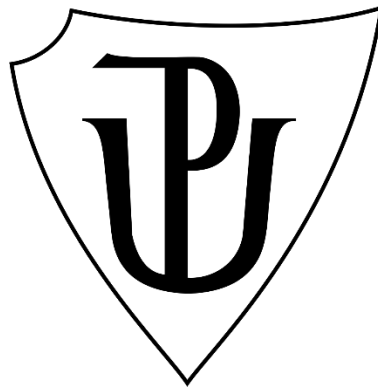


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Vývoj metody superkritické fluidní chromatografie
ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro
analýzu kyselých fytohormonů v rostlinném materiálu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Kateřina Smolková
Studijní program: N0512A130007 Biotechnologie a genové
inženýrství
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: PharmDr. Jitka Šířoká, Ph.D.
Rok: 2024

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

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své diplomové práce PharmDr. Jitce Široké, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Ivanu Petříkovi za odborné vedení práce a pomoc při zpracování dat, za jejich čas a cenné rady, trpělivost a ochotu při zpracování diplomové práce. Vypracování této diplomové práce bylo podpořeno grantem IGA-PrF-2024_013, 22-17435S.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Smolková
Název práce	Vývoj metody superkritické fluidní chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro analýzu kyselých fytohormonů v rostlinném materiálu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, LRR
Vedoucí práce	PharmDr. Jitka Šíroková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Kyselé fytohormony jsou malé molekuly řídící mnoho fyziologických funkcí v rostlinách. Kvantifikace těchto látek, jejich biosyntetických prekurzorů a metabolitů v rostlinných pletivech přispívá k pochopení biochemických procesů odehrávajících se v rostlinách. V diplomové práci byla pro tuto analýzu zvolena metoda superkritické fluidní chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (SFC-MS/MS). Cílem této práce byl vývoj metody SFC-MS/MS pro separaci kyselých fytohormonů s ohledem na citlivost detekce, rozlišení a tvar chromatografických píků. Optimalizace zahrnovala výběr stacionární fáze a složení nástřikového objemu. Pro optimalizaci chromatografických podmínek byl použit komplexní přístup experimentálního návrhu, který zahrnoval vliv těchto faktorů: složení mobilní fáze, výběr aditiv a jejich koncentrace, optimalizace gradientové eluce a dalších parametrů, jako je teplota kolony nebo hodnota zpětného tlaku. V této práci byla vytvořena SFC-MS/MS metoda pro analýzu kyselých fytohormonů. Metoda byla aplikována na stanovení kyselých fytohormonů v mechanicky stresovaných rostlinách *Arabidopsis thaliana* s cílem ukázat změny jejich hladin v poraněných a vzdálených listech v průběhu času.

Klíčová slova	kyselé fytohormony, superkritická fluidní chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie, návrh experimentu, <i>Arabidopsis thaliana</i>
Počet stran	67
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Kateřina Smolková
Title	Development of a supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of acidic phytohormones in plant material
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of growth regulators, LRR
Supervisor	PharmDr. Jitka Šíroká, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

Acidic phytohormones are small molecules that control many physiological functions in plants. Quantification of these compounds as well as their biosynthetic precursors and metabolites in plant tissues contributes to the understanding of biochemical processes occurring in plants. In diploma thesis, supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (SFC-MS/MS) was chosen for this analysis. The aim of this work was to develop an SFC-MS/MS method for the separation of acidic phytohormones with respect to detection sensitivity, resolution and shape of chromatographic peaks. The optimization included the selection of the stationary phase and the composition of the injection volume. A comprehensive experimental design approach was used to optimize chromatographic conditions, which included the influence of the following factors: mobile phase composition, additive selection and concentration, optimization of gradient elution and other parameters such as column temperature or backpressure value. In this work, an SFC-MS/MS method was developed for the analysis of acidic phytohormones. The method was applied to the determination of acidic phytohormones in mechanically stressed *Arabidopsis thaliana* plants to show changes in their levels in wounded and distal leaves over time.

Keywords	acidic phytohormones, supercritical fluid chromatography, tandem mass spectrometry, design of experiment, <i>Arabidopsis thaliana</i>
Number of pages	67
Number of appendices	2
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1 Kyselý rostlinný hormony	3
2.1.1 Abscisáty	3
2.1.2 Auxiny	5
2.1.3 Jasmonáty	7
2.1.4 Kyselina salicylová	10
2.2 Analýza fytohormonů.....	11
2.2.1 Biotesty	12
2.2.2 Imunotesty	12
2.2.3 Kapilární elektroforéza.....	13
2.2.4 Plynová chromatografie	13
2.2.5 Kapalinová chromatografie.....	13
2.3 Superkritická fluidní chromatografie	14
2.3.1 Mobilní fáze	15
2.3.2 Stacionární fáze.....	17
2.3.2.1 Nepochární stacionární fáze.....	18
2.3.2.2 Polární stacionární fáze	18
2.3.3 Kolony pro stacionární fáze	18
2.3.4 Instrumentace SFC	18
2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie	20
2.5 Plánování experimentu.....	21
2.5.1 Jeden faktor v čase	22
2.5.2 Experimentální návrh	22
2.5.2.1 Plně faktoriální návrh.....	23
2.5.2.2 Frakční faktoriální návrh.....	23

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Přístrojové vybavení, pomůcky a software	24
3.1.1 SFC-MS/MS analýza	24
3.1.2 Příprava vzorku	24
3.1.3 Software	25
3.2 Chemikálie	25
3.2.1 Standardy	25
3.2.2 Použité mobilní fáze.....	26
3.2.3 Použité pracovní roztoky.....	27
3.3 Rostlinný materiál	27
3.4 Metody	28
3.4.1 Vývoj SFC-MS/MS metody.....	28
3.4.1.1 MS/MS podmínky.....	28
3.4.1.2 Optimalizace nástřikového objemu.....	30
3.4.1.3 Výběr stacionární fáze – základní testování.....	30
3.4.1.4 Frakční DoE pro optimalizaci chromatografických podmínek.....	31
3.4.2 Příprava vzorku k SFC-MS/MS analýze.....	33
3.4.2.1 Extrakce fytohormonů z rostlinného materiálu.....	33
3.4.2.2 MikroSPE purifikace.....	34
3.4.3 Kalibrační řada	35
3.4.4 Statistické zpracování dat.....	38
4 VÝSLEDKY	39
4.1 Optimalizace nástřikového objemu.....	39
4.2 Výběr vhodné stacionární fáze – základní testování.....	40
4.3 Frakční DoE kolona Torus 1-AA.....	41
4.4 Frakční DoE kolona Viridis HSS C ₁₈ SB.....	42
4.5 Vytvořená SFC-MS/MS metoda.....	43

4.6	Porovnání SFC metody s LC	45
4.7	Analýza kyselých fytohormonů v mechanicky stresovaných rostlinách <i>A. thaliana</i> 46	
5	DISKUSE.....	50
5.1	Nástřik vzorku.....	50
5.2	Výběr stacionární fáze.....	50
5.3	DoE	50
5.4	Porovnání SFC s LC	51
5.5	Analýza kyselých fytohormonů v mechanicky stresovaných rostlinách <i>A. thaliana</i> 51	
6	ZÁVĚR	53
7	LITERATURA.....	54
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	64
9	SEZNAM PŘÍLOH.....	67

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- Připravit literární rešerši na téma související s experimentální částí.

Praktická část

- Vývoj metody superkritické fluidní chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (SFC-MS/MS) pro selektivní separaci kyselých rostlinných hormonů s ohledem na citlivost detekce, rozlišení a tvar chromatografických píků:
 - výběr vhodné stacionární fáze
 - optimalizace složení mobilní fáze: výběr aditiv a jejich koncentrace
 - optimalizace gradientové eluce
 - optimalizace složení rozpouštědla vzorku a nástřikového objemu
 - optimalizace dalších parametrů, které mají vliv na chromatografii (např., teplota, tlak)
- Experiment: Použití metody SFC-MS/MS k analýze kyselých fytohormonů v mechanicky stresovaných rostlinách *Arabidopsis thaliana* s cílem ukázat změny jejich hladin v poraněných listech a ve vzdálených listech v průběhu času.

1 ÚVOD

Kyselé fytohormony jako jsou auxiny, jasmonáty, abscisáty, salicylová kyselina a jejich deriváty jsou strukturálně rozmanité signální molekuly regulující růst, vývoj a imunitu rostlin (Davies, 2010). Pro analýzu kyselých fytohormonů již bylo použito několik metod, jako jsou například biotesty, imunotesty, kapilární elektroforéza, plynová chromatografie nebo kapalinová chromatografie (LC). Podle literatury pro analýzu kyselých fytohormonů však ještě superkritická fluidní chromatografie (SFC) použita nebyla.

V poslední době je SFC značně se vyvíjející separační technikou, a to zejména díky zlepšení v instrumentaci SFC vedoucímu k vyšší spolehlivosti a robustnosti systému (Pilařová et al., 2019). SFC využívá superkritický oxid uhličitý jako mobilní fázi, který lze smíchat s organickým modifikátorem, kterým je většinou alkohol, například metanol. Přídavkem modifikátoru a jiných aditiv lze zvýšit sílu eluce, zlepšit tvary píků a separační selektivitu. Díky možnosti analyzovat širokou škálu chemicky odlišných látek (polární i nepolární, chirální i achirální látky) je SFC v řadě případů lepší volbou než LC (Liu et al., 2020).

Superkritická tekutina je látka, která má vlastnosti plynu a tekutiny zároveň. Vlastnosti plynu se projevují tím, že je to stlačitelná tekutina. A vlastnosti tekutiny se projevují podobnou hustotou a solvatační silou (Hitchen & Dean, 1993). Hlavními výhodami SFC jsou vysoká účinnost separace souběžně s nižšími hodnotami zpětného tlaku, krátká doba analýzy, separační mechanismus ortogonální k LC a šetrnost k životnímu prostředí, díky menší spotřebě organického rozpouštědla (Pilařová et al., 2019). SFC má ale také některé limitace, jako je nutnost optimalizace více operačních parametrů, velký efekt rozpouštědla, a přídavek vody pouze do 5% (M. Chen et al., 2022).

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická detekční metoda, jejíž princip spočívá v přeměnění molekul na ionty, které rozdělí podle poměru jejich hmoty k náboji (m/z), a poté zaznamenává jejich intenzity. Trojitý kvadrupól je tandemová MS metoda (MS/MS), kde první a třetí kvadrupól slouží jako filtr hmoty, a druhý zprostředkovává fragmentaci analytu skrze interakci s kolizním plynem. Touto metodou lze tedy získat kvalitativní ale i kvantitativní informace (Guan & Eichler, 2011).

Návrh experimentu je vhodným nástrojem pro optimalizaci vícerozměrných systémů, jako je například SFC-MS/MS. Jedná se o chemometrický přístup, který se používá ke

studiu vlivu každého experimentálního faktoru současně na různých úrovních s předem definovaným počtem experimentů, který přihlíží ke všem možným interakcím mezi faktory. Proces optimalizace těchto metod zahrnuje mnoho experimentálních faktorů, které je třeba současně optimalizovat, aby se dosáhlo maximální citlivosti a rozlišení při minimálním retenčním čase (Thorsteinsdóttir & Thorsteinsdóttir, 2021).

Tato diplomová práce se věnuje vývoji a optimalizaci SFC-MS/MS metody pro analýzu vybraných kyselých fytohormonů a následnému aplikování metody na vzorky mechanicky poraněných listů rostlin *Arabidopsis thaliana*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Kyselé rostlinné hormony

Rostlinné hormony (fytohormony) jsou signální molekuly důležité pro regulaci růstu a vývoje rostlin a zprostředkovávají odpovědi na biotické a abiotické stresy (Y. Liu et al., 2019). Obecně jsou jejich endogenní hladiny v rostlinách velice nízké (fmol-pmol·g⁻¹ čerstvé hmotnosti), avšak při reakci na stres se mohou mnohonásobně zvýšit. Obecně, dostupnost těchto hormonů a jejich biologická aktivita závisí na rychlosti biosyntézy a metabolismu, a také na buněčné lokalizaci, transportu, vnímání a transdukci signálu (Davies, 2010).

Kyselé fytohormony jsou strukturně rozmanité sloučeniny (indoly, cyklopentanony/cyklopentenony, izoprenoidy i fenolické látky) obsahující volnou či substituovanou kyselou (karboxylovou) funkční skupinu (např., estery, amidy). Mezi rostlinné hormony kyselé povahy se řadí auxiny (AUX), jasmonáty (JAs), abscisáty (ABAs), salicyláty a gibereliny (GAs; Jiang et al., 2020). Funkce jednotlivých fytohormonů v různých vývojových procesech je převážně specifická. Avšak regulace pomocí fytohormonů bývá často komplexní proces, který zahrnuje interakce mezi různými třídami fytohormonů (Vanstraelen & Benková, 2012). Je tedy důležitá možnost jejich přesné kvantifikace v rostlinách, aby bylo možné studovat hormonální funkce, signální dráhy hormonů a jejich propojení s ostatními třídami hormonů (Cai et al., 2019).

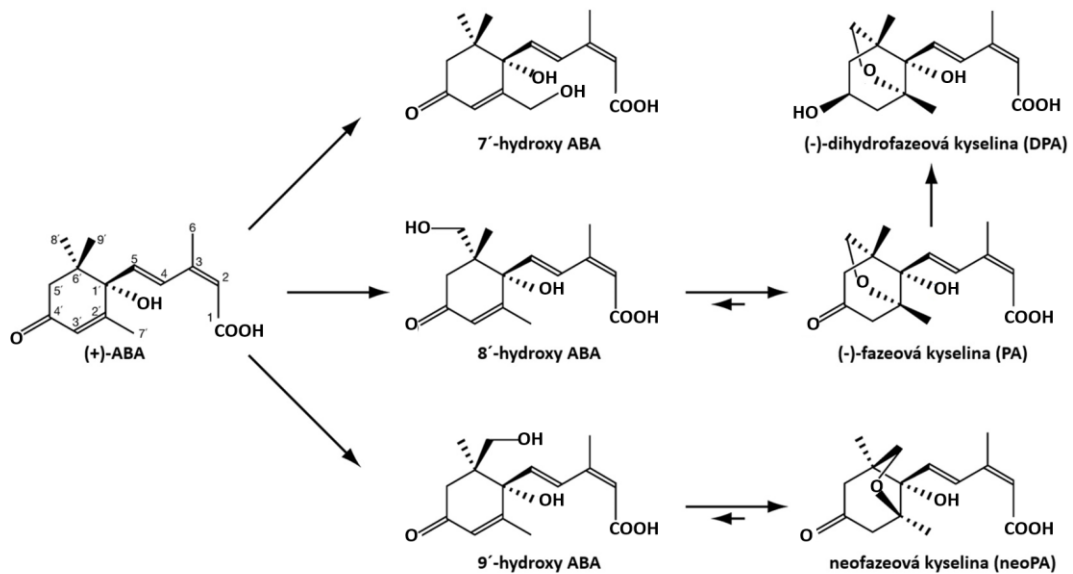
2.1.1 Abscisáty

Kyselina abscisová (ABA) patří do skupiny metabolitů známých jako izoprenoidy, nazývané také terpenoidy. ABA je syntetizována v plastidech z prekursoru s pěti uhlíky (C5), isopentenylidifosfátu, který je syntetizován 2-C-metyl-d-erythritol-4-fosfátovou (MEP) dráhou (Eisenreich et al., 2004; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002). V rostlinách ABA vzniká štěpením karotenoidů C40 (zeaxanthin, resp. violaxanthin) pocházejících z MEP dráhy. Štěpením těchto karotenoidů vzniká xanthoxin, který je dále dvakrát oxidován za vzniku ABA (HIRAI et al., 2000; Nambara & Marion-Poll, 2005).

ABA je přítomna v různých pletivech a orgánech, kde se podílí na regulaci mnoha aspektů růstu a vývoje rostlin, jako je dormance semen, stárnutí listů, pohyb prùduchů, a stresové reakce rostlin (Wu et al., 2023). Hladiny ABA v buňkách jsou také indukovány environmentálními stimuly, jako je světlo, voda, sucho a stres ze slanosti (Cutler &

Krochko, 1999). Regulace metabolismu ABA závisí na vnitřních a vnějších signálech, ale i na vývojových stádiích, orgánech nebo pletivech (Nambara & Marion-Poll, 2005).

Metabolismus ABA je z části závislý od prostředí, ve kterém se rostlina nachází. Za nepříznivých podmínek (abiotický stres) je zvýšena *de novo* biosyntéza ABA a některé její konjugáty mohou být přeměněny zpět na ABA (Kumar et al., 2022). Za příznivých podmínek je ABA biologicky inaktivována na neaktivní formu prostřednictvím hydroxylačních a konjugačních drah (L. M. Ng et al., 2014). Existují tři různé cesty pro hydroxylaci ABA (Obr. 1), které oxidují jednu z metylových skupin na kruhu v pozicích C-7', C-8' nebo C-9'.7'-hydroxy ABA (7-OH-ABA) se vyskytuje pouze jako minoritní metabolit. Hydroxylace v poloze C-8' se běžně považuje za nejčastější metabolickou dráhu ABA a je tak údajně hlavním regulačním krokem v mnoha fyziologických dějích, které jsou řízené ABA. V souladu s touto dráhou jsou jejími nejhojnějšími metabolity (-)-kyselina fazeová (PA) a kyselina (-)-dihydrofazeová (DPA). PA vzniká izomerací 8'-hydroxy-ABA a je poté redukována na DPA. ABA je v průběhu metabolismu postupně biologicky inaktivována. 9'-hydroxy ABA spolu s jejím izomerem kyselinou neofazeovou (neoPA) se vyskytují v nezralých semenech *Brassica napus*, nebo také v jiných rostlinných druzích, jako je hrách, pomeranč, ječmen a *Arabidopsis* (Nambara & Marion-Poll, 2005; Zhou et al., 2004). Inaktivace ABA je také zprostředkována konjugací ABA s glukosou za vzniku ABA glukosového esteru (ABA-GE). Při abiotickém stresu je ABA-GE enzymaticky přeměněna zpět na ABA (Xu et al., 2012). Je také předpokládána konjugace ABA s aminokyselinami, ovšem tento předpoklad byl zatím studován pouze *in vitro* (Todoroki et al., 2011). Podle dostupné literatury tyto konjugáty v rostlinném materiálu zatím nebyly identifikovány.



Obrázek 1. Metabolické dráhy ABA. Zobrazeny jsou tři různé hydroxylační cesty. Upraveno z (Nambara & Marion-Poll, 2005).

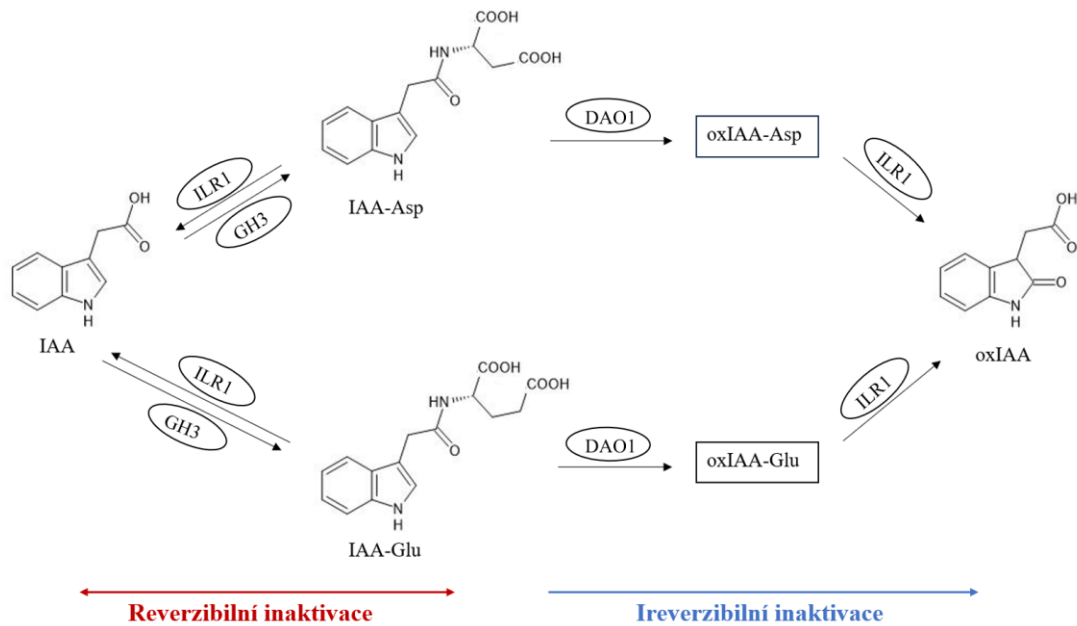
2.1.2 Auxiny

Auxiny (AUX) jsou indolové sloučeniny, prekurzory a metabolity bioaktivní kyseliny 2-(1*H*-indol-3-yl)octové (IAA), která je klíčová pro regulaci téměř každého aspektu růstu a vývoje během života rostlin (Casanova-Sáez et al., 2021). Auxin byl identifikován jako rostlinný růstový hormon kvůli své schopnosti přispět ke změně růstu rostliny v reakci na gravitační nebo světelné podněty. IAA je hlavní přirozeně se vyskytující auxin v rostlinách (Zhao, 2010). Pouze 25 % IAA je přítomno jako volná IAA v závislosti na pletivu a rostlinném druhu (Ludwig-Müller, 2011). Lokální biosyntéza IAA hraje zásadní roli v mnoha vývojových procesech včetně gametogeneze, embryogeneze, růstu semenáčků a vývoje květů (Zhao, 2010).

Biosyntéza IAA v rostlinách je poměrně složitá. Je pravděpodobné, že k *de novo* produkci IAA přispívá více cest, dosud však nebyla pevně stanovena úplná cesta *de novo* biosyntézy IAA v rostlinách (Zhao, 2010). Tryptofan (Trp) je hlavním prekurzorem syntézy IAA v rostlinách a bakteriích produkujících IAA. Trp-dependentní biosyntéza IAA zahrnuje paralelní dráhy a jejich meziprodukty (např. indol-3-acetaldoxim, indol-3-acetamid, kyselina indol-3-pyrohroznová), které vedou k produkci IAA (Casanova-Sáez & Voß, 2019). Kromě popsaných biosyntetických drah IAA závislých na Trp mohou k homeostáze IAA přispívat také biosyntetické dráhy nezávislé na Trp, ovšem tyto dráhy

zatím nejsou zmapovány (Normanly et al., 2010). Ačkoli je IAA syntetizována hlavně v listových primordiích a mladých listech, může být produkována i v různých pletivech výhonků a kořenů. Lokální biosyntéza IAA spolu s polárním transportem je nezbytná pro vytváření AUX gradientů během vývoje rostlin (Brumos et al., 2018). IAA může být také uvolněna ze svých konjugátů hydrolytickým štěpením (Zhao, 2010).

