

Studium flavonoidních glykosidů po hydrolýze metodou HPLC-DAD-ELSD zaměřené na identifikaci cukerné složky

Věra Javorková
Magdalena Kalinayová
Radka Pořízková
Milan Žemlička

*Farmaceutická fakulta VFU Brno, Ústav přírodních léčiv,
Palackého 1-3, CZ-612 43 Brno, javorkova@email.cz*

Současný stav

- **Glykosidy**
 - přirozeně se vyskytují v rostlinách
 - užívány v terapii
 - molekuly složené z cukerné (glykon) a necukerné složky (aglykon, genin).
 - cukerná složka - jedna (monosacharid) / více cukerných jednotek (oligosacharid).
- **Určení struktury glykosidu**
 - identifikace obou základních složek (aglykon a sacharid),
 - druh a poloha glykosidické vazby

Současné možnosti identifikace glykosidů

X - absence chromoforu v molekule sacharidu vylučuje použití UV-VIS detektoru

- HPLC-MS
- GC-MS (trifluoroacetylované deriváty)

X - nelze rozlišit cukerné anomery

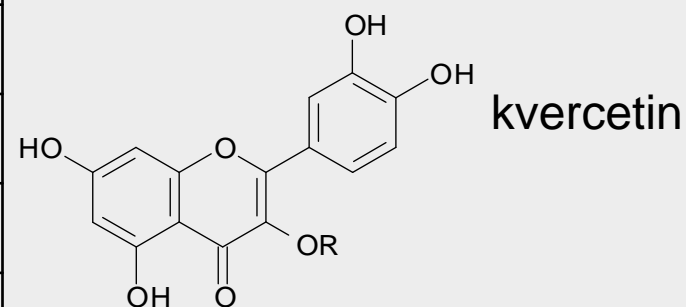
- HPLC-NMR-MS - instrumentálně velice náročné spojení
- 2D NMR techniky
- refraktometrický detektor - pouze v podmínkách izokratické eluce, nízká citlivost
- **Evaporative Light Scattering HPLC Detector (ELSD)** - detektor vhodný pro analýzu sacharidů s mnoha výhodami (dostatečná citlivost, stabilní základní linie, gradientová eluce).

Cíl práce

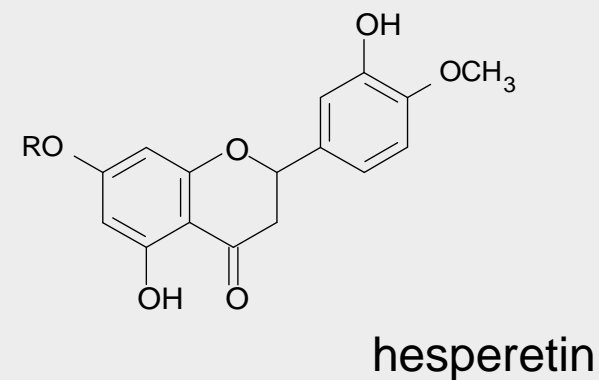
- vytvořit metodu pro identifikaci sacharidových jednotek po hydrolýze glykosidu.

Standardy

Kvercetin	R = H
Kvercetin 3-β-D-glukosid	R = glc
Kvercetin 3-β-D-galaktosid	R = gal
kvercitrin	R = rha
Rutin	R = glc-rha (rutinosa)



Hesperetin	R = H
Hesperidin	R = glc-rha (rutinosa)
Neohesperidin	R = glc-rha (v pol.2)



Hydrolýza

- **Kyselá hydrolýza:**

1. Standard rozpuštěn a smíchán s TFA (kyselina trifluoroctová 8M, ředěná AcN) v poměru 1:1.
2. Směs zahřívána 90°C, 60min
3. Analýza HPLC-DAD-ELSD

