

**UNIVERZITA PALACKÉHO V
OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Sulfatované fenolické kyseliny v rostlinách a
dalších organismech**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Klára Supíková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Termín odevzdání:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Klára Supíková
Název práce:	Sulfatované fenolické kyseliny v rostlinách a dalších organismech
Typ práce:	Magisterská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	<p>Sulfatované fenolické kyseliny byly doposud považovány za metabolity mořských trav a řas. V této diplomové práci bylo rozšířeno spektrum výskytu o několik suchozemských rostlin. Byla provedena optimalizace kvantitativní analýzy kyselin 4-(sulfooxy)benzoové (S-BA), zosterové (S-CA) a 4-(sulfooxy)fenyloctové (S-PhAA) pomocí UHPLC-MS/MS. Byly syntetizovány některé standardy pro kvantifikaci a strukturní identifikaci. Dále bylo připraveno více než 50 extraktů rostlin, hub a řas. Zmíněné sulfatované kyseliny byly detekované v 15 vzorcích. S-BA byla stanovena v největší koncentraci, překvapivě však ne v rostlině, ale v plísni <i>Penicillium candidum</i>. Dále byla provedena UHPLC-TOF MS analýza vzorků zaměřena na detekci nových sulfatovaných metabolitů. V MS/MS spektrech byla vyhledávána neutrální ztráta molekuly SO₃ ($\Delta m/z$ 79,956 Da), která je typická pro sulfatované látky. Bylo popsáno 9 metabolitů, které doposud v rostlinách nebyly zaznamenané.</p>
Klíčová slova:	sulfatované fenolické kyseliny, sulfatované metabolity, UHPLC-MS analýza, metabolomická analýza, rostlinný metabolom, <i>Penicillium candidum</i>
Počet stran:	75
Počet příloh:	2
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Bc. Klára Supíková
Title of thesis:	Sulfated phenolic acids in plants and other organisms
Type of thesis:	Master
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation:	2020
Abstract:	<p>Sulfated phenolic acids have been considered as metabolites of seagrasses and algae. Nevertheless, in this thesis it was proved that sulfated phenolic acids are present also in terrestrial plants. Quantitative UHPLC-MS/MS analysis of 4-(sulfooxy)benzoic acid (S-BA), zosteric acid (S-CA) and 4-(sulfooxy)phenylacetic acid (S-PhAA) was optimized. A couple of standards for quantification and structural identification have been synthesized. More than 50 plant, fungi and algae extracts were prepared. Sulfated phenolic acids were detected in 15 samples. The highest concentration was exhibited by S-BA, surprisingly not in the plants but in the fungus <i>Penicillium candidum</i>. Furthermore, UHPLC-TOF MS was applied to detect new sulfated metabolites in various samples. An exact difference of 79,956 Da which indicates a neutral loss of SO₃ was searched in the MS/MS spectra. A total of 9 metabolites were described, almost none of which have been reported in plants to date.</p>
Keywords:	sulfated phenolic acids, sulfated metabolites, UHPLC-MS analysis, metabolomic analysis, plant metabolome, <i>Penicillium candidum</i>
Number of pages:	75
Number of appendices:	2
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Na prvním místě děkuji mému vedoucímu práce Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D za odborné vedení, trpělivost, přátelský přístup a nedocenitelné znalosti a zkušenosti, které jsem za dobu mého působení u něj získala. Velké díky patří také doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph. D za vedení a pomoc při organické syntéze látek. Děkuji také Mgr. Lucii Slobodianové za veškerou pomoc při práci v laboratoři. Za podporu bych chtěla poděkovat také grantu IGA_PrF_2020_021.

OBSAH

1. ÚVOD A CÍLE	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Síra jako prvek	9
2.2. Organosírové sloučeniny	10
2.3. Sulfonace vs. sulfatace a názvosloví sulfo látek	11
2.4. Chemická sulfatace malých molekul	12
2.5. Koloběh síry	12
2.6. Asimilace síry	13
2.7. Sulfatační dráhy	14
2.7.1. Syntéza PAPS	15
2.7.2. Sulfotransferázy	15
2.7.3. Tyrosylprotein sulfotransferázy	16
2.7.4. Lidské sulfotransferázy	17
2.8. Metabolity obsahující síru	17
2.8.1. Glutathion	17
2.8.2. Fytosulfokiny	18
2.8.3. Sulfatované fytohormony	18
2.8.4. Glukosinoláty	19
2.8.5. Turgorin	20
2.8.6. Alicin	21
2.8.7. Sulfatované flavonoidy	21
2.8.8. Sulfolipidy	22
2.8.9. Sulfatované metabolity mořských organismů	22
2.8.9.1. Psammaplin A sulfát	22
2.8.9.2. Metabolity produkované řasou <i>Dasycladus vermicularis</i>	23
2.8.9.3. Sulfatované fenolické kyseliny	24
2.8.9.4. Sulfatované polysacharidy	25
2.8.10. Živočišné glykosaminoglykany	25
2.9. Souhrn sulfo metabolitů podle výskytu	26
2.10. Biologicky aktivní látky obsahující síru	26
2.10.1. Peniciliny	26
2.10.2. Sulfonamidy	27
2.10.3. Nereistoxin	27
2.11. Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS)	28

2.11.1.	Tandemová hmotnostní spektrometrie	29
2.11.1.1.	Monitorování vybraných reakcí (MRM)	30
2.12.	Přístupy k analýze metabolitů se sírou v rostlinách	30
2.12.1.	Značení stabilními izotopy síry	30
2.12.2.	Využití ICP-MS pro stanovení obsahu síry	31
2.12.3.	Sken neutrální ztráty sulfátové skupiny	31
2.12.4.	Vyhledávání sulfatovaných metabolitů v MS/MS spektrech	31
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1.	Materiál	33
3.2.	Chemikálie	33
3.3.	Klíčení a lyofilizace	34
3.4.	Extrakce	34
3.5.	UHPLC-TOF MS analýza	35
3.6.	Vyhledávání sulfatovaných metabolitů	36
3.7.	HPLC-MS/MS analýza	36
3.7.1.	Kvantifikace sulfatovaných látek metodou interního standardu	37
3.8.	Syntéza sulfatovaných fenolických kyselin	38
3.8.1.	Chemikálie	38
3.8.2.	Syntéza kyseliny 4-(sulfooxy)benzoové (S-BA)	38
3.8.3.	Syntéza kyseliny vanilové 4-sulfát (S-VA)	40
4.	VÝSLEDKY	41
4.1.	Vyhledávání nových sulfatovaných metabolitů	41
4.2.	Charakterizace vybraných sulfatovaných metabolitů pomocí MS/MS spekter	42
4.3.	Optimalizace UHPLC-MS/MS stanovení sulfatovaných fenolických kyselin	48
4.4.	Detekce sulfatovaných fenolických kyselin ve vzorcích rostlin, hub a řas	50
4.5.	Kvantifikace metodou UHPLC-MS/MS	53
5.	DISKUZE	54
6.	ZÁVĚR	59
7.	Seznam zkratk	60
8.	Seznam zdrojů	62
9.	Přílohy	74

1. ÚVOD A CÍLE

Fenolické látky, alkaloidy a terpenoidy, které patří mezi sekundární metabolity rostlin, slouží jako ochranné látky před parazity, k lákání opylovačů nebo k regulaci růstu. Fenolické látky zahrnují fenolické kyseliny, kumariny, flavonoidy, lignany a stilbeny. Fenolickými kyselinami jsou zde zmíněny kyseliny hydroxybenzoové a hydroxyskořicové, kam patří také velmi málo prozkoumané sulfatované fenolické kyseliny.

Fenolické kyseliny jsou ceněné pro svou antioxidační aktivitu. Vyskytují se v mnoha rostlinách, včetně zeleniny, ovoce, cereálií, obilovin, olejnin, luštěnin nebo bylin. O funkcích sulfatovaných fenolických kyselin je toho naopak známo jen málo. Doposud byly identifikovány pouze v řasách, mořských travách a v jednoděložné rostlině ovsu setém (Todd et al., 1993; Kurth et al., 2015, Supíková, 2018). Daleko prozkoumanějšími metabolity jsou např. glukosinoláty, z rostlin čeledi brukvovitých, které mají stejně jako sulfatované fenolické kyseliny přítomný atom síry oxidovaném stavu (Mugford et al., 2011). Dalšími příbuznými, o něco lépe popsány, metabolity jsou sulfatované flavonoidy, které se nachází zejména v rostlinách rodu *Flaveria* (Kleinenkuhnen et al., 2019).

V současnosti je známo několik zástupců sulfatovaných fenolických kyselin, a to kyseliny 4-(sulfooxy)benzoová (S-BA) a 4-(sulfooxy)fenyloctová (S-PhAA), detekované v řase *Dasycladus vermicularis* (scopoli) Krasser (Kurth et al., 2015), a kyselina zosterová (S-CA), poprvé zaznamenaná v mořské trávě *Zostera marina* (Todd et al., 1993). Nedávno byly S-CA a S-BA detekované také v ovsu v mé bakalářské práci (Supíková, 2018). Tyto látky vykazují antibiofilmovou aktivitu (Catto et al., 2015), což je schopnost odpuzovat a inhibovat mikroorganismy rostoucí na pevném povrchu v souvislé vrstvě. Fyziologická funkce sulfatovaných fenolických kyselin však není přesně známa. Sulfatace by se mohla uplatňovat např. při inaktivaci metabolitů nebo při skladování obranných metabolitů (Kurth et al., 2015; Thoms & Schupp, 2008).

Cíle

1. Vypracovat rešerši na téma sulfatované látky v různých organismech.
2. Vyhledávání nových sulfatovaných metabolitů v rostlinách a dalších organismech pomocí detekce neutrální ztráty SO_3 UHPLC-MS metodou.
3. Kvalitativně a kvantitativně analyzovat obsah S-BA, S-PhAA a S-CA napříč různými organismy pomocí UHPLC-MS.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Síra jako prvek

Síra je desátým nejběžnějším prvkem ve vesmíru a pátým na Zemi. Patří mezi základní makrobiogenní prvky a je esenciální pro všechny organismy, v kterých tvoří primární i sekundární metabolity plnící specifické funkce (Greenwood & Earnshaw, 1997).

Atomová hmotnost síry je 32,065 u. Síra má velké množství izotopů, celkem jich je známo 23, z nichž stabilní jsou pouze ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S a ^{36}S (Meija et al., 2016). Síra patří mezi chalkogeny, proto jsou fyzikálně-chemické vlastnosti síry podobné vlastnostem kyslíku, selenu a teluru. Např. vidíme podobnost chování organosírových sloučenin (např. thioly) s organokyslíkovými (např. alkoholy) (Klikorka et al., 1989).

Elementární síru lze získat tavením z již vytěžených hornin nebo přímým vytavením ze země. Elementární síra má původ buď vulkanický nebo biologický, kdy je síra mikroorganismy redukována ze síranů. Dalším zdrojem síry jsou fosilní paliva, uhlí, zemní plyn a ropa, kde se však síra často vyskytuje ve formě sloučenin (Klikorka et al., 1989). V přírodě se elementární síra vyskytuje převážně jako cyklická molekula tvořená osmi atomy (S_8). Síra tvoří více než 30 různých allotropních modifikací, které dále mohou tvořit rozličné polymorfy. Získat lze i amorfni síru, a to při prudkém chlazení roztavené síry (Greenwood & Earnshaw, 1997).

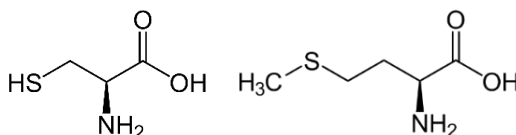
Molekula síry dokáže reagovat při oxidaci slabými oxidačními činidly v silně kyselých rozpouštědlech za vzniku polykationtů (např. S_8^{2+} , S_4^{2+} a S_{16}^{2+}) (Shriver, 2010). Síra dále tvoří mnoho anorganických sloučenin. Podobně jako kyslík reaguje síra s vodíkem za vzniku plynného sulfanu (H_2S). Jelikož síra nemá schopnost tvorby vodíkových můstků, není sulfan kapalný jako analogická sloučenina kyslíku s vodíkem, voda. Kromě běžného sulfanu existují ještě polysulfany (H_2S_x), což jsou kapalné nebo tuhé látky, jejichž molekuly tvoří nevětvené řetězce. Od sulfanu jsou odvozeny sulfidy. Technicky významné sulfidy jsou např. pyrit (FeS_2), galenit (PbS), chalkosin (Cu_2S), sfalerit (ZnS) nebo cinnabarit (HgS). S uhlíkem tvoří síra sloučeninu sirouhlík (CS_2). Dále tvoří síra s kyslíkem oxidy a z nich odvozené oxokyseliny a thiokyseliny, které mohou tvořit soli siřičitany, sírany a thiosírany (Klikorka et al., 1989).

Nejdůležitější anorganická forma síry z hlediska využití živými organismy je sulfát (SO_4^{2-}), který je přijímán rostlinami, houbami a bakteriemi z půdní nebo mořské vody. V organismech je anorganický sulfát redukován a asimilován do organické formy, kterou je thiolová skupina L-cysteinu (Patron et al., 2008; Takahashi et al., 2011). Lidský organismus a obecně živočichové schopnost redukce anorganického sulfátu a asimilace síry postrádají. Pro živočichy jsou proto zdrojem redukované síry aminokyseliny L-cystein a L-methionin obsažené v rostlinné potravě (Patron et al., 2008).

2.2. Organosírové sloučeniny

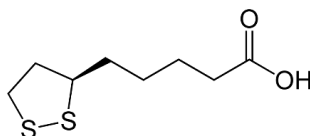
Organosírové sloučeniny lze rozdělit do tří skupin. První kategorie organických sloučenin se sírou obsahuje C–S vazbu (R–C–S–R'). V druhé kategorii jsou estery sulfátu s vazbou síry na uhlík přes kyslík (R–C–O–S–R'). Poslední kategorii tvoří sloučeniny s vazbou dusíku a síry, N–S (R–N–S–R') (Linder, 2018).

Do první kategorie patří, pro živé organismy nejvýznamnější organosírové sloučeniny, thioly (-C-SH), mezi které řadíme např. L-cystein a L-methionin (Obr. 1). Další pro život důležité organosírové sloučeniny jsou disulfidy (-C-S-S-C-), které vznikají oxidací dvou thiolových skupin. Např. v proteinech vnikají disulfidické můstky mezi SH skupinami dvou L-cysteinů, a umožňují tak správné skládání proteinů do terciárních struktur. Oproti slabým interakcím v sekundárních strukturách proteinů mají disulfidické můstky kovalentní charakter (Bulaj, 2005).



Obr. 1 L-cystein a L-methionin

Do první kategorie organosírových sloučenin dále patří thioethery (R–C–S–C–R'), thioestery (R–C–S–CO–R'), thioketony (C=S), sulfoxidy (R–C–S(=O)–R'), sulfony (R–C–SO₂–C–R') a sulfonové kyseliny (sulfonáty) (R–C–SO₃H) (Linder, 2018). Významný thioester je např. kofaktor enzymů koenzym A. Vazbu C–S obsahují také heterocyklické sloučeniny (př. thiofen, thiazol). Mezi heterocykly se sírou nalezneme zástupce, kteří mají v metabolismu nezastupitelnou roli, např. kyselina lipoová (Obr. 2), sloužící jako prostetická skupina mnoha enzymů, nebo thiamin (vitamín B1) a biotin (vitmín B7).

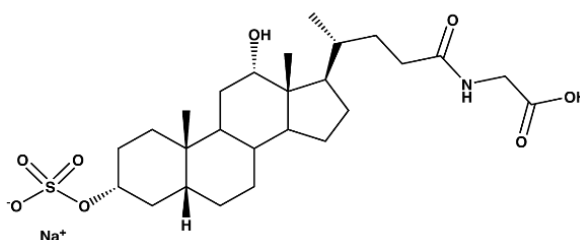


Obr. 2 Kyselina lipoová

V koenzymech se síra vyskytuje také ve formě klastrů, kde síra netvoří klasickou kovalentní vazbu ale koordináčně-kovalentní vazbu s kovem, např. typicky se železem (Fe-S). Fe-S klastry

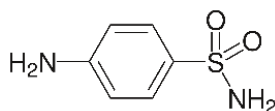
obsahují metaloproteiny, např. ferredoxiny nebo také NADH dehydrogenáza (Lippard & Berg, 1994).

Do druhé kategorie patří sulfooxy kyseliny (-C-O-SO₃H). Zástupci těchto látek mohou být např. z lidského metabolomu sulfatovaný derivát dehydroepiandrosteronu, kyselina 2-(sulfooxy)octová, glykodeoxycholát 3-sulfát sodný (Obr. 3) nebo syntetický sulfoxyethyl methakrylát (PubChem; The Humane Metabolome Database).



Obr. 3 Glykodeoxycholát 3-sulfát sodný

Do třetí kategorie organosírových sloučenin s vazbou síry na dusík patří sulfonamidy (-C-SO₂-NH₂) a sulfamáty (-C-O-SO₂-NH₂), např. sulfanilamid (Obr. 4), sulfadiazin, estriol sulfamát nebo estrol sulfamát (Linder, 2018; PubChem).



Obr. 4 Sulfanilamid

2.3. Sulfonace vs. sulfatace a názvosloví sulfo látek

Sulfonace je z chemického pohledu substituční reakce, kdy je sulfo skupina (též sulfonát; -SO₃⁻) vyměněna za vodík na uhlíku akceptorové molekuly za vzniku sulfátu. Sulfonace je substituční reakcí využívanou např. v organické syntéze. Kromě sulfonace, kdy vniká vazba mezi uhlíkem a sírou (C-S), může docházet ke vzniku vazby mezi sírou a kyslíkem na uhlíku (C-O-S), resp. k přenosu sulfonátu na kyslík hydroxylové skupiny. Pokud je však sulfonát přenesen na hydroxyl, jedná se již o sulfataci nikoli sulfonaci. Při této reakci vzniká esterová vazba. Sulfatace v lidském organismu má svůj význam při metabolizaci malých molekul endogenního původu (např.

hormonů), léčiv a xenobiotik. K sulfataci dochází ve fázi II. metabolismu za katalýzy sulfotransferázami (Strott, 2002). Skupina na uhlíku pak může být nazývána také jako sulfooxy skupina, popř. použijeme název původní molekuly a příponu sulfát. Jedna látka tedy může být nazývána např. jako kyselina vanilová 4-sulfát nebo kyselina 4-(sulfooxy)-3-methoxybenzoová.

Sulfát ve formě soli (SO_4)²⁻ reaguje pouze v organických nebo anorganických chemických reakcích s anorganickými prvky/sloučeninami nebo organickými molekulami v substitučních reakcích. V živých organismech musí být anorganický sulfát před využitím v metabolismu nejprve asimilován a redukcí zabudován do organické formy (Takahashi et al., 2011).

2.4. Chemická sulfatace malých molekul

Chemickou syntézou lze sulfatované molekuly připravit pomocí kyselin sírové, sulfamové nebo pomocí komplexu oxid sírový-pyridin ($\text{SO}_3 \cdot \text{Pyr}$). Kyselina sírová sulfonuje alkeny a cykloalkeny. Dále lze kyselinou sírovou sulfatovat jednosytné alkoholy, vícesytné alkoholy, polysacharidy (Gilbert, 1965).

Silná acidita kyseliny sírové nemusí být kompatibilní s některými výchozími látkami. Může docházet k dehydrataci, neselektivní sulfataci a degradaci struktury, což lze obejít využitím přídatného agens dicyklohexylkarbodiimid (DCC). V poměru 1:5:1 (alkohol : DCC : H_2SO_4) můžeme sulfatovat alkoholy s regioselektivním účinkem v závislosti na koncentraci (Al-Horani & Desai, 2010; Mumma, 1966).

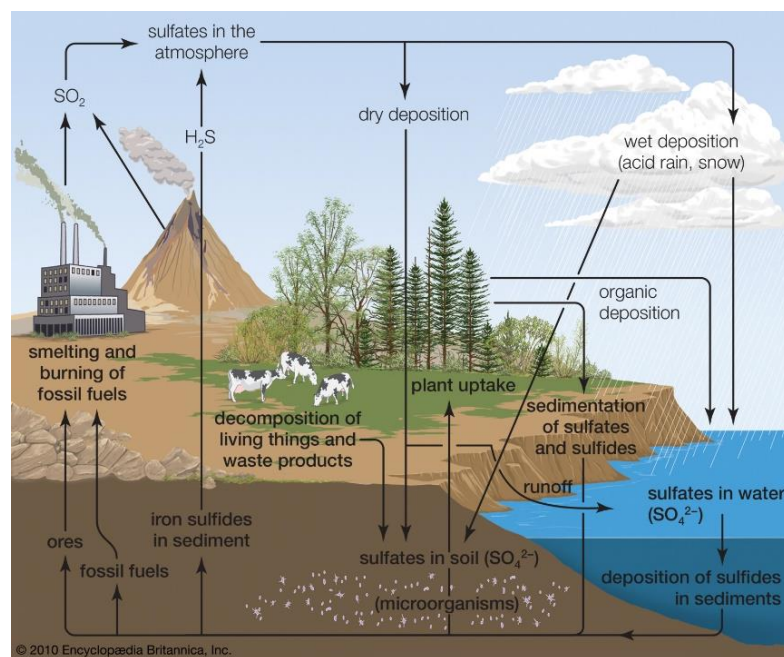
K sulfataci lze dále použít komplex oxidu sírového (SO_3) s organickou látkou. Komplexy je možno připravit probubláváním oxidu sírového vybraným rozpouštědlem tvořícím adukt. Nejčastěji jsou připravovány komplexy oxidu sírového s organickými bázemi pyridinem (Pyr), trimethylaminem (NMe_3), triethylaminem (NEt_3) nebo amidem, např. dimethylformamin (DMF). Pro sulfataci sacharidů, alkoholů, fenolů, aminů, thiolů a dalších funkčních skupin je nejpoužívanější $\text{SO}_3\text{-Py}$. Komplexy NMe_3 a NEt_3 s SO_3 jsou vhodné pro sulfataci alkoholických skupin sacharidů, steroidů a alifatických nebo alicyklických molekul. Fenolické látky s více kyselými hydroxylovými skupinami jsou snadněji sulfatované pomocí komplexů SO_3 se slabými bázemi jako je DMF nebo Py (Al-Horani & Desai, 2010).

Byly také vyvinuty metody sulfatace s využitím mikrovlnného záření pro zvýšení stupně sulfatace u mnohonásobných fenolických skupin v molekule. Metoda by mohla být prospěšná v přípravě organických látek napodobující glykosaminoglykany (mukopolysacharidy) (Raghuraman, 2007).

2.5. Koloběh síry

Síra koluje v živém i neživém prostředí v různých formách, které se mohou vzájemně měnit v procesech asimilace a disimilace síry. Schéma koloběhu síry na Zemi je zobrazeno na obrázku 5.

Redukce a asimilace anorganické síry do organické formy probíhá v rostlinách, houbách, řasách a bakteriích. Mikroorganismy jsou zase schopné degradovat organickou síru v odpadní hmotě v půdě na anorganické sulfidy. V procesu disimilace síry mohou sulfát- a síru-redukující bakterie při anaerobních podmínkách redukovat anorganické sulfidy a získávat tak energii. Koloběh síry zasahuje kromě půdy také do prostředí vod a atmosféry. Mořské řasy produkují dimethylsulfoniopropionát, jehož těkavá forma, dimethylsulfid, je uvolňována do ovzduší. Oxid siřičitý se vyskytuje v atmosféře jako produkt erupční činnosti sopek a těžkého průmyslu. Ve srážkách se dostává do půdy a moří jako kyselina sírová, která vzniká oxidací a hydratací oxidu siřičitého. Anorganické sírany jsou opět asimilovány organismy (Takahashi et al., 2011).