Většina buněčné IAA je inaktivována tvorbou přechodných zásobních forem nebo nevratnou degradací. V různých rostlinných druzích bylo identifikováno několik neaktivních forem IAA, z nichž některé lze převést zpět na volnou IAA, čímž je vyvažován gradient IAA (Korasick et al., 2013). IAA v rostlinných buňkách je převážně přítomna v konjugovaných formách, obvykle s aminokyselinami nebo cukry. Metabolismus IAA může být buď reverzibilní prostřednictvím tvorby [2-(1*H*-indol-3-yl)acetyl]aspartátu (IAA-Asp) a [2-(1*H*-indol-3-yl)acetyl]glutamátu (IAA-Glu). Tato konjugace s aminokyselinami je zprostředkována rodinou enzymů Gretchen Hagen 3 (GH3 IAA amidosyntetasy; Obr. 2; Staswick et al., 2005; Hayashi et al., 2021). IAA-Asp a IAA-Glu jsou zásobní formy IAA a mohou být konvertovány zpět na IAA pomocí IAA-LEUCINE RESISTANT1 (ILR1) amidohydrolas (Hayashi et al., 2021). Dioxigenasa pro oxidaci auxinu 1 (DAO1) nevratně oxiduje IAA-Asp a IAA-Glu na [2-(2-oxindol-3-yl)acteyl]aspartát a [2-(2-oxindol-3-yl)acteyl]glutamát, které jsou následně hydrolyzovány enzymem ILR1 na neaktivní 2-(2-oxindol-3-yl)-octovou kyselinu (oxIAA; Obr. 2; Hayashi et al., 2021; K. Müller et al., 2021). Tato dráha je navržena jako hlavní cesta inaktivace IAA a je proto klíčovým mechanismem přispívajícím k homeostáze AUX u *Arabidopsis* (Hayashi et al., 2021).



Obrázek 2. Metabolismus IAA. Zásobní (reverzibilní inaktivace) a degradační formy IAA (ireverzibilní inaktivace). DAO1 –dioxygenasa pro oxidaci AUX 1, GH3 - gretchen hagen 3 amidosyntetasa katalyzuje konjugaci IAA na Asp a Glu, ILR1 – ILR amidohydrolasa. Vytvořeno v programu ChemSketch.

2.1.3 Jasmonáty

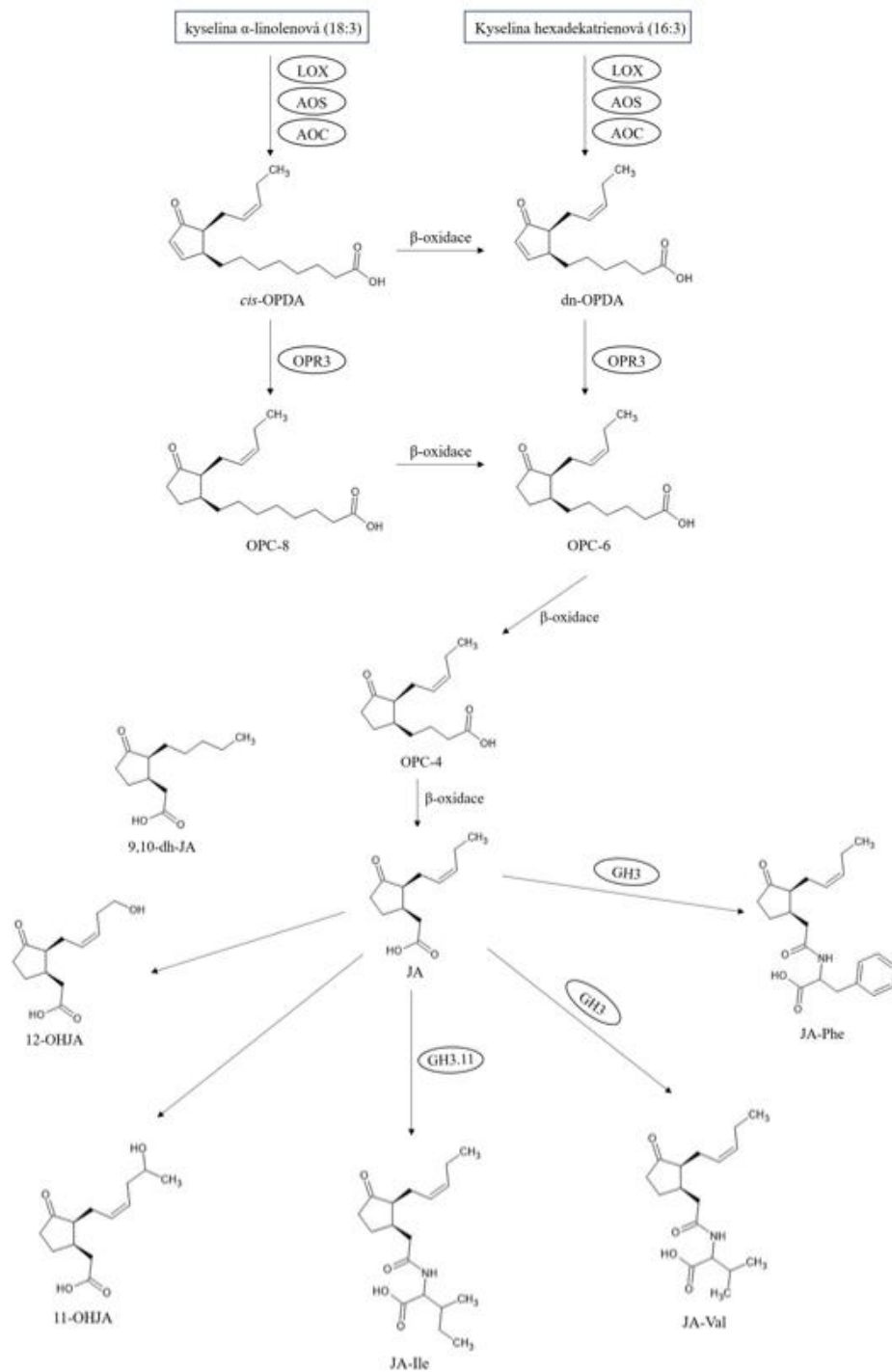
Jasmonáty (JAs), jsou třídou oxylipinových fytohormonů odvozených od polynenasycených mastných kyselin. Hlavním členem této třídy je kyselina jasmonová (JA), dále také její prekurzory a metabolity (Browse, 2009). JAs jsou cyklopentenony nebo cyklopentanony, které jsou syntetizovány v rostlinách v reakci na mechanické poškození nebo na útok nekrotrofních patogenů a býložravců. Reagují také na abiotické stresy, jako je poranění, UV záření, sůl nebo sucho. JAs také přispívají k regulaci růstu rostlin a vývojových procesů (Wasternack & Hause, 2013; Wasternack & Song, 2017).

Biosyntetická dráha JA začíná v chloroplastech, kde z kyseliny α -linolenové (C18:3) nebo analogické 7Z, 10Z, 13Z-hexadekatrienové (C16:3) kyseliny pomocí lipoxygenasy (LOX), alenoxidsynthasy (AOS) a alenoxidcyklasy (AOC) vzniká kyselina *cis*-(+)-12-fytodienoovou (*cis*-OPDA; C18 Obr. 3; Monte, 2023), respektive kyselina dinor-oxo-fytodienová (dn-OPDA; C16; Obr. 3; (Acosta & Farmer, 2010; Dave & Graham, 2012; Weber et al., 1997). *cis*-OPDA a dn-OPDA obsahují cyklopentenonový kruh, jehož dvojná vazba je v peroxisomech redukována OPDA reduktasou 3 (OPR3) za vzniku kyseliny (Z)-8-[3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl]oktanové (OPC-8; z *cis*-OPDA),

respektive kyseliny (Z)-6-[3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl]hexanové (OPC-6; z dn-OPDA). Tyto OPC poté vstupují do 3 nebo 2 cyklů β -oxidace, kde je postranní řetězec zkrácen o 2 uhlíky za vzniku (Z)-4-[3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl]butanové kyseliny (OPC-4) a následně JA (Mik et al., 2023; Monte, 2023).

JA i *cis*-OPDA mohou být konjugovány s aminokyselinami (aa) (JA-Ile; Fonseca et al., 2009) (JA-aa; J. Yan et al., 2016) (*cis*-OPDA-aa; Mik et al., 2023). JA se dále účastní glukosylace, hydroxylace (za vzniku 11-hydroxy a 12-hydroxyjasmonové kyseliny; 11-OH a 12-OHJA), karboxylace, sulfatace a metylace, a vede tak ke tvorbě sloučenin o různé biologické aktivitě (Obr. 3; Wasternack & Strnad, 2016).

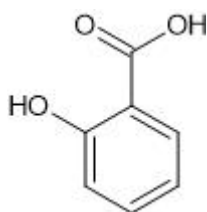
U cévnatých rostlin je za hlavní biologicky aktivní jasmonát považován (+)-7-*iso*-jasmony-L-isoleucin (JA-Ile), který vzniká činností konjugačního enzymu JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1, GH3.11; Obr. 3; Fonseca et al., 2009). JA-Ile interaguje s COI1-JAZ koreceptorovým komplexem a spouští genovou expresi (Howe et al., 2018; Chini et al., 2007, 2016; Sheard et al., 2010). COI1-JAZ komplexy jsou u rostlin konzervovány, ačkoliv vykazují rozdíly ve specifitě ligandu (Chini et al., 2023; Monte et al., 2022). Například u mechorostů mohou být ligandy izomery dn-OPDA jak bylo zjištěno u *Marchantia polymorpha* (Kneeshaw et al., 2022; Monte, 2023; Monte et al., 2018; Wasternack & Song, 2017).



Obrázek 3. Metabolismus JAs. LOX – lipoxygenasa, AOS – allendioxidsynthasa, AOC – allenoxidcyklasa, OPR3 – OPDA reduktasa 3, GH3 - gretchen hagen 3 amidosyntetasa, GH3.11 (JAR1 -syntetasa jasmonoyl-L-aminokyseliny). Vytvořeno v ChemSketch.

2.1.4 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (SA; Obr. 4) je fytohormon, který reguluje termogenezi, stárnutí, buněčný růst, ale nejznámější je pro svou významnou roli v různých aspektech imunity rostlin (Zhang & Li, 2019). SA je důležitý regulátor systémově získané rezistence, což je typ systémové imunity, která chrání neinfikované části rostlin před sekundárními infekcemi způsobenými širokou škálou patogenů (Kachroo et al., 2020). Biosyntéza SA v rostlinách může zahrnovat dvě odlišné cesty, a to isochorismátovou a fenylalanin-amonium-lyázovou dráhu (Lefevre et al., 2020). K biosyntéze SA je u obou drah zapotřebí chorismát, což je produkt šikimátové dráhy (Ding & Ding, 2020). Metabolismus kyseliny salicylové zahrnuje hydroxylaci (Zhang et al., 2017), glykosylaci (Vaca et al., 2017), konjugaci s aminokyselinami (SA-Aspartát; Y. Chen et al., 2013) nebo metylaci karboxylové skupiny (Gao et al., 2015). Předpokládá se i možnost sulfonace hydroxyskupiny SA, tyto deriváty však ještě nebyly v rostlinách identifikovány (Ding & Ding, 2020).



Obrázek 4. Chemická struktura SA. Vytvořeno v programu ChemSketch.

2.2 Analýza fytohormonů

Údaje o koncentracích hormonů odrážejí procesy probíhající v rostlinách a nabízejí tak důležitý pohled do fyziologie rostlin. A proto nové poznatky související s funkcemi fytohormonů a jejich regulací do značné míry závisí na přesné kvantifikaci fytohormonů v rostlinách. Vzhledem k širokému rozsahu fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých tříd hormonů a nízkého obsahu ve vzorcích rostlin je současné stanovení více tříd fytohormonů náročné, zejména ve velmi drobných rostlinných pletivech nebo orgánech (Tarkowská et al., 2014). Každá třída rostlinných hormonů má charakteristické biologické účinky a většina rostlinných hormonů se účastní mnoha různých procesů během růstu a vývoje rostlin. Jednotlivé třídy hormonů většinou nepůsobí samostatně, ale jejich účinek při odpovědi na stres závisí na vzájemném působení. S rozvojem analytických technik jsou k dispozici stále přesnější a citlivější metody stanovení rostlinných hormonů (Du et al., 2012).

Bez ohledu na to, jak citlivé a přesné jsou moderní analytické přístroje, je často třeba vývoj účinné metody přípravy vzorku vedoucí k odstranění nebo snížení obsahu interferující matrice a zakoncentrování analytů, protože fytohormony jsou v rostlině obvykle přítomny ve velice nízkých koncentracích a rostlinné matrice vzorků jsou složité. Metody přípravy vzorku před analýzou fytohormonů zahrnují extrakci na pevné fázi, extrakci kapalinou, a jejich miniaturizované varianty (Wang et al., 2017). Když je připravován vzorek z rostlinných pletiv pro analýzu fytohormonů, je před extrakcí zapotřebí provést homogenizaci rostlinného materiálu. Při homogenizaci jsou porušeny buněčné stěny v pletivech a je tak umožněna migrace přítomných fytohormonů do extrakčního rozpouštědla (Harrison, 2011). Pro extrakci je k rozemletému materiálu přidáno extrakční rozpouštědlo, obvykle metanol (MeOH) nebo acetonitril s vodnými roztoky organických kyselin jako je kyselina mravenčí (FA) nebo octová. Při homogenizaci a extrakci by měl být rostlinný materiál udržován v chladu, zejména proto, aby se zabránilo enzymatické nebo chemické degradaci fytohormonů. K rostlinnému extraktu se často přidávají vnitřní standardy (značené stabilními izotopy), které kompenzují ztráty analytu během purifikace. Purifikace je primárně určena k odstranění části matrice nebo k případnému zakoncentrování analytů. Purifikace může probíhat pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). SPE kolona je plněna sorbentem, který váže rostlinné hormony. Ostatní látky v matrici jsou odstraněny promytím kolony vhodným rozpouštědlem. Fytohormony zadržené na sorbentu jsou následně eluovány vhodným

rozpouštědlem, který naruší vazbu mezi sorbentem a hormony (Du et al., 2012; Tarkowska et al., 2014).

Hladiny fytohormonů mohou být stanoveny pomocí biotestů, imunotestů, ze separačních metod pak kapilární elektroforézou (CE) a zejména chromatografickými separačními metodami, jako je plynová chromatografie (GC), a kapalinová chromatografie (LC) ve spojení s různými detektory (Du et al., 2012). V dnešní době se chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (MS) stala nejúčinnější a nejvýkonnější metodou pro identifikaci a kvantifikaci fytohormonů. Pro kvantifikaci fytohormonů je v současné době hojně využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS; Han et al., 2011; Chiwocha et al., 2003).

2.2.1 Biotesty

Biotest je metoda, která využívá část rostliny (nebo živý organismus) ke stanovení přítomnosti nebo relativní účinnosti chemických látek (např. fytohormonů) (Panuganti, 1970). Poprvé byla tato metoda použita při stanovení AUX (Went, 1928). Biotest byl také použit pro analýzu ABA. Tento test byl založen na inhibici prodloužení hypokotylů okurky (*Cucumis sativus* L.) pomocí ABA. Byly použity řezy 3-denního hypokotylu *C. sativus*, které měly nejdříve inkubační dobu ve tmě 20 hod a poté byly vystaveny světlu na 24 hod. Za těchto podmínek je totiž inhibice prodloužení hypokotylu úměrná ABA koncentraci (Lin et al., 1988). Tato metoda je zaměřena na detekci jedné sloučeniny, je totiž příliš specifická na to, aby umožnila efektivní identifikaci více analytů. Navíc je tato metoda časově náročná. Má špatnou opakovatelnost, není příliš přesná, a proto se již v poslední době ke stanovení převážně nepoužívá (Du et al., 2012; Jiang et al., 2020).

2.2.2 Imunotesty

Imunoanalýza stanovuje koncentrace fytohormonů pomocí afinity mezi antigeny (fytohormony) a specifickými protilátkami. Lze ji použít pouze ke kvantifikaci ve vzorcích s vysokými koncentracemi fytohormonů, protože její citlivost a specificita jsou nízké (Weiler, 1982). Pro analýzu fytohormonů jsou tradičně používány enzymové imunisorbentní testy (enzyme-linked immuno-sorbent assay - ELISA), které jsou komerčně dostupné ve formě kitů. Analýza více tříd rostlinných hormonů zároveň je při této metodě velice náročná (Du et al., 2012).

2.2.3 Kapilární elektroforéza

CE je elektromigrační metoda založena na pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Díky odlišnému principu separace je ortogonální k chromatografickým metodám. CE má mnohostranné využití. Vyznačuje se vysokou separační účinností, minimem organického odpadu, nízkou spotřebou vzorku a chemikálií. V porovnání s LC mezi její nevýhody patří nižší citlivost, hlavně ve spojení se spektrofotometrickou detekcí, a nižší robustnost, zvláště ve spojení s MS detekcí (Lauer & Rozing, 2009). V základním nastavení je vhodná pro analýzy silně polárních nebo nabitých látek (Voeten et al., 2018). Ve spojení s různými detektory je další možnou metodou pro současné stanovení více rostlinných hormonů a příbuzných látek: IAA, ABA, kyselina gibberelová (GA) (CE-MS/MS; (Tan et al., 2014); IAA, GA (CE-UV; (T.-F. Jiang et al., 2006); IAA, ABA, JA (CE-fluorescenční detekce; H. Chen et al., 2011); IAA, ABA, SA, JA, GAs (CE-MS; (M.-L. Chen et al., 2011); ABA (CE-fluorescenční detekce; (X. Liu et al., 2003); ABA, JA, IAA, SA, GA (CE-UV; (Huang et al., 2014).

2.2.4 Plynová chromatografie

GC je separační metoda zvláště vhodná pro analýzu těkavých látek nebo látek, které lze na těkavé převést pomocí derivatizace (např. netěkavé rostlinné hormony), a které jsou stabilní při vysokých teplotách GC gradientů. Spojení GC-MS bylo pro stanovení fytohormonů (GAs) poprvé použito v roce 1969 (Binks et al., 1969). S dalším rozvojem této techniky se GC začínala používat i například pro stanovení IAA (Edlund et al., 1995), JAs (JA, *cis*-OPDA, *dn*-OPDA; (Weber et al., 1997) nebo analýzy více látek zahrnující kyselé fytohormony: IAA, ABA, JA, *cis*-OPDA a SA (A. Müller et al., 2002) nebo IAA, ABA, JA a SA (Schmelz et al., 2003).

2.2.5 Kapalinová chromatografie

LC je oblíbená separační metoda, s vysokým rozlišením, která je již od 70. let široce používaná pro analýzu fytohormonů. V současné době je LC (HPLC a ultraúčinná kapalinová chromatografie - UPLC) ve spojení s MS detekcí nejběžnější používanou metodou pro analýzu fytohormonů i proto, že GC-MS nedokáže pokrýt větší množství různých fytohormonů (Ljung et al., 2010; Walton et al., 2015). LC na reverzní stacionární fázi (nejčastěji C18) ve spojení s tandemovou MS detekcí (MS/MS) se používá pro kvantifikaci kyselých fytohormonů (Balcke et al., 2012; Floková et al., 2014; Široká et al., 2022; Yonny et al., 2020) nebo širokého spektra fytohormonů (Cai et al., 2019; Cao

et al., 2017; Erland et al., 2017; Chiwocha et al., 2003; Pan et al., 2010; Sheflin et al., 2019; Šimura et al., 2018; Xin et al., 2020). Například byla popsána metoda pro analýzu 101 fytohormonů (jejich prekurzorů a metabolitů) využívající SPE purifikaci (Šimura et al., 2018) nebo metoda využívající multifunkční derivatizaci pro současné stanovení 31 fytohormonů z různých tříd v jednom běhu (Cai et al., 2019).

V posledních letech se zvyšují požadavky na rychlost, citlivost a rozlišení chromatografických metod. Kromě toho jsou v rámci analytické chemie diskutovány i ekologické aspekty, jako je menší spotřeba toxických organických rozpouštědel, bezpečnost obsluhy, nižší cena a rychlejší analýza. Je tedy stále důležité studovat nové metody pro analýzu fytohormonů (Dispas et al., 2018; Korany et al., 2017).

2.3 Superkritická fluidní chromatografie

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je chromatografická metoda, která využívá jako mobilní fázi (MF) rozpouštědla za superkritických podmínek. Nejčastěji je to superkritický oxid uhličitý ($scCO_2$).

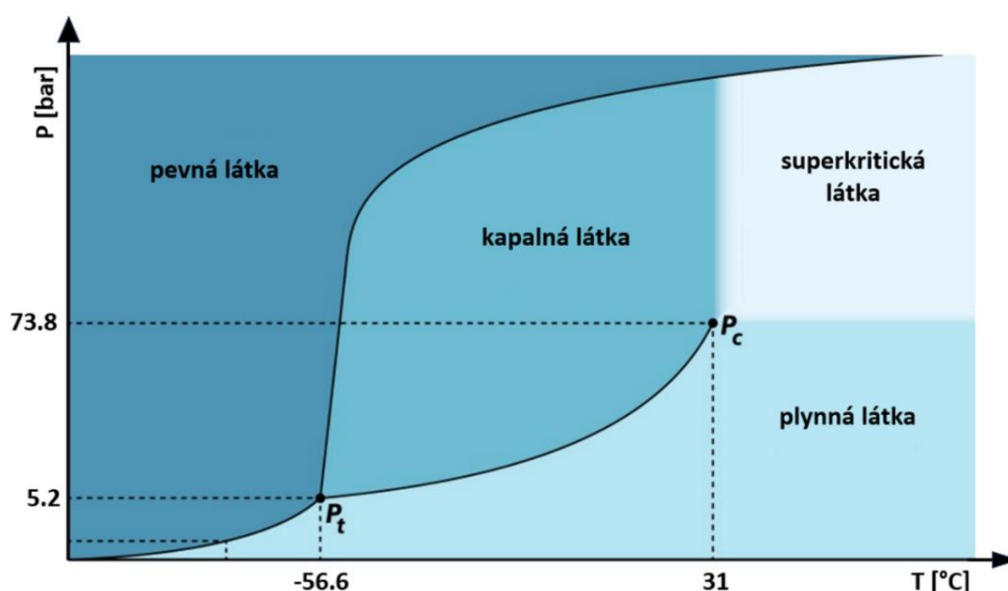
Použití SFC má řadu výhod, mezi něž patří nejen snížení spotřeby škodlivých organických rozpouštědel použitím netoxických a ekologicky šetrných rozpouštědel, ale i dobrá robustnost SFC systémů a metod. Dalšími výhodami jsou reprodukovatelnost, selektivita, citlivost, a také ortogonalita selekce k často používaným metodám LC na reverzní fázi (Edge et al., 2022; Li et al., 2018). Kromě toho je SFC vhodná metoda i pro analýzu tepelně nestabilních a netěkavých sloučenin, které je obtížné analyzovat pomocí GC. SFC může být také nápomocná při analýze sloučenin rozkládajících se v přítomnosti vody nebo alkoholu, jako jsou pesticidy a některé rostlinné metabolity. Na druhé straně je separace velmi polárních sloučenin pomocí SFC obtížná a organický modifikátor a jeho množství musí být vybráno pečlivě, aby se získal uspokojivý tvar píku. V současné době se SFC úspěšně používá v celé řadě praktických aplikací (Pilařová et al., 2019).

