UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

Vývoj metody pro identifikaci alkaloidních látek v rostlinných extraktech čeledi Amaryllidaceae pomocí techniky UHPLC-MS/MS

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Lucie Nováková Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich CSc.

Hradec Králové 2012 Hana Plečková

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Hana Plečková

Školitel: Doc. PharmDr. Lucie Nováková Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj metody pro identifikaci alkaloidních látek v rostlinných extraktech čeledi Amaryllidaceae pomocí techniky UHPLC-MS/MS

Cílem této diplomové práce je vývoj metody pro identifikaci alkaloidních látek z čeledi Amaryllidaceae v rostlinných extraktech s použitím propojení dvou metod UHPLC a MS/MS. Kombinace metod UHPLC a MS/MS umožňuje pracovat s velmi malými částicemi (< 2 μm), čímž je dosaženo rychlé separace s vysokou účinností a zkrácení doby analýzy. MS se používá k určování hmotnosti atomů, molekul, fragmentů, a to po převedení na ionty.

Vývoj metody sloužil k výběru optimální stacionární a mobilní fáze, probíhal nejdříve na UHPLC s PDA detekcí. Byly testovány kolony: BEH PHENYL, BEH C18, BEH SHIELD RP18, HSS T3. Byly studovány možnosti separace a chování sledovaných látek při změnách pH (3 a 9), doby retence, průtokové rychlosti. Nejlepší výsledky z těchto kolon vykazovala kolona BEH SHIELD R18, za použití mobilní fáze methanolu a pufru pH 3, a dále průtokové rychlosti 0,4 ml/min. Později byla představena nová stacionární fáze CSH (charged surface hybrid, hybridní povrchově nabitá) na bázi mixed-mode sorbentů, která je zajímavou alternativou pro bazické látky, a proto byla také zařazena do studie.

K dispozici byl vzorek extraktu rostliny Zephyrantes a standardy alkaloidních látek (galanthamin, galanthin, haemanthamin, lycoramin, tazettin), které byly ve vzorku hledány na základě znalosti molekulových hmotností. U standardů a vzorku byla změřena MS spektra a fragmentace jednotlivých látek v závislosti na změně kolizní energie (15, 20, 30 V). Spektra vzorku pak byla porovnávána se spektry standardních látek. Přítomnost hledaných alkaloidů se potvrdila. Dalším úkolem bylo zjistit přítomnost dalších alkaloidních látek mimo známé standardy a pokusit se určit jejich totožnost.

Klíčová slova: UHPLC – MS/MS, galanthamin, galanthin, haemanthamin, lycoramin, tazettin, BEH stacionární fáze, CSH stacionární fáze.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Hana Plečková

Supervisor: Doc. PharmDr. Lucie Nováková Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Development of method for the identification of alkaloids in plant extracts from Amaryllidaceae using UHPLC-MS/MS.

The purpose of this thesis is the development of method for identification of alkaloids from the family Amaryllidaceae in plant extracts using coupling of two methods UHPLC and MS/MS. The combination of methods UHPLC and MS/MS enables to work with the very small particles (< 2 μm) thereby fast separation with high efficiency and reduction of analysis time is achieved. MS is used for determination of atomic weight, molecular weight after the ionization of neutral species.

The development of methods was first conducted on UHPLC with PDA detection which served for the choice of optimal stationary and mobile phase. The tested columns were following: BEH PHENYL, BEH C18, BEH SHIELD RP18, HSS T3. The possibilities of separation and the behavior of the monitored substances at different pH (3 and 9), retention time and flow rate were studied. The column BEH SHIELD RP18 provided the best results of these columns, using buffer pH 3 and methanol as an organic modifier, and then flow rate 0.4 ml/min. Afterwards the new stationary phase CSH (charged surface hybrid) based on mixed-mode sorbents was introduced which is the interesting alternative for basic substances so it was included in the study.

The sample of extract of plant Zephyrantes and the standards of alkaloids (galanthamine, galanthine, haemanthamine, lycoramine, tazettine) were available. They were searched in the sample based on the knowledge of their molecular weight. The MS spectra of the standards and the sample and the fragmentation of the individual substances depending on the amount of the collision energy (15, 20, 30 V) were measured. The spectra of the sample were compared with the spectra of the standard substances. The presence of the searched alkaloids was confirmed. The next task was to find the presence other alkaloids except for known standards and to try to determine their identity.

Keywords: UHPLC – MS/MS, galanthamine, galanthine, haemanthamine, lycoramine, tazettine, BEH stationary phases, CSH stationary phases.

Největší poděkování patří mé školitelce Doc. PharmDr. Lucii Novákové Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí pomoci a rad, výbornou spolupráci a za její čas během vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům Katedry analytické chemie za poskytnutí laboratoře, informací a vstřícné jednání. Děkuji své rodině a příteli, kteří mě po celou dobu podporovali a stáli při mně.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Brušperku dne 9.5. 2012

. . . . . .

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK **8**
1. ÚVOD **9**
2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE **10**
3. TEORETICKÁ ČÁST **11**
3.1 ALKALOIDY ČELEDI AMARYLLIDACEAE 11
3.1.1 Chemická struktura a rozdělení 11
3.1.2 Fyzikálně – chemické vlastnosti 11
3.1.3 Význam a funkce jednotlivých alkaloidů 15
3.1.4 Metody stanovení alkaloidů čeledi Amaryllidaceae 17
3.1.5 Přehled publikovaných metod pro stanovení alkaloidů 17
3.2 ULTRA VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE 20
3.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE 23
3.3.1 Iontový zdroj a způsoby ionizace 24
3.3.2 Způsoby separace iontů a analyzátory 26
3.3.3 Způsoby detekce iontů a detektory 28
3.4 SPOJENÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE 30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **31**
4.1 MATERIÁLY A POMŮCKY 31
4.1.1 Přístrojové vybavení 31
4.1.2 Chemikálie 32
4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ 33
4.2.1 Příprava zásobních roztoků 33
4.2.2 Příprava pracovních roztoků 33
4.2.3 Příprava mobilní fáze 33
4.2.4 Příprava roztoků pufrů pH 3 a pH 9 34
4.3 OPTIMALIZACE UHPLC-MS PODMÍNEK 35
5. VÝSLEDKY A DISKUZE **36**
5.1 VÝVOJ METODY NA UHPLC 36
5.2 TESTOVÁNÍ CSH KOLON 42
5.3 VÝVOJ METODY NA UHPLC-MS 44

5.4 MS SPEKTRA 45
5.5 FRAGMENTACE LÁTEK 63
5.5.1 Fragmentace m/z 288 63
5.5.2 Fragmentace m/z 290 68
5.5.3 Fragmentace m/z 302 70
5.5.4 Fragmentace m/z 318 72
5.5.5 Fragmentace m/z 332 75
6. ZÁVĚR 80
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 81
8. PŘÍLOHA 84
8.1.1 Fragmentace m/z 272 84
8.1.2 Fragmentace m/z 304 86
8.1.3 Fragmentace m/z 306 90
8.1.4 Fragmentace m/z 320 92
8.1.5 Fragmentace m/z 330 95
8.1.6 Fragmentace m/z 334 98

SEZNAM ZKRATEK

AB	hydrogenuhličitan amonný
ACN	acetonitril
AmAc	octan amonný
AmF	mravenčan amonný
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku; atmospheric pressure chemical ionisation
API	ionizace za atmosférického tlaku; atmospheric pressure ionisation
BEH	hybridní stacionární fáze; bridged ethyl hybrid
ESI	ionizace elektrosprejem; electrospray ionisation
GAL	galanthamin
GAN	galanthin
GC	plynová chromatografie; gas chromatography
HAE	haemanthamin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie; high performance liquid chromatography
LYC	lycoramin
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice; matrix assisted laser desorption ionisation
MeCN	methylkyanid
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie; mass spectrometry
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie; tandem mass spectrometry
NMR	nukleární magnetická rezonance; nuclear magnetic resonance
PDA	fotodiodové pole; photo diode array
SDS	dodecylsíran sodný
TAZ	tazettin
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie; ultra high performance liquid chromatography
UV	ultrafialové záření; ultraviolet
VIS	oblast viditelného záření; visual

1. ÚVOD

Metoda *ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie* (UHPLC) se používá k separaci látek nejrůznějších typů. Jedná se o nejmodernější typ technologie *vysokoúčinné kapalinové chromatografie* (HPLC). UHPLC metoda využívá svých předností k rychlé separaci zkoumaných látek s vysokou účinností. Její výsledky zaručuje práce s velmi malými částicemi (< 2 μm), při vysokých tlacích.

Metoda *hmotnostní spektrometrie* (MS) je velice citlivá moderní spektrální technologie, která se využívá ke stanovení relativní molekulové hmotnosti iontů, elementárního složení molekuly, atd. Principem je převod molekul ve vzorku na ionty a jejich následná separace podle hodnoty podílu hmotnosti (*m*) a náboje (*z*) *m/z*.

Propojení těchto dvou metod (UHPLC – MS/MS) nabízí využití výborných vlastností obou. Pro jejich spojení se nejčastěji používá elektrosprej (ESI) a ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Tato kombinace UHPLC-MS/MS vyniká vysokou selektivitou, citlivostí a vyšší rychlostí separace a analýzy.

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Tato diplomová práce je zaměřena na identifikaci alkaloidních látek v rostlinných extraktech čeledi Amaryllidaceae pomocí metod UHPLC – MS/MS.

Prvotním cílem byl vývoj metody a hledání vhodných chromatografických podmínek na UHPLC, při kterých by probíhala analýza co nejcitlivěji na MS/MS.

Nejdříve probíhal výběr stacionární fáze na UHPLC s PDA detekcí (fotodiodový detektor). Byly testovány kolony a jejich vlastnosti, a to v závislosti na změně pH, složení mobilní fáze a průtokové rychlosti, čímž bylo dosaženo optimalizace složení mobilní fáze a gradientu vzhledem k podmínkám MS detekce.

Následně probíhalo měření standardů i extraktu na UHPLC a MS/MS za použití kolony BEH RP18 SHIELD.

Během měření byly získány informace o stacionární fázi CSH C18, která se osvědčila při analýze bazických látek, proto další testování probíhalo také s touto kolonou.

Zjištěné optimalizované parametry byly aplikovány na standardy i vzorky. Byla změřena MS spektra a spektra fragmentace při různých kolizních energiích. Spektra vzorku byla porovnávána se spektry standardů. Po nalezení přítomnosti látek standardů, byla naměřena i spektra dalších alkaloidních látek, které se vyskytovaly ve vzorku.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ALKALOIDY ČELEDI AMARYLLIDACEAE

Rostliny čeledi Amaryllidaceae (amarylkovité) získaly svůj význam díky alkaloidům, které produkují. Některé alkaloidy mají antivirový, antitumorální, antimalarický účinek nebo jsou inhibitory enzymu acetylcholinesterázy a jsou používány k léčbě degenerativních onemocnění centrální nervové soustavy [1].

3.1.1 Chemická struktura a rozdělení

Alkaloidy se vyznačují přítomností dusíku, který je obvykle vázán v molekule heterocyklu. Chemická struktura není pro alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jednotná. Na základě jejich struktury je možné je rozdělit do jednotlivých strukturních typů [1][2], které jsou uvedeny v tabulce 1.

Základem chemické struktury typu Galanthamin je benzazepin (obrázek 1). U typu Lycorin a Haemanthamin je základ struktury tvořen fenantridinem (obrázek 2) a (obrázek 3). Základním skeletem typu Homolycorin a Tazettin je indol (obrázek 4) a (obrázek 5), [1][2].

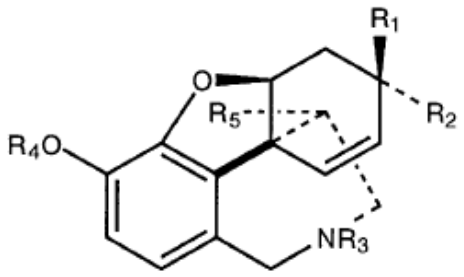
3.1.2 Fyzikálně – chemické vlastnosti

Alkaloidy jsou přírodní bazické organické sloučeniny, které vznikají biogenetickou přeměnou z aminokyselin, v případě čeledi Amaryllidaceae je to z fenylalaninu. Převážně to bývají pevné bezbarvé látky. Špatně se rozpouštějí ve vodě, lépe v méně polárních a nepolárních rozpouštědlech. Jsou dobře rozpustné ve zředěných roztocích minerálních kyselin. Reakcí vzniká kvartérní sůl, která je rozpustná ve vodě a nerozpustná v polárních rozpouštědlech. Jejich triviální názvy vznikají na základě názvu místa, kde byly objeveny, např. podle rostliny ze které byly izolovány poprvé [3][4].

V tabulce 1 jsou uvedeny jednotlivé alkaloidy a jejich hodnoty molekulové hmotnosti, sumární vzorce, hodnoty lipofility (log P) a hodnoty pKa.

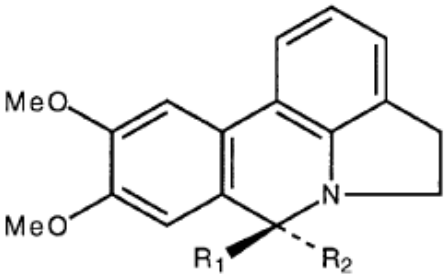
látka	strukturní typ	molekulová hmotnost	sumární vzorec	log P	pKa (kyselá funkční skupina)	pKa (zásaditá funkční skupina)
Sanguinin	Galanthamin	273,33	$C_{16}H_{19}NO_3$	-0,575±0,498	9,39±0,40	8,02±0,40
Galanthamin		287,35	$C_{17}H_{21}NO_3$	-0,054±0,517	13,93±0,20	7,92±0,40
11-hydroxygalanthamin		303,35	$C_{17}H_{21}NO_4$	-0,895±0,550	13,81±0,40	7,06±0,60
Epinorgalanthamin		273,33	$C_{16}H_{19}NO_3$	0,150±0,595	13,91±0,20	8,78±0,40
Epinorlycoramin		275,34	$C_{16}H_{21}NO_3$	0,048±0,577	14,77±0,20	8,91±0,40
Lycoramin		289,37	$C_{17}H_{23}NO_3$	0,407±0,498	14,77±0,20	8,02±0,40
Oxoassoanin	Lycorin	281,31	$C_{17}H_{15}NO_3$	1,542±0,726		-1,63±0,20
Assoanin		267,32	$C_{17}H_{17}NO_2$	1,675±0,735		5,19±0,20
Pseudolycorin		289,33	$C_{16}H_{19}NO_4$	-0,619±0,464	9,74±0,60	6,44±0,60
Lycorin		287,31	$C_{16}H_{17}NO_4$	1,955±0,656	13,55±0,40	6,34±0,60
2-O-acetylpseudolycorin		331,36	$C_{18}H_{21}NO_5$	0,131±0,457	9,71±0,60	6,11±0,60
Galanthin		317,38	$C_{18}H_{23}NO_4$	0,845±0,479	13,57±0,40	6,20±0,60
Papyramin	Haemanthamin	317,38	$C_{18}H_{23}NO_4$	-0,766±0,545	12,81±0,40	5,70±0,60
Haemathamin		301,34	$C_{17}H_{19}NO_4$	1,828±0,713	14,24±0,40	6,06±0,60
Crinamin		301,34	$C_{17}H_{19}NO_4$	1,828±0,713	14,24±0,40	6,06±0,60
Haemanthidin		317,34	$C_{17}H_{19}NO_5$	1,039±0,805	12,57±0,60	4,50±0,70
Hippeastrin	Homolycorin	315,32	$C_{17}H_{17}NO_5$	2,229±1,007	13,02±0,20	7,84±0,40
8-O-demethylhomolycorin		301,34	$C_{17}H_{19}NO_4$	2,889±0,582	9,27±0,20	8,31±0,20
9-O-demethyl-2α-hydroxyhomolycorin		317,34	$C_{17}H_{19}NO_5$	1,987±0,673	8,17±0,40	7,87±0.40
Dubiusin		445,46	$C_{23}H_{27}NO_8$	2,692±0,687	14,27±0,20	7,53±0,40
O-methyllycorenin		331,41	$C_{19}H_{25}NO_4$	2,148±0,566		8,18±0,40
Tazettin	Tazettin	331,36	$C_{18}H_{21}NO_5$	1,650±0,822	11,89±0,40	7,05±0,60
Pretazettin		331,36	$C_{18}H_{21}NO_5$	1,349±0,853	11,91±0,40	7,75±0,60

Tabulka 1: alkaloidní látky čeledi Amaryllidaceae, strukturní typy a přehled jejich fyzikálně-chemických vlastností

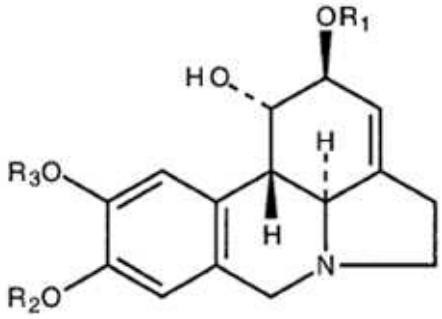


	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Sanguinin	OH	H	CH_3	H	H
Galanthamin:	OH	H	CH_3	CH	H
11-Hydroxygalanthamin	OH	H	CH_3	H	OH
Epinorgalanthamin	H	OH	H	CH_3	H
Lycoramin	OH	H	CH_3	CH_3	H
Epinorlycoramin	H	OH	H	CH_3	H

Obrázek 1: struktura alkaloidů typu Galanthamin

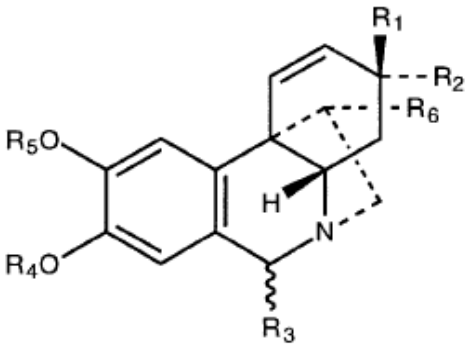


	R_1	R_2
Assoanin	H	H
Oxoassoanin	O	O



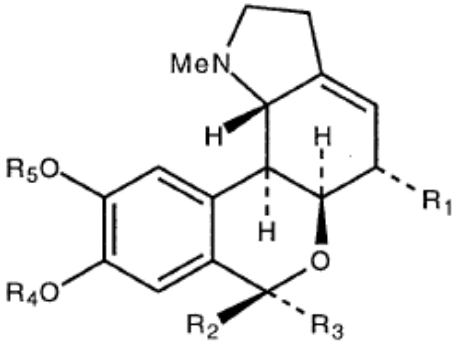
	R_1	R_2	R_3
Lycorin	H	CH_2	CH_2
Pseudolycorin	H	CH_3	H
2-*O*-Acetylpseudolycorin	CH_2CH_3	CH_3	H
Galanthin	CH_3	CH_3	CH_3

Obrázek 2: struktury alkaloidů typu Lycorin



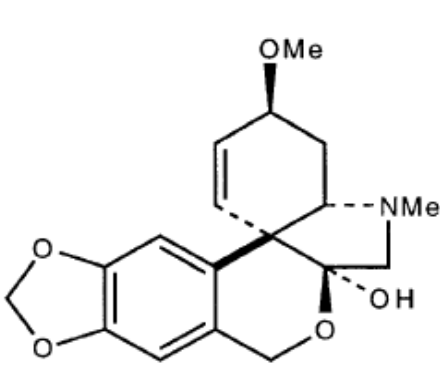
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
Haemanthamin	OCH_3	H	H	CH_2	CH_2	OH
Crinamin	H	OCH_3	H	CH_2	CH_2	OH
Papyramin	OCH_3	H	OH	CH_3	CH_3	H
Haemanthidin	OCH_3	H	OH	CH_2	CH_2	OH

Obrázek 3: struktura alkaloidů typu Haemanthamin

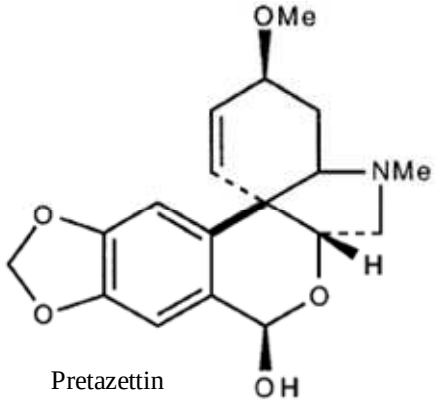


	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
8-*O*-demethylhomolycorin	H	O	O	H	CH_3
9-*O*-demethyl-2α-hydroxyhomolycorin	OH	O	O	CH_3	H
Dubiusin	OCH_2CH_3	O	O	CH_3	$OOC\text{-}CH_2\text{-}CHOH\text{-}CH_3$
Hippeastrin	OH	O	O	CH_2	CH_2
O-methyllycorenin	H	H	OCH_3	CH_3	CH_3

Obrázek 4: struktura alkaloidů typu Homolycorin



Tazettin



Pretazettin

Obrázek 5: struktury alkaloidů typu Tazettin

3.1.3 Význam a funkce jednotlivých alkaloidů

Galanthamin

Chemický název:

(4aS,6R,8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-6H-benzofuro [3a,3,2-ef] [2]benzazepin-6-ol

Nejznámějším zástupcem čeledi Amaryllidaceae je galanthamin, který byl poprvé izolován z cibule sněženky *Galanthus woronovi*. Galanthamin je znám jako přírodní inhibitor enzymu acetylcholinesterázy a standard acetylcholinesterázové inhibiční aktivity. Je používán při léčbě myasthenia gravis a paralytické poliomyelitidy. Dokáže antagonizovat neuromuskulární blokádu navozenou pachykurarovými látkami a dechový útlum způsobený opioidy (morfin, pethidin). Také je antagonista hyoscinu, který navozuje centrální anticholinergní syndrom a antagonista účinků droperidolu a diazepamu. Jeho nejrozšířenější indikací je terapie Alzheimerovy choroby a degenerativních onemocnění centrální nervové soustavy. Jeho výhodou je možnost alostericky modulovat nikotinové receptory a tím zvýšit produkci acetylcholinu [1][2] [4][5][6][7][8 [9][10]. Jeho chemická struktura je uvedena na obrázku 1.

Galanthin

Chemický název:

(1S,2S,11bS,11cS)-2,4,5,7,11b,11c-hexahydro-2,9,10-trimethoxy-1H-pyrrolo [3,2,1-de]phenanthridin-1-ol

Tento alkaloid se vyskytuje u rostlin čeledi Amaryllidaceae v menším rozsahu než galanthamin. Nebyla nalezena data dokazující inhibici acetylcholinesterázové aktivity. Spolu s oxomaritinem mají mírný účinek proti Trypanosoma brucei rhodesiense [8]. Jeho chemická struktura je uvedena na obrázku 2.

Haemanthamin

Chemický název:

(3S,4aS,5S,11bS,12S)-4,4a-dihydro-3-methoxy-3H,6H-5,11b-ethano[1,3]dioxolo [4,5-j]phenanthridin-12-ol

Haemanthamin má antineoplastický a cytotoxický účinek. Alkaloid a jeho analoga selektivně inhibují syntézu deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Ve vysokých koncentracích látky je potlačena syntéza ribonukleové kyseliny (RNA) a proteinů

[11][12][13]. Mimo jiné má antioxidační a antikonvulzivní účinek [14][15]. Slouží k přerušení tonicko - klonických a parciálních záchvatů a křečí. Protizánětlivé, antimikrobní, antihypertenzní [16], antimalarické [17][18], antiretrovirové [19] účinky jsou stále zkoumány a sledovány [9][10]. Chemická struktura je uvedena na obrázku 3.

Lycoramin

Chemický název:

(4aS,6S,8aR)-4a,5,7,8,9,10,11,12-octahydro-3-methoxy-11-methyl-6H-Benzofuro[3a,3,2-ef] [2]benzazepin-6-ol

Lycoramin je dihydrogalanthamin. Byly u něj také zkoušeny vlastnosti typu inhibice acetylcholinesterázy, ale účinky se projevily jako slabší. Terapeutický index obou alkaloidů je velmi podobný [20][21]. Jeho deriváty jsou zkoumány, protože se ukázal vliv na stimulaci svalů a působily jako antagonisté *d*-tubokurarinové blokády [22]. Je nadále studován jeho účinek na terapii Alzheimerovy choroby [23]. Chemická struktura je uvedena na obrázku 1.

Tazettin

Chemický název:

(3S,4aS,6aS,13bS)-4,4a,5,6-tetrahydro-3-methoxy-5-methyl-8H-[1,3]dioxolo[6,7] [2]benzopyrano[3,4-c]indol-6a(3H)-ol

U tohoto alkaloidu je studován antimalarický účinek proti *Plasmodium falciparum* [18]. Dále jsou sledovány jeho protinádorové, antiproliferativní a cytotoxické účinky [23][24][16]. Cytostatický mechanismus se projevuje dvěma způsoby – apoptózou a nekrózou. U izomeru tazettinu, alkaloidu pretazettinu a antibiotika streptonigrinu byl zkoumán terapeutický vliv na léčbu leukémie. Samotný tazettin nedosáhl významných výsledků v této oblasti [25]. Chemická struktura je uvedena na obrázku 5.

3.1.4 Metody stanovení alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Alkaloidy se stanovují různými metodami po izolaci z rostlin čeledi Amaryllidaceae. Mezi ně patří např. *Narcissus pseudonarcissus* (Narcis žlutý), *Crinum delagoense* (Křín), *Crinum powellii* (Křín Powellův), *Lycoris radiata* (Higanbana, pavoučí lilie), *Zephyrantes carinata* (Zefyrantes velkokvětý), *Leucojum aestivum* (Bledule letní) [1][26][27][28].

Obrázek 6: rostlina rodu Zephyrantes

Stanovují se pomocí chromatografických metod, nejčastěji pomocí HPLC s UV detekcí, dále také pomocí spojení metod GC-MS nebo LC-MS. Mezi další techniky patří NMR [29] a UV spektrometrie [30].

3.1.5 Přehled publikovaných metod pro stanovení alkaloidů

V tabulce číslo 2 a v tabulce číslo 3 jsou uvedeny přehledy publikovaných metod pro stanovení alkaloidů čeledi Amaryllidaceae zaměřené na metody HPLC, GC-MS a LC-MS. Jako stacionární fáze je nejčastěji používána kolona C18 u HPLC a HP-5MS v GC analýze. Mobilní fáze u LC-MS se značně liší, často se jedná o methanol nebo acetonitril, oba dva také v kombinaci s dalšími látkami. V případě GC-MS převažuje jako mobilní fáze helium.

látka	**zdroj**	**stacionární fáze**	**mobilní fáze**	**průtok [ml/min]**	**nástřik [µl]**	**detekce**	**metoda**	**citace**
GAL HAE TAZ LYC	Narcissus pseudonarcissus	C18 (20 mm x 3,9 mm, 5 µm)	voda-ACN , SDS (7 mM), Na_3PO_4 (25 mM), AmAc (1 mM)	1	5	UV (214nm)	HPLC	[1]
GAL LYC HAE	Narcissus pseudonarcissus	Silica DB-1 DB-5 (30 m x 0,32 mm)	N_2	0,8		MS	GC-MS	[31]
GAL	Leucojum aestivum	HP-5 MS (GC-MS) (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) RP-C18 (HPLC) (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	helium (GC-MS) ACN, MeOH, voda (HPLC)	0,8 (GC-MS) 1 (HPLC)	20	MS (GC-MS) Fluorescence (HPLC)	GC-MS HPLC	[26]
GAL	Galanthus woronowii	HS F5 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	ACN, AmAc	1	4	UV MS	LC-MS	[32]
GAL HAE LYC TAZ	Narcissus pseudonarcissus, Narcissus jonquilla	Rtx -5 MS (GC-MS) (30 m x 0,25 mm,0,25 µm) C18 (LC-MS) (100 mm x 2 mm, 3,5 µm)	N_2 (GC-MS) AmAc (0,01 M), ACN (LC-MS)	0,8 (GC-MS) 0,2 (LC-MS)	20	MS (GC-MS) UV (280nm) LC-MS	GC-MS LC-MS	[33]
GAL	Narcissus jonquilla, Crinum moorei, Galanthus nivalis, Scadoxus puniceus	HILIC silica (150 mm x 2.1 mm, 3,5µm)	MeCN, voda, AmF (10 mM)	0,2	0,4	MS	LC-MS	[34]
GAL	Leucojum aestivum	AT-1 (GC-MS) (25 m x 0,32 mm, 0,3 µm) C18 (LC-MS) (150 mm x 3 µm, 100 µm)	helium (GC-MS) AB (10 mM), MeOH (LC-MS)	0,8 (GC-MS) 0,04 (LC-MS)	1	MS (GC-MS) UV (280nm) (LC-MS)	GC-MS LC-MS	[35]

Tabulka 2: publikované metody stanovení alkaloidů čeledi Amaryllidaceae pomocí techniky HPLC, GC-MS nebo LC-MS
(AB – hydrogenuhličitan amonný, ACN – acetonitril, AmF - mravenčan amonný, AmAc – octan amonný, MeCN – methylkyanid , MeOH – methanol, SDS – dodecylsíran sodný, Na_3PO_4 – fosforečnan sodný, N_2 - dusík)

látka	**zdroj**	**stacionární fáze**	**mobilní fáze**	**průtok [ml/min]**	**nástřik [µl]**	**detekce**	**metoda**	**citace**
GAL LYC	Zephyrantes concolor Leucojum aestivum	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	helium	0,8		MS	GC-MS	[27]
GAL	Narcissus Bridal Crown	C18 (1,0 mm x 50 mm, 3 µm)	AB (10 mM), MeOH	0,02	2	MS	LC-MS	[36]
GAL	Leucojum aestivum	C18 (150 mm x 1 mm, 3 µm) (LC-MS) SLB 5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) (GC-MS)	AB (10 mM), MeOH, ACN (LC-MS) helium (GC-MS)	0,04 (LC-MS) 0,8 (GC-MS)	1	MS	LC-MS GC-MS	[28]
GAL	Narcissus Sir Winston Churchil	C18 (300 mm x 7,8 mm, 10 µm)	AmAc (0,01 M), MeOH, voda	4,5	1	UV MS	LC-MS	[37]
GAL GAN HAE LYC TAZ	Zephyrantes grandiflora	ADB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	helium	1		MS	GC-MS	[8]
GAL	Leucojum aestivum	HP-5 MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	helium	0,8		MS	GC-MS	[38]

Tabulka 3: publikované metody stanovení alkaloidů čeledi Amaryllidaceae pomocí techniky GC-MS nebo LC-MS
(AB – hydrogenuhličitan amonný, ACN – acetonitril, AmAc – octan amonný, MeOH – methanol)

(GAL – galanthamin, GAN – galanthin, HAE – haemanthamin, LYC – lycoramin, TAZ – tazettin)

3.2 ULTRA VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda spadající do oblasti kapalinové chromatografie. Tato metoda od sebe odděluje složky obsažené ve zkoumaném vzorku. Základem jsou dvě vzájemně nemísitelné fáze, stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá). Při analýze se složky vzorku rozdělují mezi stacionární a mobilní fází podle afinity ke každé z nich [39][40][41].

Oproti klasické technice HPLC má UHPLC řadu výhodných vlastností jako je vyšší separační účinnost, kratší doba analýzy, nižší spotřeba rozpouštědel, vyšší citlivost.

Velikost částic je důležitým parametrem pro chromatografické metody. Pro UHPLC je to rozměr <2 μm, což ovlivňuje zvýšení zpětného tlaku, zvýšení separační účinnosti a zvýšení rozlišení [40][41][42].

UHPLC chromatograf je analytický přístroj, který se skládá z čerpadla, dávkovacího zařízení (dávkování vzorku), UHPLC kolon (stacionární fáze), detektoru, softwaru, příslušenství, obdobně jako v HPLC.

Používá se pístové či membránové čerpadlo. Jeho funkcí je čerpání mobilní fáze do kolony. Čerpadla jsou vyráběna z nerezové oceli nebo keramiky, plastické hmoty. Tento materiál nesmí reagovat s mobilní fází a nesmí ji znehodnotit uvolňováním látek.

Dávkovací zařízení slouží k nástřiku vzorku injekční stříkačkou přímo na vrstvu sorbentu v koloně. Tato zařízení jsou buď manuální nebo automatická. Vyrábějí se opět z inertního materiálu, jako je nerezová ocel nebo titan [39][40].

Uvnitř kolon se nacházejí sorbenty. Sorbenty slouží k absorbci kapalin a mají velký vnitřní povrch. Rozdělují se podle nosiče, který obsahují. Nosič bývá anorganický, organický či hybridní. Anorganický nosič je nejčastěji silikagel, který je mechanicky odolný a vysoce separačně účinný. Organický nosič je polymer či uhlík. Je chemicky stabilní [39][40].

V chromatografii na reverzních fázích je retence ionizovaného analytu ovlivněna iontovými vlastnostmi povrchových silanolů. Kladně nabité analyty interagují s negativně nabitými povrchovými silanoly přes mechanismus iontové výměny, který tím zvyšuje retenci. Naopak negativně nabité analyty podléhají vyloučení iontů. Je tedy

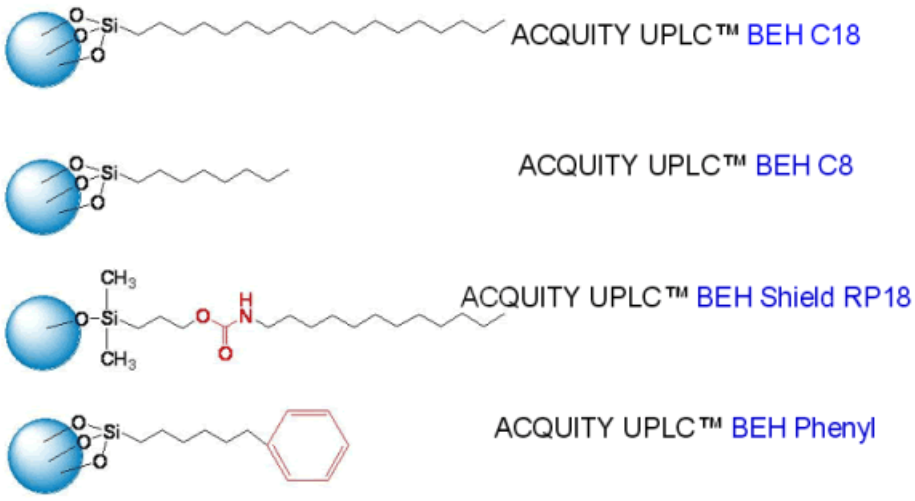
důležité mechanismus iontové výměny silanolových skupin potlačit. Lze toho dosáhnout pomocí snížení pH mobilní fáze, čímž se redukuje ionizace silanolových skupin. Další možností je přidání terciárních aminů, které se přednostně vážou na silanolové skupiny, dále také zvýšením iontové síly mobilní fáze, přidáním dalších retenčních kationů nebo použitím kolony s nízkou silanolovou aktivitou [43].

Spojením těchto dvou typů sorbentů vznikla v roce 2000 technologie Hybrid (Silicon-Carbon) Particle Technology, která využila výhodných vlastností silikagelu a polymeru. Tyto kolony jsou mechanicky odolné, vysoce účinné a jsou schopny pracovat v širším rozsahu pH.

Druhá generace hybridní technologie se nazývá BEH (bridged ethyl hybrid, hybridní stacionární fáze), která zvyšuje mechanickou odolnost přemostěním ethylové skupiny uvnitř matrice silikagelu [40][41].

S cílem potlačit mechanismus iontové výměny silanolových skupin vznikly právě BEH stacionární fáze vyrobeny technologií hybridních částic [43].

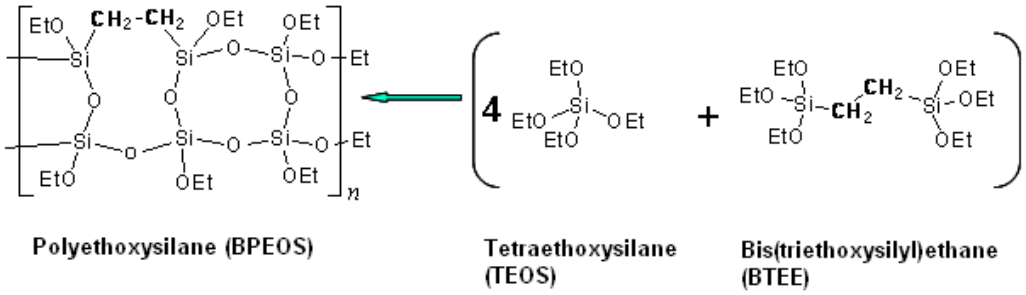
Kolony C8 a C18 (kolony s přímým alkylovým řetězcem), SHIELD RP18 (kolona s vloženou polární skupinou) a PHENYL (fenylová skupina navázána na silylovou funkční skupinu s C6 alkylem) pokryly většinu reverzně fázových separací. Tyto kolony se odlišují svou chemickou interakcí s analytem, hydrolytickou stabilitou a hydrofobicitou [40][41][42].



Obrázek 7: stacionární fáze typu BEH [44].

Částice BEH jsou syntetizovány při kondenzaci 1,2-bis(triethoxysilyl)ethanu s tetraethoxysilanem. Tyto částice zajišťují dostatečnou mechanickou pevnost. Úzká distribuce velikosti částic usnadňuje plnění částic do kolon s vysokou účinností.

Organicko-anorganický hybrid s ethylsiloxanovými můstky, které jsou jak na povrchu, tak po celém obsahu materiálu, dosahuje širšího rozsahu chemické stability, zejména škály pH (1-12), a zároveň minimalizuje interakce matrice s analytem [42].



Obrázek 8: syntéza BEH částic [45].

Od roku 2004 se rozsah použití UHPLC stacionárních fází rozšířil, a to pro aplikace na normálních fázích, iontově výměnných fázích a HILIC.

Přes všechna vylepšení v technologii kolon, stále mohlo docházet za určitých experimentálních podmínek k deformacím píků. Příznivějších výsledků dosáhla technologie „mixed-mode“. Tyto stacionární fáze obsahují reverzní fáze a zároveň silnou ion- výměnnou skupinu a/nebo slabou ion-výměnnou skupinu. Vložené iontové skupiny chrání skupiny silanolové [43].

Nové UHPLC „mixed-mode“ stacionární fáze založené na hybridním materiálu byly představeny v roce 2010 jako nová skupina CSH (charged surface hybrid) analytické kolony. CSH částice jsou třetí generací hybridní technologie částic firmy Waters. Vycházejí původně z BEH technologie. CSH částice obsahují nízký povrchový náboj, což zlepšuje symetrii píku v mobilních fázích o slabé iontové síle, přesto si dokáže udržet chemickou a mechanickou odolnost. Technologie CSH má řadu výhod jako je výborný tvar píku u bazických sloučenin, rychlá ekvilibrace kolon při změně pH mobilní fáze nebo vyšší stabilita při nízkém i vysokém pH [43][46].

3.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která slouží k separaci iontů podle hodnoty podílu jejich hmotnosti (*m*) a náboje (*z*) *m/z*. Je to technika velice rychlá, citlivá, specifická a s velmi malou spotřebou vzorku, používaná ke kvalitativní i kvantitativní analýze.

Základní procesy této destrukční metody jsou:

- převod vzorku do plynné fáze
- ionizace
- analýza – separace
- detekce iontů
- zpracování dat

Tyto procesy probíhají za nízkých tlaků, ve vakuu (10^{-4} – 10^{-8} Pa), což zabraňuje vzájemným kolizím v plynné fázi.

Při ionizaci dochází k reakcím:

$M \rightarrow M^+ + e^-$ ionizace molekuly, vznik iontu

$M^+ \rightarrow A^+ + m^0$ rozpad iontu na fragment a elektroneutrální částici

[39][47][48][49]

Možnosti použití hmotnostní spektrometrie

1. určení fyzikálně – chemických vlastností molekul

Metoda může pomoci k určení kritických potenciálů, např. ionizační energie molekuly $IE(M^+)$ a fragmentačního potenciálu $AE(F^+)$. Lze s ní stanovit reaktivitu iontů a termochemické veličiny.

2. kvantitativní chemická analýza

Použití metody slouží ke stanovení molekulové hmotnosti, k uskutečnění zřeďovací a stopové analýzy.

3. identifikace látek a určení struktury

Základem je spolupráce s jinými metodami (NMR, IR,..), přičemž úkolem hmotnostní spektrometrie je určení relativní molekulové hmotnosti. Pro identifikaci jsou důležité studie a znalosti rozpadu a štěpení iontů, fragmentace molekuly. Dochází pak ke srovnávání chování a vlastností molekuly s modelovou molekulou [39][47].

Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr je přístroj, který slouží k přípravě, analýze a detekci iontů. Jeho základní součásti jsou: vstupní systém, iontový zdroj, iontová optika, analyzátor, detektor, vakuový systém, výkonová elektronika a řídící elektronika [39][47].

3.3.1 Iontový zdroj a způsoby ionizace

Iontový zdroj je zařízení připravující ionty. Ionizace závisí na typu zkoumané látky. Ionizační techniky se dělí podle množství dodané energie na měkké a tvrdé. U měkkých technik je přebytek energie malý a možnost fragmentace je nižší. U tvrdých technik je přebytek energie natolik vysoký, aby došlo k rozsáhlejší fragmentaci.
Předností měkkých ionizačních technik je určení molekulové hmotnosti pro látky, které neuvolní molekulární ion při ionizaci EI. Při ionizaci EI vzniká ion s lichým počtem elektronů $M^{+\bullet}$.U měkkých ionizačních technik molekulární ion vzniká protonací neboli kationizací molekuly a vznikají ionty se sudým počtem elektronů. Při měření kladných iontů vzniká protonovaná molekula $[M+H]^+$, adukty se sodným iontem $[M+Na]^+$, draselným $[M+K]^+$, amonným $[M+NH_4]^+$. Při měření záporných iontů vzniká deprotonizací molekulární ion $[M-H]^-$. Výsledkem je možnost určení molekulové hmotnosti u látek velmi polárních, netěkavých i termolabilních [39][47][48][49][50].

a) Elektronová ionizace (EI)

Jedná se o základní typ ionizace. Zdrojem elektronů je rozžhavené kovové vlákno (z wolframu, platiny) zahřívané stejnosměrným proudem. Drát je katoda a elektrony se přibližují k anodě přes magnetické pole. V ionizační komůrce je nízký tlak (10^{-1} až 10^{-2} Pa), který zabraňuje srážkám iontů a neutrálních molekul. Dochází ke střetu analyzované látky a proudu elektronů. Energie elektronů narůstá a molekula je může zachytit za vzniku záporně nabitého iontu. S větší energií nastane fragmentace molekuly. Uznávaným optimem energie elektronů je 70 eV. Molekuly zůstávají v komůrce milisekundy, zatímco vzniklé ionty se pohybují rychleji v mikrosekundách. Doba kontaktu elektronu a molekuly je krátká (10^{-15} s). Množství iontů lze ovlivnit zvýšením intenzity ionizačního proudu nebo zvýšením tlaku, čímž se počet iontů zvýší. Elektronová ionizace patří mezi tvrdé ionizační techniky [47][48][50].

b) Chemická ionizace (CI)

Zdrojem ionizace je proud zrychlených elektronů. Dochází k ionizaci molekuly reakcí s ionty reakčního plynu. Typem reakčního plynu jde ovlivnit množství přenesené energie na molekulu a její fragmentaci. Čím větší je rozdíl v protonové afinitě reakčního plynu a zkoumané látky, tím víc dochází k přenosu energie na molekulu a tím je fragmentace rozsáhlejší. Mezi plyny s vysokou protonovou afinitou patří helium, vodík, methan, voda, amoniak. Chemická ionizace patří mezi měkké ionizační techniky.

c) Desorpce laserem (LD)

Laser se nachází z vnější strany iontového zdroje, fotony z laseru narážejí na molekuly vzorku. Lze analyzovat polární a netěkavé látky. Přidáním matrice vzniká MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation). Matrice může být glycerol, soli lithia a atd. Účinnost desorpce se tak zvýší. Laser je zdroj záření o vhodné vlnové délce a intenzitě (infračervená oblast a viditelná oblast). Tato technika se často používá v kombinaci s průletovým hmotnostním analyzátorem (TOF) a pro analýzu biomakromolekul [47][48][50].

d) Ionizace za atmosférického tlaku (API)

- Ionizace elektrosprejem (ESI)

Analyt se rozpustí v polárním rozpouštědle, je veden kapilárou, na kterou je vloženo napětí s hodnotou mezi 2000 V a 4000 V a vytváří tak elektrostatické pole. Kapičky aerosolu jsou nabité kladně nebo záporně podle polarity. Pomocí sušícího plynu dochází k odpařování rozpouštědla.

Existují dva mechanismy ionizace. První z nich se nazývá mechanismus stálého náboje. Kapičky se odpaří a jejich náboj zůstane nezměněn. Povrchové napětí kapiček nedokáže přemoci odpudivé síly náboje, proto se kapičky rozpadnou na mnohé kapičky ale menších rozměrů. Toto štěpení probíhá dokud kapičky neobsahují jediný ion. Když se rozpouštědlo odpaří z poslední kapičky, vytváří se iontová plynná fáze.

Druhý mechanismus se nazývá mechanismus iontového vypařování. Malé kapičky vznikají podobným způsobem jako v prvním mechanismu. Síla elektrického pole na povrchu kapky je vysoká natolik, že povrch kapek opustí a přejde přímo do plynné fáze, která je energeticky výhodnější.

Kapalina v ESI sondě se dostává do nábojové rovnováhy, tedy když rozpouštědla opouštějí ESI sondu, nesou čistý iontový náboj. Roztok získává náboj elektrochemickými reakcemi, při kterých dochází k pohybu elektronů na vodivé plochy, které mají funkci elektrod. V pozitivním modu jsou kladně nabité částice přitahovány elektrodou (oxidace). V negativním modu je tomu naopak.
Spektra kladně nebo záporně nabitých iontů se získají podle polarity nastaveného napětí. Látky s molekulovou hmotností do 1000 uvolní ionty $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$ a biopolymery s větším počtem protonů $[M+z.H]^{z+}$[50][51][52][53].

- Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Princip APCI je analogický principu konvenční chemické ionizace. Mobilní fáze je odpařena ve vyhřívané části kapiláry v iontovém zdroji. Nejdříve dochází k ionizaci molekul mobilní fáze v plynném stavu, které jsou v nadbytku. Ionizace probíhá díky koronárnímu výboji, který vzniká vkládáním vysokého napětí na výbojovou (jehlovou) elektrodu. Kapilárou proudí kapalina, kolem které nebulizuje proud plynu (dusík). Následuje ionizace molekul analytu pomocí ion-molekulárních reakcí reakčního plynu, což jsou ionizované molekuly mobilní fáze. Mobilní fáze funguje tedy jako prostředník předávající náboj analytu. Adukcí protonu vznikají kladné ionty $[M+H]^+$ a ztrátou protonu záporné ionty $[M-H]^-$. Dále mohou vznikat kationy ionty $[M]^{\cdot+}$ nebo aniony ionty $[M]^{\cdot-}$. Elektrody navádí vzniklé ionty do analyzátoru.
Tato ionizace je vhodná pro organické látky se střední polaritou [48][50][51][52][53].

3.3.2 Způsoby separace iontů a analyzátory

Analyzátor je zařízení schopné rozlišit ionty v plynné fázi na základě měření fyzikálních vlastností, filtrace iontů podle hodnoty *m/z*.

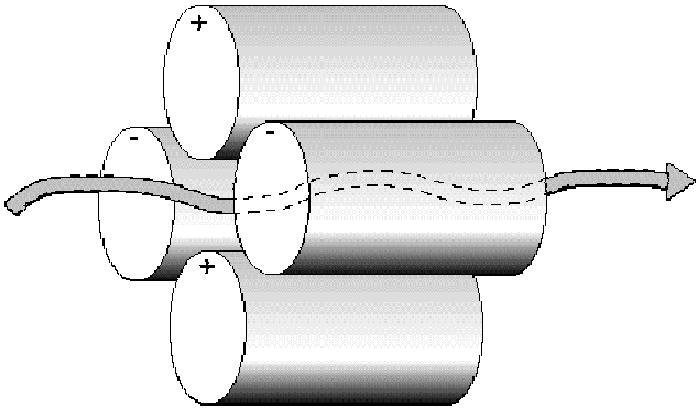
a) Magnetický hmotnostní analyzátor

Magnetický hmotnostní analyzátor je historicky nejstarší typ analyzátorů, ale prošel řadou technických vylepšení a dosáhl vysokého rozlišení, proto je stále používaný.
Je to elektromagnet a mezi jeho póly protékají ionty, které musí být urychleny elektrickým polem a v iontovém zdroji dosáhnou kinetické energie [39][47].

b) Elektrostatický hmotnostní analyzátor

Kvadrupólový analyzátor (Q – Quadrupole)

Kvadrupólový analyzátor je spojení stejnosměrného a radiofrekvenčního elektrického pole, které vytváří hmotnostní filtr pro ionty. Skládá se ze čtyř kovových paralelních tyčí hyperbolického tvaru a ty jsou připojeny ke zdroji radiofrekvenčního a stejnosměrného napětí. Ionty se pohybují uvnitř prostoru mezi tyčemi v radiofrekvenčním elektrickém poli a kmitají. Při určitém vhodném nastavení obou složek projdou kvadrupólem jen ionty o určité hodnotě *m/z*, ostatní projít nemohou. Zásahem do nastavení veličin lze zachytit postupně ionty o různých hodnotách *m/z* [39][47].



Obrázek 9: kvadrupólový analyzátor [54].

Iontová past (IT – Ion-Trap)

Mechanismus analýzy je podobný jako u kvadrupólu. Obsahuje tři elektrody, dvě kruhové elektrody (vstupní a výstupní elektroda) a jedna prstencová středová elektroda. Krajní dvě jsou uzemněny a na středovou je vkládáno vysokofrekvenční napětí. Ionty uvnitř prostoru se pohybují po kruhových drahách. Helium jim napomáhá ke shluknutí do iontového oblaku. Změnou nastavení veličin odcházejí ionty k detektoru [39][47].

c) Průletový analyzátor (TOF) (Time Of Flight)

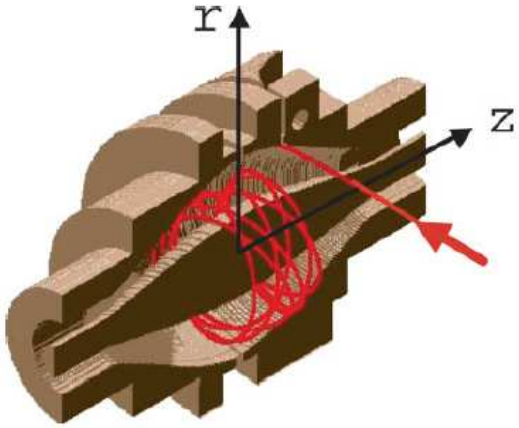
Jedná se o nejjednodušší a nejrychlejší typ analyzátoru. Ionty získají stejnou energii a pohybují se trubicí (1- 2 m) k detektoru a čas, za který tuto vzdálenost mezi iontovým zdrojem a detektorem urazí, se měří. Na detektor dorazí postupně ionty od nejlehčích po nejtěžších [39][47].

d) Iontová cyklotronová rezonance (s Fourierovou transformací) (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) (ICR)

U tohoto analyzátoru se ionty se pohybují po uzavřených kruhových drahách v magnetickém poli, jehož frekvence odpovídá jejich *m/z*. Zařízení vyžaduje vysoké vakuum, vykazuje vysokou citlivost a vysoké rozlišení při velké rychlosti pohybu hmotnostní stupnice. Lze jím analyzovat reakce plynných látek [39][47].

e) Orbitrap

Tento analyzátor se skládá z vnější a vnitřní elektrody. Vnější elektroda má tvar barelu a vnitřní hřídele a tvoří uvnitř elektrostatické pole. Ionty jsou uvnitř elektrostatického pole uvězněny mezi elektrodami díky přitažlivosti k elektrodám, která je vyvážena odstředivými silami. Orbitrap bývá nazýván jako elektrostatická past. Ionty cirkulují kolem centrální elektrody a pohybují se navíc podél osy této elektrody. Ionty vytváří proud a jejich frekvence o různé hodnotě m/z se stanovují díky Fourierově transformaci a jsou následně převedeny na hmotnostní spektrum [55][56].



Obrázek 10: Orbitrap [56].

3.3.3 Způsoby detekce iontů a detektory

Detektor je zařízení, které převádí proud iontů na proud elektronů. Rozdělují se do dvou skupin. První skupina se nazývá detektory pro přímá měření, kde elektronový proud vzniká přímým dopadem iontů. Druhá skupina jsou násobičové detektory, zde dochází k násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů.

a) Faraday cup (Faradayova klec)

Je zástupcem detektoru pro přímá měření. Základem je konverzní elektroda (dynoda) tvaru misky. Její povrch je tvořen z BeO nebo GaP. Elektrony se odrazí z povrchu dopadem iontů a dopadnou na anodu. Vzniká elektrický proud, který se zesiluje zesilovačem. Velikost této veličiny je úměrná počtu iontů a počtu nábojů na ion. Takto se nejčastěji měří silné iontové proudy a jejich velikost se pomalu mění.

b) Elektronový násobič

Jeho principem je sekundární emise elektronů za zesilování primárního signálu.

c) Fotonásobič

Dopadající ionty jsou přeměněny na fotony, které jsou zachyceny fotonásobičem [39][47][48][49].

HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM

Hmotnostní spektrum je závislost relativní intenzity iontového proudu na podílu *m/z*. Nejintenzivnější iontový proud má hodnotu relativní intenzity 100%.

Molekulový pík je pík, který odpovídá molekulové hmotnosti původní molekuly (nefragmentované) a poskytuje podrobnosti o molekulové hmotnosti analyzované látky. Základní pík je pík, který náleží fragmentu s nejvyšší relativní četností, jeho výška odpovídá relativní četnosti rovné jedné.

Hmotnostní spektrum zachycuje chemickou reaktivitu iontů v plynné fázi, jak mechanismy tak kinetiky reakcí. Dále zachycuje transportní a elektrochemické procesy v kondenzované fázi [39][47][48][49].

3.4 SPOJENÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Spojení dvou metod, separační a spektrální, je v dnešní době značně rozšířeno. Nabízí se tak možnost analýzy molekulových hmotností, struktur látek s vyššími molekulovými hmotnostmi nebo větší polaritou či menší tepelnou stabilitou než je u látek analyzovaných plynovou chromatografií (GS/MS). Výchozí metodou je separační technika, kdy se směs látek oddělí (GC, HPLC, elektroforéza). Následuje spektrální technika (MS, UV/VIS spektrometrie, IČ spektrometrie), která poskytne údaje o struktuře jednotlivých složek nebo je možné tyto složky identifikovat

Spojení metod GC/MS skloubilo separační účinnost a zjištěné strukturní poznatky, ale nemohly být analyzovány méně těkavé látky. Spojení HPLC-MS poskytlo řešení analýzy těchto látek, ale nevýhodou se stalo náročnější technické spojení. Mobilní fáze HPLC je kapalina. Do iontového zdroje hmotnostního spektrometru se dostává větší množství molekul než z plynné fáze. Rozdíl tlaků mezi HPLC a MS je značný, u hmotnostního spektrometru jde o vysoké vakuum a u chromatografu atmosférický tlak. Zásadním problémem byl nadbytek mobilní fáze, ale dnes běžně existují technická řešení. Mezi tato řešení patří ionizace v podobě klasické API techniky jako je ESI a APCI.

Iontové zdroje starších typů vyžadovaly práci s vysokým vakuem. Dnešní typy jsou schopny pracovat za atmosférického tlaku. Novější techniky ionizace se odlišují podle způsobu provedení dané ionizace. Jejich společnou vlastností je vysoká citlivost a řadí se mezi měkké ionizační techniky. Ve spektrech jsou vidět intenzivní píky molekulových iontů.

Při tomto spojení se nejčastěji používají analyzátory kvadrupólové a iontové pasti. Důvodem je nižší potřebné vakuum na rozdíl od magnetického analyzátoru. Magnetický analyzátor naopak nabízí vysokou přesnost určení hmotnosti iontů [50][52][57].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁLY A POMŮCKY

4.1.1 Přístrojové vybavení

- **UHPLC:** ACQUITY UPLC SYSTÉM, Waters, ČR
  Pumpa: ACQUITY - binary solvent manager, Waters, ČR
  Dávkovací jednotka: ACQUITY - sample manager, Waters, ČR
  Kolonový termostat: ACQUITY column manager, Waters, ČR
  Detektor: ACQUITY PDA detektor, Waters, ČR
  Program: Empower 2
- **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR:** QUATTRO MICRO
  Iontový zdroj: ESCI
  Hmotnostní analyzátor: trojitý kvadrupól
  Detektor: fotonásobič
  Program: MassLynx 4.1
- **Chromatografické kolony:**
  ACQUITY UPLC BEH PHENYL 1,7 μm, 2,1 x 50 mm, Waters, ČR
  ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μm, 2,1 x 50 mm, Waters, ČR
  ACQUITY UPLC BEH SHIELD RP 18 1,7 μm, 2,1 x 50 mm, Waters, ČR
  ACQUITY UPLC HSS T3 1,7 μm, 2,1 x 50 mm, Waters, ČR
  ACQUITY UPLC CSH C18 1,7 μm, 2,1 x 100 mm, Waters, ČR
  ACQUITY UPLC CSH PHENYL-HEXYL 1,7 μm, 2,1 x 100 mm, Waters, ČR
- **Laboratorní pH metr:** Hanna, FISHER SCIENTIFIC, ČR
- **Analytické váhy:** Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- **Automatické pipety se špičkami:** Biohit, FISHER SCIENTIFIC, ČR
- **Minitřepačka:** Ika Works, USA
- **Ultrazvuková vodní lázeň:** Sonorex Digitec, BANDELIN ELECTRONIC, Berlín
- **Vakuová pumpa a filtrační zařízení:** MEDIST s.r.o., Slovensko

4.1.2 Chemikálie

- **Kyselina mravenčí koncentrovaná –** 98%, FLUKA, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **Acetonitril R –** CHROMASOLV LC-MS, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **Methanol -** CHROMASOLV LC-MS, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **Galanthamin –** izolován na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie (kód AK 2)
- **Galanthin –** izolován na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie (kód AK 6)
- **Haemanthamin –** izolován na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie (kód AK 1)
- **Lycoramin –** izolován na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie (kód AK 4)
- **Tazettin –** izolován na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie (kód AK 5)
- **Vzorek (extrakt z rostliny Zephyrantes) –** získán na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie
- **Ultračistá voda -** Millipore

4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou bazické látky. Ve vodě jsou špatně rozpustné, ale rozpouští se dobře v méně polárních a nepolárních rozpouštědlech, např. v alkoholech (methanolu), chloroformu nebo etheru. Dále jsou rozpustné v některých organických rozpouštědlech bazického charakteru jako je anilin nebo pyridin.

Rozpouštění bylo urychleno pomocí minitřepačky, někdy pomocí ultrazvukové lázně. Koncentrace alkaloidů v zásobních roztocích byla u zkoumaných látek 10^{-3} g/ml. Jejich zásobní roztoky byly skladovány v lednici.

4.2.2 Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztok směsi látek standardů vznikal odebráním z pěti jednotlivých zásobních roztoků standardů po 100 μl a přidáním 500 μl ultračisté vody, čímž vznikla koncentrace 10^{-4} g/ml. Dále docházelo k ředění této směsi, a to odebráním 100 μl směsi a přidáním 900 μl ultračisté vody, čímž vznikla koncentrace 10^{-5} g/ml, nebo odebráním 10 μl směsi a přidáním 990 μl ultračisté vody, čímž vznikla koncentrace 10^{-6} g/ml.

Během analýzy byly připravovány pracovní roztoky jednotlivých alkaloidů o koncentraci 10^{-6} g/ml nebo 10^{-5} g/ml, a to způsobem ředěním z výchozí koncentrace 10^{-4} g/ml. Tento způsob je uveden v předchozím odstavci. Před každým měřením byly pracovní roztoky připravovány nově.

Pracovní roztok extraktu byl připravován ze zásobního roztoku extraktu, a to stejným způsobem jako standardy. Koncentrace pracovního roztoku extraktu byla 10^{-5} g/ml.

4.2.3 Příprava mobilní fáze

Roztok 0,1% kyseliny mravenčí byl připravován přidáním 200 μl kyseliny mravenčí do vody a doplněním vodou do 200 ml v odměrné baňce. Roztok byl připravován každý den ráno před měřením. Ultračistá voda byla připravována přefiltrováním také každé ráno čerstvá.

4.2.4 Příprava roztoků pufrů pH 3 a pH 9

Pufr pH 3 (200 mM) byl připraven navážením 2,52 g mravenčanu amonného a dále smísením se 180 ml vody a 5,0 ml kyseliny mravenčí a doplněním vodou v 200 ml odměrné baňce po značku.

Pufr pH 9 (200 mM) byl připraven navážením 3,08 g octanu amonného a dále smísením se 180 ml vody a 16,0 ml hydroxidu amonného a doplněním vodou v 200 ml odměrné baňce po značku.

Pro přípravu 10 mM roztoku pufru bylo třeba 200 mM roztoky naředit 20x vodou, tedy odebrat 25 ml 200 mM roztoku pufru a zbytek doplnit vodou po značku do 500 ml odměrné baňky.

4.3 OPTIMALIZACE UHPLC-MS PODMÍNEK

Cílem optimalizace UHPLC chromatografických podmínek byl výběr stacionární a mobilní fáze, průtokové rychlosti a gradientu mobilní fáze.

Jako stacionární fáze byly zkoušeny na UHPLC různé druhy kolon (BEH PHENYL, BEH C18, BEH SHIELD RP18, HSS T3, CSH C18). Na LC-MS byly dále testovány kolony (CSH C18 a CSH PHENYL-HEXYL).

Jako organické složky mobilní fáze byly použity methanol a acetonitril. Obě byly zkoušeny za použití pufru pH 3 a pH 9.

Při měření na LC-MS byly použity mobilní fáze 20% methanol a 0,1% kyselina mravenčí.

Během analýzy byly testovány průtokové rychlosti 0,6 ml/min, 0,5 ml/min, 0,4 ml/min a 0,3 ml/min. Po ověření byla zvolena a nastavena průtoková rychlost 0,4 ml/min, která pak byla zachována po celou dobu měření. Teplota na koloně byla 30°C a teplota vzorku byla 4°C. Objem nástřiku činil 5 µl.

Mezi MS parametry patří napětí vkládané na kapiláru, napětí na vstupním kuželu, iontová optika (RF Lens a extraktor), teplota zdroje, desolvační teplota, průtok dusíku a průtok dusíku na vstupním kuželu.

typ ionizace	ESI+
napětí na kapiláře	3,3 kV
napětí na vstupním kuželu	30 V
extraktor	4 V
RF lens	0,5 V
teplota ve zdroji	130°C
desolvační teplota	450°C
průtok dusíku	500 L/hod
průtok dusíku na vstupním kuželu	50 L/hod

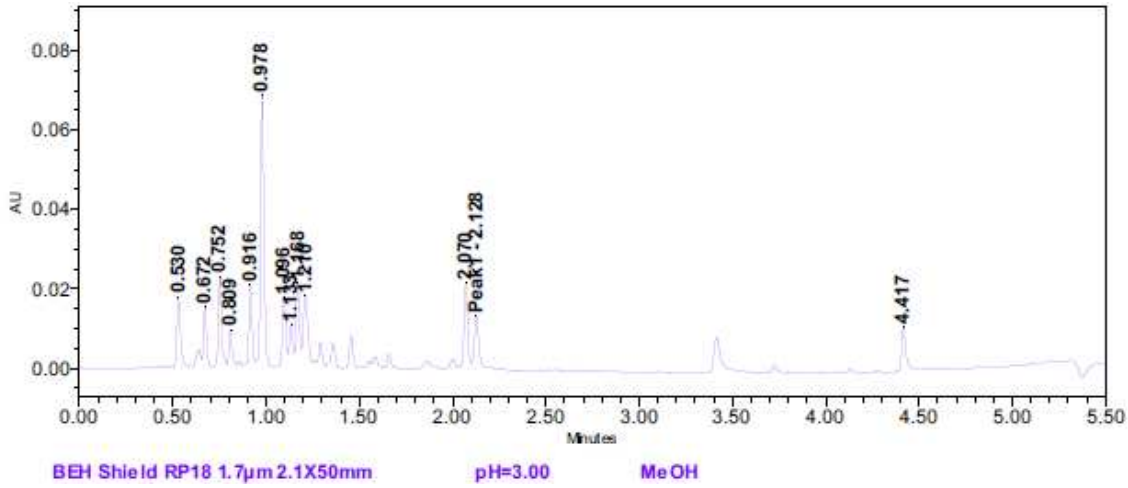
Tabulka 4: parametry MS

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 VÝVOJ METODY NA UHPLC

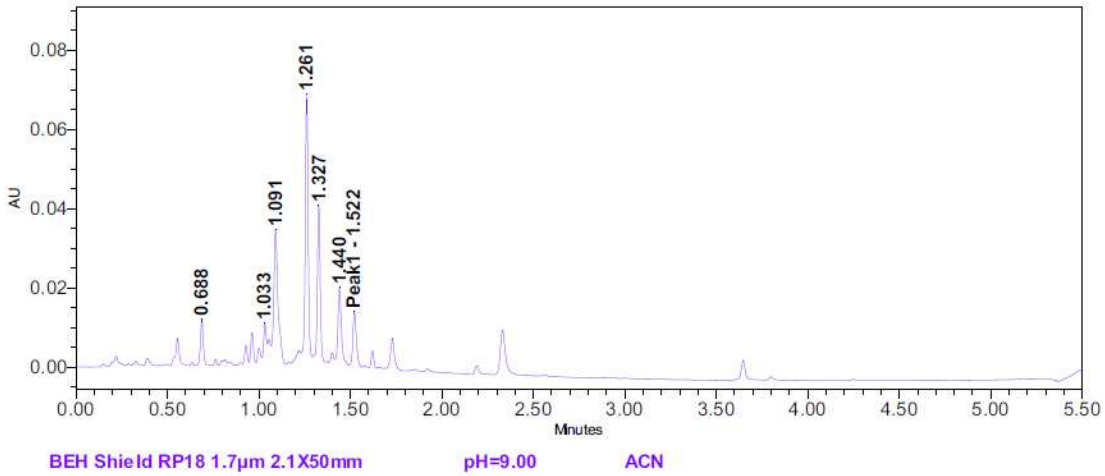
Účelem bylo vyzkoušet systematický přístup k vývoji metody pro složité vzorky typu rostlinných extraktů.

Prvním krokem měření bylo testování stacionární fáze za použití čtyř kolon (BEH PHENYL, BEH C18, BEH SHIELD RP18, HSS T3) na UHPLC. Jednotlivé stacionární fáze byly zkoušeny při separaci vzorku extraktu čeledi Amaryllidaceae za použití methanolu nebo acetonitrilu a při pH 3 nebo 9.

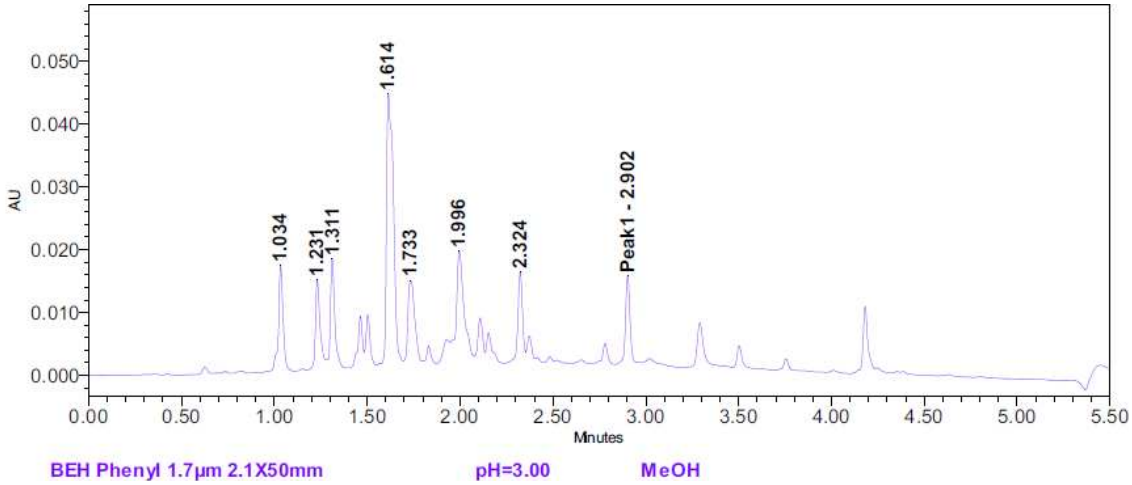


Obrázek 11: separace látek v rostlinném extraktu pomocí kolony BEH SHIELD RP18 při pH 3 za použití methanolu

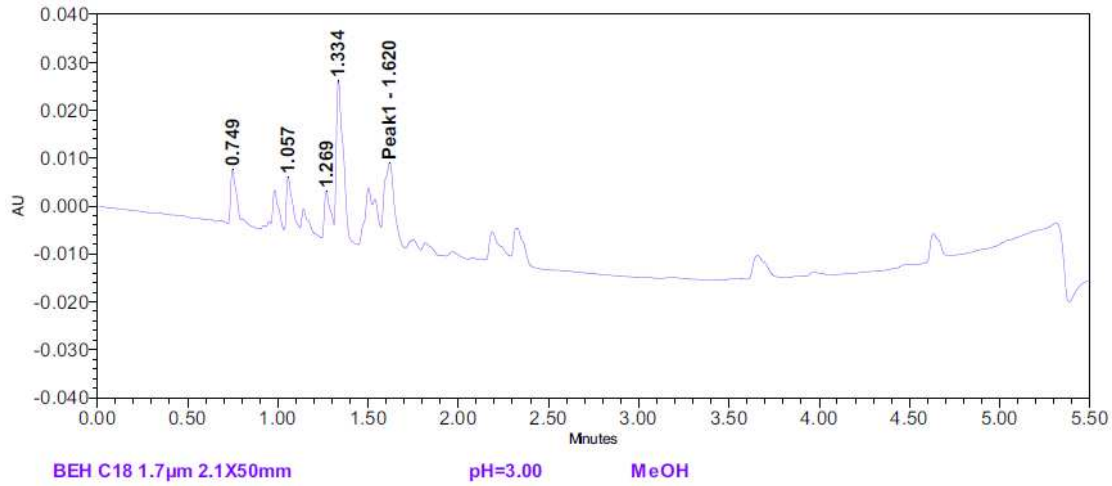
Za těchto podmínek uvedených na obrázku 11 dokázala kolona rozdělit větší počet píků než při pH 9 za použití acetonitrilu, jak je uvedeno na obrázku 12.



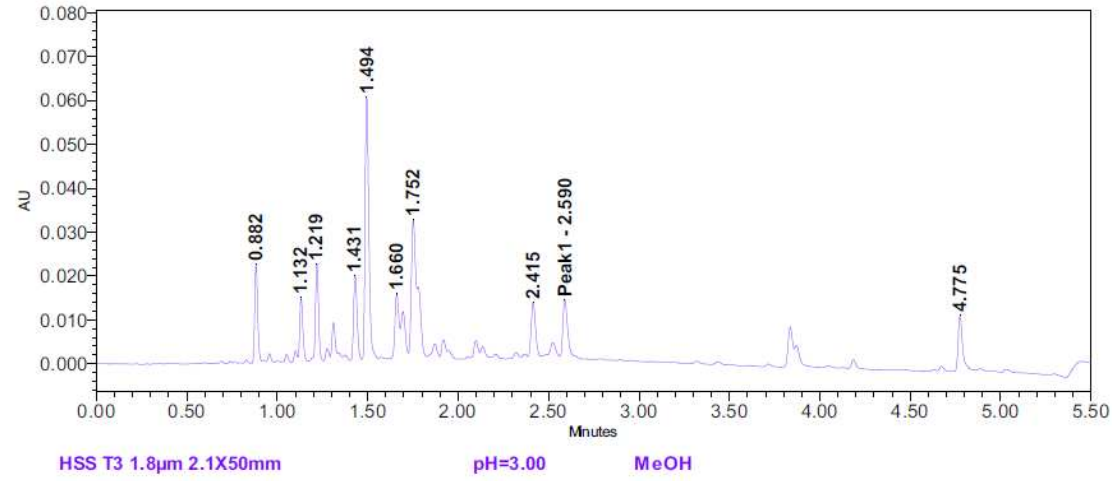
Obrázek 12: separace látek v rostlinném extraktu pomocí kolony BEH SHIELD RP18 při pH 9 za použití acetonitrilu



Obrázek 13: separace látek v rostlinném extraktu pomocí kolony BEH PHENYL při pH 3 za použití methanolu.

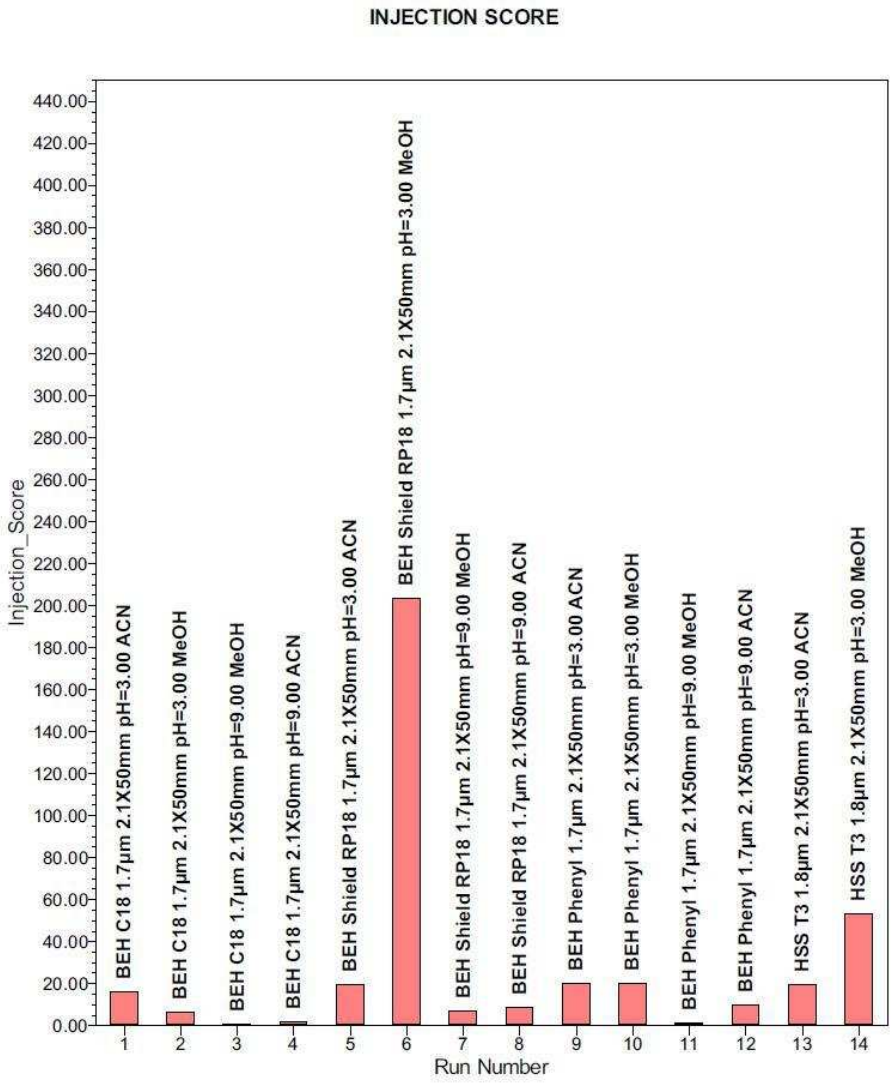


Obrázek 14: separace látek v rostlinném extraktu pomocí kolony BEH C18 při pH 3 za použití methanolu.



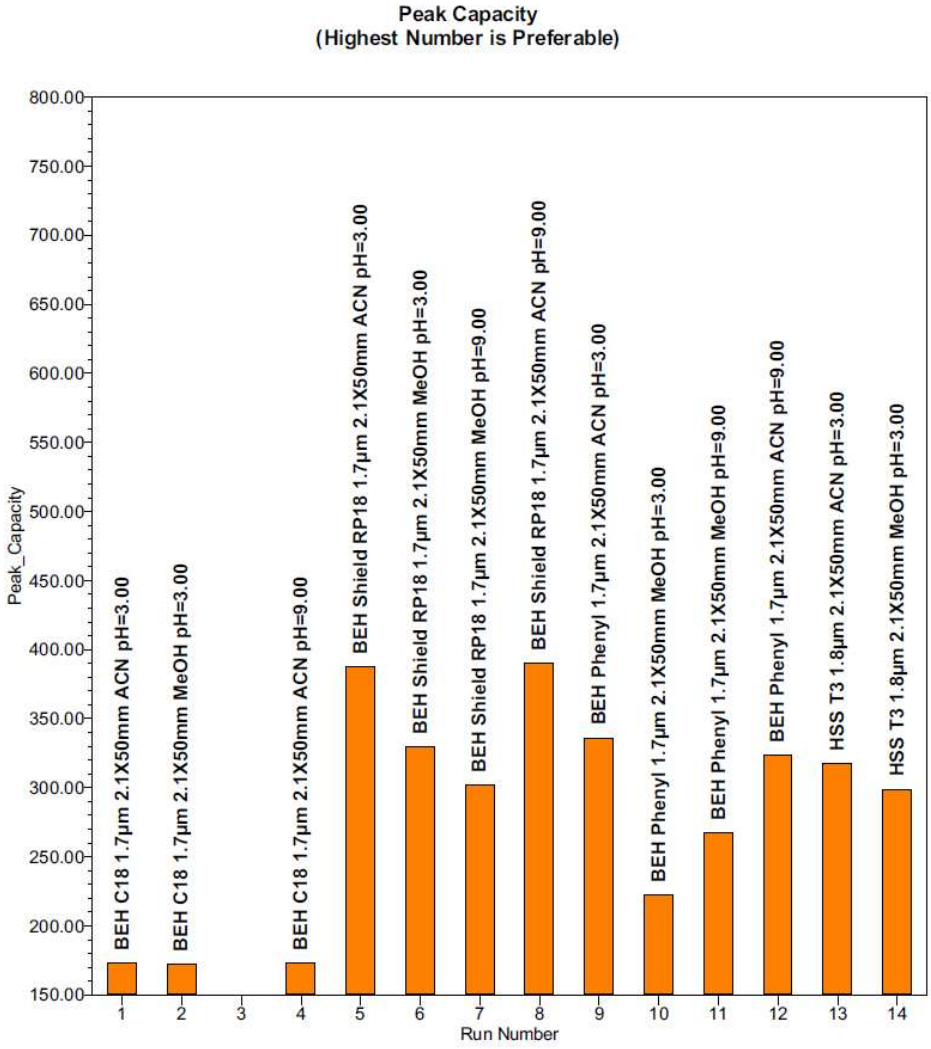
Obrázek 15: separace látek v rostlinném extraktu pomocí kolony HSS T3 při pH 3 za použití methanolu.

Chromatogramy z kolon uvedených na obrázcích 13-15 jsou uvedeny pro srovnání s kolonou BEH SHIELD RP18, ani jedna z nich nedosáhla lepší separace. Nejúčinnější separace bylo tedy dosaženo u kolony BEH SHIELD RP18 s použitím mobilní fáze methanolu při pH 3. To bylo vyhodnoceno také na základě automaticky generovaných reportů: injekční skóre, píková kapacita, počet integrovaných píků v každé separaci a také celkový počet separovaných píků.



Obrázek 16: hodnocení injekčního skóre

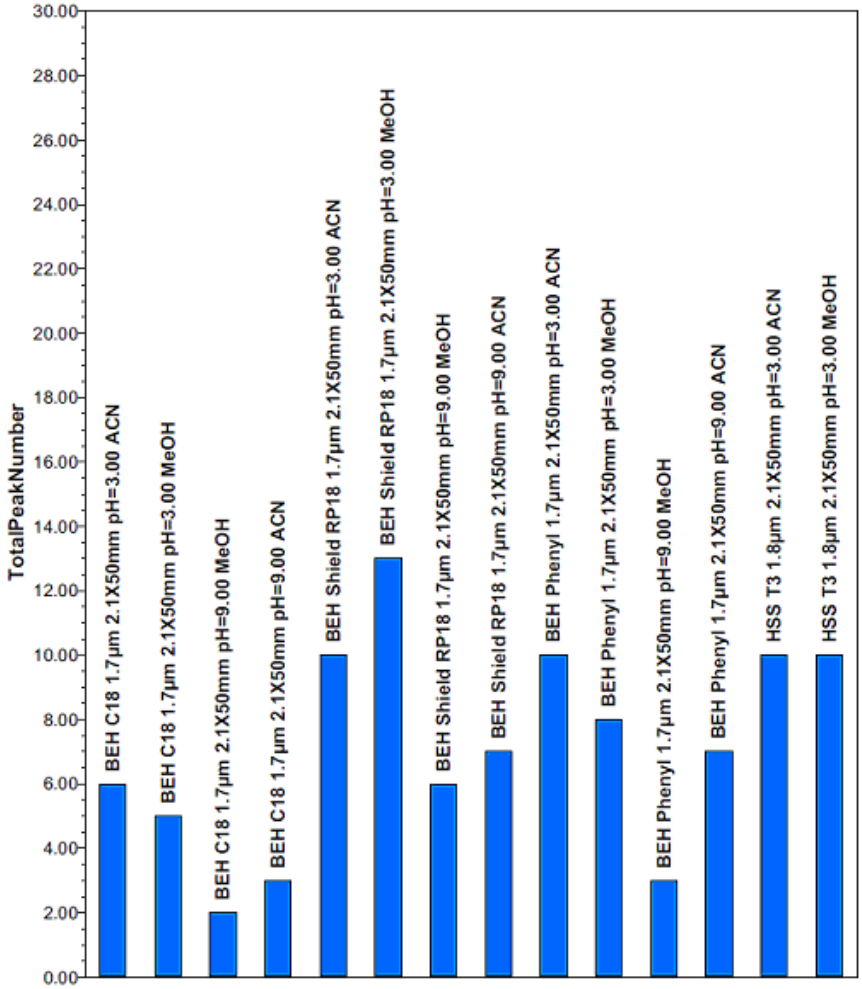
Při hodnocení injekčního skóre jednoznačně nejlepšího výsledku dosáhla kolona BEH SHIELD RP18 za použití methanolu a při pH 3, (obrázek 16).



Obrázek 17: porovnání parametru píková kapacita

Při porovnávání parametru píkové kapacity dopadla tato kolona také nejlépe s použitím acetonitrilu, ale při pH 3 a 9 měla srovnatelné výsledky, (obrázek 17).

Počet integrovaných píků u této kolony rozhodl ve prospěch pH 3, použití methanolu a acetonitrilu bylo opět srovnatelné. Při měření tohoto parametru měla dobré výsledky i kolona HSS T3.



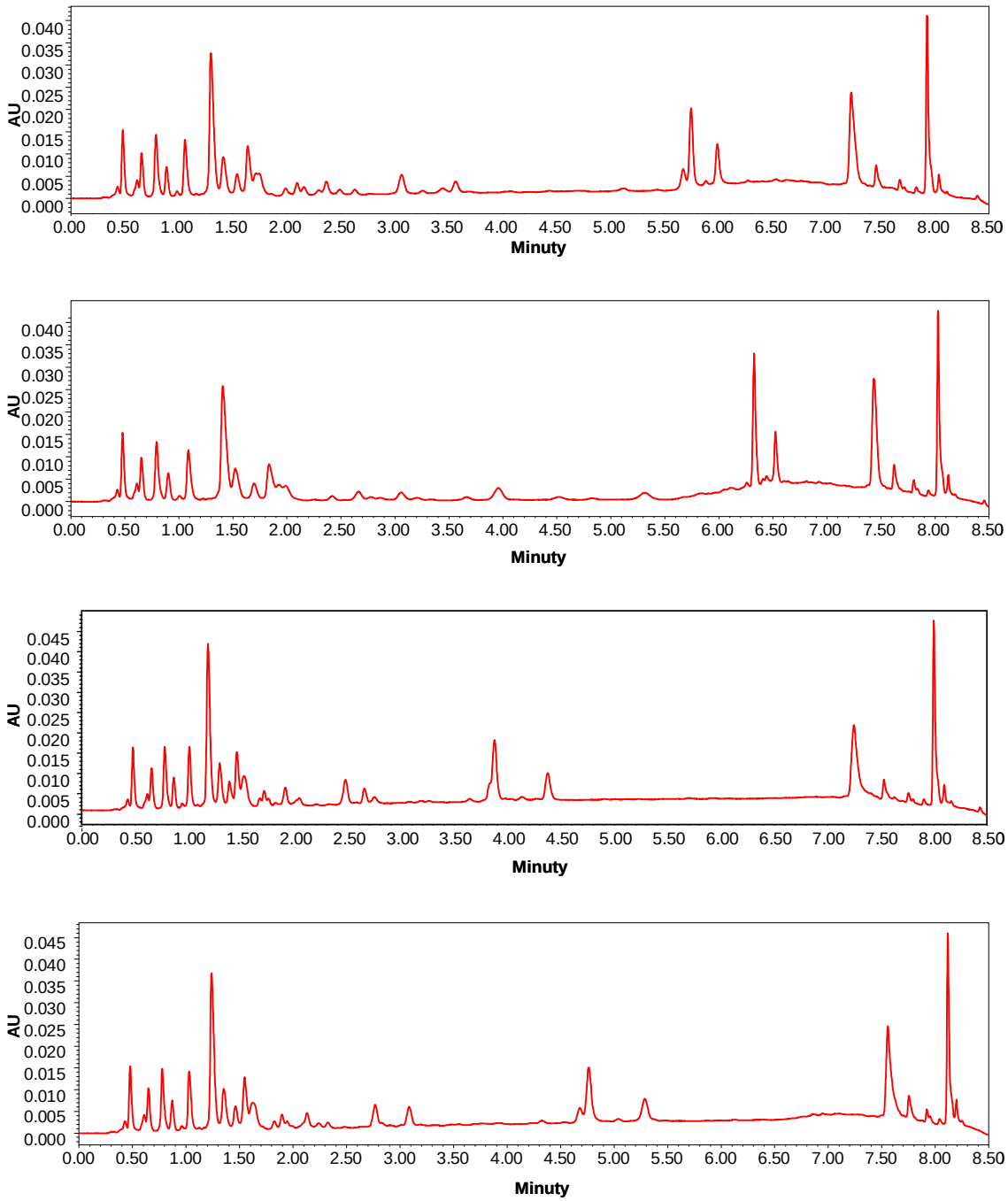
Obrázek 18: celkový počet píků

Největší počet píků dokázala separovat kolona BEH SHIELD RP18 při pH 3 a za použití methanolu, druhý nejlepší výsledek měla tatáž kolona, ale při pH 3 za použití acetonitrilu, (obrázek 18).

Dále byly na UHPLC testovány parametry jako je doba analýzy, gradient mobilní fáze, průtoková rychlost. Původní parametry UHPLC jsou uvedeny v tabulce 5.

	Retenční čas [min]	Průtoková rychlost [ml/min]	% A	% B	Křivka
1	počáteční	0,5	95	5	počáteční
2	5,0	0,5	50	50	6
3	8,0	0,5	5	95	6
4	8,5	0,5	95	5	6
5	10,5	0,5	95	5	6

Tabulka 5: původní parametry UHPLC

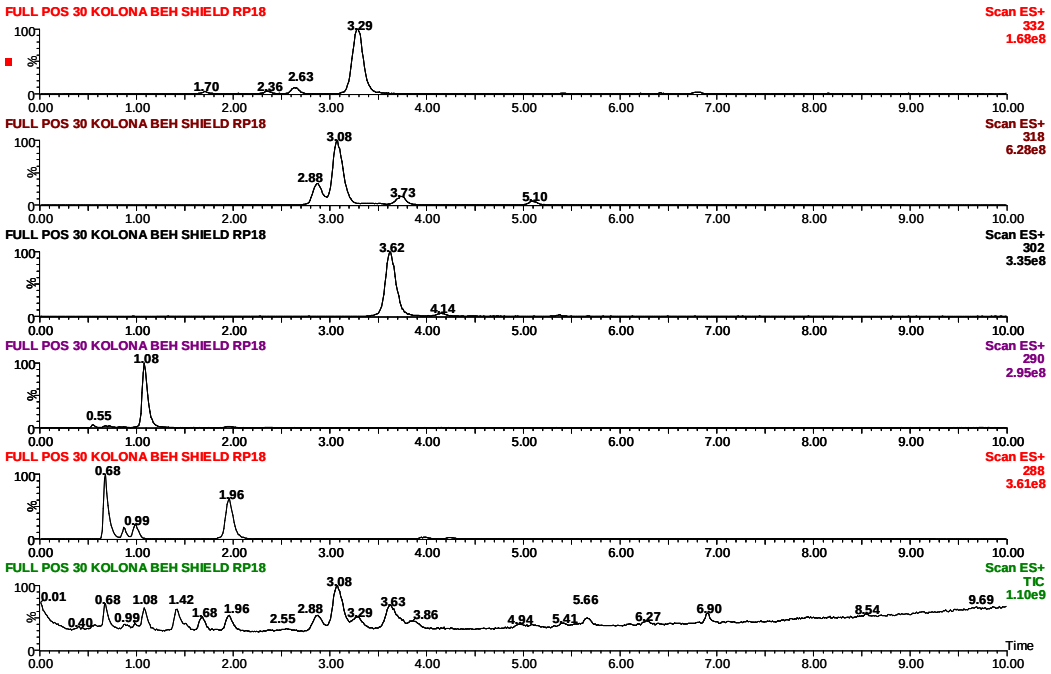


Obrázek 19: srovnání použitých parametrů při separaci na koloně BEH SHIELD RP18

Na koloně BEH SHIELD RP18 byly zkoušeny změny parametrů, aby bylo dosaženo optimálních chromatografických podmínek. Jako průtoková rychlost byla zkoušena 0,5 ml/min, doba analýzy 8,5 min, změny gradientu mobilní fáze A:B (pufr pH 3: methanol) – 80:20, 90:10, 60:40, 70:30, (obrázek 19).