Obr. 5 Koloběh síry (převzato z Encyclopaedia Britannica, 2010)

2.6. Asimilace síry

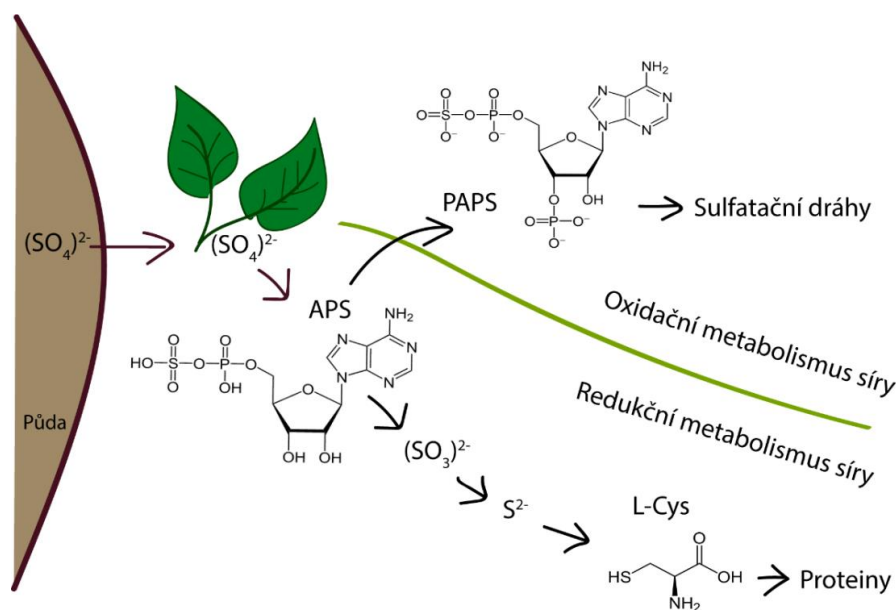
Asimilace síry je „připodobňování“ anorganické síry v sulfátu do organické formy. Při asimilaci dochází k redukcí sulfátu a jeho inkorporaci do organických sloučenin. Schopnost asimilace síry mají rostliny, řasy, houby a bakterie (Takahashi et al., 2011). Živočichové jsou však zcela závislí na dodání již redukované síry v aminokyselinách v rostlinné potravě (Bick et al., 2000; Kopriva & Koprivová, 2004). Schopnost redukce sulfátu je jedním z hlavních rozdílů v metabolismu síry mezi živočichy a ostatními organismy (Gunal et al., 2019).

Samotnou asimilaci předchází transport sulfátu v roztoku z okolního prostředí do organismu, v rostlinách probíhá absorpce např. kořenovým systémem z půdy (Takahashi et al., 2011).

Absorpce a následná metabolizace sulfátu je schematicky znázorněna na obrázku 6. V prvním kroku asimilace dochází k adenylaci sulfátu za vzniku adenosin 5'-fosfosulfátu (APS). Reakce je katalyzována ATP sulfurylázou. APS je následně redukován na siřičitan enzymem APS reduktáza. Siřičitan je poté redukován na sulfid, který je zabudován do L-cysteinu.

Syntéza APS je větvicím bodem metabolismu síry, jelikož APS může být kromě redukce také fosforylován APS kinázou na 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát (PAPS). APS reduktáza a APS kináza jsou proto klíčové pro určení, zda se síra bude dále podílet na primárním (v redukované formě) nebo sekundárním metabolismu (v oxidované formě), tedy zda síra vytvoří thiol nebo sulfát. PAPS pak slouží jako donor aktivované sulfo skupiny pro sulfataci molekul, které zprostředkovávají sulfotransferázy (Strott, 2002; Takahashi et al., 2011; Hirschmann et al., 2014).

U hub a u některých bakterií se vyskytuje modifikovaná dráha biosyntézy L-cysteinu. Tyto organismy syntetizují PAPS, který není využit pouze pro sulfataci, ale je v prvé řadě prekurzorem pro L-cystein. PAPS je nejprve redukován na siřičitan. Reakce je katalyzována enzymem PAPS reduktáza. Siřičitan je následně redukován na sulfid, který slouží k syntéze L-cysteinu (Carroll et al., 2005).



Obr. 6 Schéma metabolizace sulfátu v rostlinách

2.7. Sulfatační dráhy

Metabolismus síry lze komplexně rozdělit na část oxidační a redukční (Obr. 6). Redukční metabolismus síry zahrnuje syntézu primárních metabolitů, což jsou sírné aminokyseliny nebo kofaktory enzymů se sírou v thiolové formě. Oxidační metabolismus síry představuje především

sulfatační dráhy a biosyntézu sekundárních metabolitů obsahujících síru, převážně ve formě sulfátu (Gunal et al., 2019). Sulfatační dráhy a jejich metabolity jsou oproti primárním metabolitům se sírou mnohem méně prozkoumány a zahrnují velké množství doposud nepopsaných látek. Jsou proto z hlediska současného výzkumu zajímavější.

U téměř všech organismů jsou pro sulfataci klíčové sulfotransferázy a donor aktivovaného sulfátu PAPS (Strott, 2002). Sulfotransferázy přenášejí sulfo skupinu z PAPS na hydroxylovou nebo na amino skupinu akceptoru. Akceptorovou molekulou může být např. sacharid, lipid, peptid, prekurzor hormonu, xenobiotikum nebo jiná molekula (Dias et al., 2019; Coughtrie, 2016).

U bakterií může sulfatace probíhat modifikovaným způsobem. Některé bakterie využívají jako donor sulfo skupiny různé fenolické sulfáty. Enzymy přenášející sulfo skupinu PAPS-independentní cestou se nazývají aryl sulfotransferázy, nebo také arylsulfát sulfotransferázy (Malojčić et al., 2014). Arylsulfát sulfotransferázu obsahuje např. *Desulfotobacterium hafniense*. Donorem sulfo skupiny může být např. *para*-nitrofenol sulfát (Horst et al., 2015).

2.7.1. Syntéza PAPS

K syntéze PAPS jsou nezbytné dva již výše zmíněné enzymy: ATP sulfuryláza a APS kináza (Strott, 2002). V rostlinách je ATP sulfuryláza přítomna jak v plastidech, tak v cytosolu. Např. *Arabidopsis* má tři ze čtyř ATP sulfuryláz přítomny v plastidech a jen jednu izoformu má cytosolickou. APS kináza, která katalyzuje fosforylaci APS na PAPS, je v rostlinách lokalizována paralelně s ATP sulfurylázou (Mugford et al., 2009).

Původně však bylo předpokládáno, že APS je fosforylován v cytosolu a PAPS se pak v cytosolu účastní sulfatačních reakcí, zatímco k redukci APS dochází v plastidech. Avšak PAPS je syntetizován současně v plastidech i v cytosolu. Sulfatace pomocí sulfotransferáz probíhá pouze v cytosolu, proto jsou v membráně plastidech přítomny specifické transportéry pro PAPS. Z jakého důvodu mají rostliny syntézu PAPS v plastidech doplněnou syntézou PAPS v cytosolu není známo. Např. mutantní rostliny *Arabidopsis* bez genu pro cytosolickou ATP sulfurylázu nevykazují oproti „wilde type“ rostlinám žádné fenotypové změny (Bohrer et al., 2014; Mugford et al., 2009).

Živočichové nejsou schopni sulfát redukovat a asimilovat, nicméně využít jej v oxidované formě pro sulfataci molekul mohou. Proto i živočichové dokáží syntetizovat PAPS, ale místo enzymů ATP sulfurylázy a APS kinázy mají jeden zfúzovaný enzym PAPS syntáza (Patron et al., 2008).

2.7.2. Sulfotransferázy

V současnosti je známo 21 cytosolických sulfotransferáz v *Arabidopsis*. U člověka bylo popsáno 13 cytosolických sulfotransferáz. Popis sulfotransferáz byl umožněn především díky analýze sekvencí genů. Bližší role těchto enzymů je z větší části neprozkoumaná (Hirschmann et al., 2014;

Tibbs et al., 2015). Nejdůležitějšími sulfotransferázami v *Arabidopsis* jsou izoformy AtSOT16, AtSOT17 a AtSOT18, které se uplatňují v posledním kroku syntézy glukosinolátů (Hirai et al., 2005). Některé sulfotransferázy vykazují také vysokou substrátovou specifitu k brassinosteroidům, kyselině salicylové, 11-hydroxyjasmonátu, 12-hydroxyjasmonátu (Marsolais et al., 2007; Gidda et al., 2003). Nicméně sulfatované formy většiny výše zmíněných nebyly *in vivo* detekovány.

První izolace dvou sulfotransferáz byla provedena z rostliny *Flaverie chloraefolia*, jednalo se o 3- a 4'-flavonol sulfotransferázy. *Flaverie* jsou známé pro svůj vysoký obsah flavonoidů, které se ve *Flaverii* vyskytují i v sulfatovaných formách (Varin et al., 1992).

Dalším příkladem sulfotransferázy může být cholin sulfotransferáza přítomná v halofytních rostlinách rodu limonka (*Limonium*) a dalších halofytních druzích. Za podmínek nadměrného salinního stresu rostliny je sulfotransferáza aktivována a z cholinu tvoří cholin O-sulfát, který funguje jako osmoprotektivní látka (Rivoal & Hanson, 1994).

Jiná funkce sulfatace byla popsána v rostlinném druhu brukev řepka (*Brassica napus*), kde byla detekována sulfotransferáza sulfatující 24-epibrassinolid. Sulfatace má vliv na zrušení biologické aktivity fytohormonu a ovlivnění homeostázy brassinosteroidních hormonů v rostlině. Metabolit však byl doposud detekován pouze při *in vitro* testech s izolovaným enzymem (Rouleau et al., 1999).

Bylo charakterizováno několik dalších sulfotransferáz z různých druhů rostlin, ale stále jich k detekci mnoho zbývá. Prozatím jsou známé funkce a produkty sulfotransferáz uplatňujících se při syntéze glukosinolátů. O ostatních sulfatovaných metabolitech toho víme jen poměrně málo. Skutečně změřených sulfatovaných metabolitů v rostlinných vzorcích bylo doposud pouze pár (Koprivova & Kopriva, 2016).

U kvasinek nebo hub nebyly identifikovány žádné sulfotransferázy (Koprivova & Kopriva, 2016). Nicméně u některých kvasinek a hub byla pozorována sulfatace molekul za využití jako donoru sulfátu PAPS (Patron et al., 2008; Kopriva & Koprivova, 2004).

2.7.3. Tyrosylprotein sulfotransferázy

Tyrosylprotein sulfotransferázy jsou ukotveny v membráně Golgiho aparátu rostlinných i živočišných buněk. Mají odlišnou sekvenci a strukturu oproti cytosolickým sulfotransferázám a jejich substrátem jsou peptidy a proteiny. U rostlin jsou tyrosylprotein sulfotransferázy zodpovědné také za sulfataci peptidových fytohormonů fytosulfokinů (Komori et al., 2009).

2.7.4. Lidské sulfotransferázy

Lidské sulfotransferázy mají zkratkové označení SULT. Zkratka tak jasně odlišuje sulfotransferázy lidské od rostlinných, u kterých je používána zkratka SOT. Účinek, biologická aktivita a celková

charakterizace lidských, zvířecích ale i bakteriálních sulfotransferáz jsou v porovnání s rostlinným poměrně dobře známy (Gunal et al., 2019).

Cytosolické sulfotransferázy mají v organismu především funkci detoxifikační. Sulfatace zvyšuje rozpustnost a usnadňuje eliminaci. Dochází k ní při II. fázi metabolismu, kdy mohou být různé malé endogenní i exogenní molekuly kromě sulfatace také methylovány nebo glukuronidovány (Williamson & Clifford, 2010; Paul et al., 2012). Sulfatace má též funkci skladovací, kdy je látka aktivována až štěpením esterové vazby hydrolázami (Al-Horani & Desai, 2010). Běžně sulfatovanými molekulami v lidském organismu jsou např. steroidní hormony, neurotransmitery, žlučové kyseliny, léčiva nebo xenobiotika (Paul et al., 2012).

Vedle cytosolických sulfotransferáz jsou dalším typem sulfotransferázy Golgiho aparátu. V Golgiho aparátu jsou sulfatovány např. endoteliární glykoproteiny, které jsou součástí povrchu endoteliálních buněk cév (De Graffenried & Bertozzi, 2003). Sulfotransferázy sulfatují sacharidové jednotky glykoproteinů za vzniku sulfoadhezínů, které fungují jako ligandy L-selektinů leukocytů. K reakci dochází při zánětu za účelem vycytání leukocytů do místa zánětu. Kromě sulfatace mohou být glykoproteiny také fucosylované nebo sialylované (Hemmerich et al., 1995).

Sulfotransferázy lze také rozlišit podle substrátové specifity. Mohou katalyzovat buď sulfataci nízkomolekulárních nebo vysokomolekulárních látek jako jsou proteiny, sacharidy a glykoproteiny. Vysokomolekulární látky jsou většinou sulfatovány membránově vázanými sulfotransferázami, zatímco nízkomolekulární látky jsou obvykle sulfatovány volnými sulfotransferázami (Coughtrie, 2016; Chapman et al., 2004).

Sulfotransferázy jsou potenciální terapeutický cíl v léčbě např. nádorových onemocnění a zánětů (Hemmerich et al., 2004, Paul et al., 2012). Současný výzkum se proto zaměřuje na vyhledávání a design nízkomolekulárních inhibitorů sulfotransferáz (Paul et al., 2012).

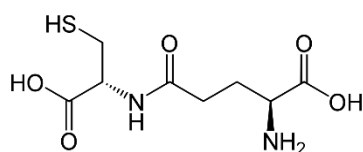
2.8. Metabolity obsahující síru

Síra se v metabolitech vyskytuje v redukované nebo oxidované podobě. Redukovanou síru obsahují primární metabolity, zatímco oxidovaná forma, která je snadněji metabolizovatelná a dostupná pro sulfotransferázy, je typická pro sulfatované sekundární metabolity. Oxidovaná síra pochází především z PAPS nebo z oxidace thiolů (Takahashi et al., 2011). Sulfatované metabolity jsou vysoce strukturně rozmanité a jejich identifikace je tudíž velmi obtížná. Např. v rostlině *Arabidopsis thaliana* bylo detekováno několik desítek síru obsahujících metabolitů, jejichž struktura je však neznámá (Glaser et al., 2014).

2.8.1. Glutathion

Nejrozšířenějším peptidem ve všech organismech, na jehož stavbě se podílí L-cystein, je glutathion (Obr. 7). Jedná se o tripeptid γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin (Jez, J. M., 2019). Glutathion je

zodpovědný za vylučování většiny „neproteinové“ redukované síry v organismu (Hell and Wirtz, 2011). Má klíčovou funkci při udržování homeostázy, buněčné obraně, redoxních dějích, přenosu signálů a detoxifikaci (Noctor et al., 2011). Glutathion dokáže tvořit konjugáty s elektrofilními látkami, např. ionty těžkých kovů nebo xenobiotiky. Konjugace probíhá na sulfhydrylové skupině bez nebo s pomocí glutathion S-transferázy, která se uplatňuje při detoxifikaci organismu od xenobiotik nebo při udržování redoxního stavu organismu (Edwards and Dixon, 2005; Cummins et al., 2011).



Obr. 7. Glutathion

2.8.2. Fytosulfokiny

Peptidy mohou kromě thiolové skupiny obsahovat síru také v oxidovaném stavu. Sulfát může být připojen k hydroxylové skupině na L-tyrosinu, např. u peptidových fytohormonů fytosulfokinů. Fytosulfokiny jsou oligopeptidy o pěti aminokyselinách. Jejich sulfatace je katalyzována tyrosylprotein sulfotransferázami (Matsubayashi & Sakagami, 1996; Komori et al., 2009). Fytosulfokiny se účastní mezibuněčné komunikace a signalizace inhibice proliferace. Např. byly detekovány v kultuře kalusových disperzních buněk za podmínek velké hustoty buněk v prostoru, kdy dochází ke kontaktní inhibici (Matsubayashi, 2013).

2.8.3. Sulfatované fytohormony

K sulfataci může docházet u fytohormonů kyselina hydroxyjasmonová, kyselina salicylová a některé brassinosteroidy (Gidda et al., 2003; Marsolais et al., 2007; Baek et al., 2010). Všechny tyto fytohormony obsahují volnou hydroxylovou skupinu, na které může být sulfát připojen. Jediným sulfatovaným fytohormonem detekovaným přímo v rostlině je kyselina 5'-(hydroxysulfonyloxy)jasmonová. Konkrétně se jednalo o rostlinu *Tribulus cistoides*, což je druh kotvičníku (Achenbach et al., 1994). Stejný derivát kyseliny jasmonové byl také identifikován v rostlině kyjovník (*Laguncularia racemosa*, L.) rostoucí jako mangrovy (Xue et al., 2008). Izomer kyselina 12'-(hydroxysulfonyloxy)jasmonová byla detekovaná v kakau (Hurst et al., 2014).

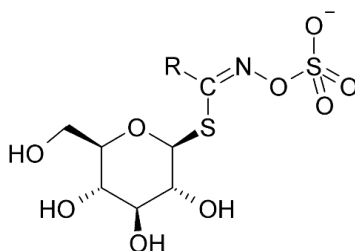
Z *Arabidopsis thaliana* byly izolovány sulfotransferázy, které *in vitro* katalyzovaly produkci 24-epibrassinolid sulfátu. Nicméně sulfatované brassinosteroidy doposud nebyly přímo v rostlině detekovány (Marsolais et al., 2017). Dále byla v *Arabidopsis* identifikována sulfotransferáza

AtSOT12, která je exprimovaná při rostlinném stresu. AtSOT12 katalyzuje sulfataci kyseliny salicylové, jejíž sulfatovaná forma byla detekována také pouze při *in vitro* testech s využitím AtSOT12. V rostlině sulfatovaná kyselina salicylová nebyla detekována (Baek et al., 2010).

2.8.4. Glukosinoláty

Glukosinoláty jsou sekundární metabolity nacházející se v rostlinách rodu *Brassicaceae* (např. brokolice, květák, hořčice nebo křen). Jsou to glykosidy obsahující β -D-glukopyranosový zbytek připojen k hydroximosulfát esteru pomocí sulfátového můstku (Obr. 8). Síra je přibližně ve stejném množství inkorporována do glukosinolátů jako do aminokyselin, proto má biosyntéza glukosinolátů velký efekt na rovnováhu obsahu síry v rostlinách (Mugford et al., 2011). Dále obsahují R-skupinu, jak je znázorněno na obrázku 8, která je odvozena od alifatické (alanin, leucin, isoleucin, methionin, valin) nebo aromatické aminokyseliny (L-fenylalanin nebo L-tyrosin), nebo od indolu (L-tryptofan) (Collett et al., 2014). Pro indolové glukosinoláty je charakteristická hořká chuť (Halkier and Gershenzon, 2006).

Doposud bylo detekováno přes 130 různých molekul glukosinolátů. Bylo zjištěno, že dokáží regulovat zánět a odpověď na stres. Mají antioxidační a antimikrobiální aktivitu (Bischoff, 2016; Collett et al., 2014; Halkier and Gershenzon, 2006). Dále mají obrannou funkci při reakci rostlin na poškození houbami, býložravci nebo bakteriemi (Fahley et al., 2001; Bednarek et al., 2009; Fan et al., 2011; Muller et al., 2010; Sonderby et al., 2010).



Obr. 8 Obecná struktura glukosinolátu

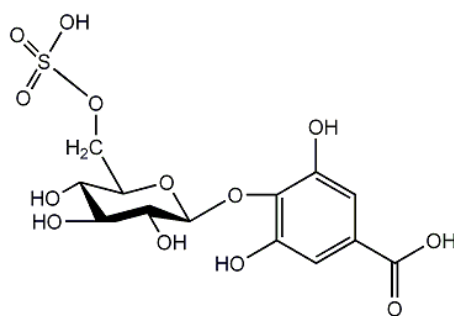
Pro vykonávání své funkce glukosinoláty vyžadují aktivaci, ke které dochází odštěpením glukózové jednotky vlivem enzymu myrosináza. Běžně se glukosinoláty vyskytují ve vakuolách, zatímco myrosináza je přítomna volně v cytoplazmě. Myrosináza má β -thioglukosid glukohydrolázovou aktivitu. Při poškození rostlinného pletiva dojde k vyjití obsahu vakuol do cytosolu, což při neutrálním pH způsobí hydrolýzu glukosinolátů působením myrosinázy za uvolnění glukózové jednotky (Bones, & Rossiter, 2006). Aglykonová část glukosinolátu tvoří

metabolity s konkrétní biologickou funkcí, což mohou být např. isothiokyanáty nebo nitrily (Bones, & Rossiter, 2006; Cavaiuolo and Ferrante, 2014).

O glukosinolátech je známo, že jejich vysoký obsah v potravě je nevhodný pro hospodářská zvířata, která by neměla být brukvovitými rostlinami krmena. Výjimkou je řepka olejka, typická velmi nízkým obsahem glukosinolátů, z níž jsou jako krmivo používána semena (Bell, 1984). Významným glukosinolátem je např. glukorafanin (4-methylsulfinylbutyl glukosinolát), který je obsažen především v brokolici. Jeho hydrolyzou vzniká isothiokyanát sulforafan, který má protinádorové vlastnosti, jelikož dokáže blokovat buněčný cyklus a podporuje apoptózu. Díky svým účinkům je řazen mezi nutraceutika (Halkier and Gershenzon, 2006, Bischoff, 2016).

2.8.5. Turgorin

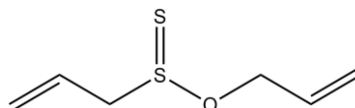
Zajímavým sulfatovaným glykosidem z rostlinné říše je molekula zodpovědná za seismonastické pohyby citlivky stýdlivé (*Mimosa pudica*), 4-O-(β -D-glukopyranosyl-6'-sulfát) kyseliny gallové neboli turgorin (Obr. 9). Turgorin je též někdy nazýván podle svého účinku Faktor periodického pohybu listů 1 (periodic leaf movement factor 1, PLMF-1) (Varin et al., 1997). Na základě biotestů a zkoumání schopnosti citlivky uzavírat listy na mechanické podněty bylo zjištěno, že klíčovou strukturou pro biologickou aktivitu PLMF-1 je sulfátová skupina v pozici 6', karboxylová skupina na aromatickém jádře a specifický substituční vzor fenolického jádra (Kallas et al, 1989).



Obr. 9 Turgorin

2.8.6. Alicin

Alicin, nebo také diallyldisulfid-S-oxid (Obr. 10), je obsažen v rostlinách čeledi cibulovitých (*Alliaceae*). Poprvé byl alicin izolován roku 1944 v laboratoři Chestera J. Cavallita. Jeho typickými vlastnostmi jsou antibakteriální a antifungální účinky (The Human Metabolom Database).



Obr. 10 Alicin

2.8.7. Sulfatované flavonoidy

Flavonoidy mají v rostlinách různorodé funkce. Jsou zodpovědné za barevnou pigmentaci rostlin, podílejí se na regulaci vývoje, na interakci s rostlinnými mikroby nebo na fotoprotekci (Koes et al., 1994; Taylor & Grotewold, 2005; Hassan & Mathesius, 2012; Cao et al., 1997). O funkcích sulfatovaných flavonoidů je oproti tomu známo jen velmi málo (Kleinenkuhnen et al., 2019). Předpokládá se, že by se mohly uplatňovat jako:

- ko-pigmenty spolu s flavonoidy,
- jaderné vazebné faktory (z angl. nuclear binding factors),
- látky s vlivem na snižování efektu efluxu auxinu,
- látky ovlivňující adaptaci rostliny na vlhká a mokrá stanoviště

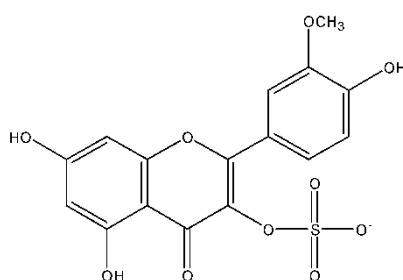
(Alluis & Dangles, 2001; Ananvoranich et al., 1994; Ibrahim, 1995; Tomás-Barberán et al., 1987).

Flavonoidy mohou být sulfatovány v jedné nebo více polohách, nejčastěji v polohách 3 a 7 (Barron et al., 1988). Sulfotransferázy specifické pro flavonol byly detekovány v *Arabidopsis thaliana* (Gidda & Varin, 2006; Hashiguchi et al., 2014) a v několika dalších druzích rodu *Flaveria* (Varin et al., 1992; Ananvoranich et al., 1994; Marsolais & Varin, 1998). U rostlin rodu *Flaveria* byly detekovány také přímo sulfatované flavonoidy. Celkem rod *Flaveria* obsahuje 21 druhů, kdy každý druh obsahoval odlišnou kombinaci sulfatovaných flavonoidů (Hannoufa et al., 1994). Sulfatované flavonoidy byly celkem detekovány v nejméně patnácti jednoděložných a sedmnácti dvouděložných rostlinných rodech, mezi nimiž bylo celkem 250 druhů (Barron et al., 1988; Teles et al., 2018). Detekovány byly také glykosidy sulfatovaných flavonoidů (Barron et al., 1988).

Zajímavým sulfatovaným flavonoidem je isorhamnetin 3-sulfát (též persicarin; Obr. 11), který je nejčastěji izolován z haluchy z čeledi miříkovitých. U persicarinu byly zjištěny antidiabetické vlastnosti. Persicarinu byl testován na myších, kterým byl navozen diabetes mellitus I. typu.

