

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Zavedení metody pro stanovení kyseliny salicylové ve  
vzorcích rostlin**

Diplomová práce

**Bc. Denisa Lejsková**

Školitelka: Ing. Fojtíková Pavla, Ph.D.

České Budějovice, 2023

Lejsková, D., 2023: Zavedení metody pro stanovení kyseliny salicylové ve vzorcích rostlin. [Introduction of a method for the determination of salicylic acid in plant samples. Mgr. Thesis, in Czech.] – 59 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Tato diplomová práce je věnována zavedení metody pro stanovení kyseliny salicylové pomocí HPLC/FLD a jejímu následnému využití pro analýzu reálných rostlinných vzorků. V teoretické části jsou uvedeny fyzikální a chemické vlastnosti stanovované látky. Pozornost je věnována procesu syntézy kyseliny salicylové v rostlinách a její funkci při regulaci fyziologických procesů. V rámci literární rešerše bylo zahrnuto i porovnání analytických metod pro stanovení kyseliny salicylové a rovněž srovnání možností extrakce kyseliny salicylové z rostlinného materiálu. Experimentální část se zabývá optimalizací chromatografické separace (délka kolony a složení mobilní fáze), optimalizací fluorescenční detekce a postupu extrakce kyseliny salicylové z rostlinných vzorků. Pro metodu byly stanoveny meze detekce, meze kvantifikace a kalibrační rozsahy kyseliny salicylové pro jednotlivé kolony. Zavedená metoda byla použita pro kvantifikaci kyseliny salicylové ve vzorcích rostlin (*Arabidopsis thaliana* a *Papaverum somniferum*).

## **Annotation**

This master's thesis is devoted to the introduction of a method for the determination of salicylic acid using HPLC-FLD and its subsequent use for the analysis of real plant samples. The physical and chemical properties of the determined substance are presented in the theoretical part. Attention is paid to the process of salicylic acid synthesis in plants and its function in the regulation of physiological processes. A comparison of analytical methods for the determination of salicylic acid as well as a comparison of the possibilities of extraction of salicylic acid from plant material were included in the literature search. The experimental part deals with optimization of chromatographic separation (column length and mobile phase composition), optimization of fluorescence detection and procedure for extracting salicylic acid from plant samples. Limits of detection, limits of quantification and calibration ranges of salicylic acid for individual columns were determined for the method. The established method was used for the quantification of salicylic acid in plant samples (*Arabidopsis thaliana* and *Papaverum somniferum*).

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 6.12. 2023

Bc. Denisa Lejsková

## **Klíčová slova**

Kyselina salicylová, kapalinová chromatografie, fluorescenční detekce, extrakce, 2-methoxybenzoová (OAA)

## **Key words**

Salicylic acid, liquid chromatography, fluorescence detection, extraction, 2-methoxybenzoic (OAA)

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, předané zkušenosti a velkou trpělivost. Děkuji za přátelský přístup, vstřícnost a ochotu při zpracování práce. Dále bych ráda poděkovala Katedře experimentální biologie, která se mnou na mé práci spolupracovala.

## **Obsah**

<b>1 Úvod</b> .....	1
<b>2 Cíle práce</b> .....	2
<b>3 Teoretická část</b> .....	3
<b>3.1 Kyselina salicylová</b> .....	3
<b>3.1.1 Základní charakteristika</b> .....	3
<b>3.1.2 Kyselina salicylová jako fytohormon</b> .....	5
<b>3.1.3 Syntéza kyseliny salicylové v rostlinách</b> .....	7
<b>3.1.4 Využití kyseliny salicylové</b> .....	9
<b>3.2 Stanovení kyseliny salicylové pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenčním a spektrofotometrickým detektorem</b> .....	10
<b>3.3 Extrakce kyseliny salicylové z rostlinných vzorků</b> .....	15
<b>3.4 Parametry validace metody</b> .....	18
<b>4 Materiály a metody</b> .....	19
<b>4.1 Použité chemikálie</b> .....	19
<b>4.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál</b> .....	19
<b>4.3 Příprava roztoků</b> .....	20
<b>4.3.1 Mobilní fáze</b> .....	20
<b>4.3.2 Roztoky standardu a vnitřního standardu</b> .....	20
<b>4.3.3 Kalibrační roztoky</b> .....	21
<b>4.3.4 Roztoky pro extrakce a přípravu vzorku k analýze</b> .....	22
<b>4.4 Nastavení podmínek fluorescenční detekce</b> .....	22
<b>4.5 Extrakce kyseliny salicylové z listu rostliny</b> .....	23
<b>4.5.1 Postup extrakce</b> .....	23

<b>5 Výsledky a diskuse .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Optimalizace podmínek chromatografické separace kyseliny salicylové .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1.1 LUNA C18 (250 × 3 mm; 5,0 μm).....</b>	<b>28</b>
<b>5.1.2 ARION Plus C18 (150 × 3 mm; 5,0 μm) .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Nastavení fluorescenčního detektoru .....</b>	<b>29</b>
<b>5.3 Validace metody pro stanovení kyseliny salicylové .....</b>	<b>31</b>
<b>5.3.1 Validace metody kolona LUNA C18 (250 × 3 mm; 5,0 μm) .....</b>	<b>32</b>
<b>5.3.2 Validace metody kolona ARION C18 (150 × 3 mm; 5,0 μm) .....</b>	<b>34</b>
<b>5.4 Stanovení koncentrace kyseliny salicylové v rostlinných vzorcích ...</b>	<b>36</b>
<b>6 Závěr.....</b>	<b>39</b>
<b>7 Seznam literatury .....</b>	<b>40</b>
<b>8 Přílohy .....</b>	<b>52</b>
<b>Příloha A: Systematické názvy .....</b>	<b>52</b>
<b>Příloha B: Validace metody-LUNA C18 (250 × 3 mm; 5,0 μm).....</b>	<b>54</b>
<b>Příloha C: Výsledky extrakce-LUNA (250 × 3 mm; 5,0 μm).....</b>	<b>56</b>
<b>Příloha D: Validace metody-ARION C18 (150 × 3 mm; 5,0 μm).....</b>	<b>57</b>
<b>Příloha E: Porovnání výsledků extrakcí LUNA a ARION .....</b>	<b>59</b>

## Seznam použitých zkratk a symbolů

a	směrnice kalibrační křivky
acetyl-SA	kyselina acetylsalicylová
AHFS	Patient Medication Information (Informace o léčivech pro pacienta)
AOAC	Association of Analytical Communities (Sdružení analytických společností)
c	koncentrace analytu
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
FL	fluorescence
FLD	fluorescenční detektor
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC	isochorismátová cesta
IPL	izochorismát pyruvátlyáza
LOD	mez detekce
LOD <sub>i</sub>	instrumentální mez detekce
LOD <sub>m</sub>	mez detekce metody
LOQ	mez stanovitelnosti
LOQ <sub>i</sub>	instrumentální mez stanovitelnosti
LOQ <sub>m</sub>	mez stanovitelnosti metody
MeSA	methylsalicylát
MF	mobilní fáze
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze B
MFC	mobilní fáze C
OAA	2-methoxybenzoová
PAL	fenylalanin ammonium-lyáza
PALC	fenylalaninammonia-lyázová cesta
PBS	fosfát
pK <sub>a</sub>	disociační konstanta kyseliny
q	intercept
Q	úsek na ose y (intercept) rovnice kalibrační křivky
QC	koeficient kvality lineární regrese
R	korelační koeficient



S/N	signál/šum
SA	kyselina salicylová
SAG	2-beta-D-glukosid kyseliny salicylové
SAR	systemově získaná rezistence
ST	roztok standardu
SGE	salicyloyl-L-aspartát
SPE	extrakce pevnou fází
TBA	terc-butylalkohol
TCA	kyselina trichloroctová
TFA	kyselina trifluoroctová
TSCA	seznam pro kontrolu toxických látek
US EPA	Americká agentura pro ochranu životního prostředí
UV	ultrafialové záření
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná spektrofotometrie
VS	vnitřní standard
y	odezva detektor

# 1 Úvod

Kyselina salicylová patří do skupiny rostlinných fenolických látek. V rostlinách působí jako důležitá signální látka, která je syntetizována jako odezva při napadení patogenem nebo při abiotickému stresu způsobeném teplem, chladem, salinitou, suchem a toxicitou kovů. Funkce kyseliny salicylové není omezena jen na obranyschopnost rostliny, má pozitivní vliv také na vývoj květů a termogenezi. Biosyntéza kyseliny salicylové probíhá dvěma metabolickými cestami. Z biologického hlediska je zajímavé rozlišovat v rostlinách obsah volné a vázané kyseliny salicylové. Předložená magisterská práce je věnována zavedení postupu extrakce a vlastnímu stanovení jak volné, tak vázané kyseliny salicylové v rostlinách. Pro stanovení kyseliny salicylové byla zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD), která patří mezi jednu z nejpoužívanějších separačních metod v praxi.

## 2 Cíle práce

Cílem diplomové práce je zavedení metody pro analýzu kyseliny salicylové pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD) a její použití ke stanovení obsahu této látky v rostlinných vzorcích. Dalším cílem je zavedení a optimalizace extrakce kyseliny salicylové z rostlinného materiálu.

Diplomová práce má následující dílčí cíle:

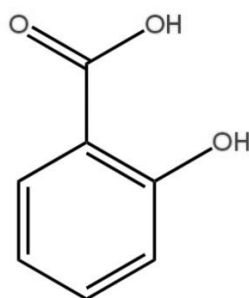
- rešerše možností stanovení kyseliny salicylové pomocí HPLC,
- vývoj, optimalizace a validace analytické metody,
- vývoj a optimalizace extrakce kyseliny salicylové z rostlinných vzorků,
- analýza získaných extraktů pomocí HPLC-FLD s využitím zavedené metody.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Kyselina salicylová

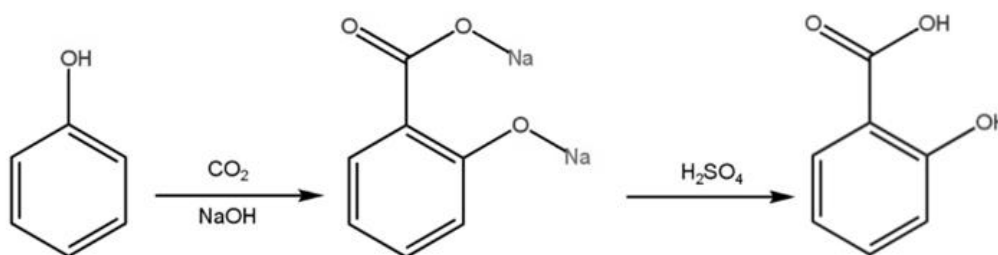
#### 3.1.1 Základní charakteristika

Kyselina salicylová je karboxylová kyselina s vzorcem  $C_6H_4(OH)COOH$  a molekulovou hmotností 138,12 g/mol. Systematický název je kyselina 2-hydroxybenzenkarboxylová, popřípadě kyselina *o*-hydroxybenzoová (Obrázek 1). Název kyseliny salicylové pochází z latinského názvu vrby bílé (*Salix alba*), v jejíž kůře se tato kyselina vyskytuje v koncentraci okolo 1 mg/g (Warمیński et al., 2021). Při laboratorních podmínkách se kyselina salicylová vyskytuje jako bílý krystalický prášek bez zápachu (Vlot et al., 2009). Kyselina salicylová je špatně rozpustná ve vodě (0,2 g/100 ml  $H_2O$  při 20 °C). Výrazně vyšší rozpustnost je při laboratorní teplotě v propanolu (27,36 g/100 ml), ethanolu (34,87 g/100 ml) či acetonu (396 g/100 ml) (O'Neil, 2006, Maruri-López et al., 2019, Raskin, 1992). Disociační konstanta, resp. hodnota  $pK_a$  kyseliny salicylové je při 20 °C 2,78–2,98 (Serjeant et al., 1979, Davies et al., 2015)



Obrázek 1: Vzorec kyseliny salicylové

Kyselina salicylová se vyrábí pomocí Kolbeho syntézy z fenolu nebo fenolátu sodného. Fenolát sodný reaguje působením oxidu uhličitého za vysokého tlaku a teploty 125 °C v prostředí hydroxidu sodného. Konečný produkt se získá z disodné soli působením  $H_2SO_4$  (Hampel et al., 2007). Tato syntéza je znázorněna na Obrázku 2.



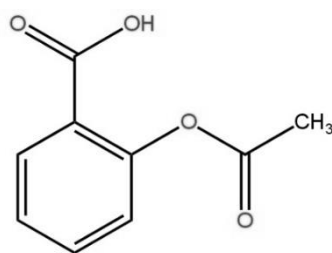
Obrázek 2: Kolbeho syntéza kyseliny salicylové

Kyselinu salicylovou řadíme do skupiny rostlinných fenolů, které patří mezi sekundární metabolity rostlin. Kyselina salicylová má důležitou roli v regulaci rostlinného růstu a vývoje a řadí se mezi fytohormony. Kyselina salicylová byla zařazena Americkou agenturou pro ochranu životního prostředí (US EPA) do seznamu pro kontrolu toxických látek (TSCA) jako experimentální teratogen (Sigmaaldrich.com, 2023, Mishra et al., 2021, Boullard et al., 2000, Lewis, 2008). Jedná se tedy o chemickou látku, která dokáže narušit vývoj plodu nebo jeho funkci.

Dříve byla kyselina salicylová konzumována jako lék pro potlačení bolesti. Dokládají to analýzy archeologických nálezů, konkrétně zubního plaku z fosilií neandrtálců nalezených v jeskyni El Sidrón. Tyto fosilie měly na zubním plaku zbytky kůry z topolu, což naznačuje, že neandrtálci žvýkali topolovou kůru a tlumili tak svou bolest (Weyitich et al., 2017, Klessig et al., 2018).

Velmi významná je nejen samotná kyselina salicylová, ale i její deriváty. Mezi salicyláty patří např. 2-beta-D-glukosid kyseliny salicylové (SAG), glukózový ester kyseliny salicylové (SGE), salicyloyl-L-aspartát a methylsalicylát (MeSA) (Demsey et al., 2011, Vlot et al., 2009, Macháčková, 2008). Funkci nejvýznamnějších salicylátů v rostlině (SAG a SGE) je věnována pozornost dále v textu.

Jeden z neznámějších derivátů kyseliny salicylové je kyselina acetylsalicylová, systematicky kyselina 2-acetyloxybenzoová (Obrázek 3). Při laboratorních podmínkách se kyselina acetylsalicylová vyskytuje v bílé krystalické formě. Stejně jako kyselina salicylová je i kyselina acetylsalicylová špatně rozpustná ve vodě. Tato látka je velmi hojně používána jako analgetikum, antipyretikum a antiflogistikum, tedy při terapii bolesti, horečky a zánětů. Kyselina acetylsalicylová dále snižuje tvorbu krevních sraženin v cévách srdce a mozku, čímž snižuje riziko vzniku cévních mozkových příhod a srdečního infarktu. Kyselina acetylsalicylová je nejstarší synteticky připravené léčivo, které je známo pod několika názvy: Aspirin, Acylpyrin, Anopyrin a jiné. Tyto preparáty se liší pouze skladbou pomocných látek použitých při jejich výrobě (Galanda, 1991, Loucká, 1998).



Obrázek 3: Kyselina acetylsalicylová

Ve stopovém množství se můžeme se salicyláty setkat i v některých nápojích a potravinách, např. v pivu, kávě, batátech a ořechách. (Swain et al., 1985).

### 3.1.2 Kyselina salicylová jako fytohormon

Kyselina salicylová (SA) je rostlinný hormon, který je lokalizován ve floémové vakuole každé rostliny a jeho funkcí je regulace mnoha fyziologických procesů. Kyselinu salicylovou najdeme v rostlinách ve formě volné kyseliny salicylové nebo methylované a glukosylované formě prostřednictvím UDP-glukosyl transferáz, konkrétně SAG (2-beta-D-glukosid kyseliny salicylové) a SGE (beta-D-glukózový ester kyseliny salicylové). Methylované a glykosylované formy kyseliny salicylové jsou v této práci označovány pojmem vázaná kyselina salicylová. Množství kyseliny salicylové se u různých druhů rostlin liší, pohybuje se v rozsahu 0,1–10 µg/g (Mishra et al., 2021, Liu et al., 2022, Rivas-San Vicente et al., 2011, Maruri-López et al., 2019, Noutoshi et al., 2012, Thompson et al., 2017).

Kyselina salicylová má v rostlinách důležitou roli při vývoji květu, klíčení semen, vzcházení semenáčů, růstu buněk, buněčném dýchání a vývoji plodů (Rajou et al., 2006, Vlot et al., 2009, Clarke et al., 2004, Thompson et al., 2017). Mechanismus role kyseliny salicylové při vývoji květu nebyl doposud přesně objasněn. Jednou z mnoha hypotéz je, že kyselina salicylová působí jako chelatační činidlo, které může vyvolat kvetení u některých druhů jednoděložných rostlin (Chisholm et al., 2006, Day et al., 2006). Bylo zjištěno, že kyselina salicylová zprostředkovává reakci rostlin na různé abiotické stresy: teplo, chlad, salinita, sucho, toxicita kovů a další stresy (Mishra et al., 2021, Liu et al., 2022). Kyselina salicylová má důležitou roli v reakcích na abiotický a biotický stres, tato role může být často i nepřímá. Kyselina salicylová mění syntézu a signalizaci jiných fytohormonů (kyselina jasmonová, ethylen a auxin) (Vlot et al., 2009).

