

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Charakterizace fytochelatinů a jejich komplexů s těžkými kovy v rostlinách s využitím LC/ESI-MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Martina Kadalová
Studijní program:	N 1407 chemie
Studijní obor:	Chemie životního prostředí
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Barbora Papoušková, Ph.D.

OLOMOUC 2012

Poděkování

Děkuji vedoucí diplomové práce RNDr. Barbore Papouškové, Ph.D. za odborné vedení, vnošený čas, cenné rady a metodické připomínky, které mi poskytla během zpracovávání diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat svému manželovi a celé rodině za trpělivost a morální podporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem získala, jsou v seznamu použité literatury.

Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Podpis

Shrnutí

Do životního prostředí je každodenně vypouštěno velké množství cizorodých látek tzv. xenobiotik, jejichž obsah se rok od roku stále zvyšuje. Nejvýznamnějšími znečišťovateli jsou zdroje antropogenního charakteru a mezi významné znečišťovatele životního prostředí patří těžké kovy, které zejména zaujímají nejvyšší obsah emisí.

Těžké kovy mohou ve vyšším množství negativně působit na rostlinu a změnit jak její strukturu a složení nejen na buněčné úrovni, ale také její metabolické procesy. Rostliny si proto vyvinuly ochranný metabolismus na odbourávání těžkých kovů, při kterém jsou produkovány fytochelatiny (PCs). Tyto peptidy vážnou těžký kov a vytvářejí s nimi komplexy, které jsou pomocí přenašeče dopraveny z cytosolu buď do vakuoly a tam jsou kumulovány.

V této studii se sledovalo působení olova a kadmia na dvou rostlinných druzích a na těchto koncentračních úrovních. Byla optimalizována LC-MS metodika umožňující citlivou detekci a spolehlivou identifikaci fytochelatinů. Pomocí přímého nástřiku byly identifikovány dimery fytochelatinů PC2-PC2 a PC3-PC3 a jednoduché komplexy fytochelatinů s jedním těžkým kovem.

V extraktech hrachu setého s Pb byla potvrzena přítomnost PC2 na všech koncentračních úrovních olova. Nicméně u ovsa nahého byl vznik PC2 potvrzen až u nejvyšší koncentrace olovnatých iontů. Ve vzorcích ovsa nahého s kadmiumem byl potvrzen vznik PC2 a PC3 v oxidované i redukované formě. Použití redukčního činidla (dithiothreitolu) umožnilo identifikaci fytochelatinů PC2, PC3, PC4 i PC5.

Klíčová slova: Fytochelatiny, PC, glutathion, olovo, kadmium, MS, QqTOF, ESI, LC, UPLC.

Summary

The environment is daily exposed to large quantities of foreign substances known as xenobiotics, whose content increases from year to year. The biggest polluters are the sources of anthropogenic character. Significant environmental pollutants are heavy metals, which probably occupy the largest content of emissions.

Heavy metals in large quantities can negatively affect the plant and change its structure and composition. This happens not only at the cellular level, but also in its metabolite processes. Plants have developed a protective metabolism for elimination of heavy metals, which is based on production of phytochelatins (PCs). These peptides bind heavy metals in complexes, which are transported from cytosol to vacuoles, where the heavy metals are accumulated.

In this study, an effect of exposition of lead and cadmium to the two plant species at three concentration levels was observed. Optimized LC-MS methodology allowed sensitive detection and reliable identification of phytochelatins. Simple complexes of PCs with one covalently bound atom of heavy metal and dimers PC₂-PC₂ and PC₃-PC₃ were identified using direct injections in to mass spectrometer.

Presence of PC₂ was confirmed for all concentration levels of lead in *pisum sativum* extracts. However in case of *Avena nuda*, the presence of PC₂ was confirmed only at the highest concentration level. In samples of oat with cadmium, a formation of PC₂ and PC₃ in oxidized and reduced form was confirmed. Utilization of reducing agent (dithiothreitol) allowed identification of following phytochelatins PC₂, PC₃, PC₄ and also PC₅.

Keywords: Phytochelatins, PC, glutathione, lead, cadmium, MS, QqTOF, ESI, LC, UPLC.

Obsah

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1 Těžké kovy	2
2.1.1 Olovo (plumbum)	2
2.1.2 Kadmium (cadmium)	4
2.2 Příjem toxického kovu rostlinami	7
2.3 Struktura rostliny	8
2.3.1 Podzemní část rostlin (kořen – radix)	8
2.3.2 Nadzemní část rostlin (stonek - caulom, list – fylom)	10
2.4 Fytochelatiny (PCs)	12
2.4.1 Struktura fytochelatin	12
2.4.1.1 Glutathion	13
2.4.2 Biosyntéza fytochelatin	14
2.4.3 Extrakce a analýza fytochelatin	15
2.5 Hrách setý (pisum sativum)	19
2.6 Oves nahý (avena nuda)	20
2.7 Principy použitých analytických metod	20
2.7.1 Kapalinová chromatografie	20
2.7.1.1 Vysokou rychlostí a ultra rychlostí kapalinová chromatografie	21
2.7.2 Součásti chromatografu	22
2.7.3 Volba separačního systému	24
2.7.4 Chromatografie na reverzních fázích	25
2.7.5 Detektory v HPLC	26
2.8 Hmotnostní spektrometrie	27
2.8.1 Iontové zdroje	28
2.8.1.1 Ionizace elektrosprejem	29
2.8.2 Hmotnostní analyzátoři	30
2.8.2.1 Kvadrupólový analyzátoř	32
2.8.2.2 Průtokový analyzátoř	33
2.8.2.3 Kvadrupól - průtokový analyzátoř QqTOF	34

3.	Experimentální část	35
3.1	Použité chemikálie	35
3.2	Příprava vzorků k analýze	35
3.2.1	Expozice rostlinných vzorků těžkým kovem	35
3.2.2	Extrakční činidlo	35
3.2.3	Postup extrakce a přípravy vzorků	36
3.2.4	Příprava mobilních fází	36
3.3	Instrumentální vybavení	37
4.	Výsledky a diskuse	38
4.1	Hmotnostní spektrometrie fytochelatinů	38
4.1.1	ESI-MS/MS experimenty s využitím přímé infuze roztoku standardů	38
4.1.2	Vliv kolizní energie na fragmentaci fytochelatinů	41
4.1.3	Studium tvorby komplexů fytochelatinů s těžkými kovy	46
4.2	Chromatografická separace fytochelatinů a glutathionu- vývoj metody UPLC	50
4.2.1	Vliv složení mobilní fáze na retenci analytů	50
4.2.2	Vliv teploty na retenci analytů	52
4.2.3	Vliv typu stacionární fáze na retenční charakteristiky analytů	55
4.3	Reálné vzorky	58
4.3.1	Identifikace GSH, GSSG a PCs v reálných vzorcích	58
5.	Závěr	66
6.	Seznam použité literatury	67
7.	Seznam zkratk	74

1. Úvod

Znečištění životního prostředí je dnes velký problém, kterým se zabývá celý svět. Znažíme se co nejvíce eliminovat emise cizorodých látek do životního prostředí například nahradou olovnatých benzín bezolovnatým benzínem.

Těžké kovy mohou být toxické pro živé organismy na všech koncentračních úrovních (rtuť, olovo, kadmium) nebo až od určité koncentrace (zinek, nikl, chrom). Tyto kovy se snadno dostávají do potravinového řetězce, ovlivují vlastnosti a úrodnost biomasy, výnosy plodin a nakonec i zdraví lidí. Jejich přítomnost v buňce se podílí na vzniku reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), které mohou vážně poškodit biomolekuly (lipidy, proteiny a nukleové kyseliny). Organismy si proti jejich úniku vytvořily ochranný mechanismus, který je založen na přítomnosti různých antioxidantních enzymů a nízkomolekulárních antioxidantů, jako je například askorbát a glutathion. Některé rostliny jsou adaptované na vysoký obsah těžkých kovů v půdě (hyperakumulátory například *Thlaspi caerulescens*)¹ a jsou schopny je ukládat ve velkém množství do listů a kořenů. V praxi se této schopnosti rostlin využívá například tzv. fytoremediace životního prostředí.²

Rostliny regulují fytotoxický účinek těžkých kovů pomocí fytochelatinů (PC). Tyto peptidy nejprve vznikají spojováním glutathionových jednotek a jsou následně eliminovány molekulou glycinu. Vzniklé fytochelatiny následně vytvářejí komplexy s ionty těžkých kovů v závislosti na jejich vaznosti a toxicitě. V rostlinách tedy může vznikat rozličné množství volných i vázaných fytochelatinů v široké škále molekulových hmotností. Z tohoto důvodu je jednou z nejlepších metod pro jejich identifikaci spojení kapalinové chromatografie (LC) s hmotnostní spektrometrií (MS).^{2,3,4}

2. Teoretická část

2.1 Těžké kovy

V průběhu evoluce si organismy vybraly řadu prvků ze svého okolí, které jsou potenciálně pro jejich biologické funkce. Mezi ně se řadí také několik p-echodných prvků, které jsou klasifikovány jako stopové např. železo (Fe), zinek (Zn), měď (Cu) a mangan (Mn). Tyto prvky jsou ve stopových koncentracích pro organismus esenciální, ve vyšších pak působí toxicky.^{5,6} Rostliny však mohou absorbovat i p-echodné prvky, které jsou pro ně toxické už i při malých koncentracích. Mezi ně řadíme např. těžké polokovy, lanthanoidy a aktinoidy, zejména Pb, Cd, Hg. Existuje mnoho definic, které vydefinují těžké kovy (podle hustoty, protonového čísla nebo atomové hmotnosti i podle toxicity). Těžké kovy jsou cizorodé látky, které mohou obecně při vyšších koncentracích znečišťovat životní prostředí.⁷

2.1.1 Olovo, plumbum (Pb)

Je nejrozšířenějším kovem v přírodě zejména v důležitých 4 izotopech (^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb), které vznikají jako stabilní produkt přirozených rozpadových řad. V přírodě se olovo vyskytuje vázané ve známých a běžně nacházených materiálech (galenit PbS , anglesit PbSO_4 , cerussit PbCO_3 , pyromorfit $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ a mimetesit $\text{Pb}_5(\text{AsO}_4)_3\text{Cl}$). Jeho hmotnostní zastoupení v přírodě činí přibližně 0,001 %. Z toho sloučenin je olovo snadno dostupné redukčními procesy při zvýšené teplotě. V rudách bývá doprovázeno stříbrem.^{8,9}

Olovo je měkký, málo pevný kov, je však kujné a tažné. Řadíme ho mezi tzv. neušlechtilé kovy, které se rozpouštějí v kyselinách. V H_2SO_4 se na něm vytváří vrstva nerozpustného síranu a dále se už nerozpouští. Kovové olovo je poměrně inertní prvek a na vlhkém vzduchu nepodléhá velkým změnám, pouze ztrácí lesk a vyvíjí se na něm šedobílá vrstva oxidu, hydroxidů a uhličitanu.¹⁰ Jeho další fyzikální a chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce I.

Ve sloučeninách se olovo nejčastěji vyskytuje v oxidačních stavech II a IV. Oxidační stupeň II je stabilnější než oxidační stupeň IV. Olovo může být zabudováno do kovalentních organických sloučenin, kde je potom nejčastěji čtyřvázný. Ochotnost tvořit

slitiny, popřímo sloučeniny s mnoha dalšími kovy a metaloidy (což jsou nekovové prvky, jež není kovy připomínají).⁸

Lidé využívají olovo odedávna. Jeho rudy jsou celkem dobře dostupné. Můžeme z nich snadno získat kovovou slitinu a oxidací tavením z ní pak oddělit sířku. Není přesně znám původ olova, ale v době bronzové bylo známo jako volný kov v Malé Asii (3000 až 2000 př. n. l.), kde bylo nalezeno ve formě olověných kuliček. Ve starověkém Egyptě bylo Pb spojeno s padláním zlatých předmětů, zejména prstenů. Kromě toho s olovem pracovali i alchymisté, kteří zjistili, že olovo je jedovaté.^{8,9,10}

Tabulka I: Fyzikální a chemické vlastnosti olova

Chemická značka	Pb (<i>plumbum</i>)
Atomové číslo	82
Atomový poloměr	175 pm
Počet izotopů	4
Oxidační stupně	II, IV
Relativní atomová hmotnost	207,2
Elektronová konfigurace	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ² 6p ²
Skupenství	Pevné
Teplota tání	327 °C
Teplota varu	1751 °C
Elektronegativita	1,8
Hustota	11,34 g/cm ³

Olovo se může do ovzduší dostávat jak přirozeně, tak antropogenně. Přirozené emise olova jsou ve formě prachu, kouře a aerosolů močkové vody. Mimo to se Pb může také uvolňovat při lesních požárech. Jeho průměrná koncentrace v ovzduší se odhaduje na $5 \cdot 10^{-5} \mu\text{g}/\text{m}^3$. V dnešní době jsou antropogenní emise olova významnější a odhaduje se, že jsou 17,5× vyšší než zdroje přirozené. Hlavním antropogenním zdrojem jsou spalovací procesy (olovnatých benzínů a odpadů). K lokálnímu znečištění dochází i při těžbě a zpracování olova. V současné době dochází ke snížení emisí olova vstupujícího do atmosféry náhradou olovnatého benzínu bezolovnatým.^{7,11} Zdrojem olova ve vodách mohou být jak odpadní vody ze zpracování rud, tak i z barevné metalurgie, z výroby akumulátorů, ze skládkového prmyslu a z dešťové vody.⁷ Koncentrace olova v pitné a podzemní vodě se pohybují v rozmezí od 1 – 60 $\mu\text{g}/\text{l}$.¹¹ V dešťových vodách je obsah olova

poměrně malý, protože galenit PbS se od jiných sulfidických rud neliší biochemické a chemické oxidací. V případě, že jsou přítomné ještě další sulfidické rudy, vzniká jejich oxidací kyselina sírová, která pohybu olova zvyšuje. V domovních vodách je koncentrace olova pod 20 µg/l. Dalším zdrojem kontaminace může být koroze olověných částí vodovodního potrubí a pájené spoje některého potrubí. Tento zdroj ale nepředstavuje v našich podmínkách významný. Voda může být znečištěna také úniky ze špatně zabezpečených skládek a atmosférickou depozicí. Olovo je v zemské kůře zastoupeno řídce (průměrný obsah 12 – 16 mg/kg), ale je nejrozšířenější z těžkých kovů.

Mezi nejvýznamnější antropogenní emise olova patří:

- těžba a zpracování olova;
- výroba a zpracování akumulátorů;
- spalování odpadů;
- aplikace listírenských kalů a průmyslových kompostů do půdy

Olovo je v přirozených podmínkách přítomno ve všech rostlinách (běžný obsah je 2 - 3 mg/kg). Rostlina olovo přijímá pasivně a jeho příjem je ovlivován pH a teplotou. V rostlině je olovo nepohyblivé a pevně vázané. V malých koncentracích působí stimulačně, ve vyšších pak toxicky. Olovo může narušovat například metabolismus vápníku, inhibuje enzymatické systémy, snižuje příjem CO₂, působí na buněčné dělení a omezuje příjem vody. Pro člověka a živočichy je olovo toxické. Po vniknutí do organismu se kumuluje a ukládá zejména v kostech a v malém množství i v krvi a jeho vyloučení z těla je obtížné. Expozice olovem vede k poškození vnitřních orgánů (ledviny, játra, nervový systém, červené krvinky, cévy a svalstvo). Olovo může mít i mutagenní účinky.^{7,11}

2.1.2 Kadmium, cadmium (Cd)

V přírodě se kadmium vyskytuje ve formě sloučenin. Často doprovází zinek, někdy i olovo. Přírodní kadmium je směsí 8 izotopů, nejrozšířenější je ¹¹⁴Cd (28,72 %) a ¹¹²Cd (24,13 %). Nejdeležitější minerál kadmia je greenockit -CdS. Kadmium je stříbrolesklý měkký kov, který je za laboratorní teploty křehký a nad 150 °C je kujný a tažný.^{9,10} Patří se mezi neušlechtilé kovy a je rozpustný ve zředěných kyselinách, není však amfoterní a s hydroxidy nereaguje. Jeho fyzikální a chemické vlastnosti jsou

uvedeny v tabulce II. Kadmium se vyskytuje ve sloučeninách v oxidačním stupni II. Na vzduchu podléhá oxidaci a ztrácí lesk. Kadmium je toxický kov a jeho použití je tím omezené. Využívá se především na přípravu nízkotavitelných slitin (Wood v kov, Roset v kov) a je součástí alkalických akumulátorů.

Tabulka II: Fyzikální a chemické vlastnosti kadmia

Chemická značka	Cd (<i>cadmium</i>)
Atomové číslo	48
Atomový poloměr	161 pm
Počet izotopů	8
Oxidační stupně	II
Relativní atomová hmotnost	112,411
Elektronová konfigurace	[Kr] 4d ¹⁰ 5s ²
Skupenství	Pevné
Teplota tání	321,7 °C
Teplota varu	767 °C
Elektronegativita	1,69
Hustota	8,65 kg/dm ³

Pokadmiování se používá v leteckém a automobilovém průmyslu proti oxidaci kovových součástí. Kadmium a jeho slitiny s bórem dobře pohlcují neutrony a na základě toho se vyrábějí regulační tyče do jaderných reaktorů.¹⁰

Zpřirozených zdrojů kadmia zejména nejvíce převládají sopečné výbuchy. Emise kadmia do ovzduší způsobené ložiskem jsou cca 8 krát vyšší než přirozené emise. Dalším významným zdrojem kadmia je jeho těžba, výroba a zpracování, spalování fosilních paliv, komunálního a nemocničního odpadu.⁷

Kadmium má relativně vysokou tenzi par a v ovzduší jsou páry kadmia rychle oxidovány na oxid kademnatý. V tůňce jeho sloučenin je rozpustná ve vodě (např. síran, dusičnan kademnatý), ale sulfidy a oxidy se ve vodě nerozpouští. Maximální koncentrace kadmia v ovzduší dosahují hodnot: ve venkovských oblastech od 1 - 5 ng/m³, v městských 5 - 15 ng/m³ a v průmyslových oblastech 15 - 50 ng/m³.

Průměrný obsah kadmia v pitné vodě je poměrně nízký, leží mezi 0,1 - 2,0 µg/l. Koncentrace 5 µg/l jsou monitorovány jen zřídka a velmi vzácně jsou zaznamenány i hodnoty 10 µg/l. Studniční vody v některých oblastech mohou vykazovat v tůňce koncentraci kadmia.¹¹

V zemské kůře je kadmium vzácným prvkem a jeho průměrný obsah je mezi 0,1 - 0,5 mg/kg.

V půdě a horninovém prostředí se kadmium vyskytuje ve velmi malém množství. Do půdy se dostává zejména atmosférickou depozicí, hnojením fosfátovými hnojivami, které jsou znečištěny kadmii a znečištěním industriálních kalů na pole. Průměrný obsah kadmia v půdě je cca 0,2 – 1,5 mg/kg. Za posledních 150 let se obsah Cd v půdách zvýšil o 27 – 55 %. Kadmium se nejvíce kumuluje ve vrstvě 0 - 5 cm. Pohyb Cd v půdě je dán hodnotou pH, koncentrací Cl^- iontů, množstvím a obsahem jílovitých minerálů a kvalitou humusových látek aj.

Rostlina přijímá kadmium převážně jako Cd^{2+} buď z atmosféry nebo z půdy. Přijímání Cd z půdy převládá při jeho vysokém obsahu a při kyselém pH půdy. Rostliny jsou vůči kadmii různě citlivé. Toxicita kadmia se na rostlinách projevuje omezeným růstem, poškozením kořenů a červenohnědým zbarvením listů, které předchází tzv. chlorózu. Vegetativní části rostliny obsahují v tisíci násobku množství kadmia než je v plodech nebo semenech. Pro živočichy je kadmium vysoce toxické. Má negativní vliv na funkci ledvin, plic, jater a kardiovaskulárního systému. Podle klasifikace EPA je zařazen jako pravděpodobný lidský karcinogen. Kumulace v organismu je velmi vysoká a dochází tak ke hromadění kadmia v potravních řetězcích.⁷

2.2 P íjem toxického kovu rostlinami

Toxické t žké kovy jsou rostlinami p evážn p íjímány ko enem, ale existuje i mimoko enový p íjem z atmosféry prost ednictvím zne íšt ného povrchu listu. P íjem t žkého kovu závisí na koncentraci volného iontu M^{2+} . Difúze a hromadný p dní tok umož ůjí transport kovu až ke ko en m, v jejichž bezprost ední blízkosti pak dochází k chelataci. Chelatace je proces, p í n mž se n které organické slou eniny, vylu ované rostlinou, vážou na vícevazebné kationty, obvykle kovy.^{12,13}

Podstatou tolerance k t žkým kov m, které se kumulují v bu kách, je jejich inaktivace vazbou na nízkomolekulární bílkoviny, které mají vysoký obsah cysteinu. Takové látky pak ozna ujeme jako fytochelatiny viz. kapitola 2.4 nebo metalotioneiny, jejíž funkce je prozkoumána u lov ka a u zví at. Zmín né bílkoviny mají vyšší afinitu k t žkým kov m, zejména pak Cd, Pb a Cu. Agregací bílkovin s t žkými kovy pak mohou vznikat komplexy o molekulové hmotnosti cca 1000 – 10 000. Rostliny se mohou p ed toxickými kovy chránit omezením vstupu iontu do bun k, jejím hromad ním ve vakuole a omezením transportu do nadzemních orgán .^{14,15} Mechanismus p íjmu toxického kovu a vzniku fytochelatin do rostliny je popsán v kapitole 2.4.2 na obr. 7.

2.3 Struktura rostliny

2.3.1 Podzemní část rostlin

Kořen (radix)

Kořen představuje podzemní orgán rostliny, zpravidla je symetrický a roste geotropicky. Od stonku se odlišuje tím, že je ne lánkovaný, nevznikají na něm listy a je zvenčí chráněn epikou (kalyptra).¹⁶

Základní funkce kořenů jsou mechanické – upevňovací, absorpční, vodivé, metabolické a zásobní.¹⁶ Dnes si však můžeme představit kořen i jako centrum dusíkatého mechanismu rostliny a vzniku aminokyselin i alkaloidů, dusíkatých fytohormonů cytokininů, podnětující buněčného dělení.¹⁷ Mimo to slouží i k vegetativnímu rozmnožování. Z rostliny vyrůstá hlavní kořen a z něj pak kořeny postranní. Tento typ soustavy kořenů se nazývá alorhizie.¹⁶ Homorhizie (euryhomos – stejný, rhiza – kořen) je kořenový systém skládající se jen z adventivních kořenů. Někdy bývají označovány jako ploidné. U kořenů můžeme rozlišovat tři základní pletivové celky. Pokožku tzv. krycí pletivo, primární kůru (cortex) a střední válec. Tato pletiva z iniciálních buněk vzrostného vrcholu jsou chráněna kořenovou epikou.¹⁷

Stavba kořene: (obr. 1)

1. Vzrostný vrchol (apikální meristém): dochází v něm k intenzivnímu dělení buněk a je chráněn kořenovou epikou.
2. Pásmo prodloužování: dochází v něm k prodloužování již nedělicích se buněk a vzniká zde primární lýko (floém) a primární dřevina (xylém).
3. Pásmo absorpční: zde dochází k nasávání roztoků z půdy a vytváří se na pokožce kořene vlásky.
4. Pásmo vtvínání: zde se kořen vtvíná a pletiva jsou již trvale vyvinuta.

