

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Stanovení 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a jejích metabolitů  
v rostlinné matrici pomocí imunoafinitní chromatografie**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Barbora Pařízková</b>
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	30. března 2013

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Barbora Pařízková
Název práce	Stanovení 2, 4 - dichlorfenoxyoctové kyseliny a jejích metabolitů v rostlinné matrici pomocí imunoafinitní chromatografie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá vývojem metodiky pro stanovení kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové (2,4-D) a jejích potencionálních metabolitů v rostlinném materiálu. Teoretická část se věnuje rešerši na téma auxinů využívaných v zemědělství jako herbicidy, především pak na mechanismus účinku 2,4-D. Dále se věnuje principům jednotlivých analytických metod, které byly k izolaci a stanovení 2,4-D a jejích metabolitů využity. V experimentální části byla vyvinuta nová metoda využívající rychlou chromatografii s hmotnostní detekcí, které předcházela izolace daných látek z rostlinného materiálu pomocí extrakce tuhou fází a imunoafinitní chromatografie. Metoda byla využita k identifikaci a kvantifikaci 2,4-D a jejích metabolitů z ošetřeného kalusu. Zjistili jsme, že se v materiálu nachází v kvantifikovatelné míře pouze konjugáty 2,4-D s kyselinami glutamovou a asparagovou.</p>
Klíčová slova	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina, 2,4-D, herbicidy, imunoafinitní chromatografie, SPE, LC-MS
Počet stran	57
Počet příloh	3
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Barbora Pařízková
Title of thesis	Determination of 2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid and its metabolites by immunoaffinity chromatography in plant matrices
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Ondřej Novák, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>We have developed the method for quantification of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its potential metabolites in plant matrices. The theoretical part consists of knowledge summaries about auxins-based herbicides, especially about the status of mechanism and the mode of action of 2,4-D as well as the principles of analytical methods used for isolation and quantification of 2,4-D metabolites. In the experimental part, the optimizing method based on a fast liquid chromatography with mass spectrometric detection was developed including SPE and IAC purification of the compounds from complex plant matrices. This method was used for identification and quantification of these compounds in the treated tobacco BY-2 callus. We found two conjugates of 2,4-D with glutamic and aspartic acids in the treated matrices which we were able to quantify.</p>
Keywords	2,4-dichlorophenoxyacetic acid, herbicides, immunoaffinity chromatography, SPE, LC-MS
Number of pages	57
Number of appendices	3
Language	Czech

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Mgr. Ondřeje Nováka, Ph.D. s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 20. 4. 2013

.....

Touto cestou bych chtěla poděkovat především svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracování této práce a Mgr. Janě Oklešťkové Ph.D. za odborné vedení v oblasti imunoafinitní chromatografie.

Dále děkuji Mgr. Luděkovi Eyerovi, Ph.D. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za přípravu použitých monoklonálních protilátek a za seznámení s metodikou ELISA.

V neposlední řadě děkuji Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph.D. za syntézu použitých standardů i všem ostatním pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů za ochotu a vstřícnost.

## Obsah

1 Úvod a cíl bakalářské práce .....	- 9 -
2 Literární přehled .....	- 10 -
2.1 Růstové regulátory .....	- 10 -
2.1.1 Auxiny .....	- 10 -
2.1.2 Syntetické auxiny .....	- 13 -
2.1.3 Herbicidy .....	- 14 -
2.1.4 Mechanismy účinku 2,4-D .....	- 15 -
2.2 Analýza biologického materiálu .....	- 17 -
2.2.1 Izolace biologicky aktivních látek .....	- 17 -
2.2.2 Purifikační metody .....	- 18 -
2.2.2.1 Extrakce tuhou fází (SPE) .....	- 19 -
2.2.2.2 Imunoafinitní chromatografie (IAC) .....	- 20 -
2.2.3 Instrumentálně analytické metody .....	- 22 -
2.2.3.1 Kapalinová chromatografie (LC) .....	- 23 -
2.2.3.2 Hmotností spektrometrie (MS) .....	- 24 -
3 Materiál a metody .....	- 27 -
3.1 Chemikálie .....	- 27 -
3.2 Materiál .....	- 29 -
3.3 Přístroje .....	- 29 -
3.4 Pracovní postupy .....	- 30 -
3.4.1 Pěstování biologického materiálu .....	- 30 -
3.4.2 Extrakce .....	- 30 -
3.4.3 Purifikace .....	- 32 -
3.4.4 Charakterizace a validace purifikačních postupů .....	- 33 -
3.4.5 Parametry LC-ESI(-)MS/MS metody .....	- 35 -
4 Diskuze a výsledky .....	- 37 -
4.1 Vývoj izolační metody pomocí SPE .....	- 37 -
4.2 Vývoj izolační metody pomocí IAC .....	- 39 -
4.3 Vývoj podmínek pro UHPLC-MS analýzu .....	- 40 -
4.4 Validace vyvinuté metody .....	- 42 -
4.5 Stanovení potenciálních metabolitů v rostlinném materiálu .....	- 44 -
5 Závěr .....	- 47 -
Seznam literatury .....	- 48 -
Přílohy .....	- 53 -

## Seznam použitých zkratk

<b>2,4-D</b>	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
<b>2,4-DB</b>	2,4-dichlorofenoxymáselná kyselina
<b>2,4-D-Asp</b>	2,4-dichlorfenoxyacetyl-L-asparagová kyselina
<b>2,4-D-Glu</b>	2,4-dichlorfenoxyacetyl-L-glutamová kyselina
<b>2,4,5-T</b>	2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina
<b>4-Cl-IAA</b>	kyselina 4-chlor-indol-3-ylactová
<b>C18</b>	typ SPE kolony (sorbentu), oktadecylová fáze vázaná na nosiči
<b>CE</b>	kapilární elektroforéza
<b>DEDCTA</b>	diethyldithiokarbamát sodný
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>ESI</b>	ionizace pomocí elektrospreje
<b>FA</b>	kyselina mravenčí
<b>FW</b>	čerstvá hmota
<b>FWHM</b>	full width half maximum
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-2,4-D</b>	deuterizovaný standard 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny
<b>HLB</b>	typ SPE kolony (sorbentu), kopolymer divinylbenzenu s vinylpyrrolidinonem
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>HRAC</b>	Herbicide Resistance Action Committee
<b>IAA</b>	kyselina indol-3-ylactová
<b>IAC</b>	imunoafinitní chromatografie
<b>IBA</b>	kyselina indol-3-ylmáslá
<b>IMS</b>	ion mobility spektrometry
<b>IS</b>	interní standard
<b>LLE</b>	liquid/liquid extraction
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie
<b>LLOD</b>	limita detekce
<b>LLOQ</b>	limita kvantifikace
<b>MALDI</b>	ionizace laserem za přítomnosti matrice

<b>MAX</b>	směsná fáze kombinující aniontově výměnné a reverzní části sorbentu
<b>MCPA</b>	2-metyl-4-chlorfenoxyoctová kyselina
<b>MCPB</b>	2-metyl-4-chlorfenoxyháselná kyselina
<b>MCPP</b>	4-chloro-2-metylfenoxypropionová kyselina
<b>MCX</b>	směsná fáze kombinující kationtově výměnné a reverzní části sorbentu
<b>MIP</b>	molekulárně vtištěné SPE
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>NAA</b>	$\alpha$ -naftyloctová kyselina
<b>PAA</b>	kyselina fenylloctová
<b>SPE</b>	extrakce tuhó fázi ( <i>Solid Phase Extraction</i> )
<b>RIA</b>	Radioimmunoassay
<b>ROS</b>	reaktivní kyslíkové deriváty
<b>TCDD</b>	dioxin
<b>TOF</b>	hmotnostní analyzátor doby letu ( <i>Time-of-Flight</i> )
<b>TLC</b>	tenkovrstvá papírová chromatografie
<b>UV</b>	ultrafialová oblast spektra
<b>VIS</b>	viditelná oblast spektra



# 1 Úvod a cíl bakalářské práce

2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4-D) je jedním z celosvětově nejpoužívanějších herbicidů využívaných ke kontrole růstu plevelů zejména v zemědělství a zahradnictví. Patří mezi auxinové herbicidy (analoga indol-3-yloctové kyseliny), které v nízkých koncentracích vykazují podobné fyziologické a biochemické účinky jako auxiny přirozené. Ve vysokých koncentracích způsobují poruchy systému oxidativní fosforylace a s tím spojené přetváření tylakoidních membrán vedoucích ke smrti rostliny.

Fenoxyoctové kyseliny jsou v půdě a vodě méně stálé, mohou se v nich tedy hromadit v podobě různých reziduí. Pro člověka i vodní organismy jsou především chlorované formy toxické. Cílem mé bakalářské práce je tedy vývoj metodiky pro stanovení 2,4-D a jejích potenciálních metabolitů v rostlinném materiálu pomocí imunoafinitní chromatografie za použití ocharakterizovaných monoklonálních protilátek vázaných na Affi-Gel s následnou analytickou koncovkou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Výsledky této práce (potenciální přirozené metabolity) mohou být následně podrobeny toxikologickým testům. Výsledky by v dalším studiu také mohly vést ke zjištění vzniku rezistence proti auxinovým herbicidům. Ta by poté mohla sloužit k vývinu nových herbicidů s jinými mechanismy účinku.

Možnými studovanými metabolity byly 2-metyl-4-chlorfenoxyoctová kyselina (MCPA), 2-metyl-4-chlorfenoxymásečná kyselina (MCPB), 2,4,5-trilorofenoxyoctová kyselina (2,4,5-T), 2,4-dichlorfenoxymásečná kyselina (2,4-DB), 4-chloro-2-metylfenoxypropionová kyselina (MCPP), a konjugáty s kyselinou asparagovou (2,4-D-Asp) a kyselinou glutamovou (2,4-D-Glu). Jejich seznam a chemické struktury jsou uvedeny v Příloze 2.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Růstové regulátory

Růstové regulátory jsou chemické látky, které se významně podílejí na růstu a vývoji rostlin a jejich orgánů. Do této skupiny látek řadíme látky jak přírodní, tak synteticky připravené. Bez ohledu na toto kritérium je můžeme rozdělit na rostlinné hormony (fytohormony) a další látky ovlivňující růst a vývoj rostlin. Mezi fytohormony řadíme cytokininy, auxiny, gibereliny, kyselinu abscisovou a etylen. Mezi další látky s regulačními účinky patří brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová a její deriváty, oligosacharidy a fenolické látky (Procházka a kol., 2003).

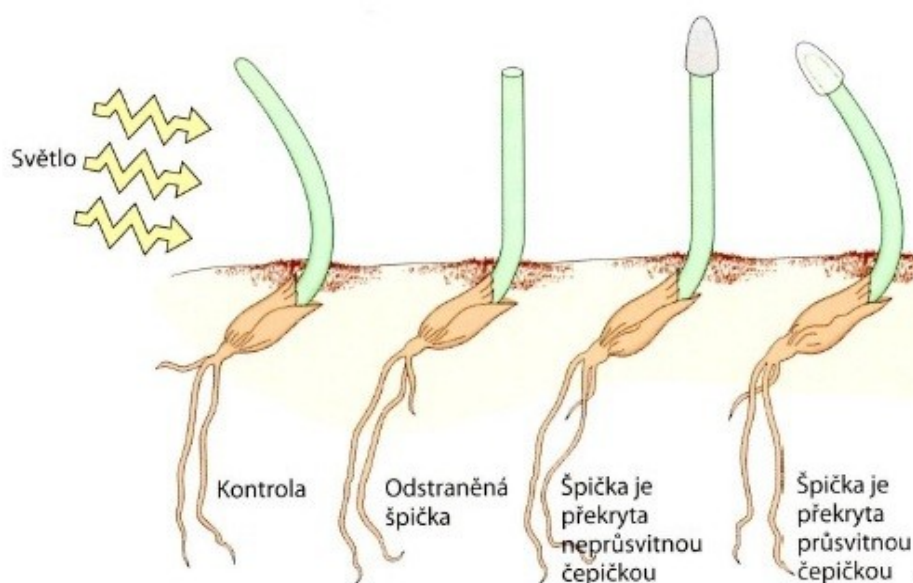
Jako první se myšlenkou regulace růstu a vývoje u rostlin pomocí chemických signálů a jejich specifických receptorů zabýval německý botanik Julius von Sachs (1832–1897). Fytohormony jsou nezbytným prvkem komunikace mezi buňkami, pletivy a orgány rostlin. Regulace metabolismu, růstu a morfogeneze velice často závisí na přenosu chemických signálů z jedné části rostliny do druhé. Těmito signály jsou právě rostlinné hormony rozpoznávané specifickými receptory v buňkách různých pletiv. Rostlinné hormony působí ve velmi malých koncentracích a mnohé procesy v rostlině jsou často řízeny skupinou různých hormonů, které mohou působit společně nebo protichůdně. Na koncentracích fytohormonů také závisí jejich účinek, který může být na určité koncentrační hladině stimulační a na jiné naopak inhibující (Procházka a kol., 2003).

#### 2.1.1 Auxiny

Auxiny jsou skupinou rostlinných hormonů, jejichž nejdůležitějšími fyziologickými účinky jsou především stimulace dlouhivého růstu a dělení buněk, regulace fototropismu a apikální dominance. Dále regulují vývojové procesy jako diferenciaci vodivých pletiv a meristému, zahájení růstu listů, fylotaxie či senescenci (Grossmann, 2009). Ve spolupráci s cytokininy se také účastní organogeneze, při které auxiny podmiňují tvorbu adventivních kořenů.

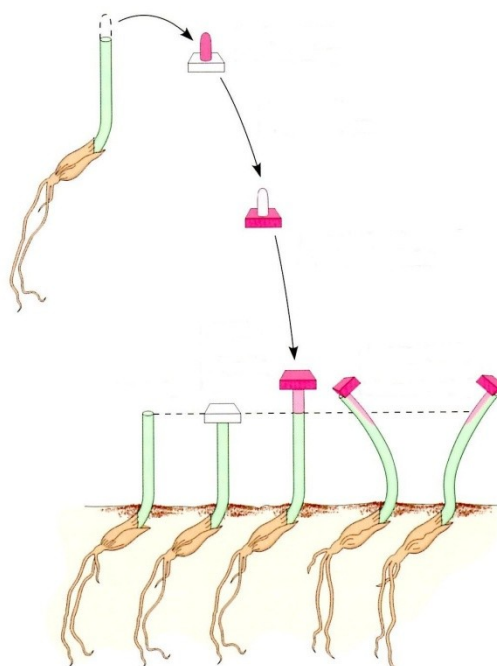
Auxiny jsou nejdéle známou skupinou fytohormonů. Jejich objevení je spojeno se studiem fototropismu a gravitropismu, jimiž se zabýval již Charles

Darwin (1809–1882) (Procházka a kol., 2003). Ten zjistil, že orgán chránící vzrostný vrchol rostliny (koleoptile) je vysoce citlivý na světlo, a to především o kratší vlnové délce (modré světlo). Pokud je koleoptile osvětlen z jedné strany, během chvíle se ohne směrem ke zdroji tohoto světla. Pokud je tento orgán zakryt neprůhledným materiálem, k ohybu nedojde (Hopkins a Hüner, 2009). Za ohyb rostliny ke světlu je zodpovědná oblast, která se nazývá prodlužovací zóna a nachází se několik milimetrů pod koleoptile (Taiz a Zeiger, 2010).