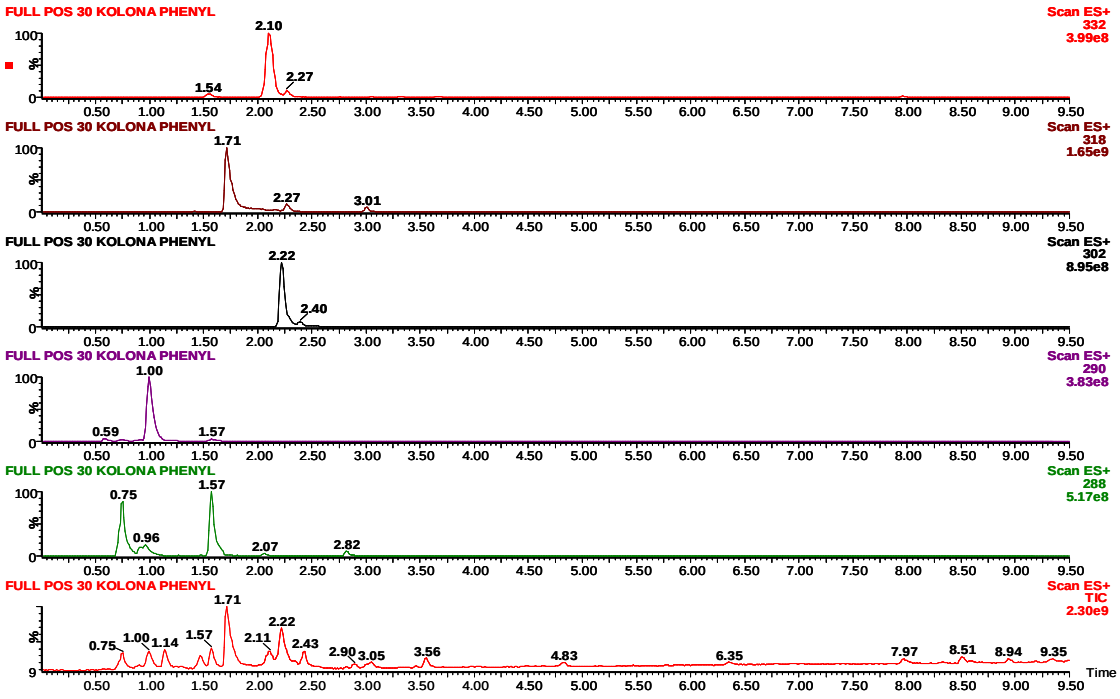
5.2 TESTOVÁNÍ CSH KOLON

Během měření a získávání výsledků k této diplomové práci byla zjištěna řada informací o kolonách CSH. Tyto kolony vynikají velmi dobrou analýzou bazických látek, a proto byly zařazeny do měření. Na obrazcích 20-22 je uvedeno testování kolon při měření MS spekter vzorku, je zde použita původní kolona BEH SHIELD RP 18 a nové kolony CSH PHENYL-HEXYL a CSH C18. Dosud používaná kolona BEH SHIELD RP18 byla tedy nahrazena jiným typem kolony – CSH C18, která dosáhla nejlepších výsledků. S použitím této kolony proběhlo již celkové měření. Byla změřena MS spektra alkaloidních látek i vzorku, jejich spektra fragmentace při změnách kolizní energie.



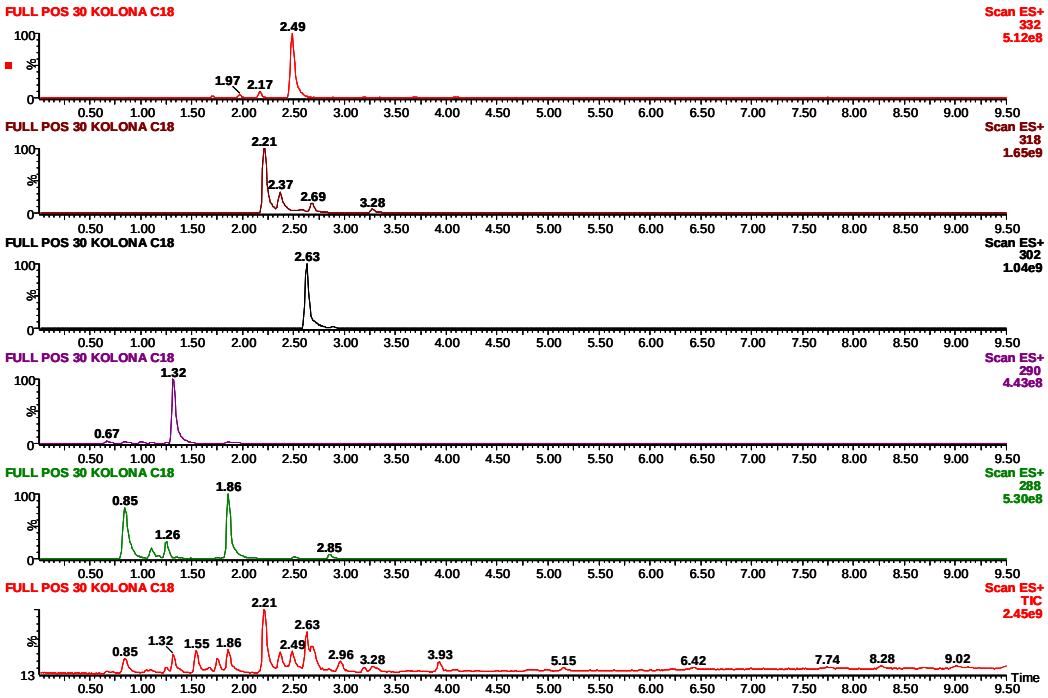
Obrázek 20: analýza vzorku a standardů za použití kolony BEH SHIELD RP18

Kolona BEH SHIELD RP18 byla první kolona použitá pro měření, ve srovnání s kolonami CSH neměla výsledky analýzy kvalitní z důvodu méně přehledného rozlišení píků, (obrázek 20).



Obrázek 21: analýza vzorku a standardů za použití kolony CSH PHENYL-HEXYL

Výsledky analýzy na koloně CSH PHENYL-HEXYL byly srovnány s výsledky dalších kolon. Tato kolona dosáhla lepších výsledků než kolona BEH SHIELD RP18, chromatogramy obsahovaly píky ostřejších tvarů, (obrázek 21).



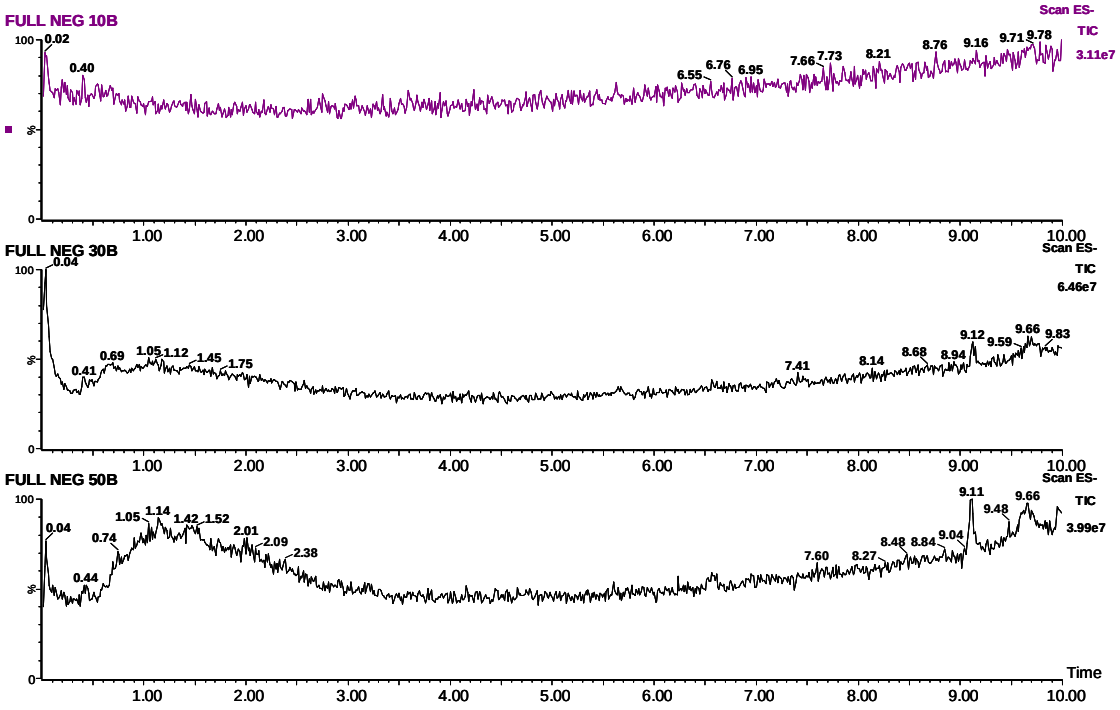
Obrázek 22: analýza vzorku a standardů za použití kolony CSH C18

Kolona CSH C18 dosáhla nejlepších výsledků měření po srovnání s dalšími kolonami. Separace píků byla přehledná, píky byly symetrické a jejich tvar ostrý (obrázek 22). Tato kolona potvrdila získané informace o jejích výhodách při analýze bazických látek.

5.3 VÝVOJ METODY NA UHPLC-MS

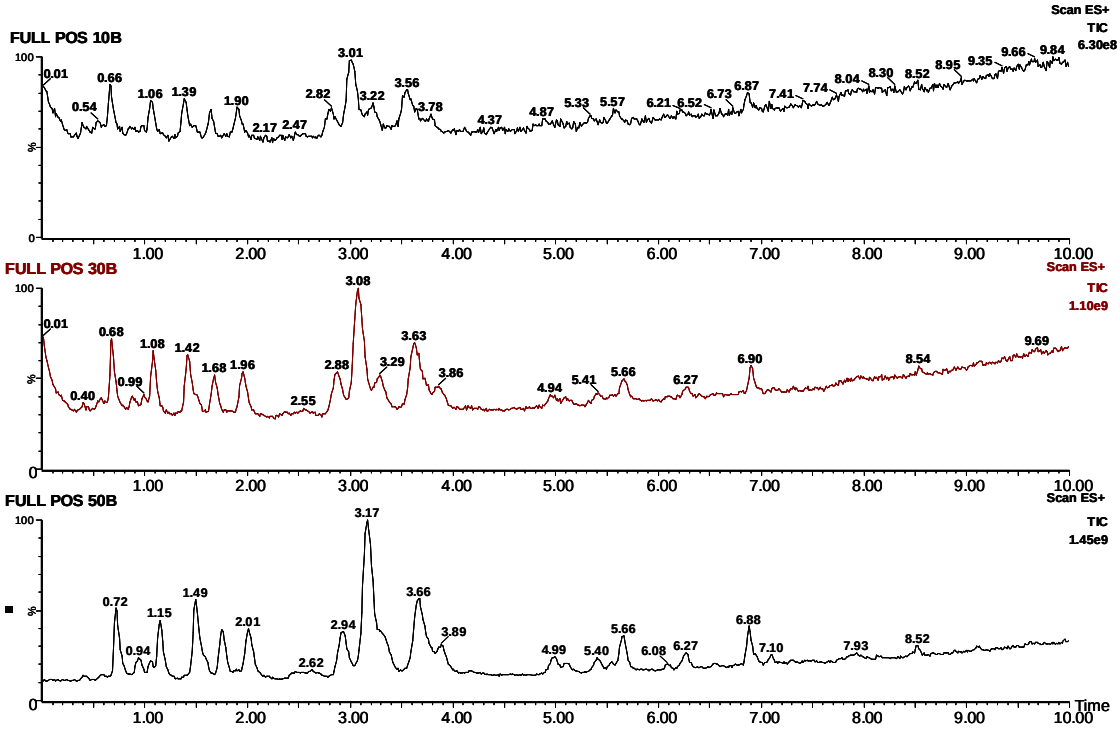
Zjištěné chromatografické parametry z UHPLC byly aplikovány na LC-MS a jako kolona byla nejdříve zvolena BEH SHIELD RP18. Analýza byla změřena jak v pozitivním tak v negativním modu. Další měření v negativním modu bylo zamítnuto z důvodu neprobíhající ionizace a tedy i analýzy. Celkové měření na UHPLC-MS probíhalo tedy pouze v pozitivním modu.

Bylo zkoušeno napětí vkládané na vstupní kužel, které se pohybovalo v hodnotách 10, 30 a 50 V, (obrázky 23-24). Při něm pak byly hledány molekulové hmotnosti standardů ve vzorku. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při napětí 30 V, které bylo po celou dobu měření zachováno.



Obrázek 23: analýza probíhající v ESI⁻ za použití kolony BEH SHIELD RP18

Měření v negativním modu bylo zamítnuto z důvodu neprobíhající ionizace, (obrázek 23).



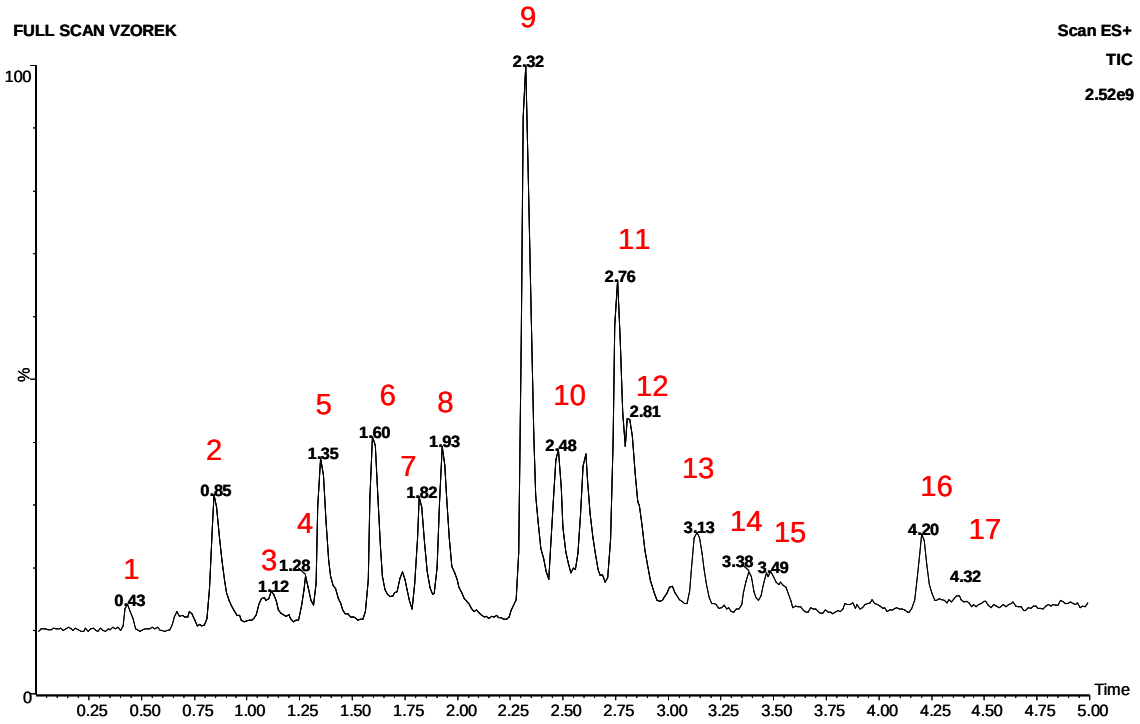
Obrázek 24: analýza probíhající v pozitivním modu za použití kolony BEH SHIELD RP18

Měření v pozitivním modu bylo vybráno jako vhodné. Při tomto měření bylo testováno napětí vkládané na vstupní kužel. Jako výsledné napětí bylo vybráno 30 V, (obrázek 24).

5.4 MS SPEKTRA

MS spektra byla již měřena pomocí stacionární fáze CSH C18. K dispozici bylo 5 standardních látek (galanthamin, galanthin, haemanthamin, lycoramin, tazettin), jejichž přítomnost ve vzorku byla ověřována.

Chromatogramy byly naměřeny pro směs standardů. Byly zjištěny retenční časy jednotlivých látek. Pro ověření byly změřeny i chromatogramy pro jednotlivé látky standardů. Dále byly změřeny chromatogramy pro vzorek a v něm ověřena přítomnost standardů. Byly porovnány chromatogramy a spektra směsi standardů a vzorku, aby byla ověřena přítomnost jednotlivých standardních látek a bylo zjištěno, které další alkaloidní látky se ještě ve vzorku nacházejí. Chromatogramy a spektra jsou seřazeny podle pořadí píků, jak za sebou v chromatogramu následují. První pík s t_R 0,43 měl mrtvý retenční čas a jeho spektrum s m/z 153 nebylo kvalitní, proto zde není uveden.

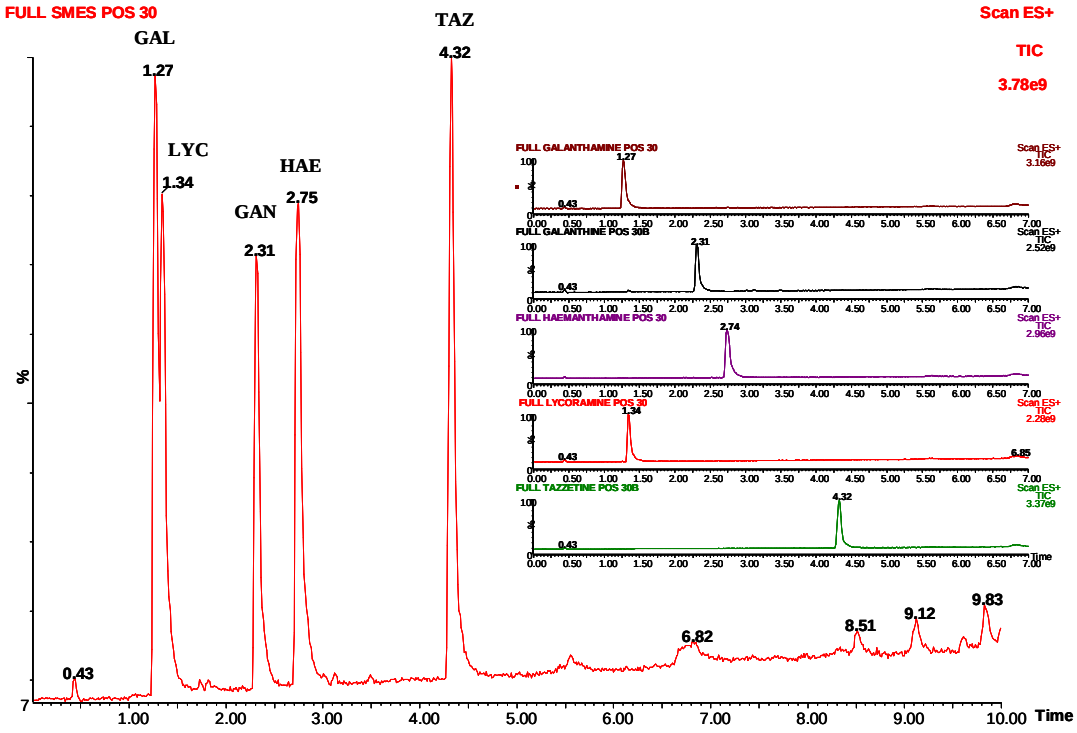


Obrázek 25: chromatogram vzorku s očíslovanými píky náležící jednotlivým m/z hodnotám

Chromatogram vzorku obsahoval 17 píků, (obrázek 25). Tyto píky jsou pak uvedeny a roztříděny v tabulce 6.

číslo píku	retenční čas	$[M+H]^+$	Mw	látka
1	0,43	153		
2	0,85	288	287	isomer galanthaminu
3	1,12	288	287	isomer galanthaminu
4	1,28	288	287	galanthamin
5	1,35	290	289	lycoramin
6	1,60	304		
7	1,82	306		
8	1,93	288	287	isomer galanthaminu
9	2,32	318	317	galanthin
10	2,48	318	317	isomer galanthinu
11	2,76	302	301	haemanthamin
12	2,81	272		
13	3,13	334		
14	3,38	330		
15	3,49	318	317	isomer galanthinu
16	4,20	320		
17	4,32	332	331	tazettin

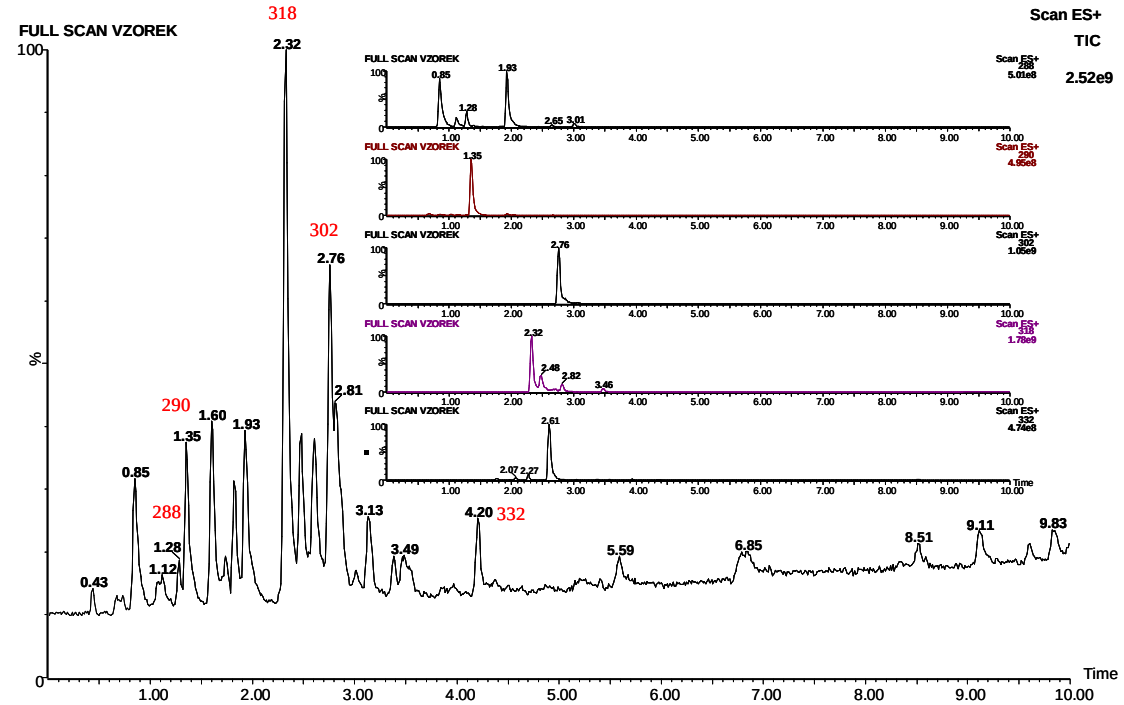
Tabulka 6: souhrn všech nalezených hodnot m/z ve vzorku, jejich čísla píků a pořadí v chromatogramu vzorku, hodnoty m/z ($[M+H]^+$), u známých látek molekulová hmotnost, označení podle standardů



Obrázek 26: chromatogram směsi a chromatogramy standardů

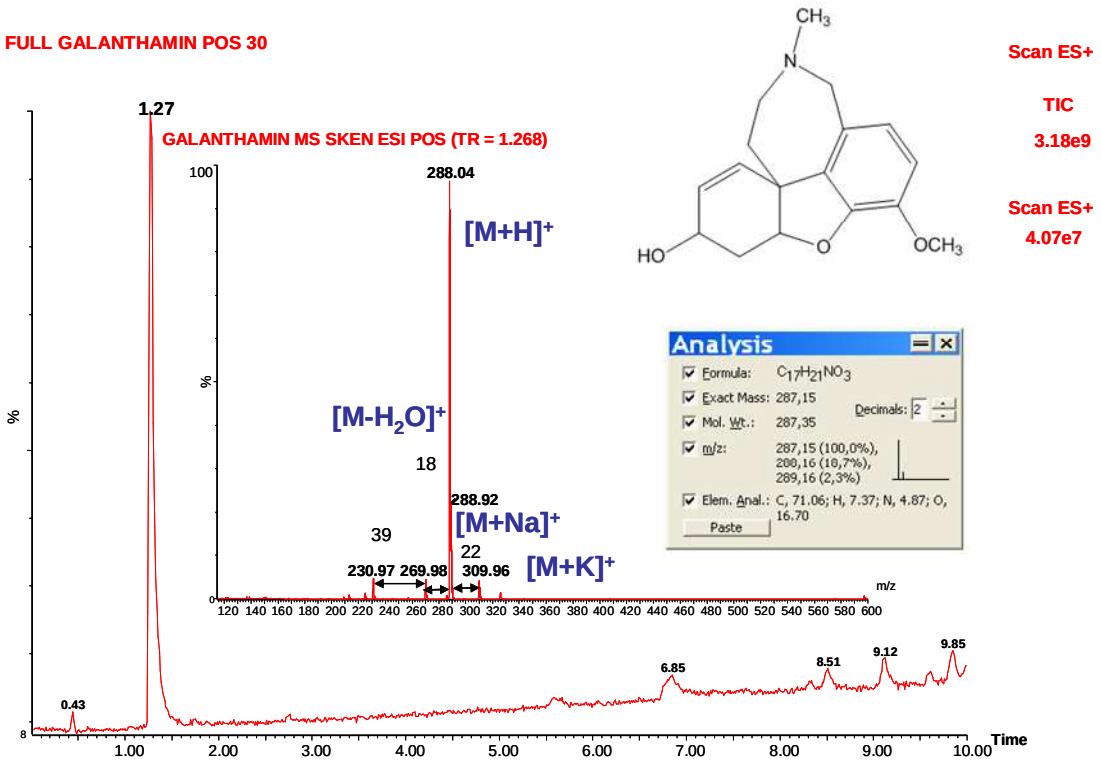
(GAL – galanthamin, GAN – galanthin, HAE – haemanthamin, LYC – lycoramin, TAZ – tazettin)

Na chromatogramu směsi jsou všechny píky standardů označeny zkratkou dané látky, k přiřazení jednotlivým látkám slouží chromatogramy jednotlivých látek s retenčními časy a spektra látek, (obrázek 26).



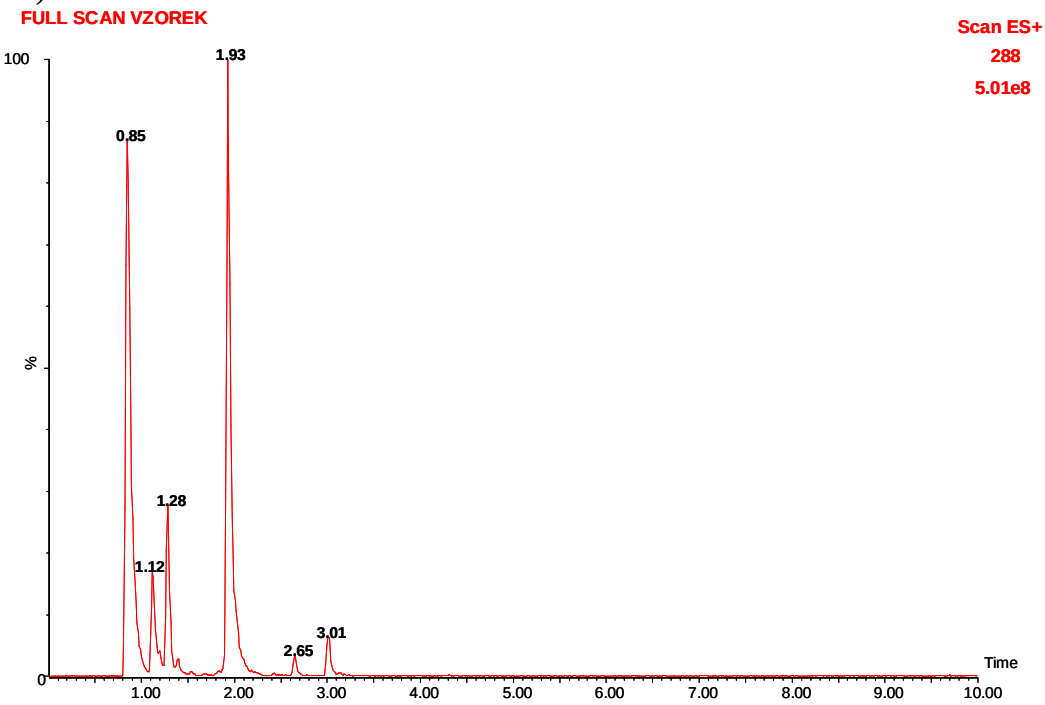
Obrázek 27: chromatogram vzorku a chromatogramy hledaných m/z standardů ve vzorku

Chromatogram vzorku obsahuje všechny retenční časy, v něm byly hledány píky standardů podle molekulárních hmotností jednotlivých látek, (obrázek 27).



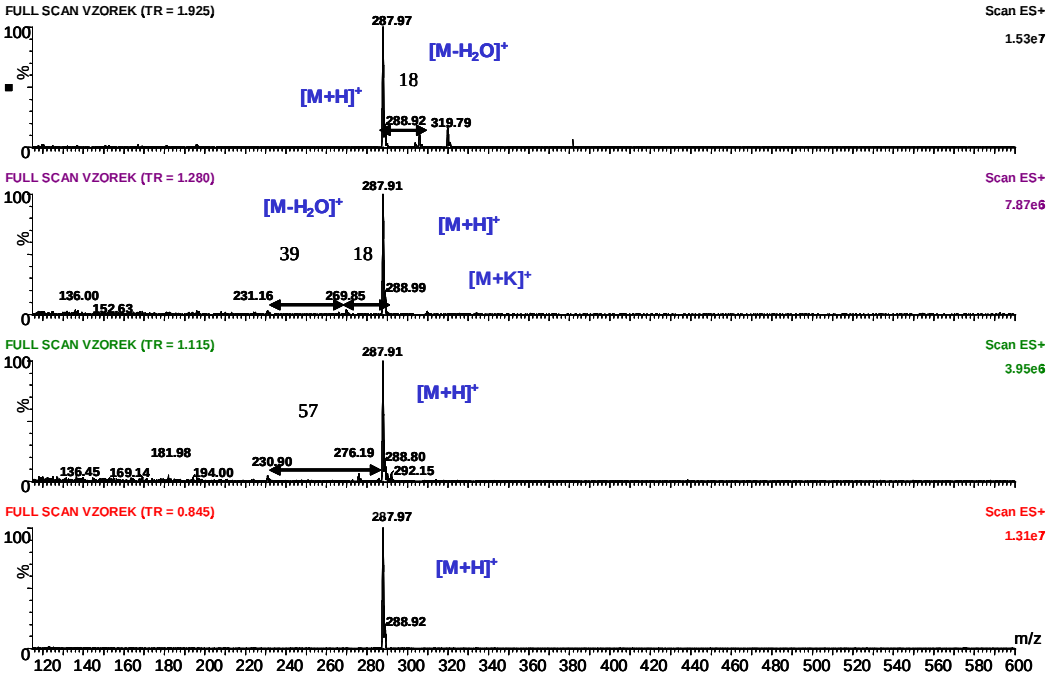
Obrázek 28: chromatogram galanthaminu a jeho spektrum se vzorcem

Protonovaná molekula galanthaminu má m/z 288. Z chromatogramu bylo získáno spektrum, kde při ionizaci došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu. Byly zde přítomny i typické adukty jako $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$ a došlo ke ztrátě vody $[M-H_2O]^+$, (obrázek 28).



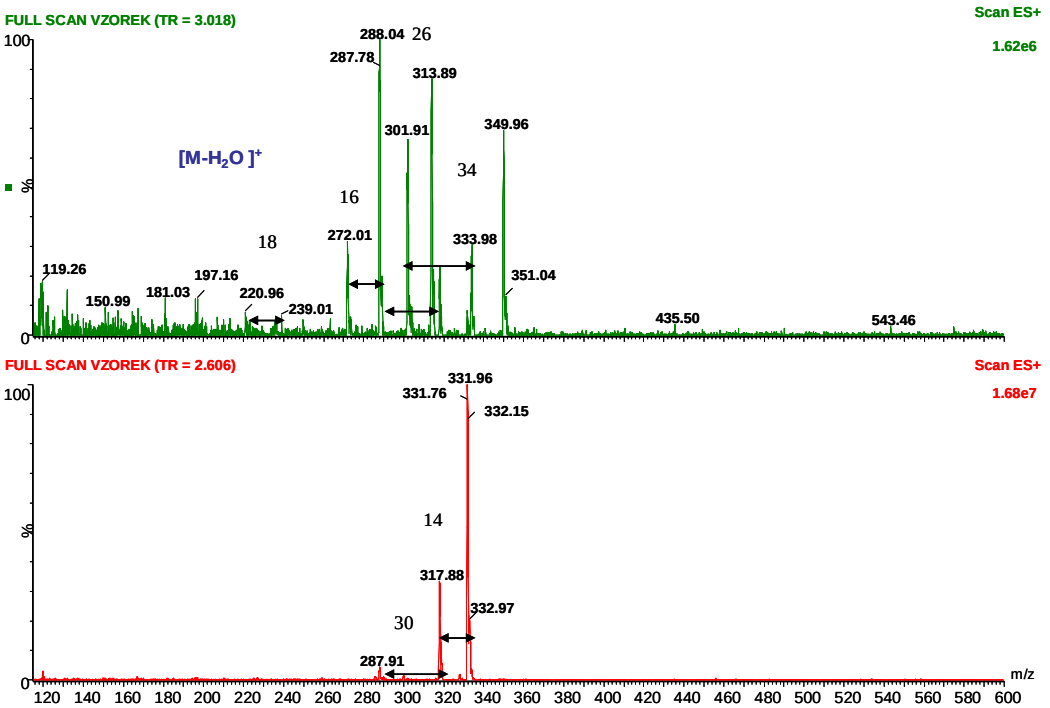
Obrázek 29: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 288

V chromatogramu vzorku bylo nalezeno 6 píků s m/z 288, (obrázek 29).



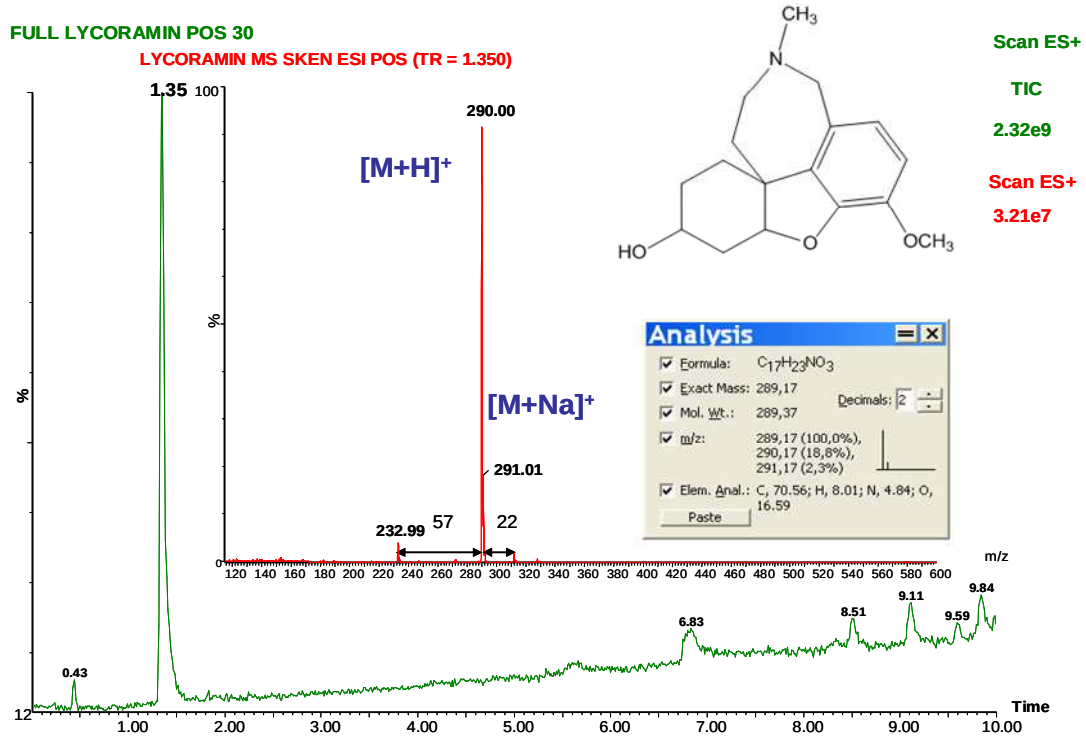
Obrázek 30: 4 spektra vzorku po nalezení hodnoty m/z 288

Spektra vzorku se úplně neshodovala se spektrem standardu, u dvou z nich došlo ke ztrátě vody $[M\text{-}H_2O]^+$ a u jednoho byl přítomen adukt $[M+K]^+$. U všech došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu. Nejpodobnější spektrum bylo při t_R 1,280, což odpovídalo standardu, (obrázek 30).



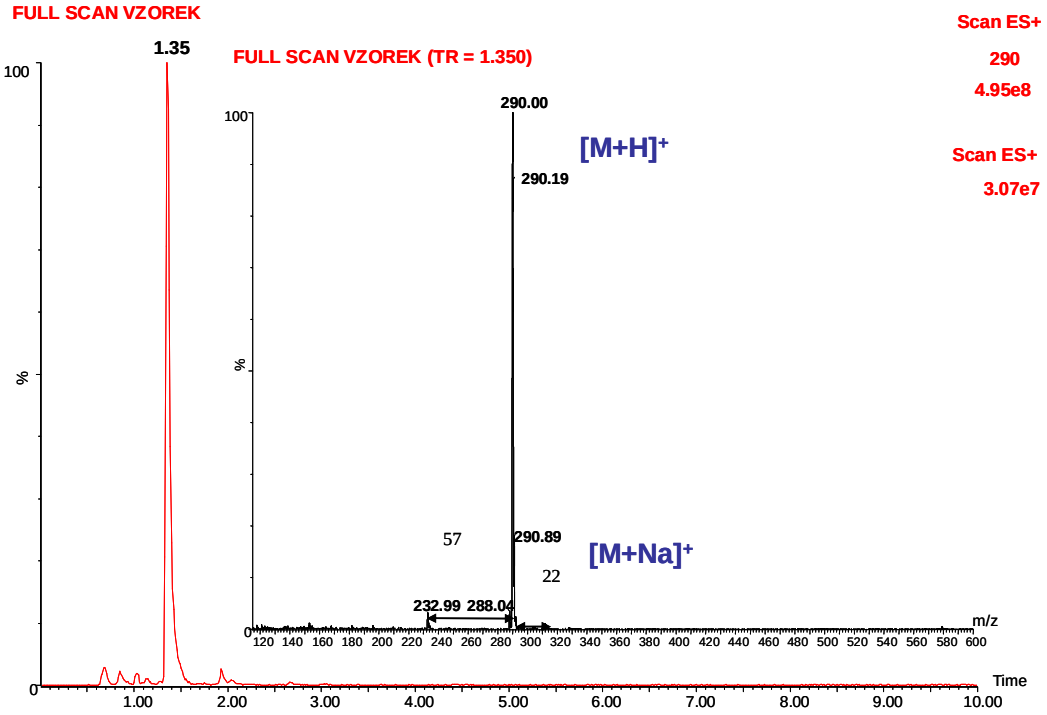
Obrázek 31: 2 spektra vzorku po nalezení hodnoty m/z 288

Spektra vzorku se neshodovala se spektrem standardu, u jednoho z nich došlo ke ztrátě vody $[M\text{-}H_2O]^+$, (obrázek 31). Jednalo se o jiné látky nebo směs látek.



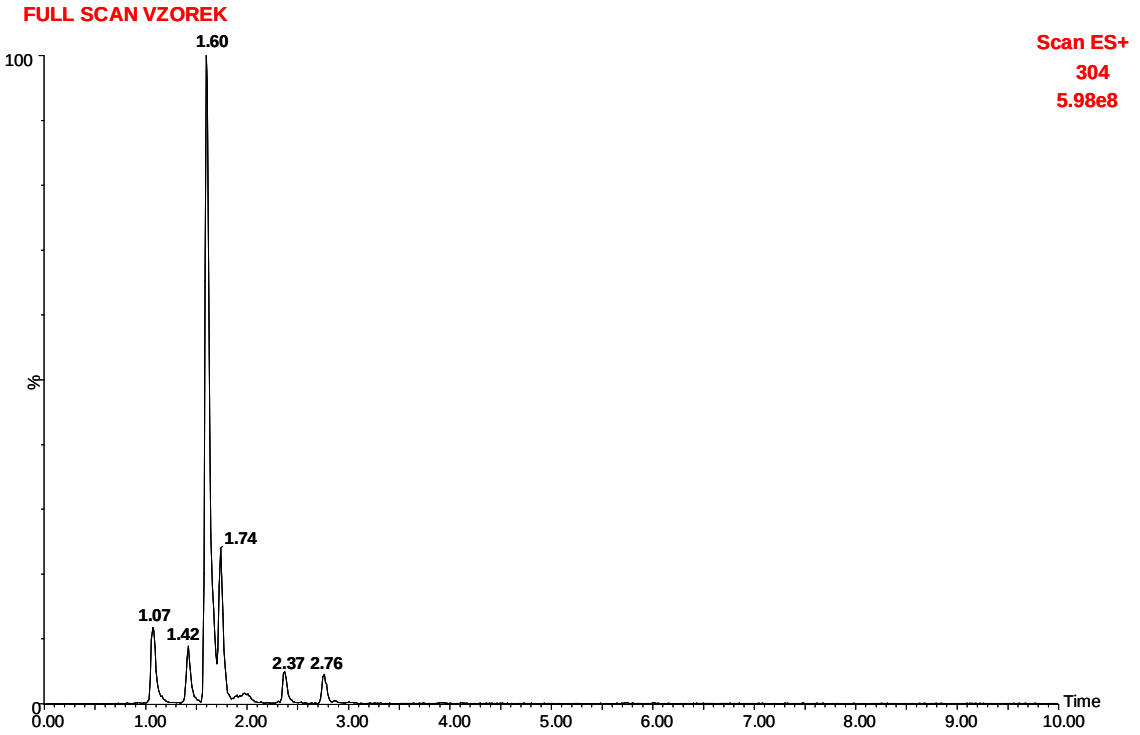
Obrázek 32: chromatogram lycoraminu a jeho spektrum se vzorcem

Lycoramin má hodnotu m/z protonované molekuly 290. Při ionizaci došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu a byl přítomen $[M+Na]^+$ adukt, (obrázek 32).



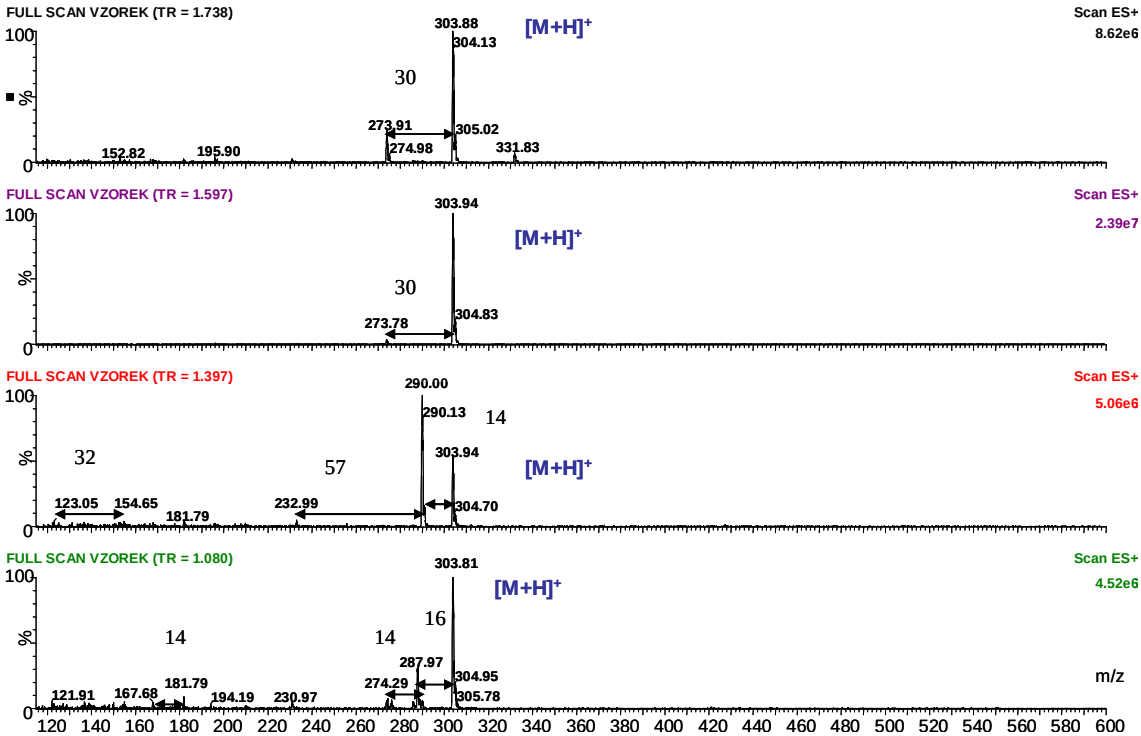
Obrázek 33: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 290 a jeho spektrum

V chromatogramu vzorku byl nalezen 1 pík s m/z 290. Spektrum vzorku se spektrem standardu se shodovalo, došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu, ale nebyl přítomen $[M+Na]^+$ adukt, (obrázek 33).



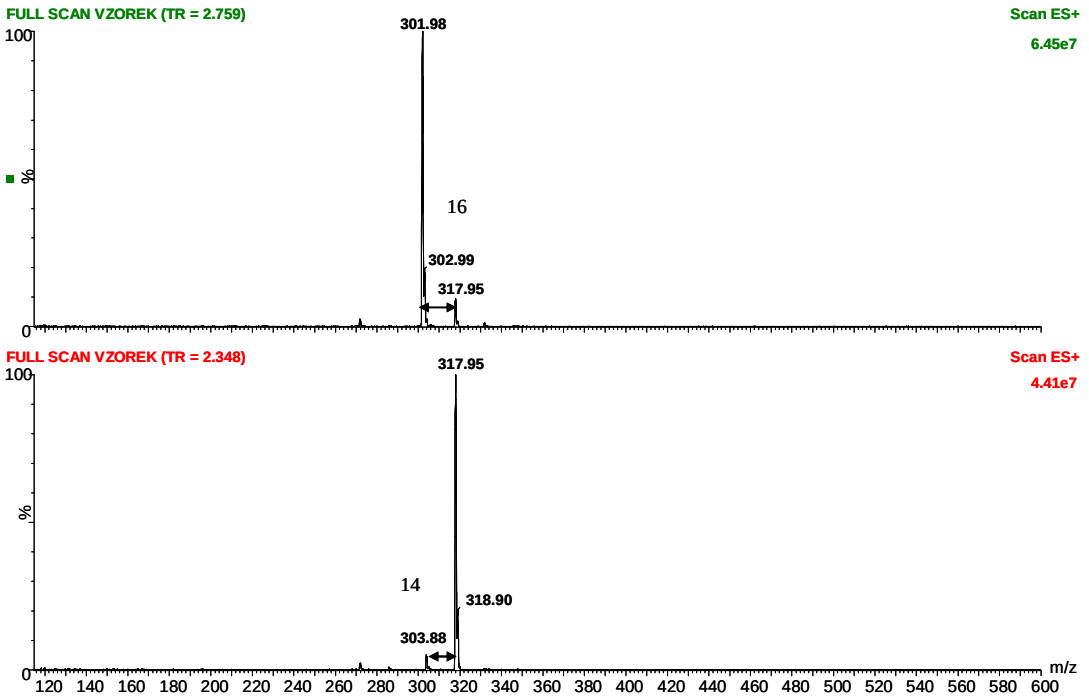
Obrázek 34**:** chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 304

V chromatogramu vzorku bylo nalezeno 6 píků s m/z 304, (obrázek 34).



