

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



**Spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrií
v analýze flavonoidů a produktů jejich biotransformace**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:

Mgr. Renáta Myjavcová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc.RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2015

„Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Petrovi Bednářovi, Ph. D. za názory, rady a podporu při měření a vypracování mé disertační práce. Za trpělivost, zodpovězené otázky a pomoc při měření děkuji Mgr. Barboře Papouškové, Ph.D.. Za spolupráci na mé disertační práci děkuji Mgr. Alžbětě Srovnalové, Ph.D. z katedry Buněčné biologie Univerzity Palackého v Olomouci.

SOUHRN

Flavonoidy jsou rozsáhlou biologicky významnou skupinou látek. Důvodů zájmu o detailní zkoumání těchto přírodních látek je několik. Především je to jejich využití v medicíně jako prevence proti kardiovaskulárním onemocněním, cukrovce (diabetes mellitus 2. typu), onemocněním centrální nervové soustavy (CNS) a také potenciálně i při léčbě rakoviny. Anthokyaniny jsou přírodní barviva patřící do skupiny flavonoidů. Tato barviva hrají významnou roli v životě rostlin - ochrana pletiv před UV zářením a predátory, přitahování opylovačů atd. Anthokyaniny jsou poměrně málo stabilní. Snadno se oxidují, hydrolyzují a rovněž kondenzují na složitější barviva. Produkty vznikající jejich kondenzací s malými reaktivními sloučeninami, jako jsou pyrohroznová kyselina, acetaldehyd, aceton a další jsou už výrazně stabilnější a lze je využít v řadě oblastí, zejména potravinářství. U vzniklých kondenzovaných barviv lze očekávat jinou biologickou aktivitu v lidském organismu, než jakou vykazují samotné anthokyaniny. V této disertační práci byla pozornost věnována jedné skupině derivátů anthokyaninů - pyranoanthokyaninům. Byla studována jejich tvorba v extraktech plodů zimolezu kamčatského během jeho testování pro využití v potravinových doplncích. Detailní pozornost byla věnována analytickým vlastnostem 5-methylpyranoanthokyaninů. Byla prostudována fragmentace tohoto barviva po kolizi indukované disociací v iontové pasti. Kromě odštěpování oxidu uhelnatého a vody byl v kolizních spektrech pozorován i fragmenty vznikající odštěpením methylového radikálu z pyrano-kruhu. Tyto fragmenty jsou pro 5-methylpyranoanthokyaniny charakteristické a mohou být analyticky využity.

Lidský metabolismus je souborem biochemických reakcí probíhajících v buňkách. Nejčastěji jsou metabolické děje studovány na jaterních a střevních buňkách. Metabolismus anthokyaninových barviv byl již v literatuře do určité míry studován. O metabolismu derivátů anthokyaninů je toho však známo velmi málo. Studium *in vitro* biotransformace vybraného pyranoanthokyanidinu bylo také předmětem této disertační práce. Pro tyto experimenty byl vybrán 5-methylpyranopelargonidin. V paralelních experimentech byly spolu s tímto barvivem studovány i pelargonidin (nejjednodušší anthokyanidin) a kvercetin (běžný a dobře prostudovaný flavonoid). Byly použity nádorové linie jaterních a střevních buněk (HepG2 a LS174T). Po proběhnutí biotransformace byly vzniklé metabolity analyzovány pomocí spojení ultraúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (UHPLC/MS). U kvercetinu byly pozorovány běžné metabolity fáze I a II. Při analýze buněčného sedimentu

(pelet) byly navíc nalezeny ionty metabolitů s hodnotou m/z 603,0789 a 905,1212 ($[M-H]^-$ ionty). Tyto ionty byly připsány dimeru a trimeru kvercetin. Obě studovaná barviva (pelargonidin a 5-methylpyranopelargonidin) metabolizovala méně ochotně než kvercetin. Biotransformace 5-methylpyranopelargonidinu probíhala s větším výtěžkem metabolitů než biotransformace pelargonidinu. Studovaný 5-methylpyranoanthokyanin se od ostatních dvou studovaných látek významně liší i v profilu metabolitů akumulovaných v buněčných sedimentech. To zřejmě souvisí s přítomností jednoho kruhu a methylu navíc v molekule pyrano-barviva oproti srovnávaným látkám a tedy s jeho vyšší hydrofobicitou.

SUMMARY

Flavonoids represent a wide group of biologically important compounds. There are several reasons for interest in the detailed investigation of these natural compounds. Especially, their use in medicine to prevent cardiovascular disease, diabetes (type 2 diabetes mellitus), central nervous system disorders (CNS) and also the potential in cancer treatment can be mentioned. Anthocyanins are natural dyes belonging among flavonoids. Those dyes play important role in plant life - protection of plant tissues against UV radiation and predators and attraction of pollinators etc. Anthocyanins are relatively unstable. Oxidation, hydrolysis and formation of more complex dyes (condensation) are the most frequent processes. Product arising by condensation with some small reactive compounds, such a pyruvic acid, acetaldehyde, acetone and other are much stable and they can be used in many areas, first of all in food industry. Different biological activity of condensed dyes can be expected compared to native anthocyanins.

This thesis is focused on one group of anthocyanin derivatives - pyranoanthocyanins. Their formation was studied in fruit extract of honeysuckle in the framework of their utilization in food supplements. Analytical properties of 5-methylpyranoanthocyanins were studied in detail, especially fragmentation after collision induced dissociation in ion trap. Besides general cleavage of carbon monoxide and water, the cleavage of the methyl radical from pyrano ring was observed in collision spectra. Some of observed fragments can be used as diagnostic ions for identification of 5-methylpyranoanthocyanins in real samples.

Human metabolism is a complex of biochemical reactions proceed in cells. The metabolic processes are mainly studied in the liver and intestinal cells. Metabolism of anthocyanin dyes was described in the literature for several times. However relevant information about metabolism of pyranoanthocyanins and other complex anthocyanin dyes is missing. Biotransformation of pyranoanthocyanins represents second topic of this thesis. 5-methylpyranoanthocyanin, pelargonidin (related anthocyanidin) and quercetin (common and well studied flavonoid) were *in vitro* metabolized with tumor lines of liver and intestinal cells (LS174T and HepG2). Arised metabolites were analyzed using ultra performance liquid chromatography hyphenated with mass spectrometry (UHPLC/MS). Common and in former literature described metabolites of quercetin of phase I and II were observed (showing that the used cells were metabolically active). In the cell sediment metabolites with a m/z 603,0789 and 905,1212 ($[M-H]^-$ ions) were also found. These ions were tentatively attributed to dimer

and trimer of quercetin. Both studied dyes (pelargonidin a 5-methylpyranopelargonidin) metabolized less readily than quercetin. Biotransformation of 5-methylpyranopelargonidin proceeded with higher yield of metabolites compared to pelargonidin. Studied 5-methylpyranoanthocyanin differed significantly from the other compounds also in the profile of metabolites accumulated in cell pellets. This may be related to the presence of one additional ring and methyl group in the molecule of pyrano dyes and thus its higher hydrophobicity.

OBSAH

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1 Flavonoidy.....	10
2.1.1 Vlastnosti	10
2.1.2. Výskyt.....	11
2.1.3 Význam.....	12
2.2 Kondenzované flavonoidy.....	13
2.3 Metabolismus a biotransformace flavonoidů	16
2.3.1 Biosyntéza.....	17
2.3.2 Interakce flavonoidů s lidským organismem	18
2.3.2.1 Metabolismus flavonoidů <i>in vivo</i>	20
2.3.2.2 Metabolismus flavonoidů <i>in vitro</i>	21
2.4 Analytické metody pro studium flavonoidů a jejich produktů (bio)transformace	22
3. Cíle práce.....	24
4. Experimentální část.....	25
4.1 Chemikálie.....	25
4.1.1 Chemikálie používané při studiu plodů zimolezu kamčatského.....	25
4.1.2 Chemikálie použité při metabolické studii.....	25
4.3 Příprava 5-methylpyranopelargonidinu (5-MePPI).....	27
4.4 Buněčné linie	27
4.5 Přístroje a experimentální podmínky.....	28
4.5.1 Přístroje a postupy pro chromatografickou prefrakcionaci a náslenou μ LC/MS analýzu plodů zimolezu kamčatského.....	28
4.5.2 UHPLC/MS pro analýzu metabolitů flavonoidů	29
4.6 Postupy vyhodnocení.....	30

5. Výsledky a diskuze.....	31
5.1. Studium polyfenolů přítomných v extraktech plodů zimolezu kamčatského.....	31
5.1.1 Optimalizace extrakčních postupů.....	31
5.1.2 Hodnocení postupů frakcionace extraktů plodů zimolezu kamčatského.....	32
5.1.3 Identifikace barviv.....	35
5.1.3.1 Identifikace barviv z frakcionace fenolické frakce zimolezu kamčatského.....	41
5.2 Biotransformace flavonoidů.....	48
5.2.2 Metabolické experimenty vybraných flavonoidů <i>in vitro</i> pomocí jaterních buněčných linií HepG2.....	50
5.2.3 Metabolické experimenty vybraných flavonoidů <i>in vitro</i> pomocí střevních buněčných linií LS174T.....	52
6. Závěr.....	63
Literatura.....	64
Curriculum Vitae.....	74
Příloha.....	78

1. Úvod

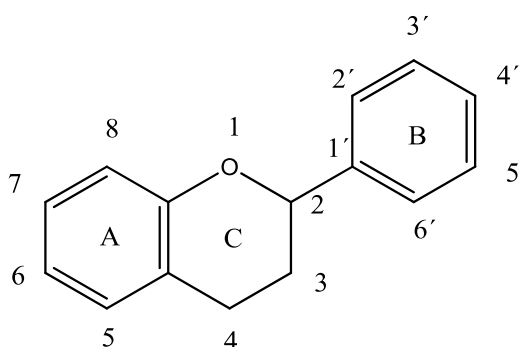
Flavonoidy patří mezi biologicky velmi významné přírodní látky. Důvodem jejich intenzivního výzkumu je jejich signální a regulační význam pro celou rostlinnou říši, ale také jejich využití v medicíně a potravinářství. Mezi flavonoidy patří celé skupiny polyfenolických látek s různou strukturou a vlastnostmi. Velmi významnou skupinou těchto sekundárních rostlinných metabolitů jsou i anthokyaninová barviva. Jedním z hlavních problémů souvisejících s jejich sledováním a využitím je jejich relativně malá stabilita v roztocích, při zvýšené teplotě, působení světla, oxidačních činidel apod. Působením těchto vlivů dochází ke strukturním změnám flavonoidů, mimo jiné i ke vzniku složitějších barviv kondenzačními a polymeračními reakcemi. Pyranoanthokyaniny patřící mezi tato složitější barviva byly poprvé identifikovány jako produkty přirozené fermentace při zrání a stárnutí vína. Vzhledem k rozmanitosti možných reakcí a vznikajících struktur je studium těchto látek dlouhodobě předmětem zájmu řady oborů a ty se neobejdou bez detailní chemické analýzy. Předkládaná disertační práce chce svým zaměřením přispět k porozumění vzniku, vlastnostem a procesu biotransformace vybraných flavonoidů se zaměřením na deriváty anthokyaninů. První část práce se věnuje analýze extraktů plodů zimolezu kamčatského během jeho testování pro využití v potravinových doplncích. Druhá část je zaměřena na studium *in vitro* biotransformace vybraných pigmentů střevními a jaterními buňkami a analýzu vzniklých metabolitů metodou UHPLC/MS².

2. Teoretická část

2.1 Flavonoidy

2.1.1 Vlastnosti

Flavonoidy jsou sloučeniny patřící mezi rostlinné fenoly. V současné době je již známo více než 8000 flavonoidních látek a stále se objevují nové [1,2]. Základní strukturální jednotkou jejich molekuly je flavan (Obr. 1) skládající se ze dvou benzenových jader (A, B) spojených pyranovým kruhem (C). Jednotlivé skupiny flavonoidů se od sebe liší počtem a druhem navázaných skupin na tuto základní strukturu. V přírodě se často vyskytují v podobě O-glykosidů [3]. Jejich molekula je tedy tvořena cukernou částí a částí necukernou (aglykonem). Glykosilace základního skeletu a přítomnost –OH skupin zvyšuje rozpustnost ve vodě i chemickou stabilitu. Naopak přítomnost methylových skupin rozpustnost ve vodě snižuje. Přitom obecně platí, že čím více je sloučenina lipofilnější, tím snáze prochází lipidovou buněčnou membránou [4,5].



Obr. 1 Základní struktura flavanu

Nízká rozpustnost aglykonů ve vodě hraje důležitou roli v terapeutickém využití flavonoidů. Využívá se syntéza ve vodě rozpustných flavonoidů jako např. hydroxyethylrutinosidy nebo inositol-2-fosfát-kvercetin, které jsou využívány v léčbě hypertenze [6].

Flavonoidy vznikají jako sekundární metabolity při biochemických procesech v rostlinné buňce. U rostlin mohou způsobovat pigmentaci samotných rostlin nebo ovocných plodů. Mohou působit jako atraktanty pro opylující hmyz a zároveň poskytují ochranu před UV zářením a útokem predátorů a patogenů [7-10].

Pro své antioxidační a antimikrobiální účinky jsou tyto látky dlouhodobým předmětem intenzivního studia s ohledem na využití v medicíně. Již od 12-tého století se využívalo terapeutických vlastností těchto látek [11]. Jsou předem zájmu a studia pro své pozitivní účinky pro lidské zdraví a to především v prevenci rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění a neurodegenerativních onemocnění [12-17]. Tyto látky jsou silnými antioxidanty, které ve spojení s vitamíny a enzymy chrání před oxidativním stresem způsobeným volnými kyslíkovými radikály (ROS). Antioxidační aktivita flavonoidů je ovlivněna chemickou strukturou, hydrofobicitou, a biologickou aktivitou [18]. Obecně platí, čím více hydroxylových skupin je navázaných na B-kruhu, tím vyšší je antioxidační aktivita a zároveň s vyšším počtem navázaných cukerných jednotek na flavanovou jednotku klesá antioxidační aktivita flavonoidu [7,18-20]. Tato vlastnost je úzce spojena s průchodem přes buněčnou membránu a následně tak se samotným metabolismem těchto látek. Různá resorbce flavonoidů je ovlivněna jejich hydrofilností a rozdílnou velikostí molekuly. Průchod přes buněčnou membránu je důležitým parametrem pro biotransformační pochody xenobiotik v lidském organismu [8,15,21].

2.1.2. Výskyt

Flavonoidy můžeme nalézt v různých částech rostliny, nejčastěji v plodech, květech, listech, ale i v kořenech a semenech. Jejich obsah závisí na teplotě, intenzitě světla přítomnosti vody, dusíku, fosforu a dalších látek při růstu rostliny [9].

Flavonoidy se rozdělují do jednotlivých skupin na:

- Aurony
- Anthokyaniny
- Flavanoly
- Flavanony
- Flavonoly
- Flavony
- Chalkony
- Isoflavonoidy
- Stilbeny
- Taniny

Účinky flavonoidů na lidský organismus je obtížné hodnotit, protože obsah a zastoupení flavonoidů v potravě a stravovací návyky každého jedince jsou velmi rozmanité. Tyto faktory jsou závislé nejen na věkovém rozmezí, ale jsou ovlivněny také společenskými a geografickými faktory. Jeden z prvních pokusů o průměrný odhad denního příjmu flavonoidů ve stravě byl v literatuře popsán již v roce 1976. Kuhnau stanovil tuto hodnotu na 1g (flavonoidů v glykosylovaných formách) na den, což představuje přibližně 170 mg aglykonů na den [10]. Jedna z dalších studií byla provedena v letech 1987-1988 v Holandsku a účastnilo se jí 4112 dospělých osob. Průměrná denní dávka na jednoho dospělého člověka byla stanovena na 23 mg aglykonů flavonoidů. Jako nejvíce zastoupený flavonoid v potravě byl uveden kvercetin (16 mg/den) a mezi hlavními zdroji flavonoidů v denním příjmu byl uveden čaj (48% z celkové příjmu flavonoidů), cibule (29% z celkové příjmu flavonoidů) a jablka (7% z celkové příjmu flavonoidů) [22].

Velké množství flavonoidů je také přítomno v bobulovitých rostlinách jako brusinky, borůvky atd. Předmětem studia v této práci jsou plody zimolezu kamčatského (*Lonicera caerulea var kamtschatica*). Její plody jsou jedlé. Chemické složení zimolezu je velmi pestré a dává předpoklad možného využití v medicíně. Význam a výzkum těchto látek je však především z důvodů využití v medicíně. Vysoký obsah flavonoidů v plodech zimolezu, vysoký výtěžek plodů při sklizni a relativní nenáročnost na pěstování (rostlina přežívá při velmi nízkých teplotách až -46°C) jsou hlavními důvody pro jeho využití v doplňcích potravin [23].

2.1.3 Význam

Je dobře známo, že lidé žijící ve Francii trpí relativně nízkým výskytem akutních srdečních příhod, navzdory jejich jídelníčku bohatého na nasycené tuky. Tento fenomén nazývaný Francouzský paradox poprvé odborně popsal irský lékař Samuel Black v roce 1819 [24]. Průměrný Francouz zkonsumoval denně 108 g živočišných tuků, zatímco průměrný Američan zkonsumoval přibližně o 50% méně. Přesto byly počty úmrtí z důvodů akutních srdečních příhod ve Francii mnohem nižší. Zdá se, že primárním důvodem tohoto paradoxu je vysoká spotřeba červeného vína ve Francii. Jeho příčiny a důsledky jsou i nadále předmětem mnoha polemik a studií [25-27].

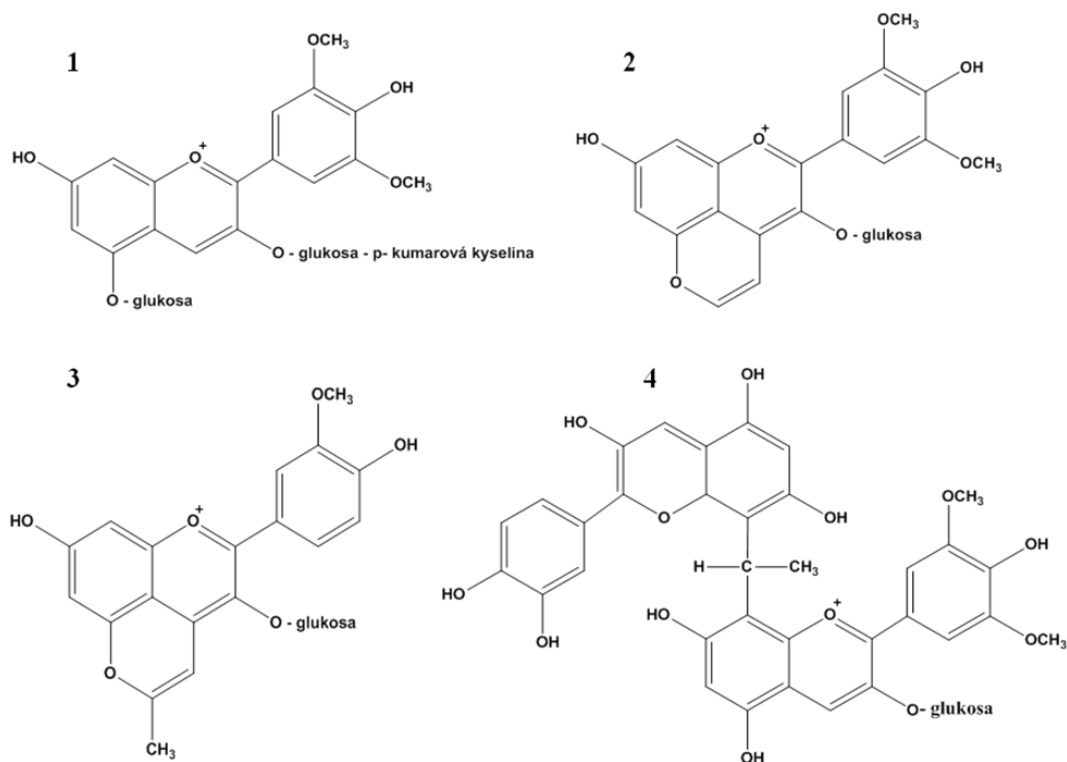
Prospěšné působení flavonoidů na organismus je spojeno s jejich antioxidačními vlastnostmi [11,28]. Při studiu vlivu flavonoidů na červené krvinky v lidském organismu bylo dokázáno, že kvercetin má značnou schopnost snižovat hemolýzu ochrannou buněčné

membrány erytrocytů před peroxidací lipidů [29]. Jak již bylo naznačeno, jedním z hlavních problémů využití flavonoidů v potravinářství i medicíně je jejich malá stabilita při zvýšení pH, teploty, přítomnosti světla a oxidačních činidel apod. Působením těchto vlivů může docházet ke strukturním změnám flavonoidů. Typickým příkladem ve skupině anthokyaninů je práce autorů Romero a Bakker. Zde autoři popisují, že působením teploty a přítomností dalších látek dochází ke kondenzační reakci mv-3-gl za vzniku vitisinu A [30]. V oblasti anthokyaninů existuje řada prací zabývajících se zvýšením stability anthokyaninových barviv jejich reakcí s některými malými reaktivními molekulami (kys. pyrohroznová, acetaldehyd, aceton a další). Touto reakcí dochází k určité změně barevného odstínu, avšak barevná intenzita produktů je vysoká. Dochází ke zvýšení stability zejména proti hydrolýze, oxidaci a působení oxidu siřičitého [31-33].

2.2 Kondenzované flavonoidy

Jak již bylo zmíněno, vznikají kondenzované flavonoidy zejména působením člověka (při jejich extrakci z rostlinného materiálu, při fermentaci v mošttech a vínech a při jejich zrání). S časem se tedy v rostlinných extraktech a potravinách zvyšuje obsah kondenzovaných barviv na úkor nativních anthokyaninů. Analytické sledování kondenzovaných barviv je tedy možno použít k také odhadu stáří vzorku (v praxi zejména u červených vín) [34,35]. Kondenzované pigmenty vznikají při výrobě a během zrání vína (klesá obsah volných anthokyaninů a taninových látek a dochází k jejich vzájemné kondenzaci) [31,35].

Kondenzace může probíhat různými způsoby za vzniku různě složitých pigmentů [5] (Obr. 2).



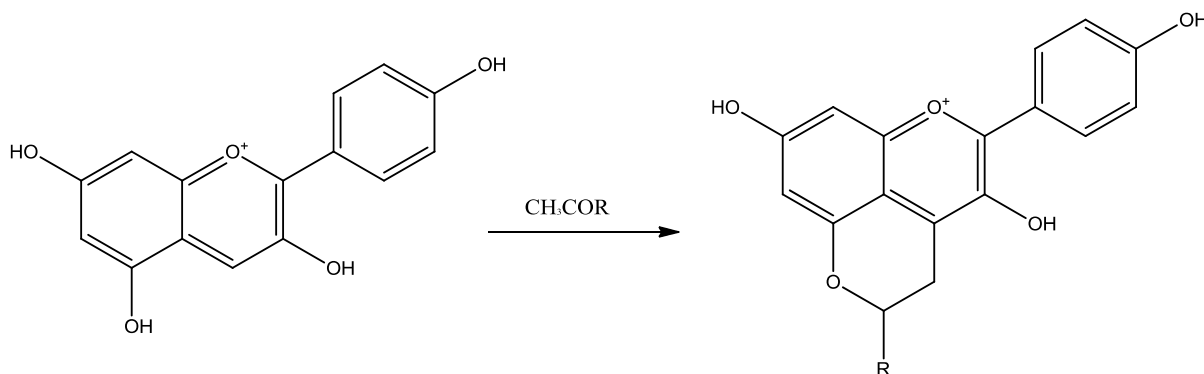
Obr. 2 Struktura pigmentu vznikajícího:

1. Navázáním kumarové kyseliny a dvou glukosových jednotek na malvidin – malvidin-3-(p-kumaryl)glukosid-5-glukosid
2. Cykloadicí malvidin-3-glukosidu s pyruvátém – vitisin B – pyranomalvidin-3-glukosid
3. Kondenzací peonidinu-3-glukosidu s acetonem – 5-methylpyranopeonidin-3-glukosid
4. Kondenzací malvidin-3-glukosidu s acetaldehydem a epikatechinem – malvidin-3-glukosid-8-vinylepicatechin

Jednotlivé pigmenty vznikající uvedenými reakcemi se mohou vyskytovat jako monomery, oligomery (několik kovalentně spojených flavonoidních jednotek) i polymery. Možnosti vzájemné kondenzace a „polymerace“ a vlastností vznikajících produktů jsou předmětem intenzivního studia [36-39].

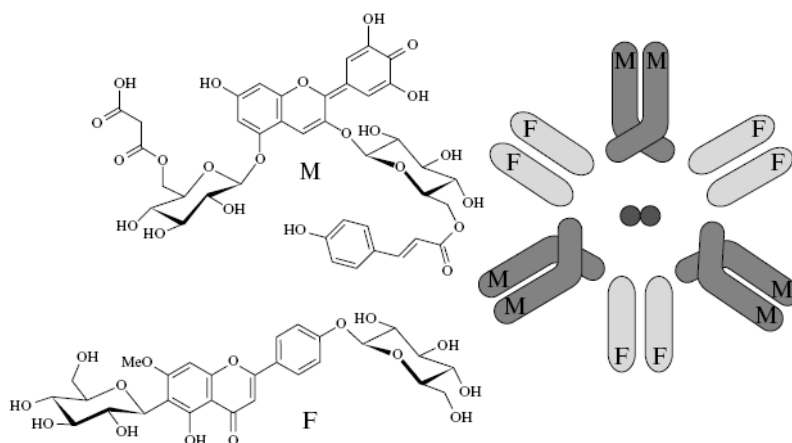
Pyroanthokyaniny, patřící mezi kondenzované anthokyaniny byly identifikovány jako produkty přirozené fermentace při zrání a stárnutí vína [40]. Tyto barviva se tak staly předmětem mnoha studií [41]. Leopoldini a kolektiv dokonce na základě na základě kvantově-chemických výpočtů udávají, že některé pyranoanthokyaniny mají vyšší

antioxidační kapacitu než samotné anthokyaniny. Obr. 3 ukazuje kondenzační reakci pelargonidinu s nízkomolekulárními aldehydy nebo ketony. Reaktivita těchto látek s jinými flavonoidy (katechin/epikatechin) je již popsána v literatuře. Tyto reakce jsou však studovány v komplexních extraktech z rostlinného materiálu [42,43].



Obr. 3 Kondenzační reakce pelargonidinu (v čisté a neglykosylované formě) s aldehydem (R= -H, -OH, -OCH₃)

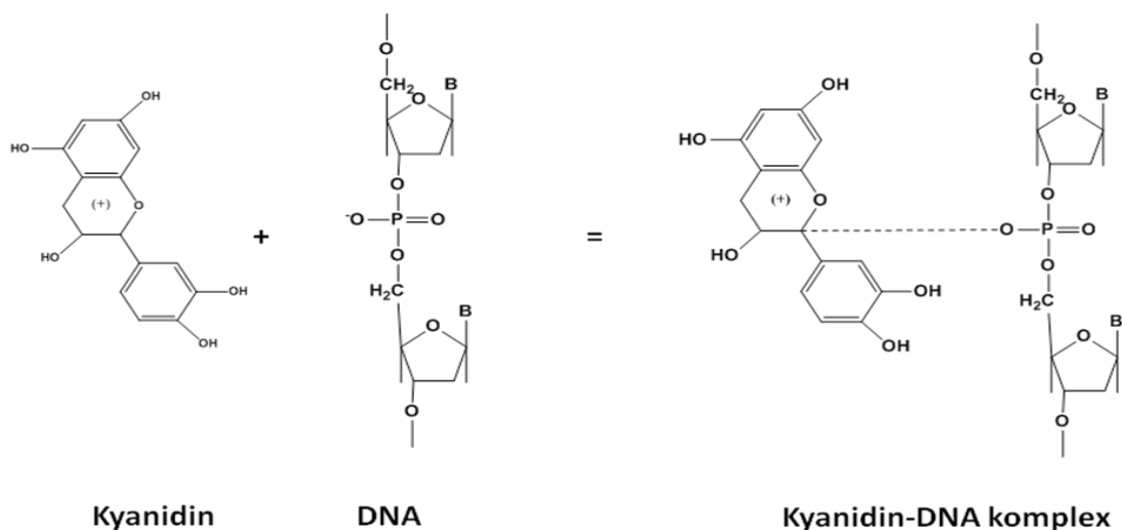
Složitější pigmenty se mohou vyskytovat nejen ve volné formě, ale také v podobě tzv. kopigmentů. Kopigmenty jsou komplexy anthokyaninových jednotek a flavanolových jednotek (často i v přítomnosti kovů) (Obr. 4). Jednotlivé jednotky jsou mezi sebou vázány nekovalentními interakcemi.



Obr. 4 Kopigmentace mezi 6 molekulami delphinidin-3-(6-p-kumarylglukosidu)-5-(6-malonylglukosidu) M a 6 molekulami flavonu F a dvěma atomy hořčíku [5]

Kopigmentace anthokyaninů s dalšími sloučeninami je hlavním mechanismem stabilizace barvy v rostlinách [14,44]. Komplexy anthokyaninů se strukturou *o*-difenolů s kovy (Al, K, Fe, Cu, Ca, Sn aj.) mohou stabilizovat barvu produktů, ale také způsobit nežádoucí změnu zbarvení. Například komplexy s cínem vznikající v konzervách mění červenou barvu plodů (např. jahod) na fialovou. Některé studie o stálosti barev v rostlinách také naznačují, že modrá barva plodů nebo květů rostlin je důsledkem vzniku komplexu mezi anthokyaniny a některými kovy, jako je Al, Fe, Cu a Sn, nebo Mg a Mo [44].

Při studiu reakcí anthokyaninů s DNA byl připraven komplex kyanidinu s DNA (Obr. 5). Bylo zjištěno, že tento komplex může chránit DNA před oxidativním poškozením, stabilizuje DNA a má tak velký význam pro rostliny, které jsou často vystavovány oxidativnímu stresu [45].



Obr. 5 Kompimentační komplex kyanidinu a DNA[45]

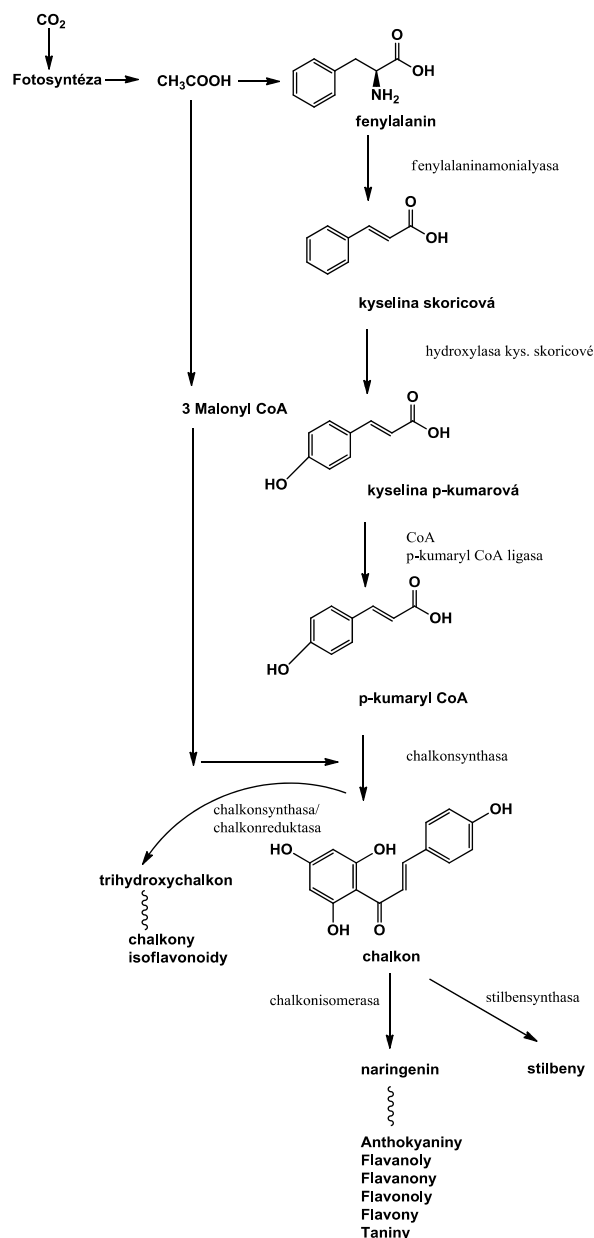
2.3 Metabolismus a biotransformace flavonoidů

V následujících kapitolách budou popsány děje související se vznikem a osudem flavonoidů v buňkách. Budou popsány jednak děje probíhající v rostlinných buňkách (biosyntéza) a jednak děje při interakci flavonoidů s živočišným organismem (vstřebávání, transport organismem, metabolizace a vylučování).

2.3.1 Biosyntéza

Samotná biosyntéza flavonoidů je situována v buněčné cytoplazmě a ovlivněna působením mnoha enzymů [4,46-48]. Výchozí látkou je kyselina octová, vzniklá při fotosyntéze, která se souborem enzymatických reakcí přeměňuje kumaryl CoA. První popis fenylypropanoidové cesty a působení enzymu fenylylamoniolyasy byl popsán již v roce 1961 [49]. Kumaryl CoA následně vstupuje do reakce s malonyl CoA a působením enzymu chalkonsythyasy vzniká základní stavební jednotka flavonoidů - chalkon. Sérií metabolických modifikací pak vznikají jednotlivé skupiny flavonoidů (Obr. 6). Působením chalkonisomerasy dochází k přeměně chalkonu na naringenin. Naringenin je výchozí sloučeninou biosyntézy pro flavanoly, flavanony, flavonoly, flavony a taniny. Syntéza anthokyaninů dále pokračuje přeměnou naringeninu na flavanon, poté na dihydroflavonol enzymem flavanon-3-hydroxylasou. Následuje redukce dihydroflavonolu na flavan-3,4-diol, katalyzovaná enzymem dihydroflavonol-3-reduktasou. Flavan-3,4-diol je poté oxidován, dehydratován a nakonec glykosylován až na anthokyanin [4].

Studiem biosyntézy flavonoidů, jednotlivých enzymů i genů se stále zabývá mnoho autorů [4,46,50-52].



Obr. 6 Schéma biosyntézy flavonoidů (převzato a upraveno z [4])

2.3.2 Interakce flavonoidů s lidským organismem

Procesy vstřebávání, metabolismu, distribuce v organismu a vylučování flavonoidů u člověka je dlouhodobě předmětem výzkumu v mnoha oborech [22,53-55]. Obecně, xenobiotika vstupují do lidského těla trávicím traktem (ústa, jícn, žaludek, střeva), respiračním systémem (epitely plic, nosní sliznice) a pokožkou. Biotransformace xenobiotik probíhá zejména v játrech a střevech, podílí se na nich ale i ledviny, plíce nebo kůže. Na buněčné úrovni je pak velmi důležitá průchodnost přes řadu buněčných membrán a to pasivní

(difuzí) nebo transportními procesy zprostředkovanými specifickými membránovými přenašeči. Konečné stádium biotransformace je vyloučení z organismu prostřednictvím moče, stolice nebo potu. V průběhu biotransformace obvykle dochází ke zvýšení polaritý xenobiotika, čímž se usnadňuje jeho exkrece. Vysoce polární látky však mohou organismem projít beze změny. Proces biotransformace v lidském organismu probíhá ve třech fázích [56].

Proces biotransformace v lidském organismu probíhá ve třech fázích [56]:

I. fáze biotransformace

V první fázi metabolismu dochází k přeměně substrátu na polárnější produkt. Toho lze dosáhnout odkrytím polární skupiny (např. dehydratací nebo demethylací) nebo zavedením jiné polární funkční skupiny do molekuly (např.: -OH, -NH₂, -SH, =CO, -COOH), či přeměnou méně polární skupiny na polárnější. V této fázi se uplatňují redoxní a hydrolytické reakce. Je-li metabolit dostatečně polární, může být snadno vyloučen z organismu. Méně polární produkty vstupují do fáze II.

II. fáze biotransformace

V druhé fázi dochází k interakci s konjugačním činidlem jako glycin, kyselina glukuronová, glutamin, glutathion, acetát nebo sulfát. Mezi enzymy účastníci se druhé fáze patří UDP-glukuronosyltransferáza, sulfotransferáza, glutathion-s-transferáza a N-acetyltransferáza. Nejvýznamnějším biodegradačním procesem druhé fáze je konjugace s kyselinou glukuronovou. Glukuronidace je katalyzována enzymem UDP-glukuronosyltransferázou (UGT), který je lokalizován na membráně endoplasmatického retikula a jádra vedle cytochromu 450 [57].

III. fáze biotransformace

Dříve byla biotransformace rozdělena pouze do dvou fází. S objevem membránových proteinů, které slouží jako přenašeče xenobiotik skrz buněčnou membránu, byla do procesu biotransformace zařazena třetí fáze. Tyto transportní proteiny se označují jako enzymy třetí fáze. Nejznámějším příkladem transmembránového proteinu je P-glykoprotein[58].

Nejvýznamnějším enzymovým systémem, který se podílí celkovém metabolismu xenobiotik jsou cytochromy P450 (CYP450) [59-61]. Cytochromy P450 jsou zapojeny v metabolismu široké řady léčiv a xenobiotik. CYP3A4 je dominantním enzymem v lidských játrech, kde je transkripčně regulován množstvím transkripčních faktorů a hormonů a je

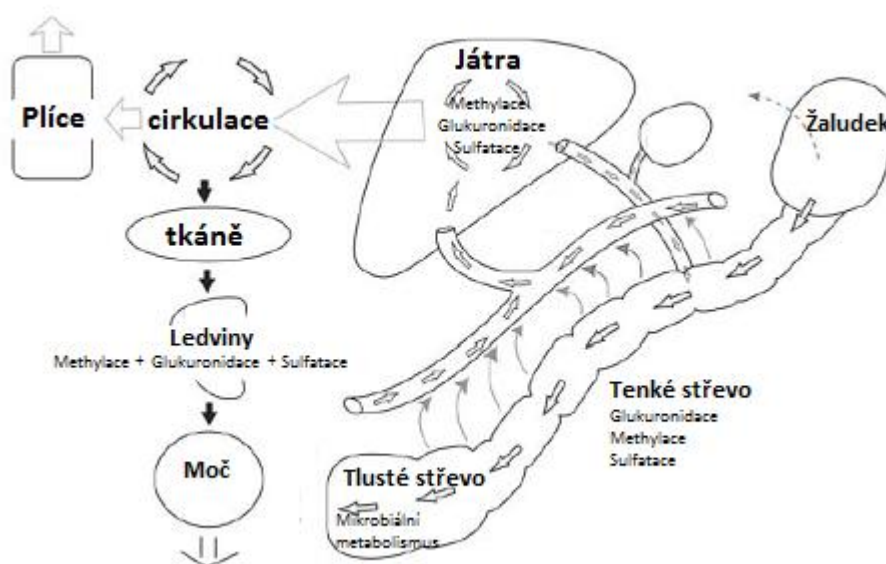
zapojen v metabolismu více než 50% klinicky užívaných léčiv. Stimulace látkami jako 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxinem (TCDD) či rifampicinem (RIF) vede k nárůstu množství enzymu a následně jeho katalytické aktivity. S ovlivněním katalytické aktivity cytochromů P450, zejména CYP3A4 je spojen fenomén mezilékových interakcí [23].

Nejčastější metabolické pochody v živočišném organismu jsou methylace, sulface a glukuronidace [62].

2.3.2.1 Metabolismus flavonoidů *in vivo*

Celkový metabolismus flavonoidů *in vivo* je ovlivněn souhrnem reakcí v lidském těle. Na začátku je velmi důležité v jaké formě potravy jsou flavonoidy do organismu přijímány. Chemické vlastnosti jako struktura, velikost, rozpustnost a přítomnost dalších látek ovlivňuje celkovou absorpci flavonoidů v těle. Za posledních 40 let bylo provedeno několik studií na odhalení a pochopení detailního metabolismu flavonoidů v lidském těle. Modelové studie byly provedeny a zkoumány nejčastěji na kvercetin[10,63]. V jedné z prvních studií byla podána dávka kvercetinu per orálně a intravenózně 6-ti dobrovolníkům a poté byla sledována přítomnost nemetabolizovaného kvercetinu v moči dobrovolníků [64]. Hollman a kol. provedl experiment dokazující, že k absorpci kvercetin-glukosidu probíhá ve střevech [65]. Tento fakt byl vysvětlen farmakokinetickou studií potvrzující zapojení Na⁺ dependetní glukózového ko-transporteru (SGLT1), přítomného ve střevech do metabolismu kvercetin-glukosidu [66]. Tato studie však poté byla vyvrácena a byl navrhnout nový mechanismus, který je založen na hydrolyze glukosové jednotky pomocí enzymu laktasa-phloridzin hydrolasa (LPH) a β-glukosidasou na povrchu klkovitých výběžků střeva [67]. Volný aglykon pak jednoduše prochází pasivní difúzí membránou střeva. Tento mechanismus byl potvrzen pro většinu flavonoidů s navázanými rozdílnými cukernými jednotkami (glukosa, arabinosa, xylosa, galaktosa rhamnosa atd.)[68]. Popsaný mechanismus měl však své omezení. Například kyanidin a delphinidin-3-glukosid nepodléhali hydrolyze a zůstávaly nezměněny. Tento fakt autoři vysvětlují tak, že anthokyaniny ky a dp-3gl nejsou vhodným substrátem pro LPH enzym. Dalším parametrem ovlivňujícím metabolismus flavonoidů v lidském organismu je množství a typ navázaných cukerných jednotek na aglykon. Kvercetin-rutinosid byl absorbován pouze z 20-ti% v porovnání s kvercetin-glukosidem [66]. Další studie doplňují, že se na metabolismu flavonoidů podílí i žaludek, kde dochází k částečné absorpci [69]. Celkový pohled na metabolismus flavonoidů v lidském organismu je tedy velmi složitý a skládá se ze celého systému biotransformačních reakcí v celém těle (Obr. 7). Jejich detailní pochopení

je cílem mnoha studií. Výstupním biologickým materiálem pro analýzu metabolitů flavonoidů *in vivo* je nejčastěji moč. V ní byly pak nejčastěji nalezeny metabolity methylované, sulfatované a glukuronidy flavonoidů [63,70,71]. Glukuronidová konjugace je nejčastější biotransformační proces flavonoidů v lidském organismu [72-74]. Glukuronidace je reakce katalyzována enzymem UDP-glukuronosyltransferasou, který je přítomen ve velkém množství v játrech, střevech a ledvinách [62]. Druhou nejčastější biotransformační reakcí je pak methylace, která je řízena skupinou enzymů methyltransferas přítomných především v tkáních jater a ledvin [75,76]. Všeobecně lze říci, že *in vivo* experimenty popisují současně celý metabolický proces. Pro detailní poznání jednotlivých částí tohoto procesu je obvykle třeba doplnit výzkum *in vitro* experimentem s jedním izolovaným typem buněk (ev. jedním typem tkáně nebo jedním orgánem).



Obr. 7 Souhrnný pohled na biotransformační procesy flavonoidů v lidském těle [62]

2.3.2.2 Metabolismus flavonoidů *in vitro*

Mnohé *in vitro* experimenty pomohly k detailnímu popsání jednotlivých biotransformačních pochodů flavonoidů v lidském těle [77-80]. Experimenty s HepG2 buňkami lokalizovaly proces glukuronidace, methylace a sulfatace kvercetinu v tenkém střevě [78]. Vacek a kolektiv provedli *in vitro* experiment metabolismu flavonoidů s lidskými

jaterními buňkami na kvercetin, rutin a isokvercitrin. I zde byly nalezeny hlavní metabolické dráhy jako metylace, sulfatace i glukuronidace [79].

V metabolismu flavonoidů je významná přítomnost střevních bakterií, která umožňuje štěpení cukerných jednotek (s pomocí enzymů β -glukosidasy, β -glukuronidasy) za vzniku aglykonů. Vzniklé aglykony jsou v dalších procesech štěpeny až na fenolické kyseliny. Fenolické kyseliny jsou vůči další degradaci střevní mikroflórou poměrně odolné. Kromě glukosidů může střevní mikroflóra hydrolyzovat také glukuronidy, sulfáty, amidy, estery a laktony (vnitřní cyklické estery). V přítomnosti střevní mikroflóry snadno dochází k štěpení kruhů (v případě degradace flavonoidu na fenolickou kyselinu), dekarboxylaci, demethylaci a dehydroxylaci [62,81].

Extrakt z malin obsahující směs polyfenolů (s bohatým zastoupením kyseliny elagové) byl testován na maligní linii buněk karcinomu tlustého střeva LS174 a na mononukleárních buňkách imunitního systému. Účinkem extraktu se významně snížil počet nádorových buněk oproti stejným buňkám v kultivačním médiu. Antiproliferativní vlastnosti na nádorové buňky přímo úměrně závisely na obsahu polyfenolů v extraktu [82]. Flavonoidy významně ovlivňují životní cyklus buňky. Autoři Kang a Liang ve své *in vitro* studii již z roku 1997 poukazují na schopnost kvercetinu inhibovat růst lidských buněk HL-60 zodpovědných za promyelocytární leukémii. Kvercetin vykazoval účinky na buněčný cyklus, aktivitu proteinkinázy C, tyrosin protein kinázy a produkci fosfoinositidu u nádorových buněk [83].

2.4 Analytické metody pro studium flavonoidů a jejich produktů (bio)transformace

Analytické studium biotransformačních produktů flavonoidů je důležitým článkem sloužící k popsání metabolismu těchto látek. Jedním z prvních popsáných pokusů o detailní vysvětlení metabolismu flavonoidů byl experiment provedený v roce 1966 na guinejských prasatech. Prasata byla krmena speciální směsí obsahující flavonoidy. V jejich moči byly pak identifikovány pomocí papírové chromatografie 4'-hydroxyflavon, 3',4'-dihydroxyflavon a kyselina salicylová [84].

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií je nejvíce používanou technikou pro studium metabolitů [34,79,85]. Metabolický profil taxifolinu, 3-O-galloylkvercetinu a 7-O-galloyltaxifolinu v lidských hepatocytech byl detailně popsán pomocí UPLC a ionizace elektrosprejem v negativním módu a s využitím hmotnostního analyzátoru Q-TOF [79]. LC-MS/MS s ionizací elektrosprejem v negativním módu a využitím trojitého

kvadrupólu byla použita pro farmakokinetickou studii metabolických přeměn rutinu, isokvercetin, astragalinu, kvercetin a isorhamnetin v moči krys při *in vivo* studii [86].

Kapilární elektroforéza s elektrochemickou detekcí byla také použita k analýze metabolismu flavonoidů (naringenin, rutin, kvercetin) v exkrementech krys při *in vivo* studii. Touto technikou však bylo studováno pouze množství nezmetabolizovaných flavonoidů nikoliv identifikace vzniklých metabolitů [87].

NMR spektroskopie je analytickou metodou využívanou ke sledování metabolických pochodů xenobiotik. Tato technika umožňuje strukturní analýzu metabolitů a popsání mezilékových interakcí v organismu [88,89]. An a kol. provedli *in vivo* experiment na krysách, kdy orálně aplikovali kvercetin (40 mg/kg váhy) a získané metabolity v moči analyzovali metodou ¹H NMR a HPLC-MS [90]. NMR technika zde umožňovala popsat biochemické změny vznikající během metabolizace sledováním přítomnosti meziproduktů Krebsova cyklu (citrátu, sukcinátu a 2-oxoglutarátu) v závislosti na čase po aplikaci kvercetin. Methylace, sulfatace a glukuronidace kvercetin byla identifikována v moči krys pomocí HPLC/MS.

Pro metabolické studie flavonoidů se stále nejvíce používá spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, která umožňuje detailní identifikaci metabolitů i v malém množství vzorku [91].

3. Cíle práce

Disertační práce se zabývá studiem vzniku, vlastností a procesu biotransformace vybraných barviv odvozených od anthokyaninů. Cíle práce je možno shrnout do následujících bodů:

- Analýza anthokyaninů, pyranoanthokyaninů a dalších složitějších pigmentů v rostlinných extraktech (plody zimolezu kamčatského)
- Studium analytických vlastností vybraných pyranoanthokyaninů
- Studium *in vitro* biotransformace vybraných pigmentů střevními a jaterními buňkami
 - provedení biotransformačních experimentů
 - analýza vzniklých metabolitů metodou UHPLC/MS²

4. Experimentální část

4.1 Chemikálie

4.1.1 Chemikálie používané při studiu plodů zimolezu kamčatského

Anthokyaniny (pelargonidin chlorid, kvercetin chlorid, kyanidin-3-galaktosid chlorid, kyanidin-3,5-diglukosid chlorid), všechny p.a., byly zakoupeny u firmy Carl-Roth (Karlsruhe, Německo). Použitý methanol, ethanol, aceton a acetonitril, gradient grade, byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Kyselina chlorovodíková, p.a. byla zakoupena u firmy Lachema (Brno, ČR). Trifluoroctová, mravenčí, octová kyselina a deuterovaný aceton (d_6) byly zakoupeny ve firmě Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Kolona pro frakcionaci barviv byla plněna Sephadexem LH-20 (1400 x 25mm (ID), velikost částic 25-100 μm) (Sigma, USA).

4.1.2 Chemikálie použité při metabolické studii

Standardy flavonoidů (pelargonidin chlorid a kvercetin chlorid) byly zakoupeny u firmy CARL-ROTH (Karlsruhe, Německo). Použité standardy měly čistotu p.a. Methanol, aceton a acetonitril použité pro přípravu mobilních fází byl pořízen od firmy Merck (Darmstadt, Německo) měly čistotu gradient grade. Kyselina chlorovodíková p. a. byla zakoupena u firmy Lachema (Brno, ČR). Dimethylsulfoxid (DMSO), rifampicin (RIF) a kultivační média byly zakoupeny ve firmě Sigma-Aldrich (Praha, ČR). 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) byl dodán firmou Ultra Scientific (Rhode Island, USA). Kyselina octová a fosfátový pufr (PBS) byl zakoupen u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

4.2 Příprava extraktů zimolezu kamčatského

Použité plody zimolezu kamčatského (*Lonicera caerulea var kamtschatica*) byly získány ze sklizně v roce 2006 až 2007 v Lipníku nad Bečvou. Extrakty byly připraveny v Ústavu lékařské biochemie a chemie Univerzity Palackého v Olomouci (1.) a v Laboratoři biotransformací, Mikrobiologického ústavu Akademie Věd České republiky (2.) následujícími postupy:

1. Zmrzlé plody zimolezu (4,84 kg) byly extrahovány vodným roztokem 0,1% kyseliny fosforečné při teplotě 50°C po dobu 14 hodin. Získaný první extrakt byl přečištěn na koloně plněné materiálem Sepabeads SP 207 (styren-divinylbenzenový kopolymer). Kolona byla promyta deionizovanou vodou, fenolické látky byly poté vymyty ethanolem a zkoncentrovány odpařením. Bylo získáno 20,3 g fenolické frakce (označení frakce: LCPF) [23].

2. Plody zimolezu byly po transportu do laboratoře lyofilizovány v argonové atmosféře při -25°C a při této teplotě uskladněny pro další experimenty. Extrahovatelnost složek plodů byla testována extrakcí 4 různými rozpouštědly (methanol, aceton, ethanol, voda). Plody byly před vlastní extrakcí manuálně rozdrceny a kapalná fáze odfiltrována na filtrech Filtrak 388. Získané filtráty byly odpařeny při 40 °C a následně znovu lyofilizovány a uskladněny při -25 °C pro následnou preparativní frakcionaci.

Takto byly připraveny surové extrakty s označením A – G. Složení jednotlivých extrakčních činidel ukazuje tabulka 1.

Tabulka 1 – extrakce anthokyaninů z plodů zimolezu kamčatského

Extrakční rozpouštědlo	Váha vzorku ^a (g)	Výtěžnost ^b (%)	Extrakční podmínky
A: 50% Methanol / 50% Aceton / 0.1 % H ₃ PO ₄ (v/v)	50.5	6,1	
B: 100% Methanol / 0.1 % H ₃ PO ₄ (v/v)	50.9	8,1	
C: 100% Aceton / 0.1 % H ₃ PO ₄ (v/v)	50.9	0,7	
D: 100% Ethanol / 0.1 % H ₃ PO ₄ (v/v)	49,3	5,8	
E: 80% Ethanol / 20% H ₂ O / 0.1 % H ₃ PO ₄ (v/v/v)	50,4	9,6	
F: 80% Methanol / 20% H ₂ O / 0.1 % H ₃ PO ₄ (v/v/v)	5,2	8,8	3 x 200 ml extrakčního rozpouštědla, doba extrakce 60 min, při pokojové teplotě a bez přístupu světla, v Ar atmosféře
G: 80% Aceton / 20% H ₂ O / 0.1 % H ₃ PO ₄ (v/v)	5,0	6,1	3 x 20 ml extrakčního rozpouštědla, doba extrakce 60 min, při pokojové teplotě a bez přístupu světla, v Ar atmosféře

^a množství lyofilizovaných plodů použitých pro extrakci

^b výtěžek extrakce po odstranění extrakčního rozpouštědla a zbytku plodů

Frakcionace byla provedena s každým surovým extraktem zvlášť. Z lyofilizovaných pevných zbytků po extrakci bylo odváženo určité množství (A-76 mg, B-80 mg, C-78 mg, D-94 mg) a toto množství bylo rozpuštěno v 0,5 ml methanolu (extrakty A, B), ve směsi methanol:aceton, 1:1 (extrakt C) a v deionizované vodě (extrakt D). Extrakty (A-C) byly rozpuštěny a poté nadávkovány na skleněnou kolonu (1400 × 25 mm i.d.) plněnou sorbentem Sephadex LH-20 (Sigma, USA). Jako mobilní fáze byl použit methanol. Mobilní fáze protékala kolonou průtokem 1,45 ml/min (sloupcová chromatografie), jednotlivé frakce byly sbírány po 8 minutách až do vymytí všech barevných podílů z kolony. Eluce kontrolována UV detekcí při 280 nm. Oddělené frakce byly vysušeny pod vakuem a uskladněny při -25 °C pro další analýzu. Pro extrakt D byl volen jiný frakcionační postup. Materiál rozpuštěný ve vodě byl nadávkován na skleněnou kolonu (930 × 25mm i.d.) plněnou Sephadexem LH-20 (Sigma, USA). Jako mobilní fáze byl použit ethanol 80/20 ve vodě (v/v) při průtoku 0,5 ml/min. Jednotlivé frakce byly sbírány po 16 min až do vymytí všech barevných podílů z kolony. Kontrola eluce byla opět prováděna UV detektorem při 280 nm. Na základě hodnot absorbance při frakcionacích byly vybrány frakce, které byly detailně analyzovány pomocí μ LC/MS.

4.3 Příprava 5-methylpyranopelargonidinu (5-MePPI)

3,21 mg pelargonidin chloridu bylo rozpuštěno v 5 ml směsi acetonu a methanolu (1:1, v/v) okyselené 5% kyselinou mravenčí. Po kompletním rozpuštění pl-chloridu byla reakční směs ponechána v temnu při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin. Rozpouštědlo bylo následně ze vzorku odfoukáno jemným proudem dusíku při 40°C s využitím přístroje TurboVap (Biotage, Charlotte, USA) a získaný materiál byl zamražen pro další experimenty.

4.4 Buněčné linie

Pro *in vitro* metabolizační experimenty byly použity nádorové buněčné linie HepG2 (jaterní) a LS174T (střevní), které byly pořízeny z Evropské kolekce buněčných kultur ECACC (European Collection of Cell Cultures) a poté kultivovány v laboratoři dle doporučení dodavatele. Na buněčné linie HepG2 ($2,5 \times 10^5$ buněk/ml) a LS174T ($1,5 \times 10^5$ buněk/ml) byly nasazeny studované látky (pelargonidin, 5-MePPI a kvercetin) o koncentraci 100 μ mol/l. Jednotlivé kultury byly ponechány v kultivačním inkubátoru při 37°C a v přítomnosti 5% CO₂. 50 μ l média bylo sbíráno v časových intervalech po 1 hodině, 2 hodinách a 24 hodinách kultivace. Aktivátory metabolismu TCCD a RIF o koncentraci

5nmol/l v DMSO (0,1% v/v) byly přidány do buněčných linií HepG2 pro příslušné experimenty.

Po 24 hodinách kultivace a odebrání zbytku kultivačního média, byly buněčné linie 3 krát promyty pomocí roztoku fosfátového pufru (PBS). Získané buňky byly poté centrifugovány (14000 x g) po dobu 2 minut. Supernatanty byly odebrány a získané pelety (buněčné sedimenty) byly resuspendovány v 200 µl methanolu okyseleného 5% (v/v) kyselinou octovou a homogenizovány v ultrazvukové lázni chlazené ledem po dobu 30 min pro narušení buněčné membrány a převedení metabolitů do roztoku.

Odebrané vzorky médií byly smíchány s 50 µl methanolu okyseleného 5% (v/v) kyselinou octovou, poté centrifugovány (14000 x g) po dobu 2 minut a získané supernatanty byly analyzovány pomocí UHPLC/MS. Vzorky pelet po destrukci buněčné membrány znovu centrifugovány (14000 x g) po dobu 2 minut a odebrané supernatanty byly analyzovány stejnou metodou, jako vzorky médií odebírané během metabolizace.

Jako kontroly byly použity i) základní roztoky standardů (kvercetin, pelargonidin, 5-MePpI) v kultivačních médiích, ii) médium neobsahující sledované flavonoidy a iii) pelety buněk bez přítomnosti flavonoidů získané při identických experimentálních podmínkách jako reálné vzorky flavonoidů.

4.5 Přístroje a experimentální podmínky

4.5.1 Přístroje a postupy pro chromatografickou prefrakcionaci a následnou µLC/MS analýzu plodů zimolezu kamčatského

Pro frakcionaci LCPF frakce (příprava viz. experimentální část kapitola 4.2) byl použit semipreparativní chromatograf od firmy Knauer (Berlín, Německo) s UV detekcí. Byla použita kolona Gemini C18 od firmy Phenomenex, USA (150 mm x 10 mm, $d_p=5\ \mu\text{m}$). Mobilní fáze A byla tvořena 5% vodným roztokem acetonitrilu okyseleným 0,12 % kys. trifluoroctovou (v/v/v) . Mobilní fáze B byla tvořena acetonitrem okyseleným 0,12 % kys. trifluoroctovou (v/v). Byla použita gradientová eluce s profilem gradientu: 0-15 min 5% B, 15-25 min 5-10% B, 25-35 min 10-20% B, 35-40 min 20-50% B, 40-55 min 50-100% B, 55–56 100-5 % B, 56-60 min 5% B, 60-70 min 100% B, průtokem 5 ml/min. Doba analýzy odpovídala 70 min. Dávkováno bylo 100 µl extraktu (přeplňování dávkovací smyčky o velikosti 100 µl, full loop technika). Získané frakce byly lyofilizovány a zamraženy (-80°C) pro následnou analýzu µLC/MS.

LCPF frakce a frakce extraktů získané preparací na koloně plněné Sephadexem LH-20 byly rozpuštěny v mobilní fázi A (deionizovaná voda okyselená 0,12 % kys. trifluoroctovou + 5% acetonitrilu, v/v/v). Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí μ LC ve spojení s hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem (Q-TOF, Premier, Waters). Byla použita binární gradientová eluce. Byly použity stejné mobilní fáze jako pro semipreparativní chromatografii. Byl použit následující profil gradientu: 0-5 min 10% B, 5-10 min 10-20%, 10-30 min 20-30% B, 30-40 min 30-50% B, 40-50 min 50-70% B, 50-55 min 70% B, 55-60 min 70-100% B, 60-70 min 100% B, 70-70,5 min 100-10% B, 70,5-75 min 10% B, průtok 5 μ l/min. Doba analýzy byla 75 min. Byly nastaveny následující parametry hmotnostního spektrometru: sprejovací napětí +3,2 kV, průtok zmlžovacího plynu 350 l/hod, teplota iontového zdroje 120°C a desolvačního plynu 300°C.

Jednotlivé frakce obsahující strukturně zajímavá barviva byly rovněž analyzovány přímým zaváděním roztoku vzorků do iontového zdroje (průtok 7 μ l/min, sprejovací napětí +2,5 kV, průtok zmlžovacího plynu 100 l/hod, teplota iontového zdroje 150°C a desolvačního plynu 150°C).

Procesy probíhající při fragmentaci analytů (5-MePPI a frakcionovaných barviv) po kolizích indukované disociaci byly dále studovány na hmotnostním spektrometru LCQ MAT (Finnigan, San Jose, CA, USA) s ionizací elektrosprejem a analyzátozem typu iontové pasti. Bylo použito přímého zavádění vzorku do iontového zdroje – průtok 10 μ l/min, teplota vyhřívání kapiláry 200°C, sprejovací napětí +5,6 kV, průtok zmlžovacího plynu 40 arbitrary units. Nastavení iontové optiky bylo laděno na methanolický roztok malvidin-3-glukosidu (10mg/l). Identifikace barviv byla provedena na základě m/z rodičovského iontu a fragmentace po kolizích indukované disociaci v iontové pasti (MS/MS, normalizovaná kolizní energie 60%).

4.5.2 UHPLC/MS pro analýzu metabolitů flavonoidů

Pro analýzu metabolitů byl použit ultraúčinný kapalinový chromatograf Waters Aquity UPLC (Waters, Milford, USA) s PDA detektorem. Byla použita kolona Aquity BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, $d_p=1,7 \mu$ m, 130Å). Pro stanovení a identifikaci metabolitů byl chromatografický systém připojen k hmotnostnímu spektrometru Q-TOF (Waters) s ionizací elektrosprejem. Ionizace elektrosprejem byly použity jak v pozitivním tak i v negativním módu. Použité mobilní fáze a podmínky pro experimenty UHPLC/MS v pozitivním ionizačním módu byly: složka A – destilovaná voda okyselená 5 % kys. mravenčí (v/v) a

složka B – acetonitril okyselený 5 % kys. mravenčí (v/v). Použitý profil gradientu: 0-8 min 95-15% A, 8-9 min 15-95% A, 9-10 min 95% A. Doba analýzy byla 10 min, průtok 0,4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Pro negativní ionizační mód: složka A – destilovaná voda okyselená 0,1 % kyselinou octovou (v/v), složka B – acetonitril. Doba analýzy 15 min, použitý profil gradientu: 0-3 min 100% A, 3-10 min 100-50% A, 10-13.5 min 50-100% A, 14-15 min 100% A a průtok 0,4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Experimentální parametry hmotnostního spektrometru: sprejovací napětí +3,2 kV (pozitivní mód) a +1,5 kV (negativní mód), průtok zmlžovacího plynu 450 l/hod, teplota iontového zdroje 120°C a desolvačního plynu 150°C. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík a jako kolizní plyn argon. Všechny experimenty MS^E byly provedeny střídáním skenu s malou kolizní energií (MS(1), CE=5eV) a sken při vyšší kolizní energii (MS(2) CE = 40eV nebo při využití rampy CE = 10 – 40eV) bez preselekcce iontů na kvadrupólu. V následných analýzách, pokud to citlivost dovolila, byla proměřena i MS/MS spektra.

4.6 Postupy vyhodnocení

Struktury metabolitů byly navrhnuty s využitím chemického software CS Chem Draw Ultra (Chemical Structure Drawing Standard, CambridgeSoft Corporation, USA) a programu Metabolynx (Waters Corporation (Milford, USA)).

Výpočet rozdělovacího koeficientu pro anthokyaniny (ClogP) byl proveden pomocí softwaru ChemBioDraw Ultra, (CambridgeSoft Corporation, USA).

5. Výsledky a diskuze

5.1. Studium polyfenolů přítomných v extraktech plodů zimolezu kamčatského

Předmětem studia byla analýza profilu anthokyaninů a jejich derivátů v přírodním materiálu a to plodech zimolezu kamčatského s podrobnějším zaměřením na kondenzované pigmenty.

5.1.1 Optimalizace extrakčních postupů

Jedním z nejdůležitějších kroků umožňujících získání přírodních látek v čisté podobě nebo jejich obohacení pro účely medicíny, potravinářství, ale i analytické chemie (příprava standardů) je jejich cílená extrakce z rostlinného materiálu. Klíčový je zde výběr extrakčního média [92]. Tabulka 2 ukazuje vliv různých extrakčních činidel na výtěžek extrakce anthokyaninů. Největší obsah anthokyaninů byl získán extrakcí okyseleným methanolem. Tyto výsledky přispívají ke známému faktu, že methanol je v oblasti flavonoidů pro řadu matric nejúčinnějším extrakčním médiem [93,94]. Extrakční účinnost se nepatrně snížila přidávkou vody k methanolu. Methanol je však pro lidský organismus nebezpečný a proto jeho využití jako extrakčního činidla v potravinářství či medicíně není žádoucí. Pro tyto účely byl zkoušen také ethanol. Zisk anthokyaninů byl však značně nižší (15% z extrahované části z extrakce okyseleným metanolem). Některé publikace uvádí, že extrakce barviv z rostlinných materiálů je nejúčinnější pomocí acetonu [95,96]. Byly tedy vyzkoušeny i extrakce pomocí acetonu a kombinace acetonu s vodou. Obě možnosti vykazovaly nižší účinnost než při použití methanolu. Na druhou stranu velmi dobrým extrakčním činidlem se jevila směs acetonu a methanolu 50:50. Zde však při kontaktu anthokyaninu s acetonem docházelo ve významném rozsahu ke kondenzační reakci za vzniku 5-methylpyranoanthokyaninů. Tvorba těchto látek je jedním z objektů zájmu této práce.

Množství identifikovaných anthokyaninů extrahovaných okyseleným metanolem je porovnatelné s množstvím nalezeným v extraktu LCPF (relativní rozdíl je 20,2 %, kdy větší množství bylo v extraktu LCPF) [97]. Oba postupy poskytují dobré extrakční účinnosti pro extrakci anthokyaninových barviv z plodů zimolezu kamčatského.

Tabulka 2 – množství anthokyaninů v extraktech plodů zimolezu kamčatského^{a,b}

Anthokyanin	m/z	(50:50)	100%	80%	100%	80%	100%	80%
		meoh:aceton (A)	methanol (B)	methanol (F)	aceton (C)	aceton (G)	ethanol (D)	ethanol (E)
kyanidin-3-hexosid	449	0,117	0,192	0,120	0,024	0,073	0,003	0,017
peonidin-3-hexosid	463	0,018	0,026	0,023	0	0,009	0,002	0,007
pelargonidin-3-hexosid	433	0,002	0,008	0,011	0	0	0	0
kyanidin-3-rutinosid	595	0,012	0,013	0,015	0	0,005	0,002	0,006
peonidin-3-rutinosid	609	0,006	0,008	0	0	0	0	0
kyanidin-3,5-dihexosid	611	0,008	0,007	0	0	0	0,002	0,007
peonidin-3,5-dihexosid	625	0	0	0	0	0	0	~0,0001
Celkem anthokyaninů		0,161	0,253	0,169	0,024	0,088	0,009	0,037
pyranoanthokyanin								
5-MePKy-3-hex	487	0,085	0	0	0	0,013	0	0
5-MePPe -3-hex	501	0,015	0	0	0	0	0	0
Celkem pyranoanthokyaninů		0,1	0	0	0	0,013	0	0
Celkem všech barviv		0,261	0,253	0,169	0,024	0,101	0,009	0,037

Všechny frakce byly měřeny třikrát; relativní směrodatná odchylka byla v rozmezí 0,0 – 13,6%.

a – všechny extrakční činidla obsahují 0.1% (v/v) kyseliny fosforečné

b – množství je udáváno v % (m/m) přepočteno na čerstvé plody

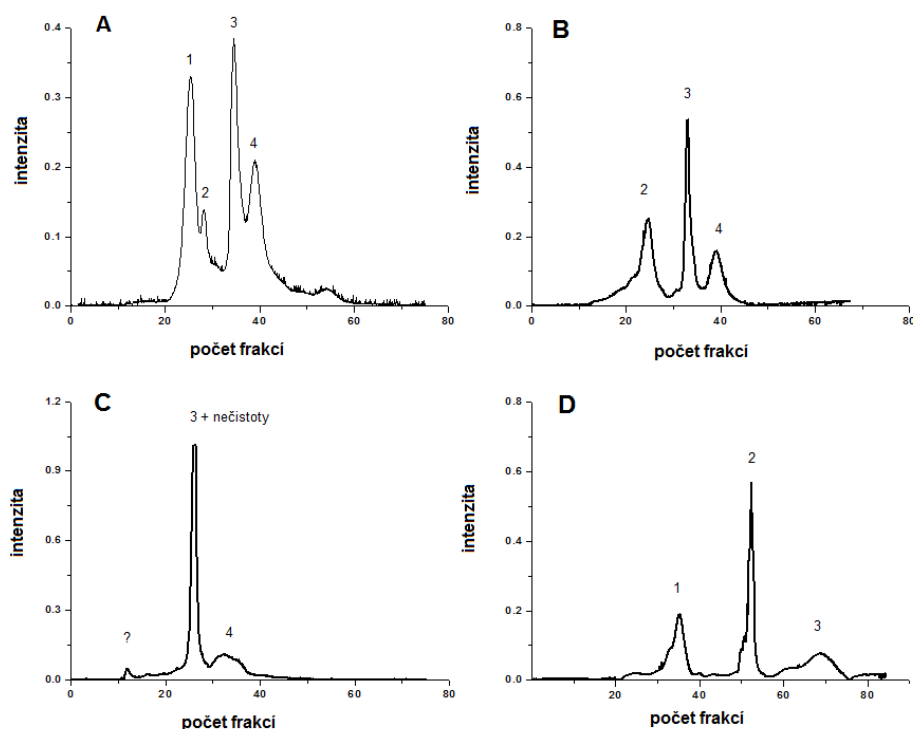
5.1.2 Hodnocení postupů frakcionace extraktů plodů zimolezu kamčatského

Po izolaci anthokyaninů ze získaného extraktu bylo třeba optimalizovat přečištění (frakcionaci). Pro preparativní část je možno použít několik stacionárních fází: reverzní fázi, Amberlite XAD-7 (neiontový makroporézní polymethakrylátový polymer), Toyopearl gel (hydroxymethakrylátový polymer) nebo Sephadex LH-20 (hydroxypropylovaný dextran) [98,99]. V rámci této studie byly pro účely identifikace a potenciálního využití extraktů v medicíně sledovány možnosti i) preparativní purifikace přítomných polyfenolů na fázi Sephadex LH-20 a ii) dvoustupňové semipreparativní separace založené na kombinaci

extrakce tuhou fází na polystyren-divinylbenzenovém kopolymeru a separace na reverzní fázi. V následujícím textu jsou diskutovány detaily obou postupů. Pro experimenty diskutované v této práci byl využit Sephadex LH-20. Obrázek 8 popisuje frakcionační proces při použití různých extrakčních činidel (UV detekce, $\lambda = 280$ nm). Při frakcionaci extraktu získaného extrakcí směsí aceton:methanol 50:50 byly získány 4 hlavní frakce (Obr. 8A). První pík obsahuje převážně pyranoanthokyaniny (pík 1). Anthokyaniny se dvěma cukernými jednotkami eluují jako druhý, ne úplně separovaný pík. Anthokyaniny s jednou cukernou jednotkou eluují ve dvou posledních pících (3 a 4). Zastoupení jednotlivých flavonoidů v získaných frakcích je diskutováno v dalších kapitolách. V chromatogramu methanolického extraktu pík s pyranoanthokyaniny prakticky zcela chybí (Obr. 8B). Eluční pořadí je shodné i v extraktech získaných extrakcí směsí aceton:methanol 1:1 (v/v), nicméně zde je pozorováno lepší rozlišení píku 3 a 4. Stejně eluční pořadí bylo pozorováno i po frakcionaci acetonového (Obr. 8C) a ethanolového (Obr. 8D) extraktu. Separace látek obsažených v ethanolovém extraktu je horší, a liší se i retenční časy. To může být způsobeno kompresí stacionární fáze během kontaktu s méně polárním rozpouštědlem. Chromatogram s acetonovým extraktem je také komplikovaný přítomností ko-extrahovaných nečistot (pík 3). Z těchto experimentů plynou i dva metodicky významné závěry: i) v použitém semipreparativním uspořádání je separace a chování stacionární fáze silně závislé na rozpouštědle, ve kterém je rozpuštěn vzorek; ii) aceton je rozpouštědlo reagující ve vysokém výtěžku s přítomnými anthokyaniny za tvorby odpovídajících 5-methylpyrano derivátů (jak bude ukázáno dále, vznikají analogické artefakty i při reakci s jinými flavonoidy). Z tohoto pohledu se jeví být použití acetonu pro získání nativních flavonoidů v praxi jako velmi problematické. Výsledky ale na druhou stranu předurčují aceton jako jednoduché činidlo pro syntézu pyranoanthokyaninů (pro účely přípravy standardů a potenciálně pro aplikace v potravinářství a dalších oborech). Separace na obrázku 8 je dosažena při použití čistého methanolu jako mobilní fáze pro extrakty A-C. Pro ethanolové extrakty byla použita mobilní fáze ethanol:voda (80:20, v/v). Toto řešení bylo zvoleno pro výzkum extrahovatelnosti a možností zakoncentrování polyfenolů netoxickým rozpouštědlem (pro potenciální využití ve farmacii a medicíně).

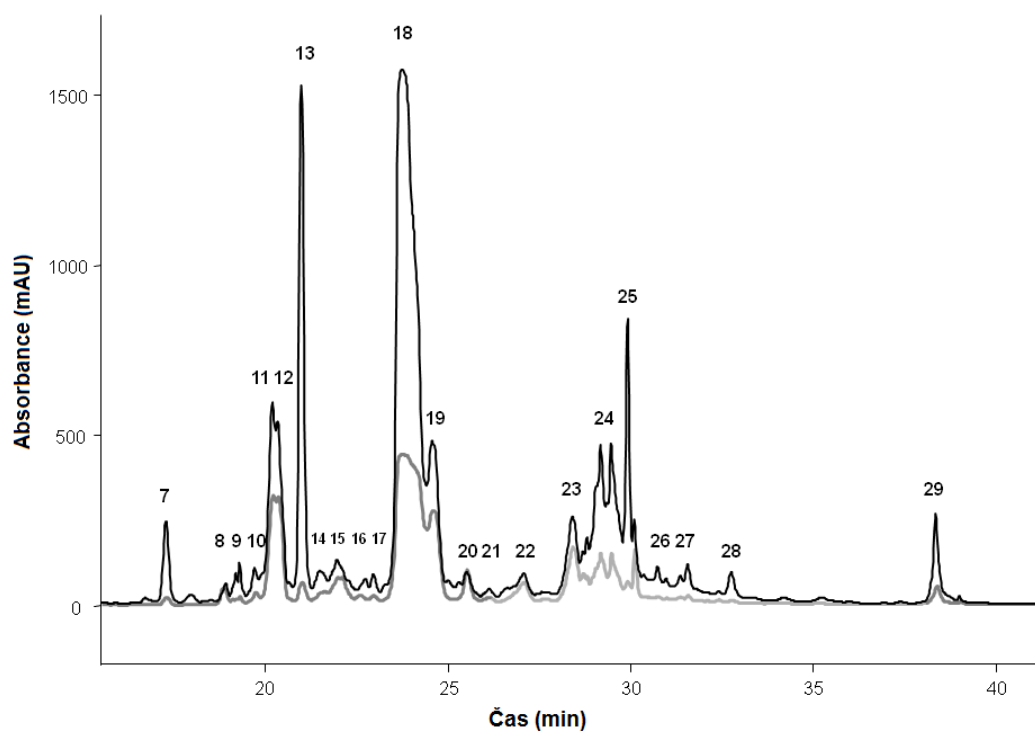
Eluční pořadí a separace anthokyaninových barviv na fázi Sephadex LH20 je zřejmě výsledkem působení více faktorů, zejména hydrofilních interakcí a zvýšené permeace malých molekul do stacionární fáze oproti molekulám větším. V literatuře zatím nebyly popsány podobné experimenty popisující hydrofobicitu anthokyaninů a pyranoanthokyaninů. Nicméně jednoduchým výpočtem rozdělovacích koeficientů (clogP) je možno hydrofilně-lipofilní

vlastnosti přibližně aproximovat. Pomocí programu Chem3D byly vypočteny hodnoty clogP 5-MePKy-3-gl, +1,8; Ky-3-gl, 0,0 a Ky-3,5-digl, -1,6. Z těchto hodnot je patrné, že přítomnost 4-kruhu a methylové skupiny u pyranoderivátů tedy vede k výraznému snížení polariry a můžeme tak vysvětlit kratší eluční čas oproti nativním glykosidům kyanidinu na polární stacionární fázi typu Sephadexu LH-20.



