

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024

Bc. Barbora Kvášová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza polyacetylenů v kořenové zelenině  
Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Kvášová**  
Osobní číslo: **C22336**  
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Analýza polyacetylenů v kořenové zelenině**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na analýzu polyacetylenů obsažených v kořenové zelenině pomocí moderních separačních technik. Věnujte se i možnostem jejich extrakce pro kvantitativní analýzu a možnostem izolace čistého standardu.
2. Na základě literární rešerše zvolte vhodné chromatografické podmínky pro separaci polyacetylenů a optimalizujte jejich HPLC separaci v systémech s obrácenými fázemi.
3. Dále vyberte vhodnou izolační techniku pro získání čistého standardu falcarinolu a zaměřte se na optimalizaci extrakce studovaných polyacetylenů pro jejich kvantitativní analýzu ve vybraných vzorcích kořenové zeleniny.
3. Optimalizovanou extrakční a chromatografickou metodu využijte pro analýzu studovaných polyacetylenů obsažených ve vzorcích kořenové zeleniny. Porovnejte a diskutujte obsah a zastoupení jednotlivých polyacetylenů v těchto vzorcích.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Mgr. Miroslav Kubát**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza polyacetylenů v kořenové zelenině jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2024

Bc. Barbora Kvášová v. r.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své vedoucí doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za její ochotu, vstřícný přístup a za veškerou energii a čas věnovaný v průběhu vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Mgr. Miroslavu Kubátovi za odborné rady a doc. Ing. Liboru Červenkoví, Ph.D. za lyofilizaci vzorků. Velké poděkování za krásná a bezstarostná studijní léta patří mým rodičům.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá analýzou polyacetylenů v kořenové zelenině z čeledi miříkovitých. Extrakce těchto látek z mrkve, petržele a pastináku byla provedena pomocí různých extrakčních technik, přičemž nejvyšší účinnosti extrakce bylo dosaženo extrakcí dichlormethanem. Pro následné stanovení obsahu polyacetylenů ve vybraných vzorcích kořenové zeleniny byla použita kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Protože komerčně dostupné standardy jsou velmi drahé, bylo v rámci této diplomové práce přistoupeno k izolaci falcarinolu pomocí preparativní chromatografie. Z jednoho kilogramu čerstvé petržele bylo získáno 24,4 mg čistého standardu a bylo uspořeno značné množství finančních prostředků.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

polyacetyleny, falcarinol, falcarindiol, pastinák, petržel, HPLC

## **TITLE**

Analysis of polyacetylenes in root vegetables

## **ANNOTATION**

This thesis deals with analysis of polyacetylenes in root vegetables from *Apiaceae* family. The extraction of these substances from carrot, parsley and parsnip was carried out using various extraction techniques with the highest extraction efficiency achieved by extraction with dichloromethane. Liquid chromatography with spectrophotometric detection was used to subsequently determine the content of polyacetylenes in selected root vegetable samples. As the commercially available standards are very expensive, the isolation of falcarinol by preparative chromatography was performed in this thesis. The isolation was successful and 24,4 mg of pure standard was obtained from one kilogram of fresh parsley. Our approach resulted in considerable financial savings.

## **KEYWORDS**

polyacetylenes, falcarinol, falcarindiol, parsnip, parsley, HPLC

# OBSAH

ÚVOD .....	11
1 Teoretická část.....	12
1.1 Pastinák setý.....	12
1.1.1 Výživová hodnota .....	12
1.1.2 Využití pastináku.....	15
1.2 Petržel kořenová.....	16
1.3 Mrkev obecná.....	17
1.4 Polyacetyleny .....	18
1.4.1 Funkce polyacetylenů v rostlinách.....	19
1.4.2 Vlivy na obsah polyacetylenů .....	20
1.4.3 Fyziologické účinky polyacetylenů.....	20
1.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	22
1.6 Hmotnostní spektrometrie .....	24
1.6.1 Ionizace elektrosprejem.....	24
1.6.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku .....	25
1.6.3 Hmotnostní analyzátory .....	26
1.6.4 Detektory v hmotnostní spektrometrii.....	27
1.7 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.....	28
1.8 Izolace čistých polyacetylenů.....	30
1.9 Příprava vzorku k analýze .....	32
1.10 Příprava a uchování standardních roztoků .....	33
1.11 HPLC analýza polyacetylenů .....	34
1.11.1 Spektrofotometrická detekce.....	34
1.11.2 Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie.....	35
1.12 GC analýza polyacetylenů.....	37
1.13 Analýza polyacetylenů Ramanovou spektroskopií .....	38
2 Experimentální část .....	40
2.1 Přístroje a zařízení.....	40
2.2 Použité chemikálie .....	41
2.3 Vzorky.....	42
2.4 Pracovní postupy .....	42
2.4.1 Extrakce pevná fáze – kapalina.....	42
2.4.2 SPE extrakce .....	42



2.4.3	Extrakce pomocí ASE .....	43
2.4.4	QuEChERS extrakce .....	43
2.4.5	Izolace falcarinolu .....	43
2.4.6	Příprava standardních roztoků.....	44
2.4.7	Příprava vzorků .....	44
2.4.8	HPLC analýza .....	45
3	Výsledky a diskuze.....	46
3.1	Optimalizace extrakce .....	46
3.1.1	Extrakce pevná fáze – kapalina.....	46
3.1.2	SPE extrakce .....	50
3.1.3	Extrakce pomocí ASE .....	51
3.1.4	QuEChERS extrakce .....	52
3.2	Izolace falcarinolu .....	54
3.3	HPLC analýza .....	61
3.3.1	UV/VIS spektrum polyacetylenů .....	61
3.3.2	Optimalizace separace.....	62
3.3.3	HPLC/MS.....	66
3.3.4	Kvantitativní analýza polyacetylenů .....	67
	ZÁVĚR.....	72
	Literatura .....	73
	PŘÍLOHY.....	80

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obr. 1: Pastinák setý.....	12
Obr. 2: Pastinák pečený na ohni a pastinák pečený s medem .....	16
Obr. 3: Zástupci polyacetylenů v čeledi miříkovitých .....	19
Obr. 4: Toxické polyacetyleny rozpuku a haluchy .....	21
Obr. 5: Schéma HPLC.....	22
Obr. 6: Ionizace elektrosprejem .....	25
Obr. 7: Chemická ionizace za atmosférického tlaku.....	26
Obr. 8: Elektronový násobič.....	27
Obr. 9: Schémata elektronových násobičů .....	27
Obr. 10: Porovnání účinnosti extrakce při použití ethylacetátu a dichlormethanu u vzorku petržele. ....	46
Obr. 11: Porovnání účinnosti extrakce při použití ethylacetátu a dichlormethanu u vzorku mrkve.....	47
Obr. 12: Vliv hexanu na extrakční účinnost polyacetylenů obsažených v mrkvi.....	47
Obr. 13: Paretův graf pro falcarinol .....	49
Obr. 14: Paretův graf pro falcarindiol .....	49
Obr. 15: Profily pro předpovědi FaOH a FaDOH při různých podmínkách extrakce .....	50
Obr. 16: SPE extrakce u vzorku mrkve.....	51
Obr. 17: QuEChERS extrakce s aktivním uhlím u vzorku petržele.....	53
Obr. 18: QuEChERS extrakce s komerční směsí sorbentu s přidáním aktivním uhlím u vzorku petržele. ....	54
Obr. 19: Chromatografické záznamy FaOH při izokratické eluci.....	55
Obr. 20: Porovnání chromatografických záznamů získaných pomocí preparativní a analytické chromatografie. ....	56
Obr. 21: Optimalizace doby jímání frakcí u preparativní chromatografie, experiment A. ....	57
Obr. 22: Kontrola čistoty frakcí u experimentu A pomocí HPLC. ....	57
Obr. 23: Optimalizace doby jímání frakcí u preparativní chromatografie, experiment C. ....	58
Obr. 24: Kontrola čistoty frakcí u experimentu C pomocí HPLC. ....	58
Obr. 25: Záznam z preparativní chromatografie při izolaci falcarinolu.....	59
Obr. 26: Čistota první jímání frakce při izolaci FaOH. ....	60
Obr. 27: Absorpční spektrum falcarindiolu.....	61
Obr. 28: Absorpční spektrum falcarinolu.....	62

Obr. 29: Optimalizace separace polyacetylenů polyacetylenů u vzorku petržele.....	63
Obr. 30: Optimalizace separace polyacetylenů u vzorku pastináku.....	63
Obr. 31: Optimalizovaná separace polyacetylenů.....	64
Obr. 32: Optimalizace separace polyacetylenů u vzorku petržele na F5 stacionární fázi.....	65
Obr. 33: Optimalizace separace FaOH u vzorku pastináku na bifenylové stacionární fázi.....	65
Obr. 34: Hmotnostní spektrum falcarinolu .....	66
Obr. 35: Hmotnostní spektrum falcarindiolu .....	67
Obr. 36: Chromatografický záznam separace standardního roztoku FaOH o koncentraci 100 µg/ml .....	67
Obr. 37: Kalibrační křivka: závislost plochy píku na koncentraci FaOH.....	68
Obr. 38: Obsah polyacetylenů ve vzorcích pastináku, petržele a mrkve .....	69
Obr. 39: Porovnání obsahu polyacetylenů ve vzorcích mrkve s literaturou .....	70
Obr. 40: Porovnání obsahu polyacetylenů ve vzorcích pastináku s literaturou .....	71
Obr. 41: Porovnání obsahu polyacetylenů ve vzorcích petržele s literaturou.....	71
Tabulka 1: Obsah a složení makronutrientů v pastináku .....	13
Tabulka 2: Obsah prvků v pastináku.....	13
Tabulka 3: Obsah vitamínů v pastináku.....	14
Tabulka 4: Přehled iontů detekovaných v MS spektru s použitím ESI v pozitivním módu ....	36
Tabulka 5: Přehled iontů detekovaných v MS spektru s použitím APCI.....	37
Tabulka 6: Fragmenty polyacetylenů v GC/MS spektru při použití EI .....	38
Tabulka 7: Fragmenty polyacetylenů v GC/MS spektru při použití chemické ionizace .....	38
Tabulka 8: Vzorky kořenové zeleniny .....	42
Tabulka 9: Parametry vybrané pro optimalizaci extrakce.....	50
Tabulka 10: Porovnání extrakce pevná fáze – kapalina s SPE extrakcí u vzorku mrkve .....	51
Tabulka 11: Optimalizace ASE extrakce .....	52
Tabulka 12: QuEChERS extrakce u vzorku petržele z Lidlu.....	54
Tabulka 13: Finanční bilance nákladů .....	60
Tabulka 14: Porovnání ceny izolovaného standardu s komerčními standardy .....	61
Tabulka 15: Vlastnosti chromatogramu roztoku FaOH o koncentraci 100 µg/ml, λ=205 nm.	67
Tabulka 16: Obsah polyacetylenů v µg/g lyofilizovaných vzorků .....	69

## SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
ASE	Zrychlená extrakce rozpouštědlem
C18	Oktadecylsilikagel
DAD	Detektor s diodovým polem
DCM	Dichlormethan
ESI	Ionizace elektrosprejem
EtAc	Ethylacetát
FaOH	Falcarinol
FaDOH	Falcarindiol
FaDOAc	Falcarindiol-3-acetát
FT	Fourierova transformace
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IČ	Infračervená spektroskopie
M	Molekulový iont v MS
MeOH	Methanol
MK	Mastné kyseliny
MRM	Monitorování vybraných přechodů
MS	Hmotnostní spektrometr
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PSE	Zrychlená extrakce podporovaná tlakem
PTFE	Polytetrafluorethylen
RIC	Rekonstruovaný iontový chromatogram
RP-HPLC	Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SIM	Monitorování vybraného iontu
SRM	Monitorování vybraného přechodu
TIC	Celkový iontový chromatogram
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
UV	Ultrafialová oblast
VIS	Oblast viditelného světla

## ÚVOD

Mrkev patří k nejoblíbenější kořenové zelenině a je spolu s petrželí k sehnání v obchodech po celý rok. Oproti tomu pastinák bývá pěstován spíše pro domácí spotřebu, čemuž nasvědčuje i skutečnost, že je mnohem snazší sehnat jeho semínka než vypěstovanou zeleninu. Díky nízké energetické hodnotě je konzumace kořenové zeleniny zdraví prospěšná, navíc obsahuje řadu minerálních látek, vitamínů, fenolické látky a je zdrojem rozpustné vlákniny.

K významným sekundárním metabolitům nacházejícím se nejen v miříkovitých rostlinách patří polyacetyleny, jež ve své struktuře obsahují trojné vazby. Polyacetyleny falcarinol a falcarindiol jsou biologicky aktivní látky působící v kořenech rostlin jako antimykotika. Na lidský organismus mají příznivé účinky, avšak ve vysokých koncentracích jsou polyacetyleny příčinou jedovatosti rostlin, například rozpuku jízlivého a haluchy vodní.

Ke stanovení falcarinolu a falcarindiolu v lyofilizovaných vzorcích kořenové zeleniny byla využita kapalinová chromatografie s UV/VIS detekcí a také kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. K extrakci analytů z matrice byly využity různé extrakční techniky, jejichž účinnost byla porovnána a byla vybrána optimální extrakce pro analýzu vzorků. Extrakt petržele posloužil také jako vstupní surovina pro izolaci vlastního standardu nezbytného pro kvantitativní stanovení.

# 1 Teoretická část

## 1.1 Pastinák setý

Pastinák setý (*Pastinaca sativa*) je méně známou kořenovou zeleninou z čeledi miříkovitých (*Apiaceae*). Lidové varianty výslovnosti „pastyňák“ či „pastiňák“ se staly natolik běžnými, že je označení „pastiňák“ k vidění i v obchodech. Pastinák má bílý kořen (Obr. 1), proto bývá zaměňován s petrželí, má však krémovější zbarvení, a hlavně dorůstá do výraznější délky a objemu. Najít pastinák v sekci ovoce a zeleniny v supermarketu není zcela běžné, nemůže být tedy divu, že se o jeho existenci mnoho lidí teprve dozvídá, ačkoliv lze dohledat až neuvěřitelné množství receptů od těch, kteří s ním již mají zkušenosti. Do jídel se přitom zařazuje velice snadno, a to hned v několika podobách. Své využití mají i listy, a to k ozdobení polévky nebo jako koření [1].



**Obr. 1:** Pastinák setý [2]

Odrůdy pastináku jsou vyšlechtěné k pěstování jak na záhonku, tak na polích. Výsev se provádí časně z jara, poněvadž klíčení semínkům trvá okolo 25 dnů. Naopak se sklizní není důvod spěchat, pastinák je mrazuvzdorný a může zůstat v zemi až do pozdního podzimu nebo zimy, dokud není zpracován [3]. Pastinák má původ ve Středomoří a v 16. století byl běžnou součástí stravy chudých v Evropě. Byl znám i v Anglii, ze které byl rozšířen do kolonizované Ameriky. Tam se k jeho pěstování přidali i indiáni. Divoký pastinák však ke konzumaci není vhodný [4].

### 1.1.1 Výživová hodnota

Nezpracovaný pastinák disponuje energetickou hodnotou 271 kJ (neboli 64 kcal) na 100 g, za níž stojí především sacharidy. Z celkového množství tvoří přibližně polovinu jednoduché sacharidy v čele se sacharózou a druhou polovinu polysacharidy, tj. škrob. Oproti malému množství tuků, mastných kyselin (MK) a bílkovin obsahuje pastinák značné množství ve vodě rozpustné vlákniny, která pomáhá regulovat hladinu cukru v krvi a snižuje koncentraci

cholesterolu [5, 6]. Obsah hlavních živin je jak v syrovém, tak v tepelně upraveném pastináku zpracován v Tabulce 1. Pastinák je překvapivě bohatším zdrojem vitamínů a minerálních látek než mrkev, ačkoliv neobsahuje takové množství barviv [5, 7].

**Tabulka 1:** Obsah a složení makronutrientů v pastináku [5]

Makronutrienty	Obsah v syrovém [g/100 g]	Obsah ve vařeném [g/100 g]
Voda	79,3	78,7
Tuky	1,1	1,2
Nasyčené MK	0,2	0,2
Mononenasyčené MK	0,5	0,5
Polynenasycené MK	0,2	0,2
Sacharidy	12,5	12,9
Škrob	6,2	6,4
Oligosacharidy	0,6	0,6
Cukry	5,7	5,9
Glukóza	0,8	0,8
Fruktóza	0,5	0,5
Sacharóza	4,3	4,5
Maltóza	0	0
Laktóza	0	0
Bílkoviny	1,8	1,6
Celkový dusík	0,29	0,26
Vláknina	4,6	4,7

Pro lidský organismus je pastinák nejen bohatým zdrojem fosforu, draslíku, hořčíku, chloru, železa a vápníku, ale obsahuje i další pro tělo důležité mikroelementy jako jsou měď, zinek, mangan, jód, selen, kobalt a chrom, včetně stopových prvků křemíku, cínu, kadmia, arsenu, hliníku, niklu a boru (Tabulka 2) [5, 6].

**Tabulka 2:** Obsah prvků v pastináku

Prvky	Obsah v syrovém [mg/100 g] [5]	Obsah ve vařeném [mg/100 g] [5]	Prvky	Obsah v syrovém [mg/kg sušiny] [6]	Prvky	Obsah v syrovém [mg/kg sušiny] [6]
Ca	41	50	Al	37,1	Li	0,06
Cl	49	33	As	0,017	Mg	1 609
Cu	0,05	0,04	B	14,2	Mn	7,80
Fe	0,6	0,6	Ca	2 129	Na	64,2
I	< LOD	< LOD	Cd	0,18	Ni	1,29
K	450	350	Co	0,07	P	4 148
Mg	23	23	Cr	0,23	Pb	0,20
Mn	0,5	0,3	Cu	2,43	Se	0,01
Na	10	4	Fe	65,0	Si	27,53
P	74	76	Hg	0,009	Sn	0,02
Se	0,002	< LOD	I	0,30	Sr	17,13
Zn	0,3	0,3	K	23 291	Zn	12,64

Pastinák obsahuje celou řadu vitamínů, jak je zobrazeno v Tabulce 3. Jeho konzumace je doporučována těhotným ženám, protože pomáhá pokrýt zvýšenou potřebu kyseliny listové (vitamín B<sub>9</sub>). Doporučená denní dávka dle WHO činí v prvním trimestru 400 µg [8], obsah ve 100 g syrového pastináku je 87 µg [5, 6].

**Tabulka 3:** Obsah vitamínů v pastináku [5]

Vitamíny	Obsah v syrovém [µg/100 g]	Obsah ve vařeném [µg/100 g]	Vitamíny	Obsah v syrovém [mg/100 g]	Obsah ve vařeném [mg/100 g]
Vitamín K <sub>1</sub>	0,05	–	Vitamín E	1,00	1,00
Retinol	0	0	Thiamin	0,23	0,07
β-karoten	30	30	Riboflavin	0,01	0,01
Vitamín D	0	0	Niacin	1,00	0,70
Biotin	0,1	–	Vitamín B <sub>5</sub>	0,50	0,35
Vitamín B <sub>9</sub>	87	41	Vitamín B <sub>6</sub>	0,11	0,09
Vitamín B <sub>12</sub>	0	0	Vitamín C	17	10,00

Dalšími sekundárními metabolity pastináku jsou fenolické látky a polyacetyleny. Ve třech skupinách pastináku rozdělených podle velikosti kořene se obsah fenolických látek vyjádřený jako množství kyseliny chlorgenové pohyboval mezi 109,7–125,3 µmol/g sušiny extraktu. Při zohlednění obsahu vlhkosti v jednotlivých skupinách bylo nejvíce polyfenolických látek nalezeno ve skupině pastináku s nejmenšími kořeny. Analýza ethanolového extraktu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) odhalila přítomnost jedenácti fenolických sloučenin, ze kterých jich osm bylo identifikováno. Přítomné byly glykosilované deriváty kvercetinu, kemferolu, apigeninu a genkwaninu a dále kyselina hydroxyskořicová. Relativní obsahy jednotlivých sloučenin byly proměnlivé v závislosti na velikosti kořene, a to u některých sloučenin dvoj- až trojnásobně. Analýze fenolických látek byly podrobeny také listy pastináku, ve kterých nedosahoval jejich obsah ani desetininy množství v kořeni [7]. Přítomnost polyacetylenů falcarinolu (FaOH) a falcarindiolu (FaDOH) v pastináku byla odhalena až studií v roce 2005, ačkoliv u mrkve byla již nějaký čas známá [9]. Ve studii [10] byla poté u pastináku zaznamenána přítomnost také falcarindiol-3-acetátu (FaDOAc).

V rostlinách čeledi miříkovitých jsou v různých množstvích obsaženy toxiny furokumariny (též furanokumariny). Jedná se o fotoaktivní sloučeniny vyráběné řadou rostlin na obranu před napadením plísněmi, bakteriemi a hmyzem. Jejich negativní účinky na lidské zdraví se dostaly do povědomí společnosti zvláště díky invazivnímu bolševníku velkolepému. Po kontaktu pokožky s furokumariny a následném vystavení na světlo dochází ke vzniku vyrážky a velkých puchýřů, které se špatně hojí [11, 12]. Nepříznivé účinky na kůži mají navíc i polyacetyleny



[13], proto se doporučuje při zpracování pastináku pracovat v rukavicích a případně i dlouhém oděvu, aby nemohlo dojít k potřísnění pokožky šťávou z natě.

Negativní účinky furokumarinů se projevují nejen při styku s pokožkou, ale i při konzumaci ovoce a zeleniny, jež je dokonce spojována s rozvojem rakoviny kůže. [12]. Furokumariny jsou obsaženy i v kulturním pastináku, proto se doporučuje snížit jejich hladinu oškrabáním a tepelnou úpravou [14]. V souladu s tímto doporučením postupovali Melough a kol. [12] při úpravě vzorku pastináku, který povařili ve vodě, nikoliv však u vzorku petržele, jež byla analyzována bez tepelné úpravy. Právě proto byla celková koncentrace furokumarinů 70× vyšší v petrželi (23 215 ng/g) než ve vařeném pastináku (335 ng/g). Podobně vysoké množství furokumarinů jako v petrželi obsahovaly grepy a limetková šťáva. V pastináku byly metodou ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií v pořadí dle klesajícího obsahu stanoveny 8-methoxypsoralen, bergapten, bergaptol, psoralen a bergamotin.

Pastinák může vedle přirozených přírodních látek obsahovat i nežádoucí kontaminanty získané z vody a půdy nebo záměrně používané při pěstování. Podle zprávy Pesticide Action Network Europe (PANEurope) patří pastinák mezi desítku zeleniny s nejčastěji nalezenými rezidui pesticidů. Závažnost tohoto zjištění naštěstí snižuje skutečnost, že kořenová zelenina je před konzumací omyta a oškrabána případně dále tepelně upravena a tyto operace redukuje skutečný přijatý obsah pesticidů [15].

### **1.1.2 Využití pastináku**

Uplatnění pastináku v kuchyni je velmi blízké jiným druhům kořenové zeleniny. Na rozdíl od petržele je jeho chuť méně aromatická, je jemnější a sladší, s oříškovými tóny. Pastinák se sice dá konzumovat za syrova např. nastrouhaný do salátu, chutnější je však po tepelné úpravě. Receptů s jeho využitím je celá řada. Vařený pastinák nalezneme v podobě kostiček v polévce, rozmixovaný v zeleninových krémech, pečený či smažený jako zeleninové chipsy nebo hranolky (Obr. 2). Přidáván je do zeleninových pyré, bramborové či batátové kaše nebo do chilli con carne. Pro jeho sladkou chuť není vyloučeno ani použití do kynutých knedlíků, koláčů a dortů [16]. V kuchyni lze pracovat i se zpracovaným pastinákem, na trhu je k dostání pastinák v podobě sušených kostek, jež ušetří čas potřebný na oškrabání a krájení. K dochucování pak slouží drcený a mletý pastinák, který je běžnou součástí zeleninových kořenicích směsí [17, 18]. Na pastinák lze poměrně často narazit v pokrmech určených pro nejmenší, ať už jde o čisté zeleninové příkrmy pro kojence nebo komplexnější pokrmy pro batolata [19–22].



**Obř. 2:** Pastinák pečený na ohni [foto autor] a pastinák pečený s medem [23]

V dnešní době je trendem vyvíjet stále nové kombinace surovin a příchutí pro zvýšení přitažlivosti a podporu prodeje i jinak běžně neochucených výrobků, případně produktů ochucovaných až v domácnosti. Příkladem takového pokusu je tvarohový dezert z Cottage sýru, do kterého ve studii [24] zkušeli přidávat kousky kandovaného pastináku a dýně. Experimentálním výsledkem se stal recept o složení 15 % pastináku nebo dýně. Přimícháním suroviny nebyly narušeny vlastnosti sýru, naopak byla podpořena hustota a plasticita produktu. Je patrné, že potenciál využití pastináku není ještě zcela vyčerpán, a časem na něj bude možné narazit mnohem častěji. Pastinák je používán také jako krmivo pro domácí zvířata, např. sušené kostky pastináku jsou nabízeny jako pochoutka pro králíky a morčata nebo je přísadou v konzervách pro psy [25, 26].

## 1.2 Petržel kořenová

Petržel kořenová (*Petroselinum crispum*) je na první pohled podobná pastináku, nicméně v porovnání s ním je její kořen bělejší a u některých odrůd by se dal popsat jako podlouhlejší ačkoli objemově menší. Velkou nápoděvu v rozeznání od pastináku představuje nať, která u petržele vyrůstá z celého vršku kořene, zatímco u pastináku naopak z propadlého středu na konci kořene. Dále by v odlišení mělo pomoci jedinečné petrželové aroma, na kterém se podílí terpeny alfa-pinen, beta-pinen, myrcen, beta-felandren a 1,3,8-p-mentatrien a další těkavé látky jako myristicin. Zelená nať petržele je proto využívána jako aromatická bylina. Zároveň představuje jeden z nejbohatších zdrojů vitamínu C a lze ji zpracovat nejen u kadeřavé nebo hladkolisté petržele, které jsou za tímto účelem pěstovány, ale i u kořenové odrůdy [27, 28]. Další zdraví prospěšnou látkou je vitamín E, který se spolu s fenolickými látkami (zejména deriváty apigeninu a kemferolu) podílí na vysoké antioxidační aktivitě. Kromě antioxidačních účinků je petržel ceněna pro hepatoprotektivní, antibakteriální, antimykotické, analgetické, diuretické a další účinky. Petržel je rovněž zdrojem mastných kyselin, především esenciální kyseliny linolenové a neesenciální kyseliny palmitové, a mnoha minerálních látek. Obsah

draslíku, vápníku, hořčíku i železa je srovnatelný s pastinákem [29]. Petrželová nať je také bohatá na furokumariny, které při potřísnění nechráněné pokožky a po vystavení světlu způsobují její poškození a vznik puchýřů [30].

Co se týká přítomnosti polyacetylenů v petrželi, tak se výsledky studií značně rozcházejí [9, 10, 31]. V některých studiích je prezentován vysoký obsah polyacetylenů, přičemž petržel byla zvolena pro izolaci čistého falcarinolu [10, 31] a dalších polyacetylenů [10]. Ve srovnání s mrkví byl stanovený obsah falcarinolu v petrželi mnohem větší [10, 31], a dokonce byla zaznamenána i přítomnost falcarindiol-3-acetátu [10]. Oproti tomu ve studii [9] nebyl falcarinol detekován vůbec, avšak byly identifikovány méně běžné polyacetyleny jako jsou 8-O-methylfalcarindiol a panaxydiol, které lze rovněž nalézt v celeru, ale nikoliv v mrkvi a pastináku [9].

### 1.3 Mrkev obecná

Mrkev obecná (*Daucus carota*) je charakteristickým zástupcem čeledi miříkovitých. Oblíbenější kořenovou zeleninu bychom hledali velmi těžko [32, 33], i proto je v obchodech mrkev k dostání po celý rok. Nejjemnější a nejsladší chutí se vyznačuje raná mrkev zvaná „karotka“, ovšem každá mrkev je bohatým zdrojem minerálních látek, vitamínů C a E, derivátů vitamínu B a dalších zdravích prospěšných látek. Zvláště důležitou fytochemikálií je betakaroten, který je v těle přeměňován na vitamín A, tzn. je jeho prekurzorem [33–36]. Energeticky hodnotná je mrkev díky obsahu sacharidů. Skoro polovinu z celkových sacharidů tvoří redukující sacharidy [33]. Nejvíce sacharidů obsahovala odrůda červené mrkve, a to 5,6 g/100 g mrkve [33], nicméně obsah sacharidů může být až 11,2 g/100 g. V mrkvi lze nalézt také malé množství škrobu a vlákninu [36]. V průběhu skladování dochází k úbytku sacharózy, což je provázáno nárůstem obsahu glukózy a fruktózy [35], proto se složení čerstvé mrkve liší od skladované. Mění se také obsah vitamínu C, který po měsíci skladování klesá až na polovinu své počáteční hodnoty [36].

Na rozdíl od pastináku s petrželí obsahuje mrkev karotenoidy, které slouží jako zdroj potravinářského barviva. Využíváno jich je hned několik, na což je myšleno v jejich označování a u E čísla je pro upřesnění, o jaké látky se jedná, uvedeno malé písmeno. Směs karotenů nebo samostatný betakaroten nese označení E160a, žlutý lykopen E160d [37] atd. Mrkev je ovšem i zdrojem dalšího přírodního barviva, a tím jsou anthokyany. Nachází se především v odrůdách fialové a černé mrkve, kde je jejich celková koncentrace okolo 250 mg/100 g, zatímco celková koncentrace karotenoidů pouhých 1,5 mg/100 g. Naopak v u nás běžné oranžové mrkvi je

koncentrace anthokyanů pouhých 0,16 mg/100 g a obsah karotenoidů se pohybuje okolo 12 mg/100 g [33]. Anthokyany patří mezi flavonoidy a je u nich možné sledovat vysokou antioxidační aktivitu, proto je konzumace černé mrkve doporučována stejně jako oranžové. Anthokyany (E163) jsou na rozdíl od karotenoidů rozpustné ve vodě, v závislosti na pH přechází z červeného do modrého zbarvení. V potravinářství jsou používány k barvení ovocných šťáv a cukrovinek. Pokud se na obalu vyskytuje označení anthokyanů (E163), nemusí se jednat pouze o anthokyany z černé mrkve, neboť nejsou jejich jediným průmyslovým zdrojem [32, 37–39]. Pomocí spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií byly v odrůdách černé mrkve stanoveny deriváty kyanidinu, především kyanidin-3-xylosylglykosylgalaktosid, kyanidin-3-xylosylgalaktosid a kyanidin-3-xylosyl-(glykosyl)galaktosidy acetylované kyselinou sinapovou, kyselinou ferulovou a kyselinou kumarovou [32, 38, 39].

Mrkev na ochranu před napadením mikroorganismy, zvláště plísněmi, syntetizuje C17-polyacetyleny. V jejím kořenu nalezneme falcarinol, falcarindiol a také falcarindiol-3-acetát [9, 10, 40]. Přítomnost polyacetylenů v mrkvi je spojována s hořkou chutí, kterou kromě dalších hořkých látek způsobuje především falcarindiol [41–43].

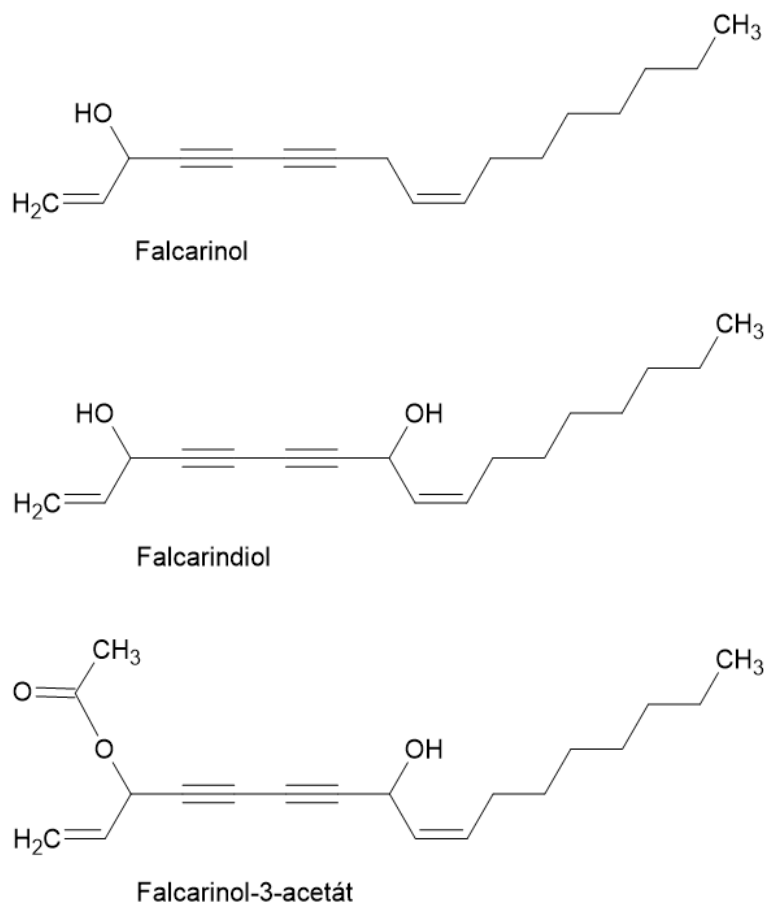
#### **1.4 Polyacetyleny**

Svůj název získaly polyacetyleny po nejjednodušším uhlovodíku s trojnou vazbou acetylenu, ačkoliv systematicky přesnější je pojmenování polyyny, neboť polymery odvozené od acetylenu obsahují pouze dvojně vazby. Jedná se o rozmanitou skupinu rostlinných metabolitů, které mimo dvou a více trojných vazeb obsahují aromatická jádra, kyslíkaté a sirné heterocykly a další funkční skupiny [13, 44, 45]. Sloučeniny jsou často citlivé na světlo a vyšší teplotu [31, 46].

Polyacetyleny se v přírodě vyskytují v jedlých, léčivých i jedovatých druzích rostlin celkem 24 čeledí [47], mezi které patří aralkovité (ženšen pravý, břečťan popínavý, heřmánek pravý), hvězdnicovité (salát listový, několik druhů pelyňku, atraktylis, dvouzubec, světlice barvířská), zvonkovité (pazvonek chloupkatý), lilkovité (rajčata, lilek), dřínovité, láhevnikovité, tykvovité a v neposlední řadě miříkovité (pastinák, mrkev, petržel, celer, fenýkl, libeček lékařský) [13, 44, 45], nicméně jejich výskyt byl prokázán i v řasách, houbách, mořských organismech i hmyzu [47].

Čeď miříkovitých obsahuje acyklické polyacetyleny s celkovým počtem sedmnácti uhlíků, díky čemuž je tato skupina specifikována jako alifatické C17-polyacetyleny. Odvozené jsou od

mononenasyčené kyseliny olejové ( $C_{17}H_{33}COOH$ ), z níž dehydrogenací,  $\beta$ -oxidací a následnými oxidacemi a dehydrogenacemi vzniká falcarinol a jemu příbuzné deriváty falcarindiol a falcarindiol-3-acetát (Obr. 3), jimž je falcarinol prekurzorem [13, 45, 48].



**Obr. 3:** Zástupci polyacetylenů v čeledi miříkovitých

#### 1.4.1 Funkce polyacetylenů v rostlinách

Primární metabolity slouží rostlinám jako zdroj energie, kdežto sekundární metabolity, kam patří také polyacetyleny, jim pomáhají čelit a odolávat vlivům okolí. V miříkovitých rostlinách mají polyacetyleny významnou obrannou úlohu a jsou přítomny a vyráběny za účelem ochrany rostliny především před napadením plísněmi a dalšími patogeny [13, 31, 40, 49], od čehož se odvíjí i tzv. nematocidní efekt, který znamená, že tyto rostliny čistí od patogenů a hád'átek i půdu ve svém okolí [9].

Pokud by se lišila tvorba polyacetylenů během růstu nebo skladování rostliny v návaznosti na mikrobiální zátěž, dalo by se o nich uvažovat jako o fytoalexinech. Tak jsou nazývány obranné látky, které si rostlina vytváří při napadení mikroorganismy. Obsah v rostlinách tím pádem kolísá nejen mezi odrůdami, ale i mezi jednotlivými kusy [31, 44, 49].