Pod pokožkou se dále nachází obvykle dosti silná vrstva primární kůry, skládající se ze tří vrstev, kterými jsou vnější exodermis (vnější vrstva kůry), prostřední mezodermis (složená z buněk s mezibuněčnými prostory) a vnitřní endodermis (obvykle jedna vrstva buněk se ztlustlými stěnami oddávající primární kůru od středního válce). Pod endodermis se nachází pericykl a pod ním střední válec. Sekundární stavba kořene

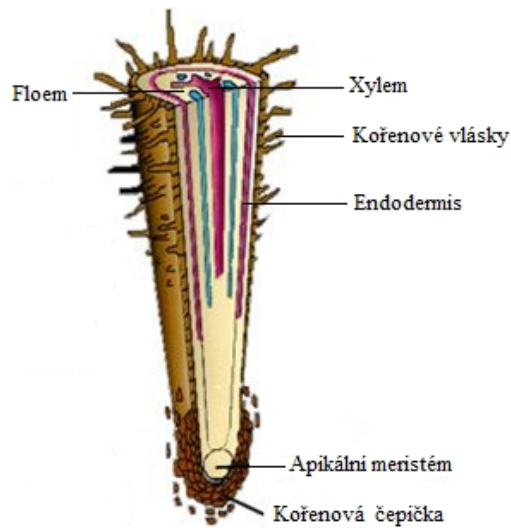
vzniká innoostí kambia u v tšiny nahosemenných a dvoud ložných rostlin, které tímto d sledkem mohou druhotn tloustnout. U jednod ložných rostlin ke druhotnému tloustnutí ko en nedochází (nevytvá í se v nich kambium).^{16,18}

Podle tvaru ko ene rozlišujeme:

1. Nitkovitý: tenký a pom rn dlouhý
2. Válcovitý: v celé své délce p ibližn stejn tlustý
3. Kuželovitý: protáhlý a postupn se zužuje
4. Srdcovitý: krátký a tlustý
5. epovitý: je krátký a dole náhle zúžený
6. Hliznatý
7. Ch dovité: plní opornou funkci ¹⁶

Podle funkce je d líme na:

1. Sací (ko enové vlásky): pro vst ebávání minerálních látek z vody a p dy
2. Zásobní: slouží k ukládání zásobních látek
3. Ko eny parazit a poloparazit
4. Ko eny vzdušné
5. Ko eny dýchací (upev ovací)
6. Ko eny ch dovité
7. Ko eny stahovací
8. Ko eny p í epivé
9. Ko eny sloupovité
10. Ko eny škrti
11. Ko eny symbiotické ¹⁸



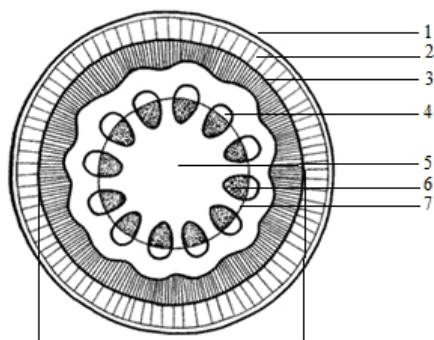
Obrázek 1: Stavba ko ene

2.3.2 Nadzemní část rostlin

Stonek (caulom)

Stonek je nadzemní část rostliny, která nese listy, úžlabní pupeny, květy a plody. Jeho hlavní funkcí je transport látek v rostlině (voda, minerální a organické látky) a umožňuje růst rostliny.¹⁹

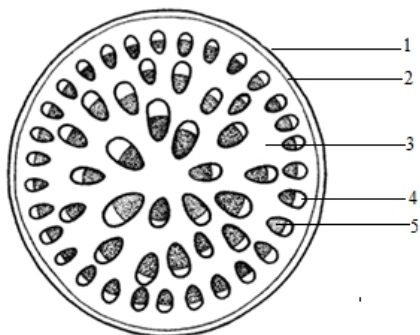
Povrch stonku je pokrytý pokožkou tzv. epidermis. Pod ní se nachází primární kůra – exodermis (cortex), která má ochrannou, mechanickou, zásobní a někdy i asimilační funkci. Vnitřní vrstva primární kůry je složena z buněk, které obsahují škrobová zrna a nazývá se škrobová pochva. Tato pochva ohraničuje stědní váleček a dělí vodivými pletivy, u dvouděložných rostlin jsou vodivá pletiva uspořádána v kruhu, u jednoděložných rostlin jsou roztroušená viz obr.2¹⁸⁻²⁰ Nadzemní část rostliny se nazývá prýtek. Rostliny s mnohými šavnatými stonky, které vznikají a zanikají v jednom roce, se nazývají byliny a jsou tvořeny lodyhou, stvolem a stéblem. Rostliny, které mají zdělené stonky, označujeme jako dřeviny. Dělí se na keře, polokeře a stromy.^{16,17,21}



8
dvouděložné rostliny

Pro dvouděložné rostliny²⁰

- 1 – pokožka
- 2 – primární kůra
- 3 – škrobová pochva
- 4 – floem (lýko)
- 5 – dřev
- 6 – xylem (dřev)
- 7 – kambium
- 8 – stědní váleček



jednoděložné rostliny

Pro jednoděložné rostliny

- 1 – pokožka
- 2 – parenchym nebo sklerenchym
- 3 – základní parenchym
- 4 – svazek cévní floem (lýko)
- 5 – svazek cévní xylem (dřev)

Obrázek 2: Příčný řez stonkem

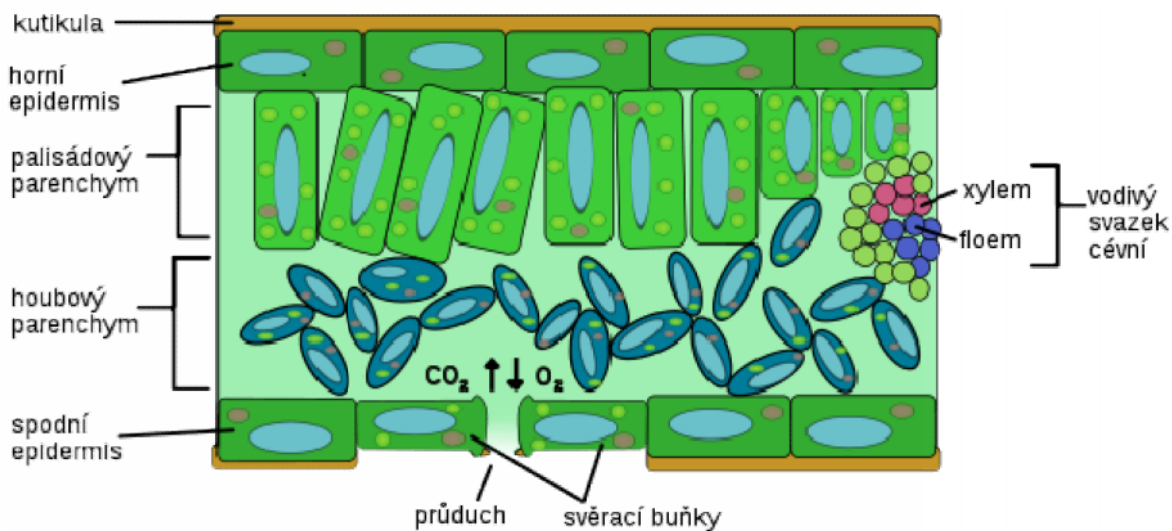
Podle tvaru na p í ném ezu rozlišujeme stonky - válcovitý, hranatý, rýhovaný, žebnatý, k ídlatý, žebrovitý a dvou ízný.

Podle orientace v prostoru d líme stonky na p ímé, vystoupavé, plazivé, poléhavé, ovíjivé a popínavé.¹⁶

List (fylom)

List je postranní orgán a vyr stá ze stonku, je v tšinou plochý, roz len ý na plochou epel a stopkovitý apík. M že být i bez apíkatý tzv. p ísedlý. N kdy m že jeho spodní ást vytvá et pochvu (v tšinou u trav). Prvními listy, které jsou vyvinuty už v semenu, jsou d lohy. Listy vyr stají v uzlinách a jsou na stonku charakteristicky uspo ádány. Pokud je v uzlin ě jeden list, nazýváme uspo ádání jako st ídavé, jsou-li v uzlinách listy po dvou, pak je ozna ujeme jako vst ícné. Jestliže z uzliny vyr stá více list ě, jedná se o postavení p íeslenité. Hlavní fukcí list ě je fotosyntéza. Podílejí se ale také na transpiraci vody a vým n ě plyn ě.^{17,21,22}

P í ný ez listem a jeho vnit ní stavba je popsána na obr. 3.



Obrázek 3: Vnit ní stavba listu - p í ný ez

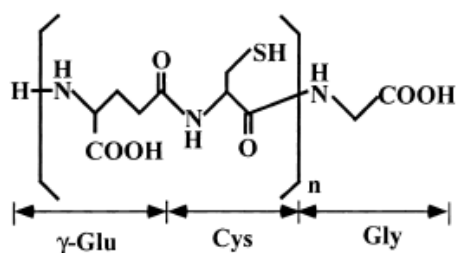
2.4 Fytochelatiny (phytochelatins) PCs

V roce 1985 byly rostlinné látky o složení iontů těžkého kovu-peptidy izolovány z buněčné suspenze vyšších rostlin při expozici kadmíem a byly označeny jako fytochelatiny PCs. Původní název pro fytochelatiny měl být ale cadystin, jak uvedl ve své studii (Kondo *et al.*, 1985)²³ a měl vyjadřovat jak přítomnost kadmia, tak cysteinu. Nicméně nakonec se od toho názvu ustoupilo, protože vznik těchto látek není omezen pouze na jeden těžký kov. Poprvé byly nalezeny v kvasince *Schizosaccharomyces pombe*,^{24,25} dále potom i v jiných kvasinkách a houbách.

Výzkum dále dokázal, že fytochelatiny jsou látky, které hrají důležitou roli při detoxikaci těžkých kovů a už toxických, esenciálních nebo neesenciálních např. (Cu, Pb, Zn, Cd, Ni, Hg, atd.). Každý má své specifické PCs v rozdílném množství, to je dáno toxicitou kovu a druhem rostliny.^{24,26,27} Ve své studii Grill *et al.* 1985 seskupil ionty těžkých kovů podle jejich síly k vytvoření fytochelatinů, což bylo prokázáno na *R. serpentina* buněčných kulturách: $Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Sb^{3+} > Ag^+ > Hg^{2+} > As^{5+} > Cu^+ > Sn^{2+} > Au^{3+} > Bi^{3+}$.²⁸ Kadmiové ionty jsou nejsilnější induktory tvorby fytochelatinů, Zn vyšel jako třetí nejsilnější induktor PCs a další kovy jako Ni, Te, W a Se fytochelatiny neaktivují.²⁹ Kinetika vzniku fytochelatinů byla sledována na experimentu s buněčnou suspenzí *Rauwolfie*. Bylo zjištěno, že po předávkě $Cd(NO_3)_2$ se rychle snížil obsah glutathionu, což souvisí se strukturou fytochelatinů, která je popsána níže. Obvykle vznik fytochelatinů nastává s jistým zpožděním cca 1-3 hodiny.²⁹

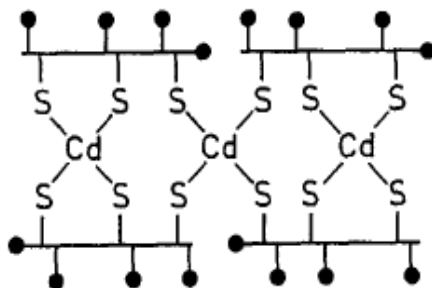
2.4.1 Struktura fytochelatinů PCs

Chemická struktura fytochelatinů naznačuje úzkou podobnost ke glutathionu (GSH), který je popsán v kapitole 2.4.1.1. PCs se skládají z $-(Glu-Cys)_n$, která se opakuje $n = 2-11\times$, nejčastěji však $2-5\times$ (obr. 4). Tato repetice bývá zakončena jednou molekulou aminokyseliny nejčastěji Gly, může být však zakončena i jinými aminokyselinami: -Alanin (homofytochelatin), Serin (hydroxymethyl-fytochelatin), Glutamová kyselina (iso-fytochelatin) anebo nemusí být zakončena vůbec (desglycin-fytochelatin).^{3,24,28}



Obrázek 4: Chemická struktura fytochelatínu, kde n je $2-11\times$, (celá tato struktura bez opakování je potom glutathion)³⁴

Fytochelatiny jsou neribozomálně enzymaticky syntetizovány z GSH, v přítomnosti iontu těžkého kovu⁶ za vzniku komplexu fytochelatin-ion kovu (PC-M) (obr. 5), které jsou vzájemně vázány přes $-NH-$ skupinu, a proto fytochelatiny můžeme adit mezi peptidy.⁷



Obrázek 5: Známkovaný strukturní vzorec komplexu $[Cd_3(PC_3)_4]^{26}$

Struktura komplexu se skládá ze čtyř molekul $(-\text{Glu-Cys})_3\text{-Gly}$, které prostřednictvím dvanácti SH skupin se vážou na tři atomy kadmia (\bullet značí karboxylové skupiny).²⁶

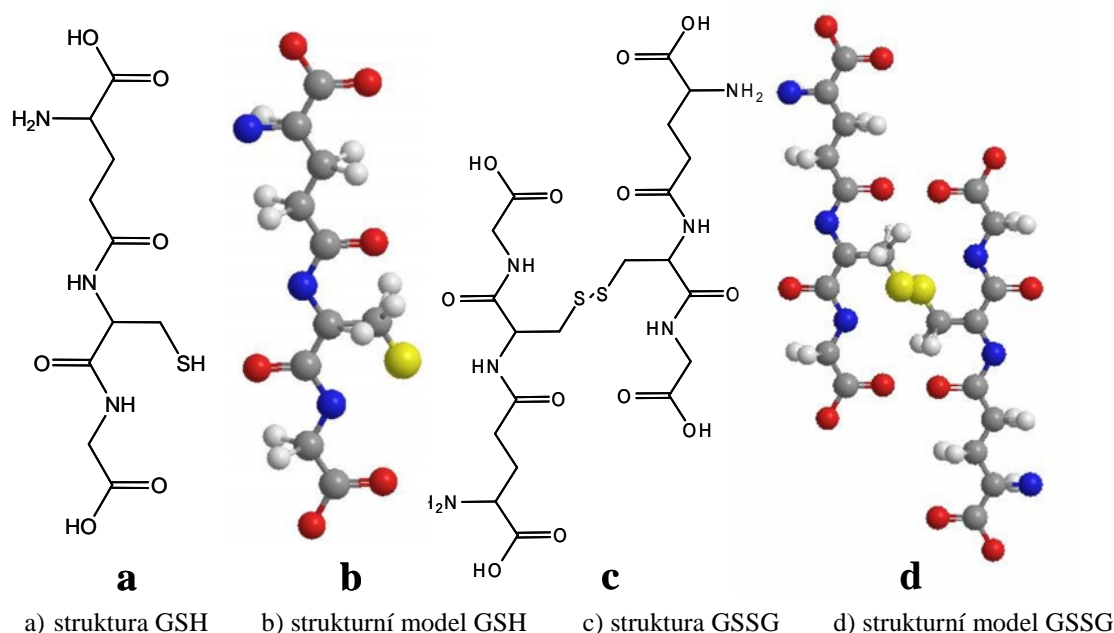
2.4.1.1 Glutathion

Glutathion (GSH) je základní stavební jednotka tzv. substrát pro vznik PCs. Jeho základem je tripeptid složený z glutamátu, cysteinu a glycinu ($-\text{Glu-Cys-Gly}$) viz obr. 6, který obsahuje γ -peptidické vazby mezi glutamátem a cysteinem. GSH je málo náchylný na oxidaci oproti cysteinu a γ -glutamylcysteinu. GSH můžeme najít u většiny savců a ve většině prokaryotických buněk. Intracelulárně se GSH můžeme nacházet v redukované

form nebo v oxidované jako disulfid glutathionu GSSG. Ob formy glutathionu bývají ve zájemném pom ru, jehož narušení m že indikovat stres vyvolaný r znými stresovými faktory, jako je nap . opadávání list , zakrn lost rostliny, rostlina neplodí apod. ^{4,24,30} GSH slouží jako koenzym pro p enos aminokyselin. GSH obecn chrání organismus p ed oxida ním poškozením, zp sobeným reaktivními kyslíkovými radikály (ROS),³¹ které jsou produkovány v souvislosti s biotickým abiotickým stresem.²⁴ GSH je obnovován reakcí katalyzovanou glutathion reduktasou.

Syntéza GSH je katalyzována dv ma ATP závislých na enzymu -glutamylcystein syntetázy (GSH1) a glutathion syntetázy (GSH2). GSH je substrátem pro vznik fytochelatin syntetázy a má taktěž zásadní vliv na detoxikaci t žkých kov .³²

Za p ítomnosti t žkého kovu je aktivován enzym fytochelatin syntetáza PCS, který se skládá z -glutamyl-cystein-dipeptidyl transpeptidázy.^{26,33}

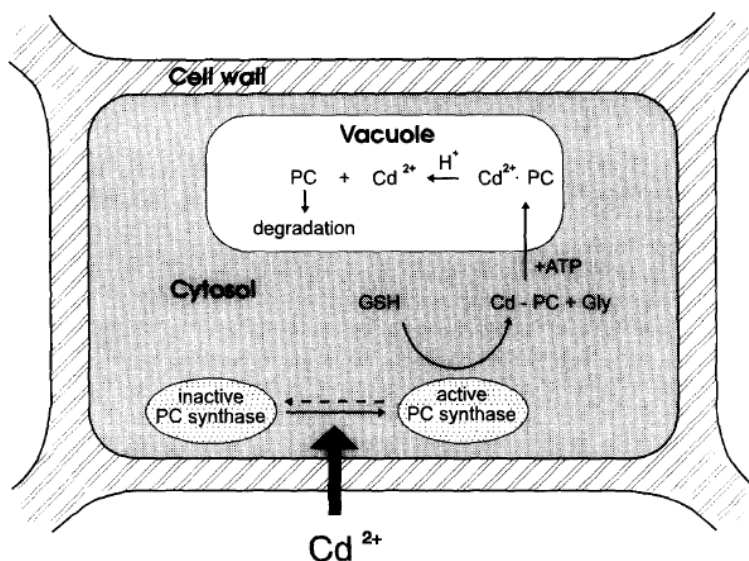


Obrázek 6 : Struktura glutathionu²⁴

2.4.2 Biosytéza fytochelatin

Biosyntéza fytochelatin byla nejlépe prostudována na rostlin *Arabidopsis thaliana*, která byla vystavena Cd^{2+} iont m.³⁴ Dále také v hrachu³⁵, raj atech³⁶, fazolích³⁷ a dalších. V p ítomnosti iont toxických kov se za nou vytvá et komplexy ion kovů-fytochelatin M-PC. Biosyntéza fytochelatin je katalyzována fytochelatin syntázou (dipeptidyltranspeptidáza), což je enzym, který pot ebuje ke své aktivaci t žké kovy jako

vyvolávající stresové faktory. V této studii bylo prokázáno, že kadmium je nejvýznamnější induktor tohoto enzymu, zatímco ostatní kovy indukují syntézu fytochelatinu méně.²⁶



Obrázek 7: Mechanismus vzniku fytochelatinu²⁶

Na obr. 7 je znázorněno schéma detoxikačního mechanismu iontu těžkého kovu v rostlinné buňce. Ionty jsou do buňky přeneseny pomocí membránových transportérů. V cytosolu jsou ionty kovů chelátovány ligandem GSH, kdy vzniká komplex GS_2-M (bisglutathionato – M komplex). GS_2-M pak aktivuje enzym fytochelatin syntetázu (PCS) a tím se zahajuje syntéza fytochelatinu (PCs), které tvoří s kovem nízkomolekulární komplexy (LMW). Ty jsou za spotřeby energie získané z ATP přeneseny pomocí přenašeče do vakuoly. Ve vakuole dochází ke shlukování jednotlivých LMW komplexů inkorporací s redukovanou sírou (S^{2-}) do většího celku, který se nazývá vysokomolekulární komplex (HMW). Dosavadní výsledky upozorují na to, že se kov dostává z vakuoly zpět do cytosolu, ale tento mechanismus nebyl dosud objasněn.^{6,24,26}

2.4.3 Extrakce a analýza fytochelatinu

Fytochelatiny mohou být stanoveny různými moderními instrumentálními metodami. Stanovení jednoduchých fytochelatinů se může provádět například pomocí elektrochemických metod. Konkrétně pro stanovení synteticky připravených PC2 a PC3

byly využito voltametrické metody. Jednotlivé fytochelatiny byly zkoumány pomocí nového typu měřené pevné amalgámové elektrody. Identifikace se prováděla na základě vzniku komplexu s mědí v pufru o pH 8,1 a vhodná koncentrace fytochelatin byla v rozmezí 10 – 100 nmol/l. Reprodukovatelnost použitého elektrochemického měření povrchu elektrody byla statisticky hodnocena. Analýzou bylo dosaženo limitu detekce ($2,1 - 2,6 \cdot 10^{-9}$ mol/l pro DCV měření), na základě čehož byla tato metoda doporučena pro stanovení fytochelatinů v reálných vzorcích.³⁹ Fytochelatiny byly analyzovány také v tabáku, který byl vystaven kadmii. Extrakce se prováděla pomocí roztoku složeného ze směsi NaCl, KCl, Na₂PO₄ s pH okolo 7,4; následovala homogenizace směsi a centrifugace. Detekce vzniklých PCs se prováděla pomocí rtuťové elektrody.⁴⁰ V této studii se autoři také zabývali voltametrickou analýzou glutathionu, fytochelatinů a jejich komplexů v přítomnosti kadmia.⁴¹

Další metodou pro analýzu PCs v mořských řasách z jihozápadní Asie je spojení LC/MS. Vzorky kontaminovaných čerstvých mořských řas byly očištěny ultra-čistou vodou, zmrazeny při T -20 °C a lyofilizovány po dobu 24 hod. Zmražené lyofilizované vzorky (čerstvé hmotnosti) byly zpracovány v mikrovlnné troubě s konc. HNO₃ po dobu 30 minut a poté byly zředěny ultra-čistou vodou. Po expozici těžkým kovem byly velké proteiny v extraktu řas identifikovány a kvantifikovány pomocí HPLC a molekulární struktury z PCs byly potvrzeny pomocí LC/ESI-MS. Koncentrace těžkého kovu nashromážděného v mořských řasách byla stanovena pomocí ICP-MS. Nejvyšší koncentrace kovu v hnědých a červených mořských řasách byla mezi 5,6 – 7,1 μmol/g, fytochelatin 200 – 400 nmol/g a GSH 1550 – 3960 nmol/g. Nejdelší délka let zce byla PC2 – 4 na nejvíce kontaminovaném místě. Porovnáním výsledků reálných vzorků a experimentálních výsledků kontaminovaných řas v laboratorních podmínkách se dokázalo, že výsledky řas vystavených expozici těžkému kovu v laboratorních podmínkách v porovnání s řasami v přírodních podmínkách jsou různé. V tomto způsobu identifikace byla využita již uvedená separační technika.⁴²

Pro analýzu fytochelatinů, těžkých kovů a jejich komplexů byly použity koeny a výhonky brukvovitých rostlin. Tyto rostlinné části byly nejprve zmrazeny v kapalném dusíku a následně lyofilizovány a pak zhomogenizovány v tefalí misce, aby se rozbily buněčné stěny. Vzorky byly postupně extrahovány v roztoku octanu amonného a následně centrifugovány. Vznilý supernatant se oddělil, přefiltroval se přes mikrofiltr a

z edil se s mobilní fází v poměru 1:15 (v/v). Extrakty rostlin byly analyzovány pomocí gelové kapalinové chromatografie a ion-párové chromatografie ve spojení s UV a ICP-MS pro monitorování síry a těžkého kovu. Identifikace jednotlivých separovaných druhů byla sledována pomocí MALDI-TOF. V rostlinných materiálech, exponovaných těžkému kovu, byl zaznamenán vznik fytochelatinové formy PC3 a na základě tohoto byly analyzované rostliny doporučeny pro studium fytořemediace. Po expozici rostlin těžkým kovem (Pb^{2+}) o koncentraci 1 mM byla zjištěna hodnota $0,20 \pm 0,09$ mg Pb/g sušiny. Při analýze byla použita vlnová délka o velikosti 254 nm, značné zvýšení píku, při kontaktu s 1 mM Pb bylo pozorováno okolo dvacáté minuty. Vzniklé komplexy PC-kovů byly aniontové povahy (silně hydrofilní). Pracovalo se v reverzní fázi a mobilní fáze byla okyselená trifluoroctovou kyselinou nebo kyselinou mravenčí, které patří mezi typické kyseliny používané v mobilní fázi pro separaci na reverzních fázích. Je známo, že komplexy PC-kovů jsou při nižším pH nestabilní a rozpadají se.⁴³

Pro stanovení glutathionu a fytochelatinů v semenech *V. Faba* byla použita metoda HPLC-ESI-MS. V této studii byly rostlinné části (listy, kořeny) zamrazeny v tekutém dusíku a zhomogenizovány v této misce s vodným roztokem dithiothretolu DTT. Následně byla suspenze sonifikována, centrifugována, po dekantaci bylo rostlinné pletivo resuspendováno do studeného roztoku DTT. Potom se oba supernatanty spojily a byly lyofilizovány. Suché vzorky byly skladovány při -80 °C a přímo před analýzou se rozpustily ve vodném roztoku NaOH. Pro srážení balastních bílovin se přidala HCl (inkubace se prováděla na ledu) a supernatant byl zfiltrován. Při optimalizaci jejich pracovních podmínek byl zjištěn limit kvantifikace $0,2$ μ mol/kg pro glutathion i fytochelatin. Mimo to bylo dokázáno, že po přidání DTT, jako redukčního činidla, se dá odhalit podstatně více volných PCů a GSH než bez přidání DTT, protože většina jich je vázána v komplexu s těžkými kovy.⁴⁴

Vznik fytochelatinů také identifikován pomocí HPLC-ESI-MS, konkrétně hPCs (homo-fytochelatin) a PC2 a PC3 v sóji (*Glycin max*) a lupině bílé (*Lupinus albus*) exponované Cd a As. Ke kontaminaci byl použit roztok kadmia a arsenu a testované části rostlin byly kořínky, stonek a listy. Pro kvantifikaci GSH, hGSH, PCů a hPCs pomocí HPLC byly rostlinné tkáně zhomogenizovány s HCl (1 ml/1 g tkáně). Po homogenizaci se nechal vzorek nainkubovat na ledu. Vysrážené makromolekuly byly odstraněny odstředěním v centrifuzě. Do extraktu byl přidán N-acetyl-Cys a směs se zfiltrovala přes mikrofiltr. Po filtraci následovala analýza pomocí HPLC s použitím

derivatiza ního Ellmanova indikátoru (DTNB; 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoová kyselina). Ve výsledku klíčky sóji kontaminované kadmíem ukazovaly v tšii vznik homoglutathionu v porovnání s lupinou bílou. Vyšší úroveň homo-fytochelatinů byly vidět u sóji s Cd, ve srovnání PCs s lupinou bílou. Mimo to detoxika ní metabolismus vzniku hPCs u rostlin exponovaných arsenem byl jasnější a vykazoval vyšší obsah thiolových sloučenin u sóji než u lupiny.⁴⁵

Další výzkum fytochelatinů byl proveden na Hrachu setém (*pisum sativum*), který byl vystaven expozici kadmíatým a olovnatým iontům a smísi Pb+Cd. Zmražený vzorek byl zhomogenizován s 5 % kyselinou sulfosalicylovou. Homogenát se dvakrát odstředil. Oddělil se supernatant a přefiltroval se přes mikrofiltr. K udržení podmínek, aby nedošlo k oxidaci -SH skupiny a rozkladu komplexu těžkých kovů s fytochelatinem, byla kolona po každém před dávkováním vzorku promyta merkaptoethanolem. Vlastní analýza byla prováděna pomocí ICP-MS pro stanovení těžkých kovů a HPLC/ESI-MS bylo použito k identifikaci fytochelatinů pomocí sériové fragmentace. Ve výsledném spektru byly identifikovány kromě PC2, PC3 a PC4 také hPC2, hPC3, PC2-Glu a PC3-Glu. Při expozici u rostlin vystavených Cd byly pozorovány intenzivnější signály pro PC3 a PC4, zatímco u rostlin s olovem jen PC2.⁴⁶

2.5 Hrách setý (*pisum sativum*)

Jako mnoho vřivovitých rostlin je hrách prastarou kulturní rostlinou. Nejstarší záznamy pocházejí z evropských a stredoziemních vykopávek v období kolem 7000 let p. n. l. Ímané a ekové p stovali a jedli hrách a práv o ímanech se tvrdí, že ho p inesli do Británie.

