

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza přírodních látek v květenství vybraných
genotypů měsíčku (*Calendula* sp.)**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jan Dehner
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval 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. Byl jsem seznámen 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

Rád bych tímto poděkoval především vedoucímu své práce panu doc. RNDr. Petru Tarkowskému, Ph.D. za odborné rady a uvedení do světa vědy. Dále děkuji Ing. Kateřině Smékalové, Ph.D., Ing. Sanje Čavar Zeljković, Ph.D., Mgr. Nikole Štefelové, Ph.D., Mgr. Dominice Kaczorové, Radaně Bátkové, doc. Mgr. Michalu Koblížkovi, Ph.D., Mgr. Tiboru Béresovi, Ph.D. a Mgr. Ondřeji Vrobelovi za pomoc při řešení dílčích úkolů a milý přístup. Poděkování patří také mým blízkým a přátelům za studijní podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Jan Dehner
Název práce	Analýza přírodních látek v květenství vybraných genotypů měsíčku (<i>Calendula</i> sp.)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Měsíček je člověku znám pro svá pestrá květenství, která slouží nejen jako okrasný prvek mnoha zahrad. Je v nich také popsán výskyt několika přírodních látek, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví. Teoretická část této práce je věnována popisu měsíčku a jeho významným sekundárním metabolitům, včetně přístupům k jejich analýze.

Experimentální část popisuje fytochemickou analýzu karotenoidů, faradiolu a fenolových látek v květenství vybraných genotypů měsíčku sklizených v průběhu dvou sezón 2021 a 2022. Také byly analyzovány vybrané produkty s obsahem měsíčku. Využity byly metody spektrofotometrické, chromatografické a hmotnostně-spektrometrické.

Výsledky ukázaly, že obsah karotenoidů odpovídal zbarvení květenství, tedy nejvyšší byl u sytě oranžových genotypů. Zastoupení karotenoidů bylo stanoveno UHPLC-PDA metodou optimalizovanou pro potřeby této práce, dominantním byl lutein. Faradiol, jakožto hlavní nosič protizánětlivé aktivity, měl vyšší hladiny u kultivarů *C. officinalis* než u druhu *C. arvensis*. Naopak nejvíce fenolových látek bylo u genotypu *C. arvensis*, dominantní byla kyselina chlorogenová, následoval rutin, 2-O- β -D-glukosid kyseliny salicylové, kyselina syringová a další.

Tato práce měla za úkol nastudovat, zavést a na reálných vzorcích vyzkoušet metody pro hodnocení kvality produkce měsíčku, což bylo splněno. Také přináší poznatky o rozdílech ve fytochemickém složení vybraných 8 genotypů měsíčku a 5 produktů s měsíčkem, což jsou informace využitelné pro producenty i spotřebitele.

Klíčová slova	měsíček, sekundární metabolity, karotenoidy měsíčku, metody fytochemické analýzy, faradiol, fenotypování
Počet stran	79
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Jan Dehner
Title	Analysis of natural compounds in the inflorescence of selected marigold genotypes (<i>Calendula</i> sp.)
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

Marigold (*Calendula* sp.) is known for its colourful inflorescences, which serve not only as a decoration, but also have a positive effect on human health due to content of several natural products. The theoretical part of this thesis gives description of marigold, its important secondary metabolites and approaches to their analysis.

The experimental part describes the phytochemical analysis of carotenoids, faradiol and phenolic compounds in inflorescences of selected *Calendula* genotypes harvested during seasons 2021 and 2022. Selected marigold products were also analyzed. Spectrophotometric, chromatographic, and mass spectrometric methods were used.

The results showed that the carotenoid content corresponded to the colour of the inflorescence, being highest in the deep orange genotypes. The carotenoid composition was determined by UHPLC-PDA method optimized for the purpose of this work, and lutein was the dominant one. Faradiol, as the main carrier of anti-inflammatory activity, had higher levels in *C. officinalis* cultivars than in *C. arvensis*. In contrast, *C. arvensis* had the highest levels of phenolic compounds. Chlorogenic acid was dominant, followed by rutin, salicylic acid 2-O- β -D-glucoside, syringic acid and others.

The aim of this work was to learn, establish and apply on real samples methods for evaluating the quality of marigold production, which was successfully accomplished. It also provides information about the differences in the phytochemical composition of the selected 8 marigold genotypes and 5 marigold products, which is useful information for producers and consumers.

Keywords	marigold, <i>Calendula</i> , secondary metabolites, carotenoids of marigold, phytochemical analysis methods, faradiol, phenotyping
Number of pages	79
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Měsíček (<i>Calendula</i> sp.)	2
2.1.1	Původ, ekologie, význam	2
2.1.2	Taxonomie	2
2.1.3	Botanická charakteristika	6
2.1.4	Využití	7
2.1.4.1	Produkty s obsahem měsíčku	8
2.2	Významné přírodní látky měsíčku	9
2.2.1	Karotenoidy	9
2.2.1.1	Rozdělení a zástupci	10
2.2.1.2	Biosyntéza	12
2.2.1.3	Biologická aktivita	15
2.2.1.4	Karotenoidy měsíčku	17
2.2.1.5	Analýza karotenoidů	18
2.2.2	Pentacyklické triterpenoidy	23
2.2.3	Fenolové sloučeniny	26
2.3	Fenotypování	28
3	Experimentální část	30
3.1	Materiál a instrumentální vybavení	30
3.1.1	Biologický materiál	30
3.1.1.1	Rostlinný materiál	30
3.1.1.2	Produkty s obsahem měsíčku	32
3.1.2	Chemikálie	36
3.1.3	Přístrojové vybavení a pomůcky	37
3.1.4	Software	38
3.2	Metody	39
3.2.1	Preanalytická příprava vzorků	39
3.2.1.1	Lyofilizace	39
3.2.1.2	Homogenizace	39
3.2.1.3	Příprava produktů s měsíčkem	39
3.2.2	Stanovení celkového obsahu karotenoidů	39
3.2.3	Extrakce a saponifikace karotenoidů	40
3.2.3.1	Extrakce bez saponifikace	40
3.2.3.2	Extrakce se saponifikací	41
3.2.4	Zavedení a optimalizace UHPLC-PDA analýzy karotenoidů	41
3.2.5	UHPLC-PDA stanovení karotenoidů	42
3.2.6	UHPLC-MS/MS stanovení faradiolu	44
3.2.7	Stanovení celkových fenolových látek	45
3.2.8	UHPLC-MS/MS stanovení fenolových látek	46
3.3	Zpracování a vyhodnocování dat	48
4	Výsledky	50
4.1	Obsah vody	50
4.2	Celkový obsah karotenoidů	51
4.3	UHPLC metoda stanovení karotenoidů	52
4.4	Zastoupení karotenoidů	54

4.5	Obsah faradiolu.....	57
4.6	Celkový obsah fenolových látek.....	59
4.7	Profil fenolových látek.....	60
5	Diskuse	64
5.1	Fytochemická analýza 8 genotypů měsíčku	64
5.1.1	Karotenoidy	64
5.1.2	Faradiol.....	66
5.1.3	Fenolové látky	67
5.2	Zavedení a optimalizace UHPLC analýzy karotenoidů.....	68
5.3	Produkty s obsahem měsíčku.....	70
6	Závěr.....	72
7	Literatura.....	73
8	Seznam použitých symbolů a zkratek	78

Cíle práce

1. Zpracování literární rešerše s klíčovými slovy: měsíček, sekundární metabolity, karotenoidy měsíčku, metody fytochemické analýzy, faradiol, fenotypování
2. Provedení základní fytochemické analýzy osmi genotypů měsíčku
3. Zavedení a optimalizace izolace a chromatografické analýzy karotenoidů v květenství měsíčku
4. Porovnání obsahu vybraných přírodních látek v měsíčku a vybraných produktech s obsahem měsíčku

1 ÚVOD

Původem ze Středozeří, dnes již celosvětově rozšířen – rostliny rodu měsíček jsou člověkem pěstovány již po staletí ať už jako okrasné rostliny, anebo pro jejich využití v lidovém léčitelství, a to jak historicky, tak v současnosti. Známé je několik druhů měsíčku, které se mohou lišit morfologií celé rostliny či rozšířením po světě. Nejznámější druh Měsíček lékařský (*Calendula officinalis* L.) je šlechtěn v různé kultivary lišící se především velikostí, barevností a plnokvětostí květenství, kterým je u čeledi hvězdnicovitých úbor.

Ačkoli se šlechtění soustředí zejména na okem pozorovatelný fenotyp rostlin, morfologické znaky nemusí být jediným rozdílem mezi odrůdami měsíčku. Uvnitř toho, co nás z měsíčku zajímá nejvíce – květenství, mohou být znatelné rozdíly v chemických složkách. A právě proto bylo zaměřit se na fytochemické složení květenství cílem této práce.

Látky, které nás v květenství měsíčku zajímají, patří do skupiny sekundárních metabolitů, typicky tak udělují danému genotypu nějakou vlastnost navíc oproti jiným organismům. Například jejich barvu jim udávají zejména pigmenty karotenoidy. Pozitivní vliv měsíčku na lidské zdraví spočívá především v protizánětlivém účinku, jehož hlavním nosičem je triterpenoid faradiol. Další vliv na protizánětlivou, antioxidační, anebo antimikrobiální aktivitu měsíčku mají obsažené fenolové sloučeniny.

Při řešení této práce bylo pracováno s 8 vzorky genotypů měsíčku, jejichž květenství byla sbírána ve dvou letech (sklizeň 2021 a 2022) ve více sběrech v průběhu sezóny. Fytochemické analýzy byly cíleny na 3 skupiny látek – karotenoidy, pentacyklické triterpenoidy a fenolové látky, přičemž byly využity metody spektrofotometrické, chromatografické a hmotnostně-spektrometrické. Také byly provedeny experimenty s vybranými produkty s obsahem měsíčku, u kterých bylo cílem seznámit se s netypickým, jiným než rostlinným materiálem a vyzkoušet, zda jsou použité metody vhodné i pro jiné typy matric.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Měsíček (*Calendula* sp.)

2.1.1 Původ, ekologie, význam

Měsíček je rod rostlin z čeledi hvězdnicovitých. Jsou to většinou jednoleté, vzácně vytrvalé byliny nebo polokeře. Pocházejí zejména z oblastí Středomořího moře, dnes se ale pěstují anebo byly zavlečeny na všechny kontinenty. Je známo asi 15–20 druhů (Slavíková, 2004).

Nejvýznamnějším druhem je měsíček lékařský (*C. officinalis*), který je znám a pěstován již více než 800 let. Jeho přesný původ je nejasný, v ČR se pěstuje po celém území od nížin až po horské zahrádky. Na pěstování je nenáročný, semena mají po vysetí vysoký stupeň klíčivosti, na dané lokalitě se samovolně udržuje a často zplaňuje v okolí zahrad, skládek, rumišť nebo hřbitovů (Slavíková, 2004).

Význam měsíčku byl již ve středověku v lidovém léčení, lékařství a kosmetice a přetrvává dodnes. Jeho pozitivní vliv na lidské zdraví je dán obsahovými látkami, a proto se studium měsíčku ubírá tímto směrem. Kromě toho je pěstován jako nenáročná okrasná rostlina s dlouhou dobou kvetení (Chitrakar *et al.*, 2019; Slavíková, 2004).

2.1.2 Taxonomie

Taxonomicky je rod měsíček zařazen do čeledi hvězdnicovitých (*Astraceae*) pařící do třídy vyšších dvouděložných rostlin (*Rosopsida*) (Tab. 1) (ITIS, 2022; BioLib.cz, 2022).

Tab. 1: Přehled taxonomického zařazení měsíčku.

Doména	Říše	Podříše	Kmen	Třída
Eukaryota (<i>Eukaryota</i>)	rostliny (<i>Plantae</i>)	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)

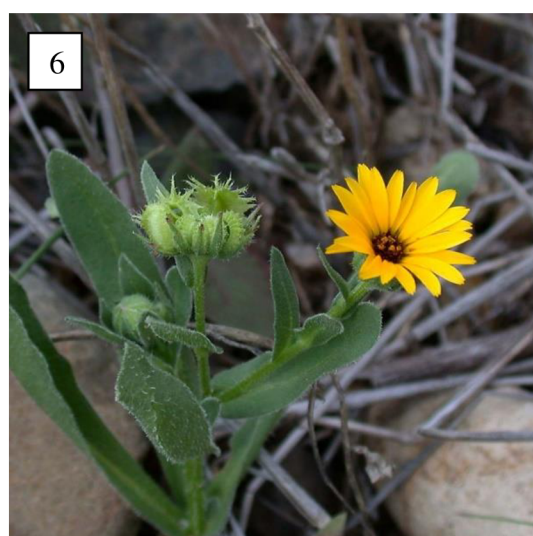
Řád	Čeleď	Podčeleď	Tribus	Rod
hvězdnicotvaré (<i>Asterales</i>)	hvězdnicovité (<i>Asteraceae</i>)	hvězdnicové (<i>Asteroideae</i>)	<i>Calenduleae</i>	měsíček (<i>Calendula</i>)

Do rodu měsíček (*Calendula*) je řazeno několik druhů. Z hlediska historie, pěstování, lidové známosti, ale i moderního výzkumu je jednoznačně nejvýznamnějším druhem měsíček lékařský (*C. officinalis*; Obr. 1). Není však jasné, zda je *C. officinalis*

alopolyploidním druhem hybridogenního původu, druh odvozený od *Calendula suffruticosa* Vahl (Obr. 1), anebo se jedná o kulturní odrůdu neznámého planého druhu původem někde z oblasti od Kanárských ostrovů až po Írán (Slavíková, 2004).

Dalším zástupcem je měsíček rolní (*Calendula arvensis* (Vaill.) L.; Obr. 1), vysoce polymorfní, teplomilný druh původem ze Středozeří, druhotně se vyskytující i na našem území. Některé z jeho forem jsou někdy považovány za samostatné druhy, např. *Calendula aegyptiaca* PERS (Slavíková, 2004).

Mezi další druhy lze uvést měsíček dvoubarevný (*Calendula bicolor* Rat.; Obr. 1), již zmíněný *C. suffruticosa* (Obr. 1), *Calendula eckerleinii* Ohle, *Calendula incana* Willd., *Calendula lanzae* Maire, *Calendula maritima* Guss., *Calendula maroccana* (Ball) B. D. Jacks., *Calendula meuselii* Ohle, *Calendula pachysperma* Zohary, *Calendula palaestina* Boiss., *Calendula stellata* Cav. a *Calendula tripterocarpa* Rupr. (BioLib.cz, 2022).



Obr. 1 Fotografie vybraných druhů měsíčku: *C. officinalis* (1,2), *C. arvensis* (3,4), *C. suffruticosa* (5) a *C. bicolor* (6). Převzato a upraveno z Wikimedia Commons, 2023.

Za zmínku stojí nejednoznačnost anglického ekvivalentu „marigold“. Nejedná se totiž o označení pouze měsíčku (*Calendula* sp.), ale také jiných rostlin, především rodu aksamitník (*Tagetes* sp.) známý také jako „afrikán“. V anglické literatuře věnující se studiu „marigoldu“ se tak často jedná o kombinaci studia těchto dvou rodů, které jsou taxonomicky příbuzné až na úrovni podčeledi hvězdnicové (*Asteroideae*). Rozlišovány jsou pak názvy „pot marigold“, „common marigold“, „scotch marigold“ (všechny tři označují kultivary druhu *C. officinalis*), „african marigold“ (*Tagetes erecta* L.; Obr. 2), „french marigold“ (*Tagetes patula* L.; Obr. 2), „mexican marigold“ (*Tagetes lucida* Cav.), „signet marigold“ (*Tagetes tenuifolia* Cav.) a další (Chitrakar *et al.*, 2019; Bhave *et al.*, 2020). Kromě toho je název „marigold“ používán také pro blatouch bahenní („marsh marigold“, *Caltha palustris* L.) a další rostliny z rodů *Baileya*, *Glebionis*, *Tithonia* a další. Přes tento lingvistický zmatek je v této práci zpracována rešerše výhradně pro rod *Calendula* sp., a pokud byly z anglické literatury vybrány informace pojednávající o rodu jiném, pak se jednalo o informace nezávislé na genetickém původu materiálu, například metodické.



Obr. 2 Fotografie *T. erecta* (1) a *T. patula* (2). Převzato a upraveno z Wikimedia Commons, 2023.

2.1.3 Botanická charakteristika

Z morfologického hlediska jsou rostliny rodu *Calendula* jedno- až dvouleté byliny, vzácně se může jednat o vytrvalé byliny s dřevnatějící bází nebo polokeře. Hlavní kořen je vřetenovitý s tenkými postranními kořeny. Stonkem je lodyha, nejčastěji přímá, vystoupavá nebo poléhavá, v závislosti na druhu 10–70 cm dlouhá, bývá bohatě větvená. Listy jsou podlouhlé až kopinaté, mělce zubaté, přisedlé nebo krátce řapíkaté, střídavé po celé lodyze. V plodenství jsou rozeznatelné až tři druhy nažek: vnější (mohou chybět), střední a vnitřní; všechny jsou dovnitř zahnuté, různě veliké, na hřbetě různě hrbolaté a po stranách mají 1–3 člunkovitá křídla (Jahodář, 2011; Slavíková, 2002; Slavíková, 2004) (Obr. 3).

Květenství typu úbor je společným znakem pro celou čeleď hvězdnicovité, umístěno je vždy na vrcholu hlavní lodyhy nebo postranních větví. Podčeleď *Astroideae* typicky vytváří jazykové i trubkovité květy uspořádané na úborovém lůžku jako paprsek a terč (Jahodář, 2011). Podle druhu mohou být květenství různě velká, v rozmezí asi 1–7 cm v průměru. Zákrov je jedno- až dvouřadý, zákrovní listeny přibližně stejně dlouhé jako jazykové květy, lůžko ploché. Jazykové květy měsíčku mají typickou žlutou až oranžovou barvu. Jsou samičí, ligula je dlouhá až 25 mm, dozrávají v nažky. Trubkovité květy mají žlutou, oranžovou až hnědou barvu, morfologicky jsou sice oboupohlavní, ale funkčně samčí, nedozrávají v nažky. Mohou se vyskytnout květenství s pouze jazykovými květy (Slavíková, 2004) (Obr. 3).

Nejčastěji pěstovaný druh *C. officinalis* dorůstá výšky až 70 cm, jeho květenství může mít průměr 3–7 cm a barva jazykových květů je sytě žlutá až oranžová. Příbuzný druh *C. arvensis* se morfologicky liší především v délce lodyhy a velikosti úboru. Je podstatně nižší (maximálně 50 cm), jeho úbory mají průměr pouhé 1–2 cm a jazykové květy jsou světle žluté. Morfologické rozdíly mezi těmito dvěma druhy jsou také ve tvaru listů a nažek (Slavíková, 2004) (Obr. 1).



Obr. 3 Botanická ilustrace *C. officinalis* z knihy Köhler's Medizinal-Pflanzen (1887). Převzato a upraveno z Wikimedia Commons, 2023.

2.1.4 Využití

Vedle pěstování jako okrasné rostliny je měsíček znám a využíván již po staletí jako tzv. „tradiční rostlina“ pro různé aplikace v lidovém léčitelství, ale také k přípravám potravin, barviv, nebo kosmetických potřeb (Garcia-Oliveira *et al.*, 2021). Kromě Evropy byl již od asi 12. století pěstován také v Egyptě, na Blízkém východě a v dnešní Indii (Safdar *et al.*, 2010). Již ve středověké francouzské kuchyni nacházela květenství měsíčku své místo při přípravě salátů či polévek. V měsíčku obsažená barviva byla historicky používána pro barvení různých textilních materiálů jako vlna, konopí, len, bavlna anebo hedvábí. Rovněž byla rostlina používána pro výrobu parfémů (Chitrakar *et al.*, 2019).

Největší význam je však samozřejmě kladen medicínským a léčebným vlastnostem měsíčku, a to nejen v historickém lidovém léčitelství, ale i současné medicíně. Používány

jsou zejména úborová květenství či pouze jazykové květy, anebo také listy (Novák *et al.*, 1958). Možností aplikace je hned několik, nejčastěji dochází ke vstřebání přímo skrze kůži. Masti a balzámy měsíčku jsou používány k léčbě ran, modřin, opruzenin, anebo ke zklidnění poškozené a zanícené kůže (Chitrakar *et al.*, 2019; Safdar *et al.*, 2010). Perorálně může být podáván extrakt měsíčku při spalničkách či neštovicích. Šťáva bývá používána při horečce, nevolnostech, menstruaci, kožních onemocněních, vředech, anebo žloutence. Odvar měsíčku je podáván při chudokrevnosti (Garcia-Oliveira *et al.*, 2021; Chitrakar *et al.*, 2019).

2.1.4.1 Produkty s obsahem měsíčku

Na trhu je dostupných několik typů různých přípravků s měsíčkem, což koresponduje s již výše uvedeným využitím měsíčku jako „tradiční rostliny“. Měsíčkový květ (lat. *Calendulae flos*) je uveden i v Českém lékopise, je popsán jako celé nebo řezané usušené zcela rozkvetlé květy plnokvětých odrůd druhu *C. officinalis* (Český lékopis 2017: Doplněk 2022 (2022); Kašparová, 2008). Takovýto sušený měsíčkový květ pak může být použit například pro přípravu nálevů nebo čajů pro zevní i vnitřní použití (Kašparová, 2008).

K dostání je rovněž například měsíčkový olej (jedná se o měsíčkový olejový extrakt, nikoli o olej získaný z měsíčku či jeho části), který lze podobně jako nálev užívat zevně i vnitřně, napomáhat by měl normální činnosti jater, střev, dýchacího systému a podobně (Nový, 2021). Připravovat lze i v domácích podmínkách s využitím kvalitního, za studena lisovaného oleje (Herbalista.cz, 2022).

Pro lokální použití je dále asi nejznámější měsíčková mast vykazující hojivé účinky (Kašparová, 2008). Ta může být také běžně připravována v domácích podmínkách, jako základ lze použít olej, vepřové sádlo, nebo lékařskou vazelínu (Herbalista.cz, 2022). K očištění a ošetření povrchových ran možno použít také měsíčkovou tinkturu (Kašparová, 2008).

V nabídce se lze běžně setkat i s kosmetickými produkty s obsahem měsíčku, například s krémem na ruce Indulona měsíčková, anebo s pleťovou vodou s užitím pro problematickou pleť se sklonem k akné a trudovitosti a podobně (Nový, 2021).

Některé tyto produkty s obsahem měsíčku jsou použity i pro experimentální část této práce, viz kapitola 3.1.1.2 *Biologický materiál – Produkty s obsahem měsíčku*.

2.2 Významné přírodní látky měsíčku

Příčinou pozitivního vlivu na lidské zdraví měsíčku a zároveň předmětem této práce jsou zejména látky v měsíčku obsažené. Ty lze obecně, ve všech rostlinách, rozdělit na primární a sekundární metabolity. Mezi primární metabolity patří molekuly, jejichž biosyntetické dráhy jsou společné pro široké spektrum organismů a které jsou pro život daného organismu nepostradatelné (aminokyseliny, mastné kyseliny, některé organické kyseliny, nukleotidy apod.). Oproti tomu sekundární metabolity jsou typické pro užší taxon organismů, nejsou nutné pro život organismu, pouze mu udělují určitou výhodu (Macholán, 1998).

Právě tyto vlastnosti dělají ze sekundárních metabolitů vysoce zajímavou skupinu látek a cíl vědeckého poznání. Jejich ekologickými funkcemi jsou především interakce s prostředím jako atrakce opylovačů a roznašečů semen (barva, vůně), obrana proti herbivorům a patogenům (hořkost, toxicita), mechanická opora a podobně. Člověk pak tyto látky využívá v odvětvích medicíny, kosmetiky, potravinářství, zemědělství a dalších. Termín „přírodní látky“ je pak prakticky synonymem pro sekundární metabolity, který však lépe vstupuje do povědomí široké, nevědecké společnosti (Macholán, 1998).

Rozdělení sekundárních metabolitů je možné podle jejich strukturálních a biosyntetických podobností, a to na terpenoidy, alkaloidy, fenolové látky, látky obsahující síru, acetyleny, psoraleny a další skupiny látek (Macholán, 1998). Právě těm prvně jmenovaným, terpenoidům, a jejich výskytu v měsíčku bude věnována v této práci pozornost především. Dále budou popsány také fenolové látky vyskytující se v měsíčku.

2.2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou sekundární metabolity patřící do široké skupiny terpenoidů, konkrétně se jedná o tetraterpenoidy. Jsou to lipofilní pigmenty červené až oranžové barvy. Známé je více než 1100 zástupců napříč různými organismy od bakterií, přes houby, nižší i vyšší rostliny až po živočichy (Britton, 1995; Yabuzaki, 2017). Pro lidské tělo jsou významné zejména přeměny α -karotenu, β -karotenu a β -kryptoxanthinu na vitamin A a antioxidační vlastnosti karotenoidů (Institute of Medicine, 2000).

