



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ AUTENTICITY MLETÉ SKOŘICE POMOCÍ QPCR-HRM

EVALUATION OF GROUND CINNAMON AUTHENTICITY USING QPCR-HRM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. et Bc. Jiří Zikmund

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Fialová, Ph.D.

BRNO 2026

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2213/2025 Akademický rok: 2025/26
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. et Bc. Jiří Zikmund**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Fialová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Sledování autenticity mleté skořice pomocí qPCR–HRM

Zadání diplomové práce:

- Literární rešerše (skořice a její význam, falšování skořice a metody využívané pro jeho detekci, qPCR–HRM a analýza jejích výsledků).
- Izolace DNA z listů skořicovníku a z komerčních vzorků mleté skořice, a stanovení její koncentrace a čistoty.
- Analýza komerčních vzorků pomocí qPCR–HRM metody navržené v rámci jiné diplomové práce.
- Analýza komerčních vzorků pomocí jiné metody běžně k tomuto účelu užívané.
- Vyhodnocení a diskuse výsledků, posouzení vhodnosti testované metody pro analýzu komerčních vzorků skořice.

Termín odevzdání diplomové práce: 4.5.2026

Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. et Bc. Jiří Zikmund
student

Ing. Lenka Fialová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2026

prof. Ing. Stanislav Obruča,
Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá sledováním autenticity komerčních vzorků mleté skořice pomocí molekulárně-biologických a analytických metod. Cílem práce bylo provést determinaci botanických druhů skořicovníků obsažených v komerčních vzorcích mleté skořice metodou real-time PCR s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (HRM) s využitím primerů TPS 1, TPS 3, ITS 2 a psbA-trnH.

DNA byla izolována dvěma postupy: pomocí komerčního kitu EliGene a pomocí CTAB protokolu. Bylo zjištěno, že izolace DNA pomocí kitu poskytuje použitelné izoláty pouze v případě vzorků listů. Pro úspěšnou izolaci DNA z komerčních vzorků mleté skořice bylo nezbytné využít CTAB protokol. Následná amplifikace DNA u komerčních vzorků proběhla úspěšně s využitím primerů TPS 1, ITS 2 a psbA-trnH. Nejspolehlivější výsledky poskytly primery TPS 1. Naopak primery TPS 3 nebyly pro tuto analýzu vyhodnoceny jako vhodné.

Za účelem ověření a srovnání výsledků získaných pomocí PCR byl u testovaných vzorků mleté skořice stanoven obsah kumarinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Na základě zjištěného obsahu kumarinu byly vzorky klasifikovány dle dominantního zastoupení cejlonské skořice či cassií.

Práce poukazuje na vhodnost kombinace real-time PCR s HRM a analytického stanovení obsahu kumarinu (HPLC) pro kontrolu autenticity, kvality a zdravotní bezpečnosti komerčně dostupné mleté skořice.

KLÍČOVÁ SLOVA

skořice, kumarin, real-time PCR, HRM analýza, HPLC

ABSTRACT

This diploma thesis focuses on monitoring the authenticity of commercial ground cinnamon samples using molecular-biological and analytical methods. The aim of the study was to identify the botanical species of cinnamon present in commercial ground cinnamon samples using real-time PCR combined with high-resolution melting (HRM) curve analysis, utilizing TPS 1, TPS 3, ITS 2, and psbA-trnH primers.

DNA was extracted using two different procedures: a commercial EliGene kit and the CTAB protocol. It was found that DNA extraction using the commercial kit yielded viable isolates only for leaf samples. To successfully extract DNA from the commercial ground cinnamon samples, the application of the CTAB protocol was essential. Subsequent DNA amplification of the commercial samples was successfully performed using the TPS 1, ITS 2, and psbA-trnH primers. The TPS 1 primers provided the most reliable results, whereas the TPS 3 primers were evaluated as unsuitable for this specific analysis.

To verify and compare the results obtained via PCR, the coumarin content in the tested ground cinnamon samples was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). Based on the detected coumarin levels, the samples were classified according to the probable proportions of Ceylon cinnamon and Cassia.

The thesis highlights the effectiveness of combining real-time PCR with HRM and the analytical determination of coumarin content (HPLC) to verify the authenticity, quality, and health safety of commercially available ground cinnamon.

KEY WORDS

cinnamon, coumarin, real-time PCR, HRM analysis, HPLC

ZIKMUND, Jiří. *Sledování autenticity mleté skořice pomocí qPCR-HRM*. Online, diplomová práce. Lenka FIALOVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2026. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/173286>. [cit. 2026-05-03]

ZIKMUND, Jiří. *Evaluation of ground cinnamon authenticity using qPCR-HRM*. Online, master's Thesis. Lenka FIALOVÁ (supervisor). Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2026. Available at: <https://www.vut.cz/en/students/final-thesis/detail/173286>. [accessed 2026-05-03]

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Jiří Zikmund

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěl poděkovat Ing. Lence Fialové, Ph.D. za cenné rady, trpělivost, a odborné vedení při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Botanické zahradě Fakulty tropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze, Botanické zahradě Univerzity Komenského v Bratislavě a Botanické zahradě Jardín Botánico La Concepción v Malaze za poskytnutí vzorků skořicovníků. Rovněž bych chtěl vyjádřit díky své rodině za podporu během studia.

OBSAH

ÚVOD	6
1 TEORETICKÁ ČÁST	7
1.1 Skořice.....	7
1.1.1 <i>Botanická charakteristika</i>	7
1.1.2 <i>Světová produkce a obchod</i>	9
1.1.3 <i>Chemické složení</i>	10
1.1.4 <i>Skořice jako koření</i>	13
1.1.5 <i>Kvalita a autenticita skořice</i>	14
1.2 Metody sloužící k ověření autenticity skořice.....	15
1.2.1 <i>Genetické metody</i>	15
1.2.2 <i>Analýza chemického složení</i>	18
1.2.3 <i>Spektrální metody</i>	21
1.3 DNA	23
1.3.1 <i>Sktruktura</i>	23
1.3.2 <i>Izolace DNA</i>	23
1.3.3 <i>Čistota a koncentrace</i>	25
1.3.4 <i>Denaturace</i>	25
1.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	26
1.5 PCR s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (real-time PCR-HRM).....	27
1.6 Chromatografie.....	28
1.6.1 <i>Princip a využití</i>	28
1.6.2 <i>Rozdělení</i>	28
1.6.3 <i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV-VIS detekcí</i>	31
1.7 Shluková analýza.....	32
1.7.1 <i>Metody měření vzdáleností kvantitativních dat</i>	33
1.7.2 <i>Metody shlukování dat</i>	33
2 CÍL PRÁCE	35
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1 Použité vzorky	36
3.1.1 <i>Vzorky listů skořicovníků</i>	36
3.1.2 <i>Komerční vzorky mleté skořice</i>	36

3.2	Použité chemikálie	37
3.3	Použité přístroje a laboratorní vybavení.....	37
3.4	Pracovní postup	38
3.4.1	<i>Izolace DNA</i>	38
3.4.2	<i>Stanovení koncentrace a čistoty DNA</i>	39
3.4.3	<i>PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání</i>	39
3.4.4	<i>Příprava vzorků na HPLC</i>	42
3.4.5	<i>Stanovení obsahu kumarinu</i>	42
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1	Koncentrace a čistota DNA	44
4.2	PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání	46
4.2.1	<i>Primery TPS 1</i>	46
4.2.2	<i>Primery TPS 3</i>	49
4.2.3	<i>Primery ITS 2</i>	51
4.2.4	<i>Primery psbA-trnH</i>	55
4.3	Stanovení kumarinu pomocí HPLC	58
4.4	Shrnutí	60
4.4.1	<i>Využitelnost testovaných primerů pro analýzu skořice</i>	61
5	ZÁVĚR	63
6	REFERENCE	64
7	PŘÍLOHY	75

ÚVOD

Globalizace představuje z hlediska potravin dvojsečný meč. Na jednu stranu umožňuje dostupnost tropických a subtropických potravin i ve střední Evropě, ale na druhou stranu znamená dlouhý dodavatelský řetězec, který je nevýhodný z hlediska záruk ohledně bezpečnosti a autenticity potravin. Falšování potravin je celosvětový problém, který je ze strany producentů motivován vidinou vyššího zisku. Na straně druhé se nachází zákazník, který je uveden v omyl ohledně geografického či botanického původu potravin či způsobu jejího pěstování.

Koření představuje jednu z nejohroženějších potravin z hlediska falšování. Příčinou je vysoká tržní cena v poměru k hmotnosti a velmi dlouhý dodavatelský řetězec, který často zahrnuje drobné pěstitele i globální distributory. Koření je na pultech maloobchodů často nabízeno v mleté či drcené podobě. Tím je prakticky znemožněna vizuální či senzorická identifikace rostliny a vzniká vhodný prostor pro falšování.

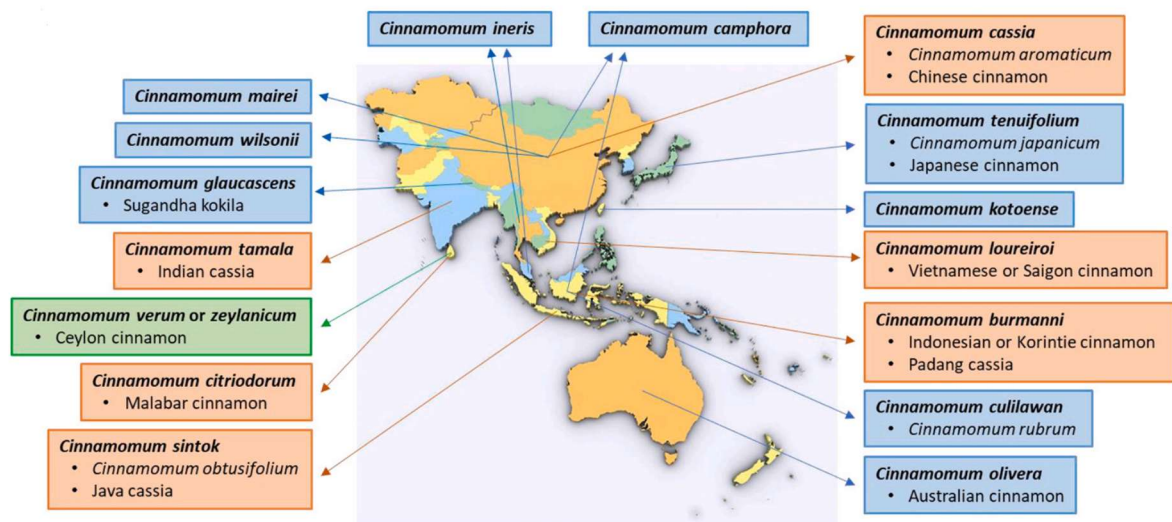
Skořice představuje celosvětově vyhledávaný a ekonomicky významný druh koření. Z botanického pohledu lze skořici rozlišit na dva typy – cejlonskou neboli pravou skořici pocházející ze skořicovníku cejlonského a ostatní druhy skořic souhrnně označované jako cassie pocházející z ostatních druhů z rodu skořicovník. Oba typy skořic jsou ve formě svitků snadno rozpoznatelné, ale po rozemletí je jejich odlišení značně obtížné. Pravá skořice je mnohem dražší a zejména v mletém stavu dochází k jejímu nahrazování cassiemi. Problém zde nevytváří jen klamání zákazníka z hlediska botanického původu, ale i obsah kumarinu v cassiích. Cassie mají přirozeně řádově vyšší obsah kumarinu. Kumarin je hepatotoxická sloučenina jejíž dlouhodobý nadměrný příjem může představovat zdravotní riziko pro lidský organismus. Z tohoto důvodu je snaha najít vhodné metody, které umožní spolehlivě stanovit botanické složení prodávané mleté skořice a díky tomu zamezit nadměrné konzumaci rizikových výrobků.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Skořice

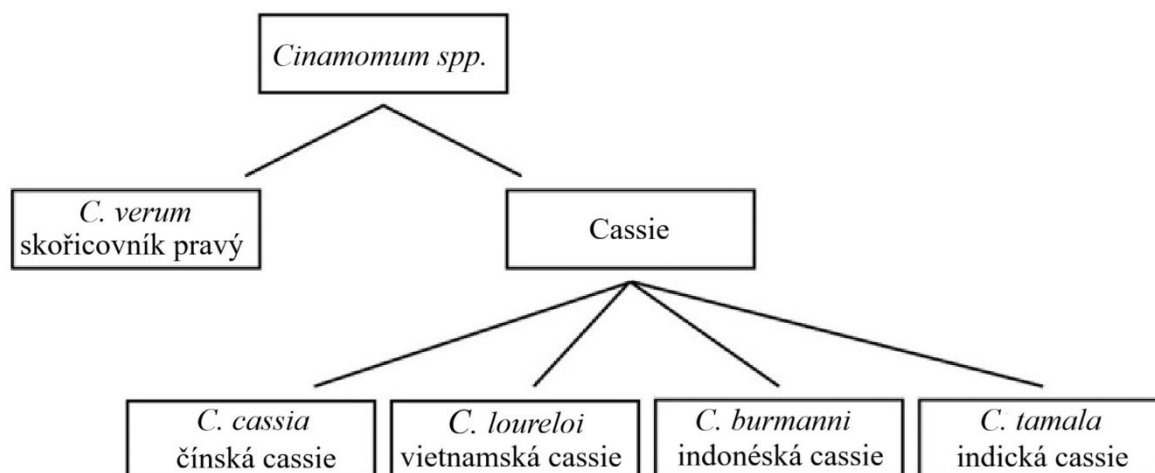
1.1.1 Botanická charakteristika

Rod skořice (*Cinnamomum* Schaeffer) zahrnuje okolo 450 rostlinných druhů. Jedná se o stálezelené keře a stromy z čeledi vavřínovité (*Lauraceae* Juss.). Lze je přirozeně najít pouze v oblasti tropů. Původně byli do tohoto rodu řazeni pouze zástupci pocházející z oblasti Asie a Oceánie. Později byly změnami v taxonomii přiřazeny i druhy, které je možné nalézt v tropických oblastech Ameriky. Ty původně náležely do rodu *Phoebe* [1]. Obrázek 1 ukazuje původ některých druhů rodu skořice. Zeleně je označen skořicovník pravý, oranžově běžné druhy cassií a modře méně významné druhy cassií [2].



Obrázek 1: Mapa původu jednotlivých druhů rodu *Cinnamomum* v jihovýchodní Asii a Oceánii [2]

Z uvedeného počtu druhů patří pouze několik k celosvětově významným a jsou předmětem mezinárodního obchodu. Jedná se zejména o skořicovník pravý a cassie. Skořicovník pravý (*Cinnamomum zeylanicum* Blume, syn. *Cinnamomum verum* J.Presl) je označován taktéž jako cejlonská skořice. Mezi cassie spadají tři hlavní druhy: čínská cassie (*Cinnamomum cassia* Nees, syn. *Cinnamomum aromaticum* Nees), indonéská cassie (*Cinnamomum burmanni* Nees) a vietnamská cassie (*Cinnamomum loureloei* Nees). Méně významná a též méně kvalitní je indická cassie (*Cinnamomum tamala* (Buch.-Ham.) T.Nees & C.H.Eberm.) [3].



Obrázek 2: Rozdělení nejvýznamnějších zástupců rodu skořice [3]

Koření ve formě svitků nebo trubek není těžké rozpoznat. Existuje mnoho sensorických parametrů, podle nichž lze poznat, zda se jedná o skořicovník pravý nebo cassii. Svitky skořicovníku pravého jsou světlejší, tenčí a méně aromatické (viz obrázek 3A). Oproti tomu svitky cassie jsou tmavší, mohutnější a rovněž aromatictější (viz obrázek 3B a 3C) [4]. Srovnání některých sensorických vlastností uvádí Tabulka 1.



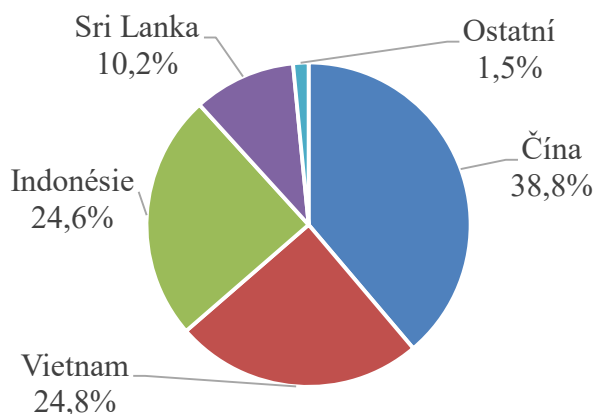
Obrázek 3: Srovnání svitků a kůry *C. zeylanicum* (A) a *C. cassia* (B a C) [4]

Tabulka 1: Srovnání senzorických vlastností svitků *C. zeylanicum* a *C. cassia* [4]

Druh	<i>C. zeylanicum</i>	<i>C. cassia</i>
Barva	krémově hnědá s tmavě hnědými skvrnami	tmavě hnědá až červenohnědá
Aroma	jemné, nasládlé	silně aromatické
Chuť	sladká, aromatická, ostrá	méně sladká, svíravá
Velikost a tvar	0,5 mm silná, s jedním nebo dvěma zámotky uvnitř jiného zámotku	1 až 3 mm silná, s jedním zámotkem
Praskliny	tříštivé	téměř žádné
Textura	hladká	hrubá
Vnější povrch	bez korku	lenticely s tmavě hnědým korkem

1.1.2 Světová produkce a obchod

Celosvětová produkce skořice se pohybuje na úrovni 230 tisíc tun. Celosvětově je skořicovník pěstován na 330 tisících ha. Průměrný výnos skořice činí $690 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Dominantní podíl na produkci představuje Čína (89,5 tisíce t), Vietnam (57,3 tisíce t) a Indonésie (56,8 tisíce t). Menší podíl připadá na Srí Lanku (23,5 tisíce tun). Produkce ostatních států činí pouze 3,5 tisíce t a představuje zhruba 1,5 % celkové produkce [5]. Každý ze zmíněných producentů exportuje rozdílný druh skořice (resp. cassie). Čína, Vietnam a Indonésie exportují dominantně cassie. Produkci skořice ze skořicovníku pravého pokrývá z 80 % Srí Lanka. Z toho vyplývá, že pravá skořice je na trhu minoritní oproti cassiím [6]. Hlavním důvodem je zejména cena. Cena pravé skořice ($470 \text{ až } 590 \text{ Kč} \cdot \text{kg}^{-1}$) je oproti cassiím ($230 \text{ až } 350 \text{ Kč} \cdot \text{kg}^{-1}$) dvojnásobná až trojnásobná [4].



Graf 1: Struktura světové produkce skořice [5]

1.1.3 Chemické složení

1.1.3.1 Skořicovník pravý (*Cinamomum zeylanicum*)

Zastoupení složek kůry skořicovníku pravého je závislé na lokalitě původu, kvalitě a pěstované odrůdě. Obsah vody kolísá v rozsahu 5,4–11,4 % (průměr 9,9 %). Obsah vlákniny se pohybuje v rozsahu 25,6–30,5 %. Dalšími zastoupenými složkami jsou: sacharidy (16,6–22,6 %); bílkoviny (3,0–4,5 %); tuk (0,3–1,9 %) a popeloviny (3,4–6,0 %). Z hlediska využití skořice jako koření je nejdůležitější přítomnost esenciálního oleje. Jeho obsah se pohybuje v rozmezí 0,3–2,8 % [7]. Fyzikální parametry esenciálního oleje uvádí Tabulka 2 [8].

Tabulka 2: Přehled fyzikálních parametrů esenciálního oleje *C. zeylanicum* [8]

Parametr	Hustota [g.cm ⁻³]	Index lomu [-]	Optická stáčitost [°]
Hodnota	1,019	1,591	-0°20‘

Dominantní složkou esenciálního oleje z kůry druhu *C. zeylanicum* je cinnamaldehyd, jehož obsah se pohybuje kolem 75 %. Dalšími složkami s obsahem nad 1 % jsou cinnamyl acetát (5,00 %); karyophyllen (3,30 %); linalool (2,40 %); eugenol (2,20 %); 1,8-cineol (2,00 %) a p-cymen (1,10 %). Rozdílný je zejména obsah kumarinu, který oproti ostatním druhům skořicovníků činí pouze 0,7 % v esenciálním oleji [9], nebo-li cca 0,004 % v kůře. Tento obsah je často nedetekovatelný pomocí běžných metod jako je HPLC [10]. Kompletní složení esenciálního oleje *C. zeylanicum* uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3: Chemické složení esenciálního oleje *C. zeylanicum* [9]

Složka	Obsah [%]	Složka	Obsah [%]
cinnamaldehyd	75,00	acetyleugenol	0,20
cinnamyl acetát	5,00	beta-pinen	0,10
karyophyllen	3,30	myrcen	0,10
linalool	2,40	terpinolen	0,10
eugenol	2,20	trans-linalool oxid	0,10
1,8-cineol	2,00	bornyl acetát	0,10
p-cymen	1,10	piperiton	0,10
alfaterpineol	0,70	fenylethyl acetát	0,10
kumarin	0,70	geraniol	0,10

benzylbenzoát	0,70	2-fenylethylalkohol	0,10
alfa-pinen	0,60	2-fenylpropylacetát	0,10
alfa-feladren	0,60	cuminaldehyd	0,04
alfa-humulen	0,60	delta-caren	0,03
limonen	0,50	gama-terpinen	0,03
alfa-terpinen	0,40	farnesol	0,03
terpinen-4-ol	0,40	2-vinylfenol	0,03
hydrocynamaldehyd	0,40	sabinen	0,02
alfa-ylangen	0,30	furfural	0,02
benzaldehyd	0,30	borneol	0,02
cinnamyl alkohol	0,30	izo Eugenol	0,02
camfen	0,20	Ostatní	0,86

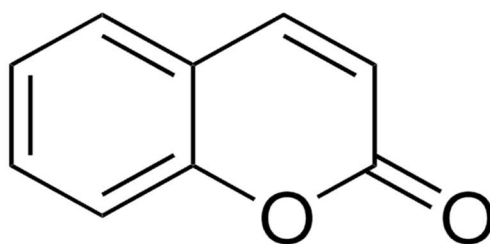
1.1.3.2 Čínská cassie (*Cinamomum cassia*)

Kůra druhu *C. cassia* obsahuje 6,5–11,9 % vody; 12,0–28,8 % vlákniny; 6,9–32,0 % sacharidů; 3,1–3,4 % bílkovin a 1,9–8,2 % popelovin. Obsah esenciálního oleje v kůře činí 0,5–5,1 %. Dominantní složku esenciálního oleje tvoří cinnamaldehyd s podílem asi 80–93 % [7].

Tabulka 4: Přehled fyzikálních parametrů esenciálního oleje *C. cassia* [13]

Parametr	Hustota [g·cm⁻³]	Index lomu [-]	Optická stáčivost [°]
Hodnota	1,055–1,070	1,600–1,606	+1–6

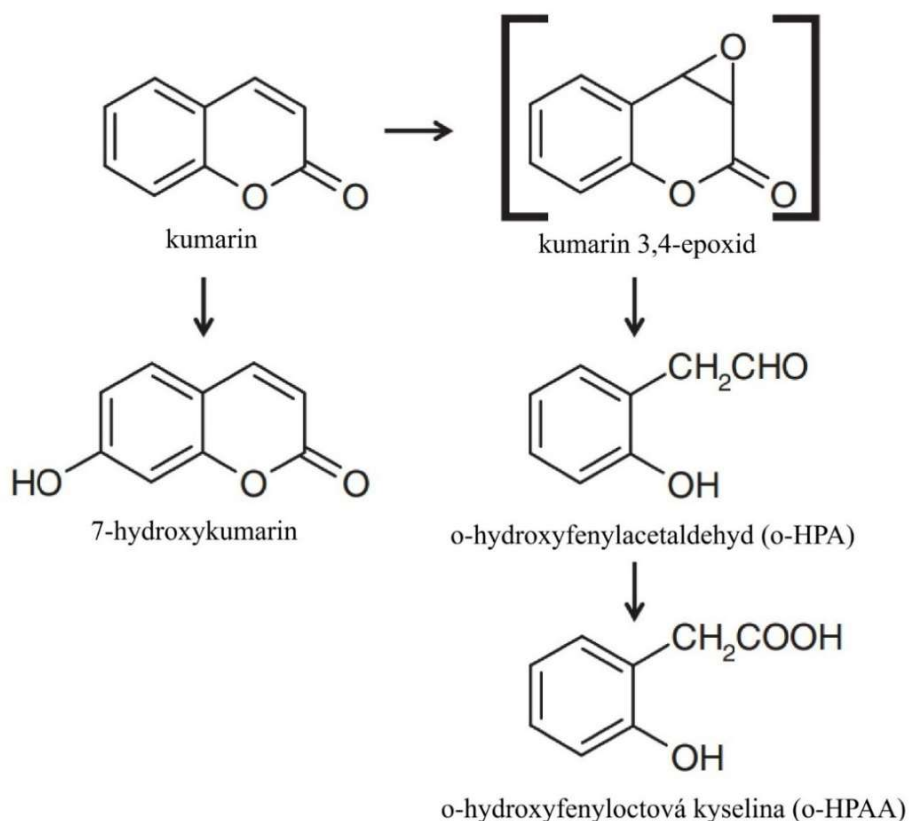
Obsah kumarinu v kůře činí 1 740–10 900 mg·kg⁻¹ (0,174–1,09 %) [11]. Dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin je tolerovaný denní příjem 0,1 mg·kg⁻¹ váhy jedince. To při kalkulované hmotnosti jedince 60 kg dává ekvivalent 6 mg kumarinu [12]. Výpočtem vychází tolerovaný denní příjem kůry *C. cassia* při obsahu kumarinu 10 900 mg·kg⁻¹ [11] na 0,55 g kůry cassie (resp. na 3,45 g při obsahu kumarinu 1 740 mg·kg⁻¹ [11]).



Obrázek 4: Strukturální vzorec kumarinu [14]

První problémy s toxickým působením kumarinu (resp. methylenbishydroxykumarinu) byly pozorovány na přelomu 19. a 20. století v Severní Americe. Při krmení skotu siláží s vysokým zastoupením komonice bílé (*Melilotus albus* Medik.) a komonice lékařské (*Melilotus officinalis* (L.) Lam.) se objevovaly krvácivé projevy. Příčina těchto potíží byla odhalena až ve 20. letech 20. století [14].

Dvě neznámější metabolické dráhy sloužící k odbourání kumarinu jsou znázorněny na Obrázku 5 [15]. Směr degradace kumarinu je dán přítomností izoforem cytochromu P450 [16]. Dominantní způsob odbourání je hydroxylace molekuly kumarinu v poloze 7 za vzniku 7-hydroxykumarinu [17]. V menší míře je kumarin odbouráván přes epoxidový meziprodukt. Ten reaguje s glutathionem za vzniku o-hydroxyfenylacetaldehydu (o-HPA). Tento o-HPA působí pravděpodobně hepatotoxicky. Produktem jeho detoxikace je netoxická o-hydroxyfenylactová kyselina (o-HPAA) [15][18].



Obrázek 5: Metabolické dráhy odbourání kumarinu [15]

1.1.4 Skořice jako koření

Parametry koření včetně skořice specifikuje v českém právním řádu vyhláška č. 398/2016 Sb. o požadavcích na koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky, ochucovadla, studené omáčky, dresinky a hořčici. Ta mimo jiné uvádí, že na trh je možné uvádět celou, drcenou nebo mletou kůru skořicovníků druhů *Cinnamomum zeylanicum*, *C. aromaticum*, *C. loureloi*, *C. burmanii* a *C. tamala*. Další požadavky týkající se sensorických, fyzikálních a chemických vlastností jsou shrnuty v Tabulkách 5 a 6 [19].

Tabulka 5: Smyslové požadavky na jakost skořice [19]

Název koření	Vzhled	Barva	Vůně	Chuť
skořice celá	kousky, svitky, trubky nebo pruty oškrábané nebo neoškrábané, hladkého až drsného povrchu, tvrdé, bez kousků dřeva a větviček skořicovníku	světle žlutá, tmavě žlutá, skořicově hnědá až červenohnědá	charakteristická po skořici, výrazná až ostrá	kořenitá, nasládlá, natrpklá až svíravá, štiplavá
skořice drcená nebo mletá	jemný prášek bez znatelných částic nebo drť	okrová s odstínem do hněda až červenohněda	charakteristická po skořici	ostrá, kořenitá

Tabulka 6: Fyzikální a chemické požadavky na jakost skořice [19]

Název koření	Vlhkost	Celkový popel	Silice	Popel nerozpustný v kyselině	Příměsí v % hm. nejvýše		
					organické	vlastní	cizí
	% hm. nejvýše	% hm. sušiny nejvýše	% v sušině nejméně	v % hm. sušiny nejvýše			
skořice celá	14,0	7,0	1,0	2,0	2,0	1,0	0,5
skořice drcená nebo mletá	12,0	7,0	0,5	2,0			

1.1.5 Kvalita a autenticita skořice

Každá potravina včetně skořice musí při uvedení na trh v EU splňovat příslušná legislativní kritéria. Produkce koření je dominantně soustředěna v méně rozvinutých státech světa a státy EU jsou závislé na dovozu komodit z těchto oblastí [20]. Koření dovážené do EU pochází především z jihovýchodní Asie. Nejvíce dováženým kořením je zázvor (114 tisíc tun, z toho 43 % z Číny). Skořice s objemem 13 tisíc tun se řadí na páté místo. Hlavním dovozcem skořice do EU je Vietnam s podílem 35 % [21].

Tabulka 7: Objem importu jednotlivých druhů koření do EU [21]

Název koření	Objem dovozu do EU [tisíc tun]	Hlavní dovozce a jeho podíl
Zázvor	114	Čína (43 %)
Paprika	111	Čína (73 %)
Pepř	50	Vietnam (63 %)
Kurkuma	16	Indie (79 %)
Skořice	13	Vietnam (35 %)

Při produkci, zpracování a transportu je zásadní dodržení podmínek pro zachování kvality a bezpečnosti potravin. Největší rizika představují kontaminace pesticidními látkami užívanými při pěstování plodin, mikrobiologické kontaminace spojené s produkcí mykotoxinů, napadení skladištními škůdci a kontaminace cizími předměty [20]. Velký problém rovněž představuje padělání a matoucí či chybějící označování. Vysoká cena kvalitních druhů koření a jejich omezená dostupnost na globálním trhu je hlavní příčinou nekalých obchodních praktik [22].

Za účelem ochrany specifických názvů produktů a jejich vlastností byla na území EU zavedena Zeměpisná označení. Mezi Zeměpisná označení spadají Chráněné označení původu, Chráněné zeměpisné označení a Zeměpisné označení. Chráněné označení původu a Chráněné zeměpisné označení se uděluje potravinám a vínu. Pokud je zboží označené známkou Chráněné označení původu, musí být všechny části produkce a výroby provedeny výhradně v dané oblasti. Při užití označení Chráněné zeměpisné označení musí být alespoň jedna fáze výroby nebo zpracování provedena v dané oblasti. Zeměpisné označení je specifické pouze pro lihoviny a garantuje, že alespoň jedna fáze destilace či přípravy proběhla v dané oblasti [23].



