

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Analýza obsahu lignanů ve vybraných dřevinách pomocí HPLC/MS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Karolína Bednářová

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce:

RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.

2022 Olomouc

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Karolína Bednářová
Název práce:	Analýza obsahu lignanů ve vybraných dřevinách pomocí HPLC/MS
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2022
Anotace:	Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro analýzu extraktů dřeva z vybraných druhů stromů se zaměřením na lignany a zjistit, zda jsou tyto stromy vhodné pro další studie z hlediska případné přítomnosti lignanů. Extrakty získané z těchto stromů byly analyzovány s využitím spojení ultraúčinné kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie. Vybrané ionty nalezené v jednotlivých vzorcích byly fragmentovány za účelem nalezení vhodných MRM přechodů a následně bylo zjišťováno, zda se vybrané analyty vyskytují ve vzorcích dřeva zkoumaných druhů stromů.
Klíčová slova:	buk, dřevo, extrakce, fragmentace, habr, hmotnostní spektrometrie, jasan, lignany, smrk, tandemová hmotnostní spektrometrie, ultraúčinná kapalinová chromatografie
Počet stran:	51
Počet příloh:	1
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Karolína Bednářová
Title:	Analysis of lignan content in selected tree species using HPLC/MS
Type of thesis:	bachelor's
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	RNDr. Ondřej Kurka, Ph.D.
The year of submission:	2022
Annotation:	<p>The aim of this bachelor thesis was to develop a method for the analysis of wood extracts from selected tree species with a focus on lignans and to determine whether these trees are suitable for further studies in terms of the possible presence of lignans. Extracts obtained from these trees were analyzed using hyphenation of ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Selected ions detected in individual samples were fragmented to determine suitable MRM transitions. Subsequently, presence of selected analytes was monitored in wood samples of examined tree species.</p>
Keywords:	ash, beech, extraction, fragmentation, hornbeam, lignans, mass spectrometry, spruce, tandem mass spectrometry, ultra-high performance liquid chromatography, wood
Number of pages:	51
Number of appendixes:	1
Language:	Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci

Karolína Bednářová

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce, panu RNDr. Ondřeji Kurkovi, Ph.D. za jeho trpělivost, odborný přístup, všechny čas, který mi věnoval a také za cenné rady při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě podporují a podporovali v průběhu celého mého bakalářského studia.

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Lignany	9
2.1.1	Struktura.....	10
2.1.2	Biosyntéza.....	11
2.1.3	Vlastnosti	14
2.1.4	Výskyt.....	15
2.2	Dřeviny.....	16
2.2.1	Smrk ztepilý	16
2.2.2	Buk lesní	17
2.2.3	Habr obecný	17
2.2.4	Jasan ztepilý	18
2.3	Extrakce.....	19
2.3.1	Extrakce pevná látka-kapalina (LSE)	19
2.3.2	Zrychlená extrakce pevná látka-kapalina (ASE)	20
2.3.3	Superkritická fluidní extrakce (SFE)	20
2.3.4	Extrakce subkritickou vodou (SWE)	21
2.4	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	21
2.4.1	Separace na normálních fázích	22
2.4.2	Separace na normálních fázích s použitím chirální kolony	23
2.4.3	Separace na reverzních fázích.....	23
2.5	Hmotnostní spektrometrie (MS)	23
2.5.1	Iontový zdroj.....	24
2.5.1.1	Ionizace elektrosprejem.....	25
2.5.1.2	Další iontové zdroje.....	25
2.5.2	Hmotnostní analyzátor	26
2.5.2.1	Kvadrupólový analyzátor	27
2.6	Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	27
2.6.1	Trojité kvadrupól	28
2.7	Hmotnostní spektrometrie lignanů.....	29
3	Experimentální část	31
3.1	Chemikálie	31
3.2	Instrumentální vybavení.....	31
3.3	Příprava vzorků ze dřeva.....	31

3.4	Příprava vzorků na analýzu.....	32
3.5	Chromatografické a hmotnostně-spektrické podmínky.....	32
4	Diskuze a výsledky.....	34
4.1	Výtěžnost rozpouštědel.....	34
4.2	Hmotnostně-spektrická analýza.....	35
4.3	Identifikace látek.....	36
4.4	Specifika fragmentací pozorovaná u neidentifikovaných prekurzorových iontů.....	38
4.5	MRM přechody.....	39
4.6	Výsledky experimentu z hlediska přítomnosti lignanů.....	42
5	Závěr.....	44
6	Seznam zkratk.....	45
7	Seznam literatury.....	47
8	Přílohy.....	52

1 Úvod

Lignany jsou organické sloučeniny – sekundární metabolity rostlin. Z chemického hlediska jsou řazeny mezi fenyylpropanoidy a jejich základními stavebními jednotkami jsou molekuly monolignolů. Lignany vykazují řadu prospěšných účinků a vzhledem k tomu, že jen v průběhu minulých 15 let bylo objeveno více než 100 nových struktur (a celkem je jich známo přes 1 000), dá se očekávat objev dalších využitelných sloučenin spadajících do této skupiny. V rámci teoretické části tedy byla provedena rešerše na téma lignanů, jejich vlastností a využití.

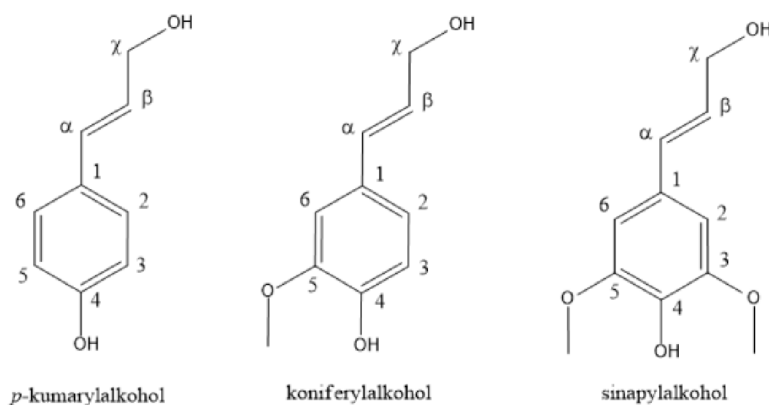
Lignany, které jsou primárně produkovány rostlinami jako ochrana před škůdci a predátory, získaly pozornost vědecké společnosti po zjištění, že působí antimikrobiálně, antivirotický a antioxidačně. Některé sloučeniny patřící do této skupiny se již využívají například v protinádorové léčbě a obecně vykazují protinádorové či protirakovinné vlastnosti. Jsou tedy považovány za možné adepty k vývoji nových léčivých látek.

Vzhledem k jejich možnému využití a nedostatečnému stavu poznání týkajícího se jejich výskytu v běžných dřevinách střední Evropy jsme se v rámci experimentální části rozhodli zaměřit na hledání potenciálních přírodních zdrojů lignanů. Konkrétně byl zkoumán polyfenolický obsah dřeva smrku ztepilého, buku lesního, jasanu ztepilého a habru obecného. Cílem práce bylo vyvinutí protokolu pro účinnou extrakci přírodních látek lignanového typu ze vzorků uvedených dřevin a následná analýza získaných extraktů pomocí kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

2 Teoretická část

2.1 Lignany

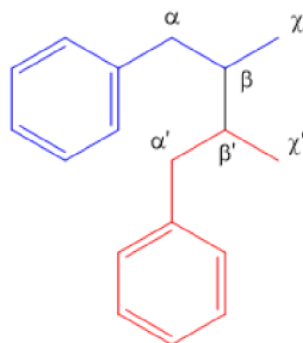
Lignany jsou sekundárními metabolity rostlin, z chemického hlediska se řadí mezi deriváty fenylpropanoidů. Ve velkém měřítku se vyskytují ve vyšších rostlinách a stejně jako většina sekundárních metabolitů rostlin jsou velmi strukturně rozmanité ^[1]. Z chemického hlediska jsou lignany často tvořeny monolignolovými dimery (Obr. 1) ^[2], ovšem mohou se vyskytovat i jako trimery (seskvilignany, přesněji seskvineolignany) či tetramery (dilignany, přesněji dineolignany). Nachází se téměř ve všech částech rostliny, od kořenů, přes stonky, listy, květy až po semena. Lignany můžeme v rostlinách najít ve formě glykosidů, například v pryskyřici nebo semínkách, ovšem většina lignanů se v rostlinách vyskytuje v nekonjugované formě ^[3].



Obr. 1: Chemická struktura základních monolignolů

První lignany byly extrahovány již koncem 19. století z odpadů při zpracování papíru a z pryskyřice. Pojmenovány a definovány byly ovšem až Haworthem roku 1936 ^[4]. Dle této definice jsou skupinou derivátů fenolu, která se nachází v rostlinách a jejíž struktura odpovídá spojení dvou zbytků kyseliny skořicové skrze β - β' uhlíkovou vazbu na propanovém řetězci ^[5] (viz Obr. 2). V průběhu následujících let byly v oblasti lignanů učiněny velké pokroky. Například jen v průběhu uplynulých 15 let bylo izolováno přes 100 nových dibenzocyklooktadienových lignanů z rostlin čeledi *Schisandraceae* – u části z nich byly prokázány protinádorové či anti-HIV farmakologické účinky ^[6], a pomocí spektrochemických metod (jako např. 2D-NMR) byla určena struktura a absolutní konfigurace u 14 z nich ^[7]. Ovšem i přesto, že dnes o lignanech víme mnohem více než před osmdesáti lety, jsou lignany stále značně neprozkoumanou skupinou látek, která by

v budoucnosti mohla najít ještě větší uplatnění například v medicíně, a jejich další výzkum je proto vysoce žádoucí.

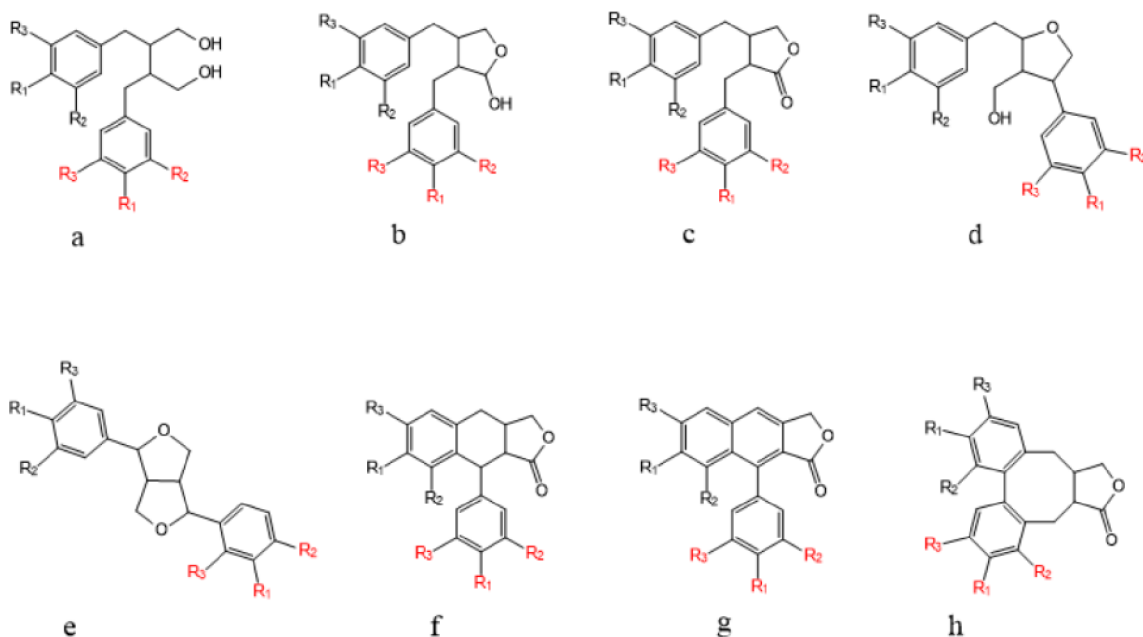


Obr. 2: Základní struktura lignanů s β - β' vazbou

2.1.1 Struktura

Za lignany byly dříve považovány pouze fenylypropanoidové sloučeniny s vazbou β - β' na propanovém řetězci (Obr. 2) ^[8]. Později ale začalo být tímto názvem označováno široké spektrum látek, z nichž některé toto kritérium sice nesplňují, ale všechny jsou si navzájem příbuzné. Kromě „pravých“ (tj. β - β') lignanů byly definovány např. *neolignany* (tj. dva či více monolignolů spojených vazbou jinde než mezi uhlíky C-8 a C-8'). Další skupinou látek jsou *norlignany*, které vznikají transformacemi lignanů, při kterých dochází ke ztrátám uhlíku ve fenylypropanoidovém skeletu některého z monomerů. Kromě vazeb mezi fenylypropanoidovými jednotkami může struktura lignanů, neolignanů, norlignanů a dalších příbuzných skupin obsahovat také násobné vazby, někdy přecházející až v konjugovaný systém ^[1].

Samotné β - β' lignany se také dále dělí do skupin, a to podle základního uspořádání skeletu, které se dále liší s ohledem na substituci jak aromatických jader, tak uhlovodíkového řetězce. Základními skupinami jsou: dibenzylbutandioly (Obr. 3a), dibenzylbutyrolaktony (Obr. 3b), dibenzylbutyrolaktoly (Obr. 3c), tetrahydrofurany (Obr. 3d), furofurany (Obr. 3e), aryltetrahydronaftaleny neboli tetraliny (Obr. 3f), naftaleny (Obr. 3g) a dibenzocyklooktadeiny (Obr. 3h) ^[9,10].

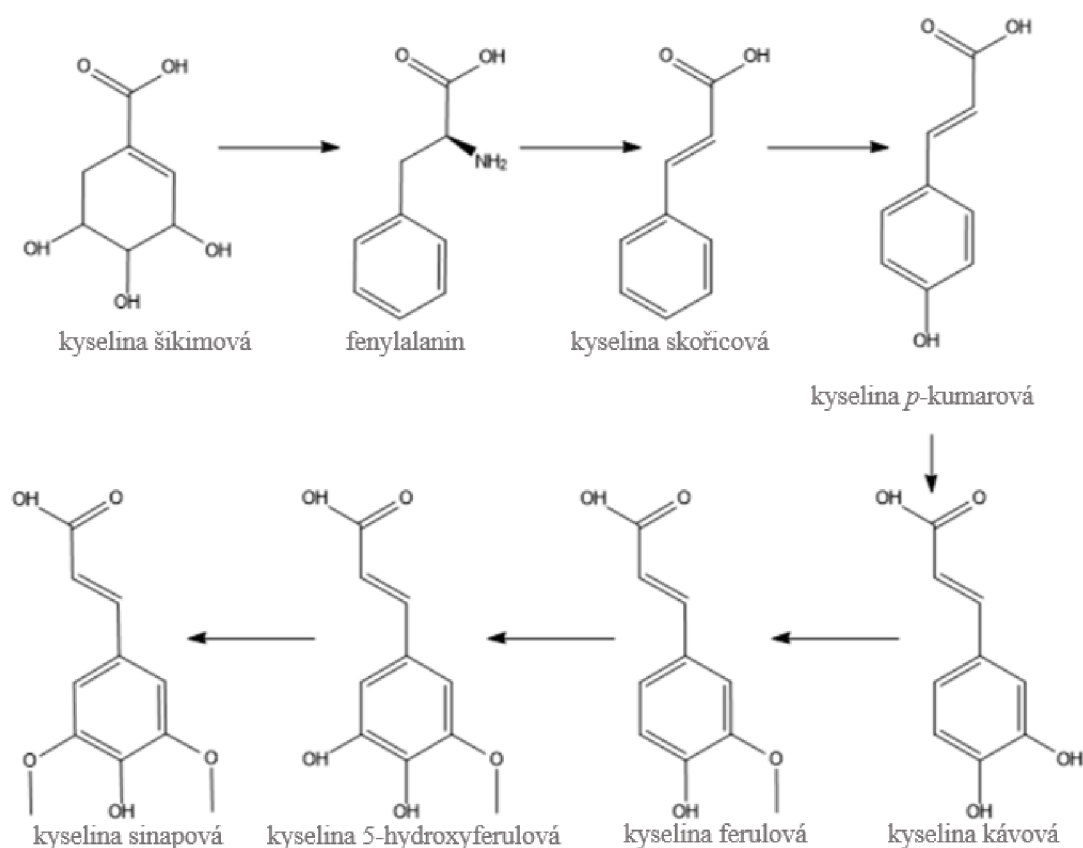


Obr. 3: Struktury základních lignanových skupin: dibenzylbutandioly (a), dibenzylbutyrolaktony (b), dibenzylbutyrolaktoly (c), tetrahydrofurany (d), furofurany (e), tetraliny (f), naftaleny (g) a dibenzocyklohepteny (h)

2.1.2 Biosyntéza

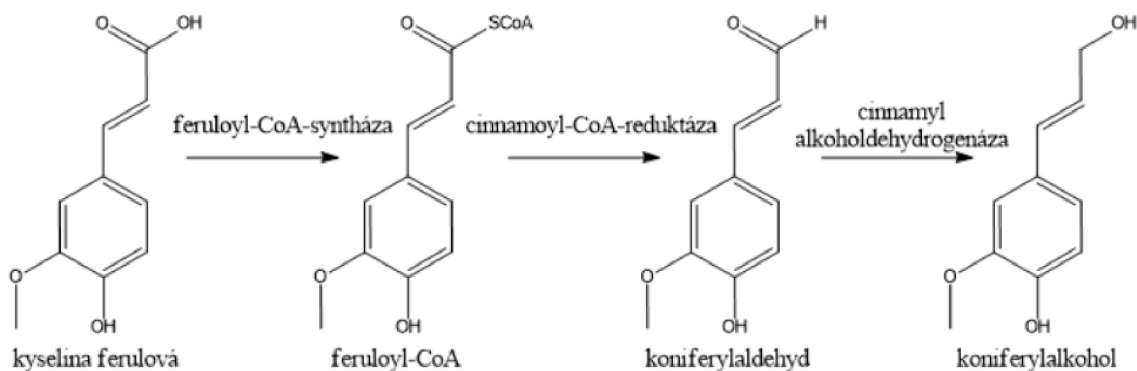
Syntéza lignanů se skládá z mnoha na sebe navazujících kroků slučovaných nejčastěji do dvou větších celků, a to: 1) šikimátové dráhy (jejímž výsledkem je syntéza jednotlivých monolignolů) a 2) následných procesů zapojených do oligomerizace, zodpovědných za vznik výsledných lignanů.