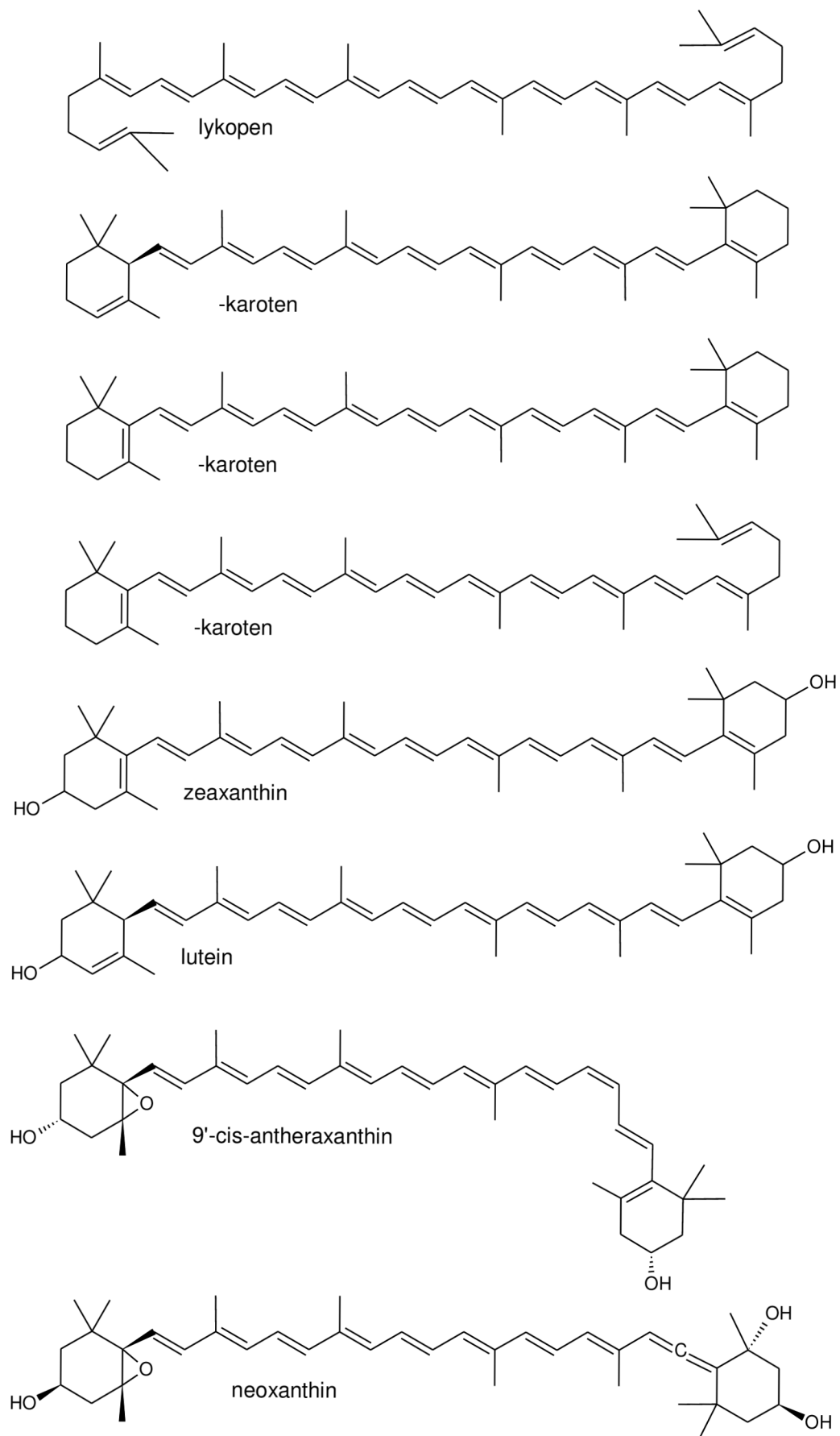
Jejich strukturu tvoří základní skelet se čtyřiceti uhlíky, který může být dále modifikován cyklizací na jednom nebo obou koncích, stupněm hydrogenace anebo přidáním kyslíkových funkčních skupin. Pro celý uhlovodíkový řetězec je pak typický konjugovaný systém dvojných vazeb (polyenový řetězec), který zapříčiňuje schopnost karotenoidů pohlcovat světelnou energii díky přechodu elektronů z vazebného π do

protivazebného π^* orbitalu. Energie tohoto přechodu koresponduje se zářením vlnové délky cca 400-500 nm z oblasti viditelného světla (Britton, 1995).

Taková struktura ovšem rovněž způsobuje vysokou reaktivitu a nestabilitu karotenoidů. Mezi faktory snižující stabilitu karotenoidů patří působení světla, tepla, kyslíku apod. (Boon *et al.*, 2010). Rozklad a degradace molekul karotenoidů vede ke ztrátě zbarvení a biologické aktivity, jako jsou antioxidační vlastnosti a funkce jako provitamin A, a rovněž komplikuje analytické stanovení karotenoidů.

2.2.1.1 Rozdělení a zástupci

V základu lze karotenoidy rozdělit do dvou skupin: karoteny a xantofyly. Karoteny jsou tvořeny pouze uhlovodíkovým řetězcem a patří zde α -, β -, γ -karoten, lykopen a další (Obr. 4). Oproti tomu xantofyly jsou jejich kyslíkovými deriváty, přičemž atom kyslíku může být zabudován ve formě hydroxy- (zeaxanthin, lutein), methoxy- (spirilloxanthin), keto- (canthaxanthin) anebo epoxy- (antheraxanthin) funkčních skupin (Obr. 4) (Ramawat a Merillon, 2013; Melton *et al.*, 2019).



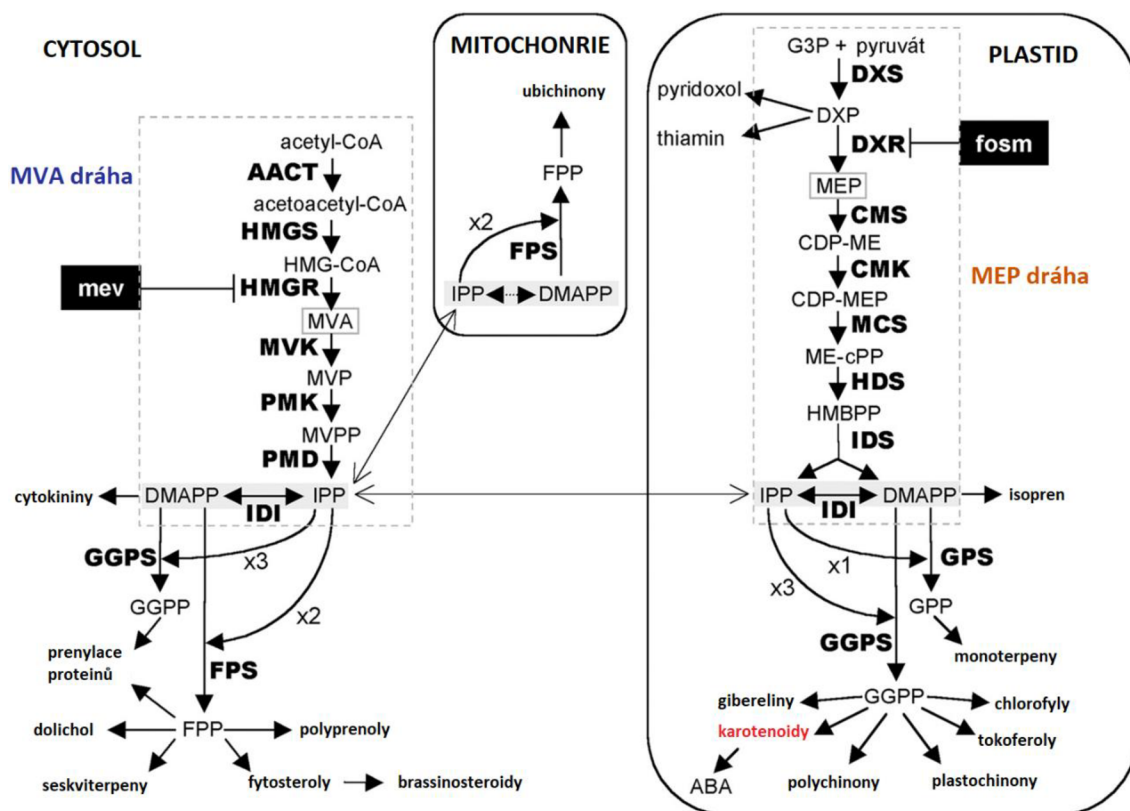
Obr. 4: Strukturní vzorce vybraných molekul karotenů a xantofylů.

Různorodost celé škály molekul karotenoidů dotváří možnost konfigurace každé dvojné vazby v polyenovém řetězci, vznikají tak geometrické *cis*- a *trans*- (*Z*- a *E*-) izomery. Při *cis*- konfiguraci, byť jediné vazby v polyenovém řetězci, však často vzniká velké sterické bránění (jak je naznačeno u 9'-*cis*-antheraxanthinu, Obr. 4) Tím se snižuje termodynamická stabilita, a proto je většina v přírodě přítomných karotenoidů v *all-trans*-konfiguraci (Britton, 1995), ačkoli mnoho *cis*- forem již bylo jako přírodních látek popsáno (Kishimoto *et al.*, 2005).

2.2.1.2 Biosyntéza

Všechny fotosyntetizující organismy potřebují produkovat molekuly karotenoidů pro správné sestavení anténových komplexů fotosystémů a pro fotoprotektivitu. Přímý vztah k fotosyntéze mají tzv. primární karotenoidy. Kromě nich jsou ale rostliny a řasy schopné syntetizovat a ukládat také sekundární karotenoidy, které jsou pak živočichy přijímány potravou jako esenciální látky pro jejich správné životní funkce (zejména syntéza vitamínu A) (Rodríguez-Concepción a Boronat, 2002, Ye a Huang, 2020).

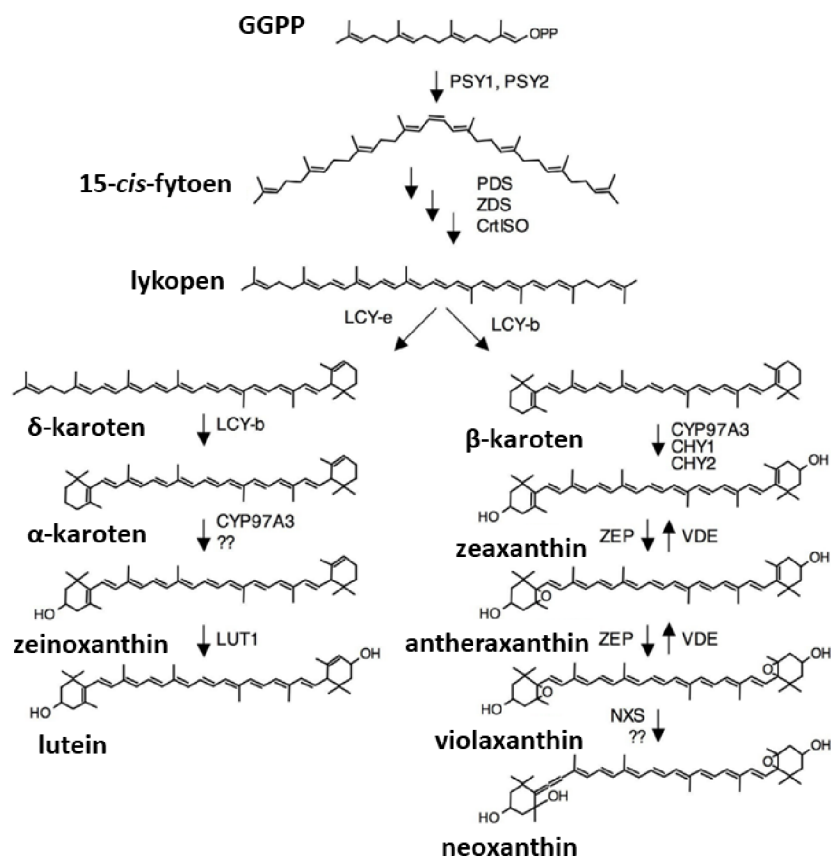
Počátek biosyntetické dráhy karotenoidů v rostlinách je v plastidech, kde glyceraldehyd-3-fosfát (G3P) a pyruvát vstupují do methylerythritol-4-fosfátové (MEP) neboli nemevalonátové dráhy. Jejimi produkty jsou isopentenylidifosfát (iPP) a dimethylallyldifosfát (DMAPP). Stejně produkty vznikají také z acetylkoenzymu A mevalonátovou dráhou (MVA), ta však probíhá v cytosolu, existuje také u živočichů a vede k tvorbě jiných metabolitů; průběh obou drah je porovnán na Obr. 5 (Rodríguez-Concepción a Boronat, 2002, Domonkos *et al.*, 2013).



Obr. 5: Schéma MEP a MVA biosyntetických drah vzniku terpenoidů v rostlinné buňce. Převzato a upraveno podle (Rodríguez-Concepción a Boronat, 2002).

Kondenzací iPP a DMAPP pak vzniká desetiuhlíkatý geranyldifosfát (GPP), dalším přidáváním pětiuhlíkatých jednotek vznikne dvacetihlíkatý geranylgeranyldifosfát (GGPP). Právě spojením dvou GGPP typu ocas-ocas vznikne první čtyřicetiuhlíkatý produkt syntézy karotenoidů, 15-*cis*-fytoen (Obr. 6) (Britton, 1995), reakce je katalyzována enzymem geranylgeranyldifosfát:geranylgeranyldifosfát-geranylgeranyltransferasa (15-*cis*-fytoen tvořící) (15-*cis*-fytoensyntasa, PSY, EC 2.5.1.32) (IUBMB, 2022). Enzym PSY je označován jako nejdůležitější regulační bod dráhy biosyntézy karotenoidů. Transkripce PSY genu je ovlivňována kyselinou abscisovou, světelnými podmínkami, suchem, teplotou a dalšími faktory (Cazzonelli a Pogson, 2010).

Následnými reakcemi vzniká z fytoenu lykopen (Obr. 6). K tomu je zapotřebí několika enzymů: 15-*cis*-fytoen:akceptor-oxidoreduktasa (fytoendesaturasa, PDS, EC 1.3.99.31), all-*trans*- ζ -karoten:akceptor oxidoreduktasa (ζ -karotendesaturasa, ZDS, EC 1.3.99.26), 7,7',9,9'-tetra-*cis*-lykopenisomerasa (prolykopenisomerasa, karotenoidisomerasa, CrtISO, EC 5.2.1.13) (Diretto *et al.*, 2006, Cazzonelli a Pogson, 2010; IUBMB, 2022).



Obr. 6: Schéma biosyntetických drah vybraných karotenoidů. Převzato z Diretto *et al.*, 2006.

Právě geny pro enzymy této dráhy, konkrétně PSY z narcisu žlutého (*Narcissus pseudonarcissus*) a gen pro enzym kombinující funkci PDS a ZDS z půdní bakterie *Erwinia uredovora*, napomohly v řešení projektu tzv. zlaté rýže, tedy geneticky modifikované rýže seté (*Oryza sativa* L.) schopné syntetizovat β -karoten jakožto provitamin A a napomocť tím vážnému zdravotnímu problému deficiencie vitamínu A převážně u dětí v rozvojových zemích (Ye *et al.*, 2000).

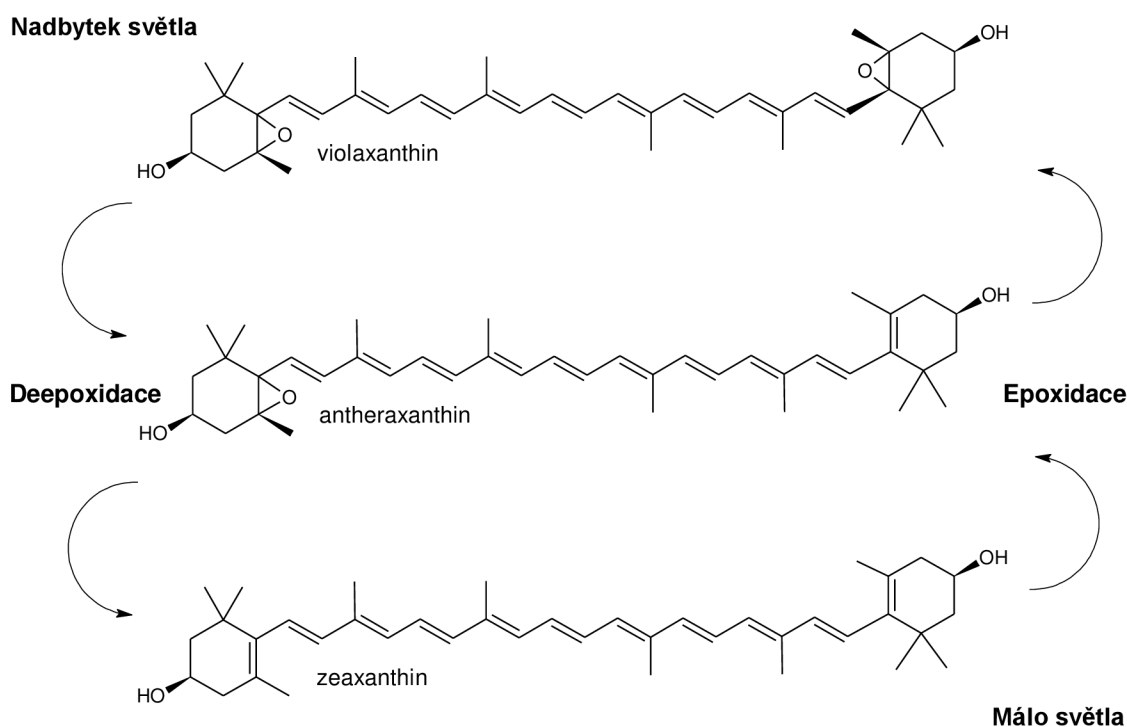
Dále se společná cesta rozděluje a lykopen podléhá reakcím dvou enzymů, které o substrát kompetují: karotenoid: β -koncová skupina-lyasa (kruh otevírající) (lykopen β -cyklasa, LCY-b, EC 5.5.1.19) a karotenoid: ψ -koncová skupina-lyasa (kruh otevírající) (lykopen ϵ -cyklasa, LCY-e, EC 5.5.1.18) (IUBMB, 2022). LCY-e napomáhá přeměně jedné ψ -koncové skupiny lykopenu na ϵ -koncovou skupinu a dává vzniknout δ -karotenu. LCY-b oproti tomu katalyzuje přeměnu dvou ψ -konc. sk. lykopenu na β -konc. sk. a vzniká tak β -karoten (anebo jedné ψ -konc. sk. δ -karotenu na β -konc. sk. za vzniku α -karotenu) (Diretto *et al.*, 2006, Domonkos *et al.*, 2013) (Obr. 6).

Další syntéza xantofylů z karotenů pak závisí na postupných oxidačních reakcích. Jako příklad může být uveden enzym α -karoten:O₂-oxidoreduktasa (3-hydroxylační) (karotenoid- ϵ -hydroxylasa, LUT1, EC 1.14.14.158) (IUBMB, 2022), který katalyzuje jednak přeměnu α -karotenu na α -kryptoxanthin, ale také přeměnu zeinoxanthinu na lutein (Diretto *et al.*, 2006; Domonkos *et al.*, 2013) (Obr. 6).

2.2.1.3 Biologická aktivita

V rostlinách a jiných fotosyntetizujících organismech hrají karotenoidy klíčovou roli v rozptylu světelné energie, jejíž efektivní využití závisí na bezpečném odvádění přebytečné energie. Pro samotnou fotosyntézu je využita jen část absorbované energie, její nadbytek ve formě světla pak představuje vážnou fotooxidační hrozbu pro fotosyntetický aparát i jiné buněčné struktury (Demmig-Adams & Adams, 1996). Podobně jako příliš velký elektrický proud žárovku nerozjasní, ale spálí, tak příliš velká absorpce světla fotosystémem nezvýší efektivitu fotosyntézy, nýbrž buňku poškodí až zahubí.

Jedním z ochranných mechanismů je tzv. xantofylový cyklus (Obr. 7). Při tomto cyklu dochází za přítomnosti světla k poměrně rychlé přeměně violaxanthinu postupnou deepoxidací přes antheraxanthin až na zeaxanthin. Při nižších hladinách světla pak dochází k reverznímu chodu reakce a epoxidací vzniká opět violaxanthin (Yamamoto, 1979; Hager, 1980; Demmig-Adams & Adams, 1996).



Obr. 7: Schéma principu xantofylového cyklu. Převzato a upraveno podle Demmig-Adams & Adams, 1996.

V rámci antioxidačního systému živočišných buněk patří karotenoidy mezi exogenní neenzymatické antioxidanty, vedle například kyseliny askorbové, tokoferolů, fenolových látek apod. Účinek těchto molekul tkví v efektivním odstranění reaktivních radikálu jako jsou $\text{HO}\cdot$ nebo $\text{ROO}\cdot$, a to buď reakcí s nimi za tvorby méně reaktivního neškodného produktu, anebo přerušením řetězových radikálových reakcí. Je známo, že radikály způsobují anebo napomáhají rozvinutí mnoha závažných chorob, jako jsou rakovina, nemoci srdce a další. Příjem karotenoidů a jejich správná antioxidační funkce tak může mít příznivý, preventivní vliv na tyto choroby. Avšak karotenoidy mohou také za určitých podmínek vykazovat prooxidační funkci. A jelikož to jsou lipofilní látky, lidskému tělu hrozí předávkování jimi a jejich správná funkce je tedy podmíněna minimálním, ale i maximálním množstvím (Britton, 1995).

Některé ze sekundárních karotenoidů jsou člověkem a jinými živočichy využívány jako provitamin A k syntéze aktivního vitamínu A – retinolu. Konkrétně se jedná o α - a β -karoten a β -kryptoxanthin, které jsou do těla přijímány z rostlinné stravy; jedná se tak o paralelní zdroj vitamínu A vedle příjmu přímo retinolu z živočišné stravy (Diretto et al., 2006; Institute of Medicine, 2000).

V lidském těle je β -karoten štěpen enzymem β -karoten:O₂-15,15'-dioxygenasa (štěpící vazbu) (karotendioxygenasa, BCDO, EC 1.13.11.63) na dvě molekuly all-*trans*-retinalu. Ten následně podléhá redukci katalyzované retinol:NAD⁺-oxidoreduktasou (retinalreduktasa, EC 1.1.1.105) a vzniká retinol, vitamin A1 (Keijer et al., 2005; IUBMB, 2022).

2.2.1.4 Karotenoidy měsíčku

Karotenoidy, s dopomocí dalších přírodních pigmentů flavonoidů, udávají květenství měsíčku jeho typické žluté až oranžové zbarvení (Piccaglia *et al.*, 1997, Kishimoto *et al.*, 2005). V měsíčku mají výše zmíněné biologické funkce spojené s fotoprotektivitou a s anténovými komplexy fotosystémů, tak jako v jiných fotosyntetizujících organismech. Zároveň jejich akumulace v květenství působí jako atraktant opylovačů a také je středem zájmu člověka, který šlechtí *C. officinalis* v různé odrůdy s celou paletou odstínů květenství.

Raal *et al.* (2009) studovali celkový obsah karotenoidů ve 42 komerčních genotypech měsíčku získaných z různých zemí Evropy a získali hodnoty mezi 0,20 – 3,51 % karotenoidů v sušených jazykových i trubkovitých květech měsíčku. Vyšší obsah karotenoidů bývá u kultivarů s tmavě oranžovým květenstvím – až 276,0 mg·100 g⁻¹ FW u kultivaru Double Esterel Orange, oproti žluto-oranžovému kultivaru Bonbon Abricot s obsahem 48,2 mg·100 g⁻¹ FW (Pintea *et al.*, 2003).

Zatímco zastoupení karotenoidů využívaných pro fotosyntézu a fotoprotektivitu v zelených částech rostliny, jako jsou listy, je podobné pro většinu rostlin, ve květech bývá karotenoidové složení charakteristické pro daný rostlinný druh (Kishimoto *et al.*, 2005). I mezi různými (různě barevnými) odrůdami měsíčku bylo studováno rozdílné karotenoidové složení. Lze tedy předpokládat, že jedním z faktorů určujících barevnost květenství měsíčku je geneticky podmíněné zastoupení a obsah karotenoidů (Kishimoto *et al.*, 2005; Bhave *et al.*, 2020; Pintea *et al.*, 2003).

Podle Bakó *et al.* (2002) patří mezi nejzastoupenější karotenoidy v okvětních lístcích měsíčku blíže nespecifikovaného druhu flavoxanthin (21,09 %), luteoxanthin (11,81 %), auroxanthin (9,54 %), lykopen (7,37 %), β -karoten (6,46 %), lutein (5,69 %), α -karoten (5,67 %), α -kryptoxanthin (5,51 %), 9-*cis*-antheraxanthin (5,14 %) a další. Kishimoto *et al.* (2005) získal podobné, ale mírně odlišné výsledky při analýze kultivaru „Alice Orange“: flavoxanthin (28,5 %), (8'R)-luteoxanthin (11,0 %), lykopen (8,7 %), (8R,8'R)-auroxanthin (7,1 %), (9'Z)-lutein-5,6-epoxid (5,0 %) a další.

To, že genotyp kultivaru má kromě enviromentálních a posklizňových faktorů (Bhave *et al.*, 2020) zásadní vliv na zastoupení a obsah karotenoidů, podává například studie Pinteá *et al.* (2003), kteří studovali rozdíl mezi čtyřmi odrůdami „Double Esterel Orange“, „Radio Extra Selected“, „Bonbon Abricot“ a „Double Esterel Jaune“. I přes rozdíly v zastoupení se však na pozicích vysokých obsahů opakují látky jako flavoxanthin, luteoxanthin a auroxanthin, lutein, lykopen a β -karoten, s poměrně vysokým obsahem jsou však uváděny také γ -karoten, rubixanthin nebo lactucaxanthin a další. Někdy bývá při studiu karotenoidů analyzován pouze β -karoten a lutein, pozornost také budí například zeaxanthin (Piccaglia *et al.*, 1997, Pavelková *et al.*, 2020).

V rostlinách se karotenoidy běžně vyskytují ve formě mono- a diesterů, jinak tomu není ani u měsíčku. Estery jsou tvořeny nejčastěji s mastnými kyselinami jako jsou kyseliny laurová (C12:0), myristová (C14:0), palmitová (C16:0), stearová (C18:0) nebo olejová (C18:1n9) (Bhave *et al.*, 2020; Lapshova *et al.*, 2013; Abdel-Aal & Rabalski, 2015).

2.2.1.5 Analýza karotenoidů

Celkové karotenoidy

Studium karotenoidů může probíhat na několika úrovních. Tou první je určení celkového obsahu karotenoidů v rostlinném materiálu, a to se děje nejčastěji spektrofotometricky. K tomu lze využít několik různých metod, jednou z nich je metoda dle Holma (1954), která bude využita i v experimentální části této práce. Pomocí ní jsme schopni vypočítat koncentraci jednotlivých pigmentů z naměřených absorbancí celé směsi v tolika vlnových délkách, kolik je ve směsi přítomno pigmentů. Je pro to nutné vědět, které pigmenty jsou ve směsi přítomné a znát jejich absorpční vlastnosti (vlnovou délku absorpčního maxima a extinkční koeficient pigmentu při této vlnové délce). Po úpravách a s využitím Lambert-Beerova zákona pak pro stanovení karotenoidů a chlorofylů *a* i *b* získáme sérii rovnic (Obr. 8).

$$\begin{aligned}c_{ChlA} &= 9,784 \cdot A_{662} - 0,99 \cdot A_{644} \\c_{ChlB} &= 21,426 \cdot A_{644} - 4,65 \cdot A_{662} \\c_{Kar} &= 4,685 \cdot A_{440} - 0,268 \cdot (c_{ChlA} + c_{ChlB})\end{aligned}$$

Obr. 8 Rovnice pro výpočet obsahu Chlorofylů *a* (c_{ChlA}), *b* (c_{ChlB}), a karotenoidů (c_{Kar}) dle Holma (1954).

Extrakce a alkalická hydrolyza karotenoidů

Chceme-li analyzovat zastoupení jednotlivých molekul karotenoidů v rostlinném materiálu, musíme přistoupit k separaci těchto látek, typicky pomocí chromatografie. Jelikož jsou ale molekuly karotenoidů v rostlinných buňkách často esterifikovány molekulami mastných kyselin, lze je analyzovat ve formě jednotlivých esterů (Abdel-Aal & Rabalski, 2015; Lapshova *et al.*, 2013), anebo je nutné je nejprve z těchto mono- či diesterů uvolnit, a to nejčastěji alkalickou hydrolyzou neboli saponifikací (Bakó *et al.*, 2002; Kishimoto *et al.*, 2005; Pavelková *et al.*, 2020). Ta standardně probíhá jako následný krok hned po extrakci, kdy se ke směsi extrahovaných látek přidá methanolický roztok KOH nebo NaOH.