Řešení chromatografických problémů s ohledem na optimalizaci rozlišení a dobu analýzy často vyžaduje použití gradientu. Jednou z výhodných vlastností SFC je větší počet gradientů, které mohou být v SFC modulovány. Jedná se o gradienty regulovaného tlaku a složení MF (West, 2018). Při analýze neznámého vzorku se doporučuje nejprve provést obecný vyhledávací gradient od 2 do 40 % organického modifikátoru (např. MeOH), včetně krátkého izokratického zadržení při 2 % MeOH a dalšího při 40 %

MeOH. Pomocí tohoto základního gradientového postupu je možné určit eluční okno analytů obsažených ve vzorku (první a poslední eluční píky) a také rozhodnout, zda je vyžadován gradient, přičemž se vezmou v úvahu rozdíly ve složení eluce mezi prvním a posledním elučním píkem. V neposlední řadě je rozlišovací schopnost a citlivost dosažená v gradientovém režimu SFC často lepší než v izokratickém režimu (Nováková et al., 2014).

2.3.1 Mobilní fáze

Samotný název této metody napovídá, že jako MF je používána superkritická tekutina. V závislosti na teplotě a tlaku může sloučenina existovat v plynném, kapalném nebo pevném stavu. Při zvyšování teploty i tlaku nad kritický bod se látka dostává do tzv. superkritického (nadkritického) stavu (Obr. 5). Vlastnosti těchto tekutin se nacházejí na pomezí vlastností kapalin a plynů (Hitchen & Dean, 1993). Oproti kapalinám mají nadkritické tekutiny nižší viskozitu a vysokou difuzivitu a jsou tak více podobné plynům. I díky tomu jsou nadkritické tekutiny velice zajímavé pro využití v chromatografii, kde tyto vlastnosti umožňují rychlejší přenos látky mezi stacionární a MF. Hustota a solvatační schopnosti superkritických tekutin jsou více podobné kapalinám a umožňují tak relativně dobrou rozpustnost, ale také i dobrý transport analytů (David et al., 2000).



Obrázek 5. Fázový diagram pro CO₂. P_t – trojný bod, P_c – kritický bod. Upraveno z: <https://newmars.com/forums/viewtopic.php?id=10044>

Při zrodu SFC se jako MF používaly látky striktně při nadkritických podmínkách. Mezi tyto látky patřili například fluorované uhlovodíky, amoniak nebo například halogenované uhlovodíky (West, 2018). Ovšem použití těchto látek jako superkritické MF muselo být pozastaveno z hlediska jejich škodlivosti pro životní prostředí, poškozování SFC systému, ale také nezpůsobivosti pro analýzu termolabilních látek. I proto se v současné době jako MF používá relativně netoxický CO₂, který má kritické hodnoty tlaku a teploty prakticky aplikovatelné (74 bar a 31 °C; Obr. 5). ScCO₂ je navíc látka s nízkou viskozitou, což umožňuje použití vyšších průtoků, než jaké jsou používány například u LC (Nováková et al., 2014).

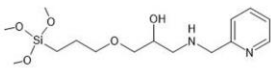
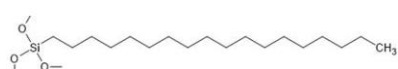
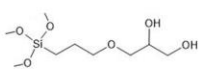
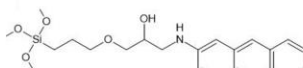
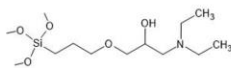
Dříve byl jako MF používán striktně scCO₂. Jelikož má scCO₂ nízkou polaritu, tak bylo i omezeno množství látek, které se touto metodou daly analyzovat. Aby se tomuto omezení předešlo, začal se k scCO₂ přidávat malý podíl polárního modifikátoru, který zvyšuje polaritu MF, a zároveň solvatační a eluční sílu čistého scCO₂ (M. Chen et al., 2022). Dobrá mísitelnost scCO₂ s organickými rozpouštědly, zejména pak alkoholy, jako jsou MeOH, etanol, či isopropanol, poskytuje SFC širokou škálu možností při optimalizaci chromatografických separací rozsáhlého množství různých analytů (Deye et al., 1990; West, 2018). Přídavek organických modifikátorů při gradientové eluci obvykle začíná na 2-5 % až do 30-40 % (Pilařová et al., 2019). Nejčastěji používaným modifikátorem v SFC je MeOH, který je zcela mísitelný se scCO₂ v širokém rozsahu teplot a tlaků. Přidáním organického modifikátoru se podstatně mění kritický bod MF v závislosti na zvoleném modifikátoru ale i na množství jeho přídavku. Z praktického hlediska ovšem není podstatné, zda je použitá MF definována jako nadkritická nebo podkritická. A to zejména proto, že nebyly pozorovány žádné významné změny ve fyzikálních a chemických vlastnostech MF, protože vlastnosti scCO₂ a podkritického CO₂ jsou spojitě (Berger, 1995; Lesellier, 2020; Nováková et al., 2014).

Obvykle ovšem samotný přídavek modifikátoru nestačí, a k MF musí být přidáno ještě aditivum. Úloha aditiv spočívá v pokrytí aktivních míst stacionární fáze a změnou polaritu MF. Přidání aditiv také umožňuje eluci vysoce polárních sloučenin (Smith, 1999). Použití nízkých koncentrací aditiv, obvykle kyselin nebo zásad, v organickém modifikátoru má příznivý vliv na tvar píku a selektivitu v SFC (Blackwell et al., 1997). Eluci organických kyselin lze tedy urychlit přidáním například kyseliny mravenčí nebo kyseliny trifluoroctové, zatímco eluci bází lze urychlit přidáním alifatických aminů nebo hydroxidu amonného (Nováková et al., 2014). Někdy jsou do MF fáze přimíchány jak

kyselá tak zásaditá aditiva a to například mravenčan amonný nebo uhličitan amonný (Pinkston et al., 2004). Další možností je přidání malého množství vody, která sice není mísitelná s scCO₂, ale v kombinaci s organickým modifikátorem se její mísitelnost zlepšuje (J. Liu et al., 2019). Malý přírůstek vody (do 5 %) může mít dobrý vliv na tvar píku a také na ionizaci v MS (Nováková et al., 2014).

2.3.2 Stacionární fáze

Prvním krokem a pravděpodobně nejdůležitějším při vývoji metody v SFC je výběr stacionární fáze. Pokud se jedná o její chemické složení, je k dispozici široká škála stacionárních fází, od nejpolarnějšího silikagelu (normální fáze) až po nepolární fáze s hustě navázanými alkylovými skupinami na povrchu silikagelu (reverzní fáze). Toto široké rozmezí umožňuje různou selektivitu a tedy i možnost analýzy látek různé polarizace (West et al., 2016). Chemii stacionární fáze lze snadno využít k podstatné změně separační selektivity. V SFC lze použít celou škálu achirálních a chirálních stacionárních fází. Většina z nich je na bázi silikagelu, ačkoli jsou k dispozici i kolony na bázi polysacharidů, zirkonu, polystyrenu nebo divinylbenzenu (Edge et al., 2022). Většina kolon používaných v SFC byla nejprve navržena pro HPLC. Účinnost separace závisí na parametrech kolony a průtoku MF v SFC systému (van Deemter et al., 1956). V poslední době se ve stacionárních fázích stále častěji používají částice menší 2 μm, což vedlo k zavedení takzvané ultra-vysokoúčinné superkritické fluidní chromatografie (UHPSFC; Grand-Guillaume Perrenoud et al., 2012). Chemická struktura stacionárních fází použitých v této práci je znázorněna na Obr. 6.

Torus 2-PIC	
Viridis HSS C ₁₈ SB	
Torus DIOL	
Torus 1-AA	
Torus DEA	

Obrázek 6. Struktury stacionárních fází použitých v této práci. Vytvořeno v programu ChemSketch.

2.3.2.1 Nepolární stacionární fáze

Nejčastěji používanými nepolárními stacionárními fázemi jsou oktyl- (C8), oktadecyl- (C18) a triakontanyl- (C30) kolony. Tyto kolony jsou vhodné pro separaci látek s nízkou polaritou, a také pro hydrofobní sloučeniny, jako jsou například lipidy, karotenoidy nebo terpeny (Lesellier & West, 2015).

2.3.2.2 Polární stacionární fáze

Polární stacionární fáze zahrnují nemodifikovaný silikagel, jehož povrch tvoří hydroxylové skupiny, resp. silanolové skupiny, a silikagel modifikovaný například 3-aminopropyl- (NH₂), 3-kyanopropyl- (CN), propandiol- (DIOL) skupinou. Středně polární stacionární fáze jsou například aromatické stacionární fáze a alkylové stacionární fáze s krátkým řetězcem jako jsou například fenylhexyl- (C6PHE), fenylpropyl- (C3PHE), difenyl- (DP) skupiny a další. Tyto stacionární fáze jsou vhodné pro analýzu polárních sloučenin jako jsou saponiny a fenoly (West et al., 2016). Specifické stacionární fáze vyvinuté pro SFC zahrnují 2-ethylpyridin (2-EP), 4-ethylpyridin (4-EP), propylacetamid, aminofenyl a pyridinkarboxamid skupiny, které mohou vést ke zlepšení tvaru píků a to zejména u bazických sloučenin (van de Velde et al., 2020).

Pokud stacionární fáze obsahuje silanolové skupiny, tak alkohol použitý v MF převede silanol na silylether, čímž se mění chromatografická retence a selektivita. Silylethery mohou být rychle odstraňovány přidáním vody do MF (J. N. Fairchild et al., 2015). Tento problém částečně vyřešila společnost Waters, která vyvinula speciální vazebnou chemii na částicích oxidu křemičitého, a tak zajistila, že retence nebude časem degradovat tvorbou silyletherů (Desfontaine et al., 2016; J. N. Fairchild et al., 2015).

2.3.3 Kolony pro stacionární fáze

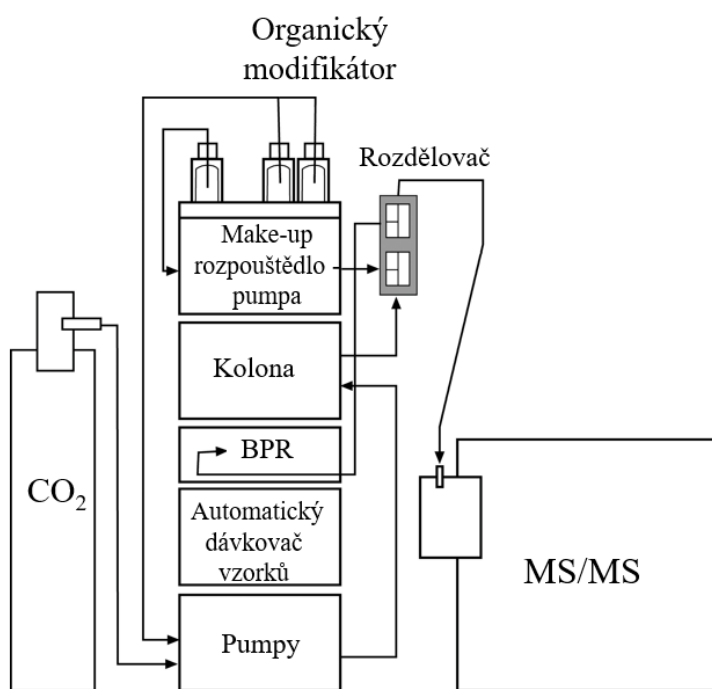
SFC může být provedena buď v otevřených kapilárních kolonách nebo v plněných kolonách (Schoenmakers, 1988). V současné době se běžně používají náplňové kolony (Edge et al., 2022). Náplňové kolony jsou naplněny sypkým sorbentem, stacionární fází, jejich vnitřní průměr je obvykle 2-5 mm a délka 15-25 cm (M. H. Ng & Din, 2020).

2.3.4 Instrumentace SFC

Významný průlom v SFC nastal se zavedením robustnější instrumentace. Byly vyvinuty přesnější čerpací systémy a vylepšena regulace zpětného tlaku, což vedlo k vyšší opakovatelnosti retenčních časů a nižšímu šumu pozadí i při použití gradientové eluce

(Lesellier & West, 2015; Plachká et al., 2023). SFC systémy jsou velice podobné HPLC systémům. Jednou z možností SFC je i hybridní zařízení, které umožňuje analýzu HPLC i SFC, jako je Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC hybridní systém, který byl použit v této práci (Lesellier & West, 2015).

V SFC systému je plynný CO₂ přiváděn z tlakové lahve při pokojové teplotě do SFC konverzního modulu, kde je zchlazen a zároveň stlačen na požadované hodnoty teploty a tlaku za vzniku scCO₂. Jelikož je modifikátor kapalina při pokojové teplotě a tlaku, tak jsou zapotřebí samostatná binární čerpadla pro scCO₂ a modifikátor. Tlak je v koloně udržován za pomoci regulátoru zpětného tlaku (back pressure regulator - BPR), který udržuje tlak v koloně nad kritickou hodnotou, aby se udržela MF v superkritickém stavu. Konverzní modul SFC obsahuje chladič, který chladí jak vstupní kapalinu, tak hlavu čerpadla. Dále tento systém obsahuje automatický dávkovač vzorku s externí smyčkou. Kolonová pec udržuje teplotu MF nad kritickou teplotou. Po průchodu kolonou je vzorek hnán MF do rozdělovače (splitter). Rozdělovač je pasivní T-kus kde je MF rozdělena do dvou toků jeden mířící skrz restriční kapiláru do MS, kde se přimíchává přídatné rozpouštědlo (make up solvent) a druhý zpět do BPR, aby se udržoval konstantní tlak v SFC systému (Berger, 2015). Spojení SFC-MS/MS je zobrazeno v Obr. 7.

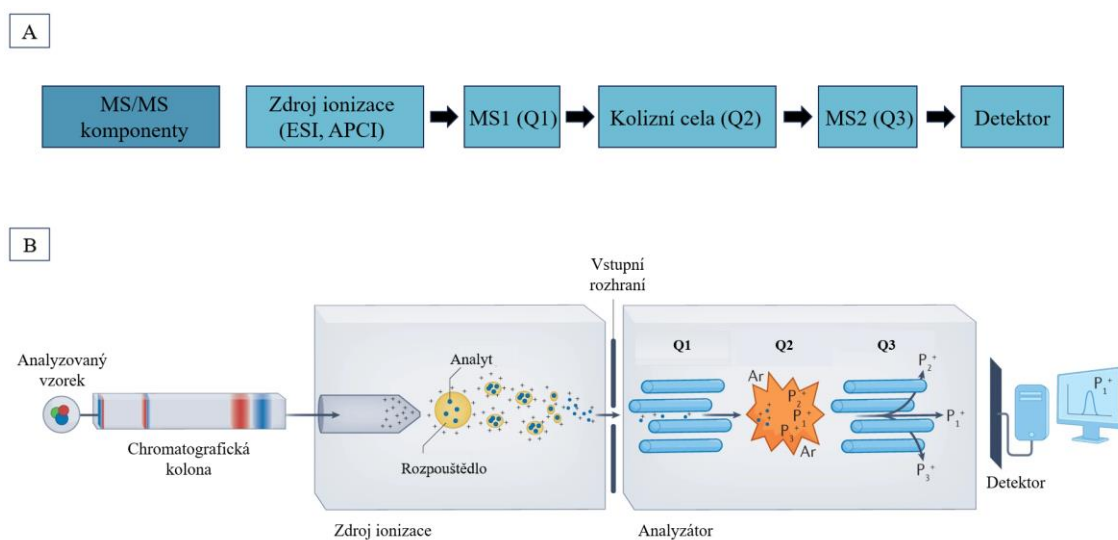


Obrázek 7. Schéma SFC-MS/MS. Upraveno z (Storbeck et al., 2018).

2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

MS je v současnosti považována za jednu z nejoblíbenějších metod detekce, a to hlavně díky své vysoké selektivitě a citlivosti. Tento detektor představuje zjevné výhody oproti optickým detekcím a je běžně používán hlavně pro stanovení stopových sloučenin v komplexních směsích, jako jsou například biologické nebo rostlinné vzorky.

MS analyzátoři se skládají z iontového zdroje, samotného hmotnostního analyzátoru a detektoru. Různé ionizační techniky umožňují analyzovat velké množství látek s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (L. Chen et al., 2021). Elektronová ionizace se řadí mezi tvrdé ionizační techniky a je používána hlavně ve spojení s GC. Ve spojení s LC jsou využívány měkké ionizační techniky jako je například ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation – ESI; Obr. 8) nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku (Grebe & Singh, 2011).



Obrázek 8. A – Schéma MS/MS. B – Schéma MS/MS s ESI ionizací a trojitým kvadrupólovým analyzátořem. Q1-3 – kvadrupól 1-3, P – produktový ion, Ar (argon) – kolizní plyn. Upraveno z (Thomas et al., 2022).

MS analýza je založena na separaci iontů podle poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z). Existuje několik různých typů hmotnostních analyzátorů včetně analyzátorů s jednotkovým rozlišením hmoty jako jsou kvadrupólové analyzátory a iontové pasti, nebo analyzátory s vysokým rozlišením hmoty jako je analyzátor doby letu (TOF), orbitrap a iontová cyklotronová rezonance (Haag, 2016).

Základní funkcí tandemové MS je určit poměr hmotnosti k náboji (m/z) sloučenin pomocí prvního kvadrupólu, po kterém následuje fragmentace v druhém kvadrupólu/kolizní cele s následnou hmotnostní analýzou fragmentů ve třetím kvadrupólu (Cao & He, 2023). MS/MS pracujícím v režimu monitorování více reakcí (MRM) je schopné detekce a kvantifikace specifických molekul v komplexní směsi a vyznačuje se nízkým chemickým šumem, který poskytuje zlepšení citlivosti (Balcke et al., 2012; Sherwood et al., 2009).

Výběr MS analyzátoru pro spojení s SFC závisí na preferované aplikaci. Mezi nejpoužívanější MS analyzátory v SFC patří MS/MS a TOF. MS/MS je užitečná jak pro kvalitativní stanovení (například strukturní charakterizace nebo identifikace), tak pro cílenou kvantitativní analýzu (Thomas et al., 2022). Vysoká specifita a senzitivita detekčního režimu MRM přispěla k tomu, že tento systém je dnes zlatým standardem pro kvantitativní analýzu malých molekul a peptidů v biologických vzorcích.

Vliv matrice a přípravy vzorku na stanovení stopových fytohormonů přináší další problém při analýze těchto látek. Proto je použití vnitřních standardů (IS) nezbytné pro přesnou kvantifikaci. Jako IS jsou při MS detekci nejvíce vhodné analyty značené stabilními izotopy (například standardy značené třemi a více ^2H , ^{13}C nebo ^{15}N), protože mají téměř stejné fyzikální a chemické vlastnosti jako odpovídající analyty, což zajišťuje korekci ztrát analytů během přípravy vzorku a také kompenzuje změny ionizace způsobené koelujícími složkami v matrici vzorku (Du et al., 2012).

2.5 Plánování experimentu

Vývoj metody v SFC je poměrně složitý proces, jelikož existuje mnoho parametrů, které působí na retenci a separaci (Lesellier et al., 2015). Na hustotu MF u stlačitelných tekutin působí především teplota a zpětný tlak kolony. Na hustotu kapaliny pak mohou prostřednictvím vstupního tlaku kolony působit i další parametry, jako jsou rozměry kolony, velikost částic ve stacionární fázi a průtok (Lesellier, 2009). Naštěstí nízká viskozita a vysoká eluční síla MF umožňuje použití vysokých průtoků pro analýzy,

rychlou ekvilibraci při změně složení MF a zajišťuje vysokou účinnost separace. Všechny tyto vlastnosti společně ovlivňují výsledek chromatografie (Desmorteux et al., 2009; Lesellier et al., 2012). Při vývoji metody by se mělo dbát na chromatografické vlastnosti, jako je rozlišení analytů a tvar píků, retenční čas, citlivost, selektivita a celková robustnost metody (Sandford & Shelver, 2009). V posledních letech se stále více k optimalizaci analytických metod využívá chemometrických nástrojů. Přinášejí totiž výhody, jako je snížení počtu experimentů, a tak i podstatně méně laboratorní práce, které je třeba provést a nižší spotřebu chemikálií (Ferreira et al., 2007).

Základní možností pro plánování experimentů je přístup jednoho faktoru v čase (One Factor At a Time - OFAT) a nebo komplexní přístup návrhu experimentu (Design of Experiments - DoE).

2.5.1 Jeden faktor v čase

Při optimalizaci metody SFC se často využívá přístup OFAT. Systematické testování k objasnění, která kolona, složení MF (scCO₂, modifikátor, aditivum), eluční režim, teplota, průtok a nastavení BPR jsou nezbytné k dosažení rychlé separace se základním rozlišením (Harps et al., 2019). U OFAT je snaha získat informace o jednom faktoru ovlivňujícím chromatografické vlastnosti v každém experimentálním pokusu. Tento postup se opakuje pro všechny studované faktory (Ye, 2003). To vyžaduje velký počet experimentálních měření, a v řadě případů se mohou při validaci stále vyžadovat další úpravy. Při OFAT nelze sledovat to jak se zvolené faktory navzájem ovlivňují, a proto může někdy docházet k špatné interpretaci výsledků (Ebrahimi-Najafabadi et al., 2014).

2.5.2 Experimentální návrh

DoE je statistický a matematický nástroj pro systematické provedení experimentů a efektivní analýzu dat, aby bylo možné získat maximum informací z chemických dat a efektivně řešit výzvy a cíle daného výzkumu (Araujo & Grung, 2012). DoE je jednou z nejběžnějších technik pro identifikaci a kontrolu kritických faktorů při procesu optimalizace. Tyto metody využívají matematické modely, které umožňují posouzení relevance i statistické významnosti studovaných vlivů faktorů. Také je umožněna identifikace interakcí mezi faktory a optimalizace a vytvoření matematického vztahu mezi faktory a odezvami (Ferreira et al., 2007).

Jedním z nejdůležitějších cílů DoE je nalezení úrovní faktorů, které vytvářejí nejlepší experimentální odezvu. Faktorům jsou přiřazeny různé hodnoty, tzv. úrovně faktorů.

Obvykle jsou tyto úrovně označeny čísly -1 , 0 a $+1$ nebo jinými znaky. Vztah mezi odezvou (y) a faktory (x_n) je definován jako: $y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$. DoE tedy umožňuje porozumět účinkům faktorů a modelovat vztah mezi x a y pomocí minimálního počtu experimentů. Pokud je tedy návrh experimentálních podmínek dobrý, ušetří se čas i náklady (Mousavi et al., 2018).

2.5.2.1 Plně faktoriální návrh

Zaměřuje se na všechny faktory zahrnuté v experimentu. Zde se studují všechny možné kombinace, které jsou spojeny s faktory a jejich úrovněmi. Sledují účinky, které mají hlavní faktory a všechny interakce mezi faktory na měřené odezvy. Často používaný je 2^k návrh, kde k je počet faktorů, přičemž faktor má právě dvě úrovně, vysokou ($+1$) a nízkou (-1). Ovšem hlavní nevýhodou plně faktoriálního návrhu je to, že se zvyšujícím se počtem faktorů se exponenciálně zvyšuje celkový počet experimentů (Peng et al., 2022; Tavares Luiz et al., 2021).

