

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Izolace a stanovení biologicky významných fytoekdysteroidů
v rostlinném materiálu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Olívková
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Olívková
Název práce:	Izolace a stanovení biologicky významných fytoekdysteroidů v rostlinném materiálu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
Rok obhajoby	2020
Abstrakt	<p>Teoretická část předkládané diplomové práce zpracovává informace o terpenoidech, se zaměřením na rostlinné steroly a fytoekdysteroidy. Tato část popisuje význam, funkce a využití fytosterolů a fytoekdysteroidů. V případě fytoekdysteroidů jsou zahrnuty metody vhodné pro jejich izolaci a stanovení. Součástí práce je experiment zaměřený na optimalizaci extrakce a izolace fytoekdysteroidů ze špenátu setého (<i>Spinacia oleracea</i> L.) a merlíku čilského (<i>Chenopodium quinoa</i>). První ze dvou částí výsledků se zabývá stanovením obsahu PEs po přečištění extraktu pomocí extrakce na tuhé fázi (SPE) ve zmíněných rostlinných druzích, kdy bylo využito kolonek s polyamidovou pryskyřicí. Dále je v experimentální části porovnávána návratnost PEs při purifikaci extraktů pomocí SPE vs. metodou disperzní SPE, tzv. QuEChERS. Pro kvantifikaci fytoekdysteroidů bylo využito ultravysoce účinné kapalinové chromaografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.</p>
Klíčová slova	Terpenoidy, fytosteroly, fytoekdysteroidy, extrakce na pevné fázi, disperzní extrakce na pevné fázi, QuEChERS, ultravysoce účinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	54
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Kateřina Olívková
Title of thesis	Isolation and determination of biologically significant phytoecdysteroids in plant material
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The theoretical part of the presented diploma thesis processes information about terpenoids, focusing on plant sterols and phytoecdysteroids. This section describes the importance, function and use of phytosterols and phytoecdysteroids. In the case of phytoecdysteroids, methods suitable for their isolation and determination are included. Part of the work is an experiment aimed at optimizing the extraction and isolation of phytoecdysteroids from spinach (<i>Spinacia oleracea</i> L.) and quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>). The first of the two parts of the results deals with the determination of the PEs after purification of the extract by solid phase extraction (SPE) in the mentioned plant species, when polyamide resin columns were used. Furthermore, the experimental part compares the recovery of PEs after the purification of extracts using SPE vs. dispersive SPE, so called QuEChERS. Ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was used to quantify PEs.</p>
Keywords	Terpenoids, phytosterols, phytoecdysteroids, solid phase extraction, dispersive solid phase extraction, QuEChERS, ultra-high performance liquid chromatography, mass spectrometry
Number of pages	54
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně,
pod vedením Mgr. Danuše Tarkowské, Ph.D. a s použitím citované literatury.“

V Olomouci dne:

.....

Ráda bych touto cestou poděkovala Mgr. Danuši Tarkowské, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za její cenné rady a podněty, které mi byly nápomocny jak při řešení praktických úkolů, tak i při konečné úpravě celého textu. Materiální podpora pro experimentální část této práce byla hrazena z grantu IGA_PrF_2020_021.

Seznam zkratek

20E	20-hydroxyekdyson
ACN	acetonitril
ajuC	ajugasteron C
CCD	protiproudá extrakce (<i>angl.</i> counter-current distribution)
DAG	dny od zasetí (<i>angl.</i> days after germination)
DCCC	kapková protiproudá chromatografie (<i>angl.</i> droplet counter-current chromatography)
DMAPP	dimetylallyl difosfát
dSPE	disperzní extrakce na pevné fázi (<i>angl.</i> dispersive solid phase extraction)
DXP, DOXP	1-deoxy-D-xylulóza 5-fosfát
E	ekdyson
ECs	ekdysteroidy
ESI ⁺	ionizace elektrosprejem v pozitivním módu (<i>angl.</i> electrospray ionization)
EtOH	etanol
FPP	farnesyl difosfát
FW	čerstvá hmota (<i>angl.</i> fresh weight)
GC	plynová chromatografie (<i>angl.</i> gas chromatography)
GCB	grafitizovaný uhlík (<i>angl.</i> graphitized carbon black)
GPP	geranyl difosfát
HMBDP	4-hydroxy-3-metyl-2-(<i>E</i>)-butenyl difosfát
IPP	izopentenyl difosfát
iPrOH	isopropanol
iso	isovitexiron
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina-kapalina (<i>angl.</i> liquid-liquid extraction)
LOD	limit detekce (<i>angl.</i> limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (<i>angl.</i> limit of quantification)
makC	makisteron C
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (<i>angl.</i> micellar electrokinetic chromatography)
MeOH	metanol

MEP	metylerytriol fosfátová dráha
MEV	mevalonátová dráha
MF	mobilní fáze
MRM	monitorování rozpadu iontu (<i>angl.</i> multiple reaction monitoring)
MS	hmotnostní spektrometr (<i>angl.</i> mass spectrometer)
MVA	kyselina mevalonová (<i>angl.</i> mevalonic acid)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PEs	fytoekdysteroidy
polB	polypodin B
ponA	ponasteron A
PSA	sorbent obsahující primární a sekundární amin (<i>angl.</i> primary and secondary amine)
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
RP	reverzní fáze (<i>angl.</i> reversed phase)
RT	retenční čas (<i>angl.</i> retention time)
SDS	dodecyl síran sodný (<i>angl.</i> sodium docecyl sulfate)
SFC	superkritická fluidní chromatografie (<i>angl.</i> supercritical fluid chromatography)
SPE	extrakce na pevné fázi (<i>angl.</i> solid phase extraction)
stachC	stachyteron C
TLC	tenkovrstevná chromatografie (<i>angl.</i> thin layer chromatography)
tur	turkesteron
UCT	United Chemical Technologies
UHPLC	ultravysoce účinná kapalinová chromatografie (<i>angl.</i> ultra-high performance liquid chromatography)

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce.....	2
3 Teoretická část	3
3.1 Izoprenoidy	3
3.2 Steroly	4
3.3 Rostlinné steroly	6
3.3.1 Význam a funkce fytosterolů	6
3.3.2 Biosyntéza fytosterolů	8
3.4 Fytoekdysteroidy	11
3.4.1 Historie fytoekdysteroidů	12
3.4.2 Význam a funkce fytoekdysteroidů	13
3.4.3 Biosyntéza fytoekdysteroidů	15
3.4.4 Obsah fytoekdysteroidů v rostlinných druzích	16
3.5 Metody extrakce a izolace fytoekdysteroidů	19
3.5.1 Extrakce na pevné fázi (SPE)	20
3.5.2 Izolace a purifikace disperzní SPE, QuEChERS	21
3.6 Metody stanovení fytoekdysteroidů	24
4 Experimentální část	26
4.1 Chemikálie	26
4.2 Rostlinný materiál	26
4.2.1 Zběhovec plazivý	28
4.2.2 Extrakt rozchodnice růžové	29
4.2.3 Hadinec obecný	30
4.3 Přístroje a materiál	30
4.4 Metody	32
4.4.1 Kultivace rostlinného materiálu	32
4.4.2 Extrakce a izolace metodou SPE	33
4.4.3 Extrakce a izolace metodou dSPE, QuEChERS	34

4.4.4 Kvantifikace fytoekdysteroidů pomocí UHPLC MS/MS.....	37
5 Výsledky.....	39
5.1 Optimalizace LC-MS a UHPLC-MS/MS analýza fytoekdysteroidů	39
5.2 Výsledky stanovení obsahu fytoekdysteroidů v rostlinných druzích.....	44
5.2.1 Výsledky kvantifikace fytoekdysteroidů – extrakce a izolace SPE.....	44
5.2.2 Návrh stanovení fytoekdysteroidů – optimalizace extrakce a izolace dSPE (QuEChERS).....	49
6 Diskuze.....	52
7 Závěr.....	54
8 Použitá literatura	

1 Úvod

Rostliny představují ohraničený rezervoár biologicky aktivních sloučenin. Mnoho rostlin syntetizuje sekundární metabolity jako jsou terpenoidy, steroidy, karotenoidy, alkaloidy, fenolické látky a další. Funkce sekundárních metabolitů je ekologická, regulační – jako v případě steroidů – anebo se jedná o vedlejší produkty metabolismu. Biosyntéza sekundárních metabolitů navazuje na primární metabolismus, nicméně význam těchto látek není vždy úplně jasný.

Fytosteroly jsou pro své vlastnosti nepostradatelnými složkami buněčných membrán, mají ale i další důležité biologické funkce ve vývojových procesech a jsou významnými prekurzory rostlinných steroidů. Ekdysteroidy patří do třídy chemických látek steroidní povahy, které plní v živočišné říši, zejména u třídy hmyzu, řídicí a regulační funkci hormonů. Fytoekdysteroidy (PEs) jsou analogy těchto látek syntetizovanými rostlinami, u kterých se předpokládá zapojení do interakcí mezi rostlinami a hmyzem. Jejich funkce v rostlinách není doposud přesně známa. Jejich úlohou je pravděpodobně ochrana rostlin před fytofágními druhy. Pro své adaptogenní účinky na lidský organismus mají PEs využití ve farmakologii a jsou často užívány jako doplňky stravy. Po chemické stránce jsou PEs polyhydroxylované steroidy vyskytující se u 5-6 % rostlinných druhů. V současné době je známo okolo 500 analogů těchto významných přírodních látek ve všech organismech.

Předkládaná práce ve své teoretické části rozšiřuje už dříve zkoumanou skupinu pěti studovaných PEs o další tři látky podobné povahy, a to isovitexiron, makisteron C a turkesteron. Experimentální část práce se zabývá optimalizací metody extrakce a izolace PEs z rostlinného materiálu. Cílem je porovnání výtěžnosti metody extrakce na tuhé fázi a disperzní extrakce na tuhé fázi s využitím přístupu metodou QuEChERS. Součástí experimentální části je i stanovení obsahu celkově osmi vybraných PEs u 12 různých rostlinných druhů.

2 Cíle práce

1. Provést literární rešerši na téma terpenoidy se zaměřením na rostlinné steroly a fytoekdysteroidy.
2. Rozšířit stávající skupinu pěti studovaných fytoekdysteroidů o další látky stejné povahy ve smyslu optimalizace postupu jejich extrakce, izolace z rostlinných pletiv a instrumentální metody jejich analýzy.
3. Provést srovnávací studii obsahu biologicky významných fytoekdysteroidů v různých druzích rostlin.

3 Teoretická část

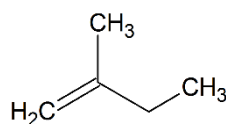
Existuje několik hledisek, dle kterých je možné rozdělit velmi širokou skupinu přírodních látek. Z biogenetického hlediska, tj. z pohledu toho, jakým způsobem přírodní látka vznikla, je lze rozdělit následovně:

- Izoprenoidy
- Alkaloidy
- Sacharidy
- Glykosidy
- Lipidy
- Aromatické sloučeniny a příbuzné látky
- Aminokyseliny, peptidy a proteiny

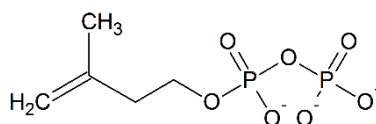
3.1 Izoprenoidy

Izoprenoidy, zvané také terpenoidy, jsou významnou skupinou přírodních látek tvořenou dvěma a více jednotkami pětiuhlíkaté molekuly izoprenu. Izopren (2-metyl-1,3-butadien) je plynná látka, která se volně v přírodě prakticky nevyskytuje. Ve všech živých organismech (prokaryotech i eukaryotech) je ale přítomna ve formě pětiuhlíkatých difosfátů; a to dimetylallyl difosfátu (DMAPP) a jeho izomeru izopentenyl difosfátu (IPP) – Obr. 1. Syntézou těchto pětiuhlíkatých (C_5) sloučenin způsobem „hlava k patě“ vznikají lineární řetězce monoterpenoidů (C_{10}), diterpenoidů (C_{20}), triterpenoidů (C_{30}), tetraterpenoidů (C_{40}) a polyterpenoidů ($>C_{40}$) –

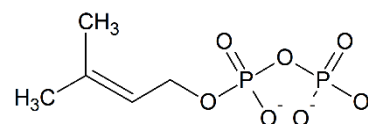
Connolly a Hill, 1992. Tyto lineární molekuly podléhají uvnitř buněk často různým modifikačním reakcím, nejčastěji cyklizacím, oxidacím anebo přesmykům. Do současné doby už bylo identifikováno několik tisíc izoprenoidů a další jsou stále objevovány (Loomis a Croteau, 1973).



izopren



izopentenyl difosfát (IPP)



dimetylallyl difosfát (DMAPP)

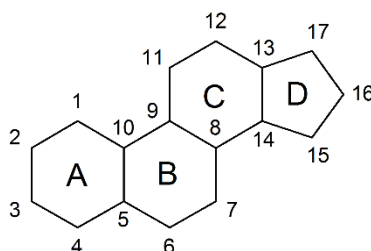
Obrázek 1: Strukturální vzorce hlavních pětiuhlíkatých izoprenoidů.

Jak už bylo zmíněno, terpenoidy jsou přírodními organickými sloučeninami nacházejícími se v rostlinách jako produkty sekundárního metabolismu. Mají lipofilní charakter a hrají důležitou roli při ochraně membránových lipidů. Po chemické stránce se jedná o čisté

uhlovodíky nebo jejich oxoderiváty, jako jsou alkoholy, aldehydy, ketony a karboxylové kyseliny (McMurry, 2015).

Mezi terpenoidy řadíme silice (těkavé aromatické kapaliny izolované z květů rostlin), pryskyřice (tuhé látky vzniklé oxidací silic) a balzámy (polotuhé směsi silic a pryskyřic). Mnohé z těchto látek našly uplatnění v přípravě léků, parfémů, narkotik anebo pigmentů (Loomis a Croteau, 1973). Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny látek jsou například karotenoidy (tetraterpeny), kaučuk (polyterpeny) a rostlinné hormony jako např. kyselina abscisová (seskviterpeny) a gibbereliny (diterpenoidy). Některé z izoprenoidních struktur jsou součástí větších biologicky aktivních molekul (např. chlorofyl, ubiquinon, tokoferol anebo fylochinon).

Neméně významnými přírodními organickými sloučeninami jsou steroidy, které dle počtu uhlíků v molekule řadíme mezi triterpenoidy. Základní výchozí strukturou všech steroidů je tetracyklický izoprenoidní uhlovodík steran (gonan, cyklopentano-perhydrofenanthren). Ten se skládá ze tří šestiuhlíkatých (A, B, C) a jednoho pětiuhlíkatého kruhu (D; Obr. 2).



Obrázek 2: Struktura steranu (gonanu, cyklopentano-perhydrofenanthrenu) s vyznačeným číslováním uhlíkových atomů (C1-C17) a popsanými uhlíkatými kruhy (A, B, C a D) podle názvosloví.

Podle fyziologického významu můžeme steroidy rozdělit na steroidní hormony, žlučové kyseliny a steroidní alkoholy (steroly).

3.2 Steroly

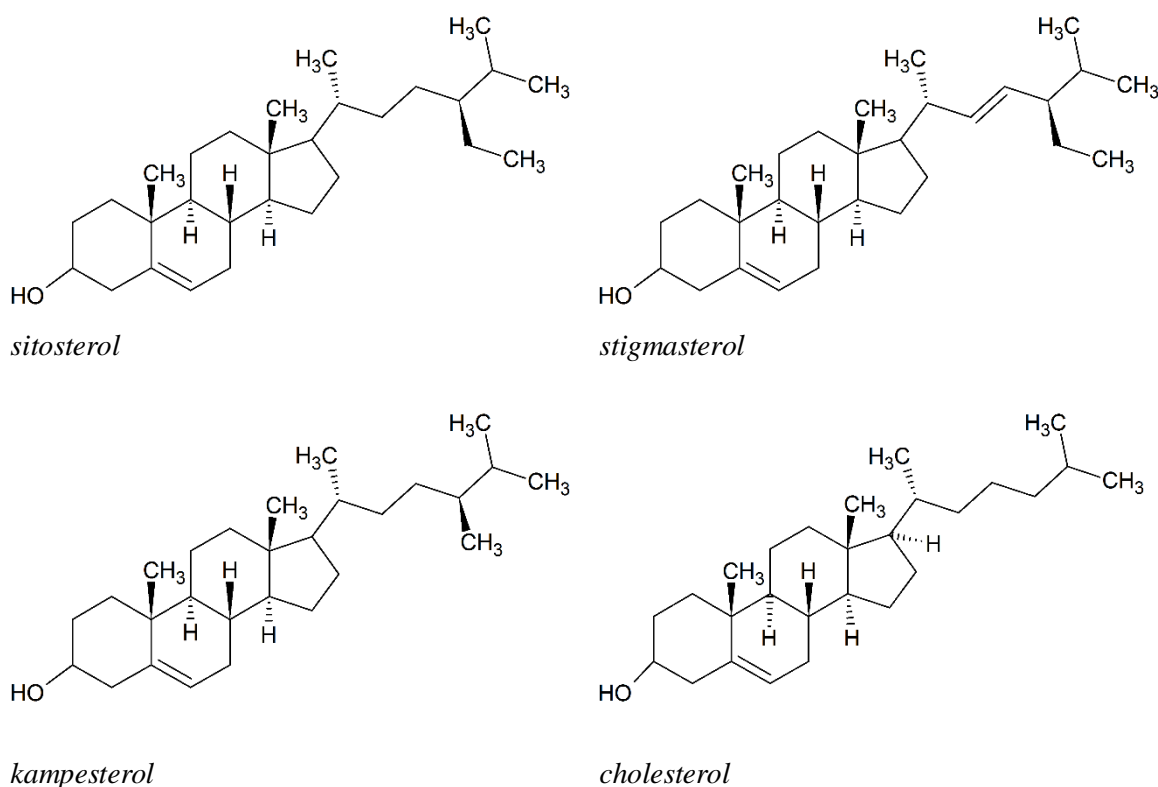
Posledně zmíněné steroly mají na C-3 uhlíku v poloze β vždy hydroxylovou skupinu a v poloze C-17 navázaný alifatický řetězec různé délky (Piironen a kol. 2000). Vyskytují se buď volně v organismu nebo jsou esterově vázány svou hydroxylovou skupinou na určité mastné kyseliny (např. laurová, myristová). Steroly se navzájem odlišují stereochemií v některých asymetrických centrech, počtem atomů uhlíku, polohou a počtem dvojných vazeb v kruhu B, a v postranním řetězci na uhlíku C-17. Platí, že čím je postranní řetězec větší (obsahuje více metylových, resp. etylových skupin), tím hydrofóbnějším se sterol stává. Steroly s např. C₂₈ nebo C₂₉ jsou tedy hydrofóbnější než například cholesterol (C₂₇). Naopak

přítomnost dvojných vazeb v postranním řetězci dělá steroly hydrofilnějšími (Armstrong a Carey, 1987; Nes, 1987).

Steroly jsou nepostradatelnou složkou buněčných membrán, nacházející se u všech eukaryot (u rostlin i zvířat), kde zastupují mnoho funkcí. Jednou z nich je udržování semipermeability membrán a regulace její fluidity. Hlavní vlastností, která umožňuje specifické interakce sterolů s fosfolipidy a proteiny v membránách buněk, je přítomnost volné hydroxylové skupiny (Piironen a kol, 2000; Wojciechowski, 1992). Díky své délce, která je stejná jako u fosfolipidové monovrstvy, se steroly snadno inkorporují do buněčných membrán a regulují jejich fluiditu a permeabilitu (Nes, 1987; Piironen a kol., 2000). V živočišných buňkách je nejznámějším zástupcem z řad sterolů cholesterol (Obr. 3), u hub nalezneme zejména ergosterol a v říši rostlin nacházíme kromě cholesterolu celou paletu různorodých sterolů (Laloi a kol., 2007; Vosolsobě, 2008).

3.3 Rostlinné steroly

Rostlinné steroly (fytosteroly) jsou většinou Δ^5 steroly (nebo jsou z nich syntetizovány), strukturně jsou velmi podobné cholesterolu, liší se pouze v postranním řetězci. Nejznámějšími zástupci z řad fytosterolů jsou sitosterol, stigmasterol, kampesterol (Obr. 3). Sitosterol a stigmasterol mají v poloze C-24 etylovou skupinu, zatímco kampesterol má na stejném uhlíku navázanu metylovou skupinu (Piironen a kol., 2000).



Obrázek 3: Vzorec sitosterolu (*24 α -etylcholest-5-en-3 β -ol*), stigmasterolu (*24 α -etylcholest-5,22-en-3 β -ol*), kampesterolu (*24 α -metylcholest-5-en-3 β -ol*) a cholesterolu (*cholest-5-en-3 β -ol*).

3.3.1 Význam a funkce fytosterolů

Nejvýznamnější vlastností fytosterolů je regulace fluidity a semipermeability buněčných membrán. V membránách buněk se fytosteroly začleňují mezi acylové řetězce mastných kyselin fosfolipidů, kde tvoří mikrodomény, čímž dochází k omezení pohybu acylových řetězců mastných kyselin a tím k ovlivnění fluidity buněčné membrány. Jednotlivé fytosteroly se pak liší v efektivitě uspořádání membránových mikrodomén (Piironen a kol., 2000; Vosolsobě, 2008).

V interakci sterol-membrána hraje roli stereochemie asymetrického centra uhlíku v poloze C-24, konformace dvojné vazby v poloze C-22, i celkové uspořádání polycyklu. Sitosterol a kampesterol jsou v regulaci fluidity ve srovnání se stigmasterolem účinnější.

Snížená účinnost regulace fluidity buněčných membrán je u stigmasterolu dána jeho *trans* orientovanou dvojnou vazbou v poloze C-22 (Obr. 3; Marsan a kol., 1996; Piironen a kol., 2000). Zatímco například ergosterol (sterol hub) díky svému planárnějšímu uspořádání polycyklu silněji indukuje v membránách tvorbu domén (Xu a kol., 2001).

Kromě zmíněné klíčové funkce v buněčných membránách jsou fytosteroly důležitými signálními molekulami, které působí jako substráty u široké škály sekundárních metabolitů – pro glykoalkaloidy, kardenolidy anebo saponiny (Brát, 2006; Dostálová a Pokorný, 2000; Tarkovská, 2019). Dále ovlivňují aktivitu enzymů vázaných na membrány a některé z nich mají specifické funkce jako je přenos signálu. Pravděpodobně hrají fytosteroly roli i v adaptaci membrán vůči teplotě (Piironen a kol., 2000). Studie využívající modelových membrán, které obsahovaly rostlinné steroly, prokázaly, že přítomnost fytosterolů způsobila menší senzitivitu těchto membrán k teplotnímu šoku (Beck a kol., 2007; Vosolsobě, 2008).

Fytosteroly hrají svou roli i v proliferaci a diferenciaci buněk. Akumulují se v semenech, kde poskytují zásobu pro růst nových buněk a mladých výhonků. Během klíčení semen vzroste v rostlinách díky intenzivní syntéze membrán obsah fytosterolů. Syntéza sterolů je v rostlinách spuštěna po vyklíčení semene a poté postupně klesá spolu s tím, jak semeno zraje (Guo a kol., 1995; Piironen a kol., 2000).

Fytosteroly mají mnoho biologických funkcí nejen v rostlinách. Již od 50. let 20. století je známo, že jsou prospěšné pro lidské zdraví vzhledem ke své schopnosti snižovat hladiny cholesterolu. Ke snížení hladiny cholesterolu v séru dochází prostřednictvím inhibice jeho absorpce a kompenzační stimulace jeho syntézy při příjmu nad 1 g za den (Moghadasian a Frohlich, 1999; Piironen a kol., 2000; Pollak, 1953).