Detailní postup se zde napříč dostupnými publikacemi liší; např. Bakó *et al.* (2002) a Pintea *et al.* (2003) přidali k etherickému, resp. v etheru rozpuštěnému, extraktu 30% KOH/MeOH po dobu 18 h, Kishimoto *et al.* (2005) použili 5% KOH/MeOH po dobu 3 h pro dosucha odpařený zakoncentrovaný extrakt, Pavelková *et al.* (2020) a Bhave *et al.* (2020) pracovali s hexan/acetonovým extraktem a saponifikaci provedli přes noc roztokem KOH resp. NaOH/MeOH o koncentraci $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (2,5 %). Podle Oliver & Palou (2000) se nejčastěji používá methanolický, ale i vodný nebo ethanolický roztok KOH v rozpětí koncentrace 10 – 60 % (w/v), přičemž reakce probíhá několik hodin, nejčastěji přes noc, a lze ji urychlit zahřátím reakční směsi.

Alkalickou hydrolyzou ideálně získáme směs analytů, kterých bude menší počet (zbavíme se všech esterů a karotenoidy budou pouze volné) a zároveň budou poskytovat větší signál (ze všech mono- a diesterů např. luteinu získáme pouze volný lutein, jehož koncentrace v extraktu po saponifikaci a tím pádem i signál vzroste). Je však potřeba počítat s určitou ztrátou během vícekrokového a několikahodinového postupu, kterou lze do určité míry potlačit např. zacházením se vzorky a jejich uchováním během hydrolyzy ve tmě.

Existují i přístupy, kdy se saponifikace cíleně obchází (Pavelková *et al.*, 2020), anebo je výzkum cílen přímo na estery karotenoidů (Abdel-Aal & Rabalski, 2015). Postup extrakce je pak o to jednodušší, Pavelková *et al.* (2020) pracovali s extrakčním činidlem *n*-hexan/ethanol (0,2 % *t*-BHT) v poměru 1/1. Abdel-Aal & Rabalski (2015) provedli zvlášť extrakce třemi rozpouštědly, a to vodou nasyceným *n*-butanolem, methyl-*terc*-butyletherem (MtBE) a isopropanolem (IPA), aby pokryli různé stupně polarit a rozpustnosti karotenoidesterů.

LC separace karotenoidů

Chromatografické stanovení rostlinných pigmentů má dlouhou historii, počínaje chromatografií na škrobové nebo cukerné koloně (Zscheile & Comar, 1941), přes papírovou chromatografii (Jensen & Jensen, 1959) a tenkovrstevnou chromatografii (Oliver & Palou, 2000), až k dnes velmi hojně využívané (ultra)vysokoučinné kapalinové chromatografii. HPLC karotenoidů probíhá dnes prakticky výhradně v systému reverzních fází (RP-HPLC).

Jako stacionární fáze se v RP-HPLC karotenoidů nejčastěji používají C18 fáze různých výrobců, např. Chromsyl C18 (6 μm endcapped, 250 \times 4,6 mm) (Bakó *et al.*, 2002), Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,7 μm , 100 \times 2,1 mm) (Pavelková *et al.*, 2020; Bhave *et al.*, 2020), Nucleosil ODS (5 μm , 250 \times 4,6 mm) (Pintea *et al.*, 2003) a další.

Využívány bývají také kolony s C30 stacionárními fázemi určené přímo pro analýzu karotenoidů, např. YMC Carotenoid C30 (3 μm ; 3,0 \times 100 mm) (Pavelková *et al.*; 2020), nebo Thermo AccucoreTM C30 (2,6 μm , 100 \times 2,1 mm) (Sommella *et al.*, 2018) a podobné (Abdel-Aal & Rabalski, 2015; Kishimoto *et al.*, 2005). Podle Pavelková *et al.* (2020) je použití C30 stacionární fáze nutné pro stanovení poměru luteinu a zeaxanthinu, jelikož tento kritický pár nelze na C18 koloně separovat. C30 kolona byla využita i při analýze esterifikovaných karotenoidů ve studii Abdel-Aal & Rabalski (2015). Nevýhodou těchto kolon je poměrně jednoúčelové využití, dlouhé doby analýz a obtížný transfer do UHPLC režimu.

Použití C8 fáze je rovněž popsáno, jedná se např. o kolony Phenomenex Kinetex C8 (2,6 μm , 150 \times 4,6 mm) (Nupur *et al.*, 2021), anebo Phenomenex Luna C8 (3,0 μm , 100 \times 4,6 mm) (Van Heukelem & Thomas, 2001; Koblížek *et al.*, 2010) a podobné.

Publikována je samozřejmě také celá řada UHPLC analýz karotenoidů, kdy jsou téměř výhradně použity C18 fáze různých výrobců a technologií. Jako příklady použití lze uvést kolony Waters Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm , 50 \times 2,1 mm) (Sommella *et al.*, 2018), Waters Acquity HSS C18 (1,8 μm , 100 \times 2,1 mm) (Maurer *et al.*, 2014), Thermo Acclaim UHPLC C18 (2,5 μm , 150 \times 4,6 mm) (Lizama *et al.*, 2021) a další. Výhodami oproti HPLC analýzám jsou samozřejmě kratší doby analýz a efektivnější separace, nižší průtoky a spotřeba mobilních fází, nebo lepší kompatibilita s hmotnostní spektrometrií (MS).

Použité mobilní fáze (MF) jsou napříč studii poměrně rozdílné, avšak většinou sdílejí společný znak, a to velkou eluční sílu použitých rozpouštědel. To dává smysl vzhledem k hydrofobnímu charakteru karotenoidů, díky němuž je jejich retence na nepolární stacionární fázi poměrně velká. Pro analýzu na C18 koloně je tak použita např.

MF A: 88% MeOH, MF B: 100% MeOH, MF C: 30% CH₂Cl₂ v MeOH (Bakó *et al.*, 2002), nebo MF A: 100% ACN, MF B: 90% ACN (Pavelková *et al.*, 2020; Bhave *et al.*, 2020), anebo v UHPLC režimu MF A: roztok CH₃COONH₄ ve vodě c = 10 mmol·l⁻¹, MF B: ACN/MeOH/IPA 7/2/1 (Sommella *et al.*, 2018) apod. Pro analýzu na C30 koloně pak mobilní fázi typicky tvoří MeOH, MtBE a voda v různých poměrech, např. podle Pavelková *et al.* (2020) je to poměr MF A: 81/15/4, MF B: 7/90/3. Při analýze na C8 koloně využili Nupur *et al.* (2021) jako MF A: 25 % roztok CH₃COONH₄ ve vodě c = 28 mmol·l⁻¹, 75 % MeOH a MF B: 100% MeOH.

Po úspěšné separaci se pak karotenoidy eluují v pořadí, které je v případě RP-LC očekávatelné – vždy nejprve xantofyly a následně karoteny. Takto separované pak přecházejí k detektoru a vytvářejí výsledný chromatografický záznam.

Detekce karotenoidů

Koncovkou pro chromatografickou separaci karotenoidů je jejich detekce. Typické je použití detektorů na principu UV-VIS fotometrie, v dnešní době tedy především detektoru diodového pole (DAD, ev. PDA), který poskytuje kompletní spektrální informace o analytech právě v UV-VIS oblasti, nevýhodou však může být nižší citlivost. Použití tohoto detektoru při analýze karotenoidů je však vzhledem k jejich poměrně vysokým extinkčním koeficientům velice výhodné.

Přednosti detekce pomocí hmotnostní spektrometrie jistě není třeba představovat a využití této techniky je samozřejmě očekávatelné i při analýze karotenoidů. Často je hmotnostní spektrometr použit v kombinaci s UHPLC systémem, není to však podmínkou, je-li například použita C30 kolona dostupná pouze pro režim HPLC (Rodrigues *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). Jako iontový zdroj je asi nejčastější volba využívána chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) (Sommella *et al.*, 2018; Dzakovich *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020), jsou ale publikovány také aplikace s ionizací elektrosprejem (ESI) (Pop *et al.*, 2014; Lizama *et al.*, 2021). Popsáno je použití pozitivního (častěji) i negativního módu ionizace. Hmotnostním analyzátozem pak bývá iontová past (IT) (Rodrigues *et al.*, 2019), trojitý kvadrupól (QqQ) (Dzakovich *et al.*, 2019), jejich spojení (Q-TRAP) (Zhang *et al.*, 2020; Pop *et al.*, 2014), anebo analyzátozem s vysokým rozlišením (např. iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací – FT-ICR, nebo hybrid kvadrupól-orbitrap – Q-Orbitrap)

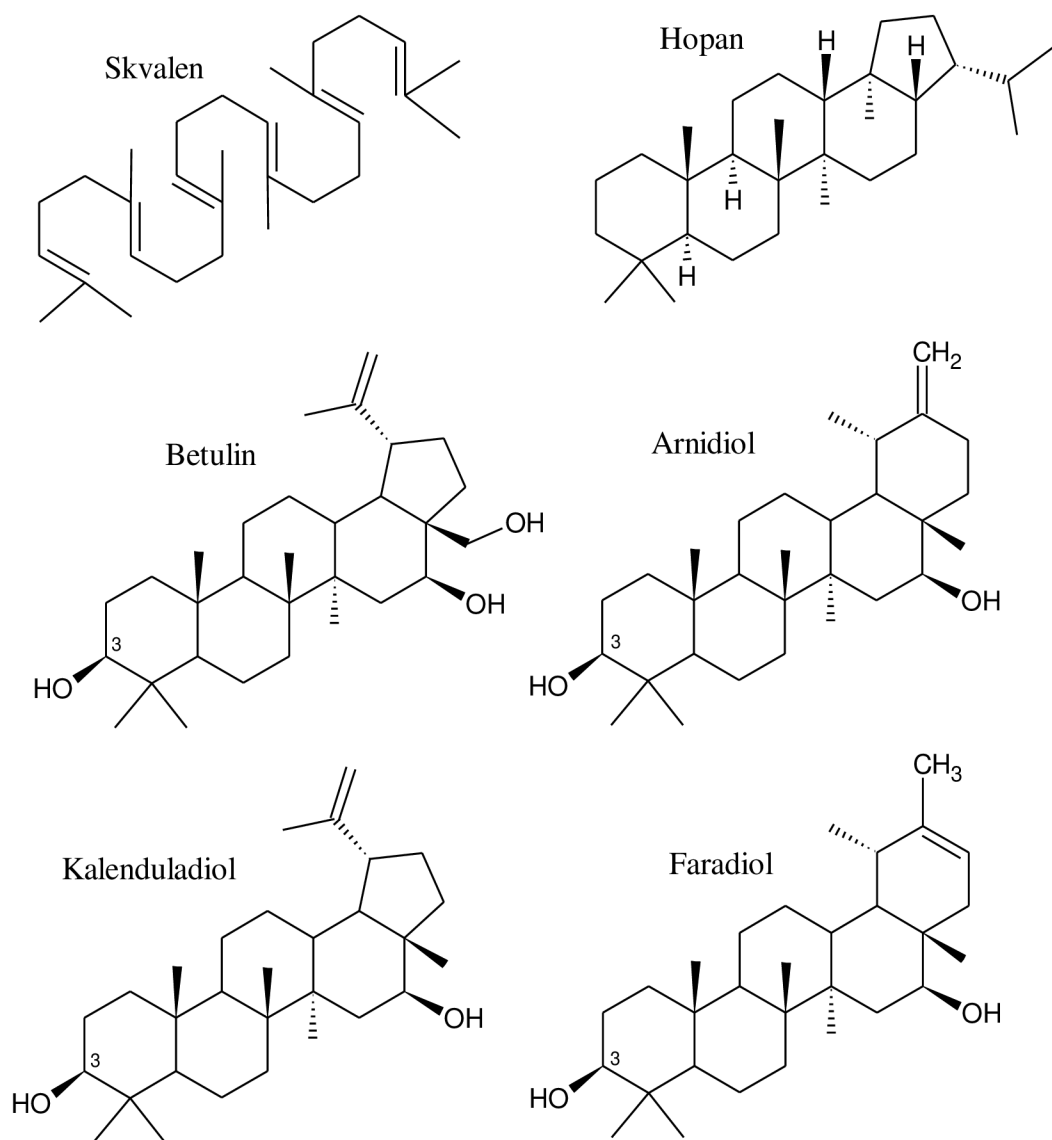
(Sommella *et al.*, 2018; Lizama *et al.*, 2021). V tabulce (Tab. 2) jsou ukázány MRM přechody vybraných analyzovaných karotenoidů.

Tab. 2: MRM přechody vybraných analyzovaných karotenoidů.

Karotenoid	Použitý typ MS	MRM přechody (m/z)	Reference
neoxanthin	APCI-IT	601 > 583; 565; 547; 509; 491; 393; 221	de Rosso & Mercadante, 2007
violaxanthin	APCI-IT	601 > 583; 565; 491; 221	de Rosso & Mercadante, 2007
	APCI-IT	600,6 > 583,5; 565,5; 547,5; 491,5; 221,2	Rodrigues <i>et al.</i> , 2019
luteoxanthin	APCI-IT	601 > 583	de Rosso & Mercadante, 2007
antheraxanthin	APCI-FT-ICR	585,43029 > 567,41961; 549,40920; 493,40407	Sommella <i>et al.</i> , 2018
lutein	APCI-IT	584,9 > 566,5; 548,4	Rodrigues <i>et al.</i> , 2019
	APCI-IT	569 > 551; 533 ; 477; 463; 459	de Rosso & Mercadante, 2007
	APCI-IT	568,7 > 551,6; 533,6; 477,3; 430,3	Rodrigues <i>et al.</i> , 2019
zeaxanthin	APCI-IT	569 > 551; 533 ; 463	de Rosso & Mercadante, 2007
	APCI-FT-ICR	569,43552 > 551,42497; 459,36256	Sommella <i>et al.</i> , 2018
	APCI-IT	569,6 > 551,5; 533,6	Rodrigues <i>et al.</i> , 2019
lykopen	APCI-QqQ	537,5 > 455,3; 269,2; 69,0	Dzakovich <i>et al.</i> , 2019
γ -karoten	APCI-IT	537 > 467; 444	de Rosso & Mercadante, 2007
	APCI-IT	536,7 > (nedetekováno)	Rodrigues <i>et al.</i> , 2019
β -karoten	APCI-IT	537 > 444	de Rosso & Mercadante, 2007
	APCI-FT-ICR	537,44562 > 413,32058; 445,38298	Sommella <i>et al.</i> , 2018
	APCI-QqQ	537,5 > 455,3; 269,2; 69,0	Dzakovich <i>et al.</i> , 2019
	APCI-IT	537,6 > 481,6	Rodrigues <i>et al.</i> , 2019

2.2.2 Pentacyklické triterpenoidy

Další skupinou významných sekundárních metabolitů měsíčku jsou pentacyklické triterpenoidy (Nagy *et al.*, 2011). Jak již napovídá název, řazeny jsou stejně jako karotenoidy do široké skupiny terpenoidů. Struktura triterpenoidů je tvořena šesti pětiuhlíkatými isoprenoidními jednotkami, jejich skelet tedy obsahuje 30 atomů uhlíku a jeho biosyntéza začíná vznikem isopentenylidifosfátu (iPP) a dimethylallyldifosfátu (DMAPP) (viz v kapitole 2.2.1.2 *Karotenoidy – Biosyntéza* a *Obr. 5*) (Rodríguez-Concepción a Boronat, 2002). Spojením těchto pětiuhlíkatých jednotek postupně vzniká třicetiuhlíkatý skvalen, který je prekursorem také pro syntézu steroidů. Cyklizací skvalenu pak vznikají právě pentacyklické triterpeny (Nagy *et al.*, 2011). Jako zástupce lze uvést např. hopan, olean, kyselinu ursolovou, betulin, arnidiol, kalenduladiol anebo faradiol (*Obr. 9*). Celkovou strukturu pak dotváří esterifikace nejčastěji v poloze 3, estery jsou, podobně jako je tomu u karotenoidů, tvořeny s mastnými kyselinami, jako jsou kyseliny laurová (C12:0), myristová (C14:0), palmitová (C16:0) (Loggia *et al.*, 1994).



Obr. 9 Strukturní vzorce skvalenu a vybraných pentacyklických triterpenoidů, vyznačena poloha 3 pro esterifikaci.

Triterpenoidy jsou bioaktivní molekuly vykazující hned několik pozitivních účinků na lidské zdraví, jako je protizánětlivá, protivirová, protinádorová anebo antioxidační aktivita (Loggia *et al.*, 1994; Shanmugam *et al.*, 2012). V měsíčku jsou právě triterpenoidy uváděny jako hlavní nosiči jeho protizánětlivého účinku, zejména mají pak největší vliv monoestery faradiolu (faradiol-3-O-palmitát, faradiol-3-O-myristát a faradiol-3-O-laurát), což je podpořeno i jejich vysokým obsahem v měsíčku (Loggia *et al.*, 1994; Zitterl-Eglseer *et al.*, 2001). Protože je obsah faradiolmonoesterů měsíčku úměrný párotizánětlivé aktivitě různých extraktů z něj, jeví se stanovení faradiolmonoesterů jako vhodný nástroj pro kontrolu kvality přípravků z měsíčku (Loggia *et al.*, 1994).

Menší protizánětlivou aktivitu pak vykazují také monooly ψ -taraxasterol, taraxasterol, lupeol, nebo β -amyrylin. Dále byly v měsíčku identifikovány monoestery arnidiolu, arniriolu, kalenduladiolu, lupantriolu anebo maniladiolu (Loggia *et al.*, 1994; Neukirch *et al.*, 2004; Nicolaus *et al.*, 2016). Květenství měsíčku je tedy velmi bohaté na obsažené petacyklické triterpenoidy, a to jak jejich mono-, di- i trihydroxyderiváty, tak jejich volné i esterifikované formy (Wilkomirski & Kasprzyk, 1979; Ukiya *et al.*, 2001).

Podle Loggia *et al.* (1994), kteří provedli HPLC analýzu na AgNO₃ impregnovaném silikagelu, je ve květech *C. officinalis* z pentacyklických triterpenoidů zastoupen faradiol z 95 %, následuje arnidiol se 2 %. Co se týče mastných kyseliny uvolněných kyselou hydrolyzou, nejhojnější je kyselina myristová (51 %), následuje palmitová (28 %) a laurová (8 %).

Moderní výzkum samozřejmě vedl k upřednostnění použití reverzních fází. Pro RP-HPLC jsou používány nejčastěji C18 kolony, např. Nucleosil 100–5 C18 (5 μ m, 250 \times 4 mm) s isokratickou elucí směsí methanolu a vody v poměru 97:3 (Neukirch *et al.*, 2004), nebo LiChrosphere RP-18e, (5 μ m, 4 \times 250 mm) s gradientovou elucí methanolem a vodným roztokem kyseliny trifluoroctové o pH = 4 (Zitterl-Eglseer *et al.*, 2001; Reznicek & Zitterl-Eglseer, 2003). Popsána je i analýza v UHPLC režimu, např. Nicolaus *et al.* (2016) využili kolonu Phenomenex Kinetex C18 (2,6 μ m, 100 \times 3 mm) s gradientovou elucí ACN/MeOH. Detekce může buď probíhat v UV oblasti při 210 nm (Zitterl-Eglseer *et al.*, 2001; Neukirch *et al.*, 2004), anebo pomocí hmotnostní spektrometrie (APCI-QTOF-MS) (Nicolaus *et al.*, 2016).

Obsah faradiolu (či jeho esterů) lze označit za opravdu vysoký, jak již ostatně bylo zmíněno výše (Loggia *et al.*, 1994). Zitterl-Eglseer *et al.* (2001) uvádí obsah faradiol-laurátu $0,206 \pm 0,052$ %, faradiol-myristátu $1,333 \pm 0,259$ % a faradiol-palmitátu $1,418 \pm 0,212$ % v suchých jazykových květech *C. officinalis*; o řád nižší hodnoty pak uvádí pro trubkovité květy, o dva řády pro zákrovň listeny, a ještě nižší nebo téměř nulový obsah pro listy.

Stanovení triterpenoidů může alternativně probíhat také pomocí plynové chromatografie (GC) (Niżyński *et al.*, 2015; Nicolaus *et al.*, 2016). Niżyński *et al.* (2015) takto v květenství *C. officinalis* stanovil jako nejzastoupenější ψ -taraxasterol/taraxasterol ($2124,28 \pm 160,40$ μ g \cdot g⁻¹ DW), následoval α -amyrenon ($924,77 \pm 56,15$ μ g \cdot g⁻¹ DW), α -amyrylin/lupeol ($773,46 \pm 48,68$ μ g \cdot g⁻¹ DW). Hodnoty obsahu faradiolu byly proti očekávání poměrně nízké, a to $19,45 \pm 1,42$ μ g \cdot g⁻¹ DW pro volný faradiol a $82,52 \pm 6,08$ μ g \cdot g⁻¹ DW pro jeho ester (blíže nespecifikováno).

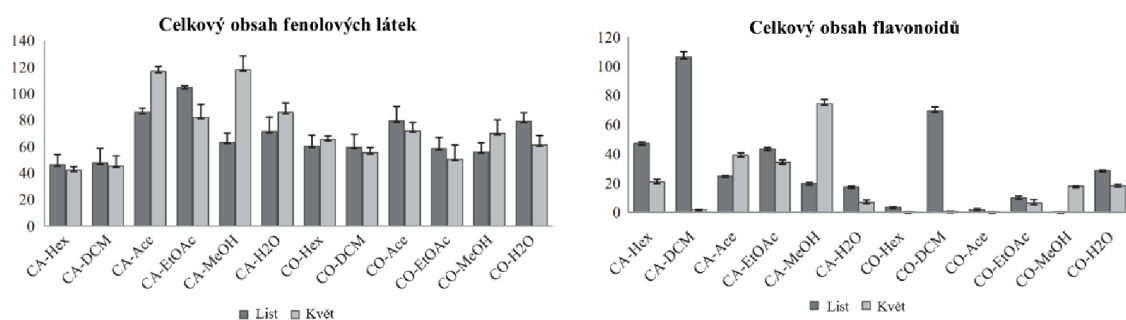
2.2.3 Fenolové sloučeniny

Fenolové látky jsou velkou skupinou sekundárních metabolitů syntetizovaných rostlinami. Ve struktuře vždy obsahují jednu nebo více hydroxylových funkčních skupin navázaných na aromatické jádro. Biosyntéza v rostlinném organismu probíhá buď šikimátovou dráhou z cukerných metabolitů (vede k systémům s kyslíkovými funkčními skupinami v *o*- a *p*- polohách), anebo polyketidovou dráhou lineární kondenzací kyseliny octové (vede k *m*- substitučním derivátům), případně jejich kombinací (Macholán, 1998). Mezi fenolové látky patří např. fenolové kyseliny, jednoduché fenoly, flavonoidy, kumariny, lignany, ligniny, tanniny a další. Vyskytují se jako volné látky, ale i jako konjugáty se sacharidy nebo proteiny (Khoddami et al., 2013; Klepacka et al., 2011; Macholán, 1998).

Rostliny jsou pro člověka významným zdrojem těchto látek, které v lidském těle často vykazují příznivé bioaktivní účinky (Klepacka *et al.*, 2011). Jejich schopnost bránit oxidativnímu stresu může být buď přímá díky jejich konjugovanému systému vazeb, anebo nepřímá aktivací redoxně senzitivní regulační dráhy Keap1-Nrf2-ARE (Kelch-like ECH-Associating protein 1 – nuclear factor erythroid 2 related factor 2 – antioxidant response element), produkující cytoprotektivní proteiny (Christensen, 2018).

V měsíčku jsou fenolové látky rovněž přítomny. Vzhledem k jejich podílu na pozitivní účinek měsíčku na lidské zdraví jsou také zkoumány ve fytochemických studiích. Konkrétně se pak jedná o látky ze skupin např. o flavonoidů, fenolových kyselin a další (Bragueto Escher *et al.*, 2019).

Celkový obsah fenolových látek v rostlinném materiálu bývá stanovován tradičně kolorimetricky Folin-Ciocalteuovou metodou podle Singleton a Rossi (1965), která je založená na reakci fenolů ze vzorku se směsí oxidů wolframu a molybdenu. U následně vzniklého sytě modrého roztoku je změřena absorbance při 765 nm (Ercetin *et al.*, 2012; Bekdeşer, 2019; Manivannan *et al.*, 2021). Alternativou může být použití metody s Berlínskou (Pruskou) modří (Margraf *et al.*, 2015; Bragueto Escher *et al.*, 2019). Obsah fenolových látek ve vzorku je typicky uveden jako ekvivalentní množství kyseliny gallové (GAE – gallic acid equivalent). Podle Ercetin *et al.* (2012) byla nejvyšší zjištěná hodnota v methanolickém extraktu květenství *C. arvensis*, a to $118,18 \pm 10,29$ mg GAE·g⁻¹ extraktu, přičemž ve stejném extraktu z *C. officinalis* byl zjištěn obsah fenolů nižší (Obr. 10). Abudunia *et al.* (2017) uvádí v methanolickém extraktu *C. arvensis* hodnotu $50,26 \pm 0,18$ mg GAE·g⁻¹ DW.



