

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**ANALÝZA SLOŽENÍ PLODU ROSTLIN RODU
LYCIUM**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2013

Radka Mikešová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**ANALÝZA SLOŽENÍ PLODU ROSTLIN RODU
LYCIUM**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:
Studijní obor:

Radka Mikešová
Učitelství pro SŠ chemie - Učitelství pro
SŠ biologie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Bednář Ph.D.

Olomouc 2013

SOUHRN

V této práci bylo studováno složení plodů rostliny rodu kustovnice (*Lycium*), konkrétně kustovnice cizí (*Lycium barbarum*), kustovnice čínské (*Lycium chinense*) a rovněž sušených plodů kustovnice čínské.

K analýze extraktů plodů bylo využito několik analytických technik. Optimální technikou pro necílený screening je kombinace kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Touto metodou bylo v plodech detekováno různorodé spektrum látek. Byly zde nalezeny nízkomolekulární látky jako jsou fenolické kyseliny (kyselina vanilová, p-kumarová a ferulová), zástupce flavonoidních látek (rutin), derivát kumarinu (skopoletin) a dále pak vitamíny rozpustné ve vodě (riboflavin (vit. B₂) a askorbová kyselina (vit. C)). Dále byla identifikována velmi polární látka betain a aminokyselina arginin. Byly také navrženy struktury dalších látek s heterocyklickým skeletem (indolin, deriváty indolu a chinolinu).

Další použitou analytickou metodou byla hmotnostní spektrometrie s MALDI ionizací. MALDI-MS se ukázala být užitečnou doplňkovou technikou k LC/MS. S pomocí MALDI byl jednoznačně identifikován karotenoid zeaxanthin dipalmitát a byla také zachycena řada neznámých polárních víceglykosylovaných látek. Pro extrakci obsahových látek bylo použito sedm rozpouštědel s různou polaritou (voda, dimethyl sulfoxid, methanol, aceton, ethylacetát, terc-butylmethylether a hexan). Práce současně kvalitativně porovnává zastoupení těchto látek v plodech mezi druhy kustovnic, stejně jako mezi slupkou a dužinou jednotlivých plodů.

SUMMARY

In this study, composition of goji berries (*Lycium*) - *lycium barbarum*, *lycium chinese* and dried *lycium chinese* was studied.

Several analytical techniques in analysis of fruit extracts. Optimal technique for untargeted screening is liquid chromatography combined with mass spectrometry. Wide range of substances was found using this method. Several classes of compounds was found, i.e, phenolic acids (vanillic acid, p-coumaric acid and ferulic acid), flavonoid compound (rutin), coumarin derivative (scopoletin) and water-soluble vitamins (riboflavin (B₂) and ascorbic acid (C)). Polar substance betaine and amino acid arginine were identified as well. Beside, structures of another compounds with heterocyclic skeleton were proposed (indoline and derivatives of indole and quinoline).

MALDI mass spectrometry appeared to be useful complementary analytical method to LC/MS. Using MALDI-MS carotenoid zeaxanthin dipalmitate was unambiguously identified. Beside, several unknown polar polyglycosylated compounds were found. Seven solvents with different polarity was used for fruit extraction (i.e. water, dimethyl sulfoxide, methanol, acetone, ethyl acetate, tert-butylmethylether and hexane). This study also qualitatively compares the content of the found compounds among the goji species, as well as between peel and pulp of each fruit..

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

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

Ráda bych na tomto místě poděkovala doc. RNDr. Petru Bednářovi Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za jeho podporu, cenné rady, velkou trpělivost, připomínky a diskuze.

Chtěla bych také poděkovat své rodině a přátelům za podporu, rozptýlení a za velkou pomoc po celou dobu mého studia.

OBSAH

	Strana
1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Rod Kustovnice	2
2.1.1 Taxonomické zařazení	2
2.1.2 Botanický popis kustovnice	2
2.1.3 Výskyt kustovnice	4
2.1.4 Historie a nomenklatura kustovnice	4
2.1.5 Pěstování	5
2.1.6 Sklizeň a úprava kustovnice	6
2.1.7 Využití v kuchyni	7
2.1.8 Složení kustovnice a její účinky na lidské zdraví	8
2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	11
2.2.1 Chromatografie	11
2.2.2 HPLC	12
2.2.3 Instrumentace	12
2.2.3.1 Čerpadlo	13
2.2.3.2 Dávkovací zařízení vzorku	14
2.2.3.3 Předkolony	15
2.2.3.4 Kolony	15
2.2.3.5 Detektory	16
2.2.4 HPLC-MS	17
2.2.5 UPLC	18
2.3 Hmotnostní spektrometrie	19
2.3.1 Princip	19
2.3.2 Instrumentace	20
2.3.2.1 Iontový zdroj	21
2.3.2.2 Hmotnostní analyzátor	22
2.3.2.3 Detektory	24
2.3.3 MALDI	24
2.3.3.1 Matrice	25
2.3.4 Analyzátoři a detektory ve hmotnostní spektrometrii s MALDI ionizací	25
2.3.5 MALDI-Synapt	27
2.4 UV/VIS spektrometrie	28
2.4.1 Princip	28
2.4.2 Metody UV/VIS analýzy	29
2.4.3 Instrumentace UV/VIS spektrofotometrie	30
2.4.3.1 Zdroj záření	31
2.4.3.2 Disperzní systém	31
2.4.3.3 Vzorek	31
2.4.3.4 Detektor	32
2.4.3.5 Metody průtokové analýzy se spektrofotometrickou detekcí	32
2.5. Analýza složení plodu kustovnice	34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37

3.1 Chemikálie	37
3.2 Příprava extrakčního činidla	37
3.3 Příprava mobilní fáze	38
3.4 Příprava vzorků plodů	39
3.5 Postup extrakce	39
3.6 Příprava matrice a destičky pro MALDI analýzu	40
3.7 Příprava vzorku pro UPLC-MS a UV/VIS analýzu	41
3.8 Přístroje	41
3.8.1 Další přístroje	43
3.9 Vyhodnocení výsledků	43
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1 Pilotní MALDI-MS experimenty s plody kustovnice	44
4.1.1	44
4.1.2	45
4.1.3	48
4.2 UV-VIS spektrometrie	50
4.3 Detailní analýza plodů kustovnice	54
4.3.1 Analýza pomocí UPLC/ESI-MS	54
4.3.1.1 Vitamíny	54
4.3.1.1.1 Vitamín B ₂	54
4.3.1.1.2 Vitamín C	55
4.3.1.1.3 Analýza vitamínů v plodech kustovnice	56
4.3.1.2 Flavonoidy	59
4.3.1.2.1 Rutin	60
4.3.1.2.2 Analýza flavonoidů v plodech kustovnice	60
4.3.1.3 Fenolické kyseliny	62
4.3.1.3.1 Kyselina vanilová	62
4.3.1.3.2 Kyselina p-kumarová a ferulová	62
4.3.1.3.3 Analýza fenolických kyselin v plodech kustovnice	63
4.3.1.4 Kumariny	65
4.3.1.4.1 Skopoletin	66
4.3.1.4.2 Analýza skopoletinu v plodech kustovnice	66
4.3.1.5 Betain	68
4.3.1.5.1 Analýza betainu v plodech kustovnice	68
4.3.1.6 Neidentifikované složky kustovnice	70
4.3.2 Analýza pomocí MALDI-MS	74
4.3.2.1 Karotenoidy	74
4.3.2.2.1 Zeaxanthin dipalmitát	74
4.3.2.2 Neidentifikované složky kustovnice zachycené technikou MALDI-MS	79
5. ZÁVĚR	81
6. LITERATURA	82
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	93

1. ÚVOD

V naší přírodě se přirozeně vyskytuje kustovnice cizí (*Lycium barbarum*) a pro společnost je neznámá nebo považována za jedovatou. Oproti tomu kustovnice čínská (*Lycium chinense*) je dnes velmi populární komerčně prodávaná jako sušené plody Goji. Plody Goji zaplavují internetové stránky i obchody se zdravou výživou jako zázračná rostlina. Prodává se v různých formách, od sušených plodů po upravené sirupy pro konzumaci, kosmetické přípravky pro zkrášlování i jako prášky či tablet pro zdraví.

Tato práce se zaměřila na necílenou analýzu složení plodů rodu kustovnice (*Lycium*) se snahou o kvalitativní porovnání přítomnosti některých látek mezi zmíněnými druhy kustovnic a jejich distribuce mezi slupku a dužinu plodů. K analýze byly použity plody kustovnice cizí a kustovnice čínské, jenž byly pěstovány na našem území a plody sušené kustovnice čínské vypěstované v Číně.

Pro analýzu plodů byla použita hmotnostní spektrometrie ve dvou experimentálních uspořádáních – UPLC/ESI-MS a MALDI-MS. Obě techniky se ukázaly být komplementární a umožnily identifikovat řadu látek s různou strukturou.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rod Kustovnice

2.1.1 Taxonomické zařazení

Studovaná rostlina kustovnice patří do čeledi lilkovité (*Solanaceae*), ta patří do krytosemenných dvouděložných rostlin a zahrnuje agrokulturní, okrasné i toxické druhy.

Čeď zahrnuje 2500 druhů ve 102 rodech, kde největšími rody jsou lilek (*Solanum*), tabák (*Nicotiana*) a rajče (*Lycopersicon*). Typickými zástupci jsou blín, durman, kustovnice, lilek, mandragora, paprika, petunie, rajče, rulík, tabák.¹

Lilkovité jsou rozšířené po celém světě, kromě arktických oblastí. Centrum diverzity je Jižní Amerika, nejvíce se jich vyskytuje v tropech a subtropích.¹ Existuje cca 70 botanických druhů kustovnice, jako příklad jsou uvedeny ty, jenž jsou známé či pěstované na Evropském kontinentu - kustovnice čínská (*Lycium chinense*), kustovnice cizí (*Lycium barbarum*), kustovnice ruthénská (*Lycium ruthenicum*), kustovnice evropská (*Lycium europaeum*) aj.²

2.1.2 Botanický popis kustovnice

K. cizí je opadavý keř, 1-3 metry vysoký, bohatě větvený, kdy větve jsou obloukovitě převislé a prutovitě, kolcovitě ostré trny mají cca 5 mm. Listy jsou jednoduché a střídavé, krátce řapíkaté až bezřapíkaté, kopinaté, 65 mm dlouhé a šedozelené barvy. Květy jsou na stopkách jednotlivě nebo po dvou i třech ve svazečcích v úžlabí listů. Květ je heterochlamydní, kdy kalich je dvoupyský a koruna pětičetná, trubkovitá, bílofialová. V koruně se ukrývá pět tyčinek a svrchní dvoupouzdrý semeník. Kvete od května do září, plodem je vícesemenná podlouhlá bobule, která je v plné zralosti oranžovočervená až šarlatově červená.^{3,4}

K. čínská je opadavý keř dosahující výšky 1-2 metry. Listy jsou střídavé, kopinaté až vejčité s malým řapíkem, jsou zelené barvy a umístěny jednotlivě nebo ve svazečcích po třech. Kuželovité kolce se mohou prodlužovat a nesou listy a květy. Kvete od června do srpna podle zeměpisné šířky a klimatu. Květy vyrůstají jednotlivě nebo po svazečcích, jsou oboupohlavné, anemochorní. Koruna nachové barvy má pět tyčinek a elipsoidní semeník. Na

jednom stonku jsou až čtyři květy. Plodem je červená bobule 25 mm dlouhá obsahující až 30 oranžovožlutých semen uložených v lepkavém míšku plodu.^{5,6}

Velmi cenný je poddruh *Lycium chinense* var. *macrocarpa*, což je Kustovnice čínská velkoplodá, která vytváří velké množství plodů. Čína je největším vývozcem plodů kustovnice.^{6,7} V roce 2004 Čína vyprodukovala 95 000 tun s obratem 120 milionu amerických dolarů.⁸

Při hledání informací o této rostlině jsem často narazila na informace, které vypovídají o jednom druhu, ale nadpis práce uvádí druh jiný. V některých pracích se dokonce oba druhy uvádějí jako jeden a jejich jména jako synonyma. Botanické klíče uvádějí, že se jedná o různé rostliny s odlišnými znaky.

Kustovnice cizí (*Lycium barbarum*) má kalich se dvěma cípy. Listy jsou sivé až šedozelené, kopinaté a skoro bez řapíku. Nitky tyčinek v květu jsou lysé. Kustovnice čínská (*Lycium chinense*) má kalich trojcípý, listy jsou zelené, vejčité až vejčité kopinaté a vždy řapíkaté a nitky tyčinek jsou na bázi chlupaté. Kustovnice čínská je považována za poddruh, ustálená kulturní forma či hybrid kustovnice cizí.^{3,9}



Obr. 1. Rozdíly mezi kustovnicí cizí (vlevo) a kustovnicí čínskou (vpravo)

a) *k. cizí má kalich dvojčípý, k. čínská má kalich trojcípý*

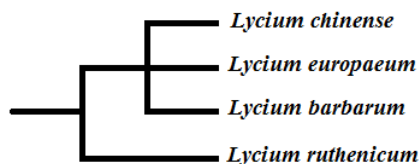
b) *listy k. cizí jsou sivé, kopinaté, listy k. čínské jsou zelené, vejčité až vejčité kopinaté*

Rozdíly mezi botanickými variantami kustovnice byly prokázány také pomocí RAPD, což je technika náhodně zesílené polymorfické DNA.¹⁰ Byly rovněž popsány rozdíly v zastoupení některých látek, například v obsahu zeaxantin diplamitátu, což je majoritní

karotenoid. Ten představuje 55% z celkového obsahu karotenoidů kustovnice cizí a 49% u kustovnice čínské.¹¹

2.1.3 Výskyt kustovnice

V Eurasii najdeme čtyři původní druhy. K. cizí je původně z Číny a k. čínská původně z Jihovýchodní Asie. Třetím druhem je k. evropská (*Lycium europaeum*) pocházející ze Středomoří a Malé Asie. Tyto tři druhy jsou sesterské skupiny a tedy nejbližší příbuzní.² V Malajsii pak roste k. ruténská (*Lycium ruthenicum*), která jako jediná z nich má plody černé a listy dužnaté. Tento druh je pouze vzdáleně příbuznou skupinou předchozích.^{2,12}



Obr. 2. Kladogram euroasijských druhů rodu kustovnice (*Lycium*)²

K. cizí má svůj areál zahrnující Středomoří, část Sibíře, Střední Asii, Mongolsko a provincii Ningxia v severozápadní Číně, zatímco k. čínská je rozšířena v Číně, Nepálu, Pákistánu, Koreji a Japonsku. K. čínská se pěstuje v Číně a dalších státech východní Asie jako léčivé ovoce, což uvádějí literární údaje již ze 7. století.³

2.1.4 Historie a nomenklatura kustovnice

Botanik Carl Linné ve svém díle *Species Plantarum*¹³ pojmenoval rostlinu jménem *Lycium barbarum* v roce 1753. O 15 let později Phillip Miller popsal jinou rostlinu, konkrétně jiný druh, pod stejným jménem jako Linné. K záměně došlo proto, že pan Linné udal mylně původ druhu ze severní Afriky a Blízkého východu. Tato záměna jmen se stále traduje ve světové vědecké literatuře včetně té naší.³

Slovo *Lycium* může být odvozeno z řeckého *lykion*, což označuje trnitý keř, název může být dále odvozen z místa původu, maloasijského kraje, který se jmenuje *Lykia*. Další teorií je pojmenování z řeckého *lykos* – tedy vlk, neboť keř trhá oděv pomocí trnů, stejně jako

vlk svými zuby. České rodové jméno vytvořil pan Josef Svatopluk Presl, autor odborné české přírodovědecké terminologie¹⁴, z ruského *kust*, což je keř či křoví.

Kustovnici můžeme najít pod českými lidovými názvy jako babí trn, čertovy nitě, čertův plot, haňba, divoká vrba a vrbice.⁴ K. cizí má řadu synonym, jako například *Lycium halimifolium* Mill., *Lycium lanceolatum* Veillard, *Lycium vulgare* a *Lycium turbinatum* Poir.,^{2,8} zatímco synonyma, pod kterými můžeme najít v literatuře Kustovnici čínskou jsou *Lycium barbarum* Thunb., *Lycium trevianum* G. Don, *Jasminoides rhombifolium* Moench.⁵ Anglické výrazy pro k. čínskou jsou Chinese boxthorn, Chinese wolfberry, což odpovídá řeckému překladu *lykos*, tedy vlk, Chinese deserthorn, Goji berry⁶ a německy se nazývá Boscksdorn.⁸ Mezi čínské známé názvy patří Hsien Jen Chang a Gougi.⁶ Gougi je odvozeno od výskytu k. čínské v provincii Ningxia, což je Chuejská autonomní oblast, která se nazývá Ning xia gou qi, odtud světoznámý a komerční název Goji pro sušené plody rostliny.³ Korejský název pro tuto rostlinu je Gugija nebo Hanja a v Japonsku ji říkají Kuko.⁶

O Kustovnici hovoří spis sepsaný Čínským císařem Sheng Nung, který vládl v Číně kolem roku 2800 př. n. l. a považuje se za mýtického otce čínského zemědělství a léčitelství. Kořen rostliny zařadil mezi tzv. „výjimečná dřeva“ k léčení špatné čchi. Čínský lékař Li Š'-čen vysvětloval ve svých spisech dlouhověkost obyvatelstva jedné vesnice častou konzumací vína z kustovnice. Lékaři dynastie Ming uvádějí, že je rostlina výborná pro léčbu revmatismu a kožních nemocí.⁸ Čínské společnosti, které nabízející výrobky z kustovnice velmi často zmiňují legendy o zdraví a dlouhověkosti. Mezi známé patří legenda o čínském muži jménem Li Qing Yuen, jenž konzumoval denně plody kustovnice a dožil se věku 252 let.⁶ Dále je populární příběh o poutníkovi, který nechápe, proč 16 leté děvčátko tluče starého muže, v legendě zjišťuje, že dívce je 372 let a její dědeček již odmítá pít nápoj dlouhověkosti a proto zestárnul.¹²

Dle historických údajů se rostlina z Asie rozšířila do Anglie, kde vytvářela přírodní ploty a v současné době se šíří do USA a pobřežních států Evropy.⁶

2.1.5 Pěstování

K. cizí roste na suchých svazích, násypech, rumišťích, podél zdí, na hrázích, kolem silnic a železničních tratích a často ji dnes najdeme i v městském prostředí.² Keř býval hojně pěstovaný v živých plotech, neboť za krátkou dobu vytvoří neproniknutelnou hráz. Nejraději roste na písčitých a hlinitopísčitých podkladech.⁴

K. čínská snadno roste, nevyžaduje bohaté humózní půdy a roste i na vyčerpaných půdách. Rostliny jsou velmi odolné a přežívají mrazy i 23°C. Je však náročná na světlo a nevyhovuje jí stín. Klíčí snadno a rychle. První zimu přežijí ve skleníku a vysazují se ven časně v létě.⁶

U nás kustovnice netrpí dosud žádnými chorobami ani škůdci, což je výhodou pro pěstování v našich podmínkách. Problémem je, že kustovnice cizí se pro pěstování plodů a jejich konzumaci nehodí a s k. čínskou mají zahrádkáři i botanické zahrady problémy, neboť rostlina v našich podmínkách kvete, ale neplodí, dokud nedosáhne určitého stáří, popř. vůbec. Obě rostliny se množí velmi dobře jak semeny, tak i vegetativními odkopky nebo řízkováním.⁷

2.1.6 Sklizeň a úprava kustovnice

Sklizeň nastává, když jsou plody zralé z 80 až 90%. Bobule nesmí být stlačeny, poškozeny nebo nesmí dojít ke kontaktu s pokožkou, jinak dochází k oxidaci a jejich zčernání. Z tohoto důvodu jsou plody při sklizni střeseny do plachty.¹⁵

Sušení probíhá buď přirozeně vzduchem tzv. pasivní sušení, nebo existuje sušení aktivní pomocí proudu horkého vzduchu. Při přirozeném sušení jsou plody rozmístěny ve vrstvě dvou centimetrů a nutná teplota je do 35°C. Při sušení mechanickém se užívá horký vzduch, kdy celá sušárna je rozdělena na 3 části dle teploty. V první části je teplota 40 až 50°C, zde se plody zdrží 24 hodin, v druhé sekci je teplota 50 až 55°C, jenž působí na sušící se plody po dobu 2 dnů, v poslední části je 55 až 65°C a plody zde zůstávají posledních 24 hodin.¹⁵



Obr. 3. Přirozené sušení vzduchem kustovnice čínské

Suchým plodům se odstraní stopky, plody se zvaží a zabalí.¹⁵ Uchovávají se v tmavé nekovové nádobě v suchu a temnu.¹²

2.1.7 Využití v kuchyni

V této oblasti máme informace pouze o využití k. čínské, neboť k. cizí se nekonzumuje a dlouho byla považována za jedovatou.

K. čínská je velmi populární ingrediencí v Čínské kuchyni. Najdeme ji v polévkách, sladkých pokrmech, jako příloha k masu i ve vegetariánské stravě.⁸ Sušené plody mají příjemnou sladkou chuť, mohou se konzumovat podobně jako rozinky, připravuje se z nich čaj, podobně jako z šípků. Běžně se přidávají do cereálních směsí, rýžových kaší, ovocných knedlíků a sladkého pečiva.⁷

V Číně jsou sušené i čerstvé plody jednou z hlavních přísad při přípravě masitých jídel. Velmi oblíbený je vepřový mozeček s kustovnicí, dále se přikládá k bambusovým výhonkům, ale i k drůbeži a rybám. Jako ingredience se používá při přípravě polévek z různých druhů mas. Plody se v poslední době také kandují v cukru, nakládají do medu, jsou součástí bonbonů nebo se z nich připravují alkoholické nápoje, tzv. lámské víno či kustovnicový destilát.⁷

Na českém území není dle mých zkušeností rostlina příliš známá. Kustovnice rostoucí planě je pro veřejnost poměrně neznámá rostlina vyskytující se kolem cest. Je považována za nejedlou a často i jedovatou.

Sušené plody kustovnice dovážené z Číny jsou na českém trhu nabízeny pod názvem Goji. Prodávají se zejména v obchodech se zdravou výživou, ale dnes jsou k dostání i v běžných obchodech s potravinami. Dále je možné zakoupit celou rostlinu v zahrádkářstvích či jejich semena v botanických zahradách, jejich pěstování pro plody je však náročné viz. kapitola Pěstování. Komerčně se k. čínská prodává jako doplněk stravy ve formě tablet, prášku, kapslí, roztoku či sirupu. V zahraničí se prodává i džus z kustovnice,¹⁶ sušenky, čokoláda, müsli a polévky. Veškeré Goji produkty je možno zakoupit na internetových stránkách od roku 2002.⁸



Obr. 4. Produkty Goji běžné dostupné na českém trhu

2.1.8 Složení kustovnice a její účinky na lidské zdraví

Kustovnice obsahuje velké množství běžných i méně známých látek. Řada z nich má prokázané léčivé účinky.

Sacharidy představují hlavní složku plodu⁸ a mají až 5x vyšší procentuální obsah než bílkoviny.¹⁶ Téměř 95% všech polysacharidů plodu se skládá z jednoduchých cukrů a nejnovější studie uvádí jako dominantní složku polysacharidů kustovnice kyselinu galakturonovou.^{17,18}

Komerčně prodávaná sušená rostlina pod názvem Goji má díky přítomnosti sacharidů vysokou energetickou hodnotu – až 1 550 kJ/100g, ale jedná se o potraviny s nízkých glykemickým indexem (GI) 29, neboť velké procento polysacharidů je vláknina.¹⁶

Plod kustovnice je jeden z nejbohatších zdrojů karotenoidů v rostlinné říši,¹⁶ jsou odpovědní za červenou barvu plodu.⁸ Plod obsahuje zejména zeaxantin dipalmitát (31 až 56% z celého obsahu karotenoidů).^{11,19} Dále pak zeaxantin monopalmitát, beta-cryptoxanthin monopalmitát, zeaxanthin, neoxanthin, lutein a beta-karoten a jejich izomery,^{8,16,19,20} při čemž obsah karotenoidů se zvyšuje v procesu zrání.²⁰

Jedna z prací uvádí, že plod obsahuje 3 – 4,6 % bílkovin⁷, jiná zase, že až 12 – 16 %. Podle dostupných literárních pramenů obsahuje až 18 aminokyselin z 20 esenciálních.¹⁶ Další literatura uvádí obsah aminokyselin 1 až 2,7%, kde prolin je hlavní aminokyselinou.¹⁷ Je patrné, že informace z literatury se značně rozcházejí.

Plod obsahuje asi 1,9 – 2,2 % tuku.⁷ Pomocí techniky GC-MS byly analyzovány esenciální oleje a mastné kyseliny, jako hlavní složky byly identifikovány hexadekanová, linolová a myristová kyselina.¹⁷ Mastné kyseliny jsou významně zastoupeny i v semenech plodu (zejména kyselina linolová a olejová).^{7,16}

Z vitamínů obsažených v kustovnici se jedná zejména o vitamíny skupiny B – vit. B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃, kyselina pantotenová a biotin. Dále jsou přítomny vitamín C (kyselina askorbová), provitamín A a vitamín E.^{8,16,17} Jejich procentuální zastoupení se v použitých zdrojích značně liší. Jeden ze zdrojů uvádí hodnotu vit. C 29 mg/100 g, jiný pak 43 mg/100 g^{8,16} a další 148 mg/100 g, což je skoro 3 krát více než v pomerančích.^{7,16}

Mezi hlavní flavonoidy plodu kustovnice patří rutin, kaempferol, quercetin a myricetin.^{7,8,16,21,22,23} a pomocí techniky HPLC byly zjištěny nejen flavonoidy, ale i fenolické kyseliny. Kustovnice tak obsahuje kyselinu chlorogenovou, protokatechovou, p-kumarovou, vanilovou, kávovou, ferulickou a hydroxyskořicovou kyselinu.^{21,22}

Dalšími bioaktivními složkami, které najdeme v plodech kustovnice, jsou fytoosteroly, zejména beta-sitosterol a jeho glukosid, skopoletin, deriváty dopaminu, dále cerebrosidy a pyroly.^{8,16}

Je třeba zmínit i betain, který čínské studie uvádějí v množství 100 mg na 100 g plodu rostliny a byl detekován pomocí HPLC-ES-MS z kustovnice čínské již v roce 1999.^{16,24}

Mezi obsažené minerální složky patří zejména vápník, měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, draslík, sodík, zinek, selen a chrom.¹⁶ Přítomno je i germanium, které je v potravinách vzácné. O tomto prvku se uvádí, že působí proti rakovinotvorným buňkám v těle.⁷

Kustovnice spadá do čeledi, která obsahuje široké spektrum alkaloidů. Nejznámějším alkaloidem čeledi *Solanaceae* je atropin. Pro zajímavost je možno uvést, že jméno tohoto alkaloidu pochází od bohyně osudu jménem *Atropa*, která přetíná nit života. Vysoký obsah této látky je v dobře známém jedovatém rulíku zlomocném (*Atropa belladonna*).¹

Kustovnice cizí je uváděna jako jedovatá rostlina i ve starších publikacích. Kniha *Naše jedovaté rostliny* z roku 1957 uvádí, že kustovnici je třeba zařadit mezi rostliny z jedovatosti podezřelé.⁴ Mnohem mladší publikace *Rostliny způsobující otravy a alergie*, která vyšla v roce 1989, však řadí kustovnici mezi velmi jedovaté. Podle této knihy jsou jedovaté všechny části rostliny včetně plodu a příznaky otravy se projevují podobně jako u rulíku zlomocného.²⁵ V roce 2006 byla publikována studie, kdy pomocí metody HPLC-MS byla potvrzena přítomnost atropinu u osmi vzorků rostliny rodu kustovnice, ale v maximální

koncentraci 19 ppb, což je pod hranicí nebezpečí. V tomto směru můžeme rostlinu považovat za zcela neškodnou.²⁶

V posledních letech vyšly práce, které uvádějí, že je nebezpečné užívání výtažku z plodu kustovnice spolu s lékem na ředění krve warfarinem, neboť podle všeho zesiluje účinky ředění krve, sama však krev neředí. V roce 2008 byla publikována práce, která uvádí, že 80 letá čínská žena zažila dvakrát, po požití čaje obsahující kustovnici, zvýšené ředění krve.²⁷ O 4 roky později další článek zmiňuje, že 71 let stará Američanka užívající warfarin byla hospitalizována se zvýšenou hodnotou ředění krve poté, co 4 dny užívala výtažek s Goji. Mezi příznaky uvedla krvácení z nosu, konečnicku a podlitiny.²⁸

Zdokumentováno bylo několik alergických reakcí. Nedávné studie uvádějí, že Goji může být alergenní zdroj u vysoce rizikové skupiny jedinců, jedná se o senzibilizaci a projev této alergie je tedy spojen s příjmem ještě další potraviny.^{29,30} Dále se v čínských léčivých knihách doporučuje opatrnost těhotným ženám a pacientům trpícím průjmem, horečkou a při zánětlivých stavech.¹⁷ Jedna z knih uvádí neslučitelnost s kovovým nádobím nebo kovovými předměty.⁵

LD₅₀ z vodného extraktu z Goji plodů je 8,32 g/kg, což je pod hranicí toxicity.⁸

Kustovnice patří mezi rostliny TČM (tradiční čínské medicíny) a o jejich léčivých vlastnostech vycházejí potvrzené studie, stejně jako kolují legendy. Problém, který nastává při hledání informací o kustovnici, spočívá nejen v tom, že existuje velké množství internetových stránek, které publikují nepravdivé nebo nepotvrzené informace za účelem komerčního prodeje, ale také to, že i když existuje celá řada různých studií o léčivých účincích kustovnice, spolehlivé údaje chybí. Většina studií je prováděna v zemích východní a jihovýchodní Asie, práce jsou psané v čínštině nebo máme k dispozici pouze abstrakt. U mnoha případů není jasné, zda byla studována k. cizí nebo k. čínská.^{16,17}

Mezi cenné složky zajišťující léčivé účinky patří zejména karotenoidy a polysacharidy, dále také menší molekuly jako je betain, cerebrosid, beta-sitosterol, p-kumarová kyselina a vitamíny.³¹

Čínské studie naznačují, že polysacharidy této rostliny mají protirakovinné a také imunitu podporující vlastnosti.³² V letech 2005 a 2009 byly provedeny studie uvádějící, že polysacharidy plodu kustovnice zvyšují imunitu a ovlivňují pokles hladiny cholesterolu a glukózy v krvi.^{32,33} Mohou také chránit neurony před toxiny a zamezují tedy neurodegenerativním chorobám a došlo i k izolaci aktivní složky polysacharidů, které

zmírňují pro-apoptickou signální dráhu, což znamená, že působí proti stárnutí organismu.³¹ Nedávná studie potvrdila schopnost polysacharidů kustovnice pozitivně působit na sexuální dysfunkci u mužů a podporovat tak jejich sexuální chování.³⁴ Imunostimulační účinky polysacharidů mají vliv i na protikarcinogenní vlastnosti,^{17,35} kdy se uvažuje o možném použití v terapii nádorových onemocnění.¹⁷

Díky vysokého obsahu karotenu zeaxantinu se používá jako lék na oční nemoci, mezi které patří zánět spojivek, rozmazané vidění či šeroslepost.⁷ Práce z roku 2002 potvrzuje schopnost této látky izolované z k. čínské, redukovat uměle vyvolanou hepatickou fibrózu u potkanů.³⁶ Spolu s luteinem je zeaxanthin dipalmitát ukládán ve žluté skvrně sítnice oka.¹⁶ Degenerace žluté skvrny na sítnici oka, jejíž pravděpodobnost se zvyšuje s rostoucím věkem, je poměrně časté onemocnění. Zeaxanthin dipalmitát je intenzivně studován pro svou schopnost zpomalovat proces degenerace tohoto orgánu. Jednou z možností je úprava stravování v kombinaci s užíváním kustovnice jako potravinového doplňku.³⁷ Dále je v kustovnici přítomen beta-karoten (provitamín A). Ten je nepostradatelný zejména pro zrak, ale také pro růst, zdravou strukturu kostí a zubů a protiinfekční ochranu některých orgánů.¹⁶

Literatura také uvádí, že užívání plodu kustovnice chrání játra před toxiny. Jsou popsány i pozitivní účinky při cukrovce, při závratích nebo bolestech zad a kloubů² a při ledvinových obtížích.^{8,16}

Doporučená denní dávka je 5 až 12 g suchých plodů (včetně semen).^{8,17} Tyto výrobky nejsou v USA ani v Evropě podporovány jako léky a podobná tvrzení jsou zakázána,¹⁷ jedná se pouze o povolené doplňky stravy.

