

## METODIKA PRO STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ FENOLICKÝCH LÁTEK, FLAVONOIDŮ A ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY ROSTLINNÝCH VZORKŮ POMOCÍ KOMBINOVANÉ EXTRAKCE

VERONIKA BERKOVÁ<sup>a</sup>, LENKA ŠTĚPÁNKOVÁ<sup>a</sup>, PETR ČÍČMANEC<sup>a</sup>, LUCIE FREJLICOVÁ<sup>b</sup>  
a MIROSLAV BERKA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav molekulární biologie a radiobiologie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>b</sup> Mendeleum – ústav genetiky, Zahradnická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Valtická 334, 691 44 Lednice na Moravě, Česká republika  
veronika.berkova@mendelu.cz

Došlo 27.2.23, přijato 19.9.23.

Přestože existuje řada metodik pro stanovení základních antioxidačních parametrů u rostlin, spousta studií využívá oddělené extrakce pro jednotlivé typy stanovení. Cílem práce bylo blíže specifikovat metodiku, která umožňuje základní analýzu celkového množství fenolických látek, flavonoidů a celkové antioxidační kapacity z jednoho vzorku, přičemž pro minimalizaci spotřeby vzorku využívá destičkový formát. Popsaný extrakční postup a snížení spotřeby vzorku současně umožňuje provedení komplementárních analýz a bližší charakterizaci složení rostlinných vzorků. Výsledky lze využít pro následné cílené analýzy, což bylo demonstrováno na stanovení vybraných flavonoidů analýzou GC-MS, která potvrdila výsledky spektrofotometrického stanovení. Popsané využití kombinované extrakce pro analýzu rostlinných vzorků usnadňuje analýzy, snižuje množství výchozího materiálu a umožňuje následnou analýzu biomolekul např. pomocí hmotnostní spektrometrie.

**Klíčová slova:** antioxidační kapacita, fenolické sloučeniny, flavonoidy, reaktivní formy kyslíku, abiotický stres

### Úvod

Rostliny jakožto přisedlé organismy jsou vystavovány různým nepříznivým podmínkám prostředí, a to jak biotickým stresům (patogeny, býložravci), tak abiotickým stresovým faktorům (chlad, sucho, zasolení, toxicita kovů, nedostatek živin, mraz nebo zvýšená teplota). Jedním z klíčových znaků abiotického stresu na molekulární úrovni je produkce reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), které zahrnují např. peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singletový kyslík (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), hydroxylový radikál (<sup>•</sup>OH), superoxidový aniontový radikál (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (cit.<sup>1</sup>). V nízkých koncentracích mohou ROS hrát důležitou roli v signalizaci a vývoji rostlin<sup>2-4</sup>. Všechny zmíněné formy ROS jsou ovšem schopny reagovat s nukleovými kyselinami, proteiny a enzymy, případně s membránovými lipidy, což má za následek poškození buněk<sup>5</sup>. Proto je klíčové studium antioxidačního systému rostlin, který byl vyvinutý pro ochranu buněk a pletiv a k neutralizaci volných radikálů<sup>6</sup>.

Fenolické sloučeniny patří k nejpočetnější skupině sekundárních metabolitů s významnou antioxidační aktivitou účastníci se mnoha fyziologických procesů ovlivňujících růst a vývoj rostlin. Kromě zapojení do klíčení semen, tvorby fotosyntetických pigmentů, strukturální a ochranné

funkce buněčných stěn mohou fenolické látky rostlin působit také jako signální molekuly pro endosymbiotické organismy (např. mykorhizní houby)<sup>7-10</sup>. V rámci stresových podmínek jsou významné pro přirozenou obranu proti mikrobiálním patogenům, herbivorům nebo pro adaptaci vůči nepříznivým abiotickým podmínkám<sup>11-14</sup>.

Fenolické sloučeniny jsou složeny z aromatického jádra nesoucí jednu nebo více hydroxylových skupin, přičemž jejich výsledná struktura může být velmi rozmanitá. Rostlinné fenolické sloučeniny se rozdělují do několika tříd, mezi které patří fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany<sup>15</sup>. Největší skupinou rostlinných fenolů jsou flavonoidy zahrnující strukturální třídy jako flavonoly, flavony, flavanoly, flavanony, antokyanidy, chalkony nebo isoflavony<sup>16</sup>. Flavonoidy mají společnou základní strukturu skeletu C6-C3-C6 sestávající se ze dvou aromatických kruhů a heterocyklického kruhu obsahující jeden atom kyslíku. Chemická struktura flavonoidů a dalších rostlinných polyfenolů je významná pro vychytávání volných radikálů a jejich antioxidační vlastnosti zahrnují chelataci kovových iontů, regeneraci antioxidačních sloučenin (např. α-tokoferolu), aktivaci antioxidačních enzymů anebo inhibici tvorby enzymů produkujících radikály.

