



## Metody analizy flawonoidów w materiale roślinnym

Dorota Muth<sup>1</sup>, Piotr Kachlicki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

<sup>2</sup>Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

### Methods of flavonoids' analysis in plant material

#### Summary

Flavonoids form a group of secondary metabolites ubiquitous in the plant kingdom. These compounds are synthesized in plant tissues on the phenylalanine lyase pathway and may be divided into several groups, differing in their skeleton: flavones, flavonols, isoflavons, flavanons, flavan-3-ols (catechins), anthocyanidins, aurons, and chalcones. All these compounds occurring in plant tissues may be hydroxylated, methylated or sulphated and are substituted with different groups such as sugars or acyls. More than 6000 compounds differing in their chemical and biological properties belong to this group. Fast and precise methods of identification and quantitative analysis of all these plant constituents are necessary because of their important biological functions and different applications of plant products. Instrumental analytical methods used in this purpose are described in the paper. Special concern is directed to particularly useful hyphenated chromatographic techniques such as HPLC/MS, HPLC/NMR, GC/MS, and CE/MS.

#### Key words:

flavonoids, glycoconjugates, instrumental methods, gas chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry.

#### Adres do korespondencji

Piotr Kachlicki,  
Instytut Genetyki Roślin,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Strzeszyńska 34,  
60-479 Poznań.

### 1. Występowanie i rola flawonoidów

Flawonoidy stanowią liczną grupę metabolitów wtórnych występujących w królestwie roślin. W ostatnich latach liczba publikacji na temat tej grupy związków wzrasta ze względu na ich rolę w przebiegu procesów fizjologicznych i biochemicznych

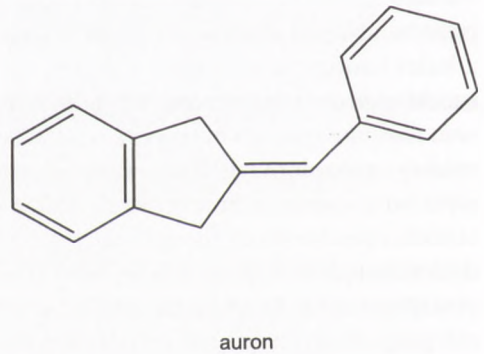
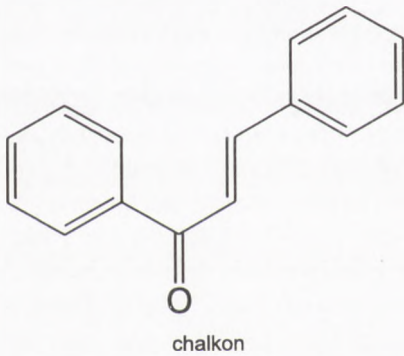
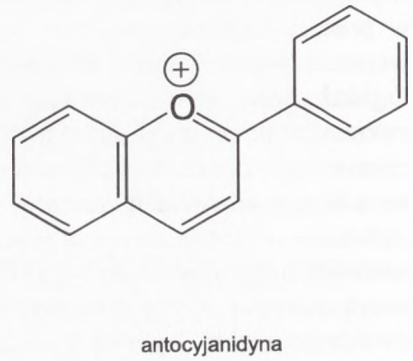
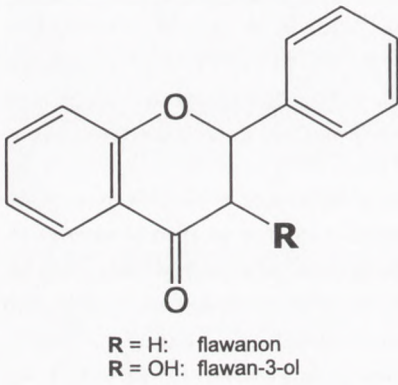
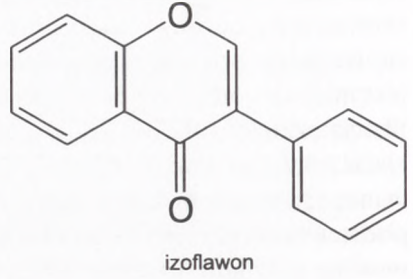
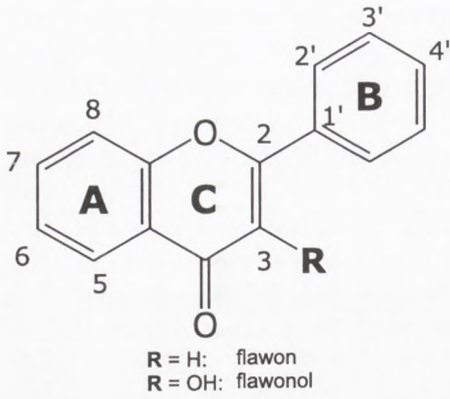
w komórkach roślinnych (1-4) oraz różnorodną aktywność wobec organizmów żywych (roślin, mikroorganizmów, owadów oraz zwierząt kręgowych) (5,6).

Ze względu na znaczenie biologiczne i fizjologiczne flawonoidów poświęca się im wiele uwagi w różnych dziedzinach nauki. Szlak syntezy flawonoidów w roślinach, chociaż stosunkowo dobrze poznany, w dalszym ciągu jest przedmiotem wielu badań w związku z możliwościami podniesienia poziomu flawonoidów w roślinach metodami biotechnologicznymi (7,8) oraz ich istotną rolę w regulacji wielu procesów rozwojowych oraz biochemicznych, czy też w podejściach opierających się na koncepcjach biologii systemów (9,10). Ta grupa produktów naturalnych odgrywa w procesach patogenezy i symbiozy u roślin rolę cząsteczek obronnych lub sygnałnych, jednakże ich główną funkcją jest ochrona komórek roślinnych przed szkodliwym promieniowaniem UV-B (1,11,12). Ze względu na swój gorzki smak flawonoidy stanowią substancje chroniące rośliny przed atakiem zwierząt roślinożernych (13,14). Izoflawony odgrywają ważną rolę podczas oddziaływań symbiotycznych pomiędzy roślinami rodziny Fabaceae (bobowate, dawniej *Papilionaceae* – motylkowate) a bakteriami glebowymi z rodzaju *Rhizobium* w procesie tworzenia brodawek korzeniowych, w których odbywa się wiązanie azotu atmosferycznego (15). Flawonoidy biorą również udział w nawiązywaniu oddziaływań symbiotycznych pomiędzy korzeniami większości gatunków roślin a grzybami mikoryzowymi (16). Antocyjany oraz niektóre flawony i ich pochodne są odpowiedzialne za barwę kwiatów oraz owoców (17). Szereg glikozyłowanych pochodnych flawonoidów odgrywa rolę repelentów lub atraktantów owadów podczas procesów zapylania roślin (18,19). Właściwości antyutleniające oraz estrogenowe sprawiają, że flawonoidy są pożądanym składnikiem diety (20). Ponadto znane są z działania antybiotycznego oraz innych typów aktywności farmakologicznej (21). Flawonoidy mogą również modyfikować działanie enzymów przekazujących sygnały między komórkami, szczególnym przykładem tego typu oddziaływań jest efekt wywołany przez flawonoidy na kinazy, które bezpośrednio wpływają na układ odpornościowy gospodarza (22). Wykazano również, że pochodne flawonoli uczestniczą w transporcie auksyn w roślinach (23). Transformacja roślin pod kątem zwiększenia poziomu syntezy tej klasy produktów naturalnych jest niezwykle ważnym kierunkiem badań naukowych ze względu na istotną rolę jaką odgrywają fenolowe metabolity wtórne w biochemii oraz fizjologii roślin oraz ich aktywność biologiczną w stosunku do innych organizmów żywych. Osiągnięcie tak postawionego celu wymaga jednak intensywnych badań na wszystkich poziomach molekularnych od genomu, poprzez transkryptom, proteom do metabolomu i analizy transportu różnych grup substancji pomiędzy komórkami lub ich kompartmentami (24-27). Jednym z narzędzi koniecznych do osiągnięcia tychże celów są metody instrumentalne umożliwiające obiektywną identyfikację oraz analizę ilościową roślinnych metabolitów wtórnych na poziomie metabolomu lub wybranych klas produktów naturalnych.



