

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Stanovení derivátů kyseliny salicylové
v rostlinných materiálech pomocí
kapalinové chromatografie**

Bakalářská práce

ZUZANA HAUKVICOVÁ

Vedoucí práce: Mgr. Miroslava Bittová, Ph.D.

Ústav chemie

Program Chemie

Brno 2022

Bibliografický záznam

Autor: Zuzana Haukvicová
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita
Ústav chemie

Název práce: Stanovení derivátů kyseliny salicylové v rostlinných materiálech pomocí kapalinové chromatografie

Studijní program: Chemie

Vedoucí práce: Mgr. Miroslava Bittová, Ph.D.

Rok: 2022

Počet stran: 52 + 9

Klíčová slova: RP-HPLC, kyselina salicylová, salicin, SAG, saligenin, helicin, kyselina gentisová, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, salicylaldehyd, kyselina benzoová, extrakce, rostlinné materiály

Bibliographic record

Author: Zuzana Haukvicová
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Chemistry

Title of Thesis: Determination of salicylic acid derivatives in plant materials by means of liquid chromatography

Degree Programme: Chemistry

Supervisor: Mgr. Miroslava Bittová, Ph.D.

Year: 2022

Number of Pages: 52 + 9

Keywords: RP-HLPC, salicylic acid, salicin, SAG, saligenin, helicin, gentisic acid, 2,3-dihydroxybenzoic acid, salicylaldehyde, benzoic acid, extraction, plant materials

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení derivátů a metabolitů kyseliny salicylové v rostlinných materiálech pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Cílem práce je vybrat vhodné podmínky ke stanovení vybraných analytů z metabolického cyklu kyseliny salicylové a dále srovnání extrakčních postupů těchto látek z přírodních materiálů. Jako modelové vzorky zde byly zvoleny extrakty z kůry vrby bílé (*Salix alba*) a listů z křížence severoamerických topolů (*Populus x canadensis Moench, klon „Gigant“*).

Teoretická část práce popisuje princip chromatografických metod, charakteristiky vysokoúčinné kapalinové chromatografie a její využití ve vědě. Dále se práce zabývá popisem studovaných analytů, jejich biosyntézou v rostlinách a hlavními funkcemi v rostlinných organismech. Experimentální část práce se věnuje validaci metody a porovnání extrakčních postupů.

Abstract

This bachelor thesis is focused on the determination of salicylic acid derivatives and metabolites in plant materials using high performance liquid chromatography. The aim of this work is to select suitable conditions for the determination of salicylic acid derivatives and to compare the extraction procedures of these substances from natural materials. Extracts from white willow bark (*Salix alba*) and poplar leaves (*Populus x canadensis Moench*) were selected as samples.

The theoretical part describes the principle of chromatographic methods, characteristics of high-performance liquid chromatography and its application in science. Another part is focused on the description of the studied analytes, their biosynthesis in plants and the main functions in plant organisms. The experimental part of the work dedicates to method validation and compares extraction procedures.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2021/2022

Ústav:	Ústav chemie
Studentka:	Zuzana Haukvicová
Program:	Chemie
Specializace:	Chemie

Ředitel ústavu PŘF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s názvem:

Název práce:	Stanovení derivátů kyseliny salicylové v rostlinných materiálech pomocí kapalinové chromatografie
Název práce anglicky:	Determination of salicylic acid derivatives in plant materials by means of liquid chromatography
Jazyk závěrečné práce:	čeština

Oficiální zadání:

Vypracování literární rešerše, zaměřené na stanovení kyseliny salicylové a jejích derivátů pomocí kapalinové chromatografie a srovnání extrakčních postupů těchto látek z přírodních materiálů. Seznámení se s technikou kapalinové chromatografie, s jejími principy a instrumentací a provedení analýzy vybrané skupiny derivátů kyseliny salicylové.

Vedoucí práce: Mgr. Miroslava Bittová, Ph.D.

Datum zadání práce: 24. 2. 2022

V Brně dne: 25. 5. 2022

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Zuzana Haukvicová, 14. 4. 2022

Mgr. Miroslava Bittová, Ph.D., 25. 5. 2022

doc. Mgr. Marek Nečas, Ph.D., 25. 5. 2022

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně 27. května 2022

.....
Zuzana Haukvicová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Miroslavě Bittové, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady, připomínky a čas, který mi věnovala při tvorbě této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Lucii Šimoníkové za vstřícný a ochotný přístup při získávání experimentálních dat a umožnění využití prostoru laboratoře.

Obsah

Úvod	11
Teoretická část	12
2.1 Chromatografická separace	12
2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC.....	12
2.2.1 Instrumentace HPLC.....	13
2.2.2 Retenční charakteristiky v HPLC	14
2.2.3 Gradientová eluce	14
2.2.4 Retenční mechanismy	15
2.3 Kyselina salicylová	16
2.3.1 Biosyntéza kyseliny salicylové v rostlinách	16
2.3.2 Odolnost rostlin vůči nemocem	18
2.4 Deriváty a metabolity kyseliny salicylové	19
2.4.1 Kyselina gentisová a 2,3-dihydroxybenzoová	19
2.4.2 Glykosylované formy kyseliny salicylové.....	19
2.4.3 Salicin, helicin, salicylaldehyd a saligenin	20
2.4.4 Kyselina acetylsalicylová	21
2.5 Validace metody v HPLC	22
2.6 Předúpravy rostlinného materiálu pro HPLC	25
2.6.1 Extrakce pomocí mikrovln (MAE)	26
2.6.2 Extrakce pomocí ultrazvuku (UAE)	27
Experimentální část	28
3.1 Vybavení	28
3.1.1 Přístroje.....	28
3.1.2 Chemikálie	29
3.2 Cíl práce	30
Výsledky a diskuse	31
4.1 Příprava mobilní fáze	31
4.2 Příprava roztoků standardů.....	31
4.3 Podmínky separace v RP-HPLC	33
4.4 Výběr vlnové délky detektoru	33

4.5	Gradientová eluce.....	34
4.6	Vyhodnocení chování analytů v RP-HPLC	35
4.6.1	Retenční charakteristiky analytů.....	35
4.7	Validace metody.....	36
4.7.1	Opakovatelnost analýzy	36
4.7.2	Linearita	38
4.7.3	Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ).....	38
4.8	Měření reálných vzorků	39
4.8.1	Příprava vzorků.....	39
4.8.2	Výsledky extrakce pomocí mikrovln (MAE)	39
4.8.3	Výsledky extrakce pomocí ultrazvuku (UAE).....	43
	Závěr	46
	Seznam použitých zkratk	47
	Seznam použité literatury	49
	Přílohy	53

Úvod

Kyselina salicylová (FSA) patří do rozmanité skupiny rostlinných fenolických látek, které mají aromatický kruh nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin, popřípadě jejich funkční deriváty. FSA je klíčový rostlinný hormon, který přispívá k mnoha různým aspektům růstu rostlin, termogenezi a vývoji, stejně tak k regulaci reakce na biotický a abiotický stres.

Tato důležitá signální sloučenina je syntetizována v rostlinách jako odpověď při napadení patogenem nebo v reakci na stres. K její syntéze v rostlinném organismu jsou používány dvě hlavní cesty, isochorismátová (IC) a dráha využívající fenylalanin amonium-lyázu (PAL). Obě syntetické cesty vyžadují velké množství kyseliny chorismové, která je konečným metabolickým produktem šikimátové dráhy. Šikimátová dráha slouží k syntéze aromatických látek u rostlin, bakterií a hub, zároveň se jedná o hlavní metabolickou cestu ve zmíněných organismech.

V této práci jsme se zaměřili na optimalizaci metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) pro separaci derivátů a metabolitů kyseliny salicylové. Mezi studované látky byl zařazen: salicin (Sal), kyselina 2,3-dihydroxybenzoová (2,3-DHBA), kyselina gentisová (Gen), 2-O- β -D-glukosid kyseliny salicylové (SAG), helicin (Hel), kyselina benzoová (BA), kyselina salicylová (FSA), salicylaldehyd (Sald) a saligenin (HBA). Pro experimenty, které by vyžadovaly použití vnitřního standardu v přírodních vzorcích, byla ke studovaným přírodním látkám přidána kyselina acetylsalicylová (aSA), která je syntetickým derivátem a v přírodě se nevyskytuje.

Teoretická část

2.1 Chromatografická separace

Chromatografie se řadí mezi separační metody, při kterých dochází k oddělení, tedy separaci, složek ve vzorku. Látky ve směsi jsou separovány na základě rozdílné distribuce mezi dvě různé nemísitelné nebo omezeně mísitelné fáze – nepohyblivá (stacionární) a pohyblivá (mobilní). Vzorek je unášen soustavou pomocí pohybu mobilní fáze přes stacionární fázi, na které mohou být složky vzorku zachycovány. Čím silněji jsou složky ke stacionární fázi poutány, tím více se zdržují. Dochází tak k postupné separaci, kdy méně zadržované složky se dostávají na konec separačního systému (například kolony) se stacionární fází dříve^{1,2}.

Poté co je látka vpravena do chromatografického systému, dochází k rychlému rozdělení mezi obě fáze v důsledku potřeby dosažení distribuční rovnováhy. Tato rovnováha je ovšem narušována průběžným tokem mobilní fáze, ve které je látka unášena. V přední části zóny je koncentrace látky v mobilní fázi větší, než rovnovážná a dochází tak k sorpci, tedy přestupu látky z mobilní fáze do stacionární. Kdežto v zadní části zóny je situace opačná a dochází zde k desorpci³.

2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) je separační technika, kdy se rozpuštěná látka pohybuje přes kolonu v níž je stacionární fáze. Látka je na koloně unášena pomocí mobilní fáze. Stacionární fáze je tvořena pevnou nebo kapalnou látkou a je ukotvena na pevném nosiči, zatímco mobilní fáze, jak název napovídá, je vždy kapalná^{2,4}.

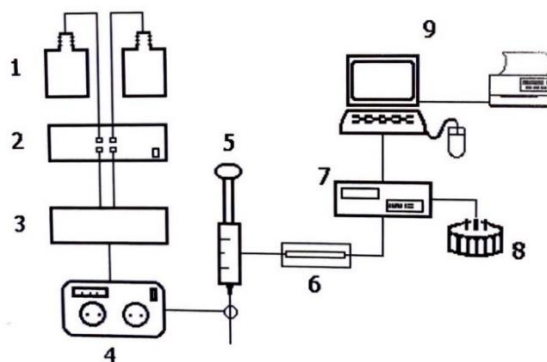
Vysoká účinnost a rychlost je u této metody dosažena použitím kolony, která je naplněna velmi jemnými částicemi, zpravidla o velikosti 3 až 15 μm . Také je zde důležité zajistit rychlý průtok mobilní fáze, toto vyžaduje použití vysokotlakého čerpadla a celkově konstrukce schopné odolávat vysokým tlakům (30 až 60 MPa)⁵.

2.2.1 Instrumentace HPLC

HPLC je nejčastějším uspořádáním kapalinové chromatografie. Kapalinový chromatograf se skládá z pěti hlavních komponentů: systém dodávající mobilní fázi, dávkovač vzorku, kolona, detekční systém, software pro zpracování dat. Můžeme se setkat s řadou obměn, kdy některé komponenty lze vyřadit nebo naopak přidat. Mobilní fáze je buď samostatné rozpouštědlo nebo směs dvou až čtyř rozpouštědel vedených ze zásobníku při tlacích až 35 MPa s konstantním a reprodukovatelným průtokem 0,01 až 5 ml.min⁻¹. Schéma kapalinového chromatografu je vyobrazeno na Obr. 1.

Systém dodávky mobilní fáze obsahuje vysokotlaké čerpadlo (4), díky kterému je mobilní fáze vedena ze zásobníků (1). Následně dojde k odstranění rozpustných plynů z kapaliny pomocí odplyňovače (2). Proudění jsou míseny dle nastaveného programu ve směšovači (3), všechny tyto části jsou zařazeny před čerpadlem. Mobilní fáze je díky vysokému tlaku vedena přes dávkovač vzorku (5). Kapalným vzorkem je přímo dávkován na chromatografickou kolonu (6), která je spojena s detektorem (7). V případě potřeby může být za detektor zařazen sběrač jednotlivých frakcí (8). Signál může být z detektoru veden do datové stanice (9) nebo je registrován zapisovačem a vyhodnocován integrátorem, ten se dnes již nepoužívá^{2,4,5}.

Dále je tento signál pomocí datové stanice převeden do podoby záznamu chromatografické separace neboli chromatogramu, ten je charakteristický elučními křivkami (píky) gaussovského tvaru. Jedná se o závislost odezvy detektoru, ta je zpravidla funkcí koncentrace eluované složky v mobilní fázi, na čase^{2,5}.



Obr. 1: Blokové schéma kapalinového chromatografu²

2.2.2 Retenční charakteristiky v HPLC

Jak již bylo zmíněno, chování látek v kapalinové chromatografii je založeno na rozdílné distribuci složek vzorku mezi mobilní fází (eluent) a stacionární fází (sorbet). Každá molekula dané složky vzorku při průchodu kolonou přechází z proudu eluentu na sorbet a zpět hned několikrát. V závislosti na době, po kterou je složka na povrchu sorbetu zadržována, je dána velikost její interakce se stacionární fází. Čím větší je tato interakce, tím později vychází složka z kolony a má vyšší retenční čas. Obecně retenční charakteristiky vyjadřují zadržení složky v koloně pomocí časů nebo objemů ^{1,5}.

Retenční čas t_R je jednou ze základních kvalitativních charakteristik pro dělenou látku. Jedná se o dobu, která uplyne od nástřiku vzorku na kolonu po dosažení maxima elučního píku sledované látky, tuto hodnotu můžeme odečíst z chromatogramu. Retenční čas složky, která není v koloně zadržována, tedy pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze, se nazývá mrtvý retenční čas t_M popřípadě t_0 . Takovou látku označujeme jako tzv. inertní látka ^{2,5}.

Další důležitou veličinou je retenční objem V_R , jehož definice souvisí s retenčním časem. Jedná se o objem mobilní fáze, který proteče kolonou za tuto dobu. Mrtvý retenční objem V_M (V_0) je obdobně jako u t_M (t_0) retenční objem látky nezadržované na koloně. Z předchozích definic vyplývá, že separované látky ve vzorku stráví na mobilní fází stejný čas a odlišují se pouze dobou strávenou ve stacionární fází ².

2.2.3 Gradientová eluce

Princip gradientové eluce spočívá v použití mobilní fáze, jejíž složení se s časem mění. Této změny je dosaženo mísením několika složek v určitém poměru, který je předem časově nastavený. K nastavení gradientu se u většinu přístrojů používá řídicí počítač s programem umožňujícím volbu gradientu.

Složky mobilní fáze mohou být míseny za atmosférického tlaku ještě před vstupem do vysokotlakého čerpadla ve směšovací komoře, popřípadě může být každá složka dávkována samostatně vlastním čerpadlem. Gradientová eluce se používá při dělení takové směsi, jejíž složky se liší retencí při eluci s konstantním složením mobilní fáze. Změna složení mobilní fáze tak probíhá ve prospěch složky s větší eluční silou a dojde ke zkrácení retenčního času ^{2,5}.

2.2.4 Retenční mechanismy

V kapalinové chromatografii rozlišujeme dva retenční mechanismy v závislosti na polaritě stacionární a mobilní fáze. V systému s normálními fázemi (NP-LC) je pro separaci látek užívána polární stacionární fáze, zatímco mobilní fáze má polaritu vždy o něco nižší. Při chromatografii na reverzních fázích (RP-LC) je stacionární fáze nepolárního charakteru a mobilní fáze je naopak polární ².

Kolona je při kapalinové chromatografii na reverzních fázích plněna hydrofobními částicemi. Nejčastěji se jedná o stacionární fáze chemicky vázané na nosiči. Příkladem je fáze typu alkyl – oxid křemičitý, zejména C8 (oktyl silan) nebo C18 (oktadecyl silan). Modifikace tohoto typu se nejčastěji provádí navázáním funkčních skupin na vazbu -O-Si-R. Odvozujeme tak další stacionární fáze, kdy navázaný zbytek (-R) může být například fenyl, alkylfenyl, diol nebo aminoskupina. Komerčně dostupné kolony od různých výrobců se mohou lišit čistotou v závislosti na technologii jejich přípravy, tím mohou poskytovat rozdíl v retenci, účinnosti a tvaru píku. Z tohoto důvodu závisí výběr kolony se stacionární fází na typu a povaze studovaných analytů.