Persicarin snižoval hladinu oxidačního stresu, kyslíkových radikálů a zánětlivé odpovědi u myši s hyperglykemií, a to především v jaterních buňkách. Protektivní účinek persicarinu na játra by tak potenciálně mohl být využit u pacientů s diabetem jako léčivo (Lee et al., 2017). Pozitivní výsledky má persicarin také v testech na neuroprotektivní aktivitu. Testy byly prováděny na kulturách krysích kortikálních buněk, u kterých byla neurotoxicita navozena glutamátem (Ma et al., 2010).

Další sulfatované flavonoidy byly detekovány např. v rostlině *Zostera marina*, což je tráva rostoucí na mořském dně. Ze *Zostery mariny* byly izolovány flavonoidy luteolin 7-sulfát, diosmetin 7-sulfát, apigenin 7-sulfát, chrysoeriol 7-sulfát a luteolin 7,3'-disulfát (Todd et al., 1993).



Obr. 11 Persicarin

2.8.8. Sulfolipidy

Sulfolipidy jsou součástí membrány chloroplastů rostlin a řas (Koprivova & Kopriva, 2016). Jsou tvořeny při nedostatku fosfátu jako kompenzační produkt v důsledku redukce fosfolipidů (Hammond et al., 2003). Zajímavý fakt je, že jejich sulfátová skupina nepochází z PAPS ale ze siřičitanu (Sanda et al., 2001). Příkladem molekuly sulfolipidu je sulfoquinovosyldiacylglycerol, jehož hlava je modifikovaná galaktózou se sulfátem na 6' uhlíku. Detekována byla např. v membráně chloroplastů narcisu, bramboru nebo kvěťáku (Schmid & Ohlrogge, 1996). Sulfolipidy jsou obsaženy také v mnoha bakteriích, v kterých byly dokonce původně objeveny, konkrétně v druhu *Mycobacterium tuberculosis* (Middlebrook, 1959).

2.8.9. Sulfatované metabolity mořských organismů

2.8.9.1. Psammaplin A sulfát

O sulfatovaných metabolitech je známo, že jsou v hojném počtu obsaženy především v mořských organismech. Jejich funkce jsou různorodé, nicméně dodnes nejsou všechny přesně objasněny. Předpokládá se, že sulfatace může sloužit k uskladnění nebo deaktivaci aktivní formy metabolitu, kdy biologická funkce je aktivována až desulfatací (Welling et al., 2009). Tak tomu je např. u houbovce *Aplysinella rhax*, jehož metabolit psammaplin A sulfát je při poškození stélky

desulfatován za vzniku aktivního psammaplinu A, který má obrannou funkci (Thoms & Schupp, 2008).

2.8.9.2. Metabolity produkované řasou *Dasycladus vermicularis*

Dasycladus vermicularis (Scopoli) Krasser (Obr. 12) patří do řádu *Dasycladales*. Řasu lze nalézt v mělkých vodách v oblastech např. Středozemního moře, Střední Ameriky, Karibských ostrovů, Brazílie nebo Jižní Číny (Hartmann et al., 2018). *Dasycladales* patří s řádem *Bryopsidales*, do třídy zelených řas *Ulvophyceae*, které mají sifonokladální stélku složenou z mnohojaderných buněk propojených v unicelulární thallus. Propojení buněk je pro řasu rizikový faktor, pokud by došlo k poškození stélky (Kurth et al., 2015; Hartmann et al., 2018). Řasa má proto vytvořený mechanismus obrany, kdy jsou při poškození stélky poraněná místa utěšňována produkty biopolymerizačních reakcí (Welling et al., 2009; Ross et al., 2006; Welling et al., 2011). V *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser bylo objeveno několik sulfatovaných metabolitů, včetně 6,7-dihydroxykumarin-3-sulfátu, který se účastní na opravě defektu stélky řasy. Neaktivní 6,7-dihydroxykumarin-3-sulfát je sulfatázami přeměněn na aktivní 3,6,7-trihydroxykumarin, a ten je následně oxidován a využit jako cross-linker proteinů. V místě defektu stélky tedy vznikají ko-polymery, které poraněné místo mechanicky opravují (Welling et al., 2011; Kurth et al., 2015). Dále byly v řase detekovány kumariny sulfatované na dvou pozicích, a to 7-hydroxykumarin-3,6-disulfát (dasycladin B) a 5,8'-di-(6(6'),7,(7'))-tetrahydroxy-3-sulfoxy-3'-sulfoxykumarin (dasycladin A) (Hartmann et al., 2018).

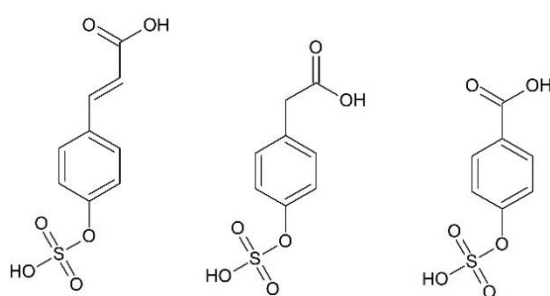


Obr. 12 *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser (Huang & Lu, 2006)

2.8.9.3. Sulfatované fenolické kyseliny

Mezi prvními detekovanými sulfatovanými fenolickými kyselinami byla sulfatovaná kyselina *para*-kumarová, jinak také 4-(sulfooxy)skořicová (S-CA; Obr. 13). Látka byla objevena rostlině *Zostera marina*, podle které byla pojmenovaná také jako kyselina zosterová (Todd et al., 1993). *Zostera marina* patří do rodu *Zosteraceae* ze skupiny mořských trav, které dokáží jako jediné z rostlinné říše růst ve slané vodě na mořském dně (den Hartog & Kuo, 2006). Kyselina zosterová má anti-biofilmovou aktivitu (z angl. anti-biofouling), což je schopnost inhibovat růst souvislé biofilmové vrstvy tvořené mikroorganismy na pevném povrchu. Bylo však zjištěno, že větší anti-biofilmovou aktivitu má desulfatovaná forma, kyselina *para*-kumarová (Catto et al., 2015). Látky s anti-biofilmovou aktivitou jsou využívány při ošetřování povrchu lodí proti mořským mikroorganismům a drobným korýšům, kteří ulpívají na povrchu, poškozují jej a zpomalují loď při plavbě (Achamlale et al., 2009). Kromě kyseliny zosterové byly ze *Zostery* izolovány i nesulfatované fenolické kyseliny: *para*-kumarová, ferulová, kávová, vanilová, gallová, protokatechová, gentisová, *para*-hydroxybenzoová a *ortho*-protokatechová (Todd et al., 1993).

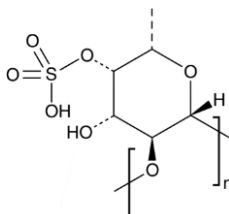
Sulfatované fenolické kyseliny 4-(sulfooxy)fenyloctová a 4-(sulfooxy)benzoová (Obr. 13) byly nedávno detekované v řase *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser. Přesná funkce látek není známá. Předpokládá se, že by mohly sloužit jako prekurzory látek s anti-biofilmovou aktivitou (Kurth et al., 2015; Catto et al., 2015). Kyseliny 4-(sulfooxy)benzoová a zosterová byly detekovány také v suchozemské rostlině oves setý (Supíková, 2018 - bakalářská práce). Je proto pravděpodobné, že se fenolické sulfooxy kyseliny vyskytují i v mnoha dalších suchozemských rostlinách.



Obr. 13 Kyseliny zosterová, 4-(sulfooxy)fenyloctová a 4-(sulfooxy)benzoová

2.8.9.4. Sulfatované polysacharidy

Sulfatované polysacharidy jsou produkovány mořskými řasami. Hlavními skupinami sulfatovaných polysacharidů jsou karagenany z červených řas, ulvany ze zelených řas a fukoidany (Obr. 14) z hnědých řas. Sulfatované polysacharidy vykazují mnoho zdraví prospěšných vlastností, např. antioxidační, protialergické, protivirové, protinádorové, anti-imunodeficientní a antikoagulační (Ngo & Kim, 2013).



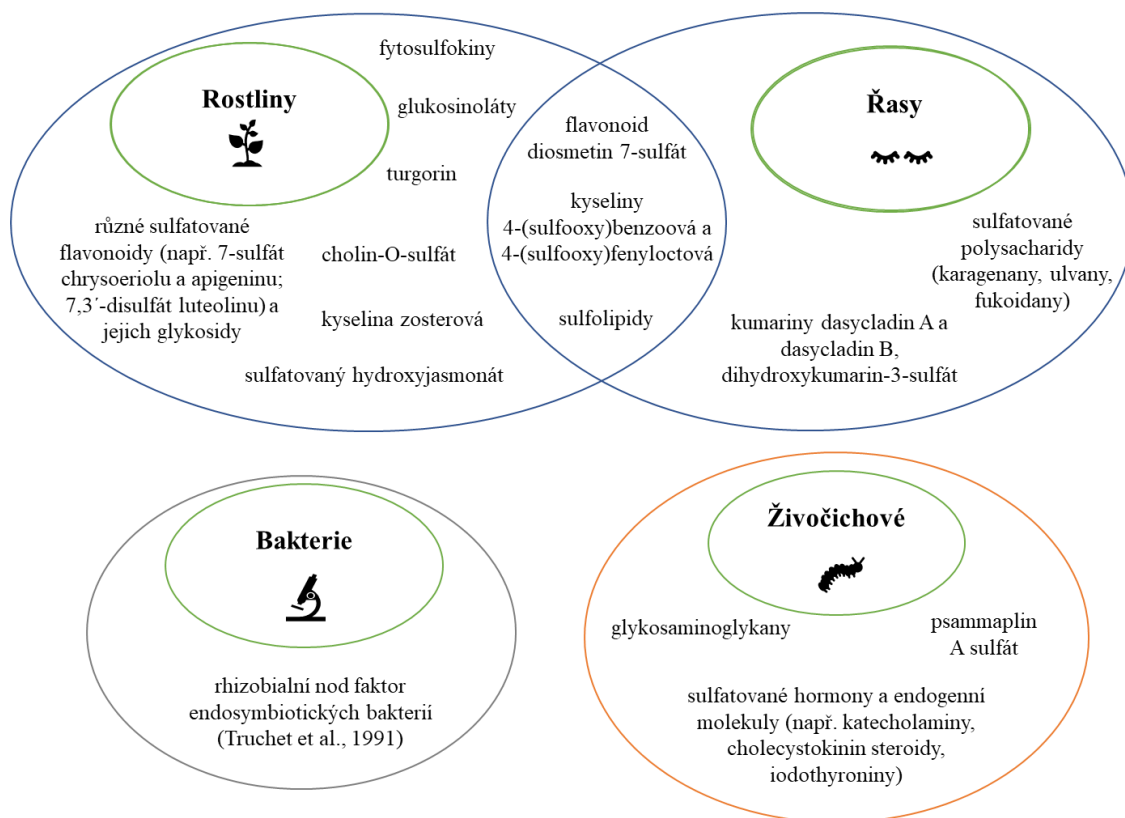
Obr. 14 Strukturální jednotka fukoidanu

2.8.10. Živočišné glykosaminoglykany

Glykosaminoglykany (mukopolysacharidy) jsou polymery glukosaminu nebo galaktosaminu a uronových kyselin (glukuronová, iduronová). Většina glykosaminoglykanů obsahuje sulfátové substituenty. Zástupci jsou např. heparansulfát nebo chondroitinsulfát. Strukturální jednotkou heparansulfátu je disacharid sulfatované kyseliny D-glukuronové a sulfatovaného glukosaminu. Vyskytuje se ve tkáních (např. v bazální membráně, aortě, plicích, mozku nebo kosterních svalech) ve formě proteoglykanu, kde vyplňuje extracelulární prostor. Je vázán k povrchu buněk a extracelulárním proteinům (Velleman & Liu, 2005). Chondroitinsulfáty jsou vysoce sulfatované glykosaminoglykany, také často tvořící proteoglykany. Vyskytují se v chrupavce, kostní tkáni, meziobratlových ploténkách nebo ve velkých cévách (Gallagher & Lyon, 2000). Podobnou strukturu jako heparansulfát má heparin, který ale obsahuje mnohem více sulfátových skupin, a může obsahovat i N-acetyly místo N-sulfátu (sulfamidová skupina) (Volpi, 2006). Heparin je produkován bazofilními granulocyty a žírnými buňkami a působí jako protisrážlivá látka krve mechanismem inhibice funkce trombinu (Lincová & Farghali, 2007).

2.9. Souhrn sulfatovaných metabolitů u všech organismů

Na obrázku 15 jsou zobrazeny sulfatované metabolity popsané výše podle detekce v různých organismech.



Obr. 15 Souhrn detekovaných sulfatovaných metabolitů podle výskytu ve skupině organismů

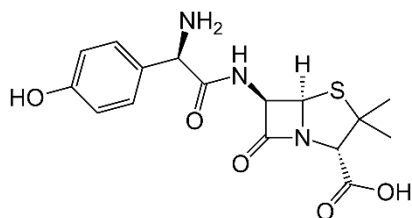
V organismech říše hub nebyly detekovány žádné známé sulfatované metabolity. Pouze u askomycet *Fusarium proliferatum* byla detekována produkce enzymů sulfatáz, které askomyceta využívají pro asimilaci uhlíku ze sulfatovaného polysacharidu fukoidanu z hnědých řas. Sulfatázy jsou však produkovány jen v případě, kdy houby rostou na půdě obsahující sulfatovaný polysacharid jako jediný dostupný zdroj uhlíku (Shvetsova et al. 2015).

2.10. Biologicky aktivní látky obsahující síru

2.10.1. Peniciliny

Peniciliny jsou skupina β -laktamových antibiotik působící na buněčnou stěnu bakterií. Jsou produkovány plísněmi (mikromycety), kdy poprvé byl penicilin objeven ve plísni štětičkovec (*Penicillium*). Peniciliny působí baktericidně. Váží se na enzymy syntetizující peptidoglykan v buněčné stěně bakterií. Peniciliny ve struktuře obsahují bicyklus tvořen beta-laktamem a

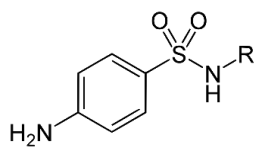
thiazolidinovým kruhem (Schlager et al., 2006). Mezi peniciliny patří několik desítek látek. Můžeme rozlišit širokospektré a úzkospektré (základní) peniciliny. Úzkospektré peniciliny jsou např. penicilin G a penicilin V. Širokospektré peniciliny jsou aminopeniciliny ampicilin, amoxicilin (Obr. 16) nebo karboxypenicilin ticarcilin (Lincová & Farghali, 2007).



Obr. 16 Amoxicilin

2.10.2. Sulfonamidy

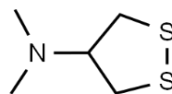
Další skupinou látek s atomem síry a s antimikrobiálními účinky jsou sulfonamidy. Jejich struktura je zobrazena na obrázku 17. Sulfonamidy obsahují sulfonamidovou funkční skupinu ($-S(=O)_2-NH_2$). Molekula může být substituovaná na atomu síry nebo na dusíku místo jednoho nebo dvou vodíků. Sulfonamidy jsou syntetická antibiotika. V bakteriích působí jako antimetabolity a omezují metabolismus kyseliny listové. Zástupci sulfonamidů jsou sulfamethoxazol, sulfasalazin nebo sulfathiazol. Sulfamethoxazol se spolu s trimetoprimem využívá velmi často k léčbě močových infekcí jako synergicky působící kombinované antibiotikum co-trimoxazol (Votava, 2005).



Obr. 17 Struktura sulfonamidu

2.10.3. Nereistoxin

Nereistoxin (4-N,N-dimethylamino-1,2-dithiolan; Obr. 18) je metabolit mořského kroužkovce *Lumbriconereis heteropoda* (Nitta, 1934). Toxin působí na neuromuskulární aparát, kde blokuje iontové kanály acetylcholinových receptorů (Eldefrawi et al., 1980). Toxicky působí na lidské i živočišné organismy. Toxických účinků se využívá u hubení hmyzu (Hashimoto & Okaichi, 1960). Nereistoxin a jeho další analoga (např. cartap a charatoxin) mohou být použity jako pesticidy a insekticidy (Sakai a Sato, 1971; Nielsen a Pedersen, 1984).



Obr. 18 Nereistoxin

2.11. Ultravysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS)

Metoda ultravysokoučinné kapalinové chromatografie (UHPLC, z angl. Ultra-High Performance Liquid Chromatography) byla využita v této diplomové práci k analýze sulfatovaných metabolitů. Jedná se o moderní chromatografickou separační techniku, která bývá velmi často spojena s detekcí hmotnostní spektrometrií (MS) s ionizací elektrosprejem (ESI). UHPLC-MS se vyznačuje vysokou specificitou a citlivostí vhodnou pro analýzu stopového množství analytů (fmol). UHPLC lze použít k detekci nízké i vysokomolekulárních látek s různou polaritou (Guillarme & Luc, 2012).

UHPLC funguje na principu rozdílné retence analytů na pevné stacionární fázi (SF). Analyty mají k SF různou afinitu a jsou za vysokého tlaku eluovány kapalnou mobilní fází (MF) v různých retenčních časech (RT). Výhodou UHPLC oproti klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografii je větší rychlost analýzy. SF je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu, který má velikost částic $< 2 \mu\text{m}$. Sorbenty mohou mít různé chemické vlastnosti, např. mohou obsahovat polární (normální fáze, NP) nebo nepolární skupiny (reverzní fáze, RP). Dále existují např. iontově výměnné kolony (Strong Cation Exchange/Strong Anion Exchange) nebo HILIC kolony (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography). Analyty jsou z NP eluovány nepolárními a z RP polárními rozpouštědly (Guillarme & Luc, 2012).

Detekce analytů probíhá v hmotnostním spektrometru, který je složen z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. V iontovém zdroji dochází k ionizaci látek eluovaných z kolony. Velmi častým typem iontového zdroje je ESI, kde je na kapiláru, kterou protéká MF s analytem vkládáno vysoké napětí (2-5 kV). Na konci kapiláry vzniká aerosol s nabitými kapičkami, z jejichž povrchu je vlivem zahřívání rozpouštědlo odpařováno. Po dosažení limitu povrchového napětí se nabitě molekulární ionty z kapičky uvolňují do plynné fáze. ESI pracuje negativním nebo pozitivním módu, kdy jsou produkovány záporně nebo kladně nabitě ionty (Hoffman & Stroobant, 2007; Friedecký & Lemr, 2012).

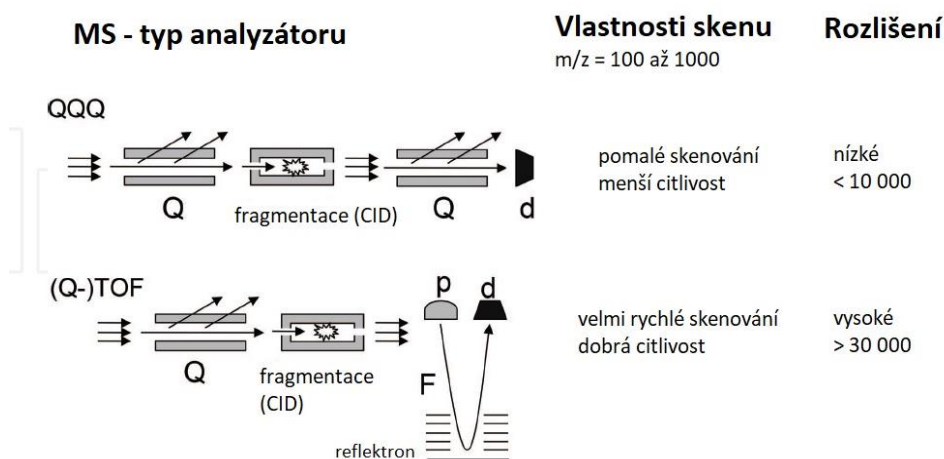
Ionty jsou separovány v hmotnostním analyzátoru podle jejich m/z (hmotnost/náboj). Hmotnostní analyzátoři mohou být založeny na různých principech. Existují např. analyzátoři sektorové, průletové (TOF, z angl. Time of flight), kvadrupólové (Q), lineární nebo sférické

iontové pasti, analyzátoři s iontovou cyklotronovou rezonancí (ICR) nebo Orbitrap. Ionty po separaci v hmotnostním analyzátoru dopadají na detektor, kde dochází ke generaci signálu, např. vznikem sekundárních elektronů a zesilováním signálů (elektronové násobiče a fotonásobiče) nebo indukci proudu (Faradayova klec). Výsledkem analýzy je tedy hmotnostní spektrum s hodnotami m/z detekovaných iontů na ose x a intenzitami iontů na ose y (Hoffman & Stroobant, 2007).

2.11.1. Tandemová hmotnostní spektrometrie

K identifikaci molekul nebo ke kvantifikaci jsou často používány tandemové/hybridní hmotnostní analyzátoři poskytující fragmentační spektra (MS/MS spektra) vybraných iontů. Je zde zapojeno více analyzátorů za sebou. První je většinou zapojen Q, kde jsou prekurzorové ionty separovány, popř. pouze izolován jeden vybraný prekurzorový ion. Typické je např. uspořádání kvadrupól s průletovým analyzátořem (QqTOF) nebo trojitý kvadrupól (QqQ) (Obr. 18). K analyzátoru TOF může být navíc přiřazen reflektron prodlužující dráhu letu iontů a zvyšující tak rozlišení (Friedecký & Lemr, 2012).

Dále je zapojena kolizní cela, nejčastěji se konstrukčně jedná o další Q, kde je prekurzorový ion fragmentován mechanismem kolizí indukovaná disociace. Následně jsou fragmentové ionty separovány v třetím hmotnostním analyzátoru. Každý molekulární ion má specifický fragmentační vzor, který se při použití určitého kolizního napětí nemění. Výsledkem jsou MS/MS spektra, která lze použít k identifikaci nebo předběžné charakterizaci (Friedecký & Lemr, 2012; Hoffman & Stroobant, 2007).



Obr. 18 Schéma uspořádání tandemových hmotnostních analyzátorů a jejich vlastnosti (převzato a upraveno podle Rochat, 2012)

2.11.2. Monitorování vybraných reakcí (MRM)

V módu monitorování vybraných reakcí (MRM, z angl. Multiple Reactions Monitoring) byly v této diplomové práci kvantifikovány vybrané sulfatované fenolické kyseliny v různých přírodních extraktech. V MRM módu měří hmotnostní analyzátor QqQ, který může kromě MRM módu dále pracovat v režimech sken produktových iontů, sken iontů prekurzoru, sken neutrálních ztrát (viz. kap. 2.11.2.) a mód monitorování vybrané reakce (SRM, z angl. Selected Reaction Monitoring), který je totožný s MRM módem, jen jde o sledování pouze jedné místo několika reakcí (Friedecký & Lemr, 2012).

V módu SRM je v prvním kvadrupólu selektován jeden iont prekurzoru, který je fragmentován v druhém kvadrupólu, tedy v kolizní cele. V třetím kvadrupólu je selektován jeden produktový ion, typicky ten s největší intenzitou. Dvě hodnoty m/z odpovídající prekurzorovému a produktovému iontu představují tzv. hmotnostní přechod. SRM je velmi selektivní a citlivý mód, proto je využíván pro kvantifikaci. V praxi jsou často měřeny různé hmotnostní přechody v jednom analyzovaném vzorku najednou. Pak se jedná o MRM mód (Friedecký & Lemr, 2012).

2.12. Přístupy k analýze metabolitů se sírou v rostlinách

2.12.1. Značení stabilními izotopy síry

K detekci metabolitů se sírou lze využít látky obsahující stabilní izotopy síry. Látky jsou aplikovány v do média, ve kterém dochází ke klíčení rostlin. Např. může být použit sulfátový anion ($^{34}\text{SO}_4$)²⁻, který je hlavním zdrojem síry v rostlinách. Paralelně je aplikován i sulfát s přirozeným izotopem síry ($^{32}\text{SO}_4$)²⁻. Sulfát je asimilován do organické formy a inkorporován do metabolitů (Takahashi et al., 2011). Metabolity se sírou jsou tímto způsobem značeny *in vivo*. Extrakty značených rostlin jsou analyzovány pomocí HPLC-MS. Výsledkem je detekce m/z metabolitů. Metabolity obsahující prekurzorovou síru jsou ve spektrech rozpoznány na základě posunu m/z molekulárních iontů s ^{32}S nebo s ^{34}S . Tento experiment byl proveden při analýze metabolomu síry v *Arabidopsis thaliana* (Glaser et al., 2014). Výsledkem byla detekce cca 12 000 features v negativním ionizačním módu, z nichž 1,2 % obsahovalo síru.