Obrázek 6: Loga Chráněné označení původu a Chráněné zeměpisné označení [23]

V případě skořice se od roku 2022 užívá Chráněné zeměpisné označení. Tyto produkty nesou označení Ceylon Cinnamon (cejlonská skořice). Jedná se o koření druhu *Cinnamomum zeylanicum* pocházející ze Srí Lanky. Tímto způsobem lze označovat celé i nařezané tyčinky (resp. svitky kůry), prášek a olej z listů a kůry. Ve všech případech musí jít o produkty vyrobené z kůry nebo listů tohoto rostlinného druhu. Podmínkou je rovněž obsah kumarinu nižší než 0,004 % a obsah cinnamaldehydu musí činit mezi 8 a 70 % éterického oleje [24].

1.2 Metody sloužící k ověření autenticity skořice

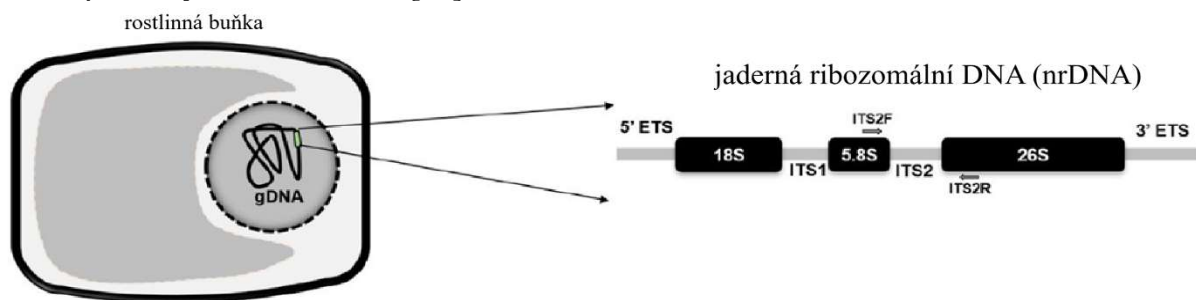
Hlavním předmětem nekalých praktik při obchodování se skořicí je uvedení v omyl ohledně botanického druhu obchodované skořice. Cílem těchto podvodů je klamavé označení cassií jako cejlonské skořice. Touto cílenou záměnou vzniká obchodníkovi vyšší zisk, než pokud by dodržel zásady poctivosti. Situaci především u mleté skořice komplikuje obtížné (či dokonce nemožné) odhalení této záměny pouze na základě vzhledu [25]. Častým jevem je rovněž míchání cejlonské skořice s cassií v různých poměrech, což ještě více ztěžuje identifikaci produktu [26]. Skořici lze padělat rovněž přimícháváním syntetických složek éterického oleje skořicovníku cejlonského jako je cinnamaldehyd. Tyto metody pozitivně ovlivňují sensorický profil padělané skořice a téměř znemožňují jeho odhalení pomocí sensorického hodnocení [27].

1.2.1 Genetické metody

Metody založené na analýze DNA poskytují mnohem přesnější výsledky než konkurenční metody. Jejich hlavní předností je schopnost odlišit druhy, které jsou morfologicky obtížně rozlišitelné či botanicky blízce příbuzné. Tyto metody rovněž umožňují provedení analýz z téměř libovolné velmi malé části rostliny [28]. Uvádí se, že tradiční taxonomie založená na morfologických znacích narazila na své limity. Důvodem je vysoký celkový počet botanických druhů a s tím související vysoká pravděpodobnost výskytu kryptických druhů. Tyto druhy jsou morfologicky nerozlišitelné, ale jsou geneticky odlišné [29].

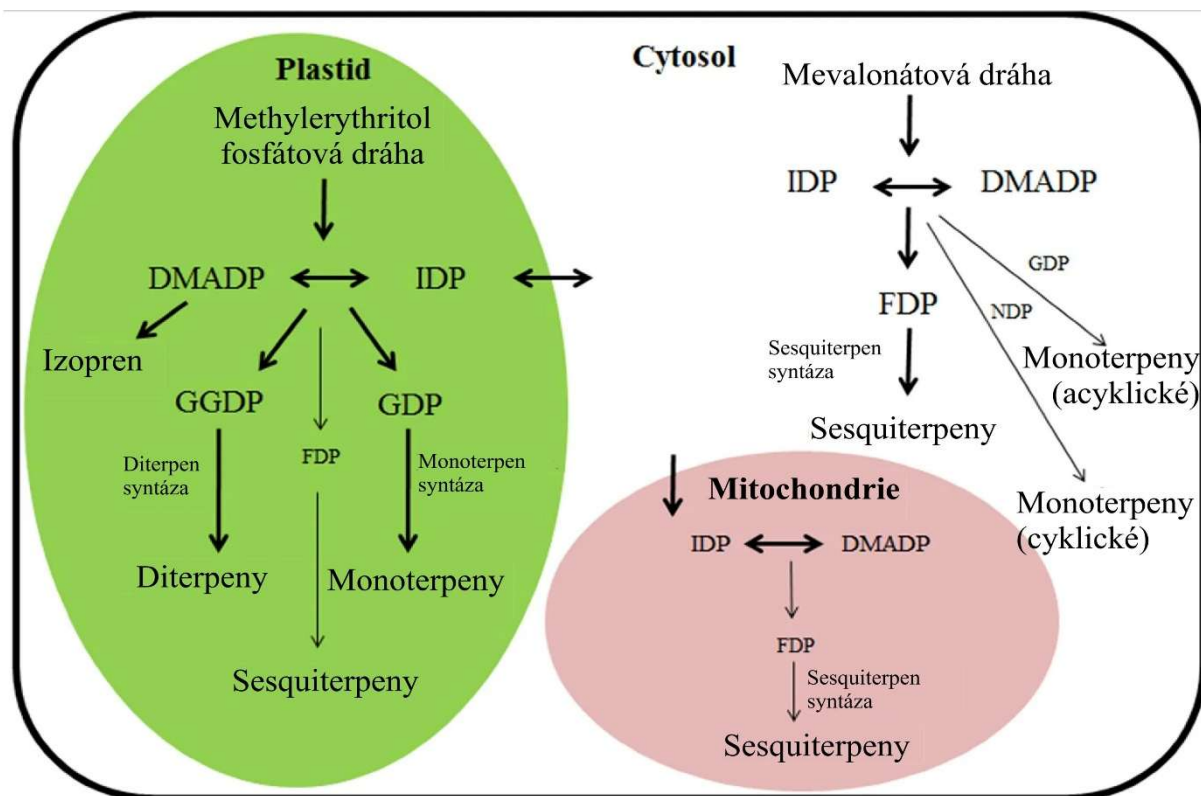
Jednou z genetických metod pro determinaci druhů je DNA barcoding. Tato metoda je založená na determinaci botanických druhů dle charakteristického úseku DNA. Délka vhodného úseku DNA může být poměrně krátká v řádu nižších desítek nukleotidů. I takto krátký úsek poskytuje počet kombinací v řádu milionů až miliard, což je k determinaci druhů

dostačující [29]. Analyzovat lze jadernou, mitochondriální i chloroplastovou DNA. Příkladem genu jaderné DNA, který je široce využíván k odlišení mnoha rostlinných druhů jsou regiony ITS [30]. ITS1 a ITS2 (z angl. *Internal Transcribed Spacer*) jsou prepisované, ale nekódující oblasti ve struktuře genu kódujícího ribozomy [31][32]. Výhodami využití regionů ITS1 a ITS2 je jejich rozšíření napříč celým fylogenetickým stromem organismů a zejména fakt, že obě oblasti jsou nekódující. Absence translace této oblasti DNA znamená prakticky nulový selekční tlak, a tím pádem dědičnost veškerých vzniklých mutací v těchto úsecích DNA. Oproti chloroplastovým genům jsou regiony ITS1 a ITS2 mnohem více univerzální [33]. Region ITS2 je snadno aplikovatelný a kratší, proto je snáze sekvenovatelný. To ho předurčuje k odlišení blízké příbuzných druhů rostlin [31].



Obrázek 7: Schématické znázornění jaderné ribozomální DNA s oblastmi ITS1 a ITS2 [32]

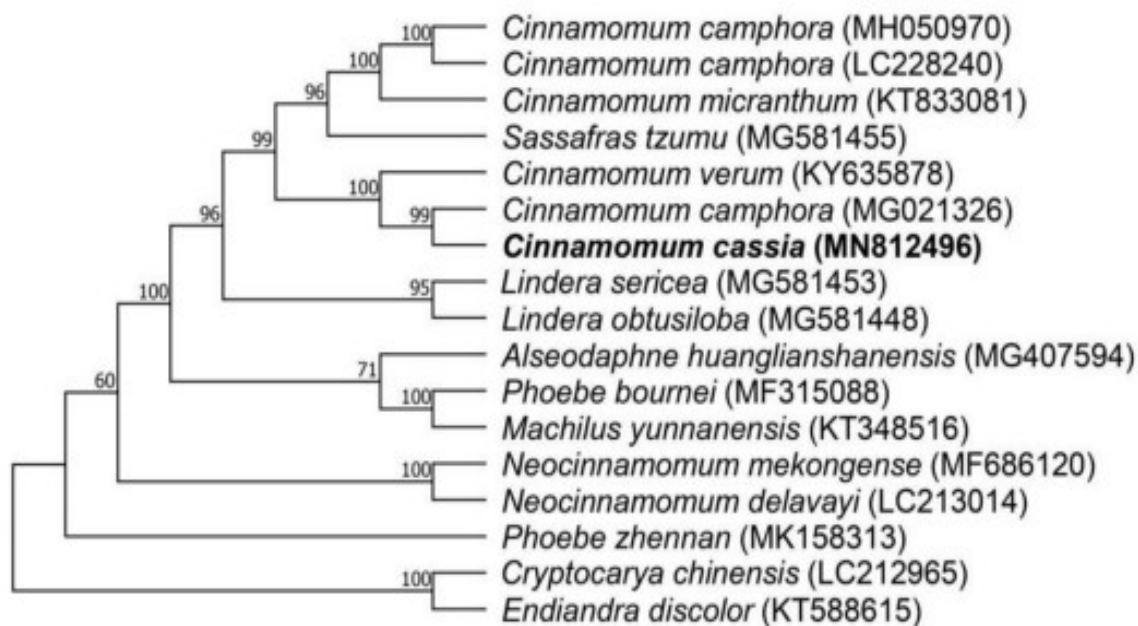
Rostliny produkují mnoho specifických sekundárních metabolitů. Terpeny představují významné rostlinné metabolity. Mnohé z nich lze zařadit mezi sekundární metabolity. Podíl zastoupení jednotlivých terpenoidních látek je do značné míry rodově i druhově specifický. Mnohé z nich jsou průmyslově či medicínsky využívány [34]. Rostliny z rodu skořicovník jsou z terpenoidních látek bohaté zejména na kafr, D-borneol a linalool [35]. Syntéza terpenů probíhá terpenoidní dráhou. Průběh terpenoidní dráhy může být u rostlin lokalizován v cytosolu, plastidech a mitochondriích. Meziprodukty těchto drah jsou mimo jiné geranyldifosfát, farnesyldifosfát a geranylgeranyldifosfát. Tyto meziprodukty jsou dále využívány enzymy souhrnně označovanými jako terpensytázy (TPS) [36]. Terpensytázy jsou u rostlin značně variabilní. Konkrétní struktura TPS je druhově specifická a geny kódující TPS mohou být využity k determinaci jednotlivých druhů skořicovníků. U skořicovníků se vyskytují terpen syntázy těchto skupin: TPS-a, TPS-b, TPS-c, TPS-e/f, TPS-g [35].



DMADP - dimethylallyldifosfát, FDP - farnesyldifosfát, GDP - geranyldifosfát, GGDP - geranylgeranyldifosfát, IDP - izopentenylidifosfát, NDP - neryldifosfát

Obrázek 8: Dráhy syntézy terpenů [36]

K rozlišení rostlinných druhů lze rovněž využít analýzu chloroplastové DNA [33]. Chloroplastová DNA je cyklická molekula o délce 120 až 217 kb. Typická rostlinná buňka obsahuje více kopií chloroplastové DNA (cca 50 kopií oproti jaderné DNA). Vyšší počet kopií DNA usnadňuje její amplifikaci. Na rozdíl od jaderné DNA je chloroplastová DNA děděna striktně matrilineárně, což umožňuje sledovat populaci rostlin po mateřské linii [30]. Mezi užívané markery chloroplastové DNA patří například *matK* (gen pro maturázu K), *rbcL* (gen pro velkou podjednotku ribulózy bisfosfát karboxylázy/oxygenázy), *trnH-psbA* (intron mezi genem pro histidinovou t-RNA a genem pro protein fotosystému II), *rpoB*, *rpoC1* (geny pro podjednotku B a C1 RNA polymerázy), *trnL-trnF* (intron mezi geny pro t-RNA přenášející leucin a fenylalanin) a *atpF-atpH* (intron mezi genem pro podjednotku I a III ATP syntázy) [33]. Chloroplastová DNA druhu *C. cassia* je tvořena 126 geny. Z nich 82 kóduje proteiny, 36 kóduje tRNA a zbývajících 8 rRNA. Na základě analýzy chloroplastového genomu lze rozlišit příbuzné druhy v rámci jedné čeledě. Obrázek 9 uvádí fylogenetický strom druhů čeledi vavřínovité (*Lauraceae*) získaný na základě srovnání 51 genů chloroplastové DNA kódujících proteiny [37].



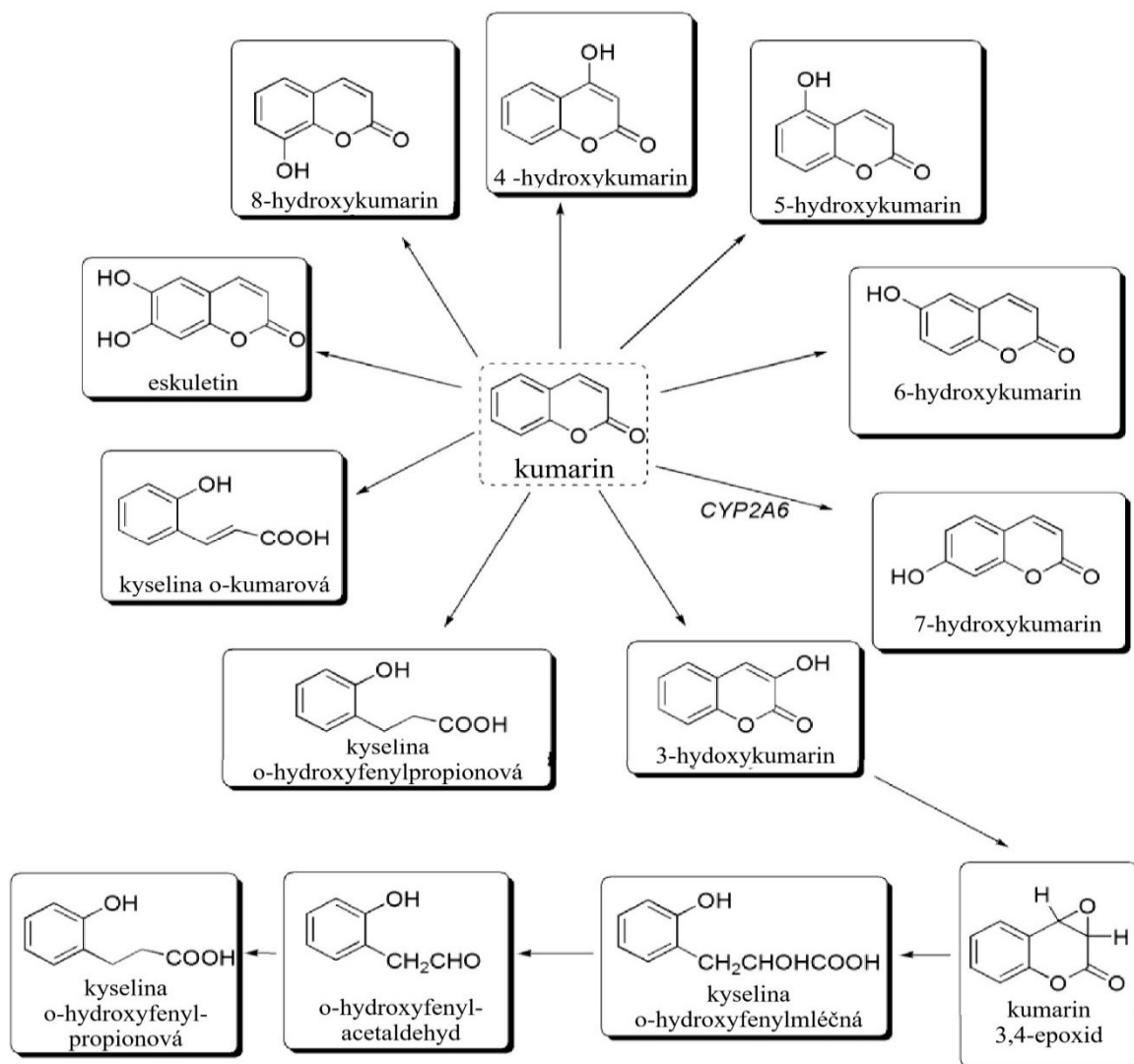
Obrázek 9: Fylogenetický strom čeledi Lauraceae získaný dle analýzy chloroplastové DNA [37]

Mitochondriální DNA je při rozlišování druhů více využívána u živočichů. Významnou sekvencí je CO1. Jedná se o mitochondriální gen kódující podjednotku 1 enzymu cytochrom c oxidázy [38]. Oblast DNA vhodná pro rozlišení druhů musí splňovat tři kritéria: prokazatelnou mezidruhovou variabilitu a současně stálost u daného druhu, vhodnou délku sekvence s ohledem na izolaci a amplifikaci DNA, a přítomnost stabilních úseků vhodných pro nasedání primerů. Významnějšímu využití zkoumání genu CO1 u rostlin brání fakt, že daná oblast mitochondriální DNA podléhá u rostlin mnohem snadněji mutacím a nepředstavuje stabilní oblast pro jednoznačnou identifikaci rostlinných druhů [39]. Obecnou nevhodnost použití mitochondriální rostlinné DNA způsobuje rovněž její vysoká variabilita ve velikosti genomu a vznik složitých struktur [40]. Omezená rychlost mutace mitochondriální DNA u rostlin představuje další problém jejího využití. Rychlost mutací mitochondriální DNA u krytosemenných rostlin je zhruba pětkrát pomalejší než u jaderné DNA. Oproti tomu u savců je naopak asi pětkrát vyšší než u jejich jaderné DNA. Vyšší rychlost mutace umožňuje rychlé shromáždění mutací v mitochondriálním genomu a tím snadné rozlišení blízkých příbuzných druhů [41].

1.2.2 Analýza chemického složení

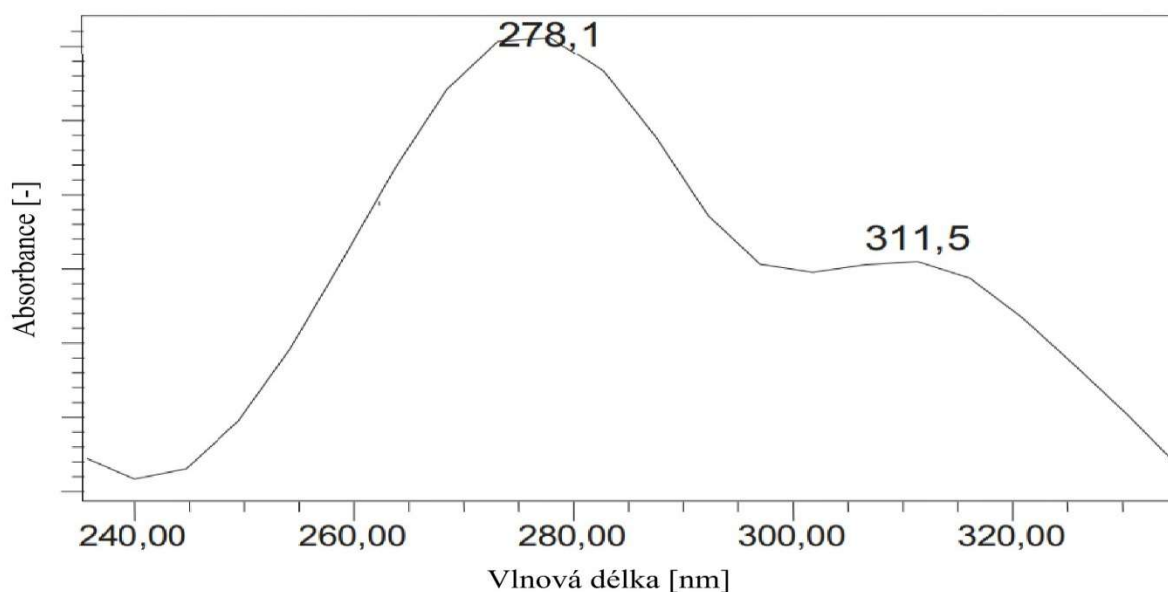
Chemické složení koření závisí na mnoha faktorech. Zásadní roli hraje botanický druh rostlin, z něhož bylo koření získáno. Vliv má rovněž prostředí, v němž bylo koření pěstováno (pedoklimatologické podmínky a agrotechnika) a procesy zpracování a výroby koření [42]. Chemické složení kůry skořicovníku cejlonského (*C. zeylanicum*) se významně liší od ostatních druhů skořicovníků. Zásadní rozdíl byl zaznamenán zejména u obsahu kumarinu a cinnamaldehydu [9][10][11]. Zmíněné rozdíly lze využít při nepřímém způsobu autentifikace mleté skořice [43].

Kumarin (neboli 2H-1-benzopyran-2-on) je tvořen kondenzovaným benzenovým a alfapyronovým kruhem. V rostlinných matricích se kromě kumarinu lze setkat s mnoha z jeho více než 1 300 derivátů. Významnými deriváty kumarinu jsou jeho hydroxyderiváty. Přítomnost jedné či více –OH skupin mění polaritu celé molekuly [44].



Obrázek 10: Významné přírodní deriváty kumarinu [44]

Běžně užívanou metodou ke stanovení obsahu kumarinu ve vzorku skořice je HPLC s UV detekcí [2]. Kumarin je ze vzorku mleté skořice extrahován činidlem na bázi organického rozpouštědla. Například pomocí extrakčního činidla methanol:voda v poměru 4:1 [10]. Pro vyšší výtěžnost extrakce lze postupnou extrakcí nejprve pomocí směsi methanol:voda v poměru 4:1 a následně 9:1 [46]. K extrakci lze využít i čistý methanol [47]. Pro detekci kumarinu je využíváno UV záření [45]. Nejčastěji je využívána detekce pomocí UV záření o vlnové délce 278,1 nm [45][46], respektive 279 nm [10]. Právě v této oblasti dosahuje absorbance kumarinu globálního maxima [45].



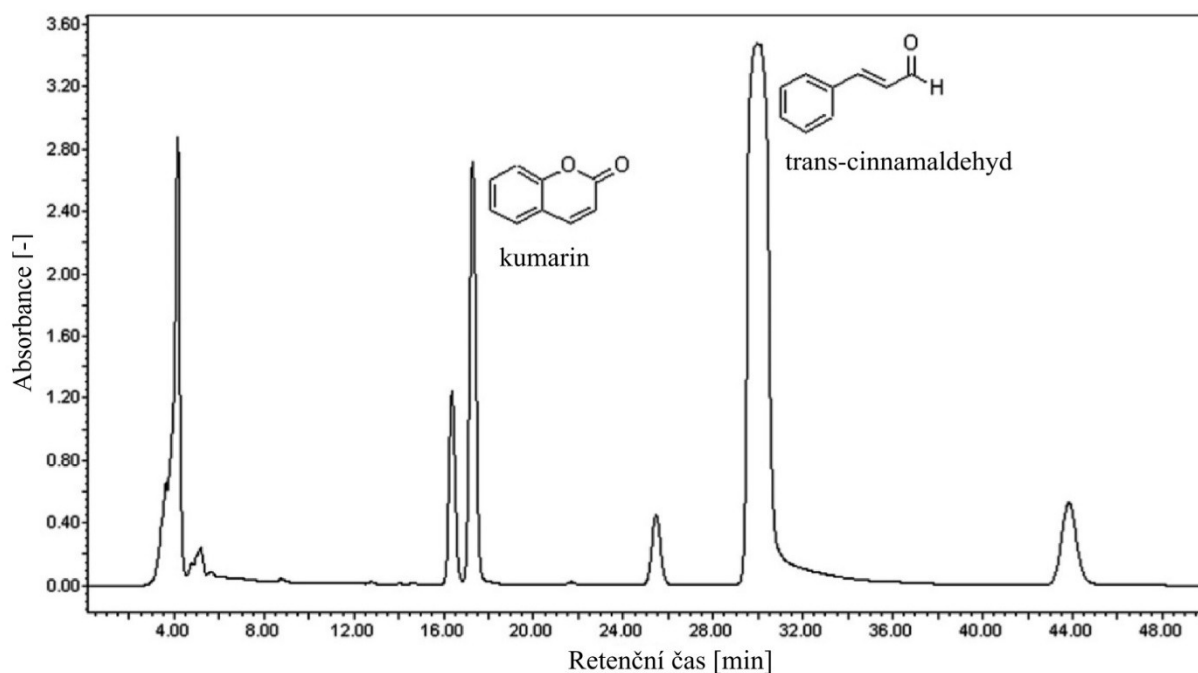
Graf 2: Absorpční spektrum kumarinu v UV oblasti [45]

Při ověření autenticity skořice se obvykle využívá stanovení i dalších sloučenin kromě kumarinu. Vůbec nejčastěji stanovovanou složkou je cinnamaldehyd. Ten tvoří až 95 % éterického oleje u cassií, ale pouze asi 50 až 83 % u skořicovníku cejlonského [10]. Zatímco obsah kumarinu představuje značně signifikantní signál k rozlišení skořicovníku cejlonského od ostatních druhů skořicovníků, pro obsah cinnamaldehydu toto tvrzení neplatí [46].

Tabulka 8: Srovnání obsahu složek mleté skořice metodou HPLC [46]

Druh	Kumarin	Cinnamaldehyd	Cinnamylalkohol
<i>C. zeylanicum</i>	<0,01	1,49–3,20	<0,02–0,083
<i>C. cassia</i>	0,14–0,70	0,76–3,37	<0,02
<i>C. burmanii</i>	0,042	0,054	0,046

Při ověření autenticity skořice se nabízí souběžné stanovení obsahu kumarinu a cinnamaldehydu. V takovém případě jako extrakční činidlo využívá směs ethanol:voda v poměru 1:1. V tomto případě probíhá detekce při 275 nm. K eluci kumarinu dochází dříve než u cinnamaldehydu [43].



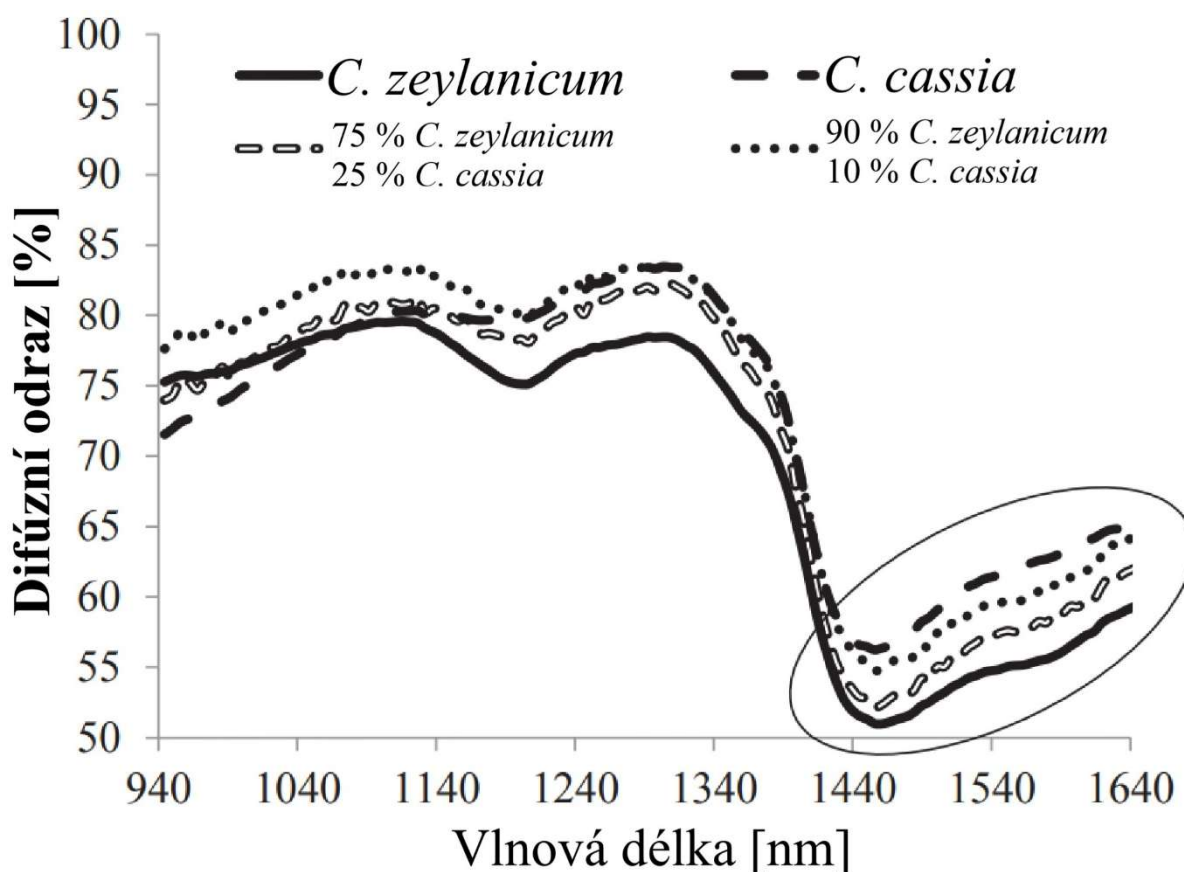
Graf 3: Chromatogram při stanovení obsahu kumarinu a trans-cinnamaldehydu [43]

Obecně mají vzorky cassií vyšší obsah cinnamaldehydu. Stanovení obsahu této sloučeniny nelze brát jako signifikantní parametr pro hodnocení autenticity skořice z důvodu její vysoké variability mezi vzorky. Jednou z příčin může být způsob skladování a s tím související vysoká volatilita cinnamaldehydu ve srovnání s kumarinem [43]. Určitou roli může hrát rovněž vysoká oxidační nestabilita cinnamaldehydu již při mírně zvýšené teplotě (35 °C) v atmosféře obsahující kyslík. Produktem těchto reakcí je nejčastěji benzaldehyd [47].