2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

2.2.1 Chromatografie

Chromatografie je jedna ze separačních metod používaných v analytické chemii. Principem je rozdělování analytů mezi dvě nemísitelné fáze. Jedna z fází je umístěná v koloně nebo v ploché vrstvě a nazývá se stacionární a druhá, která unáší separované látky, je fáze mobilní. Během chromatografického procesu interagují analyty různě silně se stacionární a mobilní fází a tím dochází k jejich vzájemnému oddělení.³⁸

První kapalinovou chromatografií uskutečnil ruský botanik Cvět na začátku 20. století, který dal této metodě také název podle latinského slova barva - *chroma*.^{38,39}

2.2.2 HPLC

Jedná se o zkratku z anglického překladu *high-performance liquid chromatography*. Metoda se začala rozvíjet až v polovině 60. let 20. století, kdy nastal pokrok v technologii přípravy stacionárních fází a plnění kolon velmi malými částicemi (μm), čímž došlo ke zvýšení účinnosti kolon. Vylepšení kolony a potřeba velkých průtoků mobilní fáze si však vynutilo složitější instrumentaci, kdy místo gravitační síly je třeba používat čerpadla umožňující práci za vysokých tlaků (v MPa).^{38,39} Jednotlivé části HPLC systému jsou popsány v dalších kapitolách.

Literatura uvádí velké množství publikací, které se zabývají touto separační metodou k analýze látek, dále tvrdí, že pomocí HPLC lze analyzovat až 80% veškerých známých látek a nakonec zmiňuje i masivní prodej kapalinových chromatografů na světovém trhu v posledních letech, to všechno udává základní výhodu HPLC, což je její obor použitelnosti.^{38,39}

2.2.3 Instrumentace

Přístroje pro HPLC mají složitější zařízení než pro klasickou sloupcovou chromatografii, kde se mobilní fáze pohybuje gravitační silou.^{38,39}

Nejjednodušší kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze (1), vysokotlakého čerpadla (2), dávkovacího zařízení vzorku (3) kolony (4), detektoru (5) a zařízení umožňující sběr a zpracování dat – tedy především počítač (6).³⁸

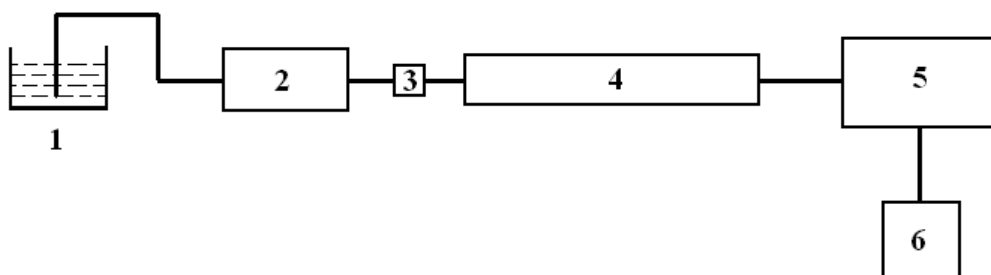


Schéma. I. Kapalinový chromatograf³⁸

Kromě základních částí přístroj obsahuje i jiné prvky. V případě gradientové eluce se mezi zásobníkem mobilní fáze a čerpadlem (1-2) nachází směšovač a je třeba více zásobníků (1) i čerpadel (2).^{38,40} Dále se mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením (2-3) mohou nacházet zařízení pro monitorování nebo zpětnovazebnou kontrolu průtokové rychlosti, průtočný tlumič pulzů nebo čidlo pro měření tlaku.^{38,39} Moderní přístroje mají před čerpadlem (2) integrován degaser, což je odplyňovač mobilní fáze.⁴⁰ Někdy se do systému zařazuje předkolona, ve které se zachycují balastní látky zhoršující vlastnosti vlastní kolony (ucpání kolony, nevratná sorpce na stacionární fázi atd.)³⁸

Dále budou popsána chromatografická čerpadla, dávkovací zařízení, kolony a nejběžnější detektory.

2.2.3.1 Čerpadlo

Čerpadlo je jednou z nejdůležitějších a nejdražších částí celého přístroje. Zajišťuje definovaný a konstantní průtok mobilní fáze s dostatečnou rychlostí za vysokých tlaků.³⁸ Jsou na něj kladeny velké nároky - čerpání kapaliny při tlaku až 60 MPa a malý vnitřní objem pro rychlou výměnu mobilní fáze.^{39,40} Následující tabulka (Tab. 1) uvádí přehled nejběžnějších typů čerpadel. Výčet zahrnuje jak jednoduše realizovatelná a historicky starší zařízení, tak i zařízení moderní s vyšší pořizovací cenou.

Tab. 1 Přehled běžně užívaných čerpadel^{38,39,40}

název	princip
pneumatické čerpadlo	Jedná se o uzavřený zásobník mobilní fáze, do kterého se zavádí inertní plyn, při jehož stlačení dochází k pohybu kapaliny. Přímým spojením mobilní fáze a plynu vznikají bubliny, které ruší funkci detektorů, proto se mezi ně vkládá píst. Tyto čerpadla nemají vysokou cenu a používají se spíše v preparativní kapalinové chromatografii.
velkoobjemové čerpadlo	Mají velký objem pístní komory čerpadla. Skládá se z válce, uvnitř něj je dokonale těsnící píst s mobilní fází, který je poháněn krokovým elektrickým motorem a vytlačuje kapalinu z válce. Ačkoli zajišťují konstantní a bezpulsní průtok mobilní fáze. Nevýhodou je, že po vytlačení veškeré kapaliny z pístu trvá poměrně dlouho další jeho

naplnění a proto je nezbytné přerušit analýzu. Cena tohoto čerpadla je rovněž poměrně vysokoá.

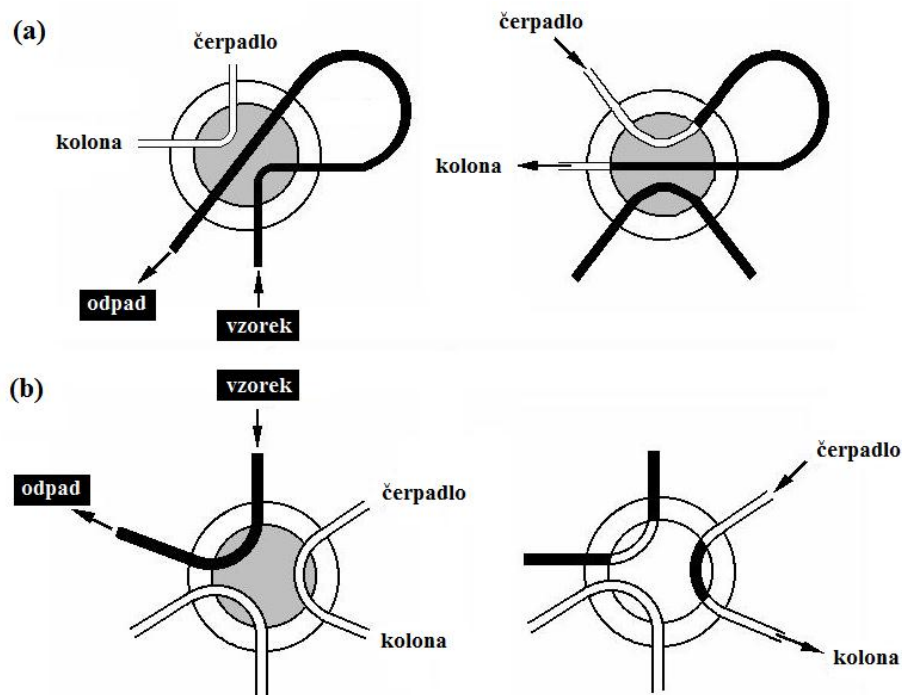
maloobjemové čerpadlo	Čerpadlo je také poháněno krokovým elektrickým motorem, ale vlastní (čerpadlo s malým objemem činné části) pracovní objem je velmi malý. Tok mobilní fáze se dosahuje periodickým nasáváním ze zásobníku a vytlačováním do kolony přes dva ventily. Řeší nevýhody předchozího čerpadla, neboť mobilní fázi lze dávkovat bez přerušení, ale dochází zde ke kolísání průtoku mobilní fáze s časem. Čerpadla tohoto typu dělíme na pístová, kde k vytlačování a nasávání kapaliny slouží píst a poté membránové, zde je mobilní fáze vytlačována membránou.
------------------------------	--

2.2.3.2 Dávkovací zařízení vzorku

Musí co nejpřesněji dávkovat definované množství vzorku.³⁸ V průběhu času byla vyzkoušena celá řada různých postupů, ale v poslední době se využívá prakticky výlučně dávkovacích ventilů.^{39,40}

Tab. 2 *Dávkování vzorku v HPLC*^{38,39,40}

název	princip
dávkování ventilem	Probíhá bez přerušení toku mobilní fáze při tlaku až 80 MPa. Můžeme dávkovat objem s využitím vnější smyčky ventilu (a) nebo konstantní objem vnitřního prostoru ventilu (b). ^{38,39,40} Dávkování ventilem pozorujeme na obr. 5, kde levá část znázorňuje plnění a pravá pak dávkování vzorku. Komerčně se objem dávkovací smyčky pohybuje od 2 do 2000 μl . ⁴¹
autosampler	Jedná se o automatické dávkovače spojené se zásobníkem vzorků. Umožňují tak dávkovat řadu vzorků bez zásahu operátora.



Obr. 5 Dávkovací ventily⁴¹

2.2.3.3 Předkolony

Ochranná předkolona je nejčastěji zkrácená verze chromatografické kolony (obsahuje stejný typ sorbentu jako hlavní kolona). Vkládá se mezi dávkovací ventil a hlavní chromatografickou kolonu (3-4). Zachytí nežádoucí rozpustné a nerozpustné příměsi ve vzorku, které by mohly kolonu ucpat nebo poškodit. Je vhodné zajistit, aby předkolony nesnižovaly účinnost separace o více než 5-10%.³⁸

2.2.3.4 Kolony

Kolona se skládá ze dvou částí, což je vlastní tělo kolony a poté dvě koncové části. Tělo je trubice, která má hladký vnitřní povrch a je z vhodného materiálu, který odolává, jak vysokým tlakům, tak i chemickému působení látek. Koncovka zajišťuje těsnost systému a porézní přepážka (frita) zadržuje náplň kolony. Jako materiál kolony se používá zejména nerezová ocel. Délka kolon se pohybuje mezi 5 až 30 cm, jejich vnitřní průměr činí 2-4 mm a náplň jsou částičky o velikosti 3 až 10 μm .^{39,40} Částičky mohou být celoporézní s průměrem 3 až 5 μm , jenž jsou typické pro HPLC. Dále pak povrchově porézní částičky o velikosti 2 až 3 μm , které mají pevný vnitřní základ a ten je obalen porézní vrstvou. Menší

než 2 μm jsou částičky u techniky U(H)PLC popsané dále v textu. Třetí stacionární fázi, kterou zmíníme, jsou monolity, což je celistvá pórovitá struktura vyplňující vnitřní část kolony.⁴²

Adsorbenty kolony mohou být polární či nepolární. V případě často používané reverzní fáze jsou sorbenty kolony nepolární a mobilní fáze je pak polární, stejně jako analyzovaná látka. Nepolární složka je chemicky vázána na částice stacionární fáze a od něj pak odvozujeme typy kolon, jejich vlastnosti i pojmenování (C8, C18, fenyl a alkylfenyl). Jako polární adsorbenty je vhodné zmínit silikagel a oxid hlinitý.⁴¹

2.2.3.5 Detektory

Tato část přístroje zaznamenává rozdíl mezi průchodem mobilní fáze a mobilní fázi obsahující separované analyty.^{39,40} Signál vycházející z detektoru musí být stabilní a reprodukovatelný po delší dobu.³⁸

Tab. 3 Typy detektorů^{38,39,40}

název	princip
spektrofotometrické detektory	Tento typ se používá nejčastěji, neboť je jednoduchý, relativně levný a lze jej použít pro mnoho rozpouštědel. Jedná se o selektivní detektor, tedy signál je úměrný koncentraci UV absorbujícího analytu v eluátu. Měří se v UV-VIS oblasti, kde je možnost pracovat s jednou vlnovou délkou tzv. fixní, nebo s více vlnovými délkami, které lze nastavit a s detektory diodového pole, jenž se používá nejčastěji (diode array detector, DAD, PDA).
fluorimetrické detektory	Jsou vysoce selektivní a velmi citlivé pro látky, které přirozeně fluoreskují nebo je lze převést na fluoreskující deriváty. Princip spočívá v měření emisního záření látek, které nastává po absorpci elektromagnetického tzv. budícího záření.
refraktometrické detektory	Refraktometrické detektory jsou univerzální a umožňují detekci mnoha látek (i těch které neobsahují v molekule chromofor). Má však řadu nevýhod, jako je nízká citlivost, odezva závisající na teplotě a nepoužitelnost při gradientové eluci. Přesto je tento

detektor stále hojně používaný. Princip spočívá v měření rozdílů indexu lomu eluátu a mobilní fáze. Nejběžnější detektory jsou založeny na třech principech - měření ohybu světla, měření odraženého světla na rozhraní skla a roztoku a sledování interference měrného a referenčního paprsku.

**elektrochemické
detektory**

K detekci se používají elektrochemické metody vycházející z elektrických vlastností roztoku. Elektrochemické detektory jsou selektivní a měří určitou veličinu, která je vyvolána během průchodu látky v oxidovaném nebo redukovaném stavu měrnou celou detektoru. Mobilní fáze musí být vodivá, nesmí obsahovat stopy elektrochemicky aktivních nečistot a nelze je použít s modelem normálních fází.

**konduktometrické
detektory**

Nejsou selektivní. Měří elektrickou vodivost eluátu. Je citlivý na analyty nesoucí elektrický náboj. Pro zamezení polarizace elektrod, je na ně vkládáno střídavé napětí.

2.2.4 HPLC-MS

Přímé spojení těchto dvou přístrojů bylo historicky poměrně obtížné, neboť je třeba odstranit složky mobilní fáze z chromatografu před ionizací v hmotnostním spektrometru. Využívalo se rozhraní s pohybujícím se kovovým páskem (zejm. pro iontové zdroje EI, CI), který odpaří mobilní fázi předtím, než vzorek vstoupí do iontového zdroje.⁴³

Dnes se ke spojení LC-MS používají zejména sprejové ionizační techniky, jako je termosprej (TSI), elektrosprej (ESI) a chemická ionizace za atmosférického (APCI), které odvádějí většinu těkavých složek (mobilní fáze) mimo hmotnostní spektrometr v průběhu ionizace (jsou odtaženy vakuovými čerpadly). V případě vysokých průtoků se za kolonu vkládá dělič toku mobilní fáze (splitr).

Iontový zdroj se vybírá dle analyzované látky. TSI a APCI se používají pro méně polární, nízkomolekulární látky s m/z menším než 1000. ESI se používá pro polárnější látky a s výhodou je využíván i pro látky s velkou molekulovou hmotností (tvorba vícenásobně nabitých iontů). ESI byl použit i v této práci.⁴³

Výběr hmotnostního analyzátoru pro spojení LC-MS dnes prakticky není sparační technikou omezen. Nejběžnější je kvadrupólový analyzátor (typicky v tandemovém

uspořádání jako spojení tří kvadrupólů - trojnásobný kvadrupól). Dále se často používá iontová past a detektor doby letu.⁴³

Nejčastěji se používají separační kolony se stacionární fází C8 a C18 (reverzní fáze). V současnosti se upřednostňují užší kolony s vnitřním průměrem okolo 2 mm a s velikostí částic stacionární fáze 3 až 4 μm . Průtok mobilní fáze je potom v řádu desetin ml/min a je možno ji vést do iontového zdroje přímo bez děliče toku, čímž se celkově zvýší citlivost detekce. V dnešní době se používají i kapilární separační metody (průměr kolony je pod 1 mm).^{39,43}

Použití mobilní fáze se hmotnostním spektrometrem omezuje. Obsah netěkavých složek musí být minimální a přítomnost sodných a draselných solí je nevhodná, neboť snižuje výtěžek ESI a APCI ionizace. Tyto soli musí být nahrazeny těkavějšími složkami (velmi často amonnými solemi). Organická rozpouštědla (methanol, acetonitril) se při zmlžování snadno odpařují a zlepšují ionizační účinnost.⁴³

Výhodou spojení těchto analytických přístrojů je vysoká citlivost i pro látky které nenesou v molekule chromofor a možnost rychlého získání informací o identitě jednotlivých složek vzorku.³⁹

2.2.5 UPLC^{41,44}

Jedná se o zkratku *ultra performance liquid chromatography*, tedy ultra účinné kapalinové chromatografie. Jde o velmi mladou a účinnou techniku, která má oproti HPLC mnoho výhodnějších vlastností, jako je zkrácení doby analýzy a zvýšení separační účinnosti a citlivosti.

UPLC kolony mají délku 5 až 10 cm a průměr 4,6 - 1 mm. Částice stacionární fáze mají pevný základ, homogenní pórzní obal a velikost 1,7 μm , což zajišťuje vyšší účinnost kolony. V současné době se pro UPLC vyrábějí kolony se stacionárními fázemi pokrývajícími polaritní škálu – reverzní fáze (C18, C8, Shield RP18 atd), středně i velmi polární fáze, včetně HILIC, iontoměničové fáze.

Jako detektory se nejčastěji používají spektrofotometrické detektory v UV/VIS oblasti, dále UV/VIS detektor s diodovým polem (PDA, DAD), odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD), detektor fluorescenční a hmotnostní detektor (MS).

Použití velmi malých částic stacionární fáze a tím nárůst tlaků s sebou přináší řadu aspektů - nezbytnost mikrofiltrace stacionární fáze a potřeba lepší úpravy vzorku před analýzou.

2.3 Hmotnostní spektrometrie

Je známá pod zkratkou MS, z anglického *mass spectrometry*. Metoda hmotnostní spektrometrie se používá k určení hmotnosti částic, které se musí před měřením převést na kladné nebo záporné ionty. Tato fyzikálně chemická technika vypovídá o struktuře zkoumaných látek.⁴⁵

Hmotnostní spektrometrie se používá jako metoda výzkumu organických sloučenin od roku 1960 a v posledních letech se rozšířila do všech laboratoří chemie. Jedná se o metodu destrukční, s výjimkou poměrně raritních postupů využívajících „měkkého přistání iontů“ na vhodném materiálu (tzv. soft landing). Pracuje s vysokou citlivostí a při vhodném uspořádání i s malou spotřebou vzorku.⁴⁶ Díky této metodě bylo v posledních letech určeno složení mnoha přírodních látek a byla zodpovězena řada otázek v biochemii a v biologii.⁴⁷

2.3.1 Princip

Princip spočívá ve třech po sobě jdoucích krocích. Nejdříve jsou složky vzorku převedeny na ionty, ionty se poté separují podle poměrů m/z a nakonec se změří zastoupení těchto oddělených iontů (iontový proud).^{46,48}

Ionty vznikají při ionizaci v iontovém zdroji. Podle množství dodané energie se ionizace nebo-li ionizační techniky dělí na měkké nebo tvrdé. Pokud je energetický přebytek předaný vzorku malý a pravděpodobnost, že se bude částice fragmentovat, je nízká, jedná se o měkkou ionizační techniku. V opačném případě dodaná energie postačuje k rozsáhlé fragmentaci a jedná se o ionizační techniku tvrdou.⁴⁵ Ionizační techniky se dají seřadit podle jejich tvrdosti: ESI < MALDI < TSI < FAB/FIB < APCI < CI < EI. Jednotlivé zkratky jsou vysvětleny dále v textu.⁴⁶

Ionty se separují v analyzátořech, které rozlišují ionty produkované z iontového zdroje podle poměru jejich hmotnosti k náboji.⁴⁵ Posledním krokem je stanovení jednotlivých druhů iontů, což mají za úkol detektory. Detektory v propojení s počítačem dávají hmotnostní spektrum.⁴⁸

Hmotnostní spektrum je základní informační výstup hmotnostního spektrometru, které umožňuje určit strukturu vzorku. Na ose x (osa vodorovná) se nanáší hodnota m/z a na osu y (osa svislá) se nanáší odezva detektoru, která je přímo úměrná relativní intenzitě iontového proudu udávanou v procentech. Nejintenzivnější pík spektra má poté 100%.^{45,46}

2.3.2 Instrumentace

Hmotnostní spektrometr se skládá z částí znázorněných na Schématu II. Iontový zdroj (1), který zajišťuje převedení naneseného vzorku do ionizovaného stavu, hmotnostní analyzátor (2), který dělí směs iontů podle poměru hmotnosti k náboji. Úsek, jenž udává signál přímo úměrný dopadajícím iontům, které prošly hmotnostním analyzátozem, se nazývá detektor (3). Počítač (4) poté zpracuje vzniklý signál do hmotnostního spektra. Kromě sběru dat zajišťuje počítač řídicí a kontrolní funkce související s chodem celého přístroje a také s optimalizací jeho parametrů.⁴⁵

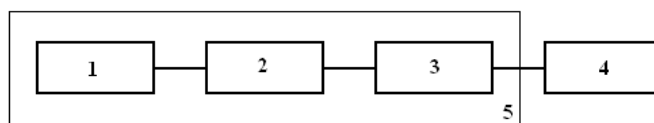


Schéma II *Blokové schéma hmotnostního spektrometru*⁴⁵

Rozlišujeme dva typy ionizace – ionizaci za vakua a ionizaci za atmosférického tlaku. Vakuové iontové zdroje (1) jsou historicky starší. Jejich výhodou je poněkud snadnější konverze analytů na ionty v plynné fázi a eliminace neutralizace iontů srážkami s molekulami přítomného plynu. Patří sem zejména ionizace nárazem elektronu a chemická ionizace, ale také například vakuové MALDI.

V posledních desetiletích roste popularita iontových zdrojů (1) pracujících za atmosférického tlaku. Sem patří především elektrosprej a chemická ionizace (ev. fotoionizace) za atmosférického tlaku. Tyto tři ionizační techniky umožňují dnes optimální spojení s kapalinovými separačními technikami. Mezi moderní povrchové techniky pracující za atmosférického tlaku patří mimo jiné „atmosférické“ MALDI a desorpční elektrosprej.

Další dvě části – analyzátor (2) a detektor (3) pracují za velmi vysokého vakua, kterého se dosahuje výkonným dvoustupňovým vakuovým čerpacím systémem (5).^{45,47} Bližší popis jednotlivých částí poskytují následující kapitoly.

2.3.2.1 Iontový zdroj

Ionizace analyzované látky je naprosto nezbytným krokem analýzy. Iontové zdroje netvoří pouze ionty, ale také významně ovlivňují transfer iontů do dalších částí přístroje.^{45,46} Energetická náročnost ionizace závisí na typu analyzovaného vzorku.⁴⁵ Tabulka 4 uvádí přehled iontových zdrojů.

Tab. 4 Tabulka iontových zdrojů^{45,46}

název (označení)	princip
ionizace elektronem (EI)	Nejtvrdší a nejstarší ionizační technika. Používá se pro látky, které jsou v plynné fázi. Podmínkou je dostatečná těkavost a termostabilita analytu. Ionty vznikají při interakci molekul vzorku s proudem urychlených elektronů, jejichž zdrojem je nejčastěji žhavené rheniové nebo wolframové vlákno.
chemická ionizace (CI)	Zde je analyt opět v plynném stavu a zdrojem je také proud urychlených elektronů, ale jejich energie se přenáší na analyzovanou molekulu pomocí reakčního média, tedy nepřímo. Médium bývá plyn nebo nízkovroucí kapaliny a je umístěno v ionizační komůrce pod tlakem (50 až 150Pa). Výběr reakčního média ovlivňuje množství energie, která se předává a tím i rozsah možné fragmentace, nejčastěji se používá methan, isobutan nebo amoniak.
ionizace urychlenými atomy a ionty (FAB, FIB)	Pro ionizaci se používají vysokoenergetické neutrální atomy (xenon nebo argon), kterými se ostřeluje vzorek nanesený spolu s matricí na vhodný povrch. FIB využívá urychlené ionty cesia.
sprejové techniky	Sprejové techniky jsou vhodné pro kombinaci s kapalinovým chromatografem a kapilární elektroforézou.
- termosprej (TS)	Roztok vzorku nebo mobilní fáze se vzorkem se vedena kapilárou, vyhřívanou na konstantní teplotu, kde se rozpouštědlo začíná částečně odpařovat a na výstupu z kapiláry se tvoří nadzvukový proud směsi částečně odpařeného rozpouštědla a malých, elektricky nabitých kapiček. Dalším odpařováním rozpouštědla z povrchu nabitých kapiček dochází k rychlému

zvýšení hustoty povrchového náboje, až dojde k uvolnění kvazimolekulárního iontu z povrchu kapičky.

- elektrosprej (ESI)	Analyt je rozpuštěn ve vhodném eluentu a dále přiveden do kovové kapiláry, kde dochází k rozprášení směsi působením nehomogenního elektrického pole. Kapičky kapalné fáze jsou inertním plynem a zvýšenou teplotou vysušeny a přecházejí do plynné fáze. Kaskádou coulombických explozí potom dochází k uvolnění jednotlivých iontů z nabitých kapiček. Dnes je nejrozšířenější technikou díky spojení HPLC-MS.
chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)	Roztok vzorku je rozprášen a rychle odpařen v odpařováku a zplyněná fáze je vedena na výbojovou jehlu. Vysoké napětí na výbojové jehle způsobí výboj, který ionizuje složky mobilní fáze. Ty následně ionizují složky vzorku.
fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)	Je analogická s iontovým zdrojem APCI, ale ionizace se dosahuje pomocí ultrafialového záření. Zdrojem UV záření je kryptonová výbojka.
MALDI	technika je podrobněji popsána v samostatné kapitole, str. 24

2.3.2.2 Hmotnostní analyzátor

Toto zařízení má za úkol rozdělit ionty vzniklé v iontovém zdroji podle jejich hodnoty m/z . Velmi důležitá je rozlišovací schopnost analyzátoru, jeho skenovací rychlost (zejména s ohledem na rychlou chromatografii) a transmise iontů (kvalita konstrukce iontové optiky). Typ této části zásadně ovlivňuje kvalitu i cenu celého přístroje.⁴⁶

Tab. 5 *Tabulka hmotnostních analyzátorů*^{45,46}

název	princip
magnetický analyzátor	Patří mezi nejstarší hmotnostní analyzátorů a nachází se u hmotnostních spektrometrů, které mají vysoké rozlišení. Jedná se o elektromagnet mezi jehož vnitřními póly procházejí ionty urychlené z iontového zdroje. Působení homogenního magnetického pole způsobí, že ionty opisují dráhy o různých poloměrech podle jejich rozdílných hodnot m/z .