2.5.2.2 Frakční faktoriální návrh

Na rozdíl od plně faktoriálního návrhu, frakční faktoriální návrhy umožňují sledovat více faktorů s menším počtem měření. Předpokladem je, že interakce vyššího řádu (tři a více faktorů) nejsou statisticky významné. Díky tomu lze z experimentu založeném na plně faktoriálním návrhu vybrat vyváženou frakci, která umožní odhadnout účinky hlavních faktorů. Nevýhodou je, že zjištěný účinek může být zároveň účinkem vyšší interakce. Účinek hlavního faktoru lze ověřit doplňujícím experimentem založeným na tzv. komplementární frakci. Pomocí tohoto nástroje lze tedy identifikovat nejvýznamnější faktory pro následné provádění podrobnějších experimentů (Peng et al., 2022; Tavares Luiz et al., 2021).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení, pomůcky a software

3.1.1 SFC-MS/MS analýza

Hybridní systém 1260 Infinity II SFC/UHPLC spojený s hmotnostním spektrometrem Agilent 6490 trojitý kvadrupól (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Oxid uhličitý, CO₂ 4.5 (Linde Gas a.s.).

Analytické separační kolony: Viridis[®] HSS C₁₈ SB kolona (100 Å, 1,8 µm, 3 mm x 100 mm, C₁₈), Torus[™] 1-AA kolona (130 Å, 1,7 µm, 3 mm x 100 mm, 1-aminoantracen), Torus DIOL (130 Å, 1,7 µm, 3 mm x 100 mm, diol), Torus DEA (130 Å, 1,7 µm, 3 mm x 100 mm, diethylamin) a Torus 2-PIC (130 Å, 1,7 µm, 3 mm x 100 mm, pyridin-2-ylmethanamin). Všechny použité analytické kolony jsou od firmy Waters, Irsko. V závorkách jsou uvedeny vlastnosti kolony v tomto pořadí: velikost pórů, velikost částic, rozměry kolony, chemie kolony. Struktury těchto kolon jsou zobrazeny v Obr. 6.

3.1.2 Příprava vzorku

Analytické váhy (Sartorius Weighing Technology GmbH, Německo)

Automatické mikropipety se špičkami (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Avanti TM 30 (Beckman, USA)

Centrifuga Hettlich Micro 220R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Německo)

Extrakční disky: C18 Empore[™] a SDB-XC Empore[™] (3M[™], USA)

Chladicí box (Biocision, USA)

Kapalný dusík

Kuličky oxidu zirkoničitého (2 mm) (Retsch GmbH, Německo)

Kulový mlýnek MM400 Retsch[®] & Co. KG (Retsch GmbH, Německo)

Mikrozkumavky Eppendorf 2,0 ml, 5,0 ml (Eppendorf, Německo)

Odměrný válec 100 ml, 500 ml, 1000 ml

Skleněná láhev s uzávěrem 100 ml, 500 ml, 1000 ml

Šroubovací vialky s uzávěry a inzerty

Zařízení na úpravu vody Millipore Direct-Q® 3 UV (Millipore Corp, USA)

3.1.3 Software

SFC-MS/MS data byly procesovány v programu MassHunter kvalitativní software verze B.08.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a MassHunter kvantitativní software verze B.09.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Pro statistické zpracování výsledků byl použit Microsoft Excel a R studio (Posit team, 2023) na bázi jazyka R (R Core Team, 2023) za použití balíčků: readxl (Wickham & Bryan, 2023), ggplot2 (Wickham, 2016) a caret (Kuhn, 2008).

3.2 Chemikálie

25% roztok amoniaku pro LC-MS (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Aceton (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francie)

Acetonitril pro LC-MS (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Kyselina mravenčí ($\geq 99\%$) pro LC-MS (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Kyselina octová (100%) pro LC-MS (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Metanol hypergrade pro LC-MS (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Metanol gradient grade (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)

Voda používaná pro přípravu MF a pracovních roztoků byla výhradně po přečištění v systému Millipore, tzv. MilliQ voda.

3.2.1 Standardy

Referenční analytické standardy a vnitřní standardy značené stabilními izotopy byly poskytnuty z knihovny standardů Laboratoře růstových regulátorů. JAs: *cis*-OPDA, OPC-8, OPC-6, OPC-4, *dn*-OPDA, JA, 9,10-dhJA, 12-OHJA, JA-Val, JA-Ile, JA-Phe, OPDA-*d*₅, JA-*d*₆, (-)-JA-*d*₂-Ile byly zakoupeny v OlChemIm Ltd. (Olomouc, Česká republika). IAA u Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) a ostatní AUX: oxIAA, IAA-Asp, IAA-Glu, IAA-¹³C₆, oxIAA-¹³C₆, IAA-Asp-¹³C₆, IAA-Glu-¹³C₆ byly zakoupeny u OlChemIm Ltd. (Olomouc, Česká republika). ABAs: ABA, PA, DPA, neoPA, 7'-OHABA a ABA-*d*₆ byly zakoupeny u National Research Council Canada (Saskatoon, Kanada). SA a SA-*d*₄ byly zakoupeny u Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Zásobní roztoky všech analytických referenčních standardů a vnitřních standardů byly připraveny v organickém rozpouštědle (MeOH či acetonitril) o koncentraci $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ a skladovány při $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Pracovní roztoky pro individuální nástřiky referenčních standardů pro ověření retence byly připraveny v koncentraci $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ v 80% MeOH. Směsi referenčních standardů byly připraveny v koncentraci $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ pro analyty měřené v negativním ionizačním módu (směs 1 - obsahující JA, OPC-4, 9,10-dh-JA, 12-OHJA, SA, ABA, DPA, neoPA, PA a 7'-OHABA) a v koncentraci $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ pro analyty měřené v pozitivním ionizačním módu (směs 2 - obsahující *cis*-OPDA, *dn*-OPDA, OPC-8, OPC-6, JA-Ile, JA-Phe a JA-Val) a AUX (směs 3 - obsahující IAA, oxIAA, IAA-Glu, IAA-Asp). Směsi 1-3 byly použity na přípravu kalibrační řady nebo dále ředěny na pracovní směs standardů obsahující všechny analyty v 80% vodném MeOH, přičemž analyty měřené v negativním ionizačním módu byly v koncentraci $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a analyty v pozitivním ionizačním módu byly v koncentraci $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Tato pracovní směs standardů byla použita pro optimalizaci podmínek pro SFC separaci.

Pracovní směs vnitřních standardů obsahovala OPDA-*d*₅, JA-*d*₆, IAA-¹³C₆, oxIAA-¹³C₆, IAA-Asp-¹³C₆, IAA-Glu-¹³C₆, ABA-*d*₆, o koncentraci $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, (-)-JA-*d*₂-Ile o koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ a SA-*d*₄ o koncentraci $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Tato směs byla použita pro přípravu kalibrační řady a přidávána o stejném množství (10 μl) do vzorků rostlinného materiálu před extrakcí v rámci přípravy vzorků k SFC analýze pro umožnění přesné kvantifikace.

3.2.2 Použité mobilní fáze

MeOH s přídavkem 0,5 obj. % vody

MeOH s přídavkem 3 obj. % vody

MeOH s přídavkem 0,1 obj. % FA a 0,5 obj. % vody

MeOH s přídavkem 0,1 obj. % FA a 3 obj. % vody

MeOH s přídavkem 0,1 obj. % amoniaku a 0,5 obj. % vody

MeOH s přídavkem 0,1 obj. % amoniaku a 3 obj. % vody

MeOH s přídavkem 0,1 obj. % FA, 0,1 obj. % amoniaku a 0,5 obj. % vody

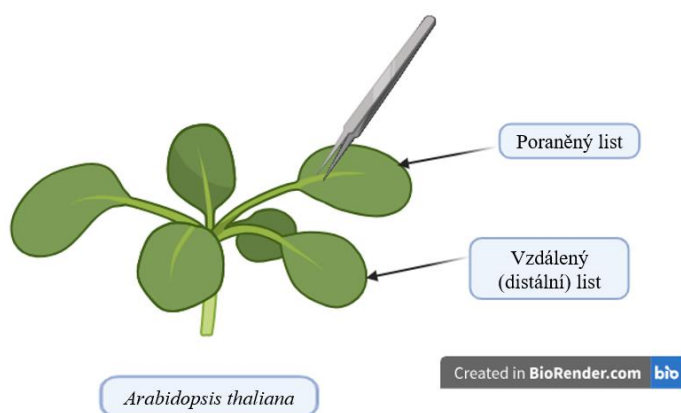
MeOH s přídavkem 0,1 obj. % FA, 0,1 obj. % amoniaku a 3 obj. % vody

3.2.3 Použité pracovní roztoky

1 mol·l⁻¹ FA v 10% MeOH; 0,1 obj. % kyselina octová; 80% MeOH

3.3 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál pro aplikaci SFC-MS/MS metody byl získán, jak popsáno v Mik et al., 2023. Rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0 byly pěstovány v půdě v růstové komoře pod krátkou denní periodou (16 h tma při 18 °C a 8 h světlo při 22 °C). Intenzita světla byla 100 μE m⁻² s⁻¹. Těsně před dokončením reprodukční fáze (úroveň 12; (Smyth et al., 1990), v tomto případě 30 dnů staré rostliny, byly 4 listy každé rostliny mechanicky poškozeny sevřením laboratorní pinzetou na 3 místech přes centrální žílu listu (Obr. 9). Poraněné listy byly sklizeny v 5, 15, 30, 60 a 180 minutě od poranění. Na každý časový bod byly použity 4 rostliny. Kromě poraněných listů byly také z rostlin ve stejných časových bodech sklizeny listy neporaněné, vzdálené (Obr. 9). Dále byly sklizeny listy ještě před poškozením a byly označeny jako časový bod 0 min. Rostlinný materiál byl sklizen odstříhnutím celých listů od růžice rostliny, rychle umístěn do předem označených mikrozkušavek (5 ml), okamžitě zamražen v kapalném dusíku a skladován při -80 °C. Zmražený rostlinný materiál byl homogenizován v třence za pomoci třerky pod tekutým dusíkem a rozvážen do předem očíslovaných mikrozkušavek (2 ml) tak, aby se navážka vzorku pohybovala kolem 10 mg. Každý typ vzorku byl navážen ve třech provedeních. Všechny navážky byly provedeny na analytických vahách. Během práce na analytických vahách byly vzorky uloženy v tekutém dusíku. Manipulace se vzorky mimo tekutý dusík byla provedena co nejrychleji. Přesné navážky všech vzorků jsou uvedeny v Tab. 1.



Obrázek 9. Schéma poranění *A. thaliana* za pomoci pinzety.

Tab. 1: Navážky rostlinného materiálu (*A. thaliana*)

Čas od poranění (min)	Číslo vzorku	Poraněné listy (mg)	Číslo vzorku	Vzdálené listy (mg)
0	1	13,33	19	10,26
	2	11,04	20	11,08
	3	13,28	21	11,74
5	4	10,48	22	11,68
	5	10,34	23	11,66
	6	13,08	24	10,73
15	7	10,58	25	11,13
	8	11,37	26	11,16
	9	10,44	27	10,53
30	10	10,23	28	11,46
	11	11,86	29	10,49
	12	10,59	30	10,41
60	13	10,45	31	11,72
	14	11,25	32	10,38
	15	10,41	33	10,32
180	16	11,31	34	10,51
	17	11,19	35	11,25
	18	10,43	36	10,56

3.4 Metody

3.4.1 Vývoj SFC-MS/MS metody

3.4.1.1 MS/MS podmínky

MS podmínky pro detekci kyselých fytohormonů byly nastaveny podle Široká et al., 2022, kde byl na stejné spektrum analytů použit stejný detektor ve spojení s LC (Tab. 2). Napětí na trysce bylo nastaveno na 0 V, napětí na kapiláře na 2800/3000 V v pozitivním/negativním módu a sušicí plyn měl teplotu 130 °C s průtokem 14 l·min⁻¹. Plyn okolo pláště byl zahřátý na 400 °C a jeho průtok byl nastaven na 12 l·min⁻¹.

Tab. 2: MS podmínky - seznam analytů, jejich zkratky, ionizační mód, MRM tranzice, kolizní energie.

Analyty	Zkratka	ESI mód	MRM tranzice	Kolizní energie (eV)
2-(1H-indol-3-yl)octová kyselina	IAA	+	176,1 – 130,1	24
2-(2-oxindol-3-yl)octová kyselina	oxIAA	+	192,1 – 146,0	12
[2-(1H-indol-3-yl)acetyl]- aspartát	IAA-Asp	+	291,1 – 130,1	36
[2-(1H-indol-3-yl)acetyl]- glutamát	IAA-Glu	+	305,2 – 130,1	24
cis-(+)-12-oxo-fytodienová kyselina	<i>cis</i> -OPDA	+	293,2 – 275,2	12
(Z)-8-[3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl]oktanová kyselina	OPC-8	+	295,2 – 135,0	20
(Z)-6-[3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl]hexanová kyselina	OPC-6	+	267,1 – 135,0	28
(Z)-4-[3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl]butanová kyselina	OPC-4	-	237,2 – 58,8	20
dinor-oxo-fytodienová kyselina	dn-OPDA	+	265,2 – 247,1	4
(-)-jasmonová kyselina	JA	-	209,2 – 58,8	8
(±)-9,10-dihydrojasmonová kyselina	9,10-dh-JA	-	211,2 – 58,8	16
11-hydroxyjasmonová kyselina/ 12-hydroxyjasmonová kyselina	11-/12-OHJA	-	225,1 – 59,0	8
(-)-jasmonoyl-L-valin	JA-Val	+	310,3 – 151,3	16
(-)-jasmonoyl-L-isoleucin	JA-Ile	+	324,3 – 151,2	16
(-)-jasmonoyl-L-fenylalanin	JA-Phe	+	358,8 – 151,2	16
salicylová kyselina	SA	-	137,1 – 92,8	16
(+)-cis,trans-abscisová kyselina	ABA	-	263,2 – 153,1	8
fazeová kyselina	PA	-	279,1 – 205,1	12
dihydrofazeová kyselina	DPA	-	281,2 – 237,1	8
neofazeová kyselina	neoPA	-	279,1 – 205,1	12
7'-hydroxyabscisová kyselina	7-OH-ABA	-	279,1 – 151,1	12

3.4.1.2 Optimalizace nástřikového objemu

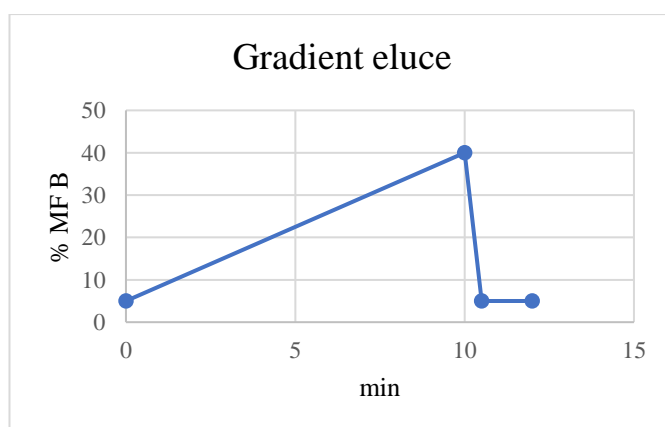
Byly zvoleny 4 možnosti nástřikového objemu: 1 μl , 3 μl , 5 μl a 10 μl . Nastříknuta byla pracovní směs standardů v 80% vodném MeOH (kapitola 3.2.1). Toto složení rozpouštědla bylo zvoleno, aby odpovídalo složení rozpouštědla vzorků po eluci (80% vodný MeOH).

3.4.1.3 Výběr stacionární fáze – základní testování

Pro základní testování stacionárních fází bylo vybráno 5 dostupných kolon (Torus DEA, Torus 1-AA, Torus DIOL, Torus 2-PIC, Viridis HSS C₁₈ SB) (Obr. 6). Na těchto kolonách byla provedena analýza pracovní směsi standardů (kapitola 3.2.1) o nástřiku 5 μl ve třech opakováních při různém složení MF B, MF A byl vždy scCO₂ (Tab. 3). Byla testována přítomnost kyselých a zásaditých aditiv v MF B a jejich vliv na detekci analytů. Hodnota BPR byla nastavena na 250 bar a teplota kolony byla nastavena na 50 °C. Průtok SFC pumpy byl nastaven na 1,5 ml·min⁻¹ a průtok iso pumpy (přídavné rozpouštědlo, MeOH) byl nastaven na 0,25 ml·min⁻¹. Podmínky gradientu eluce jsou uvedeny na Obr. 10, celkový čas analýzy byl 12 minut.

Tab. 3: Složení MF při základním testování.

Metody	Složení MF A	Složení MF B
1	scCO ₂	MeOH
2	scCO ₂	MeOH + 0,1 % FA
3	scCO ₂	MeOH + 0,1 % amoniaku



Obrázek 10. Podmínky gradientu při základním testování kolon.

3.4.1.4 Frakční DoE pro optimalizaci chromatografických podmínek

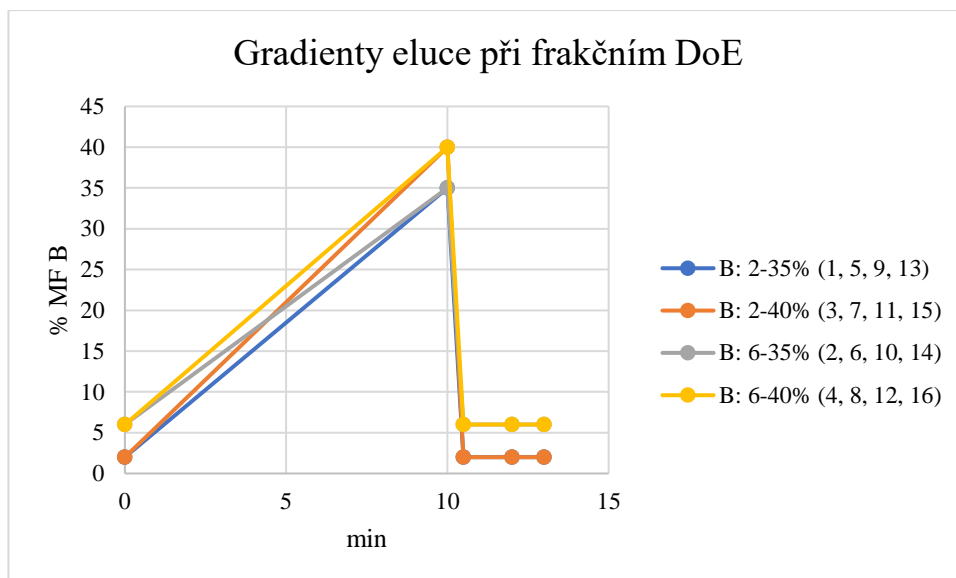
Pro další optimalizaci chromatografických podmínek byl zvolen komplexní přístup frakčního DoE, kde bylo zvoleno několik faktorů (Tab. 4), které ovlivňují vlastnosti separace jako jsou retenční čas, plocha a rozlišení píků. Pro každý faktor byla zvolena vysoká +1 a nízká -1 úroveň, a bylo vytvořeno 16 metod (Tab. 5), které odráží 16 možných kombinací zvolených faktorů. Těmito metodami byla analyzována pracovní směs standardů (kapitola 3.2.1) o nástřiku 3 µl ve třech opakováních pro každou metodu. V některých případech bylo nutné ověřit retenci nástřikem individuálních roztoku standardů (kapitola 3.2.1). Kvůli dlouhým retenčním časům IAA-Asp a IAA-Glu byl prodloužen čas metody (Obr. 11). DoE metoda byla aplikována na 2 vybrané kolony (Torus 1-AA, Viridis HSS C18 SB), které byly zvoleny pro další optimalizaci ze základního testování 5-ti kolon. Z naměřených dat byly vygenerovány retenční časy, plochy a šířky píků v polovině výšky (full width at half maximum - FWHM) detekovaných analytů. Z retenčních časů a šířek píků v polovině výšky sousedících píků bylo vypočteno rozlišení. Rozlišení těchto (R_s) píků bylo vypočítáno podle vzorce: $R_s = 1,18 \times \frac{RT_1 - RT_2}{FWHM_1 + FWHM_2}$, kde RT_1 a RT_2 jsou retenční časy pro každý pík, a $FWHM_1$ a $FWHM_2$ jsou šířky píků v polovině výšky.

Tab. 4 Zvolené faktory frakčního DoE ovlivňující SFC separaci. Vysvětlivky zkratk k Tab. 3. MF B – mobilní fáze B, BPR – regulátor zpětného tlaku, FA – kyselina mravenčí.

Faktor	Popis faktoru	Úrovně	
		-1	+1
A	úsek, počáteční podmínky gradientu % MF B	2 %	6 %
B	směrnice gradientu, % MF B	35 %	40 %
C	% vody v MF B	0.50 %	3 %
D	% FA v MF B	0 %	0.10 %
E	% amoniaku v MF B	0 %	0.10 %
F	BPR	150 bar	250 bar
G	teplota na koloně	40 °C	50 °C

Tab. 5: Frakční DoE. Faktory: A, B, C, D, E, F, G. Vysoká úroveň (+1), nízká úroveň (-1).

Metody	A	B	C	D	E	F	G
					(A/B/C)	(A/B/D)	(A/C/D)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
10	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1



Obrázek 11: Podmínky gradientu eluce při metodách frakčního DoE. B - počáteční podmínky gradientu B (%) a směrnice gradientu B (%), v závorkách jsou uvedeny metody, v kterých jsou použity tyto gradienty.

3.4.2 Příprava vzorku k SFC-MS/MS analýze

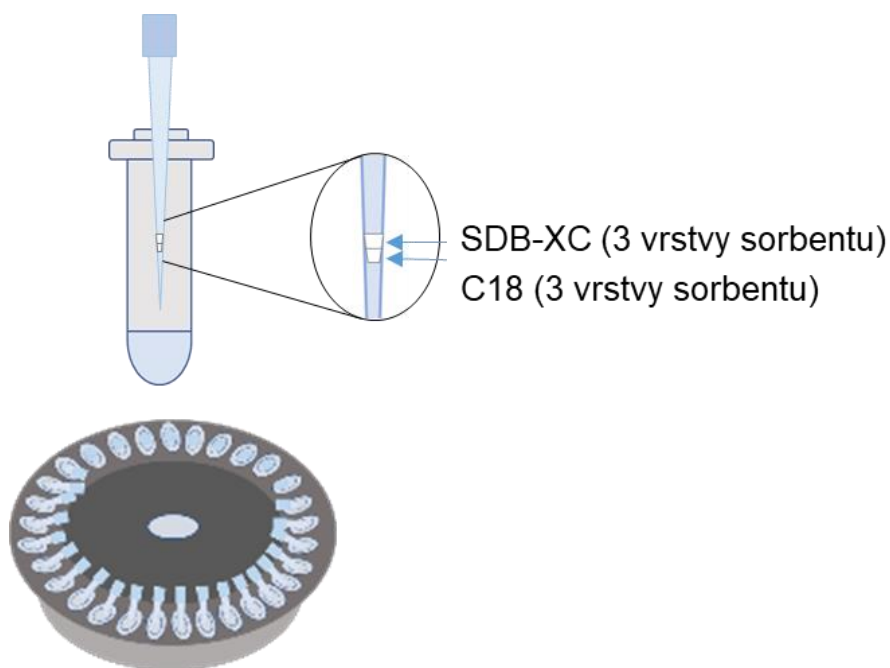
Příprava vzorku pro analýzu kyselých fytohormonů probíhala podle již optimalizovaného protokolu (Široká et al., 2022) s rozdílem, že vzorky po eluci nebylo nutné odpařovat a mohly být rovnou analyzovány na SFC-MS/MS.