V případě mobilní fáze se obvykle jedná o směs jednoho nebo více organických rozpouštědel a vody jako například zředěné roztoky kyselin či bází nebo pufrů. Obecně při RP-LC platí pravidlo, že retence látky se zvyšuje s více hydrofobními stacionárními fázemi a se snižující se koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi. Polární látky jsou tak méně zadržovány než ty nepolární ^{6,7}.

Zavedením systému na reverzních fázích na počátku 70. let 20. století se výrazně zvýšila aplikace vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V současnosti se odhaduje, že přibližně 65 % HPLC separací pro analytické účely je prováděno právě pomocí tohoto mechanismu. Mezi důvody, proč tomu tak je patří její jednoduchost a všestrannost. Reverzní systémy jsou schopny pracovat s velkým počtem různých organických sloučenin. Také umožňují nástřik vodného roztoku na kolonu, čímž usnadňují použití HPLC ve vědách o živé přírodě ⁷.

2.3 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (FSA) neboli *ortho*-hydroxybenzoová kyselina se řadí do rozmanité skupiny rostlinných fenolických látek. Jedná se o fenolické sloučeniny syntetizované rostlinami, které ve své struktuře mají aromatický kruh nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin, popřípadě jejich funkční derivát. Zároveň jde o rostlinný obranný hormon hrající důležitou roli v aktivaci a regulaci imunitní odpovědi rostlinného organismu. Dále se podílí na rostlinné termoregulaci, růstu a vývoji^{8,9,10}.

Volná kyselina salicylová se vyskytuje ve formě krystalického prášku s teplotou tání 157 – 159 °C. Je středně rozpustná ve vodě a velmi dobře rozpustná v polárních organických rozpouštědlech. Nasycený vodný roztok kyseliny salicylové má hodnotu pH 2,4. Kyselina salicylová fluoreskuje při vlnové délce 412 nm, přitom její excitační vlnová délka je při 301 nm. Této vlastnosti se využívá při její detekci v řadě rostlinných systémů¹⁰.

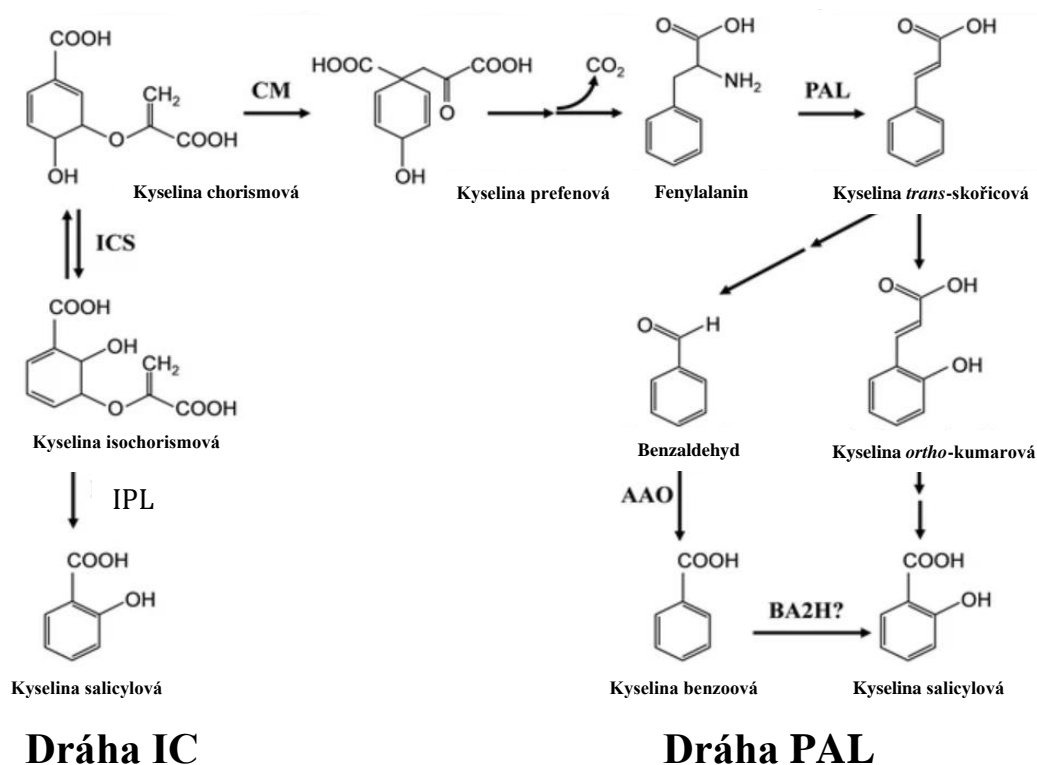
2.3.1 Biosyntéza kyseliny salicylové v rostlinách

Kyselina salicylová je v rostlinách syntetizována dvěma hlavními cestami. Isochorismátová cesta (IC), která je lokalizovaná v plastidech a dráha využívající fenylyalanin amonium-lyázu (PAL) probíhající v cytosolu. Obě metabolické dráhy se skládají z více kroků, nicméně každá z nich začíná shromážděním kyseliny chorismové, která vzniká v rámci šikimátové metabolické dráhy. Samotná kyselina salicylová slouží jako výchozí látka k tvorbě dalších fenolických sloučenin^{8,10,11}. Průběhy obou biosyntetických drah jsou zachyceny na Obr. 2.

V dráze IC je kyselina chorismová přeměněna na kyselinu isochorismovou pomocí isochorismát syntázy (ICS). Poté prostřednictvím aktivity isochorismoyl-glutamát syntázy (IGS) přechází na isochorismoyl-9-glutamát, ten se spontánně rozkládá na kyselinu salicylovou. FSA je produkována v plastidech a následně exportována do cytosolu. Syntéza kyseliny salicylové touto cestou byla poprvé objevena u bakterií. Na rozdíl od rostlin je u prokaryot kyselina isochorismová přímo přeměněna na kyselinu salicylovou pomocí pyruvát-isochorismát-lyázy (IPL)^{8,11,12}.

Kyselina salicylová může být v rostlinných organismech syntetizována také z fenylalaninu. Ten vzniká z kyseliny chorismové pomocí enzymu chorismátmutáza (CM) a následnou redukcí v rámci dráhy PAL. Tato dráha je známa mnohem déle než dráha IC. Fenylalanin je pomocí fenylalanin ammonium-lyázy (PAL) převeden na amoniak a kyselinu *trans*-skořicovou. Zde se dráha rozděluje, kyselina *trans*-skořicová buď podléhá hydroxylaci za vzniku kyseliny *ortho*-kumarové, anebo může dekarboxylovat za vzniku kyseliny benzoové. Obě se dále převádějí přímo na kyselinu salicylovou. Cesta PAL je u rostlin nepostradatelná, protože její meziproducty a produkty jsou nutné pro biosyntézu mnoha dalších sekundárních metabolitů, jako je například lignin^{9, 10, 11, 13, 14}.

Význam obou drah pro biosyntézu kyseliny salicylové se může u různých druhů rostlin lišit. U rostlin rodu *Arabidopsis*, které slouží jako modelové organismy v molekulární genetice rostlin, je důležitější dráha IC. Naopak dráha PAL se zdá být více užitečná pro akumulaci kyseliny salicylové například v rýži. V některých případech přispívají obě cesty stejným dílem, jako je tomu u sójových bobů^{9, 13}.



Obr. 2: Biosyntetické cesty vzniku kyseliny salicylové¹⁴ (upraveno)

2.3.2 Odolnost rostlin vůči nemocem

Na rozdíl od zvířat nemají rostliny specializované imunitní buňky a imunologickou paměť. Rostliny si však vypěstovaly schopnost identifikovat patogeny a tím zvýšit svoji imunitní odpověď. Jako signální molekula v imunitní odpovědi funguje právě kyselina salicylová¹⁵.

Kyselina salicylová je nezbytná jak pro lokální obranu, tak pro získanou rezistenci, což je forma dlouhodobé imunity vůči širokému spektru patogenů. Když jsou rostliny napadeny patogeny, tak dojde ke zvýšení biosyntézy tohoto hormonu prostřednictvím enzymu isochorismát syntasy 1 (ICS1). Patogenem vyvolaná syntéza kyseliny salicylové probíhá hlavně v chloroplastech. V souvislosti se zvýšením hladiny obranného hormonu je exprese ICS1 indukována lokálně i systémově. Kyselina salicylová tak může v rostlině vyvolat imunitní odpověď^{11, 15, 16}.

Získanou rezistenci můžeme rozdělit na lokální (LAR – Local Acquired Resistance) a systémovou (SAR - Systemic Acquired Resistance). Některé rostliny odolné vůči nemocem omezují šíření patogenů pouze na malou oblast kolem bodu počátečního průniku, kde se nekrotická léze mrtvých buněk objeví. Tato lokalizovaná smrt ochranných buněk v místě infekce se nazývá hypersenzitivní reakce (HR) a je projevem lokálně získané rezistence (LAR). Další typ obrany rostlin funguje tak, že při infekci patogeny se kyselina salicylová akumuluje jak v infikovaných listech, tak i v těch neinfikovaných, ve kterých se díky tomu vyvíjí systémově získaná rezistence (SAR). Takto získaná rezistence se objevuje po několika dnech od expozice a může přetrvávat i několik týdnů.^{10, 11, 15, 16}

Se zvýšenou akumulací kyseliny salicylové a následným rozvojem SAR souvisí také exprese PR (pathogenesis-related) proteinů. Tyto rostlinné proteiny se po napadení rostliny patogenem šíří do neinokulovaných částí rostlinného organismu, které vykazují systémově získanou rezistenci. I přesto, že jsou PR proteiny zapojeny do rostlinné obrany, tak nebyl zatím prokázán jejich antipatogenní účinek, ale pouze jejich zvýšená akumulace v infikovaných rostlinách. Nyní je oficiálně uznáno jedenáct rodin nízkomolekulárních kyselých PR proteinů^{10, 17}.

2.4 Deriváty a metabolity kyseliny salicylové

2.4.1 Kyselina gentisová a 2,3-dihydroxybenzoová

Kyselina gentisová (Gen), také známá jako 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, je spolu s 2,3-dihydroxybenzoovou kyselinou (2,3-DHBA) dihydroxy derivát kyseliny benzoové. Obě tyto látky vznikají metabolickými procesy v rostlinách z kyseliny salicylové. Při napadení rostliny patogenem je 2,3-DHBA akumulována stejně jako kyselina salicylová. K akumulaci kyseliny gentisové dochází také, ale v podstatně menší míře. Kyselinu gentisovou můžeme nalézt v rostlinách, například v hořci (*Gentiana sp.*), také hojně v ovoci jako je avokádo, kiwi, jablka a mnoho dalších. Kromě rostlin produkují gentisovou kyselinu také houby (např. *Penicillium patulum*)^{14, 18}.

Kyselina gentisová se vyskytuje v rostlinných materiálech v malých koncentracích. V lidském těle je jedním z metabolitů, který vzniká odbouráváním aspirinu (kyselina acetylsalicylová, aSA), což je nesteroidní protizánětlivý lék. Po podání kyseliny acetylsalicylové dochází kyselou hydrolyzou v žaludku a horní části střeva k tvorbě kyseliny salicylové. Následně kyselina salicylová podléhá dalšímu metabolismu v játrech, kdy mimo další látky, vzniká i kyselina gentisová a 2,3-dihydroxybenzoová kyselina. Nakonec je převážné množství kyseliny gentisové vylučováno močí¹⁸.

2.4.2 Glykosylované formy kyseliny salicylové

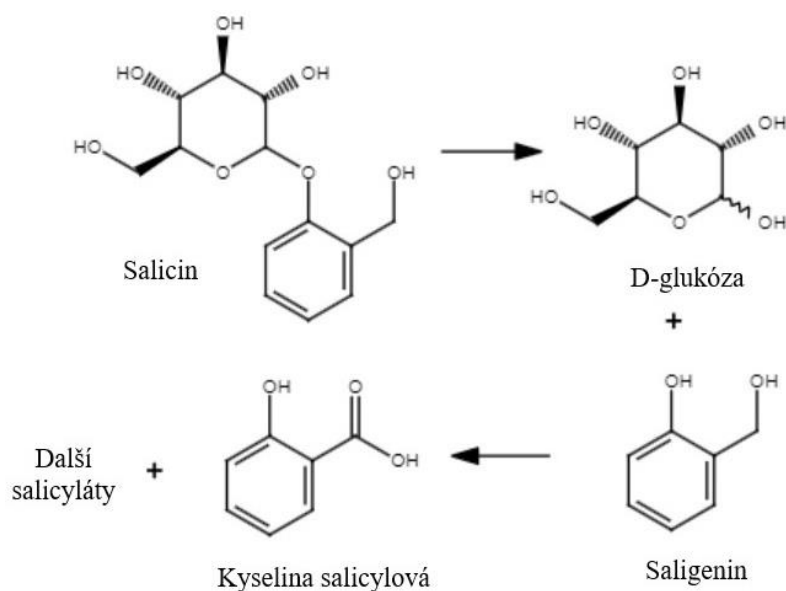
Hormony se vyskytují v rostlinách v glykosylované formě jako jejich inaktivní zásoba a ani kyselina salicylová zde není výjimkou. Glykosylací kyseliny salicylové na hydroxylové skupině vzniká její 2-O- β -D-glukosid (SAG), zatímco při glykosylaci na karboxylové skupině je produktem glukosylester kyseliny salicylové (SGE). Vzniklý SAG je následně transportován do vakuoly, kde je uložen a v případě potřeby je schopný hydrolyzovat za vzniku volné kyseliny salicylové. Předpokládá se, že tato forma pomáhá regulovat hladinu aktivní kyseliny salicylové v cytoplazmě a chrání tak rostlinu před jejími zvýšenými hladinami. U většiny rostlin je SAG hlavním metabolitem přeměny kyseliny salicylové, jelikož glykosidy jsou stabilní skladovací formou malých fenolických látek. Přesná funkce SGE

v rostlinách dosud není známá a na rozdíl od SAG není po vzniku transportován do vakuoly. Estery glukózy jsou považovány za vysokoenergetické sloučeniny a biosyntetické meziprodukty^{14, 19}.

2.4.3 Salicin, helicin, salicylaldehyd a saligenin

Salicin (Sal) neboli β -D-glukopyranosyl-saligenin je nejjednodušší fenolický glykosid a vyskytuje se nejhojněji v kůře a listech různých druhů vrb (*Salix sp.*) a topolů (*Populus sp.*). Z historického hlediska se jedná o důležitý derivát kyseliny salicylové, jelikož jeho objev vedl k vývoji aspirinu²⁰.

Salicin je nejvíce reaktivní při pokojové teplotě, je citlivý na světlo a může být hydrolyzován pomocí zředěné kyseliny za vzniku D-glukózy a saligeninu (viz Obr. 3). Zároveň je salicin glykosidickou formou saligeninu (salicylalkohol, 2-hydroxybenzylalkohol, HBA). Produktem metabolismu salicinu je také salicylaldehyd (2-hydroxybenzaldehyd, Sald), který je charakteristický svým zápachem a jeho O-glukosid helicin (Hel). Oxidací saligeninu i salicylaldehydu vzniká kyselina salicylová a další salicyláty, jako například kyselina gentisová. Tento krok vedl k samotnému objevu struktury kyseliny salicylové^{21, 22}.



Obr. 3: Hydrolyza salicinu za vzniku kyseliny salicylové²¹ (upraveno)

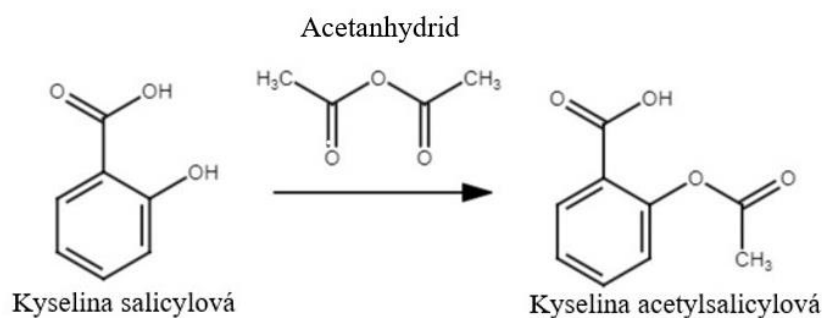
2.4.4 Kyselina acetylsalicylová

Kyselina acetylsalicylová (2-acetoxybenzoová kyselina, aSA) je název pro běžně dostupný lék aspirin. Jedná se o syntetický derivát kyseliny salicylové, a proto jej nenajdeme v přírodních materiálech. Samotná kyselina salicylová byla od roku 1860 průmyslově vyráběna pro své léčivé účinky jako analgetikum a antipyretikum. Nicméně bylo zjištěno, že působí dráždivě na žaludek a ve vyšších dávkách způsobuje krvácení. Z toho důvodu byla acetylována na kyselinu acetylsalicylovou čímž se tyto vedlejší účinky snížily. Kyselinu acetylsalicylovou začala jako lék syntetizovat německá společnost Bayer v roce 1899 pod obchodním názvem aspirin. Tento lék je dnes jedním z nejpoužívanějších na světě a užívá se pro léčbu bolesti, horečky, otoku a zánětu. Aspirin také snižuje riziko ischemické choroby srdeční, mrtvice a některých typů rakoviny ^{14, 19, 22, 23}. Reakci kyseliny salicylové s acetanhydridem za vzniku kyseliny acetylsalicylové znázorňuje Obr. 4.

