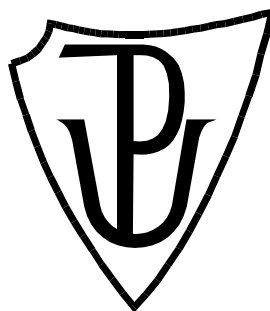


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium vybraných terpenoidů v genofondu měsíčku  
lékařského**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Adela Marína Sestrienková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Tibor Béres, Ph.D.</b>
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 13. 5. 2019

Chcela by som poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce Mgr. Tiborovi Béresovi, Ph.D. za jeho cenné rady, odborné vedenie a usmernenie pri vypracovaní predkladanej bakalárskej práce. Poďakovanie taktiež patrí pracovisku Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. v Olomouci, kde mi bolo umožnené prácu realizovať.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Adela Marína Sestrienková
Název práce	Studium vybraných terpenoidů v genofondu měsíčku lékařského
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; pracoviště Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Tibor Béres, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Měsíček lékařský (*Calendula officinalis* L.) je významnou léčivou rostlinou s výraznými protizánětlivými účinky. Extrakt z úborů je součástí celé řady přípravků používaných v kožním lékařství. Látky zodpovědné za účinky patří do skupiny pentacyklických triterpenů, z nichž nejvýznamnější jsou monoestery faradiolu. V rámci teoretické části byla vypracována rešerše na téma Měsíček lékařský, významné obsahové látky v něm obsažené, jejich biosyntéza, význam a metody používané k jejich analýze. Praktická část je zaměřena na vývoj kvantifikačních metod. Ty byly využity ve srovnání vybraných genotypů měsíčku z kolekce Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i.

Klíčová slova	Měsíček lékařský, faradiol, ultravysoce účinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	51
Počet příloh	0
Jazyk	Slovenský

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Adela Marína Sestrienková
Title	Study of selected terpenoids in genofond of marigold ( <i>Calendula officinalis</i> L.)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Olomouc
Supervisor	Mgr. Tibor Béres, Ph.D.
The year of presentation	2019

### Abstract

*Calendula officinalis* L. is an important medicinal plant with significant anti-inflammatory activity. Extracts of the flower heads are widely used in dermatology. The most important anti-inflammatory compounds are the esters of a pentacyclic triterpene diol - faradiol. The theoretical part of the bachelor thesis is focused on important compounds of pot marigold as well as their biosynthesis and methods used for their analysis. In the practical part, methods for quantification of faradiol are introduced to assess selected genotypes of pot marigold from the collection of the Crop Research Institute.

Keywords	marigold ( <i>Calendula officinalis</i> L.), faradiol, ultrahigh-performance liquid chromatography, mass spectrometry
----------	---

Number of pages	51
Number of appendices	0
Language	Slovak

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....</b>	<b>10</b>
2.1	NECHTÍK LEKÁRSKY .....	10
2.2	VÝZNAMNÉ OBSAHOVÉ LÁTKY .....	11
2.2.1	Karotenoidy .....	11
2.2.2	Fytosteroly .....	12
2.2.3	Kumaríny .....	13
2.2.4	Silice .....	14
2.2.5	Polysacharidy .....	14
2.2.6	Flavonoidy .....	15
2.2.7	Terpény .....	18
2.2.7.1	Základná charakteristika .....	18
2.2.7.2	Klasifikácia .....	20
2.2.7.3	Biosyntéza .....	22
2.3	PENTACYKLICKÉ TRITERPENOIDY .....	25
2.3.1	Biologická aktivita.....	26
2.3.2	Pentacyklické triterpenoidy nechtíku lekárskeho .....	26
2.4	METÓDY POUŽÍVANÉ K ANALÝZE PRÍRODNÝCH LÁTOK .....	28
2.4.1	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) .....	28
2.4.2	Hmotnostná spektrometria (MS) .....	29
2.4.3	Priame spojenie ultra vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie (UHPLC-MS/MS).....	29
2.4.4	UHPLC-UV .....	30
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>32</b>
3.1	MATERIÁL .....	32
3.1.1	Rastlinný materiál.....	32
3.1.2	Použité chemikálie.....	32
3.1.3	Prístroje a pomôcky .....	32
3.2	POUŽITÉ METÓDY .....	33
3.2.1	Spracovanie rastlinného materiálu .....	33
3.2.2	Analýza vzoriek pomocou UHPLC-MS/MS.....	34
3.2.3	Analýza vzoriek pomocou UHPLC-UV .....	34
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA.....</b>	<b>35</b>
4.1	OPTIMALIZÁCIA ALKALICKEJ METANOLÝZY .....	35
4.2	OPTIMALIZÁCIA EXTRAKCIE KVAPALINA-KVAPALINA .....	37
4.3	IDENTIFIKÁCIA FARADIOLU V RASTLINNOM MATERIÁLI .....	38
4.4	VÝVOJ A OPTIMALIZÁCIA METÓD UHPLC-UV A UHPLC-MS/MS .....	40
4.5	VALIDÁCIA METÓD UHPLC-UV A UHPLC-MS/MS.....	41
4.5.1	Linearita metód.....	41
4.5.2	Limit detekcie a limit kvantifikácie metódy.....	42
4.5.3	Precíznosť merania .....	42

4.6	STANOVENIE FARADIOLU V GENOTYPOCH NECHTÍKU LEKÁRSKEHO POMOCOU METÓDY UHPLC-UV .....	42
4.6.1	Stanovenie faradiolu v genotypoch nechtíku lekárskeho pomocou metódy UHPLC-MS/MS .....	44
4.7	POROVNANIE HODNÔT OBSAHU FARADIOLU STANOVENÉHO UHPLC-UV A UHPLC-MS/MS .....	45
<b>5</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....</b>	<b>51</b>

## **CIELE PRÁCE**

1. Vypracovanie literárnej rešerše na tému nechtík lekársky, významné obsahové látky, metódy ich analýzy
2. Optimalizácia extrakcie a hydrolýzy esterov faradiolu
3. Vývoj, optimalizácia a validácia metódy pre stanovenie faradiolu
4. Aplikácia vyvinutej metódy na kvantifikáciu faradiolu vo vybraných genotypoch nechtíku lekárskeho
5. Interpretácia dát a zhodnotenie jednotlivých genotypov



# 1 ÚVOD

V súčasnej dobe sú známe mnohé látky s protizápalovými účinkami. Medzi najúčinnšie patria glukokortikoidy s radou nežiadúcich účinkov, ktoré sú príčinou hľadania nových liečivých látok. Ďalší významný zdroj protizápalových látok je nechtík lekársky, ktorého extrakty sú pridávané do širokého spektra prípravkov používaných v kožnom lekárstve. Nechtík lekársky (*Calendula officinalis* L.) sa tradične používal pri liečbe zápalov vnútorných orgánov, gastrointestinálnych vredov, ako diuretikum a používa sa aj na zápaly ústnej a hltanovej sliznice, rany a popáleniny (Yoshikawa *et al.*, 2001). Je tiež používaný v alternatívnej medicíne, pri liečení povrchových vredov a bodnutí hmyzom. Éterický olej z tejto rastliny sa používa na upokojenie centrálného nervového systému (Miliauskas *et al.*, 2004).

Nechtík lekársky obsahuje karotenoidy, steroly, flavonoidy, polysacharidy a ďalšie látky. Najdôležitejšími protizápalovými látkami nechtíku lekárskeho sú však triterpenoidy a ich estery. V extrakte zo súkvetí *Calendula officinalis* L. bolo identifikovaných 8 bioaktívnych monoesterov, z ktorých najúčinnšie zložky boli predovšetkým faradiolové estery. Faradiol patrí medzi pentacyklické triterpenoidy, ktoré sa v prírode vyskytujú veľmi často. V nechtíku lekárskom sa okrem faradiolu nachádzajú aj ďalšie triterpenoidné zlúčeniny, medzi ktoré patrí arnidiol, calenduladiol a maniladiol. Najväčšie percentuálne zastúpenie v suchých kvetoch má však faradiol a jeho estery. Protizápalová aktivita rôznych extraktov je úmerná obsahu faradiolmonoesteru, ktorý môže slúžiť ako vhodný parameter pre hodnotenie kvality prípravkov s obsahom nechtíku lekárskeho (Kašparová, 2008). Na hodnotenie tohto parametru sme pracovali s genotypmi nechtíku lekárskeho z Génovej banky Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i.

Génová banka Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. je inštitúcia zabývajúca sa, okrem iného, hodnotením, konzerváciou a využívaním genofondu rastlín. Príkladom je genofond nechtíku lekárskeho, v ktorom sú študované vybrané terpenoidné zlúčeniny a podľa nich posudzovaná miera jeho hojivých účinkov.

Bakalárska práca je taktiež zameraná na vývoj vhodnej validovanej metódy pre analýzu vybraných terpenoidov. Predpokladáme, že druh *Calendula officinalis* L. s najväčším obsahom faradiolu, dosahuje najväčšej protizápalovej a antiedematóznej aktivity.

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Nechtík lekársky

*Calendula*, nechtík, je bylina alebo ker so striedavými jednoduchými listami, s jednotlivými stopkovými úbormi, ktorých lôžko je bez plevíc, s neplodnými, obojakými, trubicovitými kvetmi v terči a s jednou až troma radami okrajových samičích, jazykovitých oranžovožltých plodných kvetov. Nažky sú kosákovite zahnuté, bez páperia. Spravidla nemajú mliečnice, často sa však vytvoria schizogenné kanáliky so silicami. V ľudovom liečiteľstve a súčasnej medicíne sa používajú jeho listy (*Folia Calendulae*), úbory (*Anthodia Calendulae*) a hlavne jazykovité kvety (*Flores Calendulae*). Rod nechtík má približne 20 druhov (Novák *et al.*, 1958).

*Calendula officinalis* L., nechtík lekársky, je 1 – 2 ročná pestovaná aromatická bylina, ktorej byľ je bohato vetvená a celá listnatá. Dorastá až do výšky 60 cm. Spodné listy sú vajcovitého tvaru s krátkou stopkou, horné listy sú kopijovité a prisadnuté (Jahodár, 2011). Povrch listov je chlpatý a mierne lepkavý. Úbory (*Anthodia Calendulae*) a najmä jazykovité kvety sýto žltej a oranžovej farby sa využívajú vo farmakológii a dermatológii. Nechtík rastie dobre v slnečných polohách, pri klíčení potrebuje dostatok vlahy a kvitne od júna do začiatku jesene (Kašparová, 2008).

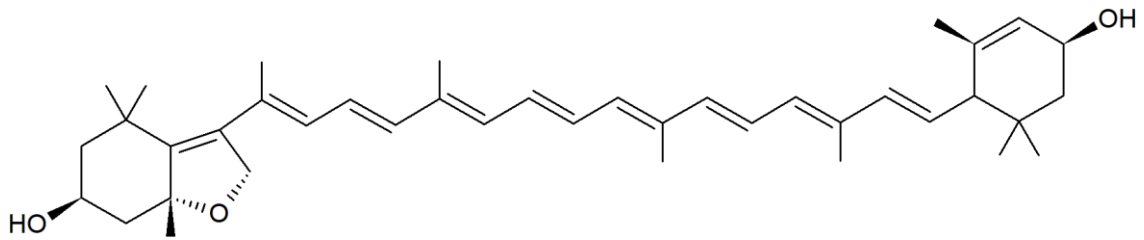
Nechtíkový kvet sa používa ako antiflogistikum vo forme nálevu, masti alebo nechtíkovej tinktúry. Nálev sa používa k výplachu úst pri zápalových ochoreniach ústnej dutiny a hltanu, často je tiež využívaný ako očné kvapky a má upokojujúce účinky na vyrážky po podráždení (Safdar *et al.*, 2010). Nechtíková masť vykazuje silné protizápalové a hojivé účinky, používa sa na kožné zápaly, vrede, krčové žily, pri liečení ekzému a akné. K ošetrovaniu povrchových poranení sa používajú obklady s nechtíkovou tinktúrou, ktorá má hojivé, regeneračné a mierne dezinfekčné a protizápalové účinky. Nechtík je čistiaca a detoxifikačná bylina, ktorá lieči chronické infekcie. Vysušené kvety majú antipyretické, protizápalové a protinádorové účinky. Táto antiseptická a antifungálna rastlina sa používa tiež pri povrchových zraneniach, pri liečení jaziev a známkach začervenej pokožky (Kašparová, 2008).

## 2.2 Významné obsahové látky

### 2.2.1 Karotenoidy

Karotenoidy sú lipofilné organické látky zo skupiny tetraterpenoidov. Patria medzi prírodné pigmenty vyskytujúce sa prevažne vo fotosynteticky aktívnych organizmoch. V rastline sú karotenoidy syntetizované výhradne v plastidoch a uskladňované v chromoplastoch. Z hľadiska chemickej štruktúry predstavujú karotenoidy izoprénové zlúčeniny, ktoré vznikli biosyntézou dvoch koncových molekúl C<sub>20</sub> geranylgeranyl difosfátu (Britton, 1995). Takto sa vyprodukuje rodičovská kostra C<sub>40</sub> a všetky variácie karotenoidov sú od nej odvodené. Karotenoidy sú rozdelené do dvoch skupín: karotény a xantofyly. Karotény sú výhradne uhl'ovodíkové karotenoidy zložené len z atómov vodíka a uhlíka ako  $\alpha$ -karotén,  $\beta$ -karotén a lykopen. Xantofyly sú známe ako okysličené deriváty uhl'ovodíkov, ktoré obsahujú minimálne jednu -keto, -hydroxy alebo -epoxid funkčnú skupinu. Patria k nim zeaxantín a luteín (-hydroxy), spiriloxantín (-metoxy), anteraxantín (-epoxid) a ďalšie (Ramawat a Merillon, 2013). Za charakteristické žlté až červené sfarbenie sú zodpovedné reťazce konjugovaných dvojitych väzieb, ktoré sú v drvivej väčšine v polohe *-trans*. Podmieňujú sfarbenie plodov a kvetov rastlín, ale aj masla, zrníek kukurice a peria vtákov a ďalšie. Množstvo rastlinami produkovaných tetraterpénov (najmä  $\beta$ -karoténu a luteínu) sa odhaduje na 10<sup>8</sup> ton ročne (Nagy *et al.*, 2011).

Nechtík lekársky vo svojich súkvetiach hromadí veľké množstvo karotenoidov. V závislosti na množstve a zložení je odtieň a farba kvetov rôzna. Na množstvo karotenoidov v kvete nechtíku vplýva mnoho faktorov – odroda, kultivácia a čas zberu (Bakó *et al.*, 2002), tiež enviromentálne faktory ako minerálne zloženie pôdy, teplota, kyslík a svetlo (Piccaglia *et al.*, 1999). Celkový obsah karotenoidov sa zisťuje pomocou chromatografických metód ako stĺpcová chromatografia (CC), chromatografia na tenkej vrstve (TLC) a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). V nechtíku lekárskom sa obsah karotenoidov pohybuje v rozmedzí od 7-8 %. V extraktoch žltoranžových a oranžových lupeňoch kvetov bolo identifikovaných 19 rôznych karotenoidov. 10 karotenoidov je špecifických pre oranžovo sfarbené druhy, z nich sa v najväčšom množstve nachádza flavoxantín (Obr. 1), hlavný pigment nechtíkových kvetov, ktorý spôsobuje ich značné zafarbenie (Kishimoto, 2005). Ďalšie hlavné pigmenty sú luteín, rubixantín,  $\beta$ -karotén,  $\gamma$ -karotén a lykopen.