Šikimátová dráha začíná kondenzací fosfoenolpyruvátu s erytrózou-4-P za vzniku šikimátu. Šikimát je dále metabolizován až na tři aminokyseliny: tryptofan, tyrosin a fenylalanin. Pro syntézu lignanů je důležitý právě fenylalanin, z něhož eliminací NH_3 za katalýzy enzymem fenylalaninamoniaklyázou vzniká kyselina skořicová. Ta je dále metabolizována hydroxylací na *p*-kumarovou kyselinu a z této kyseliny následně vzniká za pomoci alkoholdehydrogenázy přes mezikrok představovaný *p*-kumarylaldehydem jeden ze tří základních lignolů – **kumarylalkohol**. Další dva alkoholy – **koniferylalkohol** (Obr. 5) ^[7] a **sinapylalkohol** – jsou odvozeny od kyselin ferulové a sinapové, které vznikají methylací z kyseliny *p*-kumarové s mezi krokem představujícím kyselinu kávovou (Obr. 4) ^[11,12].

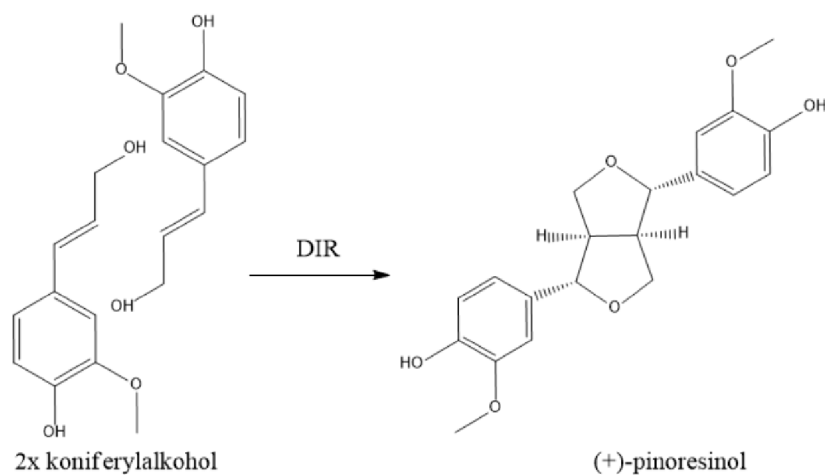


Obr. 4: Šikimátová dráha vzniku kyselin *p*-kumarové, ferulové a sinapové

Jak již bylo uvedeno výše, tyto tři základní lignoly jsou přímými prekurzory lignanů. Ovšem studie naznačují, že pro biosyntézu je nejdůležitějším lignolem koniferylalkohol, jelikož dvě hlavní metabolické dráhy syntézy lignanů u rostlin začínají spojením dvou achirálních molekul *E*-koniferylalkoholu. Tímto krokem vzniká pinoresinol, jeden ze základních lignanů. Přesný enzym katalyzující tuto reakci ještě izolován nebyl, ovšem byl nalezen takzvaný řídicí protein (**DIR**), který stojí za stereospecifitou vzniklého produktu (Obr. 6) [13, 14].

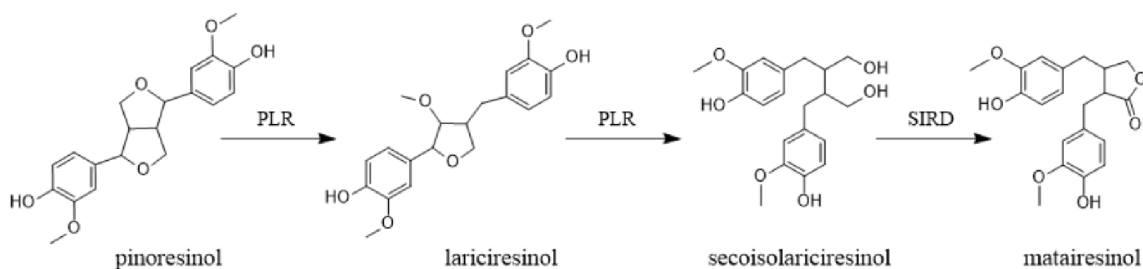


Obr. 5: Vznik koniferylalkoholu z kyseliny ferulové



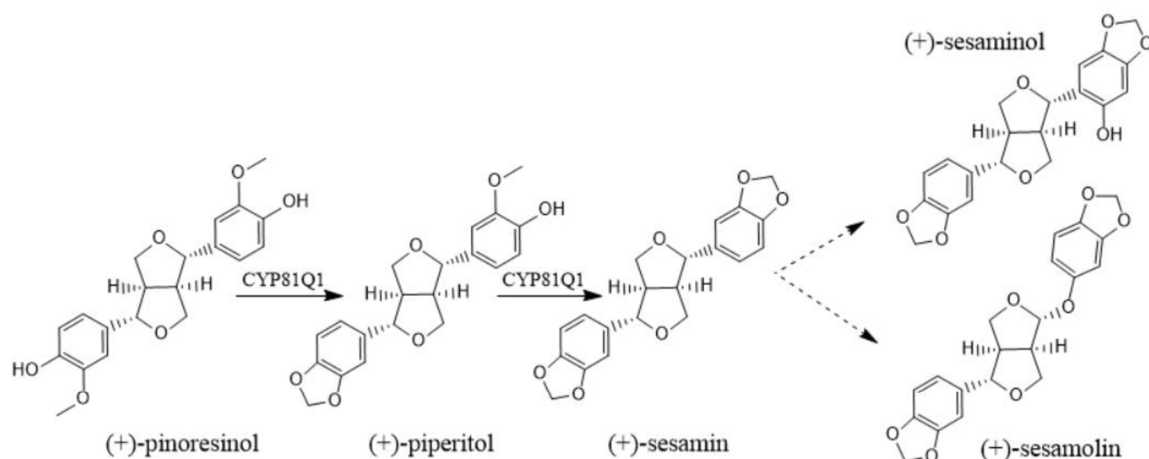
Obr. 6: Vznik a struktura pinoresinolu

Zde se biosyntetická dráha dělí na dvě různé, v závislosti na druhu rostliny. U mnoha druhů rostlin jako například zlatice, lnu či noholistu se pinoresinol redukuje nejprve na lariciresinol, a ten následně na secoisolariciresinol za účasti pinoresinol-lariciresinol reduktázy (PLR). Secoisolariciresinol je secoisolarciresinoldehydrogenázou (SIRD) přeměněn na matairesinol (Obr. 7) ^[12], z kterého může dále vznikat např. arctigenin (methyloací hydroxylové skupiny navázané na aromatickém jádru) ^[13].



Obr. 7: Biosyntéza lignanů z pinoresinolu

Rostliny rodu *Sesamum* (sezam indický, harpagofyt ležatý, *Pterodiscus*, ...) však PLR i následné biosyntetické enzymy postrádají, takže pinoresinol je namísto redukce na lariciresinol metabolizován na piperitol, který je následně přeměněn cytochromem P81Q1 na sesamin. Ze sesaminu vzniká za přítomnosti cytochromu P92B14 sesaminol a sesaminol (Obr. 8) ^[16], které poté podléhají glykosylaci například na sesaminol diglukosid (SDG) ^[13,15].



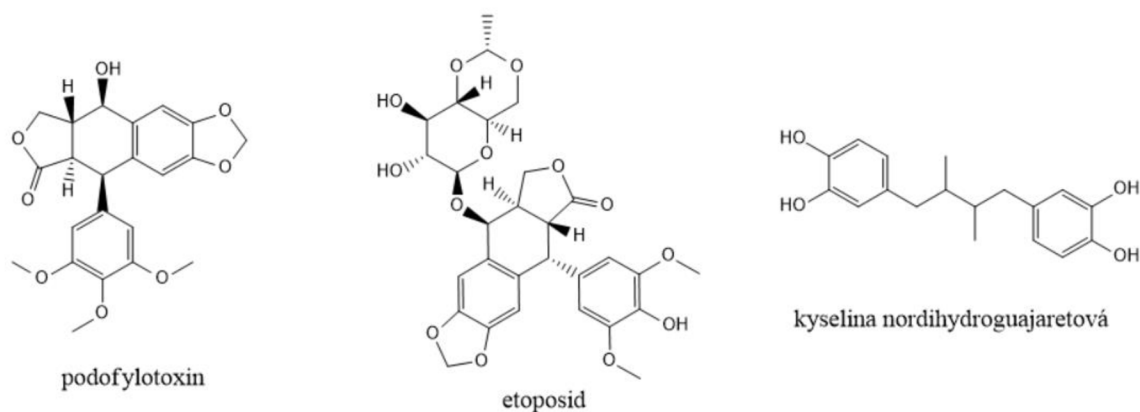
Obr. 8: Biosyntéza lignanů z pinoresinolu v rostlinách rodu *Sesamum*

2.1.3 Vlastnosti

Většina izolovaných lignanů má formu bezbarvých krystalů, ovšem některé se mohou vyskytovat i ve formě olejovitých kapalin. Lignany jsou velice širokou skupinou látek, proto jsou některé z nich rozpustné ve vodě a jiné se naopak rozpouštějí pouze v organických rozpouštědlech. Obecně jsou ve vodě mnohem více rozpustné glykosidy lignanů. Velká část lignanů také tvoří stereomery a je opticky aktivní ^[17].

V rostlinách dochází k syntéze lignanů zejména pro jejich antimikrobiální, antimitotické, antivirové a antioxidační vlastnosti, kterými zvyšují odolnost rostliny vůči patogenům. I pro člověka jsou ovšem lignany velmi užitečnými sloučeninami. Vzhledem k jejich schopnosti prostupovat buněčnou membránou a ovlivňovat řadu biologických dějů přímo uvnitř buněk jsou používány jako léčiva či specifické inhibitory enzymů.

Využití tak lignany našly např. v protinádorové léčbě: lignan podofylotoxin (Obr. 9) a jeho deriváty jsou totiž schopny inhibovat polymeraci tubulinu, čímž zastavují buněčné dělení v metafázi. Z podofylotoxinového derivátu etoposidu (Obr. 9) se vyrábí léčivo stejného jména (Etoposid), které je používáno při chemoterapii. Také skupina dibenzocyklooktadienových laktonů je využívána pro své protinádorové účinky. V neposlední řadě je pak velmi důležitá kyselina nordihydroguajaretová (NDGA) (Obr. 9), která má své místo při léčbě rakoviny i leukémie.



Obr. 9: Struktury podofylotoxinu, etoposidu a kyseliny nordihydroguajaretové

Lignany mají také antivirové vlastnosti – jsou účinné například proti papilomavirům, čehož se využívá v dermatologii pro léčbu kožních výrůstků či bradavic. Aktivitu vykazují i proti viru spalniček a viru herpes simplex, a dokonce bylo zjištěno, že demetylovaný derivát lignanu arctigeninu a NDGA vykazují anti-HIV aktivitu.

Velké množství lignanů je také inhibitory cAMP fosfodiesterázy, čím se zvyšuje hladina cAMP v buňkách a stimuluje se myokard. Jsou také antihypertenzní a zvyšují hladinu HDL-cholesterolu za současného snížení LDL-cholesterolu. Mimo jiné jsou lignany schopny potlačit účinky volných kyslíkových radikálů a pro tyto antioxidační schopnosti je například NDGA používána v potravinářství jako antioxidační aditivum ^[18].

2.1.4 Výskyt

Lignany, jakožto sekundární rostlinné metabolity, můžeme nalézt v mnoha druzích rostlin od stromů v prastarých deštných pralesích (*Himatanthus fallax*, *Iryanthera juruensis*) ^[19, 20] až po brokolici (lariciresinol: 97,2 mg/100 g, secoisolariciresinol: 1,31 mg/100 g) ^[21]. Ve velkých množstvích se vyskytují v rostlinách z oddělení nahosemenných, ale nalézají se i v rostlinách krytosemenných, například ve třídě jednoděložných. U nahosemenných rostlin jsou lignany koncentrovány nejvíce v sukovém dřevě, ve větvích, kůře, kořenech a jádrovém dřevě (u *Picea abies* až 26 %, resp. 10 % ^[22], 6 % ^[23], 2-3 % a 0,09 – 1,5 % ^[4]). U krytosemenných se vyskytují například v plodech, kořenech, listech, či stonku ^[24].

Lignany taktéž přijímáme ve své stravě, i když v nepříliš velkém měřítku. Jsou totiž obsaženy v semenech, zrnech, ovoci, zelenině, ale také v zeleném čaji či čokoládě. Nejbohatším zdrojem lignanů pro člověka jsou rostlinné oleje, zejména lněný a sezamový, a také celozrnné žitné pečivo ^[25].

2.2 Dřeviny

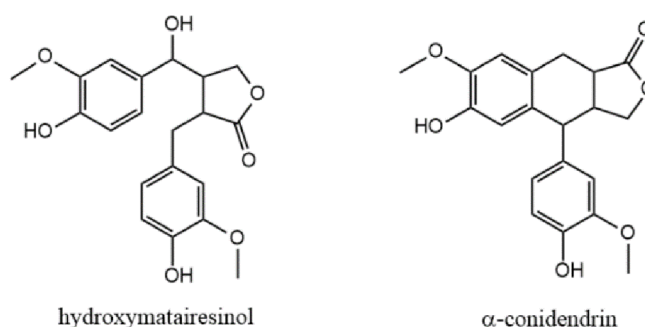
Níže jsou popsány vlastnosti druhů, které byly vybrány pro experimentální část této bakalářské práce, tj. smrku ztepilého (*Picea abies*), u něhož byla přítomnost lignanů již dříve prokázána ^[26], buku lesního (*Fagus sylvatica*), habru obecného (*Carpinus betulus*) a jasanu ztepilého (*Fraxinus excelsior*), u kterých zatím existují pouze domněnky o přítomnosti lignanů ve dřevě, avšak lignany byly nalezeny v jejich listech (*Fagus sylvatica*) ^[27] či kůře (*Carpinus betulus*) ^[28].

2.2.1 Smrk ztepilý

Smrk patří mezi nejdůležitější hospodářské dřeviny Evropy — především kvůli jeho velmi rychlému růstu. Přirozeně se vyskytuje v severní a střední Evropě, a to i ve vyšších nadmořských výškách: například v Alpách ho můžeme najít i v nadmořských výškách do 2000 m n. m., kde tvoří horní hranici lesa. Obecně je velmi nenáročný, jelikož roste i ve velmi severně položených oblastech Laponska či Ruska.