Obr. 8 Chromatogram extraktů zimolezu po frakcionaci na koloně plněné Sephadexem LH-20 (A – směs aceton-methanol; B – metanol; C – aceton; D – ethanol); $\lambda = 280\text{nm}$

Jak bylo již zmíněno výše, reverzní fáze je často používanou stacionární fází pro frakcionaci barviv z rostlinných materiálů. Předmětem naší studie bylo přečištění extraktu zimolezu použitím fáze Sepabeads SP 207 (styren-divinylbenzenový kopolymer, Porapak) (viz. experimentální část kapitola 4.2 LCPF extrakt) pro prepurifikaci a následné použití vysokotlaké semipreparativní frakcionace na reverzní fázi odolné i pro použití nízkých pH mobilních fází. Obrázek 9 ukazuje velmi dobrou separaci jednotlivých barviv při použití těchto frakcionačních podmínek. Získané frakce byly identifikovány metodou $\mu\text{LC/MS}$. V případě potřeby byly výsledky identifikace doplněny měřením MS^n spekter po přímé infuzi získaných frakcí do iontového zdroje (hmotnostní spektrometry s analyzátory typu iontové pasti a kombinace kvadrupól-detektor doby letu). Identifikovaná barviva jsou uvedena v tabulce 3.



Obr. 9 Semipreparativní frakcionace LCPF extraktu Lonicery na reverzní fázi (černá - $\lambda = 280$ nm; šedá – $\lambda = 505$ nm). Čísla jednotlivých píků odpovídají frakcím uvedeným v tabulce 3.

5.1.3 Identifikace barviv

Identifikace anthokyaninů byla založena na měření přesné a správné hmotnosti rodičovského iontu a fragmentů v MS a MS/MS spektrech, případně jejich nominálních hodnot ve spektrech vyšších řádů (Tabulka 3). Významnými doplňujícími informacemi byly retenční časy a profil UV/VIS spekter a rovněž informace z dostupné literatury.

Tabulka 3 – identifikovaná anthokyaninová barviva v LCPF

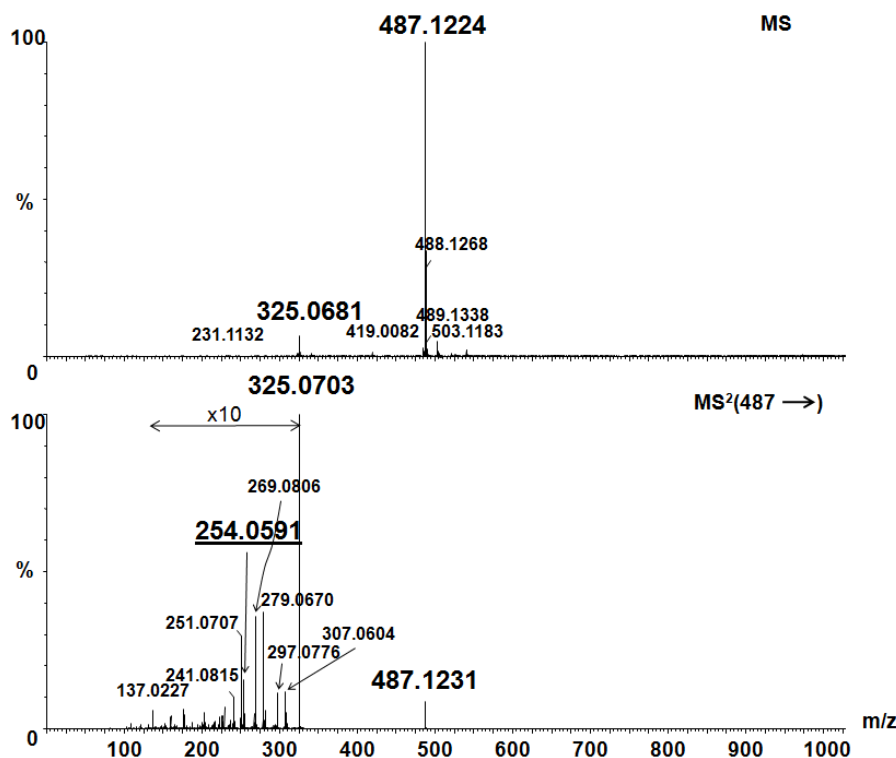
Frakce ^a	MS	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)	MS ²	název
9	611,1553	9,6	449, 287	kyanidin-3,5-dihexosid [97, 100]
10	611,1602	1,6	449, 287	kyanidin-3,5-dihexosid [97, 100]
	737,1677	5,6	575, 423, 287	kyanidin-3-hexosid(epi)katechin [101]
11	611,1609	0,5	449, 287	kyanidin-3,5-dihexosid [97, 100]
12	611,1610	0,3	449, 287	kyanidin-3,5-dihexosid [97, 100]
	625,1767	0,3	463, 301	peonidin-3,5-dihexosid [97, 101]
13	773,2135	0,6	627, 465, 303	kvercetin-methylpentosid-dihexosid
18	449,1083	0,2	287	kyanidin-3-hexosid [97, 101]
	897,2111	2,5	449, 287	dimer kyanidin-3-hexosid
	487,1224	3,3	325	5-methylpyranokyanidin-3-hexosid
	595,1663	0	449, 287	kyanidin-3-rutinosid [97]
19	595,1578	14,2	449, 287	kyanidin-pentosylhexosid ^b [97, 101]
23	463,1243	0,6	301	peonidin-3-hexosid [97, 101]
	609,1810	0,2	301	peonidin-3-rutinosid [97, 100]
	897,2019	7,8	735, 573	dimer kyanidin-3-hexosid
24	765,2038	0,9	603, 475, 313, 287	kyanidin-3-hexosid-vinyl-(epi)katechin
	897,2119	3,3	735,573,287	dimer kyanidin-3-hexosid
	597,1470	2,3	465, 303	kvercetin-pentosid-hexosid
	911,2513	10,6	749, 621, 313, 287	kyanidin-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)katechin
	465,1122	19,1	303	kvercetin-3-hexosid ^b [102]
	595,1540	20,6	449, 287	kyanidin-pentosylhexosid ^b [97, 101]
	611,1613	0,2	465, 303	kvercetin-3-rutinosid [102]
25	465,1032	0,2	303	kvercetin-3-hexosid [102]
	611,1613	0,2	465, 303	kvercetin-3-rutinosid [102]

^a číslo frakce odpovídá číslu píku v obrázku 9

^b navrhované struktury

- uvedená čísla v závorkách odpovídají identifikovaným barvivům v literatuře

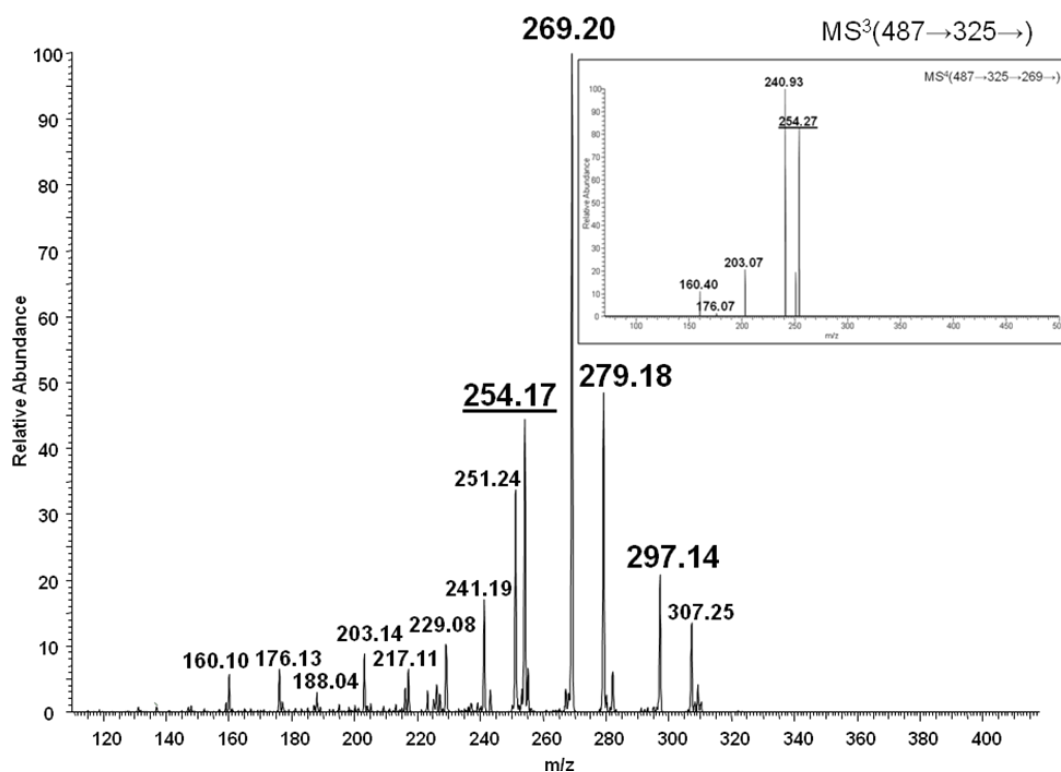
Z tabulky 3 je patrné, že dominantními barvivy v extraktech zimolezu jsou deriváty kyanidinu, zejména kyanidin-3-hexosid. Mezi nativními anthokyaniny bylo nalezeno i několik odvozených barviv kondenzovaných, jejichž struktura je diskutována v dalším textu. Ve spektru (Obr. 10) byl nalezen intenzivní signál iontu s m/z 487,1224 (extrakt směsí aceton-methanol, 1:1; první frakce, chromatografie na Sephadexu LH-20, Obr. 8).



Obr. 10 ESI-MS spektrum (výše) a ESI-MS² spektrum po izolaci m/z hodnoty 5-MePKy-3-hex (níže)

Fragmentací tohoto iontu byl získán ion m/z 325,0703. V kolizním spektru tedy patrná charakteristická neutrální ztráta m/z 162,0528 odpovídající ztrátě cukerné jednotky (dehydratované hexosy). V MS² spektru byly viditelné i další fragmenty odpovídající ztrátě CO ($\Delta m/z=28$) a vody ($\Delta m/z=18$). Na základě těchto informací byla struktura barviva připsána 5-methylpyranokyanidin-3-hexosidu (odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené, $\Delta m = -3,3$ ppm). Navržené fragmentační procesy byly dále ověřovány měřením kolizních spekter vyšších řádů (MSⁿ) s využitím hmotnostního analyzátoru typu iontové pasti (Obr.11). Byla proměřena spektra MS³ izolace rodičovského iontu, jeho fragmentace, následná izolace fragmentu s m/z 325 (aglykonu) a jeho fragmentace (ve zkráceném zápisu:

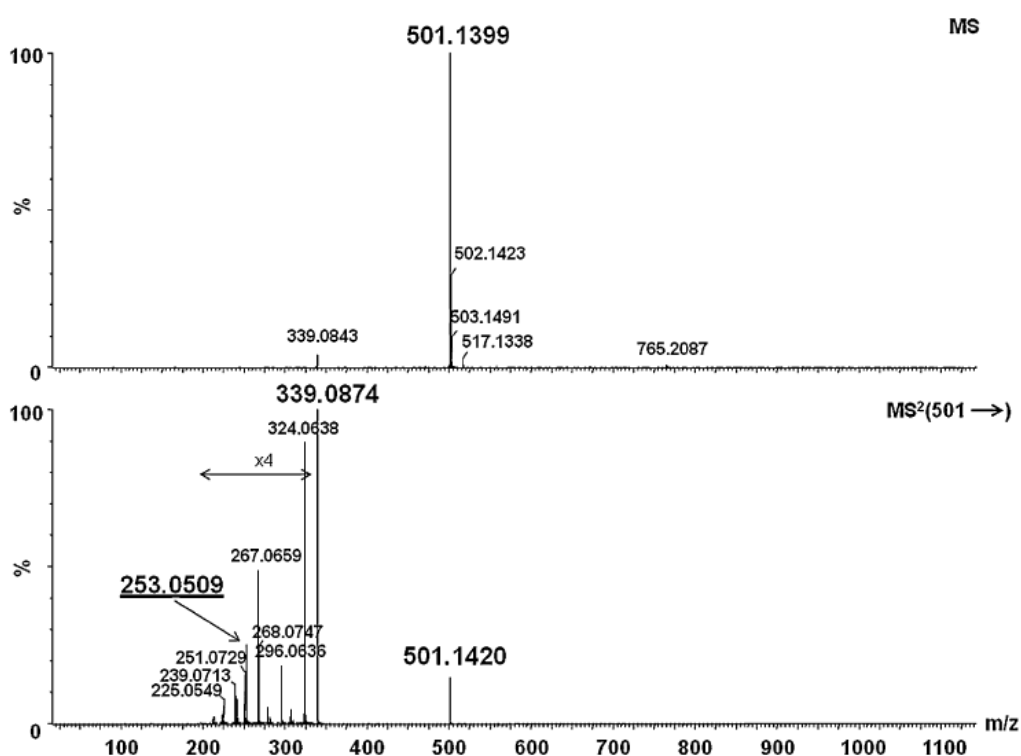
487 → 325 →) a MS⁴ (487 → 325 → 269 →). Během detailního fragmentačního postupu byl u 5-MePKy-3-hex nalezen fragment m/z 254,0591. Tento ion může být popsán ztrátou cukerné jednotky, dvou molekul oxidu uhelnatého s následnou ztrátou methylového radikálu ($\Delta m/z=15$). Odchylka přesné hodnoty m/z tohoto fragmentu měřeném na hmotnostním spektrometru typu Q-TOF od hodnoty teoretické vypočtené pro odpovídající elementární složení (C₁₅H₁₀O₄⁺) je malá ($\Delta m=4,7$ ppm), což identitu navrženého fragmentu dále potvrzuje.



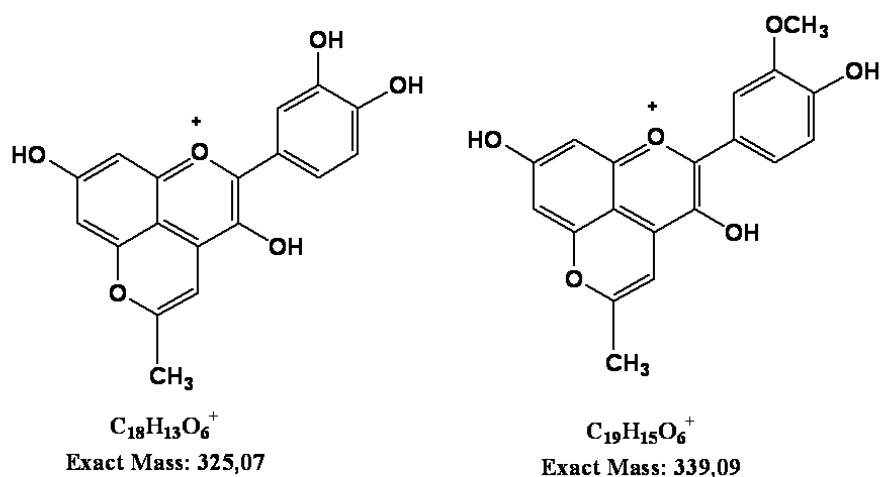
Obr. 11 MS³ spektrum a MS⁴ spektrum (vložené) 5-MePKy-3-hex

Dalším nalezeným iontem, který odpovídá 5-methylpyranoanthokyaninu je ion s m/z 501,1401 (Obr. 12). V prvním fragmentačním kroku lze opět vidět ztrátu cukerné jednotky. Při další fragmentaci aglykonu (MS³) pozorujeme opět ztrátu oxidu uhelnatého a vody a podobně jako u 5-MePKy-3-hex i ztrátu methylové skupiny ($\Delta m/z=15$). Toto barvivo bylo identifikováno jako 5-methylpyranopeonidin-3-hexosid (odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené, $\Delta m=0,8$ ppm). Tyto experimenty ukazují ztrátu methylového radikálu, která je charakteristická pro 5-methylpyranoanthokyaniny. Při fragmentaci 5-MePPE-3-hex byl v MS/MS spektru pozorován fragment s m/z 253,0509, který odpovídá odštěpení

methylového radikálu z B-kruhu aglykonu (m/z 324,0638), dvěma ztrátami oxidu uhelnatého (m/z 268,0747) a následné ztrátě methylového radikálu (Obr. 12). Tento ion s sebou tedy nese informaci o charakteru B-kruhu (přítomnost jedné methoxyskupiny) a současně informaci o přítomnosti 5-methylpyrano kruhu. Přesnost měření v tomto případě je rovněž velmi dobrá ($\Delta m = 3,1$ ppm). Výše popsané experimenty jednoznačně potvrzují přítomnost fragmentační cesty charakteristické pro 5-methylpyranoanthokyaninová barviva, kterou lze využít pro jejich identifikaci v neznámých vzorcích. Popsané struktury pyranoanthokyaninů jsou uvedeny na obrázku 13.



Obr. 12 ESI-MS spektrum (výše) a ESI-MS² spektrum (níže) 5-MePPE-3-hex



Obr. 13 Navrhované struktury identifikovaných 5-methylpyranoanthokyaninů (5-MePPKy – vlevo; 5-MePPE-vpravo)

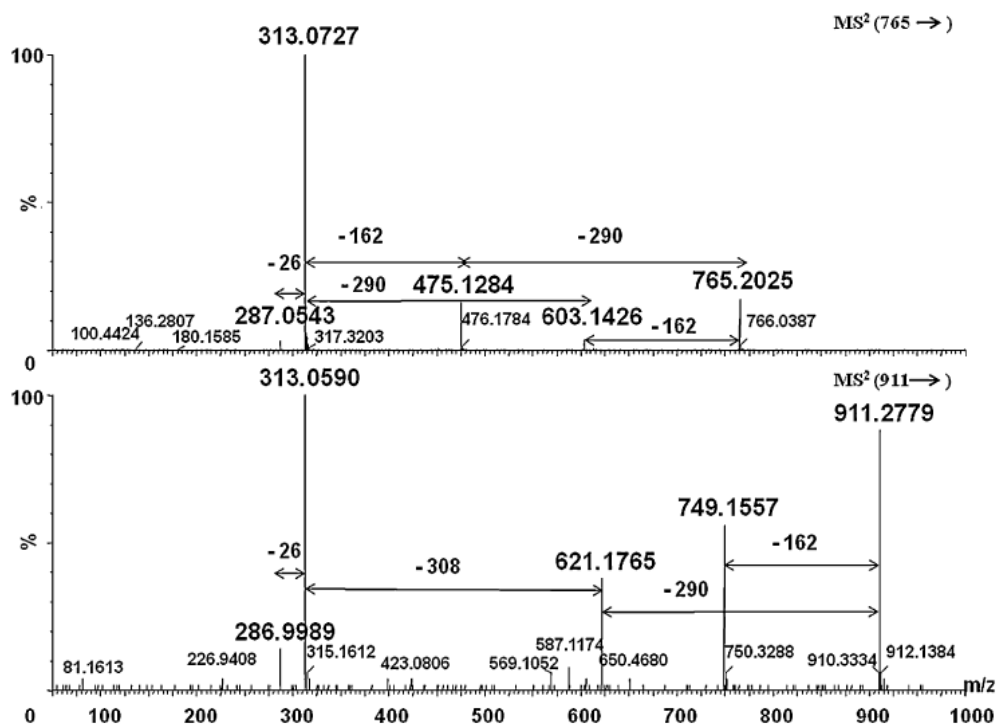
V tabulce 3 je vidět, že 5-methylpyranoderiváty byly nalezeny převážně v extraktech směsi metanol-aceton. Reakce acetonu s některými anthokyaniny byla také popsána v práci autorů Lu a Foo v roce 2001 [103]. Tito autoři popisují přítomnost těchto barviv pouze v roztocích obsahujících aceton. Naše experimenty tato pozorování potvrzují, 5-methylpyranoderiváty byly pouze v extraktech směsi metanol-aceton a aceton-voda. Zajímavé je, že 5-methylpyranoderiváty nebyly nalezeny v extraktech s čistým acetonem. Tento fakt může být vysvětlen tím, že z použité matrice jsou anthokyaniny acetonem extrahovány v relativně nízkém výtěžku a proto je jich jako reaktantů málo dostupných pro následnou cyklizační reakci. Dalším vysvětlením vysokého výtěžku 5-methylpyranoanthokyaninů oproti zanedbatelnému množství v čistém acetonu může být i ovlivnění reaktivity cyklizačních reakcí studovaného typu v polárních protických rozpouštědlech jako je methanol. Pokud je tranzitní stav cyklizační reakce protickým rozpouštědlem stabilizován, může reakce probíhat rychleji a s větším výtěžkem. Andersen a kol. se ve své studii podobně zmiňují o přítomnosti 5-karboxypyranopelargonidinu v methanolickeém extraktu jahod [5]. V této práci nejsou však detailně popsány okolnosti reakce, ani její mechanismus. Otázkou také je, zda k jeho vzniku došlo při zrání jahod nebo při zpracování před samotnou extrakcí.

5.1.3.1 Identifikace barviv z frakcionace fenolické frakce zimolezu kamčatského

Další anthokyaninová barviva byla identifikována v extraktu LCPF po frakcionaci na reverzní fázi (Obr. 9). Z tabulky 3 lze vidět, že extrakty zimolezu kamčatského obsahují celou řadu barviv s různou chemickou strukturou. Mezi nimi se vedle pyranoanthokyaninů podařilo identifikovat i můstkové sloučeniny, jak bude v detailu popsáno níže.

V prvních frakcích se vyskytují anthokyaninová barviva s vyšším počtem cukerných jednotek. Dále od frakce 18, která, jak je vidět na chromatogramu „Obr. 9“, je nejvíce barevná, se vyskytují anthokyaniny s jednou hexosovou jednotkou a v následných frakcích převažují pigmenty obsahující rutinosu. Deriváty kyanidinu eluují v kratších retenčních časech než odpovídající deriváty peonidinu. Je zajímavé, že ve frakci 18 byl nalezen pyranoderivát 5-MePKy-3-hex, jehož identifikace byla potvrzena měřením přesné a správné hmotnosti i studiem fragmentace. Studovaný extrakt však nebyl v žádném kroku zpracování v kontaktu s acetonem. Množství pe-3-hex je mnohem nižší než ky-3-hex a tudíž i množství 5-MePPE a jeho glykosidu je pod mezí detekce použité metody. Přítomnost 5-methylpyranoderivátů ve frakcích LCPF ukazuje na možnost vzniku těchto kondenzovaných barviv přímo v ovoci nebo během jeho zrání jiným mechanismem, než přímým kontaktem s acetonem (reakce s octovou kyselinou, oxidace části ethanolu při eluci barviv z Porapaku v preparativních podmínkách a další).

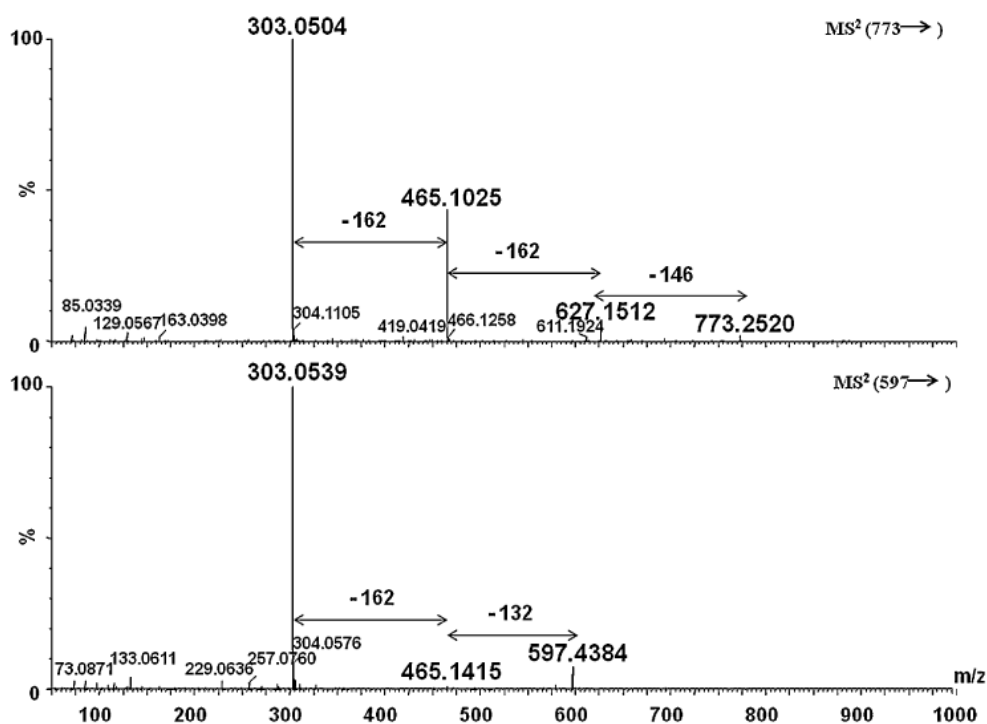
Ve frakci LCPF bylo také nalezeno mnoho derivátů kvercetinů (Obr. 9, Tab. 3) Některé z nalezených a identifikovaných flavonoidů jsou v plodech zimolezu popsány poprvé jako ky-3-hexosid-vinyl-(epi)katechin, ky-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)katechin, kvercetin-methylpentosid-dihexosid a kvercetin-pentosid-hexosid. Obrázek 14, horní spektrum, ukazuje jako příklad MS² spektrum ky-3-hexosid-vinyl-(epi)katechinu (m/z 765,2025, $\Delta m = -0,8$ ppm).



Obr. 14 ESI- MS^2 spektrum ky-3-hexosid-vinyl-(epi)katechinu (výše) a MS^2 spektrum ky-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)katechinu (níže)

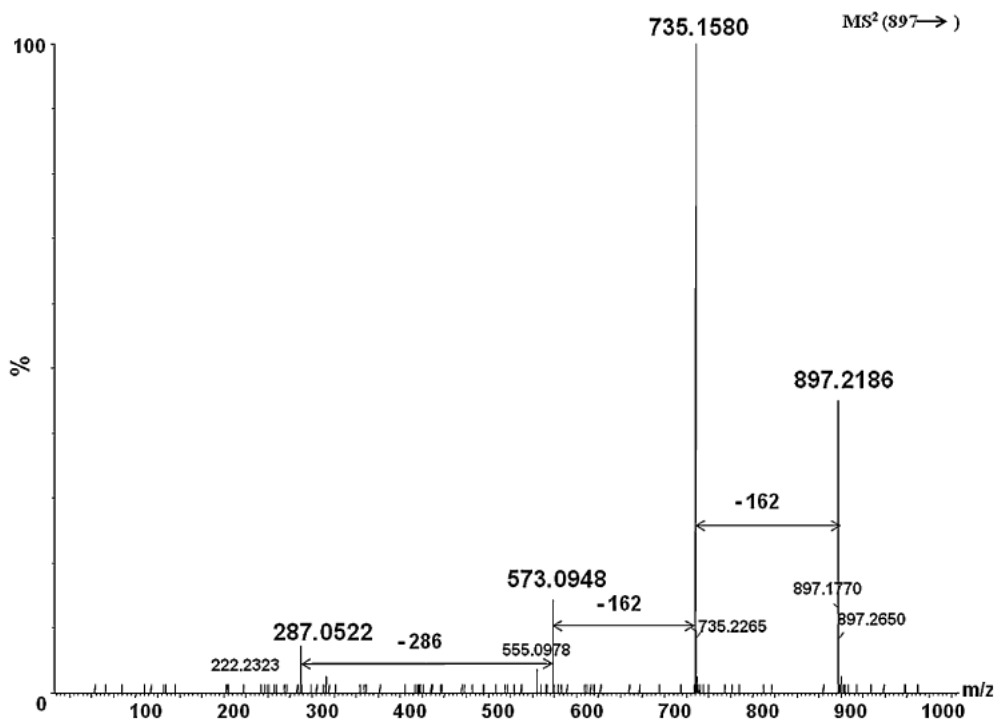
Ztráta cukerné jednotky ($\Delta m/z=162$) a neutrální molekuly (epi)katechinu ($\Delta m/z=290$) je jednoznačně viditelná. Dominantní ion m/z 313,0727 odpovídá vinylkyanidinu ($C_{17}H_{13}O_6^+$, ppm 4,8). Následně dochází ke ztrátě vinylové skupiny ($\Delta m/z=26$) a vzniku kyanidinu ($C_{15}H_{11}O_6^+$, $\Delta m/z = -4,5$ ppm). Stejně byla potvrzena struktura dalšího identifikovaného flavonoidu m/z 911,2779 (Obr. 14, spodní spektrum). Toto barvivo bylo popsáno jako ky-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)katechin. Jsou vidět následné ztráty hexosy ($\Delta m/z=162$) a methylpentosylhexosy ($\Delta m/z=308$) i neutrální molekuly katechinu ($\Delta m/z=290$) za vzniku vinylkyanidinu a kyanidinu, podobným mechanismem, jako v předchozím případě.

Obrázek 15 ukazuje MS^2 spektrum kvercetin-methylpentosid-dihexosidu (m/z 773,2520 výše) a kvercetin-pentosid-hexosidu (m/z 597,4384, níže). Ztráty methylpentosy, pentosy nebo hexosy ($\Delta m/z=132$, 146 a 162) jsou viditelné. Dominantním iontem je aglykon kvercetinu ($\Delta m/z = -0,3$ a 11,2 ppm). Deriváty kvercetinu jsou izomerní s deriváty anthokyaninu delphinidinu. Retenční pořadí získaných barviv však jednoznačně potvrzují přítomnost kvercetinových derivátů.



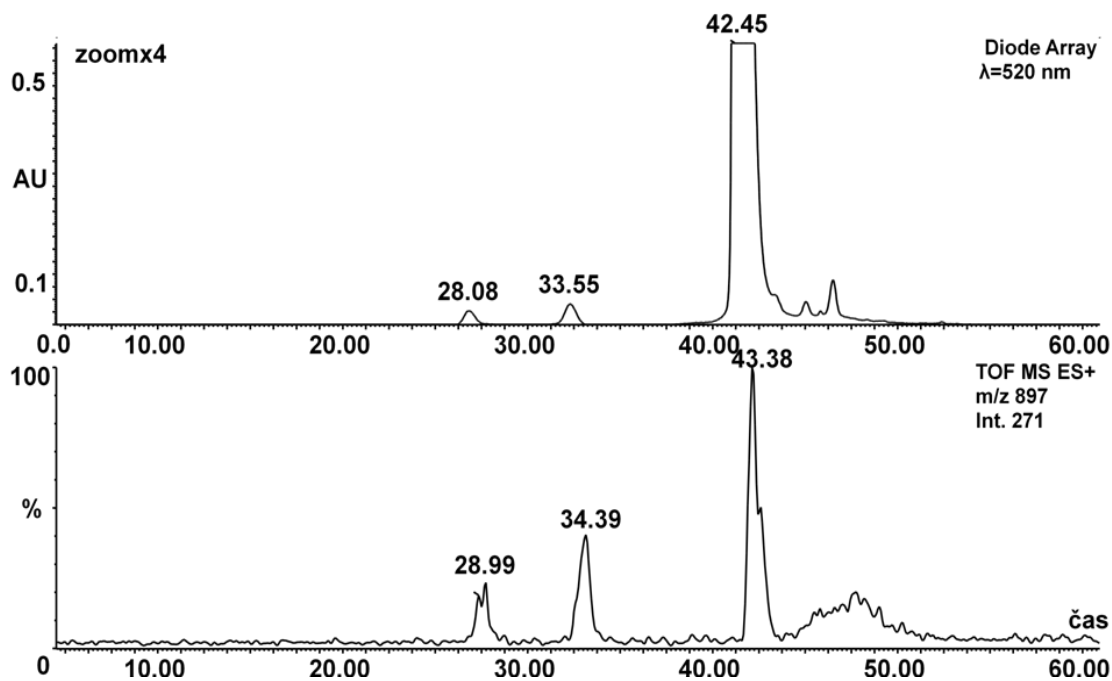
Obr. 15 ESI- MS^2 spektrum kvercetin-methylpentosid-dihexosidu (výše) a MS^2 spektrum kvercetin-pentosid-hexosidu (níže)

Na obrázku 16 je MS^2 spektrum iontu s m/z 897,2186 získaného přímou infuzí izolované frakce 24 do iontového zdroje (ESI-Q-TOF). Při jeho fragmentaci lze pozorovat neutrální ztráty dvou izolovaných molekul hexosy ($\Delta m/z=162$) a odštěpení neutrálního kyanidinu ($\Delta m/z=286$). Tyto fragmentační procesy ukazují, že nalezená látka je dimer kyanidin-3-hexosidu (odchylky m/z hodnot fragmentů od teoretických hodnot jsou menší než 15 ppm). Ion m/z 897,2089 byl přítomen ve frakci 18, kde byla také nejvyšší koncentrace ky-3-hexosidu. Z toho důvodu by se vznik dimeru dal přisoudit oxidaci v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru.



Obr. 16 MS² spektrum dimeru ky-3-hex získaného přímou infuzí izolované frakce 24 do iontového zdroje (ESI-Q-TOF)

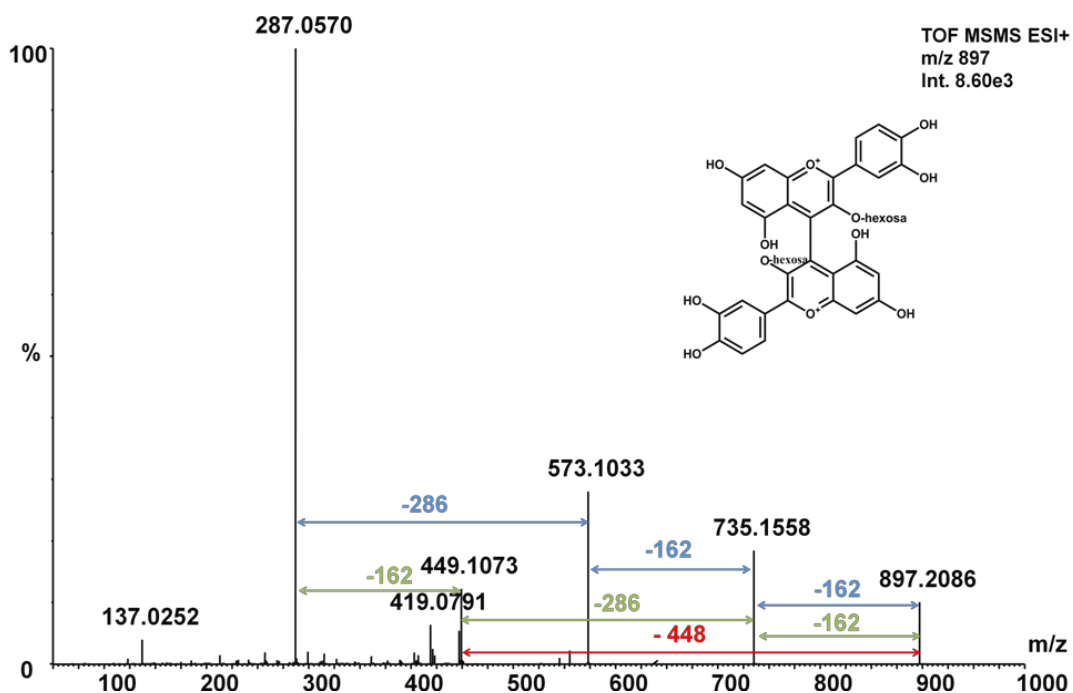
Při podrobné analýze frakce 18 metodou μ LC/MS jsou v chromatogramu rekonstruovaném pro $m/z=897$ však patrné tři chromatografické píky „Obr. 17“. Záznam z UV/VIS DAD detektoru potvrzuje, že přítomné látky jsou barevné. Ve spektru jsou patrna maxima 287 a 527 nm u prvních dvou píku a maxima 280 a 515 nm u třetího píku. Poměr odezvy píku s nejdelším retenčním časem oproti dříve eluujícím barvivům v záznamu při 520 nm je výrazně vyšší než v rekonstruovaném chromatogramu při $m/z=897$. Látka s nejdelším elučním časem je tedy patrně strukturně výrazně odlišná od dvou dříve eluujících barviv. Třetí pík má shodný eluční čas i profil píku s ky-3-hexosidem (m/z 449). Tento ion tedy vzniká oxidací v iontovém zdroji. Obě látky eluující v kratších retenčních časech jsou od ky-3-hexosidu velmi dobře chromatograficky separovány a vznikají tedy před vstupem do iontového zdroje (v plodu při jeho vývoji a zrání a/nebo při přípravě a zpracování extraktů).



Obr. 17 chromatogram rekonstruovaný pro $m/z=897$ (níže) a záznam z UV/VIS pro $\lambda=520\text{nm}$

V kolizním spektru iontu m/z 897 (Obr. 18) lze pozorovat následující procesy:

- postupné neutrální ztráty dvou hexos (m/z 735,1558 a m/z 573,1033) a následné štěpení vazby mezi jednotlivými aglykony (m/z 287,0570)
- dochází rovnou k přímému štěpení glykosylovaných forem – tedy vznik iontu m/z 449,1073
- dochází nejprve ke ztrátě jedné hexosy (m/z 735,1558), poté ke štěpení vazby mezi aglykony (m/z 449,1073) a následně k odštěpení druhé hexosy (m/z 287,0570).

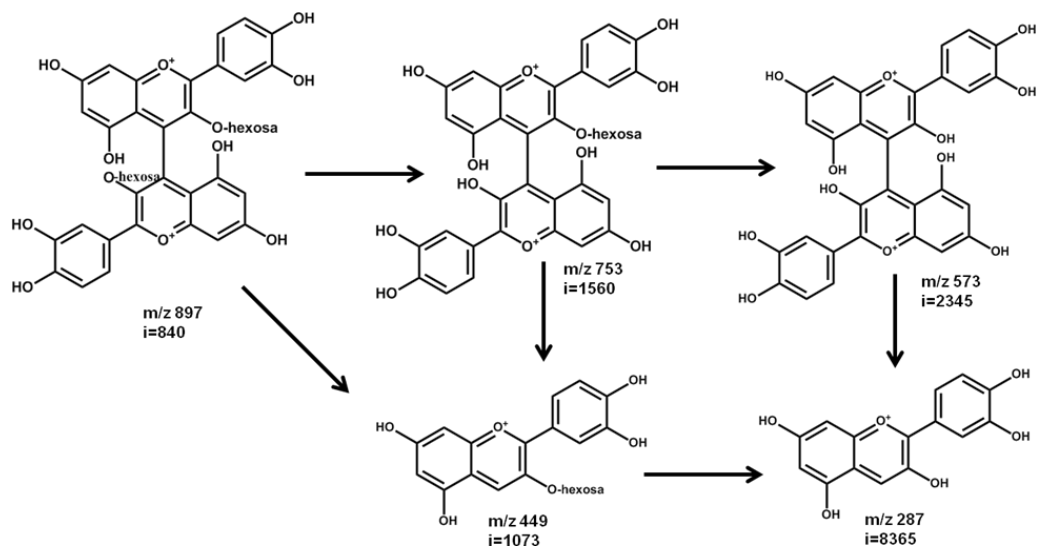


Obr. 18 fragmentační spektrum

dimeru cyanidin-3-hexosidu (m/z 897) – přímý nástřik ESI-Q-TOF

Z tabulky 3 a „Obr. 9“ můžeme vidět výskyt tohoto pigmentu ve frakcích 18 a 23 a 24. Ve frakci 18 poskytuje po fragmentaci tato látka pouze fragmenty o m/z 449 a 287. Naopak frakce 23 a 24 poskytuje ionty s m/z 735, 573 a 287 „Tab. 3“.

Můžeme tak usuzovat, že se tento dimer ky-3-hexosidu vyskytuje minimálně ve dvou rozdílných strukturách, které mají stejný sumární vzorec, jsou složeny ze dvou molekul kyanidinu a dvou hexosových jednotek avšak jejich prostorové uspořádání je natolik odlišné, že umožňuje chromatografickou separaci na reverzní fázi. Obr. 19 popisuje návrh struktury dimeru ky-3-hex a jeho fragmentační cestu.



Obr. 19 návrh struktury dimeru ky-3-hex a jeho fragmentační cesty

Chyba přesnosti měření pro navrhovanou strukturu dimeru ky-3-hex a jeho fragmentů se v provedených měřeních pohybuje v rozmezí 0 - 5 ppm, což dále potvrzuje jejich přítomnost v acetonovém extraktu zimolezu.

Výše uvedené výsledky lze shrnout následujícím způsobem. Extrakty plodů zimolezu kamčatského obsahují nativní anthokyanivá barviva (zejm. hexosidy, dihexosidy a rutinosidy kyanidinu a peonidinu), podle použitého extrakčního činidla v různých výtěžcích odpovídající 5-methylpyranoanthokyaniny (5-methylpyrano deriváty kyanidin a peonidin 3-hexosidů) a dimery (zejména kyanidin-3-hexosidu), ale také složitější pigmenty, z nichž zejména zajímavé látky jsou můstkové sloučeniny - kyanidin-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)katechin a kyanidin-3-hexosid-vinyl(epi)katechin.

Kondenzovaná anthokyaninová barviva jsou zajímavou a obecně relativně málo prostudovanou skupinou derivátů flavonoidů. Vzhledem k jejich výskytu v rostlinných extraktech a potažmo v lidské stravě a možnému využití ve farmacii je velmi důležitá znalost jejich osudu v lidském organismu. Ten bude jistě předmětem řady komplexních studií. Následující kapitola se snaží přispět k tomuto výzkumu poznatky o *in vitro* metabolizaci jednoduchého 5-methylpyranoanthokyaninu.

5.2 Biotransformace flavonoidů

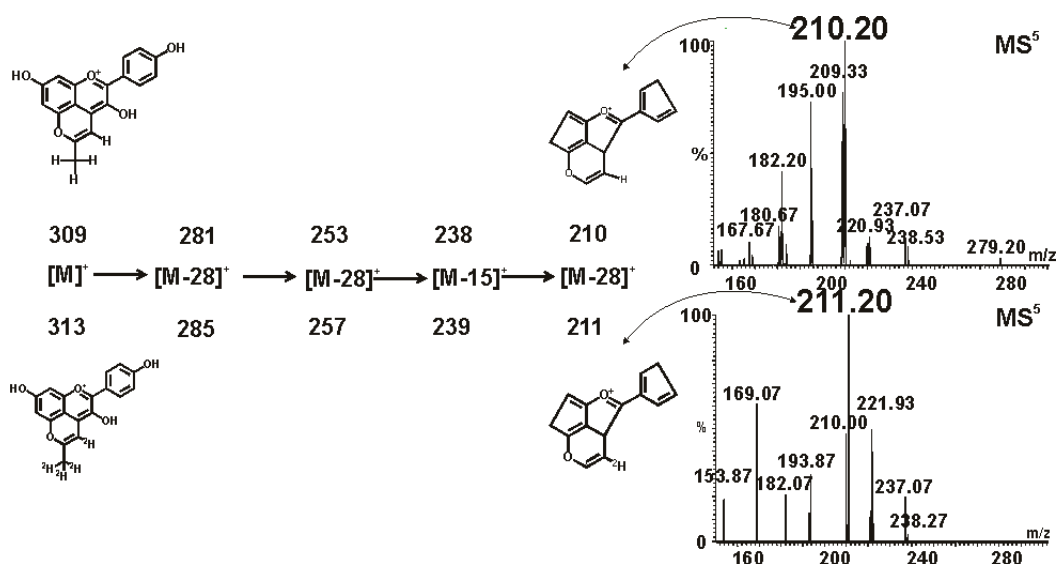
Studium biotransformačních pochodů flavonoidů v lidském těle je předmětem dlouhodobého zájmu již více než 30 let [104-106]. Experimenty *in vivo* poukazují na důležitost centrálního koloběhu v živočišném organismu. Na samotném metabolismu flavonoidních látek se podílí játra, ledviny, tenké i tlusté střevo ale i další tkáně. V lidském těle tak dochází k systematické cirkulaci látek a jejich následnému vyloučení z organismu v podobě moči, stolice, potu či jiných exkretů [62]. Na druhé straně k detailnímu poznání samotného metabolického pochodu je třeba experimenty cíleně separovat a lokalizovat na určité tkáně, respektive buněčné linie. Pro naše *in vitro* experimenty byly vybrány lidské buněčné linie jaterní HepG2 a střevní LS174T. Experimenty porovnávající metabolismus flavonoidů na buněčných jaterních HepG2 a střevních LS174T liniích nebyly doposud v literatuře popsány. Jejich detailní popis, může přispět k pochopení metabolismu flavonoidů v lidském těle a tedy i účinku stravy a užívání potravinových doplňků a přírodních léčiv na lidský organismus.

Jeden z nejdiskutovanějších flavonoidů v literatuře je kvercetin. Jeho vlastnosti i metabolismus je detailně popsán v literatuře [77,79,107,108]. Tuto látku jsme tedy zvolili jako standard pro porovnání s metabolizací dalších flavonoidních látek. Jako modelová látka byl použit anthokyanin pelargonidin. Pro studium vlastností pyranoanthokyaninů byl jako jejich zástupce připraven 5-MePPI (viz. experimentální část kapitola 4.3).

V následujících kapitolách jsou zevrubně diskutovány analytické vlastnosti 5-MePPI, jehož metabolismus byl dále studován (zejména s ohledem na procesy probíhající po kolizi indukované disociaci v kolizní cele tandemového hmotnostního spektrometru), příprava a provedení metabolické studie a analýza metabolizovaných vzorků technikou UHPLC/MS².

5.2.1 Analytický popis vybraného pyranoanthokyaninu pro biotransformační procesy

Fragmentace laboratorně připraveného 5-MePPI byla detailně prostudovaná na hmotnostním spektrometru s analyzátozem typu iontové pasti, který umožňuje měřit kolizní spektra vyšších řádů (MSⁿ). Pro detailnější pochopení procesů probíhajících v iontové pasti byl kondenzací s deuterovaným acetonem (aceton-d₆) připraven izotopicky značený 5-MePPI (látka s deuterovanou postranní methylovou skupinou a vodíkem na pyrano-kruhu). Deuterovaný 5-methylpyranoanthokyanin potvrdil navrhovanou fragmentační cestu (Obr.20).



Obr. 20 Fragmentační cesta 5-MePPI (výše) a 5-MePPI vzniklého kondenzací s deuterovaným acetonem (aceton-d₆)

Byly vidět ztráty vody ($\Delta m/z=18$) a oxidu uhelnatého ($\Delta m/z=28$). Typická ztráta methylového radikálu ($\Delta m/z=18$ pro značený 5-MePPI) z pyrano-kruhu potvrdila dřívější studie kondenzovaných barviv u zimolezu (Obr. 16). Tabulka 4 ukazuje detailně prostudovanou fragmentační cestu 5-MePPI s charakteristickým radikálovým kationtem.

Tabulka 4 - fragmentační cesta 5-MePPI

látko	m/z	Fragmentační cesta (MS ⁿ)
5-MePPI	309	$[M]^+ \rightarrow [M-28]^+ \rightarrow [M-28]^+ \rightarrow [M-15]^+ \rightarrow [M-28]^+$ 309 \rightarrow 281 \rightarrow 253 \rightarrow 238 \rightarrow 210
5-MePPI(d ₆)	313	$[M]^+ \rightarrow [M-28]^+ \rightarrow [M-28]^+ \rightarrow [M-18]^+ \rightarrow [M-28]^+$ 313 \rightarrow 285 \rightarrow 257 \rightarrow 239 \rightarrow 211

5.2.2 Metabolické experimenty vybraných flavonoidů *in vitro* pomocí jaterních buněčných linií HepG2

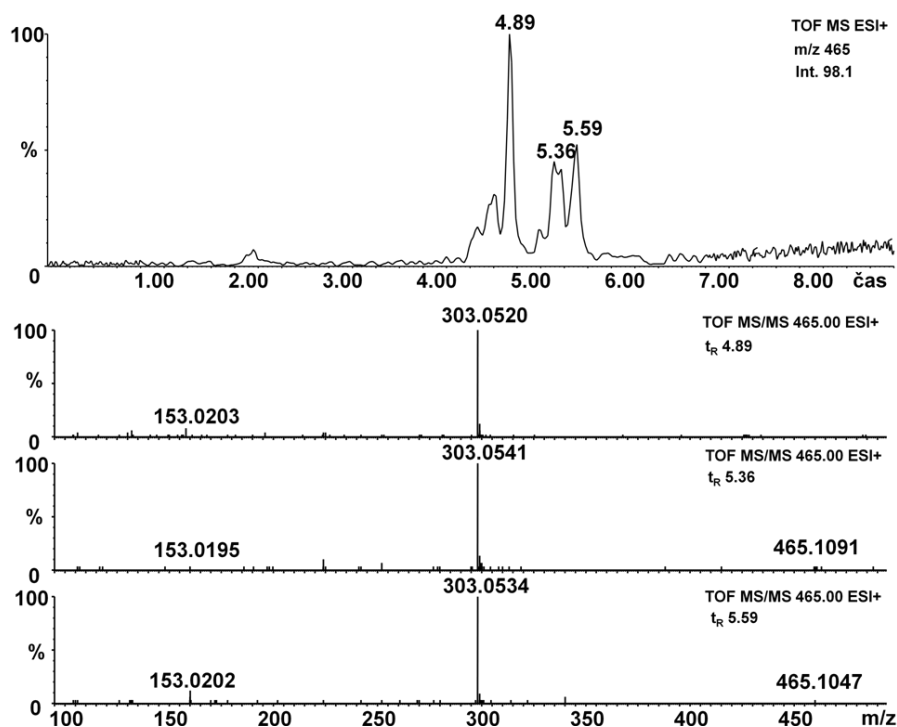
Testované látky flavonoidů byly nasazeny na jaterní buněčné linie a za specifických podmínek byly zpracovány (viz. experimentální část kapitola 4.4). Souběžně byly provedeny také experimenty za přídavku metabolických aktivátorů jako dioxin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD) a rifampicin (RIF). Oba tyto aktivátory podporují metabolismus xenobiotik v lidském těle [61]. Takto získané vzorky metabolitů s přítomností i bez přítomnosti aktivátorů byly dále analyzovány pomocí UHPLC/MS. Nalezené a identifikované metabolity kvercetinu pomocí HePG2 jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 – metabolity kvercetinu v buněčných liniích HepG2 (měřeno v buněčných sedimentech; pozitivní mód; 24 hod metabolizace)

Metabolické biotransformační pochody kvercetinu (pozitivní mód)	t_R	Naměřená přesná hmota m/z	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)	Získané ionty při CID experimentech / intenzita	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)
Methylace	7,30	317,0631	9,5	317,0703/27	13,2
				303,0535/11	9,9
				153,0205/6	11,1
Hydroxylace	5,69	319,0426	-8,8	319,0451/37	-0,9
				303,0514/8	3,0
				273,0420/5	7,7
				245,0440/11	-4,1
				153,0211/17	15,0
Glukuronidace	4,88	479,0838	2,5	303,0507/60	0,6
				153,0212/6	15,7
				303,0510/64	1,6
Glukosidace	4,89	465,1013	5,7	303,0520/55	4,9
				153,0203/7	9,8
	5,36 (n.r.)	465,1076	9,2	465,1091/6	12,5
				303,0541/24	11,9
	5,59	465,1083	12,3	153,0195/5	4,6
				465,1047/7	3,0
			303,0534/27	9,6	
			153,0202/5	9,1	

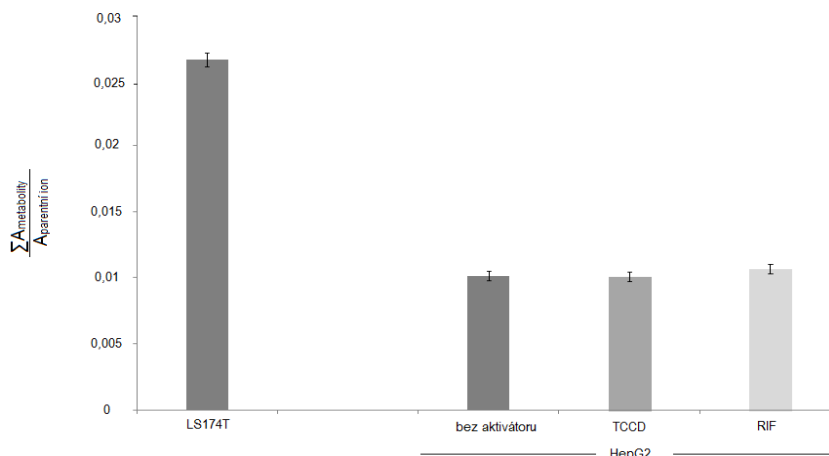
n.r. – pik není dokonale rozdělen od ostatních izomerů

Výsledky uvedené v tabulce potvrzují, že buňky metabolizující kvercetin a v paralelních experimentech i pelargonidin a 5-MePPI byly živé a metabolicky aktivní. Byl nalezen hydroxylovaný metabolit jako běžný zástupce metabolitů první fáze také řada metabolitů druhé fáze jako methyl deriváty, glukuronidy i glukosidy. Všechny tyto metabolické procesy kvercetinu již byly dříve popsány v literatuře [79,85,109]. Některé izomery kvercetin-glukuronidu a kvercetin-glukosidu se podařilo s použitím navržené metodiky chromatograficky separovat. Obrázek 21a ukazuje rekonstruovaný chromatogram pro kvercetin-glukosid. Můžeme zde vidět minimálně tři separované izomery (jeden pouze částečně). Rodičovské ionty m/z 465,1013, 465,1076, 465,1083 odpovídají izomerům kvercetin-glukosidu. Jejich MS/MS spektra jsou zobrazeny na obrázku 21b. Jsou zde viditelné ztráty hexosy (m/z 303,0520, 303,0541, 303,0534) a vznik charakteristických iontů m/z 153,0203, 153,0195, 153,0202 odpovídající Retro-Diels-Alderovskému štěpení pro kvercetinového skeletu. Přítomnost glykosidů kvercetinu jako metabolických produktů u lidských jaterních buněčných linií nebyla v literatuře doposud popsána. Tento metabolický proces byl popsán u *in vivo* experimentů na zvířecích modelech, kde byly nalezeny glykosidy isorhamnetinu v krvi krys po orální expozici rostlinného extraktu Shaofu Zhuyu [85].



Obr. 21 Rekonstruovaný chromatogram pro kvercetin-glukosidy (a) a MS/MS spektra 3 izomerů s nejvyšší intenzitou (b)

Překvapivě přítomnost metabolických aktivátorů TCCD a RIF neměla výrazný vliv na produkci metabolitů jednotlivých flavonoidů. Na obrázku 22 je znázorněn nárůst obsahu metabolitů u HepG2 buněk oproti experimentům bez aktivátorů.



Obr. 22 Porovnání výtěžku metabolitů kvercetinu mezi buněčnými liniemi LS174T a HepG2 a příspěvek aktivátorů

Jak již bylo uvedeno, biotransformační experimenty s pelargonidinem a 5-MePPI byly provedeny paralelně s experimenty s kvercetinem (ve stejnou dobu, s použitím stejných chemikálií, buněk i prostředí). V získaných metabolizovaných vzorcích pelargonidinu a 5-MePPI nebyly nalezeny metabolity (jejich obsah byl pod limitem detekce použité metodiky). Z toho lze usoudit, že tyto látky jsou jaterními buňkami metabolizovány výrazně méně ochotně/pomaleji, než kvercetin. Pro další experimenty byly použity střevní buňky LS174T.

5.2.3 Metabolické experimenty vybraných flavonoidů *in vitro* pomocí střevních buněčných linií LS174T

Experimenty s buněčnými liniemi LS174T byly provedeny za identických experimentálních podmínek jako u jaterních buněk HepG2 s použitím selektivního kultivačního média pro LS174T buněčné linie. Pro testované flavonoidy vykazovaly tyto buněčné linie mnohonásobně vyšší metabolickou aktivitu (Obr. 22).

Metabolity získané při experimentech se střevními buňkami LS174T jsou uvedeny v tabulce 6 (analýza buněčných pelet). Nejvíce biotransformačních pochodů a zároveň i největší počet nalezených metabolitů bylo nalezeno u kvercetinu. Byly pozorovány stejné metabolické pochody jako u experimentů s jaterními buňkami HepG2, avšak s většími obsahy identifikovaných metabolitů (hydroxylace, metylace, glukuronidace i glukosidace).

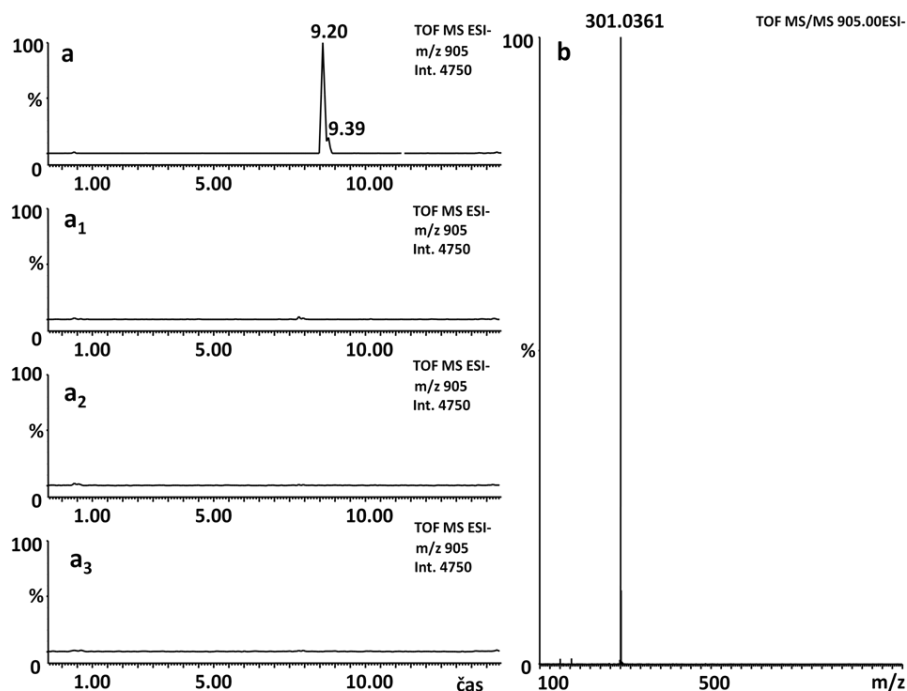
Tabulka 6 – Metabolity kvercetinu, pelargonidinu a 5-MePPI v buněčných liniích LS174T (měřeno v buněčných sedimentech; pozitivní mód i negativní mód; 24 hod metabolizace)

Metabolické biotransformační pochody studovaných flavonoidů (pozitivní mód)	t _R	Naměřená přesná hmota m/z	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)	Získané ionty při CID experimentech / intenzita	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)
KVERCETIN					
Methylace	5,10	317,0701	12,6	257,0433/7	-6,6
				217,0492/22	-4,1
				153,0195/25	4,6
Hydroxylace	3,70	319,0474	6,3	245,0436/8	-5,7
				217,0489/15	-5,5
				153,0168/51	-13,1
	4,35	319,0472	5,6	245,0424/4	-10,6
				227,0301/25	-18,9
				199,0364/6	-15,5
			171,0421/23	-14,6	
Glukuronidace	3,13	479,0841	3,1	303,0492/435	-4,3
	3,57	479,0834	1,7	303,0495/77	-3,3
	3,70	479,0801	-5,2	303,0497/245	-2,6
Glukosidace	3,08	465,1026	-1,5	303,0486/266	-6,3
	3,63	465,1049	3,4	303,0491/167	-4,6
	3,83	465,0997	-7,7	303,0469/99	-11,9
Dimer kvercetinu*	4,35	605,0893	-6,3	605,0913/1098	-3,0
				303,0524/77074	6,3
				153,0179/6841	-5,9
Trimer kvercetinu*	4,35	907,1302	-6,2	907,1350/1350	-0,9
				605,0910/1020	-3,1
				303,0521/71122	6,2
				153,0177/5859	-6,0
Neidentifikovaný metabolit*	4,97	287,0543	-4,5	287,0581/546	8,7
				259,0586/63	-7,7
				153,0207/226	12,4
PELARGONIDIN					
Hydroxylace*	4,24	287,0640	13,3	259,0665/23	22,8
				241,0573/21	29,8
Glukuronidace*	5,45	447,1710	12,6	447,1708/35	11,8
				271,0675/262	25,4
5-METHYLPYRANOPELARGONIDIN					
Hydroxylace	3,65	325,0679	-10,2	325,0675/13	-11,4
				209,0620/5	8,1
Glukuronidace*	4,71	485,1095	2,3	485,1010/8	-15,3
				309,1523/2	> 100
	4,79	485,1089	1,0	485,1020/40	-13,2
				309,0809/114	-14,9
	4,87	485,1102	3,7	485,1046/93	-7,8
				309,0810/205	-15,2
5,02	485,1072	-2,4	485,1052/8	-6,6	
			309,0803/57	-12,9	
Glukosidace*	6,5	471,1625	6,4	-	-
Hydroxylace+methylace	4,1	339,0830	-11,5	339,0875/41	1,8
				324,0631/44	-0,9
				296,0722/924	12,5
				267,0718/350	22,8
				253,0541/352	15,8
				241,0546/258	18,7
				225,0589/155	16,4
				197,0598/120	-2,5
				169,0688/41	20,7
				141,0724/53	14,2
2xhydroxylace+2xmethylace	2,85	369,0916	15	281,0703/3	-39,5
				221,9661/9	-
				193,0544/24	-
				149,0315/9	11,5
				353,0563/17	27,8
	4,12	369,0952	-6,0	323,0634/24	24,1
				295,0603/9	-1,0
				281,0582/7	9,6
				251,0705/14	-
				241,0520/33	7,8
				181,0582/8	8,1

Metabolické biotransformační pochody studovaných flavonoidů (negativní mód)	t _R	Naměřená přesná hmota m/z	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)	Získané ionty při CID experimentech / intenzita	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)
KVERCETIN					
Methylace *	10,1	315,0531	8,3	315,0521/487 301,0365/4699 285,0365/6609 151,0044/6473	5,1 5,6 -11,9 8,6
Hydroxylace *	8,09	317,0334	11,7	317,0308/68 151,0051/115	3,5 13,2
	8,45	317,0331	10,7	317,0320/162 151,0045/54	7,3 6,5
	9,24	317,0345	15,1	317,0349/2242 301,0371/1795 151,0038/3243	16,4 7,6 4,6
Glukuronidace*	7,79	477,0662	-1,5	301,0369/1946 151,0046/837	7,0 9,9
	8,41	477,0702	6,9	301,0356/1303 151,0042/624	5,3 6,2
	8,59	477,0681	2,5	301,0366/40248 151,0366/16101	6,0 3,3
Glukosidace*	7,61	463,0898	4,5	463,0890/251 301,0364/1576 151,0044/482	2,8 5,3 8,6
	8,22	463,0883	1,3	463,088/244 301,0350/1720	2,4 0,6
	8,41	463,0898	4,5	463,0893/275 301,0361/1662	3,5 4,3
Dimer kvercetinu	9,24	603,0789	2,3	301,0351/2296	1,0
Trimer kvercetinu	9,20	905,1212	1,2	301,0361/3196	4,3
Neidentifikovatelný metabolit	9,96	285,0531	-13,3	285,0414/41 267,0308/7 239,0378/32 227,0378/34	5,3 5,6 14,2 15,0
PELARGONIDIN					
Hydroxylace*	9,10	285,0403	1,4	241,0523/1250 195,0464/1593	9,1 9,2
Glukuronidace*	8,7	445,0791	4,5	445,0795/112 269,0483/430	5,4 12,2
5-METHYLPYRANOPELARGONIDIN					
Hydroxylace	7,52	323,0591	10,8	323,0570/25 305,0432/243 277,0489/9 261,0511/97 187,0432/682	-19,8 -5,9 -4,3 -15,7 -
Glukuronidace*	7,95	483,1164	-16,1	483,0890/429 307,0631/3586	-7,7 9,1
Glukosidace*	6,94	469,1235	10,2	469,1125/207 307,0642/647	-2,1 12,7
Hydroxylace+methylace	7,88	337,0748	16,1	337,0738/5 322,0478/109 294,0564/50 279,0248/18 139,0581/3	7,1 0,3 12,2 -16,1 23,7
2xhydroxylace+2xmethylace	7,23	367,0798	-12,5	367,0768/5 352,0558/17 349,0691/7 191,0421/70	-13,6 -7,1 -6,0 -
	8,05	367,0873	15,5	367,0764/4 352,0538/12 321,0731/15 239,0299/4	-14,7 -12,8 -10,0 -18,8

* data z MS(2) skenu (MS^E experiment)

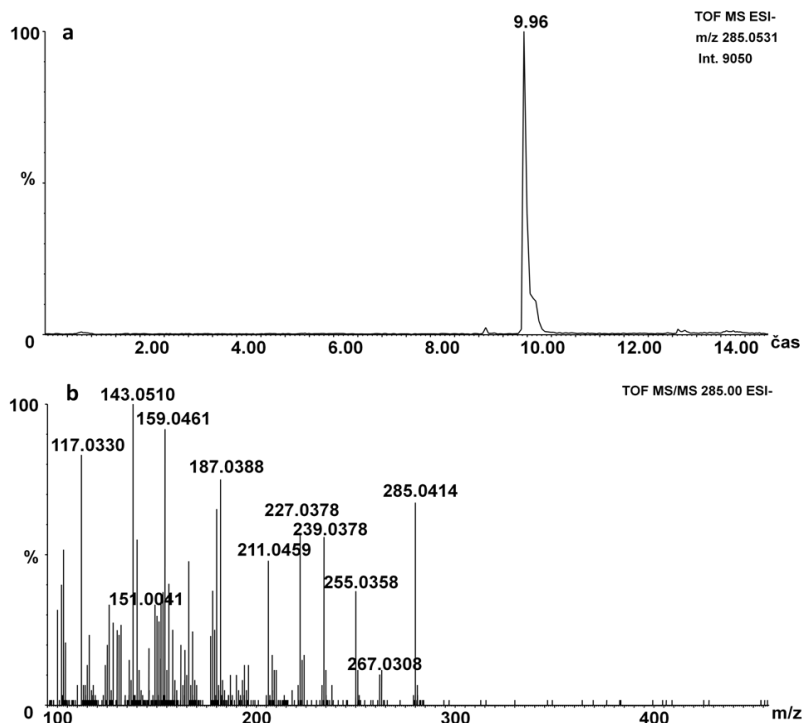
Mezi metabolity byly identifikovány i dva relativně výrazné píky s m/z 905,1212 (ionizace negativními potenciály, $[M-H]^-$). Tyto píky jsou svými retenčními časy velmi blízko kvercetinů (t_R 9,20 a 9,39 min) Obr. 23a.



Obr. 23 Rekonstruovaný chromatogram metabolitu m/z 905,1212 (a) a jeho MS/MS spektrum (b); (LS174T buněčné linie, negativní mód); (a) rekonstruovaný chromatogram extraktu z buněčných peletů v přítomnosti kvercetinu, (a₁) rekonstruovaný chromatogram extraktu z buněčných peletů bez přítomnosti kvercetinu, (a₂) rekonstruovaný chromatogram kultivačního média bez přítomnosti kvercetinu, (a₃) rekonstruovaných chromatogram kultivačního média s kvercetinem bez kontaktu s buněčnými liniemi.

V MS/MS spektru při fragmentaci tohoto iontu je patrný fragment s hodnotou m/z 301,0361 (Obr. 23b). Tento fragment odpovídá s přesností 4,3 ppm elementárnímu složení kvercetinu. Přítomnost této látky by mohla být odůvodněna kondenzací kvercetinu v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. Nicméně u všech experimentů byly při stejných podmínkách a současně (paralelně) připraveny a analyzovány kontrolní vzorky (1 – extrakt z pelet buněk bez přítomnosti flavonoidů, 2 – médium v kontaktu s buněčnými liniemi bez přítomnosti flavonoidů, 3 – kvercetin smíchaný s kultivačním médiem bez přítomnosti

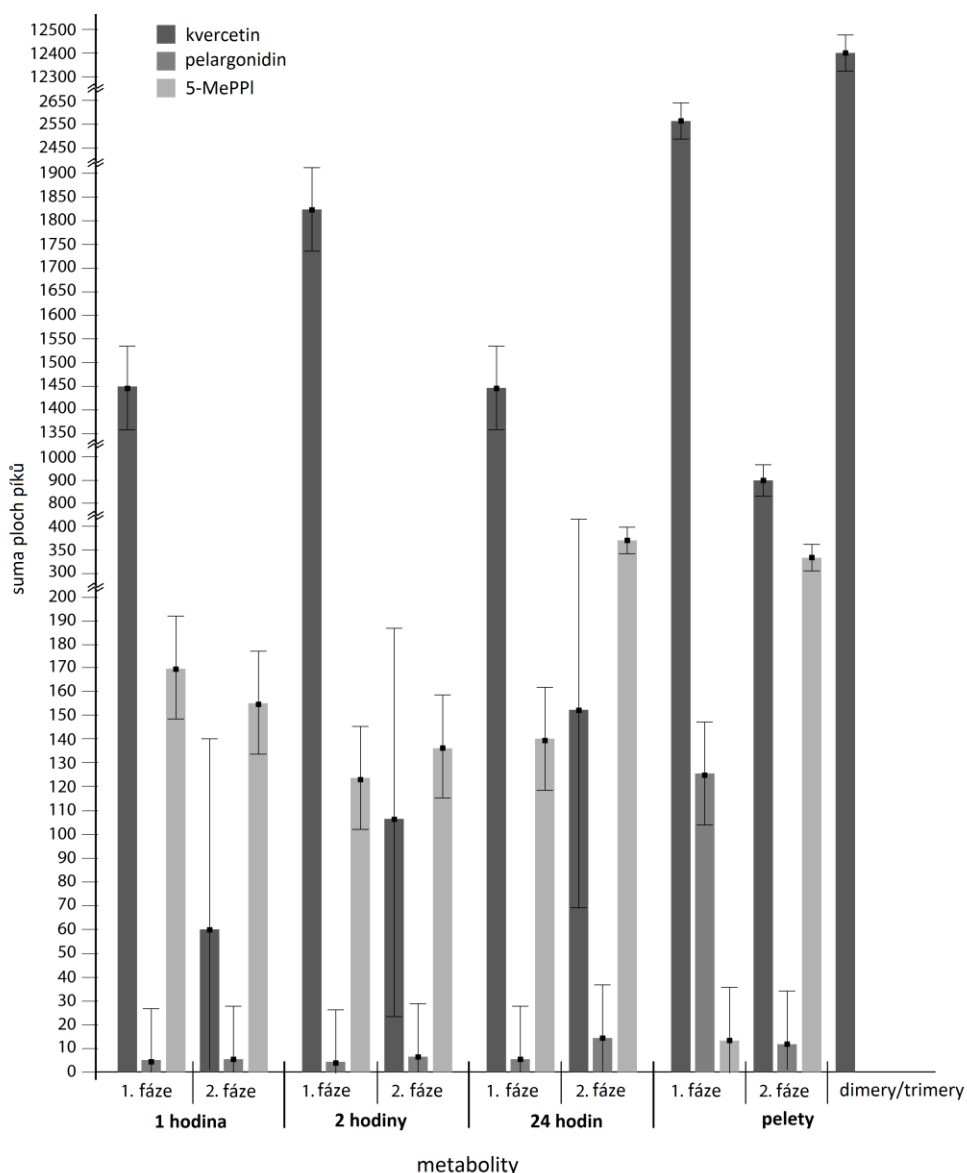
buněčných linií) a látka s m/z 905 nebyla přítomna v žádném z kontrolních vzorků (v odpovídajících rekonstruovaných chromatogramech) (Obr. 23a₁₋₃). Absence těchto iontů v kontrolních vzorcích potvrzuje vznik trimeru kvercetinů během metabolizace. Podobně ale s nižší intenzitou byl nalezen ion m/z 603,0789, který odpovídá dimeru kvercetinů. Přítomnost dimeru a trimeru kvercetinů byla potvrzena pouze v peletech buněk. Možným vysvětlením je omezená schopnost penetrace těchto látek přes buněčnou membránu vzhledem k jejich velikosti. Nicméně možnosti a způsob vzniku jak dimeru a trimeru kvercetinů během metabolismu je předmětem dalšího studia. Vznik vzájemná kondenzace flavonoidů během *in vitro* experimentů na lidských buněčných liniích LS174T nebyla v literatuře doposud popsána. Během biotransformačních experimentů byl objeven také ion m/z 285,0371 (MS ESI-) (Obr. 24). V MS/MS spektru při fragmentaci tohoto iontu byly pozorovány odpovídající ztráty vody ($\Delta m/z=18$) a CO ($\Delta m/z=28$) (Obr. 24b). Podle retenčního času tohoto metabolitu ($t_R = 9,96$) vzhledem ke kvercetinů ($t_R = 9,35$) se dá usuzovat na méně polární látku než kvercetin. Ze získaných informací lze usuzovat na metabolit odpovídající dehydroxylačnímu produktu kvercetinů (odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené, $\Delta m = -13,3$ ppm). Přesněji se ovšem nepodařilo tento metabolit charakterizovat.



Obr. 24 Rekonstruovaný chromatogram metabolitu s m/z 285,0531 (a) a jeho MS/MS spektrum (b); (LS174T buněčné linie, negativní mód)

Během biotransformačních experimentů s pelargonidinem provedených paralelně s kvercetinem bylo nalezeno jen velmi malé množství metabolitů. Jak je uvedeno v tabulce 6, pro pelargonidin byla pozorována pouze hydroxylace a glukuronidace. El Mohsen a kol. studovali metabolickou dráhu pelargonidinu *in vivo* u krys a byly nalezeny pouze dva metabolity - glukuronid pelargonidinu a hydroxybenzoová kyselina [110].

Přítomnost dalšího kruhu v molekule 5-MePPI způsobila značné zvýšení produkce metabolitů oproti pelargonidinu (Obr. 25). Poměr celkové sumy metabolitů k rodičovskému iontu 5-MePPI byl přibližně 10x větší oproti pelargonidinu (vypočteno z ploch píků).



Obr. 25 Profil metabolitů testovaných flavonoidů I a II fáze produkovaných buněčnými liniemi LS174T v médiu a v peletech v průběhu metabolizačního experimentu

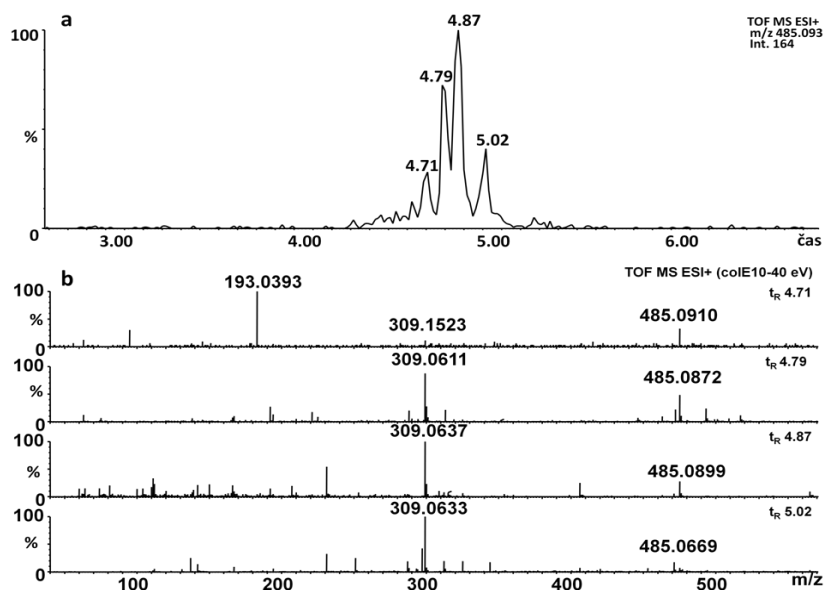
Obrázek 25 znázorňuje profil metabolitů během celé fáze biotransformace na buněčných liniích LS174T (1, 2, 24 hod, suma píků). Největší množství metabolitů I. fáze bylo pozorováno u kvercetin (hydroxylace). Samotné maximum bylo dosaženo po dvou hodinách biotransformace flavonoidu. Celkové množství metabolitů II. fáze (suma píků) je nižší. Maximum produkce metabolitů druhé fáze bylo dosaženo po 24 hodinách biotransformace. Časový rozdíl mezi maximy tvorby metabolitů I. a II. fáze je logická – konjugální metabolická fáze přichází obvykle až po I. fázi. Překvapivý je vznik dimerů/trimerů, které byly akumulovány v peletech buněk po 24 hodinách biotransformačních pochodů.

Složení metabolitů 5-MePPI I. i II. fáze je po 1 i 2 hodině srovnatelné. Pro metabolity II. fáze je však pozorován značný nárůst po 24 hodinách. Množství vzniklých metabolitů II. fáze po 24 hodinách je u 5-MePPI dokonce vyšší než u kvercetin. V peletech buněk je obsah metabolitů II. fáze pro 5-MePPI také výrazně vyšší než obsah metabolitů I. fáze.

Celkové množství vzniklých metabolitů je nejmenší pro pelargonidin v porovnání s dalšími studovanými flavonoidy. Nicméně je vidět stejný posun nástupu metabolitů II. fáze jako u ostatních flavonoidů.