## 2. Struktura chemiczna flawonoidów oraz ich pochodnych

Flawonoidy są związkami, których budowa jest oparta na szkielecie węglowym  $C_6-C_3-C_6$ . Tę grupę produktów naturalnych można podzielić na szereg podstawowych klas: flawony, flawonole, izoflawony, flawanony, flawan-3-ole (katechiny), antocyjanidyny, auryony i chalkony (schemat) (28). Poszczególne klasy związków różnią się stopniem utlenienia pierścienia C, z kolei w przypadku izoflawonów odmienne jest miejsce podstawienia pierścienia fenyloвого B. Najbardziej powszechną modyfikacją szkieletu flawonoidów jest hydroksylacja najczęściej występująca w pozycjach 3,5,7,3',4' oraz 5'. Grupy hydroksylowe mogą być z kolei metylowane, sulfonowane, acylowane kwasami aryłowymi bądź alifatycznymi oraz glikozylowane. Także podstawniki cukrowe mogą ulegać podobnym modyfikacjom. Flawonoidy magazynowane są w komórkach w wakuoli, gdzie są przechowywane w lepiej rozpuszczalnej w środowisku wodnym formie glikozydów, zarówno O-glikozydów oraz rzadziej w postaci C-glikozydów. Pozycjami podstawienia cukrów w wyniku utworzenia wiązania O-glikozydowego są najczęściej atomy węgla C-3 i C-7, natomiast wiązania C-glikozydowe usytuowane są w pozycjach C-6 oraz C-8. Najczęściej przyłączanymi cukrami w pochodnych glikozydowych są ramnoza, glukoza, galaktoza, arabinoza, czasami apioza oraz kwas glukuronowy. Glikozydy tworzone przez kwas glukuronowy z flawonoidami (glukuroniany) są znane u różnych rodzajów roślin, ale tworzone są także w wątrobie zwierząt w wyniku działania UDP-glukuronylotransferaz na flawonoidy przyjmowane w pożywieniu (29). Glikozylowane pochodne flawonoidów mogą zawierać nawet do czterech reszt cukrowych przyłączonych do jednej lub dwóch grup hydroksylowych na aglikonie, znane są również mieszane glikozydy C- oraz O-podstawione (30,31). Powszechnie występujące pochodne flawonoidów zawierają mono- di- (bardzo często neohesperozydy, rutynozydy), tri- oraz tetrasacharydy, w których można rozróżnić wiązania glikozydowe 1-6, 1-2 oraz rzadziej 1-4, z kolei konfiguracja wiązania glikozydowego może przybierać formę  $\alpha$  lub  $\beta$ . Częstoteczki cukrów przyłączone do aglikonów mogą być następnie acylowane, np. kwasem malonowym lub octowym, a także kwasami fenylopropenowymi (kumarowy, ferulowy, synapinowy). Miejsce podstawienia grupy acylowej na pierścieniu cukrowym to zazwyczaj atomy węgla C-2, C-4 lub C-6. Szacuje się, że liczba znanych struktur pochodnych flawonoidów przekracza obecnie 6000 (30,32), jednak z każdym miesiącem powiększa się ona o nowo odkryte i opisane związki. Różnorodność strukturalna tej klasy metabolitów wtórnych wynika z wielu możliwości podstawienia grup modyfikujących szkielet cząsteczki flawonoidu oraz cukrów podczas tworzenia glikozydów. W konsekwencji rozdział, identyfikacja oraz oznaczanie ilościowe tych związków stanowi duże wyzwanie. Kompletna analiza strukturalna glikopochodnych flawonoidów wymaga wyizolowania w stanie czystym wybranych połączeń z materiału biologicznego w ilości wystarczającej do równoległego użycia szeregu metod analitycznych, takich jak zwłaszcza spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego NMR, spektrometria mas oraz spektrofotometria UV.



Schemat. Typy strukturalne flawonoidów.



Niejednokrotnie celem badań próbek ekstraktów uzyskiwanych z tkanek roślinnych, kultur komórkowych lub tkankowych jest określenie zmian jakościowych oraz ilościowych cukrowych połączeń flawonoidów oraz wolnych aglikonów na przykład pod wpływem stresu środowiskowego. W takich sytuacjach nie zawsze jest możliwe precyzyjne określenie wszystkich różnic strukturalnych i rozróżnienie wszystkich izomerów badanych produktów naturalnych. Liczba danych o budowie związków uzyskiwanych w trakcie analiz jest zależna od rodzaju detektora sprzężonego z systemem rozdziału próbek.

Analizy jakościowe oraz ilościowe połączeń flawonoidów i innych metabolitów wtórnych o ważnej roli biologicznej są niezwykle istotne w wielu projektach badawczych w różnych dziedzinach nauki. Coraz częściej stosowanym podejściem badawczym w naukach biologicznych jest analiza metabolomów lub wybranych klas metabolitów wtórnych (33-35) zarówno u organizmów zwierzęcych (w tym człowieka w ramach Human Metabolome Project (36)) jak i roślinnych: (rzodkiewnik – *Arabidopsis thaliana* (35,37-40), ziemniak – *Solanum tuberosum* (41), pomidor – *Lycopersicon esculentum* (42,43), ryż – *Oryza sativa* (44)). W związku z prowadzeniem prac badawczych w tym zakresie w wielu laboratoriach na całym świecie powstała pilna konieczność umożliwienia porównywalności wyników uzyskanych przez różne grupy. W tym celu Metabolomic Society (Towarzystwo Metabolomiczne) utworzyło grupę dyskusyjną Metabolomics Standards Initiative (MSI), której celem jest zaproponowanie standardowych procedur analitycznych (45). Skład metabolomów roślinnych jest niezwykle skomplikowany szacuje się, że w roślinach jednego gatunku jest syntetyzowanych od 5 do 25 tysięcy różnych metabolitów pierwotnych i wtórnych (46), aczkolwiek nie jest wykluczone, że ten szacunek jest zaniżony. Obecnie nie istnieją metody instrumentalne umożliwiające jednoczesną analizę wszystkich metabolitów danego organizmu czy nawet wybranej tkanki. Z tego też względu w badaniach pochodnych flawonoidowych wykorzystuje się podejście metodyczne zwane analizą celowaną (ang. *targeted analysis*), w której uwaga badacza jest skoncentrowana na wybranej klasie związków (47).