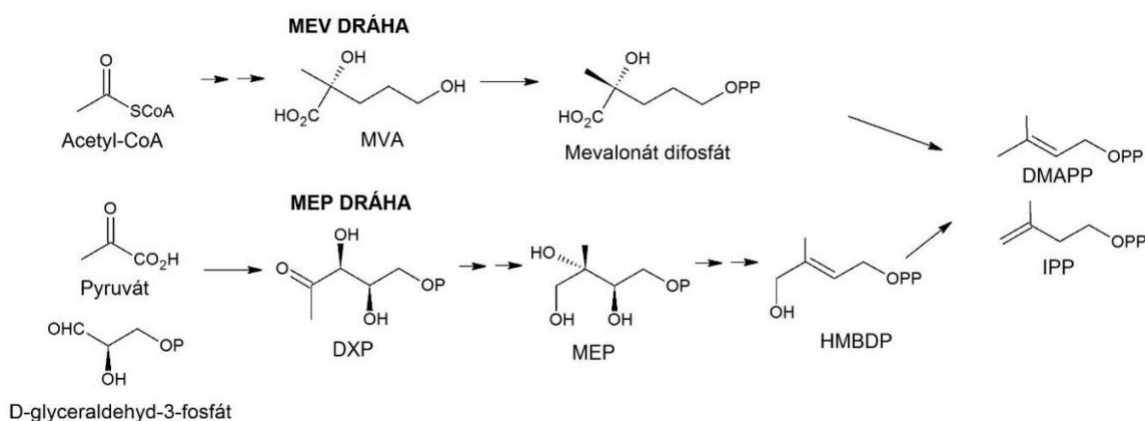
Vyjma těchto funkcí hrají steroly roli i v buněčných a vývojových procesech u rostlin, konkrétně jako prekurzory v biosyntéze signalizačních molekul rostlinných steroidů a fytohormonů. Například kampesterol je výchozím bodem biosyntézy brassinosteroidů – skupiny rostlinných hormonů nacházejících se hojně zejména v pylu řepky olejné *Brassica napus*, kde zásadně regulují vývojové procesy (Benveniste, 2002; Güll a Amar, 2006). Dalším příkladem steroidů, jejichž prekurzory jsou fytosteroly, mohou být testosteron, progesteron a jeho deriváty (Tarkovská, 2019).

3.3.2 Biosyntéza fytosterolů

Fytosteroly jsou jedním z produktů mevalonátové dráhy (MEV; Goldstein a Brown, 1990) používané k biosyntéze látek izoprenoidní povahy vedle dráhy metylerytriol fosfátové (MEP; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999).

V MEV dráze vznikají v cytosolu buněk C₅ izoprenoidní prekurzory (IPP a DMAPP), které jsou stěžejní pro pozdější syntézu fytosterolů. Biosyntéza probíhá ze dvou molekul acetyl-CoA, přičemž kyselina mevalonová (MVA), podle které je tato dráha pojmenována, je jejím třetím meziproduktem (Obr. 4).

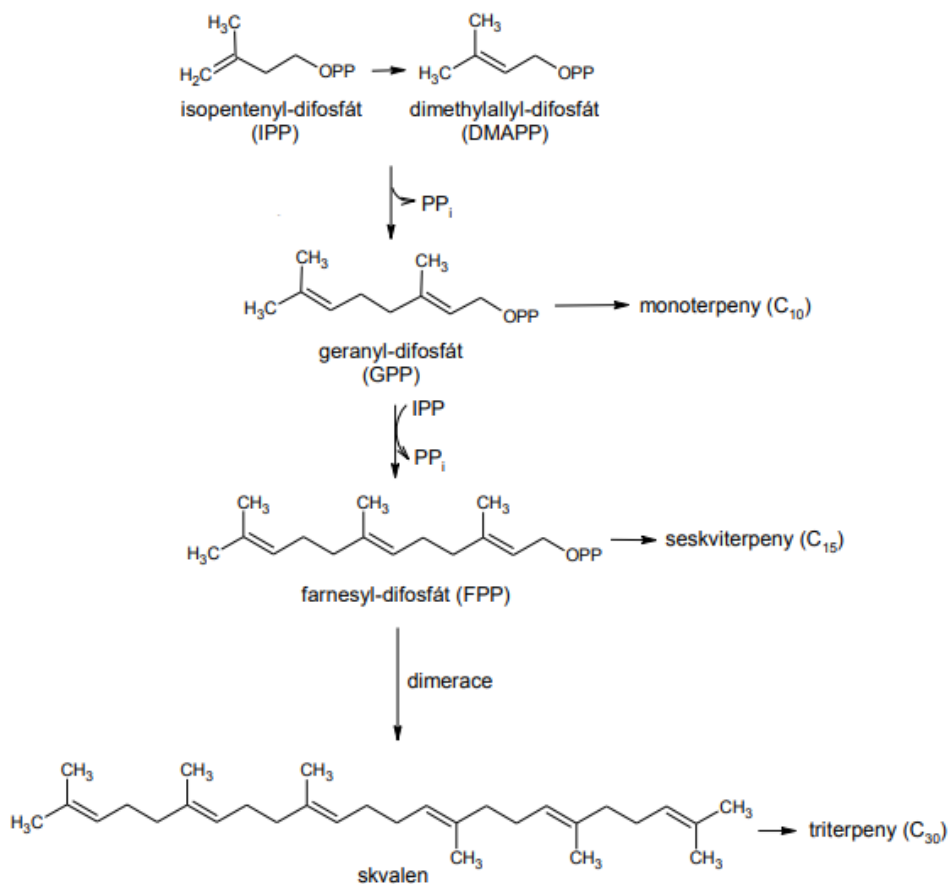
Biosyntetická dráha MEP, někdy nazývána také 1-deoxy-D-xylulóza 5-fosfát (DXP, DOXP), je vedlejší (alternativní) dráhou biosyntézy fytosterolů a na rozdíl od MEV dráhy, která probíhá v cytosolu, se MEP dráha odehrává v plastidech fotosyntetizujících eukaryotních organismů (Lichtenthaler, 1998; Chang a kol., 2013; Zhao a kol., 2013). Předpokládalo se, že stěžejní roli v biosyntéze fytosterolů sehrává MEV dráha. V případě některých fytosterolů bylo ale prokázáno, že jejich skelet je odvozen z IPP, který byl vytvořen výhradně z IPP pocházejícím z MEP dráhy (Guo a kol., 1995). Proces biosyntézy fytosterolů MEP dráhou se skládá z osmi enzymaticky katalyzovaných reakcí. Začíná kondenzací pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu za vzniku DXP. V několika krocích pak dochází k tvorbě meziprojektu 4-hydroxy-3-metyl-2-(E)-butenyl difosfátu (HMBDP), z něj pak vzniká DMAPP a následně jeho izomer IPP (Eisenreich a kol., 2004; Chang a kol., 2013; Kakimoto, 2003; Lichtenthaler, 1999; Wanke a kol, 2001) -Obr. 4.



Obrázek 4: Schéma mevalonátové dráhy (MEV) a metylerytriol fosfátové dráhy (MEP) vedoucích k biosyntéze izoprenoidních prekurzorů DMAPP a IPP. Převzato z Kakimoto, 2003 a upraveno.

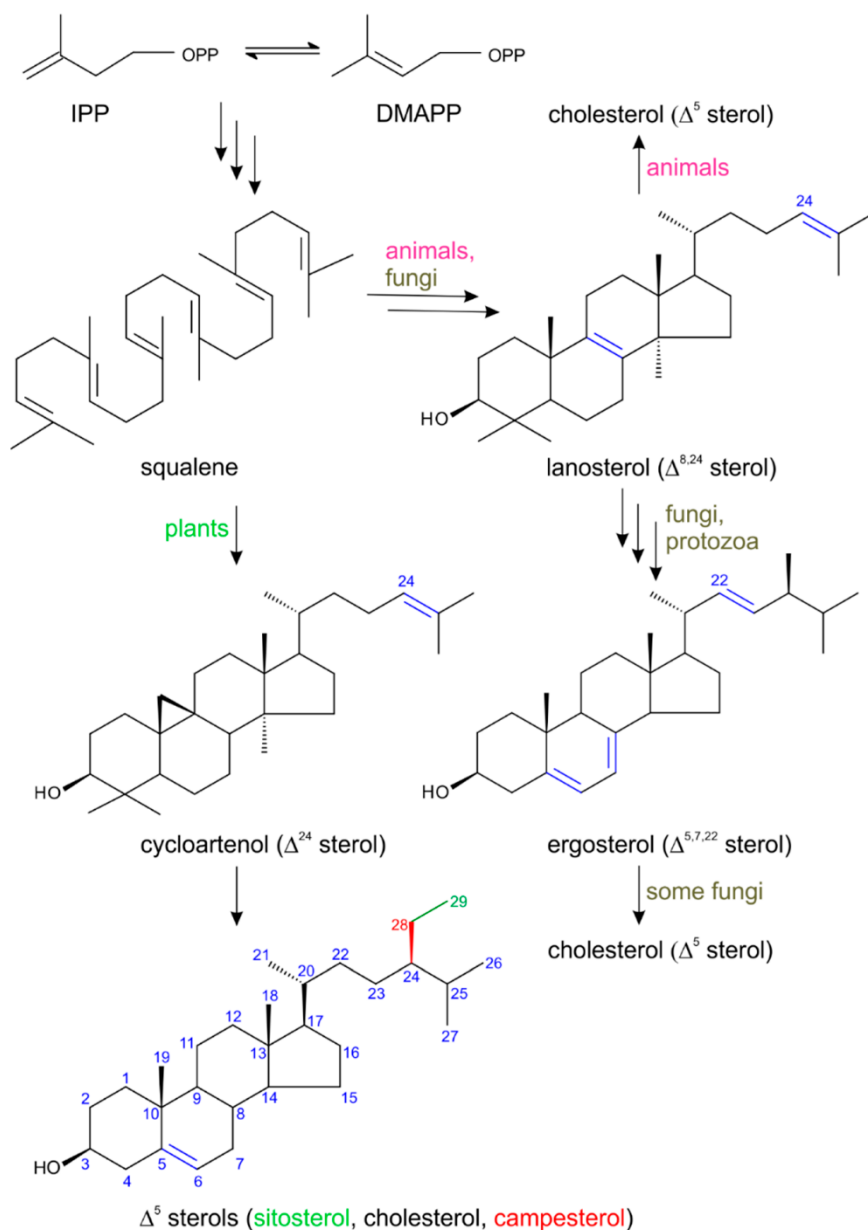
MVA (kyselina mevalonová); DMAPP (dimetylallyl difosfát); IPP (izopentenyl difosfát); DXP (deoxyxylulóza fosfát); HMBDP (4-hydroxy-3-metyl-2-(E)-butenyl difosfát).

Zásadními meziprodukty obou drah jak MEV, tak MEP jsou izoprenoidní prekurzory IPP a DMAPP, jejichž kondenzací přes geranyl difosfát (GPP) na farnesyl difosfát (FPP) a spojením způsobem „pata-pata“ za současné redukce vzniká lineární uhlovodík skvalen (Obr. 5).



Obrázek 5: Biosyntéza skvalenu z izoprenoidního prekurzoru izopentenyl difosfátu (IPP).
Převzato z Příkrylová, 2018.

Skvalen je klíčovým meziproduktem podléhajícím v biosyntetických procesech cyklizaci za spotřeby energeticky významných látek. Je výchozím prekurzorem pro syntézu všech steroidních látek jak u rostlin, tak i u živočichů včetně člověka (Piironen a kol., 2000; Obr. 6). Výjimku tvoří pouze členovci, kteří nejsou schopni skvalen cyklizovat, a musí tedy steroly přijímat z rostlinné potravy (Nes a McKean, 1977).



Obrázek 6: Zjednodušené schéma biosyntézy vybraných sterolů ze skvalenu v rostlinách, živočiších a houbách. Převzato z Tarkowská, 2019. IPP (izopentenyl difosfát); DMAPP (dimetylallyl difosfát).

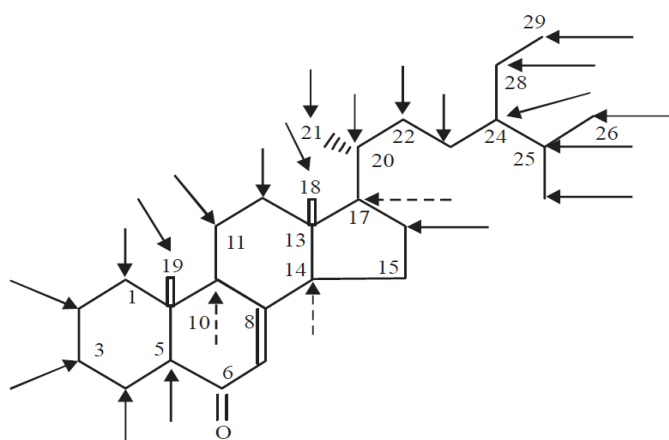
Skvalen je oxidován na 2,3-epoxid a dále cyklizován buď na lanosterol anebo cykloartenol. Houby bez fotosyntetického aparátu převádějí skvalen na lanosterol a poté na ergosterol. Ve fotosyntetizujících rostlinách vedou k syntéze fytoosterolů alkylační reakce Δ^{24} sterolu cykloartenolu (Piironen a kol., 2000; Tammi a kol., 2001; Tarkowská, 2019).

3.4 Fytoekdysteroidy

Kromě Δ^5 sterolů (např. sitosterol, kampesterol, stigmasterol, aj.; viz kapitola 3.2 Steroly) se v rostlinách vyskytují ještě Δ^7 steroly (dvojná vazba mezi C-7 C-8; např. lathosterol), které jsou prekurzory rostlinných steroidů zvaných fytoekdysteroidy (PEs).

Fytoekdysteroidy jsou polyhydroxylované sloučeniny, jejichž skelet tvoří cyklopentano-perhydrofenantrenový uhlíkový skelet společný pro steroidy – steran (viz Obr. 2 na str. 4). Základem PEs je 7-en-6-on chromofor v B kruhu. Na uhlíku C-14 má navázanu hydroxylovou skupinu v pozici α a na C-17 alifatický řetězec v pozici β . Velká část PEs je biosynteticky odvozena od cholesterolu (C₂₇), případně C₂₈ nebo C₂₉ v závislosti na tom, z jakých fytosterolů jsou syntetizovány. Podle toho si také nesou případnou alkylovou skupinu na C-24. Méně obvykle se vyskytují i různě dlouhé PEs od C₁₉ po C₃₀ (Dinan, 2001; Lafont, 1998).

Kondenzace čtyř kruhů ve skeletu je charakteristická: B/C a C/D kruhy zaujímají navzájem obecně *trans* konformaci, zatímco A/B obvykle *cis* (5 β -H) a jen výjimečně *trans* (5 α -H). Variabilita ve struktuře steroidního kruhu není tolik podstatná, významnější změna spočívá v počtu, poloze a orientaci hydroxylových skupin a konjugačních zbytků, které jsou s nimi spojeny (Obr. 7) Mezi obvykle hydroxylovaná místa zahrnujeme pozice 2 β -, 3 β -, 14 α -, 20R- a 22R-, které pokud jsou hydroxylovány všechny, definují zároveň jeden z vysoce aktivních PEs ponasteron A (ponA; 25-deoxy-20-hydroxyekdyson; Dinan, 2001; Nakanishi a kol., 1966). Například polypodin B (polB), který je druhým nejčastěji se vyskytujícím PEs, nese celkem 7 hydroxylových skupin (Jizba a kol., 1967). Od 20-hydroxyekdysonu (20E) se liší jen v jedné hydroxylové skupině (C-5), proto bývá v literatuře uváděn jako 5 β , 20-dihydroxyekdyson (Harmatha a Dinan, 1997).



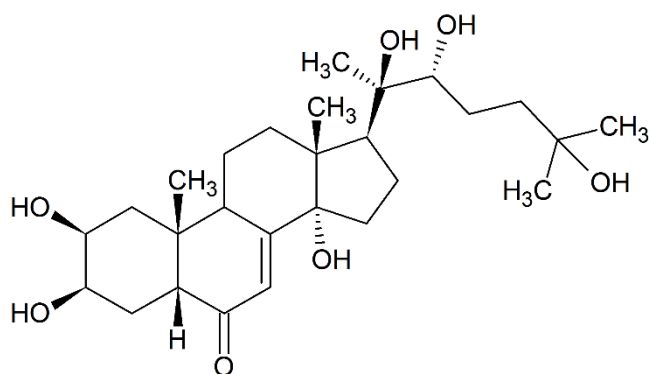
Obrázek 7: Obecný skelet ekdysteroidů cholest-7-en, 6-on s očíslovanými atomy uhlíku C1-C29. Plné šipky označují pozice hydroxylové skupiny v poloze β nebo α , čárkované šipky v pozici α . Převzato z Chaubey, 2018.

3.4.1 Historie fytoekdysteroidů

Z historického hlediska byly nejprve počátkem 50. let minulého století izolovány ekdysteroidy (ECs) v živočišné říši z kukel bource morušového *Bombyx mori* L. (Butenandt a Karlson, 1954). Prvním takto izolovaným ECs byl ekdyson (E), jeho struktura byla objevena až později metodou X-ray krystalografie (Huber a Hoppe, 1965). Název byl odvozen od jeho funkce, kdy „ekdyse“ je latinský výraz pro svlékání hmyzu (ekdyson – svlékáci hormon; Tarkowská a Strnad, 2016).

Z rostlinného materiálu byly ECs izolovány poprvé v 60. letech 20. století. Nejprve byl při studiu látek s protinádorovou aktivitou v jehličnanu *Podocarpus nakaii* náhodně izolován ponA, ponasteron B a C (Nakanishi a kol., 1966). Dalším izolovaným ECs v rostlinách byl 20E (Obr. 8) a ionokosteron z kořenů rostliny *Achyranthes fauriei* (Takemoto a kol., 1967a). V tomto období byl 20E nalezen i v dalších rostlinných materiálech – ve dřevě borovice druhu *Podocarpus elatus* (Galbraith a Horn, 1966), v oddencích kapradiny osladiče obecného *Polypodium vulgare* (Heinrich a Hoffmeister, 1967) a v listech další z kapradin hasivky orličí *Pteridium aquilinum* (Kaplanis a kol., 1967).

Ekdysteroidní látky byly postupně objevovány i v houbách, řasách, mořských organismech a ve vyšších rostlinách (nahosemenných a krytosemenných). Stejně tak i v živočišné říši u členovců a jiných bezobratlých (Dinan a kol., 2009). Od svého objevu bylo ve více než 100 čeledích různých suchozemských rostlin (jednoletých a víceletých) zjištěno okolo 300 sloučenin ekdysteroidního charakteru, z nichž nejvíce rozšířeným z nich je 20E (Lafont a kol., 2002; Tarkowská a Strnad, 2016; Obr. 8).



Obrázek 8: Strukturální vzorec nejbundantnějšího ekdysteroidu 20-hydroxyekdysonu (20E).

Pro rozlišení podle původu izolovaných látek byla tato skupina rozdělena na ECs vyskytující se v živočiších – tzv. zoekdysteroidy – a ECs přirozeně se nacházející v rostlinách – PEs. Ale vzhledem k tomu, že některé ECs se nacházejí jak v živočiších, tak i v rostlinách

(např. E, 20E a ajugasteron C -ajuC), není toto rozdělení úplně přesné. Databáze poskytující data o struktuře ECs, jejich výskytu, účincích a aplikaci jsou spolu s odkazy na příslušnou literaturu dostupné volně online na www.ecdybase.org (Dinan a kol., 2009; Mašková, 2016; Tarkowská a Strnad, 2016).

3.4.2 Význam a funkce fytoekdysteroidů

V živočišné říši plní ECs funkci steroidních hormonů řídících růst a metamorfózu hmyzu. Zásadní roli sehrávají například jako iniciátory procesu svlékání (Henrich a kol., 1999).

Na rozdíl od známé hormonální aktivity ECs u zvířat existují důvody pro to, abychom považovali PEs spíše za sekundární metabolity rostlin než fytohormony. Hladiny fytohormonů bývají zpravidla přítomné ve stopovém množství, naproti tomu hodnoty PEs bývají v rostlinách řádově několikanásobně vyšší. Například v sušině parchy saflorové *Leuzea carthamoides* se nachází 1-2 % PEs (Koudela a kol., 1995). Dále bylo zjištěno, že přítomnost PEs v dosud testovaných druzích rostlin není univerzální, toto však může být způsobeno tím, že metody používané k jejich detekci nejsou dostatečně citlivé (Dinan, 2001). Dosud nebyl objeven receptor vázající se na PEs a hormonální aktivita nebyla prokázána ani při provedení biotestů pro stanovení citlivosti fytohormonů (Tarkowská a Strnad, 2016).

I přes popsání důvodů svědčící proti hormonální funkci PEs v rostlinách víme, že se PEs podílejí na regulaci vybraných fyziologických procesů ve fotosyntetizujících organismech. Je popsán vliv na velikost a růst buněk u řasy *Chlorella vulgaris* (Bajguz a Dinan, 2004) a růst sinic rodu *Nostoc* (Maršálek a kol., 1992).

Ačkoliv (i přes poměrně vysoké koncentrace PEs v některých rostlinných druzích) není jejich funkce doposud uspokojivě objasněna, hlavní hypotéza předpokládá, že poskytují rostlinám určitý druh ochrany proti fytofágním bezobratlým predátorům. Tato hypotéza předpokládá, že PEs mají antifidantní účinky, což znamená, že snižují přitažlivost pro fytofágní druhy. Je známo, že ať už PEs působí samostatně nebo společně s jinými signálními molekulami, mohou odvrátit napadení rostlin nebo vést k endokrinní disrupci a/nebo smrti fytofágních bezobratlých (Bergamasco a Horn, 1983; Kokoška a Janovská, 2009; Kubo a Hanke, 1986). Mnohé rostliny mají schopnost „zapnout“ produkci PEs v případě, že jsou vystaveny útoku zvířat, stresu anebo jiným specifickým podmínkám (Dinan, 2001). Studie od Lamhamdí a kol. naznačuje, že 20E zvyšuje antioxidační ochranu rostlin, konkrétně ovlivňuje askorbát-glutathionový cyklus, což umožňuje lepší odolnost vůči stresům vyvolaným působením těžkých kovů (Lamhamdí a kol., 2016).

Bylo popsáno několik experimentů zahrnujících buď exogenní, nebo endogenní aplikaci s použitím mutantů rostlin, jimž byla zvýšena hladina PEs (Ajaha a kol., 2019; Soriano a kol., 2004; Udalova a kol., 2004). Ajaha a kol. (2019) prokázali, že aplikace 20E způsobila u larev hmyzího škůdce potemníka hnědého *Tribolium castaneum* indukci mortality, narušení růstu a vývoje a změnu některých jeho fyziologických parametrů (Ajaha a kol., 2019).

Vliv exogenní aplikace PEs byl zkoumán i u fytoparazitických hlístic kmene *Nematoda*. Pro příklad Udalova a kol. (2004) zjistili, že postřik rostlin rajčete *Lycopersicon esculentum* roztokem ekdysonu signifikantně snížil poškození kořenů způsobené hád'átkem *Meloidogyne inkognita*. Podobně Soriano a kol. ve stejném roce popsali, že exogenní aplikace 20E na kořenové cysty obilovin tvořené hád'átkou rodu *Heterodera avenae*, *H. schachtii*, *Meloidogyne javaica* a *Pratylenchus neglectus* vede k výrazné redukci invazivity, nehybnosti, zhoršení vývoje a smrti těchto rostlinných parazitů. Součástí stejné studie byl i výzkum na špenátu setém *Spinacia oleracea* L., kterému byla pomocí metyl-jasmonátu endogenně zvýšena koncentrace 20E. Bylo zjištěno, že PEs chrání špenát před hád'átkou parazitujícími na rostlinách a poskytuje tak rostlinám mechanismus rezistence vůči parazitickým hlísticím kmene *Nematoda* (Soriano a kol., 2004). Pro tyto své vlastnosti jsou PEs předmětem výzkumu hledajících alternativu/náhradu za syntetické insekticidy (Ajaha a kol., 2019; Chaubey, 2018, Tarkowská a Strnad, 2016).

Kromě zmíněných antifidantních účinků se zdá, že některé PEs produkované rostlinami působí jako tzv. alelochemikálie, což jsou látky, jejichž uvolňováním do půdy je stimulován nebo narušován růst a/nebo vývoj jiných organismů v blízkosti. Z listů *Chenopodium alba* byly izolovány látky ovlivňující klíčení a růst jak jednoděložných, tak i dvouděložných rostlin (Bakrim a kol., 2008; DellaGreca a kol., 2005). Intaktní semena stejné čeledi *Amaranthaceae*, merlíku čilského *Chenopodium quinoa* vylučují do vody sloučeniny, která mají během počátečních stadií klíčení údajné antidiabetické vlastnosti (Graf a kol., 2014).