Jedná se o stálezelený jehličnatý strom dosahující výšky až 50 m. Jeho borka je šupinová, větve vyrůstají k přeslencech a jehlice na nich ve šroubovici. Šišťice, které slouží k rozmnožování, se dělí na samčí a samičí. Samčí jsou červeně purpurové, samičí bývají buď fialově purpurové či zelené, vyrůstají na koncích loňských výhonů a po oplodnění se z nich stávají běžně známé „šišky“ ^[29].

Co se týče obsahu chemických látek ve smrku ztepilém, bylo provedeno mnoho studií ^[4] a bylo zjištěno, že například sukové dřevo smrku obsahuje až 64,3 % hydroxymatairesinolu a jeho diastereoizomerů. V jádrovém dřevě byl nalezen s relativním obsahem 13,2 % α -conidenrin (Obr. 10) ^[30], který se stejně jako hydroxymatairesinol (Obr. 10) ^[30] řadí mezi lignany, a mastné kyseliny s celkovým relativním obsahem 12,3 %, což byly např. kyselina palmitová, olejová či stearová ^[30]. V kůře smrku byly nalezeny látky jako isorhapontin, astringin, glykosidy resveratrolu (stilbeny), či třísloviny ^[31].



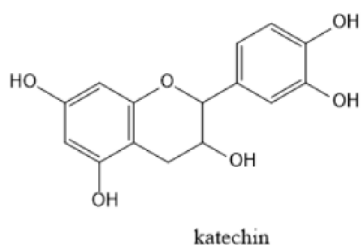
Obr. 10: Struktura hydroxymatairesinolu a α -conidendrinu

2.2.2 Buk lesní

Buk se řadí mezi naše nejrozšířenější lesní dřeviny. Obecně je velmi nenáročný na podmínky. Vyskytuje se nejčastěji v chladnějších a vlhčích oblastech v nadmořských výškách od 400 m n. m. do 1000 m n. m.

Buk je opadavý listnatý strom se zelenými okrouhlými listy. Jeho plody jsou uzavřeny ve dvojicích v číškách, které se po dozrání otevírají čtyřmi cípy. Samotný povrch číšky je matný a porostlý tuhými ostny, které jsou na vrcholu zahnuté. Dřevo buku je tvrdé, těžké a málo pružné, proto se velmi často využívá k výrobě celulózy, v parketařství či jako topivo [32].

Z chemických látek byly v sukovém dřevě nalezeny flavonoidy (7 %) a katechin (Obr. 11) (6 %) [31]. V jádrovém dřevě se dle studií vyskytuje s relativní koncentrací 6,3 % kyselina palmitová [30].



Obr. 11: Struktura katechinu

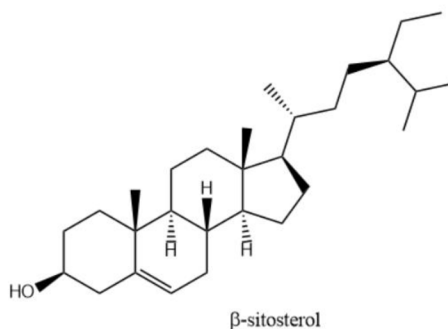
2.2.3 Habr obecný

Habr obecný, jakožto náš původní druh, má kromě svého průmyslového využití i duchovní rovinu, jelikož byl v pohanských dobách uctíván našimi předky [33]. Můžeme ho nalézt od nížin až po pahorkatiny, kde je zastoupen ve významném měřítku. Místy roste jako

„monokultura“ a vytváří tzv. habřiny, častěji ho však nalezneme v kombinovaných porostech spolu s dubem, či bukem, lípou a jasanem.

Jedná se o opadavý listnatý strom s obvejčitými zelenými listy a plody, které jsou po dvou upevněny v trojlaločném obalu. Habr je velmi ceněn pro vytváření živých plotů a za tímto účelem je pěstován v několika odrůdách. Kromě živých plotů se využívá také v kolářství, nástrojářství a modelářství. Jeho dřevo je tvrdé a těžké a vyniká vysokou výhřevností ^[34].

Při analýze dřeva habru sice lignany nalezeny nebyly, ovšem byla zjištěna přítomnost jiných chemických látek. Například v extraktu ze suků habru byl objeven β -sitosterol (Obr. 12) a mastné kyseliny jako kyselina palmitová, stearová, linolová. Tyto mastné kyseliny byly nalezeny také v jeho jádrovém dřevě ^[30].



Obr. 12: Struktura β -sitosterolu

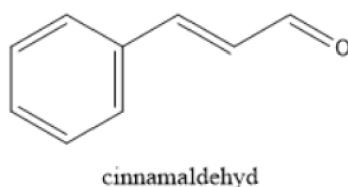
2.2.4 Jasan ztepilý

Jasan patří mezi naše pozdně rašící dřeviny. Roste pouze v doprovodu ostatních dřevin ve smíšených lesích, sám jednodruhové porosty (na rozdíl od habru a jeho habřin) netvoří. Vyskytuje se v lužních lesích, ve vyšších nadmořských výškách v úžlabinách a na kamenných sutích, a to ve výškách až do 1000 m n. m.

Řadíme jej mezi listnaté opadavé stromy. Jeho listy jsou zelené, vejčité, vstřícné a řapíkaté. Nažky jsou ploché s velkým širokým křídlem, díky kterému se mohou šířit vzduchem, či plavat několik dní na hladině. Dřevo jasanu je pružné, tvrdé a těžké. Listy, kůra i plody jasanu se mohou používat v lékařství ^[35].

Ani ve dřevě jasanu zatím nebyl potvrzen výskyt lignanů, byly však nalezeny chemické sloučeniny spadající do jiných skupin jako například mastné kyseliny, terpenoidy a fenylypropanoidy. V sukovém dřevě jasanu se vyskytuje cinnamaldehyd (Obr. 13) (2,7 %)

patřící mezi fenylpropanoidy, β -sitosterol (2,0 %) patřící mezi terpenoidy a mastné kyseliny palmitová, stearová, olejová (5,6 %). V jádrovém dřevě se kromě mastných kyselin (20,9 %) vyskytují také pryskyřičné kyseliny (18,6 %) jako kyselina abietová, dehydroabietová a pimarová, patřící mezi terpenoidy ^[30].



Obr. 13: Struktura cinnamaldehydu

2.3 Extrakce

Zásadní podmínkou pro úspěšnou analýzu minoritních složek přítomných ve složité matici – jako je např. dřevo – je obohacení analyzovaného vzorku o hledaný analyt. Jednou z technik, která umožňuje takovéto „předčištění“ vzorku, je extrakce, což je separační metoda, při které dochází k přenosu jedné látky či skupiny látek ze směsi v pevném či kapalném skupenství do jiné fáze (nejčastěji jiné rozpouštědlo). Ochota cílového analytu přejít do jiné fáze závisí na jeho polaritě a rozpustnosti. Obecně platí, že látky polární extrahujeme polárním rozpouštědlem a látky nepolární rozpouštědlem nepolárním. Také platí, že čím je větší rozpustnost látky v daném rozpouštědle, tím snáze a ve větším množství do něj přejde ^[36].

2.3.1 Extrakce pevná látka-kapalina (LSE)

Jelikož největšími zdroji lignanů jsou rostliny či výrobky z nich, nejčastěji se lignany extrahují právě z pevných vzorků, jako jsou nadrcené větve, listy či semena. Jedním ze základních postupů extrakce lignanů z rostlinných materiálů je odstranění lipidů, které se v rostlinách hojně vyskytují a jejich přítomnost je v tomto případě ve vzorku nežádoucí, následované extrakcí samotných lignanů. Jelikož jsou lipidy dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech, extrahujeme zkoumaný vzorek v prvním kroku například hexanem, velmi často v Soxhletově extraktoru. Tímto je možné se ve vzorku rostlinného materiálu zbavit interferujících lipidů, které z větší části přecházejí do nepolárního rozpouštědla, a následně je možné ze vzorku extrahovat frakci bohatou na lignany. Pro tento účel se nejčastěji

používají polární rozpouštědla, typicky aceton, ethanol či methanol. Lignany jsou obecně látkami polárními (s ohledem na jejich hydroxylové skupiny), takže budou do polární fáze přecházet ochotně. Existují ovšem také lignany nepolární (vyskytující se například v semenech). Tyto je po provedení výše uvedeného postupu nutné reextrahovat z nepolární fáze (např. methanolem) [37, 38].

Další možností je přímá extrakce vzorku horkým polárním rozpouštědlem – nejčastěji methanolem či ethanolem. Extrakt je poté možno buď přímo analyzovat, nebo zakoncentrovat a zředit vodou. Pokud extrakt smísíme s vodou, následuje extrakce hexanem a dalšími nepolárními rozpouštědly jako chloroform, dichlormethan či ethylacetát pro odstranění lipidů, terpenů či chlorofylů [38].

Protože se lignany často vyskytují ve formě glykosidů, jednou z možností extrakce typu pevná látka-kapalina je glukosidázová extrakce, při níž dochází k rozštěpení všech glykosidů lignanů na aglykony pomocí enzymu β -glukosidázy. Jako extrakční činidlo se používá například methanol. Pro aktivitu β -glukosidázy je optimální po extrakci methanolem přídavek většího množství destilované vody a úprava pH vzorku na hodnotu 5. Této metody se dá využít například pro extrakci lignanů z kořenů rostlin rodu *Linum* [39].

2.3.2 Zrychlená extrakce pevná látka-kapalina (ASE)

Jedná se taktéž o extrakci v systému pevná látka-kapalina, ovšem za vysokých teplot a tlaků, čím je dosaženo zrychlení procesu a také je zapotřebí menších objemů rozpouštědel. Je velmi vhodná pro extrakce jak polárních (např. lignany, flavonoidy), tak nepolárních (lipidy) látek ze dřeva a dá se využít například v dřevařském průmyslu pro stanovení množství lignanů ve dřevě. Díky tomu, že je ASE rychlejší, je minimalizován termický rozklad a izomerace extrahovaných látek. Další nespornou výhodou je, že výtěžnost této metody je vyšší než u standardní LSE prováděné v Soxhletově extraktoru či u ultrasonické extrakce [4, 40].

2.3.3 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce je velmi rychlá, selektivní metoda, jejíž výhodou je nižší obsah zbytkových organických rozpouštědel ve finálním extraktu. Jako rozpouštědlo se totiž nejčastěji používá superkritický oxid uhličitý, buď čistý, nebo případně doplněný modifikátory (ethanol, methanol, propanol, tetrahydrofuran aj.), který ve svém superkritickém stavu disponuje výhodnými vlastnostmi, jako jsou velmi nízká viskozita či téměř nulové povrchové napětí. Pro extrakci lignanů je však nutné složení rozpouštědla

mírně upravit: častěji než čistý superkritický oxid uhličitý se používá jeho směs s methanolem, případně ethanolem, což výrazně zvyšuje výtěžnost extrakce. Tato metoda byla použita například pro extrakci lignanů z listů a plodů klanoprašky čínské^[41], či z pecek oliv^[42].

2.3.4 Extrakce subkritickou vodou (SWE)

Dalším typem superkritické fluidní extrakce, u které se ovšem nevyužívá oxidu uhličitého, je SWE. V této metodě se jako rozpouštědlo používá tzv. subkritická voda. Tato technika mění vlastnosti vody zvýšením teploty až na 374 °C a udržováním tlaků dost vysokých na to, aby voda zůstávala v kapalném stavu (obvykle 10 až 60 bar). Díky takto vysoké teplotě vody rapidně klesá její dielektrická konstanta až k hodnotám podobným ethanolu či methanolu. Také její polarita je menší – dala by se srovnat s polaritou směsí methanol–voda nebo voda–acetonitril. V závislosti na teplotě vody tato metoda selektivně extrahuje různé polární analyty: nejpolárnější sloučeniny se extrahují při nízkých teplotách a méně polární sloučeniny při teplotách vysokých. Metoda je také v porovnání s běžnou LSE rychlejší. Dá se využít například pro extrakci lignanů z celých lněných semínek^[43,44].

2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metodou založenou na rozdílné afinitě dělených látek ke dvou různým nemísitelným fázím. Mobilní fáze (MF) je pohyblivá – v kapalinové chromatografii je jí kapalina - a unáší s sebou směs dělených látek. Druhou fází je stacionární fáze (SF), která je nepohyblivá a může být tvořena buď tuhou látkou, nebo kapalinou zakotvenou na tuhém nosiči. Stacionární fáze se nachází uvnitř chromatografické kolony buď ve formě sorbentu, či jako kapalina navázána na nosiči (např. silikagel), nebo je kapalina ukotvena v tenké vrstvě přímo na stěně kolony a fáze mobilní touto kolonou se SF protéká. V případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie je nutné pohánět MF za vysokých tlaků čerpadlem, které mobilní fázi do kolony přivádí.

Při dělení látek mezi mobilní a stacionární fází dochází k opakovanému ustanovování rovnováhy látek na fázovém rozhraní MF a SF. Tato distribuce analytů mezi dvě fáze se popisuje distribuční konstantou, a čím je její hodnota vyšší, tím déle sloučenina setrvává ve fázi stacionární, což má za následek zvýšení jejího retenčního času. Retenční čas je kvalitativní vlastností každé látky, která nám můžeme pomoci příslušnou sloučeninu

identifikovat například srovnáním retenčního času analytu s retenčním časem změřeného standardu. Retenční čas definujeme jako dobu, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky (chromatografického píku) a udává, jak dlouho je analyt zadržen na koloně.

Výstupem HPLC je chromatogram, který vzniká při průchodu separovaných zón zkoumaných analytů detektorem po převedení signálu detektoru na křivky eluce gaussovského tvaru zvané píky. Chromatogram tedy představuje časovou závislost intenzity analyticky využitelné veličiny měřené detektorem [45].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie lignanů se provádí povětšinou v systému reverzních fází s achirálními kolonami, protože většina v současné době zkoumaných lignanů je střední polaritu. Můžeme se ale setkat i s analýzou v systému normálních fází. Jelikož lignany jsou látky opticky aktivní, můžeme od sebe separovat i jednotlivé enantiomery použitím chirální HPLC kolony. Konkrétní ukázky možností využití zmíněných separačních systémů jsou v detailu popsány v následujících kapitolách. Pro chromatografii v systému normálních fází je charakteristické, že stacionární fáze je polárnější než mobilní fáze, u obrácených fází je tomu naopak – SF méně polární, MF více polární [45,46]. Pro chirální separace platí, že stacionární fáze je chemicky či dynamicky vázána na nosič (např. sikagel) a je tvořena například makrocyclickými glykoproteiny, polysacharidy, glykoproteiny či crownethery [47].

2.4.1 Separace na normálních fázích

Separace na normálních fázích se používá pro lipofilní lignany, jako jsou například některé lignany vyskytující se v rostlinách rodu *Podophyllum* nebo lignany přítomné v olejích ze sezamových semínek. Složení mobilní fáze se různí; např. pro separaci podofylotoxinu, α -peltatinu a β -peltatinu z pryskyřice rostlin *Podophyllum* byla použita izokratická eluce s MF tvořenou 1,8 % ethanolu v chloroformu [48]. Pro separaci sedmi diastereoizomerů podofylotoxinu byla využita mobilní fáze o složení *n*-heptan–dichlormethan–methanol (90:10:4) [48]. V systému normálních fází byla provedena dokonce i kvantifikace obsahu podofylotoxinu v pryskyřicích rostlin rodu *Podophyllum* [50]. Separovány byly rovněž lignany sesamin, sesamolin a sesamol, vyskytující se v sezamových olejích; mobilní fáze byla v tomto případě tvořena směsí *n*-hexanu a isopropanolu (98:2, v/v) [51].

