

**LATVIJAS UNIVERSITĀTE**  
**ĶĪMIJAS FAKULTĀTE**

Šķidrums hromatogrāfijas un masspektrometrijas metožu izstrāde un  
pielietojums antioksidantu noteikšanai

**MAGISTRA DARBS**

Autors: **Jānis Ruško**

Stud. apl. nr.: **jr12046**

Darba vadītājs: **Asoc. prof. Vadims Bartkevičs**

**Rīga**

**2017**

# ANOTĀCIJA

**Šķidruma hromatogrāfijas un masspektrometrijas metožu izstrāde un pielietojums antioksidantu noteikšanai**, Ruško J., zinātniskais vadītājs Asoc. prof. Dr. chem. Bartkevičs V., maģistra darbs, 52 lappuses, 20 attēli, 6 tabulas, 60 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Antioksidanti ir plaši izplatīti augu valsts pārtikas produktos un pēdējā desmitgadē tiem ir pievērsta pastiprināta uzmanība. Pateicoties to veselību uzlabojošajām īpašībām, ir radusies palielināta interese par to noteikšanas veidiem dažāda veida augos un augu izcelsmes produktos. Līdz ar augsti efektīvās šķidrumu hromatogrāfijas pieejamību apvienojumā ar augstas izšķirtspējas masspektrometriju, ir pavērti jauni apvāršņi analītisko metožu izstrādei sarežģītās paraugu matricās.

Darbā dots ieskats par antioksidantu un polifenolu īpašībām, to izdalīšanu no pārtikas produktiem, paraugu sagatavošanas un noteikšanas metodēm, izmantojot augsti efektīvās šķidruma hromatogrāfijas metodes. Kā pētījumu objekts ir izvirzīti antioksidanti, kas ir sastopami šokolādē un citos kakao produktos.

Darbā ir izstrādāta un pielietota antioksidantu analīzes metode izmantojot hibrīda-Orbitrap augstas izšķirtspējas masspektrometru. Izstrādātas paraugu sagatavošanas metodes, kuras ir ātras un efektīvas. Metode validēta, lai pārlicinātos par metodes precizitāti, pareizību un kopējo uzticamību. Noteikts antioksidantu saturs 26 šokolādes paraugos, kuros kopējais 8 izvēlētu antioksidantu saturs ir robežās no 330 – 2631 mg·kg<sup>-1</sup> parauga.

ANTIOKSIDANTI, POLIFENOLI, FLAVAN-3-OLI, FENOLĀS SKĀBES, METODES VALIDĀCIJA, AUGSTEFEKTĪVĀ ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJA, AUGSTAS IZŠĶIRTSPĒJAS MASSPEKTROMETRIJA, ORBITRAP, PFP STACIONĀRĀ FĀZE

# ANNOTATION

**Development and application of liquid chromatography – massspectrometry methods for the determination of antioxidants**, Rusko J., scientific supervisor Assoc. prof. Dr. chem. Bartkevics V., masters thesis, 52 pages, 20 pictures, 6 tables, 60 literature sources cited. Written in latvian.

Antioxidants are widely distributed in plant products and in recent decades an attention has been raised due to their beneficial properties to human health. An interest has been given in determination of polyphenolics in different types of plants and plant products. Consequently, availability of UPLC systems and columns with sorbent sizes smaller than 2  $\mu\text{m}$  and the modern high resolution mass spectrometry tools indicate new horizons to the development of new methods for the analysis of complex sample matrices.

The study gives an overview of antioxidant and polyphenol characteristic properties, distribution in food products, sample preparation and detection methods, using HPLC. As the main subjects of research antioxidants which are found in chocolate and other cocoa products have been evaluated.

The developed method is based on rapid sample preparation and UPLC methods in tandem with hybrid-Orbitrap HRMS technology. Method has been validated to assure its precision, accuracy and reliability. 26 chocolate samples were analysed and concentrations of selected 8 antioxidants were determined. Total concentrations of selected antioxidants varied from 330 to 2631  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

ANTIOXIDANTS, POLYPHENOLICS, FLAVAN-3-OLS, PHENOLIC ACIDS, METHOD VALIDATION, HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, HIGH RESOLUTION MASS SPECTROSCOPY, ORBITRAP, PFP PHASE

# SATURS

<b>Ievads .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Literatūras apskats .....</b>	<b>8</b>
1.1. Fenolu savienojumi un to sastopamība pārtikā.....	8
1.2. Antioksidantu ķīmiskās un bioloģiskās īpašības.....	11
1.3. Paraugu sagatavošana .....	13
1.4. Šķidrums hromatogrāfijas iespējas.....	17
1.5. UHPLC-MS pielietojums polifenolu noteikšanai .....	18
<b>2. Eksperimentālā daļa .....</b>	<b>20</b>
2.1. Izmantotā aparātūra un reaģenti .....	20
2.2. Standartšķīdumi .....	20
2.3. Paraugi .....	21
2.4. Instrumentālās metodes parametri .....	21
2.5. Paraugu sagatavošana .....	22
<b>3. Rezultātu izvērtējums .....</b>	<b>23</b>
3.1. Literatūras izpēte .....	23
3.2. Paraugu sagatavošanas metodes izstrāde .....	24
3.3. Hromatogrāfiskā sadalījuma optimizācija .....	28
3.4. HRMS apstākļi .....	31
3.5. Metodes aprobācija un veikspēja .....	34
3.6. Paraugu analīze .....	35
3.7. Nākotnes perspektīvas un diskusija .....	39
<b>Secinājumi .....</b>	<b>44</b>
<b>Izmantotās literatūras saraksts .....</b>	<b>45</b>
<b>Pateicības .....</b>	<b>52</b>

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- HPLC – augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfija
- HRMS – augstas izšķirtspējas masspektrometrija
- Orbitrap-HRMS – Orbitrap augstas izšķirtspējas masspektrometrija
- UHPLC-MS – ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija ar masspektrometru
- UHPLC-TOF – ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija ar nolidojuma laika detektoru
- UHPLC-Orbitrap-MS – ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija - Orbitrap augstas izšķirtspējas masspektrometrija
- UHPLC-QqQ-MS/MS – ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija – kvadrupola tandēma masspektrometrija
- C-Trap – jonu glabāšanas slazds
- HCD – augstās enerģijas sadursmju un disociācijas šūna
- CID – *collision-induced dissociation* jeb neselektīva molekulu fragmentēšana kolīzijas rezultātā (notiek avotā)
- TOF – nolidošanas laika masspektrometrija
- ESI – elektronu izsmidzināšanas jonizācija
- QqQ – tandēma kvadrupols
- QqTOF – kvadrupola - nolidojuma laika detektors
- Liquid-liquid extraction (LLE) – šķidrums – šķidrums ekstrakcija
- Solid phase extraction (SPE) – cietfāzes ekstrakcija
- t-SIM – mērķtiecīgā selektīvā jonu monitorēšana
- t-MS<sup>2</sup> jeb MRM, jeb PRM – tandēm masspektrometriskā jonu monitorēšana

## IEVADS

Pēdējā desmitgadē antioksidantiem un polifenoliem ir pieaugusi nozīme, veicinot izpratni par bioloģisko sistēmu vitālām funkcijām, atbildot uz atslēgas jautājumiem. Ir zināms, ka fenolu savienojumiem ir labvēlīga ietekme uz veselību, jo tie ir dabisko antioksidantu avots un tiem piemīt tādi bioloģiskie efekti kā brīvo radikāļu saistīšana, metālu helatācija, šūnu proliferācija (pēciekaisuma atjaunošana), enzimatiskās aktivitātes un pārvades ceļu regulācija. [1,2]

Polifenoli ir plaši sastopami augļos, dārzeņos, riekstos, sēklās, dzērienos un daudzos to pārstrādes produktos, ja kā sastāvdaļas tiek izmantoti dabīgie produkti. Biežāk lietotie antioksidantu avoti cilvēki uzturā mūsdienās ir kakao, āboli, tējas, dažādas ogas, kafija, vīns, ievārījumi, šokolāde. [3] Šāda veida paraugi ir sarežģīti, jo tie satur dažādas fenolu savienojumu klases, kuras savā starpā atšķiras ar dažādām polaritātēm un molekulu izmēriem, sākot no vienkāršiem fenolu savienojumiem, piemēram, fenolu skābēm (salicilskābe, vanilīns, gallskābe), līdz oligomēriem, piemēram, procianidīni vai kondensēti tannīni. Ir jāpiemin, ka fenolu savienojumi sastāda mazas masas daļas iepriekš minētajos paraugu veidos.

Atšķirīgais šo molekulu ķīmiskais raksturs sarežģī analīzi un nosaka nepieciešamību pēc jaunām analītiskām un hromatogrāfiskām metodēm. Tas ir noticis pēdējās desmitgades laikā un turpinās vēl šodien – tiek izstrādātas jaunas metodes polifenolu identificēšanai un kvantificēšanai augu valsts paraugos, ēdienos, uztura bagātinātājos un farmaceitiskos preparātos. Jaunu tehnoloģiju attīstība, kā piemēram, ultra augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija (UAEŠH) un tandēma masspektrometrija (MS/MS), ir ļāvusi pētniekiem izskaidrot sarežģītas fenolu struktūras viegli nosakot precīzas molekulu masas un fragmentācijas veidus.

Tieši šķidrums hromatogrāfijas savietojamība ar masspektrometriju ir piemērota pārtikas paraugu analīzēm. Hromatogrāfija, kā rīks vielu sadalīšanai un masspektrometrija identifikācijai, piedāvā mums informāciju par sarežģītām vielu kombinācijām, nodrošinot skrīninga, apstiprinošās un kvantitatīvās funkcijas desmitiem dažādu komponentu vienas analīzes laikā. [4]

### **Pētījuma nozīmība:**

1. Jaunākās zinātniskās literatūras dati liecina par polifenolu augstu nozīmību augu funkcionālo īpašību uzturēšanai, kā arī nozīmi cilvēku organisma fizioloģisko funkciju darbībai.

2. Galvenā polifenolu priekšrocība salīdzinot ar citiem antioksidantiem ir to spēja saistīt un deaktivizēt organismam nevēlamu savienojumu klāstu, kā brīvos radikāļus un pārejas metālus.

**Darba mērķis** – apkopot literatūru par mūsdienās lietotajām analītiskajām metodēm antioksidantu, t. sk. polifenolu, noteikšanu dažādās matricās, izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju un masspektrometriskās metodes.

**Darba uzdevumi:**

1. Apkopot un analizēt literatūru par antioksidantu veidiem un to ķīmiskajām īpašībām.
2. Apkopot un analizēt literatūru par līdz šim zināmām antioksidantu noteikšanas metodēm.
3. Izstrādāt un validēt analītisko metodi astoņu antioksidantu noteikšanai šokolādes paraugos, izmantojot UHPLC-Orbitrap-MS.
4. Aprobēt izstrādāto metodi, antioksidantu identificēšanai un kvantificēšanai analizējot Latvijas tirgū izplatītajos šokolādes paraugos.

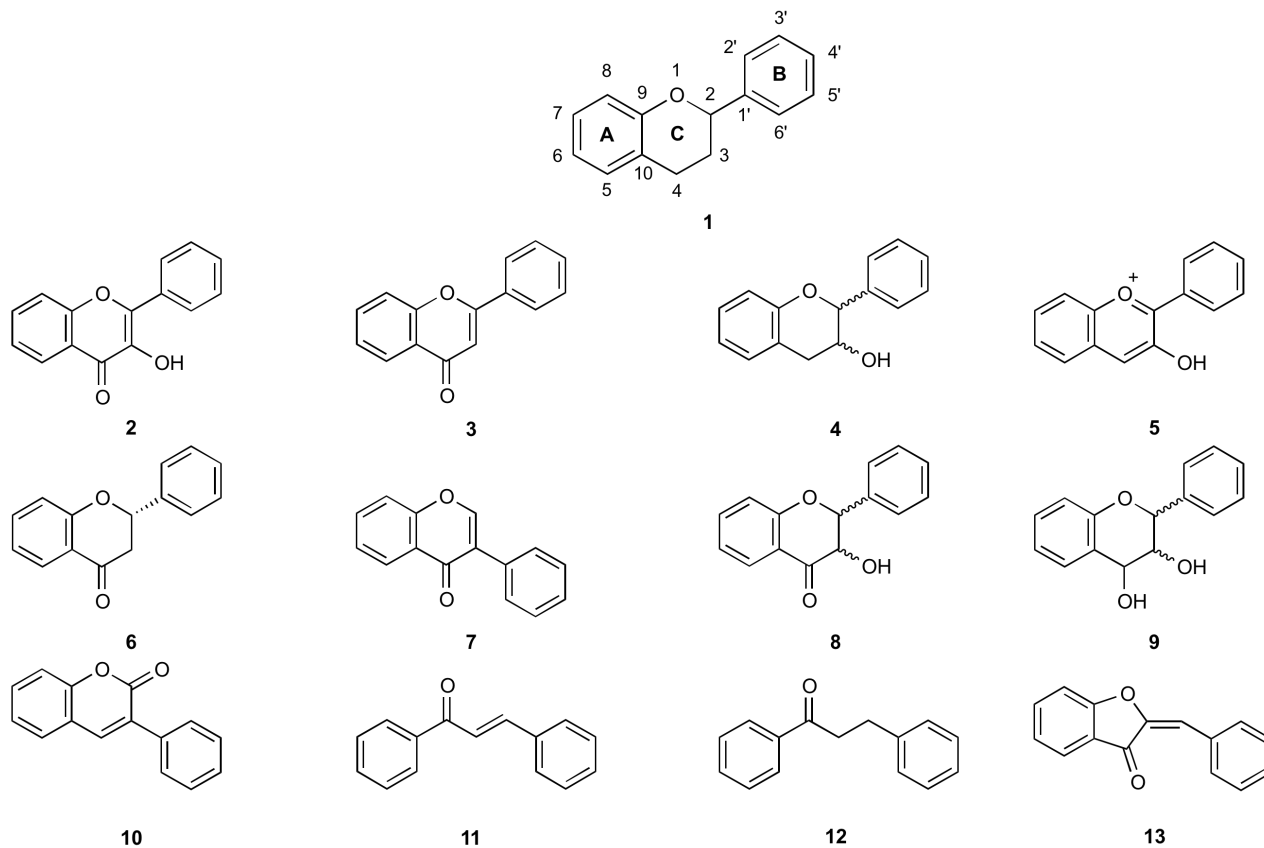
# 1. Literatūras apskats

## 1.1. Fenolu savienojumi un to sastopamība pārtikā

Fenolu savienojumi sastāda svarīgu daļu no cilvēku uztura. To ķīmiskā struktūra sastāv no vismaz viena aromātiska gredzena ar vienu vai vairākām hidroksilgrupām. Šī savienojumu klase sastāv no vienkāršām, mazām aromātisko grupu struktūrām, līdz pat lielām, sarežģītām struktūrām kā tannīni un atvasinātie polifenoli. [5,6]

Šai savienojumu klasei neeksistē konkrēts iedalījums, bet atsevišķu publikāciju un grāmatu autori ir piedāvājuši sava veida iedalījumus. Autori klasificē fenolus pēc to oglekļa atomu skaita un saišu savstarpējā novietojuma. Tos bieži var sastapt konjugētus ar cukuriem vai organiskām skābēm. Kā piemēru šāda veida iedalījumam var minēt, flavanoīdus un ne-flavonoīdus. Ne-flavonoīdi lielākoties ir sastopami pārtikas un dzērienu pārstrādes produktos, kā tējās, vīnos, kafijā un kakao. To sastāvā ir fenolu transformācijas produkti, kurus apraksta kā atvasinātos polifenolus. Tannīnu nosaukums ir cēlies no augu ekstraktiem, kuri tika izmantoti ādas apstrādē, un tie ir bieži sastopami pārtikas produktos, bet pārāk mazās koncentrācijās, lai apstrādātu ādu.

Flavonoīdi (**1**) ir polifenoli, kuri sastāv no 15 oglekļa atomiem – diviem aromātiskiem gredzeniem, kuri savā starpā ir saistīti ar trīs oglekļu saiti. Tie ir visbiežāk sastopamie fenoli augu valstī, lielākoties atrodami augu lapās un augļu mizā.

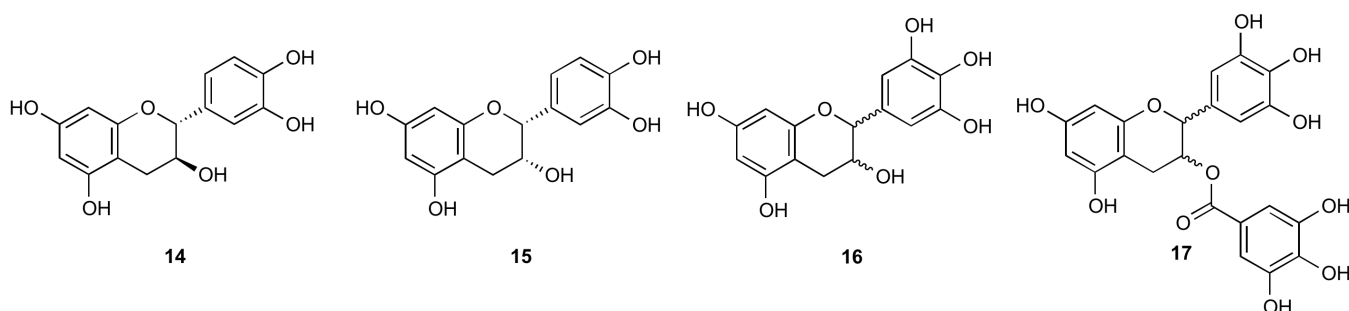


1. att. Flavanoīdu iedalījums – strukturālās atšķirība

Flavonoīdu apakšklases sastāv no flavanoliem (**2**), flavoniem (**3**), flavan-3-oliem (**4**), antrocianidīniem (**5**), flavanoniem (**6**) un izoflavoniem (**7**). Mazāk sastopamie pārstāvji ir dihidroflavanoli (**8**), flavan-3,4-dioli (**9**), kumarīni (**10**), halkoni (**11**), dihidrohalkoni (**12**) un auronī (**13**). Uz flavanoīdu bāzes skeleta (**1**) var būt dažādi aizvietotāji.

Flavanoli (**2**) ir visplašāk izplatītie no flavanoīdu klases pārstāvjiem, tie ir sastopami gandrīz visos augos, izņemot aļģēs un sēnēs.

Flavan-3-oli ir strukturāli vissarežģītākie no flavanoīdu klases. Tas ir skaidrojams ar divu hirālo centru esamību piesātinātās C-C saites klātbūtnē starp abiem aromātiskajiem gredzeniem. Vienkāršākie monomērās formas pārstāvji ir (+)-katehīns (**14**) un tā izomērs (-)-epikatehīns (**15**), kuri dabā ir sastopami gan brīvā, gan hidroksilētā - gallokatehīnu (**16**) veidā. Tiem ir iespējami arī gallskābes esterifikācijas - kondensācijas produkti (**17**). No šiem vienkāršākajiem pārstāvjiem tiek veidotas polimērās un oligomērās formas proantrocianidīni jeb kondensētie tannīni. Divi hirālie centri flavan-3-olu (**4**) molekulā rezultējas četros izomēros katram B-gredzena hidroksilēšanas produktu līmenim.