Mnohé studie poukazují na široké spektrum farmakologických účinků PEs u savců – např. hepatoprotektivních, antidiabetických, hojivých anebo anti-osteoporotických, antimikrobiálních (Burdette, 1962; Kapur a kol., 2010; Kokoška a kol., 2002; Lafont a Dinan, 2003; Seidlova-Wuttke a kol., 2010; Sláma a Lafont, 1995; Syrov a Khushbaktova, 1996). Jsou také známy jejich anabolické účinky na kosterní svalstvo, a to bez androgenních vedlejších účinků, z těchto důvodů jsou mnohdy užívány sportovci ve formě doplňků stravy ke zlepšování fyzického výkonu. Mezi další účinky PEs u savců patří zvýšení odolnosti organismu vůči stresu a podpora vitality, jsou proto popisovány jako tzv. adaptogeny (Tarkowská a Strnad, 2016).

Některé z těchto látek jsou pro své účinky využívány v tradiční asijské medicíně. Na trhu jsou široce dostupné doplňky stravy s výtažky rostlin obsahujících PEs, například parcha saflorová *Leuzea carthamoides*, rozchodnice růžová *Rhodiola rosea* a mnohé další. Dále experimenty s extrakty PEs obsahujícími 20E (používané v tradiční asijské medicíně hlavně jako diuretikum a antiseptické činidlo) naznačují, že 20E má antibakteriální a antifungální vlastnosti (Ahmad a kol., 1996; Kokoška a kol., 2002). V neposlední řadě existují i náznaky, že se PEs podílejí na regulaci fotosyntézy (Holá a kol., 2013).

3.4.3 Biosyntéza fytoekdysteroidů

Ačkoliv byly PEs odhaleny ve zhruba 5-6 % analyzovaných druhů rostlin a jejich koncentrace v některých druzích je poměrně vysoká, jsou znalosti o jejich biosyntéze omezené (Dinan a kol., 1995; Dinan, 2001; Imai a kol., 1969). V posledních desetiletích bylo uskutečněno několik biosyntetických studií, jejichž předmětem zájmu byl popis produkce těchto ekdysteroidních látek zejména u bezobratlých (Sommé-Martin a kol., 1988; Grieneisen, 1994), rostlinám bylo v tomto ohledu věnováno jen velmi málo pozornosti. O přesném průběhu biosyntézy PEs je dosud známo jen velmi málo informací. Víme, že prekurzory v procesu biosyntézy PEs jsou fytosteroly, jejichž biosyntéza je popsána v podkapitole 3.3.2 Biosyntéza fytosterolů (Tarkowská a Strnad, 2016).

Dosud například nejsou přesně známa přesná místa, kde dochází k jednotlivým krokům v produkci PEs. V 90. letech bylo prokázáno, že aktivní biosyntéza probíhá ve vyvíjejících se pletivech (Gribenok a kol., 1991, 1993) a následně jsou PEs transportovány do jiných orgánů (Ripa a kol., 1990; Gribenok a kol., 1991). Nicméně nevíme, zda produkce PEs probíhá ve všech rostlinných buňkách, nebo jsou-li využívány ještě jiné, specializované buňky (Gribenok a kol., 1996; Canals a kol., 2005).

Na přelomu tisíciletí bylo studium biosyntézy PEs zkoumáno u rostlin, které jsou známé svým vysokým obsahem PEs, např. na špenátu *Spinacia oleracea* L. (Gribenok a Adler, 1993) a zběhovci plazivém *Ajuga reptans* (Ohyama a kol., 1999; Hyodo a Fujimoto, 2000). Pro studium dějů odehrávajících se při biosyntéze izoprenoidních látek se v zásadě používají metody s radioaktivně značenými molekulami prekurzorů účastnících se procesu biosyntézy (Gribenok a Adler, 1993). Značenými/sledovanými prekurzory, mohou být například acetát, mevalonát, lathosterol nebo jiné dostupné meziprodukty. Pro označení molekul lze použít např. radioaktivní izotopy uhlíku ^{14}C , ^{13}C anebo tritium ^3H a následnou analýzu pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR; Gribenok a Adler, 1993; Hyodo a Fujimoto, 2000).

Jisté je, že PEs jsou látky rozmanité nejen svým významem, ale i svou strukturou a k jejich poznání bude do budoucna přínosné provést biosyntetické studie vedoucí k objasnění celého procesu (Dinan a kol., 2009).

3.4.4 Obsah fytoekdysteroidů v rostlinných druzích

Ve skutečnosti má po genetické stránce většina rostlinných druhů schopnost produkce PEs. Rozdílná regulace dosud ne zcela objasněné biosyntetické dráhy určuje, zda a na jakých úrovních bude určitý druh akumulovat ekdysteroidy v různých částech rostlin a jaký bude výsledný profil obsažených PEs (Dinan, 2001).

V minulosti bylo pro přítomnost PEs testováno na 6000 druhů rostlin. Toto množství představuje jen asi 2 % z celkového počtu všech suchozemských druhů rostlin. Výsledkem bylo hodnocení obsahu PEs u různých částí rostlin v různých stádiích vývoje. Víme, že rostliny mohou obsahovat navzájem odlišné PEs a metoda může tak detekovat pouze jejich konkrétní typy (Dinan a kol., 2009). Je také třeba vzít v úvahu různé metody detekce, které byly u těchto studií použity, a které se liší svou selektivitou a citlivostí. Navíc publikovaná literatura uvádí spíše na PEs pozitivní druhy spíše než ty, u kterých nebyl jejich obsah prokázán (Dinan a kol., 2020). Neschopnost detekovat tyto sloučeniny u některých druhů by mohla být způsobena potlačením transkripce genu (Dinan a kol., 2009; Lafont a kol., 2002), nedostatečnou purifikací během přípravy vzorku a/nebo instrumentálními omezeními.

Co se týče vyšších rostlin, předpokládá se signifikantní výskyt PEs v semenech nahosemenných, a krytosemenných (jedno a dvou děložných) mezi 5-6 % (Imai a kol., 1969; Dinan a kol., 1995). Nicméně, použitím citlivé imunoeseje byla jejich přítomnost v listech u náhodně vybraných druhů 40% (Dinan, 2001). Spolu s rozvojem moderních instrumentálních metod analýzy můžeme snáze detekovat látky obsažené v rostlinách i o nízkých koncentracích. Díky tomu můžeme detekovat PEs i v druzích, které byly dosud považovány za negativní na obsah PEs (Dinan, 2001).

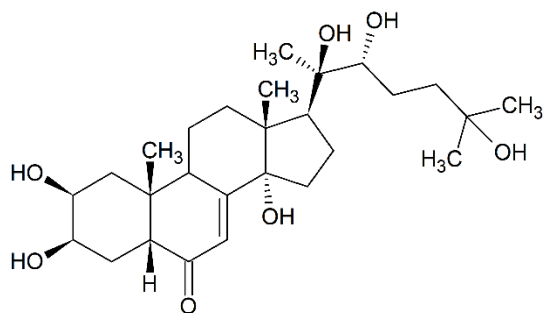
Některé studie naznačují, že výskyt PEs může souviset s fylogenetickou pozicí (Dinan a kol., 1998; Savchenko a kol., 1998). Například v rodu *Chenopodium* jsou PEs přítomny u většiny druhů, ale v podrodu *Ambrosia* detekovány nebyly (Dinan a kol., 1998). Ačkoli druhy obsahující PEs jsou v určitých rodech častější než v jiných, platí že tam kde byl zkoumán dostatek druhů v rámci rodu, byly obvykle nalezeny i na PEs pozitivní druhy. Stejně tak neplatí, že přítomnost PEs bude u všech druhů jedné čeledě (např. hvězdnicovité *Asteraceae*), která obsahuje hned dva druhy s vysokými hladinami PEs: parchu saflorovou *Leuzea carthamoides* a srpici *Serratula*. Pokud byl však zkoumán dostatek druhů v jedné čeledi např. u merlíkovitých *Chenopodiaceae* (nyní patřící mezi laskavcovité

Amaranthaceae; Dinan a kol., 1998) nebo u velkých rodů jako jsou např. silénky *Silene* (Mamadalieva, 2012; Zibareva a kol., 2003), je sledován určitý vzorec týkající se taxonomické struktury, což značí, že přítomnost a profil PEs má chemotaxonomický význam (Dinan a kol., 2020).

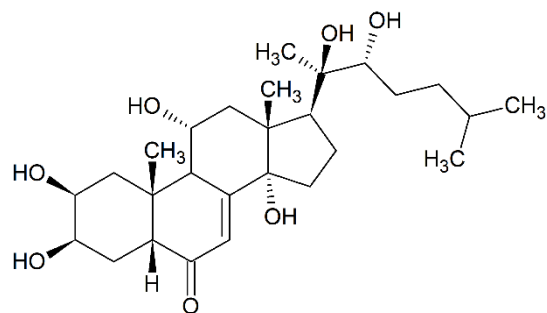
K dnešnímu datu (červenec 2020) bylo identifikováno 520 ECs z bezobratlých, rostlin a hub (data z databáze Ecdybase; Lafont a kol., 2002). Většina byla izolována z rostlin, kde se nacházely až v 1000 krát vyšších koncentracích (Dinan a kol., 2020). Nejzastoupenějším analogem živočišného ECs v rostlinách je 20E (Takemoto a kol., 1967b).

Vysoké hladiny PEs v rostlinách nejsou výsledkem intenzivně probíhající biosyntézy, ale akumulují se v rostlinách postupně. Při srovnání distribuce PEs v jednoletých a víceletých rostlinách se předpokládá, že jednoleté rostliny například špenát setý *Spinacia oleracea*, přenášejí PEs do částí klíčových pro přežití rostlin, anebo potřebných pro další generaci rostlin (Dinan a kol., 2009). Nejvyšší koncentrace PEs jsou v případě jednoletých rostlin přítomny v mladých listech a reprodukčních orgánech, méně často potom u stonků a kořenů (Dinan, 2001; Grebenok a kol., 1991). Na druhé straně pro víceleté rostliny jako je parcha saflorová *Leuzea carthamoides* nebo srpice *Serratula* platí, že obsah PEs závisí na ročním období. Zjara je nejvyšší obsah PEs v nově se vyvíjejících listech, zatímco na podzim jsou PEs transportovány z listů do kořene, kde dochází k jejich akumulaci (Kholodova a kol., 1979).

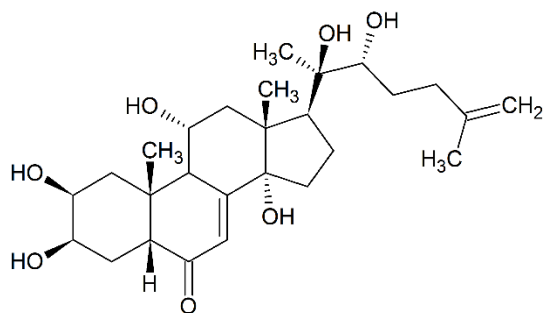
Obě výše zmíněné rostliny patří do čeledi hvězdnicovité *Asteraceae*, parcha saflorová *Leuzea carthamoides* je zároveň vůbec nejbohatší rostlinou na výskyt PEs. Sušina této rostliny obsahuje více než 1 %, v semenech pak až 2 % (Koudela a kol., 1995). Kořen parchy má mnoho využití, pro vysoký obsah PEs je například vhodným přirozeným zdrojem základních PEs (např. 20E, polB,ajuC, ionokosteron; Píš a Harmatha, 1992; Píš a kol., 1992; Píš a kol., 1994). Přítomnost PEs je méně častá v pro člověka běžně konzumovaných rostlinných druzích, výjimku tvoří špenát setý *Spinacia oleracea* L. (Báthori a kol., 1982; Grebenok a kol., 1991). Ve své diplomové práci se touto rostlinou podrobně zabývala Mašková (2016).



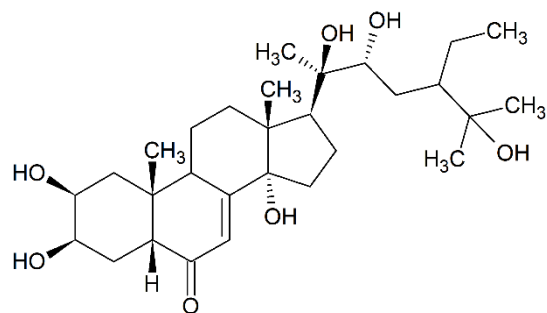
20-hydroxyekdyson (20E)



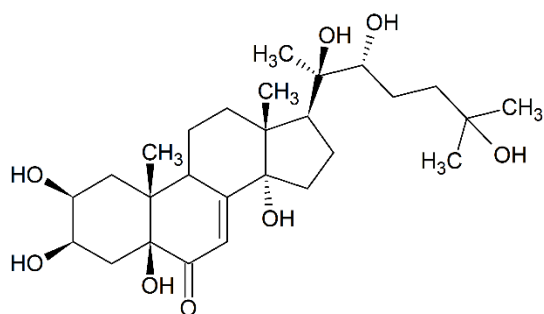
ajugasteron C (ajuC)



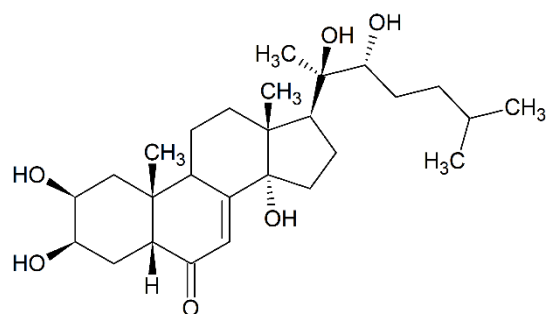
isovitexiron (iso)



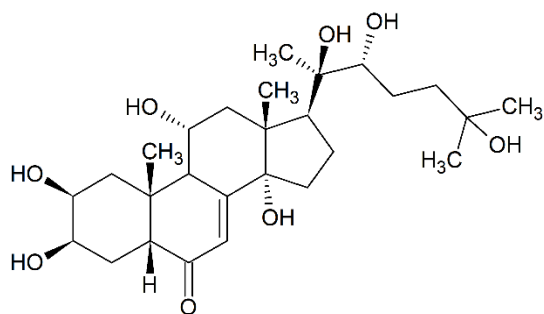
makisteron C (makC)



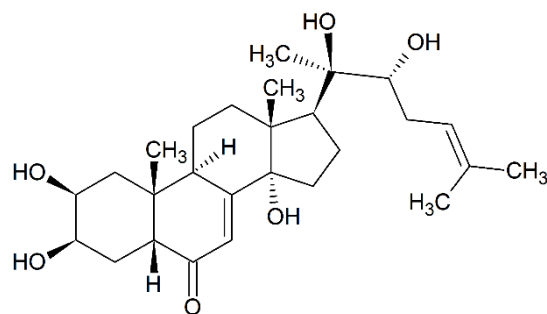
polypodin B (polB)



ponasteron A (ponA)



turkesteron (tur)



stachyteron C (stachC)

Obrázek 9: Přehled strukturních vzorců všech osmi fytoekdysteroidů (PEs), které jsou předmětem v této práci.

3.5 Metody extrakce a izolace fytoekdystreoidů

Prvním krokem vedoucím k izolaci a stanovení přírodních látek z biologického vzorku je obecně homogenizace. Tento krok bývá nezbytný pro rozbití buněčné stěny pletiva v rostlinném materiálu (Harrison, 2011). Pro účinnou extrakci látek nacházejících se zpravidla uvnitř rostlinných buněk, se v tomto kroku používá kulový mlýnek, případně předchází ještě homogenizace s přidáním tekutého dusíku ve třecí misce s tloučkem (Tarkowská a kol., 2014).

Po homogenizaci, následuje výběr vhodné metody pro izolaci a purifikaci vzorku. Jedním z možných přístupů využívaných za účelem purifikace PEs je extrakce kapalina-kapalina (LLE; *angl. liquid-liquid extraction*). Tímto způsobem dochází ke kvantitativní extrakci do rozpouštědla zvoleného podle vlastností extrahovaných analytů, s cílem odstranit převážnou část polárních a nepolárních nečistot. Nevýhodou tohoto přístupu je tvorba emulzí a relativně vysoká spotřeba rozpouštědel (Lafont a Dauphin-Villemant, 2005).

Vzhledem k tomu, že PEs tvoří skupinu poměrně polárních sloučenin, provádí se jejich extrakce do polárního rozpouštědla. Často je používán např. metanol (MeOH), jehož alternativou může být jeho vodná směs, etanol (EtOH), aceton, anebo acetonitril (ACN). Efektivita extrakce analytu do rozpouštědla závisí na polaritě vzorku, typu kontaminantů, které mají být odstraněny, lokalizaci a rozsahu v jakém je spojován s jinými sloučeninami v pletivech. Zvolené extrakční rozpouštědlo musí účinně extrahovat analyt a minimalizovat přítomnost rušivých látek, zároveň je třeba zajistit chlazení, aby nedocházelo během procesu k degradaci vzorku (Hillman, 1978; Lafont a Dauphin-Villemant, 2005).

V minulosti byla při odstraňování polárních nečistot používána metoda protiproudé extrakce (*angl. counter-current distribution*; CCD) mezi 1-butanol a vodu (Horn a Bergamasco, 1985). V roce 1954 použili Butenand a Karlson tuto metodu pro purifikaci ECs z kukel bource morušového *Bombyx mori*. Jako extrakční rozpouštědla byla použita směs butanol/cyklohexan/voda (6:4:10 v/v/v). Tato metoda umožňovala rozlišení dvou odlišných frakcí E a 20E z velkého množství v tomto případě živočišného materiálu (Lafont a Dauphin-Villemant, 2005).

Pro izolaci PEs je možné také využití chromatografických metod pracujících na principu dělení LLE. Metoda kapkové protiproudé chromatografie (*angl. droplet counter-current chromatography*, DCCC) umožňuje účinný způsob purifikace vzorků v řádech několika dnů. Za vhodných podmínek je s jejím využitím možné získat i čisté PEs (Kubo a kol., 1986). Novější alternativou DCCC je vysoce rychlostní protiproudá chromatografie, která umožňuje separaci již v řádu několika hodin. Principem je, kapalná stacionární fáze vytlačována na koloně kapalnou mobilní fází (MF) působením odstředivé síly (Ito, 1986).

Pro izolaci PEs je možné dále použití nízkotlaké kolonové chromatografie. Používá se buď v systému normálních fází, kdy je sorbentem např. silikagel nebo alumina gel, anebo v systému obrácených fází (*angl.* reversed phase, RP). V tomto případě pak slouží jako sorbent nejčastěji lineárními alkyly (C₁₈) modifikovaný silikagel nebo polymerní pryskyřice. Získané frakce je pak dále nutné separovat a analyzovat. Pro rychlé vyčištění malých vzorků lze využít stříkaček RP-HPLC, které obsahují malé množství (0,2-1 g) sorbentu.

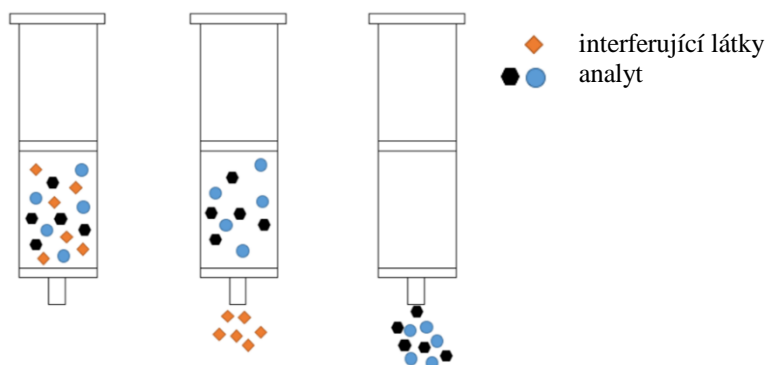
Popsané přístupy jsou stále častěji nahrazovány extrakcí na pevné fázi (*angl.* solid-phase extraction, SPE). Tato metoda má v porovnání s jinými řadu výhod, např. snížení spotřeby organických rozpouštědel, zvýšení výtěžnosti, vyšší citlivost i menší časovou náročnost (Moors a kol., 1994; Tarkowská a kol., 2014).

3.5.1 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Tato metoda je široce využívanou technikou používanou k přečištění a zakoncentrování vzorků v laboratořích nejrůznějšího zaměření. Cílem této metody je snížení množství interferujících látek a nečistot ze vzorků, a tím získání co nejčistšího vzorku analytu. Využívá rozdělení složek vzorku mezi kapalnou a pevnou fází působením nepolárních, polárních anebo iontových interakcí. Vzorek je přiveden do kontaktu s pevným sorbentem, který je umístěn buď v koloně nebo na disku. Použitý sorbent je přizpůsobován vlastnostem analytu tak, aby měl analyt vyšší afinitu k sorbentu než k rozpouštědлу, ve kterém je před izolací rozpuštěn. Sorbentem zachycený analyt je následně uvolněn vhodným elučním činidlem a následně analyticky stanoven (Obr. 10). V zásadě rozlišujeme SPE na normální fázi, kdy je sorbent polární, a častěji využívanou RP, kde je sorbent nepolární povahy.

Průběh SPE:

- Aktivace
- Ekvilibrace
- Adsorpce vzorku
- Promytí
- Eluce analytu



Obrázek 10: Obecné schéma metody extrakce na pevné fázi (SPE). Převzato a upraveno z chem.libretexts.org.

Pro izolaci PEs je používána RP, která zadržuje molekuly pomocí nepolárních hydrofobních interakcí. Typicky používaným sorbentem pro polární látky je polyamid, jehož výhodou je, že jsou z něj PEs eluovány dříve než znečišťující látky – fenolické látky, pigmenty apod. čímž je sníženo riziko další kontaminace na minimum (Báthori, 2002).

Pro účel této diplomové práce byla jako sorbent v SPE na RP použita polyamidová pryskyřice (DPA-6S), která je navržena pro odstranění hlavních kontaminantů rostlinných extraktů obsahujících COOH a OH skupiny (polyfenoly, chlorofyl, karotenoidy, huminové kyseliny a další), námi analyzované PEs (Obr. 9) prošly kolonkou bez záchytu. Pro srovnání SPE s jinou metodou se nabízí použití relativně nového přístupu *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe* (QuEChERS) využívající purifikaci na bázi disperzní SPE (dSPE). Jak napovídá i překlad názvu, přináší dSPE oproti klasické SPE několik výhod. Umožňuje analýzu většího množství vzorků při použití minimálního množství rozpouštědla, přesné výsledky, a navíc redukuje komplikované a časově náročné analytické kroky (Anastassiades a kol., 2003). Mezi dalšími ještě například odpadá nutnost použití tlakových zařízení, není nutné předem aktivovat ani kondicionovat kolonky, čímž se zkracuje doba přípravy vzorku a snižuje cena (Kydličková, 2016; Rejczak a Tuzimski, 2015).

3.5.2 Izolace a purifikace disperzní SPE, QuEChERS

Přístup QuEChERS byl popsán v letech 2001-2002 německo-kyperským chemikem Michelangelem Anastassiadem a americkým vědcem Stevenem J. Lehotayem (Anastassiades a kol., 2003a). Původně byla metoda vyvinuta pro veterinární analýzu, především anthelmintik a tyreostatik ve zvířecích tkáních. Metoda QuEChERS a její modifikace se rychle vyvíjejí nad rámec původního rozsahu aplikace, především při analýze pesticidů v rostlinných pletivech. Možnost zavedení modifikací založených na aplikaci různých rozpouštědel, solí, pufrů a sorbentů umožňuje QuEChERS implementovat do analýzy širokého spektra analytů a matric. Simultánní analýza může být provedena pro stovky látek pomocí systémů plynové chromatografie (GC) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS/MS) a kapalinové chromatografie taktéž ve spojení s tandemovou MS (LC-MS/MS; Anastassiades a kol., 2003). Rozsah aplikací tohoto analytického přístupu se neustále rozšiřuje, čemuž odpovídá i narůst počtu studií. Pro svou variabilitu a charakter by měl QuEChERS být považován spíše za koncept přípravy vzorku (metodiky), než za samostatnou metodu (Knydličková, 2016; Rejczak a Tuzimski, 2015).

