

# KVALITATIVNÍ ANALÝZA VOLNÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK V LISTECH JAHODNÍKU OBECNÉHO (*FRAGARIA VESCA* L.), STUDIUM VLIVU RADIAČNÍCH PODMÍNEK NA JEJICH SLOŽENÍ.

**Jakub Nezval<sup>1</sup>**

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

## Abstrakt

Práce je zaměřena na identifikaci a relativní kvantifikaci volných fenolických látek (FL) obsažených v listech jahodníku obecného (*Fragaria vesca* L.) s využitím HPLC systému vybaveným hmotnostním detektorem typu ESI-Q-TOF. Metoda je využita ke sledování změn profilu volných FL v důsledku vystavení rostlin různým radiačním podmínkám v průběhu kultivace. Za tímto účelem byly vypěstovány dvě skupiny rostlin jahodníku, jež byly vystaveny odlišné dávce UV-B radiace po dobu 14 dní – skupina UV ( $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a skupina NO ( $0,001 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). V extraktech bylo na základě MS a MS/MS spekter identifikováno/klasifikováno 11 FL: katechin, 2 zástupci proanthocyanidinů, 3 deriváty fenolických kyselin, 3 deriváty kvercetinu a kempferolu, 1 ellagitanin a 1 derivát kyseliny methylellagové. Výsledky kvantitativní analýzy naznačují navýšení obsahu FL s katecholovou skupinou ve skupině UV oproti NO, především kafeoylchinové kyseliny (+45 %) a kvercetin glukuronidu (+15 %). Tyto látky mohou díky svým antioxidačním schopnostem potlačovat škodlivé účinky UV-B radiace.

**Klíčová slova:** *hmotnostní spektrometrie; fenolické látky; fotoprotekce; jahodník obecný*

## Úvod

Fenolické látky jsou rostlinné sekundární metabolity, které hrají významnou roli v řadě fyziologických a ekofyziologických procesů. Již dlouhou dobu jsou zkoumány jejich fotoprotektivní vlastnosti, a to především jejich podíl na ochraně rostlin před negativními účinky UV-B radiace (280-315 nm). Tyto látky nejen že díky přítomnosti aromatických struktur ve svých molekulách účinně pohlcují UV-B záření (UV-stínění), ale často také snižují oxidativní stres vyvolaný UV-B radiací a to díky své schopnosti likvidovat reaktivní formy kyslíku (ROS) a zamezovat jejich tvorbě. Nezbytným předpokladem pro studium těchto procesů je znalost kvalitativního a kvantitativního zastoupení FL v rostlinném materiálu. Za tímto účelem se dnes nejhojněji využívá kapalinové chromatografie s UV-VIS absorpčním a hmotnostním detektorem (HPLC-DAD-MS). Hmotnostní detektory (MS) umožňují identifikaci látek na základě jejich poměru hmotnosti a náboje  $m/z$  (určení sumárního vzorce) a v případě tandemového zapojení hmotnostních detektorů i určování strukturních prvků těchto molekul (MS/MS až  $\text{MS}^n$  analýza) prostřednictvím jejich fragmentace (např. CID – kolizí indukovaná disociace).

Cílem naší práce je identifikace FL v listech rostlin jahodníku a to především na základě určení jejich strukturních prvků (s využitím MS/MS spekter) a následné srovnání kvantitativního zastoupení těchto látek v rostlinách vystaveným různé dávce UV-B radiace.

## Materiál a metody

Pro účely tohoto experimentu byly ve skleníku (Helsinki, Finsko,  $60^{\circ}13'38.8''\text{N}$   $25^{\circ}01'01.9''\text{E}$ ) vypěstovány rostliny jahodníku obecného (*Fragaria vesca* L.). Tyto rostliny ( $n=36$ ) byly pre-kultivovány 1 měsíc (srpen 2013) při ozáření přibližně  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  při různém spektrálním složení fotosynteticky aktivní radiace (FAR). Po pre-aklimační fázi byla