### **3. Metody instrumentalne stosowane do identyfikacji oraz profilowania pochodnych flawonoidów**

Podejścia analityczne stosowane do izolacji oraz identyfikacji i oznaczania flawonoidów były przedmiotem wielu prac przeglądowych (30,48-52). Najczęściej stosowanymi technikami rozdziału mieszanin podczas profilowania związków fenolowych są chromatografia cieczowa lub elektroforeza kapilarna sprzężona z detektorami UV i/lub spektrometrem mas (MS) ewentualnie spektrometrem NMR. Ponadto stosuje się również chromatografy gazowe sprzężone z systemami MS jednakże ten sposób wymaga dodatkowego etapu przeprowadzenia analizowanych związków w bardziej lotne pochodne (48).



### 3.1. Stosowane techniki chromatograficzne – rozdział produktów naturalnych

Związki fenolowe należą do grupy związków dość polarnych dlatego powszechnie stosowaną metodą ich rozdzielania jest chromatografia cieczowa. Najczęściej stosuje się kolumny z odwróconą fazą C-18 lub C-8, w których nośnikiem jest żel krzemionkowy modyfikowany łańcuchowymi pochodnymi alkilowymi o odpowiedniej długości. Dobór eluentów, czasu analizy, gradientu czy temperatury kolumny są ustalane przez eksperymentatora w zależności od złożoności rozdzielanej mieszaniny flawonoidów. W większości prac analitycznych wykorzystuje się acetonitryl i wodę z dodatkiem kwasów fosforowego, mrówkowego, octowego bądź trójfluoroctowego. Rozdział chromatograficzny może być przeprowadzany w temperaturze pokojowej jednakże jej podwyższenie może zapewnić lepszą rozdzielczość i powtarzalność czasów retencji oraz przyspieszyć czas analizy. Znane są również przykłady zastosowania kolumn monolitycznych do analizy flawonoidów (53,54). Wypełnienie kolumny stanowi pojedynczy pręt monolitycznej odpowiednio modyfikowanej krzemionki o wysokiej czystości. Dzięki takiej konstrukcji fazy stacjonarnej możliwe jest zwiększenie prędkości przepływu eluenta skutkujące skróceniem czasu analizy z zachowaniem wysokiej rozdzielczości, przy czym nie zwiększa się ciśnienie roztworów w porównaniu do kolumn o wypełnieniu ziarnistym (55).

Zdolność rozdzielcza systemu chromatograficznego odgrywa ogromną rolę w identyfikacji izomerów flawonoidów. W ostatnich latach pojawiła się nowa generacja systemów chromatograficznych, ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa, w których stosuje się kolumny wypełnione złożem o średnicy ziaren poniżej 2  $\mu\text{m}$ . Analizy wykonywane są pod wysokim ciśnieniem (400-1000 barów) i przy zwiększonych przepływach fazy ruchomej co znacznie podwyższa ich czułość i rozdzielczość oraz skraca czas w porównaniu do tradycyjnej HPLC (56,57). Zastosowanie tej techniki umożliwiło na przykład rozróżnienie 5 izomerycznych malonylowanych glikozydów chryzoeriolu w liściach łubinu wąskolistnego, których prawidłowy rozdział na kolumnie HPLC nie był możliwy (58).

### 3.2. Systemy chromatograficzne i detektory stosowane w analizach flawonoidów

#### 3.2.1. Detektor UV

Wszystkie flawonoidy absorbują światło w zakresie UV, a niektóre z nich (antocyjany) także światło widzialne, w związku z tym detektory UV dość dobrze nadają się do analiz tej grupy związków i ich ilościowego oznaczania na drodze chromatografii cieczowej. Widma absorpcyjne flawonoidów w UV zawierają kilka maksimumów i na podstawie ich analizy można rozróżnić poszczególne grupy strukturalne w obrębie tej kategorii metabolitów. Maksimum rejestrowane w zakresie 240-285 nm



pochodzi od absorpcji pierścienia A, absorpcja światła w zakresie 300-550 nm zależy od sposobu podstawienia pierścienia C oraz miejsca przyłączenia do niego pierścienia B (59). Należy jednak pamiętać, że pH roztworu ma duży wpływ na widmo UV związków fenolowych i podwyższanie pH skutkuje przesuwaniem maksimum absorpcji ku wyższym długościom fali. Długości fal charakterystyczne dla absorpcji poszczególnych klas flawonoidów można ograniczyć do kilku maksimum mieszczących się w zakresie od 250 do 400 nm (60). W instrumentach HPLC można stosować monochromatyczne detektory UV mierzące absorpcję przy jednej bądź dwóch długościach fali, bądź detektory diodowe (DAD) lub skanujące, które są przystosowane do pomiaru absorpcji promieniowania w szerszym zakresie oraz rejestracji widm absorpcyjnych poszczególnych związków. Przy stosowaniu detektorów monochromatycznych oznaczenie ilościowe złożonych mieszanin flawonoidów i izoflawonoidów podczas jednej analizy jest bardzo trudne lub wręcz niemożliwe. W detektorach DAD można dokonywać pomiarów przy długościach fali charakterystycznych dla analizowanych klas związków fenolowych i poprawnie rozróżniać ich typy strukturalne. Jednakże urządzenia tego typu charakteryzują się nieco niższą czułością niż detektory monochromatyczne. Wykorzystanie detektorów absorbujących promieniowanie UV może być wystarczającym narzędziem w analizie ekstraktów wcześniej zidentyfikowanych związków fenolowych (61,62). Jednakże w przypadku analizy bardziej złożonych mieszanin bardzo często mamy do czynienia z koelucją, czyli jednoczesnym wymywaniem różnych związków, uniemożliwiającą jednoznaczne ilościowe oznaczenie zawartości poszczególnych związków. W takich sytuacjach konieczne jest zastosowanie dodatkowego detektora, na przykład spektrometru mas (63).