2.4.2 Separace na normálních fázích s použitím chirální kolony

Podle publikovaných studií jsou pro většinu separací využívány kolony Chiralcel OC (stacionární fázi je tris-(fenyلكarbamát) celulosy) a Chiralcel OD (stacionární fázi je tris-(3,5dimethylfenyلكarbamát) celulosy). Jako mobilní fáze byla například pro separaci izomerů lariciresinolu z extraktu semen lopuchu většího (*Arctium lappa*) na koloně Chiralcel OC použita směs ethanolu a *n*-hexanu (80:20) [52]. Na koloně Chiralcel OD byla provedena například separace stereoizomerů pinoresinolu a piperitolu ze sezamových semínek. Mobilní fázi použitou pro separaci stereoizomerů pinoresinolu byla směs ethanolu a *n*-hexanu v poměru 1:1 a pro stereoizomery piperitolu pak směs ethanol–*n*-hexan (1:9) [53]. Mimo kolony o (standardním) vnitřním průměru 4,6 mm se používají také semi–mikro kolony o průměrech 1,0–2,0 mm disponující vyšší účinností separace [54].

2.4.3 Separace na reverzních fázích

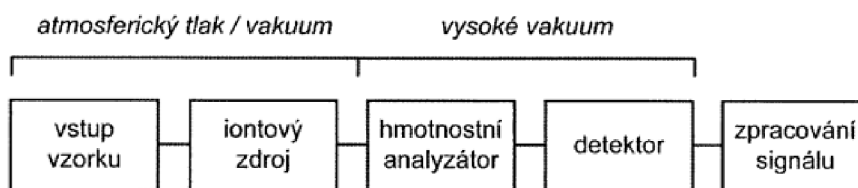
Pro lignany nejběžněji používaný typ separace je právě separace na reverzních fázích. Typicky je využívána gradientová eluce a mobilní fáze by měla být slabě kyselá pro potlačení kyselé povahy fenolových skupin. Jako organické modifikátory mobilní fáze se běžně používají např. methanol či acetonitril, častými mobilními fázemi jsou tedy směsi methanol-voda či acetonitril-voda. Nejvíce se používají kolony označované jako „RP-18“ (RP = reversed phase), příp. „C18“ ve kterých je stacionární fázi oktadecyl ukotvený na silikagelu jako nosiči. Pro separaci velmi hydrofilních lignanů, jako jsou například izomery hydroxymatairesinolu, se však více hodí kolony typu „RP-8“ („C8“), kde je jako SF použit oktyl – taktéž zakotvený na silikagelu jako nosiči [46]. Kolona typu RP-18 byla použita například pro separaci podofylotoxinu z extraktu semen rostliny *Linum album*, a to v gradientovém módu s elucí acetonitrem a vodou [55].

2.5 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je jednou ze základních analytických metod, která umožňuje provádět kvalitativní (struktura) i kvantitativní (obsah/množství) analýzu. V rámci kvantitativní analýzy je možno detekovat množství analytu i menší než 10^{-15} g. Princip hmotnostní spektrometrie je založen na generování iontů analytu a jejich následném rozdělení v plynné fázi podle jejich poměru hmotnosti a náboje. Výsledný signál je poté převeden na hmotnostní spektrum, ve kterém jsou ionty charakterizovány bezrozměrným

číslem m/z , kde m je hmotnostní číslo (nukleonové číslo) a z je hodnota náboje iontu. Analyzovanými ionty mohou být ionizované ionty jednotlivých atomů, klastrů, molekul a fragmenty nebo asociáty těchto molekul.

Měření probíhá v hmotnostním spektrometru, který je tvořen vakuovým systémem, systémem pro zavedení vzorku, iontovým zdrojem, analyzátozem a detektorem iontů. Pro úspěšnou separaci iontů je zapotřebí velmi vysokého vakua (10^{-3} až 10^{-5} Pa, v závislosti na použitém separátoru), jelikož při těchto tlacích již nedochází k výměně energie částic vzájemnými srážkami. Vakuum je vytvářeno pomocí soustavy vývív čerpajících plynou fází z jednotlivých částí hmotnostního spektrometru, které jsou od sebe odděleny kónickými clonami s malým otvorem uprostřed, nebo tenkou kapilárou. Pokud chceme dosáhnout tlaků 10^{-1} až 10^{-2} Pa, dostačující jsou olejové vývivy, pro nižší tlaky (10^{-4} až 10^{-5} Pa) už je zapotřebí vývív turbomolekulárních nebo difuzních. Vakuum je nezbytné udržovat v části obsahující hmotnostní analyzátor a detektor, v části se vstupem vzorku a iontovým zdrojem vakuum být může, ale nemusí – záleží na typu iontového zdroje ^[56,57].



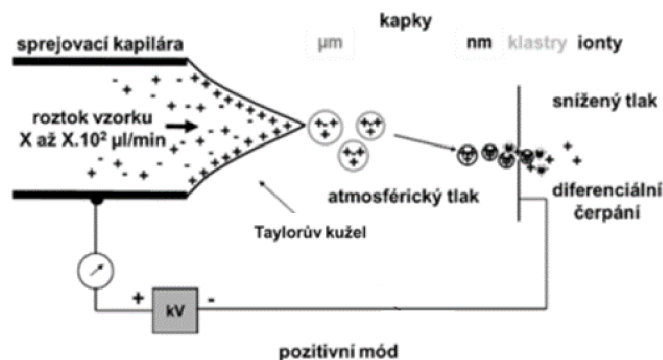
Obr. 14: Schéma hmotnostního spektrometru ^[58]

2.5.1 Iontový zdroj

V iontovém zdroji dochází k ionizaci analytu. Tento krok (ionizace analytu) je zásadním procesem, jelikož nenabitě částice nelze analyzovat. Existuje několik druhů iontových zdrojů a podle toho, který při analýze zvolíme, můžeme potlačit či podpořit fragmentaci studované molekuly. Základní dělení rozlišuje tzv. „tvrdé“ a „měkké“ iontové zdroje. U tvrdých iontových zdrojů ionizovaná molekula získá během ionizace nadbytečné množství energie, což zapříčiní fragmentaci molekuly na menší, tzv. fragmentové ionty. Při použití měkkých iontových zdrojů získává molekula mnohem menší množství energie, což znamená, že téměř nefragmentuje. ^[56,58] Vzhledem k tomu, že experimentální část této bakalářské práce využívá ionizaci elektrosprejem, bude jí níže věnována bližší pozornost.

2.5.1.1 Ionizace elektrosprejem

V současnosti je ionizace elektrosprejem velmi používanou technikou ionizace za atmosférického tlaku, a to především v kombinaci s HPLC. Dá se ovšem použít pouze pro látky středně polární až iontové. Principem je rozprašování roztoku analytu skrze kapiláru působením elektrického pole, při kterém se vytváří malé nabitě kapičky. Vznik nabitých kapiček je podmíněn vložením velmi vysokého napětí (jednotky kV) mezi sprejovací kapiláru a vstup do hmotnostního analyzátoru. Elektrické pole polarizuje rozpouštědlo a ionty se stejným nábojem se poté hromadí ve špičce sprejovací kapiláry, dokud není dosaženo dostatečné intenzity elektrického pole, při které odpuzující se ionty se stejným nábojem vytvoří tzv. Taylorův kužel. Z jeho vrcholu poté tryská jemný proud kapaliny rozpadající se na malé nabitě primární kapky. Ty se dále zmenšují odpařováním rozpouštědla za vzniku ještě menších ($R < 10$ nm) vysoce nabitých kapek, ze kterých se po několika dalších rozpadech nakonec uvolňují ionty analytu do plynné fáze. Ionizace elektrosprejem může probíhat v pozitivním nebo negativním módu, a to v závislosti na polaritě vkládaného napětí. Následně jsou sledovány buď kladně (pozitivní mód) nebo záporně (negativní mód) nabitě ionty. Tento způsob ionizace patří mezi měkké ionizační techniky, takže molekuly příliš nefragmentují, ovšem umožňuje tvorbu vícenásobně nabitých iontů, což se hodí pro analýzu vysokomolekulárních látek [58,59].



Obr. 15: Schéma tvorby nabitých kapek [59]

2.5.1.2 Další iontové zdroje

Mezi další iontové zdroje patří například elektronová ionizace, chemická ionizace, ionizace nárazem atomů či ionizace laserem za účasti matrice. **Elektronová ionizace** patří mezi tvrdé ionizační techniky, k ionizaci dochází interakcí analytu s proudem vysokoenergetických elektronů, které jsou emitovány žhaveným vláknem a urychleny elektrostatickým polem.

Chemická ionizace je měkká ionizační technika a ionizace probíhá podobně jako u elektronové ionizace (pomocí žhaveného vlákna), v tomto případě ale s pomocí reakčního plynu (např. methan, isobutan, amoniak), který je přiváděn do iontového zdroje společně s analytem. Tohoto reakčního plynu je oproti analytu ve zdroji nadbytek, a je proto proudem vysokoenergetických elektronů ionizován přednostně. Molekuly analytu jsou poté ionizovány reakcí s ionizovaným reakčním plynem, například přenosem protonu. **Ionizace nárazem atomů** využívá k ionizaci pomocnou látku (matrici), se kterou je analyt smísen. Jako matrice je využíván glycerol, thioglycerol či 3-nitrobenzylalkohol. Matrice absorbuje energii proudu urychlených atomů vzácného plynu a následně ji předá molekulám analytu. Tato technika je vhodná pro větší molekuly, které nelze převést do plynného stavu. **Ionizace laserem za účasti matrice** využívá (stejně jako ionizace nárazem atomů) k ionizaci analytu matrici, se kterou je analyt smísen a nanesen na terčik. Tato matrice absorbuje energii laserového záření a následně ji předá molekulám analytu. Také tato technika je vhodná pro analýzu vysokomolekulárních látek ^[56,58].

2.5.2 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor následuje po iontovém zdroji a vzniklé ionty v plynné fázi do něj vstupují buď kontinuálně, nebo pulzně. Tyto ionty se zde poté za vakua (ca. 10^{-3} – 10^{-11} Pa) separují podle svého poměru m/z . Vhodnost hmotnostního analyzátoru s ohledem na potřebný typ analýzy posuzujeme na základě parametrů, mezi něž patří např. rozlišení, hmotnostní rozsah, přesnost, dynamický rozsah a rychlost skenu. **Rozlišení** je schopnost analyzátoru rozlišit signály pro dva různé ionty s podobnou hodnotou m/z . **Hmotnostní rozsah** označuje rozsah hodnot m/z , které umí hmotnostní analyzátor detekovat. **Přesnost** je udávána rozdílem mezi výsledkem měření a správnou hodnotou a vyjadřuje rozptyl jednotlivých měření. **Dynamický rozsah** odpovídá rozmezí koncentrací, v nichž je odezva detektoru lineárně závislá na koncentraci a **rychlost skenu** udává rychlost, jakou je hmotnostní analyzátor schopen zaznamenávat spektrum.

Rozdělení (separace) iontů v hmotnostním analyzátoru podle m/z probíhá na základě různých fyzikálních principů. Mezi nejzákladnější patří: zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický nebo elektrostatický sektorový analyzátor), různá stabilita oscilace iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního napětí (kvadrupól, Q; iontová past, IT), různá doba rychlosti letu (analyzátor doby letu, TOF), různá frekvence harmonických oscilací

(elektrostatická orbitální past), různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací, FT-ICR) [56,58].

Hmotnostní analyzátor	Rozlišovací schopnost [$\cdot 10^3$]	Správnost [ppm]	m/z rozsah (horní limit) [$\cdot 10^3$]	Rychlost [Hz]	Lineární dynamický rozsah	Cena
Q	3 – 5	nízká	2 – 3	2 – 10	$10^5 - 10^6$	nízká
IT	4 – 20	nízká	4 – 6	2 – 10	$10^4 - 10^5$	střední
TOF	10 – 60	1 – 5	10 – 20	10 – 50	$10^4 - 10^5$	střední
Orbitrap	100 – 240	1 – 3	4	1 – 5	$5 \cdot 10^3$	vyšší
FT-ICR	750 – 2,500	0.3 – 1	4 – 10	0.5 – 2	10^4	vysoká

Obr. 16: Parametry vybraných hmotnostních analyzátorů [58]

2.5.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupól je jednou z variant hmotnostního analyzátoru, která rozděluje ionty na principu stability jejich trajektorií a je velmi vhodná pro spojení se separačními technikami, jako je plynová nebo kapalinová chromatografie. Kvadrupólový analyzátor sestává ze čtyř totožných tyčí, které jsou umístěny v rozích čtverce. Na tyto tyče je vloženo napětí, které vytváří elektrické pole o dvou složkách: stejnosměrná a radiofrekvenční, která je fázově posunuta o 180° , takže dvojice protilehlých tyčí mají stejnou polaritu. Tato polarita se periodicky mění, což způsobí oscilaci prolétávajících iontů. Při určité hodnotě poměru radiofrekvenčního a stejnosměrného napětí dosáhnou ionty o určitém m/z stabilních oscilací a prochází analyzátozem k detektoru, naopak ionty o jiném m/z oscilují se zvětšující se amplitudou a jsou zachyceny na tyčích analyzátoru. Kvadrupól tedy funguje jako jakýsi hmotnostní filtr nastavený na určitou hodnotu m/z. Umí také skenovat celé spektrum, což probíhá kontinuální změnou hodnot radiofrekvenčního a stejnosměrného napětí. [60,61].

2.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie (THS) je instrumentální metoda, která umožňuje přidat další reakční krok k analýze studované látky a také tuto analýzu zpřesnit. Tandemový hmotnostní spektrometr je tvořen kombinací například dvou kvadrupólů, kvadrupólu s analyzátozem doby letu, dvou analyzátorů doby letu či dvou sektorových analyzátorů. Obecně je cílem tandemové hmotnostní spektrometrie především řízená fragmentace iontů

analytu, která nám poskytne lepší informace například o struktuře zkoumaného vzorku. THS se dělí na dva typy: THS v prostoru, kdy jsou hmotnostní analyzátory zapojeny za sebou, a THS v čase, kdy jeden analyzátor zvládne zachytit specifický iont, excitovat jej (čímž vyvolá jeho fragmentaci) a změřit hmotnostní spektrum vzniklých produktů. Tandemová hmotnostní spektrometrie bývá v literatuře také označována zkratkami MS/MS, MSMS či MS^n , kde n vyjadřuje počet tandemových stupňů, tedy i počet hmotnostních analýz. V případě THS v prostoru je maximální počet hmotnostních analýz využitelný v praxi roven čtyřem, protože iontový proud se snižuje se ztrátami při průlety jednotlivými analyzátory a vyšší počet analýz by již neposkytl dostatečný signál. Praktické využití THS v prostoru má však pouze dvoustupňový tandemový spektrometr (MS/MS), pro vícestupňové analýzy se spíše hodí THS v čase.

Měření v MS/MS sestává ze tří základních kroků: (1) izolace iontu prekurzoru, (2) aktivace prekurzoru například srážkou s neutrálním plynem a jeho následný rozpad, (3) analýza fragmentů prekurzoru. V praxi je nejběžnějším způsobem aktivace fragmentace iontu využití **srážek**, a to buď ve srážkových komorách (např. kvadrupólových) nebo (v případě THS v čase) v iontových pastech. Dalším způsobem vybuzení fragmentace je ozáření absorbujících iontů elektromagnetickým zářením vhodné vlnové délky nebo reakce iontů s elektrony či opačně nabitými ionty ^[62].

2.6.1 Trojitý kvadrupól

Kombinace dvou kvadrupólů s kolizní celou je označována jako „trojitý kvadrupól“ a je tvořena prvním kvadrupólem pro izolaci prekurzorového iontu, druhým kvadrupólem, který funguje jako kolizní cela a je naplněn argonem jako kolizním plynem, a třetím kvadrupólem pro izolaci či skenování produktů fragmentace. Právě trojitý kvadrupól je v laboratořích velmi často využíván pro svou poměrně nízkou cenu a malou velikost.

Vzhledem k tomu, že namísto jednoho hmotnostního analyzátoru jsou přítomny dva, lze využít skenovací postupy, které jsou pouze s jedním analyzátorem nerealizovatelné, jako je např. sledování produktových iontů, kde je první analyzátor nastaven na přesnou m/z prekurzoru a funguje jako filtr a druhý analyzátor skenuje celé spektrum produktů fragmentace, což umožňuje získat informace o produktech určitého prekurzoru. Sledování neutrální ztráty pro změnu poskytuje informaci o všech iontech, které ztrácejí fragment o stejné hmotnosti (například nález fragmentu lišícího se od m/z rodičovského iontu o 18 Da odpovídá ztrátě vody). V tomto případě skenují oba analyzátory s konstantním rozdílem m/z .