Charakterizace antioxidantů a fenolických sloučenin je zásadní nejen pro oblast výzkumu rostlin, ale i pro výživu člověka. Vzhledem k velké rozmanitosti jsou fenolické sloučeniny jako markery oxidačního stresu určovány různými metodikami, které závisí na odbornosti každé laboratoře. K identifikaci a kvantifikaci mohou být využity pokročilé analytické techniky včetně vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s UV/Vis detektorem nebo detektorem diodového pole<sup>17</sup>. Pro individuální separaci a kvantifikaci se často používá rovněž kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (LC-MS)<sup>18</sup>. Pro detekci částí fenolických sloučenin lze také využít plynovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)<sup>19</sup>. Tyto techniky mohou být využity pro přesné, citlivé a selektivní stanovení sloučenin v rostlinných vzorcích, nicméně vyžadují poměrně sofistikované přístrojové vybavení a nákladnou údržbu.

Rovněž je možné provést spektrometrické stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC), celkového obsahu fenolických sloučenin (TPC) a flavonoidů (TFC), které využívají cenově dostupná činidla a přístrojové vybavení<sup>20</sup>. Stanovení celkového množství fenolických látek, flavonoidů nebo celkové stanovení antioxidační kapacity patří již několik desítek let mezi zavedené metody pro analýzu rostlinného materiálu vystaveného abiotickým nebo biotickým stresovým podmínkám. Přestože se jedná o rutinní analýzy, využívá spousta studií oddělené extrakce pro jednotlivé typy stanovení<sup>13,21</sup>. Tato skutečnost může být limitující pro analýzy s omezeným množstvím vzorku (např. analýza klíčících rostlin, určitého vývojového stádia listů). Nezávislé extrakce mohou být také časově náročnější a nemusí být lehce reprodukovatelné. V posledních letech je snaha optimalizovat extrakční postupy pro získání různých typů biomolekul z jednoho vzorku, což mnohdy urychluje a umožňuje práci s menším množstvím materiálu. Příkladem jsou studie popisující kombinovanou extrakci pro přípravu vzorků pro hmotnostní spektrometrii<sup>22,23</sup> nebo kombinovanou extrakci pro spektrofotometrickou analýzu různorodých látek<sup>20</sup>. Uvedené studie umožňují analýzy rozdílných látek a přináší velké množství výhod, nicméně mají i své nevýhody. Cílem práce bylo rozšířit metodiku pro rychlou a základní analýzu antioxidačních markerů, která v následných krocích umožňuje stanovení proteinů a metabolitů metodou hmotnostní spektrometrie. Na závěr byly výsledky srovnány s výsledky stanovení vybraných flavonoidů pomocí GC-MS analýzy.

## Experimentální část

### Reagencie

Ke stanovení byly použity standardy rutinu ( $C_{27}H_{30}O_{16}$ ) čistoty  $\geq 94\%$ , gallové kyseliny ( $C_7H_6O_5$ )  $\geq 99\%$  a askorbové kyseliny ( $C_6H_8O_6$ )  $\geq 99\%$  (Merck, Německo). Ze standardů byly připraveny zásobní roztoky, ze

kterých byly připraveny pětibodové kalibrační křivky v následujících intervalech koncentrací: 0,0625–1 mM pro rutin, 0,375–6 mM pro gallovou kyselinu a 0,125–2 mM pro askorbovou kyselinu. Chemikálie pro extrakci: methyl-*tert*-butyl ether (MTBE;  $C_5H_{12}O$ ) čistoty  $\geq 99,8\%$  (Merck, Německo), aceton ( $C_3H_6O$ ) čistoty  $\geq 99,8\%$ , (HiPerSolv CHROMANORM® pro HPLC; VWR Chemicals) a methanol ( $CH_3OH$ ) čistoty  $\geq 99,9\%$  (HiPerSolv CHROMANORM® pro LC-MS; VWR Chemicals). Chemikálie pro stanovení fenolických látek: Folinovo fenolické činidlo a uhličitan sodný ( $Na_2CO_3$ ) čistoty  $\geq 99,5\%$  (Merck, Německo). Chemikálie pro stanovení flavonoidů: dusitan sodný ( $NaNO_2$ ) čistoty  $\geq 97,0\%$ , chlorid hlinitý ( $AlCl_3$ ) čistoty  $\geq 98\%$  (Merck, Německo) a hydroxid sodný ( $NaOH$ ) čistota p.a. (Penta, Česká republika). Chemikálie pro stanovení antioxidační kapacity: fosforečnan sodný ( $Na_3PO_4$ ) čistoty  $\geq 96\%$ , heptamolybdenan amonný ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ ) čistoty  $\geq 99\%$  a kyselina sírová ( $H_2SO_4$ ) 96 % čistota p.a. (Penta, Česká republika). Chemikálie pro GC-MS analýzu: pyridin ( $C_5H_5N$ ) čistoty  $\geq 99,8\%$ , *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid ( $CF_3CON(CH_3)Si(CH_3)_3$ ) čistoty  $\geq 98,5\%$ , methoxyamin hydrochlorid ( $CH_3ONH_2 \cdot HCl$ ) čistoty  $\geq 97,5\%$  (Merck, Německo). Pro extrakci, přípravu roztoků a následná stanovení byla použita čistá voda splňující požadavky pro měření na hmotnostním spektrometru (HiPerSolv CHROMANORM® pro LC-MS; VWR Chemicals).