Jeden z nejvíce studovaných abiotických stresů je teplo. Předpokládá se, že postupné zvyšování teploty na planetě má na některé rostliny velmi negativní vliv. Dochází k narušení a zpomalení vývoje, rovněž způsobuje sterilitu rostlin a snižuje plodnost rostlin. Řada studií se zabývala rolí vlivu kyseliny salicylové na reakci rostlin na teplo a chlad. V jednom z výzkumu bylo zjištěno, že aplikace kyseliny salicylové zvýšila výnos rýže, a naopak potlačení reakce kyseliny salicylové snížilo tepelnou toleranci u hrachu (Liu et al., 2022, Bita et al., 2013, Yang et al., 2022, Pan et al., 2006). Vysoká teplota také potlačuje imunitu, která následně vede k vyšší náchylnosti rostlin k napadení patogeny (Janda et al., 2019).

Chlad způsobuje omezení růstu a produkce především u teplomilných rostlin. Regulační role kyseliny salicylové při působení chladu byla vyzkoušena u řady rostlinných

druhů (např. kukuřice a meloun). Bylo zjištěno, že po expozici kyseliny salicylové u sledovaných rostlin byl účinek chladu na rostliny mírnější (Liu et al., 2022, Janda et al., 1999, Cheng et al., 2016).

Dalším stresovým faktorem pro rostliny je salinita, která obvykle rostlinám příliš neprospívá. V slaných půdách rostliny často trpí nadměrným osmotickým stresem. Osmotický stres může dále vést k nerovnováze iontů a otravě rostlin. Vědci zjistili, že tento stres snižuje množství kyseliny salicylové u okurky a sóji (Liu et al., 2022, Chojak-Kózniewska et al., 2017, Farhangi-Abri et al., 2018).

Dalším sledovaným stresovým faktorem je vliv toxicity kovů na rostliny. Těžké kovy jsou velice snadno vstřebávány kořeny rostlin, a tím se dále dostávají do těla rostliny. Časté projevy toxicity jsou zpomalení růstu, vadnutí a popřípadě úhyn rostlin. Pokud byla uměle zvýšena koncentrace kyseliny salicylové u rostliny napadené těžkým kovem, docházelo poté ke zlepšení růstových a fotosyntetických schopností. Účinky způsobené vlivem toxicity těžkých kovů (především kadmia) poté nebyly pro rostlinu tak devastující (Liu et al., 2022, Jing et al., 2007, Huihui et al., 2020).

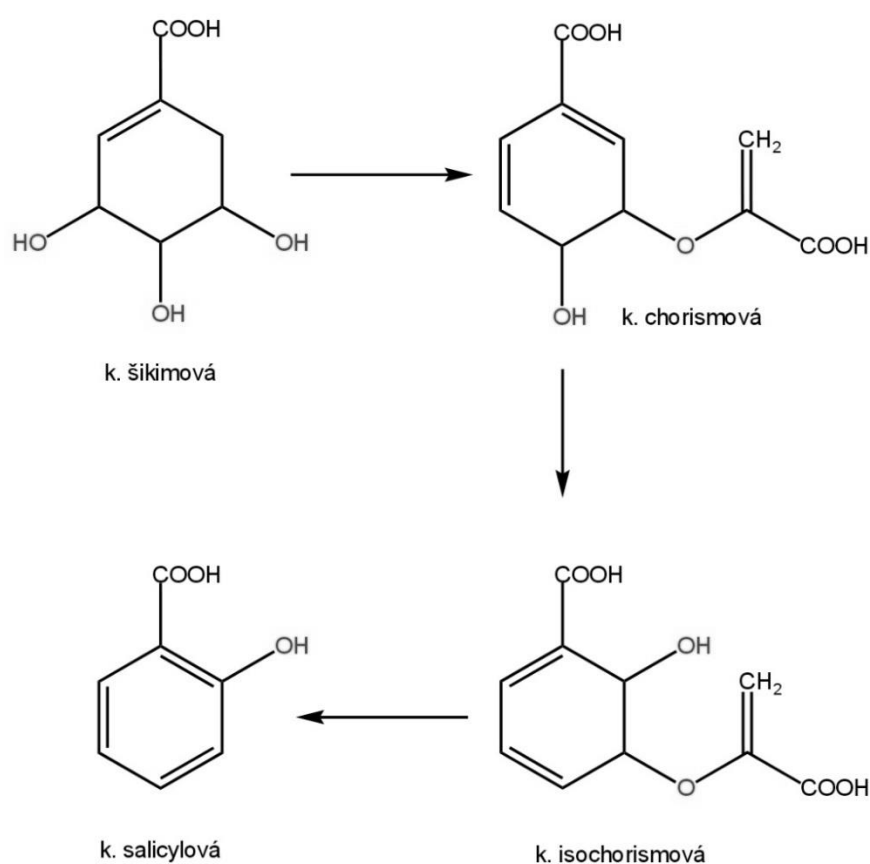
I při dalších nepříznivých podmínkách (sucho, ozon, pesticidy a UV radiace) představuje současné působení kyseliny salicylové v rostlinách důležitou roli. Syntézou kyseliny salicylové v chloroplastech dochází ke zmírnění negativních účinků těchto stresů (Liu et al., 2022).

Ta nejdůležitější a nejvíce studovaná role kyseliny salicylové u rostlin souvisí s obranou proti patogenům (Ding et al., 2020, Liu et al., 2022). První člověk, který vyzoroval, že se kyselina salicylová podílí na rostlinné imunitě, byl Raymond F. White v roce 1979. Tento fakt zjistil při experimentu aplikace Aspirinu v tabáku. Vlivem Aspirinu (acetyl-SA) byly rostliny tabáku rezistentní proti viru tabákové mozaiky (Ding et al., 2020, Liu et al., 2022). Při obraně spojené s kyselinou salicylovou dochází k indukci produkce proteinů, které spouštějí obrannou reakci. Kyselina salicylová je důležitou součástí tzv. systémově získané rezistence (SAR), kdy dochází k reakci nenapadené části rostliny patogenem na lokálně napadenou část rostliny patogenem. I v nenapadených částech rostliny dochází k syntéze kyseliny salicylové i přes to, že tyto části nejsou napadeny patogenem (Hooft Van Huijsduijnen et al., 1986, Hayat et al., 2007, Věchet et al., 2008). Kyselina salicylová zachytí signál od signální molekuly a začne reagovat na patogen svou syntézou (Liu et al., 2022). Zpočátku se akumuluje v lokálně infikovaném pletivu a poté se rozšíří po celé rostlině i do neinfikovaných částí (Maruri-López et al., 2019).

Vedle pozitivní regulace rostlin prostřednictvím kyseliny salicylové lze sledovat i její negativní vliv. Její příliš vysoká koncentrace může ovlivňovat kvetení pupenů a dozrávání plodů. Nedávno bylo dokázáno, že kyselina salicylová negativně přispívá k rezistenci rostlin vůči hmyzu (Ding et al., 2020).

### 3.1.3 Syntéza kyseliny salicylové v rostlinách

Bylo zjištěno, že kyselina salicylová může být syntetizována dvěma cestami: isochorismátovou cestou (IC) a fenylalaninammonia-lyázovou cestou (PALC). Převážná většina kyseliny salicylové (90 %) je syntetizována isochorismátovou cestou (Rekhter et al., 2017, Mishra et al., 2021, Hayat et al., 2007, Coquoz et al., 1998).

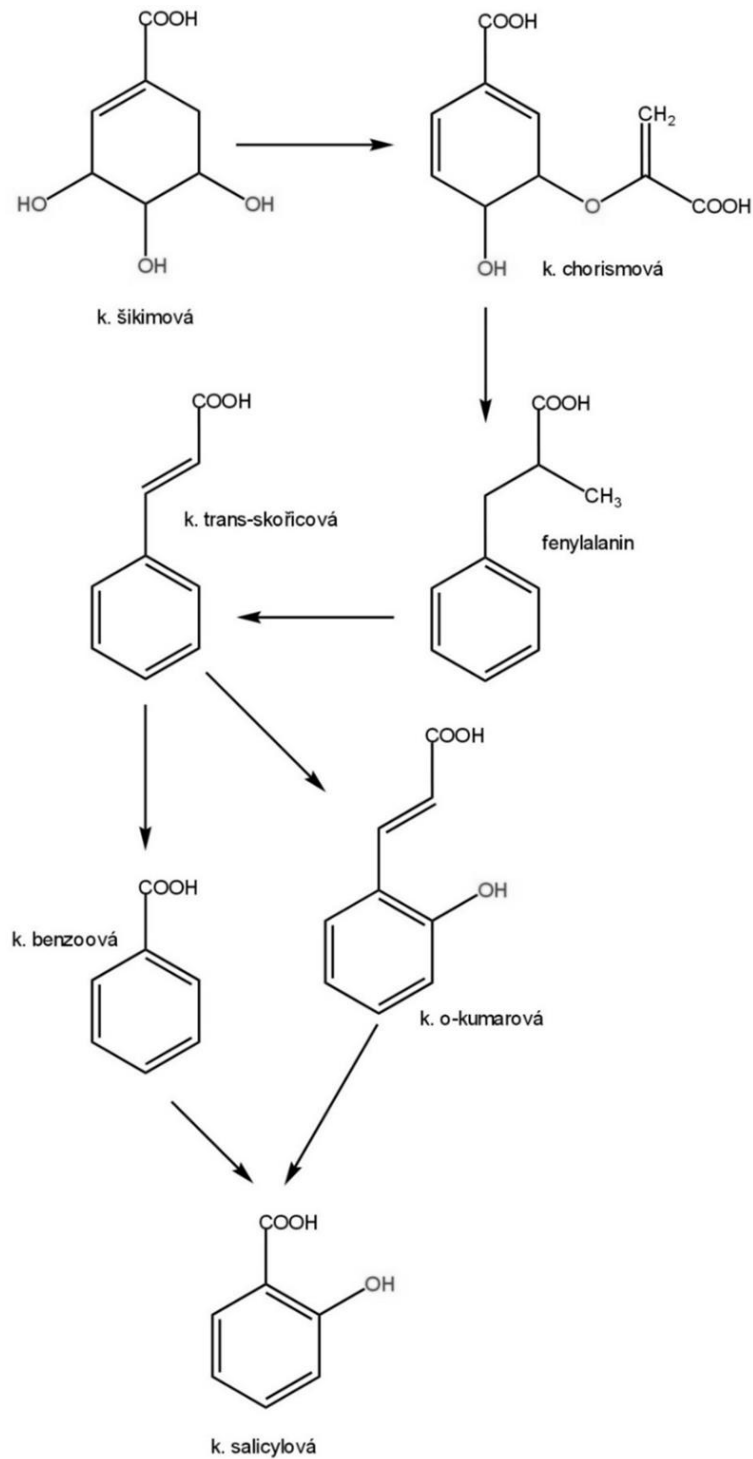


Obrázek 4: Biosyntéza kyseliny salicylové – isochorismátová cesta  
(inspirováno dle: Hasanuzzaman et al., 2017)

Během isochorismátové cesty, znázorněné na Obrázku 4, která je lokalizovaná v plastidech, dochází k akumulaci kyseliny chorismové, která je produkována kyselinou šikimovou. Dále je kyselina chorismová přeměněna na kyselinu isochorismovou pomocí enzymu izochorismát syntázy. Tato kyselina je poté prostřednictvím enzymu izochorismát pyruvát lyázy (IPL) přeměněna na kyselinu salicylovou, která je poté z plastidu



transportována do cytosolu (Rekhter et al., 2019, Mishra et al., 2021, Ding et al., 2020, Fragnière et al., 2011).



Obrázek 5: Biosyntéza kyseliny salicylové – fenylalanin ammonium-lyázová cesta (inspirováno dle: Hasanuzzaman et al., 2017)

Druhá možná cesta syntézy kyseliny salicylové je pomocí fenylalanin ammonium-lyázy. Tato dráha je lokalizována stejně jako isochorismátová cesta v plastidech a je znázorněna na Obrázku 5. V tomto případě je pomocí chorismát mutázy kyselina chorismová přeměněna na kyselinu prefenovou. Poté je tato kyselina redukována na L-fenylalanin a ten je poté pomocí fenylalanin ammonium-lyázy (PAL) přeměněn na kyselinu trans-skořicovou. Z tohoto produktu mohou dále vznikat dva produkty: kyselina *o*-kumarová a benzaldehyd. Kyselina salicylová může vznikat buď přímo z kyseliny *o*-kumarové nebo přeměnou benzylaldehydu na kyselinu benzoovou a poté pomocí hydroxylace na kyselinu salicylovou (Rekhter et al., 2019, Mishra et al., 2021, Maruri-López et al., 2019, Wildermuth et al., 2001, Yalpani et al., 1993).

Po napadení rostliny patogenem dochází k biosyntéze této kyseliny, která je syntetizována do cytosolu (část cytoplazmy). Jelikož je vysoká koncentrace kyseliny salicylové pro rostlinu toxická, nově syntetizovaná kyselina salicylová je ve vázané formě (SAG a SGE) hromaděna ve vakuolách, kde je uložena a skladována. SAG a SGE jsou pravděpodobně neaktivní formy kyseliny salicylové, které podléhají hydrolyze, pokud je koncentrace kyseliny salicylové nízká a nehrozí poškození buněk a pletiv vlivem otravy kyselinou salicylovou. Obrannou reakci způsobuje pouze aktivní nevázaná forma kyseliny salicylové (Maruri-López et al., 2019, Allasia et al., 2018). Systematické názvy chemických sloučenin v biosyntéze kyseliny salicylové jsou uvedeny v Příloze A.

### 3.1.4 Využití kyseliny salicylové

Využití kyseliny salicylové je především v lékařství jako léčivo. Kyselina salicylová se běžně používá k odstranění vnější vrstvy kůže, k léčbě bradavic, lupenky, lupů a jiných kožních onemocnění (Stuart et al., 2009, PubChem, 2004). Další možné využití kyseliny salicylové je při výrobě jiných léčiv, například výroba kyseliny 4-aminosalicylové, používané jako antibiotikum pro léčbu tuberkulózy (AHFS Patient Medication Information, 2016).

Jedno z nejdůležitějších využití kyseliny salicylové je výroba kyseliny acetylsalicylové, kterou známe pod názvem Aspirin (Boullard et al., 2000). Aspirin se připravuje pomocí esterifikace hydroxylové skupiny na aromatickém jádře acetylovou skupinou z acetanhydridu nebo acetylchloridu (Watson et al., 2011).

### 3.2 Stanovení kyseliny salicylové pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenčním a spektrofotometrickým detektorem

Kvantitativní stanovení kyseliny salicylové je prováděno především pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi. K detekci se nejčastěji využívá spektrofotometrický detektor (UV/VIS) nebo fluorescenční detektor (FL). V praxi je kyselina salicylová stanovována obvykle s dalšími látkami, např. s kyselinou acetylsalicylovou (kyselina 2-acetyloxybenzoová), dehydrooctovou (3-acetyl-2-hydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on), benzoovou (kyselina benzenkarboxylová), sorbovou (kyselina 2,4-hexadienová), niaciamidem (3-pyridinkarboxamid) a dalšími (Petrek et al., 2007, Patel et al., 2013, Swain, et al., 1985, Mikami et al., 2002). Mezi optimalizované parametry v průběhu zavádění metody patří vlastnosti stacionární fáze, složení mobilní fáze, teplota kolonového prostoru, typ a podmínky detekce, za účelem dosažení separace a dostatečné meze detekce a meze kvantifikace.