1.2.3 Spektrální metody

Spektrální metody označují další ze způsobů ověření autenticity skořice. Spadá sem hyperspektrální snímkování a NIR/IR spektrometrie. Tyto metody patří mezi nedestruktivní [42], což představuje výhodu oproti dříve zmíněným metodám. Hyperspektrální snímkování v oblasti viditelného až blízkého infračerveného záření (450 až 940 nm) představuje vhodnou metodu pro odhalení cizorodých příměsí užívaných při padělání mleté skořice. Naměřená data byla analyzována nástroji strojového učení. Na základě získaných výsledků byla úspěšně ověřena možnost detekce příměsí pšeničné a cizrnové mouky a prášku z mořské pěny v rozsahu 0 až 50 % hm. V případě obou druhů mouky činila spolehlivost 100 %, v případě prášku z mořské pěny pak 98,9 % [48].

Po analýze druhového zastoupení skořice v mleté skořici se používá spektrometrie v NIR nebo IR oblasti [26][49]. Oblast NIR odpovídá rozsahu vlnových délek přibližně 940 až 1640 nm. V této oblasti vlnových délek dochází k absorpci části záření především vazbami C–H, O–H a N–H. Ty se nachází především v sacharidech, proteinech, lipidech a vodě. Z hlediska rozlišení skořicovníku cejlonského (*C. zeylanicum*) a druhu *C. cassia* hraje zásadní roli oblast 1 440 až 1 640 nm. Uvedená metoda se osvědčila nejen pro odlišení čistých jednodruhových vzorků, ale i jejich směsí v různých poměrech [49].



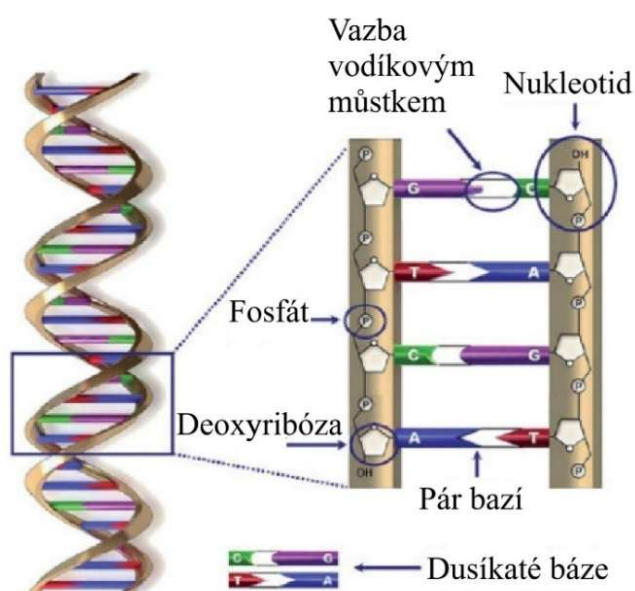
Graf 4: Spektrum vzorků skořice v NIR oblasti [49]

Určitou skupinu metod falšování skořice představuje přimíchávání destilačního zbytku po zisku esenciálních olejů. Příležitost pro odhalení těchto podvodů poskytuje analýza v infračervené oblasti (konkrétně 4000 až 600 cm^{-1} neboli $2,5$ až $16,67\text{ }\mu\text{m}$) pomocí metody FT-IR neboli infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací. Tato metoda dokázala poměrně dobře rozpoznat vzorky pravé skořice s příměsí *C. cassia* nebo destilačního zbytku. Nejvýznamnější rozdíly byly pozorovány v oblastech 1800 až 600 cm^{-1} a $3\ 500$ až $2\ 800\text{ cm}^{-1}$. Pro odhalení příměsi destilačního zbytku byl zásadní pík při $2\ 920\text{ cm}^{-1}$. Tento pík je charakteristický pro látky lipidické povahy (tj. včetně složek esenciálního oleje) a u vzorku destilačního zbytku zcela chyběl. Limitem této metody byl však obsah destilačního zbytku na úrovni 20% , který byl minimální pro detekci této metody falšování skořice [26].

1.3 DNA

1.3.1 Sktruktura

Struktura DNA (deoxyribonukleové kyseliny) byla poprvé popsána J. D. Watsonem a F. Crickem v roce 1953 [50]. Deoxyribonukleová kyselina se sestává ze dvou komplementárně spojených řetězců nukleotidů obtočených kolem společné osy. Oba řetězce jsou vzájemně spojeny vodíkovými můstky mezi nukleotidy. Bylo zjištěno, že poměr dusíkatých bází adenin ku thyminu a cytosin ku guaninu je roven jedné. Na základě těchto objevů byla formulována Watson-Crickova pravidla. Ta uvádí, že vzájemně komplementárními bázemi jsou adenin s thyminem a cytosin s guaninem [51]. Podobu dvoušroubovice DNA se všemi složkami uvádí Obrázek 11 [52].



Obrázek 11: Struktura DNA [52]

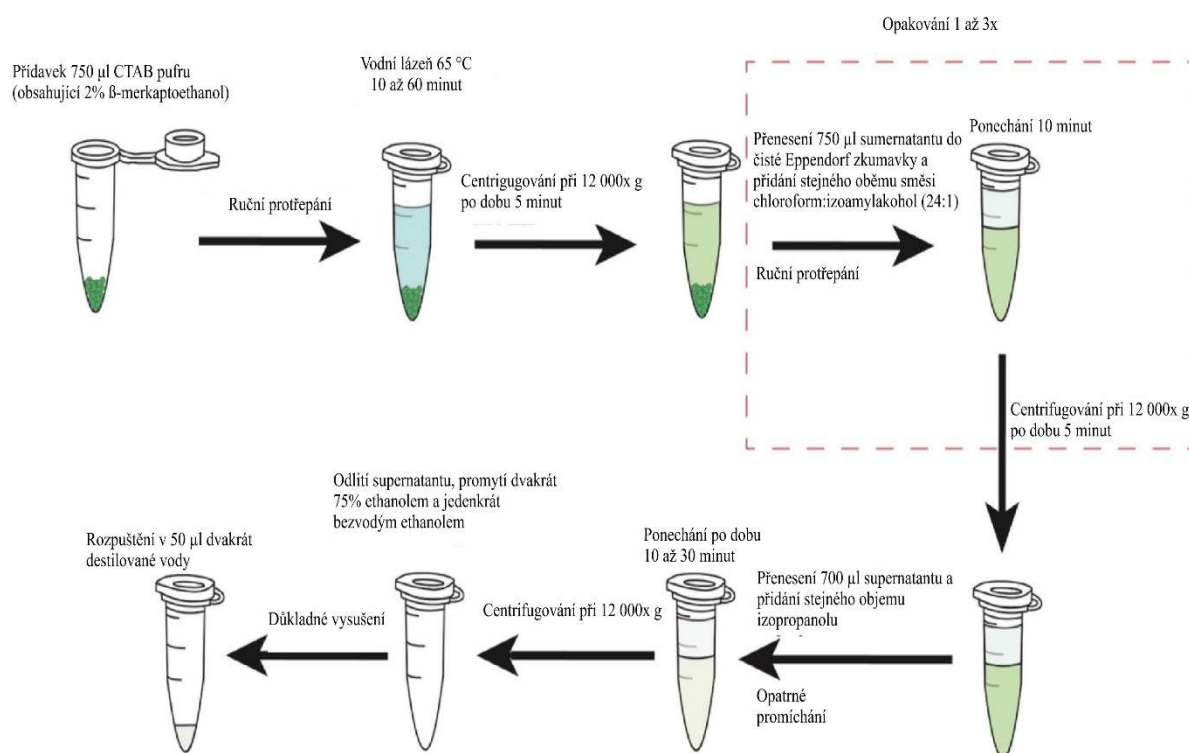
Šroubovice ds-DNA se může vyskytovat v několika formách. Nejběžnějším typem vyskytujícím se v buňkách je B-DNA, která je pravotočivá. Na jedno otočení připadá v průměru 10,5 nukleotidu. Průměr dvoušroubovice B-DNA je 2 nm. Délka jednoho závitů dosahuje 3,57 nm. Dalším typem pravotočivé šroubovice je A-DNA. U A-DNA připadá na jeden závit 11 nukleotidů. Průměr A-DNA je 2,3 nm a délka závitů činí 2,80 nm. Příkladem levotočivé DNA je Z-DNA. Ta je tvořena 12 nukleotidy na otáčku. Její průměr je 1,8 nm. Délka jedné otáčky dosahuje 4,4 nm [53].

1.3.2 Izolace DNA

Izolace DNA v odpovídající čistotě a koncentraci představuje základní požadavek pro následné analýzy [54]. Optimální způsob izolace DNA není shodný napříč všemi organismy. Existují poměrně univerzální postupy izolace DNA z rostlinných materiálů [55]. Výhodou těchto metod je rychlost izolace DNA a nepoužívání těkavých zdraví škodlivých látek. Příkladem takové

izolace je extrakce pomocí extrakčního pufru složeného z 200 mM Tris HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA a 0,5% roztoku dodecylsírany sodného (SDS). Extrakt se centrifuguje. Supernatant je přenesen do čisté zkumavky typu Eppendorf, kde je smíchán se shodným objemem isopropanolu. Roztok se ponechá při pokojové teplotě po dobu dvou minut a následně centrifuguje. Získaný pelet se vysuší na vakuové odparce a následně rozpustí v TE pufru. Celá extrakce zabírá méně než 15 minut a získaná DNA je, při skladování za vhodných podmínek, použitelná více než rok [56]. Nevýhodou obdobných metod je zvýšená možnost kontaminace izolátu DNA polysacharidy a polyfenoly. Tento problém nastává například u stromů z tropických oblastí [55]. Přítomnost zvýšeného množství polysacharidů v izolátu DNA inhibuje Taq polymerázu při polymerázové řetězové reakci. Polyfenoly vytváří kovalentní vazby s DNA čímž znemožňují jakékoliv molekulární analýzy [57].

Alternativní metodu představuje izolace pomocí CTAB protokolu. Výhodou tohoto postupu je získání DNA o vysoké čistotě bez přítomnosti inhibitorů. Samotný postup je založen na opakované centrifugaci a precipitaci, což činí tuto metodu značně časově náročnou. Uváděná doba extrakce se pohybuje v rozmezí 3 až 4 hodin v závislosti na počtu precipitačních kroků [58]. Při extrakci DNA tímto postupem je k mechanicky narušeným buňkám rostlinného vzorku přidán extrakční pufr složený z Tris-HCl, EDTA, NaCl, CTAB (neboli cetyltrimethylamoniumbromidu) a β -merkaptoethanolu. Vzorek se inkubuje za zvýšené teploty několik desítek minut. Následně je k roztoku přidána směs chloroformu s izoamylalkoholem. Roztok je centrifugován. Odebraný supernatant je smíchán se studeným isopropanolem, který zajistí vysrážení DNA. Vzniklý pelet je opakovaně přečištěn pomocí ethanolu, důkladně vysušen na vakuové odparce a rozpuštěn v malém objemu destilované vody [59]. Příklad konkrétního postupu izolace DNA pomocí CTAB protokolu ilustruje Obrázek 12 [58].



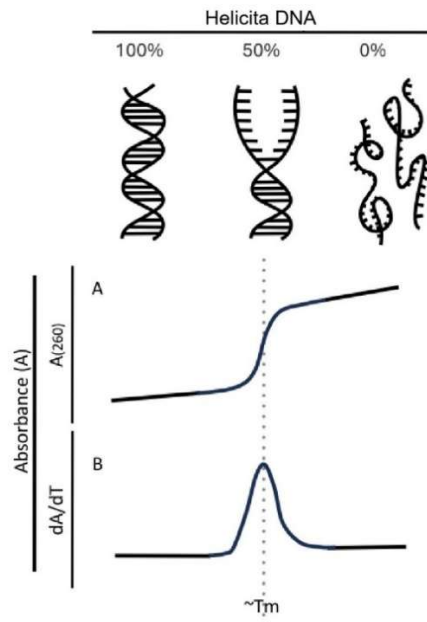
Obrázek 12: Schéma extrakce DNA pomocí CTAB protokolu [58]

1.3.3 Čistota a koncentrace

Ke stanovení čistoty a koncentrace DNA se často využívá absorbance v UV oblasti. Zásadní roli hrají vlnové délky 230, 260 a 280 nm [54]. Vychází se ze skutečnosti, že nukleové kyseliny DNA i RNA mají absorpční maxima při 260 nm. Přičemž absorbance ssDNA je vyšší než absorbance dsDNA. Naopak při 230 nm dosahuje jejich absorbance lokálního minima. Při stanovení koncentrace DNA se vychází z předpokladu, že A_{260} roztoku dsDNA o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je rovna 1 [60]. Čistotu lze stanovit pomocí poměru A_{260}/A_{280} . Jeho hodnota se u čistého vzorku DNA pohybuje kolem 1,8. Pokud je vyšší než 2, značí to kontaminaci RNA. Pokud je naopak $\leq 1,6$, je vzorek kontaminovaný proteiny. Z poměru A_{260}/A_{230} lze rovněž stanovit čistotu vzorku, nicméně poskytuje méně přesné výsledky než dříve zmíněný poměr A_{260}/A_{280} . V ideálním případě se tento poměr A_{260}/A_{230} pohybuje v rozmezí 2,0 až 2,2. V případě nižších hodnot lze konstatovat kontaminaci proteiny, EDTA, sacharidy, lipidy, solemi či fenolickými látkami [54].

1.3.4 Denaturace

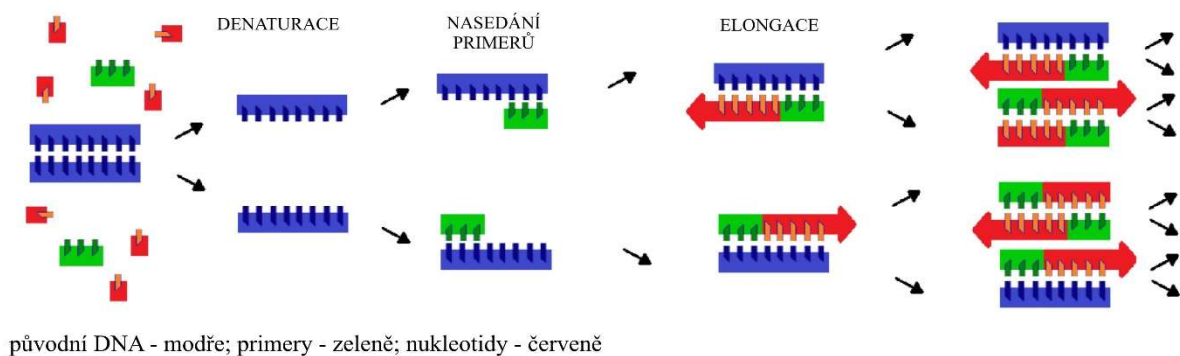
Při denaturaci DNA dochází k přerušení vodíkových můstků a vzniku dvou samostatných vláken označovaných jako ss-DNA. DNA může být denaturována chemicky (např. změnou pH nebo vysokou iontovou silou) či tepelně. Teplota denaturace je ovlivněna mimo jiné zastoupením cytosinu a guaninu [61]. Cytosin vytváří s guaninem tři vodíkové můstky, zatímco adenin s thyminem pouze dva [50]. Vyšší zastoupení cytosinu a guaninu činí DNA termostabilnější a posouvá teplotu denaturace k vyšším hodnotám [61]. Průběh denaturace lze zjišťovat měřením absorbance v UV oblasti (zejména při 260 nm). Vychází se z poznatku, že součet absorbance dvou ss-DNA vzniklých denaturací je vyšší než absorbance původní mateřské ds-DNA. Při denaturaci dochází k prudkému nárůstu absorbance záření o vlnové délce 260 nm (viz Obrázek 13). Při dosažení inflexního bodu absorpční křivky proběhla denaturace právě z 50 % [62]. Teplota, při níž bylo dosaženo inflexního bodu absorpční křivky, se nazývá teplota tání DNA a obvykle se označuje T_m [61].



Obrázek 13: Průběh absorpance UV záření při denaturaci DNA zvýšenou teplotou [62]

1.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce představuje základní analytickou metodu využívanou v molekulární biologii. Jejím cílem je zvýšení koncentrace DNA na analyzovatelnou koncentraci. Objevena byla týmem molekulárního biologa Karyho Mullise v roce 1983 [63]. Principiálně se PCR skládá ze sekvence tří mnohokrát se opakujících kroků. Prvním krokem je denaturace, při níž dochází ke vzniku dvou vláken ss-DNA z jednoho dvojvlákna ds-DNA. Následuje hybridizace, při níž se na specifické místo ss-DNA váže úsek oligonukleotidů nazývaný primer. V posledním kroku za účasti enzymu DNA polymerázy dochází k elongaci úseků primerů pomocí deoxynukleosidtrifosfátů. Během každého kroku dochází k zdvojnásobení množství DNA. Při prvním použití PCR byla využívána DNA polymeráza z bakterie *Escherichia coli*. Ta není termostabilní a během denaturačního kroku je sama denaturována. Z tohoto důvodu vyžadovala první PCR opětovné přidávání DNA polymerázy v každé sekvenci kroků, konkrétně po ochlazení následujícím po denaturaci [64].



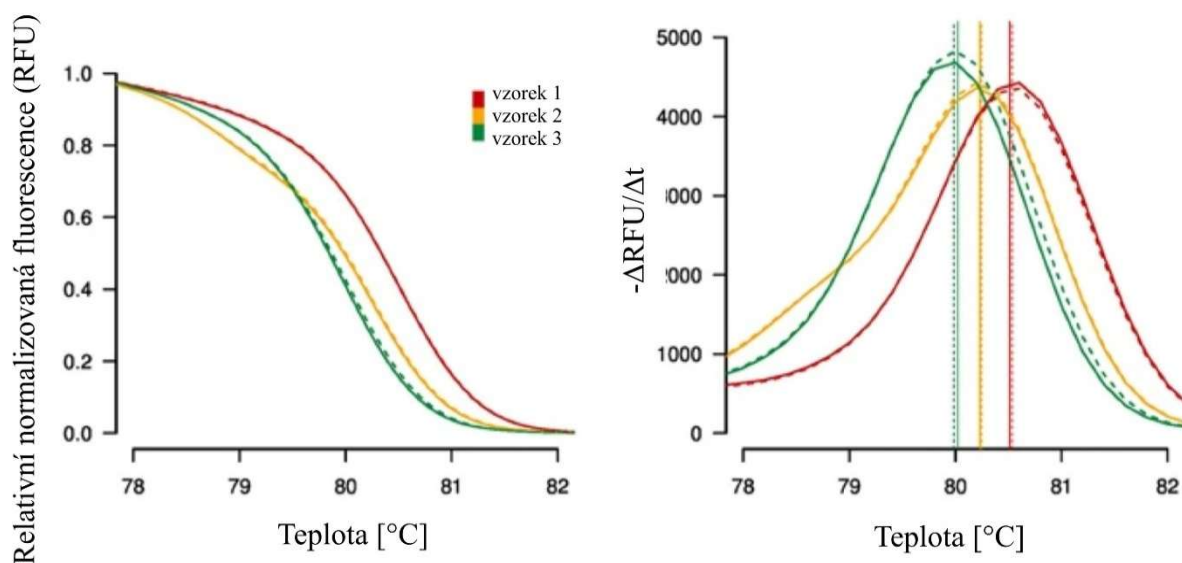
Obrázek 14: Schéma PCR [65]

V současnosti je využívána termostabilní DNA polymeráza, která odolává obvyklé denaturační teplotě 95 °C. Tím pádem ji stačí přidat do reakční směsi pouze na počátku. První a dosud hojně používanou je DNA polymeráza pocházející z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* [66]. Tříkrokový teplotní profil reakce je prováděn ve speciálním přístroji zvaném termocycler. Ten umožňuje paralelně provádět PCR pro mnoho vzorků souběžně [63]. V reakční směsi jsou kromě vzorku DNA a enzymu DNA polymerázy obsaženy hořečnaté ionty, které slouží jako kofaktor DNA polymerázy, nukleotidy a dva druhy primerů označované jako *forward* a *reverse*. Součástí PCR směsi je i voda [67].

1.5 PCR s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (real-time PCR-HRM)

Jednou z variant PCR je PCR v reálném čase (real-time PCR). Ta kombinuje princip klasické PCR s detekcí průběhu reakce v reálném čase. Detekce vznikajících amplikonů probíhá pomocí fluorescence. Využívá se schopnosti interkalačních barviv vázat se na ds-DNA. Míra fluorescence odpovídá množství ds-DNA. Nevýhodou použití interkalačních barviv (např. SYBR Green) je jejich nespecifita. To znamená, že se vážou na všechnu dostupnou ds-DNA včetně nespecifických produktů [68]. Pro detekci pouze specifických produktů PCR lze použít značené sondy, které jsou schopny vazby pouze na specifické úseky DNA. Tímto způsobem lze účinně rozpoznat specifické produkty od nespecifických [69].

Nadstavbu real-time PCR představuje vysokorozlišovací analýza křivek tání. Tato metoda je založena na měření intenzity fluorescence vzorku DNA v průběhu její denaturace (tj. v závislosti na zvyšující se teplotě) [70]. Postupným zvyšováním teploty dochází k denuraci ds-DNA na dvě vlákna ss-DNA. Průběh denaturace je ovlivněn zastoupením a pořadím jednotlivých párů nukleotidů [61]. Při HRM lze detekovat změnu i jen několika párů bází na základě odlišného průběhu denaturační křivky [70]. Výslednou křivku tání lze zobrazit v normalizované a derivované podobě (graf 5) [71]. Na základě těchto rozdílů lze rozpoznat i blízce příbuzné druhy [72], které jsou jinými metodami velmi obtížně rozpoznatelné. Výhodou qPCR-HRM je rovněž rychlost provedení analýzy [70].



Graf 5: Příklad křivek tání v podobě normalizované a derivované křivky [71]

1.6 Chromatografie

1.6.1 Princip a využití

Chromatografické techniky jsou založeny na principu separace dvou či více složek ve směsi na základě interakcí separovaných látek se stacionární a mobilní fází [73]. Stacionární fáze je v procesu separace nehybná a vytváří prostředí pro vzájemné interakce [74]. Mezi stacionární fází a separovanou složkou působí van der Waalsovy síly či sterické interakce. Adsorpční místa stacionární fáze jsou omezena pouze na povrch. Z tohoto důvodu bývá stacionární fáze tvořena porézními strukturami [75]. Mobilní fází tvoří kapalina nebo plyn. Rychlost pohybu a složení mobilní fáze přímo určuje schopnost separace. Na základě uspořádání stacionární a mobilní fáze a způsobu interakcí lze rozlišit mnoho chromatografických metod [74].

Chromatografie představuje široce rozšířenou techniku. Představuje univerzální metodu pro kvalitativní i kvantitativní analýzy, stejně tak může sloužit jako preparativní technika [75]. V současné době jsou chromatografické techniky hojně využívány v oblasti monitoringu životního prostředí, bezpečnosti potravin, ve farmacii [73], forenzní chemii [74] či petrochemii [76].

1.6.2 Rozdělení

1.6.2.1 Rozdělení dle uspořádání

Chromatografické techniky lze na základě uspořádání rozdělit na planární, kapalinovou a plynovou chromatografii. Prvním objeveným a používaným typem chromatografie je planární chromatografie [77]. Planární chromatografie představuje flexibilní a jednoduchou separační techniku umožňující paralelně separovat několik vzorků naráz. Ve svém uspořádání se jedná o stacionární fází tvořenou papírem či jiným porézním materiálem. Planární chromatografie, která využívá další porézní materiály, se nazývá tenkovrstvá chromatografie (TLC) [78]. Pohyb mobilní fáze je u TLC zajištěn kapilárními silami vytvářenými mezi porézními částicemi. Oproti jiným chromatografickým technikám je planární chromatografie levnější, ale v mnoha případech může vznikat problém s reprodukovatelností výsledků [79].

Kolonová chromatografie představuje jistý protiklad planární chromatografie. Zahrnuje kapalinovou a plynovou chromatografii. Obě tyto techniky mají společné uspořádání fází. Stacionární fáze je tvořena výplní kolony či jejím povrchem. Mobilní fází se rozumí tekutina (kapalina či plyn), která proudí skrz kolonu. Výhodou kolonové chromatografie je vyšší povrch stacionární fáze a tím vyšší účinnost separace ve srovnání s planární chromatografií [77]. Kapalinová chromatografie se využívá při separaci rozpuštěných složek v roztoku. Plynová chromatografie nalézá uplatnění při analýze složek těkavých [74]. Existuje mnoho provedení obou typů chromatografie. Všechny jsou založeny na shodných způsobech separace [75].

Nejstarší a nejdéle používanou z nich je adsorbční chromatografie. Tato metoda je založena na povrchové sorpci molekul na povrchu stacionární fáze. Rozhodující roli hraje polarita analytu. Polárnější molekuly jsou adsorbovány na stacionární fázi pevněji a prochází pomaleji. Naopak méně polární molekuly interagují se stacionární fází méně a prochází kolonou rychleji. Eluci adsorbovaných látek ovlivňuje i polarita mobilní fáze. Mobilní fáze s větší polaritou více interaguje se stacionární fází, zabírá vazebná místa a snižuje retenční čas analytu [81]. Roli hraje rovněž i samotný tvar a velikost molekul, kdy jsou snáze sorbovány molekuly protáhlejšího tvaru, které mají větší styčnou plochu se stacionární fází v poměru ke své hmotnosti [82].

Vylučovací chromatografie separuje složky na základě velikosti částic [80]. K tomu využívá principu molekulového síta. Velké molekuly difundují do pórů stacionární fáze jen velmi omezeně a prochází kolonou rychleji. Proti tomu drobné molekuly jako ionty solí snadno vstupují do stacionární fáze, kde jsou zpomalovány, a prochází kolonou nepoměrně pomaleji [83].

Iontově výměnná chromatografie je založena na reverzibilních interakcích opačně nabitých částic přítomných ve vzorku [77]. Stacionární fáze je v tomto případě tvořena iontoměničem, který může být dvojího typu – kationtoměnič a aniontoměnič. Kationtoměnič je nabitý záporně a přitahuje kationty z roztoku. Aniontoměnič má kladný náboj a přitahuje anionty. Iontoměniče jsou dále děleny dle vlivu pH na jejich náboj. Silné iontoměniče mají náboj stabilní nezávisle na pH. Náboj slabých iontoměničů ovlivňuje pH [80].

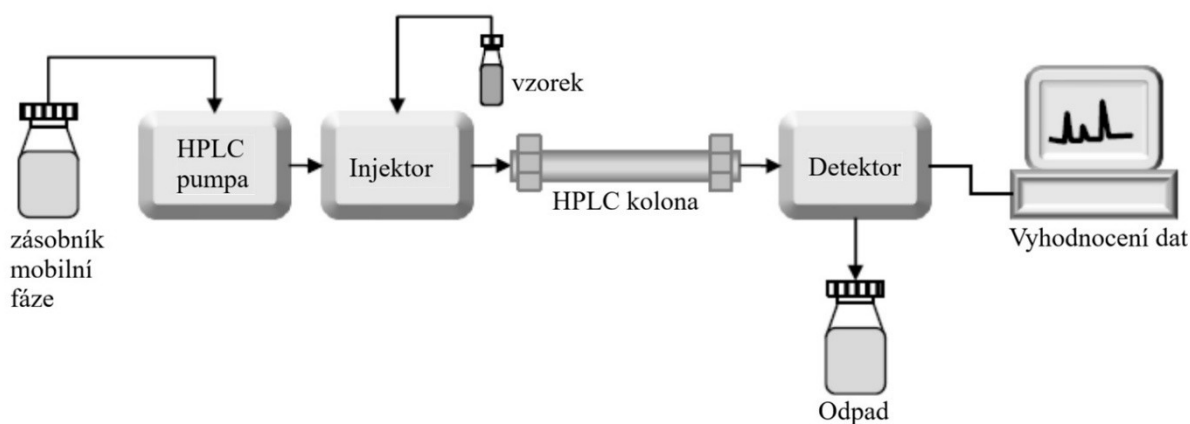
Rozdělovací chromatografie popsaná v roce 1941 je založena na rozdílné rozpustnosti separovaných složek ve vzájemně nemísitelných kapalinách. V případě rozdělovací chromatografie je stacionární i mobilní fáze tvořena kapalinou. Stacionární fáze tvořená kapalinou je pevně adsorbovaná na nosiči [84], čímž vytváří na jeho povrchu slabý film a tvoří samotnou stacionární fázi. Na základě rozdílné rozpustnosti dělených složek ve stacionární a mobilní fázi se ustanovuje rovnováha [80]. Uvedený stav je charakterizován veličinou zvanou rozdělovací koeficient. Ten byl popsán jako poměr hmotnostní koncentrace rozdělované látky ve stacionární fázi ku její hmotnostní koncentraci v mobilní fázi [84]. Rozdělovací chromatografie může pracovat ve dvou módech. Chromatografie na normální fázi užívá polární kapalinu jako stacionární fázi a nepolární kapalinu jako mobilní fázi. Nosičem stacionární fáze je nejčastěji silikagel. V tomto případě jsou dříve eluovány nepolární látky oproti polárním. Druhým způsobem je chromatografie na reverzní fázi. Při ní slouží nepolární kapalina jako stacionární fáze a polární kapalina jako mobilní fáze. Stacionární fáze bývá vázaná na dlouhé uhlovodíkové zbytky. Při reverzním módu jsou nejprve eluovány polární látky, což činí tuto techniku používanější zejména z důvodu zkrácení potřebného času pro separaci [85].

Afinitní chromatografie představuje nejselektivnější chromatografickou separační techniku [75]. Jedná se o častou techniku užívanou k separaci biologických látek. Využívá širokou škálu vzájemných velmi selektivních interakcí separovaných složek se stacionární fází. Příkladem mohou být interakce mezi enzymy a substráty, inhibitory a kofaktory; protilátkami a antigeny; nukleovou kyselinou a k ní komplementární sekvencí; ionty kovů a proteiny s polyhistidinovou sekvencí. Výsledná selektivita je dána souhrnem více vazebných

a nevazebných interakcí, které zahrnují elektrostatické a hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly a vazbu vodíkovým můstkem. Souhrn těchto interakcí zajišťuje extrémní selektivitu a schopnost separovat např. proteiny s tisícnásobným navýšením čistoty v jednom separačním kroku [77].