### Přístrojové vybavení

Pro homogenizaci byl využit kulový mlýn Retsch Mixer Mill MM 400 umožňující účinnou homogenizaci rostlinných pletiv. ThermoMixer comfort (Eppendorf) s adaptéry pro zkumavky a jamkovou destičku sloužil pro inkubace a promíchávání vzorků. Spektrofotometrické stanovení probíhalo na destičkovém spektrofotometru Tecan, Infinite® M1000 Pro s využitím polystyrenových průhledných 96jamkových destiček s plochým dnem a maximálním objemem 350  $\mu$ l (VWR® 96 well plate, VWR). Pro odpaření vzorků byl využit vakuový koncentrátor (Speed-Vac system; Thermo Fisher, USA). Výsledky ze spektrofotometrického měření byly následně doplněny pomocí měření na plynovém chromatografu Trace 1300 Gas chromatograph (Thermo Fisher, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Q Exactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS (Thermo Fisher, USA).

### Kultivace rostlin a příprava materiálu

K experimentu byly použity rostliny jahodníku (*Fragaria vesca*) odrůdy Rujana. Vitální a plně vyvinuté jahodníky (3 měsíce od vysazení) byly kultivovány v experimentálních boxech v polních podmínkách. Jeden box s rostlinami byl vystaven abiotickému stresu, a to stresu ze sucha. Rostliny ve druhém boxu byly kultivovány s pravidelnou závlivkou. Týden po působení stresu byly listy sesbírány do tekutého dusíku a lyofilizovány. Násled-

ně byly vzorky homogenizovány v kulovém mlýnu (Retsch Mixer Mill MM 400) a z homogenní směsi listových vzorků bylo naváženo 10 mg pro následnou analýzu.

#### Extrakce metabolitů

Metabolity byly extrahovány přidáním 1 ml vychlazené směsi MTBE a methanolu (3:1, v/v) a inkubovány na ThermoMixer comfort (Eppendorf) při 4 °C, 90 min, 1000 rpm. Po celou dobu extrakce byly vzorky uchovávány na ledu nebo při 4 °C. Vzorky byly následně centrifugovány (10 min, 12 000 g, 4 °C) a po centrifugaci byl odebrán supernatant do nové zkumavky. K peletu (sedimentu) bylo následně přidáno 500 µl vychlazeného methanolu, vzorky byly protřepány a následně centrifugovány (10 min, 12 000 g, 4 °C). Supernatant byl odebrán a přidán k předchozímu supernatantu. K peletu může být přidána směs vody a acetonu (2:8, v/v) a vzorky lze uložit při teplotě –80 °C pro případnou extrakci proteinů. Ze supernatantu bylo odebráno 600 µl a pro rozdělení metabolitů na polární a nepolární frakci bylo přidáno 150 µl MTBE a 450 µl vody. Vzorky byly důkladně promíchány (Retsch Mixer Mill MM 400, 60 s, 30 Hz) a centrifugovány (10 min, 12 000 g, 4 °C). Centrifugace rozdělila vzorky na nepolární a polární frakci (spodní fáze). Pro spektrometrické stanovení a GC-MS analýzu bylo dle použité metody odebráno odpovídající množství polární fáze.

#### Stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin (TPC)

Do jamek 96jamkové destičky bylo nanášeno 5 µl supernatantu vzorku nebo standardu. Pro určení pozadí byla místo vzorku nanášena voda. Následně bylo přidáno 12,5 µl Folinova fenolického činidla (FCR) a 150 µl vody. Připravená směs byla inkubována při 20 °C po dobu 10 min, a poté bylo do připravených roztoků pipetováno 37,5 µl 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Destička byla nejprve inkubována a promíchávána ve tmě 2,5 min při 45 °C a 300 ot./min (ThermoMixer). Ke vzorkům bylo poté přidáno 45 µl vody a destička byla následně inkubována při 25 °C po dobu 60 min (opět bez přístupu světla). Následně byla změřena absorbance při 760 nm.