### 1.4.2 Vlivy na obsah polyacetylenů

Bylo zjištěno, že obsah polyacetylenů v mrkvi po sklizni je odlišný oproti obsahu měřeném po dlouhodobém skladování [48]. Během skladování, které probíhalo po dobu čtyř měsíců při teplotě 1 °C a relativní vlhkosti 98 %, došlo k významnému nárůstu obsahu polyacetylenů [48]. Protože jsou polyacetyleny soustředěny po obvodu kořene, je jejich obsah zdánlivě vyšší v menších mrkvích [48]. Také bylo sledováno, jak je stabilita polyacetylenů ovlivněna mechanickými operacemi (škrábání, různé způsoby krájení), po kterých byly vzorky uskladněny v chladničce a po dobu sedmi dnů průběžně proměřovány. Ze získaných výsledků bylo patrné, že i v narušených tkáních je obsah polyacetylenů stabilní [50].

Koncentraci polyacetylenů do velké míry ovlivňuje i způsob zpracování [46, 48]. Blanšírování, kterým se rozumí krátké ošetření parou nebo vroucí vodou, inaktivuje enzymy, jež způsobují degradaci falcarinolu i dalších termolabilních polyacetylenů a dochází ke snížení jejich koncentrace. Při následném zamražení blanšírované zeleniny už k dalšímu snížení nedochází, na rozdíl od mražené neblanšírované zeleniny [46, 48]. Během degradace falcarinolu dochází k různým oxidačním a dehydrogenačním reakcím, které vedou ke vzniku falcarindionu, dehydrofalcarinolu nebo dehydrofalcarinonu [50]. Při vaření dochází k poklesu falcarinolu v mrkvi v závislosti na délce varu až o 80 %. Z trojice polyacetylenů obsažených v mrkvi (falcarinol, falcarindiol a falcarindiol-3-acetát) je k tepelné degradaci falcarinol nejodolnější [46, 51]. V případě pastináku mají tepelné úpravy vliv na následnou změnu barvy a dochází ke žloutnutí až hnědnutí [50].

### 1.4.3 Fyziologické účinky polyacetylenů

Polyacetyleny vykazují vysokou biologickou aktivitu nejen v rostlinách, ale mají široké spektrum účinků na lidské zdraví, přičemž za biologicky nejaktivnější je považován falcarinol [31]. Účinky na zdraví jsou v případě alifatických C17-polyacetylenů obsažených v zelenině příznivé, avšak jejich vyšší koncentrace nebo jiné typy polyacetylenů mají opačný efekt. Tento efekt lze nazývat jako hormetický, kdy některé toxické látky působí v nízkých koncentracích pozitivně. V případě falcarinolu je pro přechod mezi těmito účinky nutný tisícinásobné zvýšení dávky, a tak se není třeba konzumace zeleniny obávat [13, 48]. Nežádoucí účinky vyvolané konzumací se nepředpokládají a ani nejsou známy, neboť přítomnost falcarinolu způsobuje nepříjemnou hořkou chuť [41–43].

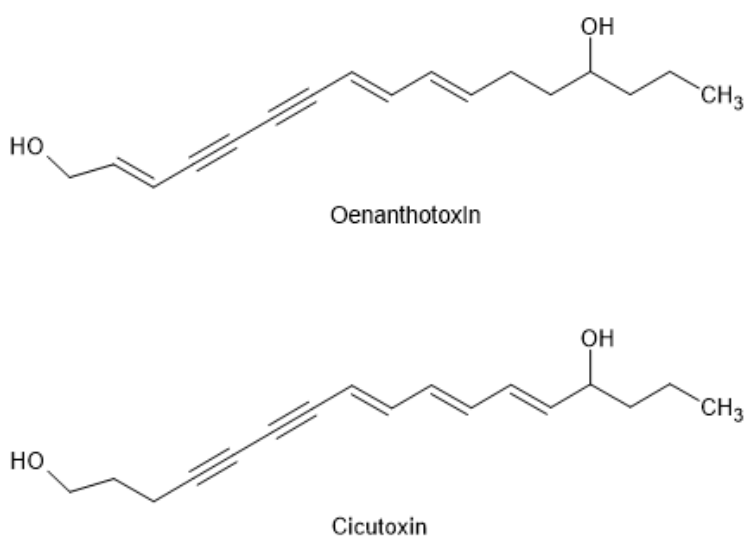
Falcarinol a jemu blízké polyacetyleny mají protizánětlivé účinky, jsou aktivní v boji proti tuberkulóze a dalším bakteriím, zvláště je však pozornost směřována k jejich cytotoxickým

vlastnostem [9, 48]. Tento účinek byl prokázán na lidských rakovinných buňkách *in vitro* a je dále zkoumán jejich antimutagenní účinek, kdy dochází k předcházení rozvoje nádorového bujení [9, 40, 48, 49]. Dále byl sledován vliv polyacetylenů na poškozené buněčné linie při akutní lymfoblastické leukémii, kde nejvýraznější cytotoxické účinky vykazoval opět falcarinol [9].

Polyacetyleny stimulují diferenciaci nespécializovaných buněk [13, 40, 48]. Při dlouhodobé kožní expozici může dojít k alergické dermatitidě, proto se předpokládá, že jsou schopné vyvolat imunitní odpověď organismu [13, 40, 48]. Podle dalších poznatků mohou některé alergické reakce naopak tlumit. Snižování srážlivosti krve je další pozitivní vlastností polyacetylenů [9, 13, 45].

Mezi další alifatické C17-polyacetyleny patří panaxydol a panaxytriol, jejichž zdrojem je ženšen pravý z čeledi aralkovitých. Tato léčivá bylina je bohatá i na další rozmanité bioaktivní látky. Také polyacetyleny obsažené v této bylině vykazují vysokou cytotoxickou aktivitu k nádorovým buňkám různého původu [13, 47]. Jako náhrada ženšenu je v některých případech používán pazvonek chloupkatý z čeledi zvonkovitých, tzv. ženšen chudých. Jelikož má podobné terapeutické účinky, není překvapením, že i pazvonek je zdrojem polyacetylenů [52].

Do čeledi miříkovitých patří kromě kořenové zeleniny i několik jedovatých rostlin. Příkladem smrtelně jedovatých rostlin vyskytujících se na území ČR mohou být rozpuk jízlivý a halucha vodní, pro něž je charakteristická vysoká koncentrace polyacetylenů citotoxinu a oenanthotoxinu (Obr. 4) [13, 45].

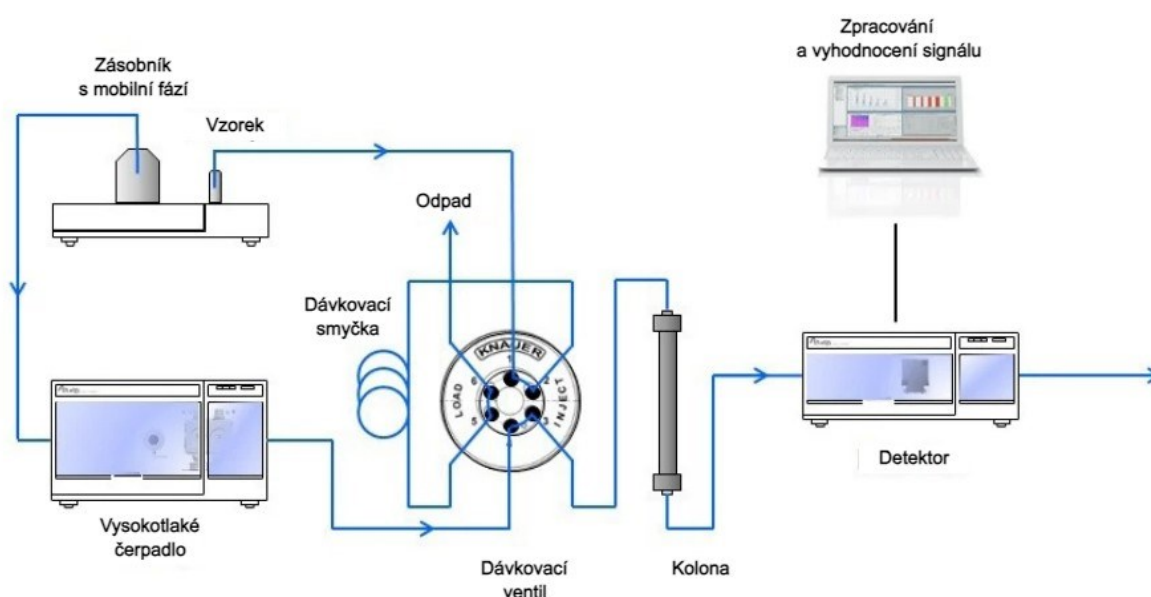


**Obr. 4:** Toxické polyacetyleny rozpuku a haluchy

Jedná se opět o alifatické C17-polyacetyleny podobné falcarinolu, ale specifická vzdálenost OH skupin v molekulách je příčinou toxického působení [13, 45]. Nasládlý oddenek rozpuku může být zaměněn za petržel či pastinák, zvláště pak dětmi. K případům otrav došlo i u dospělých, bohužel smrtelná dávka představuje pouhé 2 gramy kořene [53].

## 1.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Technika HPLC byla ke komerčnímu využití představena světu poprvé roku 1969 a od té doby byla stále zdokonalována, až se stala nenahraditelnou součástí průmyslových i vývojových laboratoří. Nikoho dnes nepřekvapí, že právě chromatografie je nejpoužívanější separační technikou. Využívá rozdílných vlastností dělených látek, díky kterým jsou při průchodu kolonou rozdělovány mezi ukotvenou stacionární fází a mobilní fází, jež je do kolony hnána pod tlakem. Obecné schéma HPLC systému je zobrazeno na Obr. 5. Mobilní fáze je ze zásobníku čerpána pomocí vysokotlakého čerpadla přes dávkovací šesticestný ventil do kolony. Konstrukce ventilu umožňuje přepínat mezi polohami pro plnění smyčky a dávkování vzorku, kde objem nadávkovaného vzorku odpovídá objemu dávkovací smyčky. Látky jsou od sebe oddělovány při průchodu kolonou, až doputují k detektoru, ve kterém vyvolají změnu signálu. Ten je dále zpracován a vyhodnocen v podobě chromatogramu [54–56].



Obr. 5: Schéma HPLC, převzato z [56] a upraveno

Chromatografická kolona je charakterizována jejími rozměry (délka 100–250 mm, průměr 3–4,6 mm), velikostí částic stacionární fáze (3-5  $\mu\text{m}$ ) a samotnou stacionární fází (silikagel, chemicky vázaný oktyl, oktadecyl, aminopropyl, bifenyl či fenylhexyl silikagel atd.). Pokud je polárnější stacionární fáze než fáze mobilní, jedná se o chromatografii v systémech



s normálními fázemi. Naopak je-li mobilní fáze polárnější než fáze stacionární, jde o chromatografii v systémech s obrácenými fázemi (RP). Tento fázový systém je v analytických laboratořích běžnější a umožňuje separace kyselých, neutrálních i bazických látek ve vzorcích potravin, životního prostředí, farmaceutik či biologických vzorcích [54, 55].

Změna retenčního chování separovaných látek v systémech s obrácenými fázemi je nejnáze dosažitelná změnou složení mobilní fáze v čase, tzv. gradientovou elucí. V průběhu separace dochází ke spojitému nebo stupňovitému zvyšování koncentrace složky s vyšší eluční silou (v RP organického rozpouštědla), které má za následek snížení retence více zadržovaných látek a zkrácení doby analýzy. Podle způsobu mísení rozpouštědel jsou možná dvě experimentální uspořádání. První možností je nízkotlaký gradientový systém, při kterém je míchání jednotlivých složek mobilní fáze uskutečněno v nízkotlaké oblasti a směs je poté čerpána pomocí vysokotlakého čerpadla na kolonu. Druhou možností je vysokotlaký gradientový systém, kde je každá složka mobilní fáze čerpána svým vysokotlakým čerpadlem a ke smíchání jednotlivých složek dochází až ve vysokotlaké oblasti. Výhodou vysokotlakého uspořádání je nízké zpoždění gradientu, avšak nízkotlaký gradientový systém umožňuje kombinaci až čtyř rozpouštědel [54, 55].

Chromatografická kolona nemusí být vždy plněna kulovitými částicemi o definovaném průměru, jak je obvyklé, stacionární fázi může tvořit i jeden kus pórovitého materiálu. Takové kolony jsou nazývány monolitické a stacionární fáze je zde tvořena buď organickým polymerem, nebo jsou na bázi silikagelu. Polymerní monolitické kolony lze připravit i v laboratorních podmínkách [57, 58].

Kolona je monolitickou stacionární fází zcela vyplněna a průchod mobilní fáze umožňují velké póry (makropóry), zatímco menší póry zajišťují dostatečný povrch pro interakci s analyty. Hydrodynamické vlastnosti systému dovolují provádět separace za vyšších průtoků mobilní fáze, aniž by byl překročen tlakový limit. Monolitické kolony našly uplatnění i v analýze potravin, např. u stanovení sacharidů pomocí iontově výměnné chromatografie, kdy byla během deseti minut dokonale rozdělena směs sedmi cukrů při použití polymerní monolitické fáze o rozměrech pórů 0,97  $\mu\text{m}$ . Tento příklad demonstruje hlavní výhodu monolitických kolon, tj. dosažení výborných separačních vlastností v krátkém čase analýzy. Další podstatnou výhodou je také možnost úpravy distribuce a objemu pórů vedoucí k ovlivnění separačních vlastností kolony [57, 58].

Důležitou roli v HPLC hraje detektor, jenž umožňuje kvantitativní a kvalitativní stanovení díky porovnání analýzy vzorku s analýzou standardu. Oblíbená a rozšířená je spektrofotometrická detekce, která vyžaduje přítomnost chromoforu v molekule analytu. Mobilní fáze by při sledované vlnové délce neměla absorbovat. Jednoduchý spektrofotometrický detektor bývá v současnosti nahrazován detektorem s diodovým polem, který snímá spojité spektrum v nastaveném rozsahu vlnových délek v celém průběhu detekce [54, 57].

Fluorescenční detekce je oproti spektrofotometrické citlivější až o tři řády, nicméně přirozenou fluorescenci vykazuje pouze málo látek, proto je přistupováno k derivatizaci za účelem zavedení skupiny fluoroforu. K selektivním detektorům patří dále vodivostní, amperometrický a coulometrický detektor, které k detekci využívají elektrochemických vlastností látek [54].

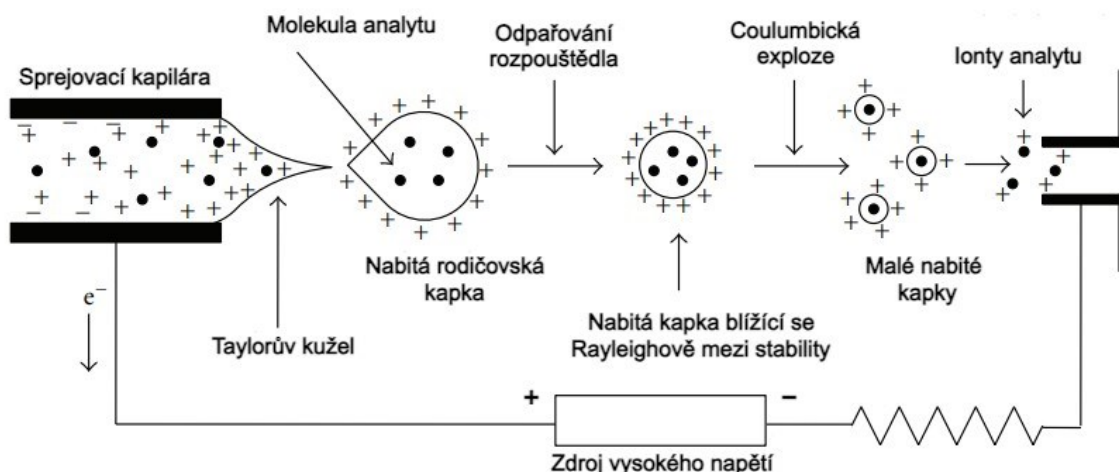
Mezi univerzální detektory schopné detekovat každou látku patří refraktometrický detektor a detektor rozptylu světla, oba jsou však poměrně málo citlivé. Jediným univerzálním detektorem, který dokáže analyt také identifikovat je hmotnostní spektrometr, proto je kapalinová chromatografie s oblibou spojována s hmotnostní spektrometrií [54, 57].

## 1.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je jedinečná technika, pomocí které lze určit molární hmotnost molekul a jejich fragmentů. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí, a to iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. V iontovém zdroji dochází k ionizaci molekul a v závislosti na vloženém napětí vznikají kladné či záporné ionty. Vzniklé ionty jsou v analyzátoru rozděleny na základě efektivních hmot ( $m/z$ ) a detekovány detektorem [59, 60].

### 1.6.1 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ESI) probíhá za atmosférického tlaku a patří mezi měkké ionizační techniky, to znamená, že molekula získá během ionizace malé množství energie a vznikají ionty se sudým počtem elektronů. Při snímání kladných iontů to jsou většinou protonované molekuly,  $[M+H]^+$ , či adukty se sodným nebo draselným iontem a při snímání záporných iontů deprotonované molekuly,  $[M-H]^-$ . Jedná se o techniku zvláště vhodnou pro spojení s HPLC umožňující analýzu malých i velkých molekul o malé až vysoké polaritě. Mechanismus ionizace je zachycen na Obr. 6, kde je ilustrován vznik iontů při snímání kladných iontů [59, 61].

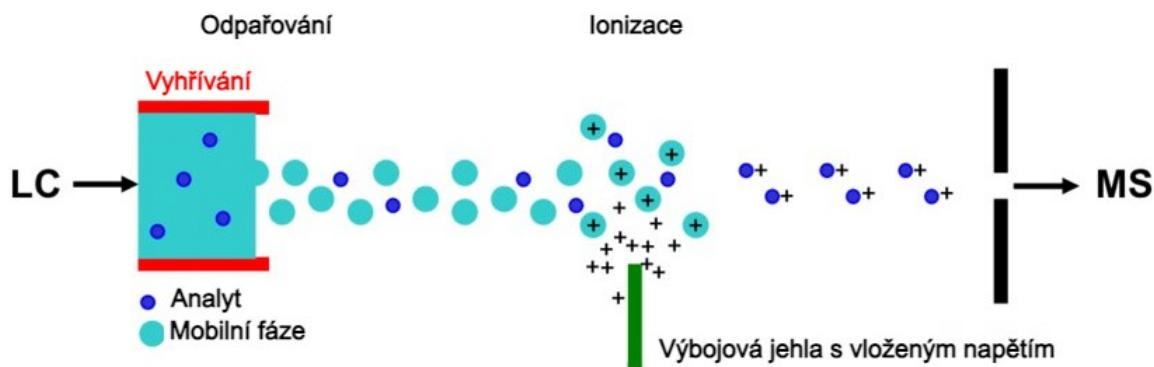


Obr. 6: Ionizace elektrosprejem, převzato z [61] a upraveno

Při určitém napětí vloženém na kapiláru dojde vlivem odpuzování kladných iontů k vytvoření Taylorova kuželu, ze kterého jsou odtrhovány kladně nabitě kapky podobného průměru. Pohybují se ve směru elektrického pole k vyhřívané kapiláře a vzájemně se od sebe odpuzují, protože mají shodný náboj. Odpařování rozpouštědla z kapek způsobí nárůst hustoty náboje na povrchu, které vede k rozpadu této kapky na menší kapky, u nichž se proces odparu a rozpad opakuje, neboť stejné náboje na povrchu kapky se odpuzují do stavu, kdy překonají povrchové napětí držící kapku pohromadě. K rozpadu dochází těsně před dosažením tzv. Rayleighovy meze stability a je nazýváno jako coulombická exploze [59, 61].

### 1.6.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Technika chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) byla navržena roku 1974 pro analýzu roztoků, nyní je jednou ze základních ionizačních technik pro spojení HPLC/MS [62]. Technika je částečně podobná ionizaci elektrosprejem, avšak s tím rozdílem, že výstupní kapilára z HPLC je vyhřívána a není na ni vloženo napětí. Zjednodušené schéma ionizace je uvedeno na Obr. 7. Na výstupu vyhřívané kapiláry je kapalina rozprašována pomocí rozprašovacího plynu na drobné kapky, jež nesou náboj. Odpařování rozpouštědla napomáhá sušící plyn, který spolu se vzrůstajícím povrchovým nábojem na kapkách vyvolává odlučování molekul analytu a rozpouštědla. Částice doputují k výbojové jehle, na kterou je vloženo napětí 2,5–3 kV, kde dochází ke koronovému výboji způsobujícímu přenos náboje. Vznikají protonované nebo deprotonované molekuly organických látek (molekulární ionty). Výhodou techniky APCI je, že nemá zvláštní nároky na složení mobilní fáze a funguje pro vodné i bezvodé roztoky [59].



Obr. 7: Chemická ionizace za atmosférického tlaku, převzato z [63] a upraveno

### 1.6.3 Hmotnostní analyzátory

Z iontového zdroje jsou ionty vedeny do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich rozdělení podle efektivních hmotností, tzn. podle poměru hmotnosti a náboje  $m/z$ . Nejčastěji používaným analyzátozem je kvadrupól sestávající ze čtyř hyperbolických tyčí, na které je vloženo stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé napětí. Podle velikosti napětí vloženo na tyče projdou analyzátozem pouze ionty se stabilními oscilacemi o určité hodnotě  $m/z$ . Ostatní ionty mají nestabilní trajektorii, proto jsou z dráhy k detektoru vychýleny. Dalším typem hmotnostního analyzátoru je analyzátor doby letu, který měří, jaký čas trvá částicím průlet evakuovanou trubicí o definované délce. Rychlost lehkých iontů je při průletu trubicí vyšší než rychlost těžkých iontů [60, 64].

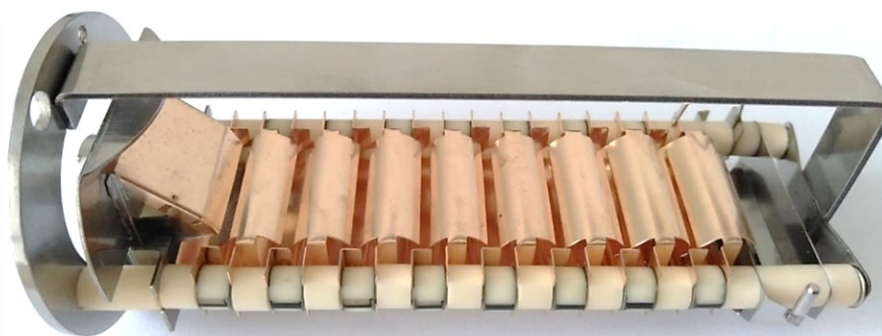
Mezi speciální řešení, jakými lze rozlišit ionty různých hmotností, patří iontová cyklotronová rezonance či orbitrap, kde jsou frekvence pohybu iontu v analyzátozem přepočítány pomocí Fourierovy transformace (FT) na hodnotu  $m/z$ . Tyto analyzátory poskytují vysokou přesnost určení hmoty a vysoké rozlišení [60, 64]. Dosud nejlepšího rozlišení dosahuje iontová cyklotronová rezonance s FT, která dokáže v jedné analýze stanovit tisíce komponent i bez jejich předchozí separace. Zařízení se vyznačuje extrémním výkonem, s nímž jde ruku v ruce i astronomická cena [65].

Dalším z využívaných analyzátozem je iontová past, která je zvláště vhodná pro studium struktury analyzovaných látek, protože umožňuje  $MS^n$  analýzu. Kromě 3D iontové pasti existuje lineární iontová past, která má díky většímu vnitřnímu objemu vyšší plnicí kapacitu iontů a dosahuje lepších detekčních schopností. Může být použita jako samostatný hmotnostní analyzátozem nebo může být začleněna do hybridních uspořádání více analyzátozem za sebou.

Spojení dvou a více analyzátorů za sebou umožňuje měřit v tandemovém uspořádání i při použití analyzátorů, které sami o sobě nejsou schopné izolovat fragmentované ionty v čase, jako právě iontová past. Častá je kombinace dvou kvadrupólů, mezi nimiž je umístěna kolizní cela plněná kolizním plynem. Principem MS/MS je izolace prekurzorového iontu v prvním kvadrupólu, jeho fragmentace v kolizní reakci pomocí kolizního plynu, a nakonec sken produktových iontů ve druhém kvadrupólu. MS/MS spektrum obsahuje pouze fragmentové ionty bez nečistot. V tandemové hmotnostní spektrometrii se uplatňují měkké ionizační techniky (ESI, APCI) vedoucí ke vzniku molekulárních iontů [60, 66].

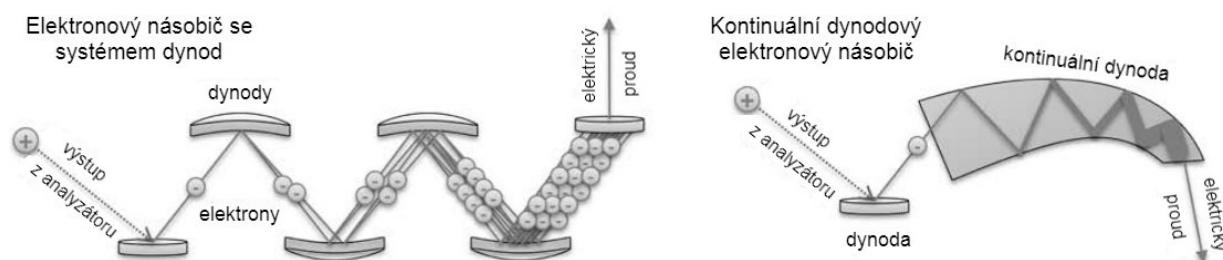
#### 1.6.4 Detektory v hmotnostní spektrometrii

K detekci iontů v hmotnostní spektrometrii slouží tradičně elektronový násobič, viz Obr. 8. V levé části fotografie se nachází místo pro vstup iontů, za kterým následuje systém šestnácti dynod.



**Obr. 8:** Elektronový násobič [foto autor]

Princip elektronového násobiče na fotografii zachycuje schéma na Obr. 9, vlevo. Na každé dynodě dojde k vyražení sekundárních elektronů, čímž dochází k násobení signálu, který je na konci násobiče zaznamenáván v podobě elektrického proudu. Existuje ještě druhé uspořádání s kontinuální dynodou, které funguje na stejném principu (pravé schéma na Obr. 9) [60].



**Obr. 9:** Schémata elektronových násobičů, převzato z [60] a upraveno

## 1.7 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Spojení HPLC/MS bylo dosaženo v 70. letech minulého století a vyžadovalo více úsilí než spojení plynové chromatografie s MS, neboť šlo o složitější instrumentaci než pouhé odsávání nosného plynu u plynové chromatografie (GC) vývěvami. Zásadními obtížemi pro spojení HPLC a MS byl rozdíl pracovních tlaků, kdy HPLC pracuje při desítkách MPa, zatímco hmotnostní analyzátor vyžaduje vakuum, a dále ohromný přebytek mobilní fáze oproti analytu, který vzniká při přechodu do plynného skupenství. Nyní jsou pro spojení používány techniky ionizace pracující za atmosférického tlaku (elektrosprej a chemická ionizace za atmosférického tlaku), kde se mobilní fáze přímo účastní ionizace [59, 60].

Zvolená technika ionizace ovlivňuje výběr kolony. Pro ESI se průtoky mobilní fáze pohybují od 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  do 1  $\text{ml}/\text{min}$ , vyšší průtoky než 1  $\text{ml}/\text{min}$  je možné použít u APCI ionizace. Hmotnostní spektrometrie klade nároky i na volbu rozpouštědel. Pro kompatibilitu spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) je potřeba, aby byla mobilní fáze těkavá a snadno se odpařovala. Aditiva přidávaná do mobilních fází se přidávají jen ve zlomcích procent, aby nedocházelo k nežádoucí kompetici o náboj s analytem a nedocházelo ke snížení odezvy analyzovaných látek [54].

Spojení HPLC-MS nabízí vysokou citlivost spolu se selektivitou a možností automatizace. Sledování iontů analytu je prováděno několika způsoby. Pokud známe látku včetně jejího elučního času, je výhodné použít některý z módů cílené analýzy, při kterém detektor sleduje v každém časovém okamžiku pouze vybrané hodnoty  $m/z$ , tím pádem dosahuje analýza nejvyšší možné citlivosti. Sledován může být iont vznikající při ionizaci (SIM, selected ion monitoring), produktový iont při MS/MS experimentech (SRM, selected reaction monitoring) nebo jsou v jedné analýze pomocí SRM sledovány produktové ionty několika analytů (MRM, multiple reaction monitoring) [54, 59, 60].

Naopak necílená analýza zaznamenává intenzity pro každou hodnotu  $m/z$  (TIC, total ion chromatogram), z celkových spekter jsou pak vybrány pouze intenzity jednotlivých analytů a z nich jsou vytvořeny iontové chromatogramy, tzv. RIC (reconstructed ion chromatogram), které představují závislost jedné  $m/z$  na čase. Kompromisem mezi TIC a SRM může být měření v úzkém rozmezí hodnot  $m/z$  blízkých sledované hmotě. Při použití této metody není dosaženo maximální možné citlivosti měření, ale je zachována informace o izotopickém složení sledovaného iontu [54, 59, 60].

Pro kvantitativní analýzu je nutné pořízení vhodného standardu, který je proměřen za stejných podmínek jako stanovovaná látka. Odezva hmotnostního spektrometru však může mezi jednotlivými analýzami kolísat, proto je nejspolehlivější použití vnitřního standardu. Ani naměření intenzit vzorku a standardu v rámci jedné analýzy však nezaručuje naprosto shodné podmínky při detekci, protože k proměření dochází v různých časech. Nejvhodnější jsou proto izotopicky značené vnitřní standardy, které mají vlastnosti identické s analytem, díky čemuž se do hmotnostního detektoru dostanou ve stejný čas, kde jsou odlišeny na základě rozdílných  $m/z$ . Problémem je jejich nedostupnost a cena, proto se vyplatí pro větší množství analýz např. pro rutinní analýzy ve firmách, kde náklad na pořízení standardu tvoří nepatrnou část ve výsledné ceně analýzy [54].

Výhodami hmotnostního spektrometru ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou nízký detekční limit, schopnost identifikace látek a možnost simultánní analýzy komplexních směsí. Často je proto využíván i pro analýzu potravin. Např. Róžaňska a kol. [67] se věnovala analýze bioaktivních látek v extra panenském olivovém oleji pocházejícím jak od komerčních, tak od malých producentů. Nalezené obsahy vitamínu E a fenolických látek odkazovaly na vysokou kvalitu výrobků, avšak olivové oleje od malých producentů obsahovaly ještě více antioxidantů secoiriodoidů a hydrotyrosolu, které tím poukazují na skutečnost, že obsah potenciálně bioaktivních látek v olivovém oleji závisí na technologii extrakce [67]. Klasická HPLC není jedinou variantou pro spojení s hmotnostní spektrometrií. Klikarová a kol. využila k analýze náhradních sladidel kapalinovou chromatografií hydrofilních interakcí s hmotnostní spektrometrií, která oproti HPLC v systémech s obrácenými fázemi umožňuje analýzu vysoce polárních látek [68]. Nicméně je-li přistoupeno k derivatizaci sacharidů 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonem, pak je možná analýza chromatografií v systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC), jak provedl Guo a kol. u analýzy dvanácti monosacharidů nacházejících se v houbě choroši oříši. Zatímco u nás roste pouze ojedinele a je klasifikován jako jedlá houba, v tradiční čínské medicíně je dlouhodobě využíván pro své antioxidantní, protinádorové, hepatoprotektivní a další léčivé účinky [69].

Prostřednictvím hmotnostní spektrometrie ve spojení se separačními technikami byla v nedávné době umožněna detekce rakoviny slinivky [70] na základě výzkumu lipidového profilu krevní plazmy [70–72]. Peterka a kol. ve své studii [71] využil techniky ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, ultra-vysokoúčinnou superkritickou fluidní chromatografií ve spojení s hmotnostní detekcí a hmotnostní spektrometrií s ionizací a desorpcí laserem za účasti matrice k charakterizaci

lipidů nacházejících se v krevní plazmě a v exosomech, což jsou mimobuněčné váčky nacházející se v tělních tekutinách a v této studii se jednalo o exosomy krevní plazmy. Pomocí statistické analýzy dat byl odhalen rozdíl ve složení lipidů v těchto matricích, přičemž v krevní plazmě bylo charakterizováno 244 lipidů, v exosomech pak 191 lipidů. Ke změnám ve složení exosomů dochází kromě onkologických onemocnění i při neurodegenerativních a kardiovaskulárních onemocněních [71]. Navíc je předpokládáno, že vybrané lipidy krevní plazmy mají potenciál stát se biomarkery rozvíjející se rakoviny slinivky [70].

## 1.8 Izolace čistých polyacetylenů

Pro kvantitativní analýzu polyacetylenů v různých přírodních matricích musí být použit standard o vysoké čistotě. Protože komerční standardy falcarinolu a falcarindiolu jsou velmi drahé a nejsou vždy dostupné, mnozí autoři proto k jejich získání využívají různých preparativních technik. Vstupní surovinou pro izolaci je nejčastěji mrkev, avšak je možné použít i jiné druhy z čeledi miříkovitých. Využití mrkve souvisí se skutečností, že výzkumy jsou nejčastěji zaměřovány právě na stanovení polyacetylenů v mrkvi, kde kromě falcarinolu a falcarindiolu je obsažen i falcarindiol-acetát. Dalším stanovovaným polyacetylenem je 8-O-methylfalcarindiol nalezený v celeru. Falcarinol a falcarindiol lze získat kromě mrkve a petržele i z celeru či pastináku. Kompletním polyacetylenovým profilem se nezabývá každá studie [9, 10, 41, 48, 51, 73], v některých byl izolován cíleně pouze falcarinol [31, 46].

Izolované látky jsou citlivé vůči světlu a vysokým teplotám, proto jsou podmínky během celého procesu izolace voleny tak, aby bylo zamezeno ztrátám falcarinolu i dalších polyacetylenů. Začátkem tisíciletí byly k izolaci používány čerstvé neupravené suroviny v množství až několika kilogramů, které byly po namletí extrahovány mnoha litry organických rozpouštědel. Důraz byl kladen na nízkou teplotu během extrakce a ochranu před světlem. V posledních letech se osvědčila lyofilizace suroviny, díky které je dosaženo významné úspory rozpouštědel, a u níž bylo prokázáno, že nemá vliv na pokles obsahu falcarinolu [31]. Lyofilizace je tak vhodnou úpravou vzorku i pro analytická stanovení [31]. Extrakce pak probíhá při běžné pokojové teplotě pomocí ethylacetátu (EtAC) nebo dichlormethanu (DCM), stále se snahou o co největší ochranu před světlem. Zvýšení účinnosti extrakce lze dosáhnout opakovanou extrakcí se sloučením výsledných extraktů. Po vysušení získaného extraktu síranem sodným a filtraci dochází k zakoncentrování ve vakuu při 30 až 35 °C, zbytek rozpouštědla je poté odfoukán dusíkem. Surový extrakt je získán v množství několika gramů [9, 10, 31, 41, 46, 48, 51, 73].



Dalším krokem izolace je zpravidla separace sloupcovou chromatografií a čištění frakcí s obsahem polyacetylenů. Pro určení frakcí, které obsahují polyacetyleny může být provedena analýza jednotlivých frakcí s využitím tenkovrstvé chromatografie (TLC) [31, 46], GC-MS [10, 73] nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie [46]. Eluáty s pozitivním nálezem polyacetylenů jsou sloučeny a dále děleny preparativní chromatografií [10, 46, 48, 73, 74].

Při sloupcové chromatografii je surový extrakt nadávkován na kolonu naplněnou silikagelem a promýván gradientem rozpouštědel se vzrůstající polaritou. Možné kombinace rozpouštědel jsou ethylacetát v n-hexanu, ethylacetát v petroletheru nebo dichlormethan a ethylacetát. Kolona je po separaci promyta methanolem [9, 10, 31, 41, 46, 48, 51, 73]. Jako další krok bylo zařazeno přečištění extraktu ze silikagelové kolony na sloupcové koloně plněné Sephadexem, kdy byla k eluci použita směs dichlormethanu a acetonu [9, 31]. Studie [9] uvádí, že v případě použití celeru jako výchozí suroviny byl ještě před silikagelovou sloupcovou chromatografií surový extrakt rozpuštěn ve vodném roztoku methanolu a zbaven polárních látek vyextrahováním do petroletheru. Teprve petroletherový extrakt byl dávkován na silikagelovou kolonu [9].

