

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

**Přirodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů**

OPTIMALIZACE SPE METODY PRO STANOVENÍ FYTOHORMONŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2012

Jan Pavlík

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

OPTIMALIZACE SPE METODY PRO STANOVENÍ FYTOHORMONŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Jan Pavlík

Studijní obor: Analytická chemie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.

Olomouc, 2012

Souhrn

Fytohormony jsou látky s regulační aktivitou, které hrají důležitou roli při vývoji či růstu rostlin. Vyvinuli jsme metodu pro efektivní a rychlé souběžné stanovení více skupin fytohormonů. Předkládaná metoda byla optimalizována pro stanovení auxinů, cytokininů a kyseliny abscisové.

Extrakcí do vhodného rozpouštědla a přečištěním pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) využívající kombinaci směsných kolon Oasis[®] MCX a MAX byly získány tři frakce látek, rozdělených na základě jejich acidobazických vlastností. Bazičtější cytokininy byly odděleny od kyselějších auxinů a kyseliny abscisové za současné eliminace interferujících nečistot. Byla testována návratnost jednotlivých analytů ovlivněná výběrem vhodného extrakčního činidla. Použití 80% methanolu bylo zvoleno jako kompromis mezi požadavky na typ extrakčního činidla a chemickými vlastnostmi různých analytů. Dále byl pro tandemové spojení SPE kolon ověřován vliv odpařování použitého rozpouštědla na ztrátu analytu a vliv matričního efektu. Vyvinutá metoda byla validována pomocí základních validačních ukazatelů (relativní návratnost, denní a mezidenní variabilita, přesnost a správnost metody) na třech koncentračních hladinách (0,1; 1 a 10 pmol) přidaných k rostlinnému extraktu.

Použitelnost navrhované metody využívající tandemové SPE uspořádání pro izolaci vybraných fytohormonů byla ověřena aplikací vyvinutého postupu na biologickém materiálu *Arabidopsis thaliana*. Závěrečná analýza poskytla výsledky endogenní hladin auxinů, cytokininů a kyseliny abscisové u 14- a 21-denních rostlin různých ekotypů *Arabidopsis* (Br-0, Cvi-0, GOT-1, RRS-7 a Van-0).

Podle naměřených parametrů a získaných výsledků lze usoudit, že SPE metoda popsaná v této práci může být dále rozšířena o další metabolity studovaných hormonů nebo aplikována na jiné rostlinné matrice. Samotné portfolio studovaných skupin fytohormonů lze rozšířit například o gibberelliny, jasmonáty či kyselinu salicylovou.

Summary

Plant hormones are substances with control activity and play an important role in plant development and growth. We have developed a multiple method for efficient and rapid determination of phytohormones. The present method was optimized for the determination of auxins, cytokinins and abscisic acid.

Extraction in efficient solvent and purification using solid-phase extraction (SPE) combined Oasis[®] MCX and MAX columns divided the samples on three fractions, based on their acid and base properties. The basic cytokinins were separated from acidic auxins and abscisic acid together with elimination of interfering impurities. A suitable extraction solvent as a major impact on the recovery of individual analytes was tested. The use of 80% methanol was chosen as a compromise between the requirements for type of extraction and chemical properties of various analytes. Moreover, the loss of analytes during evaporation step and the effect of plant matrix were elucidated for tandem SPE protocol. Basic validation parameters (relative recoveries, intra- and inter-day variabilities, method precision and accuracy) were calculated with phytohormone standards added in plant extract at three different concentrations (0.1, 1 and 10 pmol).

The applicability of the proposed methods using tandem SPE protocol for the quantification of the phytohormones selected was verified by application of the procedure developed on biological material of *Arabidopsis thaliana*. The final analysis showed endogenous levels of auxins, cytokinins and abscisic acid at 14-day and 21-day old *A. thaliana* plants (ecotypes Br-0, Cvi-0, GOT-1, RRS-7, and Van-0).

Finally, according to the parameters and results measured, the developed method for phytohormone extraction and purification seems to be suitable not only for their quantification in *Arabidopsis* but also for the measurement of hormonal levels in other plant materials. The whole SPE protocol can be further extended to other studied metabolites and hormonal groups such as gibberellins, jasmonates or salicylic acid.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Všechny literární prameny a informace, které jsem v práci použil, jsou v seznamu literatury.

Olomouc, 2012

.....

Jan Pavlík

Poděkování

Děkuji tímto vedoucímu své bakalářské práce panu Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za vedení, cenné rady a podnětné připomínky při tvorbě této práce.

OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část.....	2
2.1 Rostlinné hormony	2
2.1.1 Auxiny	2
2.1.1.1 Biosyntéza auxinů	4
2.1.1.2 Metabolismus auxinů.....	4
2.1.2 Cytokininy	5
2.1.2.1 Biosyntéza cytokininů.....	7
2.1.2.2 Metabolismus cytokininů.....	8
2.1.3 Kyselina abscisová.....	10
2.1.3.1 Biosyntéza kyseliny abscisové.....	11
2.1.3.2 Metabolismus kyseliny abscisové	14
2.2 Metody analýzy fytohormonů	15
2.2.1 Matriční efekt.....	15
2.2.2 Metody extrakce.....	15
2.2.3 Metody purifikace	17
2.2.3.1 Extrakce kapalina-kapalinou (Liquid-Liquid Extraction) - LLE	17
2.2.3.2 Extrakce na pevné fázi (Solid-Phase Extraction) - SPE.....	17
2.2.4 Analytické metody	20
2.2.4.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie.....	21
2.2.4.2 Hmotnostní spektrometrie.....	22

3.	Materiál a metody	25
3.1	Chemikálie a použitý materiál.....	25
3.2	Specifikace analytů vybraných ze studovaných skupin fytohormonů	25
3.3	Přístroje	26
3.4	Rostlinný materiál.....	26
3.5	Extrakce a purifikace fytohormonů	27
3.6	Parametry LC-ESI-MS/MS metody	29
4.	Výsledky a diskuze	31
4.1	Ověření podmínek analýzy fytohormonů	31
4.2	Vliv odpařování na ztrátu analytu	33
4.3	Návratnost u různých typů SPE kolon.....	34
4.4	Test spojení směsných SPE kolon MCX-MAX	38
4.5	Výběr vhodného extrakčního činidla	41
4.6	Vliv matričního efektu	42
4.7	Validace SPE metody	48
4.8	Stanovení vybraných fytohormonů v rostlinném materiálu.....	51
5.	Závěr	54
6.	Literatura	55
7.	Seznam použitých zkratek.....	62
8.	Přílohy	64

1. Úvod

Auxiny hrají důležitou roli v různých fyziologických procesech, jako apikální dominance, tropismus, růst buňky, zakládání pupenů a iniciace kořenů. Cytokininy regulují mnoho rostlinných procesů, včetně dělení a růstu buněk, vývoje chloroplastu, senescenci a diferenciaci buněk. Kyselina abscisová je klíčový hormon v oblasti stresu rostlin, zvláště rostlinné reakce na nedostatek vody, osmotický stres či nízkou teplotu.

Obecně je známo, že rostlinný extrakt obsahuje fytohormony ve velmi malých koncentracích, což klade nároky na velmi specifické postupy extrakce a purifikace, které musí omezovat zbytečné ztráty molekul analytu a eliminovat možné balastní látky. Je časově i finančně náročné stanovovat fytohormony jednotlivými analýzami s ohledem na jejich chemickou různorodost, vhodnost různých extrakčních činidel a purifikačních kroků. Z tohoto důvodu jsme se snažili navrhnout izolační postup, který by byl dostatečně robustní a byl schopný podat informace o koncentracích studovaných fytohormonů současně. Ve spojení se zvolenou analytickou koncovkou, kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie, je možné vyvinutý purifikační postup dále rozvíjet a rozšiřovat o další možné metabolity a nové fytohormonální skupiny.

2. Teoretická část

2.1 Rostlinné hormony

V rostlinách se vyvinul specifický systém biologicky aktivních látek, které vykonávají klíčovou roli při různých fázích vývoje, jako je klíčení, růst, reprodukce, senescence či biotická a abiotická obranná reakce na lokální stres.¹⁻³ Míra fyziologické odpovědi na přítomnost fytohormonů v rostlinách je přímo úměrná jejich koncentraci.⁴ Rostlinné hormony se ve svých účincích na životní pochody rostlin vzájemně ovlivňují a v tomto ohledu vstupují do synergických, popř. antagonistických vztahů. Mechanismy těchto interakcí jsou různé a nejsou ještě plně objasněny. Některé hormony kromě vlastní signální úlohy ovlivňují transkripci a tím i biosyntézu hormonů jiných.

První fytohormon byl objeven v roce 1926 a byl pojmenován auxin.⁵ Rostlinné hormony jsou rozdělovány do několika hlavních tříd: auxiny, cytokininy (CK), kyselina abscisová (ABA), gibberelliny (GA), ethylen, jasmonáty (JA), kyselina salicylová (SA) a brassinosteroidy.⁶ Nejnovější skupinou jsou látky terpenoidní povahy (seskviterpenoidní laktony) nazvané strigolaktony.^{7,8}

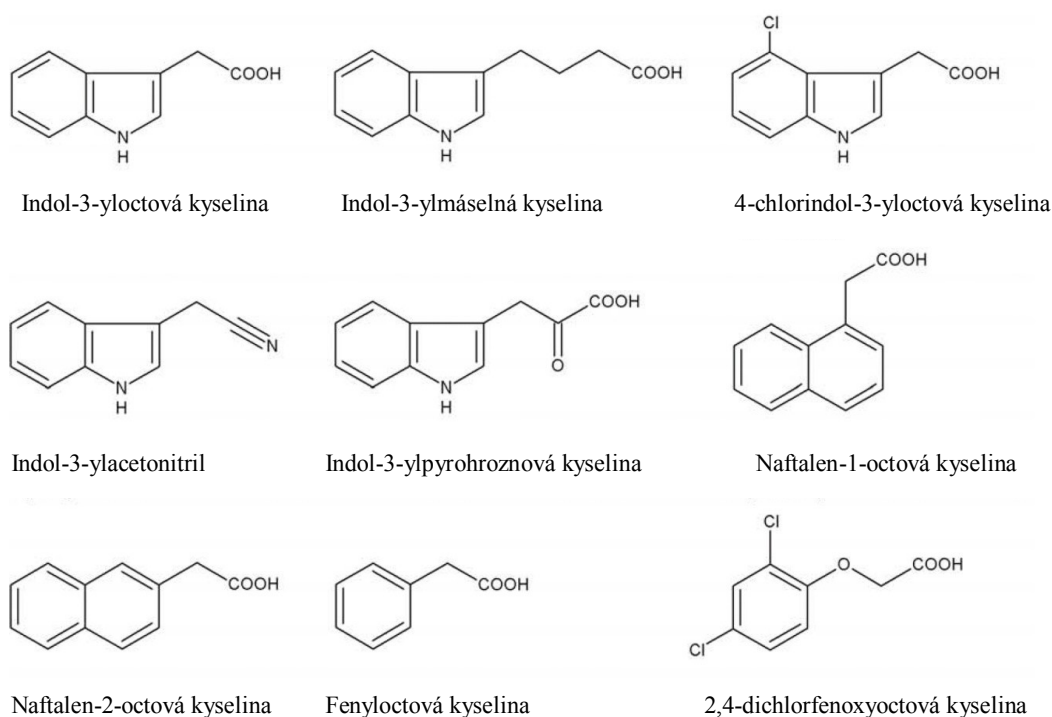
Vzhledem k tomu, že fytohormony jsou typicky přítomné v rostlinných pletivech v nízkých koncentracích, stanovení jejich koncentrace je velmi obtížné. Například endogenních auxinů se obvykle vyskytují kolem 1-100 ng v gramu zeleného materiálu.⁹ Mnoho fytohormonů existuje v několika strukturních modifikacích s různými funkčními skupinami či různými postranními řetězci. Vyskytují se současně vedle jiných endogenních organických sloučenin, které mohou ovlivňovat jejich závěrečné stanovení.¹⁰ V této práci jsme se zaměřili na izolaci a stanovení tří hormonálních skupin – auxinů, cytokininů a kyseliny abscisové.

2.1.1 Auxiny

Auxiny regulují všechny aspekty růstu a vývoje rostlin.¹¹ Hrají důležitou roli v různých fyziologických procesech, jako apikální dominance, tropismus, růst buňky, zakládání pupenů a iniciace kořenů.^{3,12} Jsou to chemicky různorodé látky, z nichž většina tvoří aromatický systém, jehož článkem může být indol, fenyl nebo naftalen, s postranním řetězcem obsahujícím karboxylovou skupinu.¹³

Primární auxin u většiny rostlin je kyselina indol-3-ylactová (IAA).^{3,12} V registru CAS můžeme najít IAA pod číslem 87-51-4. Molární hmotnost je 175.189 g.mol⁻¹.¹⁴

Mezi hlavní syntetické auxinové regulátory růstu rostlin s vysokou aktivitou patří: kyselina naftalen-1-octová a látky odvozené od benzenového jádra se substituenty na místech 2 a 4, např. kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová. Izomer kyseliny naftalen-1-octové, kyselina naftalen-2-octová, má nižší biologickou aktivitu. Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová se používá jako herbicid.¹⁵ Vybrané struktury přírodních a syntetických auxinů jsou uvedeny na Obrázek 1.



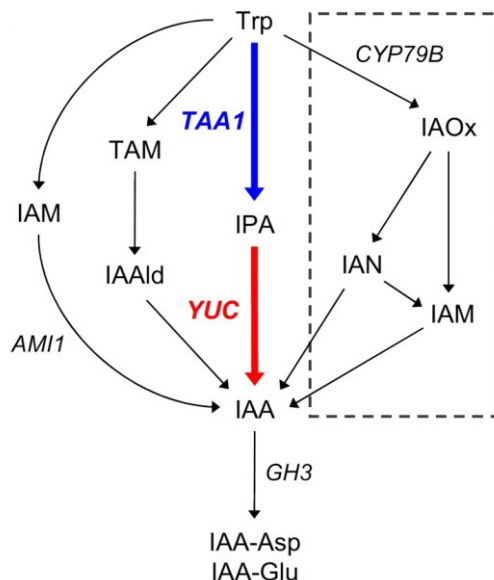
Obrázek 1 – Vybrané struktury přírodních a syntetických auxinů.¹³

Biologie auxinů patří mezi nejstarší oblasti experimentálního výzkumu rostlin. Charles Darwin prováděl prvotní pokusy s auxiny pozorováním účinků hypotetické látky ovlivňující stáčení a prodlužování výhonků rostlin za světlem.¹⁶ Na základě Darwinových experimentů rozšířil výzkum Theophil Ciesielski zkoumáním gravitropismu, tedy ohybu kořenů podle směru gravitace.¹⁷

2.1.1.1 Biosyntéza auxinů

Vyšší rostliny mohou IAA syntetizovat v listech, děložních lístcích (kotyledonech) a v kořenech. Nejvyšší biosyntetická kapacita byla u *Arabidopsis thaliana* pozorována v mladých listech.¹⁸ K regulaci produkce IAA přispívá několik biosyntetických drah.¹⁹ Rostliny používají k biosyntéze IAA dvě základní dráhy: na tryptofanu závislou a na tryptofanu nezávislou dráhu.^{19,20} Stále probíhá výzkum k objasnění jednotlivých biosyntetických drah na úrovni poznání jednotlivých příslušných genů a enzymů.¹⁹

Za zmínku stojí čtyři na tryptofanu závislé dráhy: indol-3-ylacetaldoximová; tryptaminová; přes kyselinu indol-3-ylpyrohroznovou a indol-3-ylacetamidová (viz Obrázek 2).²¹



Obrázek 2 – Schéma biosyntézy IAA:

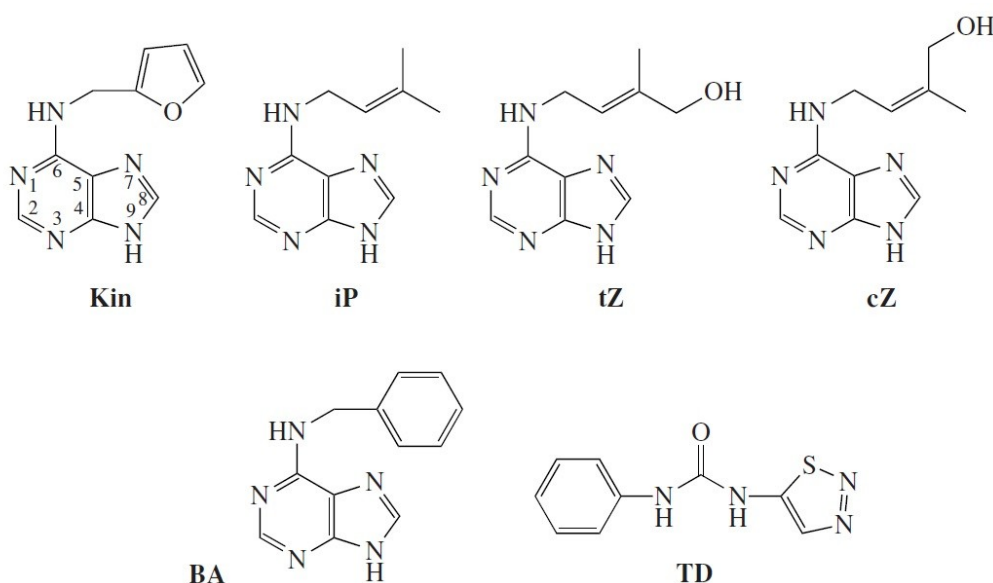
Indol-3-ylacetaldoximová (IAOx) dráha (rámeček); tryptaminová (TAM) dráha; dráha přes kyselinu indol-3-ylpyrohroznovou (IPA) a indol-3-ylacetamidová (IAM) dráha; barevně jsou označeny nově navržené změny v popisu biosyntézy^{22,23,24}

2.1.1.2 Metabolismus auxinů

Odbourávání kyseliny indol-3-ylactové probíhá různými metabolickými drahami, které jsou buď nevratné či podléhají enzymatické hydrolyze.¹³ IAA může být vázána esterickou vazbou na cukr nebo amidovou vazbou k aminokyselinám, peptidům^{19,25}

sklizně obilovin tím, že aktivují květenství meristému (např. u rýže *Oryza sativa*).²⁹ Akumulace CK v tabáku (*Nicotiana tabacum*) vede k toleranci vůči extrémnímu suchu.³⁰

Mezi významné zástupce této fytohormonální skupiny patří *trans*-zeatin (tZ) a isopentenyladenin (iP). Systematický název tZ je 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin. V CAS registru je tato látka evidována pod číslem 1637-39-4. Jeho bílé až nažloutlé krystalky mají bod tání 208-215 °C.³¹ Molární hmotnost zeatinu je 219,243.³² Systematický název iP je N⁶-(δ -2-isopentenyl)-adenin. CAS registrační číslo je 2365-40-4. Jde o bílou krystalickou látku s molární hmotností 203,24.³³



Obrázek 4 – Struktury cytokininů.³⁴
(Kin = kinetin; iP = isopentenyladenin; cZ = *cis*-zeatin; tZ = *trans*-zeatin; BA = 6-benzyladenin; TD = thidiazuron)

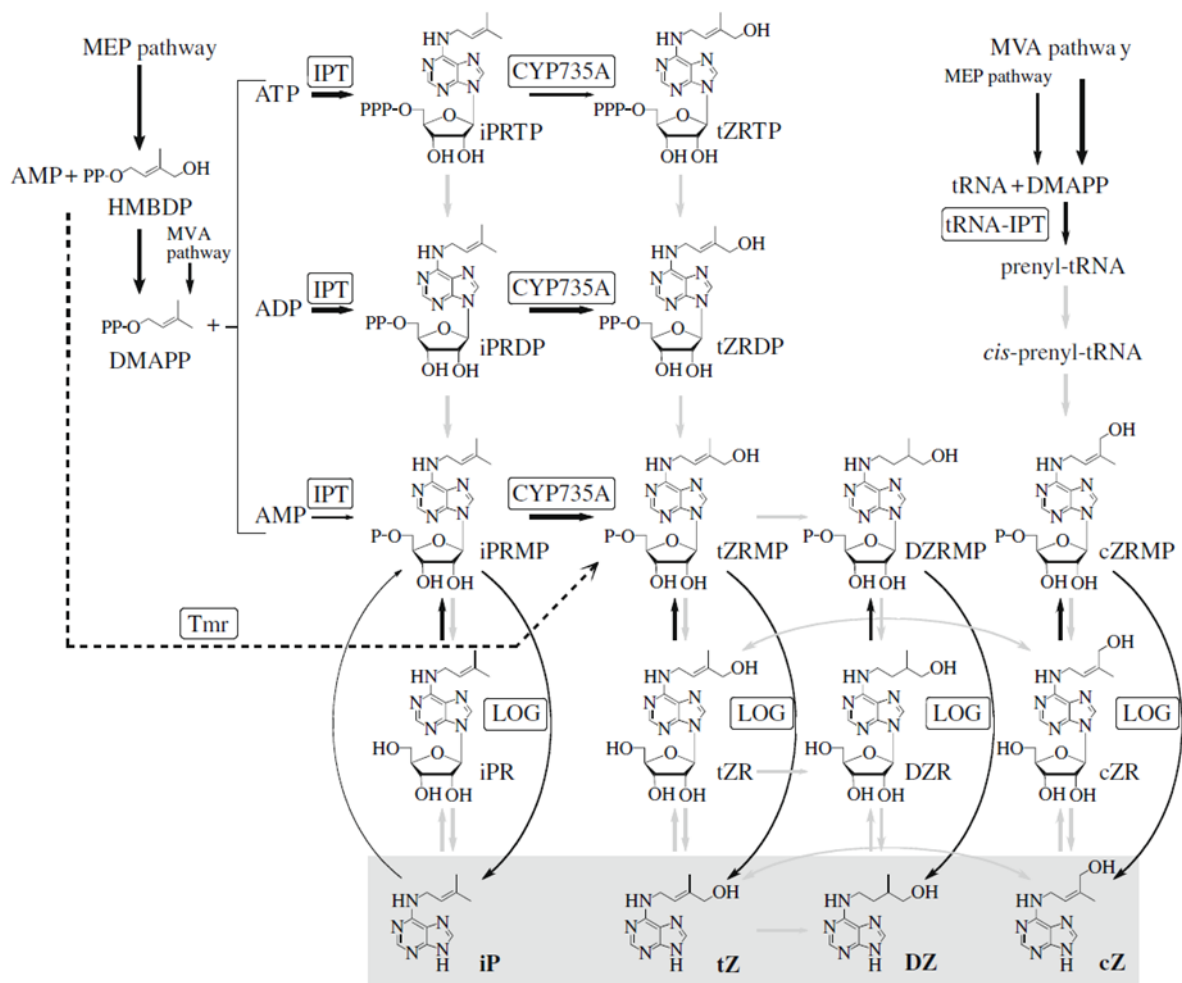
Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou relativně jednoduché deriváty adeninu modifikované na atomu dusíku na pozici 6 v šestičlenném heterocyklu (viz Obrázek 4).³⁴ Cytokininy s navázaným isopentenylovým řetězcem právě na této pozici se nazývají isoprenoidní cytokininy. Aromatické cytokininy obsahují místo alifatického řetězce benzylový zbytek. Fytohormony, u kterých se isopentenylový řetězec nemodifikuje, se řadí do podskupiny cytokininů isopentenylového typu (iP-tyt).³⁵ Rostlinné enzymy hydroxylující alifatický řetězec na koncovém uhlíku zapříčiňují výskyt podskupiny zeatinů (Z-tyt). U zeatinu jsou možné dva stereoizomery: *cis*-zeatin (koncová hydroxy skupina je orientována směrem k adeninu tak, aby vznikla vodíková vazba mezi vodíky OH skupiny a atomem dusíku v poloze 1 na adeninu) a *trans*-zeatin (isopentenylová skupina je orientována směrem

ven z adeninového heterocyklu).³⁶ Dalšími přírodními cytokininy jsou: dihydrozeatin (redukováná dvojná vazba v postranním řetězci), 6-benzyladenin³⁴ a topoliny (aromatický cytokinin s N⁶-substituovaným hydroxybenzylovým zbytkem)³⁷. Mezi syntetické cytokininy patří deriváty močoviny a thiomčoviny, např. thidiazuron nebo N,N'-difenylmočovina.