#### Stanovení celkového obsahu flavonoidů (TFC)

Do 96jamkové destičky bylo napipetováno 10 µl odebraného supernatantu vzorku nebo standardu. Pro určení pozadí byla místo vzorku nanášena voda. Následně bylo přidáno 115 µl vody a 7,5 µl 5% NaNO<sub>2</sub> a směs byla inkubována 5 min při 300 ot./min (ThermoMixer). Poté bylo přidáno 7,5 µl 10% AlCl<sub>3</sub> (vodný roztok) a směs opět inkubována 5 min při 300 ot./min (ThermoMixer). Po dalších pěti minutách bylo přidáno 50 µl 1M NaOH. Reakční směs byla promíchána 15 min při 300 ot./min (ThermoMixer). Následně byla měřena absorbance pomocí destičkového spektrofotometru při 510 nm.

#### Stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC)

Nejprve bylo připraveno reakční činidlo (28mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 4mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 3,2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Do 0,5 ml zkumavek bylo nanášeno 20 µl supernatantu vzorku nebo standardu a 200 µl roztoku výše uvedeného reakčního činidla. Pro určení pozadí byla místo vzorku nanášena voda. Směs byla promíchána a inkubována při 95 °C po dobu 90 min (ThermoMixer). Po ochlazení na teplotu místnosti bylo pipetováno po 200 µl reakční směsi na spektrofotometrickou destičku. Poté byla změřena absorbance při 695 nm.

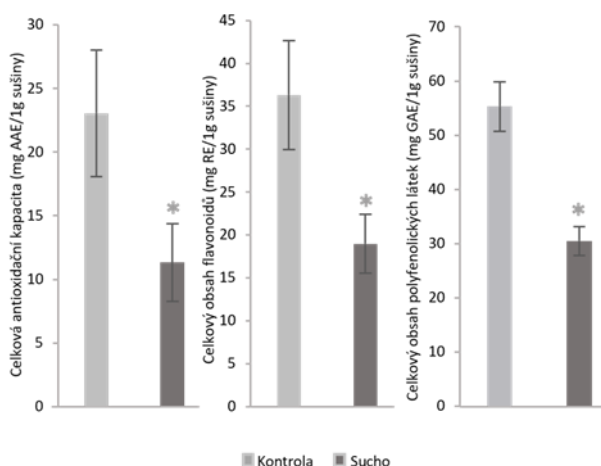
#### Stanovení vybraných metabolitů metodou GC-MS

Vybrané metabolity byly stanoveny dle dříve publikovaných studií<sup>24,25</sup>. Ze vzorků byly odebrány alikvoty o objemu 100 µl, které byly následně odpařeny (Speed-Vac system; Thermo Fisher) a derivatizovány 20 µl methoximačnického roztoku (40 mg methoxyamin hydrochloridu v 1 ml pyridinu) a inkubovány po dobu 90 min při 30 °C za neustálého třepání (800 ot./min ThermoMixer). Po inkubaci bylo přidáno 80 µl silylačního roztoku (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid) a směs byla inkubována po dobu 30 min při 37 °C za stálého třepání (800 ot./min ThermoMixer). Derivatizované vzorky o objemu 1 µl byly nastříknuty pomocí TriPlus RSH autosampleru (Thermo Fisher, USA) na kolonu TG-5SILMS GC column (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Thermo Fisher USA) a separovány pomocí 28minutového teplotního gradientu (70–320 °C) a ionizovány elektronovou ionizací (energie elektronů 70 eV, emisní proud 50 µA, teplota iontového zdroje 250 °C). Hmotnostní spektrometr operoval s rozlišením 60 000 a hmotnostním rozsahem 50–600 *m/z*. Data byla analyzována programem Skyline19.3 (cit.<sup>26</sup>) a na základě srovnání s jednotlivými standardy.

## Výsledky a diskuse

Pro ověření využitelnosti specifikované metodiky byl využit rostlinný materiál vystavený abiotickému stresu, což umožnilo ověření této metodiky přímo v praxi. Pro testování byly zvoleny rostliny jahodníku, které se vyznačují mělkou kořenovou strukturou a velkou listovou plochou vyžadující značné množství vody. Z tohoto důvodu byly rostliny vystaveny suchu, jelikož nedostatek vody v důsledku sucha je závažným environmentálním faktorem limitujícím vývoj a produkci rostlin.