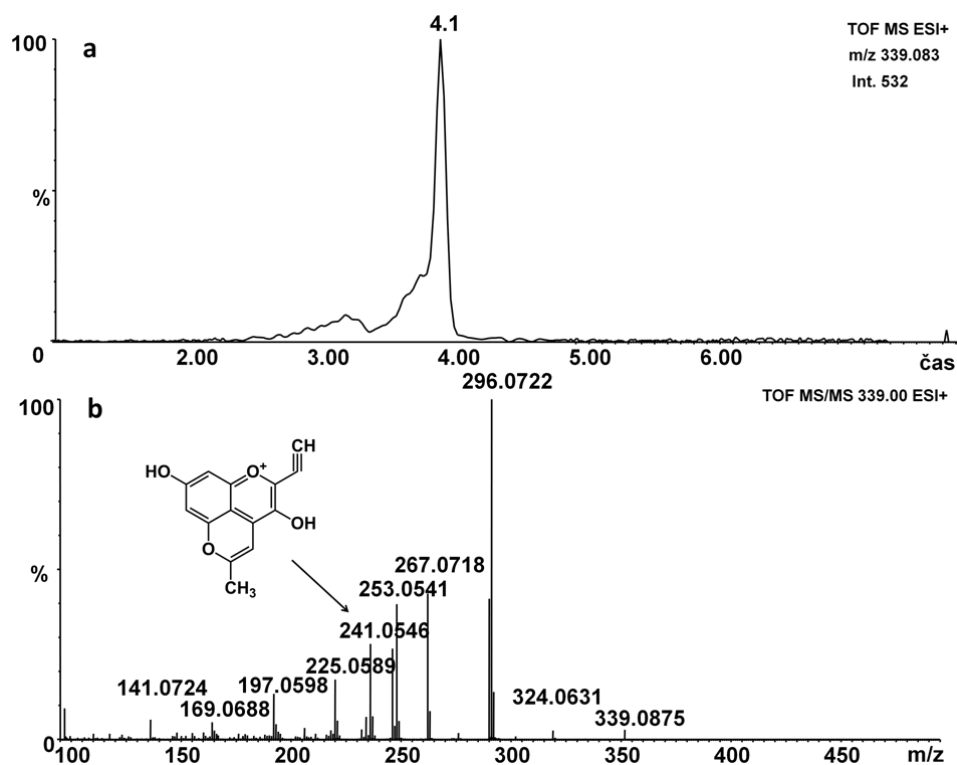
Zajímavá je výrazná akumulace metabolitů v buněčných peletech. Pelargonidin, podobně jako kvercetin akumuluje v buňkách více metabolitů I. fáze. U 5-MePPI je tomu přesně naopak. Přítomnost čtvrtého kruhu v molekule má výrazný vliv na metabolismus v buňkách. Vypočtené rozdělovací koeficienty (clogPs) pro neutrální formy kvercetin, pelargonidinu a 5-MePPI jsou 1,504, 1,523 a 2,959. 5-MePPI je mnohem více hydrofobní molekulou než pelargonidin a kvercetin. Hydrofobicita by tak mohla být jedním s parametrů mající vliv na biotransformační procesy v buňkách.

Detailní seznam všech nalezených metabolitů 5-MePPI je uveden v tabulce 6. Mezi nimi jsou i základní metabolické procesy jako hydroxylace a glukuronidace. U glukuronidace byly pozorovány 4 izomerické píky (Obr. 26a).



Obr. 26 Rekonstruovaný chromatogram 5-MePPI glukuronidů (a) a MS(2) spektra izomerů s nejvyšší intenzitou

Ztráta glukuronidové jednotky v MS spektru s vyšší kolizní energií ($\Delta m/z$ 176 v MS(2) skenu) je charakteristická pro všechny izomery (Obr. 26b). Větší rozdíl v naměřené přesné hmotě u první píku v kolizním spektru je ovlivněn nízkou intenzitou píku (t_R 4,71 min) a tedy i nízkou intenzitou vzniklých iontů. Profil chromatografického píku fragmentu m/z 193,0393 je rozdílný od ostatních iontů přítomných v MS(2) skenu a neodpovídá fragmentům 5-MePPI glukuronidu. Mezi metabolity 5-MePPI byl identifikován také odpovídající glukosid (Tab 6). 5-MePPI metabolizuje z hlediska druhu produkovaných metabolitů podobně jako kvercetin. Byly zde však navíc nalezeny dva složitější metabolity.

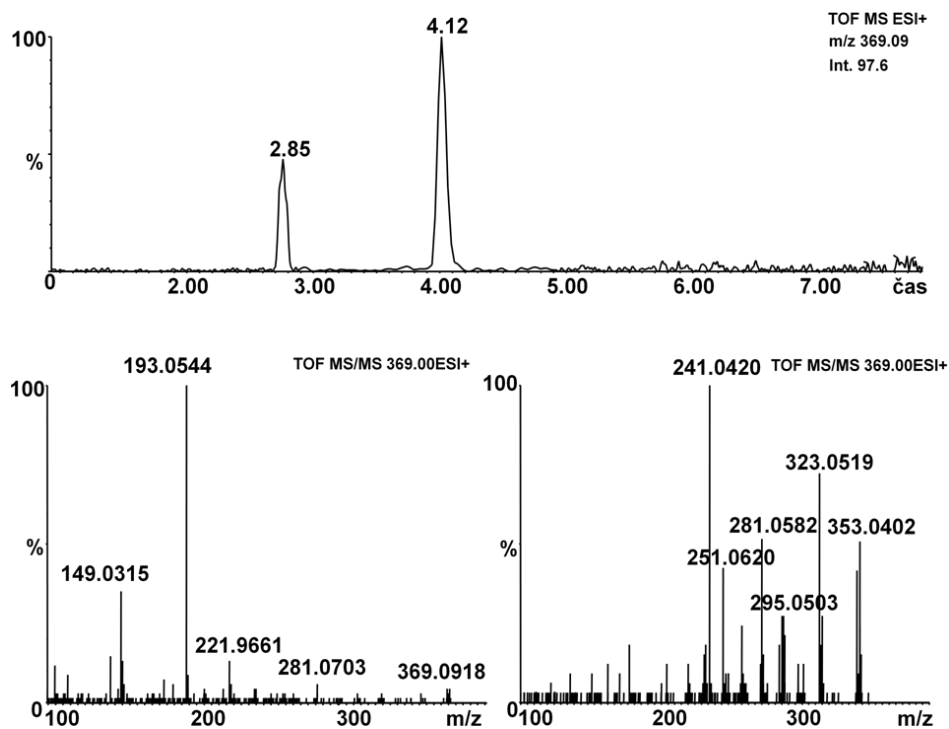


Obr. 27 Rekonstruovaný chromatogram monometylovaného metabolitu 5-MePPI (a) a jeho MS/MS spektrum (b)

Obrázek 27a znázorňuje rekonstruovaný chromatogram mono-hydroxylovaného-monometylovaného metabolitu 5-MePPI (m/z 339,0830). V jeho MS/MS spektru je pak vidět charakteristická ztráta methylového radikálu za vzniku fragmentu m/z 324,0631 a dále dvě následné ztráty oxidu uhelnatého ($\Delta m/z=28$). Fragment m/z 241,0456 lze vysvětlit probíhajícím Retro-Diels-Alderovým štěpením (RDA) na kruhu B (struktura vložená v Obr. 27b). Tento fragment dovoluje blíže určit pozici hydroxylace a methylace – oba procesy probíhají na B-kruhu tohoto metabolitu. Dále je ještě viditelná následná ztráta CO a vody za vzniku iontu m/z 197,0598.

Dalším pozorovaným metabolitem byl dvakrát hydroxylovaný a dvakrát methylovaný metabolit 5-MePPI (m/z 369,0916 a m/z 369,0952) (Obr. 28). U tohoto metabolitu byly pozorovány dva separované izomery. V MS/MS spektru intenzivnějšího izomeru ($t_R = 4,12$ min) jsou viditelné ztráty methylových radikálů, methanu, CO i vody. Dominantním fragmentem je m/z 241,0420, který je shodný s fragmentem pozorovaným u mono-hydroxylovaného-monometylovaného metabolitu 5-MePPI. Tento fragment rovněž vzniká

RDA štěpením B-kruhu. Tento metabolit je tedy rovněž hydroxylován a methylován na B-kruhu. Tento závěr navíc podporuje přítomnost fragmentu m/z 181,0582 odpovídající $^{0,2}B_0$ RDA fragmentu (vzniku acyliového iontu odvozeného z kyseliny syringové).



Obr. 28 Rekonstruovaný chromatogram dvakrát hydroxylovaného a dvakrát methylovaného metabolitu 5-MePPI (a) a MS/MS spektra dvou přítomných izomerů (b)

Fragmentační cesta prvního (méně intenzivnějšího) izomeru ($t_R = 2,86$ min) je odlišná. Ion m/z 149,0315 může být vysvětlen rozštěpením heterocyklického C-kruhu 5-MePPI a vznikem $^{0,3}B_0$ RDA fragmentu. Toto potvrzuje, že hydroxylace a methylace probíhá na A nebo D kruhu 5-MePPI.

Studium in vitro biotransformace pelargonidinu, 5-MePPI a kvercetinu bylo provedeno na modelových jaterních HepG2 a střevních LS174T buněčných liniích. Výrazně vyšší metabolickou aktivitu jevíly střevní buněčné linie LS174T. Přítomnost induktorů RIF a TCCD neměla výraznější vliv na biotransformaci. V případě kvercetinu byly nalezeny základní metabolické pochody I. a II. fáze, které potvrdily metabolickou funkci testovaných buněčných linií. Zajímavostí a do budoucna i předmět dalších studií je nález dimerů a trimerů kvercetinu v buněčných peletech LS174T. Studované anthokyaniny pelargonidin a 5-MePPI

vykazovaly nižší metabolickou aktivitu v porovnání s kvercetinem. Biotransformační cesta 5-MePPI je vzhledem k identifikovaným metabolitům odlišná od pelargonidinu i kvercetinu. Tento fakt může být způsobem přítomností pyrano kruhu a také vyšší hydrofobicitou v porovnání ostatními studovanými flavonoidy.

6. Závěr

Předmětem disertační práce bylo studium flavonoidů a produktů jejich biotransformace. V první část byla věnována extrakci plodů zimolezů a identifikaci anthokyaninových barviv. Jako nejvhodnější extrakční činidlo pro extrakci flavonoidů z plodů zimolezu z hlediska výtěžku se jeví methanol. Při extrakci směsí methanol-aceton vznikají pyranoanthokyaninová barviva. V získaných extraktech byly identifikována základní anthokyanivá barviva (zejm. hexosidy, dihexosidy a rutinosidy kyanidinu a peonidinu), ale také složitější barviva: 5-methylpyranoanthokyaniny (5-methylpyrano deriváty kyanidinu a peonidinu 3-hexosidů), dimery (zejména kyanidin-3-hexosidu) a kondezované pigmenty jako kyanidin-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)katechin a kyanidin-3-hexosid-vinyl(epi)katechin.

Další část byla věnována studiu metabolismu flavonoidů. Pomocí *in vitro* studií na lidských jaterních (HepG2) a střevních (LS174T) buněčných liniích byly testovány 3 zástupci flavonoidů – kvercetin jako modelová dobře prostudovaná látka, pelargonidin – zástupce anthokyaninových barviv a 5-MePPI jako odpovídající 5-methylpyranoanthokyanin. U kvercetinu byly nalezeny běžné metabolity I. i II. fáze, ale i složitější metabolity jako dimery a trimery. Studium procesů probíhajících při *in vitro* biotransformaci pelargonidinu a 5-methylpyranopelargonidinu na lidských jaterních (HepG2) a střevních (LS174T) buněčných liniích přispívá k porozumění rozdílům mezi osudem nativních anthokyaninů a složitějších barviv (vznikajících v plodech a z nich vyráběných potravin a potravinových doplňků) v lidském organismu. Řada metabolitů vzniká v několika chromatograficky separovaných izomerních formách, což potvrzuje přítomnost několika center v molekulách flavonoidů umožňujících metabolizaci. Mezi metabolity 5-methylpyranopelargonidinu byly nalezeny i metabolity kombinované. Detailní interpretace kolizních spekter umožnila blíže specifikovat v molekule, místa, kde dochází k metabolizaci.

Literatura

- 1 Tsao R.: *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols*. *Nutrients* 2, 1231-1246 (2010).
- 2 Gonzales G.B., Smagghe G., Grootaert C., Zotti M., Raes K., Camp J.V.: *Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity*. *Drug Metab Rev*, 1-16 (2015).
- 3 de R.E., Out P., Niessen W.M., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.: *Analytical separation and detection methods for flavonoids*. *J Chromatogr A* 1112, 31-63 (2006).
- 4 Winkel-Shirley B.: *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology*. *Plant Physiol* 126, 485-493 (2001).
- 5 Andersen O.M., Markham K.R.: *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & Francis Group. Printed in the United States of America, (2006).
- 6 Havsteen B.H.: *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. *Pharmacol Ther* 96, 67-202 (2002).
- 7 Wang H., Cao G., Prior R.L.: *Total Antioxidant Capacity of Fruits*. *J Agric Food Chem* 44, 701-705 (1996).
- 8 Williams R.J., Spencer J.P., Rice-Evans C.: *Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?* *Free Radic Biol Med* 36, 838-849 (2004).
- 9 Melo-Filho C.C., Braga R.C., Andrade C.H.: *Advances in methods for predicting phase I metabolism of polyphenols*. *Curr Drug Metab* 15, 120-126 (2014).
- 10 Cook N.C., Samman S.: *Flavonoids Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7, 66-76 (1996).
- 11 Harborne J.B.: *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, (1993).
- 12 Paliyath G., Bakovic M., Shetty K.: *Functional Foods, Nutraceuticals and Degenerative Disease Prevention*. Wiley, (2011).
- 13 Rechner A.R., Kuhnle G., Bremner P., Hubbard G.P., Moore K.P., Rice-Evans C.A.: *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*. *Free Radic Biol Med* 33, 220-235 (2002).
- 14 Wrolstad R.E., Durst R.W., Lee J.: *Tracking color and pigment changes in anthocyanin products*. *Trends in Food Science and Technology* 16, 423-428 (2005).

- 15 Mansuri M.L., Parihar P., Solanki I., Parihar M.S.: *Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways*. Genes Nutr 9, 400 (2014).
- 16 Maggioni D., Biffi L., Nicolini G., Garavello W.: *Flavonoids in oral cancer prevention and therapy*. Eur J Cancer Prev (2014).
- 17 Sak K., Everaus H.: *Role of Flavonoids in Future Anticancer Therapy by Eliminating the Cancer Stem Cells*. Curr Stem Cell Res Ther (2014).
- 18 Majewska M., Skrzycki M., Podsiad M., Czeczot H.: *Evaluation of antioxidant potential of flavonoids: an in vitro study*. Acta Pol Pharm 68, 611-615 (2011).
- 19 Pietta P.G.: *Flavonoids as antioxidants*. J Nat Prod 63, 1035-1042 (2000).
- 20 Kim D.O., Lee C.Y.: *Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship*. Crit Rev Food Sci Nutr 44, 253-273 (2004).
- 21 Beekmann K., Actis-Goretta L., van Bladeren P.J., Dionisi F., Destailats F., Rietjens I.M.: *A state-of-the-art overview of the effect of metabolic conjugation on the biological activity of flavonoids*. Food Funct 3, 1008-1018 (2012).
- 22 Hertog M.G., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D.: *Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands*. Nutr Cancer 20, 21-29 (1993).
- 23 Svarcova I., Heinrich J., Valentova K.: *Berry fruits as a source of biologically active compounds: the case of Lonicera caerulea*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 151, 163-174 (2007).
- 24 Black S.: *Clinical and Pathological Reports*. Newry:printed by Alexander Wilkinson, and sold by Longman, Hurst, Orme and Brown London, (1819).
- 25 Yang X., Li X., Ren J.: *From French Paradox to cancer treatment: anti-cancer activities and mechanisms of resveratrol*. Anticancer Agents Med Chem 14, 806-825 (2014).
- 26 Hausenblas H.A., Schoulda J.A., Smoliga J.M.: *Resveratrol treatment as an adjunct to pharmacological management in type 2 diabetes mellitus-systematic review and meta-analysis*. Mol Nutr Food Res 59, 147-159 (2015).
- 27 Artero A., Artero A., Tarin J.J., Cano A.: *The impact of moderate wine consumption on health*. Maturitas 80, 3-13 (2015).
- 28 Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L.: *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr 79, 727-747 (2004).
- 29 Chen Y., Deuster P.: *Comparison of quercetin and dihydroquercetin: antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane*. Chem Biol Interact 182, 7-12 (2009).

- 30 Romero C., Bakker J.: *Effect of storage temperature and pyruvate on kinetics of anthocyanin degradation, vitisin A derivative formation, and color characteristics of model solutions*. J Agric Food Chem 48, 2135-2141 (2000).
- 31 Fulcrand H., Benabdeljalil C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M.: *A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins*. Phytochemistry 47, 1401-1407 (1998).
- 32 Sarni-Manchado P., Fulcrand H., Souquet J.M., Cheynier V., Moutounet M.: *Stability and colour of unreported wine anthocyanin-derived pigments*. J Food Sci 61, 938-941 (1996).
- 33 He J., Carvalho A.R., Mateus N., de F., V: *Spectral features and stability of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments isolated from red wines*. J Agric Food Chem 58, 9249-9258 (2010).
- 34 Papouskova B., Bednar P., Hron K., Stavek J., Balik J., Myjavcova R., Bartak P., Tomankova E., Lemr K.: *Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic*. J Chromatogr A 1218, 7581-7591 (2011).
- 35 Alcalde-Eon C., Escribano-Bailon M.T., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C.: *Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAD-ESI/MSn*. J Mass Spectrom 42, 735-748 (2007).
- 36 Kurka O., Myjavcová R., Bednář P.: *Možnosti přípravy vybraných kondenzovaných anthokyaninů v modelových podmínkách a studium jejich vlastností*. Chem Listy 105, 37-39 (2011).
- 37 Gonzalez-Paramas A.M., Lopes da Silva F., Martin-Lopez P., Macz-Pop G., Gonzalez-Manzano S., Alcalde-Eon C., Perez-Alonso J.J., Escribano-Bailon M.T., Rivas-Gonzalo J.C., Santos-Buelga C.: *Flavanol-anthocyanin condensed pigments in plant extracts*. Food Chem 94, 428-436 (2006).
- 38 Macz-Pop G.A., Gonzalez-Paramas A.M., Perez-Alonso J.J., Rivas-Gonzalo J.C.: *New flavanol-anthocyanin condensed pigments and anthocyanin composition in guatemalan beans (Phaseolus spp.)*. J Agric Food Chem 54, 536-542 (2006).
- 39 Teixeira N., Cruz L., Bras N.F., Mateus N., Ramos M.J., de F., V: *Structural features of copigmentation of oenin with different polyphenol copigments*. J Agric Food Chem 61, 6942-6948 (2013).
- 40 He F., Liang N.N., Mu L., Pan Q.H., Wang J., Reeves M.J., Duan C.Q.: *Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression*. Molecules 17, 1571-1601 (2012).
- 41 Leopoldini M., Rondinelli F., Russo N., Toscano M.: *Pyranoanthocyanins: a theoretical investigation on their antioxidant activity*. J Agric Food Chem 58, 8862-8871 (2010).

- 42 Morata A., Gomez-Cordoves M.C., Colomo B., Suarez J.A.: *Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of Saccharomyces cerevisiae: relationship with Vitisin A and B formation in red wines*. J Agric Food Chem 51, 7402-7409 (2003).
- 43 Mateus N., Oliveira J., Haettich-Motta M., de F., V: *New Family of Bluish Pyranoanthocyanins*. J Biomed Biotechnol 2004, 299-305 (2004).
- 44 Castaneda-Ovando A., acheco-Hernandez M.L., Paez-Hernandez M.E., Rodriguez J.A., Galan-Vidal C.A.: *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chem 113, 859-871 (2009).
- 45 Kong J.M., Chia L.S., Goh N.K., Chia T.F., Brouillard R.: *Analysis and biological activities of anthocyanins*. Phytochemistry 64, 923-933 (2003).
- 46 Martens S., Preuss A., Matern U.: *Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis thaliana L*. Phytochemistry 71, 1040-1049 (2010).
- 47 Falcone Ferreyra M.L., Rius S.P., Casati P.: *Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications*. Front Plant Sci 3, 222 (2012).
- 48 Kumar S., Pandey A.K.: *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. ScientificWorldJournal 2013, 162750 (2013).
- 49 KOUKOL J., CONN E.E.: *The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare*. J Biol Chem 236, 2692-2698 (1961).
- 50 Mouradov A., Spangenberg G.: *Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate*. Front Plant Sci 5, 620 (2014).
- 51 Clegg M.T., Durbin M.L.: *Tracing floral adaptations from ecology to molecules*. Nat Rev Genet 4, 206-215 (2003).
- 52 Grotewold E.: *The Science of Flavonoids*. Springer Science, (2006).
- 53 Fang J.: *Bioavailability of anthocyanins*. Drug Metab Rev 46, 508-520 (2014).
- 54 Huynh N.T., Van C.J., Smagghe G., Raes K.: *Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review*. Int J Mol Sci 15, 19369-19388 (2014).
- 55 Jafari S., Saeidnia S., Abdollahi M.: *Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle*. Curr Pharm Biotechnol 15, 409-421 (2014).
- 56 Dvořák Z., Cvek B.: *Vybrané kapitoly z buněčné biologie*. 1. vydání, Univerzita Palackeho V Olomouci, (2011).
- 57 Dostálek M.: *Farmakokinetika*. Grada, (2006).

- 58 Knejzlík Z., Kas J., Ruml T.: *Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace*. Chem Listy 94, 913-918 (2000).
- 59 Xu C., Li C.Y., Kong A.N.: *Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics*. Arch Pharm Res 28, 249-268 (2005).
- 60 Boudene C., Boisset M.: *Cytochrome P450. Its importance in toxicology. II. Regulation of its biosynthesis and its activity. Activation and inhibition*. Ann Biol Clin (Paris) 34, 1-40 (1976).
- 61 Anzenbacher P., Anzenbacherova E.: *Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics*. Cell Mol Life Sci 58, 737-747 (2001).
- 62 Kay C.D.: *Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans*. Nutr Res Rev 19, 137-146 (2006).
- 63 Hollman P.C., Katan M.B.: *Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man*. Arch Toxicol Suppl 20, 237-248 (1998).
- 64 Gugler R., Leschik M., Dengler H.J.: *Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses*. Eur J Clin Pharmacol 9, 229-234 (1975).
- 65 Hollman P.C., de Vries J.H., van Leeuwen S.D., Mengelers M.J., Katan M.B.: *Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers*. Am J Clin Nutr 62, 1276-1282 (1995).
- 66 Hollman P.C., Bijsman M.N., van G.Y., Cnossen E.P., de Vries J.H., Katan M.B.: *The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man*. Free Radic Res 31, 569-573 (1999).
- 67 Day A.J., Bao Y., Morgan M.R., Williamson G.: *Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity*. Free Radic Biol Med 29, 1234-1243 (2000).
- 68 Nemeth K., Plumb G.W., Berrin J.G., Juge N., Jacob R., Naim H.Y., Williamson G., Swallow D.M., Kroon P.A.: *Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans*. Eur J Nutr 42, 29-42 (2003).
- 69 Passamonti S., Vrhovsek U., Vanzo A., Mattivi F.: *The stomach as a site for anthocyanins absorption from food*. FEBS Lett 544, 210-213 (2003).
- 70 Aziz A.A., Edwards C.A., Lean M.E., Crozier A.: *Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions*. Free Radic Res 29, 257-269 (1998).
- 71 Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C.: *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. Am J Clin Nutr 81, 230S-242S (2005).

- 72 Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Yamamoto H., Kinae N.: *Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans*. FEBS Lett 438, 220-224 (1998).
- 73 Spencer J.P., Chowrimootoo G., Choudhury R., Debnam E.S., Srai S.K., Rice-Evans C.: *The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids*. FEBS Lett 458, 224-230 (1999).
- 74 Oliveira E.J., Watson D.G., Grant M.H.: *Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma*. Xenobiotica 32, 279-287 (2002).
- 75 Kuhnle G., Spencer J.P., Schroeter H., Shenoy B., Debnam E.S., Srai S.K., Rice-Evans C., Hahn U.: *Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine*. Biochem Biophys Res Commun 277, 507-512 (2000).
- 76 Williamson G., Day A.J., Plumb G.W., Couteau D.: *Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates*. Biochem Soc Trans 28, 16-22 (2000).
- 77 Boulton D.W., Walle U.K., Walle T.: *Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism*. J Pharm Pharmacol 51, 353-359 (1999).
- 78 O'Leary K.A., Day A.J., Needs P.W., Mellon F.A., O'Brien N.M., Williamson G.: *Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism*. Biochem Pharmacol 65, 479-491 (2003).
- 79 Vacek J., Papouskova B., Vrba J., Zatloukalova M., Kren V., Ulrichova J.: *LC-MS metabolic study on quercetin and taxifolin galloyl esters using human hepatocytes as toxicity and biotransformation in vitro cell model*. J Pharm Biomed Anal 86, 135-142 (2013).
- 80 Aura A.M., Martin-Lopez P., O'Leary K.A., Williamson G., Oksman-Caldentey K.M., Poutanen K., Santos-Buelga C.: *In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora*. Eur J Nutr 44, 133-142 (2005).
- 81 Stalmach A., Edwards C.A., Wightman J.D., Crozier A.: *Colonic catabolism of dietary phenolic and polyphenolic compounds from Concord grape juice*. Food Funct 4, 52-62 (2013).
- 82 Juranic Z., Zizak Z., Tasic S., Petrovic S., Nidzovic S., Lepasovic A., Stanojkovic T.: *Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars*. Food Chem 93, 39-45 (2005).
- 83 Kang T.B., Liang N.C.: *Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells*. Biochem Pharmacol 54, 1013-1018 (1997).

- 84 Das N.P., Griffiths L.A.: *Studies on flavonoid metabolism. Metabolism of flavone in the guinea pig.* Biochem J 98, 488-492 (1966).
- 85 Su S., Guo J., Duan J.A., Wang T., Qian D., Shang E., Tang Y.: *Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of the bioactive components and their metabolites of Shaofu Zhuyu decoction active extract in rat plasma.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 878, 355-362 (2010).
- 86 He J., Feng Y., Ouyang H.Z., Yu B., Chang Y.X., Pan G.X., Dong G.Y., Wang T., Gao X.M.: *A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma: application to a pharmacokinetic study of total flavonoids from mulberry leaves.* J Pharm Biomed Anal 84, 189-195 (2013).
- 87 Qian X., Zhang Q., Zhang Y., Tu Y.: *Separation/determination of flavonoids and ascorbic acid in rat serum and excrement by capillary electrophoresis with electrochemical detection.* Anal Sci 26, 557-560 (2010).
- 88 Sheedy J.R.: *Metabolite analysis of biological fluids and tissues by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy.* Methods Mol Biol 1055, 81-97 (2013).
- 89 Solanky K.S., Bailey N.J., Holmes E., Lindon J.C., Davis A.L., Mulder T.P., Van Duynhoven J.P., Nicholson J.K.: *NMR-based metabolomic studies on the biochemical effects of epicatechin in the rat.* J Agric Food Chem 51, 4139-4145 (2003).
- 90 An D., Zhang Q., Wu S., Wei J., Yang J., Dong F., Yan X., Guo C.: *Changes of metabolic profiles in urine after oral administration of quercetin in rats.* Food Chem Toxicol 48, 1521-1527 (2010).
- 91 Prasain J.K., Wang C.C., Barnes S.: *Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples.* Free Radic Biol Med 37, 1324-1350 (2004).
- 92 Boutin O., Badens E.: *Extraction from oleaginous seeds using supercritical CO₂: Experimental design and products quality.* J Food Eng 92, 396-402 (2009).
- 93 Longo L., Vasapollo G.: *Anthocyanins from bay (Laurus nobilis L.) berries.* J Agric Food Chem 53, 8063-8067 (2005).
- 94 Bhandari P., Kumar N., Gupta A.P., Singh B., Kaul V.K.: *A rapid RP-HPTLC densitometry method for simultaneous determination of major flavonoids in important medicinal plants.* J Sep Sci 30, 2092-2096 (2007).
- 95 Kajdzanoska M., Petreska J., Stefova M.: *Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries.* J Agric Food Chem 59, 5272-5278 (2011).
- 96 Jing P., Giusti M.M.: *Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (Zea mays L.) color extract.* J Food Sci 72, C363-C368 (2007).

- 97 Palikova I., Heinrich J., Bednar P., Marhol P., Kren V., Cvak L., Valentova K., Ruzicka F., Hola V., Kolar M., Simanek V., Ulrichova J.: *Constituents and antimicrobial properties of blue honeysuckle: a novel source for phenolic antioxidants*. J Agric Food Chem 56, 11883-11889 (2008).
- 98 Kahkonen M.P., Heinamaki J., Ollilainen V., Heinonen M.: *Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities*. J Sci Food Agric 83, 1403-1411 (2003).
- 99 He J., Santos-Buelga C., Mateus N., de F., V: *Isolation and quantification of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments from red wines by combination of column chromatographic techniques*. J Chromatogr A 1134, 215-225 (2006).
- 100 Jordheim M., Giske N.H., Andersen O.M.: *Anthocyanins in Caprifoliaceae*. Biochem Syst Ecol 35, 153-159 (2007).
- 101 Andersen O.M., Fossen T., Torskangerpoll K., Fossen A., Hauge U.: *Anthocyanin from strawberry (Fragaria ananassa) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin*. Phytochemistry 65, 405-410 (2004).
- 102 Chaovanalikit A., Thompson M.M., Wrolstad R.E.: *Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in blue Honeysuckle (Lonicera caerulea L.)*. J Agric Food Chem 52, 848-852 (2004).
- 103 Lu Y.R., Foo L.Y.: *Unusual anthocyanin reaction with acetone leading to pyranoanthocyanin formation*. Tetrahedron Lett 42, 1371-1373 (2001).
- 104 Hackett A.M.: *The metabolism of flavonoid compounds in mammals*. Prog Clin Biol Res 213, 177-194 (1986).
- 105 Walle T.: *Absorption and metabolism of flavonoids*. Free Radic Biol Med 36, 829-837 (2004).
- 106 Havsteen B.: *Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency*. Biochem Pharmacol 32, 1141-1148 (1983).
- 107 Spencer J.P., Kuhnle G.G., Williams R.J., Rice-Evans C.: *Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites*. Biochem J 372, 173-181 (2003).
- 108 Murota K., Terao J.: *Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism*. Arch Biochem Biophys 417, 12-17 (2003).
- 109 Holcapek M., Kolarova L., Nobilis M.: *High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites*. Anal Bioanal Chem 391, 59-78 (2008).
- 110 El Mohsen M.A., Marks J., Kuhnle G., Moore K., Debnam E., Kaila S.S., Rice-Evans C., Spencer J.P.: *Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats*. Br J Nutr 95, 51-58 (2006).

Seznam zkratek

DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrosprej
Gl	Glukosid
Hex	Hexosid
Ky	Kyanidin
LC	Kapalinová chromatografie
LCPF	<i>Lonicera caerulea var kamtschatica</i> - fenolická frakce
LPH	Laktasa-phloridzin hydrolysa
MS	Hmotnostní spektrometrie
Mv	Malvidin
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PBS	Fosfátový pufr
Pe	Peonidin
Pl	Pelargonidin
Q	Kvadrupól
RDA	Retro-Diels-Alderové štěpení
RIF	Rifampicin
TCCD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TOF	Analyzátor doby letu

UHPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
μLC	Mikrokolonová kapalinová chromatografie
5-MePKy	5-methylpyranokyanidin
5-MePPe	5-methylpyranopeonidin
5-MePPl	5-methylpyranopelargonidin

Curriculum Vitae

Jméno, příjmení, titul: Renáta Myjavcová, Mgr.

Datum a místo narození: 25. dubna 1984 ve Zlíně, Česká Republika

Trvalé bydliště: Nademlejnská 1086/12, Praha 9 - Hloubětín, 19800

Kontaktní email: renata.myjavcova@gmail.com

Pracovní zkušenosti:

1. 8. 2014 – doposud

GENvia, s.r.o. – vedoucí cytogenetické laboratoře

1. 12. 2010 – 31. 7. 2014

Imalab, s.r.o. – cytogenetik

2009 - 2010

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, pracovní pozice – manažer stáží v podnicích

2009, 2010– Studijní stáž v Turecku, Suleyman Demirel University, Faculty of Art and Science in Isparta

2008 – Pracovní stáž v Maďarsku, Teva Pharmaceutical Works Ltd., oddělení analytické chemie, Debrecen

Vzdělání:

2008 – *dosud*

Postgraduální studium analytické chemie na PřF UP Olomouc

2006 – 2008

Navazující magisterské studium biochemie na PřF UP Olomouc

2003 – 2008

Bakalářské studium biochemie na PřF UP Olomouc

Jazykové znalosti:

Anglický jazyk – středně pokročily, Francouzský jazyk – mírně pokročily, Ruský jazyk – začátečník

Odborné vědecké zaměření:

Hmotnostní spektrometrie (MS), kapalinová chromatografie (LC, UHPLC, HPLC), kapilární elektroforéza (CE), CE/MS, elektrochemické metody.

Karyotypování, PCR metody, FISH metoda, CGH array, práce s buněčnými kulturami.

Intensive Course on Screening for Down's Syndrome Wolfson Institute of Preventive Medicine, London 2013, UK

Pedagogická činnost:

Laboratorní cvičení z Chemické instrumentace pro 3. ročníky bakalářských oborů chemie

Vedoucí a oponent bakalářské práce

Řešené projekty:

Projekt FRVŠ č. 2676/2010/G6 „Tvorba příručky pro začínající vyučující předmětu Cvičení z analytické chemie“ – řešitelka

Projekt FRVŠ 2909/2010/G6 „Inovace obsahu a studijních opor předmětu Projektová výuka v chemii“ – spoluřešitelka

Studijní úspěchy:

V roce 2010 – cena za nejlepší poster prezentovaný na konferenci Analytické metody a zdraví člověka, Bratislava

V roce 2006 - 3. místo v soutěži „O cenu firmy Merck“ o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie

Seznam publikací:

1. publikace přímo spojené s disertační prací:

Myjavcova R., Bednar P., Srovnalova A., Dvorak Z., Papouskova B.: *Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Study of Metabolism of 5-Methylpyranopelargonidin*. *Chromatographia* 78, 189-201 (2015).

Kurka O., **Myjavcova R.**, Bednar P. *Possibilities of preparation of selected condense anthocyanins in model conditions and study of its properties*. *Chem. Listy* 105, 37-39 (2011).

Myjavcova R., Marhol P., Kren V., Simanek V., Ulrichova J., Palikova I., Papouskova B., Lemr K., Bednar P. *Analysis of anthocyanin pigments in Lonicera (Caerulea) extracts using chromatographic fractionation by μ LC-QqTOF-MS*. *J. Chromatogr. A*, 1217 7932-7941 (2010).

2. další publikace v odborných časopisech:

Loucký J., **Myjavcová R.**, Zemánek M., Loucká E., Kovalčík M.: *Neinvazivní testování – 2 roky v klinické praxi*. *Actual Gyn.*, 6, 11 (2014).

Uygun A., Myjavcova R., Yavuz A., Ruppel J.V., Fields K.B., Frankhauser A., Zhang X.P., Bhethanbotla V.R., Bednar P. *Electrochemical polymerization and investigation of properties of poly(5-(4'-aminophenylamino)-10,20-diphenylporphyrin)*. *Electroanalysis*, 23, 1158 – 1167 (2011).

Papouskova B., Bednar P., Hron K., Stavek J., Balik J., **Myjavcova R.**, Bartak P., Tomankova E., Lemr K. *Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic*. *J Chromatogr A* 1218, 7581-7591 (2011).

Jirovsky D., Bednar P., **Myjavcova R.**, Bartosova Z., Skopalova J., Tvrdonová M., Lemr K.: *Study of electrochemical oxidation of cyanidin glycosides by online combination of electrochemistry with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Monatsh. Chem.* 142, 1211-1217 (2011).

Mrázová V., Macíková P., **Myjavcová R.**, Ginterová P., Muller L. *E-Learningové opory předmětů Projektová výuka v chemii a Cvičení z analytické chemie*. Media4u Magazine. ISSN 1214-9187. X3/2010, 132-138.

Prezentace na odborných setkáních:

Myjavcová R., Loucký J., Zemánek M., Loucká E., Kovalčík M.: Výhody a nevýhody neinvazivního prenatalního testování (NIPT). 35. celostátní konference sekce ultrazvukové diagnostiky České gynekologické a porodnické společnosti. 3.-5.10.2014 Brno, poster

Myjavcová R., Rychliková R., Macků M., Loucký J.: Prenatální diagnostika – současné možnosti neinvazivního testování. Odborná konference - Laboratorní diagnostika jako významný zdroj informací v péči o pacienta. 24.10.2013, Zlín, přednáška

Bednář P., Papoušková B., Hartmanová L., Hron K., Stávek J., Balík J., **Myjavcová R.**, Barták P., Tománková E., Lemr K.: LC/MS and surface ionization techniques in classification of red wine. 19th International Mass Spectrometry Conference. 15.-21.9.2012, Kyoto, Japan, poster

Jirovský D., Bartošová Z., **Myjavcová R.**, Bednář P., Lemr K., Study of Anthocyanin Oxidative Transformations Using on-Line Coupling Of Electrochemistry with Mass-Spectrometry. The 14th Annual Meeting of the Israel Analytical Chemistry Society Conference & Exhibition, 7.-8.2.2011, Tel Aviv, Israel, poster

Myjavcova R., Marhol P., Kren V., Simenek V., Ulrichova J., Lemr K., Papouskova B., Bednar P.: Analysis of anthocyanin dyes in extracts of Blue Honeysuckle berries by mass spectrometry. Analytické metody a zdravie človeka 2010, 18. medzinárodná konferencia 11.-14.10.2010, Bratislava, poster

Marhol P., **Myjavcová R.**, Bednář P., Ulrichová J., Šimánek V., Heinrich J., Křen V.: Anthocyanins and Pyranoanthocyanins in *Lonicera caerulea* L. Berries. 5th International Workshop on Anthocyanins. 2009, Japan, poster

Příloha

Součástí přílohy jsou publikace přímo spojené s disertační prací a další publikace v odborných časopisech.

Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Study of Metabolism of 5-Methylpyranopelargonidin

R. Myjavcova · P. Bednar · A. Srovnalova · Z. Dvorak ·
B. Papouskova

Received: 20 August 2014 / Revised: 5 December 2014 / Accepted: 8 December 2014 / Published online: 6 January 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Anthocyanin dyes represent an important group of plant polyphenols significantly affecting human diet. Their stability in solution is low and it depends on pH, presence of sulfur dioxide and other parameters. Many stable pyranoanthocyanins are formed by condensation of anthocyanins with small reactive compounds, i.e. pyruvic acid, acetaldehyde, acetone and others, commonly during maturation of food products (e.g. wines and juices). To date, little is known about their metabolism. This communication deals with the study of *in vitro* metabolism of 5-methylpyranopelargonidin (5-MePPI) as a simple member of the pyranoanthocyanin family and its direct comparison with common flavonoids quercetin and pelargonidin. Human colon adenocarcinoma cells LS174T and human hepatocellular carcinoma cells HepG2 were used for experiments. Metabolites were analyzed by UPLC/MS/MS. Quercetin underwent extensive biotransformation with a metabolic profile typical for flavonoids, corroborating that the used cells were metabolically active in parallel experiments with pelargonidin and 5-MePPI (condensation of two and three quercetin molecules was tentatively proposed in addition). Biotransformation of 5-methylpyranopelargonidin proceeded with higher yield of metabolites compared to pelargonidin. Processes related to accumulation

of 5-MePPI metabolites in pellets exhibit significant differences compared to quercetin and pelargonidin. The fact can be ascribed to the presence of an additional ring (D) in the flavonoid skeleton and probably to a higher hydrophobicity of pyrano-dye compared to both other studied flavonoids. Hydroxylation, glucuronation and glucosidation are the main metabolic processes observed during *in vitro* metabolism of 5-MePPI providing several chromatographically resolved isomers of metabolites. Moreover, some combined metabolites were found and the site of metabolization in the 5-MePPI structure was specified based on collision spectra.

Keywords UPLC/MS · Anthocyanin · Pyranoanthocyanin · Metabolite

Introduction

Anthocyanins represent an important group of plant polyphenols. They are responsible for the color of fruits, flowers and other parts of the plants. Anthocyanins significantly affect human diet. Many positive effects of these dyes on human health have been reported to date. Among others, antioxidant, antimicrobial, chemoprotective and antiadherence effects have been described for these compounds. They are considered also for prevention of cardiovascular diseases, diabetes, diseases of the central nervous system and cancer [1–3]. Color as primary organoleptic parameter of food is first determined by present dyes and thus the profile of anthocyanins directly influences the market value of table grapes, red wines and juices.

Stability of anthocyanins in solution is not high and depends on pH, temperature, presence of metals, other flavonoids etc. Anthocyanins are stabilized in solution by condensation with small reactive compounds (i.e. pyruvic acid,

R. Myjavcova · P. Bednar (✉) · B. Papouskova
Regional Centre of Advanced Technologies and Materials,
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky
University, 17. listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc,
Czech Republic
e-mail: bednar.petr@seznam.cz

A. Srovnalova · Z. Dvorak
Regional Centre of Advanced Technologies and Materials,
Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science,
Palacky University, Slechtitelu 11, 771 46 Olomouc,
Czech Republic

acetaldehyde, acetone, acetoacetone and others) to form pyranoanthocyanins. Those derivatives exhibit higher stability compared to anthocyanins. Pyranoanthocyanins were identified in red aged wine for the first time as products of fermentation [4]. Determination of pyranoanthocyanin/anthocyanin ratio can be useful for estimation of aged wine [5]. Some pyranoanthocyanins exhibit larger antioxidant capability compared to respective anthocyanins as computed by Leopoldini et al. [6]. Based on this finding a utilization of pyranoanthocyanins in medicine can be considered. Besides, several vitisin-type pigments were suggested for a safe food coloration [7].

Metabolism of anthocyanins was discussed in several publications [8–12]. Selective investigation of metabolic processes occurring in particular organs is commonly performed using in vitro experiments with corresponding cell cultures. Human hepatocytes and colon cells represent well proven model systems [13]. On the other hand, an in vivo study allows description of biotransformation with less selectivity but in context of all human body. Several papers studied bioavailability of anthocyanins in vivo after consumption of anthocyanin-rich food like blackcurrant juice [14], red grape juice and red wine [15], elderberries and blueberries [16] as well as strawberries [17]. It has long been known that compounds possessing [18, 19] a flavonoid skeleton undergo extensive metabolic transformation [18, 19]. Common processes involve methylation, hydroxylation, sulfation, glucuronation and glycation as summarized in review of Kay [11]. Published studies are not consistent concerning the yield of common metabolites. Intact anthocyanins (due to saturation of metabolic pathways) as well as products of a deeper decomposition (e.g. phenolic acids as products of bacterial activity) on the other hand are observed during biotransformation studies [11, 20, 21]. Anthocyanins are able to affect the action of cytochrome P450 during their contact with hepatic or intestinal cells [22] and thus their intake in food should be taken into account during use of pharmaceuticals (food–drug interactions).

To date, the knowledge of in vitro metabolism and cell signaling ability of anthocyanin derivatives (including pyranoanthocyanins) is very poor and targeted in vivo studies are missing completely. The objective of this communication was to use ultra-performance liquid chromatography (UPLC) combined with high-resolution tandem mass spectrometry (MS) for the study of 5-methylpyranopelargonidin (5-MePPI) in vitro metabolization in cultures of human cancer HepG2 (hepatic) and LS174T (intestinal) cell lines. Biotransformation of pelargonidin and quercetin was monitored in simultaneous experiments. To the best of our knowledge this is the first evidence about in vitro human cell metabolism of a pyranoanthocyanidin and its direct comparison with related anthocyanidin and a common flavonoid.

Experimental

Chemicals and Samples

Standards of pelargonidin chloride and quercetin chloride were obtained from Carl-Roth (Karlsruhe, Germany). Methanol, acetone, acetonitrile (HPLC-grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hydrochloric acid (p.a.) was from Lachema (Brno, Czech Republic). Dimethylsulfoxide (DMSO), rifampicin (RIF) and cell culture medium were purchased from Sigma–Aldrich (Prague, Czech Republic). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) was from Ultra Scientific (RI, USA). Preparation of 5-MePPI was performed by condensation of pelargonidin with acetone. Pelargonidin (0.3 mg) was dissolved in mixture of acetone: methanol acidified with 5 % (v/v) formic acid (1:1, v/v). After complete dissolution of pelargonidin, the reaction mixture was left in darkness and laboratory temperature for 48 h. Then the solvents were evaporated and dried material was stored in freezer until metabolic experiments. The selection of the composition of reaction mixture was based on our previous experience with formation of 5-methylpyranoanthocyanins in anthocyanin-rich extracts [23]. The content of unreacted pelargonidin in the synthesized 5-MePPI was controlled by LC/MS and it was found to be less than 3 %. The final concentration of quercetin, pelargonidin and 5-MePPI used in metabolic study was 100 $\mu\text{mol/L}$.

Cell Lines

Human colon adenocarcinoma cells LS174T and human hepatocellular carcinoma cells HepG2 were purchased from ECACC (European Collection of Cell Cultures) and then cultured as recommended by manufacturer. All cells were cultured in the relevant medium. HepG2 (2.5×10^5 cells/mL) and LS174T (1.5×10^5 cells/mL) were treated for 24 h with studied compounds (i.e. pelargonidin, 5-MePPI and quercetin; in concentration $100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Cultures were left at 37 °C and 5 % CO_2 in a humidified incubator. 50 μL of medium was collected after 1, 2 and 24 h. The metabolism activators dioxin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD), rifampicin (RIF) (concentration 5 nM) and/or vehicle DMSO (0.1 % v/v) were added for related experiments with hepatocytes.

After final collection of medium, the cells were washed three times in 0.5 mL of phosphate buffered saline (PBS). Obtained cells were then centrifuged ($14,000 \times g$) for 2 min. The pellets were resuspended in methanol acidified by 5 % acetic acid and sonicated by ultrasonic homogenizer to destroy the cell membrane (30 min, cooled by ice).

Sample Processing for UPLC/MS Analysis of Metabolites

The samples of previously collected media were diluted with methanol acidified by 5 % acetic acid (1:1, v/v), centrifuged (14,000×g) for 2 min and supernatants were analyzed by UPLC/MS. The samples of pellets after the destruction of cell membranes were again centrifuged (14,000×g) for 2 min and supernatants were analyzed by UPLC/MS.

Instrumentation

Waters Acquity UPLC equipped with PDA detector (Waters, Milford, MA, USA) was used as a chromatographic system. For the identification of metabolites, the chromatographic system was coupled to a QqTOF mass spectrometer (Q-TOF Premier, Waters, Milford, MA, USA). Electrospray ionization in both positive and negative modes was used. An Acquity UPLC BEH C18 column (100 × 2.1 mm, 1.7 μm, 130Å) was used for separation. 5 % (v/v) formic acid solution in deionized water (mobile phase A) and 5 % (v/v) formic acid in acetonitrile (mobile phase B) were used for UPLC/MS analysis in positive ion mode. Gradient elution with the profile of gradient 0–8 min 95–15 % A, 8–9 min 15–95 % A, 9–10 min 95 % A was applied. 0.1 % (v/v) acetic acid solution in deionized water (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B) were used for UPLC/MS analysis in negative ion mode. Gradient elution with the profile of gradient: 0–3 min 100 % A, 3–10 min 100–50 % A, 10–13.5 min 50–10 % A, 13.5–14 min 10–100 % A, 14–15 min 100 % A was applied. Flow rate 0.4 mL/min was applied in both chromatographic systems. Optimized parameters for mass spectrometer were: capillary voltage 3.2 kV (positive mode) and 1.5 kV (negative mode), source temperature 120 °C, sampling cone 30 V, desolvation temperature 150 °C, cone gas flow rate, 30 L/h and a desolvation gas flow rate, 450 L/h. Nitrogen was used as a desolvation gas and argon as a collision one.

All experiments were done with appropriate control samples i.e. (i) cell lines in the presence of medium without studied compounds and (ii) solution of studied compounds in medium but without cells. Metabolites were identified by comparison of samples containing studied flavonoids and cells with both controls. Data interpretation was done on the basis of accurate mass measurements, fragmentation patterns and comparison of retention times. All experiments were done using MS^E mode recording spectra without discrimination of ions or their pre-selection [alternation of MS scans with low collision energy (CE = 5 eV) and elevated collision energy (CE = 40 eV or a ramp of CE = 10–40 eV), i.e. MS(1) and MS(2) scans]. Targeted MS/MS scans were recorded in subsequent experiments

for further confirmation of fragmentation pattern (isolation width 1 Da).

Calculation of Partition Coefficients

Partition coefficients were calculated using ChemBioDraw Ultra (Cambridge Soft). Neutral forms of all compounds were considered for calculations. The results produced by the software were kindly provided by Department of Organic Chemistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic.

Result and Discussion

It is unequivocal that the real interaction of a compound with a cell can be described by an *in vivo* experiment, and systematic circulation between liver, kidney, intestine and other tissues plays very important role. Results of such studies therefore reflect combined effects of different kinds of cells [11]. On the other hand, *in vitro* studies allow dealing selectively with particular kinds of cells. In our case, differences between HepG2 and LS174T cells *in vitro* were studied. The comparison of flavonoids' metabolism between HepG2 and LS174T *in vitro* has not been described yet.

Metabolism of quercetin is relatively well known and therefore it can be used as a standard compound for examination of biotransformation of another flavonoid structures. The content of quercetin metabolites in the used cell cultures is to a certain extent in relation with metabolic activity of the present cells. We studied formation of quercetin metabolites in comparison with metabolites of pelargonidin and 5-MePPI *in vitro* at the same conditions.

Biotransformation of Flavonoids by Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells

The metabolites were produced using metabolically active cells of human hepatocellular carcinoma cells HepG2 (see "Experimental" section). The presence of metabolites was studied by UPLC/MS at varied experimental conditions i.e. time of metabolism and presence or absence of metabolism activators [dioxin (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD) (an AhR activator) and rifampicin (RIF) (a PXR activator), respectively]. The inducers dioxin and rifampicin are important liver enzyme inducers. Rifampicin, a bacterial antibiotic drug is promoting the upregulation of hepatic cytochrome P450 enzymes (such as CYP2C9 and CYP3A4). Dioxin is markedly induced cytochrome P450 (CYP)-dependent arachidonic acid metabolism in liver microsomes. Both these inducers increase the rate of metabolism of many drugs that are biotransformed by

Table 1 Metabolites of quercetin in human hepatocellular carcinoma cells HepG2, measured in cell pellets in positive mode (after 24 h of metabolization)

Metabolic transformation of quercetin (positive ion mode)	t_R	Measured mass of parent ion	Deviation from theoretical mass (ppm)	Ions observed during collision induced dissociation/intensity	Deviation from theoretical mass (ppm)		
Methylation	7.30	317.0631	9.5	317.0703/27	13.2		
				303.0535/11	9.9		
				153.0205/6	11.1		
Hydroxylation	5.69	319.0426	−8.8	319.0451/37	−0.9		
				303.0514/8	3.0		
				273.0420/5	7.7		
				245.0440/11	−4.1		
Glucuronide conjugation	4.88	479.0838	2.5	153.0211/17	15.0		
				303.0507/60	0.6		
				153.0212/6	15.7		
Glucoside conjugation	5.46	479.0832	1.3	303.0510/64	1.6		
				153.0213/5	16.3		
				303.0520/55	4.9		
Glucoside conjugation	4.89	465.1013	5.7	153.0203/7	9.8		
				5.36 (n.r.)	465.1076	465.1091/6	12.5
				5.59		303.0541/24	11.9
						465.1083	12.3
				153.0195/5	4.6		
303.0534/27	9.6						
153.0202/5	9.1						

n.r. peak not resolved from other isomers

the liver through cytochrome P450 enzymes. Cytochrome P450 is a mixed-function oxidase system, belonging to the most important enzyme complexes involved in the metabolism of xenobiotics in the human body [24].

Metabolites obtained during experiments with quercetin and HepG2 are given in Table 1. We observed hydroxylation as common metabolic process of the phase I and methylation, glucuronation and glucosylation as processes of the phase II. Those metabolic processes have already been observed in the literature [25–27]. The presence of relative metabolites is not surprising. Several isomers of quercetin-glucuronide and quercetin-glucoside were chromatographically separated. Figure 1a shows appropriate reconstructed chromatogram for quercetin-glucoside. At least three principal isomers can be seen (one not resolved from other isomers). Parent ions at m/z 465.1013, 465.1076, 465.1083 related to those peaks were found in MS spectra. Appropriate MS/MS spectra are given in Fig. 1b. Loss of dehydrated hexose (ions at m/z 303.0520, 303.0541 and 303.0534) and formation of characteristic ions at m/z 153.0203, 153.0195 and 153.0202 ($^{1,3}A_0$ fragments arising during RDA fission of flavonoid skeleton) were observed. Since the loss of a dehydrated hexose is the dominant process during

fragmentation the position of glucose on the flavonoid skeleton was not specified. To the best of our knowledge this is the first evidence of quercetin in vitro glucosidation in human cells. Note, however, that in vivo glucosidation has been observed in rat plasma [26]. Surprisingly, the presence of inductors RIF and TCCD did not have significant positive effect on the production of metabolites (an increase in content of metabolites given by induction falls in the range 2.0–8.2 %, Fig. 2). Biotransformation during analogous and at the same time done experiments with anthocyanin and (pyrano)anthocyanin (i.e. pelargonidin and 5-MePPI) was not observed. These results point out that HepG2 cells are able to metabolize them in much less extent under in vitro conditions.

Biotransformation of Flavonoids by Colon Adenocarcinoma (LS174T) Cells

LS174T cells expressed higher metabolic activity compared to HepG2 cells for quercetin. Ratio of sum of peak areas of identified metabolites to peak area of parent compound measured in cell pellets is significantly higher in LS174T samples compared to HepG2 samples (Fig. 2).

Fig. 1 Reconstructed chromatogram of quercetin-glucosides (a) and spectra of the three most intensive isomers (b)

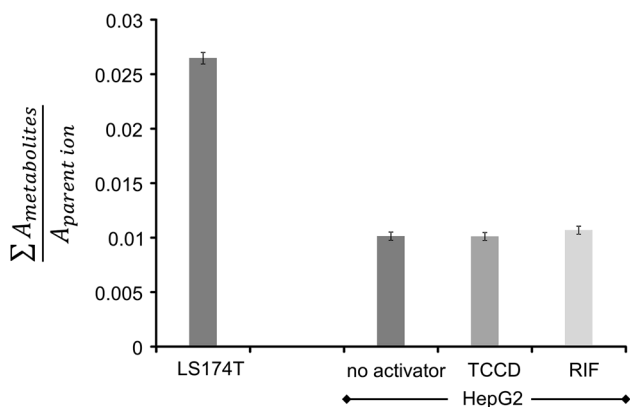
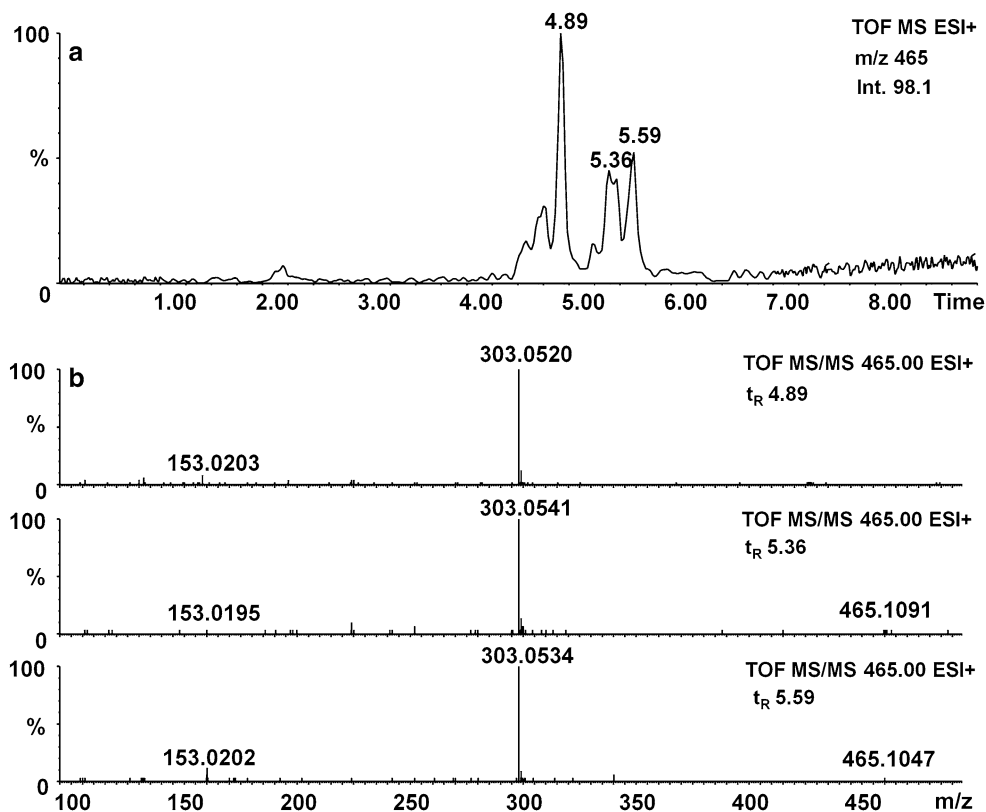


Fig. 2 Comparison of the extent of quercetin metabolism by LS174T and HepG2 cells and the effect of activators

Metabolites obtained during experiments with LS174T are given in Table 2. The most pronounced biotransformation processes (and the highest number of found metabolites) were observed in sample of quercetin. We observed the same metabolic processes as during study with HepG2 cells, i.e. methylation, hydroxylation, glucuronidation and glucosidation but in much higher yield (comparison of peak areas of metabolites). Quercetin thus underwent biotransformation processes typical for flavonoids also using LS174T cells and it therefore points out that studied

cells were viable and efficient from the point of view of metabolization.

Besides common metabolic processes, two relatively abundant peaks at m/z 905.1212 in negative ionization mode were observed eluting in retention times close to the peak of quercetin (t_R 9.20 and 9.39 min, Fig. 3a). After selection of ion at m/z 905.12 in quadrupole and its fragmentation the ion m/z 301.0361 was confirmed (Fig. 3b). Deviation of the measured mass of the fragment from the theoretical mass of quercetin is 4.3 ppm. The presence of this high mass could be explained by an in-source condensation of quercetin during the process of electrospray. However, no peak at m/z 905.1212 was observed in all measured control samples, i.e. pellets of cell lines in the presence of medium without flavonoids, a_1 , medium with cell lines without flavonoids, a_2 , quercetin incubated in medium without the presence of LS174T, a_3 (Fig. 3a₁–a₃). This fact points out the formation of the ion during metabolization. Tentatively, the ion was ascribed to quercetin trimer. Similarly an ion at m/z 603.0789 was observed during metabolization with a lower intensity. This ion can be analogously ascribed to quercetin dimer. However, detailed explanation of supposed metabolic condensation of quercetin is an objective of further research. Besides a peak at m/z 285.0371 (MS ESI⁻) was observed among quercetin metabolites. However, the structure of this compound has not been revealed.

Table 2 Metabolites of quercetin, pelargonidin and 5-MePPI in human colon adenocarcinoma cells LS174T, measured in cell pellets

Metabolic transformations of studied flavonoids (positive ion mode)	t_R	Measured mass of parent ion	Deviation from theoretical mass (ppm)	Ions observed during collision induced dissociation/intensity	Deviation from theoretical mass (ppm)
Quercetin					
Methylation	5.10	317.0701	12.6	257.0433/7 217.0492/22 153.0195/25	−6.6 −4.1 4.6
Hydroxylation	3.70	319.0474	6.3	245.0436/8 217.0489/15 153.0168/51	−5.7 −5.5 −13.1
	4.35	319.0472	5.6	245.0424/4 227.0301/25 199.0364/6 171.0421/23	−10.6 −18.9 −15.5 −14.6
Glucuronide conjugation	3.13	479.0841	3.1	303.0492/435	−4.3
	3.57	479.0834	1.7	303.0495/77	−3.3
	3.70	479.0801	−5.2	303.0497/245	−2.6
Glucoside conjugation	3.08	465.1026	−1.5	303.0486/266	−6.3
	3.63	465.1049	3.4	303.0491/167	−4.6
	3.83	465.0997	−7.7	303.0469/99	−11.9
Dimer of quercetin ^a	4.35	605.0893	−6.3	605.0913/1098 303.0524/77074 153.0179/6841	−3.0 6.3 −5.9
Trimer of quercetin ^a	4.35	907.1302	−6.2	907.1350/1350 605.0910/1020 303.0521/71122 153.0177/5859	−0.9 −3.1 6.2 −6.0
Unknown metabolite ^a	4.97	287.0543	−4.5	287.0581/546 259.0586/63 153.0207/226	8.7 −7.7 12.4
Pelargonidin					
Hydroxylation ^a	4.24	287.0640	13.3	259.0665/23 241.0573/21	22.8 29.8
Glucuronide conjugation ^a	5.45	447.1710	12.6	447.1708/35 271.0675/262	11.8 25.4
5-Methylpyranopelargonidin					
Hydroxylation	3.65	325.0679	−10.2	325.0675/13 209.0620/5	−11.4 8.1
Glucuronide conjugation ^a	4.71	485.1095	2.3	485.1010/8 309.1523/2	−15.3 >100
	4.79	485.1089	1.03	485.1020/40 309.0809/114	−13.2 −14.9
	4.87	485.1102	3.7	485.1046/93 309.0810/205	−7.8 −15.2
	5.02	485.1072	−2.4	485.1052/8 309.0803/57	−6.6 −12.9
Glucoside conjugation ^a	6.5	471.1625	6.4	–	–

Table 2 continued

Metabolic transformations of studied flavonoids (positive ion mode)	t_R	Measured mass of parent ion	Deviation from theoretical mass (ppm)	Ions observed during collision induced dissociation/intensity	Deviation from theoretical mass (ppm)
Hydroxylation + methylation	4.1	339.0830	-11.5	339.0875/41	1.8
				324.0631/44	-0.9
				296.0722/924	12.5
				267.0718/350	22.8
				253.0541/352	15.8
				241.0546/258	18.7
				225.0589/155	16.4
				197.0598/120	-2.5
				169.0688/41	20.7
				141.0724/53	14.2
2xhydroxylation + 2xmethylation	2.85	369.0916	15	281.0703/3	-39.5
				221.9661/9	-
				193.0544/24	-
				149.0315/9	11.5
				4.12	369.0952
	323.0634/24	24.1			
	295.0603/9	-1.0			
	281.0582/7	9.6			
	251.0705/14	-			
	241.0520/33	7.8			
181.0582/8	8.1				
Metabolic transformations of studied flavonoids (Negative ion mode)	t_R	Measured mass of parent ion	Deviation from theoretical mass (ppm)	Ions observed during collision induced dissociation/intensity	Deviation from theoretical mass (ppm)
Quercetin Methylation ^a	10.1	315.0531	8.3	315.0521/487	5.1
				301.0365/4699	5.6
				285.0365/6609	-11.9
Hydroxylation ^a	8.09	317.0334	11.7	151.0044/6473	8.6
				317.0308/68	3.5
	8.45	317.0331	10.7	151.0051/115	13.2
				317.0320/162	7.3
	9.24	317.0345	15.1	151.0045/54	6.5
				317.0349/2242	16.4
Glucuronide conjugation ^a	7.79	477.0662	-1.5	301.0371/1795	7.6
				151.0038/3243	4.6
	8.41	477.0702	6.9	301.0369/1946	7.0
				151.0046/837	9.9
	8.59	477.0681	2.5	301.0356/1303	5.3
151.0042/624				6.2	
			301.0366/40248	6.0	
			151.0366/16101	3.3	

Table 2 continued

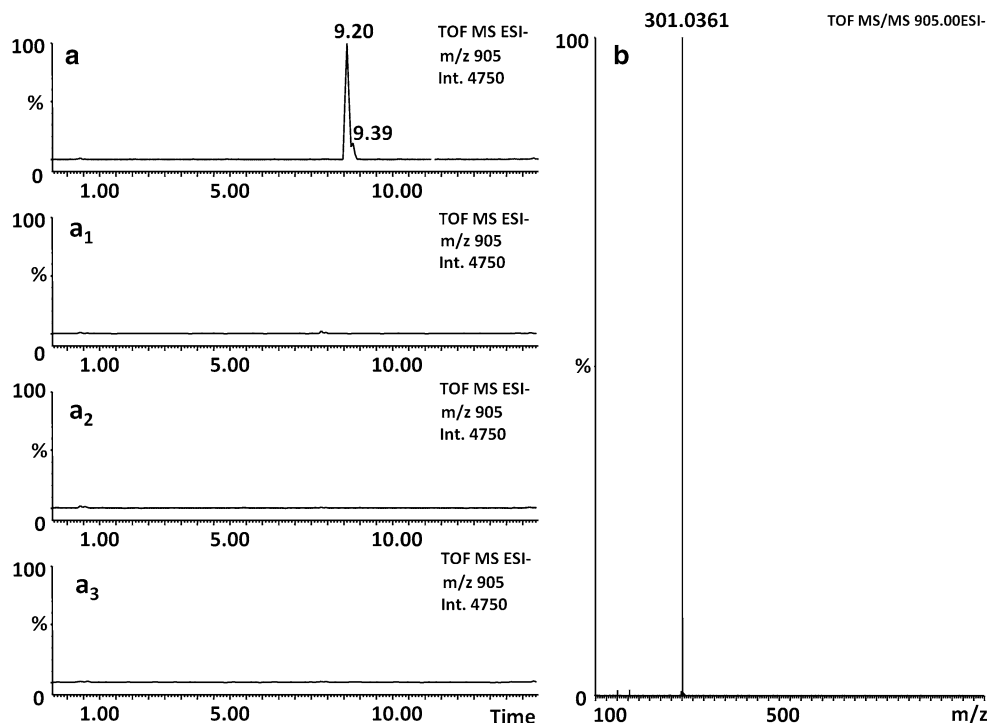
Metabolic transformations of studied flavonoids (Negative ion mode)	t_R	Measured mass of parent ion	Deviation from theoretical mass (ppm)	Ions observed during collision induced dissociation/intensity	Deviation from theoretical mass (ppm)
Glucoside conjugation ^a	7.61	463.0898	4.5	463.0890/251	2.8
	8.22	463.0883	1.3	301.0364/1576	5.3
				151.0044/482	8.6
	8	463	4.5	463.088/244	2.4
	8.41	463.0898	4.5	301.0350/1720	0.6
			463.0893/275	3.5	
			301.0361/1662	4.3	
Dimer quercetin	9.24	603.0789	2.3	301.0351/2296	1.0
Trimer quercetin	9.20	905.1212	1.2	301.0361/3196	4.3
Unknown metabolite	9.96	285.0531	-13.3	285.0414/41	5.3
				267.0308/7	5.6
				239.0378/32	14.2
				227.0378/34	15.0
Pelargonidin					
Hydroxylation ^a	9.10	285.0403/4101	1.4	241.0523/1250	9.1
				195.0464/1593	9.2
Glucuronide conjugation ^a	8.7	445.0791/720	4.5	445.0795/112	5.4
				269.0483/430	12.2
5-Methylpyranopelargonidin					
Hydroxylation	7.52	323.0591	10.8	323.0570/25	-19.8
				305.0432/243	-5.9
				277.0489/9	-4.3
				261.0511/97	-15.7
				187.0432/682	-
Glucuronide conjugation ^a	7.95	483.1164	-16.1	483.0890/429	-7.7
				307.0631/3586	9.1
Glucoside conjugation ^a	6.94	469.1235	10.2	469.1125/207	-2.1
				307.0642/647	12.7
Hydroxylation + methylation	7.88	337.0798	16.1	337.0738/5	7.1
				322.0478/109	0.3
				294.0564/50	12.2
				279.0248/18	-16.1
				139.0581/3	23.7
2xhydroxylation + 2xmethylation	7.23	367.0798	-12.5	367.0768/5	-13.6
				352.0558/17	-7.1
				349.0691/7	-6.0
	8.05	367.0873	15.5	191.0421/70	-
				367.0764/4	-14.7
				352.0538/12	-12.8
				321.0731/15	-10.0
				239.0299/4	-18.8

^a Data taken from MS(2) scan (MS^E experiment)

During biotransformation of pelargonidin a less amount of common metabolites was found. Table 2 shows that only hydroxylation and glucuronation were observed for pelargonidin in experiments done in series with the quercetin

samples. However, due to low intensity of fragments in collision spectra the position of hydroxy group or glucuronic acid in anthocyanidin skeleton was not specified. Mohsen et al. studied pelargonidin metabolites in vivo in rats and

Fig. 3 Reconstructed chromatogram of metabolite at m/z 905.1212 (a) and MS/MS spectrum (b) (LS174T cells, negative ion mode) (a) Reconstructed chromatogram of pellet of cell lines in the presence of quercetin. (a₁) Reconstructed chromatogram of pellet of cell lines in the presence of medium without flavonoids. (a₂) Reconstructed chromatogram of medium with cells without flavonoids. (a₃) Reconstructed chromatogram of quercetin incubated in medium without cells



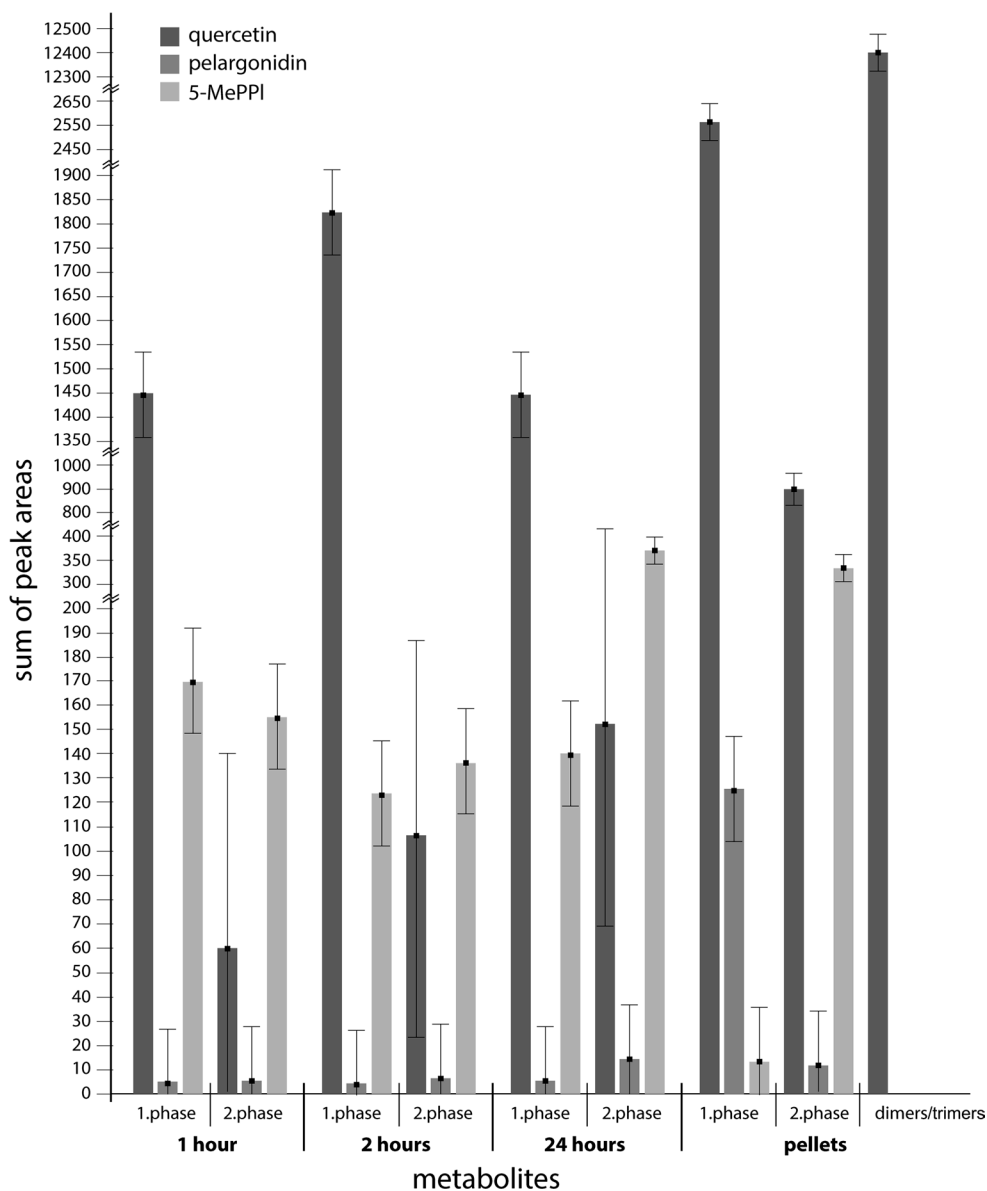
only a glucuronide and hydroxybenzoic acid was found [21].

Interestingly, the presence of additional ring (D) and methyl in the molecule of 5-methylpyranopelargonidin caused a significant increase in yield of metabolites compared to pelargonidin. More than 10 times higher ratio of sum of metabolite signals to corresponding parent compound was found during 5-MePPI metabolization compared to pelargonidin. Figure 4 shows the profile of metabolites over time of metabolization (1, 2, 24 h, sum of appropriate peak areas). The presented graph allows evaluation of the dynamic of biotransformation. Content of phase I metabolites of quercetin (represented only by hydroxylation) is the highest from all the studied compounds. The maximum value is reached in 2 h of metabolization. Content of phase II metabolites (sum of peak areas) is lower and its highest value is reached after 1 day of metabolization. The delay of releasing of phase II metabolites with respect to phase I is understandable. Surprising is the high content of tentatively assigned quercetin dimer(s) and trimers accumulated in pellets (given by a separate column). Note that those compounds were found only in pellets. Content of 5-MePPI metabolites of both phases after 1 and 2 h is comparable although a certain drop in 2 h can be observed on the time scale. However, some delay of phase II metabolites with respect to the phase I was observed as well (the content of phase II metabolites after 24 h is significantly higher than those of phase I). It should be stressed that the content of phase II metabolites of 5-MePPI is even higher than those of quercetin but in sum the content quercetin metabolites

is higher. In pellets, much higher ratio of content of phase II metabolites to phase I was found as well. Finally, the content of pelargonidin metabolites of both phases is much lower compared to other studied flavonoids. Certain, but statistically insignificant, increase in phase II metabolites after 24 h of metabolization is observed also in the case of pelargonidin. In pellets, the content of phase I metabolites of pelargonidin is significantly higher compared to those of phase II. From the point of view of accumulation of metabolites in pellets, the properties of pelargonidin are significantly different from that of 5-MePPI and qualitatively are similar to quercetin instead. In this aspect, the effect of one additional ring (D) present in 5-MePPI molecule compared to pelargonidin and quercetin seems to play an important role. Calculated partition coefficients (clogPs) of neutral forms of quercetin, pelargonidin and 5-MePPI are 1.504, 1.523 and 2.959, respectively. 5-MePPI is thus markedly more hydrophobic compared to both the other compounds and hydrophobicity could be considered as one parameter responsible for those differences.

Presence of particular 5-MePPI metabolites can be followed in more details in Table 2. Among common and simple processes hydroxylation and glucuronation of 5-MePPI were observed (Table 2). Four chromatographically separated isomeric glucuronides were observed (Fig. 5a). Losses of glucuronide units in the MS scans with elevated collision energy [$\Delta m/z$ 176 in MS(2) scans] are characteristic for all of those isomers (Fig. 5b). The higher difference of the measured masses in the collision spectrum of the first peak (t_R 4.71 min) is due to lower intensity of the present

Fig. 4 Profile of phase I and II metabolites of flavonoids produced by LS174T cells in medium over time of metabolization and in pellets



ions. The ion at m/z 193.0393 differs from the other ions in elution profile and does not belong among fragments of 5-MePPI glucuronides. The obtained data, however, do not allow to locate the position of glucuronation in particular metabolites. Besides, relatively intensive peak of 5-MePPI glucoside was also found (Table 2). Observed processes are thus similar to those of quercetin. Two combined metabolites of 5-MePPI were found in addition. Figure 6a shows reconstructed chromatogram of mono-hydroxylated-monomethylated metabolite (m/z 339.0830). In its MS/MS spectrum (Fig. 6b) a loss of methyl radical can be found (fragment at m/z 324.0631), followed by two consequent losses of carbon monoxide in main fragmentation pathway. Fragment at m/z 241.0456 can be explained by retro-Diels–Alder cleavage (RDA) of B-ring (structure inserted in the Fig. 6b). This fragment suggests the hydroxylation and

methylation on the B-ring of the 5-MePPI skeleton. Consequent fragmentation involves loss of one carbon monoxide and one water molecule and formation of ion at m/z 197.0598.