Obr. 1 Chemická štruktúra flavoxantínu.

### 2.2.2 Fytosteroly

Rastlinné steroly, fytosteroly, patria medzi tetracyklické lipofilné zlúčeniny prirodzene sa vyskytujúce v rastlinách. Sú stavebnou zložkou tiel rastlín, ktoré ovplyvňujú fyziologické procesy. Ich funkciou je tiež ovplyvňovanie permeability a zmena fluidity v bunke. Štruktúrna kostra fytosterolov je rovnaká ako kostra cholesterolu. Ich chemická štruktúra sa od štruktúry cholesterolu odlišuje len prítomnosťou modifikovaných postranných reťazcov na uhlíku C17 (Ling a Jones, 1995). Biosyntéza prebieha niekoľkými dráhami, napríklad polymeráciou izoprénu mevalonátovou dráhou. Touto polymeráciou vzniká skvalén, ktorý podlieha cyklizácii na 2,3-oxidoskvalén. Samotná syntéza prebieha pomocou 30 enzymaticky katalyzovaných reakcií. Enzymatické kroky u rastlín s fotosyntetickým aparátom premieňajú 2,3-oxidoskvalén na cykloartenol a ten je premieňaný na potrebný fytosterol (Benveniste, 1986; 2004).

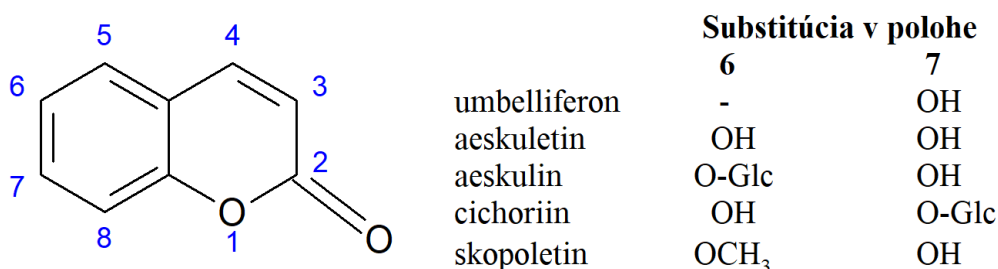
V prírode bolo identifikovaných približne 40 fytosterolov. Hydrogenáciou dvojitej väzby cholesterolu v polohe C5 vznikajú fytostanoly. Kampestanol a  $\beta$ -sitostanol sú nasýtené formy kampesterolu a  $\beta$ -sitosterolu (Ostlund *et al.*, 2003), pričom najviac vyskytujúci sa je  $\beta$ -sitosterol (65 %), kampesterol a v menšej miere stigmasterol. K identifikácii a kvantifikácii fytosterolov sa používajú metódy HPLC, plynová chromatografia s hmotnostným spektrometrom (GC-MS) a plynová rozdeľovacia chromatografia (GLC). Za ich využitia boli v nechtíku lekárskom identifikované nasledujúce steroly: cholestanol, kampestanol, stigmastanol, cholest-7-én-3- $\beta$ -ol, 24-metylcholest-7-én-3- $\beta$ -ol, stigmast-7-én-3- $\beta$ -ol, cholesterol, kampesterol, sitosterol, 24-metylcholesta-5,22-dién-3- $\beta$ -ol, 24-metylncholesterol, stigmasterol a klerosterol. Všetky identifikované steroly sa vyskytovali vo forme voľných zlúčenín, sterolových esterov, tiež glukozidov, acylovaných glukozidov a vo vode rozpustných komplexov (Adler a Kasprzyk, 1975).

### 2.2.3 Kumaríny

Kumaríny sú aromatické látky obsiahnuté hlavne v semenách a kvetoch rastlín. Svojou štruktúrou sú kumaríny deriváty  $\alpha$ -chromónu. Vznikajú z *cis*-formy kyseliny o-hydroxyškoricovej vytvorením laktónu. Prekurzory kumarínu v rastlinách sú glykozidy kyseliny o-kumarovej (*trans*-forma) a kyseliny kumarinovej (*cis*-forma), ktoré sú enzýmom isomerázou udržiavané vo vzájomnej rovnováhe (Spilková *et al.*, 2016). Glykozidy sa pri sušení štiepia a vytvára sa laktón voľnej kyseliny kumarinovej a kumaríny, ktoré sú zodpovedné za charakteristickú vôňu. V súčasnosti poznáme asi 1 300 kumarínových derivátov, pričom vo väčšom množstve sa vyskytujú iba v čeľadiach Fabaceae, Apiaceae, Asteraceae a Rutaceae (Nagy *et al.*, 2011).

V klinickej medicíne majú kumaríny hojné využitie. Za ich liečivý účinok je zodpovedný nenasýtený laktónový kruh. Kumaríny pozitívne pôsobia na centrálnu nervovú sústavu, majú hypnotické účinky, znižujú teplotu, senzibilizujú kožu na slnečné žiarenie a používajú sa preto k liečeniu vitiliga (Spilková *et al.*, 2016).

V kvetoch nechtíka sa vyskytuje malé množstvo kumarínov, prevažne hydroxykumarínov. Je detegovaných 5 derivátov (Obr. 2) – umbelliferon, aeskuletin, aeskulin, cichoriin a skopoletin (Olennikov a Kashchenko, 2014).



Obr.2 Chemická štruktúra kumarínu a jeho derivátov vyskytujúcich sa v nechtíku lekárskom.

## 2.2.4 Silice

Silice sú prchavé, olejovité, vonné látky, vo vode ťažko rozpustné a obvykle komplexného zloženia. Spravidla sa skladajú z veľkého počtu chemických zlúčenín, sú zastúpené látky všetkých biogenetických skupín. Najčastejšími zložkami sú monoterpény, seskviterpény a fenypropány. Seskviterpény a monoterpény nadobúdajú acyklickú, monocyklickú, bicyklickú a tricyklickú štruktúru. Silice získané z kvetov nechtíku lekárskeho boli zložené hlavne zo seskviterpénov. Farnezyldifosfát, ako ich prekurzor, vzniká spojením troch  $C_5$  stavebných jednotiek. Seskviterpény možno rozdeliť na mono- a di-seskviterpény. Väčšina je tvorená acyklickou alebo monocyklickou štruktúrou, pričom materská kostra vždy pochádza z  $C_{15}$  zlúčenín. Veľkú skupinu bicyklických mono-seskviterénov predstavujú mono-seskviterpénové laktóny so zabudovaným  $\gamma$ - alebo  $\delta$ -laktónovým kruhom. Z viac ako 4 000 štruktúr tohto typu bola väčšina izolovaná z čeľade *Asteraceae* (Nagy *et al.*, 2011).

Výťažok silíc z *Calendula officinalis* L. je 0,3% (Chalchat *et al.*, 1991), pričom analýza daného extraktu odhalila veľké množstvo chemických zlúčenín. Esenciálne oleje nechtíku lekárskeho sú charakterizované  $\gamma$ -murolénom,  $\delta$ -kadinénom,  $\alpha$ -muurololom,  $\tau$ -muurololom,  $\text{epi-}\alpha$  a  $\alpha$ -kadinolom v rôznom percentuálnom zastúpení podľa geografického pôvodu, vegetatívneho štádia a prípravy vzorku (Marczal *et al.*, 1987).

Extrakcia silíc nechtíku prebieha destiláciou s vodnou parou a následná analýza pomocou headspace-mikroextrakcie (HS-SPME) a GC-MS. Identifikovaných je približne 27 zlúčenín, avšak hlavnými komponentami extraktu nechtíku sú  $\delta$ -kadinén (22,5 %) a  $\alpha$ -kadinol (20,4 %) (Gazim *et al.*, 2008).

## 2.2.5 Polysacharidy

Polysacharidy sú jedným zo základných zdrojov organicky viazaného uhlíku v rastline, sú vo vode nerozpustné a majú hlavne stavebnú a zásobnú funkciu. Sú to vysokomolekulárne polykondenzáty, ktoré majú vo svojom reťazci zabudovaných viac ako 10 monosacharidových jednotiek. Podľa produktov vznikajúcich pri hydrolýze sa delia na pentozány ( $C_5H_8O_4$ )<sub>n</sub>, kedy hydrolýzou vznikli pentózy, a hexozány ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>, ktoré značia vznik hexóz. Z hľadiska zabudovania monosacharidových jednotiek sa rozdeľujú na homopolysacharidy – zostavené z rovnakých monosacharidov

a heteropolysacharidy, ktoré majú reťazec tvorený rôznymi stavebnými jednotkami. Medzi farmaceuticky dôležité heteropolysacharidy patria glukuronomanuronány (kyselina algínová), arabinogalaktány (arabská guma, tragant, slizy), ramnogalakturonány (pektíny) glykozaminoglykány (kyselina hyalurónová, heparín) a ďalšie (Spilková *et al.*, 2016).

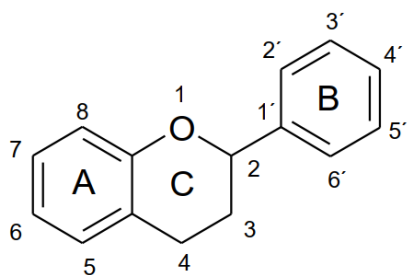
Percentuálne zastúpenie polysacharidov v nechtíku lekárskom tvorí približne 15 %. Bolo zistené, že polysacharidy obsiahnuté v danej rastline sú tvorené  $\alpha$ -D-galaktánmi s rozvetvením v pozícií C6. Sacharidová kompozícia vo vetvení zahŕňala glukózu, galaktózu, xylulózu, ramnózu a urónové kyseliny (Moiseeva a Belikov, 1992). V ďalších štúdiách boli v kvetoch nechtíku identifikované tri homogénne polysacharidy. Analýza ukázala, že všetky tri polysacharidy *Calendula officinalis* L. obsahujú (1 $\rightarrow$ 3) – viazaný  $\beta$ -D-galaktánový skelet s miestom vetvenia na C6, pričom bočné reťazce pozostávajú z krátkych jednotiek  $\alpha$ -arabinofuranóza-(1 $\rightarrow$ 3)-arabinofuranóza,  $\alpha$ -L-ramnopyranóza-(1 $\rightarrow$ 3)-arabinofuranóza a  $\alpha$ -L-arabinofuranóza (Varljen *et al.*, 1989).

## 2.2.6 Flavonoidy

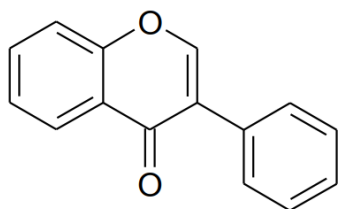
Flavonoidy sú sekundárne metabolity rozšírené hlavne v rastlinnej ríši, kde hrajú dôležitú funkciu pri regulácii rastu a obrane voči infekciám. Okrem ich prítomnosti v liečivých rastlinách sa vyskytujú aj v ovocí či zelenine. Bolo identifikovaných viac než 4 000 flavonoidov. V rastline sa vyskytujú väčšinou glykozidicky viazané, rozpustené v bunkovej šťave vakuol. Metoxylované sú lipofilné a vyskytujú sa tiež v siliciach (Spilková *et al.*, 2016). Flavonoidy majú dokázané biologické a terapeutické účinky. Významná je ich schopnosť eliminovať voľné kyslíkové radikály a reaktívne formy kyslíku. Majú schopnosť normalizovať permeabilitu kapilár a schopnosť pôsobiť antihemoragicky a antiedematózne. Zvyšujú účinok vitamínu C, ako pri posilnení imunity, tak pri zvyšovaní antioxidantnej aktivity. Majú tiež účinky choleretické, cholagogické a spazmolytické, z čoho vyplýva hepatoprotektívne pôsobenie flavonoidov (Tomko *et al.*, 1999).

Z hľadiska chemickej štruktúry je základom flavonoidov flavanové jadro (Obr. 3) a základnú štruktúru izoflavonoidov tvorí izoflavan (Obr. 4). Štruktúra flavanu pozostáva z difenylpropánu (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), ktorého dve benzenové jadrá sú spojené tromi uhlíkmi, ktoré spolu s kyslíkom formujú heterocyklus (2H-pyrán). Tieto tri kruhy označujeme A, B,C, z toho kruh A pri syntéze najčastejšie vychádza z rezorcinolu alebo

1,3,5-trohydroxybenzénu, produktov acetátovej dráhy, zatiaľ čo kruh B vychádza z dráhy šikimátovej. (Bravo, 1998; Croft, 1998; Wollgast a Anklam, 2000).



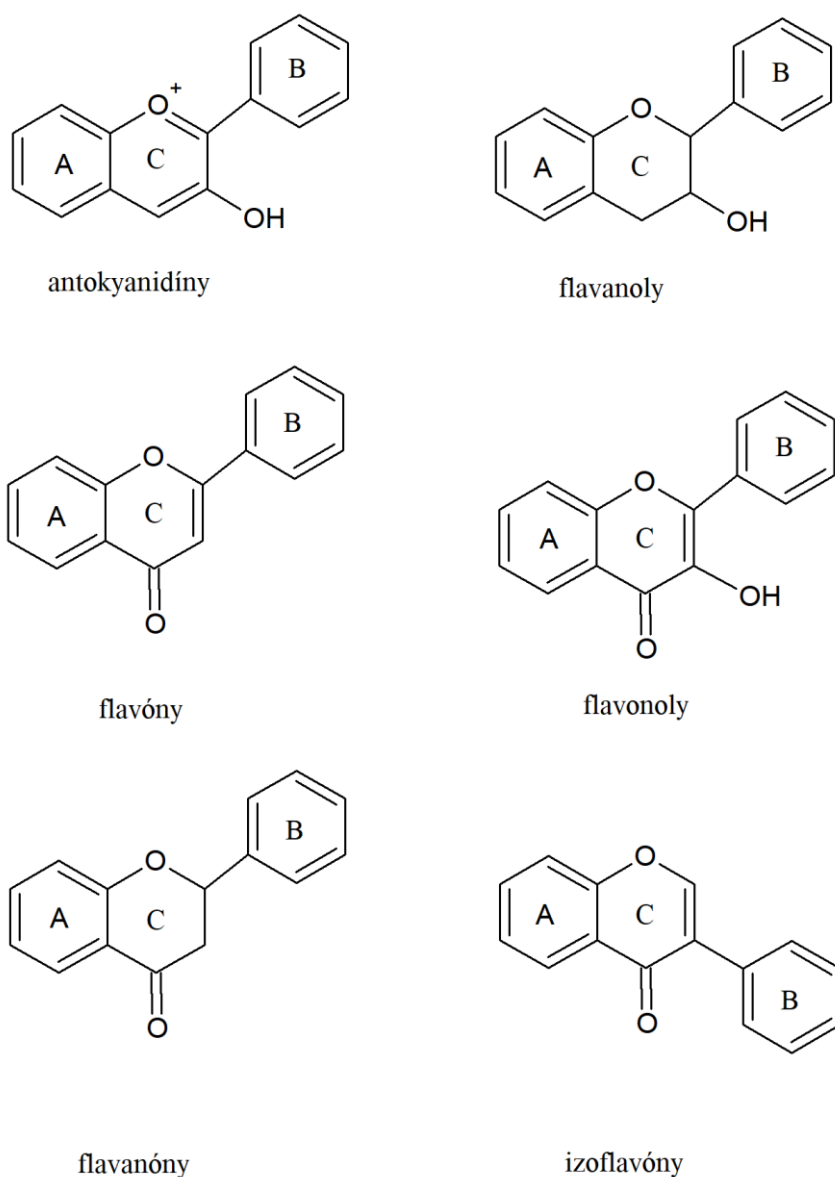
Obr.3 Flavanové jadro.



