

Využitie hmotnostnej spektrometrie s trojitým kvadrupólom na identifikáciu skupiny cyklitolov vo hviezdici prostrednej

Mária Kopáčová^{1,2}, Vladimír Pätoprstý²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; kopacova8@uniba.sk

²Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Analytické oddelenie, Dúbravská cesta 9, 845 38, Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Use of mass spectrometry with triple quadrupole for identification of a group of cyclitols in chickweed. Mass spectrometry is the most commonly used method in the detection of cyclitols because it offers high sensitivity, selectivity and versatility. Inositols, the most widespread cyclitols in eucaryotic cells with their methyl ether derivatives as plant secondary metabolites have numerous pharmaceutical properties and are widely distributed in the plants. This work deals with the identification of inositols in the leaves of chickweed by mass spectrometry. Gas chromatography was used to separate inositols on polar column SP-2330 after derivatization. In the leaves of chickweed 2 methyl ether inositols and 1 inositol have been identified with their relative percentages of the peak area: D-pinitol (98,69 %), ononitol (0,99 %), myo-inositol (0,33 %). In addition to the already known phytochemicals contained in chickweed (saponins, tannins, terpenoids, etc.), inositols also contribute to its medicinal properties.

Keywords: inositols; chickweed; gas chromatography; mass spectrometry; identification

Úvod a formulácia cieľa

Hmotnostná spektrometria je najčastejšie používanou metódou pri detekcii cyklitolov, pretože ponúka vysokú citlivosť, selektivitu a univerzálnosť. Inozitoly sú najrozšírenejšie cyklitoly v eukaryotických bunkách, s empirickým vzorcom $C_6H_{12}O_6$ (1,2,3,4,5,6-cyklohexanol). Tieto chemické zlúčeniny existujú v deviatich možných stereoizoméroch. Päť z nich, myo-, scyllo-, muco-, neo- a D-chiro-inozitol sa vyskytujú v prírode, kým ostatné štyri možné izoméry (L-chiro-, allo-, epi- a cis-inozitol) sú odvodené z myo-inozitolu [1]. Medzi všetkými známymi inozitolmi sa v prírode najviac vyskytuje myo-inozitol. Je vo všetkých eukaryotických bunkách, kde tvorí štruktúrny základ pre množstvo sekundárnych látok. Je tiež dôležitou zložkou stavebných lipidov (fosfatidyloinozitol) PI a ich rôznych fosfátov, fosfatidyloinozitol fosfátových lipidov PIP. Všetky fosfatidyloinozitolfosfáty sa podieľajú na raste a vývoji rastlín. Niektoré inozitoly sú bežne v prírode ako čisté zlúčeniny alebo ako ich deriváty [2].

Niektoré z metyléter derivátov inozitolu sú rastlinné sekundárne metabolity, zlúčeniny, ktoré sa priamo nezúčastňujú normálneho rastu, ale hrajú dôležitú úlohu v obrane proti nepriaznivým podmienkam prostredia. Medzi nimi rozlišujeme 5-O-metyl-myo-inozitol

(*sekvojitol*), 1-O-metyl-myo-inozitol (*bornezitol*), 4-O-metyl-myo-inozitol (*ononitol*), 5-O-metyl-allo-inozitol (*brahol*), di-O-metyl-(+)-chiro-inozitol (*pinpollitol*) a 1L-2-O-metyl-chiro-inozitol (*L-quebrachitol*). 3-O-metyl-D-chiro-inozitol (*D-pinitol*) je najrozšírenejší inozitol éter v rastlinách [3].

Protizápalové vlastnosti cyklitolov pomáhajú redukovať rozvoj metabolických porúch (cukrovka, hypertenzia) a aterosklerózy. Známe sú aj inzulín-napodobujúce účinky D-pinitolu, D-chiro-inozitolu a sekvojitolu. Myo-inozitol spolu s D-chiro-inozitolom dokáže zlepšiť vývoj kostí a minerálnu hustotu kostí, čím potláčajú osteoklastogenézu. Myo-inozitol a ostatné cyklitoly majú tiež antioxidačné, protizápalové a protirakovinové vlastnosti [4].