Složení jímaných frakcí ze sloupcové chromatografie je analyzováno pomocí TLC na vrstvě silikagelu, např. 40-63  $\mu\text{m}$  silikagel 60 F<sub>254</sub>, který obsahuje indikátor pro využití spektrofotometrické detekce. Mobilní fázi tvoří směs petroletheru s ethylacetátem nebo směs toluenu s ethylacetátem. Polyacetyleny na TLC byly detekovány po postříkání 1% roztokem vanilinu v methanolu a 5% roztokem kyseliny sírové v methanolu s následným zahřátím na 105 °C jako černé skvrny nebo jako hnědé skvrny při použití 2,5% ethanolového roztoku kyseliny sírové [9, 31].

Frakce ze sloupcové chromatografie, které obsahují polyacetyleny, jsou dále čištěny preparativní HPLC na koloně plněné oktadecylsilikagelovou (C18) stacionární fází s předkolonou [46, 75]. Separace je prováděna gradientovou elucí s využitím methanolu nebo acetonitrilu ve vodě s UV detekcí při vlnové délce 205, 210 nebo 256 nm [10, 46, 48, 73, 74]. Je-li vstupní surovinou pro získání standardu petržel, je nutné před preparativní HPLC zařadit další čisticí kroky [10, 31].

Pro získání standardu je možné použít také techniku superkritické fluidní chromatografie (SFC), která využívá oxid uhličitý, resp. jinou kapalinu v nadkritickém stavu jako mobilní fázi. K izolaci polyacetylenů byl zvolen pastinákový extrakt. Byly testovány různé podmínky preparativní SFC (čtyři organické modifikátory na deseti analytických kolonách), aby bylo

dosaženo optimální separace a výtěžnosti. Ke koloně byly připojeny detektor s diodovým polem (DAD) a kvadrupólový MS detektor. Prostřednictvím časově řízeného sběru frakcí bylo během 17 hodin v 85 cyklech získáno 5 mg falcarinolu a 6 mg falcarindiolu [76].

Izolované sloučeniny jsou zpravidla identifikovány pomocí spektrofotometrie v ultrafialové oblasti až oblasti viditelného světla (UV/VIS), nukleární magnetické rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS) či infračervené spektrometrie (IČ) [10, 43, 77]. NMR měření je prováděno v prostředí deuterovaného chloroformu při frekvenci 500 MHz pro získání  $^1\text{H}$  NMR spekter a frekvenci 125 MHz pro získání  $^{13}\text{C}$  NMR spekter [48, 77]. Jako interní standard byl využit tetramethylsilan [48]. Pro identifikaci izolovaných látek bylo rovněž využito spojení GC/MS [10, 43, 77, 78]. Čistota izolovaného standardu je zpravidla kontrolována chromatograficky pomocí HPLC [31, 46, 48] nebo GC, kdy je sledována přítomnost píků cizích látek a jejich podíl na celkovém signálu [73, 74].

## 1.9 Příprava vzorku k analýze

Pokud bychom hledali zeleninu, která je z hlediska složení a obsahu polyacetylenů nejprobádanější, byla by to mrkev [9, 10, 31, 40, 41, 46, 50, 51, 79–81]. Zájem laboratoří si ovšem získala i příbuzná zelenina – petržel, celer a pastinák [10, 31], včetně dalších zástupců čeledi miříkovitých, jmenovitě kerblík lesní a koprníček bezobalný [10]. Příprava pastináku a ostatních potravin se v zásadě neliší od přípravy mrkve, s tím rozdílem, že dochází k individuálnímu naředění výsledných roztoků, aby byla umožněna vhodná kvantifikace [10].

Polyacetyleny jsou přítomny jak ve slupce tak i samotném kořenu zeleniny, a to v rozdílném množství v závislosti na jejím druhu [9, 31]. Vzorek může být rozdělen na slupky a očištěný kořen [30] či je analyzován kompletní bez oškrábání pouze po důkladném omytí. Po nakrájení a rozmělnění přichází na řadu převod polyacetylenů z matrice vzorku do organického rozpouštědla. Množství rozpouštědla pro extrakci do kapaliny je násobkem navážky vzorku. Ke snížené spotřebě rozpouštědla lze dospět, je-li před extrakcí provedena lyofilizace. Pro analýzu čerstvé mrkve bylo navažováno okolo 20 g vzorku [41, 82], zatímco navážka lyofilizovaného vzorku je obvykle pouze 1 g [9, 10, 50, 51, 76, 79]. Lyofilizací může být upravena i mrkvová šťáva [81]. Tento způsob zpracování neovlivňuje obsah polyacetylenů ve vzorku, jak bylo potvrzeno ve studii [31], kde nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ve výsledcích analýz vzorků čerstvých a upravených lyofilizací.

Pokud nebyly vzorky ihned podrobeny analýze, byly zamrazeny a uchovány při  $-20$  až  $-24$  °C [10, 31, 41, 50] případně až při  $-80$  °C [40] i po dobu několika měsíců. Bylo-li cílem práce

sledovat vliv skladování na změny obsahu polyacetylenů v mrkvi, pak byly vzorky uskladněny odděleně od sebe v prodyšných plastových sáčcích při 1–4 °C při relativní vlhkosti 95–97 %, tedy za podmínek simulujících skladování zeleniny v obchodech [40, 79].

Extrakce probíhá při pokojové teplotě pomocí dichlormethanu [9, 31, 73, 78], acetonitrilu [50, 79, 83, 84], ethylacetátu [41, 46, 48, 75, 80, 82] nebo methanolu [10]. Pevný podíl je oddělen od extraktu zfiltrováním nebo centrifugací. Výsledný extrakt může být vysušen bezvodým síranem sodným a zbývající rozpouštědlo je odstraněno pod proudem dusíku [80] nebo pomocí rotační vakuové odparky [9, 10, 41, 82]. Účinnost extrakce může být u rostlinných materiálů podpořena ultrazvukem [9, 10, 41, 82], který způsobuje narušení buněčných stěn a usnadňuje látkám přestup do organického rozpouštědla. Právě s využitím extrakce podporované ultrazvukem bylo ve třech následujících krocích extrahováno maximální množství polyacetylenů [9]. Podpora účinnosti extrakce polyacetylenů zvýšením teploty naopak není vhodná, neboť polyacetyleny patří mezi termolabilní látky. Před nadávkováním do HPLC kolony jsou vzorky zbaveny větších částic membránovou filtrací [10, 41, 50, 79, 82].

V literatuře lze dohledat alternativní způsoby přípravy vzorku pomocí zrychlené extrakce rozpouštědlem (ASE, Accelerated Solvent Extraction), též nazývané zrychlená extrakce podporovaná tlakem (PSE, Pressurized Solvent Extraction), kterou bývá tradiční extrakce nahrazena. ASE je nejen efektivnější, ale i méně časově náročná. Při zrychlené extrakci rozpouštědlem zůstává za zvýšeného tlaku rozpouštědlo kapalné i při vyšší teplotě, snižuje se jeho viskozita a povrchové napětí, díky čemuž lépe proniká do matrice. Kromě celkového zefektivnění je navíc díky automatizaci všech kroků zajištěna spolehlivá reprodukovatelnost extrakce [85]. Lyofilizovaný vzorek je nadávkován do patrony ASE extraktoru a po doplnění křemelinou [50, 51, 81] probíhá extrakce organickým rozpouštědlem, nejčastěji acetonitrilem [50, 51, 79] nebo ethylacetátem [31], za zvýšeného tlaku 6–10 MPa při teplotě 40 – 80 °C [31, 76], v závislosti na použitém rozpouštědle. Vyšší účinnosti extrakce bývá dosaženo zvýšením teploty, a tedy i tlaku. Optimálních podmínek pro extrakci polyacetylenů pomocí acetonitrilu bylo dosaženo při teplotě 80 °C a tlaku cca 10 MPa [50, 51, 79]. Dále je extrakt zpravidla zakoncentrován či vysušen dusíkem a po rekonstituci vhodným rozpouštědlem a filtrací je provedena HPLC analýza [31, 50, 51, 79, 81].

### **1.10 Příprava a uchování standardních roztoků**

Se standardními roztoky připravenými ať už z izolovaného nebo komerčního standardu je zacházeno obdobně jako s roztoky vzorků. Pracovní roztoky jsou připraveny v methanolu

zvláště pro každý analyt ze zásobních roztoků a skladují se při teplotě 4–8 °C [82], v případě dlouhodobějšího uchování jsou společně skladovány ve tmě při –25 °C [76, 82]. Aby byla zajištěna co nejlepší stabilita, bylo taktéž přistoupeno k uchování roztoků standardů v ochranné atmosféře dusíku [76].

## **1.11 HPLC analýza polyacetylenů**

Technika HPLC patří mezi nejčastěji používané metody ke stanovení sekundárních metabolitů rostlin včetně polyacetylenů. K separaci dochází zásadně v systému s obrácenými fázemi, kdy je kolona plněna nepolární C18 stacionární fází s velikostí částic 3–5 μm [31, 40, 41, 46, 48, 51, 79–82]. Gradient polární mobilní fáze je zpravidla tvořen rostoucí koncentrací acetonitrilu [79–81] nebo methanolu (MeOH) [10, 31, 76] ve vodě, které způsobují vymytí i více zadržovaných látek. V některých případech je kolona chráněna před zanesením nečistot ze vzorku krátkou předkolonou s identickou stacionární fází [9, 10, 31, 46, 48].

Z dvojice falcarindiol a falcarinol je polárnější látkou falcarindiol, proto je jeho eluční čas v RP-HPLC kratší než eluční čas falcarinolu, který je na nepolární stacionární fází více zadržován [31, 40, 41, 51, 79–81]. Vyskytuje-li se ve vzorku také falcarindiol-3-acetát, je jeho eluční čas mezi falcarindiolem a falcarinolem [41, 82].

Detekci polyacetylenů lze provést dvěma způsoby, kdy první možností je proměření absorbance v UV/VIS oblasti spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem [31, 40, 41, 46, 48, 51, 79–82]. Druhou možností je snímání hmotnostních spekter při spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií, která umožňuje identifikaci jednotlivých polyacetylenů [9, 31, 49, 50, 75]. Kvantitativní analýza je obvykle provedena metodou kalibrační křivky [31, 40, 41, 46, 48, 51, 79–82]. V některých případech byly pro eliminaci chyb stanovení způsobených nestabilní odezvou detektoru přidávány vnitřní standardy, např. vanilylamid kyseliny pelargonové při MS detekci [31] nebo 4-chlorbenzofenon při spektrofotometrické detekci [9, 40].

### **1.11.1 Spektrofotometrická detekce**

Při spektrofotometrické detekci jsou polyacetyleny většinou sledovány při vlnové délce 205 nm [9, 41, 79, 81, 82, 82], ačkoli jejich spektra obsahují více absorpčních maxim [41, 46, 48, 82]. U falcarinolu byly naměřeny absorpční maxima při vlnových délkách 231, 244 a 258 nm, zatímco u falcarindiolu 233, 246 a 260 nm [41]. Mezi spektry falcarinolu a falcarindiolu je tedy velmi malý rozdíl [41, 82].

### 1.11.2 Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie

Pro hmotnostně spektrometrickou detekci polyacetylenů je možné využít jak ionizaci elektrosprejem [9, 31, 49, 50, 75], tak chemickou ionizaci za atmosférického tlaku [10, 31, 76]. Většinou se pracuje při snímání kladných iontů, ale byly publikovány práce, kdy bylo testováno snímání záporných iontů [31, 49, 75]. První pokusy o ionizaci falcarinolu elektrosprejem při snímání záporných iontů však byly neúspěšné a nevedly k produkci detekovatelných iontů [31]. Ani ve studii Jakobsena a kol. [49], která se zabývala sledováním koncentrace falcarinolu v krvi po konzumaci mrkve, nebyla ionizace při snímání záporných iontů úspěšná. Pouze ve studii Rai a kol. [75] se podařilo ionizovat polyacetyleny i při snímání záporných iontů a jako hlavní ionty byly pozorovány deprotonované molekuly falcarinolu ( $m/z$  243,17), falcarindiolu ( $m/z$  259,17), a falcarindiol-3-acetátu ( $m/z$  301,18). Další ionty, které byly pozorované ve spektru, odpovídaly ztrátě molekuly vody u falcarinolu ( $m/z$  225,16), ztrátě propenalů u falcarindiolu ( $m/z$  203,15), a u falcarindiol-3-acetátu to byly stejně intenzivní ionty odpovídající ztrátě kyseliny octové ( $m/z$  241,17) a ztrátě propenalů a ethenonu ( $m/z$  225,16). U této práce byl na rozdíl od ostatních prací využit jako analyzátor kvadrupól ve spojení s analyzátelem doby letu. Jiný typ analyzátoru a konstrukce iontového stroje tudíž mohla umožnit ionizaci polyacetylenů i při snímání záporných iontů.

Oproti ionizaci při snímání záporných iontů je ionizace při snímání kladných iontů již osvědčenou ionizační technikou. Při ESI ionizaci jsou v závislosti na použitém rozpouštědle pozorovány rozmanité ionty stanovovaných polyacetylenů (Tabulka 4) [9, 31, 49, 50, 75]. Pokud je jako mobilní fáze využit acetonitril, bývá nejintenzivnějším iontem ve spektru pozorován adukt protonované molekuly falcarinolu s acetonitrilem (ACN) se ztrátou vody  $[M+H-H_2O+ACN]^+$  ( $m/z$  268). Při ionizaci může docházet i ke vzniku dimerů, jež obsahují dvě molekuly falcarinolu [31]. V jiné studii byly místo aduktů s acetonitrilem pozorovány jako nejintenzivnější ionty adukty se sodným či draselným iontem,  $[M+Na]^+$  a  $[M+K]^+$  [75]. Pravděpodobně se jednalo o velmi zasolené vzorky, kde je tvorba těchto aduktů častá.

**Tabulka 4:** Přehled iontů detekovaných v MS spektru s použitím ESI v pozitivním módu

	Produkty ESI v pozitivním módu	<i>m/z</i>	Literární zdroje
FaOH	$[M+H-H_2O-C_7H_{16}+ACN]^+$	168	[31]
	$[M+H-H_2O-C_6H_{14}+ACN]^+$	182	[31]
	$[M+H-H_2O-C_5H_{12}+ACN]^+$	196	[31]
	$[M+H-H_2O]^+$	227	[9, 31]
	$[M+H]^+$	245	[9]
	$[M+H-H_2O+MeOH]^+$	259	[31]
	$[M+H+H_2O]^+$	263	[9]
	$[M+Na]^+$	267,19	[75]
	$[M+H-H_2O+ACN]^+$	268	[31, 49]
	$[M+K]^+$	283,16	[75]
	$[M+H+ACN]^+$	286	[31]
	$[M+H-H_2O+2ACN]^+$	309	[31]
	$[(M-H_2O)_2+H]^+$	453	[31]
	$[M+(M-H_2O)+H]^+$	471	[31]
	$[(M-H_2O)_2+H+MeOH]^+$	485	[31]
FaDOH	$[M-2H_2O+H]^+$	225	[9]
	$[M+H-H_2O]^+$	243	[9]
	$[M-2H_2O+Na]^+$	247	[9]
	$[M-H_2O+Na]^+$	265	[9]
	$[M+Na]^+$	283	[9, 75]
	$[M+K]^+$	299,15	[75]
FaDOAc	$[M-CH_3COOH+H]^+$	243,19	[75]
	$[M-H_2O+H]^+$	285,21	[75]
	$[M+Na]^+$	325,19	[75]
	$[M+K]^+$	341,18	[75]

V případě chemické ionizace za atmosférického tlaku jsou ve spektru při snímání kladných iontů pozorovány podobné ionty (Tabulka 5) jako u ionizace elektrosprejem. Vznikající ionty byly opět závislé na použité mobilní fázi. Pokud byl jako mobilní fáze použit methanol, byly pozorovány adukty s methanolem [31, 76], pokud byl použit acetonitril byly pozorovány adukty s acetonitrilem [10, 76]. V některých případech se acetonitril jako mobilní fáze neosvědčil, protože nedocházelo k ionizaci sledovaných polyacetylenů a musel být tedy využit methanol [31]. Při použití methanolu jako mobilní fáze se navíc tvořily i dimery falcarinolu, přičemž iont  $[(M-H_2O)_2+H]^+$  (*m/z* 453) byl dokonce nejintenzivnějším iontem ve spektru [31]. Stupeň dimerizace byl závislý na koncentraci falcarinolu, a proto bylo obtížné získat lineární kalibrační křivku v širokém rozsahu koncentrací, neboť při nízkých koncentracích nedocházelo ke tvorbě dimerů vůbec [31]. Malý přídavek kyseliny mravenčí do mobilní fáze obsahující methanol měl za následek zvýšení intenzity signálu a vznik nového iontu  $[M+H-H_2O-CH_3]^+$  (*m/z* 212) [31]. Při využití methanolu jako mobilní fáze byl v jiné studii [10] základním píkem spekter falcarinolu, falcarindiolu a falcarindiol-3-acetátu iont odpovídající protonované

molekule se ztrátou vody  $[M+H-H_2O]^+$ . Tyto ionty byly rovněž vybrané při selektivním záznamu iontu pro kvantifikaci polyacetylenů [76]. Samotné protonované molekuly polyacetylenů nemají v APCI spektrech vysoké zastoupení a při ionizaci falcarindiolu a falcarindiol-3-acetátu nebyly vůbec pozorovány [10, 31, 76].

**Tabulka 5:** Přehled iontů detekovaných v MS spektru s použitím APCI

	Produkty APCI ionizace	<i>m/z</i>	Literární zdroje
FaOH	$[M+H-H_2O-CH_3]^+$	212	[31]
	$[M+H-H_2O]^+$	227	[10, 31, 76]
	$[M+H]^+$	245	[10, 31, 76]
	$[M+H-H_2O+MeOH]^+$	259	[31, 76]
	$[M+H-H_2O+ACN]^+$	268	[10, 76]
	$[M+H+ACN]^+$	286	[76]
	$[(M-H_2O)_2+H]^+$	453	[31]
	$[M+(M-H_2O)+H]^+$	471	[31]
	$[(M-H_2O)_2+H+MeOH]^+$	485	[31]
FaDOH	$[M+H-2H_2O]^+$	225	[10, 76]
	$[M+H-H_2O]^+$	243	[10, 76]
	$[M+H-2H_2O+MeOH]^+$	257,19	[76]
	$[M+H-2H_2O+ACN]^+$	266,19	[76]
	$[M+H-H_2O+ACN]^+$	284	[10, 76]
	$[M+H-2H_2O+ACN+MeOH]^+$	298,22	[76]
	$[(M-H_2O)_2-H_2O+H]^+$	467	[10]
FaDOAc	$[M+H-H_2O-CH_3COOH]^+$	225	[10]
	$[M+H-CH_3COOH]^+$	243	[10]
	$[M+H-CH_3COOH+ACN]^+$	284	[10]
	$[M+H-H_2O]^+$	285	[10]

## 1.12 GC analýza polyacetylenů

Plynová chromatografie ve spojení s plamenově ionizačním detektorem je především využívána pro kontrolu čistoty standardů polyacetylenů izolovaných z různé kořenové zeleniny [42, 73, 74]. Dále byla tato technika využita i pro kvantifikaci jednotlivých polyacetylenů ve vzorcích mrkve [74]. Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) umožňuje navíc identifikaci sloučenin na základě charakteristického hmotnostního spektra. Pro ionizaci molekul se u spojení GC/MS využívá zpravidla elektronová ionizace (EI) [43, 77, 78] při energii 70 eV, kdy je možné naměřená spektra porovnávat s knihovny spekter nebo chemická ionizace [43]. Ve spektrech falcarinolu a falcarindiolu jsou často pozorovány stejné fragmentové ionty, avšak jejich intenzity se liší [10, 42, 43, 77, 78]. Přehled významných fragmentových iontů je zobrazen v Tabulce 6.

Nejintenzivnějším fragmentovým iontem v EI spektru falcarindiolu byl iont o hodnotě  $m/z$  55 [10, 43, 77] nebo  $m/z$  129 [78]. U falcarinolu tomu bylo podobně, fragmentový iont  $m/z$  129 se vyskytoval také, avšak základním píkem byl fragmentový iont  $m/z$  91 [10, 78] nebo opět  $m/z$  55 [77]. Oproti tomu EI spektrum falcarindiol-3-acetátu obsahuje jako nejintenzivnější fragmentový iont  $m/z$  43 [10, 78].

**Tabulka 6:** Fragmenty polyacetylenů v GC/MS spektru při použití EI [10, 43, 77, 78]

	m/z					
FaOH	159	128	103	77	55	41
	145	117	91	67	54	39
	141	116	81	65	53	
	131	115	79	63	51	
	129	105	78	57	43	
FaDOH	157	117	91	77	63	51
	129	115	81	69	57	43
	128	105	79	67	55	41
	127	103	78	65	53	39
FaDOAc	157	116	97	77	56	41
	133	115	91	71	55	14
	129	112	84	69	43	
	128	98	83	57	42	

V průběhu chemické ionizace získává molekula menší množství energie, protože dochází k ionizaci analytů zprostředkovaně pomocí molekul ionizovaného plynu, např. amoniaku [42, 43]. Chemická ionizace patří tedy mezi měkké techniky, což je vidět na hodnotách  $m/z$  u spektra falcarindiolu (Tabulka 7). Při ionizaci nedocházelo k tak velké fragmentaci a nejintenzivnějším iontem ve spektru byl molekulární iont  $M^+$  ( $m/z$  260) [43].

**Tabulka 7:** Fragmenty polyacetylenů v GC/MS spektru při použití chemické ionizace [43]

	m/z	Intenzita (%)	m/z	Intenzita (%)	m/z	Intenzita (%)
FaDOH	260	100	242	43	261	22
	154	68	243	31	205	19
	225	58	204	26	245	19
	172	50	229	23		

### 1.13 Analýza polyacetylenů Ramanovou spektroskopií

Ramanova spektroskopie patří mezi nedestruktivní analytické metody poskytující informace o struktuře molekul na základě jejich interakce s elektromagnetickým zářením. V Ramanově spektru se projevují vibrace, při kterých si molekula zachovává střed symetrie [86, 87]. Nový přístup k analýze polyacetylenů a karotenoidů v mrkvi v blízké infračervené oblasti byl poprvé



popsán ve studii [74]. Polyacetyleny obsahují dvě konjugované trojné vazby  $-C\equiv C-C\equiv C-$ , které se ve spektru projevují při charakteristickém vlnočtu příslušícímu symetrické vibraci trojné vazby  $2250\text{ cm}^{-1}$  (podle literatury [87] se vibrace trojné vazby mezi uhlíky projeví v oblasti  $2260-2190\text{ cm}^{-1}$ ). Dle autorů má Ramanova spektroskopie potenciál být screeningovou metodou postačující při výběru a šlechtění odrůd mrkve s vysokým obsahem polyacetylenů [74].

Zatímco studie [74] stanovovala pouze celkový obsah polyacetylenů, ve studii [88] odlišili falcarinol od falcarindiolu v posunu vlnočtu charakteristického pro trojnou vazbu, který měl hodnotu  $2258\text{ cm}^{-1}$  u falcarinolu a  $2252\text{ cm}^{-1}$  u falcarindiolu. Navíc bylo použito spektrální mapování, díky kterému je možné pozorovat rozložení polyacetylenů v průřezu kořene mrkve [88], či pastináku, celeru nebo petržele [89].

## 2 Experimentální část

### 2.1 Přístroje a zařízení

Analýzy vzorků byly provedeny na kapalinovém chromatografu sestaveném ze dvou vysokotlakých čerpadel mobilních fází LC-AD20 XD, autosampleru SIL-20A HT a DAD detektoru Nexera X2 SPD-M30A (vše Shimadzu, Japonsko). K separaci byla použita kolona Ascentis Express C18 (150×3,0 mm) plněná povrchově porézními částicemi o velikosti 2,7 μm (Supelco, USA). Dále byla testována kolona Kinetex Biphenyl (150×3,0 mm, částice 2,6 μm, Phenomenex, USA) a kolona Ascentis Express F5 (150×3,0 mm, částice 2,7 μm, Supelco). Stálá teplota během analýz byla udržována kolonovým termostatem LCO 102 (ECOM spol. s r.o., ČR).

Identifikace polyacetylenů ve vzorcích a v jímaných frakcích byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Německo) ve spojení s hmotnostním spektrometrem AB Sciex QTrap 4500 (AB Sciex, USA)

Vzorky zeleniny byly rozmělněny v mlýnku Grindomix 200 (Retsch, Německo) a vysušeny pomocí lyofilizátoru Gregor L4-110 PRO (GREGOR Instruments s.r.o., ČR).

Při přípravě extraktů byly použity:

- Analytické váhy Sartorius (Sartorius, Německo)
- Laboratorní váhy KERN 440-35A (Kern&Sohn, Německo)
- Analytické váhy Sartorius BP211D 80/210g×0,01mg/0,1mg (Sartorius)
- Míchačka Reax 2 (Heidolph Instruments, Německo)
- Třepačka Promax 1020 (Heidolph Instruments)
- Lázeň ultrazvuková digitální K12LE (Kraintek, Slovensko)
- Odstředivka Sorvall ST4R Plus-MD (Thermo Fisher Scientific, Německo)
- Odstředivka Eppendorf 5424 (Eppendorf, Německo)
- Skládání filtrační papír (Papírna Pernštejn, ČR)
- Extraktor vysokotlaký FastEx kapalinový
- Jednotka vakuová Labobasse SBC 860, Regulátor vakua CVC 3000, SPE zařízení Vacuum SPE 12-position

- SPE patronky Supelclean ENVI-18 SPE 57064 (Merck, Německo) a Strata C18-E (Phenomenex)
- Rotační vakuová odparka Hei-VAP ML (Heidolph Instruments)
- Membránové filtry LUT Syringe Filtres PTFE, 13 mm, 0,45  $\mu\text{m}$  a LUT Syringe Filters Nylon, 25 mm, 0,45  $\mu\text{m}$  (Labicom, ČR)

Izolace falcarinolu byla provedena na koloně Biospher 100 C18 (250×21,2 mm) s částicemi 5  $\mu\text{m}$  (Watrex Praha, s.r.o., ČR) připojené k preparativnímu chromatografu sestavenému z čerpadla mobilních fází Beta 50 PLUS, sběrače frakcí Spider C06 a FLASH 10 DAD 800 detektoru (vše ECOM).

Dále byly používány automatické pipety Biohit a běžné odměrné a laboratorní nádobí.

## 2.2 Použité chemikálie

- Deionizovaná voda čištěná pomocí zařízení Milli-Q Reference Shipping Kit (Merck Milipore, Německo)
- Acetonitril Chromasolv Gradient grade,  $\geq 99,9\%$  (Honeywell, Německo)
- Acetonitril Chromasolv LC-MS,  $\geq 99,9\%$  (Honeywell)
- Methanol HPLC Chromasolv  $\geq 99,9\%$  (Honeywell)
- Kyselina mravenčí 98 % (Penta, ČR) a čistoty pro HPLC/MS (Merck)
- Dichlormethan HPLC LiChrosolv (Merck)
- Ethylacetát p.a. (Lach-Ner, ČR)
- Supel QuE PSA En Cleanup Tube 55172-U (PSA 25 mg,  $\text{MgSO}_4$  150 mg) (Supelco)
- Supel QuE PSA/C18/Envi-Carb Tube 55474-U (Sigma-Aldrich)
- $\text{MgSO}_4$  bezvodý, čistota  $\geq 97\%$  (Sigma-Aldrich)
- NaCl p.a. (Lach-Ner)
- Aktivní uhlí ze zásob Univerzity Pardubice
- Grafitový prášek ze zásob Univerzity Pardubice

## 2.3 Vzorky

Vzorky kořenové zeleniny byly zakoupené v místních obchodních sítích či získané od soukromých pěstitelů (Tabulka 8).

**Tabulka 8:** Vzorky kořenové zeleniny

Vzorek	Původ
Mrkev s natí	Mrkev, svazek s natí (Albert, Itálie)
Mrkev Kaufland	Mrkev, vážená bez natě (Kaufland)
Pastinák Vysočina	Pastinák setý MoravoSeed, vlastní sklizeň říjen 2023 (Vysočina)
Pastinák Slezsko	Pastinák setý Semo, sklizeň říjen 2023 (Slezsko)
Pastinák Bio	Pastinák, Nature's Promise Bio, balení 500 g (Albert, Nizozemí)
Petržel s natí	Petržel, svazek s natí (Albert, Portugalsko)
Petržel Kaufland	Petržel, vážená bez natě (Kaufland)
Petržel Lidl	Petržel, balení 350 g (Lidl, Česká republika)

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Extrakce pevná fáze – kapalina

Pro přípravu extraktu bylo do centrifugační zkumavky naváženo zkoumané množství (0,1–1 g) lyofilizovaného vzorku a odměřeno příslušné rozpouštědlo (dichlormethan, acetonitril, metanol). Zkumavka byla obalena alobalem a z prázdného prostoru byl vzduch vypuzen proudem dusíku. Následně byla zkumavka na daný čas upevněna do míchačky nebo vložena do ultrazvuku. Po skončení extrakce byly zkumavky zcentrifugovány nebo zfiltrány přes skládaný filtrační papír a byl odebrán vždy stejný objem extraktu do nové zkumavky, ze kterých bylo rozpouštědlo odfoukáno do sucha pod proudem dusíku. Odparek byl poté rozpuštěn ve 2 ml acetonitrilu, zfiltrován přes stříkačkový polytetrafluorethylenový (PTFE) filtr do vialky z tmavého skla, čímž byl připraven k HPLC analýze.

Pro vzorek mrkve byla testována dvoukroková extrakce pro odstranění velkého množství karotenoidů. Nejprve byla provedena extrakce 50 ml *n*-hexanu 2 hodiny na míchačce s následnou centrifugací. Hexanový supernatant byl odpipetován a odfoukán do sucha, poté rozpuštěn ve 2 ml acetonitrilu a přes stříkačkový PTFE filtr zfiltrován do vialky z tmavého skla. K vysušenému extrakčnímu zbytku bylo přidáno 20 ml dichlormethanu a extrakce byla provedena stejným způsobem jako extrakce hexanem.

### 2.4.2 SPE extrakce

K SPE extrakci byl použit extrakt získaný z 1 g lyofilizované mrkve, která byla extrahována 20 ml dichlormethanu 2 hodiny na míchačce. Po centrifugaci, zfiltrování a odfoukání

rozpuštědla byly přidány 2 ml methanolu. Extrakt byl naředěn 8 ml destilované vody na 20% roztok methanolu, který tím byl připraven na nadávkování do SPE kolonky. Tento extrakt byl připraven pro dvě kolonky (Supelclean C18, Sigma-Aldrich a Strata C18, Phenomenex).

Kolonky byly na začátku kondicionovány čistým rozpuštědlem, poté promyty vodou a následně bylo nadávkováno po 10 ml vzorku. Matriční látky byly odstraněny pomocí 50% acetonitrilu a na závěr byla provedena eluce 2 ml ACN a 2 ml MeOH. Oba eluáty byly proměřeny pomocí HPLC.

### **2.4.3 Extrakce pomocí ASE**

Extrakce acetonitrem za zvýšeného tlaku byla provedena pomocí vysokotlakého extraktoru FastEx v extrakční cele, do které byl navážen 1 g lyofilizovaného vzorku promíchaného se skleněným pískem, jímž byl doplněn i zbytek prostoru extrakční cely. Po vložení do přístroje byl nastaven tlak 10 MPa, teplota a také počet a délka cyklů vysokotlaké extrakce. Jímaný extrakt byl proudem dusíku odfoukán do sucha a poté rozpuštěn ve 2 ml acetonitrilu a přes PTFE filtr zfiltrován do vialky z tmavého skla. Pro přípravu extraktu pro preparativní chromatografii bylo naváženo 5 g lyofilizované petržele a bylo extrahováno acetonitrem po dobu 10 minut ve dvou cyklech při 10 MPa a 80 °C.

### **2.4.4 QuEChERS extrakce**

QuEChERS extrakce byla provedena u vzorků lyofilizované mrkve a petržele. Do centrifugační zkumavky byl navážen 1 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 9 ml vody. Vzorek byl 10 minut ponechán v klidu, aby došlo k maceraci, poté bylo do zkumavky odměřeno 10 ml ACN a přidány 4 g MgSO<sub>4</sub> a 1 g NaCl. Se zkumavkou bylo 5 minut třepáno, následně byla zcentrifugována, čímž byl ukončen první krok QuEChERS extrakce. Ve druhém kroku přišla na řadu disperzní extrakce tuhou fází. Do zkumavky o objemu 1,5 ml byly naváženy různé sorbenty nebo byly použity komerční plastové lahvičky s již naváženým sorbentem (PSA, aktivní uhlí, C18). K jednotlivým sorbentům bylo pipetováno po 1 ml horní organické vrstvy ze zkumavky z prvního kroku. Po minutě třepání byly zkumavky a lahvičky centrifugovány. Supernatant byl přes stříkačkový PTFE filtr přefiltrován do tmavé vialky, čímž byl připraven k HPLC analýze.

### **2.4.5 Izolace falcarinolu**

Pro optimalizaci preparativní chromatografie byl připraven extrakt navážením 5 g lyofilizované petržele, která byla extrahována acetonitrem pomocí ASE (kapitola 2.4.3). Acetonitril byl odfoukán a odparek byl rozpuštěn v 5 ml acetonitrilu. Na preparativní chromatografickou

kolonu bylo dávkováno 0,5 – 1 ml extraktu a při isokratické eluci 85% acetonitrilem ve vodě bylo jímáno několik frakcí v době eluce falcarinolu. Pro potvrzení čistoty jednotlivých frakcí a přítomnosti izolovaného falcarinolu byly jednotlivé frakce proměřeny pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí a pomocí HPLC/MS. Na základě výsledků několika testovacích pokusů byla určena doba odběru frakce pro dosažení maximálního výtěžku čistého standardu.

Po optimalizaci odběru frakce byl připraven extrakt z celkem 247 g lyofilizované petržele. Extrakce probíhala celkem ve třech podílech, přičemž první dva podíly (celkem 144 g) byly extrahovány 1600 ml DCM přes noc na míchače. Po zfiltrování přes skládaný filtr byl extrakt zakoncentrován na rotační vakuové odparce. Zkondenzované rozpouštědlo bylo jímáno a použito pro extrakci posledního podílu (103 g) lyofilizované petržele, čímž došlo k významné úspoře DCM. Zakoncentrovaný extrakt ze všech tří podílů byl sloučen a odfoukán do sucha.

Vysušený extrakt o hmotnosti 2,95 g byl rozpuštěn ve 25 ml ACN, zcentrifugován a přes stříkačkový nylonový filtr zfiltrován do skleněné vialky. Na preparativní chromatografii byly dávkovány 2 ml extraktu a v optimalizovaném čase byly jímány frakce, které byly po sloučení zakoncentrovány na rotační vakuové odparce. Z rozdílu hmotností prázdné baňky a baňky s extraktem byla určena hmotnost izolovaného falcarinolu. Čistota izolované látky byla ověřena pomocí HPLC. Během celého procesu izolace byly extrakty a frakce chráněny před světlem.

#### **2.4.6 Příprava standardních roztoků**

Zásobní roztok falcarinolu byl připraven do 10ml odměrné baňky, do které bylo kvantitativně převedeno 20 mg izolovaného falcarinolu. Baňka byla doplněna po rysku acetonitrilem. Odměření příslušného objemu zásobního roztoku o koncentraci 2 mg/ml a doplněním acetonitrilem po rysku byly do 10ml odměrných baněk připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 6 – 8 – 10 – 20 – 40 – 60 – 80 – 100 µg/ml. Dále byly připraveny roztoky pro validaci metody o koncentracích 1, 2, 9 a 70 µg/ml.