Obr. 1 – Schéma Darwinova pokusu ke studiu účinku neznámého růstového faktoru (Cambell a Reece, 2008)

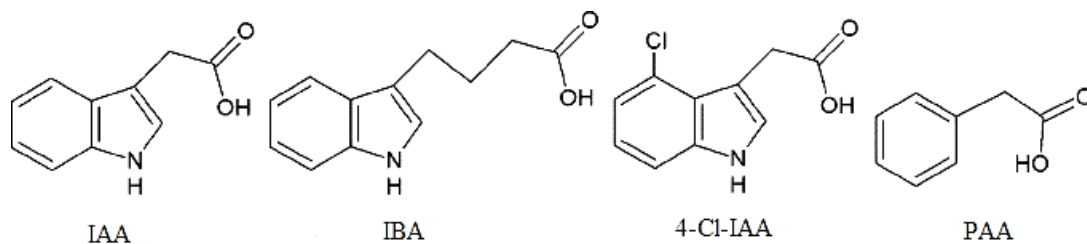
Na Darwinovu práci navázal holandský botanik Fridrich Went (1863–1935), který dokázal tyto rostlinné hormony izolovat. Jeho pokus spočíval v oddělení koleoptile ovsa setého (*Avena sativa* L.) a jejich přenosu na agarové bločky (Cambell a Reece, 2008). Pokud oddělené části zpětně k rostlinám přiložil, nedošlo k žádnému ohybu. Potvrdil tedy, že látky potřebné ke stimulaci fototropismu difundovaly do agarových bločků. Po přiložení těchto bločků k rostlinám docházelo k ohybu i v podmínkách snížené intenzity světla. Went tyto látky nazval auxiny (z řeckého *auxein* – růst). Stimulují totiž dlouhivý růst buněk na straně odvrácené od světla, což způsobuje ohyb rostliny směrem k tomuto zdroji.



Obr. 2 – Schéma izolace auxinů F. Wentem (Cambell a Reece, 2008)

Prvním identifikovaným auxinem byla kyselina indol-3-ylactová (IAA), která byla nalezena v lidské moči (1933) a teprve v roce 1946 ve vyšší rostlině. Tato látka byla po dlouhou dobu jediným známým přirozeným auxinem (Procházka a kol., 2003). V dnešní době známe další přirozené auxiny, např. kyselinu indol-3-ylmásešnou (IBA), 4-chlor-indol-3-ylactovou kyselinu (4-Cl-IAA) nebo kyselinu fenylactovou (PAA). Tyto látky jsou však méně účinné než IAA, proto působí ve větších koncentracích.

Auxiny jsou syntetizovány v meristematických oblastech a dalších aktivně rostoucích orgánech jako v již zmíněném koleoptile, kořenových špičkách, klíčících semenech či apikálních pupenech rostoucích stonků. (Hopkins a Hüner, 2009).



Obr. 3 – Chemické struktury přirozených auxinů

### 2.1.2 Syntetické auxiny

Při studiu přirozených auxinů byla objevena řada syntetických látek s podobným mechanismem účinku. Syntetické auxiny jsou chemicky připravená analoga přírodních fytohormonů, které v nízkých koncentracích vykazují fyziologické a biochemické procesy velice podobné IAA, ovšem s déle trvající a větší intenzitou účinku v důsledku jejich větší stability v rostlinách (Mithila a kol., 2011). Syntetické auxiny jsou proti inaktivaci (důsledkem např. konjugace nebo oxidace) či degradaci v rostlinách odolnější než auxiny přirozené, proto v nich tyto procesy probíhají pomaleji a jsou metabolizovány delší dobu (Taiz a Zeiger, 2010).

Společným znakem syntetických auxinů je především aromatický kruhový systém obsahující v postranním řetězci karboxylovou skupinu. Mezi -COOH skupinou a aromatickým kruhem musí být alespoň jeden uhlíkový nebo kyslíkový atom. Struktura těchto látek je řadí mezi slabé organické kyseliny. Podle té je také můžeme rozdělit do 4 hlavních skupin (Procházka a kol., 2003):

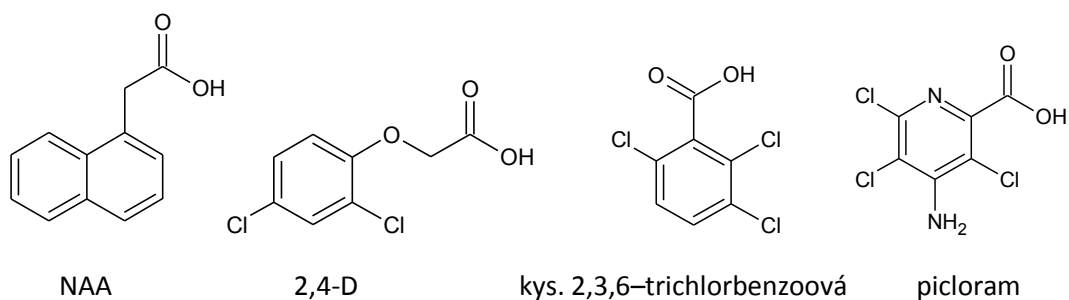
1. *naftalenové kyseliny* –  $\alpha$ -naftyloctová kyselina (NAA)
2. *chlorfenoxykyseliny* – kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D)
  - kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T)
  - kyselina 2-metyl-4-chlorfenoxyoctová (MCPA)
3. *benzoové kyseliny* – kyselina 2,3,6-trichlorbenzoová
4. *deriváty kyseliny pikolinové* – picloram.

Syntetické auxiny jsou komerčně využívány především v zemědělství a zahradnictví. Jejich využití spočívá především v ochraně před opadem listů a plodů, navození partenokarpie (vytváření plodu bez oplození vaječné buňky) či zakořeňování zastřižených částí rostlin určených k množení. Navození syntézy etylenu účinkem auxinů se využívá k urychlení kvetení a dozrávání plodů (Taiz a Zeiger, 2010). Nejvíce jsou ovšem syntetické auxiny využívány jako herbicidy ke kontrole růstu plevelů. Ve vyšších koncentracích totiž způsobují nevratná poškození až smrt rostliny. Různé skupiny auxinů mají pak různé spektrum účinku. Kromě koncentrace závisí účinky hormonů také na fyziologické fázi růstu rostliny, rostlinném druhu a citlivosti příslušného rostlinného pletiva k danému herbicidu (Hopkins a Hüner, 2009). Jak syntetické, tak přirozené auxiny ve vysokých

koncentracích dávají vzniku již zmíněnému rostlinnému hormonu etylenu, který následně spouští biosyntézu dalšího fytohormonu, kyseliny abscisové. Ta se také podílí na inhibici růstu rostlin (Grossmann a Hansen, 2000).

Hlavní roli v selektivitě auxinových herbicidů hraje rozdílný metabolismus a jiná místa účinku u jedno- a dvouděložných rostlin, čehož se v zemědělství hojně využívá. Strukturální podmínkou účinku těchto hormonů je silný záporný náboj na disociované karboxylové skupině, který je oddělený od slabšího pozitivního náboje na rovinném aromatickém kruhu (Grossmann, 2009). Vzhledem k jejich rozpustnosti ve vodě se snáze dostávají do zemědělských ekosystémů, kde způsobují znečištění povrchových i podzemních vod. Například fenoxycetová kyselina vykazuje střední stupeň toxicity, nicméně její chlorované metabolity mohou být toxické pro člověka i vodní organismy (Cserhádi a Forgács, 1998).

Velkou pozornost k syntetickým auxinům přivedla také válka ve Vietnamu, kde se směs n-butyl esterů 2,4-D a 2,4,5-T, nazývaná *Agent Orange*, používala jako biologická zbraň. Tato směs obsahuje jako vedlejší produkt jedovatý dioxin (TCDD), který způsobuje chlorakné a pro člověka je karcinogenní (Raven a kol., 1999).



Obr. 4 – Přehled nejdůležitějších syntetických auxinů

### 2.1.3 Herbicidy

Herbicidy jsou chemické látky, které řadíme mezi pesticidy, tedy přípravky určené k hubení organických škůdců, v tomto případě rostlin. Jsou proto široce využívány v zemědělství a zahradnictví k omezení množství plevelů ve prospěch pěstovaných plodin (Jursík a kol., 2010). Jejich působení ovšem přináší značná rizika v podobě fytotoxicity (poškození pěstovaných rostlin), zatěžování životního prostředí či

ve formě reziduí v potravě a krmivech vyrobených z užitkových rostlin (Jursík a kol., 2010).

Naprostá většina herbicidů postihuje rostliny zablokováním fyziologických procesů důležitých pro správný růst a vývoj rostliny. Aktivní složka herbicidu obvykle inhibuje jeden nebo více enzymů nezbytných pro průběh reakcí spojených s biosyntézou organických sloučenin. Způsob, jakým herbicid inhibuje určitý biochemický proces v rostlině, nazýváme mechanismus působení herbicidu (*Mode of Action*) a místo, ve kterém se herbicid váže na daný protein, nazýváme místem působení herbicidu (*Site of Action*). V dnešní době je známo přibližně 20 míst působení herbicidů, což je neúměrné proti tisícům chemických reakcí, probíhajících v každé rostlině. Opakované užívání herbicidů se stejným místem účinku může často vést ke vzniku rezistence k danému herbicidu, naopak střídání herbicidů s různým místem účinku tento efekt snižuje (Jursík a kol., 2010).

Herbicide lze základně rozdělit do dvou skupin – totální a selektivní. Totální herbicide ve většině případů mají jako účinnou látku glyfosát (*N*-(fosfonomethyl)glycin), popř. jeho sůl, která hubí téměř veškerou vegetaci. Selektivní (výběrové) herbicide naopak působí na vybranou skupinu rostlin, využívají například již zmíněné rozdílné fyziologické procesy jedno- a dvouděložných rostlin. V současné době je v Evropě zavedena klasifikace herbicidů podle místa působení HRAC (*Herbicide Resistance Action Committee*), která člení herbicide do patnácti hlavních skupin podle místa účinku, podobnosti symptomů poškození a příslušnosti k chemické skupině (viz Příloha 1) (Jursík a kol., 2010). Jednou z důležitých skupin auxinových herbicidů jsou tzv. fenoxycetové kyseliny, kam řadíme také 2,4-D. Základní mechanismus účinku těchto kyselin spočívá v rozrušení systému oxidativní fosforylace a následné modifikaci struktury tylakoidní membrány (Cserhádi a Forgács, 1998)

### **2.1.4 Mechanismy účinku 2,4-D**

2,4-dichlorofenoxycetová kyselina byla prvním syntetickým auxinovým analogem IAA. Je jedním z nejpoužívanějších herbicidů ve světě, který byl vyvinut za druhé světové války (Jursík a kol., 2010).

Jako u všech syntetických herbicidů i u 2,4-D je účinek závislý na koncentraci, jejíž rozdílné hladiny vytváří rozdíl mezi růstovým stimulem a

herbicidem (Pazmiño a Rodríguez-Serrano, 2011). V nízkých koncentracích 2,4-D podněcuje růst, ve vysokých koncentracích vyvolává v rostlinách smrtelné poškození. Mezi běžné viditelné příznaky způsobené 2,4-D jsou senescence, inhibice růstu kořenů a výhonků, zakřivení stonků a poruchy epinastie. Tyto jevy dále doprovází poruchy asimilace uhlíku, poškození průduchů, poruchy transpirace, lokalizovaná buněčná smrt a následný úpadek celé rostliny (Grossmann a Hansen 2000).

Na molekulární úrovni je mechanismus účinku 2,4-D orgánově specifický. Toxicita spojená s oxidativním metabolismem a vznikem reaktivních kyslíkatých derivátů (ROS – *Reactive Oxygen Species*) je podobná u listů a kořenů, liší se však u stonků (McCarthy-Suárez a kol., 2011). V prvním případě dochází k rozpoutání tzv. oxidativního stresu a enzymů s ním spojených. V listech a kořenech ošetřených rostlin se vyskytují vysoké koncentrace  $H_2O_2$ , z enzymů pak lipid peroxidázy, xantin oxidázy, endoproteázy či DNA a RNA polymerázy. Také vzniká velké množství karboxylovaných proteinů. Naopak k poklesu hladin dochází u chlorofylu a nukleových kyselin. Během oxidativního stresu také vzrůstá proteolytická aktivita za účelem degradace oxidovaných proteinů (McCarthy-Suárez a kol., 2011). U stonků aplikace 2,4-D inhibuje aktivitu xantin oxidázy, která způsobuje tvorbu superoxidových radikálů  $O_2^-$ , a naopak stimuluje antioxidantní enzymy jako jsou kataláza, guaiacol peroxidáza, askorbát peroxidáza, glutation reduktáza,  $NAD^+$ -isocitrát dehydrogenáza, účastníci se Krebsova cyklu a acyl-CoA-oxidáza, která má zásadní roli v  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin. Vyšší hladiny antioxidantů působí preventivně proti vzniku oxidativního stresu a způsobují jeho lepší odolnost. Tomu také napomáhá nadprodukce etylenu v ošetřených rostlinách, která blokuje polární transport 2,4-D do stonků a snižuje v nich tak hladiny tohoto herbicidu (McCarthy-Suárez a kol., 2011).

Mírné hladiny ROS jsou spojeny s indukcí a proliferací buněk, naopak jejich nadměrné koncentrace jsou spojeny se senescencí a programovanou buněčnou smrtí. U listů a kořenů dochází působením 2,4-D k inhibici růstu, u stonků naopak k indukci nadměrného růstu kvůli proliferaci buněk vodivých pletiv a následnému poškození floému i xylému. Důsledkem tohoto růstu mají ošetřené rostliny nadbytek vody, iontů, cukrů, vitamínů, dusíku, aminokyselin, proteinů a nukleových kyselin, ale velice nízkou nukleázovou aktivitu. Také mají vyšší



hladiny kyseliny askorbové, která hraje důležitou roli při růstu a dělení rostlinných buněk (McCarthy-Suárez a kol., 2011).

## **2.2 Analýza biologického materiálu**

### **2.2.1 Izolace biologicky aktivních látek**

Prvním krokem analýzy biologického materiálu po jeho odběru, převozu do laboratoře a případné dekontaminaci je jeho homogenizace. Tou dochází k uvolnění analytu z matrice. K homogenizaci se nejčastěji využívá třecí miska s tloučkem, vibrační kuličkový nebo rotační břitový mlýnek v závislosti na požadovaném stupni rozmělnění vzorku.

Homogenizovaný materiál je dále nutné převést do roztoku. Tento krok se nazývá extrakce a je pro něj velice důležité předem získat povědomí o chemických a fyzikálních vlastnostech hledaného analytu (polarita, přítomnost funkčních skupin apod.). Cílem extrakce je převod analytu do extrakčního činidla s maximálním výtěžkem. Je důležité, aby extrakce probíhala v chladném prostředí, čímž se zmenší riziko metabolických změn a chemické degradace cílových sloučenin (Fu a kol., 2011). Žádoucí také je, aby byl výtěžek extrakce dostatečně vysoký pro potenciální metabolity studovaného analytu (Tarkowski a kol., 2004). Mezi nejčastěji používaná extrakční činidla patří organická rozpouštědla jako methanol, ethanol či aceton, jejichž hlavní výhodou je výborná rozpustnost analytu, nebo pufr o neutrálním pH (např. fosfátový), který snižuje riziko kontaminace extraktu nepolárními balastními látkami (Novák a kol., 2012). Hojně využívanými jsou také vícesložkové extrakční směsi, z nichž nejvyužívanějším pro extrakci fytohormonů je Bielekého fixáž (methanol–chloroform–kyselina mravenčí–voda; 12:5:1:2) (Podlešáková a kol., 2012).