Mechanismus účinku aspirinu byl objasněn až o několik desítek let později od jeho objevu. Látka nevratně inhibuje dvě formy enzymu cyklooxygenázy (COX- 1 a COX-2), které jsou zodpovědné za syntézu prostaglandinů a tromboxanu A₂. Aspirin inhibuje obě tyto formy, kdy svou acetylovou skupinu kovalentně naváže na aktivní místo enzymu, působí tak jako acetylační činidlo.

Prostaglandiny jsou signální molekuly a mají za úkol regulovat řadu buněčných funkcí, včetně genové exprese, také hrají důležitou roli při přenosu nervové vzruchu při zánětech a bolesti. Nadměrná exprese enzymu COX-2 rakovinovými buňkami vede ke zvýšeným hladinám prostaglandinů a tím podporuje buněčné dělení a odolnost buňky vůči apoptóze (buněčné smrti). Podáním aspirinu dochází k inhibici enzymu, a tedy ke snížení rychlosti dělení rakovinových buněk. Tyto účinky byly prokázány především u rakoviny žaludku, tlustého střeva a konečníku.

Tromboxan A₂ způsobuje vazokonstrikci, tedy kontrakce střední vrstvy cév, čímž podporuje srážení krve. Aspirin inaktivuje enzym COX-1 a tím potlačí tvorbu tromboxanu, dojde tak k podpoře fibrinolýzy – narušení vazby fibrinu a zabránění nárustu koagula. Aspirin je proto podáván jako prevence kardiovaskulárních a mozkových příhod ^{21, 22, 24}.



Obr. 4: Acetylace kyseliny salicylové ²² (upraveno)

2.5 Validace metody v HPLC

Validace slouží jako ověření kvality a platnosti analytické metody. Ověřujeme tak, jestli je daná metoda vhodná k danému účelu a poskytuje výsledky s definovanou jistotou. Chování analytů při vysokoúčinné kapalinové chromatografii je popisováno pomocí retenčních charakteristik. Následující výpočty se používají k vyhodnocení v HPLC analýze.

Aritmetický průměr \bar{x}

Aritmetický průměr získáme součtem všech naměřených hodnot a podělíme jejich počtem.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

n – počet měření

x_i – naměřená hodnota

Směrodatná odchylka s_x

Směrodatná odchylka se využívá jako ukazatel variability souboru hodnot.

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

n – počet měření

x_i – naměřená hodnota

Relativní směrodatná odchylka s_r

Relativní směrodatná odchylka udává míru přesnosti po sobě opakujících se měření za stejných podmínek. Vyjadřuje se v %.

$$s_r = \frac{S_x}{\bar{X}} \cdot 100 [\%]$$

Kapacitní faktor k_i

Kapacitní faktor charakterizuje míru zadržení analytu na koloně. Může tak sloužit ke srovnání výsledků z různých systému, jelikož je nezávislý na délce kolony a rychlosti průtoku mobilní fáze.

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M}$$

$t_{R,i}$ – retenční čas

t_M – mrtvý retenční čas

Počet teoretických pater N a výškový ekvivalent teoretického patra H

Obě hodnoty vyjadřují míru separační účinnosti chromatografické kolony. Účinnost charakterizuje, jak moc se zóny separovaných látek na koloně rozšiřují. Jako chromatografické patro rozumíme část chromatografického sloupce, která umožňuje ustanovení rovnováhy mezi množstvím separované látky v obou fázích.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{w} \right)^2 \quad H = \frac{L}{N}$$

$t_{R,i}$ – retenční čas

w – šířka píku na základně

L – délka kolony (v mm)

Rozlišení píku R

Jedná se o parametr, který charakterizuje míru oddělení dvou sousedních píků.

$$R_{ij} = \frac{2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j}$$

$t_{R,i}$; $t_{R,j}$ – retenční časy sousedních píků

w_i ; w_j – šířky sousedních píku na základně

K hlavním parametrům, které se při validaci metod v HPLC určují, patří vedle přesnosti a správnosti výsledku také opakovatelnost, linearita metody nebo mez (limit) detekce a mez (limit) stanovitelnosti (kvantifikace).

Opakovatelnost

Opakovatelnost výsledků měření charakterizujeme jako míru těsnosti shody mezi výsledky po sobě následujících měření za stejných podmínek. Získává se zpravidla z šesti měření standardního roztoku a vyjadřuje se pomocí relativní směrodatné odchylky s_r (%).

Linearita

Linearita ověřuje schopnost metody poskytnout v určitém rozsahu koncentrací stanovované látky přijatelnou lineární závislost mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. Ověření linearity se provádí v rozsahu minimálně pěti koncentračních hodnot, kdy se pro každou hodnotu připraví tři nezávislé modelové vzorky. Následně se sestaví graf závislosti výšky píku na koncentraci a jednotlivé body se proloží křivkou lineární regrese.

Mez detekce (LOD)

Mez detekce (LOD – limit of detection) analytické metody je definována jako nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno. Zároveň toto množství nemusí být nutně kvantifikováno jako exaktní hodnota. Vychází z podílu signál/šum a odpovídá koncentraci pro kterou je signál statisticky významně odlišný

od šumu. Pro výpočet použijeme trojnásobek směrodatné odchylky šumu s_n , který podělíme směrnici kalibrační křivky m , sestrojené ze závislosti výšky píku analytu na jeho koncentraci.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_n}{m}$$

Mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification) úzce souvisí s mezí detekce. Udává nejnižší množství analytu ve vzorku, které je možno kvantitativně stanovit s potřebnou nejistotou. Zde pro výpočet použijeme desetinásobek směrodatné odchylky šum s_n , který podělíme směrnici kalibrační křivky m .

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_n}{m}$$

2.6 Předúpravy rostlinného materiálu pro HPLC

Metody extrakce jsou často nazývány jako techniky předúpravy, nebo též přípravy vzorků. Extrakce patří mezi separační metody a slouží k tomu, abychom z rostlinných materiálů získali látky, které nás zajímají. Konkrétně se jedná o bioaktivní sloučeniny, které rostliny typicky produkují jako sekundární metabolity. Zároveň je někdy nutné ze vzorku odstranit látky nežádoucí pomocí účinné metody čištění (například sloupcová chromatografie, extrakce na pevné fázi). Sloučeniny lze identifikovat a charakterizovat z různých částí rostlin, jako jsou listy, stonek, květ a plody^{25, 26}.

Mezi nejpoužívanější konvenční techniky extrakce rostlinných materiálů řadíme Soxhletovu metodu a maceraci. K často používaným metodám v této kategorii patří také extrakce kapalina-kapalina (LLE), kdy dochází k rozdělení analytů mezi dvě nemísitelné fáze. Popřípadě extrakce kapalina-pevná látka (LSE), při které se převádí analyt z pevného vzorku do roztoku. Zmíněné metody však nepatří mezi nejvýhodnější kvůli jejich ekologickému zatížení velkou spotřebou toxických rozpouštědel a časové náročnosti. Za účelem překonání zmiňovaných negativních vlastností byly zavedeny nové extrakční techniky, které jsou označovány jako

nekonvenční. Tyto metody zahrnují například extrakci pomocí pevné fáze (SPE), mikrovlnnou extrakci (MAE) nebo ultrazvukem asistovanou extrakci (UAE). Mezi vylepšené vlastnosti nekonvenčních metod patří zvýšená selektivita, vyšší účinnost extrakce, kratší doba extrakce a snížená spotřeba rozpouštědel^{25, 26}.

Fenolické sloučeniny se extrahují z rostlinných materiálů v surové formě, kdy dochází k přechodu látek z matrice do rozpouštědla. Následná analýza získaných extraktů je nejčastěji prováděna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Pro analyty tohoto typu byla skupinou vědců z Ege univerzity (Turecko) použita metoda HPLC s tandemovou hmotnostní detekcí (MS/MS) z 19 druhů rostlin rodu *Cephalaria*. Díky vysoké citlivosti metody byly v rostlinách stanoveny hlavní fenolové kyseliny, a to kyselina salicylová a kyselina kávová. Extrakce sledovaných látek ze vzorků byla provedena metodou extrakce kapalina-kapalina pomocí n-butanolu a vody²⁷.

Další studie daných analytů byla provedena skupinou vědců z Varšavské univerzity (Polsko), kteří využili ke stanovení metodu RP-HPLC s fluorescenční detekcí. Salicyláty byly extrahovány pomocí třepačky s ethylacetátem a následně byly extrakty hydrolyzovány, aby došlo k lepšímu přechodu salicylátů do rozpouštědla. Extrakce byla provedena z různých typů koření, ovoce a zeleniny. Tímto postupem bylo možné stanovit také podíl volné a vázané kyseliny salicylové v matricích²⁸.

Podobnou metodu stanovení analytů využila skupina vědců z univerzity v Sao Paulu (Brazílie), jednalo se o metodu RP-HPLC s fluorimetrickou detekcí. Pro zpracování rostlinného materiálu byla využita mikrovlnná extrakce, jejíž postup byl modifikován a použit i v této bakalářské práci²⁹.

2.6.1 Extrakce pomocí mikrovln (MAE)

Metoda MAE (Microwave-assisted extraction) se využívá především k extrakci organických polutantů z pevných matric. Principem metody extrakce jsou mikrovlny, které spadají do frekvenčního pásma asi 300 MHz až 300 GHz, to odpovídá vlnovým délkám 1 m až 1 mm. Komerčně je nejvíce využívaná frekvence okolo 2450 MHz. Díky mikrovlnné energii dochází k ohřevu rozpouštědla, které je v kontaktu se vzorkem za účelem uvolnění analytů z matric

vzorku do rozpouštědla. Hlavní výhodou použití MAE je schopnost rychle zahřát vzorek ve směsi rozpouštědla a tím i zkrátit dobu extrakce. Navíc umožňuje až desetinásobné snížení spotřeby rozpouštědla v porovnání s konvenčními extrakčními postupy³⁰.

V této práci byl použit modifikovaný postup extrakce kyseliny salicylové ze sóji, kukuřice a cukrové třtiny²⁹. Extrakce byla využita k izolaci derivátů a metabolitů kyseliny salicylové.

2.6.2 Extrakce pomocí ultrazvuku (UAE)

Dalším vyzkoušeným extrakčním postupem byla metoda UAE (ultrasonic-assisted extraction). Tato metoda slouží, stejně jako extrakce za pomoci mikrovln (MAE), pro extrakci cílových sloučenin z matric. Obě patří k alternativním technikám, které umožňují snížení nebo eliminaci toxických rozpouštědel a zároveň zvyšují výtěžnost a kvalitu extraktu. Pomocí ultrazvuku dochází k rozrušení buněčných stěn rostlinného materiálu a k lepšímu přechodu látek do rozpouštědla³¹.

Experimentální část

3.1 Vybavení

3.1.1 Přístroje

- Kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series HPLC systém s UV/Vis detekcí



Obr. 5: Kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series

- Kolona Phenomenex Gemini NX C18 (100 x 4,6 mm; 3 μ m)
- Kryogenní kulový mlýn CryoMill, Německo
- UV/Vis spektrofotometr UNICAM UV4 Series, ATI UNICAM, UK
- Ultrazvuková lázeň PS 04000 A, Slovensko
- Systém pro mikrovlnou extrakci Milestone, USA
- Váhy OHAUS Pioneer PA114, Ohaus Corporation, USA
- Laboratorní centrifuga MiniSpin, Eppendorf, Německo

3.1.2 Chemikálie

- Ethanol, C_2H_5OH , 96 %, p.a., Lach-Ner, Česká republika
- Acetonitril, CH_3CN , 99,9 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina mravenčí, $HCOOH$, 98 %, Penta, Česká republika
- Kyselina gentisová, $C_7H_6O_4$, 98 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina salicylová, $C_7H_6O_3$, ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina acetylsalicylová, $C_9H_8O_4$, ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina benzoová, $C_7H_6O_2$, 98 %, Penta, Česká republika
- Kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, $C_7H_6O_4$, 98 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Salicin, $C_{13}H_{18}O_7$, HEK Gmbh, Německo
- Helicin, $C_{13}H_{16}O_7$, ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Salicylaldehyd, $C_7H_6O_2$, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Saligenin, $C_7H_8O_2$, 99 %, Sigma-Aldrich, Německo
- 2-O- β -glukosid kyseliny salicylové, $C_{13}H_{16}O_8$, 99 %, Sigma-Aldrich, Německo

3.2 Cíl práce

Tato práce navazuje na diplomovou práci Mgr. Elišky Kožusznikové³², ve které se zabývala vývojem a optimalizací HPLC metody pro stanovení kyseliny salicylové a vybraných přírodních derivátů. Cílem této práce bylo rozšířit počet stanovovaných derivátů a metabolitů kyseliny salicylové pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích, metodu validovat a aplikovat na analýzu reálných vzorků.

Výsledky a diskuse

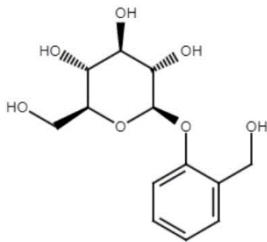
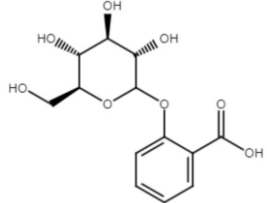
4.1 Příprava mobilní fáze

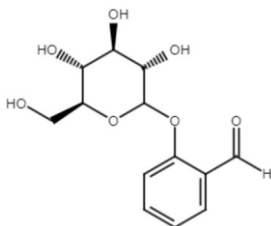
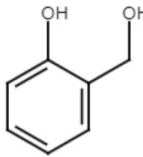
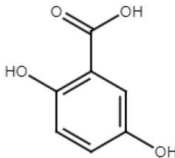
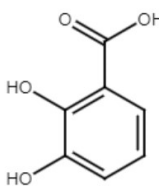
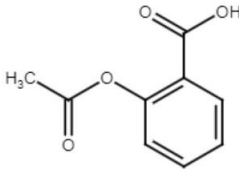
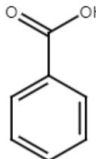
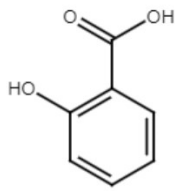
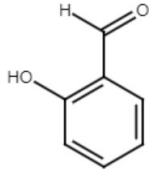
Pro analýzu derivátů a metabolitů kyseliny salicylové byla použita mobilní fáze se složením acetonitril (organická složka) a 3% kyseliny mravenčí (vodná složka). Postup přípravy mobilní fáze se shodoval s mobilní fází MF4 v práci Mgr. Kožusznikové³². Za použití této mobilní fáze bylo separace analytů dosaženo po 12 minutách za vhodné gradientové eluce, celková doba jedné separace byla nastavena na 15 minut.

4.2 Příprava roztoků standardů

Pro separaci 10 zvolených analytů byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 10 mg.ml⁻¹ do 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf tak, že jednotlivé navážky analytů byly rozpuštěny v 50% ethanolu. Pro dosažení lepšího rozpuštění látek, byly roztoky ponechány 15 minut v ultrazvukové lázni. Ze zásobních roztoků byly následně připraveny naředěné roztoky o koncentraci 1 mg.ml⁻¹ a objemu 1 ml a také směsný roztok o shodné koncentraci, opět pomocí 50% ethanolu. Připravené roztoky, rozpouštědlo a mobilní fáze byly v době mimo měření uchovávány v lednici.

