

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Alice Šimonová

Stanovení tryptaminu a tryptofanu v biologickém materiálu pomocí  
kapilární elektroforézy  
Determination of tryptamine and tryptophan in biological material by  
capillary electrophoresis

Bakalářská práce

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

Praha 2018

## 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 20. 5. 2018

Alice Šimonová

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D a Mgr. Ondřeji Hodkovi za cenné rady, připomínky a odborné vedení během mé bakalářské práce. Dále děkuji mé rodině, partnerovi a blízkým přátelům za psychickou podporu při studiu.

## Obsah

Seznam zkratk a symbolů .....	5
1 Úvod .....	7
1.1 Cíl práce .....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Tryptamin.....	8
2.2 Tryptofan.....	8
2.3 Biologické materiály .....	9
2.4 Kapilární elektroforéza.....	9
2.5 Elektroforetická pohyblivost .....	10
2.6 Elektroosmotický tok .....	10
2.7 Prekoncentrační techniky .....	11
3 Experimentální část.....	14
3.1 Použité chemikálie a přístroje .....	14
3.2 Chemikálie .....	14
3.3 Přístrojové vybavení.....	14
3.4 Experimentální podmínky .....	14
3.5 Příprava vzorků .....	15
3.6 Výpočty .....	15
4 Výsledky a diskuze.....	17
4.1 Optimalizace metody.....	17
4.2 Optimalizace složení základního elektrolytu .....	17
4.3 Optimalizace dávkování a on-line prekoncentrace .....	18
4.4 Opakovatelnost.....	19
4.5 Kalibrační přímka.....	21
4.6 Mez detekce a stanovitelnosti .....	21
4.7 Měření reálných vzorků .....	22
5 Závěr.....	24
Seznam použité literatury .....	25

## Seznam zkratek a symbolů

BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
FASS	zakoncentrování zesílením pole (field amplified sample stacking)
HEC	hydroxyethylcelulóza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
LVSS	zakoncentrování z velkého objemu (large volume sample stacking)
t-ITP	přechodná izotachoforéza (transient isotachopheresis)
$\mu_e$	elektroforetická pohyblivost
$\mu_{EOF}$	pohyblivost elektroosmotického toku
$\eta$	viskozita okolního prostředí
$\lambda$	vlnová délka
$\varepsilon$	dielektrická konstanta
$\zeta$	zeta potenciál
$A$	plocha
$A_{rel}$	relativní plocha
$A_\lambda$	absorbance při dané vlnové délce $\lambda$

$c$	molární koncentrace
$c_g$	hmotnostní koncentrace
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
$q$	náboj iontu
$r$	poloměr iontu
$s$	směrodatná odchylka
$s_r$	relativní směrodatná odchylka
$t_m$	migrační čas
$t_{rel}$	relativní migrační čas

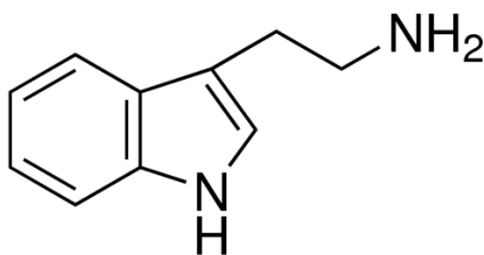
# 1 Úvod

## 1.1 Cíl práce

Cílem této práce je vývoj metody pro stanovení tryptaminu a tryptofanu v biologickém materiálu pomocí kapilární elektroforézy, konkrétně se jedná o separaci a určení obsahu ve vzorku listů lyofilizovaného tabáku virginského a v kultivačním mediu oomycety *Pythium oligandrum*. Práce se zabývá optimalizací podmínek analýzy, tedy složením základního elektrolytu a způsobem dávkování vzorku do separační kapiláry pomocí on-line prekoncentračních technik.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Tryptamin



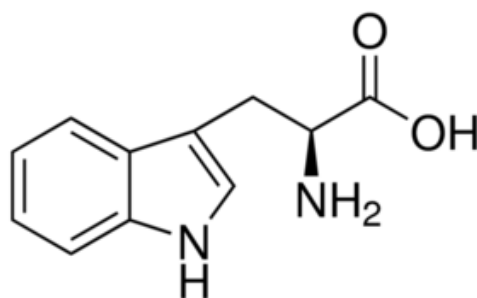
Obr. 1 – Tryptamin

Tryptamin (obr. 1) je alkaloid odvozený od indolu, strukturně se podobá aminokyselině tryptofan a je součástí celé řady hub, rostlin a živočichů. Je základní strukturou psychedelických látek (indolalkylaminů) v rostlinách [!] a předpokládá se, že má podíl na ochraně mladých sazenic proti hmyzu [„]. V některých rostlinách je prekurzorem pro růstový hormon heteroauxin (indolyl-3-octová kyselina) a tryptaminy jsou také prekurzory pro vznik tricyklických  $\beta$ -karbolinů s halucinogenními účinky [3, 4].

Indolalkylaminy vyvolávají halucinogenní účinky interakcí s 5-hydroxytryptaminovými (5-HT) receptory v CNS. Odstraňují působení 5-HT na postsynaptické neurony, čímž dochází k účinku ve zrakových oblastech mozku a v oblasti limbického systému. Konkrétně se jedná o dimethyltryptamin, diethyltryptamin, dimethylserotonin, bufotenin, psilocin a psilocybin [4].

$\beta$ -karboliny inhibují monoaminoxidázu typu A v mitochondriích, která formuje monoaminergní neurotransmitery (dopamin, noradrenalin), N-acetyltransferázu a ATP-ázu. Konkrétně se jedná o harmin, harmalin a ibogain [4].

### 2.2 Tryptofan



Obr. 2 – Tryptofan



Tryptofan (obr. 2) je jedna z 20 proteinogenních aminokyselin. Stejně jako tryptamin je odvozený od indolu a je esenciální, tzn. že lidské tělo ho neumí samo syntetizovat. V některých rostlinách je rovněž prekurzorem pro růstový hormon heteroauxin [5], protože mnoho druhů obsahuje tryptofan dekarboxylázu přeměňující tryptofan na tryptamin [2]. V rostlinách je tryptofan důležitý například pro syntézu proteinů, akridonů, auxinů, indolových alkaloidů. Funkce těchto látek je různorodá, od růstových regulátorů, přes chemickou obranu až po atrakci opylovačů. Indolové alkaloidy se využívají také ve farmacii, například vincristin a vinblastin inhibující mitózu se využívají při léčbě rakoviny [5].

### 2.3 Biologické materiály

Usušený tabák virginský (*Nicotiana tabacum*) je zdrojem nikotinu. Alkaloid nikotin je lidmi nejpoužívanější návykový neurotoxin, který vyvolává stimulaci dřeně nadledvin, mozkových neuronů a vegetativních ganglií [6].

*Pythium oligandrum* je druhem mykoparazitické houby patřící mezi řasovky. Je parazitem pro mnoho příbuzných i druhově jiných hub [7]. *P. oligandrum* chrání rostliny (například cukrovou řepu, pšenici, vinnou révu atd.) před kolonizací mnoha houbovými patogeny a pravděpodobně má podíl na růstu rostlin, protože produkuje tryptamin [8].