Dalším módem je sledování prekurzorových iontů, kde první analyzátor skenuje celé spektrum a druhý je nastaven na konkrétní hodnotu m/z – tento přístup poskytuje informaci o všech iontech, které fragmentují za vzniku stejného fragmentového iontu. Posledním je sledování vybraných reakcí, kde první analyzátor propouští pouze prekurzor o určité hodnotě m/z a druhý analyzátor je nastaven na m/z produktu [62,63].

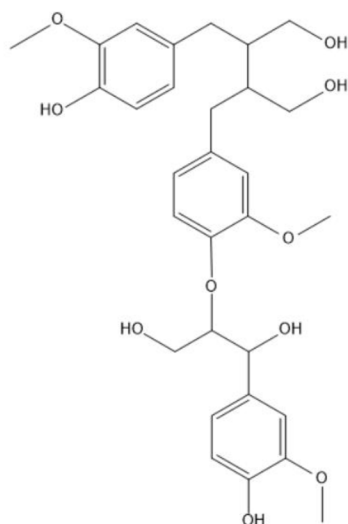
2.7 Hmotnostní spektrometrie lignanů

Analýza lignanů pomocí hmotnostní spektrometrie je poměrně častým způsobem identifikace lignanů. Většinou se využívá tandemové hmotnostní spektrometrie a lignany jsou identifikovány na základě jejich typických fragmentačních přechodů. Jelikož lignany nejsou ještě zcela probádanou skupinou látek, častějším využitím hmotnostní spektrometrie je identifikace (s následným ověřením struktury například pomocí NMR). Pro kvantifikaci obsahu lignanů se hmotnostní spektrometrie využívá pouze u velmi známých a často se vyskytujících lignanů, jako je hydroxymatairesinol, lariciresinol či secoisolariciresinol [30].

Bylo provedeno několik studií, v nichž byla pro identifikaci lignanů použita hmotnostní spektrometrie, například při identifikaci látek extrahovaných z 25 různých druhů nepražených kávových zrn [63]. Typickými ztrátami pro lignany s methoxylovými skupinami jako je například matairesinol, jsou ztráty jedné či dvou methylových skupin a také ztráta oxidu uhličitého [64]. Dalšími pozorovanými ztrátami je například ztráta vody nebo kyslíku. Tyto ztráty ovšem nelze využít pro identifikaci lignanů, protože nejsou charakteristické pouze pro lignany, ale jsou velmi běžné i pro další sekundární metabolity rostlin – flavonoidy – a obecně pro polyfenoly.

Pokud se zaměříme na skupinu seskvilignanů (trimery monolignanů), ty typicky fragmentují za ztráty vody, formaldehydu, guajacylglycerolu anebo je přítomná kombinace těchto ztrát. U dilignanů záleží na typu, například dilignan tvořený dvěma hydroxymatairesinoly ztrácí jednu či dvě molekuly vody. U dilignanů netvořených stejnými monolignany (např. dilignan secoisolariciresinol-lariciresinol) je kromě ztráty formaldehydu či vody charakteristická také ztráta odpovídající hmotnosti přímo jednoho z lignanů (v případě uvedeném výše tedy ztráta lariciresinolu a dvou vodíků případně secoisolariciresinolu a dvou vodíků).

Lignany se také často vyskytují ve formě etherů s guajacylglycerolem (viz Obr. 17). Tyto sloučeniny ovšem podle studie nevykazují ztráty odpovídající samostatným lignanům a mají sklon fragmentovat spíše za ztráty menších molekul jako je voda, formaldehyd (se současnou ztrátou dvou vodíků), methanol, oxid uhličitý či methylen glykol [66, 67].



Obr. 17: Příklad struktury lignanu (v tomto případě secoisolariciresinolu) s guajacylglycerolem ve formě etheru

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Methanol (HPLC – gradient grade, Honeywell, Charlotte, USA), deionizovaná voda (Millipore, Burlington, USA), ethanol (HPLC – gradient grade, VWR, Radnor, USA), dichlormethan (p. a., PENTA, Praha, ČR), acetonitril (HPLC, gradient grade, Honeywell, Charlotte, USA), aceton (HPLC grade, Fischer Chemicals AG, Curych, Švýcarsko), kyselina chlorovodíková (37%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), hydroxid sodný (perly, p. a., Lach-ner, Neratovice, ČR)

3.2 Instrumentální vybavení

K analýze vzorků byl použit hmotnostní spektrometr Xevo TQ-S s trojitým kvadrupólem (Waters, Milford, USA) s iontovým zdrojem ESI v negativním módu. Pro chromatografickou separaci analytů ve zkoumaných vzorcích byl využit ultraúčinný kapalinový chromatograf Acquity UPLC I-Class (Waters, Milford, USA) s PDA detektorem.

3.3 Příprava vzorků ze dřeva

Větve ze smrku ztepilého, buku lesního, jasanu ztepilého a habru obecného byly po sesbírání uloženy do mrazáku a následně lyofilizovány pro odstranění veškeré vlhkosti. Po lyofilizaci byly rozdraceny v kulovém mlýnku na prášek a ten přenesen do zásobních lahvíček. Ze zásobních lahvíček bylo pro následnou extrakci odebráno vždy cca 0,5 g vzorku. Každá navážka byla extrahována 30 minut v ultrazvukové lázni bez ohřevu pomocí 5 ml jednoho z následujících tří rozpouštědel: dichlormethan, ethanol a aceton (celkem tedy každý vzorek dřeva právě jednou každým rozpouštědlem). Po extrakci byl supernatant přefiltrován do čistých, předem zvažovaných vialek pomocí stříkačkových filtrů LUT Syringe Filters Nylon (13 mm, 0,22 µm). Z každého filtrátu byly poté odebrány přesně 3 ml, které byly odpařeny do sucha pod proudem dusíku.

3.4 Příprava vzorků na analýzu

Pro každý ze vzorků byla získaná sušina zvážena, naředěna původním rozpouštědlem na koncentraci 2 mg/ml (kromě extraktu bukového dřeva, kde byla z důvodu velké hmotnosti sušiny použita koncentrace 2,5 mg/ml) a vzniklá suspenze byla přefiltrována pomocí mikrofiltru LUT Syringe Filters PTFE (4 mm, 0,22 μ m). Pro následnou analýzu byly získané roztoky zředěny na koncentraci 100 mg/l odebráním potřebného objemu roztoku extraktu, který byl odfoukán pod proudem dusíku a následně doplněn na 1 ml buď methanolem, 2M methanolicou HCl (pro následnou kyselou hydrolyzu), či 0,3M NaOH rozpuštěném ve směsi methanol/voda 1:1 (v/v) (pro následnou bazickou hydrolyzu). Vzorky určené k hydrolyze byly po dobu 19 hodin inkubovány při 40 °C. Před samotným nástřikem byly všechny vzorky znovu zfiltrány přes teflonový mikrofiltr a bez dalších úprav analyzovány. Kromě přípravy samotných vzorků byly také připraveny odpovídající blanky pro každý způsob hydrolyzy: blank čistého methanolu, blank pro kyselou hydrolyzu obsahující 2M methanolicou HCl a blank pro alkalickou hydrolyzu, který obsahoval 0,3M NaOH rozpuštěného ve směsi methanol/voda 1:1 (v/v). Oba dva blanky pro hydrolyzy podstoupily stejně jako vzorky 19hodinovou inkubaci při 40 °C.

3.5 Chromatografické a hmotnostně-spektrometrické podmínky

Veškeré UHPLC/MS analýzy proběhly s využitím elučního gradientu popsaného v tabulce I. Mobilní fáze A byla deionizovaná voda a mobilní fází B byl acetonitril. Pro všechny analýzy byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 (Waters, Milford, USA) o rozměrech 2,1 \times 100 mm a velikosti částic 1,7 μ m. Průtok mobilní fáze byl nastaven konstantně na 0,25 ml/min.

Tab. I: Profil gradientu pro UHPLC/MS analýzu

čas [min]	A [%]	B [%]
0	95	5
2	95	5
20	5	95
25	5	95
26	95	5
30	95	5

Každý analyzovaný vzorek byl nejprve podroben MS skenu v rozsahu 50–1200 Da a na základě analýzy celkového iontového proudu byly vytipovány ionty s dostatečnou intenzitou, které zároveň nebyly přítomny v příslušném blanku. Tyto ionty byly v navazujících MS/MS analýzách podrobeny fragmentaci a byl sledován profil jejich fragmentačních spekter. Podmínky hmotnostní spektrometrie jsou podrobněji popsány v tabulce II, kolizní energie byla volena v rozsahu 5–60 eV v závislosti na vzhledu příslušného fragmentačního spektra.

Tab. II: Parametry hmotnostně-spektrometrického měření pro MS analýzy a MS/MS analýzy

Parametr	Hodnota
Napětí na sprejovací kapiláře [kV]	2,0
Napětí na sampling cone [V]	37,0
Teplota iontového zdroje [°C]	120
Desolvatační teplota [°C]	200
Průtok desolvatačního plynu [l/hod]	800
Kolizní energie v Trap cele [eV]	5–60
Průtok plynu v Trap cele [ml/min]	0,15

4 Diskuze a výsledky

Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro analýzu extraktů dřeva z vybraných stromů se zaměřením na lignany a zjistit, zda jsou vybrané dřeviny vhodnými zdroji lignanů pro případné další studie. Kromě zkoumání typu rozpouštědla nejvhodnějšího pro dané extrakce z hlediska výtěžků analytů, byly sledovány i společné či naopak rozdílné trendy extraktů (v podobě detekovaných iontů). Dalším předmětem zájmu této práce byly případné rozdíly v detekovaných iontech s ohledem na předúpravu vzorku kyselou či bazickou hydrolyzou extraktu a také trendy v detekovaných hmotách z hlediska zkoumaného dřeva jak druhově (smrk, buk, jasan, habr), tak i ve smyslu hledání rozdílů dřevem jehličnatých a listnatých stromů.

4.1 Výtěžnost rozpouštědel

Pro extrakci analytů ze směsi byla použita tři rozpouštědla o různé polaritě: dichlormethan, ethanol a aceton. Po odebrání 3 ml extraktů, jejich zfiltrování a vysušení pod proudem dusíku byla stanovena hmotnost extrahované sušiny. Bylo zjištěno, že komparativně největší výtěžky extrakce poskytoval aceton, a to nehledě na druh extrahovaného dřeva. Naopak ethanol poskytoval oproti dichlormethanu a acetonu výtěžky nejnižší, a to cca o 50 %. Pro prvotní – necílené – analýzy je tak z uvedené trojice rozpouštědel nejvhodnější aceton, pozornost je ovšem nutné věnovat nejen hmotnosti extrahované sušiny, ale i skladbě analytů, které jsou jeho prostřednictvím extrahovány z matrice. Tabulka III uvádí úplný seznam všech výtěžků s ohledem na typ dřeva i rozpouštědla.

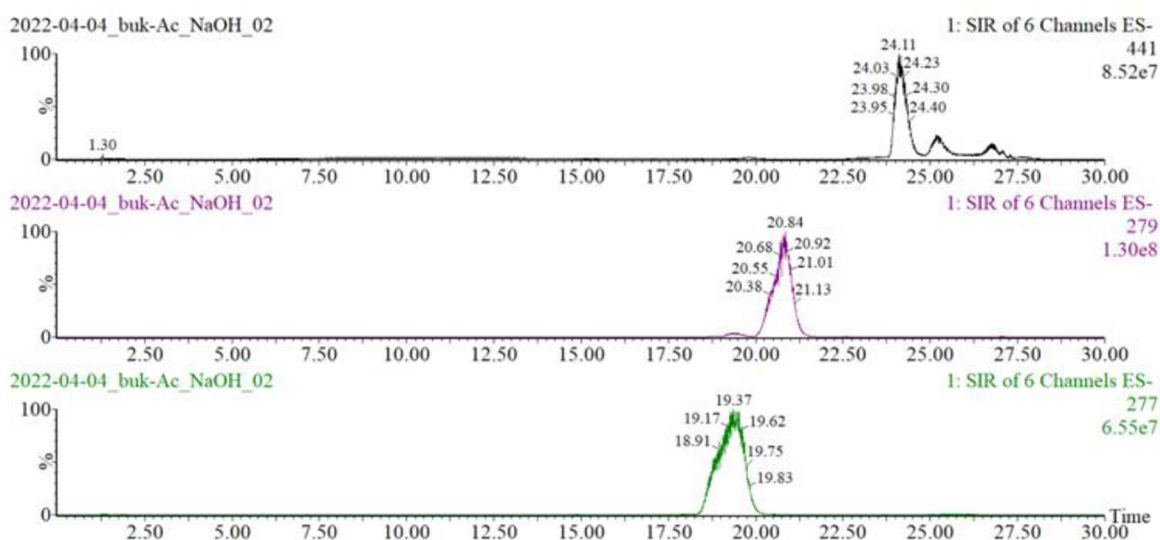
Tab. III: Hmotnosti vysušených filtrátů jednotlivých extraktů

dřevo	Hmotnost extraktu s ohledem na použité rozpouštědlo [mg]		
	dichlormethan	ethanol	aceton
smrk	2,76	1,52	3,13
buk	6,91	2,77	7,86
jasan	3,31	1,78	4,55
habr	4,20	2,91	5,02

4.2 Hmotnostně-spektrometrická analýza

Prvním krokem hmotnostně-spektrometrické analýzy, byl takzvaný MS sken, při kterém kvadrupól pouze skenuje celé spektrum v daném rozsahu m/z . Tímto byla získána prvotní informace o tom, jaké hmoty se vlastně v našich vzorcích nachází. Kromě MS skenu byl proveden také sken neutrálních ztrát, při kterém trojitý kvadrupól propouští pouze ty ionty, které fragmentují se ztrátou předem dané hmoty. V našem případě byla zvolena ztráta 15 Da odpovídající odštěpení methylové skupiny, která je u lignanů velmi běžná^[67] a ztráta 162 Da odpovídající odštěpení hexózy, jejíž měření mělo detekovat glykosylované metabolity, mezi nimiž by se mohly nacházet i komplexnější lignany, jelikož ty se vyskytují v rostlinách i ve formě glykosidů^[3]. Bohužel citlivost přístroje v tomto měřícím módu byla nedostatečná (data neprezentována) a po prvotních experimentech nebyl již tento mód dále používán.

Po prvotním skenu a výběru cílových iontů byla provedena jejich tandemová hmotnostně-spektrometrická analýza za účelem zjištění jejich fragmentačních procesů. V našem případě bylo pro zjištění fragmentačních produktů využito produktového (daughter) skenu. Při této metodě měření pomocí trojitého kvadrupólu je první z kvadrupólů nastaven na m/z prekurzorového (parent) iontu, neskenuje tedy celé spektrum m/z jako při MS skenu, v druhém kvadrupólu, který zastává funkci kolizní cely, probíhá fragmentace prekurzorového iontu na produkty a poslední kvadrupól skenuje celé spektrum m/z a zaznamenává veškeré hmoty fragmentů, které skrz něj z kolizní cely prochází. Vzhledem k náročnosti produktových skenů, ve smyslu nároků na čas skenu, bylo využito znalosti retenčních časů námi sledovaných prekurzorových iontů z předchozích měření a při zadávání analýz bylo naplánováno více produktových skenů vedle sebe a za sebou do předem definovaných časových oken v rámci jedné analýzy viz Obr. 15.