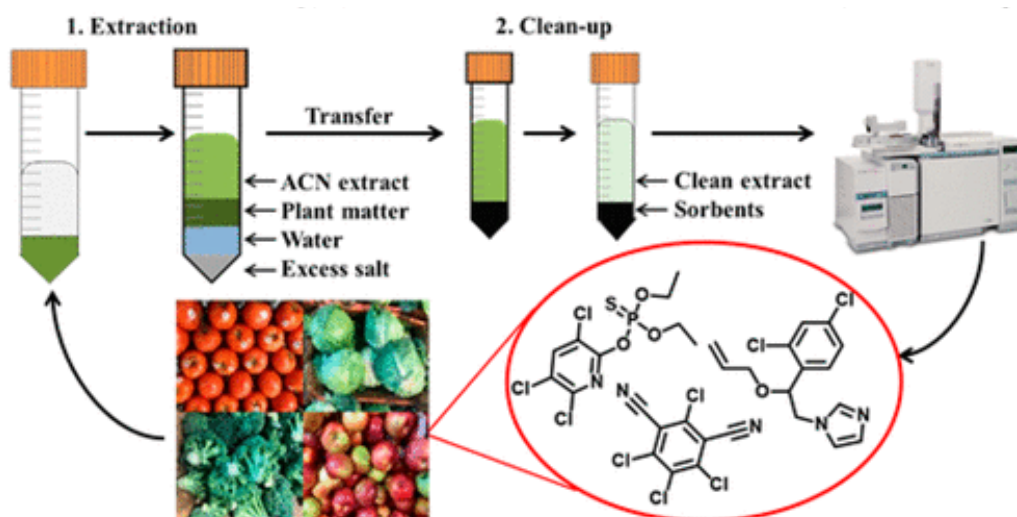
Nedávné pokroky v separaci a detekci poskytované nástroji ultravysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) nebo i GC-MS/MS umožňují analýzu při vhodných detekčních limitech

bez intenzivní přípravy vzorku. Nevýhodou může být vyšší nákladovost požadovaného vybavení pro stanovení analytů, nicméně schopnost simultánní detekce tak rozsáhlého množství analytů, kombinovaná s výhodami postupu přípravy vzorků QuEChERS, dělá celkovou analýzu efektivní i po stránce nákladové (Rejczak a Tuzimski, 2015).

Samotný postup přístupu QuEChERS zahrnuje v zásadě čtyři po sobě následující kroky využívající princip LLE a dSPE (Kydličková, 2016; Majors, 2007).

Postup metodiky přístupu QuEChERS:

- Extrakce vzorku
- Rozdělení fází
- Třepání a centrifugace
- Přečištění pomocí dSPE a centrifugace

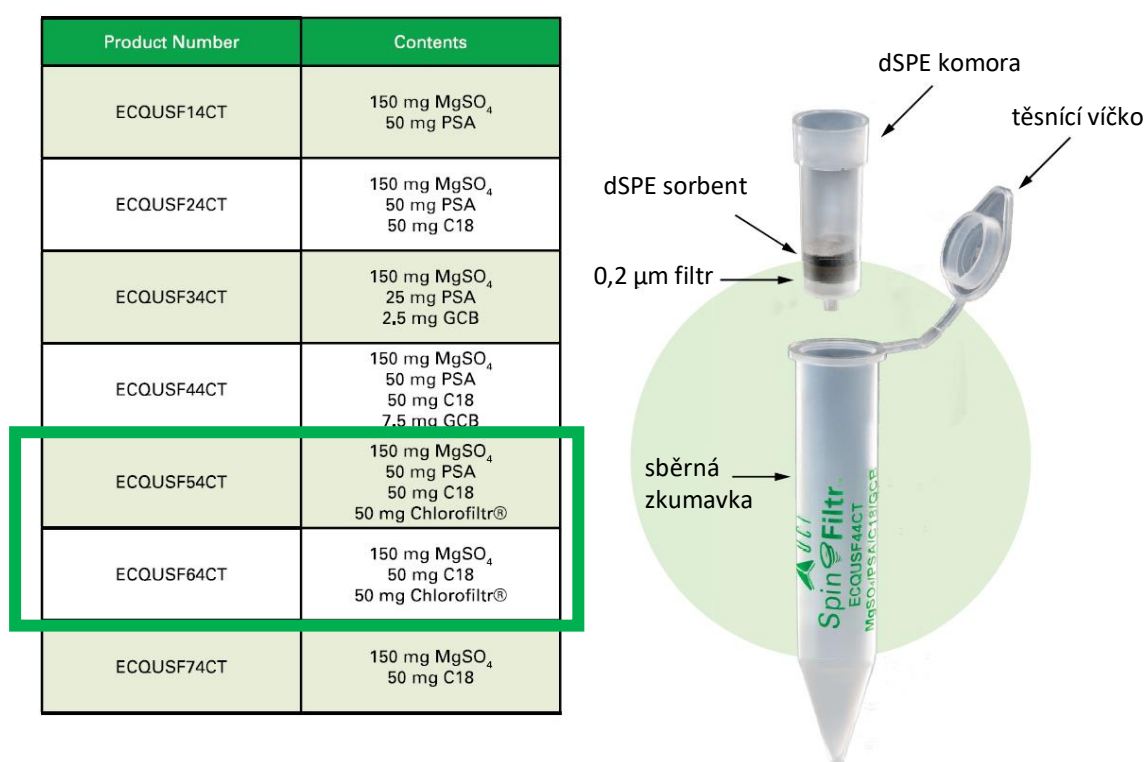


Obrázek 11: Schéma přípravy vzorku metodickým přístupem QuEChERS. Převzato z Hengel a kol., 2020.

Principem je použití vysoké koncentrace soli, která efektivně donutí přejít hydrofobní látky z předem důkladně homogenizovaného vzorku do organického rozpouštědla, které je ke vzorku přidáno. V případě, že vzorek obsahuje méně než 25 % vody, je nutné přidání vody (často ve velkém nadbytku vůči rozpouštědлу).

Počátečním krokem je extrakce vzorku, kdy jako rozpouštědlo bývá nejčastěji používán ACN, dále také etyl acetát nebo aceton. K extraktu je přidána sůl, přičemž nejvhodnější poměr síranu hořečnatého a chloridu sodného navržený autory pro krok rozdělení je 4: 1 (Anastassiades a kol., 2003). Bezvodý $MgSO_4$ je výborným sušidlem a při jeho hydrataci dochází k exotermní reakci, což má za následek zvýšení účinnosti extrakce. Teplota vzorku se může zvýšit až na 40 °C (Diéz a kol., 2006). Po centrifugaci se

vytvoří jednotlivé vrstvy, kde nejsvrchnější je vrstva ACN extraktu, pod ní zbytky rostlinných materiálů, vodná fáze a u dna je vrstva soli (Obr. 11). V dalším kroku využíváme principu dSPE, extrakt je přenesen do dSPE zkumavky (Obr. 12) obsahující vhodně zvolené dSPE sorbenty pro záchyt interferentů (Knydlíčková, 2016; Rejczak a Tuzimski, 2015). Sorbent v kroku purifikace nutné zvolit tak, aby zadržoval nežádoucí společně extrahované sloučeniny z matrice a umožnil analytům setrvat kapalně fázi ve sběrné zkumavce (Majors, 2013; Obr. 11 a 12). Ve fázi dSPE purifikace jsou hlavními otázkami k řešení typ, množství sorbentů a jejich selektivita (Anastassiades a kol., 2003; Anastassiades, 2006; Lehotay a kol., 2010).



Obrázek 12: Zkumavka typu Spinfiltr® pro metodu QuEChERS a její součásti, zelený rámeček ohraničuje konkrétní typy dSPE sorbentů použitých v experimentální části této práce, konkrétně pro postupy B a C. Kromě sorbentů v rámečku proveden i postup A obsahující směs sorbentů: 150 mg MgSO₄; 50 mg PSA a 50 mg Chlorofiltr®. Převzato a upraveno z Informační brožury QuEChERS [online].

Mezi druhy dSPE sorbentů se v přístupu QuEChERS používá často tzv. primární sekundární amin (*angl.* primary secondary amine, PSA). Jeho hlavní funkcí je odstranění mastných kyselin, organických kyselin, cukrů a iontových lipidů a některých pigmentů z extraktu, to dělá PSA vhodným pro různé rostlinné druhy (Anastassiades a kol., 2003).

Dalším sorbentem, který je vhodný pro purifikaci karotenoidů, chlorofylu a sterolů je C18 sorbent. Odstraňuje z extraktu mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, nepolární interferenty a poskytuje dobré výsledky při purifikaci vzorků s výrazným podílem tuků a vosků (Katalog firmy UCT [online]; Lehotay a kol., 2005). Jeho nevýhodou je ztráta planárních analytů.

Standartním sorbentem, který bývá používán pro odstraňování pigmentů z extraktu je grafitizovaný uhlík (*angl.* graphitized carbon black, GCB). Sorbent GCB je pro odstranění chlorofylu z rostlinného extraktu dostatečně účinným, ale jeho nevýhodou je, že může zachycovat i některé planární analyty. Z toho důvodu byl firmou United Chemical Technologies (UCT) vyvinut alternativní sorbent ChloroFiltr[®] založený na polymeru, který je určen výlučně pro odstranění chlorofylu z acetonitrilových extraktů. (Katalog firmy UCT [online]; Popis produktu a technických parametrů u QuEChERS zkumavky [online]).

V našem případě byly pro experiment v této práci vybrány směsi sorbentů MgSO₄, C₁₈, PSA a Chlorofiltr[®]. Pro optimalizaci extrakce a izolace byl záměrně vybrán rostlinný materiál špenátu setého *Spinacia oleracea L.* s vysokým obsahem pigmentů a merlíku čilského *Chenopodium quinoa*, jehož 4-denní semenáčky obsahují v porovnání se špenátem výrazně méně pigmentů. Konkrétní množství sorbentů a extrakčních činidel shrnuje Tab. 2; v podkapitole 4.4.3 Extrakce a izolace metodou dSPE, QuEChERS.

3.6 Metody stanovení fytoekdysteroidů

V dnešní době se pro stanovení PEs jeví nejvýhodněji použití moderní chromatografické metody UHPLC. Separace je založena principu rozdělování látek mezi kapalnou (mobilní) a pevnou (stacionární) fází. Lze ji použít jak pro preparativní účel, kdy jsou připravovány čisté PEs, tak pro analytickou chromatografii, kde je určována identita a koncentrace PEs ve směsi. Při porovnání s jinými přístupy je UHPLC výhodná pro rychlost, přesnost a zejména schopnost detekovat i velmi malé množství PEs (citlivost metody). S ohledem na zvýšený tlak (100 MPa), který je pro tento systém zapotřebí bylo zvoleno činidlo ACN, který je méně viskózní a tedy vhodnější v porovnání s MeOH.

Pro stanovení PEs lze použít ale i další metody. Například Demlová ve své bakalářské práci v roce 2015 kvantifikovala 5 vybraných PEs v 49 rostlinných druzích a jejich částech (celkem 83 částí rostlin) s využitím metody micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Jedná se o elektromigrační metodu na principu separace molekul PEs ve formě micel (vytvořené pomocí detergentu dodecyl síranu sodného; SDS) separujících se v elektrickém poli. Nejabundantnější PEs byl detekován u přibližně 75 % zkoumaných rostlin. Výsledkem bylo zjištění, že se tato metoda jeví jako vhodná pro stanovení PEs

ve vzorcích s jejich vysokým obsahem. Výhodou této metody v porovnání s LC/MS je zkrácení analýzy protože není nutné provést SPE purifikaci (Demlová, 2015; Large a kol., 1992; Davis a kol., 1993).

V roce 2016 použila Mašková pro stanovení a detekci PEs v rostlinách špenátu setého *Spinacia oleracea* L. metodu superkritické fluidní chromatografie ve spojení s UV/MS detekcí (SFC-UV-MS). Tato metoda používá jako MF superkritickou kapalinu (stlačený plyn – CO₂). Na podobném principu funguje i GC, důvodem proč se od této metody ustupuje je nutnost derivatizace vzorku, která u SFC není nutná (Lafont a Dauphin-Villemant, 2005).

V minulosti byla pro stanovení PEs použita také metoda tenkovrstevné chromatografie (*angl.* thin layer chromatography; TLC) s detekcí pomocí ultrafialové denzitometrie (TLC-UV). Po optimalizaci MF byla zvolena směs obsahující benzen, chloroform a MeOH. Při detekci využili znalost absorpance PEs v rozsahu UV spektra při 254 nm (Báthori a Kalász, 2001; Lafont a kol., 2012). Dále lze pro detekci použít i detektor diodového pole, který umožňuje odečítat absorpční spektra všech eluovaných píků. Pro stanovení struktury PEs lze s úspěchem použít metodu NMR (Lafont a kol., 2012).

Je možné i použití imunoanalytických metod analýzy pracujících na odlišném principu ve srovnání s výše vypsány. V tomto případě bývají používány protilátky získané imunizací zvířat (Lafont et al., 2012). Pro stanovení koncentrace PEs v extraktech rostlin nebo byly dříve používány i různé druhy *in vitro* a *in vivo* biotestů (Butenand a Karlson, 1954). Ty zároveň sloužily i pro stanovení relativní biologické aktivity různých PEs (Lafont a kol., 2012).

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie

Acetonitril HPLC LC-MS grade (Merck KGaA, USA)

Destilovaná a redestilovaná voda (Aquaosmotic Tišnov, ČR)

Hnojivo Kristalon™ Start (Agro CS a.s., ČR)

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, Německo)

Isopropanol HPLC LC-MS grade (Merck KGaA, Německo)

Kyselina mravenčí LC-MS grade ($\geq 99\%$; Chromasolv®, Velká Británie)

Metanol HPLC LC-MS grade (Merck KGaA, Německo)

Síran hořečnatý (Merck KGaA, Německo)

Standardy:

20-hydroxyekdyson (20E; Sigma-Aldrich, Německo; ÚOCHB AV ČR, v.v.i., ČR)

ajugasteron C (ajuC; ÚOCHB AV ČR, v.v.i., ČR)

isovitexiron (iso; ÚOCHB AV ČR, v.v.i., ČR)

makisteron C (makC; ÚOCHB AV ČR, v.v.i., ČR)

polypodin B (polB; Sigma-Aldrich, Německo; ÚOCHB AV ČR, v.v.i., ČR)

ponasteron A (ponA; Sigma-Aldrich, Německo; ÚOCHB AV ČR, v.v.i., ČR)

stachyteron C (stachC; ÚOCHB AV ČR, v.v.i., ČR)

turkesteron (tur; ÚOCHB AV ČR, v.v.i., ČR)

4.2 Rostlinný materiál

Pro účely této diplomové práce bylo použito celkem 14 rostlinných druhů nebo jejich částí uvedených v Tab. 1A. V tabulce je zaznamenán jak rostlinný materiál získaný již dříve a uchovaný na pracovišti v hlubokomrazicím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, tak materiál odebraný autorkou této práce (označeno symbolem „a“). Data sběru již uloženého materiálu je zaznamenán v Tab. 1B. Špenát setý *Spinacia oleracea* L. a merlík čilský *Chenopodium quinoa* byly kultivovány ze semen na Ústavu rostlinné výroby v.v.i. (viz kapitola 4.4.1 Kultivace rostlinného materiálu). Všechny materiál – kromě kapslí rozchodnice růžové – byl extrahován za použití čerstvé hmoty pletiva (FW).

Tabulka 1A: Seznam analyzovaných rostlin.

Název rostliny	Čeleď	Část rostliny
Zběhovec plazivý (<i>Ajuga reptans</i>) ^a	hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>)	kořen, stonek, květy
Yzop lékařský (<i>Hyssopus officinalis</i>)	hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>)	květ, bez květů
Rozchodnice růžová (<i>Rhodiola rosea</i>) ^a	tlusticovité (<i>Crassulaceae</i>)	extrakt v kapslích
Hadinec obecný (<i>Echium vulgare</i>) ^a	brutnákovité (<i>Boraginaceae</i>)	kořen, list+stonek, květy
Měsíček lékařský (<i>Calendula officinalis</i>)	hvězdnicovité (<i>Asteraceae</i>)	semeno, list, květy
Rakytník řešetlákový (<i>Hippophae rhamnoides</i>)	hlošínovité (<i>Elaeagnaceae</i>)	list, plod
Šalvěj lékařská (<i>Salvia officinalis</i>)	hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>)	list, květy
Heřmáněk lékařský (<i>Matricaria chamomilla</i>)	hvězdnicovité (<i>Asteraceae</i>)	list, květy
Hluchavka bílá (<i>Lamium album</i>)	hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>)	list, květy
Levandule (<i>Lavandula</i>)	hluchavkovité (<i>Lamiaceae</i>)	listy+květy
Kustovnice čínská (<i>Lycium chinense</i>)	lilkovité (<i>Solanaceae</i>)	listy+květy
Parcha saflorová (<i>Leuzea carthamoides</i>)	hvězdnicovité (<i>Asteraceae</i>)	kořen, list
Špenát setý (<i>Spinacia oleracea</i> L.) - kultivar New Japan, Japonsko	laskavcovité (<i>Amaranthaceae</i>)	semenáčky 15 DAG
Merlík čilský (<i>Chenopodium quinoa</i>) - kultivar Refineria, Bolívie	laskavcovité (<i>Amaranthaceae</i>)	semenáčky 4 DAG

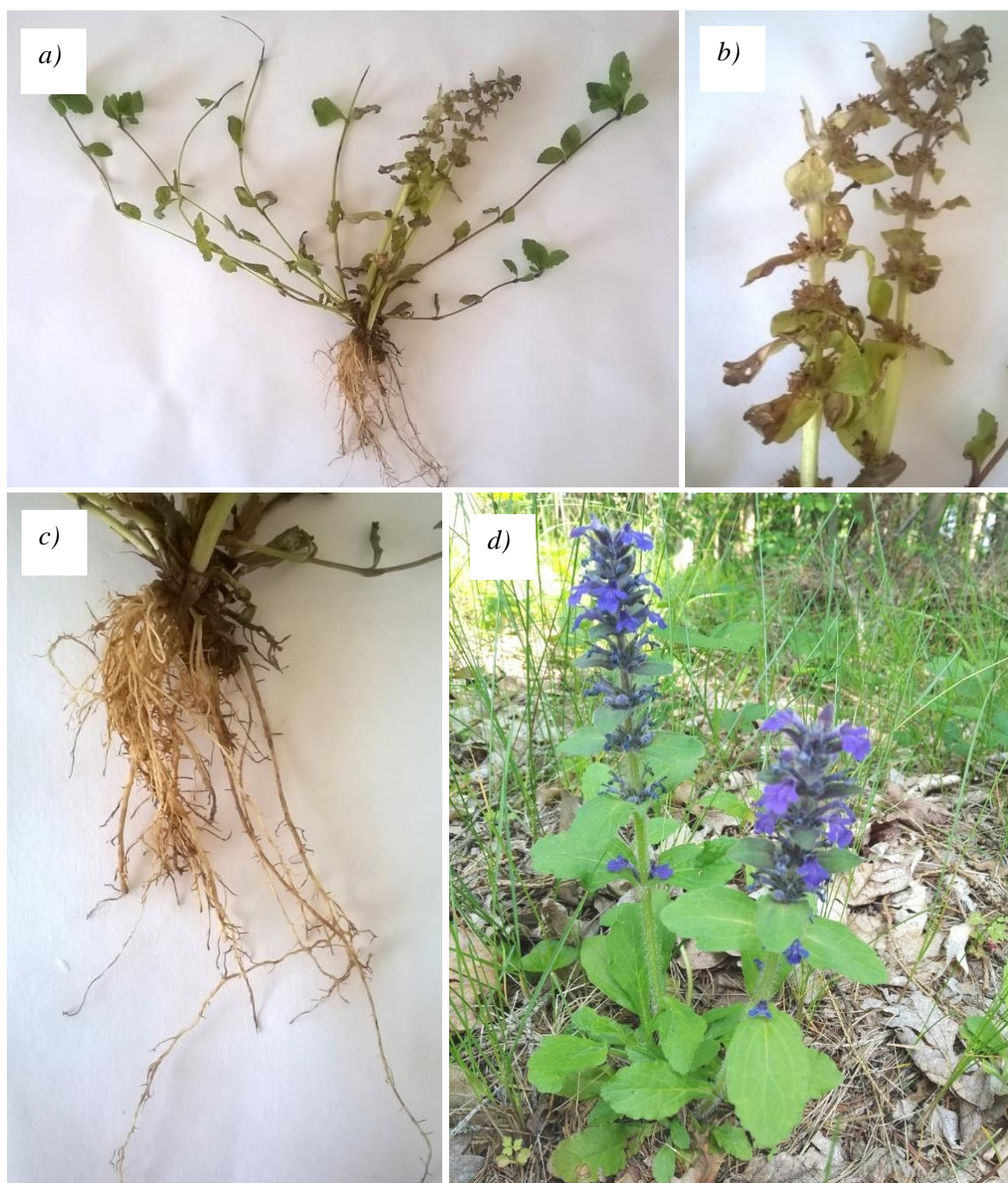
^a – rostlinný materiál odebraný autorkou práce; DAG – počet dnů od zasetí

Tabulka 1B: Datum sběru již dříve sebraných rostlin z mrazicího boxu.

Název rostliny	Datum sběru
Měsíček lékařský (<i>C. officinalis</i>)	9. 10. 2014
Rakytník řešetlákový (<i>H. rhamnoides</i>)	2. 10. 2014
Šalvěj lékařská (<i>S. officinalis</i>)	24. 9. 2014
Heřmáněk pravý (<i>M. chamomilla</i>)	9. 10. 2014
Hluchavka bílá (<i>L.m album</i>)	19. 9. 2014
Levandule (<i>Lavandula</i>)	2. 10. 2014
Kustovnice čínská (<i>L. chinense</i>)	4. 10. 2014
Parcha saflorová (<i>L. carthamoides</i>)	4. 10. 2012

4.2.1 Zběhovec plazivý

Zběhovec plazivý *Ajuga reptans*, byl sesbíráán autorkou práce na slunném zahradním stanovišti v Konici dne 31. 5. 2018. Na tomto stanovišti se již rostlina bohužel nacházela ve fázi odkvětu (viz fotografie na Obr. 13a-c). Z místa sběru byla rostlina v obou případech převezena do laboratoře, kde byla rozdělena na tři části: kořeny, stonky s listy a květní část. Jednotlivé části byly uloženy ve skříňovém mrazicím boxu při -80 °C do doby analýzy.



Obrázek 13: Zběhovec plazivý *Ajuga reptans*, celá rostlina před rozdělením (a), detail nadzemní části v odkvětu (b) a kořen (c). Kvetoucí rostlina zběhovce (d).

4.2.2 Extrakt rozchodnice růžové

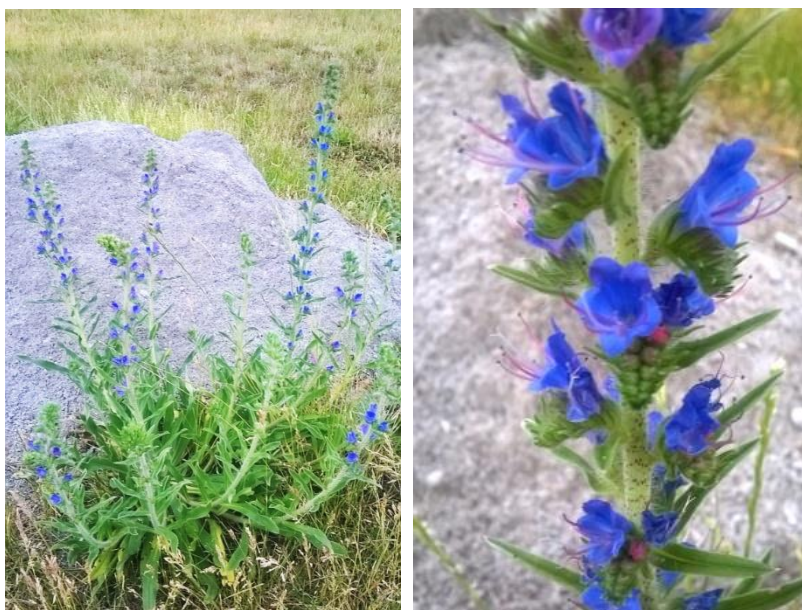
Extrakt rozchodnice růžové *Rhodiola rosea* byl získán z volně dostupného doplňku stravy Rhodiola BIO ESSENCE (Obr. 14), který dle údajů výrobce obsahuje 100 mg extraktu rozchodnice růžové *Rhodiola rosea* v jedné kapsli. Pro účely této práce byl použit pouze sypký obsah získaný smísením obsahu 10 kapslí, z nichž bylo navažováno množství 25 mg ve třech technických opakováních.



Obrázek 14: Doplňěk stravy Rhodiola BIO ESSENCE

4.2.3 Hadinec obecný

Hadinec obecný *Echium vulgare* byl odebrán autorkou práce na suché louce (Olomouc-Horní lán) dne 29. 5. 2018 (Obr. 15). Z místa sběru byla rostlina převezena do místa bydliště, omyta a rozdělena na listy se stonkem, květní část a kořen. Poté byla uskladněna v mrazničce při teplotě -20 °C do následujícího dne, kdy byla uložena ve skříňovém mrazicím boxu při teplotě -80 °C a skladována do doby analýzy.