První identifikovaný cytokinin, 6-furfurylaminopurin (kinetin), byl izolován roku 1955 v autoklávovaném sledím spermatu.³⁸ O téměř dvacet let později byl připraven kinetin poprvé synteticky.³⁴ První přírodní cytokinin, zeatin, byl izolován v Austrálii v šedesátých letech z kukuřice (*Zea mays*).³⁹ Biosyntéza isoprenoidních cytokininů v rostlinách je intenzivně studována a částečně objasněna.^{40,41} Biosyntéza aromatických cytokininů prozatím vysvětlena nebyla.

2.1.2.1 Biosyntéza cytokininů

Biosyntéza CK je naznačena na Obrázek 5. Isoprenoidní postranní řetězce N⁶-(2-isopentenyl)adeninu a *trans*-zeatinu pochází převážně z methylerythritol fosfátu (MEP), zatímco velká část *cis*-zeatinu (cZ) je odvozena z mevalonátové dráhy (MVA). Rostlinné isopentenyltransferasy (IPT) využívají adenosintrifosfát nebo adenosindifosfát jako isoprenoidní akceptory k formování CK-nukleosidových tri- a difosfátů (iPRTP a iPRDP).⁴⁰ Defosforylace iPRTP a iPRDP fosfatasou, fosforylace isopentenyldeninosinu (iPR) adenosinkinasou a konjugace fosforibosylu na iP díky adeninfosforibosyltransferase vytváří metabolický fond iPRMP a iPRDP. Adeninfosforibosyltransferasa využívá nejen iP, ale i další isoprenoidní CK. Nukleotidy CK jsou převedeny na odpovídající tZ-nukleotidy pomocí cytochromu P450 monooxygenasa (CYP735A). tRNA-IPTs katalyzuje prenylace na tRNA, což vede k produkci cZRMP. CK-nukleosidové monofosfáty jsou přímo katalyzovány na aktivní formu CK (volné báze), díky genu pojmenovanému jako LONELY GUY (LOG). cZ a tZ mohou být enzymaticky konvertovány zeatin *cis-trans* isomerázou.⁴² Cytokininy jsou syntetizovány nejen v kořenech, ale i v listech, stoncích či květech. Exprese genu CYP735A probíhá především v kořenech.⁴³



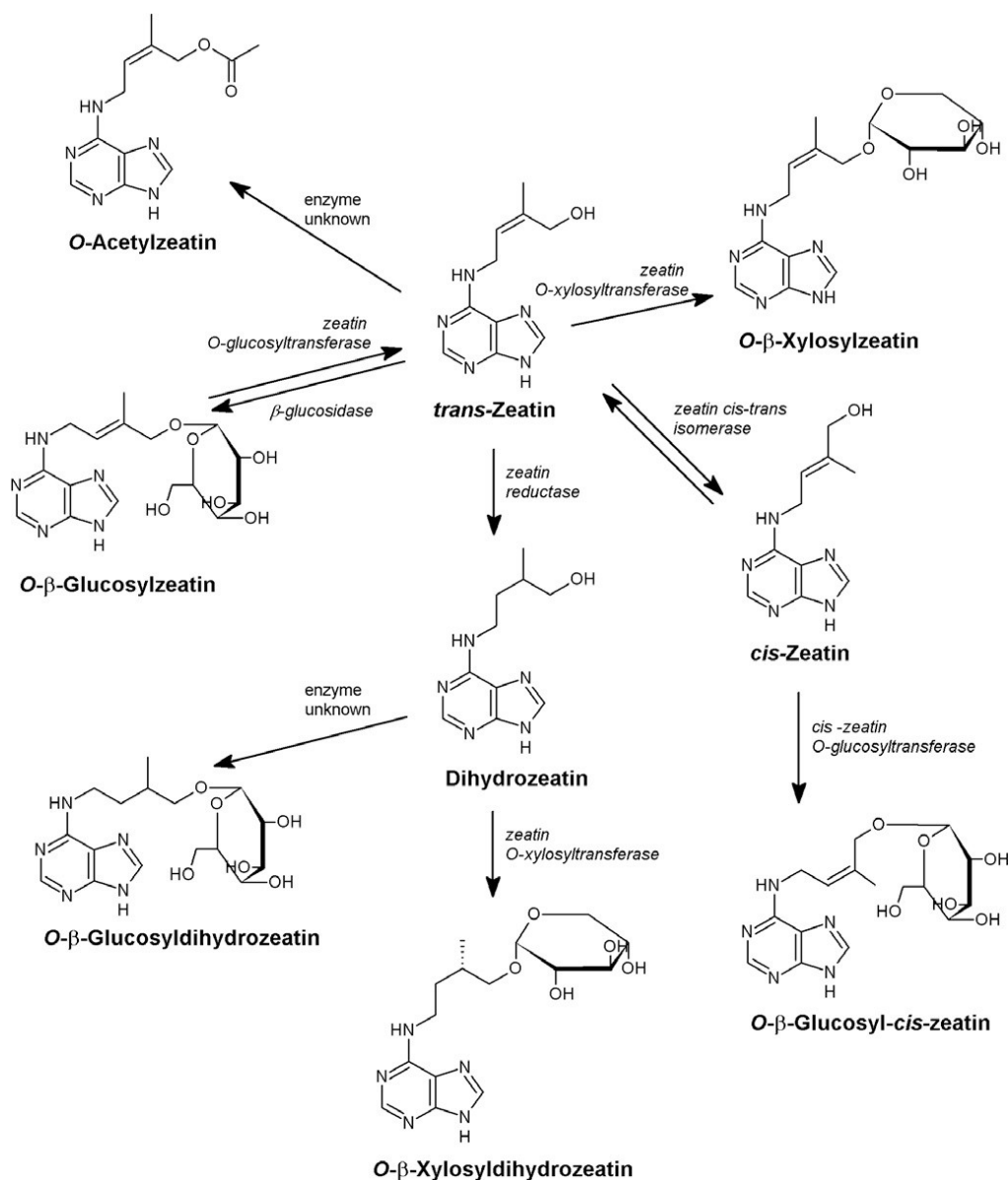
Obrázek 5 – Model biosyntézy cytokininů u *Arabidopsis thaliana*.⁴²
Šířka šipek a linek udává sílu metabolického toku.

2.1.2.2 Metabolismus cytokininů

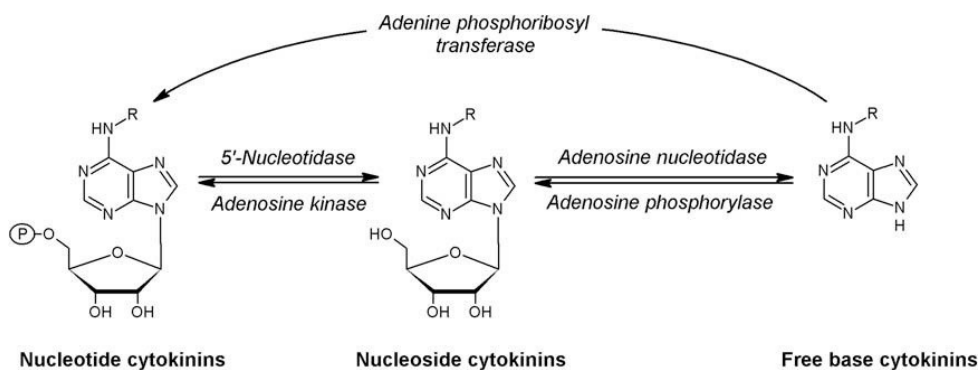
Inaktivace cytokininů probíhá degradací nebo konjugací (viz Obrázek 6). Degradací krok hraje důležitou roli při regulaci aktivity CK a bývá realizován katalýzou cytokinindehydrogenasou (CKX).^{43,44} Relativní aktivita cytokininů se může u rostlinných druhů lišit a různá je také citlivost CKX pro jednotlivé cytokininové báze.^{45,46} Obecně platí, že volné báze a ribosidy od iP a tZ jsou lepšími substráty pro CKX než cZ a aromatické cytokininy. Oproti tomu dihydrozeatin je odolný vůči CKX.⁴²

Konjugace CK s cukernými zbytky může probíhat na pozicích N³, N⁷ a N⁹ purinového kruhu či na hydroxylové skupině prenylového postranního řetězce.⁴⁷ Konjugace

a dekonjugace tZ je naznačena na Obrázek 6. O-glykosylované formy isoprenoidních a aromatických CK se nejčastěji vyskytují u vyšších rostlin.⁴⁸ O-glykosiláty a O-xylosyláty CK jsou důležité pro skladování, přepravu a ochranu před degradujícími enzymy. Navíc tyto metabolity lze snadno přeměnit β -glukosidázou na aktivní formu CK (viz Obrázek 7).⁴⁹



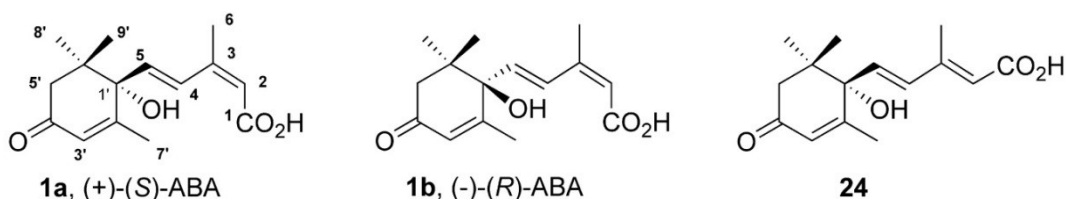
Obrázek 6 – Konjugace a dekonjugace CK na N⁶ isoprenoidním postranním řetězci.¹³



Obrázek 7 - Interkonverze CK bází, nukleosidů a nukleotidů.¹³

2.1.3 Kyselina abscisová

S-(+)-kyselina abscisová (Obrázek 8) je klíčový hormon hrající významnou roli zejména při stresu rostlin.³ Reguluje embryonální vývoj a fyziologické adaptace na různé podmínky životního prostředí, jako jsou např. nedostatek vody, osmotický stres či nízká teplota, což se v danou chvíli v rostlině projeví změnou koncentrace ABA. Kyselina abscisová podporuje uzavření průduchů tím, že rychle mění iontové toky v krycích buňkách. Tento děj nastává zvláště v období sucha, ve snaze omezit únik vody z listů, kdy je ABA nejdříve syntetizována v kořenech a následně transportována do listů.⁵⁰ Obecně platí, že ABA působí jako inhibitor, který ovlivňuje růst pupenů a osiva či klidové stádium pupenů.^{3,12} Zajímavý je i význam reverzibilní fosforylace proteinů a úpravy cytosolické hladiny vápníku a pH jako meziproductů při transdukci signálu ABA.⁵⁰

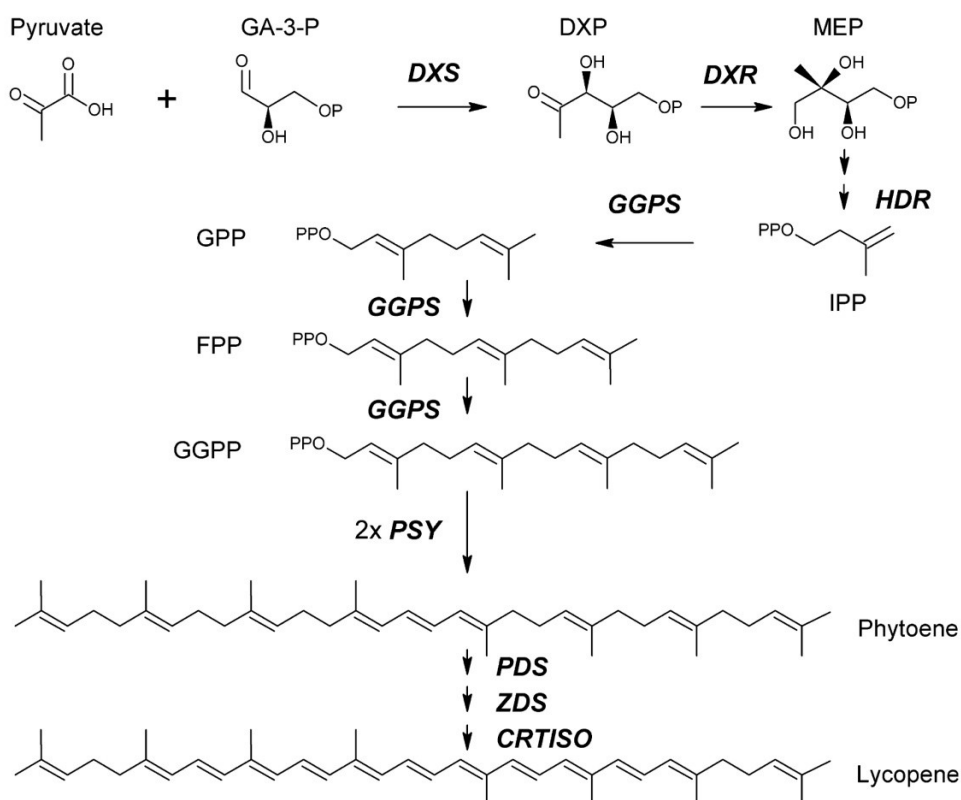


Obrázek 8 – Struktura S-ABA, R-ABA a 2-trans-ABA.⁵¹

S-(+)-kyselina abscisová je fytohormon vedený pod registračním číslem CAS 21293-29-8. Její systematický název je [S-(Z,E)]-5-(1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-

oxocyklohex-2-en-1-yl)-3-methylpenta-2,4-dienová kyselina. Teplota varu je 120 °C (sublimuje) a molární hmotnost je 264,321 g/mol.⁵²

Od objevení struktury ABA v šedesátých letech dvacátého století byly syntetizovány stovky analogů kyseliny abscisové a jejích metabolitů. Rostliny syntetizují pouze S-ABA. Její R-enantiomer se v přírodě nevyskytuje. Pro biochemické studie se proto doporučuje používat S-ABA, přičemž náklady na její výrobu se snižují fermentací.⁵¹

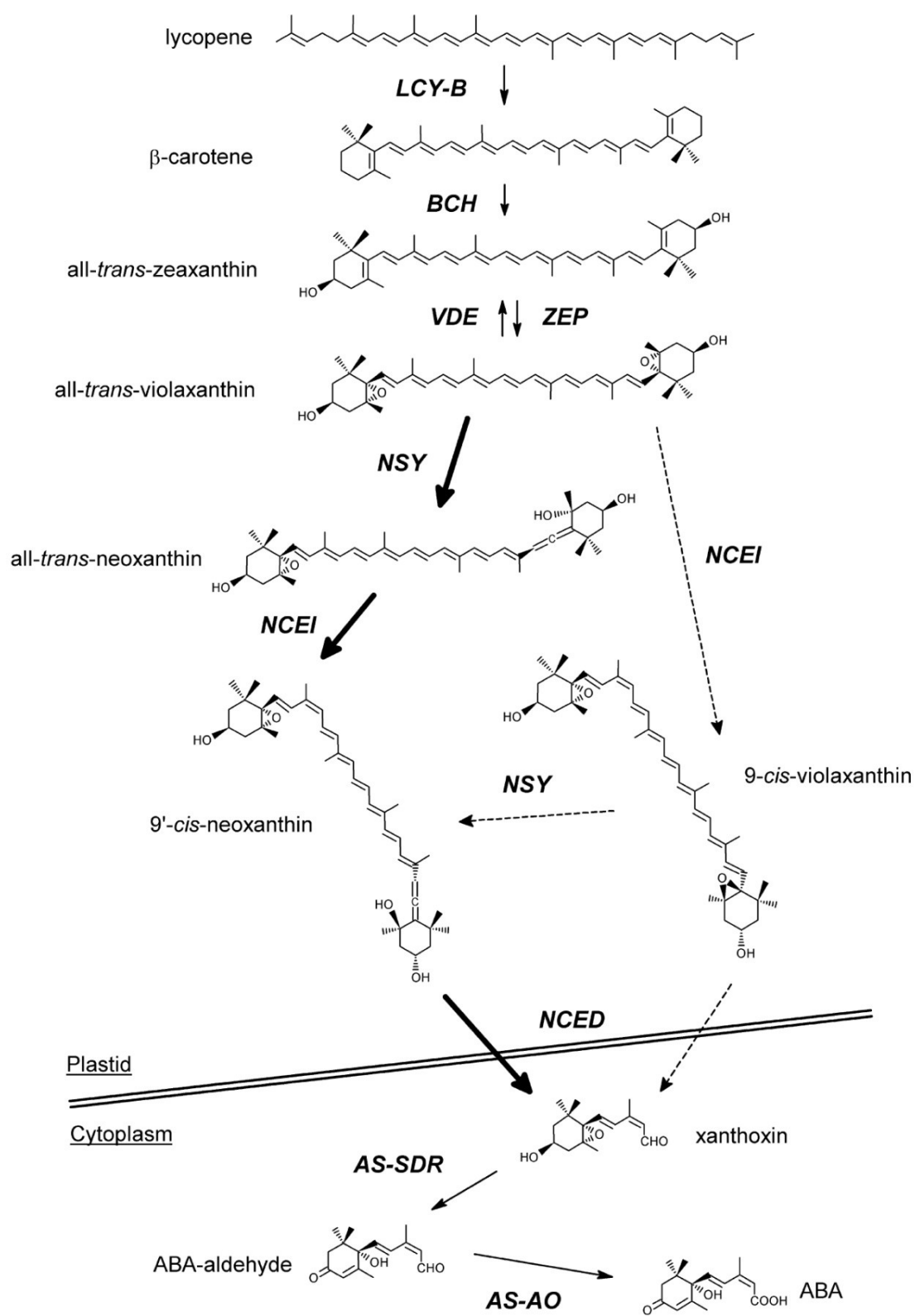


Obrázek 9 – Počátek biosyntézy ABA – mevalonová dráha vedoucí k *trans*-lykopenu.⁵³

Enzymy: DXS: 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfátsyntasa; DXR: 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfátreduktoisomerasa; HDR: hydroxymethylbutenyldifosfátreduktasa; GGPS: geranylgeranyldifosfátsyntasa; PSY: fytoenesyntasa; PDS: fytoenedesaturasa; ZDS: ζ-karotendesaturasa; CRTISO: karotenoidizomerasa. Zkratky chemických sloučenin: GA-3-P: D-glyceraldehyd-3-fosfát; DXP: 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát; GPP: geranyldifosfát; FPP: farnesyldifosfát; GGPP: geranylgeranyl difosfát

2.1.3.1 Biosyntéza kyseliny abscisové

Je velmi těžké popsat univerzální biosyntézu ABA, která by byla použitelná pro všechny organismy, v nichž byla její přítomnost zjištěna. Dva rody hub, *Cercospora* a *Botrytis*, obsahující značné množství ABA, syntetizují tuto kyselinu z isopentenylidifosfátu



Obrázek 10 - Biosyntéza kyseliny abscisové z lycopenu k ABA.⁵³

Enzymy podílející se na tomto komplexním ději: LCY-B: lykopen-β-cyklasa; BCH: β-karoten hydroxylasa;

ZEP: zeaxanthinepoxidasa; VDE: violoxanthindeepoxidasa; NSY: neoxantinsyntasa;

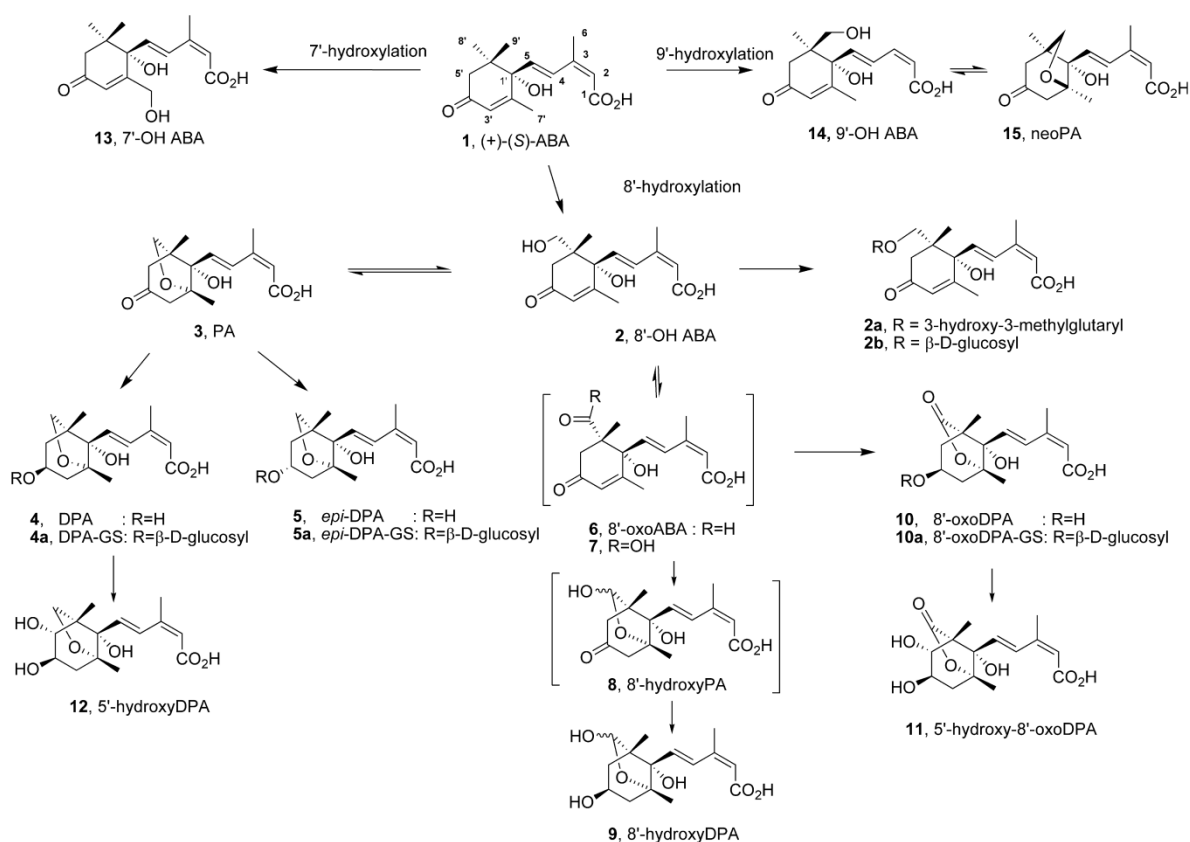
NCEI: 9-cis-epoxykarotenoid-formující izomerasa; NCED: 9-cis-epoxykarotenoiddioxygenasa;

AS-SDR: ABA specifická dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem; AS-AO: ABA specifická aldehydoxidasa.

