

VILNIAUS UNIVERSITETAS

CHEMIJOS FAKULTETAS

ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA

Emilija Butkutė

Pagrindinių studijų programa Chemija

**Alkaloido svainsonino nustatymas kulkšneje hidrofiliinės
sąveikos chromatografijos-tandeminės masių
spektrometrijos metodu**

Magistro studijų baigiamasis darbas

Darbo vadovas:

Prof. habil. dr. Audrius Padarauskas

(vadovo mokslinis laipsnis, pedagoginis vardas,
vardas, pavardė)

Įvertinimas:

(data, įvertinimas, parašas)

Vilnius, 2016

TURINYS

Įvadas	3
I. Literatūros apžvalga.....	4
1.1. Svainsoninas	4
1.2. Svainsonino nustatymas augaluose	5
1.2.1. Svainsonino ekstrakcija	5
1.2.2. Nustatymo metodai	6
1.3. Hidrofilinės sąveikos chromatografija.....	8
1.3.1. Atskyrimo principas.....	10
1.3.2. HILIC sorbentai	11
1.3.3. HILIC metodo taikymas	13
II. Eksperimento metodika	17
2.1. Reagentai ir tirpalai	17
2.2. Kulkšnės mėginiai	17
2.3. Svainsonino ekstrakcija	17
2.4. Chromatografijos-masių spektrometrijos sąlygos	18
III. Rezultatai ir jų aptarimas.....	19
3.1. MS detektavimo sąlygų optimizavimas.....	19
3.2. Chromatografinio atskyrimo sąlygų optimizavimas.....	21
3.3. Ekstrakcijos sąlygų parinkimas	25
3.4. Metodo validavimas ir taikymas.....	27
Išvados.....	32
Summary	33
Literatūros sąrašas	34

Įvadas

Svainsoninas – indolizidino grupės alkaloidas, kurio gausu įvairių rūšių kulkšnėje. Priėdę kulkšnės galvijai apsinuodija svainsoninu, kuris sukelia taip vadinamą lokoizmą. Lokoizmo simptomai: hiperaktyvus ir agresyvus elgesys, nerangi eisena, traukuliai, mažėjanti judesių koordinacija, silpnumas ir mirtis. Pvz., vien Šiaurės Amerikoje, dėl apsinuodijimo svainsoninu priėdus kulkšnės, per metus prarandama apie 25000 galvijų. Tuo tarpu apie panašius apsinuodijimus Europoje patikimų duomenų nėra.

Svainsoninas augaluose dažniausiai nustatomas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. Deja, jo nustatymas skysčių chromatografijos metodu yra kompliktuotas dėl dviejų priežasčių: svainsoninas – labai polinis junginys, todėl silpnai sulaikomas dažniausiai taikomo atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodo sąlygose. Be to, jis visiškai neabsorbuoja šviesos UV-matomoje bangos ilgių srityse, todėl jam detektuoti netinka populiariausias fotometriniis detektorius.

Darbo tikslas – optimizuoti skysčių chromatografijos-tandeminės masių spektrometrijos metodą svainsoninui kulkšnėje nustatyti.

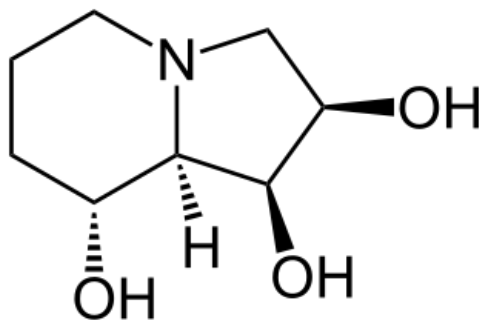
Darbo uždaviniai:

1. Optimizuoti svainsonino chromatografinio atskyrimo ir MS/MS detektavimo sąlygas.
2. Parinkti ir įvertinti svainsonino ekstrakcijos iš augalų metodą.
3. Nustatyti svainsonino koncentracijas Lietuvoje kultivuojamose kulkšnės rūšyse skirtinguose augimo tarpsniuose bei įvertinti jo pasiskirstymą skirtingose augalo dalyse.

I. Literatūros apžvalga

1. 1. Svainsoninas

Svainsoninas (1 pav.) tai indolizidinis alkaloidas randamas pupinių šeimos augaluose, tokiuose kaip kulkšnė bei kai kuriuose grybuose. Šis alkaloidas pirma kartą buvo aptiktas Australijoje augančiame *Swainsona* augale.



1 pav. Svainsonino struktūra.

Svainsoninas – tai toksiška medžiaga, galvijams sukianti neurologinę ligą vadinamą lokoizmu. Lokoizmas žinomas nuo ankstyvojo 16 a., kai ispanų konkistadorų arkliai apsinuodijo kelionių po Ameriką metu. Vėliau imigrantams apsigyvenus Šiaurės Amerikoje buvo pastebėta daugiau atvejų, taip pat pastebėtas ir galvijų apsinuodijimas Australijoje [1].

Lokoizmas yra chroniška liga ir pasireiškia galvijams nuolat (bent porą savaičių) mintant nuodingais augalais. Liga charakterizuojama neurologiniais pakitimais, sutrikusia reprodukcine sistema bei išsekimu [2]. Taip pat pasireiškia agresija, hiperaktyvumas, sustabarėjusi laikysena, seilėjimasis, traukuliai, aklumas, sutrikusi koordinacija, mirtis. Pasitaiko ir apsigimimų – jaunikliai gimsta pažeistais sanariais [3]. Be to apsinuodijimas svainsoninu veikia patinų ir patelių reprodukcinę funkciją. Patinuose pasireiškia spermatogenezės sustabdymas, patelės patiria sumažėjusį vaisingumą bei netikėtus persileidimus. Galvijai praranda libido ir apskritai gebėjimą poruotis [4].

Nors ir kenksmingas galvijams, svainsoninas neseniai buvo indentifikuotas kaip vaistas prieš vėžį ir turi potencialo gydant gliomas bei skrandžio vėžį. Tai pat pastebėtos svainsonino antivirusinės savybės. Daugybė tyrimų rodo, kad svainsoninas yra mediciniškai svarbus komponentas ir gali praversti farmacijoje [5].

1.2. Svainsonino nustatymas augaluose

1.2.1. Svainsonino ekstrakcija

Svainsoninas pagrinde yra randamas kulkšnėje bei kai kuriuose grybuose. Yra labai patogu ekstrahuoti svainsoniną iš augalų, kadangi galima surinkti didelį jų kiekį, juos sudžiovinti ir laikyti iki tol, kol prireikia juos panaudoti. Ekstrakcijai naudojami smulkinti ir išdžiovinti augalai, su lapais, žiedais bei stiebais [6].

Polihidroksi alkaloidai, kuriems priskiriamas ir svainsoninas, dažniausiai išekstrahuojami iš smulkintų augalų ekstrahentu panaudojant skiestą vandeniu (25-50%) metanolį arba etanolį, o kartais ekstrahuojami tiesiog vandeniu. Skiesta rūgštis taip pat neretai dedama, nors abejojama, kad tai padidina ekstrakcijos efektyvumą. Tačiau rūgštis gali slopinti kai kurių pyrolidinių skilimą, kuris stipriau pasireiškiantį esant didesniems pH [7]. Ilgą laiką svainsoninas buvo ekstrahuojamas etilo acetatu arba acetonu, tačiau vėliau buvo nustatyta, kad alkoholio ir vandens mišinys yra labiau tinkamas, dėl geresnio svainsonino tirpumo poliniuose vandeniniuose tirpikliuose [8, 9].

Problema naudojant vandeninius arba/ir alkoholinius tirpalus alkaloidų ekstrakcijai yra ta, jog kartu yra ekstrahuojama daug kitų polinių junginių, tokių kaip cukrai ir aminorūgštys. Todėl priemaišinių junginių pašalinimui dažnai (priklauso nuo analizei taikomo metodo) būtina atlikti ekstrakto valymo procesus. Geriausia valymą atlikti jonų mainų kietafazės ekstrakcijos metodu. Yra didelis jonitinių sorbentų pasirinkimas, tiek anijoninėje tiek katijoninėje formoje, tačiau Dowex 50 arba Amberlite CG120 NH_4^+ arba H^+ formoje yra dažniausiai naudojami [10].

Parūgštintas ir nufiltruotas vandeninis tirpalas praleidžiamas per kolonėlę ir nesulaikomi, neutralūs arba rūgštiniai junginiai pasišalina iš kolonėlės kartu su vandeniu. Alkaloidai, kurie rūgščioje terpėje yra katijono formoje ir sąveikauja su sorbentu, kartu su kitais junginiais, dažniausiai aspartamo rūgštimi ir kitomis aminorūgštimis – desorbuojami skiestu amoniako tirpalu [10].

Žemiau aprašyta keletas konkrečių svainsonino ekstrakcijos būdų.

Ekstrakcija naftos eteriu ultragarso pagalba. 5 g smulkinto augalo patalpinama į kolbą ir užpilami naftos eteriu (angl. *petroleum ether*). Mišinys patalpinamas į ultragarsinę vonelę ir paliekamas vienai valandai 40°C veikiant 40 kHz. Naftos eteris yra pašalinamas centrifuguojant, o likutis 3 val. ekstrahuojamas metanoliu. Tada filtruojama, filtratas yra sukonzentruojamas nugarinant tirpiklį ir ištirpinamas 1 mol/L HCl tirpale, vandeninis tirpalas vėl nufiltruojamas ir tada filtratas dar kartą ekstrahuojamas chloroformu siekiant pašalinti mažiau polinius junginius [11].

Ekstrakcija vandeniū. Kilogramas sauso mėginio užpilamas 10 L 60°C vandens ir valandą paliekamas maišant. Tirpalas sukonzentruojamas iki 2 L ir centrifuguojamas 10 min. Viršutinis tirpalas toliau sukonzentruojamas iki 1 L ir ekstrahuojamas n-butanoliu, tada ekstrahuojama sieros rūgštimi ir galiausiai amoniako tirpalu chloroforme [12]. Būtina pažymėti, kad šis būdas taikomas ne analizei, tačiau preparatiniams tikslams, todėl ekstrakcijos efektyvumas nėra svarbiu veiksmu.

Ekstrakcija chloroformu ir acto rūgštimi. 100 mg smulkinto augalo patalpinama į užsukamą stiklinį 15 mL mėgintuvėlį ir užpilama 4 mL chloroformo bei 5 mL 2% acto rūgštimi. Mėgintuvėliai užkemšami ir paliekami ekstrahuotis 16 val, pastoviai, mechaniškai maišant. Tada mėgintuvėliai 5 min centrifuguojami, kad būtų atskirti augalo likučiai ir tirpiklių sluoksniai. Paimamas tiksliai išmatuotas 1 ml viršutinio acto rūgšties sluoksnio mėginys, įdedamas į švarų buteliuką ir laikomas -20 °C temperatūroje iki analizės atlikimo.

Ekstrakcija acto rūgštimi. 100 mg smulkinto augalo patalpinama į užsukamą stiklinį 15 mL mėgintuvėlį ir užpilama 5 mL 2% acto rūgštimi. Mėgintuvėliai užkemšami ir paliekami ekstrahuotis 16 val., pastoviai, mechaniškai maišant. Tada mėgintuvėliai 5 min centrifuguojami, kad būtų atskirti augalo likučiai ir tirpiklių sluoksniai. Paimamas tiksliai išmatuotas 1 mL acto rūgšties sluoksnio mėginys, įdedamas į švarų buteliuką ir laikomas -20 °C temperatūroje iki analizės atlikimo.

Ekstrakcija metanoliu. 100 mg smulkinto augalo patalpinama į užsukamą stiklinį 15 mL mėgintuvėlį ir užpilama 5 mL metanolio. Mėgintuvėliai užkemšami ir paliekami ekstrahuotis 16 val., pastoviai mechaniškai maišant. Tada mėgintuvėliai 5 min centrifuguojami, kad būtų atskirti augalo likučiai ir tirpiklių sluoksniai. Paimamas tiksliai išmatuotas 1 mL metanolio sluoksnio mėginys, įdedamas į švarų buteliuką ir laikomas -20 °C temperatūroje iki analizės atlikimo [6].

1.2.2. Nustatymo metodai

Polihidroksi alkaloidų klasė, dėl sunkumų šiuos junginius detektuoti standartiniais alkaloidams specifiniais reagentais, palyginti buvo tik neseniai atrasta. Dėl šios priežasties keletas metodų buvo sukurta šių junginių identifikavimui ir nustatymui [10]. Kaip taisyklė, šių junginių nustatymas atliekamas chromatografiniais metodais.

Plonasluoksni chromatografija. Plonasluoksni chromatografinė polihidroksi alkaloidų analizė tinkama jų grynumui nustatyti, jų identifikavimui augalų ekstraktuose bei farmakokinetiniams tyrimams. Norint nustatyti polihidroksi alkaloidus stacionaria faze – labiausiai tinkamas naudoti yra silikagelis, o kaip judri fazė dažniausiai naudojamas chloroformo, metanolio ir amonio hidroksido mišinys [13]. Pirmoji iškilusi problema yra ta, kad

šios klasės junginiai yra labai nejautrūs alkaloidų vizualizacijai naudojamiems reagentams, tokiems kaip Dragendorff reagentas ar jodo platinatas ir duoda patikimus rezultatus tik esant didelėms alkaloidų koncentracijoms. Daugelis šios klasės alkaloidų reaguoja su ninhidrinu, tačiau reakcijos produktas duoda geltoną atspalvį, kuris nėra labai priimtinas identifikavimui. Taip pat skirtingi alkaloidai su šiuo reagentu sudaro skirtingo spalvos intensyvumo junginius.