1.6.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV-VIS detekcí

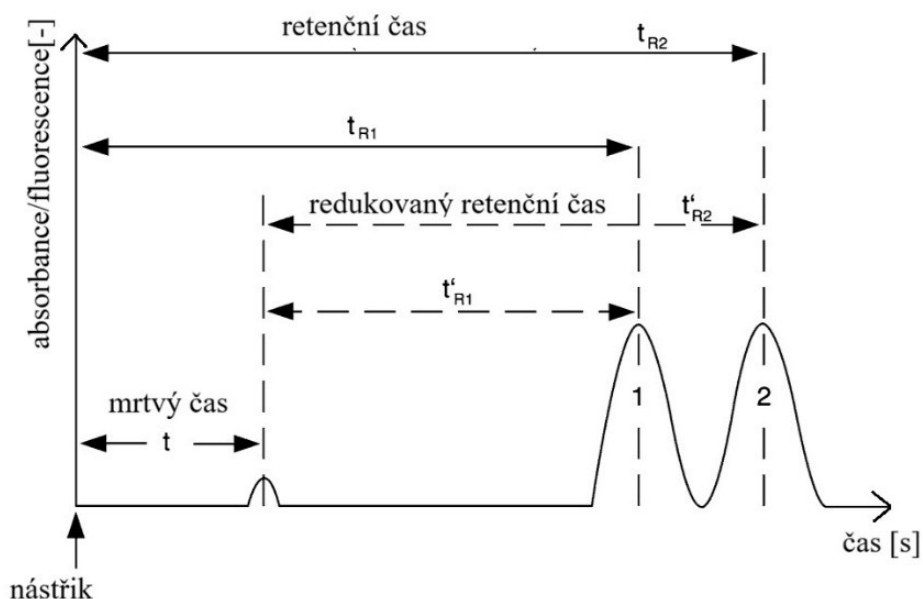
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) představuje významnou analytickou metodu využívanou v mnoha odvětvích [73]. V principu se jedná o kolonovou kapalinovou chromatografii využívající nejčastěji vylučovací, iontově výměnnou či rozdělovací chromatografii pracující na principu reverzní fáze či normální fáze. Kolona je tvořena velmi jemnými částicemi stacionární fáze o velikosti řádově v jednotkách mikrometrů. Ty vytváří velký odpor vůči proudící mobilní fázi. Součástí instrumentace HPLC je čerpadlo/pumpa, která slouží k překonání odporu vytvářeného stacionární fází a k přesnému dávkování mobilní fáze [85]. Čerpadlo musí umožňovat práci v izokratickém i gradientovém módu. Při izokratickém módu se složení mobilní fáze v průběhu separace nemění. Gradientový mód umožňuje lepší rozlišitelnost složek, které se eluují dříve, a současně zkracuje čas eluce později eluovaných složek. Analyzovaný vzorek je do proudu mobilní fáze vstříknut v injektoru. Odtud vstupuje spolu s mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek analyzovaného vzorku [86]. Mobilní fáze spolu s jednotlivými složkami analytu vstupuje do detektoru. Schéma instrumentace HPLC uvádí obrázek 17 [87].



Obrázek 17: Schéma instrumentace HPLC [87]

Pro detekci průchodu jednotlivých složek slouží detektor. Jeho cílem je převést některou z fyzikálních či chemických vlastností analytu na elektrický signál. Nejběžnějšími způsoby detekce jsou UV/VIS a fluorescenční detekce, dále elektrochemická a vodivostní detekce, měření indexu lomu a hmotnostní spektrometrie [86]. Jedním z nejužívanějších typů je UV/VIS detekce. Její velkou výhodou je fakt, že tato metoda detekce nemění strukturu a vlastnosti analytu. Ten může být následně využit i k dalším analýzám [87]. Stejnou vlastnost má i fluorescenční detekce, která je oproti UV/VIS více selektivní, ale její nevýhodou je úzká specializace na omezené množství přirozeně fosforeskujících látek [86].

Výstup UV/VIS i fluorescenční detekce se nazývá chromatogram. Z něho lze vyčíst kvalitativní i kvantitativní složení analyzovaného vzorku. Kvalitativní údaj reprezentuje retenční čas. Retenční čas označuje čas od nástřiku vzorku do jeho detekce detektorem. Případně se používá redukovaný retenční čas, což je retenční čas ponížený o tzv. mrtvý čas neboli čas, který trvá mobilní fází průchod od injektoru k detektoru. Redukovaný retenční čas označuje čas, který strávil analyt v koloně [88]. Kvantitativní vyhodnocení se provádí na základě výšky či přesněji dle plochy píku. Údaj samotný nepředstavuje absolutní hodnotu, kterou lze přímo interpretovat. K jeho interpretaci se nejčastěji využívá kalibrační přímka, ze které lze vyčíst konkrétní kvantitativní údaj analytu ve vzorku [89].



Graf 6: Příklad chromatogramu [88]

1.7 Shluková analýza

Shluková analýza představuje jednu z běžných statistických metod. Jejím cílem je přiřadit k sobě objekty (např. měření), které jsou si blízké [89]. Tímto způsobem lze sdružit dané objekty, o kterých máme mnoho různých typů informací. Jejich samostatné vyjádření vytváří velmi nepřehledné tabulky čísel a znemožňuje názornou vizualizaci dat. Shluková analýza poskytuje řešení těchto problémů, nicméně za cenu ztráty části informací [90]. Cílem shlukové analýzy je vytvořit shluky objektů tak, aby si objekty uvnitř shluku byly co nejvíce podobné a současně objekty z různých shluků byly podobné co nejméně. Tento systém lze připodobnit k vytváření taxonomického stromu organismů. Blízce příbuzné druhy jsou řazeny do stejné čeledi či rodu, a naopak nepříbuzné druhy náleží do jiné říše či domény [91].

Za účelem získání vhodné charakteristiky pro posuzování blízkých objektů se zavádí pojmy podobnost a vzdálenost [92]. Podobnost se často využívá k hodnocení kvalitativních dat. Je definována jako podíl počtu shodných znaků ku celkovému počtu znaků. Nabývá hodnot od 0 po 1, přičemž podobnější objekty mají hodnoty blíže jedné. Pro posouzení kvantitativních dat se nejčastěji využívá stanovení vzdálenosti [93].

1.7.1 Metody měření vzdáleností kvantitativních dat

Při stanovení vzdálenosti se uvažuje o umístění objektů v dimenzi o p dimenzích. Každá dimenze představuje jednu z proměnných [92]. Pro stanovení vzdáleností mezi dvěma objekty se využívá několik způsobů. Jedná se o stanovení Euklidovské, Manhattan nebo též city-block, Čebyševovy a Minkowského vzdálenosti. Vzniká matice vzdáleností obsahující vzdálenosti mezi každou dvojicí objektů. Ta je následně využita pro shlukování [91]. Nejčastěji používanou metodou posuzování vzdálenosti je Euklidovská vzdálenost. Jedná se o prostou přímou vzdálenost mezi dvěma objekty v p dimenzionálním prostoru [94]. Ve specifických případech se užívá vzdálenost typu Manhattan či Čebyševova vzdálenost. Minkowského vzdálenost například umožňuje jednotlivým proměnným (dimenzím) přiřadit specifickou váhu. Níže jsou jednotlivé vzdálenosti definovány [91]:

$$\text{Euklidovská vzdálenost:} \quad d_{ES}(x_i, x_{i'}) = \sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{i'j})^2$$

$$\text{Manhattanská vzdálenost:} \quad d_{CB}(x_i, x_{i'}) = \sum_{j=1}^p |x_{ij} - x_{i'j}|$$

$$\text{Čebyševova vzdálenost:} \quad d_C(x_i, x_{i'}) = \max_j |x_{ij} - x_{i'j}|$$

$$\text{Minkowského vzdálenost:} \quad d_M(x_i, x_{i'}) = \sqrt[m]{\sum_{j=1}^p w_j^m |x_{ij} - x_{i'j}|^m}$$

kde: x_i a $x_{i'}$ je dvojice posuzovaných objektů; p je počet proměnných; w_j^m váha proměnné.

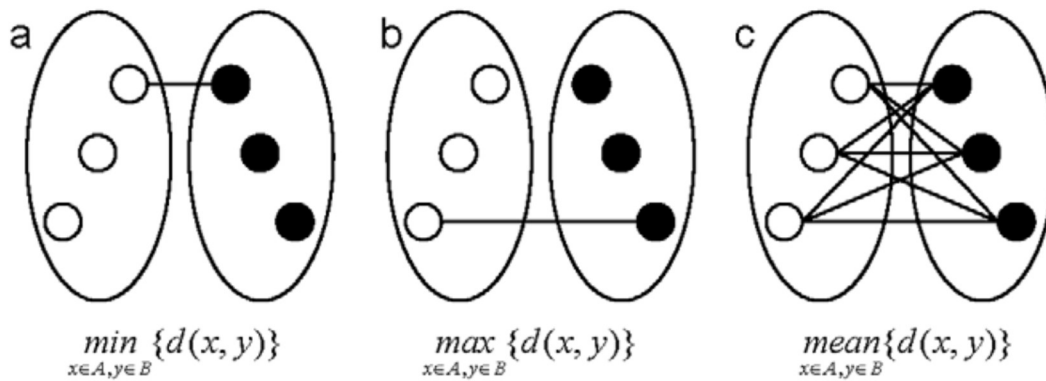
1.7.2 Metody shlukování dat

1.7.2.1 Hierarchické shlukování

Hierarchické shlukování představuje první z užívaných typů shlukování. Vytvářené shluky mají hierarchické řazení – obsahují shluky různých úrovní. Tento systém odpovídá zmíněnému taxonomickému stromu. Hierarchické shlukování lze provádět divizním a aglomerativním přístupem. Divizní přístup chápe celý soubor objektů jako jeden shluk, který postupně dělí na dva menší shluky, které jsou opakovaně dále děleny. Obecně užívanějším je aglomerativní přístup. Ten chápe každý objekt jako samostatný shluk. Následně vytváří společný shluk ze dvou nejbližších shluků a postupuje, dokud nevytvoří ze všech objektů jeden shluk. Při vytvoření nového shluku jsou přepočítány vzdálenosti mezi shluky. Výstupem hierarchického shlukování je obvykle dendrogram [93].

Pro posuzování vzdáleností mezi shluky se využívají tři metody. První z nich je metoda nejbližšího souseda. Ta definuje vzdálenost shluků jako vzdálenost dvou nejbližších objektů (shluků prvního řádu), kde každý pochází z jiného shluku. Naopak metoda

nejvzdálenějšího souseda bere v potaz vzdálenost nejvzdálenějších dvou objektů uvnitř posuzovaných shluků. Metoda průměrné vazby stanoví vzdálenost mezi shluky jako průměrnou vzdálenost mezi všemi dvojicemi objektů mezi shluky [94]. Uvedené metody stanovení vzdáleností shluků zobrazuje Obrázek 18: a – metoda nejbližšího souseda, b - metoda nejvzdálenějšího souseda, c- metoda průměrné vazby [95].



Obrázek 18: Znárodnění metod stanovení vzdálenosti mezi shluky [95]

1.7.2.2 Nehierarchické shlukování

Při nehierarchickém shlukování je znám dopředu konečný počet shluků, který se volí na základě dřívějších analýz nebo zcela náhodně [94]. Objekty jsou náhodně rozčleněny mezi dané shluky a probíhá výpočet centroidu každého shluku. Následně u každého objektu individuálně posouzeno, zda je centroid shluku, kterého byl zařazen, jeho nejbližším centroidem. V případě, že ne, je objekt přeřazen do shluku, jehož centroidu je blíže. Celý postup je opakován, dokud nesplňují všechny objekty podmínku nejbližšího centroidu [92]. Výsledky nehierarchického shlukování lze zobrazit jako body sdružené do shluků ve 2D či 3D prostoru. V případě více proměnných (dimenzí) lze využít obrysový graf [91].

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je:

1. Izolace DNA z listů skořicovníku a z komerčních vzorků mleté skořice a stanovení její koncentrace a čistoty
2. Analýza komerčních vzorků pomocí qPCR-HRM
3. Analýza komerční vzorků pomocí HPLC
4. Srovnání obou použitých metod

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité vzorky

3.1.1 Vzorky listů skořicovníků

Vzorky listů skořicovníků pocházely z Botanické zahrady Fakulty tropického zemědělství České zemědělské univerzity v Praze, Botanické zahrady Univerzity Komenského v Bratislavě a Botanické zahrady Jardín Botánico La Concepción v Malaze (Španělsko).

Tabulka 9: Seznam použitých vzorků listů skořicovníků

Český název	Vědecký název
skořicovník cejlonský (pravý)	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (syn. <i>C. verum</i>)
skořicovník indonéský	<i>Cinnamomum burmanii</i>
skořicovník kafrovník	<i>Cinnamomum camphora</i>
skořicovník japonský	<i>Cinnamomum japonicum</i>
skořicovník tamala	<i>Cinnamomum tamala</i>

3.1.2 Komerční vzorky mleté skořice

Použité komerční vzorky mleté skořice byly zakoupeny v maloobchodní síti v České republice. Abecední seznam použitých vzorků mleté skořice uvádí Tabulka 10. Použité označení ve výsledkové části z důvodu anonymizace vzorků neodpovídá pořadí v této tabulce.

Tabulka 10: Abecední seznam komerčních vzorků mleté skořice

Prodejce	Označení
Avokádo	Skořice mletá
It's Natural	Skořice mletá BIO
K-Classic	Skořice mletá
Kotanyi	Skořice cejlonská mletá
Kotanyi	Skořice mletá
Profi koření	Skořice cejlonská mletá
Profi koření	Skořice mletá
Vitana	Skořice mletá

3.2 Použité chemikálie

- Acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich, USA)
- Cetyl trimethylamonium bromid (CTAB) (Sigma-Aldrich, USA)
- EliGene Plant DNA Isolation Kit (Elisabeth Pharmacon, ČR)
- Ethanol (Lachner, ČR)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Německo)
- Chlorid sodný (Lachner, ČR)
- Chloroform:isoamyl alkohol (Serva, Německo)
- Isopropanol (Carlo Erba, Německo)
- Methanol pro HPLC, (Sigma-Aldrich, USA)
- Octan amonný (Lachner, ČR)
- PCR ultra H₂O (Top-Bio, ČR)
- Polyvinylpyrrolidin (Sigma-Aldrich, USA)
- Primery ITS-2, psbA-trnH , TPS 1, TPS 3, TPS 183, TPS 250
- qPCR 2x SYTO-9, Master Mix (Top-Bio, ČR)
- TE pufr (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Tris-HCl (Thermo Fischer Scientific, USA)
- β – merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

3.3 Použité přístroje a laboratorní vybavení

- Centrifuga Z 366 K (Hermle, Německo)
- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (Biosan, Švýcarsko)
- Laboratorní váhy KERN CM 60-2N (UNIPRO-ALPHA, ČR)
- Mikropipety Acura Manual 825 (Socorex, Švýcarsko)
- Mikropipety Discovery comfort (HTL, Polsko)
- Mikropipety Finnpiquette F2 (Thermo Scientific, USA)
- Mikrozkuhavky typu Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Mini incubator LABNET 230 V (Termo Fisher Scientific, USA)
- MS2 Minishaker Vortexer (IKA Works, Německo)
- Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 (Termo Fisher Scientific, USA)
- Kolona Kinetex 150 × 4,6 × 2,6 μm
- Spektrometr NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Stříkačkové filtry 0,45 μm Nylonové (Chromservis, ČR)
- Termocykler LightCycler Nano (Roche, Švýcarsko)
- Třecí miska a tlouček (JIPO, ČR)

3.4 Pracovní postup

3.4.1 Izolace DNA

Listy skořicovníků byly před extrakcí DNA přes noc lyofilizovány. Jejich navážka činila 0,1 g pro izolaci pomocí Plant DNA Isolation Kit. Navážka mleté skořice činila 0,05 g pro izolaci pomocí Plant DNA Isolation Kit a 0,1 g pro izolaci pomocí CTAB protokolu. Izolace DNA probíhala ve dvou opakováních u každého vzorku.

3.4.1.1 Izolace DNA pomocí kitu *EliGene*

Navážka rostlinného materiálu byla umístěna do 1,5ml zkumavky typu Eppendorf. Do zkumavky bylo přidáno 450 μ l homogenizačního pufru P1 a 0,1 g homogenizačního písku. Pomocí plastového tloučku byly třením o stěny zkumavky buňky mechanicky rozbity. Následně byla zkumavka krátce zvortexována. Do zkumavky bylo přidáno 50 μ l lyzačního pufru P2 a zkumavka byla krátce zvortexována. Obsah zkumavky byl inkubován po dobu 10 minut při 65 °C. V průběhu inkubace byla zkumavka opětovně krátce zvortexována. Po skončení inkubace byla zkumavka centrifugována po dobu 3 minut při 10 000 \times g a 22 °C.

Supernatant byl přenesen do čisté 1,5ml zkumavky typu Eppendorf, bylo přidáno 175 μ l inhibitory odstraňujícího pufru P3 a zkumavka byla krátce zvortexována. Zkumavka byla umístěna na 5 minut do mrazáku. Po vyjmutí z mrazáku byla zkumavka centrifugována po dobu 3 minut při 10 000 \times g a 22 °C. Supernatant byl přenesen do čisté 2ml zkumavky typu Eppendorf, bylo přidáno 500 μ l vazebného pufru P4, který byl dopředu předeřán na 65 °C, a zkumavka byla krátce zvortexována. Do zkumavky bylo přidáno 500 μ l vazebného pufru P5 a zkumavka byla krátce zvortexována.

Na spin filtr, který byl opatřen záchytnou zkumavkou, bylo přeneseno 750 μ l vzorku. Spin filtr se zkumavkou byl centrifugován po dobu 1 minuty při 10 000 \times g a 22 °C. Roztok ze sběrné zkumavky byl odstraněn a postup byl opakován se zbytkem roztoku.

Spin filtr byl umístěn do čisté 1,5ml zkumavky typu Eppendorf. Na spin filtr bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru P6. Spin filtr se zkumavkou byl centrifugován po dobu 1 minuty při 10 000 \times g a 22 °C. Roztok ze sběrné zkumavky byl odstraněn a na spin filtr bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru P7. Spin filtr se zkumavkou byl centrifugován po dobu 1 minuty při 10 000 \times g a 22 °C. Obsah sběrné zkumavky byl odstraněn a spin filtr se sběrnou zkumavkou byl centrifugován po dobu 2 minut při 12 000 \times g a 22 °C.

Spin filtr byl umístěn do čisté 1,5ml sběrné zkumavky typu Eppendorf. Na spin filtr bylo přidáno 100 μ l elučního pufru P8. Spin filtr se sběrnou zkumavkou byl inkubován po dobu 5 minut při 65 °C. Spin filtr se zkumavkou byl centrifugován po dobu 1 minuty při 10 000 \times g a 22 °C. Získaná zkumavka s izolátem DNA byla skladována v chladničce.

3.4.1.2 Izolace DNA pomocí CTAB protokolu

Při izolaci DNA pomocí CTAB protokolu byl využit CTAB pufr, který byl připraven smícháním 30 ml 10% roztoku cetyltriethylamonium bromidu, 10 ml 1M Tris-HCl, 28 ml 5M

NaCl, 4 ml 0,5M ethylendiamintetraoctové kyseliny, 3 g polyvinylpyrrolidonu a 24,8 ml destilované vody [96].

Navážka rostlinného materiálu byla umístěna do 2ml zkumavky typu Eppendorf. Do zkumavky bylo přidáno 1 ml CTAB pufru, 1 μ l β -merkaptoethanolu a 0,1 g homogenizačního písku. Pomocí plastového tloučku byly třením o stěny zkumavky buňky mechanicky rozbity. Následně byla zkumavka krátce zvortexována a inkubována po dobu 30 minut při 65 °C za občasných krátkých zvortexování. Po uplynutí této doby byla zkumavka inkubována při laboratorní teplotě po dobu 10 minut.

Do zkumavky bylo přidáno 800 μ l směsi chlorform:izoamylalkohol (24:1). Zkumavka byla promíchána převrácením a centrifugována po dobu 10 minut při 10 000 \times g a 22 °C. Do čisté 2ml zkumavky typu Eppendorf bylo pomocí pipety odebráno 800 μ l horní vodné fáze. K ní bylo přidáno 480 μ l izopropanolu. Zkumavka byla krátce zvortexována, dále inkubována po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě a centrifugována po dobu 5 minut při 10 000 \times g a 22 °C. Supernatant byl opatrně odlit. Do zkumavky bylo přidáno 500 μ l 10mM roztoku octanu amonného v 70% ethanolu. Pelet byl ode dna zkumavky odlepen úderem do zkumavky. Zkumavka byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě.

Po uplynutí doby byla zkumavka centrifugována 5 minut při 10 000 \times g a 22 °C. Supernatant byl opatrně odlit a pelet byl sušen v otevřené zkumavce po dobu 5 minut při 37 °C. K peletu bylo přidáno 250 μ l TE pufru a 250 μ l 5M NaCl a zkumavka byla krátce zvortexována. Dále bylo přidáno 1 250 μ l studeného 96% ethanolu. Zkumavka byla promíchána a umístěna na dobu 15 minut do mrazáku. Zkumavka byla ihned po vyjmutí z mrazáku centrifugována po dobu 15 minut při 13 000 \times g a 22 °C. Supernatant byl opatrně odlit a k peletu byl přidán 1 ml 70% ethanolu. Zkumavka byla krátce zvortexována a centrifugována po dobu 10 minut při 13 000 \times g a 22 °C. Supernatant byl opatrně odlit a pelet byl sušen v otevřené zkumavce po dobu 15 minut při 37 °C. Pelet byl rozpuštěn ve 100 μ l TE pufru a skladován v chladničce.

3.4.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pro měření koncentrace a čistoty izolátů DNA byl využit spektrofotometr Nanodrop 2000. Před použitím byla detekční část přístroje důkladně očištěna destilovanou vodou. Jako blank byl použit roztok elučního pufru P8 (v případě měření izolátů pomocí kitu EliGene) nebo TE pufru (v případě měření izolátů pomocí CTAB protokolu). Při měření bylo do detekční části přístroje napipetováno 2 μ l izolátu DNA. Každý vzorek byl změřen v celém rozsahu vlnových délek 220 až 340 nm. Ke stanovení čistoty bylo využito poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} . Každý vzorek byl změřen 3x a mezi vzorky byla detekční část přístroje očištěna příslušným pufrem.

3.4.3 PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání

Před vlastním provedením PCR byla připravena PCR směs ve sterilním boxu, který byl před použitím vysvícen UV světlem po dobu 20 minut. Pro každý vzorek DNA, pozitivní a negativní kontrolu byla real-time PCR-HRM provedena ve 3 opakováních. Složení PCR směsi pro jeden vzorek DNA uvádí tabulka 11. Jednotlivé komponenty byly napipetovány

v násobku počtu vzorků. Následně byla PCR směs důkladně promíchána a rozpipetována do 0,1ml mikrokumavek, které byly následně opatřeny víčky. Takto připravené mikrokumavky byly přeneseny do druhého sterilního boxu určeného pro práci s DNA. Box byl před užitím vysvícen UV světlem po dobu 20 minut. V boxu byly mikrokumavky otevřeny. Do každé z nich byl napipetován 1 μl příslušného izolátu DNA. V případě koncentrace DNA vyšší než 20 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl izolát před použitím zředěn. Mikrokumavky byly opět uzavřeny víčky. Víčka byla opatřena označením příslušného vzorku z důvodu pozdější manipulace.

Tabulka 11: Složení PCR směsi

Komponenta	Objem [μl]
PCR H₂O	9,5
Master Mix SYTO-9	12,5
Primer F	1
Primer R	1
Celkem	24

Tabulka 12: Přehled použitých primerů

Označení primeru	Sekvence 5' → 3'	Reference
ITS2 F	ATGCGATACTTGGT GTGAAT	[97]
ITS2 R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	[97]
psbA-trnH F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	[31]
psbA-trnH R	CGCGCATGGTGGATTCACAATC	[31]
TPS 1 F	AGGGAGATTCGCCAAAAGCA	[98]
TPS 1 R	ACAGGATCCACGCTCTCTCT	[98]
TPS 3 F	TGGCTCTCCATAACATCGCC	[98]
TPS 3 R	CACAGGATCCACGCTCTCTC	[98]

Samotná real-time PCR-HRM byla provedena na přístroji LightCycler Nano. Teplotní profil se skládal z 5 hlavních částí: úvodní denaturace, vlastní polymerázové řetězové reakce s 35 cykly, závěrečné elongace, temperování před vysokorozlišovací analýzou křivek tání

a vlastní vysokorozlišovací analýzy křivek tání. Teplota denaturace činila 95 °C. Teplota nasedání primerů byla rozdílná pro konkrétní primery (viz tabulky 13 a 14). Teplota elongace byla ve všech případech 72 °C. Po provedení závěrečné elongace a vytemperování vzorků na 60 °C proběhla vlastní vysokorozlišovací analýza křivek tání. Počáteční teplota byla zvolena na 60 °C a konečná teplota na 97 °C. Změna teploty byla nastavena na 0,05 °C·s⁻¹.

Tabulka 13: Teplotní profil real-time PCR pro primery TPS 1 a TPS 3

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Úvodní denaturace	95	300
Tříkroková polymerázová řetězová reakce (35 cyklů)	denaturace	95
	nasedání primerů	55
	elongace	72
Závěrečná elongace	72	300
Temperování před HRM	60	60

Tabulka 14: Teplotní profil real-time PCR pro primery ITS2 a psbA

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Úvodní denaturace	95	300
Tříkroková polymerázová řetězová reakce (35 cyklů)	denaturace	95
	nasedání primerů	52
	elongace	72
Závěrečná elongace	72	600
Temperování před HRM	60	60

Tabulka 15: Teplotní profil vysokorozlišovací analýzy křivek tání

Fáze	Teplota [°C]	Teplotní změna [°C·s⁻¹]	Čas [s]
počátek	60	-	60
konec	97	0,05	1

3.4.4 Příprava vzorků na HPLC

Extrakce kumarinu proběhla dle postupu popsaného v článku [10]. Na analytických vahách bylo naváženo 1,0000 g komerčního vzorku mleté skořice. Kumarin byl extrahován pomocí 50 ml směsi methanol:voda 4:1 při laboratorní teplotě za stálého míchání. Získaný roztok byl přefiltrován přes filtrační papír. Před analýzou na kapalinovém chromatografu byl extrakt přečištěn přes nylonový stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,45 μm a uchováván ve skleněné 2ml vialce. Pro kvantifikaci obsahu kumarinu byla ředěním v methanolu ze zásobního roztoku kumarinu připravena kalibrační řada o koncentracích 0,1; 0,01; 0,001 a 0,000 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.4.5 Stanovení obsahu kumarinu

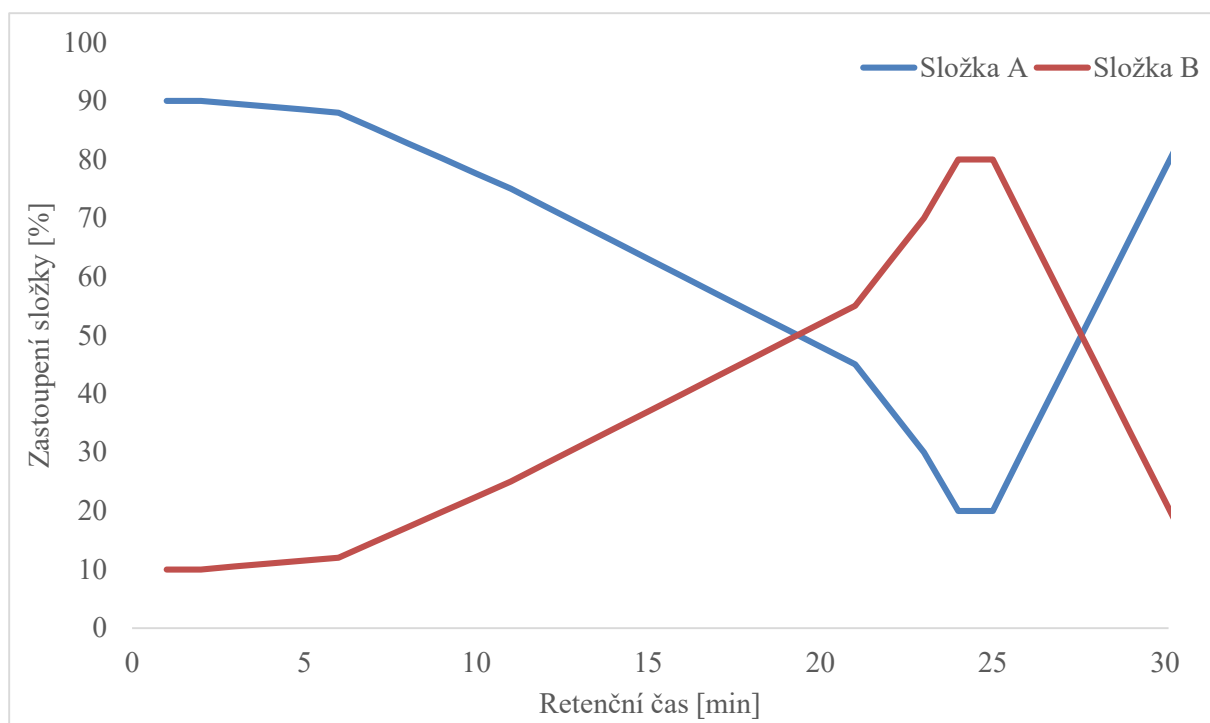
HPLC analýza proběhla na přístroji Dionex UltiMate 3000. Separace probíhala v koloně Kinetex 150 \times 4,6 \times 2,6 μm s využitím gradientové eluce. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Složení mobilní fáze uvádí Tabulka 16 a 17. Objem nástřiku činil 20 μl . Detekce byla provedena pomocí detektoru diodového pole (PDA). Měření bylo provedeno ve dvou opakováních. Vyhodnocení dat proběhlo v software Chromeleon 7.2 a MS Excel.

Tabulka 16: Složky mobilní fáze

Označení	Složka A	Složka B
Název	trifluoroctová kyselina	acetonitril
Koncentrace	0,1 %	>99,9 %

Tabulka 17: Složení mobilní fáze

Čas [min]	Složka A [%]	Složka B [%]
0	90	10
1	90	10
5	88	12
10	75	25
15	60	40
20	45	55
22	30	70
23	20	80
24	20	80
30	90	10



Graf 7: Složení mobilní fáze při gradientové eluci

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Koncentrace a čistota DNA

V prvním kroku byla izolace DNA ze všech vzorků listů provedena pomocí EliGene Plant DNA Isolation Kit. Na základě měření na spektrofotometru Nanodrop 2000 byla stanovena koncentrace a čistota DNA v získaných izolátech. Ze získaných výsledků vyplývá, že koncentrace DNA v těchto izolátech je dostačující. Poměr A_{260}/A_{280} se u izolátů DNA z listů pohyboval od 1,29 do 2,10. Nejnižší hodnoty 1,29 bylo dosaženo u izolátu listů z druhu *C. camphora*. Takto nízká hodnota značí kontaminaci proteiny či fenolickými látkami. Naopak hodnota 2,10 značí kontaminaci RNA [54]. Zbylé tři vzorky dosahují uspokojivé hodnoty tohoto poměru. Poměr A_{260}/A_{230} u všech vzorků značí kontaminaci proteiny, fenolickými látkami či zbytky složek pufrů izolačního kitu [54]. U získaných izolátů byla ověřena amplifikovatelnost s využitím primerů TPS 1 (viz postup popsáný v kapitole 4.4.3). DNA všech získaných izolátů byla úspěšně amplifikována, proto byly tyto izoláty použity k dalším analýzám.