Obr.4 Izoflavanové jadro.



Podobne ako kruh A, sú aj kruhy B a C odvodené z metabolizmu glukózy, vznikajú však zo šikimátovej dráhy, ďalej cez deväť-uhlíkaté kyseliny (napr. kyselinu *trans*-škoricovú, 4-hydroxyškoricovú a kumarovú). Aktivované formy týchto kyselín s CoA kondenzujú so šesťuhlíkatými produktami odvodenými od malonátu za vzniku chalkónov (C<sub>15</sub>). Následuje uzatvorenie kruhu a hydratačné reakcie dávajúce vznik rôznym flavonoidom (Formica a Regelson, 1995; Rice-Evans *et al.*, 1995; Wollgast a Anklam, 2000). Rozlišujeme tieto triedy flavonoidov: flavanoly, flavóny, flavonoly, flavanóny, izoflavóny a antokyanidíny (Obr. 5) (Heim *et al.*, 2002; Havsteen, 2002).



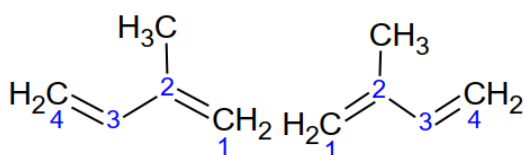
Obr. 5 Hlavné triedy flavonoidov.

Vo flavonoidoch pochádzajúcich z liečivých rastlín boli potvrdené rôzne prospešné farmakologické vlastnosti, ako vazoprotektívne, protikarcinogénne, antineoplastické, antivírusové, protizápalové, ale aj antialergické účinky a antiproliferatívna aktivita na nádorové bunky (Kuhnau, 1976; Middleton a Kandaswami, 1992; Carr *et al.*, 2000). Niektoré z týchto vlastností súvisia s účinkom týchto zlúčenín ako antioxidantov, vychytávačov voľných radikálov a inhibítorov peroxidácie. Antioxidačná aktivita fenolických zlúčenín koreluje so vzťahmi medzi aktivitou a štruktúrou, ako sú redoxné vlastnosti a počet a usporiadanie hydroxylových skupín (Cotelle *et al.*, 1996). V kvetoch nechtíku lekárskoho sa množstvo flavonoidov pohybuje v rozmedzí 0,3 – 0,8 %. Zistilo sa, že obsahujú rutín, izokvercetín, kvercetín-3-O-rutinozylramnozid, izoramentín-3-O-rutinozylramnozid, izoramentín-3-O-glykozyglukozid a izoramentín-3-O-glukozid (Billia *et al.*, 2001).

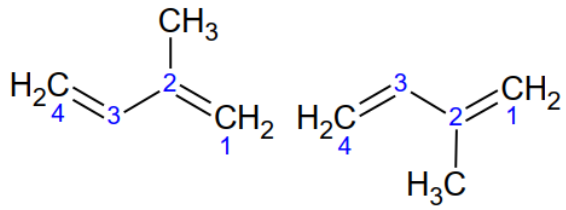
## 2.2.7 Terpény

### 2.2.7.1 Základná charakteristika

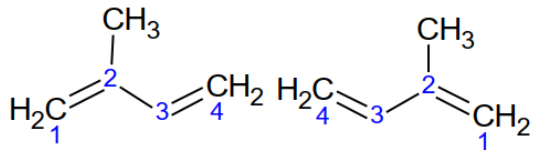
Terpény predstavujú najrozmanitejšiu skupinu prírodných látok, ktoré sa vyskytujú v rastlinách ako zložky silíc, živíc, balzamov či mliečnych štiav. V rastline plnia mnoho funkcií: stabilizujú membrány, transportujú elektróny, podieľajú sa na fotosyntéze, sú súčasťou farbív a slúžia ako rastlinné hormóny. Sú to malé organické zlúčeniny, ktorých molekuly sú tvorené izoprenovými jednotkami (2-metyl-1,3-butadién), čo sú päťuhlíkaté opakujúce sa fragmenty izoprénu. Molekuly terpénov vznikajú spojením dvoch a viac izoprenových jednotiek podľa tzv. izoprenového pravidla. Atóm uhlíku C1 je začiatkom jednotky („hlava“) a atóm C4 je koncom („chvost“). Terpény môžu vznikáť tromi spôsobmi: „hlava-hlava“ (Obr. 6), „hlava-päta“ (Obr. 7), „päta-päta“ (Obr. 8) (McMurry, 2004).



Obr. 6 Izoprenové spojenie „hlava-hlava“.



Obr. 7 Izoprénové spojenie „hlava-päta“.



Obr. 8 Izoprénové spojenie „päta-päta“.

V organizmoch sú syntetizované postupnou kondenzáciou ich prekurzorov, izopentenylidifosfátom a dimetylalylidifosfátom. Kyslíkaté a iné deriváty terpénov sú označované ako terpenoidy či izoprenoidy (Cowan, 1999). Medzi terpenoidné kyslíkaté deriváty radíme alkoholy, aldehydy, ketóny a karboxylové kyseliny. Vyskytujú sa ako skupina metabolitov vytváraných všetkými vyššími rastlinami, a to primárnymi (giberelíny, karotenoidy) alebo sekundárnymi metabolitmi (terpény éterických olejov).

### **2.2.7.2 Klasifikácia**

Terpény delíme podľa počtu izoprenových jednotiek, ktoré molekulu tvoria na:

- hemiterpény (1 x C<sub>5</sub>)
- monoterpény (2 x C<sub>5</sub>)
- seskviterpény (3 x C<sub>5</sub>)
- diterpény (4 x C<sub>5</sub>)
- sesterpény (5 x C<sub>5</sub>)
- triterpény (6 x C<sub>5</sub>)
- tetraterpény (8 x C<sub>5</sub>)
- polyterpény (n x C<sub>5</sub>)

Hemiterpény sú päťuhlíkaté zlúčeniny, ktoré nemajú priame farmaceutické využitie. 3-metyl-2-butén-1-ol (dimetylalylalkohol) a 3-metyl-3-butén-1-ol (izopentenylalkohol) sú dve hlavné hemiterpénové zlúčeniny, ktoré sa v rastlinách vyskytujú väčšinou vo forme difosfátov. Ďalším hlavným hemiterpénom je izoprén, ktorý sa považuje za hypotetický stavebný kameň terpénov. Je produktom biosyntézy mnohých rastlín a ako prchavá zložka spolu s 2-metyl-3-butén-2-ol sú uvoľňované do ovzdušia. Tvorba týchto látok sa zdá byť regulovaná v závislosti od množstva vody, teplotných a svetelných podmienok (abiotický stres) a často sú vylučované do ovzdušia vo veľmi veľkých množstvách, až do 15 % všetkého uhlíka viazaného rastlinou (Nagy *et al.*, 2011).

Monoterpény sú tvorené dvoma izoprénovými jednotkami a ich prekurzorom je geranylidifosfát. Delia sa na acyklické, monocyklické a bicyklické. Objavujú sa vo forme jednoduchých uhl'ovodíkov alkoholov, kyselín, aldehydov a esterov. V súčasnosti je známych asi 50 monoterpenických zlúčenín, prevažujúce sú ich alkoholy – linalool,

geraniol, nerol,  $\alpha$ -terpineol, citronellol a ho-trienol (Pavloušek, 2007). Monoterpény, ako ekologicky dôležité látky, sú sekundárne metabolity ktoré sú rastlinami vylučované do vzduchu a chovajú sa ako chemické signály medzi rastlinami a ich životným prostredím. Fungujú ako lákadlo opelujúceho hmyzu, ale na druhú stranu majú tiež významný odpudivý účinok pre byľinožravý hmyz a sú chemickou ochranou voči útoku patogénnych mikroorganizmov a húb (Loomis a Gerakis, 1975).

Seskviterpény vznikajú spojením troch  $C_5$  stavebných jednotiek ako farnezyldifosfát. Je identifikovaných viac ako 8 000 zlúčenín a tvoria rozmanitú skupinu s viac ako 300 rôznymi základnými štruktúrami sekundárnych metabolitov s celkovým zastúpením až 25 % spomedzi všetkých terpenov. Najväčší výskyt seskviterpenov je v siliciach. Rozdeľujeme ich na mono- a di-seskviterpény, tie ďalej môžeme deliť podľa štruktúry na acyklické, monocyklické a bicyklické. Po chemickej stránke sem patria niektoré nenasýtené uhlíkovodíky, ale väčšina sú alkoholy, ketóny alebo kyseliny (Nagy *et al.*, 2011).

Diterpény tvoria štyri päťuhlíkaté stavebné podjednotky a ich prekurzor tvorí geranylgeranyldifosfát, ktorý vzniká adíciou molekuly izopentenyldifosfátu na farnezylfosfát. Z hľadiska chemických vlastností sú veľmi podobné seskviterpenom, ktoré však nachádzame v podobe bezfarebných olejovitých tekutín, diterpény sú kryštalické látky. Rozdeľujú sa na acyklické, monocyklické, bicyklické, tricyklické a tetracyklické typy. Najdôležitejšie skelety vytvorené z geranylgeranyldifosfátu sú labdán, klerodán, taxán, abietán, pimarán a kaurán (Nagy *et al.*, 2011).

Sesterpény predstavujú skupinu 25 uhlíkových sekundárnych metabolitov. Pochádzajú z geranylfarnezyldifosfátu a nachádzajú sa predovšetkým v hubách a morských organizmoch a zriedkavo v rastlinách. Sesterpény boli predmetom mnohých nedávnych výskumov zameraných na štrukturálne, chemické a biologické charakteristiky a zistilo sa, že vykazujú široké spektrum biologických aktivít proti baktériám, hubám a hlístovcom (Cimmino *et al.*, 2014).

Triterpény sa vyskytujú vo forme alifatických, tetracyklických alebo pentacyklických 30-uhlíkatých zlúčenín, ktoré vznikli spojením dvoch molekúl farnezyldifosfátu za vzniku skvalénu. Ten oxiduje na svoj 2,3-epoxid, ktorý cyklizuje na tetracyklický lanosterol (v hubách a živočíchoch) alebo kukurbitán, prípadne na pentacyklický cykloartenol (v rastlinách). Priestorové poskladanie skvalén 2,3-epoxidu vedie cez

tetracyklický dammarán ku vzniku pentacyklických derivátov lupánu,  $\alpha$ -amyrínu a  $\beta$ -amyrínu (Nagy *et al.*, 2011). Triterpény existujú v rastlinách v jednoduchej nemodifikovanej forme, často sa akumulujú ako konjugáty so sacharidmi a inými makromolekulami, najmä ako triterpénové glykozidy. Triterpénové glykozidy majú významné ekologické a agronomické funkcie, ktoré prispievajú k odolnosti rastlín proti škodcom a patogénom a ku kvalite pestovateľských plodín. Majú tiež širokú škálu komerčných aplikácií v potravinárskych, kozmetických, farmaceutických a biotechnologických sektoroch (Augustin *et al.*, 2011).

Tetraterpény vznikajú spojením ôsmich izoprenoidných jednotiek  $C_5$ , pričom dve molekuly geranylgeranyldifosfátu kondenzujú na 40-uhlíkovú zlúčeninu fytoén. Pre ne charakteristická je konjugácia veľkého množstva dvojitych väzieb, vďaka ktorým môže dochádzať k absorpcii fotónov v oblasti viditeľného svetla. To je príčinou pozorovania sfarbenia zlúčenín tetraterpénov. Ich alifatické alebo cyklické molekuly sú teda spojené dlhým reťazcom konjugovaných väzieb. Omnoho typickejšie sú však zložité cyklické systémy. V priebehu ich biosyntézy dochádza k hydrogenácii (Waisser a Palát, 2001).

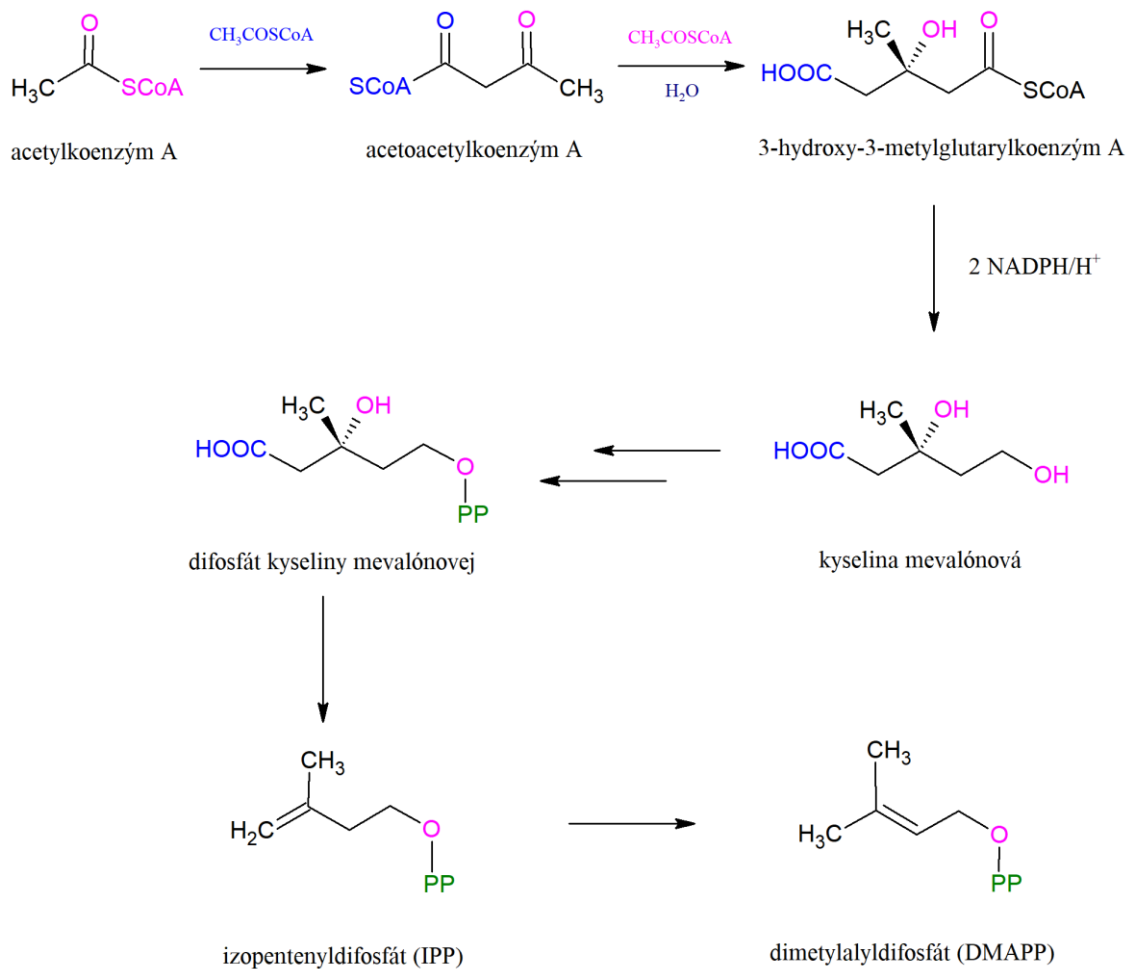
Polyterpény sú zlúčeniny obsahujúce veľké množstvo izoprenových jednotiek s molekulovou hmotnosťou viac ako 100 000. Biosyntéza začína adíciou izopentenylidifosfátu k farnezyldifosfátu alebo geranylgeranyldifosfátu za účasti špecifických prenyltransferáz zabezpečujúcich *cis*- alebo *trans*- usporiadanie dvojitych väzieb. Hlavní predstavitelia polyterpénov sú kaučuk a gutaperča (Nagy *et al.*, 2011).