Ze stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin a celkové antioxidační kapacity je patrné, že vystavení rostlin intenzivnímu nedostatku vody vede k významnému snížení obou parametrů (obr. 1). Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které ukazují, že dlouhodobý a nepřetržitý stres ze sucha inhibuje celkovou syntézu fenolických sloučenin jak v listech, tak kořenech. Kromě inhibice růstu rostlin dochází také k poklesu foto-



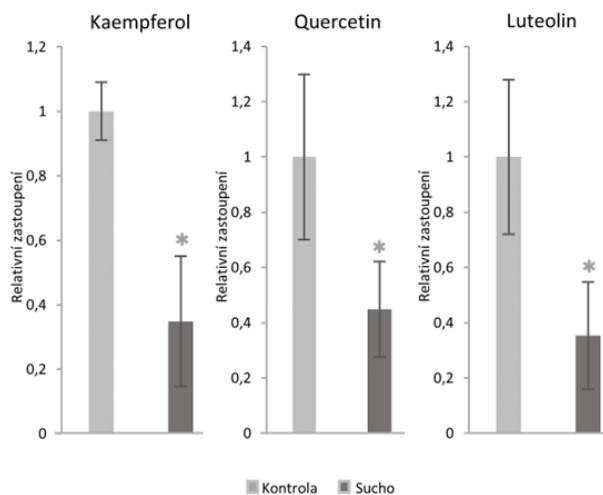
Obr. 1. Stanovení celkové antioxidační kapacity, fenolických látek a flavonoidů rostlin jahod vystavených stresu ze sucha. Světle šedé sloupce reprezentují kontrolní vzorky listů jahod a tmavě šedé sloupce označují listy jahod vystavených suchu. Hodnoty jsou vyjádřeny v ekvivalentech askorbové kyseliny (AAE), rutinu (RE) a gallové kyseliny (GAE). Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku měření ( $n=3$ ). Hvězdička označuje statisticky významnou odchylku ( $P < 0,05$ , t-test)

syntetických pigmentů, ovlivnění rychlosti transpirace, uzavírání průduchů, narušení iontové rovnováhy nebo redukci fotosyntézy<sup>27,28</sup>. Obsah fenolických látek přímo souvisí se schopností vychytávat volné radikály, což následně umožňuje provést lineární korelaci s antioxidační kapacitou<sup>29</sup>. Z tohoto důvodu bylo významné rovněž hodnocení antioxidační kapacity. Ukázalo se přibližně 50% snížení celkové antioxidační kapacity a celkového množství fenolických látek v porovnání s rostlinami rostoucími za standardních podmínek, což naznačuje, že rostliny byly efektivně vystaveny stresovým podmínkám. Stejný trend jako u fenolických sloučenin a antioxidační kapacity byl pozorován taktéž u flavonoidů (obr. 2), kdy opět došlo k jejich významnému poklesu v reakci na suchu. Tyto výsledky opět odpovídají předchozím studiím<sup>30</sup>. Uvedené analýzy dokazují funkčnost uvedené metodiky umožňující stanovení TCP, TFC a TAC z jednoho vzorku v destičkovém formátu (obr. 3).

Nutno podotknout, že řada autorů ve svých studiích prokázala, že produkce fenolických látek v rostlinných pletivech i za abiotických stresových podmínek může narůstat<sup>31,32</sup>. Nesrovnalosti ve výsledcích lze přičíst především rozdílům v intenzitě působení stresu, době jeho trvání, vývojové fázi rostlin, případně samotnému typu abiotického stresu. Pomocí uvedené metody lze tyto procesy velmi efektivně sledovat v závislosti na čase a určit závislost mezi mírou stresu a reakcí rostlin. Metodika navíc výrazně usnadňuje manipulaci se vzorky, což umožňuje zpracování velkého množství vzorků v krátkém časovém intervalu. Během extrakce jsou rovněž extrahovány nepo-