Tabulka 18: Koncentrace a čistota izolátů DNA z listů získaných EliGene Plant DNA Isolation Kit

Označení vzorku	Matrice	Koncentrace DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Poměr A_{260}/A_{280}	Poměr A_{260}/A_{230}
<i>C. zeylanicum</i>	lyofilizovaný list	5,43 \pm 0,10	1,65 \pm 0,08	0,55 \pm 0,06
<i>C. burmanii</i>	lyofilizovaný list	17,35 \pm 0,21	1,76 \pm 0,12	1,47 \pm 0,06
<i>C. camphora</i>	lyofilizovaný list	5,23 \pm 0,40	1,29 \pm 0,36	0,38 \pm 0,11
<i>C. japonicum</i>	lyofilizovaný list	3,50 \pm 0,34	1,83 \pm 0,06	0,45 \pm 0,17
<i>C. tamala</i>	lyofilizovaný list	5,23 \pm 0,35	2,10 \pm 0,17	0,57 \pm 0,09

Izolace DNA z kůry skořicovníků proběhla rovněž pomocí EliGene Plant DNA Isolation Kit. Koncentrace a čistota DNA byla změřena na spektrofotometru Nanodrop 2000. Hodnoty koncentrací DNA v těchto izolátech byly uspokojivé. Poměry A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} byly výrazně nižší než u izolátů DNA z listů a značí silnou kontaminaci proteiny, fenolickými látkami či některou ze složek izolačních pufrů. Kůra skořicovníků obsahuje významné množství fenolických látek [9] a zmíněná kontaminace byla nejpravděpodobněji způsobena jimi. U získaných izolátů byla ověřena amplifikovatelnost s využitím primerů TPS 1. DNA žádného izolátu nebyla z důvodu vysoké kontaminace amplifikována a získané izoláty byly z dalších analýz vyřazeny. Derivované křivky tání těchto izolátů jsou uvedeny v příloze (Graf 28).

Tabulka 19: Koncentrace a čistota izolátů DNA z kůry získaných EliGene Plant DNA Isolation Kit

Označení vzorku	Matrice	Koncentrace DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Poměr A_{260}/A_{280}	Poměr A_{260}/A_{230}
Komerční vzorek č. 1	mletá kůra	4,43±0,24	1,21±0,08	0,28±0,03
Komerční vzorek č. 2	mletá kůra	4,25±0,57	1,05±0,08	0,36±0,04
Komerční vzorek č. 3	mletá kůra	4,43±0,45	1,34±0,03	0,28±0,03
Komerční vzorek č. 4	mletá kůra	4,25±0,39	1,48±0,09	0,41±0,03
Komerční vzorek č. 5	mletá kůra	4,90±0,16	1,08±0,06	0,23±0,01
Komerční vzorek č. 6	mletá kůra	6,45±0,17	1,48±0,12	0,41±0,03
Komerční vzorek č. 7	mletá kůra	7,03±0,59	1,45±0,13	0,85±0,05
Komerční vzorek č. 8	mletá kůra	5,08±0,45	1,24±0,05	0,31±0,06

Z důvodu vysoké kontaminace fenolickými látkami a neúspěšné amplifikace DNA izolátů získaných pomocí kitu bylo přistoupeno k izolaci DNA z kůry mleté skořice pomocí CTAB protokolu. Devizou této metody je získání DNA o vyšší čistotě než v případě jiných metod [58]. Koncentrace DNA v izolátech získaných pomocí CTAB protokolu byla vyšší než v případě kitu. Poměr A_{260}/A_{280} byl u 7 vzorků v rozsahu 1,73 až 1,83 a značil, že DNA v těchto izolátech je o vysoké čistotě. U izolátu vzorku č. 4 byl tento poměr mírně vyšší a pravděpodobně byla v tomto izolátu kontaminace RNA [54]. Poměr A_{260}/A_{230} prokázal vyšší čistotu získaných izolátů oproti výše uvedeným výsledkům izolace pomocí kitu. V tomto ohledu se ukázaly vzorky č. 1 a 3 jako problematické, protože poměr A_{260}/A_{230} byl u nich vysoký. To může značit kontaminaci a nadhodnocení koncentrace DNA [102]. Koncentrace DNA ve vzorcích č. 5, 6 a 8 byla příliš vysoká, proto byly před provedením PCR tyto izoláty zředěny DNA vodou – izolát č. 5 v poměru 1:5, izolát č. 6 v poměru 1:1 a izolát č. 8 v poměru 1:2 (izolát:voda). U všech získaných izolátů byla DNA úspěšně amplifikována.

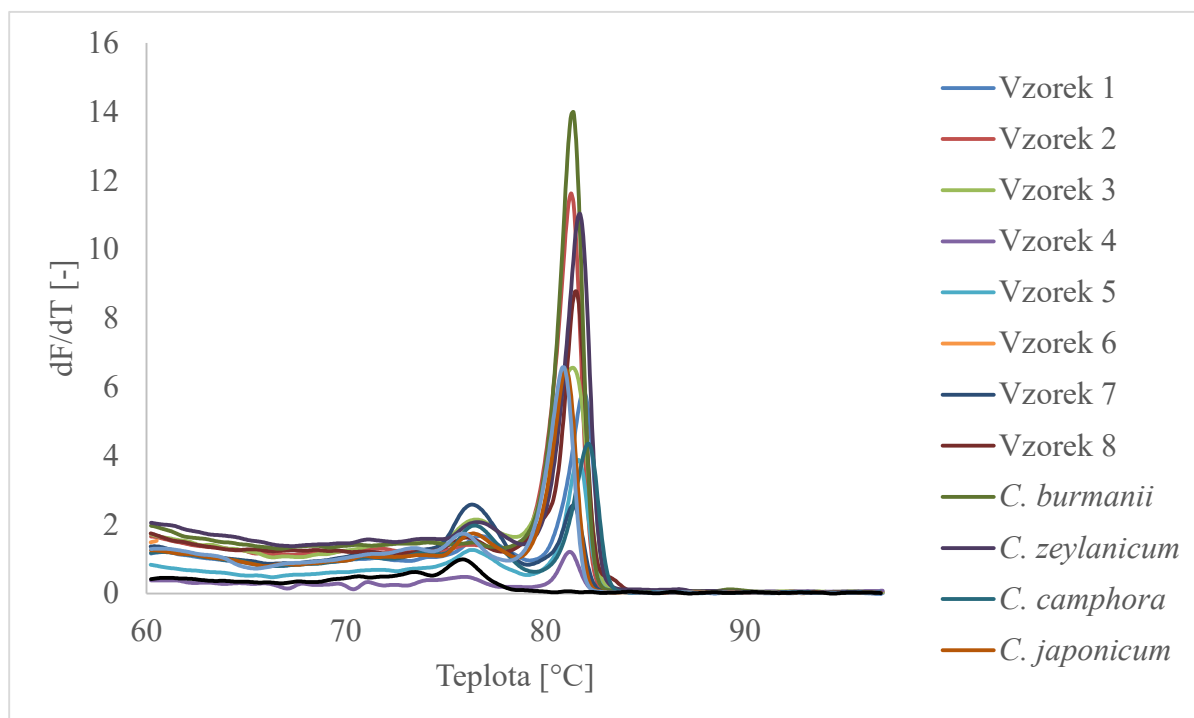
Tabulka 20: Koncentrace a čistota izolátů DNA získaných pomocí CTAB protokolu

Označení vzorku	Matrice	Koncentrace DNA [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Poměr A_{260}/A_{280}	Poměr A_{260}/A_{230}
Komerční vzorek č. 1	mletá kůra	12,90±2,62	1,74±0,10	11,15±17,22
Komerční vzorek č. 2	mletá kůra	11,85±1,37	1,73±0,09	2,29±0,74
Komerční vzorek č. 3	mletá kůra	6,62±0,61	1,73±0,10	1,25±11,00
Komerční vzorek č. 4	mletá kůra	9,17±0,71	2,03±0,13	6,65±4,44
Komerční vzorek č. 5	mletá kůra	80,95±18,39	1,78±0,03	1,12±0,26
Komerční vzorek č. 6	mletá kůra	26,65±2,30	1,83±0,05	2,10±0,52
Komerční vzorek č. 7	mletá kůra	12,25±1,84	1,76±0,17	1,91±0,65
Komerční vzorek č. 8	mletá kůra	36,03±4,419	1,83±0,03	1,40±0,19

4.2 PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání

4.2.1 Primery TPS 1

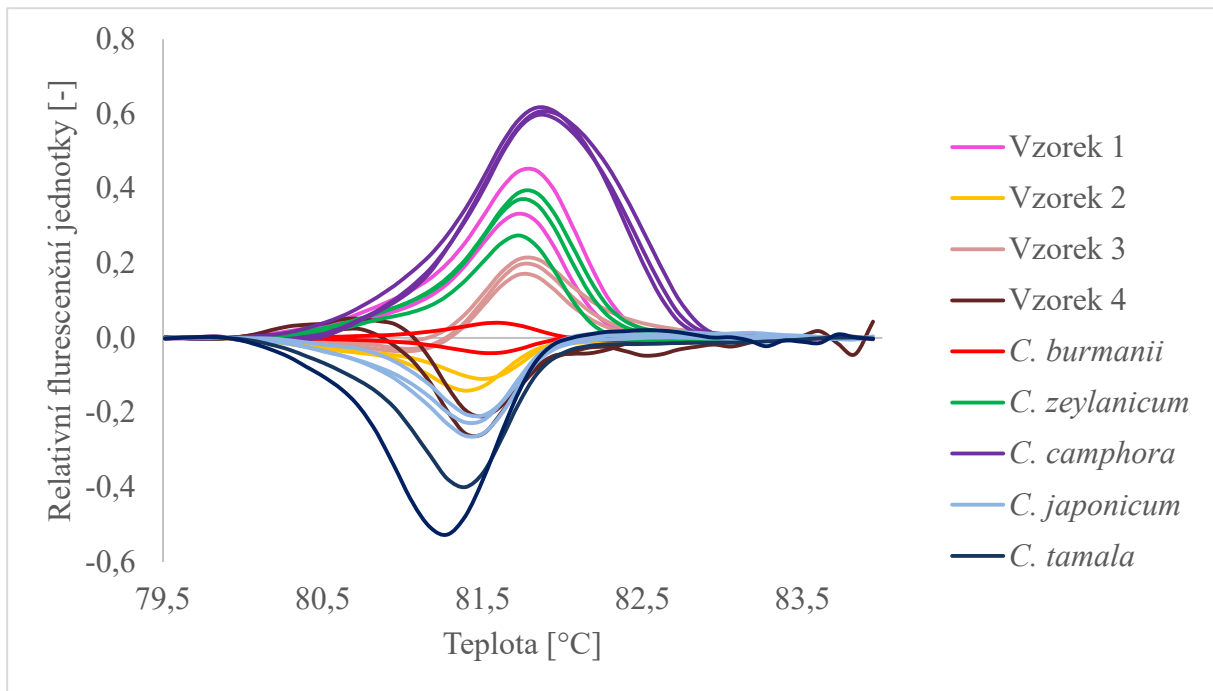
Na základě derivovaných křivek tání pro primer TPS 1 (Graf 8) byla identifikována oblast tání specifických produktů PCR v rozsahu teplot 79,5 až 84 °C. Z toho důvodu byla pro vytvoření normalizovaných a diferenčních křivek tání nastavena počáteční oblast v rozsahu 79,5 až 80 °C a konečná oblast v rozsahu 83,5 až 84 °C. V této oblasti byly ve všech vzorcích detekovány specifické produkty.



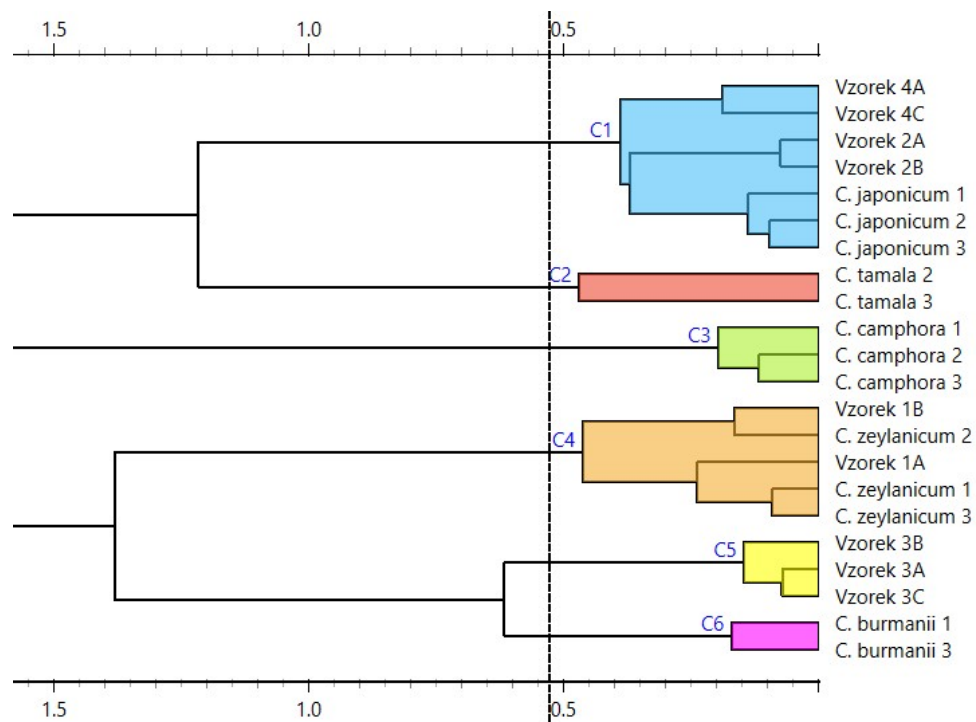
Graf 8: Derivované křivky tání vzorků pro primery TPS 1

Porovnání komerčních vzorků k jednotlivým botanickým druhům skořicovníků bylo provedeno na základě výsledků HRM analýzy. Výsledky HRM jsou prezentovány ve formě diferenčních křivek tání s využitím *C. burmanii* jako baseline. Pro lepší přehlednost byla data rozdělena na dvě sady pro vzorky č. 1 až 4 a č. 5 až 8. Přiřazení komerčních vzorků bylo provedeno vizuálním posouzením diferenčních křivek tání a potvrzeno pomocí dendrogramu. Jako vstupní data pro vytvoření dendrogramu byly použity normalizované křivky tání.

Dle níže uvedených Grafů 9 až 12 bylo provedeno rozřídění komerčních vzorků mleté skořice k botanickým druhům skořicovníků. Diferenční křivky vzorků č. 1 až č. 4 jsou znázorněny v Grafu 9. Vzorek č. 1 byl tvarem křivky i zařazením v dendrogramu klasifikován jako *C. zeylanicum*. Křivky vzorku č. 2 se nacházely mezi křivkami *C. burmanii* a *C. japonicum*. V rámci dendrogramu (Graf 10) byl tento vzorek klasifikován jako *C. japonicum*. Křivky vzorku č. 3 se nacházely mezi *C. zeylanicum* a *C. burmanii*. V dendrogramu byl tento vzorek zařazen blíže *C. burmanii*. Vzorek č. 4 svými křivkami téměř přesně kopíroval křivky *C. japonicum*, k němuž byl rovněž přiřazen v dendrogramu.



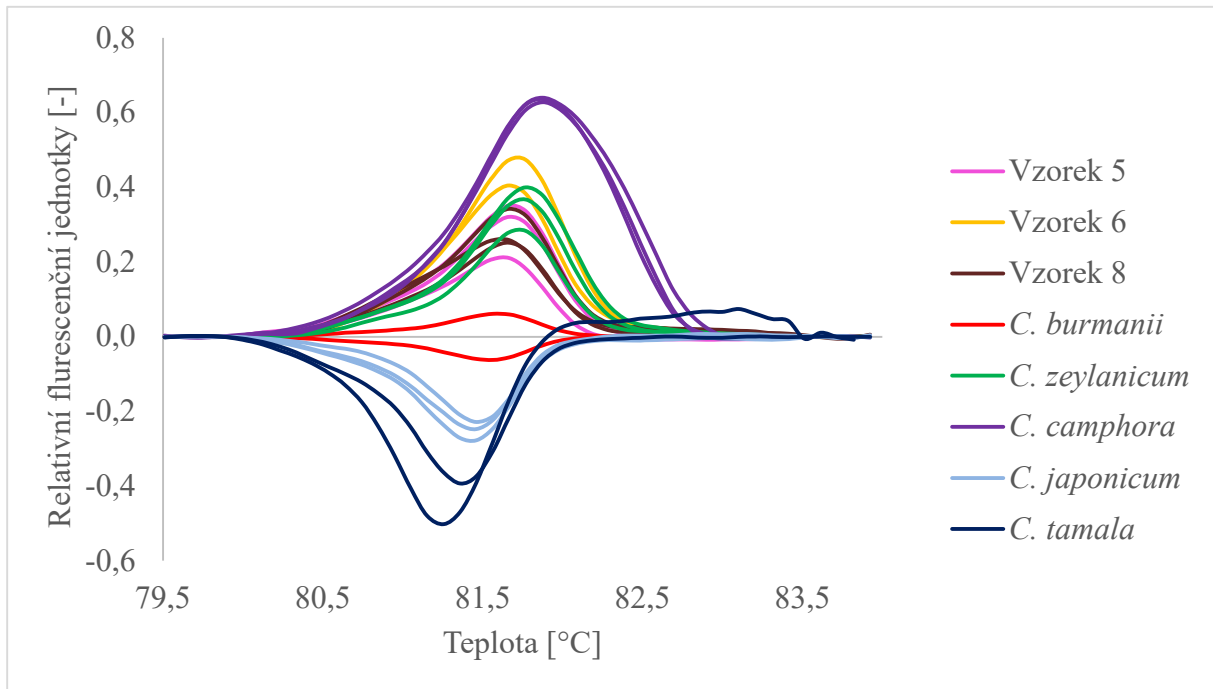
Graf 9: Diferenční křivky tání pro vzorky 1 až 4 a primery TPS 1



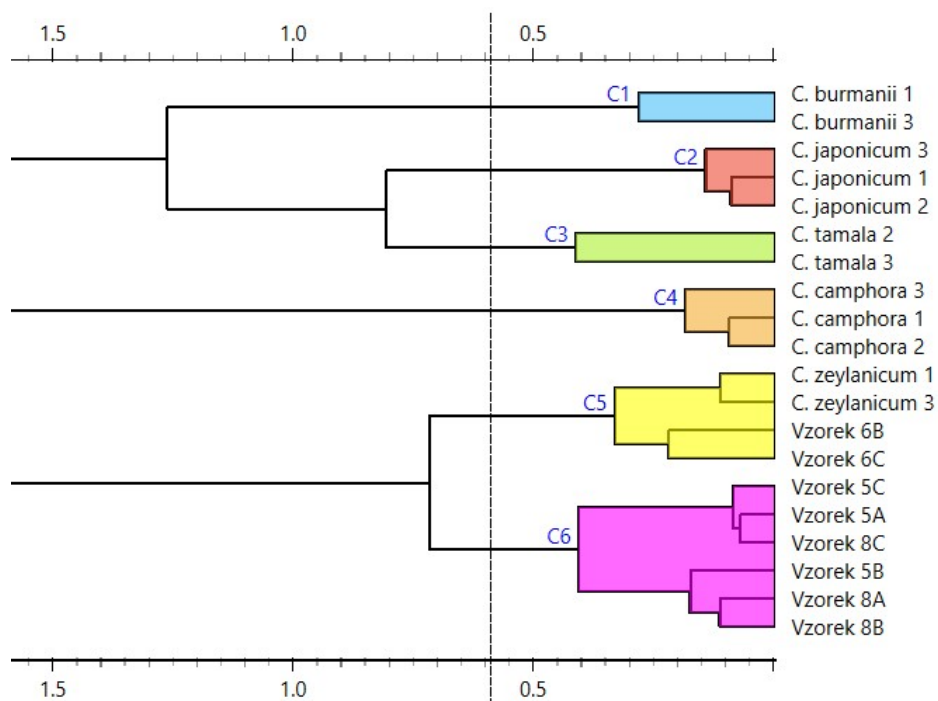
Graf 10: Dendrogram vzorků č. 1 až 4 pro primery TPS 1

Křivky vzorků č. 5, 6 a 8 měly podobný tvar jako křivky *C. zeylanicum* (Graf 11) k němuž byly přiřazeny v dendrogramu (Graf 12). Vzorek č. 7 nevykazoval konzistentní chování napříč opakováními a z tohoto důvodu byl z grafů a následného vyhodnocení výsledků pro primer TPS 1 vyřazen.

Vzorky č. 4 a 8 byly na obalu označeny jako *C. zeylanicum*. Tato informace je u vzorku č. 4 v rozporu s výsledky dle prumerů TPS 1. Naopak u vzorku č. 8 bylo toto tvrzení potvrzeno. Výsledky dle prumerů TPS 1 navíc označily jako *C. zeylanicum* i vzorky č. 1, 5 a 6. Ostatní vzorky byly dle prumerů TPS 1 klasifikovány jako cassie v souladu s označením na obalu.



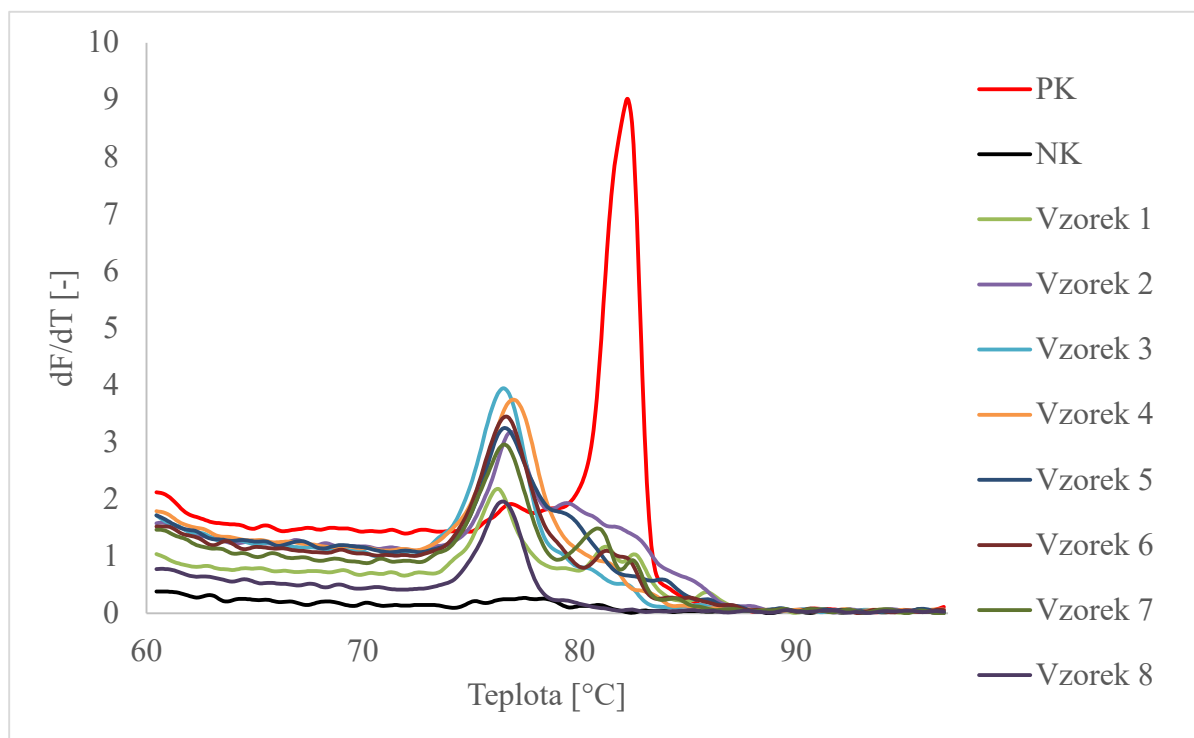
Graf 11: Diferenční křivky tání pro vzorky 5 až 8 a primery TPS 1



Graf 12: Dendrogram vzorků č. 5 až 8 pro primery TPS 1

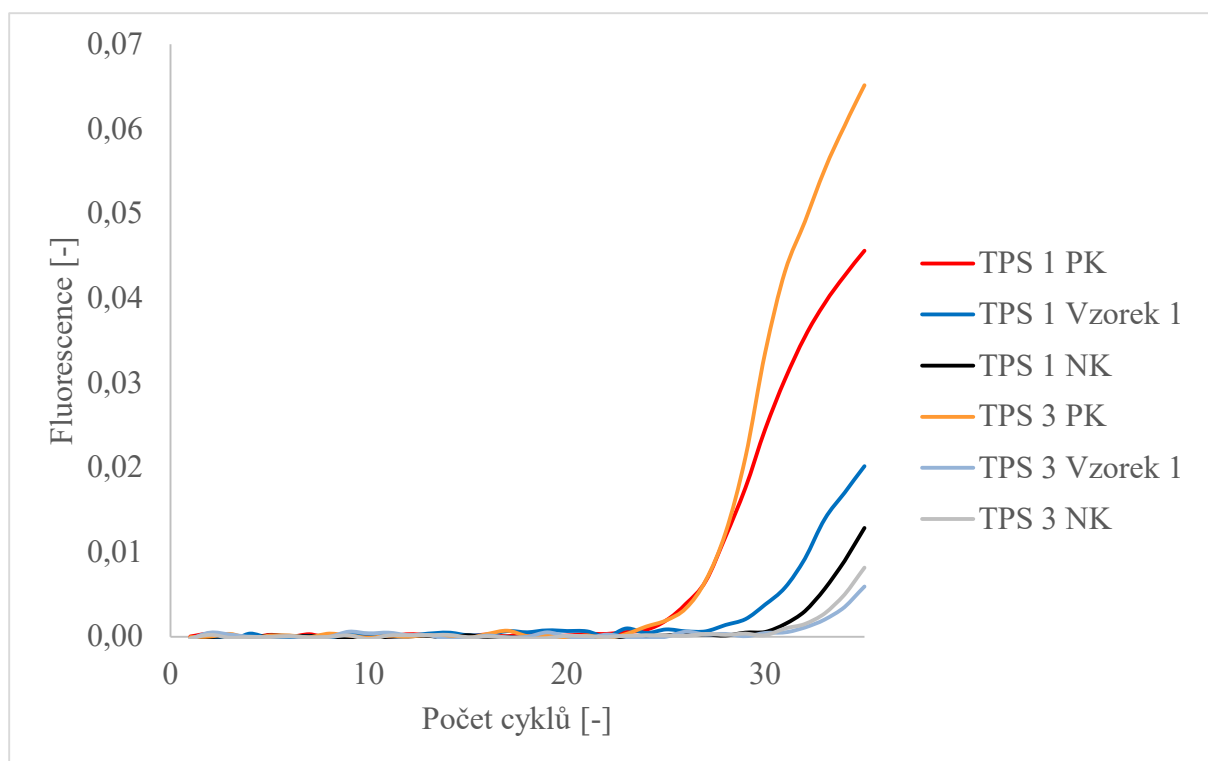
4.2.2 Primery TPS 3

Na základě derivovaných křivek tání pro primery TPS 3 (Graf 13) byla identifikována oblast tání specifických produktů PCR v rozsahu teplot 79,5 až 85,5 °C. Z toho důvodu byla pro vytvoření normalizovaných a diferenčních křivek tání nastavena počáteční oblast v rozsahu 79,5 až 80 °C a konečná oblast v rozsahu 85 až 85,5 °C. U žádného z komerčních vzorků nebyly v této oblasti zjištěny specifické produkty. Důvodem mohla být zejména kontaminace izolátů získaných z kůry. Na základě toho výsledku byl primer TPS 3 shledán nevhodným pro rozlišení jednotlivých druhů a nebyly s ním provedeny další analýzy.



Graf 13: Derivované křivky tání vzorků pro primery TPS 3

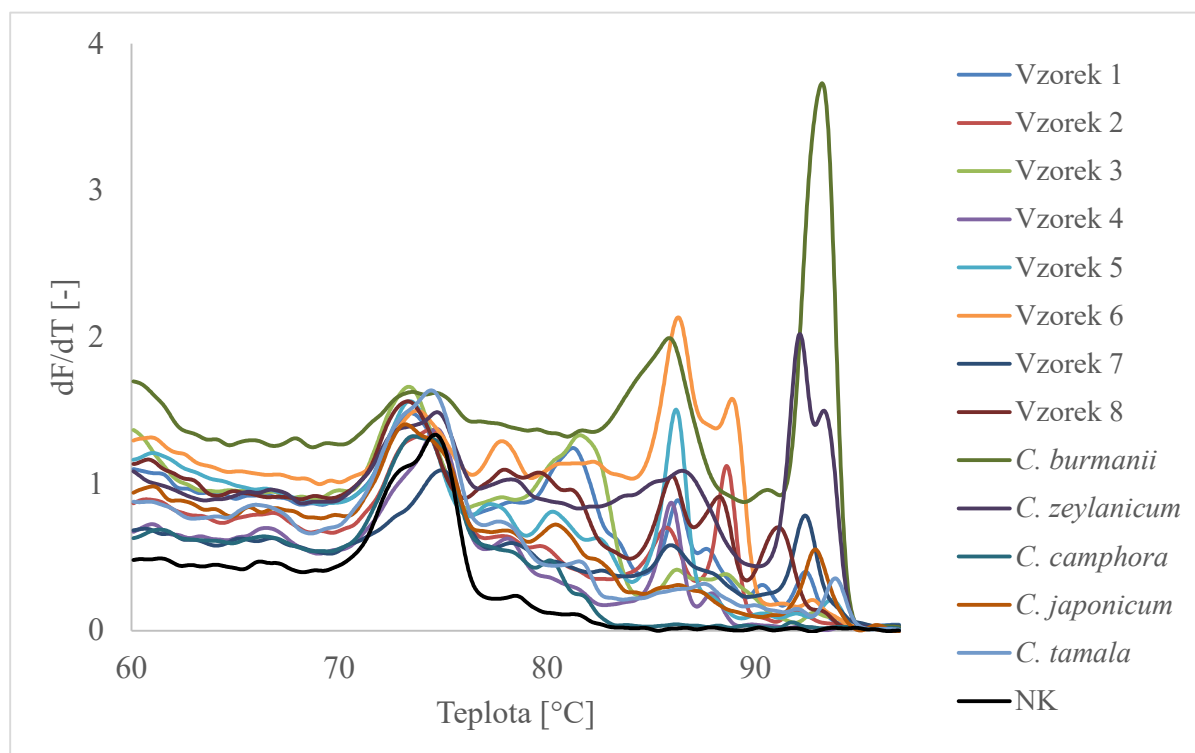
Jednou z možných příčin selhání lze uvést vliv délky amplikonu v přítomnosti látek inhibujících PCR (zejména fenolických látek). Čím delší amplikon při PCR vzniká, tím lze očekávat vyšší inhibiční vliv fenolických látek na spolehlivost PCR [99]. Dle předchozích zkušeností s primery TPS 3 bylo zjištěno, že u nich dochází k amplifikaci až při vyšším počtu cyklů ve srovnání s primery TPS 1 [98]. Tento výsledek byl rovněž zjištěn i v rámci této diplomové práce. Zatímco amplifikace pozitivních kontrol nastala v obou případech při 24. cyklu, u komerčních vzorků docházelo k amplifikaci u primerů TPS 1 při 27. cyklu a u primerů TPS 3 až při 31. cyklu. Graf 14 uvádí srovnání amplifikačních křivek pro primery TPS 1 a TPS 3.