### **2.2.7.3 Biosyntéza**

Terpenoidy sa formálne odvodzujú spojovaním izoprenových jednotiek podľa izoprenového pravidla. V tejto syntéze sa však uplatňuje „ekvivalent izoprenu“ nazývaný izopentenylpyrofosfát (IPP). Podľa štruktúry výsledného terpenoidu a podľa organizmu, kde ku syntéze dochádza, môže prebiehať dvoma cestami – mevalonátovou a metylerytritolovou. Vo väčšine rastlinných a živočíšnych organizmov vznikajú seskviterpény a triterpény z mevalonátu ((*R*)-3,5-dihydroxy-3-metylpentanoát), kým kľúčovou zlúčeninou pre biosyntézu monoterpénov, diterpénov a tetraterpénov je 1-deoxyxylulóza-5-fosfát (McMurry, 2004).

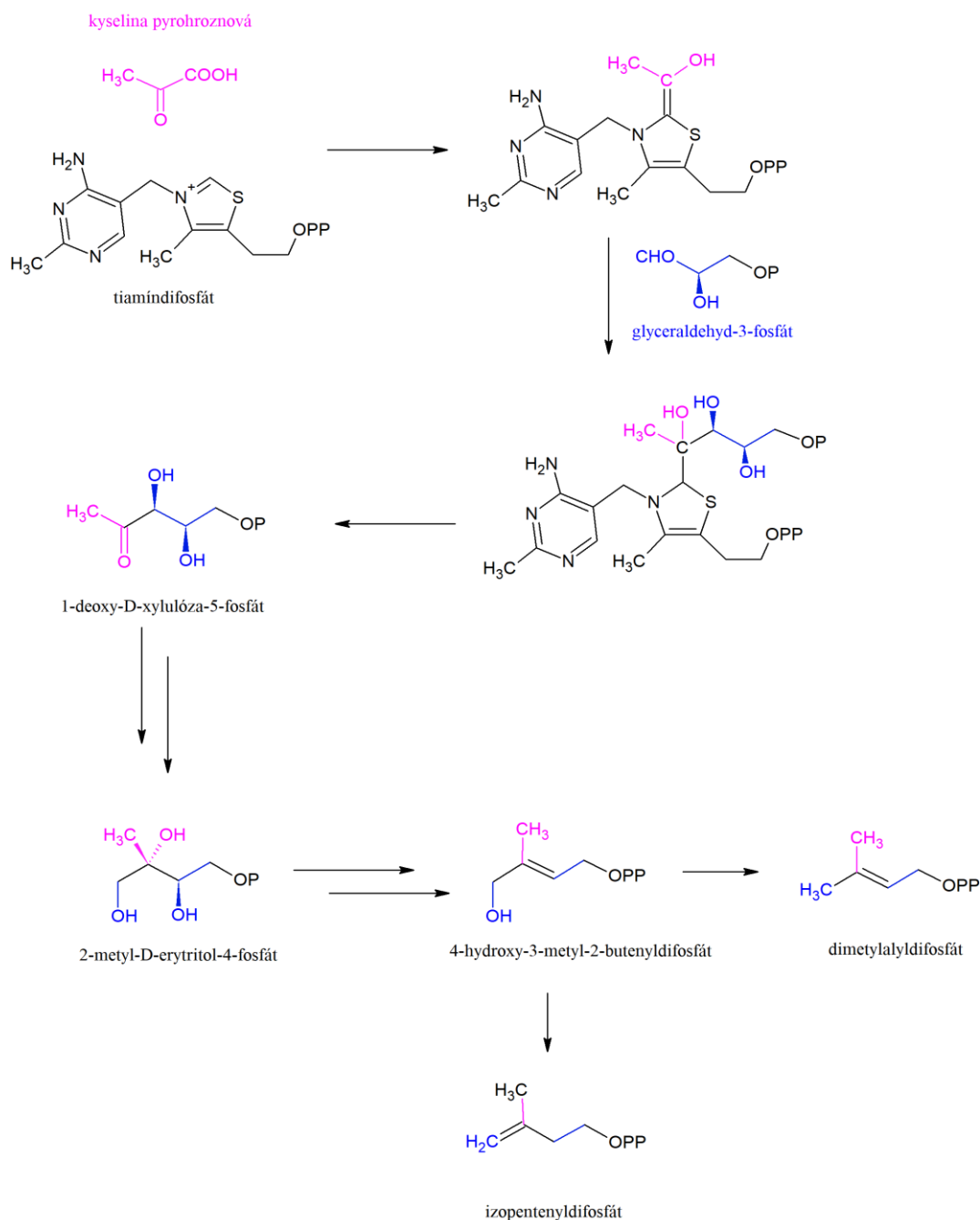
Mevalonátová cesta biosyntézy (Obr. 9) začína konverziou acetátu na acetylkoenzým A, po nej nasleduje Claisenova kondenzácia za vzniku acetoacetylkoenzýmu A. Túto reakciu katalyzuje enzým acetoacetyl-CoA-acetyltransferáza. Dochádza k aldolizácii

s ďalšou molekulou acetyl-CoA a hydrolyzou vzniká 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA. Ten sa redukuje na mevalonát a následnou fosforyláciou oboch hydroxylových skupín a dekarboxyláciou dostávame prekursor terpenoidov – izopentenyldifosfát, ktorý môže izomerizovať na dimetylalyldifosfát (McMurry, 2004).



Obr. 9 Mevalonátová cesta syntézy terpenov (prevzaté podľa Nagy *et al.*, 2011).

Metyleritritolová dráha (Obr. 10), prebiehajúca v plastidoch, zahŕňa nasledujúce reakcie: adíciu pyruvátu na tiamíndifosfát za vzniku hydroxyetyltiamínového derivátu, jeho adíciu na C<sub>3</sub> jednotku – glyceraldehyd-3-fosfát za vzniku dihydroxypentyltiamínového derivátu a elimináciu tiamíndifosfátu za vzniku prvého C<sub>5</sub> medziproduktu 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu, ktorý po redukcii tvorí 2-metyl-D-erytritolfosfát. Až v tejto molekule je zafixovaná štruktúra vznikajúceho IPP a DMAPP (Nagy *et al.*, 2011).



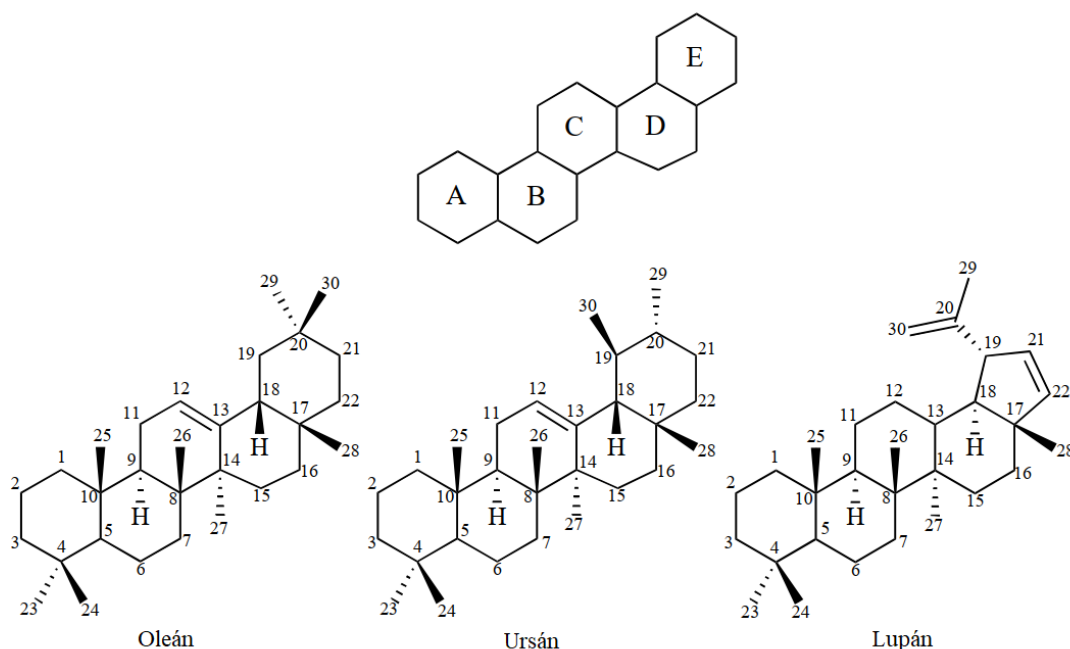
Obr. 10 Metyleritritolová cesta biosyntézy terpénov (prevzaté podľa Nagy *et al.*, 2011).



Ďalšie kroky biosyntézy pokračujú adíciou dimetylallyldifosfátu na izopentyldifosfát za vzniku geranyldifosfátu (GPP) – ten je základnou jednotkou vzniku monoterpénov. Po spojení dvoch molekúl geranyldifosfátu vzniká geranylgeranyldifosfát (GGPP), ktorý je prekuzorom diterpénv. Prekuzorom seskviterpénov je farnezyldifosfát (FPP), ktorý vzniká pridaním ďalšej molekuly IPP ku geranyldifosfátu. Farnezyldifosfát dimerizuje na najjednoduchší triterpén – skvalén. Dve molekuly geranylgeranyldifosfátu vytvárajú základný tetraterpén – fytoén (Nagy *et al.*, 2011).

### 2.3 Pentacyklické triterpenoidy

Pentacyklické triterpény sú v prírode veľmi často vyskytujúce sa sekundárne metabolity, ktoré vznikli cyklizáciou skvalénu. Môžu byť rozdelené do troch hlavných tried: lupán, oleán a ursán (Obr. 11), pričom každá z tried obsahuje dôležité bioaktívne zlúčeniny. Tieto terpény sa vyskytujú hlavne na povrchoch rastlín, ako je epiderma stonky a listy (Jäger *et al.*, 2009). Najrozšírenejšie metabolity odvodené od oleánu sú  $\alpha$ -amyrín a  $\beta$ -amyrín. Kyselina  $\beta$ -boswellová je najvýznamnejší derivát ursánu a medzi lupánový typ patrí kyselina betulínová a betulín (Nagy *et al.*, 2011).



Obr. 11 Základná štruktúra hlavných bioaktívnych pentacyklických triterpenoidov (prevzaté a upravené od Alqahtani *et al.*, 2013).

### 2.3.1 Biologická aktivita

Triterpenoidy sú biologicky aktívne zlúčeniny nachádzajúce sa v mnohých liečivých rastlinách. Spomedzi nich, skupina pentacyklických triterpenoidov našla široké farmaceutické využitie spojené s protinádorovou a protivírusovou aktivitou. Protinádorová aktivita triterpenoidov spočíva v aktivácii apoptózy, protizápalovej, imunomodulačnej a antioxidantnej aktivity. Tiež zabraňujú proliferácii buniek (Shanmugam *et al.*, 2012). Najaktívnejšie látky proti rozvoju rakoviny sú kyselina asiátová, kyselina betulínová, kyselina boswellová, glycyrizín, lupeol, kyselina oleánová, kyselina ursánová a ich analógy a deriváty. Tieto zlúčeniny vykazujú taktiež protivírusovú aktivitu, čo z nich robí potencionálne užitočné aditíva pre súčasnú anti-HIV terapiu (Yu *et al.*, 2005).

Najväčšie využitie pentacyklických triterpenoidov má však ich protizápalová aktivita, ktorá bola dokázaná podráždením myších uší a následným lokálnym užitím triterpenoidných esterov a bol pozorovaný ich silný antiedematózný účinok. Ako najúčinnšie zložky užitého extraktu boli identifikované predovšetkým faradiolové estery (Zitterl-Eglseer *et al.*, 2001).

### 2.3.2 Pentacyklické triterpenoidy nechtíku lekárskeho

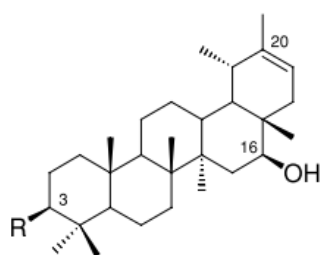
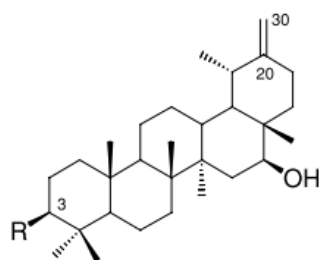
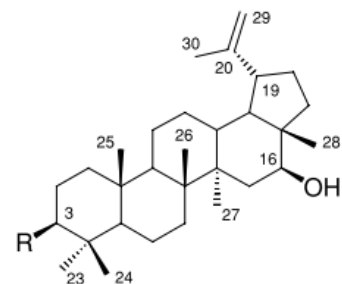
Kvety nechtíku lekárskeho sú bohaté na pentacyklické mono-, di- a tri-hydroxy triterpenoidy, ktoré boli izolované vo voľnej forme a forme esterov (Wilkomirski a Kasprzyk, 1979; Ukiya, 2001). Extrakty z vysušených kvetov obsahujú 9 bioaktívnych monoesterov – faradiol-3-O-palmitát, faradiol-3-O-myristát, faradiol-3-O-laurát, arnidiol-3-O-palmitát, arnidiol-3-O-myristát, arnidiol-3-O-laurát, kalenduladiol-3-O-palmitát, kalenduladiol-3-O-myristát a v stopovom množstve kalenduladiol-3-O-laurát (Obr. 12). Z daných pentacyklických triterpenoidov je v najväčšom množstve v kvetoch nechtíka obsiahnutý faradiol a jeho estery, najmä faradiol-3-O-palmitát (Neukirch *et al.*, 2004). Mnohé biologické skúšky dokázali, že protizápalové látky u extraktov nechtíku lekárskeho sú triterpenoidy. Z nich predovšetkým faradiolmonoester sa zdá byť zodpovedný za tento účinok, a to aj z dôvodu, že je v droge obsiahnutý v najväčšom množstve. Protizápalová aktivita rôznych extraktov je úmerná obsahu faradiolmonoesteru, ktorý môže slúžiť ako vhodný parameter, pre hodnotenie kvality prípravkov o obsahom nechtíku lekárskeho (Della Loggia *et al.*, 1994; Kašparová, 2008).

**Zlúčenina**

Faradiol-3-O-palmitát  
Faradiol-3-O-myristát  
Faradiol-3-O-laurát  
Arnidiol-3-O-palmitát  
Arnidiol-3-O-myristát  
Arnidiol-3-O-laurát  
Kalenduladiol-3-O-palmitát  
Kalenduladiol-3-O-myristát  
Kalenduladiol-3-O-laurát

**R**

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}$   
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO}$   
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}$   
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}$   
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO}$   
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}$   
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}$   
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COO}$   
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}$

**Faradiol****Arnidiol****Kalenduladiol**

Obr. 12 Štruktúra triterpenoidných monoesterov izolovaných z nechtíku lekárskeho (prevzaté a upravené podľa Neukirch *et al.*, 2004).