(IPP) a dimethylallyldifosfátu (DMAPP), které byly syntetizovány z mevalonátu. Dva IPP a jeden DMAPP vytváří sloučeninu zvanou farnesyldifosfát.⁵⁴ Přesný sled kroků vedoucích od farnesyldifosfátu k ABA se u různých druhů hub liší.⁵⁵ Tento způsob biosyntézy ABA se často označuje jako „přímá cesta“.⁵³

V rostlinách je biosyntéza ABA mnohem složitější a označuje se jako „nepřímá cesta“. Ačkoliv rostliny syntetizují mnoho terpenoidů z IPP a DMAPP molekul, které byly syntetizovány v cytosolu přes MVA dráhu, ABA mezi ně nepatří. Xantofylové prekurzory ABA v rostlinách jsou syntetizovány z IPP a DMAPP vytvořených z pyruvátu a D-glyceraldehyd-3-fosfátu v plastidech, které produkují MEP (viz Obrázek 9).^{56,57}

V nezralých zelených rajčatových plodech či u obecnějších pletiv umožňujících fotosyntézu (listy), dochází v chloroplastech k syntéze červeného barviva známého jako *trans*-lykopen. Ten je vyžadován jako mezičlánek při syntéze mnoha karotenoidů, včetně xantofylů, které mohou být využity jako prekurzory pro ABA. Lykopen- β -cyklasa, enzym katalyzující vznik β -ionon kruhu na každém konci lykopenu, vytváří bicycklický



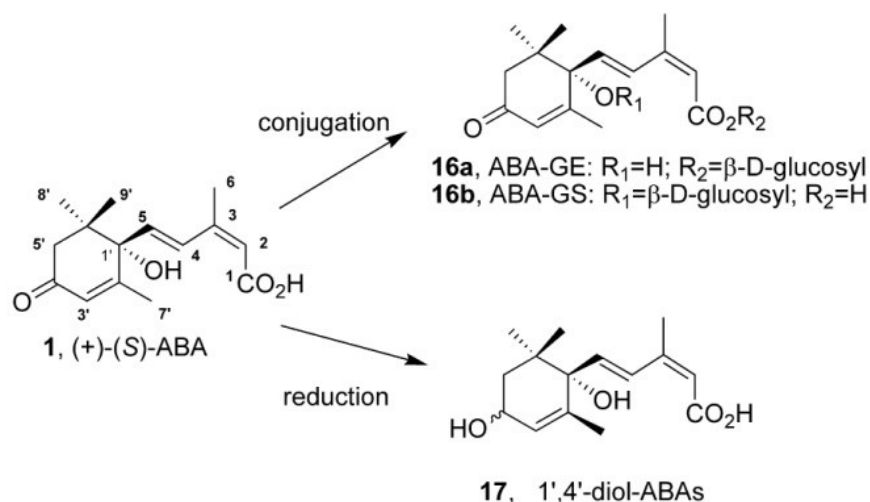
Obrázek 11 – Oxidativní metabolická dráha ABA⁵¹

β -karoten. Pomocí kaskády enzymatických reakcí jsou pak z β -karotenu syntetizovány xantofyly až po xanthoxin, který je přetvářen na ABA aldehyd a následně oxidován na ABA.⁵³ Celý tento proces mapuje Obrázek 10.

2.1.3.2 Metabolismus kyseliny abscisové

ABA může být metabolizována na řadu sloučenin oxidací, redukcí či konjugací.¹² Hlavní oxidativní cesta (+)-(S)-ABA enantiomeru je přes C8 hydroxylaci tvořící 8'-hydroxyABA, která samovolně izomerizuje na kyselinu faseovou. Ta může být redukována z velké části na kyselinu dihydrofaseovou, z menší části na epi-dihydrofaseovou kyselinu. Vedlejší oxidativní cesta zahrnuje tvorbu 7'-hydroxyABA, zatímco z menší části vzniká redukcí nestabilní ABA-1,4-diol. Také byly popsány metabolity 9'-hydroxyABA či cyklická neofaseová kyselina.^{58,59}

ABA a její metabolity mohou konjugovat s glukózou (viz Obrázek 12) a tím tvořit odpovídající estery na C1 nebo glykosidy na C1 či C4.^{58,59} Například semena salátu (*Lactuca sativa* L.) přechodně vykazují zvýšenou hladinu glukosylesteru kyseliny abscisové (ABAGE) při klíčení.⁶⁰



Obrázek 12 – Další metabolické dráhy ABA⁵¹

2.2 Metody analýzy fytohormonů

2.2.1 Matriční efekt

Po zavedení ionizačních zdrojů pracujících za atmosférického tlaku se stalo spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) standardní analytickou metodou pro analýzu sloučenin v biologických matricích. Přímé vstřikování těchto vzorků nelze zavést vzhledem k přítomnosti endogenních látek, které mohou ucpat kolonu či měnit intenzitu MS signálu. Tyto změny byly studovány u ionizace elektrosprejem (ESI) po extrakci na pevné fázi (SPE). Při přípravě biologických vzorků je důležité různými metodami selektivně redukovat množství interferentů, jako jsou proteiny, lipidy, cukry či soli. Nejpoužívanější jsou precipitace proteinů, extrakce kapalina-kapalina (LLE) a SPE.^{61,62,63} Tyto metody odstraňují hlavní část endogenního materiálu, ale často ve vzorku zůstává malá část interferujících látek indukujících matriční efekt.

Matriční efekt by měl být proto testován během vývoje metody pro kvantifikaci analytu. Používají se tři základní techniky. První využívá k dosažení kvalitativního výsledku infuzní systém za chromatografickou kolonou. Principem je infúze roztoku analytu mezi kolonu a MS detektor a snaha o dosažení konstantního signálu pro studovaný analyt.⁶⁴ Druhá technika podává kvantitativní informace. Testuje rozdíl mezi naměřenými známými koncentracemi, které byly přidávány ke vzorkům před a po extrakci.⁶⁵ Třetí technika hodnocení matričního efektu porovnává vliv nemodifikované mobilní fáze vůči mobilní fázi obohacené o látky podezřelé z matričního efektu na MS signál.⁶⁶ Vliv matričního efektu pro 13 fytohormonů byl například testován v řepce olejné pro spojení HPLC-ESI-MS v roce 2011.⁶⁷

2.2.2 Metody extrakce

Obecným cílem extrakčních technik je převod analytu do extrakčního činidla s maximálním omezením jeho degradace (oxidativní, enzymatická, tepelná, světlem indukovaná). Také je velmi důležité, aby byl extrakční výtěžek optimálně vysoký i pro případné široké spektrum metabolitů studovaného analytu.⁶⁸

Příprava vzorků je často klíčovou částí v postupu analýzy rostlinných hormonů. Je důležité, aby rostlinný materiál zůstal v chladném prostředí, pro zabránění enzymatické indukce metabolických změn nebo chemické degradace cílových sloučenin.⁶⁹ Na základě

obsahu vodné složky v extrakčním činidlo se teplota extrakce pohybuje v intervalu -20 °C až 4 °C. Doba extrakce je obvykle 4 až 24 hodin.⁶⁸ Např. auxiny snadno oxidují - reagují s kyslíkem, degradují na světle i s vysokou teplotou. Často se tedy k extrakčnímu činidlu přidává antioxidant (např. diethyldithiokarbamat).⁵⁹ Cytokininy mohou být degradovány endogenními enzymy, proto by biologický materiál měl být po vzorkování okamžitě zmražen nebo extrahován vhodným rozpouštědlem. Pozornost je třeba věnovat fosfatázám, které mohou katalyzovat hydrolyzu CK nukleotidů během extrakce. V tomto směru vyniká extrakční činidlo Bielekého fixáž, které je vhodné k inaktivaci fosfatázy, ale bohužel přítomnost trichlormethanu v rozpouštědle extrahuje lipofilní složky z rostlinného pletiva, což znesnadňuje následnou purifikaci. Výběr extrakčního rozpouštědla závisí nejen na fyzikálně-chemických vlastnostech (např. polaritě) cílových analytů, ale i na typu rostlinného materiálu (jaký druh či část rostliny je analyzována).⁶⁹

Nejčastěji používané extrakční činidlo pro CK je Bielekého fixáž ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3:\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O}$ v poměru 12:5:1:2, v/v)⁷⁰⁻⁷⁵, dále se používají: modifikovaná Bielekého fixáž ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O}$ v poměru 15:1:4, v/v)⁷⁴, 80% methanol⁷⁴ či 70% methanol⁷³. Používaná extrakční činidla pro IAA jsou sodno-fosfátový pufr o pH 7,0⁷⁶⁻⁷⁹, 100% methanol⁸⁰, 90% methanol⁸¹, 80% methanol^{76,82-85} nebo kombinovaný pufr o pH 7,0 (65% 2-propanol a 35% 0,2 M imidazol)⁸⁶. Nejčastěji používané extrakční činidla pro ABA jsou: okyselený methanol ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}$ 10:89:1 v/v)⁸⁷ či ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O}$ 15:1:4 v/v)⁸⁸, extrakční směs tvořená 1-propanol: H_2O :konc. HCl (2:1:0,002 v/v)⁸⁹ nebo modifikovaná Bieleškiho fixáž ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O}$ v poměru 75:20:5, v/v)⁹⁰.

Starším typem extrakční techniky je homogenizace vzorku pod kapalným dusíkem, extrahování do příslušného činidla (větší objem solventu - např. 20ml) a odstranění tuhých podílů centrifugací. Výhodnou alternativou je časově méně náročná mikroextrakce za využití vibračního kulového mlýnku, ultrazvuku, mechanického rotátoru a centrifugace. Tato technika využívá kombinovaný účinek tření a nárazu mlecí kovové koule. Další výhodou této techniky je možnost malého objemu extrakčního rozpouštědla (např. 1ml) i malá hmotnost vzorku (např. cca 25mg rostlinného materiálu).⁹¹

2.2.3 Metody purifikace

Vzhledem k tomu, že hormony se vyskytují v rostlinném materiálu ve velmi nízké koncentraci a jejich stanovení mohou narušit různé primární či sekundární metabolity, je často rozhodující purifikační a obohacovací krok.⁶⁹ Purifikační metoda by měla odstranit možné interferenty ze vzorku tak, aby odlišný metabolický profil rostlinného extraktu výrazně neovlivnil celkovou návratnost. Je zde také vazba na zvolenou analytickou koncovku (zde LC-MS). Purifikovaný vzorek tedy obsahuje analyt či případně látky, které neruší kvalitativní nebo kvantitativní analýzu.

2.2.3.1 Extrakce kapalina-kapalinou (Liquid-Liquid Extraction) - LLE

Jedná se o nejjednodušší techniku frakcionace, přečištění a zakoncentrování analytů, jejíž základem je rozdělování rozpuštěného analytu mezi dvě navzájem nemísitelná rozpouštědla. Obvykle se jedná o kombinaci vodného a organického rozpouštědla. K purifikaci fytohormonů se používají různá organická rozpouštědla, jako je ethylacetát, dichlormethan nebo diethylether. Nicméně, tradiční LLE je časově náročná, zahrnuje mnoho extrakčních kroků a často mívá nízkou návratnost.⁶⁹

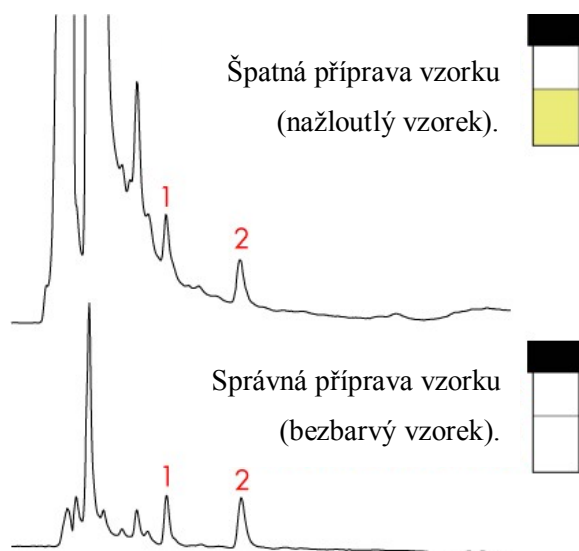
Za inovativní a modernější přístup lze považovat například disperzní mikroextrakci kapalina-kapalina. V kombinaci s kapalinovou chromatografií a fluorescenční detekcí byla publikována metoda pro analýzu auxinů, kde jako extrakční rozpouštědla byl použit trichlormethan (extrakční solvent) a aceton (disperzní solvent).⁹² Další novou mikroextrakční metodou byla práce soustředující se na čtyři rostlinné hormony s kyselou povahou (IAA, ABA, SA, JA). Metoda byla testována na kokosové šťávě, kdy analyt přecházel z vodného prostředí do jiného vodného prostředí s rozdílným pH a následně byl extrahován do organického rozpouštědla.⁹³

2.2.3.2 Extrakce na pevné fázi (Solid-Phase Extraction) - SPE

Při SPE je vzorek nanesen na kolonu obsahující lože vhodných částic (stacionární fáze). Rozpouštědlo (mobilní fáze) protéká ložem. Výběrem vhodné kombinace stacionární a mobilní fáze mohou látky procházet přímo z kolony nebo mohou být selektivně zadrženy. Použití slabšího rozpouštědla způsobuje pomalý průchod či silné zachycení. Silnější

rozpouštědlo urychluje průchod látek přes lože a vymývá analyt z kolony. Eluce analytu se obvykle provádí zvýšením síly mobilní fáze v sérii několika kroků, během kterých jsou vybrané analyty či interferenty buď stále zadržovány nebo rychle eluovány.⁹⁴

SPE je dobrou volbou v případě nutnosti odstranění specifických interferentů ze vzorku tak, aby nezpůsobovaly problémy při detekci a následné kvantifikaci. Například může docházet k překryvu interferujících látek s analytem na chromatogramu (viz Obrázek 13).⁹⁵



Obrázek 13 – Příklad interferentů překrývajících se s analytem na chromatogramu⁹⁵

Tato purifikační metoda je také vhodná pro zvýšení koncentrace ve vzorku tak, aby analyt mohl být snadno detekován a snadněji kvantifikován vhodnou analytickou technikou. Analyt obsažený ve velkém objemu může být nanesen na SPE kolonu a následně zachycen. Poté může být eluován z kolony vhodným rozpouštědlem ve velmi malém objemu, díky čemuž je jeho koncentrace ve vzorku vyšší a může být analyzován vybranou analytickou koncovkou.⁹⁵

U SPE kolon se používají dvě obecné strategie: adsorpce matričních interferentů, zatímco analyt není na koloně zadržen (vhodné pro analyt ve vysoké koncentraci v původním vzorku) nebo adsorpce analytu, zatímco matriční interferenty prochází kolonou bez zadržení (nízká koncentrace analytu v matici). Základní postup při práci s SPE kolonou se skládá z několika kroků: předběžná úprava vzorku, kondicionace kolony, dávkování vzorku, promývání vzorku a eluce selektivním rozpouštědlem.⁹⁶

V současné době je možné využít širokou škálu komerčních SPE kolon. Základní přehled je uveden v Tabulka 1.

Tabulka 1 – Výběr typu SPE – základní přehled^{97,98,99}

Fáze	Popis
C18	Pro analýzy organických látek z vodných matric (např. léky v moči, pesticidy, fytohormony , atd.)
C8	Pro extrakci středně polárních látek z vodných matric (pro látky zadržené příliš silně na C18)
C1	Pro extrakci nepolárních látek z vodných matric (pro látky zadržené příliš silně na C18)
Fenyl	Pro extrakci nepolárních aromatických látek
CN	Extrakce méně polárních látek než na silikagelu
Silika	Extrakce polárních látek (alkaloidy, barbituráty, atd.)
Diol	Extrakce polárních látek (peptidy, antibiotika,) atd.
NH₂ (amino)	Možno použít ve dvou módech - normální fáze nebo slabý ionex (nukleotidy, atd.)
SCX	Extrakce kationových analytů (hormony , vitamíny, atd.)
SAX	Extrakce aniontových látek (hormony , nukleové kyseliny, atd.)

Reverzní fáze C18 (RP-C18) je mezi sorbenty nejpoužívanější. Když je SPE kolona vystavena slabě kyselému prostředí a pH rostlinného extraktu je upraveno mírně kyselé, hormonální látky kyselé povahy zůstanou v neutrální formě vázány na stacionární fázi. Poté je analyt vymýván odpovídajícím okyseleným vodným roztokem methanolu či ethanolu (kyselost se obecně upravuje kyselinou mravenčí nebo octovou). C18 fáze je velmi efektivní při odstraňování polárních sloučenin a rostlinných pigmentů.⁶⁹

Kombinace dvou a více druhů SPE sorbentů je vhodná k analýze různých skupin fytohormonů. Iontově výměnné kolony jsou vhodné pro kyselá nebo bazická analyty. Během extrakce se pH vzorku upraví tak, aby cílové molekuly mohly být adsorbovány na opačně nabitá místa sorbentu. Poté se anion nebo kation analytu vymývají odpovídajícím kyselým nebo zásaditým vodným roztokem organického rozpouštědla. Např. cytokininy jsou amfoterní látky s pKa₁ okolo 4 (atom dusíku na C6 purinu) a s pKa₂ okolo 10 (atom dusíku v imidazolovém kruhu). CK mohou být protonizovány či deprotonovány, jsou-li vystaveny pH <3 a pH >11. Zatímco jejich nukleotidy nesou fosfátové skupiny, které mají pKa₁ okolo 1,0 a pKa₂ okolo 6,0. Díky těmto vlastnostem mohou být cytokininové skupiny snadno odděleny a rychle čištěny pomocí kombinované SPE (reverzní fáze a iontově výměnná fáze).⁶⁹

Tabulka 2 přehledně ukazuje používané SPE kolony v této práci a naznačuje jejich vlastnosti a použití.

Tabulka 2 – Přehled a charakteristika testovaných SPE kolon.

SPE	Třída	Princip	Charakter	pH	Analyt
C18	Reverzní fáze	Silně hydrofobní sililovaná báze	Nepolární až mírně polární	2,0 – 7,5	JA, ABA , IAA , IBA, GA, CK
HLB	Reverzní fáze	Makroporézní kopolymer - lipofilní divinylbenzen a hydrofilní vinylpyrrolidon	Nepolární až mírně polární	1,0 – 14,0	IAA , ABA , GA, CK
MAX	Reverzní fáze / Anex	Základem je HLB kopolymer s navázanou kvartérní amoniovou skupinou, která umožňuje anexové interakce a zároveň i reverzní retenci. .	Anion/nepolární	1,0-14,0	IAA , ABA , CK
MCX	Reverzní fáze / Katex	Základem je HLB kopolymer s přítomnou sulfoniovou skupinou, který vedle reverzní retence poskytuje katexové interakce.	Kation/nepolární	1,0-14,0	IAA , ABA , GA, CK

Pro stanovení cytokininů byly publikovány různé purifikační metody využívající hlavně reverzní a iontově výměnné stacionární fáze: kombinace DEAE Sephadex a RP-C18^{73,74,100}, RP-C18^{75,101}, SCX¹⁰¹ nebo MCX (kombinovaná C18 s SCX)^{75,101}. Pro purifikaci vzorků obsahujících IAA jsou vhodné SPE kolony s RP-C8⁷⁹, RP-C182^{82,102,103} nebo NH₂ kolony⁸⁶. Pro analyt ABA jsou obvyklé kolony HLB⁵⁹, DEAE Sephadex a následně RP-C18¹⁰⁴ či RP-C18 s kombinovanou SPE (C8/SCX)¹⁰⁵.

2.2.4 Analytické metody

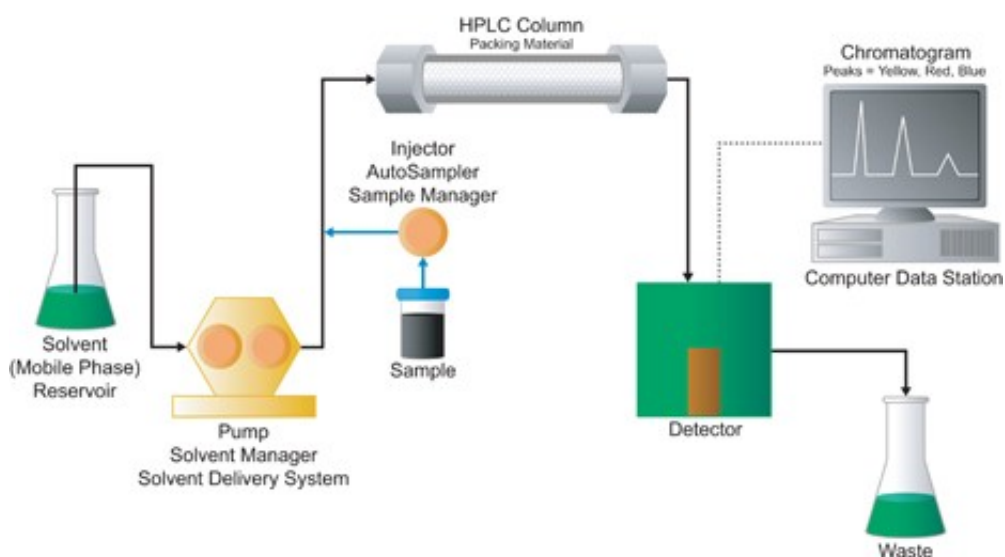
Plynová (GC) a kapalinová (LC) chromatografie jsou běžné analytické koncovky vhodné pro kvantitativní analýzu fytohormonů. Vysoká separační účinnost a jejich kombinace s různými detektory z nich činí ideální techniku pro separaci rostlinných hormonů z jejich složité matrice již od sedmdesátých let minulého století.⁶⁹

Fytohormony vyžadují při použití GC derivatizaci pro zvýšení jejich těkavosti a ke zlepšení tepelné stability. Derivatizace se realizuje během přípravy vzorku, což může ještě zvýšit již tak vysoké časové nároky. LC může pracovat s polárními sloučeninami přímo. U většiny rostlinných hormonů lze použít UV detektor bez derivatizace. Jeho nevýhodou je však nižší citlivost.¹⁰⁶ Ve srovnání s UV detekcí je citlivost fluorescenčního detektoru

o několik řádů vyšší.¹⁰⁷ Použití obou detekčních metod je ale založeno jen na shodě retenčních časů a hrozí zde komplikace při měření vzorků s komplikovanou maticí. Z tohoto důvodu patří mezi velmi oblíbená spojení GC-MS nebo LC-MS.⁶⁹ V této práci bylo pro stanovení zvolených skupin fytohormonů (CK, IAA a ABA) použito LC-MS jako analytická koncovka, proto bude tomuto spojení věnován větší prostor.

2.2.4.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je dnes jedním z nejmocnějších nástrojů v analytické chemii. Má schopnost separovat, identifikovat a kvantifikovat sloučeniny, které mohou být rozpuštěny v kapalině.¹⁰⁸ Základním principem HPLC je rovnovážná distribuce složek vzorku mezi mobilní a stacionární fází (podmíněno existencí fázového rozhraní). Mobilní fáze obtéká stacionární fázi za neustálé tvorby rovnovážných stavů separovaných látek mezi stacionární a mobilní fází. Základní instrumentace HPLC (Obrázek 14) obsahuje rezervoár rozpouštědel (mobilní fáze), vysokotlaké čerpadlo (typický průtok bývá řádově mililitr mobilní fáze za minutu), autosampler (zavedení vzorku do toku mobilní fáze), kolonu HPLC (stacionární fáze pro separaci analytů) a detektor.¹⁰⁹



Obrázek 14 – Základní instrumentace HPLC¹⁰⁹

Od roku 2004 se začala používat UHPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography; extrémně vysokotlaká kapalinová chromatografie). Tyto přístroje dosahují vysokého rozlišení, rychlosti a citlivosti. Kolony obsahují sorbent s částicemi menšími než 2.0 mikrometru a dosahují tlaku až 100 MPa.¹¹⁰ V současnosti se ujalo několik označení těchto vysokotlakých zařízení, které lze rozdělit podle pracovních tlaků na Rapid Resolution LC (až do 60 MPa), Rapid Separation LC (až do 80 MPa) a Ultra Performance LC (až do 100 MPa).⁹¹ Vývoj této metody je dnes směřován k použití ještě menšího průměru částic (okolo 1.0 mikrometru) a schopnosti dosáhnout tlaku až 690 MPa.¹¹⁰

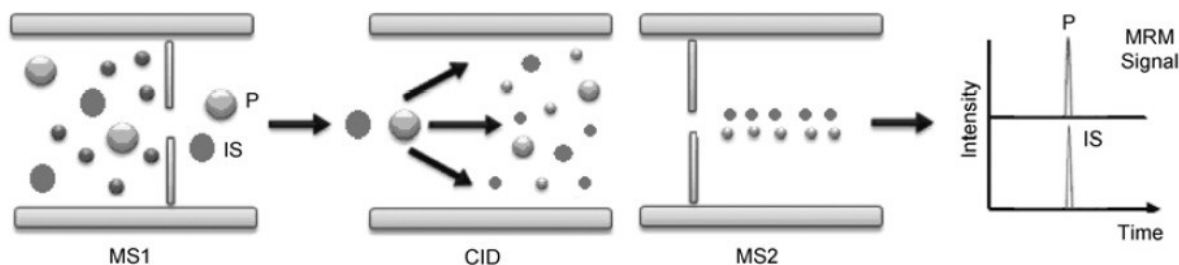
2.2.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika separující molekuly převedené na ionty podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Analyt se ionizuje v iontovém zdroji, kde jsou ionty akcelerovány, poté separovány v analyzátoru a následně detekovány v detektoru. Veškeré tyto procesy probíhají ve vakuu (10^{-3} až 10^{-6} Pa). Ve výsledném hmotnostním spektru je vynesena záznam relativních intenzit jednotlivých iontů oproti m/z . Signál příslušející určitému iontu je obvykle reprezentován několika píky odpovídajícími statistickému zastoupení jednotlivých izotopů ve struktuře iontu. Charakteristický soubor izotopických pík tvoří izotopický profil, který je charakteristický pro danou strukturu. Pík reprezentující nejvíce zastoupený izotop daného atomu se nazývá monoizotopický pík. MS podává informace kvalitativní (určení molekulové hmotnosti, struktury) nebo kvantitativní (díky použití vnitřních nebo vnějších standardů) s dosahovanými detekčními limity řádu pikomolů až femtomolů.¹¹¹

Mezi nejčastější způsoby ionizace patří elektronová ionizace, chemická ionizace, ionizace nárazem urychlených neutrálních atomů nebo iontů, ionizace a desorpce polem, ionizace desorpcí laserem v přítomnosti matrice, termosprej či elektrosprej (ESI).¹¹¹ Chemická ionizace a ionizace elektronem jsou široce používané tvrdé ionizační metody, zvláště při kombinaci GC/MS. Pro spojení s kapalinovou chromatografií se používají nejčastěji měkké ionizační techniky - ionizace elektrosprejem a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Tyto ionizační techniky jsou vhodné pro strukturní analýzu organických látek ve směsích. Převod iontů z kapalně fáze do vakua je realizován rychlým odpařením mikrokapiček za vzniku iontů s vysokou relativní intenzitou

molekulárních aduktů (např.: $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$) či duktů s mobilní fází. ESI je vhodnou ionizační technikou pro polární a iontové sloučeniny, APCI pro slabě polární a neutrální látky.