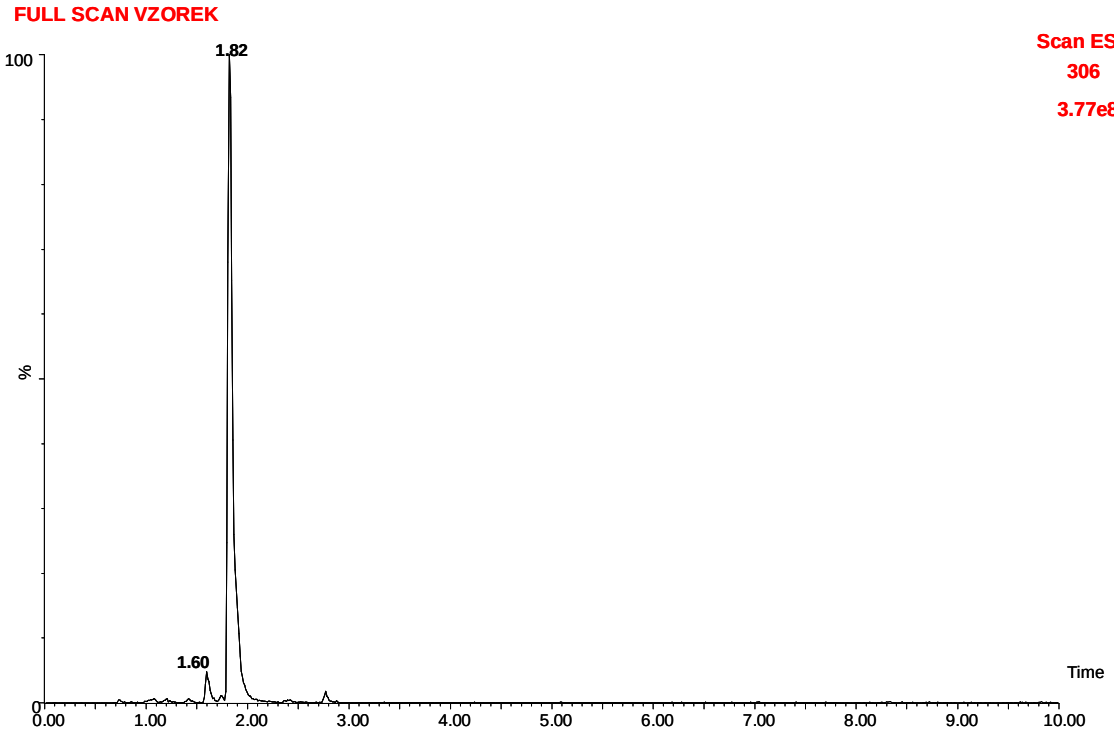
Obrázek 35**:** spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 304

Spektra vzorku s m/z 304 neobsahovala žádné adukty, došlo jen ke vzniku $[M+H]^+$ kationu. Při t_R 1,397 byl hlavní pík s m/z 290, (obrázek 35).



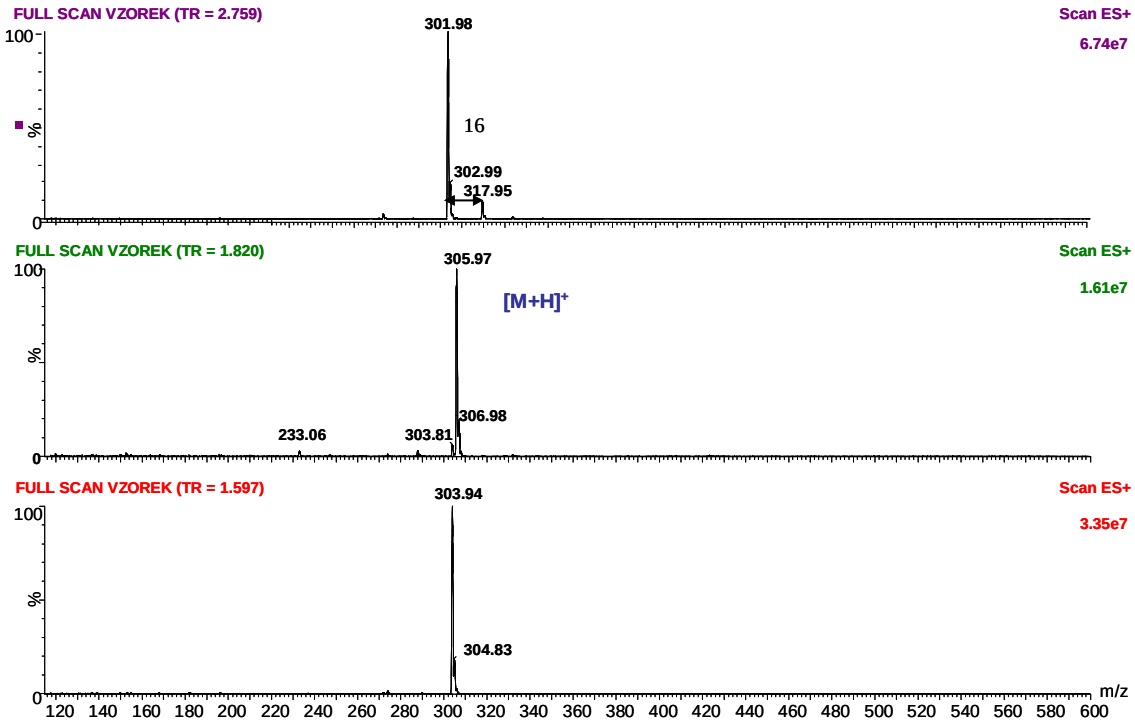
Obrázek 36:spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 304

Další dvě spektra vzorku s m/z 304 neobsahovala žádné adukty a ani nedošlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu. Tato spektra neměla ani hlavní píky s m/z 304. Hlavní píky měly hodnoty m/z 302 a 318, (obrázek 36).



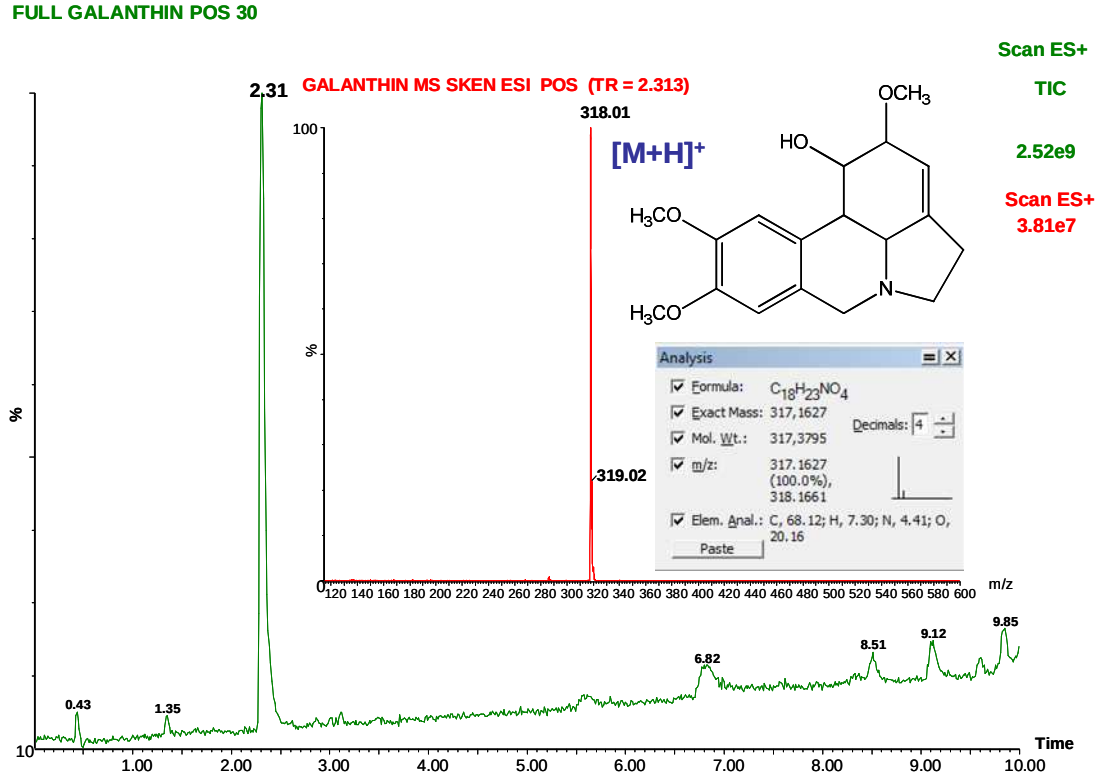
Obrázek 37: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 306

V chromatogramu vzorku byly nalezeny 3 píky s m/z 306, (obrázek 37).



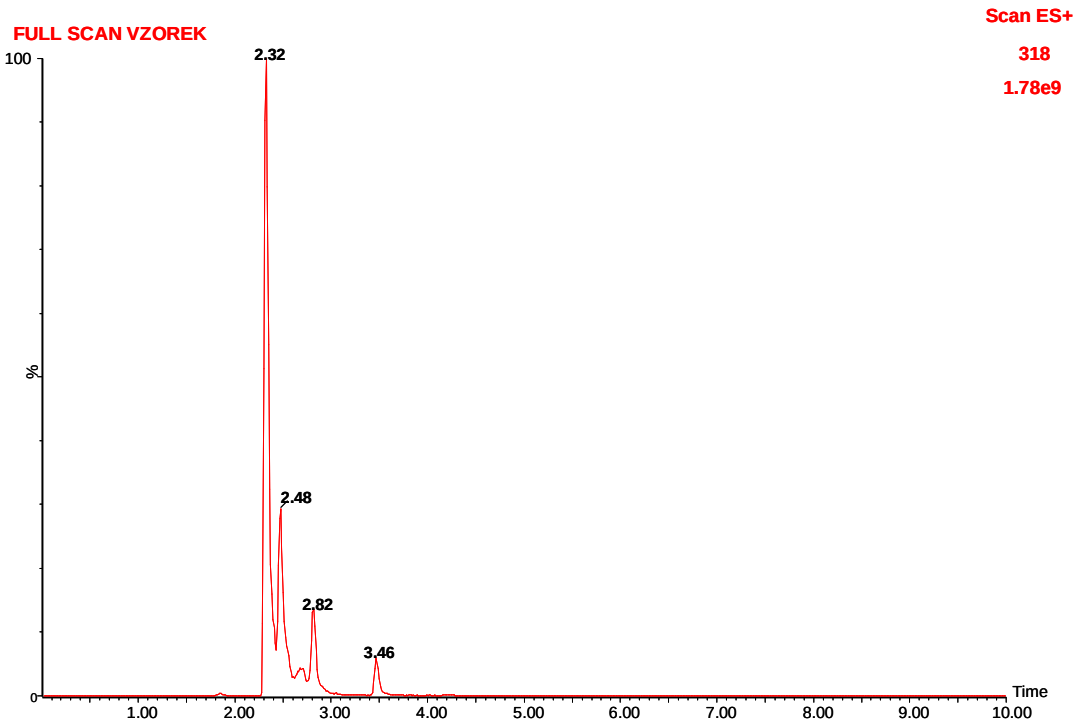
Obrázek 38: spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 306

Spektra vzorku s m/z 306 neobsahovala žádné adukty, ale došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu při t_R 1,820. Dvě spektra měla hlavní píky s m/z 302 a 304, (obrázek 38).



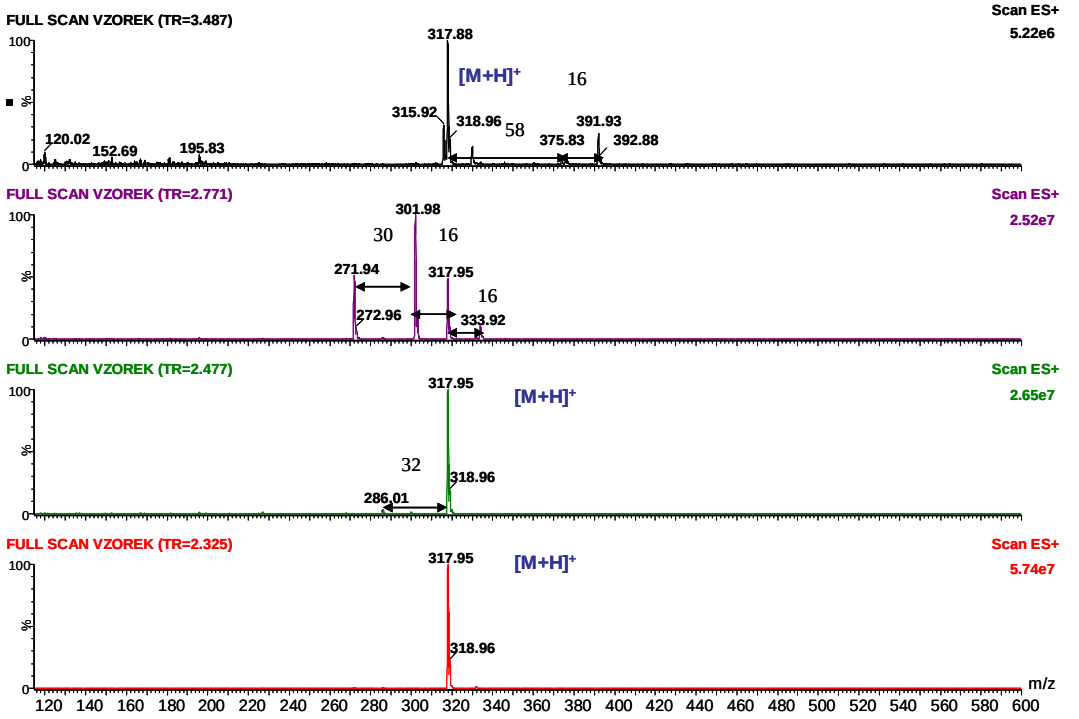
Obrázek 39: chromatogram galanthinu a jeho spektrum se vzorcem

Protonovaná molekula má hodnotu m/z 318. Při ionizaci docházelo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu a adukty tvořeny nebyly, (obrázek 39).



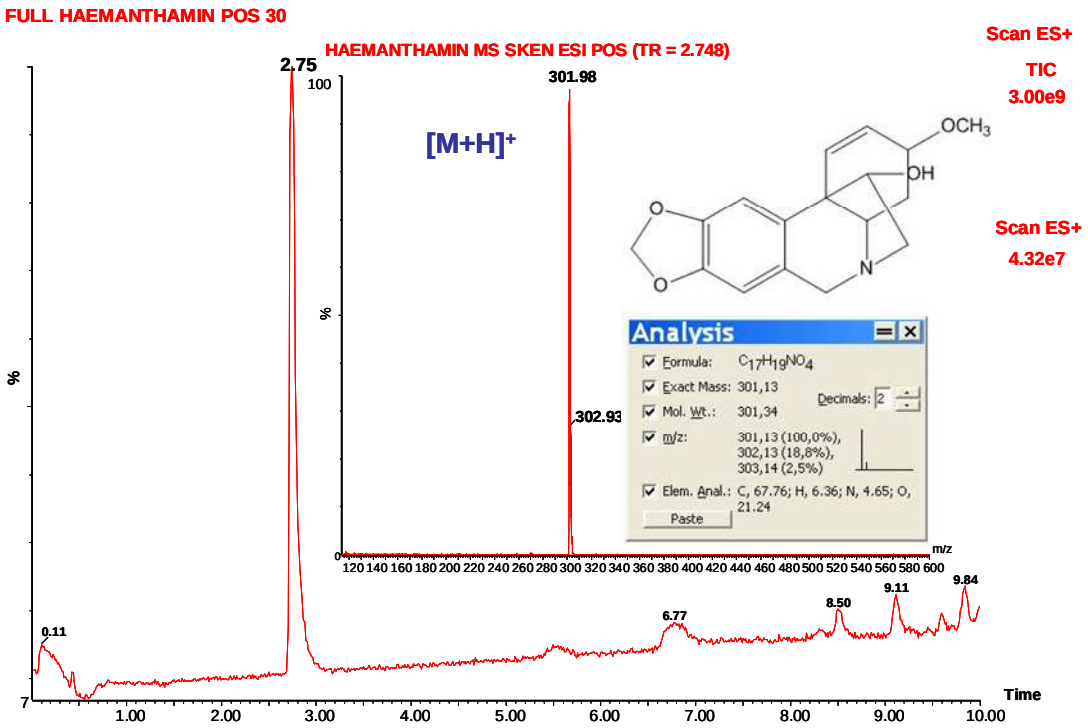
Obrázek 40: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 318

V chromatogramu vzorku byly nalezeny 4 píky obsahující m/z 318, (obrázek 40).



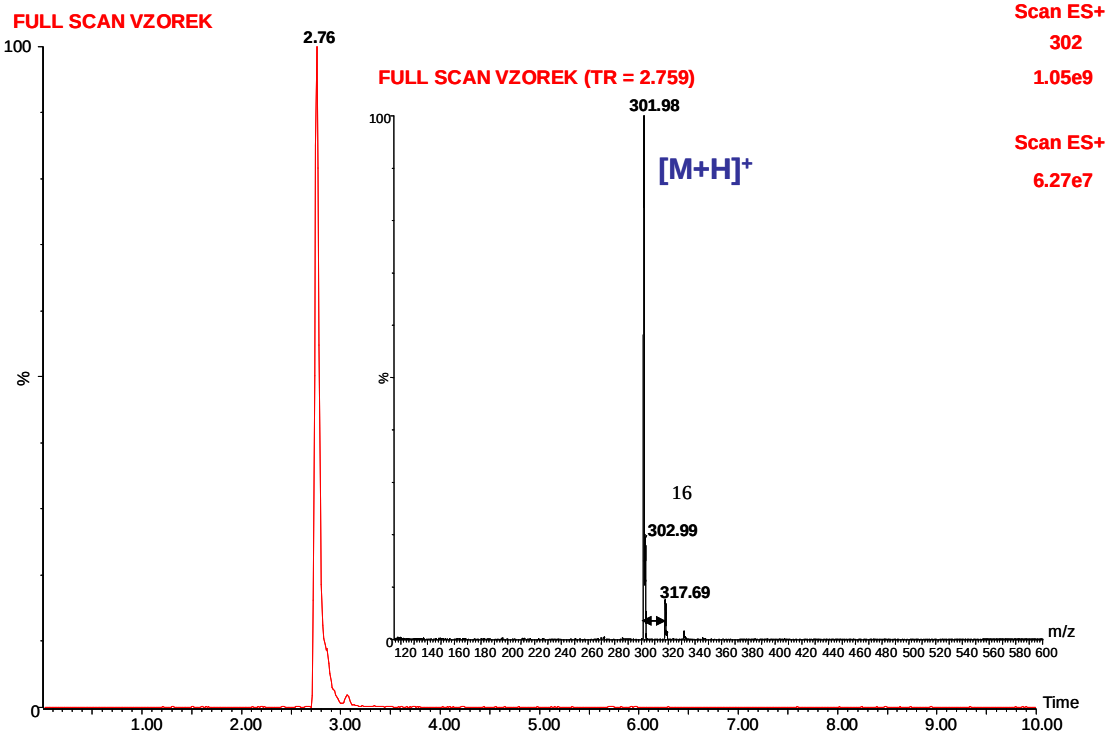
Obrázek 41: spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 318

První dvě spektra vzorku se úplně neshodovala se spektrem standardu. Jde tedy o jiné látky nebo směs více látek. Třetí spektrum se shodovalo více a čtvrté bylo identické se spektrem galanthinu, což dle t_R 2,325 odpovídalo standardu. Došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu, adukty tvořeny nebyly, (obrázek 41).



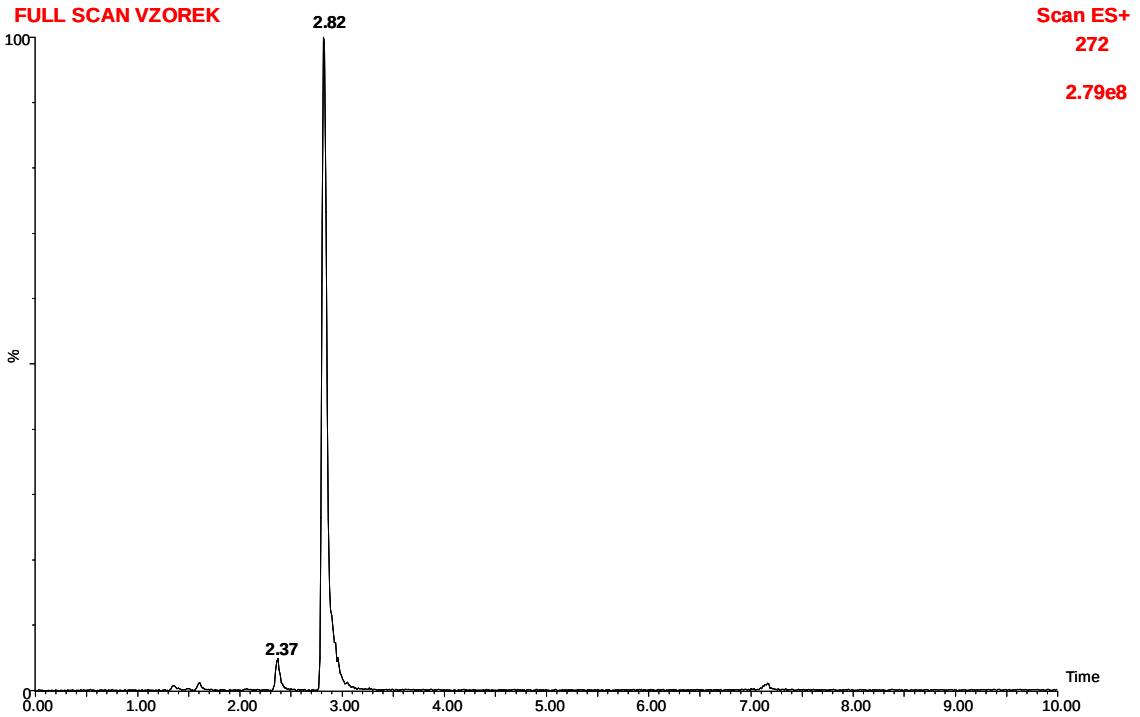
Obrázek 42: chromatogram haemanthaminu a jeho spektrum se vzorcem

Haemanthamin má hodnotu m/z protonované molekuly 302. Při ionizaci docházelo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu a adukty tvořeny nebyly, (obrázek 42).



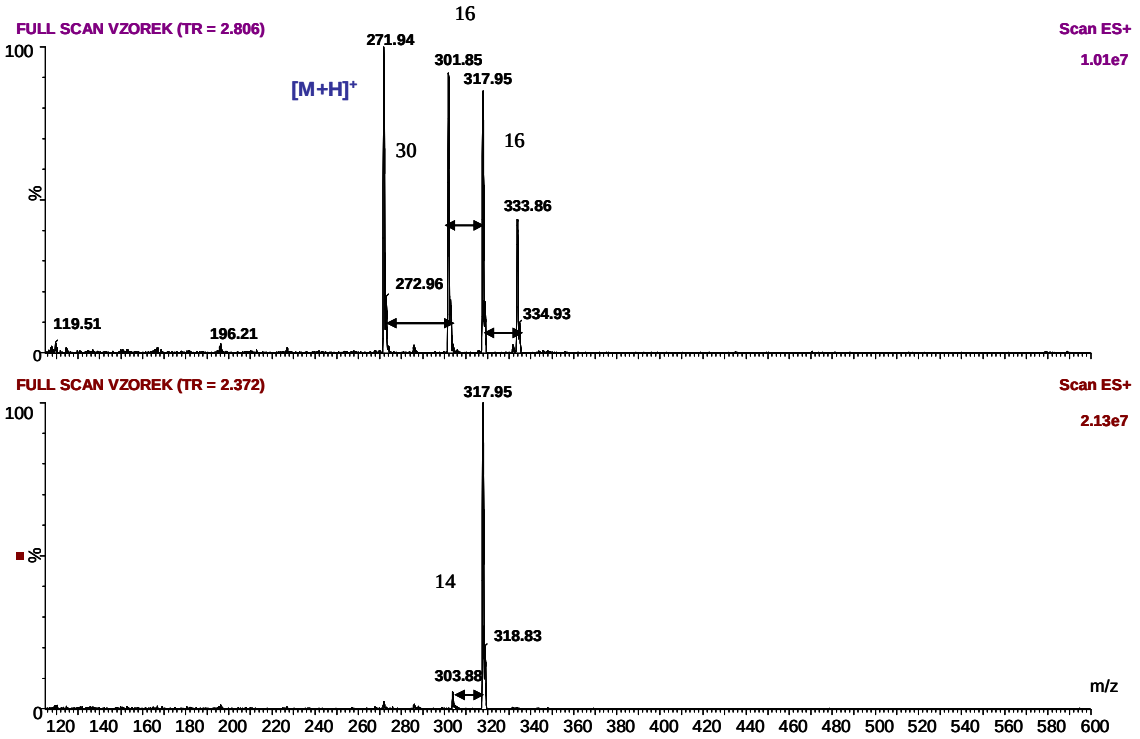
Obrázek 43: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 302 a jeho spektrum

V chromatogramu vzorku byl nalezen pouze 1 pík s hodnotou m/z 302. Spektrum vzorku se celkem shodovalo se spektrem standardu. Při ionizaci došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu a adukty tvořeny nebyly, (obrázek 43).



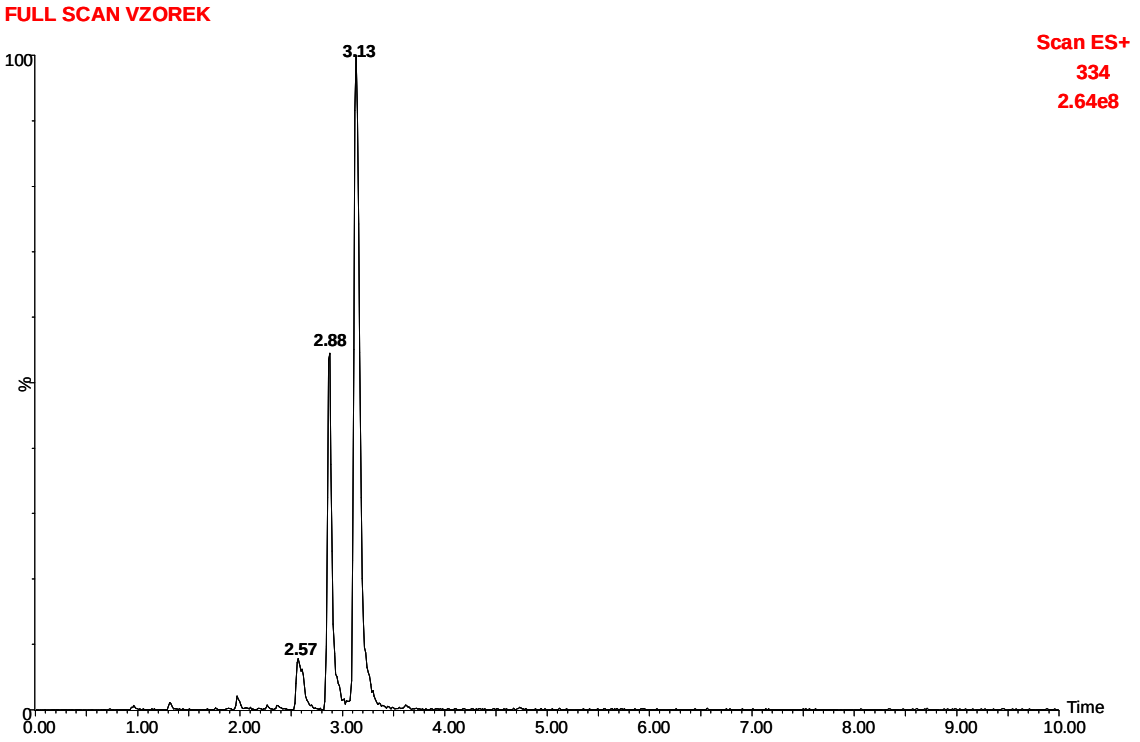
Obrázek 44: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 272

V chromatogramu vzorku byly dále nalezeny 2 píky s m/z 272 a získána 2 spektra, (obrázek 44).



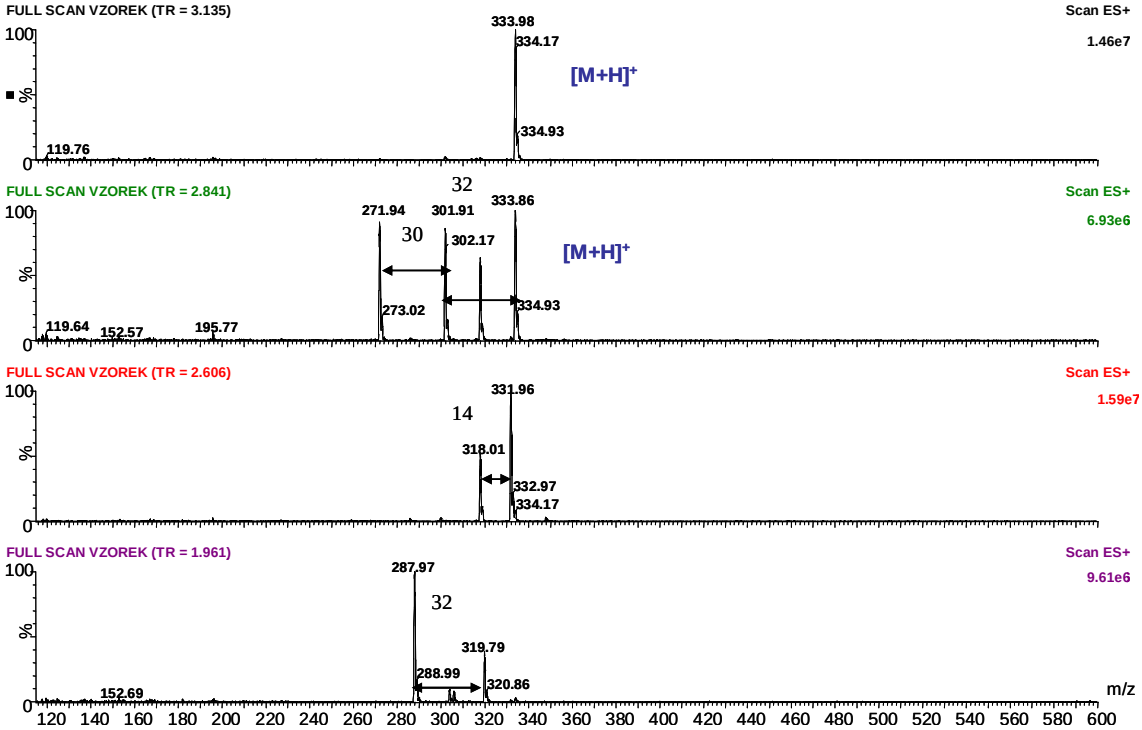
Obrázek 45: spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 272

Spektra vzorku s m/z 272 neobsahovala žádné adukty, došlo jen ke vzniku $[M+H]^+$ kationu při t_R 2,806. Hlavní pík měl hodnotu m/z 318, (obrázek 45).



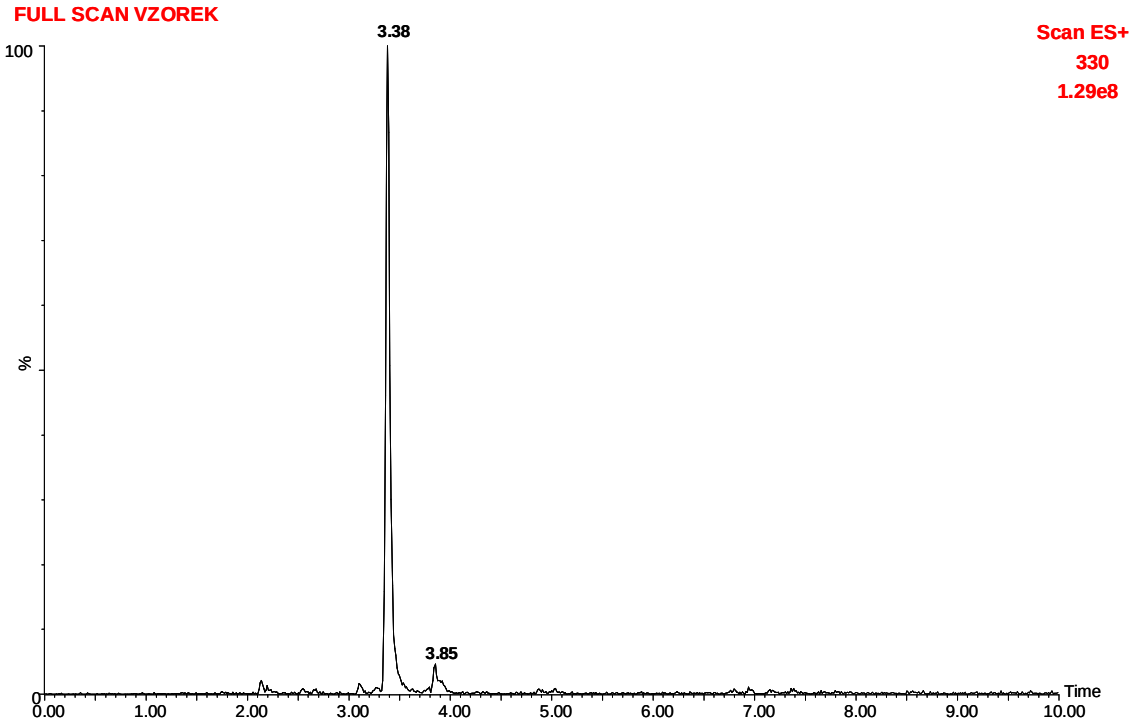
Obrázek 46: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 334

V chromatogramu vzorky byly nalezeny 4 píky s m/z 334, (obrázek 46).



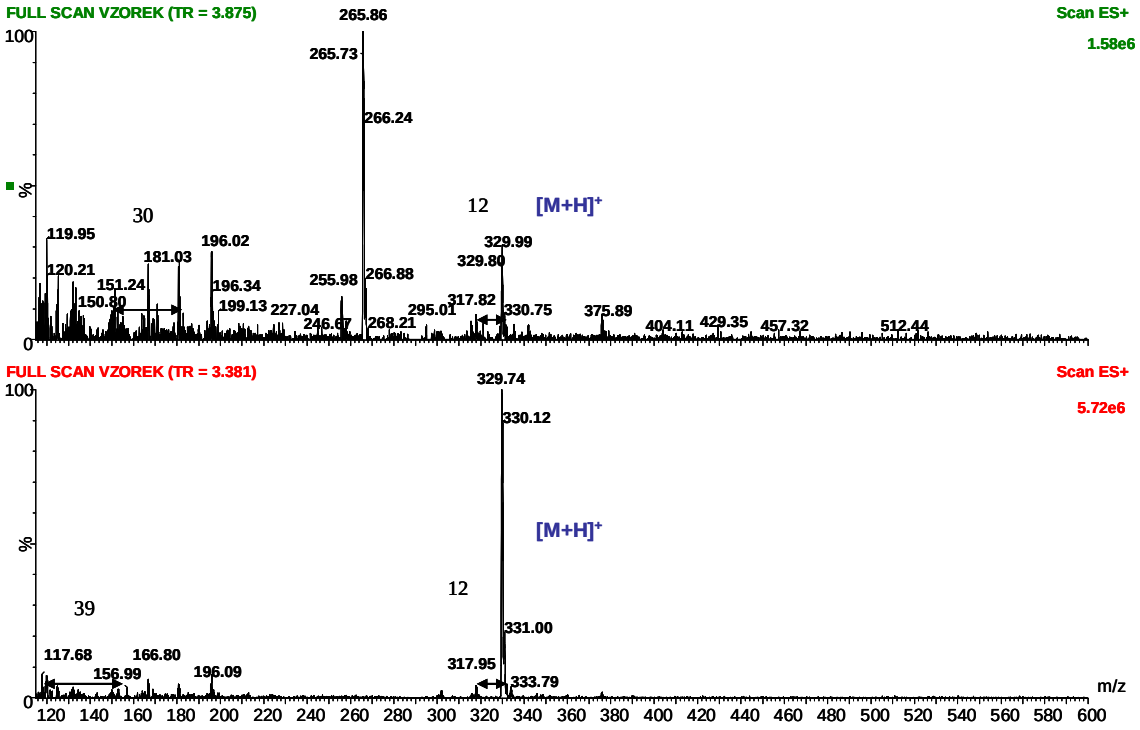
Obrázek 47: spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 334

Spektra vzorku s m/z 334 neobsahovala žádné adukty, ale došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu při t_R 3,135 a 2,841. Dva hlavní píky měly hodnoty m/z 332 a 288, (obrázek 47).



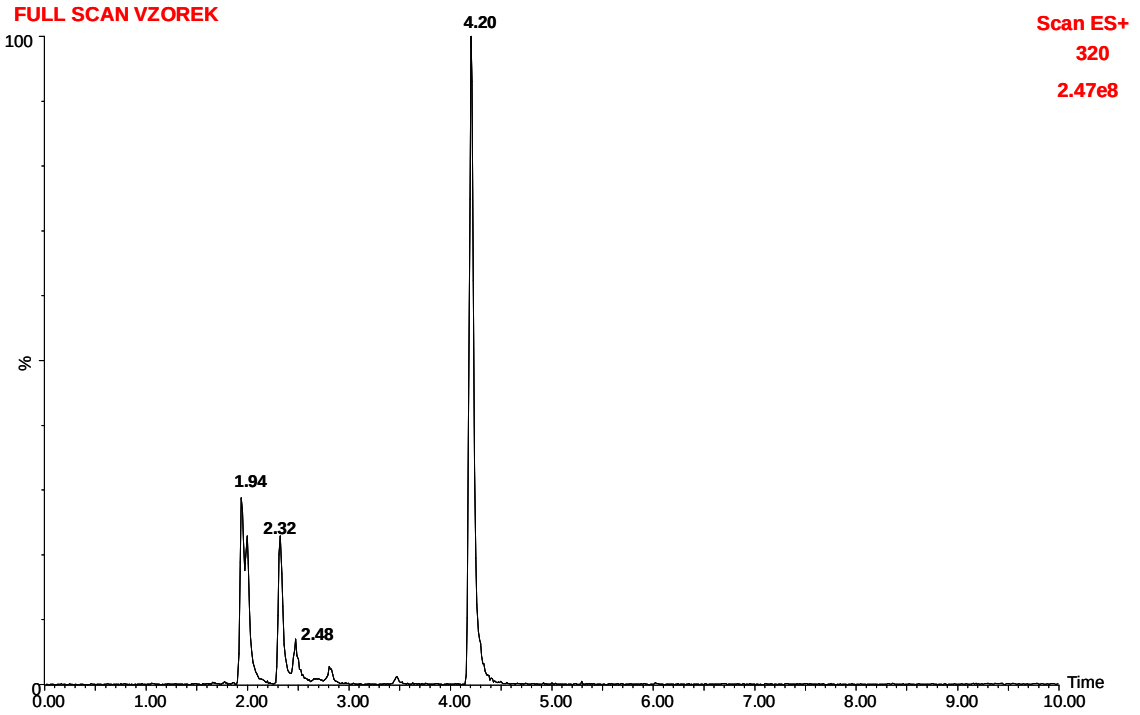
Obrázek 48: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 330

V chromatogramu vzorku byly nalezeny 2 píky s m/z 330, (obrázek 48).



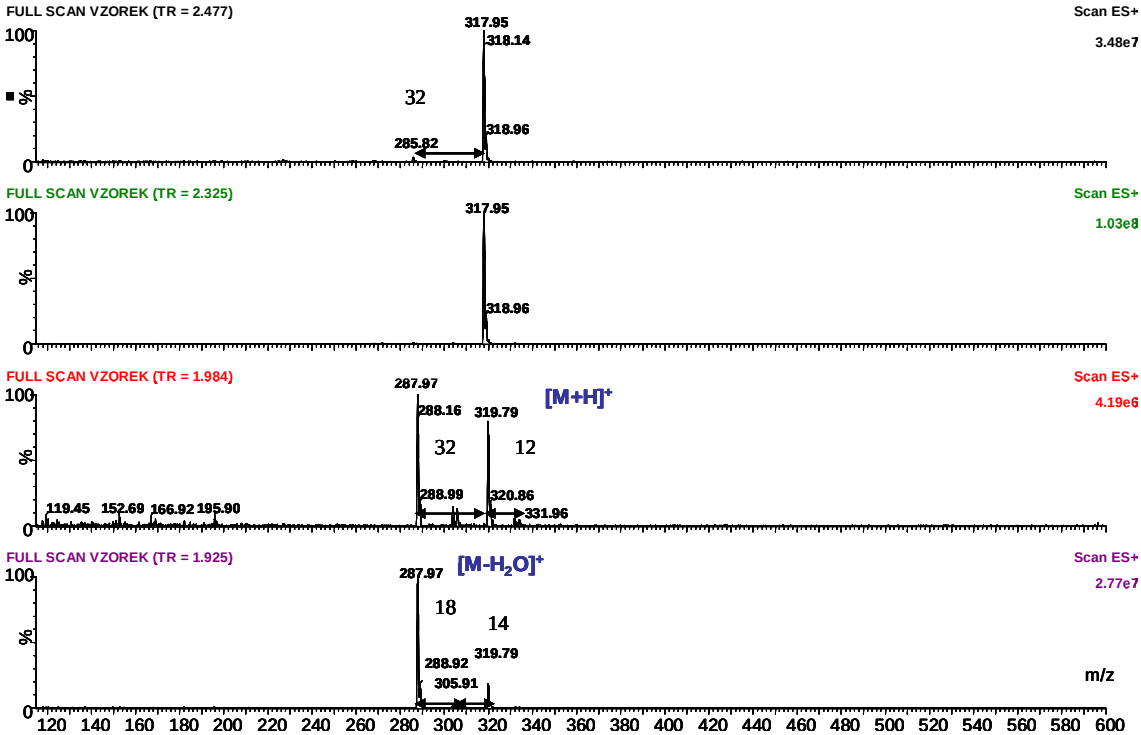
Obrázek 49: spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 330

Spektra vzorku s m/z 330 neobsahovala žádné adukty, ale došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu, (obrázek 49).



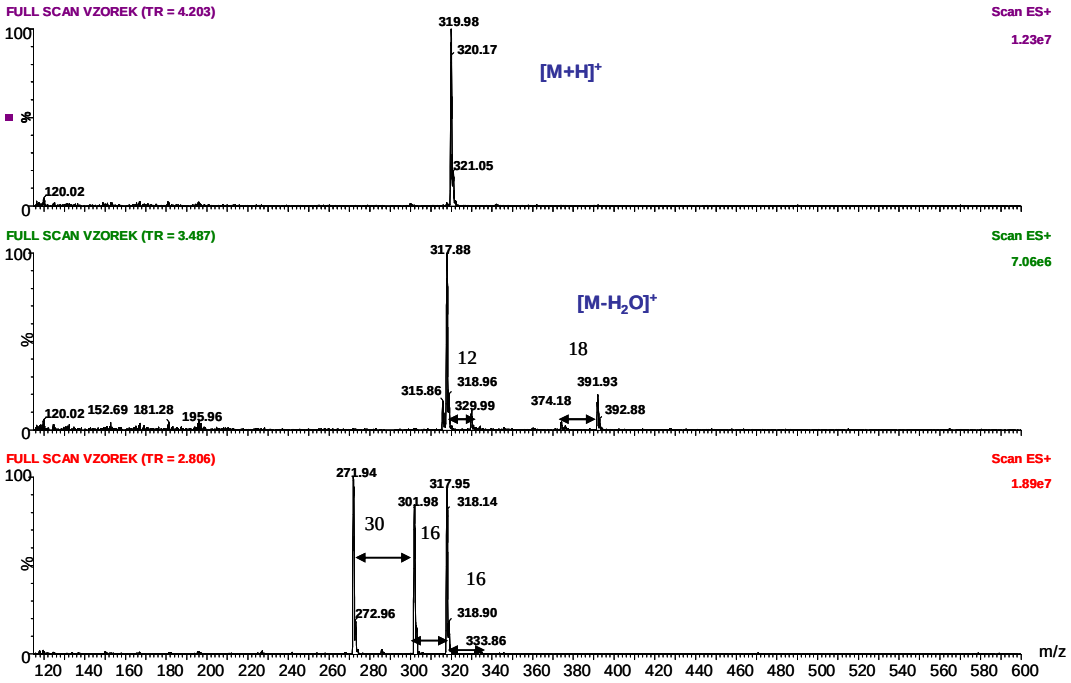
Obrázek 50: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 320

V chromatogramu vzorku bylo nalezeno 7 píků s m/z 320, (obrázek 50).



