

VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU V KVALITATIVNÍ ANALÝZE FENOLICKÝCH LÁTEK OBSAŽENÝCH V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

Jakub Nezval¹, Jiří Kalina²

¹*Katedra fyziky, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Chittussiho 10, Slezská Ostrava, 710 00, +420 724 764 053, nezval.jakub@gmail.com*

²*Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, 30. Dubna 22, 701 03, jiri.kalina@osu.cz*

Abstrakt

Práce je zaměřena na vývoj metody pro identifikaci fenolických látek (FL) v rostlinném materiálu za pomoci kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu ESI-Q-TOF. Nově zavedená a standardizovaná metoda byla využita při studiu složení FL v primárních listech ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus) a sledování odlišností ve složení FL v listech rostlin pěstovaných při nízké (LI; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a vysoké (HI; $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) úrovni fotosynteticky aktivní radiace (FAR). V rámci standardizace metod byla zaznamenána hmotnostní spektra (MS i MS/MS) 26 standardů FL, dále pak jejich UV-VIS absorpční spektra a retenční časy. V rostlinném materiálu bylo následně identifikováno 12 FL. Byl pozorován signifikantně vyšší relativní obsah všech identifikovaných FL v sadě vzorků HI, přičemž největší rozdíly vykazovaly deriváty luteolinu. U těchto látek lze předpokládat antioxidační aktivitu, díky níž mohou tyto látky v rostlině omezovat oxidativní poškození vyvolané intenzivní FAR.

Klíčová slova: *hmotnostní spektrometrie; vysoce účinná kapalinová chromatografie; fenolické látky; ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus)*

Úvod

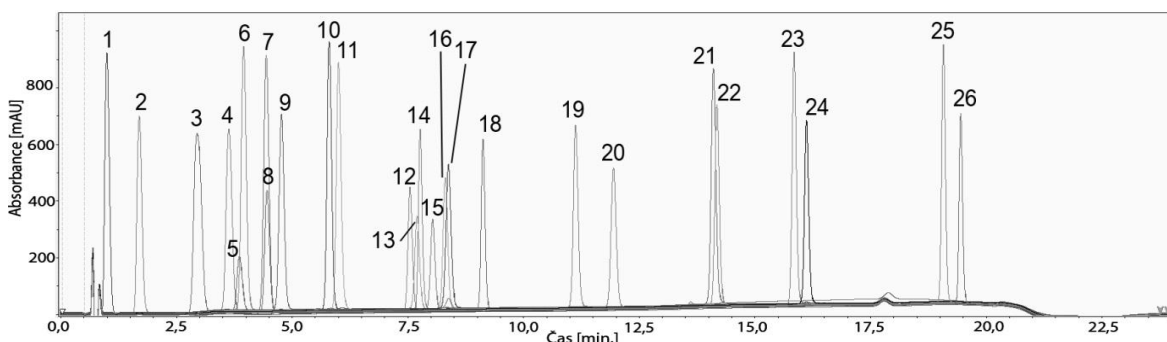
Fenolické látky (FL) tvoří jednu z nejvýznamnějších skupin sekundárních metabolitů rostlin. Mimo řady jiných fyziologických funkcí, se význačně podílí na zvyšování odolnosti rostlin vůči působení abiotických i biotických stresových faktorů. Tyto bioaktivní látky jsou také významnou složkou potravy živočichů a v současné době jsou intenzivně zkoumány i jejich pozitivní účinky na lidské zdraví. Výzkum v oblasti FL se ve většině případů neobejde bez znalosti kvalitativního případně kvantitativního složení sledovaných vzorků. Identifikace FL je však komplikována jejich značnou strukturní variabilitou. V důsledku přítomnosti mnoha typů základních strukturních jednotek odvozených od molekuly fenolu, které mohou být dále glykosylovány, methylovány, acylovány, případně mohou vytvářet polymery atd., se počet doposud identifikovaných FL pohybuje v řádech tisíců. Z toho vyplývá i fakt, že pro mnoho FL nejsou dostupné komerčně dodávané standardy, které by kvalitativní analýzu usnadnily. Cílem této práce je prezentovat nově vyvinutou metodu kvalitativní analýzy fenolických látek řadících se do skupin flavonoidů, stilbenů, hydroxyskořicových a hydroxybenzoových kyselin, využívající spojení vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostním detektorem. Na základě hmotnostních spekter lze určovat sumární vzorec sledovaných analytů, fragmentační (MS/MS) spektra pak umožňují detailnější analýzu struktury molekuly - identitu látek je tedy obvykle možné určit i v případě absence vhodného standardu. V této práci prezentujeme aplikaci vyvinuté metody při identifikaci FL v primárních listech ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus) a studiu změn jejich relativního zastoupení v důsledku odlišných radiačních podmínek (rozdílná úroveň ozáření fotosynteticky aktivní radiací - FAR), při kterých byly rostliny pěstovány.