U nás se hrách p echodn vyskytuje a zpla uje krom polí a zahrádek i rumišť a skládky. Hrách je jednoletá bylina s p ímou a vystoupavou i popínavou lodyhou, s výškou 30–120 cm, je dutá, sivá nebo žlutozelená. Listy mají 1–3 páry lístk a jsou zakon ené v tvenou úponkou, palisty bývají velké, srd íté a objímavé, dlouhé cca 3–7 cm, n kdy s ervenými skvrnami. Vej íté lístky jsou p isedlé i krátce apí katé, dlouhé 1,5–6 cm a široké 1–3,5 cm. Kv ty jsou bílé namodralé nebo nar žov lé bez v n , kalich je zvonkovitý a lysý. Plodem jsou lusky se 3–10 semeny. Doba vegetace je mezi ervnem a srpnem.

Odr dy hrachu se rozd lují podle doby zralosti na rané, polorané a hlavní. Ran jší odr dy jsou nižší než pozdní, které díky vyššímu vzr stu poskytují v tší výnosy. Nezralé lusky se využívají jako zelenina a zralá semena jsou oblíbenou a hojn využívanou lušt ninou. Hrách se m že využívat i na kompostování jako zelené hnojení. Semena hrachu se vysévají 5 cm od sebe do jednotlivých ádk 2,5–5 cm hlubokých. Hrách je chladnomilná rostlina, která nejlépe roste p i teplot mezi 13–18 °C. Rostliny nemají rády sucho, p íliš vysoké teploty a podmá ení. P stuje se na p dách s pH okolo 5,5–7,0.^{47, 48}

2.6 Oves nahý (*avena nuda*)

Oves je jednou z nejmladších obilnin. V domě se pěstuje asi 300 let a zahrnuje asi 70 druhů rozšířených po celém světě. Nejrozšířenějším druhem je oves setý, který zabírá 90 % osevních ploch na světě, druhý je oves nahý. Oves, jako takový, má mohutnou kořenovou soustavu s velkou osvojovací schopností. Květenství je formou laty, která je složená z větvek vystupujících ve 4-6 přeslenech a nese 2-4 květní klásky, které jsou bezosinné nebo mají jen jednu osinu. Stéblo ovesa roste do výšky 60-150 cm. Tato obilnina je méně náročná na teplo, je odolná proti chladu, avšak je náročná na vláhu.^{49,50}

Obilky ovesa mají vysokou nutriční hodnotu, která je daná vysokým obsahem bílkovin a tuku, převyšující ostatní obilné druhy. Oves je vhodným krmivem pro mladá, nemocná i vysoce výkonná zvířata. Značný význam má i pro lidskou výživu, protože velmi příznivě působí na tělesnou kondici i nervovou soustavu. Jeho použití v potravinářství vzhledem k jeho vlastnostem neustále stoupá.⁴⁹ Oves se k nám dostal z území mezi černým a Kaspickým mořem a k nám se převodně dostal jako plevelná rostlina. V současné době se pěstuje na severní polokouli v mírně vlhkém a chladnějším podnebí střední a severní Evropy, střední a severní Asie a v Severní Americe.⁵⁰

2.7 Principy použitých analytických metod

2.7.1 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je analytická metoda, která se řadí mezi separační techniky. Jako taková byla objevena již v roce 1903 ruským botanikem M.S. Cvetem v uspořádání kapalina-sorbent. Ten jako první rozdělil na sloupci sorbentu listová barviva. Mimo klasickou rozdělovací chromatografii se po útlumu 40. let začala rozvíjet i kolonová kapalinová chromatografie a v roce 1952 byla udělena Nobelova cena autorům Synge a Martin za práci v oboru chromatografie.⁵¹

Separací proces spoívá v dělení látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) na základě chemických interakcí například rozpouštění, adsorpce, iontová výměna apod. Složky směsi, unášené mobilní fází, se pohybují po stacionární fázi s různou rychlostí, protože jsou vzájemnými interakcemi se

stacionární fázi méně i více zpomalovány, což závisí na jejich hodnotě distribuční (rozložovací) konstanty. Látky, které interagují se stacionární fází silněji, se pohybují pomaleji oproti látkám, jejichž interakce jsou slabší. Pokud je dráha, kterou složky urazí dostatečně dlouhá a hodnoty distribuční konstanty dostatečně rozdílné, dochází k rozdělení směsi látek na jednotlivé zóny, na základě kterých je možné je detekovat.^{52,53}

Stacionární fáze může být umístěna na plošně nebo ve sloupci. Plošné uspořádání bývá používáno pro papírovou chromatografii (PC), tenkovrstevnou chromatografii (TLC) nebo vysokouinnou TLC (HP-TLC). Tenkovrstevná chromatografie a HP-TLC se liší zrnitím (velikostí částic) stacionární fáze, u HP-TLC se používá sorbent s menším průměrem částic, což vede k lepšímu rozlišení. V kolonovém uspořádání bývá stacionární fáze umístěna v trubici z inertního materiálu o určitém průměru. Toto uspořádání představuje základ klasické kolonové chromatografie, která se používá pro analytické a preparativní účely.⁵⁴

2.7.1.1 Vysokouinná a ultraúinná kapalinová chromatografie

Vysokouinná kapalinová chromatografie (HPLC) se vyvinula z plynové chromatografie poátkem 70. Let. řadí se mezi moderní separační techniky a je používána pro kvalitativní i kvantitativní analýzu zejména organických sloučenin. Pomocí ní je možné analyzovat ionty, látky polárního a nepolárního charakteru, tukové a tepelně labilní látky a vysokomolekulární látky v různých matricích. V tomto systému bývají látky rozděleny na základě ustanovení určitých typů rovnováh a opouštějí separační lože v různých tzv. retenčních časech, které jsou charakteristické pro daný typ látky a umožňují tak jejich detekci.⁵⁵

HPLC je chromatografie s velmi malými částicemi sorbentu o velikosti až 3 - 15 μm , která odolává tlakům od 30 - 60 MPa. Postupem vývoje je možné ve spojení s HPLC použít mnoha univerzálních a nových selektivních detektorů, například ze spektrálních UV-Vis, DAD, fluorescenční, refraktometrický, elektrochemické detektory (polarografie) hmotnostní spektrometrie atd.⁵⁶

Mezi nejmodernější kapalinové separační techniky v současnosti patří UPLC ultraúinná kapalinová chromatografie s velmi malými částicemi pod 2 μm , pracující za vysokých tlaků (15000 PSI, 1000 bar, 100 MPa). Tato separační technika byla založena

v roce 1997 *Jorgensonem et al.*⁵⁷ Zachovává praktičnost a zásady HPLC a zároveň zvyšuje vzájemné atributy rychlosti, citlivosti, selektivity a účinnosti. Rychlost umožňuje v tší po et analýz v krátkém čase a nižší spotřebu použitého rozpouštědla.⁵⁸ Tato metoda využívá mimo jiné specifické sorbenty připravené patentovanou technologií „bridged hybrid particle“, které jsou velmi účinné a mechanicky odolné díky ethylenovým mostkům v silikagelu“⁵⁷

2.7.2 Součásti chromatografu

Moderní kapalinový chromatograf se poměrně liší od „jednoduchého“ chromatografického zařízení používaného v klasické kapalinové kolonové chromatografii.

Chromatograf (obr. 8) bývá složen ze zásobníku kapalné fáze tzv. mobilní fáze MF (pohyblivá). Zásobník může být jen jeden nebo může být složen z několika zásobníků MF. Zásobník je nádoba nejčastěji ze skla.

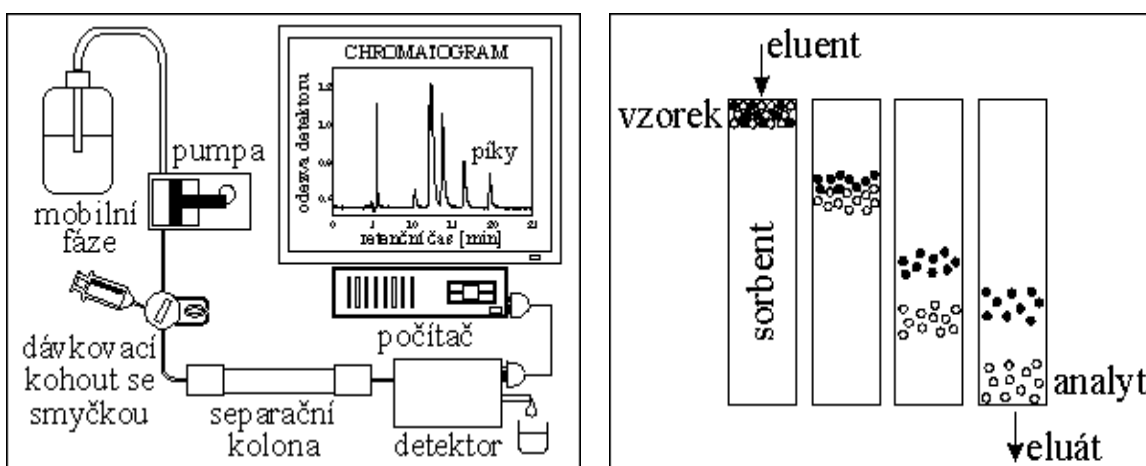
Za zásobníkem MF je vysokotlaké čerpadlo, které může být sestaveno buď pro nízkotlaký gradient anebo vysokotlaký gradient. Dále měřidlo pro měření pracovního tlaku, filtr, tlumič pulsu, mixér (prostor pro smíchování mobilních fází), odplynovač, zařízení pro dávkování vzorku (čtyřcestný nebo šesticestný ventil), chromatografická kolona, termostátovaná skříň (pro lepší reprodukovatelnost a selektivitu), detektor, zapisovač a zařízení pro zpracování dat. Mimo to se mohou použít i další doplňková zařízení například ochranné filtry, předkolonky, ventily pro přepojování několika kolon za sebou nebo separace. Dále se dá použít sériového spojení dvou nebo více detektorů.^{52,54}

Vysokotlaká čerpadla MF jsou v HPLC nutnou součástí, protože kolona může působit odporovým tlakem až 400 bar. Na základě nich si můžeme podstatně zkrátit dobu analýzy vhodně zvoleným průtokem MF a usnadnit si tak celé měření. Rozlišujeme několik čerpadel na základě hnací síly. Zdrojem hnací síly u pneumatických čerpadel bývá stlačený plyn (N₂), který se zavádí nad hladinu stlačené kapaliny nebo nepřímo přes píst. Moderní mechanická čerpadla pracují na principu elektronicky řízeného pístu. Rozlišujeme dva typy: velkoobjemová injekční stříkačka s velkým objemem inžeriáři a mechanická pístová čerpadla s malým objemem inžeriáři. Výhodou velkoobjemového

erpadla je nap . bezpulzní pr tok kapaliny s konstatním tlakem, výhodou maloobjemového je pak kompatibilita s nízkotlakým gradientem.^{54,55,57}

V HPLC rozlišujeme t i typy dávkovacího za ízení: *p ímý nást ik injek ní st íka kou* na vrstvu sorbentu v kolon , dávkování vzorku *dávkovacím ventilem se smy kou*, *dávkování vzork automatickými dávkova i*, které umožní automaticky dávkovat sérii vzork bez obsluhy p ístroje. Toto dávkování je vhodné p edevším pro rutinní sériové analýzy ady vzork .⁵⁴

Chromatografická kolona je místo, kde dochází k vlastnímu separa nímu procesu. Kolona je z inertního materiálu o ur itém pr m ru (50 – 0,005 mm), délky (500 – 10 000 mm) a bývá napln na ásticemi r zné velikosti (3 – 100 µm) a materiálu. Dnes se však pro analytické aplikace nej ast ji používá kolona s ásticemi o velikosti 3 – 10 µm s délkou 5 – 30 cm a vnit ím pr m rem 2 – 4 mm. Rozlišujeme n kolik typ ástic: klasický typ pórovité nápln , pelikulární nápl s filmem polymérní stacionární fáze, nápl s kontrolovanou povrchovou pórovitostí a mikropartikulární pórovitá nápl . Parametry kolony ovliv uje i typ separace. Nej ast ji používáme analytické separace, ale i semipreparativní a preparativní separace.⁵⁴ Z kolony je pak eluát veden do detektoru. Signál detektoru je sledován po íta em nebo n kterým jiným vyhodnocovacím za ízením (integrátor, zapisova).⁵⁹



Obrázek 8: Základní ásti kapalinového chromatografu a separace látek na kolon

2.7.3 Volba separačního systému

Jedním ze základních kritérií pro volbu separačního systému je zejména molekulová hmotnost analyzovaných látek. Důležitá je rozpustnost analytu ve vodě nebo organickém rozpouštědle. Na základě toho volíme kombinaci materiálu stacionární fáze (SF) a rozpouštědla v mobilní fázi (MF).

Nejjednodušším systémem je separace na tzv. *normálních fázích (NP)*, kdy stacionární fáze je polárního charakteru a mobilní fáze je nepolární. Jako SF volíme v tomto systému nejčastěji silikagel a jako MF například hexan nebo heptan s polárním modifikátorem (například isopropyl alkohol, propanol). Vzhledem k tomu, že principem této separace je adsorpce analytu na povrch stacionární fáze, která je polární, retence analyzovaných látek závislá v pořadí od nepolárních k polárním. Polární látky se tak zadrží na koloně delší dobu a později z ní vycházejí. Definovaná vzájemná poloha adsorpčních center umožňuje i dělení polohových izomerů. V takovéto kombinaci chromatografického systému je nutná nepřítomnost vody v mobilní fázi. Již stopová množství vody mohou interagovat s povrchem stacionární fáze a zkreslovat tak výsledky analýzy.^{52,53,60}

Dalším a asi nepoužívanějším systémem je systém na tzv. *reverzních fázích (RF)*, kdy stacionární fáze je tvořena z nepolárního materiálu a mobilní fáze z polárního rozpouštědla. RF je podrobněji popsána v kapitole 2.7.4.

Princip *iontové výměnné chromatografie (EIC)* je interakce analyzovaných látek s mionitami, při níž rozhodující úlohu má náboj a velikost iontu, jeho koncentrace, iontová síla, relativní permitivita prostředí, disociační konstanta ionogenních skupin mionitu a analytu a pH rozpouštědla mobilní fáze. Mimo to se uplatňuje i difúze mionitů, mohou se uplatňovat i adsorpční síly i hydrofóbní interakce. Separací proces si můžeme představit jako výměnu iontů analogicky, jak v ní dochází v krystalové mřížce, kdy se uvolní ion ze SF do mobilní fáze a jeho místo je obsazeno iontem jiným, přítomným v MF. Povrch stacionární fáze je pokryt chemicky vázanými mionity tzv. ionexy. Pokud máme analyt kationtové povahy, používá se katex například SO_3^- skupiny (silný katex) nebo COO^- skupiny (slabý katex) a analogicky, pokud je analyt aniontové povahy, použijeme anek například NR_3^+ soli (silný anek) nebo NH_3^+ soli (slabé aneky).⁵³

Afinní chromatografie využívá vysoce specifických interakcí (interakce v biologických systémech enzym-substrát) a biologických schopností látek specificky a

reverzibilně vázat látky jiné. Jako stacionární fáze se používají nosiče s kovalentně navázaným ligandem tzv. afinantem. Do kolony, která obsahuje stacionární fázi s příslušným ligandem se nastříkne vzorek, z něhož se pouze látky s komplementární vazbou navážou na ligand a zbytek projde kolonou a eluuje se v mrtvém prostoru. Následně změnou pH, teploty, koncentrace solí a disociačními činidly, se uvolní navázané analyty z vazby na ligand.⁵⁴

Gelová permeační chromatografie (GPC) je speciálním druhem kolonové kapalinové chromatografie a je aplikována především ke stanovení molekulových hmotností a k analýze oligomerních sloučenin. Separace je závislá na velikosti molekul analyzovaných látek a téměř vůbec není závislá na jejich chemické povaze. Jako stacionární fáze je v tomto systému použit gel o definované velikosti a distribuci pórů. Velké částice tedy kolonou projdou rychleji než částice menší. Malé částice se déle zdrží v pórech SF, velké se do póru nevlezou, proto podstatně rychleji vyeluují ven. GPC může být využita v oblasti separace proteinů a dalších makromolekul.⁵⁴

V *HILIC hydrofilní interakční chromatografii* je kolona naplněna nemodifikovaným silikagelem a jako mobilní fáze je použita voda:acetonitril v poměru (60:40 – 95:5). V tomto separačním složení se cíleně do mobilní fáze přidává voda v řádu jednotek až desítek procent. Voda způsobí, že se při separaci na povrchu polární stacionární fáze vytvoří vrstva reprodukovatelného vodného filmu a analyt se rozdělí mezi mobilní fázi (organické rozpouštědlo a voda) a vodní film na povrchu. Rozpouštědla používaná v HILIC jsou stejná jako v systému RP-HPLC. Látky polárního charakteru jsou v tomto módu zadržovány silněji než látky nepolární.^{54,55,59}

2.7.4 Chromatografie na reverzních fázích

Chromatografii na reverzních fázích lze charakterizovat jako systém složený z nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Nepolární stacionární fáze je silikagel s chemicky vázanými alkylovými řetězci například oktylevé a octe C8, oktadecylevé C18, cyklohexyl nebo fenylevé řetězce. Fenylevé skupiny bývají více polární než alkylové řetězce. Jako mobilní fáze bývá nejčastěji směs organického rozpouštědla a vody například H₂O:ACN nebo CH₃OH:H₂O, mohou být však použita i jiná (tetrahydrofuran nebo propanol).

Voda má silný vliv ovlivňovat aktivní centra na silikagelu (SiO_2) nebo na aluminu (Al_2O_3). V reverzních fázích je to tak, že voda vytlačí molekuly vzorku z mobilní do stacionární fáze tzv. hydrofóbní (solvofóbní efekt). Látky jsou tím více zadržovány, čím je nižší jejich polarita. Čím nižší je polarita analyzovaných látek, tím vyšší je jejich retenční kapacita. V tomto případě molekuly stacionární fáze interagují s analytem a solvatující složky MF jsou uvolněny. Tím dochází ke zvýšení entropie (neuspořádanosti) systému. A naopak čím polárnější je analyt, tím menší má retenci a je rychleji vymyt (vyeluován) z kolony. Molekuly MF musí analyt solvatovat a uspořádat se kolem něj (dochází k poklesu entropie systému).^{52-54,61}

2.7.5 Detektory v HPLC

Ve vysokouhliné kapalinové chromatografii můžeme použít detektory spektrofotometrické, refraktometrické, detektory rozptylu světla, fluorimetrické a radiometrické detektory. Zvláštní místo z hlediska identifikačních možností má potom spojení chromatografie s hmotnostní spektrometrií, infračervenou spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí.

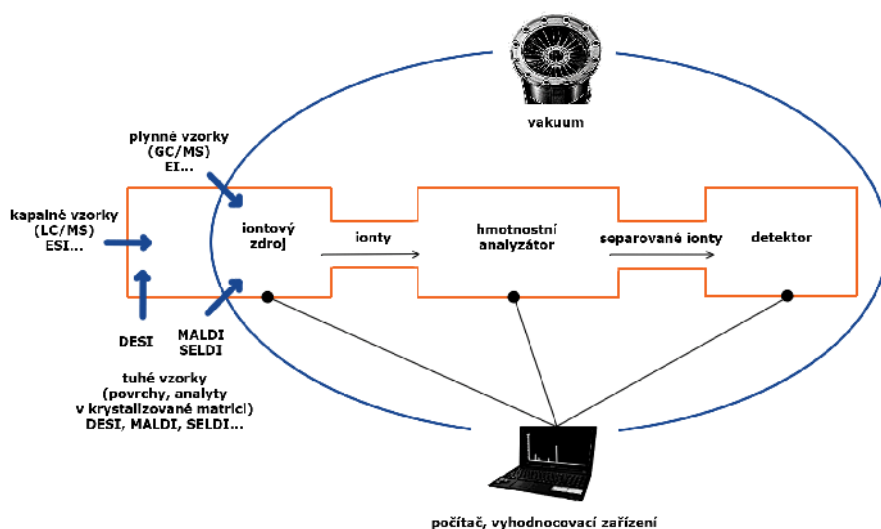
Nejvíce používaným detektorem ve spojení HPLC je UV-VIS (ultraviolet absorption detector) a DAD (detektor diodového pole, diode array detector). Při spojení s UV-VIS se měří absorbance eluátu v průtokové detekční cele při jedné vlnové délce. Ve spojení s DAD se měří eluát se vzorkem při několika vlnových délkách současně.

V současné době je nejvíce používáno spojení vysokouhliné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií jak pro kvantitativní, tak pro kvalitativní analýzu (je to jedna z nejlepších možností stanovení struktury látky v online spojení se separační technikou).^{55,61,62} Podrobnější charakterizace hmotnostního spektrometru je popsána v následující kapitole.

2.8 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektroskopie MS je analytická spektrální metoda, která stanovuje relativní četnost iontů v závislosti na poměru hmotnosti k náboji iontu (m/z). MS je metoda destruktivní, avšak spotřeba látky k analýze je velmi malá. Historicky první separace pozitivních iontů se podařila *J. J. Thomsonovi (1913)* při studiu chování kanálových paprsků v elektrickém a magnetickém poli. Abychom získali hmotnostní spektrum, je potřeba, aby proběhly tři procesy: tvorba iontů, separace a registrace iontů. Procesy v hmotnostním spektrometru probíhají ve vakuu.⁶³

Principem této metody je tedy separace vytvořených iontů podle hodnoty m/z a jejich detekce. Vznik iontů nastává v tzv. iontovém zdroji a separace v hmotnostním analyzátoru (obr. 9). Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum, proto se MS řadí mezi metody spektrální. Přítomnost dalších molekul, v těsnou v prostoru analyzátoru, může vést ke kolizi s ionizovaným analytem, která může následně vést k produkci fragmentů. Tohoto jevu se cíleně využívá při tzv. kolizí indukované disociaci (CID), kdy štěpíme iont, který nás zajímá a zkoumáním vzniklých fragmentů usuzujeme strukturu původního iontu.⁶⁴



Obrázek 9: Blokové schéma hmotnostního spektrometru

2.8.1 Iontové zdroje

Úkolem iontového zdroje hmotnostního spektrometru je analyzované látky ionizovat, aby je hmotnostní analyzátor mohl separovat na základě hodnot m/z , jejichž prostřednictvím jsou detekovány. Rozlišujeme několik iontových zdrojů, které jsou voleny na základě analyzovaného materiálu a jedním z kritérií, které rozeznáváme je množství dodané energie analytu. Podle velikosti dodané energie je dělíme na měkké a tvrdé ionizační techniky. Při tvrdé ionizační technice je dodaná energie dostatečně velká a dochází tak ke tvorbě fragmentů z primárního iontu. Měkká ionizační technika je technika, při které je dodaná energie menší a pravděpodobnost fragmentace primárně vzniklého iontu je malá.^{63,65-67}

Mezi nejvýznamnější iontové zdroje patří:

Tvrde ionizační techniky

- *Ionizace elektronem (EI)* – dříve znám jako electron impact ionization, ionizace zplyněného vzorku emitujícími elektrony ze žhaveného vlákna, je široce užívána v organické hmotnostní spektrometrii, nejčastěji bývá spojena s plynovou chromatografií (GC).⁶⁸

Ionizace s indukovaným plazmatem (ICP) – zejména pro prvkovou analýzu, využívá elektromagnetické indukce, kdy elektrony vznikají ve vysoce teplotním plazmatu.⁶⁹

Měkké ionizační techniky

- *Chemická ionizace (CI)* – je komplementární ionizaci elektronem, při CI dochází k interakci iontu reaktivního plynu s neutrálními molekulami analytu, které jsou následně ionizovány.⁷⁰

- *Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)* – směs analytu a matrice je aplikována na destičku z inertního materiálu a následně je ozářena laserem. Dojde k ionizaci, která odevzdá svůj náboj analytu.^{70,71}

- *Nano-assisted laser desorption ionization (NALDI)* – podobná MALDI, ionizace vzorku také laserem, ale na podložce z nanomateriálu, který umožní přenos energie laseru ve formě náboje na analyt.⁷²

- *Fast atom bombardment (FAB)* – směs analytu a matrice je bombardována urychlenými neutrálními atomy Ar.⁷³

- *Fast ionization bombardment (FIB)* – nebo je také označován jako SIMS (secondary ions mass spectrometry), analyt je bombardován ionty např. Cs^+ , Ar, Ga. Používá se zejména pro analýzu stopových prvků v pevných materiálech.^{73,74}

- *Ionizace polem (FI)* – ionizace zplyněného vzorku únikem elektrického pole o vysokém potenciálovém gradientu, elektrické pole se generuje v blízkosti drátku nebo kovového ostří, které se udržuje na potenciálu 5 – 10 kV.⁷⁵

- *Desorpce polem (FD)* – vhodná pro získání molekulových hmotností tepelně labilních a netěkavých sloučenin. Vzorek v rozpuštělé formě se nanáší na anodu (wolframové vlákno), rozpuštělá látka se odpařuje a na povrchu zůstává analyt, který je následně ionizován.⁷³

Molekulární ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku

- *Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)* – ionizace vzniká protednictvím výboje na jehle, ionizováno je rozpuštělá látka, které přenáší náboj analytu.^{59,75}

- *Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)* – analyt s přídavkem dopantu je sprejován, dopant je pomocná látka, která je cíleně ionizována zářením. Analyt pak získá náboj, který přijme od dopantu.^{60,76}