3.4.2.1 Extrakce fytohormonů z rostlinného materiálu

K naváženým vzorkům (1-36) a dalším 4 mikrozkuvkám (2 ml), které byly označeny jako blanky (1-4), byl přidán 1 ml chlazené $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ FA v 10% vodném MeOH. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 μl pracovní směsi vnitřních standardů (obsahující OPDA- d_5 , JA- d_6 , IAA- $^{13}\text{C}_6$, oxIAA- $^{13}\text{C}_6$, IAA-Asp- $^{13}\text{C}_6$, IAA-Glu- $^{13}\text{C}_6$, ABA- d_6 , (-)-JA- d_2 -Ile, SA- d_4 , kapitola 3.2.1.) a 5 kuliček z oxidu zirkoničitého. Takto připravené vzorky byly umístěny na 10 minut na kulový mlýnek, který byl nastaven na 29 Hz a jehož držáky byly předem vychlazeny. Poté byly vzorky 10 minut odstředovány na centrifuze, která byla nastavena na 16 000 xg a vychlazená na 8 °C. Vzniklý supernatant byl dále použit při purifikaci. Manipulace se vzorky probíhala ve vychlazeném (8 °C) chladícím boxu na mikrozkuvkách.

3.4.2.2 MikroSPE purifikace

Nejprve byly připraveny stagetipy (40 ks: 36 vzorků + 4 blanky), na kterých probíhala purifikace vzorků. Pro přípravu stagetipů byly použity pipetové špičky (2-200 μ l), do kterých byly vloženy nejprve 3 vrstvy SDB-XC a poté 3 vrstvy C18 sorbentu. Do víček od mikroskopavek (40 ks) byl vytvořen pomocí nůžek otvor, do kterého byly vloženy připravené stagetipy. Schéma mikroSPE purifikace znázorněno na Obr. 12.



Obr. 12. Schéma purifikace na stagetipech. Modifikováno z Šíroká et al., 2022.

Během extrakce vzorků byla započata kondicionace připravených stagetipů, která probíhala v centrifuze, která byla nastavena na 2 200 rpm a 8 °C. Stagetipy byly nejprve kondicionovány 50 µl acetonu a centrifugovány 10 min, poté 50 µl MeOH (10 min) a následně i 50 µl vody (15 min).

Na takto kondiciované stagetipy bylo nanášeno 200 µl supernatantu extrahovaných vzorků (36) a blanků (4) na 1 stagetip (1-40) a byly centrifugovány po dobu 15 min při 4 200 rpm a 8 °C. Poté byly stagetipy promyty 50 µl 0,1% vodné kyseliny octové a centrifugovány 15 min při 3 400 rpm a 8 °C. U všech stagetipů (1-40) byly vyměněny mikrozkuřavky za nové, do kterých byly eluovány vzorky. Eluce proběhla pomocí 50 µl 80% vodného MeOH centrifugací 20 min při 3 000 rpm a 8 °C. Eluované vzorky byly přeneseny do vialek s inzerty a bez odpaření přímo zanalyzovány na SFC-MS/MS.

3.4.3 Kalibrační řada

Jednotlivé body kalibrační křivky (L5-L1; Tab. 6 a 7) byly připraveny tak, že nejprve byla do 5 vialek s inzerty označených L5-L1 napipetována rozpouštědla podle Tab. 6 (objem rozpouštědla). Poté do vialky L5 bylo k rozpouštědlu napipetováno 10 µl směsi 1 ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), 10 µl směsi 2 ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), 10 µl směsi 3 ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) (Tab. 6) a objem byl promíchán za pomoci špičky pipety. Složení analytů ve směsích 1-3 je uvedeno v kapitole 3.2.1. Poté bylo z vialky L5 odebráno 10 µl a přidáno do vialky L4 a objem této vialky byl promíchán špičkou pipety. Z vialky L4 bylo pomocí pipety odebráno 10 µl a přidáno k rozpouštědlu ve vialce L3 a promícháno za pomoci špičky pipety. Z vialky L3 bylo odebráno 10 µl a přidáno do vialky L2 a promícháno špičkou. Z vialky L2 bylo odebráno 10 µl a přidáno do vialky L1 a promícháno špičkou pipety. Z L1 vialky odpipetováno 10 µl do odpadu. Do vialek L5-L3 bylo poté napipetováno 10 µl pracovní směsi vnitřních standardů (složení a koncentrace uvedeny v kapitole 3.2.1) a do vialek L2 a L1 bylo napipetováno 10 µl 10x zředění pracovní směsi vnitřních standardů (Tab. 7). Výsledný objem ve všech vialkách byl 100 µl. Výsledná látková množství na 10 µl (nástřík) referenčních a vnitřních standardů připravených kalibračních bodů L5-L1 jsou uvedena v Tab. 7. Připravené kalibrační body L5-L1 byly analyzovány společně se vzorky SFC-MS/MS metodou. Vytvořené kalibrační křivky (Příloha 1) byly použity pro kvantifikaci analytů v rostlinných vzorcích stresovaných rostlin *A. thaliana*, a také pro zjištění limitu detekce.

Tab. 6 Příprava kalibrační řady - koncentrace referenčních standardů v jednotlivých kalibračních bodech. Složení směsí 1-3 je definované v kapitole 3.2.1.

Kalibrační bod	Požadovaná koncentrace standardů: směs 1 / 2 / 3	Výchozí koncentrace standardů směs 1 / 2 / 3	Objem výchozího roztoku standardů: směs 1 / 2 / 3	Objem rozpouštědla (složení rozpouštědla)
L5	$10^{-5} / 10^{-6} / 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-4} / 10^{-5} / 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 / 10 / 10 μl	70 μl (80% MeOH)
L4	$10^{-6} / 10^{-7} / 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-5} / 10^{-6} / 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 μl	90 μl (80% MeOH)
L3	$10^{-7} / 10^{-8} / 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-6} / 10^{-7} / 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 μl	90 μl (80% MeOH)
L2	$10^{-8} / 10^{-9} / 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-7} / 10^{-8} / 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 μl	90 μl (80% MeOH)
L1	$10^{-9} / 10^{-8} / 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^{-8} / 10^{-9} / 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	10 μl	90 μl (80% MeOH)

Tab. 7 Příprava kalibrační řady – látková množství referenčních a vnitřních standardů na objem 10 µl. Složení směsí 1-3 a pracovní směsi vnitřních standardů je definované v kapitole 3.2.1.

Kalibrační bod	Výsledné látkové množství referenčních standardů na 10 µl: směs 1 / 2 / 3	Výsledné látkové množství vnitřních standardů na 10 µl: SA- <i>d</i> ₄ , OPDA- <i>d</i> ₅ , JA- <i>d</i> ₆ , IAA- ¹³ C ₆ , oxIAA- ¹³ C ₆ , IAA-Asp- ¹³ C ₆ , IAA-Glu- ¹³ C ₆ , ABA- <i>d</i> ₆ , (-)-JA- <i>d</i> ₂ -Ile	Objem přidané pracovní směsi vnitřních standardů	Objem řady ředěné směsi referenčních standardů
L5	90 / 9 / 9 pmol	2 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 0,5 pmol	10 µl	90 µl
L4	9 / 0,9 / 0,9 pmol	2 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 0,5 pmol	10 µl	90 µl
L3	0,9 / 0,09 / 0,09 pmol	2 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 1 / 0,5 pmol	10 µl	90 µl
L2	0,09 / 0,009 / 0,009 pmol	0,2 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,05 pmol	10 µl	90 µl
L1	0,009 / 0,0009 / 0,0009 pmol	0,2 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,1 / 0,05 pmol	10 µl	90 µl

3.4.4 Statistické zpracování dat

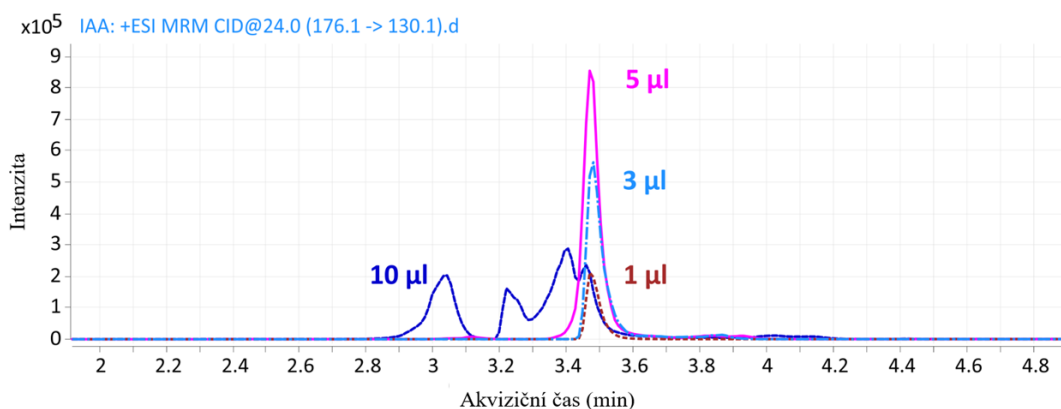
Hodnoty chromatografických vlastností (retenční čas, plochy píků a rozlišení) získané pomocí frakčního DoE byly centrovány průměrem, škálovány podělením směrodatnou odchylkou a metodou lineární regrese byly vypočítány regresní koeficienty (směrnice přímk), které jsou vzájemně porovnatelné a ze kterých byly vytvořeny teplotní mapy. Z regresního modelu byly vybrány signifikantní regresní koeficienty ($\alpha = 0,05$), které byly v teplotních mapách obarveny na barevné škále červeně (faktor zvyšuje hodnotu dané chromatografické vlastnosti) až modře (faktor snižuje hodnotu dané chromatografické vlastnosti). Nesignifikantní koeficienty byly v teplotních mapách obarveny šedě. Hodnocení spolehlivosti regresních modelů bylo provedeno na základě výpočtu koeficientu determinace (R^2) a predikce (Q^2), který vychází z křížové validace metodou „leave one out“.

Pro kvantifikaci koncentračních hladin kyselých hormonů v rostlinném materiálu byla použita metoda izotopového zředování. Kalibrační křivky byly vytvořeny metodou lineární regrese vnesením odezvy proti koncentraci referenčního standardu. Odezva byla vypočítána jako poměr plochy píků referenčního standardu a odpovídajícího vnitřního standardu vynásobené koncentrací vnitřního standardu. Odezvy i koncentrace byly logaritmicky transformovány.

4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace nástřikového objemu

Se zvyšujícím se nástřikem (1 μ l, 3 μ l, 5 μ l a 10 μ l) docházelo k rozšiřování píků analytů či jejich asymetrii. Tento jev byl nejvýraznější u auxinů, kde např. u IAA bylo pozorováno zhroucení separace u objemového nástřiku 10 μ l (Obr. 13). Proto byl jako kompromisní nástřik zvoleno 5 μ l, který poskytoval uspokojivý tvar píků u většiny analytů.

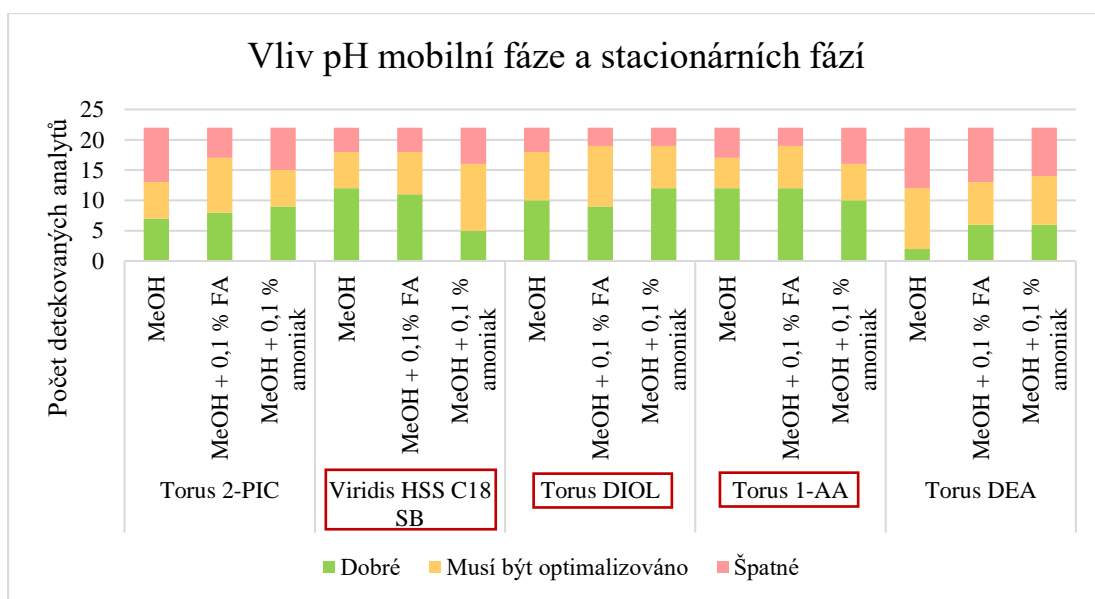


Obrázek 13. Ionový chromatogram IAA při různých nástřikových objemech (1 μ l, 3 μ l, 5 μ l a 10 μ l).

4.2 Výběr vhodné stacionární fáze – základní testování

Při základním testování 5-ti různých stacionárních fází (Obr. 6) byly zároveň testovány 3 různé složení MF B, kde byl sledován vliv pH MF na retenci a eluci analytů na koloně (Obr. 14). Byl zaznamenán počet detekovaných látek (zelená; Obr. 14). Dále počet látek, které byly detekovány, ale jejich tvar nebo množství píků pro jeden analyt stále potřeboval být optimalizováno (oranžová; Obr. 14). A poté byly zaznamenány látky, které nebylo možné na daných kolonách detekovat (červená; Obr. 14). V tomto ohledu sejevila kolona Viridis HSS C₁₈ SB, Torus DIOL a Torus 1-AA jako nejvhodnější pro další optimalizaci. U těchto kolon byl nejmenší počet látek, které nebyly vůbec detekovány. Jako méně vhodné pro další optimalizace sejevily kolony Torus DEA a Torus 2-PIC, proto již dále nebyly použity.

Pomocí základního testování bylo vyhodnoceno, že prozatím nejlepší výsledky vykazuje kolona Torus DIOL za použití MF A scCO₂ a MF B MeOH s 0,1 % amoniaku (Obr. 14). Při těchto podmínkách však PA a neoPA (izomery jež se detekují stejným MRM přechodem a musí být chromatograficky rozlišeny, Tab. 2), nebylo možné rozseparovat ani různými změnami gradientu, 12-OHJA měla silně asymetrický tvar píku a pro úspěšnou eluci IAA-Glu a IAA-Asp bylo zapotřebí prodloužit čas analýzy. Z těchto důvodů další optimalizace pokračovala na kolonách Viridis HSS C₁₈ SB a Torus 1-AA aplikací DoE.

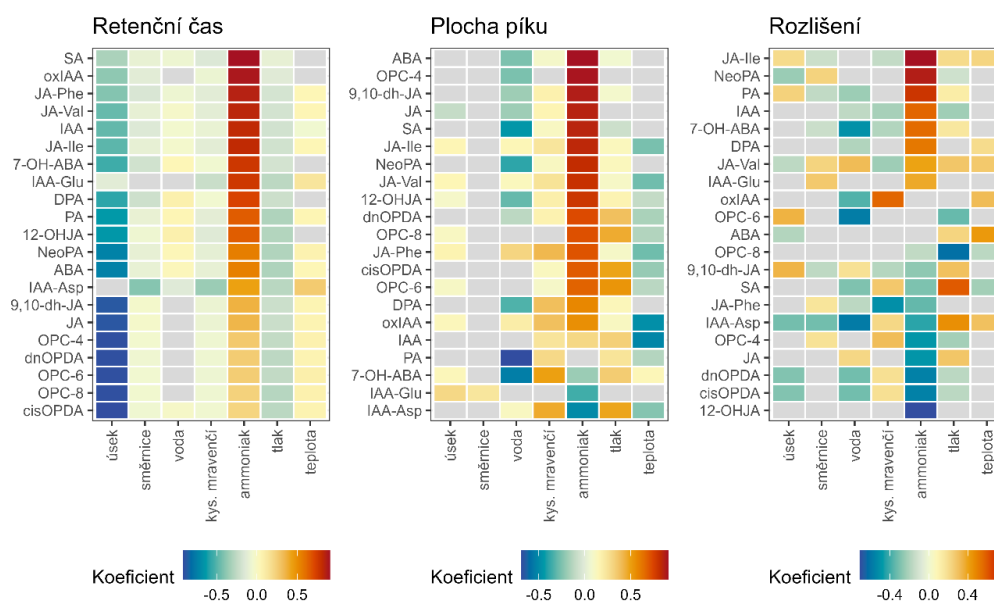


Obrázek 14. Vliv pH MF B a 5-ti zvolených stacionárních fází (Torus 2-PIC, Viridis HSS C₁₈ SB, Torus DIOL, Torus 1-AA, Torus DEA) na množství detekovaných analytů za stanovených podmínek (kapitola 3.4.1.3).

4.3 Frakční DoE kolona Torus 1-AA

Z dat experimentálního designu byly vytvořeny teplotní mapy, které reprezentují vliv 7 faktorů na retenční čas, plochu píku a rozlišení (Obr. 15). Z teplotní mapy, která reprezentuje vliv na retenční čas, lze vyčíst, že úsek (počáteční podmínky gradientu, % MF B), a přítomnost amoniaku mají největší vliv. Zvýšení počátečních podmínek gradientu % MF B mělo vliv na zkrácení retenčního času u většiny analytů (kromě IAA-Glu, IAA-Asp). Naopak amoniak v MF B měla opačný vliv a prodlužoval retenční čas analytů. Na plochu píků měla největší vliv přítomnost amoniaku a vody (Obr. 15). V přítomnosti amoniaku byly plochy píků skoro u všech analytů větší (kromě PA, 7-OH-ABA, IAA-Glu, IAA-Asp). U vyšší koncentrace vody v MF B byly pozorovány u některých látek menší plochy píků (především PA a 7-OH-ABA). Přítomnost amoniaku měla také vliv na rozlišení píků. Jeho přítomnost u některých látek rozlišení zlepšovala (JA-Ile, neoPA) a u některých naopak zhoršovala (*cis*-OPDA a 12-OHJA). Na této koloně ovšem nebylo možné spolehlivě rozlišit PA a neoPA. Ostatní faktory měly buď nesignifikanční nebo žádný vliv na zvolené chromatografické vlastnosti.

Spolehlivost regresních modelů, které vysvětlují vliv faktorů na retenční čas a plochu píku byla relativně vysoká pro většinu analytů, jak ukazují R^2 a $Q^2 > 0,5$ (Příloha 2). Regresní modely pro rozlišení byly spolehlivé jen pro analyty, u nichž měl amoniak největší vliv na rozlišení (JA-Ile, neoPA) (Příloha 2).

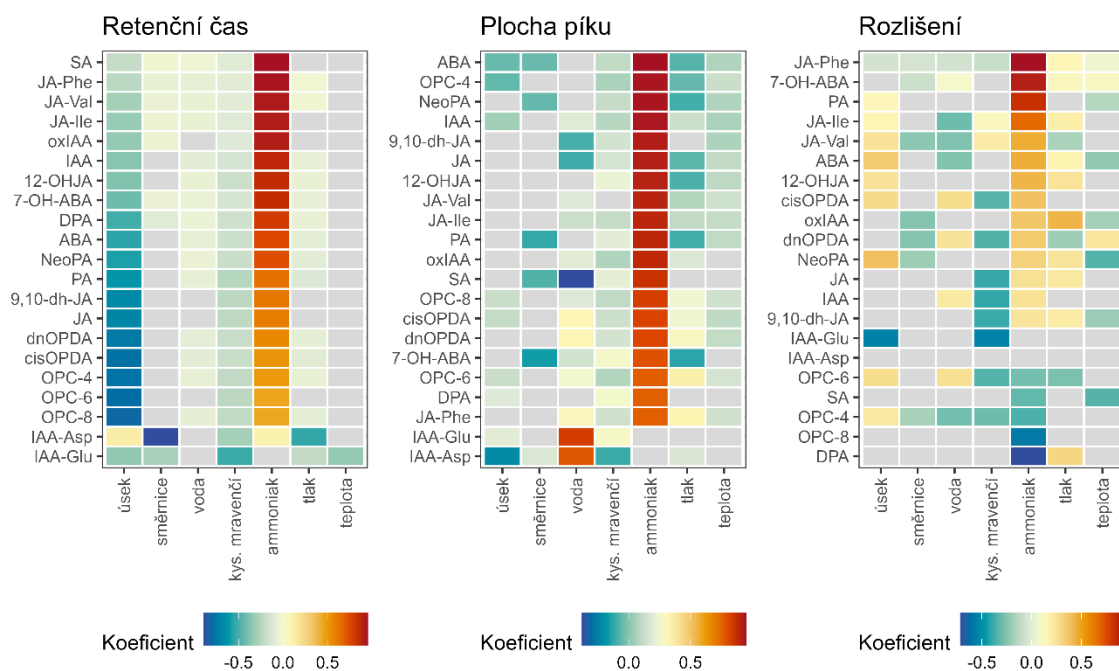


Obrázek 15. Kolona Torus 1-AA - teplotní mapy vytvořené z retenčního času, plochy píku, a rozlišení. Úsek (počáteční podmínky gradientu % MF B), směrnice (směrnice % MF B).

4.4 Frakční DoE kolona Viridis HSS C₁₈ SB

Z dat experimentálního designu byly vytvořeny teplotní mapy, které reprezentují vliv 7 faktorů na retenční čas, plochu píku a rozlišení (Obr. 16). Z teplotní mapy, která reprezentuje vliv na retenční čas, lze vyčíst, že obdobně jako u kolony Torus 1-AA, úsek (počáteční podmínky gradientu % MF B), a přítomnost amoniaku v MF mají největší vliv. Zvýšení úseku mělo vliv na zkrácení retenčního času u většiny analytů (kromě IAA-Asp a IAA-Glu). Naopak přítomnost amoniaku v MF B mělo opačný vliv a prodlužovalo retenční čas analytů (kromě IAA-Asp a IAA-Glu). Na plochu píků měla největší vliv přítomnost amoniaku (Obr. 16). V přítomnosti amoniaku byly plochy píků skoro u všech analytů větší (kromě IAA-Glu, IAA-Asp). U vyšší koncentrace vody byla pozorována zvětšená plocha píků u IAA-Asp a IAA-Glu, a výrazně snížená plocha píku SA (Obr. 16). Na rozlišení píků měla opět nejvyšší vliv přítomnost amoniaku. Zde byl pozorován pozitivní vliv u JA-Phe, 7-OH-ABA, PA a JA-Ile. Negativní vliv byl pozorován na DPA, OPC-8 a OPC-4. Na této koloně bylo možné separovat a rozlišit PA a neoPA, které mají stejné MRM tranzice. U ostatních analytů byl vliv na rozlišení buď velice mírný nebo nebyl žádný (Obr. 16). Ostatní faktory měly buď nesignifikantní nebo žádný vliv na zvolené chromatografické vlastnosti.