Materiál a metody

Za účelem zavedení a standardizace HPLC-DAD-MS-(MS/MS) metody byly použity metanolové roztoky 26 standardů FL (o koncentraci cca $0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) spadajících do podskupin hydroxyskořicových kyselin, hydroxybenzoových kyselin flavonoidů a stilbenů (výčet viz. legenda k Obrázku 1.) a jejich směs. Pro studium složení FL v rostlinném materiálu byly použity listy ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus), ten byl pěstován 8 dní v nepřítomnosti UV radiace za různé ozáření FAR – $100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LI) a $1000 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (HI). K odstínění UV-R byl použit filtr LEE 226 (s T_{50} přibližně 400 nm, Lee Filters, Velká Británie). Příprava rostlinných extraktů proběhla dle standardního postupu uvedeného v [1.]. 100 mg čerstvé hmotnosti středních segmentů primárních listů ječmene bylo odebráno na počátku 8 dne růstu (celkem bylo odebráno po šesti vzorcích ze skupiny HI a LI). Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce v cca 3 ml 40% metanolu a ultrasonifikován po dobu 5 minut a centrifugován při $6000 \text{ ot. min}^{-1}$ po dobu 3 minut (EBA 20, Hettich Zentrifugen, Německo). Získaný supernatant byl doplněn na 3 ml 40% metanolem, přefiltrován přes $0,2 \text{ } \mu\text{m}$ teflonový filtr do vialky a použit pro HPLC-DAD-MS (MS/MS) analýzu. Chromatografická analýza s UV-VIS absorpční a hmotnostní detekcí byla provedena s využitím systému HPLC-micrOTOFQ-II (dodavatel Bruker s.r.o., Česká republika). Při separaci bylo využito gradientového toku dvou mobilních fází – A: 5% vodný roztok acetonitrilu, B: acetonitril (HPLC grade, Merck, GER). Obě mobilní fáze byly okyseleny kyselinou mravenčí (mobilní fáze:HCOOH, v/v, 999:1). Průtok mobilních fází byl nastaven na $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ v průběhu celé délky analýzy (24 min.). Separace probíhala při 30°C na koloně typu Hypersil Gold (Thermo Scientific, USA), $50 \times 2,1 \text{ mm}$, s velikostí částic výplně $1,9 \text{ } \mu\text{m}$. Látky byly detekovány při 210, 270, 314 a 360 nm. Objem nástřiku rostlinných extraktů byl nastaven na $15 \text{ } \mu\text{l}$ ($25 \text{ } \mu\text{l}$ v případě MS/MS analýzy). Absorpční spektra byla zaznamenána v rozsahu 190-750 nm. Ionizace látek byla provedena za pomoci ionizátoru ESI v negativním módu. Hmotnostní spektra byla zaznamenávána v rozsahu 50-1500 m/z (poměr molekulové hmotnosti částice k jejímu náboji). Fragmentace za účelem pořízení MS/MS spekter probíhala při kolizních energiích 35 nebo 15 eV. Relativní kvantifikace metabolitů mezi sadami HI a LI byla prováděna na základě integrace píků na EIC (chromatogram extrahovaných iontů) příslušného iontu. Plochy byly zprůměrovány v rámci skupin HI a LI, byl proveden test rozptylu (f-test) a shody průměrů (t-test).