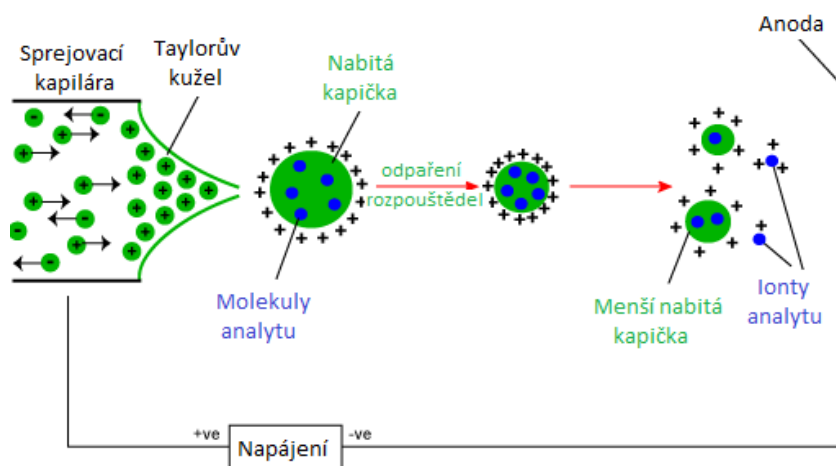
- *TSP (thermospray)* – ionizace analytu na základě odpařování rozpuštělá z rozprašovaných kapek při vysoké teplotě.⁶⁴

- *ESI (elektrospray ionization)*, který je více charakterizován v kapitole 2.8.1.1

2.8.1.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)

Princip ionizace elektrosprejem (obr. 10) spoívá ve vzniku kladně nebo záporně nabitých iontů, v závislosti na napětí, které je vloženo na sprejovací kapiláru. Pokud budeme pracovat v kladném módu, bude vloženo na kapiláru kladné napětí. V důsledku odpudivých sil a kumulace kladného náboje na konci sprejovací kapiláry dojde ke vzniku kónického tvaru povrchu kapaliny s úhlem $49,3^\circ$ tzv. Taylorova kužele (viz obr. 10). Kapky vznikající na špičce Taylorova kužele se za pomoci ohátého zmlženého plynu (N_2) rychle odpařují. Tento proces má za následek zvyšování hustoty jejich povrchového náboje až do okamžiku uvolnění kvazimolekulárních iontů z povrchu kapky nebo úplné desolvatace nabitých molekul.⁷⁷ Vzniklé ionty jsou pak vedeny pomocí iontové optiky do hmotnostního analyzátoru a tam jsou separovány na základě poměru jejich hmoty a

náboje. Protože elektrosprej představuje mkkou ioniza ní techniku, fragmenty iont bývají asto málo intenzivní nebo zcela chybí.^{66,67,78}



Obrázek 10: Princip ionizace elektrosprejem (ESI)

2.8.2 Hmotnostní analyzátoary

Hmotnostní analyzátoar se nachází mezi iontovým zdrojem a detektorem . Úkolem hmotnostního analyzátoaru je rozd lit vzniklé ionty podle hodnot m/z , p i emž kvalita rozd lení iont závisí na rozlišovací schopnosti.⁷⁹

- *Sektorové p ístroje:*
 - *s jednoduchou fokusací:* po pr chodu magnetickým polem jsou ionty fokusovány a dochází k zak ivení jejich dráhy podle jejich hodnoty m/z (malé ionty se odkloní více než ionty v tší)
 - *s dvojitou fokusací:* pokud ionty vstoupí do elektrického pole, dochází k zak ivení dráhy podle kinetické energie iont E_k (bez ohledu na hodnotu m/z) a teprve poté jsou fokusovány magnetickým polem. Tento typ hmotnostního analyzátoaru má vyšší rozlišovací schopnost než analyzátoar s jednoduchou fokusací.⁷⁶
- Do *Iontové pasti* jsou ionty pulzn p ivedeny a následn jsou podle hodnoty m/z postupn vypuzovány zm nou nap tí. Iontová past je v podstat trojrozm rný kvadrupól, který je složen ze vstupní a výstupní elektrody a prstencové st edové elektrody. M í se amplituda radiofrekvenc ního nap tí.⁸⁰
- V *orbitrap* dochází k zachycení iont ve statickém elektrickém poli, zde není použit žádný magnet. Ionty obíhají st edovou elektrodu a oscilují podél ní s frekvencí

úm rnou (m/z). V d sledku oscilace iont je indukován proud I a prost ednictvím Fourierovy transformace je signál p eveden na spektrum.⁸¹

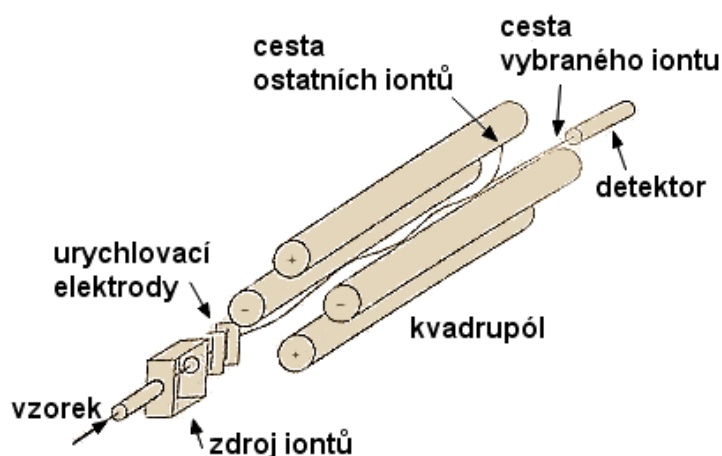
- *Iontová cyklotronová rezonance* je ultracitlivá a nedestruktivní metoda p inášející spektra v nejlepší rozlišení. Princip iontové cyklotronové rezonance je založen na pohybu iont , které obíhají po kruhových drahách p sobením silného magnetického pole (supravodivý magnet). Následn jsou frakce s vybraným m/z excitovány nap ovým pulzem a detekovány elektrodami, signál bývá zpracován Fourierovou transformací na spektrum.⁸²

- V *kvadrupólovém analyzátoru* je ion p iveden do st edu osy kvadrupólu, který je složen ze ty ech kovových ty í, na které je vloženo stejnosm rné a st ídavé nap tí. Jejich kombinací m že projít kvadrupólem ion s ur itou hodnotou m/z a dostat se až k detektoru. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na ty ích kvadrupólu. Zm nou hodnot stejnosm rného nap tí U a amplitudy V jsou postupn poušt ny na detektor všechny ionty.^{55,83} Podrobn jší popis je v kapitole 2.8.2.1

- *Analyzátor doby letu* separuje ionty podle jejich kinetické energie, malé ionty proletí k detektoru rychleji než velké ionty (viz. kapitola 2.8.2.2)

2.8.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Často označovaný jako kvadrupólový filtr bývá součástí hmotnostních spektrometrů s nízkým rozlišením, které jsou vhodné i pro spojení s HPLC. Ideální kvadrupólová geometrie (obr. 11) je tvořena čtyřmi kovovými elektrodami hyperbolického nebo kruhového průřezu se dvěma kolmými rovinami s nulovým potenciálem, které jsou umístěny mezi elektrodami a protínají se podél osy z . Elektrody jsou připojeny ke zdroji stejnosměrného a střídavého (radiofrekvenčního) napětí. Ionty vletnou do prostoru mezi elektrodami, dostanou se do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Při vhodném poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí a dané hodnotě tohoto napětí projdou přes kvadrupól pouze ionty o určitém poměru m/z . Pozitivní potenciál je aplikován na dva póly v horizontálním směru x a negativní potenciál je aplikován na dva póly ve vertikálním směru y . Zařízení se chová v podstatě jako filtr nastavený na určitou hodnotu m/z a změnou vkládaných napětí je možné nechat projít filtrem postupně ionty v celém rozsahu hodnot m/z .^{83,84}



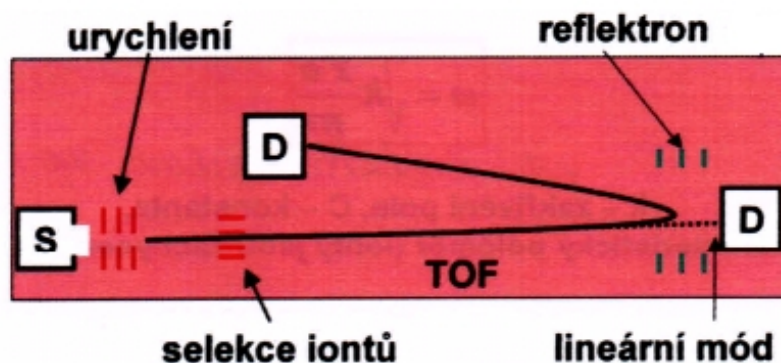
Obrázek 11: Schéma kvadrupólového analyzátoru

2.8.2.2 Pr letový analyzátor, time of flight (TOF)

Jedná se o tzv. pulzní analyzátor. Princip pr letového analyzátoru je založen na faktu, že ionty lišící se molekulovou hmotností, avšak urychlené stejnou kinetickou energií, mají různé doby letu. Malé ionty poletí rychleji (malá hmotnost), velké poletí pomaleji (větší hmotnost).

Doba letu je velmi krátká a umožňuje opakovat měření s velkou frekvencí (až 10^4 spekter za 1s). časový interval během kterého dopadají ionty na detektor je až v řádu ns.⁶² Na obrázku 12 je zobrazen TOF s reflektronem. Reflektron pracuje jako elektrostatické zrcadlo, jehož úkolem je vyrovnat poáteční rozdíl kinetických energií analyzovaných iontů. Bez této fokusace by měl TOF nedostatečné rozlišení (řádově pouze stovky, tzv. lineární mód). Analyzátor doby letu vybavený reflektronem je v současnosti velmi rozšířený typ hmotnostního analyzátoru právě díky vysokému rozlišení a rychlosti sběru dat. Mimo to mají TOF analyzátoři řadu dalších výhod, které jsou užitečné obzvláště pro analýzu biomolekul. Za prvé, jejich m/z rozsah je téměř neomezený, až na problém tvorby iontů a jejich detekci v takovém rozsahu. Za druhé, TOF neobsahuje žádné úzké štěrby nebo podobné omezující prvky, které snižují citlivost. Zvýšení rozlišení TOF lze dosáhnout kromě elektrostatického reflektronu^{85,86} i s využitím zpědné extrakce iontů. Některé nevýhody TOF jsou kompenzovány spojením s jinými analyzátoři, které tyto nedostatky doplní, abychom získali optimální kombinaci citlivosti, rozlišení a rychlé odezvy v rámci podmínek, ve kterých MS pracuje.

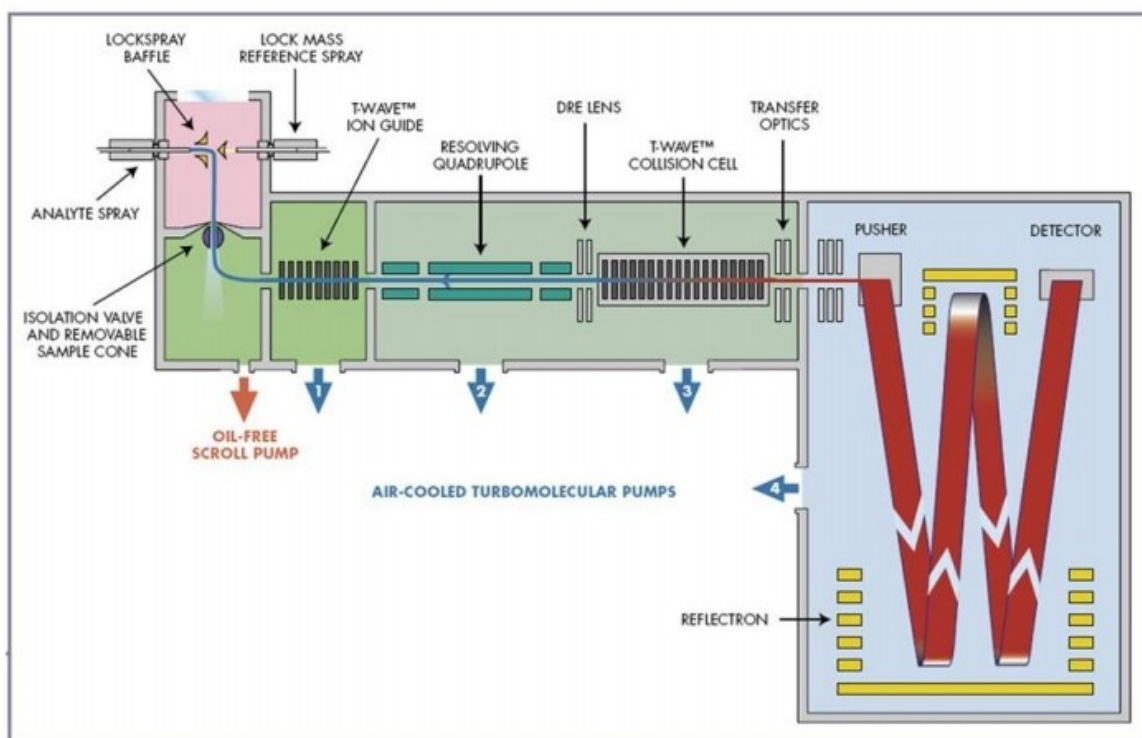
Na základě toho byly vyvinuty hybridní analyzátoři jako alternativní řešení pro MS měření. Jedna z nejznámějších kombinací je QqTOF^{86,87}, viz. kapitola 2.8.3.3.



Obrázek 12: Pr letový analyzátor

2.8.2.3 Quadrupole – Time of flight (QqTOF)

QqTOF (obr. 13) se řadí mezi hybridní hmotnostní spektrometry využívající dvou hmotnostních analyzátorů.⁷⁸ Prvním hmotnostním analyzátozem tohoto instrumentu je kvadrupólový analyzátor. Jedná se o skenovací analyzátor, který umožňuje izolaci vybraného iontu o daném poměru m/z . Následuje kolizní cela, kde lze provádět fragmentaci zvolených iontů a poté následuje analyzátor doby letu – TOF.⁸⁴ Toto spojení je charakteristické svým vysokým rozlišením a přesným určením poměru m/z poskytujícím informaci o elementárním složení iontů. Kombinace s kvadrupólem umožňuje MS/MS analýzu, případně ve spojení s kolizí indukovanou disociací ve zdroji i pseudo-MS³. Spojení kvadrupólového analyzátoru a TOF analyzátoru tak představuje mimořádně přesný a spolehlivý nástroj pro identifikaci a strukturní analýzu.⁷⁸



Obrázek 13: QqTOF

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Fytochelatiny 2 a 3 (AnaSpec, Inc. San Jose 34801 Campus Drive, Fremont, CA 94 555, USA HPLC istota > 95%); glutathion oxidovaný (Sigma-Aldrich, USA, p.a), glutathion redukovaný (Sigma-Aldrich, Japan, istota 98 - 100 %); dusí nan olovnatý (Penta, Praha, p.a.); chlorid kademnatý dihydrát (Lachema, Brno p.a.); kyselina mraven í (Sigma-Aldrich, N mecko, p.a); kyselina metafosfore ná (Sigma-Aldrich, Germany, istota 100 %); chelaton III (Lachema, Brno, p.a.); acetonitril (J. T. Baker, pro HPLC, Nizozemí), dithiothreitol (Fluka, Canada, purity 99 % RT), methanol (Fisher Scientific, pro HPLC, Nizozemí), kapalný dusík, redestilovaná voda (deioniza ní stanice Milipore, Molsheim, Francie), leucin-enkefalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, p.a.)

3.2 Příprava standardních roztoků a vzorků k analýze

Studium vlivu kolizní energie na fragmentaci fytochelatinů v hmotnostním spektrometru bylo provedeno s využitím vodných roztoků o koncentraci 10 mg/l.

3.2.1 Expozice rostlinných vzorků těžkým kovem

Vzorky, v našem případě Hrách setý nebo-li (*pisum sativum*) a Oves nahý (*avena nuda*) byly použity v tomto experimentu. Nechalo se naklíčit jedenáct šarží (ty i šarže Hrachů setého a ty i Ovsa nahého) na vat po dobu 10 - 21 dnů. Po objevení klíčků se ke třem šaržím hrachů přidaly roztoky olova o těchto koncentračních úrovních 10 μM, 100 μM a 1 mM. Do dalších tří a tří šarží ovsa se přidaly roztoky olova a kadmia o stejných koncentračních úrovních. Po 24 hodinové expozici byly rostliny zhomogenizovány, extrahovány a analyzovány pomocí UPLC/ESI-MS.

3.2.2 Extrakční inidlo

Použité extrakční inidlo bylo připraveno smícháním 5 % kyseliny metafosforené a 1mM chelatonu III (EDTA) v 0,1 % kyselin mravení následujícím způsobem: 1,25 g kyseliny metafosforené a 9,306 mg EDTA a 25 μl 99 % HCOOH bylo rozpuštěno v 25 ml odměrné baňce a doplněno po rysku.

3.2.3 *Postup extrakce a přípravy vzorků*

Do navážené kádinky byly nastříhány části rostliny (kořínky a nařezané listy), následně byly omyty redestilovanou vodou a rychle vysušeny pod proudem vzduchu. Kádinky s rostlinným materiálem a teflonovou miskou s tloučkem byly dány do hluboko mrazicího boxu o teplotě $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$ minimálně na dobu 20 minut. Poté byla provedena homogenizace zmraženého materiálu.

Do teflonové misky byly umístěny zmražené vzorky a pod kapalným dusíkem byly homogenizovány po dobu 5 minut. Přírůstek kapalného dusíku se prováděl cca třikrát. Následně byl zhomogenizovaný vzorek převeden do eppendorfkovy pipety, pak byl zvážen (cca 0,5 g) a nakonec k němu bylo přidáno 300 - 500 μl extrakčního činidla a celá směs byla promíchána v míšičce po dobu 1 minuty.

Vzorky v eppendorfkách byly umístěny do předchlazené centrifugy ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2000 r.p.m, 15 min.) a poté byla provedena vlastní centrifugace ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 19 000 r.p.m, 10 min.).

Supernatant byl odebrán a zfiltrován přes nylonový mikrofiltr ($0,45\text{ }\mu\text{m}$), který byl předem smočený v methanolu a poté byl analyzován pomocí LC/ESI-MS.

Analýzy byly rovněž zopakovány s přírůstkem dithiothreitolu (DTT) o koncentraci 50 mM (do 0,45 ml supernatantu se přidalo 50 μl DTT). Doba působení DTT byla 24 hodin. DTT má charakter silného redukčního činidla, které se využívá pro rozrušení disulfidických vazeb v peptidech a proteinech.⁴⁴

3.2.4 *Příprava mobilních fází*

Použité mobilní fáze:

- 1) A: 0,1 % HCOOH v redestilované vodě a B: 0,1 % HCOOH v ACN. Složka A MF byla připravena zředěním 1 ml 99 % HCOOH redestilovanou vodou do 100 ml odměrné bačky. Složka B byla připravena analogicky zředěním 250 μl 99 % HCOOH acetonitrilem do 250 ml odměrné bačky. Obě složky mobilní fáze byly odplyněny v ultrazvuku po dobu 10 minut.
- 2) A 0,05 % HCOOH v redestilované vodě a B 0,05 % HCOOH v ACN
- 3) A 0,5 % HCOOH v redestilované vodě a B 0,5 % HCOOH v ACN
- 4) A 5 % HCOOH v redestilované vodě a B 5 % HCOOH v ACN

3.3 Instrumentální vybavení

Hmotnostní spektrometr typu QqTOF (Q-TOF Premier, Waters, Milford, MA, USA) s ionizací elektrosprejem, ultraúhinný kapalinový chromatograf- Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) s PDA detektorem. Centrifuga (MR23i, JOUAN, France), ultrazvuk Elma S40 (MERCY s.r.o., Germany), hamiltonka, nylonový mikrofiltr 0,45 μm , stříkačka, míchačka, pipety, hmoždíky, vialky, ependorfky, špičky, sklípky a špachtle.

Podmínky iontového zdroje:

Parametry elektrospreje: napětí na kapiláře 2,1 kV (pozitivní mód), teplota zdroje 100 °C, desolvatační teplota 250 °C, průtok zmlžovacího plynu 250 L.h⁻¹, průtok pomocného plynu 38 L.h⁻¹. Pro zjištění přesné hmoty byl použit jako standard leucin-enkefalin (m/z 556,2771). Výsledná data byla pořízena s využitím simultánního skenu s nižší (5 eV) a vyšší (10 - 50 eV) kolizní energií v hmotnostním rozsahu 50 - 1500 Da, doba skenu 0,2 s (inter scan time 0,02 s).

Podmínky UPLC:

Chromatografické kolony: Kinetex C18, (100 mm × 2,1 mm, 2,6 μm) Phenomenex, Torrance CA, USA; Acquity BEH C18 (100 mm × 1,75 mm, 1,7 μm) Waters, Milford, MA, USA.

Parametry gradientové eluce: (% v/v): 0 – 90 s (100:0 % B), 0,9 - 1,20 min (95:5 % B), 1,20 – 4 min (70:30 % B), 4 - 6 min (10:90 % B), 6 - 7 min (100:0 % B), 7 - 10 min (100:0 % B).

Průtok mobilní fáze: 0.4 ml.min⁻¹ a kolona byla temperována na 30°C.

Nástřik: plná směs - 10 μL .

4. Výsledky a diskuse

4.1 Hmotnostní spektrometrie fytochelatin

4.1.1 ESI-MS/MS experimenty s využitím píímé infuze roztok standard

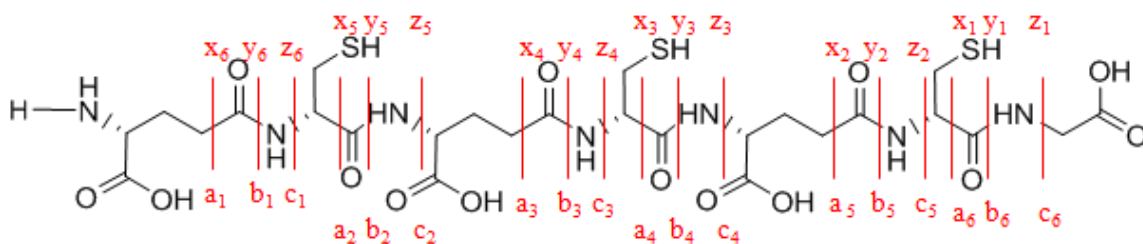
Pro optimalizaci parametrů hmotnostního spektrometru a studium chování fytochelatinů při ESI-MS/MS experimentech bylo provedeno předěžné testování, založené na píímé infuzi roztoku standardu do hmotnostního spektrometru. Pro každý analyt bylo získáno co nejvíce informací, které by usnadnily identifikaci fytochelatinů v reálných vzorcích (pííesná hmota kvazimolekulárního iontu, pííesná hmota fragmentů po kolizích indukované disociaci). Předpokládané fragmentace peptidických vazeb PC3 a PC2 jsou uvedeny v tabulkách III a IV. Ukázkové fragmentační spektrum standardu PC3 a PC2 je potom uvedeno na obrázku 14.