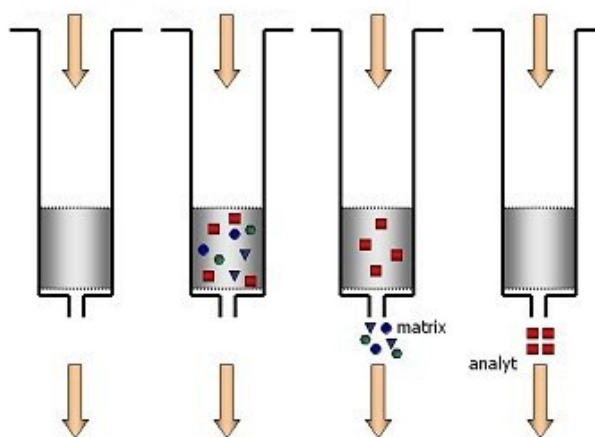
Po extrakci následuje odstranění pevných složek vzorku. K tomu jsou nejčastěji využívány metody centrifugace popř. ultracentrifugace nebo filtrace (Tarkowski a kol., 2004). Pokud je vzorek již na začátku zpracování ve vodném roztoku, lze kroky homogenizace a extrakce vynechat a chemická analýza se může provádět ihned.

### 2.2.2 Purifikační metody

Cílem purifikačních kroků preanalytické fáze přípravy vzorků je maximální odstranění interferujících balastních látek a s tím spojeného matričního efektu. Jednotlivé metody se vybírají s ohledem na použití následné analytické koncovky. Vybraná purifikační metoda musí poskytovat dostatečný stupeň přečištění s uspokojivou návratností analytů. Purifikační proces se často skládá z několika stupňů a výsledný přečištěný materiál by neměl obsahovat látky, které by mohly rušit následnou kvalitativní či kvantitativní analýzu.

Jednou z prvních technik pro přípravu vzorku před analýzou byla tzv. extrakce kapalina/kapalina (*liquid/liquid extraction - LLE*). Je založena na rozdílné rozpustnosti analytu ve dvou nemísitelných rozpouštědlech (Nováková a Vlčková, 2009). Pro kyselé rostlinné hormony, jako IAA, se nejčastěji využívá kombinace Na-fosfátový pufr/ethylacetát, okyselený 80% methanol/diethylether, nebo voda/chloroform (Liu a kol., 2002; Schmelz a kol., 2003; Durgbanshi a kol., 2005; Quittenden a kol., 2009). Jelikož se ovšem jedná pouze o hrubé rozdělení látek o podobné polaritě, je v dnešní době LLE vytlačována novějšími metodami. Pro izolaci fytohormonů je dnes nejčastěji využívána extrakce tuhou fází (SPE), často následovaná vysoce specifickou imunoafinitní chromatografií (IAC) (Tarkowski a kol., 2004).

Jeden z nejmodernějších přístupů je využití tzv. molekulárně vtištěných polymerů (MIP – *molecularly imprinted polymers*) využívajících syntetické polymery s uměle vytvořenými vazebnými místy pro cílený analyt, popř. látky strukturně velice podobné (Du a kol., 2012). Při výrobě dochází nejdříve k reakci monomeru s templátovou molekulou za tvorby komplexu, ve kterém se uplatňují kovalentní vazby, elektrostatické interakce a tvorba vodíkových můstků (Nováková a Vlčková, 2009). Vytváří se tak jeden či několik funkčních monomerů s vtištěným tvarem cílového analytu, které následně prochází polymerací. Vzniklý polymer vlastní strukturní i chemickou paměť pro templát a slouží tak jako sorbent pro SPE kolony (Nováková a Vlčková, 2009).



Obr. 5 – Schéma purifikace pomocí SPE

(obrázek přejat z <http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/item.asp?sectionid=3&mytype=training&number=2&fsid=61>)

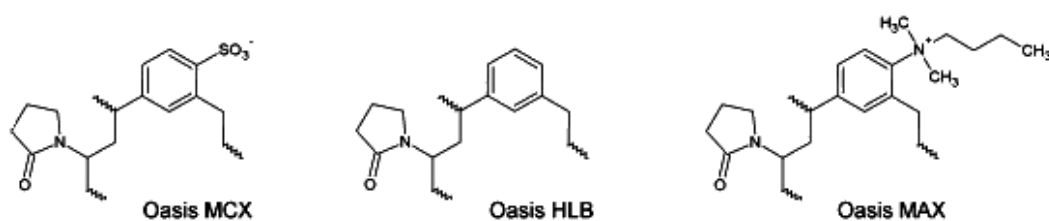
### 2.2.2.1 Extrakce tuhou fází (SPE)

Metoda SPE spočívá v zachycení vzorku na sorbentu umístěného v plastové či skleněné kolonce (*cartridge*), jenž je následně vhodně zvolenou mobilní fází eluován (viz Obr. 5). SPE může sloužit jak k purifikaci analytu, tak k jeho zakonzentrování či převedení do jiného rozpouštědla (Poole 2003). Výběr příslušného sorbentu závisí na mechanismech, které se uplatňují při interakcích mezi pevnou a mobilní fází, ale také při interakcích jednotlivých fází s analytem. Důležité je proto znát hydrofobní, polární a ionogenní vlastnosti účastněných molekul. K dalším interakcím podílejících se na vazbě mezi sorbentem a analytem můžeme řadit Van der Waalsovy či elektrostatické síly (Wells a kol., 2000).

Obecný postup pro práci s SPE kolonkou spočívá v potřebné úpravě vzorku, následné aktivaci kolonky, aplikaci vzorku, promytí vzorku (odstranění balastu) a v závěrečné eluci analytu zvoleným rozpouštědlem. Purifikace analytu pomocí SPE může probíhat dvěma způsoby v závislosti na jeho koncentraci v původním vzorku. Při vysokých koncentracích se využívá zachycení balastních látek na koloně, zatímco analyt se na koloně nezadržuje. V opačném případě můžeme využít adsorpci analytu na koloně a následné vymytí interferentů ([http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en\\_CZ&cid=10083845](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_CZ&cid=10083845)).

V dnešní době existuje široká škála sorbentů s různými chemickými vlastnostmi, ze kterých můžeme při extrakci tuhou fází vybírat. Jejich účinnost také

závisí na typu nosičů, které nesou funkční skupiny. Ty mohou být silikagelové nebo polymerní (Poole, 2003). Nosiče na bázi silikagelu jsou při výrobě SPE kolon hojně používané, nejsou ovšem vhodné ve všech případech. Obsahují malé množství ionizovaných silanových skupin, které zachycují bazické molekuly a mohou tak ovlivnit jejich návratnosti. Další nevýhodou je nestabilita při extrémních hodnotách pH ( $2 > \text{pH} > 8$ ). Řešením pro tyto případy jsou polymerní nosiče, které neobsahují žádné silanové skupiny a jsou stabilní v celém rozsahu pH (Poole, 2003). Mezi nejčastěji využívané sorbenty pak patří kolony s reverzní fází (hlavně C18), které jsou účinné především při odstraňování polárních látek a rostlinných barviv (Fu a kol., 2011). Pro analýzu více skupin fytohormonů lze jednotlivé druhy sorbentů kombinovat. Příkladem mohou být iontově výměnné kolony (např. směsné kolony Oasis MCX či MAX využívané v této práci). Polymerní sorbent těchto kolon je tvořen kromě hydrofobních částí molekul také navázanými sulfoskupinami nebo kvartérními aminoskupinami, které zajišťují vlastnosti katexu popř. anexu (Obr. 6). Vymytí kolony se provádí příslušným kyselým či zásaditým roztokem organického rozpouštědla. Funkční skupina katexu má kladný náboj, proto se na něm mohou zachycovat záporně nabitě molekuly. Slouží tedy k odstranění aniontů z vodného roztoku. Naopak funkční skupiny anexů nesou náboj záporný, zachycují tedy kladně nabitě molekuly, čímž se podílí na odstranění kationtů. (Fu a kol., 2011).



Obr. 6 – Strukturní vzorce sorbentů využívaných v této práci

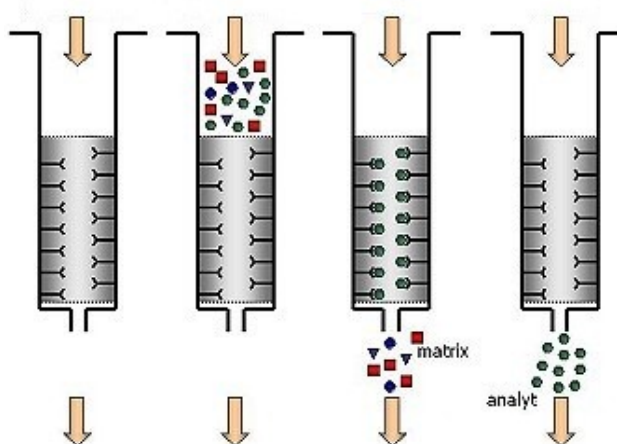
### 2.2.2.2 Imunoafinitní chromatografie (IAC)

Imunoafinitní chromatografie je vysoce specifická purifikační metoda, která využívá funkční vazby mezi antigenem a protilátkou vázanou na gelovém nosiči umístěném v krátké koloně (viz Obr. 6).

Protilátky jsou molekuly proteinové povahy (imunoglobuliny), které jsou součástí imunitního systému organismů. Jsou schopné rozpoznávat cizí molekuly (antigeny) a tím vyvolávat buněčnou odpověď. Přesněji řečeno nerozpoznávají celé molekuly, ale pouze jejich specifické sekvence – tzv. epitopy. Většina antigenů má větší množství epitopů, reakce na jejich přítomnost tedy vyvolává vznik více typů protilátek – proti každému epitopu jiný. Vzniká tak heterogenní směs tzv. polyklonálních protilátek. Při většině imunochemických analytických metod včetně IAC se ovšem využívá protilátek monoklonálních. Ty vznikají klonem pouze jediného aktivovaného B-lymfocyty (popř. plazmatické buňky), jsou proto specifické pouze proti jedinému epitopu. Monoklonální protilátky se v dnešní době vyrábí hybridomovou technologií, za jejíž objev v roce 1975 získali G. Köhler a C. Milstein Nobelovu cenu (Swaczynová, 2001). Jde o fúzi B-lymfocyty produkujícího vyžadované protilátky s myelomovými buňkami, čímž získáme tzv. hybridom. Ten nese vlastnosti obou mateřských buněk – produkuje cílové monoklonální protilátky a je schopný rychlé a téměř neomezené proliferace.

Jak již bylo řečeno, imunoafinitní chromatografie patří mezi chromatografické metody, kde stacionární fáze je nejčastěji tvořená právě monoklonálními protilátkami vázanými na vhodném nosiči, které interagují s cílovým epitopem. Tato vysoce efektivní čistící technika se často používá ve spojení s dalšími analytickými metodami (Hage, 1999). Jednou z důležitých charakteristik protilátek je jejich křížová reaktivita. Připravená protilátka nemusí vždy rozpoznávat pouze daný antigen, proti němuž byly vyvinuty, ale také další látky s podobnou strukturou. To může být v mnoha případech žádoucí, jelikož k izolaci několika strukturně blízkých látek (např. metabolitů) lze využít pouze jedné protilátky. Míra křížové reaktivity se vyjadřuje jako podíl koncentrace křížově reagující látky a antigenu nezbytné pro 50% nasycení vazebných míst protilátky (Tarkowski a kol., 2004).

Dalším významným parametrem imunoafinitních kolon je jejich kapacita. Návratnosti analytů totiž nejsou konstantní a rozsah kapacity není lineární v případě, že jsou kolony přetížené (*overloaded*). Kapacita sorbentu je definována jako maximální množství analytu, které může být předem koncentrováno daným objemem imunosorbentu (Hradecká a kol., 2007).



Obr. 6 – Schéma purifikace pomocí IAC

(obrázek přejet z <http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/item.asp?sectionid=3&mytype=training&number=2&fsid=61>)

### 2.2.3 Instrumentálně analytické metody

Z důvodů komplexnosti rostlinné matrice je přesné stanovení jednotlivých skupin fytohormonů obtížné. Kromě selektivnějších izolačních postupů je potřeba zapojit dostatečně citlivé instrumentální analytické metody (Du a kol., 2012).

Mezi nejrozšířenější v dnešní době patří bezesporu metody chromatografické. První chromatografickou metodou v analýze fytohormonů byla tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC), která je dnes nahrazována sofistikovanějšími kapalinovou (LC) či plynovou (GC) chromatografií s vysokou separační účinností a vysokou citlivostí (Tarkowski a kol., 2004). Výhodou LC je spojení s velkým množstvím detekčních technik. Mezi nejčastější řadíme hmotnostní spektrometrii (MS), UV spektrometrii, imunoanalytické metody (RIA, ELISA) či biotesty, které mohou ukazovat biologickou aktivitu jednotlivých frakcí (Tarkowski a kol., 2004). Další dnes hojně využívanou separační technikou je kapilární elektroforéza (CE) a její různé modifikace, jako např. micelární elektrokinetická chromatografie, kapilární gelová elektroforéza či kapilární izoelektrická fokusace. Detekčními technikami CE jsou především hmotnostní spektrometrie, detekce UV–VIS pomocí diodového pole nebo laserem indukovaná fluorescence (Du a kol., 2012).

### 2.2.3.1 Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová chromatografie (především vysoce účinná kapalinová chromatografie – HPLC) je v dnešní době jednou z nejrozšířenějších metod využívaných k separaci, identifikaci a kvantifikaci látek rozpuštěných v kapalině.

Základním principem této techniky je rozdílná interakce sloučenin obsažených ve vzorku se stacionární fází, upevněné v chromatografické koloně, popř. s mobilní fází, která kolonou rovnoměrně protéká. Částice, které jsou na základě různých fyzikálně – chemických vlastností přitahovány silněji k sorbentu jsou zpomalovány, zatímco částice, které více atrahují k mobilní fází, opouští kolonu rychleji. Tím dochází k jejich rozdělení v čase ([http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en\\_CZ&cid=10048919](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_CZ&cid=10048919)). Tento čas se nazývá retenční a je charakteristický pro každou sloučeninu za daných podmínek.

Klasická chromatografie v plastových kolonách podobných např. SPE či IAC kolonám dokáže pomocí gravitace či vakua oddělovat částice o průměru větším než 50  $\mu\text{m}$ . Menší částice jsou odolnější vůči toku mobilní fáze, k vytvoření požadovaného průtoku rozpouštědla je tedy nutné vytvořit větší tlak. V takovém případě mluvíme o HPLC. V počátcích, když se tlak pohyboval kolem 35 barů (500 psi), se tato zkratka překládala jako vysokotlaká kapalinová chromatografie (*high pressure liquid chromatography*). Od 70. let 20. století, kdy jsou přístroje schopny vyvinout tlak až 400 barů (6000 psi) byla zkratka přejmenována na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (*high performance liquid chromatography*). V poslední dekádě dokáží moderní kapalinové chromatografy pracovat při zpětných tlacích až 1000 bar (15000 psi) a hovoříme tedy o UHPLC – ultra účinné kapalinové chromatografii (*ultra-high performance liquid chromatography*) UHPLC dosahuje, vyšší rychlosti separace, většího rozlišení a citlivosti než klasická HPLC technika.

Výstupem každé chromatografie je tzv. chromatogram, grafický záznam závislosti intenzity signálu detektoru na čase, ze kterého lze vyčíst hned několik informací. V první řadě je to již zmíněný retenční čas. Např. mají – li dvě sloučeniny blízky retenční čas, předpokládá se jejich strukturní podobnost. Z chromatografického píku dané látky je také možné určit její množství, které je přímo úměrné ploše zaznamenaného píku. Aby se ovšem látka mohla být kvantifikována, je nutné pomocí standardů o známé koncentraci vytvořit kalibrační

křivku. V neposlední řadě můžeme ze získaného chromatogramu zjistit fyzikálně–chemickou povahu látek, v závislosti na vybraném typu kolony. Ty mohou být s reverzní stacionární fází, kdy dochází k pomalé eluci nepolárních látek a rychlé eluci látek polárních. U kolon s fází normální jsou polární látky eluovány pomaleji než látky nepolární. Při stanovení rostlinných hormonů je vzhledem k jejich strukturním a fyzikálně–chemickým vlastnostem nejčastěji používanou fází C18 (Du a kol., 2012).