V Tabulce 1 je uveden souhrn parametrů dosud publikovaných analytických podmínek pro stanovení kyseliny salicylové pomocí kapalinové chromatografie s využitím FL a UV/VIS detektoru. Ve všech publikacích byla použita kolona C18, jednotlivé aplikace se liší parametry kolony. Vodná mobilní fáze byla fosfátový pufr (Aresta et al., 2016, Bhuyian et al., 2015, Pirola et al., 1998) nebo acetátový pufr (Rozhon et al., 2005), okyselená voda kyselinou trifluoroctovou (TFA) (Allasia et al., 2018, Cheng et al., 2022), kyselinou mravenčí (Kožuszniková, 2016), kyselinou octovou (Ratzinger et al., 2009), kyselinou methansulfonovou (Shou et al., 2009) popřípadě kyselinou fosforečnou (Toiu et al., 2011). Obvykle je publikována úprava pH vodné mobilní fáze v rozsahu 2–3. Jako organické rozpouštědlo v mobilní fázi byl použit acetonitril nebo methanol. Rovněž byla použita mobilní fáze na bázi tercbutylalkohol/voda/methanol (Mikami et al., 2002). V publikovaných metodách byla použita jak isokratická tak gradientová eluce. Teploty kolonového prostoru se pohybovaly v rozsahu 25–45 °C. Jako detektory byly ve studiích používány především UV/VIS detektory při optimální vlnové délce v rozmezí 234–340 nm. Ve dvou publikacích byl použit FL detektor při excitační vlnové délce 300, resp. 310 nm a emisní vlnové délce 410, resp. 450 nm (Toiu et al., 2011, Rozhon et al., 2005). Meze detekce se pohybovaly od  $5 \times 10^{-8}$  g/ml do 0,002 g/ml a mez kvantifikace se pohybovala od  $7 \times 10^{-5}$  g/ml do 0,007 g/ml. Jako vnitřní standard byla použita kyselina benzoová (Cheng et al., 2022), kyselina 5-fluorosalicylová (Rozhon et al., 2005) a kyselina 2-methoxybenzoová (OAA) (Allasia et al., 2018). Extrakce analytů za účelem HPLC analýzy byly prováděny z kosmetických produktů

(masti a krémy), částí rostlin a rovněž z biologických vzorků (lidská kůže, sliny a krev).  
Podrobnější údaje o matricích jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Souhrn optimalizovaných podmínek HPLC analýzy kyseliny salicylové dle uvedených publikací

Rozměry	Mobilní fáze	LOD [g/ml, resp. g/g]	LOQ [g/ml]	Matrice	Citace
4,6 × 250 mm, 5 μm	MFA: 0,1 obj.% TFA/H <sub>2</sub> O MFB: 0,1 obj.% TFA/ CH <sub>3</sub> OH	–	–	listy <i>Arabidopsis thaliana</i>	Allasia et al., 2018
4,6 × 100 mm, 2,6 μm	MFA: fosfátový pufr (pH 2,8; 2 mM) MFB: CH <sub>3</sub> CN	2 × 10 <sup>3</sup> (LOD <sub>m</sub> )	7 × 10 <sup>3</sup> (LOQ <sub>m</sub> )	ovocná šťáva, ovoce	Aresta et al., 2016
4,6 x 250 mm, 5 μm	MFA: fosfátový pufr (0,0068 g/l) MFB: CH <sub>3</sub> OH MFC: CH <sub>3</sub> OH:CH <sub>3</sub> CN (1:1)	–	–	mast Clobetasol	Bhuyian et al., 2015
4,6 × 250 mm, 5 μm	MFA: 0,1 obj.% TFA/H <sub>2</sub> O MFB: CH <sub>3</sub> CN	3,3 × 10 <sup>-8</sup> (LOD <sub>i</sub> )	1,0 × 10 <sup>-5</sup> (LOQ <sub>i</sub> )	lidské sliny, krevní plazma	Cheng et al., 2022
4,6 × 150 mm; 3 μm	MFA: 3 obj.% HCOOH/H <sub>2</sub> O MFB: 72 obj.% CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O	4,0 × 10 <sup>-10</sup> (LOD <sub>i</sub> )	1,2 × 10 <sup>-9</sup> (LOQ <sub>i</sub> )	kůra a listy <i>Salix alba</i>	Kožuszniková, 2016

4,6 × 150 mm, 5 μm	MFA: 2,5mM TBA/H <sub>2</sub> O (pH 7) MFB: 2,5mM TBA/ CH <sub>3</sub> OH	5,5 × 10 <sup>-9</sup> (LOD <sub>i</sub> )	7,0 × 10 <sup>-5</sup> (LOQ <sub>m</sub> )	kosmetický produkt	Mikami et al., 2002
4,6 × 250 mm	MFA: voda (pH 3) MFB: CH <sub>3</sub> OH	–	–	kosmetický krém	Patel et al., 2013
3,2 × 150 mm, 5 μm	MFA: H <sub>2</sub> O MFB: fosfátový pufr (pH 2,5) MFC: CH <sub>3</sub> CN	5,0 × 10 <sup>-8</sup> (LOD <sub>m</sub> )	1,0 × 10 <sup>-7</sup> (LOQ <sub>m</sub> )	lidská kůže, lidská plazma	Pirola et al., 1998
2 × 100 mm, 3 μm	MFA: 7mM CH <sub>3</sub> COOH 5 obj.% CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O MFB: 7 mM CH <sub>3</sub> COOH/ CH <sub>3</sub> OH	–	–	<i>Brassica napus</i> <i>var. napus</i>	Ratzinger et al., 2009
4,6 mm × 150 mm, 5 μm	MFA: 50mM CH <sub>3</sub> COONa/H <sub>2</sub> O MFB: CH <sub>3</sub> CN	5,0 × 10 <sup>-9</sup> (LOD <sub>m</sub> )	–	<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	Rozhon et al., 2005
4,6 mm × 150 mm, 4 μm	MFA: 0,05 obj.% CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H/H <sub>2</sub> O MFB: CH <sub>3</sub> CN	–	–	Diprosalic Lotion– protizánětlivý léčivý prostředek	Shou et al., 2009

3 mm × 100 mm, 3,5 μm	MFA: 0,1 obj.% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O MFB: CH <sub>3</sub> CN	–	–	<i>Salicis cortex,</i> <i>Populi gemmae a</i> <i>Ulmariae folium</i>	Toiu et al., 2011
-----------------------	--	---	---	--	----------------------

### **3.3 Extrakce kyseliny salicylové z rostlinných vzorků**

Postupy extrakce kyseliny salicylové z rostlinných materiálů jsou ovlivněny řadou faktorů. Důležitou roli zaujímá konkrétní druh rostliny, množství dostupného rostlinného materiálu, zda jde o stanovení pouze volné nebo rovněž vázané SA a popřípadě dalších analytů. Důležitá je i volba vnitřního standardu. V Tabulce 2 je uveden souhrn dříve publikovaných parametrů extrakcí.



Tabulka 2: Souhrn parametrů extrakcí

Rostlina a rostlinná část	Navážka	Činidla pro postupnou extrakci, hydrolýzu, rozpuštění	Homogenizace	Vnitřní standard	Citace
listy <i>Arabidopsis thaliana</i>	40 mg	70% CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH, 90% CH <sub>3</sub> OH, 20% TCA, ethylacetát:cyklohexan, 10% CH <sub>3</sub> OH + 0,1% TFA, 37% HCl, ethylacetát:cyklohexan, 10% CH <sub>3</sub> OH + 0,1% TFA	vortex/ třepačka	kyselina 2-methoxybenzoová	Allasia et al., 2018
listy <i>Aloe</i>	0,5 g	90% CH <sub>3</sub> OH, 5% TCA, ethylacetát:cyklohexan, methanolvý PBS pufr	vortex	–	Fang et al., 2018
listy <i>Aloe barbadensis miller</i>	50 g	99,5% CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	–	–	Luong et al., 2023
listy <i>Arabidopsis thaliana</i>	–	–	–	–	Marek et al., 2010
listy <i>Persica vulgaris</i>	100 g	CH <sub>3</sub> OH	třepačka	–	Özpinar et al., 2017
listy <i>Nicotiana tabacum</i>	0,2 g	90% CH <sub>3</sub> OH, 100% CH <sub>3</sub> OH, 5% TCA, ethylacetát:cyklohexan, 8M HCl, ethylacetát:cyklohexan	vortex/ ultrazvuk	3,4-dihydroxybenzaldehyd	Veberne et al., 2002

Luong et al. a Fang et al. extrahovali stanovené látky z rostliny rodu *Aloe*. Kyselina salicylová byla rovněž extrahována z rostlin *Persica vulgaris* (Özpinar et al., 2017), *Nicotiana tabacum* (Veberne et al., 2002) a *Arabidopsis thaliana* (Marek et al., 2010). Ve všech uvedených studiích byla kyselina salicylová extrahována z listů rostlin. Extrakce byly prováděny s navázkou rostlinného materiálu v rozmezí 0,2 – 100 g. Příprava rostlinných vzorků k vlastní extrakci analytů byla prováděna pomocí drcení pod tekutým dusíkem. Ve studii Özpinar et al. autoři drtili listy *Persica vulgaris* v mlýnku bez použití dusíku. U *Aloe barbadensis* miller ve studii nebylo potřeba rostliny drtit, autoři použili vnitřní sliz rostliny a poté ho scedili (Luong et al., 2023).

Jako extrakční činidla se v publikovaných postupech používá v prvním kroku ethanol a methanol. Pomocí těchto rozpouštědel se získá supernatant, který obsahuje jak volnou, tak vázanou SA. Po odfoukání alkoholových rozpouštědel je přidáván roztok TCA a následuje extrakce volné SA. Extrakce volné SA obvykle probíhá do směsi rozpouštědel, např. ethylacetát-cyklohexan. Vázaná SA, která není extrahována současně s volnou SA je následně ve vodné fázi hydrolyzována působením koncentrovaného roztoku kyseliny chlorovodíkové a poté extrahovaná z vodné fáze do směsi organických rozpouštědel. Po odfoukání organických rozpouštědel použitých k extrakci jak volné, tak vázané SA, je vzorek před analýzou rozpuštěn v rozpouštědle používaném jako vodná mobilní fáze.

Během extrakce je nutno vzorky homogenizovat, pro zajištění dokonalé homogenizace byly použity techniky vortex, ultrazvuk nebo laboratorní třepačky. Vzorky byly míchány pomocí vortexu ve studiích Veberne et al., 2002 a Fang et al., 2018. Ve studii Veberne et al., 2002 byl k homogenizaci v průběhu extrakce také použit ultrazvuk. Třepačka byla použita ve studii Özpinar et al., 2017. Ve zbylých studiích nebyl způsob homogenizace uveden.

Pro zajištění přesných a správných výsledků se doporučuje extrakci analytů ze vzorku provádět při současném použití vnitřního standardu. V analyzovaných studiích byl vnitřní standard použit pouze ve dvou pracích. Veberne et al., 2002 použili ve své studii jako vnitřní standard 3,4-dihydroxybenzaldehyd. Zbylé studie vnitřní standard nepoužily. Vnitřní standard je většinou volen v závislosti na druhu rostlin. Pro rostlinné vzorky, které byly analyzovány v mé práci, byl zvolen jako vnitřní standard kyselina 2-methoxybenzoová (OAA) stejně jako ve studii Allasia et al., 2018, ze které má práce vycházela.

### 3.4 Parametry validace metody

Validací analytické metody je definována její vhodnost pro použití k získání spolehlivých dat. Během validace metody, zavedené v této práci, byly hodnoceny následující parametry: linearita a rozsah metody, správnost, přesnost, mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ).

Lineární závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu lze vyjádřit pomocí rovnice kalibrační křivky. Tento vztah je definován v rovnici (1), kde  $y$  značí odezvu detektoru,  $c$  udává koncentraci analytu,  $a$  je směrnice kalibrační křivky a  $q$  udává intercept (Nováková et al., 2021).

$$y = a \times c + q \quad (1)$$

Pro stanovení linearit se využívají vzorky s takovými koncentracemi analytů, které pokrývají celý deklarovaný rozsah metody. Pro hodnocení linearit byl použit korelační koeficient ( $R$ ), QC koeficient a hodnota difference teoretické a vypočtené hodnoty. Kritériem přijatelnosti pro korelační koeficient bylo  $R > 0,9900$  a pro QC koeficient  $QC < 5 \%$  (AOAC 2016).

Diference je definována jako rozdíl naměřené a teoretické hodnoty koncentrace vyjádřený v procentech. Pro nejnižší kalibrační bod nesmí diference přesáhnout 20 % a pro ostatní kalibrační body nesmí přesáhnout 15 % (FDA 2018).

Dalšími parametry pro validaci analytické metody jsou správnost a přesnost. Správnost neboli výtěžnost je parametr, který je definován jako těsnost shody mezi experimentálně zjištěnou hodnotou koncentrace analytu a referenční reálnou hodnotou koncentrace analytu. Hodnota správnosti se udává v procentech (Nováková et al., 2021).

Přesnost představuje těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky analýz referenčního vzorku získanými za účelem opakovatelnosti (Nováková et al., 2021). Kritéria přijatelnosti pro kyselinu salicylovou na použité koncentrační úrovni v této práci jsou pro správnost 80–110 % a pro přesnost hodnota do 15 % (AOAC, 2016).

Důležitými parametry HPLC metody určené pro kvantitativní stanovení analýzy je mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). V případě meze detekce se jedná o takovou koncentraci stanovované látky, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Nejnižší koncentrace, pro kterou hodnoty dosažené přesnosti a správnosti dovolují kvantifikovat, nazýváme mezí stanovitelnosti (Nováková et al., 2021). Pro odhad instrumentální meze detekce nabývá poměr signálu a šumu detektoru ( $S/N$ ) hodnoty 3, v případě odhadu instrumentální meze stanovitelnosti se řídíme hodnotou  $S/N = 10$ . Hodnota

instrumentální meze stanovitelnosti je následně dána koncentrací nejnižšího kalibračního roztoku, tedy spodní hranou intervalu linearity. Instrumentální meze detekce a instrumentální meze stanovitelnosti je následně nutné zohledněním procesu přípravy vzorku k analýze (ředění, zakoncentrování atp.) přepočítat na mez detekce metody a na mez stanovitelnosti metody (Nováková et al., 2021, AOAC, 2016).

## **4 Materiály a metody**

### **4.1 Použité chemikálie**

- Methanol (absolutní, LC-MS Biosolve BV)
- Methanol (p. a., Penta)
- Kyselina salicylová (99 %, Duchefa)
- Milli-Q voda generována přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo Fisher Scientific)
- Kyselina 2-methoxybenzoová (99 %, Aldrich)
- Kyselina trifluoroctová (99,9 %, Carl Roth GmbH)
- Kyselina trichloroctová (p. a., Serva)
- Ethanol (p. a., Penta)
- Ethylacetát (p. a., Lachner)
- Cyklohexan (p. a., Lachner)
- Kyselina chlorovodíková (p. a., Penta)

### **4.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál**

- Kapalinový chromatograf s UV a FLD detekcí (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific)
- Pro ovládání kapalinového chromatografu a zpracování chromatogramů byl použit program Chromeleon 7.2.
- Chromatografická kolona ARION Plus C18; délka 150 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 5,0  $\mu\text{m}$  (Chromservis)
- Chromatografická kolona LUNA C18; délka 250 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 5,0  $\mu\text{m}$  (Phenomenex)
- Analytické váhy (Mettler Toledo)
- Výrobník deionizované vody (Smart2Pure 6 UV/UF, Thermo Fisher Scientific)

- Lednice pro laboratorní vzorky s mrazákem (- 20 °C) (Liebherr)
- Generátor dusíku (Genius 1022, PeakScientific)
- Blok pro odpařování vzorků (Stuart)
- Ultrazvuková lázeň (VWR)
- Centrifuga (Eppendorf)
- Vortex (VWR)
- Automatická dávkovací pipeta o objemu 20–200 µl (Eppendorf)
- Automatická dávkovací pipeta o objemu 100–1000 µl (Eppendorf)
- Automatická dávkovací pipeta o objemu 1–10 ml (Eppendorf)
- Skleněné dávkovací stříkačky o objemu 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl (Hamilton)
- Odměrné sklo: třída přesnosti A (FischerBrand)
- Laboratorní sklo
- Skleněné dávkovací stříkačky o objemu 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl (Hamilton)
- Skleněné vialky (4 ml)
- Krimpovací kleště, pinzeta
- Spotřební materiál: plastové špičky, krimpovací vialky (1,5 ml) z tmavého skla s hliníkovým uzávěrem s pryžovým septem, hliníková fólie, mikrozkuřavky typu eppendorf (2 ml, 4 ml)

## 4.3 Příprava roztoků

### 4.3.1 Mobilní fáze

Pro zavedení metody a vlastní analýzu vzorků byla použita jako mobilní fáze A (MFA) okyselená voda kyselinou trifluoroctovou (0,1 obj.% TFA/H<sub>2</sub>O) a jako mobilní fáze B (MFB) 0,1% roztok TFA v methanolu (0,1 obj.% TFA/CH<sub>3</sub>OH).

### 4.3.2 Roztoky standardu a vnitřního standardu

V průběhu práce byl připravován zásobní roztok standardu kyseliny salicylové (SA) o přesné koncentraci ~1000 mg/l. Z tohoto roztoku byly poté připraveny pracovní roztoky o koncentracích 20 mg/l a 4 mg/l. Jako rozpouštědlo byl použit 10% methanol. Dále byl během této práce připraven zásobní roztok vnitřního standardu 2-methoxybenzoové kyseliny (OAA) o koncentraci přibližně asi 15 000 mg/l. Ze zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok

OAA o koncentraci 15 mg/l. Jako rozpouštědlo pro zásobní roztok byl použit 70% ethanol a pro pracovní roztok 10% methanol.

Při přípravě roztoku standardu bylo potřeba uchovávat látky i roztoky v alobalu a v tmavém prostoru, protože je stanovovaná látka citlivá na světlo. Zásobní roztoky standardu a vnitřního standardu byly uchovávány v boxu při teplotě - 80 °C po dobu 1 měsíce, pracovní roztoky byly uchovávány v lednici maximálně po dobu 1 týdne.