- **Enzymatická hydrolýza**

Optimální podmínky daného enzymu: pH bylo upraveno pomocí NaOH a TFA

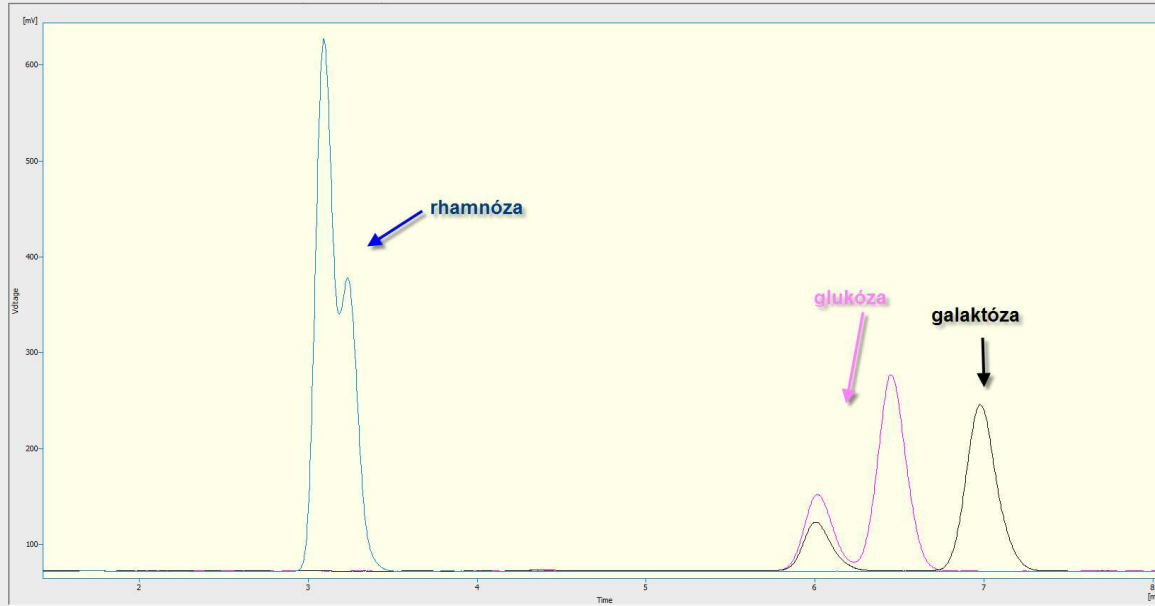
Glukosidáza (EC 3.2.1.21)	pH 5,0, 30 min, 37°C,	terminální glc	(kvercetin glukosid, hesperidinu a neohesperidinu po předchozím působení hesperidinázy)
Galaktosidáza (EC 3.2.1.23)	pH 7,3, 30 min, 37°C	terminální gal	(kvercetin galaktosid)
Hesperidináza (EC 3.2.1.40)	pH 3,8, 30 min, 40°C	terminální rha	hesperidin, neohesperidin, rutin a kvercetin rhamnosid)

Nástrojové vybavení

- Systém HPLC-DAD-ELSD:
YL9100 (Young Lin Instrument Co., Ltd.) s DAD + ELSD
(Agilent 1200 Series, Agilent, Německo), software YL-
Clarity (DataApex, Praha, CZ)
- LiChrospher 100 DIOL, Merck
(5 μ m, 4,1 x 250 mm)
- Mobilní fáze: eluce isokratická, 91:9 acetonitril:voda;
t=31°C, průtoku 2 ml/min.

Stabilita cukrů a aglykonů při hydrolýze

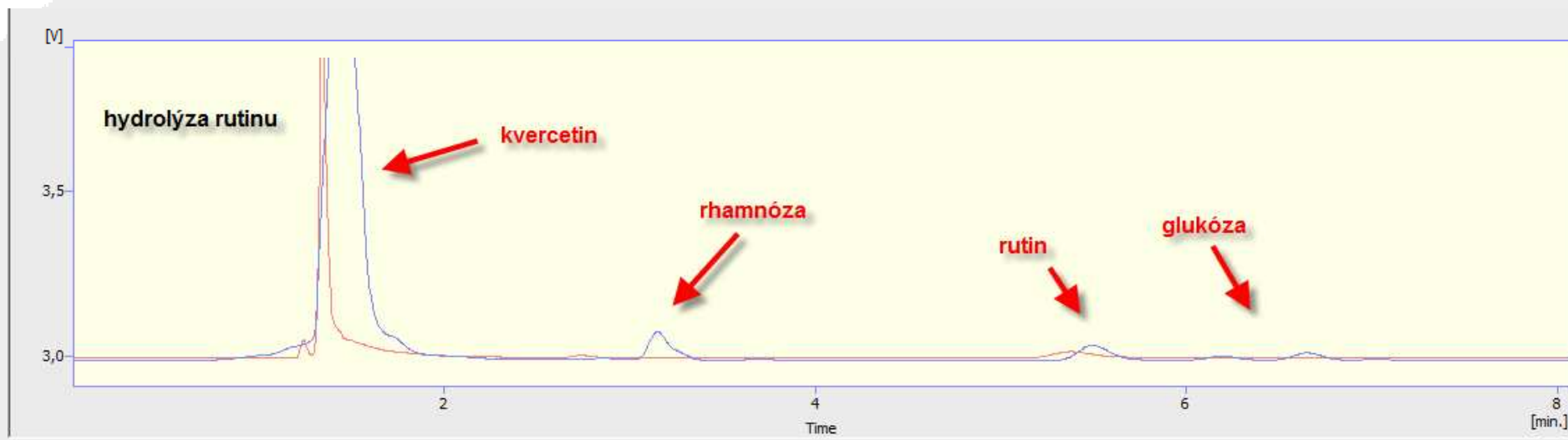
- Zkoušky stability prokázaly, že během doby potřebné k hydrolýze nedojde k destrukci monosacharidových jednotek (glc, rha, gal) ani aglykonů (kvercetin, hesperetin).



