

STANDARDIZACE HPLC A UV-VIS SPEKTROFOTOMETRICKÉ ANALÝZY FENOLICKÝCH LÁTEK A JEJICH APLIKACE PŘI STUDIU ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

Jakub Nezval¹

¹*Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziky a Environmentální centrum, Chittussiho 10, Slezská Ostrava, 710 00, nezval.jakub@gmail.com*

Abstrakt

V této práci jsme se zaměřili na tvorbu nového metodického postupu chromatografické separace umožňujícího identifikaci a kvantifikaci fenolických látek (FL) a její aplikaci v rámci experimentu sledujícího změnu zastoupení volných FL v listech ječmene jarního vyvolanou působením různých radiačních podmínek. Hlavním cílem bylo zrychlení stávající rutinně používané separační metody a zvýšení reprodukovatelnosti výsledků.

Doba analýzy byla oproti doposud rutinně používané separační metodě zkrácena na cca. 1/3 a to především díky použití separačních kolon typu Poroshell, změně mobilní fáze a aplikaci zvýšené teploty v průběhu separace. Temperování kolonového prostoru vedlo k vyšší reprodukovatelnosti výsledků. Metoda byla standardizována za pomoci 24 standardů FL (byla rozšířena databáze absorpčních spekter, retenčních časů a kalibračních rovnic). Z výsledků je patrné, že dominantní vliv na syntézu FL má fotosynteticky aktivní složka sluneční radiace, zatímco ultrafialová radiace má spíše modulační efekt.

Klíčová slova: *fenolické látky; fotoprotekce; ultrafialové záření; vysoce účinná kapalinová chromatografie*

Úvod

Rostliny si v průběhu evoluce vytvořily mnoho mechanismů zabezpečujících jejich ochranu před působením negativních účinků různých složek sluneční radiace. Příkladem může být syntéza fenolických látek (FL). Tyto sekundární metabolity zamezují poškození ultrafialovým zářením (UV), především UV-B (280-320 nm) a UV-A (320-360 nm). FL jsou schopny vzhledem ke své vhodné chemické struktuře obsahující jedno či více aromatických jader intenzivně pohlcovat tento druh záření. Rostliny syntetizují FL ve větší míře v povrchových vrstvách (epidermu), tudíž je záření pohlcováno ještě dříve, než může poškodit důležité fotosensitivní molekuly hlouběji v pletivu – tento proces označujeme jako UV- stínění. Některé FL jsou schopny kromě absorpce UV záření navíc účinně likvidovat reaktivní formy kyslíku vznikající působením UV radiace – vykazují antioxidační aktivitu [1].

Výchozím bodem pro studium fotoprotektivních mechanismů zprostředkovaným FL je analytická metoda schopná jejich identifikace a kvantifikace v rostlinném materiálu. Za tímto účelem je hojně využíváno metod vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). V současné době je na našem pracovišti rutinně využívána HPLC metoda, jejíž hlavní nevýhodou je značná časová náročnost a nižší reprodukovatelnost výsledků. Hlavním cílem této práce je zavedení nové rychlejší a efektivnější metodiky a její aplikace při studiu složení volných FL v rostlinných extraktech. Dalším cílem je pak sledování kvalitativních a kvantitativních změn těchto látek indukovaných působením intenzivní fotosynteticky aktivní radiace (FAR; 400-700 nm), UV-A a UV-B radiace a to jak pomocí nové HPLC metodiky tak pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie.

Materiál a metody

V první fázi experimentu byla provedena standardizace metod. Za tímto účelem bylo zakoupeno 24 standardů FL – zástupců hydroxybenzoových kyselin, hydroxykyselin, flavonoidů, stilbenů a jejich derivátů, konkrétně kyselina galová, chlorogenová, vanilová, kávová, 3-hydroxybenzoová, syringová, ferulová, 3-kumarová a sinapová, epigalokatechin, DL-katechin, epikatechin, epigalokatechin galát, saponarin, homoorientin, isovitexin, myricetin, resveratrol, kvercetin, luteolin, apigenin, kempferol, chrysin a galangin (dodavatelé Extrasynthèse, FR a Sigma-Aldrich, GER). Z těch byly vytvořeny zásobní roztoky přesné koncentrace. Jako rozpouštědlo byl použit metanol (HPLC grade, Merck, GER). Zásobní roztoky byly využity k tvorbě koncentračních řad, jež posloužily k záznamu spekter pomocí UV-VIS absorpčního spektrofotometru a tvorbě kalibračních rovnic. Dále byl vytvořen zásobní roztok směsi všech 24 FL (24 x 1ml zásobního roztoku standardu). Tato směs posloužila jako testovací vzorek při zavádění nové HPLC-DAD metody a její standardizaci.