### 2.2.3.2 Hmotností spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je v dnešní době jednou z nejpoužívanějších detekčních metod v analytické chemii. Velice často se využívá její on-line spojení s GC nebo LC, které může poskytovat informace jak kvalitativní (stanovení molekulové hmotnosti a struktury analytu) tak kvantitativní (s použitím vnějších nebo vnitřních standardů).

Tato technika spočívá v převedení molekul analytu na ionty, které jsou v elektromagnetickém poli separovány na základě poměru hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) a následně detekovány. Detektor tedy poskytuje analogový signál přímo úměrný množství dopadajících iontů.

Převedení molekul na ionty (ionizace) může probíhat několika způsoby v části nazývané ionizační zdroj. Mezi nejběžnější ionizační techniky patří např. ionizace nárazem elektronů, chemická ionizace, ionizace fotony, ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku či ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI).

Další důležitou součástí spektrometru je hmotnostní analyzátor. Ten umožňuje rozdělit směs iontů podle  $m/z$ . Mezi nejvyužívanější patří např. analyzátor doby letu (TOF – *Time-of-Flight*), kvadrupólový analyzátor (Q) či iontová past (IT – *Ion Trap*). Analyzátoři můžou být také kombinované a to hybridně (QqTOF, Q–Trap) nebo tandemově (TOF/TOF, QqQ).

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor, používaný i v této práci, se skládá ze čtyř rovnoběžných kovových tyčí rovnoměrně rozmístěných kolem centrální osy, okolo které jsou transportovány ionty. Na dvě protilehlé tyče je přivedeno kladné jednosměrné napětí a na druhé dvě záporné jednosměrné napětí. Ionty přivedené do středu osy oscilují. S daným napětím jsou tyto oscilace stabilní pouze pro iont



s určitým  $m/z$ . Ten prochází kvadrupólem a je zachycen detektorem, zbylé ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Vzniká tak jakýsi hmotnostní filtr. Plynulou změnou hodnot stejnosměrného napětí dochází k postupnému propouštění všech iontů k detektoru (Willoughby a kol., 1998).

Kvadrupóly jsou často používány jako kvantifikační nástroje. Nejvýhodnější je použití selektivního záznamu jednoho nebo více iontů (Selected Ion Monitoring, SIM) nebo selektivního záznamu jedné nebo více reakcí (Selected Reaction Monitoring, SRM). K získání strukturních informací o jednotlivých složkách vzorku slouží dvě cesty. Tzv. jednoduchý mód je závislý na procesu ionizace, který produkuje strukturně významné fragmenty (*in-source fragmentation*). Tyto fragmenty jsou analyzovány a struktura je následně objasněna ze zjištěných hmot a relativních intenzit. Trojitý kvadrupól (MS/MS) umožňuje fragmentaci iontů uvnitř hmotnostního analyzátoru (*post-source fragmentation*). Kvadrupóly jsou umístěné za sebou, přičemž v prvním analyzátoru dochází k rozlišení prekurzorových iontů a výběru jednoho z nich. Druhý analyzátor slouží jako kolizní cela, kde po zavedení kolizního plynu dochází k fragmentaci vybraných iontů, které jsou rozlišeny ve třetím kvadrupólu. Výsledkem je tedy hmotnostní spektrum vykazující vztah prekurzorového iontu s jeho specifickými produktovými ionty (Willoughby a kol., 1998).

Mezi nové trendy patří spektrometrie využívající mobility iontů (*Ion mobility spectrometry* – IMS) umístěných v oblasti s elektrickým polem a inertního plynu, např. helia (ca.  $10^{-3}$  Pa). Iontová mobilita závisí na velikosti, tvaru a náboji molekuly, proto může sloužit k separaci izomerů, izobarů či konformerů a k významnému potlačení chemického šumu (Kanu a kol., 2008). Ionty putují směrem k detektoru letovou trubicí, kde inertní plyn působí proti směru tohoto proudu a dochází tak k jejich separaci – čím je iont větší, tím větší má plochu umožňující kolizi s prostředím. Ta průchod iontu trubicí zpomaluje a iont potřebuje delší čas k migraci skrz hnací trubicí k detektoru. Migrační čas (*Drift Time*) je za daných podmínek charakteristický pro jednotlivé ionty (Holčapek a kol., 2012).

V poslední době také dochází k vylepšení rozlišení hmotnostních spektrometrů. Vysoké rozlišení určuje schopnost přístroje rozeznat dva píky s nepatrným rozdílem v poměru  $m/z$  a je udáván v jednotkách FWHM (*full width half maximum* – šířka píku v polovině maxima intenzity). Zatímco se tyto hodnoty

dříve pohybovaly okolo 20 000 FWHM, v poslední době se posunujeme k tzv. ultra vysokému rozlišení nad 100 000 FWHM (Russel a Edmondson, 1997). Vysoké rozlišení se projevuje zúžením chromatografických píků a umožňuje separaci izobarických iontů, čímž se podílí na výrazném potlačení falešně pozitivních výsledků zahrnutých do integrace plochy píků (Meulebroek a kol., 2012).

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Chemikálie

Methanol (> 99,9%) – Merck KGaA (Darmstadt, Německo)

Amoniak (25%) – Merck KGaA (Darmstadt, Německo)

Kyselina mravenčí (98%) – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

DEDCTA – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

Azid sodný (> 99,9%) – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (99,6%) – Lach–Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (98,5%) – Lach–Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

NaCl – Lach–Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

Sacharóza – Lach–Ner s.r.o. (Neratovice, ČR)

Murashige & Skoog médium – Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Nizozemsko)

Agar – Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Nizozemsko)

Standardy: 2,4–D (99,8%) – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]–2,4–D (> 99%) – CDN Isotopes (Quebeck, Kanada)

2,4–D–Asp – Laboratoř růstových regulátorů (Olomouc, ČR)

2,4–D–Glu – Laboratoř růstových regulátorů (Olomouc, ČR)

MCPA – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

MCPB – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

MCPP – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

2,4,5–T – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

2,4–DB – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

#### Činidla:

*Médium Murashige & Skooga:* Do jednolitrové skleněné kádinky s menším objemem redestilované vody bylo naváženo 4,4 g MS média, 30 g sacharózy a 8 g rostlinného agaru a vše důkladně rozpuštěno. Pomocí roztoku KOH bylo pH média upraveno na 5,6 a doplněno do 1 l redestilovanou vodou.

*IPT médium s přidávkem 2,4–D:* Ke 250 ml média bylo využito 25 ml MS média (viz výše), 2,5 ml roztoku inositolu, 2,5 ml roztoku glycinu, 7,5 g sacharózy,

2 g rostlinného agaru, 1,25 ml roztoku směsi vitamínů, 0,5 ml roztoku kinetinu (10 mg/100ml zásobní roztok), 0,25 ml roztoku kanamycin sulfátu (100 mg/ml zásobní roztok) a 0,25 ml roztoku claforanu (250 mg/ml zásobní roztok). Médium bylo ošetřeno 2,5 ml zásobního roztoku 2,4–D (10 mg/100 ml) a pH bylo upraveno pomocí KOH na 5,6.

*Mobilní fáze pro UHPLC:* 0,1% FA (v H<sub>2</sub>O, v MeOH) – K přípravě 1 l mobilní fáze byl k menšímu množství příslušného rozpouštědla přidán 1 ml FA a roztok byl rozpouštědlem doplněn do 1 l.

*Solný fosfátový pufr (PBS) pro IAC:* Na 1 l roztoku bylo spotřebováno 3,9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O a 0,87 g NaCl, které byly rozpuštěny v menším množství redestilované vody. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,2 a objem doplněn do 1 l.

*Sodno-fosfátový pufr pro SPE:* K přípravě 100 ml 50mM roztoku o pH 7 bylo využito 3,9 ml 0,5M zásobního roztoku NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (17,25 g do 100 ml H<sub>2</sub>O), 6,1 ml zásobního roztoku Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (17,745 g do 100 ml H<sub>2</sub>O) a 0,02 g DECTA a objem doplněn do 100 ml. pH pufru bylo upraveno pomocí 0,1M NaOH, popř. 0,1M HCl.

*1M HCl:* Na 100 ml roztoku bylo použito 8,1 ml 37% HCl a 91,9 ml redestilované vody.

*5% FA:* K 95,5 ml redestilované vody bylo napipetováno 4,5 ml zásobního roztoku 98% FA.

*5% NH<sub>4</sub>OH:* Na přípravu 100 ml roztoku bylo použito 80 ml redestilované vody a 20 ml 25% zásobního roztoku NH<sub>4</sub>OH.

*Okyselený roztok MeOH:* Vodný roztok MeOH byl připraven smícháním 10 ml redestilované vody a 88,2 ml 100% MeOH. Ten byl následně okyselen přídatkem 1,8 ml zásobního roztoku 98% FA.

*Zásobní roztoky standardů:* Zásobní roztoky byly vytvořeny v koncentraci 1.10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup> ve 100% MeOH (MCPD – 1 mg do 4,659 ml, MCPA – 1 mg do 4,984 ml, MCPB – 1,08 mg do 4,723 ml; 2,4–DB – 1,15 mg do 4,617 ml; 2,4,5–T – 0,96 mg do 4,256 ml; 2,4–D–Asp – 0,93 g do 2,767 ml a 2,4–D–Glu – 1,26 g do 3,598 ml). K experimentům byly využívány koncentrace nižší, které byly připraveny desítkovým ředěním.

*MIX*: Směs standardů o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  byla připravena smícháním 10  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku každého standardu (celkem 80  $\mu\text{l}$ ) a objem doplněn do 1 ml (920  $\mu\text{l}$ ) roztokem 10% MeOH. Nižší koncentrace směsí standardů byly připravovány desítkovým ředěním.

### 3.2 Materiál

*Pipety* – Eppendorf, Hamilton, ThermoScientific

*Vakuová komůrka* Visiprep™ – Supelco – Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)

*Chromatografická kolona* AQUITY UPLC® BEH Shield RP18 1,7  $\mu\text{m}$ ,  
2,1 x 150 mm – Waters (Wexford, Ireland)

*SPE kolony*: Oasis® HLB, 30 mg/1 ml – Waters (Milford, USA)

Oasis® MAX, 30 mg/1 ml – Waters (Milford, USA)

Oasis® MCX, 30 mg/1 ml – Waters (Milford, USA)

*Centrifuga*: Avanti™ 30 - Beckman (Brea, USA)

Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge – ThermoScientific (Osterode,  
Německo)

*Laboratorní sklo* – odměrné baňky, válce, kádinky, jednorázové zkumavky

*Čtvercové Petriho misky* pro výsev *A. thaliana* – Greiner bio-one (Kremsmuenster,  
Rakousko)

*Keramické homogenizační kuličky* – Retsch (Haan, Německo)

### 3.3 Přístroje

Systém UPLC-MS/MS – Acquity™ Ultra Performance LC (Binary solvent manager, Sample manager) s hmotnostním detektorem Micromass® Quatro micro™ – Waters (Milford, USA)

pH metr Oakton® pH 700 Benchtop Meter – Cole - Parmer (Vernon Hills, USA)

Kulový mlýnek Retsch® MM301 (Retsch GmbH, Haan, Německo)

Dusíková odparka TurboVap® LV – Caliper Life Sciences (Hopkinton, USA)

Ultrazvuková lázeň Transsonic 310 – Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co.;  
(Singen, Německo)

Milli-Q Simplicity 185 – Millipore Corp. (Billerica, USA)

Rotátor SB3 STUART® – Keison Products (Chelmsford, Spojené království)

## 3.4 Pracovní postupy

### 3.4.1 Pěstování biologického materiálu

Rostliny *Arabidopsis thaliana* (ekotyp Columbia, Col-0) byly pěstovány ve čtvercových Petriho miskách obsahujících sterilní médium Murashige & Skooga. Semínka *Arabidopsis* Col-0 byla vysterilizována pomocí roztoku 0,01% Tweenu v 70% ethanolu. Výsev byl prováděn v laminárním boxu za sterilních podmínek, aby se snížilo riziko kontaminace. Rostliny byly pěstovány ve fytotronu při 23°C při fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma ve vertikální poloze. Čtrnáctidenní semenáčky byly sklizeny do mikrozkušavek (cca 50 mg živé hmoty), zamraženy v tekutém dusíku a uchovávány v -80°C.

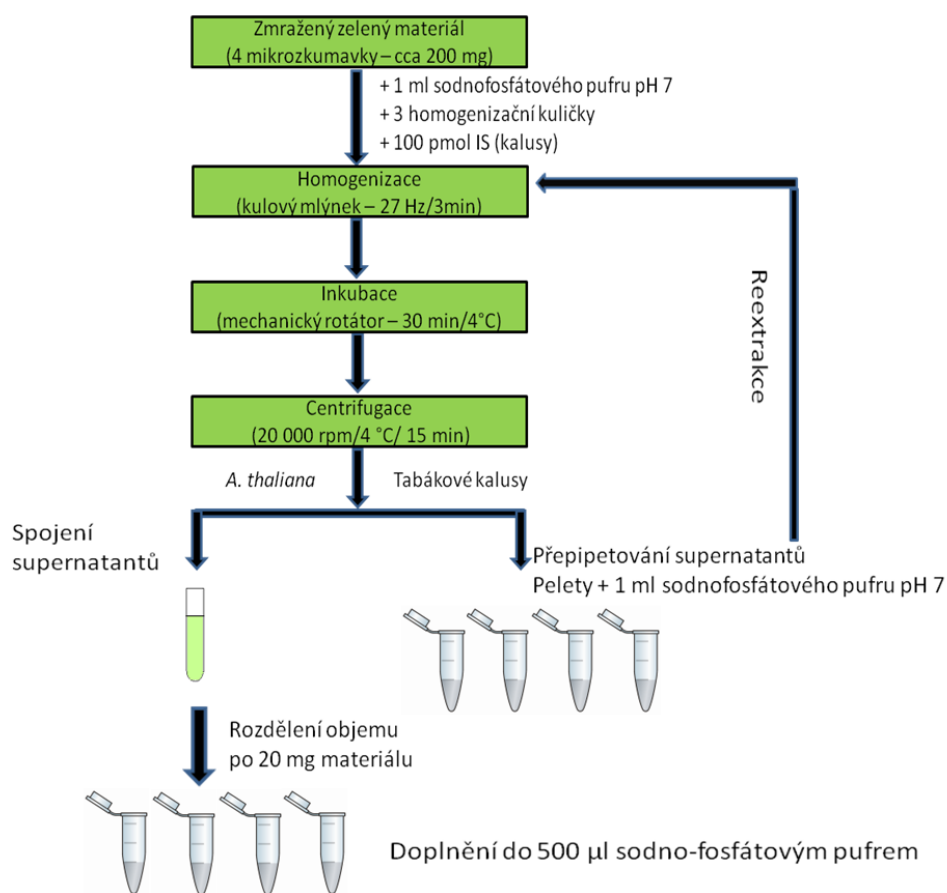
Kalusy tabákové linie BY-2 byly pasážovány a následně pěstovány v Erlenmayerových baňkách obsahující IPT médium s přidavkem 2,4-D (1 mg.l<sup>-1</sup>). Pasážování i kultivace probíhaly za sterilních podmínek. Kalusy rostly 21 dní při 23°C a při fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. Při sběru byl rostlinný materiál vzorkován přibližně po 500, 250, 100 a 50 mg, zamražen v tekutém dusíku a uchováván v -80°C.