#### **2.4.7 Příprava vzorků**

Vzorky kořenové zeleniny byly omyty pod kohoutkovou vodou, osušeny, zbaveny konců a včetně slupky najemno nastrouhány. Poté byly zamraženy při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následně lyofilizovány. Lyofilizované vzorky byly rozmělněny v třecí misce pomocí tloučku na jemný prášek. Jako optimální byla vybrána extrakce 1 g vzorku pomocí 20 ml DCM na rotační míchače po dobu 2 hodin. Po zfiltrování bylo odměřeno 13 ml extraktu, ze kterého bylo

odfoukáno rozpouštědlo. Poté byl odparek rozpuštěn 2 ml acetonitrilu, zfiltrován přes PTFE stříkačkový filtr do vialky z tmavého skla a ihned analyzován.

#### **2.4.8 HPLC analýza**

HPLC analýza byla provedena za optimalizovaných podmínek na koloně Ascentis Express C18 o rozměrech 150×3,0 mm s velikostí částic 2,7 μm (Supelco, USA) při teplotě 30 °C gradientovou elucí acetonitrilu ve vodě s následujícím gradientovým profilem: 0 min – 50 % ACN, 2 min – 60 % ACN, 10 min – 63 % ACN, 25 min – 73 % ACN, 27 min – 100 % ACN. V extraktech kořenové zeleniny byly stanovovány polyacetyleny falcarinol, falcarindiol a falcarindiol-3-acetát, jejichž koncentrace byla vypočtena z ploch příslušných píků na základě kalibrační křivky izolovaného falcarinolu.

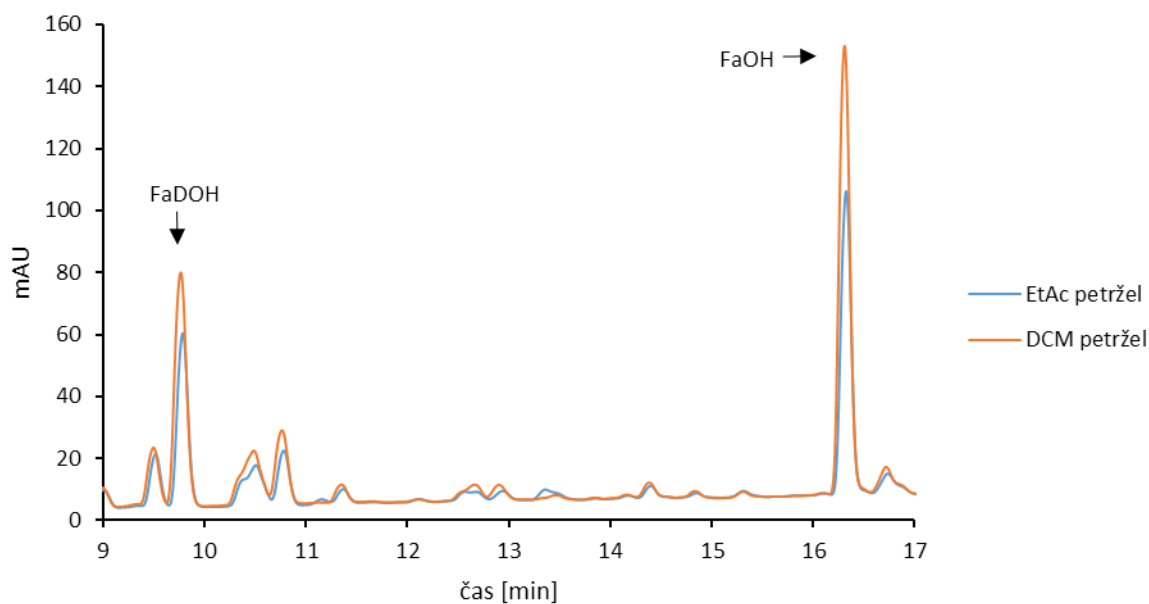
### 3 Výsledky a diskuze

#### 3.1 Optimalizace extrakce

Pro optimalizaci extrakce byly testovány čtyři extrakční techniky, konvenční extrakce pevná fáze – kapalina a dále SPE, ASE a QuEChERS extrakce.

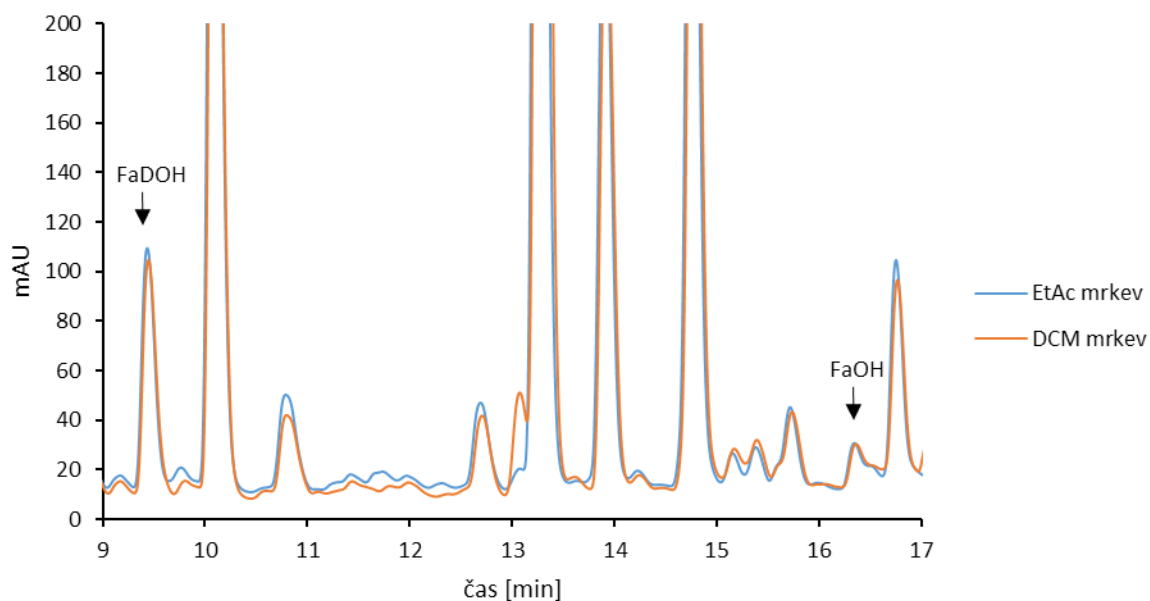
##### 3.1.1 Extrakce pevná fáze – kapalina

Pro extrakci polyacetylenů se tradičně využívají dichlormethan [9, 31, 73, 78] nebo ethylacetát [41, 46, 48, 75, 80, 82], a proto byla nejprve testována účinnost extrakce u těchto dvou rozpouštědel. K extrakci byl navážen 1 g lyofilizované petržele (Billa), který byl extrahován 20 ml dichlormethanu nebo ethylacetátu 10 minut v ultrazvukové lázni. Tato rozpouštědla byla vyzkoušena také u lyofilizované mrkve s navázkou 3 g. Zatímco pro lyofilizovanou petržel byla jednoznačně účinnější extrakce dichlormethanem (Obr. 10), pro mrkev byla účinnost extrakce u obou rozpouštědel srovnatelná (Obr. 11). Dále byla porovnána účinnost extrakce s využitím DCM a acetonitrilu (Příloha 1). Lepších výsledků bylo opět dosaženo s využitím DCM, přičemž do ACN bylo extrahováno pouze 76 % FaDOH a 68 % FaOH ve srovnání s DCM.

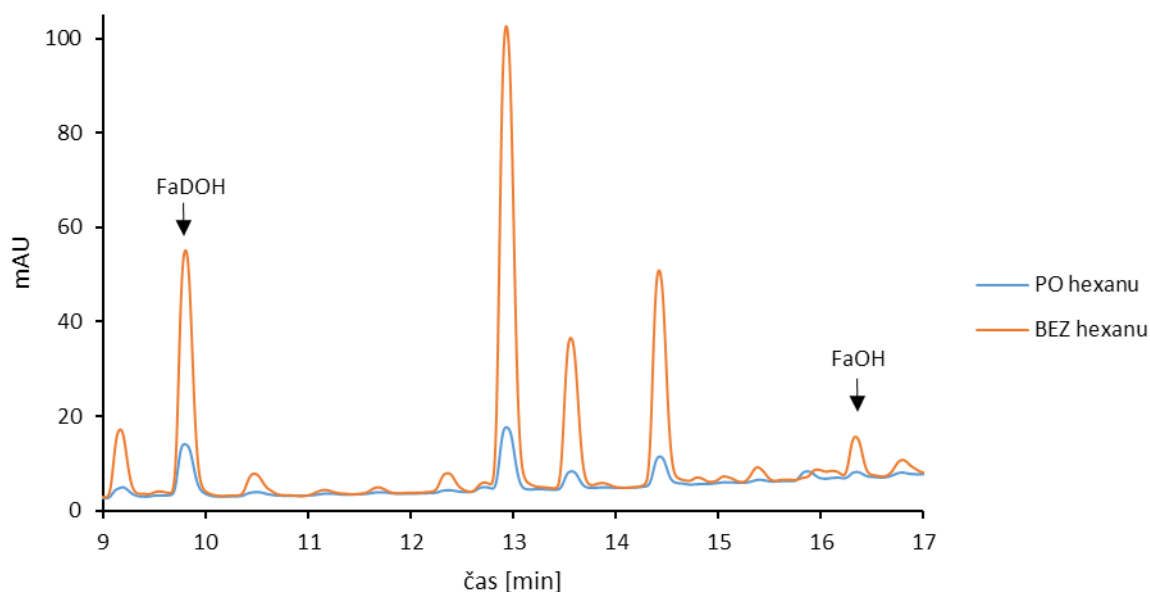


**Obr. 10:** Porovnání účinnosti extrakce při použití ethylacetátu a dichlormethanu u vzorku petržele. Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl, F<sub>MF</sub> = 0,4 ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 10 min – 70 % B, 20 min – 100 % B, detekce λ = 205 nm, extrakt připraven z 1 g petržele.





**Obr. 11:** Porovnání účinnosti extrakce při použití ethylacetátu a dichlormethanu u vzorku mrkve. Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 10 min – 70 % B, 20 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm, extrakt připraven z 1 g mrkve.



**Obr. 12:** Vliv hexanu na extrakční účinnost polyacetylenů obsažených v mrkvi. Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 1 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 10 min – 70 % B, 20 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm, extrakce 1 g mrkve hexanem v prvním kroku a dichlormetanem v druhém kroku.

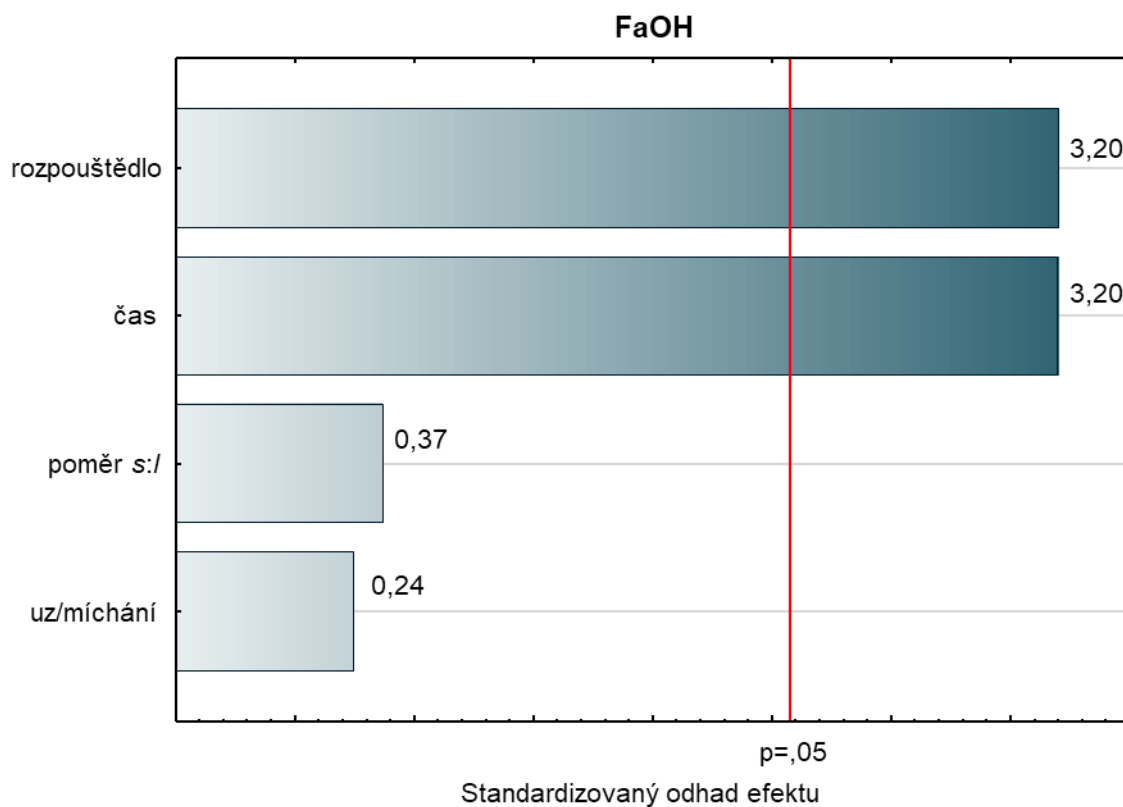
Protože mrkev obsahuje velké množství karotenoidů, byla také testována dvoukroková extrakce s využitím hexanu v prvním kroku pro odstranění matričních látek. Do hexanu byly však extrahovány rovněž polyacetyleny a ve srovnání s jednoduchou extrakcí pouze dichlormethanem byla pozorována nižší účinnost extrakce (Obr. 12).

Dále byl optimalizován vliv způsobu provedení extrakce (míchání vs. ultrazvuk) a doby extrakce (Příloha 2) a vliv navážky na chromatografický signál (Příloha 3). Protože výsledky byly nejednoznačné a nebylo jasně patrné jaké podmínky extrakce jsou optimální, bylo k optimalizaci využito statistické metody Plánování experimentu (Design of Experiment). Konkrétně byl použit částečný faktorový experiment  $2^{(k-p)}$  „Box, Hunter, and Hunter“. Do optimalizace byly zahrnuty celkem čtyři parametry (Tabulka 9): typ rozpouštědla (ACN/DCM), doba extrakce (10–240 minut), způsob extrakce (míchání/ultrazvuk) a poměr látky k rozpouštědlu (1:200 – 1:20). Bylo využito nejnižší snížení, tudíž počet pokusů byl  $2^{4-1}$ , tj. 8. Experiment byl proveden ve třech opakováních s jedním centrálním bodem, tudíž bylo k optimalizaci navrženo 27 pokusů (Příloha 4).

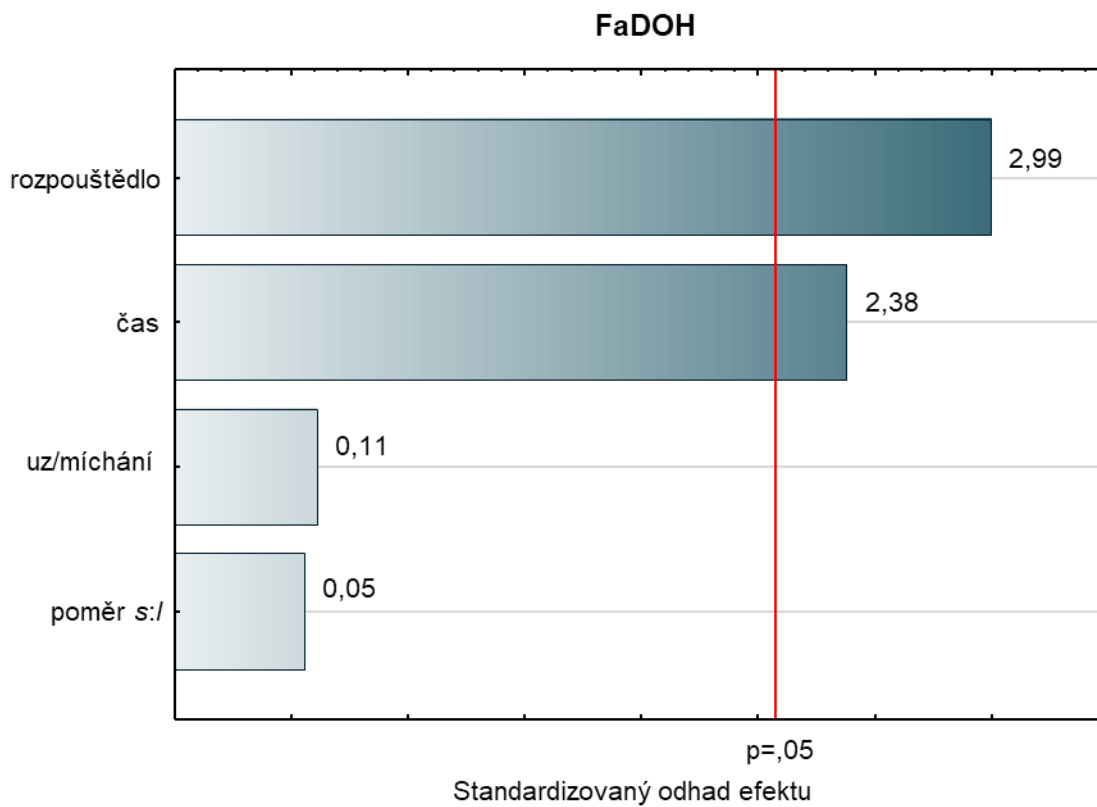
Na základě Paretových grafů (Obr. 13 a 14) byly vyhodnoceny parametry, které jsou pro extrakci polyacetylenů významné. Faktor je významný na hladině  $p = 0,05$ , kterou na grafu symbolizuje překročení červené přímky. Významnými parametry tedy byly typ rozpouštědla a doba extrakce, zatímco podpoření extrakce ultrazvukem se ukázalo být nevýznamné. Dále byl nevýznamný poměr látky ku rozpouštědlu, tzn. že v uvedeném rozsahu nedochází k přesycení rozpouštědla a použité množství rozpouštědla je dostatečné ke kvantitativní extrakci.

Z profilů pro předpověď jednotlivých parametrů (Obr. 15) je patrné, že účinnější extrakce je dosaženo s využitím DCM. Vliv ultrazvuku nebo míchání na množství vyextrahovaných polyacetylenů tedy nebyl prokázán, nicméně delší čas obou operací vedl k vyšším obsahům polyacetylenů v extraktu (Obr. 15). Vysvětlení popisků osy x u Obr. 15 je uvedeno v Tabulce 9.

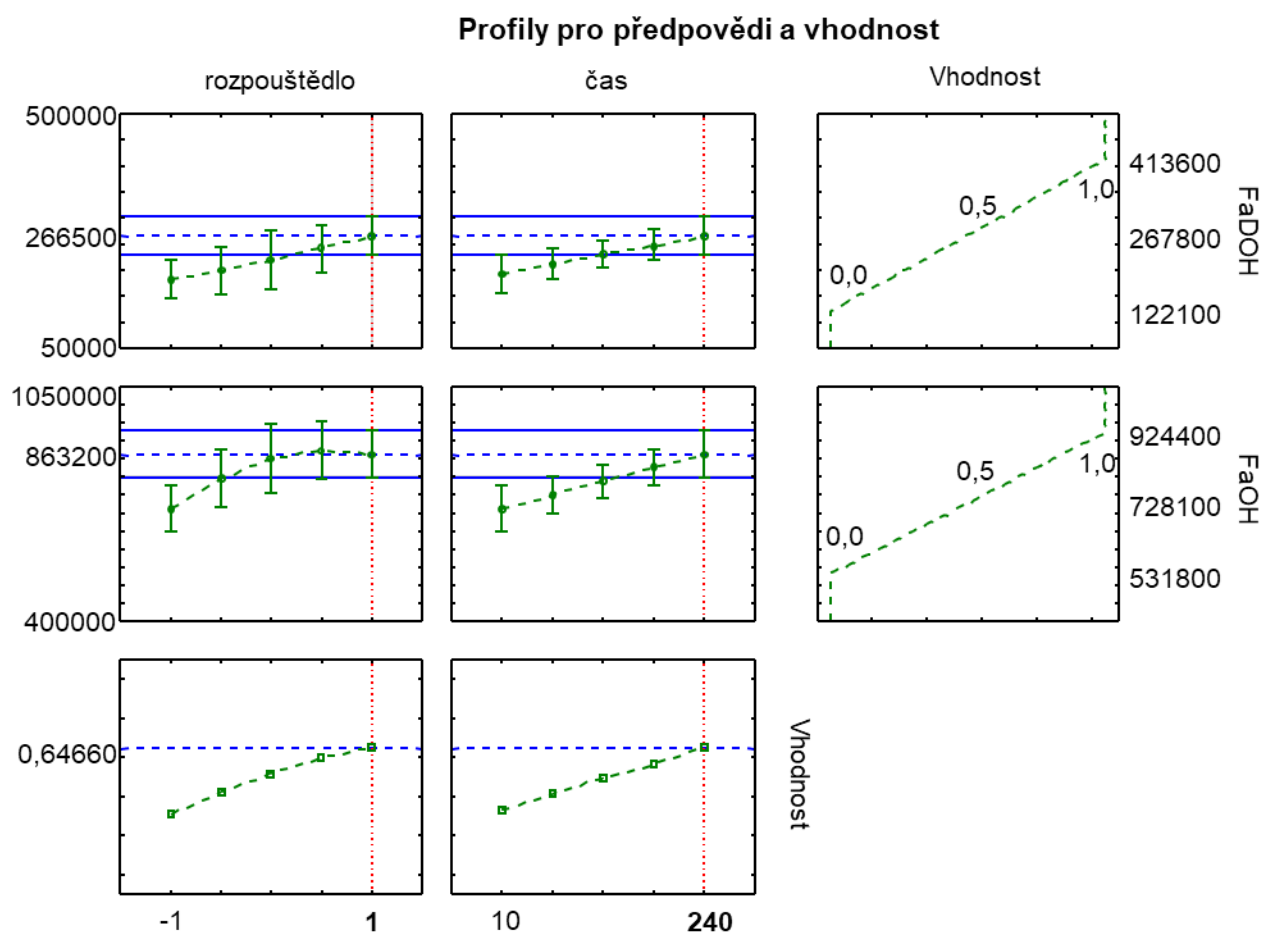
Pro extrakci vzorků byla v rámci úspory času zvolena extrakce po dobu 2 hodin, která je ještě statisticky vhodná, a jako rozpouštědlo byl zvolen DCM, jenž byl optimální pro falcarindiol. Pro falcarinol byla optimální již směs DCM s ACN, ale k míchání rozpouštědel nebylo přistoupeno, neboť i čistý DCM byl pro falcarinol statisticky vhodným rozpouštědlem (Obr. 15).



**Obr. 13:** Paretův graf pro falcarinol



**Obr. 14:** Paretův graf pro falcarindiol



**Obr. 15:** Profily pro předpovědi FaOH a FaDOH při různých podmínkách extrakce

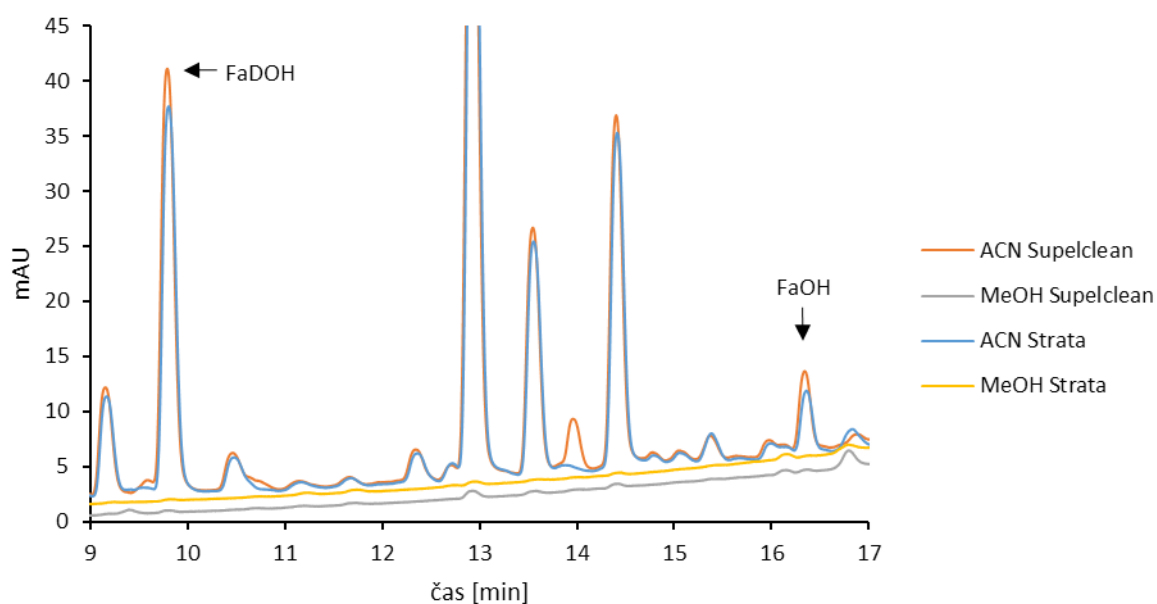
**Tabulka 9:** Parametry vybrané pro optimalizaci extrakce

Rozpouštědlo	ACN (-1)	DCM (1)
Čas	10 minut	240 minut
Uz/míchání	ultrazvuk (-1)	míchání (1)
Poměr s:l	1:200	1:20

### 3.1.2 SPE extrakce

SPE extrakce byla testována pro odstranění matričních látek především ve vzorcích mrkve a pro případné zakoncentrování cílových analytů. Pro extrakci byly vybrány extrakty připravené z 1 g lyofilizované mrkve a byly testovány dvě SPE kolonky s chemicky modifikovanou C18 stacionární fází (Strata a Supelclean). Protože polyacetyleny jsou méně polární, byl vzorek aplikovaný na kolonku promýván 50% acetonitrilem pro odstranění polárních matričních látek, které se na C18 stacionární fází nezadržují. Poté byly polyacetyleny eluovány čistým acetonitrilem a proměřeny pomocí HPLC. Dále byla kolonka promyta methanolem, pro kontrolu eluce všech cílových analytů. V podstatě veškeré zadržené látky byly z SPE kolonek eluovány již acetonitrilem, v metanolové frakci bylo obsaženo pouze stopové množství

sledovaných látek (Obr. 16). Jak je z Obr. 16 patrné, pro extrakci byla účinnější kolonka Supelclean oproti kolonce Strata.



**Obr. 16:** SPE extrakce u vzorku mrkve.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 1 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 10 min – 70 % B, 20 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.

Tato technika se však neukázala být vhodnou metodou pro odstranění matričních látek z mrkve, protože na chromatografickém záznamu byly stále pozorovány píky s vyšší intenzitou v porovnání s intenzitou sledovaných polyacetylenů. Navíc docházelo ke ztrátám sledovaných polyacetylenů ve srovnání s jednoduchou extrakcí čistým rozpouštědlem, ať acetonitrilu či dichlormethanu (Tabulka 10).

**Tabulka 10:** Porovnání extrakce pevná fáze – kapalina s SPE extrakcí u vzorku mrkve

Porovnání extrakcí	Plocha FaDOH	Plocha FaOH
Extrakce pevná fáze – kapalina DCM	446 009	92 006
Extrakce pevná fáze – kapalina ACN	444 119	66 272
SPE Supelclean – ACN eluát	341 813	59 443
SPE Strata – ACN eluát	323 267	46 336

### 3.1.3 Extrakce pomocí ASE

Další z testovaných extrakčních technik pro izolaci polyacetylenů byla extrakce za zvýšeného tlaku. Na základě poznatků z literatury [50, 51, 79], byl zvolen tlak 10 MPa a teplota 80 °C, za kterých byl pozorován maximální výtěžek polyacetylenů. Snížení teploty z 80 na 60 °C způsobilo snížení účinnosti ASE extrakce, tudíž byla ponechána původní teplota 80 °C [50, 51,

79]. Dalšími optimalizovanými parametry ASE byly počet cyklů (1–3) a čas extrakce (5–20 minut) při optimalizovaném počtu cyklů. Záznam jednotlivých analýz lze nalézt v Příloze 5 a 6. Opakování extrakce nevedlo k významnému zvýšení obsahu polyacetylenů v extraktech, proto byl pro zkrácení doby přípravy vybrán pouze 1 cyklus. Na jednom cyklu byly následně vyzkoušeny doby extrakce, kdy nejdelší čas vedl k nejvyššímu obsahu polyacetylenů v extraktu, avšak růst jejich obsahu v čase nebyl lineární a mezi jednotlivými měřeními kolísal kolem středové hodnoty (Tabulka 11).

**Tabulka 11:** Optimalizace ASE extrakce

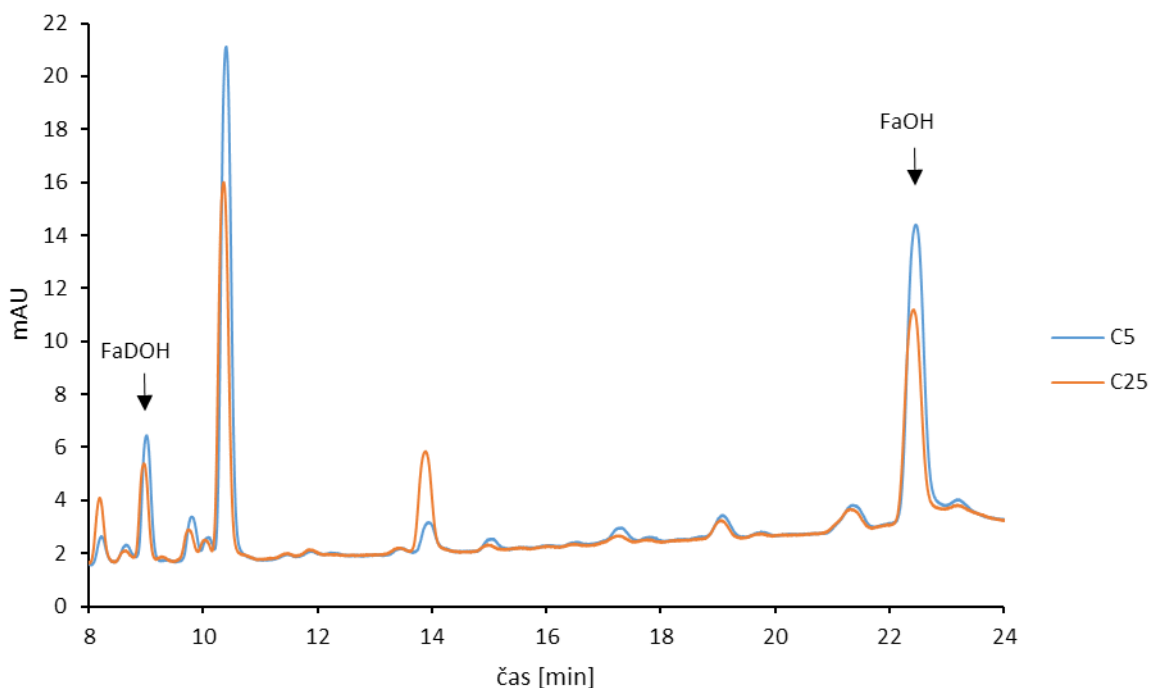
Podmínky ASE	Plocha FaDOH	Plocha FaOH
1 cyklus 10 min	269 345	1 063 804
2 cykly 10 min	226 539	992 679
3 cykly 10 min	269 005	1 062 290
5 min 1 cyklus	240 791	986 806
10 min 1 cyklus	223 934	953 969
15 min 1 cyklus	198 628	888 211
20 min 1 cyklus	260 718	1 043 151

ASE extrakce vzorku petržele z Billy neměla, v porovnání s extrakcí acetonitrilem za normálního tlaku, vliv na množství vyextrahovaného FaOH, avšak došlo k podpoření extrakce FaDOH, a to o 30 %. Ve srovnání s extrakcí pomocí DCM za normálního tlaku bylo pomocí ASE vyextrahováno o 20 % méně falcarinolu. Další experimenty se vzorkem petržele z Lidlu nepotvrdily, že by účinnost extrakce acetonitrilem byla významně podpořena zvýšením tlaku a plně postačuje třepání s rozpouštědlem za normálního tlaku. Dále byla potvrzena vyšší účinnost extrakce dichlormethanem, a proto byla vybrána i pro extrakci vzorků kořenové zeleniny určených ke kvantitativní analýze. Důvodem volby bylo také ušetření času a práce při zpracování vzorků, kterých lze najednou míchat až 18, a ušetření času při odfoukávání rozpouštědla, protože DCM má nižší bod varu než ACN.

### 3.1.4 QuEChERS extrakce

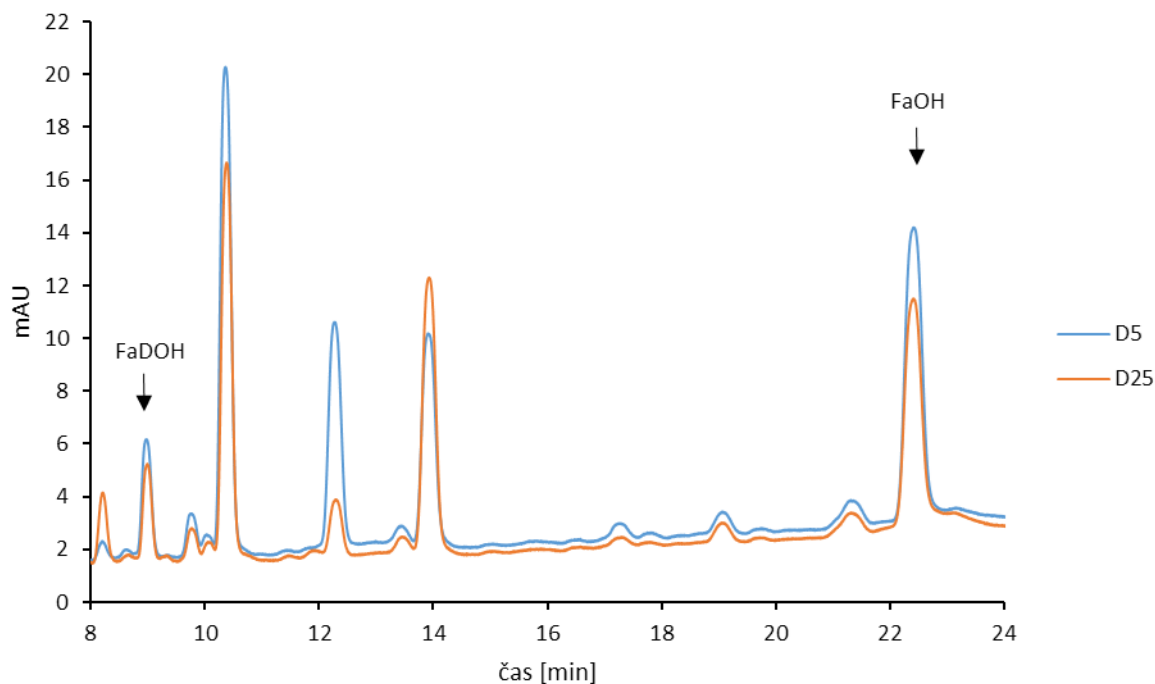
Poslední z testovaných extrakčních technik byla QuEChERS extrakce pro svoji jednoduchost a rychlost. U testovaných vzorků petržele a mrkve byla provedena nejprve extrakce acetonitrilem za přítomnosti  $MgSO_4$  a  $NaCl$  dle standardizovaného postupu [90]. Byla testována extrakce jak přímo z lyofilizovaného vzorku, tak po přidání vody. Pro odstranění matričních látek byl dále optimalizován vhodný sorbent, kterým bývá tradičně primární sekundární amin (PSA) spolu s  $MgSO_4$ . Kromě PSA, bylo rovněž testováno aktivní uhlí, grafitový prášek nebo chemicky modifikovaný silikagel (C18), buď ve směsi (komerční nebo

připravené) nebo v případě aktivního uhlí i samostatně (Tabulka 12). Pro porovnání byl také připraven extrakt ukončený po prvním kroku QuEChERS, tedy pouze extrahovaný ACN se solemi (A1 a A2). Bylo zjištěno, že k adsorpci na aktivní uhlí dochází jak ve směsi se Supelco sorbentem, tak i samostatně, a to v závislosti na množství aktivního uhlí (Obr. 17 a 18). QuEChERS extrakcí se z extraktů mrkve podařilo odstranit karotenoidy pomocí aktivního uhlí nebo grafitického prášku, nikoli však pomocí komerční směsi Supel QuE PSA/C18/Envi-Carb Tube, která rovněž obsahuje práškový uhlík. Na základě výsledků všech experimentů je patrné, že primárně dochází k odstranění matričních látek na aktivním uhlím, další sorbenty adsorpci ovlivňují minimálně. Ačkoli je QuEChERS rychlá a snadná metoda, její účinnost pro extrakci polyacetylenů byla o 10 % nižší oproti extrakci dichlormethanem. Pravděpodobně při přečištění nedocházelo k odstranění pouze matričních látek, ale rovněž i sledovaných polyacetylenů. Proto pro zpracování vzorků nebyla tato technika použita.