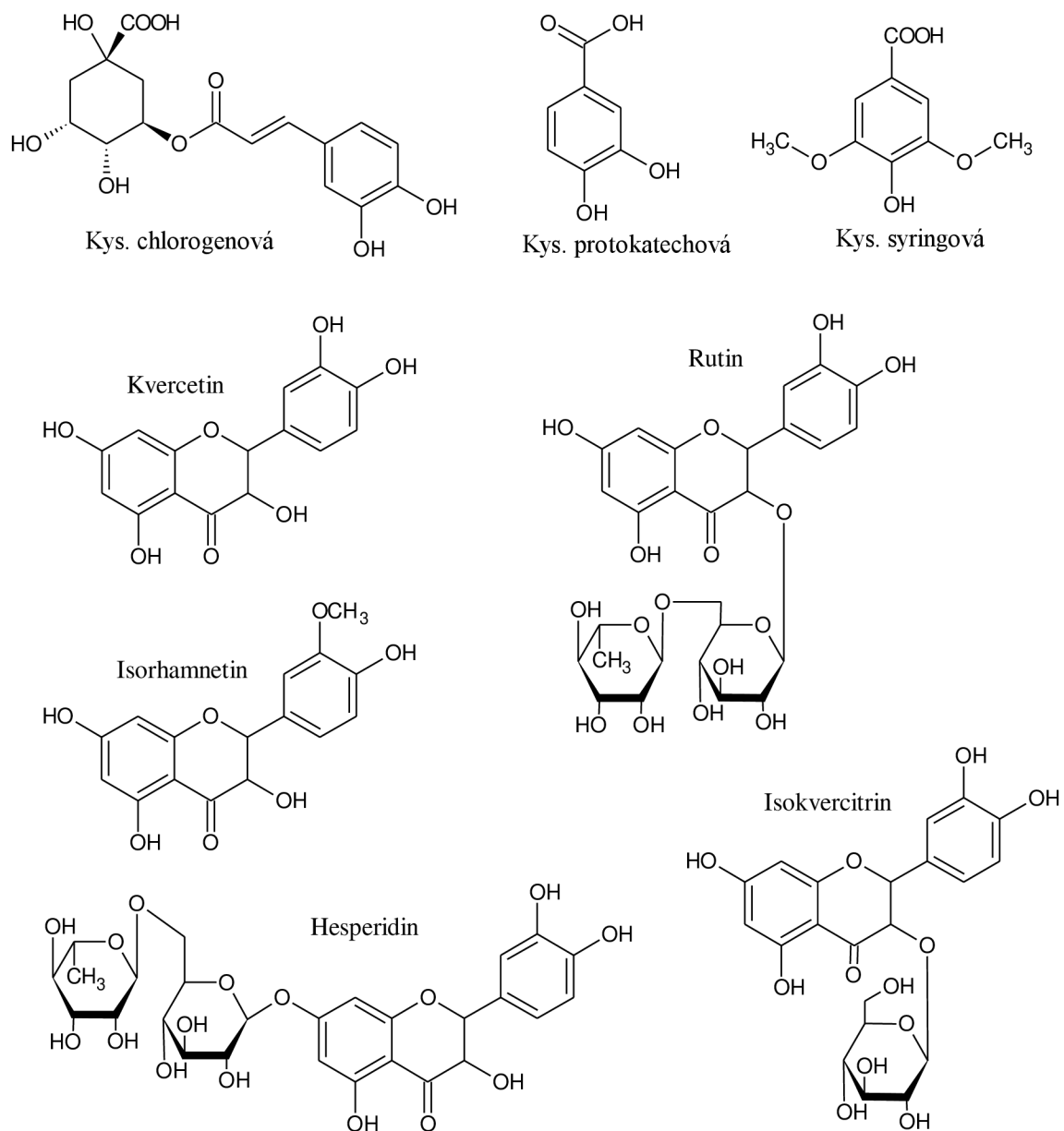
Obr. 10 Celkový obsah fenolů (v mg GAE·g⁻¹ extraktu ± S.E.M.) a celkový obsah flavonoidů (v mg QE·g⁻¹ extraktu ± S.E.M.) v extraktu *C. arvensis* (CA) a *C. officinalis* (CO); porovnání extrakčních činidel: Hex – hexan; DCM – dichloromethan; Ace – aceton; EtOAc – ethylacetát; MeOH – methanol; H₂O – voda, převzato z Ercetin *et al.* (2012).

Rovněž bývá stanovován celkový obsah flavonoidů uváděný jako ekvivalentní množství kvercetinu (QE) anebo rutinu (RE). Typicky to probíhá kolorimetrickou metodou s AlCl₃ podle Woisky a Salatino (1998), Ercetin *et al.* (2012) takto zjistili u methanolického extraktu květenství *C. arvensis* obsah flavonoidů 74,14 ± 3,09 mg·g⁻¹ extraktu, pro *C. officinalis* to pak byl několikrát menší obsah (Obr. 10). Abudunia *et al.* (2017) využili obdobnou metodu podle Zhishen *et al.* (1999), kdy získali hodnotu 174,93 ± 5,21 mg RE·g⁻¹ DW.

Má-li být stanoveno zastoupení jednotlivých fenolových látek, je typicky použita kapalinová chromatografie, výjimečně pak tenkovrstvá chromatografie (TLC) (Bilia *et al.*, 2000; Ercetin *et al.*, 2012). Kapalinová chromatografie fenolů probíhá v drtivé většině případů v UHPLC režimu s reverzními fázemi, konkrétně bývají využity kolony s C18 stacionárními fázemi. Eluce je gradientová, mobilní fáze jsou MF A: 0,1% HCOOH ve vodě, případně roztok pufru mravenčanu amonného (5 mmol·l⁻¹), MF B: 0,1% HCOOH v MeOH anebo ACN (Faustino *et al.*, 2018; Pires *et al.*, 2018; Bekdeşer, 2019; Ak *et al.*, 2020).

Podle Faustino *et al.* (2018) bylo v měsíčku odhaleno celkem 40 fenolových látek, přičemž ve vzorcích *C. arvensis* byly nejzastoupenějšími kvercetin, glykosidy kyseliny protokatechové, nebo kyselina chlorogenová (Obr. 11). Ve vzorcích *C. suffruticosa* subsp. *lusitanica* a *C. suffruticosa* subsp. *algarbiensis* byly nejzastoupenějšími kyseliny syringová, hydroxyskořicová a jejich deriváty; Obr. 11). Pires *et al.* (2018) stanovili v *C. officinalis* největší obsah glykosidů isorhamnetinu (26,12 mg·g⁻¹ DW) a kvercetinu (1,17 mg·g⁻¹ DW) (Obr. 11). Ak *et al.* (2020) uvádí v závislosti na použité extrakci velké

zastoupení hesperidinu (2,618 – 3,076 mg·g⁻¹ extraktu), rutinu (3,656 – 4,810 mg·g⁻¹ extraktu), isokvercitrinu (2,600 – 5,512 mg·g⁻¹ extraktu) a kyseliny chlorogenové (8,313 – 9,214 mg·g⁻¹ extraktu) v květenství *C. officinalis* (Obr. 11).



Obr. 11 Strukturí vzorce vybraných fenolových látek přítomných v měsíčku; podle Faustino *et al.* (2018), Pires *et al.* (2018), Ak *et al.* (2020).

2.3 Fenotypování

Popisem morfologických vlastností a znaků rostlin se zabývá obor fenotypizace. Fenotyp zahrnuje veškeré pozorovatelné znaky organismu, na výsledném fenotypu se podílí jak genotyp organismu, tak i epigenetika a prostředí, ve kterém organismus žije (Johannsen,

1911). Existuje mnoho metod fenotypování, které se používají pro studium rostlin, zvířat i mikroorganismů v závislosti na vlastnostech, které se mají měřit. U rostlin se fenotypování často provádí vizuálním hodnocením (Obr. 12), kdy se kvantitativně hodnotí jejich anatomické, ontogenetické, fyziologické a biochemické vlastnosti, které jsou dány rozdílem genotypu a podmínek prostředí, jimž byla rostlina vystavena (De Diego *et al.*, 2022).

Moderní vývoj vedl k nástupu různých poloautomatizovaných a automatizovaných fenotypovacích technologií (Obr. 12), které mohou měřit různé parametry kvantitativně, přesně a rychle. Analýza je nejčastěji prováděna neinvazivním měřením dynamiky růstu a fyziologie v čase (De Diego *et al.*, 2022). Přínosnost a důležitost rostlinného fenotypování je zejména v oblastech zemědělství a průmyslu, např. při výběru rostlin s vysokým výnosem v daném prostředí (Costa *et al.*, 2019).



Obr. 12 Ukázka vybraných fenotypovacích metod; 1 – indoor fenotypizační linka, 2 – vizuální hodnocení fenotypu fotografováním květenství, 3 – ruční fenotypové měření, 4 – Mobilní fenotypovací zařízení Plant Screen™ Field System. Převzato z: Žurnál News & Events, 2023 (1); VÚRV, v. v. i., 2023 (2); CATRIN, 2023 (3, 4).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a instrumentální vybavení

3.1.1 Biologický materiál

3.1.1.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální část diplomové práce bylo zvoleno 8 genotypů měsíčku (*Calendula* sp.) z národní kolekce léčivých, aromatických a kořeninových rostlin Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Olomouci (Tab. 3 a Obr. 13).

Tab. 3 Seznam genotypů měsíčku (*Calendula* sp.) vybraných pro experimentální část diplomové práce, jejich označení a popis.

Vzorek	ID	ECN	Druh	Název kultivaru	Popis
1	L2-1	09A2100002	<i>C. officinalis</i>	Apricot beauty Morel.	meruňkový
2	L3-1	09A2100003	<i>C. officinalis</i>	Plamen	sytě oranžový
3	L4-1	09A2100004	<i>C. officinalis</i>	Pacific Schönheit Tief.	sytě oranžový, plnokvětý, tmavý střed
4	L15-1	09A2100023	<i>C. officinalis</i>	Pacific Schönheit Cr.	vysoký, světle žlutý, plnokvětý oranžový, prázdnokvětý,
5	L29-2	09A2100032	<i>C. officinalis</i>	Meteor	světlý nebo tmavý střed
6	L42-2	09A2100039	<i>C. arvensis</i>	3354	drobný, světlý střed
7	L44-2	09A2100036	<i>C. arvensis</i>	3355	drobný, tmavý střed
8	L46-2	09A2100048	<i>C. officinalis</i>	Yellow Gitana	nizký, žlutý, většinou plnokvětý, většinou tmavý střed



Obr. 13 Autentické fotografie genotypů měsíčku vybraných pro experimentální část této práce; vzorky 1–8 (viz tab. 3). Fotografie pořízeny v polních podmínkách při 1. sběru sklizně 2021.

Tab. 4 Data sběrů ve sklizních let 2021 a 2022.

Sběr	2021	2022
1.	12.8.	19.7.
2.	19.8.	28.7.
3.	25.8.	9.8.
4.	2.9.	18.8.

Sběr květenství měsíčků probíhal v obou letech ve čtyřech termínech s rozmezím \pm týdne. Konkrétní termíny sběru (Tab. 4) byly voleny podle počasí (žádoucí bylo slunečné počasí kvůli plnému rozvinutí květenství) a podle dalších okolností (vytíženost lyofilizátoru, synchronizace s fenotypizačním experimentem, časové možnosti personálu VÚRV apod.). Bylo sbíráno vždy všech osm genotypů, od každého 10 kusů květenství s výjimkou genotypů s drobným květenstvím, kterých bylo sesbíráno více kusů. Sbírána byla pouze plně rozvinutá květenství, která ještě nejevila známky odkvétání. Květenství byla sbírána do neprůsvitných pytlíků a ihned po sběru přenesena k lyofilizaci.

Experimenty s karotenoidy (spektrofotometrie celkových karotenoidů a UHPLC-PDA karotenoidů) byly provedeny se všemi osmi sběry osmi genotypů měsíčku. Analýza faradiolu a fenolových látek byla provedena pouze s prvním a čtvrtým sběrem v každém roce sklizně, tedy se čtyřmi sběry osmi genotypů měsíčku.

3.1.1.2 Produkty s obsahem měsíčku

Dále bylo v experimentální části práce pracováno také s běžně dostupnými produkty s obsahem měsíčku nebo extraktu z něj. Cílem experimentů s těmito produkty bylo seznámit se netypickým, jiným než rostlinným materiálem a otestovat, zda jsou metody použité pro lyofilizovaný květ vhodné i pro tyto matrice. Jednalo se o čaj sypaný, krém na ruce, mast, bylinný olej a pleťovou vodu (viz tab. 5).

Tab. 5 Seznam produktů s měsíčkem vybraných pro experimentální část diplomové práce, jejich označení, popis a výrobce.

Označení vzorku	Název produktu	Typ produktu	Výrobce
C	Měsíček květ	Čaj sypaný	Mediate s.r.o., ČR
K	Indulona měsíčková	Krém na ruce	Sarantis Slovakia s.r.o., SR
M	-	Mast se základem z lékařské vazelíny	- (domácí výroba)
O	Měsíčkový olej	Bylinný olej	NOVY s.r.o., ČR
V	Pleťová voda měsíčková	Pleťová voda, směsný extrakt bylin	NOVY s.r.o., ČR

Vzorek C (čaj sypaný; Obr. 14) byl zakoupen v prodejně HERBA – Jindřich Jung, Dolní náměstí 20, Olomouc. Jedná se o části sušeného květenství, v čaji lze pohledem rozpoznat jazykové květy žluté barvy tvořící majoritní část, dále květní lůžka s trubkovitými květy, zákrovní listeny, a dokonce i plody nažky (viz kapitola 2.1.3 *Botanická charakteristika*). Produkt je označen jako doplněk stravy.

Vzorek K (krém na ruce; Obr. 14) byl zakoupen v řetězci Lidl. Podle obalu se jedná o „krém na ruce Indulona s výtažkem z měsíčku lékařského s regeneračním účinkem“. Produkt obsahuje uvedené ingredience: voda, isopropylmyristát, cetylalkohol, dimethicone, parafin kapalný, glycerin, glycerylstearát, lanolin, olivový olej, parafin, fenoxylethanol, C10–C18 triglyceridy, extrakt květenství měsíčku lékařského, kaprylylglykol, včelí vosk, ceteth-20, decylenglykol, laureth-30, kyselina palmitová, parfém, PEG-75 stearát, polyakrylát sodný, steareth-20, kyselina stearová, tokoferylacetát, trideceth-6, BHT, α -isomethylionon, citronellol, kumarin, geraniol, linalool.

Vzorek M (mast; Obr. 14) byla připravena v domácích podmínkách tradičním způsobem. Na přípravu bylo použito 100 g lékařské vazelíny a 15,38 g květenství měsíčku blíže nespecifikovaného genotypu, lokalita pěstování – Kravaře, Moravskoslezský kraj. Měsíček byl vložen do vazelíny rozehřáté ve vodní lázni a ta byla 10 min zahřívána. Proces zahřívání ve vodní lázni byl v následujících devíti dnech zopakován ještě šestkrát, vždy po dobu 15–25 minut. Poslední den byla směs zahřáta a přecezena přes plátýnko. Takto připravená mast byla skladována při pokojové teplotě po dobu asi půl roku až do analýzy.

Vzorek O (bylinný olej; Obr. 14) byl rovněž zakoupen v prodejně HERBA – Jindřich Jung, Dolní náměstí 20, Olomouc. Jedná se o směsný olej s několika bylinnými složkami. Výrobce udává využití pro imunitu, játra, trávení, zdraví dýchacích cest, klouby a pokožku a jako antioxidant. Produkt je označen jako doplněk stravy a jeho složení je: Olejová složka: slunečnicový olej, rakytníkový olej, ostropestřecový olej. Bylinná složka: měsíček lékařský, ostropestřec mariánský, heřmánek pravý, levandule lékařská, lopuch větší, řebříček obecný, benedikť lékařský, fenykl obecný, kotvičník zemní, šalvěj lékařská, parcha saflorová, chmel otáčivý.

Vzorek V (pleťová voda; Obr. 14) byl zakoupen v prodejně HERBA Zdravá výživa, Olomouc City, Pražská 255/41, Olomouc. Jedná se o vodný a ethanolový směsný extrakt bylin. Výrobce udává použití pro problematickou pleť se sklonek k akné a trudoovitosti. Produkt je označen pro zevní použití a obsahuje uvedené ingredience: voda, ethanol, květ měsíčku lékařského, nať přesličky, květ levandule lékařské, nať šalvěje, nať zlatobýlu, nať tymiánu, nať řepíku, květ heřmánku, nať řebříčku.

S produkty s obsahem měsíčku byly provedeny pouze experimenty stanovení celkového obsahu karotenoidů a stanovení faradiolu. Postup přípravy vzorků se mnohdy mírně lišil od postupu použitého pro homogenizovaný lyofilizovaný materiál, v příslušné podkapitole kapitoly 3.2 *Metody* jsou proto rozdíly vždy uvedeny. Výsledky experimentů s produkty s obsahem měsíčku nejsou vztaženy na DW – suchou hmotu (s výjimkou vzorku C), nýbrž na gram (vzorek M a K) anebo mililitr (vzorek O a V) prod. – daného produktu.



Obr. 14 Fotografie produktů s měsíčkem vybraných pro řešení této práce; C – čaj sypaný, K – krém na ruce, M – mast, O – bylinný olej a V – pleťová voda.

3.1.2 Chemikálie

Aceton pro HPLC (Sigma-Aldrich, USA)

Acetonitril hypergrade (Supelco, USA)

Butylhydroxytoluen (BHT) (Sigma-Aldrich, USA)

Dichlormethan (Penta, s.r.o., Česká republika)

Ethylalkohol 96% (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Ethylalkohol 99,8% (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma-Aldrich, USA)

Hexan (Sigma-Aldrich, USA)

Chloroform (Penta, s.r.o., Česká republika)

Interní standardy fenolových látek – kyselina *d*₆-*p*-kumarová, kyselina *d*₄-salicylová (Toronto Research Chemicals, Kanada)

Kyselina gallová (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina octová 100% (Merck, Německo)

Methanol hypergrade (Supelco, USA)

Methanol gradient grade (Supelco, USA)

Methoxid sodný 25% v methanolu (Sigma-Aldrich, USA)

Mili-Q voda (Millipore, Německo)

N, N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, USA)

Standard faradiolu (Phytolab, Německo)

Standardy fenolových látek – abietin, kyselina 5-hydroxyferulová, kyselina gallová, gallokatechin, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, epigallokatechin, 2-O-βD-glukosid kyseliny salicylové, kyselina chlorogenová, kyselina 4-hydroxybenzoová, katechin, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, kyselina vanilová, kyselina kávová, kyselina syringová, kyselina 3-hydroxybenzoová, kyselina *p*-kumarová, koniferylalkohol, sinapylalkohol, orientin, isoorientin, kyselina ferulová, kyselina sinapová, kyselina salicylová, myricitrin, vitexin, isovitexin, rutin, koniferylaldehyd, sinapaldehyd, kvercitrin, myricetin, naringin, kyselina rozmarýnová, morin, hesperidin, kvercetin, eriodiktyol, kyselina *trans*-skořicová, *p*-methylkumarát, luteolin, floretin, naringenin, kemferol, apigenin, chrysoeriol, pinocembrin, galangin, chrisin, cannflavin A, cannflavin B, (Sigma Aldrich, USA; Toronto Research Chemicals, Kanada)

Standardy vitamínů – kyselina askorbová, kyselina dehydroaskorbová, thiamin hydrochlorid, riboflavin, nikotinamid, kyselina nikotinová, kyselina pantothenová, pyridoxin hydrochlorid, kyselina listová, retinol, retinyl acetát, α -tokoferol, kyselina hippurová (IS) (Sigma Aldrich, USA)

Standardy karotenoidů – 9-*cis*-Antheraxanthin, β -karoten, lutein, neoxanthin, zeaxanthin (Sigma-Aldrich, USA)

Uhličitan sodný bezvodý p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

3.1.3 Přístrojové vybavení a pomůcky

Analytické váhy Explorer EX224 (Ohaus, USA)

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

Analytické váhy EWB (Kern, Česká republika)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifugační filtry microspin nylon 0,22 22 μ m (Chromservis, Česká republika)

Centrifugační mikrozkušavky 1,5/2 ml (Eppendorf, Německo)

Centrifugační zkumavky s víčkem 15/50 ml (VWR, USA)

Chlazený centrifugační koncentrátor CentriVap (Labconco, USA)

Chromatografická kolona Acquity UPLC BEH C8 (1,7 μ m, 150 \times 2,1mm) (Waters, USA)

Chromatografická kolona Acquity UPLC BEH C8 (1,7 μ m, 50 \times 2,1mm) (Waters, USA)

Chromatografická kolona Kinetex C8 (1,7 μ m, 150 \times 2,1 mm) (Phenomenex, USA)

Chromatografická kolona Kinetex C8 (2,6 μ m, 150 \times 4,6 mm) (Phenomenex, USA)

Chromatografická kolona Zorbax Eclipse Plus C8 (1,8 μ m, 150 \times 2,1 mm) (Agilent, USA)

Jednorázové injekční stříkačky, 2-dílné, 2 ml (B-Braun, Německo)

Kapalinový chromatograf Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Japonsko)

Tandemový hmotnostní spektrometr MS 8050 (Shimadzu, Japonsko)

Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Tandemový hmotnostní spektrometr TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific, USA)

Kryozkušavky s víčkem a těsněním (Sarstedt, Německo)

Kulový vibrační mlýn MM 400 (Retsch, Německo)

Laboratorní sklo

Laboratorní digestoř (Merci, Česká republika)

Lyofilizátor Beta 1-8 LD plus (Christ, Německo)

pH-metr CX 505 (Elmetron, Polsko)

Spektrofotometr S-20 (Boeco, Německo)
Stolní centrifuga Microspin 12 (Biosan, Lotyšsko)
Stříkačkové filtry 0,22 µm (Chromservis, Česká republika)
Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)
Vialky Clear 2 ml (Pragolab, Česká republika)
Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

3.1.4 Software

Excel, Microsoft 365 (Microsoft, USA)
ChemSketch (Freeware) 2018.1 (ACD/Labs, Kanada)
LabSolutions (Shimadzu, Japonsko)
LC Method Transfer Calculator (dostupné na: <https://appslab.thermofisher.com/lc-method-transfer-calculator>).
R (R Foundation for Statistical Computing, Rakousko)
Xcalibur 3.1 (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Preanalytická příprava vzorků

3.2.1.1 Lyofilizace

Sušení celých květenství probíhalo mrazem za sníženého tlaku v lyofilizátoru. Aby bylo zajištěno důkladné vysušení, byl sedmdesáti dvou hodinový cyklus proveden minimálně třikrát. Důkladně lyofilizovaný materiál byl zvážen a uložen v plastových zkumavkách s víčkem při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.2 Homogenizace

Homogenizace byla provedena ocelovou kuličkou v plastových 50ml zkumavkách s víčkem kulovým vibračním mlýnem. Jeden homogenizační cyklus zahrnoval 3min třepání při frekvenci 27 Hz, někdy jej bylo potřeba zopakovat, aby bylo docíleno důkladné homogenizace na jemný prášek vhodný ke snadnému navažování miligramových množství materiálu. Homogenizovaný materiál byl dále uložen při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýz.

3.2.1.3 Příprava produktů s měsíčkem

Pouze čaj z květenství měsíčku (vzorek C) byl lyofilizován. Jelikož se jednalo o již sušený materiál, jeden sedmdesáti dvou hodinový cyklus byl dostatečný. Následně byl čaj homogenizován a uložen v plastové zkumavce s víčkem při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ostatní vzorky produktů (K, M, O a V) nebyly nijak zpracovávány a byly rovnou přeneseny k extrakci pro příslušnou analýzu.

3.2.2 Stanovení celkového obsahu karotenoidů

Celkový obsah karotenoidů byl stanoven spektrofotometricky pomocí acetonových extraktů a výpočtu dle Holma (1954). Do mikrozkuvek bylo naváženo asi přesně 2,5 mg vzorků rostlinného materiálu v triplicátech. Ke každému vzorku byl následně přidán 1 ml acetonu, vzorky byly promíchány na vortexu, umístěny na 20 minut do ultrazvukové lázně a stočeny na centrifuze po dobu 5 minut při 12 000 g (vše při laboratorní teplotě). Odebraný supernatant byl přenesen do pětimililitrových odměrných baněk a vzorky byly doplněny acetonem do 5 ml po rysku.

V případě produktů s měsíčkem bylo v triplicátech naváženo asi přesně 25 mg vzorku C, 100 mg vzorku K a M a odebráno 100 μl vzorku O. Následný postup byl shodný jako v případě experimentu s rostlinným materiálem. Rozdílný postup byl použit pro vzorek

V, který nebyl nikterak ředěn, pouze centrifugován a rovnou přenesen do kyvety k měření.

Takto připravené vzorky byly změřeny na stolním spektrofotometru v křemenné kyvetě. Měřena byla absorbance při 662 nm odpovídající maximu absorbance chlorofylu *a*, 644 nm odpovídající maximu absorbance chlorofylu *b* a 440 nm odpovídající maximu absorbance karotenoidů. Pomocí rovnic dle Holma (1954) pak byly vypočteny obsahy daných látek (viz kapitola 2.2.1.5 *Analýza karotenoidů – Celkové karotenoidy*).

3.2.3 Extrakce a saponifikace karotenoidů

Pro studium zastoupení karotenoidů byly zvoleny dva přístupy. Za prvé to byla jednoduchá, přímá extrakce pigmentů bez alkalické hydrolyzy (Pavelková *et al.*, 2020), kdy by měl být získán celý profil barviv, jak volných karotenoidů, tak jejich esterů. Za druhé to pak byla extrakce s následnou alkalickou hydrolyzou (neboli saponifikací) (Bhave *et al.*, 2020), která by měla uvolnit všechny karotenoidy z jejich esterů. Oba přístupy byly následně vzájemně porovnány (viz. kapitola 5.2. *Zavedení a optimalizace UHPLC analýzy karotenoidů - Porovnání přístupů extrakce bez a se saponifikací*).

3.2.3.1 Extrakce bez saponifikace

Extrakce karotenoidů bez saponifikace byla s malými modifikacemi provedena podle Pavelková *et al.* (2020). Ve třech technických replikátech bylo naváženo asi přesně 25 mg rostlinného materiálu do 2ml mikrozkušavek. Dále bylo přidáno 200 μ l směsi EtOH (s 0,2 % *t*-BHT):Hexan 1:1 a suspenze byly 30 minut třepány na orbitální třepačce. Následně bylo přidáno 200 μ l deionizované vody, vzorky byly stočeny na centrifuze (12 000 g, 5 min, laboratorní teplota) a horní fáze byla přenesena do čisté mikrozkušavky. Zbytek byl podroben druhé extrakci přidáním 400 μ L hexanu, třepáním 30 minut a centrifugací. Znovu byla odebrána horní hexanová fáze, oba hexanové extrakty byly spojeny a odpařeny dosucha v centrifugačním koncentrátoru. Takto připravené vzorky byly rozpuštěny v 1000 μ l mobilní fáze o složení 45 % A a 55 % B pomocí ultrazvukové lázně (15 min, 30 °C) a promíchání na vortexu. Poté byly pomocí centrifugačního koncentrátoru a mikrozkušavkových nylonových filtrů microspin o porozitě 0,22 μ m zbaveny zbylých mechanických nečistot, následně byly přeneseny do zatmavených HPLC vialek, uzavřeny a přeneseny k UHPLC analýze.

3.2.3.2 Extrakce se saponifikací

Při extrakci se saponifikací bylo s drobnými změnami postupováno podle Bhave *et al.* (2020). Z každého vzorku bylo ve třech technických replikátech naváženo asi přesně 25 mg rostlinného materiálu do 2ml mikrozkušavek. Následně bylo ke vzorkům přidáno 100 μ l hexanu a 100 μ l směsi EtOH (s 0,2 % *t*-BHT):aceton 6:4 a suspenze byly lehce promíchány na vortexu a 10 minut třepány na orbitální třepačce. Poté bylo přidáno dalších 300 μ l hexanu, 250 μ l směsi EtOH (s 0,2 % *t*-BHT):aceton 6:4 a 250 μ l metanolickeho roztoku NaOH o koncentraci 20 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto připravené vzorky byly po opětovném promíchání a třepání ponechány inkubovat po dobu ~22 h při laboratorní teplotě.