### 3.4.2 Extrakce

Zamražené semenáčky *A. thaliana* (200 - 300 mg) byly nejprve zhomogenizovány ve třecí misce za chlazení kapalným dusíkem a následně přeneseny do čistých mikrozkušavek. K materiálu byl přidán 1 ml Na-fosfátového pufru (pH 7) a tři keramické homogenizační kuličky. Mikrozkušavky byly vloženy a vzorky byly extrahovány v kulovém mlýnku po dobu 3 minut při frekvenci 27 Hz. Po té byly přeneseny na rotátor a inkubovány během 30 minut při 4°C. Po dokončení byly v centrifuze odděleny pevné části vzorku (15 minut, 20 000 rpm při 4°C) a supernatanty ze všech mikrozkušavek spojeny do čisté zkumavky.

Pro testování purifikačních postupů byl spojený supernatant rozdělen na části, které objemově odpovídaly přibližně 20 mg rostlinného materiálu v závislosti na původních navážkách. Všechny vzorky byly doplněny Na-fosfátovým pufrem na celkový objem 500 µl (viz Obr. 7).

Pro výsledné stanovení 2,4-D a jejích metabolitů byly použity tabákové kalusy BY-2. 50 mg materiálu v mikrozkušavkách bylo extrahováno s 1 ml Na-fosfátového pufru (pH 7). Z důvodů přesného a správného stanovení bylo ke každému vzorku přidáno 100 pmol interního standardu [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-2,4-D (10 μl zásobního roztoku 1.10<sup>-5</sup> mol/l). Do mikrozkušavek byly opět přidány 3 homogenizační kuličky a vzorky byly vloženy do kulového mlýnku (27 Hz/3 min). Následně byly vzorky promíchávány na rotátoru (30 min/4°C), zcentrifugovány (15 minut, 20 000 rpm, 4°C) a supernatanty byly odpipetovány každý do čisté mikrozkušavky. K peletům byl přidán 1 ml Na-fosfátového pufru, vzorky byly stejným postupem reextrahovány a výsledné supernatanty spojeny s primárními (viz Obr. 7). Ke každému vzorku bylo na závěr přidáno 100 μl 25% NH<sub>4</sub>OH a celkový výsledný objem nanesen na SPE kolonu. 2,4-D společně s předpokládanými metabolity byly izolovány pomocí kolon Oasis MAX (viz Kapitola 3.4.3, Protokol A).



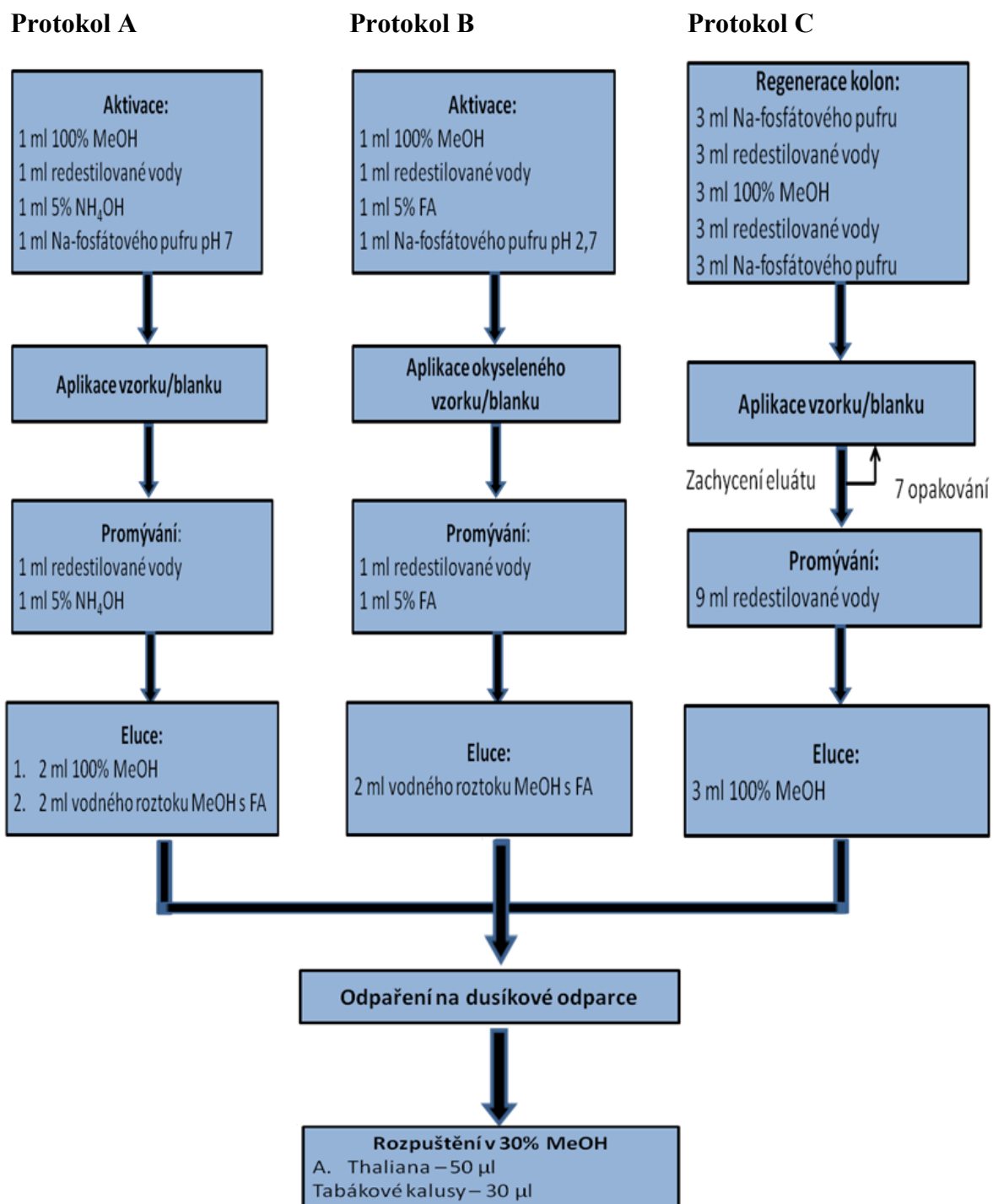
Obr. 7 – Schéma popisovaného postupu extrakce

### 3.4.3 Purifikace

Z purifikačních postupů byly testovány 3 základní metody – extrakce tuhou fází pomocí SPE kolon Oasis MAX (A), Oasis HLB (B) a imunoafinitní chromatografie (C). Vzorky připravené různými izolačními postupy byly vždy odpařeny na dusíkové odparce dosucha a uchovávány při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Před měřením byly odpařené vzorky rozpuštěny ve 100  $\mu\text{l}$  30% MeOH, popř. 50  $\mu\text{l}$  (extrakty Arabidopsis) nebo 30  $\mu\text{l}$  (u kalusových extraktů) a analyzovány pomocí UHPLC–MS/MS.

- A. Kolony MAX byly aktivovány 1 ml 100% MeOH, 1 ml redestilované vody, 1 ml 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 1 ml Na-fosfátového (pH 7). Následovala aplikace vzorků (500  $\mu\text{l}$ ). Promývací fáze byla prováděna 1 ml redestilované vody a 1 ml 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$ . První eluce pomocí 2 ml 100% MeOH poskytovala neutrální a bazické látky. Následovala eluce 2 ml vodného roztoku methanolu s kyselinou mravenčí (98:2 v/v), která byla zachycována.
- B. Kolony HLB byly kondicionovány 1 ml 100% MeOH, 1 ml redestilované vody, 1 ml 5% kyseliny mravenčí a 1 ml Na-fosfátového pufru (pH 2,7). Následovala aplikace vzorků (500  $\mu\text{l}$ ), u kterých bylo upraveno pH sodno-fosfátového pufru na hodnotu 2,7 pomocí 1M HCl (20  $\mu\text{l}$ /vzorek). Promývací fáze byla prováděna 1 ml redestilované vody a 1 ml 5% kyseliny mravenčí. Zachycené látky byly eluovány pomocí 2 ml vodného roztoku methanolu okyseleného kyselinou mravenčí (98:2 v/v).
- C. Imunoafinitní kolony s protilátkou E2/G2 navázanou na Affi-Gel 10 byly postupně regenerovány 3 ml PBS pufru pro IAC, destilované vody, 100% MeOH, opět destilovanou vodou a na závěr znovu 3 ml PBS pufru. Následně byly aplikovány vzorky rozpuštěné v PBS pufru. Ty byly ihned jímány do zkumavky pod kolonou a opět nanášeny na sorbent. Tento proces byl praktikován v sedmi cyklech a při posledním opakování byl pufr odpuštěn do odpadu. Následovalo promytí 3x 3 ml redestilované vody. Eluce probíhala pomocí 3 ml vychlazeného 100% MeOH do čistých zkumavek. Před uskladněním byly zregenerované imunoafinitní kolony opatřeny zátkou, naplněny PBS pufrem obsahujícím přibližně 1 mg azidu sodného a uchovávány v lednici při  $4^{\circ}\text{C}$ .





Obr. 8 - Schéma purifikačních protokolů (A) SPE pomocí kolon Oasis MAX, (B) SPE pomocí kolon Oasis HLB, (C) pomocí IAC

### 3.4.4 Charakterizace a validace purifikačních postupů

U imunoafinitní chromatografie byla nejprve testována kapacita kolon se standardem 2,4-D. Bylo připraveno šest roztoků ve třech opakováních s různými

látkovými množstvími standardu – 5, 10, 50, 100, 500 a 1000 pmol. Vzorky byly izolovány podle protokolu C (Obr. 8), odpařeny do sucha na dusíkové odparce a uchovávány při -20°C. Následně byla podle stejného postupu testována návratnost standardů jednotlivých potenciálních metabolitů. Připraveny a nanoseny byly roztoky s 1, 5, 10, 50, 100 a 300 pmol směsi neznačených standardů ve třech opakováních.

Při charakterizaci obou SPE metod byla nejdříve sledována jejich účinnost, která byla stanovena jako návratnost všech vybraných metabolitů. Nejprve byla studována schopnost zachycení standardu 2,4-D, všech potenciálních metabolitů a příbuzných strukturních herbicidů na SPE kolonky MAX a HLB (viz obr. 8 – Protokol A, B). Byla vytvořena směs všech standardů jednotlivých metabolitů (ozn. MIX) v koncentracích  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> v roztoku 10% MeOH. Byly také připraveny dva typy slepých vzorků – čistý sodno-fosfátový pufr a rostlinný extrakt doplněný pufrům do daného objemu – také ve dvou opakováních. Při purifikaci na kolonách HLB byla do čistých zkumavek jímána pouze eluce okyseleným vodným metanolickým roztokem, v případě kolon MAX byly jímány dvě frakce – 100% methanol i okyselený 90% methanol. Stejným postupem byl následně testován vliv rostlinné matrice na návratnost standardů.

Dále byl testován vliv rostlinné matrice na návratnost zvolených metabolitů při použitých obou SPE protokolů A a B. Extrakty semenáčků *A. thaliana* s přibližně stejnými navážkami rostlinné matrice (cca 20 mg živé hmoty) byly doplněny Na-fosfátovým pufrům do 500 µl a značeny roztoky směsí o koncentracích  $1 \cdot 10^{-5}$  a  $1 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> (10 µl na vzorek). Vzorky i oba typy blanků (čistý Na-fosfátový pufr a extrakt doplněný pufrům do 500 µl) byly vytvořeny ve dvou opakováních. V obou případech již byla do zkumavek jímána pouze eluce vodným roztokem MeOH okyseleným kyselinou mravenčí.

Posledním krokem před měřením reálného vzorku bylo stanovení přesnosti a správnosti vybraného purifikačního postupu (Protokol A) metodou izotopického zředění za pomoci interního standardu ([<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-2,4-D). Pro tento experiment byla vytvořena směs standardů všech potenciálních metabolitů v koncentračním rozsahu  $9 \cdot 10^{-9}$  –  $9 \cdot 10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> s přidavkem interního standardu o konstantní koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup> (100 pmol/vzorek).

### 3.4.5 Parametry LC-ESI(-)MS/MS metody

Pro separaci fytohormonů pomocí UHPLC byla využita chromatografická kolona AQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18 1,7 μm, 2,1 x 50 mm od firmy Waters (Milford, USA). Mobilními fázemi byly MeOH (A) a v H<sub>2</sub>O (B) s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí. Mobilní fáze B byla připravována nově před každým měřením, mobilní fáze A byla uchovávána v lednici při 4°C. Před každým měřením byla kolona po dobu 3 minut kondicionována na počáteční podmínky analýzy (35%A/65%B) a dvakrát byl spuštěn gradient metody bez nástřiku vzorku. Celkový čas každé analýzy byl 8 minut při průtoku 0,25 ml/min a gradientová eluce měla lineární průběh (0,0 min – 35% A; 6,0 min – 61,3 % A; 6,1 min – 100% A; 6,3 min – 100% A; 6,5 min – 35% A). Vzorky byly uloženy v autosampleru při 4°C, kolona byla vždy temperována na 40°C. Nástřiky vzorků se pohybovaly mezi 10 až 30 μl.

*Tabulka 1 – Optimalizace podmínek UHPLC-(ESI-)MS/MS metody pro jednotlivé analyty*

Analyt	MRM přechod	Retenční čas [min]	Napětí na koloně [V]	Kapilární napětí [V]	Kolizní energie [eV]
2,4-D	219>161	4,74 ± 0,01	21	4 000	10
2,4-D-Asp	334>161	3,55 ± 0,02	30	4 250	22
2,4-D-Glu	348>161	4,01 ± 0,01	25	3 750	22
2,4-DB	247>161	6,80 ± 0,01	17	4 000	9
MCPA	199>141	4,93 ± 0,00	15	3 750	12
MCPB	227>141	6,84 ± 0,00	18	3 750	9
MCPP	213>141	6,13 ± 0,01	20	4 250	11
2,4,5-T	253>195	6,21 ± 0,01	20	4 250	10

Detekce jednotlivých analytů probíhala na hmotnostním spektrometru ionizací látek pomocí elektrospreje v negativním módu ESI(-) a MS podmínky byly optimalizovány (viz Tabulka 1). Přístroj byl vždy před spojením s UHPLC vytemperován – kapilára měla teplotu 350 °C a teplota odpařovacího bloku byla 100 °C. Na kapiláru bylo přivedeno napětí 4,0 kV, na vstupní štěrbinu napětí 25 V a na extrakční štěrbinu 3,0 V. Průtok zmlžovacího plynu (dusík) byl 500 l/hod a průtok plynu (dusík) na vstupní štěrbině byl 2 l/hod. Další parametry na QqQ byly

následující: rozlišení LM/HM 12,5; iontová energie na Q1 0,3 V; iontová energie na Q2 1,5 V; vstupní a výstupní napětí 2 V a napětí detektoru 650 V. U standardů byl vždy prováděn kontrolní nástřik, následně změřeny nejintenzivnější přechody a na základě výsledků byla zvolena tři časová okna (časy + přechody), ve kterých probíhala analýza fragmentačních spekter jednotlivých analytů v režimu MRM při optimalizovaném kolizním napětí a tlaku kolizního plynu (argon)  $4,3 \cdot 10^{-3}$  mbar. Podle počtu zvolených MRM přechodů v daném segmentním okně trvala doba jednoho cyklu (*cycle time*) 0,7 – 1,0 s při *dwell time* 0,125 s a 0,45 s). Tyto hodnoty byly zvoleny při počtu 20 datových bodů přes celkovou šířku chromatografického píku z důvodů optimální integrace plochy chromatografických píků.