## 2. att. Flavan-3-olu veidi

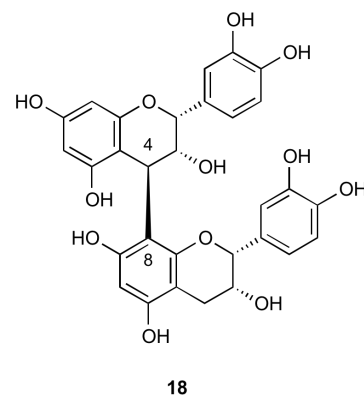
Oligomērie un polimērie proantrocianidīni ir ar papildus hirālo centru C4 oglekļa vietā, katram attiecīgajam fragmentam.

Tipiskos AEŠH apgrieztās fāzes apstākļos enantiomēru pāri netiek atdalīti.

Proantrocianidīni tiek iedalīti A, B un C tipos. B tipa veidoti no (+)-katehīna (**14**) un (-)-epikatehīna (**15**), kuri savā starpā ir saistīti ar C4 un C6 vai C8 (**18**) oglekļiem. A tipa veido ēteru saiti starp C2 un C7 oglekļiem.

Šīs struktūras var veidot polimēru virknes saturot līdz pat 50 dažādiem katehīnu fragmentiem. Tikai katehīnu struktūru saturošos polimērus sauc par procianidīniem un tie ir visbiežāk sastopamie proantrocianidīni augos.

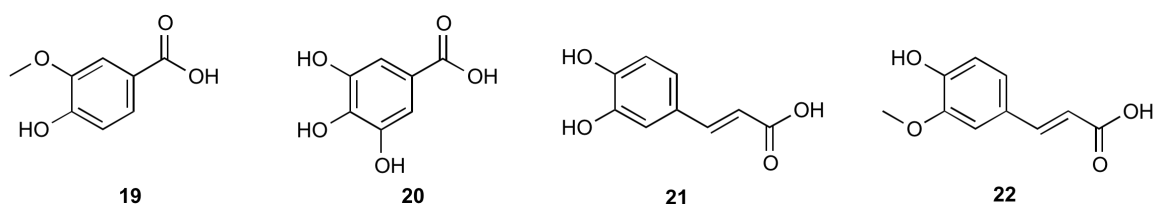
Pārtikas (tējas, kafijas, kakao) gatavošanas procesos monomēri tiek pārveidoti par teaflavīniem, teacitrīniem tearubīniem. [6]



## 3. att. Proantrocianidīns B2

Ne-flavanoīdu vielu klase sastāv no vienkāršam fenolu skābēm, fenolu alkoholiem, stilbēniem, halkoniem un lignaniem. Fenolu skābes tiek sadalītas benzoskābes atvasinājumos, veidotos uz C6-C1 skeletu, kā vanilīnskābe (**19**) un gallskābe (**20**) un kanēļskābes atvasinājumos, kuri ir veidoti uz C6-C3 skeletu, kā ferulskābe (**21**) un 3,4-dihidroksikanēļskābe (**22**). Benzoskābju atvasinājumu vidū ir arī hidroksifenilacetskābju un hidroksifenilpropānskābju atvasinājumi.

Vanilīnskābe (**19**) ir sastopama garšvielās kā oregano un timiāns, kā arī olīvās, gallskābe (**20**) – vīnos, tējās, kastaņos, ferulskābe (**21**) – šokolādē, graudaugu ēdienos, banānos, ananāsos. [7,8]



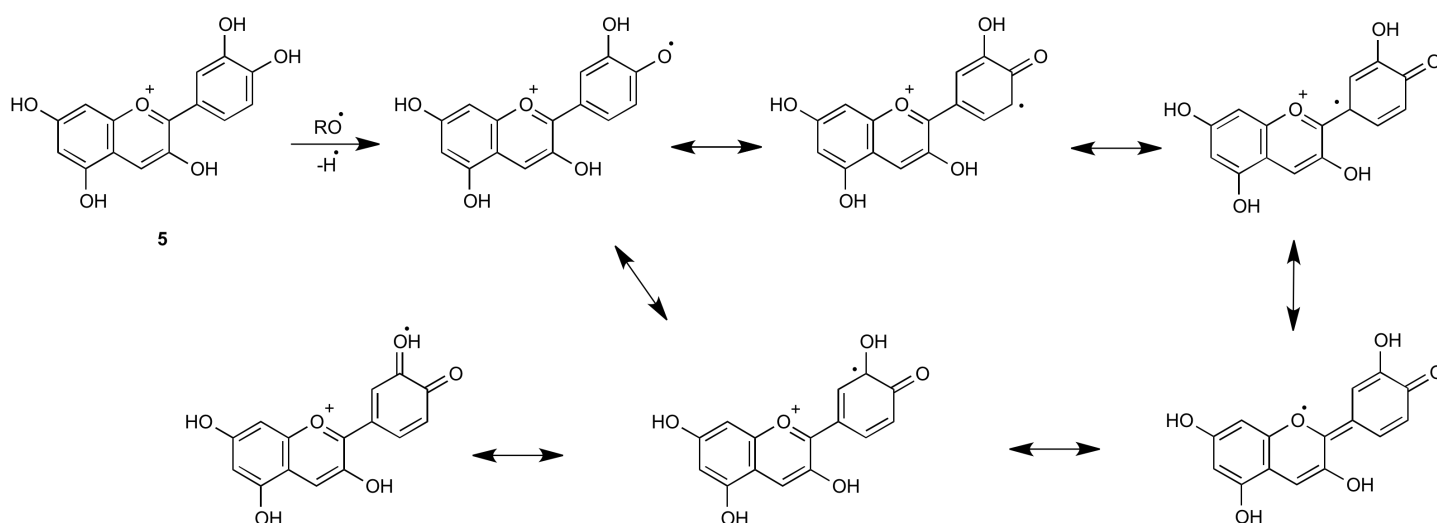
#### 4. att. Benzoskābes atvasinājumi

Fenolu alkoholi plaši izplatīti olīvās un to eļļā, stilbēni sastopami vīnā un garšvielās, halkoni - augļos (ābolos, citronos), dārzeņos (tomātos, pupiņās, kartupeļos) un garšaugos (lakricā), lignani – linsēklās un to eļļā. [9,10]

## 1.2. Antioksidantu ķīmiskās un bioloģiskās īpašības

Polifenoli ir sekundārie metabolīti, ko augi bioķīmiskos procesos sintezē, aizsardzībai pret citu organismu nelabvēlīgo ietekmi. [11] To lietošana uzturā nodrošina aizsardzību pret dažādām deģeneratīvām slimībām un ir saistīta ar samazinātiem riskiem iegūt vēzi, kardiovaskulārās slimības, iekaisuma procesus. Neseni pētījumi pierāda to, ka šīs slimības ir saistītas ar oksidatīvo stresu, kas rodas no reaktīvajām skābekļa un slāpekļa daļiņām.

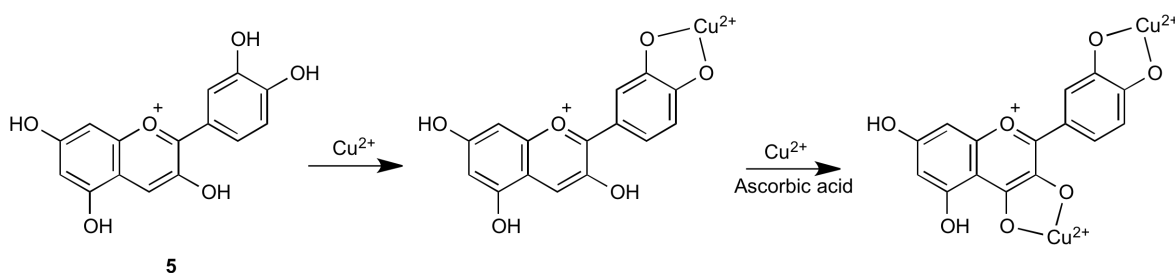
Dabas ķīmiskās vielas (*phytochemicals*), galvenokārt polifenoli, izrāda lielāku antioksidantu aktivitāti, salīdzinājumā ar askorbīnskābi. Brīvo radikāļu neutralizācija notiek fenoliem donējot elektronu vai ūdeņraža atomu (5. att.)



5. att. Brīvo radikāļu savākšanas mehānisms un tautomērās formas

Konjugētās sistēmas polifenolos un hidroksilēšanas centru stēriskais izvietojums, kā hidroksilgrupas pie 3C oglekļa flavonos (4), spēlē lielu lomu nosakot kopējās antioksidantu aktivitātes. Polifenoli samazina brīvo radikāļu ģenerēšanas ātrumu, tādējādi samazinot oksidēšanās ātrumu, inhibējot vai deaktivējot aktīvos radikāļu prekursorus. Tie darbojas kā tiešie radikāļu savācēji lipīdu peroksidēšanas ķēdes reakcijās, kā ķēdes lauzēji – tie donē elektronu brīvajam radikālim, tādējādi tos neutralizējot un kļūstot stabili jeb mazāk reaktīvi, un apstādinot ķēdes reakcijas. [12,13]

Polifenoli darbojas arī kā metālus helatējoši savienojumi (6. att.). [13]



6. att. Antrocianidīna (5)  $\text{Cu}^{2+}$  jonu helatācija

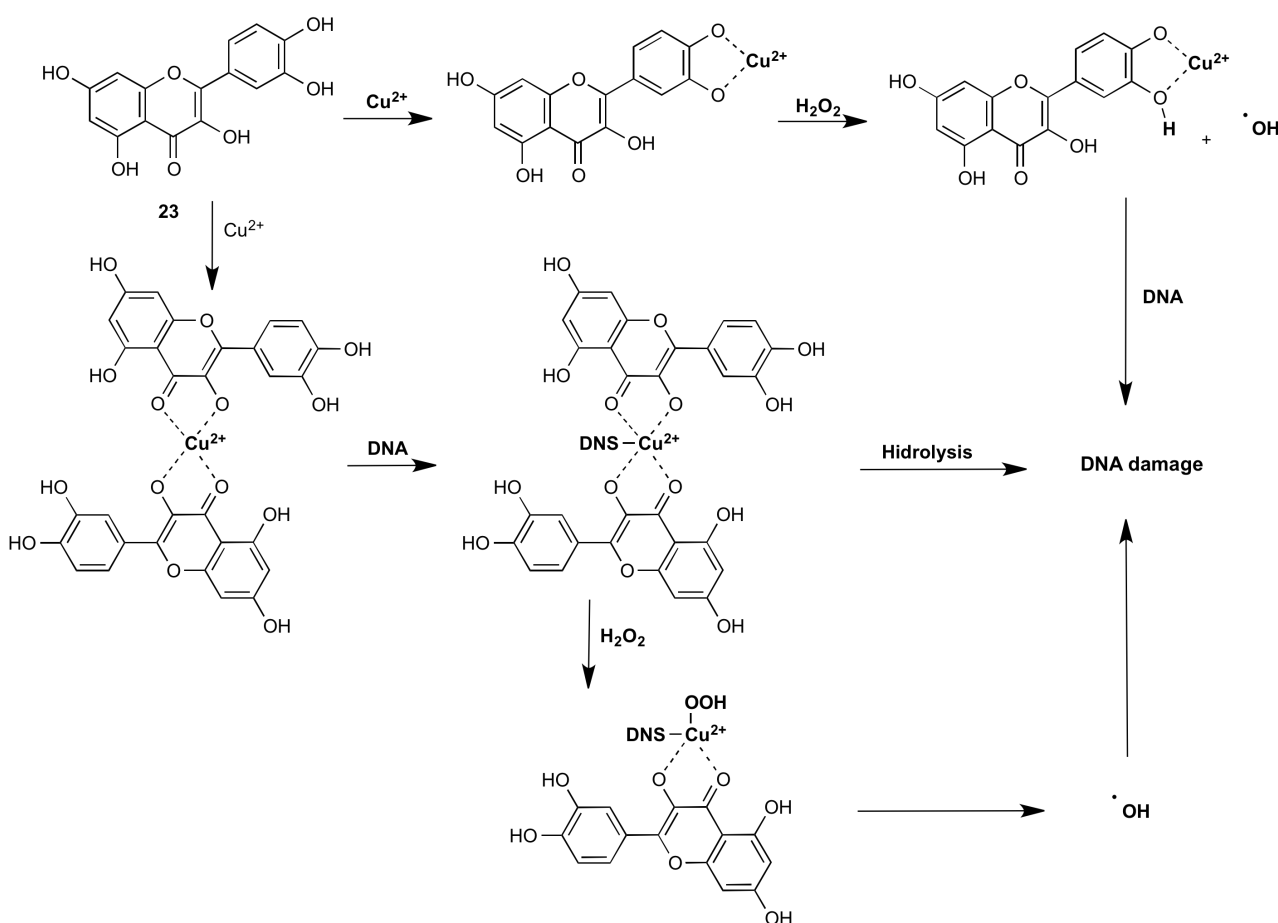
Tie inhibē  $\text{Fe}^{3+}$  reducēšanas procesu, tādējādi samazinot hidroksil radikāļu ražošanu Fentona reakcijā (7. att.). [14]



7. att. **Fentona reaģenta redox procesu reakcija**

Oksidatīvais stress ierosina novirzes no līdzsvara šūnu reducēšanās un oksidēšanās procesos, kas ir novērojams dažādos vēža šūnu veidos, tādējādi ierosinot onkogēnu stimulu. Šāds stimuls ir pirmais solis mutagēnām un kancerogēnām pārvērtībām, kā arī šūnu novecošanai. Līdz 2006. gadam ir identificēti vairāk nekā 100 oksidētie DNS produkti. [15]

Kvercētīns ir flavanols, kurš spēj aizsargāt DNS no oksidatīvajiem bojājumiem, kurus var izraisīt brīvie hidroksil, peroksīd un skābekļa radikāļi (8. att.). [13]



8. att. **Kvercētīna vara kompleksa iedarbība uz DNS bojājumiem**

Liels skaits epidemioloģisko pētījumu ir parādījis, ka lietojot uzturā pārtiku, kurai ir liela antioksidantu kapacitāte un to sastāvā ir polifenoli, samazina risku saslimt ar diabētu un no tā izrietošajām ilgtermiņa slimībām – neiropātiju, nefropātiju, retinopātiju. [16]

Vidusjūras diēta – tradicionāla ar augstu fenolu saturu uzturā, lietojot olīveļļu, jūras veltes un zivis, fetas sieru, riekstus, dateles, vīnu. Uzturā maz tiek lietota sarkanā gaļa, ēdiens tiek cepts uz grila, nevis pannas. Šīs diētas rezultātā ir krietni mazāka iespēja saslimt ar sirds

slimībām un infarktu, samazināta asins lipīdu koncentrācija, veidojas aizsardzība pret oksidēšanas un iekaisuma procesiem. [17]

Ir veikti pētījumi, kas apstiprina stilbēna – resveratrola pozitīvo iedarbību uz ādas novecošanu – process notiek lēnāk. Vērts pieminēt, ka tam piemīt pretsēnīšu, antibakteriālā un pretiekaisuma iedarbība. Tas ir sastopams tādu ogu, kā vīnogu un krūmu melleņu mizā, kā arī dažādos vīnos. [18] Sarkanvīnā tā koncentrācijas var sasniegt  $13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . [19]

### **1.3. Paraugu sagatavošana – ekstrakcijas un koncentrēšanas tehnikas**

Pārtikas produkti ir sarežģīta matrica, bet ne vienmēr ir nepieciešama paraugu sagatavošanas procedūra. Atsevišķos gadījumos pietiek ar paraugu atšķaidīšanu, kā piemēram askorbīnskābes koncentrācijas noteikšanā apelsīnu sulā [20] vai polifenolu satura noteikšanā tējā, izmantojot UPLC- MS/MS sistēmu [21]. Tējas paraugi tika atšķaidīti tikai 10 reizes, bez jebkādas papildus paraugu sagatavošanas, bet līdz ar to, bija novērojams ESI piesārņojums – jonu avots ātri kļuva netīrs.

Tas gan, protams, ir iespējams tikai šķidriem, polāriem paraugiem. Tādos paraugos, kā šokolāde, kakao, eļļa ir nepieciešama paraugu sagatavošanas procedūra pirms hromatogrāfiskās analīzes un tā viennozīmīgi ir sarežģītāka nekā vienkārša paraugu atšķaidīšana.

Tabulā Nr. 1.3.1. un 1.3.2. ir apkopotas dažas biežāk lietotās paraugu sagatavošanas metodoloģijas polifenolu noteikšanai, izmantojot UHPLC-MS sistēmas, dažādos pārtikas produktos. Visbiežāk izmantotās procedūras ir šķidrums-šķidrums ekstrakcija (LLE) un cietfāzes ekstrakcija (SPE).

#### **Šķidrums ekstrakcija (*Liquid-liquid extraction*):**

Polifenolu ekstrakcija, veicot šķidrums ekstrakciju (LLE), parasti tiek veikta, izmantojot tādus šķīdinātājus, kā ūdens [22–24], karsts ūdens [25], metanols [26,27], metanols/skudrskābe [28–30] acetons/ūdens/etiķskābe (šokolādes matrica) [31–34] vai acetonitrils/ūdens [35].

Veicot LLE augu paraugiem, polifenoli var tikt degradēti enzimatisko reakciju rezultātā, ja paraugs ir svaigs. Ir ieteicams paraugus iepriekš izžāvēt vai liofilizēt, kā arī smalki saberzt. Lielākā daļa ekstrakcijas tehniku ir diezgan laikietilpīgas un patērē daudz šķīdinātāja. Bieži pavadītais laiks, veicot ekstrakciju, ir krietni lielāks, nekā veicot hromatogrāfisko atdalīšanu, izmantojot UHPLC sistēmas.