Všechny výše zmíněné roztoky kalibračních řad standardů FL byly změřeny za pomoci UV-VIS absorpčního spektrofotometru UV-550 (Unicam, GB). Spektra byla zaznamenána v rozsahu 200-750 nm.

HPLC-DAD analýza byla provedena na systému Agilent 1200 (Agilent, USA). Při separaci bylo využito gradientového toku dvou mobilních fází – A: H₂O : H₃PO₄ (v/v, 999:1), B: acetonitril (HPLC grade, Merck, GER). Separace probíhala při 40°C na koloně typu Poroshell 120 SB (Agilent, USA), 100 x 4,6 mm, s velikostí částic výplně 2,7 μm. Látky byly detekovány při 210, 240, 270, 314, 360, 440 nm, pro kvantifikaci byly využity chromatogramy při 210 a 314 nm. Absorpční spektra byla zaznamenána v rozsahu 190-500 nm.

Pro ekofyziologický experiment byla jako modelová rostlina zvolen ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus). Rostliny vyrůstaly za kontrolovaných podmínek (teplota 20°C, vlhkost 65 %, den/noc 16h/8h) v růstových komorách (BioLine VB1014, Vötsch, GER). Rostliny byly nejprve pěstovány 8 dní v nepřítomnosti UV radiace za různých podmínek FAR – 50 μmol m⁻² s⁻¹ (low irradiance - LI) a 1000 μmol m⁻² s⁻¹ (high irradiance - HI) 1. skupina 8 dní starých rostlin byla poté pěstována dalších 6 dní při zvýšené hladině UV-A radiace (byly použity lampy Philips se spektrálním pásem vyzařování 350-400 nm, ozáření 8 W m⁻²; 16 h / den) 2. skupina sloužila jako kontrolní a vyrůstala dále bez UV radiace při daných intenzitách FAR. Vzorky, tj. střední segmenty primárních listů, byly odebírány z 8 dní starých rostlin a poté z rostlin pěstovaných další 1 den a 6 dní v různých radičních podmínkách. Také byly vypěstovány dvě sady rostlin v HI FAR podmínkách (viz. výše). První skupina vyrůstala 8 dní v nepřítomnosti UV radiace (značena HIUVB-), druhá skupina byla vystavena zvýšené hladině UV-B radiace (byly využity lampy Philips, λ_{max} cca. 305 nm, ozáření 0,5 W. m⁻², 16 h / den, označena HIUVB+).

Pro přípravu vzorků rostlinného materiálu bylo odebráno 100 mg (čerstvé hmotnosti) středních segmentů primárních listů ječmene. Vzorek byl naskenován a byla zjištěna projekční plocha listů a následně byl homogenizován ve třecí misce (ve 3 ml 40% metanolu), homogenát byl ultrasonifikován po dobu 5 minut a poté centrifugován při 6000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut (RCF = 3468 . g; centrifuga EBA 20, Hettich Zentrifugen, Německo). 1 ml získaného supernatantu byl filtrován přes 0,2 μm filtr a použit pro HPLC-DAD analýzu, další 1 ml byl zředěn extrakčním činidlem na 5 ml a analyzován spektrofotometricky.