Figure 7 shows reconstructed chromatogram for doubly hydroxylated and doubly methylated metabolite (m/z 369.0916, m/z 369.0952). Two well-resolved isomers are present. In MS/MS spectrum of the more intensive isomer ($t_R = 4.12$ min) losses of methyl radical, methane, carbon monoxide and water can be seen. Dominant fragment at m/z 241.0420 is explicable in the same way as in the case of the previously discussed metabolite (i.e. RDA fission of B-ring). This suggests that the metabolite is hydroxylated and methylated at the B-ring of 5-MePPI skeleton. This suggestion is supported also by the presence of fragment at m/z 181.0582 corresponding

Fig. 5 Reconstructed chromatogram of 5-MePPI glucuronides (a) and spectra of the most intensive isomers [MS(2) scans] (b)

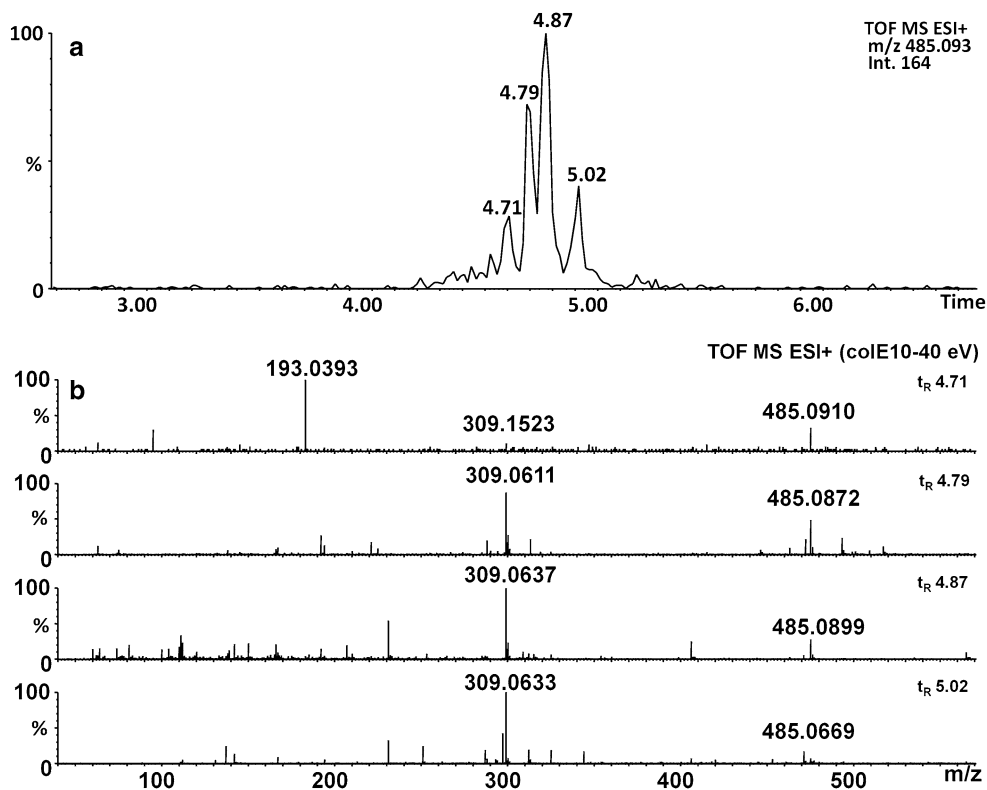
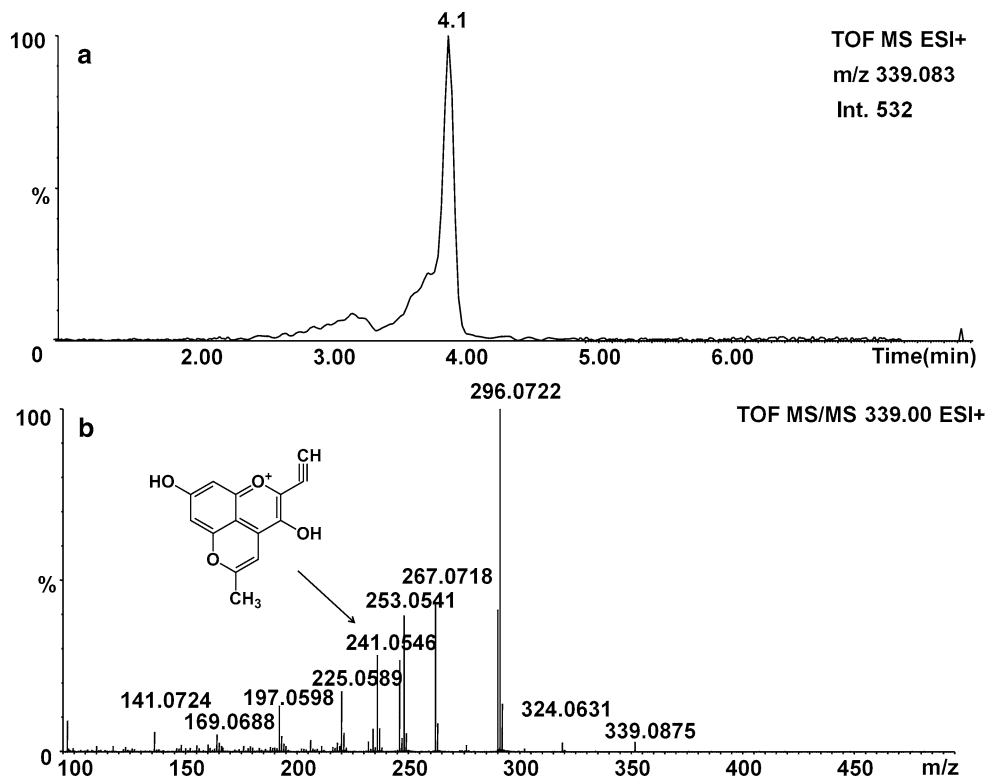


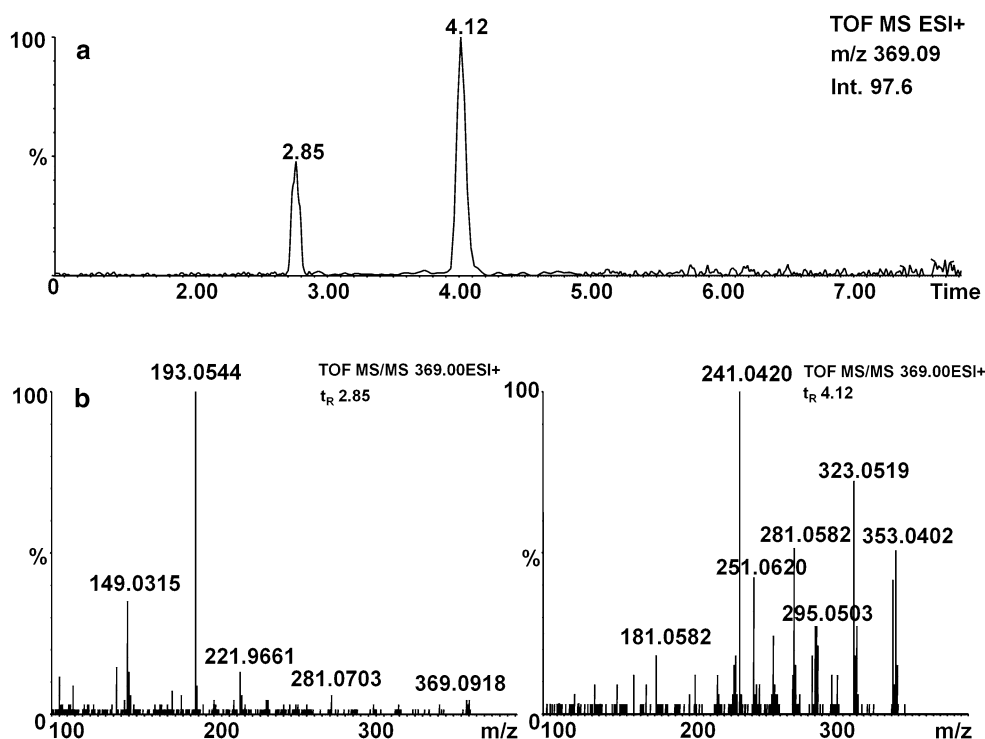
Fig. 6 Reconstructed chromatogram of metabolite at m/z 339.0830 (a) and MS/MS spectrum (b) (inset structure of fragment at m/z 241.0456)



with the $^{0,2}B_0$ RDA fragment (formation of acylium ion derived from syringic acid). Fragmentation pattern of the compound eluted in the first peak ($t_R = 2.86$ min) is

different. The ion at m/z 149.0315 can be explained by scission of heterocyclic C-ring of 5-MePPI and formation of $^{0,3}B_0$ RDA fragment. This suggests that the metabolite

Fig. 7 Reconstructed chromatogram of metabolite at m/z 369.0900 (a) and MS/MS spectra of present isomers (b)



is hydroxylated and methylated either at A or at D-ring of 5-MePPI skeleton.

Conclusion

Study of *in vitro* (bio)transformation of pelargonidin, 5-methylpyranopelargonidin and quercetin was done using metabolically active human hepatocellular carcinoma cells HepG2 and colon adenocarcinoma cells LS174T. Significantly higher yield of metabolites was achieved using LS174T. The presence of inductors RIF and TCCD did not have a significant positive effect on the production of metabolites. Common metabolic processes of phase I and II were observed in the case of quercetin as a “standard flavonoid” which confirms that the used cells were viable and metabolically active during parallel experiments with pelargonidin and 5-methylpyranopelargonidin. Formation of dimer and trimer of quercetin was tentatively suggested. Both pelargonidin and 5-methylpyranopelargonidin exhibited lower tendency for metabolization compared to quercetin. Biotransformation of 5-methylpyranopelargonidin proceeded with higher yield of metabolites compared to pelargonidin. Processes related to accumulation of 5-MePPI metabolites in pellets seem to differ from those of quercetin and pelargonidin. The fact can have a connection with the presence of additional ring (D) in flavonoid skeleton and tentatively with remarkably higher hydrophobicity of pyrano-dye compared to both other studied flavonoids.

The main metabolic processes of 5-methylpyranopelargonidin involve hydroxylation, glucuronation and glucosidation. Besides, several combined metabolites were found, i.e. once and doubly hydroxylated-methylated metabolites. Several isomeric forms of metabolites were chromatographically separated confirming presence of different sites in the molecule allowing metabolization. Interpretation of collision spectra of combined metabolites allowed a specification of the metabolized sites in more details. The results contribute to the knowledge of the impact of anthocyanin condensation (formation of more complex dyes) on human cells.

Acknowledgments Authors thank to the support of Grant Agency of the Czech Republic (GACR 303/12/G163) and Operational Program Research and Development for Innovations—European Regional Development Fund (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058) of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

References

1. Vu KD, Carletini H, Bouvet J, Côté J, Doyon G, Sylvain JF, Lacroix M (2012) Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the antiproliferative activity against two colon cancer cell lines. *Food Chem* 132:959–967
2. Song NR, Yang H, Park J, Kwon JY, Kang NJ, Heo YS, Lee KW, Lee HJ (2012) Cyanidin suppresses neoplastic cell transformation by directly targeting phosphatidylinositol 3-kinase. *Food Chem* 133:658–664
3. Rugina D, Sconta Z, Leopold L, Pintea A, Bunea A, Socaciu C (2012) Antioxidant activities of chokeberry extracts and the

- cytotoxic action of their anthocyanin fraction on HeLa human cervical tumor cells. *J Med Food* 15:700–706
4. He F, Liang NN, Mu L, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan CQ (2012) Anthocyanins and their variation in red wines. II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* 17:1483–1519
 5. Stavek J, Papouskova B, Balik J, Bednar P (2011) Effect of storage conditions on various parameters of colour and the anthocyanin profile of rose wines. *Int J Food Prop* 15:1133–1147
 6. Leopoldini M, Rondinelli F, Russo R, Toscano M (2010) Pyranoanthocyanins: a theoretical investigation on their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 58:8862–8871
 7. Amic D, Amic D, Beslo D, Trinajstić N (2000) Vitisin-type pigments: possible novel food colors. *Croat Chem Acta* 73:511–516
 8. Hidalgo M, Oruna-Concha MJ, Kolida S, Walton GE, Kallithraka S, Spencer JP, de Pascual-Teresa S (2012) Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *J Agric Food Chem* 60:3882–3890
 9. Keppler K, Humpf HU (2005) Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorgan Med Chem* 13:5195–5205
 10. Aura AM, Martín-López P, O’Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K, Santos-Buelga C (2005) In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur J Nutr* 44:133–142
 11. Kay CD (2006) Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutr Res Rev* 19:137–146
 12. Gonzalez-Barrio R, Edwards CA, Crozier A (2011) Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: in vivo and in vitro studies. *Drug Metab Dispos* 39:1680–1688
 13. Pavek P, Dvorak Z (2008) Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab* 9:129–143
 14. Netzel M, Strass G, Janssen M, Bitsch I, Bitsch R (2001) Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20:89–95
 15. Bub A, Watzl B, Heeb D, Rechkemmer G, Briviba K (2001) Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur J Nutr* 40:113–120
 16. Wu X, Cao G, Prior RL (2002) Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr* 132:1865–1871
 17. Felgines C, Talavera S, Gonthier MP, Texier O, Scalbert A, Lamaison JL, Remesy C (2003) Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J Nutr* 133:1296–1301
 18. Walle T (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 36:829–837
 19. Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE (2005) Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *J Agric Food Chem* 45:7–18
 20. Galvano F, La FL, Lazzarino G, Fogliano V, Ritieni A, Ciappellano S, Battistini NC, Tavazzi B, Galvano G (2004) Cyanidins: metabolism and biological properties. *J Nutr Biochem* 15:2–11
 21. El Mohsen M, Marks J, Kuhnle G, Moore K, Debnam E, Kaila Srai S, Rice-Evans C, Spencer JP (2006) Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *Brit J Nutr* 95:51–58
 22. Kamenickova A, Anzenbacherova E, Pavek P, Soshilov AA, Denison MS, Zapletalova M, Anzenbacher P, Dvorak Z (2013) Effects of anthocyanins on the AhR-CYP1A1 signaling pathway in human hepatocytes and human cancer cell lines. *Toxicol Lett* 221:1–8
 23. Myjavcova R, Marhol P, Kren V, Simanek V, Ulrichova J, Palikova I, Papouskova B, Lemr K, Bednar P (2010) Analysis of anthocyanin pigments in *Lonicera* (*Caerulea*) extracts using chromatographic fractionation followed by microcolumn liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217:7932–7941
 24. Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58:737–747
 25. Vacek J, Papouskova B, Kosina P, Vrba J, Kren V, Ulrichova J (2012) Biotransformation of flavonols and taxifolin in hepatocyte in vitro systems as determined by liquid chromatography with various stationary phases and electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 15:109–115
 26. Su S, Guo J, Duan JA, Wang T, Qian D, Shang E, Tang Y (2010) Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of the bioactive components and their metabolites of Shaofu Zhuyu decoction active extract in rat plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 878:355–362
 27. Holcapek M, Kolarova L, Nobilis M (2008) High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal Bioanal Chem* 391:59–78

MOŽNOSTI PŘÍPRAVY VYBRANÝCH KONDENZOVANÝCH ANTHOKYANINŮ V MODELOVÝCH PODMÍNKÁCH A STUDIUM JEJICH VLASTNOSTÍ

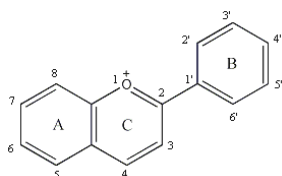
ONDŘEJ KURKA, RENÁTA MYJAVCOVÁ
a PETR BEDNÁŘ

RCPTM, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc
ondrejkurka@seznam.cz

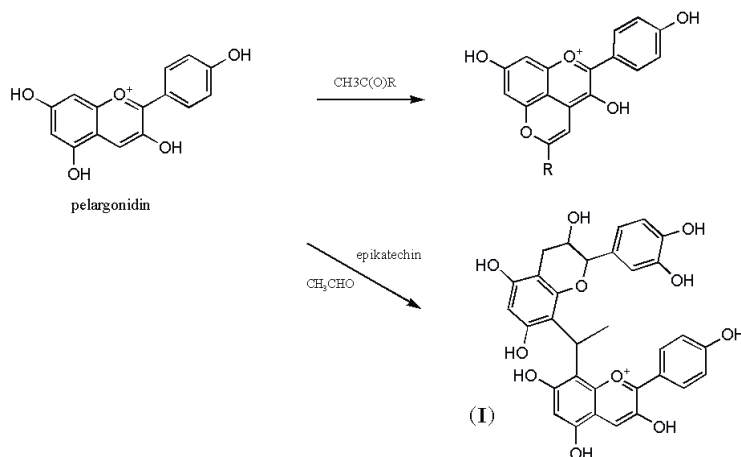
Úvod

Anthokyaniny, kterým je věnována tato práce, patří mezi sekundární metabolity rostlin. Jsou to barviva přítomná nejčastěji v květech a plodech, kterým propůjčují barvy od oranžové přes červenou a fialovou až po modrou. V poslední době roste jejich využití v potravinářství jako náhrada za syntetická barviva. Jsou také významné svým efektem na lidské zdraví. Vyznačují se silnými antioxidačními účinky, mají příznivý vliv při prevenci některých rakovinných a kardiovaskulárních onemocnění a cukrovky¹.

Anthokyaniny, které jsou řazeny mezi flavonoidy, mají základní (flavyliovou) strukturu, která je uvedena na obr. 1 a která je v přírodních látkách dále substituována.



Obr. 1. 2-Fenylchromenylium, strukturní základ anthokyaninů



Obr. 2. Pelargonidin a jeho kondenzační produkty reakcí s malými molekulami a s epikatechinem

Hlavním problémem při využití anthokyaninů v potravinářství je jejich malá stabilita při zvýšení pH, teploty, přítomnosti oxidovatel apod. Z tohoto důvodu se zkoumají možnosti, kterými by bylo možné v potravinářských produktech barvu zajištěnou přítomností anthokyaninů stabilizovat, a prodloužit tak dobu, po kterou si tyto látky uchovávají své vlastnosti. Jednou z cest, která by mohla zvyšovat chemickou stabilitu těchto látek, je jejich kondenzace s jinými molekulami za vzniku složitějších barviv.

Cílem této práce je syntetizovat vybrané deriváty pelargonidinu vznikající kondenzací tohoto anthokyanidinu (v čisté a neglykosylované formě) s malými organickými molekulami a s jinými flavonoidy (viz obr. 2). Pelargonidin je anthokyanin, vyskytující se ve větší míře v některých barevných plodech, např. v jahodách² a produktech z nich vyráběných. Pozornost je věnována kondenzacím pelargonidinu s acetaldehydem, acetonem a epikatechinem v přítomnosti acetaldehydu. Reaktivita těchto látek s jinými flavonoidy je již částečně popsána v literatuře^{3,4}, kde jsou však reakce studovány především v komplexních extraktech z rostlinného materiálu. Připravená barviva identifikujeme s využitím HPLC-MS² a UPLC-MS². V současné době optimalizujeme semipreparativní purifikaci získaných produktů.

Experimentální část

Vzorky byly připraveny ve dvou sadách: první sada obsahovala 5 ml destilované vody, okyselené kyselinou mravenčí na pH 3,08, ve které byl rozpuštěn pelargonidinium-chlorid a kondenzační činidlo tak, aby jejich výsledné koncentrace byly 1 mmol l⁻¹ resp. 10 mmol l⁻¹. V případě

epikatechinu vzorek obsahoval 5 ml destilované vody, okyselené kyselinou mravenčí na pH 3,08, ve které byl rozpuštěn pelargonidum-chlorid, epikatechin (oba v koncentraci 1 mmol l^{-1}) a acetaldehyd (v koncentraci 10 mmol l^{-1}).

Druhá sada vzorků obsahovala vždy 0,1 mg pelargonidum-chloridu v 50% roztoku cyklizačního činidla v methanolu, roztok činidla byl okyselen 0,1% H_3PO_4 (m/m, změna způsobu okyselení byla provedena na základě úspěšného přístupu známého z literatury⁵). Vzorek zaměřený na reaktivitu epikatechinu obsahoval 0,1 mg pelargonidum-chloridu a 0,1 mg epikatechinu v 50% roztoku acetaldehydu v methanolu opět okyseleném 0,1% (m/m) H_3PO_4 . Vzorky druhé sady byly připraveny vždy v objemu 1 ml.

Připravené směsi byly ponechány za laboratorní teploty v temnu a po daných intervalech byla vždy část vzorku odebrána a analyzována. Chromatografické analýzy probíhaly na kapalinových chromatogramech Cap LC (Waters, Milford, USA), HPLC (Knauer, Berlín, Německo) a Acquity UPLC (Waters) s DAD a tandemovou MS detekcí. Pro identifikaci byl použit hmotnostní spektrometr vybavený ionizací elektrosprejem (Z-spray) a hybridním analyzátozem typu QqTOF (Q-TOF Premier, Waters). Dále byla prováděna analýza s využitím MALDI ionizace na tomtéž přístroji. Studie je doplněna i měřením na přístroji LCQ s analyzátozem na principu iontové pasti (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) vybaveném ionizací elektrosprejem. Frakcionace produktů kondenzace s acetonem je prováděna na kapalinovém chromatografu Knauer osazeném semipreparativní pumpou a s využitím semipreparativní kolony Gemini C-18 ($100 \times 10 \text{ mm i.d.}$; $d_p=5 \text{ }\mu\text{m}$, Phenomenex, USA).

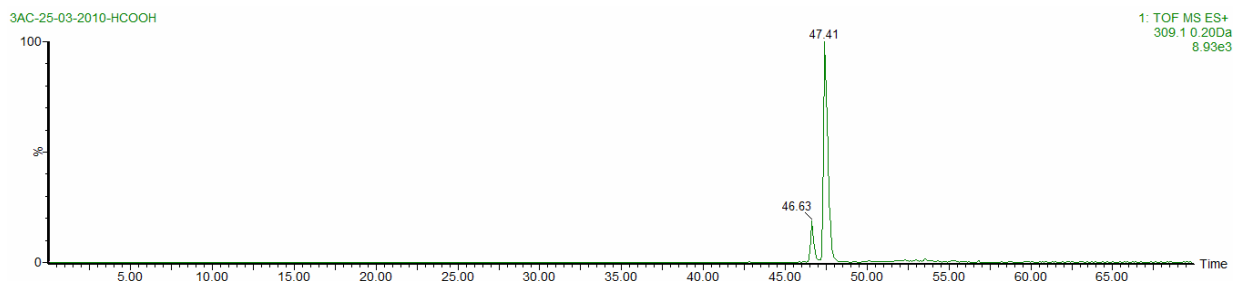
Výsledky a diskuse

Vzorky připravené ve vodném prostředí byly analyzovány pomocí LC i přímého zavádění do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Nález předpokládaného barviva se prokázal pouze v případě kondenzace s epikatechinem v přítomnosti acetaldehydu. Tento pro-

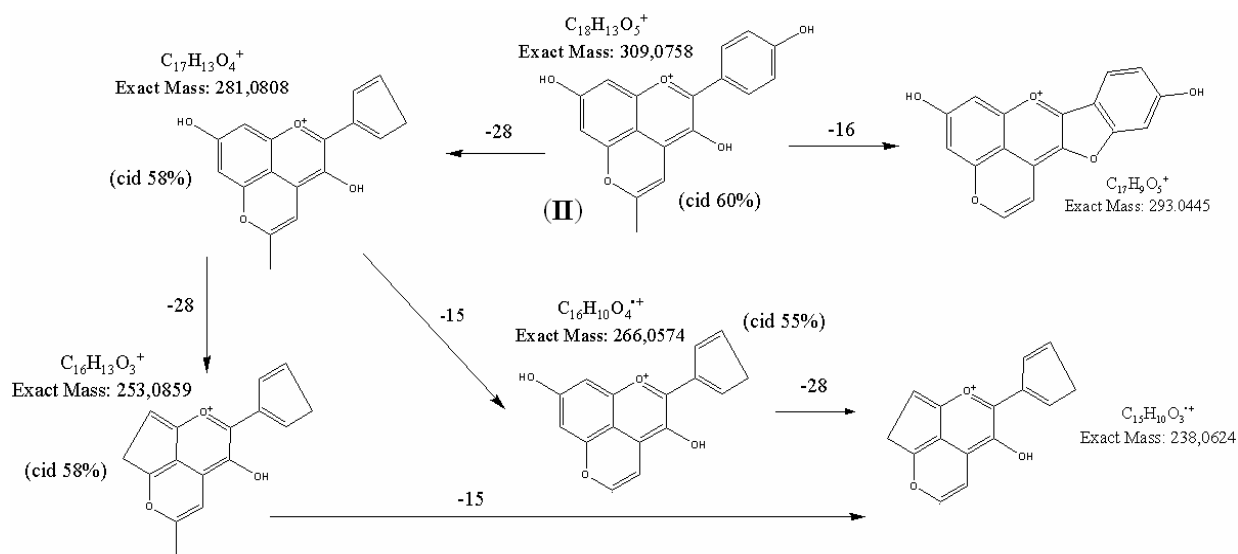
dukt I (viz obr. 2) však vznikl pouze ve stopách a identifikace je nejednoznačná. Prezentovaná struktura je tak navržena na základě porovnání s výsledky získanými použitím derivátu malvidinu⁴. Vzhledem k tomu, že reakce neposkytly očekávané produkty, byla nasazena druhá sada vzorků, tentokrát v koncentrovanějším kondenzačním médiu a v prostředí methanolu, který byl přidán za účelem zvýšení rozpustnosti pelargonidinu.

Zde bylo dosaženo dobrých výtěžků v případě kondenzace s acetonem. Už po prvním dnu reakce byl pomocí MS zjištěn molekulový ion produktu s předpokládanou strukturou II (viz obr. 3) s intenzitou cca 15 % oproti molekulovému iontu pelargonidinu. Po třech dnech se poměr produkt/substrát zvýšil na 1:1, po 6 týdnech už produkt dominuje (poměr 20:1 ve prospěch produktu; všechny údaje brány podle odezvy příslušných iontů v MS). HPLC/MS analýza potvrzuje, že použitým postupem vznikají dvě látky s rozdílnou retencí na reverzní fázi (obr. 3) a téměř shodnou fragmentací po izolaci iontu a jeho kolizi indukované disociaci v kolizní cele. Jedná se zřejmě o isomery, oba produkty se liší jen relativními intenzitami fragmentových iontů. Zkombinováním tandemových spekter ($\text{MS}^2\text{-MS}^4$) z iontové pasti a měření přesné a správné hmoty z QqTOF bylo navrženo hypotetické fragmentační schéma žádaného produktu (obr. 4). V současné době probíhá chromatografická frakcionace složek reakční směsi. Struktura izolovaných isomerů bude dále studována nukleární magnetickou rezonancí.

U ostatních vzorků nebyl ani za změněných podmínek ion předpokládaného barviva pozorován, a to ani v případě kondenzace s epikatechinem, kde při použití vodného prostředí ion aspoň v malé míře vznikal. Experimenty ukázaly, že při použití koncentrovaného roztoku acetaldehydu v methanolu dochází k rozpadu pelargonidinového skeletu – pravděpodobně na kyselinu 4-hydroxybenzoovou a flo-roglucinaldehyd (tomuto nasvědčují nálezy iontů odpovídajících hodnot m/z v chromatogramu). Takovýto rozpad pelargonidinu za odlišných experimentálních podmínek byl již popsán v literatuře⁶. V případě, že reakční směs obsahovala kromě acetaldehydu i epikatechin, byl ve hmotnostním spektru nalezen ion odpovídající hmotě dvou jednotek epikatechinu spojených ethyldenovým můstkem.



Obr. 3. Chromatogram produktu II a jeho isomeru



Obr. 4. Produkt kondenzace s acetonem (II) a jeho fragmentační schéma

I takováto struktura byla již v literatuře popsána⁷. Tvorba heterogenní můstkové sloučeniny typu pelargonidin-acetaldehydový můstek-epikatechin je v tomto případě minoritním procesem.

Závěr

V roztoku pelargonidinu ve směsi aceton-methanol dochází poměrně rychle ke vzniku 5-methylpyranopelargonidinu, který byl prostudován LC/ESI-MS² a MALDI technikami. Vedle očekávaného produktu vzniká v tomto médiu ještě jeden isomer s identickou hmotou i fragmenty v tandemových MS spektrech. Pro isomer s majoritním výskytem byla na základě analogie s jinými anthokyaniny popisovanými v literatuře navržena struktura a fragmentační schéma. V současné době je prováděna purifikace obou látek s cílem určení jejich absolutní konfigurace nukleární magnetickou rezonancí.

Dále se podařilo zjistit, že kondenzační reakce na elektrofilním centru molekuly pelargonidinu neprobíhají ve vodném prostředí dostatečně efektivně pro získání produktů v požadovaném výtěžku. V omezené míře dochází ke kondenzaci pelargonidinu s epikatechinem přes ethylenový můstek, zajištěný přítomností acetaldehydu v reakční směsi. V případě použití koncentrovaného roztoku acetaldehydu v reakční směsi dochází preferenčně ke štěpení C-kruhu anthokyaninu a vzniku floriglucinaldehy-

du a fenolické kyseliny. Tyto informace jsou klíčové pro další optimalizaci syntézy můstkových anthokyaninových barviv.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou ČR (P206/10/0625).

LITERATURA

- Konczak I., Zhang W.: J. Biomed. Biotechnol. 5, 239 (2004).
- da Silva F. L., Escribano-Bailon M. T., Alonso J. J. P., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C.: LWT-Food Sci. Technol. 40, 374 (2007).
- Morata A., Calderon F., Gonzalez M. C., Gomez-Cordoves M. C., Suarez J. A.: Food Chem. 100, 1144 (2007).
- Pissarra J., Lourenco S., Gonzalez-Paramas A. M., Mateus N., Buelga C. S., Silva A. M. S., De Freitas V.: Food Chem. 90, 81 (2005).
- Myjavcová R., Marhol P., Křen V., Šimánek V., Ulrichová J., Palíková I., Papoušková B., Lemr K., Bednář P.: J. Chromatogr., A 1217, 7932 (2010).
- Patras A., Brunton N. P., O'Donnell C., Tiwari B. K.: Trends Food Sci. Technol. 21, 3 (2010).
- Es-Safi N. E., Fulcrand H., Cheynier V., Moutounet M.: J. Agric. Food Chem. 47, 2096 (1999).



Analysis of anthocyanin pigments in *Lonicera (Caerulea)* extracts using chromatographic fractionation followed by microcolumn liquid chromatography-mass spectrometry

Renáta Myjavcová^a, Petr Marhol^b, Vladimír Křen^b, Vilím Šimánek^c, Jitka Ulrichová^c, Irena Palíková^c, Barbora Papoušková^a, Karel Lemr^a, Petr Bednář^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Tř. 17. Listopadu 1192/12, CZ 771 46 Olomouc, Czech Republic

^b Institute of Microbiology, Center for Biocatalysis and Biotransformation, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, CZ 142 20 Prague, Czech Republic

^c Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotínská 3, CZ 775 15 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 2 June 2010

Keywords:

Anthocyanin
Blueberry honeysuckle
Chromatography
Dietary supplement
Fractionation
LC/MS
Lonicera
Mass spectrometry
MS
 μ LC
Pyrananthocyanin
QqTOF

ABSTRACT

Anthocyanins from the fruit *Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* (blueberry honeysuckle, Caprifoliaceae) were studied via (semi)preparative chromatographic fractionation followed by MS and μ LC/MS analysis. The extraction procedure was optimized with respect to analytical purposes as well as its potential use for the preparation of nutraceuticals. The highest yield of anthocyanins was obtained using acidified methanol as the extraction medium. A comparable total anthocyanin content was obtained using a mixture of methanol and acetone. However, when *Lonicera* anthocyanins were in contact with acetone, a condensation reaction occurred to a large extent and related 5-methylpyranoanthocyanins were found. The effect of other extraction media, including ethanol as a “green” solvent, is also discussed. The potential of two fractionation procedures for extract purification differing in their chromatographic selectivity and scale was studied (i.e. using a Sephadex LH-20 gel column and a reversed phase). Fractions obtained by both procedures were used for a detailed analysis. MS and μ LC/MS² methods were used for monitoring anthocyanin and 5-methylpyranoderivatives content as well as identifying less common and more complex dyes (dimer of cyanidin-3-hexoside, cyanidin-ethyl-catechin-hexosides, etc.). These more complex dyes are most likely formed during fruit treatment.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

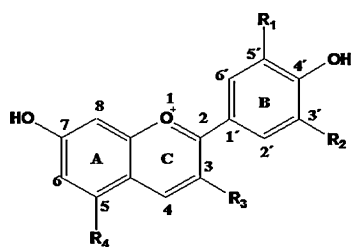
Lonicera caerulea var. *kamtschatica* (blueberry honeysuckle, Caprifoliaceae) is a fruit-bearing bush species that originated from the forests growing on the Kamchatka Peninsula in the Russian Far East. Its fruit (edible berries) are relatively unknown in North America and Europe. The fruit is oval and its color is from dark blue to purple [1–3]. The main composition of *L. caerulea* is comparable to blueberry, blackberry and blackcurrant [4,5].

L. caerulea berries are a rich source of phenolic compounds such as phenolic acids as well as anthocyanins (Fig. 1), proanthocyanidins and other flavonoids, which display potential health-promoting effects. Chemopreventive, antimicrobial, anti-adherence and antioxidant effects, among others, have been described for these compounds [6–9]. Studies on anthocyanin

absorption and bioavailability have reported the absorption of intact anthocyanin glycosides [10]. This fact accounts for the key difference between the absorption of anthocyanins and other flavonoids. The potential of *L. caerulea* berries to prevent chronic diseases such as diabetes mellitus type 2, cardiovascular diseases [11] and cancer [12] seems to be above all related to their phenolic content [2,13].

It was recently reported that anthocyanins bearing vicinal hydroxyl groups in the B-ring of their anthocyanidin skeleton were associated with the potency of apoptotic induction, antioxidative and chemoprotective effects of human cells, i.e. human leukemia [14,15]. On the other hand, some articles suggest that pigments having methoxy group(s) in their molecule (e.g. malvidin) are more effective against human cancer of the stomach, colon, CNS and lung cells than other anthocyanins [16]. Peonidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside also gave very good results in the regulation and reduction of the expression of the metalloproteinases (MMPs) and urokinasesurokinasis (u-PA), which are responsible for the initiation and proliferation of metastasis among the cells [17]. The ability of the *Lonicera* berry phenolic fraction to prevent and reduce

* Corresponding author. Tel.: +420 585634403; fax: +420 585634433.
E-mail address: bednar.petr@seznam.cz (P. Bednář).



Anthocyanidin	R ₁	R ₂
pelargonidin	-H	-H
cyanidin	-OH	-H
delphinidin	-OH	-OH
petunidin	-OH	-OCH ₃
malvidin	-OCH ₃	-OCH ₃
peonidin	-OCH ₃	-H

R₃, R₄ – OH, glycosyl unit(s), other compounds (i. e. another flavonoid unit, either directly linked or bridged), formation of pyranoanthocyanins (i. e. formation of a cycle from R₄ to position 4 of C ring)

Fig. 1. Structure of common anthocyanins and derived pigments.

UVA-related damage at a cellular level in human keratinocytes was described [18].

Cyanidin-3-glucoside is the principal anthocyanin of *L. caerulea* berries (comprising 83% of the anthocyanin pigments, w/w). Glucosides, rutinosides and 3,5-dihexosides of cyanidin, peonidin, delphinidin and pelargonidin were also found. Their detailed composition can be found in recent articles by Jordheim et al. [19] and our group [20]. A gold standard method used for the analysis of anthocyanins in berries is based on a solid phase extraction (SPE) sample pretreatment, followed by liquid chromatography on-line coupled with tandem mass spectrometry. Deactivated C18 stationary phases are the most common column packings. Generic mobile phases, most often water–acetonitrile mixtures sufficiently acidified by a volatile acid (below pH 2) to avoid peak broadening are used for gradient elution. There are a number of similar systems useful for reliable anthocyanin profiling. However, a strict unification of those methods does not seem to make practical sense due to the huge diversity of analyzed materials as well as long-term studies employing constant and formerly designed methods. These analytical procedures have been reviewed in many articles [21,22]. Generally, the critical step in the analysis of anthocyanins and other flavonoids is the sample pretreatment. During time many extraction procedures were designed for this purpose as can be found in a comprehensive review of Stalikas [23], for instance.

It is well known that during the life of the plant [24,25] as well as during the treatment of berries (i.e. preparation of food products) and their maturation [26–28] some more complex pigments are formed. The most frequent processes leading to complex pigments are polyglycosylation, acylation of the sugar moiety as well as the formation of more cycles and mutual condensation of several anthocyanin (flavonoid) units. Nowadays, many investigators focus their attention on their C-4/C-5 anthocyanin cycloaddition reactions with pyruvic acid, vinylphenols, vinylflavanols and many other groups leading to the formation of pyranoanthocyanins. Two of the most widely known derivatives are vitisin A (anthocyanidin-3-hexoside-pyruvic acid adduct) and B (anthocyanidin-3-hexoside-vinyl adduct). Those pigments were reported for the first time in 1976 [29], and are usually studied in wine products. Some of those derivatives were, however, also found in berry juices, mainly after reaction with artificially added phenolic acids [28]. The great interest in pyranoanthocyanins stems from their higher color and pH stability compared to anthocyanins. Andersen et al. found 5-carboxypelargonidin in

an acidified methanolic extract of strawberries [25]. However, it is not clear whether this pigment originates from the plant tissue itself or whether it is a product of the extraction procedure. To the best of our knowledge, no pyranoanthocyanins have been reported during the processing of Caprifoliaceae berries to date.

We recently published a paper devoted to the phenolic composition of *L. caerulea* var. *kamtschatica* fruit [20]. The aim of this paper is to investigate the effect of various solvents on anthocyanin extraction, optimize their purification methods, chromatographic fractionation and analytical description based on MS and μ LC/MS. Special attention was also paid to the formation of more complex pigments.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Standards of anthocyanins (cyanidin-3-galactoside chloride, cyanidin-3,5-diglucoside chloride) were obtained from Carl-Roth (Karlsruhe, Germany). Methanol, ethanol, acetone, acetonitrile (HPLC-grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hydrochloric acid (35%) and phosphoric acid (99.8%), both p.a. were from Lachema (Brno, Czech Republic). Trifluoroacetic acid (99%) was provided by Fluka (Buchs, Switzerland). The column for fractionation was packed with Sephadex LH-20 (Sigma, USA). Double distilled water was used for all experiments. Fresh berries of *L. caerulea* were from the 2006 and 2007 harvest at Lipník nad Bečvou (Czech Republic).

2.2. Preparation of *L. caerulea* phenolic fraction (LCPF)

Frozen fruits (4.84 kg) (from the 2006 harvest) were percolated with an aqueous solution of phosphoric acid (0.1%, v/v; 50 °C) for 14 h. The obtained primary extract was purified on a column filled with non-ionic brominated polystyrene-divinylbenzene resin Sephadex SP 207 (mean pore size 105 Å, particle size 20–60 mesh, provided by Sigma). The column was washed with deionized water; the phenolic compounds were then eluted by ethanol and concentrated by evaporation to yield 20.3 g of the *L. caerulea* phenolic fraction (LCPF) [20].

2.3. Other extraction procedures and fractionation

The berries of *L. caerulea* (from the 2007 harvest) were stored at –25 °C and subsequently lyophilized and further stored under an Ar atmosphere at –25 °C. A voucher specimen is deposited at the Department of Medical Chemistry and Biochemistry (Olomouc, Czech Republic). The analytes were extracted from lyophilized samples of berries using 4 different solvents, under the conditions given in Table 1. The berries were manually powdered immediately before extraction was begun. Filtration (Filtrak 388) of the mixture was used between extraction portions. The combined filtrates were then dried using a rotary evaporator at 40 °C and finally lyophilized and stored at –25 °C for further experiments, referred to as crude extracts (A–G). Sum of anthocyanins represents roughly 0.1–5% of mass of extract. Fractionation procedures were implemented separately with each portion of crude extracts (A–76 mg, B–80 mg, C–78 mg). The extracts were dissolved in 500 μ L of methanol or mixture methanol:acetone (1:1, v/v; extract C) and loaded into a glass column (1400 mm \times 25 mm i.d.) packed with Sephadex LH-20 (Sigma, USA). Methanol at 1.45 mL/min was used as the mobile phase, fractions were collected every 8 min. The separation was monitored at 280 nm. Selected fractions were dried *in vacuo* and stored at –25 °C until μ LC/MS analysis. A portion of crude extract D (94 mg) was dissolved separately in 500 μ L of double distilled water and loaded into a glass column (930 mm \times 25 mm i.d.) packed

Table 1
Extraction of the anthocyanins from *L. caerulea* L. berries.

Extraction solvent	Sample weight (g) ^a	Yields ^b (%)	Extraction conditions for all solvents
A: 50% Methanol/50% acetone/0.1% H ₃ PO ₄ (v/v)	50.5	6.1	3 × 200 mL of extraction solvent, each by 60 min, darkness, room temperature, Ar atmosphere
B: 100% Methanol/0.1% H ₃ PO ₄ (v/v)	50.9	8.1	
C: 100% Acetone/0.1% H ₃ PO ₄ (v/v)	50.9	0.7	
D: 100% Ethanol/0.1% H ₃ PO ₄ (v/v)	49.3	5.8	
E: 80% Ethanol/20% water/0.1% H ₃ PO ₄ (v/v/v)	50.4	9.6	
F: 80% Methanol/20% water/0.1% H ₃ PO ₄ (v/v/v)	5.2	8.8	3 × 20 mL of extraction solvent, each by 60 min, darkness, room temperature, Ar atmosphere
G: 80% Acetone/20% water/0.1% H ₃ PO ₄ (v/v/v)	5.0	6.1	

^a Mass of lyophilized fruits taken for extraction.

^b Yield represents ratio of mass of extract after removing of extraction solvent and mass of fresh fruits (expressed in percents).

with Sephadex LH-20 (Sigma, USA). Ethanol 80/20 in water (v/v) at 0.5 mL/min was used as the mobile phase, fractions were collected every 16 min. The separation was monitored at 280 nm.

2.4. Analysis of selected fractions by μ LC/MS

The μ LC profiles were recorded using a Waters CapLC XE System (Milford, USA) with UV detection. A Gemini C18 column was used (150 mm × 0.3 mm i.d., Phenomenex, USA). The optimized mobile phase was 0.12% trifluoroacetic acid in water with 5% acetonitrile (part A) and 0.12% trifluoroacetic acid in acetonitrile (part B). The optimal gradient was 0–5 min 10% B, 5–10 min 10–20% B, 10–30 min 20–30% B, 30–40 min 30–50% B, 40–50 min 50–70% B, 50–55 min 70% B, 55–60 min 70–100% B, 60–70 min 100% B, 70–70.5 min 100–10% B, 70.5–75 min 10% B and the flow rate was kept at 5.0 μ L/min.

Selected fractions were dissolved in the mobile phase (part A) and analyzed by μ LC/MS. A QqTOF mass spectrometer (Q-TOF Premier, Waters Corporation) equipped with electrospray ionization (ESI) (Z-spray) was used for MS detection. The capillary voltage was kept at +3.0 kV, the temperature of the source was 120 °C and the temperature of the desolvation gas was 300 °C. The flow rate of the desolvation gas was set at 350 L/h. Quantification of cyanidin-3-glucoside was done using linear regression of calibration dependence in the range of concentration 10–100 mg/L ($R^2 = 0.99$). The calibration dependence obtained for cyanidin-3-glucoside was employed for all the other peaks as well.

Analysis of fractions by direct infusion of their solutions into the ion source of the mass spectrometer was performed with a flow rate of 5 μ L/min, capillary voltage +2.5 kV, temperature of the source 150 °C and temperature of the desolvation gas 150 °C. The flow of the desolvation gas was 100 L/h. For all CID experiments the isolation width of the first quadrupole of QqTOF instrument was set on 1 Da.

2.5. Fragmentation experiments using ion trap (IT)

Identification of anthocyanins was supported by CID experiments using an ion trap mass spectrometer with electrospray ionization (Finnigan MAT LCQTM, Finnigan, San Jose, USA). The capillary voltage was +5.6 kV, temperature of heated capillary 200 °C. The flow of the desolvation gas was 40 arbitrary units. The identification of anthocyanins was carried out on the basis of parent ions and multistage fragmentation after collision-induced dissociation in the ion trap (MSⁿ). 60% normalized collision energy was applied.

2.6. Semipreparative high performance liquid chromatography

A Knauer semipreparative liquid chromatograph (Berlin, Germany) equipped with a UV/VIS DAD detector (operating in a wavelength range 190–510 nm) and Gemini C18 column (150 mm × 10 mm i.d., Phenomenex) was used for further fraction-

ation of the LCPF and isolation of particular dyes. The mobile phase was identical to that in the μ LC system, the gradient was 0–15 min 5% B, 15–25 min 5–10% B, 25–35 min 10–20% B, 35–40 min 20–50% B, 40–55 min 50–100% B, 55–56 min 100–5% B, 56–60 min 5% B, at flow rate 5.0 mL/min. 100 μ L of extract was injected (full loop). The fractions obtained were lyophilized and kept frozen before μ LC/MS analysis (–80 °C).

2.7. Calculation of partition coefficient (C log P)

The calculated values were obtained using the software ChemBioDraw Ultra (Cambridge Soft). Calculations were done for β -D-glucopyranosylated anthocyanins. Specific algorithms for calculating log P (C log P) from fragment-based methods were developed by the Medicinal Chemistry Project and BioByte. The results produced by the software were kindly provided by Department of Organic Chemistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic.

3. Results and discussion

3.1. Extraction procedure

The proper choice of an extraction solvent is a key variable in the efficient release of colored material from fruit. From the viewpoint of the food and pharmaceutical industry the selection of extraction medium is often restricted by biosafety demands and the content of residual solvent(s) is one of most critical parameters in the quality of the final product [30,31]. Table 2 shows the differences in the extraction efficiency of various extractions with respect to anthocyanins (all extraction media discussed below were acidified using 0.1% H₃PO₄, v/v, as given in Table 1). The highest yield of common anthocyanins from fruits was obtained using acidified methanol (sum of anthocyanins in Table 2). This contributes to the known fact that this extraction solvent is the most efficient medium for a broad range of matrices [32,33]. A lower yield of identified dyes was obtained when water was added to the methanolic extraction medium. Substituting ethanol for methanol in the extraction medium significantly decreased the amount of extracted anthocyanins. When water, being a more polar solvent, is mixed with ethanol, the extraction was improved. Some authors also reported the usefulness of acidified ethanol–water solutions [34]. Although the extraction of dyes using a water–ethanolic medium is less efficient than a methanolic medium, the decrease in anthocyanin content is not by an order of magnitude. Ethanol and its mixtures with water have a special use in the food and pharmaceutical industry, since they fulfill health requirements. When *Lonicera* fruits are extracted with an 80:20 ethanol:water mixture, 0.037% (w/w) of the anthocyanins are released (this is roughly 15% of the amount extracted by acidified methanol). This can be acceptable for many industrial purposes once the water content is optimized more precisely. Several authors reported that

Table 2
Amount of anthocyanins in extracts of *L. caerulea* L. fruits^{a,b}.

	<i>m/z</i>	(50:50) methanol: acetone (A)	100% methanol (B)	80% methanol (F)	100% acetone (C)	80% acetone (G)	100% ethanol (D)	80% ethanol (E)
Anthocyanin								
Cyanidin-3-glucoside	449	0.117	0.192	0.120	0.024	0.073	0.003	0.017
Peonidin-3-glucoside	463	0.018	0.026	0.023	0	0.009	0.002	0.007
Pelargonidin-3-glucoside	433	0.002	0.008	0.011	0	0	0	0
Cyanidin-3-rutinoside	595	0.012	0.013	0.015	0	0.005	0.002	0.006
Peonidin-3-rutinoside	609	0.006	0.008	0	0	0	0	0
Cyanidin-3,5-dihexoside	611	0.008	0.007	0	0	0	0.002	0.007
Peonidin-3,5-dihexoside	625	0	0	0	0	0	0	~0.0001
Sum of anthocyanins		0.161	0.253	0.169	0.024	0.088	0.009	0.037
Pyranoanthocyanin								
5-Methylpyranocyanidin-3-glucoside	487	0.085	0	0	0	0.013	0	0
5-Methylpyranopeonidin-3-glucoside	501	0.015	0	0	0	0	0	0
Sum of pyranoanthocyanins		0.1	0	0	0	0.013	0	0
Sum of all identified dyes		0.261	0.253	0.169	0.024	0.101	0.009	0.037

All fractions were measured in triplicate; relative standard deviation ranges from 0.0 to 13.6%.

^a All extraction media contain 0.1% (v/v) phosphoric acid.

^b Content is given as % (w/w) related to fresh fruits.

acetone is a better extraction solvent for anthocyanins than light alcohols [35,36]. It was stated that acetone as an extraction solvent enables a more reproducible extraction, a lower temperature for sample concentration and it avoids possible problems with pectins (the treatment of strawberries). Mixtures of acetone–water were also used [37]. Acetone or its mixture with water exhibited a substantially lower extraction efficiency for *Lonicera* berries than methanolic mixtures. On the other hand, our results suggest that the extraction efficiency of a 50:50 methanol:acetone mixture is much higher (comparable with an 80:20 methanol:water mixture). However, a proportion of the anthocyanins are converted into the corresponding 5-methylpyranoanthocyanins during the contact with acetone. If we consider the sum of the anthocyanins and 5-methylpyranoanthocyanins, the extraction yield of the methanol–acetone mixture is comparable with methanol. The identity of the pyranoderivatives is discussed below.

The amount of all identified anthocyanins obtained by extraction using acidified methanol roughly corresponds with the amount found in the LCPF obtained from fruits harvested one year earlier (relative difference represents 20.2%) [20]. This agreement suggests that both extraction methods can be used for the long-term analytical monitoring of anthocyanins during the treatment of the fruit. This data conformity was achieved aside from the neglect of response factors and quantification of all major dyes (listed in Table 2) using regression equation obtained for cyanidin-3-glucoside.

3.2. Purification and fractionation procedure

In order to isolate the anthocyanins from crude extracts, it was necessary to implement a purification (fractionation) step. In the preparative-scale fractionation of anthocyanins and related compounds there are several suitable stationary phases: octadecyl silica gel, Amberlite XAD-7 (nonionic macroporous polymer of poly(methyl methacrylate)), Toyopearl gel (hydroxylated methacrylic polymer resin) or Sephadex LH-20 (hydroxypropylated cross-linked dextran) [38–41]. An alternative method to the large-scale isolation of anthocyanins (up to 1000 mg of crude extract in single run) is countercurrent chromatography (CCC), which can be described as an automated version of liquid–liquid extraction [42]. In our study, low-pressure LC on Sephadex LH-20 was used to fractionate the crude extracts. Sephadex LH-20 not only swells

in solvents of weak and medium polarity but also in strongly polar ones (e.g. methanol). The exclusion limit at maximum swelling was 4000, i.e. it is suitable for the fractionation of anthocyanins. Details of the fractionation procedure can be found in Section 2. Fig. 2 describes the process of fractionation using various solvents (UV detection, $\lambda = 280$ nm).

Four main fractions were obtained during the fractionation of the acetone–methanol solution (Fig. 2A). The first peak contained the majority of the pyranoanthocyanins. Anthocyanins with two sugar units eluted in the closest smaller peak but their separation was not complete. Anthocyanins with one sugar unit eluted in the last two peaks. In the chromatogram of the methanolic extract, the peak of pyranoanthocyanins was clearly missing (Fig. 2B). The elution order of the other dyes corresponded with that observed in the chromatogram of the acetone–methanol extract, however, the resolution of peaks 3 and 4 was improved. The same elution order was observed during the fractionation of acetone (Fig. 2C) and ethanolic (Fig. 2D) extracts. However, the separation and peak shapes, especially when ethanol was used, were deteriorated and their elution times shifted. This can be explained by the compression of the polar stationary phase during contact with the less polar solvent. The chromatogram of the acetone extract is also complicated by some other co-extracted impurities (especially peak 3). These experiments indicated that the extraction medium composition is the key parameter not only for the extraction itself but also for efficient chromatographic fractionation (and consequently the purity of the final product). Methanol was used as the mobile phase for the fractionation of the methanolic, methanol–acetone and acetone extracts and the ethanol:water (80:20, v/v) mixture for the fractionation of the ethanolic extract (to avoid contact with methanol) as described in Section 2.

The elution order and separation of anthocyanins into several groups in accordance with their structure cannot be explained simply. We propose that it is a combination of hydrophilic interactions and an increased permeation of smaller molecules into the stationary phase. No tabulated parameter describing the hydrophobicity of pyranoderivatives was found in the literature. However a rough idea of the polarity differences among the studied dyes can be obtained from approximative calculations of the partition coefficients ($C_{log P_{ow}}$) of cyanidin derivatives. The value reaches +1.8 for 5-methylpyranocyanidin-3-glucoside; 0.0 for cyanidin-3-glucoside and –1.6 for cyanidin-3,5-diglucoside. The contribution

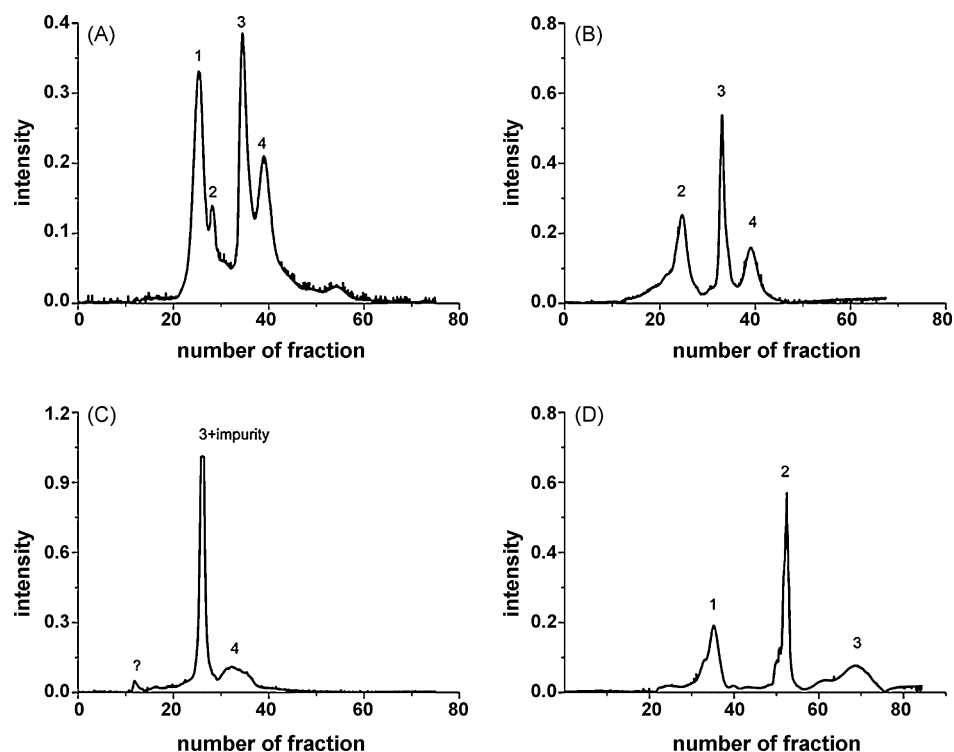


Fig. 2. Chromatograms of *Lonicera* crude extracts fractionation on Sephadex LH-20 (A—acetone–methanol mixture; B—methanol; C—acetone; D—ethanol; $\lambda = 280$ nm).

of the 4-ring and methyl group of the pyranoderivative to the decrease in polarity is apparently significant and it could explain the shortening of its elution time with respect to the other cyanidin derivatives.

As has already been mentioned, a reversed phase is often used for fractionation of phytochemicals from plant extracts. We studied a combination of the prepurification of crude *Lonicera* extract using non-ionic polystyrene–divinylbenzene resin Sepabeads SP 207 (preparation of the LCPF, for details see Section 2) with subsequent high performance semipreparative fractionation using a reversed phase resistant against acidic mobile phases. Such an approach enabled pure fractions of many dyes to be retrieved, as can be seen from the chromatogram in Fig. 3. Several mono- and diglycosylated anthocyanins, pyranoanthocyanins and some more complex pigments were identified in these fractions (Table 3).

The identification of those derivatives is discussed below. The second fractionation approach (due to the column dimensions used, 150 mm \times 10 mm i.d.) is more suited to the isolation of individual dyes to make their identification easier and study their properties than to the industrial-scale processing of *Lonicera* fruit (preparative purification). Scaling-up to a preparative level is of course possible, however, as far as the expected very high price of an appropriate preparative column is concerned, it is probably not acceptable for industrial purposes and exceeds the scope of this paper. The elution order corresponds with the decreasing polarity of the separated dyes. The injection of 100 μ L (1 mg of extract) of purified extract into the column did not cause overloading of the column and good separation was observed.

3.3. Identification of extracted dyes

Crude extracts as well as fractions obtained by both fractionation procedures (Sephadex and reversed phase) were analyzed using ESI-MS and μ LC/ESI-MS². The identification of anthocyanins was based on exact mass measurement, study of fragmentation after isolation of the parent ion and its collision-induced dissociation in the collision cell. Further valuable information was obtained from the comparison of retention times and UV/vis spectra recorded using a DAD detector. Common anthocyanins are listed in Table 2. It can be seen that cyanidin-3-hexoside is a dominant dye in *Lonicera* extracts. Some other cyanidin derivatives as well as peonidin and pelargonidin glycosides were also identified.

A relatively intensive dye with m/z 487.1224 was observed in fraction 1 of the methanol–acetone extract (fractionation on Sephadex LH-20) as can be seen in Fig. 4. The fragment at m/z 325.0703 was observed in related MS² spectra. The process of its formation corresponds with the cleavage of dehydrated hexose ($\Delta m/z = 162.0528$). Further fragmentation of the aglycon was studied by ion trap mass spectrometry. The ion with m/z 325 fragments via consequent losses of carbon monoxide ($\Delta m/z = 28$) and water ($\Delta m/z = 18$). Based on this information, the dye corresponds with

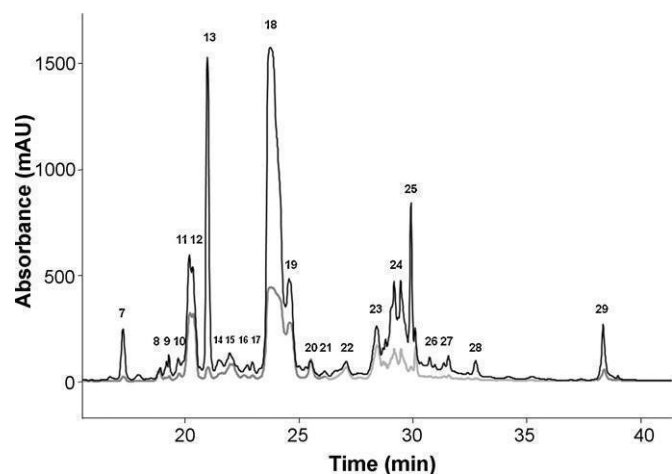


Fig. 3. Semipreparative fractionation of *L. caerulea* phenolic fraction (LCPF) on reverse phase (black— $\lambda = 280$ nm; grey— $\lambda = 505$ nm), number assigned to each peak corresponds with the number of fraction in Table 3.

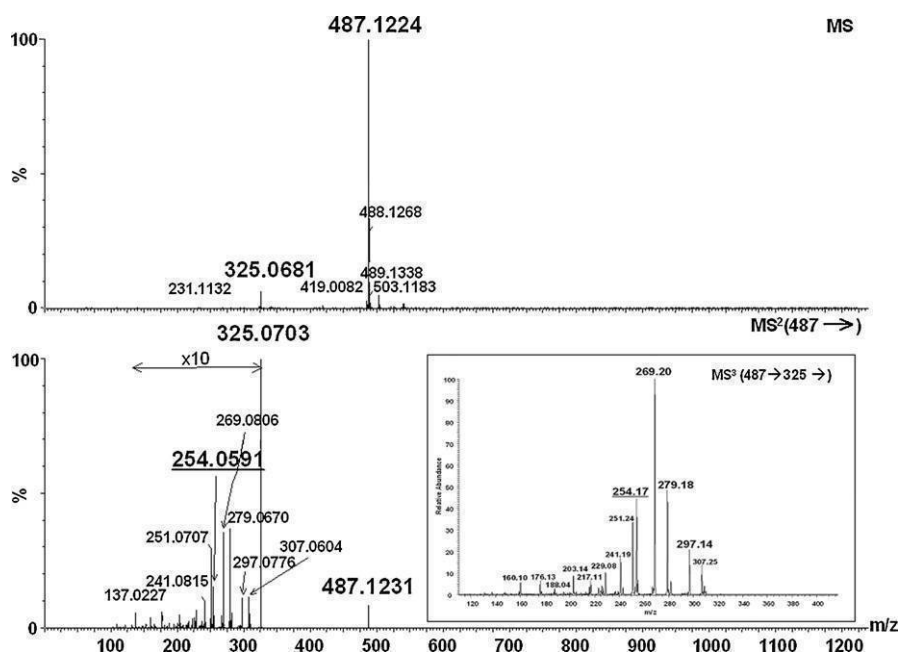
Table 3
Identified anthocyanin pigments in *L. caerulea* phenolic fraction (LCPF).

Fraction ^a	MS	Accuracy of mass measurement (ppm)	MS ²	Name
9	611.1553	9.6	449, 287	Cyanidin-3,5-dihexoside [19,20]
10	611.1602	1.6	449, 287	Cyanidin-3,5-dihexoside [19,20]
	737.1677	5.6	575, 423, 287	Cyanidin-3-hexoside-catechin [25]
11	611.1609	0.5	449, 287	Cyanidin-3,5-dihexoside [19,20]
12	611.1610	0.3	449, 287	Cyanidin-3,5-hexoside [19,20]
	625.1767	0.3	463, 301	Peonidin-3,5-dihexoside [20,25]
13	773.2135	0.6	627, 465, 303	Quercetin-methylpentoside-dihexoside
18	449.1083	0.2	287	Cyanidin-3-hexoside [20,25]
	897.2111	2.5	449, 287	Dimer of cyanidin-3-hexoside
	487.1224	3.3	325	5-Methylpyranocyanidin-3-hexoside
	595.1663	0	449, 287	Cyanidin-3-rutinoside [20]
19	595.1578	14.2	449, 287	Cyanidin-pentosylhexoside ^b [20,25]
23	463.1243	0.6	301	Peonidin-3-hexoside [20,25]
	609.1810	0.2	301	Peonidin-3-rutinoside [19,20]
	897.2019	7.8	735, 573	Dimer of cyanidin-3-hexoside
24	765.2038	0.9	603, 475, 313, 287	Cyanidin-3-hexoside-ethyl-catechin
	897.2119	3.3	735, 573, 287	Dimer of cyanidin-hexoside
	597.1470	2.3	465, 303	Quercetin-pentoside-hexoside
	911.2513	10.6	749, 621, 313, 287	Cyanidin-methylpentoside-hexoside-ethyl-catechin
	465.1122	19.1	303	Quercetin-3-hexoside ^b [2]
	595.1540	20.6	449, 287	Cyanidin-pentosylhexoside ^b [20,25]
	611.1613	0.2	465, 303	Quercetin-3-rutinoside [2]
25	465.1032	0.2	303	Quercetin-3-hexoside [2]
	611.1613	0.2	465, 303	Quercetin-3-rutinoside (rutin) [2]

^a The number of fraction corresponding with the number of peak in Fig 3.^b Suggested structures.

5-methylpyranocyanidin-3-hexoside (mass difference: -3.3 ppm). Similarly, an ion with m/z 501.1401 was observed (Fig. 5). The first fragmentation step corresponds with the cleavage of a sugar moiety. During the fragmentation of the aglycon (MS^3 , IT) the cleavage of a methyl group was observed ($\Delta m/z = 15$) as well as the loss of carbon monoxide and water, which suggests the presence of one methoxygroup in the anthocyanidin skeleton. This ion can be ascribed to 5-methylpyranopeonidin-3-hexoside (mass difference 0.8 ppm). During detailed investigation of MS^2 spectrum of 5-methylpyranocyanidin-3-hexoside a fragment at m/z 254.0591 was found. This ion can be explained by loss of hexose, two losses of carbon monoxide and consequent cleavage of methyl radical ($\Delta m/z = 15$) from pyrano-ring. This fragmentation pattern was unambiguously confirmed by targeted MS^3 ($487 \rightarrow 325 \rightarrow$; inset in

Fig. 4) and MS^4 ($487 \rightarrow 325 \rightarrow 269 \rightarrow$) experiments using ion trap. Those experiments show that the cleavage of methyl radical can occur solely from the pyrano-ring and thus the process is characteristic for 5-methylpyranoanthocyanins. The difference of measured mass from the theoretical value calculated for the proposed radical cation (elemental composition $C_{15}H_{10}O_4^+$) is 4.7 ppm showing a good agreement with our presumptions. Detailed insight into the fragmentation of 5-methylpyranopeonidin-3-hexoside (Fig. 5, bottom spectrum) disclosed fragmentation pathway leading to ion at m/z 253.0509 which is analogous structure to the fragment discussed above for 5-methylpyranocyanidin-3-hexoside (difference of measured mass from the theoretical one is 3.1 ppm in this case). As it was already mentioned the fragmentation pathway of related aglycon starts by the cleavage of methyl radical

**Fig. 4.** ESI-MS spectra of 5-methylpyranocyanidin-3-hexoside (bottom spectrum— MS^2 ; fragmentation of aglycon was zoomed 10 \times ; inset in bottom spectrum—IT- MS^3).

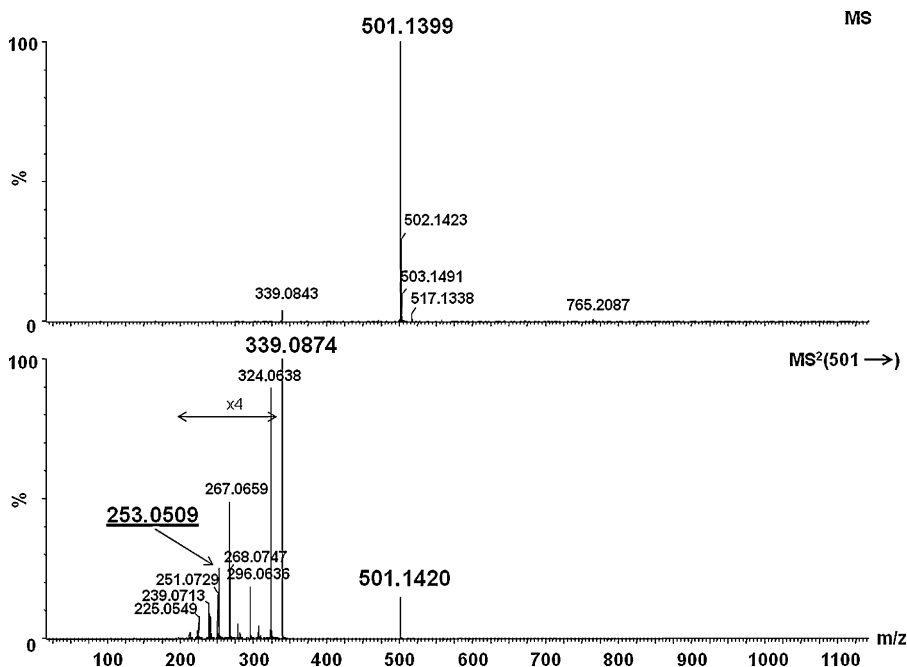


Fig. 5. ESI-MS spectra of 5-methylpyranopeonidin-3-hexoside.

(bottom spectrum—MS²; fragmentation of aglycon was zoomed 4×)

from the B-ring and formation of radical cation. Characteristic fragment rising after the cleavage of methyl radical from the pyrano-ring has one unit lesser m/z value compared to fragment of 5-methylpyranocyanidin-3-hexoside. However, the ion trap experiments done with 5-methylpyranopeonidin-3-hexoside provided only weak MS³ and MS⁴ spectra due to its lower concentration in all studied samples compared to 5-methylpyranocyanidin-3-hexoside. The structures of both dyes (aglycons) can be seen in Fig. 6.

Table 2 shows that both 5-methylpyranoderivatives were mainly found in the methanol–acetone extracts. Recently, Lu and Foo [37] also observed a significant anthocyanin reaction with aqueous acetone and the formation of 5-methylpyranoanthocyanidins. These authors did not observe such anthocyanins in other extraction solvents and our experiments are in agreement with their data (5-methylpyranoderivatives were only found in extracts with a methanol–acetone or water–acetone mixture). Interestingly, the above-mentioned pyranoanthocyanins were not found in the acetone extract. This fact could be related to a poor extraction of native anthocyanins itself and consequently their low content available for cyclization. Another explanation can also be a different reactivity in polar protic solvents such as methanol. If the transition state is stabilized by polar protic solvents the reaction

may proceed faster in such a medium and more of this product will be obtained. Andersen et al. found 5-carboxypyranopelargonidin in the methanolic extract of strawberries [25]. However, its origin was not discussed in detail and it is not clear whether the dye is formed during the fruit's growth or after its harvest (i.e. before or during extraction, when contact with pyruvic acid as the cyclization agent cannot be precluded).

Other anthocyanin dyes were identified by μ LC/MS² after a more efficient purification and fractionation of the LCPF with a reverse phase (Fig. 3). Proposed structures together with the most abundant fragments obtained after their isolation in the first quadrupole and CID in the collision cell, as well as the differences between their measured and exact masses are listed in Table 3. Anthocyanins bearing two sugar units were found in the first fractions. Simple anthocyanins with one sugar unit were eluted (not fully resolved) in fraction 18, which was the most colored. Later eluted fractions were comprised of pigments glycosylated with rutinose. In accordance with our predictions, derivatives of cyanidin eluted from the reverse phase before related derivatives of peonidin. In fractions obtained after fractionation of LCPF (fraction 18, see Table 3 and Fig. 3), the 5-methylpyranocyanidin-3-hexoside (formed from very high content of cyanidin-3-hexoside) was found and confirmed by exact mass measurement and fragmentation study regardless the fact that the fraction was not in contact with acetone. This indicates that the formation of 5-methylpyranoanthocyanins in a fruit and/or in a prepared extract by an alternative way should not be precluded. Since the content of peonidin-3-hexoside (fraction 23) is much lower than the content of cyanidin-3-hexoside, the content of 5-methylpyranopeonidin-3-hexoside is much lower than 5-methylpyranocyanidin-3-hexoside and it is below the detection limit in LCPF fractions.

In addition, several derivatives of quercetin were also found in the LCPF fraction (Fig. 3 and Table 3). Some of the identified polyphenols (or related isomeric structures) are reported in Lonicera fruits for the first time (cyanidin-3-hexoside-ethyl-catechin, cyanidin-methylpentoside-hexoside-ethyl-catechin, quercetin-methylpentoside-dihexoside, quercetin-pentoside-hexoside). Fig. 7 (upper spectrum) shows the MS² spectrum of cyanidin-3-hexoside-ethyl-catechin (m/z 765.2025; mass differ-

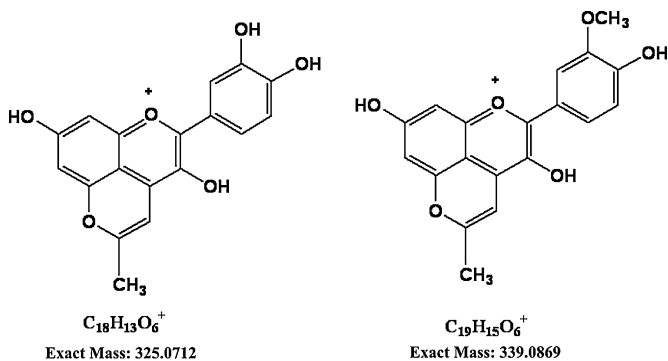


Fig. 6. Structures of identified 5-methylpyranoanthocyanidins.

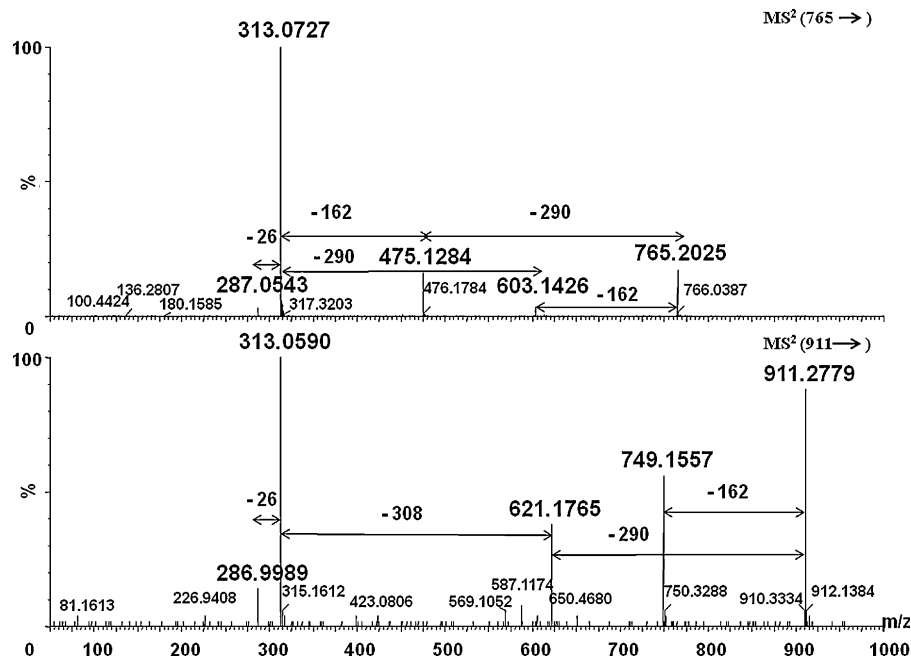


Fig. 7. ESI-MS² spectra of cyanidin-3-hexoside-ethyl-catechin (m/z 765) and cyanidin-methylpentoside-hexoside-ethyl-catechin (m/z 911).

ence -0.8 ppm). Loss of dehydrated hexose ($\Delta m/z=162$) and neutral molecule of catechin ($\Delta m/z=290$) can be clearly seen. Consequent fragmentation leads to dominant fragment ion at m/z 313.0727 which corresponds with a vinyl cyanidin (elemental composition $C_{17}H_{13}O_6^+$; mass difference 4.8 ppm). The proposed structure is confirmed by a further loss of vinyl group ($\Delta m/z=26$) and formation of cyanidin (elemental composition $C_{15}H_{11}O_6^+$; mass difference -4.5 ppm). By analogy, another bridged cyanidin glycoside can be considered. In bottom MS² spectrum an ion at m/z 911.2779 (mass difference 18.5 ppm) can be seen. This dye can be ascribed to cyanidin-methylpentoside-hexoside-ethyl-catechin. The ion fragments via loss of dehydrated hexose ($\Delta m/z=162$), dehydrated methylpentosylhexose ($\Delta m/z=308$),

neutral molecule of catechin ($\Delta m/z=290$) and formation of vinyl cyanidin and cyanidin itself. This fragmentation pattern confirms the proposed structure. Fig. 8 shows the MS² spectrum of quercetin-methylpentoside-dihexoside (m/z 773.2520; upper spectrum) and quercetin-pentoside-hexoside (m/z 597.4384; bottom spectrum). The losses of dehydrated methylpentose or pentose and hexose(s) ($\Delta m/z=132$, 146 and 162, respectively) are obvious. Quercetin aglycon is obtained as dominant fragment (mass differences -0.3 and 11.2 ppm, respectively are achieved). The derivatives of quercetin are isomeric with delphinidin analogues which could be alternatively considered as well. However, the comparison of their retention times with the other found polyphenols indicates rather the presence of quercetin derivatives.

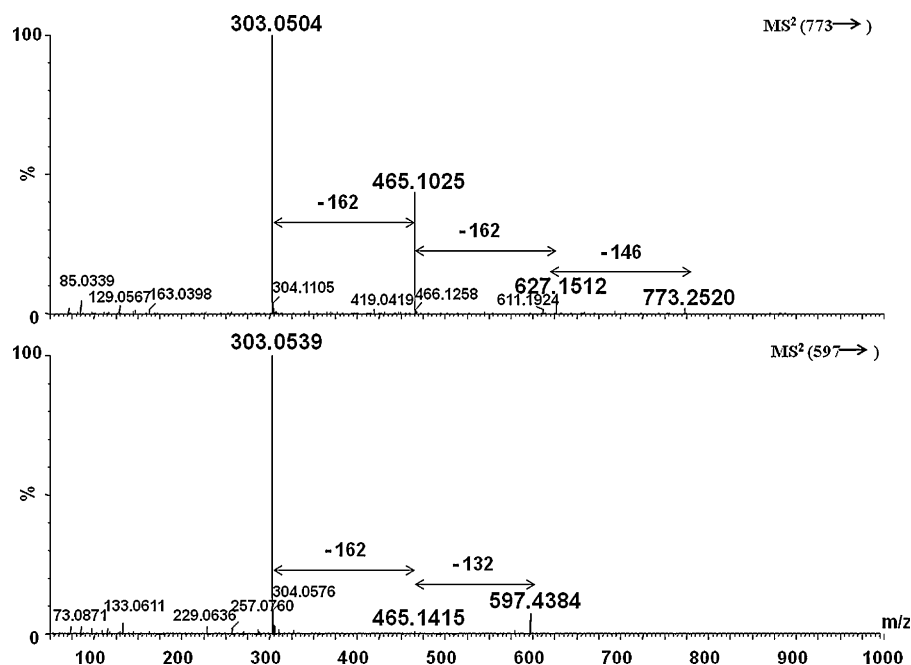


Fig. 8. ESI-MS² spectra of quercetin-methylpentoside-dihexoside (m/z 773) and MS² of quercetin-pentoside-hexoside (m/z 597).