LiChrospher 100 DIOL kolona, HPLC isokrat AcN: H₂O 91:9

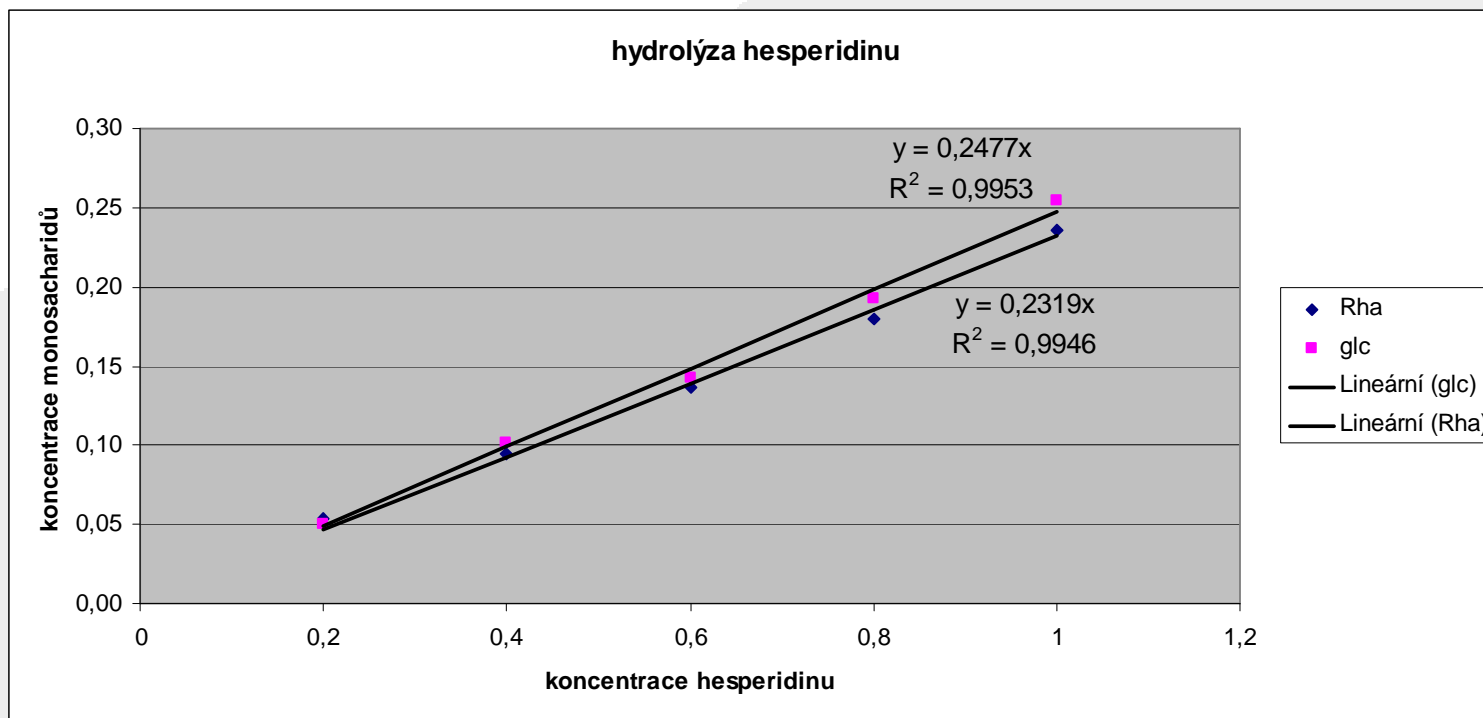
Kyselá hydrolýza

- proběhla úspěšně u všech standardů
- bylo možno separovat a identifikovat všechny složky glykosidů (aglykon i jednotlivé monosacharidy)