polovina rostlin vystavena 14 dnů dávce UV-B radiace přibližně  $0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , druhá polovina rostlin vyrůstala v podmínkách bez UV-B (sada NO;  $0,001 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). V následujících 3 dnech byly odebrány vzorky - 50 mg čerstvé hmotnosti listů srovnatelného stáří, které se vyvinuly v průběhu UV-B expozice. Vzorky byly ihned vloženy do kapalného dusíku a následně lyofilizovány. 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). Supernatant byl doplněn na 3 ml 40% metanolem, přefiltrován přes  $0,2 \mu\text{m}$  teflonový filtr do vialky a použit pro HPLC-DAD-MS (MS/MS) analýzu. Ta 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 (28 min.). Separace probíhala při  $30^\circ\text{C}$  na koloně typu Hypersil Gold (Thermo Scientific, USA),  $50 \times 2,1 \text{ mm}$ , s velikostí částic výplně  $1,9 \mu\text{m}$ . Látky byly detekovány při 270, 314, 360 a 440 nm. Objem nástřiku rostlinných extraktů byl nastaven na  $1 \mu\text{l}$  ( $3 \mu\text{l}$  v případě MS/MS analýzy). Ionizace látek byla provedena za pomoci ionizátoru ESI v negativním módu. Hmotnostní spektra byla zaznamenávána v rozsahu 50-2000 m/z. CID fragmentace byla provedena při různých kolizních energiích (15, 35, 50 eV). Relativní kvantifikace metabolitů mezi sadami UV a NO byla prováděna na základě integrace pík EIC (chromatogram extrahovaných iontů) příslušného iontu.

## Výsledky a diskuse

Pomocí vyvinuté HPLC-DAD-MS metody bylo identifikováno 11 volných FL. Na základě získaných MS a MS/MS spekter byly tyto látky zařazeny do skupin proanthocyanidinů, flavan-3-olů, flavonolů, hydroxyskořicových kyselin, ellagitaninů a derivátů kyseliny ellagové. Získaná spektrální data byla shrnuta v Tab. 1. V čase 2,9 min. byl detekován iont m/z 577  $[\text{M-H}]^-$ , jenž po CID dal vzniknout fragmentu m/z 425 (ztráta 152 amu). Tento iont vzniká v důsledku přeuspořádání heterocyklu mateřského dimeru Retro Diels-Alderovou reakcí [1., 2.]. Fragment m/z 407 vzniká po ztrátě  $\text{H}_2\text{O}$  z výše zmíněného iontu. Iont m/z 289, odpovídá základní strukturní jednotce tohoto dimeru - (epi)katechinu. Dle literatury [1.] přítomnost tohoto typu strukturní podjednotky potvrzuje fragmentace m/z 289  $\rightarrow$  245, 205, 179. V našich spektrech byla však zaznamenána pouze přítomnost iontu m/z 245 a 161 (po ztrátě  $\text{H}_2\text{O}$  z iontu m/z 179) a nebyl detekován iont m/z 205. Na základě získaných MS/MS byla tato látka zařazena mezi proanthocyanidiny, pravděpodobně procyanidin B - dimer (epi)katechinu. Látka eluovaná v čase 4,79 min. (m/z = 561  $[\text{M-H}]^-$ ) byla taktéž zařazena mezi proanthocyanidiny. Na rozdíl od předchozí látky byl pozorován přechod m/z 561  $\rightarrow$  289 odpovídající odštěpení (epi)afzelechinu od (epi)katechinové jednotky. Fragment m/z 435 (ztráta 126 amu) indikuje přítomnost 1, 3, 5-trihydroxybenzenové struktury. Předběžně byla tato látka identifikována jako (epi)afzelechin-(epi)katechin. Pík ( $R_t$  3,71 min.) byl na základě své m/z 289  $[\text{M-H}]^-$  (MS/MS přechodu m/z 289  $\rightarrow$  245, 205) a  $\lambda_{\text{max}} = 279$  identifikován jako (epi)katechin. Látky eluované v časech 6,11, 7,95, 8,51 min. (tj. ID 4, 5, 6 viz. Tab. 1.) byly zařazeny jako estery hydroxyskořicových kyselin a kyseliny chinové. U obou sledovaných  $[\text{M-H}]^-$  iontů m/z 353 a m/z 337 byly sledován přechod na m/z 173, což odpovídá ztrátě kyseliny kávové (180 amu) a kumarové (164 amu) Fragment m/z 191 odpovídá kyselině chinové (po ztrátě  $\text{H}_2\text{O}$  iont m/z 173). Ve vzorcích byly též identifikovány tři flavonoly (Tab. 1.; ID 7, 10, 11). První z nich byl identifikován jako kvercetin glukuronid (m/z = 477  $[\text{M-H}]^-$  a m/z = 955  $[\text{2M-H}]^-$ ). O přítomnosti kvercetinu svědčí přítomnost fragmentu m/z 301 vznikajícího po odštěpení glukuronové jednotky z mateřského iontu m/z 477.