Tabulka 1: Názvy a struktury zvolených analytů

Látka	Zkratka	Struktura
Salicin	Sal	
2-O-β-D-glukosid kyseliny salicylové	SAG	

Helicin	Hel	
Saligenin	HBA	
Kyselina gentisová	Gen	
2,3-dihydroxybenzoová kyselina	2,3-DHBA	
Kyselina acetylsalicylová	aSA	
Kyselina benzoová	BA	
Kyselina salicylová	FSA	
Salicylaldehyd	Sald	

4.3 Podmínky separace v RP-HPLC

Veškerá chromatografická měření byla provedena na reverzních fázích pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu Agilent 1200 Series s UV/Vis detekcí za laboratorní teploty. Jako stacionární fáze byla zvolena chromatografická kolona Phenomenex Gemini NX-C18 o rozměrech 100 x 4,6 mm a s velikostí částic 3 μm . Analýza probíhala při průtoku 0,6 ml.min⁻¹ a injektovaném objemu 5 μl . Separace za vhodně zvolené gradientové eluce byly provedeny při vlnových délkách 275 nm a 315 nm na základě měření absorpčních spekter analytů na UV/Vis spektrofotometru.

4.4 Výběr vlnové délky detektoru

Při hledání vhodné vlnové délky pro detekci všech zvolených analytů, byly pro přípravu použity zásobní roztoky o koncentraci 10 mg.ml⁻¹. Tyto roztoky byly následně desetkrát zředěny na koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹ a poté padesátkrát zředěny na koncentraci 0,002 mg.ml⁻¹. Jednotlivá absorpční spektra byla změřena pomocí UV/Vis spektrofotometru v rozsahu vlnových délek 190 – 400 nm pro obě hodnoty koncentrací. Z naměřených spekter byla vyhodnocena absorpční maxima jednotlivých analytů, jak znázorňuje tabulka 2. Absorpční spektra všech studovaných analytů jsou uvedena v příloze (Obr. 19 - 28).

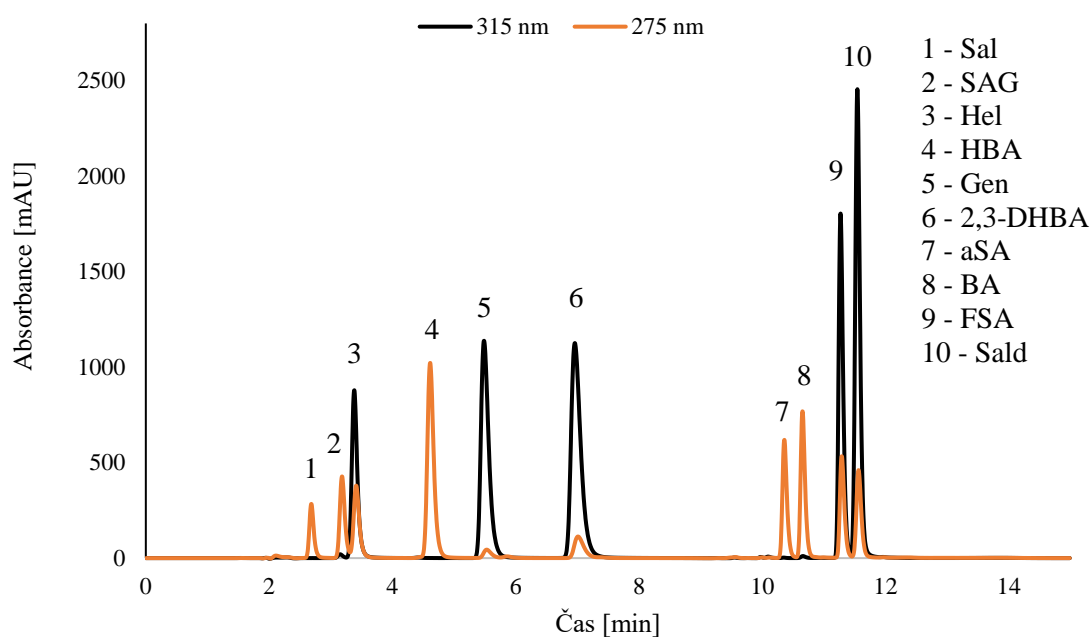
Tabulka 2: Absorpční maxima studovaných analytů

Standard	Absorpční maximum [nm]
Sal	268
SAG	275
Hel	311
HBA	274
Gen	322
2,3-DHBA	307
aSA	295
BA	226
FSA	297
Sald	327
Zvolená vlnová délka	275 315

Při zvolené vlnové délce 275 nm bylo možné detekovat všechny analyty, ale nejvíce došlo ke zlepšení tvaru píků pěti analytů právě s absorpční maximem nejbližší této hodnotě, to je salicin, SAG, saligenin, acetylsalicylová kyselina a benzoová kyselina.

Dále bylo provedeno měření při vlnové délce 315 nm, zde došlo ke značnému zlepšení ostrosti píku dalších pěti analytů, a tedy helicin, kyselina gentisová, kyselina 2,3-dihydroxybenzoová, kyselina salicylová a salicylaldehyd. Nicméně bylo možné identifikovat pouze tyto analyty. Následná měření reálných vzorků byla proto provedena při obou vlnových délkách.

Obě měření byla provedena za stejných podmínek, při stejné gradientové eluci a průtoku, došlo pouze ke změně vlnové délky. Chromatogramy obou měření srovnává Obr. 6.



Obr. 6: Srovnání separace směsi analytů při různých vlnových délkách

4.5 Gradientová eluce

Také byly nastaveny jednotlivé kroky pro gradientovou eluci, které jsou zaznamenány v tabulce 3. V tabulce jsou uvedeny procentuální obsahy 3% kyseliny mravenčí (sloupec A [%]) a acetonitrilu (sloupec B [%]) v mobilní fázi.

Tabulka 3: Nastavení gradientové eluce

Čas [min]	Průtok [ml.min ⁻¹]	A [%]	B [%]
0,0	0,6	85	15
5,0	0,6	85	15
9,0	0,6	40	60
10,0	0,6	85	15
15,0	0,6	85	15

Podle tabulky dochází od zahájení analýzy k separaci látek ve směsi při složení mobilní fáze z 15 % organické složky (acetonitrilu). Poté v deváté minutě analýzy dochází k úpravě složení mobilní fáze, kdy množství organické složky se změní z 15 % na 60 %, tím se urychlí separace posledních čtyř analytů (kyselina acetylsalicylová, kyselina benzoová, kyselina salicylová, salicylaldehyd). V posledních pěti minutách analýzy se systém vrátí do počátečního stavu. Celkový čas separace všech 10 zvolených analytů byl nastaven na 15 minut.

4.6 Vyhodnocení chování analytů v RP-HPLC

4.6.1 Retenční charakteristiky analytů

U sledovaných analytů byly naměřeny retenční časy t_R při vlnové délce 275 nm. Z této hodnoty byl proveden výpočet kapacitního faktoru (k_i), počet teoretických pater (N), výškový ekvivalent teoretického patra (H) a rozlišení píku (R) (viz Tabulka 4). Pro výpočet kapacitních faktorů byla použita hodnota mrtvého času thiomčoviny $t_M = 1,9$ minut, která se na koloně nezadržuje. Vzorce použité k výpočtům jsou uvedeny v teoretické části (kapitola 2.5).

Tabulka 4: Retenční charakteristiky zvolených analytů při 275 nm

Analyt	t_R [min]	N	H [mm]	R	k_i
Sal	2,67	483	0,21	1,11	0,41
SAG	3,17	944	0,11	0,48	0,67
Hel	3,40	626	0,16	1,62	0,79
HBA	4,60	384	0,26	1,19	1,42
Gen	5,51	1414	0,07	2,12	1,90
2,3-DHBA	6,99	1196	0,08	5,06	2,68
aSA	10,35	6344	0,02	0,51	4,45
BA	10,64	4610	0,02	1,18	4,60
FSA	11,28	9897	0,01	0,52	4,94
Sald	11,55	6073	0,02	-	5,08

4.7 Validace metody

U metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích pro stanovení derivátů a metabolitů kyseliny salicylové byly hodnoceny tyto parametry - opakovatelnost, linearita, mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ).

4.7.1 Opakovatelnost analýzy

Tabulky 5 a 6 shrnují naměřené hodnoty retenčních časů a ploch píků směsi všech sledovaných analytů metodou RP-HPLC. Měření bylo provedeno při vlnové délce 275 nm a nastavené gradientové eluci. Jedna směs standardů o koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ byla měřena šestkrát v rámci vyhodnocení opakovatelnosti analýzy. Získané hodnoty byly testovány Dean-Dixonovým testem na odlehlost. Požadavek jsme potvrdili výpočtem relativní směrodatné odchylky s_R , jejíž hodnota musí být menší než 1 % pro retenční čas t_R i pro plochu píku A.

Tabulka 5: Retenční časy sledovaných analytů při 275 nm

	t_R [min]									
	Analyt									
Měření	Sal	SAG	Hel	HBA	Gen	2,3-DHBA	aSA	BA	FSA	Sald
1	2,67	3,17	3,40	4,61	5,53	7,02	10,36	10,65	11,28	11,56
2	2,67	3,16	3,40	4,60	5,50	6,98	10,35	10,64	11,28	11,56
3	2,67	3,17	3,40	4,61	5,52	7,00	10,35	10,64	11,28	11,56
4	2,67	3,16	3,40	4,59	5,50	6,97	10,34	10,64	11,27	11,55
5	2,66	3,16	3,39	4,59	5,50	6,98	10,34	10,63	11,27	11,54
6	2,67	3,16	3,39	4,59	5,50	6,97	10,34	10,63	11,27	11,54
\bar{x}^{a)}	2,67	3,17	3,40	4,60	5,51	6,99	10,35	10,64	11,28	11,55
s_x^{b)}	0,0034	0,0059	0,0045	0,0067	0,012	0,016	0,0064	0,0068	0,0059	0,0072
s_R [%]^{c)}	0,13	0,19	0,13	0,15	0,21	0,23	0,062	0,064	0,052	0,062

Legenda: ^{a)} průměrná hodnota retenčního času; ^{b)} směrodatná odchylka; ^{c)} relativní směrodatná odchylka v %

Tabulka 6: Plochy píku sledovaných analytů při 275 nm

	A [AU.s]									
	Analyt									
Měření	Sal	SAG	Hel	HBA	Gen	2,3-DHBA	aSA	BA	FSA	Sald
1	1441	2286	2163	7423	353	1173	3193	3900	2703	2545
2	1442	2288	2177	7396	352	1176	3205	3895	2695	2531
3	1440	2276	2177	7401	356	1179	3192	3898	2704	2535
4	1447	2279	2170	7400	351	1185	3191	3890	2711	2546
5	1447	2291	2170	7413	361	1188	3192	3901	2720	2549
6	1447	2297	2179	7410	358	1189	3203	3894	2718	2545
\bar{x}^{a)}	1444	2286	2173	7407	355	1182	3196	3896	2709	2542
s_x^{b)}	3,1	6,9	5,5	9,2	3,4	5,9	5,6	3,8	8,5	6,4
s_R [%]^{c)}	0,21	0,30	0,25	0,12	0,96	0,50	0,18	0,10	0,31	0,25

Legenda: ^{a)} průměrná hodnota retenčního času; ^{b)} směrodatná odchylka; ^{c)} relativní směrodatná odchylka v %

4.7.2 Linearita

Linearita byla posuzována v rozmezí koncentrací 0,05 – 1,00 mg.ml⁻¹. K posouzení linearity využíváme korelační koeficient, kdy platí podmínka, že musí být větší než 0,99. Jednotlivé koncentrační rozsahy byly měřeny při vlnové délce 275 nm u pěti analytů, a to salicin, 2-O-β-D-glukosid kyseliny salicylové, saligenin, acetylsalicylová kyselina a benzoová kyselina. U dalších pěti analytů byla vlnová délka změněna na hodnotu 315 nm, jelikož se ukázala jako vhodnější. Grafy lineárních závislostí výšky píku na koncentraci všech sledovaných analytů jsou uvedeny v příloze (Obr. 29 – 38).

4.7.3 Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)

Ze všech sledovaných analytů měli salicin a 2-O-β-D-glukosid kyseliny salicylové (SAG) nejnižší mez detekce a stanovitelnosti. Stanovené hodnoty LOD, LOQ a korelační koeficient pro sledované analyty jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Hodnoty LOD a LOQ sledovaných analytů a linearita, měření při dvou vlnových délkách

měření při 275 nm			
Analyt	LOD [ng.ml ⁻¹]	LOQ [ng.ml ⁻¹]	Linearita (rozsah 1,0 - 0,05 mg.ml ⁻¹)
Sal	6,3	21,2	R ² = 0,9988
SAG	4,4	14,5	R ² = 0,9966
HBA	1,8	6,0	R ² = 0,9932
aSA	2,9	9,6	R ² = 0,9986
BA	2,4	8,1	R ² = 0,9937
měření při 315 nm			
Analyt	LOD [ng.ml ⁻¹]	LOQ [ng.ml ⁻¹]	Linearita (rozsah 1,0 - 0,05 mg.ml ⁻¹)
Gen	1,7	5,6	R ² = 0,9949
2,3-DHBA	1,7	5,5	R ² = 0,9991
FSA	1,1	3,6	R ² = 0,9986
Hel	2,1	7,1	R ² = 0,9972
Sald	0,7	2,5	R ² = 0,9997

4.8 Měření reálných vzorků

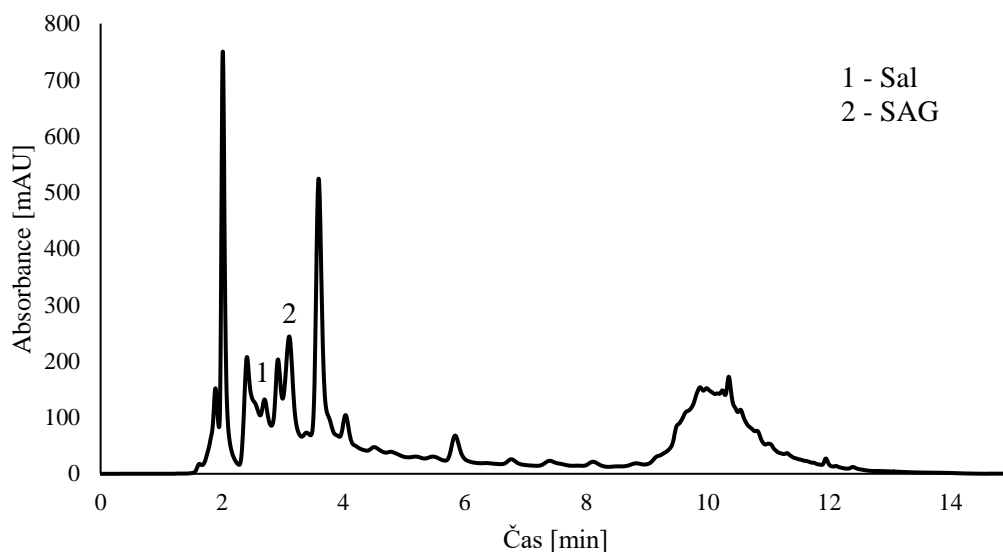
4.8.1 Příprava vzorků

Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích ke stanovení derivátů kyseliny salicylové byla aplikována na reálné rostlinné materiály. K extrakci a následné separaci pomocí RP-HPLC byla použita kůra vrby bílé (*Salix alba*) a listy topolu (*Populus x canadensis Moench*). Rostlinné vzorky byly dodány v sušeném stavu. Pro lepší rozmělnění rostlinného materiálu byly oba vzorky rozemlety pomocí kryogenního mlýnu. Extrakce byla provedena s následujícími vzorky: kůra vrby bílé nemletá, kůra vrby bílé mletá a mleté listy topolu. Jako rozpouštědlo při extrakcích byl používán 50% ethanol.