Obrázek 15: Hadinec obecný *Echium vulgare* celá rostlina (vlevo), detail kvetoucí nadzemní části rostliny (vpravo).

4.3 Přístroje a materiál

Analytické váhy Ohaus Explorer Analytical EX224 (OHAUS Europe GmbH; Švýcarsko)

Centrifuga VWR MICRO STAR 12 – přístroj pro centrifugaci vzorků (VWR, Německo)

Centrifugační nylonové filtry (Pall Co., USA; velikost pórů 0,2 µm)

Centrifugační zkumavky 50ml (Biofil, Čína)

Dewarova nádoba KL7 (Worthington Industries, Inc.; USA)

Expandovaný perlit EP AGRO (Perlit spol. s.r.o., Šenov u Nového Jičína),

Filtrační mikrozukavky 2ml s microspin filtry 0,2 µm (GraceDavison discovery science, USA)

Filtrační papír

Hmotnostní spektrometr Xevo[®] TQ MS (Micromass, Velká Británie)

Chladnička Liebherr 269L (Liebherr, Švýcarsko)

Infrared Digital Vortex Mixer TX4 (VELP Scientifica, Itálie)

Kapalinový chromatograf Acquity[™] UPLC (Waters, USA)

Kolona Acquity UPLC[®] CSH[™] C₁₈; 2,1×50 mm; 1,7µm (Waters, Irsko)

Kolona Acquity UPLC[®] CSH[™] HSS T3; 2,1x50 mm; 1,8 μ m (Waters, Irsko)
Kolona Acquity UPLC[®] CSH[™] Phenyl-Hexyl; 2,1x50 mm; 1,7 μ m (Waters, Irsko)
Kolona Kinetex[®] EVO C₁₈; 2,1x50 mm; 1,7 μ m (Phenomenex, USA)
Kolona Luna[®] Omega PS C₁₈; 2,1x50 mm; 1,6 μ m (Phenomenex, USA)
Kónický insert s pružinkou (Supelco, USA)
Kuličky ZrO₂, 2 mm (Nést Radvance, Inc.; USA)
Kulový mlýnek MM 301; MM 400 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Německo)
laboratorní sklo: Petriho misky, porcelánová třecí miska s tloučkem kádinky, odměrné
baňky, odměrné válce
LC vialky (J.G. Finneran Associates, USA)
Mikrocentrifuga VWR MICRO STAR 12 (Thermo Electron LED GmbH, Německo)
Mikrozkumavky Eppendorf 2ml (Brand GmbH + Co KG, Německo)
Millipore Simplicity 185 – zařízení na přípravu ultračisté vody (Millipore, USA)
PH metr pH 700 (Eutech Instruments, Singapur)
QuEChERS 2ml kolonky CUMPSGG2CT (United Chemical, USA)
QuEChERS 4ml kolonky ECQUSF54CT (United Chemical, USA)
QuEChERS 4ml kolonky ECQUSF64CT (United Chemical, USA)
Rotátor Stuart SB3[®] (Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, Velká Británie)
Skříňový mrazicí box MDF-DU502VH-PE (PHCbi, Nizozemsko)
SPE kolonky Discovery[®] DPA-6S (50 mg/1 ml; Supelco, USA)
Špičky a pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
Úhlový rotor 6x50 ml; 30x1,5/2,0 ml (HERMLE Labortechnik GmbH, Německo)
Ultrazvuková lázeň BANDELIN SONOREX RK510 (Bandelin, Německo)
Vakuová komůrka Visiprep[™] – Supelco (Sigma Aldrich, Německo)
Vakuový rotační koncentrátor Acid Resistant Centrivap (Labconco, USA)
Vysokovýkonná centrifuga HERMLE Z36HK (HERMLE Labortechnik GmbH, Německo)
Zkumavky z borosilikátového skla 12x75 mm (FisherBrand, USA)

Růstová komora

Kultivační komora PSI (Photon Systems Instruments spol. s.r.o., Česká republika)

Software

MassLynx (verze 4.1, Waters, Manchester, Velká Británie)

MS Excel (verze 16.0.4966.1000, součást balíčku Microsoft[®] Office Professional Plus, 2016, USA)

4.4 Metody

Pro izolaci PEs z rostlinného materiálu byly použity dvě různé metody: SPE a QuEChERS. První z obou uvedených je purifikace metodou SPE, která byla provedena na celkem 12 rostlinných druzích (viz Tab. 1A, podkapitola 4.2 Rostlinný materiál). U zbývajících dvou druhů rostlin: špenátu setém *Spinacia oleracea* L. a merlíku čilském *Chenopodium quinoa* byly PEs purifikovány použitím metody QuEChERS (viz podkapitola 3.5.2 Izolace a purifikace disperzní SPE, QuEChERS). Po získání příslušných analytů byla provedena kvantitativní analýza PEs s využitím UHPLC-MS/MS. Naměřená data byla zpracována pomocí softwaru MassLynx, v2 4.2 a výsledky byly zpracovány do grafů v programu Microsoft Excel, verze 2016. Prezentované hodnoty představují vždy aritmetický průměr tří nezávislých měření.

4.4.1 Kultivace rostlinného materiálu

Pro účely této práce byl použit kultivar špenátu setého *Spinacia oleracea* L. New Japan a kultivar merlíku čilského *Chenopodium quinoa* Refineria původem z Bolívie. Oba byly získány z genové banky Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i.(VÚRV) .

Semena špenátu setého *Spinacia oleracea* L. byla kultivována na perlitu po dobu 15 dní v růstové komoře PSI (Photon Systems Instruments spol. s.r.o., Česká republika (VÚRV). Světelný režim v komoře byl nastaven na 14 h při intenzitě ozáření 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 10 h tmy. Nastavení teploty ve fyto komoře bylo 17 °C po dobu 16 h a po zbytek dne (8 h) byla teplota snížena na 14 °C. Po dobu kultivace byly rostliny zalévány roztokem Kristalon™ při ředění 1:1000 (10 g hnojiva na 10 l vody).

Semena merlíku čilského *Chenopodium quinoa* byla vyseta do Petriho misek na filtrační papír navlhčený destilovanou vodou. Kultivace probíhala opět v růstové komoře PSI (viz výše, VÚRV) po dobu 4 dní při intenzitě ozáření 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 23 °C při nastavení délky dne 10 h. Po zbylých 14 h dne byl nastaven režim tma, při snížené teplotě 15 °C.

Oba rostlinné materiály byly po kultivaci sesbírány do plastových zkumavek, označeny a uloženy ve skříňovém mrazicím boxu MDF-DU502VH-PE (PHCbi, Nizozemsko) při teplotě -80 °C.

4.4.2 Extrakce a izolace metodou SPE

Části rostlinných materiálů byly – kromě špenátu setého *Spinacia oleracea* L. a merlíku čilského *Chenopodium quinoa* – zhomogenizovány ve třecí misce pod tekutým dusíkem. Ze získaného homogenátu bylo do 2ml mikrozkušavek na laboratorních vahách Ohaus Explorer Analytical EX224 (OHAUS Europe GmbH; Švýcarsko) naváženo 25 mg FW ve třech technických replikátech.

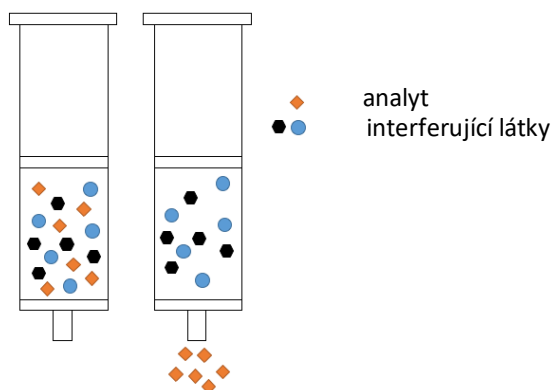
Ke každému vzorku byl přidán 1 ml 80 % MeOH vychlazeného na teplotu -20 °C a homogenizační kuličky ZrO₂ o průměru 2 mm pro účinnější extrakci. Vzorky byly umístěny do kulového mlýnku MM 400 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Německo), kde byly 3 minuty homogenizovány při frekvenci 27 Hz. Následně byly 5 minut extrahovány v ultrazvukové lázni BANDELIN SONOREX RK510 (Bandelin, Německo) a uloženy na dobu 60 minut při 17 rpm do laboratorního rotátoru Stuart SB3[®] (Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, Velká Británie) v lednici Liebherr 269L (Liebherr, Švýcarsko) při teplotě 4 °C. Nakonec byla provedena centrifugace vzorků při teplotě 4 °C a otáčkách 17000 rpm po dobu 10 minut centrifugou HERMLE Z36HK (HERMLE Labortechnik GmbH, Německo). Získaný supernatant byl odebrán do borosilikátové zkumavky, překryt alobalem a uskladněn v lednici při teplotě 4 °C.

Zbylý pelet v mikrozkušavkách byl reextrahován přidáním 1 ml 80 % MeOH a 5 minut ponechán v sonifikátoru a poté 30 minut na laboratorním rotátoru v lednici při 4 °C a otáčkách 17 rpm. Po reextrakci byly vzorky opět centrifugovány a supernatant získaný reextrakcí vzorků spojen s prvním podílem extrakce.

Spojený hrubý extrakt (2×1 ml) byl nanesením na SPE kolonku Discovery[®] DPA-6S (50 mg/1ml; Supelco, USA) zbaven pigmentů, listových barviv a dalších interferujících látek zatímco PEs procházely kolonkou do čisté borosilikátové zkumavky bez retence.

Postup SPE:

- Aktivace sorbentu kolonky nanesením 1 ml 100 % MeOH
- Ekvilibrace nanesením 1 ml 80 % MeOH
- Nanesení spojených supernatantů (2×1 ml)
- Sběr frakce do borosilikátových zkumavek



Obrázek 16: Schéma extrakce na pevné fázi. Převzato z <https://chem.libretexts.org/> a upraveno.

Sesbírané frakce vzorků po purifikaci byly v borosilikátových zkumavkách odpařeny dosucha při 37 °C ve vakuovém rotačním koncentrátoru Acid Resistant Centrivap (Labconco, USA).

Pro extrakci rostlinného materiálu a ekvilibraci SPE kolonek byl použit 80 % roztok MeOH, který byl připraven smícháním 200 ml destilované vody a 800 ml 100 % MeOH.

4.4.3 Extrakce a izolace metodou dSPE, QuEChERS

Semenáčky (15 DAG) špenátu *Spinacia oleracea* L. a merlíku čilského *Chenopodium quinoa* (4 DAG) byly zhomogenizovány tloučkem ve třecí misce pod tekutým dusíkem. Ze získaného homogenátu bylo do 2ml mikrozkušavek na laboratorních vahách Ohaus Explorer Analytical EX224 (OHAUS Europe GmbH; Švýcarsko) naváženo množství 5 mg FW ve třech technických replikátech.

Předem byla připravena extrakční směs ACN a isopropanolu (iPrOH) v poměru 9:1 smísením 900 ml 100 % ACN a 100 ml 100 % iPrOH vychlazená na -20 °C. Ke každému vzorku homogenátu byl přidán buď 1 ml 100 % ACN (**protokol 1**; P1) anebo 1 ml extrakční směsi ACN:iPrOH 9:1 (**protokol 2**; P2 viz Tab. 2). Pro účinnější extrakci byly ke každému vzorku přidány 2-3 homogenizační kuličky z ZrO₂ o průměru 2 mm. Vzorky byly umístěny do kulového mlýnku MM 301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Německo), kde byly při frekvenci 27 Hz homogenizovány po dobu 3 minut. Následně byly 5 minut sonifikovány

v ultrazvukové lázni BANDELIN SONOREX RK510 (Bandelin, Německo) a uloženy do laboratorního rotátoru Stuart SB3® (Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, Velká Británie), kde byly při teplotě 4 °C a otáčkách 17 rpm extrahovány přes noc. Nakonec byla provedena centrifugace vzorků centrifugou HERMLE Z36HK (HERMLE Labortechnik GmbH, Německo) při teplotě 4 °C a otáčkách 10000 rpm po dobu 10 minut.

Zatímco byly vzorky centrifugovány, bylo do nových 2ml mikrozkušavek naváženo 400 mg síranu hořečnatého a 100 mg chloridu sodného. Po centrifugaci byl supernatant přidán do mikrozkušavek k předem navážené směsi MgSO₄ a NaCl. Vzorky byly umístěny do kulového mlýnku, kde byly intenzivně třepány 1 minutu při frekvenci 15 Hz. Poté byly vzorky centrifugovány (10000 rpm při teplotě 4 °C) po dobu 5 minut. Získaný supernatant byl purifikován v příslušných dSPE zkumavkách QuEChERS s vybranou směsí sorbentů podle typu postupu (A, B a C; viz Tab. 2). Postup D, resp. **protokol 3** je podrobněji popsán v předchozí podkapitole 4.4.2 Extrakce a izolace metodou SPE.

*Tabulka 2: Přehled složení dSPE a SPE sorbentů ve zkumavkách a extrakčních roztoků použitých pro izolaci fytoekdysteroidů ze vzorků špenátu setého *Spinacia oleracea* L. a merlíku čilského *Chenopodium quinoa*.*

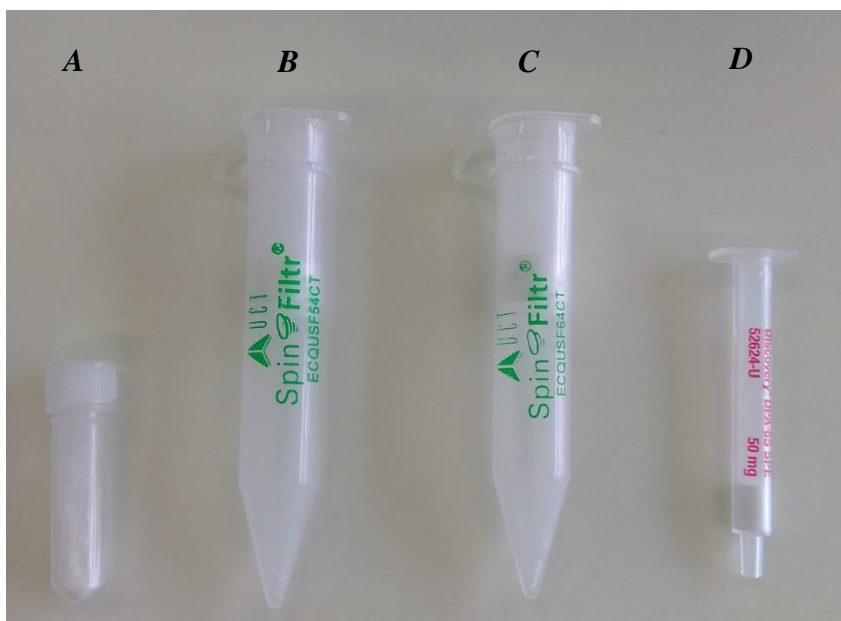
Postup	A	B	C	D
Druh metody	dSPE	dSPE	dSPE	SPE
Složení sorbentů	MgSO ₄ (150 mg) PSA (50 mg) Chlorofiltr® (50 mg)	MgSO ₄ (150 mg) PSA (50 mg) Chlorofiltr® (50 mg)	MgSO ₄ (150 mg), Chlorofiltr® (50 mg), EEC18 (50 mg),	polyamidová pryskyřice DPA-6S
Protokol 1	100% ACN	100% ACN	100% ACN	
Protokol 2	ACN:iPrOH (9:1)	ACN:iPrOH (9:1)	ACN:iPrOH (9:1)	
Protokol 3				80% MeOH

Pro **postup A** byl získaný supernatant z předchozího kroku přenesen do 2ml QuEChERS zkumavky (Obr. 17A), ve které byl 1 minutu intenzivně třepán při frekvenci 15 Hz na kulovém mlýnku, poté byly vzorky v QuEChERS zkumavkách centrifugovány 5 minut při 4500 rpm a teplotě 4°C.

Pro **postupy B a C** bylo nutné přenést sypký dSPE sorbent z dSPE komory QuEChERS zkumavek (Obr. 17B, C) do 2ml mikrozkušavek, aby bylo možné je umístit do kulového mlýnku. Ve 2ml mikrozkušavkách byl získaný supernatant z předchozího kroku intenzivně třepán s dSPE sorbentem (1 minutu při frekvenci 15 Hz).

Poté byly vzorky, obdobně jako při postupu A, centrifugovány 5 minut při 4500 rpm a teplotě 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant přenesen do 4ml QuEChERS zkumavek, ve kterých byl centrifugován 2krát 5 minut při 4500 rpm a 4 °C dokud nebyl zcela přefiltrován (přes 0,2mm filtr) do sběrné zkumavky.

Směs standardů byla předem připravena smísením jednotlivých standardů PEs a 100% MeOH.



Obrázek 17: Druhy zkumavek použitých pro izolaci fytoekdysteroidů ze špenátu setého *Spinacia oleracea* L. a merlíku čilského *Chenopodium quinoa*. Zleva dSPE zkumavky pro postup A, B a C metody QuEChERS. Úplně napravo je SPE kolonka pro postup izolace D. Písmena v horní části odpovídají použitému postupu izolace fytoekdysteroidů.

Získané frakce byly po izolaci podle příslušných postupů A, B a C přeneseny ze sběrných zkumavek QuEChERS do borosilikátových zkumavek, ve kterých byly ve vakuovém rotačním koncentrátoru Acid Resistant Centrivap (Labconco, USA) odpařeny dosucha při 37 °C.

Slepé vzorky sestávaly ze směsi standardů a příslušného množství 100 % MeOH. Při přípravě slepých vzorků bylo ředění standardů upraveno pro každý postup zvlášť. Slepé vzorky pro postup A byly připraveny ze standardů o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol \cdot l $^{-1}$, v každém z nich bylo látkové množství 100 pmol každého z osmi PEs. Pro přípravu slepých vzorků pro postupy B, C a D byla použita koncentrace standardů PEs $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$. Látkové množství ve slepých vzorcích postupu B, C a D bylo 75 pmol každého PEs. Při rekonstrukci odparku v 50 µl 100 % MeOH a nástřiku 2 µl bylo látkové množství ve slepém vzorku pro postup A 4 pmol, pro postup B, C a D 3 pmol.

4.4.4 Kvantifikace fytoekdyteroidů pomocí UHPLC MS/MS

Kvantitativní analýza na bázi LC-MS byla provedena u osmi následujících PEs: 20E, polB, stachC, ponA, ajuC, isovitexiron (iso), tur a makC. Sestava LC-MS pro tyto účely se skládala z kapalinového chromatografu spojeného s hmotnostním spektrometrem. Data byla vyhodnocena pomocí softwaru MassLynx. Separace osmi vybraných PEs byla provedena pomocí binárního gradientu tvořeného ACN (mobilní fáze A) a 10 mM kyselinou mravenčí ve vodě (mobilní fáze B) na UHPLC koloně obsahující polymerní sorbent typu C18 s pozitivním nábojem (Acquity UPLC® CSH™, C18; 2,1×50 mm; 1,7µm (Waters, Irsko) dle programu uvedeného v Tab.3 při průtoku 0,3 ml/min.

Tabulka 3: Program gradientové eluce pro analýzu fytoekdyteroidů na LC koloně.

čas (min)	A (%)	B (%)	číselné označení tvaru gradientové křivky
0,0	15	85	
0,5	15	85	1
2,5	17	83	6
4,0	50	50	6
4,5	100	0	6
5,0	100	0	1
5,2	15	85	6
7,0	15	85	1

Separované látky eluované z UHPLC kolony vstupovaly do hmotnostního spektrometru (MS), kde byly ionizovány za pomoci elektrospreje pracujícího v pozitivním módu (ESI+). Detekce látek byla provedena tandemovým MS operujícím v režimu vícenásobného monitorování rozpadu iontu (*angl.* multiple reaction monitoring; MRM) za následujících podmínek: napětí na ESI kapiláře 1,5 kV, teplota v iontovém zdroji byla nastavena na 120 °C, desolvatační teplota byla 550 °C, průtok desolvatačního plynu (dusíku) byl 600 l/h a průtok kolizního plynu (argonu) 0,21 ml/min.

Pro nedostupnost vnitřního standardu byly všechny analyzované látky kvantifikovány metodou vnější kalibrace (9 kalibračních bodů) v rozsahu 0,01 až 10 pmol/nástřík. Jednotlivé roztoky standardů pro kalibraci PEs byly připraveny smísením příslušného množství jednotlivých standardů PEs a 100 % MeOH.

Retenční časy (RT), charakteristiky kalibračních křivek a MS podmínky detekce pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v Tab. 3 a 4A,B. Z naměřených hodnot ploch (A) jednotlivých bodů pro danou látku byla sestrojena kalibrační křivka v programu MS Excel

jako $\log A = f(\log n_{\text{PEs}})$ a množství PEs v reálných vzorcích pletiv bylo vypočítáno z plochy vzorku po jejím dosazení do lineární rovnice kalibrační křivky standardu.

Tabulka 4A: Retenční čas a charakteristiky regresních kalibračních křivek studovaných fytoekdysteroidů.

	PEs	RT (min)	rovnice kalibrační přímký	korelační koeficient R²
1	tur	1,22	$\log y = 1,3298 (\log x) + 3,2895$	0,9935
2	20E	2,67	$\log y = 0,9719(\log x) + 3,7781$	0,9916
3	polB	2,76	$\log y = 0,9070(\log x) + 4,0992$	0,9934
4	iso	3,65	$\log y = 1,0447(\log x) + 4,2361$	0,9907
5	ajuC	3,89	$\log y = 1,3679 (\log x) + 2,9602$	0,9904
6	makC	3,96	$\log y = 1,0673 (\log x) + 4,1348$	0,9967
7	stachC	4,10	$\log y = 1,0338 (\log x) + 4,6577$	0,9928
8	ponA	4,25	$\log y = 1,1164 (\log x) + 3,9119$	0,9956

Tabulka 4B: Podmínky hmotnostní spektrometrie pro detekci studovaných fytoekdysteroidů.

	PEs	diagnostický MRM přechod	napětí na kóně (V)	kolizní energie (V)
1	tur	497,20> 461,20	20	12
2	20E	480,90> 445,10	30	20
3	polB	497,20> 443,20	40	18
4	iso	479,30> 443,33	25	14
5	ajuC	481,98> 464,30	30	14
6	makC	509,80> 473,30	30	14
7	stachC	463,20> 445,30	35	14
8	ponA	465,10> 447,50	35	14

RT – retenční čas; PEs – fytoekdysteroidy

Odparky reálných vzorků rostlinného původu byly po předchozí extrakci a purifikaci rekonstruovány v 50 μl 100 % MeOH vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, zamíchány pomocí přístroje na míchání vzorků – Infrared Digital Vortex Mixer TX4 (VELP Scientifica, Itálie), přefiltrovány přes centrifugační nylonové filtry, a po 5 minutách sonifikace převedeny do kónického insertu s pružinkou umístěného v LC vialce. Následně byly vzorky v objemu 2 μl nadávkovány na RP kolonu a analyzovány stejným způsobem jako PEs standardy.

5 Výsledky

Tato kapitola shrnuje naměřené výsledky prováděných experimentů v rámci této diplomové práce. Nejdříve byly získány výsledky z optimalizace LC-MS a UHPLC-MS/MS analýzy. Ze čtyř typů RPsorbentů byl vybrán nejvhodnější z nich pro separaci PEs metodou UHPLC. Sorbenty byly hodnoceny podle průměrné šířky píků a u kritického blízkce eluujícího páru 20E a polB byla vypočítána hodnota rozlišení R_s .

Dále byl stanoven obsah osmi vybraných PEs u celkem 24 částí rostlinných pletiv ze 12 rostlinných druhů (viz seznam Tab. 1A v podkapitole 4.2 Rostlinný materiál). Pro extrakci a izolaci rostlinného materiálu byla použita SPE se sorbentem DPA-6S. Postup přípravy a zpracování vzorků probíhal tak, jak je popsáno v podkapitole 4.4.