Jedním ze současných trendů je výzkum a vývoj biologické ochrany rostlin proti škůdcům. Důvodem je větší šetrnost k životnímu prostředí a menší riziko závadnosti produktů. V rámci vývoje biologické ochrany je nutné sledovat obsah tryptaminu a tryptofanu v různých biologických materiálech. Vhodnou metodou pro jejich stanovení je kapilární elektroforéza, které se věnuje následující kapitola.

### 2.4 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE, capillary electrophoresis) se řadí mezi elektromigrační separační metody a je založená na dělení nabitých částic v roztoku na základě jejich rozdílné rychlosti migrace ve stejnosměrném elektrickém poli, přičemž jejich rychlost v daném prostředí závisí na jejich náboji a velikosti. Selektivitu systému určuje primárně složení základního elektrolytu (BGE, background electrolyte) [9]. Mezi hlavní výhody CE patří vysoká účinnost separace, krátká doba prováděné analýzy a malá spotřeba vzorku a chemikálií spojená s šetrností k životnímu prostředí. Nevýhodou je nižší koncentrační citlivost například oproti nejrozšířenější separační metodě HPLC [10].

CE se dělí podle prostředí separace na kapilární zónovou elektroforézu, kapilární gelovou elektroforézu, micelární elektrokinetickou kapilární chromatografii, kapilární elektrochromatografii, kapilární isoelektrickou fokusaci a kapilární izotachoforézu [11].

Elektromigrační separační metody využívají dva transportní jevy, elektroforetickou migraci iontů v elektrickém poli a elektroosmotický tok kapaliny v kapiláře. Jednotlivé jevy jsou popsány v následujících dvou podkapitolách.

#### 2.4.1 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost  $\mu_e$  je veličina udávající rychlost pohybu nabitě částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. K pohybu dochází vlivem elektrostatického přitahování elektrického náboje částice k opačně nabitě elektrodě. Pro elektroforetickou pohyblivost částice vychází následující vztah [12]:

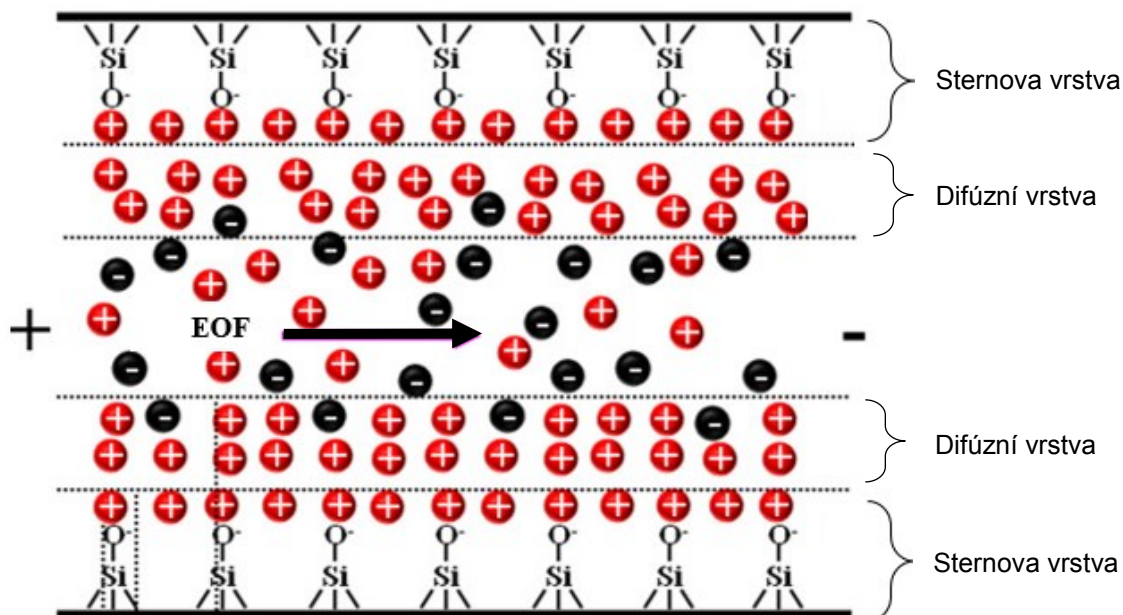
$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

$\mu_e$  – elektroforetická pohyblivost,  $q$  – náboj iontu,  $\eta$  – viskozita okolního prostředí,  $r$  – poloměr iontu

#### 2.4.2 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF, electroosmotic flow) neboli elektroosmóza je tok kapaliny v kapiláře vytvořený vložení elektrického napětí mezi konce kapiláry. Naplněním kapiláry neutrálním či bazickým elektrolytem dochází k disociaci silanolových skupin na vnitřní straně kapiláry, která tak získá negativní náboj. Kationty ze základního elektrolytu jsou přitaženy k negativně nabitě stěně a vzniká elektrická dvojvrstva (Sternova vrstva). Kationty nacházející se dále od stěny kapiláry vytvářejí v roztoku difúzní vrstvu a po vložení napětí mezi elektrody dochází k jejich pohybu směrem ke katodě. Solvatované kationty strhávají uvnitř kapiláry veškerý roztok směrem ke katodě a vzniká tak EOF (obr. 3). Nabitě částice se pohybují na základě svých elektroforetických pohyblivostí a neutrální částice se pohybují rychlostí EOF. Rychlost elektroosmotického toku přímo úměrná intenzitě elektrického pole a závisí na velikosti negativního náboje na vnitřní straně kapiláry. S rostoucím pH základního elektrolytu roste i velikost negativního náboje a tím i rychlost elektroosmotického toku [9, 13]. V kyselém prostředí jsou silanolové skupiny protonizovány a EOF je nestabilní a slabý. Záporný náboj kapiláry může vyvolávat nežádoucí interakce,

například adsorpci na stěny kapiláry, proto se do základního elektrolytu přidávají hydrofilní polymery (např. hydroxyethylcelulóza) potlačující EOF a vytvářející efektivní povlak na vnitřní straně kapiláry [14].