Graf 14: Srovnání amplifikačních křivek vzorku č. 1 pro primery TPS 1 a TPS 3 v porovnání s kontrolami

4.2.3 Primery ITS 2

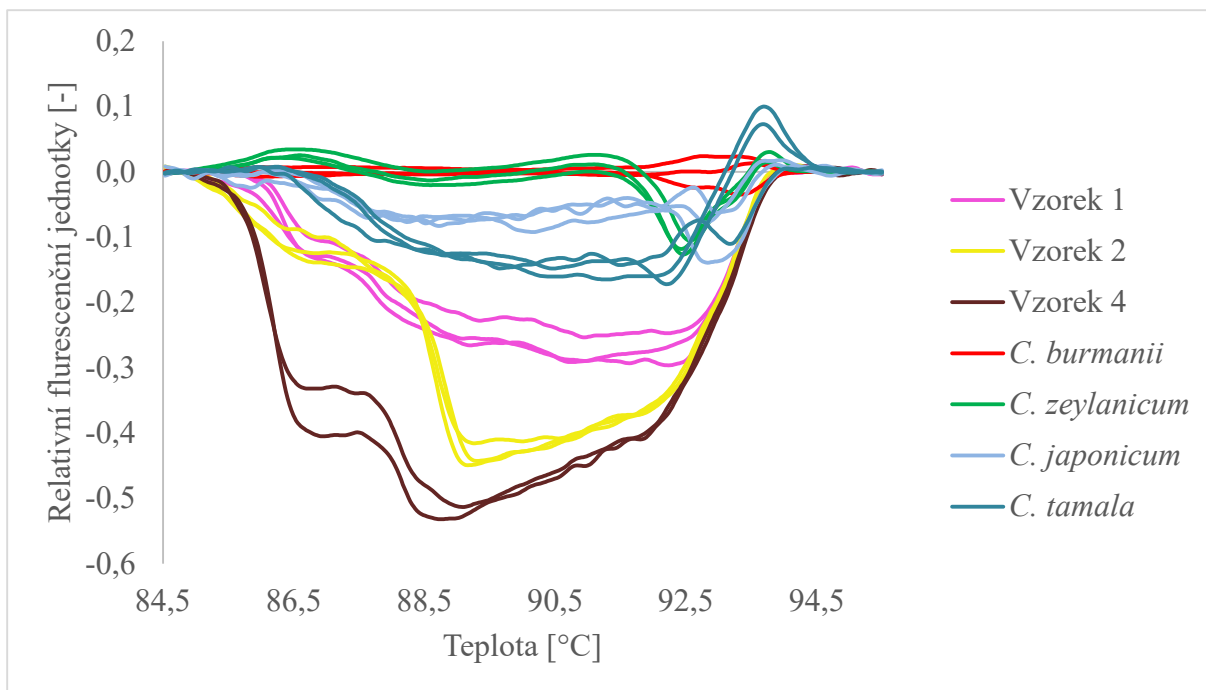
Region ITS 2 se používá při barcodingu k rozlišení rostlinných druhů [30][31][33]. Z tohoto důvodu byl využit v této diplomové práci. Na základě derivovaných křivek tání pro primery ITS 2 (Graf 15) byla identifikována oblast tání specifických produktů PCR v rozsahu teplot 84,5 až 95,5 °C. Z toho důvodu byla pro vytvoření diferenčních křivek tání nastavena počáteční oblast v rozsahu 84,5 až 85 °C a konečná oblast v rozsahu 95 až 95,5 °C. V této oblasti byly ve všech vzorcích vyjma vzorku č. 3 a *C. camphora* detekovány specifické produkty. Z tohoto důvodu byly vzorek č. 3 a *C. camphora* vyřazeny z následných analýz pro primery ITS 2.



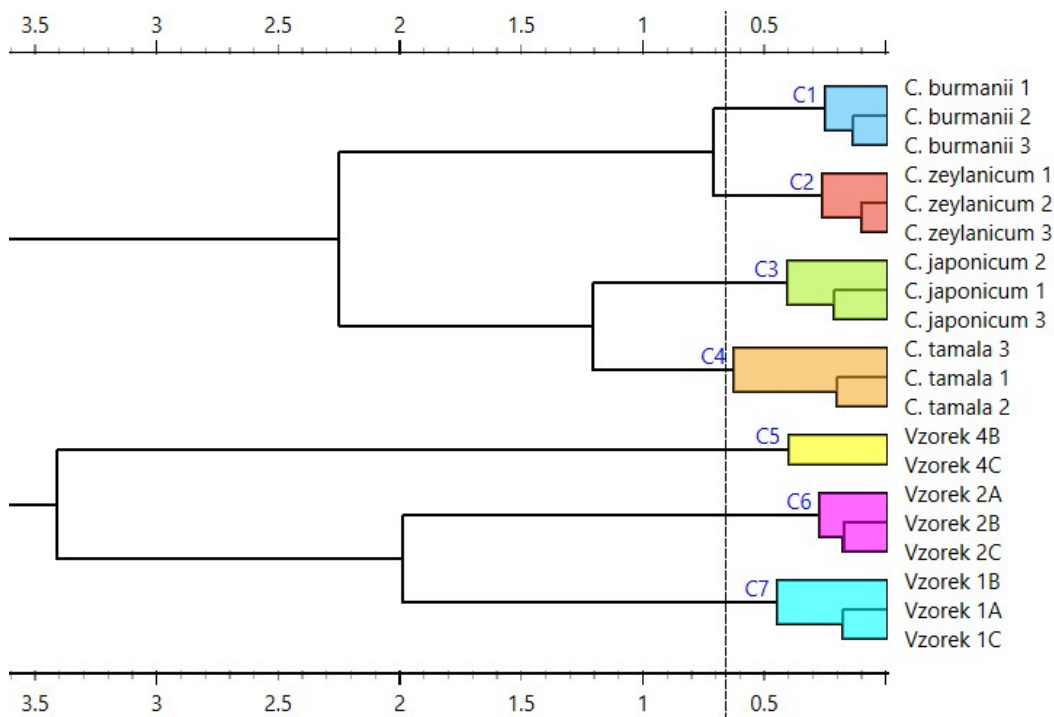
Graf 15: Derivované křivky tání vzorků pro primery ITS 2

Porovnání komerčních vzorků k jednotlivým botanickým druhům skořicovníků bylo provedeno na základě provedené HRM analýzy. Výsledky HRM jsou prezentovány ve formě diferenčních křivek tání s využitím *C. burmanii* jako baseline. Pro lepší přehlednost byla data rozdělena na dvě sady pro vzorky č. 1 až 4 a č. 5 až 8. Přiřazení komerčních vzorků bylo provedeno vizuálním posouzením diferenčních křivek tání a potvrzeno pomocí dendrogramu. Jako vstupní data pro vytvoření dendrogramu byly použity normalizované křivky tání.

Dle níže uvedených Grafů 16 až 19 bylo provedeno roztrídění komerčních vzorků mleté skořice k botanickým druhům skořicovníků. Křivky vzorků č. 1, 2 a 4 svým tvarem neodpovídaly žádnému ze zkoumaných botanických druhů (Graf 16). Rovněž v dendrogramu (Graf 17) byly zařazeny do rozdílné části než vzorky zkoumaných botanických druhů. Z těchto výsledků lze usuzovat, že ani jeden z komerčních vzorků č. 1, 2 a 4 neobsahoval žádný ze zkoumaných druhů.



Graf 16: Diferenční křivky tání pro vzorky 1 až 4 a primery ITS 2



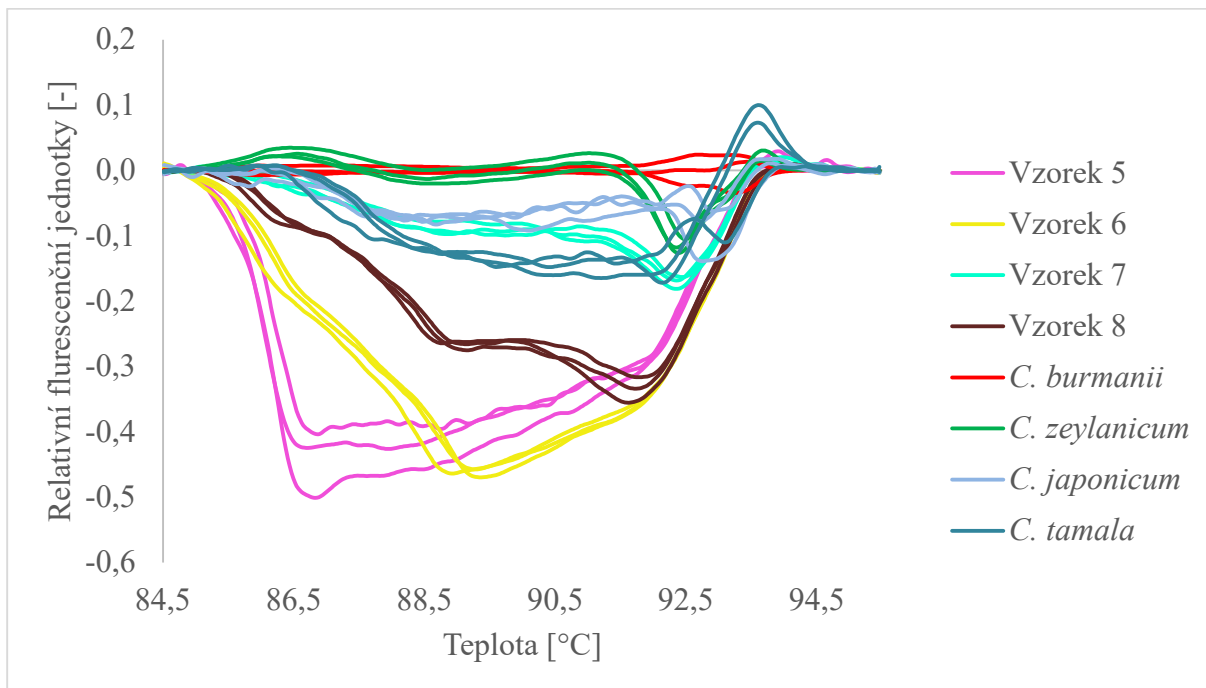
Graf 17: Dendrogram vzorků č. 1 až 4 pro primery ITS 2

Křivky vzorku č. 7 vykazují obdobné chování jako křivky *C. japonicum* a *C. tamala*. Vzorek č. 7 byl rovněž zařazen do shodné části dendrogramu jako zmíněné botanické druhy. Z toho plyne, že vzorek č. 7 pravděpodobně obsahoval kůru jednoho z těchto druhů či jejich směs.

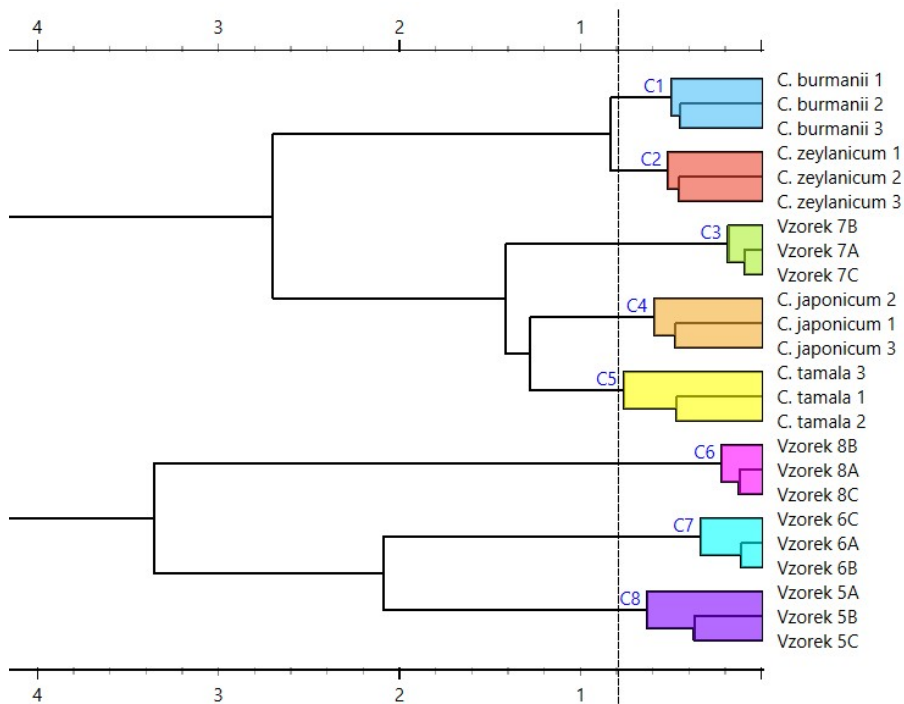
Křivky vzorků č. 5, 6 a 8 svým tvarem neodpovídaly žádnému ze zkoumaných botanických druhů (viz Graf 18). Rovněž v dendrogramu (Graf 19) byly zařazeny do rozdílné části

než vzorky zkoumaných botanických druhů. Z těchto výsledků lze usuzovat, že ani jeden z komerčních vzorků č. 5, 6 a 8 neobsahoval žádný ze zkoumaných druhů.

Vzorky č. 4 a 8 byly na obalu označeny jako *C. zeylanicum*. Tato informace je u obou zmíněných vzorků v rozporu s výsledky dle primerů ITS 2. Ostatní vzorky byly dle primerů ITS 2 klasifikovány jako cassie v souladu s označením na obalu.



Graf 18: Diferenční křivky tání pro vzorky 5 až 8 a primery ITS 2



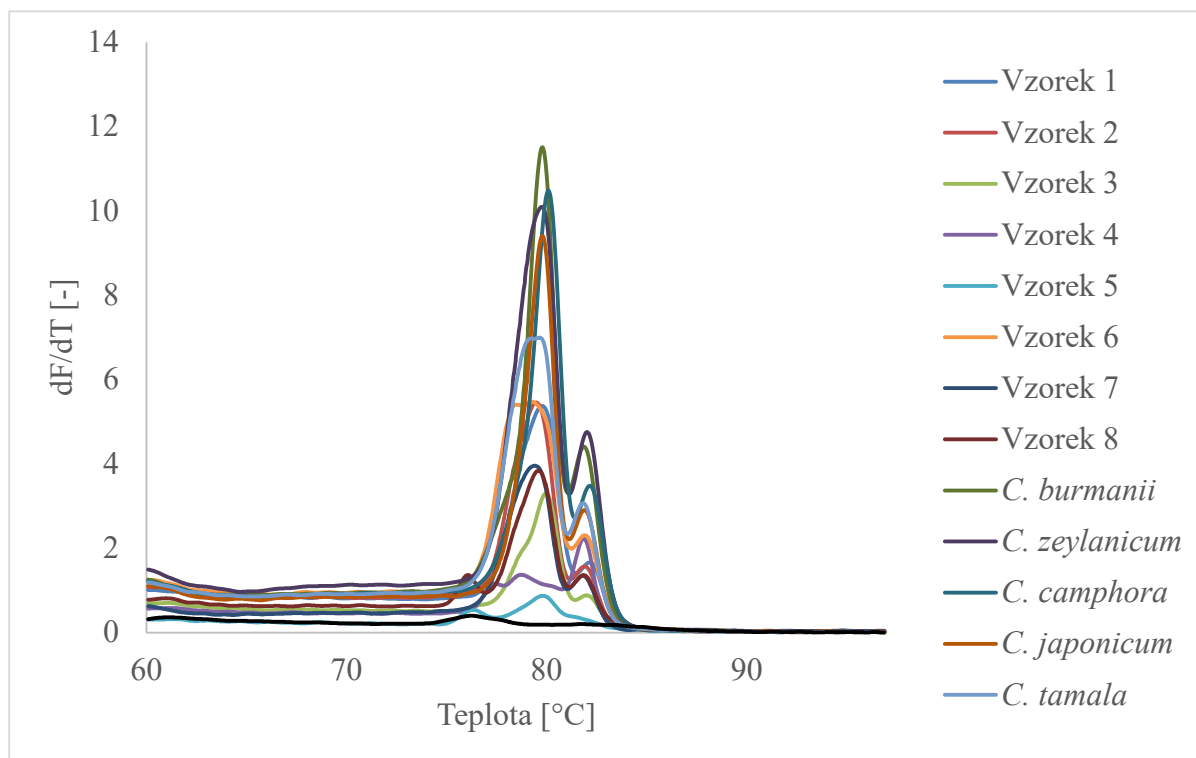
Graf 19: Dendrogram vzorků č. 5 až 8 pro primery ITS 2

V porovnání derivovaných křivek tání u primerů TPS 1 a ITS 2 je zřejmý zásadní rozdíl. V případě primerů TPS 1 (Grafy 9 a 11) se vyskytuje jeden zřetelný pík, což značí, že díky PCR vznikly v rámci jednoho vzorku amplikony shodných délek. V případě ITS 2 (Grafy 16 a 18) je zřetelných několik píků v rámci jednoho vzorku. To značí, že bylo amplifikováno více amplikonů různých délek, což snižuje schopnost determinace jednotlivých druhů. Z tohoto hlediska lze označit primery TPS 1 jako vhodnější pro rozlišení jednotlivých druhů.

I přes obecnou rozšířenost využívání regionu ITS 2 k determinaci rostlinných druhů [30][31][33] představuje využití tohoto regionu značné obtíže. Při amplifikaci regionu ITS 2 je vzhledem k užívaným primerům amplifikována i oblast 5.8S rRNA, což prodlužuje délku získaných amplikonů. Delší amplikony jsou obecně problematictější z hlediska amplifikace. Region ITS 2 ve své sekvenci většiny zkoumaných druhů obsahuje vysoké zastoupení GC párů [100]. Vysoký obsah GC prokazatelně snižuje úspěšnost amplifikace [101].

4.2.4 Primery psbA-trnH

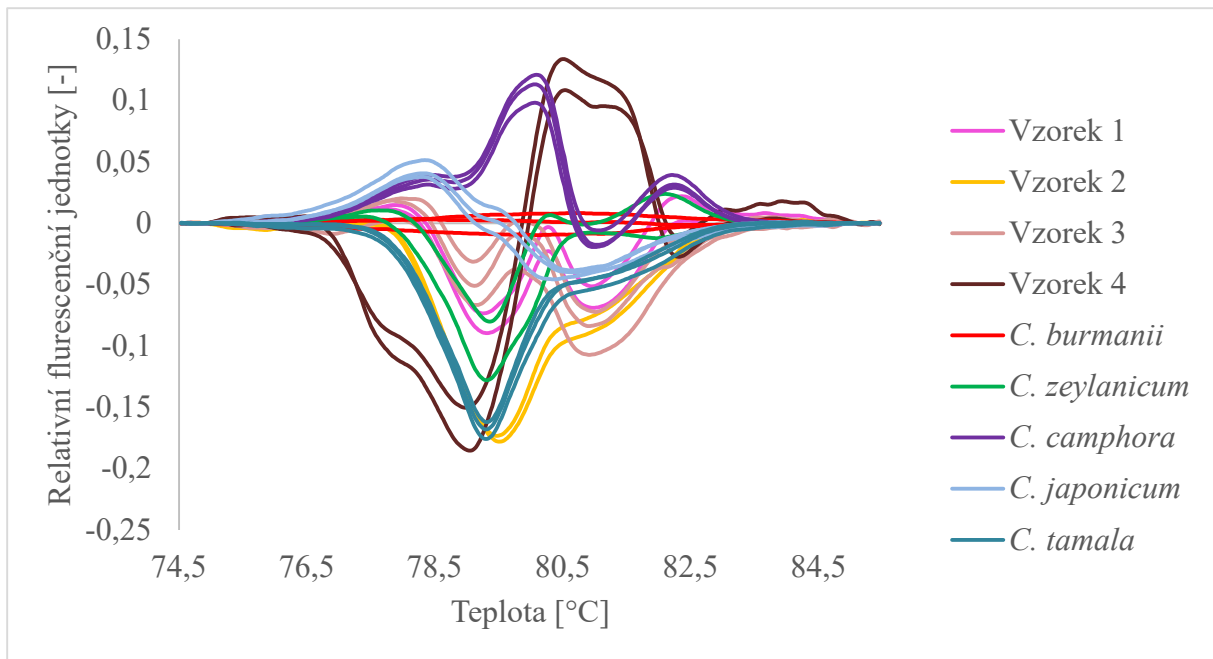
Na základě derivovaných křivek tání pro primery psbA-trnH (Graf 20) byla identifikována oblast tání specifických produktů PCR v rozsahu teplot 74,5 až 85,5 °C. Z toho důvodu byla pro vytvoření diferenčních křivek tání nastavena počáteční oblast v rozsahu 74,5 až 75 °C a konečná oblast v rozsahu 85 až 85,5 °C. V této oblasti byly ve všech vzorcích detekovány specifické produkty.



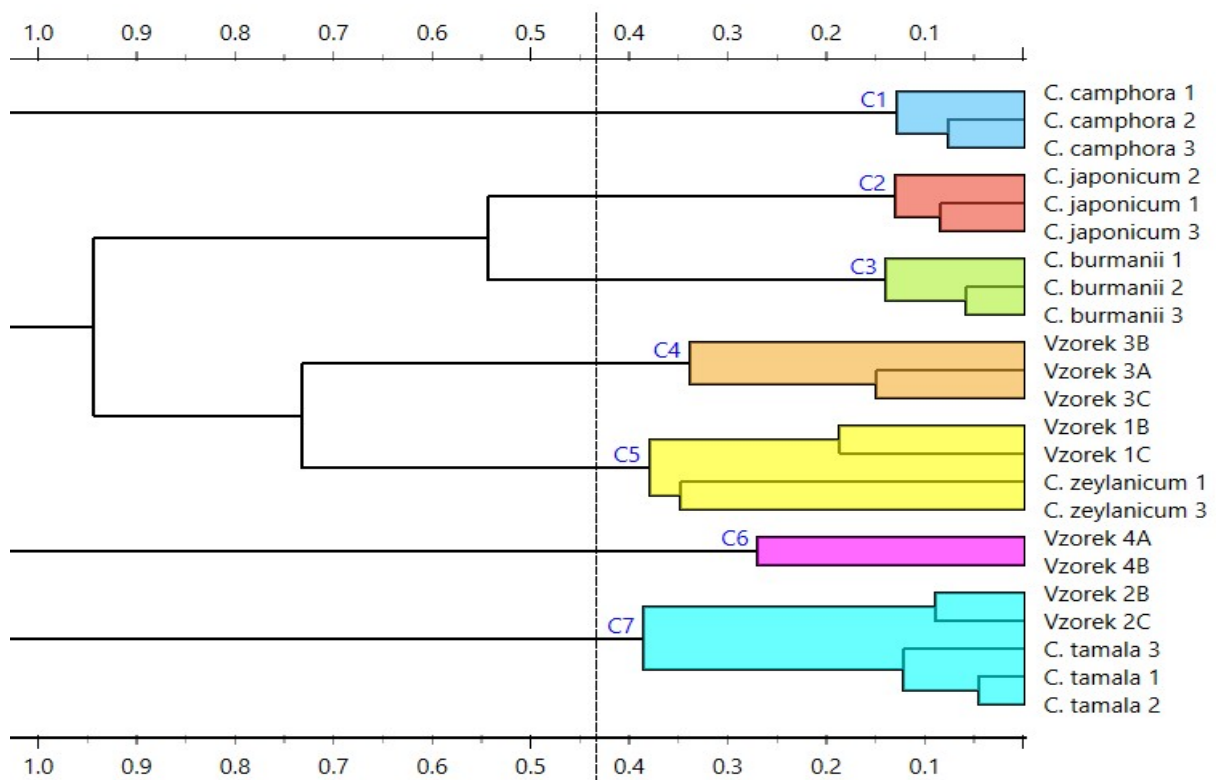
Graf 20: Derivované křivky tání vzorků pro primery psbA-trnH

Porovnání komerčních vzorků k jednotlivým botanickým druhům skořicovníků bylo provedeno na základě provedené HRM analýzy. Výsledky HRM jsou prezentovány ve formě diferenčních křivek tání s využitím *C. burmanii* jako baseline. Pro lepší přehlednost byla data rozdělena na dvě sady pro vzorky č. 1 až 4 a č. 5 až 8. Přiřazení komerčních vzorků bylo provedeno vizuálním posouzením diferenčních křivek tání a potvrzeno pomocí dendrogramu. Jako vstupní data pro vytvoření dendrogramu byly použity normalizované křivky tání.

Dle níže uvedených Grafů 21 až 24 bylo provedeno roztřídění komerčních vzorků mleté skořice k botanickým druhům skořicovníků. Křivky vzorků č. 1 a 3 vykazovaly podobný tvar jako křivky *C. zeylanicum* (Graf 21). Vyšší podobnost s *C. zeylanicum* vykazoval vzorek č. 1, čemuž odpovídá i zařazení v dendrogramu (Graf 22). Křivky vzorku č. 2 (Graf 21) vykazují obdobné chování jako křivky *C. tamala*. Vzorek č. 2 byl rovněž zařazen do shodné části dendrogramu (Graf 22) jako *C. tamala*. Z toho plyne, že vzorek č. 2 pravděpodobně obsahoval kůru tohoto druhu. Křivky vzorku č. 4 neodpovídaly žádnému ze zkoumaných druhů (Graf 21) a rovněž byly v dendrogramu (Graf 22) zařazeny do rozdílné části než vzorky zkoumaných botanických druhů. Z těchto výsledků lze usuzovat, že vzorek č. 4 neobsahoval kůru žádného ze zkoumaných druhů.



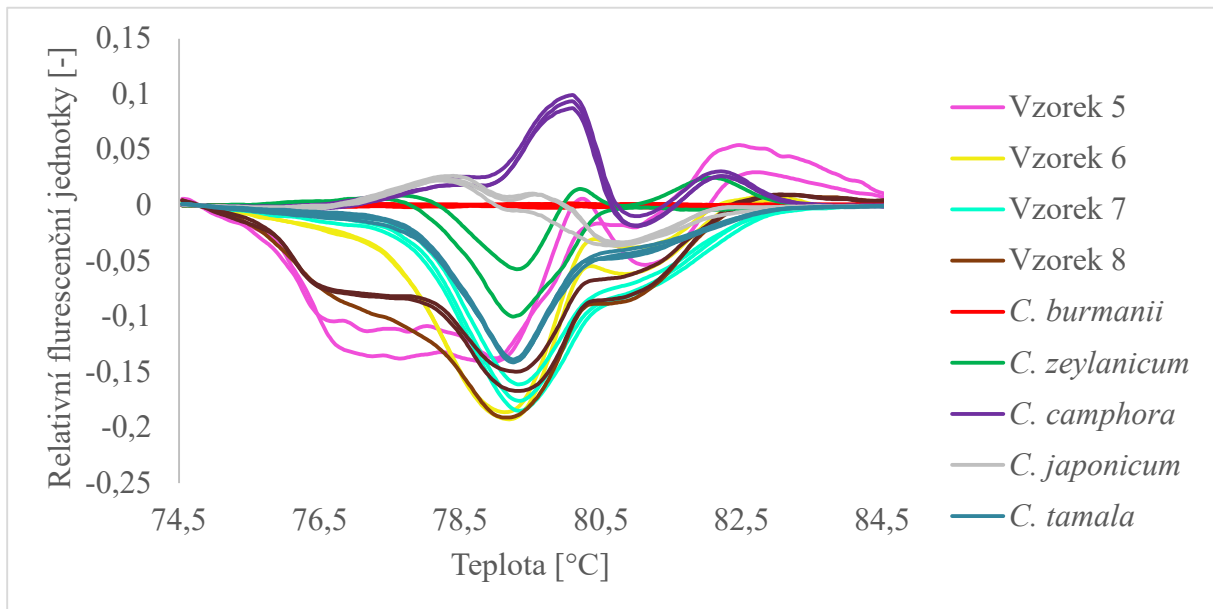
Graf 21: Diferenční křivky tání pro vzorky 1 až 4 a primer *psbA-trnH*



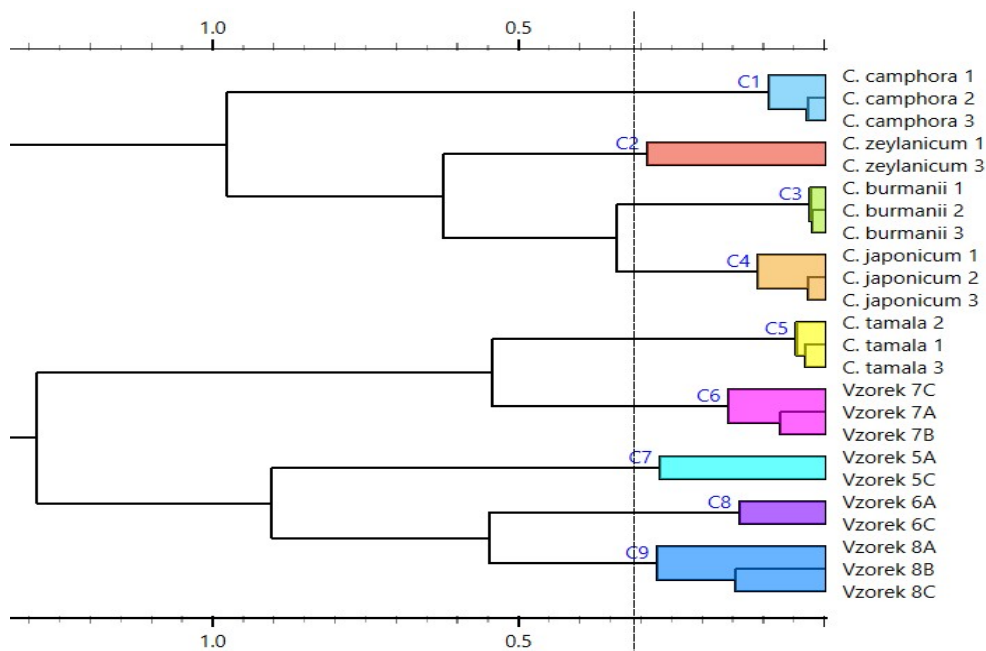
Graf 22: Dendrogram vzorků č. 1 až 4 pro primery *psbA-trnH*

Křivky vzorku č. 7 vykazují obdobné chování jako křivky *C. tamala* (Graf 23) a byly rovněž zařazeny do shodné části dendrogramu jako *C. tamala* (Graf 24). Lze usuzovat, že tento vzorek obsahoval kůru tohoto rostlinného druhu. Křivky vzorků č. 5, 6 a 8 plně neodpovídaly žádnému ze zkoumaných botanických druhů (Graf 23) a v dendrogramu (Graf 24) byly řazeny daleko od nich. Lze předpokládat, že neobsahovaly žádný ze zkoumaných botanických druhů.

