

Spektrometria mas w analizie składu propolisu

Samodzielna Pracownia Analizy Leków, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Kierownik Pracowni: dr hab. n. farm. Wojciech Miltyk

MASS SPECTROMETRY IN ANALYSIS OF CHEMICAL COMPOSITION OF PROPOLIS

SUMMARY

Propolis is a honeybee product with a very complex chemical composition and a wide spectrum of pharmacological properties. The majority of propolis studies focus on the chemical composition of ethanolic extract of propolis (EEP) and its main polyphenols constituents such as flavonoids, chalcones, aromatic acids and its derivatives, terpenes, phenyl propanoids. Analysis of such complicated matrix requires implying analytical techniques capable to identify wide range of compounds with diverse physicochemical properties. Development of chromatographic and mass spectrometric methods enabled to determine variety of constituents of propolis.

This paper reviews present literature devoted to qualitative and quantitative analysis of propolis extracts by separation techniques coupled to mass spectrometry. The most frequently used types of analyzers and ionization techniques have been described according to their suitability for evaluation of propolis composition. The review summarizes the employment of GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) and LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) in the recent 12 years in analysis of the main flavonoids (pinocembrin, pinobanksin, chrysin, galangin, quercetin, kaempferol, isorhamnetin, apigenin) and cinnamic acids (ferulic, caffeic, p-coumaric) in propolis extracts.

KEYWORDS: MASS SPECTROMETRY – CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES – PROPOLIS – EEP – GC-MS – LC-MS

Ostatnie dziesięciolecie było okresem gwałtownego rozwoju i zmian aparatury do spektrometrii mas (MS), które zwiększyły możliwości identyfikacyjne metod spektrometrycznych w różnych dziedzinach nauki. Najbardziej przydatne stały się jednak sprzężenia spektrometrów mas z niektórymi rodzajami chromatografów, takie jak chromatograf gazowy (GC-MS) lub chromatograf cieczowy (LC-MS). Połączenie układów GC-MS i LC-MS pozwoliło na stworzenie większych możliwości identyfikacyjnych wielu związków, poprzez wykorzystanie dodatkowo parametrów chromatograficznych, takich jak czas retencji oraz wyliczony eksperymentalnie indeks retencji (1, 2).

Propolis oraz wytworzone z niego produkty charakteryzują się bogatym składem chemicznym. Liczne badania wskazują na obecność około 300 składników, z czego około 240 zostało zidentyfikowanych głównie

za pomocą technik rozdzielczych połączonych ze spektrometrią mas (3-6). Analiza składu chemicznego propolisu wykazała obecność różnych grup związków chemicznych. Do najczęściej identyfikowanych należą związki polifenolowe: flawonoidy, chalkony, kwasy aromatyczne oraz ich estry, terpeny, fenylopropanoidy, stilbeny oraz lignany (2, 5, 7-9). Różnorodność składu chemicznego propolisu uwarunkowana jest rodzajem szaty roślinnej w miejscu zbioru oraz gatunkiem pszczoł zbierających ten produkt (10-15). W Polsce i innych krajach europejskich głównymi składnikami propolisu są żywice (eksudaty) wydzielane przez pączki topoli czarnej (*Populus nigra*), topoli osiki (*P. tremula*) i brzozy brodawkowatej (*Betula verrucosa*) (15, 16).

Identyfikowanie składników tak różnorodnej mieszaniny związków jak propolis jest złożonym zadaniem badawczym. Dzięki połączeniu obu uzupełniających się technik – chromatografii i spektrometrii mas – możliwym stała się identyfikacja struktur związków chemicznych wraz z ich analizą ilościową. Chromatograf rozdziela złożoną mieszaninę na pojedyncze składniki, dostarczając parametrów chromatograficznych zarówno jakościowych, jak i ilościowych. Z kolei spektrometria mas pozwala na określenie budowy strukturalnej badanych cząsteczek (17).

Idea spektrometrii mas jest oparta na wytworzeniu jonów oznaczanego związku chemicznego, a następnie na rozdziale utworzonych jonów w zależności od stosunku ich masy do ładunku (m/z) oraz detekcji. W związku z tym, możliwości stosowanego układu spektrometrycznego są zależne od trzech komponentów: źródła jonów, analizatora mas oraz detektora.