**Obr. 17:** QuEChERS extrakce s aktivním uhlím u vzorku petržele.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl, F<sub>MF</sub> = 0,4 ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 30 min – 73 % B, 32 min – 100 % B, detekce λ = 205 nm, C5: 5 mg aktivního uhlí, C25: 25 mg aktivního uhlí.



**Obr. 18:** QuEChERS extrakce s komerční směsí sorbentu s přidáním aktivním uhlím u vzorku petržele. Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 30 min – 73 % B, 32 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm, D5 a D25: 5 mg a 25 mg aktivního uhlí přidané ke komerční směsi sorbentu obsahující PSA a  $MgSO_4$ .

**Tabulka 12:** QuEChERS extrakce u vzorku petržele z Lidlu.

	Sorbent	Plocha FaDOH	Plocha FaOH
A1	Extrakt ACN se solemi	51 084	244 270
A2	Extrakt ACN se solemi	52 907	242 173
B1	Supelco směs (25 mg PSA, 150 mg $MgSO_4$ )	51 207	246 342
B2	Supelco směs (25 mg PSA, 150 mg $MgSO_4$ )	52 071	247 466
C5	Čisté aktivní uhlí 5 mg	47 779	226 666
C25	Čisté aktivní uhlí 25 mg	36 598	162 761
D5	Supelco směs + 5 mg aktivního uhlí	48 927	237 535
D25	Supelco směs + 25 mg aktivního uhlí	37 573	181 171

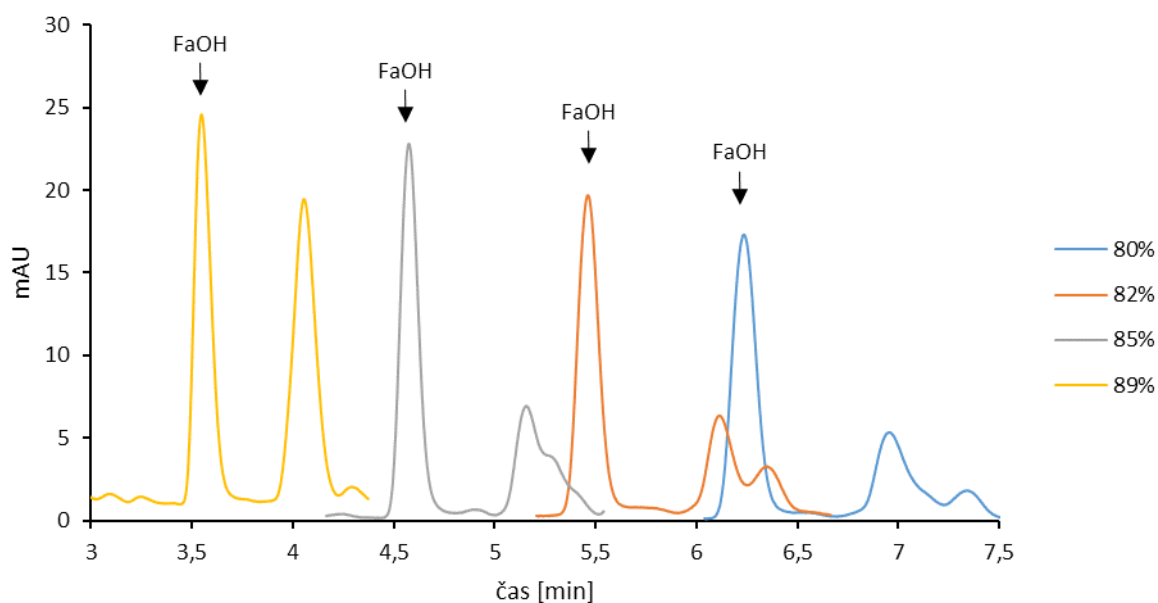
### 3.2 Izolace falcarinolu

Protože jsou komerční standardy polyacetylenů velmi drahé a jsou k dispozici pouze ve velmi malém množství, bylo přistoupeno k izolaci čistého standardu pomocí preparativní chromatografie. V rámci této diplomové práce bylo testováno využití samotné preparativní chromatografie pro izolaci FaOH bez nutnosti dalšího přečištění sloupcovou chromatografií, jak je velmi často prezentováno v literatuře [10, 46, 48, 73, 74].

Nejprve byla provedena optimalizace isokratické eluce s cílem najít vhodné podmínky pro separaci FaOH od ostatních blízko eluujících látek. Isokratická eluce je pro preparativní



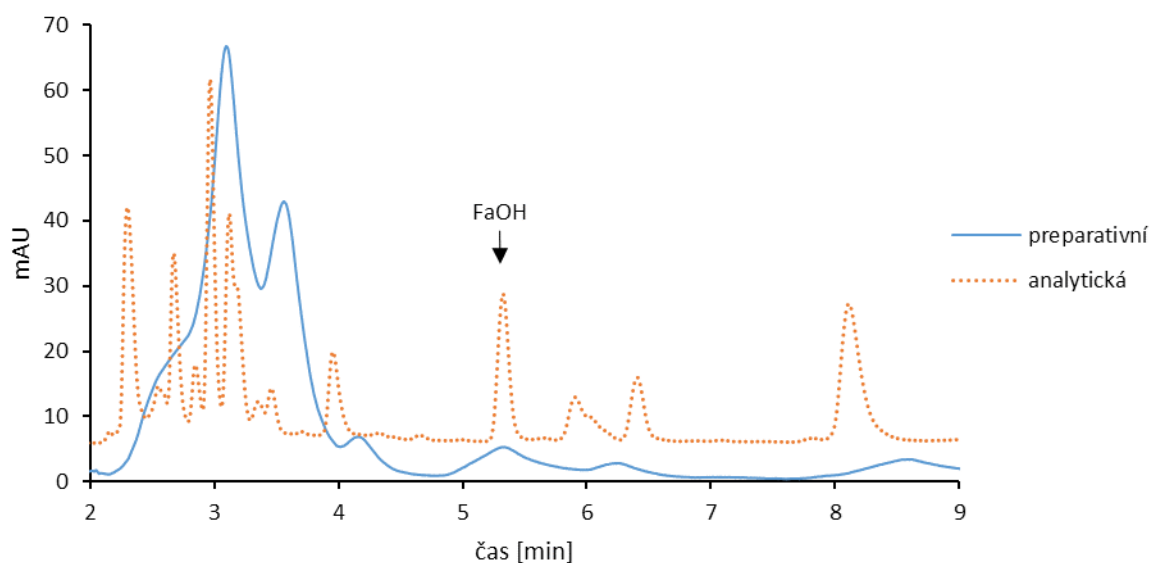
chromatografii vhodnější, protože se pracuje za vysokých průtoků mobilní fáze, a v případě gradientové eluce by byla nutná delší doba pro ustálení podmínek před analýzou, a to by vedlo k navyšování spotřeby rozpouštědel. Pro izolaci FaOH byly testovány mobilní fáze v rozmezí 80–89 % ACN ve vodě. Se vzrůstající koncentrací ACN docházelo sice ke zkrácení doby analýzy, ale rovněž se zkracoval i čas mezi FaOH a blízko eluujícími látkami (Obr. 19), což by u preparativní chromatografie, kde dochází k přetížení kolony a tvorbě širokých píků mohlo vést ke koeluci a izolovaný standard by nebyl dostatečně čistý. Proto pro izolaci falcarinolu byla zvolena izokratická eluce 85% ACN.



**Obr. 19:** Chromatografické záznamy FaOH při izokratické eluci.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 1 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), izokratická eluce: 80/ 82/ 85/ 89 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.

Na Obr. 20 je zobrazeno porovnání chromatografického záznamu získaného při analýze petrželového extraktu pomocí preparativní chromatografie (modrá křivka) s analýzou na analytické koloně (oranžová křivka). Protože retenční časy eluujících látek nebyly totožné, je pro přehlednost využito relativního porovnání k době eluce falcarinolu.

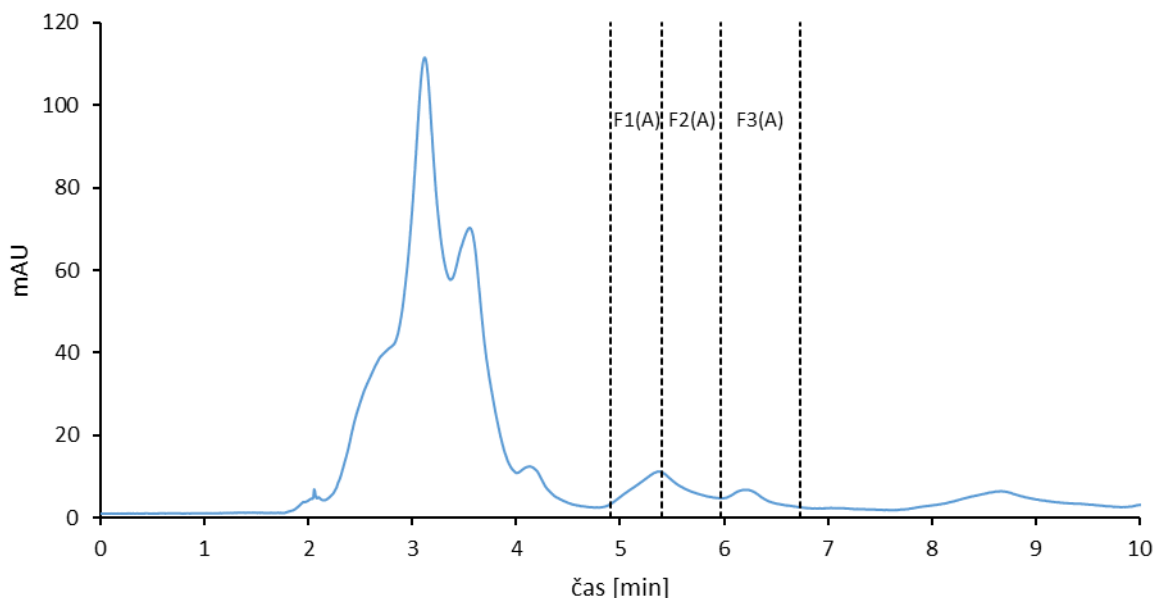


**Obr. 20:** Porovnání chromatografických záznamů získaných pomocí preparativní a analytické chromatografie.

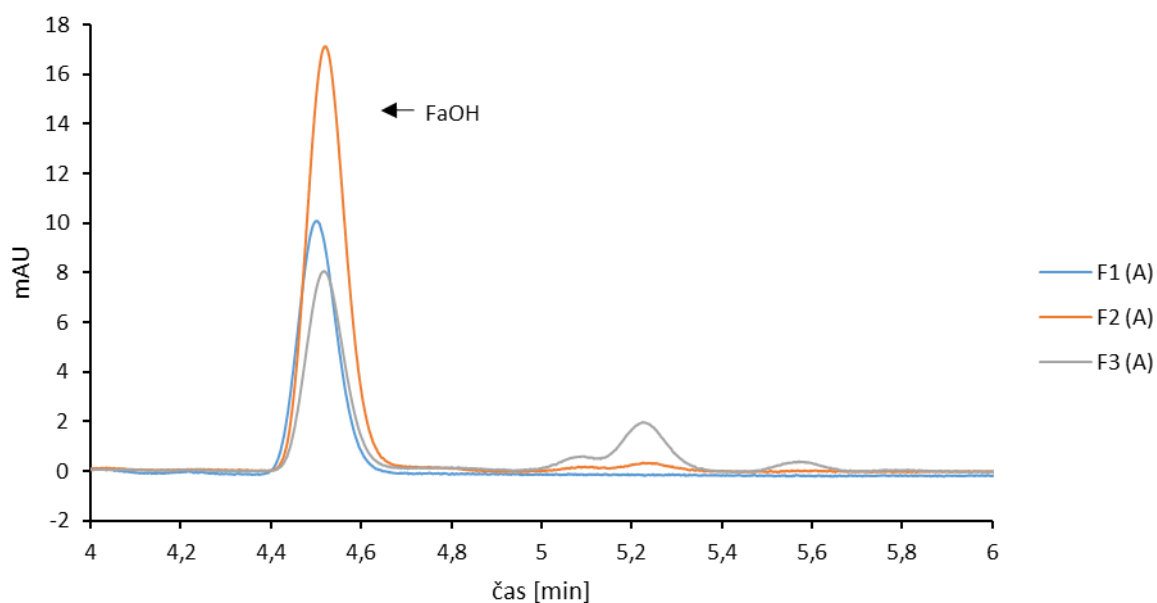
Preparativní chromatografie: kolona Biospher 100 C18 (250×21,2 mm, 5 μm), dávkování 2 ml,  $F_{MF} = 20$  ml/min, mobilní fáze: 85% acetonitril, izokratická eluce, detekce  $\lambda = 205$  nm.

Analytická chromatografie: kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm),  $T = 30$  °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: 85% acetonitril, izokratická eluce, detekce  $\lambda = 205$  nm.

Při optimalizaci doby jímání frakce obsahující co největší množství čistého standardu byl nejprve pík elujícího FaOH rozdělen na tři části (experiment A, Obr. 21) a byly jímány tři frakce F1 (A), F2 (A) a F3 (A). Tyto tři frakce byly proměřeny pomocí HPLC pro potvrzení čistoty frakcí (Obr. 22). Jak je z Obr. 22 patrné, první frakce jímáná v první polovině eluce píku obsahovala čistý FaOH. Ve druhé frakci byla sice získána nejvyšší koncentrace FaOH, ale již byla znečištěna látkami elujícími za FaOH. Třetí frakce stále obsahovala určité množství falcarinolu, ale také zde bylo pozorováno velké množství nečistot.



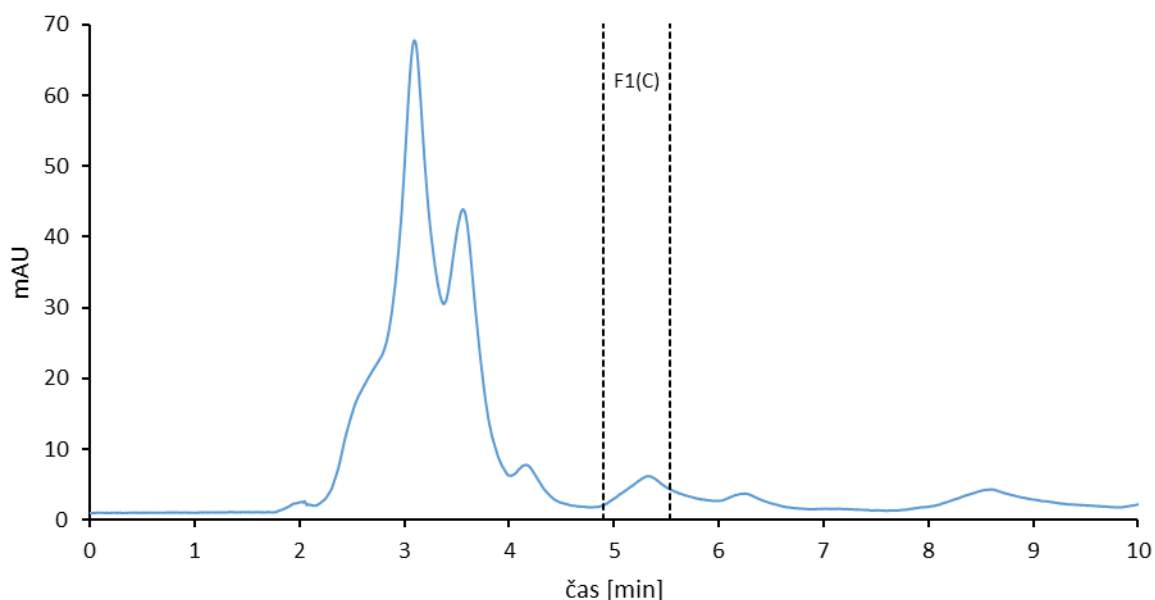
**Obr. 21:** Optimalizace doby jímání frakcí u preparativní chromatografie, experiment A. Kolona Biospher 100 C18 (250×21,2 mm, 5 μm), dávkování 2 ml,  $F_{MF} = 20$  ml/min, mobilní fáze: 85% acetonitril, izokratická eluce, detekce  $\lambda = 205$  nm.



**Obr. 22:** Kontrola čistoty frakcí u experimentu A pomocí HPLC. Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm),  $T = 30$  °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), izokratická eluce: 85 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.

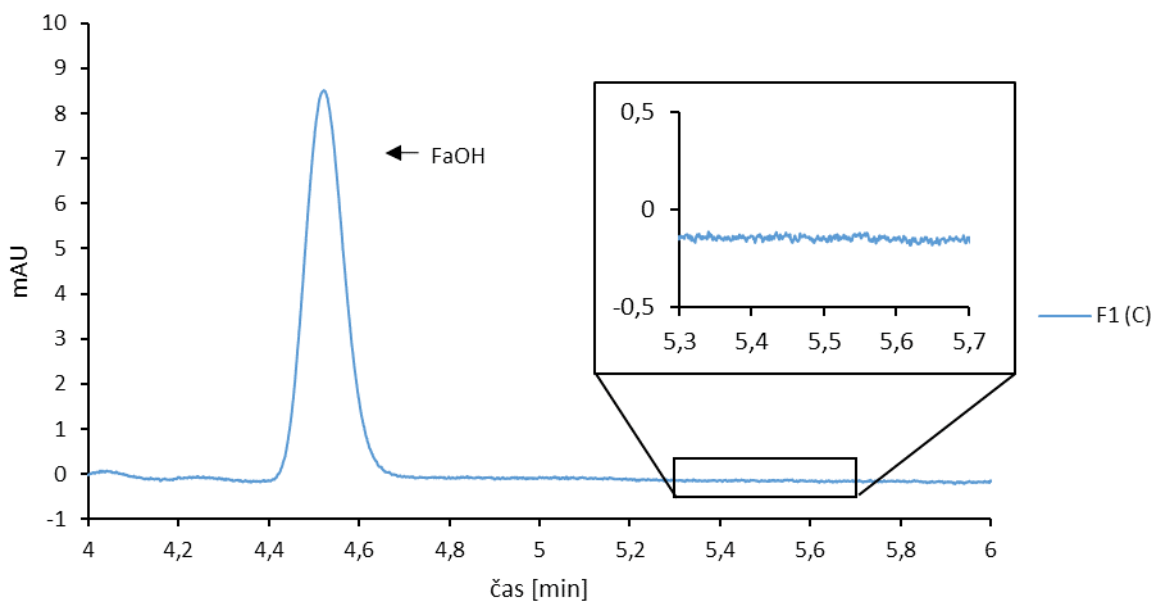
V dalším experimentu (B) byly jímány dvě frakce v době eluce píku (Příloha 7) a kontrola jejich čistoty byla opět provedena pomocí HPLC analýzy (Příloha 8). U druhé frakce byla patrná přítomnost nečistoty s elučním časem okolo 5,5 minuty. Na základě předchozích výsledků byla ve třetím experimentu (C) sbírána pouze jedna frakce, jak je uvedeno na Obr. 23. Tato frakce

byla dle výsledků z HPLC analýzy čistá (Obr. 24) a proto byla tato doba jímání frakce zvolena za optimální a dále byla použita při přípravě čistého standardu z koncentrovaného extraktu. Pro přehlednost je v Příloze 9 a 10 uveden celkový HPLC záznam kontroly čistoty frakcí u experimentů (A) a (C).



**Obr. 23:** Optimalizace doby jímání frakcí u preparativní chromatografie, experiment C.

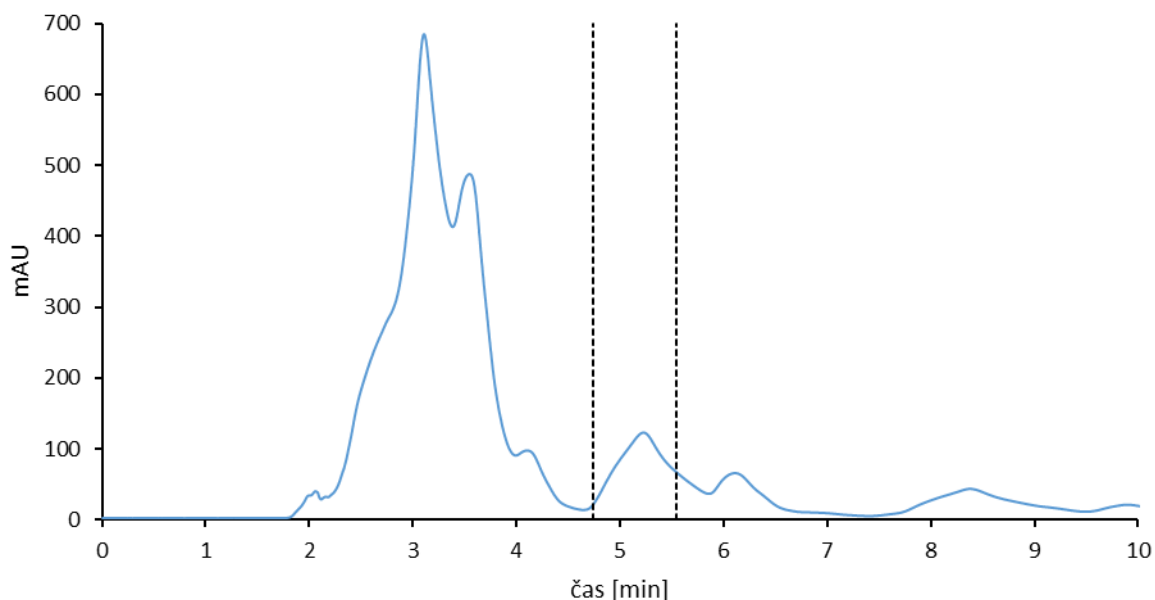
Kolona Biospher 100 C18 (250×21,2 mm, 5 μm), dávkování 2 ml,  $F_{MF} = 20$  ml/min, mobilní fáze: 85% acetonitril, izokratická eluce, detekce  $\lambda = 205$  nm.



**Obr. 24:** Kontrola čistoty frakcí u experimentu C pomocí HPLC.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm),  $T = 30$  °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), izokratická eluce: 85 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.

Koncentrace extraktu připraveného z 247 g lyofilizované petržele byla přibližně 10× větší oproti extraktu použitého k optimalizaci preparativní chromatografie. Z chromatografického záznamu získaného pro tento koncentrovaný extrakt je patrné, že pozorované píky eluují ve stejných časech, pouze jejich intenzita je vyšší, a tedy nedochází k velkému přetížení kolony a k rozšíření píků. Proto bylo možné využít pro izolaci falcarinolu téměř celý pík (Obr. 25).

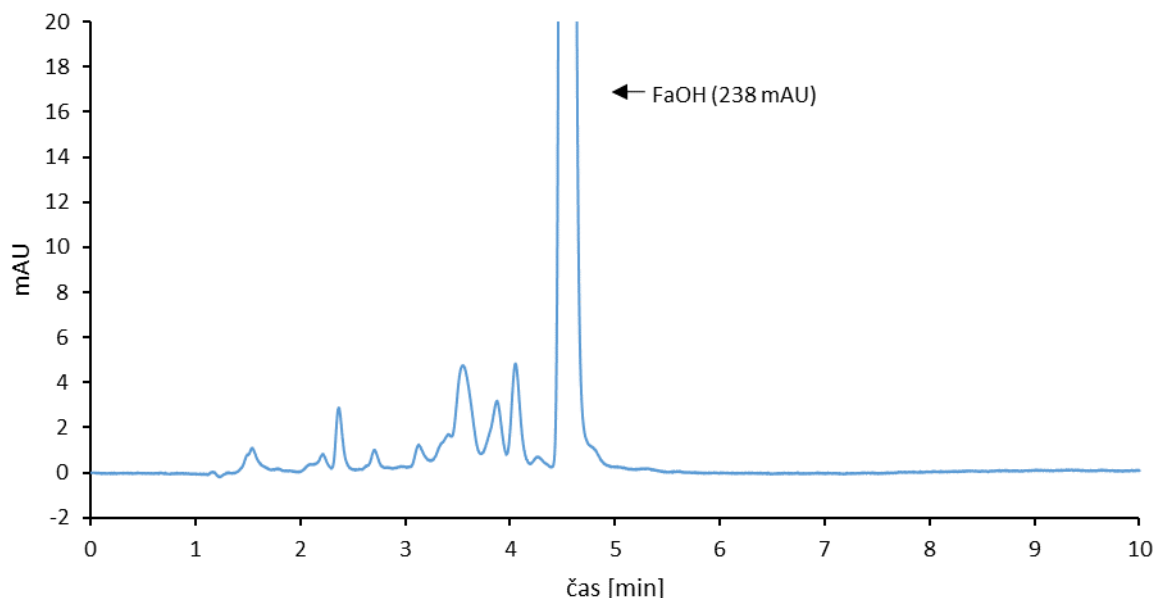


**Obr. 25:** Záznam z preparativní chromatografie při izolaci falcarinolu.

Kolona Biospher 100 C18 (250×21,2 mm, 5  $\mu$ m), dávkování 2 ml,  $F_{MF} = 20$  ml/min, mobilní fáze: 85% acetonitril, izokratická eluce, detekce  $\lambda = 205$  nm.

Následně bylo na preparativní kolonu dávkováno po 2 ml (objem dávkovací smyčky) připraveného koncentrovaného extraktu, až v posledním kole bylo nadávkováno pouze 1,7 ml, celkem tedy 23,7 ml extraktu. V průběhu izolace byla celkem třikrát kontrolována čistota jímáných frakcí pomocí analytické chromatografie (Obr. 26).

Výsledný objem sloučených frakcí i s promytím hadičky, kterou byly frakce jímány, činil 200 ml. Rozpouštědlo bylo nejprve redukováno na rotační vakuové odparce a poté byl zbytek rozpouštědla odfoukán proudem dusíku do sucha. Z rozdílu hmotností baňky před a po izolaci byl spočítán výtěžek 24,41 mg falcarinolu. Pro kontrolu dokonalého vysušení rozpouštědla bylo zopakováno vážení po 30 minutách dalšího odfoukávání.



**Obr. 26:** Čistota první jímáné frakce při izolaci FaOH.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl, F<sub>MF</sub> = 0,4 ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), izokratická eluce: 85 % B, detekce λ = 205 nm.

Protože od pořízení komerčního standardu falcarinolu bylo pro vysoké pořizovací náklady ustoupeno, byla po zdařilé izolaci falcarinolu z petržele provedena finanční bilance pro porovnání výdajů na pořízení falcarinolu s náklady na jeho izolaci. Během izolace se povedlo ušetřit nezanedbatelný objem rozpouštědla díky jímání zkapalněného dichlormethanu z rotační vakuové odparky a jeho recyklaci při druhé extrakci, kdy byly uspořeny náklady za 800 ml rozpouštědla. Ceny komerčních standardů za 1 mg se liší v závislosti na objednaném množství, avšak cena komerčního standardu i s množstevní slevou několikanásobně převyšuje náklady na suroviny vlastního izolovaného standardu i s ohledem na náklady na energii, jak je patrné z údajů uvedených v Tabulkách 13 a 14.

**Tabulka 13:** Finanční bilance nákladů

Vstupy	Měrná cena	Spotřeba	Náklady [Kč]
Petržel	100 Kč/kg	1 kg	100
ACN	350 Kč/litr	3 litry	1 050
DCM	300 Kč/litr	1,8 litrů	540
Elektrická energie	8 Kč/kWh [91]	44 kWh	352
			2 042

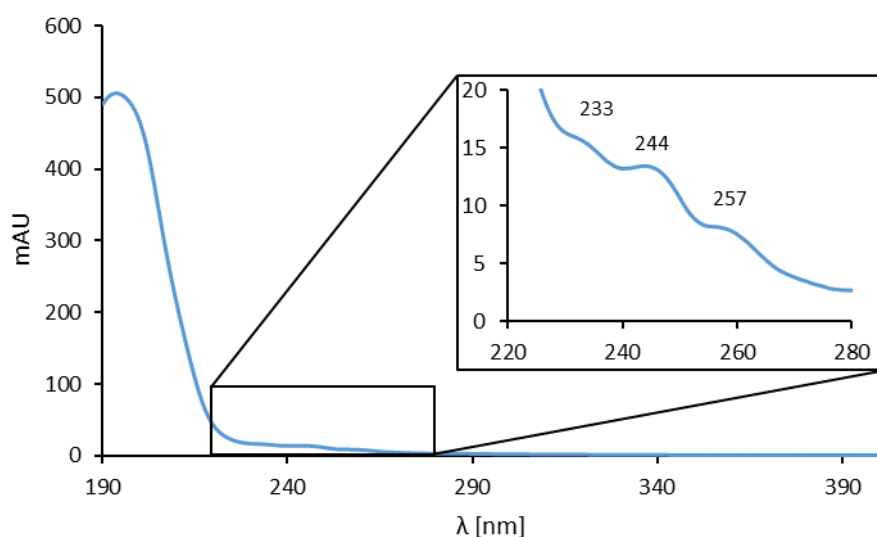
**Tabulka 14:** Porovnání ceny izolovaného standardu s komerčními standardy [92, 93]

	Množství [mg]	Cena [Kč]	Měrná cena [Kč/mg]
Vlastní standard	24,41	2 042	84
Cayman Chemical	25	44 713	1 788
Cayman Chemical	1	2 301	2 301
Aobious	25	34 887	1 395
Aobious	1	2 287	2 287

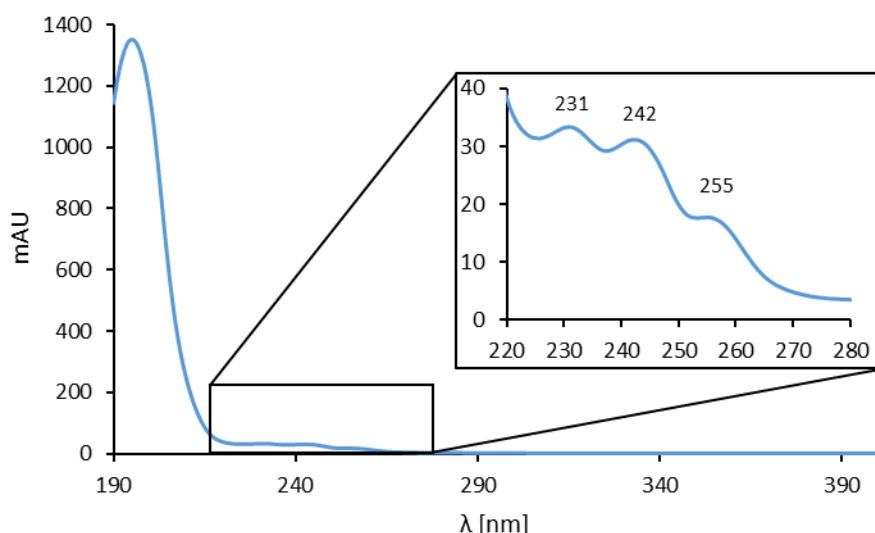
### 3.3 HPLC analýza

#### 3.3.1 UV/VIS spektrum polyacetylenů

Polyacetyleny lze identifikovat na základě UV spekter, které se kromě vysoké absorpce v oblasti kolem 200 nm vyznačují třemi charakteristickými absorpční maximy. U falcarindiolu jsou tato maxima pozorována při vlnových délkách 233, 244 a 257 nm (Obr. 27), u falcarinolu při vlnových délkách 231, 242 a 255 nm (Obr. 28).



**Obr. 27:** Absorpční spektrum falcarindiolu



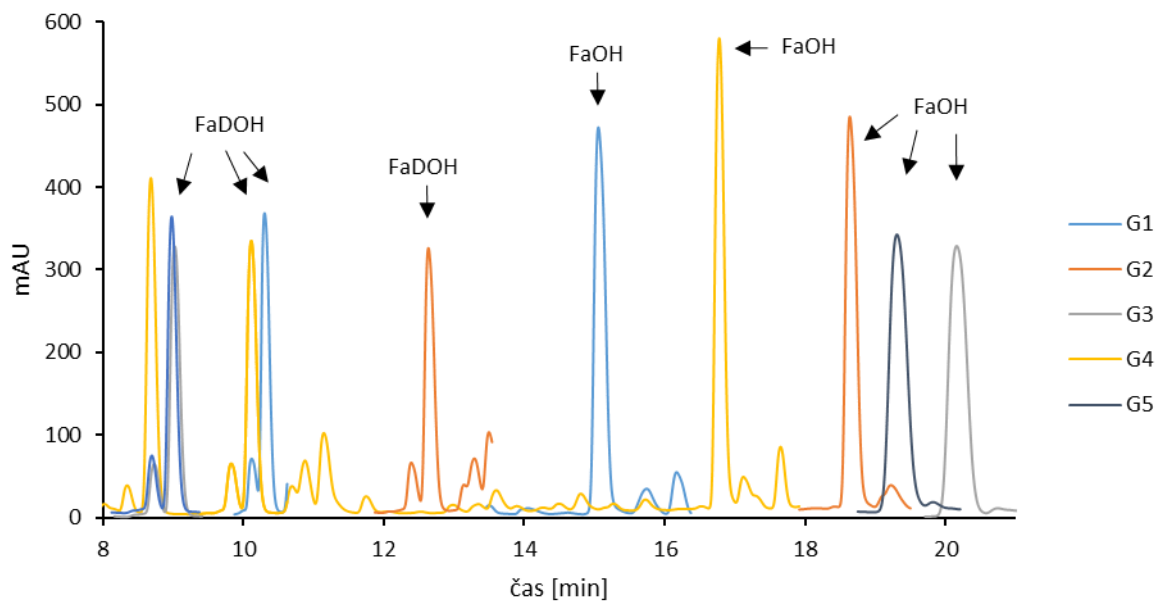
**Obr. 28:** Absorpční spektrum falcarinolu

### 3.3.2 Optimalizace separace

Na základě poznatků z literatury [31, 40, 41, 46, 48, 51, 79–82] byla pro separaci polyacetylenů zvolena RP-HPLC s oktadecylsilikagelovou stacionární fází. Optimalizace separace probíhala nejprve na koloně Ascentis Express C18, přičemž byla využita gradientová eluce acetonitrilu ve vodě. Byly testovány lineární gradienty o různé strmosti a počáteční koncentraci či jejich kombinace. Ukázky vybraných gradientových programů jsou uvedeny v Příloze 11 a vliv změny gradientového profilu na separaci falcarinolu a falcarindiolu obsažených v extraktu z petržele je zobrazen na Obr. 29. Pro přehlednost jsou uvedeny pouze píky v okolí eluce sledovaných polyacetylenů. Jak je z obrázků patrné, falcarinol je v RP-HPLC zadržován více, protože má o hydroxylovou skupinu méně než falcarindiol, a je tedy méně polární.