Následovala optimalizace extrakce a izolace PEs ze špenátu setého *Spinacia oleracea* L. a merlíku čilského *Chenopodium quinoa*. U těchto dvou rostlin byla sledovaným parametrem, který charakterizuje účinnost purifikace, návratnost neboli výtěžnost metody (%). Hodnoty výtěžnosti metody bylo dosaženo srovnáním dat z postupu D (extrakce a izolace SPE na kolonce DPA-6S) a výsledků získaných metodickým přístupem QuEChERS s principem dSPE. Návratnost PEs byla sledována při použití dvou různých typů extrakčních činidel (100% ACN a směsi ACN:iPrOH v poměru 9:1) a směsi sorbentů postupů A, B a C. Provedený postup extrakce a izolace metodou SPE a stanovení PEs UHPLC-MS/MS je v rostlinných vzorcích zavedený (Demlová, 2015). Podrobněji jsou postupy extrakce a izolace sepsány v podkapitole 4.4.3 Extrakce a izolace metodou dSPE, QuEChERS. Přehled užitých metod je souhrně sepsán v Tab. 2 na str. 36.

5.1 Optimalizace LC-MS a UHPLC-MS/MS analýza fytoekdysteroidů

Vývoj metody pro analýzu PEs v rostlinném materiálu byl již dříve řešen v bakalářské práci J. Demlové (Demlová, 2015) a diplomové práci K. Maškové (Mašková, 2016). Metoda byla tehdy zaměřena na studium pěti PEs, a to konkrétně na 20E, polB,ajuC, stachC a ponA pomocí MEKC, UHPLC ve spojení s detekcí pomocí tandemového hmotnostního spektrometru (MS/MS) pracujícího na principu trojitého kvadrupólu resp. SFC ve spojení s MS (jednoduchý kvadrupól; SFC-MS). V této práci byla nově tato pětičlenná skupina PEs rozšířena o další tři biologicky významné PEs, a to iso, tur a makC – viz přehled na str. 18; Obr. 9. Vzhledem k relativně nízkým hladinám těchto látek v rostlinných pletivech napříč rostlinnými druhy byla pro separaci a detekci těchto látek z výše uvedených metod vybrána metoda UHPLC-MS/MS, která byla dále optimalizována.

Separace osmi vybraných PEs tetracyklické struktury byla studována v systému RP, a to na následujících čtyřech typech sorbentů na pěti kolonách:

- polymerní sorbent typu C₁₈ s pozitivním nábojem a obsahem uhlíku 15 % (Acquity UPLC CSH[®] 2,1x50 mm; 1,7 μm, Waters)
- polymerní sorbent typu C₁₈ s pozitivním nábojem a obsahem uhlíku 17,5 % (Luna Omega PS 2,1x50 mm; 1,6 μm, Phenomenex)
- polymerní sorbent obsahující kombinaci lineárního a cyklického uhlovodíku (Acquity UPLC CSH[®] Phenyl-Hexyl, 2,1x50 mm; 1,7 μm, Waters)
- C₁₈ sorbent na bázi silikagelu (Acquity HSS T3, 2,1x50 mm; 1,8 μm, Waters)
- C₁₈ sorbent vyrobený technologií core-shell (Kinetex EVO, 2,1x50 mm; 1,7 μm, Phenomenex)

Píky všech PEs standardů byly symetrické na všech typech kolon bez náznaku frontování nebo chvostování. Průměrná šířka píků byla nalezena v rozsahu 0,2030 až 0,2582 min (Tab. 4), přičemž nejmenší byla pak na koloně CSH a z tohoto pohledu je tedy kolonou nejvhodnější pro separaci uvedené skupiny látek. Dalším parametrem, který byl u separace na jednotlivých typech sorbentů kolon sledován, bylo rozlišení R_s dvojice 20E a polB. Tyto dvě látky se nepodařilo kompletně rozseparovat ani na jednom ze studovaných sorbentů, přičemž složení vodné mobilní fáze ani nijak její pH separaci významně neovlivnilo (PEs nejsou iontové sloučeniny). Hodnota R_s byla vypočtena podle rovnice 1 (viz níže) a pro jednotlivé sorbenty se pohybovala v rozmezí 0,0667 až 0,3073 (Tab. 4). Teoreticky zcela rozlišené (rozdělené) látky mají hodnoty $R_s \geq 1$, tj. nejvhodnější by byl ten sorbent, pro který se hodnota R_s co nejvíce blíží hodnotě 1, případně je vyšší než 1. V tomto případě byla nalezena nejvyšší hodnota R_s pro sorbent HSS (0,3073) a dále pro CSH (0,2992). Hodnoty jsou tedy pro tyto dva sorbenty velice blízké. Vzhledem k rozdílným MRM přechodům lze ovšem i tyto píky, koeluuující z cca 30 %, kvantifikovat, a proto již dále nebyla vyvíjena snaha o dosažení $R_s \geq 1$. Průměrná šířka píků těchto látek na obou sorbentech je taky velice podobná (0,2030 min na CSH vs. 0,2070 min na HSS), takže o konečném výběru kolony rozhodla skutečnost, že píky pěti z celkově osmi sledovaných látek (iso, ajuC, makC, stachC a ponA) byly užší na koloně CSH (Tab. 4). Tato kolona byla tedy vybrána jako nejvhodnější pro separaci osmi vybraných PEs v reálných vzorcích rostlinných pletiv. Celková délka analýzy nepřekračuje 5 min a kromě částečné koeluce zmíněné dvojice 20E a polB jsou všechny ostatní látky zcela separovány – Obr. 22.

Rovnice 1:

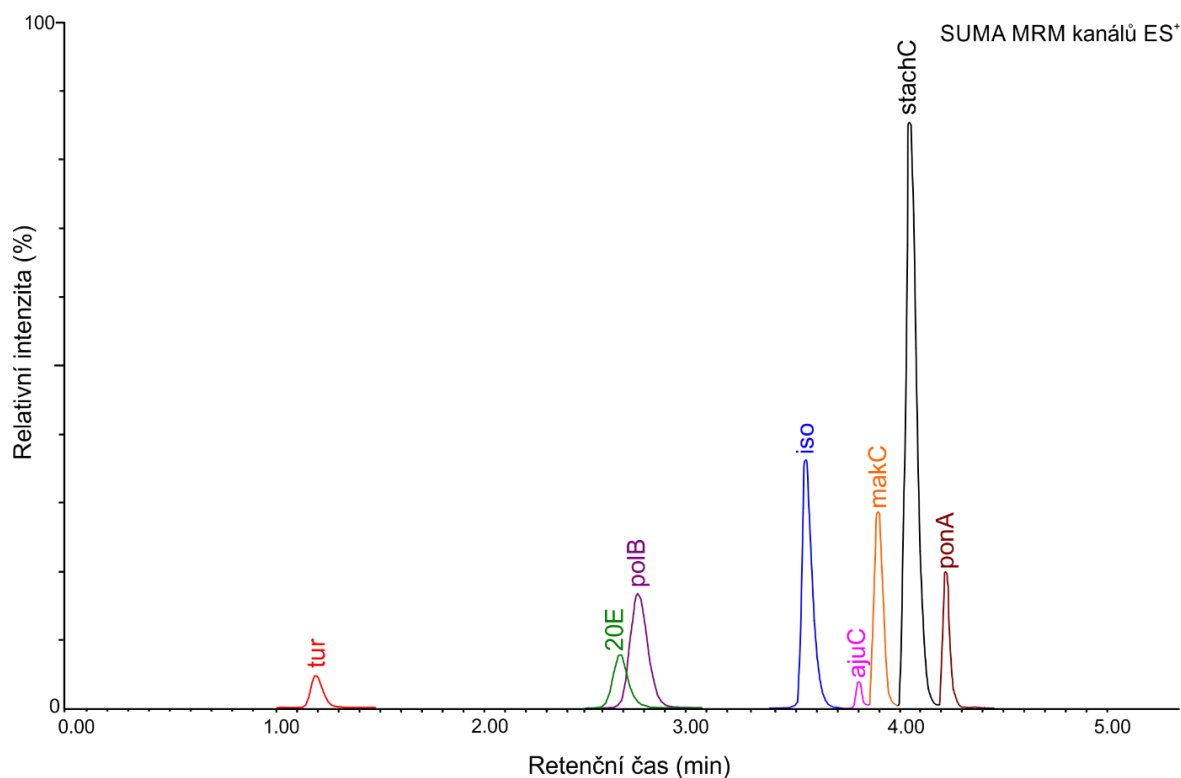
$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{polB} - t_{20E})}{(W_{20E} + W_{polB})}$$

kde t_{polB} a t_{20E} jsou příslušné retenční časy a hodnoty W_{20E} a W_{polB} jsou příslušné šířky píků u základny.

Tabulka 4: Chromatografické charakteristiky studovaných PEs na UHPLC kolonách s různým typem sorbentu při nástřiku 1 pmol PEs do gradientu dle Tab. 2.

PE	Retenční čas (min)					Šířka píku (min)				
	CSH	PS	HSS	Phenyl-Hexyl CSH	EVO	CSH	PS	HSS	Phenyl-Hexyl CSH	EVO
tur	1,22	1,31	1,48	1,06	0,87	0,2543	0,2054	0,2152	0,2323	0,2641
20E	2,67	2,85	3,26	2,07	1,88	0,3291	0,3095	0,2677	0,3169	0,2751
polB	2,76	2,89	3,34	2,15	1,90	0,2726	0,3242	0,2530	0,3046	0,3242
iso	3,65	3,63	3,75	3,44	3,09	0,1859	0,2177	0,2103	0,2959	0,4060
ajuC	3,89	3,85	3,95	3,77	3,57	0,1302	0,1621	0,1818	0,1990	0,2014
makC	3,96	3,93	4,02	3,84	3,69	0,1523	0,1867	0,1769	0,1891	0,2063
stachC	4,10	4,07	4,16	3,99	3,89	0,1597	0,1667	0,1891	0,2063	0,2112
ponA	4,25	4,22	4,31	4,15	3,96	0,1400	0,1842	0,1621	0,1965	0,1769
<i>Průměrná šířka píku (min)</i>						<i>0,2030</i>	<i>0,2196</i>	<i>0,2070</i>	<i>0,2426</i>	<i>0,2582</i>
<i>R_s (20E a polB)</i>						<i>0,2992</i>	<i>0,1262</i>	<i>0,3073</i>	<i>0,2574</i>	<i>0,0667</i>

Pro účely MS/MS detekce bylo pro každou ze studovaných látek změřeno fullscan spektrum v pozitivním módu ES, aby byla zjištěna hodnota prekurzorového iontu (Tab. 5). Na základě této hodnoty byla následně pro každou látku změřena i spektra produktových iontů, u nichž byl vybrán iont příslušného poměru m/z s nejvyšší intenzitou za účelem nastavení funkce a kvantifikace dané látky (tzv. kvantifikační MRM přechod) a dále druhý nejintenzivnější iont v pořadí pro účely potvrzení jeho identity (konfirmační MRM přechod) – oba přechody viz Tab. 4B.



Obrázek 18: (+)ESI-LC-MS/MS chromatogram separace osmi fytoekdysteroidů na koloně Acquity CSH[®] 2,1x50 mm, 1,7 μm (Waters) při koncentraci 3 pmol/nástríku. Průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, gradientová eluce dle programu uvedeného v Tab. 3 za pomoci acetonitrilu (mobilní fáze A) a 10 mM kyseliny mravenčí ve vodě (mobilní fáze B). Kolona byla termostatována při 40 °C.

Tabulka 5: Tabulované ES⁺ hmotnostní spektra fytoekdysteroidů a spektra jejich produktových iontů normalizované k nejabundantnějšímu z nich (vyznačen tučně). Hodnoty relativních molekulových hmotností M_r jsou převzaty z webu www.ecdybase.org.

PE	M_r (g·mol ⁻¹)	m/z prekurzorového iontu v ES ⁺	m/z produktových iontů v ES ⁺ (rel. intenzita, %)
tur	496	497	479 (20); 461 (100); 443 (60); 363 (20)
20E	480	481	445 (100); 427 (40); 409 (20); 371 (95)
polB	496	497	443 (100); 425 (80); 407 (50)
iso	478	479	461 (80); 443 (100); 425 (70); 407 (30)
ajuC	480	481	464 (100); 446 (75); 428 (25)
makC	508	509	491 (10); 473 (100); 455 (30); 357 (90)
stachC	462	463	445 (100); 427 (40); 371 (20)
ponA	464	465	447 (100); 426 (75); 411 (25)

Nově nalezené MRM kvantifikační přechody byly použity pro měření kalibračních křivek pro každou ze sledovaných osmi látek v rozsahu 0,01 až 40 pmol/nástrík. Kalibrační křivky byly v celém rozsahu lineární s charakteristikami uvedenými v Tab. 3A.

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) pro každý PEs byl vypočítán z experimentálních dat (pět kalibračních křivek obecné rovnice $y = kx + b$) pomocí rovnice 2 a 3, kde s_b je směrodatná odchylka posunutí b na ose y a k je průměrná hodnota směrnice pěti nezávislých měření (Araujo, 2009).

Rovnice 2:

$$LOD = 3 \times s_b/k$$

Rovnice 3:

$$LOQ = 10 \times s_b/k$$

Hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v Tab. 6 z níž vyplývá, že hodnoty LOD se pohybují pro osmici PEs v rozmezí 0,0056 pmol (iso) až 0,1061 pmol (tur) a hodnoty LOQ pak v rozmezí 0,0188 pmol (iso) až 0,3538 pmol (tur). V přírodě nejčastěji se vyskytující 20E má LOD/LOQ třetí nejnižší ze studované skupiny PEs.

Tabulka 6: Validací parametry metody – limit detekce (LOD), kvantifikace (LOQ) a dynamický rozsah LC-MS/MS metody pro studované fytoekdysteroidy (PEs).

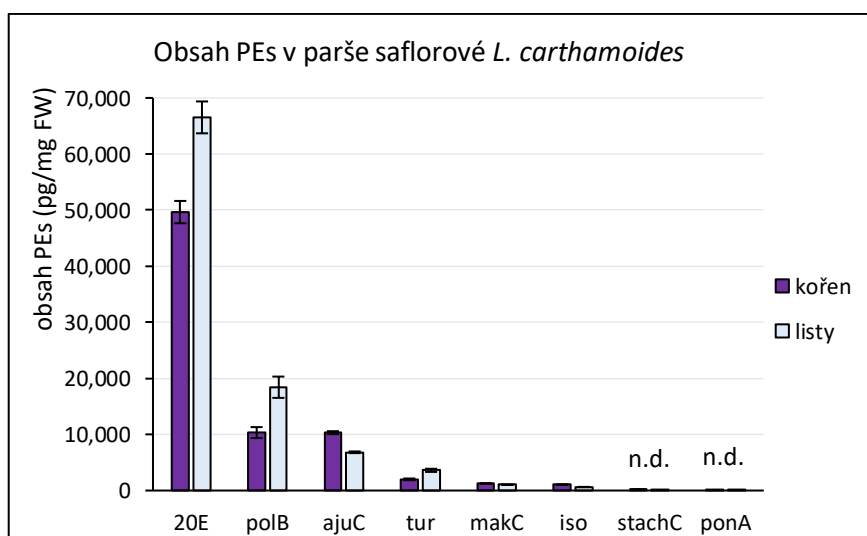
PE	LOD (pmol)	LOQ (pmol)	Dynamický rozsah (pmol)
tur	0,1061	0,3538	0,50 - 50
20E	0,0294	0,0979	0,04 - 40
polB	0,0536	0,1788	0,04 - 40
iso	0,0056	0,0188	0,01 - 50
ajuC	0,1046	0,3488	0,04 - 40
makC	0,0725	0,2416	0,01 - 50
stachC	0,0441	0,1469	0,01 - 50
ponA	0,0127	0,0423	0,04 - 40

5.2 Výsledky stanovení obsahu fytoekdysteroidů v rostlinných druzích

5.2.1 Výsledky kvantifikace fytoekdysteroidů – extrakce a izolace SPE

Výsledkem kvantifikace PEs byly detekovatelné hladiny PEs pouze u 4 druhů rostlin (parchy, zběhovce, hluchavky a heřmánku), což je jen třetina z 12 analyzovaných rostlinných druhů (viz přehled analyzovaných rostlinných materiálů Tab. 1 A podkapitola 4.2).

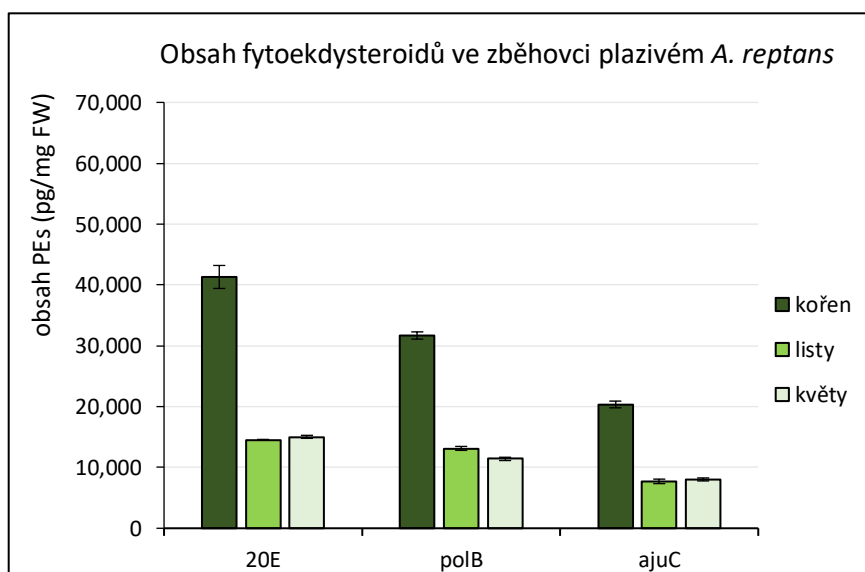
Z celkem osmi vybraných PEs – 20E, polB, ajuC, tur, iso, makC, stachC, ponA – byl ve všech analyzovaných rostlinných materiálech detekovatelný obsah pouze u prvních třech zmíněných PEs (20E, polB a ajuC). Výjimkou byla parcha saflorová *Leuzea carthamoides*, u které bylo detekováno 6 z 8 PEs (20E, polB, ajuC, tur, makC, iso; Obr. 23). Zbylé dva (stachC a ponA) byly v parše přítomny jen ve velmi nízkých hodnotách, jejich množství tedy bylo považováno za nedetekovatelné. V případě parchy byly PEs měřeny v listech a kořeni jedné rostliny. Nejhojněji byl zastoupen 20E, přičemž v listech parchy jej bylo téměř o 25 % více v porovnání s kořeny (66532 pg/mg v listech a 49647 pg/mg v kořenu). Obsah dalších PEs v parše byl v porovnání s 20E výrazně nižší. Druhým nejzastoupenějším PEs v parše byl polB, kde v kořenu bylo zjištěno 10337 pg/mg a v listech 18421 pg/mg FW (Obr. 23). Velmi podobné hodnoty byly naměřeny v kořenu u polB a ajuC, v případě polB byl jeho obsah jen o necelých 18 pg/mg FW vyšší než u ajuC. U listů byl tento rozdíl mezi polB a ajuC 11597 pg/mg FW. U zbylých tří detekovaných PEs (tur, makC a iso) byl obsah PEs ve srovnání s prvními třemi PEs (20E, polB a ajuC) nízký. Nejnižší naměřená hodnota byla v listech iso (633 pg/mg FW), zatímco nejvyšší byl v listech parchy obsah tur (3602 pg/mg FW; Obr. 23).



Obrázek 19: Obsah fytoekdysteroidů v kořenu a listech parchy saflorové *Leuzea carthamoides*; Chybové úsečky představují průměrnou směrodatnou odchylku 3 replikátů.

PEs – fytoekdysteroidy; FW – čerstvá hmota; 20E – 20-hydroxyekdyson; polB – polypodin B; ajuC – ajugasteron C; tur – turkesteron; makC – makisteronC; n.d. – nedetekováno

Rostlinou s druhým největším obsahem PEs měřených v této práci byl zběhovce plazivý *Ajuga reptans*. Obsah PEs byl měřen jak v kořenech, tak i listech a květech. U všech detekovaných PEs byl jejich nejvyšší obsah zjištěn v kořenu rostliny. Nejvyšší byl obsah 20E (41310 pg/mg FW), o 23 % byl nižší obsah polB a nejnižší byl v kořenech naměřen obsah ajuC – 20350 pg/mg FW, tj. o asi polovinu méně ve srovnání s obsahem 20E (Obr. 24). Z grafu je zřejmé, že obsah všech tří PEs se v listech a květech liší jen minimálně. Obsah 20E byl o asi 3 % nižší v květech než v listech a o necelá 4 % nižší u ajuC. Obráceně tomu bylo v případě polB, kde bylo naměřeno o 13 % více v listech v porovnání s květy (Obr. 24).

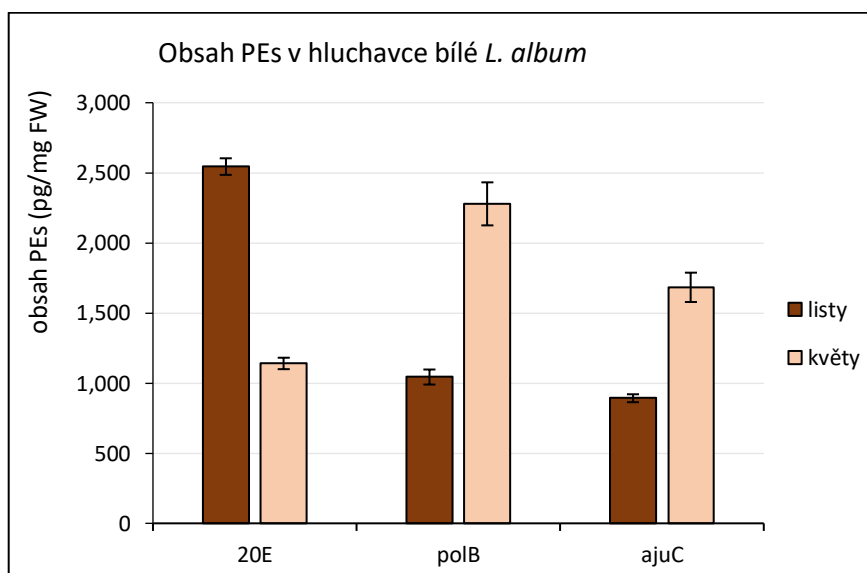


Obrázek 20: Obsah tří fytoekdysteroidů detekovaných v kořenu, listů a květů zběhovce plazivého *Ajuga reptans*. Chybové úsečky představují průměrnou směrodatnou odchylku 3 replikátů.

PEs – fytoekdysteroidy; FW – čerstvá hmota; 20E – 20-hydroxyekdyson; polB – polypodin B; ajuC – ajugasteron C

Hluchavka bílá *Lamium album* spolu s heřmánkem lékařským *Matricaria chamomilla* měla v porovnání s předchozími dvěma rostlinami výrazně nižší obsah PEs.

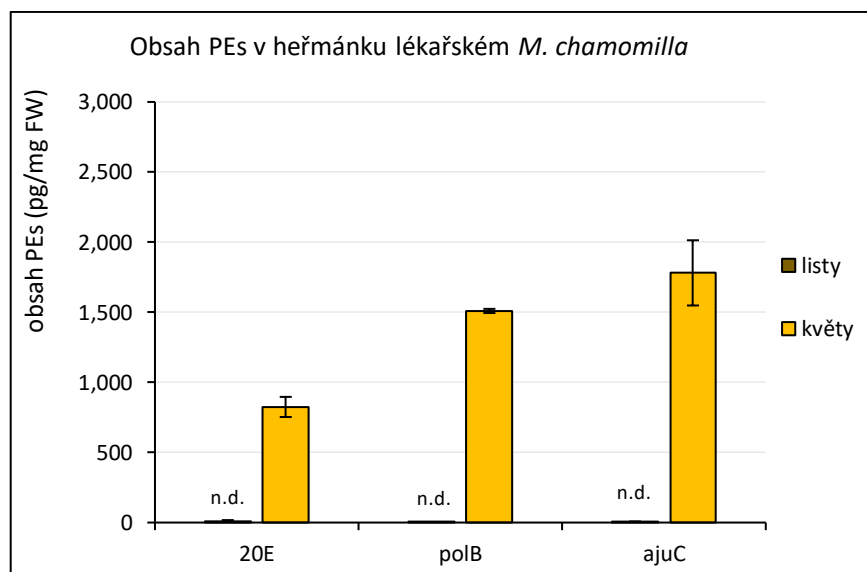
U hluchavky bílé *Lamium album* byl měřen obsah PEs v listech a květech. Zatímco v listech bylo zjištěno nejvíce 20E (2545 pg/mg), listy jej obsahovaly o více než polovinu méně (1140 pg/mg FW). Naopak tomu bylo u polB a ajuC, kde byl naměřen vyšší obsah v květech než v listech o 54 %, resp 47 % (Obr. 25).