### 3.2.2. Spektrometry mas

Do identyfikacji oraz profilowania produktów naturalnych są wykorzystywane spektrometry mas o różnorodnej budowie, stopniu złożoności i precyzji oznaczania mas badanych jonów. W przypadku analiz złożonych mieszanin substancji stosuje się spektrometr mas połączony z aparatem do chromatografii gazowej (GC, ang. *gas chromatography*), cieczowej (LC, ang. *liquid chromatography*) lub aparatem do elektroforezy kapilarnej (CE, ang. *capillary electrophoresis*). Postęp w rozwoju technik wzbudzenia (jonizacji) analizowanych substancji, rozdziału jonów (rozdzielczość) i czułości spektrometrów mas umożliwia coraz dokładniejsze oznaczanie nawet śladowych ilości związków (64). Rozwój technik spektrometrii mas wiąże się również z postępowaniem metod bioinformatycznych. Programy pozwalające na wyciągnięcie ważnych informacji z wielkich zestawów danych, liczących w niektórych przypadkach setki próbek, wygenerowanych podczas doświadczeń GC/MS i LC/MS są niezwykle istotnym narzędziem do analizy metabolomu i zachodzących w nim zmian (65).



Spektrometria mas jest metodą umożliwiającą określenie masy cząsteczkowej oraz składu elementarnego związku na podstawie pomiaru stosunku masy ( $m$ ) do ładunku ( $z$ ) –  $m/z$  zjonizowanych cząsteczek ( $M^{+\bullet}$  w przypadku jonizacji elektronami oraz  $[M+H]^+/[M-H]^-$  w przypadku jonizacji poprzez elektrorozpraszanie) dokonywanego z dużą dokładnością, do kilku miejsc znaczących po przecinku. W wielu przypadkach można wnioskować o strukturze związku na podstawie zarejestrowanych w widmie masowym wartości  $m/z$  jonów fragmentacyjnych powstających w wyniku rozpadu jonów molekularnych ( $M^{+\bullet}$ ) oraz protonowanych lub deprotonowanych cząsteczek ( $[M+H]^+/[M-H]^-$ ). Dzięki możliwości stosowania różnych metod jonizacji substancji badanych oraz różnego rodzaju typów analizatorów, metoda spektrometrii mas jest jedną z technik najpowszechniej wykorzystywanych do analizy ich składu. Do spektrometru mas można wprowadzać próbki za pomocą chromatografu gazowego lub chromatografu cieczowego i stosuje się wtedy odpowiednio jonizację elektronami (EI) lub chemiczną (CI) albo metody jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym cząsteczek znajdujących się w roztworach (jonizacja) poprzez elektrorozpraszanie ESI lub jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym – APCI. W źródłach jonów można uzyskiwać jony dodatnie lub ujemne i w zależności od chemicznego charakteru badanych związków dokonuje się analizy odpowiednio wybranych jonów i produktów ich fragmentacji. Widma zarejestrowane dla jonów ujemnych charakteryzują się z reguły większą czułością niż dla dodatnich, jednakże w wielu przypadkach widma wykonane w obydwu trybach dostarczają uzupełniających się informacji na temat struktury analizowanych związków (66).

Interesujące są możliwości zastosowania innej techniki jonizacji substancji jaką jest laserowa desorpcja-jonizacja wspomagana matrycą (MALDI, ang. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). Nie jest to typowa technika jonizacji stosowana w analizie małych cząsteczkowych związków, została ona stworzona do wzbudzania biomolekuł o masie większej niż 500 Da. Polega ona na naświetlaniu laserem wykrystalizowanej na płycie stalowej substancji badanej zmieszanej z matrycą. Matryca jest związkiem, którego zadaniem jest przyjęcie fotonów i przekazanie energii analizowanemu cząsteczkom w celu ich zjonizowania i przeniesienia w stan gazowy. Technika MALDI-ToF jest techniką wysokorozdzielczą co umożliwia precyzyjne określenie masy związku, a na jej podstawie składu elementarnego. Zastosowanie MALDI-ToF w analizie metabolitów pozwala na pominięcie rozdziału chromatograficznego, jednak wymaga precyzyjnego doboru matrycy oraz warunków eksperymentalnych (67). Dzięki zastosowaniu techniki jonizacji MALDI zidentyfikowano oraz oznaczono ilościowo cztery glikozydy wyizolowane z łupiny migdałów (68), a także stwierdzono zachodzenie zmian ilościowych w składzie antocyjanów w liściach *Arabidopsis thaliana* zachodzących pod wpływem stresu chłodu (69). Poszukiwanie dogodnych warunków analizy ekstraktów za pomocą tej techniki jest pożądane ze względu na znacznie skrócony czas oznaczania jednej próbki oraz zwiększenie wydajności przeprowadzonych analiz.



### 3.2.3. Systemy GC/MS

Chromatografia gazowa jest mniej popularną metodą jeśli chodzi o analizę flawonoidów ze względu na właściwości fizykochemiczne ich cząsteczek. Wspomniano już, że związki te w tkankach roślin występują w dość złożonej formie wielokrotnie podstawianych glikozydów. Charakteryzują się one wysoką niestabilnością termiczną oraz niską lotnością, co powoduje konieczność chemicznej modyfikacji cząsteczek przed analizą. Reakcje blokowania grup polarnych powodują bardzo duży wzrost masy cząsteczkowej do wartości ponad 1000 Da, co przekracza zakres detekcji większości instrumentów GC/MS. Ponadto zmodyfikowane pochodne flawonoidów ulegają częstokroć rozkładowi termicznemu podczas nastrzyku na kolumnę chromatograficzną lub podczas rozdziału w kolumnie. Chromatografia gazowa jest wykorzystywana od lat 60. ubiegłego wieku do analiz aglikonów flawonoidów, jednak po wprowadzeniu i usprawnieniu metod chromatografii cieczowej oraz opracowaniu metod jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym ESI i APCI straciła na znaczeniu.

Jonizacja elektronami jest podstawową metodą stosowaną w systemach GC/MS ponieważ próbka wprowadzana do źródła jonów znajduje się w postaci gazowej. Jest to tzw. twarda metoda jonizacji, gdyż podczas procesu wzbudzenia cząsteczek następuje duży wzrost ich energii wewnętrznej. Prowadzi to do znacznej fragmentacji analizowanych związków w źródle jonów i często jony molekularne obserwowane w widmie masowym są bardzo mało intensywne lub ulegają całkowitemu rozpadowi na jony fragmentacyjne. Obecnie analizy GC/MS wykorzystywane są głównie do badania zawartości metabolitów pierwotnych oraz niezbyt polarnych, stabilnych termicznie metabolitów wtórnych. Możliwa jest analiza szerokiej gamy związków takich jak aminokwasy, cukry oraz szereg ich pochodnych, kwasy tłuszczowe, metabolity cyklu Krebsa, steroidy i sterole, niektóre alkaloidy i związki fenolowe. W identyfikacji rozdzielanych związków bardzo pomocne są powszechnie dostępne bazy danych widm masowych oraz ciągle doskonalone programy do dekonwolucji pików (70).