Typy hmotnostních analyzátorů se dělí na magnetické a elektrostatické, iontovou past, ion-cyklotronovou rezonanci, průletové analyzátorů a kvadrupólové filtry.¹¹¹ Mezi základní parametry hmotnostních analyzátorů patří rozsah analyzovaných hodnot m/z (dolní hranice je od "0" nebo od vyšší hodnoty; horní hranice je maximální detekovaná hodnota), rychlost skenu (počet skenů za minutu; méně než 1 = malá rychlost, 1 až 10 = střední rychlost, 10 až 500 = velká rychlost) a možnost přepínání různých režimů (plný sken; segmentový sken selektivního záznamu jednoho nebo více iontů, SIM; selektivní záznam jedné nebo více reakcí, MRM), rozlišovací schopnost (vyjádření míry schopnosti rozlišit blízké hodnoty m/z ; řádově 10^3 až 10^6), přesnost určení hodnoty m/z (míra shody mezi naměřenou a vypočtenou hodnotou m/z) a schopnost vícenásobné analýzy (v prostoru jako sériová kombinace stejných nebo různých hmotnostních analyzátorů, např. analyzátor - kolizní cela - analyzátor; v čase za pomoci postupných změn parametrů).¹¹²



Obrázek 15 - Princip selektivního záznamu více reakcí (MRM) na tandemovém hmotnostním spektrometru.⁶⁹
MS1 monitoruje prekurzorový ion, CID značí kolizní celu a MS2 monitoruje produktový ion. IS značí stabilní izotopově značený interní standard a P znázorňuje ionty fytohormonu.

Separace iontů na základě m/z skvěle doplňuje použití purifikačních technik. V přečištěných rostlinných extraktech mohou být sledovány charakteristické ionty produkované hmotnostním spektrometrem s extrémně vysokou selektivitou. Citlivý SIM mód u jednoduchého kvadrupólu může být použit při analýze rostlinných hormonů. V SIM módu je měřen jen specifický charakteristický ion cílové sloučeniny, např. CK nebo ABA.^{73,104} Tento mód poskytuje vyšší citlivost a selektivitu na rozdíl od měření, kdy skenujeme

hmotnostní spektra v celém studovaném rozsahu m/z . Pro některé nízké koncentrace fytohormonů v komplikovaných matricích stále dochází k interferenci s analytem i při použití SIM skenovacího módu. Vhodnější variantou se tedy zdá být použití multiplexní analýzy (MRM), režimu s vyšší selektivitou na základě tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Tato technika může být realizována ve více časech či prostorech, které odpovídají trojitě kvadrupólové hmotnostní spektrometrii nebo iontové pasti. V MRM je vybrán ion prekurzoru v první fázi kvadrupólu, poté dochází k fragmentaci v kolizní cele a nakonec jsou vzniklé produktové ionty filtrovány ve třetím kvadrupólu. Signál je detekován pouze tehdy, pokud vybraný ion proletí prvním kvadrupólem a vybraný fragment z kolizní cely proletí třetím kvadrupólem (Obrázek 15).⁶⁹

MRM mód poskytuje vyšší selektivitu a citlivost než SIM mód a dovoluje výrazné snížení počátečního množství vzorku.⁶⁹ Použití rychle skenujících MS technik umožňuje spojení s UHPLC. Menší částice UHPLC kolon s vyšší separační účinností dokáží rozdělit i složitější směsi (např. rostlinné extrakty) během několika minut, což vede k velkým časovým úsporám nejen v oblasti analýzy fytohormonů. Po uvedení prvních komerčních UHPLC přístrojů bylo publikováno několik prací kombinujících rychlou chromatografii s rychlou a citlivou hmotnostní detekcí pro různé skupiny fytohormonů: CK¹⁰¹, ABA^{71,113} a GA¹¹⁴.

Hmotnostní spektrometrie ve spojení s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií je vhodnou analytickou koncovkou pro stanovení rostlinných hormonů. Je mnoho publikací využívajících MS ke stanovení cytokininů^{75,101,115}, auxinů^{2,79,115} i derivátů kyseliny abscisové^{59,104,105, 115} a dalších fytohormonálních skupin¹¹⁶.

3. Materiál a metody

3.1 Chemikálie a použitý materiál

Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo) dodala methanol (99,9%) a kyselinu octovou (99%). Acetonitril (99,9%), amoniak (25%) a kyselinu mravenčí (98-100%) vyrobila firma MERCK (Darmstadt, Německo). Ethanol (96%), dihydrogenfosforečnan sodný a chlorid sodný pochází z firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika). Fosfátový pufr byl připraven ze 7,8 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 0,877 g chloridu sodného, pH 7,2. Murashige & Skoog médium pochází z Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Nizozemsko). Použité chemikálie splňují podmínky "analytical-reagent grade" nebo "HPLC gradient grade". Deionizovaná voda (Milli-Q) byla připravována přístrojem Simplicity 185 (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA).

Kolony Spe-edTM C18 (500 mg/3 ml a 100 mg/1 ml) pochází z firmy Applied Separations (Allentown, Pensylvánie, USA); Oasis[®] MAX (30 mg/1 ml), Oasis[®] MCX (30 mg/1 ml) a Oasis[®] HLB (30 mg/1 ml) byly vyrobeny firmou Waters (Milford, Massachusetts, USA). Z laboratorního skla byly používány např. jednorázové skleněné zkumavky, odměrné baňky a kádinky.

3.2 Specifikace analytů vybraných ze studovaných skupin fytohormonů

Z širokého spektra CK byly vybrány tři isoprenoidní typy tZ, cZ a iP a jejich metabolity (N-glukosidy, 7G a 9G; ribosidy, R). Jako interní standardy (IS) byly použity deuterované standardy [²H₅]-tZ, [²H₅]-tZR, [²H₅]-tZ9G, [²H₆]-iP, [²H₆]-iPR, [²H₆]-iP7G a [²H₆]-iP9G. Jako zástupci auxinů byly zvoleny IAA a oxIAA s jejich izotopově stabilně značenými standardy [²H₅]-oxIAA a [¹³C₆]-IAA. Třetí skupinou fytohormonů, která je v této práci studována, je ABA a její metabolit ABAGE. Ze značených standardů jsme získali k dispozici pouze [²H₆]-ABA.

Cytokininové standardy, izotopově stabilně značené standardy CK, oxIAA a ABAGE byly zakoupeny od firmy Olchemim (Olomouc, Česká republika). IAA a (+)-*cis,trans*- ABA byly zakoupeny u firmy Sigma (St. Louis, USA). [¹³C₆]-IAA byla

získána od firmy Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA) Standardy [$^2\text{H}_6$]-ABA a [$^2\text{H}_5$]-oxIAA byly syntetizovány v Laboratoři růstových regulátorů (Olomouc).^{59,79}

3.3 Přístroje

Acquity UPLCTM System (Waters, Milford, USA), obsahující Binary solvent manager, Sample manager a 2996 PDA detektor kombinovaný s Quattro *micro*TM API (Waters MS Technologies, Manchester, Spojené království) byl využit pro měření CK, IAA a ABA. Další přístroje: pH metr CyberScan 500 (Eutech Instruments Europe B.V., Nijkerk, Nizozemí), kulový mlýnek Retsch[®] MM301 (Retsch GmbH, Haan, Německo), rotátor SB3 STUART[®] (Keison Products, Chelmsford, Spojené království) a vakuová odparka Univapo 150 H (UniEquip, Mnichov, Německo). Všechna data byla zpracovávána programem MassLynxTM (verze 4.1, Waters, Milford, USA).

3.4 Rostlinný materiál

Rostliny *Arabidopsis thaliana* (ekotyp BR, COL, CVI, GOT, RRS, VAN) byly vypěstovány *in vitro* na Petriho miskách, které obsahovaly médium Murashige & Skooga včetně vitamínů (4,4 g MS média, 10 g sacharózy, 10 g rostlinného agaru, pH 5,7) při 23 °C při 16 h fotoperiodě (16 h světlo a 8 hodin tma). Výsadba byla provedena ve sterilním prostředí, aby se eliminoval výskyt plísní. Čtrnáctidenní a dvacetijedenní rostliny byly sklizeny, vzorkovány po cca 25 mg čerstvé hmoty, okamžitě zamraženy v tekutém dusíku a uloženy při -80 °C.



Obrázek 16 - *Arabidopsis thaliana*¹¹⁷

3.5 Extrakce a purifikace fytohormonů

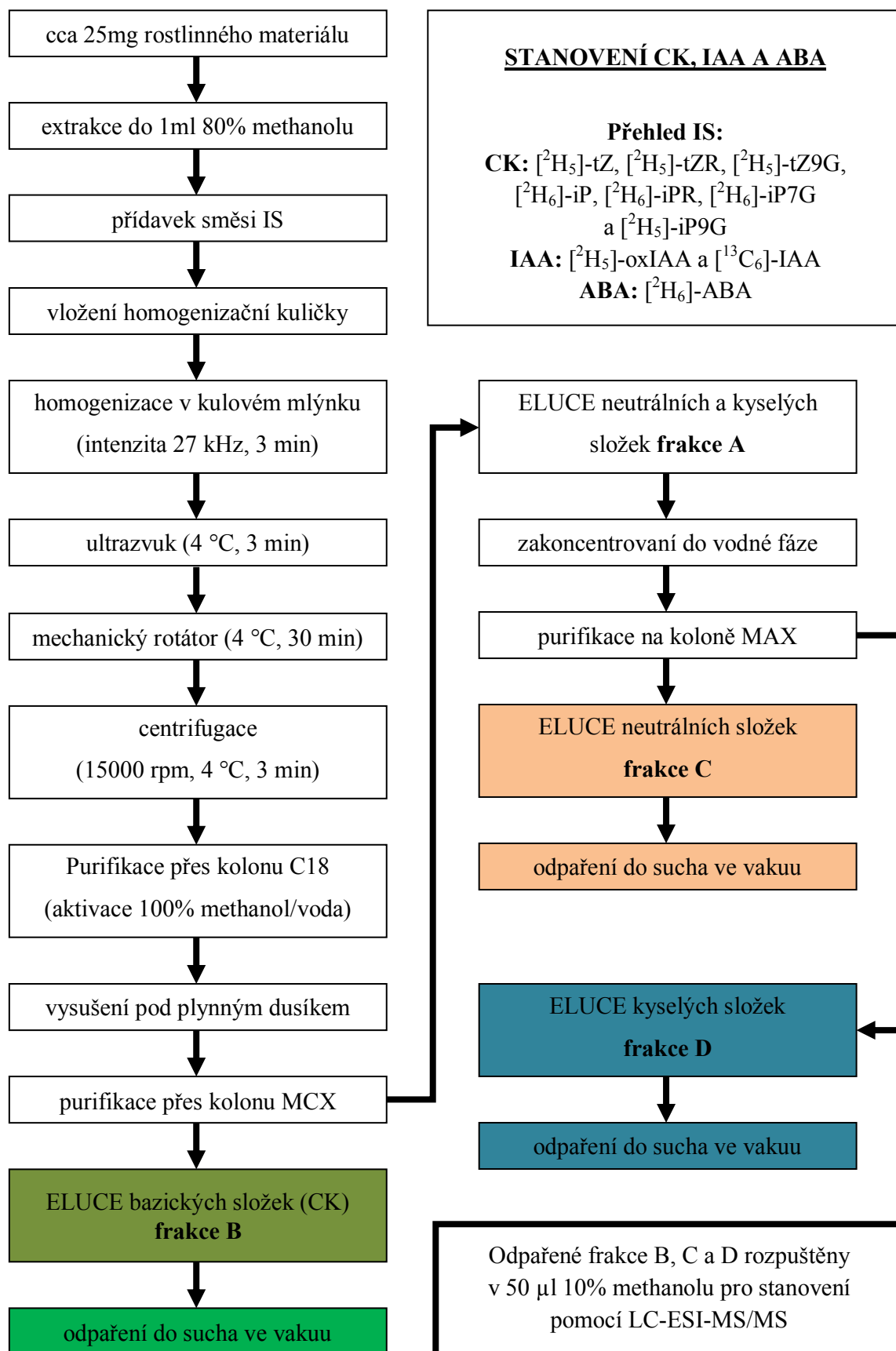
K rostlinnému materiálu (cca 25 mg) ve 2 ml mikrozkušavkách byl napipetován 1 ml 80% methanolu (-20 °C), přidána směs IS (10 pmol/vzorek) a vložena homogenizační kulička. Vzorek byl homogenizován ve vibračním kulovém mlýnku (3 minuty, intenzita 27 kHz) a umístěn na 3 minuty do ultrazvuku uloženého v lednici či obsahujícím chlazenou vodu. Následujících 30 minut byly vzorky promíchávány pomocí mechanického rotátoru v lednici při 4 °C, poté centrifugovány (3 minuty, otáčky 15000 rpm při teplotě 4 °C) a supernatant byl poté odpipetován. Zbýlý sediment byl reextrahován 80% methanolem za stejných podmínek, spojen s primárním supernatantem a nakonec přečištěn pomocí prvního purifikačního kroku.

SPE kolona C18 (100 mg/1 ml) byla aktivována 2 ml 100% methanolu a 2 ml deionizované vody. Spojené extrakty byly nanесeny na reverzní kolonu, eluát sbírán a odpařen pod proudem plynného dusíku.

Odpařené vzorky byly rozpuštěny v chladném 5% vodném roztoku kyseliny mravenčí (4 °C, pH cca 2,7) a přečištěny přes Oasis MCX kolonu (30 mg/1 ml) aktivovanou 1 ml 100% methanolu, promytou 1 ml 5% roztokem kyseliny mravenčí a 1 ml deionizované vody. Po aplikaci okyseleného vzorku proběhlo promytí 1 ml 5% roztoku kyseliny mravenčí. Eluce neutrálních a kyselých látek (frakce A) byla provedena 1 ml 100% methanolu a zkoncentrována pod vakuem na vodnou fázi (cca 0,1 ml). Eluce bazických látek (frakce B) proběhla roztokem 1 ml 10/90 (v/v) voda/methanol:hydroxid amonný (95:5 v/v), frakce byla odpařena pod vakuem do sucha a uložena při -20 °C.

K vodné fázi frakce A byl napipetován 1 ml 5% roztoku hydroxidu amonného (cca pH 12) a vzorek byl nanесen na aktivovanou Oasis MAX kolonu (30 mg/1 ml). Aktivace byla provedena 1 ml 100% methanolu, 1 ml 5% roztokem hydroxidu amonného a 1 ml deionizované vody. Na SPE koloně byl vzorek uzamknut 1 ml 5% roztoku hydroxidu amonného. Eluce neutrálních látek (frakce C) byla provedena 1 ml 100% methanolu a eluce kyselých látek (frakce D) 1 ml 10/90 (v/v) voda/methanol:kyselina mravenčí (98:2 v/v). Obě frakce byly vysušeny pod vakuem do sucha a uloženy opět při -20 °C.

Obrázek 17 (Následující strana) – Schéma popisovaného postupu mikroextrakce a purifikace stanovených fytohormonů: zeleně je označena frakce B obsahující CK, světle oranžově je označena neutrální frakce C (např. ABAGE) a frakce D pro kyselá látky – IAA a ABA.



3.6 Parametry LC-ESI-MS/MS metody

Uvedený postup (Obrázek 17) je univerzální pro stanovení CK, IAA a ABA v rostlinném vzorku a výsledné frakce obsahují analyty dle jejich acidobazických vlastností. K odparkům bylo přidáno 50 μ l 10% methanolu, čímž byl vzorek připraven pro analýzu pomocí LC-ESI-MS/MS.

Acquity UPLCTM Systém obsahoval kolonu Symmetry C18, 100 Å, 5 μ m, 4,6 x 250 mm (Waters, Milford, USA). Mobilní fázi A byl methanol a mobilní fázi B byla 10mM kyselina mravenčí, která se připravovala čerstvě před každým měřením v odměrné baňce (189 μ l koncentrované kyseliny mravenčí, doplněno deionizovanou vodou do objemu 500 ml). Celkový čas analýzy byl 24 minut. Lineární gradientová eluce probíhala při průtoku 0,25 ml/min. Počátek gradientu byl 5% A a 95% B. V 15. minutě byl gradient 90% A a 10% B, v 17. minutě 5% A a 95% B a poté následovala ekvilibrace kolony v počátečních podmínkách. V autosampleru byly uloženy vzorky a kalibrační roztoky při 4 °C a postupně nastříkovány (10-15 μ l) na kolonu, která byla termostatována na 30 °C. Na začátku i v průběhu analýz byla čistota systému ověřována nástřiky kontrolního roztoku odpovídajícího počátečnímu poměru mobilních fází z gradientu.

Na základě vlastností studovaných fytohormonů byla analýza prováděna pomocí MS v režimu MRM. Byla vytvořena 4 časová okna (1,00 až 7,80; 7,80 až 11,25; 10,80 do 14,20; 14,10 do 16,00 minut). V prvním až třetím časovém okně probíhalo skenování vybraných analytů za pomoci ionizace elektrosprejem v pozitivním módu - ESI(+) a ve čtvrtém časovém okně se pracovalo v záporném módu - ESI(-). Na kapiláru bylo přivedeno napětí 0,6 kV, extrakční štěrbinu byla pod napětím 4 V a průtok zmlžovacího plynu byl 550 l/hod. Rozlišení LM/HM bylo 12,5; iontová energie na Q1 byla 0,3 V; iontová energie na Q2 1,5 V; vstupní a výstupní napětí 2 V a detektor pracoval pod napětím 650 V. Tyto podmínky měření byly shodné pro všechny studované látky. Záznam dat probíhal za optimalizovaných podmínek napětí vloženého na vstupní štěrbině a kolizního napětí (viz Tabulka 3) a tlaku kolizního plynu, jímž byl argon, $2,18 \cdot 10^{-3}$ mbar. V Tabulka 3 jsou také uvedeny zvolené MRM přechody, naměřené retenční časy a počty datových bodů vypočtených přes celou šířku chromatografického píku na základě skenovacích časů.

Tabulka 3 – Přehled nastavení podmínek pro MS u jednotlivých sledovaných látek

Časové okno	Analyt	MRM přechod	R _t [min]	Napětí na štěrbině [V]	Kolizní napětí [V]	Čas skenu [s]	Počet datových bodů
CK							
1	tZ	220>136	4,98	24	14	0,1	30
	cZ	220>136	5,60	20	14	0,1	33
	tZ9G	382>220	5,96	22	17	0,1	23
	cZ9G	382>220	6,42	22	17	0,1	24
	iP7G	366>204	7,28	33	21	0,1	34
2	tZR	352>220	8,52	22	15	0,1	16
	cZR	352>220	9,09	22	15	0,1	19
	iP	204>136	10,10	22	15	0,1	37
	iP9G	366>204	10,83	33	21	0,1	16
3	iPR	336>204	13,72	30	15	0,1	37
1	[² H ₅]- tZ	225>137	4,90	26	18	0,1	33
	[² H ₅]- tZ9G	387>225	5,91	34	23	0,1	32
	[² H ₆]- iP7G	387>225	7,21	35	22	0,1	32
2	[² H ₅]- tZR	357>225	8,54	30	19	0,1	31
	[² H ₆]- iP	210>137	9,96	22	15	0,1	23
	[² H ₆]- iP9G	372>210	10,74	33	21	0,1	17
3	[² H ₆]- iPR	342>210	13,63	20	19	0,1	31
IAA							
2	oxIAA	192>146	9,56	17	15	0,1	18
3	IAA	176>130	12,46	17	15	0,1	27
2	[² H ₅]- oxIAA	197>151	9,48	17	15	0,1	20
3	[¹³ C ₆]- IAA	182>136	12,50	17	15	0,1	26
ABA							
3	ABAGE	427>247	11,15	20	14	0,5	16
4	ABA	263>153	14,51	25	10	0,5	19
4	[² H ₆]- ABA	269>159	14,49	23	10	0,5	19

Po smíchání zásobních roztoků vybraných fytohormonů (methanolické roztoky o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) a jejich značených standardů byl stanoven kalibrační rozsah metody. Ředění bylo prováděno výlučně deionizovanou vodou. Výsledné koncentrace neznačených standardů byly v rozmezí 10^{-9} mol/l až 10^{-5} mol/l, zatímco koncentrace značených standardů byla vždy stejná ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/l). Na kolonu bylo nastříkováno 10 μl jednotlivého kalibračního roztoku.