**kvadrupólový
analyzátor**

Je tvořen čtyřmi kovovými tyčemi, které mají kruhový nebo hyperbolický průřez. Na tyče je vloženo stejnosměrné a střídavé elektrické pole, které způsobí, že ionty zde začnou oscilovat. Různou volbou hodnot stejnosměrného a střídavého napětí lze ovlivňovat, které ionty projdou analyzátozem na detektor podle jejich m/z . Ostatní ionty jsou nestabilní a zůstávají v analyzátozu.

iontová past (iont-trap)

Trojrozměrná analogie kvadrupólového filtru je iontová past. Vkládané elektrické pole umožňuje uzavřít ionty v prostoru iontové pasti. Iontová past se skládá ze vstupní cyklické elektrody a středové elektrody. Se zvyšující se amplitudou jsou ionty s rostoucí m/z vypuzovány na detektor.

**průletový analyzátor
(TOF)**

Tento analyzátor je tvořen evakuovanou trubicí, kterou ionty prolétávají z iontového zdroje až k detektoru. Na základě různé doby letu dochází k separaci iontů podle m/z , neboť těžší ion se bude pohybovat pomaleji než ion lehčí. Dosažitelné rozlišení závisí na délce dráhy, aby však zařízení nebylo příliš rozměrné používá se tzv. reflektor, což je elektrostatické zrcadlo, které násobí dráhu iontu.

**iontová cyklotronová⁴⁹
rezonance**

Tento analyzátor je tvořen cyklotronovou celou, jenž je obklopena elektromagnetem, který tvoří magnetické pole o vysoké intenzitě. Princip spočívá v tom, že každý ion s určitou hodnotou m/z má konkrétní (cyklotronovou) frekvenci kruhového pohybu v cyklotronové cele. Fourierova transformace pak slouží k převodu frekvence na hmotnostní spektrum.

orbitrap⁴⁹

Orbitální past se skládá ze dvou elektrod, kdy vnější je soudkového tvaru a vnitřní tvaru vřetena. Ionty v orbitrapu, které mají stejný poměr m/z , oscilují podél vnitřní elektrody se stejnou frekvencí. Frekvence se pomocí Fourierovy transformace převádí na hmotnostní spektrum.

2.3.2.3 Detektory

Tato část přístroje slouží k detekci iontů po jejich separaci a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Detektory v hmotnostní spektrometrii dělíme do dvou kategorií. Detektor pro přímá měření, který měří elektrický proud přímo po dopadu iontů a násobičový detektor, jenž elektrony po dopadu iontů znásobí.^{45,46}

Tab. 6 *Tabulka detektorů*^{45,46}

název	princip
elektronásobičové detektory	Jsou dva typy. První typ se skládá ze série kovových destiček nazývajících se dynody. Při dopadu iontů jsou z dynody vyraženy elektrony, ty dopadnou na další dynody, což způsobuje znásobení elektronů. Elektrony jsou urychleny elektrickým polem směrem k následující dynodě až jsou zachyceny kolektorem. Další konstrukce je tvořena zakřivenou trubicí z olovnatého skla s vysokým elektrickým odporem a začátek a konec trubice je připojen ke zdroji vysokého napětí. Po dopadu iontu dojde opět k vyražení elektronu, opakované nárazy na stěnu trubice způsobují lavinový růst dalších elektronů, které jsou také urychleny elektrickým polem.
fotonásobičové detektory	U tohoto detektoru se nachází pomocná kovová elektroda, která mění ionty předem na elektrony, ty dopadnou na scintilační stínítko a dávají fotony, jenž vstupují do fotonásobiče. Tento detektor je složitější, ale má vyšší citlivost, a díky minimálnímu styku s vnitřním prostředím přístroje, i delší životnost.

2.3.3 MALDI

Název MALDI pochází z anglických slov *matrix assisted laser desorption/ionization*. Jedná se o šetrnou ionizační techniku, která umožnila využít hmotnostní spektrometrii k analýze vysokomolekulárních látek a zajistila vývoj v oblasti biochemie. Princip metody je následující. Laserové paprsky ozařují krystaly vzorku

smíchaného s vhodnou maticí na povrchu MALDI destičky. Energií laseru absorbuje matrice a ta přenáší energii na analyt, který se poté ionizuje (obr. 6).⁴⁶

2.3.3.1 Matrice

Je látka, která ovlivňuje kvalitu ionizace. Nejčastěji se používají aromatické karboxylové kyseliny.⁴⁶ Matrice musí být rozpustná ve stejných rozpouštědlech jako vzorek, musí být stabilní ve vakuu, vytvořit žádoucí krystal s analytem, ale nezreagovat s ním, neměla by být příliš těkává a musí podporovat ionizaci vzorku. Mezi nevýhody použití matrice patří vznik pozadí ve spektrech, kdy se překrývají ionty vzorku s maticí.^{46,50}

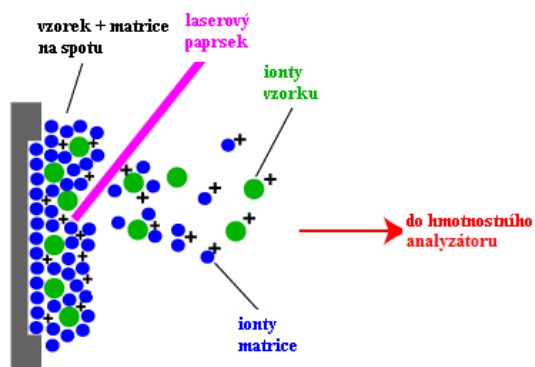
2.3.4 Analyzátoři a detektory ve hmotnostní spektrometrii s MALDI ionizací

Existuje celá řada analyzátorů, které jsou spojovány s MALDI. Teoreticky je možno spojit s MALDI ionizací i jakýkoli detektor a v průběhu času byly také postupně testovány. Svě uplatnění v praxi dosáhlo spojení s kvadrupólovým analyzátořem, iontovou pastí, orbitrapem i iontovou cyklotronovou rezonancí. Nejčastěji se však používá detektor doby letu (TOF), zejména vzhledem k jeho schopnosti měřit v širokém rozsahu hodnot m/z a měřit analyty s velmi vysokou molekulovou hmotností. Zajímavým řešením je využití hybridního tandemového analyzátořu typu QqTOF (obr. 8). Ionizované analyty vlétají do kvadrupólu (obr. 7), který je může propustit (MS sken) a nebo zadržet a propustit jen ion s určitou hodnotou m/z . Tato vybraná hmota se potom může fragmentovat v kolizní cele. Hodnoty m/z jsou tak měřeny s vysokou přesností a rozlišením detektorem doby letu.

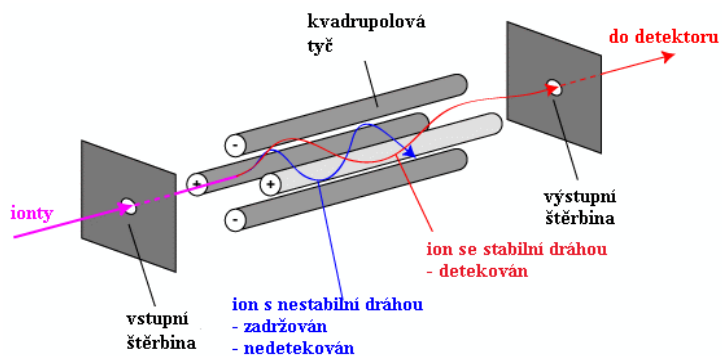
Mikrokanálová destička (MCP) je typ fotonásobičového detektoru, jenž byla použita u analýzy na přístroji Q-TOF Premiér. Skládá se ze tří destiček, kdy každá obsahuje mnoho mikrokanálků. Na stěnu kanálku dopadne elektron, který vyrazí další a ty zase další elektrony, celý proces je urychlován přivedením elektrostatického potenciálu na vodivý materiál destičky. Za destičkami je poté sběrná anoda. Často se řadí více takových mikrokanálových destiček za sebou.⁵¹

Dále existuje celá řada různých moderních detekčních systémů pro různé typy hmotnostních spektrometrů. V této diplomové práci byl použit také hmotnostní spektrometr Synapt G2-S od firmy Waters. Tento hmotnostní spektrometr je vybaven ultrarychlým elektronovým násobičem a hybridním systémem pro převod analogového signálu na digitální

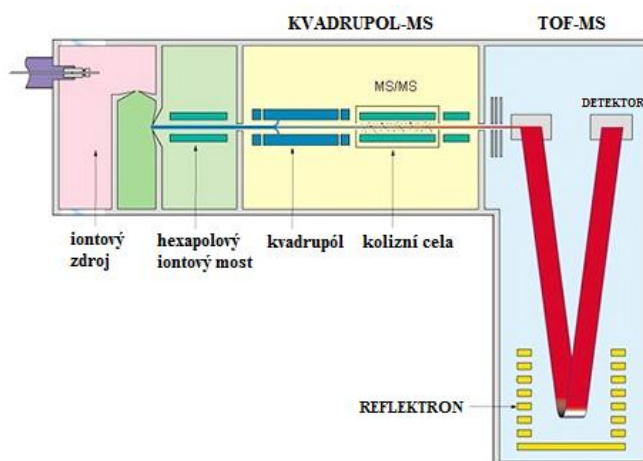
(ADC). Technické uspořádání zařízení dovoluje práci s vysokým rozlišením a malým šumem při vysokých frekvencích sběru dat.⁵²



Obr. 6 Štěpení vzorku s matricí pomocí laseru



Obr. 7 Kvadrupólový analyzátor

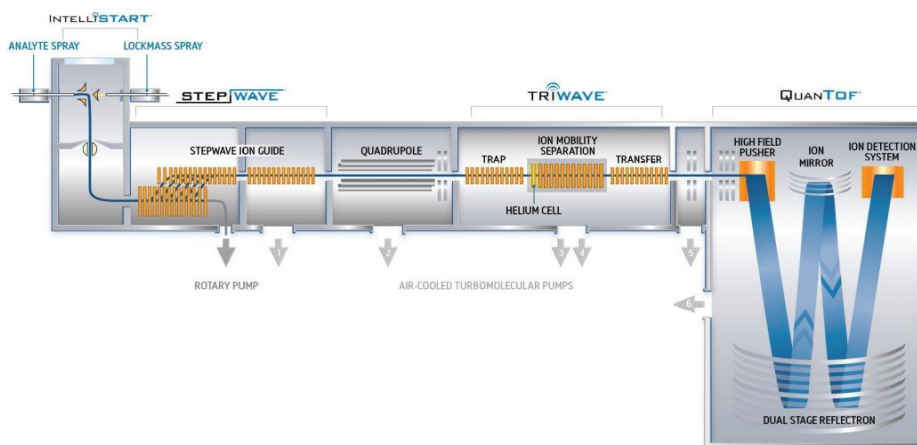


Obr. 8 Hmotnostní spektrometr Q-TOF

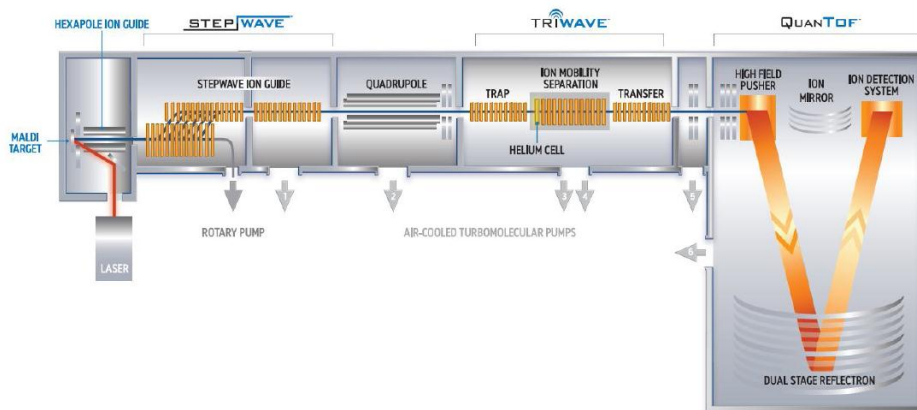
2.3.5 MALDI-Synapt

MALDI-Synapt G2-S je hmotnostní spektrometr spojující kvadrupól, kolizní zařízení a zařízení umožňující separaci iontů s využitím iontové mobility s využitím T-wave technologie a měření hodnot m/z v průletové trubici TOFu s vysokou přesností, správností a rozlišením. Uspořádání přístroje popisuje schema na obr. 9.⁵²

a)



b)



Obr. 9 Schéma hmotnostního spektrometru Synapt G2-S a) s ionizací elektrosprejem, b) s MALDI ionizací (detailní popis funkcí a skenovacích modů tohoto přístroje přesahuje rámec této práce.)

2.4 UV/VIS spektrometrie

UV/VIS spektrometrie patří do oblasti spektrálních metod. Využívá interakce elektromagnetického záření s hmotou a jeho absorpce za současného zvýšení její energie.⁵³ Molekulová absorpční spektroskopie je technika, která se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, jenž absorbují elektromagnetické záření způsobující zvýšení celkové energie atomů a molekul.^{53,54}

Dnes je absorpční spektrometrie jedna z nejpoužívanějších analytických metod zejména pro její rychlost, nenáročnost a citlivost.⁵⁴

2.4.1 Princip

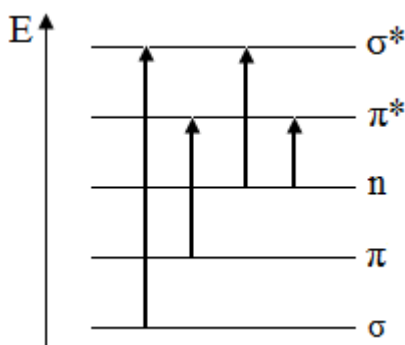
U této techniky dochází k absorpci ultrafialového a viditelného záření v rozsahu vlnových délek 200 – 800 nm, jenž má za následek excitaci vnějších (valenčních) elektronů atomů a molekul.⁵³ V excitovaném stavu setrvává částice krátce a pak se vrací různými deexcitačními přechody zpět do stavu základního.⁵⁴

Absorpce UV/VIS je způsobena intramolekulárními přechody vazebných elektronů z molekulových orbitalů σ nebo π , popř. nevazebných orbitalů (označujících se n) do protivazebných molekulových orbitalů σ^* nebo π^* . Základní typy přechodů jsou čtyři.

Přechody elektronů $\sigma \rightarrow \sigma^*$ jsou energeticky nejnáročnější a dají se pozorovat ve vzdálené UV vakuové oblasti pod 200nm. Vyskytují se u sloučenin s jednoduchými vazbami, nejčastěji C-C nebo C-H. Jedná se např. o n-heptan, n-hexan, isooktan aj. Další možnost přechodu je z nevazebného orbitalu $n \rightarrow \sigma^*$, které vyžaduje mnohem méně energie a vznikající spektra absorbují v oblasti kolem 200nm. Pro uskutečnění toho přechodu je nutné, aby se v molekule nacházel atom s volnými elektronovými páry (např. N, S, Cl aj.) Jsou to alkoholy, ethery, voda, aminy, amoniak aj. Látky těchto dvou přechodů jsou vhodnými rozpouštědly k měření jiných látek.⁵⁴

Přechody elektronů $\pi \rightarrow \pi^*$ jsou typické pro sloučeniny s násobnými vazbami. V případě, že je dvojná vazba v konjugaci s další dvojnou vazbou, posouvá se maximum absorpčního pásu k delší vlnové délce. Čím je konjugovaný systém dvojných vazeb delší, tím se pak více posouvá maximum k delším vlnovým délkám, může se projevit až ve viditelné oblasti, pak jsou látky barevné. I zde je typ přechodu z nevazebného orbitalu $n \rightarrow \pi^*$ a

podobně jako u předchozího případu se zde musí vyskytovat atom s volnými elektronovými páry, jenž je v konjugaci s dvojnými vazbami.⁵⁴



Obr. 10 Elektronové přechody v molekule

Existují i další přechody elektronů, které patří do skupiny intermolekulárních a nazývají je charge-transfer (CT), tedy přechody přenosu náboje. Pás znázorňující tento přechod vzniká přechodem elektronu ze základního π popř. n orbitalu donoru (dárce) na protivazebný π^* akceptoru (příjemce). Tento typ přechodu je energeticky výhodnější než intramolekulární přechody.⁵⁴

Výsledkem měření je absorpční elektronové spektrum látky. Při registraci jednotlivých absorpčních přechodů dochází k jejich splývání a proto je spektrum pásové.² Vynáší se jako závislost absorbance na vlnové délce.⁵⁵ U většiny látek existuje více možných energetických přechodů a spektrum je tvořeno větším počtem vzájemně se překrývajících pásů.⁵⁴

2.4.2 Metody UV/VIS analýzy

Měření absorpce v UV/VIS oblastech se provádí různými přístroji a z historického hlediska má různé názvy.⁵⁴

Tab. 7 Tabulka metod pro měření UV/VIS záření⁵⁴

název metody	oblast spektra	princip
kolorimetrie	VIS	Metoda je založená na porovnávání intenzity roztoku o neznámé koncentraci barevné látky s roztokem stejné látky o známé koncentraci.

fotometrie	VIS	Detekce paprsku produkovaného zdrojem světla je buď subjektivní, kdy detektorem je lidské oko, nebo objektivní pokud se provádí fotoelektricky. Jako dispersní prvek se používá barevný filtr.
spektrofotometrie	UV a VIS	Detekce absorpce se provádí objektivně a dispersním prvkem je monochromátor (hranol nebo mřížka).
<i>jednopaprskové</i>		Záření vycházející z monochromátoru prochází nejdříve kyvetou obsahující srovnávací vzorek a dopadá na detektor, tomuto fotoelektrickému proudu je přiřazena nulová hodnota absorbance. Poté je vložena kyveta s analytem a je změřena jeho absorbance.
<i>dvoupaprskové</i>		Záření z monochromátoru se pomocí děliče paprsků rozdělí na paprsek procházející měrnou a srovnávací kyvetou současně. Po výstupu z kyvet jsou paprsky, pomocí zrcadel, opět spojeny v jeden, který dopadá na detektor. ⁵⁴ Výhody oproti jednopaprskové spektrometrii spočívají v tom, že se srovnávací vzorek měří současně s měrným vzorkem. Tím dochází ke kompenzaci kolísání parametrů ovlivňujících měření v čase. Výsledkem je zlepšení poměru signál – šum a reprodukovatelnost měření. ⁵⁶

2.4.3 Instrumentace UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometr se skládá ze základních prvků označených ve Schématu III. Mezi základní funkční části patří zdroj záření (1), který musí poskytnout dostatečně intenzivní záření o vlnových délkách v rozsahu 200 – 800 nm. Dále zařízení obsahuje dispersní systém (2) sloužící k rozkladu záření ze zdroje, který se skládá ze vstupní štěrbin (2a), vlastního dispersního systému (2b) a výstupní štěrbin (2c). Další částí je kyveta se vzorkem upevněná ve vhodném držáku (3). Záření prošlé vzorkem je snímáno detektorem (4). Detekce je založena na vnějším fotoelektrickém jevu nebo na vnitřním fotoefektu. Nezbytnou součástí

přístroje je počítač umožňující zpracování dat (5). Součástí těchto přístrojů je také pomocná optika jako zrcadla, čočky, štěrbin, clony aj.⁵³



Schéma III. *Blokové schéma UV/VIS spektrofotometru*⁵³

2.4.3.1 Zdroj záření

Pro UV oblast vyhovují jako zdroj vodíkové či deuteriové výbojky s vyšší intenzitou², kdy elektricky excitovaný vodík (deuterium) při nízkém tlaku produkuje kontinuální ultrafialové spektrum.⁵⁵ Dále se jako zdroj záření používá vysokotlaká xenonová popř. heliová výbojka. Pro oblast VIS (popř. pro blízkou IR) se užívá wolframových nebo halogenových žárovek.^{53,54} Halogenová žárovka se od wolframové liší přidaným obsahem jódu v křemenné baňce a přibližně dvojnásobnou životností.⁵⁵

2.4.3.2 Disperzní systém

K disperzi záření ze zdroje se používá tzv. monochromátor, který z polychromatického záření izoluje záření monochromatické, v co nejužším spektrálním intervalu. Tato část instrumentace obsahuje vstupní a výstupní štěrbinu a vlastní disperzní systém, což může být hranol nebo mřížka a již zmíněné pomocné prvky.⁵⁴

Hranol se používá ve starších přístrojích. Rozkládá polychromatické světlo při jeho průchodu hranolem na základě principu lomu světla. Mřížka je modernější disperzní prvek. Rozklad polychromatického světla mřížkou je důsledkem odrazu nebo ohybu (difrakce) záření na jednotlivých vrypech mřížky a interference odražených nebo ohnutých paprsků. Úhlová disperze mřížky pak na rozdíl od hranolu nezávisí na materiálu mřížky ani na vlnové délce, která je ve spektru jednoho řádu stejná.⁵⁴

2.4.3.3 Vzorek

Vzorek ve vhodné nádobce, nazývajícím se kvjeta, se vkládá do cesty světelnému paprsku, který je produkován zdrojem záření buď před, nebo za monochromátor.⁵³ Zásadní

podmínkou pro jejich užívání je, že materiál kyvet nesmí absorbovat záření ve sledovaném vlnovém rozsahu. Pro UV oblast se tedy používají kyvety křemenné a pro viditelnou oblast spektra skleněné.⁵⁴ Kyvety se musí udržovat v dokonalé čistotě, neboť nečistoty a otisky prstů by způsobily rozptyl světla a chyby v měření.⁵⁵

Pro speciální měření se používají různé modifikace např. průtokové kyvety, válcové kyvety, jenž jsou uzavíratelné a slouží k měření absorpce plynu, temperované kyvety, kyvety s proměnlivou tloušťkou vrstvy aj.⁵³ Měření v průtoku je v současnosti často používaná technika pro různé úkoly. Zde lze zmínit průtokovou injekční analýzu (FIA), studium reakcí v průtoku, on-line detekci po separaci atd. V této práci byla využita průtoková injekční analýza, která je zmíněna v detailu v dalším textu.

2.4.3.4 Detektor

Jak již bylo zmíněno, objektivní detektory pro UV a VIS záření jsou založeny na vnějším fotoelektrickém jevu nebo na vnitřním fotoefektu, kdy při dopadu fotonů se zvyšuje elektrická vodivost polovodiče, popř. dochází ke vzniku napětí v místech styku kov-polovodič.⁵³

Mezi nejpřesnější detektory patří vakuové fotonky, zde při dopadu fotonů měřeného záření ze zdroje na fotokatodu se uvolní elektrony, které dopadnou na sběrnou anodu a vzniklý fotoelektrický proud je přímo úměrný toku záření ze zdroje. Podobně je tomu u fotonásobičů, kdy se počet fotoelektronů násobí sekundární emisí.⁵³ Dále se užívá diodové pole se zkratkou DAD (z anglického diode array detector), který obsahuje mnoho malých citlivých fotodiod na jednom křemíkovém čipu, monochromátor je v tomto případě pak umístěn až za vzorkem.^{54,55} UV/VIS detektor s diodovým polem patří v současnosti k nejběžnějším detektorům pro kapalinové separační techniky (HPLC a kapilární elektroforéza).⁵⁴

2.4.3.5 Metody průtokové analýzy se spektrofotometrickou detekcí

Jedná se o moderní instrumentální techniky přinášející mnoho výhod, zejména rychlost a možnost automatizace stanovení analýzy.⁵⁴

Tab. 8 *Tabulka metod průtokové analýzy*⁵⁴

název metody	princip
segmentovaná průtoková analýza (SFA)	Vzorek k analýze je nasáván pumpou do mísící cívky. Tam je promíchán činidlem. Zreagovaný vzorek je oddělen bublinkou. Za bublinkou dochází k promývání zařízení. Promývací část je opět oddělena bublinkou a je dávkován další vzorek. Oddělování bublinkou zabraňuje promíchání jednotlivých vzorků i jejich rozmývání a ředění. Před vlastním měřením spektrofotometrickým měření je třeba bublinky odstranit ve vhodném separátoru. Do zařízení je vehnán vzduch, jehož bublinky začnou dělit reakční směs. Vzduch je poté v separátoru oddělen a analyt vtéká do průtokové cely, kde je změřena absorbance.
průtoková injekční analýza (FIA)	Přesný objem analytu je dávkován, obvykle ventilem (4), do kontinuálního proudu vhodné kapaliny (1), jejíž tok je zajištěn pumpou (3). Analyt vstupuje do reakční cívky a reaguje s činidlem (2) za vzniku produktu, který je v průtokové cele (5) spektrofotometricky detegován. Tento druh průtokové analýzy řeší problémy segmentované průtokové analýzy jako pulsování toku, udržování stálé velikosti bublin nebo odstranění vzduchu před průtokovou celou.

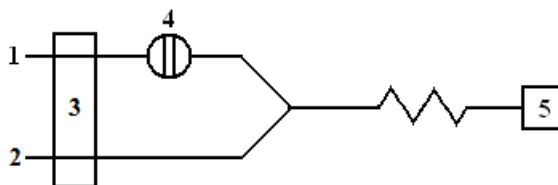


Schéma IV. *Blokové schéma průtokové injekční analýzy (FIA)*⁵⁴

2.5. Analýza složení plodu kustovnice

V této práci byl plod rostliny kustovnice studován pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací MALDI a pomocí spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pro toto spojení byl jako iontový zdroj volen elektrosprej. Hmotnostní spektrometrie představuje z hlediska identifikace obsahových látek v rostlinném materiálu patrně nejsilnější dostupný nástroj (v případě potřeby zjištění absolutní konfigurace v kombinaci s nukleární magnetickou rezonancí a/nebo některým ze spektropolarimetrických postupů). Metoda hmotnostní spektrometrie byla v minulosti pro analýzu tohoto plodu a dalších částí této rostliny už použita. Práce Penga a kol. se zaměřila na použití MALDI-TOF pro zjištění molekulové hmotnosti glykokonjugátu LbGp5B v kustovnici cizí, který inhibuje peroxidaci LDL lipoproteinu.⁵⁷

Populární a v běžných laboratořích dostupnější technikou je UV/VIS a kapalinová chromatografie s UV/VIS detekcí. Spektrometrická technika UV-VIS byla použita, spolu s HPLC a TGA, v článku publikovaném minulý rok, za účelem objasnit složení extraktu karotenoidů z kustovnice čínské.⁵⁸ Technika HPLC je jedna z typických pro studium vlastností a látek obsažených v plodu kustovnice. Metodou HPLC byla nejčastěji zjišťována přítomnost látek jako jsou polysacharidy, flavonoidy, karotenoidy a jiné látky jako atropin a betain.^{11,18,19,21,23,24,26,59-64}

Jak již bylo řečeno v kapitole 2.1.8, polysacharidy představují hlavní složku plodu a jsou složeny hlavně ze sacharidů jako rhamnóza, arabinóza, ribóza, manóza, galaktóza, fruktóza, xylóza a glukóza.⁵⁹ Studie z roku 2010 uvádí, že mezi dominantní složky polysacharidů této rostliny patří glukóza a fruktóza,⁶⁰ o 2 roky později vyšel článek udělující prvenství galakturonové kyselině a glukózu uvádí z hlediska obsaženého množství až jako čtvrtou v pořadí.¹⁸ Extrakčními činidly pro studium polysacharidů z kustovnice jsou polární látky, zejména alkoholy^{60,61} a voda v rozmezí teplot 30 až 80°C^{18,59}, doba extrakce je v rozmezí jedné až 24 hodin.^{18,59,60,61} Pro HPLC analýzu byla jako stacionární fáze použita fáze reverzní (C18). Základními složkami mobilní fáze jsou acetonitril a voda,^{18,59} například acetonitril a voda (20:80, v/v)⁵⁹ nebo acetonitril jako mobilní fáze A a 0,045% KH₂PO₄ a 0,05% triethylamin jako mobilní fáze B v gradientové eluci.¹⁸ Veškerá uvedená literatura se zabývá zejména účinkem polysacharidů na živý organismus a jejich léčebné, imunitní a antioxidační schopnosti.^{18,59,60,61}

Fenolické kyseliny a flavonoidy jsou velkou skupinou látek produkovaných v rámci sekundárního metabolismu rostlin. V poslední době je jim věnována pozornost z hlediska jejich ochranné role proti rakovině a srdečním nemocem a dalších pozitivních efektů na lidské zdraví. S růstem zájmu o tyto látky se zvyšuje i potřeba jejich věrohodné analytické kontroly. Pozornost je věnována celému analytickému procesu od extrakce přes purifikaci až k analytické koncovce.²¹ Literatura se shoduje v použití polárních extrakčních činidel k extrakci těchto látek z plodu kustovnice. Používá se zejména ethanol a methanol, popř. voda a jejich vzájemné směsi.^{21,23,62,63,64} V jedné studii byla extrakce prováděna po dobu dvou hodin ve vodní lázni s teplotou 90°C.^{21,23,62} V jiném případě po dobu 24 hodin za pokojové teploty v temné místnosti.^{63,64} Studie uvádějí, že nejčastěji užívaná mobilní fáze je opět acetonitril, tentokrát v kombinaci s methanolem, vodou nebo okyselený kyselinou octovou.^{21,23,62,63} Zajímavý je článek z roku 2003, který srovnává poměry zastoupení fenolických kyselin a flavonoidů na kustovnici cizí a kustovnici ruthénské, jenž je s kustovnicí cizí vzdáleně příbuzná (má černomodrou až černou barvu oproti námi studovaným oranžovočerveným kustovnicím). V tomto článku autoři používají celou řadu extrakčních činidel s širokým rozsahem polarit - ethylacetát, methanol, butanol, voda a 70% ethanol. Analýza kustovnice ruthénské prokázala přítomnost rutinu, anthokyanů i fenolických kyselin, jako kyselina p-kumarová, chlorogenová a kyselinu hydroxyskořicovou, v kustovnici cizí byly detekovány pouze výše zmíněné fenolické kyseliny. Rutin a anthokyaniny byly získány extrakcí polárnějšími rozpouštědly (methanol, ethanol a butanol), naopak fenolické kyseliny byly detekovány téměř ve všech použitých rozpouštědlech.⁶⁴ O 8 let později vychází studie zaměřená přímo na anthokyaniny v kustovnici ruthénské a úspěšně jich detekuje 14, z čehož 10 přímo identifikuje.⁶³

Kapalinová chromatografie se uplatnila u v analýze karotenových látek. Karotenoidy dávají plodu červenou barvu a právě plod kustovnice se uvádí jako jeden z nejbohatších zdrojů těchto látek v přírodě, což popisují v kapitole 2.1.8. Do roku 2008 nebyl detailně popsán profil karotenoidů obsažený v tomto plodu. Peng a kol. stanovil pomocí HPLC množství zeaxanthin dipalmitátu ke zbytku karotenoidů v devíti rostlinných druzích plodu kustovnice.¹¹ V roce 2010 Inbaraj a kol. popsal kompletní profil karotenoidů a jejich esterů.¹⁹ Extrakční činidla pro analýzu jsou různorodá. Peng et al. jich použil několik, methanol, petrolether, ethyl acetát, chloroform a ethanol. Další práce uvádí, že k extrakci lze použít i směs hexanu, ethanolu, acetonu a toluenu. Mobilní fáze pro kapalinovou

chromatografii se také liší, ale dostupné literární zdroje se shodují v použití acetonitrilu a dichlormethanu jako základních složek mobilní fáze.^{11,19} Inbaraj použil kolonu C30 v gradientové eluci, kdy mobilní fáze A byl dichlormethan a B pak methanol-acetonitril-voda v poměru 84:14:5 (v/v/v).¹⁹ Pengova mobilní fáze byla směs acetonitrilu a dichlormethanu v poměru 42:58 na koloně Alltima C18.¹¹

Při studiu složení kustovnice byla pozornost věnována i atropinu. Atropin je typický alkaloid čeledi Solanaceae. Literatura uvádí dvě metody extrakce atropinu z kustovnice. V obou metodách je k extrakci využito alkalizovaného methanolu (alkalizuje se buď amoniakem nebo hydroxidem sodným). Jako mobilní fáze se využívá směs methanolu, vody a octové kyseliny při reverzní fázi.²⁶

Velmi významnou látkou, která byla analyzována v plodu kustovnice pomocí HPLC je betain. Jde o zwitterionní látku nesoucí kvarterní amoniovou a karboxylovou skupinu. Tato látka je v rostlinné buňce syntetizována pro obranu buněk před osmotickým stresem daným velkým suchem, vysokou salinitou nebo vyšší teplotou. Plod byl extrahován v methanolu po dobu 30 min za pokojové teploty. Mobilní fází byl acetonitril s vodou v poměru 25:75. Analýza byla prováděna izokratickou elucí na koloně YMC s NH₂-chemicky modifikovanou fází.²⁴

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Methanol HPLC super gradient od firmy Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika), 35% kyselina chlorovodíková p. a. Penta (Praha, Česká republika), dimethyl sulfoxide for HPLC od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), aceton p. a. Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), octan ethylnatý p. a. Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), tert.-butylmethylether Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), n-hexan 95+ od firmy Chromservis (Praha, Česká republika), acetonitril LiChrosol (Darmstadt, Německo), THAP (2,4,6-trihydroxyacetophenone p. a. matrix substance for MALDI-MS) od firmy Fluka Analytical, Sigma-Aldrich (Švýcarsko) a kyselina mravenčí 95% p. a. od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Pro experimenty byla po celou dobu používána deionizovaná voda z deionizační stanice firmy Millipore (Merck, Darmstadt Německo).