#### **4.3.3 Kalibrační roztoky**

Přehled připravovaných kalibračních roztoků je uveden v Tabulce 3 a 4. V průběhu diplomové práce byly připraveny 2 sady kalibračních roztoků, jedna sada s VS a druhá bez VS. Za účelem validace byly kalibrační roztoky připraveny pro každou koncentrační úroveň ve čtyřech, resp. třech opakování, při rutinních analýzách v jednom opakování. Pro kalibrační roztoky s VS byl použit pracovní roztok kyseliny salicylové o koncentraci 20 mg/l a pro kalibrační roztoky bez VS byl použit pracovní roztok kyseliny salicylové o koncentraci 4 mg/l. Pro odhad instrumentální meze detekce byl připraven rovněž roztok o koncentraci SA 2 µg/l.

Při přípravě obohacených vzorků v průběhu validace metody byl pro obohacování použit pracovní roztok kyseliny salicylové o koncentraci 4 mg/l. Bylo dávkováno 10 µl na celkový objem 100 µl vzorku. Pro vyhodnocení přesnosti a správnosti byly provedeny analýzy extraktů z rostlinných materiálů bez a s přidavkem pracovního obohacovacího roztoku (4 mg/l) v šesti opakováních. Byly připraveny dvě série vzorků. První série byla připravena ze směsného extraktu za účelem ověření přesnosti a správnosti samotného chromatografického stanovení. Druhá série byla 6 zcela nezávislých opakování. Byla provedena extrakce 12 navážek rostlinného materiálu, pro 6 z nich bylo provedeno spikování.

Tabulka 3: Příprava kalibračních roztoků s vnitřním standardem (kolona LUNA)

Koncentrační úroveň	Objem ST [μl]	Objem VS [μl]	Objem MF [μl]	Celkový objem [μl]	Koncentrace [μg/l]
1	1	100	899	1000	20
2	5	100	895	1000	100
3	10	100	890	1000	200
4	25	100	875	1000	500
5	50	100	850	1000	1000
6	100	100	800	1000	2000
7	250	100	650	1000	5000
8	375	100	525	1000	7500
9	500	100	400	1000	10000

Tabulka 4: Příprava kalibračních roztoků bez vnitřního standardu (kolona LUNA a ARION)

Koncentrační úroveň	Objem ST [μl]	Objem MF [μl]	Celkový objem [μl]	Koncentrace [μg/l]
1	5	995	1000	20
2	10	990	1000	40
3	15	985	1000	60
4	25	975	1000	100
5	50	950	1000	200
6	100	900	1000	400
7	250	750	1000	1000
8	500	500	1000	2000
9	750	250	1000	3000
10	1000	0	1000	4000

#### 4.3.4 Roztoky pro extrakce a přípravu vzorku k analýze

Během diplomové práce byly pro extrakci analytu (SA) z rostlinného materiálu připraveny následující roztoky: 70% ethanol (70 obj.% CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH/H<sub>2</sub>O), 90% methanol (90 obj.% CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O), 20% roztok kyseliny trichloroctové (TCA) (20 obj.% TCA/H<sub>2</sub>O), 1:1 ethylacetát:cyklohexan, 10% methanol (10 obj.% CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O) a 37% HCl (37 obj.% HCl/H<sub>2</sub>O). Během diplomové práce byly tyto roztoky připraveny pouze jednou v dostatečném množství pro veškeré extrakce.

#### 4.4 Nastavení podmínek fluorescenční detekce

Nejprve bylo proměřeno absorpční spektrum analytu. Pro analyt byla vybrána excitační vlnová délka jako maximum absorpčního spektra. Poté bylo proměřeno emisní

spektrum při konstantní excitační vlnové délce. Měřením emisního spektra bylo získáno maximum, tedy hodnota emisní vlnové délky pro následné měření excitačního spektra. Excitační spektrum bylo proměřeno za konstantní emisní vlnové délky. Z naměřeného excitačního spektra bylo určeno excitační maximum. Měření excitačního a emisního spektra umožnilo vhodnou volbu excitační a emisní vlnové délky a emisního filtru. Emisní filtr byl zvolen mezi hodnotou excitační a emisní vlnové délky. Po nastavení podmínek fluorescenčního detektoru pro analyt kyseliny salicylové byly stejným postupem optimalizovány podmínky detekce pro vnitřní standard. Senzitivita detektoru byla nastavena tak, aby vliv šumu byl co nejnižší a zároveň, aby nedocházelo k přesycení detektoru (Franz a Jendreizik 2010; Pilík 2018).

## **4.5 Extrakce kyseliny salicylové z listu rostliny**

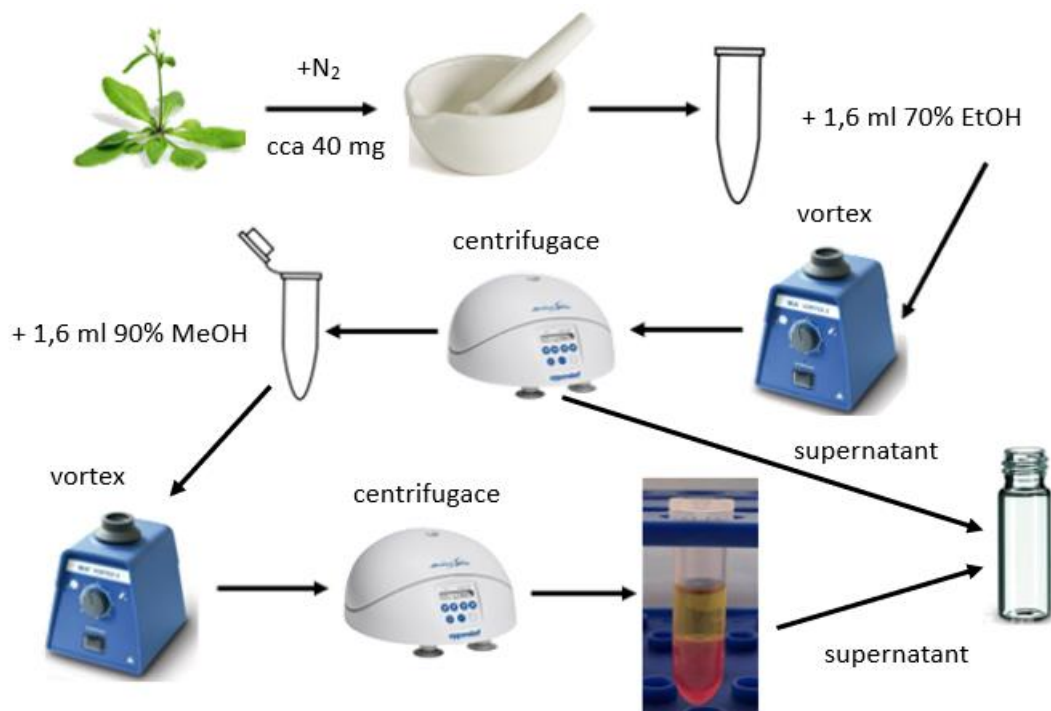
### **4.5.1 Postup extrakce**

V následujícím textu je postup extrakce SA ze vzorku rostlin rozdělen do 3 kroků. Nejprve je popsán postup přípravy vzorku před vlastní extrakcí a současná extrakce volné a vázané SA, v druhé části postup extrakce volné SA a v poslední části postup extrakce vázané SA. Extrakční postup byl zaveden ve spolupráci s Katedrou experimentální biologie.

#### **Krok 1: Příprava vzorků**

Extrakce probíhaly dle postupu uvedeného v publikaci Allasia et al., 2018. Rostlinný materiál (různé vzorky *Arabidopsis thaliana* a máku setého *Papaverum somniferum*) pro extrakce volné a vázané SA byl nejprve rozdrcen v třecí misce za stálého chlazení dusíkem. Následně bylo naváženo přesně asi 40 mg materiálu do 2ml mikrozkušavky typu Eppendorf. Do přidání vnitřního standardu byly mikrozkušavky uchovávány v ledu a temnu. Do mikrozkušavky s naváženým vzorkem bylo přidáno 1,6 ml extrakčního rozpouštědla č.1 (70% ethanol), obsah byl promíchán pomocí vortexu (cca 10 sekund, 3krát). Dále byl extrakt centrifugován (10 minut, 30000 g). Supernatant byl převeden do 4ml skleněné vialky. K vzorku v mikrozkušavce bylo přidáno 1,6 ml extrakčního rozpouštědla č.2 (90% methanol). Extrakt byl vortexován (cca 10 sekund, 3krát) a centrifugován (10 minut, 30000 g). Poté byl odebrán supernatant do stejné 4ml skleněné vialky jako předešlý supernatant. Příprava vzorků je znázorněna na Obrázku 6.

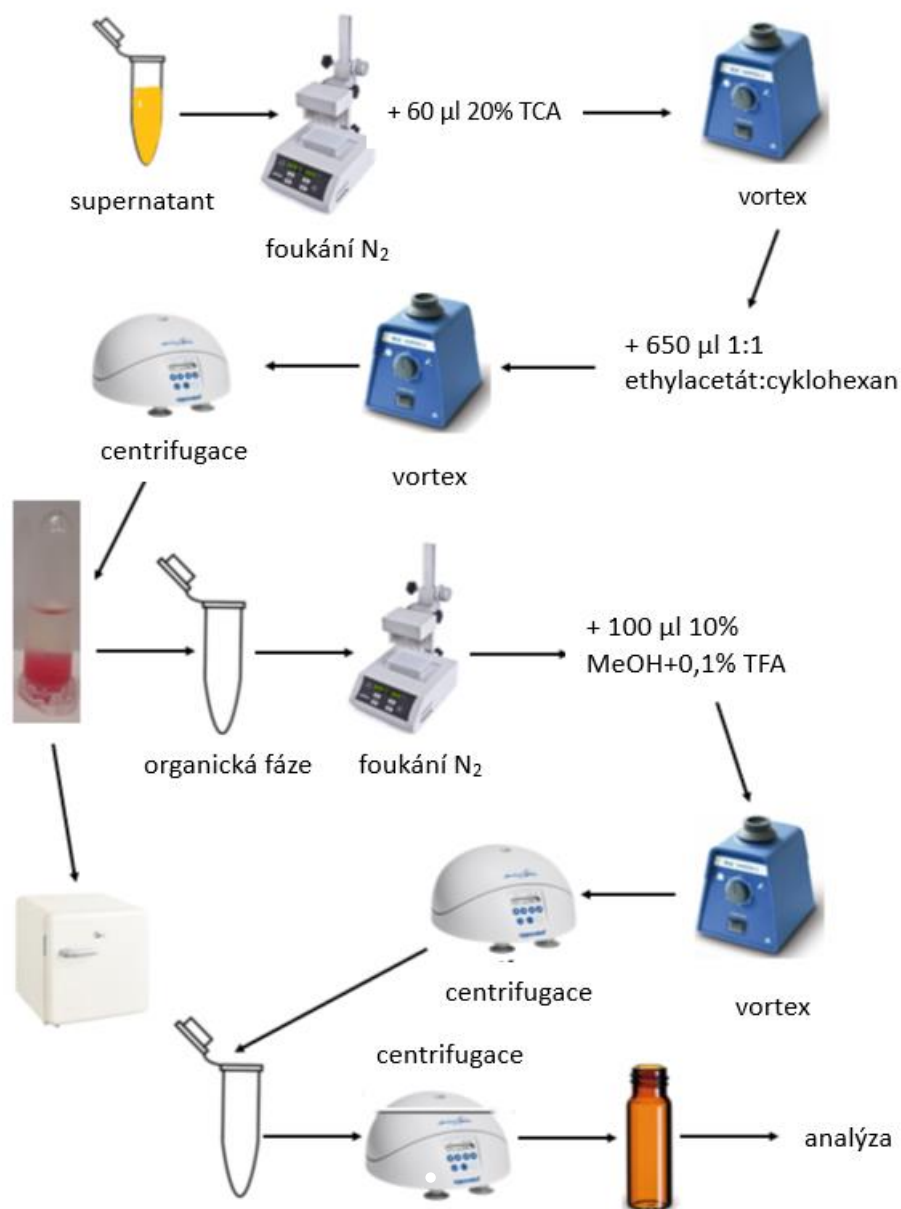




Obrázek 6: Schéma přípravy vzorků

#### Krok 2: Extrakce volné kyseliny salicylové

Získaný supernatant v 1. kroku byl postupně převeden do 2ml mikrozkušavky za současného vyfoukání rozpouštědla dusíkem do objemu  $\sim 600 \mu\text{l}$ . Poté bylo do extraktu přidáno  $65 \mu\text{l}$  20% TCA a vzorek byl krátce promíchán pomocí vortexu. Následně bylo ke vzorku přidáno  $650 \mu\text{l}$  směsi ethylacetát:cyklohexan a vzorek byl znovu promíchán pomocí vortexu. Dále byl extrakt centrifugován (2 minuty, 30000 g). Po odstředění bylo ze vzorku opatrně odebráno maximální možné množství organické fáze do nové 2ml mikrozkušavky. Extrakce se směsí ethylacetát:cyklohexan byla provedena podruhé a opět byla odebrána organická fáze. Oba podíly organické fáze byly spojeny. Vodná fáze, obsahující část extraktu s vázanou kyselinou salicylovou, byla uchována do dalšího dne v lednici, kdy byla prováděna extrakce vázané SA (Krok 3). Z oddělené organické fáze bylo následně odfoukáno organické rozpouštědlo dusíkem. Po vysušení bylo do vzorku přidáno  $100 \mu\text{l}$  10% methanolu a vzorek byl krátce promíchán pomocí vortexu. Poté byl extrakt centrifugován (2 minuty, 30000 g). Vzorky byly přeneseny do nových mikrozkušavek a opět byla provedena centrifugace (10 minut, 30000 g). Posledním krokem bylo přenést supernatant do tmavých HPLC vialek s inserty. Poté byla provedena HPLC analýza obsahu volné kyseliny salicylové. Postup extrakce volné kyseliny salicylové je znázorněna na Obrázku 7.

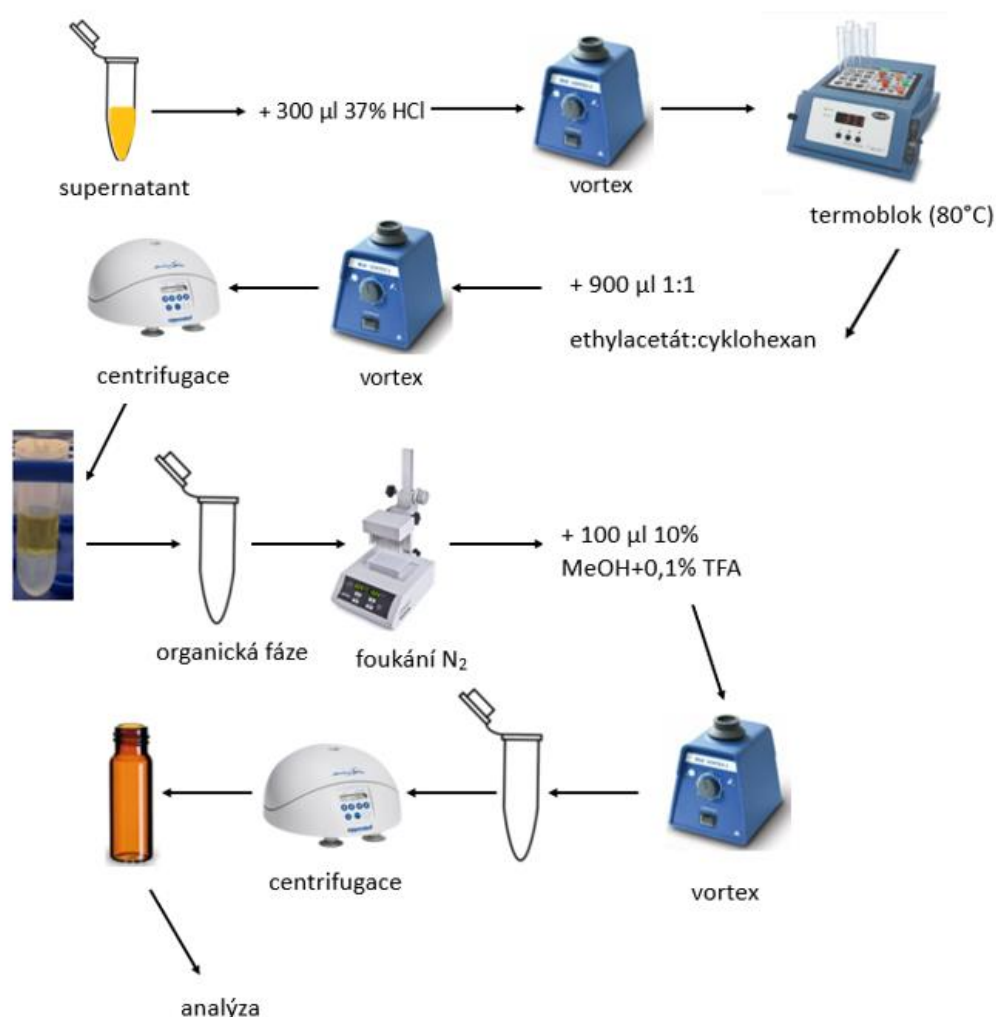


Obrázek 7: Schéma extrakce volné kyseliny salicylové

### Krok 3: Extrakce vázané kyseliny salicylové

Do vzorků s vodnou fází z předchozího dne bylo přidáno 300 µl koncentrované HCl a vzorky byly krátce promíchány pomocí vortexu (5 sekund). Poté byla provedena hydrolýza extraktů ponecháním vzorků v topném bloku (80 °C) po dobu 1 hodiny. Po hydrolýze a ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 900 µl směsi ethylacetát:cyklohexan a opět byly vzorky krátce promíchány pomocí vortexu. Dále byly vzorky centrifugovány (2 minuty, 30000 g). Dalším krokem bylo přenést horní organickou fází do nových mikrozkušavek. Extrakce byla zopakována pomocí směsi ethylacetát:cyklohexan. Ze sloučených podílů odebrané organické fáze bylo rozpouštědlo odpařováno pod dusíkem. Po odpaření bylo

k suchému extraktu přidáno 100  $\mu\text{l}$  10% methanolu a vzorky byly krátce promíchány pomocí vortexu. Vzorky byly krátce centrifugovány, převedeny do nových mikrozkušavek a opět centrifugovány (10 minut, 30000 g). Po odstředění byly extrakty přeneseny do tmavých HPLC vialek s inserty. Poté byla provedena HPLC analýza vázané SA. Postup extrakce vázané kyseliny salicylové je znázorněn na Obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma extrakce vázané kyseliny salicylové

Postup extrakce byl převzat z publikace Allasia et al., 2018 (Kapitola 4.5.1). Bylo provedeno několik změn, především kvůli nestabilitě kyseliny salicylové na světle a koeluci píku vnitřního standardu s dalšími látkami v extraktech při HPLC analýze.