Obr. 3 – Vznik elektroosmotického toku, převzato z [15] a upraveno

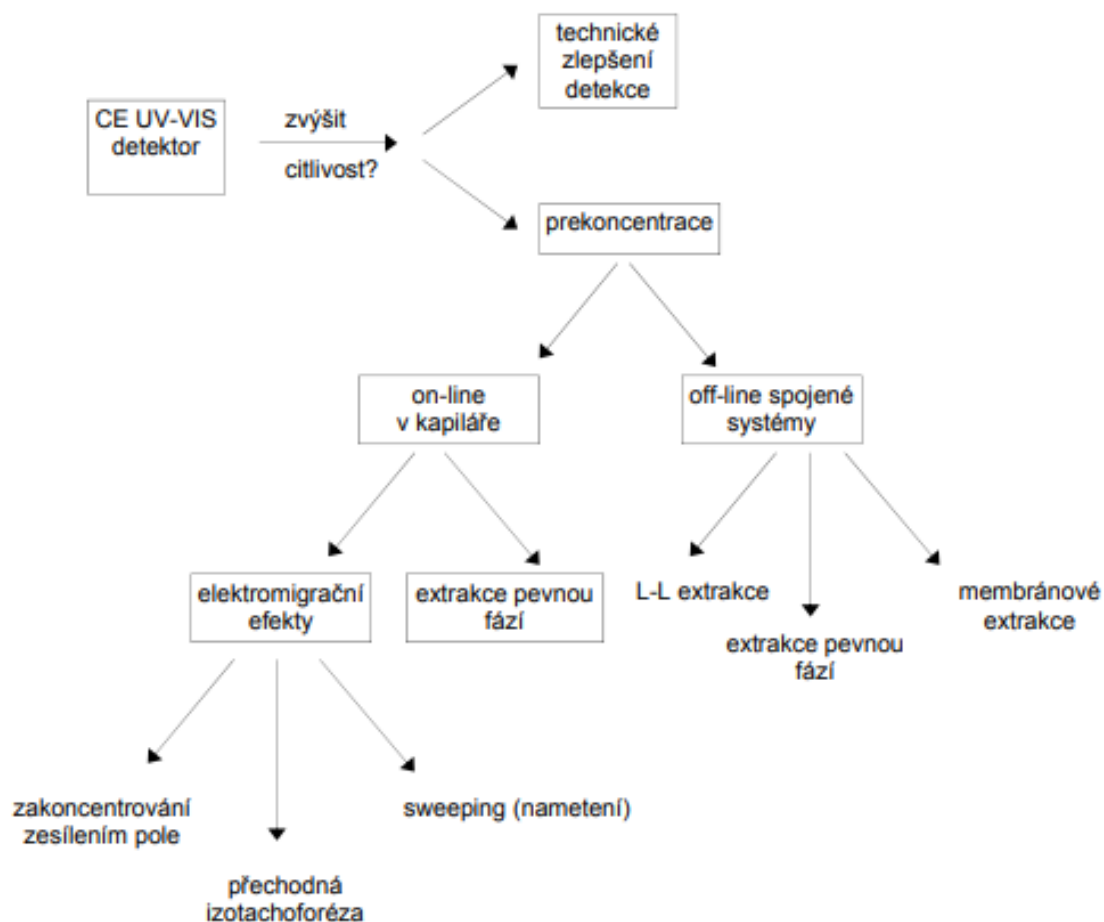
Pozorovaná pohyblivost dané částice je dána součtem její elektroforetické pohyblivosti a pohyblivosti elektroosmotického toku, kterou lze vyjádřit pomocí vztahu [12]:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (2)$$

$\mu_{EOF}$  – pohyblivost EOF,  $\varepsilon$  – dielektrická konstanta,  $\zeta$  – zeta potenciál,  $\eta$  – viskozita okolního prostředí

#### 2.4.3 Prekoncentrační techniky

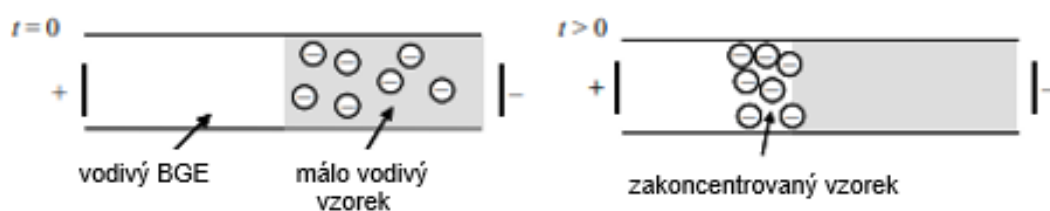
Prekoncentrací (stacking) dochází ke zvýšení citlivosti detekce dané metody, provádí se buď on-line nebo off-line (obr. 4). Off-line prekoncentrace se provádí před samotnou analýzou a jde o úpravu vzorku extrakcí (extrakce kapalina-kapalina, extrakce pevnou fází, membránová extrakce) [16]. On-line prekoncentrace se provádí přímo v kapiláře, kde se ionty analytů zakoncentrovávají do úzké zóny ještě před samotnou separací. On-line metody se dělí do několika základních skupin: metody zakoncentrování zesílením pole („stacking“), metody využívající přechodnou izotachoforézu, metody nametání („sweeping“) a metody zakoncentrování na pH rozhraní [17].



Obr. 4 – Schéma prekoncentrací v CE, převzato z [16]

#### Zakoncentrování zesílením pole

K zakoncentrování vzorku zesílením pole (FASS, field amplified sample stacking) dochází na základě rozdílné vodivosti vzorku a BGE. Zóna vzorku je málo vodivá, proto dochází po vložení napětí ke zvýšení intenzity elektrického pole a k urychlení migrace iontů, čímž dochází k jejich zakoncentrování na rozhraní zóny vzorku s BGE (obr. 5). Snížení vodivosti vzorku lze dosáhnout například přidávkem acetonitrilu. Nevýhodou je malý objem dávkovaného vzorku, protože při překročení optimální dávky hrozí ztráta separační účinnosti [16, 18].



Obr. 5 – Princip FASS, převzato z [19] a upraveno

Výše uvedený problém řeší tzv. zakoncentrování z velkého objemu (LVSS, large volume sample stacking). Do separační kapiláry se hydrodynamicky nadávkuje dlouhá zóna málo vodivého vzorku, vložení napětí se provede prekoncentrace a poté je matrice vzorku vytlačena ven z kapiláry nástřikovým koncem pomocí externího tlaku nebo EOF. Během jedné analýzy lze prekoncentrovat jen kationty nebo jen anionty [16].

#### *Přechodná izotachoforéza*

Přechodná izotachoforéza (t-ITP, transient isotachopheresis) je metoda využívající izotachoforetický efekt. Dochází k migraci analytu, který je umístěn mezi vedoucí elektrolyt obsahující ko-ion a koncový elektrolyt. Vlivem zachování konstantního proudu v kapiláře dochází k změnám koncentrace v jednotlivých zónách. Vhodnou kombinací pracovních elektrolytů v separační kapiláře dochází k přechodné izotachoforéze, která se využívá v prekoncentraci celé řady ionizovatelných analytů [16].

#### *Nametání*

Nametání se nejvíce používá při micelární elektrokinetické kapilární chromatografii. Vzorek neobsahující micely je nadávkován do kapiláry naplněné základním elektrolytem obsahujícím micely. Po vložení napětí začnou nabití micely ze vstupní vialky s BGE pronikat vzorkem, seberou molekuly analytu a akumulují je do úzké zóny [20]. Nametením lze docílit až několikatisícinásobného zesílení detekce a společně s dalšími technikami je možné tuto hranici dále zvyšovat, například spojením s nadávkováním vzorku zesílením pole došlo k zesílení odezvy téměř milionkrát [21].