## 2.4 Metódy používané k analýze prírodných látok

### 2.4.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) v súčasnosti patrí medzi často využívanú metódu separácie, a to pre jej vysokú selektivitu, citlivosť a pre možnosť analýzy veľkej série vzoriek či zložitých zmesí. Radí sa k separačným metódam, ktoré sú založené na rozdelení látok medzi dve rôzne nemiešateľné fáze, a to pohyblivú (mobilnú) fázu a nepohyblivú (stacionárnu) fázu. Bežnými mobilnými fázami pre HPLC sú kombinácie vody s organickými rozpúšťadlami. Ich zloženie a teplota hrajú dôležitú úlohu v separačnom procese tým, že ovplyvňujú interakcie medzi zložkami vzorky a sorbentom. Každý analyt vo vzorke interaguje so stacionárnou fázou kolóny rozdielne, takže sa každý v kolóne zdržuje iný čas (retenčný čas). Analyt je z kolóny eluovaný v krátkom čase, keď je interakcia slabá, naopak ak je interakcia silná, potom je elučný čas dlhší, tj. zložky vzorky zmesi sú od seba separované na základe rozdielneho stupňa ich interakcie s časticami sorbentu v kolóne. Elúcia sa volí podľa rozdielnosti fyzikálno-chemických vlastností skúmaných látok v jednej vzorke a podľa ovplyvnenia separácie povahou oboch fáz medzi izokratickou a gradientovou. Pri gradientovej elúcii je zloženie mobilnej fáze menené v prospech zložky s vyššou elučnou silou a izokratická elúcia predstavuje elúciu mobilných fáz o konštantnom zložení. Jednotlivé oddelené zóny analytov sú premieňané do podoby chromatografického záznamu s charakteristickými krivkami (píkmi) pri prechode detektorom (Nováková a Douša, 2013).

HPLC aparátúra pre chromatografickú analýzu obvykle pozostáva zo zásobných nádob mobilných fáz, odplyňovača, vysokotlakového čerpadla, zmiešavacieho zariadenia, dávkovacieho zariadenia, chromatografickej kolóny, detektoru a systému na vyhodnotenie signálu. Analýza začína nástrekom látky na kolónu a akonáhle látka kolónu opustí, prejaví sa signál na detektore. Koncentračný profil zóny je predstavovaný priebehom píku. Preto je plocha píku zhodná s množstvom látky v zóne a je základným podkladom pre kvantitatívnu analýzu. Obsah látky v neznámom vzorku sa na základe zistených plôch píku určuje relatívne, preto je nutné použitie štandardu o známej koncentrácii (Nováková a Douša, 2013).

## 2.4.2 Hmotnostná spektrometria (MS)

Medzi fyzikálno-chemické metódy patrí hmotnostná spektrometria (MS), ktorá slúži na určovanie hmotnosti iónov vznikajúcich z atómov či molekúl. Hmotnostný spektrometer sa skladá z iónového zdroja, do ktorého vstupuje analyt a kde dochádza k jeho ionizácii, z analyzátoru, v ktorom prebieha jeho separácia na základe pomeru hmotnosti a náboja ( $m/z$ ) a detektoru, kde dochádza k samotnej detekcii iónov (Gross, 2011).

Keďže hmotnostný spektrometer je schopný zaznamenať len analyt nesúci náboj, musí prebiehať proces ionizácie. Pri spojení s kvapalinovou chromatografiou sa najviac využíva metóda ionizácie elektrosprejom (ESI), následne chemická ionizácia za atmosferického tlaku (APCI) a v prípade vysoko nepolárnych analytov fotoionizácia za atmosferického tlaku (APPI). Z toho vyplýva, že podľa vlastností analytu, hlavne polaritu a molekulovej hmotnosti sa vyberá ionizačná technika (Kromidas, 2017).

Hmotnostný analyzátor slúži k rozdeleniu iónov podľa ich pomeru  $m/z$  a je umiestnený za iónovým zdrojom, kde boli neutrálne molekuly prevedené na ióny. Rozdeľujú sa na 4 skupiny: sektorové (magnet a elektrostatický analyzátor), kvadrupólové (kvadrupólový hmotnostný filter a „iónová pasca“), preletové (analyzátor doby letu) a odvodené od princípu uchovávaní iónov (Van Eeckhaut *et al.*, 2009).

Koncovým zariadením je detektor. Najjednoduchším detektorom v hmotnostnej spektrometrii je Faradayova klietka, v praxi sa využívajú hlavne elektrónové násobiče alebo fotonásobiče (Gross, 2011).

Pri použití dvoch hmotnostných analyzátorov sa jedná o tandemovú hmotnostnú spektrometriu (MS/MS). V prvom kroku vznikajú ióny, z ktorých je požadovaný ión separovaný. Analyzované sú až ióny, ktoré vznikajú reakciou z tohto požadovaného iónu. Detekcia daných iónov prebieha často v móde SRM (Selected reaction monitoring). Táto neskenovacia technika realizovaná na zariadení s trojitým kvadrupólom využíva fragmentáciu k zvýšeniu selektivity. Práve pre tieto experimenty sa využíva spojenie dvoch hmotnostných spektrometrov (Lange *et al.*, 2008).

## 2.4.3 Priame spojenie ultra vysoko účinnej kvapalinovej

### chromatografie a hmotnostnej spektrometrie (UHPLC-MS/MS)

V súčasnej dobe je najúčinnnejším nástrojom na identifikáciu a štruktúrnu analýzu priama kombinácia kvapalinovej chromatografie s vysokou separačnou schopnosťou

a hmotnostnej spektrometrie – vysoko citlivej identifikačnej techniky. Primárnou požiadavkou pre spojenie HPLC-MS je odstránenie zložiek mobilnej fázy pred samotnou ionizáciou. K tomu sa v súčasnosti používajú hlavne sprejové ionizačné techniky, ktoré sú konštrukčne vybavené tak, aby boli schopné odvieť čo najväčšie množstvo prchavých látok kvapalnej mobilnej fázy pred vstupom do hmotnostného analyzátoru. Voľba hmotnostného analyzátoru je subjektívna, keďže sa riadi požadovaným rozsahom, rozlíšením a prevádzkovými nákladmi. Chromatografická kolóna sa vyberá podľa požiadaviek pre separáciu daných látok. V praxi sú využívané kratšie kolóny (5 – 15 cm) s menším vnútorným priemerom (2 mm) a stacionárnou fázou s veľkosťou častíc 3 – 4  $\mu\text{m}$ , kde je aplikovaný prietok mobilnej fázy v rádoch desiatín  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  (Štulík, 2004). Termínom UHPLC je myslený chromatografický proces, ktorý okrem vysokých tlakov tiež používa špeciálne kolóny naplnené časticami pod 2  $\mu\text{m}$  s nízkym rozptylom, čím sú dosiahnuté citlivejšie a rýchlejšie analýzy a lepšie výsledky. UHPLC teda prináša radu výhod oproti klasickej HPLC technike, a to kratšiu dobu analýzy, zníženie limitu detekcie, zvýšenie separačnej účinnosti a zvýšenie citlivosti. Nevýhodou je nutnosť vysokotlakových čerpadiel, ktorých cena je v porovnaní s bežnými HPLC čerpadlami vyššia (Veuthey, 2012).

Po meraní pomocou metódy UHPLC možno každú látku vyhodnocovať kvalitatívne alebo kvantitatívne. Kvalitatívna analýza značí identifikáciu látok, ktoré sú určené na základe integrácie pík v chromatografických softwaroch. Naopak kvantitatívne hodnotenie sa zaoberá vzťahom medzi množstvom eluovanej látky a charakteristikami píku. Tieto veličiny sú relatívne, preto je nutné vzťah medzi nameranou hodnotou a neznámou koncentráciou stanoviť empiricky. Používajú sa 4 základné inštrumentálne metódy: metóda vonkajšieho štandardu, vnútorného štandardu, prídavku štandardu a vnútornej normalizácie. (Nováková a Douša, 2013).

#### **2.4.4 UHPLC-UV**

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia spojená s UV detekciou slúži k detekcii a identifikácii analytov vo vzorke. Princíp UV detektoru je založený na absorpcii svetla pri rôznych vlnových dĺžkach. UHPLC za použitia UV detektoru sa využíva v mnohých laboratóriách – genómových, biologických a biochemických. Taktiež na analýzu nukleových kyselín, proteínov a na testovanie toxických a terapeutických liečiv. Detektory sú rozdelené na dva typy – detektor s jednou vlnovou dĺžkou, ktorý

premeriava absorpciu vzoriek pri konštantnej vlnovej dĺžke a detektor s premenlivou vlnovou dĺžkou, ktorý meria absorpciu vzoriek pri viacerých vlnových dĺžkach a je preto citlivejší. Pri metóde UHPLC-UV sa zvažujú podmienky detekcie, najmä rozsah detekcie, v ktorej je daná látka analyzovaná (<https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/13036-HPLC-UV-Detector-UV-Visible-HPLC-Detectors/>).

## **3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Rastlinný materiál**

Faradiol bol v tejto bakalárskej práci analyzovaný u 31 genotypov nechtíku lekárskeho z genofondovej kolekcie na Oddelení genetických zdrojov zelenín, liečivých rastlín a špeciálnych plodín Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. v Olomouci. Vypestovaný biologický materiál bol odobratý v lete 2016, následne voľne vysušený pri laboratórnej teplote a z jednotlivých genotypov boli vytrhané jazykovité kvety a použité na ďalšiu analýzu.

#### **3.1.2 Použité chemikálie**

Acetonitril (Biosolve, Holandsko)

Betulín (PhytoLab, Nemecko)

Chloroform (Penta, Česká Republika)

Dietyléter (Lach-Ner, Česká Republika)

Dichlórmetán (Penta, Česká Republika)

Faradiol (PhytoLab, Nemecko)

Kyselina mravčia (98-100%, Merck KGaA, Nemecko)

Kyselina octová (100%, Merck KGaA, Nemecko)

Metanol ( $\geq 99,9\%$ , Honeywell, Nemecko)

Metoxid sodný (25% wt. v metanole, Sigma-Aldrich, USA)

Voda (VWR Chemicals, Francúzsko)

#### **3.1.3 Prístroje a pomôcky**

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Poľsko)

Centrifugačné skúmavky 15 ml (CentriStar Corning, USA)

Dávkovač Accumax s recirkulačným ventilom (Accumax Lab Devices, India)

Digitálna suchá kúpeľ (Hangzhou Miu Instruments, Čína)



Filtračná centrifuga (Hermle, Nemecko)

Hmotnostný spektrometer s ionizáciou elektrosprejom TSQ Quantum ACCESS MAX (Thermo Fisher Scientific, USA)

Chladená mikrocentrifúga (LabNet, USA)

Chromatografická kolona Acquity UPLC® BEH C18; 2,1 x 50 mm, veľkosť častíc 1,7 μm (Waters, Írsko)

Kryo skúmavky 2 ml so šróbovacím vrchnákom (Sarstedt, Nemecko)

Kvapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 s detektorom diodového poľa (Thermo Fisher Scientific, USA)

Mikroskúmavky 2 ml (Eppendorf, Nemecko)

Oscilačný mlyn MM 400 (Retsch, Nemecko)

pH-meter CX 505 (Elmetron, Poľsko)

Pipety (Eppendorf, Nemecko)

Pipety BioPette Plus (Labnet, USA)

Software Thermo Xcalibur verzia 3.1 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Suchá kúpeľ (Cleaver Scientific Ltd, Veľká Británia)

Ultrazvukový kúpeľ AU-32 (ARGO LAB, Nemecko)

Ultrazvukový kúpeľ SONOREX DIGITEC (Bandelin, Nemecko)

Vortex (VELP Scientifica, Taliansko)

## **3.2 Použité metódy**

### **3.2.1 Spracovanie rastlinného materiálu**

Jednotlivé jazykovité kvety nechtíku lekárskeho boli vybrané z rôznych súkvetí jedného genotypu, aby analyzovaný materiál predstavoval reprezentatívnu vzorku. Bol navážený približne 1 g biologického materiálu a následne zhomogenizovaný v oscilačnom mlyne po dobu 3 minút na jemný prášok. Z jemného prášku bolo navážených 160 mg do čistých skúmaviek. Následne bolo ku každej vzorke pridaných 8 ml dichlórmetánu a prebehla extrakcia v ultrazvukovom kúpeli (15 minút). Bola prevedená centrifugácia (5 min., 25° C, 5 500 g) a vzorky boli po kvantitatívnom prenesení do kryo skúmaviek

odparené do sucha na suchom kúpeli (pri 60° C). Potom boli pridané 2 ml metanolýzového činidla – 10 % MeONa. Prebehla metanolýza vo vodnom kúpeli po dobu 15 minút a pri teplote 80° C. Zo zmesi bolo do čistých mikroskúmaviiek odobratých 250 µl a bolo pridaných 5 dielov H<sub>2</sub>O (1 250 µl) a 500 µl 5 % CH<sub>3</sub>COOH na neutralizáciu. 200 µl odobratých z pripravenej zmesi bolo 2-krát vytrepaných do 1,5 ml chloroformu a vzorky boli na suchom kúpeli odparené do sucha (pri 50° C). Odparok bol rozpustený v 250 µl metanolu, prebehla filtrácia cez mikrofilter (0,22 µm).

### **3.2.2 Analýza vzoriek pomocou UHPLC-MS/MS**

Pre analýzu faradiolu v genotypoch nechtíku lekárskeho bola použitá metóda UHPLC-MS/MS. Dĺžka analýzy činila 6 minút, pričom mobilnú fázou A tvoril 0,1 % vodný roztok kyseliny mravčej, mobilná fáza B bola 0,1 % roztok kyseliny mravčej v acetonitrile. Pre správnu separáciu bola ako vhodná elúcia vybratá gradientová, pričom do 3,9 min. bol podiel mobilnej fázy B 70 %, behom 0,1 min. bol podiel zvýšený na 100 % a v min. 4,6 bola hodnota obnovená na 70% a ponechaná až do konca analýzy. Prietok mobilnej fázy bol nastavený na 0,500 ml min<sup>-1</sup> objem injektovaného vzorku na 8 µl. Teplota na kolóne bola udržiavaná na 25° C. Analyty boli separované na kolóne Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm, veľkosť častíc 1,7 µm), zahrievanej pri 25° C a chránenej predkolónou C18.

Dáta z detekcie MS boli zaznamenané v režime SRM. Parametre MS boli nasledujúce: teplota zdroja 320° C, teplota desolvatačného plynu (dusík) 350° C, tlak sprejovacieho plynu o hodnote 45 psi, tlak sušiacieho plynu 15 psi, tlak ochranného plynu 1 psi a hodnota dĺžky skenu 1 s, kapilárne napätie 3 500 V a hodnota kolíznej energie 15 V. Ionizácia elektrosprejom prebehla v pozitívnom móde (+ESI) a prechody pre kvantifikáciu boli 425,4 > 407,5 a 425,4 > 217,2.