Plody kustovnice cizí byly sesbírány v Olomouci na ulici Brněnská v průběhu 4 týdnů v červenci a srpnu roku 2012 a zamraženy. Rostlina kustovnice čínská byla zakoupena v zahradnictví Kruh Jilemnice v březnu 2010, plodila poprvé v srpnu 2012. Sušená kustovnice čínská byla zakoupena v hypermarketu Albert, země původu Čína, výrobce Ing. Kratochvíl – IBK TRADE, Praha.

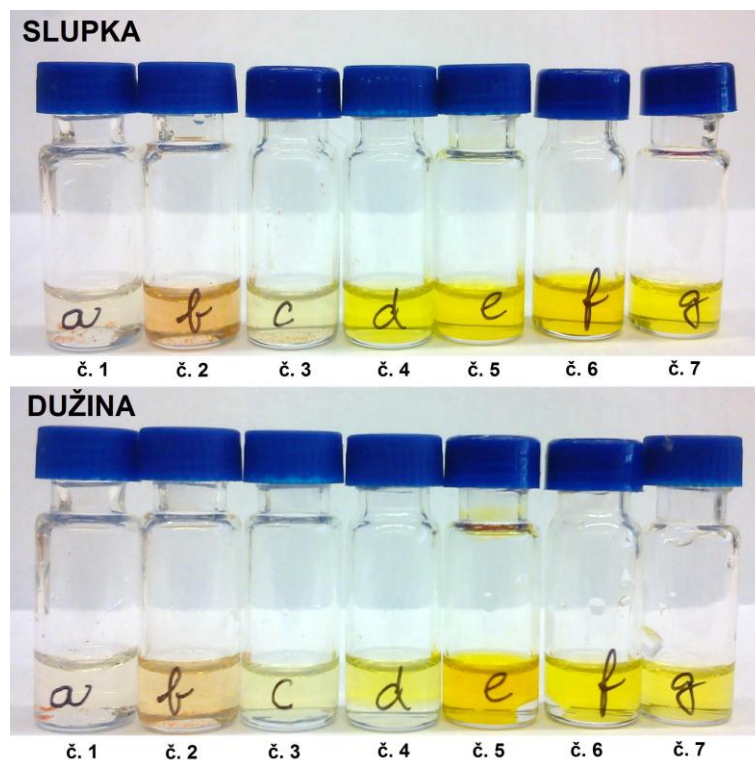
3.2 Příprava extrakčního činidla

Celkem bylo pro experiment použito 7 rozpouštědel v závislosti na polaritě. Extrakční činidla jsou vypsána, označena a seřazena dle klesající polarity solventu v tabulce 9.

Tab. 9 *Extrakční činidla*

extrakční činidlo	označení	polarita
voda + 0,01% HCl (v/v)	1	10,2
dimethyl sulfoxid	2	7,5
methanol + 0,01% HCl(v/v)	3	5,1
aceton + 0,01% HCl (v/v)	4	5,1
ethylacetat	5	4,4
terc-butylmethylether	6	2,5
hexan	7	0,1

V extraktech s nepolárními rozpouštědly je dobře patrná barva karotenoidů.



Obr. 11 *Extrakce slupky a dužiny kustovnice cizí použitými rozpouštědly*

3.3 Příprava mobilní fáze

Pro analýzu plodů kustovnice pomocí UPLC-MS byly použity dvě mobilní fáze. Mobilní fáze A byla připravena jako směs vody a kyseliny mravenčí tak, aby výsledná koncentrace kyseliny byla 0,1% (v/v). Mobilní fáze B byla připravena jako směs acetonitrilu a kyseliny mravenčí tak, aby výsledná koncentrace kyseliny byla 0,1% (v/v).

Výsledná mobilní fáze probíhala v gradientové eluci, kterou znázorňuje tabulka 10.

Tab. 10 *Gradientová eluce (profil gradientu)*

čas (min)	flow rate (μl/min)	mobilní fáze A (%)	mobilní fáze B (%)
0	0,25	95	5
2,4	0,25	95	5
6,4	0,25	10	90
8	0,25	10	90
9	0,25	95	5
12	0,25	95	5

3.4 Příprava vzorků plodů

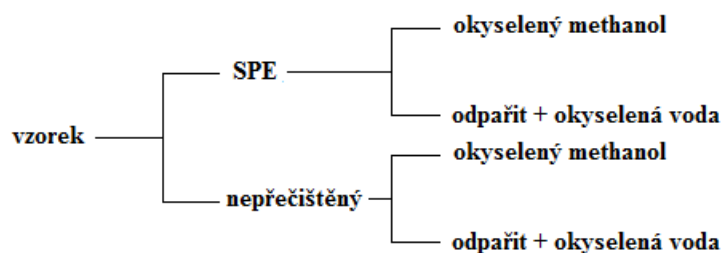
Vzorky všech tří plodů, kustovnice cizí, kustovnice čínské a sušené kustovnice čínské, byly separovány na slupku a dužinu a obě části byly nakrájeny na malé části. Od dužiny byly dále separovány semena rostliny, jenž nebyly analyzovány. Takto připravené vzorky byly zamrazeny po dobu jedné hodiny na -70°C a po vyjmutí z hlubokomrazícího boxu třecí miskou a tloučkem rozmělněny do kašovitě hmoty. Vzorky kustovnice cizí byly připraveny navážením 1g homogenizovaného materiálu a jeho extrakcí v 10 ml rozpouštědla. U kustovnice cizí byla v rámci testování extrahovatelnosti použita všechna extrakční média uvedená v tab. 9. Ostatní vzorky kustovnice byly extrahovány extrakčním činidlem č. 3 se zaměřením na flavonoidní látky. Extrakce probíhala po dobu 48 hodin v chladu a tmě pro zamezení oxidace.

3.5 Postup extrakce

K první analýze bylo použito extrakční činidlo č. 3 v tabulce 9, tedy methanol okyselený kyselinou chlorovodíkovou.

Extrakt byly rozděleny na několik částí. První část zůstala bez úpravy. Druhá část byla přečištěna na kolonkách Strata-SPE (polymerní sorbent Strata SDB-L, 100 μm , 200mg/3ml, Phenomenex, USA). Před samotnou purifikací byly 2 ml extraktu odfoukány dusíkem do sucha a smíchány s 2 ml 0,01% kyseliny chlorovodíkové v deionizované vodě. Takto upravený extrakt byl potom přečištěn na SPE kolonce. Nejdřív byla kolonka aktivována 2 ml 0,01 % (v/v) kyseliny chlorovodíkové v methanolu a pak se promyla stejným množstvím 0,01% (v/v) kyseliny chlorovodíkové v deionizované vodě. Na takto připravenou kolonku byly nanášeny 2 ml vzorku. Vysoce polární látky jako například sacharidy aj. byly odstraněny promytím 4 ml 0,01 % (v/v) kyselinou chlorovodíkovou ve vodě a zachycený přečištěný vzorek byl eluován 2 ml 0,01 % (v/v) kyseliny chlorovodíkové v metanolu.

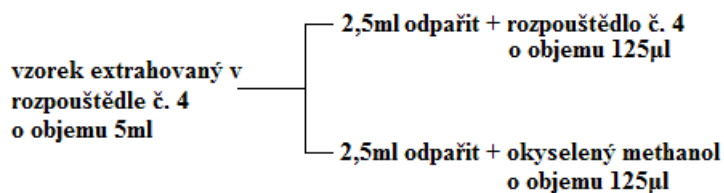
Nepřečištěná polovina vzorku (první část) a přečištěný vzorek (drahá část) se rozdělil znovu na dvě poloviny, z čehož jedna byla odfoukána dusíkem do sucha a smíchána 0,01 % (v/v) kyselinou chlorovodíkovou v deionizované vodě a druhá část zůstala v methanolicím rozpouštědle v němž byla eluována z kolonky. Přípravu vzorků přehledně ukazuje obr. 12.



Obr. 12 Postup přípravy vzorků

V další části optimalizace se pracovalo se všemi sedmi extrakčními činidly, ve kterých byla extrahována slupka a dužina kustovnice cizí.

Všechny vzorky byly zcentrifugovány, supernatant byl odebrán, odpařen a odparek rozpuštěn ve 20x menším objemu rozpouštědla (20-ti násobné zakoncentrování vzorku). Zakoncentrování přehledně ukazuje obr. 13 na příkladu rozpouštědla č. 4.



Obr. 13 Příklad koncentrace vzorku extrahovaného v okyseleném acetonu

3.6 Příprava matrice a destičky pro MALDI analýzu

Matrice byla připravena dle návodu uvedeného v manuálu firmy Waters k přístroji Q-TOF Premier.⁶⁵ Postup lze shrnout takto: 25 mg THAP bylo naváženo a rozpuštěno v 1 ml směsi acetonitrilu a vody v poměru 1:1. Vzorky upravené dle výše popsaného protokolu extrakce byly smíchány s roztokem matrice v poměru 1:1 a dávkovány na MALDI destičku (1µl na jeden spot). Po zaschnutí a krystalizaci matrice se vzorkem se destička mohla vložit do přístroje k analýze.

3.7 Příprava vzorku pro UPLC-MS a UV/VIS analýzu

Extraktů připravené podle výše uvedeného protokolu byly centrifugovány, supernatant byl odebrán, přenesen do vialek a vložen do autosampleru kapalinového chromatografu.

3.8 Přístroje

Analýzy byly provedeny na dvou vysokorozlišujících tandemových hmotnostních spektrometrech vybavených MALDI a ESI ionizací (Q-TOF Premier a SYNAPT G2-S, Waters, Milford, USA). Oba přístroje byly pro FIA-MS a LC/DAD/MS experimenty spojeny s kapalinovým chromatografem UPLC Acquity. Hlavní parametry nastavení obou přístrojů jsou uvedeny v tabulkách 11, 12 a 13.

Tab. 11 *Experimentální podmínky MALDI-Q-TOF Premier*

Experimentální podmínky	
Typ laseru	N ₂
Vlnová délka laseru (nm)	337.1
Pulsní energie (μJ)	300 (@10 Hz)
Kolizní energie (V)	3.0
Průtok chladícího plynu (ml/h)	8.0
Průtok kolizního plynu (ml/h)	0.32
Šířka píku (ns)	4
Peak power (kW)	75

Tab. 12 *Experimentální podmínky ESI-SYNAPT G2-S a Acquity UPLC I-Class*

Experimentální podmínky	
Polarity	ES+
Capillary (kV)	3.0
Source Temperature (°C)	100.0
Sampling Cone	40.0
LockSpray Infusion Flow Rate (µL/min)	5.0
Leucin Enkephalin (556.2771 Da, TOF FUNCTION3)	
Start mass	50.0
End mass	2000.0
TOF MS FUNCTION 1	
Start Mass	50.0
End Mass	2000.0
Trap Collision Energy (eV)	4.0
Transfer Collision Energy (eV)	2.0
Analyser	Resolution Mode
TOF MS FUNCTION 2	
Start Mass	50.0
End Mass	2000.0
Trap Collision Energy Ramp Start (eV)	10.0
Trap Collision Energy Ramp End (eV)	30.0
Transfer Collision Energy (eV)	2.0
Analyser	Resolution Mode

Tab. 13 *Experimentální podmínky MALDI-SYNAPT G2-S*

Experimentální podmínky	
Typ laseru	1kHz Nd: YAG solid state
Vlnová délka laseru (nm)	350
Pulsní energie (µJ)	400 (10 Hz)
Kolizní energie (eV)	6.0 (MS sken)
Rampa kolizní energie (MS/MS sken)	
Initial Ramp CE (eV)	30.0
Final Ramp CE (eV)	80.0
Šířka píku (ns)	2
Peak power (kW)	25

3.8.1 Další přístroje

K navážení vzorků kustovnice a THAP matrice byly použity váhy Mettler Toledo (Švýcarsko) pracující s přesností na 0,0001g. Pro oddělení kapalného supernatantu od sedimentu byla použita centrifuga Mikro 120 od firmy Schoeller (Německo). K odpařování vzorku byl použit TurboVap (Caliper, USA).

3.9 Vyhodnocení výsledků

Pro vyhodnocení celého experimentu bylo použito počítačového programu MassLynx V4.1 Waters Laboratory Informatics, jenž mi zpřístupnila Univerzita Palackého v Olomouci, dále pak ADC/ChemSketch Freeware pro kreslení chemických vzorců a internetových stránek ChemSpider a PubMed, zpřístupněných Univerzitou Palackého v Olomouci, pro návrh a ověření identity nalezených sloučenin.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Pilotní MALDI-MS experimenty s plody kustovnice

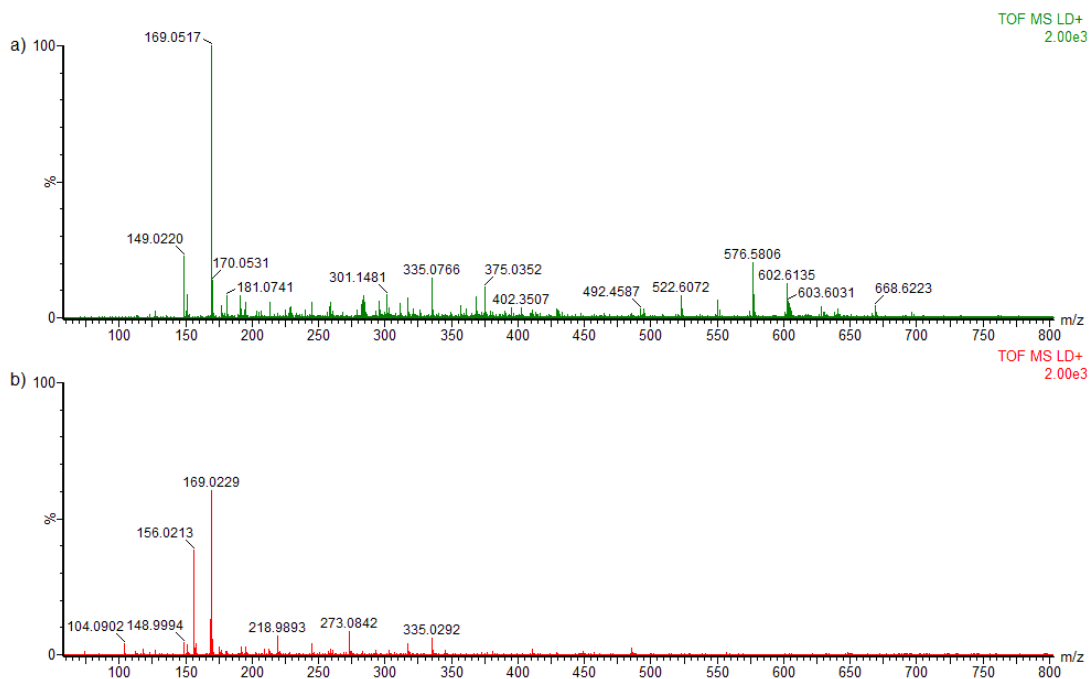
Tato kapitola si klade za cíl shrnout zkušenosti s přípravou vzorků pro MALDI-MS měření při práci s extrakty plodů kustovnice. Na příkladu identifikace zeaxanthin dipalmitátu naznačuje možnosti extrakčních postupů pro úpravu vzorku u obou hmotnostních spektrometrů použitých pro analytickou koncovku.

Dostupná literatura uvádí pouze jediný článek, který se zabýval analýzou plodu kustovnice na hmotnostní spektrometrii pomocí iontového zdroje MALDI. Neuvádí však postup práce ani extrakční činidla, které bylo třeba dále optimalizovat.⁵⁷

4.1.1

První analýza byla zaměřena na předběžný screening obsahových látek v kustovnici. V první sadě experimentů byly plody po separaci na dužinu a slupku extrahovány ve směsi methanolu a 0,01% kyseliny chlorovodíkové. Polovina vzorku byla přečištěna přes SPE kolonky a druhá analyzována bez přečištění (detaily viz. kapitola 3.5). Bylo připraveno celkem 32 vzorků a ty byly analyzovány hmotnostním spektrometrem Q-TOF Premier.

Obr. 14 znázorňuje, že naměřená spektra měla nízkou celkovou intenzitu, nejvyšší pík byl tvořen píkem matrice a nebylo zde možno identifikovat žádné flavonoidy ani jiné látky bez ohledu na přípravu.



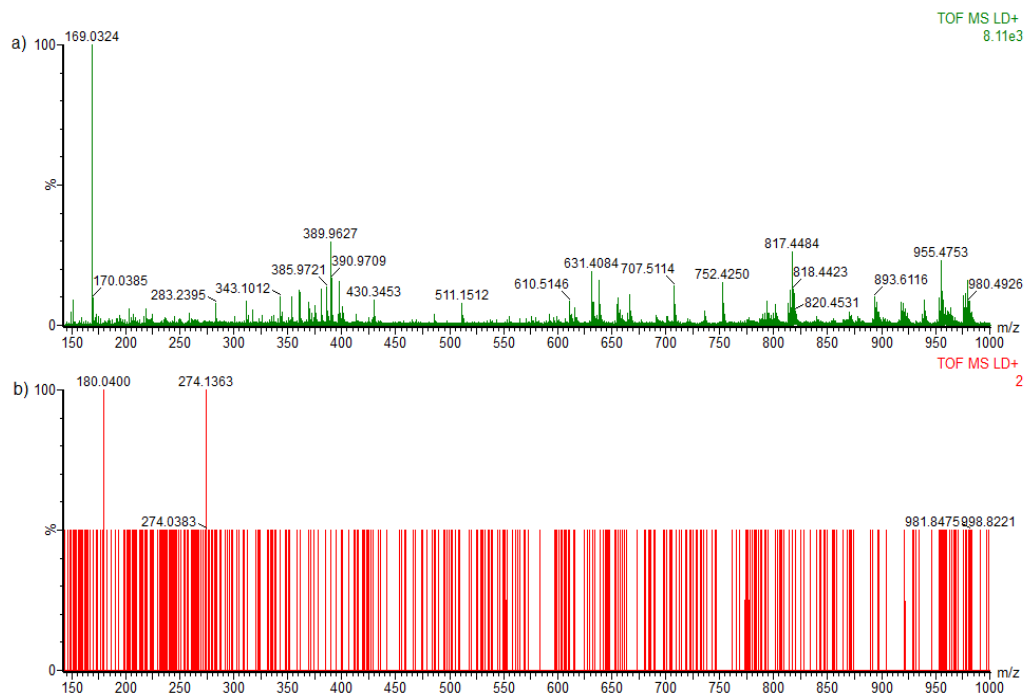
Obr. 14 Příklad srovnání hmotnostního spektra THAP matrice (a) a kustovnice cizí (b)

4.1.2

V druhé sadě experimentů bylo použito sedm extrakčních činidel s různou polaritou viz. tabulka 9 a vzhledem k očekávané nízké koncentraci látek ve vzorku byly extrakty 20x zakoncentrovány a upraveny podle protokolu uvedeného v kapitole 3.5.

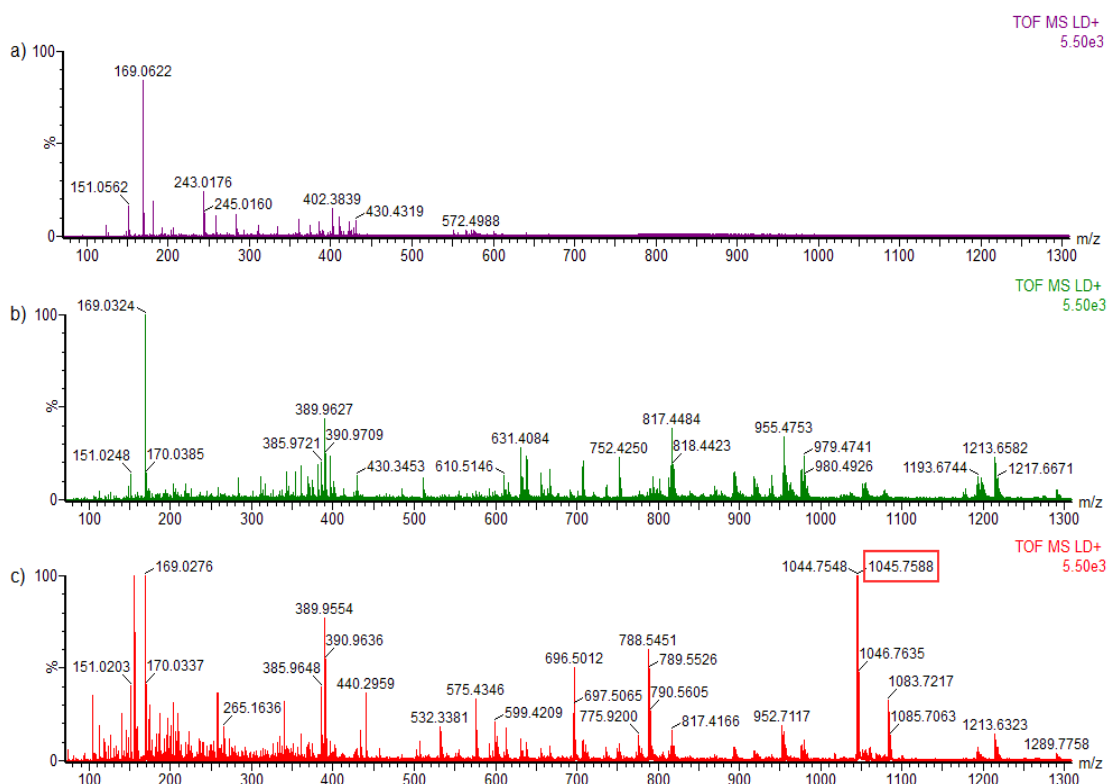
Ohřívání spotu laserem způsobovalo jistý druh karamelizace, která byla pozorována po vytažení MALDI destičky z přístroje jako žlutobílá krusta na povrchu spotu. Sacharidy (nízko i vysokomolekulárních), které tvoří 10 až 25% všech látek v plodu se extrahovaly do polárních rozpouštědel a pravděpodobně právě přítomnost velkého množství sacharidů způsobuje výrazné snížení kvality spekter. Do nepolárních rozpouštědel se sacharidické látky prakticky neextrahují a zřejmě proto byla získána kvalitnější spektra. Uvedené rozdíly v kvalitě spekter mohou však být vzhledem ke komplexnosti extraktů důsledkem řady dalších efektů.

Na následujícím obrázku si můžeme prohlédnout spektra, kde první (a) z jich je z nepolárního rozpouštědla hexanu a druhé spektrum (b) je z okyseleného acetonu. Dominantním iontem pozorovaným ve spektru a) je $[M+H]^+$ ion matrice (THAP).



Obr. 15 Příklad srovnání hmotnostního spektra extrahovaného v nepolárním (a) a polárním (b) rozpouštědle

Na obr. 16 je možno kvalitatívne sledovať rozdiely medzi blankem (matrice THAP) a), odparku 20x zakoncentrovaného ethylacetátového extraktu rozpuštěného v okyseleném methanolu b) a zakoncentrovaného ethylacetátového extraktu c). Rozdiely ve spektrech demonstrierují, jak významný je proces reextrakce a vliv složení média nanášeného na spot na krystalizaci a následný proces desorpce a ionizace. Ve spektru c) se podařilo zachytit zeaxanthin dipalmitát. Pro analýzu xanthinových barviv z rostlinných materiálů typu plodu kustovnie se tedy jeví být výhodnější použití krystalizace z ethylacetátu, který je v MALDI relativně méně běžným médiem. Na zeaxanthin dipalmitát byly zaměřeny i další experimenty.

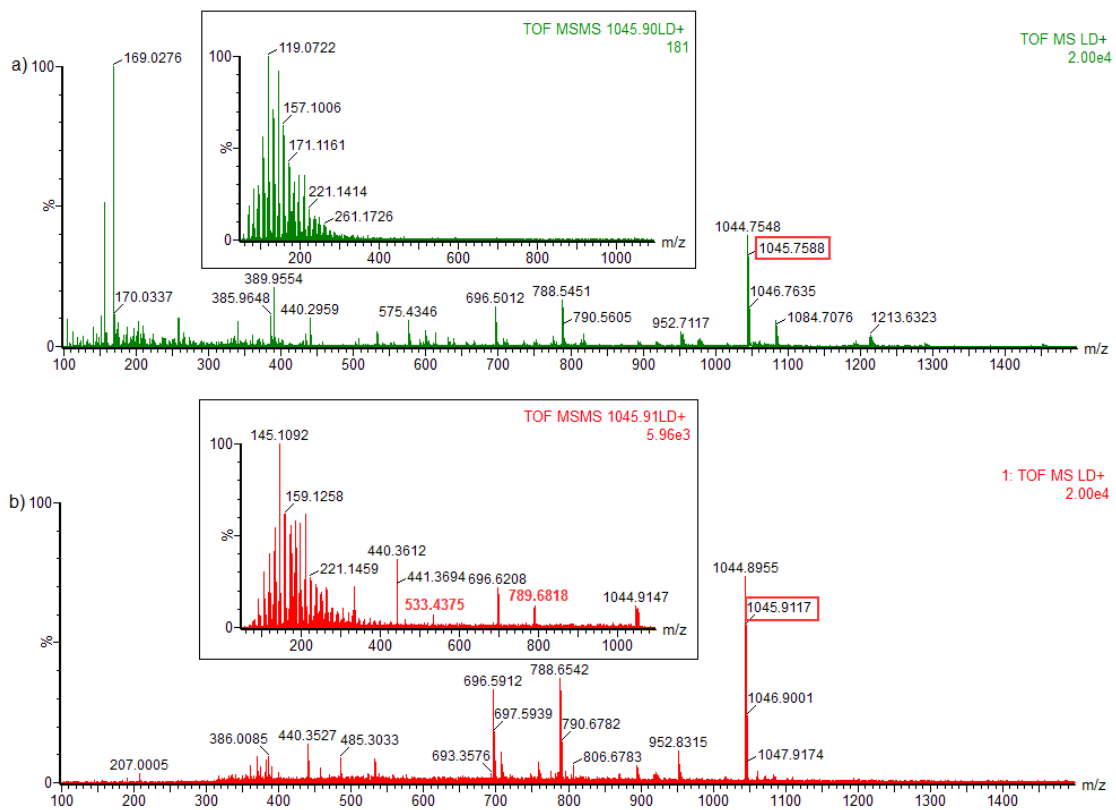


Obr. 16 Srovnání hmotnostního spektra THAP matrice (a), dužiny kustovnice cizí extrahované v ethylacetátu a po odpaření rozpouštědla rozpuštěné v okyseleném methanolu (b) a extrahované v ethylacetátu, odpařeno a smícháno s ethylacetátem (c)

4.1.3

Další experimenty byly prováděny na hmotnostním spektrometru SYNAPT G2-S. Analyzované vzorky byly extrahovány stejně jako v předchozí analýze. Vzhledem k vyšší citlivosti a rozlišovací schopnosti přístroje bylo možno pracovat bez předběžné prekoncentrace extraktů. Extrakty se před analýzou pouze centrifugovaly, supernatant se oddělil, smíchal s matricí (THAP) a nanasl na MALDI destičku.