Z důvodu citlivosti kyseliny salicylové na světlo byly vzorky během procesu extrakce uchovány v tmavých prostorách (skříň, lednice, krabice) nebo zakryté alobalem. Při foukání dusíkem byla digestoř zakryta alobalem pro minimalizaci vlivu světla. Po dokončení extrakce byly vždy vzorky přeneseny do tmavých vialek s inserty.

Extrakce volné i vázané kyseliny salicylové trvala dohromady přibližně 20 hodin. Pro zkrácení průběhu extrakce byly zkráceny doby míchání na vortexu na několik sekund, protože bylo experimentálně zjištěno, že u vzorků není potřeba delší doba míchání.

Na základě extrakce bez rostlinného materiálu pouze s roztokem standardů byl ověřován kvantitativní průběh extrakce a sledována výtěžnost procesu jak s vnitřním standardem, tak bez vnitřního standardu.

## 5 Výsledky a diskuse

Kapitola výsledky a diskuse je věnována popisu a zhodnocení průběhu optimalizace analytické metody a jejího použití k analýze rostlinných vzorků. Nejprve proběhla optimalizace chromatografické separace kyseliny salicylové a vnitřního standardu, při které byly sledovány retenční časy a symetrie píků. Pro zavedené podmínky chromatografické separace bylo možné najít optimální podmínky fluorescenčního detektoru. Pro analyt kyseliny salicylové a vnitřního standardu byly nalezeny excitační a emisní vlnové délky. Na základě excitačních a emisních vlnových délek byl zvolen vhodný optický filtr.

V průběhu optimalizace extrakce byl na základě dříve publikovaného postupu (Allasia et al., 2018) zaveden vhodný postup extrakce pro podmínky naší laboratoře. V průběhu celé práce byla věnována velká pozornost manipulaci se vzorky vzhledem k nestabilitě kyseliny salicylové na světle.

Zavedená analytická metoda byla následně validována. Validačními parametry byly linearita, přesnost, správnost, mez detekce a mez stanovitelnosti metody.

Po validaci metody byla analytická metoda použita ke stanovení obsahu volné i vázané kyseliny salicylové v rostlinných vzorcích (*Arabidopsis thaliana*, *Papaverum somniferum*).

### 5.1 Optimalizace podmínek chromatografické separace kyseliny salicylové

Tato kapitola je věnována optimalizaci podmínek chromatografické separace SA, především tedy výběru stacionární fáze, složení mobilní fáze a volbě teploty kolonového prostoru. Na základě literární rešerše byla zvolena C18 stacionární fáze (Kapitola 3.2). Jako první byla při optimalizaci chromatografické separace použita kolona LUNA C18 s délkou 250 mm (Allasia et al., 2018, Aresta et al., 2016, Bhuyian et al., 2015, Cheng et al., 2022, Kožuszniková, 2016, Mikami et al., 2002, Patel et al., 2013, Pirola et al., 1998, Ratzinger et al., 2009, Rozhon et al., 2005, Shou et al., 2009, Toui et al., 2011). Analýza na koloně LUNA

C18 umožňovala analýzu extraktů z rostlin, nevýhodou byla délka analýzy. K zavedení metody byla použita rovněž 150mm kolona ARION C18 (Kožuszniková, 2016, Mikami et al., 2002, Pirola et al., 1998, Rozhon et al., 2005, Shou et al., 2009). Volba složení mobilní fáze proběhla na základě literární rešerše (Allasia et al., 2018). Mobilní fáze A byla voda okyselená kyselinou trifluoroctovou. Mobilní fáze B byl methanol okyselený kyselinou trifluoroctovou. Teplota kolonového prostoru byla nastavena na 30 °C.

V průběhu zavádění metody byl sledován kapacitní poměr jednotlivých analytů (poměr rozdílu redukovaného retenční času analytu a mrtvého retenčního času), separace analytů a symetrie píků analytů, která byla hodnocena na základě hodnoty faktoru asymetrie (Nováková et al., 2021).

### **5.1.1 LUNA C18 (250 × 3 mm; 5,0 μm)**

Chromatografická separace probíhala za použití lineárního gradientu, obsah MFB byl zvyšován v rozsahu 10–75 obj. % po dobu 25 min při průtoku 1 ml/min. Před další analýzou byla kolona 8 minut stabilizována (10 obj.% MFB). Na základě získaného objemu extraktu k analýze byl pro stanovení kyseliny salicylové ve vzorcích zvolen objem nástřiku 50 μl. Retenční čas SA byl 22,0 minut a OAA 17,4 minut. Vzhledem k záměru využívat metodu pro analýzu extraktů z rostlin byl gradient záměrně nastaven tak, aby po eluci SA i OAA byla následně kolona vyčištěna vyšším obsahem mobilní fáze s vyšší eluční silou od všech analytů, které extrakty z rostlin obsahovaly. Celková délka analýzy včetně stabilizace kolony před další analýzou byla 33 minut. Symetrie píků byla u kolony LUNA na základě faktoru asymetrie 1,4 pro kyselinu salicylovou a 1,3 pro vnitřní standard. Mrtvý retenční čas byl 3,3 min. Retenční faktor u kolony LUNA byl následně 4,3 pro vnitřní standard a 5,7 pro kyselinu salicylovou. Tyto hodnoty retenčního faktoru vyhovují v praxi doporučené hodnotě v rozmezí 2–10 (Nováková et al., 2021)

Při prvních analýzách byla pozorována nestálost kyseliny salicylové na světle. Na základě tohoto zjištění byl v průběhu optimalizace postupu extrakce kladen důraz na minimalizaci vlivu světla v průběhu všech operací. (viz. Kapitola 4.5.1)

### **5.1.2 ARION Plus C18 (150 × 3 mm; 5,0 μm)**

Pro stanovení kyseliny salicylové byla použita vedle 25cm kolony C18 i 15cm kolona C18. Složení MFA a MFB bylo pro obě kolony shodné, byl upravován pouze gradient. Rovněž teplota kolonového prostoru byla pro obě použité kolony shodná (30 °C). Separace probíhala

za použití lineárního gradientu, obsah MFB byl zvyšován v rozsahu 10–75 obj. % po dobu 13,2 min, 3 min 90 obj.% MFB a 5 minut stabilizace (10 obj.% MFB) při průtoku 1 ml/min. Objem nástřiku vzorku při analýze byl 50 µl. Analýza trvala 21,5 minut. Délka analýzy se oproti koloně LUNA C18 snížila pro menší velikost kolony. Symetrie píku kyseliny salicylové byla u kolony ARION na základě faktoru asymetrie 1,1. Mrtvý retenční čas byl 1 min. Retenční faktor u kolony ARION byl následně 12,2. Hodnota retenčního faktoru je poměrně vysoká, a proto byla metoda později dále optimalizována a retenční čas byl zkrácen na čas 7,3 minut. Tato data již nebyla zahrnuta do předložené práce.

## 5.2 Nastavení fluorescenčního detektoru

Optimalizace fluorescenčního detektoru proběhla za účelem dosažení co nejvyššího poměru signálu a šumu. Optimalizované parametry fluorescenční detekce jsou vypsány v Tabulce 5.

Pro kyselinu salicylovou byla zvolena na základě změřeného UV spektra excitační vlnová délka 305 nm a emisní spektrum bylo snímáno v rozsahu 325–650 nm. Po proměření emisního spektra byla zvolena hodnota emisního maxima 417 nm, bylo změřeno excitační spektrum v rozsahu 200–397 nm a byla zvolena hodnota excitačního maxima 296 nm.

Pro vnitřní standard byla zvolena excitační vlnová délka 296 nm a emisní spektrum bylo snímáno v rozsahu 316–650 nm. Po proměření emisního spektra byla zvolena hodnota emisního maxima 358 nm. Excitační spektrum bylo snímáno v rozsahu vlnových délek 200–338 nm a na základě výsledku byla zvolena hodnota excitačního maxima 294 nm.

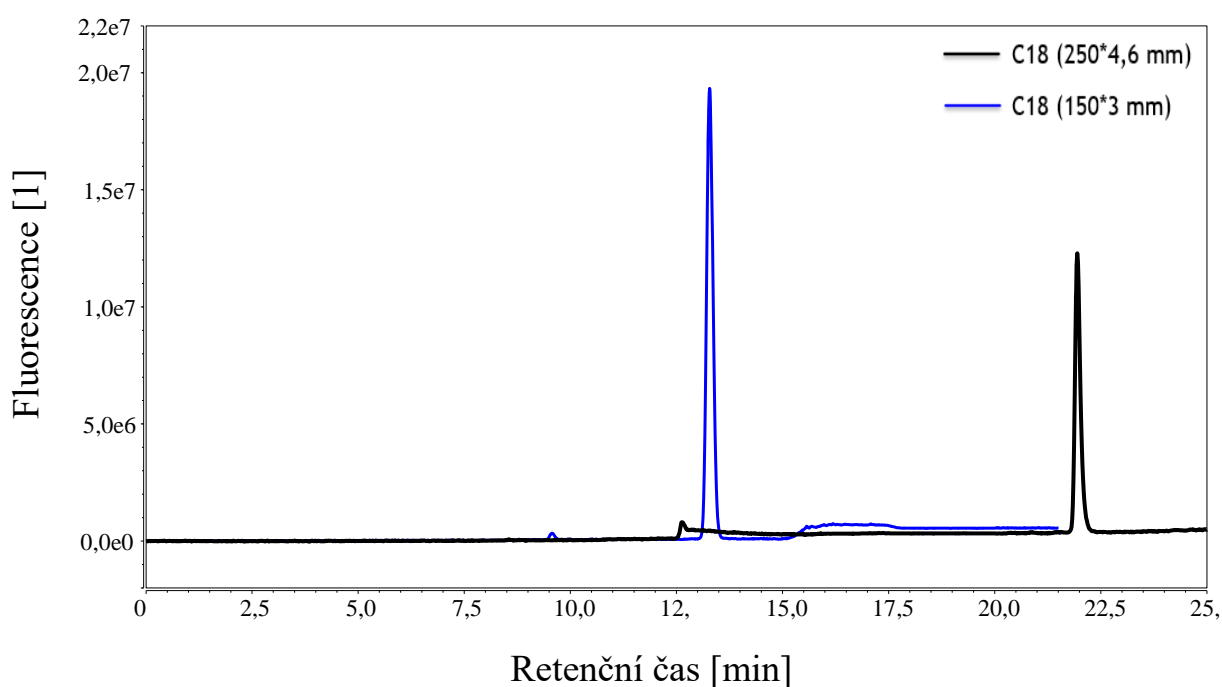
Tyto výsledky jsou srovnatelné s vlnovými délkami udávanými literaturou. Pro kyselinu salicylovou byla zvolena hodnota emisního maxima 407 nm a excitačního maxima 305 nm a pro OAA byla zvolena hodnota emisního maxima 365 nm a excitačního maxima 305 nm (Allasia et al., 2018).

Citlivost detektoru byla pro analyt kyseliny salicylové a vnitřní standard nastavena na hodnotu 8 za účelem dosažení maximální citlivosti. Na základě hodnot excitačního a emisního maxima byl pro analyt kyseliny salicylové nastaven emisní filtr o vlnové délce 370 nm a pro vnitřní standard 280 nm.

Tabulka 5: Parametry fluorescenční detekce při analýze s vnitřním standardem

Analyt	Retenční čas (min)	Excitační $\lambda$ (nm)	Emisní $\lambda$ (nm)	Citlivost (1)	Emisní filtr (nm)	Faktor asymetrie (1)
Kyselina salicylová	22,0 (LUNA C18)	296	417	8	370	1,4
	13,2 (ARION C18)					1,1
Vnitřní standard	17,4	294	358	8	280	1,3

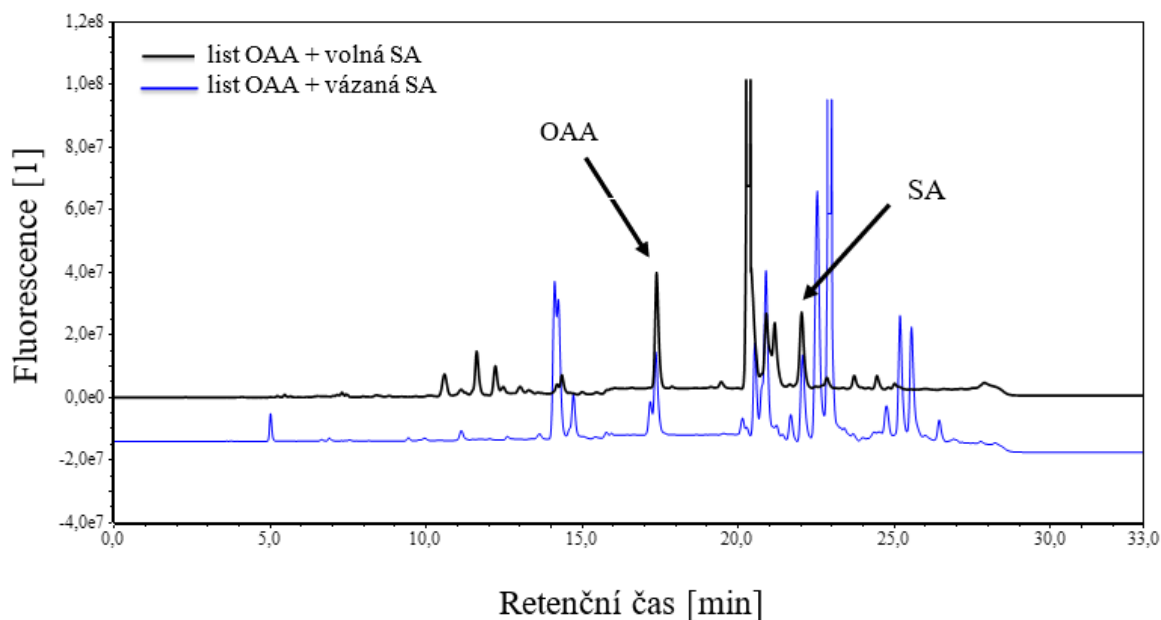
Porovnání chromatogramů analýzy roztoku (4 mg/l) standardu na obou kolonách je zobrazeno na Obrázku 9.