1.3.1. tabula. Biežāk lietotās paraugu sagatavošanas metodoloģijas polifenolu analīzēm

<b>Pārtikas paraugs</b>	<b>Noteiktie savienojumi</b>	<b>Ekstrakcijas veids</b>	<b>Stacionārā fāze</b>	<b>Kustīgā fāze</b>	<b>MS metode</b>	<b>Identificēšana/kvantificēšana</b>	<b>Atsauce</b>
Ķīniešu tautas medicīna	Flavoni	LLE (ūdens un metanols / ūdens)	BEH C <sub>18</sub> (100 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A) 0,1 % skudrskābe B) metanols	QqQ	Kvantificēšana	[22]
Ķīniešu tautas medicīna	Flavanoli	LLE (ūdens)	BEH C <sub>18</sub> (50 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A) 0,2 % etiķskābe B) acetonitrils	Q-TOF	Identificēšana	[23]
Baltvīns, greifrūtu sula, zaļā tēja	Fenolu skābes	LLE (ūdens)	BEH C <sub>8</sub> (150 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A) 7,5 mM skudrskābe B) acetonitrils	QqQ	Kvantificēšana	[24]
Tēja	Flavanoli	LLE (karsts ūdens)	BEH C <sub>18</sub> (100 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A) 0,1 % skudrskābe B) metanols	QqQ	Kvantificēšana	[25]
Salātlapas	Fenolu skābes	LLE (metanols)	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 μm)	A) ūdens / metanols / skudrskābe (94,9 / 5 / 0,1, v/v/v) B) ūdens / metanols / skudrskābe (39,9 / 60 / 0,1, v/v/v)	QqQ	Kvantificēšana	[26]
Ķīniešu tautas medicīna	Flavanoli	LLE (metanols)	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 μm)	A) 0,1 % skudrskābe B) acetonitrils	Q-TOF	Identificēšana	[27]

1.3.2. tabula. Biežāk lietotās paraugu sagatavošanas metodoloģijas polifenolu analizēm

<b>Pārtikas paraugs</b>	<b>Noteiktie savienojumi</b>	<b>Ekstrakcijas veids</b>	<b>Stacionārā fāze</b>	<b>Kustīgā fāze</b>	<b>MS metode</b>	<b>Identificēšana/ kvantificēšana</b>	<b>Atsauce</b>
Piena produkti	Flavanoli, antrocianidīni	LLE (metanols / skudrskābe, 9/1, v/v)	BEH C <sub>18</sub> (100 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A) ūdens / skudrskābe (9/1, v/v) B) acetnitrils	QqQ	Kvantificēšana	[28]
Vīnogas	Flavonoli, flavanoli, antrocianidīni, stilbēni	LLE (metanols / ūdens / skudrskābe, 70/30/1, v/v/v)	Zorbax Eclipse Plus C <sub>18</sub> (100 x 2,1 mm, 1,8 μm) (x2)	A) 0,1% skudrskābe B) acetnitrils / metanols (50/50, v/v) + 0,1% skudrskābe	QqQ	Identificēšana un kvantificēšana	[29]
Japāņu zaļā tēja	Flavanoli	LLE (metanols / ūdens / hlороforms, 2,5/1/1, v/v/v + metanols / 0,1% skudrskābe, 4/1, v/v)	BEH C <sub>18</sub> (160 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A) 0,1 % skudrskābe B) acetnitrils + 0,1% skudrskābe	TOF	Identificēšana	[30]
Kakao	Flavanols	LLE (acetons / ūdens / etiķskābe, 70/29,5/0,5, v/v/v)	HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 μm)	A) 0,2 % etiķskābe B) acetnitrils	QqQ	Kvantificēšana	[31]
Kakao šokolāde	Flavanoli	LLE (acetons / ūdens / skudrskābe, 70/28/2, v/v/v)	BEH C <sub>18</sub> (50 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A) (ūdens / THF / TFA, 98 / 2 / 0,1, v/v/v) B) acetnitrils + 0.1% skudrskābe	Q-TOF	Kvantificēšana	[34]
Rožu ekstrakti	Flavanoli, fenolu skābes	LLE (acetnitrils / ūdens, 80/20, v/v)	BEH C <sub>18</sub> (100 x 2,1 mm, 1,7 μm)	A) 0,05 % TFA B) acetnitrils	Q-TOF	Identificēšana	[35]

### **Cietfāzes ekstrakcija (*Solid phase extraction*):**

Izmantojot cietfāzes ekstrakciju (SPE), tiek ignorētas liela daļa problēmu, ar kurām nākas saskarties, izmantojot LLE. SPE ir efektīvāka, nekā LLE – tiek veiktas kvantitatīvas ekstrakcijas, kuras ir viegli realizēt, tās ir ātras un var tikt automatizētas. Tiek samazināts nepieciešamais šķīdinātāju daudzums un ietaupīts laika resurss.

Stacionārās fāzes SPE kolonnām ir pieejamas plašā klāstā ar visdažākām ķīmiskām struktūrām un poru izmēriem. Polifenolu ekstrakcijām visbiežāk izmantotie ir apgrieztās fāzes sorbenti – silika gēla bāzes, modificēti ar hidrofobām alkil un aril grupām, galvenokārt balstītām uz C<sub>18</sub> principa. [36]

Kā SPE sorbenti tiek izmantoti arī *mixed-mode* sorbenti, kuri nodrošina divu veidu mijiedarbības ar analītiem – jonu apmaiņas un apgrieztās fāzes, bet līdz šim šāda veida sorbenti nav pielietoti polifenolu analīzēm pārtikas produktos, izmantojot UHPLC-MS.

Svarīgs solis SPE ir parauga sakoncentrēšana pēc eluēšanas, to ietvaicējot slāpekļa plūsmā. Pēdējos gados ir parādījies jauns SPE veids – μSPE. Tiek izmantots mazs parauga daudzums un paraugs tiek eluēts mazā tilpumā, tādējādi nav nepieciešamība to sakoncentrēt ietvaicējot pirms hromatogrāfiskās analīzes. [37]

Šāda veida SPE tehnika tiek izmantota bioloģisko paraugu analīzei, piemēram, urīnam, asins plazmai vai audiem, bet nav bijusi izmantota polifenolu analīzei pārtikas produktos. Tas varētu būt interesants veids polifenolu analīzei, pateicoties ātrajām analīzēm, kā arī lielajam paraugu skaitam, kas var tikt sagatavots tādā pašā laikā, izmantojot, piemēram, 96-slotu mikroplates.

### **Paaugstinātā spiediena šķidrums ekstrakcija (*Accelerated solvent extraction*):**

Šī procedūra nav pārāk bieži izmantota paraugu sagatavošanai polifenolu analīzei, bet tā ir visnotaļ efektīva - pateicoties augstai temperatūrai un spiedienam tiek patērēts maz laika un šķīdinātāja, tādējādi nodrošinot labāku analītu atgūstamību, nekā lietojot tradicionālās metodes. Šo procedūru bieži izmanto iegūstot fenolu ekstraktus, kurus tālāk izmanto uztura bagātinātāju ražošanai.

ASE ir tikusi izmantota kombinācijā ar UHPLC-MS antrocianidīnu (**5**) noteikšanai sarkanajos kāpostos un fenolu skābju noteikšanai rozmarīnā, izmantojot etanolu/ūdeni, kā šķīdinātāju. [38,39]

## 1.4. Šķidrums hromatogrāfijas iespējas

Šķidrums hromatogrāfija, salīdzinājumā ar gāzu hromatogrāfiju, polifenolu analīzē sniedz tādas priekšrocības kā samazināts instrumentālās analīzes laiks un ātrāka paraugu sagatavošanas procedūra, jo nav jāievieš derivatizācijas solis paraugu sagatavošanā.

Pēdējo piecpadsmit gadu laikā radītās inovācijas paplašina viendimensionālās šķidrums hromatogrāfijas iespējas un uzsvēr UHPLC lietojamību. To pamatā ir jauna veida sorbentu formu izstrāde, t. sk. monolītās formas un virspusēji porainās formas fāzes, visaptverošas multidimensiju atdalīšanas un, atsevišķos gadījumos, paaugstinātu temperatūru lietošana.

Plaši pieejamas ir kolonnas ar sorbentu izmēriem mazākiem par 2 μm un kombinācijā ar UHPLC sistēmām, kuras spēj nodrošināt kolonnu pretspiediena izturību līdz pat 1300 bar. Saskaņā ar van Demtera vienādojumu, tiklīdz sorbenta daļiņu izmērs kļūst mazāks par 2,5 μm, ir novērojams izteikts efektivitātes ieguvums un tas neietekmē plūsmas ātrumu, jo pretestība arī ir samazināta. [40] Salīdzinājumā ar HPLC sistēmām, UPLC sistēmas nodrošina uzlabotu izšķirtspēju, mazākus analīzes laikus, asākas joslas (tās izdalās mazākā laikā) un samazinātus detektēšanas limitus. [41]

Autori ir eksperimentāli salīdzinājuši hromatogrāfisko atdalīšanu flavanoīdu paraugiem kakao matricās, izmantojot HPLC un UPLC sistēmas. No 80 minūšu analīzes laika HPLC sistēmas gadījumā, tas ir samazināts līdz 12,5 minūtēm, izmantojot UPLC sistēmas. [31] Papildus saīsinātiem analīzes laikiem ir novērojams arī mazāks matricas efekts, šinī gadījumā – samazināta jonu supresija. [32]

Sarežģītu matricu, kā pārtikas produkti, analīzēm pēdējos gados sāk izmantot divdimensionālo hromatogrāfiju. Šīs tehnoloģijas pamatā ir divu dažādu analītisko kolonnu izmantošana, lai panāktu labāku analītu sadalīšanu, identificēšanu un kvantificēšanu. Līdz ar labāku vielu atdalīšanu, ir lielāka ticamība masspektrometriskajiem rezultātiem, pateicoties mazākam matricas efektam. Otrās dimensijas ātrums ir svarīgākais faktors LC x LC analīzēs, līdz ar to tas ir analīzes ātrumu nosakošais solis. Lai panāktu ātrākus un kvalitatīvākus analīzes apstākļus ir nepieciešama UPLC sistēma, kā arī īsas kolonnas, ar mazu poru izmēru, vai arī monolītiskās kolonnas. Divdimensionālā hromatogrāfija ir iepriekš izmantota vairākos gadījumos, lai analizētu polifenolus šokolādē. Vienā no pētījumiem kolonnas, kas tika izmantotas, bija ar HILIC un apgrieztās fāzes C<sub>18</sub> sorbentiem, bet ir izmantotas arī vienādas Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> kolonnas, lai panāktu maksimālo iespējamo efektivitāti, nosakot flavanolus, flavonus, antrocianidīnus un stilbēnus vīnogās. [29,42]

Mūsdienās šķidrums hromatogrāfijas prasības pēc arvien ātrākām atdalīšanām un to efektivitātēm pieaug. Pārtikas polifenolu noteikšana pieprasa robustas un jutīgas metodes to

kvantificēšanai dažādajās matricās. Rutīnas analīzēm ir nepieciešamas metodes ar labām izšķiršanas spējām un lielu ātrumu, lai nodrošinātu kvalitātes kontroles prasības.

Polifenolu analīzēm, izmantojot apgrieztās fāzes hromatogrāfiju, lielākoties tiek izmantotas paskābinātas ūdens fāzes kombinācijā ar organisko fāzi (metanolu vai acetonitrilu). pH ūdens fāzei, lielākajā daļā gadījumu, ir zemāks par 3, pievienojot skudrskābi vai etiķskābi. [22–31,35] Atsevišķos gadījumos ūdens fāzei tiek pievienots arī organisks modifikators (THF) un trifluoretiķskābe. [34] Atdalīšanu polifenoliem ar līdzīgām polaritātēm panāk, izmantojot gradienta eluēšanu ar metanolu vai acetonitrilu, kā arī, reizēm, kombināciju no abiem. [22–31,34,35] Acetonitrils ir biežāk lietots, pateicoties tā īpašībai radīt mazāku pretpiedienu, nekā metanolam.

### 1.5. UHPLC-MS pielietojums polifenolu noteikšanai

UHPLC-MS apvieno šķidrums hromatogrāfijas vielu atdalīšanas iespējas ar selektivitāti un jutību, ko piedāvā MS detektori. Tas ļauj identificēt atsevišķus savienojumus no savienojumu jūras, ar kuru nākas saskarties sarežģītu matricu gadījumā.

MS instrumentu attīstībai pēdējo piecpadsmit gadu laikā ir bijusi lielākā nozīme, nekā HPLC instrumentiem. Tas ir izskaidrojams ar lielāku pieejamību un mazākām cenām. Iekārtas ir kļuvušas krietni avancētākas, kā arī robustākas. Rezultātā arvien biežāk var redzēt augsta līmeņa iekārtu pielietojumu arī, šķietami, triviālākām lietām, kā, piemēram, flavanoīdu analīzēm. Lielākā daļa pētījumu ir veiktas uz QqQ vai jonu slazdu, kā arī Q-TOF instrumentiem. Pēdējos piecos gados diezgan plaši ir parādījies arī Orbitrap veida detektoru pielietojums dažādu flavanoīdu analīzēm.

Visbiežāk lietotās metodes polifenolu savienojumu jonizācijai ir ESI un APCI. CID (*collision-induced dissociation* jeb neselektīva molekulu fragmentēšana avotā) ir lielisks papildus rīks, lai precīzāk noteiktu flavonoīdu struktūras – tas piedāvā lielisku informāciju par skeleta fragmentiem. Izmantojot ESI, savienojumi tiek jonizēti negatīvajā režīmā; iegūtais negatīvais jons ir jutīgāks, nekā pozitīvais jons. [22,24–26,30,31]

Atsevišķos gadījumos tiek izmantota arī pozitīvā jonizācija. [35] Pozitīvajā režīmā tiek analizēti antrociānīdīni un izoflavonoīdi, veidojot  $[M+]^+$  vai  $[M+H]^+$  jonus attiecīgi. [28] Tas notiek pateicoties flaviuma katjona klātbūtnei (*Flavylium cation*). Šie katjonie savienojumi ir stabili tikai gadījumos, kad vides pH < 2.5. [43] Izoflavoni, kuri ir metoksilēti savienojumi, nejonizējas, pateicoties tam, ka nav pieejama brīva hidroksilgrupa negatīvajā režīmā.

Nesena pētījuma rezultātā ir noteikts, ka negatīvajā ESI jonizācijā antrocianidīni tiek jonizēti par  $[M-2H]^-$  un  $[M-2H+H_2O]^-$  joniem, kas ir unikāli, kamēr pārējiem polifenoliem ir raksturīgi  $[M-H]^-$ ,  $[M+COOH]^-$  vai  $[M+Cl]^-$  joni. Gadījumā, kad kā kustīgās fāzes modifiaktors ir tikusi izmantota skudrskābe, vai antrocianidīni ir hidrohlorīda formā, ir novērojamas arī  $[M-2H+HCl]^-$  un  $[M-2H+HCOOH]^-$  jonizācijas formas. [42] Negatīvā ESI jonizācija ir labs instruments, lai atšķirtu šos savienojumu veidus – pārejas ir skaidri redzamas un savienojumus var viegli izšķirt pēc to masām.

Šī analīžu metodoloģija ir daudz ticamāka, nekā, agrāk bieži polifenolu analīzēs izmantotā, UV-VIS, it īpaši gadījumos, kad notiek ko-elūšana, vai savienojumi ir mazās koncentrācijās.

Papildus to izšķiršanai pēc masām, tos izšķir arī pēc meitas jonu fragmentācijas. Izmantotas gan tradicionālās MS metodes [30], gan tandēm-masspektrometrija [22,23,25,26,28,29,31,34,35]. MS metodēs pārsvarā tiek izmantots jutīgs detektors ar lielu masas precizitāti, kā TOF vai Orbitrap. TOF ir biežāk lietots, pateicoties tā spējai iegūt precīzu pilna masas diapazona spektru, kas ļauj identificēt un apstiprināt dažādus savienojumus. Kombinācijā ar UHPLC sistēmām TOF masas detektori ir pierādījuši sevi, kā gana robusti un kā stabila platforma augstas izšķirtspējas masspektrometriskai savienojumu izšķiršanai. [30]

Sarežģītās matricās, lielāks pielietojums ir tāda veida detektoriem, kā Orbitrap, pateicoties tā spējai iegūt līdz pat 500'000 lielu rezolūciju, jaunāko flagmaņu gadījumā. [44]

Orbitrap tipa detektoriem piemīt spēja operēt lielos masu diapazonos ar lielu masas precizitāti - <1-3 ppm. Salīdzinājumā ar TOF instrumentiem, Orbitrap piemīt mazāks skenēšanas ātrums, tiem darbojoties pie augstas izšķiršanas. Kopš Orbitrap detektoru ieviešanas komerciāli 2005. gadā, tiem ir notikušas ekstensīvas pārmaiņas un ir notikusi strauja attīstība to veidos un sarežģītībā. Tiek piedāvātas dažādas jonu šķelšanas tehnoloģijas – CID, HCD, kā arī vairāki jonu šķirošanas soļi, izmantojot QqQ.

Laika gaitā Orbitrap tipa detektori ir sevi pierādījuši, kā robusta platforma analīzēm, un to attīstība noteikti turpināsies.

## 2. Eksperimentālā daļa

### 2.1. Izmantotā aparatūra un reaģenti

- augstas izšķirtspējas masspektrometrs (Orbitrap Q-Exactive), kas savienots UHPLC sistēmu (Thermo Accela UHPLC);
- Kinetex PFP kolonna (100 mm x 3,0 mm i.d., 1,7 µm daļiņu izmērs);
- automātiskās pipetes ar regulējamu tilpumu 20, 200, 1000 un 5000 µL (Finnpipette);
- autosamplera stikla pudelītes ar ieliktniem, 250 µL;
- PP stobriņi, 15 mL, 50 mL;
- PVDF centrifugējami membrānfiltri, Ø – 90 mm, poru izmērs 0,22 µm (Merck);
- centrifūga 3K30 (SciQuip);
  
- metanols (Merck, HPLC grade);
- acetonitrils (Merck, HPLC grade);
- heksāns (Fluka, pesticide grade);
- toluols (Fluka, pesticide grade);
- hloroforms (Fluka, Pesticide grade);
- dietilēteris (Lab-Scan, Poland);
- ūdens (18.2 MΩ) attīrīts ar Milli-Q sistēmu (Billerica);
- skudrskābe, 98% (Sigma-Aldrich, ACS grade);
- amonija formiāts, 99% (Merck, analytical grade);
- PSA un C18 sorbenti, (Sigma, analytical grade)

### 2.2. Standartšķīdumi

(-)-Epikatehīna, kvercetīna, ferulskābes, šikmik skābe (*Shikimic acid*) un *p*-kumār skābes standarti tika iegādāti no Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Izoviteksīns, (+)-katehīns un procianidīns A2 tikai iegādāti no Extrasynthese (Genay Cedex, France). Informācija un spektrometriskie dati par savienojumiem ir doti tabulā Nr 3.2.1.

Standartu pamatšķīdumi tikai pagatavoti uz svara bāzes, metanolā (~ 1000 ng·µL<sup>-1</sup>) un uzglabāti -18 °C temperatūrā, tumšas krāsas stikla traukos. Standartu darba šķīdumi tika pagatavoti atšķaidot metanolā, k koncentrāciju līmeņos 100 un 10 ng·µL<sup>-1</sup>, un tika uzglabāti tumšas krāsas stikla traukos, +4 °C temperatūrā.