Obr. 17 znázorňuje MALDI spektra ethylacetátových extraktů analyzovaných na obou hmotnostních spektrometrech. První spektrum (a) bylo získáno měřením na spektrometru Q-TOF Premier. Druhé spektrum (b) bylo změřeno z přístrojem SYNAPT G2-S. Měřením na přístroji Synapt G2-S byla, s použitím vnější kalibrace, nalezena hodnota m/z zeaxanthin dipalmitátu 1045,9117. Odchylka oproti teoretické hodnotě je 16,5 mDa (15,8 ppm). Shoda s teoretickou hodnotou je tedy poměrně dobrá oproti měření na přístroji Q-TOF Premier (odchylka od teoretické hodnoty 136 mDa; 130 ppm). Velkou odchylku zjištěnou na přístroji Q-TOF Premier lze přičíst výrazným změnám teploty v laboratoři vlivem snížené funkčnosti klimatizace během odpovídajícího experimentálního období. Kolizní spektrum získané měřením na obou přístrojích se v oblasti fragmentů s nižšími hodnotami m/z kvalitativně shoduje. Měřením na přístroji Synapt G2-S se však podařilo nalézt i fragmenty jednoznačně odpovídající odštěpení mastné kyseliny a dehydrataci (fragment m/z 789,6818, odchylka 27 mDa; 34 ppm) a následnému odštěpení druhého řetězce mastné kyseliny (fragment m/z 533,4375, odchylka 23 mDa; 43 ppm). Měření přesné a správné hmotnosti rodičovského iontu a přítomnost charakteristických fragmentů jednoznačně potvrzují identitu zeaxanthin dipalmitátu. Přestože oba experimenty nejsou, vzhledem k různému stupni prekoncentrace, jiných parametrů ionizace i odlišných parametrů analyzátorů, exaktně srovnatelné, je možno si kvalitativně udělat představu o možnostech obou přístrojů pro potřeby rychlého a necíleného screeningu nízkomolekulárních složek extraktů z rostlinného materiálu. Možnosti přístroje Synapt G2-S daleko převyšují potenciál koncepčně staršího zařízení Q-TOF Premier.



Obr. 17 Příklad srovnání hmotnostního spektra z hmotnostního spektrometru Q-TOF Premier (a) a ze SYNAPTu G2-S (b)

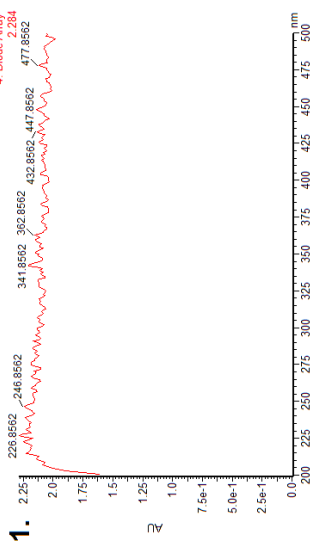
4.2 UV-VIS spektrometrie

Na obr. 18 můžeme sledovat UV-VIS spektra extraktů dužiny, slupky i rozpouštědla samotného pro srovnání přítomnosti látek v kustovnici cizí. Tato technika, ačkoli poměrně specifická umožňuje učinit si představu o účinnosti extrakce látek, které absorbují světlo v UV a viditelné oblasti spektra.

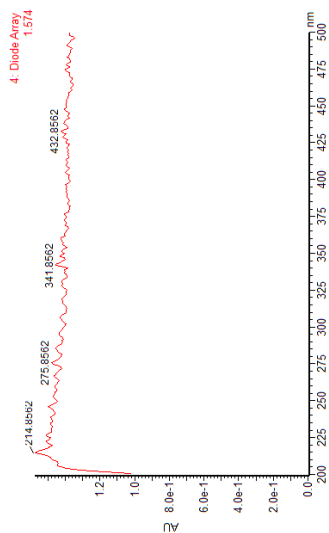
Spektra methanolických extraktů mají absorpční maxima při vlnových délkách 256, 265, 354 nm.²¹ K absorpenci v těchto oblastech nesporně přispívají flavonoidní látky a fenolické kyseliny. Extrakce methanolem je tedy vhodná pro uvolnění těchto látek z plodu kustovnice. LC/DAD/MS analýzy tyto závěry potvrzují.

Ve spektech extraktů méně polárními a nepolárními rozpouštědly (ethylacetát, methyl-t-butylether a hexan) jsou patrné široké absorpční pásy v oblasti vlnových délek 375 – 500 s maximy kolem 447 a 475 nm. Takovéto rozmezí vlnových délek může odpovídat absorpenci karotenoidů. Literatura uvádí, že pro karotenoidy nalezené v kustovnici je rozsah vlnových délek 338 až 480 nm.¹⁹ Spektra rovněž ukazují, že do ethylacetátu se extrahují vedle karotenů i některé polárnější látky. Toto rozpouštědlo lze tedy dobře použít pro studium širšího spektra látek. Hexan a methyl-t-butylether se jeví být vhodnější pokud je požadována selektivní extrakce karotenových barviv. Zeaxanthin dipalmitát jako významný zástupce karotenů má vlnovou délku 456 nm.¹¹ Tato látka byla jednoznačně identifikována pomocí MALDI-MS v extraktu dužiny methyl-t-butyletherem.

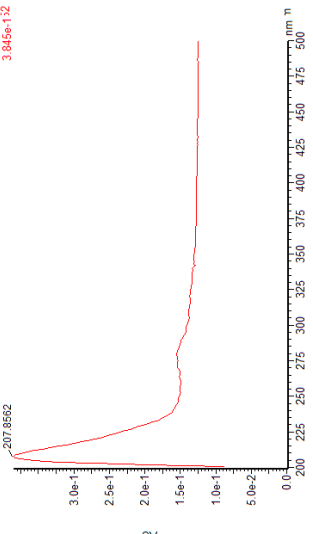
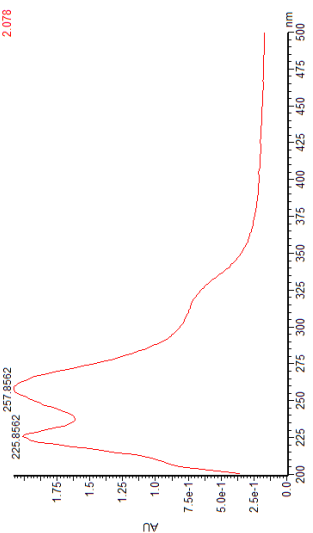
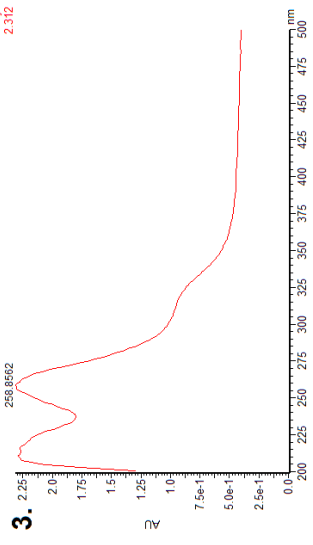
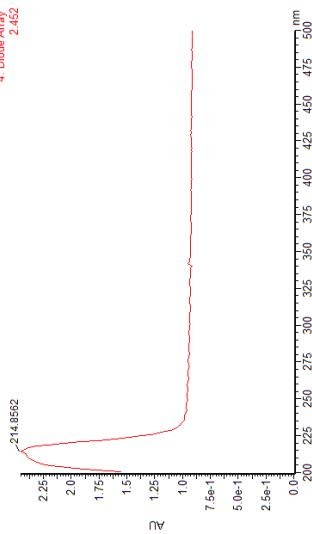
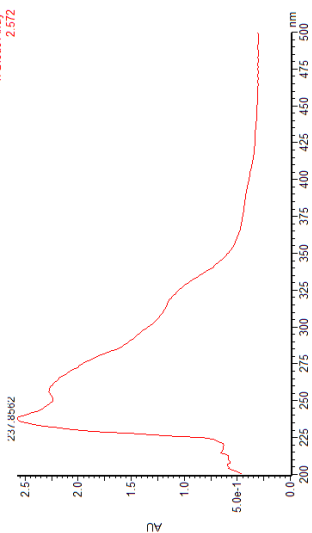
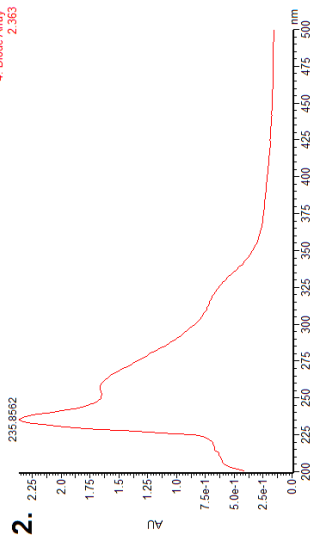
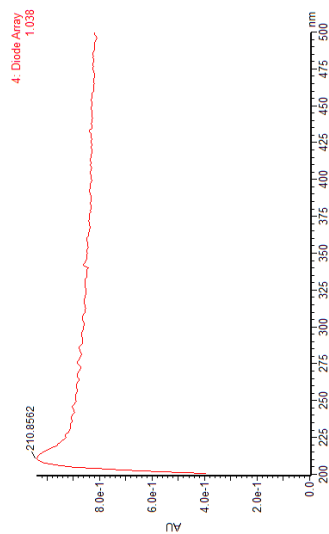
DUŽINA



SLUPKA

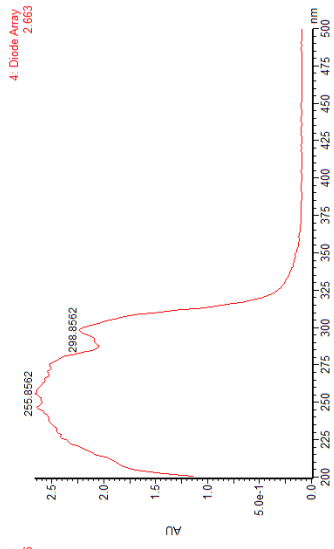


ROZPOUŠTĚDLO

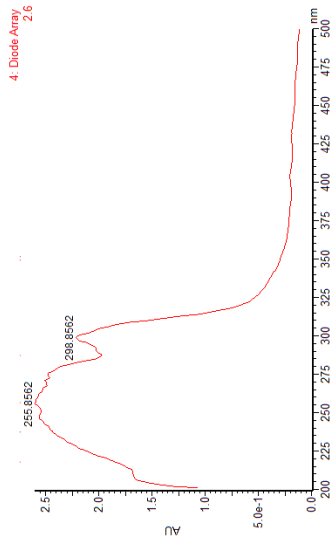


1. voda + 0,01% HCl (v/v)
2. dimethyl sulfoxid
3. methanol + 0,01% HCl (v/v)

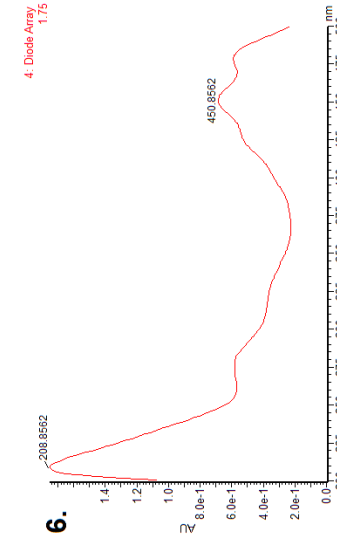
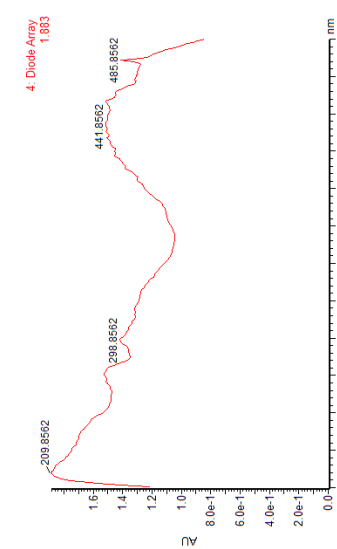
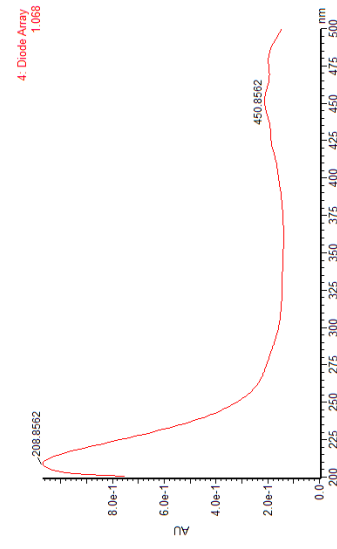
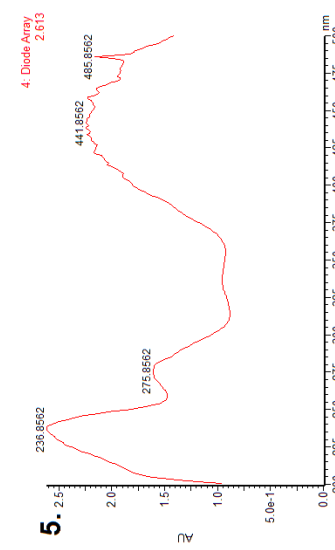
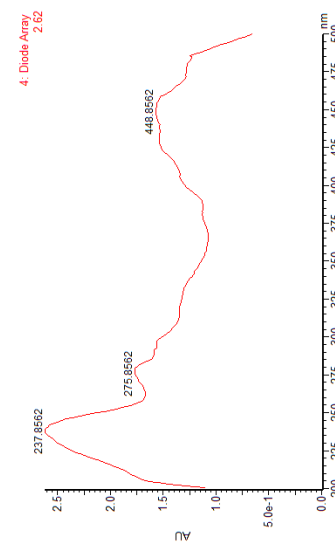
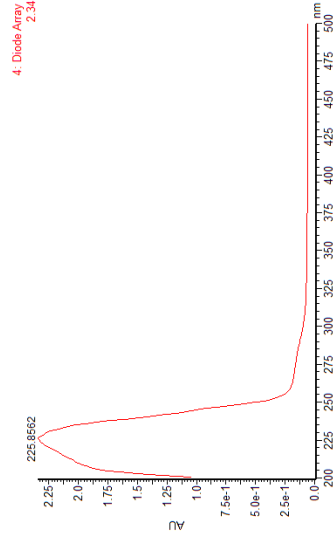
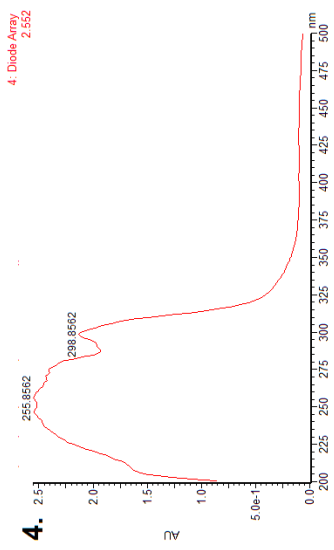
ROZPOUŠTĚDLO



SLUPKA



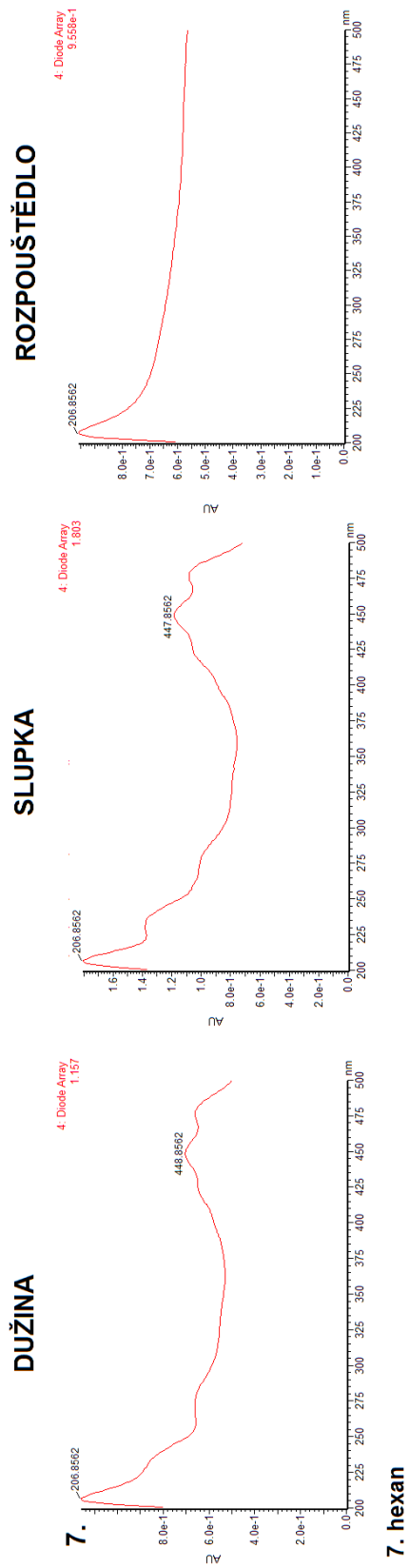
DUŽINA



4. aceton + 0,01% HCl (v/v)

5. ethylacetat

6. terc-butylmethylether



Obr. 18 Dužina a slupka kustovnice cizí v rozpouštědlech č. 1-7 a blanky rozpouštědel č. 1-7

7. hexan

4.3 Detailní analýza plodů kustovnice

Tato kapitola vychází z předběžných znalostí o přípravě vzorků plodů kustovnice a věnuje se analýze nízkomolekulárních látek metodami LC/ESI-MS a MALDI-MS.

Při zjišťování složení plodu kustovnice byla brána v úvahu dostupná literatura, sepsaná v teoretické části, retenční data z kapalinové chromatografie, měření přesné a správné hmotnosti nalezených iontů a způsobu fragmentace v kolizní cele hmotnostního spektrometru. Byla identifikována celá řada látek v širokém rozmezí polarit a s rozdílnou chemickou strukturou. Prezentována jsou i experimentální data látek, u kterých nebylo dosaženo jednoznačné identifikace.

4.3.1 Analýza pomocí UPLC/ESI-MS

Pomocí UPLC/ESI-MS byla v plodu kustovnice identifikována řada fyziologicky aktivních látek. Jde zejména o vitamíny B₂ a C, flavonoid rutin, fenolické kyseliny vanilovou, p-kumarovou a ferulovou, skopoletin a betain. Použitá metoda vychází z generických postupů používaných v laboratoři hmotnostní spektrometrie Katedry analytické chemie, PřF UP Olomouc a nebyla optimalizována cíleně na některou skupinu látek.

V následujících kapitolách jsou krátce jednotlivé identifikované látky popsány z hlediska jejich chemických vlastností a fyziologického působení v organismu a dále je popsán postup jejich identifikace na základě LC/MS dat.

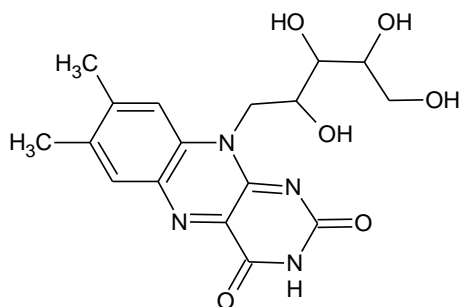
4.3.1.1 Vitamíny

Název vitamín pochází ze slova *vita*, což je život a *amin*, který označuje přítomnost amino skupiny (-NH₂). Jedná se o nízkomolekulární organické sloučeniny, které jsou v organismech zastoupeny v malém množství, ale jsou to nezbytné látky sloužící jako biochemické katalyzátory. Vitamíny jsou děleny na dvě základní skupiny a to hydrofilní, které jsou rozpustné ve vodě a lipofilní vitamíny, rozpustné v tucích.^{66,67,68,69}

4.3.1.1.1 Vitamín B₂

Riboflavin, nebo-li vitamín B₂, je fluoreskující žlutozelená látka. Mezi přírodní zdroje vitamínu patří mléko a mléčné výrobky, ryby a vnitřnosti. Chrání kůži, nehty, vlasy, léčí defekty ústní dutiny a příznivě působí na zrak. DDD (doporučená denní dávka) je 1,7mg.

Jeho velký nedostatek můžou pociťovat lidé užívající antibiotika, velké množství alkoholu nebo hormonální antikoncepci, ten se pak projevuje bolavými ústy, boláky v ústech a výrážky na obličejí. Nadbytek je odváděn močí.^{67,69} Vitamín B₂ je tvořen isoalloxazinovým jádrem a ribitolem. Riboflavin fosfát se nazývá flavin a jedná se o koenzym.⁶⁸

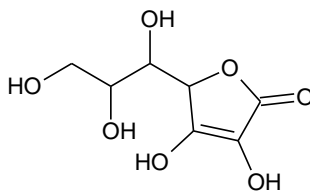


Obr. 19 *Vitamín B₂*

4.3.1.1.2 Vitamín C

Vitamín C je dobře znám i pod pojmem kyselina askorbová, odvozen od omezování kurdějí - *skorbut*. DDD se pohybuje mezi 50-70g. Nejvíce jej najdeme v plodu šípku a citrusech. Vitamín C zejména stimuluje imunitní systém a zřejmě také pomáhá snižovat rakovinotvorné bujení.⁶⁷

Jeho nedostatek se projevuje jako známé kurděje, vedoucí k vypadávání zubu, stejně jako vlasů, praskání kapilárních cév, špatně hojící se rány a celková snížená imunita. Nadbytek je u tohoto vitamínu problém, neboť vznikají ledvinové kameny, nadměrné močení, průjem či kožní vyrážky.^{67,69}



Obr. 20 *Vitamín C*

4.3.1.1.3 Analýza vitamínů v plodech kustovnice

Následující tabulka 14 srovnává přítomnost vitamínů B₂ a C v různých extraktech plodu kustovnice. Můžeme pozorovat, že se vitamíny extrahovaly pouze v polárních rozpouštědlech. To odpovídá jejich polární chemické povaze.⁶⁶

Vitamín B₂ byl nalezen v methanolických a acetonových extraktech dužiny a slupky kustovnice cizí (a). Kyselina askorbová byla detekována v analogických a navíc i ve vodných extraktech kustovnice cizí (a) a ve slupce kustovnice čínské (b).

Srovnání analyzovaných vzorků kustovnic z pohledu vitamínů je možné provést na extraktu okyseleným methanolem (č. 3). Ze sušené kustovnice čínské (c) nebyl extrahován žádný vitamín, zatímco kustovnice vypěstované na našem území (a i b) obsahují vitamín C a kustovnice cizí (a) i vitamín B₁. Možným vysvětlením je výrazný úbytek vitamínů během sušení a skladování.

Dostupná literatura, diskutovaná v teoretické části, uvádí přítomnost těchto vitamínů v plodech, necituje však žádnou vědeckou práci, která by toto tvrzení jednoznačně analyticky potvrdila.

Tab. 14 Vitamíny v plodu kustovnice

název látky	m/z [M+H] ⁺	retenční čas	dužina ^a							slupka ^a									
			1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	3 ^b	3 ^c	3 ^b
riboflavin (B ₂)	377,1461	0,59			x	x													
askorbová kys (C)	177,0399	3,93	x		x					x			x						x

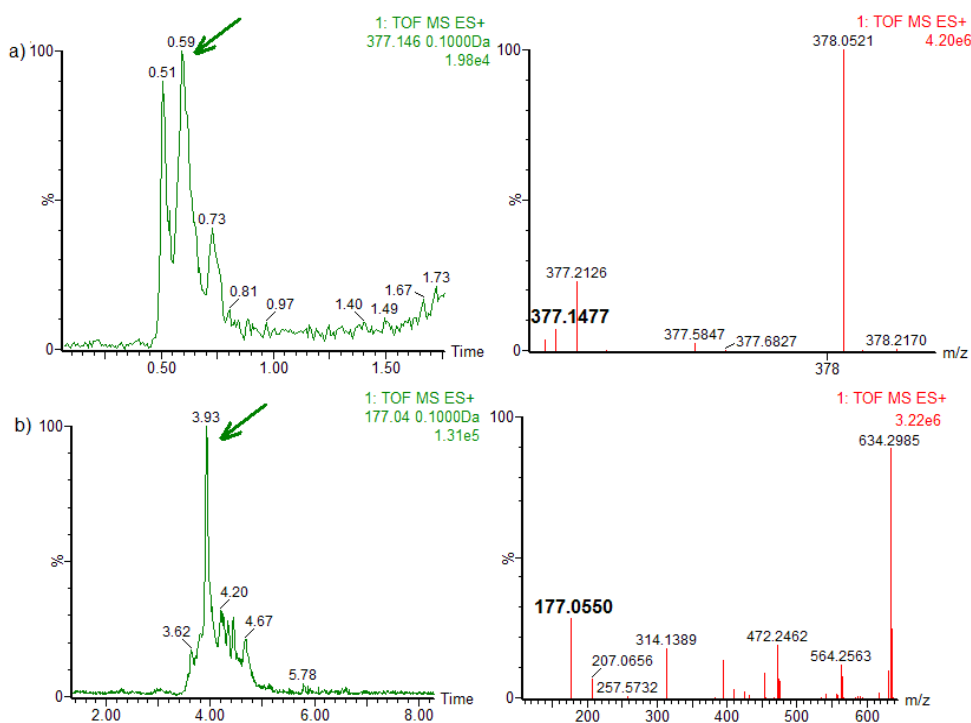
plody: **a** kustovnice cizí, **b** kustovnice čínská, **c** kustovnice čínská sušená

extrakční činidla: **1** voda + 0,01% HCl, **2** dimethylsulfoxid, **3** methanol + 0,01% HCl, **4** aceton + 0,01% HCl, **5** ethylacetát, **6** terc-buthylmethylether, **7** hexan

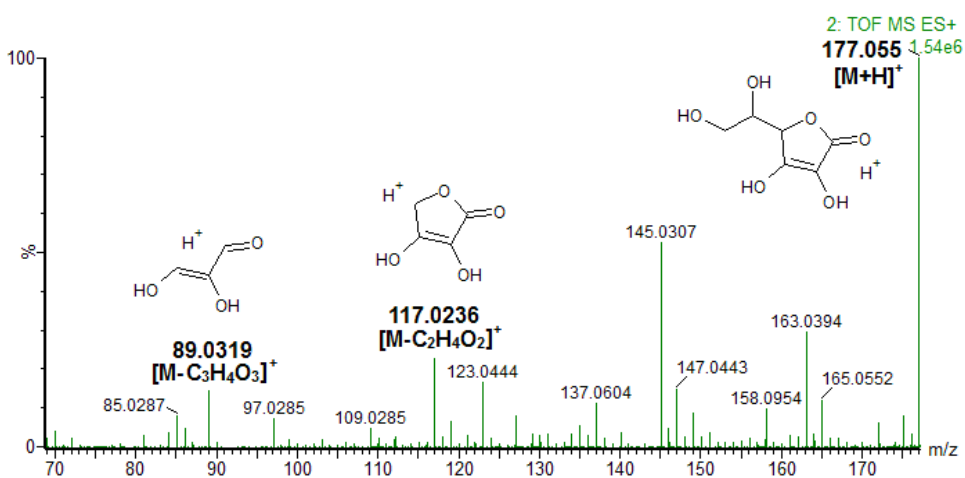
Na obr. 21 jsou uvedeny chromatogramy rekonstruované pro hodnoty m/z 377 a 177 získané analýzou methanolického extraktu dužiny kustovnice cizí a čínské. Ačkoli píky evidentně nejsou dokonale chromatograficky separovány od ostatních složek se stejnou nominální hodnotou m/z, signál je dobře pozorovatelný v odpovídajícím MS spektru průměrovaném přes dominantní pík označený šipkou (m/z 377,1477, odchylka od teoretické hodnoty 1,6 mDa; 4 ppm; m/z 177,0550, odchylka od teoretické hodnoty 15 mDa; 85 ppm).