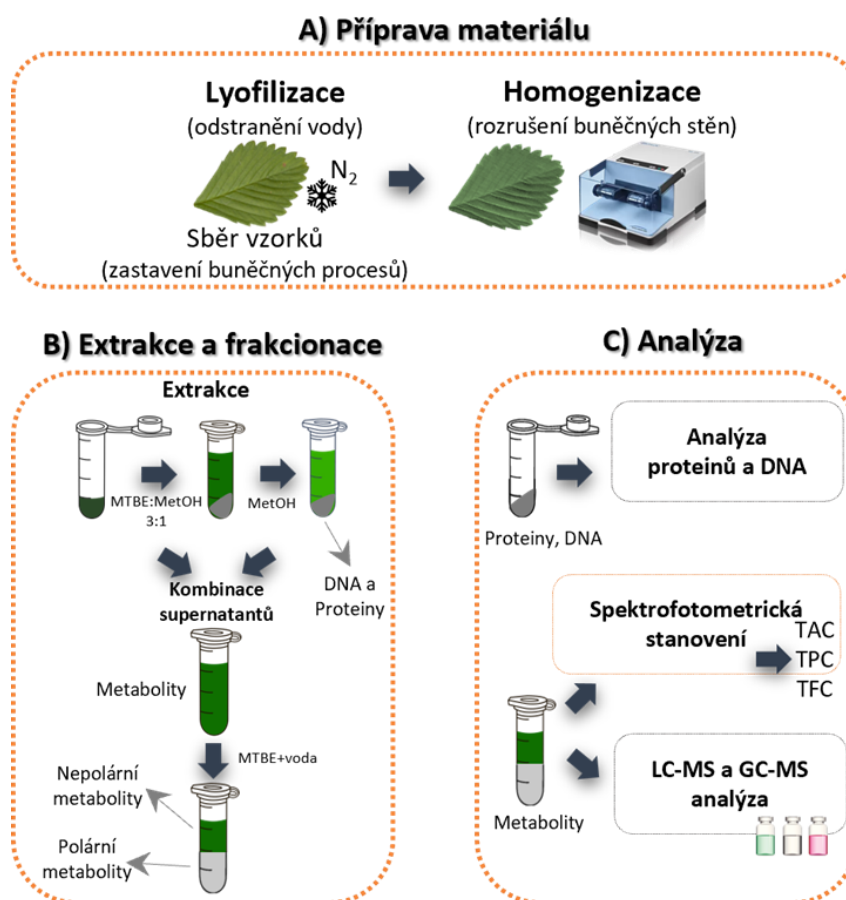
lární metabolity pomocí MTBE, například mastné kyseliny, lipidy a mimo jiné i fotosyntetické pigmenty, které lze stanovit spektrofotometricky. Dříve publikovaná studie<sup>23</sup> je rovněž založena na extrakci metabolitů pomocí směsi MTBE a methanolu. Tato metodika ovšem nevyužívá kombinaci obou supernatantů, což vede ke ztrátám části polárních metabolitů, jakými jsou např. antokyany. Při kombinaci obou extrakčních kroků a následném okyselení části polární frakce je možné stanovit i antokyany. V průběhu optimalizace byla taktéž testována možnost stanovení malondialdehydu, které ovšem při uvedeném extrakčním postupu nebylo proveditelné.

Při použití extrakčních činidel vyšší čistoty umožňuje uvedená metoda následnou analýzu metabolitů kapalinou nebo plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Metodu lze tudíž použít jako prvotní analýzu neznámých vzorků, která pomůže nastínit, zda v analyzovaných vzorcích dochází k významným změnám sekundárních látek (obr. 3). Kromě toho napomůže určit, zda má význam provádět cenově náročné analýzy využívající hmotnostní spektrometrii. Výsledky spektrofotometrických stanovení a kompatibilita extrakce byly ověřeny stanovením vybraných flavonoidů metodou GC-MS (obr. 2). Kaempferol a quercetin patří mezi nejvíce zastoupené flavonoidy v listech jahod<sup>33</sup>. Získané výsledky ukazují významný pokles kaempferolu a quercetinu u listů jahod vystavených suchu a shodují se se spektrofotometrickým stanovením celkových flavonoidů. Uvedená metoda navíc umožňuje současnou analýzu proteinů případně i nukleových kyselin<sup>34</sup>, jelikož při použití methanolu dochází k jejich srážení (obr. 3).



Obr. 2. Vliv sucha na zastoupení flavonoidů v listech jahod. Světle šedé sloupce reprezentují kontrolní vzorky listů jahod a tmavě šedé sloupce označují listy jahod vystavených suchu. Chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku měření ( $n=3$ ). Hvězdička označuje statisticky významnou odchylku ( $P < 0,05$ , t-test)





Obr. 3. Schématické zobrazení kombinované extrakce a přípravy vzorků pro spektrofotometrické stanovení sekundárních metabolitů a následné komplementární analýzy