4. Výsledky a diskuze

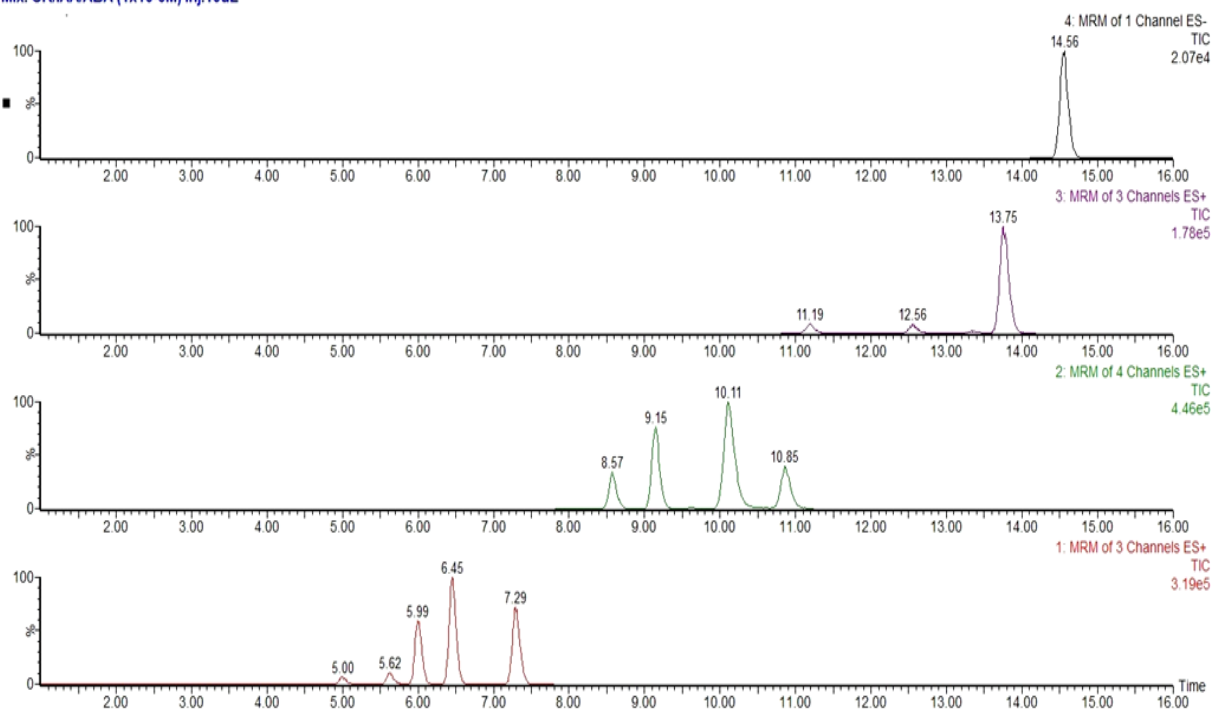
4.1 Ověření podmínek analýzy fytohormonů

Skupina cytokininů byla měřena pomocí elektrospreje v pozitivním módu za přijetí protonu na purinovém kruhu. Vybrané auxiny byly schopny poskytovat signál v pozitivním (protonizace indolového skeletu) i negativním módu (deprotonizace karboxylové skupiny). Pro závěrečnou detekci byl nakonec vybrán z důvodů vyšší citlivosti pozitivní mód. Kyselina abscisová je schopná lehce odštěpovat proton, proto jako jediná ze stanovovaných fytohormonů v této práci byla měřena pomocí elektrospreje v negativním módu. Na počátku analýzy je skupina fytohormonů odseparována od sebe i od ostatních látek (interferentů) na reverzní fázi. Poté jsou látky detekovány selektivním MRM módem (sledování záznamu více reakcí) probíhajícím v tandemovém hmotnostním spektrometru. Pro korekci možných ztrát během úpravy rostlinného materiálu je pro dané analyty přidána směs interních standardů. Pro kvantifikaci CK, IAA a ABA byla využita metoda izotopového zředování.

Byla proměřena hmotnostní spektra standardů CK, IAA a ABA (koncentrace $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l) v rozsahu 50 – 500 m/z. Byla ověřena existence iontu prekurzorů o charakteristických nominálních hmotách – viz Tabulka 3. Získali jsme MS/MS spektra při různých kolizních energiích (10 eV, 15 eV, 20 eV a 25 eV) a pro každou látku byl nalezen nejintenzivnější fragment při určité kolizní energii. Stejný experiment byl opakován pro značené standardy. Tímto způsobem byly nalezeny charakteristické MRM přechody pro jednotlivé látky, které korespondovaly s již dříve publikovanými výsledky.^{2,59,101} Byla nastavena časová okna pro sledování nalezených MRM přechodů a pro přepínání elektrospreje z pozitivního do negativního módu.

Optimalizací vhodných chromatografických podmínek jsme dosáhli potlačení možných kontaminantů, snížení matričních efektů u reálných vzorků i redukci chemického pozadí. Na koloně Symmetry C18 byla získána poměrně rychlá a robustní separace s velmi dobrou stabilitou retenčních časů (kolem 0,03 minuty).

Mix. CK/IAA/ABA (1x10⁻⁶M) Inj.10uL



Obrázek 18 - Separace CK, IAA a ABA díky zvolené analytické koncevce.

Tabulka 4 – Data lineární regrese CK, IAA a ABA

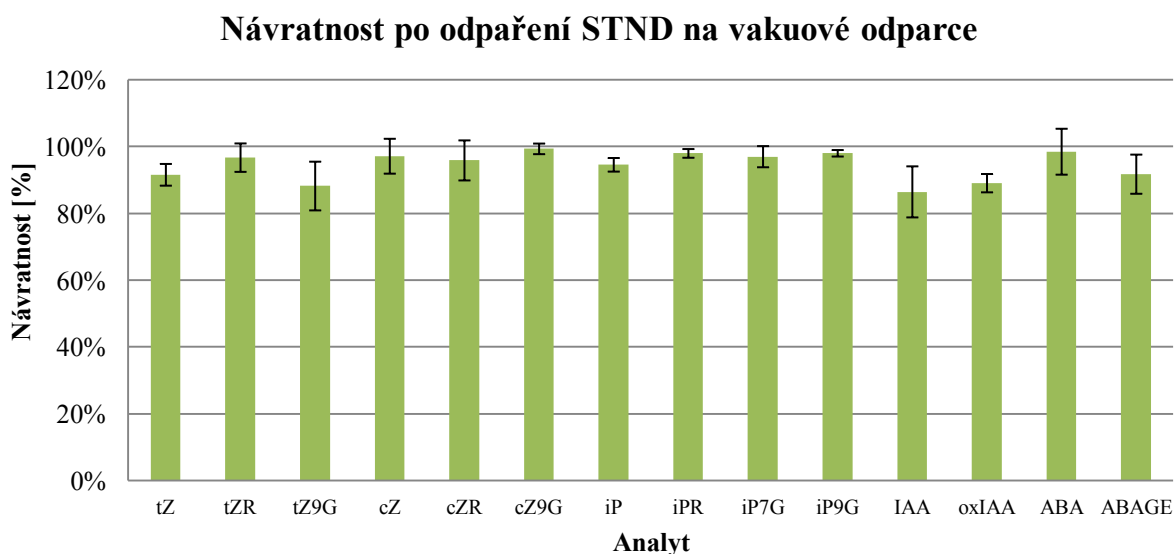
Analyt	Lineární rozsah (pmol)	Rovnice	Korelační koeficient (R^2)	LOD (fmol)
tZ	0,005-100	$y = 0,888x + 0.567$	0,9992	0,5
tZR	0,005-100	$y = 0,887x - 0.099$	0,9992	1,2
tZ9G	0,005-100	$y = 0,876x + 0.318$	0,9986	0,6
cZ	0,01-100	$y = 0,865x - 0.117$	0,9992	4,0
cZR	0,005-100	$y = 0,903x - 0.758$	0,9974	1,5
cZ9G	0,005-100	$y = 0,914x - 0.493$	0,9981	1,3
iP	0,005-100	$y = 0,871x - 0.239$	0,9975	0,4
iPR	0,005-100	$y = 0,952x - 0.658$	0,9984	0,5
iP7G	0,005-100	$y = 0,715x - 0,944$	0,9975	1,4
iP9G	0,01-100	$y = 0,922x - 1,141$	0,9975	3,5
IAA	0,1-100	$y = 0,982x - 0,370$	0,9978	40
oxIAA	1-100	$y = 0,986x - 0,132$	0,9981	500
ABA	0,1-100	$y = 0,865x + 0,621$	0,9993	55
ABAGE	0,05-100	$y = 1,114x - 0,505$	0,9603	8,5

Pro tvorbu kalibrační křivky bylo měřeno deset kalibračních bodů o koncentracích 10^{-9} až 10^{-5} mol/l, tedy 0,01 pmol až 100 pmol při nástřiku 10 μ l směsi na LC kolonu.

Ose x odpovídala koncentrace stanovovaného fytohormonu v pmol/nástřik a na osu y byla vynesena odezva (Response), která je dána poměrem plochy píku neznačeného ku značenému standardu násobeném známou (konstantní) koncentrací interního standardu (pmol/nástřik). Dosažené koeficienty determinace R^2 byly kolem 0,999 (Tabulka 4). Limita detekce byla definována jako trojnásobek poměru signál/šum a byla stanovena na koncentračních hladinách 5 až 10 fmol pro CK, 40 fmol pro IAA a 500 fmol pro oxIAA a pro poslední sledovanou skupinu fytohormonů ABA: 55 fmol pro ABA a 8,5 fmol pro ABAGE. Limita kvantifikace (signál/šum = 10) se shodovala s nejnižším prvním bodem kalibrace (viz. Tabulka 4).

4.2 Vliv odpařování na ztrátu analytu

Během každého extrakčního a purifikačního kroku dochází ke ztrátám analytu. Krok, který se několikrát opakuje je odpařování, tedy zkoncentrování vzorku. Tento krok je důležitý pro změnu rozpouštědla – prostředí, ve kterém se analyty nacházejí. Důvodů, proč je nutné toto prostředí změnit, může být několik. V našem extrakčním a purifikačním postupu to



Obrázek 19 – Návratnosti u testu příspěvku ke ztrátě analytu vakuové odparce

je použití směsných iontovýměnných SPE kolon. Vzorek nanesený na MCX fázi musí mít kyselé pH. Kolona MAX vyžaduje, aby vzorek vykazoval zásadité pH. Po aplikaci vzorku na tyto kolony standardně dochází k odpařování ve vakuu (na vodnou fázi či do sucha). Při dlouhodobém vystavení vzorku vakuu dochází ke ztrátám analytu. Proto je velmi důležité eliminovat pobyt vzorku ve vakuové odparce na nezbytně nutnou dobu.

Při odpařování reálného vzorku v něm bývají běžně obsažena různá činidla: pro CK - 1 ml 10/90 (v/v) voda/methanol:hydroxid amonný (95:5 v/v); pro IAA a ABA - 1 ml 10/90 (v/v) voda/methanol:kyselina mravenčí (98:2 v/v). Testování ztráty analytu při odpařování vzorku ve vakuové odparce bylo realizováno přípravou 1ml 90% methanolu obsahujícího 100 pmol neznačených standardů. Preparáty byly vloženy do vakuové odparky a odpařovány do úplného vysušení rozpouštědla. Tento proces trval cca 1 hodinu. Odparek byl rozpuštěn v 50 μ l 10% methanolu a změřen pomocí LC-MS/MS.

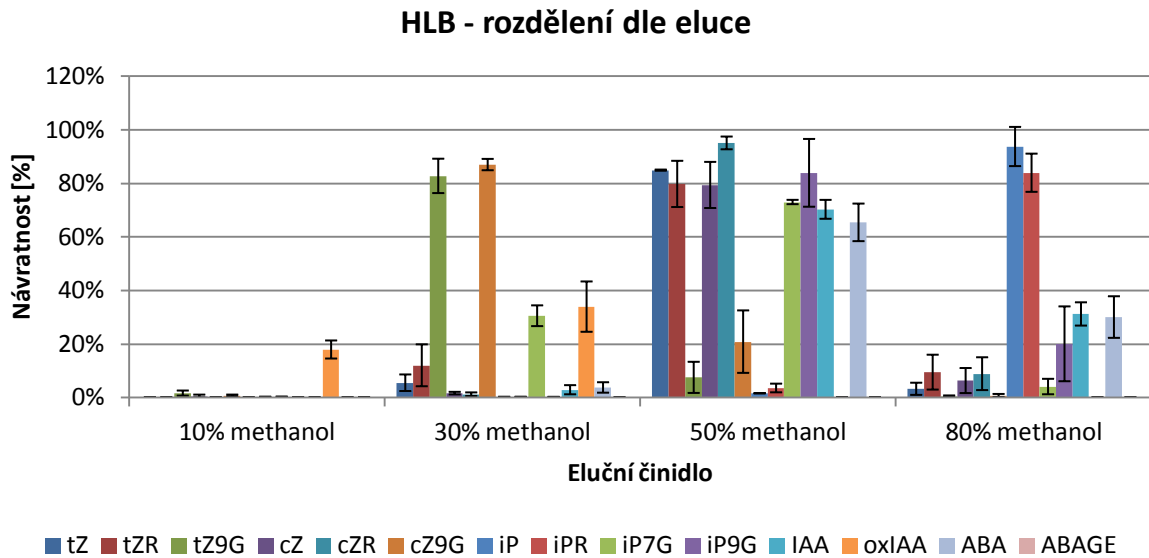
Výsledky jsou graficky prezentovány na Obrázek 19. Z hodnot vypočítaných návratností jasně vyplývá, že příspěvek ke ztrátě analytu během odpařovacího kroku je závislý na volatilní povaze sledovaných látek. Po odpaření vzorku na vakuové odparce došlo ke snížení návratnosti u CK průměrně o 4,36% a u ABA/ABAGE o 4,88%. U těkavějších auxinů je to v průměru až 12,23%. Zde by bylo možné dosáhnout lepších hodnot při odpařování pod proudem dusíku. Naměřené hodnoty jsou pouze orientační, při opakovaném odpařování nemusí být příspěvek lineárně kumulativní. To je zapříčiněno dalšími faktory, které ovlivňují celkovou návratnost SPE protokolů, např. nestálostí vybraných analytů při vyšší teplotě nebo jejich citlivostí na světlo.

4.3 Návratnost u různých typů SPE kolon

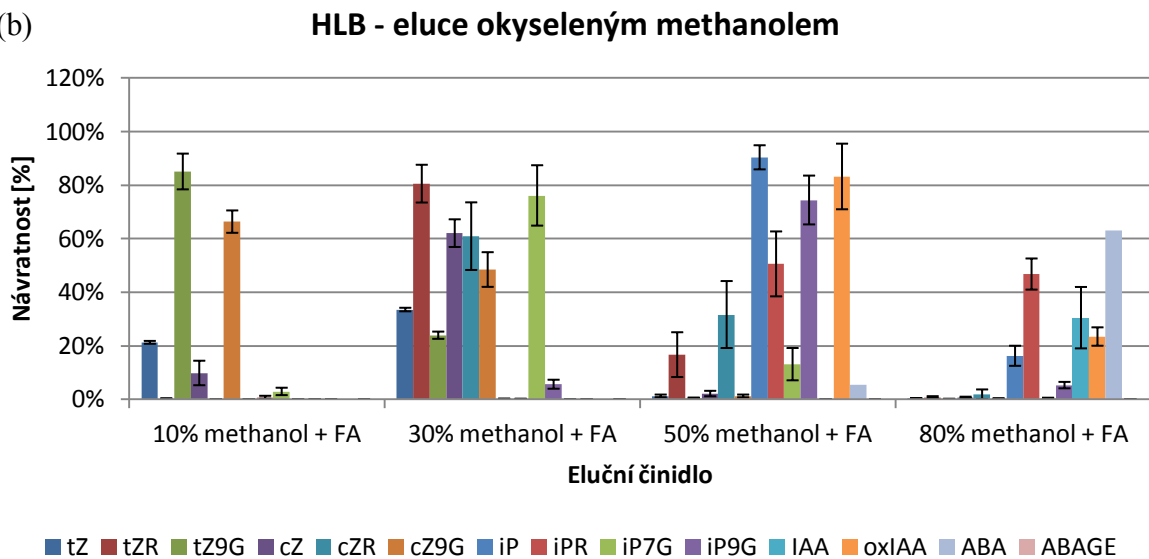
Pro výběr SPE kolony je důležité zvážit typ analytu, který by se měl na koloně zachytit. Jde zejména o posouzení jeho acidobazických vlastností pro iontovýměnné kolony nebo jeho polárnosti (např. pro RP-C18). Po teoretickém výběru SPE kolony je důležité otestovat její sorpční vlastnosti vzhledem ke stanovovanému analytu. Pokud se jedná o více analytů s různými vlastnostmi, musí být zvolena taková SPE kolona či soustava SPE kolon, která by zachytila celé spektrum stanovaných látek.

Na začátku byla studována optimální koncentrace organické fáze v elučním činidle. Při tomto experimentu byla použita kolona s reverzním polymerním sorbentem (Oasis[®] HLB),

(a)



(b)



Obrázek 20 - Eluce CK, IAA a ABA z kolony HLB při použití neokyseleného (a) a okyseleného (b) methanolu

kde jsou analyty zachycovány na základě hydrofilních a lipofilních rovnováh. Na SPE kolonu aktivovanou methanolem a deionizovanou vodou byla aplikována směs neznačených standardů v 10% methanolu (100 pmol). Kolona byla promyta 10% methanolem a poté byla zahájena eluce analytů z kolony použitím 10%, 30%, 50% a 80% roztoků methanolu. Stejný

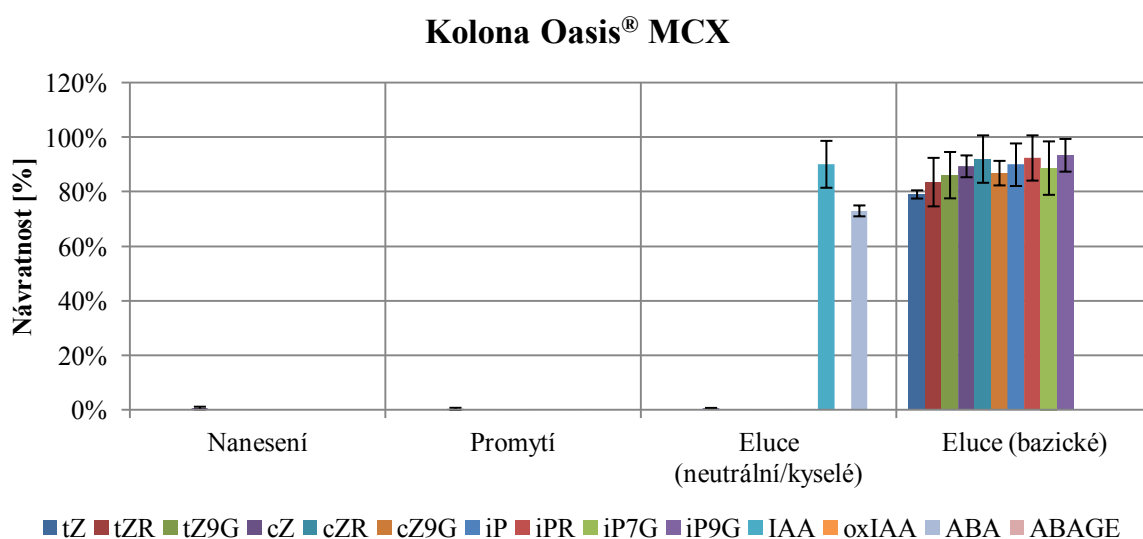
experiment byl opakován i s okyselenými methanolickými roztoky (75µl koncentrované kyseliny mravenčí na 1 ml elučního činidla). Podle očekávání se látky eluovaly se vzrůstajícím obsahem methanolu podle svých polarit (Obrázek 20a). Rozdíl byl také při použití okyseleného methanolu jako elučního činidla, kdy byly testované analyty ze zvoleného sorbentu vymývány rychleji (Obrázek 20b). I když byly fytohormonální skupiny zadržovány na zvoleném sorbentu dostatečně, lze předpokládat, že použití jednokrokového SPE čištění není nejvhodnější pro komplexní matrice jako je např. rostlinný extrakt. V takovém případě musí být snížena navážka, aby se limitoval vliv interferujících látek, ovšem za cenu snížení celkové citlivosti vyvinuté metody.

Tabulka 5 - Přehled kolon MAX a MCX a eluce jednotlivých analytů

Analyt	Oasis [®] MAX				Oasis [®] MCX			
	Nanesení	Promytí	Eluce (neutrální/bazické)	Eluce (kyselé)	Nanesení	Promytí	Eluce (neutrální/kyselé)	Eluce (bazické)
tZ	×	×	×	✓	×	×	×	✓
tZR	×	×	✓	×	×	×	×	✓
tZ9G	×	×	✓	×	×	×	×	✓
cZ	×	×	×	✓	×	×	×	✓
cZR	×	×	✓	×	×	×	×	✓
cZ9G	×	×	✓	×	×	×	×	✓
iP	×	×	×	✓	×	×	×	✓
iPR	×	×	✓	×	×	×	×	✓
iP7G	×	×	✓	×	×	×	×	✓
iP9G	×	×	✓	×	×	×	×	✓
oxIAA	×	×	×	✓	×	×	✓	×
IAA	×	×	×	✓	×	×	✓	×
ABA	×	×	×	✓	×	×	✓	×
ABAGE	×	×	✓	×	×	×	✓	×

Proto jsme se zaměřili na použití purifikačních kolon kombinujících iontově výměnné a reverzní fáze sorbentu (Oasis[®] MCX a MAX firmy Waters). Na aktivované SPE kolony bylo naneseno 100 pmol směsi neznačených standardů a kolony byly promyty 1 ml činidla pro vytvoření pH pro záchyt stanovovaných látek. Pro eluci složek vázaných

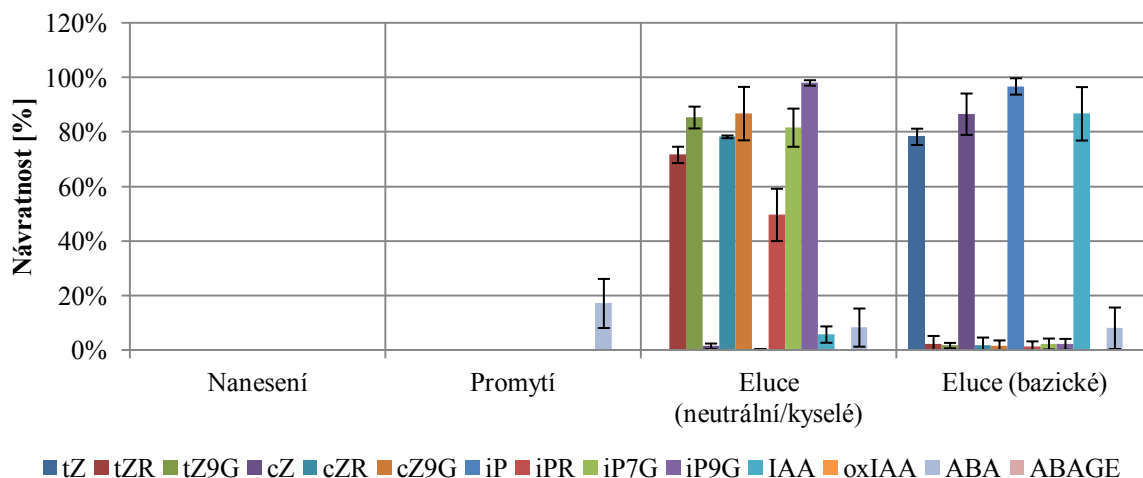
neiontovými interakcemi byl u obou typů kolon použit 1ml 100% methanolu. Konečným krokem bylo uvolnění analytu změnou pH na koloně. Z kolony MAX byly kyselé složky směsi uvolněny nanesením 1 ml 10/90 (v/v) voda/methanol:kyselina mravenčí (98:2 v/v). U kolony MCX byly bazické komponenty vymyty po napipetování 1 ml 10/90 (v/v) voda/methanol:hydroxid amonný (95:5 v/v). Po proměření všech frakcí na analytické koncovce byl získán podrobný přehled výskytu jednotlivých analytů v jednotlivých frakcích (Tabulka 5).



Obrázek 21 – Přehled návratnosti neznačených standardů eluovaných z kolony MCX

Byly vypočteny návratnosti jednotlivých složek testované směsi, které jsou uvedeny na obrázcích Obrázek 21 a Obrázek 22. Po nanesení neznačených standardů na směsnou fázi MCX došlo k zachycení celého spektra obsažených fytohormonů. Při eluci 100% methanolem byla získána frakce A obsahující kyselé a neutrální látky (IAA, oxIAA a ABA, ABAGE). Aplikací alkalického methanolu byly uvolněny všechny cytokininy. Ve shodě s dříve publikovanými výsledky¹¹⁸, směsná kolona Oasis® MCX je tedy vhodná pro zadržení CK.