Obrázek 21: Obsah vybraných fytoekdysteroidů v extraktech z listů a květů hluchavky bílé *Lamium album*. Chybové úsečky představují průměrnou směrodatnou odchylku 3 replikátů.

PEs – fytoekdysteroidy; FW – čerstvá hmota; 20E – 20-hydroxyekdyson; polB – polypodin B; ajuC – ajugasteron C; tur – turkesteron; makC – makisteronC; n.d. – nedetekováno

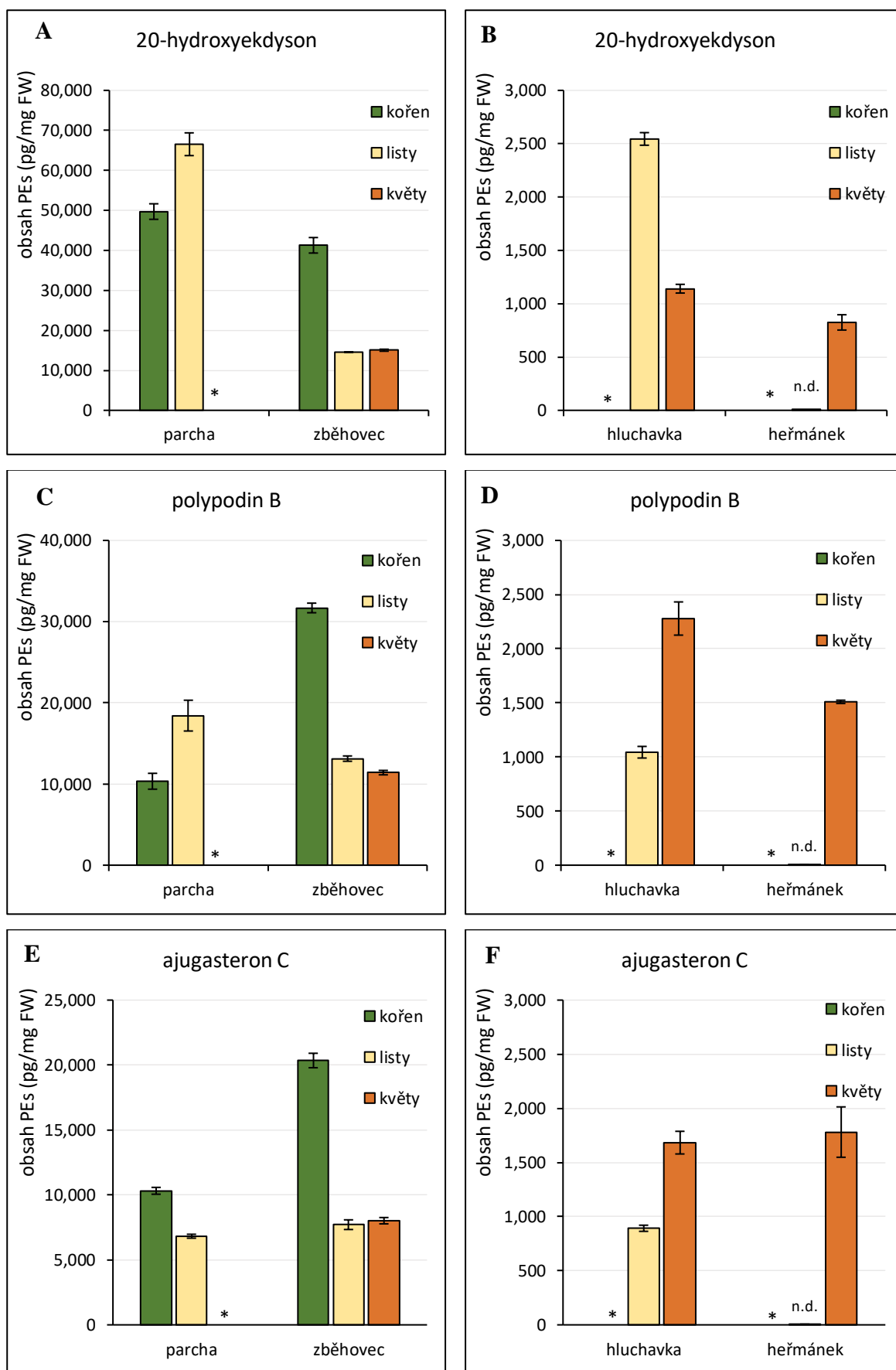
U heřmánku byl pozorován nejnižší obsah 20E ze všech čtyř rostlin obsahujících PEs. Obsah 20E byl 824 pg/mg FW, což je asi 1,2 % z množství nacházejícím se v listech parchy, kde bylo naměřeno 66532 pg/mg FW (Obr. 23 a 26). Součástí analyzovaných rostlinných materiálů byly i listy heřmánku, nicméně naměřené hodnoty obsahu PEs byly příliš blízko LOD a v obrázku jsou tudíž označeny jako nedetekované (n.d.; Obr. 26). V květech heřmánku byl nejvyšší obsah ajuC, a to 1781 pg/mg FW. Obsah polB byl o 272 pg/mg FW nižší.



Obrázek 22: Obsah vybraných fytoekdysteroidů v extraktu z květů heřmánku *Matricaria chamomilla*. PEs – fytoekdysteroidy; FW – čerstvá hmota; 20E – 20-hydroxyekdyson; polB – polypodin B; ajuC – ajugasteron C; n.d. – nedetekováno

V následujících šesti grafech Obr. 27A-F jsou srovnány všechny čtyři druhy rostlin (parcha, zběhovec, hluchavka a heřmánek) u nichž byl detekován obsah PEs.

Z grafů je zřejmé, že ve větším množství byly PEs zastoupeny u parchy a zběhovce (Obr. 27A, C a E), řádově mnohem nižších hodnot dosahoval v hluchavce a heřmánku (Obr. 27B, D a F). Protože ne u všech rostlin byly analyzovány vždy všechny části (kořen, stonek/listy a květy) byly do grafů na Obr. 27 umístěny znaky *, které označují části rostlin, které nebyly v práci analyzovány. Z grafů je dobře patrné, že ve zběhovci a parše byly naměřeny přibližně stejné hodnoty ajuC v listech (Obr. 27E). Podobně na Obr. 27F lze pozorovat



Obrázek 23: Obsah tří fytoekdysteroidů detekovaných v rostlinných druzích metodou SPE.

PEs – fytoekdysteroidy; FW – čerstvá hmota; 20E – 20-hydroxyekdyson; polB – polypodin B; ajuC – ajugasteron C; n.d. – nedetekováno; * – část rostliny nebyla součástí stanovení

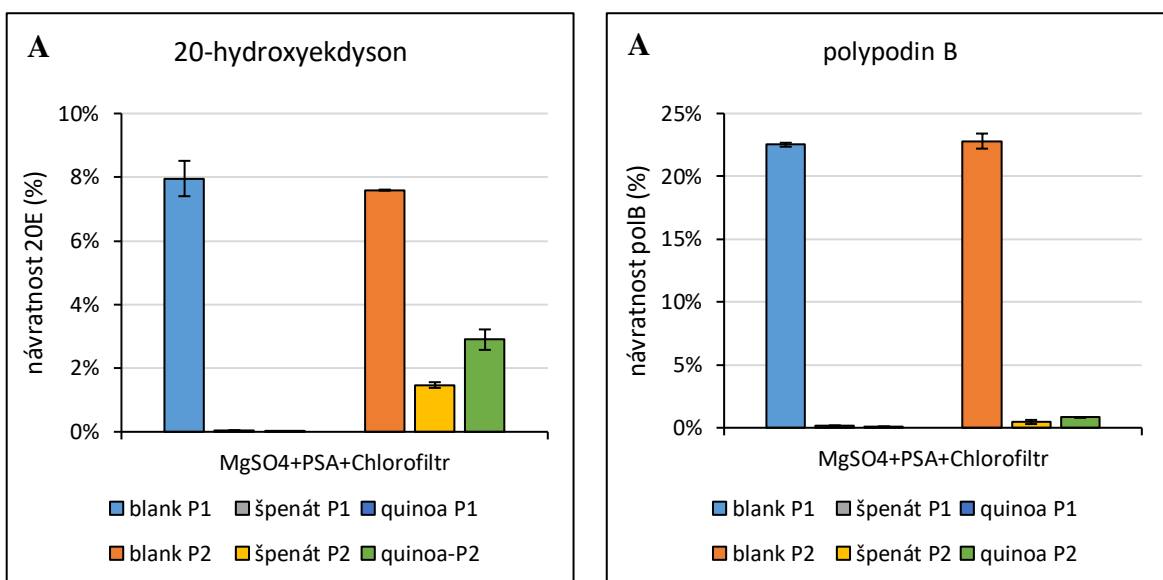
5.2.2 Návratnost stanovení fytoekdysteroidů – optimalizace extrakce a izolace dSPE (QuEChERS)

Pro zhodnocení návratnosti postupu extrakce a izolace přístupem QuEChERS ve třech různých směsích sorbentů (postupy A, B a C; Obr. 29, 30 a 31) byly z osmi analyzovaných PEs vybrány pouze dva nejzastoupenější (20E a polB). Oba PEs byly zastoupeny jak v pletivech špenátu setého *Spinacia oleracea* L., tak merlíku čilského *Chenopodium quinoa*. U ostatních pěti měřených PEs (ajuC, tur, makC, iso a ponA) nebyly hladiny PEs ve výsledcích zahrnuty, protože nebyly detekované u obou rostlin.

Návratnost metody extrakce a izolace SPE se sorbentem DPA-6S (postup D) byla 84,6 % pro 20E; a 66,56 % pro polB, proto byla tato metoda zvolena pro porovnání výtěžnosti metodického přístupu QuEChERS a dSPE.

Z naměřených výsledků je zřejmé, že metodický přístup QuEChERS není vhodný pro stopovou analýzu PEs v rostlinných vzorcích špenátu a merlíku. Pro příklad: extrakcí a izolací SPE bylo z merlíku získáno 38 926 pg/mg FW 20E, s využitím přístupu QuEChERS, dSPE (P2, postup C) jen 3 663 pg/mg FW, tj. nejvyšší zjištěná návratnost 9,41 %.

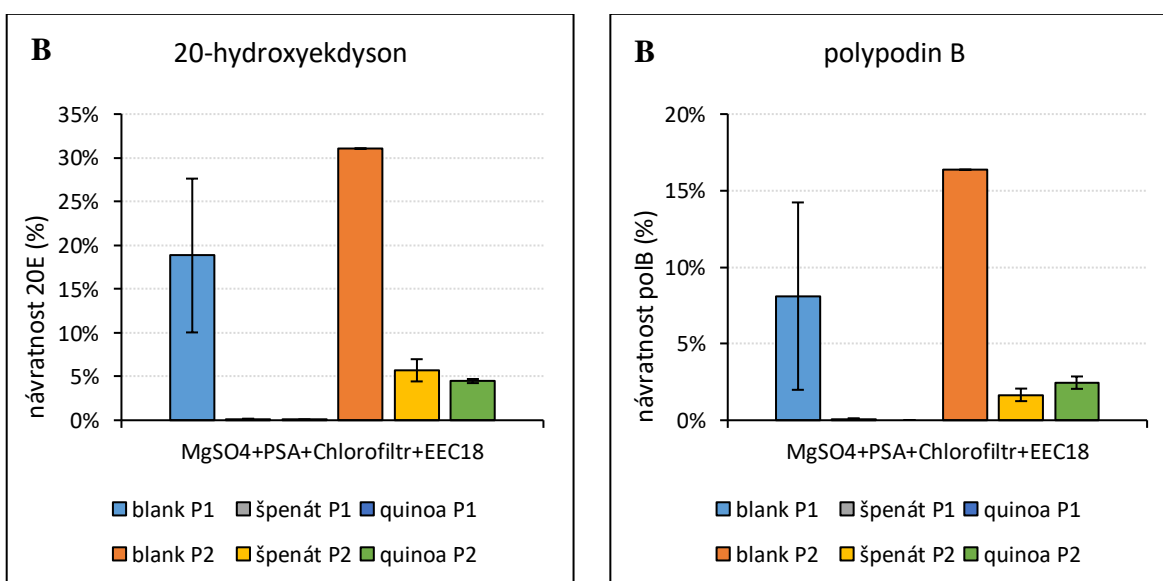
Na základě naměřených dat lze nicméně jako více vyhovující označit směsi sorbentů obsahující C18 (postup B a C; Obr. 29 a 30). U vzorků, které C18 obsahují byla návratnost téměř 5krát vyšší než u směsí sorbentů bez této složky (postup A, Obr. 28). V případě, že by byla zvolena tato směs sorbentů je výhodnější použití P2, tedy extrakčního činidla ACN:iPrOH (9:1) oproti 100 % ACN (P1; Obr. 28, 29 a 30). Z grafů je dále zřejmé, že hodnoty návratnosti byly vyšší pro 20E než u polB.



Obrázek 28: Srovnání návratnosti špenátu setého (*Spinacia oleracea* L.) a merlíku čilského (*Chenopodium quinoa*) metodiky QuEChERS (%), **postupu A**, kde směs sorbentů obsahovala 150 mg MgSO₄/ 50 mg PSA/ 50 mg Chlorofiltru[®].

20E – 20-hydroxyekdyson; polB – polypodin B; PSA – primární sekundární amin

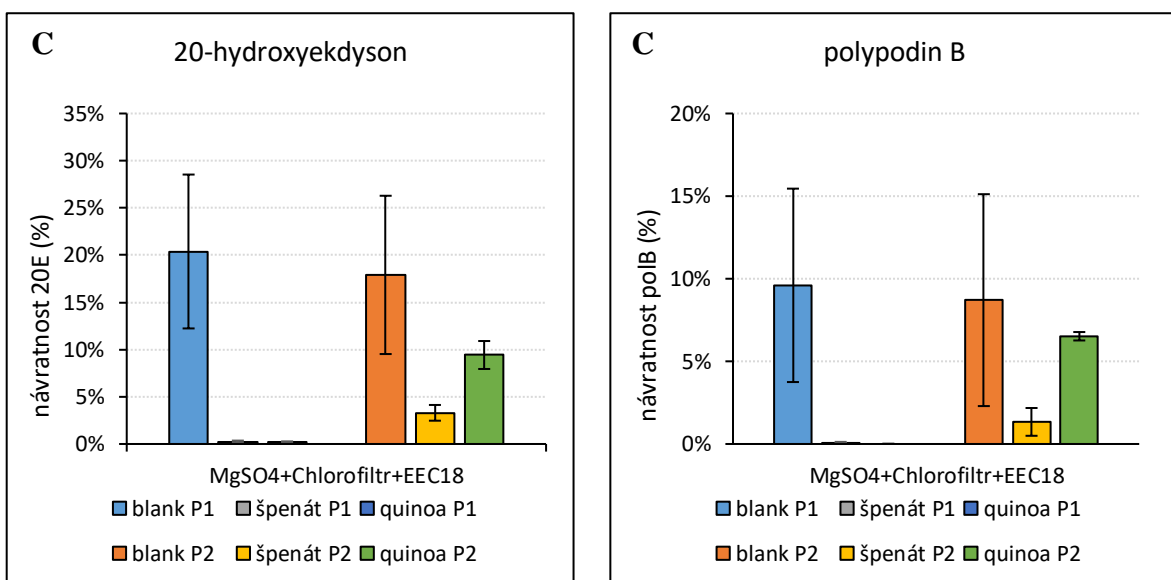
P1 – protokol 1 – 100% ACN; **P2** – protokol 2 – ACN:iPrOH (9:1)



Obrázek 30: Srovnání návratnosti špenátu setého (*Spinacia oleracea* L.) a merlíku čilského (*Chenopodium quinoa*) metodiky QuEChERS (%), **postupu B**, kde směs sorbentů obsahovala 150 mg MgSO₄/ 50 mg PSA/ 50 mg Chlorofiltru[®]/ 50 mg EEC18.

20E – 20-hydroxyekdyson; polB – polypodin B; PSA – primární sekundární amin;

P1 – protokol 1 – 100% ACN; **P2** – protokol 2 – ACN:iPrOH (9:1)



Obrázek 31: Srovnání návratnosti špenátu setého (*Spinacia oleracea* L.) a merlíku čilského (*Chenopodium quinoa*) metodiky QuEChERS (%), **postupu C**, kde směs sorbentů obsahovala 150 mg MgSO₄/ 50 mg Chlorofiltr®/ 50 mg EEC18.

20E – 20-hydroxyekdyson; polB – polypodin B;

P1 – protokol 1 – 100% ACN; **P2** – protokol 2 – ACN:iPrOH (9:1)

6 Diskuze

Fytoekdysteroidy jsou pro své široké a významné účinky, které doposud nejsou plně objasněny, předmětem výzkumu nejen u rostlin, ale i u živočichů člověka nevyjímaje (Ajaha a kol., 2019; Burdette, 1962; Chaubey, 2018; Kapur a kol., 2010; Kokoška a kol., 2002; Lafont a Dinan, 2003; Soriano a kol., 2004; Udalova a kol., 2004). Obsah těchto látek je v rostlinách několikanásobně vyšší v porovnání s živočichy, a proto jsou rostliny významným přirozeným zdrojem PEs (Píš a Harmatha, 1992; Píš a kol., 1992).

Získané výsledky stanovení v této práci prokázaly nejvyšší zastoupení PEs v rostlinných pletivech u parchy saflorové *Leuzea carthamoides*. Z osmi stanovovaných PEs (tur, 20E, polB, iso, ajuC, makC, stachC, ponA), bylo v pletivech parchy zastoupeno šest z nich (tur, 20E, polB, iso, ajuC, makC). Tento výsledek je ve shodě s literaturou. Souhrný a aktualizovaný seznam uvádějící 20 vědeckých prací, v nichž bylo předmětem zájmu stanovení PEs v této rostlině je dostupný online (Lafont a kol., [online]). Koudela a kol. 1995 uvádí, že obsah v sušině parchy je více než 1 %. Námi naměřené výsledky upokazují přítomnost 20E na hladině až cca 66 ng/mg FW v listech, což představuje 1,5 % z množství analyzovaného vzorku listů. V literatuře je nejvyšší obsah PEs obecně uváděn v kořenech parchy (např. Girault a kol., 1988). S ohledem na vegetační období se však distribuce v jednotlivých částech rostlin liší. U trvalek se předpokládá se, že zjara je nejvyšší obsah PEs v nově vyvíjejících se listech, zatímco na podzim jsou signální látky transportovány do kořene, kde dochází k jejich akumulaci (Kholodova a kol., 1979). V zimních měsících je kořen významným zdrojem potravy, je vyhrabáván a pojídán jelenem maralem *Cervus elaphus sibiricus*, a proto někdy bývá parcha označována v literatuře jako maralí kořen. Naměřené výsledky obsahu PEs u analyzovaných rostlin čeledi hvězdicovité *Asteraceae* (parcha, heřmánek a měsíček) dokazují, že přítomnost vysokého obsahu PEs u jednoho druhu v určité čeledi neznamena vysoký obsah u všech druhů této čeledi. Obsah detekovaných PEs u hvězdicovitých *Asteraceae* byl výrazně nižší v heřmánku lékařském *Matricaria chamomilla* ve srovnání s parchou *L. carthamoides* (Dinan a kol., 2020). V semenech, listech ani květech měsíčku lékařského *Calendula officinalis*, který také náleží do zmíněné čeledi, nebyl detekován žádný z měřených PEs, což je v souladu s dostupnou literaturou (Lafont a kol., seznam literatury pro rostliny s obsahem PEs [online]; Demlová, 2015). Hluchavkovité *Lamiaceae* byla další čeleď v řadě, u které byl zjišťován obsah vybraných PEs. Z pěti rostlinných druhů (zběhovce, yzop, šalvěj, hluchavka a levandule) byla detekována přítomnost PEs u zběhovce plazivého *Ajuga reptans* a hluchavky bílé *Lamium album*, a i tyto výsledky jsou v souladu s dostupnou literaturou.

V případě zbývajících druhů (yzop, šalvěj a levandule) nebyly nalezeny zdroje prokazující přítomnost PEs (Lafont a kol., seznam literatury pro rostliny s obsahem PEs [online]). V listech a květech zběhovce *A. reptans* byl naměřen prakticky shodný obsah všech tří detekovaných PEs zřejmě proto, že rostlina se v době sběru nacházela těsně před koncem vegetačního období (Obr. 24). V této fázi po odkvětu je u trvalek předpokládán transport ve směru z nadzemních částí a jejich akumulace v kořenech. Pravděpodobně tedy ocházelo k úbytku signálních látek z nadzemní části (Kholodova a kol., 1979; Taha a Salaima, 2019). Analyzovaný rostlinný materiál zahrnoval i doplněk stravy s extraktem rozchodnice růžové *Rhodiola rosea*, která je zařazována mezi modelové rostliny s adaprogenním účinkem podobně jako ženšen a parcha. V tomto potravinovém doplňku nicméně nebyl obsah PEs prokázán, což je ve shodě s literaturou (Volodin a kol., 2002).

Dosud je známo okolo 520 PEs a vzhledem k rozvoji moderních technik analýzy další postupně přibývají. Předpokládá se proto, že reálný obsah PEs je vyšší než bylo dosud detekováno (Dinan a kol., 1995, 2009, 2020; Dinan, 2001; Imai a kol., 1969). Nemožnost detekce PEs může být způsobena několika faktory, mezi které patří i nedostatečná extrakce a purifikace vzorku před vlastní analýzou. Samotná úprava vzorku před stanovením vybraných analytů je důležitý úkon, který má zejména za cíl odstranit interferující látky snižující významně signál nízkoabundantních analytů, proto byla v této práci vývoji purifikační metody věnována velká pozornost. Snahou bylo hlavně optimalizovat extrakci a izolaci PEs z rostlinných pletiv špenátu setého *Spinacia oleracea* L. a merlíku čilského *Chenopodium quinoa* s využitím metodiky QuEChERS. Tento metodický přístup by mohl vést ke snížení interferentů z rostlinné matrice, urychlení a zefektivnění procesu extrakce a purifikace (Anastassiades a kol., 2003a; Rejczak a Tuzimski, 2015). Pro zhodnocení tohoto přístupu byla metoda porovnáována se zavedeným postupem extrakce a izolace pomocí SPE. Bylo použito dvou různých extrakčních roztoků vybraných dle literárních zdrojů v kombinaci s třemi druhy směsí dSPE sorbentů (přehled v Tab. 2 na str. 35). Nicméně po zhodnocení byla nejvyšší získaná návratnost 9,41 % při extrakci do ACN:iPrOH (9:1) a při použití směsi dSPE sorbentů obsahujícího 150 mg MgSO₄, 50 mg Chlorofiltru® a 50 mg EEC18. Ze získaných výsledků je zřejmé, že metodika QuEChERS se nehodí pro stopovou analýzu PEs v rostlinných vzorcích špenátu *S. oleracea* L. a merlíku *Ch. quinoa*.

7 Závěr

Tato práce nahlíží na téma PEs z pohledu jejich extrakce, izolace z rostlinných pletiv a následného stanovení pomocí UHPLC-MS/MS. Stěžejním úkolem bylo rozšíření dosavadní sady pěti studovaných PEs: 20E, polB,ajuC, stachC a ponA o další tři: tur, iso, makC. Extrakce a izolace dvanácti rostlinných druhů byla prováděna pomocí SPE metody. Protože v případě některých rostlin bylo analyzováno více jejich částí (kořen, stonek, květy), bylo celkem kvantifikováno dvacet čtyři rostlinných částí. Výsledkem kvantifikace bylo stanovení obsahu u tří PEs, které se nacházely ve čtyřech analyzovaných druzích. Tyto tři PEs (20E, polB aajuC) byly detekovány v rostlinných pletivech parchy, zběhovce, hluchavky a heřmánku. Při kvantifikaci PEs u parchy saflorové *Leuzea carthamoides* bylo detekováno šest z osmi studovaných PEs (20E, polB,ajuC, iso, makC, tur). Použitý postup SPE s využitím polyamidové pryskyřice DPA-6S tedy vedl k úspěšnému stanovení PEs.

Součástí experimentu byla i optimalizace přístupu extrakce a purifikace PEs v rostlinách špenátu setého *Spinacia oleracea* L. a merlíku čilského *Chenopodium quinoa*. Pro tyto účely bylo využito relativně nové metodiky pro extrakci a purifikaci QuEChERS, dSPE, která při vhodném provedení vede ke zrychlení analýzy, snížení množství rozpouštědel a přesnějším výsledkům. Účelem tohoto experimentu bylo zhodnocení návratnosti s využitím tohoto přístupu ke stanovení PEs. Výsledkem této optimalizace postupu bylo zjištění, že tento přístup není vhodný pro stanovení obsahu vybraných PEs, a to ani v jednom z celkem tří postupů uspořádání, kdy byly využity tři různé směsi dSPE sorbentů a dvě různá extrakční rozpouštědla.