Výsledky a diskuse

Nově zavedená HPLC metodika má ve srovnání s dříve používanou několik výhod. V první řadě umožňuje separaci 22 z 24 látek v průběhu 20 minut (+3 min. ekvilibrace) na rozdíl od metody původní trvající 56 minut (+7 min. ekvilibrace). Analýza byla tedy zkrácena téměř na

třetinu. Navíc původní metoda nebyla optimalizována pro všechny výše uvedené standardy, proto nedokáže všechny tyto látky bez další modifikace efektivně separovat. Výrazné zrychlení analýzy bylo umožněno díky několika faktorům. V první řadě byla použita moderní kolona typu Poroshell – tyto kolony umožňují efektivní separaci při podstatně nižším zpětném tlaku, než je tomu u klasických kolon. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril namísto metanolu – ten díky odlišné viskozitě indukuje ve srovnání s metanolem podstatně menší zpětný tlak, snížení zpětného tlaku bylo také umocněno temperováním separační kolony na 40°C, což vedlo též ke snížení rozptylu retenčních časů analyzovaných standardů a tedy k vyšší reprodukovatelnosti výsledků. V důsledku podstatného snížení zpětného tlaku bylo umožněno zvýšení průtoku mobilních fází na 2 ml.min⁻¹ (původní metoda 1 ml.min⁻¹) Maximální zpětný tlak v průběhu analýzy se pohybuje okolo 350 bar – metoda je tedy poměrně rychlá a navíc aplikovatelná na klasické HPLC systémy pracující do 400 bar, které jsou stále značně rozšířené. Využití acetonitrilu jako mobilní fáze umožnilo záznam spekter již od 190 nm (namísto 200 nm v případě metanolu), což usnadňuje identifikaci, nevýhodou je však vyšší cena acetonitrilu ve srovnání s metanolem.

Separace směsi 24 sledovaných FL na koloně s reverzní fází probíhala dle očekávání – nejprve byly eluovány polární fenolické kyseliny a katechiny následované glykosidy flavonoidů, poté byly eluovány aglykony flavonoidů. Byla zaznamenána spektra a retenční časy všech eluovaných látek, včetně jejich prvních a druhých derivací. Za účelem kvantifikace byl proveden nástřik směsi standardů o objemech 0,1; 0,5; 1; 3 a 5 µl (ve 3 opakováních), na základě získaných ploch pík byly sestaveny kalibrační rovnice pro detektor 210 a 314 nm. V případě koeluovaných látek a apigeninu bylo spektrum a plochy pro kvantifikaci získány na základě analýzy roztoků jednotlivých standardů.

Na základě měření absorpčních spekter koncentračních řad 24 standardů byly sestaveny kalibrační rovnice umožňující spektrofotometrickou kvantifikaci všech zmíněných FL a rozšířena databáze jejich spekter včetně prvních a druhých derivací.

HPLC metoda byla využita ke studiu složení volných FL v listových extraktech pořízených z rostlin vyrůstajících za odlišných radiačních podmínek (FAR, UV-A, UV-B) Hlavní složkou těchto extraktů byl saponarin (což je patrné i ze spekter pořízených pomocí UV-VIS absorpční spektrofotometrie), eluovaný v čase 5,5 min., ten byl identifikován na základě shody absorpčního spektra i retenčního času se standardem saponarinu. V počáteční fázi chromatogramu (do 5,5 min.) byly detekovány především deriváty fenolických kyselin a také látka (Rt = 3,4 min.), která se svým absorpčním spektrem velmi blíží spektru standardu homoorientin, liší se však svým retenčním časem. Domníváme se, že by se mohlo jednat o lutanarin. Látka eluovaná v čase 2,5 min. se svým spektrem i retenčním chováním nejvíce podobala kyselině chlorogenové, domníváme se, že by se mohlo jednat o kyselinu feruoylchinovou nebo kafeoylchinovou. Většina ostatních látek je eluována mezi 6 a 13 minutou, nejvýraznější píky v této oblasti náležejí pravděpodobně flavonoidům s mono- a dihydroxylovaným B aromatickým jádrem. V některých vzorcích byl detekován minoritní pík v čase 6,0 min., pravděpodobně se jedná o kyselinu ferulovou. Z výsledku experimentu vyplynulo, že složení volných FL v extraktech je silně závislé na radiačních podmínkách, jimž byly rostliny vystaveny. Blíže byla prostudována dynamika akumulace tří látek v průběhu růstu za různých radiačních podmínek. Obsah fenolické kyseliny eluované v čase 2,5 min. byl cca 10x vyšší v rostlinách vyrůstajících při HI a byl pozitivně modulován UV-A radiací. Obsah této látky v rostlinách spontánně klesal v průběhu růstu. Je možné, že je tato kyselina v průběhu růstu inkorporována do buněčných stěn. Obsah látky eluované v čase 3,4 min. (pravděpodobně lutanarinu), je velmi silně ovlivněn intenzitou FAR, v HI rostlinách je její výskyt až 50 x vyšší, v průběhu růstu v HI podmínkách ještě narůstá a je pozitivně ovlivněn UV-A radiací. V LI