Źródła jonów

Generowanie jonów jest procesem, który ma duże znaczenie w zakresie jakości uzyskiwanych danych spektroskopowych. Wybór zastosowanej metody jonizacji zależy od właściwości fizykochemicznych oznaczanych związków (lotności, masy cząsteczkowej, stabilności termicznej) oraz stopnia złożoności matrycy, w ramach której jest analizowany (18). Metody jonizacji możemy podzielić na dwie grupy: te, które zachodzą w fazie gazowej, i pozostałe,

które służą do jonizacji niskolotnych i wielkocząsteczkowych związków. Pierwsza grupa obejmuje jonizację elektronową (EI) i jonizację chemiczną (CI) – najbardziej rozpowszechnione sposoby jonizacji, które znalazły zastosowanie w systemach GC-MS. Wymienione metody są wykorzystywane do jonizacji związków wykazujących nawet nieznaczną prężność par przy ciśnieniu około 10^{-6} tora i jednocześnie charakteryzujących się trwałością w temperaturze parowania (1). Do drugiej grupy możemy zaliczyć ewaporacyjne sposoby jonizacji: termorozpylanie (TE), elektrorozpylanie (ESI), jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) oraz oparte na desorpcji próbek: bombardowanie szybkimi atomami (FAB) czy desorpcję laserową z udziałem matrycy (MALDI). Desorpcyjne metody jonizacji są technikami, w których substancje są bezpośrednio emitowane w postaci jonów z powierzchni fazy skondensowanej do fazy gazowej.

Jonizacja strumieniem elektronów (EI) jest najstarszą i najczęściej stosowaną metodą w rutynowych analizach małowcząsteczkowych, hydrofobowych i stabilnych termicznie cząsteczek (19). Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że jest to najczęściej stosowana metoda jonizacji w analizie próbek propolisu (tab. 1) w połączeniu z chromatografią gazową. Cząsteczki próbki w fazie gazowej są bombardowane elektronami o energii 70 eV, które następnie wybijają elektron z cząsteczki, tworząc kationorodnik M^{+} nazywany jonom molekularnym (1). Nadmiar energii elektronów zostaje zużyty na zrywanie kolejnych wiązań kowalencyjnych w cząsteczce. Jonizacja elektronowa jest nazywana „twardą” ze względu na generowanie licznych jonów fragmentacyjnych. Zaletą metody EI jest otrzymywanie wysoce powtarzalnych i charakterystycznych dla analizowanych związków widm mas. Przewidywalność procesu fragmentacji badanych związków jest podstawą do pełnego określania struktur za pomocą spektrometrii mas. Z kolei powtarzalność tego procesu przyczyniała się do powstania i ciągłego rozbudowywania baz danych, zawierających widma masowe, które zwiększają możliwości identyfikacyjne, m.in. w analizie składu propolisu.

Technika o nazwie elektrosprej, elektrorozpylanie (ESI), oparta jest na procesie utworzenia zawiesiny bardzo drobnych rozpylanych cząstek badanej substancji i odparowaniu rozpuszczalnika w celu jonizacji próbki. Ewaporacyjne metody jonizacji są bardzo wygodnym rozwiązaniem, szczególnie w połączeniu z chromatografem cieczowym. Znajdują one szerokie zastosowanie w analizie składu propolisu (tab. 1). W metodzie ESI badany roztwór przepływa przez kapilarę do źródła jonów, gdzie przy wlocie rurki

kapilarnej podlega działaniu bardzo silnego pola elektrycznego. Powoduje ono nebulizację próbki na małe, obdarzone ładunkiem kropelki. Elektrorozpylanie może następować pod ciśnieniem atmosferycznym w podwyższonych temperaturach (350-400°C) oraz przy udziale wyładowań koronowych. W jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) próbka rozpylona z rurki kapilarnej przetwarzana jest w delikatną mgiełkę przy pomocy ogrzewanego nebulizera. Następnie zostaje ona porwana przez strumień azotu i przemieszcza się obok elektrody będącej źródłem wyładowań koronowych, gdzie ulega jonizacji. APCI znajduje zastosowanie do analizy mniejszych, termicznie stabilnych, polarnych i niepolarnych związków. Dane piśmiennictwa wskazują, że najpowszechniejszym źródłem jonizacji w połączeniu z chromatografem cieczowym, zastosowanym w badaniach nad propolisem, jest elektrorozpylanie ESI (20-24).