Buvo pasiūlytas specifinis reagentas polihidroksiindolizidiniams junginiams, tokiems kaip svainsoninas, plonasluoksnės chromatografijos metodu detektuoti. Tam yra naudojama dviejų reagentų sistema: pirmiausia benzene išpurškiamas 10% acto anhidrido tirpalas, po to – Ehrlich'o reagentas (p-dimetilaminobenzaldehidas etanolyje su boro trifluorido eteratu). Pašildžius alkaloido zona nusidažo violetine spalva. Metodas yra pakankamai jautrus – daugumai alkaloidų nustatymo riba siekia 0,5 µg [14].

Dujų chromatografija. Polihidroksi alkaloidų struktūrinis panašumas į cukrus pasufleravo, kad dujų chromatografija gali būti naudojama kaip atskirų komponentų ar augalų ekstraktų analizės metodas. Kaip ir cukrūs, nemodifikuoti alkaloidai yra per daug poliniai, kad galėtų būti tiesiogiai analizuojami dujų chromatografijos būdu, tačiau modifikavimas trimetilsililu suteikia jiems pakankamą lakumą ir stabilumą šiai analizei.

Polihidroksi alkaloidų trimetilsililacija pirmiausia buvo pasiekta su trimetilchlorosilano-heksametildisilazano-piridino (1:3:9) mišinių 50 °C, veikiant 15 min. Modifikuoti alkaloidai buvo atskirti 1,5 m ilgio, 4 mm diametro pakuotoje stiklo kolonėlėje, užpildytoje Chromosorb W HP sorbentu, padengtu 3% OV-1 arba OV-17 skysta faze. Kolonėlės temperatūros programa nuo 125-135 iki 175-200 °C ir detektavimas atliktas liepsnos jonizacijos detektoriumi. Visi individualiai analizuoti alkaloidai buvo registruojami atskiromis smailėmis, ir nors trimetilsililacijos laipsnis nebuvo nustatytas, manoma, jog esant duotoms sąlygoms ji įvyko iki galo. Sulaikymo trukmės svyravo nuo 2,0 iki 17,9 min naudojant OV-1, ir nuo 1,3 iki 12,9 min naudojant OV-17. Be to, buvo pastebėta sulaikymo trukmės koreliacija su hidroksi grupių skaičiumi alkaloido. Alkaloidai, turintys mažesnę hidroksi grupių skaičių, turėjo mažesnę sulaikymo trukmę, nei tie, kurie jų turėjo daugiau. Nei su viena kolonėle nepavyko gauti visiško atskyrimo, tačiau skirtingose kolonėlėse sulaikymo trukmės buvo skirtingos, todėl mišinį buvo galima išanalizuoti atlikus tyrimą du kartus su skirtingomis kolonėlėmis [10].

Žymiai geresnė skiriamoji geba, nei naudojant pakuotas kolonėles, bei visiškas komponentų atskyrimas buvo pasiekti naudojant 30 m ilgio 0,32 mm vidinio skersmens kapiliarinę kolonėlę, padengtą SE-30 skysta faze. Detektavimas buvo atliekamas liepsnos jonizacijos detektoriumi, o kolonėlės temperatūra užprogramuota nuo 105 iki 300 °C. Modifikavimo reagentai, sudarantys nelakius pašalinius produktus, negali būti naudojami, kadangi išpurškimo adata ar kapiliaras gali

užsikimšti. Todėl reagentu buvo pasirinktas N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamidas piridine. Šis reagentas su alkaloidais sudaro tik lakius šalutinius produktus, tačiau reakcijos trukmė pakankamai ilga – pilnam analičių modifikavimui mišinys turi būti laikomas 60 °C temperatūroje 1 val. Masių spektrometrinė analizė parodė, kad šiomis sąlygomis yra pasiekiamas kiekybiškas svainsonino modifikavimas. Papildomi tyrimai parodė, kad linijinis detektoriaus atsakas yra registruojamas plačiame intervale, o nustatymo riba yra apie 150 pg. Šis metodas gali būti naudojamas svainsoninui kulkšneje nustatyti nenaudojant priedų metodo [10].

Skysčių chromatografija (HPLC). Kadangi polihidroksi alkaloidų neįmanoma detektuoti populiariausiais spektrofotometriniais detektoriais, efektyvioji skysčių chromatografija retai buvo taikoma šiems junginiams analizuoti. Ši problema galėjo būti išspręsta modifikavus analites tam tikrais chromoforais ar fluoroforais, bet tai labai apsunkina analizę ir padaro ją nepatrauklia. Didesnė problema yra didelis šių junginių hidrofiliškumas ir mažas tirpumas mažiau poliniuose organiniuose tirpikliuose. Tai apsunkina judrios ir stacionarios fazių pasirinkimą. Pvz., svainsoninas labai silpnai sulaikomas dažniausiai taikomo atvirkščių fazių skysčių chromatografijos metodo sąlygose.

Praktinis svainsonino nustatymas buvo atliktas atvirkščių fazių skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos metodu. Po ekstrakcijos ir mėginio valymo atskyrimas buvo atliekamas 100 mm ilgio ir 2 mm vidinio skersmens Betasil C₁₈ atvirkščių fazių kolonėlėje, eliuentu naudojant 20 mmol/L vandeninio amonio acetate tirpalą su 5% metanolio. Tačiau ir tokiose sąlygose svainsonino sulaikymo trukmė buvo tik 1,4 min. Svainsoninas identifikuotas ir kiekybiškai nustatytas naudojant teigiamą atmosferos slėgio cheminę jonizaciją ir tandeminę masių spektrometriją. Pirmame spektre buvo registruojama intensyvi protonizuotas svainsonino molekulinis jonas, kurio m/z 174, o antrajame – netekęs vandens svainsonino molekulinis jonas, kurio m/z 156. Buvo išmatuota svainsonino nustatymo riba, siekianti 0,019 mg/mL, kas atitinka 0,001% sauso augalo masės [2].

1.3. Hidrofilinės sąveikos chromatografija

Skysčių chromatografija buvo atrasta stebint, kaip spalvoti junginiai yra atskiriami ant polinio sorbento, kuris plaunamas nepoline organine judria faze. Ilgą laiką po chromatografijos atsiradimo tai buvo pagrindinis fazių chromatografijoje pasirinkimo būdas. 20 a. 6-ojo dešimtmečio pabaigoje buvo pasiūlyta priešinga fazių sistema: nepoliniais ligandais modifikuoti silikagelio sorbentai kombinacijoje su polinėmis judriomis fazėmis. Ši fazių sistema buvo

pavadinta atvirkščiu fazių chromatografija, o prieš tai dominavęs variantas buvo pavadintas normalių fazių chromatografija. Didžiausi normalių fazių skysčių chromatografijos, naudojančios neorganinius oksidus kaip stacionarią fazę minusai buvo lėtas pusiausvyros nusistovėjimas ir sorbento paviršiaus heterogeniškumas, duodavęs netiesines izotermas. Dėl to buvo fiksuojamos išplitusios smailės su „uodegomis“, o sulaikymo trukmė keitėsi priklausomai nuo medžiagos koncentracijos mėginyje [15].

Atvirkščių fazių skysčių chromatografijos populiarumas labai išaugo, tačiau buvo susidurta su problema, kaip sukurti sistemą, kuri sulaikytų medžiagas, kurios visiškai nesąveikauja arba labai silpnai sąveikauja su atvirkščių fazių chromatografijoje naudojamais nepoliniais sorbentais. Tais atvejais, kai stebimas labai silpnas sulaikymas, reikia naudoti eluentus su labai daug vandens. Tačiau daug vandens ($\geq 95\%$) turinčios judrios fazės blogai drėkina sorbento poras („dewetting“ efektas). Tai dar labiau susilpnina analičių sulaikymą bei pablogina efektyvumą. Buvo bandyta sustiprinti labai polinių analičių sulaikymą į stacionarią fazę ar į alkilo ligandą jos paviršiuje įterpiant ar prijungiant polines grupes. Nors tai leido išvengti „dewetting“ efekto ir panaudoti judriomis fazėmis 100% vandeninius tirpalus, tačiau problematiškų analičių sulaikymo beveik nesustiprino [16].

Labai polinių molekulių nesulaikymas ant nepolinio sorbento yra paaiškinamas molekulės tirpumu. Polinės analitės sudaro stiprius dipolinius ryšius su poliniu tirpikliu, t. y. puikiai jame ištirpsta. Tuo tarpu su nepoline stacionaria faze tokių ryšių analizė sudaryti negali. Taigi, atskyrimo metu jiniai pasilieka judrioje fazėje visiškai nesąveikaudama su nepoliniu sorbentu. Tais atvejais, kai yra nesulaikomos įkraudų funkcinių grupių turinčios analitės, jas nesunkiai galima analizuoti jonų mainų chromatografijos metodu. Šis metodas gali būti naudojamas bet kokioms turinčioms krūvį analitėms atskirti, pradedant mažais neorganiniais jonais ir baigiant biologinėmis makromolekulėmis [17].

Problematiškiausios analitės skysčių chromatografijoje yra labai hidrofiliški, bet neturintys krūvio junginiai. Vienas iš būdų chromatografiškai analizuoti šiuos junginius yra chemine reakcija pakeisti vieną ar daugiau polinių funkcijų grupių į labiau hidrofobines grupes. Šis procesas vadinamas derivatizacija. Derivatizacija dažnai ne tik padidina tokių junginių sulaikymo trukmę, bet taip pat gali pagerinti ir jų detektavimo jautrį. Ši technika buvo plačiai naudojama, kai labai populiarūs buvo UV ir fluorescensiniai detektoriai. Į analitės struktūrą buvo įvedamos taip vadinamos chromoforinės/fluoroforinės funkcinės grupės, įgalinančios jautrų detektavimą. Derivatizacija dažniausiai būna sėkminga, jeigu yra modifikuojama tik viena ir labai reaktyvi analitės funkcinė grupė, kai reakcija duoda tik vieną produktą ir vyksta švelniomis sąlygomis. Junginiams, kurie turi daug polinių grupių, reakcijos metu dažnai sudaro pašalinių

produktų, o pati reakcija nevyksta kiekybiškai. Dar viena problema, išskylanti naudojant derivatizaciją yra ta, jog analizės sulaikymas priklauso nuo prijungtos funkcinės grupės sąveikos su stacionaria faze. Tai reiškia, jog artimos struktūros junginiai po derivatizacijos dažnai būna blogiau atskiriami [18].

Pats racionaliausias būdas atskirti labai hidrofiliškas ir krūvio neturinčias molekules būtų panaudojus taip vadinamą „atvirkščią atvirkščių fazių chromatografiją“, t. y. atskyrimo būdą, kuriame polinė stacionari fazė naudojama su poline judria faze. Hidrofilinės sąveikos chromatografija (HILIC) ir yra toks metodas, kur manoma, kad analizės sulaikymas atsiranda dėka analizės pasiskirstymo tarp vandens sluoksnio, susidarančio ant polinio sorbento ir sąlyginai hidrofobiškos (vandens atžvilgiu) judrios fazės. Judria faze šiame metode dažniausiai naudojama 5-40% vandens tirpalas acetonitrile. Vandens, kaip stiprios eliuacijos gebos tirpiklio panaudojimas suteikia šiam metodui eilę privalumų prieš tradicinį normalių fazių chromatografijos metodą. Visų pirma, judrios fazės paruošimas yra žymiai paprastesnis, kadangi nereikia jaudintis, kad į judrią fazę pateks vandens. Tokiose judriose fazėse puikiai tirpsta normalių fazių chromatografijos judriose fazėse netirpstančios polinės analizės. Be to, polinės judrios fazės puikiai suderinamos su elektropurkštuvinės jonizacijos masių spektrometrija (ESI-MS).

HILIC metode analizių eliuacijos tvarka dažniausiai priešinga nei jų eliuacijos tvarka atvirkščių fazių chromatografijoje. Tai reiškia, kad hidrofiliškos sąveikos chromatografija geriausiai tinka junginiams, kurie atvirkščių fazių chromatografijoje yra nesulaikomi arba silpnai sulaikomi. Didelė acetonitrilo koncentracija eluente suteikia dar du privalumus: a) lakesnis eluentas – didesnis jautris naudojant ESI-MS detektorius; b) daug acetonitrilo turintis eluentas yra mažiau klampus, todėl sukelia mažesnius slėgius prieš kolonėlę [19].

1.3.1. Atskyrimo principas

Hidrofilinės sąveikos chromatografija yra toks normalių fazių skysčių chromatografijos metodas, kuriame naudojama 5-40% vandens turinti judri fazė. Antrasis tirpiklis – acetonitrilas. Dominuojantis analizių atskyrimo mechanizmas HILIC metode – pasiskirstymas tarp polinio sorbento paviršiuje adsorbuoto vandens sluoksnio ir judrios fazės. Polinio sorbento paviršiuje vandenilinių ryšių pagalba susiformuoja vandens sluoksnis, atliekantis taip vadinamos skystos nejudrios fazės vaidmenį. Atskyrimo metu analizės pasiskirsto tarp labai polinio gryno vandens sluoksnio sorbento paviršiuje ir mažiau polinės judrios fazės sudarytos iš vandens/acetonitrilo mišinio. Kuo geriau analizė tirpsta vandenyje, t.y. kuo ji poliškesnė, tuo stipriau ji yra sulaikoma [20].