U výsledné optimalizované UHPLC-(ESI-)MS/MS metody bylo potřeba proměřit kalibrační křivky a stanovit limity detekce a kvantifikace. Ze zásobních roztoků bylo odebráno 25  $\mu\text{l}$  od každého standardu (tzn. celkem 200  $\mu\text{l}$ ) a objem doplněn do 500  $\mu\text{l}$  roztokem 10% MeOH. Vznikla tak směs o koncentraci jednotlivých standardů  $2 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol.l}^{-1}$ . Postupným ředěním byla vytvořena řada roztoků o objemu 100  $\mu\text{l}$  a o koncentracích  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$  až po  $2 \cdot 10^{-9}$   $\text{mol.l}^{-1}$ . Z každého roztoku bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  a přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku IS o koncentraci  $10^{-5}$   $\text{mol.l}^{-1}$ . Vznikla tak kalibrační řada o koncentracích standardů  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$  až po  $1 \cdot 10^{-9}$   $\text{mol.l}^{-1}$  a stálé koncentraci IS ( $5 \cdot 10^{-6}$   $\text{mol.l}^{-1}$ ).

## 4 Diskuze a výsledky

### 4.1 Vývoj izolační metody pomocí SPE

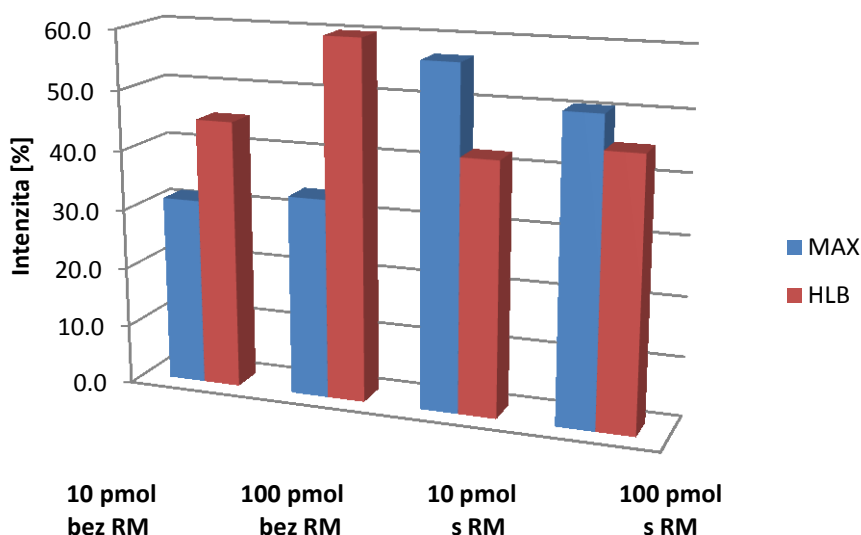
Výběr SPE kolon často závisí na chemicko–fyzikálních vlastnostech analytu, který chceme z daného materiálu izolovat (Nováková a Vlčková, 2009). V první fázi této práce byla testována a porovnávána selektivita a specifická dvou vybraných SPE kolon – Oasis MAX a HLB. Byla studována schopnost navázání jednotlivých analytů na zvolené sorbenty a vliv rostlinné matrice na jejich návratnost. Dále bylo testováno, ve kterém z purifikačních kroků budou jednotlivé analyty eluovány z dané SPE kolony.

Tabulka 2 – Srovnání elucí jednotlivých analytů u kolon MAX a HLB. Hodnoty v závorkách udávají návratnosti [%] 10 pmol jednotlivých analytů v Na-fosfátovém pufru ( $n=2$ ).

Analyt	Oasis® MAX		Oasis® HLB
	Eluce 1 (neutrální/ bazické)	Eluce 2 (kyselé)	Eluce (neutrální/ bazické/kyselé)
2,4-D	x	✓ (35,4 ± 0,3)	✓ (36,3 ± 0,5)
2,4-D-Asp	x	✓ (41,2 ± 0,2)	✓ (34,6 ± 2,6)
2,4-D-Glu	x	✓ (46,3 ± 0,2)	✓ (46,9 ± 1,3)
2,4-DB	x	✓ (28,6 ± 0,4)	✓ (49,4 ± 3,3)
MCPA	x	✓ (20,3 ± 0,3)	✓ (46,4 ± 0,1)
MCPB	x	✓ (20,2 ± 0,1)	✓ (37,3 ± 1,6)
MCPP	x	✓ (18,2 ± 0,3)	✓ (48,2 ± 1,2)
2,4,5-T	x	✓ (20,2 ± 0,1)	✓ (61,4 ± 2,4)

Pro test kolony MAX podle postupu A byly připraveny směsi neznačených standardů jednotlivých metabolitů o látkovém množství 10 a 100 pmol v 500  $\mu$ l Na-fosfátového pufru (pH 7), popř. v extraktu z prýtlů semenáčků *A. thaliana*

ve dvou opakováních. Do čisté zkumavky byly jímány dvě eluční frakce – 100% MeOH a vodný roztok MeOH okyselený kyselinou mravenčí (viz Obrázek 8, Protokol A). Pro test kolony HLB podle protokolu B byly připraveny okyselené vzorky Na-fosfátového pufru (20 µl HCl na 500 µl vzorku), popř. extraktu z prýtů s přidavkem 10 a 100 pmol směsí neznačených standardů. Pomocí analytické koncovky LC–MS/MS byl získán přehled o zastoupení studovaných analytů v jednotlivých frakcích. V Tabulce 2 jsou uvedeny vypočtené návratnosti analytů bez vlivu komplexní rostlinné matrice pro testované kolony MAX a HLB. Výsledné hodnoty návratností jednotlivých analytů bez přítomnosti i v přítomnosti předpokládané matrice pro obě testované koncentrační hladiny jsou shrnuty v Příloze 2.



Obr. 9 – Srovnání celkových návratností [%] kolon MAX a HLB s a bez přidavku rostlinného materiálu (RM)

Z kolony MAX byly všechny testované látky eluovány okyseleným metanolicným roztokem. Tento výsledek je dán kyselým charakterem těchto látek, kdy dochází při změně pH k narušení iontových vazeb a následnému uvolnění analytů z SPE kolony. Při porovnání celkových návratností analytů na jednotlivých typech kolon bylo zjištěno, že bez použití rostlinného materiálu vykazuje vyšší návratnosti kolona HLB, v přítomnosti rostlinné matrice naopak kolona MAX (viz Obrázek 9). Je zřejmé, že kolona HLB využívá k zachycení analytu pouze

hydrofilních a lipofilních rovnováh (reverzní fáze), proto bez přítomnosti rostlinné matrice vykazovala vyšší návratnosti než kolona MAX. V opačném případě nedostatečně limitovala vliv komplexní rostlinné matrice, která obsahuje velké množství interferujících látek (proteinů, pigmentů, sacharidů a lipidů). Kolona MAX kombinuje reverzní fázi s iontově výměnnou fází (anexem) a proto docházelo ke specifitější izolaci kyselých analytů od interferentů obsažených v rostlinné matrici.

## 4.2 Vývoj izolační metody pomocí IAC

Ve spolupráci s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně byly vytvořeny monoklonální protilátky E2/G2 proti 2,4-D-thyreoglobulinu, které byly ocharakterizovány kompetitivní ELISA metodou, kdy byly zjištěny křížové reaktivity s jednotlivými metabolity (Tabulka 3). Ty byly spočítány podle vzorce

$$CR (\%) = \frac{IC_{50} (2,4 - D)}{IC (\text{křížový reaktant})} * 100$$

kde hodnota  $IC_{50}$  udává koncentraci analytu, při které je obsazeno přesně 50 % celkového množství vazebných míst protilátky. Nejvyšších křížových reaktivit dosahovaly látky 2,4-D-Asp a 2,4-D-Glu, popř. MCPA. Tyto látky tedy obsahují epitop, který vytvořená protilátka rozpoznává.

Monoklonální protilátky byly navázány na Affi-Gel 10 a následně byly vytvořeny imunoafinitní kolony. Jejich kapacita byla testována na různých

*Tabulka 3 – Křížové reaktivity jednotlivých analytů s protilátkou proti 2,4-D-thyreoglobulinu*

Sloučenina	Křížová reaktivita [%]
2,4-D	100.0
2,4-D-Asp	46.4
2,4-D-Glu	60.0
2,4-DB	0.2
MCPA	8.0
MCPB	0.9
MCPD	<0.2
2,4,5-T	3.8

koncentračních hladinách 2,4-D pomocí postupu C. Pro tento test byly vytvořeny vzorky PBS s přídatkem 5, 10, 50, 100, 500 a 1000 pmol 2,4-D ve třech opakováních.

Z dosažených výsledků vyplývá, že největší návratnost vykazovaly nejnižší koncentrace 5 a 10 pmol (Tabulka 4). S rostoucí koncentrací 2,4-D docházelo ke snižování návratnosti. Množství 2,4-D v těchto případech převyšovalo počet vazebných míst protilátky vázané na imunoafinitní gelu. Z těchto důvodů se velká část analytu nezachycovala a vyplavila se během promývací fáze.

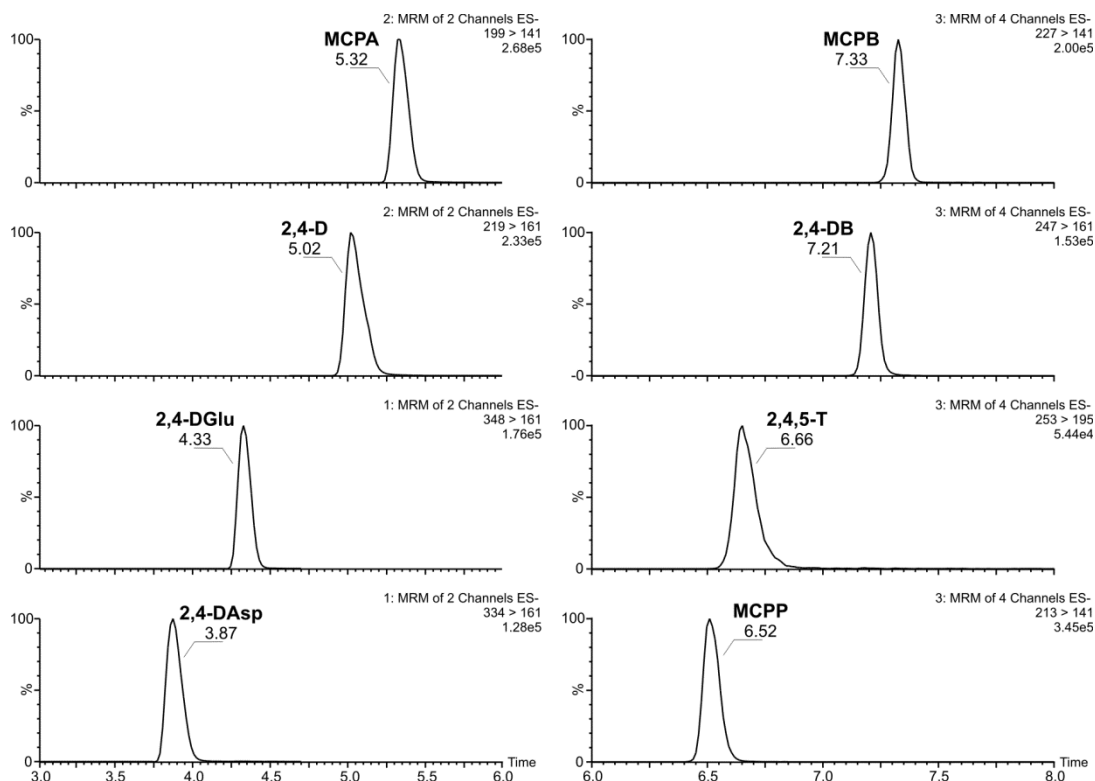
Tabulka 4 – Test kapacity připravených imunoafinitních kolon pro izolaci 2,4-D

Koncentrace 2,4-D	Návratnost [%]
5 pmol	138 ± 13
10 pmol	92 ± 7
50 pmol	47 ± 8
100 pmol	41 ± 3
500 pmol	32 ± 6
1000 pmol	19 ± 5

### 4.3 Vývoj podmínek pro UHPLC-MS analýzu

Všechny metabolity byly detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie v negativním módu, kdy byl za použití elektrospreje (ESI-) odštěpován vodíkový proton z karboxylové skupiny. K rychlé chromatografické separaci byly využity mobilní fáze 0,1% FA v MeOH a 0,1% FA v H<sub>2</sub>O. Pro jednotlivé látky separované na reverzní fázi UPLC kolony byly nalezeny optimální chromatografické podmínky vykazující vysokou stabilitu retenčních časů v rozmezí 0,1 – 0,6 % RSD. Pro všechny separované látky (viz Obr. 10) byla změřena hmotností a fragmentační spektra pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. U MS/MS spekter byly pro každý analyt vybrány nejintenzivnější produktové ionty. Poté byly nastaveny MRM přechody a optimalizovány podmínky MS měření – napětí na vstupní štěrbině a kolizní energie. Za účelem zvýšení citlivosti detekce a v závislosti na dobré stabilitě retenčních časů byly nastaveny tři retenční segmenty. Všechny optimalizované podmínky shrnuje Tabulka 1.





Obr. 10 – Chromatografická separace studovaných metabolitů stanovených metodou UHPLC–MS/MS.

Pro ověření linearity vyvinuté metody byla připravena sada deseti roztoků o koncentracích  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  až  $2,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.l}^{-1}$ , které představovaly jednotlivé kalibrační body křivky. Koncentrace interního standardu  $[^2\text{H}_5]\text{-2,4-D}$  byla konstantní v celém rozsahu ( $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$ ). Kalibrační křivka byla měřena ve třech opakováních, z naměřených dat byly stanoveny hodnoty lineární regrese, lineární rozsahy, limity detekce a kvantifikace (Tabulka 5).

Limity detekce (LLOD, stanovené jako poměr signál/šum roven 3) se pohybovaly v rozmezí od 29 do 63 fmol v nástřiku u většiny analytů, pouze pro 2,4,5–T byla tato hodnota několikanásobně vyšší – 500 fmol. Limity kvantifikace (LLOQ, poměr signál/šum roven 10) se pohybovaly v rozmezí 63 – 270 fmol v nástřiku, pro 2,4,5–T to opět byla hodnota vyšší – 1000 fmol. Hladiny LLOQ se blížily prvnímu bodu testovaného kalibračního rozsahu, který byl u všech metabolitů lineární v rozmezí od 0,25 do 250 pmol, jen u 2,4,5–T od 1 do 250 pmol v nástřiku. Dále byly stanoveny rovnice regresních přímek, jejich hodnoty spolehlivosti  $R^2$ , které se pohybovaly okolo hodnot 0,999.