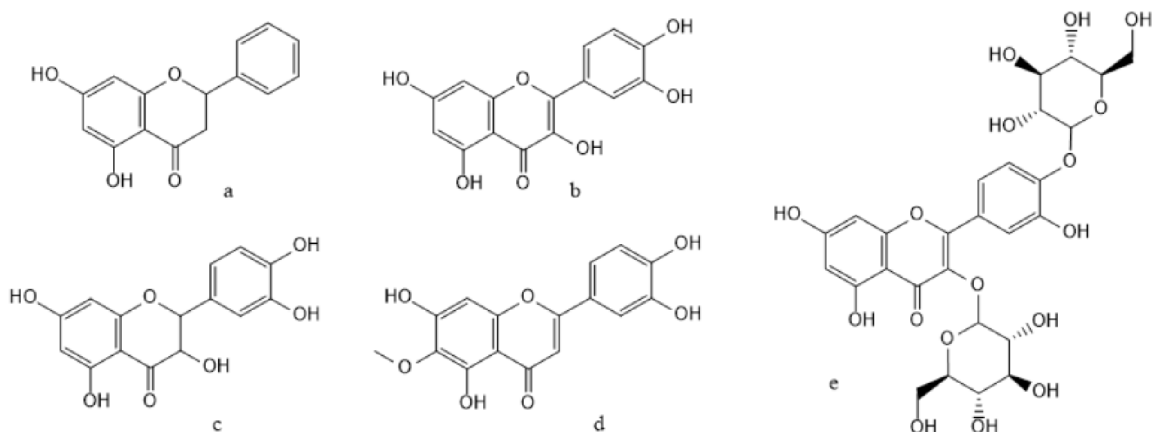


Obr. 15: Vzájemně se doplňující profily produktových skenů jednotlivých prekurzorových iontů

Jelikož podmínky pro optimální fragmentaci každého iontu v kolizní cele jsou mírně odlišné, bylo také zapotřebí pro každý prekurzorový iont optimalizovat kolizní energii. Naším cílem bylo dosáhnout takové kolizní energie, při které by byla intenzita zfragmentovaného parentového iontu ve výsledném spektru rovna přibližně 10% intenzitě base píku (tj. nejintenzivnějšího píku spektra) – přítomnost prekurzorového iontu ve spektru je jedním z indikátorů, že nedochází k přílišné fragmentaci v kolizní cele, která by mohla snižovat výtěžek primárních fragmentů jejich kaskádovou fragmentací. Získané m/z hodnoty párů parent + base pík fragmentu byly poté využity při analýze MRM přechodů. Výsledky všech analýz byly v rámci práce zpracovávány manuálně, v případě většího rozsahu dat by bylo možné využít i metody vícerozměrné statistiky [68].

4.3 Identifikace látek

Identifikace analytů probíhala, z důvodu absence příslušných standardů, srovnáváním fragmentačních produktů s databází. Na základě shody fragmentů bylo možné identifikovat některé nalezené ionty, například sloučenina s poměrem m/z 303 byla identifikována jako dihydrokvercetin (Obr. 16c) – viz srovnání fragmentačních spekter na Obr. 17. Dalšími rozpoznávanými sloučeninami byly: pinocembrin ($m/z = 255$; Obr. 16a), kvercetin ($m/z = 301$; Obr. 16b), 6-methoxyluteolin ($m/z = 315$; Obr. 16d), kvercetin-3,4'-O-di-beta-glukopyranosid ($m/z = 625$; Obr. 16e) a byl pozorován i dihydrokvercetin v dimerní formě ($m/z = 606$).

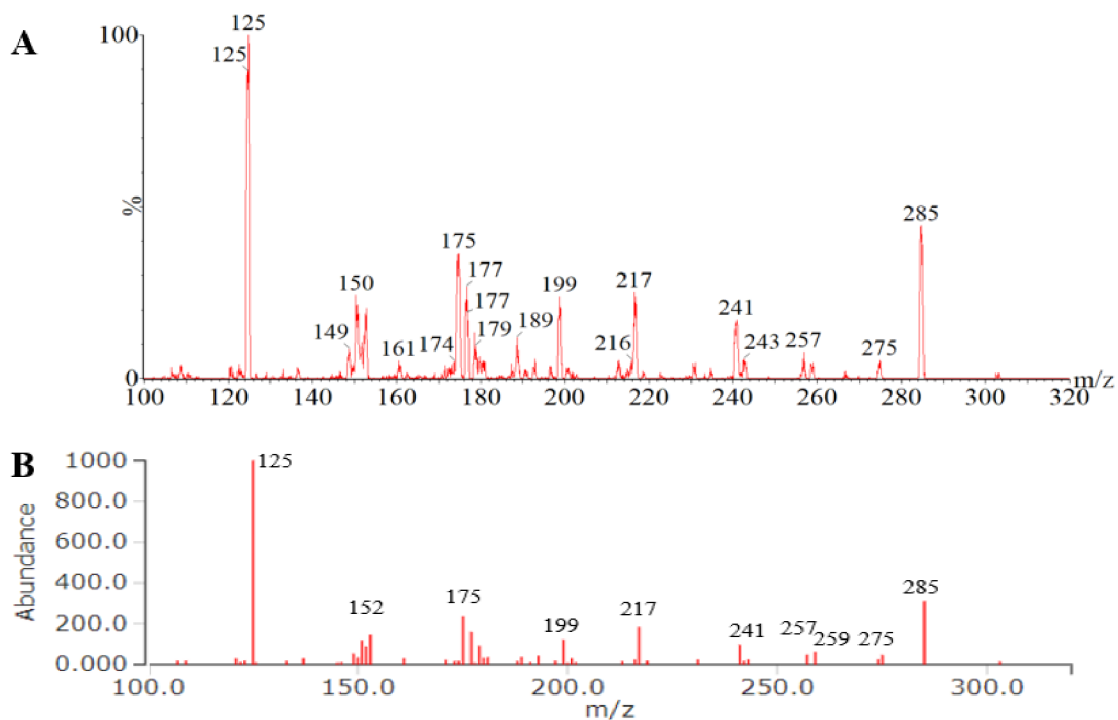


Obr. 16: Struktury analytů identifikovaných na základě srovnání fragmentačních spekter: pinocembrin (a), kvercetin (b), dihydrokvercetin (c), 6-methoxyluteolin (d), kvercetin-3,4'-O-di-beta-glukopyranosid (e)

V tabulce IV je uveden kompletní seznam prekurzorových iontů, vybraných pro další analýzu, a jejich fragmentů. Hodnota m/z odpovídající base píku, který byl vybrán pro tvorbu MRM přechodu, je vyznačena tučně. Jako příklad identifikace sloučeniny na základě shody databázového a experimentálně naměřeného MS/MS spektra jsou na Obr. 17 uvedena spektra dihydrokvercetinu. Porovnání spekter zbylých výše uvedených identifikovaných sloučenin je uvedeno v Příloze 1.

Tab. IV: Identifikované sloučeniny a profil jejich fragmentačního spektra

sloučenina	prekurzorový iont [Da]	nejvýznamnější pozorované fragmenty [Da]	optimální kolizní energie [eV]
pinocembrin	255	213, 171, 145, 106 , 83	30
kvercetin	301	257, 159, 83	38
dihydrokvercetin	303	285, 241, 217, 199, 177, 153, 125	20
6-methoxyluteolin	315	271 , 269, 255, 244, 215, 97	38
kvercetin-3,4'-O-di-beta-glukopyranosid	625	301	20
dimer dihydrokvercetinu	606	303 , 285	20

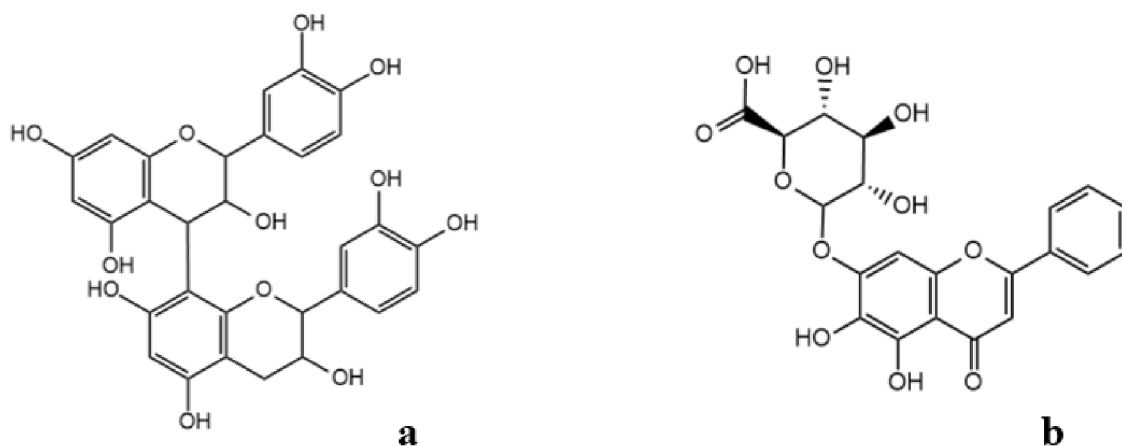


Obr. 17: Změřené fragmentační spektrum dihydrokvercetinu (A) a fragmentační spektrum dihydrokvercetinu z databáze MassBank.eu (B)

4.4 Specifika fragmentací pozorovaná u neidentifikovaných prekurzorových iontů

Většina iontů, pozorovaných v analyzovaných extraktech dřev, nebyla s pomocí databáze MassBank.eu identifikována. Některé hmoty ovšem po srovnání s literaturou vykazovaly stejné ztráty jako lignany, například iont s m/z 193 poskytoval ztrátu 59, kterou poskytuje arctigenin. Analyt s m/z 441 ztrácel hmotu 146 Da, která byla v literatuře pozorována u secoisolariciresinolu, lariciresinolu, arctigeninu či matairesinol-rhamnosidu, ovšem může se jednat také o ztrátu deoxyhexózy ($C_6H_{10}O_4$). Látka s $m/z = 279$ fragmentovala za ztráty hmoty 182, která byla pozorována u secoisolariciresinolu a ztráta 148 u prekurzorového iontu s $m/z = 255$ odpovídala jedné ze ztrát pozorovaných u secoisolariciresinolu ^[67]. Z důvodu nedostatku času nebyla identita těchto hmot dále sledována, jedná se však o kandidáty pro další měření, ať už pomocí vysokorozlišující hmotností spektrometrie, která by poskytla bližší informace týkající se sumárního vzorce těchto iontů (a jejich fragmentů) nebo pomocí jiných technik umožňujících strukturální analýzu, jako je např. NMR. Několik fragmentovaných prekurzorů (konkrétně ionty o m/z 611, 613, 633 a 637) vykazovalo

poněkud netradiční ztrátu 332 Da, která by mohla naznačovat buď přítomnost sterolového jádra, (jelikož podle MassBank.eu vykazuje tuto ztrátu například ginsenosid F1 [69]), nebo také příslušnost k flavonoidům, protože (-)-epicatechin-(4-β-8)-(+)-catechin (Obr. 18a) a baicalin (glukosid baicalienu) (Obr. 18b) také poskytují ztrátu 332 [70,71].



Obr. 18: Struktura (-)-epicatechin-(4-β-8)-(+)-catechinu (a) a baicalinu (b)

4.5 MRM přechody

Pro ionty, u nichž byla měřena fragmentační spektra, byly následně navrženy MRM přechody jako rychlý způsob screeningu jejich výskytu ve všech připravených (a analyzovaných) vzorcích. Takto byly vytvořeny přechody pro 48 iontů (detaily zahrnující m/z parentu, m/z fragmentového iontu, kolizní energii a retenční čas, ve kterém se námi chtěný iont eluoval, jsou uvedeny v tabulce V).

Tab. V: Informace o 48 iontech analyzovaných v MRM módu

m/z parentu	m/z fragmentu	kolizní energie [eV]	retenční čas [min]
164,6	149	25	2–3; 7,5–9
192,7	133	25	8–9,5
204,7	189	30	2–3; 17,5–18,5
255	106	30	12,5–14
277	58	25	18–20,5
279	96	35	19,5–22
295	277	20	15–16
299	185	38	18–19
301	83	38	19,5–20,5
303	125	20	6,5–10

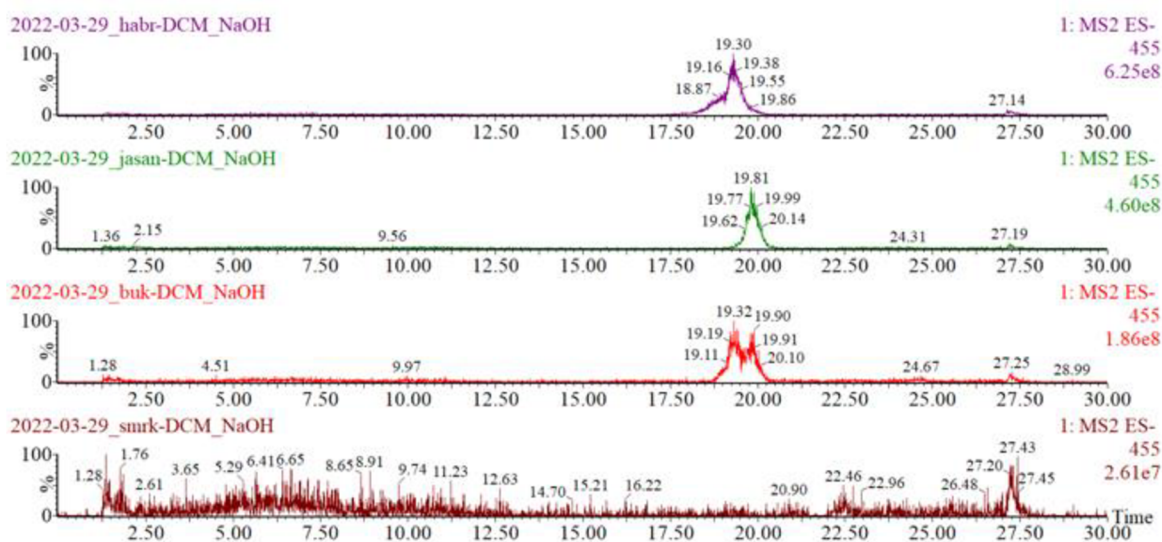
305	58	25	21–22
315	271	38	15–16
329	299	25	8,5–10
331	131	30	11,5–14,5
359	269	25	7–8,5
369	207	25	4,5–7
423	328	20	6–9
441	295	35	24–25;25–26
455	407	50	16,5–21
457	425	45	15,5–17
477	161	25	6,5–8,5
603	161	45	20–21,5
606,8	303	20	7,5–10
611	279	15	19,5–22
613,5	281	20	22–23
619	160	40	18–20
623	161	25	6,5–8,5
625	301	25	19,5–20,5
633	301	15	19–20,5
637	305	15	21–22
713	677	40	7–8
826	790	45	7–8,5
939,5	904	45	7–9
1181,7	582	30	16,5–20,5

Vzhledem k tomu, že záznam MRM přechodů je řádově rychlejší než záznam scanů ve velkém rozsahu m/z, bylo možné tyto přechody měřit po celou dobu analýzy, a sledovat tak, zda se ve vzorcích vyskytují i izomery poskytující stejnou fragmentaci, ale lišící se retenčními časy. Takto byl zjištěn výskyt izomerů pro přechody 441→295 (retenční časy 24–25 min a 25–26 min) a 165→149 (r_t 2–3 min a 7,5–9 min).

Výsledky těchto analýz ukazují zajímavé trendy, které by bylo možné dále studovat a v budoucnu využít například pro určení druhu dřeva na základě analýzy extraktu vzorku, který není možné identifikovat dendrologickou analýzou (např. z důvodu jeho malého množství nebo destrukce původní struktury). Jako další možná aplikace se jeví obecné odlišení dřeva pocházejícího z listnatého, resp. jehličnatého druhu. Z tohoto hlediska se jako analyticky zajímavé ukazují přechody 305→58 (r_t 21–22 min), 315→271 (r_t 15–16 min), 607→303 (r_t 7,5–10 min) a 625→301 (r_t 19,5–20,5 min), které byly pozorovány pouze ve smrkovém dřevě a můžeme tedy předběžně předpokládat, že se jedná o sloučeniny typické pro jehličnaté stromy (je však nutno brát v potaz, že předkládaná práce zpracovává omezený počet druhů dřevin). Také pik přisouzený pinocembrinu (255→106)

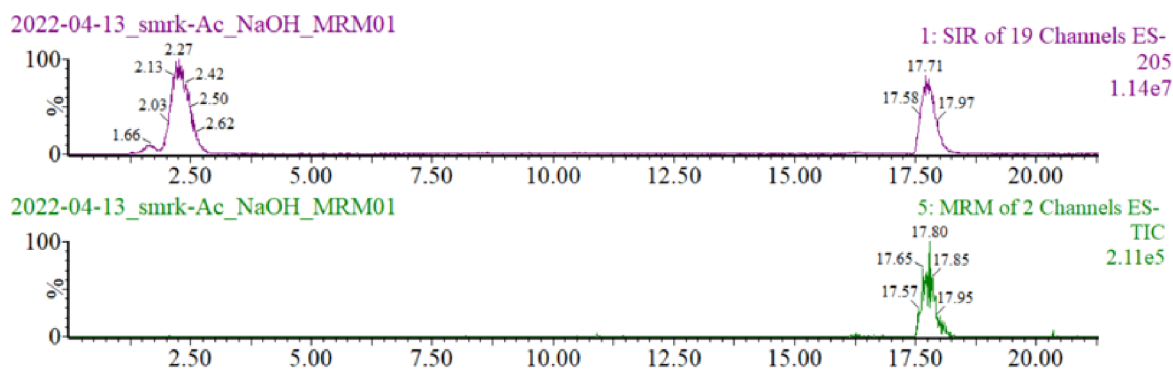
(r_t 12,5–14 min) nebyl přítomen v žádném jiném analyzovaném vzorku dřeva než v nehydrolyzovaném smrkovém dřevě. Mezi další analyty typické pouze pro jeden konkrétní druh dřeva patří pík odpovídající přechodu 713→677 (r_t 7–8 min) (pozorován pouze ve vzorku bukového dřeva). Pro jasan jsou pak unikátní přechody 369→207 (r_t 4,5–7 min) a 623→161 (r_t 6,5–8,5 min). Habr pak poskytuje unikátní píky pro přechody 331→131 (r_t 11,5–14,5 min), 359→269 (r_t 7–8,5 min), 423→328 (r_t 6–9 min) a 1182→582 (r_t 16,5–20,5 min).