Druhý den bylo přidáno dalších 500 μ l hexanu a 500 μ l roztoku Na_2SO_4 o koncentraci 100 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Po promíchání na vortexu, 10 min třepání a centrifugaci (12 000 g, 5 min, laboratorní teplota) byla vytvořeno zřetelné fázové rozhraní. Horní hexanová fáze byla odebrána do čisté mikrozkušavky. Zbytek byl znovu ještě dvakrát podroben hexanové extrakci (500 μ l hexanu, vortex, třepačka, centrifuga), všechny hexanové fáze byly následně spojeny a odpařeny v centrifugačním koncentrátoru. K suchému extraktu bylo přidáno 1000 μ l počáteční mobilní fáze o složení 45 % A a 55 % B, rozpuštění bylo dopomoženo ultrazvukovou lázní (15 min, 30 °C) a promícháním na vortexu. Vzorky byly ještě pomocí centrifugačního koncentrátoru a mikrozkušavkových nylonových filtrů microspin o porozitě 0,22 μm zbaveny zbylých mechanických nečistot, následně byly přeneseny do zatmavených HPLC vialek, uzavřeny a přeneseny k UHPLC analýze.

3.2.4 Zavedení a optimalizace UHPLC-PDA analýzy karotenoidů

Při zavádění metody pro chromatografickou analýzu karotenoidů bylo vycházeno z dostupné literatury a rovněž byly využity zkušenosti z laboratoře s již zavedenou obdobnou metodou. Cenné rady poskytl pan doc. Mgr. Michal Koblížek, Ph.D. (Laboratoř anoxygenních fototrofů, Centrum ALGATECH, Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Třeboň) zabývající se zejména kvalitativní analýzou karotenoidů prokaryot.

Metoda doc. Koblížka (Nupur *et al.*, 2021) využívá HPLC kolonu Phenomenex Kinetex C8 (2,6 μm , 150 \times 4,6 mm) s mobilními fázemi MF A: 25 % roztok $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ve vodě $c = 28 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 75 % MeOH a MF B: 100 % MeOH a doba analýzy činí 28 minut. Průběh gradientu mobilní fáze byl: 0 min 0 % B, 23 min 100 % B, 25 min 100 % B, 27 min 0 % B a 28 min 0 % B (28 min).

V rámci optimalizace metody byl proveden transfer této metody do UHPLC režimu pomocí online softwaru LC Method Transfer Calculator (dostupné na:

<https://appslab.thermofisher.com/lc-method-transfer-calculator>). Do softwaru byly zadány parametry aktuální a plánované kolony, průběh gradientu a průtok. Byl tak získány údaje pro nový gradient v UHPLC režimu s celkově kratší dobou analýzy. Podle těchto údajů byla nastavena metoda, která byla dále otestována nástřikem standardů, přičemž bylo vyzkoušeno více kolon různých výrobců s podobnými parametry, konkrétně se jednalo o Phenomenex Kinetex C8 (1,7 μm, 150×2,1 mm), Agilent Zorbax Eclipse Plus C8 (1,8 μm, 150×2,1 mm) a Waters Acquity BEH C8 (1,7 μm, 150×2,1 mm). Teoretické parametry získané softwarem byly dále optimalizovány pro praktické použití (zejména úpravou počátečního poměru mobilní fáze, průběhu gradientu, úprava reekvilibrační fáze apod.) a byla vybrána kolona s nejspokojivějšími výsledky.

3.2.5 UHPLC-PDA stanovení karotenoidů

Připravené vzorky byly přeneseny k analýze ultra vysokoučinným kapalinovým chromatografem s detektorem diodového pole (UHPLC-PDA) Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Japonsko). Použité podmínky jsou uvedeny níže v tabulce (Tab. 6).

Tab. 6 Podmínky UHPLC-PDA analýzy karotenoidů

Parametr	Údaj/hodnota
Kolona	Acquity UPLC BEH C8 (1,7 μm, 150×2,1mm)
Teplota kolony	40 °C
Mobilní fáze	A: 25 % NH ₄ COOH 28 mmol·l ⁻¹ , 75 % MeOH B: MeOH
Průtok	0,3 ml·min ⁻¹
Eluce	Gradient MF: 0 min 55 % B, 2 min 55 % B, 4 min 61 % B, 6 min 85 % B, 10,5 min 100 % B, 13,5 min 100 % B, 13,6 min 55 % B, 17 min 55 % B
Nástřík	5 μl
Rozsah měření vl. délky	190–800 nm

Kalibrační řada byla sestavena z roztoků autentických standardů neoxanthinu, zeaxanthinu, luteinu, 9-*cis*-antheraxanthinu a β -karotenu o koncentracích $5,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $3,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jednotlivé pracovní roztoky standardů byly připraveny ze zásobních roztoků ředěním do počáteční mobilní fáze (55 % B, 45 % A). Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním pevných analytických standardů v následujících rozpouštědlech o následujících koncentracích: neoxanthin $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v EtOH:aceton 1:1, lutein $0,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v acetonu, zeaxanthin $0,6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v dimethylsulfoxidu (DMSO), 9-*cis*-antheraxanthin $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v EtOH:aceton 1:1, β -karoten $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v acetonu. Zásobní roztoky byly uchovávány v temnu a chladu, pracovní roztoky byly vždy chystány čerstvé před analýzou.

Identifikace jednotlivých analytů ve vzorcích byla zajištěna porovnáním jejich retenčních časů a informací z UV-VIS spektra (absorpčních maxim) (Tab. 7) s autentickými standardy. Zpracování dat proběhlo pomocí softwaru LabSolutions.

Tab. 7 Vlnové délky absorpčních maxim karotenoidů a jejich retenční časy.

Standard	Absorpční maxima (vlnové délky, nm)	Rt (min)
Neoxanthin	412, 436, 464	2,72
Zeaxanthin	(425), 450, 476	4,73
Lutein	421, 444, 472	4,86
9- <i>cis</i> -Antheraxanthin	(418), 440, 467	5,29
β -karoten	423, 450, 476	10,42

3.2.6 UHPLC-MS/MS stanovení faradiolu

Pro analýzu faradiolu bylo postupováno s mírnými změnami podle Sestrienková (2019). Nejprve bylo naváženo asi přesně 20 mg rostlinného materiálu (v případě produktů s měsíčkem: 20 mg vzorku C, 100 mg vzorku K a M, 100 μ l vzorku O a 1000 μ l vzorku V) do mikrozkuavek. Dále bylo přidáno 1000 μ l dichlormethanu a po 15 minutách ultrazvukové lázně a centrifugaci (5 500 g, 5 min, laboratorní teplota) byl supernatant odebrán do kryozkuavek (neplatilo pro vzorky V a O, které byly rovnou přeneseny k odpaření, resp. methanolýze). Následovalo odpaření pomocí centrifugačního koncentrátoru při 60 °C. Poté byla provedena methanolýza přidáním 2 ml 10% roztoku methoxidu sodného MeONa a umístěním do vodní lázně (15 minut, 80 °C). Ze směsi bylo odebráno 250 μ l do čisté mikrozkuavky, bylo přidáno 1250 μ l deionizované vody a 500 μ l 5% roztoku kyseliny octové pro neutralizaci. Z této směsi bylo odebráno 200 μ l, ke kterým bylo přidáno 1,5 ml chloroformu. Po vytřepání byla odebrána spodní chloroformová fáze a extrakce chloroformem proběhla ještě jednou. Spojené chloroformové extrakty byly odpařeny do sucha pomocí centrifugačního koncentrátoru při 45 °C, odparky byly rozpuštěny v 250 μ l MeOH a následovala filtrace pomocí centrifugačního koncentrátoru a mikrozkuavkových nylonových filtrů microspin o porozitě 0,22 μ m. Před analýzou byly vzorky ještě desetkrát naředěny methanolem.

Kalibrační řada byla připravena z roztoků autentického standardu faradiolu v MeOH o koncentracích 5 ng·ml⁻¹, 10 ng·ml⁻¹, 25 ng·ml⁻¹, 50 ng·ml⁻¹, 100 ng·ml⁻¹, 250 ng·ml⁻¹, 500 ng·ml⁻¹, 1000 ng·ml⁻¹ a 5000 ng·ml⁻¹.

Vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS systému Dionex UltiMate™ 3000 TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific, USA) podle podmínek uvedených v Tab. 8. Identifikace analytu ve vzorcích byla zajištěna porovnáním jeho retenčního času a MRM přechodu s autentickým standardem faradiolu (Tab. 8). Zpracování dat proběhlo pomocí softwaru Xcalibur.

Tab. 8 Podmínky UHPLC-MS/MS analýzy obsahu fenolických látek.

Parametr	Údaj/hodnota
Kolona	Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm , 50 \times 2,1mm)
Průtok	0,5 ml \cdot min ⁻¹
Mobilní fáze	A: H ₂ O s 0,1 % HCOOH B: ACN s 0,1 % HCOOH
Eluce	Gradient: 0,0 min 70 % B, 3,9 min 70 % B, 4,0 min 100 % B, 4,6 min 70 % B, 6,0 min 70 % B
Teplota kolony	25 °C
Teplota autosampleru	10 °C
Nástřík	8 μl
Ionizace a mód MS	ESI +
Tlak sprejovacího/ sušícího/ochranného plynu	45 psi / 15 psi / 1 psi
Teplota zdroje/desolvatačního plynu (N ₂)	320 °C / 350 °C
Hodnota délky skenu	1 s
Kapilární napětí	3500 V
Kolizní energie	15 V
MRM přechody	425,4 > 407,5; 217,2
Retenční čas	3,33 min

3.2.7 Stanovení celkových fenolových látek

Kvantitativní analýza celkového obsahu fenolových látek byla provedena Folin-Ciocalteuovou metodou (Singleton a Rossi, 1965). Extrakty byly připraveny navážením asi přesně 10 mg vzorků v triplicátech do mikrozkuvek, přidáním 1 ml methanolu, promícháním na vortexu, desetiminutovou ultrazvukovou lázní a centrifugací (12 400 g, 5 min, laboratorní teplota). Supernatant byl odebrán do čisté mikrozkuvky a bylo s ním dále pracováno.

Kalibrační řada byla připravena z roztoků kyseliny gallové v MeOH o koncentracích 0,02 mg \cdot ml⁻¹, 0,04 mg \cdot ml⁻¹, 0,08 mg \cdot ml⁻¹, 0,012 mg \cdot ml⁻¹, 0,024 mg \cdot ml⁻¹.

Pro samotnou analýzu bylo rovnou do kyvet pipetováno: 2,3 ml deionizované vody, 100 μl extraktu vzorků/kalibračního roztoku/vody pro blank, 150 μl Folin-Ciocalteuova činidla naředěného v poměru 1:2 s deionizovanou vodou a po deseti minutách 450 μl 20% roztoku uhličitanu sodného. Následovalo důkladné promísení všech složek směsi

v kyvetách a dvouhodinová inkubace ve tmě při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance oproti blanku při 765 nm pomocí stolního spektrofotometru.

3.2.8 UHPLC-MS/MS stanovení fenolových látek

Kvantitativní analýza zastoupených fenolových látek byla provedena pomocí UHPLC-MS/MS metody (Čavar Zeljković *et al.*, 2020), která je nastavena na stanovení celkem 52 analytů (převážně fenolových kyselin a flavonoidů). Pro extrakci bylo naváženo asi přesně 10 mg vzorků v triplikátech do mikrozkuvek. Následně byl přidán 1 ml extrakčního činidla, a to 80% methanolu s obsahem 0,1 % *tert*-butylhydroxytoluenu (*t*-BHT) jako antioxidantu. Po promíchání na vortexu byly vzorky umístěny na deset minut do ultrazvukové lázně a následně centrifugovány (12 400 g, 5 min, laboratorní teplota). Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkuvky a proces extrakce byl zopakován.

Z takto získaných extraktů bylo odebráno 400 μ l a odpařeno pomocí centrifugačního koncentrátoru. Odpařené extrakty byly následně rozpuštěny v 50 μ l mobilní fáze o složení 95 % A a 5 % B obsahující interní standardy kyselina *d*₆-*p*-kumarová a kyselina *d*₄-salicylová o koncentraci 15 μ mol·l⁻¹. Po promíchání na vortexu, 10 minutách ultrazvukové lázně a 10 minutách centrifugace (12 400 g, 5 min, laboratorní teplota) byl supernatant přenesen do HPLC vialek s insertem.

Kalibrační řada byla připravena jako směsný roztok standardů fenolických látek v počáteční mobilní fázi (5 % B). Koncentrační rozpětí kalibračních roztoků bylo 0,1 μ mol·l⁻¹, 0,25 μ mol·l⁻¹, 0,5 μ mol·l⁻¹, 1,0 μ mol·l⁻¹, 2,5 μ mol·l⁻¹, 5,0 μ mol·l⁻¹, 10,0 μ mol·l⁻¹, 25,0 μ mol·l⁻¹, 50,0 μ mol·l⁻¹ a 100,0 μ mol·l⁻¹. Interní standardy byly v kalibračních roztocích vždy v koncentraci 5,0 μ mol·l⁻¹.

Analýza byla provedena pomocí UHPLC-MS/MS systému Nexera X2 UHPLC (Shimadzu, Japonsko) podle podmínek uvedených v Tab. 9.

Tab. 9 Podmínky UHPLC-MS/MS analýzy obsahu fenolických látek.

Parametr	Údaj/hodnota
Kolona	Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm , 50 \times 2,1mm)
Průtok	0,4 ml·min ⁻¹
Mobilní fáze	A: HCOOH 15 mmol·l ⁻¹ pH = 3 B: ACN
Eluce	Gradien MF: 0 min 10 % B, 1 min 10 % B, 3 min 13 % B, 7 min 13 % B, 10 min 25 % B, 11,2 min 70 % B, 12 min 70 % B, 12,5 min 10 % B, 16 min 10 % B
Teplota kolony	40 °C
Teplota autosampleru	10 °C
Nástřík	2 μl
Ionizace a mód MS	ESI +/-
Průtok zmlžovacího/ vyhřívací/sušící plynu	3 l·min ⁻¹ / 10 l·min ⁻¹ / 10 l·min ⁻¹
Teplota rozhraní/desolvatace/ DL/heatblocku	300 °C / 526 °C / 250 °C / 400 °C

Identifikace jednotlivých analytů ve vzorcích byla zajištěna porovnáním retenčních časů a MRM přechodů (Tab. 10) analytů s autentickými standardy. Pro kvantifikaci byla využita interní standardizace pomocí izotopicky značené kyseliny d₆-*p*-kumarová a kyseliny d₄-salicylové. Zpracování dat proběhlo pomocí softwaru LabSolutions.

Tab. 10 MRM přechody standardů fenolických látek vyjádřené jako m/z prekurzorového iontu > m/z produkovaného iontu (kolizní energie) a jejich retenční časy.

Standard	MRM přechody (kolizní energie; eV)	Rt (min)
Kyselina gallová	169,00>125,05 (10); 79,05 (23); 97,10 (21)	0,94
Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová	153,1>109,1 (16); 108,05 (25); 91,1 (26)	1,39
2-O-β-D-glukosid kyseliny salicylové	298,70>137,10 (12); 93,10 (38)	1,84
Kyselina chlorogenová	352,70>190,80 (10); 85,15 (43); 93,10 (95)	1,93
Kyselina 4-hydroxybenzoová	137,00>93,00 (15); 65,00 (31); 41,00 (53)	2,15
Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová	153,10>108,80 (10); 108,15 (25); 91,10 (26)	2,31
Kyselina kávová	178,80>134,75 (15); 134,25 (25); 107,15 (23)	2,76
Kyselina vanilová	167,2>152,25 (18); 108,15 (21)	2,79
Kyselina syringová	197,10>182,25 (16); 123,20 (24); 95,10 (31)	3,10
Kyselina <i>p</i> -kumarová	163,00>149,10 (10); 93,00 (31); 147,10 (32)	4,33
Koniferyl aldehyd	177,05>162,25 (18); 134,1 (29); 105,1 (29)	4,53
Kyselina ferulová	193,10>134,25 (25); 178,25 (16)	5,55
Salicylová kyselina	137,10>92,70 (19); 65,00 (29); 75,05 (35)	5,81
Rutin	609,15>300,03 (18); 271,03 (23); 255, 03 (18)	7,31
Kvercetin	301,20>151,25 (21); 179,25 (19); 107,05 (28)	7,85
Luteolin	284,6>133,2 (34); 151,26 (26); 175,25 (27)	11,5
Kyselina <i>d</i> ₆ - <i>p</i> -kumarová (IS)	169,10>124,85 (15); 97,15 (33); 213,30 (25)	4,23
Kyselina <i>d</i> ₄ -salicylová (IS)	141,10>96,80 (16); 69,10 (31); 78,10 (35)	5,9

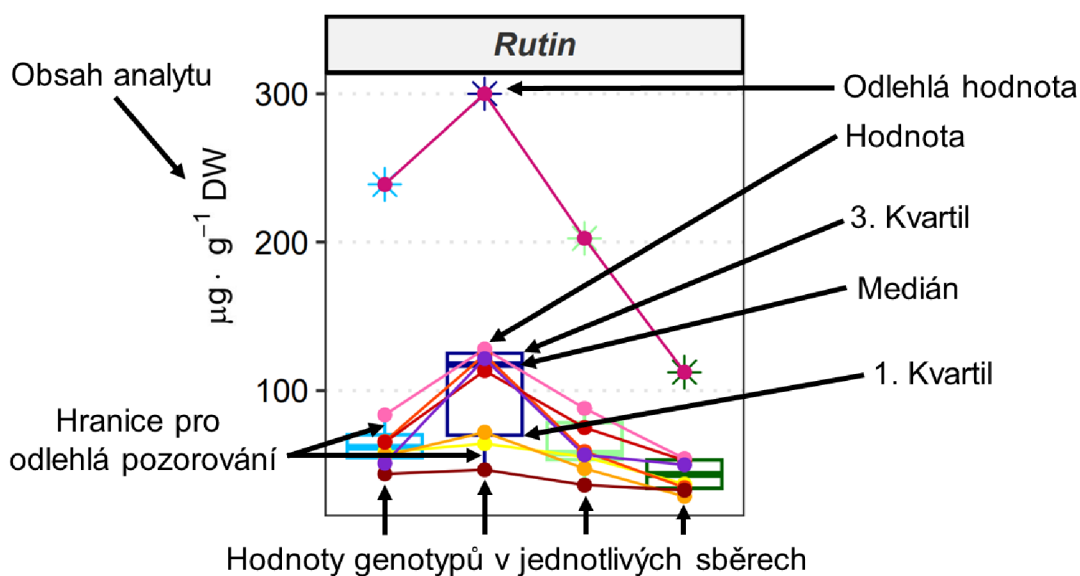
3.3 Zpracování a vyhodnocování dat

Zpracování dat získaných pomocí jednotlivých instrumentů proběhlo vždy pomocí příslušného softwaru. Vyhodnocení chromatogramů a integrace ploch signálů byla provedena v programu LabSolutions (při LC analýze karotenoidů a fenolových látek na LC systému Shimadzu) a Xcalibur (při analýze faradiolu na systému Thermo Fisher Scientific).

Získaná data byla vyhodnocena za využití matematických, statistických a jiných tabulkových funkcí programu Microsoft Excel. Krabicové grafy s propojenými hodnotami byly vytvořeny v prostředí R. Heatmapy byly vytvořeny pomocí programu Microsoft Excel, hodnoty byly nejprve převedeny na jejich dekadický logaritmus, aby

rozdíly více vynikly. Příliš nízké, nekvantifikovatelné hodnoty byly pro logaritmicizaci nahrazeny 2/3 nejnižší hodnoty. Následně byla využita funkce podmíněného formátování.

Krabicové grafy vizualizují získaná data pomocí jejich kvartilů (Obr. 15). Na ose y je zobrazen obsah analytu v příslušné jednotce. Samotná krabice (obdélník) zobrazuje hodnoty genotypů měsíčku v jednom sběru, je shora ohraničena 3. kvartilem, zespodu 1. kvartilem, vodorovná čára mezi nimi je medián. Kolmé linie vyznačují hranici pro odlehlá pozorování: horní hranice = $\min(\max, q3+1.5*IQR)$, dolní hranice = $\max(\min, q1-1.5*IQR)$; kde $q1$ je 1. kvartil, $q3$ je 3. kvartil a IQR je mezikvartilové rozpětí $q3-q1$. Barevné tečky jsou jednotlivé zjištěné hodnoty (propojené v rámci genotypu). Hvězdičky značí odlehlé hodnoty.



Obr. 15 Vysvětlení významu krabicových grafů, příklad uveden na hodnotách obsahu rutinu získaných v této práci.

4 VÝSLEDKY

4.1 Obsah vody

Obsah vody v květenství měsíčků byl určen jako rozdíl čerstvé hmotnosti květenství (FW) a hmotnosti po lyofilizaci (DW). Pohyboval se okolo 82 % s mírnými rozdíly mezi jednotlivými sběry i mezi genotypy (viz Tab. 11).

Tab. 11: Obsah vody v květenství měsíčků

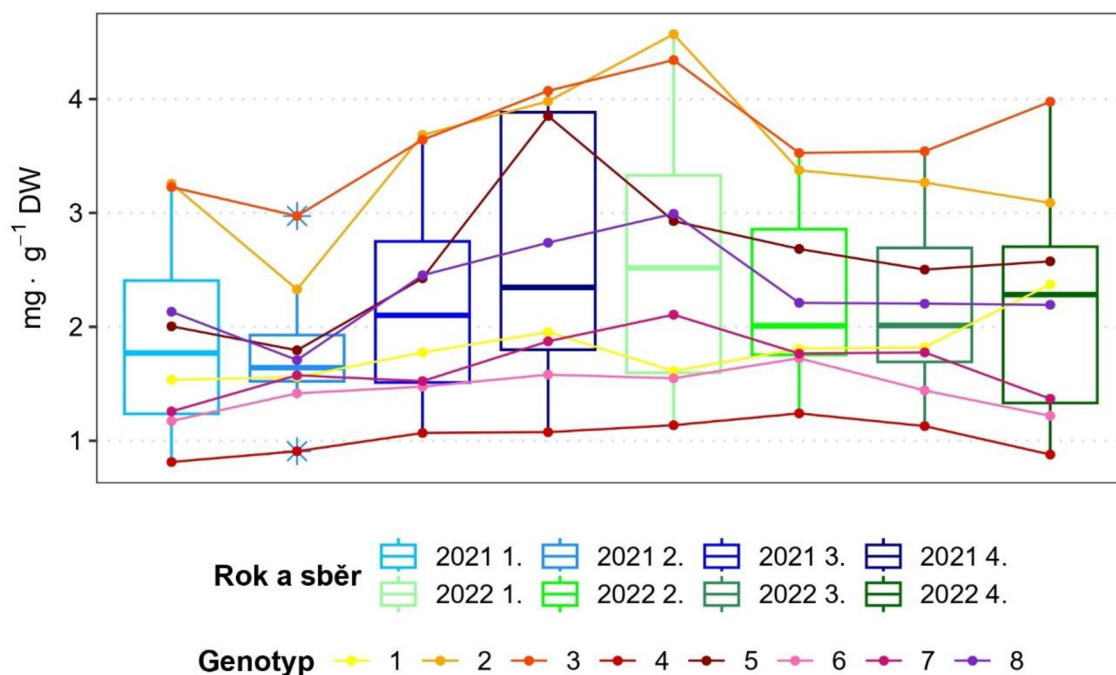
Rok sklizně	Vzorek	Průměrný obsah vody	Porovnání jednotlivých sběrů
2021	1	83,9 %	
	2	82,9 %	
	3	84,3 %	
	4	82,9 %	
	5	81,8 %	
	6	82,7 %	
	7	79,4 %	
	8	81,1 %	
2022	1	82,7 %	
	2	83,9 %	
	3	82,7 %	
	4	83,6 %	
	5	81,3 %	
	6	83,0 %	
	7	82,7 %	
	8	83,6 %	

4.2 Celkový obsah karotenoidů

Kvantifikace celkového obsahu karotenoidů byla provedena pomocí rovnic dle Holma (1954). Stanovení proběhlo u genotypů měsíčku i u produktů s jeho obsahem. Výsledky jsou vyjádřeny v jednotce $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW (případně $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ u některých produktů). Porovnání celkového obsahu karotenoidů v produktech a ve zkoumaných genotypech měsíčku zobrazuje tabulka (Tab. 12). Rozložení hodnot v prvním až čtvrtém sběru měsíčků v letech 2021 a 2022 je uvedeno ve formě krabicových grafů (Obr. 16)

Tab. 12 Tabulka zobrazující porovnání průměrných hodnot celkového obsahu karotenoidů u jednotlivých genotypů měsíčku ve dvou letech sklizně (levé dva sloupce) a v produktech s měsíčkem (pravý sloupec).

	Genotypy sklizeň 2021 a 2022		Produkty	
	(mg·g ⁻¹)		(mg·g ⁻¹ /mg·ml ⁻¹)	
1	1,706	1,903	0,141	C
2	3,312	3,575	-	K
3	3,478	3,847	0,016	M
4	0,966	1,096	0,118	O
5	2,519	2,673	0,001	V
6	1,411	1,483		
7	1,557	1,754		
8	2,258	2,400		

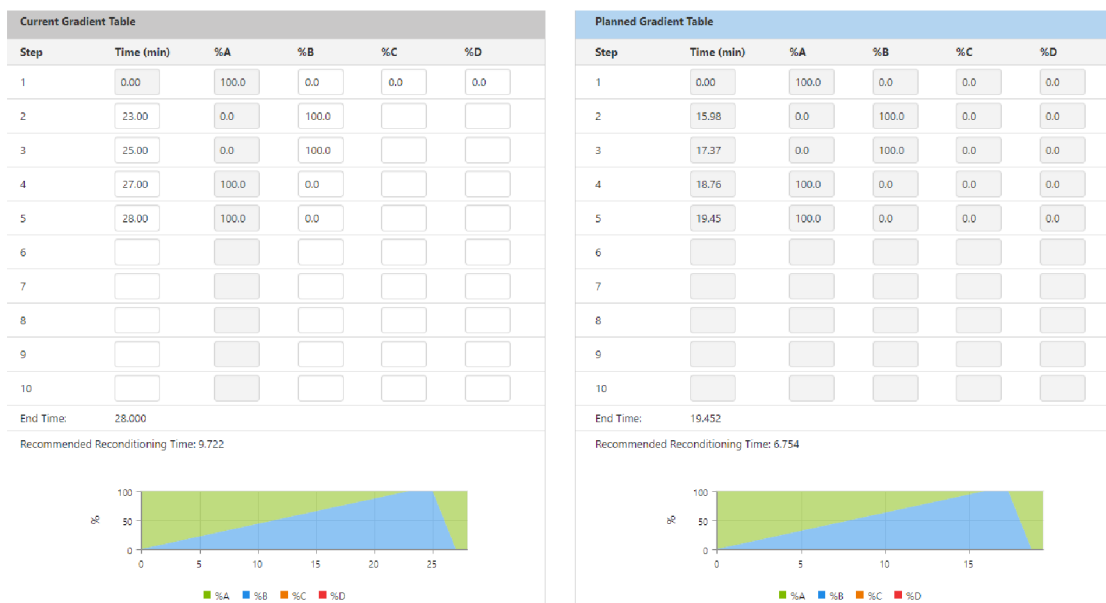


Obr. 16 Krabicové grafy znázorňující rozložení hodnot celkového obsahu fenolových látek analyzovaných genotypů měsíčku, porovnání jednotlivých sklizní.