LiChrospher 100 DIOL kolona, HPLC isokrat AcN: H₂O 91:9

Standardizace metod



1mg hesperidinu odpovídá 0,29 mg glc a 0,26 mg rha

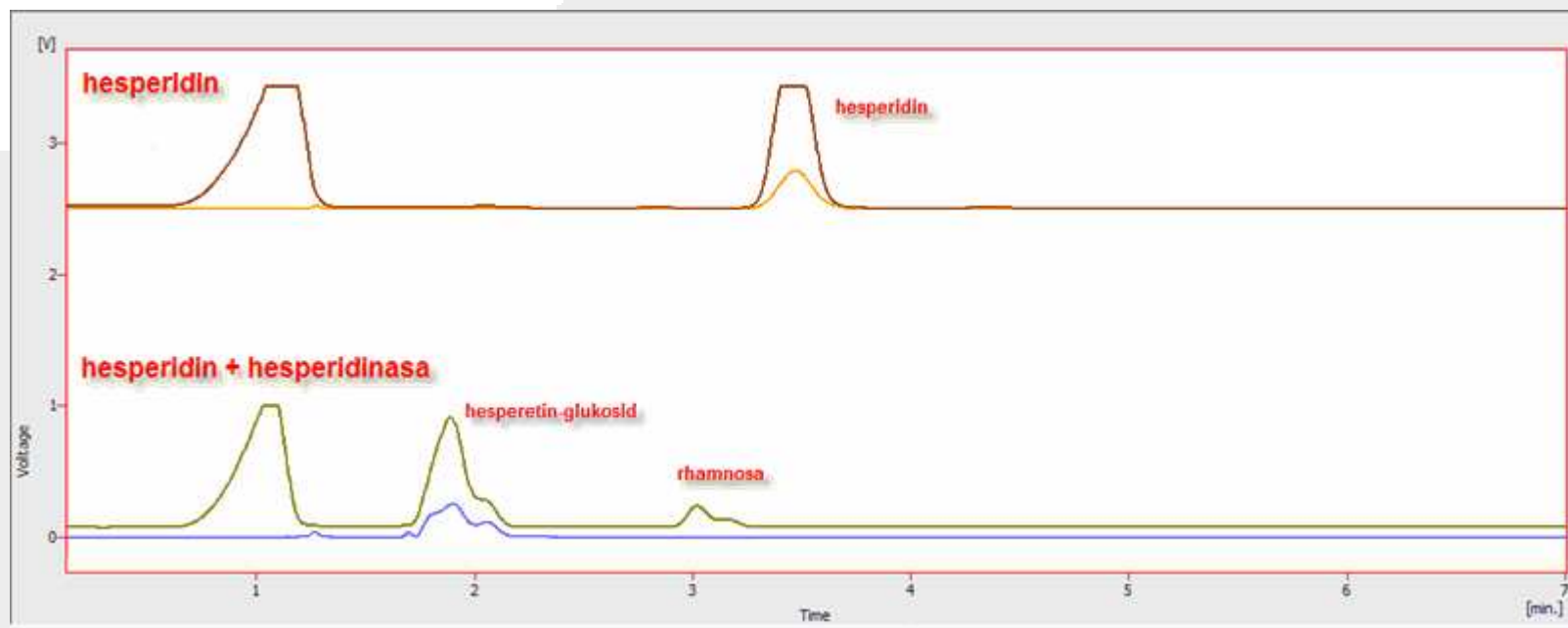
Enzymatická hydrolýza

Při enzymatické hydrolýze flavonoidních glykosidů hraje významnou roli:

- Druh cukerné složky
- Poloha cukerné složky. Poloha 3 je velmi odolná vůči enzymatické hydrolýze.