Kolona Oasis[®] MAX



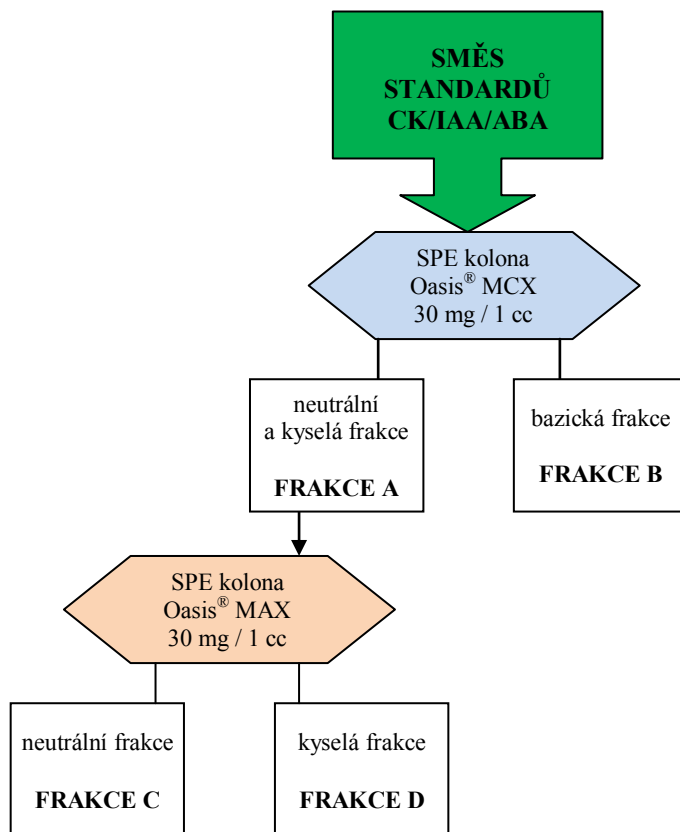
Obrázek 22 – Eluce CK, IAA a ABA z kolony MAX

Kolona Oasis[®] MAX ve vztahu k cytokininům dokáže odseparovat jejich neutrálnější zástupce od kyselějších (Obrázek 22). V případě potřeby tak získáme ve dvou frakcích CK báze a CK ribosidy společně s N-glukosidy. Vzhledem k tomu, že tato separace nemá pro stanovení těchto látek v našem experimentu zvláštní význam (účinná separace je provedena na chromatografické koloně v analytické koncovce), nebyl tento fakt více studován. Pro další testované fytohormony kyselého povahy se ukázala Oasis[®] MAX kolona jako dobrá alternativa. V naší testovací směsi nebyla obsažena látka ABAGE, která má spíše neutrální charakter. Jak bylo později zjištěno, ABAGE je z kolony MAX vymýván v neutrální frakci C (Tabulka 5). Pro špatnou odezvu oxIAA na zvoleném detektoru nebyla tato látka v průběhu experimentu detekována. Z pozdějších měření bylo zjištěno, že oxIAA je eluována v kyselé frakci D. Kolona MAX je tedy vhodná pro oddělení kyselých a neutrálních látek, tedy IAA, oxIAA a ABA od ABAGE.

4.4 Test spojení směsných SPE kolon MCX-MAX

Na základě testu návratnosti u různých typů SPE kolon lze vyslovit závěr, že pro stanovení fytohormonů o různých acidobazických vlastnostech je nejvhodnější spojení dvou iontovýměnných fází v tandemu. Spojení dvou Oasis[®] kolon (MCX-MAX) bylo dále

studováno za použití směsi standardů (100 pmol), stejných činidel a principů zacházení s SPE kolonou jako v předchozím testu.



Obrázek 23 – Schéma výsledného uspořádání SPE kolon MCX a MAX

Konečné uspořádání SPE kolon je zobrazeno na Obrázek 23. Pro purifikaci a rozdělení fytohormonů podle jejich acidobazických vlastností do tří frakcí (B, C a D) je postačující použití jedné kolony MCX a jedné kolony MAX. Frakce A, methanolická eluce pocházející z prvního SPE kroku (kolona MCX), se odpaří na vodnou fázi a z důvodu změny na alkalické pH (kolem 12.0) se doplní vhodným činidlem (5% hydroxidem amonným). Poté je tato frakce nanášena a přečištěna pomocí směsné fáze kombinující aniontově výměnnou a reverzní fázi sorbentu (kolona MAX).

Tabulka 6 názorně ukazuje výskyt sledovaných analytů v jednotlivých frakcích. Tandemové spojení SPE kolon bylo testováno nejen nanášením směsi neznačených standardů ($1 \cdot 10^{-6}$ mol/l), ale také aplikací navrženého postupu na vzorky obsahující rostlinnou matici. Byly připraveny tři typy vzorků: (i) vzorky obsahující neznačené standardy (100 pmol),

(ii) vzorky obsahující pouze 25 mg rostlinného materiálu, (iii) vzorky cca 25 mg rostlinného materiálu s přidavkem směsi neznačeného standardu (100 pmol). K extrakci byl použit 80% methanol. Výsledky přehledně ukazuje Tabulka 7.

Tabulka 6 - Přehled frakcí a výsledný výskyt analytů

Analyt	FRAKCE		
	B	C	D
tZ	✓	×	×
tZR	✓	×	×
tZ9G	✓	×	×
cZ	✓	×	×
cZR	✓	×	×
cZ9G	✓	×	×
iP	✓	×	×
iPR	✓	×	×
iP7G	✓	×	×
iP9G	✓	×	×
IAA	×	×	✓
oxIAA	×	×	✓
ABA	×	×	✓
ABAGE	×	✓	×

Tabulka 7 – Přehled nalezených návratností pro spojení MCX/MAX

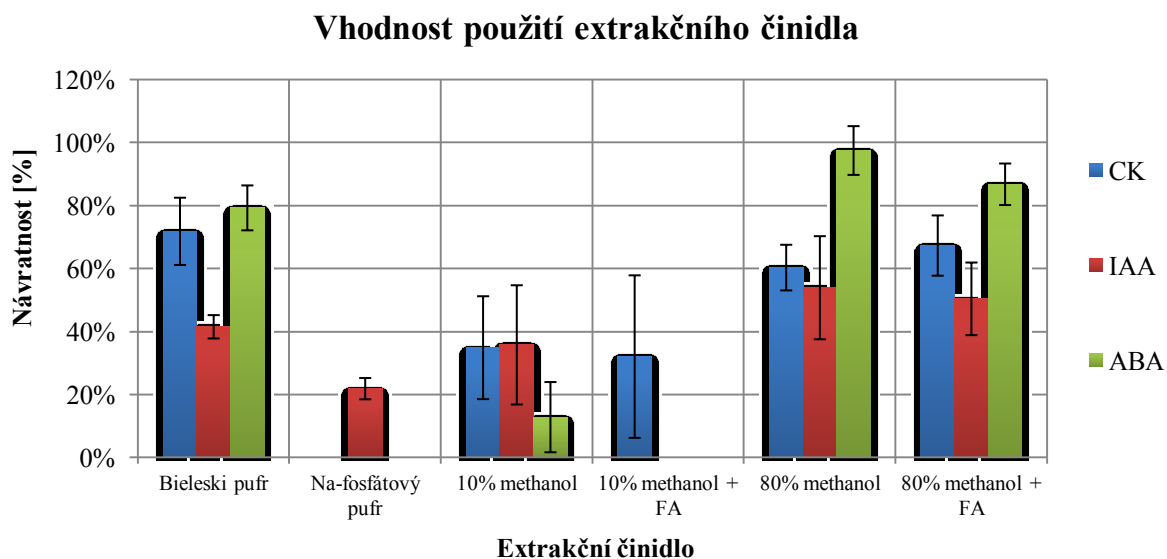
Frakce	Analyt	Návratnost [%]	
		100 pmol	Rostlinný extrakt + 100 pmol
B	tZ	87 ± 6%	86 ± 7%
	tZR	89 ± 9%	92 ± 6%
	tZ9G	93 ± 4%	92 ± 5%
	cZ	90 ± 3%	91 ± 6%
	cZR	88 ± 4%	85 ± 4%
	cZ9G	84 ± 6%	95 ± 9%
	iP	82 ± 8%	84 ± 3%
	iPR	98 ± 11%	93 ± 9%
	iP9G	96 ± 5%	96 ± 6%
	iP7G	91 ± 3%	94 ± 8%
C	ABAGE	103 ± 3%	103 ± 1%
D	IAA	84 ± 1%	107 ± 4%
	oxIAA	80 ± 2%	124 ± 4%
	ABA	93 ± 5%	107 ± 12%

Z tohoto testu lze usoudit, že navrhované spojení směsných SPE kolon, tedy MCX-MAX, je vhodné pro stanovení vybraných skupin fytohormonů. Spojení poskytuje výborné návratnosti (průměrně kolem 90%). Z důvodů dosažení vyššího stupně přečištění byla tandemovému uspořádání směsných kolon v dalších testech předřazena reverzní fáze C18 pro zachycení rostlinných pigmentů, které by mohly zvyšovat efekt matrice.⁶⁹

4.5 Výběr vhodného extrakčního činidla

Výběr extrakčního činidla pro vyvinutý purifikační protokol má velký vliv na celkovou návratnost. Pokud bychom stanovovali pouze jednu látku, řešením je jedno extrakční činidlo, které je vhodné pro daný analyt a z celého spektra extrakčních činidel dává nejvyšší extrakční výtěžnost. V případě, kdy stanovujeme více analytů v jedné analýze, musíme řešit situaci, kdy každá látka má své vlastní vhodné extrakční činidlo. Proto je nejlepší najít kompromisní řešení.

Pro testování návratnosti v závislosti na výběru extrakčního činidla byly vybrány tyto média: Bieleškiho pufr (60% methanol, 25% trichlormethanu, 10% kyselina mravenčí a 5% voda) často používaný pro extrakci CK, sodno-fosfátový pufr (50mM; pH 7,0) s přidavkem antioxidantu 0,02% diethyldithiokarbamátu sodného, obvyklý při extrakci IAA, 10% methanol (neokyselený a okyselený) a 80% methanol (neokyselený a okyselený).



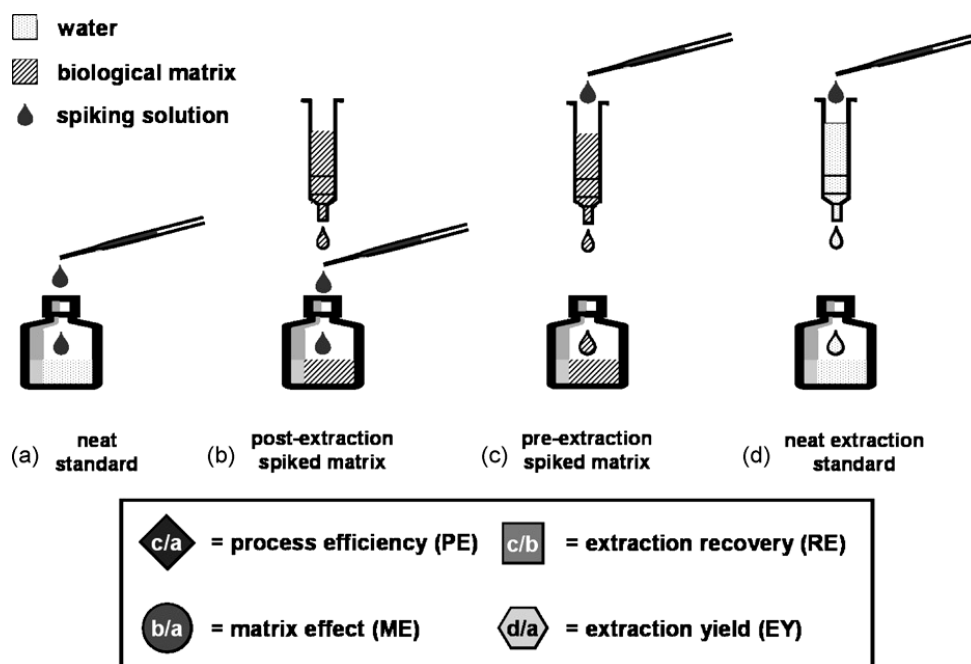
Obrázek 24 – Vhodnost použití extrakčního činidla pro stanovení CK, IAA a ABA.

Rostlinný materiál (asi 25 mg) byl extrahován testovaným rozpouštědlem v triplicátech dle postupu v kapitole 3.5. Po prvním purifikačním kroku a odpaření na vodnou fázi bylo u každého vzorku zkontrolováno pH. Aby vzorky mohly být naneseny na kolonu MCX, musely mít kyselé pH. Pokud by byla tato podmínka porušena (obzvláště u pufrů), tak by bylo nutné vzorek okyselit, např. malým množstvím kyseliny octové či kyseliny mravenčí. Při tomto testu nebylo třeba eluáty dodatečně okyselovat, pH bylo mírně kyselé (cca 2,7 – 4,7). Pro sledování extrakčních účinností jednotlivých činidel byly použity značené standardy (viz. Tabulka 3), jejichž výsledná odezva (plocha píku) v přečištěném extraktu byla porovnána s odezvou původní směsi IS. Pro zjednodušení byly návratnosti jednotlivých látek zprůměrovány dle svého zařazení mezi fytohormony a hodnoty vyneseny do grafu (Obrázek 24).

Výsledky ukazují, že pro extrakci CK je nejvhodnější Bieleskiho pufr (standardně se používá). Zatímco pro auxiny a ABA bylo nejvyšších návratnosti dosaženo při extrakci do 80% methanolu. I když byl pro stanovení IAA publikován Na-fosfátový pufr jako vhodné činidlo,⁷⁶ naše výsledky tento fakt nepotvrdily. Z největší pravděpodobnosti bylo příčinou nedostatečné okyselení vzorků po extrakci před nanesením na první SPE kolonu (RP-C18). Tento krok je uváděn jako kritický při stanovení auxinů.⁷⁹ Z výsledků jasně vyplývá, že vhodným extrakčním činidlem pro současné stanovení CK, auxinů a ABA je 80% methanol bez přídavku nebo s přídavkem kyseliny mravenčí. Okyselený 80% methanol zvýhodňuje CK a poskytuje nižší návratnost stanovovaným kyselinám (IAA a ABA). Opačný trend byl nalezen při použití 80% methanolu. Celková extrakční účinnost dosahovala nejlepších výsledků při použití neokyseleného 80% methanolu. Z těchto důvodů byl 80% methanol zvolen jako standardní extrakční činidlo pro společné stanovení CK, auxinů a ABA.

4.6 Vliv matričního efektu

Testování vlivu matričního efektu vychází ze článku autorů Marchi a kol.⁶³ a to přesněji z druhé techniky určování vlivu matričního efektu zaměřující se na kvantitativní podstatu efektu. Princip této techniky spočívá v přidání neznačených standardů před extrakcí a těsně před analýzou vzorku. Při použití LC-MS/MS metod je vhodné stanovit opatření k eliminaci matričního efektu při vývoji metod. Z tohoto důvodu bylo navrženo hodnocení účinků matrice a postup jejího kvantitativního stanovení.



Obrázek 25 – Grafické znázornění složení vzorků a naznačení výpočtu hodnotících kritérií⁶³
 Podrobnosti: (a) čistý standard, který nebyl extrahován; (b) obohacená matrice po SPE extrakci;
 (c) obohacená matrice před extrakcí; (d) čistý extrahovaný standard

Kvalita celého purifikačního procesu, tzv. účinnost procesu (PE; *process efficiency*), sleduje změny způsobené během přípravy vzorku a analýzy (např. přenos ionů). PE je dána poměrem ploch píků neznačených standardů přidaných před extrakcí k biologické matrici a čistého standardu nastříknutého na kolonu. Reziduální látky obsažené ve vzorku po extrakci a purifikaci ovlivňují v MS ionizační proces. Následkem je potlačení či umělý nárůst signálu.

Matriční efekt (ME; *matrix effect*), vliv endogenních látek na LC-MS, získáme, pokud podělíme plochu píků neznačených standardů přidaných po SPE přečištění biologických vzorků a čistého standardu nastříknutého na kolonu. Příprava vzorku (extrakce a purifikace) obvykle snižuje výtěžnost ve srovnání se situací, kdy je měřeno stejné množství standardu, které tímto procesem neprošlo.

Výtěžek extrakce (RE, *extraction recovery*) se stanovuje z poměrů ploch píků vzorku, který byl obohacen o neznačený standard před extrakcí a po SPE purifikaci. Při multianalytickém stanovení může neefektivní extrakce analytů z biologického materiálu vést k znehodnocení parametru RE.⁶³ Z tohoto důvodu se zavádí pojem výtěžnost extrakce (EY, *extraction yield*). Kdy je porovnáván poměr signálu vzorku, který obsahoval pouze směs standardů bez biologické matrice a standardů nastříknutých na kolonu bez extrakce.

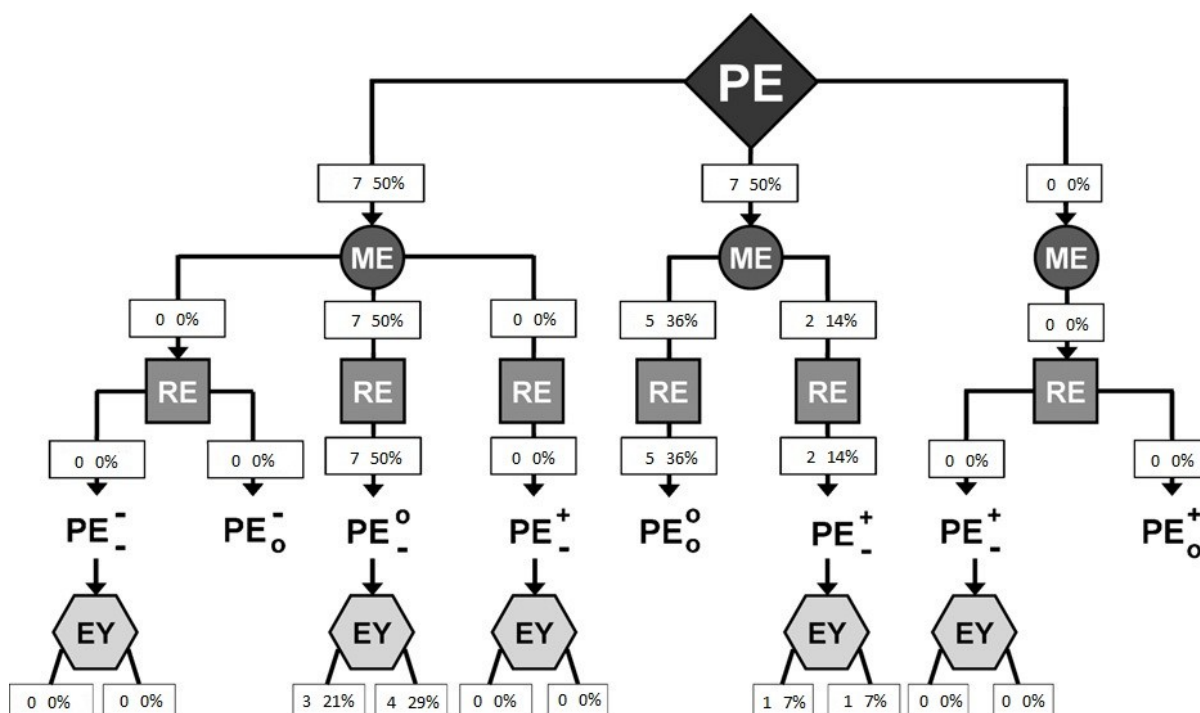
Vypočtené poměry jednotlivých hodnotících kritérií je možné rozdělit do osmi tříd: PE, který je kombinací ME a RE, může nabývat hodnot -1 (nízká; < 90%), 0 (dobrá, 90% - 110%) a 1 (vysoká; > 110%); ME se dále dělí třemi způsoby, tedy jako -1 (pokles signálu), 0 (žádná změna) a 1 (rozšíření signálu vlivem koeluace interferentů); RE představuje pouze dvě možné hodnoty, -1 (úbytek) nebo 0 (žádný vliv). Pro přehlednost se používá PE a horní index značící ME a dolní index jako RE.⁶³

Extrakce a purifikace byla provedena ve třech opakováních pro každý typ vzorků dle standardního postupu uvedeného v kapitole 3.5. Byly připraveny tři typy vzorků (Obrázek 25): (i) biologické vzorky s přidavkem směsi neznačených standardů před extrakcí; (ii) biologický vzorek s přidavkem směsi neznačených standardů po extrakci a purifikaci (před měřením na analytické koncovce) a (iii) vzorky obsahující pouze směs neznačených standardů. Posledním, čtvrtým, typem vzorku byl roztok standardů, který nebyl extrahován, pouze analyzován. Vzorky obsahovaly 100 pmol směsi neznačených standardů (tZ, tZR,tZ9G, cZ, cZR, cZ9G, iP, iPR, iP7G, iP9G, IAA, oxIAA, ABA a ABAGE; o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l). Byly dodrženy standardní laboratorní podmínky vyžadované typem analytu.

Tabulka 8 - Matriční efekt I – Procentuální poměry hodnotících kritérií před extrakcí a po SPE přečištění.

Analyt	PE (%)	ME (%)	RE (%)	EY (%)
tZ	77%	94%	82%	82%
tZR	78%	102%	76%	77%
tZ9G	91%	111%	82%	93%
cZ	84%	100%	84%	90%
cZR	85%	97%	88%	88%
cZ9G	95%	116%	82%	84%
iP	84%	92%	91%	82%
iPR	78%	99%	79%	98%
iP7G	89%	115%	77%	91%
iP9G	89%	93%	96%	92%
IAA	94%	100%	94%	88%
oxIAA	96%	97%	99%	65%
ABA	98%	104%	95%	95%
ABAGE	83%	105%	79%	90%

V první části testu jsme se zaměřili na porovnání obohacených vzorků před samotnou extrakcí v 80% methanolu a po purifikačním kroku kombinujícím tandemové uspořádání SPE kolon. Tabulka 8 ukazuje procentuální poměry hodnotících kritérií a Obrázek 26 představuje rozdělení matričního efektu s procentuálním naznačením výskytu analytů v jednotlivých třídách. Pro vybrané fytohormony byla účinnost procesu z 50% nízká (záporná) a z 50% vyhovující (rovna nule). Pro PE se záporným efektem byl ME nulový pro 50% sledovaných analytů. Pro nulový PE byl ME beze změn pro 36% analytů. ME vykazoval kladné hodnoty pro 14% analytů, tedy docházelo k nadbytku signálu vlivem matrice.

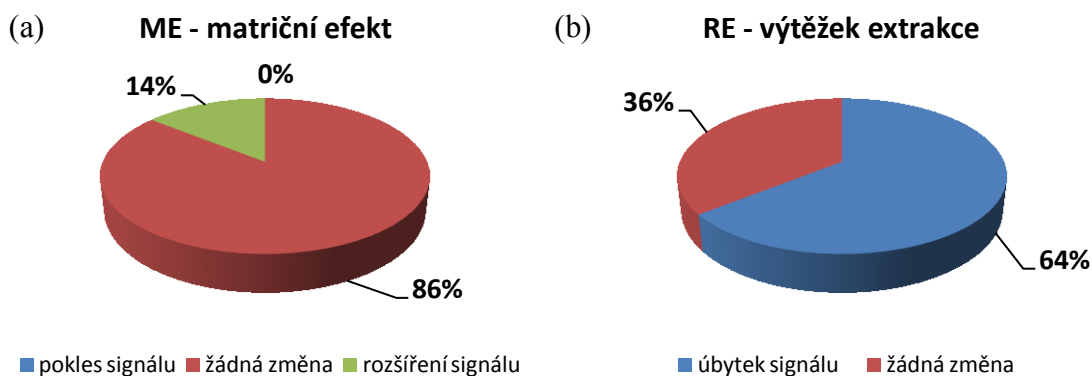


Obrázek 26 – Distribuce matričního efektu

V jednotlivých buňkách jsou uvedeny počty analytů splňující dané kritérium a jejich procentuální zastoupení z celkového počtu stanovovaných látek (14 fytohormonů).

Pokud se podíváme na celý proces extrakce a purifikace (Obrázek 17) lze říci, že vliv matričního efektu byl u 86% sledovaných látek nepatrný a u 14% analytů docházelo k rozšíření signálu díky interferencím z matrice. Vyšší výtěžek extrakce a purifikace byl nalezen u 36% stanovovaných látek. U 64% fytohormonů byl RE nižší než 90%, což je

zapříčiněno stanovením více skupin fytohormonů současně a použitím metody, která je kompromisem z hlediska extrakčního činidla.