V MS spektru s vyšší kolizní energií na obr. 22 můžeme pozorovat fragmentaci kyseliny askorbové. Fragmentace probíhá z rodičovského iontu (m/z 177) ztrátou postranního

řetězce na fragment s m/z 117,0236 (odchylka od teoretické hodnoty 4,8 mDa; 41 ppm) a ztrátou CO na fragment s m/z 85,0319 (odchylka od teoretické hodnoty 8 mDa; 89,9 ppm). Tuto fragmentaci potvrzuje studie z roku 2005, ve které byla kyselina askorbová identifikována pomocí LC-MS v rajčeti, kiwi a mangu. V této práci bylo použito stejného extrakčního činidla a fragmentace se shoduje.⁷⁰



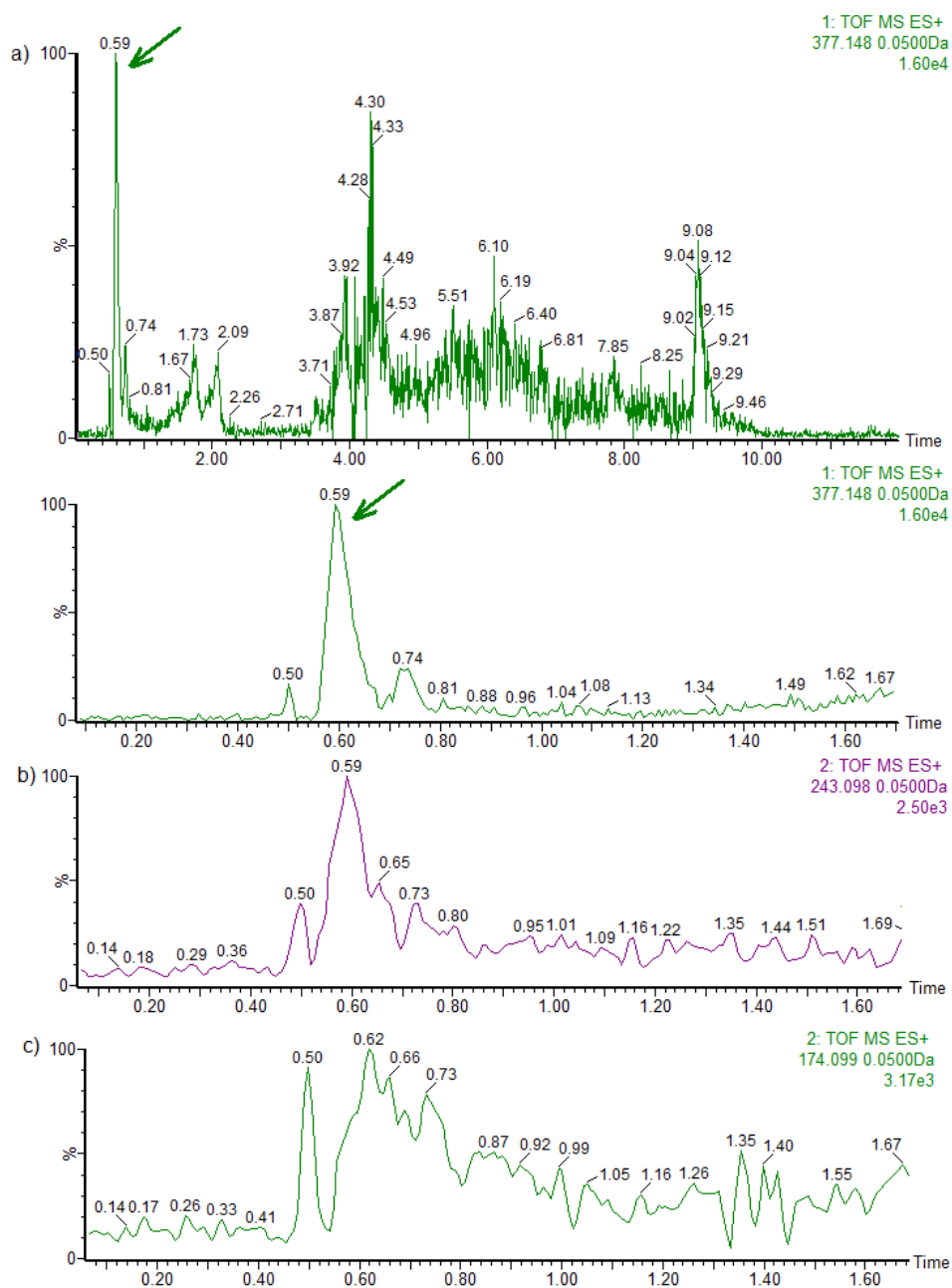
Obr. 21 Chromatogram a hmotnostní spektrogram methanolického extraktu dužiny kustovnice cizí - riboflavin (a) a kyselina askorbová (b)



Obr. 22 Hmotnostní spektrum získané z MS skenu s vyšší kolizní energií znázorňující fragmentaci kyseliny askorbové

V chromatogramu rekonstruovaném pro m/z 377 je pozorován pík s retenčním časem 0,59 min. Průměrováním přes tento pík získáme ion s m/z 377,1477 s odchylkou od vypočtené hodnoty m/z riboflavinu 1,6 mDa. Další chromatogramy jsou rekonstruovány pro fragmenty riboflavinu (ve spektru s vyšší kolizní energií), které jsou uvedeny v databázi.⁷¹

Intenzita obou fragmentů je relativně nízká a v případě menšího fragmentu dochází ke koeluci s dalšími látkami, přesto je možno oba ionty zachytit. obr. 23. Fragment m/z 243,0877 (odchylka od teoretické hodnoty 9,8 mDa; 40 ppm) vzniká odštěpením postranního řetězce riboflavinu (b). Rozštěpením isoalloxazinového jádra vitamínu pak vzniká m/z 174,099 (odchylka od teoretické hodnoty 4,1 mDa; 23,5 ppm) (c).



Obr. 23 Chromatogram methanolického extraktu slupky kustovnice cizí - riboflavin (a), fragment m/z 243 (b) a fragment m/z 174 (c)

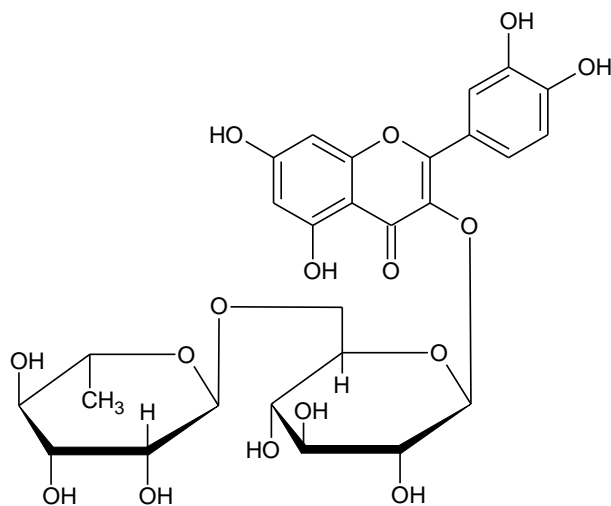
4.3.1.2 Flavonoidy

Flavonoidní látky jsou rozsáhlou skupinou sekundárních rostlinných metabolitů, které můžeme najít ve všech částech rostliny. Jedná se o rostlinná barviva, fungující jako enzymy a zajišťující ochranu před UV zářením a hmyzem. Částečně se účastní fotosyntézy a regulace rostlinných růstových hormonů.⁷² Z chemického hlediska jsou odvozeny od 2H-

chromenu a substituované v C-2 poloze fenylovou skupinou, což dává tzv. flavan. Flavonoidy obvykle existují glykosidované jednoduchými sacharidy, vyskytují se ve formě O-glykosidů a méně často se také ve formě C-glykosidů.⁷³

4.3.1.2.1 Rutin

Rutin je žlutá pevná látka, která se skládá s quercetinu a disacharidu rutinózy, což je rhamnóza a glukóza. Vyskytuje se ve velkém množství v ovoci a zelenině. Mezi významné zdroje patří i pohanka. Rutin má, stejně jako jeho aglykon quercetinu, antioxidantní, protizánětlivé a antikarcinogenní schopnosti, také stabilizuje a zesiluje účinek vitamínu C a posiluje krevní kapiláry.⁷⁴



Obr. 24 Rutinu

4.3.1.2.2 Analýza flavonoidů v plodech kustovnice

Jak můžeme pozorovat z tabulky 15 popisující přítomnost flavonoidů v plodu, v kustovnici se nachází glykosidovaný derivát quercetinu rutin. Rutin byl nalezen pouze v plodu sušené kustovnice čínské (methanolický extrakt, c), v ostatních vzorcích nebyl zachycen. Větší obsah rutinu v kustovnici vypěstované v Asii by mohl souviset se zakonzentrováním plodu sušením, případně rozdílnými podmínkami pro jeho růst a zrání.

V teoretické části této práce v kapitole 2.5 je uvedeno, že typickými extrakčními činidly pro studium flavonoidních extraktů z kustovnice jsou methanol, ethanol popř. i voda, což odpovídá výsledkům v této analýze.

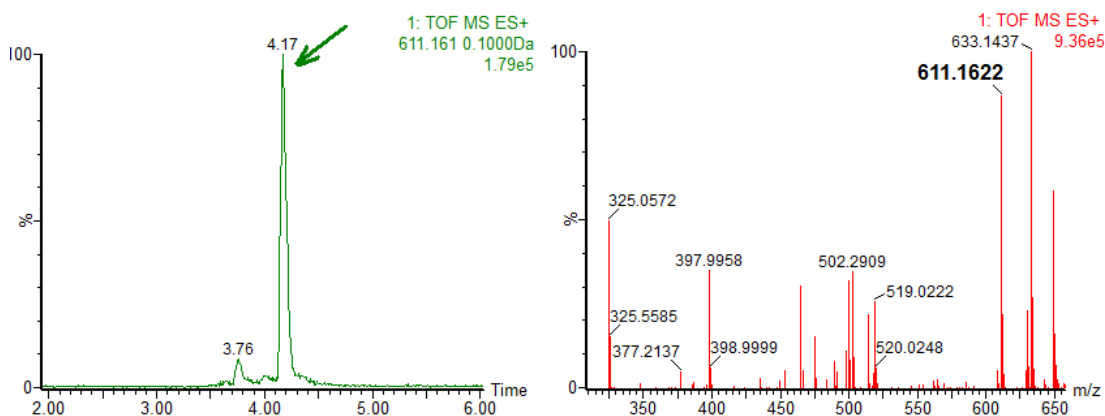
Tab. 15 *Flavonoidy v plodu kustovnice*

Název látky	m/z [M+H] ⁺	retenční čas	dužina ^a							slupka ^a							dužina		slupka	
			1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	3 ^b	3 ^c	3 ^b	3 ^c
Rutin	611,1612	4,17																X		X

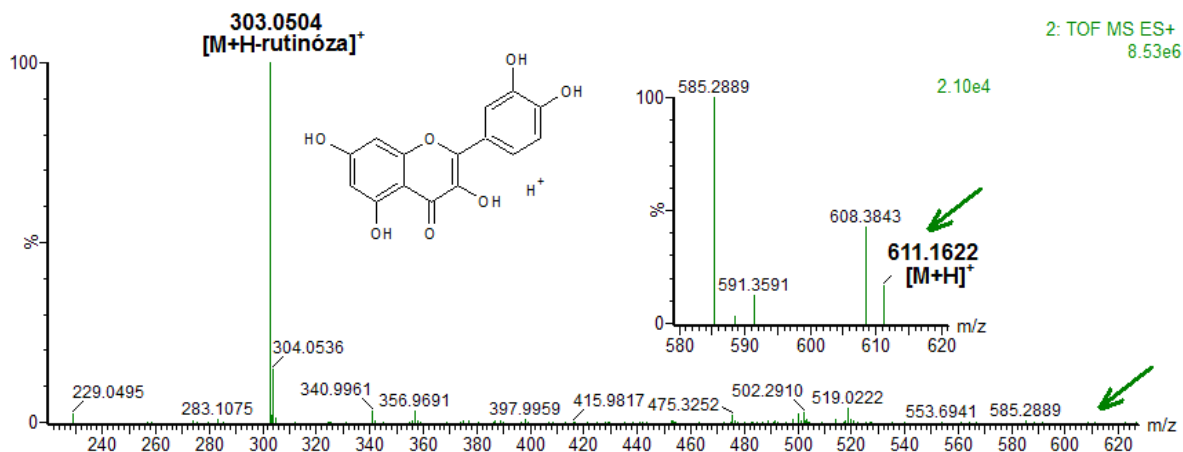
plody: **a** kustovnice cizí, **b** kustovnice čínská, **c** kustovnice čínská sušená

extrakční činidla: **1** voda + 0,01% HCl, **2** dimethylsulfoxid, **3** methanol + 0,01% HCl, **4** aceton + 0,01% HCl, **5** ethylacetát, **6** terc-buthylmethylether, **7** hexan

Obrázek 25 znázorňuje chromatogram a výsledné hmotnostní spektrum rutinu (m/z 611,1622, odchylka od teoretické hodnoty 1 mDa; 1,6 ppm) ve slupce sušené kustovnice čínské (c). Na obr. 26 je zde možno pozorovat fragmentaci rutinu na quercetin. Disacharid rutinóza se fragmentuje z aglykonu z hodnoty m/z 611 na konečný m/z 303,0504 s teoretickou odchylkou pouhých 0,1 mDa (0,3 ppm). Je zajímavé, že k poměrně rozsáhlé fragmentaci dochází už při poměrně nízké kolizní energii (Trap CE 4 eV, Transfer CE 2 eV). Pravděpodobně zde přispívá i termální fragmentace. Podle MS spekter jsou další píky v tomto chromatogramu pravděpodobně izomery rutinu.



Obr. 25 *Chromatogram a hmotnostní spektrum methanolickeho extraktu dužiny sušenné kustovnice čínské*



Obr. 26 Hmotnostní spektrum získané z MS skenu s vyšší kolizní energií znázorňující fragmentaci rutinu

4.3.1.3 Fenolické kyseliny

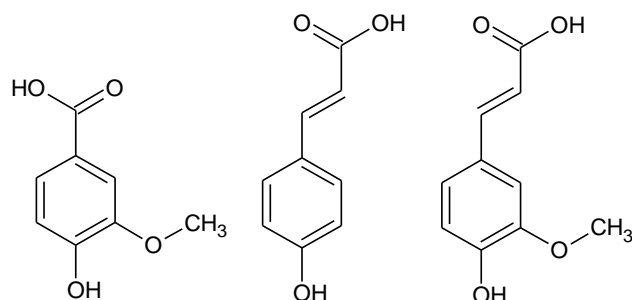
Fenolické kyseliny můžeme najít v různých částech rostlin. Je to velká skupina látek, které ovlivňují kvalitu potravin rostlinného původu. Jsou považovány za antioxidanty s vlivem na autoimunitní systém organismů.⁷⁵ Mohou vystupovat jako přenašeče elektronů nebo signální molekuly v biochemických metabolismech, dále mohou stejně jako flavonoidy chránit rostlinu před UV zářením.⁷⁶ Obsah fenolických kyselin v rostlině není stálý, ale závisí na stupni zralosti rostliny, na období i na skladovacích podmínkách.⁷⁵

4.3.1.3.1 Kyselina vanilová

Jedná se o oxidovanou formu látky vanilin a strukturně se řadí mezi hydroxybenzoové kyseliny. Nejvíce kyseliny vanilové je možno najít v kořenech angeliky čínské, která, stejně jako kustovnice, spadá do tradiční čínské medicíny.⁷⁷

4.3.1.3.2 Kyselina p-kumarová a ferulová

Tyto látky patří mezi hydroxyskořicové kyseliny, jenž mají antioxidační a antikarcinogenní účinky na buněčné stěny rostlin a dále jsou toxické pro některé celulotické bakterie, neboť inhibují trávení sacharidů.⁷⁸ Samotná ferulová kyselina je nejrozšířenější hydroxyskořicovou kyselinou s hlavním výskytem například v kukuřici seté.⁷⁹



Obr. 27 Kyselina vanilová, *p*-kumarová, ferulová

4.3.1.3.3 Analýza fenolických kyselin v plodech kustovnice

Fenolické kyseliny jako polární látky byly extrahovány do okyseleného methanolu (3). Obr. 28 znázorňuje chromatogram rekonstruovaný pro hodnotu m/z 169, 165 a 195, které odpovídají výše zmíněným fenolickým kyselinám.

V MS spektru získaném průměrováním přes dominantní pík je patrný signál iontu s hodnotou m/z 165,0549. Tato hodnota velmi dobře koresponduje s teoretickou hodnotou m/z pro *p*-kumarovou kyselinu ($[M+H]^+$; odchylka od teoretické hodnoty 0,6 mDa; 3,6 ppm). S velmi malou intenzitou lze také pozorovat ion s m/z 121,0645 (odchylka od teoretické hodnoty 0,8 mDa; 6,6 ppm), který může odpovídat ztrátě CO_2 , jenž je typická pro organické kyseliny.

Průměrováním přes dominantní pík byl získán také ion m/z 195,0684. S odchylkou 2,7 mDa (13,8 ppm) odpovídá elementárnímu složení ferulové kyseliny. Rovněž u této látky byla pozorována ztráta karboxylové skupiny s výslednou hodnotou m/z fragmentu 151,078 (odchylka od teoretické hodnoty 2,1 mDa; 13,9 ppm). V extraktech okyseleným acetonem byla nalezena kyselina vanilová. Naměřená hodnota m/z byla 169,0499, což odpovídá minimální teoretické odchylce 0,2 mDa (1,2 ppm). V chromatogramech je patrná řada minoritních složek se stejnou nominální hodnotou m/z . Některé z nich mohou odpovídat izomerním strukturám odvozeným od těchto kyselin.

Studie, zmíněná v teoretické části, uvádí, že v kustovnici bylo možno pomocí HPLC-DAD-ESI-MS identifikovat všechny tyto kyseliny, práce bohužel neuvádí, žádné fragmentace těchto látek.²¹

Opět můžeme kvalitativně pozorovat odlišnost ve složení mezi kustovnicemi čínskými, neboť pouze kustovnice cizí (a) a kustovnice čínská (b) obsahují *p*-kumarovou

kyselinu, zatím co sušená kustovnice čínská (c) ji neobsahuje. Může se jednat o již zmíněnou skutečnost, že obsah fenolických kyselin v rostlině se mění během skladování.⁷⁵

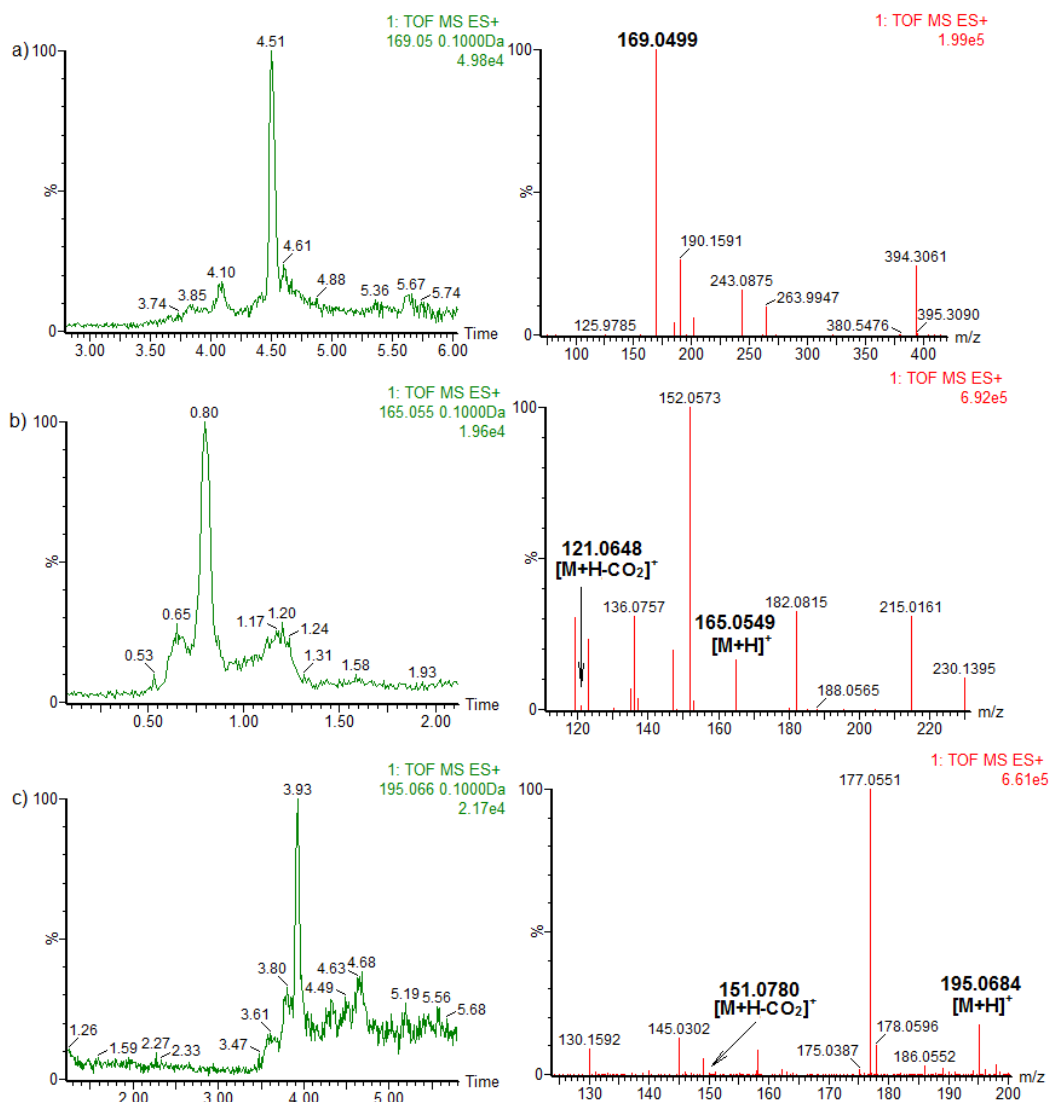
Tab. 16 Fenolické kyseliny v plodu kustovnice

název látky	m/z [M+H] ⁺	retenční čas	dužina ^a							slupka ^a							dužina		slupka	
			1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	3 ^b	3 ^c	3 ^b	3 ^c
vanilová kys	169,0501	4,51				x														
p-kumarová kys	165,0552	0,8			x							x						x		x
ferulová kys	195,0657	3,93			x															

plody: **a** kustovnice cizí, **b** kustovnice čínská, **c** kustovnice čínská sušená

extrakční činidla: **1** voda + 0,01% HCl, **2** dimethylsulfoxid, **3** methanol + 0,01% HCl, **4** aceton + 0,01% HCl, **5** ethylacetát, **6** terc-buthylmethylether, **7** hexan

Výsledky naznačují, že použitá metodika je vhodná pro analýzu fenolických kyselin v plodech kustovnice.



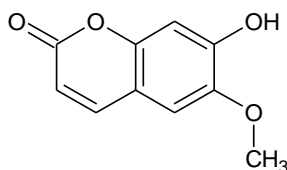
Obr. 28 Chromatogram a hmotnostní spektrogram kyseliny vanilové (a), *p*-kumarové kyseliny (b) a ferulové kyseliny (c)

4.3.1.4 Kumariny

Patří mezi polyfenolické sloučeniny rostlinného původu mající benzopyranový základ. Deriváty kumarinu se nacházejí v antibiotikách, antivirových, protirakovinových i protizánětlivých látkách. Některé kumariny fluoreskují a užívají se jako fotoiniciátory v polymerní vědě.⁸⁰

4.3.1.4.1 Skopoletin

Skopoletin byl objeven na počátku 20. století, když po osvětlení klíčících semen UV zářením, bylo možno sledovat silnou modrou fluorescenci. V nízkých koncentracích se nachází v cévním řečišti všech zdravých rostlin a literatura jej nazývá všudypřítomným. Pro skopoletin je typická akumulace kolem virem napadené tkáně rostliny a zvýšená produkce v případě zranění.⁸¹



Obr. 29 Skopoletin

4.3.1.4.2 Analýza skopoletinu v plodech kustovnice

Zajímavostí skopoletinu je jeho přítomnost ve všech rozpouštědlech kromě č. 6, tedy terc-butylmethyletheru. Tuto možnost podporuje práce Tzenga a kol., která studovala skopoletin v pelyňku ročním. Při použití několika extrakčních činidel jako voda, methanol, ethylacetát a n-hexan se skopoletin ve všech vyskytoval⁸²

Tab. 17 Skopoletin v plodu kustovnice

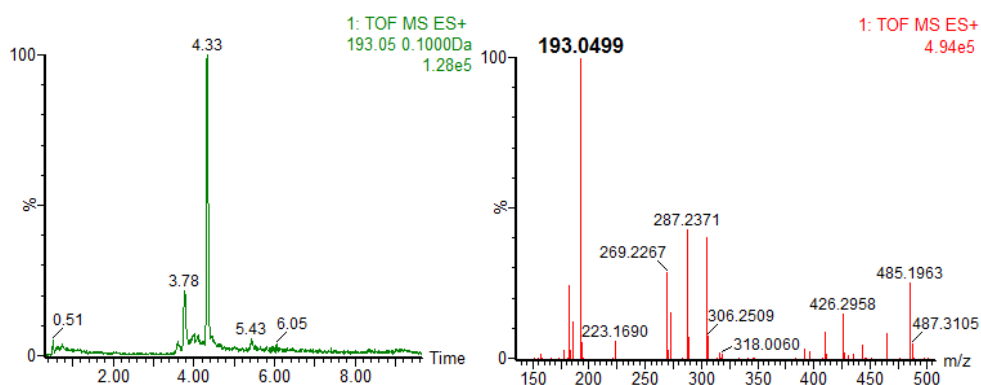
název látky	m/z [M+H] ⁺	retenční čas	dužina ^a							slupka ^a							dužina		slupka	
			1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	3 ^b	3 ^c	3 ^b	3 ^c
skopoletin	193,0501	4,33	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

plody: **a** kustovnice cizí, **b** kustovnice čínská, **c** kustovnice čínská sušená

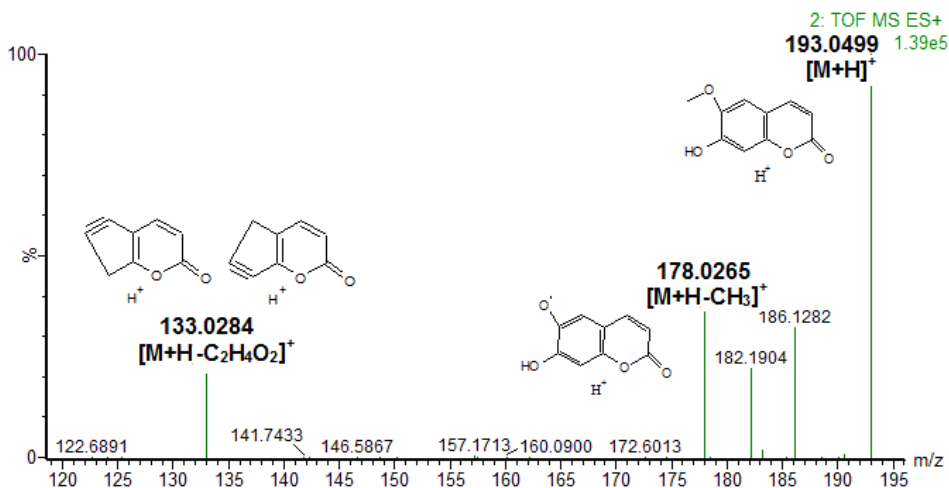
extrakční činidla: **1** voda + 0,01% HCl, **2** dimethylsulfoxid, **3** methanol + 0,01% HCl, **4** aceton + 0,01% HCl, **5** ethylacetát, **6** terc-butylmethylether, **7** hexan

Při studiu MS spekter získaných z LC/MS experimentu byla zachycena i látka s hodnotou m/z 193,0499. Tato hodnota velmi dobře koresponduje s hodnotou m/z pro protonizovanou molekulu látky s elementárním složením C₁₀H₉O₄ (odchylka od teoretické hodnoty 0.2 mDa; 1 ppm). Studium dostupných informačních zdrojů^{8,16} bylo zjištěno, že v tomto případě jde s vysokou pravděpodobností o skopoletin. Na obr. 30 a 31 můžeme vidět přítomnost skopoletinu v dužině kustovnice cizí (a) extrahované v methanolicím rozpouštědle, stejně jako je tomu v článku z roku 2010. Tento článek rovněž potvrzuje způsob

fragmentace této látky. Článek se zabývá rostlinou lilek potměchuť, který spadá do čeledi *Solanaceae* stejně jako kustovnice a svými květy i plody je jí velmi podobný.⁸³ Fragmentací při vyšší kolizní energii dochází podle odpovídajícího spektra ke ztrátě methylu za vzniku m/z 178,0265 a dále pak pravěpodobně kontrakcí benzenového kruhu za odštěpení obou kyslíkových substituentů vzniká m/z 133,0284. Zde je vhodné zmínit, že hodnoty m/z obou vznikajících fragmentů výborně korespondují s vypočtenými hodnotami odpovídající elementárních složení (0,1 mDa; 0,6 ppm pro fragment s m/z 178,0265 a 0,6 mDa; 5 ppm pro fragment m/z 133,0284).



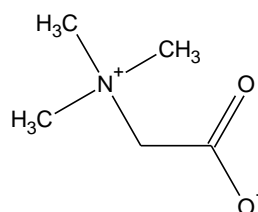
Obr. 30 Chromatogram a hmotnostní spektrogram methanolického extraktu dužiny kustovnice cizí



Obr. 31 Hmotnostní spektrum získané z MS skenu s vyšší kolizní energií znázorňující fragmentaci skopoletinu

4.3.1.5 Betain

Na konci 19. století byla izolována nová látka z cukrové řepy (*Beta vulgaris*) a pojmenována po ní jako *betain*. Z chemického hlediska se jedná o zwitterionickou sloučeninu, která je velmi polární.⁸⁴ Betain je opět všudypřítomná látka, co se rostlinné říše týče. Je pro ni typická akumulace v cytoplasmě a v mezibuněčných tekutinách rostlinných buněk. Funguje jako ochrana proteinů, nukleových kyselin a buněčných membrán před stresovými podmínkami, které vyvolává chlad, mraz, toxické kovy, nedostatek vody či salinita.⁸⁵



Obr. 32 *Betain*

4.3.1.5.1 Analýza betainu v plodech kustovnice

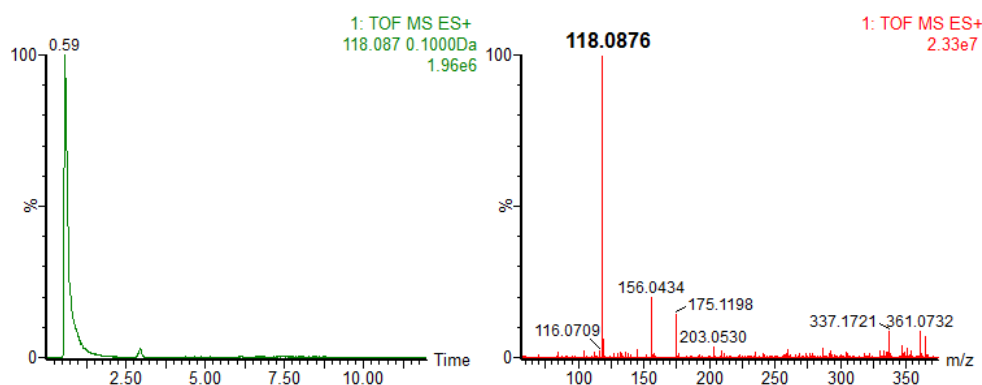
Betain se nachází ve všech polárních rozpouštědlech použitých v této studii, tj. okyselená voda (1), dimethyl sulfoxid (2), okyselený methanol (3) i aceton s kyselinou chlorovodíkovou (0,01%, v/v) (4).