#### *Zakoncentrování na pH rozhraní*

Princip zakoncentrování na pH rozhraní (pH mediated stacking) je vhodný jen pro slabé kyseliny a zásady, u kterých je pohyblivost závislá na pH pufru. Matrice vzorku a BGE má rozdílné pH, čímž je potlačena disociace analytu a ten ztrácí svou elektroforetickou pohyblivost. Před nebo za zónu vzorku se nadávkuje kyselina nebo báze, která po vložení napětí titruje ionty BGE. Tím BGE ztrácí svůj náboj a zóna obsahující analyt se stane méně vodivá, tím se zvyšuje jejich pohyblivost a dochází k zakoncentrování do úzké zóny [22].

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie a přístroje

#### 3.2 Chemikálie

Octová kyselina, 99,8 % (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)

Chloroctová kyselina, 99,9 % (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)

Kyselina chlorovodíková, 36 % (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)

Hydroxid sodný, p.a. (Penta, Česká republika)

Deionizovaná voda

Tryptamin,  $\geq 97,5$  % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Tryptofan, 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Hydroxyethylcelulóza (Hercules Natrosol, Wilmington, Německo)

Anilin,  $< 99,5$  % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Lyofilizovaný vzorek tabáku virginského

Vzorek kultivačního media oomycety *Pythium oligandrum* (Katedra biochemie, PřF UK)

#### 3.3 Přístrojové vybavení

Kapilární elektroforéza Agilent Technologies CE<sup>3D</sup> (Waldbronn, SRN)

UV-VIS detektor s diodovým polem

Křemenná kapilára: délka 50,5/8,5 cm, vnitřní průměr 75  $\mu\text{m}$  (Polymicro Technologies, Phoenix, USA)

Ultrazvuk: Elmasocin S15, Elma Schmidbauer (Singen, Německo)

Centrifuga: Microcentrifuge, Denver Instrument (Bohemia, USA)

#### 3.4 Experimentální podmínky

Teplota kazety s kapilárou 25 °C

Příprava nové kapiláry: promytí 10 minut 1M roztokem hydroxidu sodného a poté 10 minut deionizovanou vodou

Příprava kapiláry před separací: promytí 60 s BGE do odpadní vialky a poté 60 s BGE do vialky s BGE

Separační napětí  $-30$  kV (proud přibližně  $-60$   $\mu\text{A}$ )

Vlnová délka: analyty při 220 nm a vnitřní standard (anilin) při 200 nm

Optimalizované podmínky (viz kapitola 4.1): BGE – 1,6M kyselina octová s 0,1 % HEC, dávkování – hydrodynamické  $-5$  kPa 5 s

### 3.5 Příprava vzorků

Postup extrakce vzorku tabáku jsem provedla na základě článku O. Hodka a kol [23]. Na třecí misce s tloučkem jsem rozetřela vzorek tabáku, do vialky jsem odvážila 50 mg a přidala 700  $\mu\text{l}$  8,2mM kyseliny chlorovodíkové. Pro smočení celého materiálu jsem vzorek vložila na 5 minut do ultrazvuku, poté na 5 minut na třepačku a na dalších 5 minut do centrifugy na 5000 rpm. Supernatant jsem přefiltrovala přes bezstříkačkový filtr Whatman 0,45  $\mu\text{m}$  PVDF.

Kapalný vzorek kultivačního media oomycety *Pythium oligandrum* centrifugovala 5 minut při 5000 rpm a přefiltrovala přes bezstříkačkový filtr Whatman 0,45  $\mu\text{m}$  PVDF.

### 3.6 Výpočty

Směrodatná odchylka  $s$ :

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - x_{\text{PRŮMĚR}})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

$x_i$  – měření,  $x_{\text{PRŮMĚR}}$  – průměrná hodnota měření,  $n$  – počet měření

Relativní směrodatná odchylka  $s_r$ :

$$s_r = \frac{s \cdot 100}{x_{\text{PRŮMĚR}}} \quad (4)$$

$s$  – směrodatná odchylka,  $x_{\text{PRŮMĚR}}$  – průměrná hodnota měření

Interval spolehlivosti  $L_{1,2}$ :

$$L_{1,2} = K_3 \cdot R = 1,3 \cdot R \quad (5)$$

$K_3$  – Dean-Dixonův koeficient pro 3 měření,  $R$  – rozpětí (rozdíl mezi největší a nejmenší naměřenou hodnotou)

Hmotnostní koncentrace  $c_g$ :

$$c_g = \frac{c \cdot V}{m} \quad (6)$$

$c$  – molární koncentrace,  $V$  – objem,  $m$  – hmotnost

Mez detekce a stanovitelnosti:

Mez detekce (LOD, limit of detection) vyjadřující citlivost metody se určuje jako koncentrace analytu poskytující signál odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ, limit of quantification) se určuje jako koncentrace analytu poskytující signál odpovídající desetinásobku směrodatné odchylky šumu.