Tačiau sorbento paviršiuje susidaręs vandens sluoksnis pilnai neapsaugo nuo tiesioginės analičių sąveikos su sorbento paviršiumi. Todėl greta pasiskirstymo, priklausomai nuo sorbento ir analičių prigimties, HILIC sistemoje pasireiškia ir antrinės sąveikos:

- a) Jonas-jonas sąveikos (jonų mainai arba elektrostatinė stūma);
- b) Jonas-dipolis sąveikos;
- c) Dipolis-dipolis sąveikos (ypač vandenilinis ryšys).

1.3.2. HILIC sorbentai

Nemodifikuotas silikagelis. Tai iki šiol populiariausias HILIC sorbentas. Priklausomai nuo paruošimo būdo, komerciškai prieinami silikagelio sorbentai skiriasi savo grynumu ir savybėmis. A tipo silikagelis yra nusodinamas iš šarminių silikato tirpalų ir turi metalų priemaišų, kurie aktyvuoja paviršiaus silanolines grupes. Toks silikagelis netinkamas HILIC metodui. Sferinės B tipo silikagelio sorbento dalelės gaunamos vykstant silicio delelių agregacijai ore. Toks sorbentas turi mažiau metalų priemaišų ir yra stabilesnis iki 9 pH judrioje fazėje. Šio tipo silikagelis pasižymi geresniu bazinių junginių atskyrimu. C tipo silikagelis arba „silicio hidridas“ yra modifikuotas, t.y. apie 95% jo paviršiuje esančių silanolinių grupių ($\equiv\text{Si-OH}$) hidrosilaninimo proceso metu yra pakeistos į silicio hidrido ($\equiv\text{Si-H}$) grupes. C tipo silikagelis yra mažiau polinis už nemodifikuotą silikagelį, jis silpniau sąveikauja su vandeniu ir pasižymi geresniu rezultatų atsikartojamumu [21].

Naudojant silikagelio stacionarias fazes būtina atsižvelgti į silikagelio paviršiuje esančių silanolinių grupių jonizaciją. Ypač tai svarbu atskiriant bazinius junginius, kurių elektrostatinė sąveika su disocijavusiomis silanolinėmis grupėmis gali ženkliai įtakoti tiek jų sulaikymą, tiek ir smailių efektyvumą. Nors vanduo ir užblokuoja silikagelio paviršių, tai vis tiek nesutrukdo silanolinėms grupėms disocijuoti ir dalyvauti katijonų mainų procese. Iš tikrųjų vanduo netgi skatina laisvų silanolinių grupių formavimąsi ir taip pat palengvina jų disociaciją. Neigiamai įkrautas paviršius pritraukia katijonus, bet taip pat sumažina neigiamai įkrautų polinių junginių sulaikymo trukmę, kadangi šie yra atstūmiami neigiamo paviršiaus. Elektrolitų (buferio) pridėjimas į judrią fazę šiuo atveju yra būtinas norint susilpninti tarpjonines krūvį turinčių analičių sąveikas su disocijavusiomis silanolinėmis grupėmis [22].

Aminopropil ligandu ($\equiv\text{Si-O}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$) modifikuotas silikagelis. Aminopropilsilikagelis buvo pirmasis modifikuoto silikagelio sorbentas, kuris iki šiol dažnai naudojamas amino rūgščių, peptidų, karboksirūgščių, nukleozidų, cukrų ir kai kurių vaistų atskyrimui HILIC metodu [22]. Stacionarios fazės paviršiuje esančios amino grupės yra labiau giminingos rūgštiniam

junginiams. Dirbant su parūgštintomis judriomis fazėmis amino grupės protonizuojasi ir sorbento paviršius įgyja teigiamą krūvį. Taip atsiranda papildoma jonų mainų sąveika su neigiamą krūvį turinčiomis analitėmis, sustiprinanti tokių analizių sulaikymą ir netgi galinti sukelti negrįžtamą kai kurių junginių adsorbcija stacionarios fazės paviršiuje. Be to, lyginant su silikagelio sorbentais, aminopropilsilikagelis mažiau stabilus, jį būtina žymiai ilgiau kondicionuoti, o jo tarnavimo trukmė dėl ligandų išsiplovimo gerokai trumpesnė. Pirminės amino grupės yra labai reaktingos ir sąveikaudamos su aldehidais gali suformuoti Šifo bazes, kas gali daryti neigiamą įtaką angliavandenių atskyrimui. Antriniai ir tretiniai aminai pasižymi mažesniu reaktingumu, todėl jais modifikuotas silikagelis yra chemiškai stabilesnis už aminopropilsilikagelį. Pagrindinis aminopropilsilikagelio sorbentų privalumas – žymiai geresnis sacharidų atskyrimas nei ant nemodifikuoto silikagelio. Amino grupės pagreitina cukrų mutarotacijos procesą ir eliminuoja dvigubų smailių susidarymą. Skirtingų gamintojų aminopropil silikagelis taip pat pasižymi dideliais skirtumais, todėl reikia atidžiai rinktis kolonėles, jei jos nėra pritaikytos būtent HILIC metodui. Didelė problema su šio tipo kolonėlėmis yra ribotas adsorbento stabilumas naudojant vandeninius eliuventus, lemiantis greitą ligandų atskilimą ir iškreiptas chromatogramas [23].

Amido ligandu modifikuotas silikagelis. Šioms stacionarioms fazėms priskiriamas karbamoil arba amido ($\equiv\text{Si-O}-(\text{CH}_2)_3\text{-CO-NH-R}$) funkcinėmis grupėmis modifikuoti silikagelio sorbentai. Amido grupė yra prijungama per alkilo grandinę. Priešingai nei aminopropilas, šios grupės yra mažiau reaktingos ir nepasižymi bazinėmis savybėmis, todėl jonizuotų analizių sulaikymui mažesnę įtaką turi jonų mainai. Taigi, dirbant su amidiniais sorbentais rečiau reikia naudoti joninius judrios fazės priedus, dėl to mažesni druskų kiekiai patenka į MS detektorius. Be to, ant amidu modifikuoto silikagelio rečiau pasireiškia negrįžtama adsorbcija ir geriau atsikartoja rezultatai. Šios stacionarios fazės įprastai naudojamos peptidų, oligosacharidų, glikoproteinų, glikozidų atskyrimui. Kai kurios amidu modifikuotos stacionarios fazės buvo sukurtos specialiai HILIC metodui. Pvz., karbamoil-silikagelis HILIC TSK-gel Amide-80, kuris tapo pagrindine stacionaria faze atskiriant mono ir oligosacharidus, angliavandenių darinius, peptidus ir aminorūgštis [18].

Diolio ligandu modifikuotas silikagelis. Dioliu modifikuotas silikagelis savo poliškumu ir gebėjimu formuoti vandenilinius ryšius yra artimas nemodifikuotam silikageliui. Šio sorbento paviršiuje nėra jonizuotų grupių, išskyrus likutines silanolines grupes, kurios gali būti dalinai užblokuotos silaninimo agento, taip išvengiant negrįžtamos polinių junginių adsorbcijos. Diolio stacionari fazė plačiai taikoma baltymų atskyrimui, bet pastaruoju metu šis sorbentas pradėtas naudoti ir mažos molekulinės masės junginiams atskirti. Dioliu modifikuoto silikagelio sorbentai nepasižymi dideliu atsparumu rūgštinei judriai fazei. Tačiau naujos kartos sutinklintos diolio

stacionarios fazės jau yra atsparesnės hidrolizei, pasižymi stipresne hidrofobine sąveika, geresne skiriamąją geba ir efektyvumu lyginant su tradicinėmis diolio kolonėlėmis [24]

Cviterjoniniais ligandais padengtas silikagelis. Šio tipo fazės tradiciškai sukurtos jonų mainų chromatografijai, tačiau pasirodė tinkamomis ir HILIC metodui. Specialiai HILIC metodui susintetintos sulfoalkilbetainu modifikuotos stacionarios fazės, kurios buvo pritaikytos neorganinių druskų, mažų joninių organinių junginių ir baltymų analizei. Šios stacionarios fazės – silikagelis, kurio paviršiuje kovalentiškai prijungti ligandai su rūgštinėmis savybėmis pasižyminčiomis sulfo funkcinėmis grupėmis ir stipriomis bazinėmis savybėmis, pasižyminčiomis ketvirtinio amonio grupėmis, atskirtomis trumpa alkilo grandine. Tokia stacionari fazė gali būti panaudota katijonų, anijonų ir neutralių polinių junginių atskyrimui. Sorbento paviršiuje moliniu santykiu 1:1 esančios ketvirtinio amonio ir sulfo funkcinės grupės duoda artimą nuliui sorbento paviršiaus krūvį, tačiau sulfoalkilbetaino cviterjonas yra osmolitas, gebantis sorbento paviršiuje stipriai sulaikyti vandenį. Pagrindinės neutralių analičių sąveikos ant šios stacionarios fazės – vandenilinio ryšio sudarymas ir dipolio-dipolio sąveika. Tuo tarpu joninių analičių sulaikyme dominuoja jonų mainai [25].

1.3.3. HILIC metodo taikymas

Nors hidrofiliinės sąveikos chromatografija yra žinoma gana seniai, tačiau prireikė nemažai laiko, kol ji buvo pradėta naudoti ne tik angliavandenių nustatymui. Dabar šis analizės metodas naudojamas įvairiems junginiams nustatyti, nuo mažų molekulių iki baltymų.

Mažos molekulės. Hidrofiliinės sąveikos chromatografija yra puikus mažų labai polinių analičių atskyrimo ir analizės metodas. Ypač bazinių analičių, kurių sulaikymui ir atskyrimui atvirkščių fazių chromatografijos metodu būtinas jonų porų mechanizmas. Daugelis šio tipo analičių yra atskiriamos naudojant nemodifikuoto silikagelio kolonėles. Taip pat atskyrimui buvo palygintos modifikuoto aminopropilo ir amido ligandais silikagelio kolonėlės [26]. Buvo pastebėta, jog junginiai, turintys ketvirtinį azotą, pasižymi stipresniu sulaikymu naudojant amido ligandu modifikuoto silikagelio kolonėlę. Be to, pridėjus į eliuentą amonio acetato, analičių sulaikymas susilpnėja abiejose kolonėlėse. Cianopropilo ligandu modifikuotas silikagelis buvo naudojamas piperidinui vaistiniuose preparatuose nustatyti [27]. Chromatografinė sistema su poli(2-hidroksietil) aspartamo ligandu modifikuoto silikagelio kolonėle ir UV detektoriumi buvo naudojama karbamidui, alatoinui bei lizinui nustatyti kosmetiniuose mėginiuose [28]. Karbamidas, sacharozė bei glicinas buvo naudojami įvertinti naujai pagamintos dioliu modifikuoto silikagelio kolonėlės parametrus. Buvo nustatyta, jog optimalus judrios fazės srauto greitis yra trigubai mažesnis nei atvirkščių fazių chromatografinėi sistemai reikalingas greitis,

naudojant tokio pačio dydžio kolonėlę. Šis analizės metodas dažnai yra labai greitas. Pvz., klinikinėje diagnostikoje homocisteiną, metilmaleino rūgštį ir gintaro rūgštį galima nustatyti per 3 minutes [29]. Nemodifikuotas silikagelis naudojamas alantoinui žmonių biologiniuose mėginiuose nustatyti hidrofilinės sąveikos chromatografijos metodu su ESI-MS pagalba [18].

Bioanalizė ir farmakokinetika. Hidrofilinės sąveikos chromatografija taip pat yra svarbi šiuolaikiniam vaistų kūrimui, kur būtina analizuoti labai mažų koncentracijų stipraus poveikio vaistus biologiniuose mėginiuose. Daugelis šiuolaikinių vaistų yra labai poliniai junginiai, todėl atvirkščių fazių chromatografija, kuri buvo dažniausiai naudojama biologiniams mėginiams tirti, negali būti naudojama daugelio šių junginių analizei. Nemodifikuotas silikagelio kolonėlės yra šiuo metu plačiausiai naudojamos biologiniams mėginiams tirti hidrofilinės sąveikos chromatografijos metodu ir MS/MS analize [21].

Vienas iš įdomesnių pavyzdžių yra foliatų analizė žmogaus plazmoje. Atskyrimas buvo patikrintas tiek HILIC, tiek ir atvirkščių fazių chromatografijos metodu. Hidrofilinės sąveikos chromatografinei analizei buvo pasirinkta poli(2-hidroksietil) aspartamido ligandu modifikuota silikagelio kolonėlė. Nustatyta, kad naudojant atvirkščių fazių chromatografiją foliatų smailės dreifuoja, o mėginio matrica slopina ESI jonizaciją, todėl papildomam ekstraktų valymui būtina naudoti kietafazę ekstrakciją [30].