Manuální analýza experimentálních dat zaměřená na sloučeniny, které mají potenciál odlišit stromy jehličnaté a listnaté odhalila ve všech listnatých stromech (buk, jasan, habr) přítomnost dvou analytů, které zároveň nebyly nalezeny ve smrku, tudíž by se mohlo jednat o látku, typické pouze pro listnaté stromy. Konkrétně se jedná o iont s m/z 603, (detekovaný nehledě na to, zda byl vzorek hydrolyzován či nikoli), pozorovaným přechodem 603→161 (r_t 20–21,5 min) a iont s m/z 455 (pozorovaný pouze za alkalické hydrolyzy), detekovaný při přechodu 455→407 (r_t 18–21 min). Na obrázku (Obr. 18) lze vidět, že zatímco v buku, jasanu i habru jakožto listnatých stromech (při extrakci dichlormethanem za alkalické hydrolyzy) se hmota 455 Da objevuje, ve smrku nelze najít ani náznak píku v daném retenčním čase. Tato hmota 455 Da ovšem eluovala ve dvou různých retenčních časech v závislosti na druhu listnaté stromu. Po porovnání produktových skenů analytů se domníváme, že se jedná pravděpodobně o dva izomery, jelikož profily fragmentačních spekter jsou totožné.



Obr. 18: Srovnání výskytu hmoty 455 Da u listnatých a jehličnatých druhů stromů

Specifická MRM přechodů rovněž umožnila eliminovat z chromatogramů nečistoty vyskytující se typicky zejména v mrtvém čase, kde eluovala řada sloučenin v širokém rozsahu hodnot m/z . Například při proměření vzorku alkalicky hydrolyzovaného acetonového extraktu smrku, byl v SIR módu detekován pík pro hodnotu $m/z = 205$ ve dvou retenčních časech, avšak sken MRM přechodu cílený na později eluovaný pík (se změřeným fragmentačním spektrem a vhodně zvoleným přechodem), detekoval pouze požadovaný analyt poskytující přechod $205 \rightarrow 189$ (Obr. 18).



Obr. 18: Porovnání SIR a MRM pro sloučeninu s m/z 205

4.6 Výsledky experimentu z hlediska přítomnosti lignanů

I přes neúspěch v identifikaci většiny studovaných iontů byly detekovány hmoty, za které by mohly být podezřelé sloučeniny řadící se mezi lignany. Po srovnání ztrát našich iontů s literaturou zabývající se tandemovou hmotnostní spektrometrií lignanů byly vytipovány ztráty, odpovídající některým lignanům. Jsou to: ztráta 59 Da (arctigenin), ztráta 146 Da (např. secoisolariciresinol, lariciresinol a arctigenin), ztráta 148 Da (secoisolariciresinol) a ztráta 182 (secoisolariciresinol). Tyto ztráty poskytují hmoty o m/z 193, 441, 255 a 279 a odpovídající ionty by tedy měly být cílem následných studií jejich struktury.

V rámci příprav k praktické části bakalářské práce byla také vytvořena tabulka (Tab. VI) s teoretickými hmotnostmi lignanů, které byly spočítány kombinací molekulových hmotností vždy dvou monolignolových jednotek s ohledem na případnou ztrátu vodíků z důvodu vzniku násobných vazeb. Při analýze byly nalezeny hmoty, odpovídající vypočítaným teoretickým hmotnostem lignanových struktur (295 Da, 299 Da, 301 Da, 329 Da, 331 Da a 359 Da), ovšem z důvodu nedostatku času nemohly být blíže prozkoumány. Tyto hmoty by rovněž měly být cíli další strukturní analýzy.

Tab. VI: Teoretické relativní molekulové hmotnosti základních lignanových skupin s ohledem na to, jakými monolignolovými jednotkami je struktura tvořena (H = *p*-kumarylalkohol, G = koniferylalkohol, S = sinapylalkohol)

typ	podjednotky	C	H	O	nominální hmotnost	přesná hmota
dibenzylbutandiol (+ 2 H)	H-H	18	22	4	302	302,1512
	H-G	19	24	5	332	332,1617
	H-S	20	26	6	362	362,1722
	G-G	20	26	6	362	362,1722
	G-S	21	28	7	392	392,1827
	S-S	22	30	8	422	422,1932
dibenzylbutyrolactol stejný sum. vzorec jako furan (bez ztráty)	H-H	18	20	4	300	300,1356
	H-G	19	22	5	330	330,1461
	H-S	20	24	6	360	360,1566
	G-G	20	24	6	360	360,1566
	G-S	21	26	7	390	390,1671
	S-S	22	28	8	420	420,1776
dibenzylbutyrolacton stejný sum. vzorec jako furofuran (- 2 H)	H-H	18	18	4	298	298,12
	H-G	19	20	5	328	328,1305
	H-S	20	22	6	358	358,141
	G-G	20	22	6	358	358,141
	G-S	21	24	7	388	388,1515
	S-S	22	26	8	418	418,162
dibenzocyklooktadien stejný sum. vzorec jako aryltetralin (- 4 H)	H-H	18	16	4	296	296,1044
	H-G	19	18	5	326	326,1149
	H-S	20	20	6	356	356,1254
	G-G	20	20	6	356	356,1254
	G-S	21	22	7	386	386,1359
	S-S	22	24	8	416	416,1464
arylnaftalen (- 8 H)	H-H	18	12	4	292	292,0732
	H-G	19	14	5	322	322,0837
	H-S	20	16	6	352	352,0942
	G-G	20	16	6	352	352,0942
	G-S	21	18	7	382	382,1047
	S-S	22	20	8	412	412,1152

5 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá lignany, způsoby jejich extrakce ze 4 konkrétních druhů stromů a jejich následnou analýzou pomocí HPLC/MS. Teoretická část popisuje lignany z hlediska jejich strukturního složení, biosyntézy, vlastností a výskytu. Rovněž stručně popisuje čtyři druhy stromů, jejichž dřevo bylo analyzováno v rámci praktické části práce, mj. i s ohledem na potenciální výskyt lignanů v těchto druzích. V neposlední řadě jsou rozebírány možnosti extrakce analytů ze složitých matic a stručně jsou popsány základní principy kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s ohledem na to, že kombinace těchto tří analytických metod byla použita v experimentální části pro detekci a identifikaci látek přítomných v daných dřevinách.

Experimentální část práce se věnovala několika dílčím otázkám v oblasti analýzy dřevin. Bylo zjišťováno, které rozpouštědlo je pro extrakce nejvhodnější z hlediska výtěžků analytů. Kromě toho byly sledovány i společné či naopak rozdílné trendy extraktů (v podobě detekovaných iontů). Dalším předmětem zájmu této práce byly případné rozdíly v detekovaných iontech s ohledem na předúpravu vzorku kyselou či bazickou hydrolýzou extraktu. Extrakty dřeva byly analyzovány za použití ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí. Vybrané ionty byly podrobeny kolizí indukované disociaci a naměřená fragmentační spektra byla porovnávána s databází spekter dostupnou na webu MassBank.eu s ohledem na majoritní pozorované fragmentační ionty. Tímto způsobem byla identifikována část detekovaných iontů. Mezi sloučeniny, které se nám podařilo identifikovat, patří pinocembrin, kvercetin, dihydrokvercetin, 6-methoxyluteolin a kvercetin-3,4'-O-di-beta-glukopyranosid.

Byly také nalezeny analyty (představované MRM přechody) typické pouze pro jeden druh stromu, a to konkrétně pět pro smrk, jeden pro buk, dva pro jasan a čtyři pro habr. V neposlední řadě byly detekovány také dvě sloučeniny, které by mohly umožňovat odlišení listnatých stromů od jehličnatých. Některé z neidentifikovaných látek navíc vykazují hodnoty neutrálních ztrát, které by – po srovnání s literaturou – mohly odkazovat na přítomnost lignanových sloučenin.

6 Seznam zkratek

ASE – zrychlená extrakce kapalina-pevná látka

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CoA – koenzym A

DIR – řídicí protein

FT-ICR – iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

G – koniferylalkohol

H – *p*-kumarylalkohol

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IT – iontová past

LSE – extrakce kapalina-pevná látka

MF – mobilní fáze

MRM – multiple reaction monitoring

MS – hmotnostní spektrometrie

MS/MS, MSMS, MSⁿ – tandemová hmotnostní spektrometrie

NDGA – kyselina nordihydroguajaretová

NMR – nukleární magnetická rezonance

PDA – fotodiodové pole

PLR – pinoresinol-lariciresinol reduktáza

Q – kvadrupól

RP – systém obrácených fází

t_r – retenční čas

S – sinapylalkohol

SWE – extrakce subkritickou vodou

SDG – sesaminol diglukosid

SF – stacionární fáze

SFE – superkritická fluidní extrakce

SIR – selected ion recording

SIRD – secoisolarciresinoldehydrogenáza

THS – tandemová hmotnostní spektrometrie

TOF – analyzátor doby letu

UHPLC – ultraúčinná kapalinová chromatografie

7 Seznam literatury

- [1] J. Harmatha, Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů, *Chem. Listy* 99 (2005) 622-632.
- [2] S. Schoenherr, M. Ebrahimi, P. Czermak, Lignin Degradation Processes and the Purification of Valuable Products, v knize: M. Poletto (ed.), *Lignin – Trends and Applications*, IntechOpen, London 2017, str. 29-63.
- [3] J. Zhang, J. Chen, Z. Liang, Ch. Zhao, New Lignans and Their Biological Activities, *Chem. Biodiversity* 11 (2014) 1-54.
- [4] L. Nisula, Wood Extractives in Conifers – a Study of Stemwood and Knots of Industrially Important Species, disertační práce, Åbo Akademi University Press, Åbo 2018.
- [5] F. Calvo-Flores, J. Dobado, J. García, Structure and Chemical Properties of Lignans. v knize: *Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials: Chemistry, Technology and Applications*, Wiley, United Kingdom 2015, str. 313-368.
- [6] M. Chen, X. Xu, B. Xu, P. Yang, Z. Liao, S. L. Morris-Natschke, K. H. Lee, D. Chen, Neglschisandrins E-F: two new lignans and related cytotoxic lignans from *Schisandra neglecta*, *Molecules* 18(2) (2013) 2297-2306.
- [7] R. B. Teponno, S. Kusari, M. Spiteller, Recent advances in research on lignans and neolignans, *Nat. Prod. Rep.* 33(9) (2016) 1044-1092.
- [8] Q. Cui, R. Du, M. Liu, L. Rong, Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals, *Molecules* 25(1) (2020) 183.
- [9] D. Ayres, J. Loike, A registry of the natural lignans, v knize: *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*, Cambridge University Press, Cambridge 1990, str. 12-84.
- [10] T. Umezawa, Diversity in lignan biosynthesis, *Phytochemistry Reviews* 2 (2003) 371–390.
- [11] M. Šindelářová, Význam lignanů ve výživě člověka, bakalářská práce, Masarykova Univerzita, Brno 2013.
- [12] S. Metsämuuronen, H. Sirén, Bioactive phenolic compounds, metabolism and properties: a review on valuable chemical compounds in Scots pine and Norway spruce, *Phytochemistry Reviews* 18 (2019) 623-664.
- [13] H. Satake, T. Koyama, S. Bahabadi, E. Matsumoto, E. Ono, J. Murata, Essences in Metabolic Engineering of Lignan Biosynthesis, *Metabolites* 5(2) (2015) 270-290.
- [14] A. Noguchi, Y. Fukui, A. Iuchi-Okada et al., Sequential glucosylation of a furofuran lignan, (+)-sesaminol, by *Sesamum indicum* UGT71A9 and UGT94D1 glucosyltransferases, *Plant J.* 54(3) (2008) 415-427.

- [15] M. Andargie, M. Vinas, A. Rathgeb, E. Möller, P. Karlovsky, Lignans of Sesame (*Sesamum indicum* L.): A Comprehensive Review, *Molecules* 26(4) (2021) 883.
- [16] J. Murata, E. Ono, S. Yoroizuka et al., Oxidative rearrangement of (+)-sesamin by CYP92B14 co-generates twin dietary lignans in sesame, *Nat. Commun.* 8(1) (2017) 2155.
- [17] https://m.chemicalbook.com/ProductCatalog_EN/2311.htm, staženo 15. února 2022.
- [18] J. Slanina, Biologická a farmakologická aktivita lignanů, *Chem. Listy* 94 (2000) 111-116.
- [19] M. S. Abdel-Kader, J. Wisse, R. Evans, H. Werff, D. G. I. Kingston, Bioactive Iridoids and a New Lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest, *J. Nat. Prod.* 60(12) (1997) 1294-1297.
- [20] M. Bascope, O. Sterner, LIGNANS FROM *IRYANTHERA JURUENSIS* WARB, *Revista Boliviana de Química* 23 (2006) 44-47.
- [21] C. Rodríguez-García, C. Sánchez-Quesada, E. Toledo, M. Delgado-Rodríguez, J. J. Gaforio, Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion?, *Molecules* 24(5) (2019) 917.
- [22] B. Holmbom, C. Eckerman, P. Eklund et al., Knots in trees – A new rich source of lignans, *Phytochemistry Reviews* 2 (2003) 331–340.
- [23] S. Barbini, D. Sriranganadane, S. E. Orozco et al., Tools for Bark Biorefineries: Studies toward Improved Characterization of Lipophilic Lignocellulosic Extractives by Combining Supercritical Fluid and Gas Chromatography, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 9(3) (2021) 1323-1332.
- [24] C. Frezza, A. Venditti, C. Toniolo et al., *Nor*-Lignans: Occurrence in Plants and Biological Activities-A Review, *Molecules* 25(1) (2020) 197.
- [25] J. Moravcová, T. Kleinová, Fytoestrogeny ve výživě - přináší užitek, nebo riziko?, *Chem. Listy* 96(5) (2002) 282-289.
- [26] R. Ekman, Analysis of Lignans in Norway Spruce by Combined Gas Chromatography - Mass Spectrometry, *Holzforschung* 30(3) (1976) 79-85.
- [27] M. Formato, S. Piccolella, C. Zidor et al., UHPLC-HRMS Analysis of *Fagus sylvatica* (Fagaceae) Leaves: A Renewable Source of Antioxidant Polyphenols, *Antioxidants* 10(7) (2021) 1140.
- [28] C. Felegyi-Tóth, Z. Garádi, A. Darcsi et al., Isolation and quantification of diarylheptanoids from European hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and HPLC-ESI-MS/MS characterization of its antioxidative phenolics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 210 (2022) 114554.
- [29] www.atlasrostlin.cz/jehlicnany/smrk-ztepily, staženo 29. prosince 2021.