### **3.2.3 Analýza vzoriek pomocou UHPLC-UV**

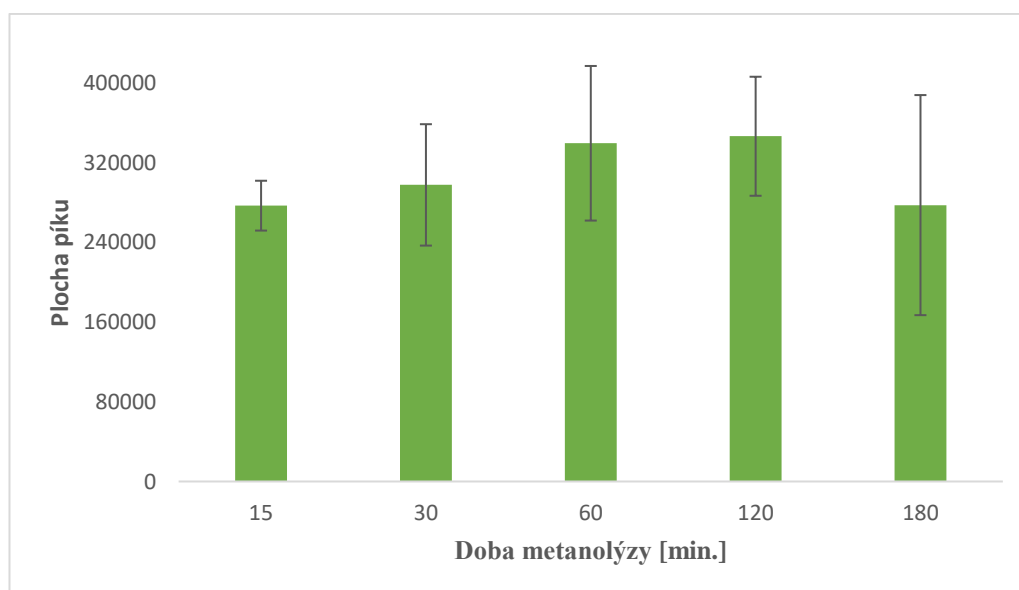
Pre porovnanie kvality metód bola na stanovenie obsahu faradiolu v jednotlivých genotypoch nechtíku lekárskeho bola použitá tiež metóda UHPLC-UV. Parametre pre UHPLC boli zhodné. Spektra boli snímané pri vlnovej dĺžke 210 nm a vyhodnotená pomocou softwaru Quan Browser XCalibur.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Faradiol je v pletivách súkvetí nechtíka lekárskeho prítomný z veľkej časti vo forme monoesterov s mastnými kyselinami. Najviac zastúpené sú faradiol-3-O-palmitát, faradiol-3-O-myristát a faradiol-3-O-laurát. (Neukirch *et al.*, 2004). Tieto estery sú lipofilné a ich separácia chromatografiou na reverznej fáze je časovo náročná a vedie k značnej spotrebe organických rozpúšťadiel (Zitterl-Eglseer *et al.*, 2001). Pre potreby hodnotenia kvality genotypov nechtíka z kolekcie VÚRV, v.v.i. z pohľadu obsahu monoesterov faradiolu sa javí vhodnejšie podrobiť vzorky jednotlivých genotypov alkalickéj hydrolyze resp. metanolýze a kvantifikovať vzniknutý faradiol.

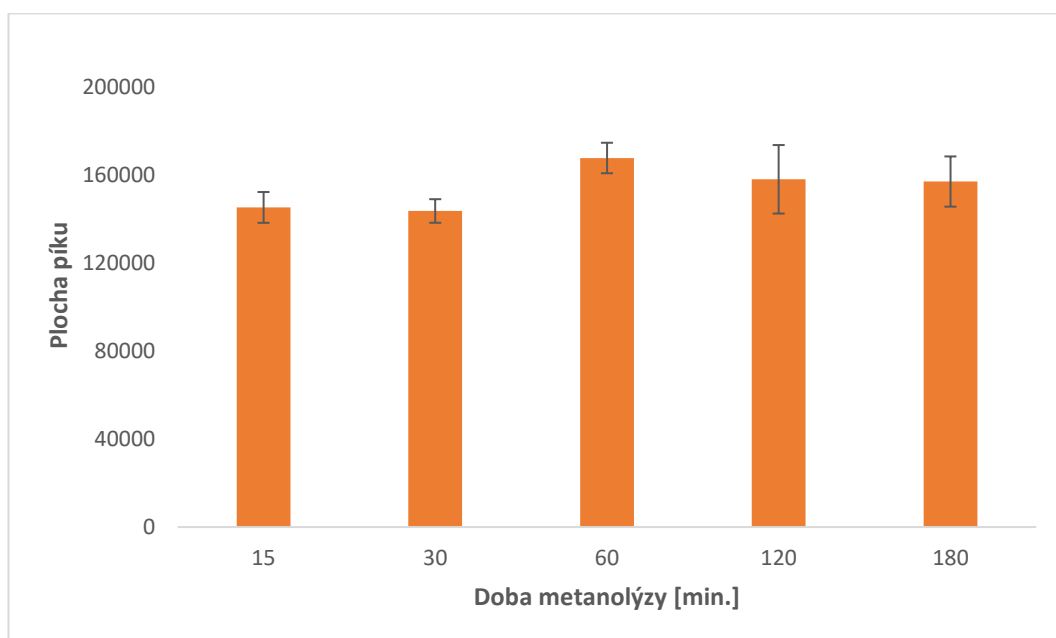
### 4.1 Optimalizácia alkalickéj metanolýzy

Na uvoľnenie faradiolu z príslušných esterov je potrebné odštiepiť zvyšky mastných kyselín. S ohľadom na lipofilné vlastnosti esterov a požiadaviek vysokej priepustnosti vzoriek bol postup uvedený v publikácii Nižyński *et al.* (2015) modifikovaný (hydrolyza bola nahradená metanolýzou), a tiež optimalizovaný (čas reakcie). V uvedenej publikácii dochádza k uvoľneniu faradiolu po 180 minútach, pôsobením 10% NaOH v 80% MeOH pri teplote 80° C. Nami zavedený postup využíva prídavok 250 µl 10 % MeONa pri zhodnej teplote. Postup reakcie je monitorovaný odoberaním časti vzoriek po 15, 30, 60, 120 a 180 min. Priebeh reakcie bol v rozpore s očakávaným nárastom plôch píku faradiolu v čase (Obr. 13).



Obr. 13 Plocha píku metanolyzovaného faradiolu v závislosti na čase reakcie; teplota 80° C; 250 µl 10% MeONa.

Možným vysvetlením by mohol byť príliš malý objem reakčnej zmesi a z toho plynúce vyzrážanie pevného podielu na stenách mikroskúmaviek, kvôli čomu neprebehla úplná hydrolýza celého obsahu faradiolu. Medzi jednotlivými opakovaniami ( $n = 3$ ) boli viditeľné značné rozdiely (Obr. 13), čo taktiež indikovalo neúplnú metanolýzu celkového obsahu faradiolu vo vzorkách. Z dôvodu zabránenia odpareniu časti rozpúšťadla a bezpečnosti bolo nutné použiť namiesto mikroskúmaviek špeciálne kryto skúmavky so šróbovacím vrchnákom. Po zvýšení objemu činidla na objem 2 000  $\mu\text{l}$ , čím bol pokrytý celý povrch mikroskúmaviek, bolo možné sledovať približne rovnaké plochy pík faradiolu po celú dobu metanolýzy (Obr. 14). Z hľadiska časovej úspory bola ako optimálna doba zvolená 15 minút.



Obr. 14 Závislosť plochy píku metanolyzovaného faradiolu na čase reakcie; teplota 80° C; 2 000  $\mu\text{l}$  10% MeONa.

Podľa predchádzajúcej štúdie bola ako vhodná kyselina na neutralizáciu zvolená 5 % CH<sub>3</sub>COOH (Nižyński *et al.*, 2015). Bolo nutné zistiť presný objem tejto kyseliny, ktorý bude pridávaný pre neutralizáciu vzoriek. Kvôli veľkosti dostupného pH-metru bola mierka oproti reálnemu pracovnému postupu 10-krát zväčšená, ale pomery jednotlivých chemikálií zachované. K 250 µl odobranej zmesi po metanolýze bolo pridaných 12,5 ml H<sub>2</sub>O a 2,5 ml 10 % MeONa. pH daného roztoku činilo 12,66. Po pridaní 5 ml 5 % CH<sub>3</sub>COOH bolo pH roztoku 6,01. Množstvo 5 % kyseliny octovej pridávané k reálnym vzorkám bolo teda 0,5 ml.

## 4.2 Optimalizácia extrakcie kvapalina-kvapalina

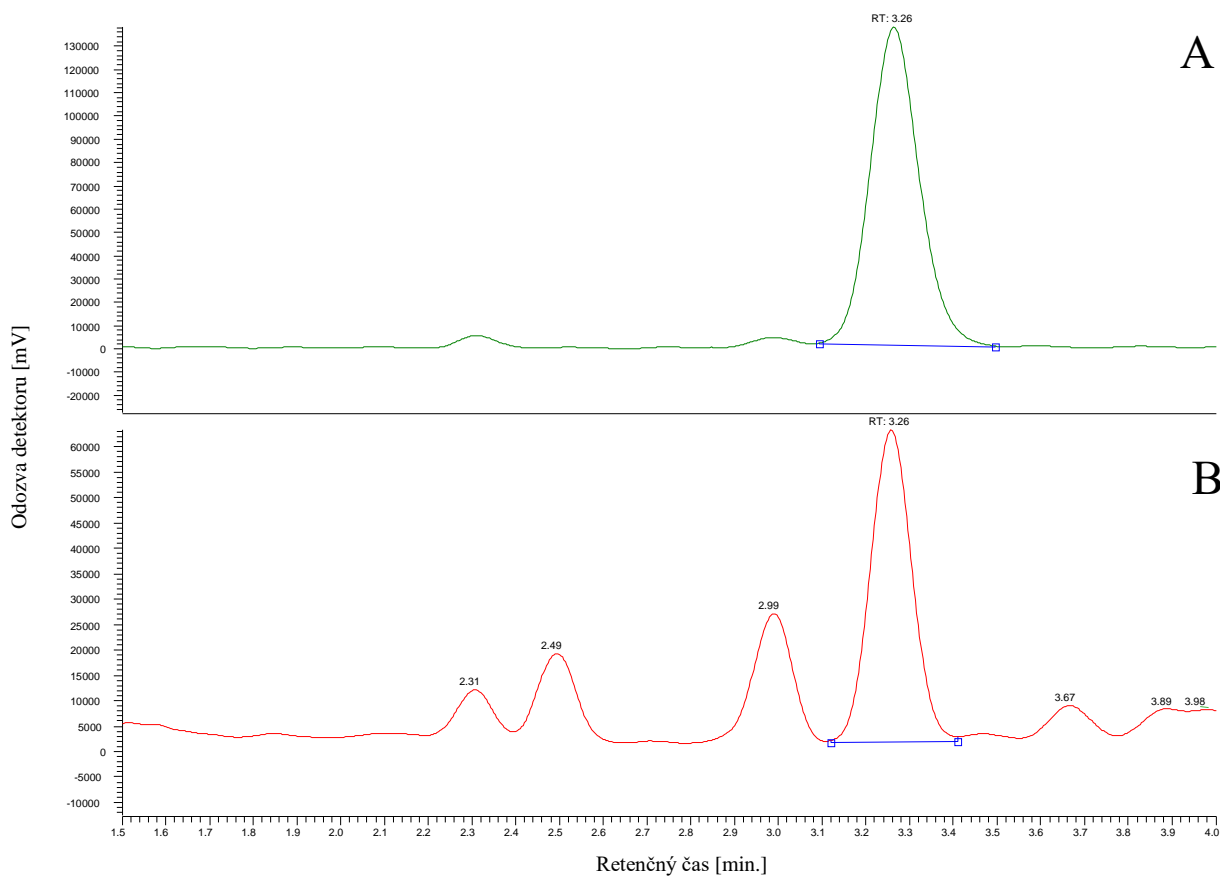
Dôležitou súčasťou prípravy vzoriek je extrakcia kvapalina-kvapalina (liquid-liquid; LL) metanolýzou uvoľneného faradiolu do nepolárneho organického rozpúšťadla. Extrakčným rozpúšťadlom použitým v publikácii Nižyński *et al.* (2015) bol dietyléter. Bolo zistené, že dietyléter nie je vhodným rozpúšťadlom (Tab. 1), keďže v 1. extrakcii bolo prevedených iba 49,74 % faradiolu, v druhej približne 30 % a v tretej okolo 20 %. To môže indikovať nedostatočnú účinnosť LL extrakcie do dietyléteri. Pre porovnanie bol ako ďalšie rozpúšťadlo použitý dichlórmetán. Je možné pozorovať vyššiu účinnosť prvej extrakcie (60,14 %), no tretia extrakcia obsahuje približne 16 % (Tab. 1), čo opäť naznačuje nedostatočnú efektivitu LL extrakcie s použitím dichlórmetánu. Literatúra neposkytuje dáta rozpustnosti faradiolu v rôznych organických rozpúšťadlách. Zo štúdie (Cao *et al.*, 2007) však vyplýva, že rozpustnosť pentacyklického triterpenoidu betulínu, ktorý je štruktúrou a fyzikálne-chemickými vlastnosťami blízky faradiolu, je najvyššia pre chloroform. Ten sa ukázal byť optimálnym pre LL extrakciu faradiolu (Tab. 1), keďže suma prvých dvoch frakcií činila približne 97 %. Posledná, tretia extrakcia bola teda pri príprave reálnych vzoriek vynechaná.