Hviezdica prostredná (*Stellaria media*) sa tradične používa pri kožných ochoreniach, popáleninách a pomliaždeninách, ako aj pri liečbe zápalov tráviaceho traktu, obličiek a dýchacích ciest alebo pri ochoreniach kĺbov. Pôsobí antibakteriálne, antioxidačne a má analgetické účinky. Pre niekoho známa ako chutná burina, využívaná na prípravu šalátov, smoothies, pomazánok, do polievok alebo ako čaj, je bohatá na mnohé prospešné fytochemikálie. V literatúre sa neuvádza identifikácia inozitolov vo hviezdici prostrednej hmotnostnou spektrometriou. Okrem toho sa cyklitoly zvyknú derivatizovať trimetylsilyláciou. My sme sa rozhodli pre iný spôsob derivatizácie, takže nie sú k dispozícii ani príslušné hmotnostné spektrá z literatúry. Cieľom tejto práce bolo identifikovať pomocou MS, aké inozitoly obsahuje hviezdica prostredná [1, 5].

Materiál a metódy

Listy hviezdice prostrednej (*Stellaria media*) boli lyofilizované, aby sa v nich zachoval obsah látok. Následne boli podrvené a extrahované v metanole. Extrakt bol homogenizovaný 30 min pri laboratórnej teplote ultrazvukovým homogenizátorom s pulzom 10 s x 1 s (Bandelin Sonopuls HD 3100) pre lepšiu výťažok. Po 5 min vortexovaní (IKA Vortex Genius 3) a 5 min centrifugácii (Heraeus PICO 17 Centrifuge) sa odobratý 1 ml nechal odpariť. Vzorka sa pred analýzou GC-MS derivatizovala zásaditou acetyláciou pridaním 50 µl pyridínu a 50 µl acetanhydridu v termobloku (Block heater SBH130D STUART) 1 hod pri 80°C. Po acetylácii sa nechala vzorka odpariť do sucha a rozpustila v acetonitrile.

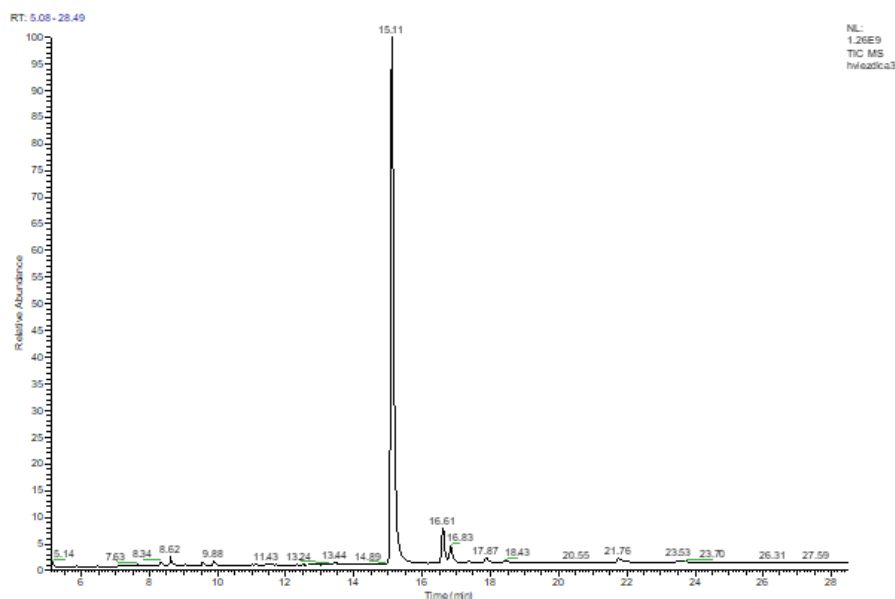
Vzorky boli analyzované plynovým chromatografom v spojení s hmotnostným detektorom GC-MS (Trace GC Ultra Thermo Scientific - TSQ Quantum XLS) s použitím kremennej kapilárnej kolóny SP-2330 (30m x 0.25mm x 0.2µm) a teplotným gradientom: 180 °C (4 min) – 20 °C/min – 230 °C – 2 °C/min – 250 °C (10 min). Tieto podmienky boli optimalizované a teplotný program dosahuje najlepšiu separáciu. Prietok hélia bol 0,6 ml/min,

teplota iónového zdroja a dávkovača bola 200 °C a 240 °C. Použitá bola elektrónová ionizácia (70 eV) a kvadrupólový analyzátor pracoval v režime úplného skenovania v hmotnostnom rozsahu 40-450 m/z. Chemikálie LC-MS čistoty, použité na extrakciu, prípravu a analýzy vzoriek ako aj štandardov, boli získané od firiem VWR Chemicals (Poľsko), Honeywell Chromasolv (Nemecko). Štandardy inozitolov (D-ononitol, sekvojitol, D-pinitol, D-chiro-, allo-, epi-, neo-, scyllo-, muco-, myo-inozitol) boli zakúpené od firiem Carbosynth (Spojené kráľovstvo), Sigma-Aldrich (Švajčiarsko).