Uvedená metodika výrazně snižuje množství použitého vzorku oproti dříve publikovaným metodám. Příkladem je jedna z nejcitovanějších studií<sup>35</sup>, která stanovuje celkové množství fenolických látek, flavonoidů a antioxidační kapacitu. Pro extrakci látek využili autoři studie methanol, ale ve srovnání s námi použitou metodou používali velké navážky rostlinných vzorků (až 70 g) a extrakty následně zakoncentrovali, což komplikuje analýzy. Následně pro stanovení jednotlivých parametrů využívali velké množství vzorku a činidel, což výrazně zvyšuje cenovou náročnost analýz oproti námi použité metodice. Destičkový formát navíc výrazně šetří čas a omezuje nutnost stálého otevírání a zavírání zkumavek při přidávání jednotlivých složek směsi. V porovnání s další často citovanou studií<sup>36</sup> je v rámci uvedené metodiky použito 100krát méně vzorku a 200krát méně FC činidla. Při sledování efektu stresu na rostliny je množství materiálu limitní, proto většina studií používá již menší navážky vzorků a objemy reakčních směsí<sup>30,37</sup>. Uvedené metody ovšem v rámci extrakce nevyužívají kombinaci polárního a nepolárního rozpouštědla a pro stanovení chlorofylu musí provádět novou ex-

trakci. V rámci naší metodiky je ovšem získána rovněž nepolární frakce, kterou lze využít pro stanovení chlorofylů případně karotenoidů dle zavedených protokolů.

### Závěr

Kombinovanou extrakci lze využít pro následné stanovení celkového množství fenolických látek, flavonoidů a celkové antioxidační kapacity z jednoho vzorku. Využití destičkového formátu umožňuje nahrazení jednotlivých extrakčních kroků, usnadňuje manipulaci se vzorky, čímž výrazně snižuje časovou náročnost analýz. Jednou z dalších výhod je možnost stanovení fotosyntetických pigmentů, karotenoidů nebo antokyanů. Metodika navíc využívá extrakční činidla, která umožňují analýzu polárních a nepolárních látek hmotnostní spektrometrií. Zvolením vhodného extrakčního roztoku je dále získán pelet, který obsahuje proteiny a nukleové kyseliny, které lze využít pro další analýzy.

Tento výstup vznikl za podpory projektu Interní grantová schémata Mendelovy univerzity v Brně, reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/19\_073/0016670, financovaného z ESF.

## Seznam zkratk

FCR	Folinovo fenolické činidlo (Folin-Ciocalteu reagent)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
TAC	celková antioxidační kapacita (total antioxidant capacity)
TFC	celkový obsah flavonoidů (total flavonoid content)
TPC	celkový obsah fenolických sloučenin (total phenol content)