Stupeň izotopového značení metabolitů, na kterém závisí i pravděpodobnost detekce co největšího počtu metabolitů se sírou, je ovlivněn koncentrací sulfátového aniontu ve výživovém roztoku. Jako nejúčinnější byla stanovena koncentrace sulfátu 0,36 mM. Ideální doba inkubace klíčků *Arabidopsis* s prekurzory je 2 týdny, kdy je účinnost značení metabolitů 70 % (Glaser et al., 2014).

Znamé metabolity obsahující síru jsou dostupné v databázích, s kterými je možné výsledky inkorporačních studií porovnávat. Lze využít např. databázi KNApSAcK (<http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK>), PlantCyc (<http://www.plantcyc.org>) nebo KEGG

(<http://www.genome.jp/kegg>) (Shinbo et al., 2006; Afendi et al., 2012; Altman et al., 2013). Např. databáze KNAp-SAcK obsahuje 626 látek rostliny *Arabidopsis thaliana*, včetně 89 metabolitů obsahujících jeden až tři atomy síry.

2.12.2. Využití ICP-MS pro stanovení celkového obsahu síry

Technika MS s indukčně vázaným plazmatem (ICP, z angl. Inductively Coupled Plasma) je využívána k multielementární analýze kovů, polokovů a některých nekovů, včetně síry (Pluháček, 2017). Detekce a kvantifikace síry ve vzorku může být užitečná např. k porovnání obsahu síry v různých rostlinných orgánech. Z rostlinného extraktu je také možné nejprve extrahovat a kvantifikovat L-cystein a glutathion, abundantní síru obsahující metabolity v celkovém metabolomu, které není cílem stanovit a které by zbytečně zastiňovaly obsah jiných zajímavějších metabolitů. Následně může být pomocí ICP-MS změřen obsah síry ve zbylých metabolitech v extraktu (Almario et al., 2017; Kleinenkuhnen, 2019).

Prvková analýza se využívá také ve spojení HPLC-ICP-MS, kdy je možné v konkrétním retenčním čase stanovit obsah prvku (Pechancová et al., 2018). Pokud by se data z HPLC-ICP-MS zkombinovala s daty např. z HPLC-ESI-MS/MS se stejnými podmínkami separace, bylo by možné retenční časy píků se sírou z výsledků HPLC-ICP-MS přiřadit k daným retenčním časům molekulárních iontů v MS a MS/MS spektrech, a tak popř. identifikovat metabolit obsahující síru (osobní komunikace s dr. Tomášem Pluháčkem).

2.12.3. Sken neutrální ztráty sulfátové skupiny

Sken neutrálních ztrát mód, který se používá na hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem (QqQ). První a třetí kvadrupól skenují zároveň ionty s konstantní diferencí m/z , která představuje neutrální fragment vzniklý v kolizní cele při kolizi indukované disociaci (Friedecký & Lemr, 2012). To lze využít k detekci neznámých sulfatovaných látek, které při fragmentaci ztrácí sulfát jako neutrální molekulu oxidu sírového o hmotnosti 80 Da. Sulfátová skupina obsahuje záporný náboj, proto je pro její stanovení při ESI ionizaci využíván negativní mód. Sken neutrálních ztrát lze využít také ke kvantifikaci (Kleinenkuhnen, 2019).

2.12.4. Vyhledávání sulfatovaných metabolitů v MS/MS spektrech

Pro vyhledávání sulfatovaných látek, následované také jejich charakterizací, je vhodné použít hmotnostní analyzátor s vysokým rozlišením, jako je např. QqTOF, Orbitrap nebo ICR (Rochat, 2012). Vysoká přesnost stanovení hodnot m/z je předpokladem pro vypočtení sumárního vzorce molekuly. Dále jsou přesné hodnoty m/z molekulárního iontu a jeho fragmentů využívány pro detekci neutrální ztráty, která je vypočtena jako rozdíl dvou m/z . U sulfatovaných metabolitů lze ve fragmentačních spektrech odečíst charakteristickou neutrální ztrátu 79.957 Da, která představuje přesnou monoizotopickou hmotnost oxidu sírového (Kurth et al., 2015). Odchylka od hodnoty 79.957 Da větší než 0,01 Da, popř. i odchylka 0,001 Da, už značí ztrátu jiné molekuly,

proto je nutné k analýze použít přístroj s adekvátním rozlišením. Oxid sírový by mohl být zaměněn např. se zbytkem kyseliny fosforečné ($-\text{PO}_3\text{H}$; 79.967 Da), methyldisulfidem ($\text{CH}_3\text{-S-SH}$; 79.975 Da), methylendifosfinem ($\text{H}_2\text{P-CH}_2\text{-PH}_2$; 79.995 Da) nebo s kyselinou methansulfinovou ($\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{H}$; 79.993 Da) (zdroj: Chemspider web).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

Nemořená semínka

oves setý (klíček) (Seva-SEED; Olomouc, ČR), pšenice setá (klíček), ječmen setý (klíček), proso seté (klíček), kukuřice setá (klíček), pór pravý (klíček), rajče keříčkové (klíček), mrkev obecná (klíček), ostropestřec mariánský (klíček), brokolice - brukev zelná (klíček) a kapusta hlávková (klíček) (Seva Moravia s.r.o., Valtice, ČR)

Rostliny

pažitka pobřežní (kořen, list), sněženka podsněžník (list), narcis žlutý (list), cibule kuchyňská (list), hyacint (list), banánovník (mladé výhonky), orchidej (list), modřín opadavý (šišky), bříza bělokorá (jehnědy), máta rolní (list), kopřiva dvoudomá (list), meduňka lékařská (list), tis červený (jehličky), pryšec trojúhlný (list), šťovík kyselý (list), sakura ozdobná (pupeny), *Magnolia denudata* (pupeny), violka vonná (list), hruškovce přelahnodný/avokádo (list), jitrocel větší (list) a řebříček obecný (list) (vlastní vypěstované vzorky nebo sbírané v přírodě, Olomouc)

Zakoupené vzorky/potraviny

banánovník (plod a slupka plodu), ananasovník (plod a listy), rajče (plod), miřík celer (bulva) a ředkev setá (bulva) (vše Supermarket Albert, Praha, ČR); produkty rostliny olivovník evropský - olivový olej Giana (Gaston s.r.o., Zlín, ČR) a černé olivy v nálevu (Franz Josef Kaiser, Gaston s.r.o., Zlín, ČR); Hermelín (Sedlčanský hermelín, Slavencia Fromage & Dairy Czech Republic, a.s., Praha, ČR) obsahující plíseň *Penicilium candidum*; Niva (Sýr s modrou plísní Albert Quality, Praha, ČR) obsahující plíseň *Penicillium roqueforti*

Lišejníky

terčovka bublinatá a provazovka obecná (sbírané v přírodě, Rakovecký les, Řepiště)

Lyofilizované vzorky řas a hub

řasa hroznovice (*Sargassum* – (hijiki)), houba houževnatec jedlý (shiitake) a houba václavka, vypůjčené z databáze vzorků Laboratoře růstových regulátorů (Olomouc, UP)

Použitý biologický materiál je také shrnut v tabulce 7 v kapitole 4.4.

3.2. Chemikálie

Pro identifikaci a kvantifikaci metabolitů byly použity standardy:

- kyselina 4-(sulfooxy)skořicová/zosterová (S-CA)
 - získaná darem - syntetizovaná prof. dr. Ronem Weverem z Van 't Hoff Institute for Molecular Sciences, Universiteit van Amsterdam

- vlastní syntetický standard
- kyselina 4-(sulfooxy)fenyloctová (S-PhAA)
- kyselina 4-(sulfooxy)benzoová (S-BA)
 - obě izolovány z řasy *Dasycladus vermicularis* a získány darem od Anji Hartmann, Ph.D; University of Innsbruck
- kyselina vanilová 4-sulfát (S-VA)
 - vlastní syntetický standard

Jako IS byla použita deuterovaná kyselina *para*-hydroxybenzoová (dpHBA) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA). Při extrakci a chromatografii byly použity $\geq 99,9\%$ methanol (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Germany) a kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Deionizovaná destilovaná voda byla připravena v přístroji Simplicity 185 (Millipore Corp., Billerica, USA). Jako MF sloužil $\geq 99,9\%$ acetonitril (LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Germany). V hmotnostním spektrometru Synapt G2-Si byl použit lockspray leucin-enkefalin o koncentraci 5 ng/ μ l (Waters, Milford, USA).

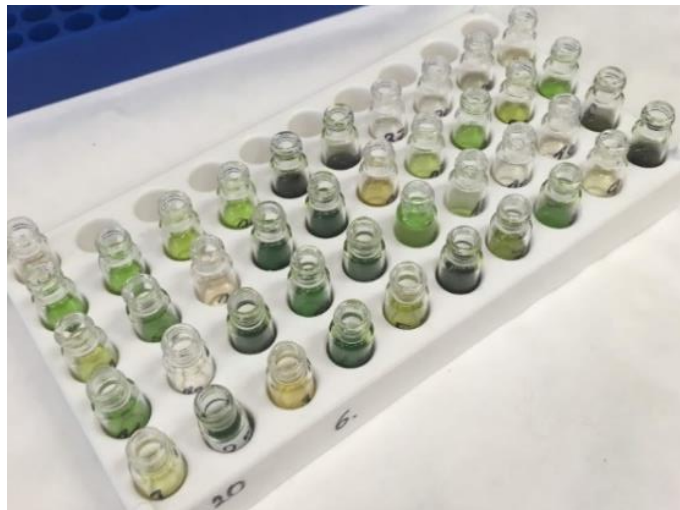
3.3. Klíčení a lyofilizace

Semínka byla ponechána v uzavřených Petriho miskách na buničině vlhčené kohoutkovou vodou po dobu 5-ti dní. Po vyklíčení byly rostliny extrahovány. Vzorky čerstvě sbíraných rostlin, zakoupených rostlin, ovoce a zeleniny byly vysušeny v lyofilizátoru FreeZone 2,5 Liter (LABCONCO, Kansas City, USA) a poté homogenizovány na kávovém mlýnku (Bosch, Gerlingen, Německo). Vzorky plísň ze sýrů a olivový olej byly extrahovány přímo.

3.4. Extrakce

Na analytických váhách Pioneer PA214C (Ohaus, Parsippany, USA) bylo naváženo 20 mg lyofilizovaného materiálu (dry weigh, DW) nebo 100 mg čerstvého materiálu (fresh weigh, FW), tj. klíčky, plísně a olivový olej. K naváženým vzorkům byl přidán 1 ml 100% methanolu obsahující 0,1% kyselinu mravenčí a $2 \cdot 10^{-6}$ M dpHBA. Vzorky byly homogenizovány na kulovém oscilačním mlýnu Verder MM400 (Retsch GmbH, Haan, Německo) s kovovými (FW) nebo skleněnými kuličkami (DW) při frekvenci 27 Hz po dobu 10 min a následně ponechány 10 min na ultrazvukové lázni (VWR International, Radnor, USA). Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 10 min na rotační centrifuze 5424 (Eppendorf, Hamburg, Germany) při 20238 g. Supernatanty byly odpařeny na dusíkové odparce TurboVap® LB (Biotage, Uppsala, Švédsko). Odparky byly rozpuštěny v 200 μ l 20% methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí. Výsledná koncentrace roztoku činila v závislosti na navážce cca 20 mg DW/200 μ l nebo 100 mg FW/200 μ l. Extrakty (Obr. 20) byly zfiltrány na membránových mikrofiltrech z recyklované celulózy Micro Spin Filter s póry

o průměru 0,2 μm (Ciro Manufacturing Corp., Deerfield Beach, USA). Extrakty poté byly přeneseny do vialek.



Obr. 20 Extrakty z rostlin a dalších organismů

3.5. UHPLC-TOF MS analýza

Systém UHPLC byl složen z PDA detektoru (Acquity Ultra Performance), Sample manageru (FTN Acquity UPLC) a pump (Quaternary Solvent manager Acquity UPLC Class H) (vše Waters). Nástřikový objem vzorku byl 2 μl . Teplota vzorků byla 4 $^{\circ}\text{C}$. Použity byly MF A (acetonitril) a B (5 mM kyselina mravenčí). Vzorek byl separován na RP na koloně Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μm , 2,1 x 150 mm, která byla vyhřívána na 30 $^{\circ}\text{C}$. Eluce probíhala v gradientu (Tab. 1).

Tab. 1 Gradient MF A (acetonitril) a B (5 mM kyselina mravenčí)

Čas (min)	Průtok (ml/min)	%A	%B	Curve
0	0.25	5	95	6
0.1	0.25	5	95	6
1	0.25	10	90	6
12	0.25	35	65	6
17	0.25	70	30	6
17.5	0.25	100	0	6
19	0.25	100	0	6
19.5	0.25	5	95	6
22	0.25	5	95	6

Detekce byla provedena na hmotnostním spektrometru Synapt G2-Si (Waters) s hybridním hmotnostním analyzátozem QqTOF s ESI ionizací v negativním ionizačním módu. Parametry nastavení iontového zdroje jsou vypsány v tabulce 2. Jako zmlžující plyn a plyn na vstupní šterbině byl použit dusík. Rozsah měřených hmotností byl 70 - 1500 Da. Kolizní energie při fragmentaci byla 20 eV. Data z TOF analyzátoru byla získávána v režimu DDA (Data-Dependent Acquisition). Rozsah měřených hmotností MS/MS spekter byl 50 - 1500 Da. Sběr dat probíhal v módu centroid. Data byla zpracována a vyhodnocována v programu MassLynx™ software, ver. 4.0 (Waters, Milford, MA, USA).

Tab. 2 Parametry nastavení iontového zdroje

Parametr	Hodnota
kapilární napětí	2 kV
teplota zdroje	120 °C
napětí na kóně	15 kV
desolvatační teplota	500 °C
průtok desolvatačního plynu	600 L/Hr
průtok plynu na kóně	30 L/Hr

3.6. Vyhledávání sulfatovaných metabolitů

Automatická metabolomická analýza surových dat z MS analýzy byla provedena v programu vytvořeném v Laboratoři Růstových Regulátorů (UP, Olomouc). Výsledkem procesování byla tabulka (Microsoft Excel) se seznamem features (m/z prekurzorových iontů + RT), jejich deseti nejintenzivnějšími fragmenty a intenzitami. Pomocí analýzy fragmentačních spekter bylo zjišťováno, zda některá ze struktur obsahuje sulfátovou kupinu. Ve spektrech sulfo-látek je patrna neutrální ztráta oxidu sírového (SO_3) o molekulové hmotnosti 79.957 Da. Proto byly vypočteny rozdíly m/z prekurzoru (m/z_p) a m/z každého z deseti fragmentů (m/z_{1-10}), tj. ($m/z_p - m/z_1, \dots, m/z_p - m/z_{10}$). Rozdíl, který byl roven molekulární hmotnosti oxidu sírového, představoval neutrální ztrátu této molekuly u dané feature. Rozdíl $79.957 \pm 0,01$ byl vyhledáván ve všech spektrech u celkem čtyřiceti vzorků (kap. 3.1.). Features, které obsahovaly neutrální ztrátu $79,957 \pm 0,01$ Da byly manuálně prověřovány a charakterizovány v softwaru MassLynx.

3.7. UHPLC-MS/MS analýza

Systém UHPLC je popsán v předešlé kapitole. Teplota vzorků byla nastavena na 8 °C a teplota kolony na 35 °C. Nástřikový objem vzorku byl 5 μl . Jako MF byly použity acetonitril a 10 mM kyselina mravenčí. Gradient je zaznamenán v tabulce 3.

Tab. 3 Gradient MF A (acetonitril) a B (10 mM kyselina mravenčí)

Čas (min)	Průtok (ml/min)	%A	%B	Curve
0	0.25	5	95	0
2	0.25	15	85	6
4	0.25	100	0	6
4.5	0.25	5	95	6
6.5	0.25	5	95	6

Detekce probíhala na hmotnostním spektrometru Micromass Quattro micro™ API benchtop v negativním ionizačním módu (ionizace ESI Z-spray, hmotnostní analyzátor QqQ, vše Waters). Teplota zdroje byla nastavena na 100 °C a desolvatační teplota na 350 °C. Průtok desolvatačního plynu byl nastaven na 500 L/Hr. Standardy byly změřeny v režimu sken produktových iontů (daughter scan), kdy byly optimalizovány hmotnostní přechody, napětí na kóně a kapiláře a kolizní energie (kap. 4.3.) pro stanovení látek v extraktech v MRM módu. Rozsah skenovaných hmotností v MS¹ i MS² byl 40 – 2048 Da. Data byla zpracována a vyhodnocena v MassLynx™ softwaru (version 4.0, Waters). Analýza vzorků a standardů byla provedena v MRM módu (Tab. 4). Parametry analýzy v MRM módu jsou zobrazeny v tabulce 4. Naměřené chromatogramy byly hodnoceny v programu TargetLynx™ (Waters).

Tab. 4 Parametry MRM módu potřebné pro stanovení sulfatovaných fenolických látek v extraktech při kvantifikaci pomocí UHPLC-MS/MS na reverzní fázi v negativním ionizačním módu.

Látka	RT [min]	Časové okno [min]	Dwell time [s]	Hmotnostní přechod <i>m/z</i>	Napětí na kapiláře [kV]	Napětí na kóně [V]	Kolizní energie [eV]	Delay [s]
S-BA	3.236 ± 0.025	3.00 - 3.90	0.2	217 > 137	1.5	30	16	0.1
S-PhAA	3.601 ± 0.039	3.00 - 3.90	0.2	231 > 151	1.5	30	16	0.1
S-CA	4.099 ± 0.045	3.90 - 4.45	0.3	243 > 163	1.5	30	16	0.1
dpHBA	4.207 ± 0.005	3.90 - 4.45	0.3	141 > 97	1.5	25	16	0.1

3.7.1. Kvantifikace sulfatovaných látek metodou interního standardu

Sulfatované fenolické kyseliny byly ve vzorcích kvantifikovány metodou interního standardu. Vzorky byly analyzovány na hmotnostním spektrometru Micromass pracujícím v MRM módu. Látková množství kyselin ve vzorcích byla stanovena a vypočtena podle kalibračních přímek standardů S-BA, S-PhAA a S-CA. Standardy pro kalibraci byly připraveny v koncentracích $1 \cdot 10^{-4}$,

$1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$ a $1 \cdot 10^{-8}$ M. Všechny standardy obsahovaly IS o finální koncentraci 10^{-5} M. Koncentrace látek ve vzorcích byly následně vypočteny dle vztahu:

$$n_{inj} = \frac{\left(\frac{Area_x}{Area_{IS}}\right) - c}{b}$$

n_{inj} – látkové množství stanovované látky v nástřiku [pmol/inj]

$Area_x$ – plocha píku stanovované látky

$Area_{IS}$ – plocha píku IS

b – směrnice kalibrační přímky

c – úsek na ose y.

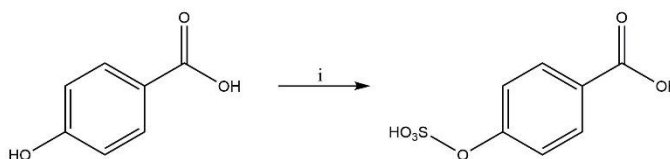
Výsledný obsah látky ve vzorku byl vyjádřen v jednotkách ng/g DW nebo FW vzorku. Molekulové hmotnosti látek činí 218 Da (S-BA), 232 Da (S-PhAA) a 244 Da (S-CA).

3.8. Syntéza sulfatovaných fenolických kyselin

3.8.1. Chemikálie

Kyseliny *para*-hydroxybenzoová (pHBA) a vanilová, bezvodý pyridin, komplex oxid sírový-pyridin ($SO_3 \cdot Pyr$), ethyl acetát, hydroxid draselný, kyselina sírová, methanol, methanol (HPLC grade), dimethylsulfoxid (DMSO) a aceton (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; Lach-ner s.r.o., ČR).

3.8.2. Syntéza kyseliny 4-(sulfooxy)benzoové (S-BA)



Podmínky (i): $SO_3 \cdot Pyr$, H_2O , 48 h, lab. teplota

Schéma 1 Syntéza kyseliny 4-(sulfooxy)benzoové

Syntéza S-BA (Schéma 1) byla provedena jen s malými úpravami podle protokolu z publikace Kurth et al. (2015). V 25 ml bezvodého pyridinu byla pod argonovou atmosférou rozpuštěna pHBA (1,5 g; 10,86 mmol). K roztoku bylo přidán $SO_3 \cdot Pyr$ (1,72 g; 10,86 mmol), kdy došlo k zakalení

roztoku a zbarvení do šedo-růžové barvy. Reakce probíhala při laboratorní teplotě za stálého míchání 48 h na laboratorní magnetické míchačce s ohřevem Heidolph MR 3001 K (Heidolph, Německo). Výsledkem reakce byl olejový produkt žluto-hnědé barvy v čirém pyridinu. Pyridin byl odpařen na rotační vakuové odparce Interface I-300 (Büchi, Švýcarsko) za vzniku bílo-oranžového produktu mazlavé konzistence. Produkt byl rozpuštěn v 20 ml deionizované vody. Hodnota pH byla 6-7.

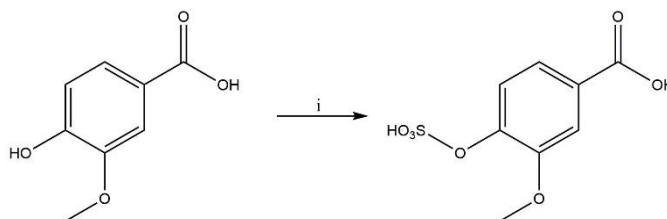
Vodný roztok byl 3-krát promyt 20 ml ethyl acetátu. V prvním a druhém promývacím kroku došlo k vytvoření krystalků solí v organické fázi. Vodná fáze s produktem byla oddělena spolu s organickou fází pomocí dělicí nálevky. Vodný roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Produktem byl bílo-žlutý prášek, který byl rozpuštěn v 20 ml deioniz. Vody. pH bylo upraveno na 6-7 pomocí 25% hydroxidu draselného. Roztok byl 3-krát promyt ethyl acetátem a vodná fáze byla odpařena, kdy byl získán bílý prášek. Prášek byl opět rozpuštěn v 20 ml deioniz. vody a pH 2 bylo upraveno na pH 10 pomocí 25% roztoku hydroxidu draselného. Roztok byl za stálého míchání zahříván při 60 °C v olejové lázni po dobu 1 h. Roztok byl neutralizován 0,1M kyselinou sírovou a poté odpařen na rotační vakuové odparce.

Produkt byl rozpuštěn při 40 °C v 20 ml deioniz. vody. K roztoku byl přidán dvojnásobný objem methanolu. Precipitát byl zfiltrován na fritě, promyt 40 ml methanolu a ponechán bez míchání přes noc v lednici pro precipitaci zbylých solí. Precipitát byl odfiltrován a filtrát byl dále odpařen.

Produkt byl rozpuštěn v 2 ml methanolu (HPLC grade) a filtrován na fritě. Filtrát byl odpařen a následně znova promyt dalšími 2 ml methanolu. Tento krok byl opakován ještě jednou. Produkt byl nakonec rozpuštěn v methanolu (HPLC grade) a přečištěn na pomoci preparativní HPLC s detekcí MS v negativním ionizačním módu, kdy byla izolována frakce s molekulárním iontem S-BA s m/z 216,9. Přítomnost produktu byla ověřena pomocí 1D NMR analýz.

^1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ = 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.95 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.55 (broad s, 1H, SO_3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ = 123.9, 133.3, 136.8, 156.4, 177.7 ppm.

3.8.3. Syntéza kyseliny vanilové 4-sulfát (S-VA)



Podmínky (i): $\text{SO}_3 \cdot \text{Pyr}$, H_2O , 48 h, lab. teplota

Schéma 2 Syntéza kyseliny vanilové 4-sulfát

K syntéze (Schéma 2) byl použit podobný protokol jako v předešlé kapitole. 1,84 g kyseliny vanilové (10,86 mmol) bylo rozpuštěno v 25 ml bezvodého pyridinu pod argonovou atmosférou. K roztoku bylo přidáno 1,73 g $\text{SO}_3 \cdot \text{Pyr}$ (10,86 mmol). Reakce probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě 48 h na laboratorní magnetické míchačce s ohřevem. Produktem byl oranžovo-hnědý roztok, který byl odpařen na rotační vakuové odparce za vzniku žluto-hnědého oleje. Olejový produkt byl rozpuštěn v 20 ml deioniz. vody. Hodnota pH byla upravena pomocí 25% roztoku KOH na hodnotu 6-7.