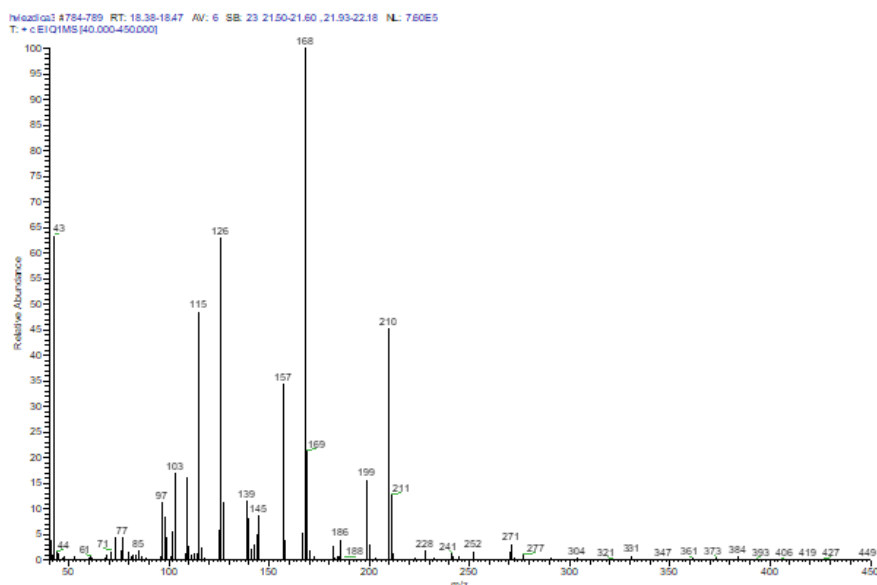
Výsledky a diskusia

Vzorka derivatizovaného extraktu listov hviezdice prostrednej bola analyzovaná plynovou chromatografiou s hmotnostnou spektrometriou. Inozitoly sa separovali na polárnej kolóne SP-2330. V študovanej rastline bol identifikovaný 1 inozitol a 2 metyléter inozitoly, ktoré sa pravdepodobne nachádzajú v rastline vo voľnej forme (Obr. 1). V analyzovanom extrakte listov boli identifikované aj acetylované hexózy (16,61 min a 16,83 min), ale ani pomalý teplotný gradient 2 °C/min z teploty 230 °C na 250 °C nebol schopný zabezpečiť ich dostatočnú separáciu. Voľné sacharidy však neboli cieľom našej štúdie (Obr. 1).

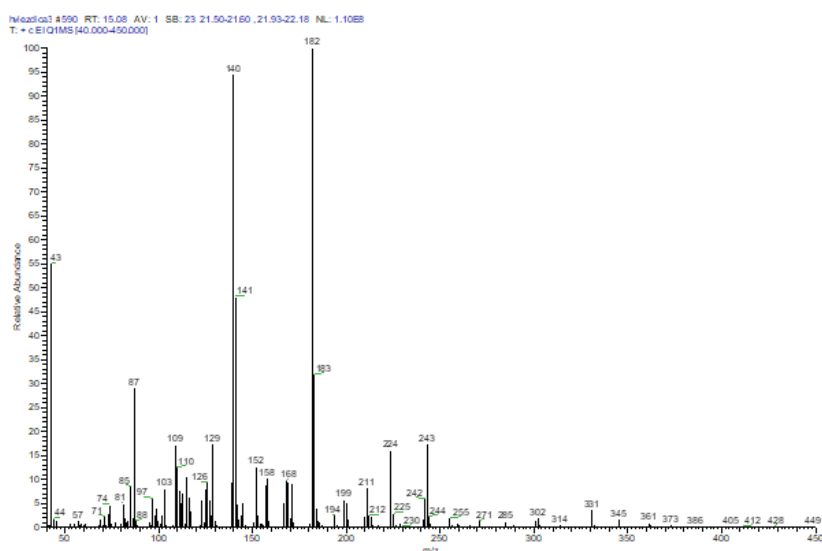
Analyzované inozitoly v extrakte hviezdice prostrednej boli potvrdené hmotnostnými spektrami a retenčnými časmi rôzne eluujúcich rovnako pripravených acetylovaných štandardov inozitolov a metyléter inozitolov, ktoré majú charakteristické fragmentačné vzorce (Obr. 2, 3).