Tabulka 5 – Limity detekce a kvantifikace, lineární rozsah a hodnoty lineární regrese pro jednotlivé analyty

	LLOD [fmol]	LLOQ [fmol]	Lineární rozsah [pmol]	Rovnice regresní přímky	R <sup>2</sup>
<b>2,4–D</b>	63	144	0,25–250	y=1,037(±0,014)*x+2,108(±0,017)	0,9988
<b>2,4–D–Asp</b>	60	227	0,25–250	y=1,069(±0,025)*x+1,808(±0,062)	0,9988
<b>2,4–D–Glu</b>	58	270	0,25–250	y=1,063(±0,020)*x+1,899(±0,034)	0,9987
<b>2,4–DB</b>	57	240	0,25–250	y=1,060(±0,031)*x+1,726(±0,066)	0,9986
<b>MCPA</b>	42	218	0,25–250	y=0,996(±0,014)*x+2,205(±0,074)	0,9991
<b>MCPB</b>	44	63	0,25–250	y=1,035(±0,020)*x+1,828(±0,050)	0,9955
<b>MCPP</b>	29	190	0,25–250	y=1,053(±0,027)*x+2,305(±0,061)	0,9992
<b>2,4,5 – T</b>	500	1000	1,00–250	y=1,099(±0,033)*x+1,625(±0,165)	0,9987

#### 4.4 Validace vyvinuté metody

Pro validaci nové metody je nutné určit její přesnost a správnost. Přesnost udává těsnost shody mezi výsledky měření vzorků připravených stejným postupem a udává se v % RSD. Správnost neboli míra chyby udává těsnost shody mezi naměřenými hodnotami a hodnotou vypočítanou (pravou) a je udávána v % bias (Honour, 2011). Obě tyto veličiny byly stanoveny metodou izotopického zředování pomocí interního standardu, kdy koncentrace analytu určuje vztah

$$c(A) = \frac{\text{plocha píku analytu}}{\text{plocha píku IS}} * c(IS)$$

Pro validaci metody byly vytvořeny vzorky Na–fosfátového pufru a extraktu z prýtlů semenáčků *Arabidopsis* ve dvou opakováních. Ke vzorkům byla přidána směs neznačených standardů všech studovaných metabolitů o koncentraci  $9 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (9 pmol/vzorek) a interní standard o koncentraci  $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  (100 pmol/vzorek). Hodnoty přesnosti a správnosti udává Tabulka 6. Tyto hodnoty jsou uváděny pouze pro 2,4–D, jelikož pro žádný jiný analyt nebyl k dispozici interní standard. Podle van Rhijn (2001) by se přesnost analytických metod zaměřených na izolaci růstových regulátorů z komplexních rostlinných matic měla pohybovat v rozmezí  $\pm 25$  % RSD. Vyvinutá metoda pro izolaci 2,4–D dosahuje dostačující přesnosti (cca 5%) i správnosti (17% bias).

Tabulka 6 – Hodnoty přesnosti (% RSD) a správnosti (% bias) vyvinuté SPE metody pro izolaci 2,4-D

	Obsah 2,4-D [pmol/vzorek]	
	Přídavek 9 pmol 2,4-D	<i>A.thaliana</i> + 9 pmol 2,4-D
1. opakování	8,71	11,04
2. opakování	8,85	10,07
Průměr ± SD	8,78 ± 0,09	10,56 ± 0,68
Přesnost [% RSD]	0,75	4,56
Správnost [% bias]	-2	17

Pro dosažení vyšší selektivity izolačního kroku bylo testováno zapojení imunoafinitní chromatografie. Byla připravena směs všech neznačených standardů v PBS pufru o různých látkových množstvích všech sledovaných analytů – 1, 5, 10, 50, 100 a 300 pmol – ve třech opakováních. Tyto vzorky byly přečištěny na imunoafinitních kolonách pomocí postupu C (Obr. 8) a byla sledována návratnost jednotlivých analytů (Tabulka 7). Naměřené výsledky podle očekávání korelovaly s nalezenými křížovými reaktivitami (viz Tabulka 3). Největší návratnost vykazovala 2,4-D, proti které byly protilátky připraveny. S vysokou návratností na nejnižších koncentracích (od 1 pmol) byly vázány také konjugáty s aminokyselinami (2,4-D-Asp, 2,4-D-Glu) a MCPA.

Z výsledků je tedy patrné, že afinita protilátky ke zvoleným analytům klesá s prodlužujícím se vedlejším řetězcem. Lze tedy předpokládat, že schopnost

Tabulka 7 – Návratnosti jednotlivých analytů pro purifikaci pomocí IAC

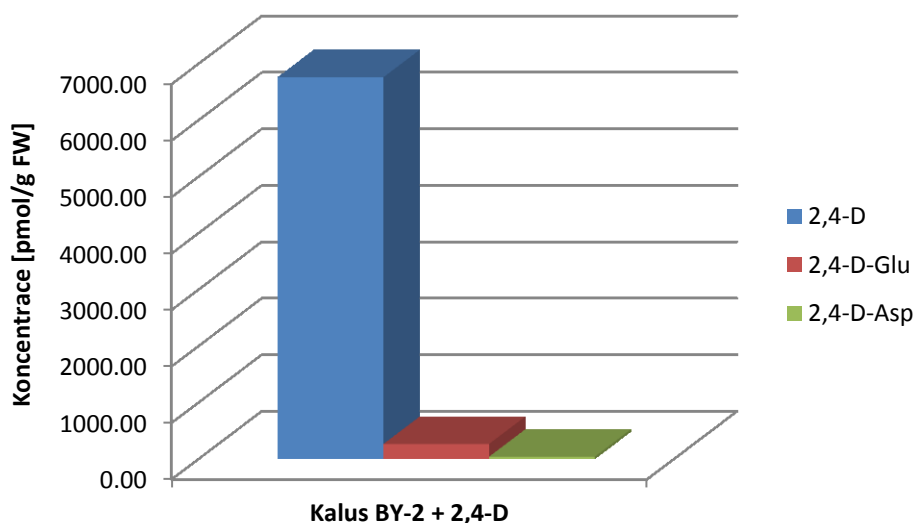
	1 pmol	5 pmol	10 pmol	50 pmol	100 pmol	300 pmol
<b>2,4-D</b>	91,5 ± 7,9	75,3 ± 4,3	69,4 ± 4,9	59,2 ± 2,3	47,6 ± 7,9	62,6 ± 5,8
<b>2,4-D-Asp</b>	48,3 ± 9,6	14,7 ± 2,4	9,3 ± 1,4	7,2 ± 0,2	1,6 ± 0,3	0,8 ± 0,1
<b>2,4-D-Glu</b>	36,1 ± 6,6	31,8 ± 0,6	19,9 ± 1,5	18,0 ± 1,4	6,8 ± 1,2	4,9 ± 0,1
<b>2,4-DB</b>	–	10,5 ± 3,2	14,7 ± 1,9	8,7 ± 0,7	2,5 ± 0,4	1,0 ± 0,3
<b>MCPA</b>	32,4 ± 3,5	23,6 ± 1,0	15,3 ± 1,6	13,8 ± 1,5	4,0 ± 0,4	1,9 ± 0,3
<b>MCPB</b>	–	–	–	–	–	0,6 ± 0,1
<b>MCPP</b>	–	–	–	–	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0
<b>2,4,5-T</b>	–	–	11,9 ± 2,8	9,0 ± 0,4	2,3 ± 0,5	1,1 ± 0,3

vytvoření nekovalentní vazby závisí na vzdálenosti karboxylové skupiny acetátu od kyslíku na 2,4-dichlorfenolu. Zapojení imunoafinitního kroku by mělo pomoci k selektivní izolaci možných 2,4-D metabolitů u rostlin ošetřených tímto herbicidem.

#### 4.5 Stanovení potenciálních metabolitů v rostlinném materiálu

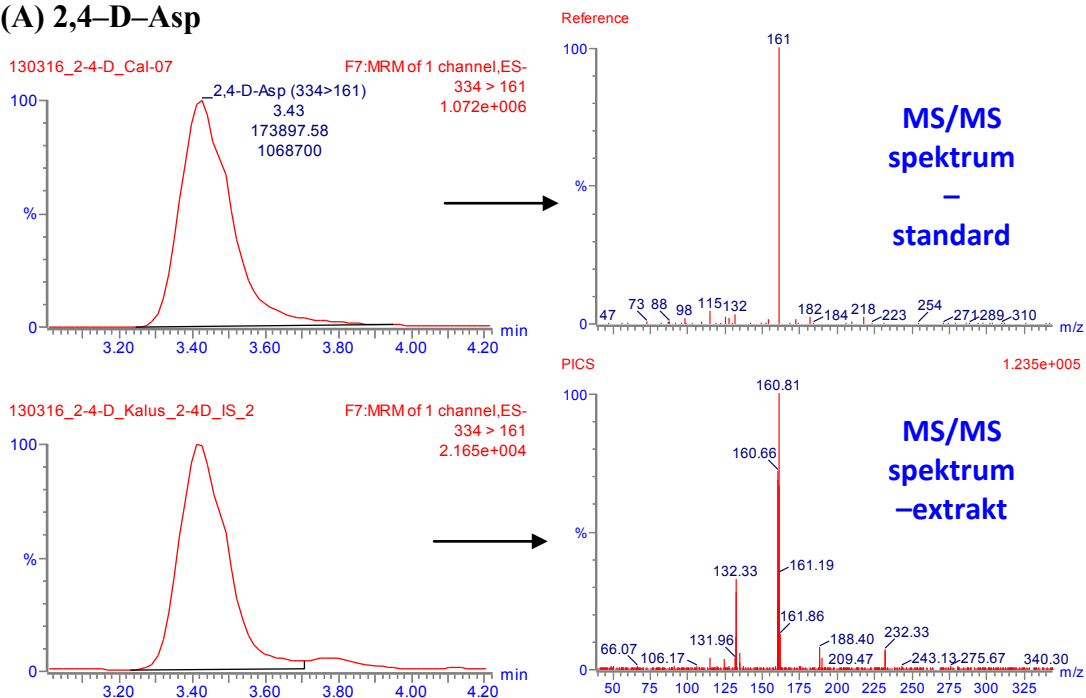
Vyvinuté metody extrakce a izolace potenciálních metabolitů 2,4-D byly v první fázi testovány na tabákových kalusech BY-2 ošetřených 2,4-D. Kalusy rostly 21 dní na médiu s přídavkem 2,4-D ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Extrahovány byly postupem uvedeným na Obr. 7 a purifikovány podle protokolu A (obr. 8). Jako analytická koncovka sloužil systém UHPLC-MS/MS s nastavenými optimalizovanými podmínkami (Tabulka 1).

V ošetřených kalusech byly identifikovány dva možné metabolity 2,4-D s aminokyselinami glutamovou a asparagovou (Obr. 12). Pomocí metody izotopického zředování byly kvantifikovány velmi vysoké hladiny 2,4-D ( $6760.6 \pm 612.1 \text{ pmol/g ž.h.}$ ) a dále stanoveny koncentrace 2,4-D-Glu ( $266.3 \pm 28.6 \text{ pmol/g ž.h.}$ ) a 2,4-D-Asp ( $40.7 \pm 1.0 \text{ pmol/g ž.h.}$ ). Vzájemný poměr nalezených metabolitů bylo přibližně 169:7:1 a je prezentován v grafickém znázornění na Obr. 11.

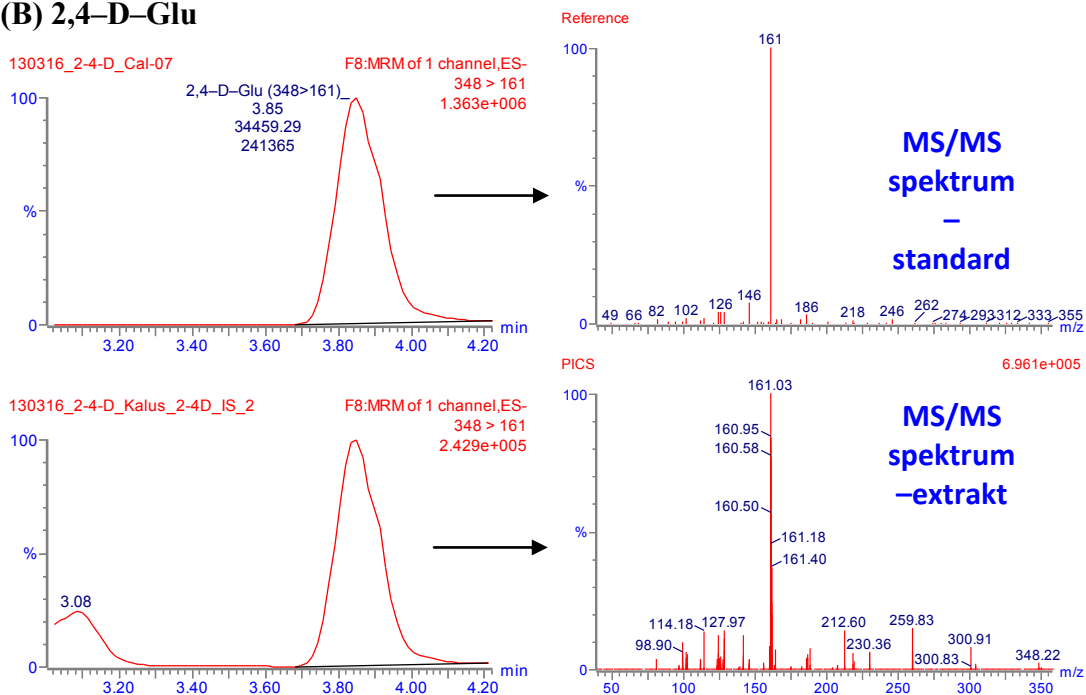


Obr. 11 – Koncentrace 2,4-D a jejích metabolitů izolovaných z tabákových kalusů ošetřených tímto herbicidem.

### (A) 2,4-D-Asp



### (B) 2,4-D-Glu



Obr. 12 – Pozitivní identifikace potenciálních metabolitů 2,4-D s kyselinou asparagovou (A) a glutamovou (B) u ošetřených tabákových kalusů BY-2 na základě shody retenčních časů a sběru příslušných produktových spekter v porovnání se standardy připravenými organickou syntézou.

Podle dostupné literatury a našich předběžných nepublikovaných výsledků lze předpokládat, že konjugace 2,4-dichlorofenoxyoctové kyseliny tlumí její herbicidní účinky. U rostlin byla již ocharakterizována rodina proteinů GH3, která zodpovídá za konjugaci aminokyselin s kyselinou indol-3-ylactovou, salicylovou a jasmonovou, čímž dochází k jejich inaktivaci (Normanly, 2010). Lze tedy předpokládat, že tato rodina zodpovídá také za tvorbu 2,4-D-Asp a 2,4-D-Glu.

## 5 Závěr

Tato práce předkládá vyvinutou metodu pro izolaci a stanovení 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a strukturně podobných látek v rostlinném materiálu pomocí SPE a IAC purifikace. Jako analytická koncovka byl zvolen systém rychlé chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

U metody SPE docházelo k vyšším návratnostem při použití kolony HLB bez přídavku rostlinného materiálu, u kolon MAX bylo dosaženo vyšších návratností na pozadí komplexní rostlinné matrice. Dále byly ocharakterizovány monoklonální protilátky připravené proti 2,4-D-tyreoglobulinu, které byly použity k přípravě imunoafinitních kolon. Tyto protilátky lze využít k izolaci z rostlinného materiálu také konjugátů 2,4-D s aminokyselinami glutamovou a asparagovou, popř. u 2-metyl-4-chlorfenoxyoctové kyseliny, jež vykazovaly vysokou křížovou reaktivitu s danou protilátkou.

Použitelnost jedné z vyvinutých izolačních metod využívající extrakci tuhou fází byla testována na tabákových kalusech pěstovaných na médiu s přídavkem 2,4-D. Závěrečná analýza odhalila přítomnost kvantifikovatelných hladin konjugátů 2,4-D s aminokyselinami glutamovou a asparagovou a potvrdila tak předpoklad o existenci této metabolické dráhy u 2,4-D.

Do budoucna je plánováno spojení purifikační SPE metody s imunoafinitní chromatografií ošetřených vzorků, čímž se předpokládá zvýšení citlivosti vyvinuté metody a zvýšení návratností jednotlivých metabolitů. Ve spolupráci s kolegy z Umeå Plant Science Centre ve Švédsku také probíhají testy na mutantních liniích *A. thaliana* objasňující mechanismy účinku identifikovaných konjugátů, ve kterých se potvrzuje předpoklad, že se jedná o způsob deaktivace účinků 2,4-D v rostlinách.

## Seznam literatury

Cambell N. A., Reece J. B.: Biologie. Computer press a. s., Brno: 807, 2008

Cserháti T., Forgács E.: Phenoxyacetic acids: separation and quantitative determination. *Journal of Chromatography B* **717**: 125–178, 1998.

Du F., Ruan G., Liu H.: Analytical methods for tracing plant hormones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**: 55–74, 2012.