Vodný roztok byl promyt 3-krát 20 ml ethyl acetátu. Vodná fáze byla oddělena pomocí dělicí nálevky. Vodný roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Hnědo-žlutý olej byl následně opět rozpuštěn v 15 ml deioniz. vodě, a pH bylo upraveno na 10 pomocí 25% KOH. Poté byl produkt hydrolyzován po dobu 1 h při 60 °C v olejové lázni. Pomocí 0,1 M kyseliny sírové bylo upraveno pH hodnotu 7. Roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Práškový produkt měl po odpaření bílo-žlutou barvu a při 40 °C byl rozpuštěn v 15 ml deioniz. vody. Pomocí 30 ml methanolu byly v roztoku vysráženy soli. Po přidání methanolu došlo zakalení roztoku a změny barvy ze žluté na bílou (zakalení). Roztok byl filtrován na fritě. Frita byla poté promyta dalšími 15 ml methanolu. Methanolvé frakce byly spojeny a ponechány v -4 °C v lednici po dobu 1 týdne.

V roztoku vznikly bílé krystalky, které byly odfiltrovány na fritě. Filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Výsledným přečištěným produktem byl žluto-bílý prášek, který byl rozpuštěn v methanolu (HPLC grade) a přečištěn preparativní HPLC-MS v negativním ionizačním módu. Izolována frakce s molekulárním iontem S-VA o m/z 247. Přítomnost produktu byla ověřena pomocí 1D NMR analýz. NMR spektrum S-VA je zobrazeno v přílohách v obrázku 1.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 3.75 (s, 3H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.40 (dd, J = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 1.9 Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 56.2, 114.6, 121.5, 122.55, 122.57, 144.6, 151.4, 172.0 ppm.

4. VÝSLEDKY

Tématem sulfatované fenolické kyseliny v rostlinách a dalších organismech jsem navázala na výsledky své bakalářské práce, kdy byly při analýze benzoových kyselin v ovsu setém identifikovány sulfatované fenolické kyseliny S-BA a S-CA, o jejichž přítomnosti v suchozemských rostlinách doposud nebylo známo. Cílem této diplomové práce bylo proto rozšířit základní poznatky o této skupině látek. Byla provedena kvantitativní analýza sulfatovaných fenolických kyselin (S-BA, S-CA a S-PhAA) a také analýza zaměřená na vyhledávání nových sulfatovaných látek v různých organismech. Součástí byla také syntéza některých sulfatovaných fenolických kyselin, které sloužily jako standardy pro potvrzení identifikace a ke kvantifikaci.

4.1. Vyhledávání nových sulfatovaných metabolitů

Pro detekci a charakterizaci nových sulfatovaných metabolitů byla provedena analýza 40 různých vzorků rostlin, hub a řas pomocí UHPLC-TOF MS. Ve fragmentačních spektrech sulfatovaných látek je vždy patrná typická neutrální ztráta 80 Da (monoizotopická hmotnost 79,9567 Da), která představuje molekulu SO_3 odštěpenou z prekurzorového iontu.

Bylo detekováno 22 prekurzorových iontů, v jejichž fragmentačních spektrech byla patrná neutrální ztráta $79,957 \pm 0,01$ Da. U vybraných iontů bylo manuálně ověřováno, zda se jedná o molekulární ionty $[\text{M-H}]^-$ a zda se jedná o neutrální ztrátu právě molekuly SO_3 .

Celkem bylo detekováno 9 molekulárních iontů $[\text{M-H}]^-$ (Tab. 5) obsahujících sulfát. Sulfátová skupina byla převážně navázána přes hydroxylovou skupinu, popř. přes amino skupinu. U 13 z 22 analyzovaných features bylo zjištěno, že se nejedná o ztrátu molekuly SO_3 . Vysoké rozlišení TOF analyzátoru umožňuje stanovení přesné hmotnosti až na 1 mDa, což je podstatné pro co nejpřesnější odvození sumárního vzorce. S využitím sumárních vzorců a fragmentačních spekter byla dále detailněji charakterizována struktura detekovaných látek. Výsledná předběžná identifikace (anotace), popř. přesná identifikace struktury molekul, je shrnuta v tabulce 5. Postup charakterizace molekulárních iontů pomocí fragmentačních spekter je popsán v následující kapitole.

Tab. 5 Molekulární ionty $[M-H]^-$ sulfatovaných metabolitů s jejich RT a s předpokládanými sumárními vzorci pro molekulární ionty. Detekované v různých organismech při UHPLC-ESI(-)-TOF MS analýze. Kolizní energie při fragmentaci byla 20 eV.

Molekulární ion $[M-H]^-$	RT	Předpokládaný sumární vzorec iontu	Vzorek (část)	Anotace (popř. strukturální identifikace)
247.007	4.68	$C_8H_7O_7S$	oves (nadzemní část)	kyselina vanilová 4-sulfát ^a
188.978	5.25	$C_6H_5O_5S$	<i>Penicilium candidum</i> (povrch hermelínu) a hermelín (vnitřní část)	hydrochinon sulfát ^b
239.989	6.70	$C_9H_6NO_5S$	<i>Penicilium candidum</i> (povrch hermelínu) a hermelín (vnitřní část)	neznámá sulfatovaná látka (pravděpodobně obsahuje indol)
244.018	6.34	$C_9H_{10}NO_5S$	pšenice (klíček)	sulfatovaný fenylalanin ^b
272.994	6.58	$C_{10}H_9O_7S$	celer (bulva)	sulfatovaná kyselina ferulová ^b
272.995	7.45	$C_{10}H_9O_7S$	celer (bulva)	sulfatovaná kyselina izo-ferulová ^b
230.91	5.10	$C_8H_7O_6S$	brokolice (ružice)	kyselina 4-(sulfooxy)fenyloctová ^a
216.967	4.84	$C_7H_6O_6S$	oves (nadzemní část)	kyselina 4-(sulfooxy)benzoová ^a
243.015	6.32	$C_9H_8O_6S$	oves (celá rostlina) a ječmen (celá rostlina)	kyselina zosterová ^a

^astrukturální identifikace pomocí standardu

^bpředběžná identifikace (anotace)

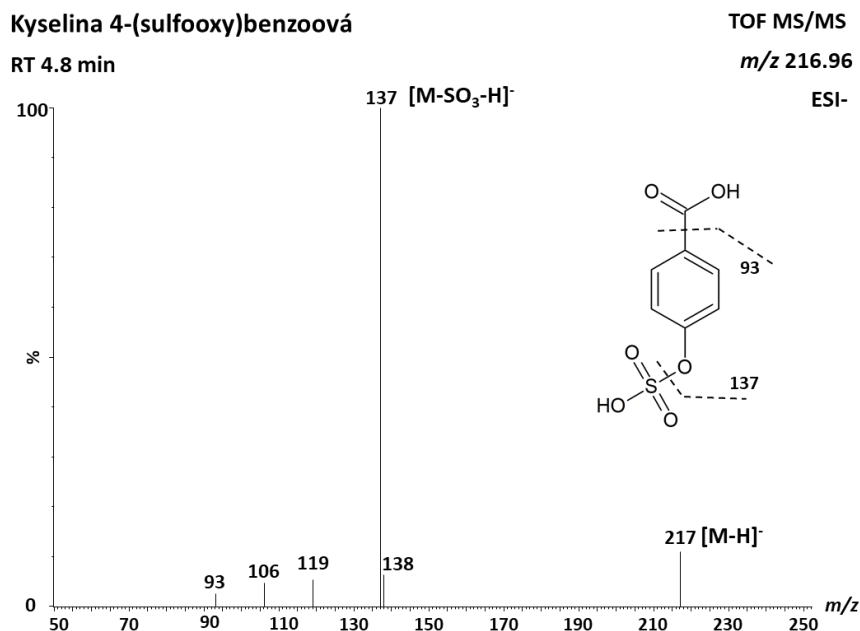
4.2. Charakterizace vybraných sulfatovaných metabolitů pomocí MS/MS spekter

U každého charakterizovaného prekurzorového iontu bylo nejdříve potvrzeno, že se jedná o molekulární ion $[M-H]^-$. Molekulární ion je zpravidla nejintenzivnější m/z v MS spektru. Dále jej lze poznat podle typických aduktů, které tvoří např. s kyselinou mravenčí $[M+HCOOH-H]^-$ nebo s chlórem $[M+Cl]^-$, a dimerů $[M+M-H]^-$ vznikajících v iontovém zdroji.

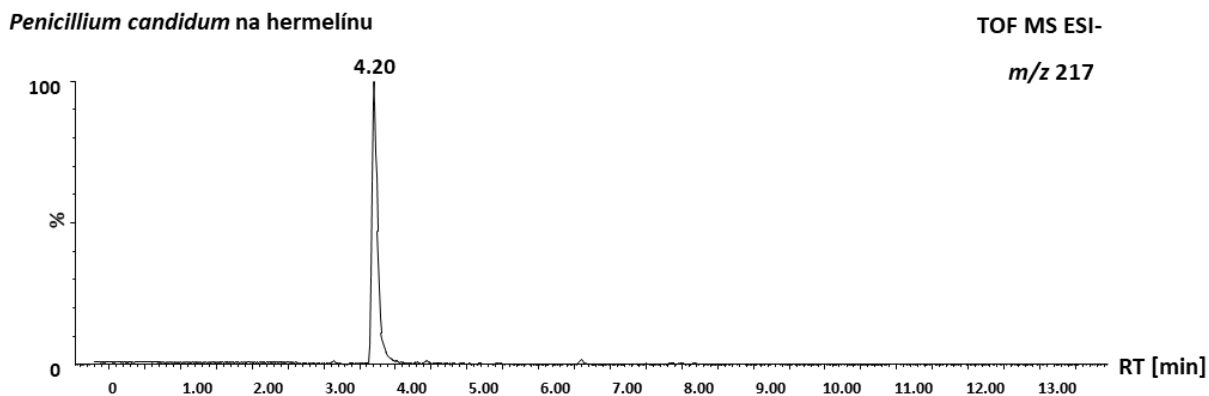
Dále byla charakterizována struktura molekulárního iontu, a to podle fragmentačních spekter, sumárního vzorce a on-line dostupných databází (např. METLINTM), kde lze vyhledat potenciální struktury látek i s fragmentačními spektry při různých kolizních energiích. Konečná identifikace může být potvrzena až na základě porovnání látky se standardem.

Všechny nově detekované látky byly fenolické kyseliny nebo látky fenolické povahy. Na obrázku 21 je fragmentační spektrum S-BA, která byla původně detekována v ovsu setém v mé bakalářské práci. Bylo zjištěno, že se vyskytuje v mnoha dalších rostlinách, např. v pšenici seté, banánovníku, ředkvi seté nebo v modřínu opadavém, ale také v plísní *Penicillium candidum* a v řase hroznovici (*Sargassum*) (kap. 4.4.). S-BA detekovaná v *P. candidum* s RT 4,2 min je zaznamenaná v chromatogramu (Obr. 22). Ve spektru S-BA je nejintenzivnější fragment m/z 137 představující neutrální ztrátu molekuly SO_3 (-80 Da) z molekulárního iontu 217. Stejnou neutrální

ztrátu mají příbuzné látky S-PhAA (Obr. 23) nebo S-CA (Obr. 24). Ve spektrech látek S-PhAA a S-CA jsou také intenzivní fragmenty m/z 107 a m/z 119, které představují neutrální ztrátu karboxylové i sulfátové skupiny z molekulárního iontu.

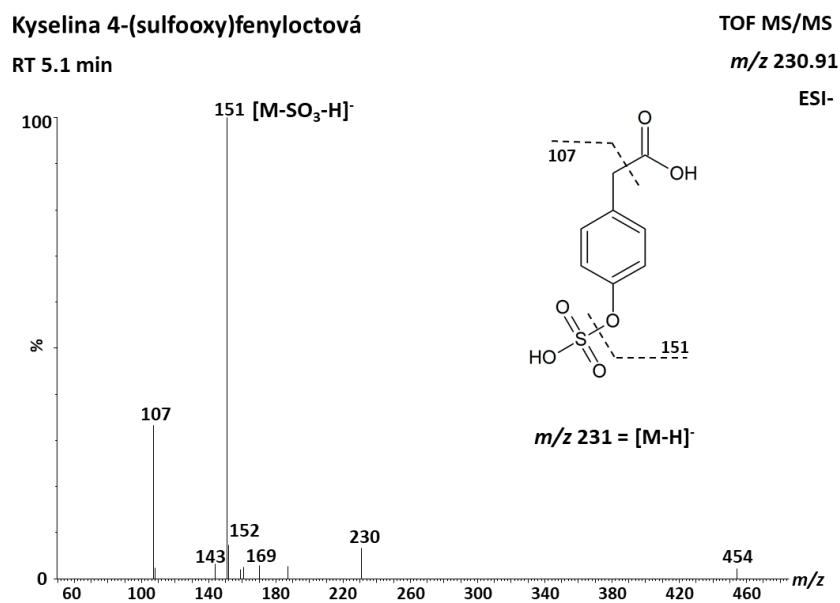


Obr. 21 Fragmentační spektrum kyseliny 4-(sulfooxy)benzoové s m/z 217 detekované při UHPLC-TOF MS analýze v negativním ionizačním módu při kolizní energii 20 eV.

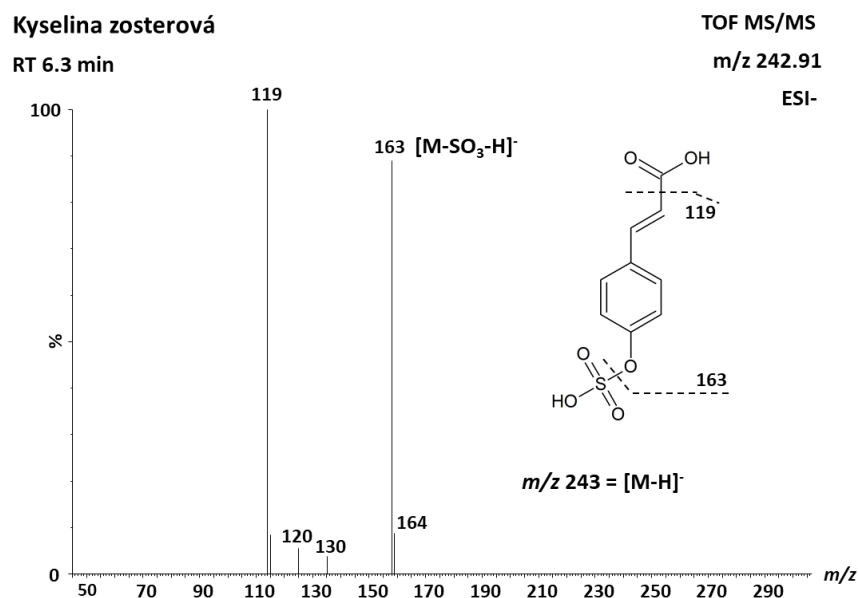


Obr. 22 Chromatogram vybraného molekulárního iontu m/z 217 (kyselina 4-(sulfooxy)benzoová) detekovaného ve vzorku plísně *Penicillium candidum* z povrchu hermelínu v UHPLC-TOF MS analýze na reverzní fázi v negativním ionizačním módu (ESI-).

S-CA (Obr. 24) byla také detekovaná v mé bakalářské práci v ovsu setém. V této práci však bylo zjištěno, že se S-CA vyskytuje i v dalších rostlinných druzích, např. v pšenici seté, kopřivě dvoudomé, miříku celeru nebo mrkvi seté (kap. 4.4.). S-PhAA (Obr. 23), doposud známá jen v řasách, byla poprvé detekovaná v rostlinách (např. banánovník, ananasovník a miřík celer) a v plísni *Penicillium candidum* (kap. 4.4.). S-BA, S-PhAA a S-CA byly v různých organismech také kvantifikovány (kap. 4.5.).



Obr. 23 Fragmentační spektrum kyseliny 4-(sulfooxy)fenyloctové s m/z 231 detekované při UHPLC-TOF MS analýze v negativním ionizačním módu při kolizní energii 20 eV.



Obr. 24 Fragmentační spektrum kyseliny zosterové s m/z 243 detekované při UHPLC-TOF MS analýze v negativním ionizačním módu při kolizní energii 20 eV.

Látka poprvé detekovaná jako přirozený metabolit v rostlinách byla kyselina vanilová 4-sulfát (S-VA). S-VA byla detekovaná v nadzemní části ovsa setého, ale už ne v kořenech, a také v bulvě celeru. Nejintenzivnější fragmenty ve spektru S-VA (Obr. 25) jsou m/z 167 (neutrální ztráta SO_3), m/z 123 (neutrální ztráta SO_3 i CO_2), m/z 152 (neutrální ztráta SO_3 a methylu) a m/z 108 (ztráta všech třech skupin). Navržená struktura S-VA byla ověřena porovnáním MS/MS spektra a RT syntetického standardu s MS/MS spektrem a RT metabolitu ze vzorku. Standard S-VA jsem syntetizovala v Laboratoři růstových regulátorů pod vedením doc. Jiřího Pospíšila, a to metodou reakce kyseliny vanilové s komplexem oxid sírový-pyridin, a jeho struktura byla potvrzena pomocí NMR (Přílohy 1 a 2).

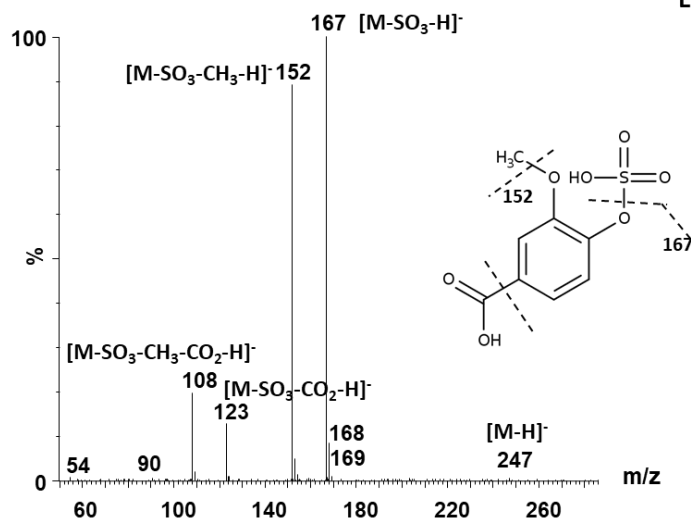
Kyselina vanilová 4-sulfát

RT 4.7 min

TOF MS/MS

m/z 247.06

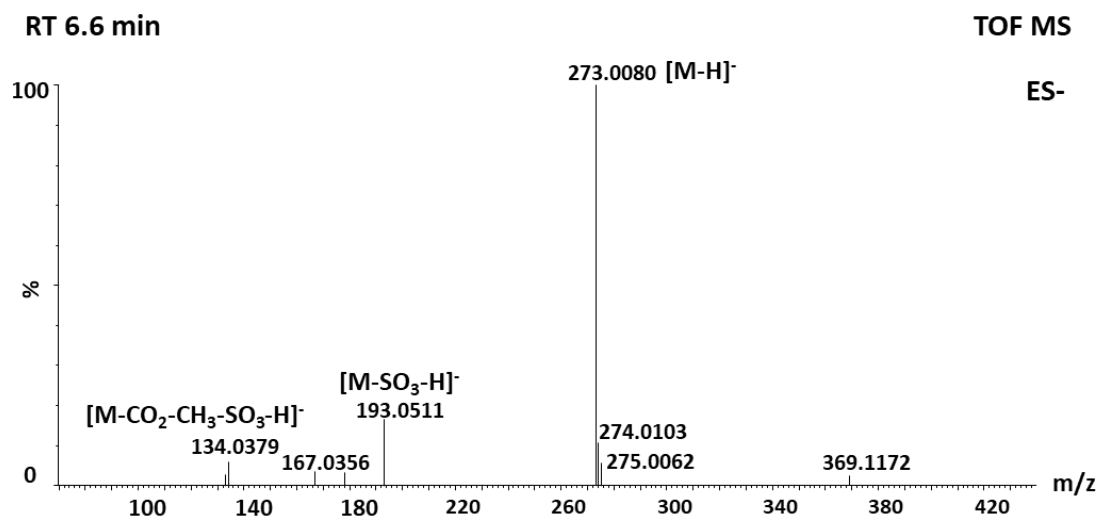
ESI-



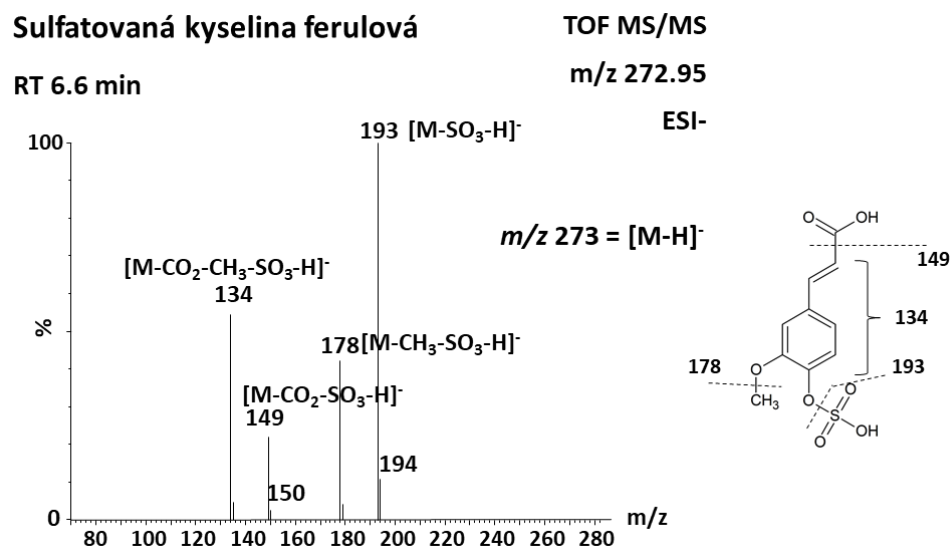
Obr. 25 Fragmentační spektrum kyseliny vanilové 4-sulfát s m/z 247 detekované při UHPLC-TOF MS analýze v negativním ionizačním módu při kolizní energii 20 eV.

Další nově detekovanou látkou je sulfatovaná kyselina ferulová (S-FA). Byl detekován také strukturální izomer této látky, pravděpodobně sulfatovaná kyselina isoferulová (S-iFA). Oba metabolity byly objeveny v rostlině miřík celer v bulvě. MS/MS spektra obou metabolitů obsahovala fragment kyseliny ferulové (m/z 193), jehož pseudo MS³ spektrum odpovídalo spektru standardu kyseliny ferulové, dostupné např. v databázi MetlinTM. Přesto se jedná pouze o předběžnou identifikaci, popř. anotaci. Pro plnou identifikaci by byl potřebný standard. S-FA má na uhlíku C4 sulfooxy skupinu a na C3 methoxy skupinu (Obr. 27), zatímco u S-iFA jsou skupiny na C4 a C3 prohozené (Obr. 28). Látky byly odlišeny pomocí RT, kdy S-FA byla detekována v čase 6,58 min a S-iFA v čase 7,45 min. V chromatogramu měl pík S-FA mnohonásobně vyšší intenzitu než pík S-iFA. Lze tedy předpokládat, že je intenzivnější metabolit skutečně derivát kyseliny ferulové, která se v přírodě vyskytuje častěji a ve větším zastoupení než kyselina isoferulová.

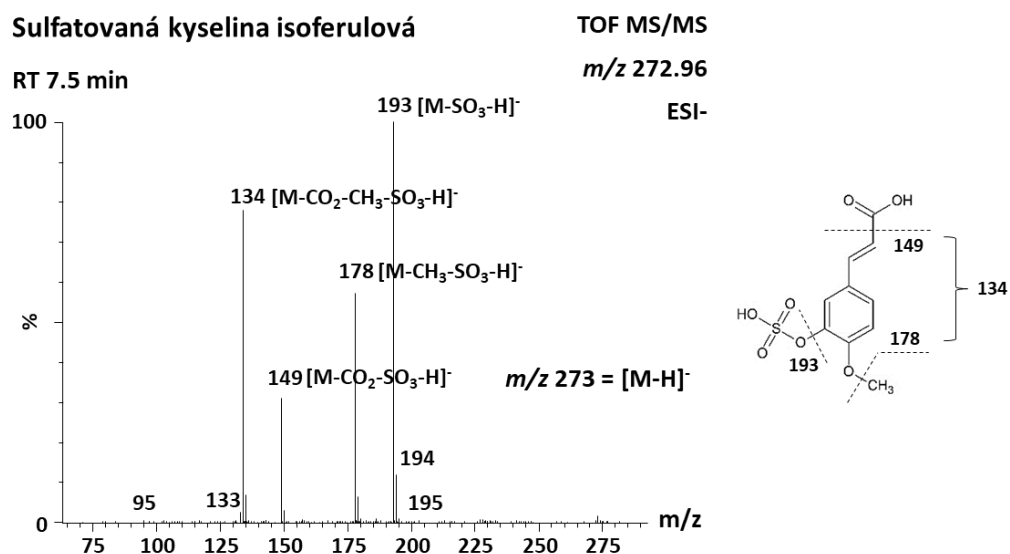
V MS spektru detekovaném v RT 6,6 min (Obr. 26) je nejintenzivnější iontem molekulární ion S-FA s hodnotou m/z 273. V MS/MS spektrech S-FA (Obr. 27) i S-iFA (Obr. 28) jsou nejintenzivnější fragmenty m/z 193 (ztráta SO₃), m/z 149 (ztráta SO₃ i CO₂), m/z 178 (ztráta SO₃ a methyly) a m/z 134 (ztráta všech třech skupin).