**Tabulka 1.** Shrnutí parametrů využitých k identifikaci volných FL v extraktech listů jahodníku obecného;  $R_t$  – retenční čas,  $\lambda_{max}$  – poloha UV absorpčního maxima,  $m/z$  – poměr hmotnosti a náboje iontu a jeho typ, CID (15, 35, 50 eV) – MS/MS spektra při zvolené kolizní energii, uvedena  $m/z$  a četnost, Poměr UV/NO – relativní zastoupení dané FL (uvedena skupina s vyšším relativním obsahem FL). \* nízká intenzita fragmentů, \*\* nízká kolizní energie při CID – nefragmentuje \*\*\* nízká koncentrace - absorpční spektrum nezaznamenáno

ID	Identifikovaná látka	$R_t$ [min.]	$\lambda_{max}$ [nm]	$m/z$	CID 15 eV	CID 35 eV	CID 50 eV	Poměr UV/NO [rel.]
1	Proanthocyanidin dimer (1)	2,97	279	577 [M-H] <sup>-</sup>	577 (100); 425 (27); 289 (4)	289 (100); 407 (58); 125 (43); 161 (17); 245 (6); 339(6); 381 (5)	*	NO 0.94
2	Katechin	3,71	279	289 [M-H] <sup>-</sup> a 579 [2M-H] <sup>-</sup>	289 (100); 245 (21); 125 (4); 179 (4); 205 (3)	123 (100); 109 (92); 137 (29); 205 (22); 149 (19)	*	NO 0.96
3	Proanthocyanidin dimer (2)	4,79	278	561 [M-H] <sup>-</sup>	561 (100); 289 (46); 425 (12); 271 (10); 435 (9); 407 (4)	289 (100); 407 (17); 271 (14); 273 (13); 125 (12); 245 (12); 164 (8); 435 (7); 329 (5); 179 (4); 205 (4)	125 (100); 245 (90); 137 (62); 164 (61); 203 (49); 289 (46); 123 (44); 109 (41); 151 (41); 179 (35)	NO 0.99
4	Kafeoylchinová kyselina	6,11	327	353 [M-H] <sup>-</sup>	173 (100); 111 (70); 191 (62); 154 (15)	111 (100); 135 (22); 191 (15)	*	UV 1.45
5	Kumaroylchinová kyselina (1)	7,95	313	337 [M-H] <sup>-</sup>	173 (100); 111 (41); 154 (15); 129 (6)	111 (100); 154 (10); 119 (6)	*	NO 0.78
6	Kumaroylchinová kyselina (2)	8,51	***	337 [M-H] <sup>-</sup>	*	*	*	NO 0.81
7	Kvercetin glukuronid	9,53	354, 256	477 [M-H] <sup>-</sup> a 955 [2M-H] <sup>-</sup>	477 (100); 301 (12)	301 (100); 151 (5); 179 (4); 283 (2); 273 (1); 255 (1)	301(100); 151 (71); 179 (35); 245 (18); 255 (18); 273 (17); 163(14); 283 (13); 121 (10); 229 (8); 109 (7); 107 (6)	UV 1.15
8	Argimoniin nebo Sanguiin H-6	10,46	266 sh	934 [M-2H] <sup>2-</sup>	*	301 (100); 783 (7); 935(6); 633 (3); 915 (3); 1085 (2); 898 (1)	301 (100); 275 (5); 633 (5); 897 (5); 783 (5); 481 (5); 613 (4);	UV 1.07
9	Glykosid kyseliny metylellagové	11,07	367	461 [M-H] <sup>-</sup> a 923 [2M-H] <sup>-</sup>	461 (100); 285 (75); 315 (29)	315 (100); 285 (77); 300 (23)	300 (100); 315 (20); 285(2)	UV 1.02
10	Kempferol kumaroyl hexosid (1)	15,21	***	593 [M-H] <sup>-</sup>	**	285 (100); 593 (35); 307 (13)	284(100); 255 (14); 227 (11); 145 (10); 163 (8)	UV 1.09
11	Kaempferol kumaroyl hexosid (2)	15,64	***	593 [M-H] <sup>-</sup>	**	284 (91)	285 (100)	UV 1.22