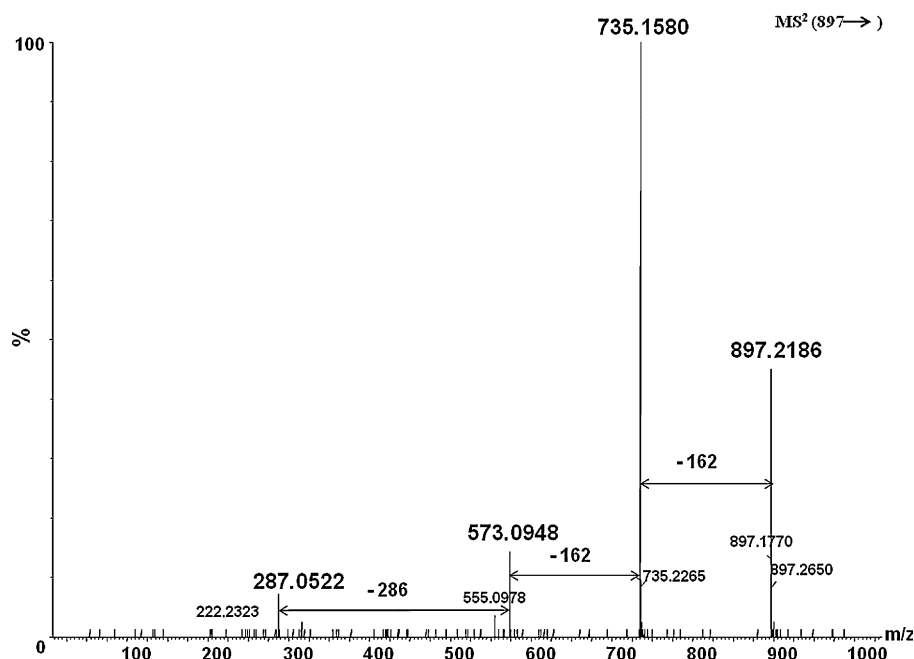


Fig. 9. ESI-MS² spectrum of dimer of cyanidin-3-hexoside (m/z 897).

Fig. 9 shows the collision spectrum obtained by direct infusion of colored fraction 24, isolation of an ion at m/z 897.2186 in the first quadrupole and CID in the collision cell. Although the obtained MS² spectra of those peaks are of a lower quality, the consequent losses of two dehydrated hexoses ($\Delta m/z = 162$) as well as the cleavage of two anthocyanidin units ($\Delta m/z = 286$) were observed. The structure of the dye corresponds with a dimer of cyanidin-3-hexoside (the differences in the measured masses of the corresponding fragments from those calculated are less than 15 ppm). An ion with the same nominal mass (m/z 897.2089) was observed in fraction 18, which contained a high concentration of cyanidin-3-hexoside. We presuppose that this ion is formed by the oxidation of cyanidin-3-hexoside to dimer in the ion source of the mass spectrometer. An independent μ LC/MS analysis of purified *Lonicera* extract identified three separated ions with m/z 897.2 (data not shown). One of them had a retention time and peak shape identical to cyanidin-3-hexoside. This ion confirms the production of the dimer in the ion source and it serves as a good example of a pitfall stemming from sample transformation during analysis and subsequent possible misinterpretation of MS data.

4. Conclusion

The process of extracting anthocyanin pigments from the fruit of *L. caerulea* var. *kamtschatica* was studied. The highest yield of these compounds was obtained using acidified methanol. This result confirms the overall suitability of methanolic extraction media for the treatment of various fruits. A high extraction efficiency was also reached using a mixture of methanol:acetone:phosphoric acid (50:50:0.1, v/v/v), however during this process a considerable amount of 5-methylpyranoanthocyanins was formed due to condensation with the acetone. It was found that extraction medium strongly affects the properties of Sephadex LH-20 when used as the stationary phase for the preparative fractionation of extracts. Suitable chromatographic performance was achieved using methanolic media. Less polar solvents (i.e. ethanol and acetone) caused a phase compression as well as longer and less reproducible retention. This phase allowed fractionation into three groups (5-methylpyranoanthocyanins, diglycosylated and mono-

glycosylated anthocyanins). The retention mechanism seems to be a combination of hydrophilic interactions and an increased permeation of smaller molecules into the stationary phase compared to bigger ones. A combination of prepurification on Sepabeads SP 207 and semipreparative separation on the reversed phase produced relatively pure fractions of particular dyes. Besides native *Lonicera* anthocyanins, several less common pigments were found in these fractions using μ LC/MS and MS² experiments. Based on precise mass measurement and the study of collision spectra, 5-methylpyranoanthocyanins, dimers of cyanidin-3-hexoside and compounds containing an anthocyanin and catechin unit connected via ethyl bridge were identified in extracts of *Vacciniaceae* and *Caprifoliaceae* berries for the first time.

Acknowledgements

The support of Ministry of Trade and Commerce (FT-TA3/024) and Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic (MSM6198959216 and AV0Z50200510) is gratefully acknowledged. We thank to Miroslav Chovanec from Lipník nad Bečvou for growing the *L. caerulea* and to Assoc. Prof. Jan Hlaváč from the Department of Organic Chemistry, Palacký University for the calculation of partition coefficients.

References

- [1] J. Matuskovic, T. Pokorna, M. Antalíkova, *Acta Horticult. Regiotech.* 2 (2006) 44.
- [2] A. Chaovanalikit, M.W. Thompson, R.E. Wrolstad, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 848.
- [3] M.N. Plekhanova, *Acta Horticult.* 538 (2000) 159.
- [4] M. Thompson, A. Chaovanalikit, *Acta Horticult.* 626 (2003) 65.
- [5] R.A. Moyer, K.E. Hummer, C.E. Finn, B. Frei, R.E. Wrolstad, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 519.
- [6] J. Kong, *Phytochemistry* 64 (2003) 923.
- [7] M.P. Kähkönen, M. Heinonen, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 628.
- [8] E. Kowalczyk, P. Krzesiński, M. Kura, B. Szmigiel, J. Baszczyk, *Pol. J. Pharmacol.* 55 (2003) 699.
- [9] I. Paříková, K. Valentová, I. Oborná, J. Ulrichová, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 6584.
- [10] T.K. McGhie, M.C. Walton, *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (2007) 702.
- [11] A. Mauray, D. Milenkovic, C. Besson, N. Caccia, C. Morand, F. Michel, A. Mazur, A. Scalbert, C. Felgines, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 11106.

- [12] M.I. Gruiá, E. Oprea, I. Gruiá, V. Negoita, I.C. Farcasanu, *Molecules* 13 (2008) 1195.
- [13] I. Švarcová, J. Heinrich, K. Valentová, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 151 (2007) 163.
- [14] D.X. Hou, T. Yanagita, T. Uto, S. Masuzaki, M. Fujii, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 417.
- [15] D.X. Hou, T. Ose, S. Lin, K. Harazono, I. Imamura, M. Kubo, T. Uto, N. Tarahara, M. Yoshimoto, M. Fujii, *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 705.
- [16] Y.J. Zang, S.K. Vareed, M.G. Nair, *Life Sci.* 76 (2005) 1465.
- [17] P. Chen, W. Kuo, C. Chiang, H. Chiou, Y. Hsieh, S. Chu, *Chem. Biol. Interact.* 163 (2006) 218.
- [18] A. Svobodová, J. Rambousková, D. Walterová, J. Vostálová, *Arch. Dermatol. Res.* 300 (2008) 225.
- [19] M. Jordheim, N.H. Giske, Ø.M. Andersen, *Biochem. Syst. Ecol.* 35 (2007) 153.
- [20] I. Palíková, J. Heinrich, P. Bednář, P. Marhol, V. Křen, L. Cvak, K. Valentová, F. Růžička, V. Holá, M. Kolář, V. Šimánek, J. Ulrichová, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 11883.
- [21] C.T. da Costa, D. Horton, S.A. Margolis, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 403.
- [22] J. Valls, S. Millán, M. Pilar Martí, E. Borràs, L. Arola, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7143.
- [23] C.D. Stalikas, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3268.
- [24] I. Revilla, S. Perez-Magarin, M.L. Gonzalez-SanJose, S. Beltra, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 83.
- [25] O.M. Andersen, T. Fossen, K. Torskangerpoll, A. Fossen, U. Hauge, *Phytochemistry* 65 (2004) 405.
- [26] C. Alcalde-Eon, M.T. Escribano-Bailón, C. Santos Buelga, J.C. Rivas-Gonzalo, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 238.
- [27] H. Fulcrand, C. Benabdeljalil, J. Rigaud, V. Cheynier, M. Moutounet, *Phytochemistry* 47 (1997) 1401.
- [28] M.J. Rein, V. Ollilainen, M. Vahermo, J. Yli-Kauhaluoma, M. Heinonen, *Eur. Food Res. Technol.* 220 (2005) 239.
- [29] C.F. Timberlake, P. Bridle, *Am. J. Enol. Viticult.* 27 (1976) 97.
- [30] O. Boutin, E. Badens, *J. Food Eng.* 92 (2009) 396.
- [31] R. Otero, G. Carrera, J.F. Dulsat, J.L. Fabregas, J. Claramunt, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 193.
- [32] L. Longo, G. Vasapollo, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 475.
- [33] P. Bhandari, N. Kumar, A.P. Gupta, B. Singh, V.K. Kaul, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2092.
- [34] J. Oliveira, V. Fernandes, C. Miranda, C. Santos-Buelga, A. Silva, V. de Freitas, N. Mateus, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6894.
- [35] C. Garcia-Viguera, P. Zafrilla, F.A. Tomas-Barberan, *Phytochem. Anal.* 9 (1998) 274.
- [36] P. Jing, M.M. Guisti, *J. Food Sci.* 72 (2007) 363.
- [37] Y. Lu, Y. Foo, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 1371.
- [38] M.P. Kähkönen, J. Heinämäki, V. Ollilainen, M. Heinonen, *J. Sci. Food Agric.* 83 (2003) 1403.
- [39] J. He, C. Santos-Buelga, N. Mateus, V. de Freitas, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 215.
- [40] M.M. Giusti, L.E. Rodriguez-Saona, D. Griffin, R.E. Wrolstad, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4657.
- [41] A.M. González-Paramaš, F. Lopes da Silva, P. Martín-López, G. Marcz-Pop, S. González-Manzano, C. Alcalde-Eon, J.J. Pérez-Alonso, M.T. Escribano-Bailón, J.C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, *Food Chem.* 94 (2006) 428.
- [42] M. Schwarz, S. Hillebrand, S. Habben, A. Degenhardt, P. Winterhalter, *Biochem. Eng. J.* 14 (2003) 179.

Přehledový článek

Neinvazivní testování - 2 roky v klinické praxi

Non invasive prenatal testing - two years in clinical practice

Jaroslav Loucký^{1,2}, Renáta Myjavcová^{1,2}, Michal Zemánek^{1,2}, Eva Loucká², Milan Kovalčík²

¹IMALAB, s.r.o., Zlín, ²PREDIKO, s.r.o., Zlín

Korespondenční adresa: RNDr. Jaroslav Loucký, IMALAB s.r.o., U Lomu 638, 760 01, Zlín, tel.: +420 602 303 098, email: loucky@imalab.cz

Publikováno: 31. 1. 2014 Přijato: 17. 1. 2014 Akceptováno: 22. 1. 2014
Actual Gyn 2014, 6, 11 ISSN 1803-9588 © 2014, Aprofema s.r.o.
Článek lze stáhnout z www.actualgyn.com



Citujte tento článek jako: Loucký J, Myjavcová R, Zemánek M, Loucká E, Kovalčík M. Neinvazivní testování - 2 roky v klinické praxi. Actual Gyn. 2014;6:11

Stávající způsob screeningu Downova syndromu a některých dalších chromozomálních aberací je v současné době prováděn s pomocí informací, získaných stanovením biochemických parametrů nebo měřením ultrazukových markerů. U těhotenství s Downovým syndromem nalézáme u těchto biochemických a ultrazukových parametrů odlišné hodnoty. Tato vyšetření mají charakter tzv. surogátních markerů, které souvisejí s fenotypem screenovaného onemocnění. Zdrojem informací v tomto případě tedy není přímo genetická výbava vyšetřovaného plodu. Koncem roku 2011 byl poprvé uveden do klinické praxe test, který dokázal analyzovat DNA plodu v krvi matky. Za poslední dva roky došlo k výraznému rozvoji tohoto typu testování a to jak z pohledu nabídky testů od různých firem, tak z pohledu spektra vyšetřovaných onemocnění nebo vad. Prostředkem pro analýzu DNA plodu v krvi matky je po technologicko-vědecké stránce buď metoda masivního paralelního sekvenování nebo cíleného sekvenování.

V posledních dvou letech bylo publikováno několik významných studií, které prokázaly, že tento typ testování přináší při sledování těhotných žen výrazně lepší výsledky, než obvyklý a dosud používaný typ screeningu. Zároveň tyto práce ukázaly, že v současné době nemůžeme neinvazivní testování považovat za diagnostickou metodu, ale že se jedná stále o metodu screeningovou, byť s výrazně lepšími parametry, než je tomu u stávajícího typu screeningu. Většina publikací také upozornila na skutečnost, že existuje malé procento vzorků, u nichž tyto metody neposkytnou žádný výsledek. Právě v této skupině vzorků ovšem mohou být přítomny plody s hledaným onemocněním, což reálně výsledné parametry těchto testů o něco zhoršuje.

Po praktické stránce dnes existuje osm testů, které nabízejí různé společnosti. Vyšetření je zpravidla realizováno během několika dnů a výsledky mají ve většině případů charakter vyjádření rizika. V jednom případě je výsledek vyjádřen v podobě negativní/pozitivní. Tento typ testování přináší těhotným ženám nesporné výhody, ke kterým patří zejména včasnost provedení (od 10. týdne těhotenství). Vzhledem k vysoké senzitivitě a nízké falešné pozitivitě může být tento test vhodnou alternativou invazivní diagnostiky pro ženy, které z ní mají obavu, ev. pro ženy po IVF, při výskytu chromozomálních vad v rodině nebo např. při hraničních výsledcích běžného screeningu. Jako velmi výhodné se jeví využití těchto testů při provádění tzv. sekundárního screeningu u pozitivních výsledků běžného screeningu. Velmi podstatnou součástí tohoto typu testování je stanovení tzv. fetální frakce, tedy zastoupení množství genetické informace plodu v krvi matky. U vzorků s nižším obsahem fetální frakce (méně než 4 %) může dojít ke stanovení falešně negativního výsledku.

Je zřejmé, že neinvazivní prenatální testování v současné době plně nenahrazuje invazivní diagnostické metody, ale může výrazně snížit počet těchto invazivních zákroků. Pozitivní výsledek DNA testu by měl vždy být potvrzen odběrem choriových klků, nebo odběrem plodové vody. Tyto testy v současné době dokáží odhalit pouze některá genetická onemocnění a není možno s jejich pomocí analyzovat např. mozaicismus, částečné trizomie nebo translokace.

Electrochemical Polymerization and Investigation of Properties of Poly(5-(4'-aminophenylamino)-10,20-diphenylporphyrin)

Aysegul Uygun,^{*a} Renata Myjavcova,^b Ayse Gul Yavuz,^a Joshua V. Ruppel,^c Kimberly B. Fields,^c Anita Frankhauser,^c X. Peter Zhang,^c Venkat R. Bhethanbotla,^d Petr Bednar^b

^a Suleyman Demirel University, Arts and Science Faculty, Department of Chemistry, 32260 Isparta, Turkey

^b Palacky University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^c Department of Chemistry, University of South Florida, Tampa, Florida, USA 33620-5250

^d Sensors Research Laboratory, Department of Chemical and Biomedical Engineering, University of South Florida, Tampa, Florida, USA 33620-5350

*e-mail: aysegul@fef.sdu.edu.tr

Received: September 30, 2010

Accepted: December 27, 2010

Abstract

The preparation and electropolymerization of a new porphyrin monomer with an amino group connecting the porphyrin core and aniline unit were studied. Cyclic voltammetry, FTIR spectroscopy, and a tandem quadrupole/time of flight mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization source (MALDI-QqTOF) were used for the characterization of poly(5-(4'-aminophenylamino)-10,20-diphenylporphyrin) (PAPADPP). The PAPADPP formed a smooth layer on the *Indium tin oxide* (ITO) electrode and grew perpendicular to the electrode surface. An oligonucleotide (ODN)-probe was physisorbed onto the PAPADPP film and tested for hybridization with complementary and noncomplementary ODN segments. Biological recognition was monitored by comparison of the electrochemical signals (cyclic voltammogram) from single and double strand state oligonucleotides. The morphology of the physisorbed ODN-probe and its hybridization were observed on ITO electrodes using AFM and SEM.

Keywords: Porphyrin, Electropolymerization, Conducting polymers, Biosensors

DOI: 10.1002/elan.201000609

1 Introduction

Porphyrins are among the most-studied organic chromophores. These macrocyclic compounds have great potential in catalysis, sensors, biomedicine, and photosensitizer applications due to their rich electron-transfer chemistry [1]. Among these materials, metalloporphyrins have been used as attractive agents for electrode modification and are useful in photoelectrochemical processes due to their strong light absorption in the visible to near-ultraviolet region [2,3]. Moreover, modifying electrode surfaces with electropolymerized porphyrin films have been studied because of the ease of film formation and their potential in catalysis and sensor applications [4,5]. An attractive future direction in porphyrin research would be to apply their characteristics for the production of electricity or fuels [1]. This can be potentially accomplished through the movement of electrons and holes (oxidizing equivalents) from the chromophore to electrodes or catalytic sites.

The best method for interfacing porphyrins with electrodes is to incorporate them into conductive polymers that can move electrons or holes from the site of generation to a conductor which could modulate the transport of electrons between conductors, or otherwise transduce the molecular event into an electrical response. With this

purpose, porphyrins containing electropolymers have recently been reported [6–11]. The one method to produce a conducting porphyrin polymer is the electrochemical polymerization of molecules where a functionalized macrocycle is contained within the conducting polymer (such as pyrrole, aniline, or thiophene).

Pyrrole and thiophene derivatives have been used recently in the modification of electrode coverages containing metalloporphyrin systems [12–14]. The polymerization of these systems were carried out via the substituents attached to the tetraphenylporphyrin periphery. The electropolymerization of 5,10,15,20-tetrakis(2-aminophenyl)porphyrin has been investigated by the groups of White [15] and Spiro [16]. White and co-workers investigated and reported on the oxidative electropolymerization of tetrakis(*o*-aminophenyl)porphyrin and some of its metalated derivatives [15]. Spiro and co-workers documented that this porphyrin served as a bridge between polyaniline chains [16]. The resulting polymer structure displayed hole conductivity and exhibited a similar conductivity mechanism to that of polyaniline.

This paper presents a novel procedure for the synthesis of (5-(4'-aminophenylamino)-10,20-diphenylporphyrin) monomer and its electropolymerization (Figure 1). The amino group was chosen to connect the porphyrin core to the aniline unit. The specificity of the immobilization and

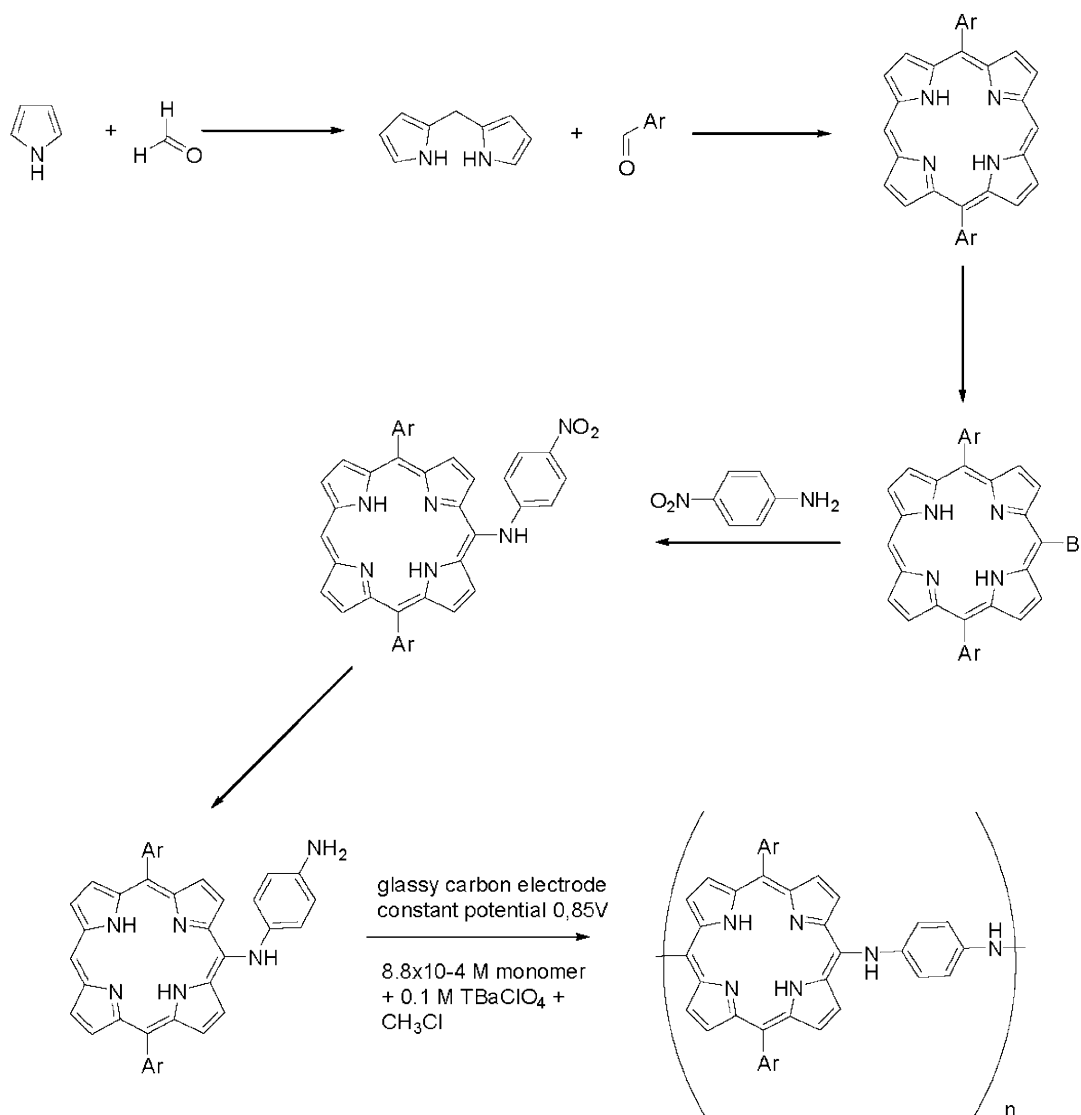


Fig. 1. Synthesis and electrochemical polymerization of monomer and polymer.

the ability of the ODN-probe to physisorb onto the PA-PADPP were investigated electrochemically. The poly(5-(4'-aminophenylamino)-10,20-diphenylporphyrin) (PA-PADPP) and PAPADPP/ODN films were characterized using cyclic voltammetry (CV), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), UV-visible spectrophotometry (UV-vis), MALDI-QqTOF mass spectrometry (MALDI-MS), atomic force microscopy (AFM), and scanning electron microscopy (SEM) techniques.

2 Experimental

2.1 Materials

All reactions were carried out under a nitrogen atmosphere in oven-dried glassware following standard Schlenk techniques. Toluene and tetrahydrofuran (THF) were distilled under nitrogen from sodium benzophenone ketyl. The *p*-phenylenediamine was purchased from Acros and

used without further purification. Ultra-fine high purity cesium carbonate was a generous gift from Chemtall. Palladium(II) acetate and bis(2-diphenylphosphinophenyl)-ether (DPEphos) were all purchased commercially from Strem Chemicals. All ligands, palladium precursors, and bases were stored in desiccators filled with anhydrous calcium sulfate and weighed in the air. 10-bromo-5,15-diphenylporphyrin was prepared according to the method described in literature [17]. Thin layer chromatography was performed on Merck TLC plates (silica gel 60 F-254). Flash column chromatography was performed with Merck silica gel (60 Å, 230–400 mesh, 32–63 μm).

Tetrabutylammonium perchlorate (Fluka) was used as received. Indium tin oxide (ITO) coated glass electrodes (surface resistivity; 5–15 Ω/sq), chloroform, acetonitrile, lithium perchlorate, tetrahydrofuran, and phosphate buffer (pH 7.4) were obtained from Sigma-Aldrich and used as received. Integrated DNA Technologies (IDT), Inc. synthesized the oligonucleotides (ODNs) including

probe NH₂-GATGAGTATTGATGCCGA-3', complementary target 5'-TCGGCATCAATACTCATC-3' and noncomplementary 5'-TAT GCTGGTGCGTCG CAC-3'. Dithranol (Aldrich) was used as the matrix for the MALDI-MS experiments.

2.2 Methods and Instruments

The electrochemical experiments were carried out with a Gamry 300 model potentiostat. FTIR spectra were recorded on a Perkin Elmer, Spectrum BX II spectrophotometer. ¹H NMR and ¹³C NMR were recorded on a Varian Inova400 (400 MHz) with chemical shifts reported relative to residual solvent. UV-visible spectra measurements were recorded between 300 and 1000 nm using a 1 cm path length quartz cuvette and pure N-methylpyrrolidone (NMP) on a Perkin-Elmer Lambda 20 UV-visible spectrophotometer. The surface topology of the electrodes were characterized using an atomic force microscopy (AFM) in contact mode under a constant force (Nano-Surf) and the roughness was obtained from a 9.8 × 9.8 μm² scan. The samples were sputter coated with gold layer and photographs were taken on a scanning electron microscope (SEM) model Tescan Vega LSU. The mass spectrometer was equipped with a MALDI source and a hybrid QqTOF analyzer and used for the measurement of the molecular mass of the oligomers present on PAPADPP. The equipment was provided by Waters, Milford, USA. The PAPADPP was dissolved in tetrahydrofuran with dithranol as the matrix. PAPADPP/tetrahydrofuran solutions with concentrations of 10 mg/mL and 20 mg/mL were prepared, properly mixed with the dithranol, and deposited on the sample plate. After evaporation, the plate was loaded into the ion source and the mass spectra were recorded. The setup of mass spectrometer was as follows: positive ion mode, laser parameters: wavelength: 337.1 nm; pulse energy 300 μJ (10 Hz), flow rate of cooling gas: 10 mL/h, collision energy 10 V, and collision gas flow 0.32 mL/min. A mixture of polyethylene glycols (PEG) 600, 1000, 2000, 4000, and 10000 were used for TOF calibration. It was proven that ion optics allowed for the transmission of ions up to m/z 12700, corresponding with [M+Na]⁺ ions of PEG. The effect of the quadrupole setup on the MS spectrum appearance was studied by the variation of quadrupole MS profile parameters. The scan range was determined by nominal masses 100, 1258, and 4000. The parameter defining the time delay (i.e. dwell time) was set to zero and the parameter defining the speed of reaching the middle and upper mass (i.e. ramp time) was varied over the whole range (i.e. 0–100%).

2.3 General Procedures for Synthesis of Porphyrin Monomer [18]

An oven-dried Schlenk tube equipped with a stirring bar was degassed on a vacuum line and purged with nitrogen. The tube was then charged with palladium precursor,

phosphine ligand, bromoporphyrin, and base. The tube was capped with a Teflon screwcap, evacuated and back-filled with nitrogen. After the Teflon screwcap was replaced with a rubber septum, a portion of solvent was added via syringe followed by the amine and the remaining solvent. The tube was purged with nitrogen (1–2 min) and the septum was then replaced with the Teflon screwcap and sealed. The reaction mixture was heated in an oil bath with stirring and monitored by TLC. After being cooled to room temperature, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate, washed with water (×3) and concentrated to dryness. The solid residue was purified by flash chromatography.

2.4 10-(4'-Phenylenediamino)-5,15-diphenylporphyrin

The general procedure was used to couple 10-bromo-5,15-diphenylporphyrin 20.7 mg (0.038 mmol) with *p*-phenylenediamine 33.1 mg (0.307 mmol) using Pd(OAc)₂ 1.0 mg (10 mol %) and DPEphos 4.3 mg (20 mol %) in the presence of Cs₂CO₃ 105.2 mg (0.307 mmol). The reaction was conducted in THF 5 mL (0.02 mmol/mL) at 100 °C for 24 hours. The title compound was isolated in 82.5% yield (18.9 mg). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (9.942, s, 1H), (9.296, d (*J* = 4.4 Hz), 2H), (9.170, d (*J* = 4.4 Hz), 2H), (8.880, d (*J* = 4.4 Hz), 2H), (8.712, d (*J* = 4.8 Hz), 2H), (8.184, m, 4H), (7.745, bs, 7H), (6.870, d (*J* = 8.4 Hz), (6.566, d (*J* = 8.8 Hz), (3.450, bs, 2H), (-2.382, bs, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 134.64, 131.54, 131.05, 127.88, 127.68, 126.85, 122.04, 117.82, 116.51, 112.30, 103.60.

2.5 Electropolymerization of 10-(4'-Aminophenylamino)-5,15-diphenylporphyrin

The electrochemical experiments were carried out with a potentiostat using 8.8 × 10⁻⁴ M (1.76 × 10⁻⁵ mol, (0.01 g)) monomer in chloroform and 0.1 M tetrabutylammonium perchlorate (TBAClO₄) as the supporting electrolyte. The

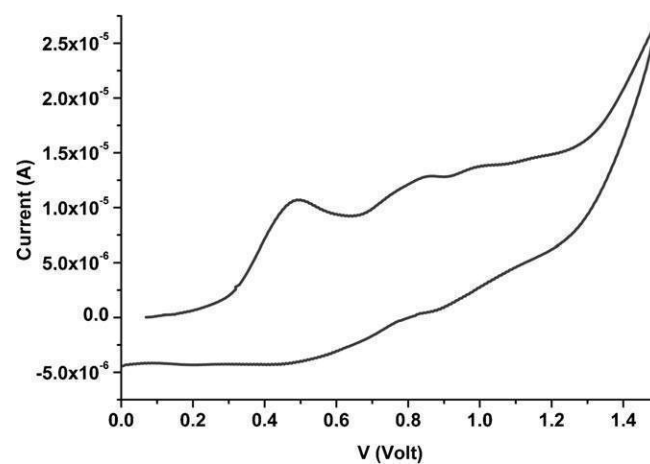


Fig. 2. Cyclic voltammogram of PAPADPP in chloroform/TBAClO₄. Scan rate: 100 mV/s.

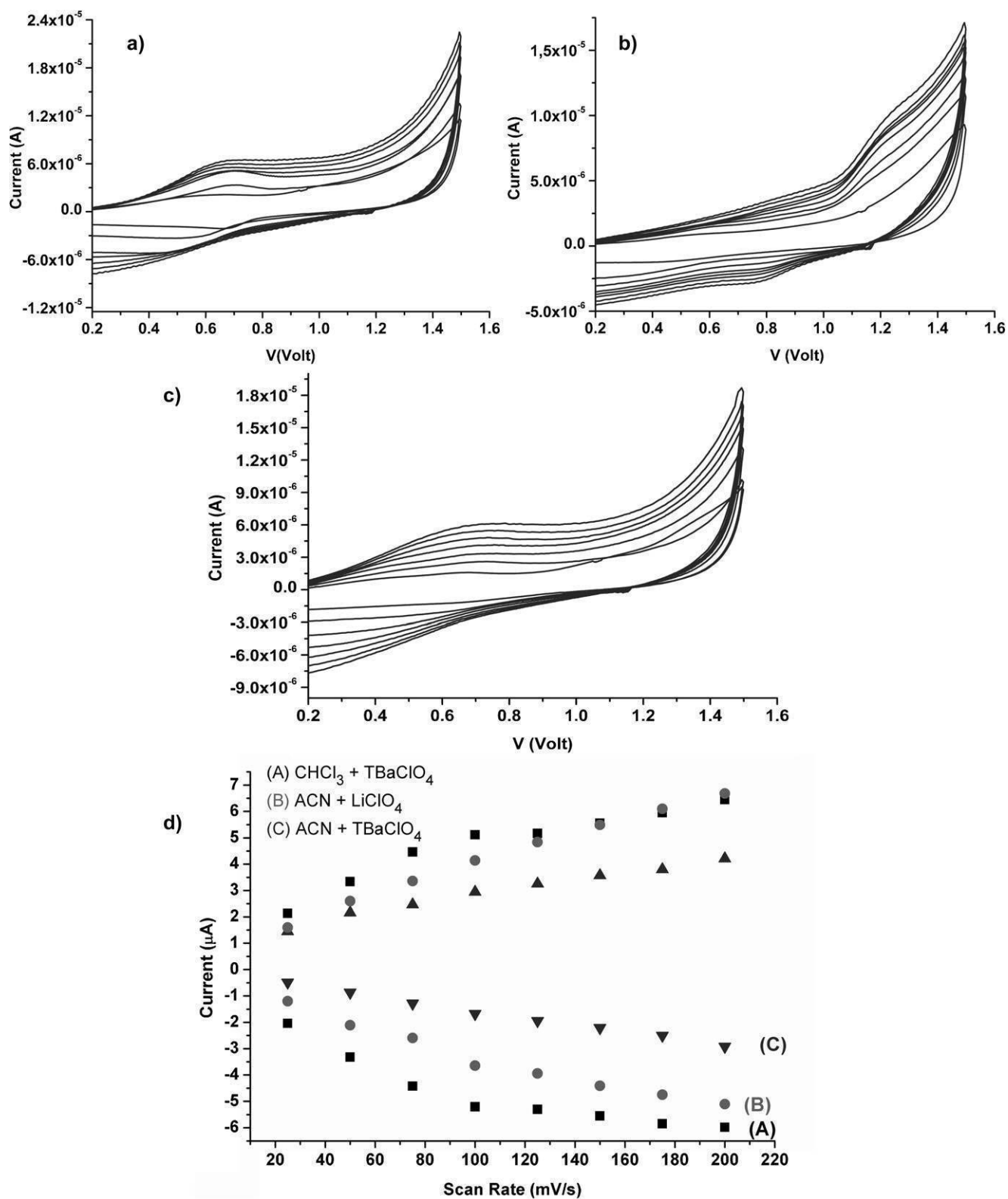


Fig. 3. Cyclic voltammogram of PAPADPP during changing scan rate from 25 mV s⁻¹ to 200 mV s⁻¹ in chloroform + TBAcClO₄ (a), ACN + TBAcClO₄ (b), ACN + LiClO₄ (c). Relationship of anodic current peaks as a function of scan rate for PAPADPP in three media (d).

porphyrin film was prepared by controlled potential coulometry with time 240 s with a 0.85 V potential (maximum charge 1.38 mC). The working electrode was glassy

carbon electrode, the counter electrode was platinum wire, and the reference electrode was Ag/AgCl. For the study of electrochemical properties, a PAPADPP covered

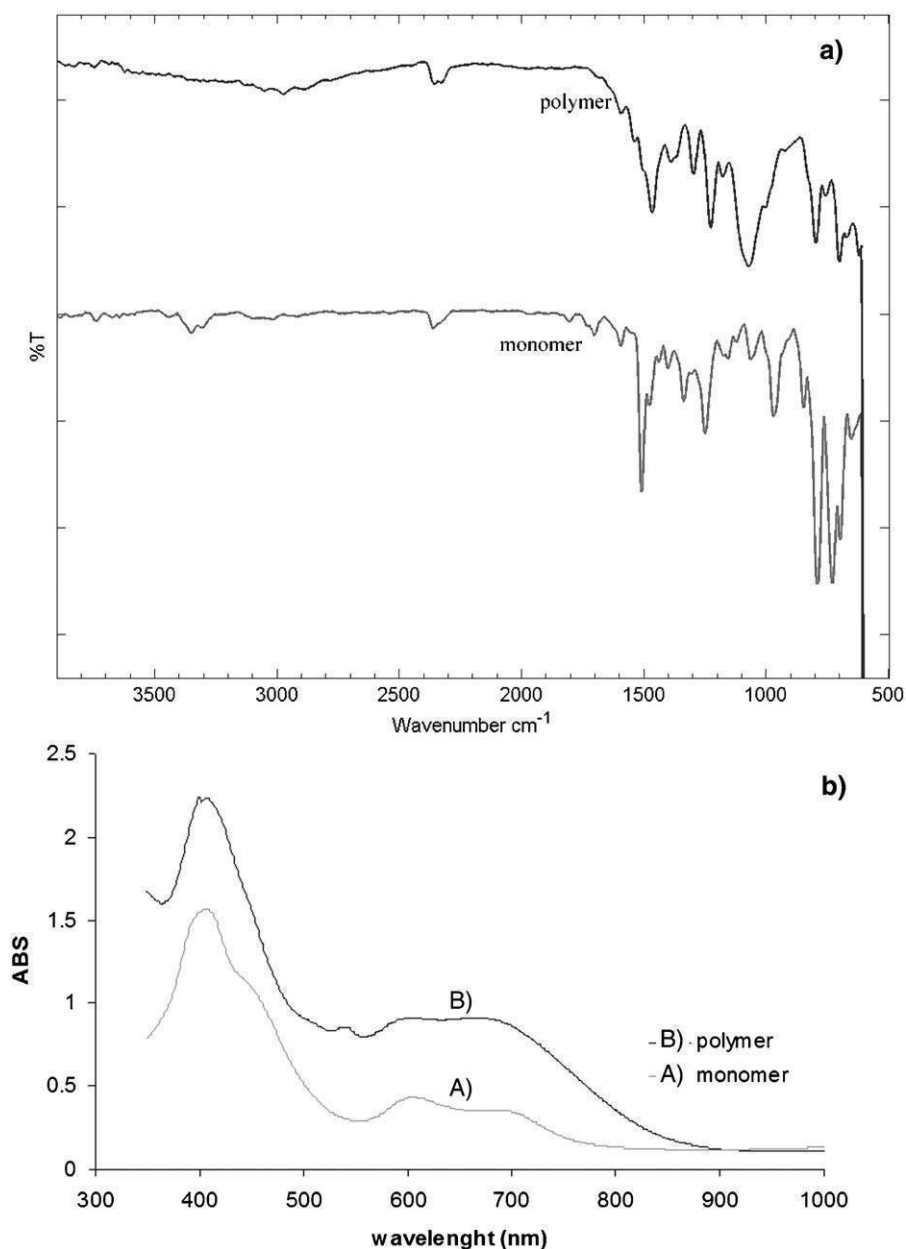


Fig. 4. a) FTIR spectra of monomer and polymer. b) UV-vis spectra of monomer (A) and polymer (B).

electrode was prepared by controlled potential coulometry with same conditions. Then, the polymer-coated electrode was removed from the monomer solution and washed with chloroform to remove the residual monomer.

The electrochemical properties of the porphyrin polymer preparation were monitored using cyclic voltammetry in several different solutions including chloroform/TBAClO₄, ACN/TBAClO₄ and ACN/LiClO₄. The electrode coated with PAPADPP was dipped into these solvents and while changing the scanning rate from 25 mV/s to 200 mV/s the electrochemical stability of the current required for the polymer preparation was observed.

2.6 Preparation of the DNA Sensor

The PAPADPP was prepared on glassy carbon and ITO electrodes by controlled potential coulometry. The PAPADPP covered electrode was rinsed with chloroform to remove the excess monomer before 10 μ L of the ODN-probe (1.35 nmol) was pipetted over the electrode's surface. After measurement by cyclic voltammetry in LiClO₄ with ACN as solvent, the electrode was kept at room temperature for 1 hour. The resulting ODN-probed PAPADPP/ITO bioelectrode was thoroughly washed with a phosphate buffer solution (PBS) of pH 7.4 to rinse off any loosely bound ODN-probe from the electrode. The immobilization of ODN onto the ITO electrode's poly-

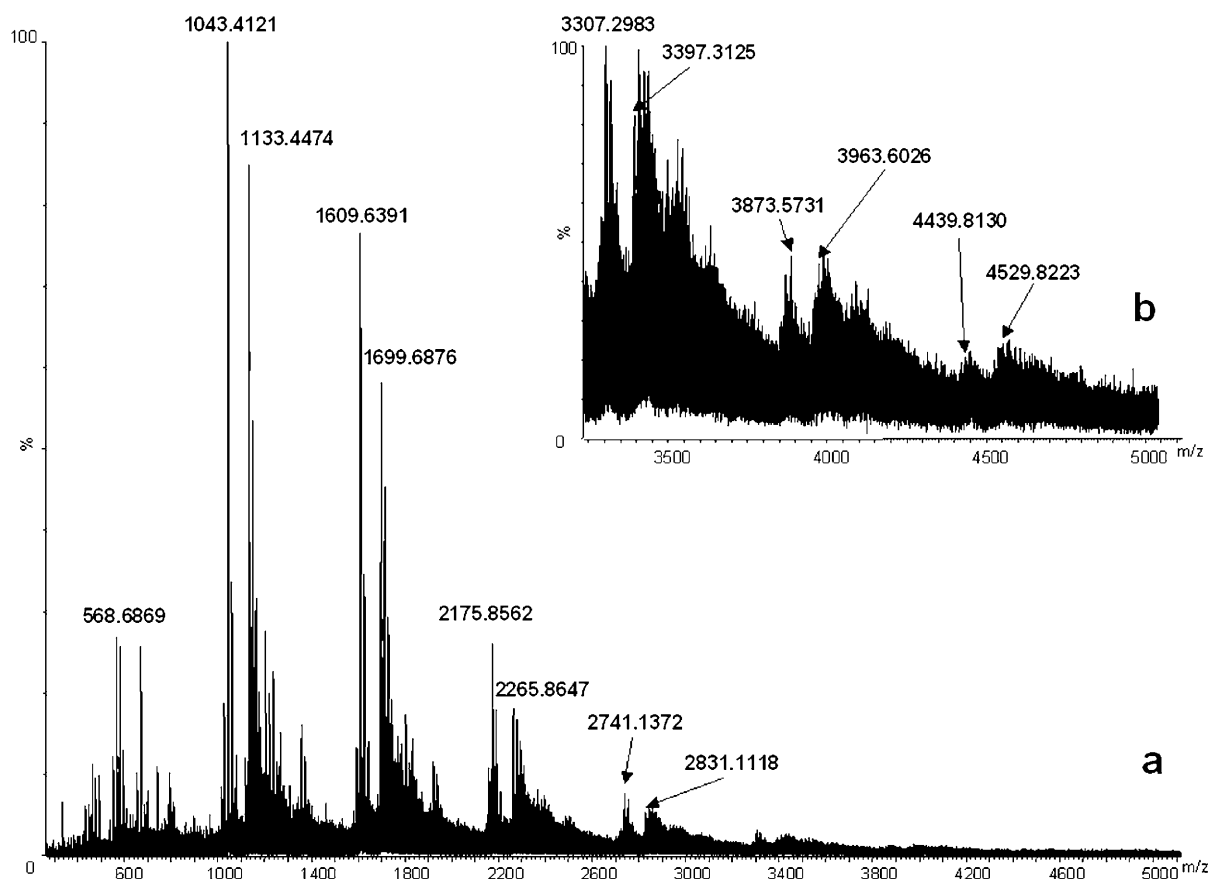


Fig. 5. MALDI-MS Spectrum of PAPADPP (a). Inset: spectrum focused on the higher masses with 6–8 units (b).

mer-coated surface was confirmed by AFM and SEM analyses. Then, cyclic voltammetry was performed again using 10 μL of the complementary base of the ODN in the same solution at the same conditions. Using the same procedure as outlined above, this experiment was repeated again using the noncomplementary base of ODN in the final step to verify the bioselectivity for the targeted base set. The surface of the resulting ITO electrodes were observed through tapping-mode AFM and SEM analyses.

3 Results and Discussion

3.1 Solution Electrochemistry

Figure 2 shows the cyclic voltammogram of the monomer in a $\text{TBAClO}_4/\text{chloroform}$ solution using a glassy carbon electrode and counter electrode, and an Ag/AgCl reference electrode, as detailed in the experimental section. The cyclic voltammogram was recorded over the potential range between 0.0 and 1.5 V. As a result, one main peak and two smaller peaks were observed during the oxidation process and two small peaks were observed during the reduction process of the polymer formation. This cycle shows the nucleation loop where the scan is reversed on the rising part of the peak, which is typical for a voltammogram of monomers yielding a conducting

polymer [19]. The color of the polymer changed from brown to dark green with increasing film thickness.

Preparation of the porphyrin polymer was accomplished through controlled potential coulometry. At a constant potential (0.85 V), the oxidation current first increased with increasing polymerization time and then the current maintained a constant level once the polymerization was complete. The polymerization time was determined to be 240 s at 0.85 V. After this time, the coated electrode was removed from the monomer solution and rinsed with chloroform to remove the monomer and oligomeric species. Unlike the monomer, the PAPADPP is not soluble in chloroform. Then, the electrode was placed in a fresh monomer-free electrolytic solution. The electrochemical properties of the porphyrin polymer were investigated using cyclic voltammetry in several different solutions. These cyclic voltammograms and the corresponding oxidation current–scanning rate graphs are shown in Figures 3a–d.

The anodic peak current (I_{ac}) responses were recorded and it was found that anodic current response increased linearly as the scan rate increased (Figure 3d). This demonstrated that the redox process was nondiffusional and the electroactive polymer was well adhered to the working electrode surface [20]. The PAPADPP/glassy carbon electrode illustrated the highest electrochemical activity in the $\text{LiClO}_4/\text{acetonitrile}$ medium. Furthermore, comple-

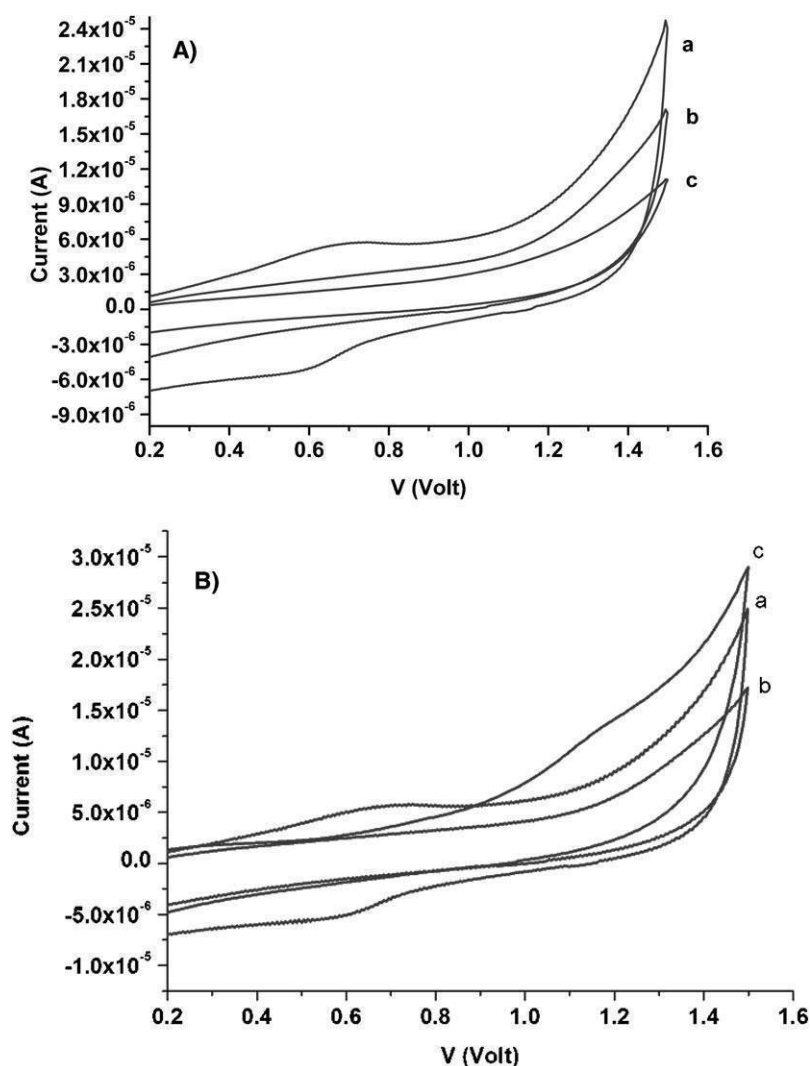


Fig. 6. A) Cyclic voltammograms of the (a) PAPADPP, (b) PAPADPP/ODN and (c) ODN hybridized PAPADPP/ODN electrodes in acetonitrile/LiClO₄ (Scan rate 100 mV/s). B) Cyclic voltammograms of the (a) PAPADPP, (b) PAPADPP/ODN probe and (c) after immobilization of noncomplementary ODN onto PAPADPP/ODN electrodes in acetonitrile/LiClO₄ (scan rate 100 mV/s).

mentary and noncomplementary ODN hybridization of the ODN-physisorbed PAPADPP were carried out in a 0.1 M solution of LiClO₄/acetonitrile.

3.2 Structure Characterization

3.2.1 FTIR and UV-Vis Results

The FTIR spectra of the monomer and the PAPADPP were seen in Figure 4a in the 600–4000 cm⁻¹ region. In general, the band ~730 cm⁻¹ is related to out-of-plane bending of the pyrrole N–H and C–H bonds, accompanied by a folding motion of pyrrole rings [21]. The band at ~800 cm⁻¹ is assigned to the *meso* C–H out-of-plane bending of the porphyrin's *meso* position [21]. The porphyrin-phenyl stretching bands were obtained around 1200 and 1180 cm⁻¹ for the polymer and monomer, respectively [3]. Figure 4a shows the broadening of bands and the decrease in intensity associated with polymeric structures.

Further evidence of polymerization is the lack of the free NH₂ bands in the spectra of the polymer.

Figure 4b shows the the absorption spectra of monomer (A) and the polymer (B) into NMP. The monomer and polymer solution have different colors in NMP. The Soret (b-bands) at 407 nm and 402 nm are characteristic for the monomer and polymer, respectively. The Q bands (n–π) are observed at 450, 604, 704 nm for the monomer and 538, 591, 688 nm for the polymer. As seen from the Figure 4b(B), the Q absorption bands of the polymer were blue shifted, which is further evidence of polymerization [22].

3.2.2 Mass Spectrometry

Figure 5 shows the spectrum of PAPADPP. Protonized oligomers, radical cations and fragments formed by fragmentation from higher oligomers can be seen. For instance ions of the type [M–2H+H]⁺ correspond well with the measured masses at *m/z* 568.6869, 1133.4474,

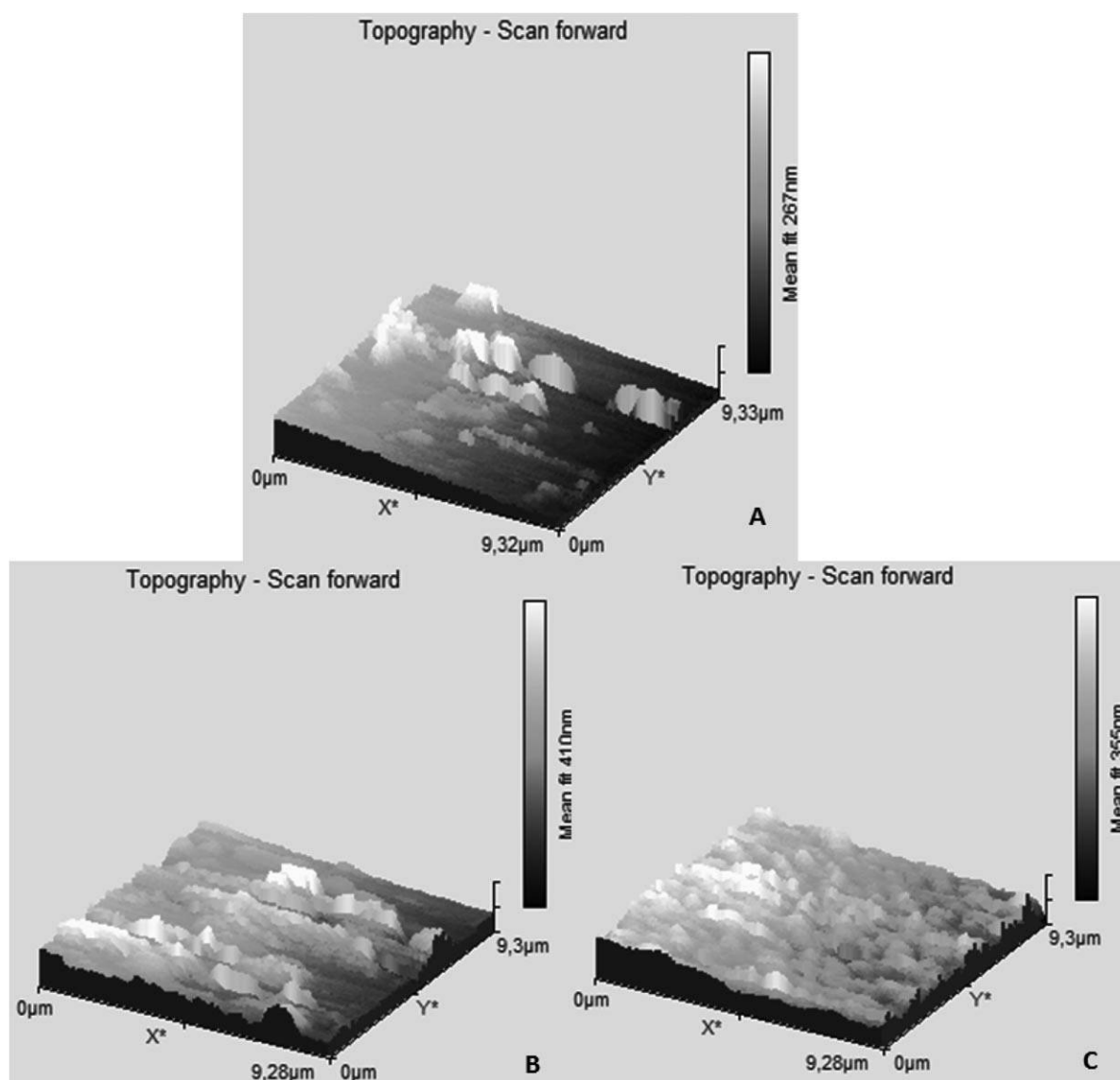


Fig. 7. AFM of (A) PAPADPP, (B) PAPADPP/ODN probe and (C) after immobilization of complementary ODN onto PAPADPP/ODN electrodes.

1699.6552, 2265.8647, 2831.1118, 3397.3125, 3963.6026 and 4529.8223. Deviation of measured masses from the proposed ions correspond to accuracy of mass measurement 10.5, 3.7, 8.3, 13.5, 4.2, 5.6, 12.4 and 10.4 ppm, respectively. Oligomers containing 6–8 units can be seen in the inserted spectrum (Figure 5b) focused on higher masses. It can be seen that the highest signals provide quasimolecular ions of dimers and trimers. The highest yield of those oligomers was proven at each setup of quadrupole scan range profile. MS/MS experiments confirmed structure of PAPADPP. We observed losses of the monomer unit ($m/z=566$) and losses of diaminobenzen ($m/z=106$). Besides an other series of ions differing in one aminophenyl group from PAPADPP oligomers were observed (i.e. 1043.4121, 1609.6391, 2175.8562, 2741.1372, 3307.2983, 3873.5731 and 4439.8130). To conclude, the MS experiments show that the PAPADPP is a mixture of oligomers

containing 1–8 units of (5-(4'-aminophenylamino)-10,20-diphenylporphyrin). Dimer and trimer are evaluated as the most abundant components.

3.2.3 ODN Immobilization

The electrochemical sensor for the biorecognition of complementary ODN was prepared by electrochemical polymerization of porphyrin onto glassy carbon electrode. The ODN-probe was physisorbed onto the PAPADPP film and tested for hybridization with complementary ODN segments. Biological recognition can be monitored by comparison with the electrochemical signal (CV) of single and double strand oligonucleotide. The oxidation current of the double strand state oligonucleotide is lower than that of the single strand (at 0.85 V). This correlates the decrease in the electroactivity of the porphyrin with

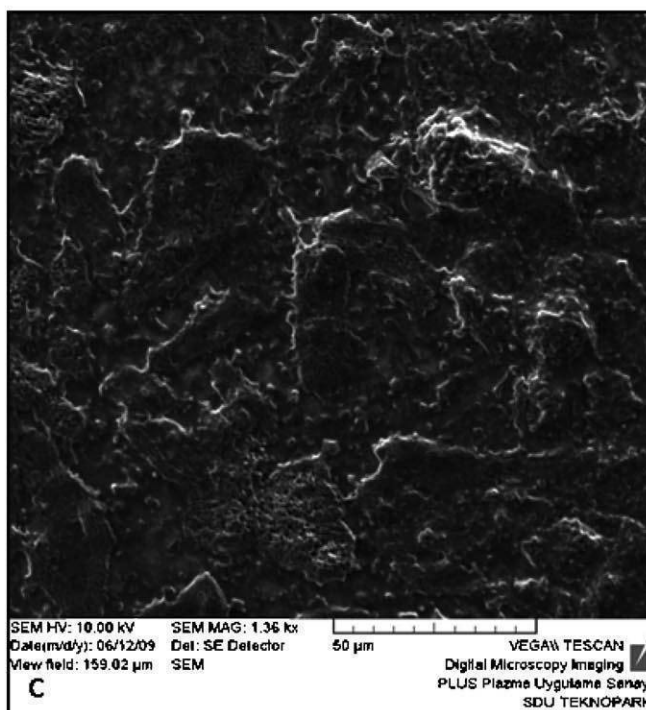
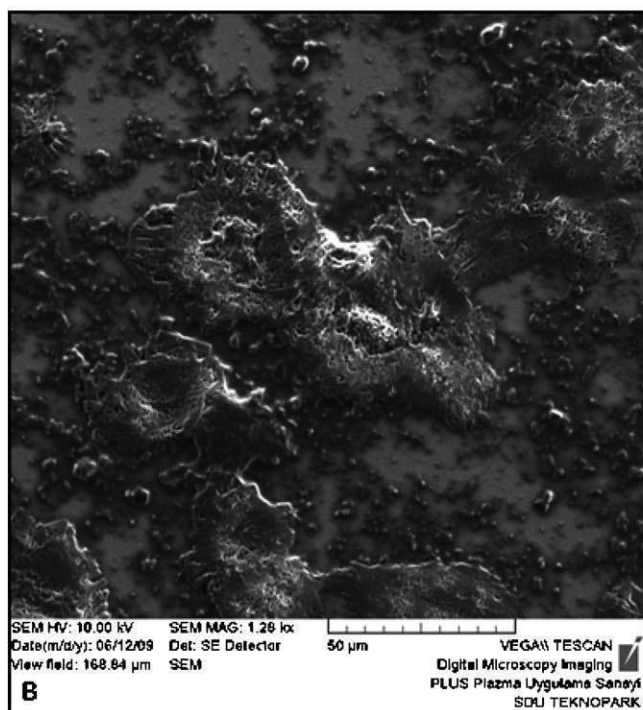
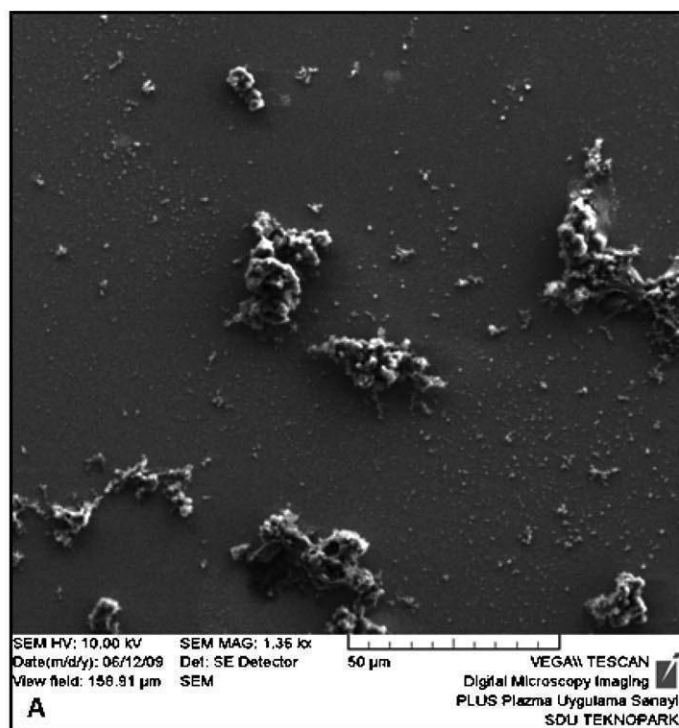


Fig. 8. SEM of (A) PAPADPP, (B) PAPADPP/ODN probe and (C) after immobilization of complementary ODN onto PAPADPP/ODN electrodes.

an increase in the stiffness of the polymeric structure (Figure 6).

The decrease of the intensity of the oxidation current of a single strand (ss, without target ODN) and a double strand (ds, with complementary target ODN) can be explained by the polar hydrogen bonds at the polymer's surface, which form a potential barrier to the rotation of the

polymer backbone and can be attributed to the bulky conformational modifications made along the conjugated polymer backbone (Figure 6A) [23–25].

The selectivity of the biosensor was investigated through hybridization of the ODN-probe immobilized on the PAPADPP/glassy carbon bioelectrode with noncomplementary ODN sequences. After the bioelectrode was

incubated with noncomplementary ODN sequences, no change in current was observed during the observation of the electrochemical signal (Figure 6B).

3.2.4 Surface Characterization

The advancement of modern microscopic technology has enabled the examination and analysis of the PAPADPP film surfaces. AFM and SEM were used to investigate the surface of the electropolymerized polymer. For AFM studies (Figure 7), the polymer film was grown onto an ITO electrode. The PAPADPP formed a smooth layer on the ITO-coated electrode surface and grew perpendicular to its surface. Figure 7 shows AFM tapping-mode images of the (A) polymer film; (B) with ODN-probe; and (C) with complementary target. The PAPADPP/ODN bioelectrodes exhibited a relatively rough surface morphology, which may have helped facilitate the immobilization of the ODN target onto the PAPADPP [25].

The SEM images (Figure 8) show the structure of (A) the PAPADPP; (B) with ODN-probe; and (C) with complementary target. After the ODN-probe and target immobilization onto PAPADPP, the surface of the PAPADPP covered with these materials is shown in Figures 8A–C. Both surface characterizations confirm ODN immobilization onto the polymer surface.

4 Conclusions

In this work, a novel porphyrin polymer was synthesized and characterized by CV, FTIR, MALDI-QqTOF, AFM and SEM measurements. It was shown that ODN can be physisorbed onto an ITO glassy carbon electrode modified with an electrochemically deposited PAPADPP film. The PAPADPP bioelectrode has several advantages: low price, ease of preparation, without grafting agent, and good selectivity. Our future efforts will be to modify polymerization conditions and to enhance the chain length, morphology and crystalline structure of the PAPADPP for different application fields.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Scientific and Technological Research Council of Turkey, the Science Fellowships and Grant Program Department (2214 and 2219 Fellowship Program) and the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic (MSM6198959216),

XPZ is grateful to Draper (URAD) and DOD (DTRA) for financial support.

References

- [1] P. A. Liddell, M. Gervaldo, J. W. Bridgewater, A. E. Keirstead, S. Lin, T. A. Moore, A. L. Moore, D. Gust, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 135.
- [2] C. Y. Lin, Y. C. Hung, C. M. Liu, C. F. Lo, Y. C. Lin, C. L. Lin, *Roy. Soc. Chem.* **2005**, *2*, 396.
- [3] F. Bedioui, M. Voisin, J. Devynck, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *297*, 257.
- [4] M. S. M. Quintino, H. Winnischofer, M. Nakamura, K. Araki, H. E. Toma, L. Angnes, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *539*, 215.
- [5] F. Bedioui, J. Devynck, C. Bied-Charreton, *C. Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 30.
- [6] J. R. Fish, E. Kubaszewski, A. Peat, T. Malinski, J. Kaczor, P. Kus, L. Czuchajowski, *Chem. Mater.* **1992**, *4*, 795.
- [7] D. Wöhrle, *J. Porphyr. Phthalocyan.* **2000**, *4*, 418.
- [8] B. Ballarin, R. Seeber, L. Tassi, D. Tonelli, *Synth. Met.* **2000**, *114*, 279.
- [9] C. Poriel, Y. Ferrand, P. Le Maux, J. Rault-Berthelot, G. Simonneaux, *Synth. Met.* **2008**, *158*, 796.
- [10] G. Li, S. Bhosale, S. Tao, R. Guo, S. Bhosale, F. Li, T. Zhang, T. Wang, J.-H. Furhop, *Polymer* **2005**, *46*, 5299.
- [11] K. Takahashi, T. Iwanaga, T. Yamaguchi, T. Komura, K. Murata, *Synth. Met.* **2001**, *123*, 91.
- [12] J. A. Reedijk, H. C. F. Martens, S. M. C. Van Bohemen, O. Hilt, H. B. Brom, M. A. J. Michels, *Synth. Met.* **1999**, *101*, 475.
- [13] S. E. Shaheen, C. J. Brabec, N. S. Sariciftci, F. Padinger, T. Fromherz, J. C. Hummelen, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *78*, 841.
- [14] C. J. Brabec, S. E. Shaheen, C. Winder, N. S. Sariciftci, P. Denk, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 1288.
- [15] B. A. White, R. W. Murray, *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *189*, 345.
- [16] K. A. Macor, Y. O. Su, L. A. Miller, T. G. Spiro, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 2594.
- [17] S. G. DiMugno, V. S.-Y. Lin, M. J. Therien, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5983.
- [18] Y. Chen, X. P. Zhang, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4432.
- [19] A. J. Downard, D. Pletcher, *J. Electroanal. Chem.* **1986**, *206*, 147.
- [20] J. Cha, J. I. Han, Y. Choi, D. S. Yoon, K. W. Oh, G. Lim, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 1241.
- [21] Y. H. Zhang, W. J. Ruan, Z. Y. Li, Y. Wu, J. Y. Zheng, *Chem. Phys.* **2005**, *315*, 201.
- [22] L. Chen, Y. Yu, H. Mao, X. Lu, W. Zhang, Y. Wei, *Synth. Met.* **2005**, *149*, 129.
- [23] C. M. H. Yaua, H. L. Chana, S. F. Suib, M. Yang, *Thin Solid Films* **2002**, *413*, 218.
- [24] A. Uygun, *Talanta* **2009**, *79*, 194.
- [25] K. Arora, A. Chaubey, R. Singhal, R. P. Singh, M. K. Pandey, S. B. Samanta, B. D. Malhotra, S. Chad, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1777.



Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic

Barbora Papoušková^a, Petr Bednář^{a,*}, Karel Hron^b, Jan Stávek^c, Josef Balík^c, Renáta Myjavcová^a, Petr Barták^a, Eva Tománková^c, Karel Lemr^a

^a Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^b Department of Mathematical Analysis and Applications of Mathematics, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

^c Department of Post-Harvest Technology of Horticultural Products, Faculty of Horticulture in Lednice, Mendel University in Brno, Czech Republic, Valtická 337, 691 44 Lednice, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 20 July 2011

Keywords:

Capillary chromatography

Ultra-performance liquid chromatography

Mass spectrometry

Anthocyanin

Variety

Principal component analysis

ABSTRACT

Hyphenation of micro-liquid and ultra-performance liquid chromatography with a hybrid (QqTOF) tandem mass spectrometry was studied from the viewpoint of their applicability for monitoring of anthocyanin dyes in various cultivars and different vintages of red wine. After appropriate optimization both techniques proved to be suitable for this task. UHPLC system provided lower LOD and LOQ values as well as higher productivity and precision of retention parameters and peak areas with respect to micro-LC method. On the other hand, micro-LC method offers significant savings of mobile phase, less contamination of ion source of mass spectrometer and makes the nebulization process in electrospray much easier. In combination with principal component analysis (PCA), the method allows to elucidate long-term relations in a complete set of certified red wine cultivars grown in South Moravia (certified in Czech Republic until year 2005). Among the studied varieties Rubinet exhibit a specific anthocyanin profile. Especially interesting is a high content of 3-coumaroylglucoside-5-glucosides of malvidin and peonidin. Those dyes can be used as markers of artificial color enhancement. Principal component analysis applied to data processed with regard to enzymatic activity markedly facilitate classification among varieties. This approach allows resolution of teinturiers, variety Blaufränkisch and partial classification of other varieties.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Anthocyanins (Fig. 1) represent a large class of plant polyphenols responsible for the color of many fruits, flowers and other parts of the plant. With regard to general growing consumption of fruits and vegetables, anthocyanins significantly affect human diet. Many positive effects of those dyes on human health have been reported. Chemoprotective, antimicrobial, antiadherence and antioxidant effects, among others, have been described for these compounds [1–4]. Color as fundamental organoleptic quality of food is first determined by present dyes and thus anthocyanins directly influence the market value of table grapes, red wine and juice.

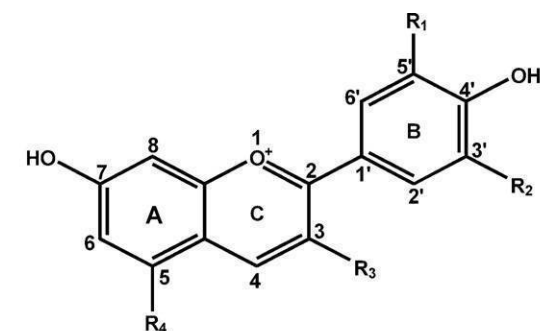
It is long time known that levels of individual anthocyanins strongly depends on the type of a plant. The distribution and concentration of grape anthocyanins depends on the cultivar, maturity, fruit yield and “terroir” (i.e., production area, climatic and soil conditions [5]). The anthocyanin profile has been used as chemotaxonomy criterion to establish differences between grape varieties.

Relationships between the individual or the total concentration of the different anthocyanidins are related first of all to the enzymatic activities of flavonoid-3'-hydroxylase and o-dihydroxyphenol-O-methyltransferase [6] (and references given herein).

A number of papers show that anthocyanin profile can be used for classification of red grapes [7–10]. The utilization of anthocyanin profile for cultivar identification purposes assumes that genetic factors influence mutual ratios among individual anthocyanins more than other factors (i.e., environmental conditions and viticultural practices). This premise seems to be sufficiently fulfilled since it was shown that non-genetic effects influence total concentration of anthocyanins more than their profile (relative distribution) [8,9]. In 2005 Pomar et al. showed that 50 Spain red wine cultivars differs significantly in anthocyanin profile monitored by RP-HPLC analysis. The obtained data after statistical treatment allowed to distinguish among individual cultivars [8]. Moreover, the usability of the database was tested by unknown sample. Authors report that all the unknown samples were correctly assigned. One year later Mattivi et al. studied a large set of 91 red and white grape varieties of *Vitis vinifera* L. based on the relative contents of anthocyanins and profile of flavonols considering analogous enzymatic transformations (i.e., hydroxylation

* Corresponding author. Tel.: +420 585 634 403; fax: +420 585 634 433.

E-mail addresses: bednarp@prfnw.upol.cz, bednar.petr@seznam.cz (P. Bednář).



Anthocyanidin	R ₁	R ₂
pelargonidin	-H	-H
cyanidin	-OH	-H
delphinidin	-OH	-OH
peonidin	-OCH ₃	-H
petunidin	-OCH ₃	-OH
malvidin	-OCH ₃	-OCH ₃

R₃, R₄ – OH, glycosyl unit(s), acylglycosyl unit, other compounds (i.e. another flavonoid unit, either directly linked or bridged), formation of pyranoanthocyanins (i.e. formation of a cycle from R₄ to position 4 of C ring)

Fig. 1. Structure of common anthocyanins.

and methylation of the B-ring of flavonoid skeleton) [10]. On the other hand, Dopico-García et al. have recently shown that anthocyanins exhibit more valuable information for resolution of cultivars when compared with non-colored polyphenols [11]. Several works confirm the potential of acylated anthocyanins (acetyl and coumaryl derivatives) with respect to wine variety and also the region of origin [11–13]. Amount of catechin together with anthocyanins appeared to be also efficient for varietal characterization of red wines [14]. Classification of wines is influenced by anthocyanin transformation during maturation. Main processes occurring during wine ageing include reactions with enzymatically generated *o*-quinones, direct and acetaldehyde-mediated anthocyanin-flavanol and anthocyanin–anthocyanin condensation and reactions leading to pyranoanthocyanin formation [6]. Thus, other genetically but also non-genetically based effects have to be taken into account such as the presence of reactive compounds and components influencing parameters of the solution (pH, polarity, presence of metal ions and oxygen etc.).

The key moment of successful classification of plant material or related food product is the choice of a reliable analytical tool. Spectrometric techniques directly used for a measurement of a grape or a wine sample belong to a less selective group of methods. Nevertheless obtained spectra have provided fast information about a complete phenolic composition utilizable for discrimination of red wines. For instance, an interesting application of mid-infrared spectroscopy was published for this purpose [15]. Recently we described differentiation of wines based on a desorption nanoelectrospray–tandem mass spectrometric analysis (nanoDESI-MSⁿ) of anthocyanin profile [16].

On the other hand, separation techniques represent the most common tools for highly selective analysis of anthocyanins and derived dyes since they provide a list of contents of particular compounds. Among high performance separation techniques, liquid chromatography [17] and capillary electrophoresis [18] are most widely used. A gold standard method for the analysis of anthocyanins in berries and wines involves a solid phase extrac-

tion, followed by combination of liquid chromatography with PDA detection and tandem mass spectrometry (LC/DAD/MSⁿ). Deactivated C18 stationary phases are the most common column packings. Generic mobile phases, frequently water–acetonitrile mixtures sufficiently acidified by a volatile acid (below pH 2) to avoid peak broadening are used with gradient elution. There are a number of similar systems useful for reliable anthocyanin profiling as described in many reviewing articles [17,19]. Several methods based on ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry aiming at the analysis of anthocyanins was published [20,21]. Beside, Nagy et al. recently published a very fast and sensitive UPLC/MS analysis of anthocyanins and other flavonoids in milk products (separation of 27 analytes in 10 min) [22]. Utilization of an ultra-performance format instead of conventional one brought a remarkable improvement in the speed of analysis and the separation efficiency. Microcolumn and capillary chromatographic analysis have also been already published by Dugo et al. (wine) [23], Fanali et al. [24] (fruit juices) and by our team [25] (*Lonicera caerulea* extracts). Miniaturization in chromatography becomes popular mainly due to reduction of sample size and mobile phase flow rate (reduction of solvents consumption and easy coupling to mass spectrometry). Beside, improvement of detection parameters is achieved when using concentration sensitive detectors due to the reduced chromatographic detection [23]. Regardless of the analytical procedure, there is a need of a careful statistical treatment of raw data for successful variety discrimination. Multivariate techniques (principal component, factor and cluster analyses) represent well-proven and useful tools for such purpose [26]. Because the data contain relative contributions of compounds rather than absolute information (so called compositional data or compositions for short [27]), they need to be transformed using a proper log-ratio transformation before the above mentioned standard statistical methods can be applied. The main argument for such a treatment is an existence of a relative scale for the observations, i.e., we are used to think in ratios rather than in absolute (Euclidean) distances when comparing concentrations of a compound between observations [28].

The aim of this communication is to study a hyphenation of micro-liquid (μ LC) or ultra-performance chromatographic (UPLC) technique with a hybrid (QqTOF) tandem mass spectrometry applicable for a long time monitoring of anthocyanin dyes. In combination with principal component analysis (PCA), the method allows to elucidate long-term relations in a complete set of certified red wine cultivars grown in South Moravia. To the best of our knowledge this is the first comprehensive long-time study focused on the anthocyanin profiling and its utilization for variety classification done in the northernmost European viticultural area known for production of red wines.

2. Experimental

2.1. Samples of wine

A total number of sixty-eight red wine samples was obtained from the Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Viticulture Department in Oblekovice. These samples represented seventeen approved red wine cultivars from National Listing of Plant Varieties which were analyzed over four vintages (2005, 2007–2009).

The grapes were harvested from the pure line cultivars (Table 1 [27]) and processed using the same wine-making technology in order to minimize factors influencing anthocyanin content and profile in resulting wines.

Single vinifications of 100 kg were performed with each variety grape. Grapes were destemmed and crushed and 25 mg kg⁻¹ of SO₂

Table 1
National list of red wine varieties certified in Czech Republic [29].

Variety	Abbreviation	Origin (crossing)	Year of registration to National List of Varieties
Agni	Ag	André × Irsai Oliver	2001
Alibernet	Al	Alicante Bouschet × Cabernet Sauvignon	1975
André	An	Blaifränkisch × Saint Laurent	1980
Ariana	Ar	(Rheinriesling × Saint Laurent) × Zweigeltrebe	2001
Cabernet Moravia	CM	Cabernet Franc × Zweigeltrebe	2001
Cabernet Sauvignon	CS	Cabernet Franc × Sauvignon	1980
Cerason ^a	Ce	(Merlot × Seibel 13,666) × (Blaifränkisch × Saint Laurent)	2008
Domina	Do	Blauer Portugieser × Pinot noir	2004
Dornfelder	Dr	Helfensteiner × Heroldrebe	2004
Blaifränkisch	Fr	Old variety, one parent would be Heunisch	1941
Fratava ^a	Ftv	Blaifränkisch × Saint Laurent	2008
Laurot	La	(Merlot × Seibel 13,666) × (Blaifränkisch × Saint Laurent)	2004
Merlot	Me	Old variety, genetically closed to Cabernet Franc	2004
Blauer Portugieser	MP	Old variety, origin not known	1941
Neronec	Ne	(Saint Laurent × Blauer Portugieser) × (Alicante Bouschet × Cabernet Sauvignon)	1991
Rubinet	Ru	(Revolta × Alibernet) × André	2005
Pinot noir	RM	Old variety, origin probably from Roter Traminer	1941
Sevar ^a	Sev	Seyve villard 12/58 × Saint Laurent F1	2008
Saint Laurent	Sv	Old variety, related to burgundy varieties	1941
Zweigeltrebe	Zw	Saint Laurent × Blaifränkisch	1980

^a Denoted varieties were not available at the start of the study.

was added. Alcoholic fermentation of grape pulp was conducted in automatic stainless closed vessel with periodic punching-down at temperatures 25 °C for 10 days. At the end of the process the wine was separated from pomace by pneumatic press and supplied with 50 mg L⁻¹ SO₂. Prepared wines were placed in glass demijons. Collected analytical samples were stored in a freezer at -18 °C until the time of analysis.