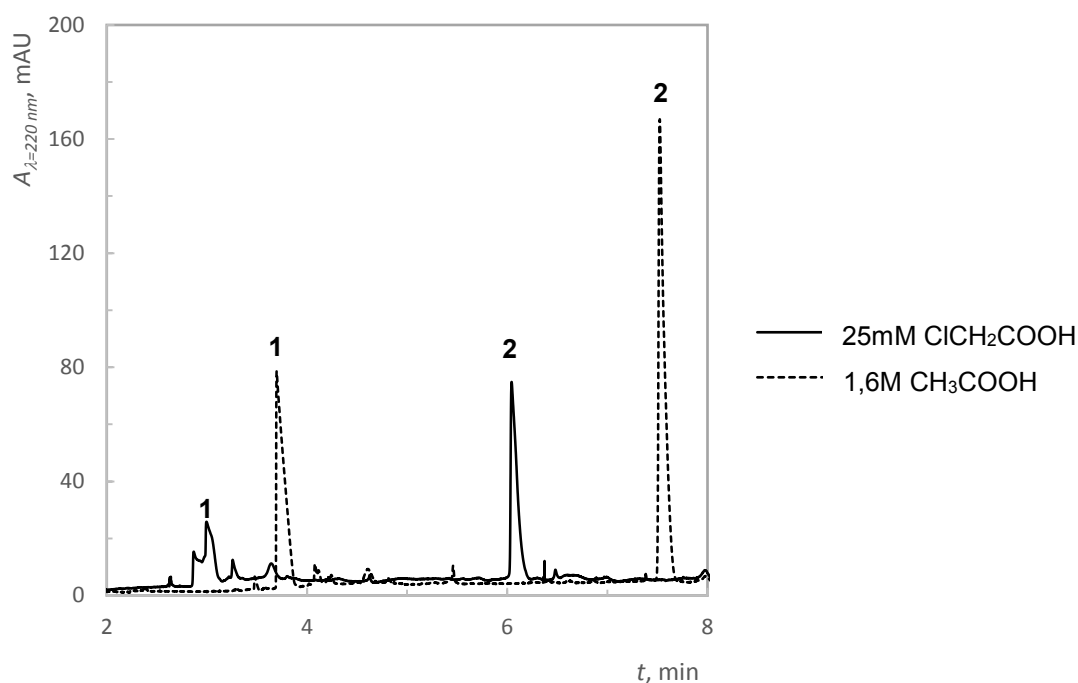


## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Optimalizace metody

#### 4.1.1 Optimalizace složení základního elektrolytu

Základní elektrolyt pro stanovení tryptaminu a tryptofanu jsem zvolila kyselý, protože při nízkém pH dochází k jejich protonizaci. Octová kyselina, která se hojně využívá ke stanovení aminokyselin, byla zvolena na základě článků [23, 24, 25] a chloroctová kyselina na základě bakalářské práce [26]. K identifikaci píků standardů tryptaminu a tryptofanu o koncentraci 1 mmol/l jsem použila jako základní elektrolyt 0,5M roztok kyseliny octové (pH 2,5) a následně jsem jako základní elektrolyt otestovala roztoky 1,6M kyseliny octové (pH 2,3) a 25mM kyseliny chloroctové (pH 2,3). Použila jsem je pro separaci vzorku tabáku s přidavkem standardů o koncentraci 1,5 mmol/l. Z naměřených elektroferogramů (obr. 6) jsem určila jako vhodný BGE pro separaci 1,6M octovou kyselinu, protože poskytuje výrazně vyšší píky a při použití kyseliny chloroctové dochází při stanovení tryptaminu k překryvu jeho píku s píky dalších látek přítomných ve vzorku. 1,6M octová kyselina byla zvolena, protože je vodivější než 0,5M kyselina a rozdíl mezi separací v 0,5M a 1,6M octové kyselině nebyl výrazný, proto nebyla prováděna další optimalizace její koncentrace.



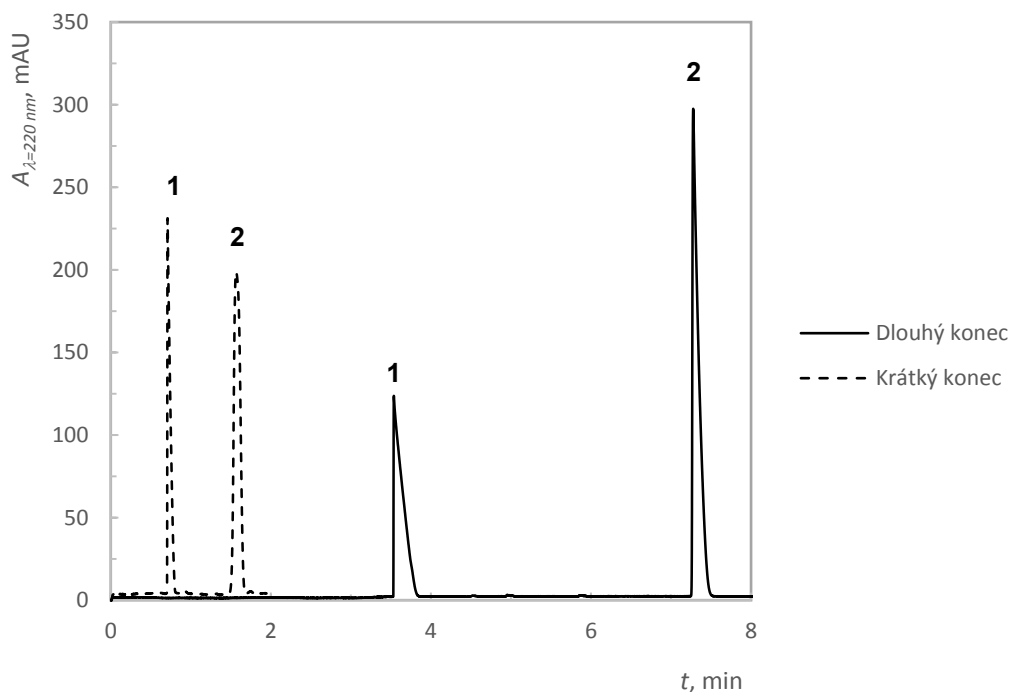
Obr. 6 – Porovnání analýzy vzorku lyofilizovaného tabáku s přidavkem 1,5mM standardů tryptaminu (1) a tryptofanu (2) v 1,6M octové kyselině a 25mM chloroctové kyselině, napětí 30 kV, proud 60  $\mu$ A, dávkování hydrodynamické 5 kPa po dobu 5 s, kapilára 50,5/42,0 cm

#### 4.1.2 Optimalizace dávkování a on-line prekoncentrace

Na vzorku tabáku jsem porovnávala hydrodynamické dávkování (5 kPa, 5 s) s elektrokinetickým (10 kV, 5 až 15 s), při kterém mělo teoreticky dojít ke snížení meze detekce velmi malého píku tryptaminu. Jako vhodný způsob dávkování jsem určila hydrodynamické, protože při elektrokinetickém došlo k deformaci píků a také k úplnému zmizení některých píků s delším migračním časem, například stanovovaného tryptofanu.

Poté jsem na vzorku prováděla několik způsobů on-line prekoncentrace, jednalo se například o natlačení zóny vzorku do kapiláry po dobu 1 minuty (LVSS); natlačení zóny vzorku do kapiláry po dobu 2 minut (LVSS); natlačení zóny vzorku do kapiláry po dobu 2 minut, vložení napětí 30 kV na 60 s a vysunutí zóny 90 s zpět pod tlakem 5 kPa (LVSS + FASS). Po vyhodnocení všech naměřených elektroferogramů jsem určila jako nejvhodnější způsob prekoncentrace natlačování zóny vzorku po dobu 2 minut, od normálního dávkování tlakem 5 kPa 5 s se ale výrazně nelišilo, proto jsem ho nadále nevyužívala.

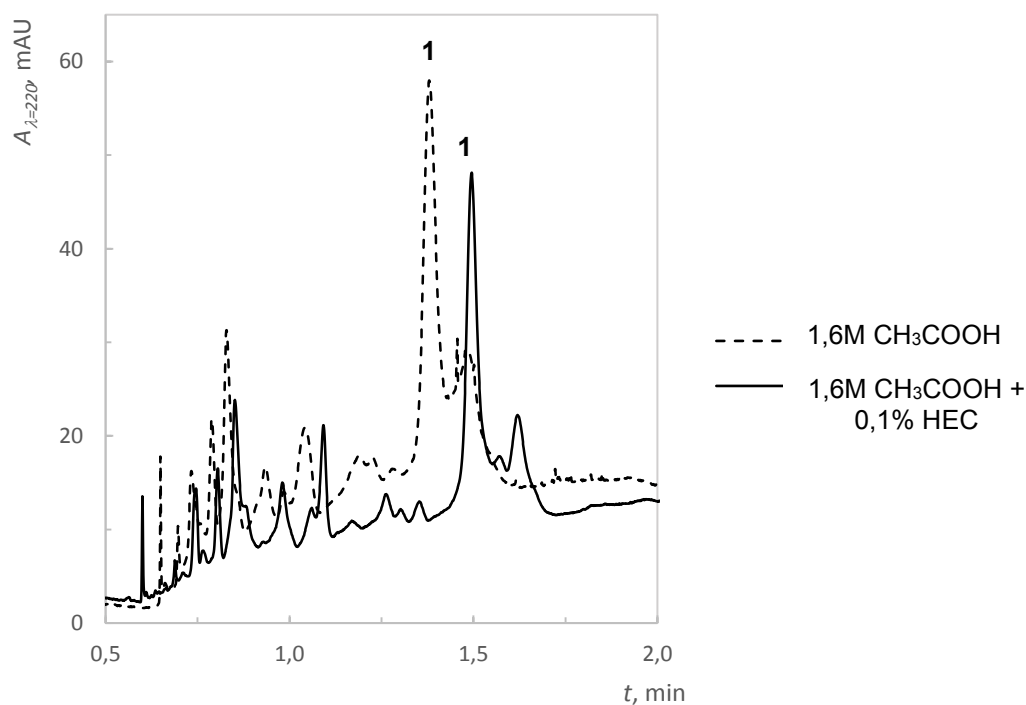
Pro zkrácení velmi dlouhé doby analýzy jsem dávkovala vzorek z opačného konce kapiláry, který je blíže detektoru. Jde o tzv. analýzu z krátkého konce, kdy se obrátí separační napětí, polarita a tlak. Z obr. 7 je patrné, že z 8 minut se analýza zkrátila na 2 minuty.