Tabulka III: Modelová fragmentace PC3, a) série iontů y_1 - y_6 a b) série iontů b_1 - b_6

a) série iontů y_1 - y_6		b) série iontů b_1 - b_6	
m/z	chemický vzorec	m/z	chemický vzorec
76,0393	$C_2H_6NO_2^+$	130,0499	$C_5H_8NO_3^+$
179,0485	$C_5H_{11}N_2O_3S^+$	233,0591	$C_8H_{13}N_2O_4S^+$
308,0911	$C_{10}H_{18}N_3O_6S^+$	362,1016	$C_{13}H_{20}N_3O_7S^+$
411,1003	$C_{13}H_{23}N_4O_7S_2^+$	465,1108	$C_{16}H_{25}N_4O_8S_2^+$
540,1429	$C_{18}H_{30}N_5O_{10}S_2^+$	594,1534	$C_{21}H_{32}N_5O_{11}S_2^+$
643,152	$C_{21}H_{35}N_6O_{11}S_3^+$	697,1626	$C_{24}H_{37}N_6O_{12}S_3^+$

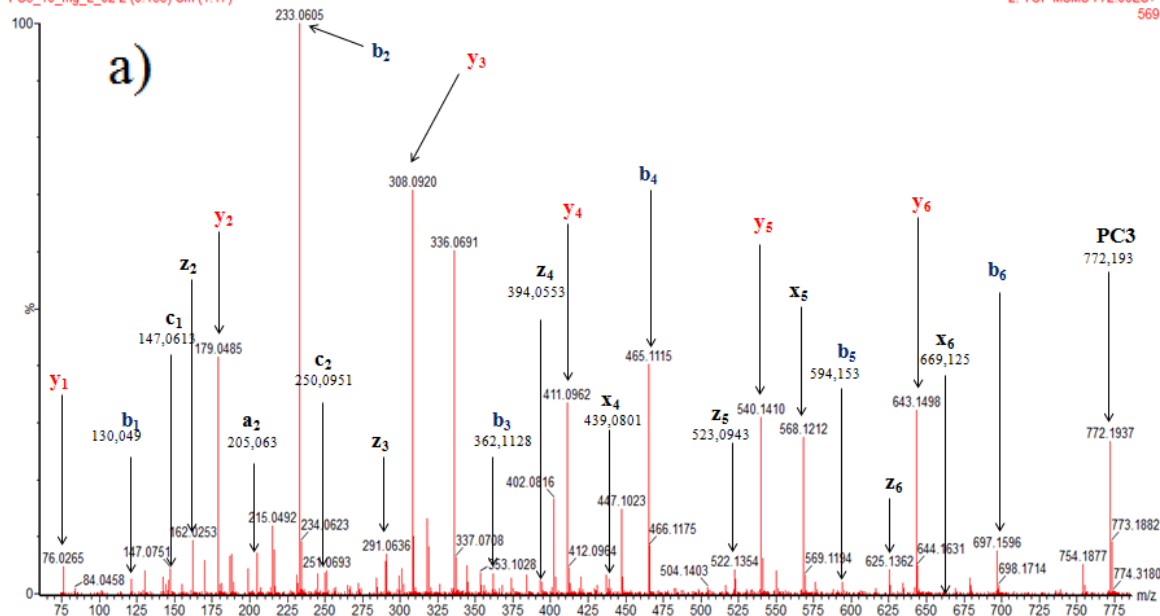
Tabulka IV: Modelová fragmentace PC2, a) série iontů y_1 - y_4 a b) série iontů b_1 - b_4

a) série iontů y_1 - y_4		b) série iontů b_1 - b_4	
m/z	chemický vzorec	m/z	chemický vzorec
76,0393	$C_2H_6NO_2^+$	130,0499	$C_5H_8NO_3^+$
179,0485	$C_5H_{11}N_2O_3S^+$	233,0591	$C_8H_{13}N_2O_4S^+$
308,0911	$C_{10}H_{18}N_3O_6S^+$	362,1016	$C_{13}H_{20}N_3O_7S^+$
411,1003	$C_{13}H_{23}N_4O_7S_2^+$	465,1108	$C_{16}H_{25}N_4O_8S_2^+$



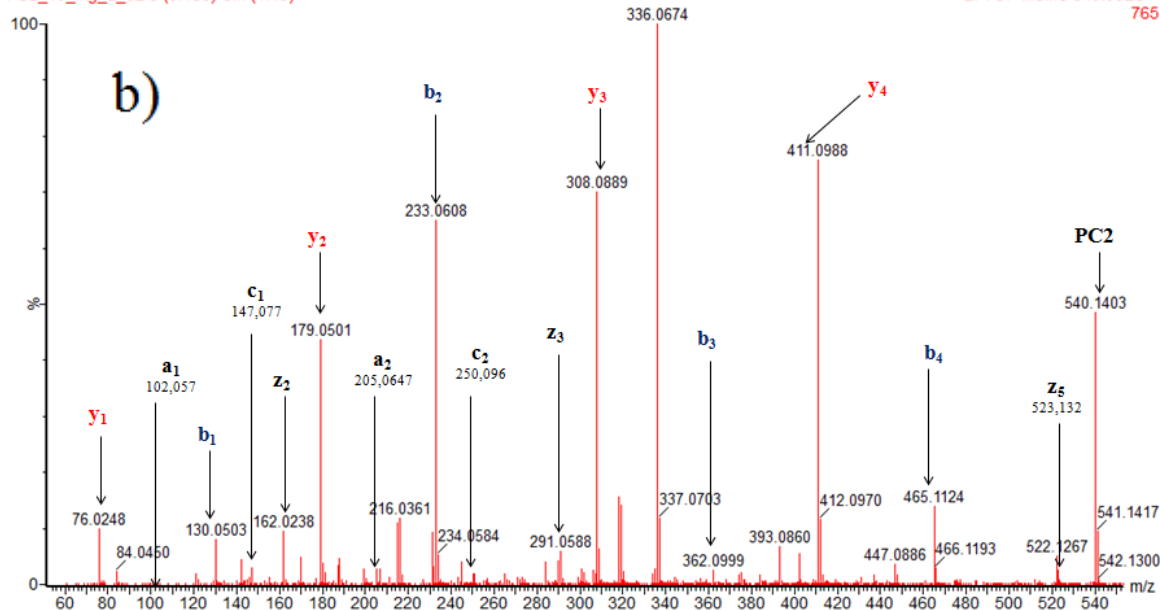
10 mg_I PC3, voda,ramp
PC3_10_mg_L_02 2 (0.155) Cm (1:17)

2: TOF MSMS 772.00ES+
569



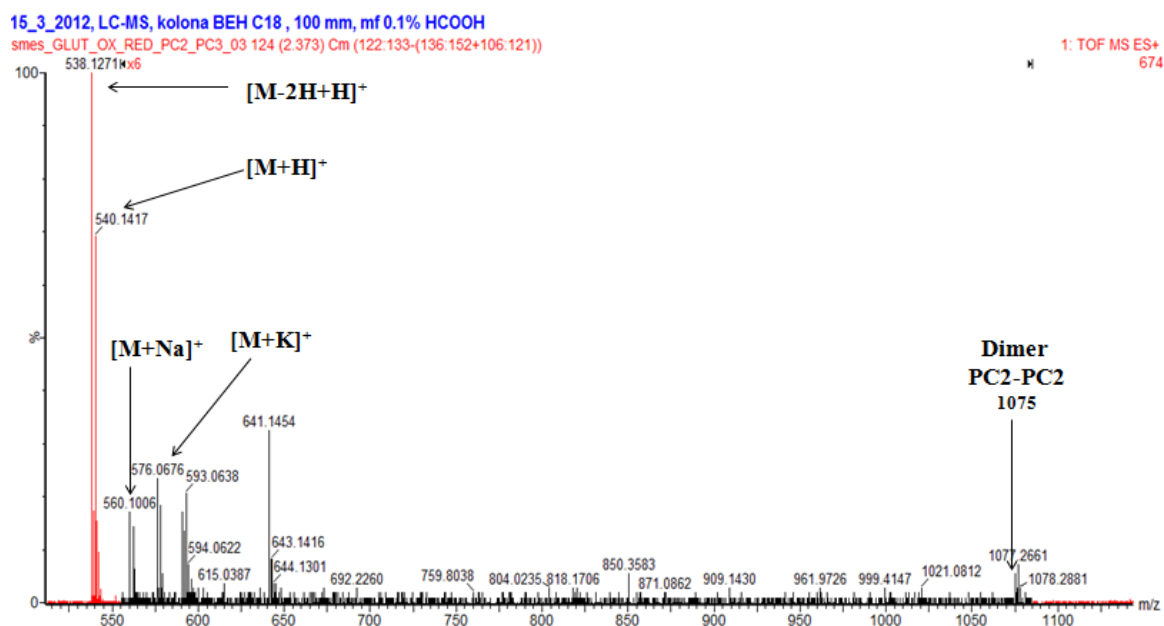
10 mg_I PC2, voda,ramp
PC2_10_mg_L_02 6 (0.466) Cm (1:19)

2: TOF MSMS 540.00ES+
765



Obrázek 14: Strukturální vzorec PC3 s naznačenou fragmentací a reprezentativní fragmentační spektrum standardu a) PC3 a b) PC2, šťepní od C (x, y, z) a N (a, b, c) konce

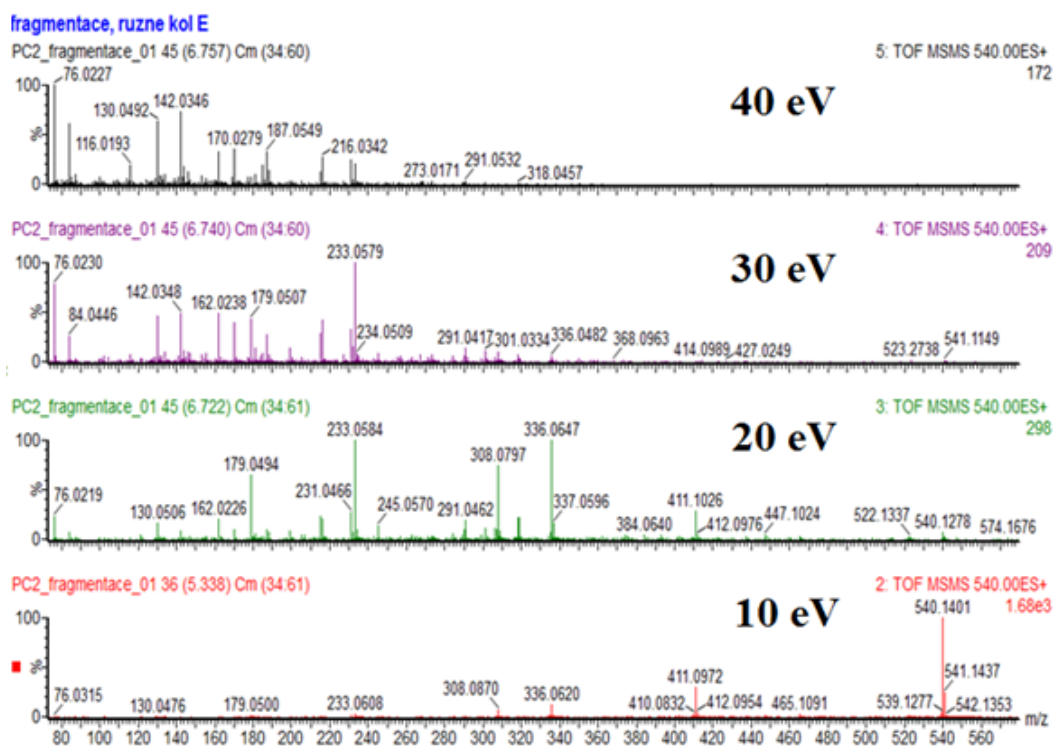
Na fragmentačním spektru standardu PC3 a PC2 (obr. 14 a, b) je vidět vznik jednotlivých fragmentů, které se štěpí od C konce a N konce. Nejintenzivnější jsou fragmenty peptidické vazby, které patří do série y a b. Stejně jako je v případě modelové fragmentace uvedené v tabulce III a IV, lze ve spektru PC3 a PC2 pozorovat eliminaci jednotlivých aminokyselinových jednotek. Fragmenty PC3, které se štěpí od C konce, odpovídají tyto hodnoty: pro x (439, 568, 669), y (76, 179, 308, 411, 540, 643) a z (162, 291, 394, 523, 626). Při štěpení od N konce vznikají následující fragmenty: pro a (205), b (130, 233, 362, 465, 594, 697) a c (147, 250). Intenzita fragmentů vznikajících ve spektru, závisí primárně na struktuře molekuly a vložené kolizní energii.



Obrázek 15: Reprezentativní MS spektrum PC2

Na obrázku 15 je MS spektrum PC2, ve kterém můžeme pozorovat kromě kvazimolekulárního iontu i vznik aduktů se sodíkem a draslíkem (v oxidované i redukované formě) s intenzitou menší jak 5 %. Mimo to byla u vyšších hmot pozorována i tvorba dimeru fytochelatin (< 2 %) viz tabulka VIII. Všechny tyto látky byly pozorovány jak v oxidované, tak redukované formě.

4.1.2 Vliv kolizní energie na fragmentaci fytochelatin



Obrázek 16: Fragmentační spektrum PC2 při různých kolizních energiích: 10 eV, 20 eV, 30 eV a 40 eV

Na obr. 16 si můžeme všimnout, jak se mění intenzita jednotlivých fragmentů při postupném nárůstu kolizní energie. Měnila se fragmentace PC2 při 5 kolizních energiích 2. TOF MS/MS je měřeno při 10 eV, 3. TOF MS/MS při 20 eV a 4. TOF MS/MS při 30 eV, 5., 6. a 7. TOF MS/MS byly měřeny při 40, 50, 60 eV. Tyto energie byly však příliš vysoké a proto došlo k rozštěpení molekuly na velmi malé fragmenty o nízké intenzitě.

Jak vyplývá z uvedených MS spekter, se změnou kolizní energie se mění poměry jednotlivých fragmentů, při změně intenzity kvazimolekulárního iontu PC2 se při vyšších kolizních energiích snižuje a postupně mizí úplně. Velký pokles lze vidět už při nárůstu z 10 eV na 20 eV a při 30 eV je intenzita iontu m/z 540 ve spektru nižší než 2%. Ze získaných spekter je patrné, že optimální kolizní energie pro fytochelatin PC2 náleží hodnotám okolo 20 eV.

Tabulka V: Intenzita vzniklých fragment PC2 pro různé kolizní energie
a) kolizní energie 10 eV, b) kolizní energie 20 eV, c) kolizní energie 30 eV,
d) kolizní energie 40 eV

a)

Vzniklé fragmenty při změně kolizní energie (10 eV)		
m/z	% BPI	% TIC
540,1392	100	33,42
411,0969	28,21	9,43
308,0879	7,07	2,36
233,059	2,95	0,99
179,0493	1,39	0,46
162,0228	0,24	0,08

b)

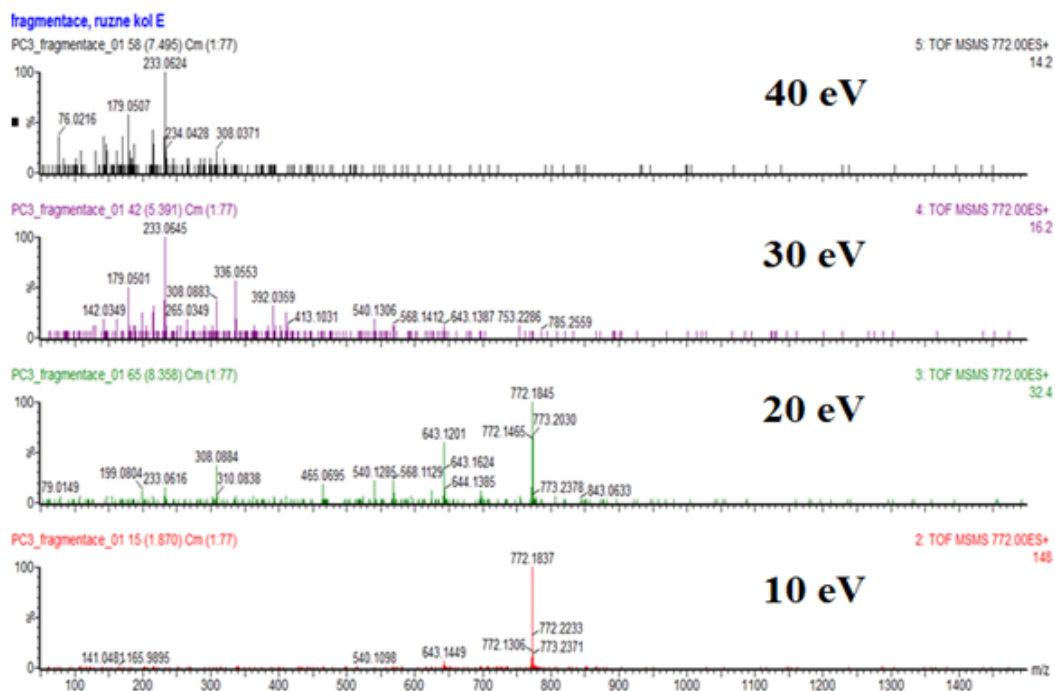
Vzniklé fragmenty při změně kolizní energie (20 eV)		
m/z	% BPI	% TIC
540,1328	5,52	0,1
411,1	26,6	1,98
308,0799	8,44	0,63
233,0581	100	7,45
179,0493	64,96	4,84
162,0222	20,87	1,55
76,023	21,64	1,64

c)

Vzniklé fragmenty při změně kolizní energie (30 eV)		
m/z	% BPI	% TIC
233,059	100	6,79
179,0493	42,15	2,86
162,0228	46,8	3,18
147,0751	7,72	0,52
130,0495	51,15	3,47
76,023	77,96	5,29

d)

Vzniklé fragmenty při změně kolizní energie (40 eV)		
m/z	% BPI	% TIC
233,066	24,33	2,13
162,023	29,87	2,61
130,0493	57,7	5,05
76,0229	100	8,74



Obrázek 17: Fragmentační spektrum PC3 při různých kolizních energiích: 10 eV, 20 eV, 30 eV, 40 eV

Při pořízení fragmentačních spekter PC3 (obr. 17) bylo také využito 5 kolizních energií, 2. TOF MS/MS bylo měněno při 10 eV, 3. TOF MS/MS bylo použito při 20 eV, 4. TOF MS/MS při 30 eV a 5. TOF MS/MS bylo použito při 40 eV. Nejvhodnější kolizní energie náležejí hodnotám mezi 20 eV a 30 eV, kdy lze pozorovat ještě kvazimolekulární ion a většinu vyšších fragmentů. Hodnoty 40 eV a vyšší se již nacházejí mimo optimální rozmezí pro fytochelatin PC3, jelikož vznikají pouze malé fragmenty o nízké intenzitě. Použité rozsahy kolizních energií jsou sice poměrně široké, nicméně dobře naznačují přibližnou optimální oblast kolizních energií pro tento typ analytu.

Tabulka VI: Intenzity vzniklých fragmentů u PC3 pro různé kolizní energie a) kolizní energie 20 eV, b) kolizní energie 30 eV, c) kolizní energie 40 eV

a)

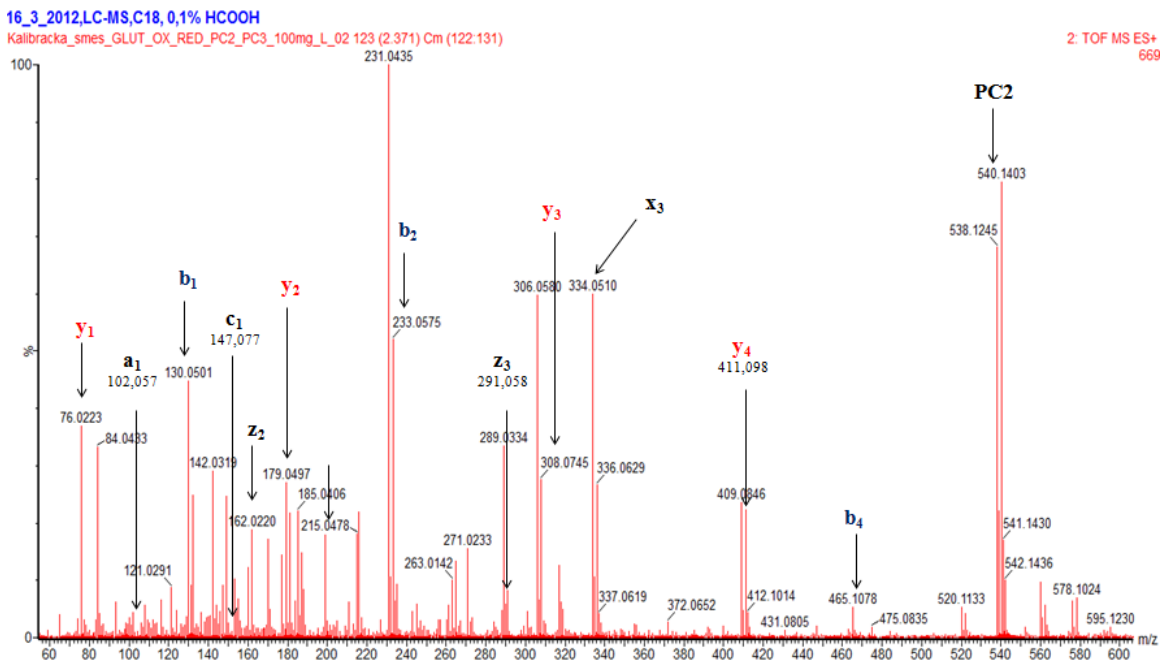
Vzniklé fragmenty při změně kolizní energie (10 eV)		
m/z	% BPI	% TIC
772,1845	100	6,85
643,1201	59,37	3,47
540,1285	21,88	1,28
465,0695	18,75	1,1
308,0884	37,5	2,19
233,0616	15,63	0,91

b)

Vzniklé fragmenty při změně kolizní energie (20 eV)		
m/z	% BPI	% TIC
643,1387	12,5	0,49
540,1306	18,75	0,74
308,0883	37,5	1,47
233,0645	100	3,92
179,0501	50	1,96

c)

Vzniklé fragmenty při změně kolizní energie (30 eV)		
m/z	% BPI	% TIC
308,0371	21,43	0,93
233,0624	100	4,35
179,0507	57,14	2,48
76,0216	35,71	1,55



Obrázek 18: Reprezentativní fragmentační spektrum PC2 při rampě 10 - 50 eV bez izolace

Bylo zjištěno, že použití kolizních energií v rozsahu 20 – 30 eV pro PC3 a v rozsahu 15 – 20 eV pro PC2 ionty lze získat kvalitní MS/MS spektra poskytující informaci o hlavních fragmentačních procesech (ionty série y a b). Z důvodu vysokých nároků na krátkou dobu skenu při práci s UPLC, kde vyšší počet skenovacích událostí by mohl způsobit nepatřičnou ztrátu dat a nedostatečný počet skenů přes chromatografický pík, byl zvolen kompromis umožňující získat strukturální informace pro všechny analyty od glutathionu až po PC4. Tento kompromis představuje rozsah kolizních energií od 10 – 50 eV (obr. 18).

4.1.3 Studium tvorby komplex fytochelatin s těžkými kovy

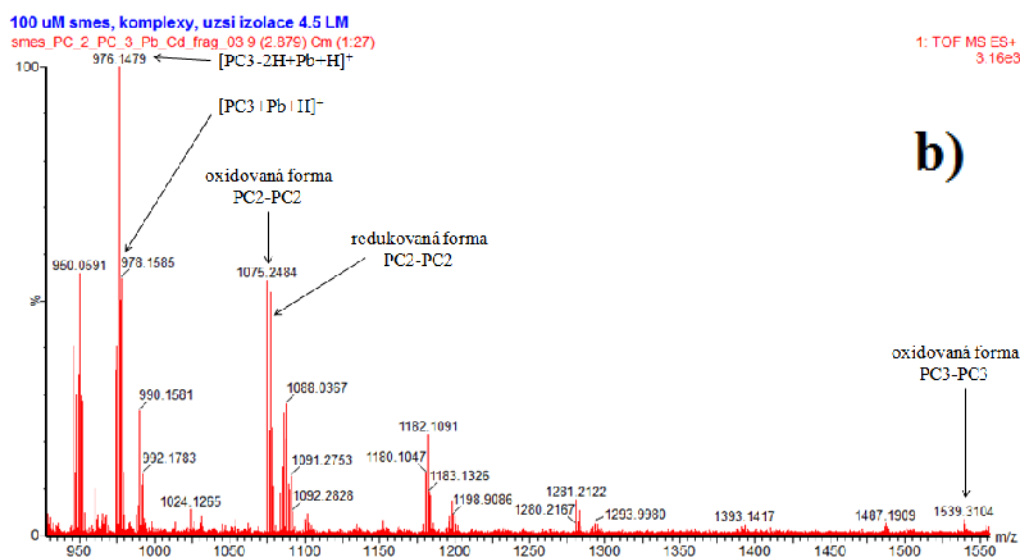
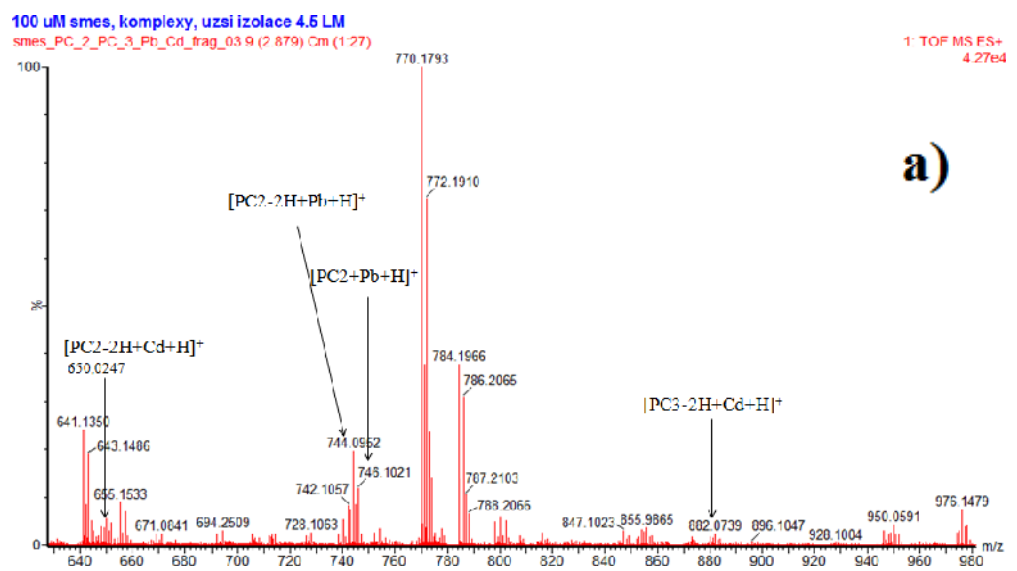
Pomocí přímého nástiku do hmotnostního spektrometru jsem zkoumala tvorbu komplex těžkých kov s fytochelatin v ekvimolární směsi na koncentracích úrovních 10 μM , 20 μM a 100 μM . Teprve od koncentrační hladiny 100 μM byl pozorován vznik komplex $[\text{PC-M+H}]^+$ a $[\text{PC-2H+M+H}]^+$.

V této práci jsem se zaměřila na dva těžké kovy Pb a Cd, jejichž prostřednictvím byla prováděna inkubace rostlin.

Zjištěné výsledky:

V připravené směsi fytochelatin a těžkých kov byl pozorován vznik dimeru fytochelatin $\text{PC}_2 - \text{PC}_2$ a $\text{PC}_3 - \text{PC}_3$ v oxidované a redukované formě (obr. 19 b, tabulka VIII), přičemž oxidovaná forma fytochelatinu je zejména stabilnější, protože ve spektru mají analyzované látky v oxidované formě vyšší intenzitu. Při porovnání tvorby dimeru $\text{PC}_2 - \text{PC}_2$ a $\text{PC}_3 - \text{PC}_3$ v roztoku standardu s těžkými kovy a bez nich se zjistilo, že jejich intenzita v istém standardu je dvakrát nižší oproti roztoku standardu PC_2 a PC_3 s těžkými kovy, což platí pro oxidovanou i redukovanou formu. Krom dimeru fytochelatin PC_2 a PC_3 byly z MS spekter (obr. 19 a, b) identifikovány i jednoduché komplexy fytochelatin PC_2 a PC_3 s jedním těžkým kovem: $[\text{PC}_2+\text{Pb+H}]^+$, $[\text{PC}_2-2\text{H+Pb+H}]^+$, $[\text{PC}_2+\text{Cd+H}]^+$, $[\text{PC}_2-2\text{H+Cd+H}]^+$, $[\text{PC}_3+\text{Pb+H}]^+$, $[\text{PC}_3-2\text{H+Pb+H}]^+$, $[\text{PC}_3+\text{Cd+H}]^+$ a $[\text{PC}_3-2\text{H+Cd+H}]^+$. Jejich struktura je znázorněna v tabulce VII. Jako v případě dimer je intenzivnější oxidovaná forma komplex oproti redukované. Redukovaná forma fytochelatin je vysvětlena vznikem koordinace kovalentní vazby na kov a oxidovaná forma by mohla být charakterizována jako elektrostatická asociace těžkého kovu k naprotonizovanému oxidovanému PC_2 ⁸⁹ nebo jako tvorba jiného typu komplexu, jestliže je síra blokována disulfidickou vazbou (př. analogie chelatonu, vazba přes N nebo O).