HILIC metodas panaudotas citrulinui nustatyti išdžiūvusiuose kraujo mėginiuose, antivirusiniam agentui aciklovirui plazmoje, placentoje ir vaisiaus audiniuose nustatyti, antidepresantui proksetinui plazmoje nustatyti, antipsichotropiniam vaistui levosulpiridui plazmoje nustatyti ir daugybei kitų biologinių medžiagų nustatyti [31]. Vaistas prieš tuberkuliozę – izoniazidas, taip pat sunkiai nustatomas atvirkščių fazių chromatografijos metodu, tačiau hidrofilinės sąveikos chromatografijos pagalba gali būti sėkmingai nustatytas [32].

Kaip alternatyva jonų porų ar jonų mainų chromatografijai, buvo sukurtas HILIC metodas acetilcholinui ir cholinui druskose ir endogeninių junginių mikrodializės mėginiuose nustatyti naudojant dioliu modifikuoto silikagelio kolonėlę. Jautrumas buvo 5 kartus didesnis negu ankstesnių metodų [33]. Taip pat farmakokinetiniams tyrimams buvo sukurtas ypač greitas HILIC-MS/MS metodas nikotino rūgščiai ir jos metabolitams nustatyti [34]. Pilna vieno mėginio analizės trukmė buvo mažiau nei 2 min.

Antibiotikai ir priešvėžiniai vaistai. Daugelis antibiotikų yra natyvūs ar sintetiniai hidrofiliniai junginiai. Tetraciklininiai antibiotikai – pakankamai sena antibiotikų grupė, kurią gamina *Streptomyces* bakterijos. Tai buvo pirma antibiotikų grupė, kuri buvo sintetiškai modifikuota tam, kad išgauti naujus antibiotiko variantus. HILIC metodu buvo bandyta išskirti tris skirtingus tetraciklino antibiotikus. Nemodifikuoto silikagelio kolonėlė negalėjo būti

naudojama, kadangi joje analičių smailės smarkiai dreifavo dėl sąveikos tarp protonizuotos tretinės amino grupės tetraciklino junginyje ir disociavusios silanolinės grupės. Geresnis efektyvumas buvo pasiektas aminopropilo ligandu modifikuoto silikagelio kolonėlėje, bet tik naudojant citratinį buferį [35].

Nemažai priešvėžinių vaistų taip pat yra labai hidrofiliški junginiai. Amino ligandu modifikuoto silikagelio kolonėlė buvo naudojama 5-fluoruracilui, pirimidino analogo matobolitui, naudojamam gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžiui gydyti, nustatyti [36]. Taip pat HILIC metodas buvo sukurtas priešvėžinio vaisto zaubulerino farmokinetikai tirti [37]. HILIC buvo naudojamas radioaktyviu ^{14}C izotopu pažymėtus junginius ir jų pagrindinius metabolitus: uridiną, uracilą ir dihidrouracilą – pelių plazmoje sekti. Atskyrimas buvo pasiektas aminopropilo kolonėle, tuo tarpu atvirkščių fazių metodu atskyrimas nepavyko [18].

Narkotikai. Hidrofilinės sąveikos chromatografija taip pat naudojama narkotikams analizuoti. Buvo sukurtas metodas kokainui ir septyniems jo metabolitams žmogaus kūno skysčiuose ir audiniuose nustatyti panaudojus nemodifikuoto silikagelio kolonėlę [38]. Sulfoalkilbetaino cvinterjoninė silikagelio kolonėlė kartu su C_{18} prieškolonėle buvo naudojama morfinui ir jo 3- ir 6-gliukuronidui plazmoje ir mikro dializės mėginuose nustatyti [39].

Žemės ūkio ir maisto chemija. Hidrofilinės sąveikos chromatografija plačiai taikoma ir žemės ūkio bei maisto produktų analizei. Pvz., amino ligandu modifikuoto silikagelio kolonėlė buvo panaudota parmezano sūrio ekstraktui analizuoti. Ekstrakte buvo aptikti ir atskirti daugiau nei 25 skirtingi junginiai, tokie kaip argininas, lizinas, glutamo rūgštis bei įvairūs poliniai dipeptidai [40].

Poli (2-hidroksietil) aspartamo ligandu modifikuoto silikagelio kolonėlė HILIC metodui bei atvirkščių fazių analizė buvo panaudotos dviejų pagrindinių glikoalkaloidų - α -chaconino ir α -salonino - nustatymui bulvėse. Abu metodai pripažinti pakankamai tikslūs ir teisingi, tačiau hidrofilinės sąveikos chromatografijos metodu kolonėlės tarnavimo trukmė buvo mažesnė [41].

Taurinas ir metioninas buvo kiekybiškai nustatyti HILIC metodu gazuotuose energetiniuose gėrimuose be sudėtingesnio mėginio paruošimo (mėginys tikrai praskiedžiamas). Metodas yra labai tikslus, specifiškas, tiesiškas, turi mažą nustatymo ribą ir yra stabilus [42]. HILIC panaudotas ir dichloracto rūgščiai geramajame vandenyje nustatyti. [43]

Toksinai. Daugelis gamtoje aptinkamų toksinų yra labai hidrofiliški junginiai. HILIC itin gerai tinka jūriniams toksinams, kurie asocijuojami su paralyžuojančiais vėžiagyviais tirti. Amido ligandu modifikuoto silikagelio kolonėlė panaudota hidroksibenzoato aksitoksino, cilindrospermopsino, anatoksino analogams, cianobakteriniams toksinams ir daugeliui kitų

toksinų nustatyti. Metodas yra patikimas ir jautrus – analizę galima atlikti iš nevalytų bei nesukoncentruotų mėginių [44].

Angliavandeniai. Angliavandenių analizė HILIC metodu yra ypač plačiai naudojama. Analizuojama nuo cukrų, nukleozidų, mažų, vidutinių ir didelių molekulinų masių polisacharidų ir jų darinių iki sintetinių glikopolimerų ir kompleksinių glikanų struktūrų pačiuose.

Angliavandeniai pasižymi savybėmis, kurios ilgą laiką apsunkino jų chromatografinę analizę. Jie turi daug hidroksi ir kitų polinių funkcinių grupių, nėra termiškai stabilūs dujų chromatografinėi analizei ir neregistruojami spektrofotometriniais detektoriais. Šios problemos daro hidrofiliinės sąveikos chromatografiją ypač patrauklia šiems junginiams tirti. HILIC plačiai naudojama mažų molekulinų masių angliavandenius maiste ir gaiviuosiuose gėrimuose nustatyti, cukrus tradiciniuose kinietiškuose vaistuose nustatyti, glikoalkaloidus ir jų hidrolizės produktus augaluose nustatyti ir dar daugybės kitų šios klasės junginių ir objektų analizei [45, 46].

Aminorūgštys ir peptidai. Kaip ir angliavandeniai, peptidai buvo vieni iš pirmųjų junginių, atskirtų hidrofiliinės sąveikos chromatografijos metodu. Šiuo metu jie gali būti atskiriami visomis populiariausiomis HILIC kolonėlėmis. Tyrimai taip pat parodė, jog kombinuojant katijonų mainų chromatografiją ir HILIC, kai kurių peptidų analizė yra kur kas efektyvesnė nei atvirkščių fazių chromatografijos metodu [47]. Peptidų tyrimai taip pat parodė, kad modifikavus hidrofiliinę peptido dalį, bus registruojami pokyčiai tik HILIC metode, tuo tarpu modifikavus hidrofobinę peptido dalį, matysime pasikeitimus tik atvirkščių fazių chromatografijoje, o HILIC metode rezultatai nepasikeis. Tai įrodo, kad didelių peptidų sulaikymas priklauso nuo kontaktuojančio su sorbentu peptido region [18].

Tai tik keletas apžvelgtų hidrofiliinės sąveikos chromatografijos taikymo pavyzdžių. Apibendrinant galima konstatuoti, kad HILIC metodas šiuo metu yra nepakeičiamas analizuojant labai polinius, tiek neutralius, tiek ir turinčius krūvį junginius. Tai palyginti greitas, efektyvus ir sudėtingo mėginio paruošimo nereikalaujantis metodas.

II. Eksperimento metodika

2.1. Reagentai ir tirpalai

Darbe buvo naudojamas du kartus distiliuotas ir 0,2 µm membraniniu filtru filtruotas vanduo. Skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos (LC-MS) grynumo acetonitrilas (ACN), metanolis, chloroformas, acto rūgštis, skruzdžių rūgštis, amonio formiatas ir amonio acetatas buvo įsigyti iš Sigma-Aldrich kompanijos (Sent Luisas, MO, JAV). Svainsoninas (≥99%) taip pat įsigytas iš Sigma-Aldrich.

Pirminis 250 mg/L koncentracijos svainsonino standartinis tirpalas buvo ruošiamas iš svėrinio tirpinant vandenyje ir, iki panaudojimo analizėje, buvo laikomas 4 °C temperatūroje. Darbiniai tirpalai buvo ruošiami kiekvieną dieną skiedžiant pirminį standarto tirpalą atitinkama judria faze iki reikiamos koncentracijos.

2.2. Kulkšnės mėginiai

Kulkšnės mėginiai (ilguolinė kulkšnė ir saldžialapė kulkšnė) buvo surinkti 2014-aisiais metais centrinėje Lietuvos dalyje (Kėdainių raj.), įvairiais augimo tarpsniais. Mėginiai buvo ruošiami Lietuvos Agrarinių ir miškų mokslų centro Žemdirbystės institute. Abi žydėjimo tarpsnio kulkšnės rūšys papildomai buvo išskaidytos į 3 morfologines dalis: stiebus, lapus ir žiedus. Augalai buvo kruopščiai išplauti vandentiekio vandeniu, perplauti distiliuotu vandeniu ir nusausinti filtriniu popieriumi. Tada augalai buvo 15 min. kaitinami 105 °C temperatūroje, išdžiovinami džiovavimo spintoje (65±5)°C ir susmulkinami smulkintuvu. Dalis viso augalo mėginių papildomai buvo džiovinami ir liofilizacijos būdu.

2.3. Svainsonino ekstrakcija

Sausas ir susmulkintas augalo mėginys (0,100 g) patalpinamas į 10 mL uždaramą mėgintuvėlį ir, nuolatos maišant, 14 val ekstrahuojamas su 5 mL 2% acto rūgšties vandeniniu tirpalu. Po ekstrakcijos mėginys 5 min centrifuguojamas. Ekstrakto dalis (0,50 mL) praskiedžiama 1,00 mL ACN, kruopščiai išmaišoma, nufiltruojama su 0,2 µm nailoniniu švirkštiniu filtru, patalpinama į stiklinį mėginio indelį ir analizuojama.

2.4. Chromatografijos-masių spektrometrijos sąlygos

Visi atskyrimai buvo atlikti 1290 Infinity UHPLC skysčių chromatografijos sistema, sujungta su 6410 trigubo kvadrupolio masių spektrometru, naudojančiu elektropurkštuvinį jonizacijos (ESI) šaltinį (Agilent Technologies, JAV). Acquity UPLC HSS T3 (2,1×100 mm, 1,8 μm) kolonėlė (Waters) buvo naudojama atvirkščių fazių ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metode. Judrios fazės tekėjimo greitis 0,25 mL/min.

Atskyrimai hidrofilinės sąveikos chromatografijos metodu buvo atliekami Acquity UPLC BEH HILIC (2,1×100 mm, 1,7 μm) kolonėlėje (Waters). Galutine judria faze buvo acetonitrilo ir vandens mišinys (90:10, v/v) su 10 mmol/L skruzdžių rūgšties priedu. Judrios fazės srauto greitis - 0,5 mL/min. Abiem atskyrimo būdams buvo palaikoma 25 °C kolonėlės temperatūra ir įleidžiamas 5 μL mėginio tūris.

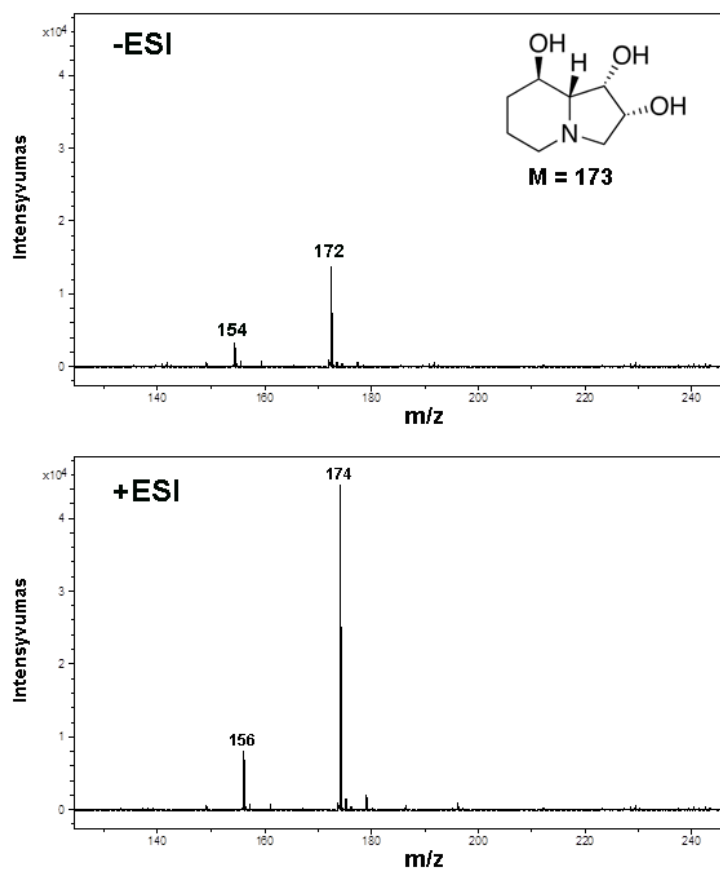
MS detektavimui buvo naudojama teigiama elektropurkštuvinė jonizacija (ESI). Tandeminė masių spektrometrija (MS/MS) buvo atliekama pasirinktų reakcijų monitoringo (SRM) režime. MS/MS duomenys surinkti ir apdoroti MassHunter programa (Agilent).

III. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. MS detektavimo sąlygų optimizavimas

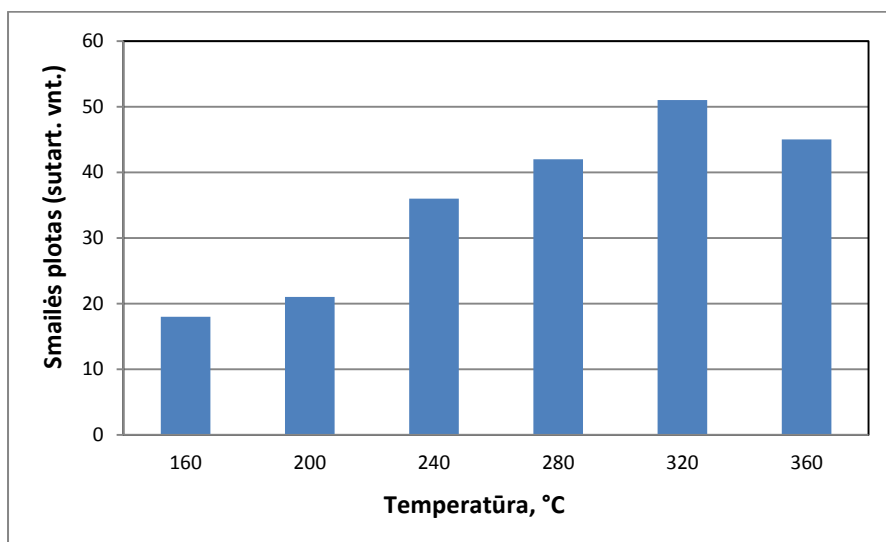
Svainsoninas augaluose dažniausiai nustatomas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu. Deja, jis visiškai neabsorbuoja šviesos UV-matomoje bangos ilgių srityse, todėl jam detektuoti netinka populiariausias fotometriniis detektorius. Šiame darbe detektavimui panaudojome trigubo kvadrupolio MS detektorių su elektropurkštuvine jonizacija.

Pirmiausiai parinkome MS detektavimo sąlygas. Kadangi svainsoninas turi ir rūgštines (-OH), ir bazines (-N=) funkcines grupes, jos jonizacijai tinka tiek neigiama, tiek ir teigiama elektropurkštuvinė jonizacija. Todėl pirmiausiai palyginome svainsonino jonizacijos efektyvumą teigiamos ir neigiamos ESI režimuose. 2 pav. palyginti abiem jonizacijos režimais išmatuoti svainsonino standarto MS spektrai. Abiem atvejais svainsonino MS spektrai labai paprasti: registruojamas intensyvus svainsonino molekulinis jonas (m/z 172 arba 174) bei mažesnio intensyvumo jonas, susidarantis atskilus vandens molekulei (m/z 154 arba 156). Nustatėme, kad apie 3 kartus intensyvesnis signalas registruojamas naudojant teigiamą jonizaciją, kuri ir buvo pasirinkta detektavimui.



2 pav. Svainsonino standarto (0,5 mg/L) MS spektrai išmatuotas MS scan režime neigiamos ir teigiamos ESI režimais.

Toliau buvo optimizuojami pagrindiniai jonizacijos šaltinio parametrai: džiovinančių dujų (N_2) temperatūra ir srauto greitis, išpurškimo (N_2) dujų slėgis bei purkštuvo adatos įtampa. 3 pav. pateikta svainsonino smailės ploto priklausomybė nuo džiovinančių dujų (N_2) temperatūros. Matome, kad svainsonino jonizacijos efektyvumas gerėja keliant džiovinančių dujų temperatūrą iki 320 °C, bet vėliau pradeda vėl sumažėja. Tyrimams buvo pasirinkta 320 °C temperatūra. Analogiškai buvo įvertinta ir kitų ESI šaltinio parametrų įtaka. Optimizuotos ESI šaltinio parametrų vertės pateiktos 1 lentelėje.



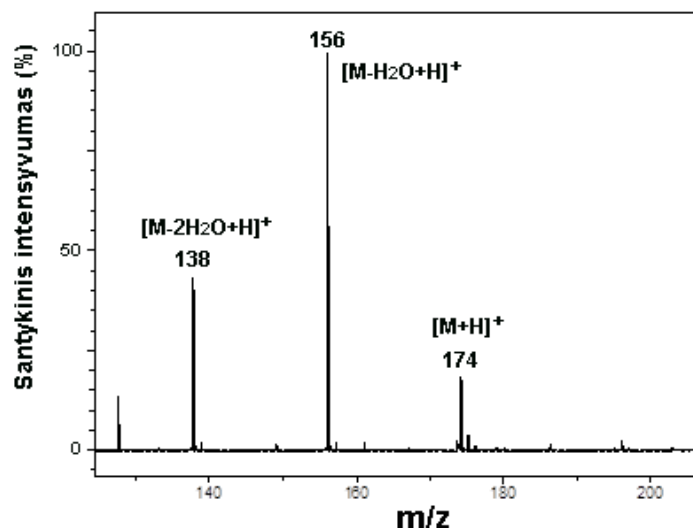
3 pav. Džiovinančių dujų (N_2) temperatūros įtaka svainsonino jonizacijos efektyvumui.

1 lentelė. Svainsoninui optimizuoti ESI šaltinio parametrai.

Parametras	Vertė
Jonizacija	+ESI
Išpurškimo (N_2) dujų slėgis	60 psi
Džiovinančių (N_2) dujų srautas	10 L/min
Džiovinančių (N_2) dujų temperatūra	320°C
Purkštuvo adatos įtampa	4000 V

Analizei buvo pasirinktas didžiausiu jautriu pasižymintis pasirinktų reakcijų monitoringo (SRM) MS/MS režimas, kuriame pirmajame kvadrupolyje yra izoliuojamas intensyviausias svainsonino jonas (m/z 174), skaldymo celėje jis yra fragmentuojamas, o trečiajame kvadrupolyje izoliuojami du intensyviausi fragmentai - vienas kiekybiniam nustatymui, o kitas patvirtinimui. 4 pav. pateiktas svainsonino molekulinio jono m/z 174 skaldymo fragmentų MS spektras. Spektre registruojami tik du fragmentai: intensyviausias m/z 156 jonas ir mažiau intensyvus m/z 138 jonas. Pirmasis fragmentas susidaro atskylant iš molekulinio jono vienai, o antrasis - atskylant

dviems vandens molekulėms. Fragmentatoriaus įtampa bei skaldymo energija abiem fragmentams buvo optimizuoti tiesiogiai įleidžiant svainsonino standartą. 2 lentelėje pateikti optimizuoti MS/MS parametrai svainsoninui nustatyti.



4 pav. Svainsonino molekulinio jono skaldymo fragmentų MS spektras.

2 lentelė. Svainsoninui optimizuoti MS/MS parametrai.

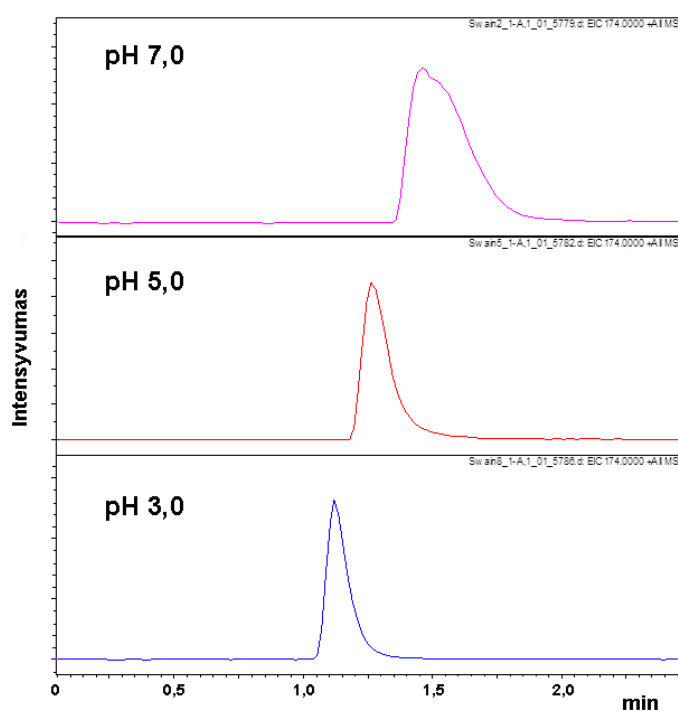
Fragmentavimas	Perėjimas, m/z	Fragmentatoriaus įtampa, V	Skaldymo energija, eV
Kiekybinis	174→156	80	6
Patvirtinantysis	174→138	80	8

3.2. Chromatografinio atskyrimo sąlygų optimizavimas

Svainsoninas - labai polinis junginys, todėl tradiciniu atvirkščių fazių chromatografijos metodu yra silpnai sulaikomas. Tikėtina, kad jo atskyrimui tinkamesniu metodu galėtų būti hidrofilinės sąveikos chromatografija, kuri būtent ir skirta labai polinių analizių atskyrimui. Todėl pirmiausia palyginome svainsonino chromatografinę elgseną abiem skysčių chromatografijos metodais. Visi atskyrimai buvo atliekami izokratinės elucijos sąlygomis. Atskyrimams buvo naudojami 1,7 ir 1,8 μm dalelių dydžio sorbentai, t.y. ultraefektyviosios skysčių chromatografijos variantas, kuris suteikia žymiai greitesnius atskyrimus, didesnę

efektyvumą bei mažesnes tirpiklių sąnaudas lyginant su tradicine efektyviaja skysčių chromatografija.

Atvirkščių fazių chromatografijos metodui buvo pasirinkta Acquity UPLC HSS T3 kolonėlė. HSS T3 sorbentas - poliniams junginiams atskirti skirtas nepolinis silikagelio sorbentas su prijungtomis oktadecilo (C18) funkcinėmis grupėmis. Šiame sorbente oktadecilo funkcinės grupės silikagelio paviršiuje prijungtos per tris silanolines grupes. Toks trifunkcinis prijungimas iki minimumo sumažina C18 funkcinę grupių tankį silikagelio paviršiuje, todėl sorbentas puikiai suderinamas ir su 100% vandens turinčiomis judriomis fazėmis. 5 pav. pavaizduotos svainsonino standarto chromatogramos, išmatuotos atvirkščių fazių chromatografijos metodu esant skirtingoms vandeninės judrios fazės pH vertėms.

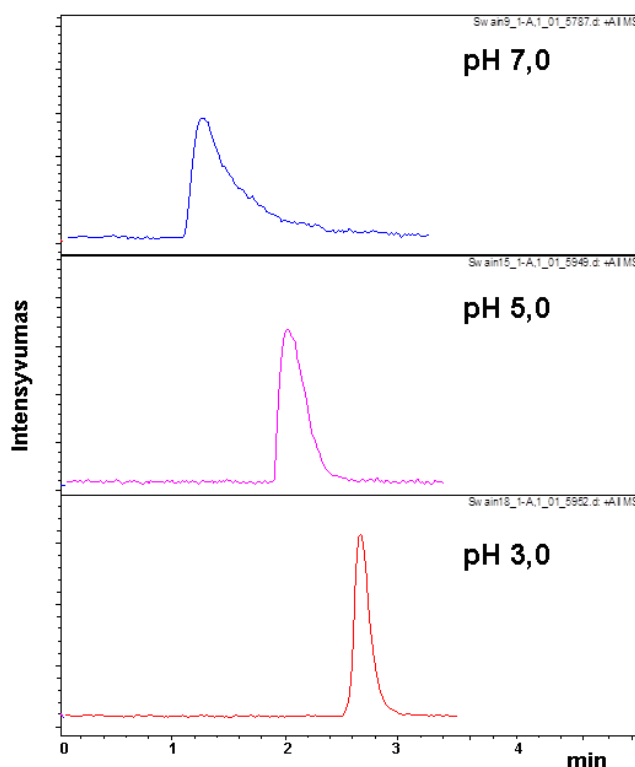


5 pav. Judrios fazės pH įtaka svainsonino (0,5 mg/L) atskyrimui atvirkščių fazių chromatografijos sąlygose. Kolonėlė – HSS T3 C18. Judri fazė – vandeninis 10 mmol/L amonio acetato (pH 7,0 ir 5,0) arba skruzdžių rūgšties (pH 3,0) tirpalas.