Analizatory

Rozdział jonów w zależności od stosunku ich masy do ładunku (m/z) można osiągnąć na wiele sposobów, m.in. za pomocą oddzielnych pól magnetycznych i elektrycznych lub w wyniku ich interakcji. Znanych jest kilka rodzajów analizatorów. Najstarszym urządzeniem rozpoczynającym erę spektrometrii mas był przyrząd z sektorem magnetycznym. Stopniowy rozwój spektrometrów mas zaowocował w nowe rozwiązania technologiczne i przyczynił się do powstania analizatorów charakteryzujących się: większą dokładnością, wyższą czułością, szerszym zakresem analizowanych mas i zdolnością do wyjaśniania struktur badanych związków. Pojawiły się systemy oparte na analizatorze kwadrupolowym, pułapce jonowej, transformacji Fouriera oraz czasie przelotu. Efektywność rozdziału jonów w analizatorze mas została zdefiniowana za pomocą następujących parametrów: dokładności pomiaru, zdolności rozdzielczej, zakresu mas, szybkości skanowania oraz możliwości zastosowania analizy tandemowej (19).

Analizator kwadrupolowy (Q) zbudowany jest z czterech cylindrycznych prętów, które w przekroju poprzecznym tworzą kwadrat. Do prętów przykładana jest napięcie prądu stałego oraz potencjał zmieniający się z częstością radiową. Jony są przyspieszane pomiędzy źródłem jonów a analizatorem kwadrupolowym i pod wpływem połączonych pól elektrycznych poruszają się po złożonych trajektoriach (17). W warunkach wyindukowanego pola elektrycznego jedynie jony o określonej wartości m/z mają stabilny tor i są w stanie dotrzeć do końca kwadrupola, a następnie do detektora. Jony o innych wartościach m/z poruszają się niestabilnie,

Tab. 1. Przegląd metod oznaczania niektórych składników propolisu

Oznaczone związki	Jonizacja	Rozdział chromatograficzny i detekcja	Piśmiennictwo
Kwas <i>p</i> -kumarowy	EI	GC-MS	(2, 8, 28-31)
	ESI, APCI	LC-MS-MS, HPLC-MS, UPLC-Q-ToF-MS, HPLC-IT	(20, 21, 24, 25, 32, 33)
Kwas ferulowy	EI	GC-MS	(2, 8, 29-31)
	ESI, APCI	LC-MS-MS, LC-Q-ToF, HPLC-MS, UPLC-Q-ToF-MS, HPLC-IT	(20, 21, 24, 25, 34, 35)
Kwas kawowy	EI	GC-MS	(2, 8, 29-31)
	ESI, APCI	LC-MS-MS, HPTLC-MS, LC-Q-ToF, UPLC-Q-ToF-MS, HPLC-IT	(21, 24, 25, 32-35)
Ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE)	EI	GC-MS	(2, 30)
	ESI	LC-MS-MS, HPLC-MS	(20, 21)
Pinoembryna	EI	GC-MS	(2, 29-31)
	ESI	LC-MS-MS, HPTLC-MS, UPLC-Q-ToF-MS, HPLC-IT	(20, 21, 24, 32, 33, 35)
Pinobanksyna	EI	GC-MS	(2, 29-31)
	ESI, APCI	LC-MS-MS, HPTLC-MS, UPLC-Q-ToF-MS, HPLC-IT	(21, 24, 25, 32, 33, 35)
Chryzyna	EI	GC-MS, GCxGC-ToF-MS	(8, 27, 28, 30, 31)
	ESI	LC-MS-MS, HPTLC-MS, UPLC-Q-ToF-MS, HPLC-IT	(20, 21, 24, 32, 33)
Galangina	EI	GC-MS	(2, 30, 31)
	ESI	LC-MS-MS, HPTLC-MS, UPLC-Q-ToF-MS, HPLC-IT	(21, 24, 32, 33)
Kwercetyna	EI	GCxGC-ToF-MS	(8, 28)
	ESI	LC-MS-MS, HPTLC-MS, HPLC-IT	(20, 21, 24, 32)
Kemferol	EI	GC-MS	(8, 30)
	ESI, APCI	LC-MS-MS, HPLC-MS, HPLC-IT	(21, 24, 25)
Izoramnetyna	EI	GC-MS, GCxGC-ToF-MS	(28, 29)
	ESI	LC-MS-MS, HPLC-IT	(21, 24)
Apigenina	EI	GC-MS, GCxGC-ToF-MS	(2, 8, 28-30)
	ESI	LC-MS-MS, HPTLC-MS, UPLC-MS, UPLC-Q-ToF-MS, HPLC-IT	(21, 24, 32, 33)