## LITERATURA

- Mittler R.: Trends Plant Sci. 22, 11 (2017).
- Černý M., Habánová H., Berka M., Luklová M., Brzobohatý B.: Int. J. Mol. Sci. 19, 2812 (2018).
- Dufková H., Berka M., Luklová M., Rashotte A. M., Brzobohatý B., Černý M.: Molecules 24, 4270 (2019).
- Berka M., Luklová M., Dufková H., Berková V., Novák J., Saiz-Fernández I., Rashotte A. M., Brzobohatý B., Černý M.: Front. Plant Sci. 11, 590337 (2020).
- Fujita M., Hasanuzzaman M.: Antioxidants 11, 925 (2022).
- Dumanović J., Nepovimova E., Natić M., Kuča K., Jačević V.: Front. Plant Sci. 11, 552969 (2021).
- Xu M., Rao J., Chen B.: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 60, 740 (2020).
- Falcioni R., Moriwaki T., de Oliveira D. M., Andreotti G. C., de Souza L. A., Dos Santos W. D., Bonato C. M., Antunes W. C.: Front. Plant Sci. 9, 1391 (2018).
- Sarmiento-López L. G., López-Meyer M., Sepúlveda-Jiménez G., Cárdenas L., Rodríguez-Monroy M.: Biocatal. Agric. Biotechnol. 31, 101889 (2021).
- Tanase C., Bujor O.-C., Popa V. I., v knize: Polyphenols in Plants (Watson R. R., ed.), kap. 3, str. 45. Academic Press, London 2019.
- Zaynab M., Fatima M., Abbas S., Sharif Y., Umair M., Zafar M. H., Bahadar K.: Microb. Pathog. 124, 198 (2018).
- Singh A. K., Dhanapal S., Yadav B. S.: Mol. Biol. Rep. 47, 1459 (2020).
- Ahmed U., Rao M. J., Qi C., Xie Q., Noushahi H. A., Yaseen M., Shi X., Zheng B.: Molecules 26, 5546 (2021).
- Hampejšová R., Berka M., Berková V., Jersáková J., Domkářová J., von Rundstedt F., Frary A., Saiz-Fernández I., Brzobohatý B., Černý M.: Front. Plant Sci. 13, 2295 (2022).
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L.: Am. J. Clin. Nutr. 79, 727 (2004).
- Shen N., Wang T., Gan Q., Liu S., Wang L., Jin B.: Food Chem. 383, 132531 (2022).
- Ziani B. E. C., Heleno S. A., Bachari K., Dias M. I., Alves M. J., Barros L., Ferreira I. C. F. R.: Food Res. Int. 116, 312 (2019).
- López-Fernández O., Domínguez R., Pateiro M., Munekata P. E. S., Rocchetti G., Lorenzo J. M.: Antioxidants 9, 479 (2020).
- Cerny M., Berka M., Dvořák M., Milenković I., Saiz-Fernández I., Brzobohatý B., Ďurkovič J.: Front. Plant Sci. 13, 1018272 (2022).
- López-Hidalgo C., Meijón M., Lamelas L., Valledor L.: Plant, Cell Environ. 44, 1977 (2021).
- Ma D., Sun D., Wang C., Li Y., Guo, T.: Plant Physiol. Biochem. 80, 60 (2014).
- Valledor L., Escandón M., Meijón M., Nukarinen E., Cañal M. J., Weckwerth W.: Plant J. 79, 173 (2014).
- Salem M. A., Yoshida T., de Souza L., Alseekh S., Bajdzienko K., Fernie A. R., Giavalisco P.: Plant J. 103, 1614 (2020).
- Berková V. a 11 spoluautorů: Int. J. Mol. Sci. 24, 5454 (2023).
- Berková V. a 11 spoluautorů: Plants 11, 2931 (2022).
- Pino L. K., Searle B. C., Bollinger J. G., Nunn B., MacLean B., MacCoss M. J.: Mass Spectrom. Rev. 39, 229 (2020).
- Abid G. a 11 spoluautorů: Plant Biosyst. 155, 797 (2021).
- Mansour E., Desoky E.-S. M., Ali M. M. A., Abdul-Hamid M. I., Ullah H., Attia A., Datta A.: Agric. Water Manage. 247, 106754 (2021).
- Gharibi S., Tabatabaei B. E. S., Saeidi G., Goli S. A. H.: Appl. Biochem. Biotechnol. 178, 796 (2016).
- Shin Y. K., Bhandari S. R., Jo J. S., Song J. W., Lee J. G.: Horticulturae 7, 238 (2021).
- Wróbel M., Karama M., Amarowicz R., Frczek E., Weidner S.: Acta Physiol. Plant. 27, 313 (2005).
- Sarker U., Oba S.: BMC Plant Biol. 18, 1 (2018).
- Kårlund A., Hanhineva K., Lehtonen M., McDougall G. J., Stewart D., Karjalainen R. O.: J. Sci. Food Agric. 97, 2182 (2017).
- Dufková H. a 11 spoluautorů: Plants 11, 61 (2021).
- Aryal S., Baniya M. K., Danekhu K., Kunwar P., Gurung R., Koirala N.: Plants 8, 96 (2019).
- Niroula A., Khatri S., Khadka D., Timilsina R.: Int. J. Food Prop. 22, 427 (2019).
- Shin Y. K., Bhandari S. R., Jo J. S., Song J. W., Cho M. C., Yang E. Y., Lee J. G.: Agronomy 10, 1627 (2020).

V. Berková<sup>a</sup>, L. Štěpánková<sup>a</sup>, P. Čičmanec<sup>a</sup>, M. Berka<sup>a</sup> and L. Frejlichová<sup>b</sup> (<sup>a</sup> Department of Molecular Biology and Radiobiology, <sup>b</sup> Mendeleum – Department of Genetics, Brno, Czech Republic): **Methodology for Determination of the Total Amount of Phenolic Substances, Flavonoids and Antioxidant Capacity of Plant Samples using Combined Extraction**

Although multiple methodologies are used to determine antioxidant parameters in plants, most studies use separate extractions for each type of the determination. The aim of this work was to specify detailed methodology able to analyse the total amount of phenolic and flavonoid compounds and total antioxidant capacity from one sample using a microtitration plate format to minimize the sample consumption. In addition to that, the described extraction procedure and the decreased sample consumption enable one to make complementary analyses and a closer characterization of the composition of plant samples. The extract can be used for subsequent targeted analyses, which was demonstrated by the determination of selected flavonoids using GC-MS analysis, which confirmed the results of spectrophotometry. The described combined extraction of plant samples facilitates complex analyses, reduces the amount of starting material and enables the subsequent analysis of biomolecules.

Keywords: antioxidant capacity, phenolic compounds, flavonoids, reactive oxygen species, abiotic stress

*Acknowledgements*

*This work was supported by the Internal Grant Schemes of Mendel University in Brno. Reg. no. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19\_073/001/6670, funded by the ESF.*



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.