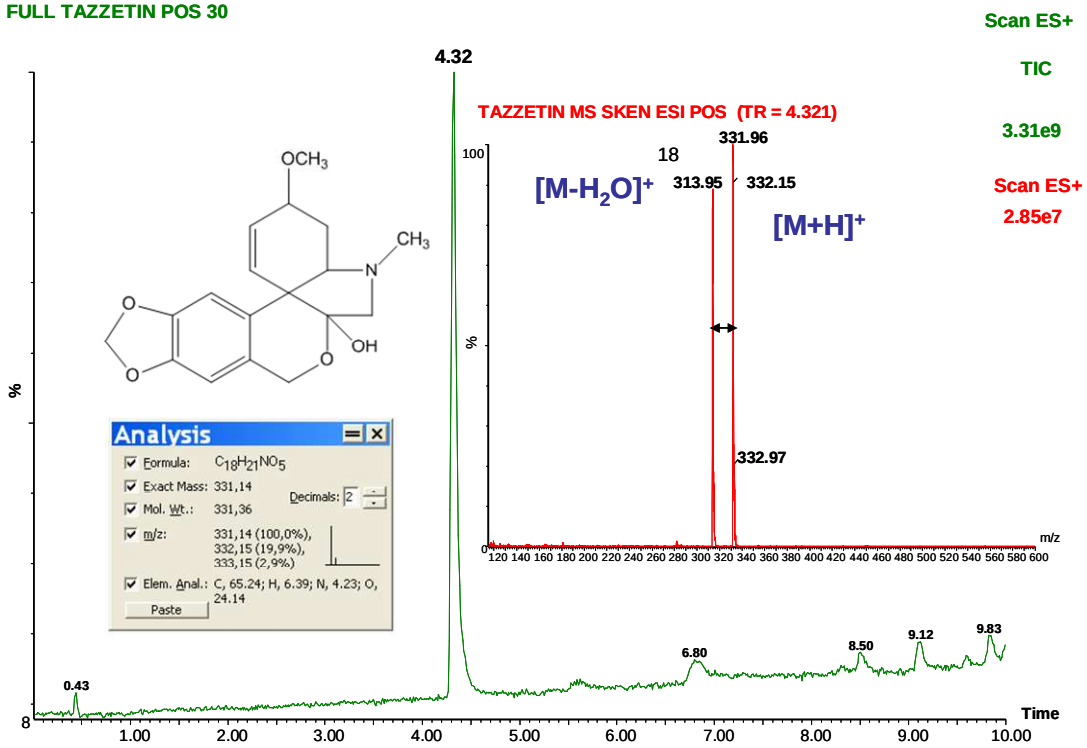
Obrázek 51: spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 320

Spektra vzorku s m/z 320 neobsahovala žádné adukty, ale došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu při t_R 1,984 a k výrazné ztrátě vody $[M-H_2O]^+$ při t_R 1,925. Hlavní píky měly hodnotu m/z 318 a 288, (obrázek 51).



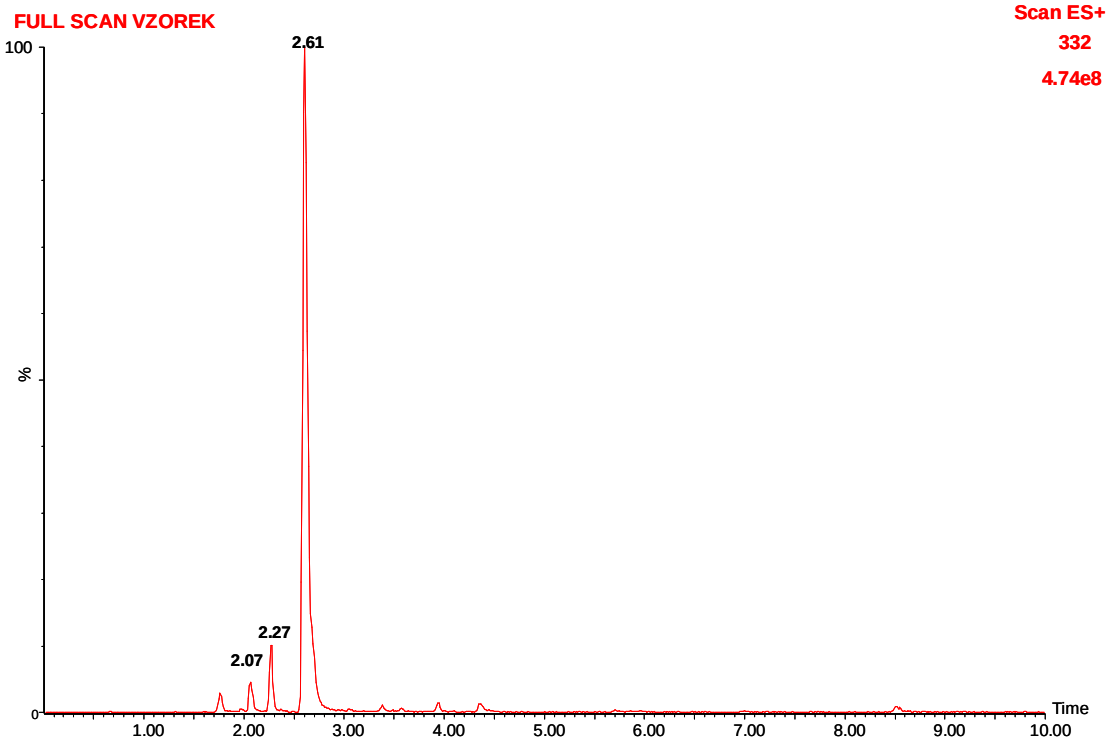
Obrázek 52: spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 320

Další tři spektra vzorku s m/z 320 neobsahovala žádné adukty, ale došlo ke vzniku $[M+H]^+$ kationu při t_R 4,203 a k výrazné ztrátě vody $[M-H_2O]^+$ při t_R 3,487. Hlavní píky měly hodnotu m/z 318, 302 a 272, (obrázek 52).



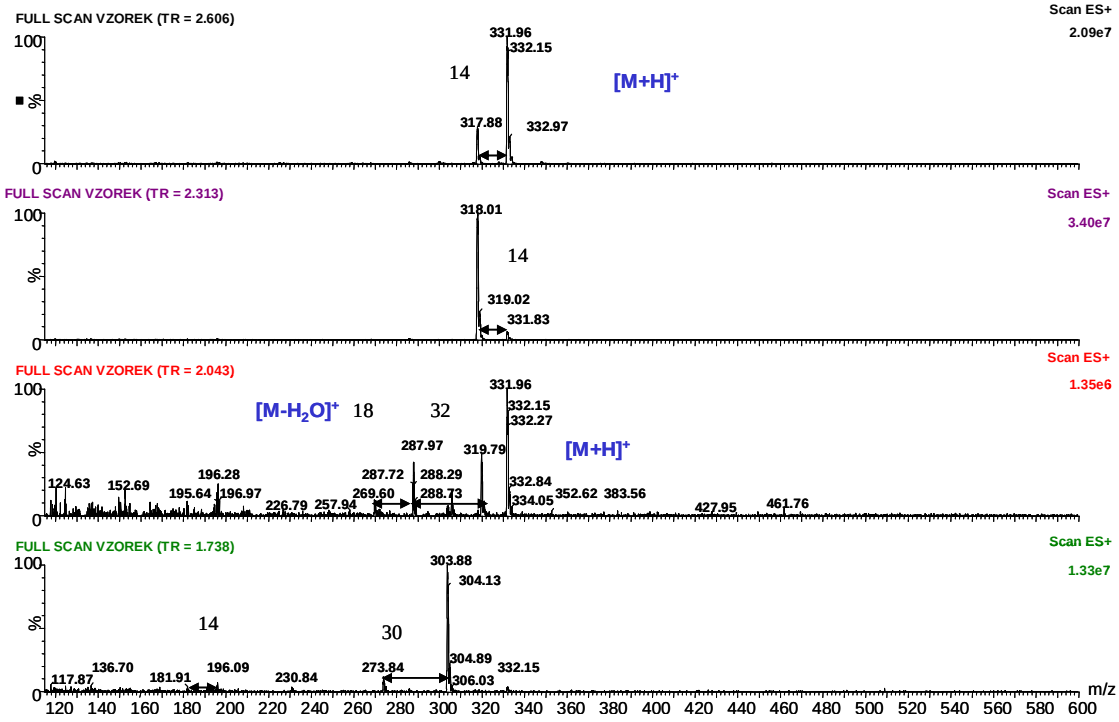
Obrázek 53: chromatogram tazettinu a jeho spektrum se vzorcem

Hodnota m/z protonované molekuly tazettinu je 332. Při ionizaci docházelo k výrazné ztrátě vody $[M-H_2O]^+$. Došlo také ke vzniku $[M+H]^+$ kationu, nebyly zde tvořeny žádné adukty, (obrázek 53).



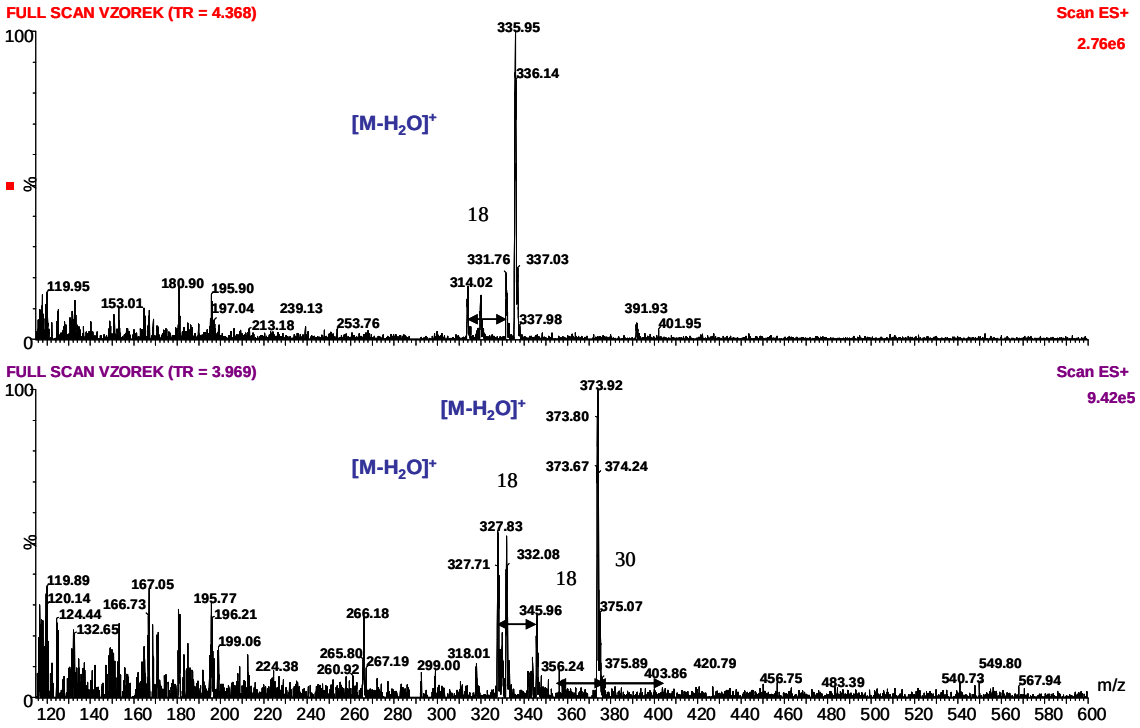
Obrázek 54: chromatogram vzorku odpovídající hodnotě m/z 332

V chromatogramu vzorku bylo nalezeno 6 píků s m/z 332 a získána spektra, (obrázek 54).



Obrázek 55: spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 332

Spektra vzorku se neshodovala se spektrem standardu. Při ionizaci docházelo ke ztrátě vody $[M\text{-}H_2O]^+$. Došlo také ke vzniku $[M+H]^+$ kationu a adukty tvořeny nebyly. Jednalo se tedy o jiné látky, (obrázek 55).



Obrázek 56: : spektra vzorku nalezené hodnoty m/z 332

Další dvě spektra vzorku se neshodovala se spektrem standardu. Při ionizaci docházelo ke ztrátě vody $[M\text{-}H_2O]^+$ a adukty tvořeny nebyly. Jednalo se o jiné látky, (obrázek 56).

K hodnocení přítomnosti alkaloidních látek ve vzorku byly očíslovány píky v chromatogramu vzorku, (obrázek 25). Byly zde nalezeny látky podle hodnot m/z standardů, látky isomerní ve vztahu k látkám standardním a také látky další, (tabulka 6).

Z hlediska MS spekter byly porovnávány látky ve vzorku se standardy. Podle výsledků a podobnosti spekter lze potvrdit přítomnost alkaloidů. Galanthin a lycoramin se svými identickými výsledky ve vzorku se prokázaly jistou přítomností. Shodných výsledků dosáhly i látky jako galanthamin a haemanthamin. Obsah tazettinu ve vzorku se neprojevil tak výrazně jako předchozí látky z důvodu jeho přítomnosti v nízké koncentraci ve vzorku.

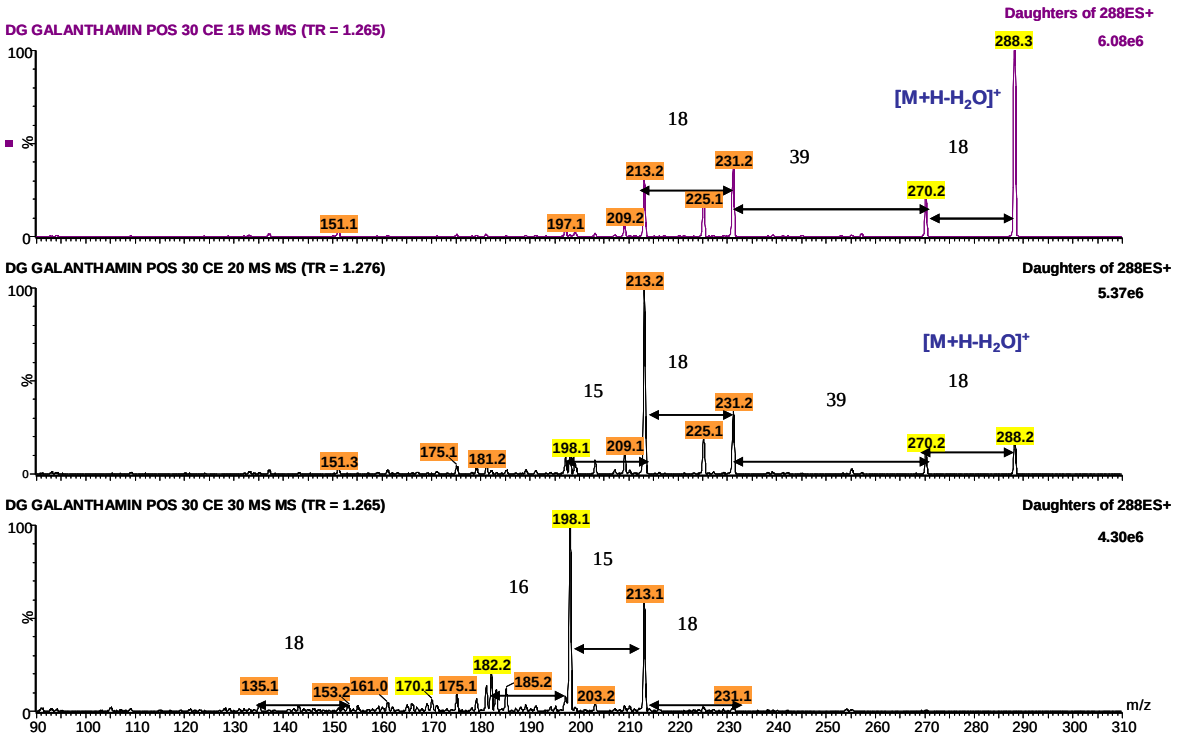
Dále byly hodnoceny pomocí MS spekter ostatní látky, které se vyskytovaly ve vzorku. Spektra těchto látek často obsahovala jako hlavní píky hodnoty m/z jiných látek. Teoreticky byla hodnota m/z 272 odhadnuta na látku vittatin [8], hodnota m/z 304 na 11-hydroxygalanthamin viz tabulka 1, hodnota m/z 320 na alkaloid nerbowdin [8]. Tuto skutečnost by bylo nutno ověřit pomocí fragmentace, použití standardů, případně s použitím dalších analytických technik.

5.5 FRAGMENTACE LÁTEK

Spektra fragmentace látek byla naměřena při třech hodnotách kolizní energie (15, 20, 30 V). Tato analýza štěpení byla nejdříve měřena u látek standardních. Informace o štěpení byly získány z odborné literatury [27][32][38][58][59]. Pak proběhlo měření pro vzorek, kde nejprve byly vyhodnoceny hodnoty m/z odpovídající standardům. Spektra standardů a spektra vzorku byly porovnávána. Jednotlivé podkapitoly této části jsou rozděleny právě podle hodnot m/z náležící standardům.

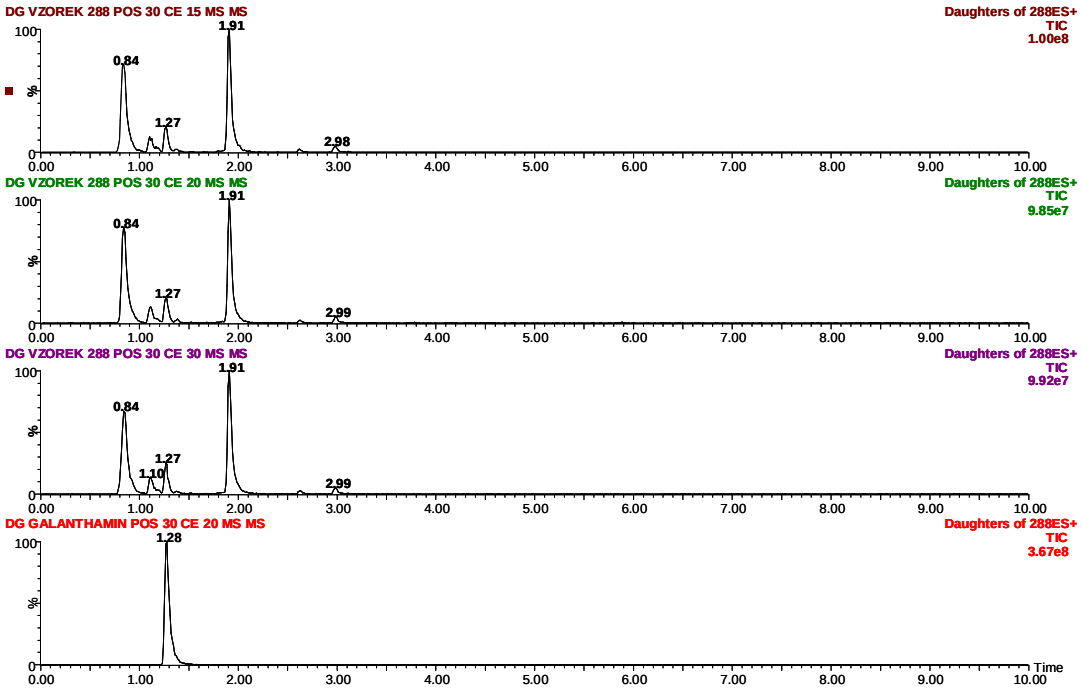
Dále byla naměřena spektra fragmentace zbylých hodnot m/z dalších alkaloidních látek, které se ve vzorku vyskytovaly. Chromatogramy a spektra těchto dalších látek jsou uvedeny v kapitole příloha.

5.5.1 Fragmentace m/z 288



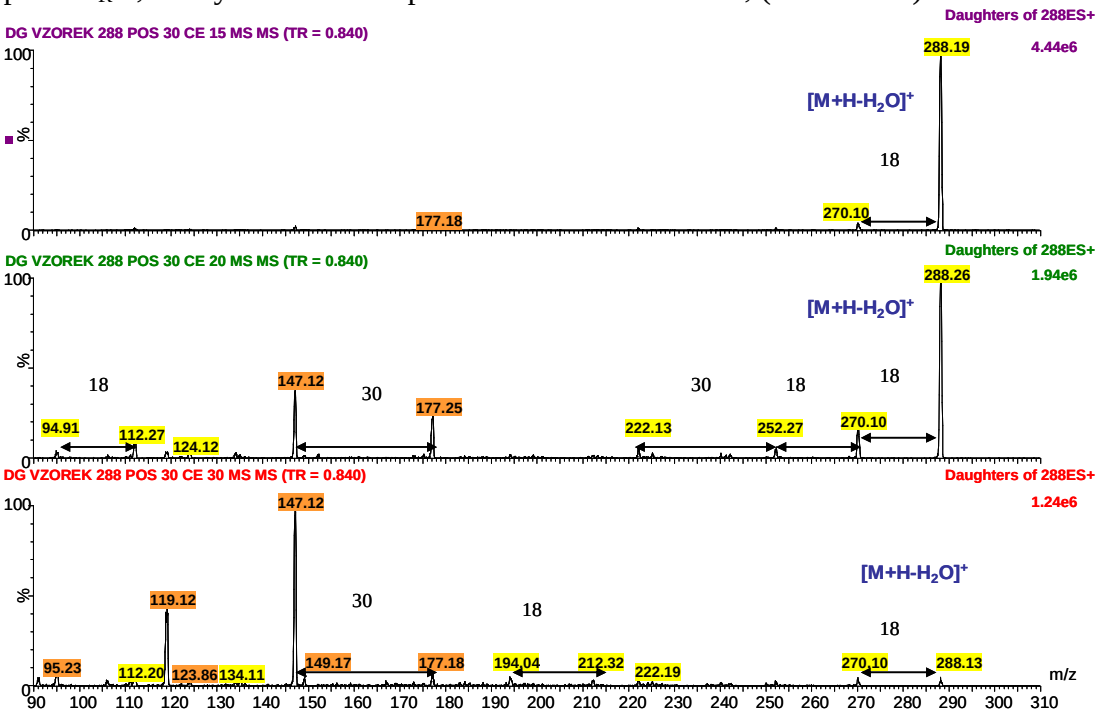
Obrázek 57: spektra fragmentace standardu galanthaminu při kolizních energiích 15, 20, 30 V

Při fragmentaci galanthaminu docházelo ke ztrátě 18, tedy k odštěpení molekuly vody. Dále docházelo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2, a 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta činila 39, (obrázek 57).



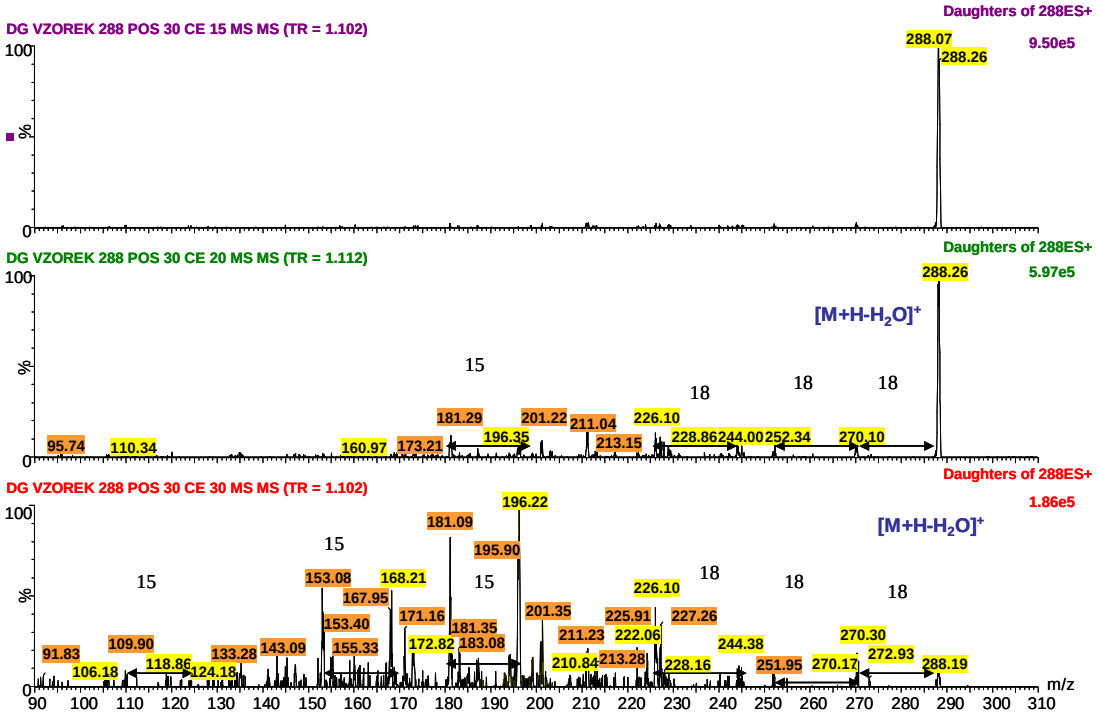
Obrázek 58: chromatogramy fragmentace vzorku po nalezení hodnoty m/z 288 při kolizních energiích 15, 20, 30 V a porovnání s galanthaminem při kolizní energii 20 V

Chromatogramy s m/z 288 se shodovaly s chromatogramem galanthaminu přítomností píku s t_R 1,27. Bylo nalezeno 6 píků s touto hodnotou m/z, (obrázek 58).



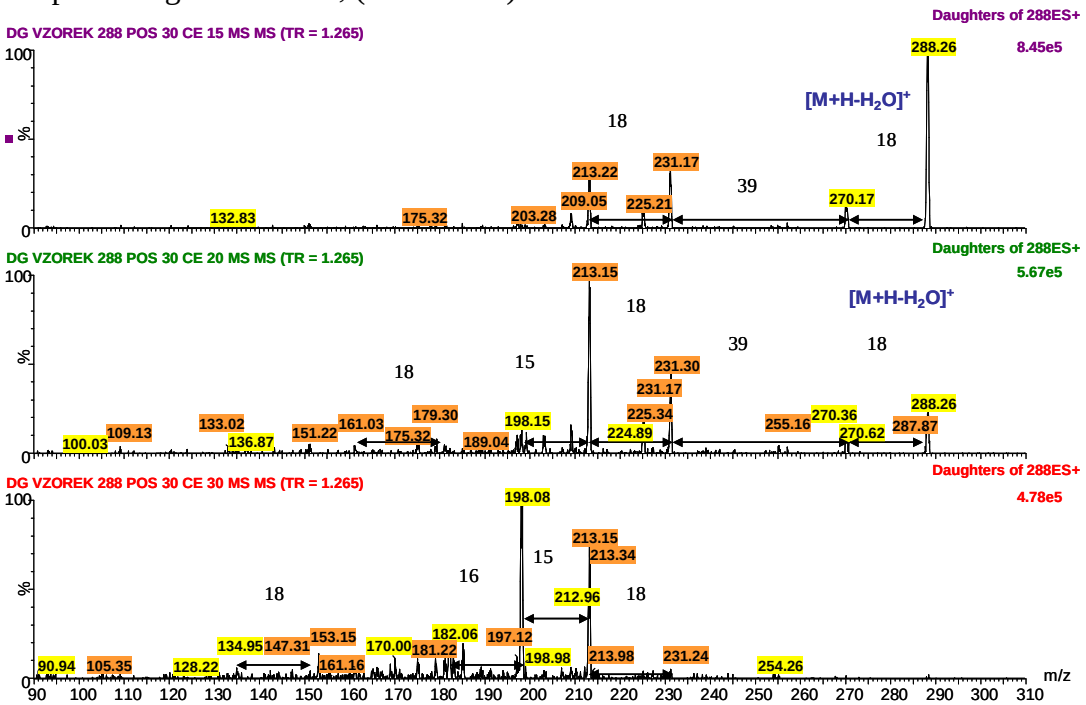
Obrázek 59: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 288 při t_R 0,84, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 0,84 obsahovala ztrátu 18, odštěpení molekuly vody. Další častou ztrátou bylo 30. Spektra fragmentace se zcela neshodovala se spektrem galanthaminu, (obrázek 59).



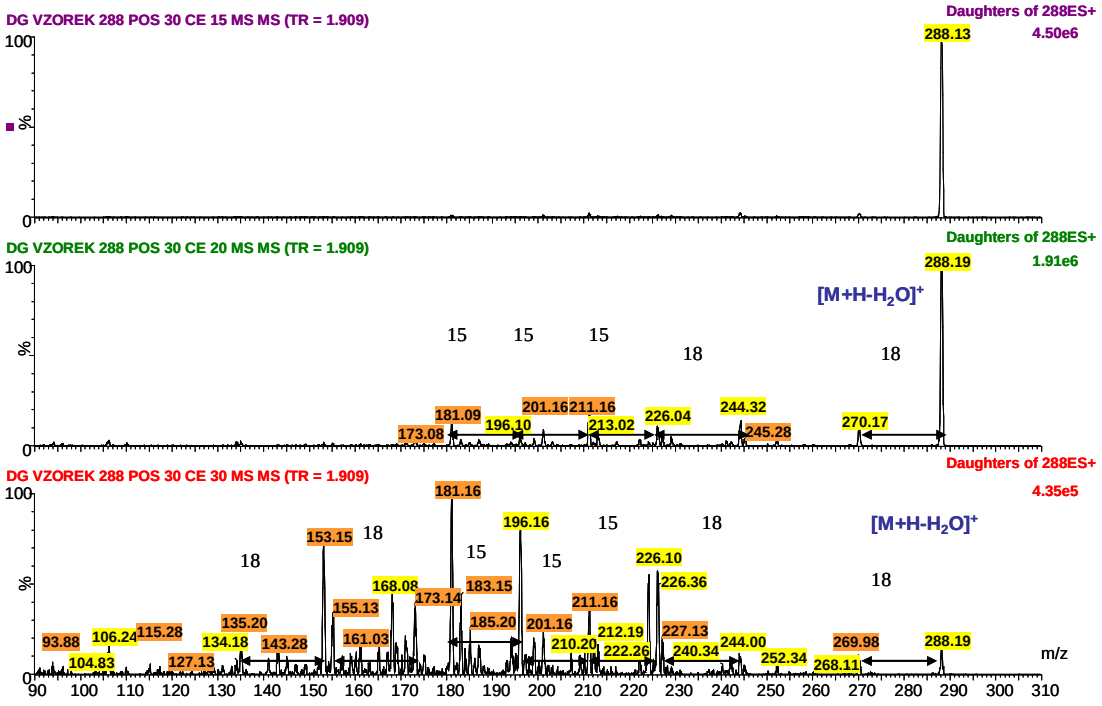
Obrázek 60: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 288 při t_R 1,10, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,10 obsahovala ztrátu 18, odštěpení molekuly vody. Další častou ztrátou bylo 15, tedy odštěpení CH_3. Spektra fragmentace se zcela neshodovala se spektrem galanthaminu, (obrázek 60).



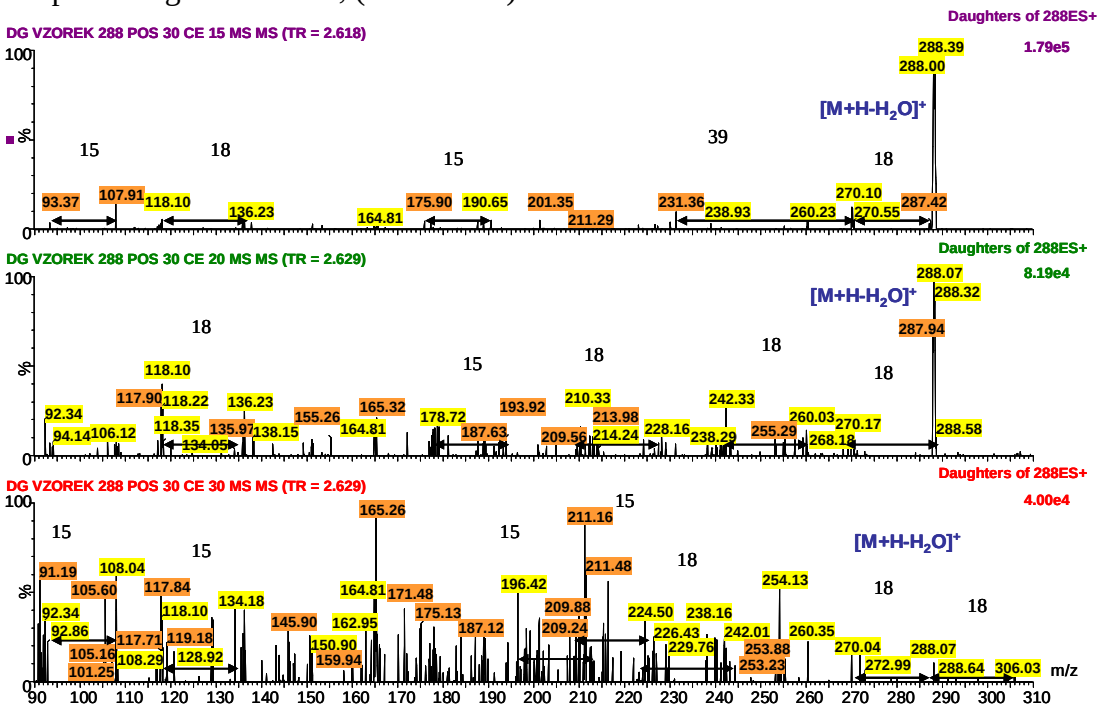
Obrázek 61**:** spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 288 při t_R 1,27, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,27 obsahovala ztrátu 18, odštěpení molekuly vody. Dále docházelo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2, a 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta činila 39. Spektra fragmentace se zcela shodovala se spektrem galanthaminu a také díky shodnému t_R se standardem, (obrázek 61).



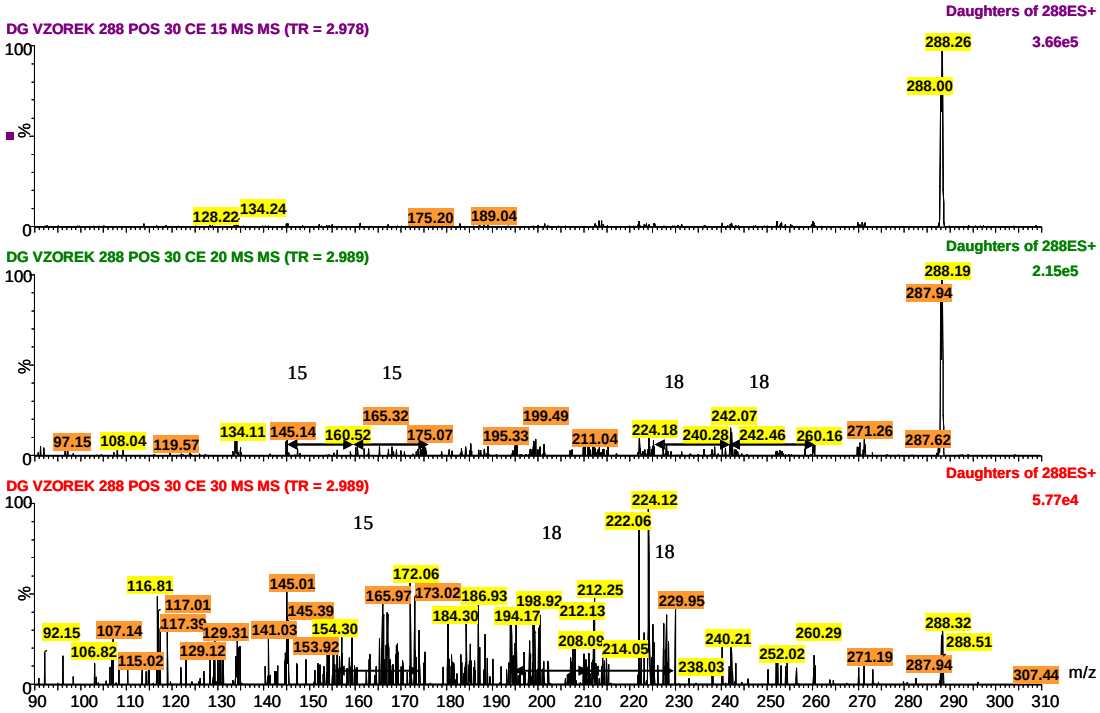
Obrázek 62: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 288 při t_R 1,91, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,91 obsahovala ztrátu 18, odštěpení molekuly vody. Další častou ztrátou bylo 15, tedy odštěpení CH_3. Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem galanthaminu, (obrázek 62).



Obrázek 63: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 288 při t_R 2,62, při kolizních energiích 15, 20, 30V

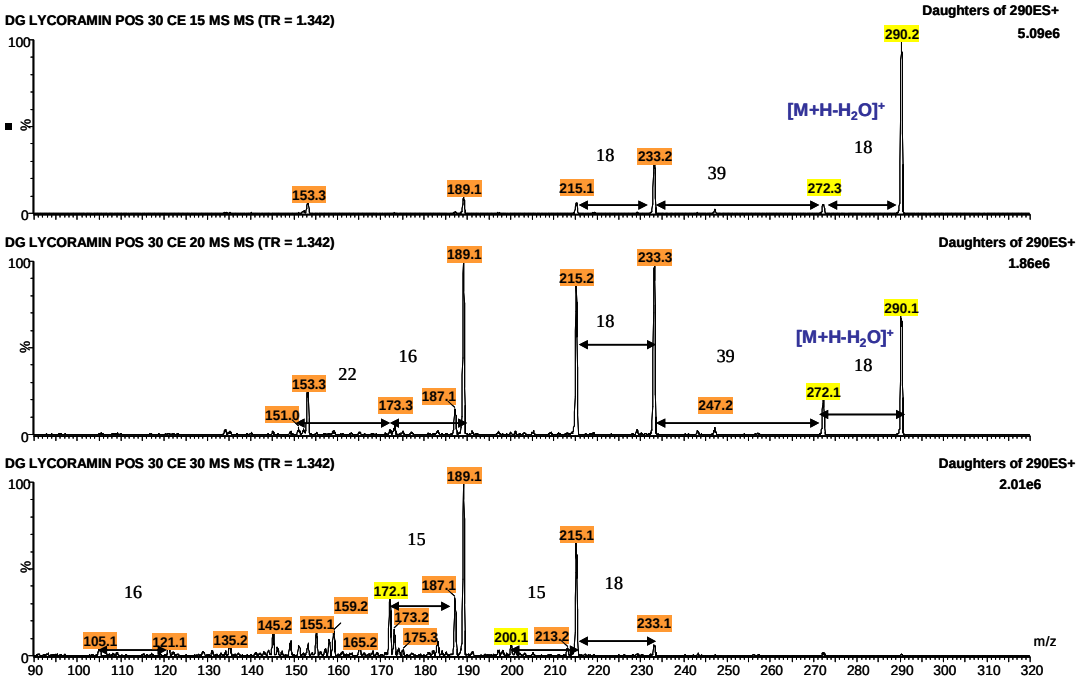
Spektra fragmentace při t_R 2,62 obsahovala ztrátu 18, odštěpení molekuly vody. Další častou ztrátou bylo 15, tedy odštěpení CH_3. Méně pak ztráta činila 39. Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem galanthaminu, (obrázek 63).



Obrázek 64: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 288 při t_R 2,98, při kolizních energiích 15, 20, 30V

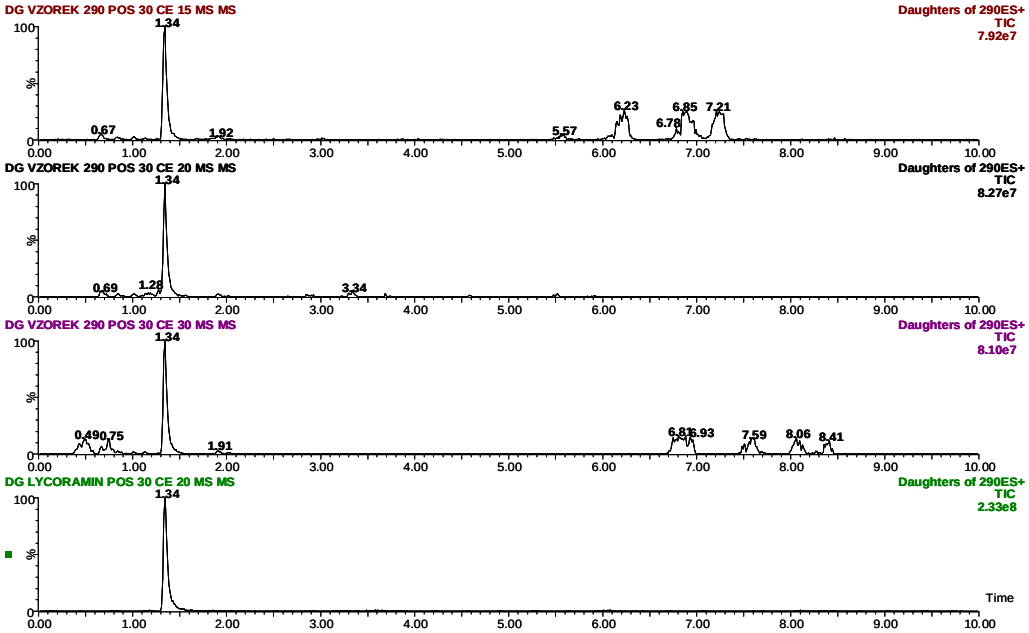
Spektra fragmentace při t_R 2,98 obsahovala ztrátu 18, odštěpení molekuly vody. Další častou ztrátou bylo 15, tedy odštěpení CH_3. Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem galanthaminu, (obrázek 64).

5.5.2 Fragmentace m/z 290



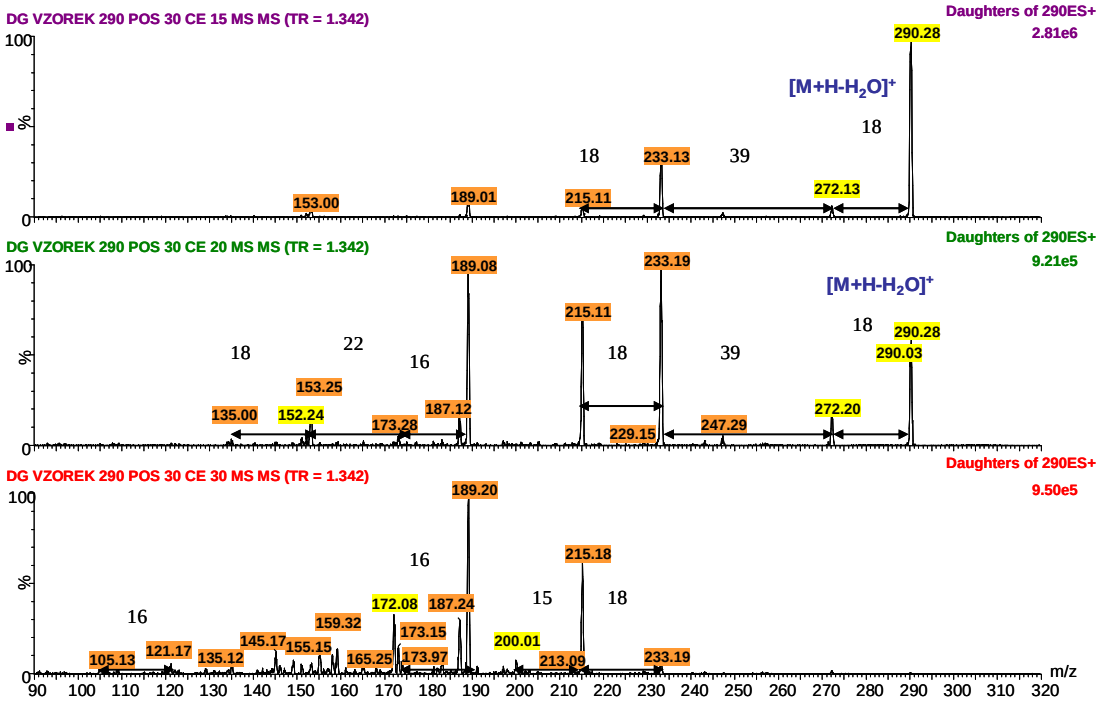
Obrázek 65: spektra fragmentace standardu lycoraminu při kolizních energiích 15, 20, 30 V

Při fragmentaci lycoraminu docházelo ke ztrátě 18, tedy k odštěpení vody. Dále docházelo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2, a 15, což byla ztráta CH_3. Další časté ztráty byly 39 a 22, (obrázek 65).



Obrázek 66: chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 290 při kolizních energiích 15, 20, 30 V a porovnání s lycoraminem při kolizní energii 20 V

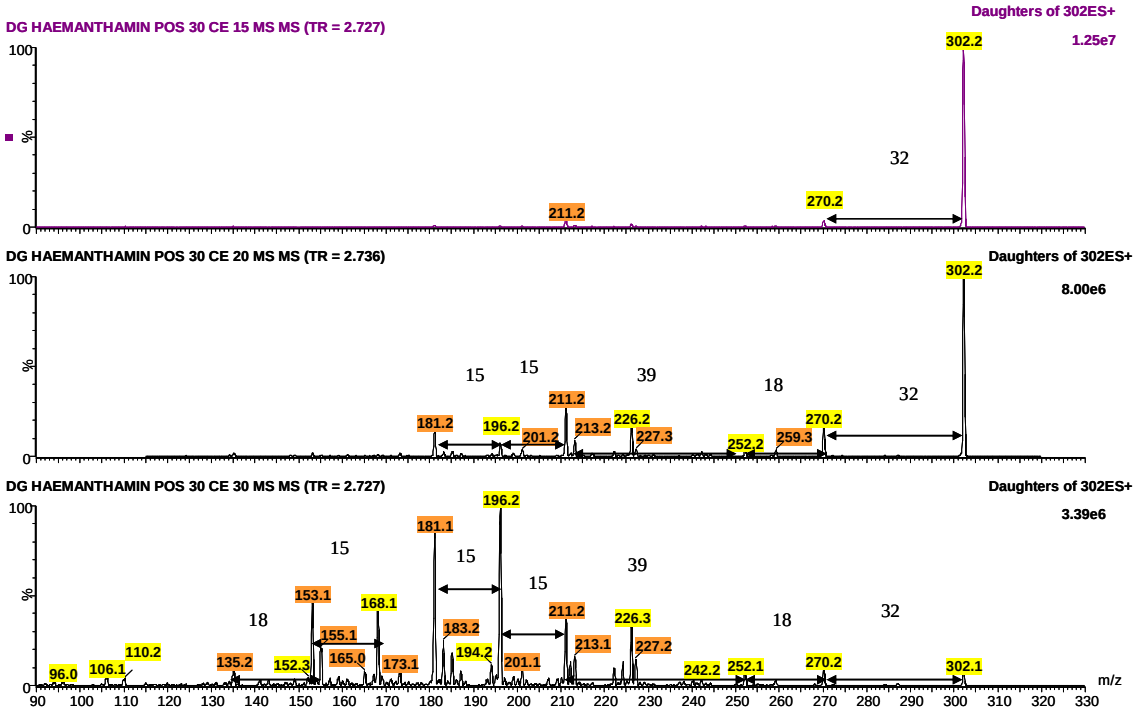
Chromatogramy s m/z 290 se shodovaly s chromatogramem lycoraminu přítomností píku s t_R 1,34. Byl nalezen 1 pík s touto hodnou m/z, (obrázek 66).