Na následujících MS spektrech jsou vyznačené komplexy $[\text{PC-M+H}]^+$, $[\text{PC-2H+M+H}]^+$ a $\text{PC}_n\text{-PC}_n$ identifikované na základě přesné hmoty a fragmentace.



Obrázek 19 a,b: MS spektra dimerů fytochelatinů a jejich komplexů s těžkými kovy

Tabulka VII: Identifikované komplexy [PC-M+H]⁺ v MS

pozn. komplexy byly pozorovány jak v uvedené redukované, tak i oxidované form

Vzniklé komplexy PC2 a PC3 s Pb a Cd	
652,0306	
$C_{18}H_{28}CdN_5O_{10}S_2^+$	
884,0823	
$C_{26}H_{40}CdN_7O_{14}S_3^+$	
746,1038	
$C_{18}H_{28}N_5O_{10}PbS_2^+$	
978,1556	
$C_{26}H_{40}N_7O_{14}PbS_3^+$	

Tabulka VIII: Identifikované dimery PC_n-PC_n v MS

pozn. dimery vznikají jak v redukované, tak i oxidované form

Vzniklé dimery PC2-PC2 a PC3-PC3	
1075,2471	
$C_{36}H_{55}N_{10}O_{20}S_4^+$	
1077,2628	
$C_{36}H_{57}N_{10}O_{20}S_4^+$	
1537,335	
$C_{52}H_{77}N_{14}O_{28}S_6^+$	

4.2 Chromatografická separace fytochelatin a glutathionu – vývoj metody UPLC

4.2.1 Vliv složení mobilní fáze na retenci analyt

Při optimalizaci separace byl testován vliv pH mobilní fáze na retenční čas GSH, GSSG, PC2 a PC3. Byly vyzkoušeny čtyři různé mobilní fáze s využitím stejného profilu gradientové eluce pro 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % a 5 % HCOOH ve vodě (A složka) a v acetonitrilu (B složka).

Tabulka IX: Vliv pH mobilních fází na retenční čas a) GSH, b) GSSG, c) PC2 a d) PC3

a)

Vliv pH na retenční čas GSH	
HCOOH v %	retenční čas t_R
0,05%	$1,29 \pm 0,038$
0,10%	$1,29 \pm 0$
0,50%	$1,29 \pm 0$
5%	$1,05 \pm 0,005$

b)

Vliv pH na retenční čas GSSG	
HCOOH v %	retenční čas t_R
0,05%	$2,26 \pm 0,1485$
0,10%	$2,26 \pm 0,1461$
0,50%	$2,25 \pm 0,1414$
5%	$1,47 \pm 0,0235$

c)

Vliv pH na retenční čas PC2	
HCOOH v %	retenční čas t_R
0,05%	$2,46 \pm 0,061$
0,10%	$2,46 \pm 0,061$
0,50%	$2,45 \pm 0,071$
5%	$2,26 \pm 0,066$

d)

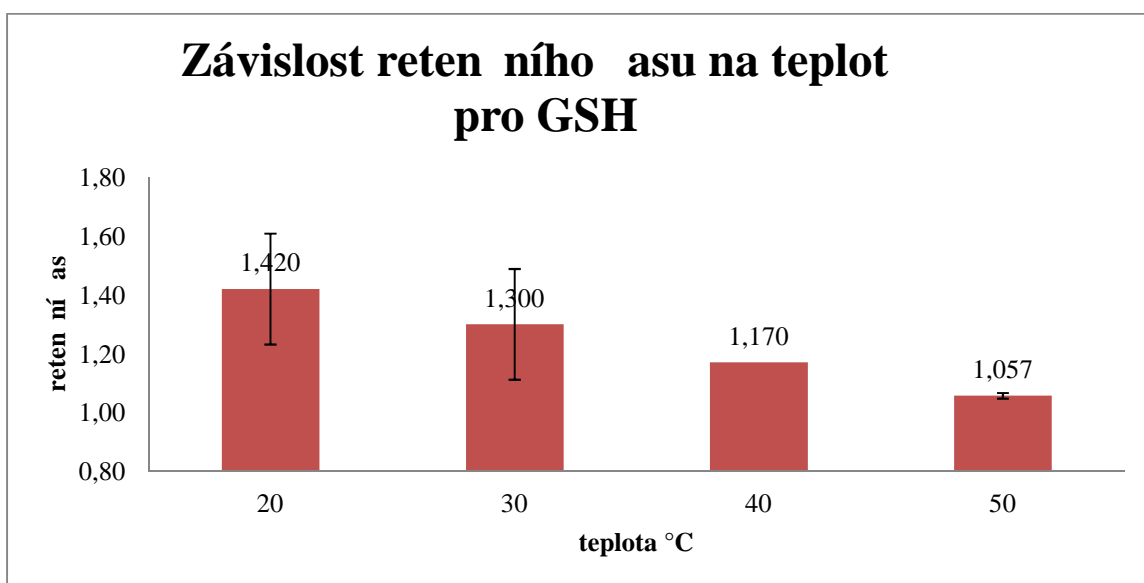
Vliv pH na retenční čas PC3	
HCOOH v %	retenční čas t_R
0,05%	$2,73 \pm 0,045$
0,10%	$2,73 \pm 0,045$
0,50%	$2,73 \pm 0,024$
5%	$2,51 \pm 0,057$

V tabulkách IX jsou zaznamenány retenční časy při čtyřech mobilních fázích (0,05 %, 0,1 %, 0,5 % a 5 % HCOOH ve vodě a acetonitrilu), přičemž výsledky uvedené v tab. IX představují průměrné hodnoty těchto měření. Pro všechny čtyři testované mobilní

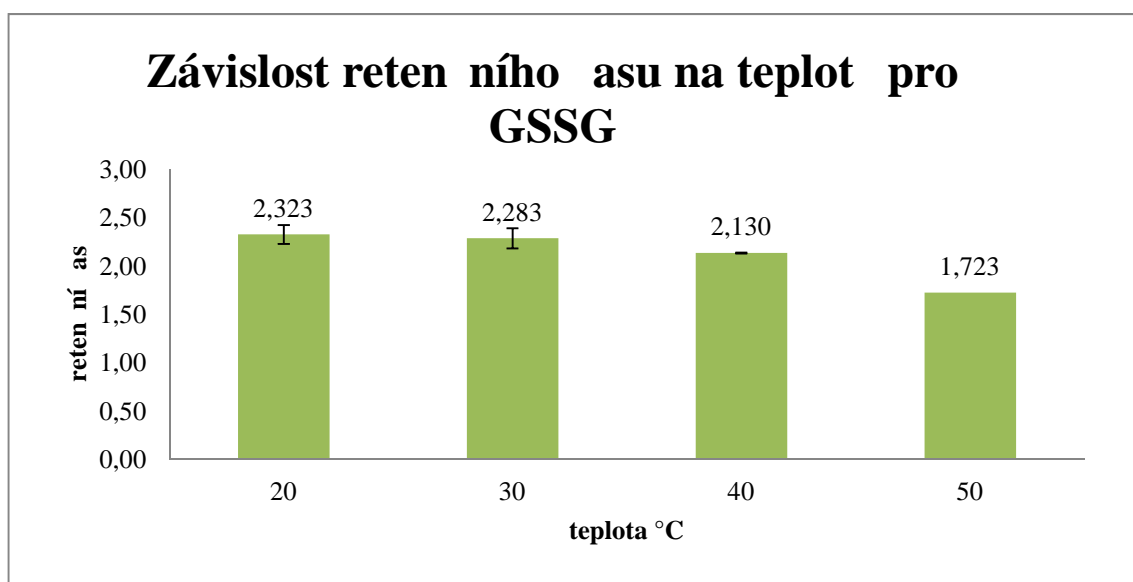
fáze bylo zachováno následující eluční pořadí: GSH, GSSG, PC2 a PC3. Vliv změny koncentrace kyseliny mravenčí na retenční časy eluovaných látek je zanedbatelný v rozmezí od 0,05 %, 0,1 % a 0,5 % HCOOH. V případě koncentrovanější kyseliny (5 % HCOOH) dochází ke zkrácení retenčních časů analytů. Použití nejvyšší MF z důvodu urychlení separace by ale způsobilo ztrátu rozlišení a navíc při dlouhodobé práci s takto kyselou mobilní fází se snižuje životnost kolony. Z toho důvodu byla pro následující experimenty zvolena mobilní fáze s obsahem 0,1 % HCOOH v H₂O a ACN. Důvod, proč se pracovalo kyselým prostředím je ten, že se tvoří nadbytek protonů a dochází ke zvýšení citlivosti detekce v pozitivním módu elektrospreje.

4.2.2 Vliv teploty na retenci analyt

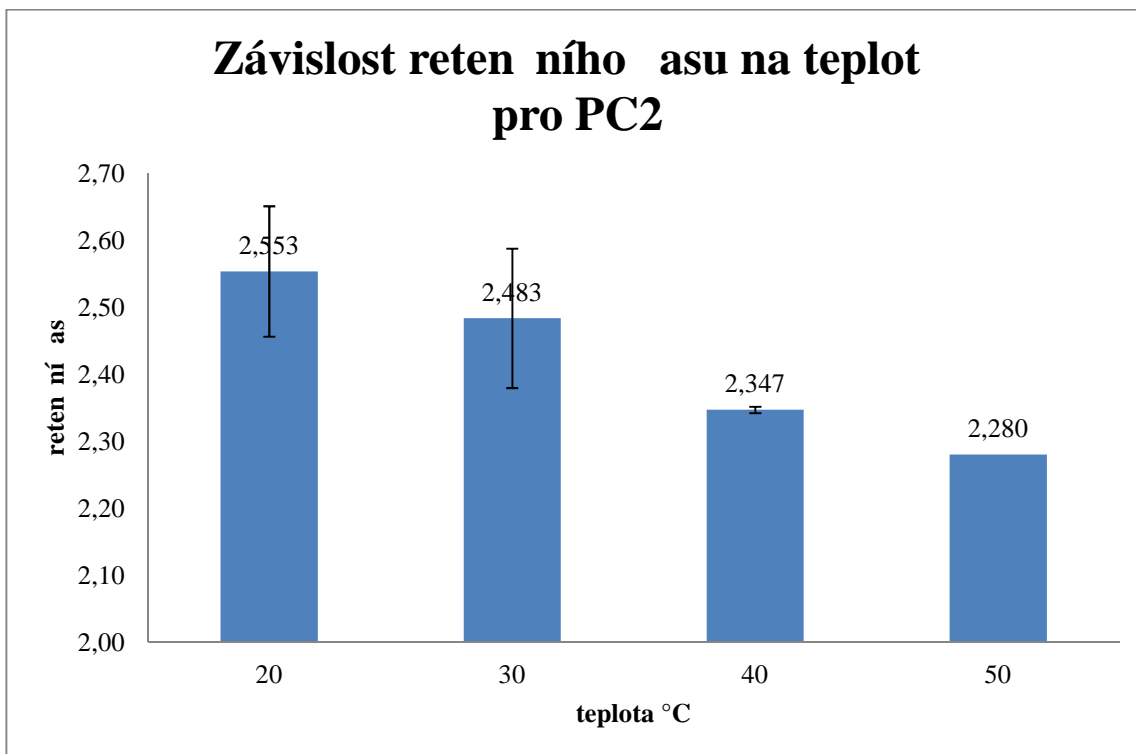
Dalším ze zkoumaných parametrů bylo testování při různých teplotách. Sledovala jsem, jak se mění retenčníasy jednotlivých složek, popřípadě jejich stabilita při vyšších teplotách. Standardy GSH, GSSG, PC2 a PC3 o koncentraci 100 mM byly proměřeny při teplotách 20, 30, 40, 50 °C ve třech opakováních.



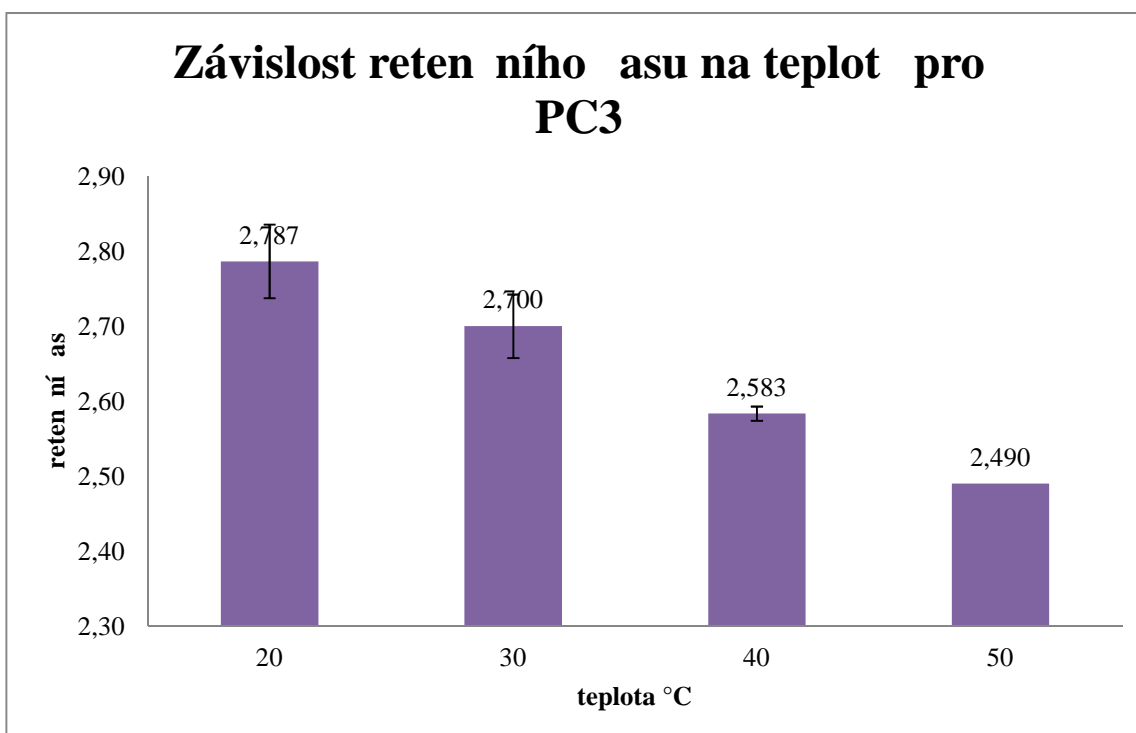
Obrázek 20: Závislost retenčního času na změně T pro redukovaný glutathion



Obrázek 21: Závislost retenčního času na změně T pro oxidovaný glutathion

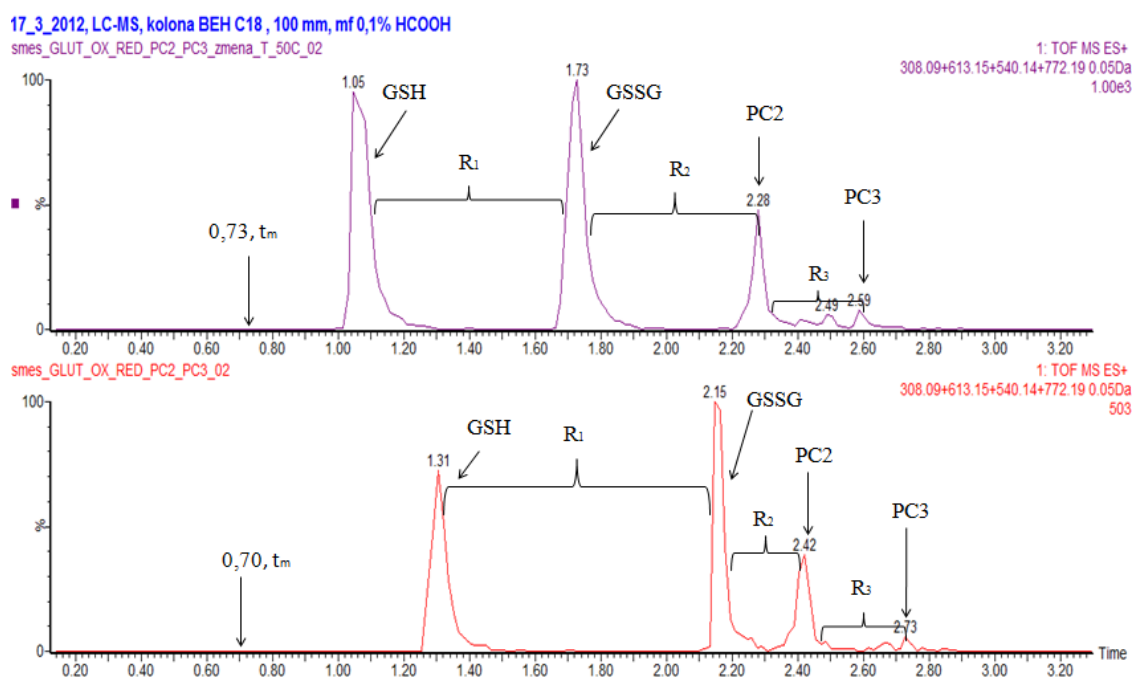


Obrázek 22: Závislost reten ního asu na zm n T pro fytochelatin 2



Obrázek 23: Závislost reten ního asu na zm n T pro fytochelatin 3

Na základ dat uvedených na obrázku 20 - 23 lze tvrdit, že s roustoucí teplotou klesá retenční čas, nicméně nárůst účinnosti kompenzuje ztrátu rozlišení (obr. 24, tabulka X). Při nárůstu teploty kolony dochází ke změně selektivity. Tato změna výrazně postihuje obě formy glutathionu ve srovnání s fytochelatinu. Práce za vyšších teplot je výhodná z důvodu rychlosti analýzy a nižší viskozity mobilní fáze, která umožňuje pracovat i za vyšších průtoků, nicméně je zapotřebí brát v potaz i tepelnou stabilitu analytů a životnost kolony. Z těchto důvodů byla nakonec zvolena pracovní teplota 30 °C.



Obrázek 24: Chromatogramy ukazují separaci při 30 °C a druhý při 50 °C

Rovnice 1: Rozlišení

$$R = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_2 + w_1)}$$

Tabulka X: Rozlišení při 30 °C a 50 °C, (výpočet podle rovnice 1a)

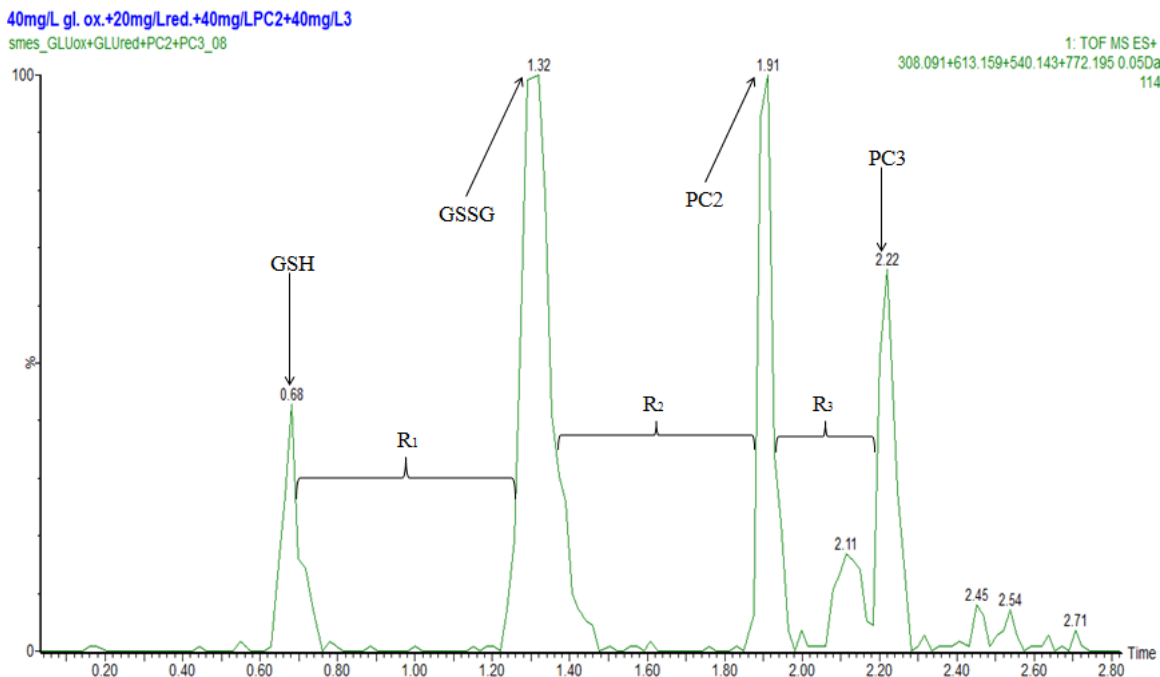
	30 °C	50 °C
R₁	5,56	3,4
R₂	1,8	2,86
R₃	2,9	2,27

4.2.3 Vliv typu stacionární fáze na retenční charakteristiky analyt

Hlavní podstatou chromatografie je dosáhnout spolehlivé separace dvou nebo více složek, a už se jedná o analytickou nebo preparativní chromatografii. Rozdělení může být dokonalé nebo neúplné a proto je vhodné jej kvantitativně vyjádřit pomocí R (rozlišení), které je definované rovnicí 1. Rozlišení souvisí se selektivitou, kapacitou a účinností kolony, proto lze lepšího rozlišení dosáhnout zvýšením selektivity (změna MF nebo SF), kapacitního poměru (změna MF, SF a změna teploty) nebo účinnosti (velikostí částic, délka kolony, rychlost průtoku MF apod.).

Kapacita chromatografické kolony (rovnice 1b a 2b) je vyjádřena jako maximální množství vzorku, které může daná kolona ještě separovat (kolona pracuje v lineární oblasti absorpční isotermy). Kapacita kolony je pro každý vzorek charakteristická a závisí například na složení mobilní fáze a charakteru vzorku. Kapacitu lze vyjádřit pomocí kapacitního poměru, který je definován jako množství separované látky ve stacionární a mobilní fázi. Vysoké hodnoty kapacitního poměru jsou méně vhodné, protože dochází ke větší spotřebě rozpouštědla a ke zvýšení doby analýzy, což vede obzvláště při izokratické eluci k rozmytým píčkám.^{54,88}

Při výběru vhodné stacionární fáze pro separaci PCs a glutathionu byla testována standardní UPLC kolona BEH C18 a kolona Kinetex, která využívá tzv. core-shell technologii. Zde je pevné jádro částice stacionární fáze pokryto tenkou porézní vrstvou stacionární fáze, do které mohou vstupovat molekuly rozpouštědla a analytu. Toto řešení umožňuje pracovat i za vysokých tlaků. Tento systém představuje zajímavou alternativu pro standardní UPLC kolonu, která je naplněna částicemi modifikovaného silikagelu o průměru menším než 2 μm . UPLC systém je charakteristický velmi vysokou separační účinností, avšak rovněž i vysokými tlaky na kolonu. Z výsledků testování obou kolon vyplývá, že jak kolona BEH C18 tak i Kinetex jsou vhodné v daném systému po optimalizaci složení mobilní fáze a teploty pro separaci obou forem glutathionu a fytochelatinu, přičemž kolona Kinetex poskytovala mírně lepší hodnoty rozlišení a kapacity (obr. 25) pro sledovaný typ látek (viz výpočty na straně 56 a 57).