Výsledky a diskuse

Nově vyvinutá chromatografická metoda umožnila, i přes nízký průtok mobilních fází, rychlou ($t = 24 \text{ min.}$) a účinnou separaci 26 standardů FL (Obrázek 1.). Toho bylo dosaženo především díky využití krátké kolony s $1,9 \text{ } \mu\text{m}$ částicemi výplně. V průběhu analýzy dochází k 5 koelucím FL (pík 5-6, 7-8, 13-14, 16-17 a 21-22 – viz. Obrázek 1.). Hmotnostní detektor však umožňuje rozlišení těchto látek podle jejich odlišné m/z. Na základě analýzy jednotlivých standardů FL i jejich směsi byla vytvořena databáze hmotnostních, fragmentačních i UV-VIS absorpčních spekter a retenčních časů použitelných pro identifikaci těchto a podobných FL v rostlinném materiálu či jiných vzorcích (např. tělních tekutinách, potravinách atd.).



Obrázek 1. Chromatografická separace 26 standardů fenolických látek – proložené chromatogramy pořízené během HPLC-DAD-MS analýzy jednotlivých standardů (detektor DAD 210 nm). 1 – kyselina gallová, 2 - kyselina protocatechová, 3 – (-)-epigalokatechin, 4 – DL-katechin, 5 – kyselina chlorogenová, 6 – kyselina vanilová, 7 - kyselina 3-hydroxybenzoová, 8 – kyselina kávová, 9 – kyselina syringová, 10 – (-)-epikatechin, 11 – (-) epigalokatechingalát, 12 – saponarin, 13 – kyselina ferulová, 14 – isoorientin, 15 – kyselina sinapová, 16 – kyselina 3-kumarová, 17 – taxifolin, 18 – isovitexin, 19 – myricetin, 21 – kvercetin, 22 – luteolin, 23 – apigenin, 24 – kempferol, 25 – chrysin, 26 - galangin)

Tabulka 1. Identifikace vybraných FL a srovnání jejich relativního obsahu v primárních listech ječmene jarního. (Rt – retenční čas)

Detekovaná látka	Ø m/z sledovaného iontu (n=6) ⁺⁺⁺	Ø Rt (n=12)	Ø plocha píku v sadě HI (n=6)	Ø plocha píku v sadě LI (n=6)	Poměr ploch piků extrahovaných iontů v HI/LI [rel.]	Signif. rozdíl mezi HI x LI
Luteolin-6-C-glc (Isoorientin)	447,0943	7,99 ⁺	4083	+	+	+
Isoorientin-7-O-[6-fer]-glc	785,1900	9,88	86897	6952	12,50	ANO ***
Isoorientin-7-O-[6-sinp]-glc	815,1995	9,55	120571	10471	11,51	ANO ***
Isoorientin-7-O-glc (Lutonarin)	609,1443	6,54	284354	40791	6,97	ANO ***
Isoscoparin-7-O-[6-sinp]-glc	829,2152	10,54	23715	4187	5,66	ANO ***
Isovitexin-7-O-[6-sinp]-glc	799,2053	10,46	336075	62428	5,38	ANO ***
Kyselina feruloyl-chinová	367,1024	4,50	200113	40552	4,93	ANO **
Isoscoparin-X _{7/2''} -O-glc ⁺⁺	623,1597	8,26	64895	21073	3,08	ANO **
Isovitexin-7-O-[6-fer]-glc	769,1946	11,01	166319	67320	2,47	ANO ***
Apigenin-6-C-arab-8-C-glc	563,1394	11,31	49975	20274	2,46	ANO ***
Apigenin-6-C-glc (Isovitexin)	431,0978	9,37	5651	2811	2,01	ANO ***
Isovitexin-7-O-glc (Saponarin)	593,1503	7,78	1886666	1263842	1,49	ANO ***

*, **, ***: porovnání skupin na základě t-testu při hladině významnosti 0,05, 0,01 resp. 0,001

⁺: v sadě LI nebyla tato látka detekována, není proto možné určit poměr ploch HI/LI ani provést statistické testování, retenční čas a m/z určeno ze vzorků skupiny HI

⁺⁺: na základě hmotnostní analýzy se jedná buď o Isoscoparin-7-O-glc nebo Isoscoparin-2''-O-glc

