9, s. 893–907, 1985.
- [25] G. Ravindran a W. L. Bryden, „Tryptophan determination in proteins and feedstuffs by ion exchange chromatography", *Food Chem.*, roč. 89, č. 2, s. 309–314, úno. 2005.
- [26] J. J. Pesek a M. T. Matyska, „The Analysis of Melatonin, Tryptamine, and Serotonin by HPCE and CEC", *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, roč. 21, č. 19, s. 2923–2934, lis. 1998.
- [27] G. P. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska, a M. Masci, „Rapid analysis of melatonin in pharmaceutical tablets by capillary electrophoresis with UV detection", *Chromatographia*, roč. 52, č. 9, s. 603–606, lis. 2000.
- [28] F. Tagliaro, G. Manetto, F. Crivellente, a F. P. Smith, „A brief introduction to capillary electrophoresis", *Forensic Sci. Int.*, roč. 92, č. 2, s. 75–88, dub. 1998.
- [29] J. P. Landers, *Handbook of Capillary Electrophoresis, Second Edition*. CRC Press, 1996.
- [30] A. Weston a P. R. Brown, *High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis: Principles and Practices*. Elsevier, 1997.
- [31] S. F. Y. Li, *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*. Elsevier, 1992.
- [32] G. de Jong, „Detection in Capillary Electrophoresis – An Introduction", in *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS)*, John Wiley & Sons, Ltd, 2016, s. 1–5.
- [33] D. A. Skoog, F. J. Holler, a S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning, 2017.

- [34] *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*. 2007.
- [35] Shigeru. Terabe, Koji. Otsuka, Kunimichi. Ichikawa, Akihiro. Tsuchiya, a Teiichi. Ando, „Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries", *Anal. Chem.*, roč. 56, č. 1, s. 111–113, led. 1984.
- [36] S. A. A. Rizvi, D. P. Do, a A. M. Saleh, „Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC)", *Eur. J. Chem.*, roč. 2, č. 2, s. 276–281, čer. 2011.
- [37] H. Ozaki, A. Ichihara, a S. Terabe, „Micellar electrokinetic chromatography using high-molecular-mass surfactants: comparison between anionic and cationic surfactants and effects of modifiers", *J. Chromatogr. A*, roč. 709, č. 1, s. 3–10, srp. 1995.
- [38] S. Slomkowski *et al.*, „Terminology of polymers and polymerization processes in dispersed systems (IUPAC Recommendations 2011)", *Pure Appl. Chem.*, roč. 83, č. 12, s. 2229–2259, 2011.
- [39] K. D. Altria, „Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography", *J. Chromatogr. A*, roč. 856, č. 1–2, s. 443–463, zář. 1999.
- [40] G. Hancu, B. Simon, A. Rusu, E. Mircia, a A. Gyéresi, „Principles of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis", *Adv. Pharm. Bull.*, roč. 3, č. 1, s. 1–8, 2013.
- [41] S. Terabe, „Peer Reviewed: Micellar Electrokinetic Chromatography", *Anal. Chem.*, roč. 76, č. 13, s. 240 A–246 A, čvc. 2004.
- [42] A. Segura Carretero, C. Cruces-Blanco, S. Cortacero Ramírez, A. Carrasco Pancorbo, a A. Fernández Gutiérrez, „Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the analysis of uncharged pesticides of environmental impact", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 52, č. 19, s. 5791–5795, zář. 2004.
- [43] M. R. A. Rodrigues, E. B. Caramão, L. Arce, A. Ríos, a M. Valcárcel, „Determination of Monoterpene Hydrocarbons and Alcohols in *Majorana hortensis* Moench by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatographic", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 50, č. 15, s. 4215–4220, čvc. 2002.
- [44] O. Hodek, T. Křížek, P. Coufal, a H. Ryšlavá, „Design of experiments for amino acid extraction from tobacco leaves and their subsequent determination by capillary zone electrophoresis", *Anal. Bioanal. Chem.*, roč. 409, č. 9, s. 2383–2391, bře. 2017.