Obr. 26 MS spektrum molekulárního iontu m/z 273 v RT 6.6 min, anotovaný jako sulfatovaná kyselina ferulová, detekovaný v miříku celer (*Apium graveolens*) v negativním ionizačním módu pomocí UHPLC-TOF MS, při kolizní energii 20 eV.



Obr. 27 Fragmentační spektrum sulfatované kyseliny ferulové (anotace) s m/z 273, detekované v miříku celer (*Apium graveolens*) v RT 6.6 min, v negativním ionizačním módu při UHPLC-TOF MS analýze při kolizní energii 20 eV.



Obr. 28 Fragmentační spektrum sulfatované kyseliny isoferulové (anotace) s m/z 273, detekované v miříku celer (*Apium graveolens*) v RT 7.45 min, v negativním ionizačním módu při UHPLC-TOF MS analýze při kolizní energii 20 eV.

4.3. Optimalizace UHPLC-MS/MS stanovení sulfatovaných fenolických kyselin

UHPLC-MS/MS analýza byla optimalizována pro stanovení látek S-BA, S-PhAA a S-CA. Standardy látek byly nejprve změřeny v režimu sken dceřiných iontů (z angl. daughter scan). Byla získána fragmentační spektra molekulárních iontů látek s hodnotami m/z 217 (S-BA), 231 (S-PhAA) a 243 (S-CA). Ve spektrech byly vybrány fragmenty s největší plochou (area). Prekursorové m/z a m/z fragmentu s největší plochou byly zvoleny jako hmotnostní přechod pro kvantifikaci v MRM módu (Tab. 6). Ve výsledku se jedná vždy o molekulární iont, který ztratil neutrální molekulu SO_3 , tj. hmotnostní přechod $[M-H]^- > [M-SO_3-H]^-$ s rozdílem 80 Da. Dále byly zjištěny RTs, podle kterých byly látky rozděleny do čtyř časových oken (Tab. 6). Jako interní standard byla použita dpHBA (IS).

Byly optimalizovány parametry dwell time, napětí na kapiláře, napětí na kóně a kolizní energie. Testované napětí na kapiláře byly 1,5 a 2,5 kV. Testovaný rozsah napětí na kóně byl 10, 15; 20; 25; 30 a 35 kV. Testované kolizní energie byly 8; 12; 16; 20 a 28 eV. Vybrané kombinace parametrů pro citlivé stanovení látek jsou zobrazeny v kapitole 3.7. v tabulce 4.

Validační parametry metody pro stanovení sulfatovaných kyselin jsou shrnuty v tabulce 6. Patří mezi ně retenční časy (RT), které jsou průměrem všech RT dané látky, spolu se směrodatnými odchylkami (SD), dwell times, limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ),

parametry kalibrační přímky (hodnoty c a b) a lineární rozsah metody. Kalibrační přímky standardů stanovených látek jsou zobrazeny v grafech na obrázcích 29 - 31.

Tab. 6 Validační parametry metody pro stanovení obsahu sulfatovaných fenolických kyselin v extraktech pomocí UHPLC-MS/MS analýzy v negativním ionizačním módu a v MRM módu

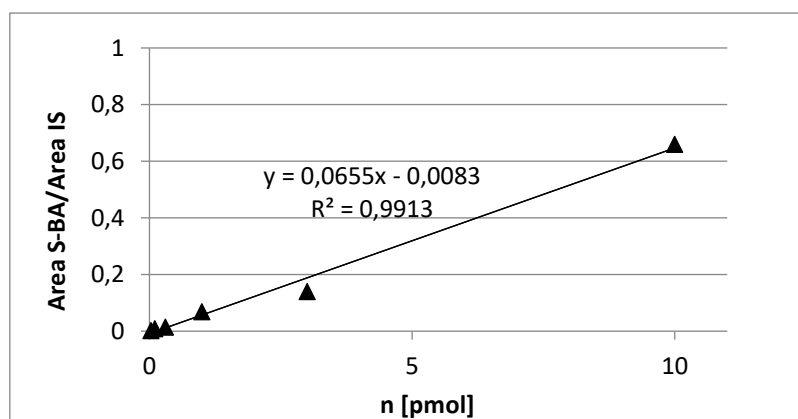
Látka	RT ± SD [min]	Hmotnostní přechody (MRM)	Dwell time [s]	LOD ^a [pmol/inj]	LOQ ^b [pmol/inj]	b	c	R ²	Lineární rozsah ^c [pmol/inj]
S-BA	3.236 ± 0.025	217 > 137	0.2	0.0022	0.022	0.0655	-0.0083	0.9913	0.022 - 10
S-PhAA	3.601 ± 0.039	231 > 151	0.2	0.004	0.04	0.0799	-0.0155	0.9934	0.040 - 10
S-CA	4.099 ± 0.045	243 > 163	0.3	0.0004	0.004	0.2241	-0.0208	0.9933	0.004 - 10
dpHBA ^d	4.207 ± 0.005	141 > 97	0.3	-	-	-	-	-	-

^alimit detekce - koncentrace analytu, kdy je hodnota signál/šum (S/N) rovna 3; S/N > 3 (signál); S/N < 3 (šum)

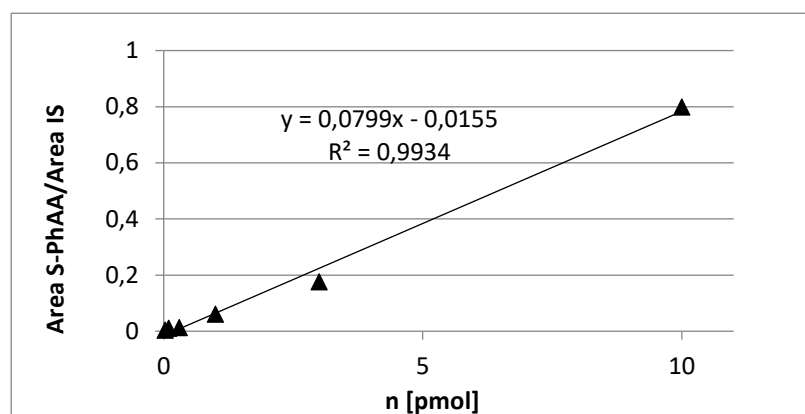
^blimit kvantifikace - desetinásobek LOD

^clineární rozsah byl vyhodnocen podle kalibrační přímky standardu a koeficientu determinace (R²)

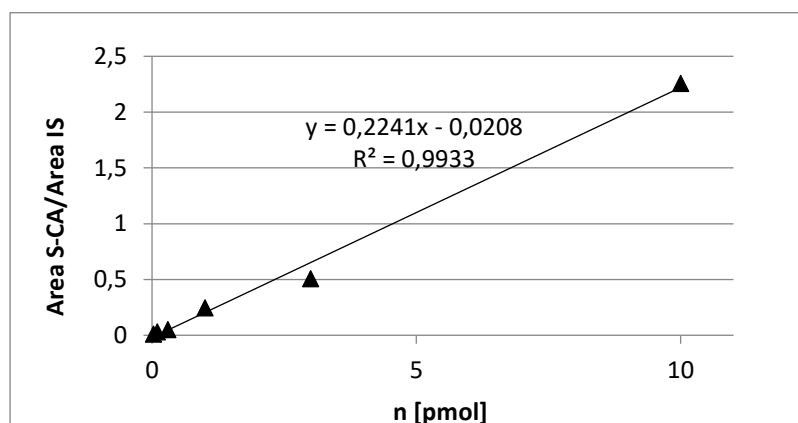
^dinterní standard



Obr. 29 Kalibrační přímka kyseliny 4-(sulfooxy)benzoové (S-BA) včetně kalibračních parametrů a koeficientu determinace (R²)



Obr. 30 Kalibrační přímka kyseliny 4-(sulfooxy)fenyloctové (S-PhAA) včetně kalibračních parametrů a koeficientu determinace (R^2)

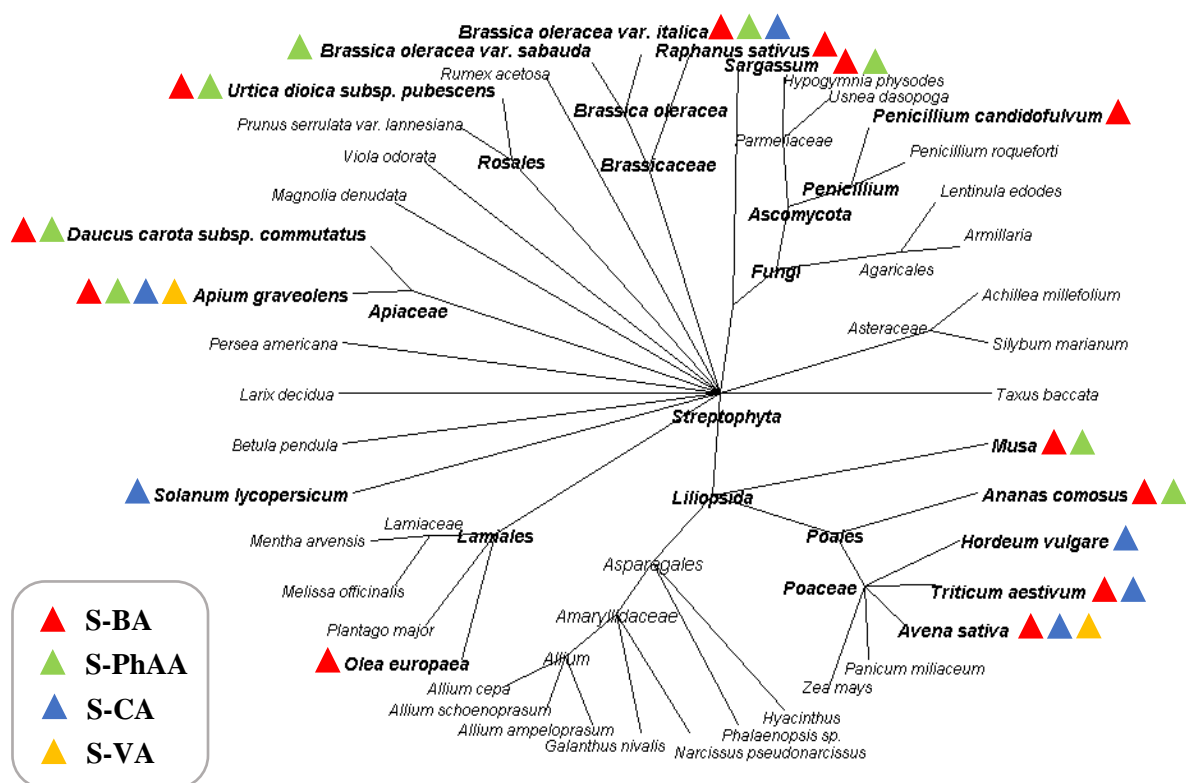


Obr. 31 Kalibrační přímka kyseliny zosterové (S-CA) včetně kalibračních parametrů a koeficientu determinace (R^2)

4.4. Detekce sulfatovaných fenolických kyselin ve vzorcích rostlin, hub a řas

Sulfatované kyseliny byly detekovány v celkem 15 vzorcích z 51. Na obrázku 32 jsou ve fylogenetickém stromu zobrazeny všechny analyzované vzorky s jejich taxonomickým zařazením do říše organismů, kdy organismy, které obsahují jednu nebo více sulfatovaných fenolických kyselin, jsou zvýrazněny tučným písmem a označeny symbolem podle detekovaného metabolitu.

Výskyt sulfatovaných metabolitů je dále popsán v tabulce 7. Analyzované organismy jsou v tabulce rozděleny do skupin jednoděložné a dvouděložné rostliny, houby a řasy, a také je v tabulce popsáno zařazení organismů do čeledí.



Obr. 32 Fylogenetický strom analyzovaných rostlin, hub a řas s jejich taxonomickým zařazením, kdy jsou tučným písmem zvýrazněny vzorky, u kterých byla detekována některá ze sulfatovaných fenolických kyselin: 4-(sulfooxy)benzoová (S-BA); 4-(sulfooxy)fenyloctová (S-PhAA), zosterová (S-CA) a vanilová 4-sulfát

Tab. 7 Výskyt kyselin 4-(sulfooxy)benzoová (S-BA); 4-(sulfooxy)fenyloctová (S-PhAA), zosterová (S-CA) a vanilová 4-sulfát (S-VA) detekovaných při UHPLC-MS/MS analýze v různých vzorcích rostlin, hub a řas

Skupina	Čeleď	Organismus	Latinský název	Analyzovaná část	Metabolit
jednoděložné rostliny	lipnicovité	pšenice setá	<i>Triticum aestivum</i>	klíček	S-BA, S-CA
	lipnicovité	ječmen setý	<i>Hordeum vulgare</i>	klíček	-
	lipnicovité	proso seté	<i>Panicum miliaceum</i>	klíček	-
	lipnicovité	oves setý	<i>Avena sativa</i>	klíček	S-BA, S-CA, S-VA
	lipnicovité	kukuřice setá	<i>Zea mays</i>	klíček	-
	amarylkovité	pažitka pobřežní	<i>Allium schoenoprasum</i>	list a kořen	-
	amarylkovité	sněženka podsněžník	<i>Galanthus nivalis</i>	list	-
	amarylkovité	narcis žlutý	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	list	-
	amarylkovité	pór pravý	<i>Allium porrum</i>	klíček	-
	amarylkovité	cibule kuchyňská	<i>Allium cepa</i>	list	-
	chřestovité	hyacint	<i>Hyacinthus litwinowii</i>	list	-
	banánovníkovité	banánovník	<i>Musa</i>	plod, slupka a výhonek	S-BA, S-PhAA ^a
	brméliovité	ananasovník chocholatý	<i>Ananas comosus</i>	list a plod	S-BA, S-PhAA
	vstavačovité	orchidej	<i>Phalaenopsis</i>	list	-
	dvouděložné rostliny	borovicovité	modřín opadavý	<i>Larix decidua</i>	šišky
břizovité		bříza bělokora	<i>Betula pendula</i>	jehnědy	-
hluchavkovité		máta rolní	<i>Mentha arvensis</i>	list	-
hluchavkovité		kopřiva dvoudomá	<i>Urtica dioica</i>	list	S-BA, S-CA
hluchavkovité		meduňka lékařská	<i>Melissa officinalis</i>	list	-
lilkovité		rajče keříčkové	<i>Solanum lycopersicum</i>	klíček a plod	S-CA ^b
miříkovité		miřík celer	<i>Apium graveolens</i>	bulva	S-BA, S-CA, S-PhAA, S-VA
miříkovité		mrkev obecná	<i>Daucus carota</i>	klíček a kořen	S-BA, S-CA
tisovité		tis červený	<i>Taxus baccata</i>	jehlice	-
olivovníkovité		olivovník evropský	<i>Olea europaea</i>	plod a olej	S-BA ^c
prýšcovité		prýšec trojúhlný	<i>Euphorbia trigona</i>	prýt	-
rdesnovité		šťovík kyselý	<i>Rumex acetosa</i>	list	-
růžovité		sakura ozdobná	<i>Prunus serrulata var. Lannesiana</i>	pupen	S-PhAA, S-BA
šácholánovité		<i>Magnolia denudata</i>	<i>Magnolia denudata</i>	pupen	-
violkovité		violka vonná	<i>Viola odorata</i> L.	list	-
vavřínovité		hruškovec přelahný (avokádo)	<i>Persea americana</i>	list	-
jitrocelovité		jitrocel větší	<i>Plantago major</i>	list	-
brukvovité		ředkev setá	<i>Raphanus sativus</i>	Bulva	S-BA, S-CA
brukvovité		kapusta hlávková	<i>Brassica oleracea var. sabauda</i>	klíček	S-PhAA
brukvovité		brokolice (brukev zelná)	<i>Brassica oleracea var. botrytis italica</i>	klíček a růžice	S-BA, S-CA, S-PhAA ^d
hvězdnicovité	řebříček obecný	<i>Achillea millefolium</i> L.	list	-	
	ostropestřec	<i>Silybum marianum</i>	klíček	-	

Skupina	Čeleď	Vzorek	Latinský název	Část organismu	Metabolit
houby	<i>Physalacriaceae</i>	václavka	<i>Armillaria</i>	plodnice	-
	terčovkovité	terčovka bublinatá	<i>Hypogymnia physodes</i>	stélka	-
	terčovkovité	provazovka obecná	<i>Usnea filipendula</i>	stélka	-
	špičkovité	houževnatec jedlý (shiitake)	<i>Lentinula edodes</i>	plodnice	-
	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	plíseň z nivy	-
	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Penicillium candidum</i>	<i>Penicillium candidum</i>	plíseň na hermelínu	S-BA
řasy	<i>Sargassaceae</i>	hroznovice (hijiki)	<i>Sargassum</i>	stélka	S-PhAA, S-BA

^adetekováno pouze v mladém výhonku banánovníku

^bdetekováno pouze v plodu rajčete

^cdetekováno pouze v olivovém oleji

^ddetekováno pouze v růžici brokolice

4.5. Kvantifikace metodou UHPLC-MS/MS

Ve vybraných 10 vzorcích byly pomocí UHPLC-MS/MS analýzy v módu MRM kvantifikovány analyty S-BA, S-PhAA nebo S-CA. Analýza byla provedena ve třech opakováních, ze kterých byl vypočten průměr. Výsledky kvantifikace jsou zobrazeny v tabulce 8. Koncentrace analytu ve vzorku je vyjádřena v µg na gram čerstvé (FW) nebo suché (DW) hmoty vzorku.

Tab. 8 Kvantifikace sulfatovaných fenolických kyselin v extraktech pomocí UHPLC-ESI(-)-MS/MS pracujícím v MRM módu. Jako interní standard byla použita dpHBA.

Vzorek	Analyzovaná část	Materiál	S-BA [µg/g] ^a	S-PhAA [µg/g]	S-CA [µg/g]
brokolice	růžice	DW	1.593 ± 0.053 ^b	2.495 ± 0.388	-
ananas	list	DW	-	4.459 ± 0.068	-
ředkev	bulva	DW	1.037 ± 0.077	-	-
sakura	pupeny	DW	-	5.560 ± 0.849	-
banánovník	výhonky rostliny	DW	-	2.800 ± 0.115	-
plíseň <i>Penicillium candidum</i>	plíseň na hermelínu	FW	16.098 ± 0.455	-	-
řasa <i>Sargassum</i>	stélka	DW	-	2.935 ± 0.321	-
rajče	plod	DW	-	-	0.350 ± 0.025
celer	bulva	DW	4.419 ± 0.333	0.699 ± 0.053	2.081 ± 0.184
oves	nadzemní část klíčku	FW	0.498 ± 0.037	-	1.056 ± 0.154

^aµg analyzované látky v gramu suché (FW) nebo čerstvé (FW) hmoty

^bprůměr ze tří opakování ± směrodatná odchylka (SD)

5. DISKUZE

Sulfatované fenolické látky jsou málo prozkoumanou skupinou metabolitů. Převážně byly detekované v mořských organismech (Kurth et al., 2015). Původním organismem, ve kterém byla objevena S-CA, je mořská tráva *Zostera marina*. *Zostera* obsahuje také různé sulfatované flavonoidy jako jsou např. luteolin 7-sulfát, diosmetin 7-sulfát, apigenin 7-sulfát nebo luteolin 7,3'-disulfát (Todd et al., 1993). S-BA byla poprvé detekovaná v zelené řase *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser, ve které byly objeveny také další příbuzné sulfatované látky, jako je S-PhAA nebo sulfatované kumariny (Kurth et al., 2015; Hartmann et al., 2018). Přítomnost S-PhAA byla doposud známá jen u těchto mořských řas.

Výskyt látek S-BA a S-CA v suchozemských rostlinách byl poprvé potvrzen v ovsu setém (*Avena sativa*) v mé bakalářské práci (Supíková, 2018). V současně předkládané diplomové práci jsem potvrdila přítomnost v rostlinných organismech také u látky S-PhAA. Dále byly S-BA, S-PhAA a S-CA detekovány v mnoha dalších rostlinných druzích, a dokonce i v zástupcích z říší hub a řas. Organismy, u kterých byly analyzovány sulfatované látky, byly vybrány náhodně, s ohledem na to, aby bylo pokryto co možná nejširší spektrum rostlinných čeledí.

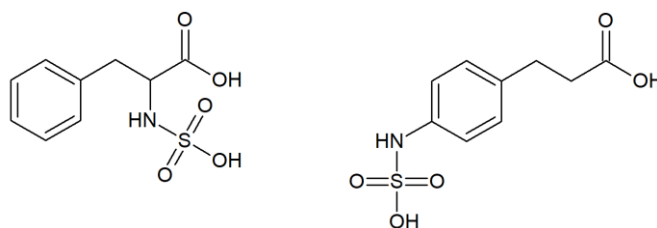
Co se týče biologické aktivity S-BA, S-PhAA a S-CA, látky by podle některých studií mohly sloužit jako inhibitory tvorby biofilmové vrstvy (Catto et al., 2015; Kurth et al., 2015). Jaké jsou funkce sulfatovaných fenolických kyselin v suchozemských rostlinách nebo v houbách není přesně známé. Sulfatace by mohla sloužit k inaktivování látek pro jejich pozdější použití nebo jsou sulfatované látky odpadními metabolity, podobně jako v lidském organismu. Vyloučit nelze ani jiné specifitější fyziologické funkce těchto metabolitů.

Vyhledávání nových sulfatovaných metabolitů

Svou prací mohu do skupiny sulfatovaných fenolických kyselin přispět novým zástupcem, a to metabolitem S-VA, který jsem detekovala v rostlinách oves setý (*Avena sativa*) a miřík celer (*Apium graveolens*). S-VA byla doposud popsána nikoli jako rostlinný metabolit, ale jako metabolit detekovaný v lidském organismu v krevní plazmě po podání olivového oleje v potravě. S-VA vzniká metabolizací rostlinného metabolitu kyseliny vanilové, která je v játrech při metabolismu II. fáze sulfatovaná za vzniku S-VA (Suarez et al., 2009). V UHPLC-TOF MS analýze extraktů olivového oleje a oliv nebyla S-VA detekovaná. V extraktu olivového oleje však byla detekovaná S-BA.

Dále byl v klíčku pšenice seté detekován molekulární ion (m/z 244), který byl předběžně identifikován jako sulfatovaný fenylalanin (Phe-SO₃; Obr. 33). Struktura byla navržena na základě MS² spektra molekulárního iontu. V on-line databázi MetlinTM bylo vyhledáno MS² spektrum fenylalaninu. Porovnáním tohoto spektra s pseudo MS³ spektrem fragmentu fenylalaninu (m/z 164)

byla struktura látky předběžně potvrzena. Pro úplné potvrzení identifikace je potřeba látku porovnat se syntetickým standardem Phe-SO₃. V mnohem méně pravděpodobném případě by se mohlo jednat např. o kyselinu 2-(4-aminofenyl)propanovou (Obr. 33). U obou variant by byla sulfátová skupina navázaná na dusíku -NH₂ skupiny. Phe-SO₃ doposud nebyl v rostlinách popsán, proto nelze usuzovat, jakou má v rostlině funkci.



Obr. 33 Zleva sulfatovaný fenylalanin a kyselina 2-(4-aminofenyl)propanová

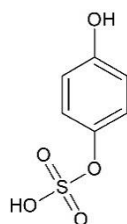
V rostlině miřík celer byly detekovány dva velmi podobné metabolity, pravděpodobně izomery. Obě látky doposud v rostlinné říši nebyly popsány. Intenzivnější molekulární ion byl určen jako S-FA a méně intenzivní ion jako S-iFA. Spektra nebyla porovnána se standardem, tudíž se nejedná o pravou strukturní identifikaci. Nicméně pseudo MS³ spektrum fragmentu kyseliny ferulové (*m/z* 193) bylo totožné s MS² spektrem standardu kyseliny ferulové.