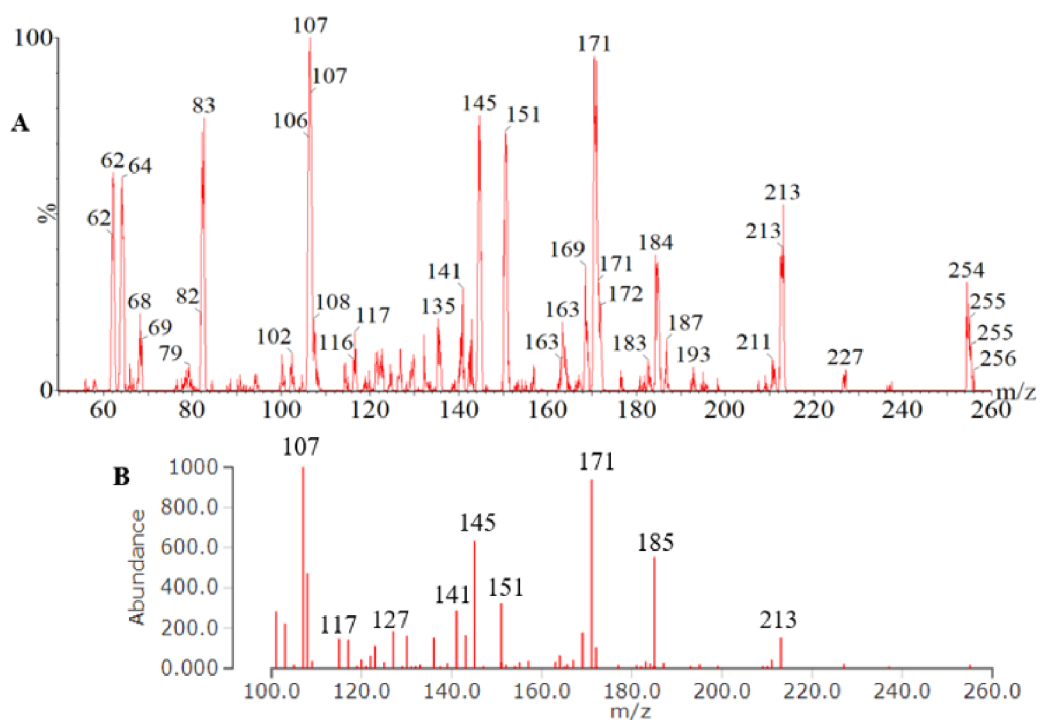
- [30] Z. Kebbi-Benkeder, F. Colin, P. Gérardin, Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species, *Annals of Forest Science* 72 (2014) 277-284.
- [31] S. P. Pietarinen, S. M. Willför, M. O. Ahotupa et al., Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials, *J. Wood Sci.* 52 (2006) 436–444.
- [32] <https://www.atlasrostlin.cz/listnate-stromy/buk-lesni>, staženo 29. prosince 2021.
- [33] <https://www.nppodyji.cz/habr-obecny-carpinus-betulus>, staženo 18. února 2022.
- [34] <https://www.atlasrostlin.cz/listnate-stromy/habr-obecny>, staženo 29. prosince 2021.
- [35] <https://www.atlasrostlin.cz/listnate-kere/jasan-ztepily>, staženo 29. prosince 2021.
- [36] <https://www.chemicool.com/definition/extraction.html>, staženo 10. února 2022.
- [37] D. Ayres, J. Loike, Isolation, purification and initial characterisation, v knize: *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*, Cambridge University Press, Cambridge 1990, str. 138-165.
- [38] J. Slanina, Z. Glatz, Separation procedures applicable to lignan analysis, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 812(1-2) (2004) 215-229.
- [39] M. Kartal, B. Konuklugil, G. Indrayanto et al., Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35(3) 2004 441-447.
- [40] B. E. Richter, B. A. Jones, J. L. Ezzell, Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation, *Analytical Chemistry* 68 (6) (1996) 1033-1039.
- [41] H. Sovová, L. Opletal, M. Bártlová, M. Sajfrtová, M. Křenková, Supercritical fluid extraction of lignans and cinnamic acid from *Schisandra chinensis*, *The Journal of Supercritical Fluids* 42(1) (2007) 88-95.
- [42] J. P. Inostroza, J. Troncoso, C. Mardones, C. Vergara, Lignans in olive stones discarded from the oil industry. Comparison of three extraction methods followed by HPLC-DAD-MS/MS and antioxidant capacity determination, *Journal of the Chilean Chemical Society* 63(2) (2018) 4001-4005.
- [43] J.E. Cacace, G. Mazza, Pressurized low polarity water extraction of lignans from whole flaxseed, *Journal of Food Engineering* 77(4) 2006 1087-1095.
- [44] E. Ö. Kanmaz, G. Ova, The effective parameters for subcritical water extraction of SDG lignan from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) using accelerated solvent extractor, *European Food Research and Technology* 237(2) (2013) 159-166.
- [45] L. Nováková, M. Douša a kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, Lucie Nováková, Praha 2013.
- [46] A. Smeds, HPLC of Lignans, v knize: *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*, Åbo Akademi Universty Press, Åbo 2010, str. 557-565.

- [47] http://www.hplc.cz/Chiral/index.htm#_Mechanismy_chir%C3%A1ln%C3%AD_sep arace, staženo 4. května 2022.
- [48] S. Treppendahl, P. Jakobsen, Isolation of α - and β -peltatin and podophyllotoxin by liquid chromatography and analysis by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 189 (1980) 276–278.
- [49] C. K. Lim, D. C. Ayres, High-performance liquid chromatography of aryltetrahydronaphthalene lignans, *J. Chromatogr.* 255 (1983) 247–254.
- [50] D. A. Fay, H. W. Ziegler, Botanical source differentiation of Podophyllum resin by HPLC, *J. Liq. Chromatogr.* 8(8) (1985) 1501–1505.
- [51] Shi, Longkai et al., A Rapid Method for Simultaneous Analysis of Lignan and γ -Tocopherol in Sesame Oil by Using Normal-Phase Liquid Chromatography, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 95 (2018) 13-19.
- [52] S. Suzuki, T. Umezawa, M. Shimada, Stereochemical difference in secosolariciresinol formation between cell-free extracts from petioles and from ripening seeds of *Arctium lappa* L., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(7) (1998) 1468–1470.
- [53] M. J. Kato, A. Chu, L. B. Davin, N. G. Lewis, Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds, *Phytochemistry* 47(4) (1998) 583–591.
- [54] T. Okunishi, T. Umezawa, M. Shimada, Semi-micro chiral HPLC analysis of lignans, *J. Wood Sci.* 50 (2004) 93–96.
- [55] M. Yousefzadi, M. Sharifi, N. A. Chashmi et al., Optimization of podophyllotoxin extraction method from *Linum album* cell cultures, *Pharmaceutical Biology* 48(12) (2010) 1421-1425.
- [56] K. Záruba a kol., *Analytická chemie*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2016.
- [57] J. H. Gross, *Mass Spectrometry*, A textbook, third ed., Springer International Publishing AG, Cham 2017.
- [58] https://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf, staženo 11. února 2022.
- [59] K. Lemr, L. Borovcová, Ionizace elektrosprejem, *Chem. Listy* 114(3) (2020) 169-178.
- [60] <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/10-im-ms-1352292974.pdf>, staženo 12. února 2022.
- [61] V. Havlíček, F. Tureček, Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti, *Chem. Listy* 114(2) (2020) 106-112.
- [62] M. Sadílek, Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie, *Chem. Listy* 114(2) (2020) 133-144.

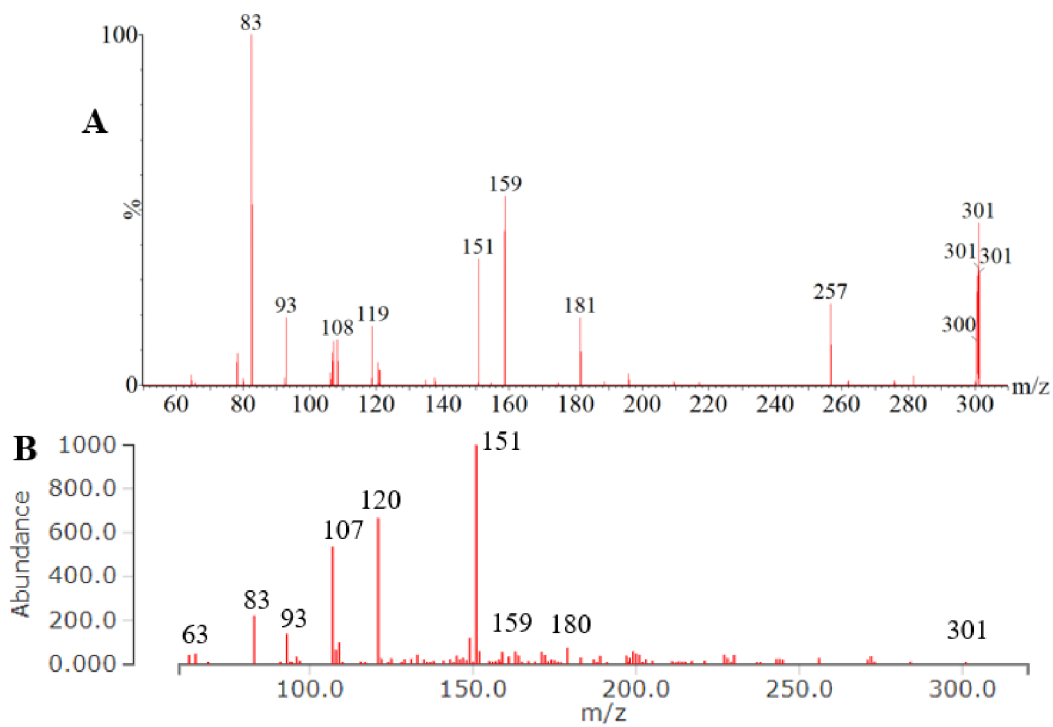
- [63] https://web.vscht.cz/~poustkaj/AMFA%204_3-REV%20092019%20JP%20MS.pdf, staženo 13. února 2022.
- [64] S. Angeloni, L. Navarini, G. Khamitova et al., A new analytical method for the simultaneous quantification of isoflavones and lignans in 25 green coffee samples by HPLC-MS/MS, *Food Chemistry* 325 (2020) 126924.
- [65] Ch. Zhicong, Z. Biming, J. B. Colin et al., Identification of phenolic compounds in Australian grown dragon fruits by LC-ESI-QTOF-MS/MS and determination of their antioxidant potential, *Arabian Journal of Chemistry* 14(6) (2021) 103151.
- [66] A. I. Smeds, P. C. Eklund, S. M. Willför, Chemical characterization of high-molar-mass fractions in a Norway spruce knotwood ethanol extract, *Phytochemistry* 130 (2016) 207-217.
- [67] P. Eklund, M. Backman, L. Kronberg, A. I. Smeds, R. Sjöholm, Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 97–107.
- [68] V. Hrbek, K. Navrátilová, V. Kocourek, J. Hajšlová, Ověření geografického původu zeleného čaje pomocí metabolomického fingerprintingu metodou kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií, *Certifikovaná metodika, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*, 2017.
- [69] <https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay?id=PR304368&dsn=RIKEN>, staženo 3. května 2022.
- [70] W. Sun, JM. Miller, Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrodiccatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (-)-epicatechin, *J Mass Spectrom.* 38(4) (2003) 438-446.
- [71] <https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay?id=PR040076&dsn=RIKEN>, staženo 3. května 2022.

8 Přílohy

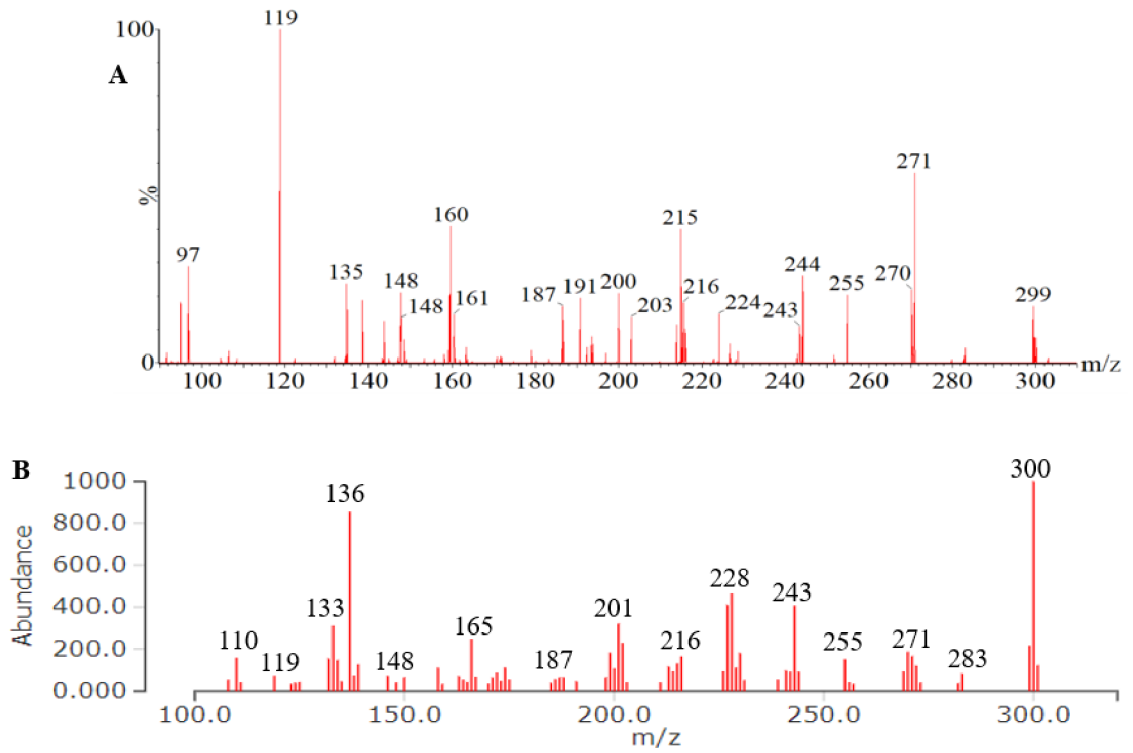
Příloha 1: Porovnání spekter naměřených (A) a spekter z databáze MassBank.eu (B) pro identifikované sloučeniny



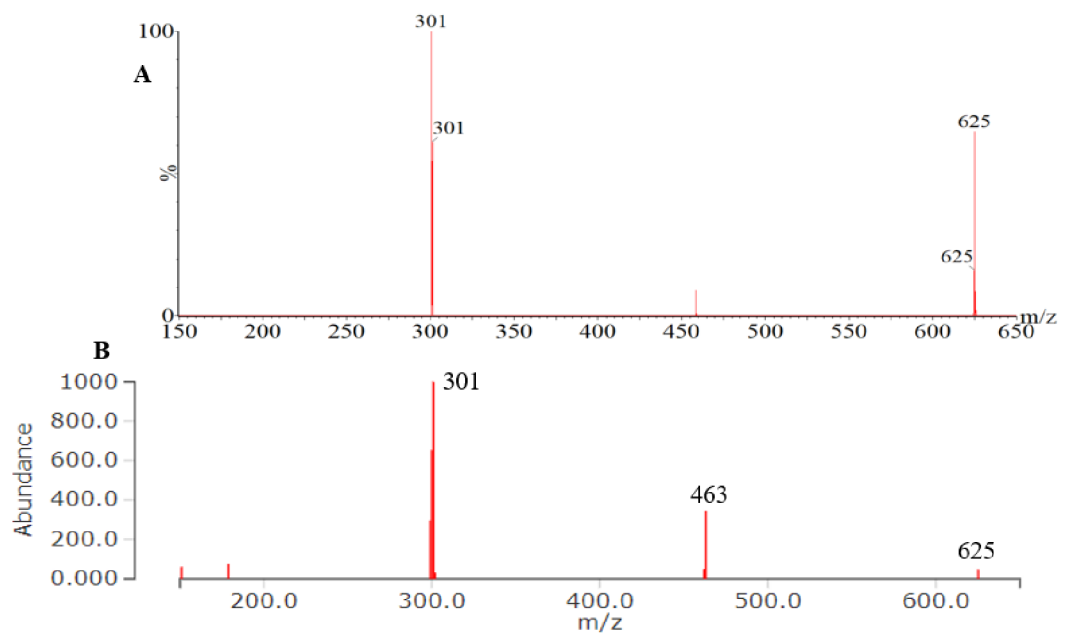
Obr. 1: Fragmentační spektra pinocembrinu



Obr. 2: Fragmentační spektra kvercetinu



Obr. 3: Fragmentační spektra 6-methoxyluteolinu



Obr. 4: Fragmentační spektra kvercetin-3,4'-O-di-beta-glukopyranosidu