2.2. Chemicals and standards

Acetonitrile, methanol and water (all gradient-grade) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Trifluoroacetic acid and hydrochloric acid (both p.a.) were provided by Fluka (Buchs, Switzerland) and Lachema (Brno, Czech Republic). Anthocyanin standard (malvidin-3-glucoside) was obtained from Carl-Roth (Karlsruhe, Germany).

2.3. Sample preparation

The samples of red wine were filtered through 0.45- μ m PTFE filters (LUT syringe filters, Cronus, Gloucester, UK) and cleaned using solid phase extraction on styrene divinylbenzene polymer packed cartridges (Strata SDB-L, 200 mg/3 mL, Phenomenex, USA). The elution procedure consisted of activating and washing the cartridge (3 mL 0.1% HCl in methanol (v/v), 3 mL 0.1% HCl in water (v/v)), followed by applying the sample (250 μ L), washing cycle (3 mL 0.1% HCl in water) and elution (2 mL of 0.1% HCl in methanol). The extracts were immediately evaporated to dryness under the constant stream of nitrogen at 33 °C. The dried samples were dissolved in a mobile phase (part A) prior to their analysis.

2.4. Instrumentation

Analyses were performed on two liquid chromatographs CapLC XE System (Waters, Milford, USA) and PLATInblue (Knauer, Berlin, Germany).

μ LC separation of anthocyanins was achieved on a CapLC XE System using a C18 microcolumn (Gemini C18, 5 μ m, 150 mm × 300 μ m, Phenomenex, Torrance, USA) at a room temperature. A Waters CapLC 2996 photodiode array was used as the UV-vis detector prior to connection to the mass spectrometer.

Analyses of the last vintage (2009) were performed on PLATInblue ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) system. The separation was carried out using a C18 column (Acquity BEH, 1.7 μ m, 50 mm × 2.1 mm, Waters), also at a room temperature.

Mass spectrometric detection was performed on QqTOF mass spectrometer (Q-TOF Premier, Waters, Milford, USA) in a positive electrospray (ESI) mode. For the μ LC/MS analysis, the capillary voltage was kept at 3.2 kV, the temperature of the source was 120 °C and the desolvation gas was set at 300 °C with flow rates adjusted to 300 L/h. UHPLC/MS analysis required higher flow rates of the desolvation gas (550 L/h). Also, to facilitate the ionization process, a usage of a flow-splitting device was necessary. The ratio of the used/wasted mobile phase was set for 11/14. The chromatographic and mass spectrometric processing software used for data evaluation was MassLynx 4.0 and Masslynx 4.1. Quantification of malvidin-3-glucoside was done using linear regression of calibration dependence (Table 2). Peak area for calibration was obtained from extracted ion chromatogram at m/z = 493.1 (isolation width 1 Da). The appropriate calibration dependence was used for all the other anthocyanins as well (changes in response factors were neglected).

2.5. Chromatographic conditions

Mobile phases A and B consisted of 0.12% (v/v) trifluoroacetic acid in water and acetonitrile, respectively. The following optimized linear gradient was applied for μ LC/MS analysis: 10% B for 5 min, 10–20% B in 5 min, 20–30% B in 20 min, 30–50% B in 10 min, 50–70% B in 10 min, 70–100% B in 4 min, and 100% B for 5.5 min before returning to the initial conditions (backpressure at initial conditions was 38 bar). Total runtime of the analysis was 70 min (10.5 min for column reconditioning). One microliter was injected at microcolumn (full-loop mode). The flow-rate was 5 μ L min⁻¹ and detection was performed at 520 nm. UV spectra were recorded over the range 200–600 nm. This method has been modified for UHPLC/MS analysis, resulting in the following gradient: 0% B for 4 min, 10–45% B in 3 min, 45–90% B in 2 min, 90–100% B in 0.1 min before returning to the initial conditions (backpressure at initial conditions was 430 bar). Total runtime of the analysis was 10 min (0.9 min for column reconditioning). Three microliters were injected at column (10 μ L loop, partial-filling mode). The flow-rate

Table 2
Analytical parameters of used methods.

Separation	k'	H (μm)	h_{red}	$R_{\text{min}} - R_{\text{max}}^a$	COF	As
$\mu\text{LC/MS}$	4.2	14.8	3.0	0.29–3.05	40.7	1.2
UHPLC/MS (scaled)	2.9	52.1	31.2	0.20–2.94	65.3	1.4
UHPLC/MS (optimized)	2.5	7.2	4.3	0.31–3.45	79.0	0.8
Detection	LOD _{MS} (mg L^{-1})	LOQ _{MS} (mg L^{-1})	Sensitivity ^b	Calibration range (mg L^{-1})	R^2	RSD A (%)
$\mu\text{LC/MS}$	1.0	2.4	8.5 ± 0.2	5–100	0.998	12.5
UHPLC/MS (scaled)	0.05	0.1	3.3 ± 0.1	0.5–60	0.998	3.1
UHPLC/MS (optimized)	0.6	0.9	1.4 ± 0.1	1–100	0.990	8.3

k' , retention factor; R^2 , coefficient of determination; H , plate height (column length/number of theoretical plates); h_{red} , reduced plate height (plate height/particle diameter).

^a The range of resolution of adjacent peaks of anthocyanins (malvidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside and their acetyl derivatives).

^b Slope of the calibration line.

Injection volume was 1 μL for $\mu\text{LC/MS}$, 16.3 μL for UHPLC/MS (scaled) and 3 μL for UHPLC/MS (optimized), respectively.

was 0.5 mL min^{-1} and UV spectra were recorded over the range 200–600 nm. A scaled UHPLC conditions were used for comparison of $\mu\text{LC/MS}$ and UHPLC/MS methods as follows: gradient: 10% B for 1.6 min, 10–20% B in 1.6 min, 20–30% B in 6.4 min, 30–50% B in 3.2 min, 50–70% B in 3.2 min, 70–100% B in 1.3 min, and 100% B for 1.8 min (3.4 min for column reconditioning). Flow rate was 0.287 mL min^{-1} . Injection volume was 16.3 μL .

2.6. Statistical analysis

The principal component analysis (PCA) is well-known statistical technique for dimension reduction of multivariate data sets. The main task is to construct new variables (principal components) from the original compounds such that already a few of them explain most of the total variability of the data set. Even more, loadings and scores of the first two principal components can be displayed simultaneously in a planar graph, called biplot, that makes an impression on the overall multivariate data structure possible [30]. Here the scores represent the observations (pictured usually as small circles or crosses) and loadings stand for the compounds (rays in the biplot).

Because the variability of compounds is strongly related to the chosen scale and the standard statistical methods (like PCA) rely on the Euclidean geometry (and absolute information of observations), the relative-scaled compositions need to be transformed first to the usual Euclidean space in order to make the use of PCA possible. Here the centred logratio (clr) transformation [27] was applied that seems to be the best one for construction of the compositional biplot [31,32]. The scores represent, as usual, the multivariate compositional data structure, however, the interpretation of rays corresponds to the nature of compositional data. The shorter link (distance) between rays means the less variability of ratio of corresponding compounds throughout the data set. The links can be used to visualize how strong the relations between the (original) compounds are.

2.7. Climatic data

The climatic data consisting of a sunshine duration (h) and a precipitation (mm) were obtained from the closest meteorological station situated in Velké Pavlovce.

2.8. Calculation of chromatographic parameters

The chromatographic optimization function (COF) was calculated using the following equation reported by Glajch [33]:

$$\text{COF} = \sum A_i \ln \frac{R_{s,i}}{R_{s,id}} + B(t_m - t_n) \quad (1)$$

where $R_{s,i}$ represents resolution of i th pair of consequently eluted compounds, $R_{s,id}$ is desired resolution for the i th pair set for this study at unity. The term t_m refers to the maximum desired length of analysis (70 min; corresponds to the total time of analysis including a time necessary for column equilibration used for $\mu\text{LC/MS}$), t_n is a retention time of the last eluted compound of interest, A and B represent optional weighting factors ($A = 10, B = 1$, in our case, giving ten times higher emphasis on resolution with respect to the time of analysis). Asymmetry factor b/a , where b and a are half-width parameters, was measured at 0.1 h peak height of Mv-3-Glu.

3. Results and discussion

3.1. Methodology evaluation

Two less common LC/MS systems, when considering the field of anthocyanin control, were used during this long-time study. Common features of both methods are reversed phase separation mode, identical mobile phases based on the mixture water–acetonitrile–trifluoroacetic acid (see Section 2.5), electrospray ionization (Z-spray) and QqTOF analyser allowing tandem MS experiments and exact mass measurement. First procedure is based on capillary chromatography (column Gemini C-18, 150 mm \times 0.3 mm i.d., $d_p = 5 \mu\text{m}$). Second one adopts benefits of using sub 2- μm particles of stationary phase (UPLC column Acquity C-18, 50 mm \times 2.1 mm i.d., $d_p = 1.7 \mu\text{m}$). To show the separation and detection capability of both systems the chromatographic behavior of six relatively abundant anthocyanins in wines (i.e., malvidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside and related acetyl derivatives) was studied. Table 2 shows analytical parameters of both techniques. For UHPLC/MS system two different conditions were tested. First one, denoted as “scaled” shows the UHPLC/MS system comparable with the $\mu\text{LC/MS}$ one (injection volume was scaled to reach the same ratio of injection volume to column volume for both systems; the same profile of gradient was set with regard to scaled linear flow velocity and retention time of the last eluted anthocyanin). The system denoted as “optimized” represents change of experimental conditions in order to improve parameters of separation and to allow an adequate linear dynamic range for continuity of long-time variety classification purpose. It can be seen that $\mu\text{LC/MS}$ system exhibits a higher retention of malvidin-3-glucoside expressed by roughly 1.4 times higher retention factor (comparing the scaled conditions). Separation efficiency (expressed as plate height, H) is better for UHPLC/MS system at optimized conditions compared to $\mu\text{LC/MS}$. In the scaled UHPLC system where a higher injection volume is used (10% of column volume instead of 1.7%) we can observe a significant deterioration of efficiency. The value of reduced plate height is slightly higher for UHPLC/MS system indicating somewhat higher extra-column band broadening (column overloading at higher injection

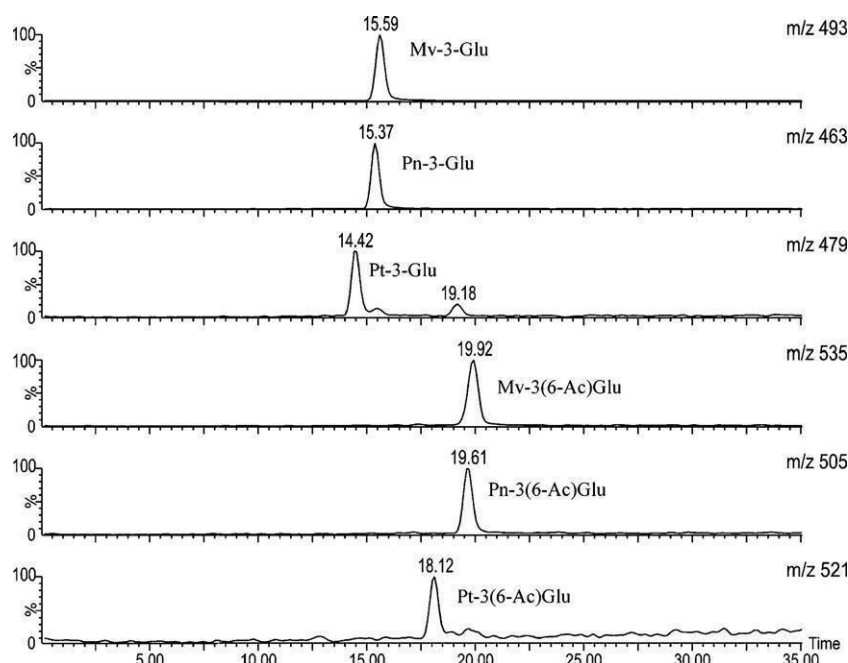


Fig. 2. μ LC/MS analysis of major anthocyanins in red wines (Neronet variety, vintage 2008).

volume and effect of splitting after the column). Three times shorter UHPLC column compared to μ LC/MS provided similar resolution of studied anthocyanins suggesting that at comparable column lengths much better resolution using UHPLC systems should be achieved, however at the cost of very high backpressures. It can be seen that mutual chromatographic separation of some critical pairs is not sufficient in both systems. However as can be seen in Figs. 2 and 3 a sufficient selectivity was provided by hyphenation with mass spectrometry. Chromatographic optimization function (COF, for definition see Section 2.8) is commonly used as parameter for optimization of multicomponent mixture with reference to separation capability and speed of analysis. Obviously, this parameter implies much higher productivity of UHPLC system even though

ten times higher importance was ascribed to contribution of resolution vs. contribution of retention time. Peak asymmetry factor (A_s) compares peak shape of Mv-3-Glu. A tailing was observed for μ LC as well as for scaled UHPLC system. This again indicates some column overloading. When a lower injection was used for UHPLC system, the Acquity BEH C18 column exhibited some fronting. However the values of A_s measured at optimized conditions of both chromatographic systems can be regarded acceptable (see Ref. [34], p. 210, for instance). The values of limit of detection and limit of quantification obtained at optimized conditions are sufficient for long-time monitoring of anthocyanin profile in wines and those parameters can be in the case of UHPLC improved by higher injection. Then values of $LOD_{MS} = 0.05 \text{ mg L}^{-1}$ and $LOQ_{MS} = 0.10 \text{ mg L}^{-1}$ are achieved being

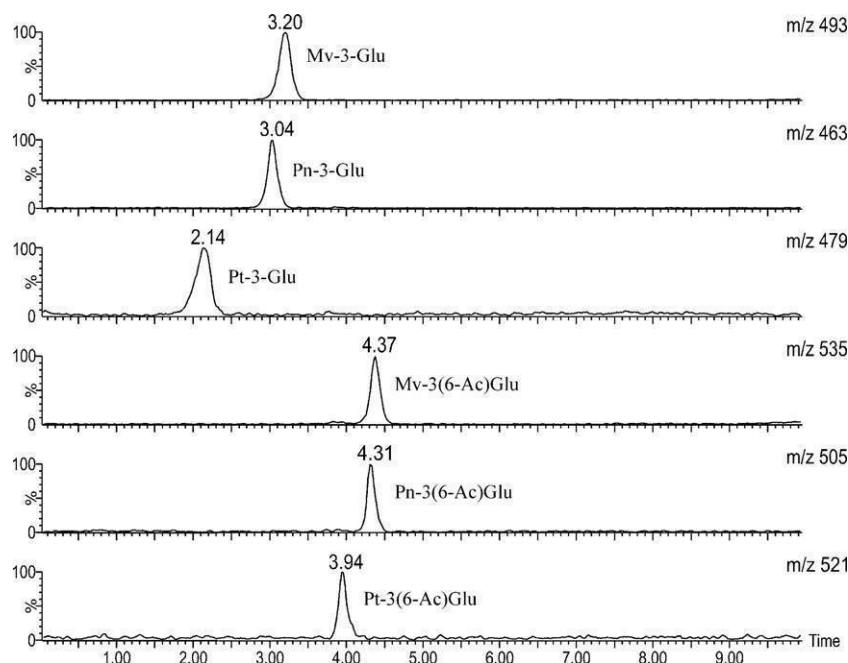


Fig. 3. UPLC/MS analysis of major anthocyanins in red wines (Neronet variety, vintage 2009).

Table 3

List of identified anthocyanins, their retention times and mass spectral data.

No.	Anthocyanin	Abbreviation	t_R (2009) UHPLC	t_R (2008) μ LC	MS > 10% ^a	Error (ppm) ^b	MS/MS > 5% ^a
1	Malvidin-3-glucoside	Mv-3-Glu	3.2	15.6	331.0804, 493.1349	0.6	150, 179, 242, 270, 287, 299, 315, 316, 331, 493
2	Malvidin-3-(6-acetyl)-glucoside	Mv-3(6-AC)Glu	4.4	19.9	535.1420	-6.0	179, 242, 270, 287, 299, 315, 316, 331, 535
3	Malvidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside	Mv-3(6-Coum)Glu	5.5	24.9	609.1600, 639.1683	-4.9	179, 242, 270, 287, 299, 315, 316, 331, 639
4	5-Carboxypyranomalvidin-3-glucoside	5-CPMv-3-Glu	3.4	16.1	401.1261, 561.1220 , 765.2125	-4.3	341, 399, 561
5	Malvidin-3,5-diglucoside	Mv-3,5-diGlu	1.4	13.0	625.1781, 655.1896	3.4	179, 242, 270, 287, 299, 315, 316, 331, 493, 655
6	Malvidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside	Mv-3-(6-Coum)Glu-5-Glu	4.5	21.9	771.2131, 801.2248	0.7	270, 299, 331, 493, 639, 801
7	Peonidin-3-glucoside	Pn-3-Glu	3.0	15.4	301.0732, 463.1245	1.1	201, 229, 230, 243, 258, 268, 286, 301, 463
8	Peonidin-3-(6-acetyl)-glucoside	Pn-3 (6-AC)Glu	4.3	19.6	213.0766, 505.1326 , 783.2164	-4.0	201, 229, 258, 286, 301, 505
9	Peonidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside	Pn-3(6-Coum)Glu	5.4	24.7	609.1594 , 639.1683	-2.3	230, 258, 286, 301, 609
10	5-Carboxypyranopeonidin-3-glucoside	5-CPPn-3-Glu	xxx	15.9	531.1086	-10.0	253, 297, 354, 369
11	Peonidin-3,5-diglucoside	Pn-3,5-diGlu	1.4	12.9	625.1780 , 655.1912	1.8	151, 258, 286, 301, 463, 625
12	Peonidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside-5-glucoside	Pn-3(6-Coum)Glu-5-Glu	4.5	21.8	130.1232, 771.2131 , 801.2251	-0.6	230, 286, 301, 463, 609, 771
13	Petunidin-3-glucoside	Pt-3-Glu	2.1	14.4	479.1194	0.8	150, 203, 217, 228, 245, 274, 302, 317, 479
14	Petunidin-3-(6-acetyl)-glucoside	Pt-3(6-AC)Glu	3.9	18.1	521.1307	-2.7	245, 302, 317, 521
15	Petunidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside	Pt-3(6-Coum)Glu	4.9	22.7	625.1561	0.6	218, 245, 274, 302, 317, 625
16	5-Carboxypyranopetunidin-3-glucoside	5-CPpt-3-Glu	xxx	15.8	216.1028, 547.1469	3.1	369, 385
17	Petunidin-3,5-diglucoside	Pt-3,5-diGlu	1.0	12.0	160.1353, 188.0724, 641.1738	3.1	274, 302, 317, 479, 641
18	Delphinidin-3-glucoside	Dp-3-Glu	1.3	13.1	160.1354, 188.0728, 303.0545, 465.1018	-3.2	153, 165, 229, 257, 303, 465
19	Delphinidin-3-(6-acetyl)-glucoside	Dp-3(6-AC)Glu	3.5	16.5	163.0422, 229.0985, 507.1150	2.2	257, 303, 507
20	Delphinidin-3-(6-p-coumaroyl)-glucoside	Dp-3(6-Coum)Glu	4.4	20.6	389.1235, 611.1393	-1.3	153, 229, 257, 303, 611
21	Delphinidin-3,5-diglucoside	Dp-3,5-diGlu	0.8	10.9	214.9879, 627.1530	-4.9	303, 465, 627
22	Cyanidin-3-glucoside	Cy-3-Glu	1.8	14.1	287.0563, 449.1070 , 547.1366	-3.1	287, 449
23	Cyanidin-3-(6-acetyl)-glucoside	Cy-3(6-AC)Glu	3.8	17.7	491.1145	-9.2	287
24	Cyanidin-3,5-diglucoside	Cy-3,5-diGlu	0.9	xxx	611.1584	-4.6	287, 449, 611

Values displayed in bold represent molecular ions, values displayed in italics show ion with the abundance of 100%.

^a Ions appeared in the spectrum with abundance higher than 10% or 5% of the base peak, respectively.^b Deviation of measured molecular ion m/z value from the theoretical one.

comparable with recent experiments using conventional HPLC [24]. Other parameters of mass spectrometric detection given in Table 2 were satisfactory for our study.

It should be noted that UV/vis detector allows 1.5 times lower LOQ for UHPLC and 1.2 times lower LOQ for CapLC. To compare both systems, UHPLC system offers better LOD_{MS} and limit of quantification (LOQ_{MS}) and repeatability of peak area (RSD A). On the other hand regarding a low flow of water rich mobile phase (typically in the range units–tens of $\mu\text{L min}^{-1}$) the capillary chromatography is ideally suited for combination with electrospray ion source making the nebulization process much easier (working efficiently without a splitter). In addition, it also offers significantly lower mobile phase consumption, less contamination and/or corrosive action due to aggressive components of mobile phase (higher contents of acid) compared to work with “conventional” flow rates (i.e., tenths–units of mL min^{-1}). The advantages of using capillary chromatography have been stressed, for instance, in a recent review aimed at food analysis [35].

Figs. 2 and 3 display chromatograms of wine (cultivar Neronet) obtained using both LC/MS techniques. The studied methods appeared to be suitable for monitoring of anthocyanin profile in young wines after SPE sample pretreatment. The elution order respected the polarity of the dyes, i.e., Pt-3-Glu, Pn-3-Glu, Mv-3-Glu, Pt-3(6-Ac)Glu, Pn-3(6-Ac)Glu, Mv-3(6-Ac)Glu as could be expected on both reversed phases. All other identified anthocyanins eluted accordingly.

The composition of mobile phase affects both the chromatographic behavior and detection sensitivity. Especially the effect of an acidic modifier deserves a proper attention since it allows a complete displacement of the equilibria to the flavylium cation and the consequently separation efficiency. Formic acid (FA) and trifluoroacetic acid (TFA) are mostly used. As already reported, when FA is used, its high contents are required to maintain $\text{pH} < 2$ (commonly 5–10% FA (v/v)), which may decrease detection sensitivity. On the other hand, it is well known that TFA causes a drop in yield of ions in electrospray due to formation of electroneutral ion pairs even at a low TFA content [36,37]. At the start of our experiments (CapLC, Gemini C18), a mobile phase containing TFA was selected and this additive was kept throughout the whole study. Indeed, the process of ionization is significantly influenced by flow rate of mobile phase and parameters of ion source and therefore a careful optimization of mobile phase composition for particular LC/MS system is highly recommended. Recently we also compared effect of both acids on separation selectivity and detection sensitivity. FA provided some improvement concerning both the separation and the detection. COF value describing the overall separation of major anthocyanins was improved 1.4 times with respect to the system with TFA. Limit of detection and quantification was improved 2 times and 1.2 times, respectively, for UHPLC system [38].

The achieved chromatographic parameters can be compared with conventional chromatography represented for instance by a review done by Merken and Beecher [39] or more recently by Welch et al. [40] and articles cited herein. Common time of analysis in conventional chromatography of anthocyanins in wine falls in the range 25–65 min. An average mobile phase consumption can be roughly estimated from average values of time of analysis (53 min) and average flow rate (0.7 mL min^{-1}) as 37 mL/one injection. The time of analysis achieved using $\mu\text{LC/MS}$ system corresponds to this range but due to much lower flow rate ($5 \mu\text{L min}^{-1}$) a significant saving of mobile phase is achieved (0.18 mL/one injection). On the other hand UHPLC/MS method provides among 2.5–6.5 times higher speed of analysis which is crucial especially for comprehensive studies and high throughput screening. On the other hand much higher backpressure is generated using sub-2 micron particles (430 bar) and thus a conventional chromatographic pump does

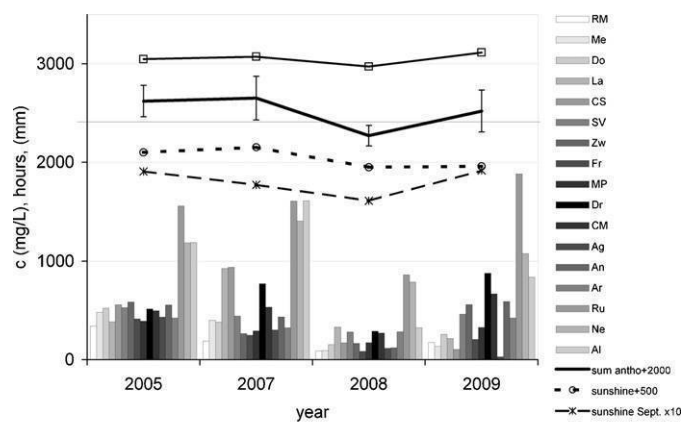


Fig. 4. Relationship between weather and total anthocyanin content (added values or multiplication is used to translate data or their zoom in uniform coordinates).

not provide optimal productivity (UHPLC pump is required). The mobile phase consumption corresponds with 5 mL/one injection.

Table 3 shows list of identified anthocyanins in studied wines. Twenty four anthocyanins were found and their structures were unambiguously confirmed by exact mass measurement and MS/MS spectra. The error of m/z measurement was lower than 5 ppm with the exception of three anthocyanins and characteristic neutral losses (i.e., cleavage of sugar moiety, loss of water, carbon monoxide, methyl group and retro Diels–Alder cleavage of anthocyanidin skeleton) were observed. Retention times and UV/vis collected by PDA detector (data not shown) provided additional confirmative information. Such results clearly demonstrate the analytical power of QqTOF analyzer.

3.2. Relationship between anthocyanin profile and cultivar

Fig. 4 displays the sum of anthocyanins content (TAC) in each cultivar with respect to the number of sunny days and precipitation during the growing season (or sunny days in September, respectively). Although TAC is influenced by many parameters, statistically significant drop of its average value can be observed in the year 2008 with respect to preceding years corresponding with a weaker precipitation and sunshine duration in this particular year. However, considering individual cultivars the TAC values change quite differently in the studied years. Teinturiers, varieties having pigmented flesh (i.e., Alibernet, Neronet and Rubinet) have higher content of anthocyanins compared to the rest of cultivars (with the only one exemption in Dornfelder vs. Alibernet, vintage 2009). Note, that an unexpectedly low content of TAC was observed in Agni, vintage 2009. As it has been already mentioned, climatic conditions should change TAC but they should not modify substantially anthocyanin profile (mutual proportions of individual dyes). Fig. 5 compares relative contents of anthocyanins present in the most popular varieties, i.e., Saint Laurent and Blaufränkisch and their hybrids (Zweigeltrebe and André). Long time known facts can be observed in this group of cultivars (which however does not contribute too much to the variety resolution); (i) malvidin derivatives followed by peonidin and petunidin ones are the most abundant dyes, (ii) delphinidin and cyanidin derivatives represent minority components, (iii) content of diglycosylated dyes does not exceed 10% (rel.). On the other hand, surprisingly, lower content of acetylated monoglucosides when compared to the rest of displayed varieties is observed in Blaufränkisch. This phenomenon reflects a significance of enzymatic acetylation and it is discussed in detail hereinafter.

Activity of particular enzymes involved in anthocyanin biosynthesis is genetically inborn. The appropriate ratio of enzymatic

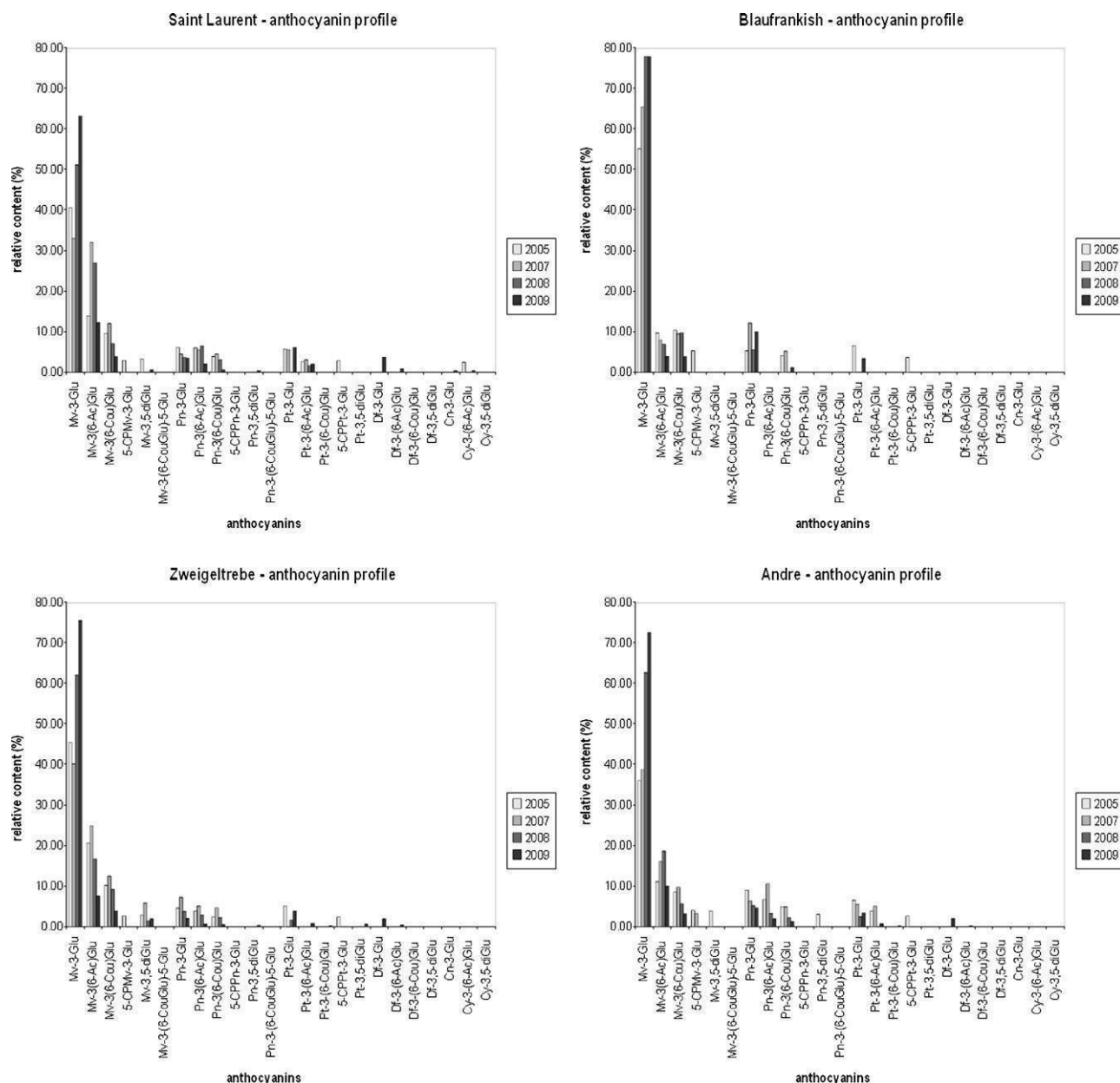


Fig. 5. Comparison of relative contents of anthocyanins (Saint Laurent and Blaufränkisch and their hybrids – Zweigeltrebe, André).

products to TAC (or to sum of substrates, respectively) can serve as a selective parameter utilizable for variety classification [7,8,10]. We studied differences in activities of flavonoid-hydroxylase, *o*-dihydroxyphenol-*O*-methyltransferase and acyl transferases over the set of Czech certified red wine varieties. To evaluate the extent of enzymatic transformation the approach firstly proposed by Carreno et al. was adopted [7]. The principle is based on fact that cyanidin (dihydroxylated on B-ring) is the precursor pigment of the other anthocyanins. An effect of flavonoid-hydroxylase on anthocyanins can be described by a fraction of trihydroxylated anthocyanins in TAC (i.e., delphinidin and its methylated analogues petunidin and malvidin). By analogy, the effect of *o*-dihydroxyphenol-*O*-methyltransferase or acyltransferases can be described by fractions of peonidin or acylated forms in TAC, respectively. Table 4 explains the parameters allowing to estimate activity of particular enzymes in detail. Statistically significant differences in the values of particular parameters averaged over all vintages were observed allowing preliminary classification of some varieties.

M1 allows differentiate three teinturiers from the rest of varieties except of Merlot, Agni and André (whose confidence intervals coincide with teinturiers). Parameter A is very useful for almost unambiguous resolution of Blaufränkisch from all other varieties, only RM and La could interfere. This pilot finding seems to be useful for authenticity control of Blaufränkisch as widely distributed and popular wine. Comparison of parameters M1 and H2 gives also interesting information. Teinturiers exhibit high tendency to direct methylation of cyanidin but low readiness to its hydroxylation.

3.3. Principal component analysis

Fig. 6 shows the results of PCA applied to compositional data (relative contents of individual anthocyanins) after clr transformation obtained within four years study. Some very interesting trends can be observed. First, teinturier Rubinet is located side-ward from the other groups of varieties in the PCA plot. This location was observed in all vintages and it seems typical and

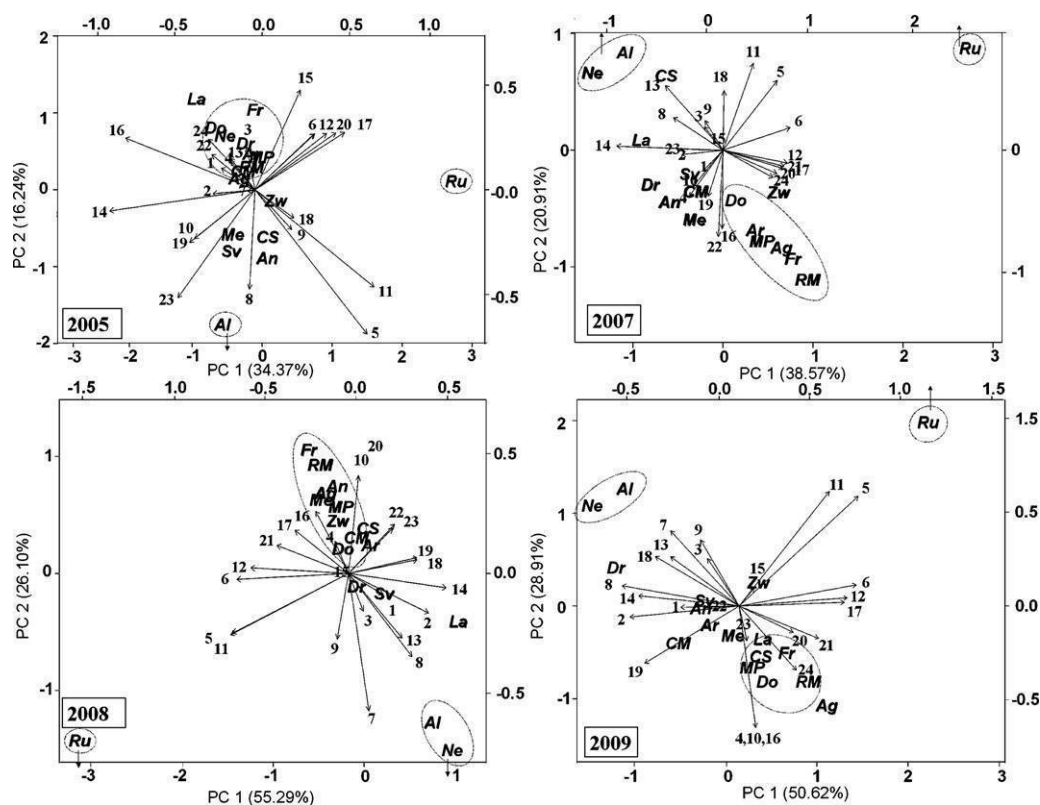


Fig. 6. PCA biplots of anthocyanins vs. varieties. Numbering of anthocyanins: 1, Mv-3-Glu; 2, Mv-3(6-Ac)Glu; 3, Mv-3(6-Cou)Glu; 4, 5-CPMv-3-Glu; 5, Mv-3,5-diGlu; 6, Mv-3(6-Cou)Glu-5-Glu; 7, Pn-3-Glu; 8, Pn-3(6-Ac)Glu; 9, Pn-3(6-Cou)Glu; 10, 5-CPN-3-Glu; 11, Pn-3,5-diGlu; 12, Pn-3(6-Cou)Glu-5-Glu; 13, Pt-3-Glu; 14, Pt-3(6-Ac)Glu; 15, Pt-3(6-Cou)Glu; 16, 5-CPPt-3-Glu; 17, Pt-3,5-diGlu; 18, Dp-3-Glu; 19, Dp-3(6-Ac)Glu; 20, Dp-3(6-Cou)Glu; 21, Dp-3,5-diGlu; 22, Cy-3-Glu; 23, Cy-3(6-Ac)Glu; 24, Cy-3,5-diGlu (the certain varieties located outside the zoomed biplots are marked by arrows).

utilizable for Rubinet differentiation. A higher content of malvidin and peonidin 3,5-diglucosides appear to be significant with respect to this variety. Also the related 3-coumaroylglucosides-5-glucosides proved to have a certain significance for segregation of Rubinet from the rest of varieties. As mentioned above, peonidin-3-coumaroylglucoside-5-glucoside was found only in the case of Rubinet. As to Mv-3(Cou)Glu-5-Glu (number 6, Fig. 6), a trace of this anthocyanin was also detected in Alibernet (Al) and Agni (Ag) (both vintage 2007). Rubinet as the most colored teinturier (its extraction provides the highest yield of anthocyanins) is the first choice variety for artificial improvement of pale red wines color. We suggest to use 3-coumaroylglucosides-5-glucosides of malvidin and peonidin as markers of such a treatment as we have recently published [15].

Interestingly, other teinturiers, i.e., Neronet (Ne) and Alibernet, are located in PCA plot in a region unambiguously separated

from Rubinet and other groups of varieties over all the studied vintages. The only exception represents Neronet 2005. However, when the PCA plot consisting of all the studied vintages is considered (data not shown), this particular wine is also located close to the cluster of those teinturiers. A detached group of four varieties – Blaufränkisch (Fr), Pinot Noir (RM), Blauer Portugieser (MP) and Domina (Do, crossbreed of Pinot Noir, Blauer Portugieser) is roughly located in a direction of vitisins (numbers 4,10,16, Fig. 6). To summarize this part, utilization of PCA directly on the raw relative contents of anthocyanins allows to distinguish between teinturiers and other wines and it is useful for preliminary classification. However, more interesting results can be obtained when action of enzymes involved in the anthocyanin biosynthesis is taken into the account. Fig. 7 shows PCA plots arising from the action of enzymes and formation of various kinds of anthocyanins. Division in accordance with Table 3 provided us a synoptic image

Table 4
Relationship between enzyme activity during biosynthesis of anthocyanins and variety of wine grapes.

Type of enzyme activity	Indication	Equation	Classification ability ^a		
			I	II	U ^b
Methylation	M1	(Sum Pn)/TAC	Ru, Ne, Al	All others	Me, Ag, An
Hydroxylation	H2	(Sum Dp + Pt + Mv)/TAC	RM, Do, La, Sv, Zw, Fr, MP, Dr, CM, Ar	Me, Ru, Ne, Al	CS, Ag, An
			All others	Ru	Ne
Acetylation	A	(Sum acetylated forms)/TAC	All others	Ru, Fr	RM, La
			All others	Ru	–
Coumarylation	C	(Sum coumarylated forms)/TAC	Ru, Ag	CS, Do, La, Dr, Al	All others

I, group with a significantly higher value of given parameter.

II, group with a significantly lower value of given parameter.

^a Classification ability indicates which groups of varieties can be distinguished (classified); it reflects the statistically significant differences in averaged parameters over all vintages using confidence intervals ($\alpha = 0.05$).

^b Undistinguishable.

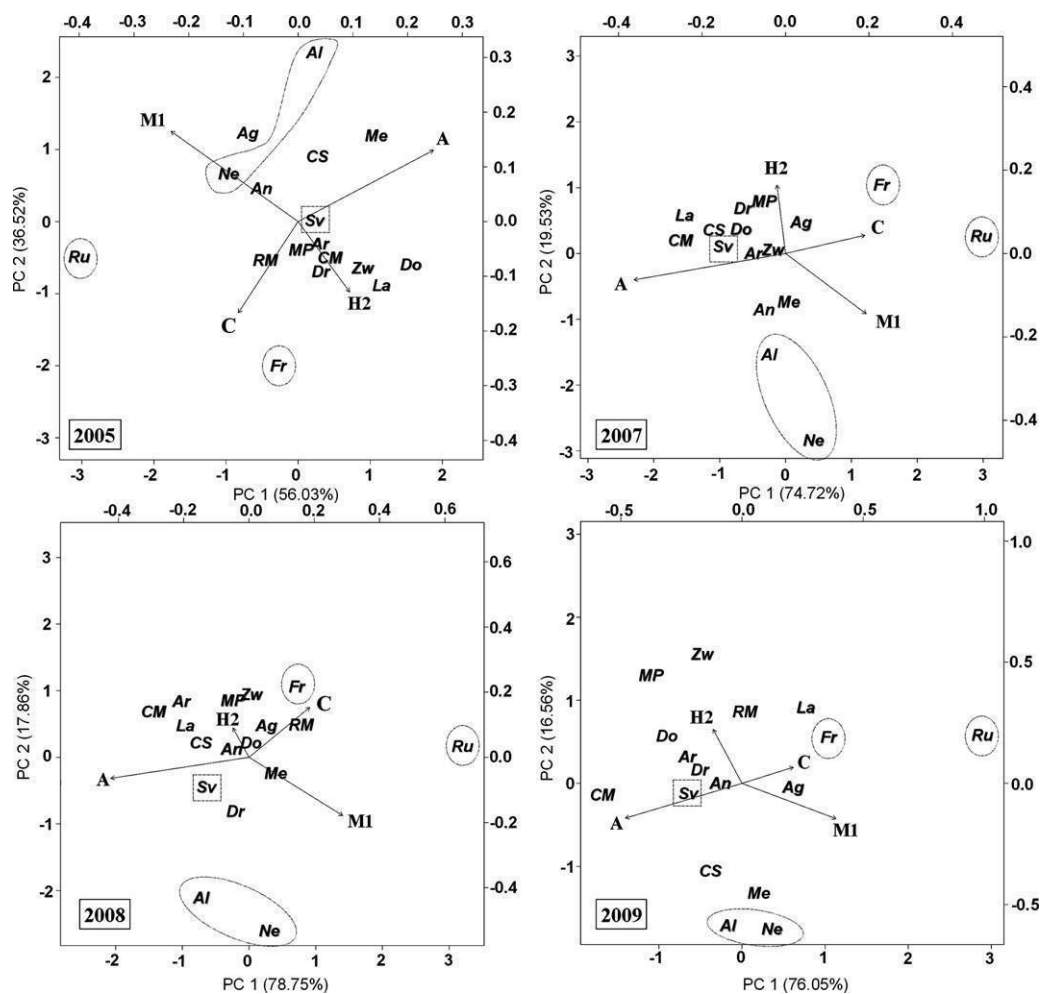


Fig. 7. PCA biplots of enzymatic activity vs. varieties (for explanation of principal components see Table 4).

of variety distribution. On the first sight, Rubinet (Ru) is again located far from other varieties. The process of coumarylation (C) and lack of acetyl derivatives (A) seems to be really significant for this specific variety. Other teinturiers are clustered in the segment between M1 and A. Thus, formation of peonidin derivatives and acetylated dyes is the most significant with respect to Alibernet and Neronet. Note that Neronet exhibits apparent shift towards M1 component with respect to Alibernet. Neronet (Ne), vintage 2005 is tilted more markedly. The PCA plots also reflect and confirm important diversity of Blaifränkish (Fr) based on the lack of acetylated anthocyanins. Classification of other varieties is not so straightforward but still it is possible to observe several characteristic and time-constant features.

It seems to be practical to separate the biplots into two parts along the lines (arrows) defined by hydroxylation and methylation. Varieties Saint Laurent (Sv), André (An), Cabernet Sauvignon (CS) and Cabernet Moravia (CM) are always located in the part oriented in the direction to acetylation (A).

This rule applies to a certain degree also to Ne, Dr (both with exemption in 2005), Me, Do (both with exemption in 2008) and La (exemption in 2009). Moreover, Cabernet Moravia is always located in the part allotted by A and H2. On the opposite side (towards C), there are always located Rubinet (Ru), Blaifränkish (Fr), Pinot Noir (RM) and with only one exemption, Agni (Ag, 2005). Other varieties are distributed without an apparent rule.

Also, biplots can be divided by a flowline of acetylation and coumarylation. Then, all teinturiers (i.e., Ru, Al, Ne) and Merlot (Me)

are always located in section oriented towards the methylation (M1). Consistent location in the biplots also exhibit Dr, Do and La. However, in the case of these varieties, there is always one exception against the rule: Dr 2005, Do 2008 and La 2009. Other varieties are distributed without an evident order. PCA plots which were designed using sums of specific types of anthocyanins (expressed as M1, H, A, C) do not allow perfect resolution among all studied varieties. However, they allow reliable differentiation of teinturiers from the other varieties as well as representatives within their group. Results show that the chosen approach of data processing allows to distinguish Blaifränkish from the other varieties. Further, PCA plots facilitate classification of varieties into several groups in dependence on their position with respect to principal components.

4. Conclusions

This long time study proves that microcolumn as well as ultra-performance chromatography hyphenated with tandem mass spectrometry represent conclusive tools for anthocyanin profiling nowadays. When compared both the LC modes, UHPLC system provided lower LOD and LOQ values as well as higher productivity (expressed by COF) and precision of retention parameters and peak areas. Utilization of both chromatographic systems led to a significant improvement with respect to conventional HPLC used for analysis of anthocyanin dyes.

These methods were used for monitoring of anthocyanin profile in all varieties (certified in Czech Republic until year 2005) over four years. Direct comparison of a content of anthocyanins does not provide a resolution among individual varieties, except of the teinturier Rubinet. In this particular variety, relatively high contents of 3-coumaroylglucoside-5-glucosides of malvidin and peonidin were found and we suggest using them as markers of artificial color enhancement.

Our results also confirm that enzymatic processes involved in anthocyanin biosynthesis are utilizable for classification of a variety. The higher content of peonidin derivatives (a higher activity of related methyltransferase) refers to a potential occurrence of teinturiers (i.e., Alibernet, Neronet and Rubinet) when included in the set of analyzed wine samples. It was found out that Blaufränkisch has low content of acetyl derivatives of anthocyanins (lower activity of acetyltransferase) and this fact can be utilized for resolution of this variety.

When principal component analysis is applied either directly to anthocyanin profiles or to the data processed with regard to enzymatic activity, the resolution among varieties is markedly facilitated. Two-dimensional display of data (in the form of biplot) emphasizes differences among individual teinturiers, Blaufränkisch and partially separate the group of Blaufränkisch, Pinot Noir, Blauer Portugieser and Domina. Moreover, suitable division of biplots in a direction of a principal component based on enzymatic activities further allowed a more detailed classification of Merlot, Cabernet Moravia and led to an unambiguous differentiation of Saint Laurent from Blaufränkisch which has indispensable meaning from the viewpoint of their high occurrence on the Czech market.

Acknowledgements

Authors thank to Grant Agency of Czech Republic (project P206/10/0625). This work was supported also by the projects MSM 6198959214, 6198959216 and Operational Program Research and Development for Innovations – European Social Fund (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058) of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. Authors of paper respectfully thank to Ing. Ivana Ludvikova from Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture in Brno, Viticulture Department of Testing Stations in Oblekovice for providing authentic red wines.

References

- [1] J. Kong, *Phytochemistry* 64 (2003) 923.
- [2] M.P. Kähkönen, M. Heinonen, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 628.
- [3] E. Kowalczyk, P. Krzesinski, M. Kura, B. Szmigiel, J. Baszczyk, *Pol. J. Pharmacol.* 55 (2003) 699.
- [4] I. Palíková, K. Valentová, I. Oborná, J. Ulrichová, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 6584.
- [5] Z. Li, Q. Pan, Z. Jin, L. Mu, C. Duan, *Food Chem.* 125 (2011) 77.
- [6] M. Monagas, B. Bartolomé, Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds, in: M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer Science + Business Media, LLC, New York, 2009, p. 439.
- [7] J. Carreno, L. Almela, A. Martínez, J.A. Fernández-López, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 30 (1997) 259.
- [8] F. Pomar, M. Novo, A. Masa, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 34.
- [9] I. Arozarena, B. Ayestarán, M.A. Cantalejo, M. Navaro, M. Vera, I. Abril, *A. Casp. Eur. Food Res. Technol.* 214 (2002) 303.
- [10] F. Mattivi, R. Guzzon, U. Vrhovsek, M. Stefanini, R. Velasco, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7692.
- [11] M.S. Dopico-García, A. Figue, L. Guerra, J.M. Afonso, O. Pereira, P. Valentao, P.B. Andrade, R.M. Seabra, *Talanta* 75 (2008) 1190.
- [12] I. Arozarena, A. Casp, R. Marín, M. Navarro, *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2000) 108.
- [13] R.A. Fong, R.E. Kepner, D. Webb, *Am. J. Enol. Vitic.* 22 (1971) 150.
- [14] S. Río Segade, E. Soto Vázquez, E.I. Vázquez Rodríguez, J.F. Rego Martínez, *Eur. Food Res. Technol.* 229 (2009) 763.
- [15] A. Edelmann, J. Diewok, K.C. Schuster, B. Lendl, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1139.
- [16] L. Hartmanova, V. Ranc, B. Papouškova, P. Bednar, V. Havlicek, K. Lemr, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4223.
- [17] J. Valls, S. Millán, M. Pilar Martí, E. Borrassa, L. Arolab, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7143.
- [18] P. Bednar, B. Papouškova, L. Muller, P. Bartak, J. Stavek, P. Pavloušek, K. Lemr, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1291.
- [19] C.T. da Costa, D. Horton, S.A. Margolis, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 403.
- [20] C. Mane, M. Loonis, C. Juhel, C. Dufour, C. Malien-Aubert, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 3330.
- [21] M.P. Martí, A. Pantaleon, A. Rozek, A. Soler, J. Valls, A. Macia, M.P. Romero, M.J. Motilva, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2841.
- [22] K. Nagy, K. Redeuil, R. Bertholet, H. Steiling, M. Kussmann, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6347.
- [23] P. Dugo, O. Favoino, M. Lo Presti, R. Luppino, G. Dugo, L. Mondello, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1458.
- [24] C. Fanali, L. Dugo, G. D'Orazio, M. Lirangi, M. Dacha, P. Dugo, L. Mondello, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 150.
- [25] R. Myjavcova, P. Marhol, V. Kren, V. Simanek, J. Ulrichova, I. Palikova, B. Papouškova, K. Lemr, P. Bednar, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7932.
- [26] P.J. Martin-Alvarez, Statistical techniques for the interpretation of analytical data, in: M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer Science + Business Media, LLC, New York, 2009, p. 677.
- [27] J. Aitchison, *The Statistical Analysis of Compositional Data*, Chapman and Hall, London, 1986.
- [28] G. Mateu-Figueras, V. Pawlowsky-Glahn, *Math. Geosci.* 40 (2008) 489.
- [29] *The State Variety Book of Czech Republic*, Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture in Brno, 2010.
- [30] K.R. Gabriel, *Biometrika* 58 (1971) 453.
- [31] J. Aitchison, M. Greenacre, *Appl. Stat.* 51 (2002) 375.
- [32] M. Korhoňová, K. Hron, D. Klimčíková, L. Müller, P. Bednář, P. Barták, *Talanta* 80 (2009) 710.
- [33] J.L. Glajch, J.J. Kirkland, K.M. Squire, J.M. Minor, *J. Chromatogr.* 199 (1980) 57.
- [34] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2nd ed., J. Wiley & Sons, New York, 1997, p. 210.
- [35] M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges, A. Rocco, S. Fanali, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3764.
- [36] J. Valls, S. Millán, M. Pilar Martí, E. Borràs, L. Arola, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7143.
- [37] E. García-Beneytez, F. Cabello, E. Revilla, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5622.
- [38] B. Papoušková, P. Bednář, unpublished results.
- [39] H.M. Merken, G.R. Beecher, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 577.
- [40] C.R. Welch, Q. Wu, J.E. Simon, *Curr. Anal. Chem.* 4 (2008) 75.

Study of electrochemical oxidation of cyanidin glycosides by online combination of electrochemistry with electrospray ionization tandem mass spectrometry

David Jirovský · Petr Bednář · Renáta Myjavcová ·
Zdenka Bartošová · Jana Skopalová ·
Michaela Tvrdoňová · Karel Lemr

Received: 28 September 2010 / Accepted: 2 September 2011 / Published online: 20 October 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Electrochemistry coupled with mass spectrometry (EC–MS) is a promising analytical tool for the online study of oxidation processes of anthocyanins. Two cyanidin glycosides, cyanidin-3-galactoside (ideain) and cyanidin-3,5-diglucoside (cyanin), were subjected to electrochemical oxidation and subsequent online mass spectrometric identification of the formed products. Application of relatively low working potentials (around 100 mV vs. Pd/H₂) using a porous graphite coulometric electrode yielded detectable oxidation products. As determined by hydrodynamic voltammetry, the monoglycosylated analogue undergoes anodic oxidation easier than the diglycosylated one. As a first step of the electrochemically induced oxidation, incorporation of a hydroxyl group was observed for both glycosides. Besides, an oxidative condensation of two anthocyanin molecules was observed. The proposed oxidative condensation was further confirmed by consecutive fragmentation (i.e., collection of MS², MS³, and MS⁴ spectra) in which corresponding subsequent losses of the sugar moiety were observed.

Keywords Cyanidin · Anthocyanin · Electrochemistry · Oxidations · Mass spectrometry

Introduction

The first serious attempts to combine electrochemistry (EC) with mass spectrometry (MS) date back to the early 1970s. Nevertheless, these pioneering works stayed rather

aside from the main analytical stream over the next several decades. The interest in this hyphenated technique, however, has been rapidly growing in recent years; this is even more evident by the continuously increasing number of scientific papers dealing with this topic [1]. The expansion of electrospray ionization (ESI–MS) as a soft ionization technique in recent years also plays a major role in the current EC–MS development [2]. ESI is an ionization technique which is well compatible with electrochemistry. The EC–MS technique (often in combination with previous separation by liquid chromatography) can be particularly useful in the case that separation is required for the study of electrochemical properties of an individual compound in a mixture and/or separation is required for electrochemical conversion product(s). Electrochemical cells that are easily coupled to ESI–MS instruments became commercially available within recent years. Porous graphite coulometric working electrodes, combined with the maintenance-free palladium–hydrogen reference electrode, are among the most popular systems. At their large electrode surface, high conversion at moderate flow rates of the mobile phase can be achieved (<0.1 cm³/min).

Current applications of the EC–MS technique can be divided into four main areas [3]: (i) online electrochemical derivatization prior to MS; (ii) specific protein/peptide cleavage [4, 5]; (iii) studies of electrochemical reaction mechanisms [6, 7], including studies of short-lived intermediates [8]; (iv) *in vitro* mimicking of biological processes [9–11], approaching metabolic oxidation [12, 13]. Such EC–MS applications are a very promising starting point for further metabolic studies and drug metabolism mimicking in living organisms.

Electrospray MS (ESI–MS), thanks to its demands on mobile phase composition and flow rates, offers very good EC compatibility, although it has to be taken into account

D. Jirovský (✉) · P. Bednář · R. Myjavcová · Z. Bartošová ·
J. Skopalová · M. Tvrdoňová · K. Lemr
Department of Analytical Chemistry, Palacký University,
17. Listopadu 1192/12, 771 46 Olomouc, Czech Republic
e-mail: david.jirovsky@upol.cz

that the ESI outlet capillary also itself acts as a current-controlled electrochemical cell and thus diverse further electrochemical reactions can occur [14, 15].

As coulometric detection yields up to 100% conversion, coulometric cells can be used as online flow-through reactors, enabling quantitative transformation of electroactive reactants into their oxidized (or reduced) forms.

Anthocyanins are natural water-soluble dyes that are responsible for the red, blue, and purple colors of numerous flowers and fruits. Anthocyanins, as glycosylated derivatives of the 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavylium cation, are generally classified as flavonoids. The electron deficiency of the flavylium cation makes the free aglycons (anthocyanidins) highly reactive and much less stable than the glycosides. Consequently the aglycons occur much less frequently in nature. Up to now, over 500 different anthocyanins have been isolated from plant material [16].

Anthocyanins have several health-promoting effects, notably antimicrobial and antiviral properties. Beside, formulations rich in anthocyanins were used for the prevention and treatment of diabetes, cardiovascular diseases, some forms of cancer and obesity [17–19]. Anthocyanins are also natural antioxidants that are attracting attention because of their chemoprotective role in the oxidative metabolism of cells.

There are several articles dealing with the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with electrochemical detection for the analysis of anthocyanins (e.g., [20, 21]). The obtained data served as supporting information for the MS-based identification of anthocyanins in flavonoid-rich samples. Moncada et al. [22] reported an interesting electrochemical oxidation of kuromanin (cyanidin-3-glucoside) and a synthetic analogue bearing no hydroxyl on the B ring of the anthocyanidin skeleton. These authors (following the previous study of catechols [23]) proposed the formation of quinones followed by a reaction with an original molecule to form a dimeric structure. Cyanidin glycosides (for their structure, see Fig. 1) belong to the group of the most frequently occurring anthocyanins and, therefore, they extensively contribute to the human diet.

In this paper, we report the use of EC–MS to investigate processes involved in the oxidation of anthocyanins. To the best of our knowledge, there is no previous study of anthocyanins using online coupling of electrochemical transformation with ESI–MS. The observed electrochemical conversion contributes to our understanding of the transformation processes of anthocyanins in biosystems.

Results and discussion

As can be seen from the hydrodynamic voltammograms in Fig. 2, anthocyanins can be easily oxidized electrochemically.

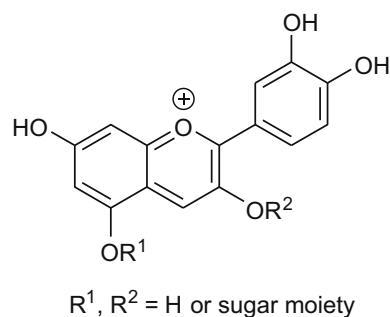


Fig. 1 Structure of cyanidin glycosides

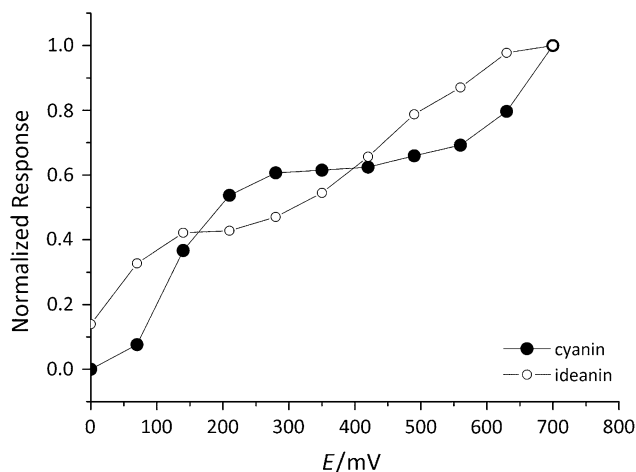


Fig. 2 Hydrodynamic voltammograms of cyanidin-3,5-diglucoside (cyanin) and cyanidin-3-galactoside (ideain) (normalized response expressed as a relative peak area A ; $A_{\text{max}} = 1$)

The monoglycosylated analogue is oxidized at even lower potentials than the diglycosylated one. When an appropriate electrochemical cell is coupled with the mass spectrometer the oxidation products can be studied online. Relatively low potentials (around 100 mV vs. Pd/H₂, see Fig. 3) allow the formation of detectable oxidation products.

Figure 4 shows the mass spectra obtained when cyanidin-3-galactoside is passed through the electrochemical cell. The upper spectrum is obtained when the electrochemical cell is switched off and corresponds to the spectrum obtained using direct injection of a standard into the ion source. The dominant ion corresponds to the flavylium cation of the original dye (i.e., m/z 449, $[M]^+$). Minor peaks at m/z 471 and 919 correspond to adducts with sodium (i.e., $[M - H + Na]^+$ and $[2M - 2H + Na]^+$, respectively). The peak at m/z 897 can be ascribed to a monocharged dimer formed from the original dye (i.e., $[2M - H]^+$). Those ions are commonly formed during the ESI process. The bottom spectrum shows the situation when the potential +100 mV vs. Pd/H₂ is applied on the electrochemical cell. Besides the molecular ion of cyanidin-3-galactoside (m/z 449) a peak at m/z 465 appeared.

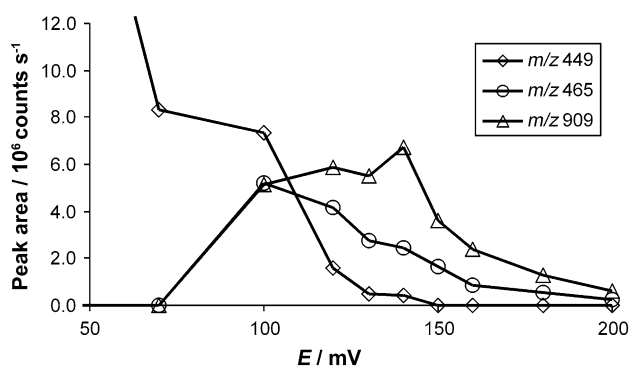
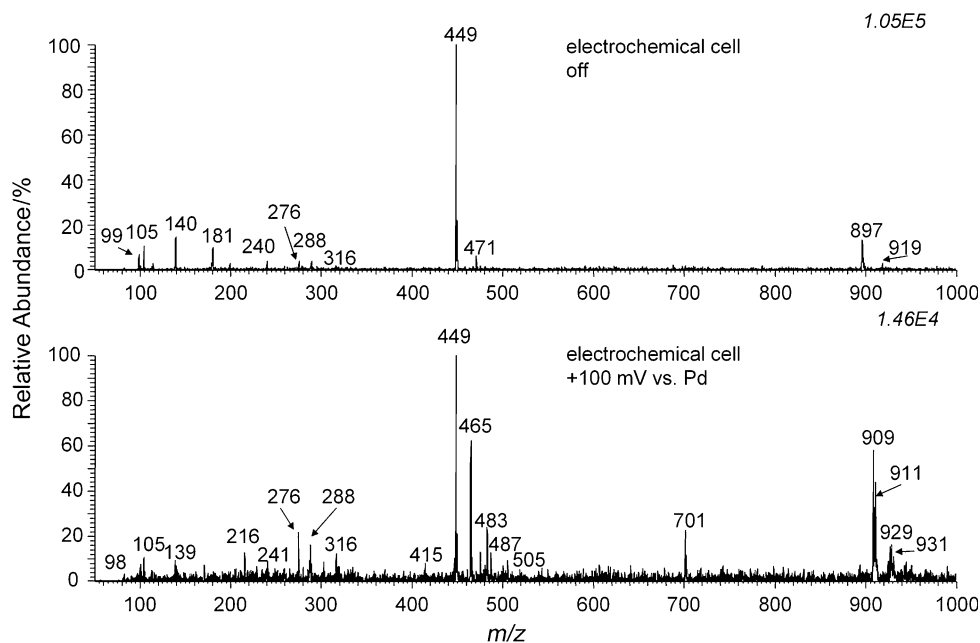


Fig. 3 Effect of applied voltage on the response of cyanidin-3-galactoside and arising oxidation products measured by MS (peak area obtained by integration of peak of eluting compound in an ion chromatogram reconstructed at related m/z value)

The difference of both values corresponds to 16 mass units, suggesting the introduction of one oxygen atom into the anthocyanin molecule. This process can be very likely explained as hydroxylation. A tandem mass spectrometer allows one to isolate the formed ions and to study their fragmentation after collision-induced dissociation in the ion trap. Figure 5a shows the fragmentation of the oxidation product m/z 465. The loss of water (formation of ion at m/z 447) can be observed. As a dominant process, however, loss of the sugar moiety occurs ($\Delta m/z$ 162) and the related aglycon is formed (m/z 303; isomer of delphinidin). The loss of the sugar unit corresponds to the main fragmentation pattern of the original pigment (i.e., the fragment at m/z 287 dominates: $287 = 449 - 162$). The spectrum, therefore, supports the identification and proves that the oxidation occurs on the anthocyanidin skeleton (the sugar moiety remains unchanged during the “soft” oxidation).

Fig. 4 MS spectra of cyanidin-3-galactoside (top) and products of its oxidation at +100 mV (vs. Pd/H₂) (bottom)



Further fragmentation of the aglycon (although providing a weak signal) leads to the typical cascade of neutral losses of water ($\Delta m/z$ 18) and carbon monoxide ($\Delta m/z$ 28) (Fig. 5b).

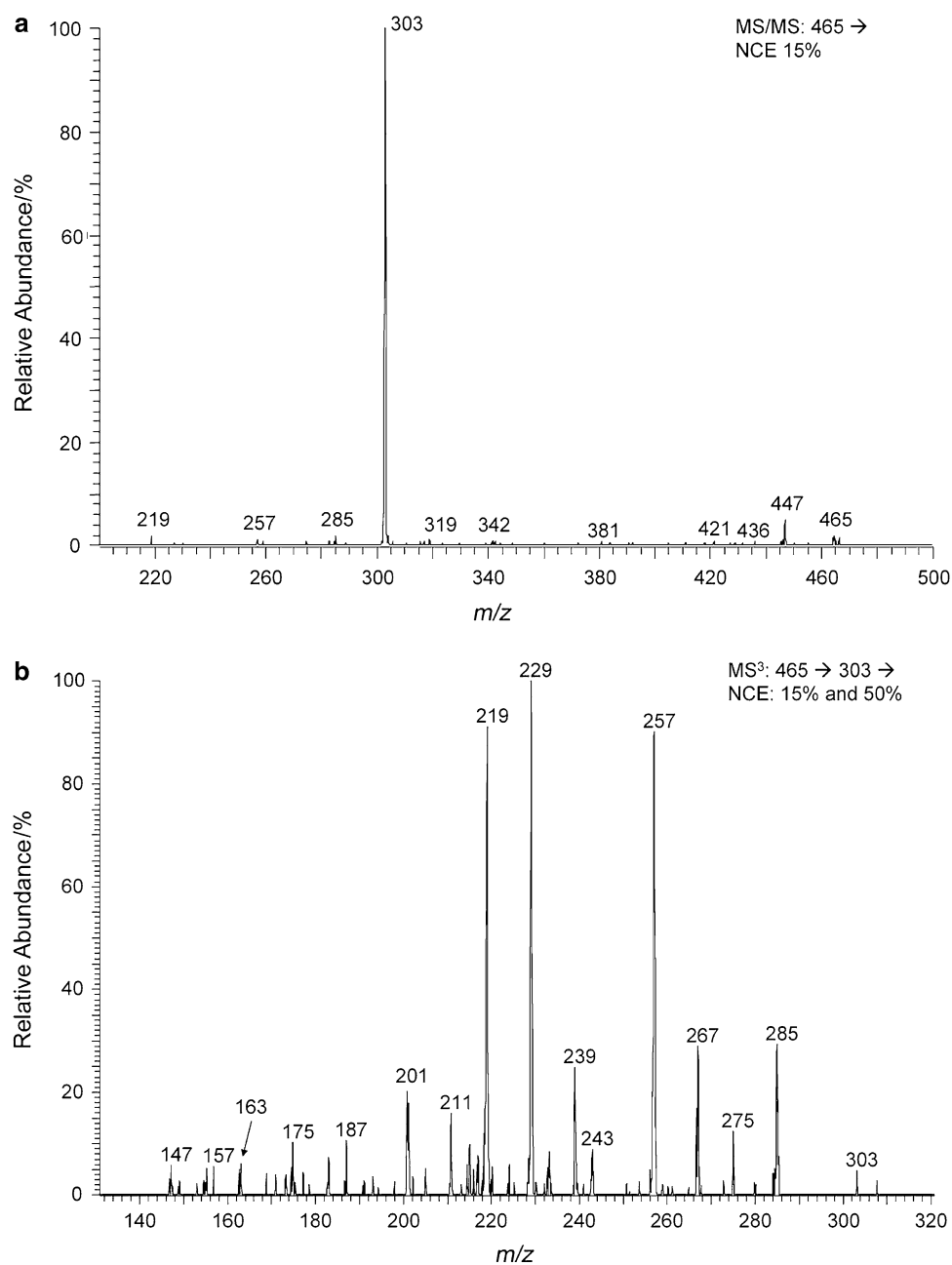
The main fragments obtained after collision-induced dissociation of the aglycon correspond to the fragments found in the MS² spectrum of delphinidin [24]. However, as a result of the weak signals obtained in the MS³ spectrum and the lack of isomer standards the position of hydroxylation was not satisfactorily located. This is an objective of future experiments. Besides, an ion at m/z 909 was detected after oxidation (Fig. 4) and in the collision spectra two consequent losses of galactose units are distinctly observed (Fig. 6). This can be explained as an oxidative condensation of two ideain molecules.

As mentioned in the “Introduction”, a couple of previous articles also suggest an oxidation and condensation of catechol-bearing compounds [23]. Our mass spectrometric data therefore support this idea. During electrochemical transformation a peak at m/z 701 is also observed with a lower intensity compared with those of the oxidation products discussed above (Fig. 4). The corresponding structure, however, has not been elucidated yet.

Similar processes were observed when a diglycosylated analogue (i.e., cyanidin-3,5-diglucoside, cyanin) was electrochemically oxidized (Fig. 7).

The ion at m/z 627 dominates in the bottom spectrum ($E = 140$ mV vs. Pd/H₂electrode) corresponding to monohydroxylation of cyanidin-3,5-diglucoside. The ion at m/z 465 represents an oxidized cyanidin-monoglucoside arising due to elimination of the sugar moiety from the ion at m/z 627 in the ion source. The minor ion at m/z 649 corresponds to the mass of the sodium adduct of the oxidized

Fig. 5 **a** MS² spectrum of the oxidized product of cyanidin-3-galactoside at *m/z* 465. **b** MS³ spectrum of the aglycon arising from fragmentation of the oxidized product at *m/z* 465



compound $[M - H + Na]^+$. Formation of sodium adducts is, as has already been mentioned, a typical process accompanying ESI and even trace amounts of sodium ions can result in the appearance of these adducts. More interesting is the formation of an ion at *m/z* 1,233 (inset in Fig. 7). Four sequential losses of glucose units are observed in the MS² of this ion (Fig. 8), and related MS³ and MS⁴ spectra confirmed that these cleavages are consecutive (data not shown).

The fragmentation pattern supports the idea of oxidative condensation of anthocyanins. Although generally many possible structures can be taken into account for oxidative condensation of anthocyanins, in the case of the diglycosylated derivative some processes are blocked (the two

hydroxy groups in positions 3 and 5 are glycosylated). Thus the number of potential reaction sites is decreased. Two speculative structures resulting from a condensation on the C or A ring of the anthocyanidin skeleton, respectively, are shown in Fig. 9.

Experimental

Chemicals

Standards of anthocyanins (cyanidin-3-galactoside chloride and cyanidin-3,5-diglucoside chloride) were obtained from

Fig. 6 MS² spectrum of a “dimer” product at m/z 909

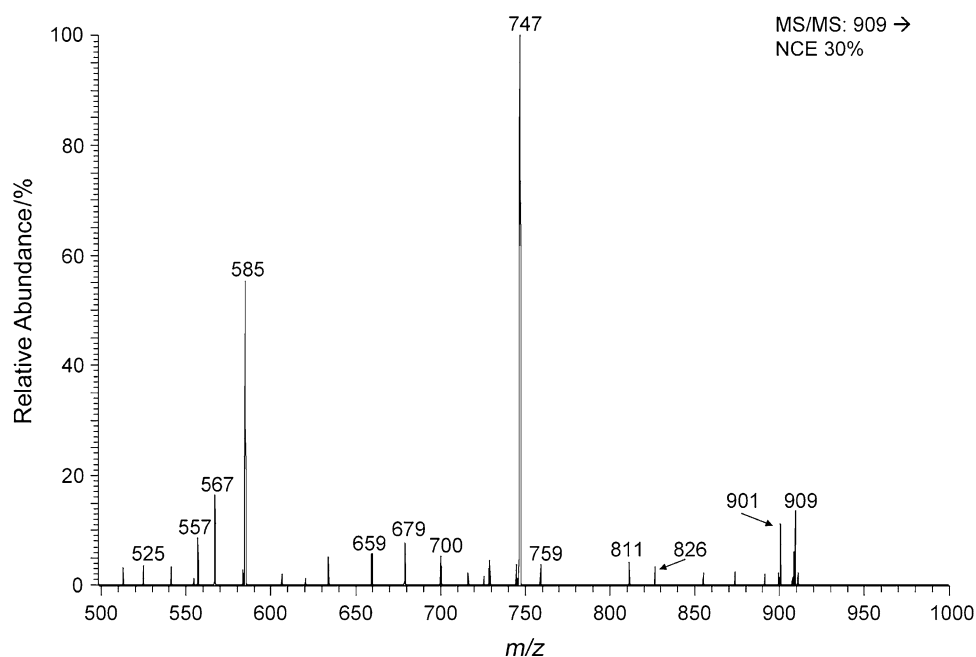
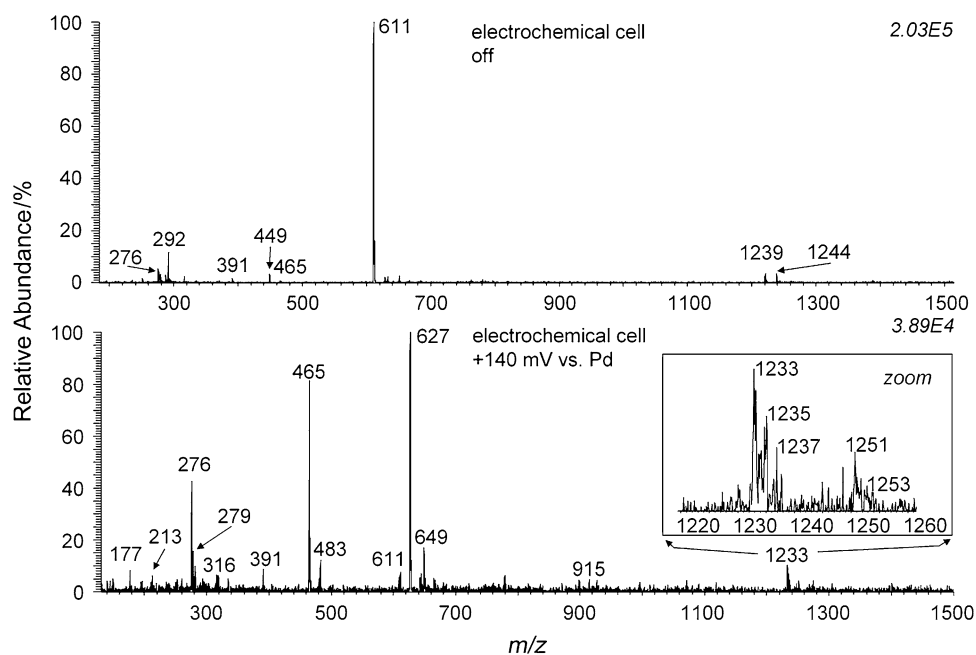


Fig. 7 MS spectra of cyanidin-3,5-diglucoside (*top*) and products of its oxidation (*bottom*; inset shows the zoom of product at m/z 1,233)



Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The concentration of anthocyanin standards used for the experiments was 0.1 mg/cm^3 . Trifluoroacetic acid (99%) and acetonitrile (gradient grade) were provided by Fluka (Buchs, Switzerland). The mobile phase (liquid for transportation of the sample zone to the electrochemical cell and ion source of the mass spectrometer) was prepared by mixing deionized water (Elga, Elgastat, Bucks, Great Britain) with acetonitrile and trifluoroacetic acid to give the final mixture (0.12% trifluoroacetic acid, 15% acetonitrile in water, v/v).