nieregularnie i trafiają poza kwadрупol. Z powodu filtrującego działania układu często jest on nazywany kwadрупolowym filtrem mas. Możliwości przyrządu kwadрупolowego ograniczają się do rejestrowania mas w zakresie do 4000 *m/z*, a maksimum zdolności rozdzielczej to blisko 4000 (17). Kwadрупolowy filtr mas ma szereg zalet, charakteryzuje się dużą czułością oraz efektywnością działania w przypadku jonów o małej prędkości. Poza tym spektrometr kwadрупolowy jest trwały, tani, o małych rozmiarach i może być łatwo łączony z szeregiem różnych układów rozdzielczych. Liczne zalety przyrządu kwadрупolowego spowodowały, że jest on powszechnie wykorzystywany w analizie próbek zawierających propolis.

Analiza ekstraktów propolisowych z użyciem analizatora kwadрупolowego obejmuje identyfikację składników propolisu oraz typową analizę ilościową. Z doniesień piśmiennictwa wynika, że za pomocą pojedynczego kwadрупola możliwa jest identyfikacja szerokiego spektrum związków chemicznych obecnych w propolisie (2, 8, 25). Dotychczas wykonano badania preparatów farmaceutycznych zawierających etanolowe ekstrakty z propolisu, które pozwoliły na wykrycie prawie 230 różnych składników. W badaniach zastosowano indeksy retencji w połączeniu z uzyskiwanymi widmami mas. Stwierdzono, że w największej ilości występowały polifenole, do których zaliczono flawonoidy i chalkony, kwasy aromatyczne oraz ich

estry. W analizowanych ekstraktach wskazano na obecność wielu glicerydów kwasów aromatycznych, których udział był na poziomie od 2,05 do 3,00%. Przeprowadzona analiza jakościowa wskazała na udział innych grup związków chemicznych: alkoholi i kwasów alifatycznych, hydrokys kwasów, związków terpenowych, mono- i disacharydów oraz polioli. Na podstawie uzyskanych profili fitochemicznych stwierdzono, że źródłem roślinnym analizowanego propolisu były topola czarna, osika oraz brzoza (2).

Liczne badania wskazują, że pojedynczy analizator kwadрупolowy jest odpowiednim narzędziem w analizie ilościowej związków chemicznych obecnych w propolisie. Marquez-Hernandez i wsp. (26) zaprezentowali metodę ilościowego oznaczenia triterpenoidów, m.in. lanosterolu, β -amironu, β -amiryny, lupeolu oraz germanikolu w próbkach propolisu pochodzącego z Kuby. Wykazano, że sumaryczna zawartość triterpenoidów w 19 badanych próbkach była na poziomie od 2,4 do 19,2 μg w 100 μl ekstraktu. Inni autorzy dokonali ilościowego oznaczenia alergizujących składników propolisu, do których zaliczono: estry benzytowe kwasu cynamonowego oraz ester benzytowy kwasu salicylowego. W każdej z pięciu analizowanych próbek oznaczono ester benzytowy kwasu cynamonowego na poziomie 20-1025 $\mu\text{g/g}$ oraz ester benzytowy kwasu salicylowego w ilości 15-80 $\mu\text{g/g}$. Uzyskane wyniki oznaczeń porównano z zawartością niektórych flawonoidów i kwasów cynamonowych w tych samych próbkach propolisu. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zawartość alergenów, w stosunku do składników aktywnych biologicznie, jest nieznaczna (8).

Badania wskazują, że kwadрупolowy filtr mas dobrze sprawdza się w wykrywaniu nowych związków chemicznych w skompilowanej matrycy propolisu. Choudhari i wsp. (27) dokonali identyfikacji nowych związków chemicznych odpowiedzialnych za aktywność biologiczną propolisu.