Tab. 18 *Betain v plodu kustovnice*

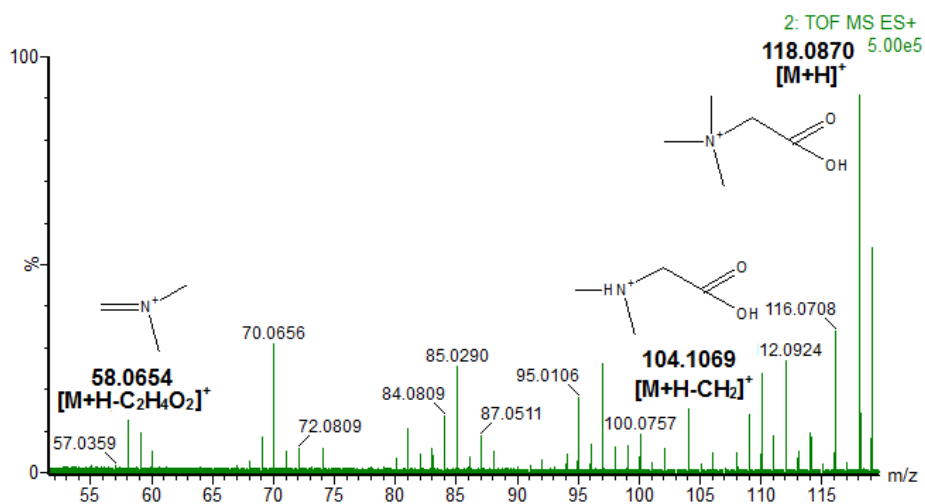
název látky	m/z [M+H]	retenční čas	dužina ^a							slupka ^a							dužina		slupka			
			1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	3 ^b	3 ^c	3 ^b	3 ^c		
betain	118,0868	0,59	x	x	x	x					x	x	x	x					x	x	x	x

Nedávná studie uvádí, že pro analýzu betainu je vzhledem k jeho polaritě a tedy velmi nízké retenci nevhodné používat HPLC a zároveň uvádí, že UPLC-MS/MS může být přístroj, který je schopen betain identifikovat.⁸⁶ To potvrzuje naše studie využívající reverzní fázi (Acquity BEH C18) v uspořádání ultraúčinné chromatografie ve spojení citlivou MS detekcí. Současně však platí, že za použitých generických podmínek je retenční čas betainu velmi krátký, což zhoršuje selektivitu i citlivost měření. Optimální by patrně bylo použít HILIC chromatografii. Tato možnost však přesahuje rámec této práce.

Obr. 33 a 34 ukazují chromatogram rekonstruovaný pro hodnotu m/z 118. Zde je patrný výrazný pík s hodnotou retenčního času 0,59 min. V MS spektru získaném průměrováním spekter přes tento pík dominuje ion s m/z 118,0876, který může být připsán betainu (odchylka od teoretické hodnoty 0,8 mDa; 7 ppm). Identitu této látky dobře potvrzuje i spektrum s vyšší kolizní energií, kde je patrný fragment vznikající po odštěpení methylové skupiny a zejména ion s hodnotou m/z 58,0654 odpovídající N-methyl-N-methylenmethanaminium (odchylka od teoretické hodnoty 0,3 mDa; 5 ppm).



Obr. 33 Chromatogram a hmotnostní spektrogram methanolického extraktu dužiny kustovnice cizí

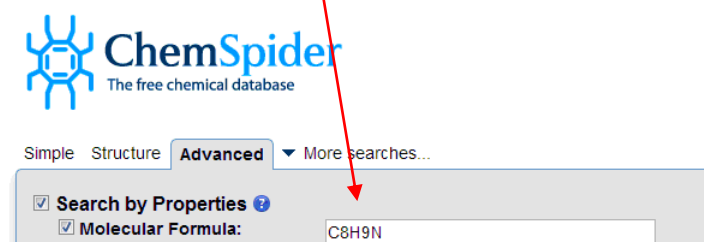


Obr. 34 Hmotnostní spektrum získané z MS skenu s vyšší kolizní energií znázorňující fragmentaci betainu

4.3.1.6 Neidentifikované složky kustovnice

LC/MS metodou bylo nalezeno 8 píků s vysokou intenzitou, jejichž identitu se nepodařilo v rámci této práce spolehlivě určit a mohla by být námětem navazujících experimentů. Identifikace probíhala po několika krocích.

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit. Conf %	C	H	N	O	S
120.0811	120.0813	-0.2	-1.7	4.5	C8 H10 N	2704.1	0.000	99.99	8	10	1		
	120.0773	3.8	31.6	0.5	C5 H10 N3 O2	2713.8	9.758	0.01	3	10	3	2	
	120.0847	-3.6	-30.0	-0.5	C5 H14 N 5	2726.2	22.097	0.00	5	14	1		1



Obr. 35 Znárodnění identifikace látek

Pomocí programu MassLynx, záložky Elemental composition, byly navrženy možné molekulové vzorce odpovídající m/z látky s odchylkou do 20 ppm. Tyto vzorce byly následně zadány do tří webových programů - ChemSpider, PubMed a MolPort, které generují možné struktury těchto látek. Takové, které se shodovaly ve všech programech a jejichž polarita kvalitativně odpovídá pozorované retenci na reverzní fázi, byly zaznamenány jako možné látky příslušící této hodnotě m/z v tabulce 19.

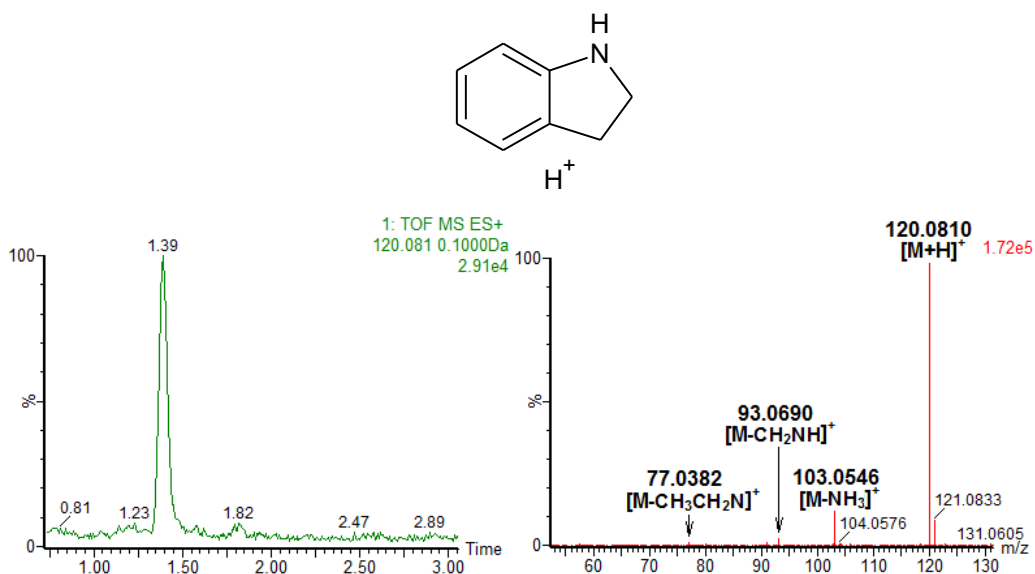
Vysokým hodnotám m/z program MassLynx navrhl velké množství možných elementárních složení, které však nebyly nalezeny v použitých online programech ani v literatuře. Dále byly látky s vyšší m/z hledány ve spektru z vyšší kolizní energií v případě možné fragmentace na menší látky, lépe identifikovatelné, ale ani zde nebyl nalezen žádný pík, který by odpovídal vhodné fragmentaci k píku mateřskému. Nakonec byly hledány přímo pod hodnotou m/z v literatuře a v rostlinách podobným kustovnici. Když ani zde nebyl žádný výsledek, byly látky označeny jako *neidentifikováno*.

Tab. 19 Neznámé látky z HPLC-MS

m/z [M+H]	retenční čas	elementary composition	ppm	fragmentace	navrhovaná struktura
120,0811	1,39	C ₈ H ₈ N	1,7		indolin
175,12	0,51	C ₆ H ₁₅ N ₄ O ₂	2,9	175 [M+H ⁺] → 158 [M+H ⁺ -17] 158 [M+H ⁺] → 130 [M+H ⁺ -28]	arginin
188,0710	2,99	C ₁₁ H ₉ NO ₂	1,1	188 [M+H ⁺] → 146 [M+H ⁺ -42] 146 [M+H ⁺] → 118 [M+H ⁺ -28]	1-acetyl-1H-indol-3-karbaldehyd
245,0924	4,38	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃	0,8	245 [M+H ⁺] → 201 [M+H ⁺ -44] 201 [M+H ⁺] → 130 [M+H ⁺ -71]	4-oxo-4-(8-chinolinylamino)butanová kyselina
543,1334	0,54			543 [M+H ⁺] → 381 [M+H ⁺ -162]	Neidentifikováno
796,3494	3,65			796 [M+H ⁺] → 634 [M+H ⁺ -162] 634 [M+H ⁺ -162] → 472 [M+H ⁺ -324]	Neidentifikováno
798,3642	3,67			798 [M+H ⁺] → 636 [M+H ⁺ -162] 636 [M+H ⁺ -162] → 474 [M+H ⁺ -324]	Neidentifikováno
1017,4744	3,54			1017 [M+H ⁺] → 855 [M+H ⁺ -162] 855 [M+H ⁺ -162] → 693 [M+H ⁺ -324]	Neidentifikováno

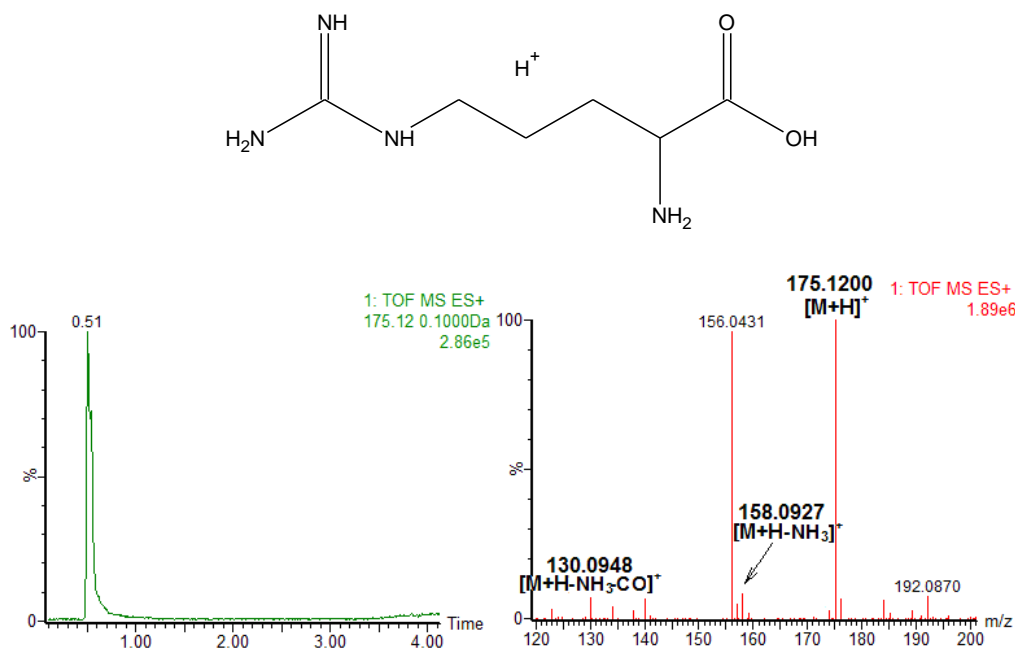
První čtyři hodnoty z tabulky 19, získané z polárních extraktů (č. 1,2,3 a 4) všech kustovnic, byly identifikovány pomocí výše popsaného postupu a dále na základě hledání fragmentů ve spektrech a jejich interpretace. Jde o navrhované řešení struktury.

Hodnota m/z 120,0811 se dobře shoduje s teoretickou hodnotou vypočtenou z elementárního složení indolinu (odchylka od teoretické hodnoty 0,2 mDa; 1,7 ppm). Také fragmentace odpovídá procesům, které lze očekávat u indolinu jak znázorňuje obr. 36. Indolin se fragmentuje na ion s m/z 103,0546 za eliminace amoniaku (odchylka od teoretické hodnoty 0,2 mDa; 1,9 ppm), dále se původní pyrolový kruh otvírá za vzniku m/z 93,0690 (odchylka od teoretické hodnoty 1,4 mDa; 15 ppm) a je možno pozorovat i třetí fragment s m/z 77,0382 (odchylka od teoretické hodnoty 0,9 mDa; 11,7 ppm) odpovídající kationtu benzenu (C₆H₅⁺).



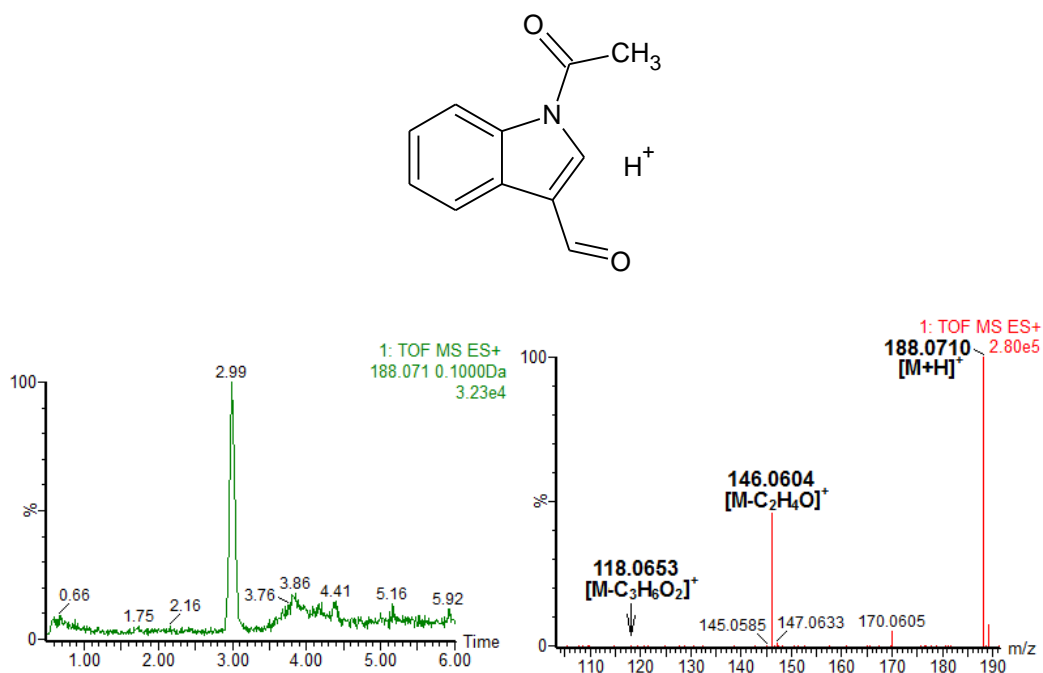
Obr. 36 Struktura indolinu, chromatogram a hmotnostní spektrogram píku m/z 120,0811

Neznámá látka v tab. 19 s hodnotou m/z 175,1200 by mohla odpovídat aminokyselině argininu (odchylka od teoretické hodnoty 0,5 mDa; 2,9 ppm), v hmotnostním spektru na obr. 37 můžeme pozorovat fragmentaci této organické látky, která odpovídá literatuře.⁸⁷ Při fragmentaci dochází nejdříve ke ztrátě NH₃ za vzniku fragmentu m/z 158,0927 (odchylka od teoretické hodnoty 0,3 mDa; 1,9 ppm) a poté i k odštěpení CO skupiny na m/z 130,0948 (odchylka od teoretické hodnoty 3,2 mDa; 24,6 ppm).



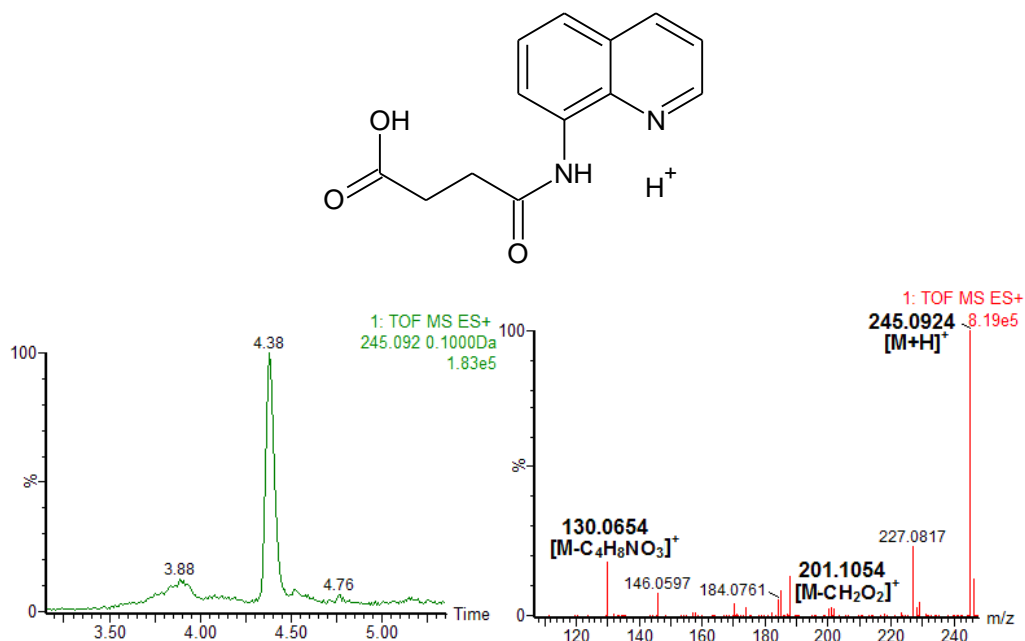
Obr. 37 Struktura argininu, chromatogram a hmotnostní spektrogram píku m/z 175,12

V polárních extraktech byl nalezen i pík s hodnotou m/z 188,0710 (odchylka od teoretické hodnoty 0,2 mDa; 1,1 ppm). S využitím online databází navrženo několik možných vzorců. Nejpravděpodobnější strukturou je 1-acetyl-1H-indol-3-karbaldehyd nebo o některý z možných polohových izomerů. Logický mechanismus fragmentace této látky odpovídá iontům přítomným ve spektru na obr. 38 (mají identický retenční čas s rodičovskou molekulou). Jde o ion s m/z 146,0604 související s odštěpení acetylové skupiny (odchylka od teoretické hodnoty 0,4 mDa; 2,7 ppm) a dále ion s m/z 118,0653 odpovídající indolu s teoretickou odchylkou 0,2 mDa (1,7 ppm).



Obr. 38 *Struktura 1-acetyl-1H-indol-3-karbaldehydu jako jednoho z možných izomerních struktur, chromatogram a hmotnostní spektrogram píku m/z 188,071*

Látka pod hodnotou m/z 245,0924 (odchylka od teoretické hodnoty 0,2 mDa; 0,8 ppm) je patrně derivátem chinolinu substituovaném na svém skeletu aminoskupinou a karboxylem. Fragmentace uvedena na obr. 39 tomu odpovídá, z molekuly se odštěpuje karboxylová skupina za vzniku iontu s m/z 201,1054 (odchylka od teoretické hodnoty 2,6 mDa (12,9 ppm)). Následně se odštěpuje i zmíněná aminoskupina za vzniku iontu m/z 130,0654 (odchylka od teoretické hodnoty 0,3 mDa; 2,3 ppm). Z naměřených spekter však nelze jednoznačně rozhodnout o poloze jednotlivých funkčních skupin.



Obr. 39 *Struktura 4-oxo-4-(8-chinolinylamino)butanové kyseliny jako jednoho z možných izomerních struktur, chromatogram a hmotnostní spektrogram píku m/z 245,0924*

4.3.2 Analýza pomocí MALDI-MS

Pomocí MALDI-MS metody byl v plodu kustovnice identifikován karotenoid zeaxanthin dipalmitát, který byl již předběžně diskutován v kapitole 4.1 věnované optimalizaci extrakce.

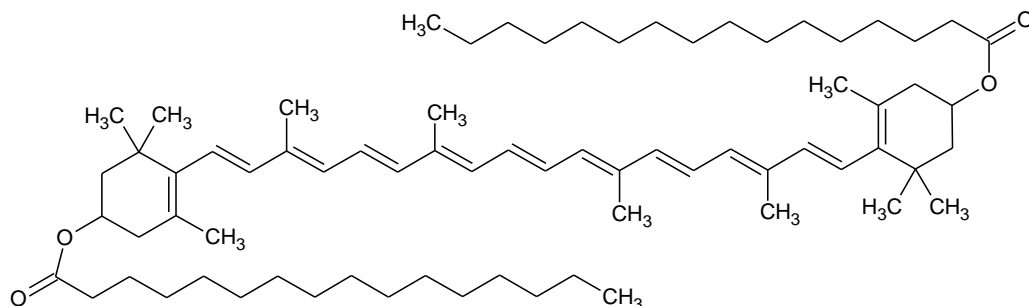
4.3.2.1 Karotenoidy

Jedná se o žlutá a oranžová barviva dosahující výjimečně žlutozelené až červené barvy. Karotenoidy jsou lipofilní barviva nejen u rostlin, ale i hub, řas a živočichů. Z chemického hlediska se řadí mezi tetraterpeny, konkrétně terpenoidy obsahující osm isoprenových jednotek. Barevné jsou díky násobným konjugovaným vazbám a dělí se na dvě skupiny – karoteny obsahující uhlovodíky a xanthofyly obsahující navíc i kyslík.⁷²

4.3.2.2.1 Zeaxanthin dipalmitát

Je disubstituovaný pigment, jehož prekurzorem je beta-karoten nebo beta-kryptoxanthin, patřící mezi xanthofyly.⁷² Běžně se spolu s luteinem vyskytuje v listové zeleni a ve žloutku. Jedná se o hlavní karotenoidy oční čočky a vyskytují se v oblasti žluté skvrny na

sítnici. Nyní je studován v souvislosti s možností léčby některých nemocí nebo jejich předcházení, např. prevence onemocnění srdce, mozkové mrtvice⁸⁸ nebo degenerace žluté skvrny související se stárnutím.³⁷

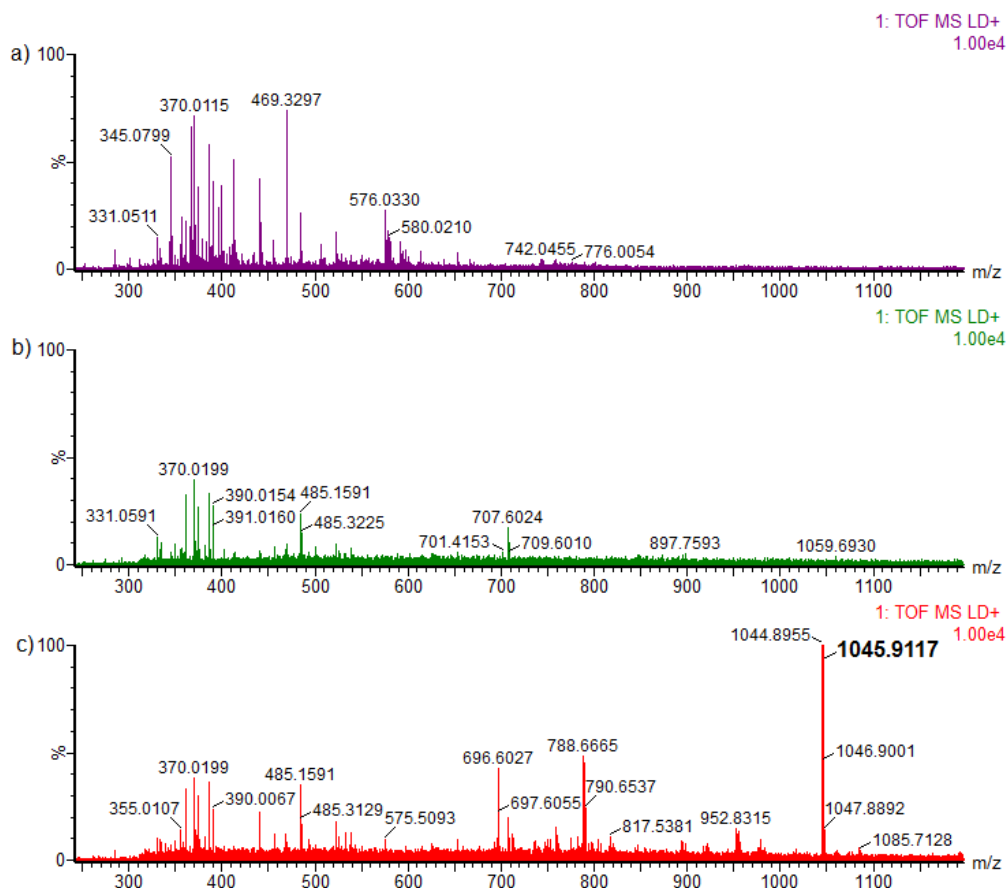


Obr. 40 Zeaxanthin dipalmitát

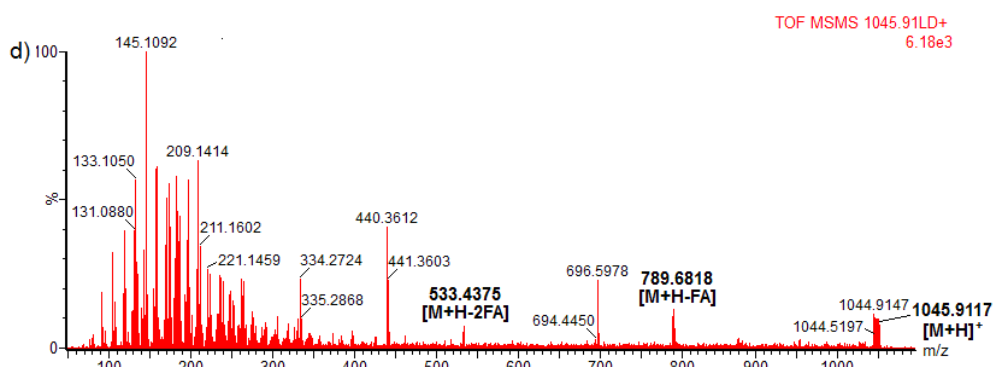
Technikou MALDI-MS byl identifikován zeaxanthin dipalmitát pouze v dužině kustovnice cizí, jenž byla extrahována pomocí ethylacetátu (extrakční činidlo č. 5) po dobu 48 hodin v chladu a tmě.

Kaufmann a kol. uvádí ve své studii z roku 1996, že studie používající hmotnostní spektrometrii k identifikaci karotenoidů v předchozích letech jsou vzácné. Jako důvody udává některé vlastnosti karotenoidů, jako je jejich tepelná nestabilita a malá rozpustnost v běžných maticích užívaných pro hmotnostní spektrometrii. Zároveň se pozastavuje nad tehdy novými iontovými zdroji, ESI a MALDI.⁸⁹ O 11 let později vychází studie zaměřená na analýzu karotenoidů pomocí MALDI-TOF, která identifikuje několik karotenoidů z různých rostlin. Mezi optimální rozpouštědla uvádí i ethylacetát, což se shoduje s výsledky této práce.⁹⁰

Obr. 41 a 42 ukazuje MS a MS/MS spektrum ethylacetátového extraktu kustovnice kustovnice cizí.