Hesperidináza

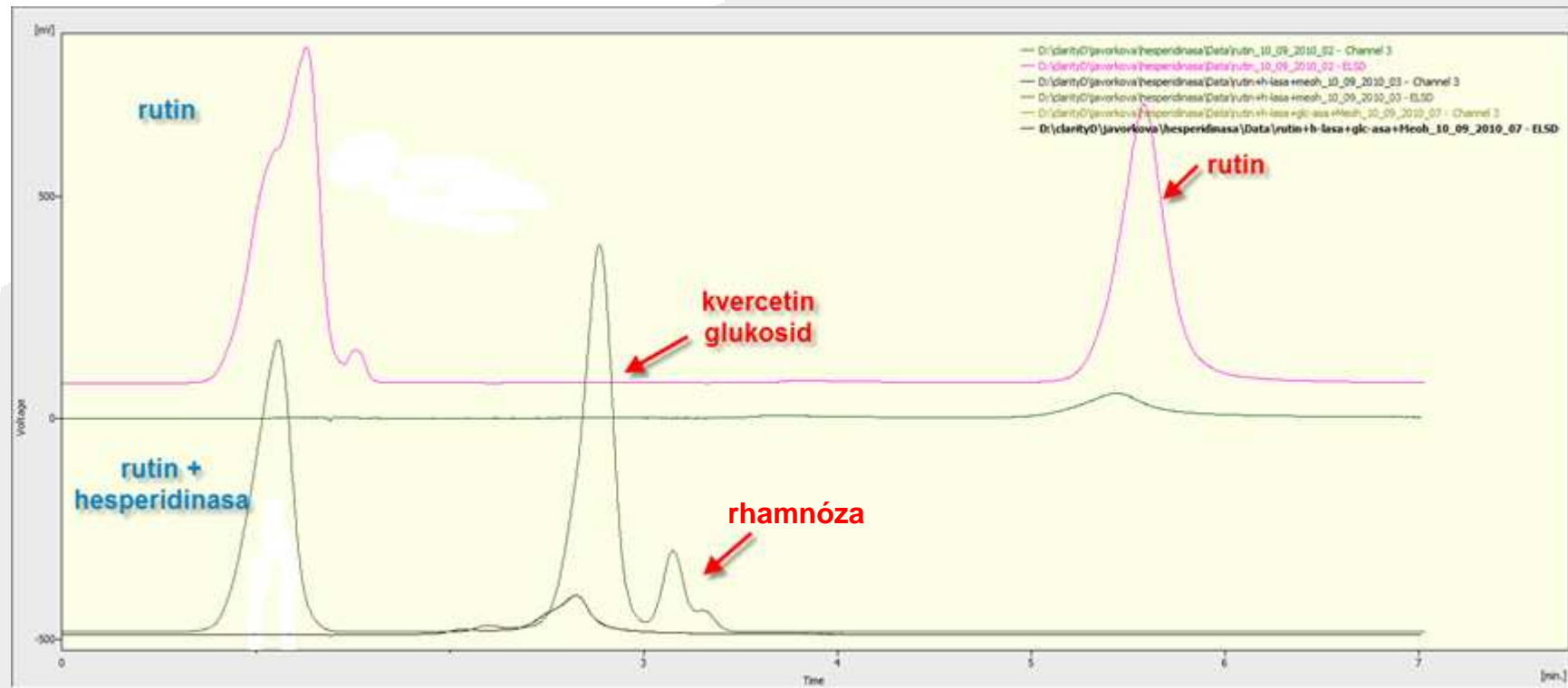
Enzymatická hydrolýza hesperidinu



LiChrospher 100 DIOL kolona, HPLC isokrat AcN: H₂O 91:9

Hesperidináza

Enzymatická hydrolýza rutinu

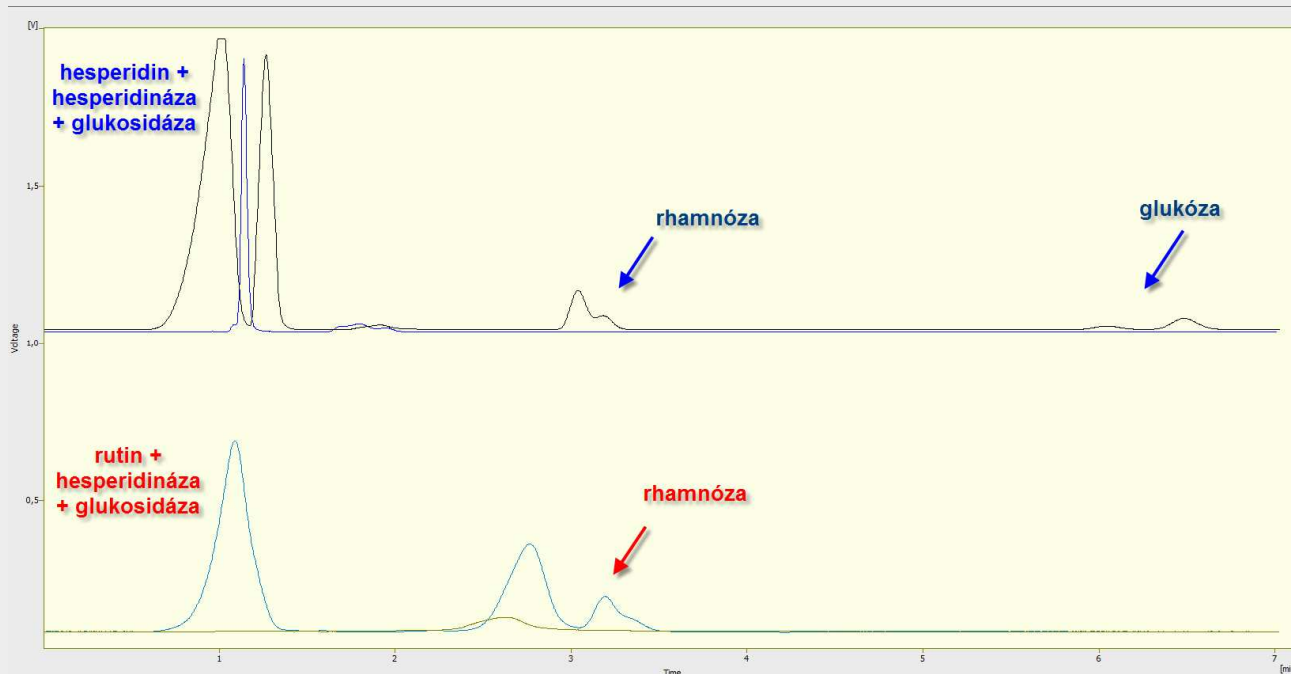


LiChrospher 100 DIOL kolona, HPLC isokrat AcN: H₂O 91:9

Glukosidáza

Enzymatická hydrolýza

- Z hesperidinu po hydrolýze hesperidinázou vznikl kvercetin-7-glukosid, který byl štěpen glukosidásou
- Z rutinu po hydrolýze hesperidinasou vznikl kvercetin-3-glukosid, který nebyl štěpen glukosidasou.



LiChrospher 100 DIOL kolona, HPLC isokrat AcN: H₂O 91:9

Enzymatická hydrolýza vliv polohy 3

Enzymatická hydrolýza - hesperidináza

- Kvercetin-3-rhamnosid není rozkládán hesperidinázou.

Enzymatická hydrolýza - glukosidáza

- Kvercetin-3-glukosid není štěpen glukosidázou.