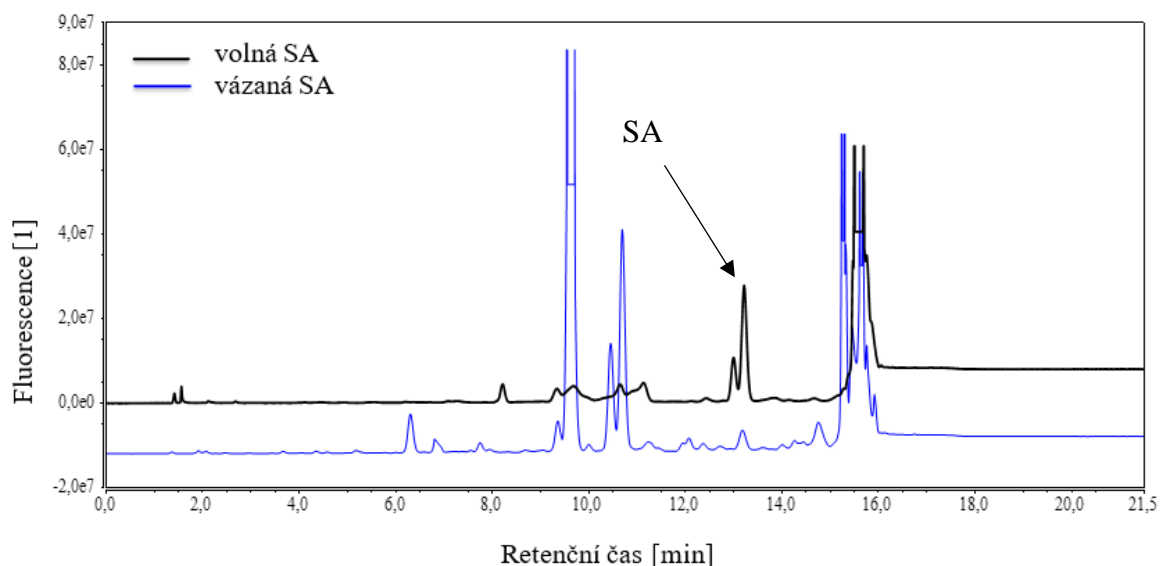
Obrázek 9: Chromatogramy analýz roztoku kyseliny salicylové (4 mg/l) na kolonách LUNA C18 a ARION C18

V průběhu stanovení kyseliny salicylové v reálných vzorcích, tedy extraktech z rostlinného materiálu, docházelo ke koeluci a interferenci jiného analytu s vnitřním standardem (OAA). Metoda extrakce a vlastní analytická metoda byly optimalizovány a následně validovány i bez použití vnitřního standardu.

Chromatogram analýzy extraktů za účelem stanovení volné a vázané kyseliny salicylové s použitím kolony LUNA C18 je znázorněno na Obrázku 10 a pro kolonu ARION C18 na Obrázku 11.



Obrázek 10: Chromatogram analýzy volné a vázané kyseliny salicylové v reálném vzorku



Obrázek 11: Chromatogram stanovení kyseliny salicylové na koloně ARION C18

### 5.3 Validace metody pro stanovení kyseliny salicylové

Metoda byla validována pomocí validačních parametrů, kterými byly mez detekce a mez stanovitelnosti, přesnost a správnost, linearita a kalibrační rozsah. Kritéria přijatelnosti



byla použita dle Asociace analytických společností (AOAC, Association of Analytical Communities) (AOAC, 2016) a FDA (Food and Drug Administration) (FDA, 2018). Pro kolonu LUNA byla metoda validována s vnitřním standardem, pro kolonu ARION byla metoda validována bez vnitřního standardu.

### 5.3.1 Validace metody kolona LUNA C18 (250 × 3 mm; 5,0 μm)

Pro nalezení instrumentálních mezí detekce a stanovitelnosti a lineární oblasti v závislosti odezvy detektoru na koncentraci analytu pro jednotlivé analyty byly připraveny roztoky kalibrační křivky v rozsahu 20–10000 μg/l ve čtyřech nezávislých opakováních (Kapitola 4.3.3).

Pro odhad mezí detekce a stanovitelnosti byly použity stanovené hodnoty poměru signál/šum při analýze kalibračních roztoků s nejnižší koncentrací (20 μg/l). Pro kyselinu salicylovou je hodnota instrumentální meze detekce (LOD<sub>i</sub>) 2,8 μg/l, kde poměr signál/šum byl roven 3. Na základě poměru signál/šum lze odhadnout hodnotu instrumentální meze stanovitelnosti (LOQ<sub>i</sub>) 4,6 μg/l. Vzhledem k požadavku, že LOQ<sub>i</sub> musí být součástí lineárního rozsahu metody, je hodnota LOQ<sub>i</sub> rovna 20 μg/l, tedy koncentraci nejnižšího kalibračního roztoku. Pro tuto koncentraci byla hodnota poměru signál/šum rovna 22.

V publikacích s použitím FL detekce nebyly hodnoty LOD<sub>i</sub> a LOQ<sub>i</sub> uvedeny. Hodnota LOD<sub>i</sub> pro stejně dlouhou kolonu (250 mm) uvedená v Tabulce 1 byla  $3,3 \times 10^{-8}$  g/ml při použití UV detekce (Cheng et al., 2022). V porovnání s touto hodnotou LOD<sub>i</sub> byla instrumentální mez detekce mnou validované metody o řád nižší, což lze vysvětlit vyšší citlivostí FL detekce v porovnání s UV detekcí ( $2,8 \times 10^{-9}$  g/ml). Hodnota instrumentální meze stanovitelnosti uvedená v Tabulce 1 pro stejně dlouhou kolonu byla  $1,0 \times 10^{-5}$  g/ml (Cheng et al., 2022). V porovnání s těmito LOQ<sub>i</sub> byla instrumentální mez detekce mnou validované metody nižší ( $4,6 \times 10^{-9}$  g/ml).

Rozsah metody byl určen na základě výpočtu difference mezi teoretickou a vypočtenou hodnotou kalibračního roztoku (Příloha B). Metoda byla lineární v rozsahu 20–2000 μg/l. Korelační koeficient pro kyselinu salicylovou byl 1 a odpovídal kritériu přijatelnosti ( $R > 0,9900$ ). QC koeficient pro kyselinu salicylovou byl 2,13 % a vyhovoval kritériu přijatelnosti ( $\leq 5,00$  %).

Hodnoty poměru S/N i difference pro nejnižší kalibrační bod splňovaly požadovaná kritéria. Pro koncentrace 7500 a 10000 došlo k přesycení detektoru a koncentrační úroveň 5000 byla vyřazena z důvodu nesplnění podmínek kritérií pro hodnotu difference.

V rámci lineárního rozsahu byla pro jednotlivé koncentrační úrovně vypočtena přesnost a správnost z výsledků analýz jednotlivých kalibračních roztoků připravených ve čtyřech opakování (Tabulka 6). Průměrné hodnoty přesnosti se pro jednotlivé koncentrační úrovně pohybují v rozmezí 1,2–4,6 %. Maximální hodnota správnosti byla 114 % pro nejnižší koncentrační úroveň, minimální hodnota správnosti byla pro koncentrační úroveň  $10^{-7}$  rovna 95 %. Na všech koncentračních úrovních byla jak pro přesnost, tak pro správnost splněna kritéria dle AOAC.

Tabulka 6: Správnost a přesnost

<b>Koncentrační úroveň (1)</b>	<b>Přesnost* (%)</b>	<b>Správnost* (%)</b>	<b>Přesnost (%)</b>	<b>Správnost (%)</b>
$10^{-8}$	<21	60–115	2,9	110
$10^{-7}$	<15	80–110	4,6	101
$10^{-6}$	<11	80–110	1,2	100

\* kritérium přijatelnosti dle AOAC

Z LOD<sub>i</sub> a nejnižších bodů kalibračních rozsahů byla po zahrnutí procesu extrakce a ředění vypočtena mez detekce metody (LOD<sub>m</sub>) a mez stanovitelnosti metody (LOQ<sub>m</sub>). Hodnota LOD<sub>m</sub> byla 90 µg/g a LOQ<sub>m</sub> 670 µg/g.

V žádné z rešeršovaných studií (Kapitola 3.2, Tabulka 1) nebyl žádný údaj o LOD<sub>m</sub> a LOQ<sub>m</sub> pro 25cm kolonu, proto není možné mez detekce a stanovitelnosti mnou validované metody porovnat s jinými zdroji. Srovnání mezi detekce s literárními daty pro kolonu ARION je diskutováno dále v textu.

V dalším kroku byla provedena extrakce rostlinného materiálu s použitím vnitřního standardu. Opakovaná analýza rostlinných extraktů za účelem vyhodnocení volné a vázané SA prokázala interferenci vnitřního standardu (OAA) s jiným analytem obsaženým v extraktu. Z tohoto důvodu nebyl vnitřní standard použit při hodnocení přesnosti a správnosti.

Pro ověření přesnosti a správnosti analytické metody byl využit směsný extrakt, obohacování bylo provedeno těsně před HPLC analýzou. Přesnost se pro všechny analyzované vzorky pohybovala v rozmezí 0,080–5,4 %. Všechny hodnoty splňovaly kritérium pro přesnost dle AOAC (na dané koncentrační úrovni hodnota přesnosti do 15 %). Pro volnou SA byla správnost v rozmezí 102–106 % a pro vázanou SA 103–122 %. Pro tři páry vzorků při

analýze vázané SA byla hodnota správnosti vyšší než požadované kritérium (80–110 %). Jednou z možných příčin je částečná koeluce píků kyseliny salicylové s jiným analytem z extraktu. Nedostatečná separace analytů způsobuje chybu při vyhodnocování plochy píku a následném výpočtu koncentrace analytu ve vzorku. Získané výsledky pro přesnost a správnost byly dostačující pro účel zavedené metody.

Přesnost a správnost byla hodnocena rovněž pro 6 párů zcela nezávislých vzorků. Bylo naváženo 12 vzorků rostlinného materiálu, do 6 z nich byl pipetován obohacovací roztok na začátku extrakce. Přesnost se pro všechny analyzované vzorky pohybovala v rozmezí 2,2–8,5 % a tedy splňovala kritéria přijatelnosti. Správnost byla v rozmezí 79–97 % pro vázanou kyselinu salicylovou. Správnost nebylo možné vyhodnotit pro volnou SA z důvodu poruchy nástřikového systému a chybějících dat.

Validace prokázala vhodnost využití metody bez vnitřního standardu v koncentračním rozsahu 20–2000 µg/l. Metoda byla použita pro stanovení obsahu volné a vázané kyseliny salicylové v *Arabidopsis thaliana*. Výsledky analýz obsahu volné i vázané SA, uvedené jako průměr koncentrace kyseliny salicylové ± dvojnásobek směrodatné odchylky pro vzorky (*Arabidopsis thaliana*), jsou uvedeny v Příloze C.

### 5.3.2 Validace metody kolona ARION C18 (150 × 3 mm; 5,0 µm)

Pro nalezení mezí detekce a stanovitelnosti a lineární oblasti v závislosti odezvy detektoru na koncentraci analytu pro jednotlivé analyty byly připraveny roztoky kalibrační křivky v rozsahu 2–10000 µg/l ve třech nezávislých opakováních (Kapitola 4.3.3).

Pro odhad instrumentálních mezí detekce a stanovitelnosti byly použity stanovené hodnoty poměru signál/šum při analýze kalibračních roztoků s nejnižší koncentrací (2, resp. 20 µg/l). Při analýze roztoku s koncentrací 2 µg/l byla hodnota signál/šum 3,8, a tedy hodnota  $LOD_i$  byla odhadnuta na 2 µg/l. Pro odhad  $LOQ_i$  byl použit roztok o koncentraci 20 µg/l, kde byl signál/šum 16. Vzhledem k lineární oblasti pro kolonu ARION je hodnota  $LOQ_i$  rovna 40 µg/l (nejnižší kalibrační bod), pro který je poměr signál/šum 30.

Hodnoty instrumentálních mezí detekce pro stejně dlouhé kolony použité v dříve publikovaných studiích (Tabulka 1) byly  $4,0 \times 10^{-10}$  g/ml (Kožuszniková, 2016) a  $5,5 \times 10^{-9}$  g/ml (Mikami et al., 2002). V porovnání s těmito  $LOD_i$  byla instrumentální mez detekce mnou validované metody vyšší v případě Kožuszniková, z důvodu nižší citlivosti UV detektoru a nižší v případě Mikami et al. Hodnota mnou validované metody na koloně ARION C18 byla  $2 \times 10^{-9}$  g/ml. Hodnota instrumentální meze stanovitelnosti pro stejně dlouhou

kolonu uvedené v Tabulce 1 byla  $1,2 \times 10^{-9}$  g/ml (Kožuszniková, 2016). V porovnání s touto hodnotou  $LOQ_i$  byla instrumentální mez detekce mnou validované metody vyšší ( $4,6 \times 10^{-9}$  g/ml), z důvodu vyšší citlivosti FL detektoru oproti UV detektoru v práci Kožuszniková.

Rozsah metody byl určen na základě výpočtu difference mezi teoretickou a vypočtenou hodnotou kalibračního roztoku (Příloha D). Metoda byla lineární v rozsahu 40–4000  $\mu\text{g/l}$ . Korelační koeficient pro kyselinu salicylovou byl 1 a odpovídal kritériu přijatelnosti ( $R > 0,9900$ ). QC koeficient pro kyselinu salicylovou byl 1,10 %, tedy odpovídal kritériu přijatelnosti ( $\leq 5,00$  %)

Hodnota difference pro nejnižší kalibrační bod (20  $\mu\text{g/l}$ ) nespĺňovala požadovaná kritéria, proto byl tento bod vyřazen.

Metoda byla lineární v rozsahu 40–4000  $\mu\text{g/l}$ . V rámci lineárního rozsahu byla pro jednotlivé koncentrační úrovně vypočtena přesnost a správnost z výsledků analýz jednotlivých kalibračních roztoků (Tabulka 7).

Tabulka 7: Správnost a přesnost

<b>Koncentrační úroveň (1)</b>	<b>Přesnost* (%)</b>	<b>Správnost* (%)</b>	<b>Přesnost (%)</b>	<b>Správnost (%)</b>
$10^{-8}$	<21	60–115	0,033	120
$10^{-7}$	<15	80–110	0,42	98
$10^{-6}$	<11	80–110	0,77	100

\* kritérium přijatelnosti dle AOAC

Z  $LOD_i$  a nejnižších bodů kalibračních rozsahů byla po zahrnutí procesu extrakce a ředění vypočtena mez detekce metody ( $LOD_m$ ) a mez stanovitelnosti metody ( $LOQ_m$ ). Hodnota  $LOD_m$  byla 70  $\mu\text{g/g}$  a  $LOQ_m$  1330  $\mu\text{g/g}$ .

Hodnoty  $LOD_m$  pro stejně dlouhou kolonu uvedené v Tabulce 1 byly  $5,0 \times 10^{-8}$  g/ml (Pirola et al., 1998) a  $5,0 \times 10^{-9}$  g/g (Rozhon et al., 2005). V případě Pirola et al. je mez detekce uváděna v g/ml z důvodu stanovování kyseliny salicylové v tekutém kosmetickém produktu. V porovnání s touto hodnotou  $LOD_m$  byla mez detekce metody mnou validované metody řádově nižší ( $70 \times 10^{-6}$  g/g) z důvodu vyšší citlivosti FL detekce v porovnání s UV detekcí (Pirola et al., 1998). V případě Rozhon et al. byla použita vyšší navážka vzorku,

zakoncentrování analytu pomocí SPE extrakce a vyšší nástřik při HPLC analýze. Hodnoty LOQ<sub>m</sub> uvedené v Tabulce 1 pro stejně dlouhou kolonu byly  $7,0 \times 10^{-5}$  g/ml (Mikami et al., 2002) a  $1,0 \times 10^{-7}$  g/ml (Pirola et al., 1998). V obou porovnávaných studiích jsou meze stanovitelnosti uváděny v g/ml z důvodu stanovování SA v tekutém kosmetickém produktu. V porovnání s těmito LOQ<sub>m</sub> byla mez stanovitelnosti mnou validované metody ( $1330 \times 10^{-6}$  g/g) řádově nižší v případě Pirola et al. z důvodu vyšší citlivosti FL detekce v porovnání s UV detekcí a řádově vyšší v případě Mikami et al. z důvodu vyšší navážky produktu (1 g).

#### 5.4 Stanovení koncentrace kyseliny salicylové v rostlinných vzorcích

Koncentrace kyseliny salicylové byla stanovována ve vzorcích z rostlin rodu *Arabidopsis thaliana* a *Papaverum somnoferum*. Listy těchto rostlin byly uchovávány při teplotě -80 °C několik dní až měsíců.