Niewiele doniesień piśmiennictwa wskazuje na zastosowanie pułapki jonowej (IT) w analizie propolisu oraz jego składników. Pułapka jonowa jest typem spektrometru mas, w którym jony przechowuje się w znajdującej się pod próżnią komorze. Najprostszym sposobem działania IT jest sekwencyjne wyrzucanie jonów (odpowiednio do wartości ich masy) do detektora i rejestracja uzyskanego widma. Pułapka jonów jest rozszerzeniem układów kwadрупolowych. Przyrządy składają się z trzech elektrod: jednej pierścieniowej o hiperbolicznej powierzchni wewnętrznej, do której przykłada się potencjał sinusoidalny o częstotliwości radiowej; pozostałe dwie elektrody zakrywające znajdują się na obu końcach elektrody pierścieniowej. Obie elektrody mogą działać w trybie uziemionym

z potencjałem zerowym lub z przyłożonym napięciem stałym lub zmiennym. Pułapki jonowe mogą być stosowane na wiele sposobów, przy użyciu różnych potencjałów lub uziemień pokrywy. Celem typowego działania analizatora IT jest wytworzenie porcji jonów, uwięzienie ich, a następnie, przy zmiennym potencjale o częstotliwości radiowej, wywołanie ruchu jonów w kierunku detektora, zgodnie z ich wartościami m/z . Należy podkreślić, że w kwadрупolowym filtrze mas jony o niestabilnych trajektoriach nie są rejestrowane, podczas gdy w IT jony nabierają niestabilnego ruchu, aby mogły wydostać się z pułapki i ulec detekcji (17).

Pułapka jonowa działa w takich samych wartościach zakresu mas i zdolności rozdzielczej, jak kwadрупolowy filtr mas. Badania w pułapce jonowej charakteryzują się bardzo dużą czułością i łatwością wykonania, przy niskim koszcie analizy. Największą zaletą takiego urządzenia jest możliwość zastosowania tandemowej analizy, przy zastosowaniu jednego analizatora IT (1). Ten aspekt został wykorzystany przez Pellati i wsp. (24), którzy zastosowali tandemową analizę w oparciu o pułapkę jonową. Oznaczono ilościowo związki należące do polifenoli i flawonoidów: kwas cynamonowy, kawowy, p -kumarowy, kwercetynę, pinocembrynę, chryzynę, kemferol, izoramnetynę oraz apigeninę. Z przeprowadzonego procesu walidacyjnego wyznaczono najmniejszą wartość granicy oznaczalności LOQ dla kwasu kawowego – 2,68 $\mu\text{g/ml}$ oraz największą dla pinocembryny – 7,74 $\mu\text{g/ml}$. Autorzy zaproponowali opracowaną procedurę do oceny składu ilościowego polifenoli i flawonoidów w preparatach farmaceutycznych zawierających propolis.

Ristivojevic i wsp. (22) wykorzystali pułapkę jonową do identyfikacji licznych flawonoidów oraz ich połączeń glikozydowych w próbkach propolisu pochodzącego z Serbii. W wyniku przeprowadzonego eksperymentu oznaczono 75 związków o strukturze fenolowej, do których zaliczono: kwasy fenolowe i ich pochodne, flawonoidy, flawan-3-ole, flawonole, flawanonole, flawony, glikozydy, glicerydy oraz pochodne kwasu kawowego.

Podstawa działania analizatora czasu przelotu (ToF) jest względnie prosta. Przyrząd oparty jest na czasie przelotu i rozdziela jony o różnych masach na podstawie ich różnych wartości prędkości uzyskanych po przyśpieszeniu przez przyłożony potencjał V . Na początku drogi wszystkie jony mają tę samą energię $zeV = mv^2/2$, a jony o różnych masach m mają różną prędkość $v = (2zeV/m)^{1/2}$. Jeżeli długość analizatora zostanie określona jako L , a prędkość wyrażona jako $v = L/t$, to czas przelotu zostanie zdefiniowany następującym wzorem: $t = (L^2m/2zeV)^{1/2}$, z którego

łatwo oblicza się masę (m/z) jonu (1, 18). Zdolność rozdzielcza linowych analizatorów czasu przelotu jest rzędu 20 000, co wynika z rozrzutu energii początkowej przekazanej jonom. Do istotnych zalet analizatora ToF należą: szybki czas odpowiedzi, nieograniczony zakres analizowanych mas oraz wysoka czułość.

Gao i wsp. (28) zaproponowali spektrometrię czasu przelotu do analizy jakościowej i ilościowej składników propolisu i innych próbek pochodzenia naturalnego. Identyfikację składników w matrycy prowadzono w oparciu o wyliczone indeksy retencji oraz widma masowe uzyskane w wyniku tandemowego sprzężenia ToF-MS. Analizator czasu przelotu umożliwił wykrycie nowych połączeń aglikonów flawonoidowych w propolisie. Dokonano ilościowego oznaczenia flawonoidów: epikatechiny, katechiny, chryzyny, tektochryzyny, kemferolu, kwercetyny, izoramnetyny, apigeniny oraz luteoliny. Autorzy zaproponowali ocenę jakości propolisu na podstawie sumarycznej zawartości flawonoidów w próbce. Propolis o procentowym udziale flawonoidów powyżej 17% kwalifikowano jako próbki spełniające wymogi wysokiej jakości.