Didinant judrios fazės pH svainsonino sulaikymas stiprėja: padidinus pH nuo 3 iki 7 sulaikymo trukmė padidėja nuo 1,10 iki 1,42 min. Svainsonino struktūroje esančios amino grupės $pK_a = 7,4$. Taigi, didinant judrios fazės pH, dėka deprotonizacijos, svainsonino teigiamas krūvis (tuo pačiu ir poliškumas) mažėja, todėl ir jo sulaikymas stiprėja. Deja, atskiriant neutralioje terpėje pasireiškė nepageidautinas smailės išsiplėtimas ir asimetriškumas. Šioje terpėje svainsoninas judrioje fazėje egzistuoja dviejose formose (protonizuota ir neutrali), kurių

kiekiai yra panašūs. Būtent nevienoda šių formų sąveika su sorbentu ir sukelia smailės išsiplėtimą. Maksimalus tokio tipo junginių smailių efektyvumas pasiekiamas terpėje, kurioje junginys egzistuoja vienoje formoje. Esant judrios fazės pH 3, svainsoninas beveik nesulaikomas: nesulaikomo junginio (nitrato) sulaikymo trukmė šiose sąlygose 0,96 min., o svainsonino – 1,1 min. Tai apsunkina realių mėginių analizę. Deja, kadangi atskyrimui buvo naudota 100% vandens turinti judri fazė, dar labiau silpninti jos eliuacinės gebą nebuvo galimybės.

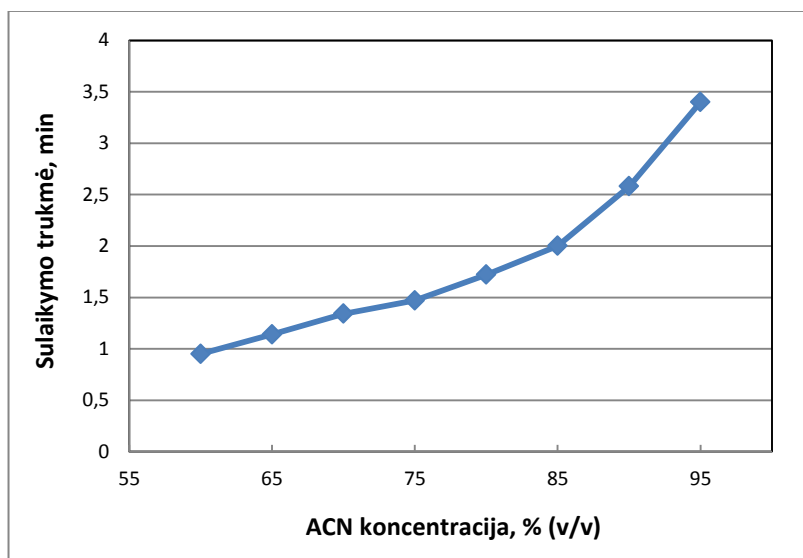
Analogiškas tyrimas buvo atliktas ir HILIC metodu. Šiam metodui pasirinkta poliniu silikagelio sorbentu užpildyta kolonėlė HILIC Acquity UPLC BEH. Svainsonino sulaikymas buvo tiriamas naudojant acetonitrilo/vandens (90:10 v/v) judrią fazę su 10 mmol/L atitinkamos rūgšties ar buferio priedu. Judrios fazės pH įtaką iliustruoja 6 pav. pateiktos chromatogramos. HILIC režime didinant judrios fazės pH svainsonino sulaikymas silpnėja, kadangi priešingai nei atvirkščių fazių chromatografijos metode, šiame metode analitės sulaikomos poliškumo stiprėjimo tvarka. Tačiau kaip ir atvirkščių fazių metode, didėjant pH smailės efektyvumas blogėja.



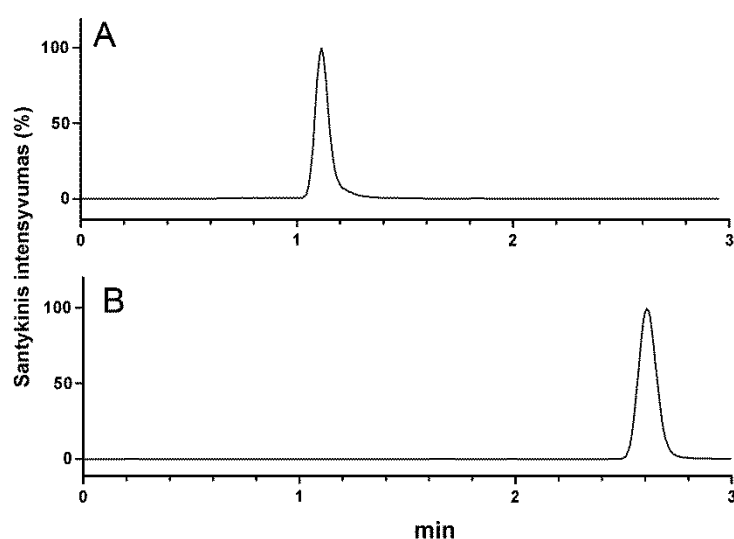
6 pav. Judrios fazės pH įtaka svainsonino (0,5 mg/L) atskyrimui HILIC sąlygose. Kolonėlė – BEH HILIC. Judri fazė – 10 mmol/L amonio acetato (pH 7,0 ir 5,0) arba skruzdžių rūgšties (pH 3,0) H₂O/ACN (10:90 v/v) mišinyje.

7 pav. pavaizduota acetonitrilo koncentracijos judrioje fazėje įtaka svainsonino sulaikymui. Mažėjant vandens kiekiui (didėjant ACN kiekiui) judrioje fazėje svainsonino sulaikymas stiprėja. Tai rodo, kad tiriamoje sorbentas/judri fazė sistemoje vanduo pasižymi stipresne išstūmimo jėga už acetonitrilą. Tokia priklausomybė, kai vanduo pasižymi stipresne išstūmimo jėga nei acetonitrilas, būdinga būtent HILIC metodui.

8 pav. palygintos svainsonino standarto chromatogramos, išmatuotos optimizuotose salygos atvirkščių fazių ir HILIC metodais. HILIC metodu svainsoninas yra daug stipriau sulaikomas, todėl šis metodas žymiai tinkamesnis svainsoninui nustatyti.



7 pav. Acetonitrilo koncentracijos judrioje fazėje įtaka svainsonino sulaikymui. Kolonėlė – BEH HILIC. Judri fazė – 10 mmol/L skruzdžių rūgšties (pH 3,0) H₂O/ACN mišinyje.



8 pav. Svainsonino standarto (0,5 mg/L) chromatogramos optimizuotose atvirkščių fazių (A) ir HILIC (B) sąlygose.

3.3. Ekstrakcijos sąlygų parinkimas

Svainsonino ekstrakcijai iš kulkšnės palyginome tris literatūroje aprašytus ekstrakcijos skysčiais metodus [8]. Ekstrakcijos sąlygų optimizavimo tyrimai buvo atliekami su ilguolinės kulkšnės (*Astragalus cicer*) mėginiu (visas augalas).

Metodas A (2% acto rūgštis ir chloroformas): 100 mg smulkinto augalo patalpinama į užsukamą stiklinį 15 mL talpos mėgintuvėlį ir užpilama 4 mL chloroformo bei 5 mL 2% vandeninio acto rūgšties tirpalo. Mėgintuvėliai užkemšami ir mechaniškai maišant ekstrahuojami 16 valandų. Tada mėgintuvėliai 5 min. centrifuguojami, kad būtų atskirti augalo likučiai ir tirpiklių sluoksniai. Paimamas tiksliai išmatuotas 0,5 mL viršutinio vandeninio sluoksnio mėginys, pridedamas 1 mL ACN ir analizuojamas.

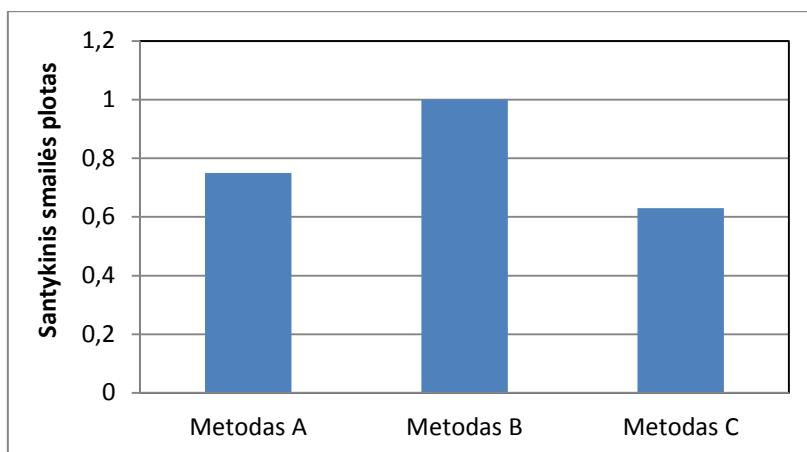
Metodas B (2 % acto rūgštis): 100 mg smulkinto augalo patalpinama į užsukamą stiklinį 15 mL mėgintuvėlį ir užpilama 5 mL vandeninio 2% acto rūgšties tirpalo. Mėgintuvėliai užkemšami ir mechaniškai maišant ekstrahuojami 16 valandų. Tada mėgintuvėliai 5 min. centrifuguojami, kad būtų atskirti augalo likučiai ir tirpiklių sluoksniai. Paimamas tiksliai išmatuotas 0,5 mL viršutinio vandeninio sluoksnio mėginys, pridedamas 1 mL ACN ir analizuojamas.

Metodas C (metanolis): 100 mg smulkinto augalo patalpinama į užsukamą stiklinį 15 mL mėgintuvėlį ir užpilama 5 mL metanolio. Mėgintuvėliai užkemšami ir mechaniškai maišant ekstrahuojami 16 valandų. Tada mėgintuvėliai 5 min. centrifuguojami, kad būtų atskirti augalo likučiai ir tirpiklių sluoksniai. Paimamas tiksliai išmatuotas 0,5 mL viršutinio vandeninio sluoksnio mėginys, pridedamas 1 mL ACN ir analizuojamas.

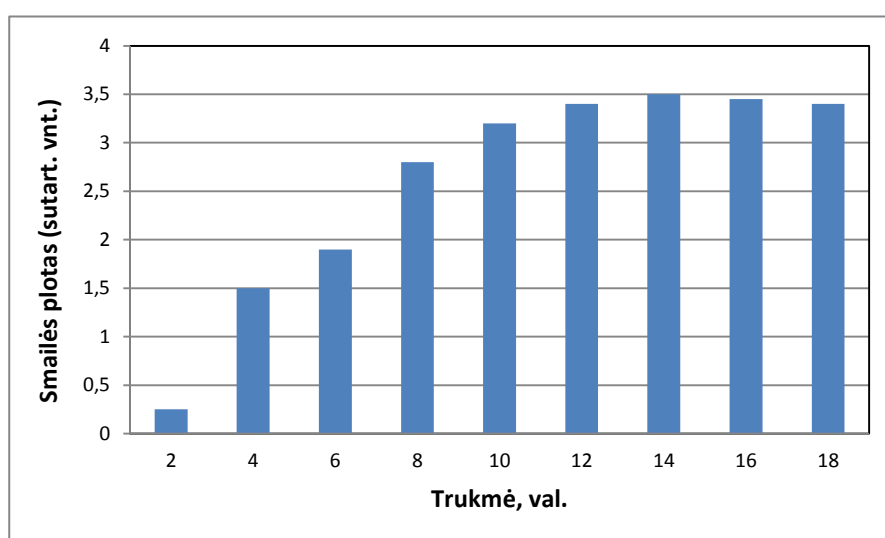
Svainsonino ekstrakcijos skirtingais ekstrahentais efektyvumo (santykinio svainsonino smailės ploto) palyginimo rezultatai pateikti 9 pav. Akivaizdu, kad efektyviausiai ekstrakcija pasiekama metodu B, t.y. ekstrahentu naudojant vandeninį 2% acto rūgšties tirpalą. Ekstrakcija metanolio pasižymėjo mažiausiu efektyvumu tarp tirtų ekstrakcijos metodų. Tolesniems tyrimams pasirinktas metodas B.

Taip pat ištirta ekstrakcijos efektyvumo priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės (10 pav.). Iš 10 pav. pateiktos priklausomybės matyti, kad išekstrahuotas svainsonino kiekis (svainsonino smailės plotas) sparčiai didėja didinant ekstrakcijos trukmę iki maždaug 12 val, tačiau toliau ilginant ekstrakcijos trukmę smarkiai nebesikeičia. Pasirinkome 14 val. ekstrakcijos trukmę.

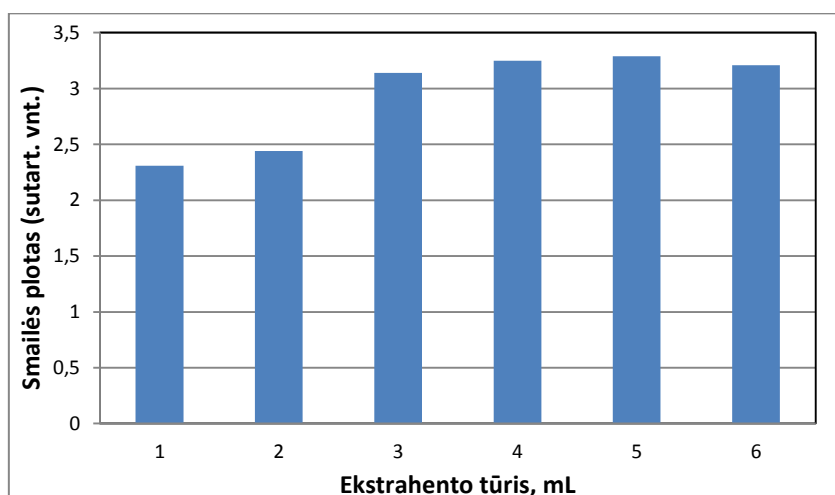
Galiausiai įvertinome ekstrahento tūrio įtaką (11 pav.). Vienodi augalo kiekiai buvo 16 val. ekstrahuojami skirtingais ekstrahento tūriais. Rezultatai rodo, jog 5 mL ekstrahento tūris pakankamas svainsoninui išekstrahuoti iš 0,100 g augalo mėginio.