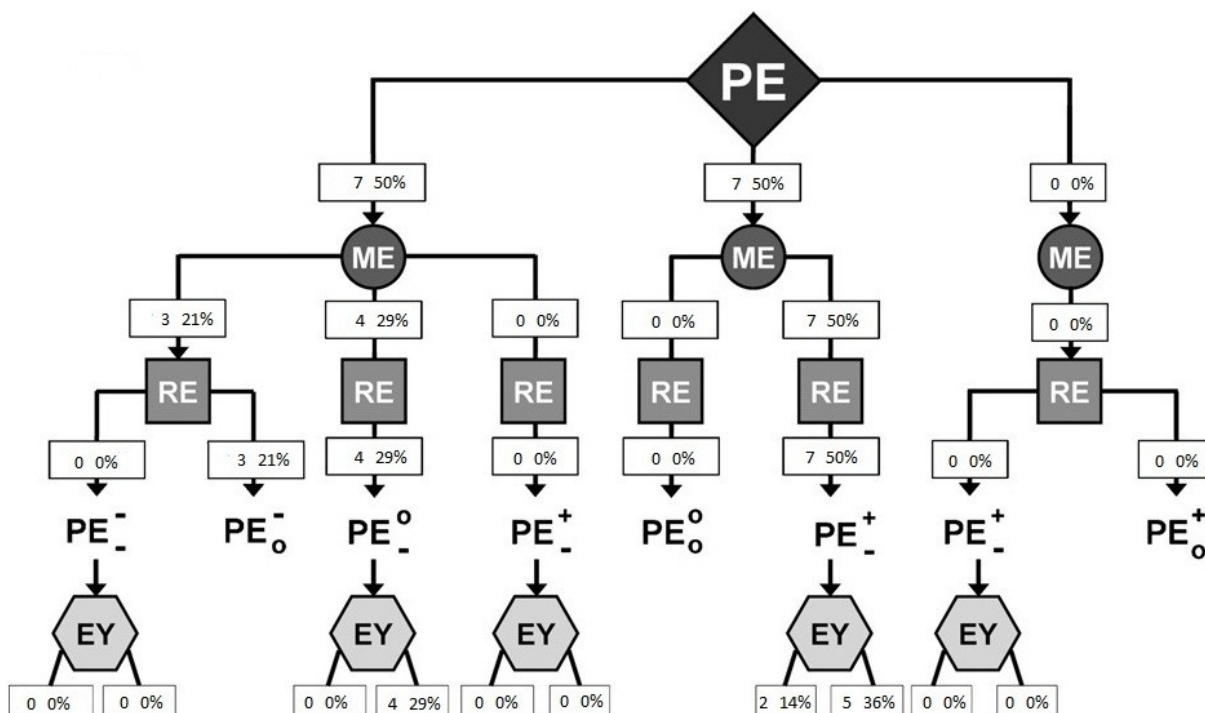
Obrázek 27 – Sumární vyjádření vlivu ME a RE:
 u většiny ze 14 stanovovaných analytů nedochází k změnám způsobeným ME; u RE je u většiny ze 14 sledovaných fytohormonů patrný úbytek signálu ve vztahu k výtěžku extrakce

Vzhledem k tomu, že používáme tandemové SPE uspořádání, byl ve druhé části testu studován matriční efekt samotného purifikačního kroku. Rostlinné extrakty byly obohaceny směsí neznačených standardů bezprostředně před a po SPE purifikaci.

Tabulka 9 - Matriční efekt II – – Procentuální poměry hodnotících kritérií před a po SPE přečištění

Analyt	PE (%)	ME (%)	RE (%)	EY (%)
tZ	83%	86%	96%	102%
cZ	84%	85%	98%	101%
tZ9G	90%	96%	94%	100%
cZ9G	90%	96%	94%	100%
iP7G	89%	111%	86%	96%
tZR	80%	94%	88%	100%
cZR	78%	92%	89%	98%
iP	80%	87%	92%	95%
iP9G	87%	109%	86%	96%
iPR	83%	91%	92%	105%
IAA	95%	96%	91%	87%
oxIAA	94%	98%	89%	76%
ABA	101%	109%	93%	92%
ABAGE	101%	109%	93%	92%

Tabulka 9 prezentuje naměřené výsledky a Obrázek 28 představuje rozdělení matričního efektu. Pro vybrané fytohormony byl PE z 50% nízký (záporný) a z 50% vyhovující (roven nule), což byl shodný výsledek jako v první části testu. Pro účinnost procesu se záporným efektem byl ME záporný pro 3 analyty (21%) a nulový pro 4 analyty (29%). Pro PE s vyhovujícími hodnotami je ME nulový pro 50% fytohormonů.

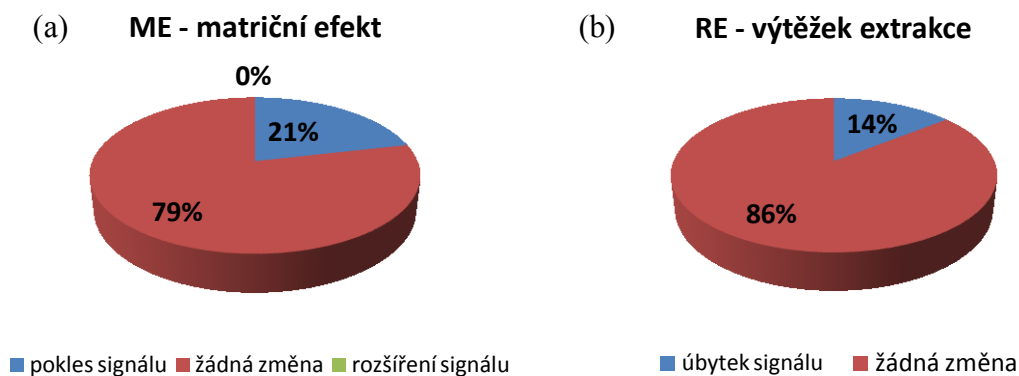


Obrázek 28 - Distribuce matričního efektu u druhé části testu⁶³

Závěrem druhé části testu hodnotícího matriční efekt můžeme konstatovat, že purifikační krok výrazně nepřispívá k ME. Z Obrázek 29 je zřejmé, že pouze u 3 analytů (21%) docházelo k poklesu signálu a u 2 sledovaných látek (14%) byl výtěžek extrakce snížen na hodnoty kolem 86%.

Z celkového hodnocení studovaných kritérií vlivu matričního efektu lze usuzovat, že samotná tandemová SPE ovlivňuje výsledné stanovení podobnou měrou jako extrakce v 80% methanolu. Celkově je 36% studovaných látek ovlivněno matričním efektem. Zatímco porovnáním výtěžků extrakce (Obrázek 27 a Obrázek 29) obou testů je patrné, že až 50%

analytů je zatíženo úbytkem signálu způsobeného pouze extrakcí do zvoleného organického činidla (např. přítomností rostlinných pigmentů).



Obrázek 29 - Sumární vyjádření vlivu ME a RE u druhé části testu

4.7 Validace vyvinuté metody

Přesnost (preciznost) metody značí těsnost shody mezi výsledky měření stejných vzorků. Přesnost je popsána směrodatnou odchylkou. Správnost metody značí těsnost shody mezi výsledkem měření a deklarovanou hodnotou měřeného materiálu. Správnost je dána chybou. Pravdivost výsledků, tedy rozdíl průměru z více výsledků a referenční hodnoty, je dána odchylkou (bias).¹²⁰

Pro tento test bylo připraveno dvanáct vzorků, které odpovídaly 20 mg rostlinného materiálu v 1 ml 80% methanolu. Ke vzorkům obsahujícím rostlinnou matici byla přidána směs značených interních standardů (10 pmol) a směsi neznačených standardů o koncentračních hladinách (0; 0,1; 1 a 10 pmol). Takto připravené vzorky byly přečištěny na koloně C18, MCX a MAX, posbírány frakce B (bazická frakce) a frakce D (kyselá frakce) a odpařeny do sucha. Stejný proces absolvovaly dva slepé vzorky obsahující po 1 ml 80% methanolu a IS (10 pmol). Všechny odparky byly rozpuštěny v 50 μ l 10% methanolu a pro LC-MS/MS stanovení bylo na chromatografickou kolonu nastříkováno 10 μ L.

Tabulka 10 – Intraday a interday pro určení reprodukovatelnosti metody. (n.d.=neodekóváno)

Analyt	Intraday (RSD %, n = 3)			Interday (RSD %, n = 3)		
	0,1 pmol	1 pmol	10 pmol	0,1 pmol	1 pmol	10 pmol
tZ	7,1%	8,5%	3,3%	14,80%	2,5%	6,6%
tZR	14,4%	4,6%	4,0%	3,5%	3,3%	2,8%
tz9G	6,8%	3,0%	5,0%	4,6%	0,9%	2,7%
cZ	10,1%	7,3%	6,4%	14,8%	4,9%	4,3%
cZR	8,7%	2,6%	4,0%	4,5%	1,7%	1,7%
cZ9G	6,2%	4,4%	2,5%	2,8%	1,4%	2,7%
iP	4,3%	2,5%	3,3%	6,9%	1,1%	3,5%
iPR	6,8%	1,9%	5,0%	3,6%	2,2%	3,8%
iP7G	8,8%	2,7%	2,0%	2,1%	0,6%	2,0%
iP9G	11,0%	0,6%	2,1%	12,6%	2,6%	3,2%
IAA	4,5%	11,8%	7,8%	23,5%	6,2%	5,6%
oxIAA	n.d.	15,5%	7,3%	n.d.	12,9%	2,5%
ABA	10,3%	13,9%	9,0%	27,3%	15,6%	2,9%
ABAGE	20,7%	11,2%	5,1%	30,4%	24,9%	9,3%

Tabulka 11 – Přesnost (% RSD) a správnost (% bias) vyvinuté SPE metody

Analyt	RSD	BIAS
tZ	7,5%	1,7%
tZR	5,9%	7,9%
tz9G	3,6%	1,2%
cZ	7,6%	-3,2%
cZR	5,6%	-7,7%
cZ9G	3,9%	-4,5%
iP	2,5%	5,3%
iPR	3,1%	5,3%
ip7G	7,6%	-9,9%
iP9G	3,1%	-1,9%
IAA	13,5%	-0,8%
ABA	6,8%	-9,7%

Tři kontrolní vzorky ke každé koncentrační hladině (0,1 pmol, 1 pmol a 10 pmol) byly změřeny opakovaně pro stanovení denních (*intraday*) a mezidenních (*interday*) variabilit. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 10. Hodnoty relativní směrodatné odchylky pro intraday poskytovaly velmi dobrou reprodukovatelnost v průměru 5,3% pro cytokininy, 9,4% pro auxiny a 11,7% pro ABA. U kontrolních vzorků, které byly měřeny v odstupu tří dnů (*interday*) se opakoval u CK a IAA podobný trend jako u intraday (4,2% RSD a 10,1% RSD). Jen u ABA a jejího glukosylesteru dosahovala průměrná mezidenní variabilita 18,4% RSD. Na základě těchto výsledků lze usoudit, že LC-MS/MS měření vykazovalo dobrou reprodukovatelnost v celém koncentračním rozsahu pro všechny stanovované fytohormony v závislosti na jejich naměřených hodnotách LOD (Tabulka 4).

Přesnost vyvinuté metody se pohybovala od 2,5% do 13,55% RSD. Správnost metody byla hodnocena parametrem bias, který byl v intervalu -9,89% až 1,19%. Tabulka 11 prezentuje obě vypočtené hodnoty. Oba tyto parametry splňovaly základní požadavky pro použitelnost metody pro kvantifikaci sledovaných analytů.^{59,60}

Tabulka 12 – Návratnost u validačních vzorků obsahujících rostlinnou matici pro tři různé koncentrační hladiny

Analyt	Návratnost (% , n = 3)		
	0,1 pmol	1 pmol	10 pmol
tZ	81 ± 2	70 ± 10	68 ± 6
tZR	93 ± 13	107 ± 6	85 ± 9
tZ9G	74 ± 9	87 ± 11	108 ± 1
cZ	99 ± 4	62 ± 4	69 ± 5
cZR	101 ± 10	102 ± 4	72 ± 1
cZ9G	107 ± 2	86 ± 3	93 ± 8
iP	78 ± 13	74 ± 4	85 ± 7
iPR	62 ± 6	61 ± 4	75 ± 5
ip7G	103 ± 6	98 ± 9	89 ± 5
ip9G	108 ± 12	107 ± 3	79 ± 8
IAA	116 ± 6	74 ± 6	84 ± 3
ABA	60 ± 9	82 ± 5	62 ± 3

Posledním sledovaným validačním parametrem je relativní návratnost u vzorků obsahujících rostlinnou matici testovaná na třech koncentračních hladinách (viz Tabulka 12). Všechny koncentrační hladiny (0,1; 1 a 10 pmol) vykazují hodnoty návratnosti v intervalu

přibližně od 60% do 110%. Tyto výsledky jsou zatíženy kompromisním řešením ve výběru extrakčního činidla (80% methanol), z tohoto důvodu jsou některé návratnosti nižší (diskutováno v kapitole 4.5). Celková výtěžnost purifikačních kroků a analytického stanovení je také ovlivněna matričním efektem (viz kapitola 4.6).

Na základě všech zvolených validačních parametrů (relativní návratnost, denní a mezidenní variabilita, přesnost a správnost metody) a naměřených výsledků lze označit metodu za validovanou pro stanovení cytokininů, kyseliny indol-3-yloctové a kyseliny abscisové v rostlinném materiálu.

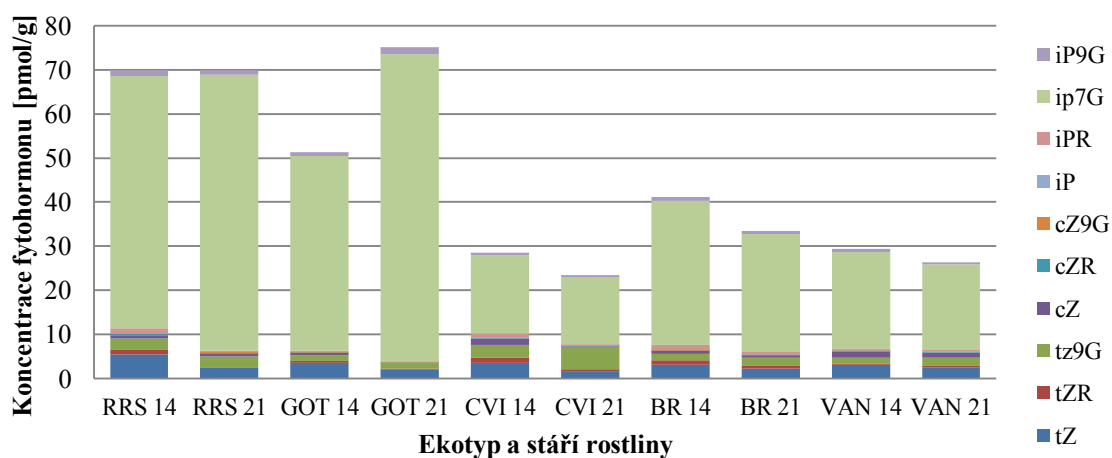
4.8 Stanovení vybraných fytohormonů v rostlinném materiálu

Metoda optimalizované extrakce a tandemové SPE purifikace byla na závěr testována na rostlinném materiálu získaného z rostliny *Arabidopsis thaliana*. Byly napěstovány rostliny různých ekotypů: Br-0, Cvi-0, GOT-1, RRS-7 a Van-0. Biologický materiál (20 mg) byl sklizen 14 a 21 dní od výsadby. Vzorky byly zpracovány dle prezentovaného extrakčního a purifikačního protokolu (Obrázek 17). Jako analytická koncovka byl použit systém LC-MS/MS s použitím optimalizovaných podmínek (Tabulka 3). Grafické znázornění naměřených výsledků je zobrazeno v obrázku 30 a výsledné hodnoty jsou uvedeny v Příloze 2.

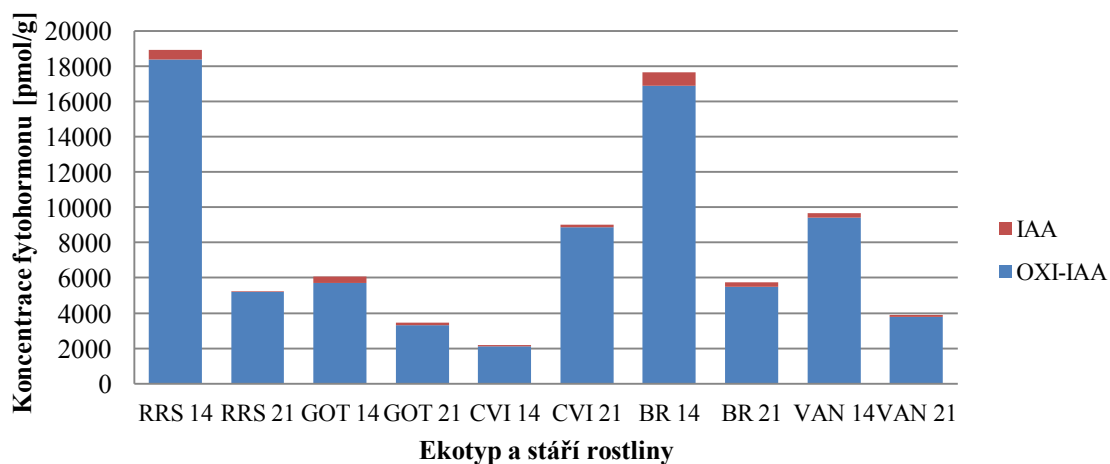
Z pohledu rostlinné fyziologie získané výsledky ukázaly trend v obsahu auxinů, cytokininů a kyseliny abscisové v závislosti na stáří rostliny (14 a 21 dnů). Celkově byl patrný nárůst jednotlivých metabolitů (hlavně nedegradabilních forem) na úkor aktivních forem studovaných hormonálních skupin. Z analytického hlediska bylo z naměřených výsledků patrné, že naše vyvinutá metoda je dostatečně robustní a vykazuje linearitu v rozsahu několika koncentračních řádů. U sledovaných cytokininových bazí, ribosidů a *N*-glukosidů se nalezené koncentrační hladiny pohybovaly v rozsahu desítek fmol až stovek pmol na gram živé hmoty (ž.h.). U zvolených auxinů, IAA a oxIAA, byly hladiny analyzovány v rozpětí třech koncentračních řádů. Kyselina abscisová a její glukosylester byly nalezeny v rozsahu 0,5 – 8,3 pmol/g ž.h.

Obrázek 30 (Následující strana) – Hladiny nalezených fytohormonů ve studovaných 14 a 21 denních ekotypch *A. thaliana*: (a) koncentrace cytokininů, (b) koncentrace auxinů, (c) koncentrace ABA a ABAGE.

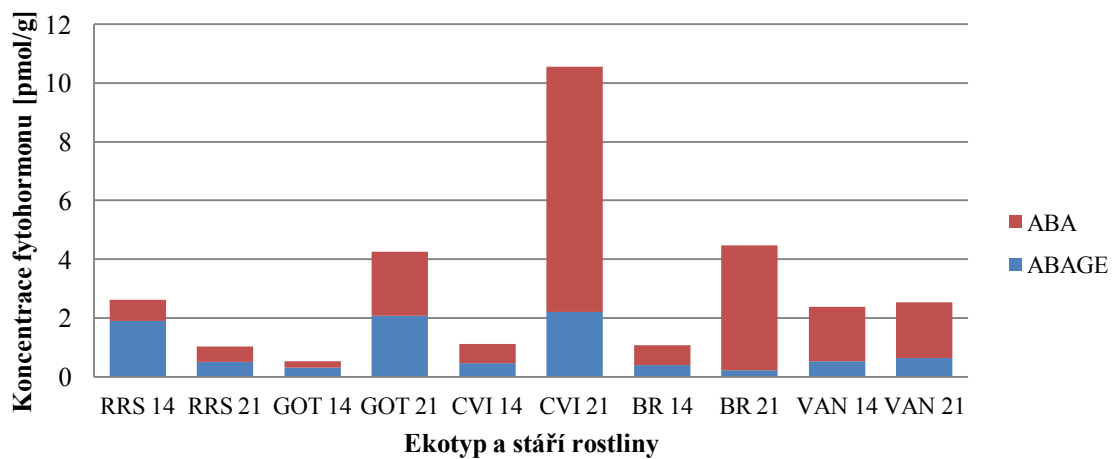
Koncentrace CK (pmol/g)



Koncentrace IAA (pmol/g)



Koncentrace ABA (pmol/g)



V případě rozšíření navržené metodiky o další metabolity či nové fytohormonální skupiny lze doporučit použití citlivější analytické koncovky, například novějšího LC-MS/MS systému s modernější konstrukcí přístroje. Toto spojení by mohlo poskytnout kvalitativně i kvantitativně lepší informace s celkově vyšší citlivostí, přesností a správností.

5. Závěr

Tato práce předkládá optimalizovanou metodu pro stanovení několika skupin fytohormonů v jedné analýze. Diplomová práce podává základní informace o fyzikálních a chemických vlastnostech, biosyntéze, metabolismu a metodách analýzy auxinů, cytokininů a kyseliny abscisové. Na základě dříve publikovaných informací byla navržena izolační metoda, jejíž základem je extrakce a tandemová SPE purifikace. Toto multihormonální stanovení bylo nejen časově výhodné (v porovnání s prováděním několika extrakcí a purifikací dle klasických postupů pro jednotlivé fytohormonální skupiny), ale bylo dosaženo i vyhovujících návratností (pohybující se v rozmezí 60% až 90%). Byl také testován vliv odpařování použitého rozpouštědla na ztráty sledovaných analytů. Při odpaření vzorku na vakuové odparce došlo ke snížení celkových hladin CK průměrně o 4%, u ABA/ABAGE o 5% a u těkavějších auxinů to bylo v průměru až 12%. Při testování tandemového uspořádání SPE kolon Oasis[®] MCX a MAX byly návratnosti bez rostlinné matrice kolem 90%. Při analýze obohaceného rostlinného extraktu byly nalezené návratnosti u některých fytohormonů nižší z důvodu kompromisu ve výběru extrakčního činidla (byl použit 80% methanol). Vliv matričního efektu byl z pohledu celého procesu (extrakce a purifikace) u 86% sledovaných analytů nepatrný a u 14% docházelo k rozšíření signálu díky interferenci látek z matrice. Výsledná metoda byla validována pomocí přidavku směsi studovaných fytohormonů na třech koncentračních hladinách (0,1; 1 a 10 pmol). Na základě zvolených validačních parametrů (relativní návratnost, denní a mezidenní variabilita, přesnost a správnost metody) bylo ukázáno, že vyvinutá metoda je dostatečně robustní v celém kalibračním rozsahu.

Použitelnost navržené metody byla ověřena aplikací popisovaného postupu na rostlinný materiál *Arabidopsis thaliana*. Závěrečná analýza ukázala trend v obsahu auxinů, cytokininů a kyseliny abscisové v závislosti na stáří rostliny (14 a 21 dnů). Věříme, že purifikační protokol bude vhodnou metodou pro multidimenzionální analýzu rostlinných hormonů nejen u testované *A. thaliana*, ale i u jiných rostlinných materiálů. Navíc je zde možnost rozšířit metodiku o další metabolity studovaných hormonů nebo celé nové skupiny fytohormonů (např. gibberelliny, jasmonáty či kyselinu salicylovou).