Durgbanshi A., Arbona V., Pozo O. a kol.: Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **53**: 8437–8442, 2005.

Fu J., Sun X., Wang J. D., Chu J. F., Yan C.: Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Plant Physiology* **56**: 355–366, 2011.

Grossmann K., Hansen H.: Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* **124**: 1437–1448, 2000.

Grossmann K.: The mode of action of quinclorac: a case study of a new auxin-type herbicide. In *Herbicides and Their Mechanisms of Action* (Cobb and Kirkwood, eds), pp. 181–214, University of Strathclyde, UK, 2000.

Grossmann K.: Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest management science* **66**: 113–120, 2009.

Hage D. S.: Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical chemistry* **45**: 593–615, 1999.



Holčapek M., Jirásko R., Lísa M.: Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A* **1259**: 3–15, 2012.

Hopkins W., Hüner N.: *Introduction to plant physiology*, pp. 306–307, John Wiley & Sons Inc., U.S.A., 2009.

Honour J. W.: Development and validation of a quantitative assay based on tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry* **48**: 97–111, 2011.

<http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideSiteofAction.aspx>  
staženo 1. prosince 2012.

<http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/item.asp?sectionid=3&mytype=training&number=2&fsid=61>  
staženo 25. února 2013

What Is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)?  
[http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en\\_CZ&cid=10048919](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_CZ&cid=10048919);  
Staženo 25. února 2013.

SPE is Chromatography.  
[http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en\\_CZ&cid=10083845](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_CZ&cid=10083845);  
Staženo 25. února 2013

Jursík M., Soukup J., Holec J.: Úvod do problematiky mechanismu působení herbicidů. *Listy cukrovarnické a řepařské* **126**: 14–16, 2010.

Kanu A. B., Dwivedi P. a kol.: Ion mobility–mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **43**: 1–22, 2008.

Liu B.-F., Zhong X.-H., Lu Y.-T.: Analysis of plant hormones in tobacco flowers by micellar electrokinetic capillary chromatography coupled with on-line large volume sample stacking. *Journal of Chromatography A* **945**: 257–265, 2002.

Mccarthy-SUÁREZ I., GÓMEZ M., Del RÍO A. L., PALMA M. J.: Organ-specific effects of the auxin herbicide 2,4-D on the oxidative stress and senescence-related parameters of the stem of pea plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**: 2239–2247, 2011.

Mccarthy-SUÁREZ I., GÓMEZ M., Del RÍO A. L., PALMA M. J.: Role of peroxisomes in the oxidative injury induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in leaves of pea plants. *Biologia Plantarum* **55**: 485–492, 2011.

Meulebroek L. V., Bussche J. V., Steppe K., Vanhaecke L.: Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry for metabolomic profiling of the endogenous phytohormonal status of the tomato plant. *Journal of Chromatography A* **1260**: 67–80, 2012.

Mithila J., Hall Ch. J., Johnson G. W. a kol.: Evolution of Resistance to Auxinic Herbicides: Historical Perspectives, Mechanisms of Resistance, and Implications for Broadleaf Weed Management in Agronomic Crops. *Weed Science* **59**: 445–457, 2011.

Normanly J.: Approaching Cellular and Molecular Resolution of Auxin Biosynthesis and Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: 1–17, 2010.

Nováková L., Vlčková H.: A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* **656**: 8–35, 2009.

Pazmiño M. D., Rodríguez-Serrano M. a kol.: Differential response of young and adult leaves to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment* **34**: 1874–1889, 2011.

Podlešáková K., Tarkowská D.: Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chemické listy* **106**: 373–379, 2012.

Poole C. F.: New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* **22**: 362–373, 2003.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol.: *Fyziologie rostlin*, pp. 240–245, Nakladatelství Academia, Praha, 2003.

Quittenden L. J., Davies N. W., Smith J.A. a kol.: Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiology* **151**: 1130–1138, 2009.

Raven P., Evert R., Eichhorn S.: *Biology of Plants*, p. 679, W. H. Freeman And Company Word Publishers, U.S.A., 1999.

Russell D. H., Edmondson R. D.: High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **32**: 263–276, 1997.

Schmelz E. A., Engelberth J., Alborn H.T. a kol.: Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **100**: 10552–10557, 2003.

Swaczynová J.: Příprava monoklonálních protilátek proti 6-(3-hydroxybenzylamino) purinu ribosidu a jejich praktické využití. Diplomová práce, UP v Olomouci, 2001.

Taiz L., Zeiger E.: *Plant Physiology*, pp. 545–578, Sinauer Associates, Inc., U.S.A., 2010.

Tarkowski P., Doležal K., Strnad M.: *Analytické metody studia cytokininů. Chemické Listy* **98**: 834-841, 2004.

Van Rhijn J. A., H.H. Heskamp a kol.: Quantitative determination of glycosylated and aglykon isoprenoid cytokinins at sub-picomolar levels by microcolumn liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **929**: 31–42, 2001.

Wells M. J. M., Yu L. Z.: Solid–phase extraction of acidic herbicides. *Journal of Chromatography A* **885**: 237–250, 2000.

Willoughby R., Sheehan E., Mitrovich S.: *A Global View of LC/MS*, pp. 56–57, Global View Publishing, Pittsburgh, 1998.

## **Přílohy**

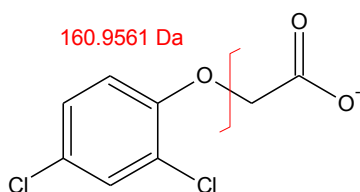
*Příloha 1 – Klasifikace herbicidů podle HRAC (Herbicide Resistance Action Committee)*

HRAC skupina	Místo účinku	Chemická skupina	HRAC skupina	Místo účinku	Chemická skupina
<b>A</b>	Inhibice acetyl-CoA karboxylasy (ACC)	Aryloxyfenoxo-propionát	<b>E</b>	Inhibice protoporphyrinogen oxidasy (PPO)	Difenylether
		Cyclohexandion			Fenylpyrazol
<b>B</b>	Inhibice acetolaktát syntasy (ALS) (acetoxyhydroxyacetát syntasy - AHAS)	Sulfonylmočovina	<b>F1</b>	Inhibice biosyntézy karotenoidů at the phytoene desaturase step (PDS)	N-fenylftalimid
		Imidazolinon Triazolopyrimidin Pyrimidinyl(thio)-benzoát Sulfonylaminokarbonyl-triazolinon			Thiadiazol
<b>C1</b>	Inhibice fotosyntézy ve fotosystému II	Triazin	<b>F2</b>	Inhibice 4-hydroxyfenyl-pyruvát-dioxygenasy (4-HPPD)	Oxadiazol Triazolinon Oxazolidinedion Pyrimidindion
		Triazinon Triazolinon			Pyridazinon
		Uracil Pyridazinon Fenyl-karbamát			Pyridinkarboxamid
<b>C2</b>	Inhibice fotosyntézy ve fotosystému II	Močovina	<b>F3</b>	Inhibice biosyntézy karotenoidů (neznámé místo účinku)	Triketon
		Amidy			Isoxazol Pyrazol
<b>C3</b>	Inhibice fotosyntézy ve fotosystému II	Nitrily	<b>G</b>	Inhibice 5-enolpyruvylshikimát-3-fosfát (EPSP) syntasy	Triazol
		Benzothiadiazinon			Isoxazolidinon
<b>D</b>	Fotosystém I - odklon elektronů	Fenyl-pyridazin	<b>H</b>	Inhibice glutamin syntetasy	Močovina Difenylether
		Bipyridylium			Glycin
			<b>I</b>	Inhibition of DHP (dihydropteroate) synthase	Kyselina fosforová Carbamate

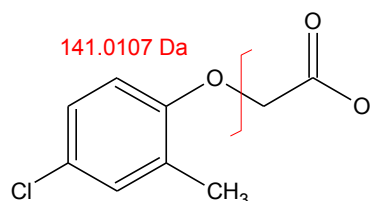
HRAC skupina	Místo účinku	Chemická skupina	HRAC skupina	Místo účinku	
K1	Inhibice shlukování mikrotubulů	Dinitroanilin Phosphoramidate  Pyridin Benzamid Kyselina benzoová	M	Narušení membrán (rozrušení buněčných spojení)	Dinitrofenol
			N	Inhibice syntézy lipidů – netýká se inhibice ACCasy	Thiokarbamát  Phosphorodithioate Benzofuran Chloro-Carbonic-acid
K2	Inhibice mitózy / mikrotubulové organizace	Karbamát	O	Účinky podobné indol octové kyselině (syntetické auxiny)	Fenoxy-karboxylové kyseliny
K3	Inhibice dlouhých řetězců mastných kyselin (VLCFA) (Inhibice buněčného dělení)	Chloroacetamid  Acetamid Oxyacetamid Tetrazolinon			Benzoová kyselina  Pyridin-karboxylová kyselina Chinolin-karboxylová kyselina
L	Inhibice syntézy buněčné stěny (celulózy)	Nitrily  Benzamid Triazolokarboxamid Chinolin-karboxylová kyselina	P	Inhibice auxinového transportu	Ftaláty Semikarbazon
			Z	Jakmile je místo účinku herbicidů ze skupiny Z neznámé, pravděpodobně se liší vlastním místem účinku od jiných skupin.	Arylamino-propi-onová kyselina  Pyrazolium Organoarsenical Ostatní

<http://www.hracglobal.com>

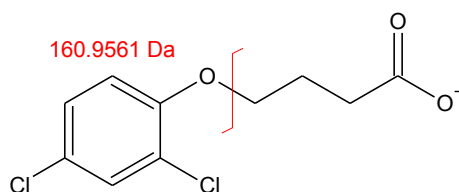
*Příloha 2 – Struktury, elementární složení a izotopické hmoty studovaných herbicidů*



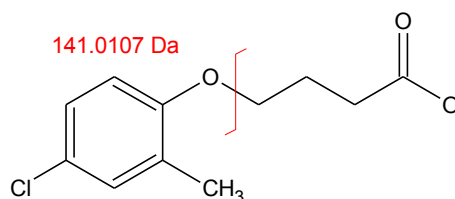
**2,4-D (2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina)**  
Molecular Formula =  $C_8H_5Cl_2O_3$   
Monoisotopic Mass = 218.961576 Da



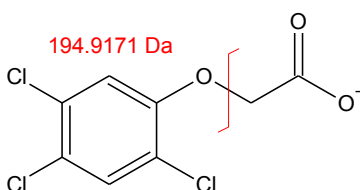
**MCPA (2-metyl-4-chlorofenoxyoctová kyselina)**  
Molecular Formula =  $C_9H_8ClO_3$   
Monoisotopic Mass = 199.016198 Da



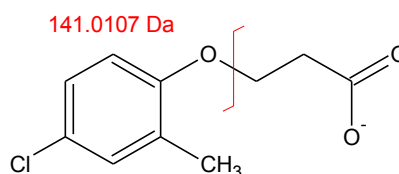
**2,4-DB (2,4-dichlorofenoxymáselná kyselina)**  
Molecular Formula =  $C_{10}H_9Cl_2O_3$   
Monoisotopic Mass = 246.992876 Da



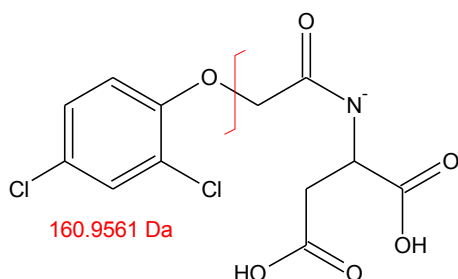
**MCPB (2-metyl-4-chlorofenoxymáselná kyselina)**  
Molecular Formula =  $C_{11}H_{12}ClO_3$   
Monoisotopic Mass = 227.047498 Da



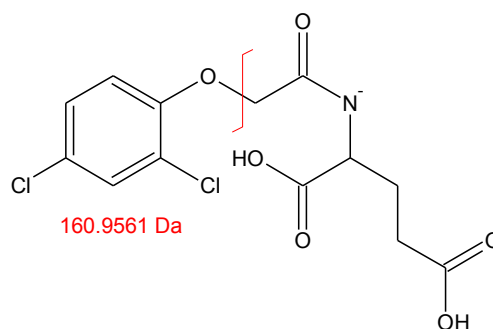
**2,4,5-T (2,4,5-trichlorofenoxyoctová kyselina)**  
Molecular Formula =  $C_8H_4Cl_3O_3$   
Monoisotopic Mass = 252.922604 Da



**MCPP (2-metyl-4-chlorofenoxypropoinová kyselina) (Mecoprop)**  
Molecular Formula =  $C_{10}H_{10}ClO_3$   
Monoisotopic Mass = 213.031848 Da



**2,4-D-Asp (2,4-dichlorofenoxyacetyl-L-asparagová kyselina)**  
Molecular Formula =  $C_{12}H_{10}Cl_2NO_6$   
Monoisotopic Mass = 333.98852 Da



**2,4-D-Glu (2,4-dichlorofenoxyacetyl-L-glutamová kyselina)**  
Molecular Formula =  $C_{13}H_{12}Cl_2NO_6$   
Monoisotopic Mass = 348.00417 Da



Příloha 3 – Tabulka návratností [%] kolon MAX a HLB

	Oasis® MAX				Oasis® HLB			
	10 pmol		100 pmol		10 pmol		100 pmol	
	bez matrice	s matricí	bez matrice	s matricí	bez matrice	s matricí	bez matrice	s matricí
<b>2,4-D</b>	35,4 ± 0,3	42,4 ± 3,6	27,3 ± 2,8	36,1 ± 2,2	36,3 ± 0,5	22,3 ± 0,0	45,2 ± 1,8	26,1 ± 1,9
<b>2,4-D-Asp</b>	41,2 ± 0,2	90,4 ± 14,0	51,0 ± 2,5	75,1 ± 5,6	34,6 ± 2,6	85,7 ± 0,0	59,8 ± 3,2	87,0 ± 0,8
<b>2,4-D-Glu</b>	46,3 ± 0,2	75,2 ± 11,5	57,0 ± 2,3	69,7 ± 4,9	46,9 ± 1,3	52,2 ± 0,0	68,7 ± 4,1	60,2 ± 2,5
<b>2,4-DB</b>	28,6 ± 0,4	40,6 ± 4,0	29,2 ± 5,3	31,1 ± 1,2	49,4 ± 3,3	31,5 ± 0,0	61,4 ± 0,7	28,8 ± 1,9
<b>MCPA</b>	20,3 ± 0,3	33,5 ± 2,9	26,7 ± 5,3	40,6 ± 2,0	46,4 ± 0,1	20,0 ± 0,0	62,2 ± 3,6	28,3 ± 1,4
<b>MCPB</b>	20,2 ± 0,1	23,0 ± 3,4	20,9 ± 4,6	18,5 ± 0,1	37,3 ± 1,6	18,3 ± 0,0	43,7 ± 0,4	17,3 ± 1,3
<b>MCPP</b>	18,2 ± 0,3	61,8 ± 5,6	18,5 ± 4,1	57,7 ± 5,1	48,2 ± 1,2	46,4 ± 0,0	62,9 ± 0,3	50,6 ± 3,3
<b>2,4,5 - T</b>	40,9 ± 2,1	89,1 ± 15,7	37,5 ± 3,3	75,5 ± 8,2	61,4 ± 2,4	61,3 ± 0,0	75,8 ± 0,0	61,4 ± 5,7
<b>Celková návratnost</b>	<b>31,4 ± 11,0</b>	<b>57,0 ± 25,9</b>	<b>33,5 ± 14</b>	<b>50,5 ± 21,9</b>	<b>45,1 ± 8,8</b>	<b>42,2 ± 23,8</b>	<b>60,0 ± 10,9</b>	<b>44,9 ± 23,8</b>