

Využití HPLC při stanovení rostlinných metabolitů

Teorie:

HPLC (high performance liquid chromatography) je separační metoda, která slouží k rychlé separaci především nízkomolekulárních látek, i když v poslední době se HPLC využívá i k separaci malých proteinů. Z hlediska uspořádání se HPLC nejčastěji dělí na normální a reverzní fázi. Při využití normální fáze je jako stacionární fáze použita polární látka nejčastěji různé silikáty a jako mobilní fáze se uplatňuje nepolární rozpouštědlo, například hexan. Naproti tomu u reverzní fáze jsou ve stacionární fázi vázány nepolární alifatické zbytky (podle délky se potom označují jako C8, C18, atd.) jako mobilní fáze se využívají polární rozpouštědla (methanol, acetonitrilem atd.). Pro zcela specifické účely se při HPLC používají i iontoměničové kolony, kdy jako mobilní fáze slouží roztoky solí například NaCl. Volba uspořádání závisí na typu sloučenin, které hodláme separovat. Při studiu rostlinného metabolismu využíváme dělní pomocí normální fáze například pro stanovení MDA (malonyldialdehydu), což je ukazatel poškození buněk vyvolaného například aktivními formami kyslíku. Naproti tomu pro stanovení sekundárních metabolitů u rostlin, například fytoalexinů, je nejčastěji využívána reverzní fáze. Navíc při molekulárně-biologických experimentech se pro stanovení délkových fragmentů DNA používá iontoměničová HPLC.

V rámci tohoto cvičení budeme provádět stanovení sekundárních metabolitů ve vzorku vína, konkrétně nás bude zajímat obsah polyfenolů (resveratrol, kvercetin, atd.).

Polyfenoly patří mezi nejpočetnější a nejvíce zastoupené sekundární rostlinné metabolity. Rostlinám slouží jednak jako stavební a strukturní složky, jsou zodpovědné za chuťové, vonné a barevné látky květů a plodů a také slouží jako obranné látky chránící před škůdci, infekcemi, chladem, mechanickým poškozením či jiným stresem. V současné době jsou polyfenoly studovány především v souvislosti s jejich blahodárným vlivem na zdraví člověka.

Přírodní polyfenoly zahrnují látky od jednoduchých fenolických molekul až k vysoce polymerizovaným sloučeninám s molekulární hmotností 30 kDa. Primárně obsahují jeden nebo více hydroxylových skupin, které jsou navázány většinou přímo na fenolovou část molekuly. Navíc bývají polyfenoly často glykosilovány (nejčastěji

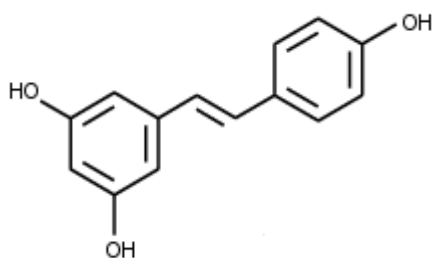
glukosou) jednou, případně i více sacharidovými jednotkami přes β -glykosidickou hydroxylovou skupinu.

Dělení polyfenolů:

Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek	Příklady
C_6	6	Jednoduché fenoly	Katechol
C_6-C_1	7	Fenolické kyseliny	Kys.salicylová
C_6-C_3	9	Fenylpropanoidy	Chromen
$C_6-C_2-C_6$	14	Stilbeny	Resveratrol
$C_6-C_3-C_6$	15	Flavonoidy	Kvercetin
$(C_6-C_3)_2$	18	Lignany	Yatein
$(C_6-C_3-C_6)_2$	30	Biflavonoidy	Amentoflavon
$(C_6-C_3-C_6)_n$	n	Flavolany	Gallotaniny
$(C_6-C_3)_n$	n	Ligniny	-
$(C_6)_n$	n	Katecholmelaniny	Rostlinné pigmenty