Obrázek 67: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 290 při t_R 1,34, při kolizních energiích 15, 20, 30V

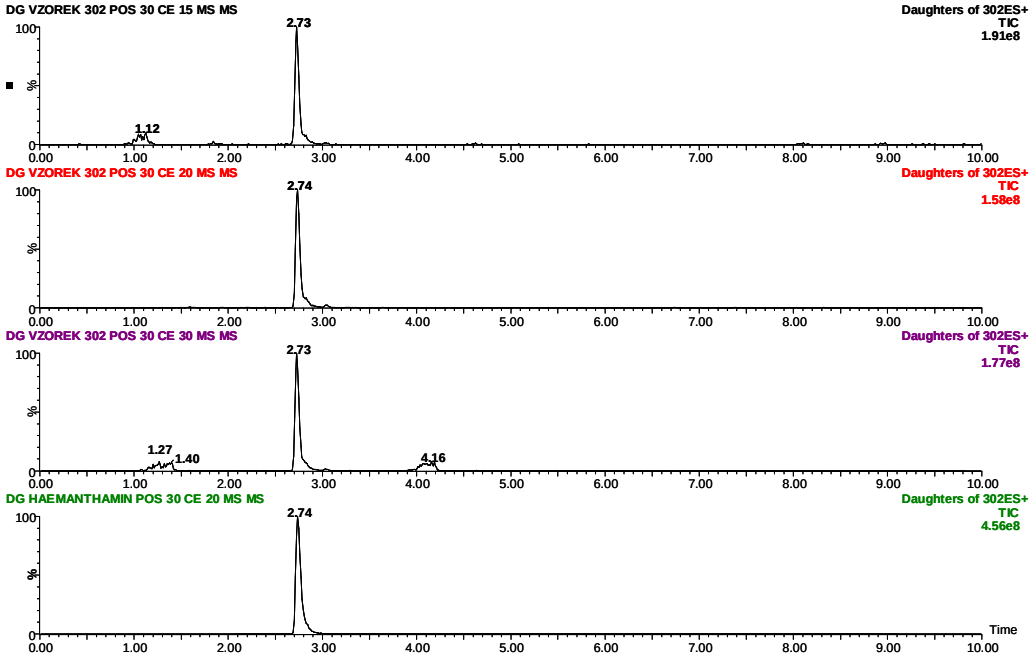
Spektra fragmentace při t_R 1,34 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení vody. Dále docházelo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2, a 15, což byla ztráta CH_3. Další časté ztráty byly 39 a 22. Spektra fragmentace se zcela shodovala se spektrem lycoraminu a také díky shodnému t_R se standardem, (obrázek 67).

5.5.3 Fragmentace m/z 302



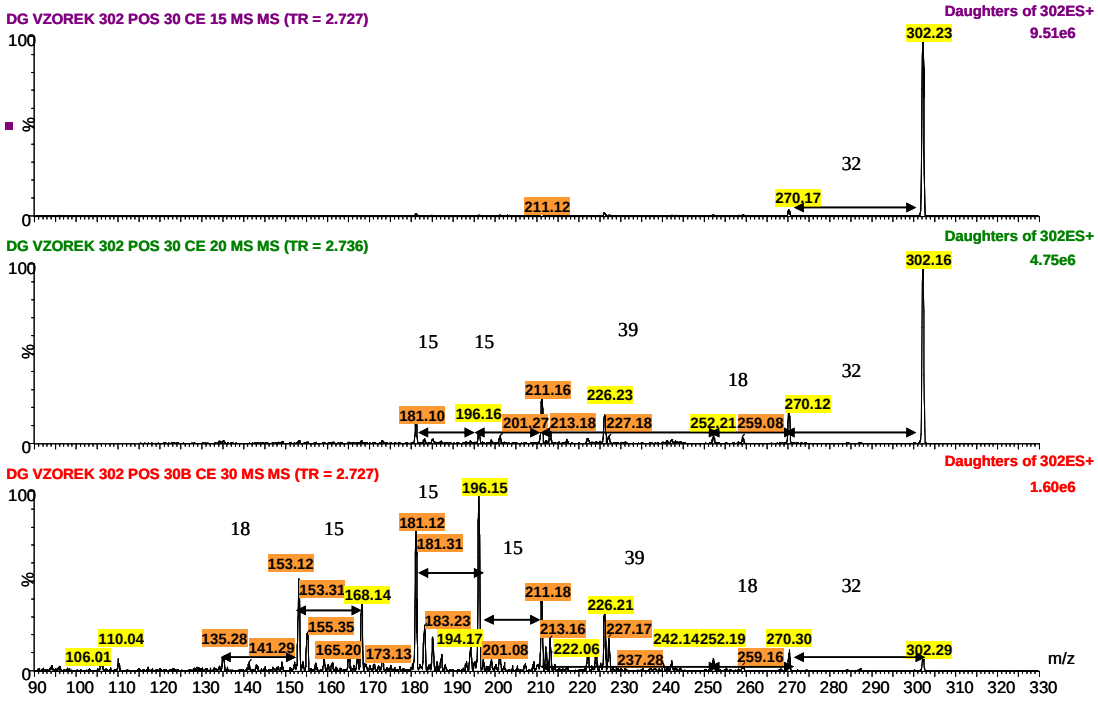
Obrázek 68: spektra fragmentace standardu haemanthaminu při kolizních energiích 15, 20, 30 V

Při fragmentaci haemanthaminu docházelo ke ztrátě 18, tedy k odštěpení molekuly vody a dále 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráty byly 32 a 39, (obrázek 68).



Obrázek 69: chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 302 při kolizních energiích 15, 20, 30 V a porovnání s haemanthaminem při kolizní energii 20 V

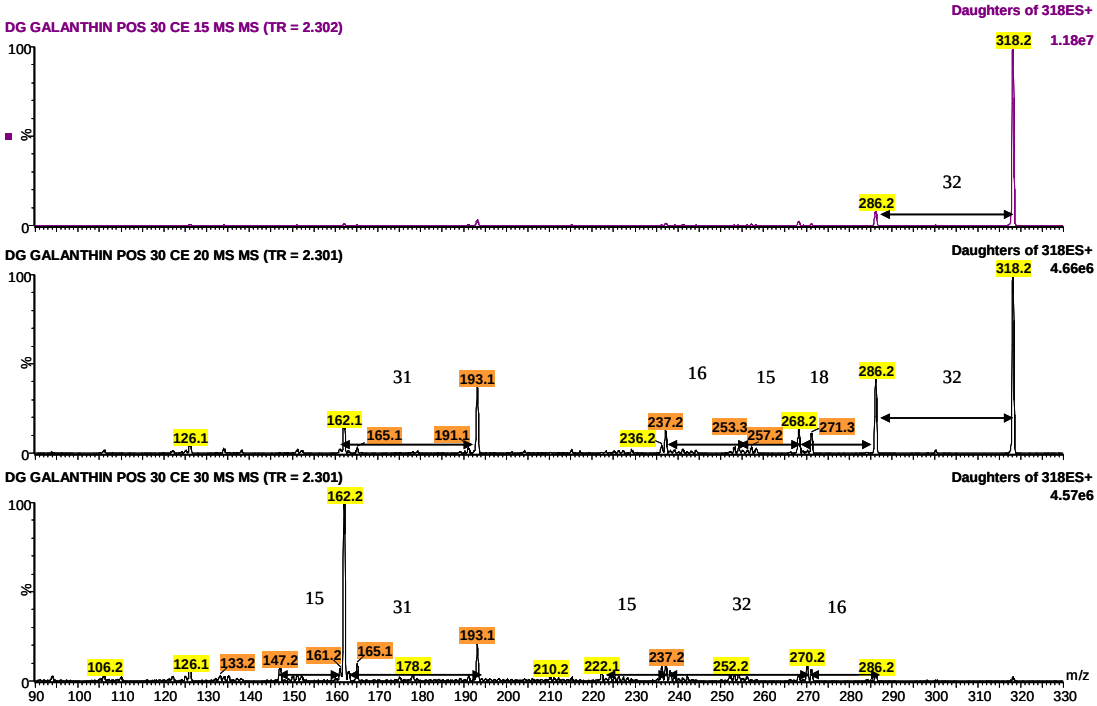
Chromatogramy s m/z 302 se shodovaly s chromatogramem haemanthaminu přítomností píku s t_R 2,74. Byl nalezen 1 pík s touto hodnotou m/z, (obrázek 69).



Obrázek 70: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 302 při t_R 2,73, při kolizních energiích 15, 20, 30V

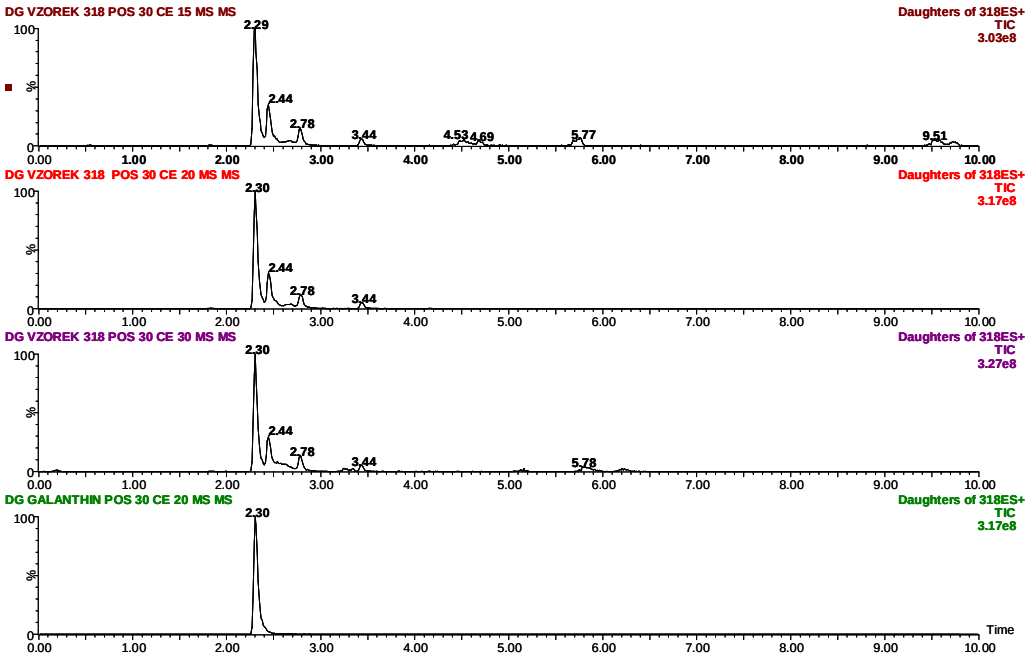
Spektra fragmentace při t_R 2,73 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody a dále 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 32. Spektra fragmentace se zcela shodovala se spektrem haemanthaminu a také díky shodnému t_R se standardem, (obrázek 70).

5.5.4 Fragmentace m/z 318



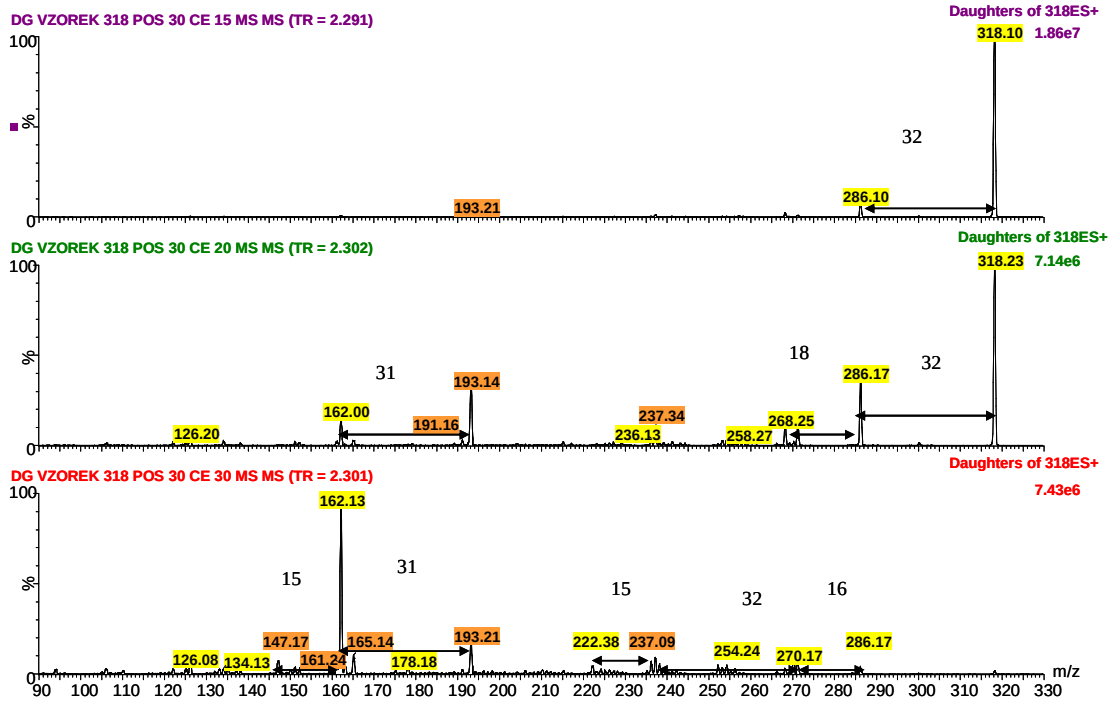
Obrázek 71: spektra fragmentace standardu galanthinu při kolizních energiích 15, 20, 30 V

Při fragmentaci galanthinu docházelo ke ztrátě 18, tedy k odštěpení molekuly vody. Dále docházelo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2, a 15, což byla ztráta CH_3. Další časté ztráty byly 32 a 31, (obrázek 71).



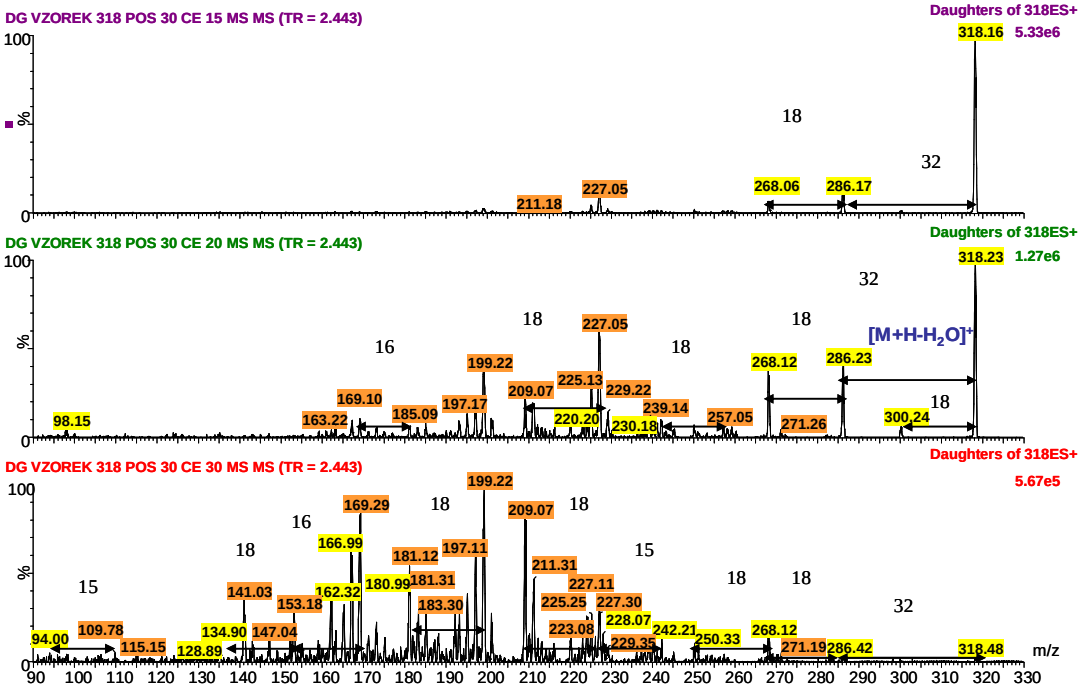
Obrázek 72: chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 318 při kolizních energiích 15, 20, 30 V a porovnání s galanthinem při kolizní energii 20 V

Chromatogramy s m/z 318 se shodovaly s chromatogramem galanthinu přítomností píku s t_R 2,30. Celkem byly nalezeny 4 píky s hodnotou m/z 318, (obrázek 72).



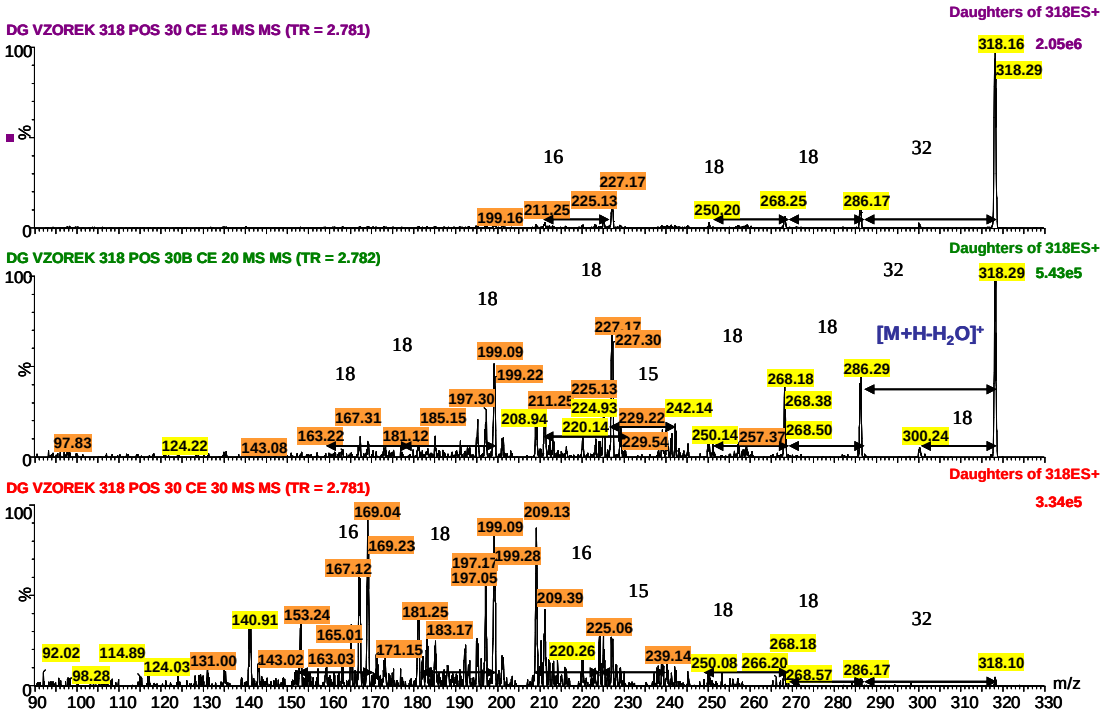
Obrázek 73**:** spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 318 při t_R 2,30, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 2,30 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Dále 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2, a 15, což byla ztráta CH_3. Další časté ztráty byly 32 a 31, (obrázek 73). Spektra fragmentace se shodovala se spektrem galanthinu, také podle shodného t_R se standardem.



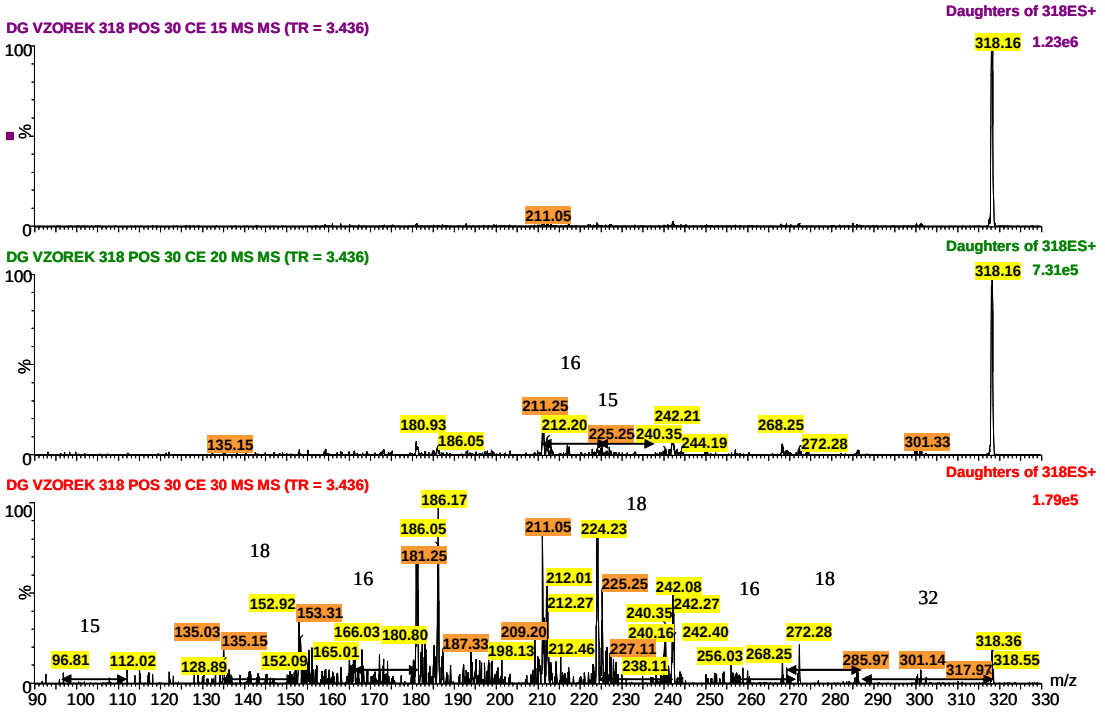
Obrázek 74: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 318 při t_R 2,44, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 2,44 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Dále ztrátu 16, čímž došlo k odštěpení NH_2, a 15, tedy ztráta CH_3. Další ztráta byla 32. Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem galanthinu, (obrázek 74).



Obrázek 75: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 318 při t_R 2,78, při kolizních energiích 15, 20, 30V

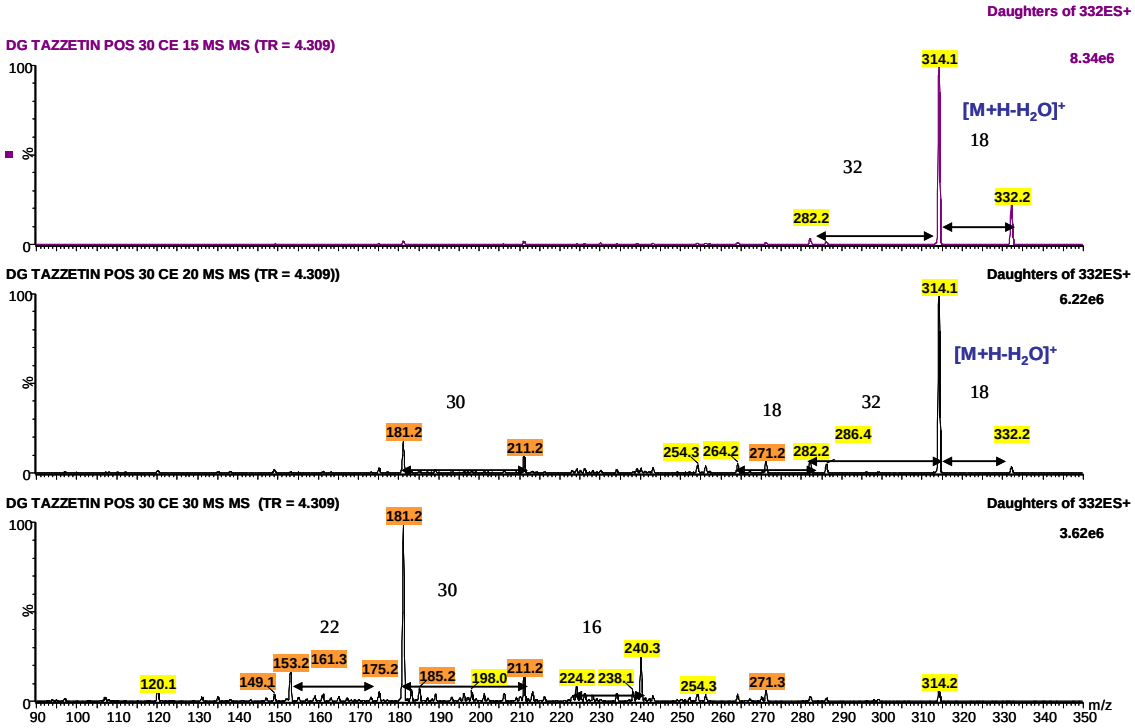
Spektra fragmentace při t_R 2,78 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení vody. Dále ztrátu 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2, a 15, což byla ztráta CH_3. Další častá ztráta byla 32. Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem galanthinu, (obrázek 75).



Obrázek 76: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 318 při t_R 3,44, při kolizních energiích 15, 20, 30V

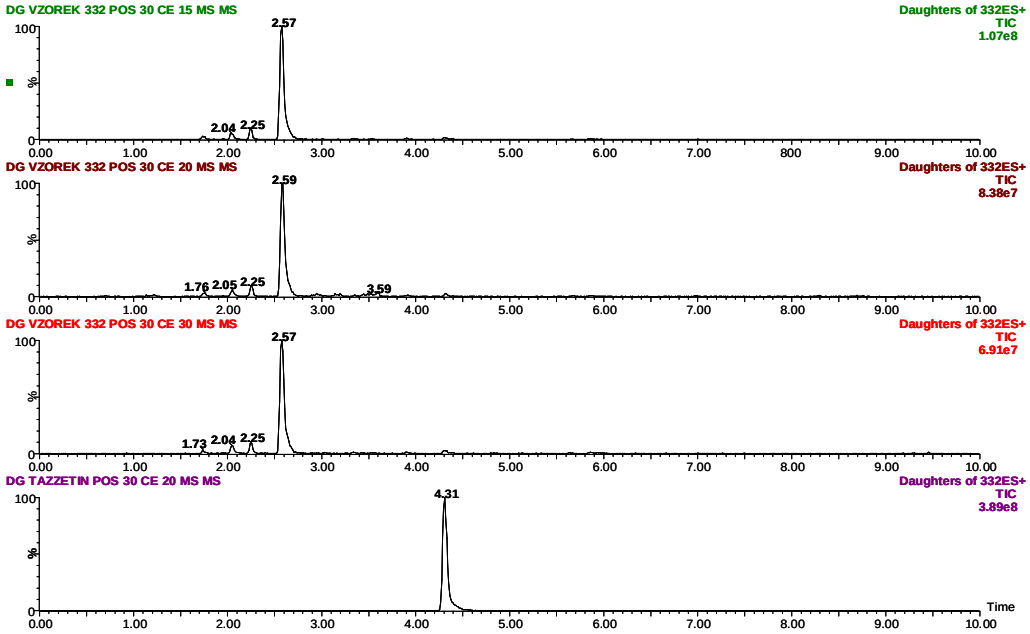
Spektra fragmentace při t_R 3,44 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody a dále ztrátu 16, čímž došlo k odštěpení NH_2, a 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 32. Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem galanthinu, (obrázek 76).

5.5.5 Fragmentace m/z 332



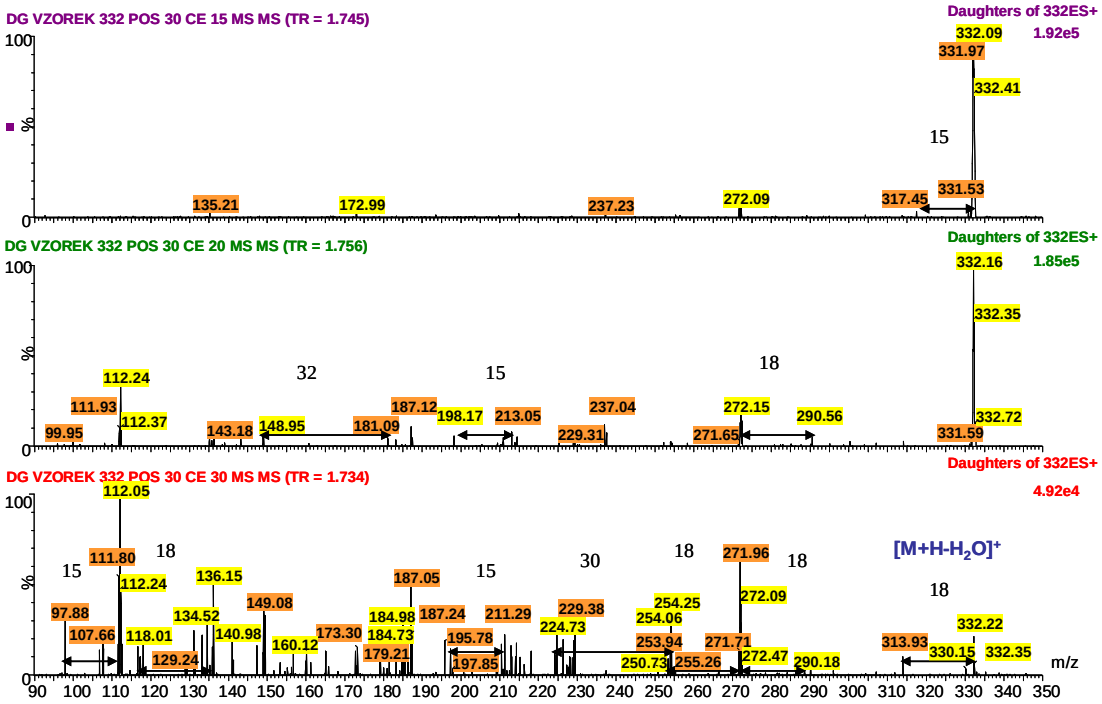
Obrázek 77**:** spektra fragmentace tazettinu při kolizních energiích 15, 20, 30 V

Při fragmentaci tazettinu docházelo ke ztrátě 18, tedy k odštěpení vody. Dále docházelo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Další častá ztráta byla 30 a to bylo odštěpení H_2CO, méně 22 , (obrázek 77).



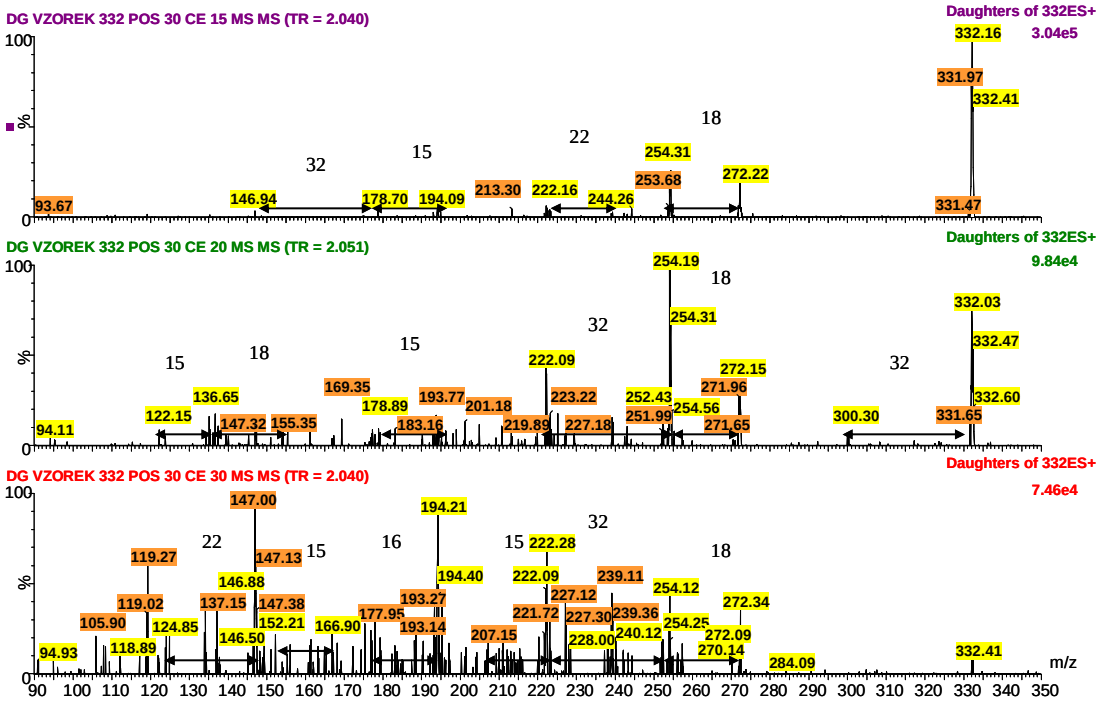
Obrázek 78: chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 332 při kolizních energiích 15, 20, 30 V a porovnání s tazettinem při kolizní energii 20 V

Chromatogramy s m/z 332 se neshodovaly s chromatogramem tazettinu přítomností výrazného píku s t_R 4,31. Bylo nalezeno 5 píků s hodnotou m/z 332, (obrázek 78).



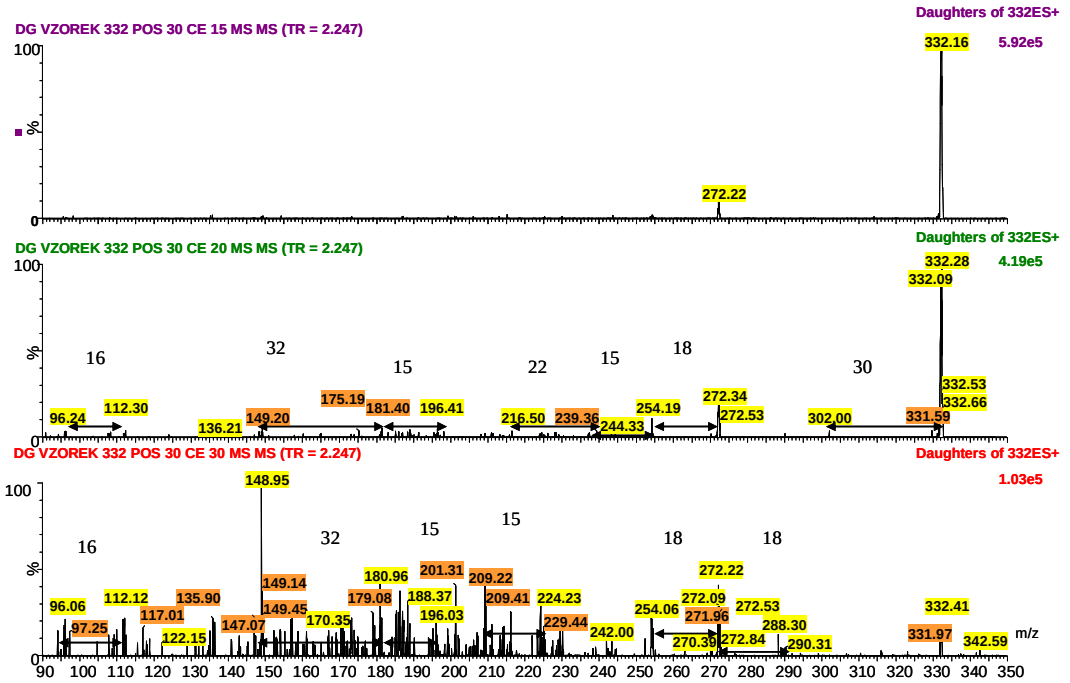
Obrázek 79: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 332 při t_R 1,73, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,73 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Dále odštěpení 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 32, dále 30 a to bylo odštěpení H_2CO. Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem tazettinu, (obrázek 79).



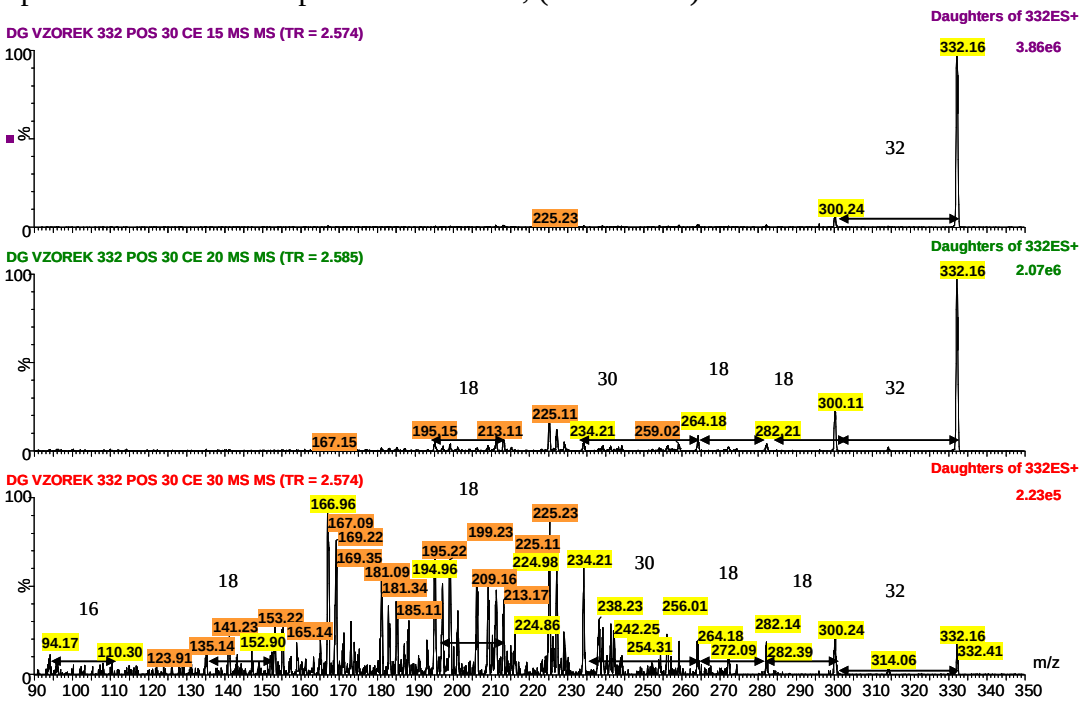
Obrázek 80**:** spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 332 při t_R 2,04, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 2,04 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody, a 15, tedy ztráta CH_3. Došlo ke ztrátám 16, čímž došlo k odštěpení NH_2. Další ztráty byly 32 a 22. Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem tazettinu, (obrázek 80).



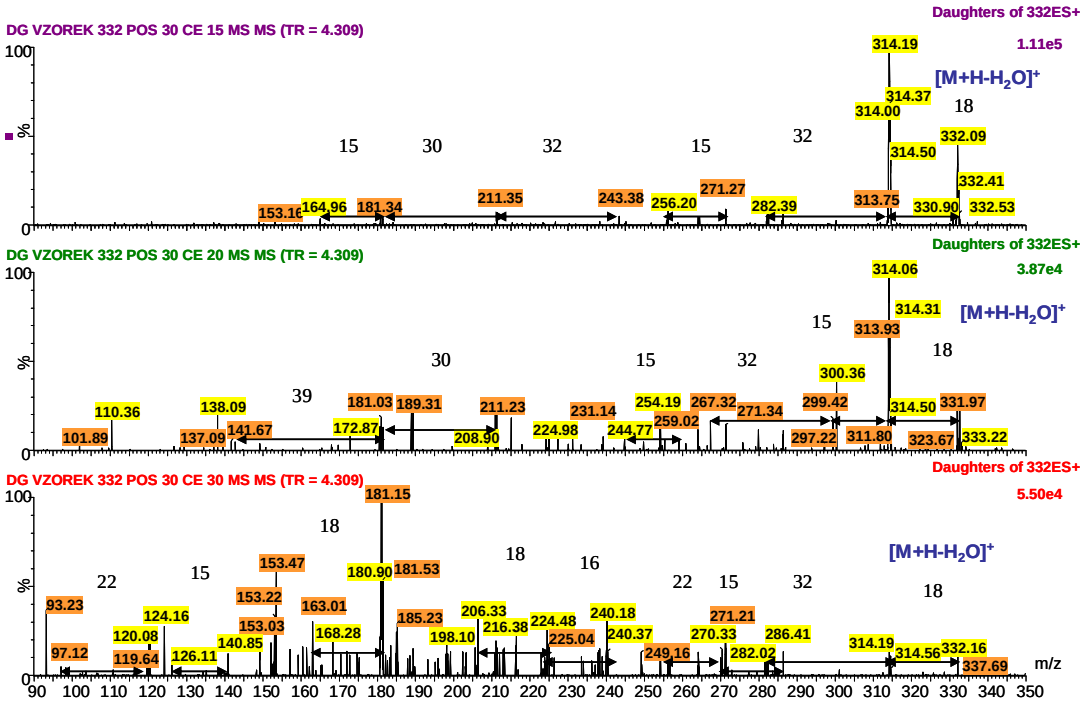
Obrázek 81: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 332 při t_R 2,25, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 2,25 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody a dále 15, což byla ztráta CH_3. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Další ztráty byly 32 a 22, dále 30, a to bylo odštěpení H_2CO Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem tazettinu, (obrázek 81).



Obrázek 82: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 332 při t_R 2,57, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 2,57 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž došlo k odštěpení NH_2. Další ztráta byla 32, dále 30 a to bylo odštěpení H_2CO. Spektra fragmentace se úplně neshodovala se spektrem tazettinu, (obrázek 82).



Obrázek 83: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 332 při t_R 4,31, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 4,31 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráty byly 32 a 22. Spektra fragmentace se úplně přesně neshodovala se spektrem tazettinu, přitom se jednalo o t_R standardu, (obrázek 83).

látka	**t_R**	**MS**	**MS/MS**
galanthamin	1,27	288	288, 270, 231, 225, 213, 198, 182, 175, 151
vzorek	0,84		288, 270, 222, 177, 147, 112, 95
	1,10		288, 270, 252, 244, 226, 211, 196, 181, 153, 110
	1,27		288, 270, 231, 225, 213, 198, 175, 161, 135
	1,91		288, 270, 244, 226, 211, 196, 181, 153
	2,62		288, 270, 260, 242, 211, 165, 136, 118, 106, 92
	2,92		288, 271, 260, 240, 224, 198, 165, 145, 134
lycoramin	1,34	290	290, 272, 233, 215, 189, 172
vzorek	1,34		290, 272, 233, 215, 189, 172
haemanthamin	2,73	302	302, 270, 252, 226, 211, 196, 181, 168, 153
vzorek	2,73		302, 270, 252, 226, 211, 196, 181, 168, 153
galanthin	2,30	318	318, 286, 268, 237, 193, 162, 126
vzorek	2,30		318, 286, 268, 237, 193, 162, 126
	2,44		318, 286, 268, 227, 209, 199, 169
	2,78		318, 286, 268, 227, 209, 199, 169, 124
	3,44		318, 272, 268, 242, 225, 211, 186, 181
tazettin	4,31	332	332, 314, 282, 271, 240, 211, 181, 153, 120
vzorek	1,73		332, 290, 272, 229, 187, 149, 112
	2,04		332, 272, 254, 222, 194, 147, 94
	2,25		332, 272, 254, 196, 181, 149, 136, 112, 96
	2,57		332, 300, 282, 264, 225, 213, 195, 167
	4,31		332, 314, 282, 271, 240, 211, 181, 153

Tabulka 7: souhrn alkaloidních látek a jejich m/z ve vzorku, jejich t_R, MS a MS/MS hodnoty

MS/MS spektra látek s hodnotami m/z standardů byla porovnávána s MS/MS spektry standardů. Podle výsledků a podobnosti spekter lze potvrdit přítomnost alkaloidů.

Galanthamin, galanthin, haemanthamin a lycoramin měly identické MS/MS spektra se spektry příslušných hodnot m/z ve vzorku při shodném t_R. I jejich MS/MS hodnoty při stejném t_R se shodovaly. Při rozdílných hodnotách t_R, v případě hodnot m/z 288 a 318, již naprosto identické výsledky dosaženy nebyly, ale MS/MS hodnoty si byly často podobné, a proto lze z těchto výsledků usuzovat, že se jednalo o izomerní látky, které byly přítomny ve vzorku. Obsah tazettinu ve vzorku se neprojevil tak výrazně jako předchozí látky z důvodu jeho přítomnosti v nízké koncentraci. Jeho MS/MS spektrum se spektrem příslušné hodnoty m/z ve vzorku při shodném t_R nebylo identické, ale došlo k podobnému štěpení. Jejich MS/MS hodnoty byly shodné. Při dalších hodnotách t_R došlo k určitým shodám fragmentace i MS/MS hodnotám a mohlo se tedy jednat o izomery. Shrnutí základních údajů je v tabulce 7.

Dále byly pomocí MS/MS spekter hodnoceny ostatní látky, které se vyskytovaly ve vzorku. Jejich souhrn základních údajů je v tabulce 8, která je uvedená v příloze. Jejich hodnoty m/z byly hojně zastoupeny v MS/MS chromatogramu, tudíž byl dostatek spekter, který prokázal jejich přítomnost ve vzorku rostlinného extraktu. Všechna jejich MS/MS spektra jsou uvedená v příloze.

6. ZÁVĚR

1. UHPLC

Ze všech zkoušených kolon byla nejdříve vybrána kolona BEH SHIELD RP18. Později byla zvolena kolona CSH C18 díky kvalitní analýze s ostrými a symetrickými píky. Z podmínek byla určena průtoková rychlost 0,4 ml/min a mobilní fáze methanol a pufr pH 3.

2. UHPLC - MS

Z UHPLC byly zkoušeny chromatografické parametry na LC-MS. Pro veškerou analýzu byl vybrán pozitivní mód, protože v negativním módu ionizace neprobíhala. Dále bylo vybráno napětí vkládané na vstupní kužel, jehož hodnota byla 30V a byla zachována po celou dobu měření.

3. MS spektra

Podle výsledků a podobnosti spekter lze potvrdit přítomnost hledaných alkaloidů. Jediný tazettin se neprojevil tak výrazně jako ostatní látky. Důvodem byla jeho nízká koncentrace ve vzorku.

V chromatogramu vzorku bylo nalezeno mnohem více píků, než které odpovídaly jen standardním látkám. Ze všech píků byla získána spektra a bylo zjištěno, že se ve vzorku nacházejí další látky s hodnotami m/z 272, 304, 306, 320, 330 a 334.

4. MS/MS spektra

Podle výsledků a podobnosti spekter lze potvrdit přítomnost hledaných alkaloidů. Galanthamin, galanthin, haemanthamin a lycoramin měly identická MS/MS spektra se spektry příslušných hodnot m/z ve vzorku při shodném t_R. Tazettin neměl opět tak jednoznačné výsledky jako další alkaloidní látky kvůli jeho nižší koncentraci ve vzorku.