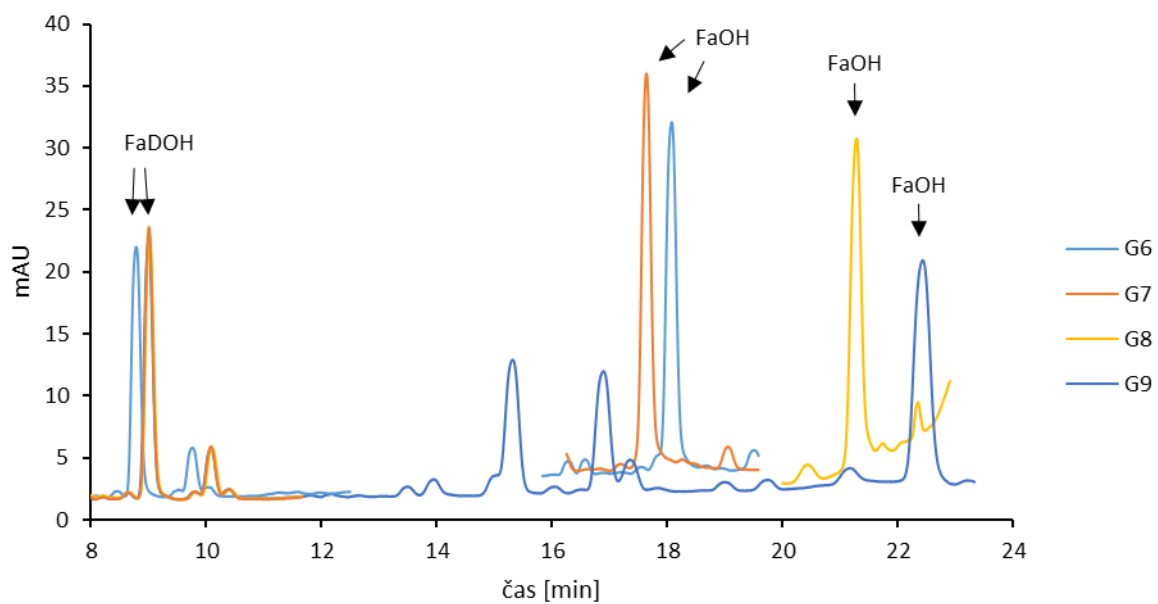
Nejlepšího rozlišení pro oba sledované polyacetyleny bylo dosaženo pomocí gradientu 4 (0 min – 50 % ACN, 10 min – 70 % ACN, 20 min – 100 % ACN), který byl dále využit pro analýzu extraktů připravených z ostatních vzorků kořenové zeleniny, a to z mrkve a pastináku. Bohužel docházelo ke koeluci FaOH s dalšími látkami obsaženými v mrkvi a pastináku, a proto byla gradientová eluce ještě mírně upravena. Chromatografické záznamy separace polyacetylenů obsažených v pastináku jsou pro vybrané gradientové profily (Příloha 12) zobrazeny na Obr. 30. Protože se zmíněná koeluce týkala pouze FaOH, změna gradientového profilu téměř neovlivnila separaci FaDOH (Obr. 30). Optimální separace polyacetylenů ve všech vzorcích bylo dosaženo pomocí gradientu 9 (0 min – 50 % ACN, 2 min – 60 % ACN, 10 min – 63 % ACN, 25 min – 73 % ACN, 27 min – 100 % ACN), proto byl tento gradientový profil využit pro kvantitativní analýzu (Obr. 31).





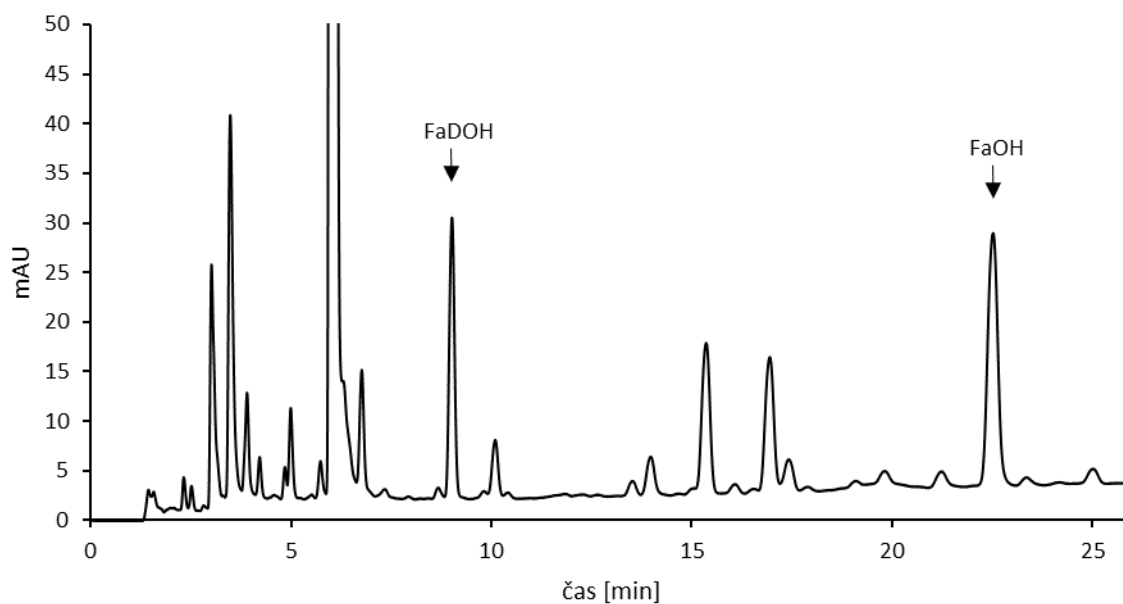
**Obr. 29:** Optimalizace separace polyacetylenů polyacetylenů u vzorku petržele.

Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl, F<sub>MF</sub> = 0,4 ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce (Příloha 11), detekce λ = 205 nm.



**Obr. 30:** Optimalizace separace polyacetylenů u vzorku pastináku

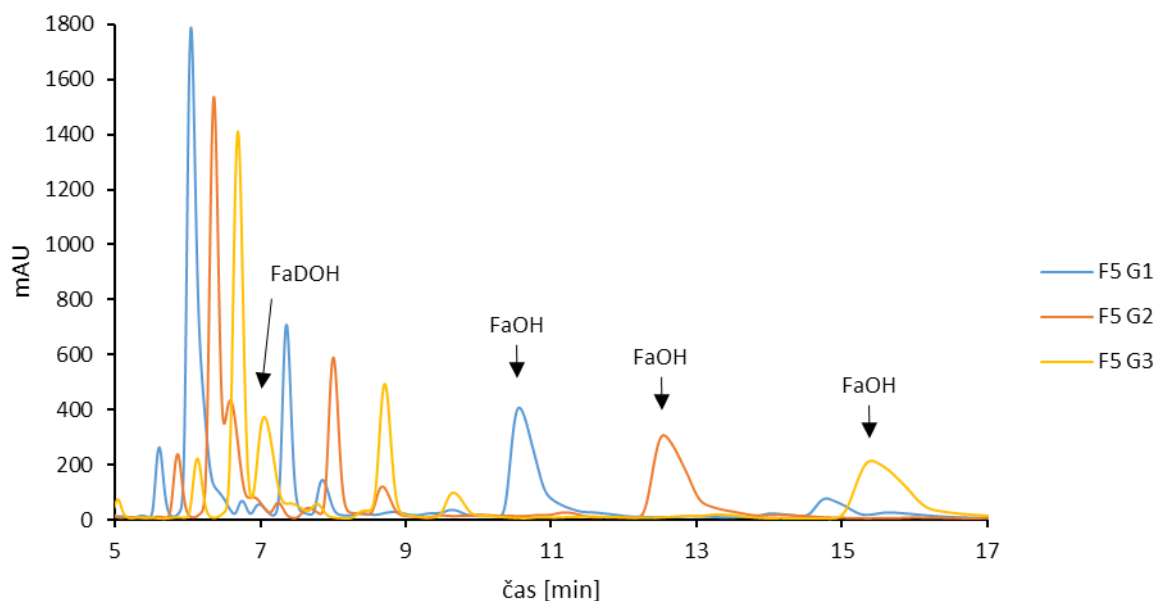
Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl, F<sub>MF</sub> = 0,4 ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce (Příloha 12), detekce λ = 205 nm.



**Obr. 31:** Optimalizovaná separace polyacetylenů.

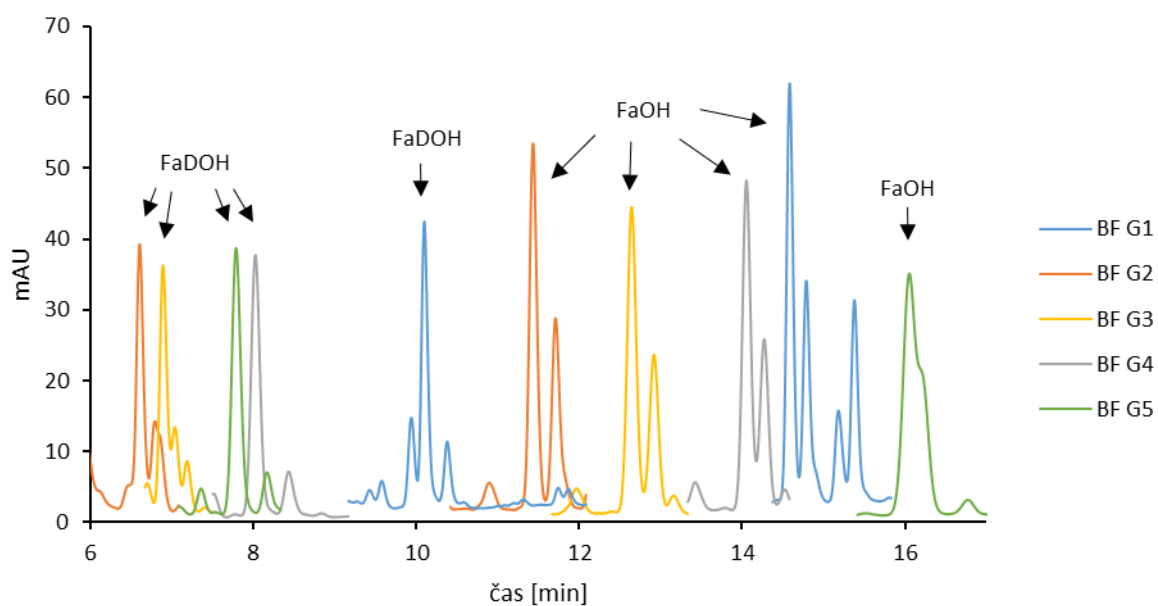
Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl, FMF = 0,4 ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 27 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm, extrakt z pastináku.

Kromě C18 stacionární fáze byla pro separaci polyacetylenů testována také pentafluorfenylová (F5) či bifenylová stacionární fáze. Ani jedna ze zmíněných modifikovaných stacionárních fází však nebyla pro separaci polyacetylenů vhodnější než klasická C18. U F5 stacionární fáze docházelo ke koeluci s matriční sloučeninou a zároveň k deformaci píku falcarinolu (Obr. 32). Detailnější pohled na tvar píků FaOH je ilustrován na obrázku v Příloze 14. U bifenylové stacionární fáze nebylo možné rozdělit píky falcarinolu a falcarindiolu (Obr. 33) od matričních sloučenin ani jedním z testovaných gradientů, které jsou pro obě stacionární fáze uvedeny v tabulkách v Přílohách 13 a 15.



**Obr. 32:** Optimalizace separace polyacetylenů u vzorku petržele na F5 stacionární fázi.

Ascentis Express F5 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce (Příloha 13), detekce  $\lambda = 205$  nm.

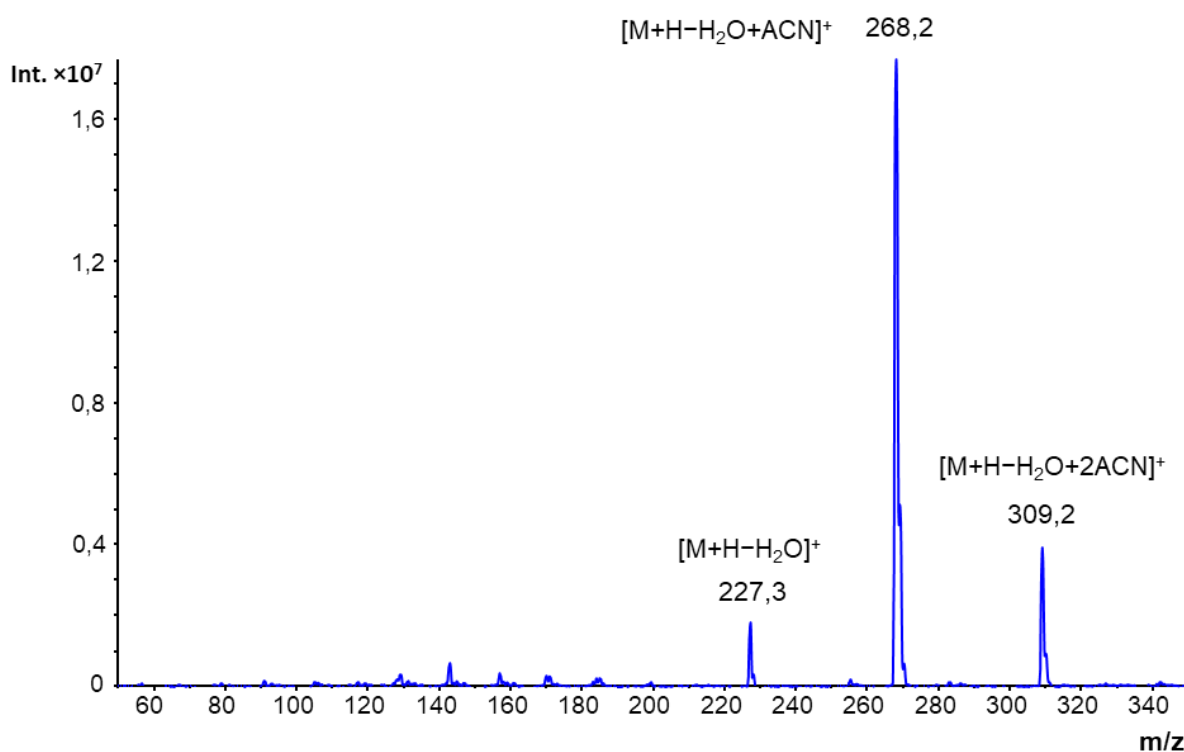


**Obr. 33:** Optimalizace separace FaOH u vzorku pastináku na bifenylové stacionární fázi.

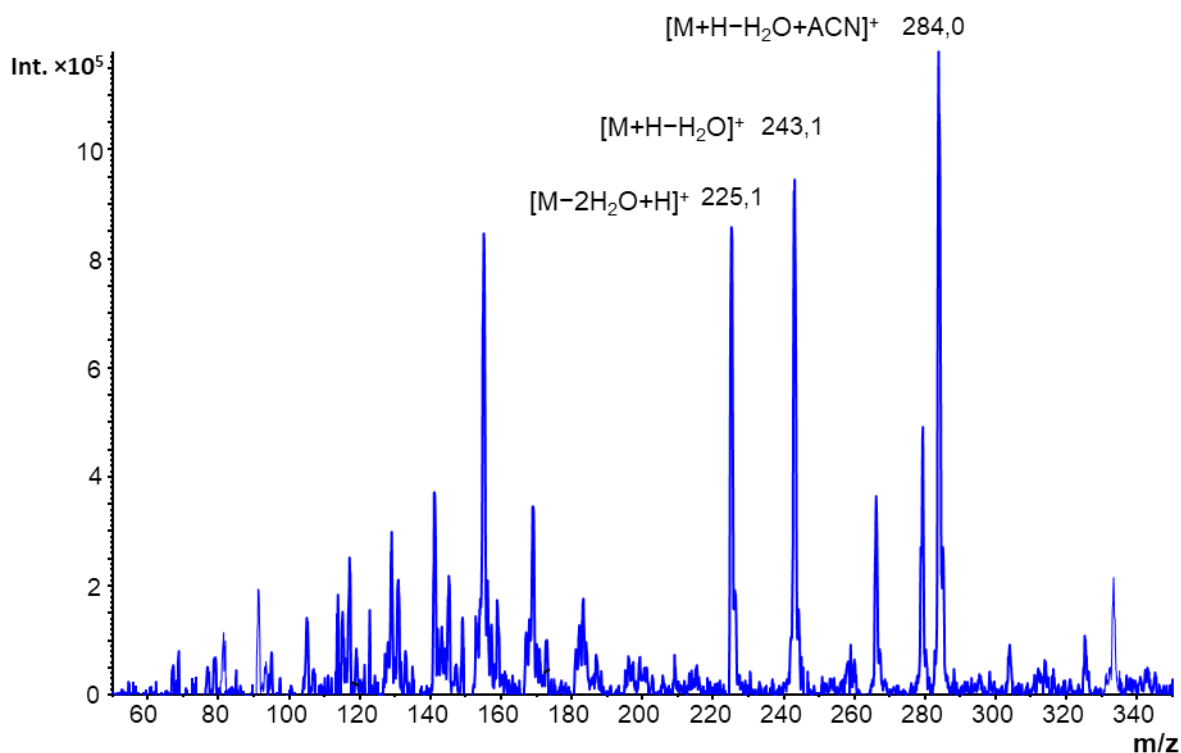
Kinetex Biphenyl 100 A (150x3 mm, 2,6 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce (Příloha 15), detekce  $\lambda = 205$  nm.

### 3.3.3 HPLC/MS

Přítomnost falcarinolu a falcarindiolu v extraktech z mrkve a petržele byla potvrzena analýzou na kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem. V mrkvi byla navíc potvrzena přítomnost falcarindiol-3-acetátu. Pro ionizaci polyacetylenů se zpravidla využívá chemická ionizace za atmosférického tlaku a ESI se využívá zřídka. Proto byla nejprve testována ionizační účinnost ESI při snímání kladných a záporných iontů při využití různých organických rozpouštědel v mobilní fázi (acetonitril a metanol). Dále byl sledován vliv kyseliny mravenčí na ionizaci sledovaných látek. Pro zajištění optimálních podmínek ionizace bylo nutné využít mobilní fázi skládající se z acetonitrilu a vody okyselené kyselinou mravenčí. Při záznamu kladných iontů pak byly pozorovány intenzivní ionty  $[M+H-H_2O+ACN]^+$  (Obr. 34 a 35).



Obr. 34: Hmotnostní spektrum falcarinolu



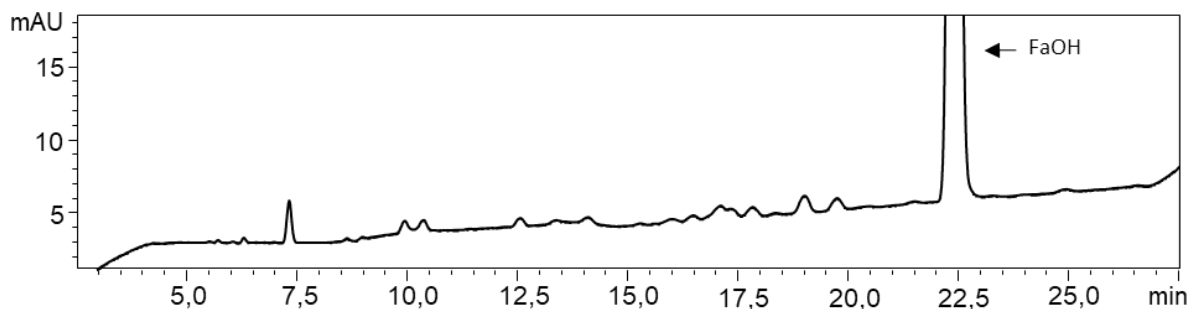
**Obr. 35:** Hmotnostní spektrum falcarindiolu

### 3.3.4 Kvantitativní analýza polyacetylenů

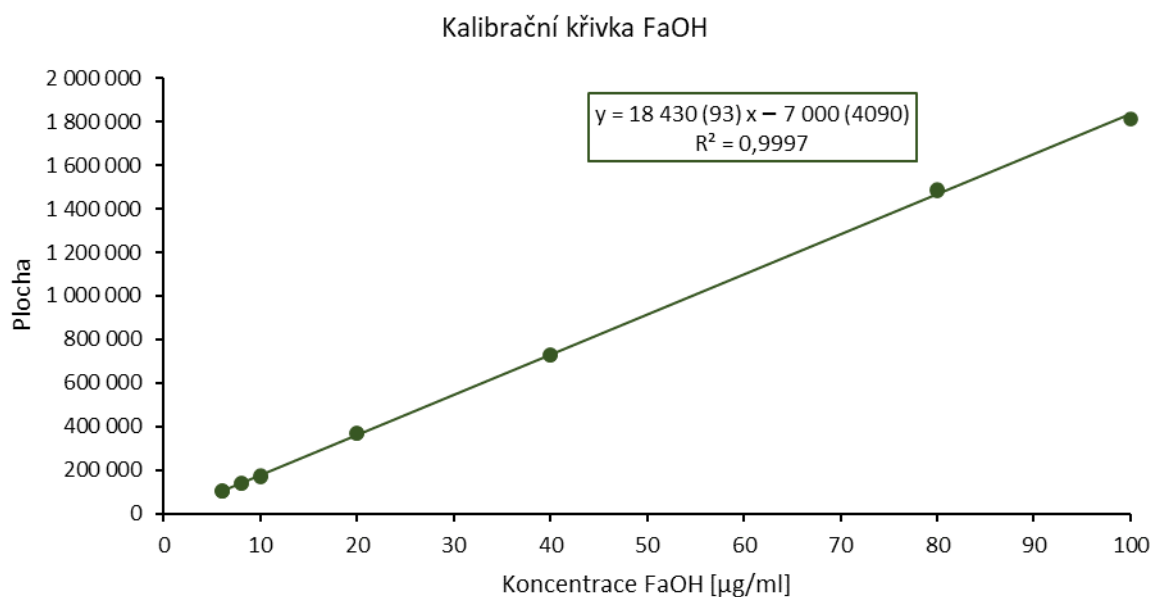
Kvantitativní analýza polyacetylenů bylo provedeno metodou kalibrační křivky pomocí izolovaného standardu falcarinolu o čistotě  $\geq 93\%$ . Čistota standardu byla ověřena proměřením roztoku o koncentraci  $100\ \mu\text{g/ml}$  jako poměr plochy píku FaOH ku celkové ploše všech píků (Tabulka 15, Obr. 36).

**Tabulka 15:** Vlastnosti chromatogramu roztoku FaOH o koncentraci  $100\ \mu\text{g/ml}$ ,  $\lambda=205\ \text{nm}$

	Čas [min]	Plocha	Výška [mAU]	%
FaOH	22,443	1 939 561	114,760	93,392
Celkem		2 076 791	125,801	100



**Obr. 36:** Chromatografický záznam separace standardního roztoku FaOH o koncentraci  $100\ \mu\text{g/ml}$ .



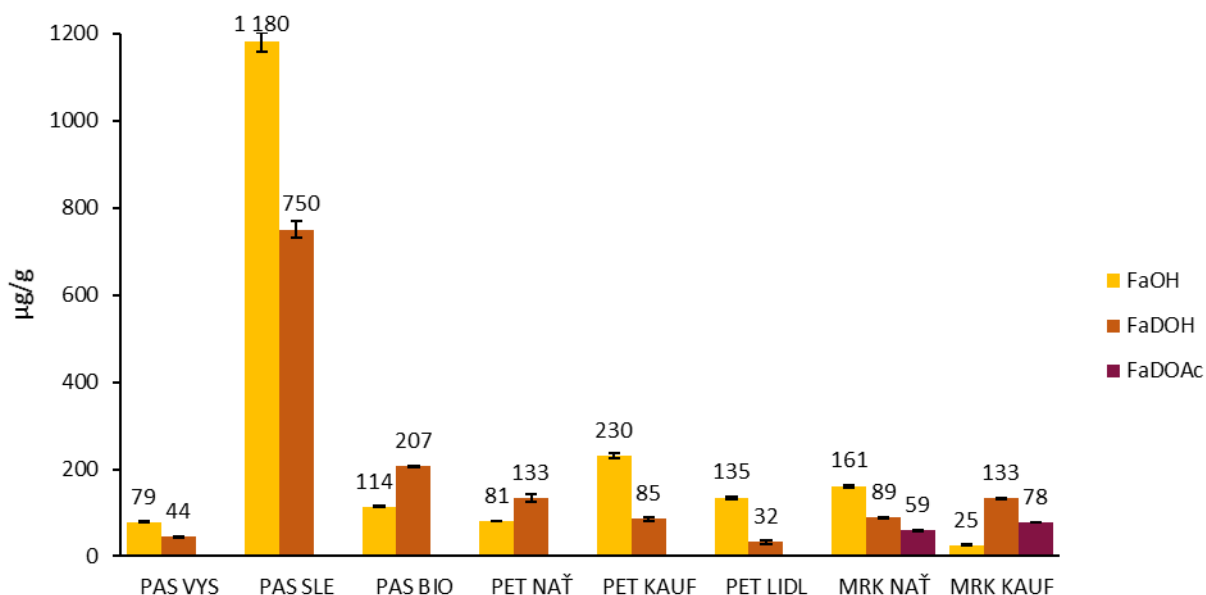
**Obr. 37:** Kalibrační křivka: závislost plochy píku na koncentraci FaOH.

Kalibrační roztoky byly proměřeny třikrát na osmi koncentračních hladinách v rozmezí koncentrací 6-100 µg/ml. Regresní diagnostika byla provedena v programu QC Expert 2.9 (TriloByte). Nejprve bylo využito grafických diagnostik (Williamsův, Pregibonův, McCulloh-Meterův a L-R graf) pro odhalení a odstranění vlivných bodů. Významnost regresních parametrů byla testována pomocí Studentova t-testu. Absolutní člen kalibrační křivky falcarinolu byl shledán jako nevýznamný, křivka tedy prochází nulou. Regresní parametry spolu se směrodatnými odchylkami a koeficientem determinace ( $R^2$ ) jsou zobrazeny na Obr. 37. Hodnoty meze detekce, LOD = 75 ng/l, a meze stanovitelnosti, LOQ = 250 ng/l byly stanoveny jako trojnásobek, resp. desetinásobek odstupů signálu od šumu.

V rámci validace metody byla zjištěna návratnost proměřením roztoků falcarinolu o koncentracích 9 a 70 µg/ml. Obě hodnoty, 101,31 a 103,87 %, spadaly do rozmezí kritéria přijatelnosti 80–110 % dle AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) [94]. Pro opakovatelnost nástřiku byla z deseti opakování stanovena odchylka < 0,27 % a relativní chyba extrakce z pěti opakování byla stanovena na 3,44 %.

Pro kvantitativní stanovení polyacetylenů byly připraveny extrakty z kořenové zeleniny dle optimalizovaného postupu popsaného v kapitole 2.4.7. Celkem byly připraveny dva extrakty od každého vzorku, které byly dvakrát proměřeny. Koncentrace FaOH, FaDOH a v případě mrkve i FaDOAc byla vypočítána na základě kalibrační závislosti uvedené na Obr. 38. Plochy píků polyacetylenů u vzorků byly v rozmezí kalibrační křivky, pouze vzorek pastináku ze

Slezska musel být desetkrát naředěn. Obsah a poměr polyacetylenů byl jedinečný pro každý vzorek, a to i bez ohledu na druh zeleniny (Tabulka 16, Obr. 38). Příčinou mohou být různé podmínky během pěstování, neboť kupované vzorky měly svůj původ v různých zemích Evropy, a dále podmínky během skladování zeleniny, které mají na obsah polyacetylenů v zelenině také vliv [48]. Nejednotný poměr falcarinolu a falcarindiolu v rámci jednoho druhu zeleniny lze vysvětlit přechodem mezi sloučeninami, kdy falcarinol slouží jako prekurzor pro další polyacetyleny [13, 45, 48]. Oba vzorky domácích pastináků byly sklizeny na podzim a následně dlouhodobě uskladněny. Zatímco pastinák z Vysočiny byl skladován ve sklepě, pastinák ze Slezska byl skladován v zemině při nestálé teplotě. Vysoké množství polyacetylenů v pastináku ze Slezska mohlo být způsobeno napadením mikroorganismy, před kterými polyacetyleny rostlinu chrání. Záznamy analýz osmi vzorků kořenové zeleniny jsou uvedeny v Přílohách 17–23.



**Obr. 38:** Obsah polyacetylenů ve vzorcích pastináku, petržele a mrkve

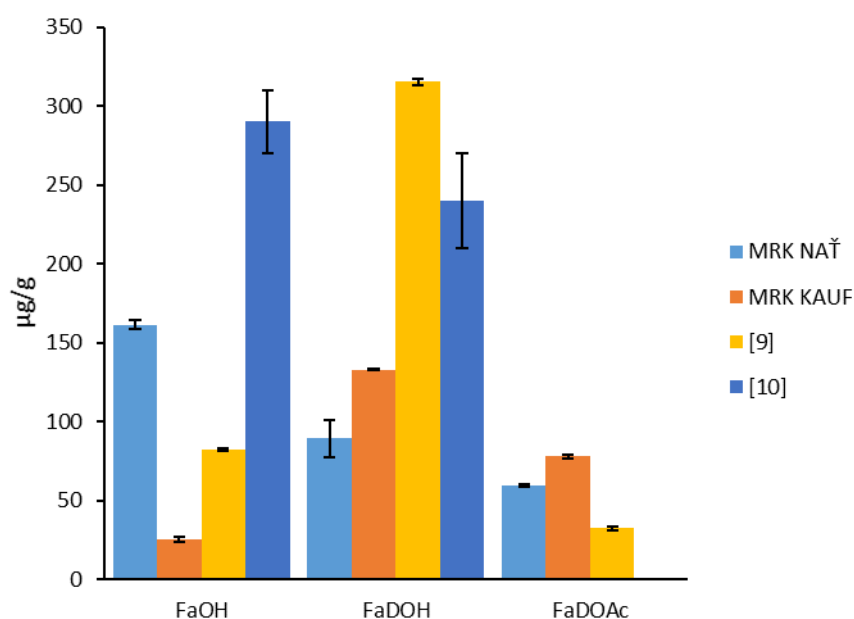
**Tabulka 16:** Obsah polyacetylenů v µg/g lyofilizovaných vzorků

Vzorek	Zkratka	FaOH	FaDOH	FaDOAc
Mrkev s natí	MRK NAŘ	161 ± 2,7	89 ± 1,6	59,5 ± 0,68
Mrkev Kaufland	MRK KAUF	25 ± 1,4	133,1 ± 0,72	78 ± 1,4
Pastinák Vysočina	PAS VYS	79 ± 2,0	44,2 ± 0,92	
Pastinák Slezsko	PAS SLE	1180 ± 22	750 ± 18	
Pastinák Bio	PAS BIO	114 ± 1,5	207 ± 1,9	
Petržel s natí	PET NAŘ	81,2 ± 0,29	133 ± 8,6	
Petržel Kaufland	PET KAUF	230 ± 6,6	85 ± 3,7	
Petržel Lidl	PET LIDL	135 ± 3,2	32 ± 3,1	

Mezi mrkví a petrželí s natí, které byly považovány za vzorky nejčerstvější s nejkratší dobou skladování, nebyl nalezen společný jmenovatel, neboť petržel s natí měla nižší obsah falcarinolu než ostatní petržele, a naopak mrkev s natí měla mnohem vyšší obsah falcarinolu než mrkev bez natě. Pro obsahy falcarindiolu u vzorků s natí platí obráceně, že petržel s natí měla vyšší obsah než petržele bez natě, a mrkev s natí měla nižší obsah než mrkev bez natě. U vzorků mrkve byl stanoven rovněž falcarindiol-3-acetát, jehož obsah byl pro mrkev s natí i bez natě srovnatelný.

Vzorek petržele s natí obsahoval více falcarindiolu než falcarinolu, ostatní petržele obsahovaly více falcarinolu. Nejvíce falcarinolu obsahovala petržel z Kauflandu, která byla předem vybraná pro izolaci falcarinolu. Nejméně falcarindiolu ze všech vzorků obsahovala petržel z Lidlu, nejméně falcarinolu obsahovala mrkev bez natě.

Pro vzorky domácích pastináků platilo, že falcarinolu bylo obsaženo více než falcaridiolu, a to o více než polovinu, Takto vysoký obsah si lze vysvětlit jako reakci na možnou mikrobiální zátěž, která indukuje jejich tvorbu [44, 49]. Poměr polyacetylenů byl opačný u vzorku Bio pastináku, který obsahoval naopak více falcarindiolu než falcarinolu.

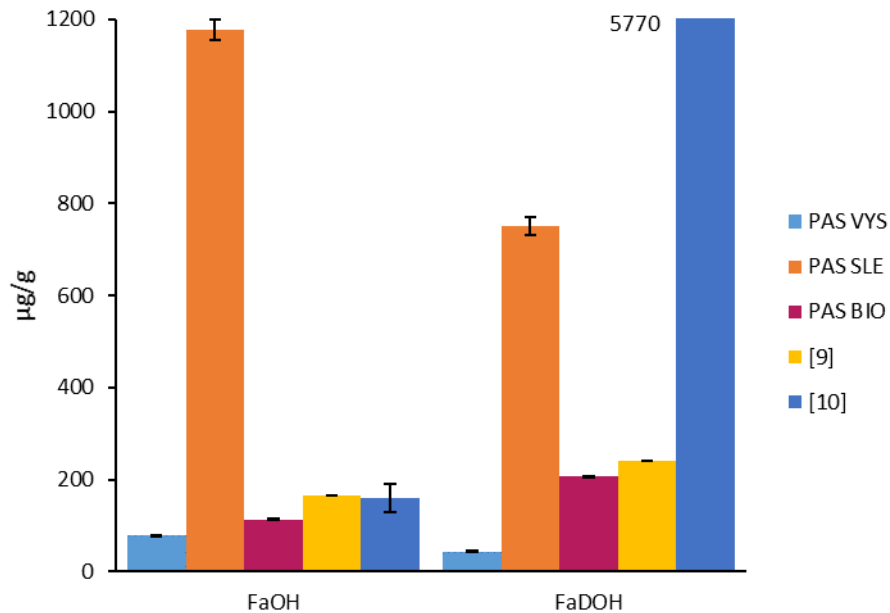


**Obr. 39:** Porovnání obsahu polyacetylenů ve vzorcích mrkve s literaturou [9, 10]

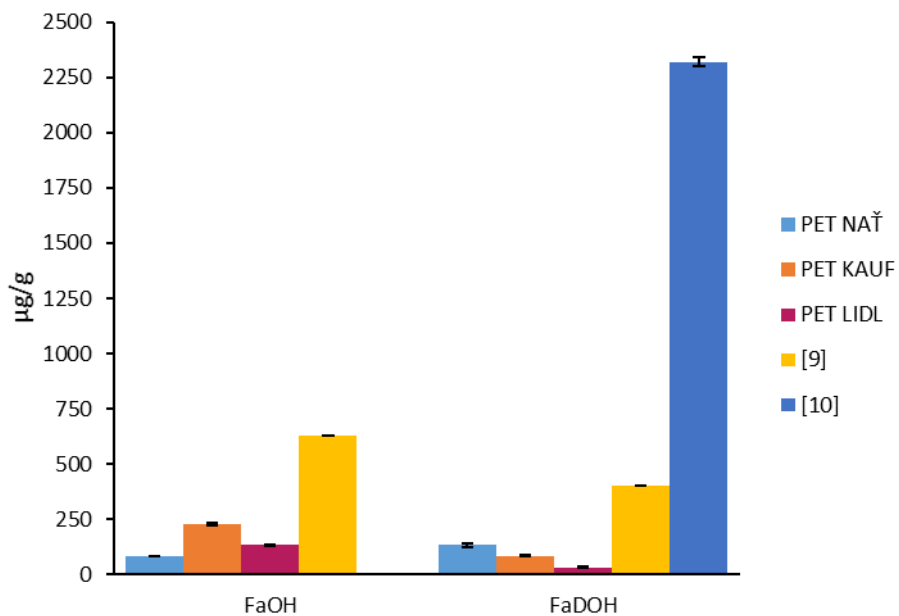
Při porovnání dosažených výsledků v mrkvi se studii Zidorna a kol. [9] a Kramera a kol. [10] (Obr. 39) je patrné, že obsah falcarinolu v mrkvi z Kauflandu byl nižší nejenom oproti mrkvi s natí, ale i ve srovnání s publikovanými výsledky. Také obsah falcarindiolu ve vzorcích byl nižší, než udává literatura, avšak koncentrace falcarindiol-3-acetátu byla



v měřených vzorcích vyšší. Vzorky pastináku z Vysočiny a Bio pastináku obsahovaly méně polyacetylenů než vzorky ve studiích, nicméně Bio pastinák byl blízký výsledkům studie [9]. Pastinák ze Slezska obsahoval vysoké množství obou polyacetylenů, přesto ve studii [10] našli ještě vyšší obsah falcarindiolu (Obr. 40). Vzorky petržele měly v porovnání s literaturou nízký obsah obou polyacetylenů (Obr. 41).