Resveratrol

Látka, kterou lze nalézt ve více než 72 rostlinných druzích. Poprvé byl resveratrol izolován z kýchavice velkokvěté, ale díky zdokonalování analytických metod je objeven ve stále větším počtu rostlinných druhů. Nejvíce je obsažen v bobulích révy vinné, dále pak v řadě druhů zeleniny a ořechách. V menším množství ho lze nalézt ve víně. Jeden litr červeného vína obsahuje cca 2 – 6 mg resveratrolu, v bílém je menší množství. Z chemického hlediska se jedná se o 3,4',5-trihydroxystilben. Existují dva geometrické isomery: trans- a cis-, většinou se vyskytuje směs obou isomerů. V rostlině bývá často substituován např. v poloze 3 se váže β -glykosid. Dále se také vyskytují dehydrooligomery, jedná se o tzv. konstitutivní stilbeny (α -viniferin či ϵ -viniferin). Jako zatím poslední byly objeveny a popsány deriváty amurensin, piceatannol, pterostilben, pinosylvin

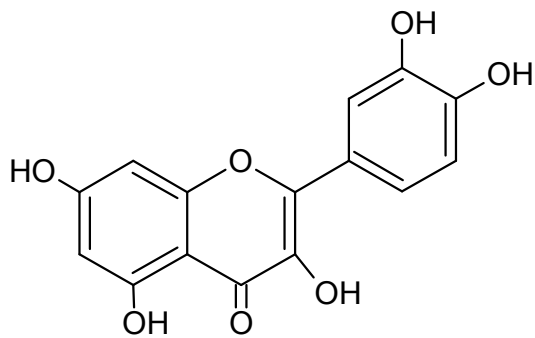


Trans-resveratrol

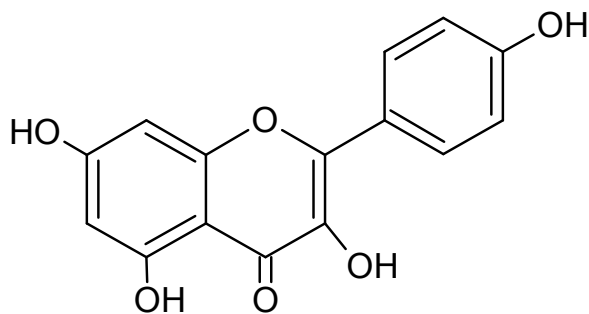
V rostlině je resveratrol produkován jako sekundární metabolit s antibakteriálními nebo antifungálními účinky, který se tvoří de novo jako odpověď na stres.

Flavonoly

Flavonoly jsou přítomné přibližně z 80% u vyšších rostlin. Protože je biosyntéza stimulována světlem, nacházejí se ve vnějších obalových pletivech. Nejrozšířenější flavonoly jsou kvercetin, kemferol a myricetin, které byly nalezeny například v čaji nebo vinné révě. Existuje ovšem i glykosilovaná forma flavonolů, kde cukernou složkou je glukosa nebo rhammosa, s názvem rutin. Tyto látky vykazují antioxidační účinky, přičemž kvercetin má výraznější účinky než kemferol. Vzhledem k tomu, že při vystavení rostliny mechanickému poškození se jejich obsah v listech rostlin zvyšuje, předpokládá se, že glykosidy kvercetinu hrají roli při obranně rostlin na abiotické faktory.



Kvercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon)



Kemferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavon)

Postup:

Při analýze pomocí HPLC bude použita kolona Supelcosil LC-18-DB. Jako mobilní fáze bude směs methanol a voda. Při eluci jednotlivých sloučenin bude využíváno změny v zastoupení jednotlivých složek mobilní fáze tzv. gradientové eluce viz níže.

	METHANOL	VODA
0 min.	5%	95%
20 min.	83%	17%
20,01 – 30 min.	100%	0%
Ekvilibrace kolony		
30,01 – 40 min.	5% MetOH	95% vody

Jako vzorek bude použito víno Laurot, přičemž na kolonu bude nastříknuto 10 ul vzorku.

Detekce bude provedena pomocí DAD (diode array detector). Absorbance bude měřena při vlnových délkách 210 ± 8 nm a 320 ± 8 nm. Referenční vlnová délka bude 500 ± 50 nm. V každém zaznamenaném píku bude změřeno absorpční spektrum v rozmezí 210 – 400 nm.

Vyhodnocení:

Na výsledném chromatogramu bude provedena identifikace sledovaných látek pomocí porovnání retenčních časů se změřenými standardy, případně bude využito pro identifikaci absorpčních spekter jednotlivých látek.