Dále byly hodnoceny pomocí MS/MS spekter ostatní látky, které se vyskytovaly ve vzorku. Jejich přítomnost ve vzorku rostlinného extraktu byla prokázána, ale nebylo možné látky identifikovat. K jejich určení by bylo zapotřebí proměření jejich standardů a vyhledávání informací v odborné literatuře.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] López S. et al.: Life Sciences 71 (2002) 2521-2529.

[2] Tram N. T. N. et al.: Fitoterapia 73 (2002) 183-208.

[3] http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/alkaloidy.php (9.2. 2012).

[4] Evans W. C.: Pharmacognosy (2009) 374-390.

[5] Krejčová G. Et al: Vojenské zdravotnické listy LXXII, č. 1 (2003) 37-44.

[6] Červenka F. et al: Česká a Slovenská farmacie LV, č. 5 (2006) 220-222.

[7] Martin J. et al.: Praktické lékárenství 7(1) (2011) 39-41.

[8] Cahlíková L. et al.: Brazilian Journal of Pharmacognosy 21(4) (2011) 575-580.

[9] Ebadi M.: Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine, Second Edition (2006) 297-307.

[10] Barton D. H. R: Reason and Imagination, Reflections on Research in Organic chemistry (1996) 237-246.

[11] http://pharmacycode.com/Haemanthamine.html (15.1. 2012).

[12] Evidence A. et al.: Planta Med 75 (5) (2009) 501-507.

[13] Ghosal S. et al.: Phytochemistry 24 (8) (1985) 1825-1828.

[14] Ganiyat Oloyede K. et al.: World Journal of Chemistry 5 (1) (2010) 26-31.

[15] Orhan I. E. et al.: Records of Natural Products 53 (2011) 193-201.

[16] Khan M. T. H. et al.: Lead Molecules from Natural Products, Discovery and New Trends, Advances in Phytomedicine 2 (2006) 331-352.

[17] Kaur K. et al.: Bioorganic and Medicinal Chemistry XXX (2009) 1-28.

[18] Şener B. et al.: Phytotherapy Research 17 (10) (2003) 1220-1223.

[19] Szlávik L. et al.: Planta Med 70(9) (2004) 871-773.

[20] Xi-Can T. et al.: Acta Pharmaceutica Sinica 08 (1963).

[21] Xi-Can T. et al.: Acta Pharmaceutica Sinica 04 (1964).

[22] Irwin R. L. et al.: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 134 (1) (1961) 53-59.

[23] Chány H. et al.: Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica (1986, 2001) 294-300.

[24] Zupkó I. et al.: International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research 23 (2009) 41-48.

[25] Furusawa E. et al.: The Royal Society of Medicine Press, Experimental Biology and Medicine 152 (2) (1976) 186-191.

[26] Pavlov A. et al.: Process biochemistry 42 (2007) 734-739.

[27] Berkov S. et al.: Phytochemical Analysis 19 (2008) 285-293.

[28] Ptak A. et al.: Journal of Natural Product 72 (2009) 142-147.

[29] Crain W.O. Jr. et al.: Contribution 4061, The Gates and Crellin Laboratories of Chemistry (1970) 990-994.

[30] Sangster A. W. et al.: Ultraviolet spectra of alkaloids (1964) 94-97.

[31] Kreh M. et al.: Phytochemistry 38 (1995) 773-776.

[32] Maláková J. et al.: Journal of Chromatography B, 853 (2007) 265-274.

[33] Gotti R. et al.: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 42 (2006) 17-24.

[34] Mroczek T.: Journal of Chromatography A 1216 (2009) 2519-2528.

[35] El Tahchy et al.: Acta Biochimica Polonica, Paper in Press 57, 1899 (2010) 1-10.

[36] De Jong C. et al.: Journal of Chromatography A 1112 (2006) 303-310.

[37] Ingkaninan K. et al.: Journal of Natural Products 63 (2000) 803-806.

[38] Berkov S. et al.: Phytochemical Analysis 16 (2005) 98-103.

[39] Klouda P. Moderní analytické metody, Ostrava (2003) 9-53.

[40] Swartz M. E.: Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 28 (2005) 1253-1263.

[41] Swartz M. E. et al.: Separation Science Redefined May (2005) 8-14.

[42] Grumbach E. S. et al.: Separation Science Redefined May (2005) 40-44.

[43] Nováková L. et al.: Talanta 12759 (2012) 1-7.

[44] http://www.hplc.cz/UPLC/columns_uplc.html (23.3. 2012).

[45] http://www.hplc.cz/UPLC/sorbent_uplc.html (23.3. 2012).

[46] http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618101 (23.2. 2012).

[47] Vřešťál J. et al.: Hmotnostní spektrometrie (1998), (Masarykova univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta) 4-14.

[48] Čáslavský J. et Lána R.: Sborník přednášek (2007)

[49] McCloskey J.A.: Methods in Enzymology 193 (Mass Spektrometry) (1990) 3-130.

[50] Holčapek M. et al.: Journal of Chromatography A 1217 (2010) 3908-3921.

[51] http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10073251 (9.2. 2012).

[52] Holčapek M. et al.: Chemické listy 92 (1998) 278-286.

[53] http://www.uochb.cz/web/structure/683.html?lang=cz (24.2. 2012).

[54]http://www.tzhealth.com/Concentration%20Analyzer%20html/Rather%20than%20using%20a%20large%20magnet%20as%20mass%20analyzer%20our%20GC%20MS%20uses%20a%20ratio%20three%20stan (2.5. 2012)

[55] Makarov A.: Analytical Chemistry 72 (2000) 1156-1162.

[56] Hu Q. et al.: Journal of Mass Spectrometry 40 (2005) 430-443.

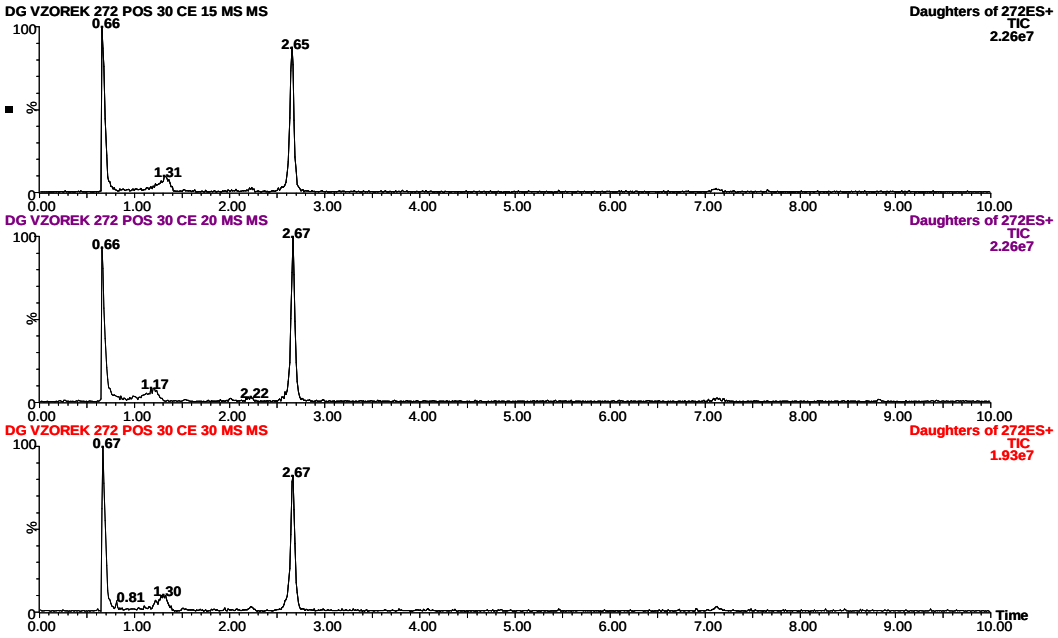
[57] Vřešťál J. et al.: Hmotnostní spektrometrie (1998), (Masarykova univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta) 93-100.

[58] Zhang Xi et al.: Rapid communications in mass spectrometry 23 (2009) 2903-2916.

[59] Duffield A. M. et al.: Journal of the American Chemical Society 87:21, November 5 (1965) 4902-4912.

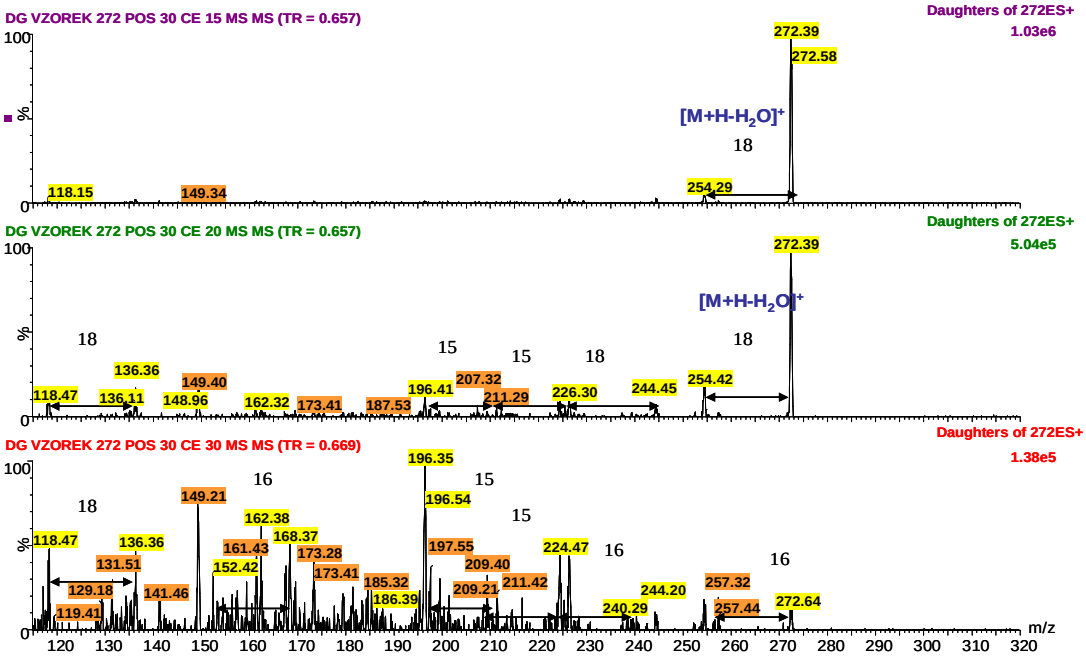
8. PŘÍLOHA

8.1.1 Fragmentace m/z 272



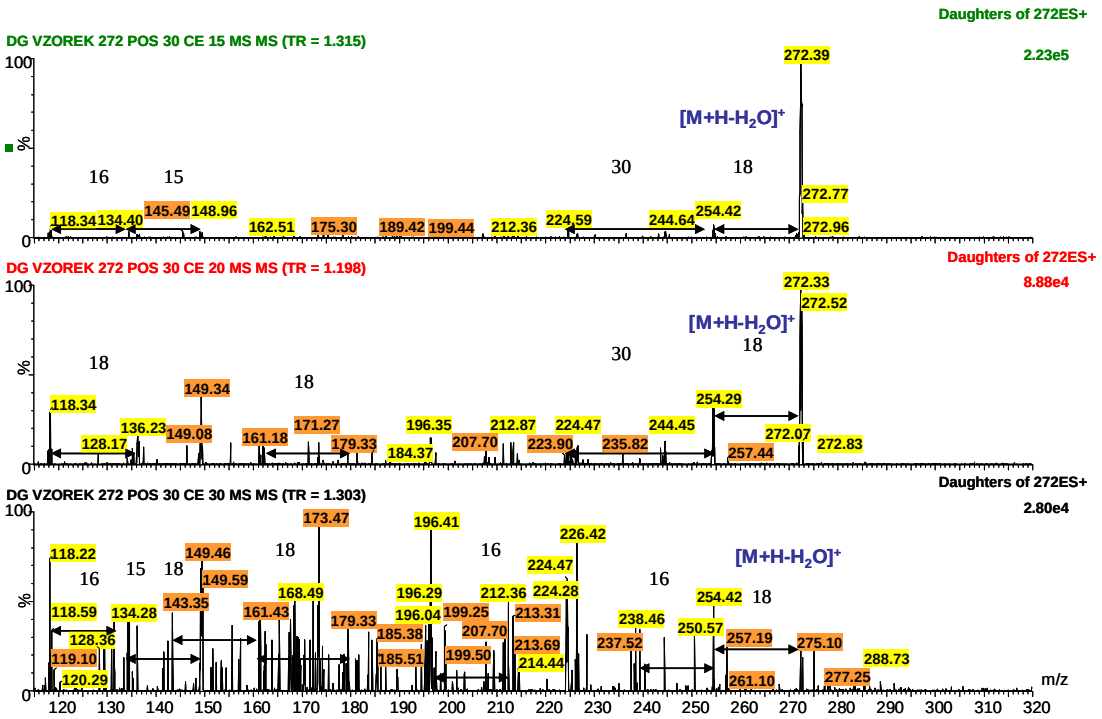
Obrázek 84: chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 272 při kolizních energiích 15, 20, 30 V

V chromatogramech fragmentace vzorku s m/z 272 bylo nalezeny 4 píky s touto hodnotou m/z, (obrázek 84).



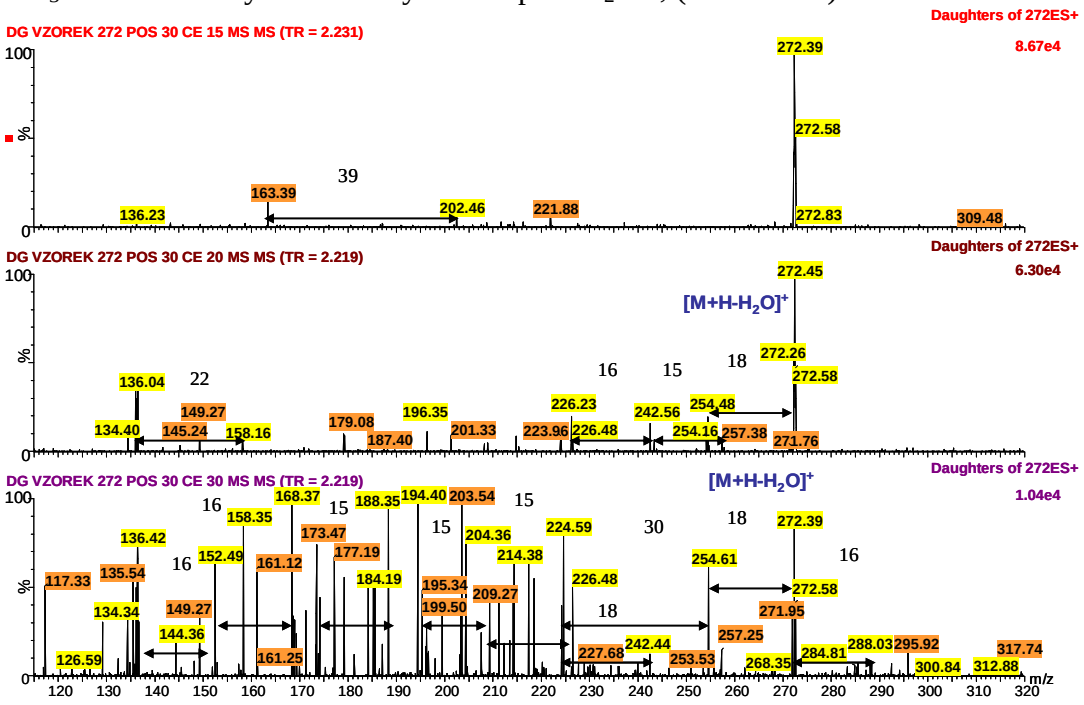
Obrázek 85: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 272 při t_R 0,66, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 0,66 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3, (obrázek 85).



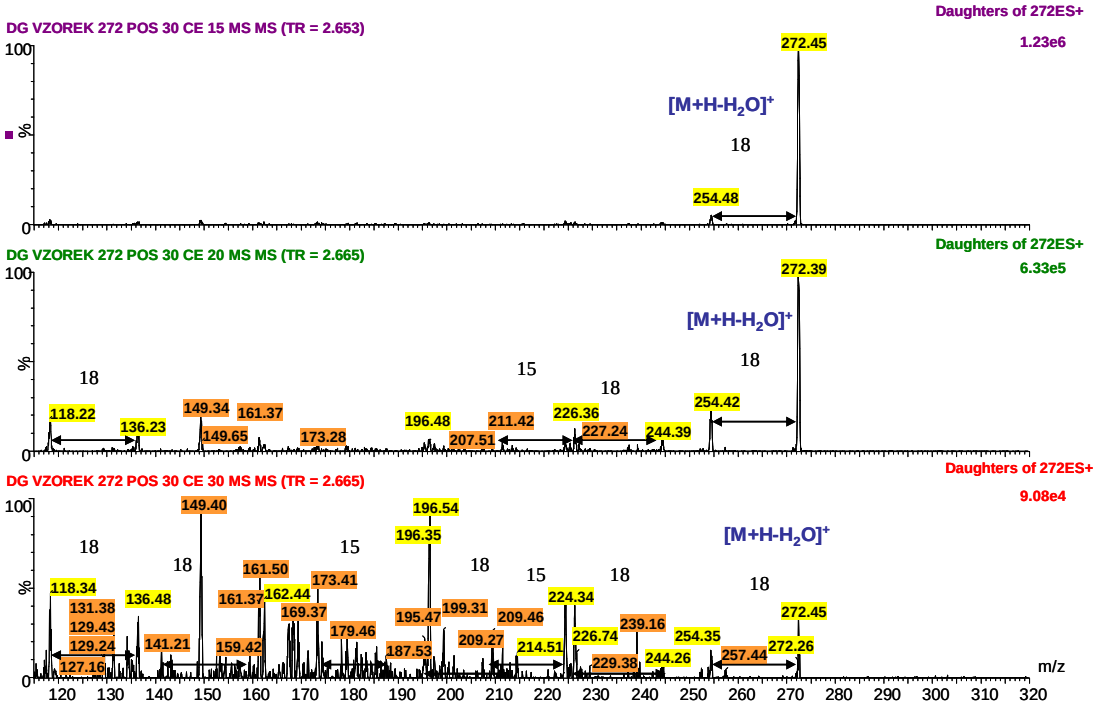
Obrázek 86: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 272 při t_R 1,30, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,30 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 30 a to bylo odštěpení H_2CO, (obrázek 86).



Obrázek 87: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 272 při t_R 2,22, při kolizních energiích 15, 20, 30V

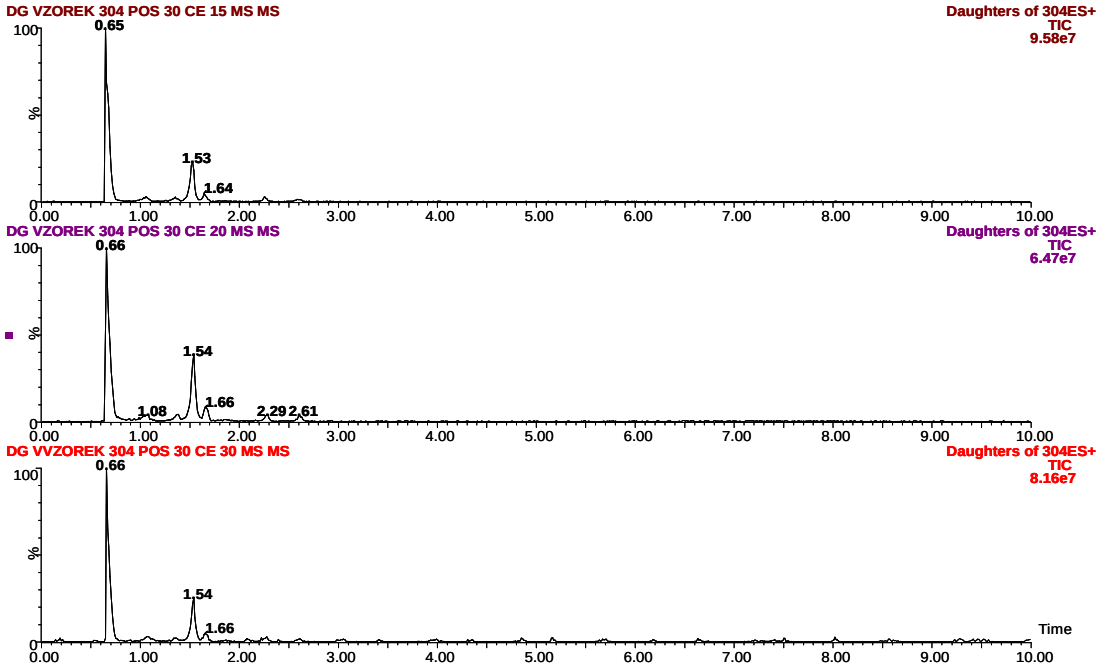
Spektra fragmentace při t_R 2,22 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další menší ztráty byly 22, 39 a pak 30, a to bylo odštěpení H_2CO, (obrázek 87).



Obrázek 88: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 272 při t_R 2,65, při kolizních energiích 15, 20, 30V

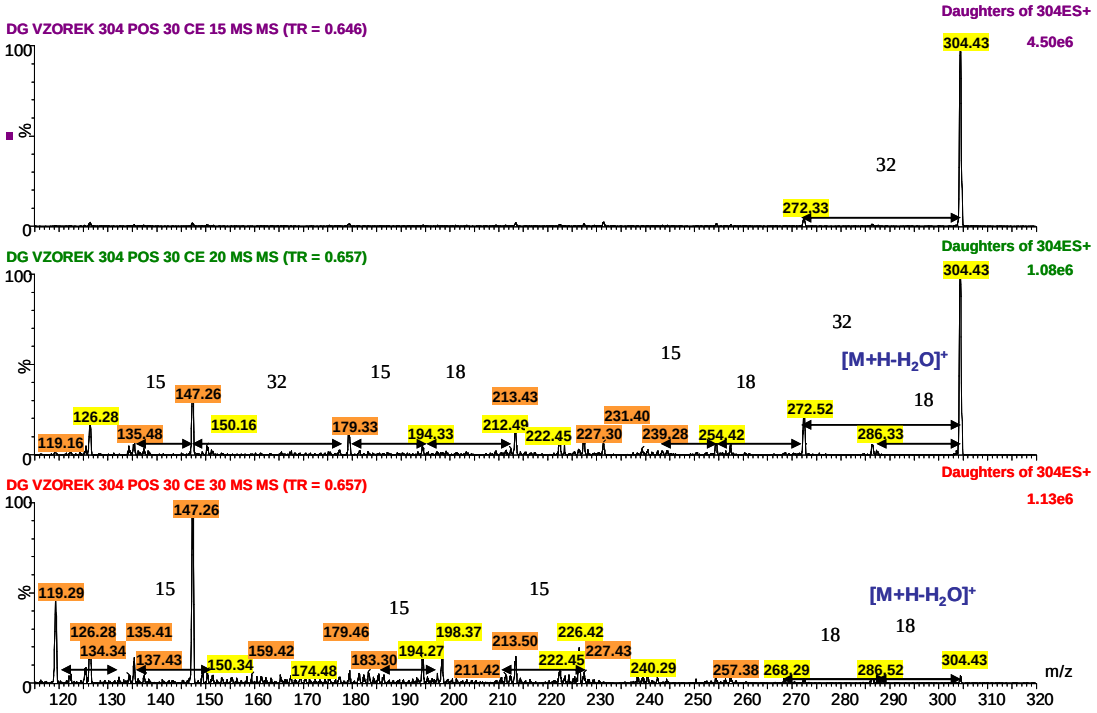
Spektra fragmentace při t_R 2,65 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3, (obrázek 88).

8.1.2 Fragmentace m/z 304



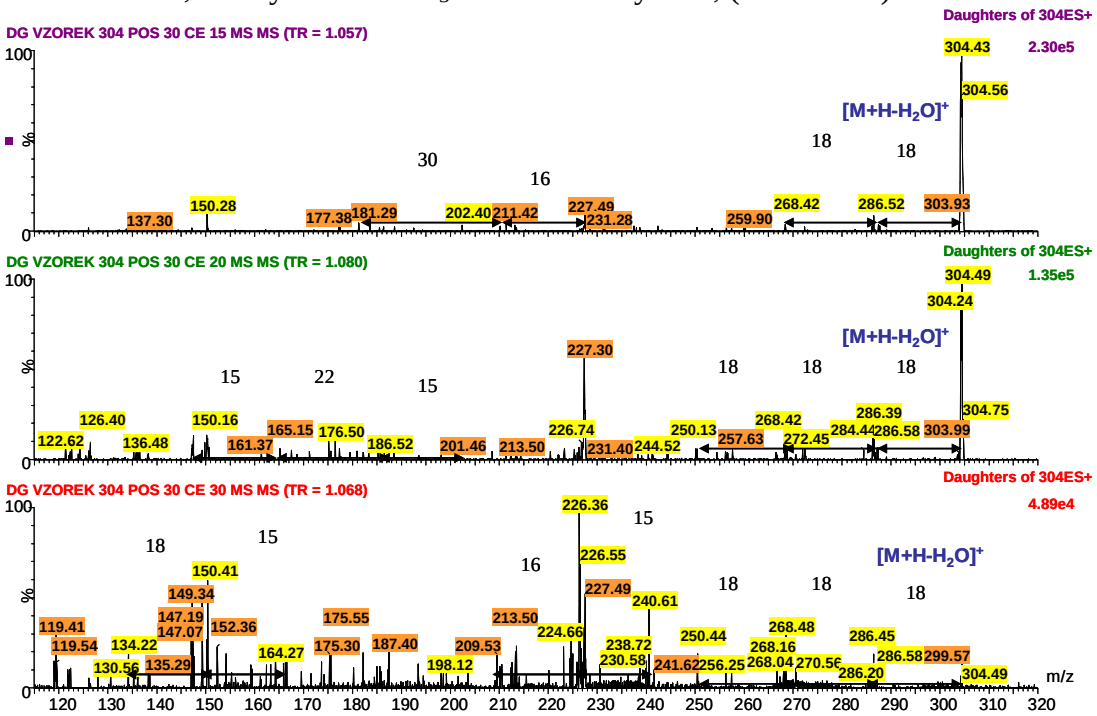
Obrázek 89: chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 304 při kolizních energiích 15, 20, 30 V

V chromatogramech fragmentace vzorku s m/z 304 bylo nalezeno 6 píků s touto hodnotou m/z, (obrázek 89).



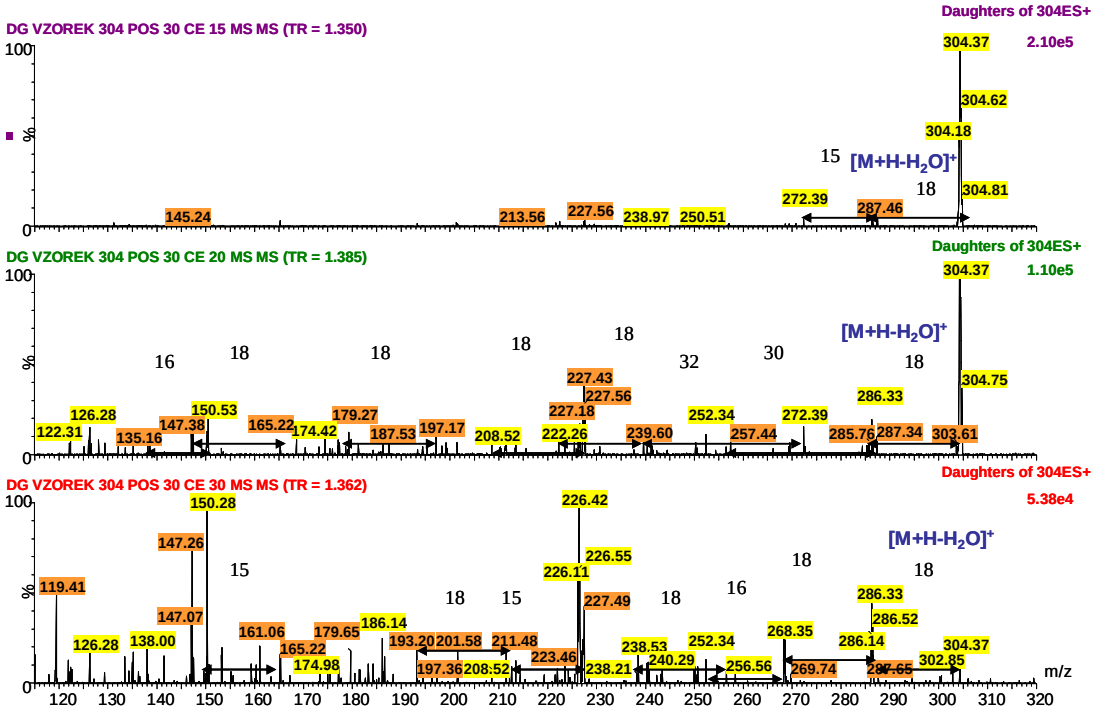
Obrázek 90: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 304 při t_R 0,66, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 0,66 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 32, (obrázek 90).



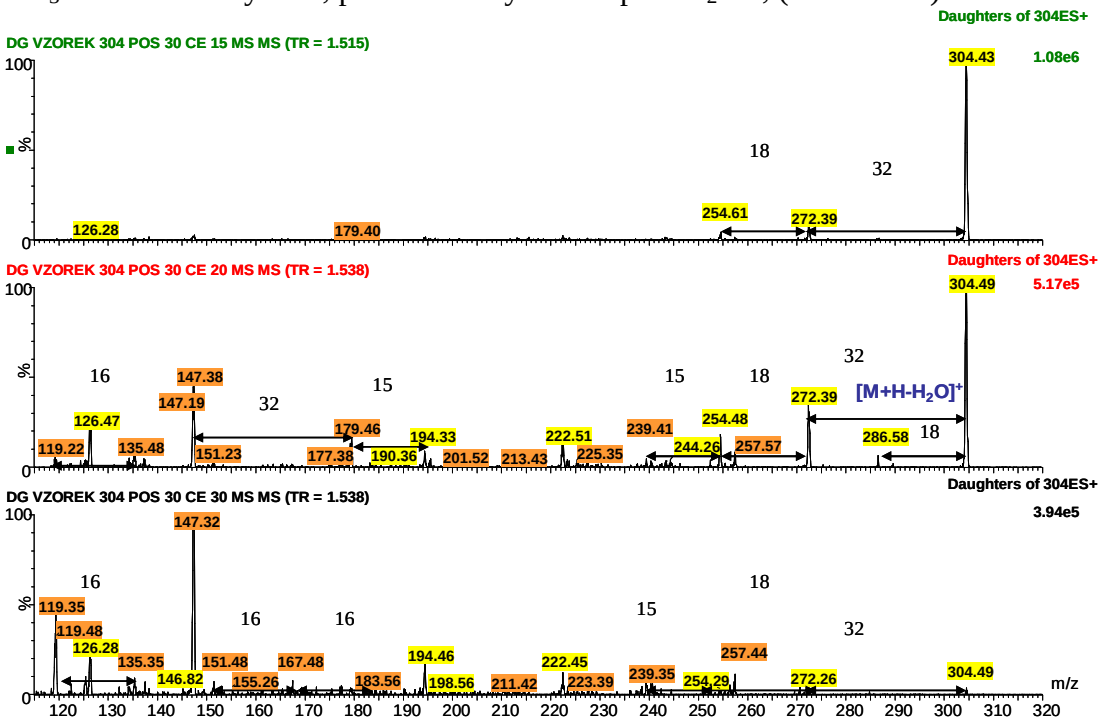
Obrázek 91: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 304 při t_R 1,06, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,06 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráty byly 32 a 22, (obrázek 91).



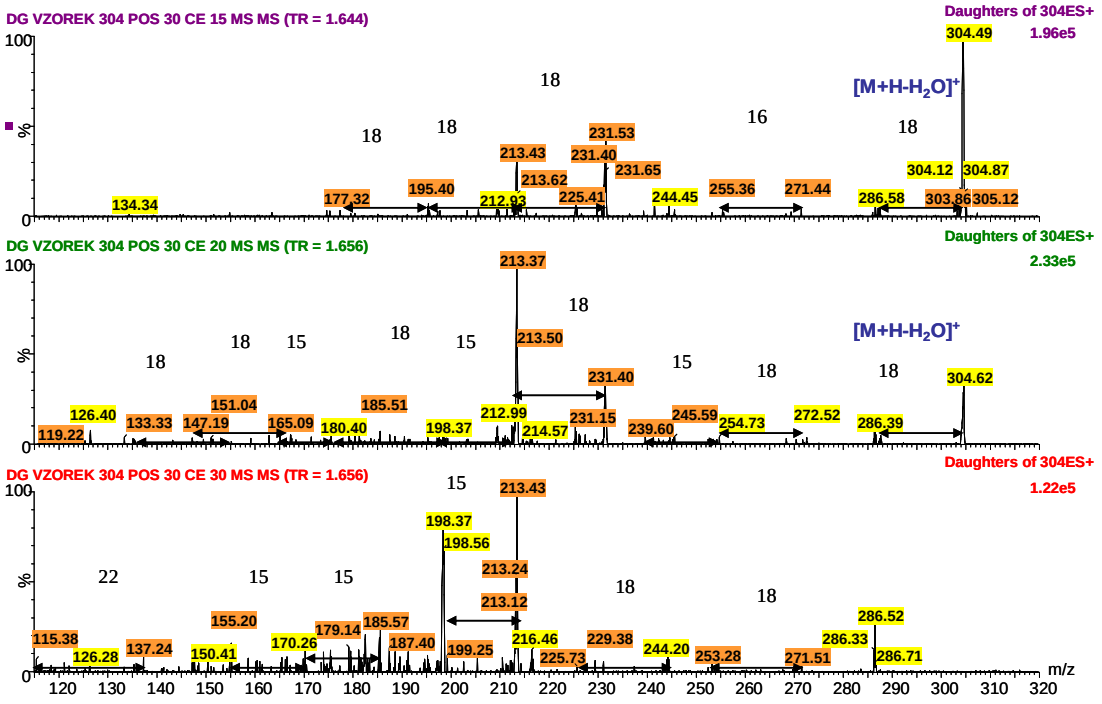
Obrázek 92: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 304 při t_R 1,36, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,36 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 32, pak 30 a to bylo odštěpení H_2CO, (obrázek 92).



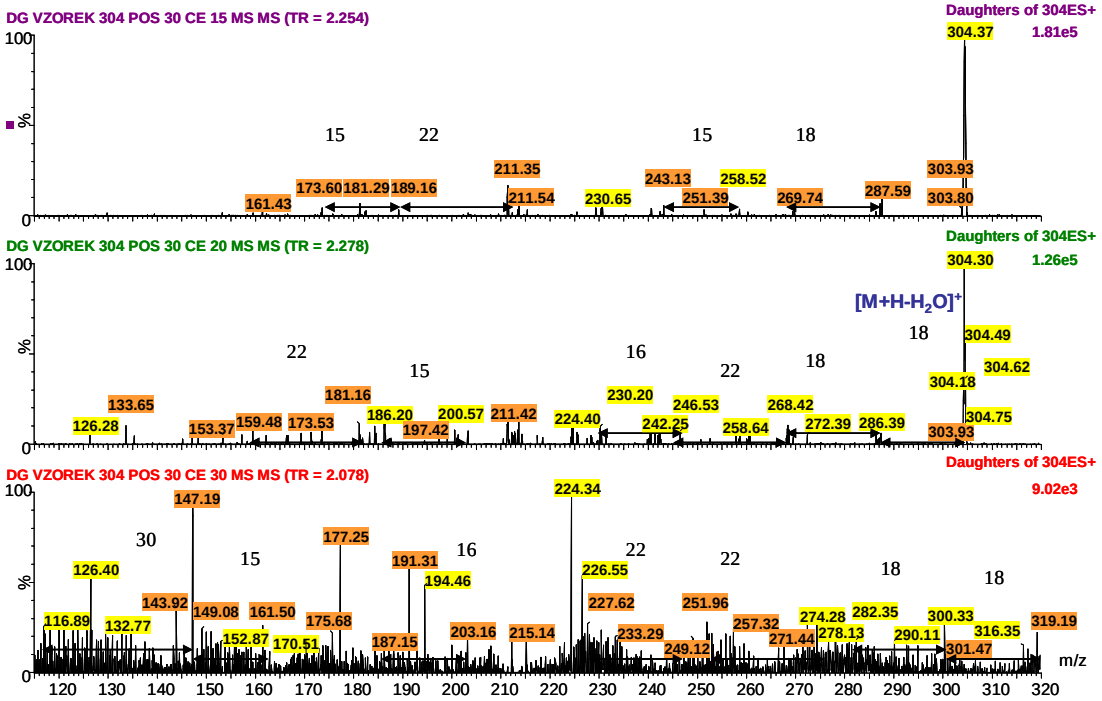
Obrázek 93: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 304 při t_R 1,54, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,54 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 32, (obrázek 93).



Obrázek 94: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 304 při t_R 1,66, při kolizních energiích 15, 20, 30V

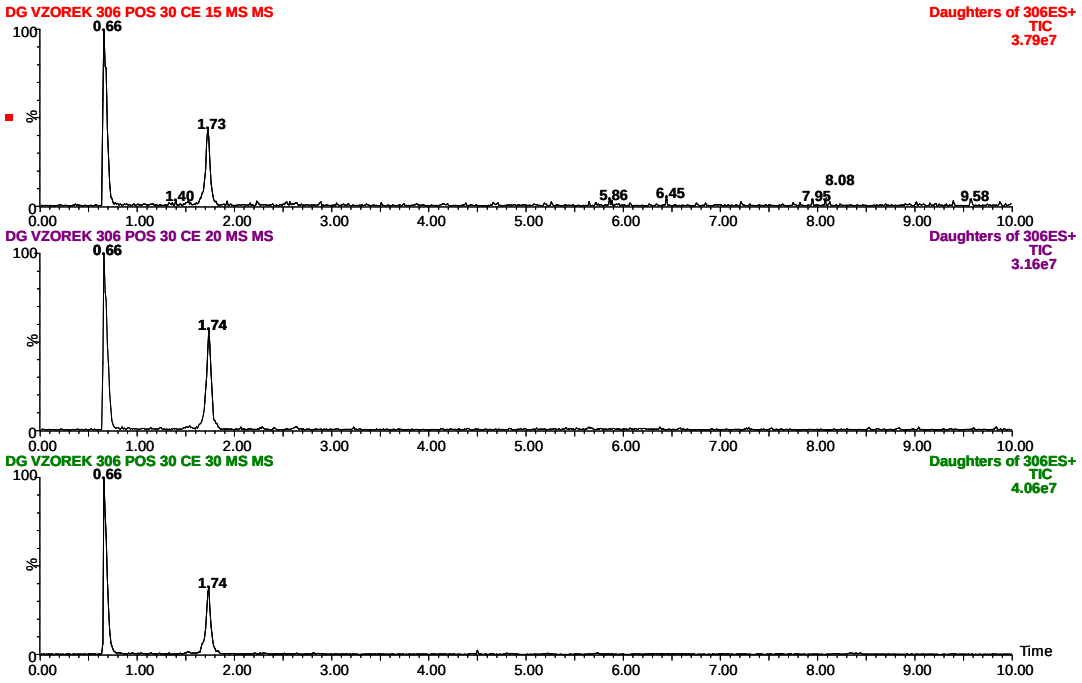
Spektra fragmentace při t_R 1,66 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 94).



Obrázek 95: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 304 při t_R 2,25, při kolizních energiích 15, 20, 30V

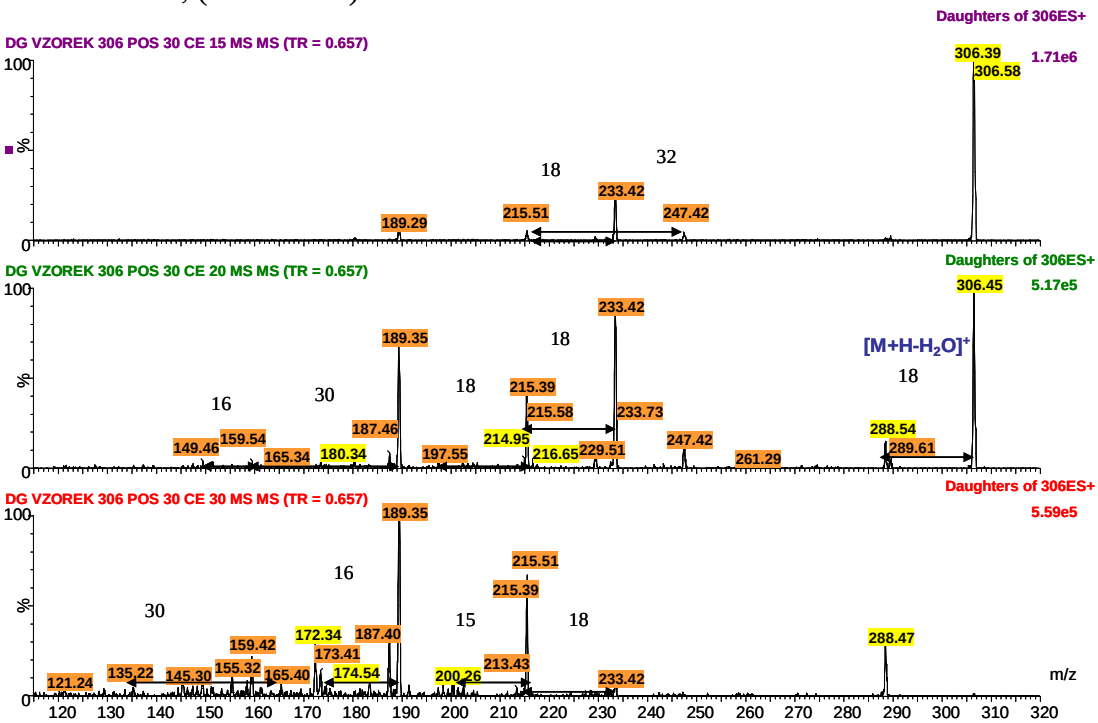
Spektra fragmentace při t_R 2,25 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 95).

8.1.3 Fragmentace m/z 306



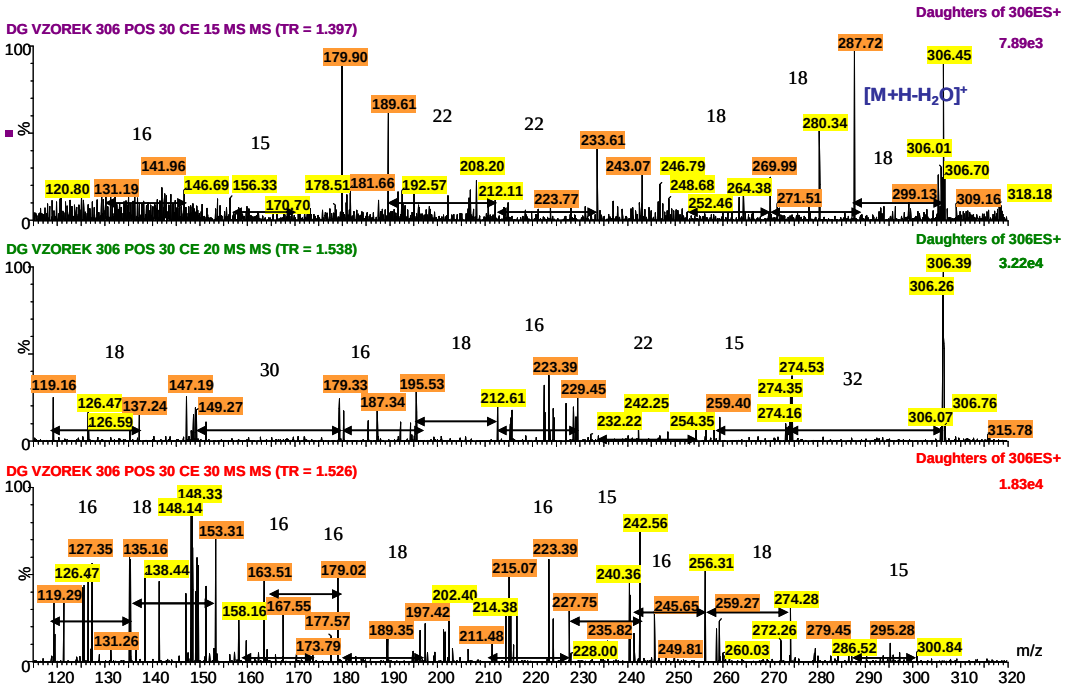
Obrázek 96: chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 306 při kolizních energiích 15, 20, 30 V

V chromatogramech fragmentace vzorku s m/z 306 byly nalezeny 3 píky s touto hodnotou m/z, (obrázek 96).



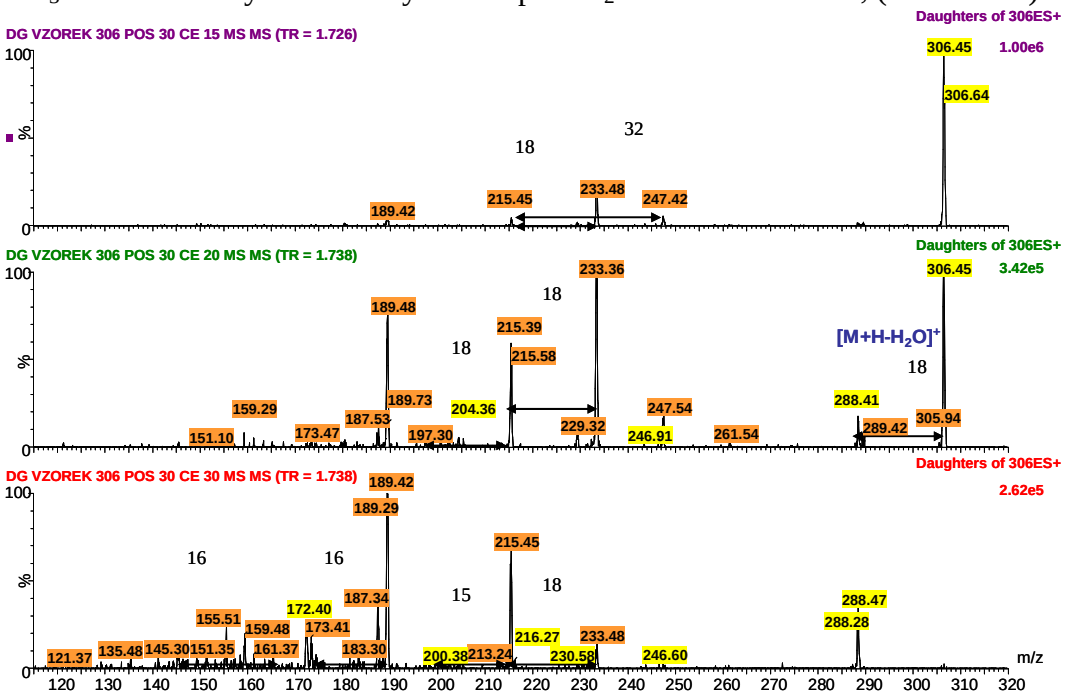
Obrázek 97: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 306 při t_R 0,66, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 0,66 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 32, pak 30 a to bylo odštěpení H_2CO, (obrázek 97).