2.2.1. tabula. Mērķa savienojumu klase un apakšklase, un masspektrometriskie dati

Savienojums	Klase	Apakšklase	Molekulārā formula	Aprēķinātā masa, Da [M-H] <sup>-</sup>	Iegūtā masa, Da [M-H] <sup>-</sup>	Masas precizitāte, Δppm	Galvenie fragment joni, Da	NCE <sup>a</sup> , eV
(+)-Katehīns	Flavonoīdi	Flavan-3-oli	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,07176	289,07175	0,03	245,0816	25
(-)-Epikatehīns		Flavan-3-oli	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,07176	289,07178	-0,07	245,0816	25
Procianidīns A2		Polimērie flavan-3-oli	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	575,11950	575,12000	-0,87	285,0405	25
		Izoviteksīns	Flavoni	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431,09837	431,09848	-0,26	311,0564
Kvercefīns		Flavoni	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301,03538	301,03534	0,13	151,0022	25
<i>p</i> -Kumārskābe		Fenolās skābes	<i>Chlorogenic acids</i>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163,04007	163,04026	-1,17	119,0487
<i>Shikimic acid</i>	<i>Cyclitol</i>		C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	173,04555	173,04543	0,69	93,0330	50
Ferulskābe	<i>Chlorogenic acids</i>		C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,05063	193,05084	-1,09	134,0359	10

<sup>a</sup>Normalizētā kolīzijas enerģija

### 2.3. Paraugi

Divdesmit seši komerciāli pieejamie tumšās un piena šokolādes paraugi tika iegādāti tieši no vietējiem izplatītājiem Latvijā. Iegūtie paraugi bija dažādas ģeogrāfiskās izcelsmes: Spānija (n=1), Francija (n=3), Beļģija (n=1), Šveice (n=3), Vācija (n=9), Dānija (n=1), Somija (n=1), Igaunija (n=1), Lietuva (n=1), Latvija (n=2) un Krievija (n=3). Paraugi tika iedalīti kategorijās pēc to uz marķējuma norādītā šokolādes satura ar sadalījumu: 70-77%, (n=8); 60-69%, (n=4); 50-59%, (n=4); 41%, (n=2); 33% (n=1).

### 2.4. Instrumentālās metodes parametri

Hromatogrāfiskā analītu sadalīšana tika veikta uz Thermo Accela UHPLC sistēmas (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), izmantojot Kinetex PFP (100 mm x 3,0 mm i.d., 1,7 μm daļiņu izmērs) kolonnu (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Kolonnas temperatūra tika uzstādīta 40 °C un plūsmas ātrums – 250 μL·min<sup>-1</sup>. Kustīgā fāze sastāvēja no (A) 10 mM amonija formiāta ūdens šķīdumā ar 0,1% skudrskābes piedevu un (B) acetoniātrila. Optimizētie gradienta parametri bija sekojoši: sākotnēji 98% A (0-1,0 min); 98-2% A (1,0-10,0 min); 2% A (10,0-14,0 min); atgriešanās uz sākotnējo stāvokli (14,0-14,1 min); kolonnas kondicionēšana (14,1-16,0 min). Injekcijas tilpums bija 5 μL.

UHPLC instruments bija savienots ar Orbitrap Q-Exactve masas spektrometru (Thermo Fisher Scientific), aprīkotu ar apsildāmu elektroizsmidzināšanas (HESI-II) jonizācijas avotu. Negatīvā jonizācija tika izmantota masas spektru iegūšanai, pielietojot pilna masas diapazona skenēšanu ar diapazonu 100–1500 m/z un izšķirtspēju 70'000 FWHM.

Sekojošie instrumentālie parametri tika izvēlēti: *source voltage*, -3 kV; *sheath gas flow*, 18 (pieņemta vienība); *auxiliary gas flow*, 3 (pieņemta vienība); *capillary temperature*, 300 °C; *S-lens RF level*, 50; *auxiliary gas heater temperature*, 350 °C. *Automatic gain control* (AGC) mērķis tika noteikts  $3e^6$  un maksimālais jonu injekcijas laiks bija 200 ms. t-SIM skenēšanas režīmam tika izmantoti tādi paši instrumentālie un masspektroskopiskie parametri, kā pilna masas diapazona spektriem. Mērķtiecīgās tandēma masspektroskopiskās metodes parametri bija sekojoši: izšķirtspēja 17'500 un AGC 100'000. Prekursoru izolācijas logs t-SIM skenēšanas režīmam bija uzstādīts 2 m/z. Pieļaujamā masas kļūda – 5 ppm. Kolīzijas enerģijas visiem analītiem tika noteiktas optimizācijas ceļā, veicot tiešās infūzijas eksperimentus, izmantojot standartšķīdumus.

Lai garantētu masas precizitāti, pirms katras analīžu sērijas, tika veikta Orbitrap-MS sistēmas kalibrācija pēc instrumenta ražotāju vadlīnijām masu diapazonā no 50 līdz 2000 m/z. Datu analīze tika veikta izmantojot Xcalibur 3.0 programnodrošinājumu (Thermo Fisher Scientific), spektri tika meklēti un saskaņoti pret Mass Frontier 7.0 programmu (Thermo Fisher Scientific)

## **2.5. Paraugu pagatavošana**

Šokolādes paraugi tika glabāti saldētavā (-18 °C) un samalti liela ātruma laboratorijas dzirnavās rupjā pulverī. 50 mL PP stobriņā veic ekstrakciju 200 mg parauga pievienojot 5 mL 2% skudrskābes ūdens šķīdumā un 25 mL *n*-heksāna. Stobriņu aizvāko un maisa 30 minūtes izmantojot orbitālo rotācijas maisītāju. Parauga stobriņu centrifugē (10 min, 3500 rpm) un atbrīvojas no augšējā, *n*-heksāna, slāņa. 100 µL no centrifugāta pārnes uz analīžu pudelīti un atšķaida līdz 1 mL tilpumam ar dejonizētu ūdeni. Ekstraktu filtrē izmantojot 0,22 µm PTFE membrānfiltrus un pārnes autosamplera pudelītēs, gatavus UHPLC-HRMS analīzei.

### 3. Rezultātu izvērtējums

#### 3.1. Literatūras izpēte

Polifenolu noteikšana pārtikā var būt diezgan izaicinoša dēļ matricas sarežģītības. Ir nepieciešama paraugu sagatavošanas procedūra, lai samazinātu traucējošo vielu klātbūtni un līdz ar to matricas efektu. Mūsu gadījumā par matricu ir izvēlēta šokolāde. Matrica ar sarežģīta pēc uzbūves, jo ir nepieciešami vairāki soļi paraugu attīrīšanā, lai atbrīvotos no piena taukiem, cukuriem, lecitīna un, atsevišķos gadījumos, arī no augu taukiem. Paraugu sagatavošana kakao matricām un šokolādei iepriekš ir veikta veicot LLE ekstrakcijas, par šķīdinātāju izvēloties ar skudrskābi paskābinātu ūdeni un acetonu. [31,34]

Nevienā no iepriekš minētajiem literatūras avotiem nav minēts, vai ir veikta ekstrakcijas metožu optimizācija un SPE metožu salīdzinājums, tādēļ ir radusies doma veikt ekstrakcijas metožu salīdzinājumu savā starpā – salīdzināt efektivitātes atšķirīgu sorbentu, piemēram, Strata-X un Oasis HLB polimērās apgrieztās fāzes gadījumā, kā arī dažādu šķīdinātāju salīdzinājums LLE gadījumā. SPE metožu izstrādei ir nepieciešams arī eluentu salīdzinājums un parauga vides pH salīdzinājums.

Noteikti ir nepieciešams ieviest paraugu attaukošanas soli, pēc Adamsona metodes, par šķīdinātāju izmantojot heksānu. [45] Ekstensīva paraugu attīrīšanas procedūra samazina paraugu radīto matricas efektu, kā arī paliela metodes detektēšanas limitus.

Iespējams, tiks izmantots metodes iekšējais standarts – kāds deiterēts fenolu klases savienojums, lai labāk paredzētu un pārrēķinātu metodes atgūstamības, kā arī uzlabotu precizitāti.

Pēc paraugu sagatavošanas metodes izstrādes ir nepieciešams veikt instrumentālo metožu optimizāciju – pielāgot un izvērtēt dažādas kolonnas nosakot optimālo šķītvju skaitu un savienojumu sadalīšanas koeficientu. Piemērotas kolonnas optimizācijai var būt apgrieztās fāzes C18 kolonnas, kā, piemēram, Hypersil Gold vai Kinetex C18, kā arī literatūrā bieži pieminētās BEH C18 kolonnas. Var novērot šķītvju skaita un sadalīšanās koeficientu izmaiņas, mainot kolonnu dimensijas un daļiņu izmērus. Mainot kolonnu dimensijas var panākt arī augstāku jutību.

Par kustīgo fāzi viennozīmīgi ir nepieciešams izvēlēties skābas vides ūdens šķīdumu un kādu organisku polāru šķīdinātāju, kā arī pielietot gradienta apstākļus.

Par jonizācijas avotu kalpos H-ESI, kā maigas jonizācijas veids. APCI nav nepieciešams izmantot, jo tas ir biežāk lietots nepolāru struktūru analīzei, kamēr polifenoli ir

izteikti polāri. Ir iespējams salīdzināt pozitīvās un negatīvās jonizācijas atšķirības polifenolu gadījumā.

Orbitrap detektoram pietiek jutības un izšķiršanas spējas, lai veiktu uzticamus pilna masas diapazona eksperimentus, bet tā kā intereses molekulas ir oligomēri ar dažādām stereoķīmiskām struktūrām, pamatota interese ir veikt fragmentācijas eksperimentus, lai noteiktu molekulu šķelšanās veidus un vairāk uzzinātu par to strukturālajām īpašībām.

Fragmentācijas eksperimentu laikā ir iespējams mainīt pievadītās kolīzijas jeb šķelšanas enerģijas un, attiecīgi, sašķelt molekulas, lai uzzinātu vairāk par to fragmentācijas veidiem, līdzīgi, kā tas ir darīts divdimensionālos pētījumos augu un kakao polifenolu gadījumā. [46] Papildinājums jeb turpinājums šim līdzīgajam darbam, būtu pētījumi vēl sarežģītākas matricas klātbūtnē.

### 3.2. Paraugu sagatavošanas metodes izstrāde

Fenolo antioksidantu noteikšanā šokolādes paraugos vistipiskākie hromatogrāfiskos un masspektrometriskos traucējumus radošie savienojumi ir cukuri un tauki. Tā kā analīti ir polāras ķīmiskās dabas, papildus mērķa savienojumu ekstrakcijai, ir iespējams izmantot nepolārus organiskos šķīdinātājus, kas nodrošina lipīdu frakcijas atdalīšanu. Kā fakultatīva iespēja, tika izmēģināta dispersīvās cietfāzu ekstrakcijas (dSPE) ieteikme uz rezultātu, izmantojot PSA (primāro un sekundāro amīnu maisījuma jeb *primary-secondary amines*) sorbentu.

Parauga ekstrakcijas efektivitāti mūsu darbā noteica savā starpā izvērtējot četrus ekstrakcijas šķīdinātājus – ūdeni, 2% skudrskābi ūdens šķīdumā, 2% skudrskābi acetoneitrila un acetona-ūdens-skudrskābes šķīdumu (70:28:2 v/v/v).

Iegūtie mērķsavienojumu hromatogrāfiskie laukumi tika savā starpā salīdzināti un izteikti procentuāli, relatīvi pret acetona-ūdens-skudrskābes šķīdumu (70:28:2 v/v/v). Iegūtie hromatogrāfisko joslu laukumi liecināja par to, ka acetona-ūdens-skudrskābes šķīduma ekstrakcijas efektivitāte bija vislielākā, salīdzinot ar datiem, kas tika iegūti no citām ekstrakcijas sistēmām. Tajā pašā laikā varēja novērot to, ka līdz ar palielinātu efektivitāti attiecībā uz mērķsavienojumiem, tiek ekstrahēts arī krietni lielāks pigmentu daudzums un citu, traucējošo savienojumu daudzums. Vērā ņemams ir arī fakts, ka ir nepieciešams papildus paraugus sagatavošanas solis, lai ietvaicētu paraugus, lai iztvaicētu acetonu, kas ir diezgan reti izmantots apgrieztās fāzes hromatogrāfijas šķīdinātājs. Vidējās ekstrakcijas efektivitātes un standartnovirzes iepriekš norādītajām ekstrakcijas sistēmām ir dotas Tabulā 2.2.1.

3.2.1. tabula. Dažādu šķīdinātāju sistēmu ekstrakcijas efektivitātes salīdzinājums fenolu savienojumu ekstrakcijā<sup>a</sup>

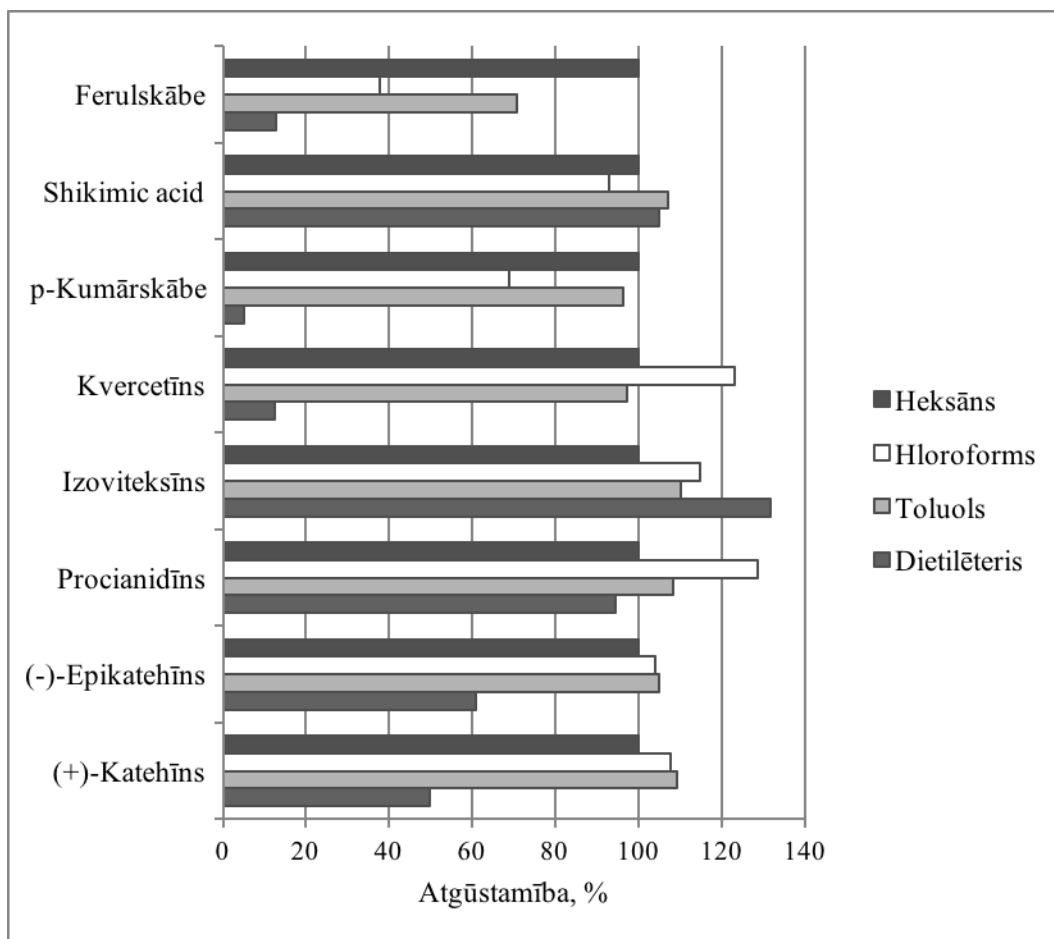
Savienojums	Ekstrakcijas efektivitāte, % (n=3)		
	Ūdens, vid ± RSD	2% skudrskābe, vid ± RSD	2% skudrskābe acetonitrilā, vid ± RSD
(+)-Katehīns	90,7 ± 0,5	69,5 ± 2,8	151,7 ± 3,1
(-)-Epikatehīns	98,2 ± 0,5	69,7 ± 0,4	11,6 ± 1,4
Procianidīns A2	17,7 ± 2,0	26,0 ± 1,3	26,6 ± 2,2
Izoviteksīns	74,8 ± 2,2	58,8 ± 1,0	43,2 ± 3,4
Kvercetinīns	5,4 ± 3,0	10,3 ± 2,0	44,3 ± 0,3
<i>p</i> -Kumārskābe	102,7 ± 0,3	61,1 ± 1,0	89,6 ± 1,6
<i>Shikimic acid</i>	99,2 ± 0,3	82,3 ± 3,0	57,0 ± 3,6
Ferulskābe	85,8 ± 3,4	58,7 ± 2,1	47,4 ± 3,1

<sup>a</sup>Ekstrakcijas apstākļi: attaukota šokolādes parauga masa, 200 mg; ekstrakcijas šķīdinātāja tilpums, 5 mL; istabas temperatūra; ultraskaņošana 15 min; 10-reizes liels parauga atšķaidījums; standartpiedevas koncentrācija, 50 mg·kg<sup>-1</sup>.

Ja salīdzina ekstrakcijas efektivitātes katehīniem, tad iegūtie joslu laukumi bija par 20-30% lielāki, izmantojot tīru ūdeni, salīdzinot ar ūdeni, kuram bija pievienota skudrskābes piedeva. Tomēr, ekstrahētais procianidīnu daudzums bija par 9% lielāks, kad paskābināts ūdens tika izmantots, kā ekstrakcijas šķīdinātājs. Fenolo skābju gadījumā, ekstrakcijas efektivitātes bija pieņemamas, robežās no 60 līdz 100% un nebija novērojama izteikta konkrētas šķīdinātāju sistēmas priekšrocība. Izrietoši, gan ūdens, gan skudrskābe ir pieņemami ekstrakcijas šķīdinātāji, bet tā kā oligomērie flavan-3-oli ir galvenās intereses molekulas šokolādē, tika dota priekšroka 2% skudrskābes šķīdumam ūdenī.

Kā nākamais solis, tika izvērtēta šķidrums-šķidrums ekstrakcijas (LLE) efektivitāte attiecībā pret lipīdiem, izmantojot nepolārus, aprotonus, lipīdus šķīdinošos šķīdinātājus kā heksānu, toluolu, hloroformu un dieetilēteri. Šī procedūra tika veikta vienā solī, apvienojot to ar fenolu ekstrakciju, izmantojot 2% skudrskābi, kas tika izvēlēta iepriekšējos eksperimentos. Šokolādes paraugi tika kratīti kopā ar šķīdinātāju maisījumu, izmantojot orbitālo maisītāju un nepolārais šķīdinātājs tika noņemts. Tika iegūta atgūstamība visām LLE procedūrām, izmantojot iepriekš minētos šķīdinātājus, relatīvi pret LLE procedūru, kurā tika izmantots *n*-heksāns un 2% skudrskābe ūdens šķīdumā.

Novēroja būtisku fenolo savienojumu zaudējumu eksperimentā, kurā tika izmantots dieetilēteris lipīdu atdalīšanai, kas sakrīt ar rezultātiem, kuri iepriekš ir jau reiz novēroti. [47] Tika novēroti nelieli fenolo skābju zudumi, kad hloroforms tika izmantots lipīdu aizvākšanai, bet flavan-3-olu atgūstamības bija līdzvērtīgas vai labākas (104-129%), kad toluols un hloroforms, bija izmantots lipīdu frakcionēšanai. Toluola izmantošana lipīdu noņemšanai veicināja ferulskābes atgūstamības samazināšanos līdz 70% (Attēls 3.2.1.).