8 Použitá literatura

- Ahmad V. U., Khaliq-Uz-Zaman S. M., Ali M. S., Perveen S., Ahmed W. (1996) An antimicrobial ecdysone from *Asparagus dumosus*. *Fitoterapia* **67**, 88–91.
- Ajaha A., Bouayad N., Aarab A., Rharrabe K. (2019) Effect of 20-Hydroxyecdysone, a Phytoecdysteroid, on Development, Digestive, and Detoxification Enzyme Activities of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Insect Science* **19**, doi: 10.1093/jisesa/iez097.
- Anastassiades M., CVUA Stuttgart, The QuEChERS Method – Background Information and Recent Developments; Community Reference Laboratory Pesticide Residues using Single Residue Methods 1st Joint CRL-Workshop - Stuttgart, 06/12/2006. Dostupné z http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/1stws2006_lecture_anastassiades_quechers.pdf
- Anastassiades M. Validation of Simple and Rapid Multiresidue Method (QuEChERS) and its Implementation in Routine Pesticide Analysis. MGPR Symposium 2003a [online]. cit. [2016-04-29] Dostupné z: quechers.cvua-stuttgart.de
- Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J. (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* **86**, 412–431. PMID: 12723926.
- Araujo P. (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* **877**, 2224–2234. doi:10.1016/j.jchromb.2008.09.030.
- Armstrong M. J., Carey M. C. (1987) Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *The Journal of Lipid Research* **28**, 1144–1155.
- Bajguz A., Dinan L. (2004) Effects of ecdysteroids on *Chlorella vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **121**, 349–357. doi:10.1111/j.1399-3054.2004.00329.x
- Bakrim A., Maria A., Sayah F., Lafont R., Takvorian N. (2008) Ecdysteroids in spinach (*Spinacia oleracea* L.): Biosynthesis, transport and regulation of levels. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 844–854. doi:10.1016/j.plaphy.2008.06.002.
- Bárnét M., Pavela R., Pilař M., Mráz J., Pluhař P., Vosátka M. (2015) Alternativní plodina parcha saflorovitá (*Rhaponticum carthamoides* (Wild.) Iljin) pěstování, význam, využití v ochraně rostlin. Praha, Botanický ústav AV ČR.
- Báthori M., Toth I., Szendrei K., Reisch J. (1982) Ecdysteroids in *Spinacia oleracea* and *Chenopodium bonushenicus*. *Phytochemistry* **21**, 236–238.
- Báthori M., Toth, I., Szendrei K., Rattai M., Minker E., Blazso G. (1984) Determination and isolation of ecdysteroids in native goosefoot species. *Herba Hungarica* **23**, 131–145.
- Báthori M., Kalász H. (2001) Separation methods for phytoecdysteroids. *LC-GC Europe* **14**, 626–633.
- Báthory M. (2002) Phytoecdysteroids effects on mammals, isolation and analysis. *Mini-Review in Medicinal Chemistry* **2**, 285–293.
- Beck J. G., Mathieu D., Loudet C., Buchoux S., Dufourc J. E. (2007) Plant sterols in “rafts”: A better way to regulate membrane thermal shocks. *The FASEB Journal* **21**, 1714–1723. doi: 10.1096/fj.06-7809com.

- Benveniste P. (2002) Sterol Metabolism. *American Society of Plant Biologists, The Arabidopsis Book* 1:e0004. doi:10.1199/tab.0004.
- Bergamasco R., Horn D. H. S. (1983) Distribution and role of insect hormones in plants. *Endocrinology of insects*. New York: Alan R. Liss Inc., s. 627–654.
- Brát J. (2006) Potraviny obohacené o rostlinné steroly. *Výživa a potraviny* **61**, 158–159.
- Burdette W. J. (1962) Effect of invertebrate hormones on vertebrate tissues. *Science* **139**, 987.
- Butenandt A., Karlson P. (1954) Über die Isolierung eines metamorphose-hormons der Insekten in kristallisierter Form. *Zeitschrift für Naturforsch* **96**, 389–391.
- Canals D., Iurre-Santilari J., Casas J. (2005) The first cytochrome P450 in ferns. *FEBS Journal* **272**, 4817–4825. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04897.x
- Connolly J. D., Hill R. A. (1992) Dictionary of terpenoids. *Flavour and Fragrance Journal* **7**, 242–243. doi: 10.1002/ffj.2730070418.
- Davis P., Lafont R., Large T., Morgan E. D., Wilson I. D. (1993) Micellar capillary electrophoresis of the ecdysteroids. *Chromatographia* **37**, 37–42.
- DellaGreca M., D'Abrosca B., Fiorentino A., Previtera L., Zarrelli A. (2005) Structure elucidation and phytotoxicity of ecdysteroid from *Chenopodium album*. *Chemistry Biodiversity* **2**, 457–462. doi:10.1002/cbdv.200590025.
- Demlová J. (2015) Profilování farmakologicky významných fytoekdysteroidů ve vybraných rostlinných druzích. Olomouc, bakalářská práce (Bc.). Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
- Díez, C., Traag W., Zommer P., Marinero P., Atienza J. (2006) Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *Journal of Chromatography A* **1131**, 11–23. doi: 10.1016/j.chroma.2006.07.046
- Dinan L. (1995) A strategy for the identification of ecdysteroide receptor agonists and antagonists from plants. *European Journal of Entomology* **92**, 271–283.
- Dinan L., Whiting P., Scott A. J. (1998) Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of the Chenopodiaceae. *Biochemical Systematic and Ecology* **26**, 553–576.
- Dinan L. (2001) Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* **57**, 325–339. doi: 10.1016/S0031-9422(01)00078-4.
- Dinan L., Harmatha J., Volodin V., Lafont R. (2009) Phytoecdysteroids: Diversity, biosynthesis and distribution. In: Smagghe G. (ed) *Ecdysone: Structures and functions*. 3–45, Springer, Berlin. doi:10.1007/978-1-4020-9112-4_1.
- Dinan L., Mamadaliyeva N. Z., Lafont R., (2020) Dietary Phytochemicals. In: Xiao J., Sarker S., Asakawa Y. (eds.) *Handbook of Dietary Phytochemicals*. 1–54, Springer, Singapore. ISBN 978-981-13-1745-3. doi:1007/978-981-13-1745-3_35-1
- Dostálová J., Pokorný J. (2000) Rostlinné steroly (fytosteroly) v potravinách, jejich příjem a význam pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění. *Výživa a potraviny* **55**, 189–190.

- Dufourc E. J. (2008) Sterols and membrane dynamics. *Journal of Chemical Biology* **1**, 63–77. doi: 10.1007/s12154-008-0010-6.
- Eisenreich W., Bacher A., Arigoni D., Rohdich F. (2004) Biosynthesis of isoprenoids *via* the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 1401–26.
- Galbraith, M. N., Horn D. H. S. (1966) An insect-moulting hormone from a plant. *Chemical Communications (London)* **24**, 905–906. doi: 10.1039/c19660000905.
- George J., Pal Bais H., Ravishankar G. A. (2000) Biotechnological Production of Plant-Based Insecticides, *Critical Reviews in Biotechnology* **20**, 49–77. doi: 10.1080/07388550091144186.
- Goldstein J. L., Brown M. S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425–430. doi: 10.1038/343425a0.
- Graf B. L., Poulev A., Kuhn P., Grace M. H., Lila M. A., Raskin I. (2014) Quinoa seeds leach phytoecdysteroids and other compounds with anti-diabetic properties. *Food Chemistry* **163**, 178–185. doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.088.
- Grebenok R. J., Adler J. H. (1993) Ecdysteroid biosynthesis during the ontogeny of spinach leaves. *Phytochemistry* **33**, 341–347. doi:10.1016/0031-9422(93)85514-R
- Grebenok R. J., Ripa P. V., Adler J. H. (1991) Occurrence and levels of ecdysteroids in spinach. *Lipids* **26**, 666–668. doi: 10.1007/BF02536433.
- Grebenok R. J., Galbraith D. W., Benveniste I., Feyereisen R. (1996) Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach, *Spinacia oleracea*. *Phytochemistry* **420**, 927–933. doi:10.1016/0031-9422(96)00094-5
- Grieneisen M. L. (1994) Recent Advances in our Knowledge of Ecdysteroid Biosynthesis in Insects and Crustaceans. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **24**, 115–132.
- Gül M. K., Amar S. (2006) Sterols and phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Cell and Molecular Biology* **5**, 71–79.
- Guo D. A., Vekatramesh M., Nes W. D. (1995) Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*. *Lipids* **30**, 203–219.
- Harmatha J., Dinan L. (1997) *Biological Activity of Natural and Synthetic Ecdysteroids in the BII Bioassay*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **35**, 219–225.
- Harrison S. T. L. (2011) Cell disruption. In: Moo-Young M (ed.) *Comprehensive biotechnology*, 2nd edn. 619–640, Elsevier. Oxford.
- Heinrich G., Hoffmeister H. (1967) Ecdyson als begleitsubstanz des ecdysterons in *Polypodium vulgare* L. *Cellular and Molecular Life Sciences* **23**, 995–995.
- Hengel M. J., Wong J. W., Redman Z. C., Rering C., Williams K. L. (2020) Analysis of Pesticides in Plant Foods by QuEChERS and Gas Chromatography–Mass Spectrometry: An Undergraduate Laboratory Experiment. *Journal of Chemical Education* **97**, 226–233. doi: 10.1021/acs.jchemed.9b00476
- Henrich V. C., Rybczynski R., Gilbert L. I. (1999) Peptide hormones, steroid hormones, and puffs: Mechanisms and models in insect development. *Vitam Horm* **55**, 73–125.

- Hillman W. S., Dudley D. C. Jr. (1978) The Uses of Duckweed: The rapid growth, nutritional value, and high biomass productivity of these floating plants suggest their use in water treatment, as feed crops, and in energy-efficient farming. *American Scientist* **66**, 442–451.
- Holá D., Kočová M., Rothová O., Tůmová L., Kamlar M., Macek T. (2013) Exogenously applied 20-hydroxyecdysone increases thenet photosynthetic rate but does not affect the photosyntheticelectron transport or the content of photosynthetic pigments in *Tetragonia tetragonioides* L. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 3489–3495. doi:10.1007/s11738-013-1379-6
- Huber R., Hoppe W. (1965) Die Kristall-und Molekul struktur analyse des Insekt enverpuppungs hormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekulmethode. *Chemische Berichte* **98**, 2403–2404.
- Hyodo R., Fujimoto Y. (2000) Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga hairy* roots: The possibility of 7-ene introduction at a late stage. *Phytochemistry* **53**, 733–737.
- Chang W. C., Song H., Liu H. W., Liu P. (2013) Current development in isoprenoid precursor biosynthesis and regulation. *Current Opinion in Chemical Biology* **17**, 571–579. doi:10.1016/j.cbpa.2013.06.020
- Chaubey M. K. (2018) Role of Phytoecdysteroids in Insect Pest Management: A Review. *Journal of Agronomy* **17**, 1–10. doi: 10.3923/ja.2018.1.10.
- Imai S., Toyosato T., Sakai M., Sato Y., Fujioka S., Murata E., Goto M. (1969) Screening results of plants for phytoecdysones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **17**, 335–339.
- Infromační brožura QuEChERS, QUeChERS Informational Booklet. In: www.unitedchem.com [online]. [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: <https://www.unitedchem.com/product/dspe-spe/>.
- Ito Y. (1986) Trends in Countercurrent chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **5**, 142–147.
- Jizba J., Herout V., Sorm F. (1967) Polypodine B–A novel ecdysone-like substance from plant material. *Tetrahedron Letters* **51**, 5139–5143.
- Kakimoto T. (2003) Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**, 233–239. doi: 10.1007/s10265-003-0095-5.
- Kaplanis J. N., Thompson M. J., Robbins W. E., Bryce B. M. (1967) Insect hormones: Alpha ecdysone and 20-hydroxyecdysone in bracken fern. *Science* **157**, 1436–1438.
- Kapur P., Wuttke W., Jarry H., Seidlova-Wuttke D. (2010) Beneficial effects of beta-ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissueand trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* **17**, 350–355. doi:10.1016/j.phymed.2010.01.005
- Katalog firmy UCT (United Chemical technologies) [online]. [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.unitedchem.com/product/chlorofiltr-2/>
- Kholodova Yu. D., Baltaev U., Volovenko V. O., Gorovits M. B., Abubakirov N. K. (1979) Phytoecdysones of *Serratula xeranthemoides* (during various vegetation periods). *Chemistry of Natural Compounds* **15**, 144–146.
- Kokoška L., Polesný Z., Rada V., Nepovím A., Vaněk T. (2002) Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **82**, 51–53.

- Kokoška L., Janovská D. (2009) Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: A review. *Phytochemistry* **70**, 842–855.
- Koudela K., Tenora I., Bajer J., Mat'hořová A., Sláma K. (1995) Stimulation of growth and development in Japanese quails after oral administration of ecdysteroid-containing diet. *European Journal of Entomology* **92**, 349–354.
- Kubo I., Hanke F. J. (1986) Chemical methods for isolating and identifying phytochemicals biologically active in insects. In: Miller J. R., Miller T. A. (Eds.), *Insect Plant Interactions*, 225–249. Springer Verlag, New York. doi: 10.1007/978-1-4612-4910-8_8.
- Kumpun S., Maria A., Crouzet S., Evrard-Todeschi N., Girault J-P., Lafont R. (2011) Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa* Willd., an ancient Andean crop of high nutritional value. *Food Chemistry* **125**, 1226–1234. doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.039.
- Kydličková J. (2016) Stanovení vybraných antikokcidů v kuřecím mase metodami QuEChERS a HPLC. Hradec Králové, diplomová práce (Mgr.). Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- Lafont R. (1998) Phytoecdysteroids in the world flora: diversity, distribution, biosynthesis and evolution. *Russian Journal of Plant Physiology* **45**, 276–295.
- Lafont R., Dauphin-Villemant C., Warren J. T., Rees H. (2005) Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert L.I. (Ed.), *Insect endocrinology*. 106-176, Elsevier. ISBN: 978-0-12-384749-2
- Lafont R., Dinan L. (2003) Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *Journal of Insect Science* **3**, 7.
- Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I. D. (2002) Ecdybase, a free ecdysteroid database. [online]. [cit. 2020-04-29]. Dostupné z: <http://ecdybase.org/>
- Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I. D. The Ecdysone Handbook, 3rd edition, [on-line], <http://ecdybase.org>
- Laloi M., Perret A-M., Chatre L., Melsner S., Cantrel C., Vaultier M-N., Zachowski A., Bathany K., Schmitter J-M., Vallet M., Lessire R., Hartmann M-A., Moreau P. (2007) Insights into the Role of Specific Lipids in the Formation and Delivery of Lipid Microdomains to the Plasma Membrane of Plant Cells. *Plant Physiology* **143**, 461–472. doi: 10.1104/pp.106.091496.
- Large T., Lafont R., Morgan E. D., Wilson I. D. (1992) Advances in capillary electrophoresis. Micellar capillary electrophoresis of ecdysteroids. *Analytical Proceedings* **29**, 386–388.
- Lehotay S. J., Mastovská K., Yun S. J. (2005) Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes, *Journal of AOAC International* **88**, 630–638, PMID:15859091
- Lichtenstein A. H., Deckelbaum R. J. (2001) Stanol/Sterol Ester-Containing Foods and Blood Cholesterol Levels. *Circulation* **103**, 1177–1179.
- Lichtenthaler H. K. (1998) The plants' 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *Fett-Lipid* **100**, 128–138.

- Lichtenthaler H. K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 47–65. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.47.
- Loomis W. D., Croteau R. (1973) Biochemistry and Physiology of Lower Terpenoids. *Recent Advances in Phytochemistry* **6**, 147–185. doi: 10.1016/B978-0-12-612406-4.50012-7.
- Majors R. E. (2007) Modern techniques for the extraction of solid materials - an update, *LC–GC Europe* **20**, 574–576.
- Majors R. E. (2013) Sample preparation fundamentals for chromatography, Agilent Technologies, Mississauga, Canada.
- Mamadaliyeva N. Z. (2012) Phytoecdysteroids from *Silene* plants: distribution, diversity and biological (antitumour, antibacterial and antioxidant) activities. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **11**, 474–497. ISSN 0717 7917.
- Marsan M-P., Muller I., Milon A. (1996) Ability of clionasterol and poriferasterol (24-epimers of sitosterol and stigmasterol) to regulate membrane lipid dynamics. *Chemistry and Physics of Lipids* **84**, 117–121. doi: 10.1016/S0009-3084(96)02628-X.
- Maršálek B., Šimek M., Smith R. J. (1992) The effect of ecdysone on the cyanobacterium *Nostoc* 6720. *Zeitschrift für Naturforschung* **47c**:726–730.
- Mašková K. (2016) Studium fytoekdysteroidů během ontogeneze špenátu setého (*Spinacia oleracea* L.). Olomouc, diplomová práce (Mgr.). Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
- McMurry J. (2015) Organická chemie. Brno: Vutium. ISBN 978-80-214-4769-1.
- Moghadasian M. H., Frohlich, J. J. (1999) Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: Clinical and experimental evidence. *The American Journal of Medicine* **107**, 588–594.
- Moors M., Steenssens B., Tielemans I., Massart D. L. (1994) Solid-phase extraction of small drugs on apolar and ion-exchanging silica bonded phases: Towards the development of a general strategy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **12**, 463–481. doi: 10.1016/0731-7085(94)80028-6
- Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki L., Chang M. L., Hsu H. Y. (1966) Insect hormones I. the structure of ponasterone A, an insect moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **24**, 915–917. doi: 10.1039/C19660000915
- Nes W. R., McKean M. L. (1977) Biochemistry of steroids and other isopentenoids 411–533, University Park Press, Baltimore.
- Nes W. R. (1987) The metabolism, Structure, Function of plant lipids. Mudd B. J., Nes D. W., Stumpf P. K., ed. *Multiple roles for plant sterols*. 3–9, 1. vydání New York: Plenum Press. ISBN 978-1-4684-5263-1.

- Obrázek SPE [online]. [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/Contextual_Modules/Sample_Preparation/03_Solid-Phase_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/Contextual_Modules/Sample_Preparation/03_Solid-Phase_Extraction).
- Ohyama K., Kushiro T., Nakamura K., Fujimoto Y. (1999) Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga hairy* roots: Fate of 6 α - and 6 β -hydrogens of lathosterol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**, 2925–2930.
- Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., Lampi A-M. (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 939–966. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939:AID-JSFA644>3.0.CO;2-C.
- Píš J., Harmatha J. (1992) Phenylboronic acid as a versatile derivatization agent for chromatography of ecdysteroids. *Journal of a Chromatography A* **596**, 271–275.
- Píš J., Hykl J., Buděšínský M., Harmatha J. (1992) Cyclic phenylboronates of ecdysteroids as products of regiospecific reaction with phenylboronic acid. *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* **58**, 612–618.
- Pollak O. J. (1953) Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* **7**, 702–706.
- Popis produktu a technických parametrů u QuEChERS zkumavky [online]. [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/p/quechers-150mg-mgso4-50mg-psa-50mg-chlorofiltr-2ml-ct-100-pkg?lang=CZ>
- Příkrylová V. (2018) Úvod do studia terpenů. Brno, bakalářská práce (Bc.). Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta.
- QuEChERS Informational Booklet [online]. [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: <https://www.unitedchem.com/product/dspe-spe/>.
- Rejczak T., Tuzimski T. (2015) A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry* **13**, 980-1010.
- Ripa P. V., Martin E. A., Cocciolone S. M., Adler J. H. (1990) Fluctuation of phytoecdysteroids in developing shoots of *Taxus cuspidata*. *Phytochemistry* **29**, 425–427.
- Rohmer M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural Product Reports* **16**, 565–74.
- Savchenko T., Whiting P., Sarker S. D., Dinan L. (1998) Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (*Amaranthaceae*). *Biochemical Systematic and Ecology* **26**, 337–346.
- Seidlova-Wuttke D., Christel D., Kapur P., Nguyen B. T., Jarry H., Wuttke W. (2010) Beta-ecdysone has bone protective but noestrogenic effects in ovariectomized rats. *Phytomedicine* **17**, 884–889. doi: 10.1016/j.phymed.2010.03.021
- Sláma K., Lafont R. (1995) Insect hormones—ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *European Journal of Entomology* **92**, 355–377.
- Sommé-Martin G., Colardeau J., Lafont R. 1988. Metabolism and biosynthesis of ecdysteroids in the *Drosophila* development mutant *ecd1*. *Insect Biochemistry* **18**, 735–742.

- Soriano I. R., Riley I. T., Potter M. J., Bowers W. S. (2004) Phytoecdysteroids: A novel defense against plant-parasitic nematodes. *Journal of Chemical Ecology* **30**, 651–654. doi:10.1023/B:JOEC.0000045584.56515.11
- Syrov V. N., Khushbaktova Z. A. (1996) Wound-healing effects of ecdysteroids. *Doklady Akademii Nauk Respubliki Uzbekistana* **12**, 47–50.
- Taha-Salaime L., Davidovich-Rikanati R., Sadeh A., Abu-Nassar J., Marzouk-Kheredin S., Yahyaa Y., Ibdah M., Ghanim M., Lewinsohn E., Inbar M., Aly R. (2019) Phytoecdysteroid and Clerodane Content in Three Wild *Ajuga* Species in Israel. *American Chemical Society Omega* **4**, 2369–2376. doi: 10.1021/acsomega.8b03029.
- Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N. (1967a) Studies on the constituents of *Achyranthis radix*. I. *Yakugaku Zasshi* **87**, 1463–1468.
- Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N., Arihara S., Bue K. (1967b) Insect moulting activity of crude drugs and plants. *Yakugaku Zasshi* **87**, 1414–1418. doi: 10.1248/yakushi1947.87.11_1414.
- Tammi A., Rönnemaa T., Valsta L., Seppänen R., Rask-Nissilä L., Miettinen T. A., Gylling H., Viikari J., Anttolainen M., Simell O. (2001) Dietary Plant Sterols Alter the Serum Plant Sterol Concentration but Not the Cholesterol Precursor Sterol Concentration in Young Children (The STRIP Study). *The Journal of Nutrition* **131**, 1942–1945.
- Tarkowská D. (2019) Plants are capable of synthesizing animal steroid hormones. *Molecules* **24**, 2585.
- Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M. (2014) Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* **240**, 55–76.
- Tarkowská D., Strnad M. (2016) Plant ecdysteroids: Plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones. *Planta* **244**, 545–555. doi: 10.1007/s00425-016-2561-z.
- Udalova Z. V., Zinov'eva S. V., Vasil'eva I. S., Paseshnichenko V. A. (2004) Correlation between the structure of plant steroids and their effects on phytoparasitic nematodes. *Applied Biochemistry and Microbiology* **40**, 93–97. doi:10.1023/B:ABIM.0000010362.79928.77
- Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L. (2002) Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids. *Biochemical Systematics and Ecology* **30**, 525–578. doi:10.1016/S0305-1978(01)00128-4.
- Vosolsobě S. (2008) Fluidita plazmatické membrány a lipidové rafty u rostlin. Praha, bakalářská práce (Bc.) Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta.
- Wanke, M., Skorupinska-Tudek K., Swiezewska E. (2001) Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. *Acta Biochimica Polonica* **48**, 663–672.
- Wojciechowski Z., Ogawa S., Nishimoto N., Arihara S., Bue K. (1992) Biochemistry of Phytosterol Conjugates. *Physiology and Biochemistry of Sterols*. American Oil Chemists' Society Publishing, **87**, 361–395. doi: 10.1201/9781439821831.ch14. ISBN 978-0-935315-38-7.

- Xu X., Bittman R., Duportail G., Heissler D., Vilcheze C., London E. (2001) Effect of the Structure of Natural Sterols and Sphingolipids on the Formation of Ordered Sphingolipid/Sterol Domains (Rafts). *Journal of Biological Chemistry* **276**, 33540–33546. doi: 10.1074/jbc.M104776200.
- Zhao L., Chang W-C., Xiao Y., Liu H-W., Liu P. (2013) Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* **82**, 497–530.
- Zibareva L., Volodin V., Saatov Z., Savchenko T., Whiting P., Lafont R., Dinan L. (2003) Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae. *Phytochemistry* **64**, 499–517.