Tab. 1: Účinnosť extrakcie kvapalina-kvapalina pri použití rôznych rozpúšťadiel

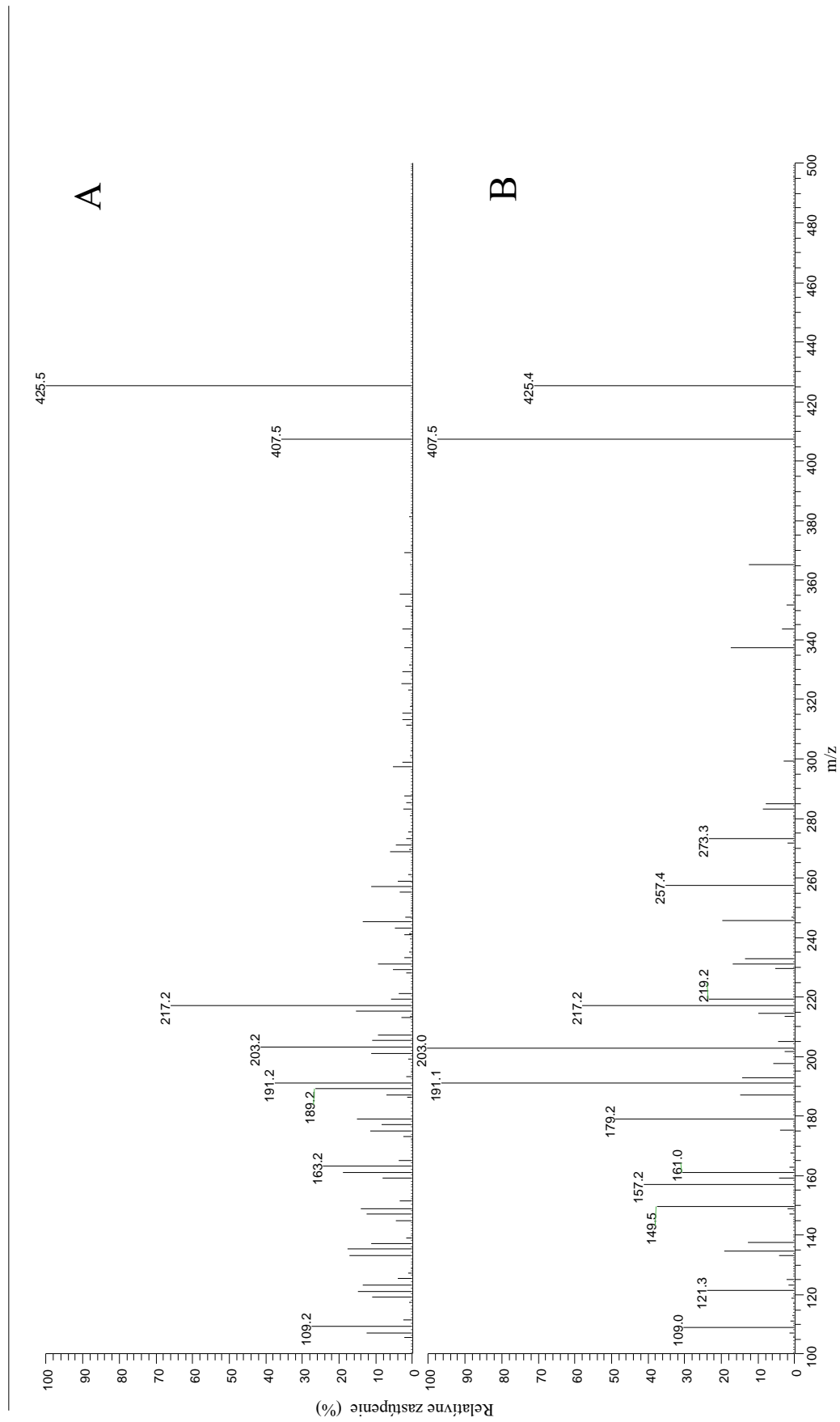
Extrakcia	Rozpúšťadlo / Účinnosť (%)		
	Dietyléter	Dichlórmetán	Chloroform
1.	49,7	60,1	68,2
2.	30,2	23,4	29,0
3.	19,9	16,3	2,7

### 4.3 Identifikácia faradiolu v rastlinnom materiáli

UHPLC v spojení s tandemovou MS hrá v identifikácii prírodných látok významnú rolu. Zhoda retenčných časov a kolíznych spektier predpokladaného faradiolu s autentickým štandardom slúžilo k jednoznačnej identifikácii študovaného analytu v rastlinnom extrakte. Zhody retenčných časov sú prezentované na Obr. 15. Porovnanie kolíznych spektier autentického štandardu (A) a izolovaného faradiolu (B) znázorňuje Obr. 16.



Obr. 15 Porovnanie retenčných časov autentického štandardu (A) a izolovaného faradiolu (B) metódou UHPLC-UV ( $\lambda=210$  nm).



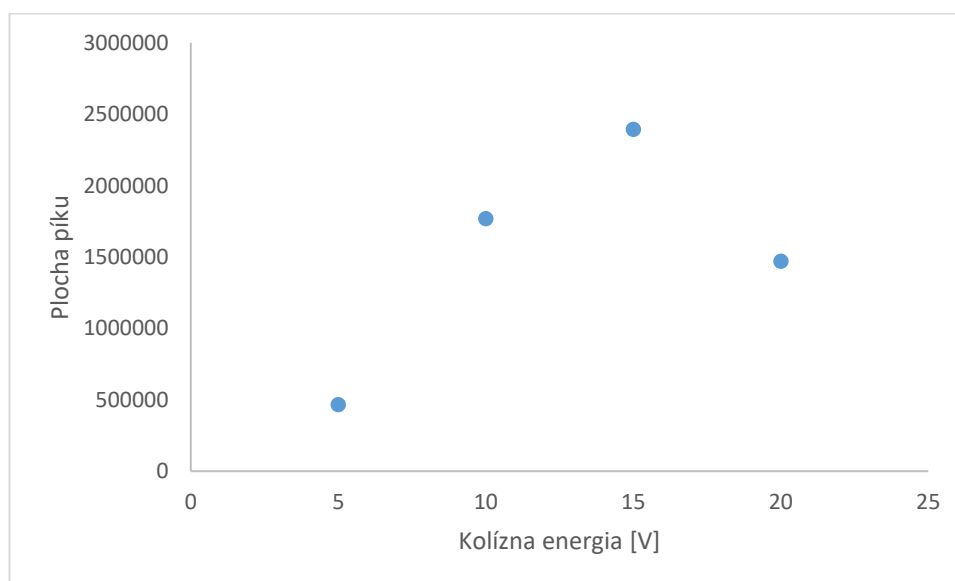
Obr. 16 Porovnanie fragmentov z kolíznych spektier autentického štandardu (A) a izolovaného faradiolu (B); kolízna energia: 15 V.

#### 4.4 Vývoj a optimalizácia metód UHPLC-UV a UHPLC-MS/MS

Z dôvodu úspory času a rozpúšťadiel bola na separáciu reálnych vzoriek extraktov nechtíka lekárskeho zvolená metóda UHPLC. Gradientová elúcia, pôvodne zavedená pri analýze štandardu faradiolu bola pri procese optimalizácie separácie nahradená izokratickou, pretože dochádzalo ku koelúcii faradiolu s inou látkou z extraktu. Optimálna separácia bola docieľená prietokom mobilných fáz  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  v pomere 30% A : 70% B po dobu 3,9 min. V čase 4,0 – 4,5 min. bola kolóna premývaná mobilnou fázou B, kvôli odstráneniu prípadných lipofilných zložiek extraktu. Vlnová dĺžka detekcie 210 nm, bola zvolená s ohľadom na údaj uvedený v certifikáte získanom spolu so štandardom faradiolu. Celková doba jednej analýzy trvala 6 minút.

Čo sa týka MS detekcie, zaujímavé je, že signál pseudomolekulového iónu  $[M+H]^+$  ( $m/z$  443,5) bol v móde Full Scan nevýrazný. Naopak, veľmi výrazným sa javil byť ión  $[M-H_2O]^+$  ( $m/z$  425,5). Toto sa dá vysvetliť elimináciou vody pri ionizácii. Pre kvantifikáciu tandemovou MS detekciu bol preto ako materský vybraný ión  $m/z$  425,5. Z kolízneho spektra boli vybrané dva fragmenty s vysokou intenzitou. Vybranými multiple reaction mode (MRM) prechodmi boli  $425,4 > 407,5$  a  $425,4 > 217,2$ .

Jedným z kľúčových parametrov, ktorý zásadne ovplyvňuje citlivosť detekcie je kolízna energia. Tá bola optimalizovaná v rozsahu 5 V až 20 V (Obr. 17). Na základe grafického vyjadrenia závislosti plochy píku na kolíznej energii, bola pre faradiol vybraná optimálna hodnota 15 V.



Obr. 15 Závislosť plochy píku faradiolu na kolíznej energii pri tandemovej MS; MRM prechod  $425,4 > 407,5$ .



## 4.5 Validácia metód UHPLC-UV a UHPLC-MS/MS

### 4.5.1 Linearita metód

Linearita vyvinutej a optimalizovanej UHPLC-UV metódy bola sledovaná v rozsahu hodnôt koncentrácií 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  až 500  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (5 koncentračných hladín). Linearita bola vyhodnotená lineárnou regresnou analýzou závislostí hodnôt plôch píku na hodnotách koncentrácií.

Linearita metódy UHPLC-MS/MS bola sledovaná v rozsahu hodnôt koncentrácií 10  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  až 2 500  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  (7 koncentračných hladín). Linearita bola vyhodnotená lineárnou regresnou analýzou závislostí hodnôt plôch píku na hodnotách koncentrácií. Pri vyšších koncentráciách bol signál saturovaný a pri koncentráciách nižších ako 10  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  pík nebol detegovaný.

Lineárny dynamický rozsah pre jednotlivé metódy, vrátane rovníc kalibračných kriviek a koeficientov determinácie sú uvedené v Tab. 2. Metóda s tandemovou MS detekciou má širší lineárny dynamický rozsah (od 10 do 2 500  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Koeficient determinácie  $R^2$  pre MS metódu je 0,9958 a pre UV metódu 0,9994 . Obe metódy vyhovujú požiadavkám validácie metódy ( $R^2 \geq 0,99$ ).

Tab. 2 Lineárny dynamický rozsah, rovnica kalibračnej krivky a korelačný koeficient pre jednotlivé metódy

Metóda	Lineárny dynamický rozsah	Rovnica kalibračnej krivky	Korelačný koeficient ( $R^2$ )
UHPLC-UV	5 - 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$y = 1704x - 47289$	0,9994
UHPLC-MS/MS	10 - 2 500 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	$y = 4438,9x - 15143$	0,9958

#### 4.5.2 Limit detekcie a limit kvantifikácie metódy

Pre metódu UHPLC-UV bol stanovený limit detekcie (LOD) na  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a limit kvantifikácie na  $33,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (LOQ), pričom za LOD bola považovaná koncentrácia, pri ktorej signál analytu prevyšoval hodnotu šumu 3-krát a LOQ koncentrácia, pri ktorej signál analytu prevyšoval hodnotu šumu 10-krát. Hodnoty pre metódu UHPLC-MS/MS boli LOD  $7,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a LOQ bol stanovený na  $25 \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Na základe týchto hodnôt môžeme konštatovať, že metóda s tandemovou MS detekciou je výrazne citlivejšia a uplatnenie by našla pri analýze vzoriek s nízkym obsahom faradiolu.

#### 4.5.3 Precíznosť merania

Precíznosť jednotlivých metód bola skúmaná porovnaním hodnôt priemernej relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD AVG) stanovenej z merania troch opakovaní. RSD AVG u metódy UHPLC-UV činila 9,6 % a u metódy UHPLC-MS/MS mala hodnotu 11,9 %. Na základe získaných hodnôt je možné vyvodit', že u tandemovej MS je precíznosť merania nižšia. K jej zlepšeniu by mohlo prispieť zavedenie vnútornej štandardizácie.

#### 4.6 Stanovenie faradiolu v genotypoch nechtíku lekárskeho pomocou metódy UHPLC-UV

Ku stanoveniu faradiolu bol ako prvá zvolená UHPLC-UV. Faradiol bol kvantifikovaný pomocou metódy externého štandardu. Pre genotypy A2100001 až A2100041 prebehlo meranie v troch opakovaniach a namerané hodnoty sú uvedené v tabuľke (Tab. 3). Najvyšší obsah faradiolu pomocou metódy UHPLC-UV bol sledovaný u genotypu A2100022 s hodnotou  $2,90 \pm 0,05$  % suchej hmoty (dry weight, DW). Najnižší obsah bolo možné naopak vidieť u genotypu A2100019 ( $0,84 \pm 0,23$  % DW).

Tab. 3 Obsah faradiolu v jednotlivých genotypoch nechtíku lekárskeho podľa metódy UHPLC-UV

Genotyp	Obsah faradiolu (% DW)
A2100001	$2,57 \pm 0,28$
A2100002	$1,75 \pm 0,17$
A2100003	$2,41 \pm 0,09$
A2100004	$2,31 \pm 0,05$
A2100005	$2,19 \pm 0,07$
A2100006	$2,43 \pm 0,26$

Tab. 3 Obsah faradiolu v jednotlivých genotypoch nechtíku lekárskeho podľa metódy UHPLC-UV (pokračovanie)

Genotyp	Obsah faradiolu (% DW)
A2100007	2,73 ± 0,13
A2100008	2,20 ± 0,43
A2100009	2,20 ± 0,30
A2100011	2,44 ± 0,39
A2100012	2,13 ± 0,42
A2100014	2,08 ± 0,16
A2100015	1,56 ± 0,09
A2100016	2,36 ± 0,08
A2100017	2,59 ± 0,08
A2100018	2,02 ± 0,01
A2100019	0,84 ± 0,23
A2100020	1,93 ± 0,28
A2100021	2,89 ± 0,02
A2100022	2,90 ± 0,05
A2100025	2,09 ± 0,07
A2100028	1,62 ± 0,13
A2100030	2,57 ± 0,21
A2100031	2,51 ± 0,07
A2100032	1,78 ± 0,41
A2100033	2,32 ± 0,15
A2100035	2,50 ± 0,13
A2100037	2,21 ± 0,31
A2100038	1,25 ± 0,11
A2100040	1,44 ± 0,45
A2100041	2,13 ± 0,16

#### 4.6.1 Stanovenie faradiolu v genotypoch nechtíku lekárskeho pomocou metódy UHPLC-MS/MS

Pre porovnanie správnosti stanovenia faradiolu metódou UHPLC-UV, boli vzorky stonásobne nariadené a analyzované pomocou UHPLC-MS/MS. V analytických metódach využívajúcich UHPLC-MS/MS je obvykle používaný vnútorný štandard, ktorý je pridávaný ku kalibračným štandardom a slepým vzorkám v konštantnom množstve. Slúži teda pre korekciu straty analytu počas prípravy vzorky a je často využívaný pri kvantifikácii v zvolenej metóde. Obvyklé je použitie izotopicky značeného štandardu, ktorý prináša lepšie výsledky pri kvantitatívnych analýzach v LC-MS (Stokvis *et al.*, 2005). Izotopicky značený faradiol nie je komerčne dostupný.

Z dôvodu dostupnosti a podobných chemicko-fyzikálnych vlastností, bol pre účely vnútornej štandardizácie vybraný iný pentacyklický triterpenoid – betulín. Keďže v publikácii Arora *et al.* (2013) betulín nie je uvedený v zozname doposiaľ identifikovaných látok nechtíku, bol učený predpoklad, že betulín je vhodným vnútorným štandardom. Pri analýze reálnych vzoriek bol však pozorovaný signál v retenčnom čase zhodnom so signálom autentického štandardu betulínu. Kvantifikácia faradiolu bola preto vykonaná za externej kalibrácie.

Každý genotyp bol meraný v troch opakovaní. Jednotlivé genotypy sú evidované pod kódmi A2100001 až A2100041. Výsledné namerané hodnoty sú uvedené v tabuľke (Tab. 4). Najvyšší obsah faradiolu bol pozorovaný u genotypu A2100022, ktorý činil asi 3,21 % DW, takisto genotyp A2100021 má obsah faradiolu nad 3 % DW. S najnižším obsahom  $0,88 \pm 0,22$  % DW sa javil genotyp A2100019, ktorý ako jediný mal obsah faradiolu nižší než 1 % DW.