Enzymatická hydrolýza - galaktosidáza

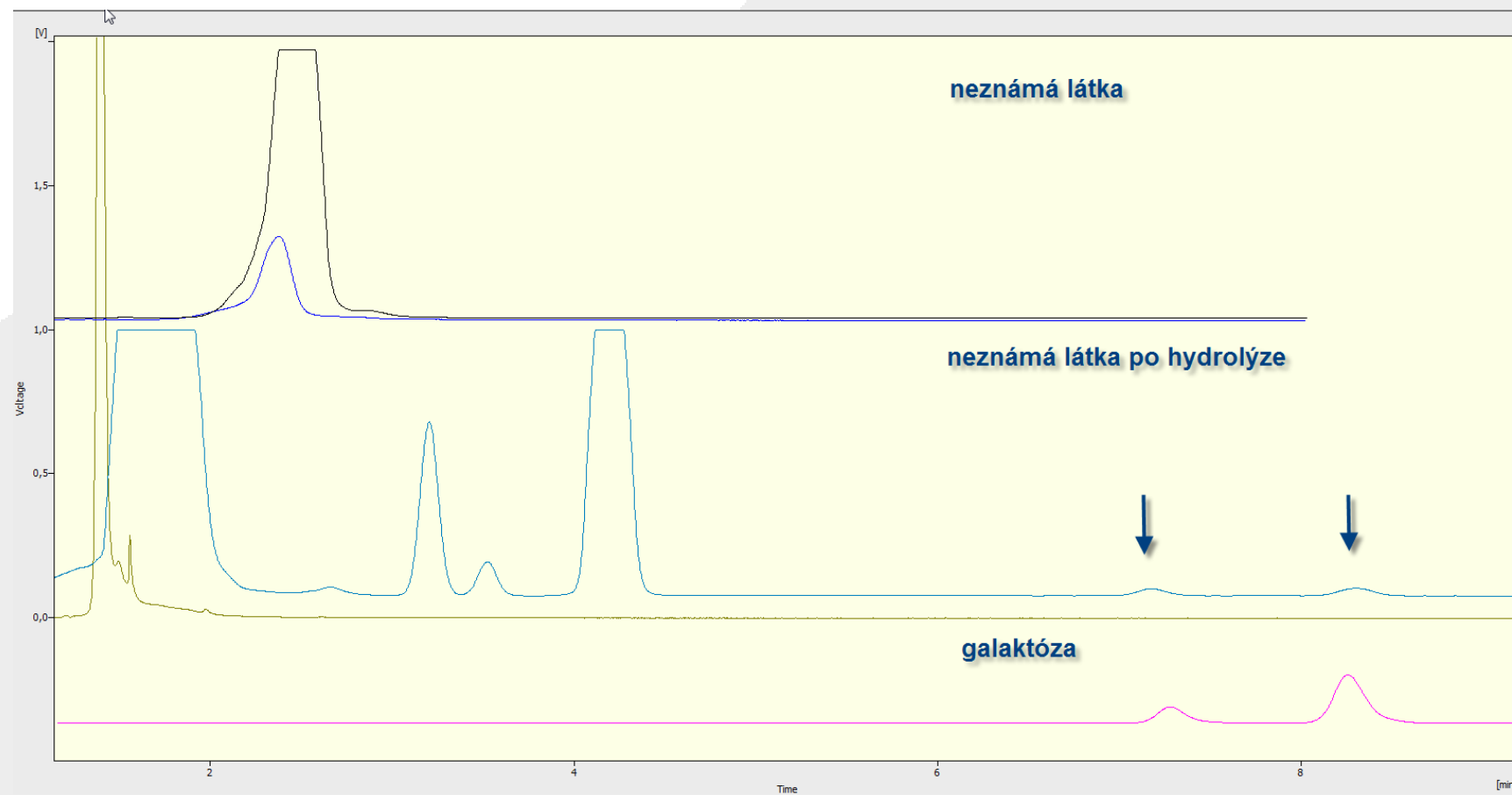
- Kvercetin-3-galaktosid není štěpen galaktosidázou

Aplikace na neznámou látku



- látka z extraktu nati *Polygonum lapathifolium* (Polygonaceae).
- Dle shody UV-Vis spektra, Rt aglykonu se standardem a hmotnostního spektra látky: glykosid kempferolu.
- Pomocí kyselé hydrolýzy: kempferol-galaktosid.
- nepodléhá enzymatické hydrolýze: cukerná složka navázána v poloze 3 ?