Attēls 3.2.1. Šķīdinātāju ieteikme uz fenolo savienojumu atgūstamību<sup>a</sup>

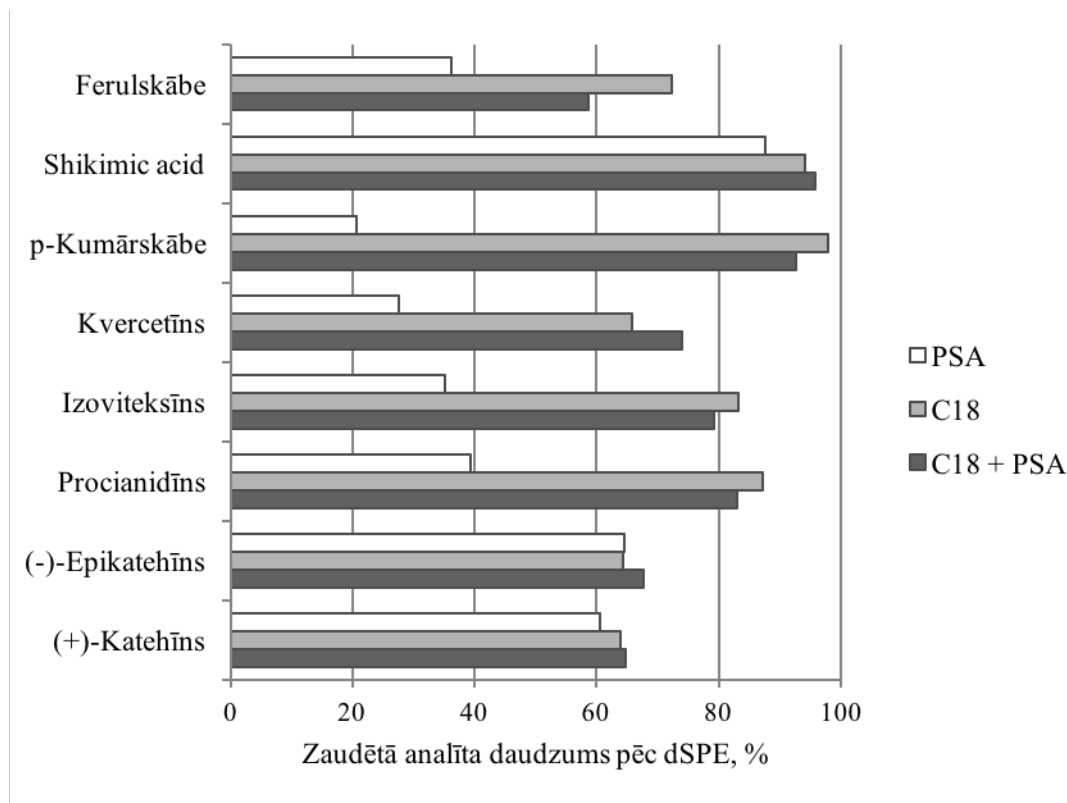
<sup>a</sup>Ekstrakcijas apstākļi: šokolādes parauga masa, 200 mg; organiskā/ūdens šķīdinātāja attiecība, 5:1 v/v; istabas temperatūra; maisīšana izmantojot orbitālo maisītāju, 15 minūtes; 10-reizes liels ekstrakta atšķaidījums; standartpiedevas koncentrācija, 50 mg·kg<sup>-1</sup>

Eksperimentu rezultātā, *n*-heksāns tika izvēlēts kā primārais šķīdinātājs ekstraktu attīrīšanai no lipīdiem, ņemot vērā labākas atgūstamības fenolu skābēm un kopsummā labām polifenolu atgūstamībām, ja salīdzina pret toluolu un hloroformu kā LLE šķīdinātājiem.

dSPE attīrīšana tika veikta izmēģinot divus dažādus sorbentus. Tika izveidotas trīs sistēmas: C18, 30 mg; PSA, 30 mg; C18+PSA; 30+30 mg. Šādas sistēmas tika izveidotas ar mērķi izvēlēties piemērotāko sorbentu sistēmu šokolādes paraugu ekstraktu attīrīšanai no matricas. PSA tipiski tiek izmantots, lai atbrīvotos no ekstraktā esošajiem polārajiem pigmentiem, cukuriem un skābēm, kamēr C18 sorbents vislabāk sorbē pāri palikušos lipīdus un nepolārās komponentes. [48]

Sorbenti tika pievienoti 0,5 mL centrifugāta ekstrakta, iegūta no šokolādes LLE soļa, izmantojot šķīdumu kombināciju *n*-heksāns un 2% skudrskābe ūdenī. Ekstrakti tika salīdzināti ar to pašu ekstraktu, pagatavotu nepielietojot dSPE attīrīšanu.

Tika noteikts, ka sistēma, kurā tika izmantota abu sorbentu kombinācija samazināja koncentrāciju fenolu skābēm un polifenolie, kā tas ir ilustrēts Attēlā 3.2.2. Iemesls ir stiprā fenolu sorbcija uz C18 un PSA maisījuma, ņemot vērā arī to ka fenoli ir sastopami diezgan mazās koncentrācijās.



Attēls 3.2.2. dSPE procedūras ietekme uz analītu daudzumu<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ekstrakcijas apstākļi: ekstrakta tilpums, 500  $\mu\text{L}$ ; maisīšana izmantojot vortex maisītāju, 1 min; ultrasonificēšana, 15 min; 10-reizes liels ekstrakta atšķaidījums; standartpievevas koncentrācija, 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

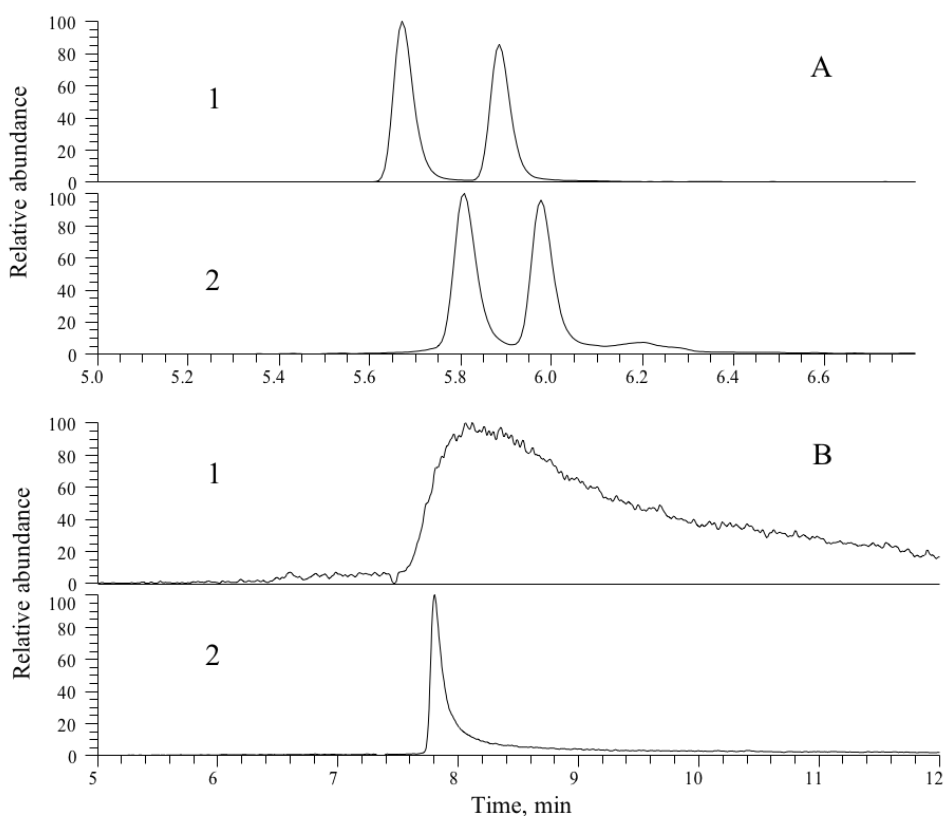
Tika novēroti lielāki fenolo skābju zudumi PSA klātbūtnē, bet C18 – polifenolu zudumi. Veiktie papildus eksperimenti liecināja par to, ka lietotais PSA daudzums nebija pietiekams, lai eliminētu no matricas cukurus, kuru klātbūtne bija sastopama masspektros. Tādejādi dSPE procedūra tika eliminēta, dēļ nespējas ievērojami atbrīvoties no matricas komponentiem, pie reizes palielinot analītu zudumus.

Beigu paraugu sagatavošanas procedūra sastāvēja no LLE soļa, kurā tika izmantots 2% skudrskābes ūdens šķīdums un heksāns, tilpuma attiecībās 1:5. Kopējā procedūra ir vienkāršota un patērē mazāk laika, tādejādi veicinot lielu paraugu caurlaidi. Literatūrā iepriekš minētās metodes bieži sastāv no vismaz trīs soļiem (atkaulošanas, ekstrakcijas, šķīdinātāja iztvaicēšanas) un lieliem patērējamiem resursiem, kamēr mēs esam apvienojuši šos paraugu sagatavošanas soļus un sasnieguši precīzus rezultātus.

### 3.3. Hromatogrāfiskā sadalījuma optimizācija

Hromatogrāfiskā selektivitāte tika optimizēta piemeklējot un pielāgojot kustīgās un stacionārās fāzes. Kā ūdeni saturošas fāzes tika izvērtētas: 0,1% skudrskābe, 10 mM amonija formiāta šķīdums un 10 mM amonija formiāta buferšķīdums ar pievienotu 0,1% skudrskābes (v/v). Acetonitrils tika izvēlēts kā organiskais kustīgās fāzes modifikators, ņemot vērā tā spēju nodrošināt mazāku pretspiedienu, salīdzinājumā ar metanolu, un labāku hromatogrāfisko joslu formu. [49] Iepriekš minētās kustīgo fāzu kombinācijas tika testētas izmantojot C18 un pentafluorofenil (PFP) ar sorbentu saistītās kolonnas. Kolonnu efektivitāte tika salīdzināta injicējot 5  $\mu\text{L}$  standarta, koncentrāciju līmenī 100  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , veicot trīs atkārtojumus un aprēķinot teorētisko šķīvju skaitu ( $N$ ) un izdalīšanās faktoru ( $k$ ) vienādos gradienta apstākļos katram mērķa savienojumam.

Hromatogrammas ar kvercetīna *tailingu* jeb asimetriju (Attēls 3.3.1., B segments) tika iegūtas izmantojot C18 kolonnas, tādejādi rezultējot ļoti mazā teorētisko šķīvju skaitā, salīdzinot ar citiem savienojumiem.

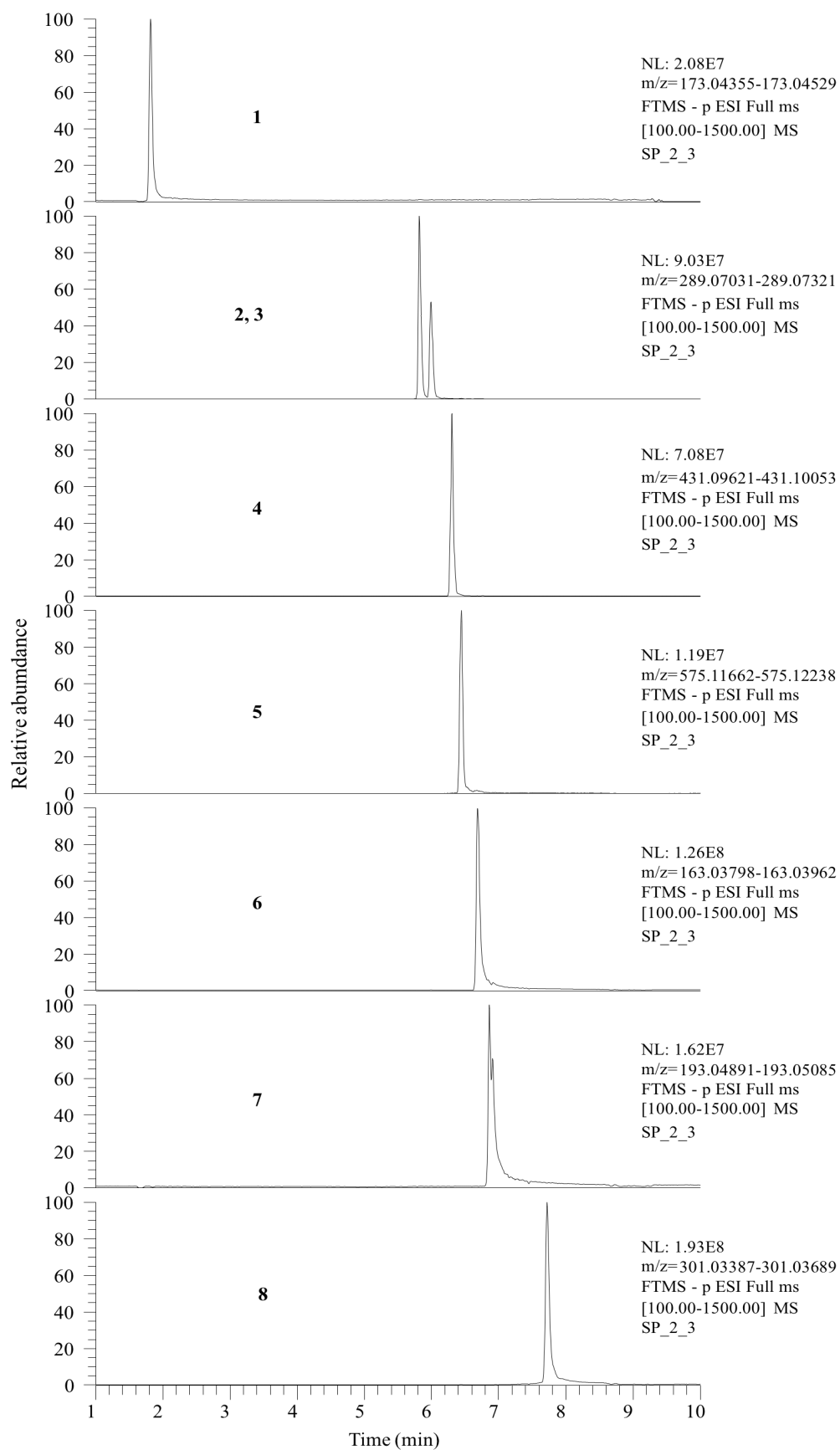


Attēls 3.3.1. Katehīnu (A) un kvercetīna (B) hromatogrammas, iegūtas ar divām dažādām kolonnām (1 – C18, 2 – PFP)

Par spīti kvercetīna lielajai joslas asimetrijai, izmantojot C18 kolonnu, tikai neliela joslas izplūšana tika novērota, izmantojot PFP kolonnu. Fenolo skābju gadījumā, krietni lielāka efektivitāte tika novērota C18 kolonnām, salīdzinot ar PFP, bet toties flavanoīdiem lielāka bija efektivitāte, izmantojot C18 sorbentu. (Attēls 3.3.1, A segments)

Fluorētā stacionārā fāze nodrošina lielāku selektivitāti attiecībā pret polāriem analītiem, aromātiskiem un nepiesātinātiem savienojumiem, fenoliem, halogēniem savienojumiem un taksāniem, pateicoties augstu elektronegatīvajiem fluora atomiem. Vērā ņemams ir fakts, ka PFP stacionārā fāze ir ļoti hidrofoba un var tikt lietota kustīgās fāzes apstākļos ar lielu ūdens saturu, kas ir svarīgi mūsu gadījumā, kad gradienta sākotnējā kompozīcija ir 98% ūdens fāze.

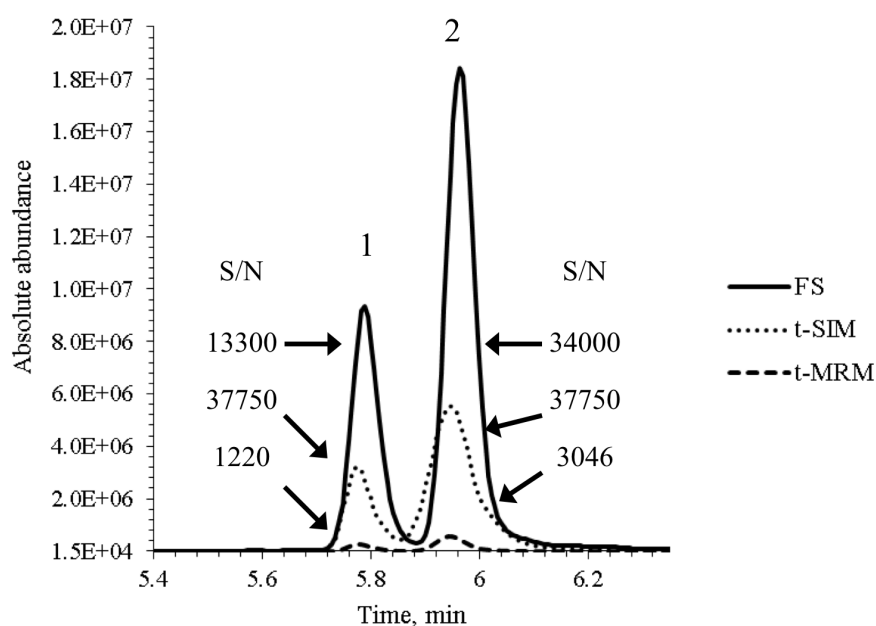
Buferētās sistēmas izmantošana salīdzinājumā ar vienkārši paskābināto ūdens fāzi palielināja teorētisko šķīvju skaitu. Kolonnas efektivitāte katehīnam un epikatehīnam palielinājās divas un četras reizes attiecīgi, kamēr pārējiem savienojumiem šī  $N$  skaita izmaiņa nebija tik izteikta. Visefektīvākā no fāzēm bija 10 mM amonija formiāts ar 0,1% skudrskābes piedevu. Tā radīja lielākās  $N$  vērtības un sadalījuma koeficienti bija robežās no 2 – 4. Kopējais hromatogrāfiskais vielu sadalījums ir parādīts Attēlā 3.3.2.



**Attēls 3.3.2. Ekstrahētās jonu hromatogrammas šokolādes ekstraktam ar standartpiedevu (500 mg·kg<sup>-1</sup>); 1 – shikimic acid, 2, 3 – katehīns un epikatehīns, 4 – izoviteksīns, 5 – procianidīns A2, 6 – p-kumārskābe, 7 – ferulskābe, 8 - kvercetinīns**

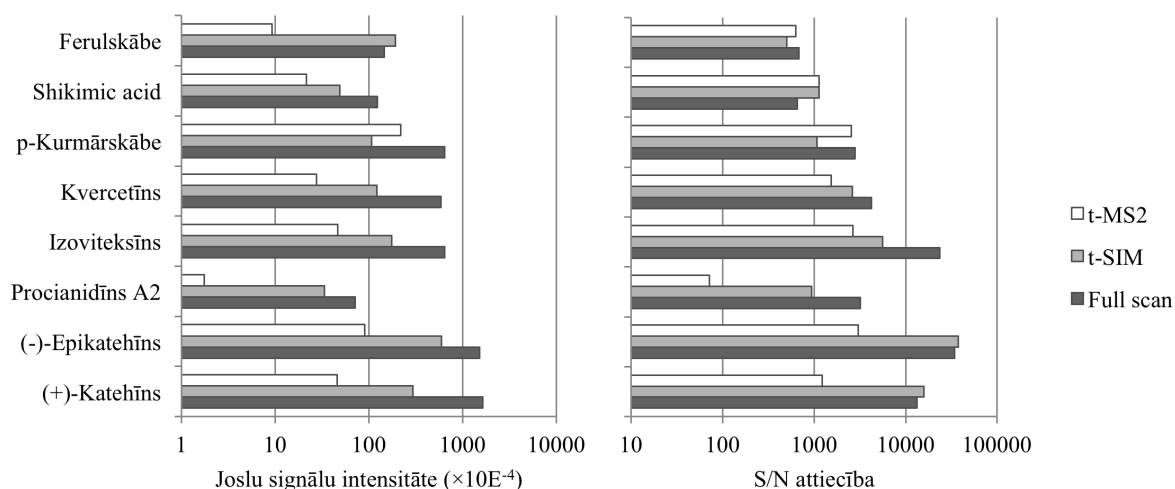
### 3.4. HRMS apstākļi

Šinī darbā tika izvērtēti dažādi Q-Orbitrap MS detektora skenēšanas režīmi, izmantojot signālu intensitātes un signāla pret troksni attiecību (SNR) kā kritērijus. Selektīvā jonu monitorēšana (t-SIM) ir bieži uzskatīta par gana atbilstošu detektēšanas metodi, pateicoties tās spējai izolēt analīta jonus no matricas, izmantojot kvadrapolu, bet zināmi jonu zudumi var notikt izolācijas procesa laikā. [50] Šokolādes ekstrakti tika analizēti izmantojot tandēm-masspektrometrisko (t-MS<sup>2</sup> jeb t-MRM), t-SIM un pilna masas diapazona jeb *full scan* (FS) detektēšanas metodes un tika izvērtētas signālu intensitātes un SNR astoņiem savienojumiem.