Tab. 4 Obsah faradiolu v jednotlivých genotypoch nechtíku lekárskeho podľa metódy UHPLC-MS/MS

Genotyp	Obsah faradiolu (% DW)
A2100001	$2,85 \pm 0,38$
A2100002	$1,96 \pm 0,23$
A2100003	$2,65 \pm 0,21$
A2100004	$2,52 \pm 0,12$
A2100005	$2,13 \pm 0,24$
A2100006	$2,67 \pm 0,49$

Tab. 4 Obsah faradiolu v jednotlivých genotypoch nechtíku lekárskeho podľa metódy UHPLC-MS/MS (pokračovanie)

Genotyp	Obsah faradiolu (% DW)
A2100007	2,79 ± 0,16
A2100008	2,46 ± 0,41
A2100009	2,32 ± 0,38
A2100011	2,57 ± 0,34
A2100012	2,22 ± 0,42
A2100014	2,15 ± 0,13
A2100015	1,65 ± 0,14
A2100016	2,59 ± 0,39
A2100017	3,06 ± 0,12
A2100018	2,28 ± 0,13
A2100019	0,88 ± 0,22
A2100020	2,24 ± 0,50
A2100021	3,15 ± 0,07
A2100022	3,21 ± 0,09
A2100025	2,25 ± 0,05
A2100028	1,68 ± 0,29
A2100030	2,73 ± 0,14
A2100031	2,75 ± 0,27
A2100032	1,78 ± 0,43
A2100033	2,54 ± 0,26
A2100035	2,81 ± 0,35
A2100037	2,52 ± 0,42
A2100038	1,37 ± 0,18
A2100040	1,64 ± 0,40
A2100041	2,26 ± 0,11

#### 4.7 Porovnanie hodnôt obsahu faradiolu stanoveného UHPLC-UV a UHPLC-MS/MS

Pomocou metódy UHPLC-UV bol stanovený obsah faradiolu v jednotlivých genotypoch nechtíku lekárskeho, ktorý sa pohyboval v rozmedzí 0,84 až 2,90 % DW. Väčšina genotypov prekročila hodnotu 2 % DW, 5 genotypov malo hodnotu obsahu okolo 1,5 % DW a u genotypu A2100019 bolo možné vidieť hodnotu nižšiu ako 1% DW. Metódou UHPLC-MS/MS boli dosiahnuté veľmi podobné výsledky. U genotypov

s nižšími obsahmi faradiolu boli hodnoty takmer identické. Hodnoty obsahov sa viac rozchádzali v prípade genotypov s vyšším obsahom faradiolu (Tab. 3 a Tab. 4). Dôvodom môže byť začínajúca saturácia signálu v prípade MS/MS detekcie a tiež neprítomnosť vnútorného štandardu.

Po aplikácii daných metód pre kvantifikáciu faradiolu bol očakávaný obsah okolo 3 % DW. Zitterl-Eglseer *et al.* (2001) stanovili, že v jazykovitých kvetoch nechtíku lekárskeho je približne 1,4 % faradiol-3-O-palmitátu, 1,3 % faradiol-3-O-myristátu a 0,2 % faradiol-3-O-laurátu. V našom prípade sme stanovovali obsah celkového faradiolu a výsledky získané metódami UHPLC-MS/MS a UHPLC-UV boli odpovedajúce danej štúdií. Hodnoty obsahov faradiolu sa vo väčšine genotypov pohybovali v rozmedzí 2 – 3 %. V danej publikácii síce zisťujú percentuálne zastúpenie jednotlivých esterov faradiolu, no analýza je časovo a inštrumentálne náročná. Nami vyvinutá metóda analýzy prebiehala po dobu 6 minút, čo spĺňa časovú požiadavku a umožňuje analýzu niekoľko stoviek vzoriek za deň.

## 5 ZÁVER

Táto bakalárska práca bola zameraná na stanovenie faradiolu v jednotlivých genotypoch nechtíku lekárskeho poskytnutých Génovou bankou Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. V tejto práci bola vypracovaná literárna rešerš na kľúčové slová nechtík lekársky, jeho významné obsahové látky a metódy ich analýzy.

Ďalším z cieľov bola optimalizácia hydrolýzy postranných reťazcov monoesterov faradiolu a optimalizácia extrakcie kvapalina-kvapalina. Postup hydrolýzy bol nahradený metanolýzou a optimálna doba bola určená ako 15 minút. Bolo zistené, že vhodným rozpúšťadlom pre danú extrakciu je chloroform, do ktorého bol faradiol prevedený v dvoch frakciách.

Prebehol vývoj, optimalizácia a validácia jednotlivých metód pre stanovenie faradiolu vo vybraných genotypoch nechtíka lekárskeho. Bola vyvinutá veľmi rýchla analýza, ktorá umožnila vysokú priepustnosť merania. Faradiol bol identifikovaný v rastlinnom materiáli na základe získaných kolíznych spektier. Metóda bola pomocou externej štandardizácie aplikovaná na reálne vzorky. Kvantifikácia faradiolu bola prevedená pomocou metód UHPLC-UV a UHPLC-MS/MS.

U oboch metód bol pozorovaný najnižší obsah faradiolu u genotypu A2100019. Naopak najvyšší obsah faradiol bol pozorovaný u genotypu A2100022. Vzhľadom na to, že protizápalová aktivita extraktu je úmerná obsahu faradiolu, ktorý môže slúžiť ako vhodný parameter pre hodnotenie kvality prípravkov s obsahom nechtíku lekárskeho, má tento genotyp potencionálne využitie vo farmácii a kožnom lekárstve.

## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Adler G., Kasprzyk Z. (1975): Free sterols, steryl esters, glucosides, acylated glucosides and water-soluble complexes in *Calendula officinalis*. *Phytochemistry* **14**, 627-631.
- Alqahtani A., Hamid K., Wong K.H., Abdelhak Z., Razmovski-Naumovski V., Chan K., Li K.M., Groundwater P.W., Li G.Q. (2013): The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications. *Current Medicinal Chemistry* **20**, 908-931.
- Augustin J. M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S. (2011): Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **72**, 435-457.
- Bakó E., Deli J., Tóth G. (2002): HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **53**, 241-250.
- Benveniste P. (1986): Sterol biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **37**, 275-308.
- Benveniste P. (2004): Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 429-457.
- Billia A.R., Salvini D., Mazzi G., Vincieri F.F. (2001): Characterization of *Calendula* flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Chromatographia* **53**, 210-215.
- Biocompare page: <https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/13036-HPLC-UV-Detector-UV-Visible-HPLC-Detectors/> (5. 5. 2019).
- Blumenthal M., Goldberg A., Brickmann J. (2001): Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs, 376-378.
- Bravo L. (1998): Polyphenols: Chemistry, Dietary sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 317-333.
- Britton G. (1995): Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* **9** (15), 1551-1558.
- Chalchat J.C., Garry R.P.H., Michet A. (1991): Chemical composition of essential oil of *Calendula officinalis* L. (Pot Marigold). *Flavour and Fragrance Journal* **60**, 189-192.
- Carr A.C., Zhu B.Z., Frei B. (2000): Potential antiatherogenic mechanism of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research* **87**, 349-354.
- Cimmino A., Andolfi A., Evidente A. (2014): Phytotoxic terpenes produced by phytopathogenic fungi and allelopathic plants. *Natural Products Communications* **9**, 401-408.
- Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C., Gaydou E.M. (1996): Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine* **20**, 35-43.
- Cowan M.M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12** (4), 564-582.
- Croft K.D. (1998): The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of New York Academy of Sciences* **20**, 435-442.
- Della Loggia R., Tubaro A., Sosa S., Becker H., Saar S., Isaac O. (1994): The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica* **60**, 516-520.
- Formica J.V., Regelson W. (1995): Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* **33**, 1061-1080.
- Gazim Z.C., Rezende C.M., Fraga S.R., Filho B.P.D., Nakamura C.V., Cortez D.A. (2008): Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **44**, 391-395.
- Gross J.H. (2011): *Mass Spectrometry*. 2. edition, Springer Berlin Heidelberg. 753 strán.
- Havsteen B.T. (2002): The biochemistry and significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* **96**, 67-202.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572-584.
- Jahodář L. (2011): *Farmakobotanika – semenné rostliny*. Nakladatelství Karolinum v Prahe, 278 strán.



- Jäger S., Trojan H., Kopp T., Laszczyk M.N., Scheffler A. (2009): Pentacyclic triterpene distribution in various plants-rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* **14**, 2016-2031.
- Kašparová M. (2008): *Měsíček lékařský – významné lokální antiflogistikum*. Dermatologie pro praxi 2 (5-6), 241-242.
- Kishimoto S., Maoka T., Sumitomo K., Ohmiya A. (2005): Analysis of carotenoid composition in petals of *Calendula* (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**, 2122-2128.
- Kromidas S. (2017): The HPLC-MS handbook for practitioners. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 233 strán.
- Kuhnau J. (1976): The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics* **24**, 117-191.
- Lange V., Picotti P., Domon B., Aebersold R. (2008): Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology* **4**, 222.
- Ling W.H., Jones P.J. (1995): Dietary phytosterols-review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences* **57**, 195-206.
- Loomis R.S., Gerakis P.A. (1975): Productivity of agricultural ecosystems. In: *Photosynthesis and productivity in different environments*. (Cooper J.P. ed), Cambridge university press, Cambridge, 145-166.
- Marczal G., Cserjesi Z., Hethelyi E., Petri G. (1987): Data on the essential oil content and composition of *Calendula officinalis* L. *Herba Hungaria* **26**, 179-189.
- McMurry J. (2004): Alkeny-struktura a reaktivita. In: *Organická chemie*. 6 (Svoboda J. ed.), Vysoké učení technické v Brně-Nakladatelství Vutium, 197-198.
- Middleton E., Kandaswami C. (1992): Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. *Biochemical Pharmacology* **43**, 1167-1179.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A. (2004): Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* **85**, 231-237.
- Moiseeva G.F., Belikov V.G. (1992): Isolation and characterization of polysaccharides of *Calendula officinalis* L. *Farmatsyia* **3**, 79-84.
- Nagy M., Grančai D., Mučaji P. (2011): *Farmakognózia – Biogenéza prírodných látok*. 1. vydanie, Vydavateľstvo Osveta, spol., Martin, 237 strán.
- Neukirch H., D'Ambrosio M., Via J.D., Guerriero A. (2004): Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochemical analysis* **15**, 30-35.
- Niżyński B., Alsoufi A.S.M., Paćzkowski C., Długosz M., Szakiel A. (2015): The content of free and esterified triterpenoids of the native marigold (*Calendula officinalis*) plant and its modifications in *in vitro* cultures. *Phytochemistry Letters* **11**, 410-417.
- Novák F. A., Penka M., Cejp K., Martinec T. (1958): *Farmaceutická botanika*. Vydání 2, Státní zdravotnické nakladatelství, n.p., Praha, 640 strán.
- Nováková L., Douša M. (2013): *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání, Europrint a.s., Praha, 299 strán.
- Olenikov D.N., Kashchenko N.I. (2014): Componential Profile and Amylase Inhibiting Activity of Phenolic Compounds from *Calendula officinalis* L. leaves. *The Scientific World Journal*, Volume 2014, 9 strán.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/654193>
- Ostlund R.E., Racette S.B., Stenson W.F. (2003): Inhibition of cholesterol absorption by phytosterols-replete wheat germ compared phytosterols-depleted wheat germ. *The American Journal of Clinical Nutrition* **77**, 1385-1389.
- Pavloušek P. (2007): *Encyklopedie révy vinné*. Computer Press, Brno, 318 strán.
- Piccaglia R., Marotti M., Chiavari G., Gandini N. (1999): Effects of harvesting date and climate on the flavonoid and carotenoid content of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Flavour and Fragrance Journal* **12**, 85-90.

- Ramawat K.G., Merillon J.M. (2013): Tetraterpenes: Carotenoids. In: *Natural Products*. Vol. 1: *Phytochemistry, Botany and Metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes* (Ramawat K.G., Merillon J.M. eds.), Germany, Springer Berlin Heidelberg, 3251–3283.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996): Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine* **7**, 933-956.
- Safdar W., Majeed H., Naveed I., Kayani W.K., Ahmed H., Hussain S. (2010): Pharmacognostical study of the medicinal plant *Calendula officinalis* L. (Family Compositae). *International Journal of Cell and Molecular Biology* **1**, 108–116.
- Shanmugan M.K., Nguyen A.H., Kumar A.P., Tan B.K.H., Sethi G. (2012): Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic terpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Letters* **320**, 158-170.
- Spilková J., Martin J., Siatka T., Tůmová L., Kašparová M. (2016): *Farmakognózie*. Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum v Praze, 346 strán.
- Stokvis E., Rosing H., Beijnen J.H. (2005): Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 401-407.
- Štulík K. (2004): *Analytické separační metody*. 1. vydání, Nakladatelství Karolinum, Praha, 264 strán.
- Tomko J. a kol. (1999): *Farmakognózia – učebnica pre farmaceutické fakulty*. Vydavateľstvo Osveta, Martin, 422 strán.
- Ukiya M., Yasukawa K., Kasahara Y., Kimura Y., Koike K., Nikaido T., Takido M. (2001): Constituents of Compositae plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters form edible chrysanthemum flower extract and their anti-inflammatory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 3187-3197.
- Van Eeckhaut A., Lanckmans K., Sarre S., Smolders I., Michotte Y. (2009): Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography. B – Analytical technologies in the biomedical and life science* **877**, 2198-2207.
- Varljen J., Lipták A., Wagner H. (1989): Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry* **28**, 2379-2383.
- Veuthey J.L. (2012): Method transfer between conventional HPLC and UHPLC. In: *UHPLC in life sciences*. (Guillarme D. ed.), Cambridge, Royal Society of chemistry, 68-90.
- Yoshikawa M., Murakami T., Kishi A., Kageura T., Matsuda H. (2001): Medicinal Flowers. III. Marigold (1): Hypoglycemic, Gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D *Calendula officinalis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **49** (7), 863–870.
- Yu D., Wild C.T., Martin D.E., Morris-Natschke S.L., Chen C.H., Allaway G.P., Lee K.H. (2005): The discovery of a class of novel HIV-1 maturation inhibitors and their potential in the therapy of HIV. *Expert Opinion on Drug Discovery* **14**, 681-693.
- Waisser K., Palát K. (2001): *Bioorganická chemie*. 2.vydanie, Nakladatelství Karolinum v Praze, 307 strán.
- Wilkomirski B., Kasprzyk Z. (1979): Free and ester-bound triterpene alcohols and sterols in cellular sub-fractions of *Calendula officinalis* flowers. *Phytochemistry* **18**, 253-255.
- Wollgast J., Anklam E. (2000): Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* **33**, 423-447.
- Zitterl-Eglseer K., Reznicek G., Jurenitsch J., Novak J., Zitterl W., Franz Ch. (2001): Morphogenetic variability of faradiol monoesters in marigold *Calendula officinalis* L. *Phytochemical Analysis* **12**, 199-201.

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

CC	Stĺpcová chromatografia
DMAPP	Dimetylalylidifosfát
DW	Suchá hmota
ESI	Ionizácia elektrosprejom
FPP	Farnezyldifosfát
GC-MS	Plynová chromatografia s hmotnostnou detekciou
GGPP	Geranylgeranyldifosfát
GLC	Plynová rozdeľovacia chromatografia
GPP	Geranyldifosfát
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HS-SPME	Headspace-mikroextrakcia
IPP	Izopentenylpyrofosfát
LC-MS	Kvapalinová chromatografia s hmotnostnou detekciou
LL	Extrakcia kvapalina-kvapalina
LOD	Limit detekcie
LOQ	Limit kvantifikácie
MRM	Multiple reaction mode
MS	Hmotnostná spektrometria
RSD AVG	Priemerná relatívna smerodajná odchylka
SRM	Selected reaction monitoring
TLC	Plynová rozdeľovacia chromatografia
UHPLC-MS/MS	Ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou detekciou
UHPLC-UV	Ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s UV detekciou