6. Literatura

1. Santner A., Calderon-Villalobos L. I. A., Estelle M.: *Nat. Chem. Biol.* **5**, 301 (2009).
2. Hou S. J., Zhu J., Ding M. Y., Lv G.H.: *Talanta* **76**, 798 (2008).
3. Davies P. J.: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Kluwer Academic, Netherlands 2004.
4. Bruzzone S., Moreschi I., Usai C., Guida L., Damonte G., Salis A., Scarfi S., Millo E., Flora A. D., Zocchi E.: *PNAS* **104**, 5759 (2007).
5. Rivier L. a kol.: *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*. Academic Press, London 1987.
6. Crozier A., Kamiya Y., Bishop G., Yokota T.: *Biosynthesis of hormones and elicitor molecules*. American Society of Plant Physiologists, Maryland 2000.
7. Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyojuka J., Yamaguchi S.: *Nature* **455**, 195-200 (2008).
8. Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pagès V., Dun E. A., Pillot J. P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J. C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C. A., Rameau C., Rochange S. F.: *Nature* **455**, 189-194 (2008).
9. Sandberg G., Crozier A., Ernsten A., Sunberg B.: *HPLC and the analysis of indole-3-acetic acid and some of its decarboxylated catabolites in scots pine (Pinus sylvestris L.)*, Springer-Verlag, Germany 1987.
10. Watanabe E., Tsuda Y., Watanabe S., Ito S., Hayashi M., Watanabe T., Yuasa Y., Nakazana H.: *Anal. Chim. Acta* **424**, 149 (2000).
11. Bartel B., LeClere S., Magidin M., Zolman B. K.: *J. Plant Growth Regul.* **20**, 198–216 (2001).
12. Pan X., Wang X.: *J. Chromatogr. B* **877**, 2806–2813 (2009).
13. Bajguz A., Piotrowska A.: *Phytochem.* **70**, 957–969 (2009).
14. http://www.eurochem.cz/index.php?EURID=1039589124&CompNo=1&PropNo=0&LtoB=1&QSAS=4&QSPG=1&MN=Podrobn%E9+hled%E1n%ED&ID=283&MLEV=3&DT=134222336&SPC=0&ACT=30&M_ID=103&M_MLEV=1&M_SPC=0&LA=CS, staženo 18.9.2011.

15. Kelley K. B., Riechers D. E.: Pestic. Biochem. Physiol. **89**, 1–11 (2007).
16. Darwin C.: *The power of movement in plants*, John Murray, Londýn 1880.
17. Ciesielski T.: Beitr. Biol. Pflanz. **1**, 1-30 (1872).
18. Ljung K., Bhalerao R. P., Sandberg G.: Plant J. **28**: 465–474 (2001).
19. Woodward A. W., Bartel B.: Ann. Bot. **95**, 707–735 (2005).
20. Ehlert B., Schöttler M. A., Tischendorf G., Ludwig-Müller J., Bock R.: J. Exp. Bot. **59**, 3635–3647 (2008).
21. Lehmann T., Hoffmann M., Hentrich M., Pollmann S.: Eur. J. Cell Biol. **89**, 895–905 (2010).
22. Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., McSteen P., Zhao Y., Hayashi K. I., Kamiya Y., Kasahara H.: PNAS **108**, 18512–18517 (2011).
23. Won C., Shen X., Mashiguchi K., Zheng Z., Dai X., Cheng Y., Kasahara H., Kamiya Y., Chory J., Zhao Y.: PNAS **108**, 18518-18523 (2011).
24. Štěpánová A. N., Yun J., Robles L. M., Novák O., He W., Guo H., Ljung K., Alonso J. M.: Plant Cell **23**, 3961-3973 (2011).
25. Cohen J. D., Bandurski R. S.: Annu. Rev. Plant Physiol. **33**: 403–430 (1982).
26. Tam Y. Y., Epstein E., Normanly J.: Plant Physiol. **123**: 589–595 (2000).
27. Mander L. N.: Nat. Prod. Rep. **20**, 49 (2003).
28. Choi J., Choi D., Lee S., Ryu C., Hwang I.: Plant Sci. **16**, 388-394 (2011).
29. Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyozuka J.: Nature **445**, 652–655 (2007).
30. Rivero R. M., Kojima M., Gepstein A., Sakakibara H., Mittler R., Gepstein S., Blumwald E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **104**, 19631–19636 (2007).
31. Technický list *Trans*-zeatin. Staženo 23.11.2011.
<http://www.zeatin.net/zeatinmsds.pdf>
32. <http://en.wikipedia.org/wiki/Zeatin> Staženo 23.11.2011.
33. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6342247.htm
Staženo 10.4.2012.
34. Romanov G. A.: Russ. J. Plant Physiol. **56**, 295–319 (2009).
35. Takei K., Yamaya T., Sakakibara, H.: J. Biol. Chem. **279**, 866-872 (2004).
36. Korszun Z. R., Knight C., Chen C.M.: FEBS Lett. **243**, 53–56 (1986).

37. Strnad M.: *Physiol. Plant* **101**, 674–688 (1997).
38. Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392–1392 (1955).
39. Letham D. S.: *Life Sci.* **2**, 569–573 (1963).
40. Kakimoto T.: *Plant Cell Physiol.* **42**, 677–685 (2001).
41. Takei K., Sakakibara H., Sugiyama, T.: *J. Biol. Chem.* **276**, 26405–26410 (2001).
42. Kamada-Nobusada T., Sakakibara H.: *Phytochem.* **70**, 444–449 (2009).
43. Kudo T., Kiba T., Sakakibara H.: *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 53–60 (2010).
44. Galuszka P., Frebort I., Sebel M., Sauer P., Jacobsen S., Pec P.: *Eur. J. Biochem.* **268**, 450–461 (2001).
45. Bilyeu K. D., Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M. D., Morris R. O.: *Plant Physiol.* **125**, 378–386 (2001).
46. Galuszka P., Popelkova H., Werner T., Frebortova J., Pospisilova H., Mik V., Kollmer I., Schmulling T., Frebort I.: *J. Plant Growth Regul.* **26**, 255–267 (2007).
47. Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E. R., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M.: *Science* **309**, 741–745 (2005).
48. Martin R. C., Cloud K. A., Mok M. C., Mok D. W. S.: *J. Plant Growth Regul.* **32**, 289–293 (2000).
49. Brzobohaty B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K.: *Science* **262**, 1051–1054 (1993).
50. Leung J., Giraudat J.: *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **49**, 199 (1998).
51. Zaharia L. I., Walker-Simmon M. K., Rodriguez C. N., Abrams S. R.: *J. Plant Growth Regul.* **24**, 274–284 (2005).
52. http://www.eurochem.cz/index.php?EURID=2147439540&CompNo=1&PropNo=0&LtoB=2&QSAS=4&QSPG=1&MN=Hled%E1n%ED+produkt%F9&ID=284&MLEV=3&DT=134222336&SPC=0&ACT=30&M_ID=103&M_MLEV=1&M_SPC=0&LA=CS, staženo 18.9.2011.
53. Taylor I. Sonneveld T., Bugg T., Thompson A.: *J. Plant Growth Regul.* **24**, 253–273 (2005).
54. Hirai N., Yoshida R., Todoroki Y., Ohigashi H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1448–1458 (2000).
55. Nambara E, Marion-Poll A.: *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 165–185 (2005).

56. Arigoni D., Sagner S., Latzel C., Eisenreich W., Bacher A. a kol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**,10600–10605 (1997).
57. Lichtenthaler H., Schwender J., Disch A., Rohmer M.: FEBS Lett. **400**, 271–274 (1997).
58. Oritani T., Kiyota H.: Nat. Prod. Res. **20**, 414 (2003).
59. Turečková V., Novák O., Strnad M.: Talanta **80**, 390–399 (2009).
60. Chiwocha S. D. S., Abrams S. R., Ambrose S. J., Cutler A. J., Loewen M.: Plant J. **35**, 405–417 (2003).
61. Schumacher J., Zimmer D., Tesche F., Pickard V.: Mass Spectrom. **17**, 1950 (2003).
62. Sojo L. E.: Analyst **128**, 51 (2003).
63. Marchi I., Viette V., Badoud F., Fathi M., Saugy M., Rudaz S., Veuthey J. L.: J. Chromatogr. A **1217**, 4071-4078 (2010).
64. Bonfiglio R., King R. C., Olah T. V., Merkle K.: Mass Spectrom. **13**, 1175 (1999).
65. Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez-Eng C. M.: Anal. Chem. **75**, 3019 - 3030 (2003).
66. Holčápek M., Volná K., Jandera P., Kolářová L., Lemr K., Exner M., Církva A.: J. Mass Spectrom. **39**, 43 (2004).
67. Fan S., Wang X., Li P., Zhang Q., Zhang W.: J. Sep. Sci. **34**, 640-650 (2011).
68. Tarkowski P., Doležal K., Strnad M.: Chem. Listy **98**, 834 (2004).
69. Fu J., Sun X., Wang J. D., Chu J. F., Yan C.: Plant Physiol. **56**, 355-366 (2011)
70. Bielecki R. L., Anal. Biochem. **9**, 431 (1964).
71. Prinsen E., Van Dongen W., Esmans E. L., Van Onckelen H.: J. Chromatogr. A **826**, 25-37 (1998).
72. Åstot C., Doležal K., Moritz T., Sandberg G.: J. Mass Spectrom. **33**, 892-902 (1998).
73. Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležal K., Lenobel R., Strnad M.: Anal. Chim. Acta **480**, 207-218 (2003).
74. Hoyerova K., Gaudinova A., Malbeck J., Dobrev P. I., Kocabek T., Solcova B., Travnickova A., Kaminek M.: Phytochem. **67**, 1151-1159 (2006).
75. Chen W., Gai Y., Liu S., Wang R., Jiang X.: J. Integr. Plant Biol. **52**, 925-932 (2010).
76. Sundberg B.: Physiol. Plant. **78**, 293-297 (1990).
77. Nordström A. C., Eliaßon L.: Physiol. Plant **82**, 599-605 (1991).

78. Olsson J., Claeson K., Karlberg B., Nordström A. C.: *J. Chromatogr. A* **824**, 231-239 (1998).
79. Pěňčík A., Rolčík J., Novák O., Magnus V., Barták P., Buchtík R., Salopek-Sondi B., Strnad M.: *Talanta* **80**, 651-655 (2009).
80. Östin A., Kowalyczk M., Bhalerao R. P., Sandberg G.: *Plant Physiol.* **118**, 285-296 (1998).
81. Peters W. a kol.: Peters W., Ritter J., Tiller H., Valdes O., Renner U., Fountain M., Beck E.: *Planta* **210**, 478-487 (2000).
82. Rolčík J., Řečinská J., Barták P., Strnad M., Prinsen E.: *J. Sep. Sci.* **28**, 1370-1374 (2005).
83. Durgbanshi A., Arbona V., Pozo O., Miersch O., Sancho J. V., Gómez-Cadenas A.: *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8437-8442 (2005).
84. Cao J., Murch S. J., O'Brien R., Saxena P. K.: *J. Chromatogr. A* **1134**, 333-337 (2006).
85. Hou S., Zhu J., Ding M., Lv G.: *Talanta* **76**, 798-802 (2008).
86. Barkawi L. S., Tam Y.-Y., Tillman J. A., Normanly J., Cohen J. D.: *Nat. Protoc.* **5**, 1609-1618 (2010).
87. Turečková V., Novák O., Strnad M.: *Talanta* **80**, 390-399 (2009).
88. Kojima M., Kamada-Nobusada T., Komatsu H., Takei K., Kuroha T., Mizutani M., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M., Suzuki K., Sakakibara H.: *Plant Cell Physiol.* **50**, 1201–1214 (2009).
89. Pan X., Welti R., Wang X.: *Phytochem.* **69**, 1773-1781 (2008).
90. Giannarelli S., Muscatello B., Bogani P., Spiriti M. M., Buiatti M., Fuoco R.: *Anal. Biochem.* **398**, 60-68 (2010).
91. Pavlík J.: *Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2010.*
92. Lu Q., Chen L., Lu M., Chen G., Zhang L.: *J. Agric. Food Chem.* **58**, 2763–2770 (2010).
93. Wu Y., Hu B.: *J Chromatogr A* **1216**, 7657–7663 (2009).
94. http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10083495&locale=en_CZ, staženo 1.3.2012.
95. http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=10083488, staženo 1.3.2012.

96. http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_CZ&cid=10083845,
staženo 1.3.2012.
97. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>,
staženo 1.3.2012.
98. http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=solid%20phase%20extraction&source=web&cd=11&sqi=2&ved=0CHkQFjAK&url=http%3A%2F%2Fwww.forumsci.co.il%2FHPLC%2FSPE_site.pdf&ei=g9IPT9C8FcGD-wbR7ei6Bg&usg=AFQjCNGEChGuW0v5YUSC3Dde0hgLLrAdyQ&cad=rja,
staženo 1.3.2012.
99. <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>,
staženo 1.3.2012.
100. Faiss M.: *Plant J.* **10**, 33-36 (1996).
101. Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M.: *Phytochem.* **69**, 2214-2224 (2008).
102. Matsuda F., Miyazawa H., Wakasa K., Miyagawa H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 778-783 (2005).
103. Jager C. E., Symons G. M., Ross J. J., Smith J. J., Reid J. B.: *Planta* **221**, 141-148 (2005).
104. Hradecká V., Novák O., Havlíček L., Strnad M.: *J. Chromat. B* **847**, 162-173 (2007).
105. Susawaengsup C., Rayanakorn M., Wongpornchai S., Wangkarn S.: *Talanta* **85**, 897-905 (2011).
106. Albrecht T., Kehlen A., Stahl K., Knofel H.-D., Sembdner G., Weiler E. W.: *Planta* **191**, 86-94 (1993).
107. Fu J. H., Chu J. F., Wang J. D., Yan C. Y.: *Chin. J. Anal. Chem.* **37**, 1324-1327 (2009).
108. http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_CZ&cid=10048919,
staženo 5.3.2012.
109. http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ,
staženo 5.3.2012.
110. http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=en_CZ,
staženo 5.3.2012.

111. http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_43.htm,
staženo 6.3.2012.
112. <http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM%20MS%20SEPARACE%20A%20DETEKCE%20I%20ONTU%20102007.pdf>, staženo 6.3.2012.
113. Zentella R., Zhang Z.-L., Park M., Thomas S. G., Endo A., Murase K., Fleet C. M., Jikumaru Y., Nambara E., Kamiya Y., Sun T.-P.: *Plant Cell* **19**, 3037-3057 (2007).
114. Hirano K., Nakajima M., Asano K., Nishiyama T., Sakakibara H., Kojima M., Katoh E., Xiang H., Tanahashi T., Hasebe M., Banks J. A., Ashikari M., Kitano H., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M.: *Plant Cell* **19**, 3058-3079 (2007).
115. Müller M., Munné-Bosch S.: *Plant Methods* **7**, 37 (2011).
116. Kojima M., Kamada-Nobusada T., Komatsu H., Takei K., Kuroha T., Mizutani M., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M., Suzuki K., Sakakibara H.: *Plant Cell Physiol.* **50**, 1201-1214 (2009).
117. <http://www.flickr.com/photos/ajc1/5323579021/lightbox/>,
staženo 8.3.2012.
118. Dobrev P. I., Kamínek M.: *J. Chromat. A* **950**, 21–29 (2002).
119. <http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm>,
staženo 14.3.2012.
120. <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/02a-terminologievim3-1287047120.pdf>,
staženo 23.3.2012.

7. Seznam použitých zkratk

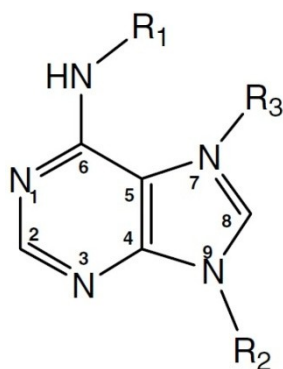
ABA	kyselina abscisová
ABAGE	glukosylester kyseliny abscisové
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
C18	typ SPE kolony (sorbentu), oktadecylová fáze vázaná na nosiči
C8	typ SPE kolony (sorbentu), oktylová fáze vázaná na nosiči
CAS	registrační číslo CAS - numerický identifikátor chemických látek
CK	cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa
CYP735A	cytochrom P450 monooxygenasa
cZ	<i>cis</i> -zeatin
cZ9G	<i>cis</i> -zeatin-9-glukosid
cZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
cZRMP	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
DEAE	zesíťovaná dextranová jednotka (Sephadexu) s diethyl-aminoethylovým kationtem
DMAPP	dimethylallyldifosfát
ESI	ionizace elektrosprejem
EY	výtěžnost extrakce
GA	gibberelliny
HLB	typ SPE kolony (sorbentu), kopolymer divinylbenzenu s vinylpyrrolidinonem
IAA	kyselina indol-3-yloctová
iP	isopentenyladenin
iP7G	isopentenyladenin-7-glukosid
iP9G	isopentenyladenin-9-glukosid
IPP	isopentenyldifosfát
iPR	isopentenyladenosin
iPRDP	isopentenyladenosin-5'-difosfát
iPRMP	isopentenyladenosin-5'-monofosfát
iPRTP	isopentenyladenosin-5'-trifosfát

IPT	isopentenyltransferasa
IS	interní standard
JA	jasmonáty
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOG	5'-monofosfát fosforibohydrolasa
m/z	poměr hmotnosti iontu a celkového náboje
MAX	směsná fáze kombinující aniontově výměnné a reverzní fáze sorbentu
MCX	směsná fáze kombinující kationtově výměnné a reverzní fáze sorbentu
ME	matriční efekt
MEP	methylethritol fosfát
MRM	selektivní záznam více reakcí
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MVA	mevalonátová dráha
n.d.	nedetekováno
oxIAA	2-oxoindol-3-ylactová kyselina
PE	účinnost procesu
R ²	koeficient determinace
RE	výtěžek extrakce
RP	reverzní fáze
rpm	jednotka úhlové rychlosti, otáčky za minutu
RSD	relativní směrodatná odchylka
R _t	retenční čas
SA	kyselina salicylová
SIM	selektivního záznam jednoho nebo více iontů
SPE	extrakce na pevné fázi
tRNA	transferová RNA
tRNA-IPTs	katalasa formující cytokininy - isopentenylace tRNA
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZ9G	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
ž.h.	živá hmota

8. Přílohy

Příloha 1

Přehled struktur studovaných analytů:

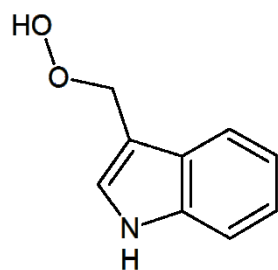


Základní skelet CK⁷⁵

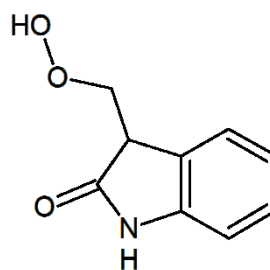
Přehled substituovaných skupin CK – navazuje na výše uvedený základní skelet.⁷⁵

R1	R2	R3	R4	Název	Zkratka
	H	-	-	Isopentenyladenin	iP
	R	-	-	Isopentenyladenosin	iPR
	-	G	-	Isopentenyladenin-7-glukosid	iP7G
	G	-	-	Isopentenyladenin-9-glukosid	iP9G
	H	-	H	<i>trans</i> -zeatin	tZ
	R	-	H	<i>trans</i> -zeatin ribosid	tZR
	G	-	H	<i>trans</i> -zeatin-9-glukosid	tZ9G

G = β -D-glukopyranosyl; *H* = vodík; *R* = β -D-ribofuranosyl

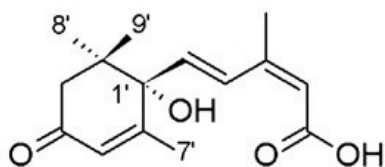


IAA

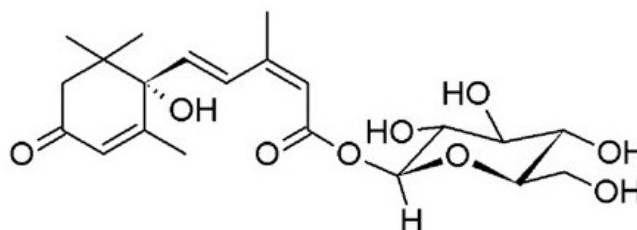


oxIAA

Struktury stanovovaných látek IAA a oxIAA.



ABA



ABAGE

Struktury studovaných látek ABA a ABAGE.⁵⁹

Příloha 2

Naměřené hodnoty pro aplikaci navrhovaného postupu tandemové SPE purifikace na různých ekotypech rostliny *Arabidopsis thaliana* (viz podkapitola 4.8).

Analyt	RRS		GOT		CVI
	14 dní	21 dní	14 dní	21 dní	14 dní
tZ	5,43 ± 0,99	2,31 ± 0,23	3,47 ± 1,32	2,07 ± 0,29	3,47 ± 1,32
tZR	1,05 ± 0,46	0,22 ± 0,02	1,16 ± 0,30	0,17 ± 0,00	1,16 ± 0,30
tz9G	2,49 ± 0,40	2,42 ± 0,23	2,97 ± 1,22	1,05 ± 0,05	2,97 ± 1,22
cZ	0,80 ± 0,80	0,71 ± 0,06	1,48 ± 1,17	0,20 ± 0,11	1,48 ± 1,17
cZR	0,33 ± 0,24	0,08 ± 0,00	0,13 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,13 ± 0,04
cZ9G	0,11 ± 0,04	0,22 ± 0,05	0,10 ± 0,06	0,19 ± 0,10	0,10 ± 0,06
iP	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,03
iPR	1,17 ± 0,56	0,31 ± 0,01	0,89 ± 0,66	0,10 ± 0,00	0,89 ± 0,66
ip7G	57,18 ± 8,43	62,61 ± 5,32	17,68 ± 1,24	69,76 ± 3,13	17,68 ± 1,24
ip9G	1,33 ± 0,12	0,97 ± 0,10	0,52 ± 0,04	1,55 ± 0,35	0,52 ± 0,04
IAA	542,81 ± 436,10	5,07 ± 5,07	98,28 ± 24,30	116,12 ± 116,12	98,28 ± 24,30
oxIAA	18402,96 ± 9514,89	5196,87 ± 1647,41	2094,77 ± 589,28	3323,35 ± 1605,55	2094,77 ± 589,28
ABA	0,71 ± 0,31	0,53 ± 0,15	0,65 ± 0,37	2,18 ± 1,53	0,65 ± 0,37
ABAGE	1,91 ± 0,87	0,50 ± 0,14	0,45 ± 0,43	2,06 ± 1,86	0,45 ± 0,43
Analyt	CVI	BR		VAN	
	21 dní	14 dní	21 dní	14 dní	21 dní
tZ	1,54 ± 0,16	3,10 ± 0,02	2,26 ± 0,79	3,02 ± 0,43	2,45 ± 0,35
tZR	0,57 ± 0,27	1,01 ± 0,10	0,68 ± 0,00	0,32 ± 0,06	0,51 ± 0,41
tz9G	5,00 ± 0,32	1,48 ± 0,00	1,73 ± 0,14	1,30 ± 0,08	1,78 ± 0,20
cZ	0,21 ± 0,03	0,66 ± 0,08	0,54 ± 0,15	1,47 ± 0,59	1,09 ± 0,48
cZR	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,01
cZ9G	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,14 ± 0,04	0,10 ± 0,00	0,20 ± 0,04
iP	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
iPR	0,27 ± 0,02	1,21 ± 0,03	0,57 ± 0,17	0,38 ± 0,02	0,35 ± 0,16
ip7G	15,20 ± 0,75	32,68 ± 1,60	26,71 ± 3,51	22,01 ± 3,79	19,40 ± 3,61
ip9G	0,46 ± 0,18	0,80 ± 0,12	0,70 ± 0,10	0,64 ± 0,11	0,45 ± 0,08
IAA	150,30 ± 101,77	744,81 ± 56,99	234,28 ± 234,28	264,00 ± 13,10	132,59 ± 5,32
oxIAA	8855,74 ± 5549,51	16902,35 ± 4112,65	5496,07 ± 484,86	9419,94 ± 565,01	3776,33 ± 243,44
ABA	8,34 ± 7,70	0,68 ± 0,47	4,26 ± 0,05	1,85 ± 0,73	1,90 ± 0,44
ABAGE	2,20 ± 2,20	0,41 ± 0,36	0,22 ± 0,09	0,53 ± 0,04	0,64 ± 0,57