⁺⁺⁺: pro stanovení průměrné m/z byly použity vzorky ze skupiny HI (n=6)

V extraktech primárních listů ječmene bylo identifikováno 12 FL (Tabulka 1.), převážně glykosylovaných a acylovaných flavonoidů a to na základě srovnání jejich přesné m/z s příslušnými hodnotami m/z publikovanými Ferreres et al. [2.]. V případě, že hodnotě m/z odpovídalo několik různých FL, bylo provedeno srovnání fragmentačních spekter (MS/MS). Saponarin, isovitexin a isoorientin byl identifikován na základě srovnání spekter a retenčních časů se zakoupenými standardy. Kyselina feruloyl-chinová byla identifikována na základě přesného jejího m/z, studia fragmentů vznikajících při MS/MS a také díky podobnosti UV-VIS absorpčního spektra se spektry kyseliny ferulové a chlorogenové (kafeoyl-chinové). Díky využití

hmotnostního detektoru byly přiřazeny konkrétní FL většině významných píků zaznamenaných UV-VIS absorpčním detektorem při 314 nm. Díky hmotnostnímu detektoru bylo tedy možné látky identifikovat i bez přímé aplikace standardů FL přítomných v ječmeni, a to i navzdory nízké koncentraci těchto látek ve vzorcích – to nebylo dříve s HPLC vybaveným pouze DAD možné. Relativní obsah všech identifikovaných FL byl signifikantně vyšší v sadě vzorků HI oproti sadě LI. Rozdíl byl markantnější u derivátů luteolinu a isoorientinu ve srovnání s deriváty apigeninu a isovitexinu, např. HI/LI poměr obsahu luteolinu je 6,97, naproti tomu v případě saponarinu pouze 1,49 (viz. Tabulka 1.). Významným rozdílem mezi těmito dvěma skupinami látek je v přítomnosti katecholové skupiny na B aromatickém cyklu aglykonové jednotky. Přítomnost této struktury je spojována s antioxidační aktivitou. Navýšení syntézy látek obsahující katecholovou skupinu by tedy mohlo být projevem fotoprotektivní reakce, tyto látky mohou zmírnit negativní účinky oxidativního stresu vyvolaného zvýšenou FAR ozářeností.

Závěr

Byla vyvinuta metoda účinné a rychlé chromatografické separace FL kompatibilní s hmotnostní detekcí pomocí ESI-Q-TOF spektrometru. Tato metoda byla využita při analýze extraktů primárních listů ječmene jarního vyrůstajícího při různé úrovni FAR. Výsledkem byla identifikace 12 metabolitů řadících se mezi FL, převážně glykosylovaných a acylovaných flavonoidů. Ve skupině HI byl prokázán signifikantně vyšší relativní obsah všech identifikovaných metabolitů.

Poděkování

Práce byla vypracována za podpory Institutu Environmentálních Technologií (CZ.1.05/2.1.00/0.3.0100) a Ostravské Univerzity v Ostravě (SGS20/PřF/2012)

Literatura

- [1.] NEZVAL, J. Detekce a kvantifikace UV-absorbujících látek a fotosyntetických pigmentů u vyšších rostlin, diplomová práce, vedoucí práce J. Kalina, Ostravská univerzita v Ostravě, 2009
- [2.] FERRERES, F., ANDRADE, P. B., VALENTÃO, P., GIL-IZQUIERDO, A. Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, č. 1182, s. 56-64.

Abstract

This work is focused on the development of the method suitable for the identification of phenolic compounds (PC) in a plant material using the high performance liquid chromatography system connected to mass spectrophotometer (ESI-Q-TOF type). The method was standardized and applied for the identification of PC in spring barley primary leaves and also for the observation of changes in their relative content between samples obtained from plants cultivated under the low (LI; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and high irradiance (HI; $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) of the photosynthetically active radiation (PAR). For the standardization of method 26 PC standards were used and their mass spectra (both MS and MS/MS), UV-VIS absorption spectra and retention times were recorded. 12 PC were identified in the plant material and the significantly higher relative contents of these PC were observed in HI samples. The major differences were observed in the relative content of luteolin derivatives, which are known for their antioxidative properties. Due to that property, these compounds can reduce oxidative damage induced by intensive PAR.