Połączenia flawonoidów są związkami stosunkowo polarnymi i labilnymi termicznie, dlatego warunkiem wykonania analizy GC/MS jest hydroliza połączeń glikozydowych oraz przekształcenie aglikonów w substancje bardziej lotne i stabilne w wysokiej temperaturze (71). Istnieje szeroka gama odczynników przeprowadzających grupy hydroksylowe w pochodne eterowe bądź estrowe. Grupy hydroksylowe przeprowadza się w mniej polarne poprzez podstawienie ich grupami metylowymi, lub trialkilosililowymi – TMS (poprzez blokowanie N-(trimetylosililo)-N-metylotrifluoroacetamidem lub N-(tert-butylo-dimetylosililo)-N-metylotrifluoroacetamidem). Porównanie analizy silylowanych oraz metylowanych pochodnych izoflawonów z ekstraktów korzeni łubinu metodą GC-MS dostarczyło ciekawych wniosków strukturalnych (72). Zastosowanie odczynnika CD<sub>3</sub>I zostało zaprezentowane jako sposób na określenie pozycji podstawienia natywnej grupy metylowej w cząsteczce flawonoidu (73). Podczas fragmentacji pochodnych silylowych możemy zaobserwować eli-

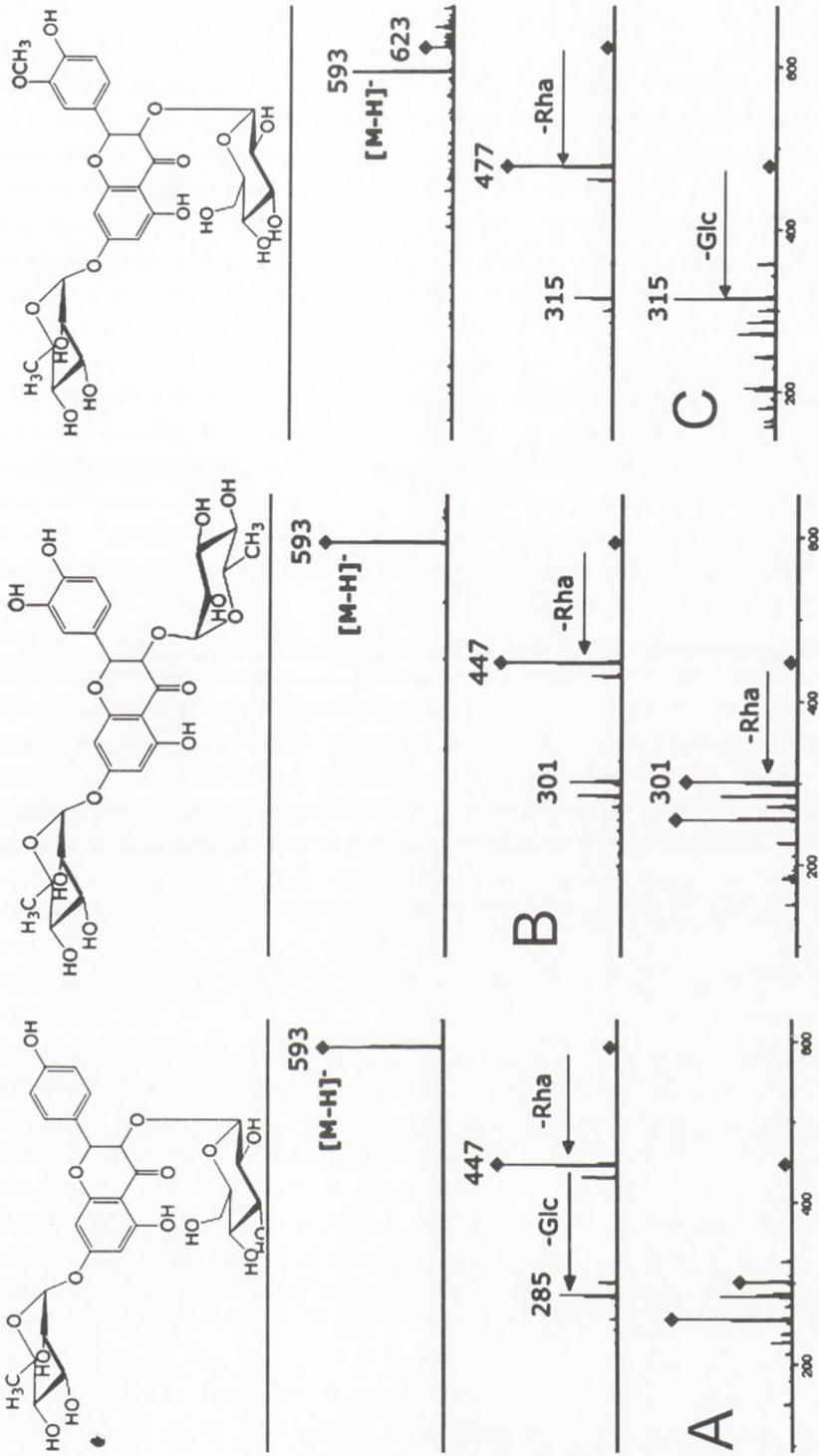


minację rodników metylowych, grup trimetylosilanowych lub też jednoczesną eliminację dwóch grup metylowych, z których powstają fragmenty specyficzne dla danego związku (74). Trzeba również wziąć pod uwagę, że podczas procesu syntezy pochodnych siliolowych mogą tworzyć się produkty uboczne, które mogą utrudnić analizę ilościową badanych związków. Dodatkowym problemem jest konieczność przechowywania pochodnych TMS w warunkach bezwodnych gdyż łatwo ulegają one hydrolizie.