podmínkách je obsah této látky velice nízký, často na hranici detekčního limitu a její obsah v průběhu růstu klesá, tento pokles je částečně redukován v přítomnosti UV-A radiace. Na základě tohoto chování usuzujeme, že se lutonarin pravděpodobně zapojuje do fotoprotektivních mechanismů prostřednictvím své schopnosti vychytávat reaktivní formy kyslíku, které jsou produkovány jak působením přemíry fotosynteticky aktivní radiace, tak vlivem UV-radiace. Lutonarin vykazuje antioxidační vlastnosti, které jsou vázány na přítomnost katecholové skupiny v jeho molekule. Obsah saponarinu ($R_t = 5,5$ min.) je přibližně 3x vyšší v HI rostlinách a jeho množství zůstává v průběhu růstu prakticky konstantní za všech podmínek. Saponarin se zřejmě může zapojit do fotoprotektivních procesů prostřednictvím UV-stínění – vykazuje intenzivní absorpci v UV-oblasti spektra a je v listech přítomen ve vysoké koncentraci. HPLC ani UV-VIS absorpční analýza nepotvrdila, žádné významné rozdíly mezi skupinami HIUVB+ a HIUVB-, je možné, že zvolená dávka UV-B radiace nebyla dostatečná k indukci změn složení FL. Zdá se tedy, že dominantní vliv na složení FL v testovaných vzorcích má FAR, rozdíly byly natolik výrazné, že mohly být pozorovány i metodou UV-VIS absorpční spektrofotometrie. UV složky radiace mají spíše modulační efekt.

Závěr

Zavedli jsme novou HPLC-DAD metodiku separace FL. Rozšířili jsme databázi spekter FL (ze stávajících 11 na 24 záznamů) a získali data potřebná pro jejich kvantifikaci. Metodu jsme aplikovali v ekofyziologickém experimentu, v němž byly pozorovány změny kompozice FL pod vlivem různých radiačních podmínek (FAR, UV-A, UV-B). Z výsledků vyplývá, že hlavní vliv na syntézu a akumulaci volných FL má FAR a UV složka radiace má modulační nebo jen minimální efekt v závislosti na dávce.

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Jiřímu Kalinovi, Ph.D. za vedení této práce. Ostravské univerzitě v Ostravě (SGS16/PRF/2011 a SGS17/PRF/2012) a Institutu environmentálních technologií (CZ.1.05/2.1.00/03.0100) za financování projektu.

Literatura

[1] TATTINI, M., GALARDI, C., PINELLI, P., MASSAI, R., REMORINI, D., AGATI, G. *Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of Ligustrum vulgare under excess light and drought stress.*, New Phytologist, 2004, č. 163 s. 547–561.

Abstract

In this study we cope with the development of new methodology of chromatographic separation capable of an identification and quantification of phenolic compounds (PC) and also with its utilization in the experiment which is focused on changes of PC profile in the leaves of spring barley under the influence of different radiation conditions. The main aim of the study was to speed up currently used chromatographic method and increase the reproducibility of obtained results.

The duration of the analysis was significantly decreased in comparison with the original methodology (to a third of the time). This was allowed due to the utilization of the Poroshell type of separation column and application of higher temperature during analyses. The column tempering leads to better reproducibility of results. The method was standardized using 24 PC standards - our database of absorption spectra, retention times and calibration equations was extended. On the basis of obtained results we suppose that photosynthetically active radiation has the main influence on the composition of PC, whereas ultraviolet radiation has rather modulation effect.