Obrázek 25: Reten ní asy standard GSH, GSSG, PC2 a PC3 o koncentraci 40 mg/l na kolon Kinetex

pozn. mrtvý as byl zaznamenán pomocí PDA okolo 0,46 minuty

Rozlišení a kapacita kolony Kinetex:

Rovnice 2: a) Rozlišení, b) Kapacita

Rozlišení R

$$R = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_2 + w_1)}$$

$$R_1 = 2 \times \frac{(1,32 - 0,68)}{(0,2431 + 0,1492)} = 3,262$$

$$R_2 = 2 \times \frac{(1,91 - 1,32)}{(0,1324 + 0,2431)} = 3,142$$

$$R_3 = 2 \times \frac{2,22 - 1,91}{(0,0939 + 0,1324)} = 2,739$$

Kapacita k

$$k = \frac{t_1 - t_m}{t_m}$$

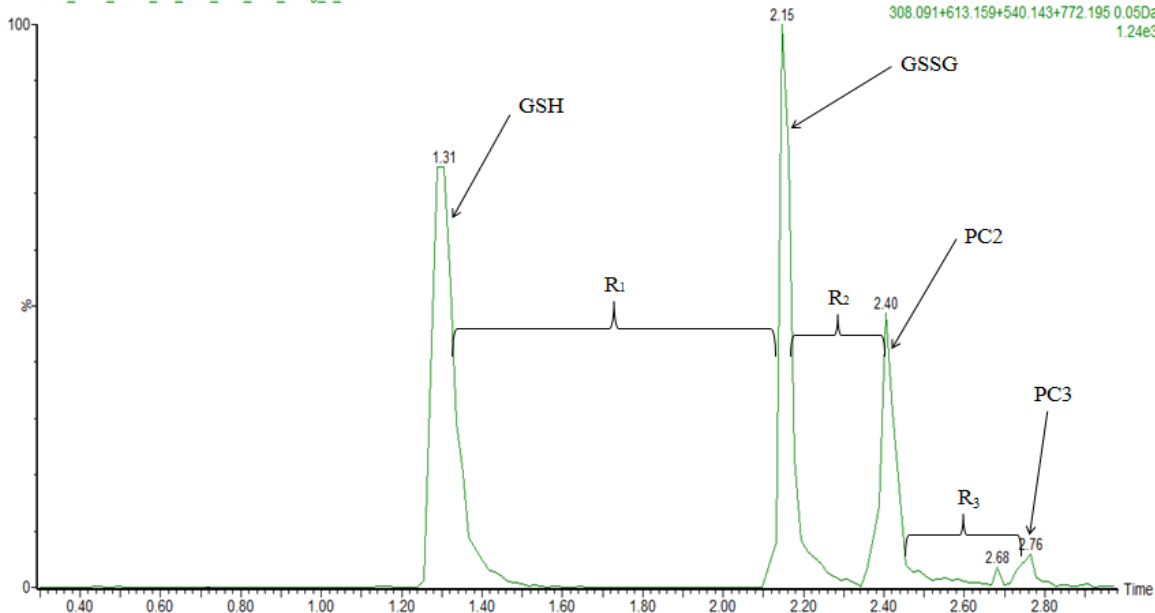
$$k_{GSH} = \frac{0,68 - 0,46}{0,46}$$

$$k_{GSH} = 0,47$$

$$k_{GSSG} = 1,87$$

$$k_{PC2} = 3,1$$

$$k_{PC3} = 3,82$$



Obrázek 26: Reten ní asy standard GSH, GSSG, PC2 a PC3 o koncentraci 15 mg/l

pozn. mrtvý as byl zaznamenán pomocí PDA okolo 0,71 minuty

Rozlišení a kapacita kolony Acquity:

Rovnice 3: a) Rozlišení, b) Kapacita

Rozlišení R

$$R = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_2 + w_1)}$$

$$R_1 = 2 \times \frac{(2,15 - 1,31)}{(0,1754 + 0,2156)} = 4,3$$

$$R_2 = 2 \times \frac{(2,4 - 2,15)}{(0,517 + 0,1754)} = 0,722$$

$$R_3 = 2 \times \frac{(2,75 - 2,4)}{(0,0687 + 0,517)} = 1,195$$

Kapacita k

$$k = \frac{t_1 - t_m}{t_m}$$

$$k_{GSH} = \frac{1,31 - 0,71}{0,71}$$

$$k_{GSH} = 0,84$$

$$k_{GSSG} = 2,03$$

$$k_{PC2} = 2,3$$

$$k_{PC3} = 2,88$$

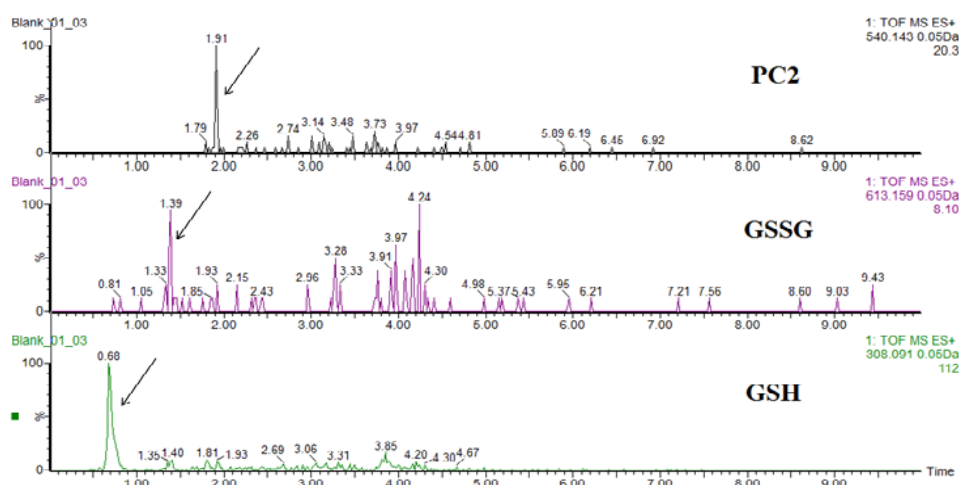
Z výsledk optimalizace vyplývá, že ultraú inná kaplinová chromatografie, resp. chromatografie na ásticích využívajících core-shell technologii v systému reverzních fází, je pln použitelná pro separaci sledovaných látek v širokém rozsahu teplot a koncentrací kyseliny v mobilní fázi. Pro analýzu reálných vzork byl tedy zvolen

následující systém sestavený z: mobilní fáze (složka A 0,1 % HCOOH v H₂O a složka B 0,1 % HCOOH v ACN) a z kolony BEH C18, která byla temperována na teplotu 30 ° C. Tento systém umožní separaci všech sledovaných analytů na základní linii.

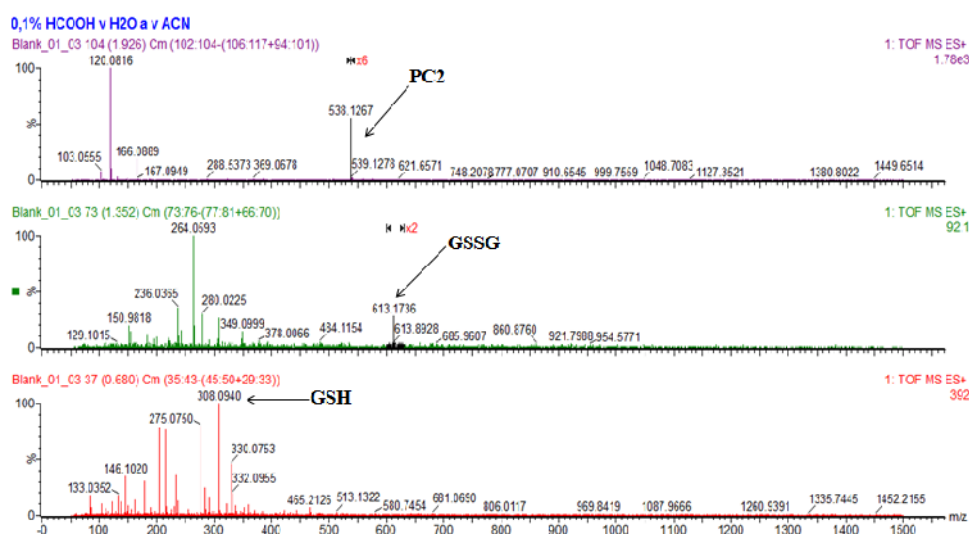
4.3 Reálné vzorky

4.3.1 Identifikace GSH, GSSG a PCs v reálných vzorcích

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, identifikace fytochelatinů byla provedena ve vzorcích rostlin (Hrách setý a Oves nahý), které byly vystaveny účinku těžkého kovu (Pb a Cd o koncentraci 10 μM, 100 μM a 1mM) po dobu 24 hodin. V této kapitole jsou diskutovány získané výsledky.

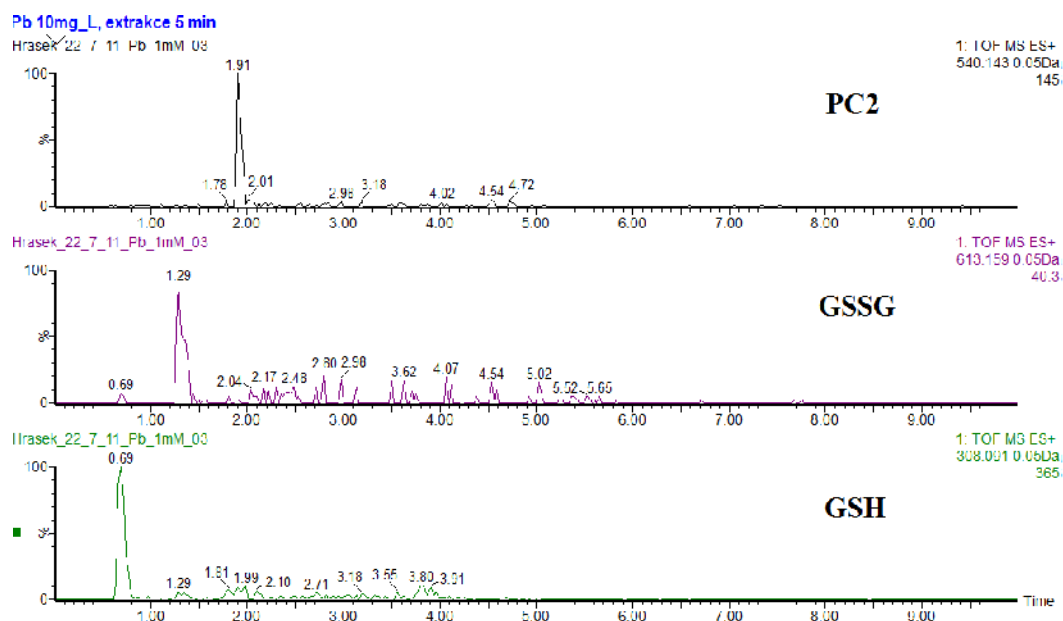


Obrázek 27: Chromatogramy blanku pro Hrách setý

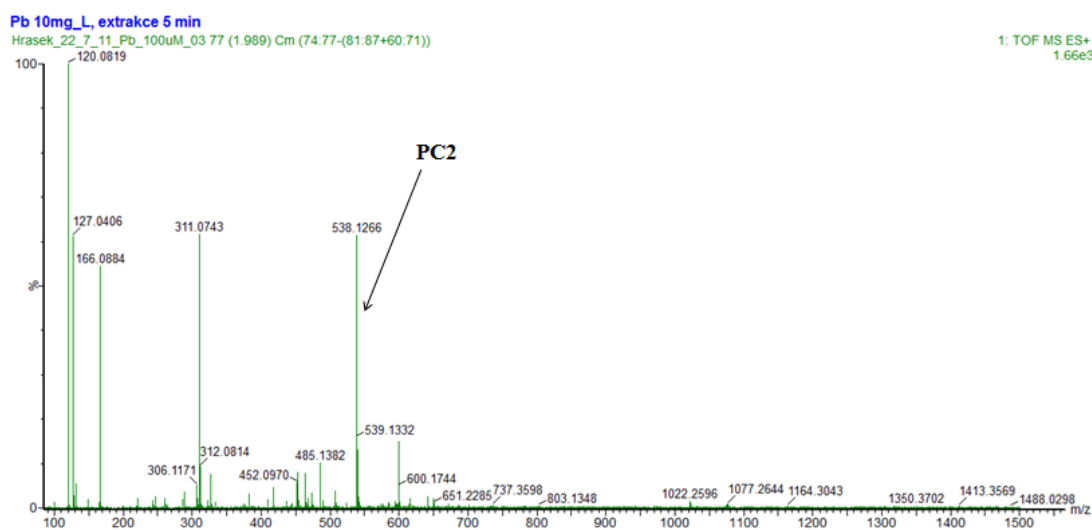


Obrázek 28: MS spektrum blanku pro Hrách setý

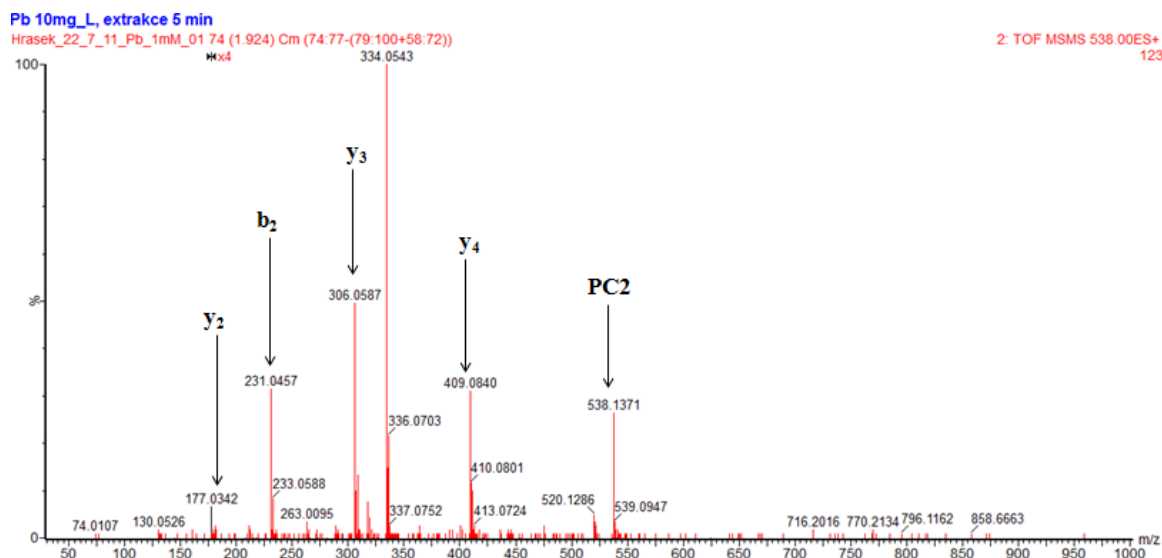
Obrázek 27 a 28 zobrazují chromatogramy a MS spektra pro GSH, GSSG a PC2. Použité vzorky (blanku) Hrachy setého byly zřejmě v průběhu sklizně kontaminovány určitým kovem a proto vzorek po naklíčení na vlně bez další expozice obsahoval i stopové množství fytochelatinu 2 s přesností 2,1 ppm. Signál iontu PC2 nebyl dostatečný pro získání kvalitního MS/MS spektra.



Obrázek 29: Chromatogramy Hrachy setého s 1 mM Pb



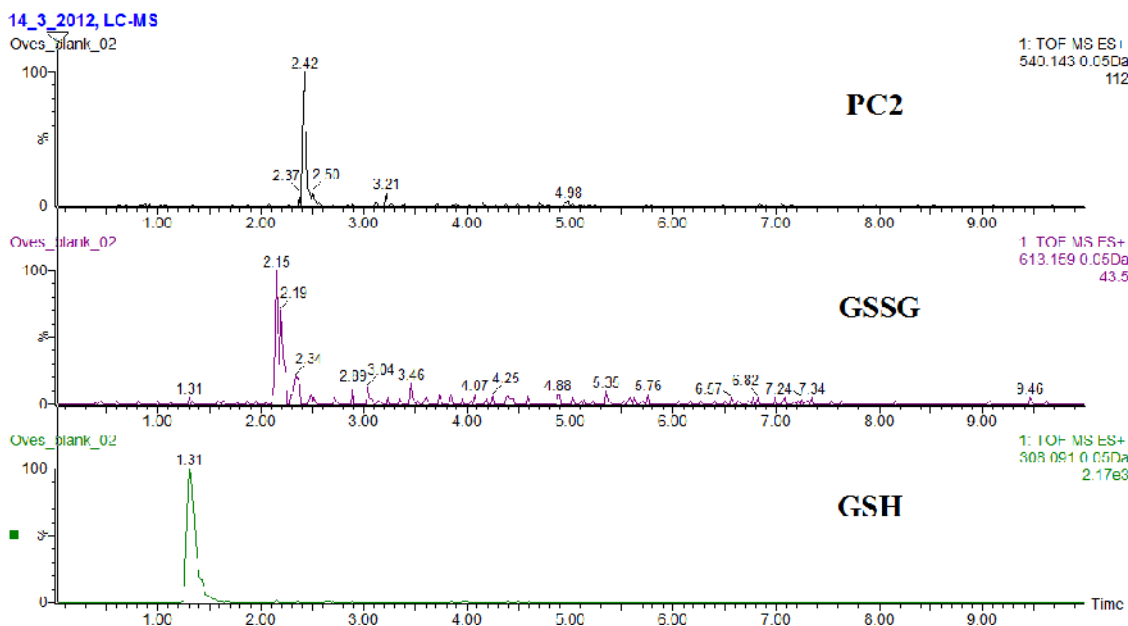
Obrázek 30: MS spektrum PC2 u Hrachy setého



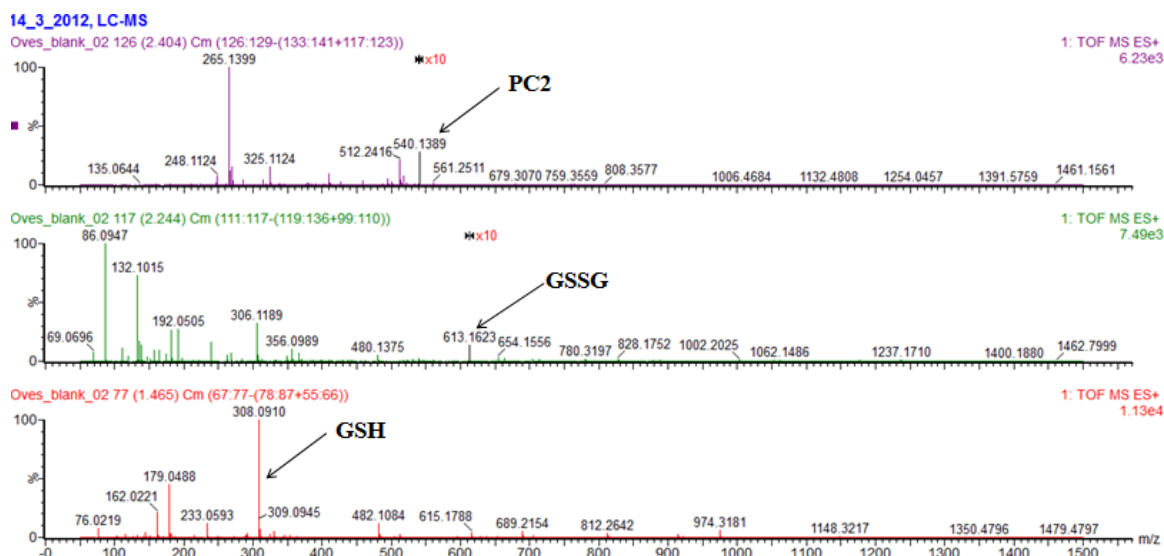
Obrázek 31: Reprezentativní MS/MS spektrum PC2 u Hrachu setého s 1 mM Pb²⁺

Na obrázku 29 jsou zobrazeny chromatogramy GSH, GSSG a PC2 získané z extrakt hrachu, který byl vystaven úink m olovnatých iont (10 μ M, 100 μ M a 1 mM) podobu 24 hodin. Ve srovnání s blankem je patrný nár st intenzity signálu PC2. Na obr. 30 je MS spektrum PC2, ze kterého je z ejmý vznik fytochelatinu jak v redukované, tak v intenzivn jší oxidované form s p esností -2,2 ppm. Z toho plyne, že fytochelatiny jsou látky, které jsou na vzduchu nestálé a podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem. Vznik PC2 u Hrachu setého byl pozorován už p i expozici 10 μ M roztokem olova.

Obrázek 31 p edstavuje fragmenta ní spektrum fytochelatinu 2 s p esnou hmotou 538,1371 v oxidované form s intenzitou (BPI 22,3 %, TIC 4,85 %). Mezi jeho hlavní fragmenty, které byly identifikovány pat í následující ionty: y₄ (409,084), y₃ (306,059); b₂ (231,045); y₂ (177,034). Všechny tyto fragmenty poukazují na tvorbu disulfidické vazby, respektive na související deficienci vodík zp sobenou touto vazbou, která pak ovlivnila tvorbu fragment v kolizní cele.



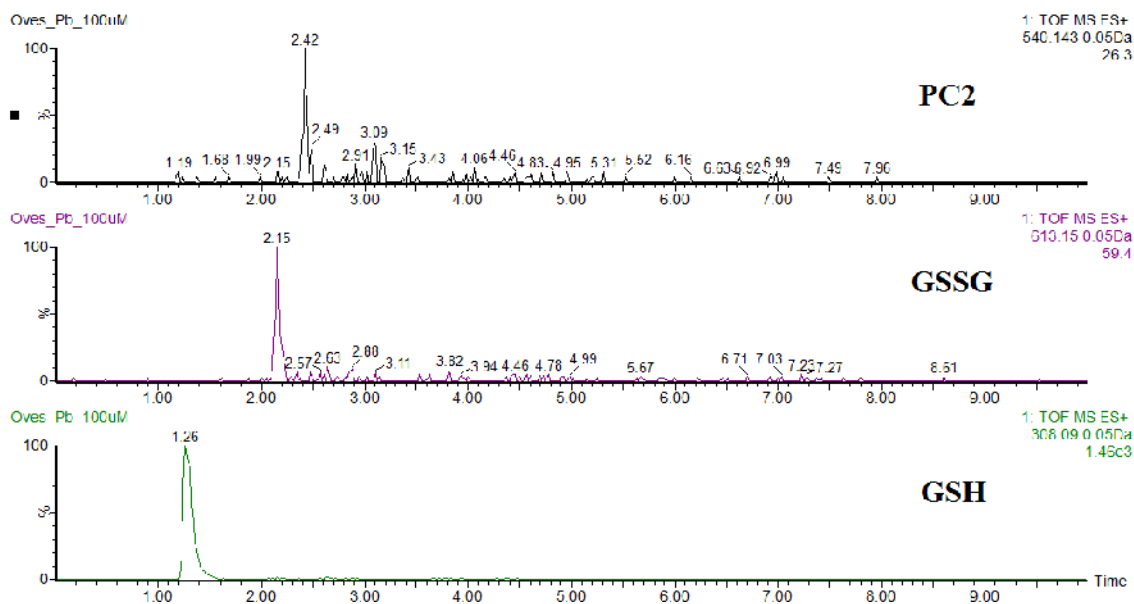
Obrázek 32: Chromatogramy blanku Ovsa nahého



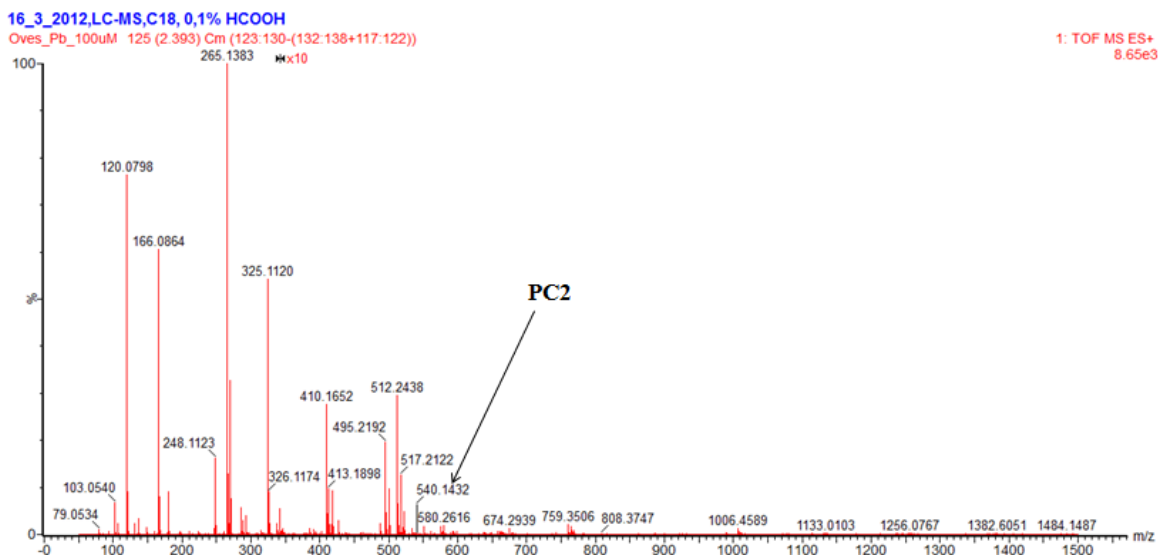
Obrázek 33: MS spektrum blanku Ovsa nahého

Problém kontaminace blanku se krom Hrachů setého týká i vzorku Ovsa nahého. Jelikož byla vyloučena možnost kontaminace v laboratoři, je pravděpodobné, že již samotné plodiny obsahovaly významné množství těžkých kovů, které indukují fytochelatin syntázu.

Na obrázku 32 a 33 je zobrazena separace a MS spektrum GSH, GSSG a PC2. V MS/MS spektru PC2 byly pozorovány fragmenty y_4 (411,09), x_3 (336,06) a y_3 (308,08), které jednoznačně prokazují přítomnost PC2 v extraktu blanku.



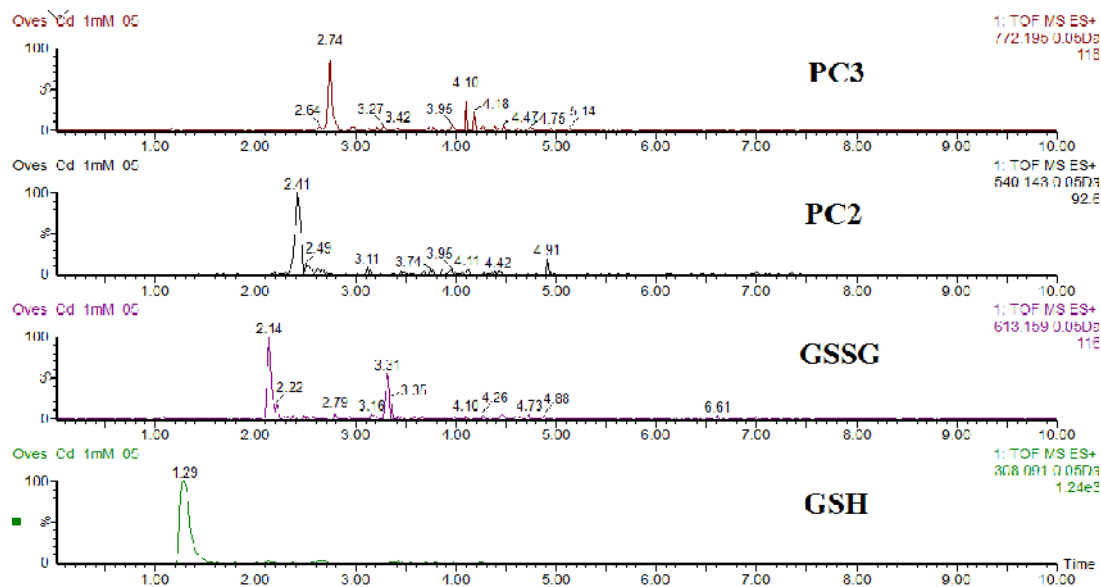
Obrázek 34: Chromatogramy Ovsu nahého se 100 µM Pb



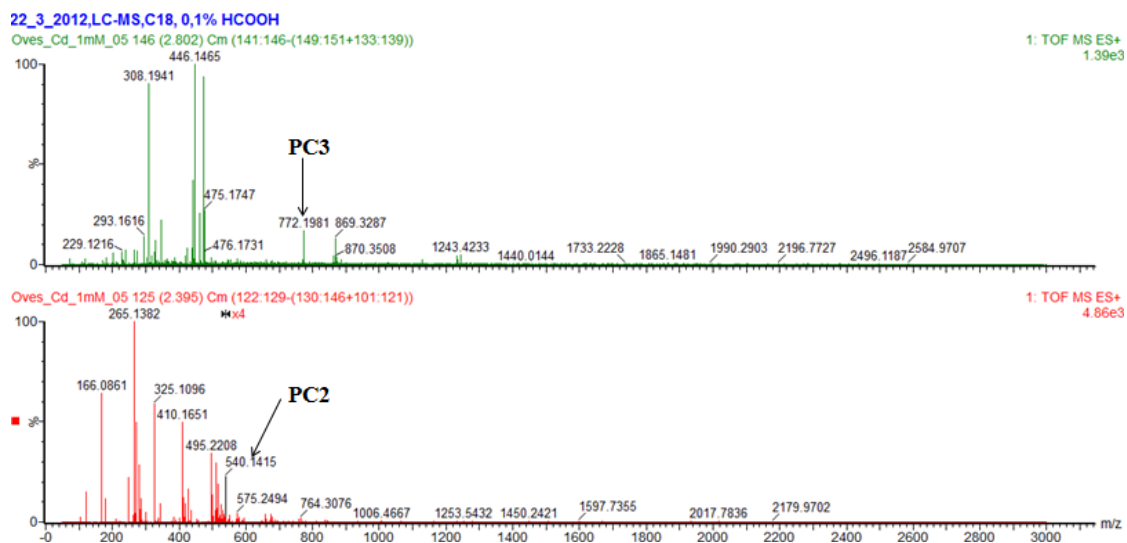
Obrázek 35: Reprezentativní MS spektrum PC2 u Ovsu nahého se 100 µM Pb

Na obrázku 34 jsou znázorněny chromatogramy GSH, GSSG a PC2. V uvedeném MS spektru (obr. 35) byla intenzita PC2 na tolik nízká, že v MS/MS spektru nebyly fragmenty PC2 pozorovány. Nepřítomnost významného množství volných fytochelatinů, ani při nejvyšší koncentraci (1 mM) Pb, vedlo k předpokladu, že olovo je

v případě Ovsu nahého velmi slabý induktor fytochelatin syntázy, obzvláště v porovnání s toxickyjším kadmíem.