#### 3.2.4. Systemy LC/MS

Strategią powszechnie stosowaną w analizie metabolitów wtórnych jest profilowanie metabolitów, które polega na analizie tylko wybranej grupy związków, np. alkaloidów lub flawonoidów. Podczas analizy produktów biosyntezy szlaku fenylopropanoidowego istotne są formy glikozylacji bądź acylacji pochodnych flawonoidów oraz ich zmiany ilościowe w określonych punktach czasowych różnego rodzaju doświadczeń biologicznych. Jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym, którą stosuje się gdy wprowadzana próbka jest w roztworze, prowadzi do powstania jonów pseudomolekularnych protonowanych lub deprotonowanych cząsteczek  $[M+H]^+/[M-H]^-$ . Procesem krytycznym dla przeprowadzenia analizy HPLC/MS jest odparowanie dużej ilości wycieku z kolumny w źródle jonów. Podczas jonizacji analizowanym związkom dostarczane są bardzo niewielkie ilości energii, dlatego na widmie obserwujemy tylko jon pochodzący od niefragmentowanej cząsteczki. Tandemowe spektrometry mas umożliwiają wykonanie fragmentacji (rozpadu) jonów  $[M+H]^+/[M-H]^-$  w celu uzyskania informacji o budowie związku. Proces ten zachodzi na drodze kolizyjnie indukowanej dysocjacji (CID, ang. *Collision Induced Dissociation*), prowadzonej w analizatorze lub jego części, w której jony poddawane są fragmentacji poprzez zderzenia z atomami gazu szlachetnego, np. helu lub argonu. Analizatory wykorzystywane do tego rodzaju eksperymentów zazwyczaj są dość złożone konstrukcyjnie. Najczęściej stosowane w instrumentach HPLC/MS są potrójny analizator kwadrupolowy QQQ, pułapka jonowa IT, analizator cyklotronowego rezonansu jonowego wykorzystujący transformację Fouriera FTICR, lub też analizatory hybrydowe takie jak kwadrupol sprzężony z analizatorem czasu przelotu QToF, oraz wysokorozdzielczy analizator działający na zasadzie pułapki jonowej Orbitrap. W zależności od zastosowanego analizatora uzyskiwane są widma o niskiej lub wysokiej rozdzielczości. Wysoka rozdzielczość pozwala na wyznaczenie masy i określenie składu elementarnego związku na podstawie wartości  $m/z$  jonów rejestrowanych w widmie masowym z dokładnością, w zależności od typu analizatora  $\sim 2-5$  ppm. Należy zwrócić uwagę na sprawę, że precyzja określania masy zależy od typu spektrometru, a analiza porównawcza rozdzielczości detektorów klasyfikuje najwyżej FTICR (75). Trzeba tu podkreślić, że jedynie dzięki zastosowaniu spektrometrów mas rejestrujących widma CID MS/MS można wykryć oraz ilościowo oznaczyć koeluujące z kolumny





Rys. Widma MS<sup>n</sup> jonów [M-H]<sup>-</sup> trzech różnych dwuglikozydów flawonoli *Arabidopsis thaliana* wymywanych w jednym wierzchołku chromatograficznym podczas analizy HPLC/MS (38). A – 3-O-glukozyl-7-O-rannozyd kempferolu; B – 3-O-rannozyd-7-O-glikozyl kwercetyny; C – 3-O-glikozyl-7-O-rannozyd izoramnetyny.

chromatograficznej różne związki występujące w bardzo różnych ilościach. Przykład takiej analizy pokazano na rysunku przedstawiającym widma trzech różnych dwuglikozydów flawonoli z liści *Arabidopsis thaliana*, które są wymywane w jednym wierzchołku chromatograficznym w systemie HPLC (38).

Badania strukturalne zmierzające do rozróżnienia izomerów C- i O- glikozydów oraz O-diglikozydów flawonoidów techniką HPLC/MS prowadzono już w latach 90. XX w. przy użyciu nie stosowanej już metody jonizacji FAB (76-79). Wraz z udoskonalaniem metod analitycznych badano możliwości określenia pozycji podstawienia reszty cukrowej do aglikonu na podstawie widm fragmentacyjnych deprotonowanych cząsteczek (80,81). Scharakteryzowano również wiązania interglikozydowe di-, tri-, tetra- i pentaglikozydowanych flawonoidów na podstawie intensywności jonów fragmentacyjnych (82). Możliwe jest również określenie jakie cząsteczki cukrów wchodzi w skład glikozydu. Analizę strukturalną glikozydów flawonoidów można przeprowadzić wykorzystując modyfikację mechanizmów fragmentacji przez tworzenie jonów sodowanych  $[M+Na]^+$ , bądź też z dodatkami dwuwartościowych kationów metali. Obydwie metody prowadzą do uzyskania informacji o sposobie podstawienia cząsteczek cukrowych i pozycjach ich przyłączenia do cząsteczki aglikonu (80,83,84).

Podczas wykonywania analiz zwłaszcza przy zastosowaniu jonizacji ESI należy zwrócić uwagę na parametry napięciowe w źródle jonów oraz w komorze kolizyjnej (energia kolizji), które mają wpływ na stopień fragmentacji związków. Przyłożenie większej różnicy potencjałów w źródle jonów powoduje fragmentację związku już na tym etapie analizy. Zabieg ten bywa stosowany w przypadku flawonoidów w celu rozerwania wiązań glikozydowych jeszcze w źródle jonów i identyfikacji aglikonów na podstawie ich fragmentacji w wyniku procesu CID. Diagnostyczne jony fragmentacyjne aglikonów flawonoidów powstają podczas reakcji retro Dielsa – Aldera, (RDA) zachodzącej w pierścieniu C (38,85,86).

### 3.2.5. Systemy CE/MS

Elektroforeza kapilarna jest stosunkowo nową metodą rozdzielania związków chemicznych, wprowadzoną na szerszą skalę pod koniec lat 80. XX w. wraz z dostępnością komercyjnych instrumentów analitycznych. Rozdział komponentów próbki następuje w wyniku zróżnicowanej szybkości migracji cząsteczek w roztworze elektrolitu wewnątrz kapilary o średnicy 50-75  $\mu\text{m}$  i długości kilkudziesięciu centymetrów, do której przyłożono napięcie elektryczne rzędu kilkunastu kV. Klasyczną technikę tego typu rozdzielania – strefową elektroforezę kapilarną (CZE, ang. *Capillary Zone Electrophoresis*) stosuje się najczęściej do analizy substancji obdarzonych ładunkiem lub takich, które można zjonizować w odpowiednim pH. Rozdział niepolarnych związków nienaładowanych elektrycznie można osiągnąć dodając do buforu elektrolitycznego detergenty jonowe tworzące naładowane micelle migrujące w po-



lu elektrycznym, w których wnętrzu przenoszone są substancje analizowane. Ten wariant elektroforezy kapilarnej, nazywany micelną elektrokinetyczną chromatografią kapilarną (MEKC, ang. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*), jest szczególnie przydatny w badaniach metabolitów wtórnych. Metoda ta w połączeniu ze spektrometrem mas (CE/MS) jest jednak rzadziej stosowana do analizy flawonoidów, aczkolwiek jej użycie pozwoliło na rozdzielenie i zidentyfikowanie 18 różnych flawonoidów i ich glikozydów, podczas gdy wcześniej stosowane metody oparte na HPLC ujawniły obecność tylko 5 związków tej kategorii w tej samej próbie (86).