**Obr. 7 – Porovnání doby analýzy na standardech tryptaminu (1) a tryptofanu (2) o koncentraci 2 mmol/l, napětí 30 a –30 kV, proud 55 a –55  $\mu$ A, dávkování hydrodynamické 5 a –5 kPa po dobu 5 s, kapilára 50,5/42,0 cm a 50,5/8,5 cm**

#### 4.1.3 Příklad přidání hydrofilního polymeru do BGE

Nakonec jsem zkoumala vliv přidavku hydroxyethylcelulózy do základního elektrolytu 1,6M octové kyseliny. Z obr. 8 je patrné, že s přidáním HEC do BGE dojde k lepšímu rozlišení jednotlivých píků ve vzorku, sníží se šum základní linie a píky jsou užší než při použití BGE bez HEC.



Obr. 8 – Porovnání analýzy vzorku tabáku se základním elektrolytem bez a s přidáním hydroxyethylcelulózy (HEC), 1 – tryptofan, napětí  $-30$  kV, proud  $-55$   $\mu\text{A}$ , dávkování hydrodynamické  $-5$  kPa po dobu 5 s, kapilára 50,5/8,5 cm

#### 4.2 Opakovatelnost

Pro ověření opakovatelnosti ploch píků (kvantitativní údaj) a migračních časů (kvalitativní údaj) jsem provedla deset měření standardů o koncentraci 0,045 mmol/l s přidáním vnitřního standardu anilinu o koncentraci 0,5 mmol/l. Z tabulky 1 je zřejmé, že vztažením ploch na vnitřní standard jsem dosáhla podstatně lepších výsledků opakovatelnosti měření, protože relativní směrodatná odchylka se snížila z původních přibližně 17 % na 3,65 %. U měření opakovatelnosti migračních časů (tabulka 2) dochází také ke snížení směrodatné odchylky při vztažení na vnitřní standard.

Tabulka 1 – naměřené a vypočtené hodnoty opakovatelnosti ploch píků standardů tryptaminu a tryptofanu o koncentraci 0,045 mmol/l a anilinu o koncentraci 0,5 mmol/l,  $\lambda(\text{standardy}) = 220 \text{ nm}$ ,  $\lambda(\text{anilin}) = 200 \text{ nm}$ ;  $A$  – plochy píků,  $A_{rel}$  – relativní plochy píků,  $s$  – směrodatná odchylka,  $s_r$  – relativní směrodatná odchylka

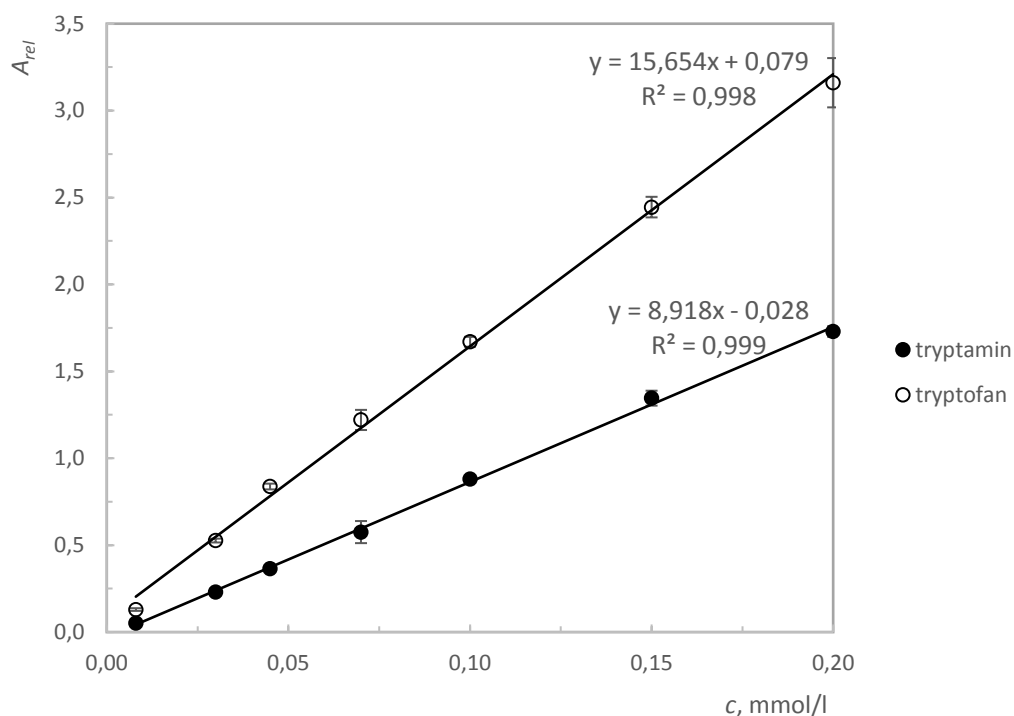
	$A$ [mAU·s]			$A_{rel}$	
	Anilin	Tryptamin	Tryptofan	Tryptamin	Tryptofan
1	30,2	10,0	22,6	0,330	0,747
2	66,5	22,2	45,9	0,334	0,690
3	63,1	20,8	44,5	0,330	0,705
4	64,4	20,8	45,8	0,323	0,712
5	58,2	18,5	40,2	0,318	0,691
6	57,4	18,4	41,4	0,321	0,720
7	63,1	20,9	47,7	0,332	0,757
8	62,6	20,4	45,5	0,325	0,726
9	63,7	21,3	49,3	0,334	0,775
10	67,0	24,4	49,2	0,364	0,734
$s$		3,6	7,4	0,012	0,026
$s_r$ [%]		<b>17,4</b>	<b>16,3</b>	<b>3,65</b>	<b>3,65</b>