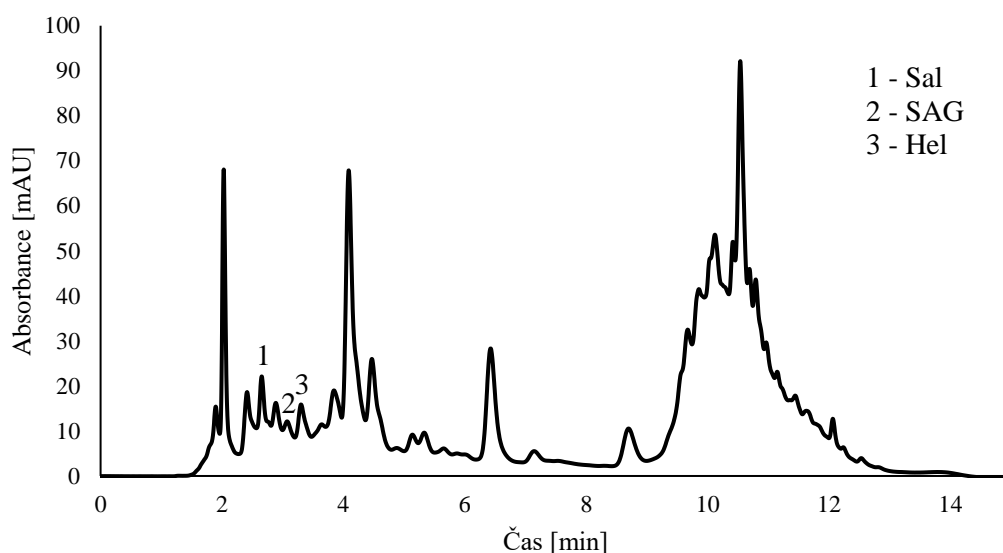
4.8.2 Výsledky extrakce pomocí mikrovln (MAE)

V našem případě bylo provedena mikrovlnná extrakce v uzavřené nádobě, díky tomu byly všechny vzorky, včetně kontrolního blanku, extrahovány současně. K extrakci bylo naváženo 0,5 g rostlinného materiálu, toto množství bylo následně smícháno s 10 ml 50% ethanolu v teflonové nádobce. Směs byla zahřívána při teplotě 40 °C po dobu 8 minut. Naprogramované teploty bylo dosaženo za 1 minutu a po extrakci byla směs chlazená na laboratorní teplotu. Následně byl extrakt pipetováno po 1 ml do zkumavek a ponechán 1 minutu ve stolní centrifuze. Poté byl zbylý pevný materiál přefiltrován přes 0,22 µm syringe filtr.

V jednotlivých rostlinných extraktech byly identifikovány píky pomocí metody tzv. spikování, kdy byl ke vzorku přidán standard analytu. Veškeré extrakty byly měřeny optimalizovanou metodou RP-HPLC při vlnových délkách 275 nm a 315 nm.

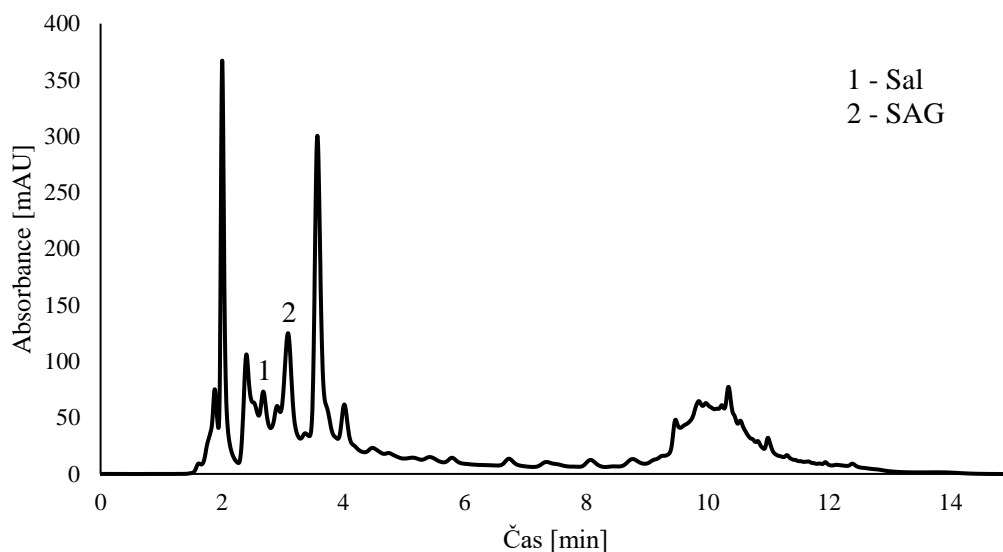


Obr. 7: Extrakt mleté vrbové kůry pomocí MAE při 275 nm

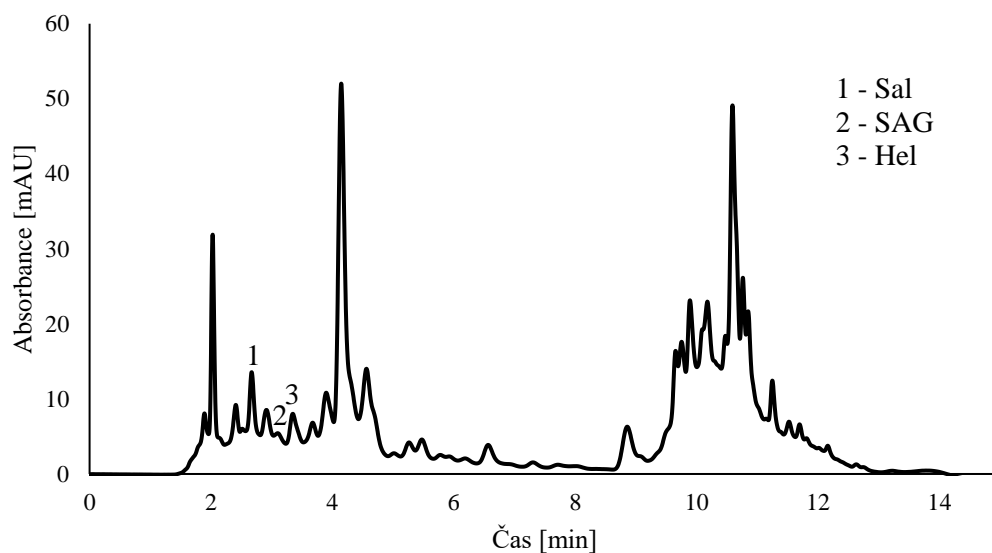


Obr. 8: Extrakt mleté vrbové kůry pomocí MAE při 315 nm

Pomocí metody spikování byl při 275 nm v extraktu mleté vrbové kůry identifikován pík salicinu a 2-O- β -D-glukosidu kyseliny salicylové (Obr. 7 -8). Měření při vlnové délce 315 nm odhalilo i malé množství helcinu. Vrba je jedním z přírodních zdrojů salicinu a helcinu, proto byl výskyt těchto derivátů nejvíce předpokládán. Vysvětlení pro identifikaci SAG může být takové, že se jedná o zásobní inaktivní formu kyseliny salicylové.

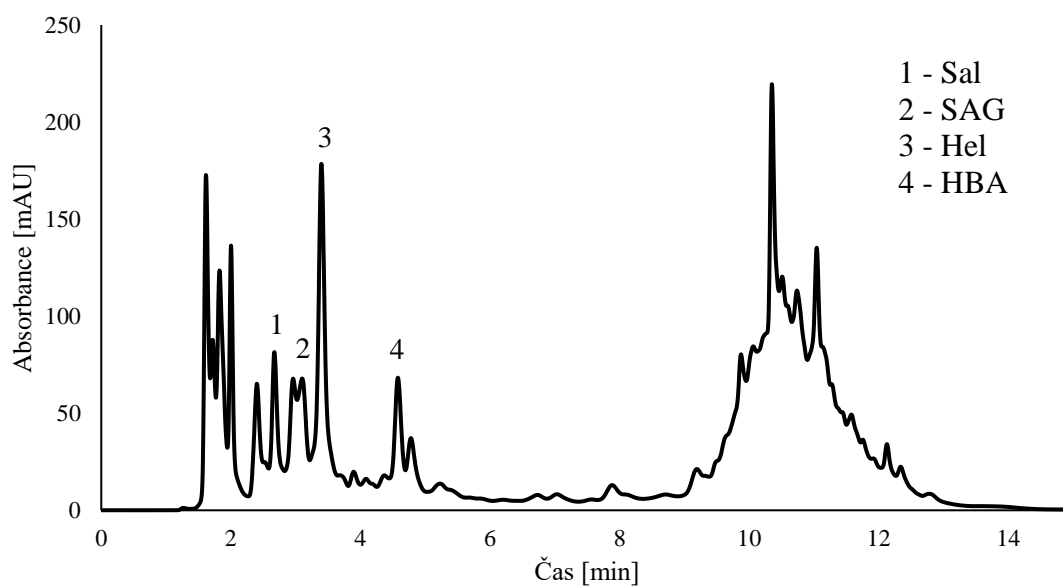


Obr. 9: Extrakt nemleté vrbové kůry pomocí MAE při 275 nm

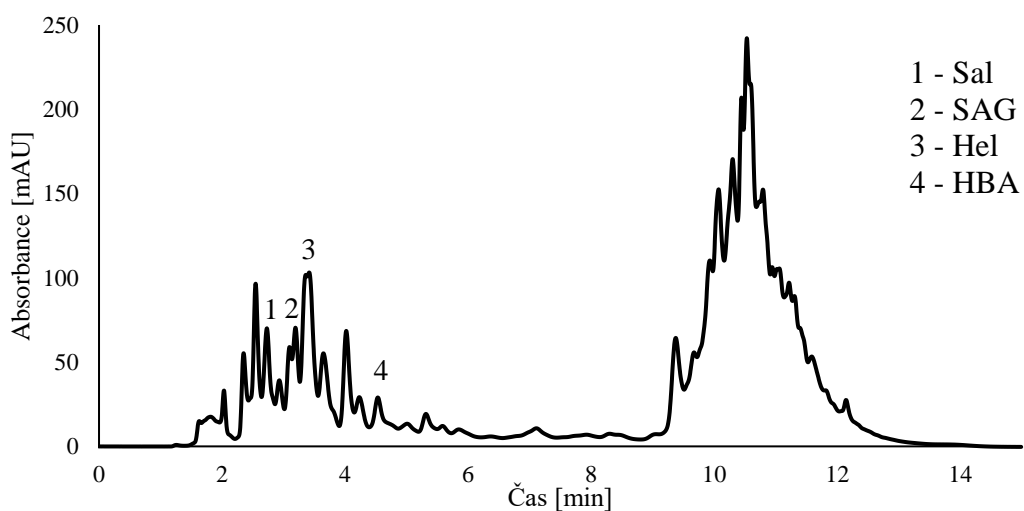


Obr. 10: Extrakt nemleté vrbové kůry pomocí MAE při 315 nm

Důvodem, proč byly analyzovány vzorky mleté i surové vrbové kůry byl předpoklad, že po rozmělnění materiálu dojde k lepšímu přechodu látek do rozpouštědla a budeme tak moci identifikovat více derivátů, popřípadě ve výraznějším množství. Při extrakci pomocí mikrovln byly u obou extraktů z vrbové kůry identifikovány stejné píky, ale u mletého vzorku měly vyšší intenzitu.



Obr. 11: Extrakt mletých listů topolu pomocí MAE při 275 nm

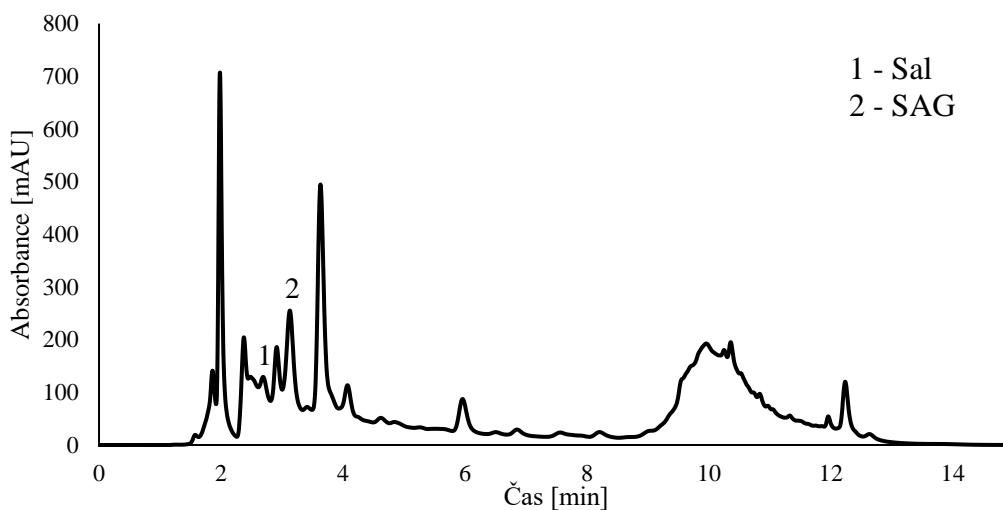


Obr. 12: Extrakt mletých listů topolu pomocí MAE při 315 nm

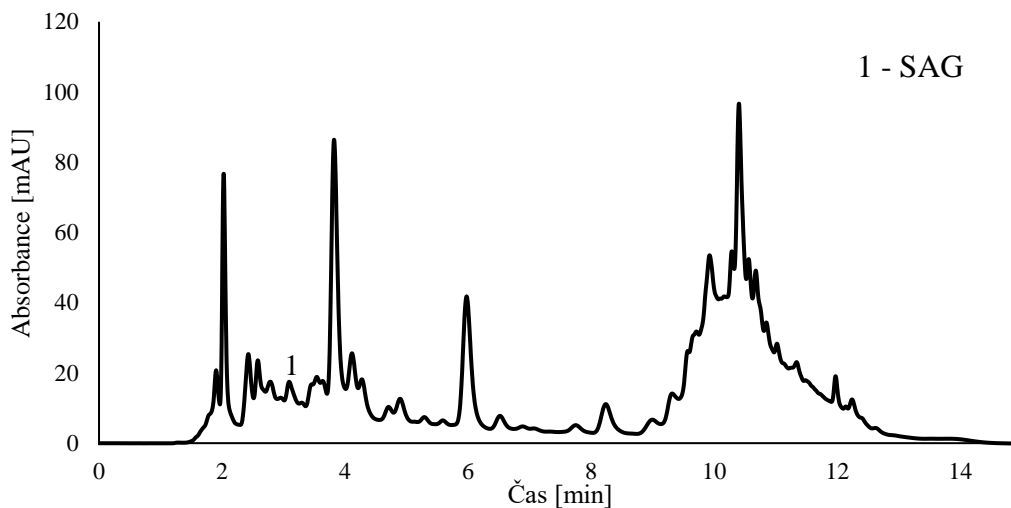
Metodou spikování bylo v extrakt listů topolu možné přiřadit píky odpovídající salicin, SAG, helicin a saligeninu. Ve srovnání s analýzou extraktů vrbové kůry měly píky helicin vyšší intenzitu, a to i při vlnové délce 275 nm. Rovněž byla možná identifikace saligeninu, který také patří mezi metabolity salicin.

4.8.3 Výsledky extrakce pomocí ultrazvuku (UAE)

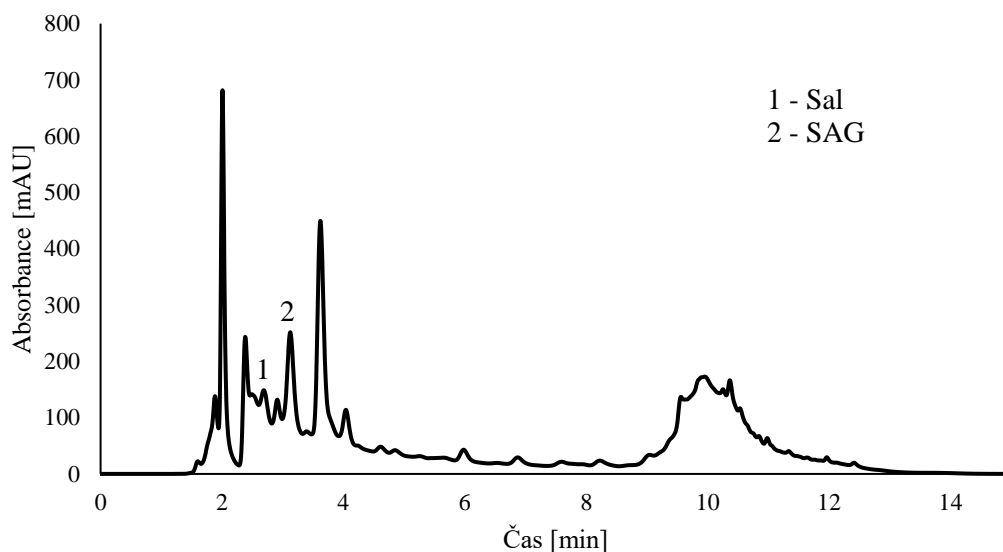
K extrakci bylo použito 0,5 g rostlinného materiálu, ten byl v kádince smíchán s 10 ml 50% ethanolu. Směs byla uzavřena pomocí fólie parafilm a ponechána 3 hodiny v ultrazvukové lázni. Všechny vzorky byly extrahovány současně. Následně byl extrakt pipetován po 1 ml do zkumavek a ponechán 1 minutu ve stolní centrifuze. Poté byl zbylý pevný materiál odstraněn pomocí 0,22 μm syringe filtru. K identifikaci píků v rostlinných extraktech byla opět použita metoda spikování.