**Obr. 40:** Porovnání obsahu polyacetylenů ve vzorcích pastináku s literaturou [9, 10]



**Obr. 41:** Porovnání obsahu polyacetylenů ve vzorcích petržele s literaturou [9, 10]

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla nejprve optimalizace extrakce polyacetylenů z kořenové zeleniny. Nejlepší účinnosti extrakce z lyofilizovaných vzorků bylo dosaženo pomocí třepání s dichlormethanem. Dále byla optimalizována chromatografická separace polyacetylenů v RP-HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Nejlepší separace bylo dosaženo na koloně Ascentis Express C18 s gradientovou elucí acetonitrilu ve vodě.

Kvantifikace polyacetylenů byla umožněna díky izolaci vlastního standardu falcarinolu o čistotě  $\geq 93\%$ . Pomocí preparativní chromatografie bylo z 247 g lyofilizované petržele izolováno 24,41 mg falcarinolu. Během izolace bylo díky recyklaci dichlormethanu sbíraného na rotační vakuové odparce ušetřeno 800 ml rozpouštědla. Náklady na pořízení vlastního standardu pak představovaly pouhých 3,7–6,0 % z ceny komerčního standardu.

Pro proměření obsahu polyacetylenů byly získány dva vzorky, které byly vypěstovány v domácích podmínkách, ostatní vzorky byly zakoupené v místní obchodní síti. Obsah polyacetylenů v lyofilizované kořenové zelenině se pohyboval v rozmezí od  $25 \pm 1,4$  do  $230 \pm 6,6$   $\mu\text{g/g}$  falcarinolu a od  $32 \pm 3,1$  do  $207 \pm 1,9$   $\mu\text{g/g}$  falcarindiolu. Vysoký obsah polyacetylenů mimo tato rozmezí byl zaznamenán u vzorku domácího pastináku ze Slezska, pro který byly naměřeny obsahy  $1180 \pm 22$   $\mu\text{g/g}$  pro falcarinol a  $750 \pm 18$   $\mu\text{g/g}$  pro falcarindiol. Ve vzorcích lyofilizované mrkve byl navíc stanoven falcarindiol-3-acetát v koncentracích  $59,5 \pm 0,68$   $\mu\text{g/g}$  a  $78 \pm 1,4$   $\mu\text{g/g}$ .

## Literatura

- [1] ČR, ÚZIS. Pastinák. NZIP.cz [online]. [vid. 2023-12-05]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1001-pastinak>
- [2] Parsnip. FreshPoint [online]. [vid. 2023-11-30]. Dostupné z: <https://www.freshpoint.com/archive/commodity-parsnip/>
- [3] Pastinák - Dlouhý bílý. Osej.cz [online]. [vid. 2023-12-05]. Dostupné z: <https://osej.cz/produkt/10532>
- [4] Two Mediterranean Root Crops. Aggie Horticulture [online]. [vid. 2023-12-05]. Dostupné z: <https://aggiehort.tamu.edu/archives/parsons/publications/vegetabletravelers/parsnip.html>
- [5] MCCANCE, R. A. a Elsie M. WIDDOWSON. McCance and Widdowson's The composition of foods. 6th summary ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004. ISBN 978-0-85404-428-3.
- [6] GOLUBKINA, N. A., M. I. FEDOROVA, A. N. STEPANOV a S. M. NADEZHKIN. Content of micro- and macro-elements of parsnip (*Pastinaca sativa* L.). Vegetable crops of Russia [online]. 2014, (3), 18–21 [vid. 2023-10-30]. ISSN 2072-9146. Dostupné z: doi:10.18619/2072-9146-2014-3-18-21
- [7] NIKOLIĆ, Nada Č., Miodrag M. LAZIĆ, Ivana T. KARABEGOVIĆ, Gordana S. STOJANOVIĆ a Zoran B. TODOROVIĆ. A Characterization of Content, Composition and Scavenging Capacity of Phenolic Compounds in Parsnip Roots of Various Weight. Natural Product Communications [online]. 2014, 9(6), 1934578X1400900 [vid. 2023-11-24]. ISSN 1934-578X, 1555-9475. Dostupné z: doi:10.1177/1934578X1400900620
- [8] Periconceptional folic acid supplementation to prevent neural tube defects. who.int [online]. [vid. 2023-11-28]. Dostupné z: <https://www.who.int/tools/elena/interventions/folate-periconceptional>
- [9] ZIDORN, Christian, Karin JÖHRER, Markus GANZERA, Birthe SCHUBERT, Elisabeth Maria SIGMUND, Judith MADER, Richard GREIL, Ernst P. ELLMERER a Hermann STUPPNER. Polyacetylenes from the Apiaceae Vegetables Carrot, Celery, Fennel, Parsley, and Parsnip and Their Cytotoxic Activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2005, 53(7), 2518–2523 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf048041s
- [10] KRAMER, Maike, Andrea MÜHLEIS, Jürgen CONRAD, Martin LEITENBERGER, Uwe BEIFUSS, Reinhold CARLE a Dietmar R. KAMMERER. Quantification of Polyacetylenes in Apiaceous Plants by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detection. Zeitschrift für Naturforschung C [online]. 2011, 66(7–8), 319–327 [vid. 2023-10-30]. ISSN 1865-7125, 0939-5075. Dostupné z: doi:10.1515/znc-2011-7-801
- [11] ČR, MŽP. Ministerstvo životního prostředí vydává první zásady regulace invazních nepůvodních druhů. Zaměřují se na dvě škodlivé rostliny v krajině - bolševník velkolepý a pajasan žláznatý. Ministerstvo životního prostředí [online]. 2. srpen 2023 [vid. 2023-12-05]. Dostupné z: [https://www.mzp.cz/news\\_20230802\\_MZP-vydava-prvni-zasady-regulace-pro-bolsevník-a-pajasan](https://www.mzp.cz/news_20230802_MZP-vydava-prvni-zasady-regulace-pro-bolsevník-a-pajasan)
- [12] MELOUGH, Melissa M., Sang Gil LEE, Eunyoung CHO, Kijoon KIM, Anthony A. PROVATAS, Christopher PERKINS, Min Kyung PARK, Abrar QURESHI a Ock K. CHUN. Identification and Quantitation of Furocoumarins in Popularly Consumed Foods in the U.S. Using QuEChERS Extraction Coupled with UPLC-MS/MS Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2017, 65(24), 5049–5055 [vid. 2024-01-16]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.7b01279
- [13] CHRISTENSEN, Lars P. a Kirsten BRANDT. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2006, 41(3), 683–693 [vid. 2023-10-30]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2006.01.057
- [14] Ministry for Primary Industries. Natural toxins in vegetables and beans. Ministry for Primary Industries. A New Zealand Government Department. [online]. 11. srpen 2021 [vid. 2023-12-05]. Dostupné z: <https://www.mpi.govt.nz/food-safety-home/safe-eat/natural-toxins-in-vegetables-and-beans/>

- [15] KNEZ, Eliza, Kornelia KADAC-CZAPSKA, Kamila DMOCHOWSKA-ŚLEZAK a Małgorzata GREMBECKA. Root Vegetables—Composition, Health Effects, and Contaminants. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2022, 19(23), 15531 [vid. 2023-11-23]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph192315531
- [16] Pastinák. *Apetit Online* [online]. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://www.apetitonline.cz/pastinak>
- [17] Pastinák kostka sušený (1 Kg). Profi koření [online]. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://www.profikoreni.cz/Pastinak-kostka-suseny-1-Kg-d1162.htm>
- [18] Hamé.cz. *Hamé.cz* [online]. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://www.hame.cz>
- [19] Dětská výživa BABYBIO. *Babybio* [online]. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://babybio.cz/>
- [20] Sortiment dětských příkrmů HiPP - Zeleninové příkrmy pro děti - První lžička. *HiPP.cz* [online]. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://www.hipp.cz/prikrmly/produkty/zeleninove-prikrmly-pro-deti/?cHash=5e88bf9d011eaf53f2af39ee0caaf21b#pm%3A%7B%22limit%22%3A9%7D>
- [21] WWW.PEARSHEALTHCYBER.CZ, Pears Health Cyber. HAMI Masozeleninový příkrm pastinák s květákem a telecím masem 10m+ BIO 190 g. *Lékárna.cz* [online]. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/hami-masozeleninovy-prikrm-pastinak-s-kvetakem-a-telecim-masem-10m-bio-190-g/>
- [22] Příkrmy. *dm.cz* [online]. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://www.dm.cz/pece-o-dite/detska-vyziva-a-napoje/prikrmly>
- [23] Honey roasted parsnips recipe: How to make delicious honey roasted parsnips. *Express.co.uk* [online]. [vid. 2023-11-30]. Dostupné z: <https://www.express.co.uk/life-style/food/1283507/Honey-roasted-parsnips-recipe>
- [24] SAMILYK, Marina, Anna HELIKH, Natalia BOLGOVA, Taisia RYZHKOVA, Igor SIRENKO a Oleg FESYUN. Substantiation of the choice of fillers for cottage cheese masses. *EUREKA: Life Sciences* [online]. 2020, 2, 38–45 [vid. 2023-10-30]. ISSN 2504-5695, 2504-5687. Dostupné z: doi:10.21303/2504-5695.2020.001210
- [25] Pastinák. Prémiové seno [online]. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: [https://www.premioveseno.cz/pastinak/?utm\\_source=tanganica&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=thb79ce96bea66f6fcd51e47f717643b4&utm\\_term=EAIAIQobChMIssTY4u3oggMVM5CDBx23agAhEAAAYASAAEgL6ZPD\\_BwE&gclid=EAIAIQobChMIssTY4u3oggMVM5CDBx23agAhEAAAYASAAEgL6ZPD\\_BwE](https://www.premioveseno.cz/pastinak/?utm_source=tanganica&utm_medium=cpc&utm_campaign=thb79ce96bea66f6fcd51e47f717643b4&utm_term=EAIAIQobChMIssTY4u3oggMVM5CDBx23agAhEAAAYASAAEgL6ZPD_BwE&gclid=EAIAIQobChMIssTY4u3oggMVM5CDBx23agAhEAAAYASAAEgL6ZPD_BwE)
- [26] SpokojenyPes.cz. *SpokojenyPes.cz* [online]. [vid. 2023-11-29]. Dostupné z: <https://www.spokojenypes.cz/konzerva-isegrim-adult-river-pstruh-pastynak-400-g/>
- [27] DOBRIČEVIĆ, Nadica, Jana ŠIĆ ŽLABUR, Sandra VOĆA, Stjepan PLIESTIĆ, Ante GALIĆ, Azra DELIĆ a Sanja FABEK UHER. Bioactive compounds content and nutritional potential of different parsley parts (*Petroselinum crispum* Mill. *Journal of Central European Agriculture* [online]. 2019, 20(3), 900–910 [vid. 2024-02-06]. ISSN 1332-9049. Dostupné z: doi:10.5513/JCEA01/20.3.2417
- [28] KARKLELIENĖ, R., E. DAMBRAUSKIENĖ, D. JUŠKEVIČIENĖ, A. RADZEVIČIUS, M. RUBINSKIENĖ a P. VIŠKELIS. Productivity and nutritional value of dill and parsley. *Horticultural Science*. 2014, 41(3), 131–137.
- [29] ČR, ÚZIS. Petržel. *NZIP.cz* [online]. [vid. 2024-02-19]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1000-petrzel>
- [30] LIBERAL, Ângela, Ângela FERNANDES, Nikolaos POLYZOS, Spyridon A. PETROPOULOS, Maria Inês DIAS, José PINELA, Jovana PETROVIĆ, Marina SOKOVIĆ, Isabel C.F.R. FERREIRA a Lillian BARROS. Bioactive Properties and Phenolic Compound Profiles of Turnip-Rooted, Plain-Leafed and Curly-Leafed Parsley Cultivars. *Molecules* [online]. 2020, 25(23), 5606 [vid. 2024-02-06]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25235606

- [31] PFERSCHY-WENZIG, Eva-Maria, Verena GETZINGER, Olaf KUNERT, Karin WOELKART, Johann ZAHRL a Rudolf BAUER. Determination of falcarinol in carrot (*Daucus carota* L.) genotypes using liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2009, 114(3), 1083–1090 [vid. 2023-10-30]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.042
- [32] ALGARRA, Manuel, Ana FERNANDES, Nuno MATEUS, Victor DE FREITAS, Joaquim C.G. ESTEVES DA SILVA a Juan CASADO. Anthocyanin profile and antioxidant capacity of black carrots (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) from Cuevas Bajas, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2014, 33(1), 71–76 [vid. 2024-02-06]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2013.11.005
- [33] SHARMA, Sakshi a Kd SHARMA. Nutritional characteristics of different types of carrot. *International Journal of Chemical Studies* [online]. 2020, 8(6), 2275–2278 [vid. 2024-02-06]. ISSN 23498528, 23214902. Dostupné z: doi:10.22271/chemi.2020.v8.i6ag.11111
- [34] BOADI, Nathaniel Owusu, Mercy BADU, Nii Korley KORTEI, Selina Ama SAAH, Benjamin ANNOR, Michael Baah MENSAH, Harry OKYERE a Alphonse FIEBOR. Nutritional composition and antioxidant properties of three varieties of carrot (*Daucus carota*). *Scientific African* [online]. 2021, 12, e00801 [vid. 2024-02-06]. ISSN 24682276. Dostupné z: doi:10.1016/j.sciaf.2021.e00801
- [35] SUOJALA, Terhi. Variation in sugar content and composition of carrot storage roots at harvest and during storage. *Scientia Horticulturae*. 2000, 2000(85), 1–19.
- [36] MANDRICH, Luigi, Antonia Valeria ESPOSITO, Silvio COSTA a Emilia CAPUTO. Chemical Composition, Functional and Anticancer Properties of Carrot. *Molecules* [online]. 2023, 28(20), 7161 [vid. 2024-02-06]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28207161
- [37] BABIČKA, Luboš. Přídavné látky v potravinách: Publikace České technologické platformy pro potraviny. 1. vyd. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2012. ISBN 978-80-905096-3-4.
- [38] MONTILLA, Elyana Cuevas, Miriam Rodriguez ARZABA, Silke HILLEBRAND a Peter WINTERHALTER. Anthocyanin Composition of Black Carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) Cultivars Antonina, Beta Sweet, Deep Purple, and Purple Haze. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, 59(7), 3385–3390 [vid. 2024-02-06]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf104724k
- [39] ASSOUS, M.T.M., M.M. ABDEL-HADY a Ghada M. MEDANY. Evaluation of red pigment extracted from purple carrots and its utilization as antioxidant and natural food colorants. *Annals of Agricultural Sciences* [online]. 2014, 59(1), 1–7 [vid. 2024-02-06]. ISSN 05701783. Dostupné z: doi:10.1016/j.aos.2014.06.001
- [40] KJELLENBERG, Lars, Eva JOHANSSON, Karl-Erik GUSTAVSSON a Marie E OLSSON. Polyacetylenes in fresh and stored carrots (*Daucus carota*): relations to root morphology and sugar content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2012, 92(8), 1748–1754 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0022-5142, 1097-0010. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.5541
- [41] KREUTZMANN, Stine, Lars P. CHRISTENSEN a Merete EDELENBOS. Investigation of bitterness in carrots (*Daucus carota* L.) based on quantitative chemical and sensory analyses. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2008, 41(2), 193–205 [vid. 2023-10-30]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2007.02.024
- [42] CZEPA, Andreas a Thomas HOFMANN. Structural and Sensory Characterization of Compounds Contributing to the Bitter Off-Taste of Carrots (*Daucus carota* L.) and Carrot Puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, 51(13), 3865–3873 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf034085+
- [43] CZEPA, Andreas a Thomas HOFMANN. Quantitative Studies and Sensory Analyses on the Influence of Cultivar, Spatial Tissue Distribution, and Industrial Processing on the Bitter Off-Taste of Carrots (*Daucus*

- carota L.) and Carrot Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, 52(14), 4508–4514 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf0496393
- [44] XIE, Qi a Changhong WANG. Polyacetylenes in herbal medicine: A comprehensive review of its occurrence, pharmacology, toxicology, and pharmacokinetics (2014–2021). *Phytochemistry* [online]. 2022, 201, 113288 [vid. 2023-10-30]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2022.113288
- [45] SOUSA, Rose Marie O.F., Ana C. CUNHA a Manuel FERNANDES-FERREIRA. The potential of Apiaceae species as sources of singular phytochemicals and plant-based pesticides. *Phytochemistry* [online]. 2021, 187, 112714 [vid. 2024-01-16]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2021.112714
- [46] HANSEN, Susanne L, Stig PURUP a Lars P CHRISTENSEN. Bioactivity of falcarinol and the influence of processing and storage on its content in carrots (*Daucus carota* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2003, 83(10), 1010–1017 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0022-5142, 1097-0010. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.1442
- [47] NEGRI, Roberto. Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. *Fitoterapia* [online]. 2015, 106, 92–109 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0367326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2015.08.011
- [48] KIDMOSE, U., S. L. HANSEN, L. P. CHRISTENSEN, M. EDELENBOS, E. LARSEN a R. NØRBAEK. Effects of Genotype, Root Size, Storage, and Processing on Bioactive Compounds in Organically Grown Carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Food Science* [online]. 2006, 69(9), S388–S394 [vid. 2023-10-30]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb09955.x
- [49] JAKOBSEN, Ulla, Morten KOBÆK-LARSEN, Karoline D. KJØLLER, Steen ANTONSEN, Gunnar BAATRUP a Morten B. TRELLE. Quantification of the anti-neoplastic polyacetylene falcarinol from carrots in human serum by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* [online]. 2022, 1210, 123440 [vid. 2023-10-30]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2022.123440
- [50] RAWSON, Ashish, Anastasios KOIDIS, Dilip K. RAI, Maria TUOHY a Nigel BRUNTON. Influence of Sous Vide and Water Immersion Processing on Polyacetylene Content and Instrumental Color of Parsnip (*Pastinaca sativa*) Disks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, 58(13), 7740–7747 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf100517p
- [51] RAWSON, A., A. KOIDIS, A. PATRAS, M.G. TUOHY a N.P. BRUNTON. Modelling the effect of water immersion thermal processing on polyacetylene levels and instrumental colour of carrot disks. *Food Chemistry* [online]. 2010, 121(1), 62–68 [vid. 2023-10-30]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.003
- [52] JIANG, Yueping, Yufeng LIU, Qinglan GUO, Zhibo JIANG, Chengbo XU, Chenggen ZHU, Yongchun YANG, Sheng LIN a Jiangong SHI. Acetylenes and fatty acids from *Codonopsis pilosula*. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2015, 5(3), 215–222 [vid. 2023-12-23]. ISSN 22113835. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2015.03.005
- [53] PATOČKA, Jiří. Jedovaté polyacetylenické alkoholy rozpuku jízlivého [online]. [vid. 2023-12-23]. Dostupné z: <https://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=184>
- [54] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vydání. Praha: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [55] BIDLINGMEYER, Brian A. *Practical HPLC methodology and applications*. New York: Wiley, 1992. ISBN 978-0-471-57246-6.
- [56] GMBH, KNAUER Wissenschaftliche Geräte. *HPLC Principles and parameters*. KNAUER [online]. [vid. 2023-10-30]. Dostupné z: <https://www.knauer.net/en/Systems-Solutions/Analytical-HPLC-UHPLC/HPLC-Basics---principles-and-parameters>
- [57] HÁJEK, Tomáš. *Přednášky z Instrumentálních metod v analýze potravin*. 2023.

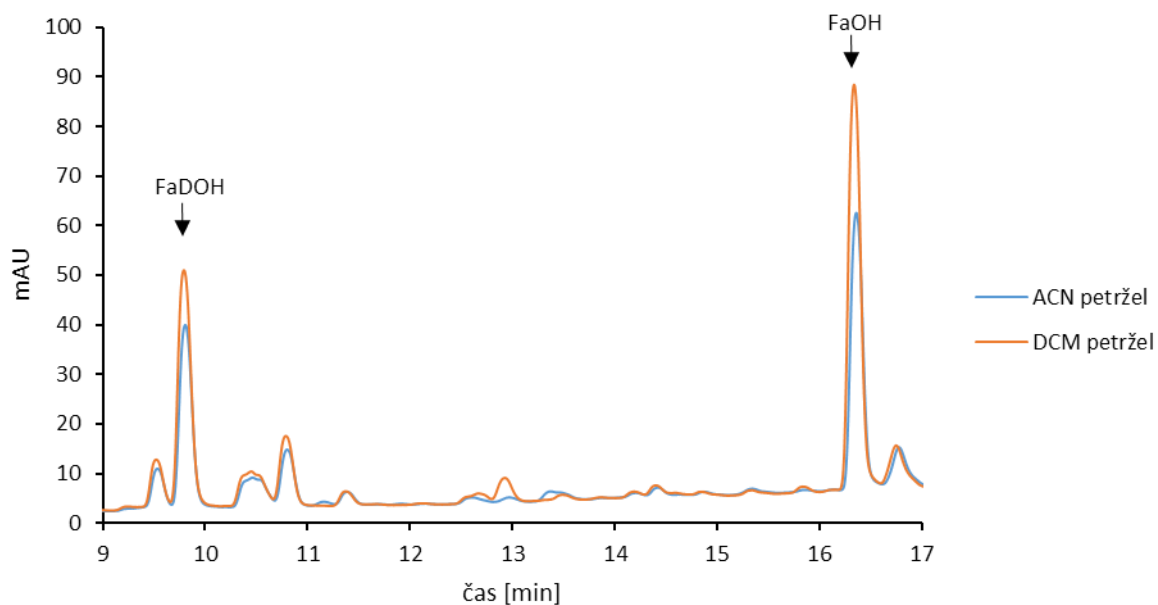
- [58] VOJTA, Jiří, Adéla MUSILOVÁ-SVOBODOVÁ, Martin FRANC, Pavel COUFAL a Zuzana BOSÁKOVÁ. Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních médií. *Chemické Listy*. 2014, (108), 127–134.
- [59] HOLČAPEK, Michal, ed. *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. B.m.: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8.
- [60] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, 20(41), 152–157.
- [61] BANERJEE, Shibdas a Shyamalava MAZUMDAR. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2012, 2012, 1–40 [vid. 2023-11-02]. ISSN 1687-8760, 1687-8779. Dostupné z: doi:10.1155/2012/282574
- [62] LEMR, Karel a Lucie BOROVCOVÁ. Vznik iontů v hmotnostní spektrometrii: Ionizace a fragmentace. *Chemické Listy*. 2020, (114), 96–100.
- [63] VERPLAETSE, Ruth. ResearchGate. ResearchGate [online]. [vid. 2023-11-01]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-overview-of-two-ionization-interfaces-ESI-A-and-APCI-B-A-In-ESI\\_fig3\\_263205281](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-overview-of-two-ionization-interfaces-ESI-A-and-APCI-B-A-In-ESI_fig3_263205281)
- [64] HAVLÍČEK, Vladimír a František TUREČEK. Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti. *Chemické Listy*. 2020, (114), 106–112.
- [65] ŠKRÍBA, Antonín, Jiří HOUŠŤ a Vladimír HAVLÍČEK. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací. *Chemické Listy*. 2020, (114), 119–125.
- [66] SADÍLEK, Martin. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chemické Listy*. 2020, (114), 133–144.
- [67] RÓŽAŇSKA, Anna, Marina RUSSO, Francesco CACCIOLA, Fabio SALAFIA, Žaneta POLKOWSKA, Paola DUGO a Luigi MONDELLO. Concentration of Potentially Bioactive Compounds in Italian Extra Virgin Olive Oils from Various Sources by Using LC-MS and Multivariate Data Analysis. *Foods* [online]. 2020, 9(8), 1120 [vid. 2023-11-21]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods9081120
- [68] KLIKAROVÁ, Jitka, Hana ŠTĚPÁNOVÁ, Lenka ŠIMOROVÁ, Lenka ČESLOVÁ a Jan FISCHER. HILIC-MS analysis of common artificial sweeteners in food and beverages. *Scientific Papers of the University of Pardubice*. nedatováno, (27), 33–47.
- [69] GUO, Ning, Zongli BAI, Weijuan JIA, Jianhua SUN, Wanwan WANG, Shizhong CHEN a Hong WANG. Quantitative Analysis of Polysaccharide Composition in *Polyporus umbellatus* by HPLC–ESI–TOF–MS. *Molecules* [online]. 2019, 24(14), 2526 [vid. 2023-11-21]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24142526
- [70] WOLRAB, Denise, Robert JIRÁSKO, Eva CÍFKOVÁ, Marcus HÖRING, Ding MEI, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Ondřej PETERKA, Jakub IDKOWIAK, Tereza HRNČIAROVÁ, Ladislav KUCHAR, Robert AHREND, Radana BRUMAROVÁ, David FRIEDECKÝ, Gabriel VIVO-TRUYOLS, Pavel ŠKRHA, Jan ŠKRHA, Radek KUČERA, Bohuslav MELICHAR, Gerhard LIEBISCH, Ralph BURKHARDT, Markus R. WENK, Amaury CAZENAVE-GASSIOT, Petr KARÁSEK, Ivo NOVOTNÝ, Kristína GREPLOVÁ, Roman HRSTKA a Michal HOLČAPEK. Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer. *Nature Communications* [online]. 2022, 13(1), 124 [vid. 2023-11-21]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-27765-9
- [71] PETERKA, Ondřej, Robert JIRÁSKO, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Ladislav KUCHAR, Denise WOLRAB, Roman HÁJEK, David VRÁNA, Ondřej STROUHAL, Bohuslav MELICHAR a Michal HOLČAPEK. Lipidomic characterization of exosomes isolated from human plasma using various mass spectrometry techniques. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2020, 1865(5), 158634 [vid. 2023-11-21]. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2020.158634

- [72] WOLRAB, Denise, Ondřej PETERKA, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ a Michal HOLČAPEK. Ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography / mass spectrometry in the lipidomic analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2022, 149, 116546 [vid. 2023-11-21]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2022.116546
- [73] TAN, Kee W., Daniel P. KILLEEN, Yan LI, James W. PAXTON, Nigel P. BIRCH a Arjan SCHEEPENS. Dietary polyacetylenes of the falcarinol type are inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *European Journal of Pharmacology* [online]. 2014, 723, 346–352 [vid. 2023-10-30]. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2013.11.005
- [74] KILLEEN, Daniel P., Catherine E. SANSOM, Ross E. LILL, Jocelyn R. EASON, Keith C. GORDON a Nigel B. PERRY. Quantitative Raman Spectroscopy for the Analysis of Carrot Bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, 61(11), 2701–2708 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf3053669
- [75] RAI, Dilip K., Nigel P. BRUNTON, Anastasios KOIDIS, Ashish RAWSON, Pdraig MCLOUGHLIN a William J. GRIFFITHS. Characterisation of polyacetylenes isolated from carrot (*Daucus carota*) extracts by negative ion tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2011, 25(15), 2231–2239 [vid. 2024-01-16]. ISSN 0951-4198, 1097-0231. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.5103
- [76] BIJTTEBIER, Sebastiaan, Els D'HONDT, Bart NOTEN, Nina HERMANS, Sandra APERS, Vassiliki EXARCHOU a Stefan VOORSPOELS. Automated analytical standard production with supercritical fluid chromatography for the quantification of bioactive C17-polyacetylenes: A case study on food processing waste. *Food Chemistry* [online]. 2014, 165, 371–378 [vid. 2023-10-30]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.093
- [77] NITZ, Siegfried, Martin SPRAUL a Friedrich DRAWERT. C17 Polyacetylenic Alcohols as the Major Constituents in Roots of *Petroselinum crispum* Mill. ssp. *tuberosum*. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 1990(38), 1445–1447.
- [78] METZGER, Brandon T. a David M. BARNES. Polyacetylene Diversity and Bioactivity in Orange Market and Locally Grown Colored Carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, 57(23), 11134–11139 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf9025663
- [79] KOIDIS, Anastasios, Ashish RAWSON, Maria TUOHY a Nigel BRUNTON. Influence of unit operations on the levels of polyacetylenes in minimally processed carrots and parsnips: An industrial trial. *Food Chemistry* [online]. 2012, 132(3), 1406–1412 [vid. 2023-10-30]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.128
- [80] HINDS, L., O. KENNY, M. B. HOSSAIN, D. WALSH, E. SHEEHY, P. EVANS, M. GAFFNEY a D. K. RAI. Evaluating the Antibacterial Properties of Polyacetylene and Glucosinolate Compounds with Further Identification of Their Presence within Various Carrot (*Daucus carota*) and Broccoli (*Brassica oleracea*) Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector and Ultra Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2017, 65(33), 7186–7191 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.7b02029
- [81] AGUILÓ-AGUAYO, I., N. BRUNTON, D.K. RAI, E. BALAGUERÓ, M.B. HOSSAIN a J. VALVERDE. Polyacetylene levels in carrot juice, effect of pH and thermal processing. *Food Chemistry* [online]. 2014, 152, 370–377 [vid. 2023-10-30]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.146
- [82] CHRISTENSEN, Lars P. a Stine KREUTZMANN. Determination of polyacetylenes in carrot roots (*Daucus carota* L.) by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, 30(4), 483–490 [vid. 2023-10-30]. ISSN 1615-9306, 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200600325
- [83] RAWSON, Ashish, Brijesh K. TIWARI, Maria TUOHY a Nigel BRUNTON. Impact of frozen storage on polyacetylene content, texture and colour in carrots disks. *Journal of Food Engineering* [online]. 2012, 108(4), 563–569 [vid. 2023-10-30]. ISSN 02608774. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.09.003



- [84] RAWSON, Ashish, Mohammad B. HOSSAIN, Ankit PATRAS, Maria TUOHY a Nigel BRUNTON. Effect of boiling and roasting on the polyacetylene and polyphenol content of fennel (*Foeniculum vulgare*) bulb. *Food Research International* [online]. 2013, 50(2), 513–518 [vid. 2023-10-30]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2011.01.009
- [85] Dionex™ AutoTrace™ 280 Solid-Phase Extraction Instrument. ThermoFisher Scientific [online]. [vid. 2023-10-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/071386>
- [86] What is Raman Spectroscopy? Horiba Scientific [online]. [vid. 2023-10-30]. Dostupné z: <https://www.horiba.com/usa/scientific/technologies/raman-imaging-and-spectroscopy/raman-spectroscopy/>
- [87] COLTHUP, Norman B., Lawrence H. DALY a Stephen E. WIBERLEY. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 2nd ed. New York: Academic Press, 1975. ISBN 978-0-12-182552-2.
- [88] ROMAN, Maciej, Jan Cz. DOBROWOLSKI, Malgorzata BARANSKA a Rafal BARANSKI. Spectroscopic Studies on Bioactive Polyacetylenes and Other Plant Components in Wild Carrot Root. *Journal of Natural Products* [online]. 2011, 74(8), 1757–1763 [vid. 2024-01-16]. ISSN 0163-3864, 1520-6025. Dostupné z: doi:10.1021/np200265d
- [89] ROMAN, Maciej, Rafal BARANSKI a Malgorzata BARANSKA. Nondestructive Raman Analysis of Polyacetylenes in Apiaceae Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, 59(14), 7647–7653 [vid. 2023-10-30]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf202366w
- [90] MAJORS, Ronald E., Michelangelo ANASTASSIADES a Steven J. LEHOTAY. The QuEChERS Revolution. *LCGC Europe*. 2010, 23(8), 418–429.
- [91] Cena elektřiny 2024 - srovnání E.ON, PRE, ČEZ. TZB-info [online]. [vid. 2024-05-07]. Dostupné z: <https://www.tzb-info.cz/ceny-paliv-a-energii/14-ceny-elektriny>
- [92] Falcarinol (CAS 21852-80-2) [online]. [vid. 2024-04-16]. Dostupné z: <https://www.caymanchem.com/product/22407>
- [93] Falcarinol supplier | CAS No :21852-80-2 | AOBIOUS [online]. [vid. 2024-04-16]. Dostupné z: <https://aobious.com/aobious/ultra-pure-pharmacological-standard/3830-falcarinol.html>
- [94] APPENDIX, F. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Official Method of Analysis. 2016.

## PŘÍLOHY



### Příloha 1: Porovnání účinnosti extrakce při použití acetonitrilu a dichlormethanu.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 1 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 10 min – 70 % B, 20 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.