### 3.2.6. Systemy HPLC/NMR

Spektroskopia NMR jest metodą analityczną dostarczającą jednoznaczne informacje o strukturze badanych związków na podstawie widm rezonansowych jąder atomów  $^1\text{H}$  oraz  $^{13}\text{C}$ . Opracowano różnorodne techniki umożliwiające rejestrację dwuwymiarowych widm odzwierciedlających interakcje pobliskich atomów np. homonuklearne techniki COSY (ang. *Correlation Spectroscopy*) i NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) lub heteronuklearne HSQC (ang. *Heteronuclear Single Quantum Correlation*) i HMBC (ang. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Wadą spektrometrii NMR jest stosunkowo niska czułość, jednak postęp technologiczny ostatnich lat umożliwił stworzenie systemów HPLC-NMR jako w pełni funkcjonalnej metody analitycznej, stosowanej również do analizy flawonoidów izolowanych z tkanek roślin (88-91). Zastosowanie takich systemów eliminuje konieczność izolacji i oczyszczania poszczególnych związków w celu ich identyfikacji, jednak konieczne jest pokonanie przeszkód wynikających z niskiej czułości NMR (92). Obecnie możliwe jest instalowanie w spektrometrach NMR sprzężonych z instrumentami HPLC magnesów o wysokim polu przynajmniej 500, a nawet 750-900 MHz. Innym rozwiązaniem pozwalającym na rejestrację widm kolejnych związków wymywanych z kolumny jest zatrzymywanie przepływu eluenta na czas niezbędny do akwizycji widm. Dzięki temu można przeprowadzić różne eksperymenty NMR, włącznie z dwuwymiarowymi pomiarami widm interakcji  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  jak HSQC i HMBC używając nawet tylko 10  $\mu\text{g}$  próbki (92). Alternatywą do stosowania akwizycji widm NMR przez spektrometr liniowo sprzężony z HPLC jest wykonywanie pomiarów *off line*, w których kolejne związki są zbierane w wycieku z kolumny i ich widma są uzyskiwane po zakończeniu eksperymentu chromatograficznego. W większości przypadków analizy HPLC/NMR używane są jako wsparcie i uzupełnienie wyników doświadczeń HPLC/MS/MS, które zazwyczaj przeprowadza się w pierwszej kolejności. Wykazano np., że u dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum* L.) występują dwa różne glikozydy kwercetyny, które koeluują z kolumny RP C-18 i mają identyczne widma MS/MS, jednak na podstawie widm NMR można było stwierdzić, że są to 3- $\beta$ -D-glukozyd i 3- $\beta$ -D-galaktozyd (89). Innym problemem nierozwiązywalnym zazwyczaj przy zastosowaniu wy-



łącznie technik HPLC/MS jest lokalizacja miejsc malonylacji u glikokoniugatów flawonoidów. Jednak użycie HPLC/NMR umożliwiło zidentyfikowanie izomerycznych 7-O- $\beta$ -D-glukozydów izoflawonów formononetyny i bioczaniny A jako zestryfikowanych przez kwas malonowy w pozycjach 4'' lub 6'' cząsteczki glukozy (90).

Publikacja została przygotowana dzięki finansowaniu przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt badawczy nr 2 P06A 31 27.

## Literatura

1. Dixon R. A., Paiva N. L., (1995), *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
2. Taylor L. P., Grotewold E., (2005), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 317-323.
3. Peer W. A., Murphy A. S., (2007), *Trends Plant Sci.*, 12, 556-563.
4. Treutter D., (2005), *Plant Biol.*, 7, 581-591.
5. Walle T., (2004), *Free Radical Biol. Medicine*, 36, 829-837.
6. Moon Y. J., (2006), *Toxicology in Vitro*, 20, 187-210.
7. Winkel-Shirley B., (2001), *Plant Physiol.*, 126, 485-493.
8. Dixon R. A., Steel C. L., (1999), *Trends Plant Sci.*, 4, 394-400.
9. Fernie A. R., Trethewey R. N., Krotzky A. J., Willmitzer L., (2004), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 763-769.
10. Dixon R. A., Strack D., (2003), *Phytochemistry*, 62, 815-816.
11. Olsson L. C., Veit M., Weissenböck G., Bornman J. F., (1998), *Phytochemistry*, 49, 1021-1028.
12. Reuber S., Bornman J. F., Weissenböck G., (1996), *Physiol. Plant.*, 97, 160-168.
13. Lahtinen M., Salminen J., Kapari L., Lempa K., Ossipov V., Sinkkonen J., Valkama E., Haukioja E., Pihlaja K., (2004), *J. Chem. Ecol.*, 30, 2257-2268.
14. Arimura G., Tashiro K., Kuhara S., Nishioka T., Ozawa R. T., Akabayashi J., (2000), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 277, 305-310.
15. Garg N., Geetanjali, (2007), *Agron. Sustain. Dev.*, 27, 59-68.
16. Shaw L. J., Morris P., Hooker J. E., (2006), *Environ. Microbiol.*, 8, 1867-1880.
17. Goto T., Kondo T., (1991), *Angew. Chem. Intern.*, ed. 30, 17-33.
18. Clegg M. T., Durbin M. L., (2000), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 97, 7016-7023.
19. Jones K. N., Riethel J. S., (2001), *Am. J. Bot.*, 88, 447-454.
20. Dixon R. A., Steel C. L., (1999), *Trends Plant Sci.*, 4, 394-400.
21. Weidenborner M., Jha H. C., (1994), *Mycol. Res.*, 98, 1376-1378.
22. Middleton E. M., Teramura A. H., (1993), *Plant Physiol.*, 103, 741-752.
23. Peer W. A., Murphy A. S., (2007), *Trends Plant Sci.*, 12, 556-563.
24. Weckwerth W., (2003), *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 669-689.
25. Trethewey R. N., (2004), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 196-201.
26. Lange B. M., (2006), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 220-226.
27. Oksman-Caldentey K. M., Saito K., (2005), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 16, 174-179.
28. Stafford H. A., (1990), *Flavonoid metabolism*, CRC Press, Boca Raton.
29. Zhang L., Zuo Z., Lin G., (2007), *Molecular Pharmaceutics*, 4, 833-845.
30. *FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications*, (2006), Eds. Andersen Ø. M., Markham K. R., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
31. Harborne J. B., Williams C. A., (2000), *Phytochemistry*, 55, 481-504.
32. Rauha J. P., Vuorela H., Kostianen R., (2001), *J. Mass Spectrom.*, 36, 1269-1280.
33. Fernie A. R., Trethewey R. N., Krotzky A. J., Willmitzer L., (2004), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 763-769.
34. Hall R. D., (2006), *New Phytologist.*, 169, 453-468.