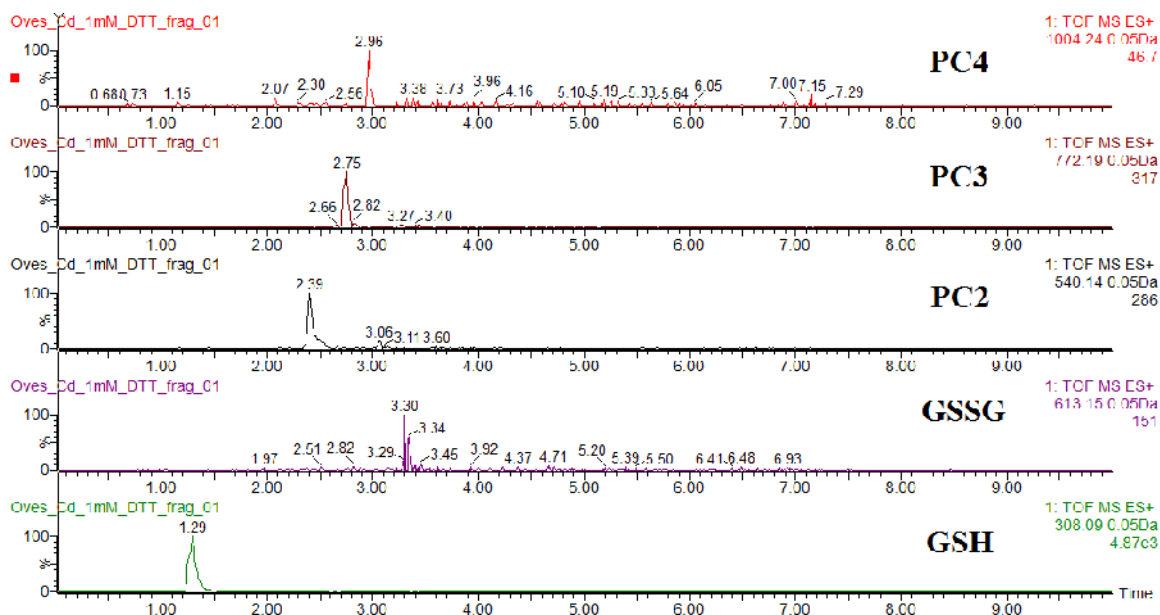
Obrázek 36: Chromatogramy Ovsu nahého s 1mM Cd pro GSH, GSSG a PC2



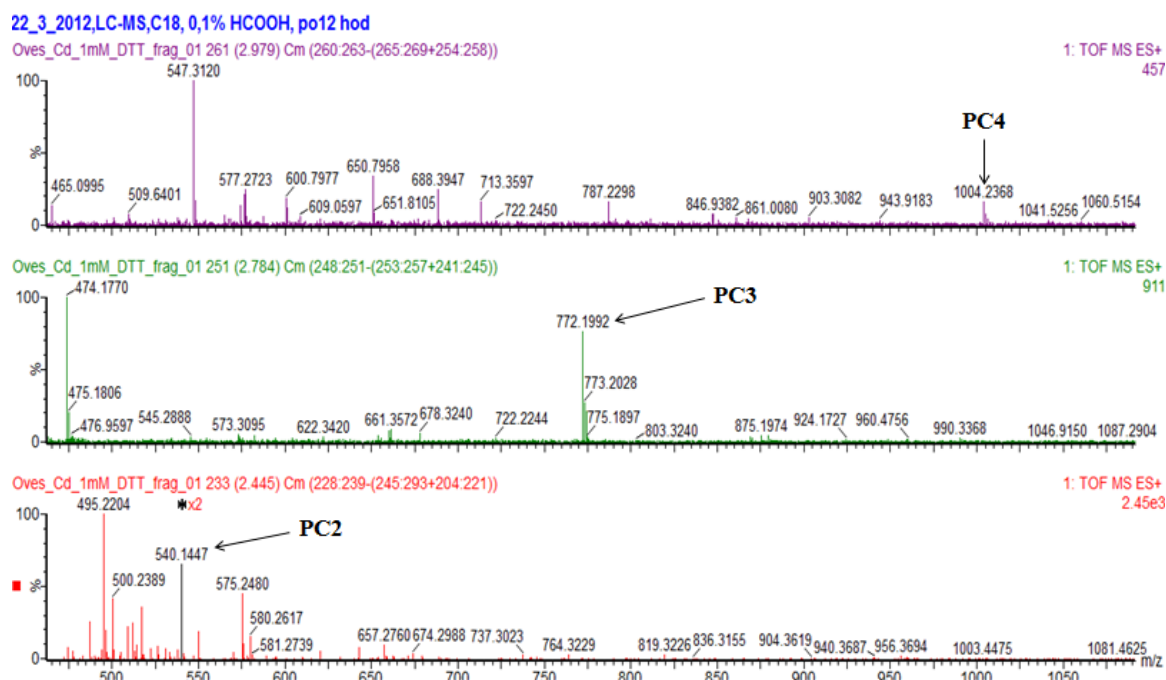
Obrázek 37: Reprezentativní MS spektrum PC2 v Ovsu nahém s 1mM Cd

Vzhledem k tomu, že olovo je kov, který v případě ovsu méně aktivuje fytochelatin syntázu, rozhodla jsem se pro další experimenty vystavit oves toxickým úinkem kadmia. Ze získaných chromatogram (obr. 36) a MS spekter (obr. 37) byl identifikován PC2 s přesností 0,9 ppm. Z fragmentačního spektra PC2 byly

identifikovány fragmenty b_2 (233,09), b_3 (362,08) a y_4 (411,1) a intezita PC3 byla o n co vyšší než u PC2, fragmenty však nebyly pozorovány.



Obrázek 38: Chromatogram GSH, PC2, PC3 a PC4 Ovsí nahém s 1mM Cd^{2+} a DTT



Obrázek 39: Reprezentativní MS spektrum PC2, PC3 a PC4 u Ovsí nahého s 1mM Cd^{2+} a DTT

Jak už bylo v případě Hrachy setého s Pb, také Oves nahý vykazoval významné množství peptidu PC2 v oxidované formě a kromě toho i PC3. Vzhledem k velkému obsahu oxidovaných forem PCs bylo použito redukční činidlo dithiothreitol k rozrušení disulfidické vazby v oxidovaných formách a ke zvýšení citlivosti detekce analyzovaných látek. Roztok dithiothreitolu byl přidán do extraktu ovsa s Cd na výslednou koncentraci 5 mM a nechal se působit po dobu 24 hodin. Poté byl extrakt analyzován. Tímto způsobem byly u Ovsa nahého s Cd^{2+} a při dávce DTT identifikovány fytochelatiny PC2, PC3 a PC4, dokonce i PC5 s m/z 1236,2982. Intenzita fytochelatinu 5 byla však velmi slabá. Na obrázku 38 lze vidět, že nejvyšší obsah zaujímá vznik PC2 s plochou píku 14,5 a s přesnou hmotou 540,1447 (2,6 ppm), následně PC3 s plochou píku 6,5 a s přesnou hmotou 772,1992 a nejnižší obsah zaujímala PC4 s plochou píku 0,7 a s přesnou hmotou 1004,2368. Identifikace těchto fytochelatinů byla potvrzena MS/MS experimenty a byly pozorovány fragmenty y_5 (540,164); b_4 (465,117); y_4 (411,1) a b_2 (233,056).

Z uvedených MS a MS/MS spekter se usoudilo, že hrách je rostlina, která produkuje v větší množství PC2 už při vystavení úniku méně toxických olovnatých iontů. Při expozici 10 μM roztokem Pb^{2+} byl pozorován nárůst odezvy PC2 ve srovnání s blankem. Na druhou stranu oves při kontaktu s nejvyšší koncentrací olova (1mM) fytochelatin PC2 téměř neprodukuje. Nicméně pokud byl oves exponován únikem kadmia, vykazoval významnou produkci fytochelatinu PC2 už na koncentrační úrovni 10 μM . Po přidání redukčního činidla DTT byly identifikovány i PC3, PC4 a PC5.

5. Závěr

Bylo zjištěno, že extrakční činidlo skládající se ze směsi 0,1 % HCOOH, 5 % kyseliny metafosforené, 1mM EDTA, je vhodné pro extrakci analyzovaných látek. Pro analýzu obou forem glutathionu a zejména fytochelatin bylo použito spojení UPLC/ESI-MS. Na základě získaných výsledků se zjistilo, že toto spojení je spolehlivé k identifikaci těchto rostlinných látek (oxidovaný a redukovaný glutathion, PC2 a PC3).

Pomocí přímého nástřiku směsi roztoků standardů těžkých kovů do hmotnostního spektrometru byla potvrzena tvorba komplexů PC2 a PC3 s olovnatými a kadmnatými ionty. Kromě základních fytochelatinů s kovalentně navázaným jedním atomem kovu byly ve směsi identifikovány i dimery fytochelatinů PC2-PC2 a PC3-PC3 v oxidované a redukované formě.

Dále se sledoval vliv kolizních energií při optimalizaci podmínek MS pro PC2 a PC3. Nejvhodnější kolizní energie pro získání kvalitních MS byla 5 eV. Mimoto bylo zjištěno, že pro kolizní spektra fytochelatinů a glutathionu představuje optimální kompromis rozsah kolizních energií od 10 do 50 eV, při kterém byla MS/MS spektra všech studovaných analytů bohatá na fragmenty.

Při optimalizaci separace byl prozkoumán vliv mobilních fází, teploty kolony a vliv stacionárních fází (chromatografická kolona BEH C18 a Kinetex) na separaci daných standardů. Z výsledků vyplývá, že tyto kolony jsou použitelné pro separaci sledovaného typu analytů na základní linii v širokém rozmezí teplot a koncentrací kyseliny mravenčí v mobilní fázi.

Získaná metodika byla úspěšně aplikována na extrakty vzorků Hrachy setého a Ovsu nahého.

Ze zjištěných výsledků lze usoudit, že Hrách setý je v těmto induktorem fytochelatin syntázy oproti Ovsu nahému. Dále se předpokládá, že kadmium je pro organismus ovesu toxičtější než olovo a proto dochází ke zvýšené tvorbě fytochelatinů PC2 a PC3. Z experimentů s DTT lze potvrdit, že dithiothreitol je vhodné redukční činidlo pro rozrušení disulfidických vazeb a tím i zvýšení citlivosti metody, což je dáno převahou více forem (oxidované a redukované) do jedné (redukované).

Komplexy fytochelatinů s olovem a kadmii nebyly v extraktu Hrachy setého ani Ovsu nahého identifikovány.

6. Seznam použité literatury

1. Cosio Claudia, Martinoia Enrico and Keller Catherine: *Plant Physiology*, **134**, 716 (2004).
2. Mudgal V., Madaan N. and Mudgal A.: *Agric. Biol. J. N. Am.* **1**, 40 (2010).
3. Rauser WE: *Annual Review of Biochemistry* **59**, 61 (1990).
4. Noctor G., Arisi A. C. M.: Jouanin L. et al.: *Journal of Experimental Botany* **49**, 62 (1998).
5. Tennstedt P., Peisker D. et al.: *Plant Physiology* **149**, 938 (2009).
6. Clemens S.: *Journal of Plant Physiology* **163**, 319 (2006).
7. Poláková Š., Kubík L., Malý S.: Monitoring zemědělských půd v České republice 1992 -2007, ISBN 978 – 80 – 7401 – 041 – 5, (2011).
8. Navrátil T., Rohovec J.: Olovo, Vesmir 85, 518, (2006), dostupné z <http://www.vesmir.cz/clanek/olovo>, staženo 1.3.2012.
9. Toužín J.: Stručný pohled chemie prvků, Masarykova univerzita v Brně, ISBN 80 – 210 – 2635 – 9, (2001).
10. Kulveitová H.: Chemie II (Chemie prvků), Vysoká škola Báňská – Technická univerzita Ostrava, ISBN 978 – 80 – 248 – 1322 – 6, (2007).
11. Kašpar J. a Vacek V.: Směrnice pro kvalitu ovzduší v Evropě, ISBN 80 – 7212 – 000 – X, (1996).
12. Cibulka J.: Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. In. Academia, Praha, (1991).
13. Cibulka J. a kol.: Pohyb olova, kadmia a rtuti v zemědělské výrobě a biosféře, Ministerstvo zemědělství a výživy v ČR, Praha (1986).
14. Procházka S., Macháková I., Krekule J., Šebánek J. a kol.: Fyziologie rostlin. Academia Praha, ISBN 80-200-0586-2, (1998).
15. Prasad M.N.V., Hagemeyer J.: Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystem. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN: 978-354065469, (1999).

16. Novák J., Skalický M.: Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika, česká zemědělská univerzita v Praze, ISBN 978 – 80 – 904011 – 1 – 2, (2008).
17. Procházka S. a kol.: Botanika: Morfologie a fyziologie rostlin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, ISBN 978 – 80 – 7375 - 125 – 8, (2007).
18. Dostál P.: Anatomie a morfologie rostlin v pojmech a nákresech, Univerzita Karlova v Praze, ISBN 978 – 80 – 7290 – 358 – 0, Praha (2008).
19. Vyšší rostliny a jejich orgány, dostupné z http://www.planina.cz/priro/prehledy/prehled_b02_vyssi_organy.pdf, staženo dne 17.2.2012.
20. Primární stavba stonku, dostupné z http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-organologie-primarni_stavba_stonku.html, staženo dne 17.2.2012.
21. Jelínek J., Zicháček V.: Biologie pro gymnázia, ISBN 80 – 7182 – 159 – 4, Olomouc (2003).
22. Luxová M.: Zemědělská botanika – Anatomie a morfologie rostlin, 07 – 012 – 65, Praha (1965).
23. Kondo N., Isobe M., Imai K. and Goto T.: *Agric. Biol. Chem.* **49**, 71 (1985).
24. Stejskal K.: Syntéza thiolových sloučenin u modelových rostlin exponovaných toxickým těžkým kovům, Bakalářská práce, Masarykova univerzita Brno (2008).
25. Kondo N., Imai K., Isobe M., et al: *Tetrahedron Letters* **25**, 3869 (1984).
26. Zenk Meinhart H.: *Gene* **179**, 21 (1996).
27. Rama Pal & J. P. N. Rai: *Appl Biochem Biotech* **160**, 945 (2010).
28. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M. H.: *Science* **320**, 674 (1985).
29. Grill., E., Winnacker, E.-L. and Zenk, M. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 439 (1987).
30. M. J. May, T. Vernoux, C. Leaver, et al.: *Journal of Experimental Botany* **49**, 649 (1998).
31. Anderson M. E.: *Chemico-Biological Interactions*, **111-112**, 1 (1998).
32. Yadav S.K.: *South African Journal of Botany* **76**, 167 (2010).

33. Bramanti E., Toncelli D., Morelli E. et al.: *Journal of Chromatography A* **1133**, 195 (2006).
34. Hirata K., Tsuji N., Miyamoto K.: *Journal of Bioscience and Bioengineering* **100**, 593 (2005).
35. Klapheck S., Schlunz S., & Bergmann L.: *Plant Physiology* **107**, 515 (1995).
36. Chen J., Zhou J. & Goldsbrough P. B.: *Plant Physiology* **101**, 165 (1997).
37. Inouhe M., Ito R., Ito S., Sasada N., Tohyama H. & Joho M.: *Plant Physiology* **123**, 1029 (2000).
38. Clemens S., *Biochimie* **88**, 1707 (2006).
39. Yosypchuk B., Šestáková I., Novotný L.: *Talanta* **59**, 1253 (2003).
40. Fojta M., Fojtová M., Havran L. et al.: *Analytica Chimica Acta* **558**, 171 (2006).
41. Gusmão R., Ariño C., Díaz-Cruz J. M., Esteban M.: *Analytical Biochemistry* **406**, 61 (2010).
42. Pawlik-Skowronska B., Pirszel J.: *Aquatic Toxicology* **83**, 190, Poland (2007).
43. Zaiera H., Mudarra A.: *Analytica Chimica Acta* **671**, 48 (2010).
44. El-Zohri M. H. A., Cabala R., Frank H.: *Anal Bioanal Chem*, **382**, 1871 (2005).
45. Saúl Vazquez, Peter Goldsbrough, Ramon O. Carpena: *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 63 (2009).
46. Barańkiewicz D., Kozka M., Piechalak A.: *Talanta* **79**, 493 (2009).
47. Hrách setý, dostupné z <http://botany.cz/cs/pisum-sativum/>, staženo dne 20.2.2012.
48. Biggs M., McVicarová J. and Flowerdew B.: *Velká kniha zeleniny, bylin a ovoce*, ISBN 80 - 7207 -537 - 3, (2004).
49. Benada J., Flašarová M. a kol.: *Metodika pěstování jarních obilnin – ječmen jarní, oves, pšenice jarní*, ISBN 80 – 902545 – 4 - 3 , Kroměříž (2001).
50. Moudrý J., *Základy pěstování ovsa*, ISBN 80 – 7105 – 044 – x, Praha (1993).

51. Douša M.: Základy separačních metod se zaměřením na HPLC, ISBN 80-86548-09-0, Brno (2002).
52. Churáček J., Jandera P.: Separace látek: Kapalinová vysokoucíinná kolonová chromatografie, .p. 450-33685, Praha (1986).
53. Pacáková V., Štulík K.: Vysokoucíinná kapalinová chromatografie, .p. 1012-5066, Praha (1986).
54. Churáček J. a kolektiv: Analytická separace látek, typové . L16-C3-IV-3If/68173, Praha (1990).
55. Kurka O.: Studium chemických p em n anthokyanidinových barvin, Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, (2011).
56. Jandera P., Churáček J.: Kapalinová chromatografie s programovaným složením mobilní fáze, Academia, Praha (1984).
57. Macnair J. E., Lewis K. C., Jorgenson J. W.: *Analytical chemistry* **69**, 983 (1997).
58. Kondawar Manish S., Patel Sandeep B., Bhise Satish B.: Appasaheb Birnale College of Pharmacy, South Shivajinagar, Sangli – 416416 (MS), **4, 5** (2006).
59. Štulík K. a kolektiv: Analytické separační metody, ISBN 80 – 246 – 0852 – 9, Praha (2004).
60. Churáček J., Jandera P.: Úvod do vysokoucíinné kapalinové chromatografie. SNTL, Praha 1981.
61. Meyer Veronika R.: Practical High - performance liquid chromatography, Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research (EMPA), St. Gallen, Switzerland, ISBN 978-0-470-68218-0 (cloth) – ISBN 978-0-470-68217-3 (pbk.), (2010).
62. R. P. V. Scott: Liquid chromatography detectors, Journal of chromatography library, Elsevier Scientific Publishing Company, **11**, 248, ISBN: 0 – 444 – 41580, (1997).
63. V eš ál J. a kolektiv: Hmotnostní spektrometrie, ISBN 80-210-1835-6, Brno (1998).
64. Edmond de Hoffmann and Vincent Stroobant: Mass spectrometry – Principles and application, John Wiley & Sons, 489, ISBN 978-0-470-03310-4 (HB) ISBN 978-0-470-03311-1 (PB), Chippenham (2007).
Dostupné z <http://www.pharmainfo.net>, staženo dne 25.2.2012.

65. Hmotnostní spektrometrie, dostupné z http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm, staženo 15.2.2012.
66. CS Ho, CWK Lam, MHM Chan: *Clin Biochem Rev*, **24**, 3 (2003).
67. Fenn John B., Mann Matthias, Meng Chin Kai: *Mass Spectrometry Reviews*, **9**, 37 (1990).
68. Prest H. F.: Ionization Methods in Gas Phase Mass Spectrometry; Operating Modes of the 5973 Network Series MSDs, Agilent technologies, 23, 5968-7957E (1999), dostupné z <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5968-7957.pdf>, staženo dne 10.3.2012.
69. Houk R. S., Fassel V. A., Flesch G. D., H. Svec J., Gray A. L., Taylor C. E.: *Anal. Chem.* **52**, 2283 (1980).
70. Shan H. N. and Gharbia S. E.: Mass spectrometry for Microbial Proteomics, Library of Congress cataloging in publication data, ISBN 978 – 0 – 470 – 68199 – 2 (2010).
71. Karas M., Hillenkamp F.: *Anal. Chem.* **60**, 2299 (1988).
72. Kang M. J., Pyun J. C., Lee J. C., Choi Y. J, et al.: *Mass Spectrom.* **19**, 3166 (2005).
73. Hunt D. F.: *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, **45**, 111 (1982).
74. Benninghoven A., Rüdenauer F. G. and Werner H. W.: Secondary Ion Mass Spectrometry: Basic Concepts, Instrumental Aspects, Applications and Trends, Wiley, New York, p. 1227 (1987), dostupné z <http://pprco.tripod.com/SIMS/Theory.htm>, staženo dne 10.3.2012.
75. Chait E. M.: *Analytical chemistry* **44**, 77A–91a (1972).
76. Churá ek J., Kotrlý S.: Analytická chemie II, 55 – 714 – 82, Pardubice (1983).
77. Robert B. Cody: Electrospray Ionization Mass Spectrometry- History, Theory, and Instrumentation, JEOL USA, Peabody, Massachusetts, (2002).
78. Hol apek M., Jandera P.: *Chem. listy*, **92**, 278 (1998).
79. Hmotnostní analyzátoary, dostupné z http://holcapek.upce.cz/teaching/MS04_Hmotnostni_analyzatory.pdf, staženo dne 24.2.2012.

80. Louris John N., Cooks R. Graham et al: *Anal. Chem.* **59**, 1677 (1987).
81. Markov A.: *Anal. Chem.* **72**, 1156 (2000).
82. Bohá M.: Arnd Ingendoh et al.: *Chem. listy* **99**, 943 (2005).
83. S. E. Van Bramer: An Introduction to Mass Spectrometry, Widener University - Department of Chemistry, One University Place Chester, PA 19013, dostupné z <http://science.widener.edu/svb/massspec/massspec.pdf>, staženo dne 22.2.2012.
84. Blaum K., Geppert Ch. et al.: *International Journal of Mass Spectrometry* **181**, 67 (1998).
85. Mamyryn B. A., Karataev V. I., Shmikk D. V. and Zagulin V. A.: *Sov. Phys. JETP* **37**, 45 (1973).
86. Abelson J. N., Simon M. I. et al.: Methods in enzymology, *Biological Mass spectrometry*, **402**, 1-478, ISBN: 978-0-12-182807-3, (2005).
87. Shevchenko A. A., Chernushevich I. V., Ens, W., Standing K et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1015 (1997).
88. UPLC, dostupné z <http://www.hplc.cz/>, staženo dne 15.3. 2012.
89. Ten-Yang Yen, Joseph A. Villa, Jane G. DeWitt, *J. Mass Spectrom.* **34**, 930 (1999).

Obrázek 1: <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/angiosperm-morphology/root-system.php>

Obrázek 2: http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-organologie-primarni_stavba_stonku.html

Obrázek 3: <http://cs.wikipedia.org/wiki/List>

Obrázek 8: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

Obrázek 10: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>

Obrázek 11: <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/detektivni-chemie/2>

Obrázek 12: Hmotnostní spektrometrie, Karel Lemr, Katedra analytické chemie P F UP

Obrázek 13: <http://penyfan.ugent.be/labo/joelv/Qtof.html>

7. Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
ATP	Adenosintrifosfát
CI	Chemická ionizace
Cys	Cysteinylní
DAD	Detektor diodového pole
DTT	Dithiothreitol
EI	Ionizace elektronem
ESI	Ionizace elektrosprejem
FAB	Bombardování urychlenými atomy
FIB	Bombardování urychlenými ionty
FD	Desorpce polem
FI	Ionizace polem
GSSG	Glutathion v oxidované formě
GSH	Glutathion v redukované formě
Glu	Glutamyl
Gly	Glycin
HMW	Vysokomolekulární komplex
HCOOH	Kyselina mravenčí
HPLC	Vysokou rychlostí kapalinová chromatografie
hPC	Homofytochelatin
PC	Fytochelatin
PDA	Detektor diodového pole
hPC	Homofytochelatin

LC	Kapalinová chromatografie
LMW	Nízkomolekulární komplex
M	Označení kovu
MALDI	Laserová desorpční ionizace za účasti matrice
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
NF	Normální fáze
QqTOF	Kvadrupólový analyzátor-analyzátor doby letu
RF	Reverzní fáze
ROS	Reaktivní kyslíkové radikály
SF	Stacionární fáze
TIC	Celkový iontový proud
TOF	Průletový analyzátor
TSP	Termosprej