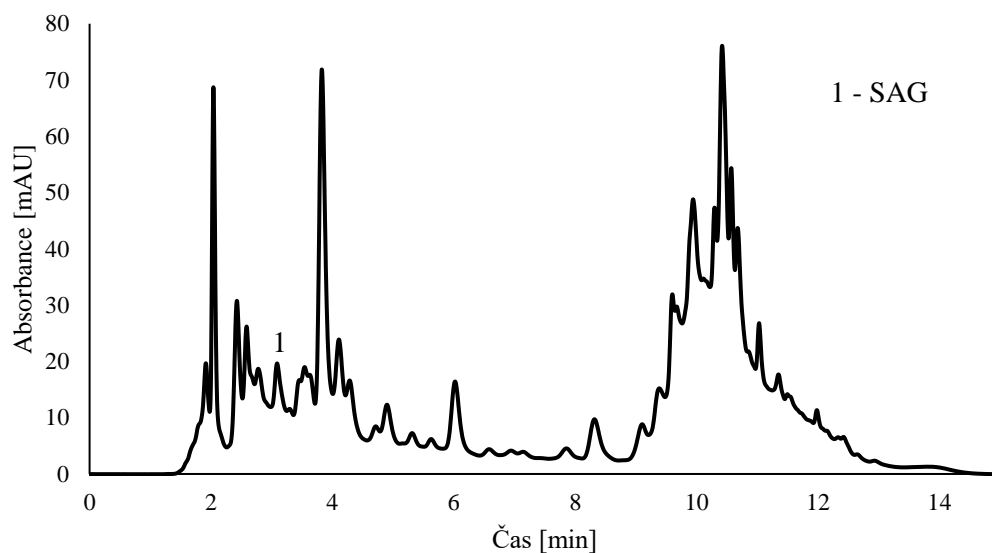
Obr. 13: Extrakt mleté vrbové kůry pomocí UAE při 275 nm



Obr. 14: Extrakt mleté vrbové kůry pomocí UAE při 315 nm

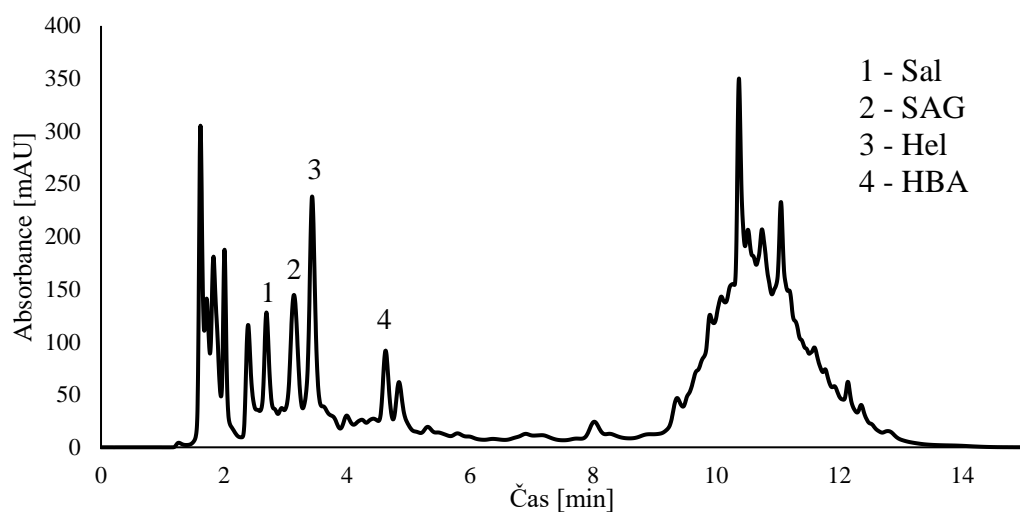


Obr. 15: Extrakt nemleté vrbové kůry pomocí UAE při 275 nm

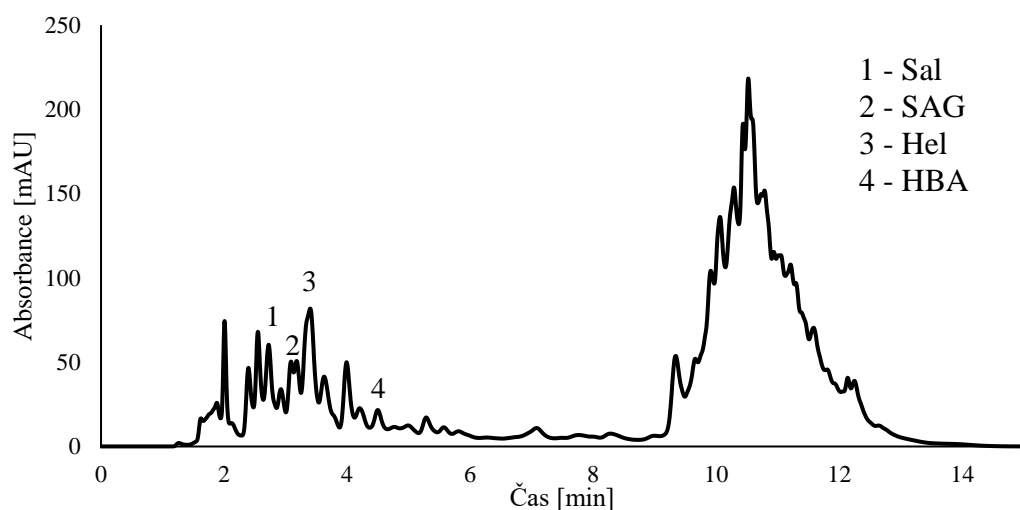


Obr. 16: Extrakt nemleté vrbové kůry pomocí UAE při 315 nm

V porovnání s extrakty vrbové kůry pomocí mikrovln nebyl při vlnové délce 315 nm identifikován helicín a salicin. Zároveň došlo k mírnému nárůstu intenzity píku 2-O- β -D-glukosidu kyseliny salicylové. Stejně jako u předešlé extrakce byly u obou analyzovaných roztoků (mletá a nemletá vrbová kůra) identifikovány stejné deriváty, zde i při podobné intenzitě. Tento postup extrakce byl vyhodnocen jako méně účinný při hledání daných derivátů.



Obr. 17: Extrakt mletých listů topolu pomocí UAE při 275 nm



Obr. 18: Extrakt mletých listů topolu pomocí UAE při 315 nm

V analyzovaném extraktu mletých listů topolu byly identifikovány stejné deriváty jako při extrakci za pomoci mikrovln. Na rozdíl od předešlého postupu extrakce při vlnové délce 275 nm nedochází ke koeluci píku SAG s jinými látkami, také došlo ke zvýšení intenzity všech stanovených analytů.

Závěr

Cílem bakalářské práce bylo optimalizovat metodu pro separaci přírodních derivátů a metabolitů kyseliny salicylové pomocí RP-HPLC z rostlinných materiálů. Dílčím úkolem bylo otestovat vybrané extrakční postupy a aplikovat metodu na reálné vzorky. Jako modelový vzorek byla použita kůra vrby bílé (*Salix alba*) a listy topolu (*Populu x canadensis Moench*).

Veškerá chromatografická měření byla provedena pomocí HPLC systému Agilent 1200 Series vybaveného UV/Vis detektorem. Separace byla provedena na koloně Phenomenex Gemini NX C18 (100 x 4,6; 3 μm). Mobilní fáze sestávala z 3% kyseliny mravenčí a acetonitrilu, analýza probíhala za vhodně nastavené gradientové eluce. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a injektovaný objem vzorku byl 5 μl . Standardní zásobní roztoky analytů byly připraveny v 50% ethanolu o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jednotlivé separace byly provedeny při vlnových délkách 275 nm a 315 nm na základě měření absorpčních spekter analytů pomocí UV/Vis spektrofotometru a porovnány. Optimalizovaná metoda byla částečně validována z hlediska opakovatelnosti, linearity, limitu detekce (LOD) a limitu stanovitelnosti (LOQ).

Pro stanovení požadovaných látek ze vzorků byla použita mikrovlnná extrakce (MAE) a extrakce za pomoci ultrazvuku (UAE). Účinnějším postupem byla extrakce za pomoci mikrovln, touto metodou bylo možné identifikovat více derivátů ve vzorku vrbové kůry. Nemůžeme vyloučit, že další látky, které byly stanovovány v extraktech nejsou, ale nenašli jsme takový postup, jaký by odstranil interferenty z rostlinných matric. Předúprava vzorku byla pro naše analyty nedostatečná, do budoucna by bylo vhodné vyzkoušet další postupy extrakce, které by odstranily nežádoucí matici.

Seznam použitých zkratk

2,3-DHBA	kyselina 2,3-dihydroxybenzoová
A	plocha píku
aSA	kyselina acetylsalicylová
CM	chorismátmutáza
COX	cyklooxygenáza
FSA	kyselina salicylová
Gen	kyselina gentisová
H	výškový ekvivalent teoretického patra
HBA	saligenin
Hel	helicin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HR	hypersenzitivní reakce
IC	isochorismát
ICS	isochorismát syntáza
IGS	isochorismoyl-glutamát syntáza
IPL	pyruvát-isochorismát-lyáza
k_i	kapacitní faktor
LAR	lokální získaná rezistence
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
LSE	extrakce kapalina-pevná fáze
MAE	extrakce pomocí mikrovln
MS/MS	tandemová hmotnostní detekce
N	počet teoretických pater
NP	normální fáze
PAL	fenylalanin amonium-lyáza
R	rozlišení píku
RP	reverzní fáze

SAG	2-O- β -D-glukosid kyseliny salicylové
Sal	salicin
Sald	salicylaldehyd
SAR	systemově získaná rezistence
SGE	glukosylester kyseliny salicylové
SPE	extrakce pomocí pevné fáze
t_M, t_0	mrtvý retenční čas
t_R	retenční čas
UAE	extrakce pomocí ultrazvuku
V_M, V_0	mrtvý retenční objem
V_R	retenční objem

Seznam použité literatury

1. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 131 s. ISBN 80-86369-07-2.
2. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
3. MIKEŠ, Otakar. *Laboratorní chromatografické metody*. Vyd. 1. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1980. 639 s. ISBN 04-614-80
4. KEALEY, D. and HAINES, P. J. *Analytical Chemistry*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 2002. 336 s. ISBN 1-85996-189-4.
5. CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. 383 s. ISBN 04-626-90.
6. JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Analytica Chimica Acta*. 2011, **692** (1-2), 1 – 25
7. ENGELHARDT, H., JUNGHEIM, M. Comparison and characterization of reversed phases. *Chromatographia* [online]. 1990, **29** (1-2), 59 – 68, [18.3.2022]. DOI: 10.1007/BF02261141. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02261141>
8. MARURI-LÓPEZ, Israel, AVILES-BALTAZAR, Norma Yaniri, BUCHALA Antony, SERRANO Mario. Intra and Extracellular Journey of the Phytohormone Salicylic Acid. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2019, **10**, [6.3.2022]. DOI: 10.3389/fpls.2019.00423. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00423>
9. ZHANG, Yuelin, LI, Xin, Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity, *Current Opinion in Plant Biology*. 2019, **50**, 29 – 36.
10. RASKIN, Ilya, Role of salicylic acid in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1992, **43**, 439 – 463.
11. DING, Pingtao, DING, Yuli. Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone, *Trends in Plant Science*. 2020, **25** (6), 549 – 565.

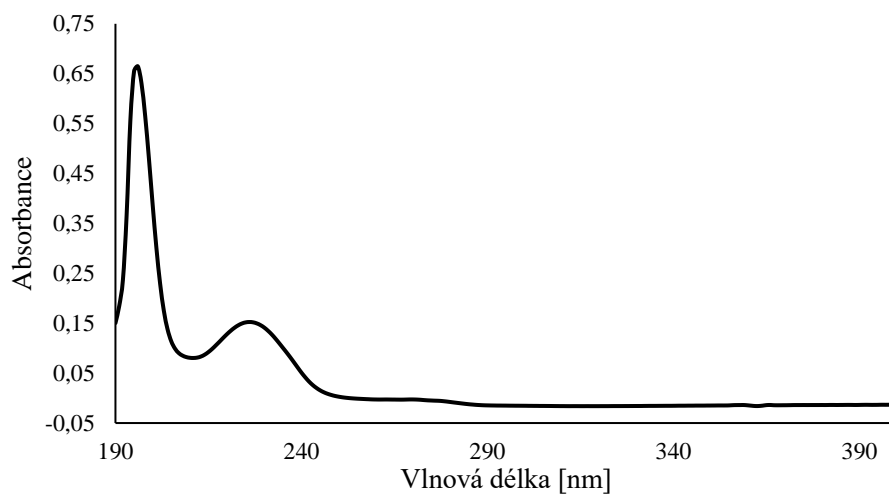
12. CHEN, Zhixiang, et al. Biosynthesis of salicylic acid in plants, *Plant Signaling and Behavior*. 2009, **4** (6), 493 - 496.
13. LEFEVERE, Hannes, BAUTERS, Lander, GHEYSEN, Godelieve, Salicylic Acid Biosynthesis in Plants, *Frontiers in Plant Science*. 2020, **11**
14. DEMPSEY, D. A., & KLESSIG, D. F. How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biology*. 2017, **15** (1), 1–11.
15. CHUANFU A., ZHONGLIN M. Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity, *Journal of Integrative Plant Biology*. 2011, **53** (6), 412 – 428
16. ZHENG, Xiao-yu, ZHOU, Mian, YOO, Heejin. Spatial and temporal regulation of biosynthesis of the plant immune signal salicylic acid, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2015, **112** (30), 9166 – 9173, [17.3.2022]. DOI: 10.1073/pnas.1511182112. Dostupné z: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1511182112>
17. VAN LOON, L. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins, *European Journal of Plant Pathology*. 1997, **103**, 753–765 DOI: 10.1023/A:1008638109140
18. ABEDI, F., RAZAVI, B. M., HOSSEINZADEH H. A review on gentisic acid as a plant derived phenolic acid and metabolite of aspirin: Comprehensive pharmacology, toxicology, and some pharmaceutical aspects, *Phytotherapy research*. 2020, **34** (4), 729 - 741
19. Dean, J. V., Delaney, S. P. Metabolism of salicylic acid in wild type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Physiologia plantarum*. 2008, **132** (4), 417 - 425.
20. MACHOLÁN, Lumír. *Sekundární metabolismy*. 2. dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2003. 143 s. ISBN 80-210-3068-2.
21. MAHDI, J. G., et al. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential, *Cell Proliferation*. 2006, **39** (2), 147 – 155.