Přítomnost kvercetinu dokládá i vysoká četnost iontů  $m/z$  179 a 151 (fragmety aromatického cyklu A kvercetinu; štěpení v pozici 1,2 –  $m/z$  179 a následná ztráta CO ->  $m/z$  151). Zbývající dva flavonoly byly klasifikovány jako kempferol kumaroyl hexosidy ( $m/z$  593 [M-H]<sup>-</sup>). Přítomný fragment  $m/z$  285 odpovídá aglykonu kempferolu, neutrální ztráta 308 amu pak odštěpení kumaroyl hexosového zbytku z mateřského iontu  $m/z$  593. Tento fragment byl také pozorován ve spektru ve své iontové formě  $m/z$  307. V čase 10,46 min. byl detekován iont  $m/z$  934. Na základě svého izotopického složení byl určen jako [M-2H]<sup>2-</sup>. Tato látka byla předběžně identifikována jako ellagitatinin - argimoniin, případně sanguiin H-6. Tomu nasvědčuje přítomnost fragmentů  $m/z$  935 – rozštěpení galloyl-bis-HHDP-glukózového dimeru (HHDP – hexahydroxydifenová

kyselina), 783 (bis-HHDP-glukosa), 633 (galloyl-HHDP-glukosa), a 301 (ellagová kyselina nebo HHDP). Poslední identifikovanou látkou byl derivát kyseliny metylellagové  $R_t$  11,07 min. ( $m/z$  461  $[M-H]^-$  a 923  $[2M-H]^-$ ). Přechod  $m/z$  461- $\rightarrow$ 315 odpovídá odštěpení metyl pentosy (ionty  $m/z$  315 a 300 naznačují přítomnost metylellagové kyseliny). Z výsledků kvantitativní analýzy vyplývá, že nízká dávka UV-B radiace vede k mírným změnám profilu FL, především k nárůstu obsahu kyseliny kafeoylchinové a poklesu obsahu kumaroylchinové kyseliny (viz. Tab. 1.). Tyto látky se liší pouze přítomností katecholové skupiny, která je u FL považována za jeden ze strukturních prvků zapříčiňující jejich antioxidační vlastnosti – navýšení syntézy kafeoylchinové kyseliny proto může být považován za tendenci potlačit oxidativní stres. Pozorovali jsme mírné navýšení obsahu derivátů kvercetinu a kempferolu ve skupině UV, tyto látky mají schopnost absorbovat škodlivé UV-B záření, deriváty kempferolu jsou též významné rostlinné antioxidanty.

### Závěr

Za pomoci HPLC-DAD-MS bylo identifikováno 11 volných FL obsažených v listech jahodníků. Byla zaznamenána absorpční spektra, MS a MS/MS spektra detekovaných látek při různých kolizních energiích a interpretována identita významných fragmentů za účelem určení struktury sledovaných látek. Metoda byla využita ke sledování změn obsahu detekovaných FL v rostlinách vyvolaných rozdílnou dávkou UV-B radiace. Z výsledků kvantitativní analýzy vyplývá, že velmi nízká dávka tohoto záření indukuje akumulaci FL s katecholovou skupinou, které mohou hrát roli ve fotoprotekci v důsledku svých antioxidačních vlastností.

### Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. J. Kalinovi, Ph.D. a M. T. Robsonovi, Ph.D. za vedení a pomoc při praktickém provedení experimentu. Práce byla vypracována za podpory IET-TEWEP (CZ.1.05/2.1.00/0.3.0100; LO1208), Ostravské Univerzity v Ostravě (SGS21/PřF/2014) a projektu Bionetwork (CZ.1.07/2.4.00/31.0025).

### Literatura

- [1.] SIMIRGIOTIS, M. J., BÓRQUEZ, J., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. *Antioxidant capacity, polyphenolic content and tandem HPLC-DAD-ESI/MS profiling of phenolic compounds from South American berries Luma apiculata and L. chequén*. Food Chemistry, 2013, č. 139, s. 289-299
- [2.] KAJDŽANOSKA, M., GJAMOVSKI, V., STEFOVA, M., *HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>, identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia*. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 2010, č. 29, s. 181-194

### Abstract

This work is focused on identification and relative quantification of soluble phenolic compounds (PC) using HPLC equipped with ESI-Q-TOF mass spectrometer. Method is used for study of changes in PC profile caused by different radiation conditions during the growth. For this purpose two groups of strawberry plants were cultivated and then exposed to different dose of UV-B radiation for 14 days – group UV ( $0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and NO ( $0.001 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). 11 PC were identified/classified in samples based on MS and MS/MS spectra: catechin, 2 proanthocyanidins, 3 phenolic acid derivatives, 3 quercetin and kaempferol derivatives, 1 ellagitannin and 1 derivative of methylellagic acid. Results of quantitative analysis imply increased accumulation of catechol group containing PC in UV samples in comparison to NO, mainly of caffeoylquinic acid (+45 %) and quercetin glucuronide (+15 %). These compounds could play a role in UV-B plant protection due to their antioxidative properties.