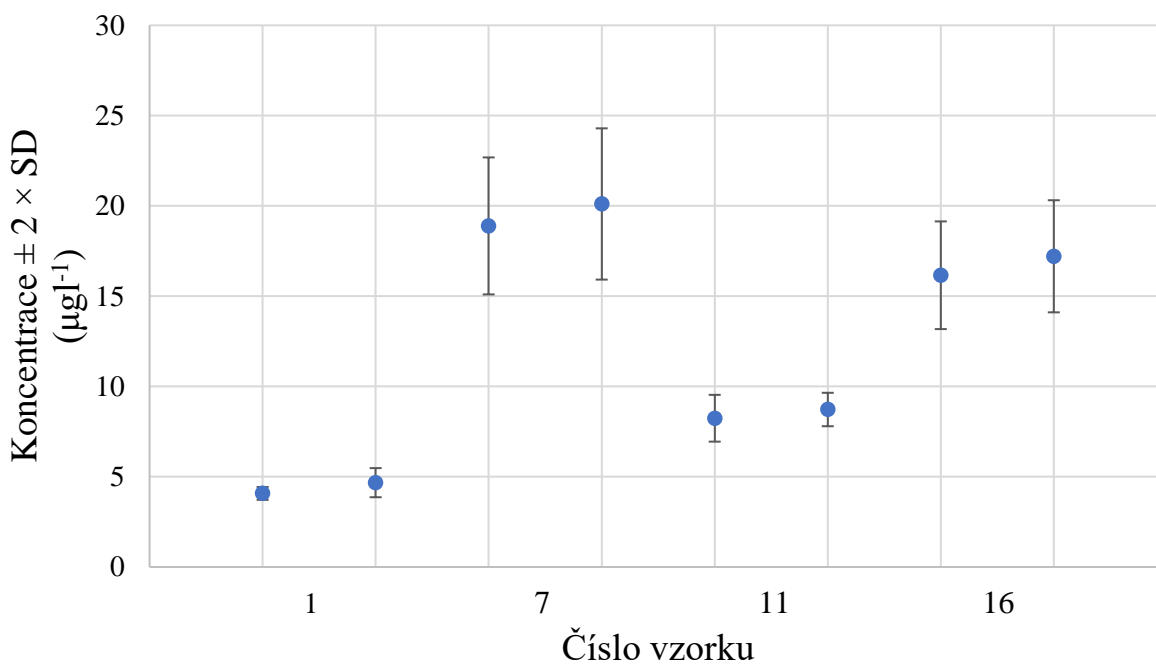
Nejprve byly prováděny analýzy obsahu SA různých kultivarů rostlin (*Arabidopsis thaliana*). Naměřená data byla předána Katedře experimentální biologie k posouzení, zda stanovená koncentrace volné a vázané kyseliny salicylové v rozdílných typech rostlin daného rodu odpovídá předpokladům. Předpoklady vycházely z typu analyzovaných kultivarů. Po experimentování s *Arabidopsis thaliana* bylo provedeno několik analýz s *Papaverum somnoferum*. V průběhu zpracovávání magisterské práce se nepodařilo v žádném ze vzorků máku setého (*Papaverum somnoferum*) prokazatelně detekovat ani volnou ani vázanou kyselinu salicylovou.

Extrakce vzorků *Arabidopsis thaliana* probíhaly nejméně ve třech opakováních. Z výsledků těchto analýz byla určena přesnost a správnost metody pro obě použité kolony (LUNA C18 a ARION C18) (viz. Kapitola 5.3.1. a 5.3.2). Výsledky koncentrací kyseliny salicylové v reálných vzorcích splnily očekávání kolegů z Katedry experimentální biologie.

V první části práce byla metoda validována na 250mm koloně LUNA C18. Tato kolona byla vybrána dle publikace Allasia et al., z které na základě konzultace s kolegy z Katedry experimentální biologie vycházela předložená diplomová práce. Analýza však byla relativně dlouhá a byla snaha zkrátit dobu analýzy, proto byla použita 150mm kolona ARION C18. Podmínky chromatografické separace byly pro obě kolony zvoleny tak, aby byl zajištěn dostatečně velký kapacitní poměr analytu SA a popřípadě vnitřního standardu OAA, a rovněž se minimalizovala koeluce s píky jiných látek obsažených v extraktu. Bylo nutné vhodným gradientem zajistit eluci všech analytů obsažených v extraktu. Za tímto účelem na konci každé

analýzy byla kolona pročištěna vysokým podílem organické mobilní fáze (90 obj. % MFB, 3 min).

Pro porovnání výsledků analýz na obou použitých kolonách, byly provedeny analýzy jedné sady vzorků nejprve na delší koloně (LUNA C18 250 × 3 mm; 5,0 μm) a poté na kratší koloně (ARION C18 250 × 3 mm; 5,0 μm) (Příloha E). Byly porovnány pouze vzorky s vázanou kyselinou salicylovou. Na Obrázku 12 jsou zobrazeny průměrné hodnoty koncentrace SA pro daný vzorek naměřený na koloně ARION i na koloně LUNA. Interval spolehlivosti je vyjádřen dvojnásobkem směrodatné odchylky. Jedná se data z Přílohy E. První bod pro daný vzorek v grafu zobrazuje vždy data pro 150mm kolonu (LUNA) a druhý bod pro 250mm kolonu (ARION). Na tomto obrázku je vidět, že průměrná hodnota koncentrace kyseliny salicylové pro daný vzorek naměřený na koloně ARION spadá do konfidenčního intervalu výsledku získaného analýzou daného vzorku na koloně LUNA. Pro analýzu kyseliny salicylové je možné použít obě již zmíněné kolony. Vzhledem k délce analýzy a spotřebě mobilní fáze je vhodnější kolona ARION C18.



Obrázek 12: Graf průměrných hodnot koncentrace kyseliny salicylové s vyznačenými konfidenčními intervaly pro kolonu LUNA i ARION

Výsledky srovnávacího měření prokázaly, že se na obou kolonách zavedenými metodami získávají srovnatelné výsledky a je možné využít k analýzám 150mm kolonu. Při

použití této kolony je délka analýzy kratší o 11,5 min a spotřeba mobilní fáze A nižší o 6,5 ml a mobilní fáze B nižší o 5 ml.

## 6 Závěr

V této práci byla zavedena a následně k analýzám využita metoda pro stanovení kyseliny salicylové v rostlinných vzorcích pomocí kapalinové chromatografie.

V teoretické části jsou shrnuty vlastnosti a použití kyseliny salicylové, pozornost je věnována biosyntéze a popisu funkce kyseliny salicylové v průběhu regulačních procesů v rostlinách. Byla provedena rešerše publikací zabývajících se stanovením kyseliny salicylové pomocí HPLC. Sledován byl hlavně typ stacionární fáze a složení mobilní fáze. Poslední část teoretického úvodu je věnována shrnutí a porovnání postupu extrakce volné a vázané kyseliny salicylové.

HPLC metoda pro stanovení kyseliny salicylové byla optimalizována na dvou kolonách. Rostlinné vzorky (*Arabidopsis thaliana* a *Papaverum somniferum*) byly extrahovány v několika krocích po dobu přibližně 20 hodin. Pro analyt kyseliny salicylové byla při validaci nalezena mez detekce, mez stanovitelnosti, koncentrační rozsah metody, byla ověřena přesnost a správnost dle AOAC. Validovaná metoda pro kolonu LUNA C18 byla lineární v rozsahu 20–2000 µg/l a pro kolonu ARION C18 v koncentračním rozsahu 40–4000 µg/l. Jako vnitřní standard byla původně použita kyselina 2-methoxybenzoová, která byla během vývoje metody z metody odstraněna z důvodu koeluce a interference píků s jiným analytem. Analýzou obohacených vzorků bylo prokázáno, že extrakce bez použití vnitřního standardu probíhá s vyhovující přesností a správností.

Zavedená analytická metoda bude dále využívána při sledování obsahu kyseliny salicylové v rostlinných vzorcích (*Papaverum somniferum*).



## 7 Seznam literatury

AHFS Patient Medication Information [Internet]. „Salicylic Acid Topical”. *Bethesda (MD): American Society of Health-System Pharmacists*. 2019. Available from: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a607072.html> [updated 09/15/2016 cited 2023 Jul 1].

ALLASIA V., INDUSTRI B., PONCHET M., QUENTIN M., FAVERY B. & KELLER H. „*Quantification of Salicylic Acid (SA) and SA-glucosides in Arabidopsis thaliana*”. *Bio Protoc*. 2018. 20;8(10):e2844. doi: 10.21769/BioProtoc.2844. PMID: 34285965; PMCID: PMC8275313.

AOAC. „*Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance*”. 2016. Dostupné z: [http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)

ARESTA A. & ZAMBONIN C. „*Simultaneous determination of salicylic, 3-methyl salicylic, 4-methyl salicylic, acetylsalicylic and benzoic acids in fruit, vegetables and derived beverages by SPME-LC-UV/DAD*”. *J Pharm Biomed*. 2016. Anal;121:63-68. doi: 10.1016/j.jpba.2015.12.016. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26775020.

ARIF, Y., SAMI, F., SIDDIQUI, H., BAJGUZ, A. & HAYAT, S. „*Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: A study towards physiology and signal transduction under challenging environment*”. *Environ. 2020. Exp. Bot.* 175, 104040.

BHUYIAN, M. H., RASHID, H., ISLAM, A. & TAREQUE, M. „*Development and Validation of Method for Determination of Clobetasol Propionate and Salicylic Acid from Pharmaceutical Dosage Form by HPLC*”. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 2015. 7. 375-385. 10.9734/BJPR/2015/18494.

BITA, C. & GERATS, T. „*Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops*”. *Front. Plant Sci*. 2013. 4, 273.

BOULLARD, O., LEBLANC, H. & BESSON, B. „*Salicylic Acid*. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*". Wiley-VCH GmbH & Co., Weinheim. 2000. [http://dx.doi.org/10.1002/14356007.a23\\_477](http://dx.doi.org/10.1002/14356007.a23_477)

COQUOZ, J., BUCHALA, A. & MÉTRAUX, J. „*The biosynthesis of salicylic acid in potato plants*". *Plant Physiology*. 1998. 117.3: 1095-1101.

DAVIES, M., NOWOTKA, M., PAPADATOS, G., DEDMAN, N., GAULTON, A., ATKINSON, F., BELLIS, L. & OVERINGTON, J. P. „*ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities*", *Nucleic Acids Res.* 2015. 1;43(W1):W612-20. doi: 10.1093/nar/gkv352. Epub 2015 Apr 16. PMID: 25883136; PMCID: PMC4489243.

DEMSEY D. A., VLOT A. C., WILDERMUTH M. C. & KLESSIG D. F. „*Salicylic Acid biosynthesis and metabolism*". *Arabidopsis Book*. 2011. doi: 10.1199/tab.0156. Epub 2011 Dec 20. PMID: 22303280; PMCID: PMC3268552.

DING, P. & DING, Y. „*Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone*". *Trends Plant Sci.* 2020. 25(6):549-565. doi: 10.1016/j.tplants.2020.01.004. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32407695

DOS SANTOS, R. B., SALES DE VALE, W. F. & SENA COTA, C. L. „*Structural planning, development and analysis of in silico pharmacokinetic properties of salicylic acid analogues for cosmetic purposes*". *Estacao Cientifica (UNIFAP)*. 2017. 7 (1), 103–112.

ENGELBERTH, J., SCHMELZ, E. A., ALBORN, H. T., CARDOZA, Y. J. & HUANG, J., HUANG, J. „*Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry*". *Anal Biochem.* 2003 Jan 15;312(2):242–50. doi: 10.1016/s0003–2697(02)00466–9. PMID: 12531212.

ERJEANT, E. P & DEMPSEY, B. „*Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*". International Union of Pure and Applied Chemistry. Commission on Equilibrium Data, Elsevier Science & Technology, 1979. pp 989

FANG, X., CHEN, G., QIU, J., XU, J., WANG, J., ZHU, F. & OUYANG, G. „Determination of Four Salicylic Acids in Aloe by in vivo Solid Phase Microextraction Coupling with Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection". *Talanta*. 2018. 184. 10.1016/j.talanta.2018.03.043.

FARHANGI-ABRIZ, S. & GHASSEMI-GOLEZANI, K. „How can salicylic acid and jasmonic acid mitigate salt toxicity in soybean plants?" *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. 147, 1010–1016.

FDA. „Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Biopharmaceutics Contains Nonbinding." 2018. Dostupné z: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

FRANZ, H. & JENDREIZIK, V. „*Fluorescence Method Development Handbook*." Thermo Fisher Scientific. 2010.

GALANDA, V. „*Klinická farmakológia salicylanov u detí a mladistvých*." Martin: Osveta. 1991. 240 s. ISBN 80–217–0355–5.

GARCION, C., LOHMANN, A., LAMODIÈRE, E., CATINOT, J., BUCHALA, A., DOERMANN, P. & MÉTRAUX, J. P. „*Characterization and biological function of the Isochorismate Synthase 2 gene of Arabidopsis*." *Plant Physiol.* 2008. 147, 1279–1287.

GUO, B., LIU, C., LIANG, Y., LI, N. & FU, Q. „*Salicylic acid signals plant defence against cadmium toxicity*." *Int. J. Mol. Sci.* 2019. 20, 2960.

HAMPL, F., RÁDL, S. & PALEČEK, J. „*Farmakochemie*". 2. rozš. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2007. 450 s., CD-rom s elektronickou verzí. ISBN 978-80-7080-639-5.

HASANUZZAMAN, M., NAHAR, K., BHUIYAN, T. F., ANEE, T. I., INAFUKU, M., OKU, H., & FUJITA, M. „*Salicylic Acid: An All-Rounder in Regulating Abiotic Stress*

*Responses in Plants*". In M. A. El-Esawi (Ed.), *Phytohormones-Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*. 2017. pp. 31–75. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68213>.

HAYAT, S. & AHMAT, A. „*Salicylic Acid - A Plant Hormone*." Springer. 2007. ISBN 978–1–4020–5183–8

HAYAT, S., ALI, B. & AHMAD, A. „*Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants*. In: *Salicylic acid: A plant hormone*." Springer Netherlands. 2007. p. 1–14.

HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R. A., ALBLAS, S. W., DE RIJK, R. H. & BOL J. F. „*Induction by Salicylic Acid of Pathogenesis-related Proteins or Resistance to Alfalfa Mosaic Virus Infection in Various Plant Species*." *Journal of General Virology*. 1986. 67 (10): 2135–2143. doi:10.1099/0022–1317–67–10–2135.

HUIHUI, Z., XIN, L., ZISONG, X., YUE, W., ZHIYUAN, T., MEIJUN, A., YUEHUI, Z., WENXU, Z., NAN, X., & GUANGYU, S. „*Toxic effects of heavy metals Pb and Cd on mulberry (Morus alba L.) seedling leaves: Photosynthetic function and reactive oxygen species (ROS) metabolism responses*." *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. 195, 110469.

CHEN J, ZHU C., LI, L. P., SUN, Z. Y. & PAN, X. B. „*Effects of exogenous salicylic acid on growth and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress*." *J. Environ. Sci.* 2007. 19, 44–49.

CHEN, Z. et al. „*Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant signaling & behavior*." 2009. 4.6: 493–496.

CHENG, F., LU, J., GAO, M., SHI, K., KONG, Q., HUANG, Y. & BIE, Z. „*Redox signaling and CBF-responsive pathway are involved in salicylic acid-improved photosynthesis and growth under chilling stress in watermelon*." *Front. Plant Sci.* 2016. 7, 1519.

CHENG, S., XU, X., KONG, X., JIANG, Y., MO, L., LI, M., JIN, Y., HAN, Y., LI, X. L., JIN, T., MIN, J. Z. „*Monitoring of salicylic acid content in human saliva and its relationship with plasma concentrations.*” J. Pharm Biomed Anal. 2022. 20;219:114961. doi: 10.1016/j.jpba.2022.114961. Epub 2022 Jul 23. PMID: 35907319.

CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B., & STAKAWICZ, B. J. „*Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response*”. Cell. 2006. 124:803–14

CHOJAK-KÓZNIIEWSKA, J. Linkiewicz, A., SOWA, S., RADZIOCH, M. & KÚZNIAK, E. „*Interactive effects of salt stress and Pseudomonas syringae pv. lachrymans infection in cucumber: Involvement of antioxidant enzymes, abscisic acid and salicylic acid.*” Environ. 2017. Exp. Bot. 136, 9–20.

IGNATENKO, A., TALANOVA, V., REPKINA, N. & TITOV, A. „*Exogenous salicylic acid treatment induces cold tolerance in wheat through promotion of antioxidant enzyme activity and proline accumulation.*” Acta Physiol. 2019. Plant. 41, 1–10.

JANDA, M., LAMPAROVÁ, L., ZUBÍKOVÁ, A., BURKETOVÁ, L., MARTINEC, J. & KRČKOVÁ, Z. „*Temporary heat stress suppresses PAMP-triggered immunity and resistance to bacteria in Arabidopsis thaliana*”. Molecular plant pathology. 2019. 20(7), 1005–1012. <https://doi.org/10.1111/mpp.12799>

JANDA, T., SZALAI, G., TARI, I. & PALDI, E. „*Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (Zea mays L.) plants.*” Planta. 1999. 208, 175–180.

KLESSIG, D. F., CHOI, H. W. & DEMPSEY, D. M. A. „*Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future.*” Mol. Plant-Microbe Interact. 2018. 31, 871–888. doi: 10.1094/MPMI-03-18-0067-CR

KOO, Y. M., HEO, A. Y. & CHOI, H. W. „*Salicylic Acid as a Safe Plant Protector and Growth Regulator.*” The Plant Pathology Journal. 2020. 36 (1): 1-10. doi:10.5423/PPJ.RW.12.2019.0295. PMC 7012573. PMID 32089657.