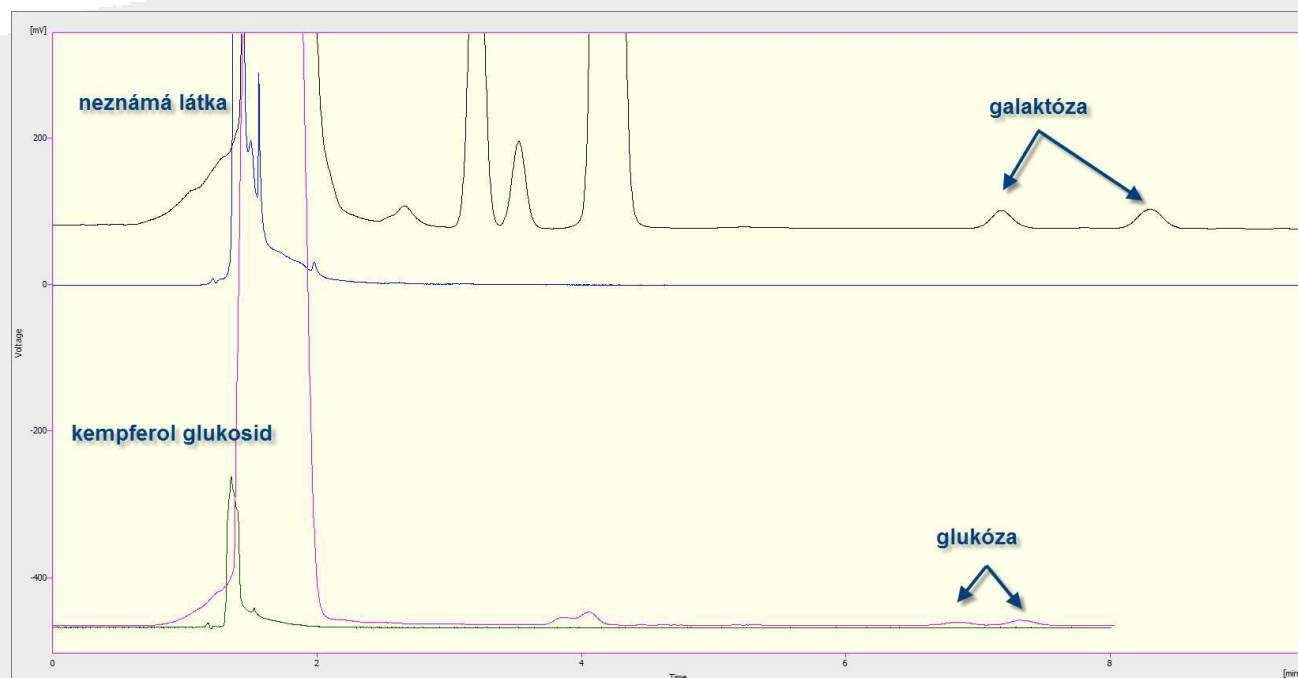
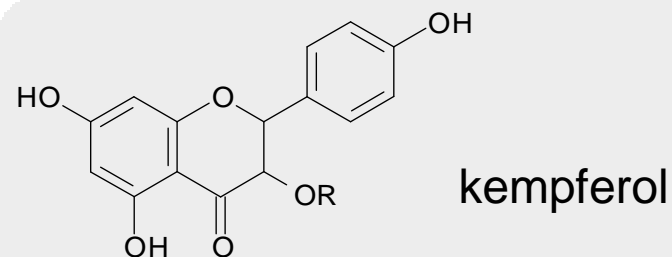
Aplikace na neznámou látku



LiChrospher 100 DIOL kolona, HPLC isokrat AcN: H₂O 91:9

Aplikace na neznámou látku

- Kempferol-glukosid
- Kempferol-galaktosid ?



LiChrospher 100 DIOL kolona, HPLC isokrat AcN: H₂O 91:9

Shrnutí

- ELSD detektor, kolona LiChrospher 100 DIOL, izokratická eluce 9:91 (voda: AcN) - sestava schopná identifikovat původní glykosid i jeho aglykon a cukerné složky po proběhlé hydrolýze.
- Kyselá hydrolýza: U všech modelových případech bylo dosaženo hydrolýzy a byly zaznamenány jednotlivé složky.
- Enzymatická hydrolýza: značně specifická metoda.
 - u hesperidinu a neohesperidinu dosaženo úplné hydrolýzy.
 - u glykosidů v poloze 3 k hydrolýze nedošlo.
- Analýza neznámého glykosidu odhalila přítomnost galaktózy.

Perspektiva , využití

- Zavedení metody HPLC-DAD-ELSD do běžné praxe rozšíří možnosti identifikace přírodních glykosidů.
- Kyselá hydrolýza - levnější a rychlejší metoda
- Enzymatická hydrolýza - informace o pořadí a částečně i poloze navázaných sacharidů.

zdroje

References

- Brito-Arias M.: *Synthesis and Characterization of Glycosides*, ISBN 13: 978-0-387-26251-2 Springer, 2007.
- Vystrčil A.: *Rostlinné glykosidy*, ČSAV, 1955, Praha.
- Rotrekl V.: *Chemické Listy* 92, 883 (1998).
- Day A.J. et al.: *FEBS Letters* 436, 71 (1998)
- Berrin J.G. et al.: *European Journal of Biochemistry* 269, Issue 1, 249 (2002)
- Douša M., HPLC.CZ,
<http://www.hplc.cz/Teorie/ELSD.htm> (24.11.2010)

Práce vznikla s podporou grantu IGA VFU 10/2010/FaF.