Celkový obsah karotenoidů se pohyboval mezi hodnotami 0,813–4,569 mg·g⁻¹ DW, průměr všech měření byl 2,246 ± 0,965 mg·g⁻¹ DW a medián 1,979 mg·g⁻¹ DW. Z produktů obsahoval nejvíce karotenoidů vzorek C (čaj sypaný), naopak ve vzorku K (krém na ruce) nebyly použitou metodou detekovány žádné karotenoidy.

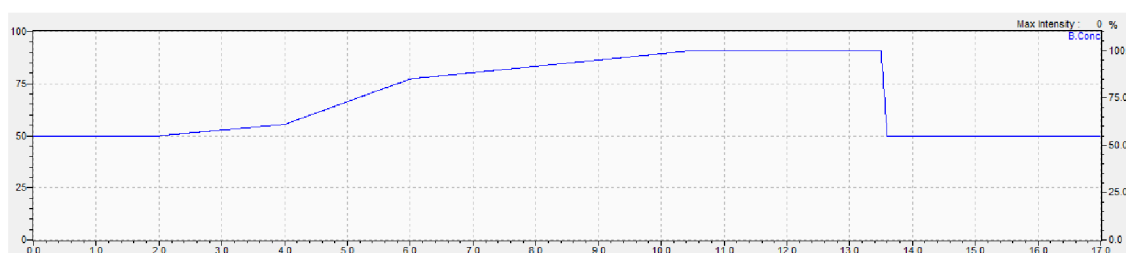
4.3 UHPLC metoda stanovení karotenoidů

Jako výsledek optimalizace UHPLC metody karotenoidů jsou považovány podmínky, při kterých byly získány nejspokojivější výsledky. Těch bylo dosaženo nejprve transferem existující metody doporučené doc. Koblížkem (Nupur *et al.*, 2021) do UHPLC režimu pomocí online softwaru LC Method Transfer Calculator (dostupné na: <https://appslab.thermofisher.com/lc-method-transfer-calculator>) (Obr. 17).



Obr. 17 Transfer HPLC metody do UHPLC režimu pomocí online softwaru LC Method Transfer Calculator.

Po dalších optimalizačních krocích (zejména úprava počátečního poměru mobilní fáze, průběhu gradientu a volba konkrétní kolony) bylo dosaženo následujícího nejlepšího výsledku: kolona Waters Aquity BEH C8 (1,7 μm , 150 \times 2,1 mm), teplota kolony 40 $^{\circ}\text{C}$, mobilní fáze (nezměněné) MF A: 25 % roztok $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ve vodě $c = 28 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 75 % MeOH a MF B: 100 % MeOH, průtok 0,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, doba analýzy 17 min, průběh gradientu MF: 0 min 55 % B, 2 min 55 % B, 4 min 61 % B, 6 min 85 % B, 10,5 min 100 % B, 13,5 min 100 % B, 13,6 min 55 % B, 17 min 55 % B (Obr. 18), nástřik 5 μl , rozsah měření vlnové délky 190–800 nm. Takto připravená metoda byla použita pro analýzu reálných vzorků genotypů měsíčku (kapitola 3.2.5 UHPLC-PDA stanovení karotenoidů).



Obr. 18 Průběh gradientu mobilní fáze nejuspokojivějšího výsledku optimalizace UHPLC metody stanovení karotenoidů.

4.4 Zastoupení karotenoidů

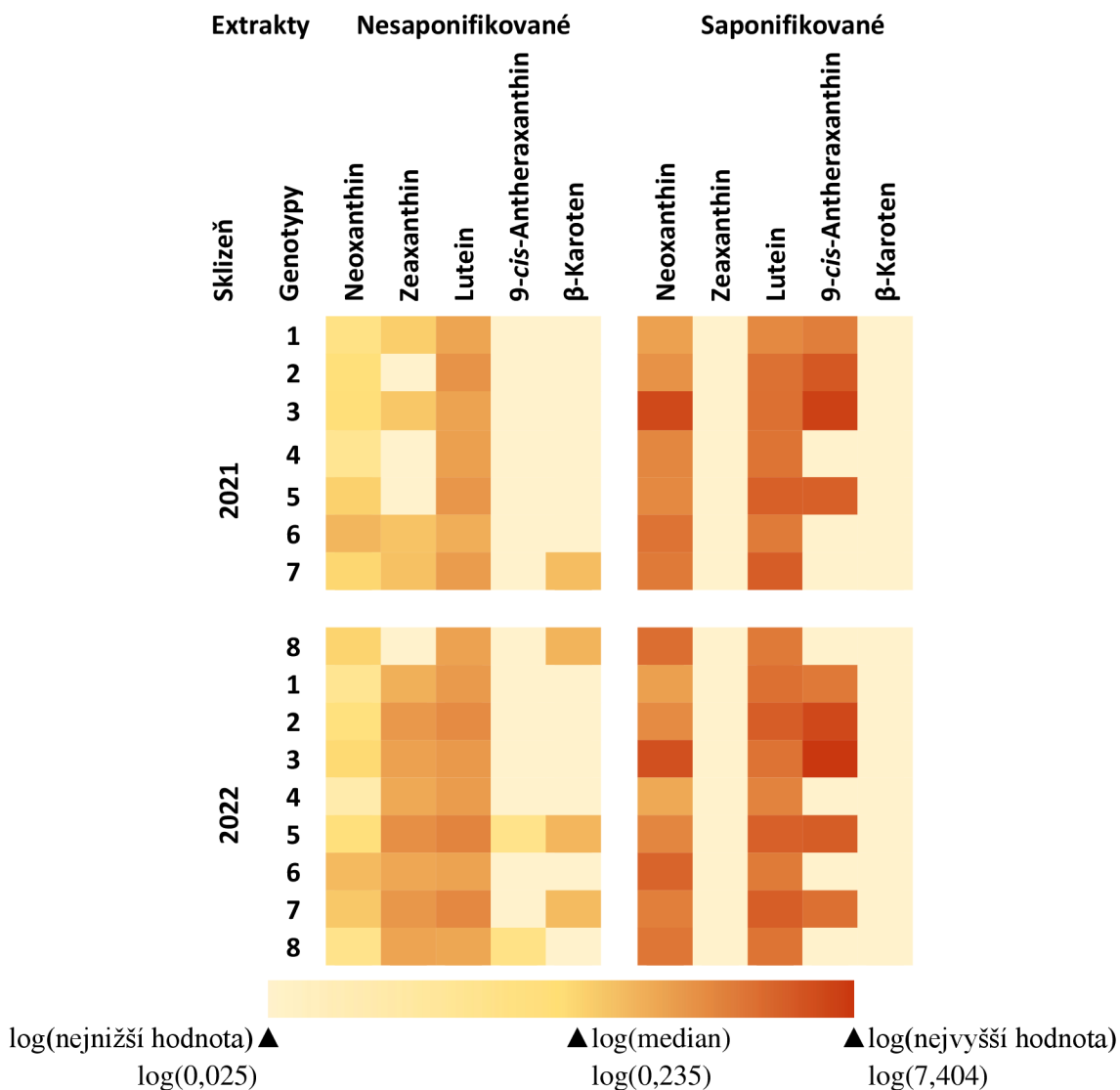
Kalibrační křivky pro kvantifikaci karotenoidů ve vzorcích měsíčku (jak nesaponifikovaných, tak saponifikovaných) byly sestaveny pro pět analytů. Vyjadřují závislost plochy signálu analytu na koncentraci jednotlivých standardů (Tab. 13).

Tab. 13 Rovnice kalibračních křivek standardů karotenoidů a jejich hodnoty spolehlivosti R^2

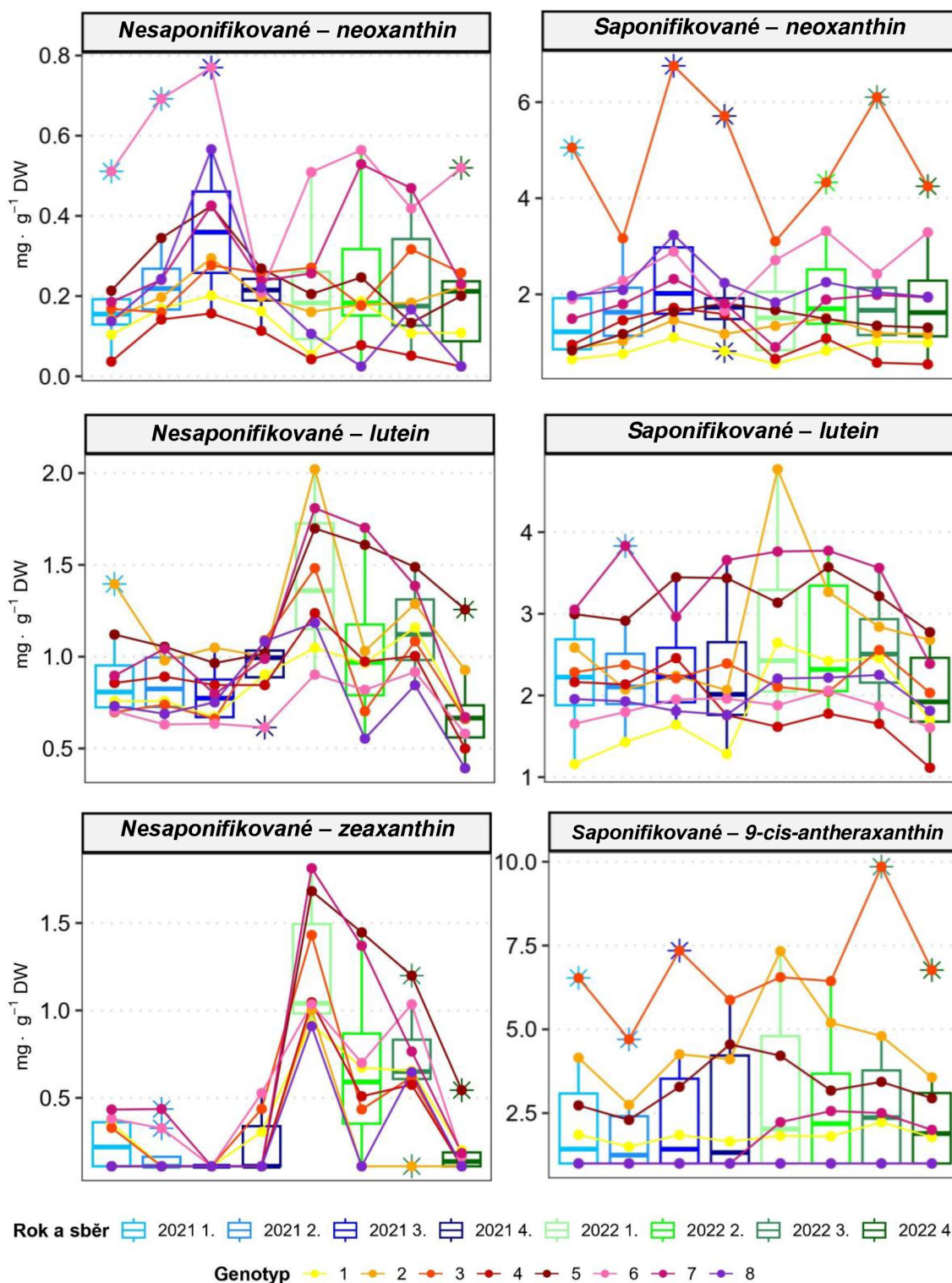
Standard	Rovnice lineární regrese	Hodnota spolehlivosti R^2
Neoxanthin	$y = 1,82 \cdot 10^9 x + 6621,75$	0,9933
Zeaxanthin	$y = 9,31 \cdot 10^8 x + 4225,99$	0,9948
Lutein	$y = 5,50 \cdot 10^9 x - 9106,64$	0,9973
9- <i>cis</i> -Anthraxanthin	$y = 6,73 \cdot 10^8 x + 359,66$	0,9939
β -karoten	$y = 2,37 \cdot 10^9 x - 17613,70$	0,9860

Výsledky z měření jednotlivých vzorků byly vypočteny jako průměr třech technických replikátů a vyjádřeny v jednotce $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. Hodnoty obsahů analytů v 8 genotypech jsou zobrazeny pomocí heatmapy, která navíc porovnává dvě sklizně (2021 a 2022) a dva extrakční přístupy (bez saponifikace a se saponifikací) (Obr. 19).

Krabicové grafy (Obr. 20) zobrazují obsahy v genotypech měsíčku v jednotlivých sběrech materiálu ve sklizních 2021 a 2022. Zobrazeny jsou hodnoty neoxanthinu a luteinu pro oba extrakční přístupy, zeaxanthinu pro nesaponifikované a 9-*cis*-antheraxanthinu pro saponifikované vzorky. Hodnoty ostatních analytů byly naměřeny pouze u malého počtu vzorků a nemá tedy smysl je zobrazovat v podobě krabicových grafů.



Obr. 19 Heatmapa zobrazující porovnání obsahu karotenoidů u jednotlivých genotypů měsíčku; extrakty bez a se saponifikací, jednotka $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, dekadické logaritmy průměrných hodnot ve sklizních 2021 a 2022.



Obr. 20 Krabicové grafy znázorňující rozložení hodnot obsahu karotenoidů v 8 genotypech měsíčku po extrakci bez a se saponifikace, porovnání jednotlivých sběrů ve sklizních 2021 a 2022.

Identifikováno bylo pět látek, ovšem ne ve všech vzorcích bylo možné všechny látky kvantifikovat. Největší průměrný obsah byl stanoven pro lutein, ačkoli některé genotypy vykazovaly vyšší obsahy neoxanthinu a/nebo antheraxanthinu, jak ukazuje heatmapa (Obr. 19). Obsah luteinu se u nesaponifikovaných vzorků pohyboval mezi 0,392–2,020

$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, průměrná hodnota byla $0,975 \pm 0,330 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW a medián $0,922 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. U saponifikovaných to bylo mezi $1,115\text{--}4,770 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, průměrná hodnota byla $2,393 \pm 0,741 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW a medián $2,215 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW.

Dále byl stanoven neoxanthin s průměrnou hodnotou $0,241 \pm 0,164 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW a mediánem $0,201 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW u nesaponifikovaných a $1,984 \pm 1,324 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW a mediánem $1,662 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW u saponifikovaných. Zeaxanthin měl u nesaponifikovaných průměrnou hodnotu $0,392 \pm 0,484 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW a medián $0,192 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, u saponifikovaných nebyl kvantifikován. 9-*cis*-antheraxanthin byl u nesaponifikovaných kvantifikován pouze u několika málo vzorků, u saponifikovaných měl průměrnou hodnotu $2,198 \pm 2,465 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW a medián $1,817 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, ale také nebyl kvantifikován ve všech vzorcích. β -Karoten byl v obou extrakčních přístupech kvantifikován pouze v několika jednotkách vzorcích (viz heatmapa Obr. 19).

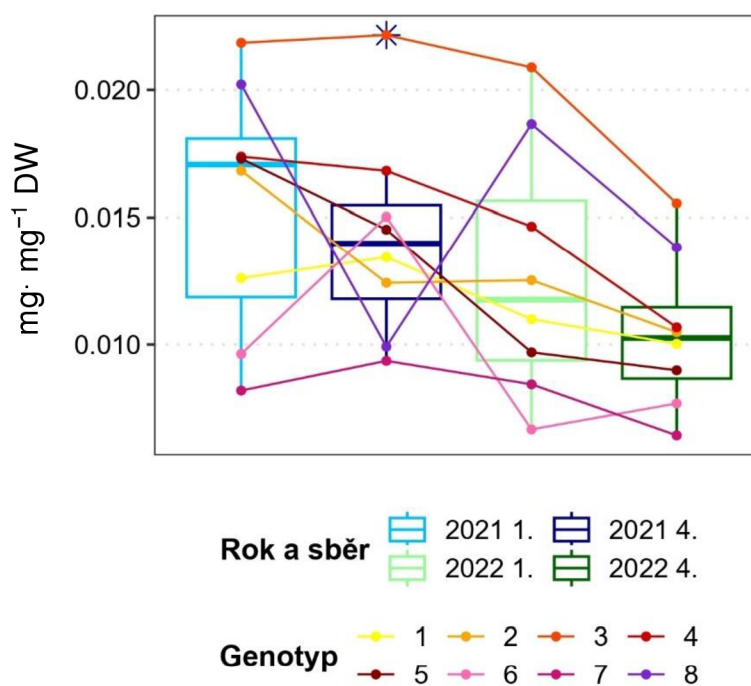
4.5 Obsah faradiolu

Kvantifikace faradiolu byla provedena pomocí jeho autentického standardu. Kalibrační křivka vyjadřuje závislost dekadického logaritmu plochy signálu na dekadickém logaritmu koncentrace standardu analytu: $y = 1,033x + 3,246$, hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9988$.

Analýza faradiolu byla provedena u genotypů měsíčku i u produktů s obsahem měsíčku. Výsledky z měření jednotlivých vzorků byly vypočteny jako průměr třech technických replikátů a vyjádřeny v jednotce $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ DW (případně $\text{mg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ u některých produktů). Obsah faradiolu v produktech a ve studovaných genotypech porovnává tabulka (Tab. 14). Rozložení hodnot v prvním a posledním sběru v letech 2021 a 2022 je uvedeno ve formě krabicových grafů (Obr. 21)

Tab. 14 Porovnání průměrných hodnot obsahu faradiolu u jednotlivých genotypů měsíčku ve dvou letech sklizně (levé dva sloupce) a v produktech s měsíčkem (pravý sloupec).

	Genotypy sklizeň 2021 a 2022		Produkty	
	(mg·g ⁻¹)		(mg·g ⁻¹ /mg·μl ⁻¹)	
1	0,013	0,011	0,016	C
2	0,015	0,012	3,4·10 ⁻⁵	K
3	0,022	0,018	2,8·10 ⁻⁵	M
4	0,017	0,013	1,7·10 ⁻³	O
5	0,016	0,009	7,5·10 ⁻⁶	V
6	0,012	0,007		
7	0,009	0,007		
8	0,015	0,016		



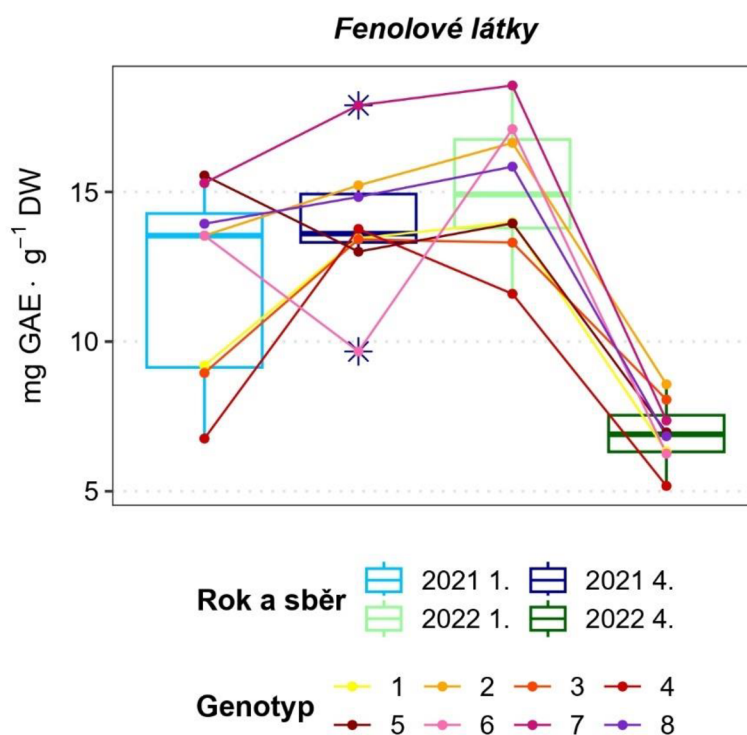
Obr. 21 Krabicové grafy znázorňující rozložení hodnot obsahu faradiolu v analyzovaných genotypch měsíčku, porovnání jednotlivých sběrů ve sklizních 2021 a 2022.

Stanovené hodnoty faradiolu v genotypech měsíčku se pohybovaly mezi 0,006–0,022 mg·mg⁻¹ DW, průměrná hodnota byla 0,013 ± 0,004 mg·mg⁻¹ DW, medián 0,013 mg·mg⁻¹ DW. Z produktů s měsíčkem obsahoval nejvyšší množství faradiolu vzorek C (čaj sypaný), a to 0,016 ± 0,001 mg·mg⁻¹ DW, následoval vzorek O (bylinný olej) s obsahem 1,685·10⁻³ ± 0,228 mg·μl⁻¹ prod. V ostatních produktech byl obsah faradiolu nižší než 1 μg·μl⁻¹ prod.

4.6 Celkový obsah fenolových látek

Kvantifikace celkového obsahu fenolových látek byla provedena podle kalibrační křivky kyseliny gallové v koncentračním rozpětí 0,02–0,24 mg·ml⁻¹. Rovnice lineární regrese byla $y = 3,1572x - 0,0009$, hodnota spolehlivosti $R^2 = 0,9978$.

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z měření třech technických replikátů v jednotce mg GAE·g⁻¹ DW. Zobrazeny jsou pomocí krabicových grafů porovnávajících hladiny v osmi genotypech první a čtvrtý sběr ve sklizních 2021 a 2022 (Obr. 22).



Obr. 22 Krabicové grafy znázorňující rozložení hodnot celkového obsahu fenolových látek v analyzovaných genotypech měsíčku, porovnání jednotlivých sběrů ve sklizních 2021 a 2022.

Celkový obsah fenolických látek se pohyboval mezi hodnotami 5,22–17,48 mg GAE·g⁻¹ DW, průměr všech měření byl 11,49 ± 3,51 mg GAE·g⁻¹ DW a medián 12,78 mg GAE·g⁻¹ DW.

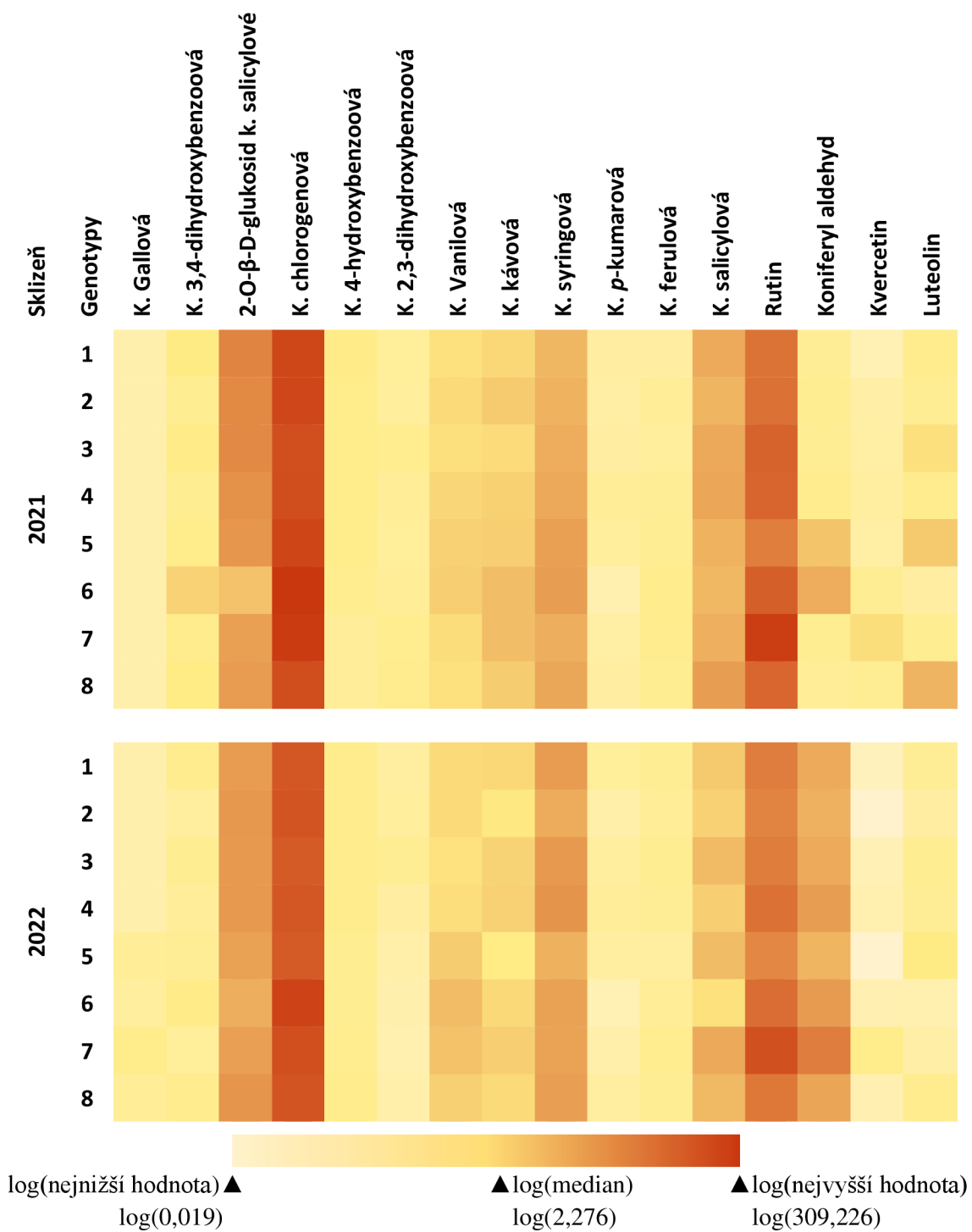
4.7 Profil fenolových látek

Kalibrační křivky pro kvantifikaci fenolových látek byly sestaveny pouze pro analyty detekované v reálných vzorcích genotypů měsíčku. Vyjadřují závislost dekadického logaritmu odezvy signálu (vypočteného jako součin fixní koncentrace interního standardu a poměru plochy signálu standardu analytu o dané koncentraci ku ploše signálu interního standardu) na dekadickém logaritmu koncentrace jednotlivých standardů analytů (Tab. 15). Pro standardy kyselina gallová–kyselina p-kumarová (řazení podle retenčního času) byla pro výpočet použita jako interní standard kyselina d₆-p-kumarová, pro kyselinu salicylovou–naringenin kyselina d₄-salicylová.