Obrázek 98: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 306 při t_R 1,50, při kolizních energiích 15, 20, 30V

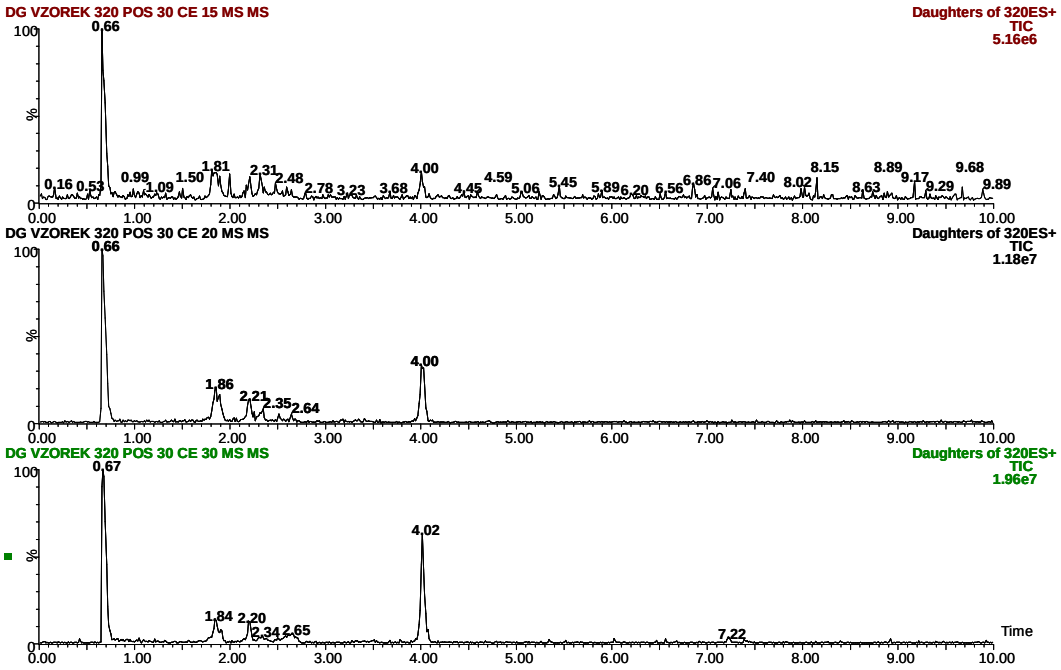
Spektra fragmentace při t_R 1,50 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 30 a to bylo odštěpení H_2CO a dále méně 22, (obrázek 98).



Obrázek 99: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 306 při t_R 1,74, při kolizních energiích 15, 20, 30V

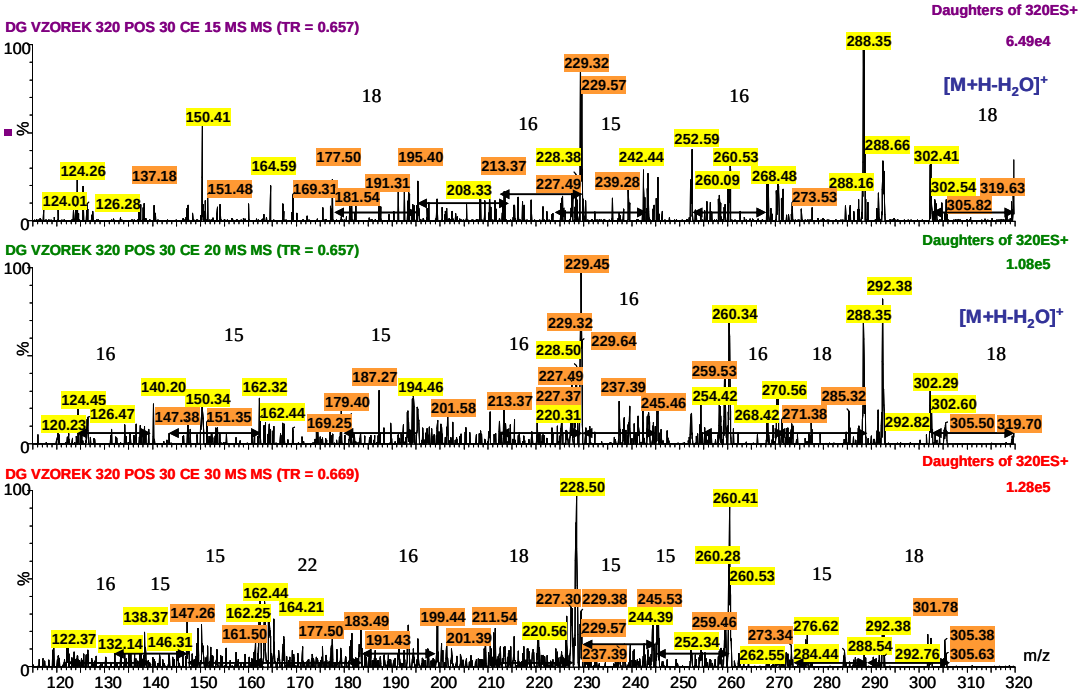
Spektra fragmentace při t_R 1,74 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 32**,** (obrázek 99).

8.1.4 Fragmentace m/z 320



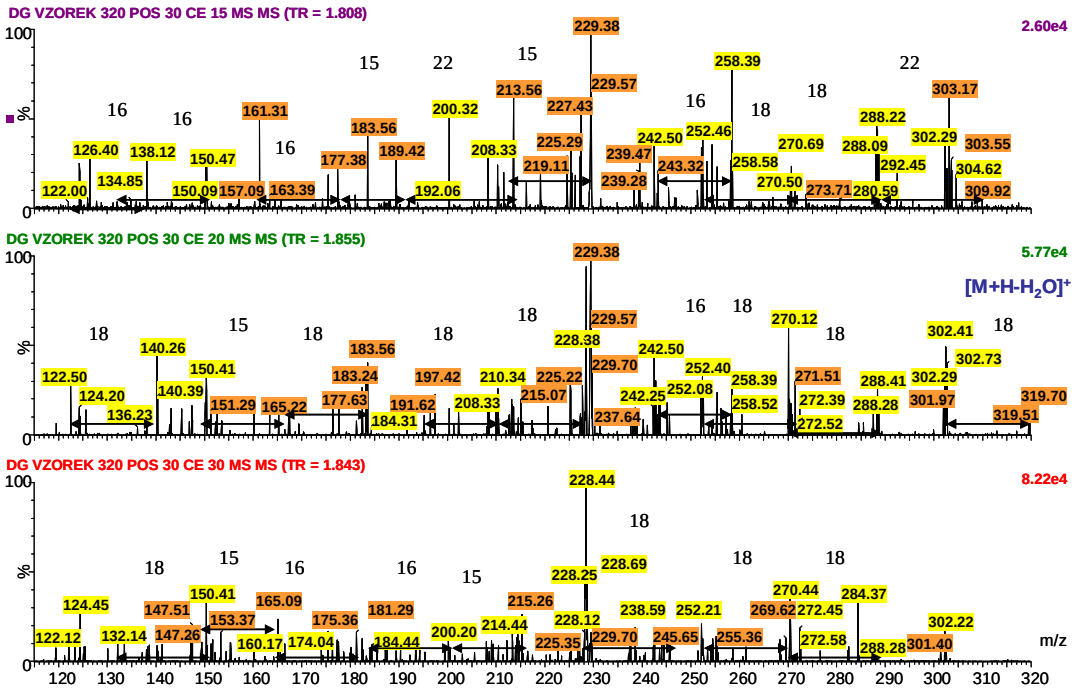
Obrázek 100: chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 320 při kolizních energiích 15, 20, 30 V

V chromatogramech fragmentace vzorku s m/z 320 bylo nalezeno 6 píků s touto hodnotou m/z, (obrázek 100).



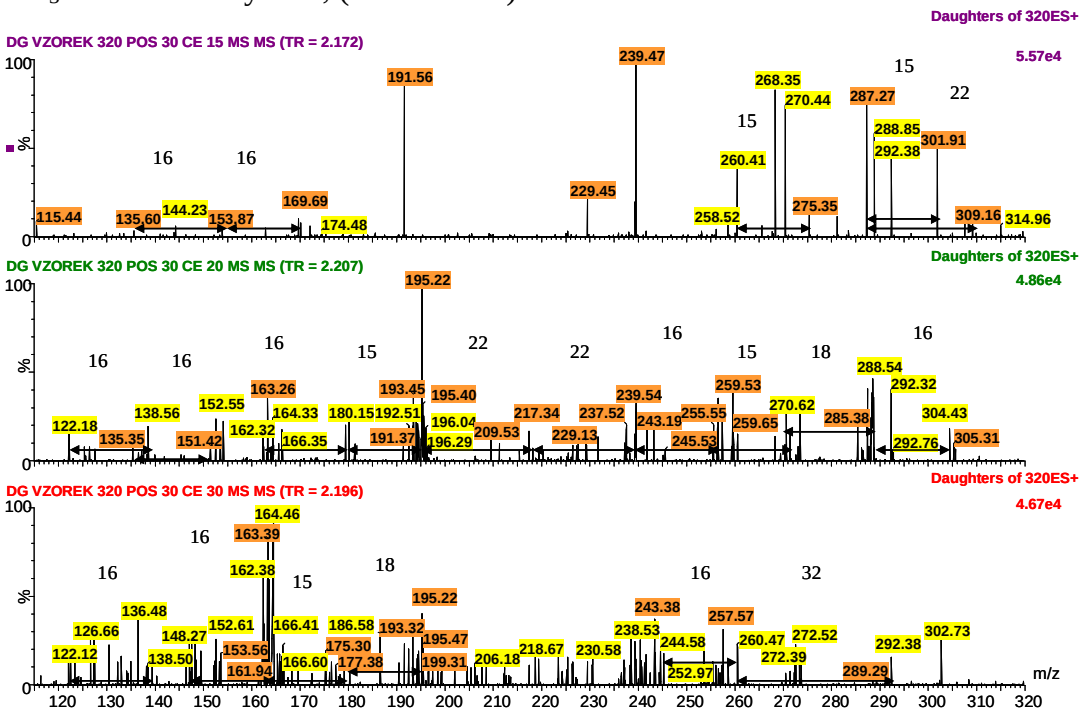
Obrázek 101: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 320 při t_R 0,66, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 0,66 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpen NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráty byly 32 a 22, (obrázek 101).



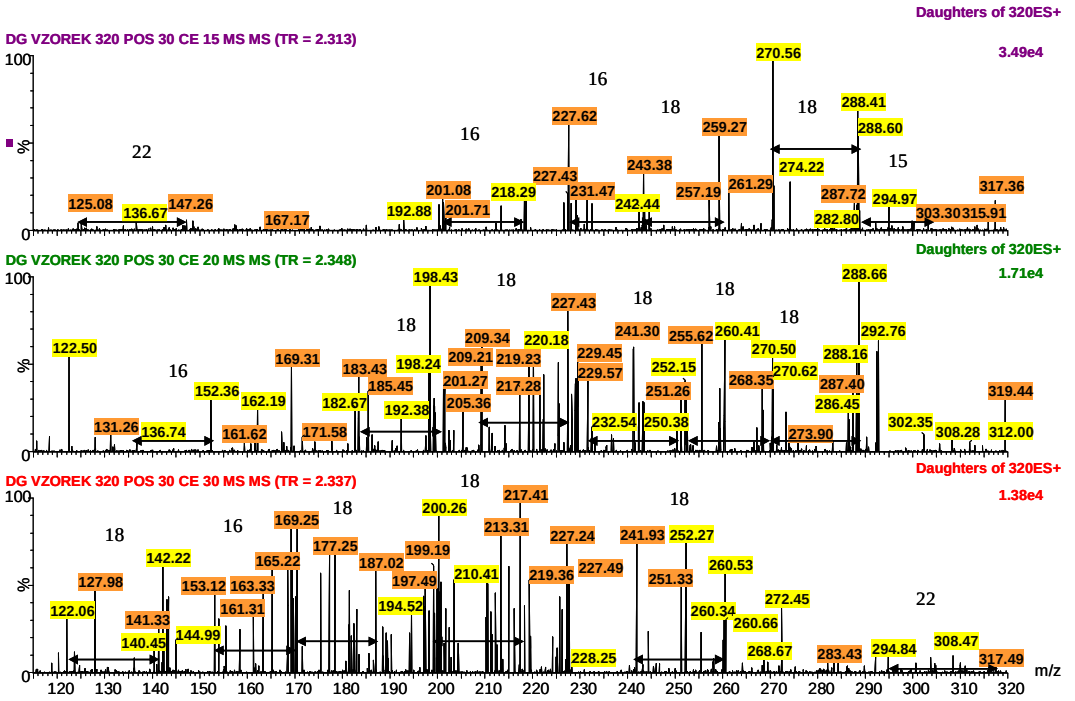
Obrázek 102: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 320 při t_R 1,84, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,84 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 102).



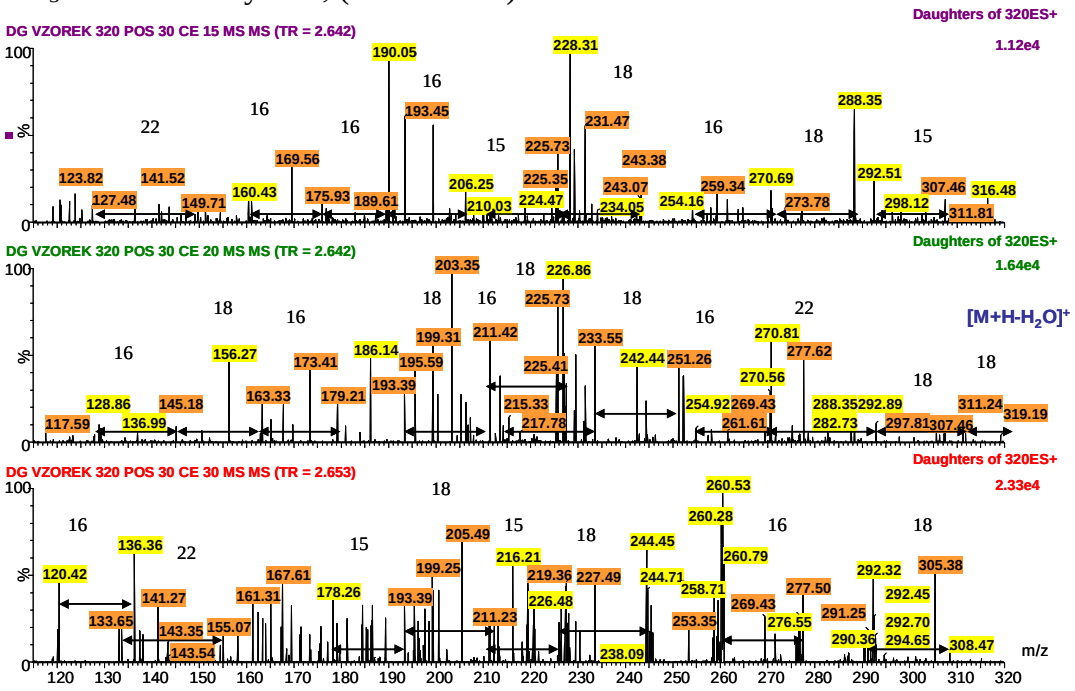
Obrázek 103: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 320 při t_R 2,20, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 2,20 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráty byly 32 a 22, (obrázek 103).



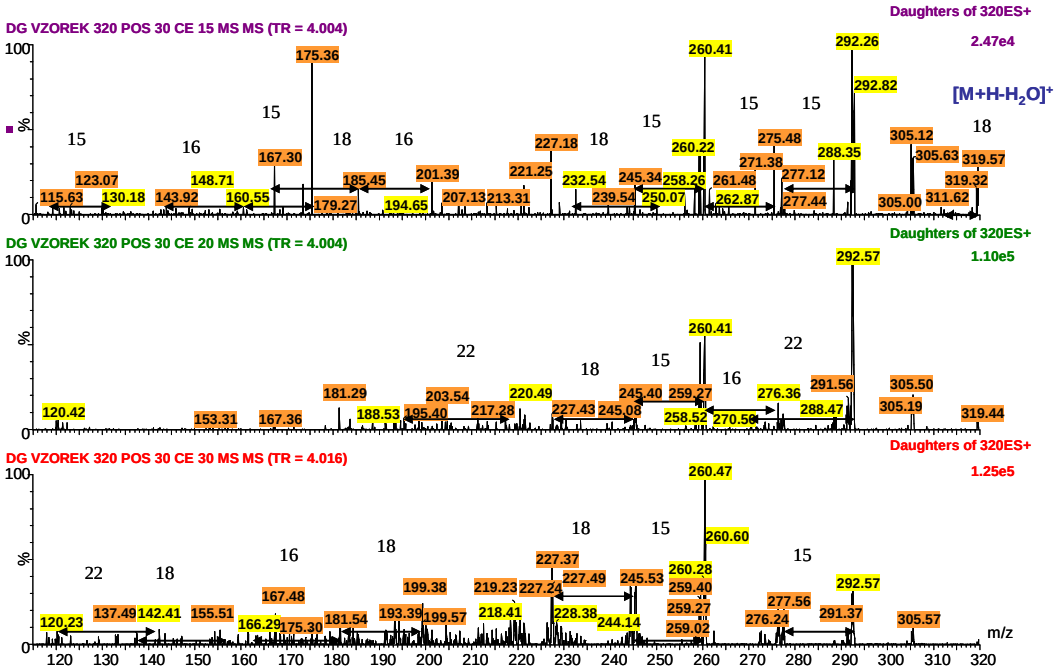
Obrázek 104: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 320 při t_R 2,34, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 2,34 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 104).



Obrázek 105: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 320 při t_R 2,65, při kolizních energiích 15, 20, 30V

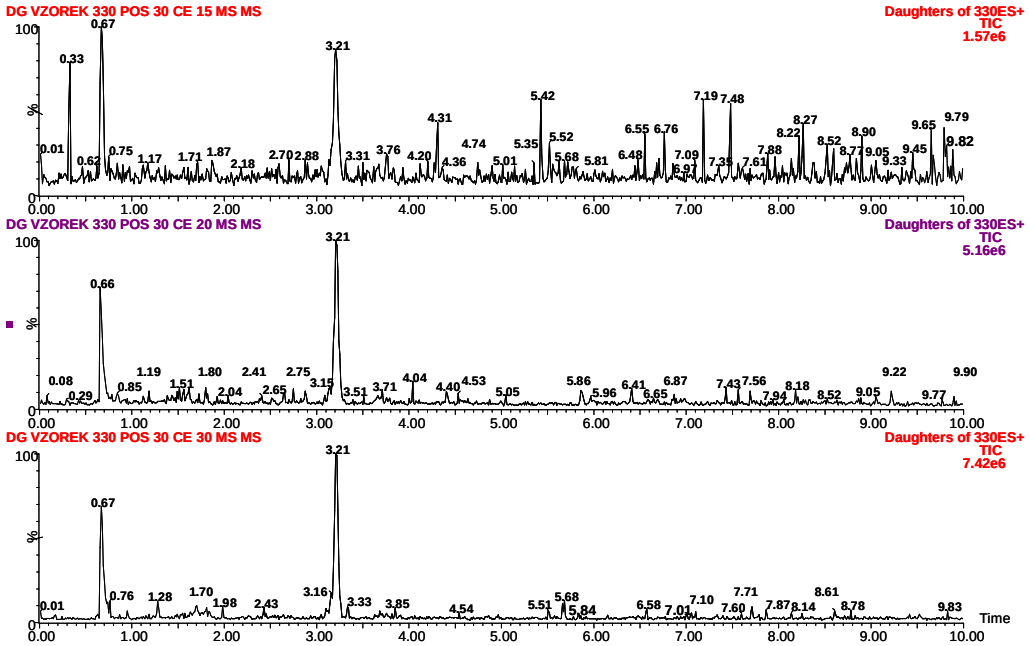
Spektra fragmentace při t_R 2,65 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 105).



Obrázek 106: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 320 při t_R 4,00, při kolizních energiích 15, 20, 30V

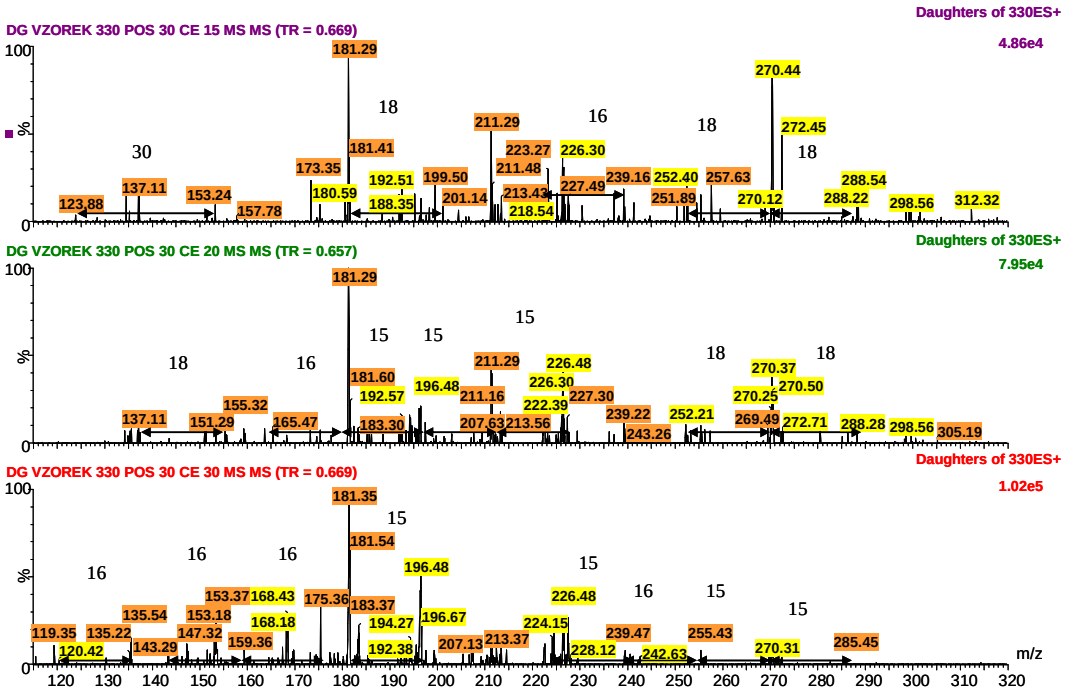
Spektra fragmentace při t_R 4,00 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 106).

8.1.5 Fragmentace m/z 330



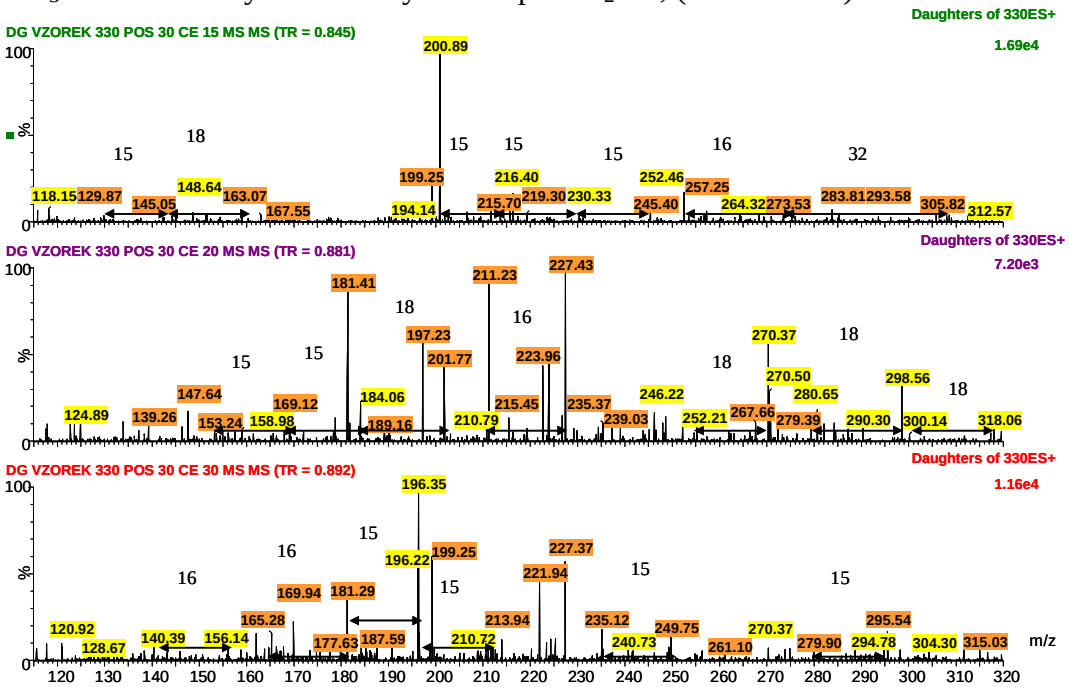
Obrázek 107: chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 330 při kolizních energiích 15, 20, 30 V

V chromatogramech fragmentace vzorku s m/z 330 bylo nalezeno 5 píků s touto hodnotou m/z, (obrázek 107).



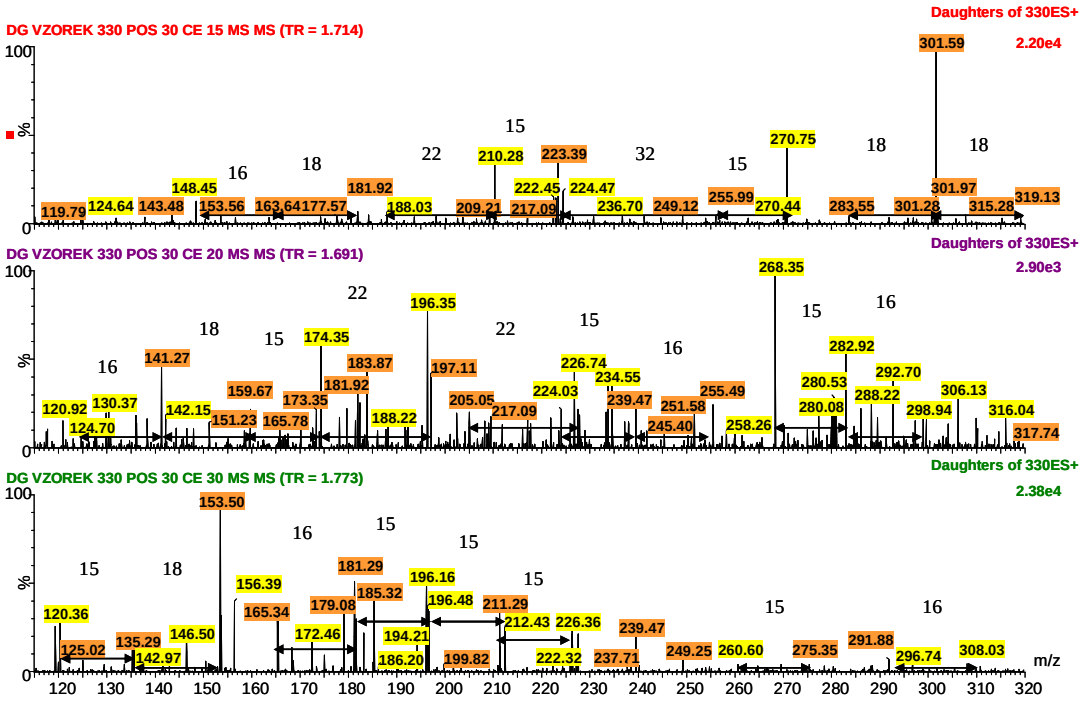
Obrázek 108: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 330 při t_R 0,67, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 0,67 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 30 a to bylo odštěpení H_2CO, (obrázek 108).



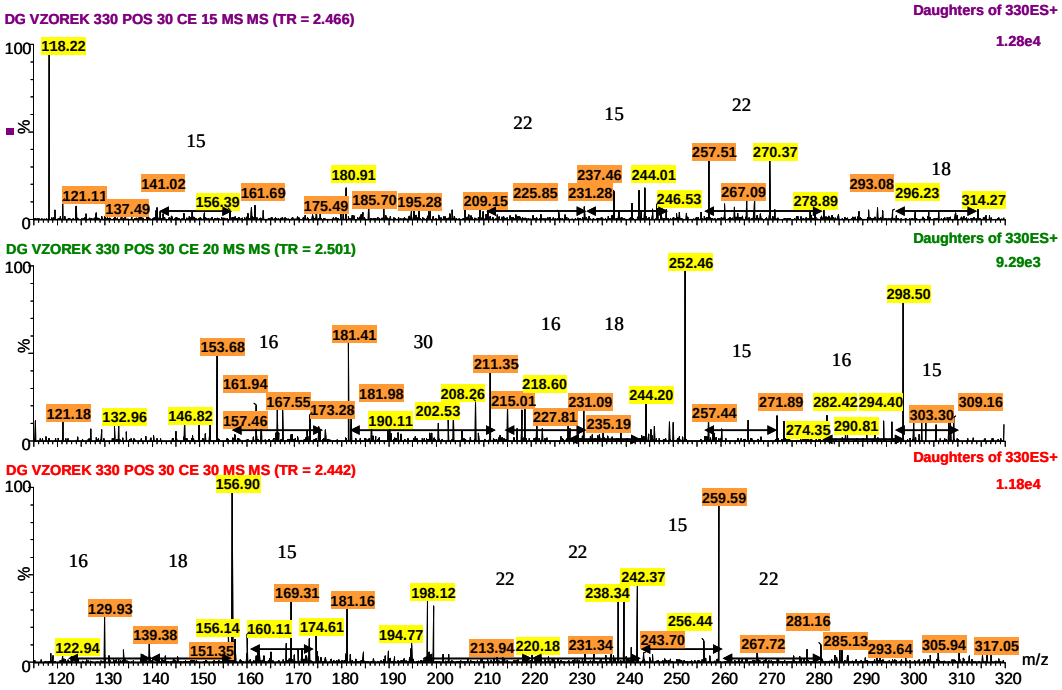
Obrázek 109: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 330 při t_R 0,88, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 0,88 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 32, (obrázek 109).



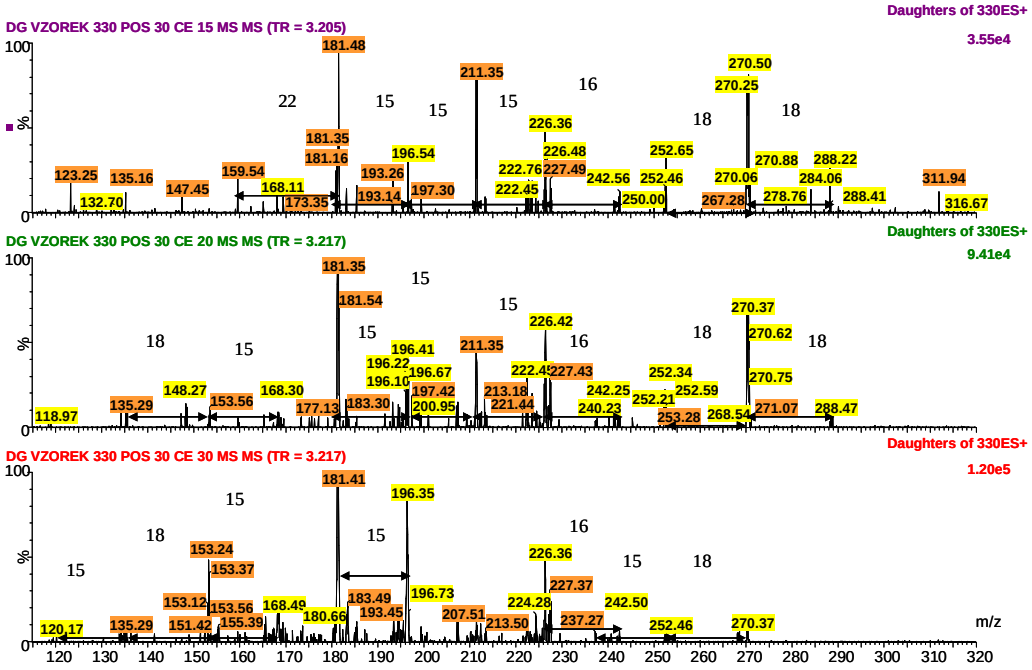
Obrázek 110: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 330 při t_R 1,70, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 1,70 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráty byly 32 a 22, (obrázek 110).



Obrázek 111: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 330 při t_R 2,43, při kolizních energiích 15, 20, 30V

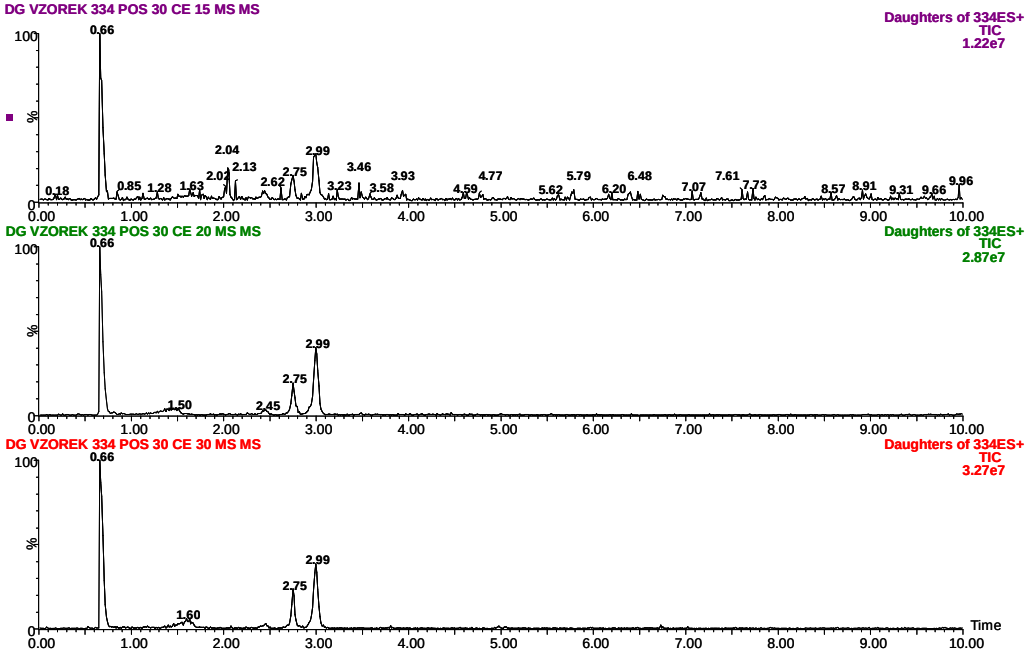
Spektra fragmentace při t_R 2,43 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 30 a to bylo odštěpení H_2CO a dále méně 22, viz (obrázek 111).



Obrázek 112: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 330 při t_R 3,21, při kolizních energiích 15, 20, 30V

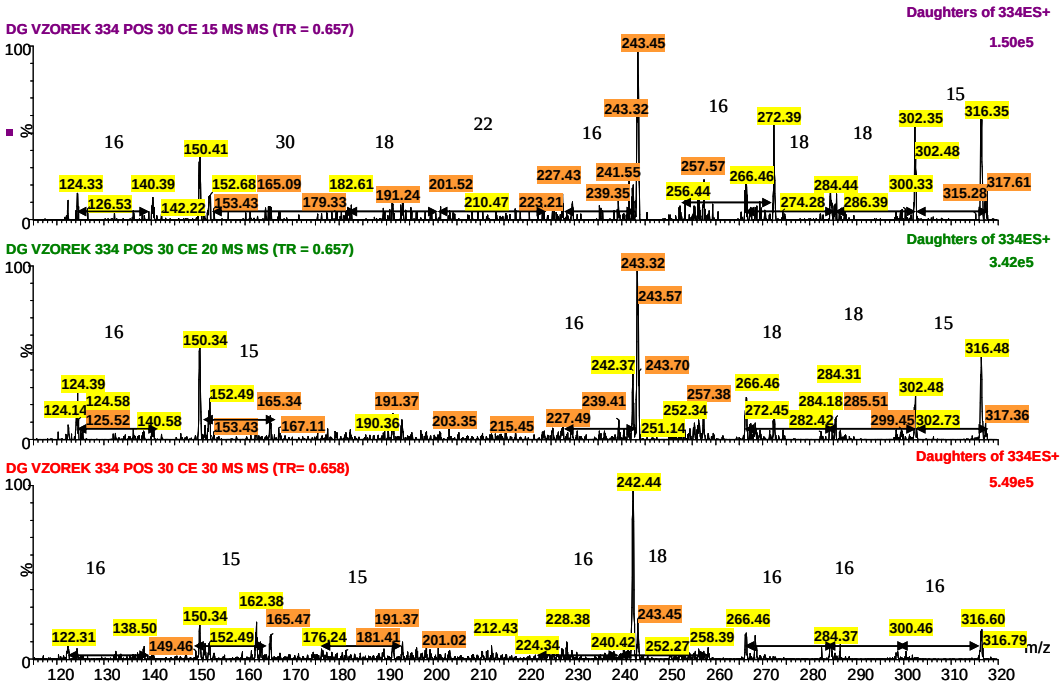
Spektra fragmentace při t_R 3,21 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 112).

8.1.6 Fragmentace m/z 334



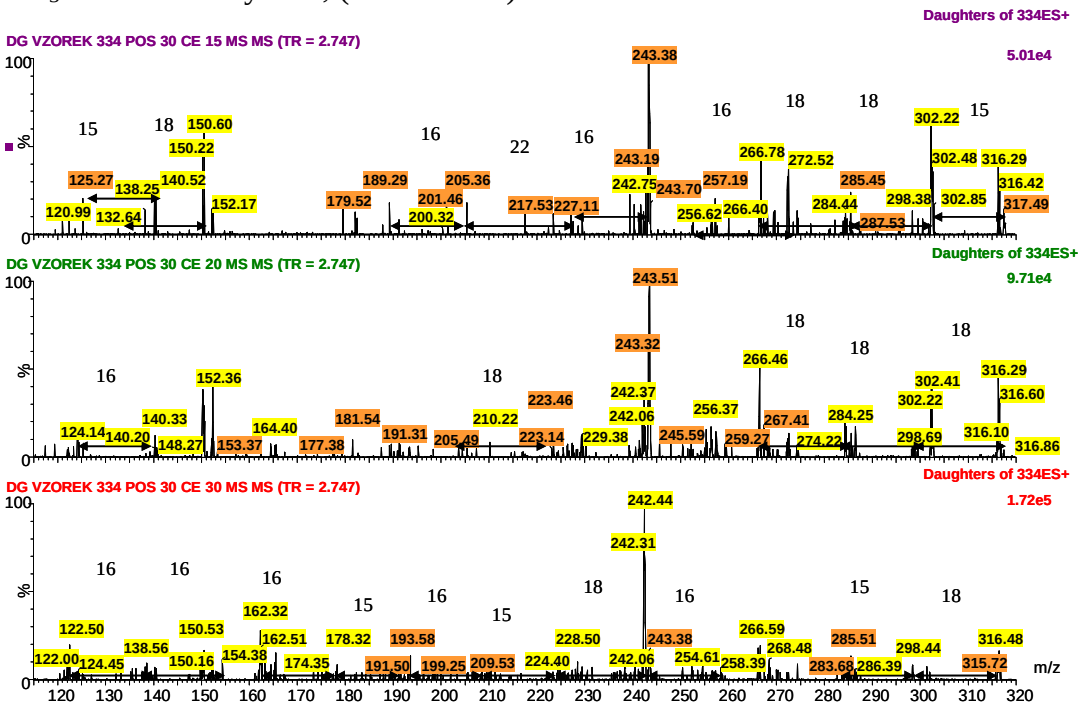
Obrázek 113**:** chromatogramy fragmentace vzorku s m/z 334 při kolizních energiích 15, 20, 30 V

V chromatogramech fragmentace vzorku s m/z 334 bylo nalezeno 5 píků s touto hodnotou m/z, (obrázek 113).



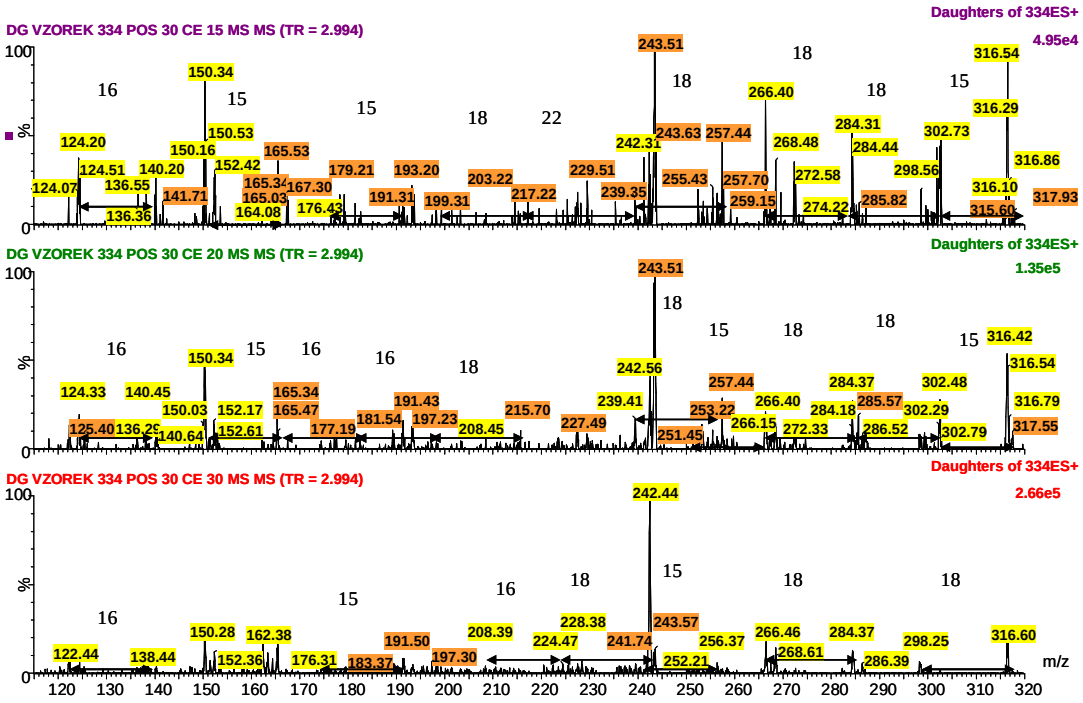
Obrázek 114**:** spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 334 při t_R 0,66, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 0,66 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 114).



Obrázek 115: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 334 při t_R 2,75, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 2,75 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení molekuly vody. Došlo ke ztrátám 16, čímž mohlo dojít k odštěpení NH_2. Dále ztráta 15, což byla ztráta CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 115).



Obrázek 116: spektra fragmentace vzorku hodnoty m/z 334 při t_R 2,99, při kolizních energiích 15, 20, 30V

Spektra fragmentace při t_R 2,99 obsahovala ztrátu 18, tedy odštěpení vody. Došlo ke ztrátě 16, tedy odštěpení NH_2 a ztrátě 15, tedy CH_3. Další ztráta byla 22, (obrázek 116).

t_R	MS	MS/MS
0,67	272	272, 254, 224, 211, 196, 173, 162, 149, 136, 118
1,17		272, 254, 226, 212, 196, 173, 162, 149, 136, 118
2,22		272, 254, 224, 203, 194, 188, 168, 152, 136
2,65		272, 254, 224, 196, 173, 161, 149, 136, 118
0,66	304	304, 272, 227, 213, 194, 179, 147, 135, 126, 119
1,06		304, 286, 268, 250, 227, 213, 175, 150, 134
1,36		304, 286, 272, 252, 227, 186, 179, 150, 147, 126
1,54		304, 272, 254, 222, 194, 179, 147, 135, 126, 119
1,66		304, 286, 271, 254, 231, 213, 198, 185, 150, 126
2,25		304, 286, 268, 258, 224, 211, 177, 147, 126
0,66	306	306, 288, 247, 233, 215, 189, 159
1,53		306, 274, 242, 223, 212, 189, 179, 148, 126, 119
1,74		306, 288, 247, 233, 215, 189, 159
0,66	320	320, 288, 260, 229, 195, 177, 162, 150, 124
1,84		320, 302, 288, 270, 258, 252, 229, 183, 150, 124
2,20		320, 302, 288, 270, 259, 239, 229, 195, 163, 135
2,34		320, 288, 270, 260, 241, 227, 200, 169, 152, 122
2,65		320, 307, 292, 270, 260, 243, 226, 199, 167, 136
4,00		320, 305, 292, 276, 260, 245, 227, 181, 167, 120
0,67	330	330, 298, 288, 270, 252, 226, 211, 196, 181, 137
0,88		330, 294, 270, 252, 227, 211, 200, 196, 181, 169
1,70		330, 292, 282, 270, 226, 211, 196, 181, 153, 120
2,43		330, 298, 293, 270, 252, 244, 211, 181, 156, 121
3,21		330, 288, 270, 252, 226, 211, 196, 181, 153, 135
0,66	334	334, 316, 302, 284, 272, 243, 191, 165, 150, 124
2,75		334, 316, 302, 285, 266, 243, 205, 150, 124
2,99		334, 316, 302, 284, 266, 243, 191, 165, 150, 124

Tabulka 8: souhrn dalších alkaloidních látek a jejich m/z ve vzorku, jejich t_R, MS a MS/MS hodnoty