22. MAHDI, J. G. Medicinal potential of willow: A chemical perspective of aspirin Discovery, *Journal of Saudi Chemical Society*. 2010, **14** (3), 317 – 322.
23. VENEMA, D. P., et al. Determination of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid in Foods, Using HPLC with Fluorescence Detection, *J. Agric. Food Chemistry*. [online 12.4.2022]1996, **44** (7), 1762 – 1767. DOI: 10.1021/jf950458y. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf950458y>
24. MEKAJ, Y., DACI, F., MEKAJ, A. New insights into the mechanisms of action of aspirin and its use in the prevention and treatment of arterial and venous thromboembolism, *Ther Clin Risk Manag*. 2015, **11**, 1449 – 1456
25. OLUWASEUN, R. A., et al. Extraction of phenolic compounds: A review, *Current Research in Food Science*. 2021, **4**, 200 – 214.
26. AZMIR, J., ZAIDUL, I.S.M., RAHMAN, M.M, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*. 2013, **17** (4), 426 – 436.
27. SARIKAHYA, N.B., GOREN, A.C., KIRMIZIGUL S. Simultaneous determination of several flavonoids and phenolic compounds in nineteen different *Cephalaria* species by HPLC-MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019, **173**, 120 – 125.
28. SZKOP, M., SZKOP, U., KEŠZYCKA, P. et al. A Simple and Robust Protocol for fast RP-HPLC Determination of Salicylates in Foods, *Food Anal. Methods*. 2017, **10**, 618 – 625.
29. MARQUES, L.T., et al. Systematic evaluation of sample preparation for fractionation of phytohormone salicylic acid in fresh leaves, *Talanta*. 2020, **208**, Article 120352
30. ESKILSSON, C.S., BJÖRKLUND, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*. 2000, **902** (1), 227 – 250.
31. TIWARI B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **71**, 100 – 109.
32. KOŽUSZNIKOVÁ, Eliška. HPLC analýza přírodních derivátů kyseliny salicylové [online]. Brno, 2016 [cit. 2022-03-22]. Dostupné z:

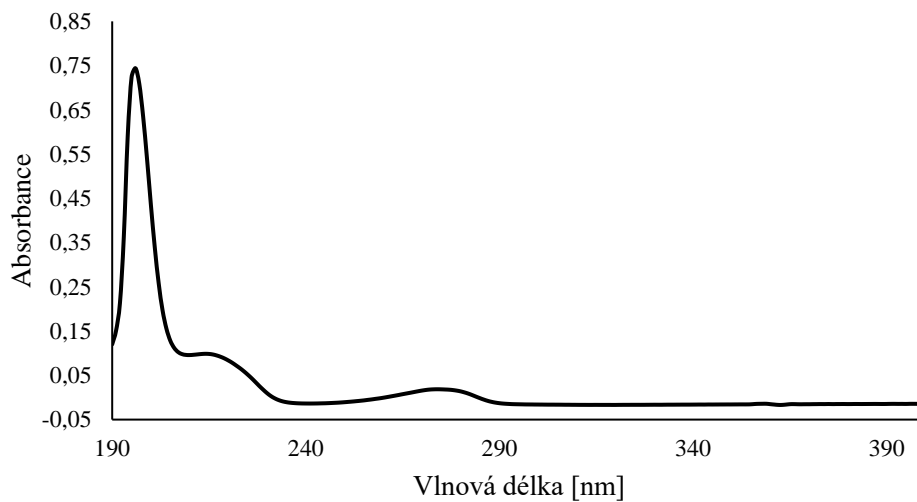
<https://is.muni.cz/th/vogq3/>. Diplomová práce. Masarykova univerzita,
Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Miroslava BITTOVÁ

Přílohy

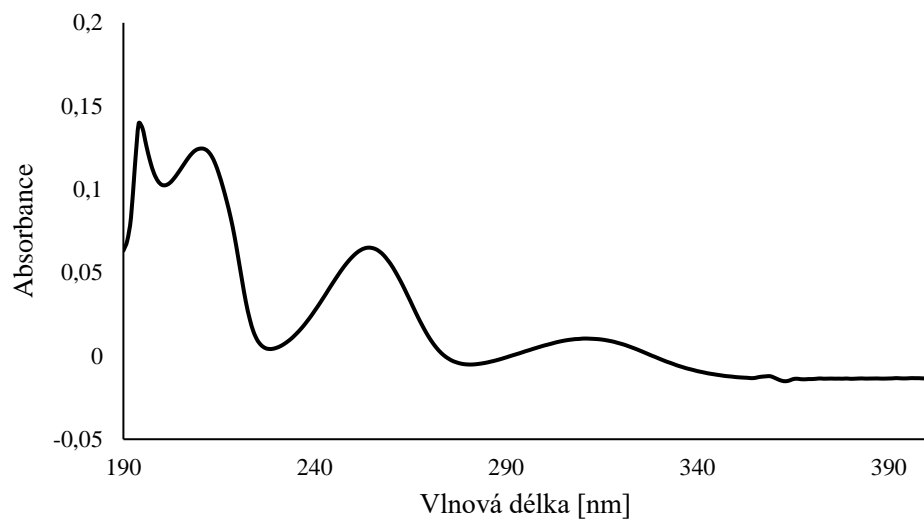
Absorpční spektra sledovaných analytů jsou uvedena na obr. 19 – 28.



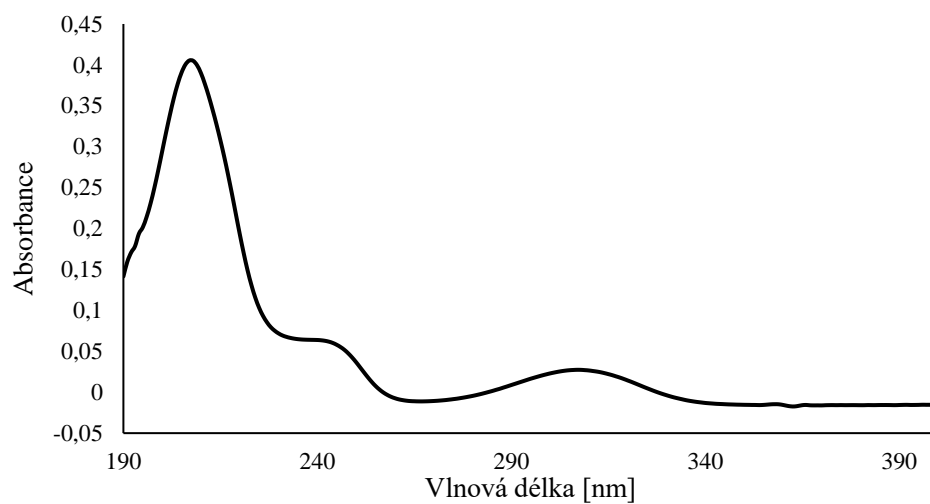
Obr. 19: Absorpční spektru kyseliny benzoové



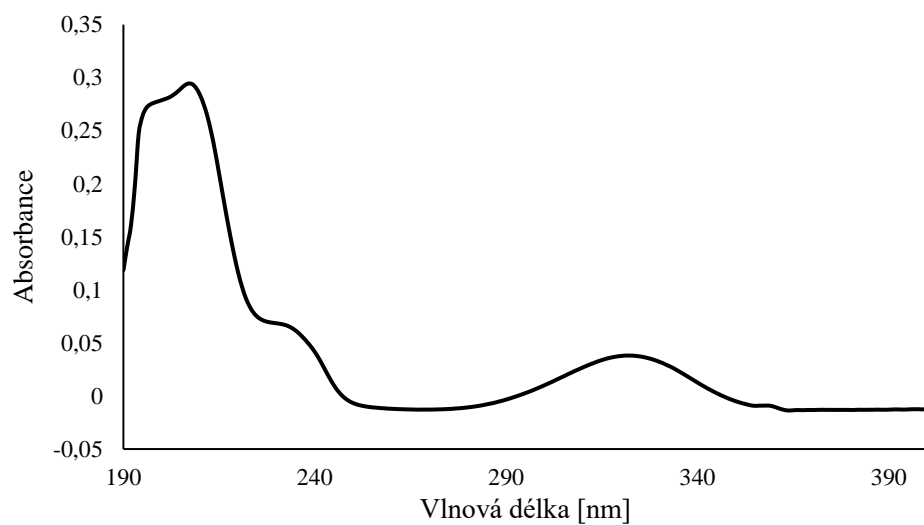
Obr. 20: Absorpční spektru saligeninu



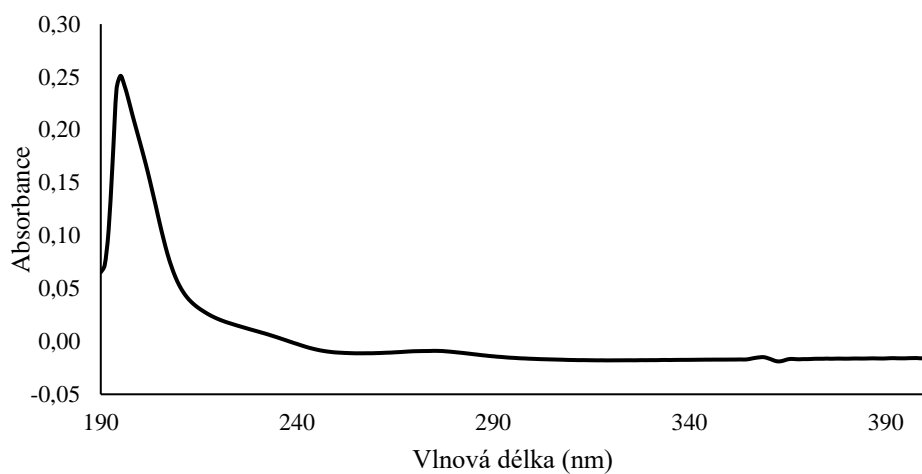
Obr. 21: Absorpční spektru helicineu



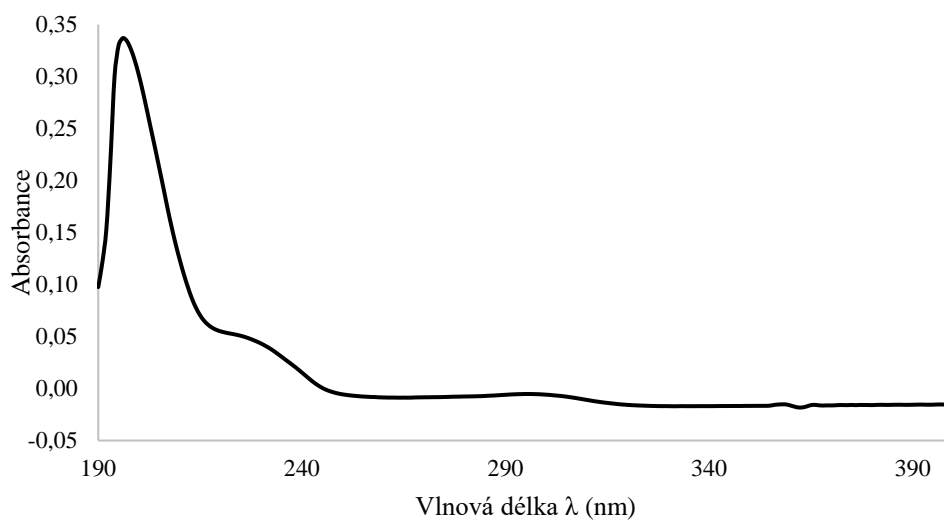
Obr. 22: Absorpční spektru kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové



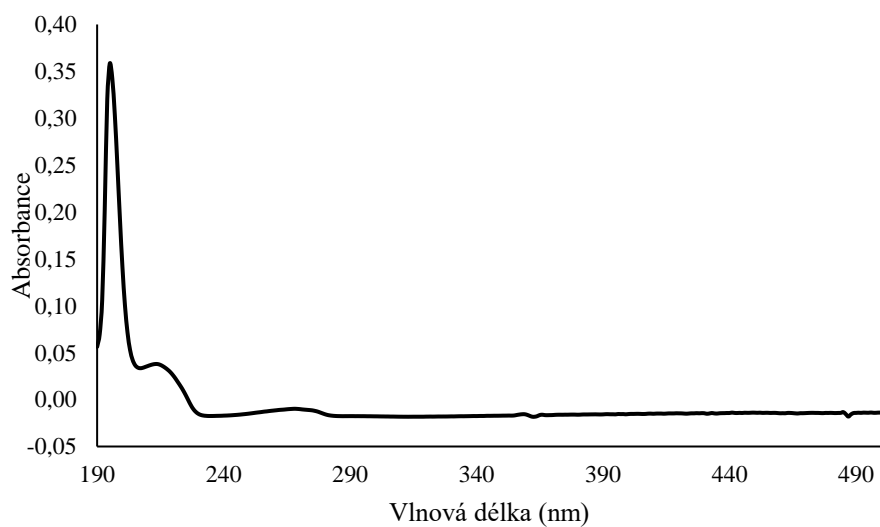
Obr. 23: Absorpční spektru kyseliny gentisové



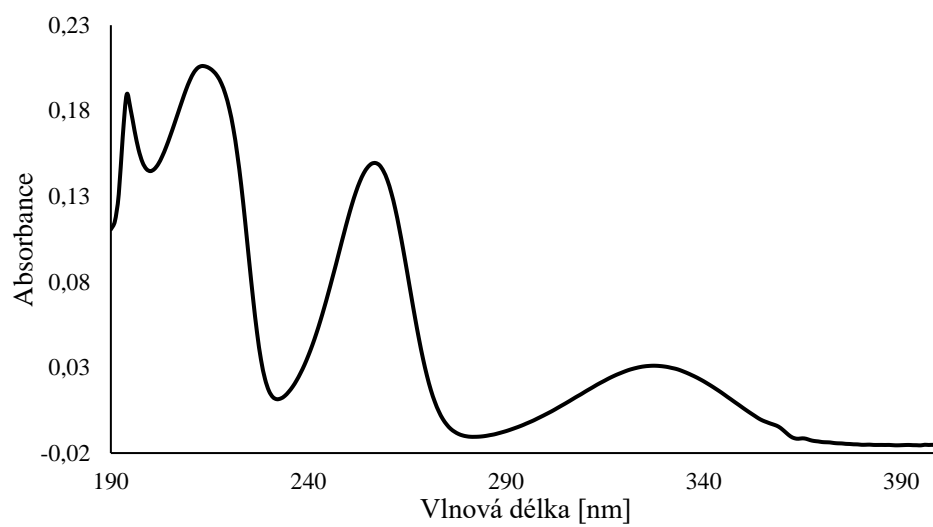
Obr. 24: Absorpční spektru 2-O- β -D-glukosidu kyseliny salicylové



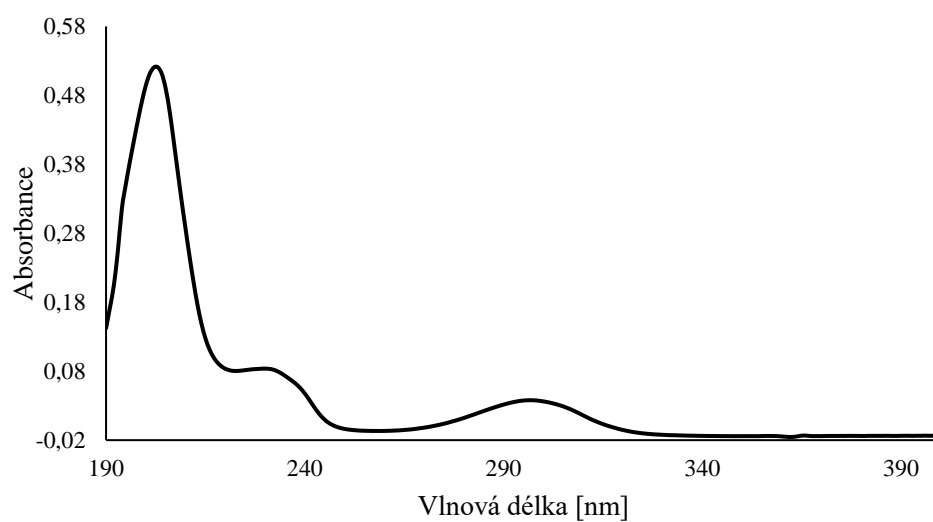
Obr. 25: Absorpční spektru kyseliny acetylsalicylové