Instrumentation

A Finnigan MAT LCQTM ESI-MS instrument (an ion trap mass spectrometer; Finnigan, San Jose, USA) was used for hyphenation with a Coulochem III electrochemical detector, equipped with a dual-channel coulometric cell (model 5010A) and a guard cell (model 5020) (all ESA Inc., Chelmsford, MA, USA). The liquid used for transport of sample through the electrochemical cell to the ion source was identical with the mobile phase used for measurement

Fig. 8 MS² spectrum of oxidized product of cyanidin-3,5-diglucoside at *m/z* 1,233

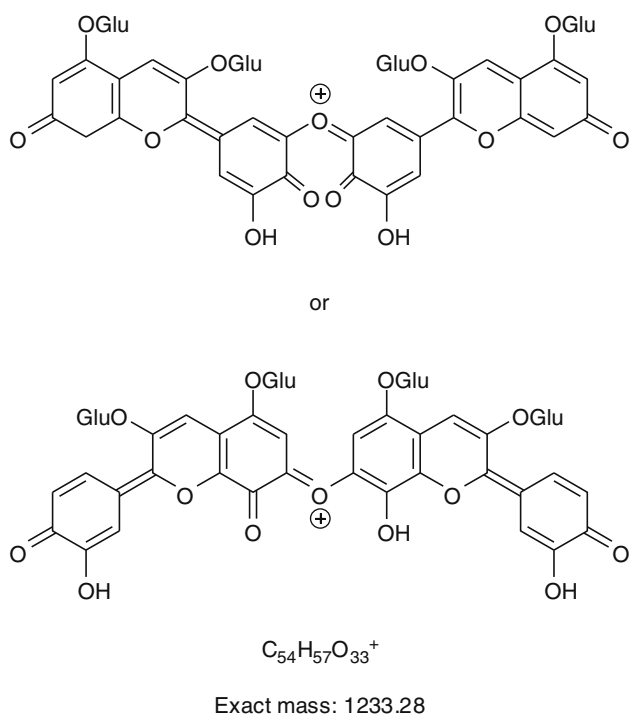
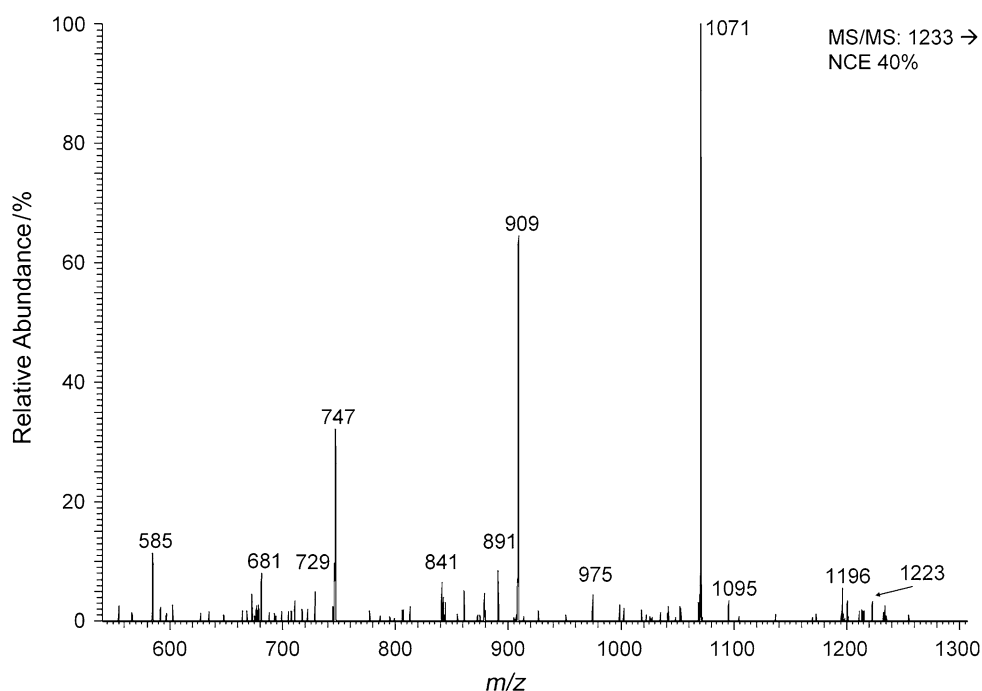


Fig. 9 Speculative structure of products of the oxidative condensation of cyanidin-3,5-diglucoside

of hydrodynamic voltammograms. The sample of anthocyanin was injected into the flow of acidic mobile phase and the zone was pumped into an electrochemical cell. The liquid was pumped through the system using a chromatographic pump Rheos 2000 (Flux Instruments, Reinach,

Switzerland). The flow rate used was 0.2 cm³/min. A volume of 20 mm³ of sample solution (0.1 mg/cm³) was injected (full loop). The electrochemical cell was operated at selected voltages within the range 0 to +200 mV (vs. Pd/H₂). The parameters of the ion source and ion optics were tuned using a standard solution of studied pigments. Spray voltage +5.6 kV, sheath gas flow rate 60 arb. (arbitrary units), auxiliary gas 0 arb., and temperature of a heated capillary 200 °C were used. The electrochemical cell was connected to a grounded block before entering the ion source by a PEEK capillary (0.13 mm I.D.). From the grounded block the liquid was introduced to the ion source using a fused silica capillary (0.075 mm I.D.). The mass spectrometer was operated in the full scan mode (range *m/z* 50–1,500). Product ions were identified by online tandem and multi-stage (MS² and MS³) experiments performed by collision-induced dissociation of the studied ion after its isolation in the ion trap.

For hydrodynamic voltammogram measurements, the HPLC system consisted of an ESA isocratic pump (model 582; ESA Inc., Chelmsford, MA, USA) with a pulse damper, a manual injector (Rheodyne, Cotati, CA, USA) equipped with a 10-mm³ loop and an ESA Coulochem III coulometric detector with a dual-electrode standard analytical cell (model 5010A) combined with a guard cell (model 5020) (all ESA Inc., Chelmsford, MA, USA).

Samples were introduced into the system by a glass 25-mm³ syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). All fittings, ferules, and tubing were made of PEEKTM. A Purospher

Star RP-18 (5 μm), 125 \times 4-mm-I.D. HPLC column (Merck, Darmstadt, Germany) was used.

Mobile phase composition was acetonitrile/water/tri-fluoroacetic acid (15:85:0.12, v/v). The mobile phase was vacuum-filtered through a 0.2- μm porous filter (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and degassed by helium sparkling prior to use. The flow rate was 1.2 cm^3/min . The working potential was increased gradually in 70-mV increments in the range 100–700 mV (vs. Pd/H₂). Hydrodynamic voltammograms were expressed as a normalized mean peak area vs. applied potential. The chromatographic station Clarity (DataApex, Prague, Czech Republic) was used for chromatogram recording.

Acknowledgments The support by the Grant Agency of Czech Republic (P206/10/0625), the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic (MSM6198959216 and Operational Program Research and Development for Innovations—European Social Fund; project CZ.1.05/2.1.00/03.0058), and the student project PrF_2011_025 of the Palacky University in Olomouc is gratefully acknowledged.

References

1. Van Berkel GJ (2004) *J Am Soc Mass Spectrom* 15:1691
2. Zhou FM, Van Berkel GJ (1995) *Anal Chem* 67:3643
3. ESA (2010) <http://www.esainc.com>. Accessed 1 March 2010
4. Permentier HP, Jurva U, Barroso B, Bruins AP (2003) *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:1585
5. Permentier HP, Bruins AP (2004) *J Am Soc Mass Spectrom* 15:1707
6. Modestov AD, Gun J, Savotina I, Lev O (2004) *J Electroanal Chem* 565:7
7. Zhang TY, Pali SP, Eyley JR, Brajter-Toth A (2002) *Anal Chem* 74:1097
8. Lohmann W, Karst U (2007) *Anal Chem* 79:6831
9. Jurva U, Wikstrom HV, Weidolf L, Bruins AP (2003) *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:800
10. Gamache PH, Meyer DF, Granger MC, Acworth IN (2004) *J Am Soc Mass Spectrom* 15:1717
11. Jurva U, Wikstrom HV, Bruins AP (2000) *Rapid Commun Mass Spectrom* 14:529
12. Lohmann W, Karst U (2006) *Anal Bioanal Chem* 386:1701
13. Jurva U (2004) *Electrochemistry on-line with mass spectrometry/ Instrumental methods for in vitro generation and detection of drug metabolites*. Ph.D. dissertation, University of Groningen, The Netherlands
14. Liu SY, Griffiths WJ, Sjoval J (2003) *Anal Chem* 75:1022
15. Van Berkel GJ, Zhou FM (1995) *Anal Chem* 67:2916
16. Andersen ØM, Jordheim M (2006) *The anthocyanins*. In: Andersen ØM, Markham KR (eds) *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC, Boca Raton
17. He JA, Giusti MM (2010) *Annu Rev Food Sci Technol* 1:163
18. Prior RL, Wu XL (2006) *Free Radical Res* 40:1014
19. Schreckinger ME, Wang JZ, Yousef G, Lila MA, de Mejia EG (2010) *J Agric Food Chem* 58:8966
20. Aaby K, Ekeberg D, Skrede G (2007) *J Agric Food Chem* 55:4395
21. Munoz-Espada AC, Wood KV, Bordelon B, Watkins BA (2004) *J Agric Food Chem* 52:6779
22. Moncada MC, de Mesquita MF, dos Santos MMC (2009) *J Electroanal Chem* 636:60
23. Ryan MD, Yueh A, Chen WY (1980) *J Electrochem Soc* 127:1489
24. Bednář P, Papoušková B, Müller L, Barták P, Stávek J, Pavloušek P, Lemr K (2005) *J Sep Sci* 28:1291

E-LEARNINGOVÉ OPORY PŘEDMĚTŮ PROJEKTOVÁ VÝUKA V CHEMII A CVIČENÍ Z ANALYTICKÉ CHEMIE

**MRÁZOVÁ Veronika, MACÍKOVÁ Pavla, MYJAVCOVÁ Renáta,
GINTEROVÁ Pavlína, MÜLLER Lukáš, CZ**

Abstract

This article describes new e-learning support of two subjects: Project education in chemistry (PVCH) and Practicals in Analytical Chemistry (ACC) which are taught at Palacký University at the Department of Analytical Chemistry. The supports are created within an implementation of two projects of University Development Fund (FRVŠ): "The innovation of the subject Project education in Chemistry" and "The Handbook for beginning teachers of Practicals in Analytical Chemistry". These projects are managed mainly by doctoral students of the branches Didactics of Chemistry and Analytical Chemistry. One of the outcomes of both projects are web pages - e-learning support of the two subjects. The support of PVCH is mainly intended for the students of the subject, the support of ACC is mainly devoted to the teachers of the subject. One part of the support of the subject PVCH is a course in the e-learning system Moodle. The support contains a lot of different e-learning materials: files (created e.g. in Word, Excel, PowerPoint etc.), discussion forums, online assignments, a calendar or news. These supports are currently prepared and they should be finished by the end of 2010.

ÚVOD

Na katedře analytické chemie Univerzity Palackého (UP) v Olomouci jsou v roce 2010 řešeny dva projekty podporované Fondem rozvoje vysokých škol (FRVŠ), které inovují předměty Projektová výuka v chemii (PVCH) a Cvičení z analytické chemie (ACC). Projekty „Inovace obsahu a studijních opor předmětu Projektová výuka v chemii“ a „Příručka pro začínající vyučující předmětu Cvičení z analytické chemie“ jsou realizované převážně studentkami doktorského studia oborů Didaktika chemie a Analytická chemie. Jedním z výstupů obou těchto projektů je vytvoření webových stránek - e-learningových opor daných předmětů. Obě tyto opory se v současnosti připravují - měly by být kompletně zpracovány do konce roku 2010.

E-LEARNINGOVÉ OPORY

V současnosti dochází k dynamickým změnám ve všech sférách naší společnosti. Vzhledem k nepřetržitěmu dynamickému vývoji e-learningu i souvisejících informačních a komunikačních technologií (ICT) existuje řada definic e-learningu.

Podle Zounka (2009) e-learning „zahrnuje jak teorii a výzkum, tak jakýkoliv reálný vzdělávací proces (s různými stupni intencionality), v němž jsou v souladu s etickými principy používány informační a komunikační technologie pracující s daty v elektronické podobě. Způsob využívání prostředků ICT a dostupnost učebních materiálů jsou závislé především na vzdělávacích cílech a obsahu, charakteru vzdělávacího prostředí, potřebách a možnostech všech aktérů vzdělávacího procesu.“

Kopecký (2006) rozlišuje e-learning v širším a užším slova smyslu a uvádí definici shrnující společné rysy řady běžně používaných definic: „E-learning chápeme jako multimediální podporu vzdělávacího procesu použitím moderních informačních a komunikačních technologií, které je zpravidla realizováno prostřednictvím počítačových sítí. Jeho základním úkolem je v čase i prostoru svobodný a neomezený přístup ke vzdělávání.“

V souladu s uvedenými definicemi jsou nově vytvářené elektronické opory předmětů PVCH a ACC v pravém slova smyslu oporami „e-learningovými“.

Blended learning a opora PVCH

Tzv. *blended learning* v současnosti převažující pedagogický model v e-learningu. Jde o tzv. smíšené či propojené vzdělávání (někdy označované také jako blended e-learning či hybridní vzdělávání), v němž se mísí, spojují či prolínají prezenční formy výuky s e-learningem (Zounek, 2009).

Mason a Rennie (2006) jej chápou jako kombinaci online a prezenční výuky. Podle Kopeckého (2006) je však rovněž možné blended learning „chápat jako reálnou kombinovanou výuku - tedy kombinaci prezenční a distanční formy.“

Podle Zounka (2009) mohou být příkladem tohoto propojení moderních technologií s tradičními postupy např. používání tištěných a elektronických výukových materiálů a offline a online učení, materiály nebo zdroje (např. výuka v klasické třídě propojená s učením pomocí ICT). Podle tohoto chápání je elektronická

opora předmětu PVCH nástrojem k realizaci blended learningu, neboť některé její části jsou využívány jak k prezenční výuce studentů předmětu PVCH, tak k offline učení.

Moodle

LMS je označení pro řídicí vzdělávací systémy (případně systémy řízeného vzdělávání, systémy pro řízení vzdělávání; LMS - Learning Management System). Jejich základ je postaven na bázi WBT (web based training) - vzdělávání, které využívá webových (síťových) technologií (Kopecký, 2006, Vaněk, 2008).

Původně se v prostředí Internetu vystavovaly jen jednotlivé výukové materiály a komunikace probíhala pomocí e-mailu. V dnešní době však existuje celá řada LMS systémů, které usnadňují tvorbu, používání a správu online výuky tím, že poskytují:

- rozhraní, které umožňuje vytvářet prezentace kurzů,
- celou řadu výukových materiálů, které usnadňují studium, komunikaci a spolupráci,
- celou řadu administrativních nástrojů, které slouží tutorům (pedagogům vedoucím online výuku) v procesu správy, vedení a vylepšování kurzů (Bubela, 2005).

Jedním z nejznámějších a často využívaných LMS systémů je e-learningový systém Moodle. Velmi výstižně je Moodle charakterizován na oficiálním portále www.moodle.cz (2003): Moodle je softwarový balík určený pro podporu prezenční i distanční výuky prostřednictvím online kurzů dostupných na webu; je vyvíjen jako nástroj umožňující realizovat výukové metody navržené v souladu s principy konstruktivisticky orientované výuky; umožňuje či podporuje snadnou publikaci studijních materiálů, zakládání diskusních fór, sběr a hodnocení elektronicky odevzdávaných úkolů, tvorbu online testů a řadu dalších činností sloužících pro podporu výuky. Moodle patří mezi volně šiřitelný software s otevřeným kódem, který je kompatibilní s operačními systémy Unix, Linux, Windows, Mac OS X, Netware a dalšími, které podporují PHP.

Slovo *Moodle* bylo původně akronymem pro Modular Object-Oriented Dynamic Learning Environment (Modulární objektově orientované dynamické prostředí pro výuku). V angličtině jej lze také považovat za sloveso, které popisuje proces líného bloumání od jednoho k druhému, děláni věcí podle svého, hravost, která často vede k pochopení problému a podporuje tvořivost. V tomto smyslu se vztahuje jak k samotnému zrodu Moodle, tak k přístupu studenta či učitele k výuce v on-line kurzech (2006).

Právě systém Moodle je využíván k podpoře prezenční výuky předmětu Projektová výuka chemie. Na webových stránkách <http://pvch.upol.cz/moodle> byl v rámci řešení projektu nově nainstalován systém Moodle a založen první kurz na podporu výuky předmětu PVCH (Projektová výuka 2010).

PŘEDMĚTY PVCH A ACC

Předmět Projektová výuka v chemii (ACH/PVCH) je určen především studentům učitelských kombinací s chemií. Jde o doplňující předmět učitelského studia z celkově relativně nízkého počtu (10) volitelných předmětů na Univerzitě Palackého určených studentům oboru Učitelství chemie a současně jenom jednoho ze dvou volitelných předmětů určených pouze studentům tohoto oboru. V rámci předmětu PVCH se studenti seznamují s teoretickými základy jedné z netradičních metod výuky chemie - projektové metody. Získávají však rovněž praktické zkušenosti nutné k úspěšnému realizování této metody ve svém budoucím povolání.

Předmět Cvičení z analytické chemie (ACH/ACC) ročně absolvuje více než 100 studentů studijního oboru Chemie na PŘF UP. V rámci cvičení se realizuje 10 laboratorních úloh probíhajících během jednoho semestru (každý týden jedno cvičení s časovou dotací šesti hodin). Studenti doktorského studia oboru Analytická chemie mají ve svém studijním programu povinnou praxi, kterou obvykle plní právě jako vedoucí ACC. Velmi často však postgraduálním studentům chybí i minimální didaktické a pedagogické vzdělání. Pro zvýšení kvality výuky bylo třeba vytvořit podpůrný materiál (studijní i metodický), který by začínajícím vyučujícím pomohl se blíže seznámit s úskalími výuky. Proto vznikla e-learningová opora předmětu ACC - soubor webových stránek určených primárně pro vedoucí tohoto předmětu.

CHARAKTERISTIKA OPORY PŘEDMĚTU PVCH

E-learningová opora předmětu PVCH je umístěna na internetové adrese <http://pvch.upol.cz> (Mrázová, 2010a), její součástí je systém Moodle, který je k dispozici na adrese <http://pvch.upol.cz/moodle> (Mrázová, 2010b).

Podpora je určena především pro studenty oboru 7504T075 Učitelství chemie pro střední školy (1. a 2. ročník dvouletého magisterského studia - cca 60 studentů), kteří si vyberou volitelný předmět ACH/PVCH, je však k dispozici i jiným studentům dalších oborů UP v Olomouci (prostřednictvím předmětu ACH/PVCH), který je zařazen do celouniverzitní nabídky přednášek, seminářů a cvičení. Studentům UP je umožněno využívání LMS Moodle, který slouží především jako podpora prezenční výuky předmětu PVCH. Podpora však obsahuje i veřejnou část (Mrázová, 2010a), která je určena široké veřejnosti, a to především studentům učitel-

ství chemie z jiných univerzit či učitelům chemie z praxe. Učitelé základních a středních škol budou o opoře informováni prostřednictvím periodicky pořádaných projektů dalšího vzdělávání učitelů UP v Olomouci.

Cíle

Elektronická podpora PVCH by měla být prostředkem k splnění několika cílů inovace předmětu Projektová výuka v chemii:

- zefektivnit výuku předmětu Projektová výuka v chemii a stát se tak účinnou pomůckou ke zkvalitnění pedagogického profilu absolventů oboru učitelství, čímž jim umožní lepší uplatnění teoretických i praktických poznatků z této v současnosti populární metody v praxi,
- zkvalitněním výuky motivovat studenty učitelství k rozšíření svých znalostí a dovedností v oborově-didaktické části přípravy učitelů, která bývá často oproti odborné části studia podceňována,
- podporovat nejen vlastní vzdělávací proces u studentů, ale umožnit i zlepšení organizace výuky předmětu,
- vytvořit vhodný nástroj k osvojení metodiky RVP nejen v pregraduální přípravě učitelů (na Univerzitě Palackého i na jiných univerzitách), ale i pro učitele z praxe (veřejná část podpory - např. přístup k studijním oporám předmětu a k databázi vytvořených projektů),
- poskytnout studentům předmětu PVCH zkušenosti s e-learningem, které mohou jednou využít ve své pedagogické praxi.

Obsah

Část e-learningové opory určená k podpoře prezenční výuky předmětu PVCH (Mrázová, 2010a) obsahuje stručnou charakteristiku obsahu jednotlivých seminářů, nové studijní opory k těmto seminářům, zadání domácích úkolů a odkazy na vhodnou studijní literaturu. Kromě toho je v ní k dispozici diskusní fórum k problémům týkajících se daného předmětu a stránky obsahující komentáře učitele. Dále nabízí studentům možnost ukládat vytvořené projekty a jiné související materiály či domácí úkoly.

Veřejná část e-learningové opory předmětu PVCH (Mrázová, 2010a) by v konečném stavu měla obsahovat:

- úvodní informace o opoře (proč vznikla, komu je určena),
- informace o předmětu PVCH a jeho e-learningové opoře v Moodle - např. přehled cvičení (s hypertextovými odkazy na studijní opory týkající se jednotlivých cvičení) a odkaz na diskusní fórum v Moodle (umožňující studentům řešit aktuální problémy související s předmětem),
- databázi projektů realizovaných v rámci PVCH na UP,
- přehled literatury zabývající se projekty (především se zaměřením na chemii).



Obr.1 Vzhled části podpory PVCH vytvořené v LMS Moodle

V rámci LMS Moodle založený kurz „Projektová výuka 2010“ má tzv. týdenní uspořádání - tzn. obsah kurzu je uspořádán po týdnech jdoucích za sebou, týdny odpovídají harmonogramu semestru. Každému týdnu odpovídá jeden graficky oddělený oddíl, v jehož záhlaví je uvedeno datum začátku a konce týdne. Příslušný oddíl vždy obsahuje stručnou charakteristiku daného semináře, odkazy na studijní materiály a tzv. činnosti (Moodle.Docs, 2006).

Moodle podporuje řadu různých typů studijních materiálů, umožňuje vložit do kurzu téměř jakýkoliv druh obsahu používaný na webu. Je možné např. vkládat studijní materiály připravené ve formě souborů (Word, Excel, PowerPoint, PDF apod.), nabízí však i další formy v jakých je možné materiály prezentovat (stránka s textem, webová stránka, odkaz na soubor nebo web, zobrazení adresáře uloženého na Moodle atd.) (Moodle.Docs, 2006, Oliva, 2009).

E-learningová část podpory PVCH v Moodleu zpřístupňuje studentům nejrůznější elektronické výukové materiály (studijní opory k jednotlivým seminářům včetně odkazů na vhodnou studijní literaturu - textové soubory, PowerPointové prezentace, pdf soubory, obrázky atd.).

Systém Moodle rovněž umožňuje vkládat do svého kurzu řadu interaktivních učebních modulů - např. moduly anketa, chat, databáze, fórum, průzkum, slovník, test, úkol, workshop (Moodle.Docs, 2006). V rámci PVCH jsou používány především moduly úkol a fórum.

Křestní jméno : Vše A A B C C D D E E E F G H I J K L M N N O O P Q R R S S T T U U V W X Y Y Z Z
Příjmení : Vše A A B C C D D E E E F G H I J K L M N N O O P Q R R S S T T U U V W X Y Y Z Z

Křestní jméno / Příjmení	Známka	Komentář	Naposledy změněno (Student)	Naposledy změněno (Učitel)	Stav	Výsledná známka
M F	-				Známka	-
Jakub Martinek	3 / 5		Pracovní verze: Martinek_ukol_2a.doc Čtvrtek, 14. říjen 2010, 20:55	Sobota, 16. říjen 2010, 19:24	Aktualizovat	3,00
Veronika Mrázová	-				Známka	-
Hana Porubová	-		Pracovní verze: Porubova_ukol_1.doc Pátek, 15. říjen 2010, 19:24	Sobota, 16. říjen 2010, 19:30	Aktualizovat	-
Jakub Přichystal	4 / 5	nápady k ...	Prichystal_ukol_1.doc Pátek, 15. říjen 2010, 18:13	Sobota, 16. říjen 2010, 20:10	Aktualizovat	4,00
Veronika Švandová	-				Známka	-
Magdalena Techetová	4 / 5		Pracovní verze: Techetova_ukol_1.doc Úterý, 12. říjen 2010, 18:36	Sobota, 16. říjen 2010, 19:30	Aktualizovat	4,00

Počet úkolů na stránku 10
Použít rychlé hodnocení
Likoř přidejby

Obr.2 Ukázka prostředí pro hodnocení úkolů

Modul „úkol“ umožňuje učitelům sbírat studentské práce, hodnotit je a poskytovat studentům zpětnou vazbu včetně známkování. K dispozici jsou čtyři typy úkolů: odevzdat soubor, pokročilé nahrávání souborů, online text, offline činnost. V rámci podpory PVCH je nejvíce využíváno "pokročilé nahrávání souborů", které na rozdíl od úkolu typu „odevzdat soubor“ umožňuje studentům odevzdat zároveň více než jeden soubor. Studenti mohou odevzdat jakýkoli digitální obsah (soubory), například textové dokumenty, sešity z tabulkových procesorů, obrázky a zvukové a obrazové sekvence. Konkrétní požadavky jsou vždy formulovány v zadání úkolu (v poli „popis“). Studenti vidí nejen datum zadání domácího úkolu, ale rovněž i datum, kdy mají úkol odevzdat. Je možné nastavit zákaz odevzdávání úkolů po stanoveném termínu. Učitel může k odevzdanému úkolu vložit komentář. Odevzdané úkoly lze známkovat na učitelem předem zvolené škále. V případě zájmu učitele je možné nastavit si upozorňování na e-mail, které se odešle na jeho e-mailovou adresu vždy, když studenti odevzdají nový úkol nebo když již odevzdaný úkol aktualizují. Studenti jsou vedeni k přepracování úkolů na základě komentáře učitele, uvedený modul „úkol“ tedy umožňuje efektivní komunikaci mezi učitelem a žáky, která by v konečné podobě měla vést k získání vypracovaných úkolů v podobě odpovídající představám učitele (Moodle.Docs, 2006).

Projekt Síra V tomto fóru si může každý zvolit, zda bude odebírat příspěvky nebo ne.
Zde budeme řešit problematiku spojenou s projektem Magdalény Techetové. [Vnutit všem odebírání příspěvků e-mailem](#)
[Ukázat/vybrat odběratele](#)
[Neodebírat příspěvky z tohoto fóra e-mailem](#)

[Přidat nové téma diskuse](#)

Diskuse	Zahájil/-a	Odpovědi	Poslední příspěvek
Brainstorming a myšlenková mapa, Precheza, úprava plánu	Veronika Švandová	1	Magdalena Techetová Čtvrtek, 28. říjen 2010, 12:00
Animace výroby k. sirové	Veronika Švandová	1	Magdalena Techetová Neděle, 17. říjen 2010, 22:03
Pokusy se sírou - modifikace	Veronika Švandová	0	Veronika Švandová Sobota, 16. říjen 2010, 18:55

Obr.3 Ukázka diskusního fóra k projektu Síra

Modul „fórum“ je hlavním asynchronním komunikačním nástrojem systému Moodle. Slouží především pro diskusi mezi účastníky kurzu. Fórum může být uspořádáno několika různými způsoby, je možné nastavit několik různých parametrů podle metodických potřeb kurzu. Fóra mohou zahrnovat hodnocení příspěvků ostatními účastníky kurzu či učitelem, příspěvky lze prohlížet v několika formátech, je možné k nim připojit přílohu. Účastníci kurzu mají možnost přihlásit se k odběru příspěvků (kopie každého vloženého příspěvku jim v tom případě bude zasílána e-mailem), učitel má možnost odebírání příspěvků všem účastníkům vnutit.

Při vhodném použití diskuzního fóra moderovaného učitelem může být tato činnost pro úspěšné online studium tou nejdůležitější - může vhodně motivovat účastníky kurzu k dalšímu studiu (Moodle.Docs, 2006).

CHARAKTERISTIKA OPORY PŘEDMĚTU ACC

E-learningová opora předmětu ACC je umístěna na internetové adrese http://ach.upol.cz/ACC_prirucka (Myjavcová, Ginterová, 2010).

Podpora je určena především pro vedoucí cvičení ACC (až 10 vedoucích cvičení ročně), sekundárně však může být využita studenty bakalářského programu Chemie a Biochemie, kteří absolvují ACC a jsou tedy přímo ovlivněni kvalitou jeho výuky. Zveřejnění návodů k jednotlivým laboratorním úlohám může být dále prospěšné pro studenty učitelství chemie či učitele chemie z praxe. Učitelé základních a středních škol budou o opoře informováni stejným způsobem, jako o podpoře předmětu PVCH (semináře „Další vzdělávání učitelů“).

Cíle

E-learningová podpora ACC by měla být prostředkem k splnění těchto cílů:

- umožnit postgraduálním studentům využívat nově vytvořený podpůrný materiál, který by jim měl pomoci efektivně vést cvičení a překonávat možné problémy plynoucí z jejich minimálního didaktického a pedagogického vzdělání,
- umožnit dalším zájemcům (např. studenti učitelství a učitelé z praxe) o jednotlivé laboratorní úlohy (díky úzké příbuznosti témat středoškolského a vysokoškolského laboratorního vyučování) využívat jednotlivé studijní i metodické materiály příručky.

Obsah

Vzniklá příručka se skládá ze dvou hlavních částí: obecné a speciální. V obecné části jsou zmíněny především obecné zásady správného vedení laboratorního cvičení (např. správná laboratorní praxe a pedagogické zásady). Část speciální se věnuje praktické části cvičení. Jsou zde konkrétně rozpracovány jednotlivé postupy každého cvičení doplněné o metodické pokyny (např. cíle výuky, časové rozvržení, modelové příklady na ústní i písemné zkoušení apod.).

Příručka pro začínající vyučující předmětu Cvičení z analytické chemie

Tento materiál vznikl za podpory Fondu rozvoje vysokých škol, projekt č. 2676/2010/G6

Úvod
Kvalitní výuka předmětu cvičení z analytické chemie je jedním z nezbytných předpokladů pro další studium a celkového rozvoje chemických oborů. Čím více bude dobře prakticky připravených studentů, tím více odborníků bude v chemických laboratořích a provozech pracovat a podílet se na rozvoji chemie. Cílem této příručky je vytvoření nového textu pro kvalitnější výuku, určený pro začínající vyučující předmětu cvičení z analytické chemie. Vzniklá příručka se skládá ze dvou hlavních částí: obecné a speciální. V obecné části jsou zmíněny především obecné zásady správného vedení laboratorního cvičení (např. správná laboratorní praxe, pokyny o poskytnutí první pomoci, pedagogické zásady, požadavky na studenta – vedení laboratorního deníku, zpracování protokolů apod.). Část speciální se věnuje praktické části cvičení, jsou zde konkrétně rozpracovány jednotlivé postupy každého cvičení doplněné o metodické pokyny (např. cíle výuky, časové rozvržení, modelové příklady na ústní i písemné zkoušení apod.).

Obecná část:

- Správná laboratorní praxe (bezpečnostní zásady a první pomoc při úrazech v laboratoři)
- Zásady pedagogického vedení laboratorního cvičení (metody ověřování znalostí, vědomostí a dovedností studentů, zásady vedení laboratorních záznamů, zásady při zpracování laboratorních protokolů a požadavky na jejich obsah)

Speciální část:

- 01 Kvalitativní analýza anorganických kationtů
- 02 Kvalitativní analýza anorganických aniontů
- 03 Kvalitativní analýza směsi anorganických kationtů a aniontů
- 04 Gravimetrické stanovení Ni a Fe

Obecná část

- Správná laboratorní praxe
- Zásady pedagogického vedení

Speciální část

- Kvalitativní analýza anorganických kationtů
- Kvalitativní analýza anorganických aniontů
- Kvalitativní analýza směsi anorganických kationtů a aniontů
- Gravimetrické stanovení Ni a Fe
- Acidobazická titrace, alkalimetrie a acidimetrie
- Chelatometrie, stanovení Ca^{2+} , Mg^{2+} a tvrdosti vody
- Oxidimetrie, manganometrie a jodometrie
- Elektrogravimetrie a coulometrie, stanovení Cu^{2+}
- Spektrofotometrické stanovení Fe^{3+}
- Tenkovrstevná chromatografie

Ostatní

- Diskuzní fórum
- PDF verze příručky

Obr.3 Vzhled podpory předmětu ACC

ZÁVĚR

E-learningové podpory předmětů PVCH a ACC jsou vytvářené převážně studentkami doktorského studia oborů Didaktika chemie a Analytická chemie. Jde o soubory internetových stránek, které obsahují nejrůznější e-learningové nástroje. Část podpory předmětu PVCH určená k podpoře prezenční části výuky využívá LMS Moodle. Předpokládá se využívání příslušných opor v konečné verzi od konce roku 2010.

Článek vznikl za podpory projektů FRVŠ 2909/2010/G6 a 2676/2010/G6.

Použité zdroje

- ZOUNEK, J. *E-learning - jedna z podobčaní v moderní společnosti* Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-5123-2.
- KOPECKÝ, K. *E-learning (nejen) pro pedagogy* Olomouc: Hanex, 2006. ISBN 80-85783-50-9.
- MASON, R. - RENNIE, F. *Elearning: the key concepts* London: Routledge, 2006. 158 s. ISBN 0-415-37307-7.
- VANĚK, J. *E-learning, jedna z cest k moderním formám učení* Opava: Slezská univerzita v Opavě, 2008. ISBN 978-80-7248-471-3.
- BUBELA, J., et al. *Příručka pro tutorý: návod k užívání LMS iTutor a Moodle* Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2009. ISBN 978-80-7013-492-4.
- MOODLE.CZ* [online]. 2003 [cit. 2010-11-09]. Dostupné z WWW: <<http://moodle.cz/>>.
- MoodleDocs* [online]. 2006 [cit. 2010-11-09]. Dostupné z WWW: <<http://docs.moodle.org/cs>>.
- OLIVA, J. *Využití Moodle ve vzdělávání* [online]. Brno, 2009. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta, Katedra technické a informační výchovy. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/136421/pedf_b/bp_oliva.pdf>.
- MRÁZOVÁ, V. *PVCH: Projektová výuka v chemii* [online]. 2010a [cit. 2010-11-09]. Dostupné z WWW: <<http://pvch.upol.cz>>.
- MRÁZOVÁ, V. *Projektová výuka v chemii: elektronická podpora* [online]. 2010b [cit. 2010-11-09]. Dostupné z WWW: <<http://pvch.upol.cz/moodle/>>.
- MYJAVCOVÁ, R.; GINTEROVÁ, P. *Příručka pro začínající vyučující předmětu Cvičení z analytické chemie* [online]. 2010 [cit. 2010-11-09]. Dostupné z WWW: <http://ach.upol.cz/ACC_prirucka/>.

Kontaktní adresy

Mgr. Veronika Mrázová
Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého
17. listopadu 12
771 46 Olomouc
e-mail: mrazova.veronika@seznam.cz

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



AUTOREFERÁT

K DISERTAČNÍ PRÁCI

**Spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrií
v analýze flavonoidů a produktů jejich biotransformace**

Autor práce:

Mgr. Renáta Myjavcová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc.RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2015

SOUHRN

Flavonoidy jsou rozsáhlou biologicky významnou skupinou látek. Důvodů zájmu o detailní zkoumání těchto přírodních látek je několik. Především je to jejich využití v medicíně jako prevence proti kardiovaskulárním onemocněním, cukrovce (diabetes mellitus 2. typu), onemocněním centrální nervové soustavy (CNS) a také potenciálně i při léčbě rakoviny. Anthokyaniny jsou přírodní barviva patřící do skupiny flavonoidů. Tato barviva hrají významnou roli v životě rostlin - ochrana pletiv před UV zářením a predátory, přitahování opylovačů atd. Anthokyaniny jsou poměrně málo stabilní. Snadno se oxidují, hydrolyzují a rovněž kondenzují na složitější barviva. Produkty vznikající jejich kondenzací s malými reaktivními sloučeninami, jako jsou pyrohroznová kyselina, acetaldehyd, aceton a další jsou už výrazně stabilnější a lze je využít v řadě oblastí, zejména potravinářství. U vzniklých kondenzovaných barviv lze očekávat jinou biologickou aktivitu v lidském organismu, než jakou vykazují samotné anthokyaniny. V této disertační práci byla pozornost věnována jedné skupině derivátů anthokyaninů - pyranoanthokyaninům. Byla studována jejich tvorba v extraktech plodů zimolezu kamčatského během jeho testování pro využití v potravinových doplncích. Detailní pozornost byla věnována analytickým vlastnostem 5-methylpyranoanthokyaninů. Byla prostudována fragmentace tohoto barviva po kolizi indukované disociaci v iontové pasti. Kromě odštěpování oxidu uhelnatého a vody byl v kolizních spektrech pozorován i fragmenty vznikající odštěpením methylového radikálu z pyrano-kruhu. Tyto fragmenty jsou pro 5-methylpyranoanthokyaniny charakteristické a mohou být analyticky využity.

Lidský metabolismus je souborem biochemických reakcí probíhajících v buňkách. Nejčastěji jsou metabolické děje studovány na jaterních a střevních buňkách. Metabolismus anthokyaninových barviv byl již v literatuře do určité míry studován. O metabolismu derivátů anthokyaninů je toho však známo velmi málo. Studium *in vitro* biotransformace vybraného pyranoanthokyanidinu bylo také předmětem této disertační práce. Pro tyto experimenty byl vybrán 5-methylpyranopelargonidin. V paralelních experimentech byly spolu s tímto barvivem studovány i pelargonidin (nejjednodušší anthokyanidin) a kvercetin (běžný a dobře prostudovaný flavonoid). Byly použity nádorové linie jaterních a střevních buněk (HepG2 a LS174T). Po proběhnutí biotransformace byly vzniklé metabolity analyzovány pomocí spojení ultraúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (UHPLC/MS). U kvercetinu byly pozorovány běžné metabolity fáze I a II. Při analýze buněčného sedimentu (pelet) byly navíc nalezeny ionty metabolitů s hodnotou m/z 603,0789 a 905,1212 ($[M-H]^+$ ionty). Tyto ionty byly připsány dimeru a trimeru kvercetinu. Obě studovaná barviva (pelargonidin a 5-methylpyranopelargonidin) metabolizovala méně ochotně než kvercetin. Biotransformace 5-methylpyranopelargonidinu probíhala s větším výtěžkem metabolitů než biotransformace pelargonidinu. Studovaný 5-methylpyranoanthokyanin se od ostatních dvou studovaných látek významně liší i v profilu metabolitů akumulovaných v buněčných sedimentech. To zřejmě souvisí s přítomností jednoho kruhu a methylu navíc v molekule pyrano-barviva oproti srovnávaným látkám a tedy s jeho vyšší hydrofobicitou.

SUMMARY

Flavonoids represent a wide group of biologically important compounds. There are several reasons for interest in the detailed investigation of these natural compounds. Especially, their use in medicine to prevent cardiovascular disease, diabetes (type 2 diabetes mellitus), central nervous system disorders (CNS) and also the potential in cancer treatment can be mentioned. Anthocyanins are natural dyes belonging among flavonoids. Those dyes play important role in plant life - protection of plant tissues against UV radiation and predators and attraction of pollinators etc. Anthocyanins are relatively unstable. Oxidation, hydrolysis and formation of more complex dyes (condensation) are the most frequent processes. Product arising by condensation with some small reactive compounds, such a pyruvic acid, acetaldehyde, acetone and other are much stable and they can be used in many areas, first of all in food industry. Different biological activity of condensed dyes can be expected compared to native anthocyanins.

This thesis is focused on one group of anthocyanin derivatives - pyranoanthocyanins. Their formation was studied in fruit extract of honeysuckle in the framework of their utilization in food supplements. Analytical properties of 5-methylpyranoanthocyanins were studied in detail, especially fragmentation after collision induced dissociation in ion trap. Besides general cleavage of carbon monoxide and water, the cleavage of the methyl radical from pyrano ring was observed in collision spectra. Some of observed fragments can be used as diagnostic ions for identification of 5-methylpyranoanthocyanins in real samples.

Human metabolism is a complex of biochemical reactions proceed in cells. The metabolic processes are mainly studied in the liver and intestinal cells. Metabolism of anthocyanin dyes was described in the literature for several times. However relevant information about metabolism of pyranoanthocyanins and other complex anthocyanin dyes is missing. Biotransformation of pyranoanthocyanins represents second topic of this thesis. 5-methylpyranoanthocyanin, pelargonidin (related anthocyanidin) and quercetin (common and well studied flavonoid) were *in vitro* metabolized with tumor lines of liver and intestinal cells (LS174T and HepG2). Arised metabolites were analyzed using ultra performance liquid chromatography hyphenated with mass spectrometry (UHPLC/MS). Common and in former literature described metabolites of quercetin of phase I and II were observed (showing that the used cells were metabolically active). In the cell sediment metabolites with a m/z 603,0789 and 905,1212 ($[M-H]^-$ ions) were also found. These ions were tentatively attributed to dimer and trimer of quercetin. Both studied dyes (pelargonidin a 5-methylpyranopelargonidin) metabolized less readily than quercetin. Biotransformation of 5-methylpyranopelargonidin proceeded with higher yield of metabolites compared to pelargonidin. Studied 5-methylpyranoanthocyanin differed significantly from the other compounds also in the profile of metabolites accumulated in cell pellets. This may be related to the presence of one additional ring and methyl group in the molecule of pyrano dyes and thus its higher hydrophobicity.

OBSAH

1. Úvod.....	5
2. Teoretická část	6
2.1 Flavonoidy	6
2.2 Kondenzované flavonoidy	6
2.3 Metabolismus a biotransformace flavonoidů.....	6
2.3.1 Metabolismus flavonoidů <i>in vivo</i>	6
2.3.2 Metabolismus flavonoidů <i>in vitro</i>	8
3. Cíle práce	9
4. Experimentální část.....	10
4.1 Chemikálie	10
4.3 Příprava 5-methylpyranopelargonidinu (5-MePPI).....	11
4.4 Buněčné linie	11
4.5 Přístroje a experimentální podmínky	11
4.5.1 Přístroje a postupy pro chromatografickou prefrakcionaci a následnou μ LC/MS analýzu plodů zimolezu kamčatského	11
4.5.2 UHPLC/MS pro analýzu metabolitů flavonoidů	12
4.6 Postupy vyhodnocení.....	13
5. Výsledky a diskuze	14
5.1. Studium polyfenolů přítomných v extraktech plodů zimolezu kamčatského	14
5.1.1 Optimalizace extrakčních postupů.....	14
5.1.2 Hodnocení postupů frakcionace extraktů plodů zimolezu kamčatského	15
5.1.3 Identifikace barviv.....	17
5.1.3.1 Identifikace barviv z frakcionace fenolické frakce zimolezu kamčatského.....	21
5.2 Biotransformace flavonoidů	24
5.2.2 Metabolické experimenty vybraných flavonoidů <i>in vitro</i> pomocí jaterních buněčných linií HepG2..	25
5.2.3 Metabolické experimenty vybraných flavonoidů <i>in vitro</i> pomocí střevních buněčných linií LS174T	25
6. Závěr	33
Literatura.....	34

1. Úvod

Flavonoidy patří mezi biologicky velmi významné přírodní látky. Důvodem jejich intenzivního výzkumu je jejich signální a regulační význam pro celou rostlinnou říši, ale také jejich využití v medicíně a potravinářství. Mezi flavonoidy patří celé skupiny polyfenolických látek s různou strukturou a vlastnostmi. Velmi významnou skupinou těchto sekundárních rostlinných metabolitů jsou i anthokyaninová barviva. Jedním z hlavních problémů souvisejících s jejich sledováním a využitím je jejich relativně malá stabilita v roztocích, při zvýšené teplotě, působení světla, oxidačních činidel apod. Působením těchto vlivů dochází ke strukturním změnám flavonoidů, mimo jiné i ke vzniku složitějších barviv kondenzačními a polymeračními reakcemi. Pyranoanthokyaniny patřící mezi tato složitější barviva byly poprvé identifikovány jako produkty přirozené fermentace při zrání a stárnutí vína. Vzhledem k rozmanitosti možných reakcí a vznikajících struktur je studium těchto látek dlouhodobě předmětem zájmu řady oborů a ty se neobejdou bez detailní chemické analýzy. Předkládaná disertační práce chce svým zaměřením přispět k porozumění vzniku, vlastnostem a procesu biotransformace vybraných flavonoidů se zaměřením na deriváty anthokyaninů. První část práce se věnuje analýze extraktů plodů zimolezu kamčatského během jeho testování pro využití v potravinových doplncích. Druhá část je zaměřena na studium *in vitro* biotransformace vybraných pigmentů středními a jaterními buňkami a analýzu vzniklých metabolitů metodou UHPLC/MS².

2. Teoretická část

2.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou sloučeniny patřící mezi rostlinné fenoly. V současné době je již známo více než 8000 flavonoidních látek a stále se objevují nové [1,2]. Flavonoidy vznikají jako sekundární metabolity při biochemických procesech v rostlinné buňce. U rostlin mohou způsobovat pigmentaci samotných rostlin nebo ovocných plodů. Mohou působit jako atraktanty pro opylující hmyz a zároveň poskytují ochranu před UV zářením a útokem predátorů a patogenů [3-6]. Pro své antioxidační a antimikrobiální účinky jsou tyto látky dlouhodobým předmětem intenzivního studia s ohledem na využití v medicíně.

Velké množství flavonoidů je přítomno v bobulovitých rostlinách jako brusinky, borůvky atd. Předmětem studia v této práci jsou plody zimolezu kamčatského (*Lonicera caerulea var kamtschatica*). Jedním z hlavních problémů využití flavonoidů v potravinářství i medicíně je jejich malá stabilita při zvýšení pH, teploty, přítomnosti světla a oxidačních činidel apod. Působením těchto vlivů může docházet ke strukturálním změnám flavonoidů.

2.2 Kondenzované flavonoidy

Kondenzované flavonoidy vznikají zejména působením člověka (při jejich extrakci z rostlinného materiálu, při fermentaci v moštích a vínech a při jejich zrání). S časem se tedy v rostlinných extraktech a potravinách zvyšuje obsah kondenzovaných barviv na úkor nativních anthokyaninů. Pyroanthokyaniny, patřící mezi kondenzované anthokyaniny byly identifikovány jako produkty přirozené fermentace při zrání a stárnutí vína [7]. Tyto barviva se tak staly předmětem mnoha studií [8].

2.3 Metabolismus a biotransformace flavonoidů

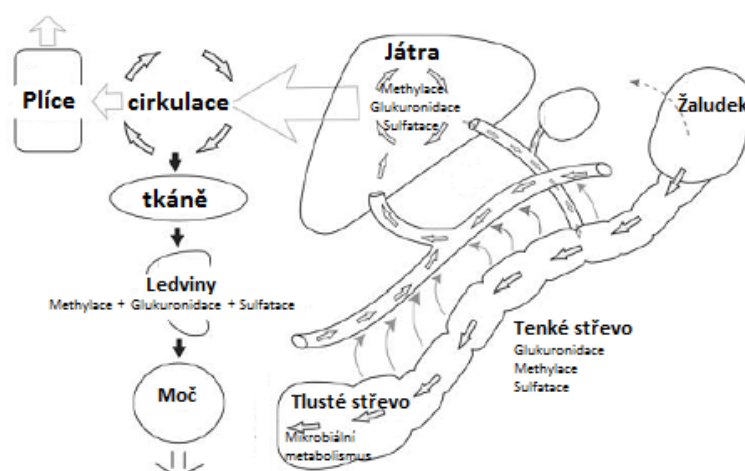
Biosyntéza flavonoidů je situována v buněčné cytoplazmě a ovlivněna působením mnoha enzymů [9-12]. Výchozí látkou je kyselina octová, vzniklá při fotosyntéze, která se souborem enzymatických reakcí přeměňuje na kumaryl CoA. Kumaryl CoA následně vstupuje do reakce s malonyl CoA a působením enzymu chalconsythasy vzniká základní stavební jednotka flavonoidů - chalkon. Sérií metabolických modifikací pak vznikají jednotlivé skupiny flavonoidů [10].

Procesy vstřebávání, metabolismu, distribuce v organismu a vylučování flavonoidů u člověka je dlouhodobě předmětem výzkumu v mnoha oborech [13-16]. Obecně, xenobiotika vstupují do lidského těla trávicím traktem (ústa, jícen, žaludek, střeva), respiračním systémem (epitely plic, nosní sliznice) a pokožkou. Biotransformace xenobiotik probíhá zejména v játrech a střevech, podílí se na nich ale i ledviny, plíce nebo kůže.

2.3.1 Metabolismus flavonoidů *in vivo*

Celkový metabolismus flavonoidů *in vivo* je ovlivněn souhrnem reakcí v lidském těle. Na začátku je velmi důležité v jaké formě potraviny jsou flavonoidy do organismu přijímány. Chemické vlastnosti jako struktura, velikost, rozpustnost a přítomnost dalších látek ovlivňuje celkovou absorpci flavonoidů v těle. Za posledních 40 let bylo provedeno několik studií na odhalení a pochopení detailního metabolismu flavonoidů v lidském těle.

Modelové studie byly provedeny a zkoumány nejčastěji na kvercetin [6,17]. V jedné z prvních studií byla podána dávka kvercetinu per orálně a intravenózně 6-ti dobrovolníkům a poté byla sledována přítomnost nemetabolizovaného kvercetinu v moči dobrovolníků [18]. Hollman a kol. provedl experiment dokazující, že k absorpci kvercetin-glukosidu probíhá ve střevech [19]. Tento fakt byl vysvětlen farmakokinetickou studií potvrzující zapojení Na^+ dependetní glukózového ko-transporteru (SGLT1), přítomného ve střevech do metabolismu kvercetin-glukosidu [20]. Tato studie však poté byla vyvrácena a byl navrhnout nový mechanismus, který je založen na hydrolýze glukosové jednotky pomocí enzymu laktasa-phloridzin hydrolasa (LPH) a β -glukosidasou na povrchu křkovitých výběžků střeva [21]. Volný aglykon pak jednoduše prochází pasivní difúzí membránou střeva. Tento mechanismus byl potvrzen pro většinu flavonoidů s navázanými rozdílnými cukernými jednotkami (glukosa, arabinosa, xylosa, galaktosa rhamnosa atd.) [22]. Popsaný mechanismus měl však své omezení. Například kyanidin a delphinidin-3-glukosid nepodléhali hydrolýze a zůstávaly nezměněny. Tento fakt autoři vysvětlují tak, že anthokyaniny ky a dp-3gl nejsou vhodným substrátem pro LPH enzym. Dalším parametrem ovlivňujícím metabolismus flavonoidů v lidském organismu je množství a typ navázaných cukerných jednotek na aglykon. Kvercetin-rutinosid byl absorbován pouze z 20-ti% v porovnání s kvercetin-glukosidem [20]. Další studie doplňují, že se na metabolismu flavonoidů podílí i žaludek, kde dochází k částečné absorpci [23]. Celkový pohled na metabolismus flavonoidů v lidském organismu je tedy velmi složitý a skládá se ze celého systému biotransformačních reakcí v celém těle (Obr. 1). Jejich detailní pochopení je cílem mnoha studií. Výstupním biologickým materiálem pro analýzu metabolitů flavonoidů *in vivo* je nejčastěji moč. V ní byly pak nejčastěji nalezeny metabolity methylované, sulfátované a glukuronidy flavonoidů [17,24,25]. Glukuronidová konjugace je nejčastější biotransformační proces flavonoidů v lidském organismu [26-28]. Glukuronidace je reakce katalyzována enzymem UDP-glukuronosyltransferasou, který je přítomen ve velkém množství v játrech, střevech a ledvinách [29]. Druhou nejčastější biotransformační reakcí je pak methylace, která je řízena skupinou enzymů methyltransferas přítomných především v tkáních jater a ledvin [30,31]. Všeobecně lze říci, že *in vivo* experimenty popisují současně celý metabolický procesů. Pro detailní poznání jednotlivých částí tohoto procesu je obvykle třeba doplnit výzkum *in vitro* experimentem s jedním izolovaným typem buněk (ev. jedním typem tkáně nebo jedním orgánem).



Obr. 1 Souhrnný pohled na biotransformační procesy flavonoidů v lidském těle [29]

2.3.2 Metabolismus flavonoidů *in vitro*

Mnohé *in vitro* experimenty pomohly k detailnímu popsání jednotlivých biotransformačních pochodů flavonoidů v lidském těle [32-35]. Experimenty s HepG2 buňkami lokalizovaly proces glukuronidace, methylace a sulfatace kvercetinu v tenkém střevě [33]. Vacek a kolektiv provedli *in vitro* experiment metabolismu flavonoidů s lidskými jaterními buňkami na kvercetinu, rutinu a isokvercitrinu. I zde byly nalezeny hlavní metabolické dráhy jako metylace, sulfatace i glukuronidace [34].

V metabolismu flavonoidů je významná přítomnost střevních bakterií, která umožňuje štěpení cukerných jednotek (s pomocí enzymů β -glukosidasy, β -glukuronidasy) za vzniku aglykonů. Vzniklé aglykony jsou v dalších procesech štěpeny až na fenolické kyseliny. Fenolické kyseliny jsou vůči další degradaci střevní mikroflórou poměrně odolné. Kromě glukosidů může střevní mikroflóra hydrolyzovat také glukuronidy, sulfáty, amidy, estery a laktony (vnitřní cyklické estery). V přítomnosti střevní mikroflóry snadno dochází k štěpení kruhů (v případě degradace flavonoidu na fenolickou kyselinu), dekarboxylaci, demethylaci a dehydroxylaci [29,36].

Extrakt z malin obsahující směs polyfenolů (s bohatým zastoupením kyseliny elagové) byl testován na maligní linii buněk karcinomu tlustého střeva LS174 a na mononukleárních buňkách imunitního systému. Účinkem extraktu se významně snížil počet nádorových buněk oproti stejným buňkám v kultivačním médiu. Antiproliferativní vlastnosti na nádorové buňky přímo úměrně závisely na obsahu polyfenolů v extraktu [37]. Flavonoidy významně ovlivňují životní cyklus buňky. Autoři Kang a Liang ve své *in vitro* studii již z roku 1997 poukazují na schopnost kvercetinu inhibovat růst lidských buněk HL-60 zodpovědných za promyelocytární leukémii. Kvercetin vykazoval účinky na buněčný cyklus, aktivitu proteinkinázy C, tyrosin protein kinázy a produkci fosfoinositidu u nádorových buněk [38].

3. Cíle práce

Disertační práce se zabývá studiem vzniku, vlastností a procesu biotransformace vybraných barviv odvozených od anthokyaninů. Cíle práce je možno shrnout do následujících bodů:

- Analýza anthokyaninů, pyranoanthokyaninů a dalších složitějších pigmentů v rostlinných extraktech (plody zimolezu kamčatského)
- Studium analytických vlastností vybraných pyranoanthokyaninů
- Studium *in vitro* biotransformace vybraných pigmentů střevními a jaterními buňkami
 - provedení biotransformačních experimentů
 - analýza vzniklých metabolitů metodou UHPLC/MS²

4. Experimentální část

4.1 Chemikálie

Standardy flavonoidů (pelargonidin chlorid, kvercetin chlorid, kyanidin-3-galaktosid chlorid, kyanidin-3,5-diglukosid chlorid), všechny p.a., byly zakoupeny u firmy Carl-Roth (Karlsruhe, Německo). Použitý methanol, ethanol, aceton a acetonitril, gradient grade, byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Kyselina chlorovodíková, p.a. byla zakoupena u firmy Lachema (Brno, ČR). Trifluoroctová, mravenčí, octová kyselina a deuterovaný aceton (d_6) byly zakoupeny ve firmě Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Kolona pro frakcionaci barviv byla plněna Sephadexem LH-20 (1400 x 25mm (ID), velikost částic 25-100 μm) (Sigma, USA). Kyselina chlorovodíková p. a. byla zakoupena u firmy Lachema (Brno, ČR). Fosfátový pufr (PBS) byl zakoupen u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

4.2 Příprava extraktů Zimolezu kamčatského

Použité plody zimolezu kamčatského (*Lonicera caerulea var kamtschatica*) byly získány ze sklizně v roce 2006 až 2007 v Lipníku nad Bečvou. Extrakty byly připraveny v Ústavu lékařské biochemie a chemie Univerzity Palackého v Olomouci (1.) a v Laboratoři biotransformací, Mikrobiologického ústavu Akademie Věd České republiky (2.) následujícími postupy:

1. Zmrzlé plody zimolezu (4,84 kg) byly extrahovány vodným roztokem 0,1% kyseliny fosforečné při teplotě 50°C po dobu 14 hodin. Získaný první extrakt byl přečištěn na koloně plněné materiálem Sepabeads SP 207 (styren-divinylbenzenový kopolymer). Kolona byla promyta deionizovanou vodou, fenolické látky byly poté vymyty ethanolem a zkoncentrovány odpařením. Bylo získáno 20,3 g fenolické frakce (označení frakce: LCPF) [39].

2. Plody zimolezu byly po transportu do laboratoře lyofilizovány v argonové atmosféře při -25°C a při této teplotě uskladněny pro další experimenty. Extrahovatelnost složek plodů byla testována extrakcí 4 různými rozpouštědly (methanol, aceton, ethanol, voda). Plody byly před vlastní extrakcí manuálně rozdrceny a kapalná fáze odfiltrována na filtrech Filtrak 388. Získané filtráty byly odpařeny při 40 °C a následně znovu lyofilizovány a uskladněny při -25 °C pro následnou preparativní frakcionaci.

Frakcionace byla provedena s každým surovým extraktem zvlášť. Z lyofilizovaných pevných zbytků po extrakci bylo odváženo určité množství (A-76 mg, B-80 mg, C-78 mg, D-94 mg) a toto množství bylo rozpuštěno v 0,5 ml methanolu (extrakty A, B), ve směsi methanol:aceton, 1:1 (extrakt C) a v deionizované vodě (extrakt D). Extrakty (A-C) byly rozpuštěny a poté nadávkovány na skleněnou kolonu (1400 × 25 mm i.d.) plněnou sorbentem Sephadex LH-20 (Sigma, USA). Jako mobilní fáze byl použit methanol. Mobilní fáze protékala kolonou průtokem 1,45 ml/min (sloupcová chromatografie), jednotlivé frakce byly sbírány po 8 minutách až do vymytí všech barevných podílů z kolony. Eluce kontrolována UV detekcí při 280 nm. Oddělené frakce byly vysušeny pod vakuem a uskladněny při -25 °C pro další analýzu. Pro extrakt D byl volen jiný frakcionační postup. Materiál rozpuštěný ve vodě byl nadávkován na skleněnou kolonu (930 × 25mm i.d.) plněnou Sephadexem LH-20 (Sigma, USA). Jako mobilní fáze byl použit ethanol 80/20 ve vodě (v/v) při

průtoku 0,5 ml/min. Jednotlivé frakce byly sbírány po 16 min až do vymytí všech barevných podílů z kolony. Kontrola eluce byla opět prováděna UV detektorem při 280 nm. Na základě hodnot absorbance při frakcionacích byly vybrány frakce, které byly detailně analyzovány pomocí μ LC/MS.

4.3 Příprava 5-methylpyranopelargonidinu (5-MePPI)

3,21 mg pelargonidin chloridu bylo rozpuštěno v 5 ml směsi acetonu a methanolu (1:1, v/v) okyselené 5% kyselinou mravenčí. Po kompletním rozpuštění pl-chloridu byla reakční směs ponechána v temnu při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin. Rozpouštědlo bylo následně ze vzorku odfoukáno jemným proudem dusíku při 40°C s využitím přístroje TurboVap (Biotage, Charlotte, USA) a získaný materiál byl zamražen pro další experimenty.

4.4 Buněčné linie

Pro *in vitro* metabolizační experimenty byly použity nádorové buněčné linie HepG2 (jaterní) a LS174T (střevní), které byly pořízeny z Evropské kolekce buněčných kultur ECACC (European Collection of Cell Cultures) a poté kultivovány v laboratoři dle doporučení dodavatele. Na buněčné linie HepG2 ($2,5 \times 10^5$ buněk/ml) a LS174T ($1,5 \times 10^5$ buněk/ml) byly nasazeny studované látky (pelargonidin, 5-MePPI a kvercetin) o koncentraci 100 μ mol/l. Jednotlivé kultury byly ponechány v kultivačním inkubátoru při 37°C a v přítomnosti 5% CO₂. 50 μ l média bylo sbíráno v časových intervalech po 1 hodině, 2 hodinách a 24 hodinách kultivace.

Po 24 hodinách kultivace a odebrání zbytku kultivačního média, byly buněčné linie 3 krát promyty pomocí roztoku fosfátového pufru (PBS). Získané buňky byly poté centrifugovány (14000 x g) po dobu 2 minut. Supernatanty byly odebrány a získané pelety (buněčné sedimenty) byly resuspendovány v 200 μ l methanolu okyseleného 5% kyselinou octovou (v/v) a homogenizovány v ultrazvukové lázni chlazené ledem po dobu 30 min pro narušení buněčné membrány a převedení metabolitů do roztoku.

Odebrané vzorky médií byly smíchány s 50 μ l methanolu okyseleného 5% kyselinou octovou (v/v), poté centrifugovány (14000 x g) po dobu 2 minut a získané supernatanty byly analyzovány pomocí UHPLC/MS. Vzorky pelet po destrukci buněčné membrány znovu centrifugovány (14000 x g) po dobu 2 minut a odebrané supernatanty byly analyzovány stejnou metodou, jako vzorky médií odebírané během metabolizace.

Jako kontroly byly použity i) základní roztoky standardů (kvercetin, pelargonidin, 5-MePPI) v kultivačních médiích, ii) médium neobsahující sledované flavonoidy a iii) pelety buněk bez přítomnosti flavonoidů získané při identických experimentálních podmínkách jako reálné vzorky flavonoidů.

4.5 Přístroje a experimentální podmínky

4.5.1 Přístroje a postupy pro chromatografickou prefrakcionaci a následnou μ LC/MS analýzu plodů zimolezu kamčatského

Pro frakcionaci LCPF frakce (příprava viz. experimentální část kapitola 4.2) byl použit semipreparativní chromatograf od firmy Knauer (Berlín, Německo) s UV detekcí. Byla použita kolona Gemini C18 od firmy Phenomenex, USA (150 mm x 10 mm, $d_p=5 \mu$ m). Mobilní fáze A byla tvořena 5% vodným roztokem acetonitrilu okyseleným 0,12 % kys. trifluoroctovou (v/v/v). Mobilní fáze B byla tvořena acetonitrilem okyseleným 0,12 % kys. trifluoroctovou (v/v). Byla použita gradientová eluce s profilem gradientu: 0-15 min 5%

B, 15-25 min 5-10% B, 25-35 min 10-20% B, 35-40 min 20-50% B, 40-55 min 50-100% B, 55-56 min 100-5% B, 56-60 min 5% B, 60-70 min 100% B, průtokem 5 ml/min. Doba analýzy odpovídala 70 min. Dávkováno bylo 100 µl extraktu (řeplňování dávkovací smyčky o velikosti 100 µl, full loop technika). Získané frakce byly lyofilizovány a zamraženy (-80°C) pro následnou analýzu µLC/MS.

LCPF frakce a frakce extraktů získané preparací na koloně plněné Sephadexem LH-20 byly rozpuštěny v mobilní fázi A (deionizovaná voda okyselená 0,12 % kys. trifluoroctovou + 5% acetonitrilu, v/v/v). Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí µLC ve spojení s hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem (Q-TOF, Premier, Waters). Byla použita binární gradientová eluce. Byly použity stejné mobilní fáze jako pro semipreparativní chromatografii. Byl použit následující profil gradientu: 0-5 min 10% B, 5-10 min 10-20%, 10-30 min 20-30% B, 30-40 min 30-50% B, 40-50 min 50-70% B, 50-55 min 70% B, 55-60 min 70-100% B, 60-70 min 100% B, 70-70,5 min 100-10% B, 70,5-75 min 10% B, průtok 5 µl/min. Doba analýzy byla 75 min. Byly nastaveny následující parametry hmotnostního spektrometru: sprejovací napětí +3,2 kV, průtok zmlžovacího plynu 350 l/hod, teplota iontového zdroje 120°C a desolvačního plynu 300°C.

Jednotlivé frakce obsahující strukturně zajímavá barviva byly rovněž analyzovány přímým zaváděním roztoku vzorků do iontového zdroje (průtok 7 µl/min, sprejovací napětí +2,5 kV, průtok zmlžovacího plynu 100 l/hod, teplota iontového zdroje 150°C a desolvačního plynu 150°C).

Procesy probíhající při fragmentaci analytů (5-MePPI a frakcionovaných barviv) po kolizí indukované disociaci byly dále studovány na hmotnostním spektrometru LCQ MAT (Finnigan, San Jose, CA, USA) s ionizací elektrosprejem a analyzátozem typu iontové pasti. Bylo použito přímého zavádění vzorku do iontového zdroje – průtok 10 µl/min, teplota vyhřívání kapiláry 200°C, sprejovací napětí +5,6 kV, průtok zmlžovacího plynu 40 arbitrary units. Nastavení iontové optiky bylo laděno na methanolický roztok malvidin-3-glukosidu (10mg/l). Identifikace barviv byla provedena na základě m/z rodičovského iontu a fragmentace po kolizí indukované disociaci v iontové pasti (MS/MS, normalizovaná kolizní energie 60%).

4.5.2 UHPLC/MS pro analýzu metabolitů flavonoidů

Pro analýzu metabolitů byl použit ultraúčinný kapalinový chromatograf Waters Aquity UPLC (Waters, Milford, USA) s PDA detektorem. Byla použita kolona Aquity BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, $d_p=1,7 \mu\text{m}$, 130Å). Pro stanovení a identifikaci metabolitů byl chromatografický systém připojen k hmotnostnímu spektrometru Q-TOF (Waters) s ionizací elektrosprejem. Ionizace elektrosprejem byly použity jak v pozitivním tak i v negativním módu. Použité mobilní fáze a podmínky pro experimenty UHPLC/MS v pozitivním ionizačním módu byly: složka A – destilovaná voda okyselená 5 % kys. mravenčí (v/v) a složka B – acetonitril okyselený 5 % kys. mravenčí (v/v). Použitý profil gradientu: 0-8 min 95-15% A, 8-9 min 15-95% A, 9-10 min 95% A. Doba analýzy byla 10 min, průtok 0,4 µl/min. Pro negativní ionizační mód: složka A – destilovaná voda okyselená 0,1 % kyselinou octovou (v/v), složka B – acetonitril. Doba analýzy 15 min, použitý profil gradientu: 0-3 min 100% A, 3-10 min 100-50% A, 10-13.5 min 50-100% A, 14-15 min 100% A a průtok 0,4 µl/min. Experimentální parametry hmotnostního spektrometru: sprejovací napětí +3,2 kV (pozitivní mód) a +1,5 kV (negativní mód), průtok zmlžovacího plynu 450 l/hod, teplota iontového zdroje 120°C a desolvačního plynu 150°C. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík a jako kolizní plyn argon. Všechny experimenty MS^E byly provedeny střídáním skenu s malou kolizní energií (MS(1), CE=5eV) a sken při vyšší kolizní energii (MS(2) CE = 40eV nebo při

využití rampy CE = 10 – 40eV) bez preselektce iontů na kvadrupólu. V následných analýzách, pokud to citlivost dovolila, byla proměřena i MS/MS spektra.

4.6 Postupy vyhodnocení

Struktury metabolitů byly navrženy s využitím chemického software CS Chem Draw Ultra (Chemical Structure Drawing Standard, CambridgeSoft Corporation, USA) a programu Metabolyx (Waters Corporation (Milford, USA)).

Výpočet rozdělovacího koeficientu pro anthokyaniny (ClogP) byl proveden pomocí softwaru ChemBioDraw Ultra, (CambridgeSoft Corporation, USA).

5. Výsledky a diskuze

5.1. Studium polyfenolů přítomných v extraktech plodů Zimolezu kamčatského

Předmětem studia byla analýza profilu anthokyaninů a jejich derivátů v přírodním materiálu a to plodech zimolezu kamčatského s podrobnějším zaměřením na kondenzované pigmenty.

5.1.1 Optimalizace extrakčních postupů

Jedním z nejdůležitějších kroků umožňujících získání přírodních látek v čisté podobě nebo jejich obohacení pro účely medicíny, potravinářství, ale i analytické chemie (příprava standardů) je jejich cílená extrakce z rostlinného materiálu. Klíčový je zde výběr extrakčního média [40]. Tabulka 1 ukazuje vliv různých extrakčních činidel na výtěžek extrakce anthokyaninů. Největší obsah anthokyaninů byl získán extrakcí okyseleným methanolem. Tyto výsledky přispívají ke známému faktu, že methanol je v oblasti flavonoidů pro řadu matric nejúčinnějším extrakčním médiem [41,42]. Extrakční účinnost se nepatrně snížila přidáním vody k methanolu. Methanol je však pro lidský organismus nebezpečný a proto jeho využití jako extrakčního činidla v potravinářství či medicíně není žádoucí. Pro tyto účely byl zkoušen také ethanol. Získání anthokyaninů bylo však značně nižší (15% z extrahované části z extrakce okyseleným methanolem). Některé publikace uvádí, že extrakce barviv z rostlinných materiálů je nejúčinnější pomocí acetonu [43,44]. Byly tedy vyzkoušeny i extrakce pomocí acetonu a kombinace acetonu s vodou. Obě možnosti vykazovaly nižší účinnost než při použití methanolu. Na druhou stranu velmi dobrým extrakčním činidlem se jevila směs acetonu a methanolu 50:50. Zde však při kontaktu anthokyaninu s acetonem docházelo ve významném rozsahu ke kondenzační reakci za vzniku 5-methylpyranoanthokyaninů. Tvorba těchto látek je jedním z objektů zájmu této práce.

Množství identifikovaných anthokyaninů extrahovaných okyseleným methanolem je porovnatelné s množstvím nalezeným v extraktu LCPF (relativní rozdíl je 20,2 %, kdy větší množství bylo v extraktu LCPF) [45]. Oba postupy poskytují dobré extrakční účinnosti pro extrakci anthokyaninových barviv z plodů zimolezu kamčatského.

Tabulka 1 – množství anthokyaninů v extraktech plodů zimolezu kamčatského^{a,b}

Anthokyanin	m/z	(50:50)	100%	80%	100%	80%	100%	80%
		meoh:aceton (A)	methanol (B)	methanol (F)	aceton (C)	aceton (G)	ethanol (D)	ethanol (E)
kyanidin-3-hexosid	449	0,117	0,192	0,120	0,024	0,073	0,003	0,017
peonidin-3-hexosid	463	0,018	0,026	0,023	0	0,009	0,002	0,007
pelargonidin-3-hexosid	433	0,002	0,008	0,011	0	0	0	0
kyanidin-3-rutinosid	595	0,012	0,013	0,015	0	0,005	0,002	0,006
peonidin-3-rutinosid	609	0,006	0,008	0	0	0	0	0
kyanidin-3,5-dihexosid	611	0,008	0,007	0	0	0	0,002	0,007
peonidin-3,5-dihexosid	625	0	0	0	0	0	0	~0,0001
Celkem anthokyaninů		0,161	0,253	0,169	0,024	0,088	0,009	0,037
pyranoanthokyanin								
5-MePKy-3-hex	487	0,085	0	0	0	0,013	0	0
5-MePPe -3-hex	501	0,015	0	0	0	0	0	0
Celkem pyranoanthokyaninů		0,1	0	0	0	0,013	0	0
Celkem všech barviv		0,261	0,253	0,169	0,024	0,101	0,009	0,037

Všechny frakce byly měřeny třikrát; relativní směrodatná odchylka byla v rozmezí 0,0 – 13,6%.

a – všechny extrakční činidla obsahují 0.1% (v/v) kyseliny fosforečné

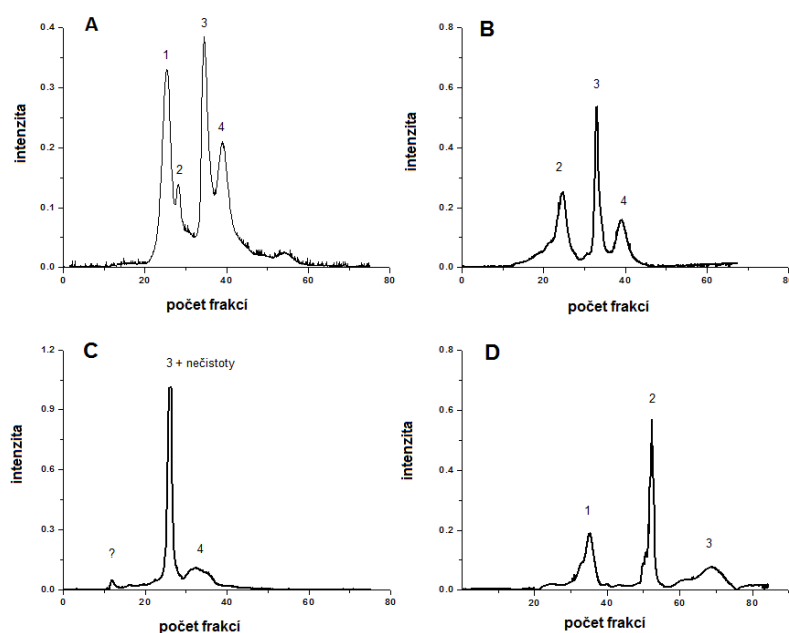
b – množství je udáváno v % (m/m) přepočteno na čerstvé plody

5.1.2 Hodnocení postupů frakcionace extraktů plodů Zimolezu kamčatského

Po izolaci anthokyaninů ze získaného extraktu bylo třeba optimalizovat přečištění (frakcionaci). Pro preparativní část je možno použít několik stacionárních fází: reverzní fázi, Amberlite XAD-7 (neiontový makroporézní polymethakrylátový polymer), Toyopearl gel (hydroxymethakrylátový polymer) nebo Sephadex LH-20 (hydroxypropylovaný dextran) [46,47]. V rámci této studie byly pro účely identifikace a potenciálního využití extraktů v medicíně sledovány možnosti i) preparativní purifikace přítomných polyfenolů na fázi Sephadex LH-20 a ii) dvoustupňové semipreparativní separace založené na kombinaci extrakce tuhými fázemi na polystyren-divinylbenzenovém kopolymeru a separace na reverzní fázi. V následujícím textu jsou diskutovány detaily obou postupů. Pro experimenty diskutované v této práci byl využit Sephadex LH-20. Obrázek 2 popisuje frakcionační proces při použití různých extrakčních činidel (UV detekce, $\lambda = 280$ nm). Při frakcionaci extraktu získaného extrakcí směsí aceton:methanol 50:50 byly získány 4 hlavní frakce (Obr. 2A). První pík obsahuje převážně pyranoanthokyaniny (pík 1). Anthokyaniny se dvěma cukernými jednotkami eluují jako druhý, ne úplně separovaný pík. Anthokyaniny s jednou cukernou jednotkou eluují ve dvou posledních píkách (3 a 4). Zastoupení jednotlivých flavonoidů v získaných frakcích je diskutováno v dalších kapitolách. V chromatogramu methanolickeho extraktu pík s pyranoanthokyaniny prakticky zcela chybí (Obr. 2B). Eluční pořadí je shodné i v extraktech získaných extrakcí směsí aceton:methanol 1:1 (v/v), nicméně zde je pozorováno

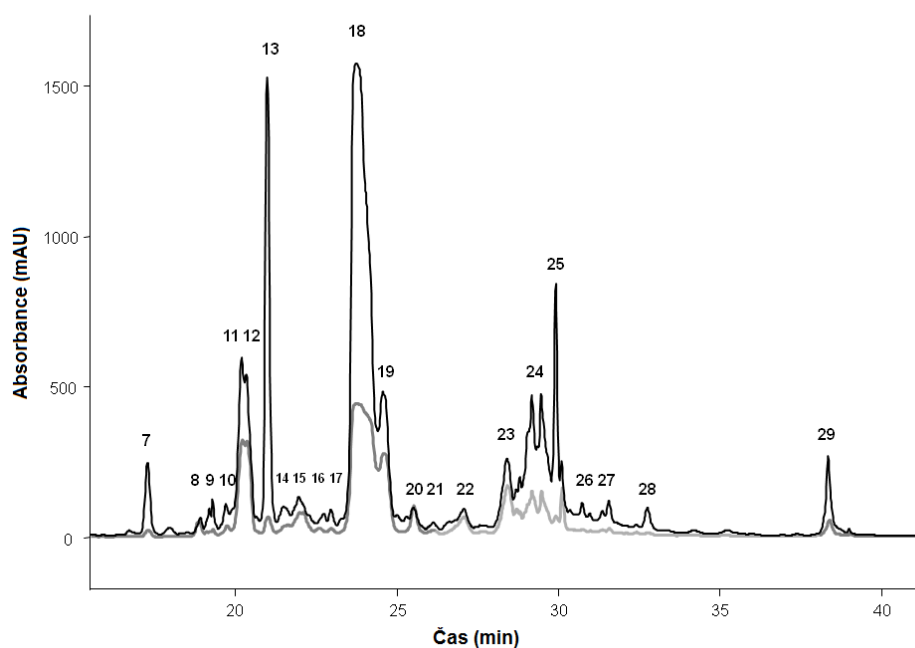
lepší rozlišení píku 3 a 4. Stejně eluční pořadí bylo pozorováno i po frakcionaci acetonového (Obr. 2C) a ethanolového (Obr. 2D) extraktu. Separace látek obsažených v ethanolovém extraktu je horší, a liší se i retenční časy. To může být způsobeno kompresí stacionární fáze během kontaktu s méně polárním rozpouštědlem. Chromatogram s acetonovým extraktem je také komplikovaný přítomností ko-extrahovaných nečistot (pík 3). Z těchto experimentů plynou i dva metodicky významné závěry: i) v použitém semipreparativním uspořádání je separace a chování stacionární fáze silně závislé na rozpouštědle, ve kterém je rozpuštěn vzorek; ii) aceton je rozpouštědlo reagující ve vysokém výtěžku s přítomnými anthokyaniny za tvorby odpovídajících 5-methylpyrano derivátů (jak bude ukázáno dále, vznikají analogické artefakty i při reakci s jinými flavonoidy). Z tohoto pohledu se jeví být použití acetonu pro získání nativních flavonoidů v praxi jako velmi problematické. Výsledky ale na druhou stranu předurčují aceton jako jednoduché činidlo pro syntézu pyranoanthokyaninů (pro účely přípravy standardů a potenciálně pro aplikace v potravinářství a dalších oborech). Separace na obrázku 2 je dosažena při použití čistého methanolu jako mobilní fáze pro extrakty A-C. Pro ethanolové extrakty byla použita mobilní fáze ethanol:voda (80:20, v/v). Toto řešení bylo zvoleno pro výzkum extrahovatelnosti a možností zakoncentrování polyfenolů netoxickým rozpouštědlem (pro potenciální využití ve farmacii a medicíně).