Spolehlivost regresních modelů, které vysvětlují vliv faktorů na retenční čas a plochu píku byla relativně vysoká pro většinu analytů, jak ukazují R^2 a $Q^2 > 0,5$ (Příloha 2). Regresní modely pro rozlišení byly spolehlivé jen pro analyty, u nichž měl amoniak největší vliv na rozlišení (JA-Phe, 7-OH-ABA, PA a JA-Ile) (Příloha 2).

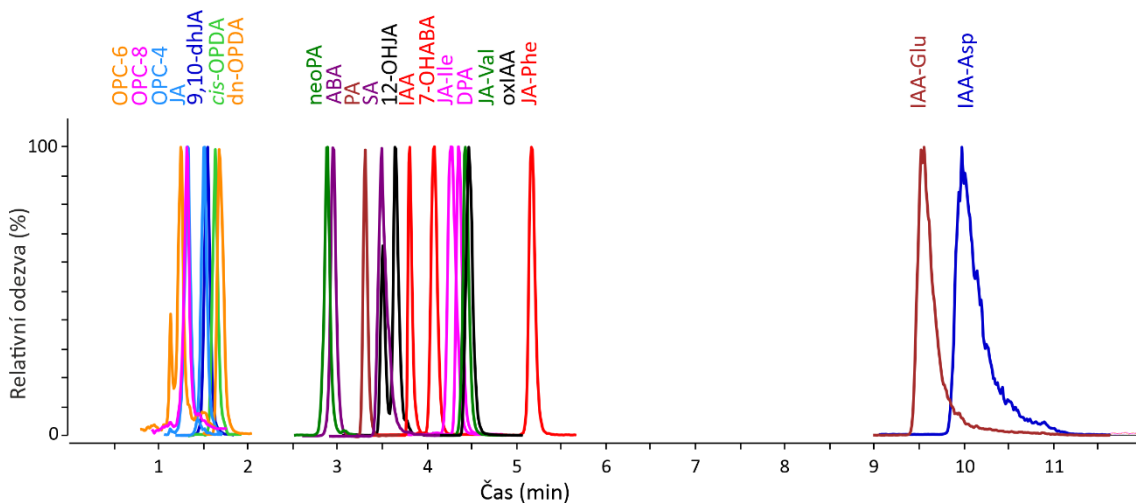


Obrázek 16. Viridis HSS C₁₈ SB – teplotní mapy vytvořené z retenčního času, plochy píku a rozlišení Úsek (počáteční podmínky gradientu % MF B), směrnice (směrnice % MF B).

4.5 Vytvořená SFC-MS/MS metoda

Na koloně Viridis HSS C₁₈ SB byla umožněna separace PA a neoPA, které mají stejné MRM přechody. I proto byla kolona Viridis HSS C₁₈ SB vybrána jako finální kolona pro analýzu kyselých fytohormonů. Metoda 8 (Tab. 5) byla vybrána jako neoptimálnější, zejména kvůli přítomnosti amoniaku, který měl pozitivní vliv na separaci většiny analytů. Jelikož přítomnost většího % vody měla u většiny analytů negativní vliv na velikost a rozlišení píku, byla vybrána nižší % vody v MF B. Separace analytů optimální metodou (metoda 8, Tab. 5) je zobrazena v Obr. 17.

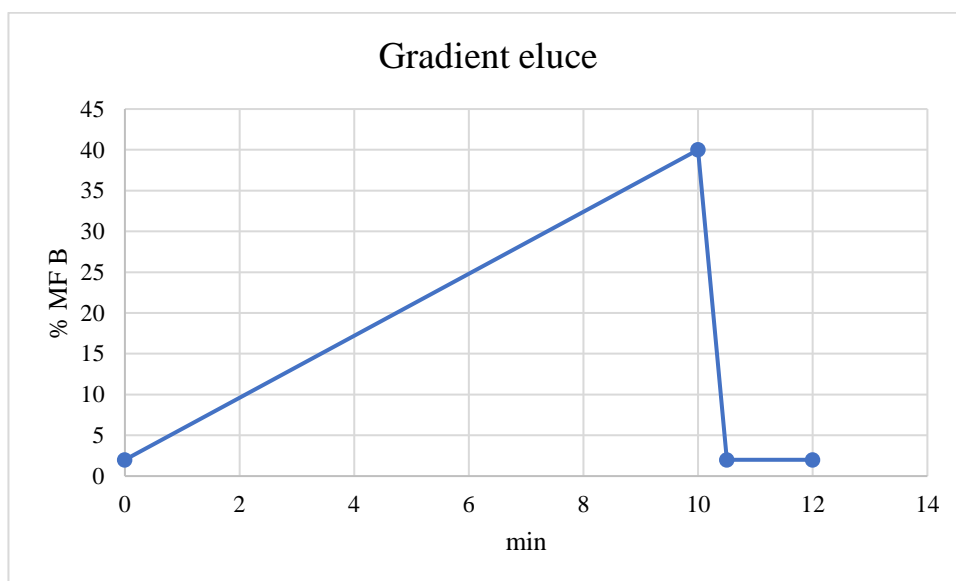
Výsledné podmínky SFC analýzy jsou uvedeny v Tab. 8. Průběh SFC gradientu byl před analýzou rostlinných vzorků zkrácen na 9 min, jeho finální verze je uvedena na Obr. 18.



Obrázek 17. Reprezentativní iontový chromatogramu separace standardů kyselých fytohormonů za na koloně Viridis HSS C₁₈ SB za použití metody 8 (Tab. 3).

Tab. 8: Výsledné SFC chromatografické podmínky. BPR – regulátor zpětného tlaku, MF B – mobilní fáze B.

SFC podmínky	Hodnoty
BPR	250 bar
Teplota na koloně	40 °C
MF A	scCO ₂ ,
MF B	MeOH, 0,1 % amoniaku, 0,5 % vody



Obrázek 18. Průběh gradientu finální SFC metody. % MF B – 2-40 %.

4.6 Porovnání SFC metody s LC

V Tab. 9 je uvedené porovnání metody SFC-MS/MS vytvořené v této diplomové práci a metody LC-MS/MS (Široká et al., 2022) pro analýzu kyselých fytohormonů za identických detekčních podmínek (Tab. 2). Jsou zde porovnány hodnoty meze detekce (LOD), které byly vypočítány jako trojnásobek výšky signálu šumu. LOD je nejnižší koncentrace, kterou lze se statistickou významností měřit (detekovat) pomocí daného analytického postupu. LOD byly vypočítané jako $LOD = 3 \times \frac{\text{výška šumu}}{b}$, kde b je směrnice kalibrační přímky sestavená z výšek píků analytu v lineárním rozsahu a odpovídajících koncentrací. V pěti případech byl LOD lepší u SFC (Tab. 9). V pěti případech byl LOD stejný u LC i SFC (Tab. 9). U jedenácti analytů byl LOD u SFC horší než u LC (Tab. 9).

Tab. 9: Srovnání LOD (mez detekce) mezi LC-MS/MS (Široká et al., 2022) a SFC-MS/MS (hodnoty získané v této diplomové práci).

analyt	LC	SFC
	LOD (fmol)	LOD (fmol)
IAA	0,5	0,5
oxIAA	10	0,5
IAA-Asp	25	2,5
IAA-Glu	2,5	2,5
<i>cis</i> -OPDA	2,5	5
OPC-8	25	25
OPC-6	25	25
OPC-4	25	25
dn-OPDA	25	5
JA	0,75	5
9,10-dhJA	2,5	10
12-OHJA	5	25
JA-Val	1	0,5
JA-Ile	2,5	0,5
JA-Phe	2,5	50
SA	25	250
ABA	0,25	2,5
PA	5	25
DPA	25	250
neoPA	1	2,5
7-OH-ABA	5	25

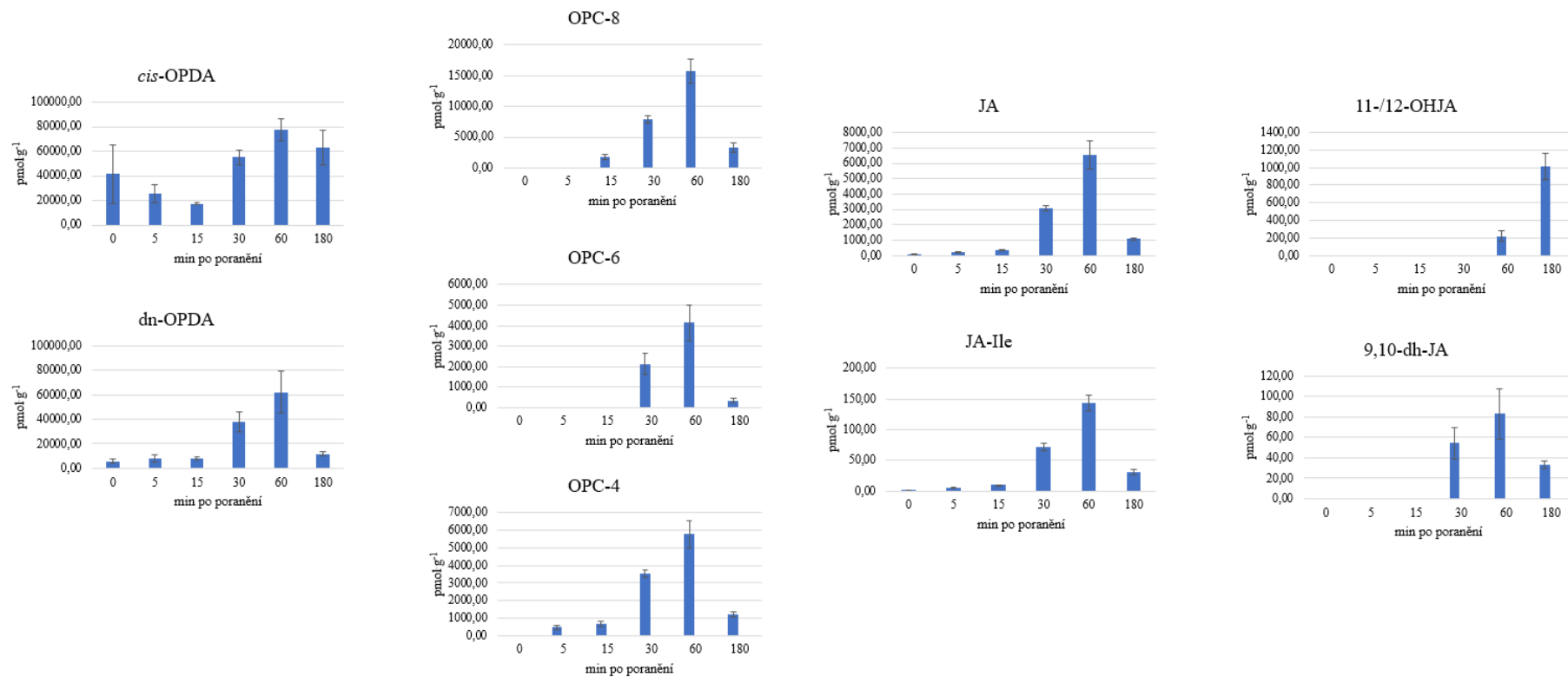
4.7 Analýza kyselých fytohormonů v mechanicky stresovaných rostlinách *A. thaliana*

Vyvinutá SFC metoda byla aplikována na stanovení hladin kyselých hormonů ve vzorcích mechanicky poraněných rostlin *A. thaliana*. Koncentrace analytů byly stanoveny na základě kalibračních křivek (Příloha 1).

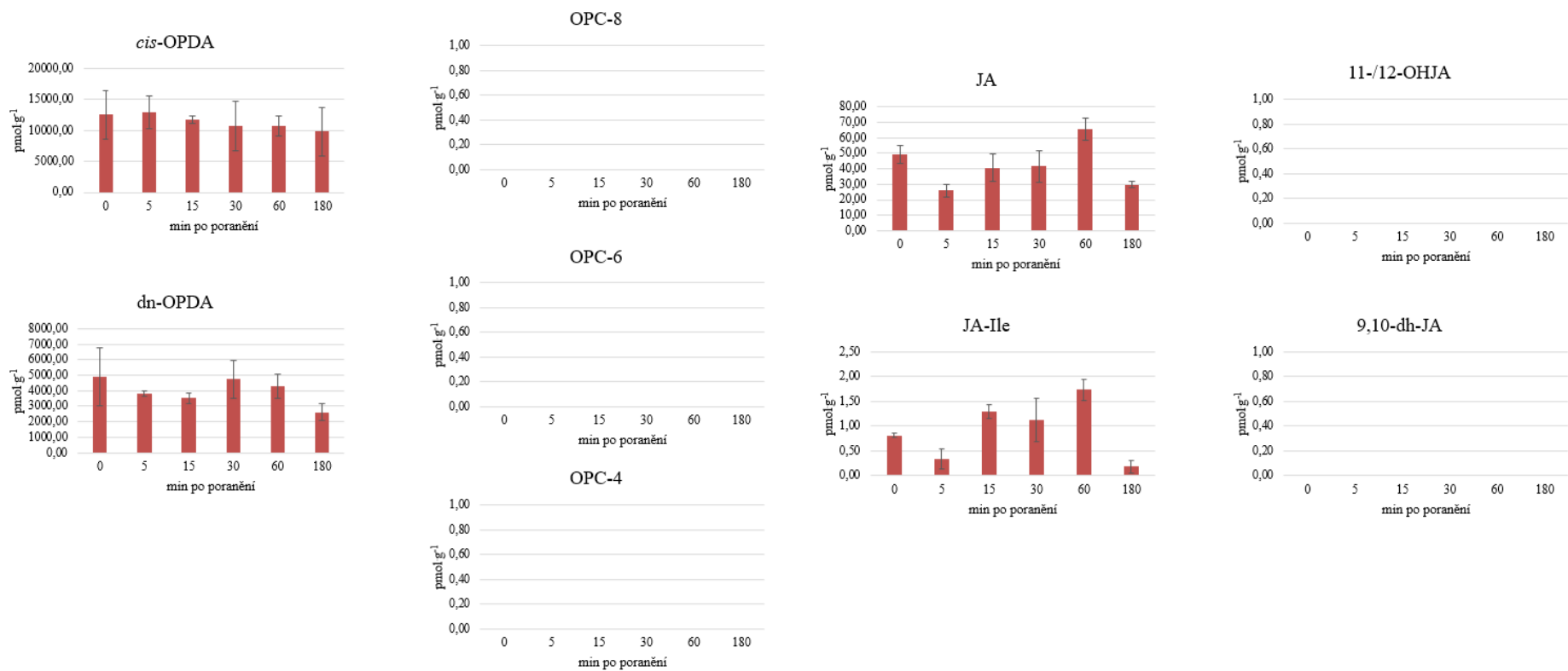
V poraněných listech *A. thaliana* bylo stanoveno několik JAs – *cis*-OPDA, *dn*-OPDA, OPC-8, OPC-6, OPC-4, JA, JA-Ile, suma nerozlišené 11- a 12-OHJA, 9,10-dh-JA (Obr. 19). U JAs (*cis*-OPDA), které byly detekované už v 0 min je třeba zohlednit, že zde jsou chybové úsečky velké. Obecně lze vidět, že systematická odpověď na mechanické poranění u *A. thaliana* začíná 30 min po poranění s maximem v 60 min a následným poklesem hladin ve 180 min (Obr. 19). Hladiny Σ 11-/12-OHJA narůstaly od 60 min (Obr. 19).

Ve vzdálených listech *A. thaliana* bylo také stanoveno několik JAs: *cis*-OPDA, *dn*-OPDA, JA a JA-Ile (Obr. 20). Koncentrace *cis*-OPDA a *dn*-OPDA byly téměř konstantní ve všech časových bodech. Zde je ale také třeba zohlednit velikost chybových úseček. U JA a JA-Ile je patrný mírný nárůst koncentrace v 60 min s poklesem ve 180 min (Obr. 20).

Hladiny JAs v poraněných listech byly řádově 100x vyšší než u listů neporaněných (Obr. 19 a 20).



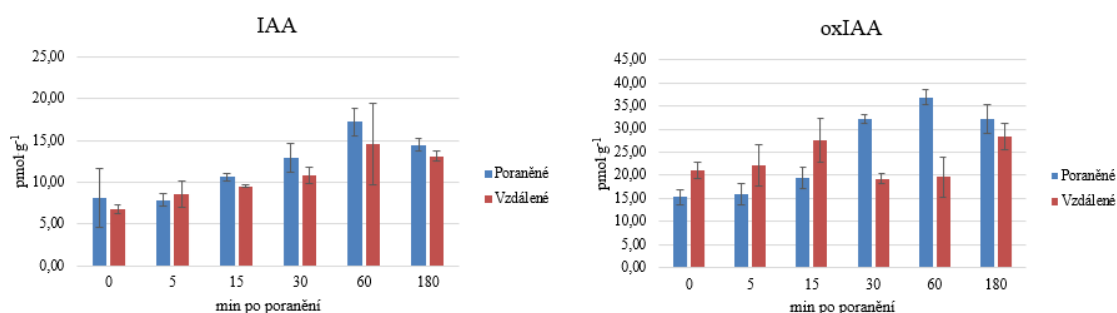
Obrázek 19. Koncentrační profily JAs (*cis*-OPDA, dn-OPDA, OPC-8, OPC-6, OPC-4, JA, JA-Ile, Σ 11-/12-OHJA, 9,10-dh-JA) v poraněných listech *A. thaliana* v 0, 5, 15, 30, 60 a 180 min po poranění. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky.



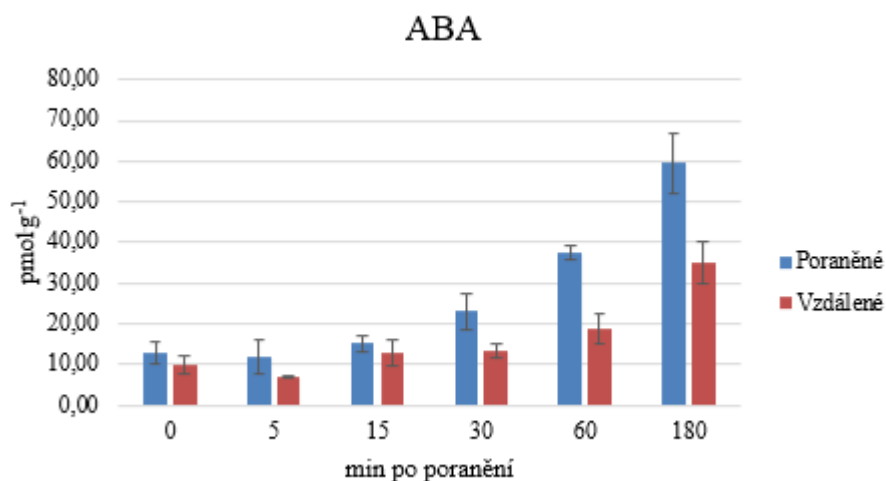
Obrázek 20. Koncentrační profily JAs ve vzdálených listech *A. thaliana* v 0, 5, 15, 30, 60 a 180 min po poranění. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky.

Bylo stanoveno i několik AUX: IAA, oxIAA (Obr. 21). IAA i oxIAA byly detekovány v poraněných i vzdálených listech (Obr. 21). Jejich koncentrace se průběžně zvyšovala od 5 min po poranění až do 60 min po poranění. Ve 180 min byl pozorován menší pokles v koncentraci IAA. Narozdíl od JAs, koncentrace AUX v poraněných a vzdálených listech se pohybovala v podobných hladinách.

Dále byla detekována ABA, jejíž koncentrace se postupně zvyšovala v poraněných i vzdálených listech, přičemž ve 180 min od poranění byla její hodnota nejvyšší (Obr. 22).



Obrázek 21. Koncentrační profily AUX v poraněných a vzdálených listech *A. thaliana* v 0, 5, 15, 30, 60 a 180 min po poranění. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky.



Obrázek 22. Koncentrační profily ABA v poraněných a vzdálených listech *A. thaliana* v 0, 5, 15, 30, 60 a 180 min po poranění. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky.

5 DISKUSE

5.1 Nástřik vzorku

80% vodný MeOH byl vybrán jako rozpouštědlo vzorku, protože umožňuje nástřik přímo na SFC hned po purifikaci bez potřeby odpařování a znovurozpouštění vzorku před analýzou. Objem nástřiku 10 μ l, ale nebyl vhodný pro reprodukovatelnost a tvar píků. Přítomností velkého množství rozpouštědla vzorku (tj. vysoký nástřikový objem) je počáteční část stacionární fáze v koloně nasycena rozpouštědlem, což nutí alespoň část pásma analytu pohybovat se spolu s rozpouštědlem bez interakce se stacionární fází, což vede k silné asymetrii píků, nebo zhroucení separace některých analytů (Desfontaine et al., 2017). Objem nástřiku vzorku by měl být co nejmenší s ohledem na reprodukovatelnost nástřiku a detekční limity systému. Jelikož jsou koncentrace kyselých fytohormonů v rostlinném materiálu velice nízké je zapotřebí zvolit kompromis v nástřikovém objemu (J. Fairchild et al., 2013). Proto byl jako nejvhodnější objem zvoleno 5 μ l.

5.2 Výběr stacionární fáze

Polární kolony DIOL a DEA byly pravděpodobně nevhodné pro analýzu kyselých fytohormonů, jelikož jsou svou chemií stacionární fáze vhodné spíše pro separaci polárních bazických sloučenin (Petřík et al., 2024; West et al., 2016). Torus 2-PIC je kolona s polární stacionární fází a je vhodná pro separaci polárních bazických ale i kyselých sloučenin (Galea et al., 2015; West et al., 2016). Analyzované sloučeniny zahrnovaly jak polární, tak i nepolární látky. Retence na nepolární koloně Torus 1-AA je založena na π - π interakcích mezi antracenovou skupinou stacionární fáze a aromatickými skupinami analytů. Torus 1-AA je vhodná pro analýzu nepolárních kyselých a bazických sloučenin (Tyśkiewicz et al., 2018). Viridis HSS C₁₈ SB je nepolární stacionární fáze, která se skládá ze stacionárních fází s alkylovou vazbou, které nemají hydrofilní skupiny. Tato kolona je vhodná pro separaci nepolárních kyselých, neutrální sloučenin, ale i slabých bází. Polární analyty obecně vykazují špatné retenční chování a mají špatný tvar píku. Tento problém se ovšem dá vyřešit přidavkem organického modifikátoru s příslušnými aditivami (M. Chen et al., 2022; West et al., 2016).