Obr. 26: Absorpční spektru salicinu

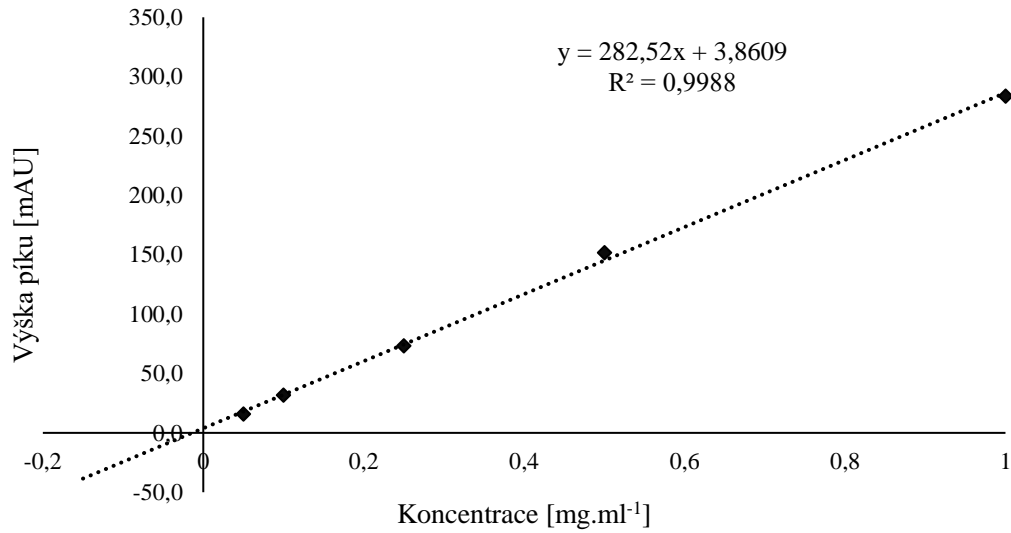


Obr. 27: Absorpční spektru salicylaldehydu

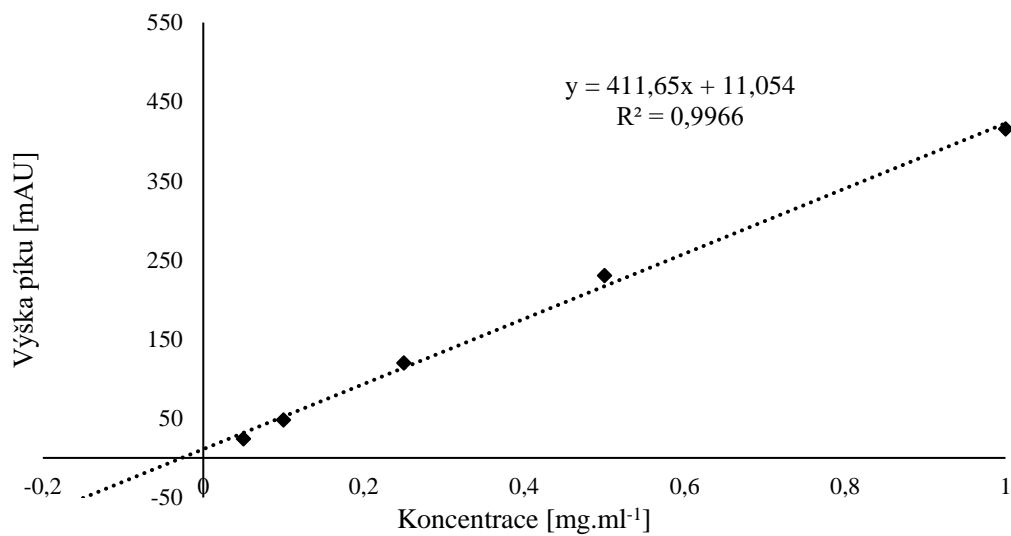


Obr. 28: Absorpční spektru kyseliny salicylové

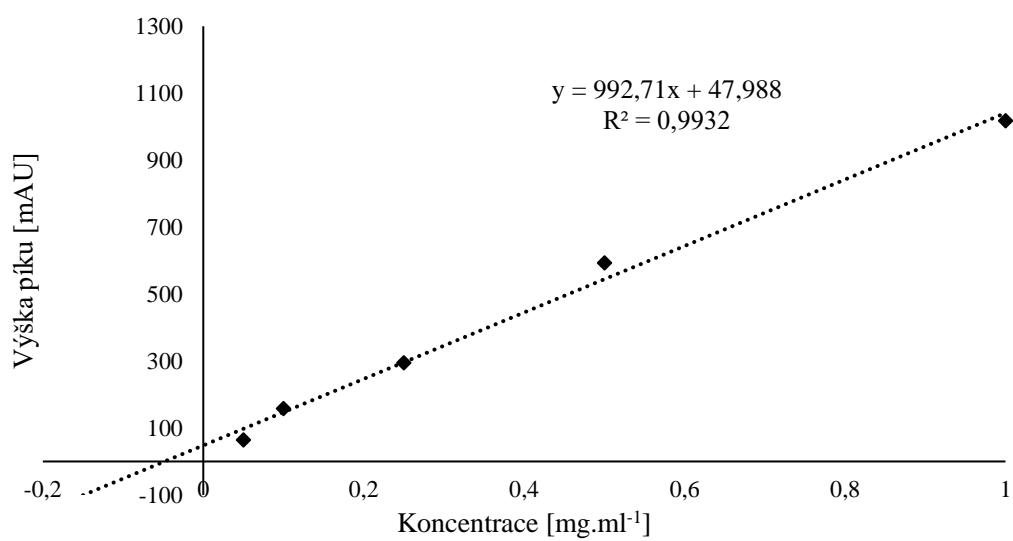
Lineární závislost výšky píku na koncentraci sledovaných analytů jsou uvedeny na Obr. 29 – 38



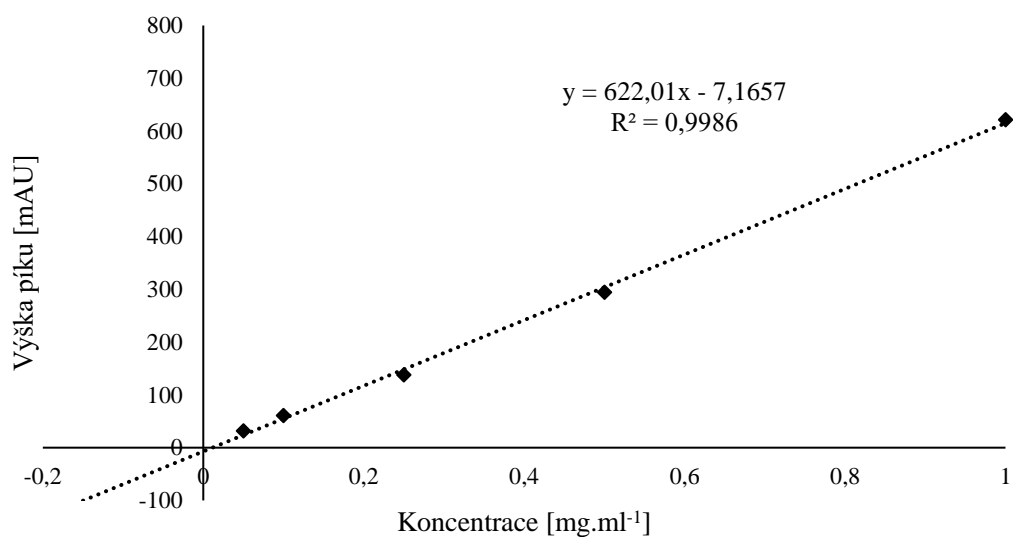
Obr. 29: Závislost výšky píku na koncentraci salicinu při 275 nm



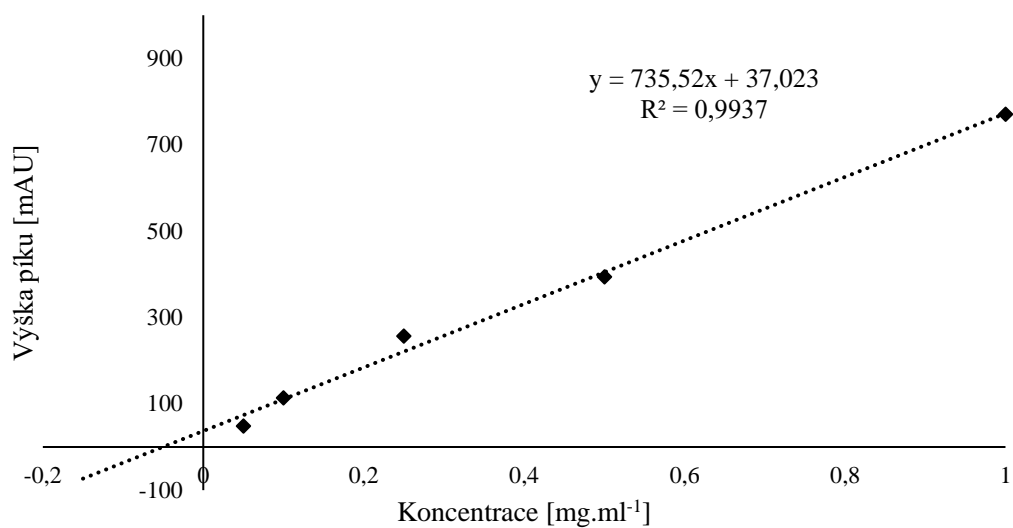
Obr. 30: Závislost výšky píku na koncentraci 2-O-β-D-glukosidu kyseliny salicylové při 275 nm



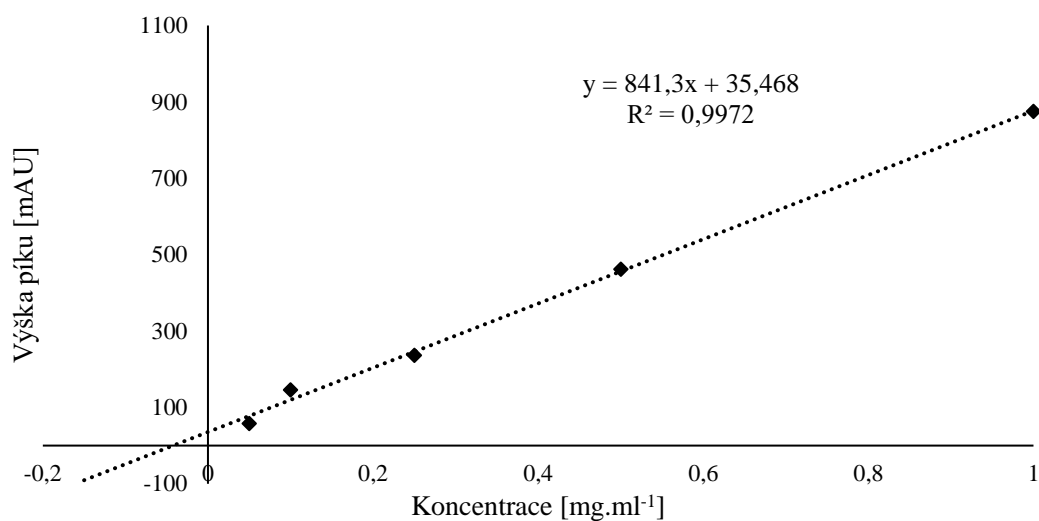
Obr. 31: Závislost výšky píku na koncentraci saligeninu při 275 nm



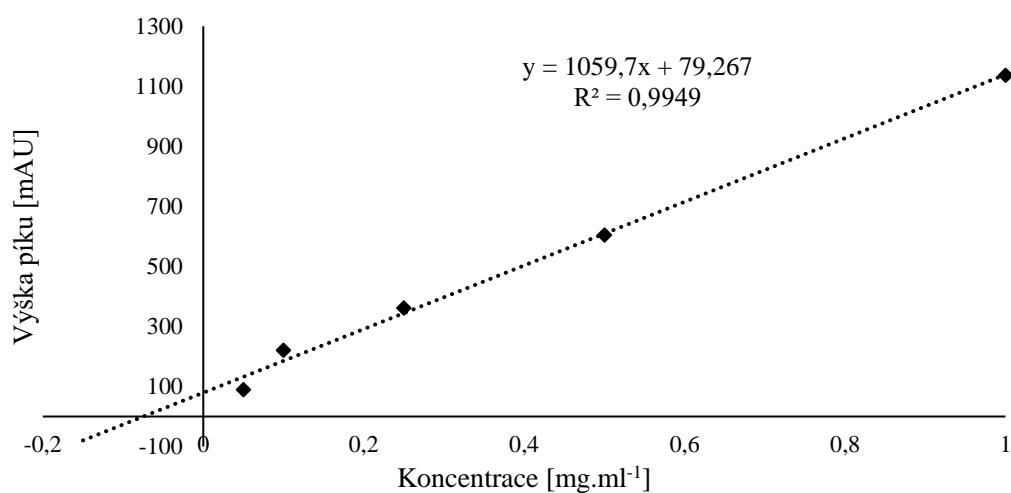
Obr. 32: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny acetylsalicylové při 275 nm



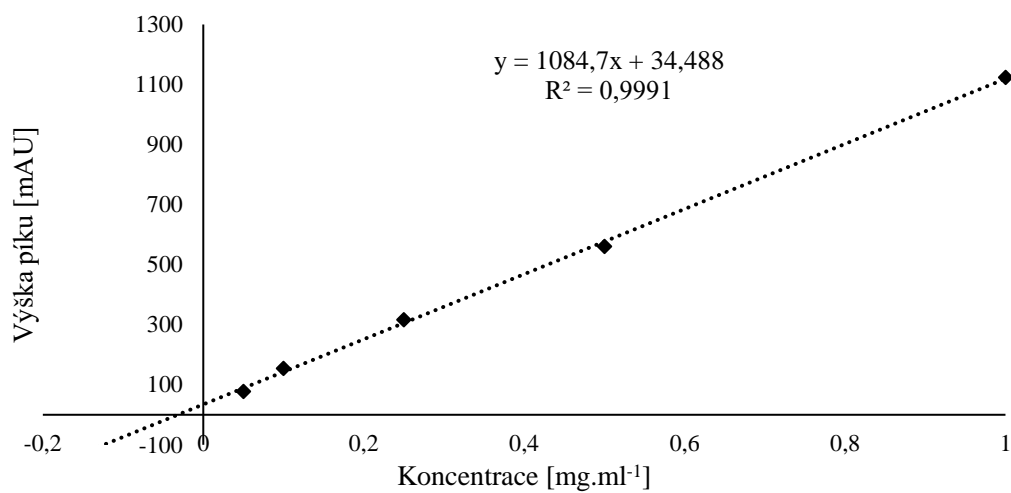
Obr. 33: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny benzoové při 275 nm



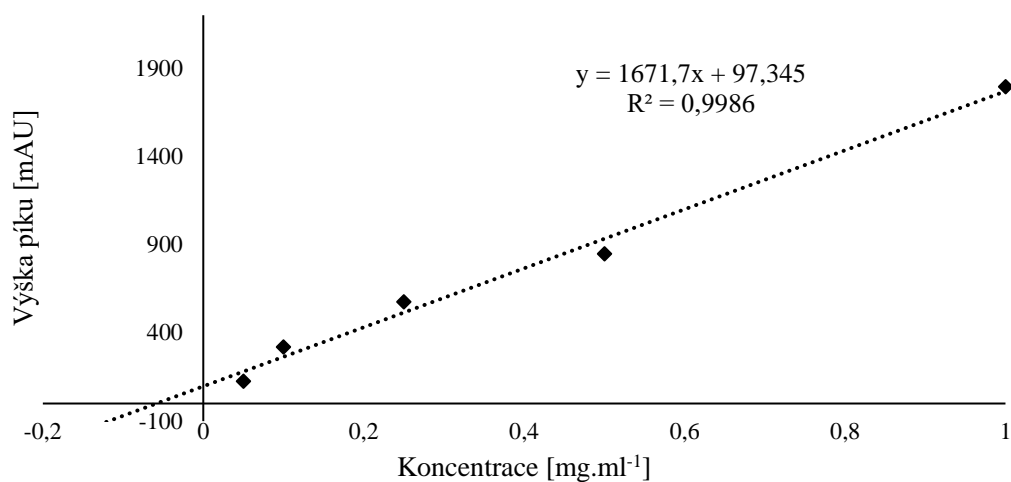
Obr. 34: Závislost výšky píku na koncentraci helicinu při 315 nm



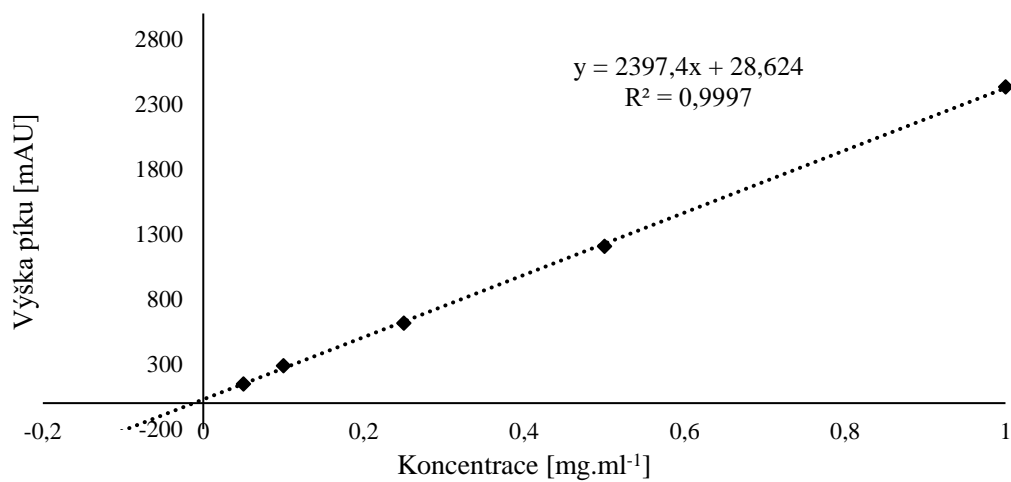
Obr. 35: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny gentisové při 315 nm



Obr. 36: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové při 315 nm



Obr. 37: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny salicylové při 315 nm



Obr. 38: Závislost výšky píku na koncentraci salicylaldehydu při 315 nm