Eluční pořadí a separace anthokyaninových barviv na fázi Sephadex LH20 je zřejmě výsledkem působení více faktorů, zejména hydrofilních interakcí a zvýšené permeace malých molekul do stacionární fáze oproti molekulám větším. V literatuře zatím nebyly popsány podobné experimenty popisující hydrofobicitu anthokyaninů a pyranoanthokyaninů. Nicméně jednoduchým výpočtem rozdělovacích koeficientů (clogP) je možno hydrofilně-lipofilní vlastnosti přibližně aproximovat. Pomocí programu Chem3D byly vypočteny hodnoty clogP 5-MePKy-3-gl, +1,8; Ky-3-gl, 0,0 a Ky-3,5-digl, -1,6. Z těchto hodnot je patrné, že přítomnost 4-kruhu a methylové skupiny u pyranoderivátů tedy vede k výraznému snížení polaritě a můžeme tak vysvětlit kratší eluční čas oproti nativním glykosidům kyanidinu na polární stacionární fázi typu Sephadexu LH-20.



Obr. 2 Chromatogram extraktů zimolezu po frakcionaci na koloně plněné Sephadexem LH-20 (A – směs aceton-methanol; B – metanol; C – aceton; D – ethanol); $\lambda = 280\text{nm}$

Jak bylo již zmíněno výše, reverzní fáze je často používanou stacionární fází pro frakcionaci barviv z rostlinných materiálů. Předmětem naší studie bylo přečištění extraktu zimolezu použitím fáze Sepabeads SP 207 (styren-divinylbenzenový kopolymer, Porapak) (viz. experimentální část kapitola 4.2 LCPF extrakt) pro prepurifikaci a následné použití vysokotlaké semipreparativní frakcionace na reverzní fázi odolné i pro použití nízkých pH mobilních fází. Obrázek 3 ukazuje velmi dobrou separaci jednotlivých barviv při použití těchto frakcionačních podmínek. Získané frakce byly identifikovány metodou μ LC/MS. V případě potřeby byly výsledky identifikace doplněny měřením MS^n spekter po přímé infuzi získaných frakcí do iontového zdroje (hmotnostní spektrometry s analyzátory typu iontové pasti a kombinace kvadrupól-detektor doby letu). Identifikovaná barviva jsou uvedena v tabulce 2.



Obr. 3 Semipreparativní frakcionace LCPF extraktu Lonicery na reverzní fázi (černá - $\lambda = 280$ nm; šedá - $\lambda = 505$ nm). Čísla jednotlivých píků odpovídají frakcím uvedeným v tabulce 2.

5.1.3 Identifikace barviv

Identifikace anthokyaninů byla založena na měření přesné a správné hmotnosti rodičovského iontu a fragmentů v MS a MS/MS spektrech, případně jejich nominálních hodnot ve spektrech vyšších řádů (Tabulka 2). Významnými doplňujícími informacemi byly retenční časy a profil UV/VIS spekter a rovněž informace z dostupné literatury.

Tabulka 2 – identifikovaná anthokyaninová barviva v LCPF

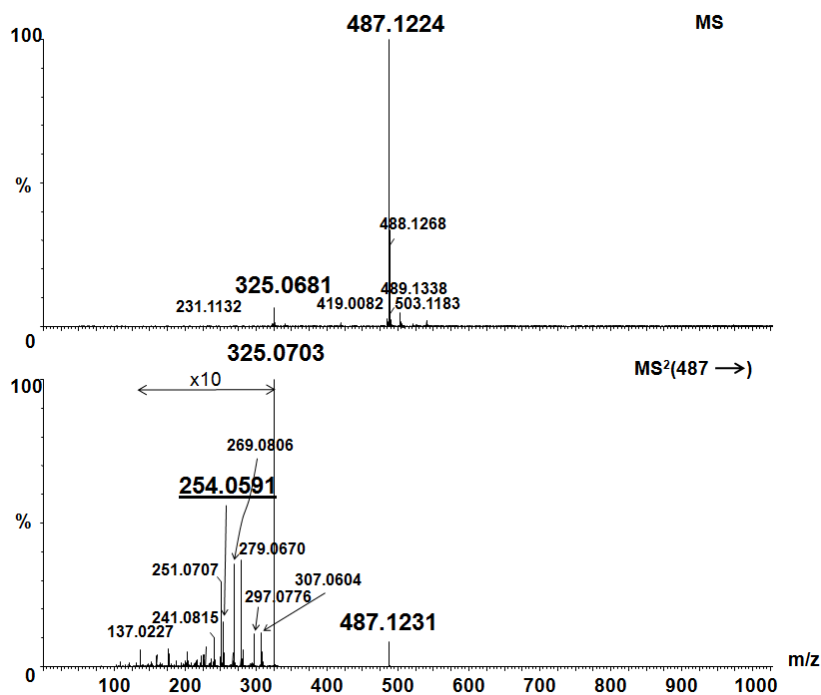
Frakce ^a	MS	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)	MS ²	název
9	611,1553	9,6	449, 287	kyanidin-3,5-dihexosid [45,48]
10	611,1602	1,6	449, 287	kyanidin-3,5-dihexosid [45,48]
	737,1677	5,6	575, 423, 287	kyanidin-3-hexosid(epi)catechin [49]
11	611,1609	0,5	449, 287	kyanidin-3,5-dihexosid [45,48]
12	611,1610	0,3	449, 287	kyanidin-3,5-dihexosid [45,48]
	625,1767	0,3	463, 301	peonidin-3,5-dihexosid [45,49]
13	773,2135	0,6	627, 465, 303	kvercetin-methylpentosid-dihexosid
18	449,1083	0,2	287	kyanidin-3-hexosid [45,49]
	897,2111	2,5	449, 287	dimer kyanidin-3-hexosid
	487,1224	3,3	325	5-methylpyranokyanidin-3-hexosid
	595,1663	0	449, 287	kyanidin-3-rutinosid [45]
19	595,1578	14,2	449, 287	kyanidin-pentosylhexosid ^b [45,49]
23	463,1243	0,6	301	peonidin-3-hexosid [45,49]
	609,1810	0,2	301	peonidin-3-rutinosid [45,48]
	897,2019	7,8	735, 573	dimer kyanidin-3-hexosid
24	765,2038	0,9	603, 475, 313, 287	kyanidin-3-hexosid-vinyl-(epi)catechin
	897,2119	3,3	735,573,287	dimer kyanidin-3-hexosid
	597,1470	2,3	465, 303	kvercetin-pentosid-hexosid
	911,2513	10,6	749, 621, 313, 287	kyanidin-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)catechin
	465,1122	19,1	303	kvercetin-3-hexosid ^b [50]
	595,1540	20,6	449, 287	kyanidin-pentosylhexosid ^b [45,49]
	611,1613	0,2	465, 303	kvercetin-3-rutinosid [50]
25	465,1032	0,2	303	kvercetin-3-hexosid [50]
	611,1613	0,2	465, 303	kvercetin-3-rutinosid [50]

^a číslo frakce odpovídá číslu piku v obrázku 3

^b navrhované struktury

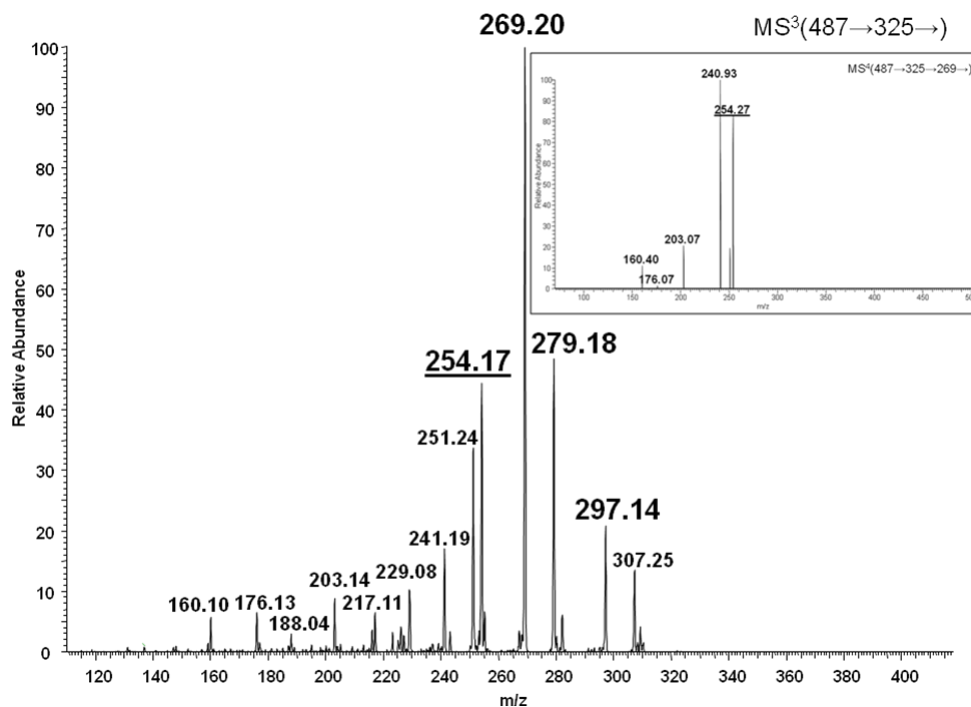
- uvedená čísla v závorkách odpovídají identifikovaným barvivům v literatuře

Z tabulky 2 je patrné, že dominantními barvivy v extraktech zimolezu jsou deriváty kyanidinu, zejména kyanidin-3-hexosid. Mezi nativními anthokyaniny bylo nalezeno i několik odvozených barviv kondenzovaných, jejichž struktura je diskutována v dalším textu. Ve spektru (Obr. 4) byl nalezen intenzivní signál iontu s m/z 487,1224 (extrakt směsi aceton-methanol, 1:1; první frakce, chromatografie na Sephadexu LH-20, Obr. 3).



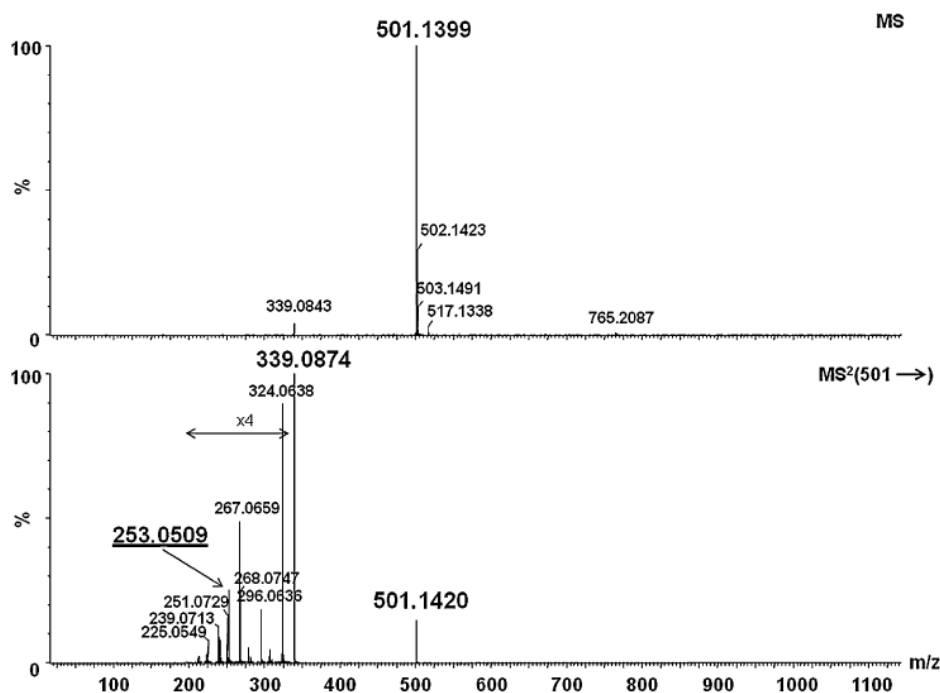
Obr. 4 ESI-MS spektrum (výše) a ESI-MS² spektrum po izolaci m/z hodnoty 5-MePKy-3-hex (níže)

Fragmentací tohoto iontu byl získán ion m/z 325,0703. V kolizním spektru tedy patrná charakteristická neutrální ztráta m/z 162,0528 odpovídající ztrátě cukerné jednotky (dehydratované hexosy). V MS² spektru byly viditelné i další fragmenty odpovídající ztrátě CO (m/z=28) a vody ($\Delta m/z=18$). Na základě těchto informací byla struktura barviva připsána 5-methylpyranokyanidin-3-hexosidu (odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené, $\Delta m = -3,3$ ppm). Navržené fragmentační procesy byly dále ověřovány měřením kolizních spekter vyšších řádů (MSⁿ) s využitím hmotnostního analyzátoru typu iontové pasti (Obr. 5). Byla proměřena spektra MS³ izolace rodičovského iontu, jeho fragmentace, následná izolace fragmentu s m/z 325 (aglykonu) a jeho fragmentace (ve zkráceném zápisu: 487 325 →) a MS⁴ (487 → 325 → 269 →). Během detailního fragmentačního postupu byl u 5-MePKy-3-hex nalezen fragment m/z 254,0591. Tento ion může být popsán ztrátou cukerné jednotky, dvou molekul oxidu uhelnatého s následnou ztrátou methylového radikálu ($\Delta m/z=15$). Odchylka přesné hodnoty m/z tohoto fragmentu měřeném na hmotnostním spektrometru typu Q-TOF od hodnoty teoretické vypočtené pro odpovídající elementární složení (C₁₅H₁₀O₄⁺) je malá $\Delta m=4,7$ ppm, což identitu navrženého fragmentu dále potvrzuje.



Obr. 5 MS³ spektrum a MS⁴ spektrum (vložené) 5-MePKy-3-hex

Dalším nalezeným iontem, který odpovídá 5-methylpyranoanthokyaninu je ion s m/z 501,1401. V prvním fragmentačním kroku lze opět vidět ztrátu cukerné jednotky. Při další fragmentaci aglykonu (MS³) pozorujeme opět ztrátu oxidu uhelnatého a vody a podobně jako u 5-MePKy-3-hex i ztrátu methylové skupiny ($\Delta m/z=15$). Toto barvivo bylo identifikováno jako 5-methylpyranopeonidin-3-hexosid (odchylná nalezená hodnota m/z od vypočtené $\Delta m=0,8$ ppm). Tyto experimenty ukazují ztrátu methylového radikálu, která je charakteristická pro 5-methylpyranoanthokyaniny. Při fragmentaci 5-MePpe-3-hex byl v MS/MS spektru pozorován fragment s m/z 253,0509, který odpovídá odštěpení methylového radikálu z B-kruhu aglykonu (m/z 324,0638), dvěma ztrátám oxidu uhelnatého (m/z 268,0747) a následné ztrátě methylového radikálu (Obr. 6). Tento ion s sebou tedy nese informaci o charakteru B-kruhu (přítomnost jedné methoxyskupiny) a současně informaci o přítomnosti 5-methylpyrano kruhu. Přesnost měření v tomto případě je rovněž velmi dobrá ($\Delta m=3,1$ ppm). Výše popsané experimenty jednoznačně potvrzují přítomnost fragmentační cesty charakteristické pro 5-methylpyranoanthokyaninová barviva, kterou lze využít pro jejich identifikaci v neznámých vzorcích.



Obr. 6 ESI-MS spektrum (výše) a ESI-MS² spektrum (níže) 5-MePpE-3-hex

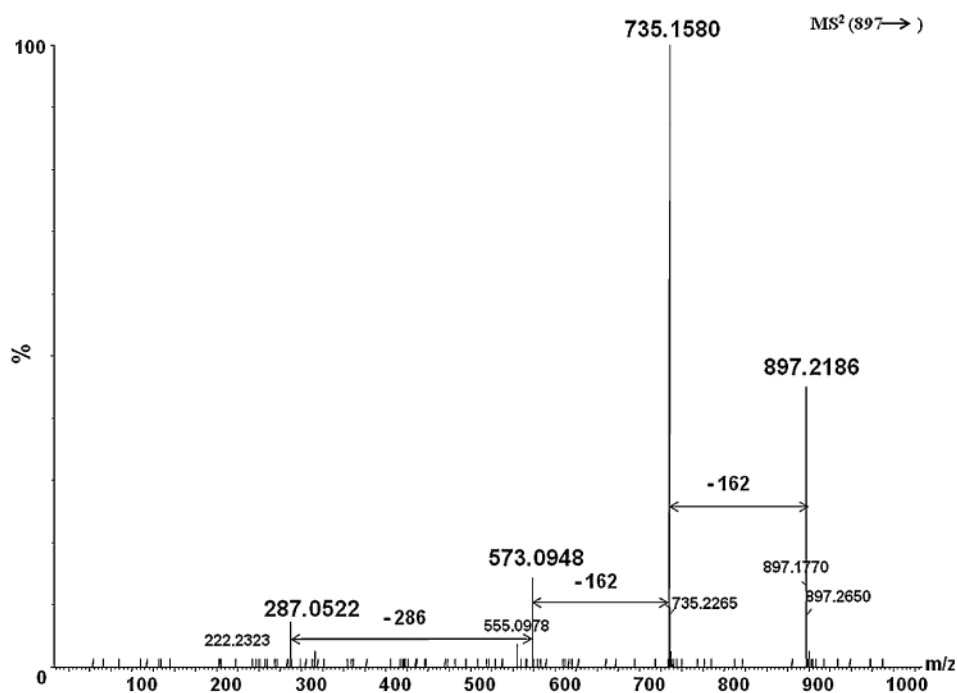
V tabulce 2 je vidět, že 5-methylpyranoderiváty byly nalezeny převážně v extraktech směsí metanol-aceton. Reakce acetonu s některými anthokyaniny byla také popsána v práci autorů Lu a Foo v roce 2001 [51]. Tito autoři popisují přítomnost těchto barviv pouze v roztocích obsahujících aceton. Naše experimenty tato pozorování potvrzují, 5-methylpyranoderiváty byly pouze v extraktech směsí metanol-aceton a aceton-voda. Zajímavé je, že 5-methylpyranoderiváty nebyly nalezeny v extraktech s čistým acetonem. Tento fakt může být vysvětlen tím, že z použité matrice jsou anthokyaniny acetonem extrahovány v relativně nízkém výtěžku a proto je jich jako reaktantů málo dostupných pro následnou cyklizační reakci.

5.1.3.1 Identifikace barviv z frakcionace fenolické frakce zimolezu kamčatského

Další anthokyaninová barviva byla identifikována v extraktu LCPF po frakcionaci na reverzní fázi (Obr. 3). Z tabulky 2 lze vidět, že extrakty zimolezu kamčatského obsahují celou řadu barviv s různou chemickou strukturou. Mezi nimi se vedle pyranoanthokyaninů podařilo identifikovat i můstkové sloučeniny.

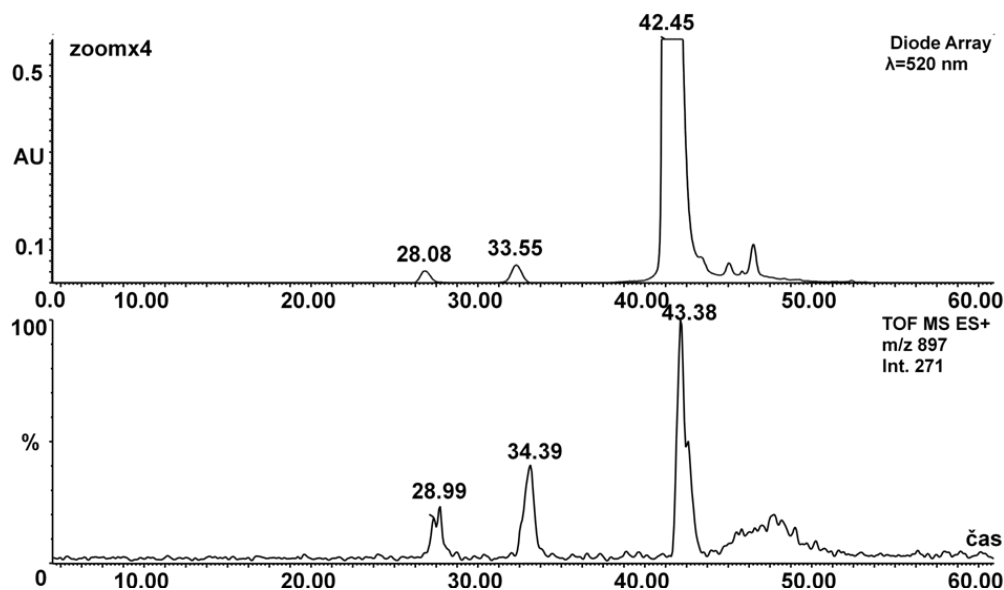
Ve frakci LCPF bylo také nalezeno mnoho derivátů kvercetinů (Obr. 3, Tab. 2) Některé z nalezených a identifikovaných flavonoidů jsou v plodech zimolezu popsány poprvé jako ky-3-hexosid-vinyl-(epi)katechin, ky-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)katechin, kvercetin-methylpentosid-dihexosid a kvercetin-pentosid-hexosid.

Na obrázku 7 je MS² spektrum iontu s m/z 897,2186 získaného přímou infuzí izolované frakce 24 do iontového zdroje (ESI-Q-TOF). Při jeho fragmentaci lze pozorovat neutrální ztráty dvou izolovaných molekul hexosy ($\Delta m/z=162$) a odštěpení neutrálního kyanidinu ($\Delta m/z=286$). Tyto fragmentační procesy ukazují, že nalezená látka je dimer kyanidin-3-hexosidu (odchylky m/z hodnot fragmentů od teoretických hodnot jsou menší než 15 ppm). Ion m/z 897,2089 byl přítomen ve frakci 18, kde byla také nejvyšší koncentrace ky-3-hexosidu. Z toho důvodu by se vznik dimeru dal přisoudit oxidaci v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru.



Obr. 7 MS² spektrum dimeru ky-3-hex získaného přímou infuzí izolované frakce 24 do iontového zdroje (ESI-Q-TOF)

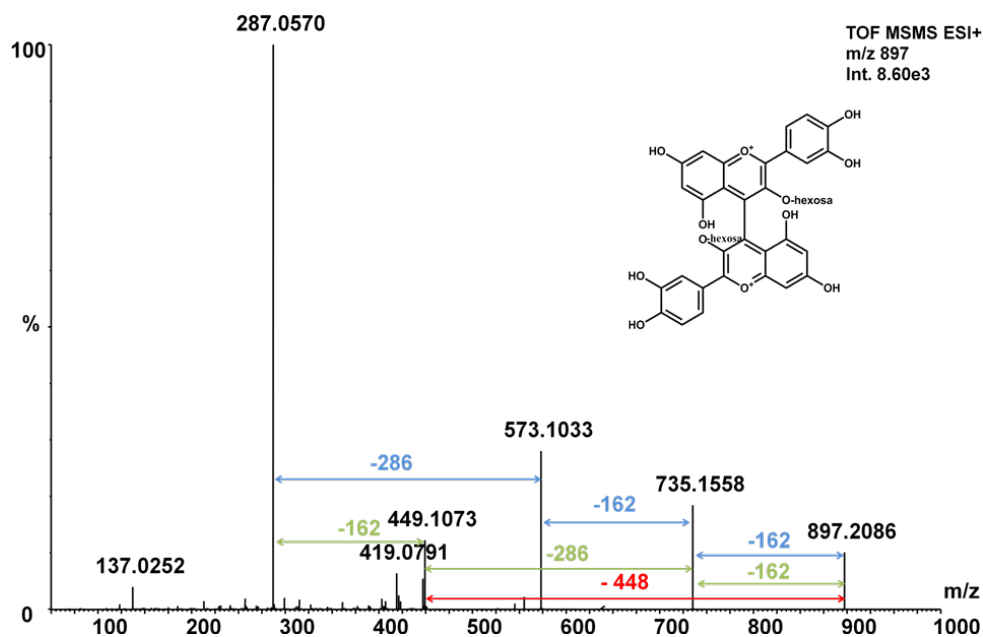
Při podrobné analýze frakce 18 metodou μ LC/MS jsou v chromatogramu rekonstruovaném pro $m/z=897$ však patrné tři chromatografické píky „Obr. 8“. Záznam z UV/VIS DAD detektoru potvrzuje, že přítomné látky jsou barevné. Ve spektru jsou patrna maxima 287 a 527 nm u prvních dvou píku a maxima 280 a 515 nm u třetího píku. Poměr odezvy píku s nejdelším retenčním časem oproti dříve eluujícím barvivům v záznamu při 520 nm je výrazně vyšší než v rekonstruovaném chromatogramu při $m/z=897$. Látka s nejdelším elučním časem je tedy patrně strukturně výrazně odlišná od dvou dříve elujících barviv. Třetí pik má shodný eluční čas i profil píku s ky-3-hexosidem (m/z 449). Tento ion tedy vzniká oxidací v iontovém zdroji. Obě látky eluující v kratších retenčních časech jsou od ky-3-hexosidu velmi dobře chromatograficky separovány a vznikají tedy před vstupem do iontového zdroje (v plodu při jeho vývoji a zrání a/nebo při přípravě a zpracování extraktů).



Obr. 8 chromatogram rekonstruovaný pro $m/z=897$ (níže) a záznam z UV/VIS pro $\lambda=520$ nm

V kolizním spektru iontu m/z 897 (Obr. 9) lze pozorovat následující procesy:

1. postupné neutrální ztráty dvou hexos (m/z 735,1558 a m/z 573,1033) a následné štěpení vazby mezi jednotlivými aglykony (m/z 287,0570)
2. dochází rovnou k přímému štěpení glykosylovaných forem – tedy vznik iontu m/z 449,1073
3. dochází nejprve ke ztrátě jedné hexosy (m/z 735,1558), poté ke štěpení vazby mezi aglykony (m/z 449,1073) a následně k odštěpení druhé hexosy (m/z 287,0570).



Obr. 9 fragmentační spektrum

dimeru cyanidin-3-hexosidu (m/z 897) – přímý nástřik ESI-Q-TOF

Z tabulky 2 a „Obr. 3“ můžeme vidět výskyt tohoto pigmentu ve frakcích 18 a 23 a 24. Ve frakci 18 poskytuje po fragmentaci tato látka pouze fragmenty o m/z 449 a 287. Naopak frakce 23 a 24 poskytuje ionty s m/z 735, 573 a 287 „Tab. 2“.

Můžeme tak usuzovat, že se tento dimer ky-3-hexosidu vyskytuje minimálně ve dvou rozdílných strukturách, které mají stejný sumární vzorec, jsou složeny ze dvou molekul kyanidinu a dvou hexosových jednotek avšak jejich prostorové uspořádání je natolik odlišné, že umožňuje chromatografickou separaci na reverzní fázi.

Výše uvedené výsledky lze shrnout následujícím způsobem. Extrakty plodů zimolezu kamčatského obsahují nativní anthokyanivá barviva (zejm. hexosidy, dihexosidy a rutinoidy kyanidinu a peonidinu), podle použitého extrakčního činidla v různých výtěžcích odpovídající 5-methylpyranoanthokyaniny (5-methylpyrano deriváty kyanidin a peonidin 3-hexosidů) a dimery (zejména kyanidin-3-hexosidu), ale také složitější pigmenty, z nichž zejména zajímavé látky jsou můstkové sloučeniny - kyanidin-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)katechin a kyanidin-3-hexosid-vinyl(epi)katechin.

Kondenzovaná anthokyaninová barviva jsou zajímavou a obecně relativně málo prostudovanou skupinou derivátů flavonoidů. Vzhledem k jejich výskytu v rostlinných extraktech a potažmo v lidské stravě a možnému využití ve farmacii je velmi důležitá znalost jejich osudu v lidském organismu. Ten bude jistě předmětem řady komplexních studií. Následující kapitola se snaží přispět k tomuto výzkumu poznatky o *in vitro* metabolizaci jednoduchého 5-methylpyranoanthokyaninu.

5.2 Biotransformace flavonoidů

Studium biotransformačních pochodů flavonoidů v lidském těle je předmětem dlouhodobého zájmu již více než 30 let [52-54]. Experimenty *in vivo* poukazují na důležitost centrálního koloběhu v živočišném organismu. Na samotném metabolismu flavonoidních látek se podílí játra, ledviny, tenké i tlusté střevo ale i další tkáně. V lidském těle tak dochází k systematické cirkulaci látek a jejich následnému vyloučení z organismu v podobě moči, stolice, potu či jiných exkretů [29]. Na druhé straně k detailnímu poznání samotného metabolického pochodu je třeba experimenty cíleně separovat a lokalizovat na určité tkáně, respektive buněčné linie. Pro naše *in vitro* experimenty byly vybrány lidské buněčné linie jaterní HepG2 a střevní LS174T. Experimenty porovnávající metabolismus flavonoidů na buněčných jaterních HepG2 a střevních LS174T liniích nebyly doposud v literatuře popsány. Jejich detailní popis, může přispět k pochopení metabolismu flavonoidů v lidském těle a tedy i účinku stravy a užívání potravinových doplňků a přírodních léčiv na lidský organismus.

Jeden z nejdiskutovanějších flavonoidů v literatuře je kvercetin. Jeho vlastnosti i metabolismus je detailně popsán v literatuře [32,34,55,56]. Tuto látku jsme tedy zvolili jako standard pro porovnání s metabolizací dalších flavonoidních látek. Jako modelová látka byl použit anthokyanin pelargonidin. Pro studium vlastností pyranoanthokyaninů byl jako jejich zástupce použit 5-MePPI.

V následujících kapitolách jsou zevrubně diskutovány analytické vlastnosti 5-MePPI, jehož metabolismus byl dále studován (zejména s ohledem na procesy probíhající po kolizi indukované disociaci v kolizní cele tandemového hmotnostního spektrometru), příprava a provedení metabolické studie a analýza metabolizovaných vzorků technikou UHPLC/MS².

5.2.2 Metabolické experimenty vybraných flavonoidů *in vitro* pomocí jaterních buněčných linií HepG2

Testované látky flavonoidů byly nasazeny na jaterní buněčné linie a za specifických podmínek byly zpracovány (viz. experimentální část kapitola 4.4). Získané vzorky metabolitů byly dále analyzovány pomocí UHPLC/MS. Nalezené a identifikované metabolity kvercetinu pomocí HePG2 jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 – metabolity kvercetinu v buněčných liniích HepG2 (měřeno v buněčných sedimentech; pozitivní mód; 24 hod metabolizace)

Metabolické biotransformační pochody kvercetinu (pozitivní mód)	t_R	Naměřená přesná hmota m/z	Odchylna nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)	Získané ionty při CID experimentech / intenzita	Odchylna nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)
Methylace	7,30	317,0631	9,5	317,0703/27	13,2
				303,0535/11	9,9
				153,0205/6	11,1
Hydroxylace	5,69	319,0426	-8,8	319,0451/37	-0,9
				303,0514/8	3,0
				273,0420/5	7,7
				245,0440/11	-4,1
				153,0211/17	15,0
Glukuronidace	4,88	479,0838	2,5	303,0507/60	0,6
	5,46	479,0832	1,3	153,0212/6	15,7
				303,0510/64	1,6
			153,0213/5	16,3	
Glukosidace	4,89	465,1013	5,7	303,0520/55	4,9
	5,36 (n.r.)	465,1076	9,2	153,0203/7	9,8
				465,1091/6	12,5
				303,0541/24	11,9
	5,59	465,1083	12,3	153,0195/5	4,6
				465,1047/7	3,0
			303,0534/27	9,6	
			153,0202/5	9,1	

n.r. – pík není dokonale rozdělen od ostatních izomerů

Výsledky uvedené v tabulce potvrzují, že buňky metabolizující kvercetin a v paralelních experimentech i pelargonidin a 5-MePPI byly živé a metabolicky aktivní. Byl nalezen hydroxylovaný metabolit jako běžný zástupce metabolitů první fáze také řada metabolitů druhé fáze jako methyl deriváty, glukuronidy i glukosidy. Všechny tyto metabolické procesy kvercetinu již byly dříve popsány v literatuře [34,57,58]. Některé izomery kvercetin-glukuronidu a kvercetin-glukosidu se podařilo s použitím navržené metodiky chromatograficky separovat. Přítomnost glykosidů kvercetinu jako metabolických produktů u lidských jaterních buněčných linií nebyla v literatuře doposud popsána.

Biotransformační experimenty s pelargonidinem a 5-MePPI byly provedeny paralelně s experimenty s kvercetinem (ve stejnou dobu, s použitím stejných chemikálií, buněk i prostředí). V získaných metabolizovaných vzorcích pelargonidinu a 5-MePPI nebyly nalezeny metabolity (jejich obsah byl pod limitem detekce použité metodiky). Z toho lze usoudit, že tyto látky jsou jaterními buňkami metabolizovány výrazně méně ochotně/pomaleji, než kvercetin. Pro další experimenty byly použity střevní buňky LS174T.

5.2.3 Metabolické experimenty vybraných flavonoidů *in vitro* pomocí střevních buněčných linií LS174T

Experimenty s buněčnými liniemi LS174T byly provedeny za identických experimentálních podmínek jako u jaterních buněk HepG2 s použitím selektivního kultivačního média pro LS174T buněčné linie.

Metabolity získané při experimentech se střevními buňkami LS174T jsou uvedeny v tabulce 4 (analýza buněčných pelet). Nejvíce biotransformačních pochodů a zároveň i největší počet nalezených metabolitů bylo nalezeno u kvercetinu. Byly pozorovány stejné metabolické pochody jako u experimentů s jaterními buňkami

HepG2, avšak s většími obsahy identifikovaných metabolitů (hydroxylace, metylace, glukuronidace i glukosidace).

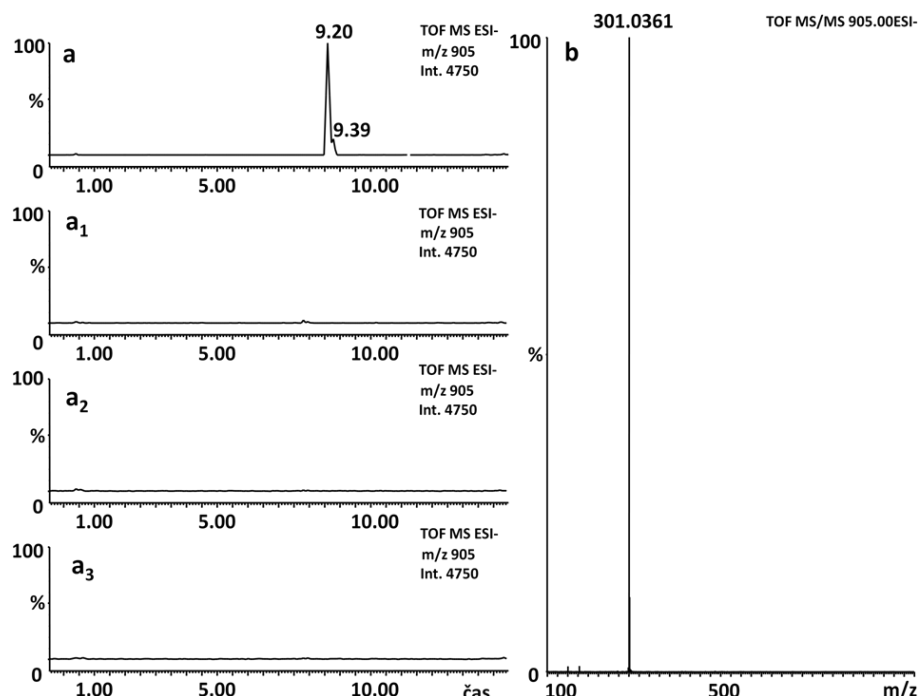
Tabulka 4 – Metabolity kvercetinu, pelargonidinu a 5-MePPI v buněčných liniích LS174T (měřeno v buněčných sedimentech; pozitivní mód i negativní mód; 24 hod metabolizace)

Metabolické biotransformační pochody studovaných flavonoidů (pozitivní mód)	t _R	Naměřená přesná hmota m/z	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)	Získané ionty při CID experimentech / intenzita	Odchylka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)				
KVERCETIN									
Methylace	5,10	317,0701	12,6	257,0433/7	-6,6				
				217,0492/22	-4,1				
				153,0195/25	4,6				
Hydroxylace	3,70	319,0474	6,3	245,0436/8	-5,7				
				217,0489/15	-5,5				
				153,0168/51	-13,1				
	4,35	319,0472	5,6	245,0424/4	-10,6				
				227,0301/25	-18,9				
199,0364/6	-15,5								
171,0421/23	-14,6								
Glukuronidace	3,13	479,0841	3,1	303,0492/435	-4,3				
	3,57	479,0834	1,7	303,0495/77	-3,3				
	3,70	479,0801	-5,2	303,0497/245	-2,6				
Glukosidace	3,08	465,1026	-1,5	303,0486/266	-6,3				
	3,63	465,1049	3,4	303,0491/167	-4,6				
	3,83	465,0997	-7,7	303,0469/99	-11,9				
Dimer kvercetinu*	4,35	605,0893	-6,3	605,0913/1098	-3,0				
				303,0524/77074	6,3				
				153,0179/6841	-5,9				
Trimer kvercetinu*	4,35	907,1302	-6,2	907,1350/1350	-0,9				
				605,0910/1020	-3,1				
				303,0521/71122	6,2				
				153,0177/5859	-6,0				
Neidentifikovaný metabolit*	4,97	287,0543	-4,5	287,0581/546	8,7				
				259,0586/63	-7,7				
				153,0207/226	12,4				
PELARGONIDIN									
Hydroxylace*	4,24	287,0640	13,3	259,0665/23	22,8				
				241,0573/21	29,8				
Glukuronidace*	5,45	447,1710	12,6	447,1708/35	11,8				
				271,0675/262	25,4				
5-METHYLPYRANOPELARGONIDIN									
Hydroxylace	3,65	325,0679	-10,2	325,0675/13	-11,4				
				209,0620/5	8,1				
Glukuronidace*	4,71	485,1095	2,3	485,1010/8	-15,3				
				309,1523/2	> 100				
	4,79	485,1089	1,0	485,1020/40	-13,2				
				309,0809/114	-14,9				
	4,87	485,1102	3,7	485,1046/93	-7,8				
5,02	485,1072	-2,4	309,0810/205	-15,2					
			485,1052/8	-6,6					
			309,0803/57	-12,9					
Glukosidace*	6,5	471,1625	6,4	-	-				
Hydroxylace+methylace	4,1	339,0830	-11,5	339,0875/41	1,8				
				324,0631/44	-0,9				
				296,0722/924	12,5				
				267,0718/350	22,8				
				253,0541/352	15,8				
				241,0546/258	18,7				
				225,0589/155	16,4				
				197,0598/120	-2,5				
				169,0688/41	20,7				
				141,0724/53	14,2				
				2xhydroxylace+2xmethylace	2,85	369,0916	15	281,0703/3	-39,5
								221,9661/9	-
193,0544/24	-								
4,12	369,0952	-6,0	149,0315/9		11,5				
			353,0563/17		27,8				
			323,0634/24		24,1				
295,0603/9	-1,0								
281,0582/7	9,6								
251,0705/14	-								
241,0520/33	7,8								
181,0582/8	8,1								

Metabolické biotransformační pochody studovaných flavonoidů (negativní mód)	t _R	Naměřená přesná hmota m/z	Odchyłka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)	Získané ionty při CID experimentech / intenzita	Odchyłka nalezené hodnoty m/z od vypočtené (ppm)
KVERCETIN					
Methylace *	10,1	315,0531	8,3	315,0521/487 301,0365/4699 285,0365/6609 151,0044/6473	5,1 5,6 -11,9 8,6
Hydroxylace *	8,09	317,0334	11,7	317,0308/68 151,0051/115	3,5 13,2
	8,45	317,0331	10,7	317,0320/162 151,0045/54	7,3 6,5
	9,24	317,0345	15,1	317,0349/2242 301,0371/1795 151,0038/3243	16,4 7,6 4,6
Glukuronidace*	7,79	477,0662	-1,5	301,0369/1946 151,0046/837	7,0 9,9
	8,41	477,0702	6,9	301,0356/1303 151,0042/624	5,3 6,2
	8,59	477,0681	2,5	301,0366/40248 151,0366/16101	6,0 3,3
Glukosidace*	7,61	463,0898	4,5	463,0890/251 301,0364/1576 151,0044/482	2,8 5,3 8,6
	8,22	463,0883	1,3	463,088/244 301,0350/1720	2,4 0,6
	8,41	463,0898	4,5	463,0893/275 301,0361/1662	3,5 4,3
Dimer kvercetinu	9,24	603,0789	2,3	301,0351/2296	1,0
Trimer kvercetinu	9,20	905,1212	1,2	301,0361/3196	4,3
Neidentifikovatelný metabolit	9,96	285,0531	-13,3	285,0414/41 267,0308/7 239,0378/32 227,0378/34	5,3 5,6 14,2 15,0
PELARGONIDIN					
Hydroxylace*	9,10	285,0403	1,4	241,0523/1250 195,0464/1593	9,1 9,2
Glukuronidace*	8,7	445,0791	4,5	445,0795/112 269,0483/430	5,4 12,2
5-METHYLPYRANOPELARGONIDIN					
Hydroxylace	7,52	323,0591	10,8	323,0570/25 305,0432/243 277,0489/9 261,0511/97 187,0432/682	-19,8 -5,9 -4,3 -15,7 -
Glukuronidace*	7,95	483,1164	-16,1	483,0890/429 307,0631/3586	-7,7 9,1
Glukosidace*	6,94	469,1235	10,2	469,1125/207 307,0642/647	-2,1 12,7
Hydroxylace+methylace	7,88	337,0748	16,1	337,0738/5 322,0478/109 294,0564/50 279,0248/18 139,0581/3	7,1 0,3 12,2 -16,1 23,7
2hydroxylace+2methylace	7,23	367,0798	-12,5	367,0768/5 352,0558/17 349,0691/7 191,0421/70	-13,6 -7,1 -6,0 -
	8,05	367,0873	15,5	367,0764/4 352,0538/12 321,0731/15 239,0299/4	-14,7 -12,8 -10,0 -18,8

* data z MS(2) skenu (MS^F experiment)

Mezi metabolity byly identifikovány i dva relativně výrazné píky s m/z 905,1212 (ionizace negativními potenciály, $[M-H]^-$). Tyto píky jsou svými retenčními časy velmi blízko kvercetinu (t_R 9,20 a 9,39 min) Obr. 10a.



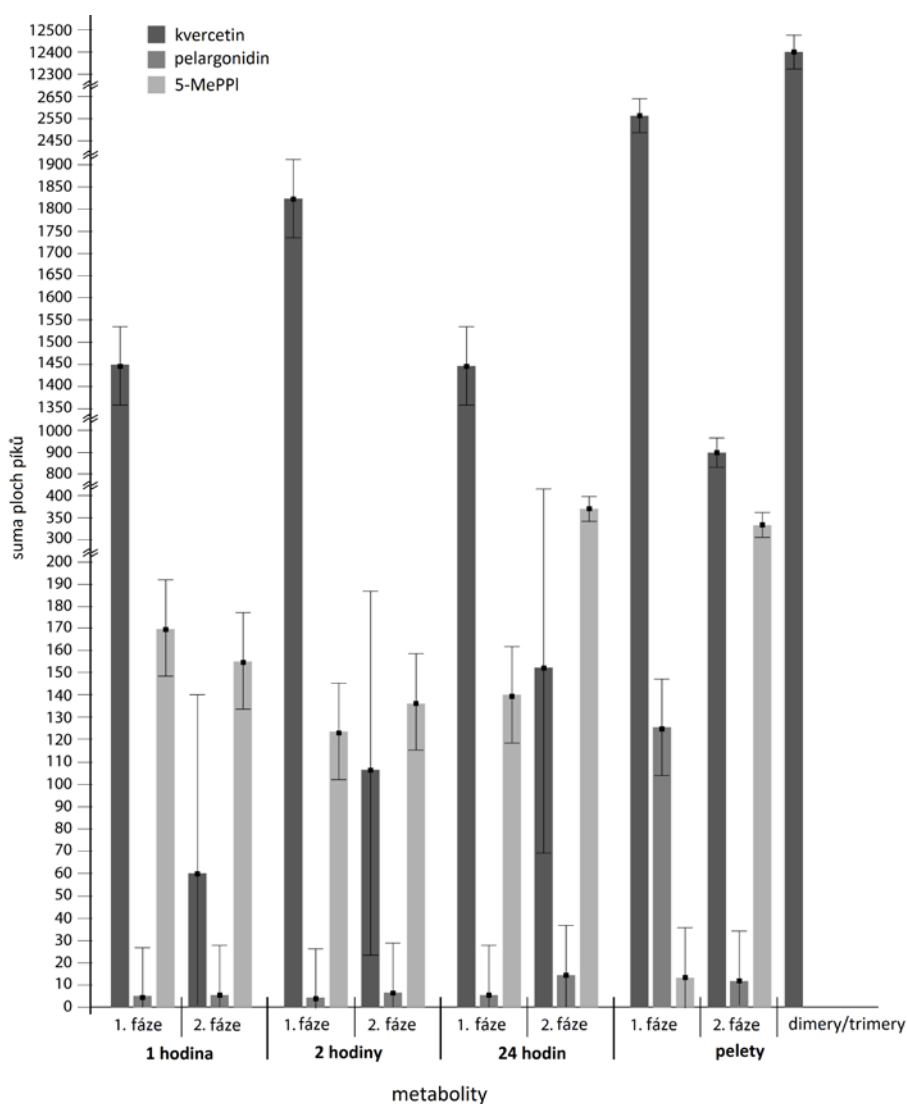
Obr. 10 Rekonstruovaný chromatogram metabolitu m/z 905,1212 (a) a jeho MS/MS spektrum (b); (LS174T buněčné linie, negativní mód); (a) rekonstruovaný chromatogram extraktu z buněčných peletů v přítomnosti kvercetinu, (a₁) rekonstruovaný chromatogram extraktu z buněčných peletů bez přítomnosti kvercetinu, (a₂) rekonstruovaný chromatogram kultivačního média bez přítomnosti kvercetinu, (a₃) rekonstruovaných chromatogram kultivačního média s kvercetinem bez kontaktu s buněčnými liniemi.

V MS/MS spektru při fragmentaci tohoto iontu je patrný fragment s hodnotou m/z 301,0361 (Obr. 10b). Tento fragment odpovídá s přesností 4,3 ppm elementárnímu složení kvercetinu. Přítomnost této látky by mohla být odůvodněna kondenzací kvercetinu v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru. Nicméně u všech experimentů byly při stejných podmínkách a současně (paralelně) připraveny a analyzovány kontrolní vzorky (1 – extrakt z pelet buněk bez přítomnosti flavonoidů, 2 – médium v kontaktu s buněčnými liniemi bez přítomnosti flavonoidů, 3 – kvercetin smíchaný s kultivačním médiem bez přítomnosti buněčných linií) a látka s m/z 905 nebyla přítomna v žádném z kontrolních vzorků (v odpovídajících rekonstruovaných chromatogramech) (Obr. 10a₁₋₃). Absence těchto iontů v kontrolních vzorcích potvrzuje vznik trimeru kvercetinu během metabolizace. Podobně ale s nižší intenzitou byl nalezen ion m/z 603,0789, který odpovídá dimeru kvercetinu. Přítomnost dimeru a trimeru kvercetinu byla potvrzena pouze v peletech buněk. Možným vysvětlením je omezená schopnost penetrace těchto látek přes buněčnou membránu vzhledem k jejich velikosti. Nicméně možnosti a způsob vzniku jak dimeru a trimeru kvercetinu během metabolismu je předmětem dalšího studia. Vznik vzájemná kondenzace

flavonoidů během *in vitro* experimentů na lidských buněčných liniích LS174T nebyla v literatuře doposud popsána.

Během biotransformačních experimentů s pelargonidinem provedených paralelně s kvercetinem bylo nalezeno jen velmi malé množství metabolitů. Jak je uvedeno v tabulce 4, pro pelargonidin byla pozorována pouze hydroxylace a glukuronidace.

Přítomnost dalšího kruhu v molekule 5-MePPI způsobila značné zvýšení produkce metabolitů oproti pelargonidinu (Obr. 11). Poměr celkové sumy metabolitů k rodičovskému iontu 5-MePPI byl přibližně 10x větší oproti pelargonidinu (vypočteno z ploch píků).



Obr. 11 Profil metabolitů testovaných flavonoidů I a II fáze produkovaných buněčnými liniemi LS174T v médiu a v peletech v průběhu metabolizačního experimentu

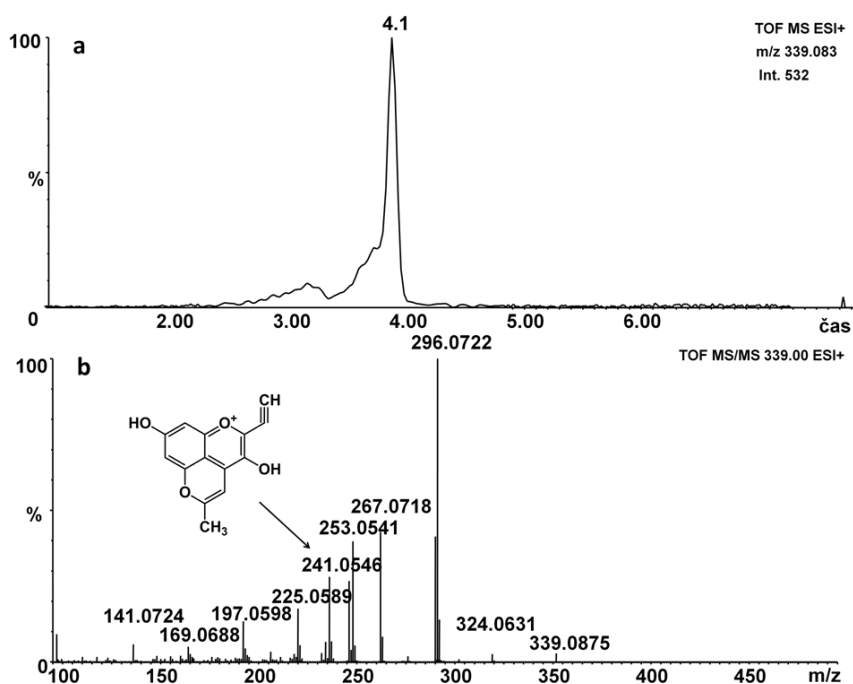
Obrázek 11 znázorňuje profil metabolitů během celé fáze biotransformace na buněčných liniích LS174T (1, 2, 24 hod, suma píků). Největší množství metabolitů I. fáze bylo pozorováno u kvercetin (hydroxylace). Samotné maximum bylo dosaženo po dvou hodinách biotransformace flavonoidu. Celkové množství metabolitů II. fáze (suma píků) je nižší. Maximum produkce metabolitů druhé fáze bylo dosaženo po 24 hodinách biotransformace. Časový rozdíl mezi maximy tvorby metabolitů I. a II. fáze je logická – konjugální metabolická fáze přichází obvykle až po I. fázi. Překvapivý je vznik dimerů/trimerů, které byly akumulovány v peletech buněk po 24 hodinách biotransformačních pochodů.

Složení metabolitů 5-MePPI I. i II. fáze je po 1 i 2 hodině srovnatelné. Pro metabolity II. fáze je však pozorován značný nárůst po 24 hodinách. Množství vzniklých metabolitů II. fáze po 24 hodinách je u 5-MePPI dokonce vyšší než u kvercetin. V peletech buněk je obsah metabolitů II. fáze pro 5-MePPI také výrazně vyšší než obsah metabolitů I. fáze.

Celkové množství vzniklých metabolitů je nejmenší pro pelargonidin v porovnání s dalšími studovanými flavonoidy. Nicméně je vidět stejný posun nástupu metabolitů II. fáze jako u ostatních flavonoidů.

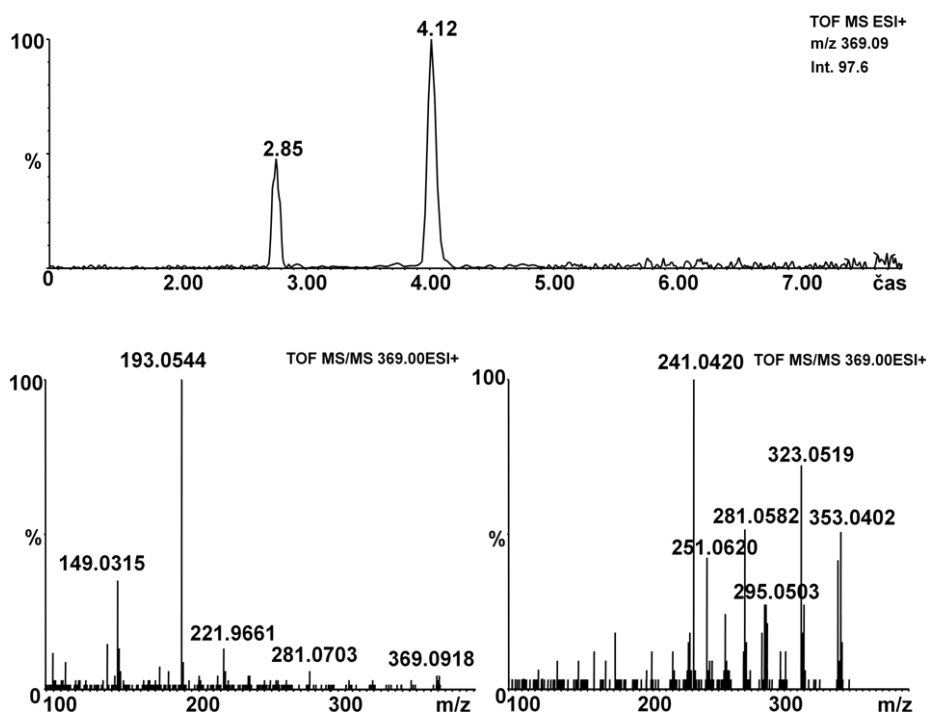
Zajímavá je výrazná akumulace metabolitů v buněčných peletech. Pelargonidin, podobně jako kvercetin akumuluje v buňkách více metabolitů I. fáze. U 5-MePPI je tomu přesně naopak. Přítomnost čtvrtého kruhu v molekule má výrazný vliv na metabolismus v buňkách. Vypočtené rozdělovací koeficienty (clogPs) pro neutrální formy kvercetin, pelargonidinu a 5-MePPI jsou 1,504, 1,523 a 2,959. 5-MePPI je mnohem více hydrofobní molekulou než pelargonidin a kvercetin. Hydrofobicita by tak mohla být jedním s parametrů mající vliv na biotransformační procesy v buňkách.

Detailní seznam všech nalezených metabolitů 5-MePPI je uveden v tabulce 4. Mezi nimi jsou i základní metabolické procesy jako hydroxylace a glukuronidace. 5-MePPI metabolizuje z hlediska druhu produkovaných metabolitů podobně jako kvercetin. Byly zde však navíc nalezeny dva složitější metabolity.



Obr. 12 Rekonstruovaný chromatogram monometylovaného metabolitu 5-MePPI (a) a jeho MS/MS spektrum (b)

Obrázek 12a znázorňuje rekonstruovaný chromatogram mono-hydroxylovaného-monometylovaného metabolitu 5-MePPI (m/z 339,0830). V jeho MS/MS spektru je pak vidět charakteristická ztráta methylového radikálu za vzniku fragmentu m/z 324,0631 a dále dvě následné ztráty oxidu uhelnatého ($\Delta m/z=28$). Fragment m/z 241,0456 lze vysvětlit probíhajícím Retro-Diels-Alderovým štěpením (RDA) na kruhu B (struktura vložená v Obr. 27b). Tento fragment dovoluje blíže určit pozici hydroxylace a methylace – oba procesy probíhají na B-kruhu tohoto metabolitu. Dále je ještě viditelná následná ztráta CO a vody za vzniku iontu m/z 197,0598. Dalším pozorovaným metabolitem byl dvakrát hydroxylovaný a dvakrát methylovaný metabolit 5-MePPI (m/z 369,0916 a m/z 369,0952) (Obr. 13). U tohoto metabolitu byly pozorovány dva separované izomery. V MS/MS spektru intenzivnějšího izomeru ($t_R = 4,12$ min) jsou viditelné ztráty methylových radikálů, methanu, CO i vody. Dominantním fragmentem je m/z 241,0420, který je shodný s fragmentem pozorovaným u mono-hydroxylovaného-monometylovaného metabolitu 5-MePPI. Tento fragment rovněž vzniká RDA štěpením B-kruhu. Tento metabolit je tedy rovněž hydroxylován a methylován na B-kruhu. Tento závěr navíc podporuje přítomnost fragmentu m/z 181,0582 odpovídající $^{0,2}B_0$ RDA fragmentu (vzniku acyliového iontu odvozeného z kyseliny syringové).



Obr. 13 Rekonstruovaný chromatogram dvakrát hydroxylovaného a dvakrát methylovaného metabolitu 5-MePPI (a) a MS/MS spektra dvou přítomných izomerů (b)

Fragmentační cesta prvního (méně intenzivnějšího) izomeru ($t_R = 2,86$ min) je odlišná. Ion m/z 149,0315 může být vysvětlen rozštěpením heterocyklického C-kruhu 5-MePPI a vznikem $^{0,3}B_0$ RDA fragmentu. Toto potvrzuje, že hydroxylace a methylace probíhá na A nebo D kruhu 5-MePPI.

Studium *in vitro* biotransformace pelargonidinu, 5-MePPI a kvercetinů bylo provedeno na modelových jaterních HepG2 a střevních LS174T buněčných liniích. Výrazně vyšší metabolickou aktivitu jevíly střevní

buněčné linie LS174T. Přítomnost induktorů RIF a TCCD neměla výraznější vliv na biotransformaci. V případě kvercetinu byly nalezeny základní metabolické pochody I. a II. fáze, které potvrdily metabolickou funkci testovaných buněčných linií. Zajímavostí a do budoucna i předmět dalších studií je nález dimerů a trimerů kvercetinu v buněčných peletech LS174T. Studované anthokyaniny pelargonidin a 5-MePPI vykazovaly nižší metabolickou aktivitu v porovnání s kvercetinem. Biotransformační cesta 5-MePPI je vzhledem k identifikovaným metabolitům odlišná od pelargonidinu i kvercetinu. Tento fakt může být způsobem přítomností pyrano kruhu a také vyšší hydrofobicitou v porovnání ostatními studovanými flavonoidy.

6. Závěr

Předmětem disertační práce bylo studium flavonoidů a produktů jejich biotransformace. V první část byla věnována extrakci plodů zimolezů a identifikaci anthokyaninových barviv. Jako nejvhodnější extrakční činidlo pro extrakci flavonoidů z plodů zimolezu z hlediska výtěžku se jeví methanol. Při extrakci směsí methanol-aceton vznikají pyranoanthokyaninová barviva. V získaných extraktech byly identifikována základní anthokyanivá barviva (zejm. hexosidy, dihexosidy a rutinosidy kyanidinu a peonidinu), ale také složitější barviva: 5-methylpyranoanthokyaniny (5-methylpyrano deriváty kyanidinu a peonidinu 3-hexosidů), dimery (zejména kyanidin-3-hexosidu) a kondezované pigmenty jako kyanidin-methylpentosid-hexosid-vinyl-(epi)katechin a kyanidin-3-hexosid-vinyl(epi)katechin.

Další část byla věnována studiu metabolismu flavonoidů. Pomocí *in vitro* studií na lidských jaterních (HepG2) a střevních (LS174T) buněčných liniích byly testovány 3 zástupci flavonoidů – kvercetin jako modelová dobře prostudovaná látka, pelargonidin – zástupce anthokyaninových barviv a 5-MePPI jako odpovídající 5-methylpyranoanthokyanin. U kvercetinu byly nalezeny běžné metabolity I. i II. fáze, ale i složitější metabolity jako dimery a trimery. Studium procesů probíhajících při *in vitro* biotransformaci pelargonidinu a 5-methylpyranopelargonidinu na lidských jaterních (HepG2) a střevních (LS174T) buněčných liniích přispívá k porozumění rozdílům mezi osudem nativních anthokyaninů a složitějších barviv (vznikajících v plodech a z nich vyráběných potravin a potravinových doplňků) v lidském organismu. Řada metabolitů vzniká v několika chromatograficky separovaných izomerních formách, což potvrzuje přítomnost několika center v molekulách flavonoidů umožňujících metabolizaci. Mezi metabolity 5-methylpyranopelargonidinu byly nalezeny i metabolity kombinované. Detailní interpretace kolizních spekter umožnila blíže specifikovat v molekule, místa, kde dochází k metabolizaci.

Literatura

- 1 Tsao R.: *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols*. *Nutrients* 2, 1231-1246 (2010).
- 2 Gonzales G.B., Smaghe G., Grootaert C., Zotti M., Raes K., Camp J.V.: *Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity*. *Drug Metab Rev* , 1-16 (2015).
- 3 Wang H., Cao G., Prior R.L.: *Total Antioxidant Capacity of Fruits*. *J Agric Food Chem* 44, 701-705 (1996).
- 4 Williams R.J., Spencer J.P., Rice-Evans C.: *Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?* *Free Radic Biol Med* 36, 838-849 (2004).
- 5 Melo-Filho C.C., Braga R.C., Andrade C.H.: *Advances in methods for predicting phase I metabolism of polyphenols*. *Curr Drug Metab* 15, 120-126 (2014).
- 6 Cook N.C., Samman S.: *Flavonoids Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7, 66-76 (1996).
- 7 He F., Liang N.N., Mu L., Pan Q.H., Wang J., Reeves M.J., Duan C.Q.: *Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression*. *Molecules* 17, 1571-1601 (2012).
- 8 Leopoldini M., Rondinelli F., Russo N., Toscano M.: *Pyrananthocyanins: a theoretical investigation on their antioxidant activity*. *J Agric Food Chem* 58, 8862-8871 (2010).
- 9 Martens S., Preuss A., Matern U.: *Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis thaliana L*. *Phytochemistry* 71, 1040-1049 (2010).
- 10 Winkel-Shirley B.: *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology*. *Plant Physiol* 126, 485-493 (2001).
- 11 Falcone Ferreyra M.L., Rius S.P., Casati P.: *Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications*. *Front Plant Sci* 3, 222 (2012).
- 12 Kumar S., Pandey A.K.: *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. *ScientificWorldJournal* 2013, 162750 (2013).
- 13 Fang J.: *Bioavailability of anthocyanins*. *Drug Metab Rev* 46, 508-520 (2014).
- 14 Hertog M.G., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D.: *Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands*. *Nutr Cancer* 20, 21-29 (1993).
- 15 Huynh N.T., Van C.J., Smaghe G., Raes K.: *Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review*. *Int J Mol Sci* 15, 19369-19388 (2014).
- 16 Jafari S., Saeidnia S., Abdollahi M.: *Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle*. *Curr Pharm Biotechnol* 15, 409-421 (2014).
- 17 Hollman P.C., Katan M.B.: *Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man*. *Arch Toxicol Suppl* 20, 237-248 (1998).
- 18 Gugler R., Leschik M., Dengler H.J.: *Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses*. *Eur J Clin Pharmacol* 9, 229-234 (1975).

- 19 Hollman P.C., de Vries J.H., van Leeuwen S.D., Mengelers M.J., Katan M.B.: *Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers*. Am J Clin Nutr 62, 1276-1282 (1995).
- 20 Hollman P.C., Bijlsman M.N., van G.Y., Cnossen E.P., de Vries J.H., Katan M.B.: *The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man*. Free Radic Res 31, 569-573 (1999).
- 21 Day A.J., Bao Y., Morgan M.R., Williamson G.: *Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity*. Free Radic Biol Med 29, 1234-1243 (2000).
- 22 Nemeth K., Plumb G.W., Berrin J.G., Juge N., Jacob R., Naim H.Y., Williamson G., Swallow D.M., Kroon P.A.: *Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans*. Eur J Nutr 42, 29-42 (2003).
- 23 Passamonti S., Vrhovsek U., Vanzo A., Mattivi F.: *The stomach as a site for anthocyanins absorption from food*. FEBS Lett 544, 210-213 (2003).
- 24 Aziz A.A., Edwards C.A., Lean M.E., Crozier A.: *Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions*. Free Radic Res 29, 257-269 (1998).
- 25 Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C.: *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. Am J Clin Nutr 81, 230S-242S (2005).
- 26 Shimoi K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Yamamoto H., Kinai N.: *Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans*. FEBS Lett 438, 220-224 (1998).
- 27 Spencer J.P., Chowrimootoo G., Choudhury R., Debnam E.S., Srai S.K., Rice-Evans C.: *The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids*. FEBS Lett 458, 224-230 (1999).
- 28 Oliveira E.J., Watson D.G., Grant M.H.: *Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma*. Xenobiotica 32, 279-287 (2002).
- 29 Kay C.D.: *Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans*. Nutr Res Rev 19, 137-146 (2006).
- 30 Kuhnle G., Spencer J.P., Schroeter H., Shenoy B., Debnam E.S., Srai S.K., Rice-Evans C., Hahn U.: *Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine*. Biochem Biophys Res Commun 277, 507-512 (2000).
- 31 Williamson G., Day A.J., Plumb G.W., Couteau D.: *Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates*. Biochem Soc Trans 28, 16-22 (2000).
- 32 Boulton D.W., Walle U.K., Walle T.: *Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism*. J Pharm Pharmacol 51, 353-359 (1999).
- 33 O'Leary K.A., Day A.J., Needs P.W., Mellon F.A., O'Brien N.M., Williamson G.: *Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism*. Biochem Pharmacol 65, 479-491 (2003).
- 34 Vacek J., Papouskova B., Vrba J., Zatloukalova M., Kren V., Ulrichova J.: *LC-MS metabolic study on quercetin and taxifolin galloyl esters using human hepatocytes as toxicity and biotransformation in vitro cell model*. J Pharm Biomed Anal 86, 135-142 (2013).

- 35 Aura A.M., Martin-Lopez P., O'Leary K.A., Williamson G., Oksman-Caldentey K.M., Poutanen K., Santos-Buelga C.: *In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora*. Eur J Nutr 44, 133-142 (2005).
- 36 Stalmach A., Edwards C.A., Wightman J.D., Crozier A.: *Colonic catabolism of dietary phenolic and polyphenolic compounds from Concord grape juice*. Food Funct 4, 52-62 (2013).
- 37 Juranic Z., Zizak Z., Tasic S., Petrovic S., Nidzovic S., Leposavic A., Stanojkovic T.: *Antiproliferative action of water extracts of seeds or pulp of five different raspberry cultivars*. Food Chem 93, 39-45 (2005).
- 38 Kang T.B., Liang N.C.: *Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells*. Biochem Pharmacol 54, 1013-1018 (1997).
- 39 Svarcova I., Heinrich J., Valentova K.: *Berry fruits as a source of biologically active compounds: the case of Lonicera caerulea*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 151, 163-174 (2007).
- 40 Boutin O., Badens E.: *Extraction from oleaginous seeds using supercritical CO₂: Experimental design and products quality*. J Food Eng 92, 396-402 (2009).
- 41 Longo L., Vasapollo G.: *Anthocyanins from bay (Laurus nobilis L.) berries*. J Agric Food Chem 53, 8063-8067 (2005).
- 42 Bhandari P., Kumar N., Gupta A.P., Singh B., Kaul V.K.: *A rapid RP-HPTLC densitometry method for simultaneous determination of major flavonoids in important medicinal plants*. J Sep Sci 30, 2092-2096 (2007).
- 43 Kajdzanoska M., Petreska J., Stefova M.: *Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries*. J Agric Food Chem 59, 5272-5278 (2011).
- 44 Jing P., Giusti M.M.: *Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (Zea mays L.) color extract*. J Food Sci 72, C363-C368 (2007).
- 45 Palikova I., Heinrich J., Bednar P., Marhol P., Kren V., Cvak L., Valentova K., Ruzicka F., Hola V., Kolar M., Simanek V., Ulrichova J.: *Constituents and antimicrobial properties of blue honeysuckle: a novel source for phenolic antioxidants*. J Agric Food Chem 56, 11883-11889 (2008).
- 46 Kahkonen M.P., Heinamaki J., Ollilainen V., Heinonen M.: *Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities*. J Sci Food Agric 83, 1403-1411 (2003).
- 47 He J., Santos-Buelga C., Mateus N., de F., V.: *Isolation and quantification of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments from red wines by combination of column chromatographic techniques*. J Chromatogr A 1134, 215-225 (2006).
- 48 Jordheim M., Giske N.H., Andersen O.M.: *Anthocyanins in Caprifoliaceae*. Biochem Syst Ecol 35, 153-159 (2007).
- 49 Andersen O.M., Fossen T., Torskangerpoll K., Fossen A., Hauge U.: *Anthocyanin from strawberry (Fragaria ananassa) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin*. Phytochemistry 65, 405-410 (2004).
- 50 Chaovanalikit A., Thompson M.M., Wrolstad R.E.: *Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in blue Honeysuckle (Lonicera caerulea L.)*. J Agric Food Chem 52, 848-852 (2004).
- 51 Lu Y.R., Foo L.Y.: *Unusual anthocyanin reaction with acetone leading to pyranoanthocyanin formation*. Tetrahedron Lett 42, 1371-1373 (2001).

- 52 Hackett A.M.: *The metabolism of flavonoid compounds in mammals*. Prog Clin Biol Res 213, 177-194 (1986).
- 53 Walle T.: *Absorption and metabolism of flavonoids*. Free Radic Biol Med 36, 829-837 (2004).
- 54 Havsteen B.: *Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency*. Biochem Pharmacol 32, 1141-1148 (1983).
- 55 Spencer J.P., Kuhnle G.G., Williams R.J., Rice-Evans C.: *Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites*. Biochem J 372, 173-181 (2003).
- 56 Murota K., Terao J.: *Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism*. Arch Biochem Biophys 417, 12-17 (2003).
- 57 Holcapek M., Kolarova L., Nobilis M.: *High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites*. Anal Bioanal Chem 391, 59-78 (2008).
- 58 Su S., Guo J., Duan J.A., Wang T., Qian D., Shang E., Tang Y.: *Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of the bioactive components and their metabolites of Shaofu Zhuyu decoction active extract in rat plasma*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 878, 355-362 (2010).

Curriculum Vitae

Jméno, příjmení, titul: Renáta Myjavcová, Mgr.

Datum a místo narození: 25. dubna 1984 ve Zlíně, Česká Republika

Trvalé bydliště: Nademlejská 1086/12, Praha 9 - Hloubětín, 19800

Kontaktní email: renata.myjavcova@gmail.com

Pracovní zkušenosti:

1. 8. 2014 – doposud

GENvia, s.r.o. – vedoucí cytogenetické laboratoře

1. 12. 2010 – 31. 7. 2014

Imalab, s.r.o. – cytogenetik

2009 - 2010

Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, pracovní pozice – manažer stáží v podnicích

2009, 2010– Studijní stáž v Turecku, Suleyman Demirel University, Faculty of Art and Science in Isparta

2008 – Pracovní stáž v Maďarsku, Teva Pharmaceutical Works Ltd., oddělení analytické chemie, Debrecen

Vzdělání:

2008 – *dosud*

Postgraduální studium analytické chemie na PřF UP Olomouc

2006 – 2008

Navazující magisterské studium biochemie na PřF UP Olomouc

2003 – 2008

Bakalářské studium biochemie na PřF UP Olomouc

Jazykové znalosti:

Anglický jazyk – středně pokročily, Francouzský jazyk – mírně pokročily, Ruský jazyk – začátečník

Odborné vědecké zaměření:

Hmotnostní spektrometrie (MS), kapalinová chromatografie (LC, UHPLC, HPLC), kapilární elektroforéza (CE), CE/MS, elektrochemické metody.

Karyotypování, PCR metody, FISH metoda, CGH array, práce s buněčnými kulturami.

Intensive Course on Screening for Down's Syndrome Wolfson Institute of Preventive Medicine, London 2013, UK

Pedagogická činnost:

Laboratorní cvičení z Chemické instrumentace pro 3. ročníky bakalářských oborů chemie

Vedoucí a oponent bakalářské práce

Řešené projekty:

Projekt FRVŠ č. 2676/2010/G6 „Tvorba příručky pro začínající vyučující předmětu Cvičení z analytické chemie“ – řešitelka

Projekt FRVŠ 2909/2010/G6 „Inovace obsahu a studijních opor předmětu Projektová výuka v chemii“ – spoluřešitelka

Studijní úspěchy:

V roce 2010 – cena za nejlepší poster prezentovaný na konferenci Analytické metody a zdraví člověka, Bratislava

V roce 2006 - 3. místo v soutěži „O cenu firmy Merck“ o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie

Seznam publikací:

1. publikace přímo spojené s disertační prací:

Myjavcova R., Bednar P., Srovnalova A., Dvorak Z., Papouskova B.: *Ultra-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Study of Metabolism of 5-Methylpyranopelargonidin*. *Chromatographia* 78, 189-201 (2015).

Kurka O., **Myjavcova R.**, Bednar P. *Possibilities of preparation of selected condense anthocyanins in model conditions and study of its properties*. *Chem. Listy* 105, 37-39 (2011).

Myjavcova R., Marhol P., Kren V., Simanek V., Ulrichova J., Palikova I., Papouskova B., Lemr K., Bednar P. *Analysis of anthocyanin pigments in Lonicera (Caerulea) extracts using chromatographic fractionation by μ LC-QqTOF-MS*. *J. Chromatogr. A*, 1217 7932-7941 (2010).

2. další publikace v odborných časopisech:

Loucký J., **Myjavcová R.**, Zemánek M., Loucká E., Kovalčík M.: *Neinvazivní testování – 2 roky v klinické praxi*. *Actual Gyn.*, 6, 11 (2014).

Uygun A., Myjavcova R., Yavuz A., Ruppel J.V., Fields K.B., Frankhauser A., Zhang X.P., Bhethanbotla V.R., Bednar P. *Electrochemical polymerization and investigation of properties of poly(5-(4'-aminophenylamino)-10,20-diphenylporphyrin)*. *Electroanalysis*, 23, 1158 – 1167 (2011).

Papouskova B., Bednar P., Hron K., Stavek J., Balik J., **Myjavcova R.**, Bartak P., Tomankova E., Lemr K. *Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic*. *J Chromatogr A* 1218, 7581-7591 (2011).

Jirovsky D., Bednar P., **Myjavcova R.**, Bartosova Z., Skopalova J., Tvrdonová M., Lemr K.: *Study of electrochemical oxidation of cyanidin glycosides by online combination of electrochemistry with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Monatsh. Chem.* 142, 1211-1217 (2011).

Mrázová V., Macíková P., **Myjavcová R.**, Ginterová P., Muller L. *E-Learningové opory předmětů Projektová výuka v chemii a Cvičení z analytické chemie*. *Media4u Magazine*. ISSN 1214-9187. X3/2010, 132-138.

Prezentace na odborných setkáních:

Myjavcová R., Loucký J., Zemánek M., Loucká E., Kovalčík M.: Výhody a nevýhody neinvazivního prenatálního testování (NIPT). 35. celostátní konference sekce ultrazvukové diagnostiky České gynekologické a porodnické společnosti. 3.-5.10.2014 Brno, poster

Myjavcová R., Rychliková R., Macků M., Loucký J.: Prenatální diagnostika – současné možnosti neinvazivního testování. Odborná konference - Laboratorní diagnostika jako významný zdroj informací v péči o pacienta. 24.10.2013, Zlín, přednáška

Bednář P., Papoušková B., Hartmanová L., Hron K., Stávek J., Balík J., **Myjavcová R.**, Barták P., Tománková E., Lemr K.: LC/MS and surface ionization techniques in classification of red wine. 19th International Mass Spectrometry Conference. 15.-21.9.2012, Kyoto, Japan, poster

Jirovský D., Bartošová Z., **Myjavcová R.**, Bednář P., Lemr K., Study of Anthocyanin Oxidative Transformations Using on-Line Coupling Of Electrochemistry with Mass-Spectrometry. The 14th Annual Meeting of the Israel Analytical Chemistry Society Conference & Exhibition, 7.-8.2.2011, Tel Aviv, Israel, poster

Myjavcova R., Marhol P., Kren V., Šimánek V., Ulrichova J., Lemr K., Papouskova B., Bednar P.: Analysis of anthocyanin dyes in extracts of Blue Honeysuckle berries by mass spectrometry. *Analytické metody a zdraví člověka 2010*, 18. mezinárodní konference 11.-14.10.2010, Bratislava, poster

Marhol P., **Myjavcová R.**, Bednář P., Ulrichová J., Šimánek V., Heinrich J., Křen V.: Anthocyanins and Pyranoanthocyanins in *Lonicera caerulea* L. Berries. 5th International Workshop on Anthocyanins. 2009, Japan, poster