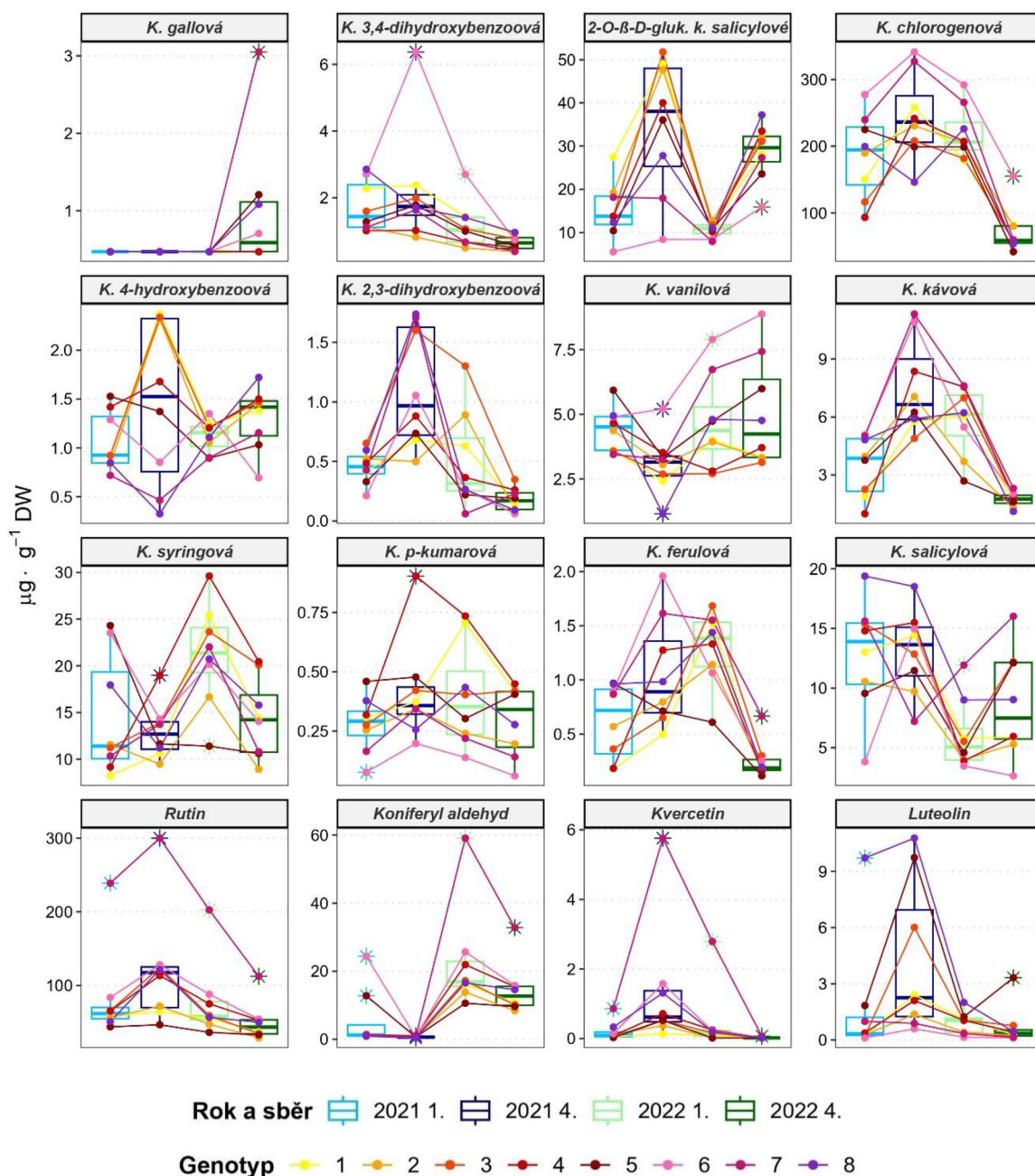
Tab. 15 Rovnice kalibračních křivek standardů fenolových látek a jejich hodnoty spolehlivosti R²

Standard	Rovnice lineární regrese	Hodnota spolehlivosti R ²
K. gallová	$y = 1,172x - 0,576$	0,9905
K. 3,4-dihydroxybenzoová	$y = 1,096x - 0,320$	0,9917
K. 4-hydroxybenzoová	$y = 1,050x - 0,453$	0,9980
2-O-β-D-glukosid k. salicylové	$y = 1,148x - 0,223$	0,9966
K. 2,3-dihydroxybenzoová	$y = 1,096x - 0,518$	0,9965
K. chlorogenová	$y = 1,084x - 0,012$	0,9948
K. vanilová	$y = 1,293x - 1,635$	0,9958
K. kávová	$y = 1,073x + 0,362$	0,9969
K. syringová	$y = 1,235x - 1,368$	0,9984
K. p-kumarová	$y = 1,019x + 0,113$	0,9985
K. ferulová	$y = 1,094x - 0,774$	0,9984
K. salicylová	$y = 1,064x + 0,043$	0,9932
Rutin	$y = 1,199x - 0,852$	0,9915
Koniferyl aldehyd	$y = 1,199x - 0,852$	0,9915
Kvercetin	$y = 0,774x + 0,043$	0,9828
Luteolin	$y = 0,795x - 0,848$	0,9895

Výsledky z měření jednotlivých vzorků jsou vyjádřeny v jednotce $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, hodnoty jsou zobrazeny pomocí heatmapy (Obr. 23), která ukazuje obsah analytů v jednotlivých genotypech. Rozložení naměřených hodnot v prvním a čtvrtém sběru ve sklizních 2021 a 2022 zobrazují krabicové grafy (Obr. 24).



Obr. 23 Heatmapa zobrazující porovnání obsahu jednotlivých fenolových látek u analyzovaných genotypů měsíčku, jednotka $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, dekadické logaritmy průměrných hodnot ve sklizních 2021 a 2022.



Obr. 24 Krabicové grafy znázorňující rozložení hodnot obsahu jednotlivých fenolových látek analyzovaných genotypů měsíčku, porovnání prvního a posledního sběru ve sklizních 2021 a 2022.

Celkem bylo detekováno a kvantifikováno 16 látek, které lze rozdělit do skupin fenolové kyseliny (k. gallová, k. 3,4-dihydroxybenzoová, 2-O-β-D-glukosid k. salicylové, k. chlorogenová, k. 4-hydroxybenzoová, k. 2,3-dihydroxybenzoová, k. vanilová, k. kávová, k. syringová, k. p-kumarová, k. ferulová, k. salicylová), flavonoidy (rutin, kvercetin, luteolin) a fenolové aldehydy (koniferyl aldehyd).

Jako nejzastoupenější fenolová látka byla napříč všemi analyzovanými genotypy měsíčku stanovena kyselina chlorogenová, její obsah se pohyboval mezi 42,018–341,189 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, průměrná hodnota byla $180,824 \pm 81,799 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. Následoval rutin s hodnotami 28,796–300,006 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW a průměrnou hodnotou $83,010 \pm 60,530 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. Desítky mikrogramů na gram suché hmoty byly stanoveny ještě pro 2-O- β -D-glukosid kyseliny salicylové (5,551–51,791 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, průměr $22,272 \pm 13,025 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW), kyselinu syringovou (8,216–29,615 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, průměr $15,778 \pm 5,658 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW), koniferyl aldehyd (0,406–59,117 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, průměr $10,870 \pm 12,398 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) a kyselinu salicylovou (2,646–19,388 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, průměr $10,130 \pm 4,767 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW). Ostatní analyty vykazovaly průměrný obsah v jednotkách či desetínách $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. Některé analyty (kys. gallová, kys. 2,3-dihydroxybenzoová, kvercetin) nebyly v některých vzorcích detekovány vůbec, anebo byl jejich signál příliš nízký pro kvantifikaci.

5 DISKUSE

5.1 Phytochemická analýza 8 genotypů měsíčku

5.1.1 Karotenoidy

Celkový obsah karotenoidů

Pro většinu genotypů platí, že ve druhém roce sklizně byl stanoven obsah karotenoidů o něco vyšší než v prvním. A zatímco v roce 2021 byl nejvyšší obsah stanoven u většiny vzorků pro čtvrtý sběr, v roce 2022 to bylo pro sběr první. Lze tak pravděpodobně pozorovat vliv proměnlivých podmínek mezi jednotlivými sběry a sklizněmi, jakými může být například počasí, doba kvetení apod.

Jak z tabulky (Tab. 12), tak z krabicových grafů (Obr. 16) však vyplývá, že na obsah karotenoidů měl rozhodující vliv spíše genotyp měsíčku, jelikož je patrné, že genotypy s nadprůměrným obsahem v jednom roce sklizně vykazují nadprůměrný obsah i v roce druhém. Vůbec nejvyšší obsah tak vykazovaly genotypy č. 3 (kultivar Pacific Schönheit Tief.), č. 2 (Plamen) a č. 5 (Meteor). Naopak nejnižší obsah byl stanoven pro genotyp č. 4 (Pacific Schönheit Cr.), který měl dokonce nižší obsah než analyzované genotypy *C. arvensis* (vzorky č. 6 a 7).

Pozoruhodné je v tuto chvíli porovnání získaných výsledků s fotografiemi sklizených květenství měsíčku (kapitola 3.1.1.1 *Rostlinný materiál*, Obr. 13). Lze si všimnout, že vysoké hodnoty karotenoidů byly změřeny zejména u genotypů se sytě oranžovými květenstvími, nejnižší hodnoty naopak vykazovaly genotypy světlé a bledé. To se shoduje i s poznatkem z literatury (kapitola 2.2.1.4 *Karotenoidy měsíčku*; Pintea *et al.*, 2003).

Pintea *et al.* (2003) uvádí obsah celkových karotenoidů u čtyř různobarevných kultivarů v rozmezí 48,2–276,0 mg·100 g⁻¹ FW. Uvedení výsledku vztaženého na čerstvou hmotnost poměrně ztěžuje porovnání s výsledky této práce, pokud bychom však předpokládali zjištěný obsah vody 82 % (kapitola 4.1 *Obsah vody*), pak lze přepočtené hodnoty studie Pintea *et al.* (2003) 2,76–15,33 mg·g⁻¹ DW hodnotit jako o něco vyšší. Studie Raal *et al.* (2009) uvádí hodnoty 2,0–35,1 mg·g⁻¹ DW, tedy rovněž o něco vyšší než v této práci. Studie však zahrnuje také některé genotypy, které byly použity pro tuto práci, konkrétně se jedná o Apricot Beauty (odpovídá genotypu č. 1) s hodnotami 4,3 resp. 5,3 mg·g⁻¹ DW (dvě různé lokality růstu) a Pacific Beauty (pravděpodobně odpovídá genotypu č. 3 nebo 4) s hodnotami 7,6 resp. 21,0 mg·g⁻¹ DW. Vyšší hodnoty obsahu lze

pravděpodobně vysvětlit rozdílnými technikami zpracování materiálu a metodami stanovení karotenoidů.

Zastoupení karotenoidů

Vyjádření výsledků samotných UHPLC analýz genotypů měsíčku pomocí heatmap (Obr. 19) prezentuje rozdíly mezi jednotlivými genotypy a sklizněmi 2021 a 2022. Heatmapy jsou vytvořeny z dekadických logaritmů získaných hodnot obsahu a barevně jsou koncipovány tak, ať lze obě heatmapy (nesaponifikovaných i saponifikovaných vzorků) vedle sebe porovnat. Lze dobře vidět, že β -karoten a 9-cis-antheraxanthin u nesaponifikovaných, respektive β -karoten a zeaxanthin u saponifikovaných, byly kvantifikovány pouze u několika (anebo žádných) vzorků v některých sběrech. Příčinou nekvantifikace byl zejména příliš nízký signál analytu, ale také neshodující se absorpční spektrum a špatný, nesouměrný tvar píku, což obojí ukazuje na nedokonalou separaci a případně koeluci s jinou látkou.

Následuje zobrazení výsledků ve formě krabicových grafů (Obr. 20) ilustrujících rozložení hodnot obsahu v jednotlivých sběrech; zobrazeny jsou pouze ty analyty, u kterých dávalo použití krabicových grafů smysl. Pro lutein, karotenoid s nejvyšším průměrným obsahem ve všech vzorcích, podle krabicových grafů platí to, co bylo pozorováno u celkového obsahu karotenoidů, a sice že jeho obsah byl mírně vyšší ve sklizni 2022. To podporuje hypotézu, že je lutein dominantním karotenoidem v květenství měsíčku.

9-cis-antheraxanthin, který ve většině nesaponifikovaných vzorcích nebyl kvantifikován vůbec, vykazoval po saponifikaci obsah znatelně vyšší. Naopak u zeaxanthinu si lze všimnout trendu opačného, tedy že ve většině saponifikovaných vzorcích nebyl kvantifikován vůbec. To může být způsobeno buď nedokonalou separací a koelucí s luteinem, anebo degradací v průběhu časově náročnějšího procesu extrakce. Například biologická funkce právě zeaxanthinu je založena na přeměnách v závislosti na světelném režimu (viz kapitola 2.2.1.3 *Karotenoidy – Biologická aktivita*).

V dostupné literatuře bývají jako karotenoidy zastoupené v měsíčku uvedeny flavoxanthin, luteoxanthin, auroxanthin, lykopen, β -karoten, lutein, α -karoten, α -kryptoxanthin, 9-cis-antheraxanthin a další (kapitola 2.2.1.4 *Karotenoidy měsíčku*; Bakó *et al.*, 2002; Pintea *et al.*, 2003; Kishimoto *et al.*, 2005). V této studii bylo stanoveno látek pouze pět, další látky nebyly kvantifikovány, ačkoli mohly být chromatograficky odděleny, jelikož nebyl dostupný jejich analytický standard. Zařazením dalších analytů

by tak mohlo být docíleno vylepšení metody, případně by dále mohla být vylepšena chromatografická separace či identifikace s využitím např. hmotnostní spektrometrie (viz níže kapitola 5.2 *Zavedení a optimalizace UHPLC analýzy karotenoidů*).

5.1.2 Faradiol

Metoda pro LC-MS stanovení obsahu celkového faradiolu v květenství měsíčku byla s úpravami převzata od Sestrienková (2019). V genotypech měsíčku nebyl obsah faradiolu stanovován u všech čtyř sběrů v obou sklizních, jako v případě karotenoidů, nýbrž vždy pouze u prvního a posledního sběru.

Z tabulky výsledků i krabicových grafů (Tab. 14, Obr. 21) lze vyzorovat nižší obsah faradiolu ve sklizni 2022 než ve sklizni 2021, pouze s výjimkou genotypu č. 8. Také lze vidět, že v obou sklizních jsou u většiny vzorků hodnoty nižší v pozdější fázi sezóny než v prvním sběru.

Podobně jako u karotenoidů, obsah faradiolu v květenství závisí zejména na genotypu měsíčku. Nelze však mluvit o korelaci obsahu karotenoidů a faradiolu. Nejvyšší obsah byl stanoven v genotypu č. 3 (kultivar Pacific Schönheit Tief) č. 8 (Yellow Gitana) a č. 4 (Pacific Schönheit Cr.). Naopak nejnižší obsah byl u genotypů *C. arvensis*, tedy vzorků č. 7 a č. 6.

Je tedy zřejmé, že na rozdíl od celkového obsahu karotenoidů se u faradiolu nelze řídit vizuálním vzhledem květenství (Obr. 13), neboť poměrně vysoké hladiny byly stanoveny jak u pestře zbarveného genotypu č. 3, tak bledého genotypu č. 4. Zároveň je pozoruhodné zjištění, že šlechtěné odrůdy *C. officinalis* jsou lepším zdrojem faradiolu, než genotypy *C. arvensis*.

Pro srovnání s literaturou lze uvést studii Zitterl-Eglseer *et al.* (2001), která uvádí obsah tří esterů faradiolu, jejichž součet odpovídá hodnotě asi 3 % pro jazykové květy *C. officinalis*, volně sušené při 40 °C a ne lyofilizované. Sestrienková (2019) uvádí v bakalářské práci hodnoty v rozmezí 0,88–3,2 % DW. Sice byla použita stejná metoda jako v této práci, opět se ale jedná o volně sušené jazykové květy. Hodnoty získané v této diplomové práci (vyjádřeno v procentech 0,6–2,2 % DW) jsou sice o něco nižší, ale je třeba brát v potaz, že byly získány pro celá květenství včetně trubkovitých květů i zákrovních listenů, ne pouze pro květy jazykové.

Zlepšení analýzy faradiolu by mohlo spočívat např. v použití interní standardizace, která by pokryla případnou ztrátu analytu v průběhu poměrně náročné extrakce a metanolýzy faradiolu. Jak však uvádí Sestrienková (2019), izotopicky značený faradiol

není komerčně dostupný a fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobný betulin není pro reálné vzorky měsíčku vhodné použít, jelikož byl v jeho retenčním čase pozorován rušivý signál. Další obohacení by mohlo spočívat v analýze esterů faradilou, což by však vyžadovalo zcela jiný přístup.

5.1.3 Fenolové látky

Podobně jako faradiol, ani fenolové látky nebyly stanovovány u všech sběrů v obou sklizních, ale jen u prvního a posledního sběru.

Folin-Ciocalteuovo stanovení celkových fenolů ukázalo znatelný pokles hladiny fenolových látek ve všech vzorcích u čtvrtého sběru sklizně 2022 (Obr. 22), kdy byly stanoveny oproti ostatním sběrům téměř poloviční hodnoty. Pro tento pokles obsahu nebyl zjištěn eventuální důvod a je pozorován i u jednotlivých fenolových látek při stanovení jejich profilu (viz níže). Tato skutečnost tak značně ovlivnila rozdíly mezi jednotlivými sklizněmi 2021 a 2022.

Nejvyšší obsah fenolů byl u genotyp č. 7 (*C. arvensis*), č. 2 (Plamen), č. 8 (Yellow Gitana) a č. 5 (Meteor). Zajímavostí je nižší obsah u druhého genotypu *C. arvensis* (č. 6), jelikož u předchozích parametrů (obsah karotenoidů a faradiolu) měly oba genotypy *C. arvensis* poměrně vyrovnané hodnoty. Nejnižší obsah pak byl stanoven pro genotyp č. 4 (Pacific Schönheit Cr.), podobně jako u obsahu karotenoidů.

Studie Ercetin *et al.* (2012) rovněž ukazuje na vyšší obsah fenolových látek u *C. arvensis* než u *C. officinalis*. Abudunia *et al.* (2017) uvádí v methanolickém extraktu *C. arvensis* hodnotu $50,26 \pm 0,18$ mg GAE·g⁻¹ DW, což je o něco vyšší obsah, než byl naměřen v této práci.

Výsledky UHPLC-MS/MS analýz profilu fenolových látek vyjádřené pomocí heatmapy (kapitola 4.7 *Profil fenolových látek*, Obr. 23) prezentují rozdíly mezi jednotlivými genotypy a sklizněmi 2021 a 2022. Heatmapa je vytvořena z dekadických logaritmů získaných hodnot obsahu jednotlivých analytů. Lze dobře vidět, že kyselina gallová a kvercetin nebyly kvantifikovány u všech vzorků, příčinou byl zejména příliš nízký signál analytu.

Následuje zobrazení výsledků ve formě krabicových grafů (Obr. 24) ukazujících rozdíly mezi prvním a čtvrtým sběrem ve sklizních 2021 a 2022. Krabicový graf nejzastoupenější látky, kyseliny chlorogenové, nápadně připomíná graf získaný u Folin-Ciocalteuova stanovení. To podporuje myšlenku, že kyselina chlorogenová je majoritní fenolová látka v květenství měsíčku, podobně jako je tomu u luteinu a celkového obsahu

karotenoidů. U některých dalších analytů (rutin, k. kávová, luteolin, k. 2,3-dihydroxybenzoová, kvercetin) lze tento trend, kdy nejvyšší obsah byl naměřen u čtvrtého sběru 2021 a nejnižší u čtvrtého 2022, pozorovat také.

V literatuře jsou jako zastoupené fenolové látky v měsíčku uvedeny např. kvercetin, glykosidy kyseliny prokatecholové, kyselina chlorogenová, syringová, hydroxyskořicová, hesperidin, rutin, isokvercitrin a další (viz kapitola 2.2.3 *Fenolové sloučeniny*). Ak *et al.* (2020) jako nejzastoupenější rovněž kyselinu chlorogenovou, jako bylo zjištěno v této práci. Porovnat lze hodnoty ze studie Pires *et al.* (2018), která uvádí obsah kyseliny chlorogenové (5-O-kafeoylchinová) v sušených květech měsíčku $120 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, rutin (Kvercetin-3-O-rutinosidu) $300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW a kyseliny kávové $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. V této práci byly pro stejné látky získány hodnoty 42,018–341,189 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW, 28,796–300,006 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW a 0,990–11,329 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW. Další shodné látky stanoveny nebyly. Jak lze na hodnotách vidět a jak již bylo napsáno, obsah fenolových závisel na genotypu měsíčku, a tím lze pravděpodobně vysvětlit i mírnou diferenciaci od obsahu ve studii Pires *et al.* (2018).

5.2 Zavedení a optimalizace UHPLC analýzy karotenoidů

Práce se standardy karotenoidů

Jak již bylo podrobně rozebráno v kapitole 2.2.1 *Karotenoidy*, karotenoidy jsou vysoce lipofilními pigmenty. Podle serveru DrugBank.com (2023) je hodnota logP (dekadický logaritmus rozdělovacího poměru) například luteinu rovna 7,9 a β -karotenu dokonce 17,6. Tyto vysoké hodnoty značí obtížnou rozpustnost ve vodě, a naopak lepší rozpustnost v organických rozpouštědlech, jako například *n*-oktan, chloroform, hexan a další.

To představovalo překážku v případě analýzy těchto pigmentů pomocí RP-HPLC, kde má mobilní fáze polární charakter. Při samotné analýze se s tím vypořádávalo poměrně velké množství organické složky v mobilní fázi (MF A: 25% roztok $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ve vodě $c = 28 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, 75% MeOH a MF B: 100% MeOH viz kapitola 3.2.4 *Zavedení a optimalizace UHPLC-PDA analýzy karotenoidů*).

Další problém ale vězel v rozpuštění standardů karotenoidů a přípravě kalibračních roztoků. Autentické standardy karotenoidů byly zakoupeny v množství 1–1000 mg od firmy Sigma Aldrich (USA) jako pevné, analytické standardy. Nejprve bylo testováno rozpouštědlo EtOH:aceton 1:1 pro všechny použité karotenoidy. Pouze některé však byly rozpuštěny dokonale (neoxanthin, 9-*cis*-antheraxanthin), jiné se rozpustit nepodařilo (β -

karoten) a některé sice rozpuštěny byly, ale po čase z roztoku vypadly (lutein, zeaxanthin). S těmi problematickými tedy byly prováděny další pokusy s jinými rozpouštědly, přičemž bylo pracováno tak, aby byla rozpouštědla použitelná pro následnou RP-HPLC a mísitelná se složkami mobilní fáze.

Nakonec byly zásobní roztoky standardů připraveny o tomto složení a koncentraci: neoxanthin $c = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v EtOH:aceton 1:1, zeaxanthin $c = 0,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v DMSO, lutein $c = 0,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v acetonu, 9-*cis*-antheraxanthin $c = 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v EtOH:aceton 1:1, β -karoten $c = 0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v acetonu.

Rozdílná koncentrace a rozpouštědla zásobních roztoků standardů znamenaly obtížnější ředění roztoků na jednotlivé kalibrační roztoky. Kalibrační roztoky nebyly připravovány jako směsné roztoky všech standardů, nýbrž pro každou látku zvlášť. Vedle toho samozřejmě muselo být počítáno s degradací karotenoidů vlivem působení světla, tepla, kyslíku apod., a proto byly zásobní roztoky standardů uchovávány v temných vialkách při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ a kalibrační roztoky byly míchány vždy čerstvé.

Optimalizovaná UHPLC metoda stanovení karotenoidů

Požadavky na metodu vhodnou pro analýzu karotenoidů v květenství měsíčku byly následující: provedení analýzy pokud možno v UHPLC režimu, dostatečná separační schopnost kolony při současném zachování poměrně krátké doby analýzy a složení mobilní fáze kompatibilní s případnou LC-MS analýzou.

Získanou optimalizovanou metodou (kapitola 4.3 *UHPLC metoda stanovení karotenoidů*) bylo dosaženo výhod UHPLC analýz oproti analýzám HPLC, jakými jsou např. kratší doby analýz (17 vs. 28 minut), nižší spotřeba rozpouštědel daná zejména nižším průtokem ($0,3$ vs. $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), lepší kompatibilita s LC-MS systémem a další.

Co se týká samotného použití finální metody pro analýzu karotenoidů v měsíčku, chromatogramy obsahovaly poměrně komplexní směs látek. To lze pozorovat i v jiných studiích nevyužívajících kolony s C30 stacionárními fázemi (např. Pintea *et al.*, 2003). Identifikováno (a kvantifikováno) bylo 5 analytů, pro které byly dostupné autentické standardy.

Lepší chromatografické separace by bylo možné docílit použitím účinnější stacionární fáze, jakými disponují např. C30 kolony (kapitola 2.2.1.5 *Analýza karotenoidů – LC separace karotenoidů*) a pomocí kterých lze např. kritický pár zeaxantin a lutein jedinečně dokonale oddělit (Pavelková *et al.*, 2020). S těmito kolonami je však složitější dosáhnout separace v UHPLC režimu a krátkých dob analýz, což byly jedny z požadavků. Zlepšení

v identifikaci mnoha neznámých látek by pak do jisté míry mohlo přinést použití hmotnostní spektrometrie, zpřesnění kvantifikace zase použití interní standardizace.

Porovnání přístupů extrakce bez a se saponifikací

Při analyzování zastoupení karotenoidů bylo využito dvou přístupů, a sice bez saponifikace a se saponifikací, přičemž nebylo cílem analyzovat zastoupení jednotlivých esterů karotenoidů jako v případě studie Abdel-Aal & Rabalski (2015), nýbrž pokusit se proces saponifikace obejít v zájmu zjednodušení extrakčního postupu, výsledky obou přístupů pak porovnat a zjistit efektivitu saponifikace, podobně jako studie Pavelková *et al.* (2020).

Jak bylo očekáváno (kapitola 2.2.1.5 *Analýza karotenoidů – Extrakce a alkalická hydrolyza karotenoidů*), po saponifikaci byl izolován menší počet látek a signály kvantifikovaných analytů byly intenzivnější – bylo dosaženo zbavení se esterů a zůstaly pouze volné karotenoidy. U vzorků bez saponifikace byly navíc jasně identifikovatelné signály chlorofylu *a* a *b* (retenční časy 7,6 a 8,6 min), u kterých lze předpokládat, že se rozpadají při poměrně drastických podmínkách alkalické hydrolyzy.

U nejzastoupenějšího analytu, luteinu, byl nárůst obsahu po saponifikaci v průměru o 147 %, u neoxanthinu to bylo dokonce o 823 %. Nárůst obsahu lze krásně pozorovat v heatmapách (kapitola 4.4 *Zastoupení karotenoidů*, Obr. 19). Tento přístup byl tedy zhodnocen jako kvalitnější. Bohužel je ale také zdlouhavější, vlivem čehož může docházet k degradaci karotenoidů, což by mohlo být ošetřeno technikami interní standardizace.

Studie Pavelková *et al.* (2020) tvrdí, že krok alkalické hydrolyzy je v případě analýzy karotenoidů *C. officinalis* nezbytný, obsah luteinu v případě této studie po hydrolyze vzrostl více než třikrát.