9 pav. Svainsonino ekstrakcijos skirtingais ekstrahentais efektyvumo palyginimas (n=3).



10 pav. Ekstrakcijos trukmės įtaka svainsonino ekstrakcijos efektyvumui (n=3).



11 pav. Ekstrahento tūrio įtaka svainsonino ekstrakcijos efektyvumui (n=3). Ekstrahentas - vandeninis 2% acto rūgšties tirpalas. Ekstrakcijos trukmė – 14 val.

3.4. Metodo validavimas ir taikymas

Masių spektrometrija yra jautri mėginio matricai. Dažniausiai mėginio matricos komponentai slopina analitės signalą, žymiai rečiau – jį padidina. Todėl analizuojant biologinių objektų mėginius būtina įvertinti matricos įtaką. Matricos įtakos įvertinimui buvo naudojamas ilguolinės kulksnės (*Astragalus cicer*) viso augalo mėginio ekstraktas.

Matricos įtaka (%) buvo vertinama išmatavus svainsonino smailės plotus ekstrakto be priedo, ekstrakto su svainsonino standarto priedu ir tos pačios kaip priedas koncentracijos svainsonino standarto tirpale gryname tirpiklyje (9:1 ACN/H₂O):

$$(\%) = \left(1 - \frac{A_{st} - A_x}{A_{tirp}} \right) \times 100$$

A_x – svainsonino smailės plotas ekstrakto be priedo; A_{st} – svainsonino smailės plotas ekstrakto su standarto priedu; A_{tirp} – svainsonino standarto tirpiklyje smailės plotas.

Matricos įtaka, lygi 100% rodo, kad matrica visiškai neįtakoja analitės signalo. Mažesnė už 100% - matrica slopina analitės signalą, didesnė – matrica sustiprina analitės signalą. Įprastai laikoma, kad matricos įtaka nereikšminga, jei išmatuotos vertės yra intervalu 90-110%. Matricos įtakos trims svainsonino priedo koncentracijoms įvertinimo rezultatai (3 lentelė) parodė, kad matricos įtaka svainsonino signalui nereikšminga, todėl kiekybinę analizę galima atlikti tradiciniu kalibracinės kreivės būdu, t.y. kalibravimas matricoje nebūtinus.

3 lentelė. Matricos įtakos vertinimo rezultatai (n = 3)

Pridėta koncentracija, mg/L	Matricos įtaka (%)	SSN (%)
0,02	92	11,2
0,05	97	8,4
0,25	96	4,7

Metodo validavimui buvo įvertinti šie parametrai: tiesiškumo intervalas, aptikimo ir nustatymo ribos, analizės rezultatų glaudumas ir teisingumas. Tiesiškumo intervalas nustatytas iš 6 taškų kalibracinių kreivių (kiekvienam taškui po 3 matavimus). Aptikimo riba buvo nustatyta esant signalo/fono (S/N) triukšmų santykiui 3, nustatymo riba - esant signalo/fono triukšmų santykiui 10. Rezultatai pateikti 4 lentelėje.

4 lentelė. Svainsonino nustatymo HILIC-MS/MS metodu analizinės charakteristikos

(n = 3)

Parametras	Vertė	
	Galutiniame ekstrakte	Perskaičiuavus į sausą augalo masę
Tiesiškumo intervalas	0,005 – 0,750 mg/L	0,75-112,5 µg/g
R^2	0,9985	-
Aptikimo riba, (S/N=3)	1,5 µg/L	0,23 µg/g
Nustatymo riba (S/N=10)	5,0 µg/L	0,75 µg/g

Analizės rezultatų glaudumas ir teisingumas buvo vertinami analizuojant dviejų rūšių kulkšnės viso augalo mėginius. Prieš ekstrakciją į dalį atsvertų augalo mėginio porcijų buvo pridėdamas fiksuotas svainsonino standartinio tirpalo kiekis, mėginys palaikomas kol tirpiklis išgaruos (~30 min) ir atliekama mėginių su ir be priedo ekstrakcija ir analizė. Nors šis būdas nėra visiškai korektiškas kietų mėginių analizės rezultatų teisingumui vertinti, tačiau įvertinti teisingumą kitais būdais (pvz. analize alternatyviu metodu arba sertifikuotos pamatinės medžiagos analize) nebuvo galimybės. 5 lentelėje apibendrinti tyrimų rezultatai rodo, kad išmatuotos glaudumo ir teisingumo vertės yra tinkamos kiekybinei analizei.

5 lentelė. Svainsonino nustatymo kulkšnėje glaudumo ir teisingumo vertinimo rezultatai

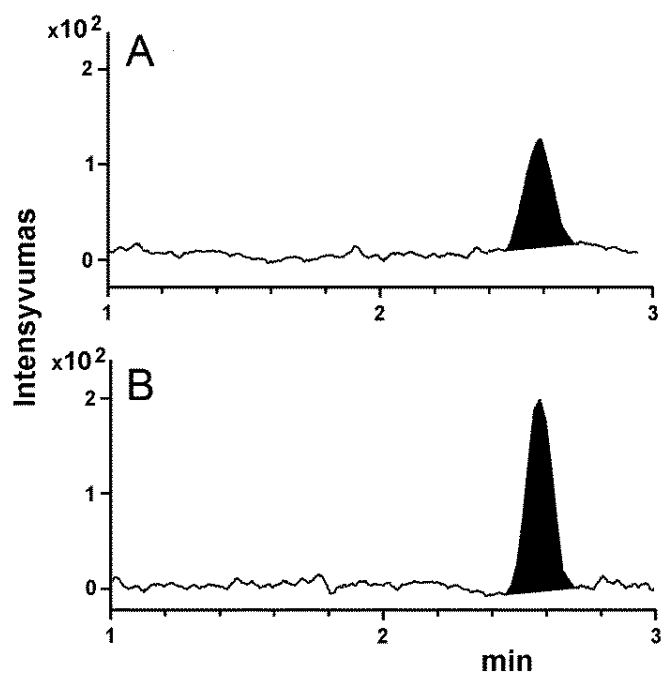
(n = 3)

Kulkšnės rūšis	Pridėta koncentracija ^a (mg/L)	Glaudumas (SSN, %)	Išgava (%)
Ilguolinė kulkšnė (<i>Astragalus cicer</i>)	0,010	15,2	90,2
	0,050	7,4	95,5
	0,500	8,7	97,3
Saldžialapė kulkšnė (<i>Astragalus glycyphyllos</i>)	0,010	13,5	85,5
	0,050	8,0	104,4
	0,500	7,3	95,8

^aLentelėje pateikta pridėto svainsonino koncentracija, perskaičiuota į jau analizei imamą ekstrakto porciją.

Optimizuotu HILIC-MS/MS metodu buvo atlikta svainsonino analizė Lietuvoje augančioje dviejų rūšių kulkšnėje: ilguolinėje (*Astragalus cicer*) ir saldžialapėje (*Astragalus glycyphyllos*). Buvo tirama 2014 m. derliaus žydėjimo tarpsnio kulkšnių viso augalo antžeminė dalis. Be to,

abi žydėjimo tarpsnio kulkšnės rūšys papildomai buvo išskaidytos į 3 morfologines dalis - stiebus, lapus ir žiedus. Iliustracijai 12 pav. pateiktos saldžialapės kulkšnės stiebų ekstrakto be priedo ir su 10 µg/L svainsonino priedu chromatogramos. Analizės rezultatai surašyti 6 lentelėje. Truputį didesnės svainsonino koncentracija nustatytos ilguolinėje kulkšnėje. Matome, kad didžiausi svainsonino kiekiai susikaupia lapuose. Tuo tarpu žieduose svainsonino apskritai nerasta.

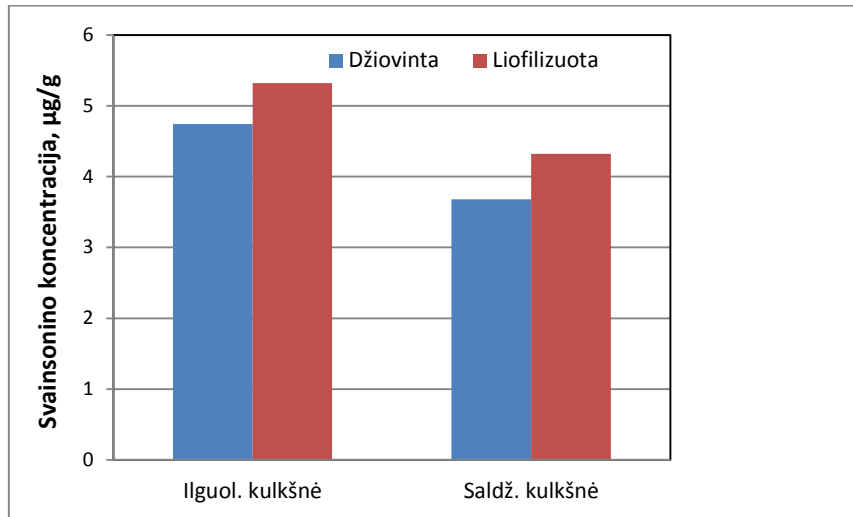


12 pav. Saldžialapės kulkšnės (stiebai) ekstrakto chromatogramos. A – be priedo; B – su 10 µg/L svainsonino priedu. Pateiktos tik kiekybinio perėjimo m/z 174→156 smailės.

6 lentelė. Svainsonino nustatymo kulkšnėje (žydėjimo tarpsnis) rezultatai (n = 3)

Kulkšnės rūšis	Augalo dalis	Nustatyta (µg/g)	SSN (%)
Ilguolinė kulkšnė (<i>Astragalus cicer</i>)	Visas augalas	4,83	10,2
	Stiebai	1,40	14,6
	Lapai	6,72	8,9
	Žiedai	Nerasta	-
Saldžialapė kulkšnė (<i>Astragalus glycyphyllos</i>)	Visas augalas	3,56	9,7
	Stiebai	0,94	15,3
	Lapai	5,77	8,4
	Žiedai	Nerasta	-

Papildomai buvo analizuoti skirtingu būdu paruošti kulkšnės viso augalo mėginiai. Buvo palygintas svainsonino kiekis 65°C temperatūroje išdžiovintuose ir liofilizuotuose mėginiuose (13 pav.). Truputį didesni svainsonino kiekiai buvo nustatyti liofilizuotuose mėginiuose. Tokį neatitikimą gali sukelti du veiksniai: 1) liofilizuojant mėginiai efektyviau išdžiovinami; 2) džiovinant nedidelė dalis svainsonino prarandama. Vis tik labiau tikėtina pirmojo veiksnio įtaka.

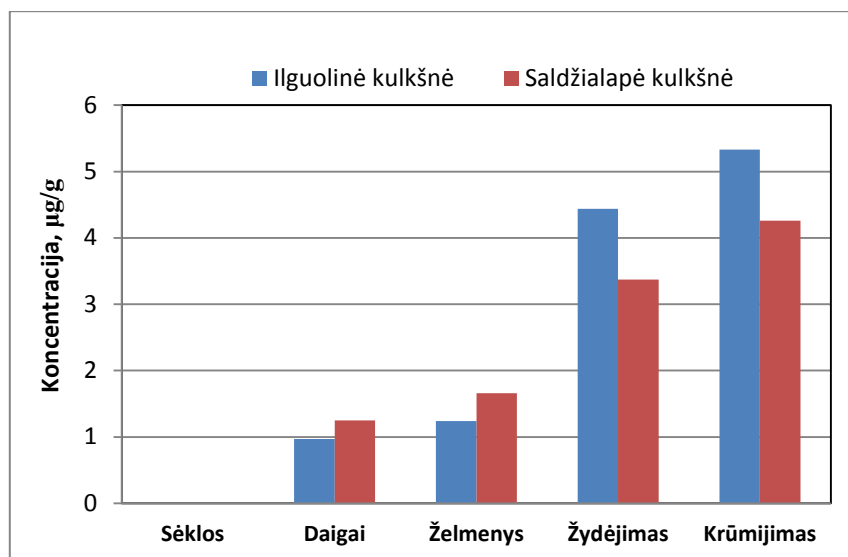


13 pav. Svainsonino koncentracija 65°C temperatūroje išdžiovintuose ir liofilizuotuose kulkšnės (visas augalas) mėginiuose (n=3).

Galiausiai buvo įvertintas svainsonino koncentracijos viso augalo masėje kitimas skirtinguose augimo tarpsniuose grandinėje:

sėklos → daigintos sėklos → želmenys → žydėjimo tarpsnis → krūmijimosi tarpsnis

Analizės rezultatai pateikti 14 pav. Matome, kad svainsonino koncentracija palaipsniui didėja ilgėjant augimo tarpsniui: sėklose svainsonino apskritai nerasta, o didžiausia jo koncentracija nustatyta paskutiniajame augimo tarpsnyje.