### Příloha 2: Vliv různých způsobů extrakce na plochy píků při 205 nm

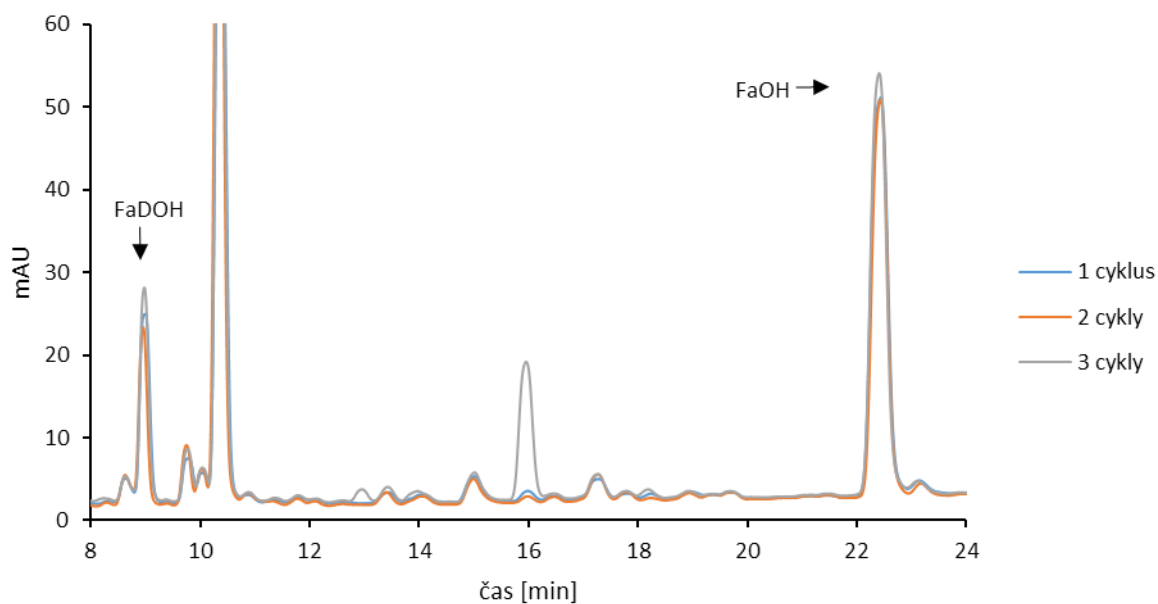
	Plocha FaDOH	Plocha FaOH
Míchání 30 min	94 924	122 469
Míchání 1 hod	93 628	167 506
Míchání 2 hod	90 878	140 901
Míchání 4 hod	90 125	148 201
Míchání 20 hod	93 514	166 392
Míchání 24 hod	67 799	159 182
Ultrazvuk 10 minut	66 538	97 390
Ultrazvuk 20 minut	75 601	114 266
Ultrazvuk 30 minut	83 747	154 645
Ultrazvuk 10 minut, míchání 30 minut	67 824	115 156
Míchání 30 minut, ultrazvuk 10 minut	77 037	112 720

### Příloha 3: Vliv různé navážky na plochy píků při 205 nm

Navážka	Plocha FaDOH	Plocha FaOH
0,1 g	90 878	140 901
0,2 g	143 294	300 926
0,5 g	375 848	698 474
1 g	808 962	1 442 608

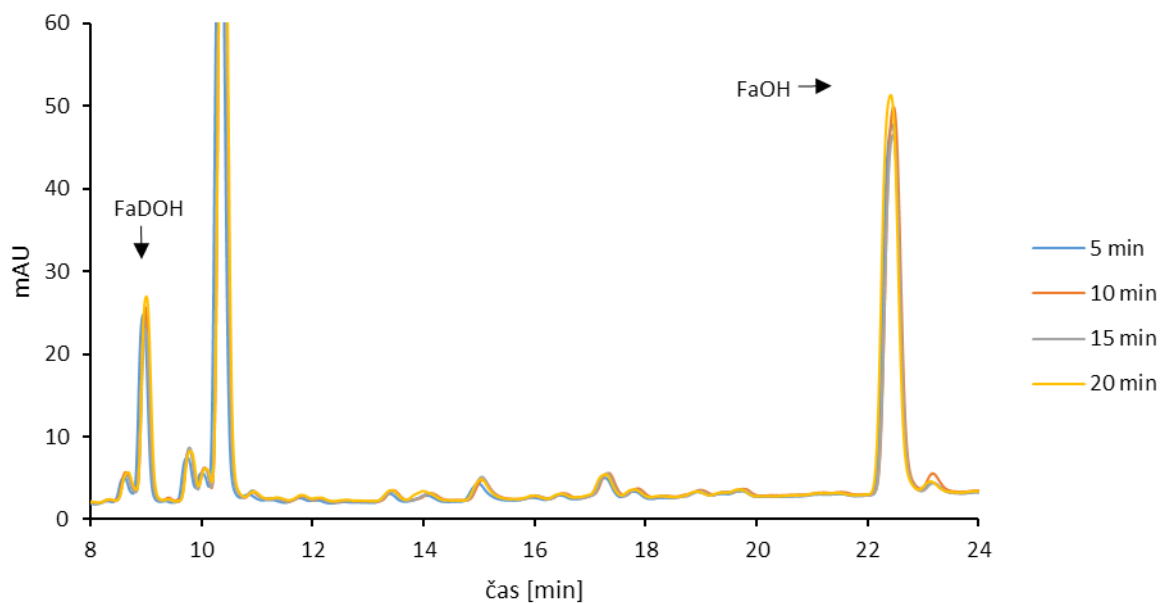
**Příloha 4: Optimalizace extrakce pomocí metody Plánování experimentů**

Poměr vzorek:rozpouštědlo (s:l)	Rozpouštědlo 20 ml	Extrakce	Extrakt č.	Plocha FaDOH	Plocha FaOH
1:200	ACN	ultrazvuk 10 minut	1	16 870	66 946
1:200	ACN	ultrazvuk 10 minut	10	12 211	54 398
1:200	ACN	ultrazvuk 10 minut	19	17 398	75 535
1:20	DCM	ultrazvuk 10 minut	2	203 301	728 980
1:20	DCM	ultrazvuk 10 minut	11	193 825	702161
1:20	DCM	ultrazvuk 10 minut	20	200 007	780 714
1:20	ACN	ultrazvuk 240 minut	3	169 413	675 638
1:20	ACN	ultrazvuk 240 minut	12	183 379	719 286
1:20	ACN	ultrazvuk 240 minut	21	174 134	679 776
1:200	DCM	ultrazvuk 240 minut	4	41 357	92 438
1:200	DCM	ultrazvuk 240 minut	13	20 342	82 647
1:200	DCM	ultrazvuk 240 minut	22	20 596	75 471
1:20	ACN	míchání 10 minut	5	173 778	651 906
1:20	ACN	míchání 10 minut	14	183 979	644 048
1:20	ACN	míchání 10 minut	23	172 445	627 307
1:200	DCM	míchání 10 minut	6	21 699	83 676
1:200	DCM	míchání 10 minut	15	13 315	53 177
1:200	DCM	míchání 10 minut	24	21 449	69 399
1:200	ACN	míchání 240 minut	7	17 335	67 903
1:200	ACN	míchání 240 minut	16	20 970	84 974
1:200	ACN	míchání 240 minut	25	18 254	67 054
1:20	DCM	míchání 240 minut	8	291 146	921 335
1:20	DCM	míchání 240 minut	17	256 229	894 522
1:20	DCM	míchání 240 minut	26	228 549	857 510
1:36,36	50/50 DCM+ACN	ultrazvuk 125 minut, míchání 125 minut	9	125 399	469 493
1:36,36	50/50 DCM+ACN	ultrazvuk 125 minut, míchání 125 minut	18	108 042	433 641
1:36,36	50/50 DCM+ACN	ultrazvuk 125 minut, míchání 125 minut	27	92 299	411 803



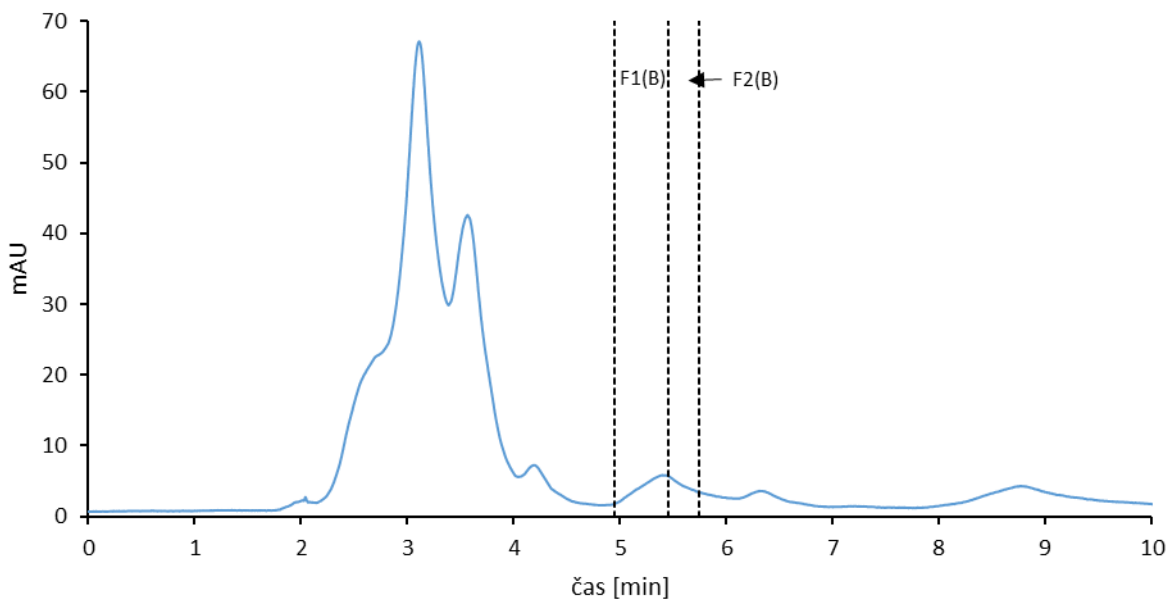
**Příloha 5:** Optimalizace počtu cyklů u ASE extrakce u vzorku petržele z Lidlu.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 30 min – 73 % B, 32 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



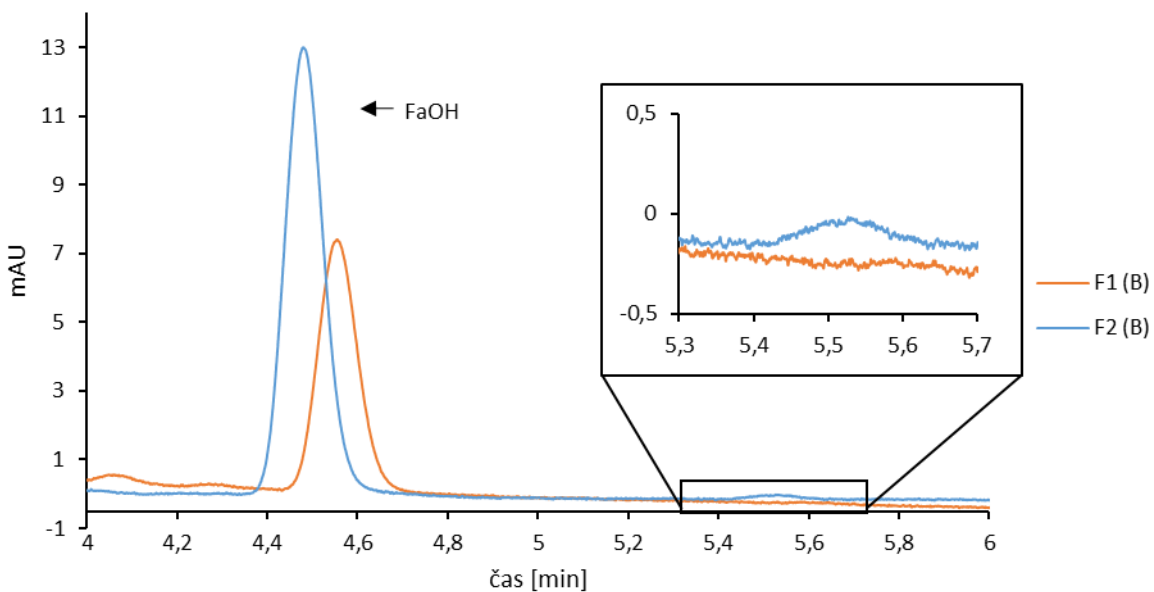
**Příloha 6:** Optimalizace délky cyklu ASE extrakce u vzorku petržele z Lidlu.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 30 min – 73 % B, 32 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



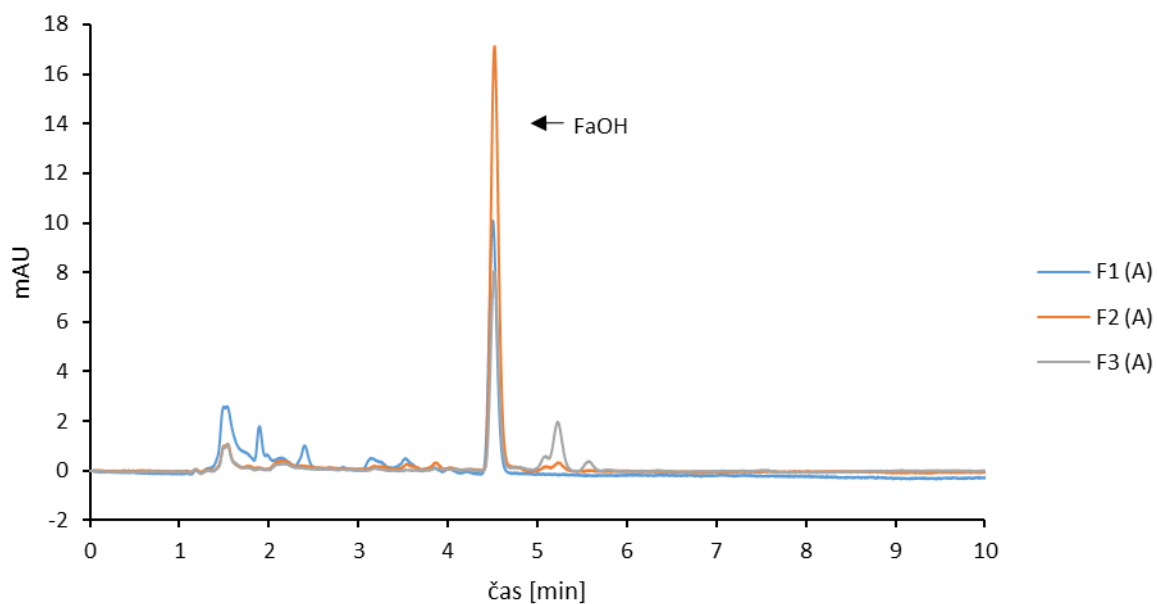
**Příloha 7:** Optimalizace doby jímání frakcí u preparativní chromatografie, experiment B.

Kolona Biospher 100 C18 (250×21,2 mm, 5 μm), dávkování 2 ml,  $F_{MF} = 20$  ml/min, mobilní fáze: 85% acetonitril, izokratická eluce, detekce  $\lambda = 205$  nm.



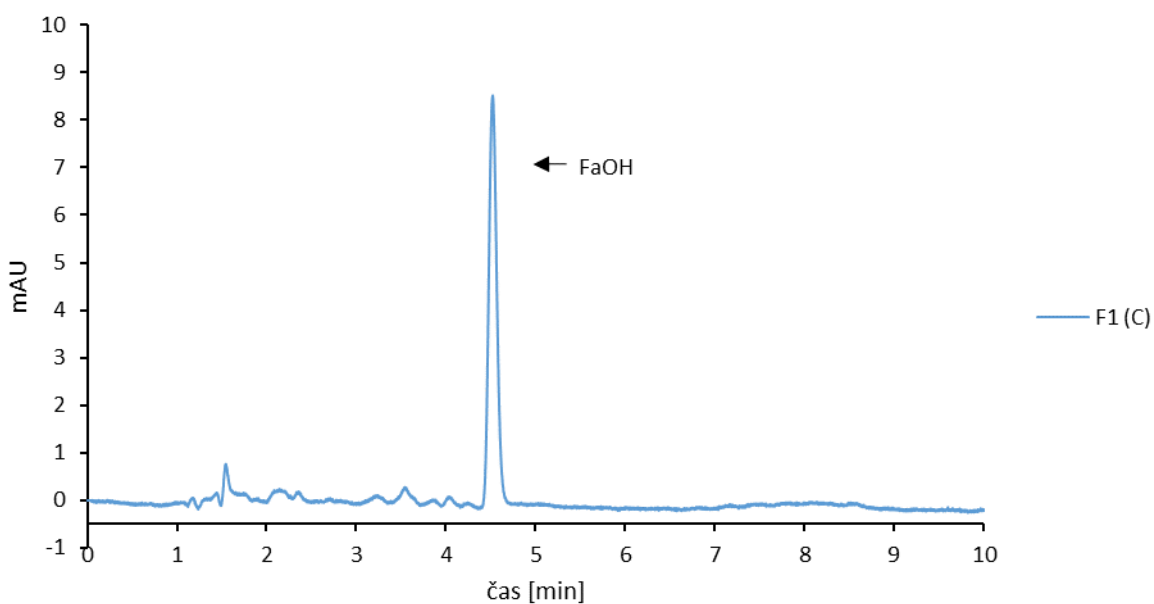
**Příloha 8:** Kontrola čistoty frakcí u experimentu B pomocí HPLC.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm),  $T = 30$  °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), izokratická eluce: 85 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



**Příloha 9:** Kontrola čistoty frakcí u experimentu A pomocí HPLC, celkový záznam.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), izokratiká eluce: 85 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



**Příloha 10:** Kontrola čistoty frakcí u experimentu C pomocí HPLC, celkový záznam.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), izokratiká eluce: 85 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.

**Příloha 11:** Vybrané gradientové profily použité při optimalizaci separace polyacetylenů na koloně Ascentis Express C18 u vzorku petržele

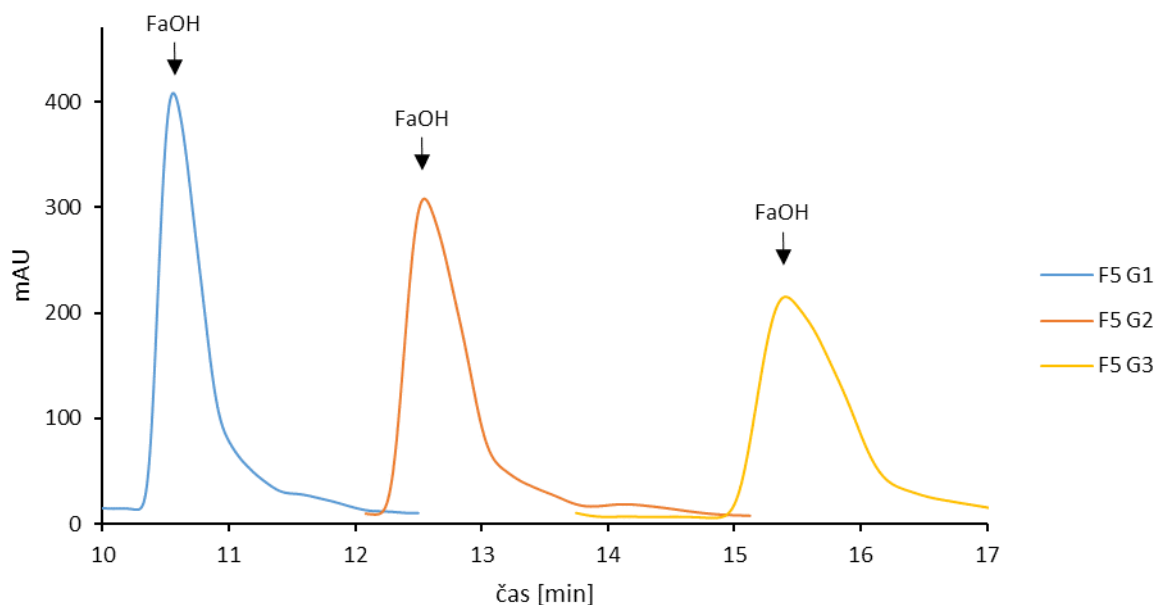
Gradient 1		Gradient 2		Gradient 3		Gradient 4		Gradient 5	
min	% B	min	% B	min	% B	min	% B	min	% B
0	40	0	40	0	50	0	50	0	50
10	80	15	80	5	65	10	70	5	65
20	85	35	100	15	70	20	100	20	75
22	90			20	75			25	100
32	95			30	80				
35	100			35	100				

**Příloha 12:** Vybrané gradientové profily použité při optimalizaci separace polyacetylenů na koloně Ascentis Express C18 u vzorku pastináku

Gradient 6		Gradient 7		Gradient 8		Gradient 9	
min	% B	min	% B	min	% B	min	% B
0	50	0	50	0	50	0	50
2	60	2	60	2	60	2	60
10	65	10	63	10	63	10	63
14	75	12	75	19	72	25	73
20	80	22	80	21	100	27	100
22	100	24	100	23	50		

**Příloha 13:** Vybrané gradientové profily použité při optimalizaci separace polyacetylenů na koloně Ascentis Express F5 (150×3 mm, 2,7 μm) u vzorku petržele

F5 Gradient 1		F5 Gradient 2		F5 Gradient 3	
min	% B	min	% B	min	% B
0	50	0	50	0	50
15	75	20	70	20	60
20	100	22	100	23	65
				25	100



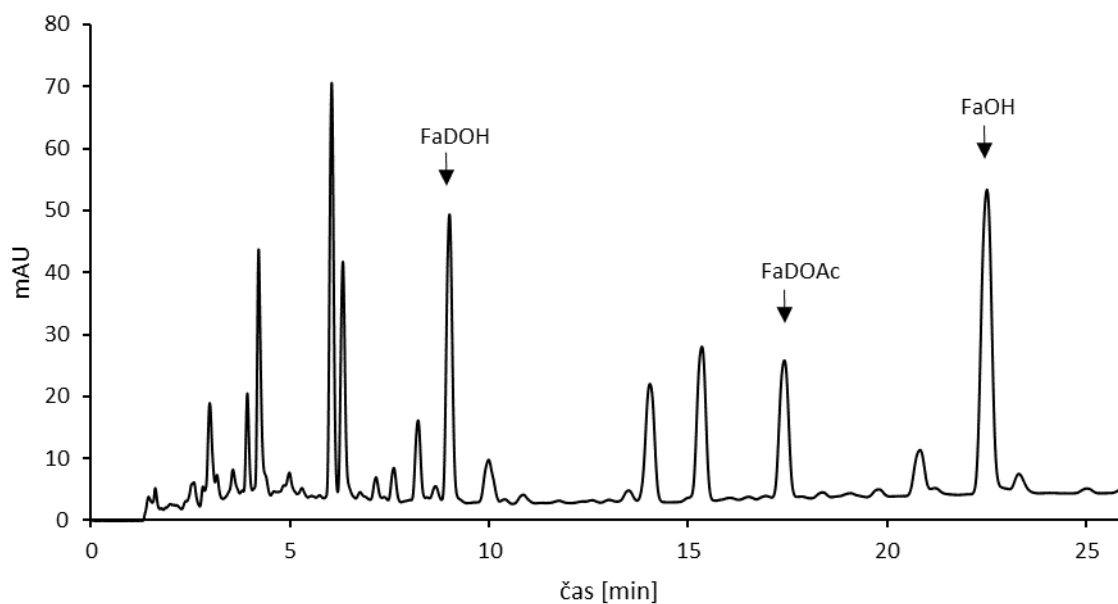
**Příloha 14:** Optimalizace separace polyacetylenů u vzorku petržele na F5 stacionární fázi.

Ascentis Express F5 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce (Příloha 13), detekce  $\lambda = 205$  nm.

**Příloha 15:** Vybrané gradientové profily použité při optimalizaci separace polyacetylenů na koloně Kinetex Biphenyl u vzorku pastináku

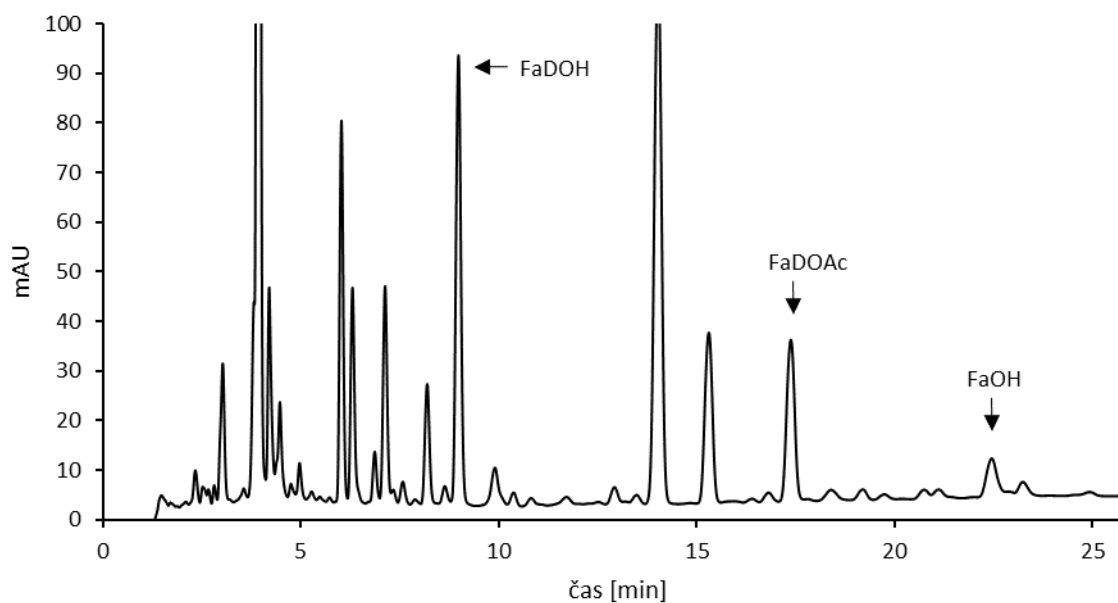
BF Gradient 1		BF Gradient 2		BF Gradient 3		BF Gradient 4		BF Gradient 5	
min	% B	min	% B	min	% B	min	% B	min	% B
0	40	0	50	0	50	0	50	0	50
5	50	15	70	10	60	5	50	3	50
20	80	20	100	12	60	10	60	10	55
22	100			20	70	20	65	12	55
				22	100	22	100	18	60
								20	100





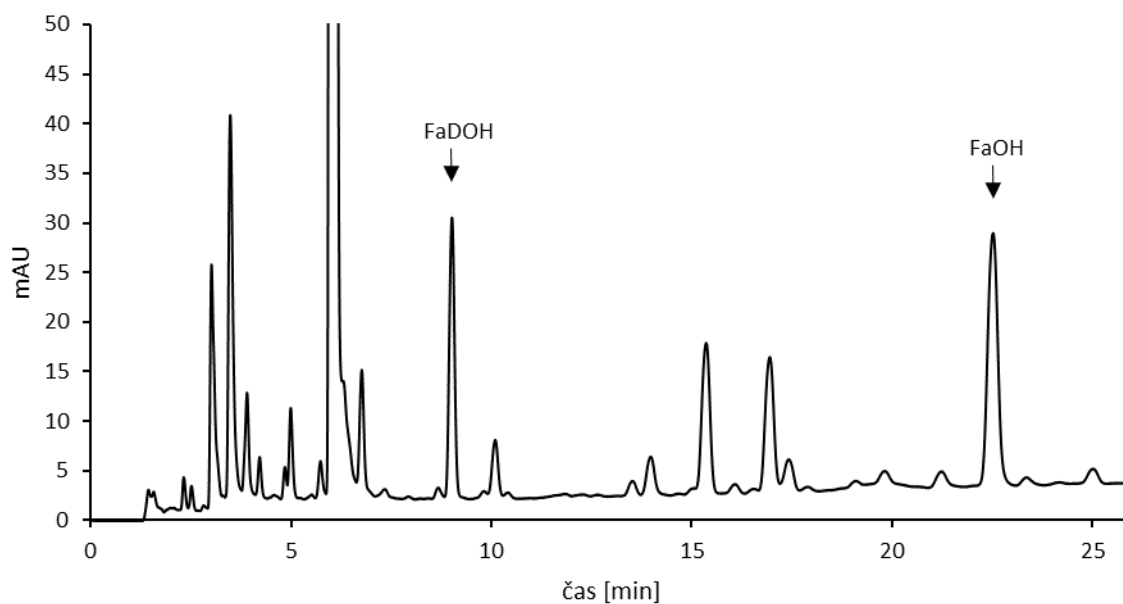
**Příloha 16:** HPLC analýza vzorku mrkve s natí.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 27 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



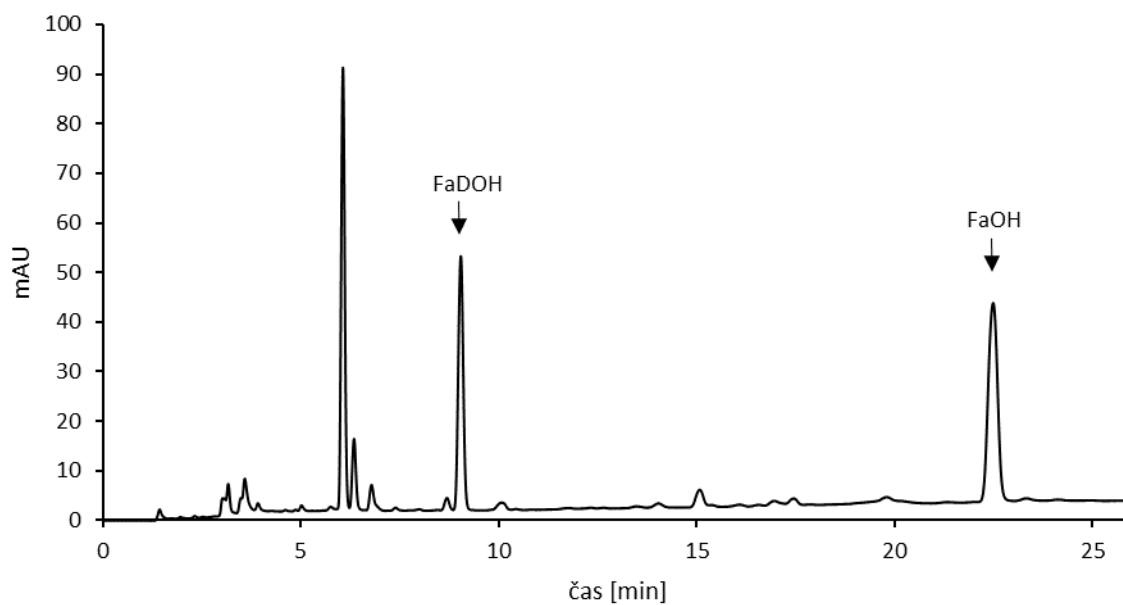
**Příloha 17:** HPLC analýza vzorku mrkve z Kauflandu.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 27 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



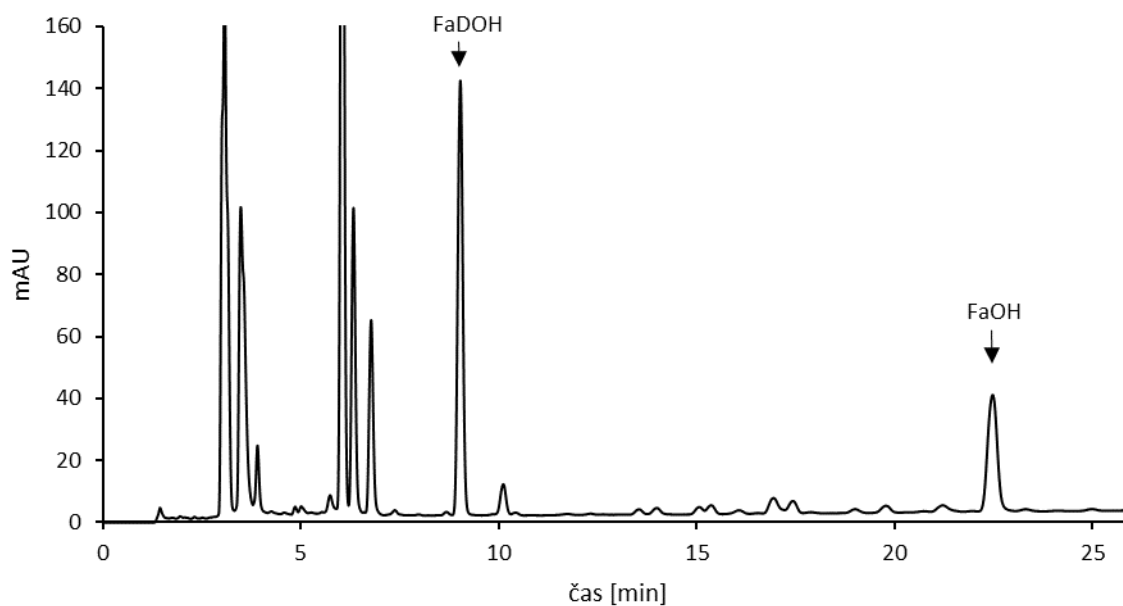
**Příloha 18:** HPLC analýza vzorku pastináku z Vysočiny.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 27 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



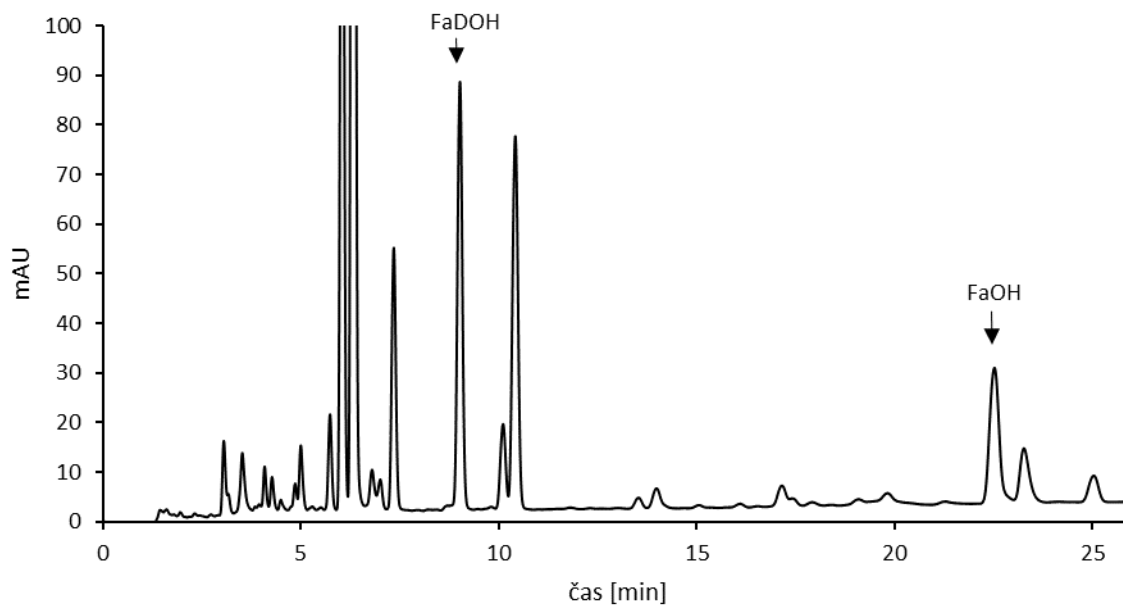
**Příloha 19:** HPLC analýza vzorku pastináku ze Slezska.

10× zředěno, kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 27 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



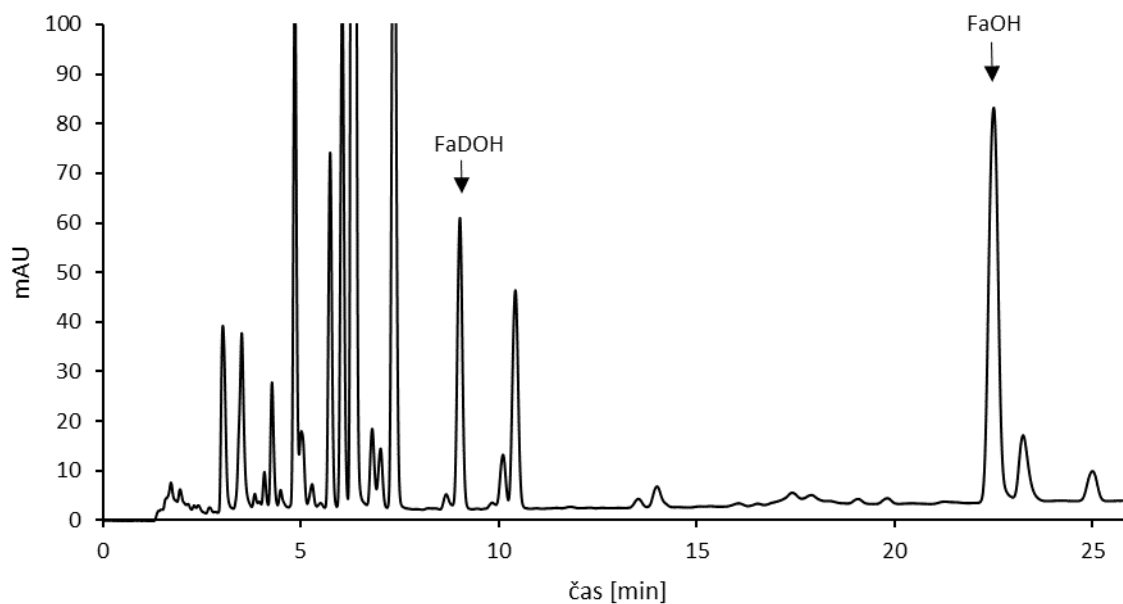
**Příloha 20:** HPLC analýza vzorku Bio pastináku.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 27 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



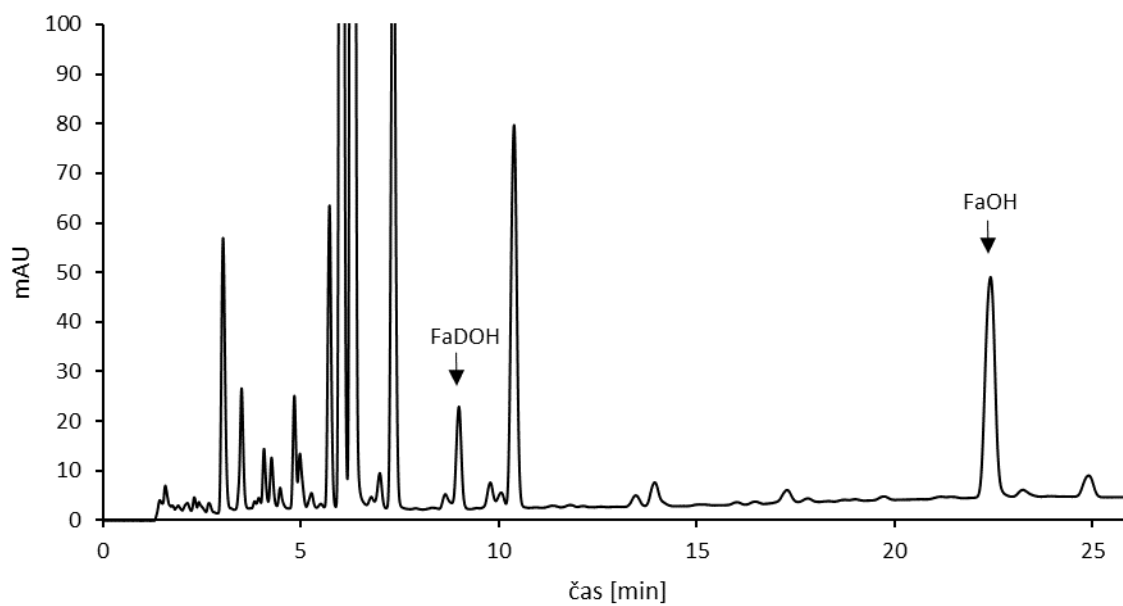
**Příloha 21:** HPLC analýza vzorku petržele s natí.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 27 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



**Příloha 22:** HPLC analýza vzorku petržele z Kauflandu.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 27 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.



**Příloha 23:** HPLC analýza vzorku petržele z Lidl.

Kolona Ascentis Express C18 (150×3 mm, 2,7 μm), T = 30 °C, dávkování 2 μl,  $F_{MF} = 0,4$  ml/min, mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B), gradientová eluce: 0 min – 50 % B, 2 min – 60 % B, 10 min – 63 % B, 25 min – 73 % B, 27 min – 100 % B, detekce  $\lambda = 205$  nm.