Obr. 1. Chromatogram inozitolov, metyl-éter derivátov v extrakte listov hviezdice prostrednej
D-pinitol (15,11 min), ononitol (17,87 min), myo-inozitol (18,43 min)



Obr. 2. Hmotnostné spektrum acetylovaných inozitolov



Obr. 3. Hmotnostné spektrum acetylovaných metyléter inozitolov

Tab. 1 znázorňuje relatívne (plošné) percentá zastúpenia inozitolov v extrakte listov hviezdice prostrednej v danom poradí s príslušnými retenčnými časmi. Myo-inozitol ako najviac vyskytujúci sa inozitol v prírode sa tiež nachádza v extrakte, aj keď je jeho zastúpenie najmenšie. Vo hviezdici prostrednej bol identifikovaný D-pinitol ako dominantný voči ďalším dvom inozitolom, ononitolu a myo-inozitolu. Predpokladáme, že to súvisí s úlohou D-pinitolu ochrániť burinu pred nepriaznivými podmienkami prostredia, a teda aj s tým, že myo-inozitol môže byť metyltransferázou metylovaný na ononitol a potom sa prostredníctvom epimerázovej reakcie premení na pinitol [1]. Podľa literatúry boli vo hviezdici prostrednej identifikované inozitoly - pinitol, ononitol, najmenej chiro-inozitol metódou HPAE-PAD a NMR porovnaním

so spektrami z literatúry, čo sa líši od našich výsledkov získaných pomocou identifikácie MS [6]. GC-MS metódu doplnenú o potvrdenie štandardmi považujem za spoľahlivejšiu.

Tab. 1. Relatívne percentá [%] zastúpenia jednotlivých inozitolov v listoch hviezdice prostrednej, porovnanie ich retenčných časov so štandardmi a charakteristické ióny fragmentácie

	Plocha [%]	RT [min]	RT štandardov [min]	MS fragmenty
D-pinitol	98,69	15,11	15,09	43, 87, 109, 129, 140 , 141, 152, 182 , 183, 211, 224, 243
ononitol	0,99	17,87	17,84	43, 87, 109, 129, 140 , 141, 152, 182 , 183, 211, 224, 243
myo-inozitol	0,33	18,43	18,40	43, 103, 109, 115, 126, 139, 145, 157, 168 , 199, 210

Záver

Hmotnostná spektrometria hrá dôležitú úlohu pri jednoznačnej identifikácii, z toho dôvodu je spojenie GC-MS výhodné aj pri identifikácii skupiny cyklitolov. Na základe porovnania retenčných časov a hmotnostných spektier štandardov a analyzovanej vzorky boli v extrakte listov hviezdice prostrednej identifikované 2 metyléter inozitoly a 1 inozitol v eluovanom poradí: *D-pinitol*, *ononitol*, *myo-inozitol*. Možno skonštatovať, že okrem už známych fytochemikálií obsiahnutých vo hviezdici prostrednej (saponíny, taníny, terpenoidy a i.) prispievajú k liečivým vlastnostiam tejto rastliny, využívanéj v kuchyni, aj inozitoly, najmä D-pinitol so svojimi inzulín-napodobujúcimi účinkami.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a bol podporený Slovenskou grantovou agentúrou VEGA (Grant č. 1/0116/22).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Al-Suod H., Ligor M., Raĭiu I. A., et al. (2017) *Phytoch. Lett.* 20, p. 507
- [2] Sanz M. L., Martínez-Castro I., Moreno-Arribas M. V. (2008) *Food Chem.* 111(3), p. 778
- [3] Endringer D. C., Pezzuto J. M., Braga F. C. (2009) *Phytomed.* 16, p. 1064
- [4] Owczarczyk-Saczonek A., Lahuta L. B., Ligor M., et al. (2018) *Nutrien.* 10(12), p. 1891
- [5] Rogowska M., Lenart M., Srećec S., et al. (2017) *Industr. Crops and Prod.* 97, p. 448
- [6] Negishi O., Mun'im A., Negishi Y. (2015) *J. Agric. Food Chem.* 63(10), p. 2683