35. Weckwerth W., (2003), *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 669-689.
36. Wishart D. S., (2007), *Pharmacogenomics*, 8, 683-686.
37. Tohge T., Nishiyama Y., Hirai M. Y., Yano M., Nakajima J-I., Awazuhara M., Inoue E., Takahashi H., Goodenowe D. B., Kitayama M., Noji M., Yamazaki M., Saito K., (2005), *Plant J.*, 42, 218-235.
38. Stobiecki M., Skiryecz A., Kerhoas L., Kachlicki P., Muth D., Einhorn J., Mueller-Roeber B., (2006), *Metabolomics*, 2, 197-219.
39. Pourcel L., Routaboul J-M., Kerhoas L., Caboche M., Lepiniec L., (2005), *Plant Cell.*, 17, 2966-2980.
40. Routaboul J-M., Kerhoas L., Debeaujon I., Pourcel L., Caboche M., Einhorn J., Lepiniec L., (2006), *Planta*, 224, 96-107.
41. Roessner U., Willmitzer L., Fernie A. R., (2001), *Plant Physiol.*, 127, 749-764.
42. Le Gall G., DuPont M. S., Mellon F. A., Davis A. L., Collins G. J., Verhoyen M. E., Colquhoun I. J., (2003), *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2438-2446.
43. Moco S. I. A., Bino R. J., Vorst O. F. J., Verhoeven H. A., de Groot J. C. W., van Beek T. A., Vervoort J. J. M., de Vos C. H., (2006), *Plant Physiology*, 141, 1205-1218.
44. Sato S., Soga T., Nishioka T., Tomita M., (2004), *Plant J.*, 40, 151-163.
45. Fiehn O., Sumner L. W., Rhee S. Y., Ward J., Dickerson J., Lange B. M., Lane G., Roessner U., Last R., Nikolau B., (2007), *Metabolomics*, 3, 195-201.
46. Trethewey R. N., (2004), *Current Opin. Plant Biol.*, 7, 196-201.
47. Muth D., Kachlicki P., Stobiecki M., (2007), *Biotechnologia*, 1(76), 156-175.
48. de Rijke E., Out P., Niessen W., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U., (2006), *J. Chromatogr. A*, 1112, 31-63.
49. Stalikas C., (2007), *J. Sep. Sci.*, 30, 3268-3295.
50. Prasain J. K., Wang C-C., Barnes S., (2004), *Free Radic. Res.*, 37, 1324-1350.
51. Stobiecki M., Kachlicki P., (2006), in: *The Science of Flavonoids*, Ed. Grotewold E., Springer Science and Business Media, New York, 47-69.
52. Cuyckens F., Claeys M., (2004), *J. Mass Spectrom.*, 39, 1-15.
53. Maruska A., Kornysova O., (2006), *J. Chromatogr. A.*, 1112, 319-330.
54. Tolstikov V., Fiehn O., Tanaka N., (2007), *Metabolomics: Methods and Protocols*, Humana Press.
55. Mistry K., Grinberg N., (2005), *J. Chromatogr. Rel. Tech.*, 28, 1055-1074.
56. Plumb R., Castro-Perez J., Granger J., Beattie I., Joncour K., Wright A., (2004), *Rapid Comm. Mass Spec.*, 18, 2331-2337.
57. Churchwell M., Twaddle N., Meeker L., Doerge D. R., (2005), *J. Chromatogr. B*, 825, 134-143.
58. Muth D., Marsden-Edwards E., Kachlicki P., Stobiecki M., (2008), *Phytochem. Anal.*, 19, 444-452.
59. *The Systematic Identification of Flavonoids*, (1970), Eds. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B., Springer-Verlag, New York, NY, USA.
60. Merken H. M., Beecher G. R., (2000), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 577.
61. Carini M., Aldini G., Furlanetto S., Stefani R., Maffei F. R., (2001), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, 517-526.
62. Luczkiewicz M., Glod D., Baczek T., Bucinski A., (2004), *Chromatographia*, 60, 179.
63. Kachlicki P., Marczak L., Kerhoas L., Einhorn J., Stobiecki M., (2005), *J. Mass Spectrom.*, 40, 1088-103.
64. Wilkins C., (2007), *Trends Anal. Chem.*, 26, 65-67.
65. Smith C. A., Want E. J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G., (2006), *Anal. Chem.*, 78, 779-787.
66. Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq J., (2001), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 707-715.
67. Vaidyanathan S., (2006), *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 20, 1192-1198.
68. Frison-Norrie S., Sporns P., (2002), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2782-2787.
69. Marczak L., Kachlicki P., Koźniewski P., Skiryecz A., Krajewski P., Stobiecki M., (2008), *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 22, 3949-3956.
70. Kopka J., Schauer N., Krueger S., Birkemeyer C., Usadel B., Bergmüller E., Dörmann P., Weckwerth W., Gibon Y., Stitt M., Willmitzer L., Fernie A. R., Steinhauser D., (2005), *Bioinformatics*, 21, 1635-1638.
71. Liscic J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A. R., (2006), *Nature Protocols*, 1, 387-396.
72. Stobiecki M., Wojtaszek P., (1990), *J. Chromatogr.*, 508, 391-398.

73. Bednarek P., Franski R., Kerhoas L., Einhorn J., Wojtaszek P., Stobiecki M., (2001), *Phytochemistry*, 56, 77-85.
74. Maul R., Schebb N. H., Kulling S. E., (2008), *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 239-250.
75. Bristow A., Webb K., (2003), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14, 1086-1098.
76. Li Q. M., van den Heuvel H., Dillen L., Claeys M., (1992), *Biol. Mass Spectrom.*, 21, 213-221.
77. Li Q. M., Claeys M., (1994), *Biol. Mass Spectrom.*, 23, 406-416.
78. Ma Y. L., Vedernikova I., van den Heuvel H., Claeys M., (2000), *J. Am. Soc. of Mass Spectrom.*, 11, 136-144.
79. Ma Y. L., Cuyckens F., van den Heuvel H., Claeys M., (2001), *Phytochem. Anal.*, 12, 159-165.
80. Cuyckens F., Claeys M., (2005), *J. Mass Spectrom.*, 40, 364-372.
81. Hvattum E., Ekeberg D., (2003), *J. Mass Spectrom.*, 38, 43-49.
82. Ferreres F., Llorach R., Gil-Izquierdo A., (2004), *J. Mass Spectrom.*, 39, 312-321.
83. Kachlicki P., Einhorn J., Muth D., Kerhoas L., Stobiecki M., (2008), *J. Mass Spectrom.*, 43, 572-586.
84. Davis B. D., Brodbelt J. S., (2004), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 15, 1287-1299.
85. Wolfender J. L., (2000), *Analisis*, 28, 895-906.
86. March R. E., Lewars E. G., Stadey C. J., Miao X-S., Zhao X., Metcalfe C. D., (2006), *Int. J. Mass Spectrom.*, 248, 61-85.
87. Edwards E. L., Rodrigues J. A., Ferreira J., Goodall D. M., Rauter A. P., Justino J., Thomas-Oates J., (2006), *Electrophoresis*, 27, 2164-2170.
88. Wolfender J. L., Rodriguez S., Hostettmann K., Hiller W., (1997), *Phytochem. Anal.*, 8, 97-104.
89. Hansen S. H., Jensen A. G., Cornett C., Bjørnsdottir I., Taylor S., Wright B., Wilson I. D., (1999), *Anal. Chem.*, 71, 5235-5241.
90. de Rijke E., de Kanter F., Ariese F., Brinkman U. A. T., Gooijer C., (2004), *J. Sep. Sci.*, 27, 1061-1070.
91. Waridel P., Wolfender J. L., Lachavanne J. B., Hostettmann K., (2004), *Phytochemistry*, 65, 2401-2410.
92. Wolfender J. L., Ndjoko K., Hostettmann K., (2001), *Phytochem. Anal.*, 12, 2-22.