5.3 DoE

Přídavek amoniaku zvyšoval plochu píku, měl vliv na rozlišení a zároveň snižoval retenční čas. Amoniak v MF může soutěžit s kyselými analyty o adsorpční místa na

stacionární fázi, což pomáhá maskovat zbytkové silanolové skupiny a zlepšovat tvar píku (Edge et al., 2022). Přítomnost amoniaku může také zvyšovat ionizaci analytů v ESI, což může být výhodné pro jejich detekci (J. Liu et al., 2019).

5.4 Porovnání SFC s LC

Citlivost metody SFC-MS/MS je u některých analytů nižší než u LC-MS/MS (Široká et al., 2022). To může být zapříčiněno vlivem aditiv na účinnosti ionizace (Gazárková et al., 2022). U vytvořené SFC-MS/MS metody byla doba analýzy 12 min, přičemž analýza stejných látek u LC-MS/MS metody trvala 19 min (Široká et al., 2022). Tvary píků byly obecně lepší u LC-MS/MS metody (Široká et al., 2022). U metody SFC-MS/MS (Obr. 17) byly tvary píků u některých látek nesymetrické (IAA-Glu, IAA-Asp, OPC-6; Obr. 17). U 11-/12-OHJA na SFC-MS/MS nebylo možné rozlišit 11-OHJA od 12-OHJA, což ovšem nebylo možné ani u LC-MS/MS (Široká et al., 2022). U SFC-MS/MS metody není třeba vzorek před analýzou odpařovat, což je výhodou oproti LC-MS/MS, kde je tento krok potřebný (Široká et al., 2022).

5.5 Analýza kyselých fytohormonů v mechanicky stresovaných rostlinách *A. thaliana*

V experimentu, kde byly mechanicky poškozeny listy *A. thaliana* byly detekovány hladiny JAs. Ve výsledcích lze vidět jakým způsobem je JA biosyntetizována. V dalších publikacích zaměřujících se na analýzu fytohormonů po mechanickém poranění u *A. thaliana* bylo detekováno několik JAs (UHPLC-MS/MS; Floková et al., 2014). Lokální akumulace JA v poraněných listech zde dosáhla vrcholu v 30 min po poranění a byla 33krát vyšší než u neporaněných listů. Byla zde tedy také pozorována systémová reakce na stres z poranění (Floková et al., 2014). Stejně jako v této práci byla pozorována i akumulace *cis*-OPDA, naznačující biosyntézu JA a jejího biologicky aktivního konjugátu JA-Ile. Podobný profil JAs byl tedy pozorován i v Floková et al. (2014), kde ale do analýzy nebyly zahrnuty *dn*-OPDA a OPC-8. V dalších publikacích, které se zabývali stejným tématem se u *A. thaliana* JA lokálně akumulovala v listech již 30 s po poranění a k významnému zvýšení hladin JA-Ile bylo zapotřebí méně než 5 minut (Glauser et al., 2009). Vzestup hladiny JA a JA-Ile je doprovázen vzestupem hladiny *cis*-OPDA v místních, respektive systémových listech (Koo et al., 2009).

Zvyšující se hladina ABA v poraněných listech napovídá tomu, že poraněné rostliny usychaly. Při stresu suchem se hladina ABA zvyšuje zejména v listech a vodivých

pletivech. Toto zvýšení hladiny ABA vyvolává uzavření průduchů, což snižuje ztráty vody transpirací (Takahashi et al., 2020).

6 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla připravená literární rešerše týkající se kyselých fytohormonů a možnosti jejich analýzy. Dále byla práce zaměřena na obecné představení metody SFC a MS/MS a použití DoE jako nástroje pro optimalizaci chromatografických metod.

V experimentální části diplomové práce byla provedena optimalizace nástřikového objemu, kde jako nejvhodnější objem bylo zvoleno 5 μ l. Dále bylo provedeno základní testování pěti chromatografických kolon (Torus DEA, Torus 2-PIC, Torus DIOL, Viridis HSS C₁₈ SB), kde byl zároveň sledován i vliv pH MF na detekci analytů. Na základě výsledků z provedených měření byly vybrány 2 kolony (Viridis HSS C₁₈ SB, Torus 1-AA), které byly dále použity pro komplexní optimalizaci systému pomocí metody frakčního DoE. Byly vybrány faktory mající vliv na SFC chromatografii (počáteční podmínky gradientu % MF B, směrnice % MF B, % vody v MF B, amoniaku v MF B, FA v MF B, BPR, teplota na koloně). Prostřednictvím frakčního DoE bylo sestaveno 16 metod, které byly aplikovány na tyto 2 kolony. Získané výsledky byly vizualizovány v podobě teplotních map pro 3 chromatografické vlastnosti: retenční čas, plocha píku a rozlišení. Byl ohodnocen vliv vybraných faktorů na chromatografické vlastnosti a vybrána nejvhodnější metoda pro separaci kyselých fytohormonů. Jako nejvhodnější kolona se jevila Viridis HSS C₁₈ SB za použití scCO₂, MeOH, 0,1% amoniaku a 0,5% vody jako MF, gradient eluce MF B byl nastaven na 2-40% během 9 minut, BPR byl nastaven na 250 bar a teplota na koloně na 40 °C. Celková doba analýzy byla 12 min. Tato vytvořená metoda byla aplikována na experiment, ve kterém byly sledovány hladiny kyselých fytohormonů v odpovědi na mechanický stres v poraněných a vzdálených listech *A. thaliana*. Byly kvantifikovány hladiny JAs: *cis*-OPDA, *dn*-OPDA, OPC-8, OPC-6, OPC-4, JA, JA-Ile, 9,10-dh-JA a OHJA. Dále byly kvantifikovány hladiny IAA, oxIAA a ABA. V souladu s literaturou byla pozorována změna hladin JAs v reakci na mechanický stres.

7 LITERATURA

- Acosta, I. F., & Farmer, E. E. (2010). Jasmonates. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8, e0129. <https://doi.org/10.1199/tab.0129>
- Araujo, P., & Grung, B. (2012). Chemometrics in chromatography. *Journal of Chromatography B, Complete*(910), 1. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.10.042>
- Balcke, G. U., Handrick, V., Bergau, N., Fichtner, M., Henning, A., Stellmach, H., Tissier, A., Hause, B., & Frolov, A. (2012). An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods*, 8, 47. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-47>
- Berger, T. A. (1995). *Packed Column SFC*. Royal Society of Chemistry.
- Binks, R., MacMillan, J., & Pryce, R. J. (1969). Plant hormones—VIII: Combined gas chromatography-mass spectrometry of the methyl esters of gibberellins A1 to A24 and their trimethylsilyl ethers. *Phytochemistry*, 8(1), 271–284. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85825-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85825-2)
- Blackwell, J. A., Stringham, R. W., & Weckwerth, J. D. (1997). Effect of mobile phase additives in packed-column subcritical and supercritical fluid chromatography. *Analytical Chemistry*, 69(3), 409–415. <https://doi.org/10.1021/ac9608883>
- Browse, J. (2009). Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 183–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092007>
- Brumos, J., Robles, L. M., Yun, J., Vu, T. C., Jackson, S., Alonso, J. M., & Stepanova, A. N. (2018). Local Auxin Biosynthesis Is a Key Regulator of Plant Development. *Developmental Cell*, 47(3), 306–318.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.022>
- Cai, W.-J., Yu, L., Wang, W., Sun, M.-X., & Feng, Y.-Q. (2019). Simultaneous Determination of Multiclass Phytohormones in Submilligram Plant Samples by One-Pot Multifunctional Derivatization-Assisted Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 91(5), 3492–3499. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05087>
- Cao, D., & He, M. (2023). Editorial: Methods in phytohormone detection and quantification: 2022. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1235688>
- Cao, D., Lutz, A., Hill, C. B., Callahan, D. L., & Roessner, U. (2017). A Quantitative Profiling Method of Phytohormones and Other Metabolites Applied to Barley Roots Subjected to Salinity Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02070>
- Casanova-Sáez, R., Mateo-Bonmatí, E., & Ljung, K. (2021). Auxin Metabolism in Plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(3), a039867. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039867>
- Casanova-Sáez, R., & Voß, U. (2019). Auxin Metabolism Controls Developmental Decisions in Land Plants. *Trends in Plant Science*, 24(8), 741–754. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.006>
- Cutler, A. J., & Krochko, J. E. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4(12), 472–478. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01497-1](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01497-1)
- Dave, A., & Graham, I. A. (2012). Oxylipin Signaling: A Distinct Role for the Jasmonic Acid Precursor cis-(+)-12-Oxo-Phytodienoic Acid (cis-OPDA). *Frontiers in plant science*, 3, 42. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00042>
- David, F., Medvedovici, A., & Sandra, P. (2000). OILS, FATS AND WAXES: SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY. In I. D. Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science* (s. 3567–3575). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/04071-0>
- Davies, P. J. (Ed.). (2010). *Plant Hormones*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7>
- Desfontaine, V., Tarafder, A., Hill, J., Fairchild, J., Grand-Guillaume Perrenoud, A., Veuthey, J.-L., & Guillarme, D. (2017). A systematic investigation of sample diluents in modern

- supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1511, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.075>
- Desfontaine, V., Veuthey, J.-L., & Guillaume, D. (2016). Evaluation of innovative stationary phase ligand chemistries and analytical conditions for the analysis of basic drugs by supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1438, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.029>
- Desmorteux, C., Rothaupt, M., West, C., & Lesellier, E. (2009). Improved separation of furocoumarins of essential oils by supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(42), 7088–7095. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.080>
- Deye, J. F., Berger, T. A., & Anderson, A. G. (1990). Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids. *Analytical Chemistry*, 62(6), 615–622. <https://doi.org/10.1021/ac00205a015>
- Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science*, 25(6), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004>
- Dispas, A., Jambo, H., André, S., Tyteca, E., & Hubert, P. (2018). Supercritical fluid chromatography: A promising alternative to current bioanalytical techniques. *Bioanalysis*, 10(2), 107–124. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0211>
- Du, F., Ruan, G., & Liu, H. (2012). Analytical methods for tracing plant hormones. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(1), 55–74. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5623-x>
- Ebrahimi-Najafabadi, H., Leardi, R., & Jalali-Heravi, M. (2014). Experimental Design in Analytical Chemistry—Part I: Theory. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 97(1), 3–11. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGEEbrahimi1>
- Edge, T., James, M., Pipe, C., Bylikin, S., Field, J., & Euerby, M. (2022). *An Assessment of Stationary Phase Selectivity in SFC*. 40, 9–22.
- Edlund, A., Eklof, S., Sundberg, B., Moritz, T., & Sandberg, G. (1995). A Microscale Technique for Gas Chromatography-Mass Spectrometry Measurements of Picogram Amounts of Indole-3-Acetic Acid in Plant Tissues. *Plant Physiology*, 108(3), 1043–1047. <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.1043>
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., & Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(12). <https://doi.org/10.1007/s00018-004-3381-z>
- Erland, L. A. E., Shukla, M. R., Glover, W. B., & Saxena, P. K. (2017). A simple and efficient method for analysis of plant growth regulators: A new tool in the chest to combat recalcitrance in plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131(3), 459–470. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1297-1>
- Fairchild, J., Hill, J., & Iraneta, P. (2013). *Influence of Sample Solvent Composition for SFC Separations*. 31, 326–333.
- Fairchild, J. N., Brousmiche, D. W., Hill, J. F., Morris, M. F., Boissel, C. A., & Wyndham, K. D. (2015). Chromatographic evidence of silyl ether formation (SEF) in supercritical fluid chromatography. *Analytical Chemistry*, 87(3), 1735–1742. <https://doi.org/10.1021/ac5035709>
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- Floková, K., Tarkowská, D., Miersch, O., Strnad, M., Wasternack, C., & Novák, O. (2014). UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry*, 105, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.015>
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., & Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nchembio.161>
- Galea, C., Mangelings, D., & Vander Heyden, Y. (2015). Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC – a review. *Analytica Chimica Acta*, 886, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.009>

- Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 6, 228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- Gazárková, T., Plachká, K., Svec, F., & Nováková, L. (2022). Current state of supercritical fluid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 149, 116544. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116544>
- Glauser, G., Dubugnon, L., Mousavi, S. A. R., Rudaz, S., Wolfender, J.-L., & Farmer, E. E. (2009). Velocity Estimates for Signal Propagation Leading to Systemic Jasmonic Acid Accumulation in Wounded Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34506–34513. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.061432>
- Grand-Guillaume Perrenoud, A., Veuthey, J.-L., & Guilleme, D. (2012). Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds. *Journal of Chromatography A*, 1266, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.005>
- Grebe, S. K., & Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here? *The Clinical Biochemist Reviews*, 32(1), 5–31.
- Guan, Z., & Eichler, J. (2011). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry of dolichols and polyprenols, lipid sugar carriers across evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 800–806. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2011.04.009>
- Haag, A. M. (2016). Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In H. Mirzaei & M. Carrasco (Ed.), *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications* (Roč. 919, s. 157–169). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7
- Han, Z., Liu, G., Rao, Q., Bai, B., Zhao, Z., Liu, H., & Wu, A. (2011). A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of acid/alkaline phytohormones in grapes. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 881–882, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.12.002>
- Harps, L. C., Joseph, J. F., & Parr, M. K. (2019). SFC for chiral separations in bioanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 162, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.061>
- Harrison, S. T. L. (2011). Cell Disruption. In *Comprehensive Biotechnology* (s. 619–640). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00127-6>
- Hayashi, K., Arai, K., Aoi, Y., Tanaka, Y., Hira, H., Guo, R., Hu, Y., Ge, C., Zhao, Y., Kasahara, H., & Fukui, K. (2021). The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications*, 12(1), 6752. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27020-1>
- HIRAI, N., YOSHIDA, R., TODOROKI, Y., & OHIGASHI, H. (2000). Biosynthesis of Abscisic Acid by the Non-mevalonate Pathway in Plants, and by the Mevalonate Pathway in Fungi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(7), 1448–1458. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1448>
- Hitchen, S. M., & Dean, J. R. (1993). Properties of supercritical fluids. In J. R. Dean (Ed.), *Applications of Supercritical Fluids in Industrial Analysis* (s. 1–11). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2146-0_1
- Howe, G. A., Major, I. T., & Koo, A. J. (2018). Modularity in Jasmonate Signaling for Multistress Resilience. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 387–415. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040047>
- Huang, L., He, M., Chen, B., & Hu, B. (2014). Membrane-supported liquid–liquid–liquid microextraction combined with anion-selective exhaustive injection capillary electrophoresis-ultraviolet detection for sensitive analysis of phytohormones. *Journal of Chromatography A*, 1343, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.053>
- Chen, H., Guo, X.-F., Zhang, H.-S., & Wang, H. (2011). Simultaneous determination of phytohormones containing carboxyl in crude extracts of fruit samples based on chemical derivatization by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 879(20), 1802–1808. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.05.002>
- Chen, L., Dean, B., & Liang, X. (2021). A technical overview of supercritical fluid chromatography-mass spectrometry (SFC-MS) and its recent applications in pharmaceutical

- research and development. *Drug Discovery Today: Technologies*, 40, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.10.002>
- Chen, M., Wen, S.-S., Wang, R., Ren, Q.-X., Guo, C.-W., Li, P., & Gao, W. (2022). Advanced Development of Supercritical Fluid Chromatography in Herbal Medicine Analysis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(13), 4159. <https://doi.org/10.3390/molecules27134159>
- Chen, M.-L., Huang, Y.-Q., Liu, J.-Q., Yuan, B.-F., & Feng, Y.-Q. (2011). Highly sensitive profiling assay of acidic plant hormones using a novel mass probe by capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879(13), 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.03.003>
- Chen, Y., Shen, H., Wang, M., Li, Q., & He, Z. (2013). Salicyloyl-aspartate synthesized by the acetyl-amido synthetase GH3.5 is a potential activator of plant immunity in Arabidopsis. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 45(10), 827–836. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt078>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L., & Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>
- Chini, A., Monte, I., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., & Solano, R. (2023). Evolution of the jasmonate ligands and their biosynthetic pathways. *New Phytologist*, 238(5), 2236–2246. <https://doi.org/10.1111/nph.18891>
- Chiwocha, S. D. S., Abrams, S. R., Ambrose, S. J., Cutler, A. J., Loewen, M., Ross, A. R. S., & Kermodé, A. R. (2003). A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: An analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *The Plant Journal*, 35(3), 405–417. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01800.x>
- Jiang, C., Dai, J., Han, H., Wang, C., Zhu, L., Lu, C., & Chen, H. (2020a). Determination of thirteen acidic phytohormones and their analogues in tea (*Camellia sinensis*) leaves using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1149, 122144. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122144>
- Jiang, C., Dai, J., Han, H., Wang, C., Zhu, L., Lu, C., & Chen, H. (2020b). Determination of thirteen acidic phytohormones and their analogues in tea (*Camellia sinensis*) leaves using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1149, 122144. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122144>
- Jiang, T.-F., Lv, Z.-H., Wang, Y.-H., & Yue, M.-E. (2006). Separation of Plant Hormones from Biofertilizer by Capillary Electrophoresis Using a Capillary Coated Dynamically with Polycationic Polymers. *Analytical Sciences*, 22(6), 811–814. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.811>
- Kachroo, P., Liu, H., & Kachroo, A. (2020). Salicylic acid: Transport and long-distance immune signaling. *Current Opinion in Virology*, 42, 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.05.008>
- Kneeshaw, S., Soriano, G., Monte, I., Hamberg, M., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., Franco-Zorrilla, J. M., Kato, N., Ueda, M., Rey-Stolle, M. F., Barbas, C., Michavila, S., Gimenez-Ibanez, S., Jimenez-Aleman, G. H., & Solano, R. (2022). Ligand diversity contributes to the full activation of the jasmonate pathway in *Marchantia polymorpha*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(36), e2202930119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2202930119>
- Koo, A. J. K., Gao, X., Daniel Jones, A., & Howe, G. A. (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 59(6), 974–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03924.x>
- Korany, M. A., Mahgoub, H., Haggag, R. S., Ragab, M. A. A., & Elmallah, O. A. (2017). Green chemistry: Analytical and chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40(16), 839–852. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1373672>

- Korasick, D. A., Enders, T. A., & Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, *64*(9), 2541–2555. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert080>
- Kuhn, M. (2008). Building Predictive Models in R Using the caret Package. *Journal of Statistical Software*, *28*, 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i05>
- Kumar, S., Shah, S. H., Vimala, Y., Jatav, H. S., Ahmad, P., Chen, Y., & Siddique, K. H. M. (2022). Abscisic acid: Metabolism, transport, crosstalk with other plant growth regulators, and its role in heavy metal stress mitigation. *Frontiers in Plant Science*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.972856>
- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Lesellier, E. (2009). Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns. *Journal of Chromatography A*, *1216*(10), 1881–1890. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.081>
- Lesellier, E. (2020). Usual, unusual and unbelievable retention behavior in achiral supercritical fluid chromatography: Review and discussion. *Journal of Chromatography A*, *1614*, 460582. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460582>
- Lesellier, E., Destandau, E., Grigoras, C., Fougère, L., & Elfakir, C. (2012). Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector. *Journal of Chromatography A*, *1268*, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.102>
- Lesellier, E., Mith, D., & Dubrulle, I. (2015). Method developments approaches in supercritical fluid chromatography applied to the analysis of cosmetics. *Journal of Chromatography A*, *1423*, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.053>
- Lesellier, E., & West, C. (2015). The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review. *Journal of Chromatography A*, *1382*, 2–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.083>
- Li, R., Chen, Z., Dong, F., Xu, J., Liu, X., Wu, X., Pan, X., Tao, Y., & Zheng, Y. (2018). Supercritical fluid chromatographic-tandem mass spectrometry method for monitoring dissipation of thiacloprid in greenhouse vegetables and soil under different application modes. *Journal of Chromatography B*, *1081–1082*, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.021>
- Lin, C. H., Lin, Y. L., & Chow, Y.-J. (1988). A simple bioassay for abscisic acid using cucumber hypocotyls. *Journal of Plant Growth Regulation*, *7*(3), 161–168. <https://doi.org/10.1007/BF02024679>
- Liu, J., Makarov, A. A., Bennett, R., Haidar Ahmad, I. A., DaSilva, J., Reibarkh, M., Mangion, I., Mann, B. F., & Regalado, E. L. (2019). Chaotropic Effects in Sub/Supercritical Fluid Chromatography via Ammonium Hydroxide in Water-Rich Modifiers: Enabling Separation of Peptides and Highly Polar Pharmaceuticals at the Preparative Scale. *Analytical Chemistry*, *91*(21), 13907–13915. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03408>
- Liu, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Li, G., Yang, G., & Feng, X. (2020). The Application of Supercritical Fluid Chromatography in Food Quality and Food Safety: An Overview. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *50*(2), 136–160. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1586520>
- Liu, X., Ma, L., Lin, Y.-W., & Lu, Y.-T. (2003). Determination of abscisic acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, *1021*(1), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.004>
- Liu, Y., Fang, X., Chen, G., Ye, Y., Xu, J., Ouyang, G., & Zhu, F. (2019). Recent development in sample preparation techniques for plant hormone analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *113*, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.006>
- Ljung, K., Sandberg, G., & Moritz, T. (2010). Methods of Plant Hormone Analysis. In P. J. Davies (Ed.), *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (s. 717–740). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_31
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, *62*(6), 1757–1773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq412>

- Mik, V., Pospíšil, T., Brunoni, F., Grúz, J., Nožková, V., Wasternack, C., Miersch, O., Strnad, M., Floková, K., Novák, O., & Šíroká, J. (2023). Synthetic and analytical routes to the L-amino acid conjugates of cis-OPDA and their identification and quantification in plants. *Phytochemistry*, *215*, 113855. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113855>
- Monte, I. (2023). Jasmonates and salicylic acid: Evolution of defense hormones in land plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *76*, 102470. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102470>
- Monte, I., Caballero, J., Zamarreño, A. M., Fernández-Barbero, G., García-Mina, J. M., & Solano, R. (2022). JAZ is essential for ligand specificity of the COI1/JAZ co-receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(49), e2212155119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2212155119>
- Monte, I., Ishida, S., Zamarreño, A. M., Hamberg, M., Franco-Zorrilla, J. M., García-Casado, G., Gouhier-Darimont, C., Reymond, P., Takahashi, K., García-Mina, J. M., Nishihama, R., Kohchi, T., & Solano, R. (2018). Ligand-receptor co-evolution shaped the jasmonate pathway in land plants. *Nature Chemical Biology*, *14*(5), 480–488. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0033-4>
- Mousavi, L., Tamiji, Z., & Khoshayand, M. R. (2018). Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review. *Talanta*, *190*, 335–356. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.002>
- Müller, A., Düchting, P., & Weiler, E. W. (2002). A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, *216*(1), 44–56. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0866-6>
- Müller, K., Dobrev, P. I., Pěňčík, A., Hošek, P., Vondráková, Z., Filepová, R., Malínská, K., Brunoni, F., Helusová, L., Moravec, T., Retzer, K., Harant, K., Novák, O., Hoyerová, K., & Petrášek, J. (2021). DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1 catalyzes the oxidation of IAA amino acid conjugates. *Plant Physiology*, *187*(1), 103–115. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab242>
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, *56*(1), 165–185. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>
- Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., & Xu, H. E. (2014). Abscisic acid perception and signaling: Structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica*, *35*(5), 567–584. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.5>
- Ng, M. H., & Din, A. K. (2020). Applications of packed and capillary supercritical fluid chromatography in the separation of tocochromanols. *Journal of Separation Science*, *43*(1), 285–291. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900342>
- Normanly, J., Slovin, J., & Cohen, J. (2010). *Auxin Biosynthesis and Metabolism* (s. 36–62). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_3
- Nováková, L., Grand-Guillaume Perrenoud, A., Francois, I., West, C., Lesellier, E., & Guillaume, D. (2014). Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2 μ m particles: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, *824*, 18–35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.034>
- Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature Protocols*, *5*(6), 986–992. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.37>
- Panuganti, S. J. (1970). Principles Involved in Bioassay by different Methods: A Mini-Review. *Research & Reviews: Journal of Biology*, *3*(2), 21.
- Peng, L., Gao, X., Wang, L., Zhu, A., Cai, X., Li, P., & Li, W. (2022). Design of experiment techniques for the optimization of chromatographic analysis conditions: A review. *ELECTROPHORESIS*, *43*(18–19), 1882–1898. <https://doi.org/10.1002/elps.202200072>
- Petřík, I., Pěňčík, A., Stýskala, J., Tranová, L., Amakorová, P., Strnad, M., & Novák, O. (2024). Rapid profiling of cytokinins using supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *1285*, 342010. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.342010>