Tabulka 2 – naměřené a vypočtené hodnoty opakovatelnosti migračních časů standardů tryptaminu a tryptofanu o koncentraci 0,045 mmol/l a anilinu o koncentraci 0,5 mmol/l,  $\lambda(\text{standardy}) = 220 \text{ nm}$ ,  $\lambda(\text{anilin}) = 200 \text{ nm}$ ;  $t_m$  – migrační čas,  $t_{rel}$  – relativní migrační čas,  $s$  – směrodatná odchylka,  $s_r$  – relativní směrodatná odchylka

	$t_m$ [min]			$t_{rel}$	
	Anilin	Tryptamin	Tryptofan	Tryptamin	Tryptofan
1	0,622	0,802	1,718	1,289	2,762
2	0,577	0,742	1,509	1,286	2,615
3	0,592	0,773	1,637	1,306	2,765
4	0,581	0,752	1,561	1,294	2,687
5	0,575	0,744	1,543	1,294	2,683
6	0,575	0,743	1,576	1,292	2,741
7	0,581	0,756	1,650	1,301	2,840
8	0,583	0,757	1,605	1,298	2,753
9	0,581	0,754	1,635	1,298	2,814
10	0,547	0,708	1,433	1,294	2,620
$s$		0,023	0,077	0,005	0,072
$s_r$ [%]		<b>3,04</b>	<b>4,88</b>	<b>0,42</b>	<b>2,63</b>

### 4.3 Kalibrační přímka

Kalibrační přímku (obr. 9) jsem sestrojila z dat získaných měření standardů tryptaminu a tryptofanu o koncentracích 0,008; 0,03; 0,045; 0,07; 0,1; 0,15; 0,2 mmol/l. Všechna měření jsem provedla ve třech opakováních, výsledky relativních ploch zprůměrovala a vynesla spolu s chybovými úsečkami do grafu.



Obr. 9 – graf závislosti relativních ploch píků  $A_{rel}$  standardů tryptaminu a tryptofanu na jejich koncentraci

### 4.4 Mez detekce a stanovitelnosti

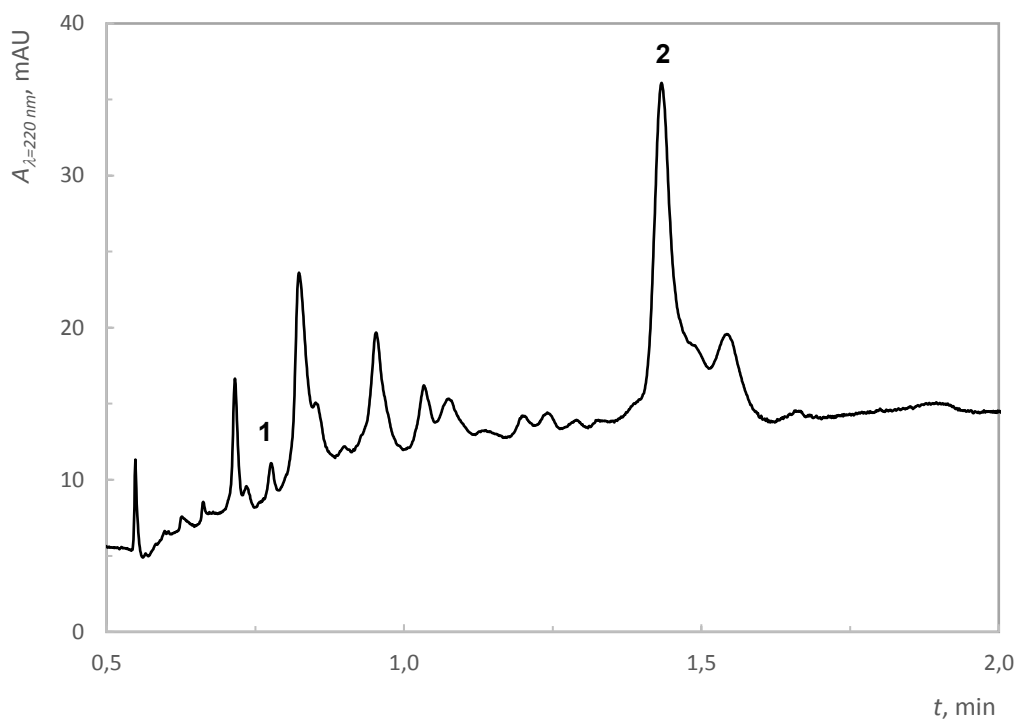
Mez detekce a stanovitelnosti pro tryptamin a tryptofan jsem určila z kalibrace výšek píků. Vypočtené hodnoty jsem uvedla do tabulky 3.

Tabulka 3 – vypočtené hodnoty meze detekce a stanovitelnosti pro tryptamin a tryptofan; LOD – mez detekce, LOQ – mez stanovitelnosti

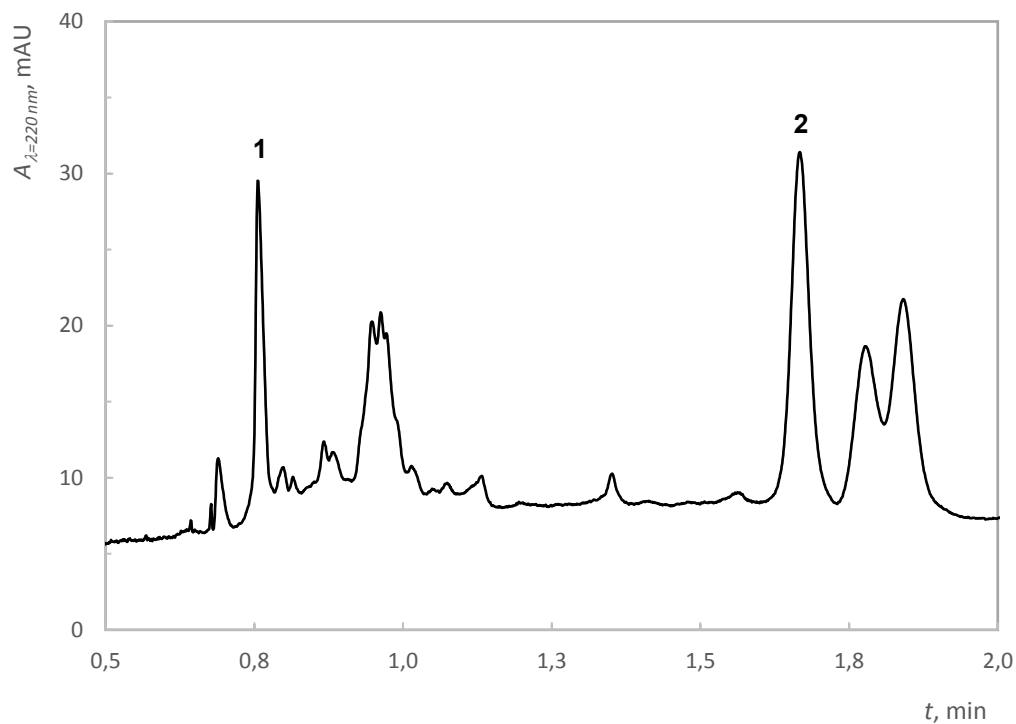
Analyt	LOD [mmol/l]	LOQ [mmol/l]
Tryptamin	0,002	0,006
Tryptofan	0,001	0,005

#### 4.5 Měření reálných vzorků

Pomocí ploch píků získaných z elektroferogramů a kalibrační závislosti jsem určila koncentrace tryptaminu a tryptofanu ve vzorku tabáku virginského (obr. 10) a ve vzorku oomycety *Pythium oligandrum* (obr. 11).