#### 3.3.1. attēls Katehīnu (1 – katehīns, 2 – epikatehīns) hromatogrammu salīdzinājums dažādos skenēšanas režīmos (*Full scan*, t-SIM, t-MRM) ar masas izolācijas logu 5 ppm

Kā tas ir redzams Attēlā 3.3.1., FS skenēšanas režīms rada vislielākās signālu intensitātes un lielāko SNR, kamēr veicot eksperimentus t-SIM skenēšanas režīmā, abi iegūtie parametri ir krietni zemāki un t-MRM režīmā tie ir viszemākie. Attēlā 3.3.2. ilustrētas signālu intensitātes un SNR arī pārējiem izvēlētajiem analītiem. Ir redzams, ka arī pārējo analītu gadījumā, SNR un intensitātes ir lielākās FS gadījumā, salīdzinot ar t-SIM un t-MRM, ar vienu izņēmumu – ferulskābi, kurai novērojama lielāka intensitāte t-SIM skenēšanas režīmā, salīdzinot ar FS.



### 3.3.2. attēls Signālu intensitāšu un S/N attiecības salīdzinājums trīs dažādiem skenēšanas režīmiem, n=5, rezultāti izteikti logaritmiskā skalā

SNR parametrs vislielākais ir FS skenēšanas režīmā 5 no 8 analītiem. Tajā pašā laikā t-SIM bija pārāks katehīnu detektēšanai un, kad salīdzināts ar t-MRM, bija krietni pārāks SNR parametrā, izņemot fenolu skābju gadījumā, kuras uzrādīja līdzīgu vai labāku performanci t-MRM režīmā.

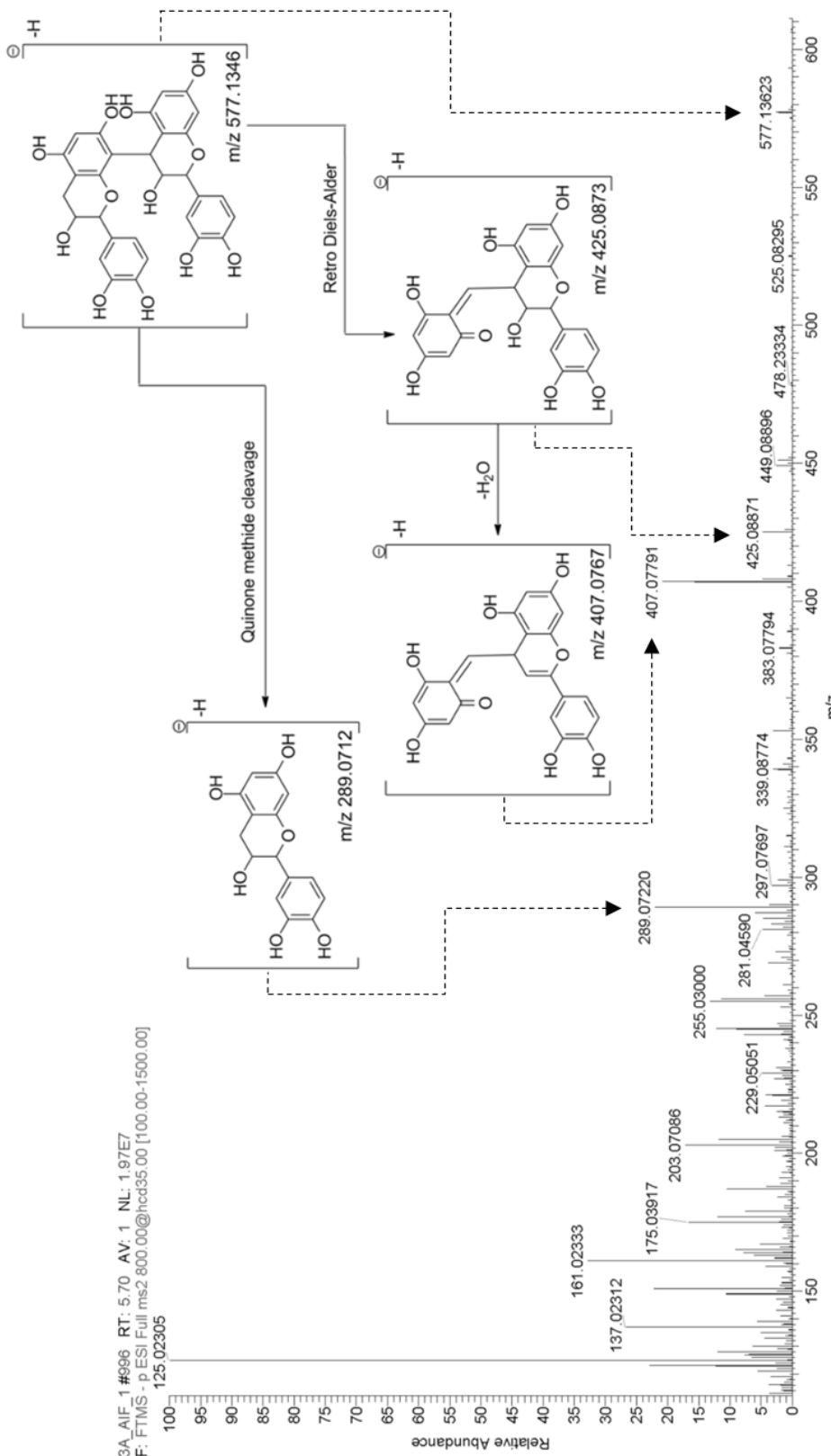
Tā kā FS izrādīja lielāko jutību mūsu pielietojumā, šis skenēšanas režīms tika pielietots kā galvenais skenēšanas režīms kvantificēšanai. FS var lieliski tiks pielietots arī kā skrīninga metodes pamatakmens, nodrošinot ne tikai kvantificēšanu, bet citu savienojumu identificēšanu, kas nav iespējams t-SIM un t-MRM režīmos, kad ir nepieciešamība sastādīt analītu ietveršanas sarakstu ar prekursoru masām un hromatogrāfiskajiem izdalīšanās laikiem.

Papildus mērķtiecīgām izvēlēto savienojumu analīzēm, tika veikta šokolādes paraugus saturošo savienojumu identifikācija izmantojot iepriekš aprakstītās FS metodes parametrus. Lai izvērtētu raksturīgos molekulas fragmentus, tika izmantota augstas-enerģijas kolīzijas disociācijas (HCD) šūna, kas tika operēta visu jonu fragmentēšanas (AIF) režīmā, kombinācijā ar FS, tādējādi vienlaicīgi ļaujot veikt gan prekursoru, gan fragmentjonu skenēšanu.

Savienojumi tika identificēti pēc trīs kritērijiem – precīzās masas noteikšana prekursora jonam, HCD šūnas inducētajam fragmentācijas modelim ar vismaz vienu prekursora jonu un, nedrošības gadījumā, pēc izotopu modeļa atbilstības.

Tika iegūtas divas masas spektru bāzes virsotnes iegūtas no divām hromatogrāfiskajām joslām ar vērtībām 577,1368  $m/z$  ( $[C_{30}H_{26}O_{12}-H]^-$ ), norādot uz procianidīna B dimēru klātbūtni. Kā tas jau ir iepriekš literatūrā aprakstīts [51], abiem

izomēriem ir raksturīgs vienāds fragmentēšanas modelis un tie veido divus identiskus bāzes masas pīķus  $m/z$  407,0782 ( $[C_{22}H_{16}O_8-H]^-$ ) un 289,0725 ( $[C_{15}H_{14}O_6-H]^-$ ), kas rodas no fragmenta zaudējuma retro-Dīlsa-Aldera procesā un *quinone methide* fragmentā, attiecīgi, kā tas ir redzams Attēlā 3.3.3.



3.3.3. attēls Piedāvātais fragmentēšanas modelis procianidīna B dimēram, saskaņā ar HCD šūnas izraistu MS/MS prekursora fragmentēšanu

Veicot tālāku spektru izmeklēšanu izdevās atrast procianidīna trimērus ( $C_{45}H_{38}O_{18}$ ) un tetramērus ( $C_{60}H_{48}O_{24}$ ) pie  $m/z$  vērtībām 865,2022 ( $t_R = 5,50$  min; 5,70 min; 5,85 min,  $\Delta m = 4,9$  ppm) un 1153,2550 ( $t_R = 5,70$  min; 5,85 min,  $\Delta m = 7,9$  ppm), attiecīgi, kā arī MS<sup>2</sup> modeļi atbilda literatūrā iepriekš aprakstītiem. [52.]

12-Hidroksijasmīnskābes sulfāts deva  $m/z$  vērtību 305,0708 ( $[C_{12}H_{18}O_7S-H]^+$ ), bet to ir ļoti viegli sajaukt ar epigallokatehīnu ( $m/z$  305,0667). HCD šūnas radītais fragmentācijas modelis norādīja bāzes masas pīķi pie  $m/z$  vērtības 225,1132 ( $[C_{12}H_{18}O_4-H]^+$ ), norādot uz SO<sub>3</sub> fragmenta zaudēšanu, tādejādi apstiprinot izvīrīto molekulas struktūru, kura arī ir bijusi iepriekš literatūrā aprakstīta. [52]

AIF eksperimenti sevi pierādīja kā ļoti vērtīga piedeva skrīninga un identifikācijas metodei fenolo savienojumu gadījumā, izmantojot fragmentēšanas modeļa atbilstību ar iespēju šo identifikāciju apvienot ar FS kvantificēšanu.

### 3.5. Metodes aprobācija un veikspēja

Metodes veikspēja tika izvērtēta nosakot precizitāti, izteiktu kā relatīvo standartnovirzi (RSD), linearitāti, kvantificēšanas robežu (LOQ) un matricas efektu.

Iekšdienas precizitāte tika noteikta pieciem replikātiem, divos standartpiedevu līmeņos, kamēr starpdienas precizitāte tika izvērtēta divām sekojošām dienām. Iegūtās RSD vērtības bija robežās no 5,2 līdz 8,2% 1000 mg·kg<sup>-1</sup> un 5,5 līdz 14,2% 10 mg·kg<sup>-1</sup> koncentrāciju līmeņos. Linearitāte metodei tikai noteikta izmantojot matricai pieskaņoto kalibrāciju. Kalibrācijas taisnes izrādīja pietiekošu linearitāti Tabulā 3.4.1. norādītajos koncentrāciju diapazonos ar noteikšanas koeficientu lielāku par 0,993 visiem analītiem, bet ar vienu izņēmumu – izoviteksīnu, kam R<sup>2</sup> bija 0,988.

3.4.1. tabula Validācijas parametri un matricas efekta izvērtējums izmantotajai metodei

Savienojums	Linearitāte	LOQ, mg·kg <sup>-1</sup>	Taisnes ME, %	Iekšdienas precizitāte (n=5), %		Starpdienu precizitāte (n=2), %	
				10 mg·kg <sup>-1</sup>	1000 mg·kg <sup>-1</sup>	10 mg·kg <sup>-1</sup>	1000 mg·kg <sup>-1</sup>
(+)-Katehīns	0,9952	0,04	112,7	9,9	7,8	9,6	8,0
(-)-Epikatehīns	0,9931	0,12	120,1	11,2	8,2	11,1	8,2
Procianidīns A2	0,9978	0,13	64,5	12,2	5,7	11,9	5,2
Izoviteksīns	0,9887	0,03	128,5	9,0	6,7	10,3	6,7
Kvercetinīns	0,9979	0,01	140,9	11,8	5,6	11,4	5,7
<i>p</i> -Kumārskābe	0,9996	0,01	51,8	5,7	6,0	5,5	5,4
<i>Shikimic acid</i>	0,9999	0,30	89,6	16,2	6,1	14,2	5,6
Ferulskābe	0,9994	0,03	59,1	15,6	8,8	12,9	7,6

Lineāra kalibrācijas taisne bija novērota koncentrāciju diapazonā no 5 līdz 10'000 mg·kg<sup>-1</sup> lielākajai daļai savienojumu, izņemot katehīnu un epikatehīnu (5 - 5000 mg·kg<sup>-1</sup>) un izoviteksīnu (5 – 5000 mg·kg<sup>-1</sup>). LOQ vērtības tika definētas kā koncentrācija, kurā raksturīgais analīta jona ([M-H]<sup>+</sup>) signāls bija lielāks nekā 5000 intensitātes vienības. LOQ vērtības bija robežās no 0,01 mg·kg<sup>-1</sup> kvercetīnam līdz 0,30 mg·kg<sup>-1</sup> *shikimic acid*, attiecīgi.

Mūsu pētījumā iegūtās LOQ vērtības bija divas reizes zemākas(labākas), nekā pētījumos, kuros izmantotas DAD-MS sistēmas [53] un TOF-MS/MS sistēmas [31]. LOQ vērtības DAD-MS sistēmu gadījumā bija 15,6 mg·kg<sup>-1</sup> katehīnam un epikatehīnam un 31,2 mg·kg<sup>-1</sup> procianidīniem. TOF-MS/MS aprīkojumam LOQ vērtības bija zemākas – 12,2 mg·kg<sup>-1</sup> katehīnam un 62,5 mg·kg<sup>-1</sup> epikatehīnam. Lineārie diapazoni minētajām sistēmām bija izteikti mazāki, bet linearitātes koeficienti bija labāki.

Metode, kuru ir izstrādājusi Castro—López et al., izmantojot LTQ-Orbitrap sistēmu antioksidantu notiekšanai kakao pulverī piedāvā līdzīgu precizitāti (8,6% RSD katehīnam; 3,1% epikatehīnam; 10,9% kvercetīnam), bet krietni augstākas(sliktākas) LOQ vērtības tika iegūtas (katehīnam, 4,7 mg·kg<sup>-1</sup>; epikatehīnam, 10,7 mg·kg<sup>-1</sup>; kvercetīnam, 0,14 mg·kg<sup>-1</sup>). [54]

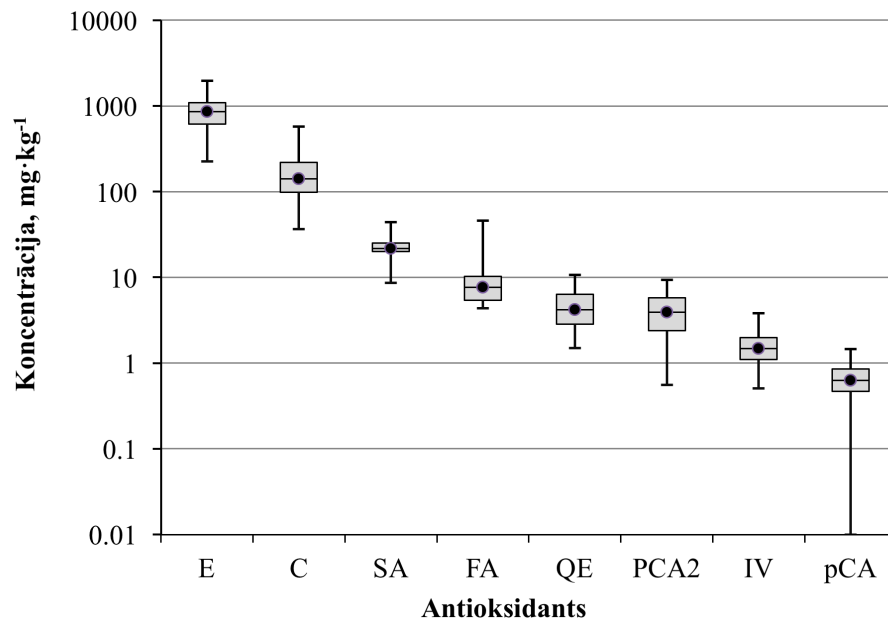
Matricas efekts (ME) tika izvērtēts, lai noteiktu cik lielā mērā notiek jonu signāla slāpēšana vai uzlabošana. Matricas efekts tika izvērtēts pēc izteiksmes (1.), dalot taisnes virziena koeficientu kalibrācijai, kas tika veidota matricas klātbūtnē ( $\text{slope}_{\text{matrix}}$ ) ar taisnes virziena koeficientu, kas tika iegūts veicot kalibrācijas tīrā kustīgās fāzes šķīdinātājā ( $\text{slope}_{\text{std}}$ ). 100% vērtība norāda uz to, ka matricas efekts neeksistē, >100% - novērojams signāla pastiprinājums, <100% - novērojama signāla slāpēšana.

$$\text{Izteiksme (1.) ME} = (\text{slope}_{\text{matrix}} / \text{slope}_{\text{std}}) \times 100$$

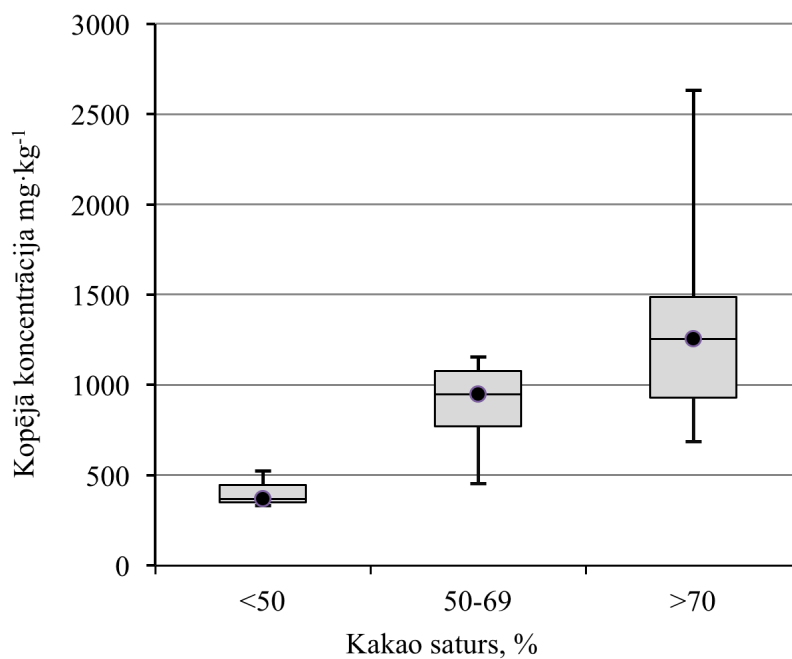
Piezīme – dažāds šokolādes sastāvs var novest pie citādām ME vērtībām. Iegūtie rezultāti ir apkopoti Tabulā 3.4.1., līdz ar validācijas rezultātiem. Lielākajai daļai savienojumu tika novērota signāla intensitātes palielināšanās. Fenolu skābju gadījumā, neliels ME tika novērots, bet katehīnu un flavonu ME bija ievērojami lielāks.