- Pilařová, V., Plachká, K., Khalikova, M. A., Svec, F., & Nováková, L. (2019). Recent developments in supercritical fluid chromatography – mass spectrometry: Is it a viable option for analysis of complex samples? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *112*, 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.023>
- Pinkston, J. D., Stanton, D. T., & Wen, D. (2004). Elution and preliminary structure-retention modeling of polar and ionic substances in supercritical fluid chromatography using volatile ammonium salts as mobile phase additives. *Journal of Separation Science*, *27*(1–2), 115–123. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301672>
- Plachká, K., Pilařová, V., Horáček, O., Gazárková, T., Vlčková, H. K., Kučera, R., & Nováková, L. (2023). Columns in analytical-scale supercritical fluid chromatography: From traditional to unconventional chemistries. *Journal of Separation Science*, *46*(18), 2300431. <https://doi.org/10.1002/jssc.202300431>
- Posit team. 2023. RStudio: Integrated development environment for R. posit software, PBC, Boston, MA.
- R Core Team. 2023. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rodríguez-Concepción, M., & Boronat, A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, *130*(3), 1079–1089. <https://doi.org/10.1104/pp.007138>
- Sandford, L., & Shelver, G. (2009). *Using a Design of Experiments Approach to Develop Fast LC Methods for Automated Scale-up to Preparative Chromatography of Sulfa Drugs*.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F.-F., Sharon, M., Browse, J., He, S. Y., Rizo, J., Howe, G. A., & Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. *Nature*, *468*(7322), 400–405. <https://doi.org/10.1038/nature09430>
- Sheflin, A. M., Kirkwood, J. S., Wolfe, L. M., Jahn, C. E., Broeckling, C. D., Schachtman, D. P., & Prenni, J. E. (2019). High-throughput quantitative analysis of phytohormones in sorghum leaf and root tissue by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*(19), 4839–4848. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01658-9>
- Sherwood, C. A., Eastham, A., Lee, L. W., Risler, J., Mirzaei, H., Falkner, J. A., & Martin, D. B. (2009). Rapid Optimization of MRM-MS Instrument Parameters by Subtle Alteration of Precursor and Product m/z Targets. *Journal of proteome research*, *8*(7), 3746–3751. <https://doi.org/10.1021/pr801122b>
- Schmelz, E. A., Engelberth, J., Alborn, H. T., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H., & Tumlinson, J. H. (2003). Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(18), 10552–10557. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633615100>
- Schoenmakers, P. J. (1988). Supercritical-fluid chromatography: Open columns vs packed columns. *Journal of High Resolution Chromatography*, *11*(3), 278–282. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240110311>
- Smith, R. M. (1999). Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future. *Journal of Chromatography A*, *856*(1), 83–115. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00617-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00617-2)
- Smyth, D. R., Bowman, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *2*(8), 755–767. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.8.755>
- Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., & Suza, W. (2005). Characterization of an Arabidopsis Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. *The Plant Cell*, *17*(2), 616–627. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026690>
- Storbeck, K.-H., Gilligan, L., Jenkinson, C., Baranowski, E. S., Quanson, J. L., Arlt, W., & Taylor, A. E. (2018). The utility of ultra-high performance supercritical fluid chromatography–tandem mass spectrometry (UHPSFC-MS/MS) for clinically relevant steroid analysis. *Journal of Chromatography B*, *1085*, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.033>

- Šimura, J., Antoniadis, I., Široká, J., Tarkowská, D., Strnad, M., Ljung, K., & Novák, O. (2018). Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. *Plant Physiology*, *177*(2), 476–489. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00293>
- Široká, J., Brunoni, F., Pěňčík, A., Mik, V., Žukauskaitė, A., Strnad, M., Novák, O., & Floková, K. (2022). High-throughput interspecies profiling of acidic plant hormones using miniaturised sample processing. *Plant Methods*, *18*, 122. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00954-3>
- Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2020). Drought Stress Responses and Resistance in Plants: From Cellular Responses to Long-Distance Intercellular Communication. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556972>
- Tan, S. N., Yong, J. W. H., & Ge, L. (2014). Analyses of Phytohormones in Coconut (*Cocos Nucifera* L.) Water Using Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry. *Chromatography*, *1*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/chromatography1040211>
- Tarkowská, D., Novák, O., Floková, K., Tarkowski, P., Turečková, V., Grúz, J., Rolčík, J., & Strnad, M. (2014). Quo vadis plant hormone analysis? *Planta*, *240*(1), 55–76. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2063-9>
- Tavares Luiz, M., Santos Rosa Viegas, J., Palma Abriata, J., Viegas, F., Testa Moura de Carvalho Vicentini, F., Lopes Badra Bentley, M. V., Chorilli, M., Maldonado Marchetti, J., & Tapia-Blácido, D. R. (2021). Design of experiments (DoE) to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *165*, 127–148. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.011>
- Thomas, S. N., French, D., Jannetto, P. J., Rappold, B. A., & Clarke, W. A. (2022). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nature Reviews Methods Primers*, *2*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00175-x>
- Thorsteinsdóttir, U. A., & Thorsteinsdóttir, M. (2021). Design of experiments for development and optimization of a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry bioanalytical assay. *Journal of Mass Spectrometry*, *56*(9), e4727. <https://doi.org/10.1002/jms.4727>
- Todoroki, Y., Narita, K., Muramatsu, T., Shimomura, H., Ohnishi, T., Mizutani, M., Ueno, K., & Hirai, N. (2011). Synthesis and biological activity of amino acid conjugates of abscisic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *19*(5), 1743–1750. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.01.019>
- Tyśkiewicz, K., Gieysztor, R., Maziarczyk, I., Hodurek, P., Rój, E., & Skalicka-Woźniak, K. (2018). Supercritical Fluid Chromatography with Photodiode Array Detection in the Determination of Fat-Soluble Vitamins in Hemp Seed Oil and Waste Fish Oil. *Molecules*, *23*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/molecules23051131>
- Vaca, E., Behrens, C., Theccanat, T., Choe, J.-Y., & Dean, J. V. (2017). Mechanistic differences in the uptake of salicylic acid glucose conjugates by vacuolar membrane-enriched vesicles isolated from *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, *161*(3), 322–338. <https://doi.org/10.1111/ppl.12602>
- van de Velde, B., Guillarme, D., & Kohler, I. (2020). Supercritical fluid chromatography – Mass spectrometry in metabolomics: Past, present, and future perspectives. *Journal of Chromatography B*, *1161*, 122444. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122444>
- van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J., & Klinkenberg, A. (1956). Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*, *5*(6), 271–289. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(56\)80003-1](https://doi.org/10.1016/0009-2509(56)80003-1)
- Vanstraelen, M., & Benková, E. (2012). Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*(1), 463–487. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155741>
- Voeten, R. L. C., Ventouri, I. K., Haselberg, R., & Somsen, G. W. (2018). Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances. *Analytical Chemistry*, *90*(3), 1464–1481. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00015>
- Walton, A., Stes, E., De Smet, I., Goormachtig, S., & Gevaert, K. (2015). Plant hormone signalling through the eye of the mass spectrometer. *PROTEOMICS*, *15*(5–6), 1113–1126. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400403>

- Wang, W., He, M., Chen, B., & Hu, B. (2017). Simultaneous determination of acidic phytohormones in cucumbers and green bean sprouts by ion-pair stir bar sorptive extraction-high performance liquid chromatography. *Talanta*, *170*, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.006>
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, *111*(6), 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Wasternack, C., & Song, S. (2017). Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, *68*(6), 1303–1321. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
- Wasternack, C., & Strnad, M. (2016). Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. *New Biotechnology*, *33*(5, Part B), 604–613. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.001>
- Weber, H., Vick, B. A., & Farmer, E. E. (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(19), 10473–10478.
- Weiler, E. W. (1982). Plant hormone immunoassay. *Physiologia Plantarum*, *54*(2), 230–234. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb06331.x>
- Went, F. W. (1928). Wuchsstoff und Wachstum. *Recueil des travaux botaniques néerlandais*, *25*(1/2), 1–116.
- West, C. (2018). Current trends in supercritical fluid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *410*(25), 6441–6457. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1267-4>
- West, C., Lemasson, E., Bertin, S., Hennig, P., & Lesellier, E. (2016). An improved classification of stationary phases for ultra-high performance supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1440*, 212–228. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.052>
- Wickham, H. (2016). *Ggplot2*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wickham H, Bryan J. 2023. readxl: Read Excel Files. R package version 1.4.3.
- Wu, W., Cao, S., Shi, L., Chen, W., Yin, X., & Yang, Z. (2023). Abscisic acid biosynthesis, metabolism and signaling in ripening fruit. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1279031. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1279031>
- Xin, P., Guo, Q., Li, B., Cheng, S., Yan, J., & Chu, J. (2020). A Tailored High-Efficiency Sample Pretreatment Method for Simultaneous Quantification of 10 Classes of Known Endogenous Phytohormones. *Plant Communications*, *1*(3), 100047. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100047>
- Xu, Z.-Y., Lee, K. H., Dong, T., Jeong, J. C., Jin, J. B., Kanno, Y., Kim, D. H., Kim, S. Y., Seo, M., Bressan, R. A., Yun, D.-J., & Hwang, I. (2012). A Vacuolar β -Glucosidase Homolog That Possesses Glucose-Conjugated Abscisic Acid Hydrolyzing Activity Plays an Important Role in Osmotic Stress Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(5), 2184–2199. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095935>
- Yan, J., Li, S., Gu, M., Yao, R., Li, Y., Chen, J., Yang, M., Tong, J., Xiao, L., Nan, F., & Xie, D. (2016). Endogenous Bioactive Jasmonate Is Composed of a Set of (+)-7-iso-JA-Amino Acid Conjugates1. *Plant Physiology*, *172*(4), 2154–2164. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00906>
- Ye, K. (2003). Review of „Experiments: Planning, analysis, and parameter design optimization by C. F. Jeff Wu, Michael Hamada." John Wiley and Sons, New York, 2000. *Interfaces*, *33*, 96–98.
- Yonny, M. E., Ballesteros-Gómez, A., Toscano Adamo, M. L., Torresi, A. R., Nazareno, M. A., & Rubio, S. (2020). Supramolecular solvent-based high-throughput sample treatment for monitoring phytohormones in plant tissues. *Talanta*, *219*, 121249. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121249>
- Zhang, Y., & Li, X. (2019). Salicylic acid: Biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *50*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.004>

- Zhang, Y., Zhao, L., Zhao, J., Li, Y., Wang, J., Guo, R., Gan, S., Liu, C.-J., & Zhang, K. (2017). S5H/DMR6 Encodes a Salicylic Acid 5-Hydroxylase That Fine-Tunes Salicylic Acid Homeostasis. *Plant Physiology*, *175*(3), 1082–1093. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00695>
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, *61*, 49–64. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>
- Zhou, R., Cutler, A. J., Ambrose, S. J., Galka, M. M., Nelson, K. M., Squires, T. M., Loewen, M. K., Jadhav, A. S., Ross, A. R. S., Taylor, D. C., & Abrams, S. R. (2004). A New Abscisic Acid Catabolic Pathway. *Plant Physiology*, *134*(1), 361–369. <https://doi.org/10.1104/pp.103.030734>

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1-AA	1-aminoantracen
2-PIC	pyridin-2-ylmethanamin
7-OH-ABA	7'-hydroxyabscisová kyselina
9,10-dh-JA	(±)-9,10-dihydrojasmonová kyselina
11-OHJA	kyselina 11-hydroxyjasmonová
12-OHJA	kyselina 12-hydroxyjasmonová
ABA	(+)- <i>cis,trans</i> -abscisová kyselina
ABA-GE	kyselina abscisová-glukosový ester
ABAs	abscisáty
AOC	alenoxidcyklasa
AOS	alenoxidsynthasa
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
AUX	auxiny
BPR	regulátor zpětného tlaku
CE	kapilární elektroforéza
<i>cis</i>-OPDA	<i>cis</i> -(+)-12-oxofytodienová kyselina
CO₂	oxid uhličitý
COI1	koronatin insenzitivní protein 1
DAO1	dioxigenasa pro oxidaci auxinu 1
DEA	diethylamin
DIOL	diol
dn-OPDA	dinor-oxofytodienová kyselina
DoE	návrh experimentu

DPA	kyselina dihydrofazeová
ELISA	enzymové imunisorbentní test
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
FWHM	šířka píků v polovině výšky (full width at half maximum)
GA	kyselina gibberelová
GAs	gibereliny
GC	plynová chromatografie
GH3	Gretchen hagen 3 amido syntetáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)octová kyselina
IAA-Asp	[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetyl]aspartát
IAA-Glu	[2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetyl]glutamát
ILR1	IAA-LEUCINE RESISTANT1 amidohydrolasy
IS	vnitřní standardy
JA	(-)-jasmonová kyselina
JA-Ile	(-)-jasmonoyl-L-isoleucin
JA-Phe	(-)-jasmonoyl-L-fenylalanin
JAR1	enzym JASMONATE RESISTANT 1, syntetasa jasmonoyl-L-aminokyselin
JAs	jasmonáty
JA-Val	(-)-jasmonoyl-L-valin
JAZ	represorový protein jasmonát zim-doména
LC	kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce

LOX	lipoxygenasa
MeOH	metanol
MEP	2-C-metyl-d-erythritol-4-fosfátová cesta
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MRM	monitorování více reakcí
neoPA	kyselina neofazeová
OFAT	jeden faktor v čase (One Factor at Time)
OPC-4	kyselina (Z)-4-[3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl]butanová
OPC-6	kyselina (Z)-6-[3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl]hexanová
OPC-8	kyselina (Z)-4-[3-oxo-2-(pent-2-enyl)cyklopentyl]oktanová
oxIAA	2-(2-oxindol-3-yl)octová kyselina
PA	kyselina fazeová
R2	koeficient determinace
Q	kvadrupól
Q2	koeficient predikce
SA	kyselina salicylová
scCO₂	superkritický oxid uhličitý
SFC	superkritická fluidní chromatografie
SPE	extrakce na pevné fázi
TOF	analyzátor doby letu
Trp	tryptofan

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Kalibrační křivky všech analyzovaných látek.

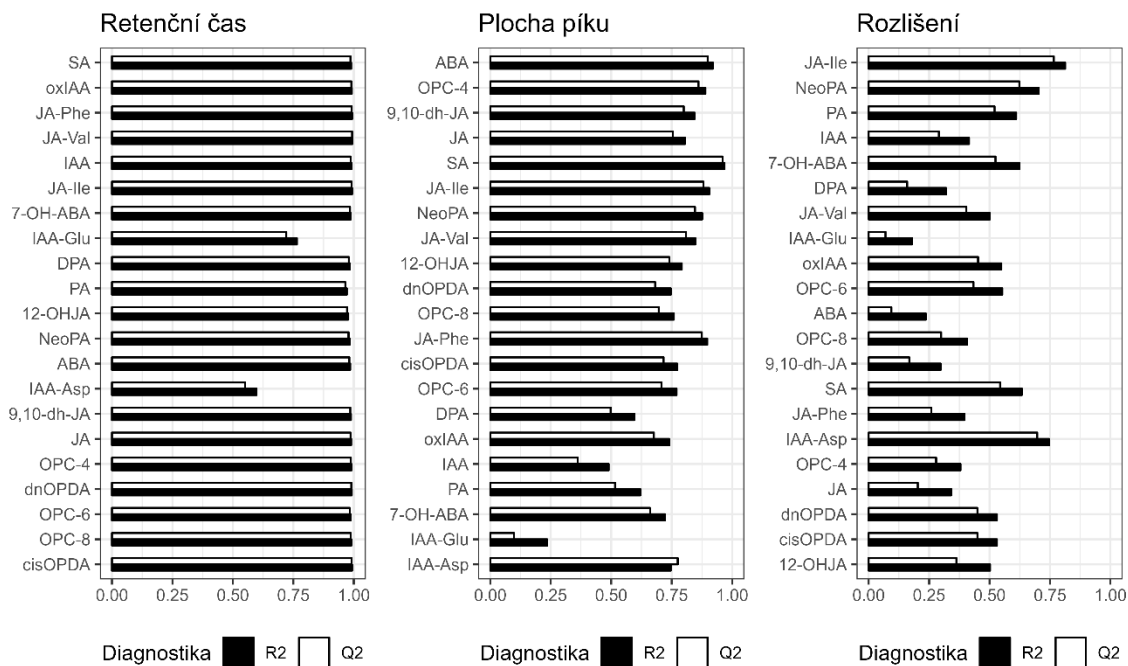
Příloha 2: Spolehlivost regresních modelů – sloupcové grafy

Příloha 1: Kalibrační křivky

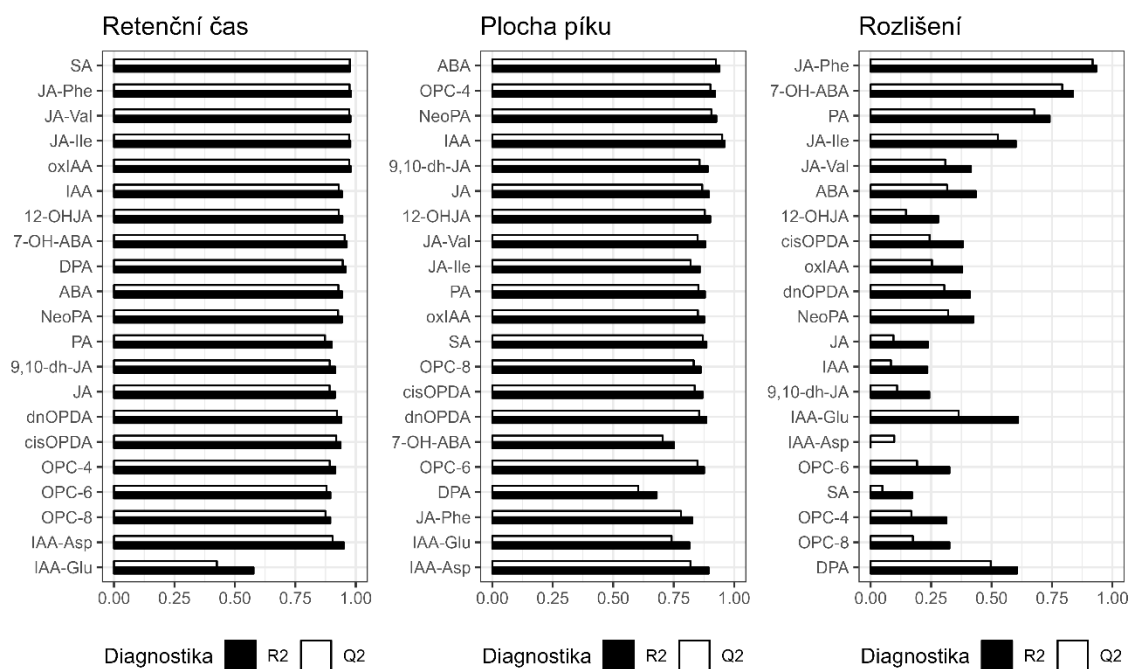
Tab. P1: Parametry kalibračních křivek analytů; $y = bx+a$

Analyt	Směrnice (b)	Úsek (a)	R²	Lineární rozsah (pmol)
IAA	0,8422	+ 0,0983	0,9993	0,005 - 5
oxIAA	0,8904	+ 0,0277	0,9993	0,005 - 5
IAA-Asp	0,8827	- 0,0395	0,9988	0,005 - 5
IAA-Glu	0,8728	- 0,1589	0,9983	0,005 - 5
SA	0,8595	+ 0,4377	0,9992	0,05 - 50
ABA	0,897	+ 0,0773	0,9996	0,05 - 50
PA	1,1019	- 0,0391	0,9993	0,05 - 50
neoPA	0,8913	+ 0,2777	0,9997	0,05 - 50
DPA	0,9308	- 1,2182	0,9999	0,05 - 50
7-OH-ABA	0,8955	- 0,9376	0,9998	0,05 - 50
cis-OPDA	0,7517	+ 0,4365	0,9975	0,05 - 5
dn-OPDA	0,7223	- 0,2395	0,9994	0,05 - 5
OPC-4	0,9877	- 0,849	0,9987	0,05 - 50
OPC-6	0,7624	- 1,2584	0,9991	0,05 - 5
OPC-8	0,7911	- 1,0538	0,9996	0,05 - 5
9,10-dh-JA	0,9565	+ 0,2514	0,9981	0,05 - 50
JA	0,9508	+ 0,3666	0,9985	0,05 - 50
11-/12-OHJA	0,9454	+0,4694	0,9999	0,05 - 50
JA-Phe	0,825	- 1,5108	0,9999	0,005 - 5
JA-Ile	0,8919	+ 0,8788	0,9989	0,005 - 5
JA-Val	0,8231	+ 0,2434	0,9994	0,005 - 5

Příloha 2: Spolehlivost regresních modelů – sloupcové grafy



Obrázek P1. Kolona Torus 1-AA. Sloupcové grafy vyjadřující spolehlivost modelu pro retenční čas, plochu píku a rozlišení. Čím více se diagnostické parametry R² a Q² blíží 1, tím je model spolehlivější. Pokud je R² nebo Q² < 0,5 - model je relativně nespolehlivý.



Obrázek P2. Kolona Viridis HSS C₁₈ SB. Sloupcové grafy vyjadřující spolehlivost modelu pro retenční čas, plochu píku a rozlišení. Čím více se diagnostické parametry R2 a Q2 blíží 1, tím je model spolehlivější. Pokud je R2 nebo Q2 < 0,5 - model je relativně nespolehlivý.