**Obr. 10 – elektroferogram vzorku lyofilizovaného tabáku virginského, 1 – tryptamin, 2 – tryptofan, BGE 1,6M octová kyselina + 0,1% HEC, napětí –30 kV, proud –60  $\mu\text{A}$ , dávkování hydrodynamické –5 kPa po dobu 5 s, kapilára 50,5/8,5 cm**



Obr. 11 – elektroferogram vzorku oomycety *Pythium oligandrum*, 1 – tryptamin, 2 – tryptofan, BGE 1,6M octová kyselina + 0,1% HEC, napětí –30 kV, proud –55  $\mu$ A, dávkování hydrodynamické –5 kPa po dobu 5 s, kapilára 50,5/8,5 cm

Tabulka 4 – vypočtené koncentrace tryptaminu a tryptofanu ve vzorcích,  $c$  – molární koncentrace,  $c_g$  – hmotnostní koncentrace,  $L_{1,2}$  – interval spolehlivosti

Analyt	$C_{\text{TABÁK}}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$c_g \text{ TABÁK}$ [ $\mu\text{mol/g}$ ]	$L_{1,2} \text{ TABÁK}$ [ $\mu\text{mol/g}$ ]	$C_{\text{OOMYCETA}}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	$L_{1,2} \text{ OOMYCETA}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]
Tryptamin	8,1	0,11	0,01	50,4	7,9
Tryptofan	33,6	0,71	0,11	60,5	2,0

## 5 Závěr

Cílem této práce byl vývoj metody stanovení tryptaminu a tryptofanu v biologickém materiálu, konkrétně ve vzorku listů lyofilizovaného tabáku virginského a v kultivačním mediu oomycety *Pythium oligandrum*. Během práce jsem optimalizovala složení základního elektrolytu na 1,6M kyselinu octovou s 0,1% HEC a způsob dávkování na hydrodynamické. Pokusy on-line prekoncentračních technik pro snížení meze detekce nebyly úspěšné.

Použitelnost metody byla otestována na dvou biologických materiálech. Vzorek lyofilizovaného tabáku virginského obsahoval  $0,11 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/g}$  tryptaminu a  $0,71 \pm 0,11$   $\mu\text{mol/g}$  tryptofanu a vzorek kultivačního media oomycety *Pythium oligandrum* obsahoval  $50,4 \pm 7,9$   $\mu\text{mol/l}$  tryptaminu a  $60,5 \pm 2,0$   $\mu\text{mol/l}$  tryptofanu. V tabáku je však stanovení tryptofanu pouze orientační, protože nedošlo k úplné separaci píků a tím dochází k částečné interferenci dvou píků.



## Seznam použité literatury

- [1] Kalina, K. *Klinická adiktologie*. Praha: Grada Publishing, 2015. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-4331-8.
- [2] Thomas, J.C., Adams, D.G., Nessler, C.L., Brown, J.K., Bohnert, H.J. Tryptophan decarboxylase, tryptamine, and reproduction of the whitefly. *Plant Physiol* 109 (1995) 717-720.
- [3] Smith, T.A. Tryptamine and related compounds in plants. *Phytochemistry* 16 (1977) 171-175.
- [4] Patočka, J. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0608-3
- [5] Singh, B. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. New York: M. Dekker, c1999. ISBN 0824702042.
- [6] Orel, M. *Nervové buňky a jejich svět*. Praha: Grada, 2015. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-5070-5.
- [7] Brozova, J. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science* 38 (2002) 29-35.
- [8] Horner, N.R., Grenville-Briggs, L.J., Van Vest, P. The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. *Fungal biology* 116 (2012) 24-41.
- [9] Klouda, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [10] Michalcová, L., Glatz, Z. Nové směry ve studiu biomolekulárních interakcí pomocí kapilární elektroforézy. *Chemické listy* 110 (2016) 249–257.
- [11] Li, S. F. Y. *Capillary electrophoresis: principles, practice, and applications*. New York: Elsevier, 1992. ISBN 0-444-89433-0.
- [12] Poole, C.F. *The essence of chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2003. ISBN 0-444-50199-1.

- [13] Kašička, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy* 91 (1997) 320-329.
- [14] Heiger, D. High performance capillary electrophoresis, Agilent Technologies, Germany (2000).
- [15] Li, S., Cao, W., Hui, Y.S., Wen, W. Simple and reusable picoinjector for liquid delivery via nanofluidics approach. *Nanoscale Res Lett.* 9(1) (2014) 147.
- [16] Horáková, J., Maier, V., Ševčík, J. On-line prekoncentrační techniky v kapilární elektroforéze. *Chemické listy* 100 (2006) 163–168.
- [17] Petr, J., Maier, V., Znaleziiona, J., Vítková, K., Ranc, V. Ševčík, J. On-line prekoncentrace na rozhraní elektrolytů o různém pH aneb krása kapilární elektroforézy. *Chemické listy* 103 (2009) 661–666.
- [18] Schmitt-Kopplin, P. *Capillary electrophoresis: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, c2008. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), v. 384. ISBN 978-1-58829-539-2.
- [19] Bharadwaj, R., Santiago J.G. Dynamics of field-amplified sample stacking. *J. Fluid Mech.* 543 (2005) 57-92.
- [20] García, C. D., Chumbimuni-Torres, K. Y., Carrilho, E. Capillary electrophoresis and microchip capillary electrophoresis: principles, applications, and limitations. Hoboken: John Wiley, c2013. ISBN 978-0-470-57217-7.
- [21] Quirino, J.P., Terabe, S. Approaching a Million-Fold Sensitivity Increase in Capillary Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection: Cation-Selective Exhaustive Injection and Sweeping. *Analytical Chemistry* 72 (2000) 1023-1030.
- [22] Kim, J.B., Britz-McKibbin, P., Hirokawa, T., Terabe, S. Mechanistic Study on Analyte Focusing by Dynamic pH Junction in Capillary Electrophoresis Using Computer Simulation. *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3986-3993.
- [23] Hodek, O., Křížek, T., Coufal, P., Ryšlavá, H. Design of experiments for amino acid extraction from tobacco leaves and their subsequent determination by capillary zone electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (2017) 2383-2391.

- [24] Coufal, P., Zuska, J., van de Goor, T., Smith, V., Gaš, B. Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* 24 2003 671–677.
- [25] Tůma, P., Málková, K., Samcová, E., Štulík, K. Rapid monitoring of arrays of amino acids in clinical samples using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Sep Sci.* 33 (2010) 2394–2401.
- [26] Molnárová K. *Optimalizácia elektroforetického stanovenia protamínu a inzulínu*, Praha, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.