Vzorky č. 4 a 8 byly na obalu označeny jako *C. zeylanicum*. Tato informace je u obou zmíněných vzorků v rozporu s výsledky dle primerů psbA-trnH. Vzorky č. 1 a 3 byly dle primerů psbA-trnH klasifikovány jako *C. zeylanicum*. Tomu neodpovídá jejich označení na obalu. Ostatní vzorky byly dle primerů psbA-trnH klasifikovány jako *Cassia* v souladu s označením na obalu.



Graf 23: Diferenční křivky tání pro vzorky 5 až 8 a primery psbA-trnH

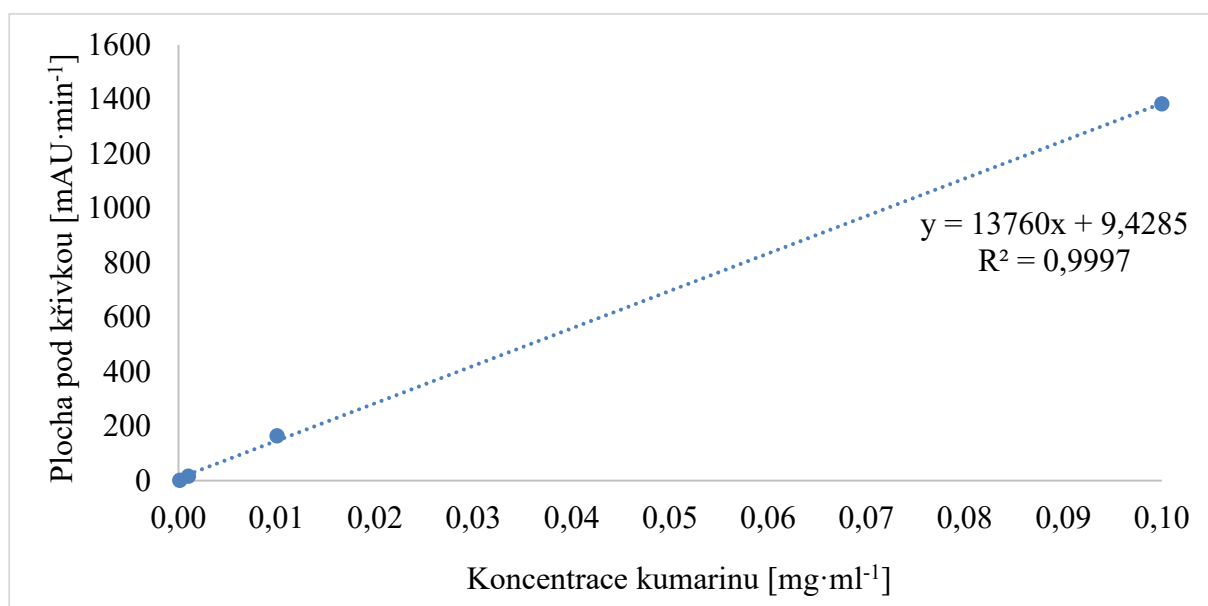


Graf 24: Dendrogram vzorků č. 5 až 8 pro primery psbA-trnH

V derivovaných křivkách pro primery psbA-trnH (Graf 20) lze pro každý vzorek v oblasti tání specifických produktů pozorovat 2 zřetelné píky. To naznačuje, že při PCR byly amplifikovány dva amplikony, což je mnohem vhodnější než mnoho různých amplikonů, které lze pozorovat u ITS 2.

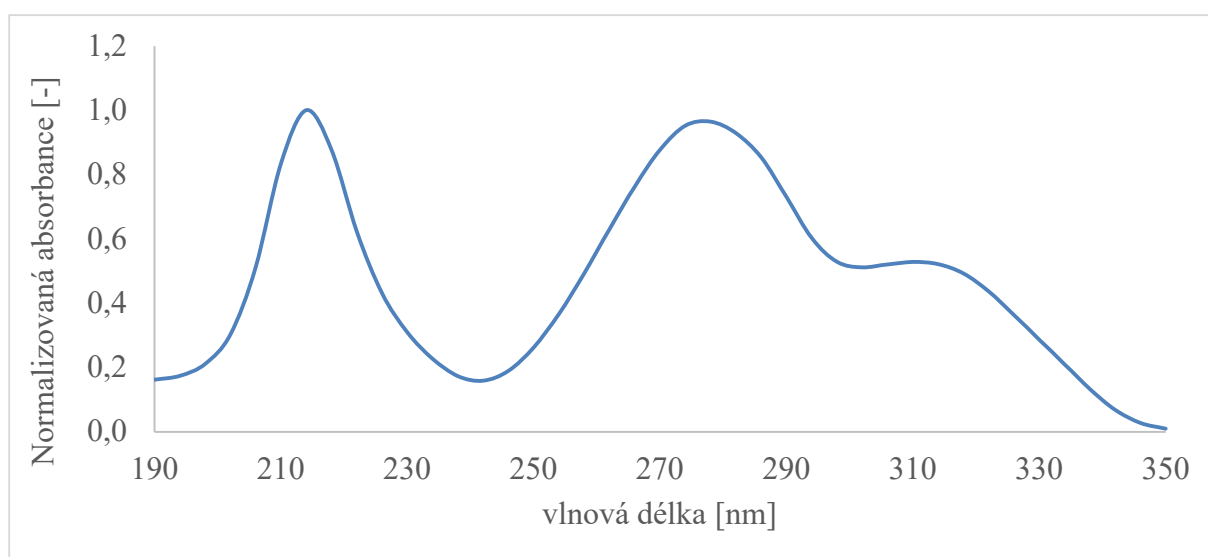
4.3 Stanovení kumarinu pomocí HPLC

Jako srovnávací metoda k real-time PCR s vysokorozlišovací analýzou křivek tání bylo zvoleno stanovení obsahu kumarinu v mleté kůře skořice pomocí HPLC. Důvodem byl dramaticky se lišící obsah kumarinu mezi skořicovníkem cejlonským a ostatními druhy. Obsah kumarinu v kůře skořicovníku pravého se pohybuje zhruba na úrovni $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ [10]. U ostatních druhů rodu skořicovník je řádově vyšší (až $10\,900 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) [11]. Nejprve byla připravena kalibrační přímka (viz Graf 25).



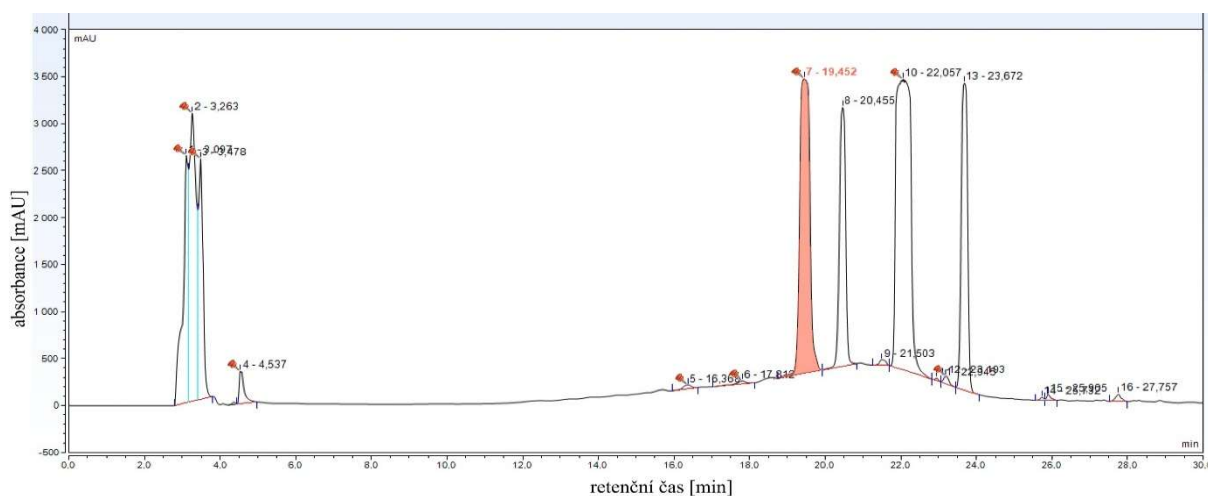
Graf 25: Kalibrační přímka kumarinu

Díky připraveným standardům byl rovněž zjištěn retenční čas kumarinu v koloně, který činil 19,452 minuty. Rovněž bylo díky diodovému poli zjištěno absorpční spektrum kumarinu pro lepší identifikaci píku, který odpovídá kumarinu.



Graf 26: Získané absorpční spektrum kumarinu

Na základě získaného retenčního času a absorpčního spektra byl mezi jednotlivými píky v chromatogramu identifikován kumarin. Chromatogram vzorku č. 1 uvádí Graf 27. Z důvodu chybějících referenčních vzorků nemohly být ostatní píky kvalitativně ani kvantitativně vyhodnoceny. Přehled ploch pod píky všech vzorků je uveden v příloze (Tabulky 23 a 24).



Graf 27: Chromatogram extraktu kůry skořice s vyznačeným píkem odpovídající kumarinu

Výsledky stanovení obsahu kumarinu ukazují výrazný rozdíl mezi nejvyšší ($3946,18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejnižší ($26,82 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) zjištěnou hodnotou. Nejvyšší hodnota je více než 147krát vyšší než nejnižší hodnota. Srovnáním s uváděnými hodnotami obsahu kumarinu [10][11] lze vzorky č. 4 a č. 6 označit za kůru skořicovníku cejlonského. Zajímavostí je, že prodejce označil pouze vzorek č. 4 jako skořicovník cejlonský. Naopak vzorek č. 6 byl označen jako běžný skořicovník, a přesto s největší pravděpodobností obsahoval významný podíl kůry skořicovníku cejlonského. Obsah kumarinu ve vzorku č. 8 je na hranici a jedná se pravděpodobně o směs více druhů se zastoupením skořicovníku cejlonského. Tento vzorek byl prodejcem označen jako skořicovník cejlonský. Vzorek č. 5 měl obsah kumarinu, který nedopovídá *C. zeylanicum*. Nicméně byl třetinový ve srovnání s ostatními vzorky označenými jako cassie. To může naznačovat směsný vzorek obsahující cassie i *C. zeylanicum*. Ostatní vzorky pravděpodobně obsahují kůru ostatních druhů skořicovníků a rovněž tomu odpovídalo jejich označení.

Tabulka 21: Obsah kumarinu v kůře skořice

Označení	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Vzorek č. 4
Obsah kumarinu [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	$3404,12 \pm 50,69$	$3946,18 \pm 144,67$	$2938,65 \pm 30,99$	$26,82 \pm 0,44$
Označení	Vzorek č. 5	Vzorek č. 6	Vzorek č. 7	Vzorek č. 8
Obsah kumarinu [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	$1053,08 \pm 2,01$	$77,31 \pm 2,02$	$3373,85 \pm 156,70$	$451,1 \pm 7,19$

4.4 Shrnutí

Z důvodu lepší přehlednosti a orientace byly výsledky všech použitých primerů a stanovení kumarinu pomocí HPLC upořádané do přehledové Tabulky 22. Pro zřetelnou interpretaci jsou barevně odlišeny cassie (červeně) a *C. zeylanicum* (zeleně). U vzorků, které byly pro dané primery vyřazeny z hodnocení (viz kapitola 4.2), je uvedena pomlčka.

Tabulka 22: Shrnutí výsledků jednotlivých metod

Vzorek	Označení na obalu	primery TPS 1	primery ITS 2	primery psbA-trnH	kumarin HPLC
č. 1	skořice	<i>C. zeylanicum</i>	žádný z druhů	<i>C. zeylanicum</i>	ostatní druhy
č. 2	skořice	<i>C. burmanii</i> + <i>C. japonicum</i>	žádný z druhů	<i>C. tamala</i>	ostatní druhy
č. 3	skořice	<i>C. burmanii</i> + <i>C. zeylanicum</i>	-	<i>C. zeylanicum</i> s příměsí	ostatní druhy
č. 4	pravá skořice	<i>C. japonicum</i>	žádný z druhů	žádný z druhů	<i>C. zeylanicum</i>
č. 5	skořice	<i>C. zeylanicum</i>	žádný z druhů	žádný z druhů	ostatní druhy s možnou přítomností <i>C. zeylanicum</i>
č. 6	skořice	<i>C. zeylanicum</i>	žádný z druhů	žádný z druhů	<i>C. zeylanicum</i>
č. 7	skořice	-	<i>C. japonicum</i> + <i>C. tamala</i>	<i>C. tamala</i> s příměsí	ostatní druhy
č. 8	pravá skořice	<i>C. zeylanicum</i>	žádný z druhů	žádný z druhů	<i>C. zeylanicum</i> s příměsí

Vzorek č. 1 byl prodejcem označen jako běžná skořice. Tomu odpovídá i zjištěný obsah kumarinu. S nejvyšší pravděpodobností se v tomto vzorku nenacházela kůra *C. zeylanicum*. Nicméně výsledky primerů TPS 1 a psbA-trnH poskytly u tohoto vzorku falešně pozitivní výsledek. Jediné primery ITS 2 správně identifikovaly nepřítomnost *C. zeylanicum* ve vzorku. Příčinou mohla být kontaminace tohoto vzorku (viz kapitola 4.2)

Vzorek č. 2 byl prodejcem označen jako běžná skořice. Toto označení bylo potvrzeno i obsahem kumarinu. Všechny primery shodně nezaznamenaly přítomnost *C. zeylanicum* v tomto vzorku.

Vzorek č. 3 byl prodejcem označen jako běžná skořice. Primer TPS 1 našel jistou podobnost s *C. zeylanicum*. Nicméně blíže tvarově i zařazením v dendrogramu byl vzorek klasifikován jako *C. burmanii*. Rovněž dle psbA-trnH byla ve vzorku rozpoznána přítomnost *C. zeylanicum*. Obsah kumarinu v tomto vzorku byl poměrně vysoký, ale mírně nižší než u vzorků č. 1, 2 a 7. To naznačuje směs s dominantním obsahem cassie a nízkým zastoupením *C. zeylanicum*.

Vzorek č. 4 byl prodejcem klasifikován jako pravá skořice a toto označení bylo potvrzeno i zjištěným obsahem kumarinu. Avšak žádný ze zkoumaných primerů tuto skutečnost nepotvrdil. Příčinou může být zjištěná kontaminace v izolátu DNA toho vzorku (viz kapitola 4.1), což mohlo silně ovlivnit průběh PCR i následné HRM a špatně klasifikovat zařazení tohoto vzorku. Nejpatrnější je velmi odlišné chování diferenčních křivek u primerů psbA-trnH, kde se křivky vzorku č. 4 chovaly diametrálně odlišně než křivky ostatních komerčních vzorků i botanických druhů.

Vzorek č. 5 byl prodejcem označen jako běžná skořice. Obsah kumarinu u tohoto vzorku byl vyšší než u vzorků klasifikovaných jako *C. zeylanicum*, ale zhruba třetinový se srovnání se vzorky klasifikovanými jako cassie. Z tohoto výsledku lze usuzovat, že vzorek byl směsí cassií s možnou přítomností *C. zeylanicum*. Výsledky TPS 1 prokázaly přítomnost *C. zeylanicum*, ale pomocí ITS 2 i psbA-trnH byla jeho přítomnost zamítnuta.

Vzorek č. 6 byl prodejcem označen jako běžná skořice. Nicméně obsah kumarinu byl druhý nejnižší ze zkoumaných vzorků, což naznačuje, že se ve skutečnosti jednalo o pravý skořicovník. Tuto skutečnost se podařilo potvrdit pomocí primerů TPS 1. Oba zbývající primery tuto informaci nepotvrdily.

Vzorek č. 7 byl prodejcem označen jako běžná skořice. Toto tvrzení potvrdil i obsah kumarinu a výsledky primerů ITS 2 a psbA-trnH. Pro primer TPS 1 nebyly u tohoto vzorku získány relevantní výsledky.

Vzorek č. 8 byl prodejcem označen jako pravá skořice. Obsah kumarinu byl třetí nejnižší ze zkoumaných vzorků. Tento obsah byl nicméně mnohem vyšší než u vzorku č. 4 a 6. To naznačuje směs *C. zeylanicum* s cassiemi. Přítomnost *C. zeylanicum* byla prokázána pomocí primerů TPS 1. Zbylé dva ostatní primery tuto skutečnost nepotvrdily.

4.4.1 Využitelnost testovaných primerů pro analýzu skořice

4.4.1.1 TPS 1

Primery TPS 1 se ukázaly jako poměrně vhodné pro identifikaci přítomnosti *C. zeylanicum* ve vzorku. V případě vzorků č. 6 a 8 shodně s výsledky HPLC potvrdil přítomnost tohoto druhu ve vzorcích. V případě vzorků č. 3 a 5 byl obsah kumarinu nižší než u vzorků s nejvyššími hodnotami, což lze vysvětlit jistým podílem *C. zeylanicum* v těchto vzorcích. Tato skutečnost byla pomocí primeru TPS 1 potvrzena. V případě vzorku č. 2 byla nepřítomnost druhu *C. zeylanicum* potvrzena díky HPLC, neboť obsah kumarinu v tomto vzorku byl nejvyšší ze všech zkoumaných komerčních vzorků. Rozpor mezi obsahem kumarinu a výsledky primerů TPS 1 byly u vzorků č. 1 a 4. U izolátů těchto vzorků byla shodně zjištěna pravděpodobná kontaminace DNA díky vysokému poměru A_{260}/A_{230} , která mohla negativně zkreslit výsledek.

4.4.1.2 ITS 2

Primery ITS 2 se ukázaly jako nejméně vhodné ze zkoumaných primerů. Důvodem je vyšší délka vznikajících ampliconů a tím pádem vyšší náchylnost na zkreslení výsledku v důsledku kontaminace DNA. V derivovaných křivkách tání se tato skutečnost projevila zjištěním mnoha píků, které značí vznik mnoha různě dlouhých ampliconů. Tato skutečnost následně snižuje schopnost determinace druhů. V žádném vzorku nebyla prokázána přítomnost *C. zeylanicum* a pouze u vzorku č. 7 se vyskytla podobnost s některým z botanických druhů. Ve všech ostatních případech byly křivky tání zcela odlišné od zkoumaných botanických druhů.

Region ITS 2 sice vykazuje vysokou variabilitu, která ho předurčuje pro využití v barcodingu. Nicméně většina těchto změn nebyla vhodná pro rozlišení jednotlivých druhů. Problém využití HRM s primery ITS 2 představuje rovněž vysoké množství sekundárních struktur a vysoký obsah bází GC, což zvyšuje termodynamickou stabilitu a je příčinou velice komplikovaného chování při tepelné denaturaci [104]. Vhodnějším postupem k rozpoznání *C. zeylanicum* je využití specifické sekvence ITS 2 právě pro tento druh. Při PCR dochází k amplifikaci pouze vzorků s obsahem kůry tohoto druhu a díky využití standardů je možné přesně kvantifikovat zastoupení *C. zeylanicum* ve směsném vzorku mleté skořice [105].

4.4.1.3 *psbA-trnH*

Primery *psbA-trnH* se ukázaly jako nejméně citlivé na přítomnost kontaminace. Z hlediska samotné determinace druhů pomocí *psbA-trnH* nebyly výsledky uspokojivé. V žádném z velmi pravděpodobných případů obsahu *C. zeylanicum* ve vzorcích č. 4, 6 a 8 nebyla tato přítomnost pomocí primerů *psbA-trnH* potvrzena. Naopak v případě vzorku č. 1 byla zjištěna falešná pozitivita přítomnosti *C. zeylanicum*.

Variabilita *psbA-trnH* je vhodná a dostatečná pro determinaci jednotlivých druhů [104]. Amplicony *psbA-trnH* obsahují více než 400 bp, což může být problematické při užití kontaminovaného vzorku DNA. Ragupathy et al. ve svém článku z roku 2024 navrhuje sekvenaci DNA v této oblasti a návrh mini DNA markerů [103].

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo analyzovat komerční vzorky mleté skořice pomocí PCR v reálném čase s vysokorozlišovací analýzou křivek tání s využitím různých párů primerů, stanovením obsahu kumarinu pomocí HPLC a vzájemné porovnání těchto metod.

Při izolaci DNA z komerčních vzorků pomocí kitu byly zjištěny vysoké kontaminace fenolickými látkami, které znemožnily následnou amplifikaci DNA těchto vzorků. Z tohoto důvodu musely být izolace provedeny časově náročnějším CTAB protokolem, který ve většině případů poskytl vzorky DNA bez kontaminace.

Nejvhodnějšími primery se ukázaly primery TPS 1, protože dokázaly správně identifikovat přítomnost *C. zeylanicum* ve vzorcích, kde se prokazatelně nacházela. V případě směsných vzorků s pravděpodobným obsahem *C. zeylanicum* dokázaly tuto skutečnost rovněž potvrdit. Nicméně u vzorků vykazující kontaminaci fenolickými látkami, rozpoznanou díky nevhodnému poměru A_{260}/A_{230} , poskytly falešně pozitivní výsledek.

Z hlediska srovnání ostatních primerů se primery TPS 3 ukázaly jako zcela nevýhodné, neboť v jejich případě nedošlo k amplifikaci DNA vzorků. Primery ITS 2 úspěšně amplifikovaly DNA komerčních vzorků, ale v rámci vysokorozlišovací analýzy křivek tání poskytly mnoho píků, které znemožnily determinaci botanických druhů. Primery psbA-trnH se rovněž neukázaly jako vhodné k determinaci druhů, protože v žádném z případů vzorku pravého skořicovníku nedokázaly tuto skutečnost potvrdit.

K extrakci DNA by bylo vhodnější využít jednu z modifikovaných verzí CTAB protokolu [58]. Vyšší čistoty by mohlo DNA být dosaženo při zkrácení prvotní extrakce na 10 minut a snížením času srážení DNA pomocí ethanolu na 10 minut. Opakované přečištění izolátu DNA pomocí směsi chloroform:izoamylalkohol by rovněž mohlo zvýšit čistotu izolované DNA.

Metoda stanovení kumarinu pomocí HPLC se ukázala jako rychlá se snadno interpretovatelným výsledkem o přesném obsahu kumarinu ve vzorku. Rovněž potvrdila označení prodejců v případě vzorků pravé skořice, a navíc odhalila jeden komerční vzorek, který prodejce označil jako běžnou skořici, ale obsah kumarinu v tomto vzorku jednoznačně prokázal obsah *C. zeylanicum*. Nevýhodou této metody je zejména neschopnost rozlišit přítomnost jednotlivých cassií.

6 REFERENCE

- [1] RAVINDRAN, P. N.; BABU, K. N. a SHYLAJA, M. *Cinnamon and Cassia: The genus Cinnamomum*. CRC Press, 2003, 384 s. ISBN 978-0-42-921186-7
- [2] PAGES-REBULL, J.; PÉREZ-RÀFOLS, C.; SERRANO, N. a DÍAZ-CRUZ, J. M. Analytical methods for cinnamon authentication. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2024, roč. 146. ISSN 0924-2244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104388> [cit. 2025-10-02]
- [3] DERKS, A.; TURNER, S. a HANH, N. T. Bastard Spice or Champagne of Cinnamon? Conflicting Value Creations along Cinnamon Commodity Chains in Northern Vietnam. *Development and Change* [online]. 2020, roč. 52, s. 895–920. ISSN 1467-7660. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/dech.12582> [cit. 2025-10-02]
- [4] GOVINDARAJAN, N.; RAVICHANDRAN, L.; SUNDHARAMOORTHY, S.; CHELLADURAI, P. K.; PANDEY, A. a ILAVARASAN, R. Comparative Morpho-anatomical Studies to Authenticate and Differentiate the Stem Barks of *Cinnamomum verum* J.Presl and *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl and its Market Scenario. *Journal of Drug Research in Ayurvedic Science* [online]. 2022, roč. 7, s. 185–191. ISSN 2581-8295. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/jdras.jdras_38_22 [cit. 2025-10-02]
- [5] FAOSTAT. Crops and livestock products. *Food and Agriculture Organization of United Nations* [online]. 2025. Dostupné z: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [cit. 2025-10-02]
- [6] DE SILVA, D. A. M.; JEEWANTHI, R. K. C.; RAJAPAKSHA, R. H. N.; WEDDAGALA, W. M. T. B.; HIROTSU, N.; SHIMIZU, B. a MUNASINGHE, M. A. J. P. Clean vs dirty labels: Transparency and authenticity of the labels of Ceylon cinnamon. *PLoS One* [online]. 2021, roč. 16. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260474> [cit. 2026-10-07]
- [7] PRUTHI, J. S. *Spices and Condiments: Chemistry, Microbiology, Technology*. Academic Press, 1980, 449 s. ISBN 978-0-12-016464-6
- [8] BERNARD, T. M.; PÉRINEAU, F.; DELMAS, M. a GASET, A. Extraction of essential oils by refining of plant materials. II. Processing of products in the dry state: *Illicium verum* Hooker (fruit) and *Cinnamomum zeylanicum* nees (bark). *Flavour and Fragrance Journal* [online]. 1989, roč. 4, s. 85–90. ISSN 1099-1026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ffj.2730040211> [cit. 2026-10-07]
- [9] SENANAYAKE, U. M.; LEE, T. H. a WILLS, R. B. H. Volatile Constituents of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2003, roč. 26, s. 53–55. ISSN 1520-5118. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.1277> [cit. 2026-10-07]
- [10] BLÁHOVÁ, J. a SVOBODOVÁ, Z. Assessment of Coumarin Levels in Ground Cinnamon Available in the Czech Retail Market. *The Scientific World Journal* [online]. 2012, roč. 14. ISSN 1537-744X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1100/2012/263851> [cit. 2026-10-07]

- [11] WOEHLIN, F.; FRY, H.; ABRAHAM, K. a PREISS-WIEGERT, A. Quantification of Flavoring Constituents in Cinnamon: High Variation of Coumarin in Cassia Bark from the German Retail Market and in Authentic Samples from Indonesia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, roč. 58, s. 10568–10575. ISSN 1520-5118. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf102112p> [cit. 2026-10-07]
- [12] EFSA. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Coumarin. *EFSA Journal* [online]. 2004. Dostupné z: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.104> [cit. 2026-10-07]
- [13] PARTHASARATHY, V. A.; CHEMPAKAM, B. a ZACHARIAH, T. J. *Chemistry of Spices*. Oxford University Press, 2008, s. 124–145. ISBN 978-1-84593-405-7
- [14] MUELLER, R. L. a SCHEIDT, S. History of Drugs for Thrombotic Disease. Discovery, Development, and Directions for the Future. *Circulation* [online]. 1994, roč. 89, s. 432–449. ISSN 0009-7322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1161/01.cir.89.1.432> [cit. 2026-10-07]
- [15] ABRAHAM, K.; WÖHLIN, F.; LINDTNER, O.; HEINEMEYER, G. a LAMPEN, A. Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2010, roč. 52, s. 228–239. ISSN 1613-4133. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900281> [cit. 2026-10-09]
- [16] PITARO, M.; CROCE, N.; GALLO, V.; ARIENZO, A.; SALVATORE, G. a ANTONINI, G. Coumarin-Induced Hepatotoxicity: A Narrative Review. *Molecules* [online]. 2022, roč. 27. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27249063> [cit. 2026-10-09]
- [17] PEARSE, R. E.; GREENWAY, D. a PARKINSON, A. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: Effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1992, roč. 298, s. 211–225. ISSN 1096-0384. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90115-D](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90115-D) [cit. 2026-10-09]
- [18] BAROT, K. P.; JAIN, S. V.; KREMER, L.; SINGH, S. a GHATE, M. D. Recent advances and therapeutic journey of coumarins: current status and perspectives. *Medicinal Chemistry Research* [online]. 2015, roč. 24, s. 2771–2798. ISSN 1554-8120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1350-8> [cit. 2026-10-09]
- [19] ČESKO. Vyhláška č. 398/2016 Sb., o požadavcích na koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky, ochucovadla, studené omáčky, dresinky a hořčici. In: *Sbírka zákonů* [online]. 2016, částka 162, s. 6286–6311. Dostupné z: <https://mze.gov.cz/public/portal/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/uplna-zneni/vyhlaska-2016-398> [cit. 2026-10-09]
- [20] FAO. *Spices and herbs for home and market*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011, 72 s. ISBN 978-92-5-107073-4
- [21] EUROSTAT. Flavours of 2023: EU spice imports. *Eurostat* [online]. 2023. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/w/ddn-20241202-1> [cit. 2025-

10-16]

- [22] SHAWKY, E.; NAHAR, L.; NASSIEF, S. M.; SARKER, S. D. a IBRAHIM, R. S. Spice authentication by near-infrared spectroscopy: Current advances, limitations, and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2024, roč. 148. ISSN 1879-3053. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104522> [cit. 2025-10-16]
- [23] EVROPSKÁ UNIE. Zeměpisná označení a režimy jakosti – přehled. *Evropská unie* [online]. 2026. Dostupné z: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/geographical-indications-and-quality-schemes/geographical-indications-and-quality-schemes-explained_cs [cit. 2026-02-19]
- [24] EVROPSKÁ UNIE. Rejstřík zeměpisných označení. *Evropská unie* [online]. 2026. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/agriculture/eambrosia/geographical-indications-register/details/EUGI00000016986> [cit. 2026-02-19]
- [25] CRUZ-TIRADO, J. P.; BRAZIL, Y. L.; LIMA, A. F.; PRETEL, H. A.; GODOY, H. T.; BARBIN, D. a SICHE, R. Rapid and non-destructive cinnamon authentication by NIR-hyperspectral imaging and classification chemometrics tools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2023, roč. 289, s. 1386–1425. ISSN 1873-3557. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122226> [cit. 2026-02-19]
- [26] LIXOURGIOTI, P.; GOGGIN, K. A.; ZHAO, X.; MURPHY, D. J.; VAN RUTH, S. a KOIDIS, A. Authentication of cinnamon spice samples using FT-IR spectroscopy and chemometric classification. *LWT – Food Science and Technology* [online]. 2022, roč. 154. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112760> [cit. 2026-02-19]
- [27] PRIMOŽIČ, S.; TERRO, C.; STROJNIK, L.; ŠEGATIN, N.; POKLAR ULRIH, N. a OGRINC, N. Assessing the Authenticity and Quality of Paprika (*Capsicum annum*) and Cinnamon (*Cinnamomum* spp.) in the Slovenian Market: A Multi-Analytical and Chemometric Approach. *Foods* [online]. 2025, roč. 14, s. 2323–2349. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods14132323> [cit. 2026-02-24]
- [28] TNAH, L. H.; LEE, S. L.; TAN, A. L.; LEE, C. T.; NG, K. K. S.; NG, C. H. a FARHANAH, Z. N. DNA barcode database of common herbal plants in the tropics: a resource for herbal product authentication. *Food Control* [online]. 2019, roč. 95, s. 318–326. ISSN 0956-7135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.0224> [cit. 2026-02-24]
- [29] HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. a DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2023, roč. 270, s. 313–321. ISSN 1471-2954. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218> [cit. 2026-02-24]
- [30] ALI, M. A.; GYULAI, G.; HIDVÉGI, N.; KERTI, B.; AL HEMAID, F. M. A.; PANDEY, A. K. a LEE, J. The changing epitome of species identification – DNA barcoding. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2014, roč. 21, s. 204–231. ISSN 1319-562X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.03.003> [cit. 2026-02-24]
- [31] CHEN, S.; YAO, H.; HAN, J.; LIU, C.; SONG, J.; SHI, L.; ZHU, Y.; MA, X.; GAO, T.; PANG, X.; LUO, K.; LI, Y.; LI, X.; JIA, X.; LIN, Y. a LEON, C. Validation of the ITS2

- Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS One* [online]. 2010, roč. 5. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613> [cit. 2026-02-26]
- [32] BHAT, A. R.; HEGDE, S.; MUTHAMMA, S. S. K. M. B.; MUDGAL, G.; CHARUKESI, R. a MOHAN, T. C. Identification and validation of ITS2-specific universal primers for DNA barcoding in plants [online]. 2024. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/2024.01.05.574284> [cit. 2026-02-26]
- [33] LETSIOU, S.; MADESIS, P.; VASDEKIS, E.; MONTEMURRO, C.; GRIGORIOU, M. E.; SKAVDIS, G.; MOUSSIS, V.; KOUTELIDAKIS, A. E. a TZAKOS, A. G. DNA Barcoding as a Plant Identification Method. *Applied Sciences* [online]. 2024, roč. 14, s. 1415–1426. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app14041415> [cit. 2026-02-26]
- [34] BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S. a BOLLINGER, W. M. H. Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. *Science* [online]. 1985, roč. 228, s. 1154–1160. ISSN 1095-9203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.3890182> [cit. 2026-02-26]
- [35] LIANG, J. a FU, M. Mining and Analysis of Terpene Synthase Genes in Cinnamomum Plants. *Tropical Plant Biology* [online]. 2025, roč. 18. ISSN 1935-9756. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12042-025-09420-5> [cit. 2026-02-26]
- [36] PAZOUKI, L. a NIINEMETS, Ü. Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2016, roč. 7. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01019> [cit. 2026-02-27]
- [37] JIANG, S.; LIU, Y.; CUI, S.; GUI, L. a HUANG, J. The Complete Chloroplast Genome Analysis Of Cinnamomum Cassia Presl. *Bangladesh Journal of Botany* [online]. 2022, roč. 51. ISSN 0253-5416. Dostupné z: <https://doi.org/10.3329/bjb.v51i1.58820> [cit. 2026-02-27]
- [38] HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S. a DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings: Biological sciences* [online]. 2003, roč. 270, s. 96–99. ISSN 1471-2954. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025> [cit. 2026-02-27]
- [39] KRESS, W. J.; WURDACK, K. J.; ZIMMER, E. A.; WEIGT, L. A. a JANSEN, D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Plant Biology* [online]. 2005, roč. 102, s. 8369–8374. ISSN 1438-8677. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102> [cit. 2026-02-27]
- [40] PARK, H. S.; JAYAKODI, M.; LEE, S. H.; JEON, J. H.; LEE, H. O.; PARK, J. Y.; MOON, B. C.; KIM, C. K.; WING, R. A.; NEWMASTER, S. G.; KIM, J. Y. a YANG, T. J. Mitochondrial plastid DNA can cause DNA barcoding paradox in plants. *Scientific Reports* [online]. 2020, roč. 10, s. 6112–6123. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63233-y> [cit. 2026-02-27]
- [41] HO, S. W.; CHAO, C. T. a LIAO, P. C. Beyond a single locus: Evolutionary constraints

- and genomic alternatives to plant DNA barcoding. *Taiwania* [online]. 2026, roč. 71, s. 185–197. ISSN 0372-333X. Dostupné z: <https://doi.org/10.6165/tai.2026.71.185> [cit. 2026-02-27]
- [42] VELÁZQUEZ, R.; RODRÍGUEZ, A.; HERNÁNDEZ, A.; CASGUETE, R.; BENITO, M. J. a MARTIN, A. Spice and Herb Frauds: Types, Incidence, and Detection: The State of the Art. *Foods* [online]. 2023, roč. 12, s. 3373–3410. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods12183373> [cit. 2026-02-27]
- [43] LUNGARINI, S.; AURELI, F. a CONI, E. Coumarin and cinnamaldehyde in cinnamon marketed in Italy: A natural chemical hazard? *Food Additives & Contaminants* [online]. 2008, roč. 25, s. 1297–1305. ISSN 0265-203X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/02652030802105274> [cit. 2026-02-27]
- [44] BAROT, K. P.; JAIN, S. V.; KREMER, L.; SINGH, S. a GHATE, M. D. Recent advances and therapeutic journey of coumarins: current status and perspectives. *Medicinal Chemistry Research* [online]. 2015, roč. 24, s. 2771–2798. ISSN 1554-8120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1350-8> [cit. 2026-02-27]
- [45] BALLIN, N. Z. a SØRENSEN, A. T. Coumarin content in cinnamon containing food products on the Danish market. *Food Control* [online]. 2014, roč. 38, s. 198–203. ISSN 1873-7129. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.014> [cit. 2026-03-03]
- [46] ARCHER, A. W. Determination of cinnamaldehyde, coumarin and cinnamyl alcohol in cinnamon and cassia by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* [online]. 1988, roč. 447, s. 272–276. ISSN 0021-9673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(88\)90035-0](https://doi.org/10.1016/0021-9673(88)90035-0) [cit. 2026-03-03]
- [47] YU, C.; LI, Y. L.; LIANG, M.; DAI, S. Y.; MA, L.; LI, W. G.; LAI, F. a LIU, X. M. Characteristics and hazards of the cinnamaldehyde oxidation process. *RSC Advances* [online]. 2020, roč. 32, s. 19124–19133. ISSN 2048-7754. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C9RA10820C> [cit. 2026-03-03]
- [48] NARGESI, M. H.; AMIRIPARIAN, J.; BAGHERPOUR, H. a KHEIRALIPOUR, K. Detection of different adulteration in cinnamon powder using hyperspectral imaging and artificial neural network method. *Results in Chemistry* [online]. 2024, roč. 9. ISSN 2211-7156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101644> [cit. 2026-03-03]
- [49] CANTARELLI, M. A.; MOLDES, C. A.; MARCHECKY, E. J.; AZCARATE, S. M. a CAMINA, J. M. Low-cost analytic method for the identification of Cinnamon adulteration. *Microchemical Journal* [online]. 2020, roč. 159. ISSN 0026-265X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105513> [cit. 2026-03-03]
- [50] TRAVERS, A. a MUSKHELISHVILI, G. DNA structure and function. *FEBS Journal* [online]. 2015, roč. 282, s. 2279–2295. ISSN 1742-4658. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/febs.13307> [cit. 2026-03-03]
- [51] WATSON, J. D. a CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* [online]. 1953, roč. 171, s. 737–738. ISSN 1476-4687. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/171737a0> [cit. 2026-03-05]

- [52] SALIEB-BEUGELAAR, G. B. *Electrokinetic Transport of DNA in Nanoslits* [online]. Faculty of Science and Technology Basel, 2009. Dostupné z: <https://doi.org/10.3990/1.9789036529174> [cit. 2026-03-05]
- [53] SINDEN, R. R. *DNA Structure and Function*. Academic Press, 1994, 398 s. ISBN 978-0-08-057173-7
- [54] LUCENA-AGUILAR, G.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. M.; BARBERÁN-ACEITUNO, C.; CARRILLO-ÁVILA, J. A.; LÓPEZ-GUERRERO, J. A. a AGUILAR-QUESADA, R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking* [online]. 2016, roč. 14, s. 264–270. ISSN 1947-5535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064> [cit. 2026-03-05]
- [55] BARBIER, F. F.; CHABIKWA, T. G.; AHSAN, M. U.; COOK, S. E.; POWELL, R.; TANURDZIC, M. a BEVERIDGE, C. A. A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. *Plant Methods* [online]. 2019, roč. 15. ISSN 1746-4811. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0447-3> [cit. 2026-03-06]
- [56] EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C. a THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* [online]. 1991, roč. 19, s. 1349. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349> [cit. 2026-03-06]
- [57] SAHU, S. K.; THANGARAJ, M. a KATHIRESAN, K. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology* [online]. 2012, roč. 2012. ISSN 2090-7907. Dostupné z: <https://doi.org/10.5402/2012/205049> [cit. 2026-03-06]
- [58] LIU, B.; WU, H. F.; CAO, Y. Z.; MA, G. P.; ZHENG, X. W.; ZHU, H. X.; SONG, X. a SUI, S. Z. Reducing costs and shortening the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method to improve DNA extraction efficiency from wintersweet and some other plants. *Scientific Reports* [online]. 2025, roč. 15. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-94822-4> [cit. 2026-03-10]
- [59] ASHWINI, D. a TIWARI, S. T. Use of CTAB Method for Isolation of Good Quality and Quantity of DNA. *Journal of Pure and Applied Microbiology* [online]. 2015, roč. 9, s. 2271–2274. ISSN 0973-7510. Dostupné z: <https://microbiologyjournal.org/use-of-ctab-method-for-isolation-of-good-quality-and-quantity-of-dna/> [cit. 2026-03-10]
- [60] NWOKEOJI, A. O.; KILBY, P. M.; PORTWOOD, D. E. a DICKMAN, M. J. Accurate Quantification of Nucleic Acids Using Hypochromicity Measurements in Conjunction with UV Spectrophotometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2017, roč. 89, s. 13567–13574. ISSN 1520-6882. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04000> [cit. 2026-03-10]
- [61] MARMUR, J. a DOTY, P. Determination of the Base Composition of Deoxyribonucleic Acid from its Thermal Denaturation Temperature. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1962, roč. 5, s. 109–118. ISSN 0022-2836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/S0022->

[2836\(62\)80066-7](#) [cit. 2026-03-12]

- [62] WITTWER, C. T.; HEMMER, A. C.; KENT, J. O. a REJALI, N. A. DNA melting analysis. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2024, roč. 97. ISSN 0098-2997. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101268> [cit. 2026-03-12]
- [63] PHANEUF, C. R.; PAK, N.; SAUNDERS, D. C.; HOLST, G. L.; BIRJINIUK, J.; NAGPAL, N.; CULPEPPER, S.; POPLER, E.; SHANE, A. L. a JERRIS, R. Thermally multiplexed polymerase chain reaction. *Biomicrofluidics* [online]. 2015, roč. 9. ISSN 1932-1058. Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/1.4928486> [cit. 2026-03-12]
- [64] MULLIS, K. B.; FALOONA, F.; SCHARF, S. J.; SAIKI, R. K.; HORN, G. T. a ERLICH, H. A. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [online]. 1986, roč. 51, s. 263–273. ISSN 1943-4456. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032> [cit. 2026-03-13]
- [65] SHERINA, V.; McMURRAY, H. R.; POWERS, W.; LAND, H.; LOVE, T. M. T. a McCALL, M. N. Statistical Approaches to Decreasing the Discrepancy of Non-detects in qPCR Data [online]. 2017. ISSN 1555-3884. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/231621> [cit. 2026-03-13]
- [66] SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B. a ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* [online]. 1988, roč. 239, s. 487–491. ISSN 1095-9203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.2448875> [cit. 2026-03-13]
- [67] GONZALES, A.; GRIMES, R.; WALSH, E. J.; DALTON, T. a DAVIES, M. Interaction of quantitative PCR components with polymeric surfaces. *Biomedical Microdevices* [online]. 2007, roč. 9, s. 261–266. ISSN 1572-8781. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10544-006-9030-6> [cit. 2026-03-17]
- [68] HARSHITHA, R. a ARURAJ, D. R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. 2021, roč. 49, s. 800–812. ISSN 1539-3429. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmb.21552> [cit. 2026-03-17]
- [69] CHARRON, M. R.; YATES, M. C. a HEATH, D. D. Stomach Content DNA (scDNA) Detection and Quantification for Predator Diet Assessment Using High-Throughput Nanofluidic Chip Technology: Species-Specific qPCR Assay Panel Development and Validation. *Molecular Ecology Resources* [online]. 2025, roč. 25. ISSN 1755-0998. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.14106> [cit. 2026-03-17]
- [70] JAAKOLA, L.; SUOKAS, M. a HÄGGMAN, H. Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. *Food Chemistry* [online]. 2010, roč. 123, s. 494–500. ISSN 1873-7072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.069> [cit. 2026-03-19]
- [71] ASHRAFI, R.; BRUNEAUX, M.; SUNDBERG, L. R.; PULKKINEN, K. a KETOLA, T. Application of high resolution melting assay (HRM) to study temperature-dependent

- intraspecific competition in a pathogenic bacterium. *Scientific Reports* [online]. 2017, roč. 7, s. 980–987. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01074-y> [cit. 2026-03-19]
- [72] HE, Z.; YANG, Z.; DONG, C.; YAN, S.; LIN, J.; BAO, H.; TANG, F.; ZNANG, L.; ZHU, C.; HU, Y. a DING, Y. Identification of *Dendrobium officinale* species and authentication of commercial products by DNA barcoding and high-resolution melting analysis. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* [online]. 2025, roč. 46. ISSN 2214-7861. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2025.100633> [cit. 2026-03-19]
- [73] HUSSEIN, J. Principles and Applications of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Review. *Biomedical & Pharmacology Journal* [online]. 2025, roč. 18, s. 1085–1089. ISSN 0974-6242. Dostupné z: <https://doi.org/10.13005/bpj/3154> [cit. 2026-03-20]
- [74] STEPHEN, Ch. Classification of Chromatography and its Applications. *Journal of Chromatography* [online]. 2023, roč. 6. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://doi.org/10.4172/JCGR.1000060> [cit. 2026-03-20]
- [75] DEBNATH, S.; DAS, M.; MONDAL, S.; SARKAR, B. K. a BABU, G. Essential Chem [online]. 2025, roč. 2, s. 1–27. ISSN 2837-8083. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/28378083.2025.2466624> [cit. 2026-03-20]
- [76] HESHKA, N. E. Applications of High Performance Liquid Chromatography in the Petroleomic Analysis of Crude Oil: A Mini-Review. *Energy and Fuels* [online]. 2021, roč. 35, s. 18104–18115. ISSN 1520-5029. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.1c02091> [cit. 2026-03-24]
- [77] LI, J.; HAN, W. a YU, Y. Chromatography Method. Protein Engineering - Technology and Application. 2013. ISBN 978-953-51-1138-2
- [78] NYIREDY, S. Planar chromatography. *Journal of Chromatography Library* [online]. 1992, roč. 51, s. 109–150. ISSN 0301-4770. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)61564-X](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)61564-X) [cit. 2026-03-24]
- [79] WILSON, I. D. a POOLE, C. F. Planar chromatography – Current practice and future prospects. *Journal of Chromatography* [online]. 2023, roč. 1214. ISSN 1570-0232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123553> [cit. 2026-03-24]
- [80] CAMARA, J. S.; MARTINS, C.; PEREIRA, J. A. M.; PERESTRELO, R. a ROCHA, S. M. Chromatographic-Based Platforms as New Avenues for Scientific Progress and Sustainability. *Molecules* [online]. 2022, roč. 27, s. 5267–5293. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27165267> [cit. 2026-03-26]
- [81] STRAW, W. A. Principles of Chromatography and Separative Techniques - Adsorption and Partition Chromatography. *Journal of the Society of Dyers and Colourists* [online]. 1985, roč. 101, s. 409–416. ISSN 0037-9859. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1478-4408.1985.tb01004.x> [cit. 2026-03-26]
- [82] SNYDER, L. R. Linear elution adsorption chromatography : XI. Separability of aromatic isomers on alumina. Mechanisms of adsorption. *Journal of Chromatography* [online].

1965, roč. 20, s. 463–495. ISSN 1570-0232. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)97449-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)97449-7) [cit. 2026-03-26]

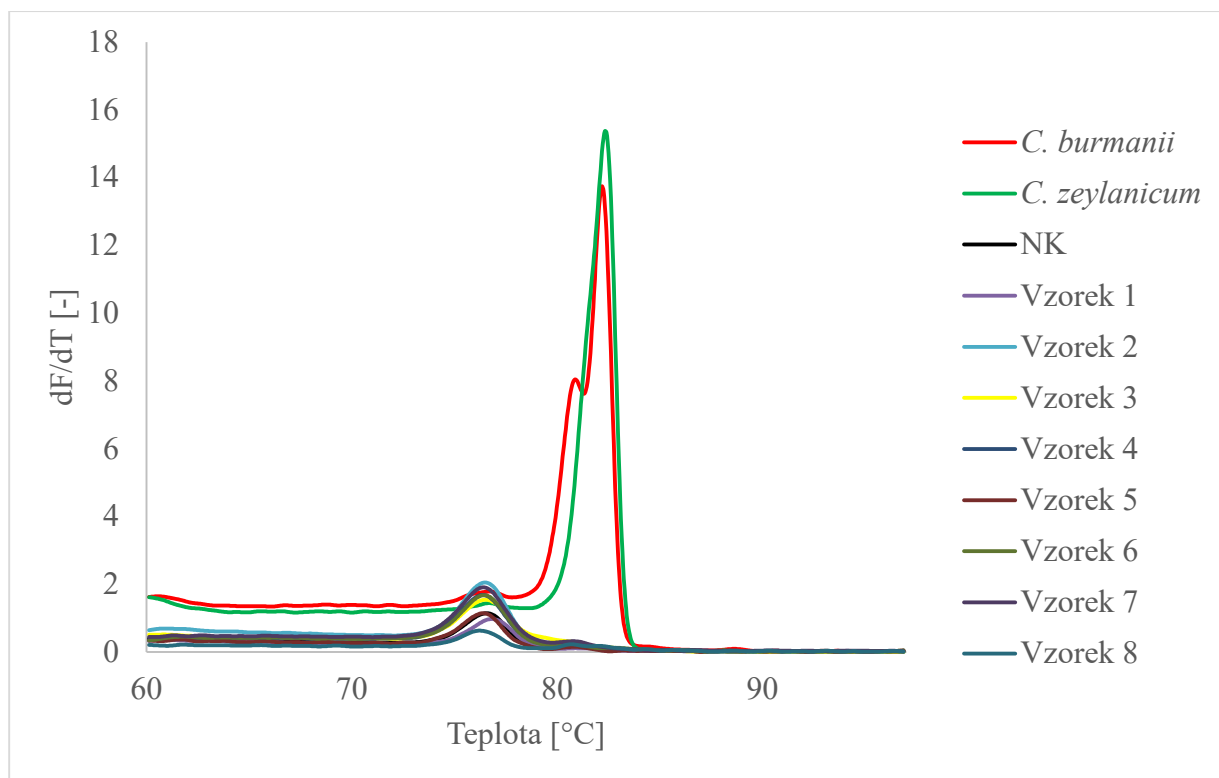
- [83] BURGESS, R. R. A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. *Protein Expression and Purification* [online]. 2018, roč. 150, s. 81–85. ISSN 1096-0279. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.05.007> [cit. 2026-03-26]
- [84] MARTIN, A. J. P. a SYNGE, R. L. M. A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. *Biochemical Journal* [online]. 1941, roč. 35, s. 1358–1368. ISSN 1756-2651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/bj0351358> [cit. 2026-03-27]
- [85] BHATI, C.; MINOCHA, N.; PUROHIT, D.; KUMAR, S.; MAKHIJA, M.; SAINI, S.; KAUSHIK, D. a PANDEY, P. High Performance Liquid Chromatography: Recent Patents and Advancement. *Biomedical & Pharmacology Journal* [online]. 2022, roč. 15, s. 729–746. ISSN 0974-6242. Dostupné z: <https://doi.org/10.13005/bpj/2411> [cit. 2026-03-27]
- [86] LaCOURSE, M. E. a LaCOURSE, W. R. Liquid Chromatography: General instrumentation in HPLC. In: *Liquid Chromatography*. 2. vyd. Elsevier, 2017, s. 417–429. ISBN 978-0-12-805393-5
- [87] CZAPLICKI, S. Column Chromatography: Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. InTech, 2013. ISBN 978-953-51-1074-3
- [88] NIEC, D. a KUNICKI, P. K. Validation of an assay for quantification of free normetanephrine, metanephrine and methoxytyramine in plasma by high performance liquid chromatography with coulometric detection: Comparison of peak-area vs. peak-height measurements. *Journal of Chromatography B* [online]. 2015, roč. 1002, s. 63–70. ISSN 1873-376X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.004> [cit. 2026-03-27]
- [89] JAIN, A. K. Data clustering: 50 years beyond K-means. *Pattern Recognition Letters* [online]. 2010, roč. 31, s. 651–666. ISSN 1872-7344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.patrec.2009.09.011> [cit. 2026-03-27]
- [90] WARD, J. H. Jr. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* [online]. 1963, roč. 58, s. 236–244. ISSN 0162-1459. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845> [cit. 2026-03-27]
- [91] HEBÁK, P.; JAROŠOVÁ, E.; PECÁKOVÁ, I.; PLAŠIL, M.; ŘEZANKOVÁ, H.; VILIKUS, O. a VLACH, P. *Statistické myšlení a nástroje analýzy dat*. 1. vyd. Informatorium, 2013, 876 s. ISBN 978-80-7333-105-4
- [92] HEBÁK, P.; HUSTOPECKÝ, J.; PECÁKOVÁ, I.; PRŮŠA, M.; ŘEZANKOVÁ, H.; SVOBODOVÁ, A. a VLACH, P. *Vícerozměrné statistické metody (3)*. Informatorium, 2005, 255 s. ISBN 978-80-733-039-0
- [93] LEPŠ, J. a ŠMILAUER, P. *Biostatistika*. 1. vyd. Nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 2000, 438 s. ISBN 978-80-7394-587-9
- [94] HENDL, J. *Přehled statistických metod: analýza a metaanalýza dat*. 5. vyd. Portál, 2015,

- [95] CHAE, M. a CHEN, J. J. Reordering Hierarchical Tree Based on Bilateral Symmetric Distance. *PLOS One* [online]. 2011, roč. 6. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845> [cit. 2026-03-27]
- [96] COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS. CTAB extraction buffer. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2009, roč. 2009, č. 10. ISSN 1559-6095. Dostupné z: <https://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/10/pdb.rec11984> [cit. 2026-04-29]
- [97] MA, Yao; LI, Jingmiao; TIAN, Mingjing; LIU, Yulin a WEI, Anzhi. Authentication of Chinese prickly ash by ITS2 sequencing and the influence of environmental factors on pericarp quality traits. Online. *Industrial Crops and Products*. 2020, roč. 155. ISSN 09266690. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112770> [cit. 2026-04-29]
- [98] TRÖDLEROVÁ, Martina. Testování primerů pro ověření autenticity skořice. Online, diplomová práce. Lenka FIALOVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/161909> [cit. 2026-04-29]
- [99] McCORD, B.; PIONZIO, A. a THOMPSON, R. Analysis of the Effect of a Variety of PCR Inhibitors on the Amplification of DNA Using Real Time PCR, Melt Curves and STR Analysis. National Institute of Justice [online]. 2014. Dostupné z: <https://nij.ojp.gov/library/publications/analysis-effect-variety-pcr-inhibitors-amplification-dna-using-real-time-pcr> [cit. 2026-05-01]
- [100] WANG, X. C.; LIU, C.; HUANG, L.; BENGTSSON-PALME, J.; CHEN, H.; ZHANG, J. H.; CAI, D. a LI, J. Q. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources* [online]. 2015, roč. 15, č. 3, s. 573–586. ISSN 1755-0998. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12325> [cit. 2026-05-02]
- [101] McDOWELL, D. G.; BURNS, N. A. a PARKES, H. C. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Research* [online]. 1998, roč. 26, č. 14, s. 3340–3347. ISSN 1362-4962. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/26.14.3340> [cit. 2026-05-02]
- [102] KOETSIER, G. a CANTOR, E. J. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers [online]. 2019. Dostupné z: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:197865789> [cit. 2026-05-02]
- [103] RAGUPATHY, S.; THIRUGNANASAMBANDAM, A.; VINAYAGAM, V. a NEWMASER, S. G. Nuclear Magnetic Resonance Fingerprints and Mini DNA Markers for the Authentication of Cinnamon Species Ingredients Used in Food and Natural Health Products. *Plants* [online]. 2024, roč. 13, č. 6, s. 841. ISSN 2223-7747. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants13060841> [cit. 2026-05-03]
- [104] PEIRIS, M. A. L. M.; NANAYAKKARA, D.; SILVA, C.; ABEYSUNDARA, S. P. a WIJESINGHE, P. Barcode high-resolution melting (Bar-HRM) analysis to authenticate true cinnamon (*Cinnamomum verum*) from its adulterants and contaminants. *PLoS One* [online]. 2025. ISSN 1932-6203. Dostupné z:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328808> [cit. 2026-05-03]

- [105] RANA, P.; LEE, M. S. a SHEU, S. C. Authentication of *Cinnamomum verum* (Ceylon cinnamon) in commercial products by qualitative and real-time quantitative PCR assays. *European Food Research and Technology* [online]. 2024. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00217-024-04587-9> [cit. 2026-05-03]

7 PŘÍLOHY



Graf 28: Derivované křivky tání DNA izolátů pomocí EliGene Plant DNA Isolation Kit s využitím primerů TPS 1

Tabulka 23: Kompletní výsledky HPLC vzorků č. 1 až 4 (kumarin vyznačen žlutě)

Retenční čas [min]	vzorek č. 1	vzorek č. 2	vzorek č. 3	vzorek č. 4
	plocha pod grafem [mAU·min ⁻¹]			
3,263	1669,09 ± 336,89	1970,21 ± 1,21	1319,16 ± 769,53	1204,37 ± 61,67
3,835	6,06 ± 8,57	16,04 ± 0,23	12,99 ± 5,52	
4,362	1,84 ± 2,6	6,04 ± 0,08	6,22 ± 0,33	
4,537	73,45 ± 33,17	104,73 ± 1,28	200,26 ± 85,9	
4,568			2,27 ± 3,21	50,69 ± 0,17
12,042			86,2 ± 80,51	
13,195				35,33 ± 0,09
14,617				12,02 ± 0,83
15,700	3,02 ± 4,28	11,21 ± 0,31	7,57 ± 2,48	8,82 ± 0,1
16,368	9,6 ± 0,41	9,7 ± 0,13	2,67 ± 3,77	
16,712				
17,812	8,49 ± 2,44	12,94 ± 0,1	6,75 ± 1,24	
18,662		7,07 ± 10	9,89 ± 0,47	
19,452	946,24 ± 14,09	1095,42 ± 40,16	818,15 ± 8,63	16,81 ± 0,27
19,575				
20,455	503 ± 20,98	503,19 ± 12,48	336,68 ± 1,73	147,12 ± 0,09
20,518	18,38 ± 25,99	43,39 ± 0,71		
21,503	11,14 ± 0,26	11,63 ± 0,13		
22,057	1403,12 ± 10,3	1337,08 ± 18,94	1251,73 ± 35,78	1145,33 ± 6,77
22,123	0,34 ± 0,48		0,23 ± 0,32	0,17 ± 0,24
22,178	0,65 ± 0,92	0,79 ± 0,08	24,3 ± 33,97	
22,945	2,78 ± 0,16			
23,193	12,98 ± 0,3	5,36 ± 0,17		26,01 ± 0,06
23,672	636,65 ± 14,79	597,91 ± 16,87	173,23 ± 0,06	139,49 ± 0,11
25,732	4,19 ± 0,18	39,01 ± 1,04	4,69 ± 0,05	6,38 ± 0,02
25,905	8,6 ± 0,28	10,05 ± 0,1		9,24 ± 0
27,252				
27,757	14,14 ± 0,23	19,61 ± 0,66	17,9 ± 0,02	9,36 ± 0,01
28,178				3,18 ± 0,01
28,850		4,98 ± 0,36		

Tabulka 24: Kompletní výsledky HPLC vzorků č. 5 až 8 (kumarin vyznačen žlutě)

Retenční čas [min]	vzorek č. 5	vzorek č. 6	vzorek č. 7	vzorek č. 8
	plocha pod grafem [mAU·min ⁻¹]			
3,263	1785,07 ± 41,01	1819,58 ± 78,25	1830,07 ± 31,99	1417,44 ± 64,37
3,835	13,22 ± 0,74		13,78 ± 0,48	3,86 ± 5,47
4,362	3,75 ± 0,13	9,13 ± 0,54	3,91 ± 0,33	1,52 ± 2,15
4,537	117,24 ± 3,16	3,24 ± 0,13	87,67 ± 0,04	72,82 ± 11,24
4,568		95,81 ± 1,44	7,12 ± 10,07	
12,042			9,99 ± 6,01	
13,195		39,77 ± 1,83		23,84 ± 2,66
14,617				10,05 ± 3,1
15,700		13,06 ± 1,03	2,82 ± 3,98	14,73 ± 0,1
16,368	6,93 ± 0,01	5,34 ± 0,51	7,54 ± 0,26	
16,712				
17,812		0 ± 0	14,55 ± 1,04	
18,662	8,28 ± 0,1	0 ± 0	9,12 ± 0,61	
19,452	299,24 ± 0,57	30,7 ± 0,8	937,91 ± 43,56	133,57 ± 2,13
19,575				
20,455	443,59 ± 3,28	199,53 ± 13,82	459,97 ± 1,79	183,67 ± 4,59
20,518				
21,503	21,22 ± 0,74		8,08 ± 0,2	
22,057	1320,74 ± 8,42	1221,32 ± 47,25	1313,49 ± 17,91	1234,93 ± 14,71
22,123	0,25 ± 0,05	0,2 ± 0,28	0,71 ± 0,28	0,19 ± 0,27
22,178			0,32 ± 0,45	0,16 ± 0,23
22,945				
23,193	18,77 ± 0,34	17,72 ± 1,45	3,42 ± 0,09	20,9 ± 0,22
23,672	697,55 ± 11,2	145,58 ± 10,35	257,3 ± 0,33	156,47 ± 1,72
25,732				
25,905	4,07 ± 0,11	4,64 ± 0,62	5,75 ± 0,01	5,45 ± 0,09
27,252			42,27 ± 0,03	7,15 ± 0,03
27,757	12,11 ± 0,17	14,21 ± 0,53	14,9 ± 0,06	7,17 ± 0,12
28,178		2,23 ± 0,35	2,56 ± 0,04	
28,850				