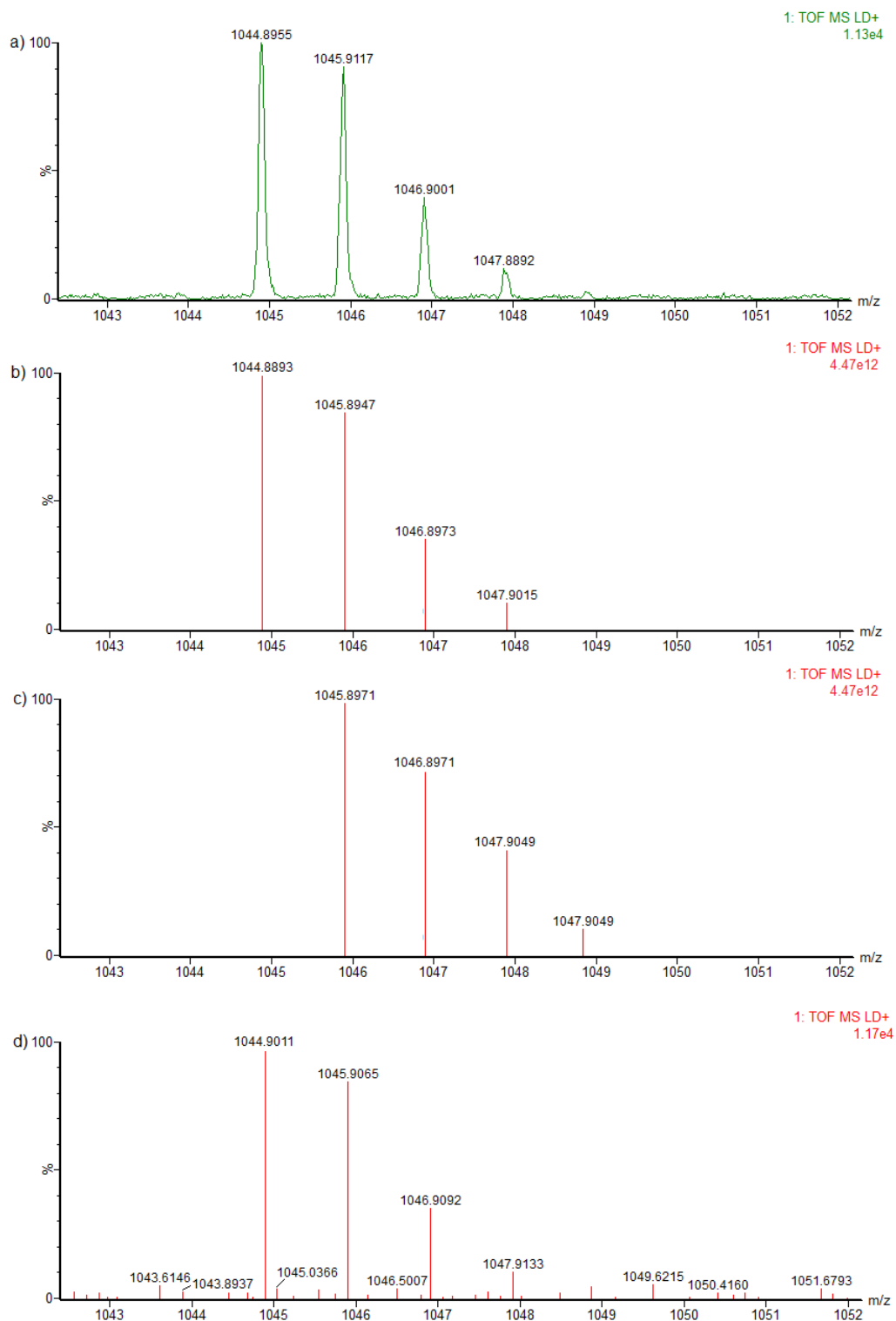
Obr. 41 MALDI-TOF-MS spektrum THAP matrice (a), ethylacetátového extraktu kustovnice cizí - slupka (b), dužina (c)



Obr. 42 MSMS fragmentace zeaxanthin dipalmitátu z ethylacetátového extraktu dužiny kustovnice cizí

Tento typ fragmentace potvrzuje Inbaraj a kol., kdy hodnota m/z 1045,9117 (odchylka od teoretické hodnoty 16,5 mDa; 15,8 ppm) se nejdříve fragmentuje jedna palmitová kyselina (FA) za vzniku fragmentu s hodnotou m/z 789,6818 s odchylkou od teoretické hodnoty 26,8 mDa (33,9 ppm) a poté druhá (2FA) za vzniku fragmentu s hodnotou m/z 533,4375, kde odchylka od teoretické hodnoty činí 22,8 mDa; 42,7 ppm.¹⁹ Detaily k identifikaci jsou uvedeny v kapitole věnované optimalizaci.

Ve spektrech c) a d) si můžeme povšimnout profilu izotopů. Těmi se zabýval ve své práci Kaufmann a kol. Uvádí, že izotopický profil je významně ovlivněn příspěvkem karotenoidů a mastných kyselin v protonizovaných formách i formách radiál kationtů (produkce smíšené populace sudých a lichých iontů).⁸⁹ Vzhledem k tomu je vhodné potvrdit identitu zeaxanthin dipalmitátu porovnáním reálného izotopického profilu s izotopickým modelem. Toto porovnání je patrné z obr. 43.



Obr. 43 Izotopy zeaxanthin dipalmitátu ve spektru (profilová data) (a), modelová izotopická spektra obou forem (centrovaná data) (b,c), experimentálně změřené spektrum (centrovaná data) (d)

Shoda izotopického modelu od reálného spektra byla testována na základě úvahy, že na druhém izotopickém píku se podílí protonizovaná forma i radikál-kation. Vzájemný poměr jejich intenzit v reálném spektru je možno vypočítat z intenzity prvního izotopu radikálkationtu a intenzity „směsného“ izotopu m/z 1045,9. Z tohoto poměru je možno vypočítat i příspěvky obou forem k intenzitě třetích a čtvrtých izotopů. Součty intenzit třetích a čtvrtých izotopů se od experimentálně naměřených intenzit liší o 10%. Tuto odchylku lze považovat za akceptovatelnou pro potvrzení identity zeaxanthin dipalmitátu.

4.3.2.2 Neidentifikované složky kustovnice zachycené technikou MALDI-MS

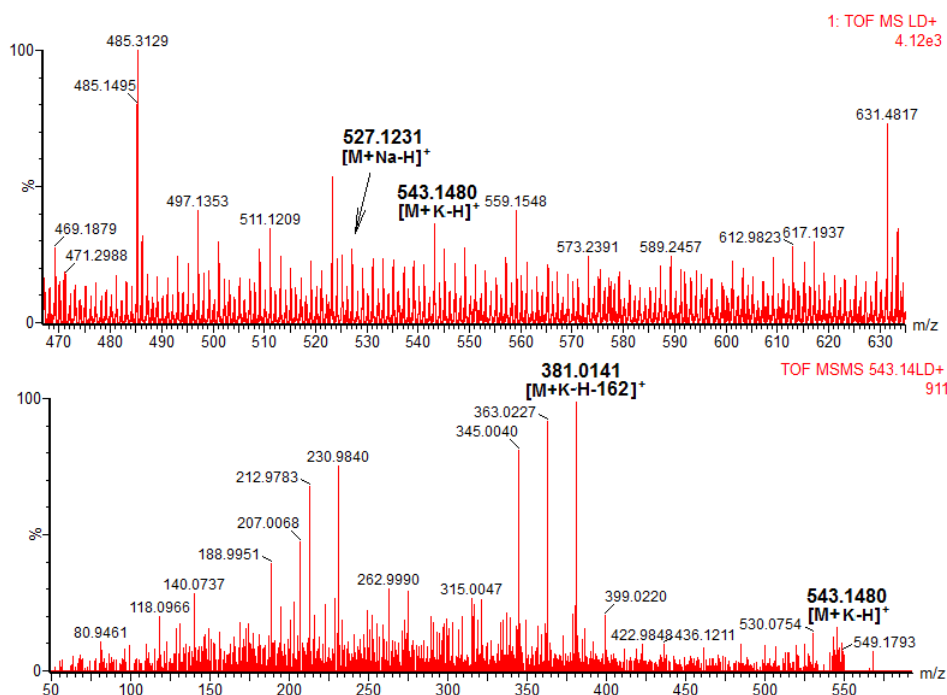
Pro nespécifický screening látek obsažených v extraktech plodů kustovnice byla použita metoda zahrnující fragmentaci přítomných iontů na základě automatického měření jejich intenzity. Podle změřené intenzity iontů v MS spektru (Survey Scan) a prahové intenzity definované uživatelem v metodě jsou přístrojem automaticky provedeny odpovídající kolizní experimenty a získaná MS/MS spektra. Tento postup je ve hmotnostně spektrometrické praxi označován jako Data Dependent nebo Data Directed Analysis (DDA) a umožnil kromě zeaxanthin dipalmitátu detekovat dominantní ionty ve spektru, které uvádí tabulka 20.

Tab. 20 Neznámé látky z MALDI-MS

m/z [M+H ⁺]	fragmentace	ppm	
543,148	543 [M+H ⁺] → 381 [M+H ⁺ -162]	28,2	
785,2623	785 [M+H ⁺] → 623 [M+H ⁺ -162]		neidentifikováno
821,3492	821 [M+H ⁺] → 659 [M+H ⁺ -162] → 497 [M+H ⁺ -324]		neidentifikováno
836	836 [M+H ⁺] → 674 [M+H ⁺ -162] → 512 [M+H ⁺ -324]		neidentifikováno
874	874 [M+H ⁺] → 712 [M+H ⁺ -162] → 550 [M+H ⁺ -324]		neidentifikováno
893	893 [M+H ⁺] → 731 [M+H ⁺ -162] → 569 [M+H ⁺ -324]		neidentifikováno
911	911 [M+H ⁺] → 749 [M+H ⁺ -162] → 587 [M+H ⁺ -324]		neidentifikováno

Ion s m/z 543,148 fragmentuje ztrátou hexózy na ion 381,0141 (s odchylkou 65,8 mDa). Možným vysvětlením přítomnosti tohoto iontu ve spektru je vznik draselného aduktu trisacharidu (trihexosy) jak uvádí obr. 44. Ve MALDI-MS spektru lze s poněkud nižší intenzitou nalézt i odpovídající sodný adukt tj. ion s nominální hodnou m/z 527,1231 (odchylka od teoretické hodnoty 35,7 mDa; 67,7 ppm).

Robinson a kol. se snažili pomocí MALDI-MS popsat ve vodě rozpustné cukry přítomné ve stonku pšenice. Ve své studii uvádí, že m/z 543 je trihexosid draselný a při jeho fragmentaci dochází ke vzniku iontu s m/z 381. To se dobře shoduje s naší prací.⁹¹



Obr. 44 Hmotnostní spektrogram MS a MSMS iontu s m/z 543,148

Ostatní látky v tabulce 20 štěpí hexózu hned tři krát. Literatura, která by splňovala tyto podmínky, nebyla nalezena. Vzhledem k tomu, že se vyskytují pouze v polárních rozpouštědlech (č. 1,2,3) a mají velké množství hexóz je možnost se jedná o oligosacharidy nebo víceglykosylované látky, které se doposud nezdařilo jednoznačně identifikovat.

5. ZÁVĚR

Optimální technikou pro analýzu látek obsažených v extraktech z plodu kustovnice je kombinace kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

V této práci byly touto technikou nalezeny nízkomolekulární látky jako jsou fenolické kyseliny (kyselina vanilová, p-kumarová a ferulová), látky flavonoidní povahy (rutin a jeho deriváty) a kumarinové deriváty (skopoletin) a rovněž některé ve vodě rozpustné vitamíny (riboflavin (B₂) a askorbová kys (C)). Dále byla identifikována velmi polární látka betain a závěrem i aminokyselina arginin a pilotně navrženy struktury některých heterocyklických složek (indolin, deriváty indolu a chinolinu).

MALDI-MS je užitečnou komplementární technikou k LC/MS. Pomocí této metody byly zachyceny látky v širokém rozsahu polarity. Tato technika umožnila jednoznačnou identifikaci významného karotenu zeaxanthin dipalmitátu. Vedle toho byla technikou MALDI-MS v polárních extraktech zachycena řada víceglykosylovaných derivátů s neznámou strukturou. Jejich jednoznačná identifikace v kustovnici může být zajímavým předmětem dalšího studia složení plodu kustovnice. Technika UV/VIS spektrometrie poskytla doplňkové informace pro klasifikaci majoritních látek obsahujících chromofor v jednotlivých extraktech.

Práce také srovnává zastoupení nalezených látek v dužině a slupce a mezi druhy kustovnic navzájem. Na základě srovnání přítomnosti jednotlivých nalezených látek zatím nelze provést odlišení jednotlivých druhů kustovnic. To je dáno jednak okolnostmi růstu, zrání i případného dalšího zpracování plodů (klíma, půda, škůdci, onemocnění, forma skladování, sušení), ale patrně i potřebou porovnání většího počtu látek a vzorků i vhodného statistického zpracování získaných dat. To může být námětem pro pokračování výzkumu kustovnice.

6. LITERATURA

¹ Lilkovité. *Wikipedie* [online]. [cit. 2013-04-26]. Dostupné z: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Lilkovit%C3%A9>>.

² FUKUDA, Tatsuya et al. Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium* (Solanaceae): inferences from chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. 2001, vol. 19, iss. 2 [cit. 2013-02-19], s. 246-258.

³ SEKERKA, Pavel. Obrazový opravník obecně oblíbených omylů 4.: Kustovnice. *Botany.cz* [online]. [cit. 2013-04-26]. Dostupné z: <<http://botany.cz/cs/opravnik-kustovnice-goji/>>

⁴ JIRÁSEK, Václav, et al. *Naše jedovaté rostliny*. Praha: Nakladatelství československé akademie věd, 1957. 384 s.

⁵ ANDO, Vladimír et al. *Léčivé rostliny tradiční čínské medicíny*. 1. vyd. Hradec Králové: Svítání, 1998. 321 s. ISBN 80-86198-01-4.

⁶ JABLONSKÝ, Ivan a BAJER, Jiří. *Rostliny pro posílení organismu a zdraví*. Praha: Grada, 2007. 104 s. ISBN 978-80-247-1745-6.

⁷ VALÍČEK, Pavel. Kustovnice. *Zahradkář*. 2010, s. 30-31.

⁸ POTTERAT, Olivier. Goji Juice: A novel miraculous cure for longevity and well-being? A review of composition, pharmacology, health-related claims and benefits. *Ganzheits Medizin*. [online]. 2008, vol. 20, iss. 7 [cit. 2013-03-05], s. 399-405.

⁹ KOBLÍŽEK, Jaroslav. *Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků*. 2., rozš. vyd. Tišnov: Sursum, 2006. 2 sv. (551, 178 s.). ISBN 80-7323-117-4.

¹⁰ ZHANG, KY. Differentiation of *Lycium barbarum* from its related *Lycium* species using random amplified polymorphic DNA. *Chinese Medicine* [online]. 2001, vol. 67, iss. 4 [cit. 2013-03-05], s. 379-81.

¹¹ PENG, Y., et al. Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in *Lycium* fruits (*Fructus Lycii*). *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2005, vol. 60, iss. 4 [cit. 2013-03-05], s. 161-164.

¹² VALÍČEK, Pavel. *Rostliny pro zdravý život*. 1. vyd. Benešov: Start, 2007. 229 s. ISBN 978-80-86231-40-2.

¹³ LINNÉ, Carl von. *Species plantarum exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus synonymis selectis, locis natalibus secundum systema sexuale digestas. Tom. III. Pars III.; Curante Carolo Ludovico Willdenow*. 4.-5. Edit. Berolini: Impensis G. C. Nauk, [1800]. 1478-2409 s.

¹⁴ *Osobnosti* [online]. [cit. 2013-04-23]. Dostupné z: <http://www.quido.cz/osobnosti/presl_js.htm>.

¹⁵ MIKULÁŠOVÁ, Monika. *Kustovnice čínská*. Zlín, 2010. 66 s. Bakalářská práce na Technologické fakultě Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Monika Černá.

¹⁶ NOVOTNÝ, Marek. *Kustovnice čínská a maka v nových potravinových výrobcích*. Brno, 2009. 96 s. Diplomová práce na Chemické fakultě Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

¹⁷ POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta medica* [online]. 2010, vol. 76, iss. 1 [cit. 2013-03-05], s. 7-19.

- ¹⁸ HE, Nianwu. Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits. *Food chemistry* [online]. 2012 vol. 133, iss. 3 [cit. 2013-04-12], s. 978-989.
- ¹⁹ INBARAJ, BS. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* [online]. 2008, vol. 47, iss. 4-5 [cit. 2013-03-05], s. 812-818.
- ²⁰ PIAO, Meilan. Changes in Carotenoid Content and its Composition during Maturation of *Fructus lycii* Fruits. *J. Food Chem.* [online]. 2005, vol. 12, iss. 1 [cit. 2013-03-05], s. 35-39.
- ²¹ INBARAJ, B. Stephen. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* [online]. 2010 vol. 51, iss. 3 [cit. 2013-04-12], s. 549-556.
- ²² QIAN, Jian-Ya., et al. The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium chinense* Mill fruits as free radical scavenger. *Food chemistry* [online]. 2004, vol. 87, iss. 2 [cit. 2013-03-05], s. 283-288.
- ²³ LE, Kim. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food chemistry* [online]. 2007 vol. 105, iss. 1 [cit. 2013-04-12], s. 353-363.
- ²⁴ YOUNG, Geun Shin. Determination of betaine in *Lycium chinense* fruits by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography A* [online]. 1999, vol. 857, iss. 1-2 [cit. 2013-03-05], s. 331–335.
- ²⁵ BALOUN, Jan, et al. *Rostliny způsobující otravy a alergie*. Praha: Avicenum, 1989. 235 s.
- ²⁶ ADAMS, M., et al. HPLC-MS trace analysis of atropine in *Lycium barbarum* berries. *Phytochemical Analysis* [online]. 2006, vol. 17, iss. 5 [cit. 2011-03-13], s. 279-283.

- ²⁷ LEUNG H., HUNG A., HUI A., CHAN T. Warfarin overdose due to the possible effects of *Lycium barbarum* L. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, vol. 46, iss. 5 [cit. 2011-03-13], s. 1860–1862.
- ²⁸ Lam AY, Elmer GW, Mohutsky MA. Possible interaction between warfarin and *Lycium barbarum* L. *Ann Pharmacother* [online]. 2012, vol. 32, iss. 3 [cit. 2011-03-13], s. E50–E53.
- ²⁹ LARRAMENDI, CH. Goji Berries (*Lycium barbarum*): Risk of Allergic Reactions in Individuals With Food Allergy. *Journal of investigational allergology and clinical immunology* [online]. 2012, vol. 22, iss. 5 [cit. 2013-03-05], s. 345-350.
- ³⁰ CARNÉS, J. Recently introduced foods as new allergenic sources: sensitisation to Goji berries (*Lycium barbarum*). *Food chemistry* [online]. 2013, vol. 137, iss. 1-4 [cit. 2013-03-05], s. 130-135.
- ³¹ CHANG, RC. Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far? *Laboratory of neurodegenerative diseases* [online]. 2008, vol. 28, iss. 5 [cit. 2013-03-05], s. 643-52.
- ³² MA, L., et al. Effect of *lycium barbarum* polysaccharide against atherosclerosis in rabbits. *Journal of Zhengzhou* [online]. 2005 vol. 40, [cit. 2013-03-05], s. 328-330.
- ³³ MING, Ma. Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo. *Food chemistry* [online]. 2009, vol. 113, iss. 4 [cit. 2013-03-05], s. 872-877.
- ³⁴ CHENG, CY. Polysaccharides from Wolfberry Prevents Corticosterone- Induced Inhibition of Sexual Behavior and Increases Neurogenesis. *Plos one* [online]. 2012, vol. 7, iss. 4 [cit. 2013-03-05], s. 1.

- ³⁵ CUI, B. Antitumour activity of Lycium chinensis polysaccharides in liver cancer rats. *International journal of biological macromolecules* [online]. 2012, vol. 51, iss. 3 [cit. 2013-03-05], s. 314-318.
- ³⁶ KIM, HP. Zeaxanthin dipalmitate from Lycium chinense fruit reduces experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *Biol. Pharm. Bull.* [online]. 2002, vol. 25, iss. 3 [cit. 2013-03-05], s. 390-392.
- ³⁷ CHENG, CY. Fasting plasma zeaxanthin response to Fructus barbarum L. (wolfberry; Kei Tze) in a food-based human supplementation trial. *The British journal of nutrition* [online]. 2005, vol. 93, iss. 1 [cit. 2013-03-05], s. 123-30.
- ³⁸ PACÁKOVÁ, Věra. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*. Vyd. 1. Praha, 1986. 144 s.
- ³⁹ CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: Vysokošk. učeb. pro vys. šk. chemickotechnol.* 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1990. 384 s. ISBN 80-03-00569-8.
- ⁴⁰ DOUŠA, Michal, ed. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2002. 129 s. Učební texty pro pracovníky ÚKZÚZ. ISBN 80-86548-09-0.
- ⁴¹ DOUŠA, Michal. *HPLC*. [online]. [cit. 2013-04-25]. Dostupné z: <<http://www.hplc.cz/>>.
- ⁴² ŠESTÁK, Josef. *Rychlá separace výbušnin vysokoučinnou kapalinovou chromatografií*. Brno, 2011. 63 s. Diplomová práce na Chemické fakultě Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí diplomové práce RNDr. Vladislav Kahle, CSc.
- ⁴³ *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek*. Praha: VŠCHT, 2006. 112 s. ISBN 80-86238-13-X.

⁴⁴ HÁKOVÁ, Eva. *Ultra performance liquid chromatography (UPLC)*. [online]. [cit. 2013-04-25]. Dostupné z: <http://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/pokroky-v-modernich-separacnich-metodach/ultra-performance-liquid-chromatography-uplc?student_welcome=1>.

⁴⁵ ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 263 s. ISBN 80-246-0852-9.

⁴⁶ DOHNAL, Jiří et al. *Moderní přístupy k farmaceutické analýze. 2., Strukturní analýza léčiv*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2009. 105 s. ISBN 978-80-7305-058-0.

⁴⁷ STUŽKA, Václav. *Instrumentální metody chemické analýzy II: hmotnostní spektrometrie organických molekul*. 3. vyd. Olomouc: Palackého univerzita, 1996. 108 s. ISBN 80-7067-613-2.

⁴⁸ *Hmotnostní spektrometrie*. [online]. [cit. 2013-03-13]. Dostupné z: <http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/MS/ms.pdf>.

⁴⁹ *Molekulární modelování a bioinformatika. Hmotnostní spektrometrie I*. [online]. [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/ms_1.pdf>.

⁵⁰ *MALDI Mass*. [online]. [cit. 2013-03-22]. Dostupné z: <<http://www.sigmaldrich.com/analytical-chromatography/spectroscopy/maldi-mass.html>>.

⁵¹ DUDA, Radek. *Analýza ultratenkých vrstev metodami SIMS a TOF-LEIS*. Brno, 2008. 60. Diplomová práce na fakultě Strojního inženýrství Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Babor, Ph.D.

⁵² *Waters MALDI SYNAPT G2 HDMS: System Overview and Maintenance Guide*. Milford: Waters Corporation, 2010.

⁵³ POSPÍŠIL, Milan. *Instrumentální metody výzkumu a analýzy I*. 1. vyd. Praha: České vysoké učení technické, 1993. 141 s. ISBN 80-01-01010-4.

⁵⁴ NĚMCOVÁ, Irena, RYCHLOVSKÝ, Petr a ČERMÁKOVÁ, Ludmila. *Spektrometrické analytické metody I*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 166 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0776-X.

⁵⁵ KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

⁵⁶ Návod k obsluze spektrofotometru UNICAM UV550. [online]. [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <<http://biofyzika.upol.cz/userfiles/merged-1360231057.pdf>>.

⁵⁷ PENG at al. Physico-chemical properties and bioactivities of a glycoconjugate LbGp5B from *Lycium barbarum* L. *Chinense Journal of Chemistry* [online]. 2001, vol. 19, iss. 9 [cit. 2013-04-12], s. 842-846.

⁵⁸ BUNGHEZ, I.R. Obtaining of carotenoid extract from *lycium chinense* ang characterization using spectrometrical analysis. *Digest Journal of nanomaterials and biostructures* [online]. 2012 vol. 7, iss. 2 [cit. 2013-04-12], s. 523-528.

⁵⁹ YU, Ding-Hai. Health-promoting effect of LBP and healthy Qigong exercise on physiological functions in old subjects. *Carbohydrate polymers* [online]. 2009 vol. 75, iss. 2 [cit. 2013-04-12], s. 312-316.

⁶⁰ LU, Shao-Ping. Chemical characterization of *Lycium barbarum* polysaccharides and their reducing myocardial injury in ischemia/reperfusion of rat heart. *International journal of biological macromolecules* [online]. 2010 vol. 47, iss. 5 [cit. 2013-04-12], s. 681-684.

⁶¹ CUI, BoKang. Antitumour activity of *Lycium chinensis* polysaccharides in liver cancer rats. *International journal of biological macromolecules* [online]. 2012 vol. 51, iss. 3 [cit. 2013-04-12], s. 314-318.

⁶² QIAN, JY. The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium chinense* Mill fruits as free radical scavenger. *Food chemistry* [online]. 2004 vol. 87, iss. 2 [cit. 2013-04-12], s. 283-288.

⁶³ ZHENG, Jie. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau. *Food chemistry* [online]. 2011 vol. 126, iss. 3 [cit. 2013-04-12], s. 859-865.

⁶⁴ KOSAR, M. Determination of the free radical scavenging activity of *Lycium* extracts. *Chemistry of natural compounds* [online]. 2003 vol.39, iss. 6 [cit. 2013-04-12], s. 531-535.

⁶⁵ *Waters Micromass MALDI Q-ToF Premier: Operator's Guide*. Milford: Waters Corporation, 2005.

⁶⁶ *Determination of water- and fat-soluble vitamins by HPLC*. [online]. 2010 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: <<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/88784-TN89-HPLC-WaterFatSolubleVitamins-27Oct2010-LPN2598.pdf>>.

⁶⁷ ŠTREJBAROVÁ, Monika. *Vitaminy, minerály a jejich vliv na zdraví*. Brno, 2008. 58 s. Bakalářská práce na Pedagogické fakultě Masarykovy univerzity v Brně na katedře Biologie. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Jitka Reissmannová.

⁶⁸ ZLÍNSKÝ, Jakub. *Význam vitamínů ve výživě*. Brno, 2007. 51 s. Bakalářská práce na fakultě sportovních studií Masarykovy univerzity v Brně na katedře Sportovní medicíny a zdravotní tělesné výchovy. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Jana Juříková, Ph. D.

⁶⁹ MINDELL, Earl a MUNDIS, Hester. *Nová vitaminová bible: nejnovější informace o vitamínech, minerálních látkách, antioxidantech, léčivých rostlinách, o doplňcích stravy, léčebných účincích potravin i lécích používaných v homeopatii*. Vyd. 2., (dopl., přeprac.). V Praze: Ikar, 2006. 572 s. ISBN 80-249-0744-5.

⁷⁰ FRENICH, A.G. Determination of ascorbic acid and carotenoids in food commodities by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *J. Agric. Food Chem.* [online]. 2005, vol. 53, iss. 19 [cit. 2011-04-08], s. 7371-7376.

⁷¹ *Mass Bank* [online]. [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <<http://www.massbank.jp/index.html>>.

⁷² CUYCKENS, Filip a Magda CLAEYS. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2003, vol. 39, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 1-15.

⁷³ VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. 3. Vyd. 2., upr. Tábor: OSSIS, 2002. xii., 343 s. ISBN 80-86659-02-X.

⁷⁴ What is Rutin? *Phytochemicals* [online]. [cit. 2013-04-28]. Dostupné z: <<http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rutin.php>>.

⁷⁵ LAMPART-SZCZAPA, Eleonora. Chemical composition and antibacteria activities of lupin seed extracts. [online]. 2003, vol. 47, iss. 5 [cit. 2011-04-08], s. 286-290.

⁷⁶ LUŠTINEC, Jiří a ŽÁRSKÝ, Viktor. *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003. 261 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0563-5.

⁷⁷ KIM, Su-Jin. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. [online]. 2010, vol. 15, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 7208-7217.

⁷⁸ FERGUSON, Lynnette R. Antioxidant and antigenotoxic effect of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. [online]. 2005, vol. 49, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 585-693.

⁷⁹ MATHEW, S. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. [online]. 2004, vol. 24, iss. 2-3 [cit. 2011-04-08], s. 59-83.

- ⁸⁰ Coumarins. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2013-04-28]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16267169>>.
- ⁸¹ PETERSON, Joseph K. Biological activities and contents of scopolin and scopoletin in sweetpotato clones. [online]. 2003, vol. 38, iss. 6 [cit. 2011-04-08], s. 1129-1133.
- ⁸² TZENG, Tzu-Ching. Ethanol modified supercritical fluids extraction of scopoletin and artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology* [online]. 2007, vol. 56, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 18-24.
- ⁸³ BUTNARU, Claudia. Determination of scopoletin in *Physalis Alkekengi* and *Solanum dulcmarum* by High Performance Liquid Chromatography. *Farmacia* [online]. 2010, vol. 58, iss. 6 [cit. 2011-04-08], s. 711-718.
- ⁸⁴ LEVER, Michael a Sandy SLOW. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. [online]. 2010, vol. 43, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 732-744.
- ⁸⁵ SERVILLO, L. Betaines of fruit in citrus genus plants. *J. Agric. Food Chem.* [online]. 2011, vol. 59, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 9410-9416.
- ⁸⁶ DU SHIN, Hyun. Determination of betaine in fructus *Lycii* using hydrophilic interaction liquid chromatography with evaporative light scattering detection. [online]. 2012, vol. 33, iss. 2 [cit. 2011-04-08], s. 553-556.
- ⁸⁷ SHEK, P. Y. Iris. Fragmentations of Protonated Arginine, Lysine and Their Methylated Derivatives: Concomitant Losses of Carbon Monoxide or Carbon Dioxide and an Amine.. *J. Phys. Chem. A* [online]. 2006, vol. 110, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 8282-8296.
- ⁸⁸ RIBAYA-MERCADO, J.D. a J.B. BLUMBERG. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. [online]. 2004, vol. 23, iss. 6 [cit. 2011-04-08], s. 567S-587S.

⁸⁹ KAUFMANN, Raimund. Analysis of Carotenoids and Carotenol Fatty Acid Esters by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and MALDI–Post-Source-Decay Mass Spectrometry. *Analytical biochemistry* [online]. 1996, vol. 238, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 117–128.

⁹⁰ FRASER, Paul D. Metabolite profiling of plant carotenoids using the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *The plant journal*. [online]. 2006, vol. 49, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 552-564.

⁹¹ ROBINSON, Sarah. Localization of water-soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *New Phytologist* [online]. 2007, vol. 173, iss. 1 [cit. 2011-04-08], s. 438-444.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<u>zkratka</u>	<u>termín</u>
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization
HPLC	high performance liquid chromatography
UPLC	ultra performance liquid chromatography
LC	liquid chromatography
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography
MS	mass spectrometry
DNA	deoxyribonucleic acid
GI	glykemický index
GC	gas chromatography
TČM	tradiční čínská medicína
DAD	diode array detector
PDA	photodiode array
ELSD	evaporative light scattering detector
FAB	fast atom bombardment
FIB	fast ion bombardment
TS	termospray
CI	chemical ionisation
EI	electron ionization
ES	electrospray
ESI	electrospray ionization
APCI	atmospheric-pressure chemical ionization
APPI	atmospheric pressure photoionization
Q-TOF	kvadrupólový hmotnostní analyzátor time-of-flight
MCP	microchannel plate
ADC	analog-to-digital converter
UV/VIS	ultraviolet/visible
DDD	doporučená denní dávka