5.3 Produkty s obsahem měsíčku

Obecně lze u analyzovaných produktů s obsahem měsíčku pozorovat nižší hladiny obsahů než u analyzovaných genotypů měsíčku, ať už celkových karotenoidů anebo faradiolu. Je však potřeba si uvědomit, na co je daná jednotka u obsahu vztažena.

V případě rostlinného materiálu je to zpravidla na gram suché hmoty (DW). Je tak v podstatě dosaženo normalizovaného obsahu vody, který se ideálně u správně lyofilizovaného materiálu blíží nule. Výsledky tak nejsou zatíženy případnými rozdíly v obsahu vody a lze je lépe porovnávat, ale zároveň jsou koncentrace stanovovaných analytů o to vyšší, protože suchá hmota je samozřejmě menší než čerstvá.

V případě produktů je to na gram anebo mililitr produktu. To je samozřejmě zavádějící a vzájemně neporovnatelný údaj, jelikož každý produkt je jiný, na druhou stranu je to popis produktu přesně takového, jak si jej lze pořídit. Zároveň je nutno brát v potaz, že samotný produkt již je extraktem anebo extrakt měsíčku obsahuje (s výjimkou Čaje sypaného), a tím pádem takovýmto vztažením obsahu analytu na hmotu (objem) produktu dojde ke snížení jeho koncentrace, než by tomu bylo v případě vztažení na původní hmotu extrahovaného materiálu. Ta však pochopitelně není známa, a tak ani přepočítání na ni nelze provést.

Celkový obsah karotenoidů v Čaji sypaném je asi o řád nižší než hodnoty stanovené pro genotypy, ačkoli se jedná o podobnou matici. Lze předpokládat, že došlo k degradaci karotenoidů během sušení květenství anebo skladování čaje. V Bylinném oleji byl obsah karotenoidů až o dva řády vyšší, než v dalším produktu s kapalnou maticí – Pleťové vodě; to může být pravděpodobně dáno lipofilními vlastnostmi karotenoidů, pro které je olej lepším rozpouštědlem, než základ Pleťové vody na bázi ethanolu a vody. Překvapením může být Mast, ve které bylo přes své výrazné zbarvení stanovena poměrně nízká hodnota obsahu karotenoidů, velký vliv však zde mohou hrát výše zmíněné důvody. U vzorku Krém na ruce nebyly použitou metodou karotenoidy detekovány, odpovídá tomu i bílé zbarvení produktu.

Obsah faradiolu v Čaji sypaném je srovnatelný se zkoumanými genotypy měsíčku, na rozdíl od obsahu karotenoidů. Druhý nejvyšší obsah byl zjištěn opět v Bylinném oleji. V dalším kapalném produktu, Pleťové vodě, byl obsah faradiolu více než o tři řády nižší. Překvapením opět byla Mast, která obsahovala poměrně malé množství faradiolu, řádově stejně jako Krém na ruce; opět zde mohou hrát roli výše zmíněné důvody.

Analýza produktů, jsoucí jinou maticí než rostlinný materiál, představovala výzvu zejména v extrakci daných látek z oněch matic. Smyslem bylo zejména otestovat, zda jsou použité metody vhodné i pro netypický, jiný než rostlinný materiál, a naučit se s takovým materiálem pracovat. Zjištěné hodnoty nebyly porovnány s údaji výrobce, neboť tyto nebyly dostupné. Je zde tedy otevřená cesta pro případné další experimenty.

6 ZÁVĚR

První cíl diplomové práce vedl ke zpracování literárního přehledu na témata: měsíček, jeho taxonomie, botanická charakteristika, využití a přírodní látky zahrnující karotenoidy, pentacyklické triterpenoidy a fenolové sloučeniny.

Druhý cíl byl naplněn provedením fytochemické analýzy karotenoidů, faradiolu a fenolových látek v květenství osmi vybraných genotypů měsíčku, která byla sbírána ve dvou sklizních (2021 a 2022) v průběhu sezóny.

Celkový obsah karotenoidů odpovídal zbarvení jejich květů, nejvyšší byl u sytě oranžových genotypů Pacific Schönheit Tief., Plamen a Meteor, nejnižší u Pacific Schönheit Cr. Nejčastěji nejzastoupenějším karotenoidem byl lutein.

UHPLC-MS/MS analýza faradiolu ukázala pokles obsahu v pozdějších fázích sezóny. Největší obsah byl u genotypů Pacific Schönheit Tief., Yellow Gitana, a Pacific Schönheit Cr. Nejnižší u *C. arvensis*. Jelikož je obsah faradiolu úměrný protizánětlivé aktivitě, může tento parametr sloužit k hodnocení pozitivního účinku měsíčku na lidské zdraví.

Další biologickou aktivitu vykazují fenolové látky, u kterých UHPLC-MS/MS analýza ukázala jako nejzastoupenější kyselinu chlorgenovou, dále rutin, 2-O- β -D-glukosid kyseliny salicylové a další. Jejich celkový obsah byl nejvyšší u genotypů *C. arvensis* (č. 7), Plamen, Yellow Gitana a Meteor, nejnižší u Pacific Schönheit Cr.

Třetí cíl byla optimalizace metody stanovení karotenoidů pro analýzu rostlinného materiálu. Nejspokojivějších výsledků bylo dosaženo s kolonou Aquity BEH C8 (1,7 μ m, 150 \times 2,1 mm), mobilními fázemi MF A: 25 % CH₃COONH₄ c = 28 mmol·l⁻¹, 75 % MeOH a MF B: 100 % MeOH, doba analýzy činila 17 minut. Také byly porovnávány přístupy extrakce bez a se saponifikací, přičemž po saponifikaci byl izolován menší počet látek a získány intenzivnější signály analytů. Tento přístup byl tedy zhodnocen jako kvalitnější, ačkoli zdlouhavější.

Poslední cíl byl analyzovat přírodní látky také ve vybraných produktech s měsíčkem. Smyslem bylo vyzkoušet, zda jsou metody vhodné i pro netypický, jiný než rostlinný materiál. U produktů čaj sypaný, krém na ruce, mast, bylinný olej a plet'ovou vodu byl úspěšně stanoven celkový obsah karotenoidů a obsah faradiolu.

Účelem práce bylo zavést metody pro hodnocení kvality produkce měsíčku a použít je na reálných vzorcích, což bylo společně s cíli této práce naplněno. Téma by dále mohlo být rozšířeno o další genotypy měsíčku, anebo o další stanovované analyty.

7 LITERATURA

- Abdel-Aal, E. -S. M., & Rabalski, I. (2015). Composition of Lutein Ester Regioisomers in Marigold Flower, Dietary Supplement, and Herbal Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(44), 9740-9746. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04430>
- Abudunia, A. -M., Marmouzi, I., Faouzi, M. E. A., Ramli, Y., Taoufik, J., El Madani, N., Essassi, E. M., Salama, A., Khedid, K., Ansar, M., & Ibrahim, A. (2017). Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(1), 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.11.002>
- Ak, G., Zengin, G., Sinan, K. I., Mahomoodally, M. F., Picot-Allain, M. C. N., Cakir, O., Bensari, S., Yilmaz, M. A., Gallo, M., & Montesano, D. (2020). A Comparative Bio-Evaluation and Chemical Profiles of *Calendula officinalis* L. Extracts Prepared via Different Extraction Techniques. *Applied Sciences*, 10(17). <https://doi.org/10.3390/app10175920>
- Arora, D., Rani, A., & Sharma, A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14). <https://doi.org/10.4103/0973-7847.120520>
- Ayaz, F. A., Hayirlioglu-Ayaz, S., Gruz, J., Novak, O., & Strnad, M. (2005). Separation, Characterization, and Quantitation of Phenolic Acids in a Little-Known Blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Fruit by HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8116-8122. <https://doi.org/10.1021/jf058057y>
- Bakó, E., Deli, J., & Tóth, G. (2002). HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53(1-3), 241-250. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00112-4)
- Bekdeşer, B. (2019). Modeling and optimizing microwave-assisted extraction of antioxidant compounds from marigold (*Calendula officinalis* L.) using response surface methodology. *TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY*, 43(5), 1457-1471. <https://doi.org/10.3906/kim-1905-48>
- Bhave, A., Schulzová, V., Mmka, L., & Hajšlová, J. (2020). Influence of Harvest Date and Postharvest Treatment on Carotenoid and Flavonoid Composition in French Marigold Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(30), 7880-7889. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02042>
- Bilia, A. R., Salvini, D., Mazzi, G., & Vincieri, F. F. (2000). Characterization of *calendula* flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Chromatographia*, 53(3-4), 210-215. <https://doi.org/10.1007/BF02491573>
- BioLib.cz – Profil taxonu rod měsíček *Calendula* L. <https://www.BioLib.cz/cz/taxon/id41324/> (7.4.2022).
- Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J., & Decker, E. A. (2010). Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(6), 515-532. <https://doi.org/10.1080/10408390802565889>
- Bragueto Escher, Cardoso Borges, Sousa Santos, Mendanha Cruz, Boscacci Marques, Vieira do Carmo, Azevedo, M. Furtado, Sant'Ana, Wen, Zhang, & Granato. (2019). From the Field to the Pot: Phytochemical and Functional Analyses of *Calendula officinalis* L. Flower for Incorporation in an Organic Yogurt. *Antioxidants*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/antiox8110559>
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.15.8529834>
- CATRIN: Vědci v Olomouci testovali speciální zařízení pro analýzu vlastností rostlin v polních podmínkách. <https://www.catrin.com/cs/aktuality/vedci-v-olomouci-testovali-specialni-zarizeni-pro-analyzu-vlastnosti-rostlin-v-polnich-podminkach/> (14.4.2023).
- Čavar Zeljković, S., Komzáková, K., Šišková, J., Karalija, E., Smékalová, K., & Tarkowski, P. (2020). Phytochemical variability of selected basil genotypes. *Industrial Crops and Products*, 157(112910), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112910>
- Cazzonelli, C. I., & Pogson, B. J. (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 15(5), 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>

- Costa, C., Schurr, U., Loreto, F., Menesatti, P., & Carpentier, S. (2019). Plant Phenotyping Research Trends, a Science Mapping Approach. *Frontiers in Plant Science*, 9(1933), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01933>
- Český lékopis 2017: Doplněk 2022. 6. vydání (2022). GRADA Publishing. Praha. Česká republika.
- De Diego, N., Spíchal, L., & Janni, M. (2022). Presence and future of plant phenotyping approaches in biostimulant research and development. *Journal of Experimental Botany*, 73(15), 5199-5212. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac275>
- Demmig-Adams, B., & Adams, W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1(1), 21-26. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80019-7)
- de Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5062-5072. <https://doi.org/10.1021/jf0705421>
- Diretto, G., Tavazza, R., Welsch, R., Pizzichini, D., Mourgues, F., Papacchioli, V., Beyer, P., & Giuliano, G. (2006). Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-13>
- Herbalista.cz – Domáci měsíčková mast – recept, použití. <https://www.herbalista.cz/recepty/domaci-mesickova-mast-recept-pouziti/> (23.1.2023)
- DrugBank.com <https://go.drugbank.com/drugs> (28.3.2023).
- Dzakovich, M. P., Gas-Pascual, E., Orchard, C. J., Sari, E. N., Riedl, K. M., Schwartz, S. J., Francis, D. M., & Cooperstone, J. L. (2019). Analysis of Tomato Carotenoids: Comparing Extraction and Chromatographic Methods. *Journal of AOAC International*, 102(4), 1069-1079. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0017>
- Ercetin, T., Senol, F. S., Erdogan Orhan, I., & Toker, G. (2012). Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 203-208. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.09.007>
- Faustino, M. V., Pinto, D. C. G. A., Gonçalves, M. J., Salgueiro, L., Silveira, P., & Silva, A. M. S. (2018). *Calendula* L. species polyphenolic profile and in vitro antifungal activity. *Journal of Functional Foods*, 45, 254-267. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.013>
- Garcia-Oliveira, P., Barral, M., Carpena, M., Gullón, P., Fraga-Corral, M., Otero, P., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2021). Traditional plants from *Asteraceae* family as potential candidates for functional food industry. *Food and function*, 12(7), 2850-2873. <https://doi.org/10.1039/D0FO03433A>
- Hager, A. (1980). The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast. ed. C. Czygan, v: *Pigments in plants* (2. vydání, pp. 57-59). Fischer.
- Holm, G. (1954). Chlorophyll Mutations in Barley. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 4(1), 457-471. <https://doi.org/10.1080/00015125409439955>
- Chitrakar, B., Zhang, M., & Bhandari, B. (2019). Edible flowers with the common name “marigold”: Their therapeutic values and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 89, 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.008>
- Christensen, L. P. (2018). The Role of Direct and Indirect Polyphenolic Antioxidants in Protection Against Oxidative Stress. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*, 147-179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00013-1>
- Institute of Medicine (2000). Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids (1. vydání), National Academies Press, Washington, D.C., USA., 300 stran.
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System) – Report: *Calendula officinalis* L. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=36910#null (7.4.2022).
- International union of biochemistry and molecular biology (IUBMB): <https://iubmb.qmul.ac.uk/> (30.6.2022)
- Jahodář L. (2011). *Astroideae* – hvězdicovitě. V: *Farmakobotanika semenné rostliny* (3. vydání), Karolinum, Praha. 166-167.

- Jensen, A., & Jensen, S. L. (1959). Quantitative paper chromatography of carotenoids. *Acta Chemica Scandinavica*, 13(9), 1863-1868, ISSN: 0302-4369.
- Johannsen, W. (1911). The Genotype Conception of Heredity. *The American Naturalist*, 45(531), 129-159. <https://doi.org/10.1086/279202>
- Kašparová, M. (2008). Měsíček lékařský - významné lokální antiflogistikum. *Dermatologie pro praxi*, 2(5-6), 241-242. <https://doi.org/https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2008/05/08.pdf>
- Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kishimoto, S., Maoka, T., Sumitomo, K., & Ohmiya, A. (2005). Analysis of Carotenoid Composition in Petals of *Calendula* (*Calendula officinalis* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(11), 2122-2128. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.2122>
- Klepáčka, J., Gujska, E., & Michalak, J. (2011). Phenolic Compounds as Cultivar- and Variety-distinguishing Factors in Some Plant Products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(1), 64-69. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0205-1>
- Koblížek, M., Mlčoušková, J., Kolber, Z., & Kopecký, J. (2010). On the photosynthetic properties of marine bacterium COL2P belonging to Roseobacter clade. *Archives of Microbiology*, 192(1), 41-49. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0529-0>
- Krygier, K., Sosulski, F., & Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 330-334. <https://doi.org/10.1021/jf00110a028>
- Lapshova, M. S., Deineka, V. I., Deineka, L. A., Blinova, I. P., & Tret'yakov, M. Y. (2013). Identification of xanthophylls in a marigold petal extract. *Journal of Analytical Chemistry*, 68(11), 1014-1019. <https://doi.org/10.1134/S1061934813110075>
- Lizama, C., Romero-Parra, J., Andrade, D., Riveros, F., Bórquez, J., Ahmed, S., Venegas-Salas, L., Cabalín, C., & Simirgiotis, M. J. (2021). Analysis of Carotenoids in *Haloarchaea* Species from Atacama Saline Lakes by High Resolution UHPLC-Q-Orbitrap-Mass Spectrometry: Antioxidant Potential and Biological Effect on Cell Viability. *Antioxidants*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/antiox10081230>
- Loggia, R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S., & Isaac, O. (1994). The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. *Planta Medica*, 60(06), 516-520. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959562>
- Macholán L. (1998). *Sekundární metabolity*. (1. vydání). Masarykova universita, Brno, 147 stran.
- Manivannan, A., Narasegowda, S., & Prakash, T. (2021). Comparative study on color coordinates, phenolics, flavonoids, carotenoids, and antioxidant potential of marigold (*Tagetes* sp.) with diverse colored petals. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(5), 4343-4353. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01015-4>
- Maurer, M. M., Mein, J. R., Chaudhuri, S. K., & Constant, H. L. (2014). An improved UHPLC-UV method for separation and quantification of carotenoids in vegetable crops. *Food Chemistry*, 165, 475-482. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.038>
- Melton L., Shahidi F., Varelis P. (2019). *Encyclopedia of Food chemistry*. Kidlington, Oxford; Cambridge MA: Elsevier. 40-52.
- Nagy, M., Grančai, D., & Mučaji, P. (2011). *Farmakognózia: Biogenéza prírodných látok*. Osveta.
- Neukirch, H., D'Ambrosio, M., Via, J. D., & Guerriero, A. (2004). Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterisation of a new triterpenoid monoester. *Phytochemical Analysis*, 15(1), 30-35. <https://doi.org/10.1002/pca.739>
- Nicolaus, C., Sievers-Engler, A., Murillo, R., D'Ambrosio, M., Lämmerhofer, M., & Merfort, I. (2016). Mastering analytical challenges for the characterization of pentacyclic triterpene mono- and diesters of *Calendula officinalis* flowers by non-aqueous C30 HPLC and hyphenation with APCI-QTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 118, 195-205. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.025>

- Niżyński, B., Alsoufi, A. S. M., Pączkowski, C., Długosz, M., & Szakiel, A. (2015). The content of free and esterified triterpenoids of the native marigold (*Calendula officinalis*) plant and its modifications in in vitro cultures. *Phytochemistry Letters*, 11, 410-417. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.12.017>
- Novák, F. A., Penka, M., Cejp, K., & Martinec, T. (1958). *Farmaceutická botanika* (2., dopl. vydání). Státní zdravotnické nakladatelství.
- Nový, B. (2021). *Co máme na co: malý průvodce výrobky Dědka kořenáře* (8. vydání). NOVY.
- Nupur, Kuzma, M., Hájek, J., Hrouzek, P., Gardiner, A. T., Lukeš, M., Moos, M., Šimek, P., & Koblížek, M. (2021). Structure elucidation of the novel carotenoid gemmatoxanthin from the photosynthetic complex of *Gemmatimonas phototrophica* AP64. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95254-6>
- Oliver, J., & Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 543-555. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00329-0)
- Pavelková, P., Krmela, A., & Schulzová, V. (2020). Determination of carotenoids in flowers and food supplements by HPLC-DAD. *Acta Chemica Slovaca*, 13(1), 6-12. <https://doi.org/10.2478/acs-2020-0002>
- Piccaglia, R., Marotti, M., Chiavari, G., & Gandini, N. (1997). Effects of Harvesting Date and Climate on the Flavonoid and Carotenoid Contents of Marigold (*Calendula officinalis* L.). *Flavour and fragrance journal*, 12(2), 85-90. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199703\)12:2<85::AID-FFJ616>3.0.CO;2-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199703)12:2<85::AID-FFJ616>3.0.CO;2-L)
- Pintea, A., Bele, C., Andrei, S., Socaciu, C. (2003). HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1-4), 37-40. <http://www.sci.u-szeged.hu/ABS>
- Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential. *Food Research International*, 105, 580-588. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.014>
- Raal, A., Kirsipuu, K., Must, R., & Tenno, S. (2009). Content of Total Carotenoids in *Calendula Officinalis* L. from Different Countries Cultivated in Estonia. *Natural Product Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400109>
- Ramawat K.G., Merillon J.M. (2013). Tetraterpenes: Carotenoids. In: *Natural Products*. Vol. 1: Phytochemistry, Botany and Metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes (Ramawat K.G., Merillon J.M. eds.), Germany, Springer Berlin Heidelberg, 3251–3283.
- Reznicek, G., & Zitterl-Eglseer, K. (2003). Quantitative determination of the faradiol esters in marigold flowers and extracts. *Scientia Pharmaceutica*, 71(2), 121-128. <https://doi.org/10.3797/scipharm.aut-03-13>
- Rodrigues, D. B., Mercadante, A. Z., & Mariutti, L. R. B. (2019). Marigold carotenoids: Much more than lutein esters. *Food Research International*, 119, 653-664. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.043>
- 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>
- Safdar, W., Majeed, H., Naveed, I., Khan Kayani, W., Ahmed, H., Hussain, S., & Kamal, A. (2010). Pharmacognostical study of the medicinal plant *Calendula officinalis* L. (family *Compositae*). *International Journal of Cell & Molecular Biology*, 1(2), 108-116, ISSN: 2220-7589.
- Sestrienková, A. M. (2019). *Studium vybraných terpenoidů v genofondu měsíčku lékařského* [Bakalářská práce]. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie.
- Shanmugam, M. K., Nguyen, A. H., Kumar, A. P., Tan, B. K. H., & Sethi, G. (2012). Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. *Cancer Letters*, 320(2), 158-170. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.037>

- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158, dostupné na: <https://www.ajeonline.org/content/16/3/144.short>
- Slavíková Z. (2002). *Calendula L. – měsíček*. V: *Klíč ke květeně České republiky* (1. vydání), (Kubát K. ed.), Academia, Praha. 665.
- Slavíková Z. (2004). *Calendula L. – měsíček*. V: *Květena České republiky 7* (1. vydání), (Slavík B. a Štěpánková J. ed.), Academia, Praha. 110-114.
- Sommella, E., Conte, G., Salviati, E., Pepe, G., Bertamino, A., Ostacolo, C., Sansone, F., Prete, F., Aquino, R., & Campiglia, P. (2018). Fast Profiling of Natural Pigments in Different *Spirulina (Arthrospira platensis)* Dietary Supplements by DI-FT-ICR and Evaluation of their Antioxidant Potential by Pre-Column DPPH-UHPLC Assay. *Molecules*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/molecules23051152>
- Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Kasahara, Y., Kimura, Y., Koike, K., Nikaido, T., & Takido, M. (2001). Constituents of *Compositae* Plants. 2. Triterpene Diols, Triols, and Their 3-O-Fatty Acid Esters from Edible *Chrysanthemum* Flower Extract and Their Anti-inflammatory Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3187-3197. <https://doi.org/10.1021/jf010164e>
- Van Heukelem, L., & Thomas, C. S. (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography A*, 910(1), 31-49. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00603-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00603-4)
- VURV, v. v. i.: Polní fenotypování v Olomouci. <https://www.vurv.cz/2021/08/19/polni-fenotypovani-v-olomouci/> (14.4.2023).
- Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/Main_Page (14.4.2023).
- Wilkomirski, B., & Kasprzyk, Z. (1979). Free and ester-bound triterpene alcohols and sterols in cellular subfractions of *Calendula officinalis* flowers. *Phytochemistry*, 18(2), 253-255. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80064-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80064-3)
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (2015). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2), 99-105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>
- Yabuzaki, J. (2017). Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. *Database*, 2017. <https://doi.org/10.1093/database/bax004>
- Yamamoto, H. Y. (1979). BIOCHEMISTRY OF THE VIOLAXANTHIN CYCLE IN HIGHER PLANTS. *Carotenoids* 5, 639-648. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-022359-9.50017-5>
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., & Potrykus, I. (2000). Engineering the Provitamin A (β -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. *Science*, 287(5451), 303-305. <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.303>
- Ye, Y., & Huang, J. -C. (2020). Defining the biosynthesis of ketocarotenoids in *Chromochloris zofingiensis*. *Plant Diversity*, 42(1), 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2019.11.001>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zitterl-Eglseer, K., Reznicek, G., Jurenitsch, J., Novak, J., Zitterl, W., & Franz, C. (2001). Morphogenetic variability of faradiol monoesters in marigold *Calendula officinalis* L. *Phytochemical Analysis*, 12(3), 199-201. <https://doi.org/10.1002/pca.582>
- Zscheile, F. P., & Comar, C. L. (1941). Influence of Preparative Procedure on the Purity of Chlorophyll Components as Shown by Absorption Spectra. *Botanical Gazette*, 102(3), 463-481. <https://doi.org/10.1086/334981>
- Žurnál News & Events: Odborníci na fenotypizaci rostlin se sejdou na výstavě Země živitelka. <https://www.zurnal.upol.cz/nc/en/news/clanek/odbornici-na-fenotypizaci-rostlin-se-sejdou-na-zeme-zivitelce/> (14.4.2023).

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACN – acetonitril

BCDO – β -karoten:O₂-15,15'-dioxygenasa (štěpící vazbu) (karotendioxygenasa, EC 1.13.11.63)

BHT – viz. *t*-BHT – *terc*-butylhydroxytoluen

CrtISO – 7,7',9,9'-tetra-*cis*-lykopenisomerasa (prolykopenisomerasa, karotenoidisomerasa, EC 5.2.1.13)

DAD – detektor diodového pole

DHA – kyselina dokosahexaenová

DMAPP – dimethylallyldifosfát

DMSO – dimethylsulfoxid

DW – suchá hmotnost

EtOH – Ethanol

FPP – farnesyldifosfát

FT-ICR – Iontová cyklotronová rezonanční hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací

FW – čerstvá hmotnost

G3P – glycerinaldehyd-3-fosfát

GAE – ekvivalent kyseliny gallové

GC – plynová chromatografie

GPP – geranyldifosfát

GGPP – geranylgeranyldifosfát

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IPA – isopropylalkohol, isopropanol, 2-propanol

iPP – isopentenylidifosfát

IS – interní standard

IT – iontová past

ITIS – Integrated Taxonomic Information System

IUBMB – International union of biochemistry and molecular biology

Keap1-Nrf2-ARE – Kelch-like ECH-Associating protein 1 – nuclear factor erythroid 2 related factor 2 – antioxidant response element – redoxně senzitivní regulační dráha

KOH/MeOH – roztok KOH v methanolu

LC – kapalinová chromatografie

LCY-b – karotenoid: β -koncová skupina-lyasa (kruh otevírající) (lykopen β -cyklasa, EC 5.5.1.19)

LCY-e – karotenoid: ψ -koncová skupina-lyasa (kruh otevírající) (lykopen ε -cyklasa, EC 5.5.1.18)

LUT1 – α -karoten: O_2 -oxidoreduktasa (3-hydroxylační) (karotenoid- ε -hydroxylasa, EC 1.14.14.158)

MeOH – methanol

MEP – methylerythritol-4-fosfátová dráha

MF – mobilní fáze

MRM – multiple reaction monitoring

MS – hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

MtBE – methyl-*terc*-butylether

MVA – mevalonátová dráha

NMR – nukleární magnetická resonance

prod. – produktu; např. „obsah $x \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ prod.“

S.E.M. – Standard error of the mean – střední chyba průměru

PDA – detektor diodového pole

PDS – 15-*cis*-fytoen:akceptor-oxidoreduktasa (fytoendesaturasa, EC 1.3.99.31)

PSY – geranylgeranyldifosfát:geranylgeranyldifosfát-geranylgeranyl-transferasa (15-*cis*-fytoen tvořící) (15-*cis*-fytoensyntasa, EC 2.5.1.32)

resp. – respektive

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému reverzních fází

t-BHT – *terc*-butylhydroxytoluen

UHPLC – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UV-VIS – ultrafialová a viditelná oblast, spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti

Q-Orbitrap – spojení kvadrupólu a orbitrapu

Q-TRAP – spojení kvadrupólu a iontové pasti

QE – ekvivalent kvercetinu

QqQ – trojitý kvadrupól

ZDS – all-*trans*- ζ -karoten:akceptor oxidoreduktasa (ζ -karotendesaturasa, EC 1.3.99.26)