### 3.6. Paraugu analīze

Atsevišķais un kopējais izvēlēto 8 fenolu savienojumu saturs 26 šokolādes paraugos ir sumārizēts Attēlos 3.5.1. un 3.5.2. attiecīgi. Koncentrāciju līmeņi šiem izvēlētajiem savienojumiem bija robežās no zem LOQ līdz pat 1530 mg·kg<sup>-1</sup>. Katehīna un epikatehīna līmeņi bija robežās no 50 līdz 570 mg·kg<sup>-1</sup> un no 240 līdz 1530 mg·kg<sup>-1</sup>, attiecīgi.



3.5.1. attēls Individuālo antioksidantu saturs šokolādes paraugos (vērtības dotas logaritmiskā skalā); C – katehīns, E – epikatehīns, PCA – procianidīns A2, IV – izovitekīns, QE – kvercefīns, pCA – *p*-kumārskābe, SA – *shikimic acid*, FA – ferulskābe



3.5.2. attēls Kopējā fenolu savienojumu koncentrācija šokolādes paraugos attiecībā pret kakao saturu

Tika novērota sešas reizes liela starpība starp zemākajiem un augstākajiem epikatehīna līmeņiem šokolādē, kakao saturs diapazonā no 33 līdz 70%. Šokolādes kopumā ar kakao saturu 70-77%, koncentrāciju diapazoni katehīnam un epikatehīnam variēja 6 un 4 reizes attiecīgi. Lielākās koncentrācijas procianidīnam A2 bija šokolādes paraugos ar augstu kakao saturu un kopējais koncentrāciju diapazons bija no 1,7 līdz 9,5 mg·kg<sup>-1</sup>, šokolādē ar kakao saturu lielāku nekā 70%. Izoviteksīns un kvercetīns izrādīja 7 reizes lielu starpību starp zemākajām un lielākajām koncentrācijām (0,5 – 3,8 un 1,8 – 13 mg·kg<sup>-1</sup>, attiecīgi). Noteiktais fenolu skābju saturs bija diapazonā zem noteikšanas robežas *p*-kumārskābes gadījumā, līdz 44 mg·kg<sup>-1</sup> *shikimic acid* gadījumā. Kontrastējot ar iepriekšminētajām skābēm, ferulskābe bija atrodama koncentrāciju līmeņos nepārsniedzot 20 mg·kg<sup>-1</sup> ar vienu izņēmumu, kad koncentrācija sasniedza 46,1 mg·kg<sup>-1</sup>.

Tika veikts salīdzinājums koncentrācijām, kas norādītas Attēlā 3.5.1., ar “Phenol explorer” datubāzi [55] un tika iegūta saskaņa jeb rezultāti bija līdzīgi ar flavan-3-olu (+)-katehīna un (-)-epikatehīna koncentrāciju diapazoniem. Pēc datubāzes datiem, mūsu iegūtās ferulskābes koncentrācijas bija relatīvi zemas un atšķīrās desmit reizes, pat tik lielā paraugu kopā. Literatūrā netika atrasti dati procianidīna A2 koncentrācijām šokolādē. Procianidīna A tipa fenoli tipiski var rasties no B tipa procianidīniem oksidatīvas iekšmolekulāras reakcijas ceļā, norādot uz oksidēšanās blakusreakciju notikšanu šokolādes ražošanas procesā. [56]

Tika izvērtētas korelācijas starp kakao saturu un dažādu antioksidantu koncentrācijām, antioksidantu koncentrāciju summu, izcelsmes valstīm un iegūtajām koncentrāciju savstarpējām korelācijām. Papildus tam, tika izvērtēta mijiedarbība antioksidantu starpā, un tika novērota ievērojama ( $R^2 = 0,77$ ;  $p < 0,05$ ) korelācija starp (+)-katehīnu un (-)-epikatehīnu. Šie rezultāti sakrīt jau ar literatūrā iepriekš aprakstītiem datiem. Vērā ņemama korelācija bija starp (-)-epikatehīnu un izoviteksīnu ( $R^2 = 0,80$ ;  $p < 0,05$ ). Savstarpējā korelācija starp monomērajiem flavan-3-oliem ir bijusi iepriekš aprakstīta [34,57], bet tā nav bijusi aprakstīta izoviteksīnam ar flavan-3-oliem. Visatpazīstamākais šokolādes kvalitātes rādītājs, norādīts uz iepakojuma, kakao saturs, spēcīgi korelē ar kopējo antioksidantu koncentrāciju, kā tas ir novērojams Attēlā 3.5.2. un tas ir labs indikators patērētājam, ka šokolāde ar lielāku kakao saturu var dot lielāku labumu veselībai.

Pilnais paraugu saraksts ar antioksidantiem un attiecīgajām koncentrācijām ir dots Tabulā 3.5.3.

3.5.3. tabula Individuālo fenolo savienojumu saturs, mg·kg<sup>-1</sup>; C – katehīns, E – epikatehīns, PCA – procianidīns A2, IV – izoviteksīns, QE – kvercetinīns, pCA – *p*-kumārskābe, SA – *shikimic acid*, FA – ferulskābe

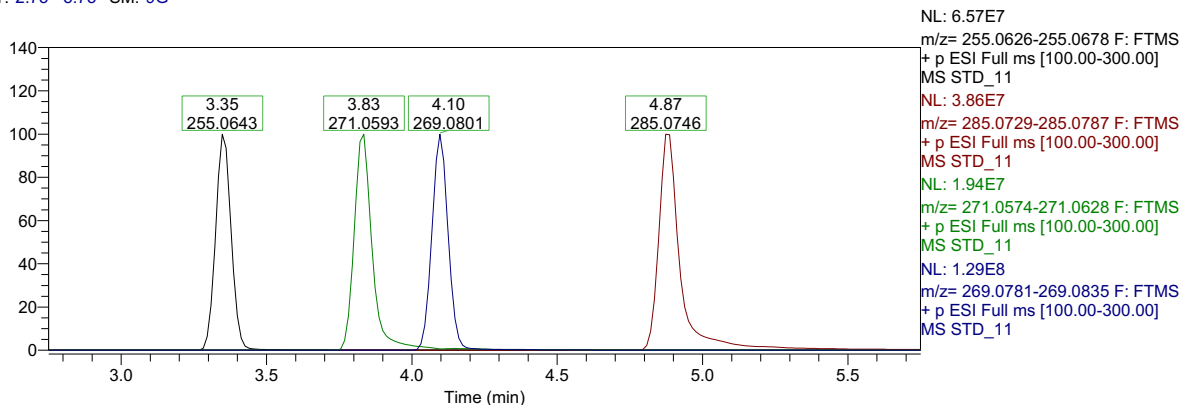
Paraugs	Kakao saturs	C	E	PCA2	IV	QE	pCA	SA	FA	Kopējā antioksidantu koncentrācija
DC1	70	575	1972	2,7	3,8	10,7	1,45	44	21,0	2631
DC2	70	205	1112	9,3	2,2	6,6	1,26	35	10,1	1381
DC3	70	168	1036	6,5	2,5	6,1	1,01	27	5,2	1253
DC4	72	130	592	3,6	1,4	2,8	0,73	25	14,6	771
DC5	70	141	1004	6,7	2,2	4,2	0,40	21	9,3	1189
DC6	70	142	495	1,7	1,4	3,8	0,34	29	10,3	684
DC7	72	134	665	4,8	1,5	4,2	0,57	18	7,4	836
DC8	56	48	377	0,9	0,9	2,4	0,58	15	7,6	453
DC9	50	82	434	2,9	0,9	2,4	<0,01	18	4,3	544
DC10	72	177	676	2,3	1,4	4,1	0,72	22	11,8	895
DC11	50	106	699	4,5	1,3	2,8	0,84	25	5,2	845
DC12	54	120	893	4,5	1,2	4,5	1,05	28	5,3	1058
DC13	73	262	1387	5,3	2,0	4,4	0,46	22	11,2	1694
DC14	72	236	683	4,2	1,0	7,1	1,00	21	10,2	964
DC15	72	285	1167	2,0	1,6	6,5	0,87	23	7,7	1494
DC16	72	225	1205	7,6	2,2	4,6	0,93	23	5,2	1473
DC17	72	95	945	8,5	1,8	5,4	0,45	22	6,8	1085
DC18	64	92	824	3,2	1,7	3,7	0,64	22	12,8	961
DC19	77	382	1634	6,8	3,0	8,7	0,65	26	5,0	2066
DC20	66	139	963	5,8	1,1	9,7	0,61	14	5,8	1139
DC21	60	167	949	5,8	1,4	4,2	0,55	21	4,6	1154
DC22	66	107	786	3,4	1,8	7,1	0,66	22	5,8	934
DC23	70	303	1144	2,2	1,9	1,5	0,60	21	8,9	1483
DC24	41	64	430	3,4	0,7	2,5	<0,01	14	7,9	523
DC25	41	46	305	0,9	0,5	1,7	0,49	9	5,7	368
MK1	33	37	225	0,6	0,6	1,8	<0,01	20	46,1	330

### 3.7. Nākotnes perspektīvas un diskusija

#### *Antioksidantu noteikšana fermentētos sojas produktos*

Ir veiktas darba iestrādes un izstrādāta hromatogrāfiskā un masspektrometriskā metode sojas sēklu un produktu analīzei. Hromatogrāfiskā noteikšanas metode ietver četrus izoflavonu klases analītus – dadzeīnu (*dadzein*), *genistein*, *formononetin*, *biochanin A*. Līdzīgi kā šinī darbā, analītu hromatogrāfiskai atdalīšanai tiek izmantota PFP kolonna un pilna masas diapazona skenēšanas režīms pozitīvajā jonizācijas režīmā. Hromatogrāfiskā metode ir 12 minūtes ilga, ietverot 4 minūšu kondicionēšanas laiku. (Attēls 3.6.1.) Ir veikta linearitātes diapazona noteikšana, izmantojot standartus, panākot lielisku linearitāti ( $R^2 > 0,999$ ) koncentrāciju diapazonā no 5 - 1000  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (standartvielas šķīdinātājā; injekcijas tilpums 5  $\mu\text{L}$ ; SNR zemākajā līmenī  $>100$ ). Savā starpā ir salīdzinātas savienojumu intensitātes gan pozitīvajā, gan negatīvajā jonizācijas režīmā  $[\text{M}+\text{H}]^+$  un  $[\text{M}-\text{H}]^-$  joniem attiecīgi un tika izlemts par labu  $[\text{M}+\text{H}]^+$  joniem, pateicoties novērotajām lielākām intensitātēm.

RT: 2.75 - 5.75 SM: 9G



3.6.1. attēls Soju saturošo izoflavonu hromatogrāfiskais sadalījums (m/z: 255,0634 – *dadzein*; 271,0593 – *genistein*; 269,0801 – *formononetin*; 285,0746 – *biochanin A*)

Jūtība viennozīmīgi ir pietiekoši augsta, lai detektētu savienojumus, kas ir sastopami salīdzinoši lielos daudzumos, kā jau dabas vielas, bet problēmas zemākajos koncentrāciju līmeņos var sagādāt matricas sastāvā esošie savienojumi, kas ir sastopami daudz lielākos daudzumos. Tātad ir nepieciešams uzlabot detektora selektivitāti vai veikt apjomīgu paraugu attīrīšanu. Paraugu sagatavošanas metodes izstrāde un validēšana tipiski patērē krietni lielākus resursus, nekā masspektrometriskās metodes izstrāde un optimizācija. Masspektrometriskās metodes selektivitāti uzlabot var mainot detektēšanas veidu no pilna masas diapazona skenēšanas uz mērķa jonu skenēšanu (t-SIM) vai mērķa jonu fragmentēto skenēšanu (SRM). Tā kā metode ir ar zināmiem 4 analītiem, var piemērot mērķa jonu sarakstu (t-SIM; *inclusion*

*list*), un, ja ir vēlme, kvantificēt pēc fragmentu molekulām (SRM, pirms tam piemērojot atbilstošas kolīzijas enerģijas tiešās paraugu infūzijas apstākļos), kas, salīdzinājumā ar FS masspektrometrisko metodi, dotu neapšaubāmu selektivitāti, pateicoties augstas izšķirspējas masspektriem apvienojumā ar precīzu savienojumu fragmentāciju un šauriem (<5 ppm) jonu izolācijas diapazoniem.

### ***Ogu polifenolu identificēšana***

Iepriekš tika veikta savienojumu identificēšana izmantojot AIF metodi, kuras darbības pamatā ir plaša masas diapazona jonu fragmentācija. Lietotā metode ir pietiekoši laba, lai apvienotu skrīningu ar puslīdz zināmu savienojumu identifikāciju, bet, gadījumos, kad ir nepieciešams neapstrīdams vielas fragmentācijas modelis, šī metode var izrādīties pārāk neselektīva pateicoties lielajam savienojumu skaitam, kas tiek reizē fragmentēti. Gadījumos, kad liela daļa savienojumu ir ar līdzīgiem molekulu skeletiem, fragmentācija noved pie liela skaita izobārisko jonu, kas līdz ar to var panākt nepareizi izvirzītus fragmentācijas modeļus.

Lai veiktu akurātus fragmentācijas modeļa noteikšanas mērījumus ir nepieciešami mērķtiecīgi mērījumi, izolējot izvēlētas prekursora molekulas, izmantojot kvadropolu un iegūstot MS<sup>2</sup> spektru. Praktiski, izmantojot Q Exactive Orbitrap detektoru, var iegūt arī MS<sup>3</sup> spektru, vispirms fragmentējot savienojumus avotā, lietojot CID fragmentāciju (MS<sup>2</sup>) un pēc tam, mērķtiecīgi izvēloties fragmentus un selektīvi tos tālāk fragmentējot kolīzijas šūnā, iegūt sekojošu MS<sup>3</sup> spektru. Orbitrap LTQ modeļos, vai citos jaunākās paaudzes tribrīdos ir integrēts arī jonu slazds, kas atvieglo vairāku pakāpju fragmentāciju, ļaujot veikt MS<sup>n</sup> fragmentāciju (n= līdz pat 10 fragmentācijas soļiem jeb kamēr vien jonu pārpilnība ļauj).

Selektīvus un segmentētus MS<sup>2</sup> spektrus var iegūt izmantojot FS-ddMS<sup>2</sup> (*full scan data dependant tandem MS*). Šī metode ļauj vienlaikus veikt plašu savienojumu skrīningu veicot pilnā spektra skenēšanu lielā masas diapazonā, gan veikt savienojumu fragmentāciju gan brīvi izvēlētiem savienojumiem, gan definētiem inklūzijas sarakstā (*inclusion list*). Ir iespējama arī masspektrometriskās metodes kombinācija kā t-SIM-ddMS<sup>2</sup>, kas, salīdzinājumā ar FS metodi, ir jutīgāka un ar lielāku selektivitāti, pateicoties kvadropola jonu izolācijai diezgan mazos diapazonos (līdz pat 0,4 m/z), kas līdz ar to nodrošina to, ka Orbitrapā netiek ieinjicēts tik daudz matricas jonu un ir novērojama mazāka signāla supresija, mazāks troksnis, un, līdz ar to, lielāks SNR. Tomēr nākas saskarties ar to, ka t-SIM metodei ir nepieciešams mērķa analītu saraksts ar definētiem laikiem, kamēr, ja tiek izmantots FS apvienots ar ddMS<sup>2</sup>, tiek iegūta pilna spektra skenēšana un savienojumu fragmentācija notiek, jebkad, kad tiek detektēts atbilstošs prekursora jons. Atbilstošos prekursoru jonus definē sarakstā (*inclusion*

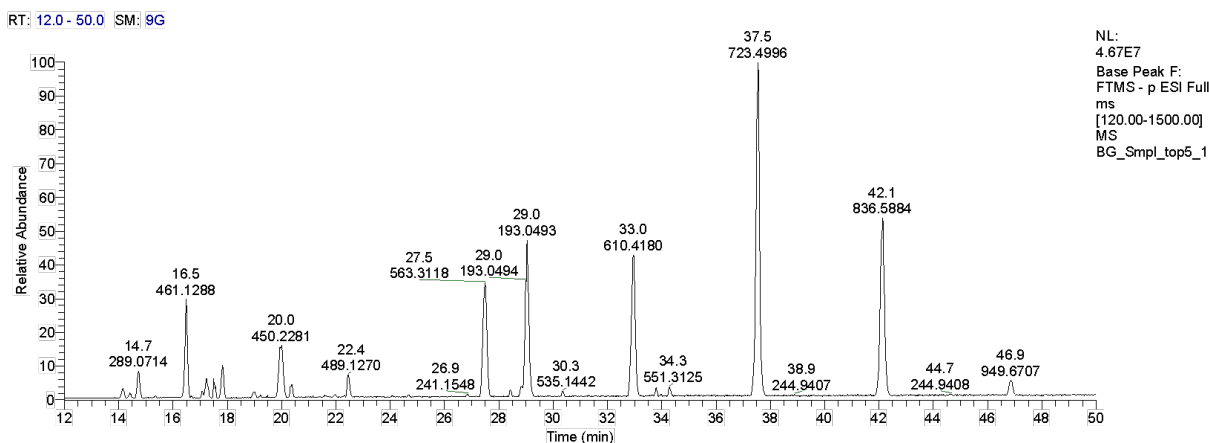
list) un fragmentācija notiek, kad tiek detektēts precīzās masas jons 10 ppm lielā izolācijas logā.

Šobrīd laboratorijā ir pieejami pieci dažādi purva ogu ekstrakti – brūklenes, lielogu dzērvenes, purva dzērvenes, meža mellenes un lielogu krūmmellenes. Šīs ogas ir ļoti bagātas ar fenolajām skābēm un flavanoīdiem, bet tām, savā starpā, ir atšķirīgs antioksidantu profils. Mellenēs ir sastopamas vislielākās antrociānu koncentrācijas, kamēr sarkanajās ogās ir vislielākās procianidīnu koncentrācijas. [58,59]

Lielākā daļa fenolo savienojumu jonizējas gan pozitīvajā, gan negatīvajā režīmā, bet, kaut arī pozitīvā jonizācija izrāda lielākas savienojumu jonu intensitātes, negatīvais režīms izrāda lielāku selektivitāti gadījumos, kad matricas savienojums(-i) ietekmē mērķa savienojumu. [25] Līdz ar to ir nepieciešami hromatogrāfiskie mērījumi gan pozitīvajā, gan negatīvajā jonizācijā. Pozitīvā jonizācija dod mums iespēju ieskatīties antrociānu pasaulē, kas ir ļoti plaši izplatīta dažādu meža ogu gadījumā un negatīvā ļauj izvērtēt klasiskākos polifenolos, kas ir būvēti uz katehīnu oglekļa skeleta.