- KOŽUSZNIKOVÁ, E. „*HPLC analýza přírodních derivátů kyseliny salicylové*“, 2016.
- KUMAR, S., ABASS AHANGER, M., ALSHAYA, H., LATIEF JAN, B. & YERRAMILI, V. „*Salicylic acid mitigates salt induced toxicity through the modifications of biochemical attributes and some key antioxidants in capsicum annuum*“, Saudi J. Biol. Sci. 2022. 29, 1337–1347. [CrossRef] [PubMed]
- LEWIS SR R. J. „*Hazardous Chemicals Desk Reference*“, John Wiley & Sons. 2008. p. 1217. ISBN 9780470334454.
- LI N., HAN X., FENG, D., YUAN, D. & HUANG, L. J. „*Signaling Crosstalk between Salicylic Acid and Ethylene/Jasmonate in Plant Defense: Do We Understand What They Are Whispering?*“ Int J Mol Sci. 2019. 4;20(3):671. doi: 10.3390/ijms20030671. PMID: 30720746; PMCID: PMC6387439.
- LIU, J., QIU, G., LIU, C., LI, H., CHEN, X., FU, Q., LIN, Y. & GUO, B. „*Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone, Combats Abiotic Stresses in Plants*“, Life (Basel). 2022. 14;12(6):886. doi: 10.3390/life12060886. PMID: 35743917; PMCID: PMC9225363.
- LOUCKÁ, P. „*Aspirin a acylpyrin*“. Vesmír: přírodovědecký časopis. Praha: Vesmír, roč. 77, č. 3, s. 176. 1998.
- LUONG, T., NGUYEN, T., NGUYEN, L., TRAN, T., NGUYEN, N. & MAI, C. „*Extraction of anthraquinone and salicylic acid from Aloe barbadensis miller*“, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2023. 1155. 012015. 10.1088/1755–1315/1155/1/012015.
- MALAKAR, S., GIBSON, P. R., BARRETT, J. S. & MUIR, J. G. „*Naturally occurring dietary salicylates: A closer look at common Australian foods*“. Journal of Food Composition and Analysis. 2017. 57: 31–39. doi:10.1016/j.jfca.2016.12.008.
- MANOHAR, M., TIAN, M., MOREAU, M., PARK, S. W., CHOI, H. W., FEI, Z., FRISO, G., ASIF, M., MANOSALVA, P., VON DAHL, C. C., SHI, K., MA, S., DINESH-KUMAR, S. P., O'DOHERTY, I., SCHROEDER, F. C., VAN WIJK, K. J., &

KLESSIG, D. F. „*Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens*". Front Plant Sci. 2015. 12;5:777. doi: 10.3389/fpls.2014.00777. PMID: 25628632; PMCID: PMC4290489.

MAREK, G., CARVER, R., DING, Y. et. al., *A high-throughput method for isolation of salicylic acid metabolic mutants*". Plant Methods. 2010. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-21>

MARURI-LÓPEZ, I., AVILES-BALTAZAR, N. Y., BUCHALA, A. & SERRANO, M. „*Intra and Extracellular Journey of the Phytohormone Salicylic Acid*". Front Plant Sci. 2019. 16;10:423. doi: 10.3389/fpls.2019.00423. PMID: 31057566; PMCID: PMC6477076.

MIKAMI, E., GOTO, T., OHNO, T., MATSUMOTO, H. & NISHIDA, M. „*Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography*". J Pharm Biomed Anal. 2002. 15;28(2):261–7. doi: 10.1016/s0731-7085(01)00564-7. PMID: 11929668.

MOHI-UD-DIN, M., TALUKDER, D., ROHMAN, M., AHMED, J. U., JAGADISH, S., ISLAM, T. & HASANUZZAMAN, M. „*Exogenous Application of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Mitigates Drought-Induced Oxidative Damages in French Bean (Phaseolus vulgaris L.)*". Plants. 2021.

NAGELSCHMITZ, J., BLUNCK, M., KRAETZSCHMAR, J., LUDWIG, M., WENSING, G. & HONHLEFELD, T. „*Pharmacokinetics and pharmacodynamic of ASA after intravenous and oral administration to healthy volunteers*". Clinical Pharmacology: Advances and Applications. 2014. 6, 51–59.

NOUTOSHI, Y., OKAZAKI, M., KIDA, T., NISHINA, Y., MORISHITA, Y., OGAWA, T., SUZUKI, H., SHIBATA, D., JIKUMARU, Y., HANADA, A., KAMIYA, Y. & SHIRASU, K. „*Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in Arabidopsis*". Plant Cell. 2012. 24(9): 3795–3804.

NOVÁKOVÁ, L. & DOUŠA, M. et al. „*Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*“. 1. vyd. Praha. 2021. str 158. ISBN 9788027085606

O'NEIL, M. J. „*The Merck Index-An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*“. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co. 2006.

ÖZPINAR, H., DAG, Ş. & YIGIT, E. „*Alleopathic effects of benzoic acid, salicylic acid and leaf extract of Persica vulgaris Mill. (Rosaceae)*“. South African Journal of Botany. 2017. 108. 102–109. 10.1016/j.sajb.2016.10.009.

PAN, Q., ZHAN, J., LIU, H., ZHANG, J., CHEN, J., WEN, P. & HUANG, W. „*Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants*“. Plant Sci. 2006. 171, 226–233.

PATEL, P., SHRIVASTAVA, B., PRAJAPATI, J. & AKHTAR, J. „*Validated liquid chromatographic method for simultaneous estimation of niacinamide and salicylic acid in semi-solid dosage form*“. Indian Journal of Chemical Technology. 2013. 20. 185–188.

PETREK, J., HAVEL, L., PETRLOVA, J. et al. „*Analysis of salicylic acid in willow barks and branches by an electrochemical method*“. Russ J Plant Physiol. 2007. 54, 553–558. <https://doi.org/10.1134/S1021443707040188>

PILÍK, P. „*Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení 16 indikátorových polycyklických aromatických uhlovodíků dle US EPA ve vodě pomocí HPLC-PDA-FLD*“. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 2018.

PIROLA, R., BAREGGI, S. R., & DE BENEDITTIS, G. „*Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography*“. Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications, 1998. 705 2, 309–15.

PROKEŠ, J. „*Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*“. 1. vydání. Praha: Galén. 2005. ISBN 80–726–2301–X.



PUBCHEM. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004. PubChem Compound Summary for CID 338, Salicylic Acid; [cit.11.11.2023]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-Acid>

RANDJELOVIC, P., VELJKOVIC, S., STOJILJKOVIC, N., SOKOLOVIC, D., ILJIC, I., LAKETIC, D., RANDJELOVIC, D. & RANDJELOVIC, N. „*The Beneficial Biological Properties of Salicylic Acid*”. Acta Facultas Medicae Naissens. 2015. 32(4), 259–265.

RAO, M. V., PALIYATH, G., ORMROD, D. P., MURR, D. P. & WATKINS, C. B. „*Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*”. Plant Physiol. 1997. 115, 137–149.

RASKIN, I. „*Role of salicylic acid in plants*”. Annual review of plant biology. 1992. 43.1: 439–463.

RATZINGER, A., RIEDIGER, N., VON TIEDEMANN, A., KARLOVSKY, P. „*Salicylic acid and salicylic acid glucoside in xylem sap of Brassica napus infected with Verticillium longisporum*”. J Plant Res. 2009. 122(5):571–9. doi: 10.1007/s10265-009-0237-5. PMID: 19449088; PMCID: PMC2776162.

REKHTER, D., LÜDKE, D., DING, Y., FEUSSNER, K., ZIENKIEWICZ, K., LIPKA, V., WIERMER, M., ZHANG, Y., & FEUSSNER, I. „*Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid*”. Science (New York, N.Y.). 2019. 365(6452), 498–502. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1720>

RIVAS-SAN VICENTE, M. & PLASENCIA, J. „*Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development*”. J. Exp. Bot. 2011. 62, 3321–3338.

ROZHON, W., PETUTSCHNIG, E., WRZACZEK, M. & JONAK, C. „*Quantification of free and total salicylic acid in plants by solid-phase extraction and isocratic high-performance anion-exchange chromatography*”. Anal Bioanal Chem. 2005. 382(7):1620–7. doi: 10.1007/s00216-005-3326-x. Epub 2005 Jul 5. PMID: 15997378.

SETTIMO, L., BELLMAN, K. & KNEGTEL, R. M. „*Comparison of the accuracy of experimental and predicted pKa values of basic and acidic compounds*”. Pharm Res. 2014. Apr;31(4):1082-95. doi: 10.1007/s11095-013-1232-z. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24249037.

SHOU, M., GALINADA, W. A., WEI, Y. C., TANG, Q., MARKOVICH, R. J. & RUSTUM, A. M. „*Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, betamethasone dipropionate and their related compounds in Diprosalic Lotion*”. J Pharm Biomed Anal. 2009. 15;50(3):356–61. doi: 10.1016/j.jpba.2009.05.015. PMID: 19545962.

SIGMAALDRICH.COM, Merck KGaA, Darmstadt, Germany [online]. © 2023 [cit. 13.11.2023]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/sds/aldrich/169978>

STUART, M. C., KOUIMTZI, M. & HILL, S. R. „*World Health Organization*”. Stuart WHO Model Formulary 2008. World Health Organization. 2009. p. 310. hdl:10665/44053. ISBN 9789241547659.

SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv, online. Praha. 2010. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/> [cit. 2020–03–12].

SWAIN, A. R., DUTTON, S. P. & TRUSWELL, A. S. „*Salicylates in foods*”. Journal of the American Dietetic Association. 1985. 85 (8): 950–960. doi:10.1016/S0002–8223(21)037433. PMID 4019987. S2CID 42796737.

THOMPSON, G. A. M., IANCU, C. V., NEET, K. E., DEAN, J. V. & CHOE, J. Y. „*Differences in salicylic acid glucose conjugations by UGT74F1 and UGT74F2 from Arabidopsis thaliana*”. Sci Rep. 2017. 20;7:46629. doi: 10.1038/srep46629. PMID: 28425481; PMCID: PMC5397973.

VEBERNE, M. C., BROUWER, N., DELBIANCO, F., LINTHORST, H. J., BOL, J. F. & VERPOORTE, R. „*Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material*”. Phytochem Anal. 2002. 13(1):45–50. doi: 10.1002/pca.615. PMID: 11899606.

VĚCHET, L. & BURKETOVÁ, L. „Indukovaná rezistence pšenice k padlí travnímu (*Blumeria graminis f. sp. Tritici*)”. In: Věchet, L.: Rezistence obilnin k chorobám, pp. 14–17, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 2008.

VLOT, A. C., DEMPSEY, D. M. A., & KLESSIG, D. F. „*Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease*”. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2009. 47, 177–206. doi: 10.1146/annurev.phyto.050908.135202

WARMIŃSKI, K., STOLARSKI, M., GIL, Ł. & KRZYŻANIAK, M. „*Willow bark and wood as a source of bioactive compounds and bioenergy feedstock*”. *Industrial Crops and Products.* 2021. 171. 113976. 10.1016/j.indcrop.2021.113976.

WASSIE, M., ZHANG, W., ZHANG, Q., JI, K., CAO, L. & CHEN, L. „*Exogenous salicylic acid ameliorates heat stress-induced damages and improves growth and photosynthetic efficiency in alfalfa (Medicago sativa L.)*”. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020. 191, 110206.

WATSON, D. G. „*Pharmaceutical chemistry*”. Edinburgh: Churchill Livingstone. 2011. p. 273. ISBN 9780702048500.

WEYRICH, L. S., DUCHENE, S., SOUBRIER, J., ARRIOLA, L., LLAMAS, B. & BREEN, J., et al. „*Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus*”. *Nature.* 2017. 544:357. doi: 10.1038/nature 21674

WHITE, R. „*Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco*”. *Virology.* 1979. 99, 410–412.

WILDERMUTH, M. C. DEWDEY, J, WU, G. & AUSUBEL, F. M. „*Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence*”. *Nature.* 2001, 414, 562–565.

YALPANI, N., LEON, J., LAWTON, M. A. & RASKIN, I. „*Pathway of Salicylic Acid Biosynthesis in Healthy and Virus-Inoculated Tobacco*”. *Plant Physiol.* 1993. 103(2):315–321. doi: 10.1104/pp.103.2.315. PMID: 12231938; PMCID: PMC158986.

YANG, J., DUAN, L., HE, H., LI, Y., LI, X., LIU, D., WANG, J., JIN, G. & HUANG, S. „Application of Exogenous  $KH_2PO_4$  and Salicylic Acid and Optimization of the Sowing Date Enhance Rice Yield Under High-Temperature Conditions". J. Plant Growth Regul. 2022. 41, 1–15.

ZHANG, Y. & LI, X. „Salicylic acid: Biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity". Curr. Opin. Plant Biol. 2019. 50, 29–36.

## 8 Přílohy

### Příloha A: Systematické názvy

Triviální název	Systematický název
benzaldehyd	benzenkarbaldehyd
kyselina benzoovou	kyselina benzenkarboxylová
kyselina chorismová	(3R, 4R)-3-[(1-karboxyvinyl)oxy]-4-hydroxycyklohexa-1,5-dien-1-karboxylová kyselina
kyselina <i>o</i> -kurmarová	(2E)-3-(2-hydroxyfenyl)-prop-2-enová kyselina
kyselina šikimová	(3R, 4S, 5R)-3,4,5-trihydroxycyklohex-1-en-1-karboxylová kyselina
kyselinu prefenovou	kyselina 1-(2-karboxy-2-oxoethyl)-4-hydroxy cyklohexa-2,5-dien-1-karboxylová

L-fenylalanin	(2S)-2-amino-3-fenylpropanová kyselina
trans-skořicovou	kyselina (2E)-3-fenylprop-2-enová

**Příloha B: Validace metody-LUNA C18 (250 × 3 mm; 5,0 μm)**

<b>Koncentrace [μg/l]</b>	<b>Vypočtená koncentrace [μg/l]</b>	<b>Plocha [counts × min]</b>	<b>Plocha VS [counts × min]</b>	<b>Diference [%]</b>
20	21,27	122999	3443730	6,4
20	22,80	125666	3430666	14
20	21,87	125062	3466559	9,4
20	22,25	126580	3486679	11
100	100,32	295968	3564278	0,32
100	110,09	313864	3531191	10
100	103,38	304039	3582393	3,4
100	94,74	288886	3624714	-5,3
200	206,86	626485	4267253	3,4
200	189,06	495778	3641159	-5,5
200	210,25	521590	3504235	5,1
200	202,40	532334	3693064	1,2
500	510,73	1181775	3595071	2,2
500	525,09	1217207	3608519	5,

500	496,64	1183772	3695999	-0,67
500	476,18	1122403	3643714	-4,8
1000	984,46	2288241	3737064	-1,6
1000	996,05	2259591	3648913	-0,39
1000	982,20	2243438	3672012	-1,8
1000	976,46	2232324	3674459	-2,4
2000	2015,75	4528805	3682927	0,79
2000	2015,46	4505146	3664212	0,77
2000	2023,90	4564888	3697596	1,2
2000	1971,78	4437751	3687819	-1,4
5000	–	10868523	3739750	–
5000	–	11692062	3640554	–
5000	–	11631613	3651389	–
5000	–	11580214	3699843	–



**Příloha C: Výsledky extrakce-LUNA (250 × 3 mm; 5,0 μm)**

<b>Vzorek</b>	<b>Koncentrace ± 2 × SD (μg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vzorek</b>	<b>Průměr obsahu SA ± 2 × SD (μg/g)</b>
Mix volná SA	436,52±0,70	Ex volná SA	–
Mix SP volná SA	858±20	Ex SP volná SA	1,960 ± 0,088
Mix vázaná SA	258±28	Ex vázaná SA	0,76 ± 0,13
Mix SP vázaná SA	706±66	ExSP vázaná SA	1,64 ± 0,14

**Příloha D: Validace metody-ARION C18 (150 × 3 mm; 5,0 μm)**

<b>Koncentrace [μg/l]</b>	<b>Vypočtená koncentrace [μg/l]</b>	<b>Plocha [counts × min]</b>	<b>Diference [%]</b>
20	–	57554	–
20	–	50746	–
20	–	55523	–
40	48,03	106227	20
40	48,02	106187	20
40	48,05	106269	20
60	66,64	155053	11
60	65,51	152100	9,2
60	66,91	155780	12
100	108,02	263675	8,0
100	107,62	262633	7,6
100	107,84	263210	7,8
200	200,20	505627	0,10
200	198,31	500669	-0,84

200	202,88	512669	1,4
400	391,02	1006484	-2,2
400	392,23	1009667	-1,9
400	394,29	1015057	-1,4
1000	990,09	2578902	-0,99
1000	995,08	2591992	-0,49
1000	993,32	2587378	-0,67
2000	1984,05	5187813	-0,80
2000	1980,28	5177920	-0,99
2000	1980,46	5178390	-0,98
3000	2995,58	7842845	-0,15
3000	2995,02	7841374	-0,17
3000	2997,77	7848588	-0,070
4000	3991,00	10455582	-0,22
4000	4002,46	10485646	0,060
4000	4049,30	10608614	1,2

**Příloha E: Porovnání výsledků extrakcí LUNA a ARION**

	<b>Kolona LUNA</b> (250 × 3 mm; 5,0 μm)	<b>Kolona ARION</b> (150 × 3 mm; 5,0 μm)
<b>Vzorek</b>	<b>Průměr obsahu SA ± 2 × SD</b> (μg/g)	<b>Průměr obsahu SA ± 2 × SD</b> (μg/g)
vzorek 1	4,67 ± 0,81	4,08 ± 0,36
vzorek 7	20,1 ± 4,2	18,9 ± 3,8
vzorek 11	8,72 ± 0,92	8,2 ± 1,4
vzorek 16	17,2 ± 3,1	16,2 ± 3,0