S-FA lze detekovat v krevní plazmě po konzumaci kávy, která obsahuje kyselinu ferulovou. Podobně jako S-VA je i S-FA produktem metabolismu II. fáze. V kávě samotné se však S-FA nevyskytuje (Stalmach et al., 2009). Jako rostlinný metabolit nebyla ani S-FA doposud detekována.

Při výzkumu biologické aktivity S-FA bylo zjištěno, že má S-FA pozitivní účinek na kardiovaskulární systém. V experimentu *ex vivo* s myšími arteriemi v tkáňovém myografu byl prokázán vazorelaxační účinek S-FA na arterie, který byl výraznější než účinek také pozitivně působící nesulfatované kyseliny ferulové. Intravenózním podáním S-FA živým myším vedlo ke snížení arteriálního tlaku (Rymenant et al., 2017). S-FA má současně protizánětlivý účinek, neboť významně snižuje produkci proteinu VCAM-1 účastnícího se zánětlivé reakce (Amin et al., 2015). Regulací exprese protizánětlivých faktorů může S-FA přispět ke zmírnění kardiovaskulárních nemocí. S-FA dále snižuje adhezi monocytů na endoteliální stěnu a migraci makrofágů do cévní stěny, což podporuje vznik aterosklerotických plátů a vznik kardiovaskulárních nemocí (Olthof et al., 2003).

Dále byl detekován zajímavý metabolit hydrochinon sulfát (Obr. 34), a to v plísni *Penicillium candidum* rostoucí na povrchu hermelínu, a v sýru samotném, který byl analyzován jako negativní kontrola k plísni. Struktura metabolitu byla navržena předběžně podle fragmentačního spektra.

Penicillium candidum pravděpodobně vůbec prvním houbovým organismem, ve kterém byl kdy detekovaný sulfatovaný metabolit.



Obr. 34 Hydrochinon sulfát

Hydrochinon sulfát byl popsán v lidském organismu, kde je vylučován do moči po metabolizaci přírodní látky arbutin (Schindler et al., 2002). Arbutin je glykosid obsahující monosacharid glukózu a aglykonovou část hydrochinon. V organismu může být hydrolyzován na glukózu a hydrochinon, který je dále v játrech sulfatován. Arbutin se vyskytuje v medvědicí lékařské (*Arctostaphylos uva-ursi*), klikvě bahenní (*Vaccinium oxycoccos*) a dalších rostlinách čeledi vřesovcovité (*Ericaceae*). Např. výluh z listů z rostliny medvědice lékařské je díky příznivým účinkům arbutinu užíván v domácí medicíně při onemocněních urologického traktu (Schindler et al., 2002). Arbutin se také přidává do kosmetických produktů, jelikož dokáže redukovat pigmentové skvrny na kůži (Chawla et al., 2012). Hydrochinon uvolněný z arbutinu může mít podle některých studií na organismus také karcinogenní účinky, a to především ve střevě, kde se hydrochinon z arbutinu uvolňuje působením střevních bakterií (Blautt et al., 2006).

Ačkoli v houbách doposud žádné sulfatované látky ani sulfotransferázy nebyly popsány, podařilo se v *Penicilliu* detekovat přítomnost ještě dalšího sulfatovaného metabolitu. Přesnou strukturu látky nebylo možné podle MS/MS spektra definovat. Je pouze patrné, že obsahuje strukturu indolového jádra. *Penicillium candidum* tedy produkuje několik sulfatovaných metabolitů, zatímco v plísni *Penicillium roqueforti* ze sýru niva nebyl detekovaný žádný ze studovaných metabolitů ani ve stopovém množství.

Kvantitativní analýza S-BA, S-PhAA a S-CA

Sulfatovaná látka přítomná v nejvyšší koncentraci ze všech analyzovaných vzorků byla S-BA ($16,098 \pm 0,455$ ug/g FW), překvapivě však ne v rostlině ale opět v plísni *Penicillium candidum* z povrchu hermelínu. V sýru samotném bylo detekováno jen velmi malé množství S-BA, což naznačuje původ látky z plísně. Příslušná desulfatovaná forma S-BA, pHBA, byla dříve detekovaná v hermelínu, kde se podílí spolu s několika dalšími látkami na chuti (Law, 2012). Není však jasné, zda je pHBA produktem plísně nebo látkou vyskytující se v sýru samotném.

Naopak v klíčcích ovsa setého, kde byla S-BA původně objevena (Supíková, 2018), byla stanovena nejnižší koncentrace S-BA ze všech vzorků, a to $0,498 \pm 0,037 \mu\text{g/g FW}$. Emmons et al. (1999) stanovili v ovesné mouce koncentraci pHBA $4,5 \mu\text{g/g FW}$. V této obilnině je tedy obsah pHBA přibližně $4\times$ vyšší než obsah S-BA, což je jen přibližný odhad, neboť koncentrace pHBA a S-BA mohou být různé pro klíčky, dospělé rostliny nebo ovesné produkty (vločky, otruby, mouka apod.). Dále byla S-BA detekována ve vzorku růžice brokolice v koncentraci $1,593 \pm 0,053 \mu\text{g/g DW}$. Pro srovnání, obsah pHBA v brokolici je výrazně vyšší, a pohybuje se okolo $4,1 \mu\text{g/g FW}$ (Mattila & Hellström, 2007). Při obsahu vody v čerstvém materiálu (FW) až 90 % se může jednat až o 30-násobou koncentraci nesulfatované pHBA.

Dále byl analyzován obsah S-BA ve výhoncích banánovníku, v dužině a slupce banánu, kde byla S-BA detekována pouze ve výhoncích ($1,593 \pm 0,053 \mu\text{g/g DW}$). Nejvyšší koncentrace pHBA byly stanoveny v dužině banánů u odrůd Ney Poovan ($85,9 \mu\text{g/g}$), Samurá B ($72,3 \mu\text{g/g}$) a Tiaprot ($58,2 \mu\text{g/g}$) (Borges et al., 2018).

S-CA byla jako jediná z analyzovaných látek dříve kvantifikovaná, a to dokonce v rostlinách. Achamlale et al. (2009) kvantifikovali S-CA v mořských travách *Zostera nultii* a *Zostera marina*, kdy se koncentrace pohybovaly v rozmezí $65 - 456 \mu\text{g/g DW}$, resp. $51 - 692 \mu\text{g/g DW}$, v závislosti na ročním období sběru trávy. V publikaci navrhovali využití těchto mořských trav pro izolaci S-CA, která by mohla být dále v průmyslu použita jako anti-biofilmová přísada např. do nátěrových hmot na lodě (Achamlale et al., 2009). Obsah S-CA v mořských travách je $50 - 400\times$ vyšší než v celeru ($2,081 \pm 0,184 \mu\text{g/g DW}$), ovsu ($1,056 \pm 0,154 \mu\text{g/g FW}$) a rajčeti ($0,350 \pm 0,025 \mu\text{g/g DW}$).

Obsah S-CA v analyzovaných vzorcích lze, podobně jako u S-BA, porovnat s nesulfatovanou kyselinou *para*-kumarovou, jejíž koncentrace jsou $949,2 \mu\text{g/g DW}$ v celeru (Yao et al., 2010) nebo $590 - 826 \mu\text{g/g DW}$ v ovsu (různé odrůdy) (Multari et al., 2018). Celer tedy obsahuje téměř $500\times$ vyšší koncentraci nesulfatované kyseliny než S-CA. Kromě toho je miřík celer zajímavý také tím, že v něm bylo detekováno nejvíce druhů sulfatovaných látek (S-BA, S-CA, S-PhAA, S-VA, S-FA a S-iFA), což vede k zamyšlení, zda může mít tato pestrá škála metabolitů souvislost se zdraví prospěšnými vlastnostmi celeru, např. řapíkatý celer je považován za superpotravinu. Dále je důležité podotknout, že v ovsu se jedná o vázanou kyselinu *para*-kumarovou, typicky na sacharidy, zatímco volná kyselina se v ovsu vyskytuje jen minimálně (Multari et al., 2018). Kyselina *para*-kumarová je v ovsu přítomna v $600 - 800\times$ vyšší koncentraci než sulfatovaná forma látky. Nízký obsah S-CA může být také dán vazbou na jiné molekuly, kdy se frakci vázané S-CA nepodařilo detekovat.

Poslední analyzovaná látka S-PhAA byla vůbec poprvé detekovaná v rostlinách. Kromě toho bylo ve vzorcích provedeno i kvantitativní stanovení S-PhAA. Doposud byla S-PhAA

identifikovaná jen v mořské řase *Dasycladus vermicularis* (Kuth et al., 2015). Podle dostupných publikací nejsou ani ostatní hydroxyfenyloctové kyseliny (např. homovanilová nebo 4-hydroxyfenyloctová) příliš často vyskytujícími se metabolity, na rozdíl od derivátů kyselin hydroxybenzoových a hydroxykořicových. Desulfatovaná varianta, kyselina 4-hydroxyfenyloctová, byla detekovaná jen v několika bylinách (např. proskurník lékařský, pelyněk pravý a pampeliška lékařská), kakau, olivách a olivovém oleji, vínu a pivu (Phenol-Explorer Database; Dr. Duke Phytochemical Database). Kyselinu 4-hydroxyfenyloctovou kvantifikovali Sosulski et al. (1982) v ovesné mouce (0,3 ug/g FW). Nicméně v této práci nebyla její sulfatovaná forma v klíčících rostlinách ovesa vůbec detekovaná.

Zcela novým metabolitem, doposud nepopsaným v rostlinách, řasách ani houbách, je S-VA detekovaná v klíčku ovesa setého a v bulvě miříku celeru. Multari et al. (2018) stanovili v různých odrůdách ovesa nesulfatovanou kyselinu vanilovou ve vázané formě na jiné molekuly v rozsahu koncentrací 4,59 - 7,1 µg/g DW. Podobně jako u S-CA a S-BA lze opět předpokládat několikanásobně nižší koncentraci S-VA než nesulfatované látky.

Analyzované organismy byly sestaveny do fylogenetického stromu pro zobrazení příbuznosti. Předpokladem bylo, že v příbuzných vzorcích nebo čeledích bude podobné zastoupení metabolitů. Také bylo původně předpokládáno, že se sulfatované látky vyskytují spíše u řas a jednoděložných rostlin, kam patří i *Zostera marina* a mořské trávy. Z výsledků je však patrné, že se sulfatované fenolické kyseliny vyskytují nahodile v různých čeledích a zástupcích říší rostlin, řas i hub.

6. ZÁVĚR

Ve více než 50 vzorcích rostlin, hub a řas byly vyhledávány sulfatované látky, k čemuž byla použita metoda detekce charakteristické neutrální ztráty oxidu sírového ($\Delta m/z$ 79,956 Da) v UHPLC-TOF MS analýze. Podařilo se objevit několik nových a dosud nepopsaných metabolitů. Větší část identifikovaných látek tvořily fenolické kyseliny, popř. se jednalo o látky obsahující strukturu aromatického jádra. Takovým příkladem je metabolit plísně *Penicillium candidum*, hydrochinon sulfát. V houbách doposud nebyly popsány ani sulfotransferázy ani jejich produkty. *Penicillium* se tak stalo pravděpodobně vůbec první houbou, ve které byla jakákoli sulfatovaná látka detekovaná. V rostlinách miřík celer, oves setý a pšenice setá byly detekovány sulfatované fenolické kyseliny S-FA, S-iFA a S-VA. Miřík celer je potřeba vyzdvihnout také pro jeho překvapivý obsah největšího počtu zástupců sulfatovaných látek (S-BA, S-CA, S-PhAA, S-VA, S FA a S-iFA), což může naznačovat, že sulfatace je pro některé organismy typičtější než pro jiné. Kromě sulfatovaných fenolických kyselin byl detekován také sulfatovaný primární metabolit, aminokyselina L-Phe, kde sulfát tvoří sulfoamino skupinu na rozdíl od ostatních sulfooxy látek. Funkce sulfatace byla v minulosti popsána např. u některých mořských organismů jako inaktivační a skladovací (Kurth et al., 2015; Thoms & Schupp, 2008), takže je možné, že jsou fenolické kyseliny rostlin sulfatací uskladněny pro pozdější použití.

Dále byly kvantitativně analyzovány kyseliny S-BA, S-PhAA a S-CA, které byly doposud detekovány pouze v řasách (Kurth et al., 2015), mořských travách (Todd et al., 1993) a v ovsu setém (Supíková, 2018). V celkem 15 vzorcích z více než 50 se podařilo prokázat přítomnost jednoho nebo více analytů. Látky byly stanoveny v rozsahu koncentrací 0,35 $\mu\text{g/g}$ DW (S-CA) až 16,096 $\mu\text{g/g}$ FW (S-BA), a to v 10 vzorcích: brokolice, ananas, sakura, oves, banánovník, *Penicillium candidum*, řasa *Sargassum*, rajče, celer a ředkev. V *Penicilliu* byla překvapivě nejvyšší koncentrace jedné z látek, konkrétně S-BA. Nejnižší koncentrace S-BA byla stanovena v ovsu, ačkoli se jedná o první suchozemskou rostlinu, ve které byly sulfatované fenolické kyseliny objeveny (Supíková, 2018). Obecně platí, že je obsah dané sulfatované látky vždy význačně nižší než obsah odpovídající desulfatované formy. Nesporný přínos této analýzy představuje zjištění, že sulfatované fenolické kyseliny jsou přítomny v plísních i dvouděložných rostlinách, a to plošně bez spojitosti s typickou čeledí, jako je tomu např. u glukosinolátů.

Seznam zkratek

APS	adenosin 5'-fosfosulfát
ATP	adenosin trifosfát
AtSOT12/16/17/18	<i>Arabidopsis thaliana</i> sulfotransferáza 12/16/17/18
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DMF	dimethylformamin
DMSO	dimethylsulfoxid
dpHBA	deuterovaná kyselina <i>para</i> -hydroxybenzoová
DW	sušený materiál
ESI	ionizace elektrosprejem
FW	čerstvý materiál
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP	indukčně vázané plazma
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IS	interní standard
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MF	mobilní fáze
MRM	monitorování vybraných reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS spektrum	fragmentační spektrum
MS ²	fragmentační spektrum
NEt ₃	triethylamin
NMe ₃	trimethylamin
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	normální fáze
PAPS	3'-fosfoadenosin 5-fosfosulfát
PDA	fotodiodové pole

pHBA	kyselina <i>para</i> -hydroxybenzoová
Phe-SO ₃	sulfatovaný fenylalanin
Pyr	pyridin
Q	kvadrupól
QqQ	trojitý kvadrupól
QqTOF	kvadrupól s průletovým analyzátozem
RP	reverzní fáze
RT	retenční čas
S-BA	kyselina 4-(sulfooxy)benzoová
S-CA	kyselina 4-(sulfooxy)skořicová
SD	směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
S-FA	sulfatovaná kyselina ferulová
S-iFA	sulfatovaná kyselina isoferulová
SO ₃ · Pyr	komplex oxid sírový-pyridin
SOT	sulfortansferáza (rostlinná)
S-PhAA	kyselina 4-(sulfooxy)fenyloctová
SRM	monitorování vybrané reakce
SULT	sulfotransferáza (lidská)
S-VA	sulfatovaná kyselina vanilová
TOF	průletový analyzátor
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

Seznam zdrojů

1. Achamlale, S., Rezzonico, B., & Grignon-Dubois, M. (2009). Evaluation of *Zostera detritus* as a potential new source of zosteric acid. *Journal of Applied Phycology*, 21(3), 347–352.
2. Afendi, F. M., Okada, T., & Yamazaki, M. (2012). KNApSAcK family databases: integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol.*, 53.
3. Achenbach, H., Hübner, H., Brandt, W. & Reiter, M. (1994). Cardioactive steroid saponins and other constituents from the aerial parts of *Tribulus cistoides*. *Phytochemistry*, 35(6),1527–43.
4. Al-Horani, R. A. and Desai, U. R. (2010). Chemical sulfation of small molecules-advances and challenges, *Tetrahedron*, 66(16), 2907–2918.
5. Alluis, B. & Dangles, O. (2001). Quercetin (= 2(3,4 dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4-1-benzopyran-4-one) glycosides and sulfates: chemical synthesis, complexation, and antioxidant properties. *Helv. Chim. Acta*, 84, 1133–1156.
6. Almario, J., Jeena, G., Wunder, J., Langen, G., Zuccaro, A., Coupland, G. & Bucher, M. (2017). Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabidopsis alpina* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114, 9403–9412.
7. Altman, T., Travers, M., Kothari, A., Caspi, R. & Karp, P.D. (2013). A systematic comparison of the MetaCyc and KEGG pathway databases. *BMC Bioinformatics*, 40, 112.
8. Amin, H. P., Czank, C., Raheem, S., Zhang, Q., Botting, N. P., Cassidy, A. & Kay, C. D. (2015). Anthocyanins and their physiologically relevant metabolites alter the expression of IL-6 and VCAM-1 in CD40L and oxidized LDL challenged vascular endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 59, 1095–1106.
9. Ananvoranich, S., Varin, L., Gulick, P. & Ibrahim, R. (1994). Cloning and regulation of flavonol 3-sulfotransferase in cell-suspension cultures of *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.*, 106, 485–491.
10. Baek, D., Pathange, P., Chung, J. S., Jiang, J., Gao, L., Oikawa, A., Hirai, M. Y., Saito, K., Pare, P. W. & Shi, H. (2010). A stress-inducible sulphotransferase sulphonates salicylic acid and confers pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.*, 33(8), 1383–1392.
11. Barron, D., Varin, L., Ibrahim, R. K., Harborne, J. B. & Williams, C. A. (1988). Sulphated flavonoids—an update., *Phytochemistry*, 27, 2375–2395.
12. Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubek, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A., & Schulze-

- Lefert, P. (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense, *Science*, 323(5910), 101–106.
13. Bell, J. M. (1984). Nutrients and toxicants in rapeseed meal: a review, *J. Animal Sci.*, 58(4), 996–1010.
 14. Bick, J. A., Dennis, J. J., Zylstra, G. J., Nowack, & Leustek, J. T. (2000). Identification of a new class of 5'-adenylylsulfate (APS) reductases from sulfate-assimilating bacteria, *Journal of Bacteriology*, 182(1), 135–142.
 15. Bischoff, K. L. (2016). Chapter 40 - Glucosinolates, Editor(s): Ramesh C. Gupta, Nutraceuticals, Academic Press, Pages 551-554, ISBN 9780128021477.
 16. Blaut, M., Braune, A., Wunderlich, S., Sauer, P., Schneider, H. & Glatt, H. (2006). Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, 44(11), 1940–1947.
 17. Bohrer, A. S., Kopriva, S. & Takahashi, H. (2014) Plastid-cytosol partitioning and integration of metabolic pathways for APS/PAPS biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*, 5, 751.
 18. Bones, A. M. & Rossiter, J. T. (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates, *Phytochemistry*, 67(11), 1053–1067.
 19. Borges, C. V., Maraschin, M., Coelho, D. S., Minatel, I. O., Belin, M. A. F., Amorim, E. P. & Lima, G. (2018). Characterization of (poly)phenolic compounds during the ripening and after domestic cooking of bananas and plantains. Paper presented at the 1st International Congress on Bioactive Compounds and 2nd International Workshop on Bioactive Compounds: Food Design and Health.
 20. Bulaj, G. (2005) Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnology Advances*, 23(1), 87–92.
 21. Cao, G., Sofic, E. & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 749–760.
 22. Carroll, K. S., Gao, H., Chen, H., Stout, C. D., Leary, J. A., and Bertozzi, C. R. (2005). A conserved mechanism for sulfonucleotide reduction. *PLoS Biol.*, 3, 250.
 23. Catto, C., Dell'Orto, S., Villa, F., Villa, S., Gelain, A., Vitali, A., Marzano, V., Baroni, S., Forlani, F. & Cappitelli, F. (2015). Unravelling the structural and molecular basis responsible for the anti-biofilm activity of zosteric acid. *PLoS ONE*, 10(7), 1–24.
 24. Cavaiuolo, M. & Ferrante, A. (2014). Nitrates and glucosinolates as strong determinants of the nutritional quality in rocket leafy salads. *Nutrients*, 6(4), 1519–1538.

25. Collett, M.G., Stegelmeier, B.L., & Tapper, B. (2014). Could nitrile derivatives of turnip (*Brassica rapa*) glucosinolates be hepato- or cholangiotoxic in cattle? *J. Agric. Food Chem.* 62 (30), 7370–7375.
26. Coughtrie, M. W. H. (2016). Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (SULT) family. *Chem. Biol. Interact.*, 259, 2–7.
27. Cummins, I., Dixon, D. P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M. & Edwards, R. (2011). Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab. Rev.*, 43, 266–280.
28. De Graffenried, C. L., & Bertozzi, C. R. (2003). Golgi localization of carbohydrate sulfotransferases is a determinant of L-selectin ligand biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 278, 40282–40295.
29. Den Hartog, C. & Kuo, J. (2006). Taxonomy and biogeography of seagrasses. In: Larkum, A. W. D., Orth, R. J. & Duarte, C. M., Eds., *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, Springer, The Netherlands, 1–24.
30. Dias, I. H. K., Ferreira, R., Gruber, F., Vitorino, R., Rivas-Urbina, A., Sanchez-Quesada, J. L., Vieira Silva, J., Fardilha, M., de Freitas, V., & Reis, A. (2019) Sulfate-based lipids: analysis of healthy human fluids and cell extracts. *Chem. Phys. Lipids*, 221, 53–64.
31. Dixon, D. P. & Edwards, R. (2010). Glutathione transferases. *The arabidopsis book*, 8, e0131.
32. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases, on-line web: <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search>
33. Eldefrawi, M. E. & Eldefrawi, A. T. (1983). Neurotransmitter receptors as targets for pesticides. *J Environ Sci Health B.*, 18(1), 65–88.
34. Emmons, C. L., Peterson, D. M. & Paul, G. L. (1999). Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47,4894–4898.
35. Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *Phytochemistry*, 56(1), 5–51.
36. Fan, J., Crooks, C., Creissen, G., Hill, L., Fairhurst, S., Doerner, P., & Lamb, C. (2011). *Pseudomonas* sax genes overcome aliphatic isothiocyanate-mediated non-host resistance in *Arabidopsis*, *Science*, 331 (6021), 1185–1188.
37. Gallagher, J.T. & Lyon, M. (2000). "Molecular structure of Heparan Sulfate and interactions with growth factors and morphogens". In Iozzo, M, V. (ed.). *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions*. Marcel Dekker Inc. New York, 27–59.

38. Gidda, S. K. & Varin, L. (2006). Biochemical and molecular characterization of flavonoid 7-sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.*, 44, 628–636.
39. Gidda, S. K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C. & Varin, L. (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, 278(20), 17895–17900.
40. Gilbert, E. E. (1965) Sulfonation and related reactions. New York: Interscience Publishers; Chapters 1 & 6.
41. Glaser, K., Kanawati, B., Kubo, T., Schmitt-Kopplin, B. & Grill, E. (2014). Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome. *Plant J.*, 77(1), 31–45.
42. Greenwood, N. N. & Earnshaw, A. (1997). Chemistry of the Elements (2nd ed.), Oxford: Butterworth-Heinemann. ISBN 0-7506-3365-4.
43. Guillarme, D. & Luc, J. (2012). UHPLC in life sciences. Cambridge: Royal Society of Chemistry, ISBN 978-184-9733-885
44. Guiry, M. D., Guiry, M. D. & Guiry, G. M. AlgaeBase; World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland: Galway, Ireland. Available online: <http://www.algaebase.org> (staženo 5. 10. 2019)
45. Halkier, B.A., & Gershenzon, J., (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 57, 303–333.
46. Hammond, J. P., Bennett, M. J., Bowen, H. C., Broadley, M. R., Eastwood, D. C., May, S. T., Rahn, C., Swarup, R., Woolaway, K.E. & White, P.J. (2003). Changes in Gene Expression in *Arabidopsis* Shoots during Phosphate Starvation and the Potential for Developing Smart Plants. *American Society of Plant Biologists*, 132(June), 578–596.
47. Hannoufa, A., Brown, R. H. H. & Ibrahim, R. K. (1994). Variations in flavonoid sulphate patterns in relation to photosynthetic types of five *Flaveria* species. *Phytochemistry*, 36, 353–356.
48. Hanson, A. D., Rathinasabapathi, B., Rivoal, J., Burnet, M., Dillon, M. O., & Gage, D. A. (1994). Osmoprotective compounds in the *Plumbaginaceae*: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(1), 306–310.
49. Hartmann, A., Ganzera, M., Karsten, U., Skhirtladze, A., & Stuppner, H. (2018). Phytochemical and Analytical Characterization of Novel Sulfated Coumarins in the Marine Green Macroalga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser. *Molecules*, 23(11).

50. Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Shimohira, T., Kurogi, K., Yamasaki, M. & Nishiyama, K. (2014). Identification of a novel flavonoid glycoside sulfotransferase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biochem.*, 155, 91–97.
51. Hashimoto, Y. & Okaichi, T. (1960). Some chemical properties of nereistoxin. *Ann N Y Acad Sci.*, 90: 667–673.
52. Hassan, S. & Mathesius, U. (2012). The role of flavonoids in rootrhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plantmicrobe interactions. *J. Exp. Bot.*, 63, 3429–3444.
53. Hell, R. & Wirtz, M. (2011). Molecular Biology, Biochemistry and Cellular Physiology of Cysteine Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. The arabidopsis book, 9, e0154.
54. Hemmerich, S., Leffler, H., & Rosen, S. D. (1995). Structure of the O-Glycans in GlyCAM-1, an Endothelial-derived Ligand for L-selectin, *J. Biol. Chem.*, 270, 12035–12047.
55. Hemmerich, S., Verdugo, D., & Rath, V.L. (2004). Strategies for drug discovery by targeting sulfation pathways. *Drug Discov Today*, 9, 967–975.
56. Hirai, M. Y., Klein, M., Fujikawa, Y., Yano, M., Goodenowe, D. B., Yamazaki, Y., Kanaya, S., Nakamura, Y., Kitayama, M., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Tokuhisa, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., Papenbrock, J., & Saito, K. (2005). Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25590–25595.
57. Hirschmann, F., Krause, F., & Papenbrock, J. (2014) The multi-protein family of sulfotransferases in plants: composition, occurrence, substrate specificity, and functions. *Front. Plant Sci.*, 5, 556.
58. Huang, S. F. & Lu, Ch. K. (2006). *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser (*Chlorophyta*, *Dasycladales*, *Dasycladaceae*), a New Record in Taiwan. *Taiwania.*, 51.
59. Hurst, W. J., Stuart, D. A., Justavino, A. I. C. & van Breemen, R. B. (2014). JASMONIC ACID COMPOUNDS IN COCOA PRODUCTS. Patent No.: US 9,040,096. United States Patent US. Patent. United States Pat. US 2(12)
60. Huxtable, R. J. (1986). *Biochemistry of sulfur*, New York: Plenum Publishing Corp.
61. Chapman, E., Best, M. D., Hanson, S. R., & Wong, C. H. (2004). Sulfotransferases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem.*, 43, 3526–3548.
62. Chawla, S., Kvalnes, K., de Long M. A., Wickett, R., Manga, P. & Boissy, R. E. (2012). DeoxyArbutin and its derivatives inhibit tyrosinase activity and melanin synthesis without inducing reactive oxygen species or apoptosis. *J Drugs Dermatol.*, 11(10), 28–34.

63. ChemSpider, Search and share chemistry, on-line web: <http://www.chemspider.com/>
64. Ibrahim, R. K. (1995). Evidence for nuclear protein binding of flavonol sulfate esters in *Flaveria chloraefolia*. *J. Plant Physiol.*, 147, 653–660.
65. Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N. & Gupta, S. (2012). A comparative study on the polyphenolic content, antibacterial activity and antioxidant capacity of different solvent extracts of *Brassica oleracea* vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(2), 223–231.
66. Jez, J. M. (2019). Structural biology of plant sulfur metabolism: from sulfate to glutathione. *J Exp Bot.*, 19; 70(16), 4089–4103.
67. Kleinenkuhnen, N., Büchel, F., Gerlich, S. C., Kopriva, S., & Metzger, S. (2019). A Novel Method for Identification and Quantification of Sulfated Flavonoids in Plants by Neutral Loss Scan Mass Spectrometry. *Frontiers in plant science*, 10, 885.
68. Koes, R. E., Quottrochio, F. & Mol, J. N. M. (1994). Flavonoid biosynthesis. *BioEssays*, 16, 123–132.
69. Komori, R., Amano, Y., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2009). Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106(35), 15067–15072.
70. Kopriva, S., & Koprivova, A. (2004). Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future, *J. Exp. Bot.*, 55(404), 1775–1783.
71. Kopriva, S., Buchert, T., Fritz, G., Suter, M., Benda, R.D., Schunemann, V., Koprivova, A., Schurmann, P., Trautwein, A.X., Kroneck, P.M.H., & Brunold, C. (2002). The presence of an iron-sulfur cluster in adenosine 50-phosphosulfate reductase separates organisms utilizing adenosine 5'-phosphosulfate and phosphoadenosine 5'-phosphosulfate for sulfate assimilation, *J. Biol. Chem.* 277(24), 21786-21791.
72. Kurth, C., Welling, M. & Pohnert, G. (2015). Sulfated phenolic acids from *Dasycladales* siphonous green algae. *Phytochemistry*, 117, 417–423.
73. Law, B. A. (2012). *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Second edition. Blacki Academic & Professional, Springer Science & Business Media, pp. 286.
74. Lee, J. Y., Kim, M. Y., Shin, S. H., Shin, M. R., Kwon, O. J., Kim, T. H., Park, Ch. H., Noh, J. S., Rhee, M. H. & Roh S. S. (2016). Study of Antiobesity Effect through Inhibition of Pancreatic Lipase Activity of Diospyros kaki Fruit and Citrus unshiu Peel. *Biomed Res Int.*, 2016(2016), 1723042.

75. Lincová, D. & Farghali, H., et al. (2007). *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Praha, Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
76. Linder, T. (2018). Assimilation of alternative sulfur sources in fungi. *World journal of microbiology & biotechnology*, 34(4), 51.
77. Lippard, S. J. & Berg, J. M. (1994). *Principles of Bioinorganic Chemistry*. University Science Books: Mill Valley, CA, ISBN 0-935702-73-3.
78. Ma, C. J., Lee, K. Y., Jeong, E. J., Kim, S. H., Park, J., Choi, Y. H., Kim, Y. C. & Sung, S. H. (2010). Persicarin from water dropwort (*Oenanthe javanica*) protects primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *Phytother Res.*, 24, 913–918.
79. Malojčić, G., Owen, R. L., and Glockshuber, R. (2014) Structural and mechanistic insights into the PAPS-independent sulfotransfer catalyzed by bacterial aryl sulfotransferase and the role of the Dsbl/Dsbl system in its folding. *Biochemistry*, 53, 1870–1877.
80. Marsolais, F. & Varin, L. (1998). Recent developments in the study of the structure-function relationship of flavonol sulfotransferases. *Chem. Biol. Interact.* 109, 117–122.
81. Marsolais, F., Boyd, J., Paredes, Y., Schinas, A. M., Garcia, M., Elzein, S. & Varin, L. (2007). Molecular and biochemical characterization of two brassinosteroid sulfotransferases from Arabidopsis, AtST4a (At2g14920) and AtST1 (At2g03760). *Planta*, 225(5), 1233–1244.
82. Matsubayashi, Y., & Sakagami, Y. (1996). Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (15) 7623e7627. Mattila, P., & Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 152–160.
83. Matsubayashi, J. (2013). Chapter 7 – Phytosulfokine. *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*. Academic Press. pp. 35–39. ISBN 9780123850959.
84. Meija, J., Coplen, T. B., Berglund, M., Brand, W.A., De Bièvre, P., Gröning, M., Holden, N. E., Irrgeher, J., Loss, R. D., Walczyk, T. & Prohaska, T. (2016). Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 88 (3), 265–91.
85. Middlebrook, G., Colemann, C. & Schaeffer, W.B. (1959). Sulfolipids from virulent tubercle bacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45, 1801–1804.
86. Mugford, S. G., Lee, B.-R., Koprivova, A., Matthewman, C., & Kopriva, S. (2011). Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism. *Plant J.*, 65, 96–105.
87. Mugford, S. G., Yoshimoto, N., Reichelt, M., Wirtz, M., Hill, L., Mugford, S.T., Nakazato, Y., Noji, M., Takahashi, H., Kramell, R., Gigolashvili, T., Flugge, U. I., Wasternack, C.,

- Gershenzon, J., Hell, R., Saito, K., & Kopriva, S. (2009). Disruption of adenosine-50-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites, *Plant Cell*, 21(3), 910–927.
88. Muller, R., de Vos, M., Sun, J.Y., Sonderby, I.E., Halkier, B.A., Wittstock, U., & Jander, G. (2010). Differential effects of indole and aliphatic glucosinolates on lepidopteran herbivores, *J. Chem. Ecol.*, 36(8), 905–913.
89. Multari, S., Pihlava, J. M., Ollenu-Chuasam, P., Hietaniemi, V., Yang, B., & Suomela, J. P. (2018). Identification and Quantification of Avenanthramides and Free and Bound Phenolic Acids in Eight Cultivars of Husked Oat (*Avena sativa* L) from Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2900–2908.
90. Mumma, R. O. (1966). Preparation of sulfate esters. *Lipids*, 1, 221-223.
91. Ngo, D., & Kim, S. (2013). International Journal of Biological Macromolecules Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 70–75.
92. Nitta S. (1934). Ober Nereistoxin, einen giftigen Bestandteil von *Lumbriconereis heteropoda* Marenz (Eunicidae). *Yakagaku Zasshi*, 54, 648–652.
93. Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G. & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 454–484.
94. Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M. & Katan, M. B. (2003). Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.*, 133, 1806–1814.
95. Østerås, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M.C. & Le Rudulier, D. (1998). Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 11394–11399.
96. Patron, N. J., Durnford, D. G. & Kopriva, S. (2008). Sulfate assimilation in eukaryotes: Fusions, relocations and lateral transfers, *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1–14.
97. Paul, P., Suwan, J., Liu, J., Dordick, J. S. & Linhardt, R. J. (2012). Recent advances in sulfotransferase enzyme activity assays. *Anal. Bioanal. Chem.*, 403, 1491–1500.
98. Pechancová, R., Pluháček, T., Gallo, J., & Milde, D. (2018). Study of chromium species release from metal implants in blood and joint effusion: Utilization of HPLC-ICP-MS. *Talanta*, 185, 370–377.

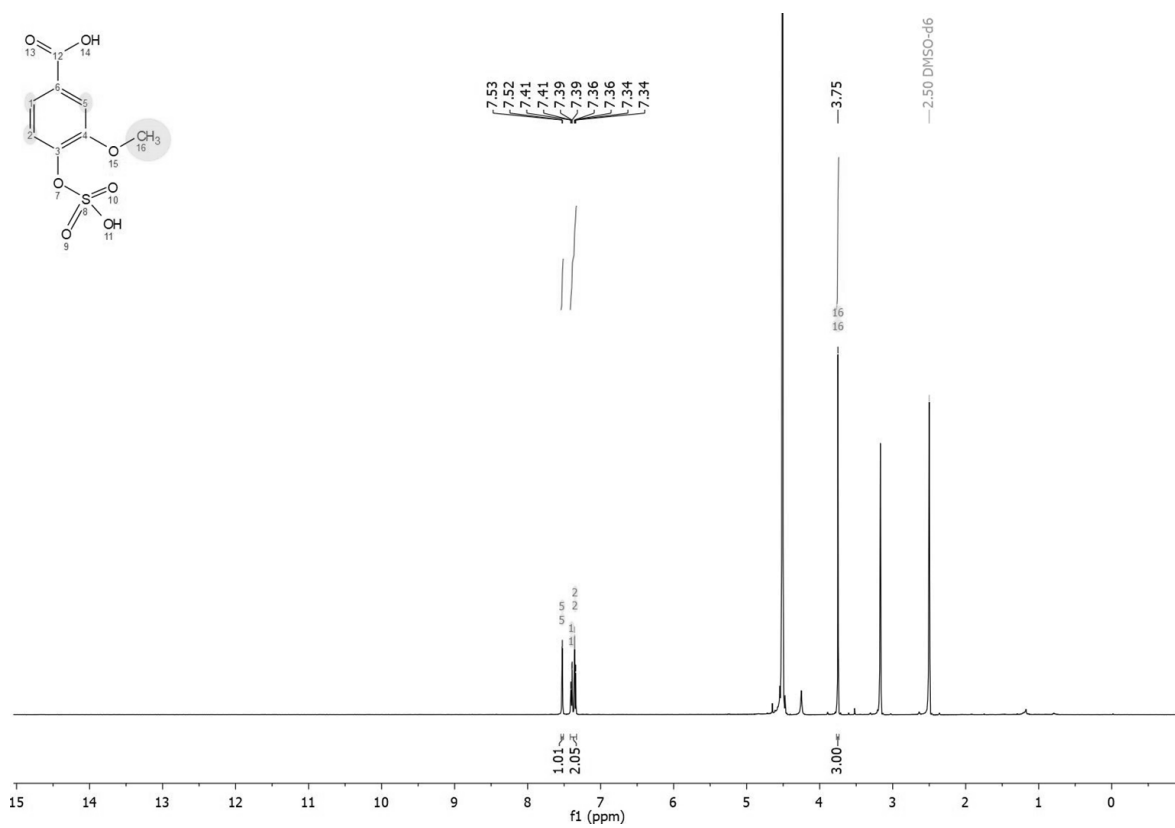
99. Phenol-Explorer: Database on Polyphenol Content in Foods, ver. 3.6; on-line web: <http://phenol-explorer.eu/>
100. Pluháček, T. (2017). Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v metabolomice a forenzní analýze. Olomouc. Disertační práce (Ph.D). Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce prof. Ing. Vladimír Havlíček, Dr.
101. PubChem (NIH), web on-line: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
102. Quackenbush, R. C., Bunn, D., & Lingren, W. (1986). HPLC determination of phenolic acids in the water-soluble extract of *Zostera marina* L. (eelgrass). *Aquatic Botany*, 24(1), 83–89.
103. Raghuraman, A., Riaz, M., Hindle, M., & Desai, U. R. (2007). Rapid and efficient microwave-assisted synthesis of highly sulfated organic scaffolds. *Tetrahedron letters*, 48(38), 6754–6758.
104. Rhee, M.H. & Roh, S. S. (2017). Persicarin isolated from *Oenanthe javanica* protects against diabetes-induced oxidative stress and inflammation in the liver of streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *Experimental and therapeutic medicine*, 13(4), 1194–1202.
105. Rochat, B. (2012). We are IntechOpen , the world' s leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists. Chapter: Quantitative and Qualitative LC-High-Resolution MS: The Technological and Biological Reasons for a Shift of Paradigm. IntechOpen, i(tourism), 13.
106. Rouleau, M., Marsolais, F., Richard, M., Nicolle, L., Voigt, B., Adam, G., Adam, G., & Varin, L. (1999). Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*. *J Biol Chem.*, 274, 20925–20930.
107. Sakai, M. & Sato, Y. (1971). Metabolic conversion of the nereistoxin-related compounds into nereistoxin as a factor of their insecticidal action. In Abstracts 2nd Int Congr Pestic Chem Tel Aviv.
108. Sanda, S., Leustek, T., Theisen, M.J., Garavito, R.M. & Benning, C. (2001). Recombinant *Arabidopsis* SQD1 converts udp-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose in vitro, *J. Biol. Chem.*, 276 (6), 3941–3946.
109. Shinbo, Y., Nakamura, Y., Altaf-Ul-Amin, M., Asahi, H., Kurokawa, K., Arita, M., Saito, K., Ohta, D., Shibata, D. & Kanaya, S. (2006). KNApSACk: a comprehensive species–metabolite relationship database. *Biotechnol. Agric. For.*, 57, 165–181.
110. Shriver, A. (2010). Inorganic Chemistry, Fifth Edition. W. H. Freeman and Company, New York, 2010, 416.

111. Shvetsova, S. V., Zhurishkina, E. V., Bobrov, K. S., Ronzhina, N. L., Lapina, I.M., Ivanen, D.R., Gagkaeva, T.Y. & Kulminskaya, A.A. (2015). The novel strain *Fusarium proliferatum* LE1 (RCAM02409) produces α -L-fucosidase and arylsulfatase during the growth on fucoidan. *J Basic Microbiol*, 55(4), 471–9.
112. Schindler, G., Patzak, U., Brinkhaus, B., von Nieciecki, A., Wittig, J., Krähmer, N., Veit, M. (2002). Urinary Excretion and Metabolism of Arbutin after Oral Administration of *Arctostaphylos uvae ursi* Extract as Film-Coated Tablets and Aqueous Solution in Healthy Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(8), 920–927.
113. Schlager, N., Weisblatt, J. & Newton, D. E (2006). Chemical compounds. *Thomson Gale*. ISBN 1414404670.
114. Schmid, K. M., & Ohlrogge, J. B. (1996). Lipid metabolism in plants. *New Comprehensive Biochemistry*, 363–389.
115. Sonderby, I.E., Geu-Flores, F., & Halkier, B.A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond, *Trends Plant Sci.*, 15(5), 283–290.
116. Sosulski F., Krygier K., Hogge L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 337–340.
117. Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, K., Yokota, T., Cavin, C., Steiling, H., Williamson, G. & Crozier, A. (2009). Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metab. Dispos.*, 37, 1749–1758.
118. Strott, C. A. (2002). Sulfonation and molecular action, *Endocrine Reviews*, 23(5), 703–732.
119. Suarez, M., Romero, M.P., Macia, A., Valls, R.M., Fernandez, S., Sola, R. & Motilva, M.J. (2009). Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass sp. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877, 4097–106.
120. Supíková, K. (2018). Studium biosyntézy benzoových kyselin v rostlinách pomocí izotopově značených prekurzorů. Olomouc. Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
121. Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., & Hell, R. (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 62, 157–184.

122. Taylor, L. P. & Grotewold, E. (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 317–323.
123. Teles, Y. C. F., Souza, M. S. R. & Souza, M. F. V. (2018). Sulphated flavonoids: biosynthesis, structures, and biological activities., *Molecules*, 23, 480.
124. The Human Metabolome Database, web on-line: <https://hmdb.ca/>
125. Thoms, C., Schupp, P.J., (2008). Activated chemical defense in marine sponges – a case study on *Aplysinella rhax*. *J. Chem. Ecol.*, 34, 1242–1252.
126. Tibbs, Z. E., Rohn-Glowacki, K. J., Crittenden, F., Guidry, A. L. & Falany, C. N. (2015). Structural plasticity in the human cytosolic sulfotransferase dimer and its role in substrate selectivity and catalysis, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30(1), 3-20.
127. Tomás-Barberán, F. A., Harborne, J. B. & Self, R. (1987). Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *L. canescens*., *Phytochemistry*, 26, 2281–2284.
128. Truchet G., Roche P., Lerouge P., Vasse J., Camut S., de Billy F., Promé J.-C. & Dénarié J. (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*, 351, 670–673.
129. Van der Horst, M. A., Hartog, A. F., El Morabet, R., Marais, A., Kircz, M., & Wever, R. (2015) Enzymatic sulfation of phenolic hydroxy groups of various plant metabolites by an arylsulfotransferase. *European Journal of Organic Chemistry*, 2015(3), 534–541.
130. Van Rymentant, E., Van Camp, J., Boydens, C., Vanden Daele, L., Beerens, P., Brouckaert, P., Smagge, G., Kerimi, A., Williamson, G., Grootaert, C. & Van der Voorde, J. (2017). Ferulic acid-4-O-sulfate rather than ferulic acid relaxes arteries and lowers blood pressure in mice. *J. Nutr. Biochem.*, 44, 44 –51.
131. Varin, L., DeLuca, V., Ibrahim, R. K., & Brisson, N. (1992). Molecular characterization of two plant flavonol sulfotransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(4), 1286–1290.
132. Varin, L., Chamberland, H., Lafontaine, J. G., & Richard, M. (1997). The enzyme involved in sulfation of the turgorin, gallic acid 4-O-(β -D-glucopyranosyl-6'-sulfate) is pulvini-localized in *Mimosa pudica*, *Plant Journal*, 12(4), pp. 831–837.
133. Velleman, S. G., & Liu, C. (2005). Chapter 2. In *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate: Considerations for Surface Immobilisation of HS/Heparin Saccharides and Monitoring Their Interactions with Binding Proteins*.
134. Volpi, N. (2006). Therapeutic applications of glycosaminoglycans. *Current Medicinal Chemistry*, 13(15), 1799–1810.

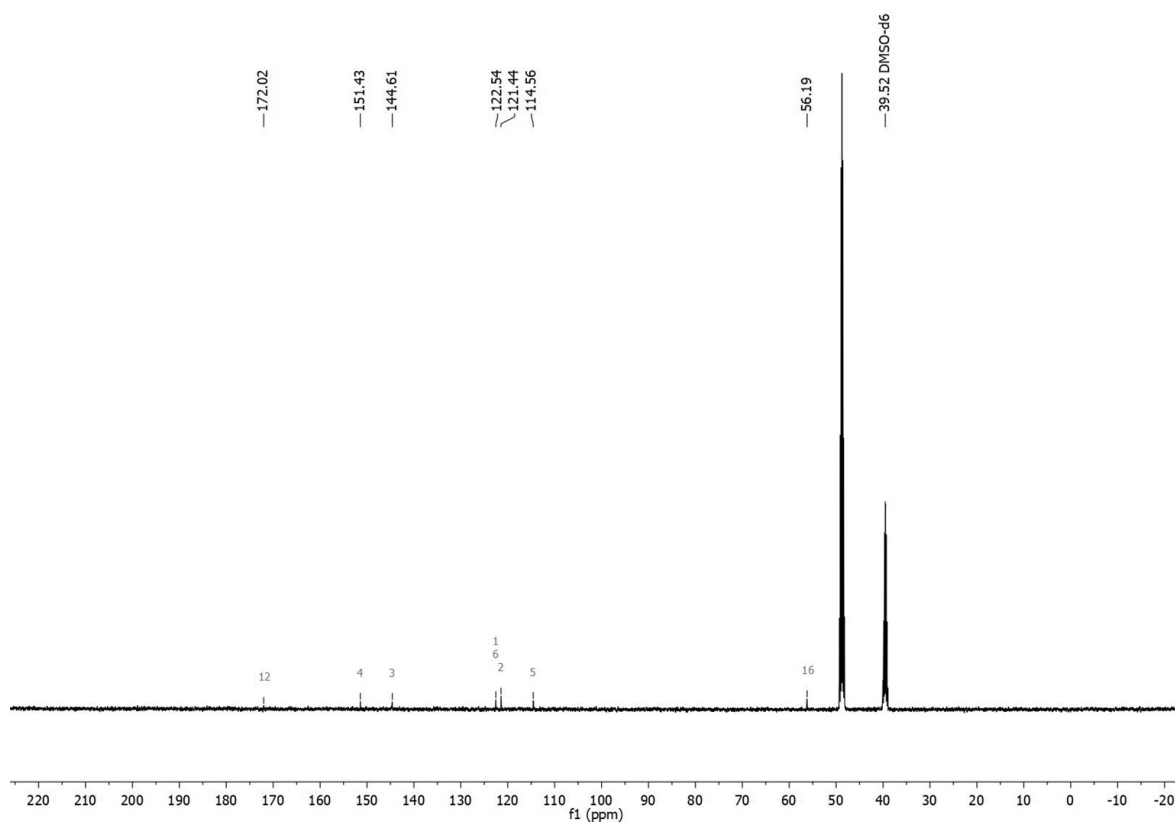
135. Votava, M. (2005). Lékařská mikrobiologie obecná. 2. přeprac. vyd. Brno: *Neptun*, 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
136. Welling, M., Pohnert, G., Kupper, F.C., & Ross, C. (2009). Rapid biopolymerisation during wound plug formation in green algae. *J. Adhes.*, 85, 825–838.
137. Williamson, G., & Clifford, M.N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *Br J Nutr*, 104, S48–S66.
138. Xue, D. X., Wang, J. D., & Guo, Y. W. (2008). A new sulphated nor-sesquiterpene from mangrove *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. *F. J Asian Nat Prod Res.*, 10(3-4), 367–71.
139. Yao, Y., Sang, W., Zhou, M., & Ren, G. (2010). Phenolic Composition and Antioxidant Activities of 11 Celery Cultivars. *Journal of Food Science*, 75(1), C9–C13.
140. Yun, B. R., Yang, H. J., Weon, J. B., Lee, J., Eom, M. R., & Ma, C. J. (2016). Simultaneous Determination of Eight Bioactive Compounds in *Dianthus superbus* by High-performance Liquid Chromatography. *Pharmacognosy magazine*, 12(Suppl 2), S264–S269.
141. Zamek-Gliszczyński, M. J., Hoffmaster, K. A., Nezasa, K., Tallman, M. N., & Brouwer K. L. (2006). Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 27(5), 447–86.

Příloha 1



Obr. 35 ¹H NMR spektrum kyseliny vanilové 4-sulfát; (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 3.75 (s, 3H), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H) ppm.

Příloha 2



Obr. 36 ^{13}C NMR spektrum kyseliny vanilové 4-sulfát; (126 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) $\delta = 56.2, 114.6, 121.5, 122.55, 122.57, 144.6, 151.4, 172.0$ ppm.