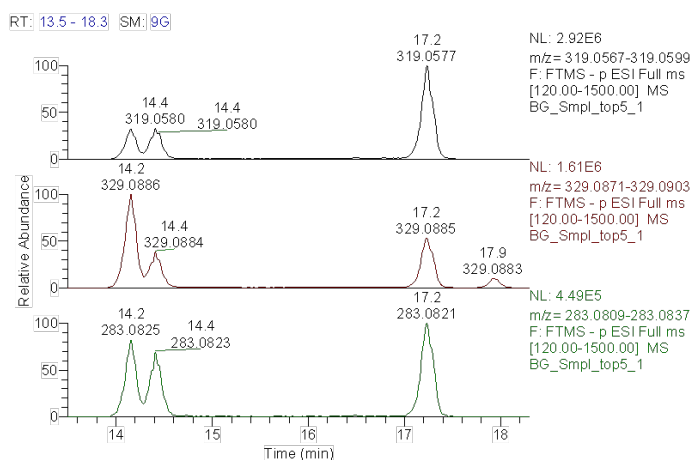
Šobrīd tiek pielietots sekojošs identifikācijas plāns:

Tiek piemēroti ilgi (90 min) hromatogrāfiskie gradienta apstākļi, C<sub>18</sub> stacionārās fāzes klātienē, lai pilnībā atdalītu savā starpā savienojumus un to izomērus. Šo hromatogrāfisko atdalīšanu pavada mērījumi gan pozitīvajā, gan negatīvajā jonizācijā. Paralēli tiek veikti arī tukšās hromatogrāfiskās injekcijas (*blank runs*), izmantojot tīru šķīdinātāju, lai iegūtu fona ainu. No parauga spektriem tiek atņemts fona signāls, lai tiktu iegūta salīdzinoši tīra *base peak* (attēlots intensīvākais masas signāls) hromatogramma, no kuras tiek iegūtas dominējošo savienojumu prekursoru jonu masas. (Attēls. 3.6.2.)



3.6.2. attēls *Base peak* hromatogramma pēc fona trokšņa noņemšanas, uzņemta negatīvajā jonizācijas režīmā, gara hromatogrāfiskā gradienta apstākļos

No iegūtām prekursoru masām tiek veidots inklūzijas saraksts ar definētām masām, kuras tiks pakļautas fragmentācijai. Fragmentācija notiek izmantojot ddMS<sup>2</sup> metodi, pielietojot vairāku pakāpju fragmentācijas enerģijas (*stepped NCE*), tādējādi iegūstot lielāku fragmentu skaitu. Paralēli fragmentācijai, tiek iegūti precīzās masas mērījumi augstas izšķirspējas apstākļos (70'000 FWHM), pielietojot *lock mass* savienojumus ar precizitāti <1 ppm. *Lock mass* tiek definēts kā tiešā laika *on-line* masas kalibrācija un kā izmantotie savienojumi masas kalibrācijai negatīvajā režīmā kalpo nātrija dodecil stearāts (m/z 265,147903) un pozitīvajā – kafēīns (m/z 195,087652). Tiek novērota arī molekulu jonu *aduktu* veidošanās (Attēls 3.6.3.), kas ļauj labāk interpretēt savienojumu īpašības.



### 3.6.3. attēls Savienojuma un tā izomēru hromatogrammas dažādu jonu *aduktu* klātbūtnē; m/z, 319,058 – [M+Cl]<sup>-</sup>, 329,089 – [M+COOH]<sup>-</sup>, 283,082 – [M-H]<sup>-</sup>

Paralēli tiek izveidota savienojumu fragmentu bibliotēka, iegūta no literatūras datiem. Tiek noteikti savienojumi, kuri ir visbiežāk sastopami šāda veida paraugos un to struktūrformulas, izmantojot MassFrontier 7.0 programmatūru, kas ļauj modelēt un paredzēt iespējamās sašķelšanās mehānismus, tādējādi iegūstot fragmentu bibliotēku. Iegūtie ddMS<sup>2</sup> spektri tiek salīdzināti pret fragmentiem, kas ir sastopami izveidotajā bibliotēkā un tiek izvirzīta hipotētiskā nezināmā savienojuma struktūrformula. Ir iespējams arī salīdzināt iegūtos fragmentus vai prekursorus ar publiski pieejamām MS bibliotēkām, kā, piemēram, M/z Cloud, bet lielākajā daļā gadījumu, spektri nav pieejami, jo šīs dabas vielas nav komerciāli pieejamas vai pat izolētas, lai iegūtu tīru, apstiprinošu masspekturu.

Nezināmo struktūru izziņāšana dabas molekulu gadījumā viennozīmīgi ir viens no lielākajiem izaicinājumiem. Masspektrometrija ir tikai viens no nepieciešamajiem instrumentiem. Lai pilnībā pārliecinātos par izvirzītās struktūras pareizību, ir nepieciešamas citas apstiprinošas metodes, kā KMR vai XRD, bet šīm metodēm ir nepieciešami salīdzinoši

ļoti lieli tīras vielas daudzumi, bet vielu izolēšanas vai sintēzes procesi ir ļoti laika un resursu ietilpīgi. Iespējams, laika gaitā pieaugs šo dabas vielu nozīmība un tiks inducēti papildus pētījumi, un tas veicinās tālāku, dziļāku izpēti.

## SECINĀJUMI

1. Sekojot analītiskās ķīmijas pētniecības aktualitātēm, ir tikusi izmantota HRMS tehnoloģija pārtikas paraugu analīzei un ir izstrādāta un validēta ātra, uzticama skrīninga metode antioksidantu noteikšanai šokolādē.
2. Salīdzinot ar citām, literatūrā aprakstītām metodēm, tā ir vienkāršota uz vienu soli, kas nodrošina samazinātu materiālu un laika patēriņu.
3. Izstrādātā metode ļauj izolēt mērķa savienojumus no šokolādes ekstrakta matricas izmantojot *full scan* metodi ar izšķīrējspēju 70'000 FWHM un masas ekstrakcijas logu 5 ppm.
4. Salīdzinot ar citām skenēšanas metodēm pilna masas diapazona skenēšana izrādīja pārkāpumu par t-SIM un t-MS<sup>2</sup> metodēm.
5. Nākamais solis masspektrometrijā ir metodes, kuras ļauj kvantificēt un kvalificēt grūti nosakāmus mērķa savienojumus, izmantojot vienlaicīgu skrīningu un fragmentēšanu. [60]
6. Metode nodrošina pietiekoši lielu precīziāti (RSD 5,4 – 16,2%) un lineāru detektēšanas diapazonu (5 – 5000 mg·kg<sup>-1</sup>). Iegūtie LOQ ir krietni zemāki nekā iepriekš literatūrā norādītie, arī fenolu savienojumu noteikšanai.
7. Tika noteikta astoņu fenolu savienojumu klātbūtne 26 šokolādes paraugos koncentrāciju līmeņos sākot no zem noteikšanas robežas līdz 1972 mg·kg<sup>-1</sup>.
8. Kopsummā šis pētījums norāda uz šokolādes kā antioksidantu avota, funkcionāla ēdiena svarīgumu.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- [1] M. Przygodzka, D. Zielińska, Z. Ciesarová, K. Kukurová, H. Zieliński, Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices, *LWT-Food Sci. Technol.* 58 (2014) 321–326.
- [2] A. Vallverdú-Queralt, J. Regueiro, M. Martínez-Huélamo, J.F.R. Alvarenga, L.N. Leal, R.M. Lamuela-Raventos, A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay, *Food Chem.* 154 (2014) 299–307.
- [3] J.A.M. Kyle, G.G. Duthie, Flavonoids in foods, in: *Flavonoids Chem. Biochem. Appl.*, CRC Press, 2005: pp. 219–262.
- [4] D. Guillarme, J. Schappler, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 15–27.
- [5] M. González-Castejón, A. Rodríguez-Casado, Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review, *Pharmacol. Res.* 64 (2011) 438–455.
- [6] A. Crozier, I.B. Jaganath, M.N. Clifford, Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 1001–1043.
- [7] N. Kumar, V. Pruthi, Potential applications of ferulic acid from natural sources, *Biotechnol. Reports.* 4 (2014) 86–93.
- [8] J. Damašius, P.R. Venskutonis, V. Kaškonienė, A. Maruška, Fast screening of the main phenolic acids with antioxidant properties in common spices using on-line HPLC/UV/DPPH radical scavenging assay, *Anal. Methods.* 6 (2014) 2774–2779.
- [9] B. Orlikova, D. Tasdemir, F. Golais, M. Dicato, M. Diederich, Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential, *Genes Nutr.* 6 (2011) 125–147.
- [10] J.M. Landete, Plant and mammalian lignans: a review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health, *Food Res. Int.* 46 (2012) 410–424.
- [11] L. Pourcel, J.-M. Routaboul, V. Cheynier, L. Lepiniec, I. Debeaujon, Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions, *Trends Plant Sci.* 12 (2007) 29–36.

- [12] R. Tsao, Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols, *Nutrients*. 2 (2010) 1231–1246.
- [13] S.B. Nimse, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *RSC Adv.* 5 (2015) 27986–28006.
- [14] H. Zhang, R. Tsao, Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects, *Curr. Opin. Food Sci.* 8 (2016) 33–42.
- [15] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84.
- [16] Z. Bahadoran, P. Mirmiran, F. Azizi, Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review, *J. Diabetes Metab. Disord.* 12 (2013) 43.
- [17] R. Estruch, E. Ros, J. Salas-Salvadó, M.-I. Covas, D. Corella, F. Arós, E. Gómez-Gracia, V. Ruiz-Gutiérrez, M. Fiol, J. Lapetra, Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet, *N. Engl. J. Med.* 368 (2013) 1279–1290.
- [18] R.A. Baxter, Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation, *J. Cosmet. Dermatol.* 7 (2008) 2–7.
- [19] W.D. Johnson, R.L. Morrissey, A.L. Osborne, I. Kapetanovic, J.A. Crowell, M. Muzzio, D.L. McCormick, Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 3319–3327.
- [20] H. Kelebek, S. Selli, A. Canbas, T. Cabaroglu, HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan, *Microchem. J.* 91 (2009) 187–192.
- [21] D. Guillarme, C. Casetta, C. Bicchi, J.-L. Veuthey, High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 6882–6890.
- [22] X. Deng, G. Gao, S. Zheng, F. Li, Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in the leaves of *Isatis indigatica* Fort. by ultra-performance liquid chromatography with PDA and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 562–567.

- [23] X. Zheng, P. Shi, Y. Cheng, H. Qu, Rapid analysis of a Chinese herbal prescription by liquid chromatography–time-of-flight tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1206 (2008) 140–146.
- [24] J. Gruz, O. Novák, M. Strnad, Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS, *Food Chem.* 111 (2008) 789–794.
- [25] Z. Spáčil, L. Nováková, P. Solich, Comparison of positive and negative ion detection of tea catechins using tandem mass spectrometry and ultra high performance liquid chromatography, *Food Chem.* 123 (2010) 535–541.
- [26] A. Ribas-Agustí, M. Gratacós-Cubarsí, C. Sárraga, J. García-Regueiro, M. Castellari, Analysis of Eleven Phenolic Compounds Including Novel p-Coumaroyl Derivatives in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) by Ultra-high-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry Detection, *Phytochem. Anal.* 22 (2011) 555–563.
- [27] H. Zhang, H. Yang, M. Zhang, Y. Wang, J. Wang, L. Yau, Z. Jiang, P. Hu, Identification of flavonol and triterpene glycosides in Luo-Han-Guo extract using ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Food Compos. Anal.* 25 (2012) 142–148.
- [28] K. Nagy, K. Redeuil, R. Bertholet, H. Steiling, M. Kussmann, Quantification of anthocyanins and flavonols in milk-based food products by ultra performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6347–6356.
- [29] C. Cavaliere, P. Foglia, R. Gubbiotti, P. Sacchetti, R. Samperi, A. Laganà, Rapid-resolution liquid chromatography/mass spectrometry for determination and quantitation of polyphenols in grape berries, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 3089–3099.
- [30] W. Pongsuwan, T. Bamba, K. Harada, T. Yonetani, A. Kobayashi, E. Fukusaki, High-throughput technique for comprehensive analysis of Japanese green tea quality assessment using ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry (UPLC/TOF MS), *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 10705–10708.
- [31] N. Ortega, M.-P. Romero, A. Macià, J. Reguant, N. Anglès, J.-R. Morelló, M.-J. Motilva, Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples, *J. Food Compos. Anal.* 23 (2010) 298–305.

- [32] A. de Villiers, P. Venter, H. Pasch, Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids, *J. Chromatogr. A.* 1430 (2016) 16–78.
- [33] F. Ioannone, C.D. Di Mattia, M. De Gregorio, M. Sergi, M. Serafini, G. Sacchetti, Flavanols, proanthocyanidins and antioxidant activity changes during cocoa (*Theobroma cacao* L.) roasting as affected by temperature and time of processing, *Food Chem.* 174 (2015) 256–262.
- [34] K.A. Cooper, E. Campos-Giménez, D. Jiménez Alvarez, K. Nagy, J.L. Donovan, G. Williamson, Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2841–2847.
- [35] A.J. Steevensz, S.L. MacKinnon, R. Hankinson, C. Craft, S. Connan, D.B. Stengel, J.E. Melanson, Profiling phlorotannins in brown macroalgae by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry, *Phytochem. Anal.* 23 (2012) 547–553.
- [36] R.N. Xu, L. Fan, M.J. Rieser, T.A. El-Shourbagy, Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC–MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 342–355.
- [37] P. Arapitsas, P.J.R. Sjöberg, C. Turner, Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry, *Food Chem.* 109 (2008) 219–226.
- [38] M.E. Swartz, UPLC<sup>TM</sup>: an introduction and review, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28 (2005) 1253–1263.
- [39] M. Herrero, J.A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2495–2511.
- [40] C.C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussell, B.J. Keely, Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1103 (2006) 94–101.
- [41] J. Castro-Perez, R. Plumb, J.H. Granger, I. Beattie, K. Joncour, A. Wright, Increasing throughput and information content for in vitro drug metabolism experiments using ultra-performance liquid chromatography coupled to a quadrupole time-of-flight mass

- spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 843–848.
- [42] J. Sun, L. Lin, P. Chen, Study of the mass spectrometric behaviors of anthocyanins in negative ionization mode and its applications for characterization of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 1123–1133.
- [43] J.S. Barnes, H.P. Nguyen, S. Shen, K.A. Schug, General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4728–4735.
- [44] Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer, (n.d.).  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAEGAAPFADBMBXCX>  
(accessed January 15, 2017).
- [45] G.E. Adamson, S.A. Lazarus, A.E. Mitchell, R.L. Prior, G. Cao, P.H. Jacobs, B.G. Kremers, J.F. Hammerstone, R.B. Rucker, K.A. Ritter, HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4184–4188.
- [46] K.M. Kalili, A. de Villiers, Off-line comprehensive two-dimensional hydrophilic interaction× reversed phase liquid chromatographic analysis of green tea phenolics, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 853–863.
- [47] C. Counet, S. Collin, Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6816–6822.
- [48] C.L. Silva, N. Haesen, J.S. Câmara, A new and improved strategy combining a dispersive-solid phase extraction-based multiclass method with ultra high pressure liquid chromatography for analysis of low molecular weight polyphenols in vegetables, *J. Chromatogr. A.* 1260 (2012) 154–163.
- [49] S. Keunchkarian, M. Reta, L. Romero, C. Castells, Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions, *J. Chromatogr. A.* 1119 (2006) 20–28.
- [50] A. Kaufmann, S. Walker, Improved performance of multiplexed targeted tandem mass spectrometry scans using customized Q Orbitrap data acquisition, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30 (2016) 1131–1138.

- [51] J. Fu, M. Wang, H. Guo, Y. Tian, Z. Zhang, R. Song, Profiling of components of rhizoma et radix polygoni cuspidati by high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode-array detector and ion trap/time-of-flight mass spectrometric detection, *Pharmacogn. Mag.* 11 (2015) 486.
- [52] M.A. Patras, B.P. Milev, G. Vrancken, N. Kuhnert, Identification of novel cocoa flavonoids from raw fermented cocoa beans by HPLC–MS n, *Food Res. Int.* 63 (2014) 353–359.
- [53] L. Carrillo-Hormaza, A. Ramírez, E. Osorio, Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction and Rapid Resolution Analysis of Flavanols and Methylxanthines for the Quality Control of Cocoa-Derived Products, *Food Anal. Methods.* (2016). <http://link.springer.com/article/10.1007/s12161-016-0610-7> (accessed October 31, 2016).
- [54] M. del Mar Castro-López, J.M. López-Vilariño, M.V. González-Rodríguez, Analytical determination of flavonoids aimed to analysis of natural samples and active packaging applications, *Food Chem.* 150 (2014) 119–127.
- [55] V. Neveu, J. Perez-Jimenez, F. Vos, V. Crespy, L. du Chaffaut, L. Mennen, C. Knox, R. Eisner, J. Cruz, D. Wishart, Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods, *Database.* 2010 (2010) bap024.
- [56] K. Kondo, M. Kurihara, K. Fukuhara, T. Tanaka, T. Suzuki, N. Miyata, M. Toyoda, Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation, *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 485–488.
- [57] K.B. Miller, W.J. Hurst, N. Flannigan, B. Ou, C.Y. Lee, N. Smith, D.A. Stuart, Survey of commercially available chocolate-and cocoa-containing products in the United States. 2. Comparison of flavan-3-ol content with nonfat cocoa solids, total polyphenols, and percent cacao, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 9169–9180.
- [58] G. Borges, A. Degeneve, W. Mullen, A. Crozier, Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3901–3909. doi:10.1021/jf902263n.
- [59] H. Chen, Y. Zuo, Y. Deng, Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 913 (2001) 387–395. doi:10.1016/S0021-9673(00)01030-X.

- [60] C. Guo, F. Shi, S. Jiang, L. Gong, Y. Zhao, J. Zhang, S. Zeng, Simultaneous identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated antidiabetics in herbal medicines and dietary supplements using high-resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 967 (2014) 174–182.

## **PATEICĪBA**

Autors vēlas izteikt pateicību saviem kolēģiem, kas ir palīdzējuši un motivējuši šī darba tapšanas laikā:

- Ivetai Pugejevai
- Ingum Pērkonam
- Ingaram Reinholdam
- Vadimam Bartkevičam

Paldies ZI “BIOR” kolektīvam.

Maģistra darbs „Šķidruma hromatogrāfijas un masspektrometrijas metožu optimizācija antioksidantu noteikšanai” izstrādāts LU Ķīmijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs, Asoc. prof. Dr. chem. Vadims Bartkevičs:

\_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (datums)

Recenzents, Dr. chem. Antons Podjava: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: \_\_\_\_\_ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: \_\_\_\_\_ Vija Gutāne  
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

\_\_\_\_\_ protokols Nr. \_\_\_\_\_ (ieraksta sekretārs)  
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: \_\_\_\_\_  
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)