14 pav. Svainsonino koncentracija skirtingo augimo tarpsnio kulkšneje (n=3).

Apibendrinant tyrimų rezultatus galime konstatuoti, kad Lietuvoje augančioje kulkšneje toksiško alkaloido svainsonino kiekiai yra labai maži, todėl augalas visiškai nepavojingas galvijams. Palyginimui, Šiaurės Amerikoje augančioje kulkšneje svainsonino koncentracija siekia 0,5-5,0 mg/g [2, 6, 8], t.y. maždaug 100-1000 kartų didesnė nei lietuviškoje kulkšneje.

Išvados

1. Teigiamos ESI sąlygomis svainsoninui registruojamas ~3 kartus intensyvesnis MS signalas nei naudojant neigiamą jonizaciją.
2. HILIC režime svainsoninas yra žymiai stipriau sulaikomas nei atvirkščių fazių chromatografijos sąlygomis, todėl HILIC metodas žymiai tinkamesnis svainsoninui nustatyti. Maksimalus efektyvumas pasiekiamas atskiriant rūgščioje terpėje (pH 3,0).
3. Efektyviausiai svainsoninas išskiriamas iš augalo matricos ekstrahuojant vandeniniu 2% acto rūgšties tirpalu. Optimali ekstrakcijos trukmė – 14 val., ekstrahento tūris – 5 mL 0,100 gramui mėginio.
4. Nustatyti Lietuvoje augančioje kulkšnėje svainsonino kiekiai (3,56-4,83 $\mu\text{g/g}$) yra 100-1000 kartų mažesni nei Šiaurės Amerikoje augančioje kulkšnėje, todėl augalas visiškai nepavojingas galvijams. Svainsonino koncentracija didėja ilgėjant kulkšnės augimo tarpsniui grandinėje sėklos → daigintos sėklos → želmenys → žydėjimo tarpsnis → krūmijimosi tarpsnis. Didžiausi svainsonino kiekiai sukaupiami kulkšnės lapuose.

DETERMINATION OF ALKALOID SWAINSONINE IN MILKVETCH USING HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

Emilija Butkutė

GRADUATION THESIS CARRIED OUT IN DEPARTMENT OF ANALYTICAL AND
ENVIRONMENTAL CHEMISTRY OF VILNIUS UNIVERSITY

Research adviser: prof. A. Padarauskas

Summary

Swainsonine, an indolizidine alkaloid, is found in some *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Swainsona* species of the Leguminosae family growing throughout the world. Consumption of swainsonine containing plants by grazing animals leads to a chronic neurologic disease characterized by weight loss, depression, and death. Rapid, sensitive and accurate analytical methods are therefore needed to detect and to determine swainsonine in plants.

In this master thesis hydrophilic interaction chromatography (HILIC) technique combined with tandem mass spectrometry was developed and validated for the rapid and sensitive quantification of swainsonine. Developed technique was employed for the determination of swainsonine in milkvetch (*Astragalus* sp.) growing in Lithuania.

Obtained results showed that in comparison to conventional reversed-phase separation mode, HILIC technique provided significantly better retentivity for swainsonine. HILIC separation was performed on an Acquity UPLC BEH HILIC (2.1×100 mm, 1.7 μm) column using a mixture of acetonitrile and water (90:10, v/v) with 10 mmol/L formic acid as the mobile phase. The calibration curve showed good linearity over the concentration range 0.005-0.75 mg/L corresponding to 0.75-112.5 μg/g in dry matter (DM) of the original plant material. The estimated limit of quantification for the method was 5.0 μg/L (0.75 μg/g DM). The optimized method was applied to determine swainsonine in two milkvetch species (*Astragalus cicer* and *Astragalus glycyphyllos*) growing in Lithuania. The highest swainsonine concentration (6.72 μg/g DM) was found in the leaves of the plant. It was determined that the amount of swainsonine in the aerial part of milkvetch increases with its stage of growth.

Literatūros sąrašas

1. Haschek and Rousseaux's, *Handbook of Toxicologic Pathology third edition*, 2013, 1270-1274 psl., ISBN: 978-12-415759-0
2. D. R. Gardner, R. J. Molyneux, M. H. Ralphs, *Analysis of Swainsonine: Extraction Methods, Detection, and Measurement in Populations of Locoweed (oxytropis spp.)*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49, 4573-4580.
3. <http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/locoweed/swain2.html>
4. A. B. CONNER, *Locoism in Domestic Animals*, Division of Veterinary Science, 1932.
5. D. Singh, G. Kaur, *Preparative-cum-quantitative mass-directed analysis of swainsonine and its in situ activity against Sf-21 cell line*, Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Guwahati, Guwahati, Assam, India, 2013, DOI: 10.1111/1574-6968.12214
6. D. R. Gardner, D. Cook, *A comparison of alternative sample preparation procedures for the analysis of swainsonine using LC-MS/MS*, Phytochemical Analysis, 2011.
7. G.H. Wagman, R. Cooper, *Natural Products Isolation– Separation Methods for Antimicrobials, Antivirals and Enzyme Inibitors*, 1989, p. 539, ISBN 0-444-87147-0
8. S. M. Colegate, P. R. Dorling, C. R. Huxtable, *A Spectroscopic Investigation of Swainsonine: An α -Mannosidase Inhibitor Isolated from Swainsona canescens*, Australian Journal of Chemistry, 1979, 32(10), 2257 – 2264.
9. R. J. Molyneux, L. F. James, *Loco Intoxication: Indolizidine Alkaloids of Spotted Locoweed (Astragalus lentiginosus)*, Science, 1982, 216 (4542), 190-191.
10. R. J. Molyneux, D. R. Gardner, L. F. James, S. M. Colegate, *Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis*, Journal of Chromatography A, 2002, 967, 57-74.
11. H. Baocheng, Y. Xianpeng, W. Xuehong, L. Jianzhi, W. Baohai, L. Yu, G. Wenzhu, G. Zhiting, S. Ruofeng, H. Yonghao, L. Jianping, *Extraction and GC Study on Swainsonine from Locoweed, Astragalus strictus in Tibet*, Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS, Lanzhou 730050, China, 2013.
12. Y. Wang, Y. Hu, J. Wang, Z. Liu, G. Yang, G. Geng, *Ultrasound-assited solvent extraction of swainsonine from Oxytropis ochrocephala Bunge*, Journal of Medical Plants Research, 2011, 5(6), 890-894.
13. I. Pastuszak, R. J. Molyneux, L. F. James, A. D. Elbein, *Lentiginosine, a dihydroxyindolizidine alkaloid that inhibits amyloglucosidase*, Biochemistry, 1990, 29 (7), 1886–1891.

14. R. J. Molyneux, L. F. James, K. E. Panter, M. H. Ralphs, *Analysis and distribution of swainsonine and related polyhydroxyindolizidine alkaloids by thin layer chromatography*, *Phytochemical Analysis*, 1991, 2 (1991) 125.
15. H. Engelhardt, *One century of liquid chromatography: From Tswett's columns to modern high speed and high performance separations*, *Journal of Chromatography B*, 2004, 800, 3–6.
16. T. H. Walter, P. Iraneta, M. Capparella, *Mechanism of retention loss when C8 and C18 HPLC columns are used with highly aqueous mobile phase*, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1075, 177–183.
17. S. A. Gustavsson, J. Samskog, K. E. Markides, B. Langstrom, *Studies of signal suppression in liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents*, *Journal of Chromatography A*, 2001, 937, 41–47.
18. P. Hemstrom, K. Irgum, *Review, Hydrophilic interaction chromatography*, *Journal of Separation Science*, 2006, 29, 1784-1821.
19. A. J. Alpert, *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*, *Journal of Chromatography A*, 1990, 499, 177-196.
20. P. G. Wang, W. He, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications*, 2011, ISBN: 978-1-4398-0753-8
21. W. Naidong, *Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases*, *Journal of Chromatography B*, 2003, 796, 209-224.
22. B. A. Olsen, *Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities*, *Journal of Chromatography A*, 2001, 913, 113-122.
23. M. Bjorklund, M.T.W. Hearn, *Synthesis of silica-based heparin-affinity adsorbents*, *Journal of Chromatography A*, 1996, 728, 149-169.
24. C. West, E. Lesellier, *Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model: III. Polar stationary phases*, *Journal of Chromatography A*, 2006, 1110, 200-213.
25. V. V. Tolstikov, O. Fiehn, *Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry*, *Analytical Biochemistry*, 2002, 301, 298–307.
26. Y. Guo, *Analysis of Quaternary Amine Compounds by Hydrophilic Interaction Chromatography/Mass Spectrometry (HILIC/MS)*, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2005, 28, 497-512.

27. C. McClintica, D. M. Remickb, J. A. Petersonb, D. S. Risleyb, *Novel Method for the Determination of Piperazine in Pharmaceutical Drug Substances Using Hydrophilic Interaction Chromatography and Evaporative Light Scattering Detection*, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2003, 26, 3093-3104.
28. Ph. Dallet, L. Labat, E. Kummer, J. P. Dubost, *Determination of urea, allantoin and lysine pyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography*, *Journal of Chromatography B*, 2000, 742, 447-452.
29. K. Zhanga, C. Yanb, Z. Zhanga, Q. Wang, R. Gaoa, *Mixed Mode of Hydrophilic and Ionic Interaction Pressurized Capillary Electrochromatography for Separation of Basic Compounds*, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2003, 26, 2119-2131.
30. S. D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C. E. West, R. B. van Breemen, *Determination of Folates in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*, *Analytical Chemistry*, 2001, 73, 5358–5364.
31. S. D. Brown, C. A. White, M. G. Bartlett, *Hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray mass spectrometry determination of acyclovir in pregnant rat plasma and tissues*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, 16, 1871-1876.
32. A. C. Li, H. Junga, W. Z. Shou, M. S. Bryant, X. Jiang, W. Naidong, *Direct injection of solid-phase extraction eluents onto silica columns for the analysis of polar compounds isoniazid and cetirizine in plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, 18, 2343-2350.
33. P. Uutela, R. Reinila, P. Piepponen, R. A. Ketola, R. Kostianen, *Analysis of acetylcholine and choline in microdialysis samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19, 2950-2956.
34. Y. Hsieh, J. Chen, *Simultaneous determination of nicotinic acid and its metabolites using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19, 3031-3036.
35. J. C. Valette, C. Demesmay, J. L. Rocca, E. Verdon, *Separation of Tetracycline Antibiotics by Hydrophilic Interaction Chromatography Using an Amino-Propyl Stationary Phase*, *Chromatographia*, 2004, 59, 55-60.
36. R. Pisano, M. Breda, S. Grassi, C. A. James, *Hydrophilic interaction liquid chromatography–APCI–mass spectrometry determination of 5-fluorouracil in plasma and tissues*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38, 738-745.

37. J. H. Beumera, E. Josepha, M. J. Egorina, J. M. Coveyd, J. L. Eisemana, *Quantitative determination of zebularine (NSC 309132), a DNA methyltransferase inhibitor, and three metabolites in murine plasma by high-performance liquid chromatography coupled with on-line radioactivity detection*, Journal of Chromatography B, 2006, 831, 147-155.
38. C. Giroud, K. Michaud, F. Sporkert, C. Eap, M. Augsburger, P. Cardinal, P. Mangin, *A Fatal Overdose of Cocaine Associated with Coingestion of Marijuana, Buprenorphine, and Fluoxetine. Body Fluid and Tissue Distribution of Cocaine and Its Metabolites Determined by Hydrophilic Interaction Chromatography-Mass Spectrometry (HILIC-MS)*, Analytical Toxicology, 2004, 28, 464-474.
39. J. Bengtsson, B. Jansson, M. Hammarlund-Udenaes, *On-line desalting and determination of morphine, morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide in microdialysis and plasma samples using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, 19, 2116-2122.
40. H. Schlichtherle-Cerny, M. Affolter, C. Cerny, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis*, Analytical Chemistry, 2003, 75, 2349-2354.
41. B. Zywickia, G. Catchpolea, J. Draperb, O. Fiehna, *Comparison of rapid liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry methods for determination of glycoalkaloids in transgenic field-grown potatoes*, Analytical Biochemistry, 2005, 336, 178-186.
42. M. de Person, A. Hazotte, C. Elfakir, M. Lafosse, *Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for taurine and methionine in matrices rich in carbohydrates*, Journal of Chromatography A, 2005, 1081, 174-181.
43. H. Schlichtherle-Cerny, M. Affolter, C. Cerny, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis*, Analytical Chemistry, 2003, 75, 2349-2354.
44. C. Dell'Aversano, G. K. Eaglesham, M. A. Quilliam, *Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 2004, 1028, 155-164.
45. C. Panagiotopoulos, R. Sempere, *Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions*, Limnology And Oceanography: Methods, 2005, 3, 419-454.
46. Q. Wang, Y. Fang, *Analysis of sugars in traditional Chinese drugs*, Journal of Chromatography B, 2004, 812, 309-324.

47. B. Zhu, C. T. Mant, R. S. Hodges, *Mixed-mode hydrophilic and ionic interaction chromatography rivals reversed-phase liquid chromatography for the separation of peptides*, Journal of Chromatography A, 1992, 594, 75-86.