Moc działania każdego analizatora może być zwiększona poprzez zbudowanie integralnego systemu opartego o kilka analizatorów – tego samego lub innego typu. Układy sprzężone noszą nazwę „tandemowej spektrometrii mas” (MS-MS). Typowy tandem MS-MS polega na wyodrębnieniu z jonów fragmentacyjnych jonu-prekursora, następnie jego samostnej lub wymuszonej fragmentacji, z wytworzeniem jonu-produktu. Stosując metodę MS-MS, można jednoznacznie stwierdzić obecność analizowanego związku w bardzo złożonej mieszaninie bez wstępnego oczyszczenia, rozdzielania i izolacji badanej próbki. Połączenie analizatorów w tandemową spektrometrię mas zostało wykorzystane w analizie ilościowej związków biologicznie czynnych zawartych w próbkach propolisu (20, 21, 24). Do najczęściej wykorzystywanych układów tandemowych należą połączenia trzech analizatorów kwadrupolowych, w których pierwszy kwadrupol wyodrębnia określone jony do dalszej analizy, drugi działa jako komora zderzeń, a trzeci rozdziela jony-produkty, dając widmo mas (1, 21). Warto zaznaczyć, że jeden analizator typu pułapka jonowa jest zdolny do przeprowadzenia analizy w tandemie MS-MS bez konieczności łączenia kilku analizatorów; te możliwości IT zostały wykorzystane przy analizie składników propolisu (24).

Możliwości tandemowej spektrometrii mas zostały przedstawione przez Gardanę i wsp. (21), którzy oznaczyli ilościowo szereg związków polifenolowych i flawonoidów. Dokonano charakterystyki metody analitycznej, w której uzyskano limity wykrywalności (LOD)

równe 0,8 $\mu\text{g/ml}$, limity oznaczalności (LOQ) na poziomie 2,0 $\mu\text{g/ml}$ oraz wysoką powtarzalność wyników (RSD = 5,4%).

Podsumowanie

Spektrometria mas, w sprzężeniu z technikami rozdzielczymi, znajduje szerokie zastosowanie w analizie składu propolisu oraz wytworzonych z niego produktów, zarówno w analizie jakościowej, w tym w identyfikacji nowych składników, jak i typowym oznaczeniu ilościowym. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że najbardziej rozwiniętym połączeniem chromatografii ze spektrometrią mas w analizie składu propolisu jest sprzężenie w układzie GC-MS, które charakteryzuje się wysoką czułością oraz wszechstronnością zastosowań (2, 8, 15, 23, 25, 26, 29, 36). Połączenie chromatografu gazowego ze spektrometrem mas jest bardzo wygodne ze względu na przebieg analizy w fazie gazowej. Składniki rozdzielonej mieszaniny opuszczające kolumnę chromatograficzną z łatwością przemieszczają się do spektrometru mas, gdzie ulegają jonizacji i fragmentacji. Przyrządy, oparte na połączeniu chromatografii ciekłowej ze spektrometrią mas, nie osiągnęły jeszcze takiego stopnia rzetelności wyników, który w codziennej rutynowej praktyce osiąągają instrumenty GC-MS.

Urządzenia LC-MS zyskują uznanie w przypadkach, kiedy mamy do czynienia z analizą związków nielotnych lub termicznie nietrwałych, takich jak glikozydy flawonoidowe (20, 22). Z kolei przygotowanie próbek propolisu do analizy LC-MS jest często łatwiejsze i nie wymaga w porównaniu do metody GC-MS derywatyzacji. Połączenia chromatografu ciekłowego ze spektrometrem tandemowym LC-MS-MS charakteryzują się wysoką specyficznością i dużą czułością. Właśnie z tego względu nadają się one do badań jakościowych i ilościowych wieloskładnikowych mieszanin, takich jak propolis (21).

Piśmiennictwo

1. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric identification of organic compounds. PWN, Warszawa 2007; 1-13.
2. Czyżewska U, Konończuk J, Teul J i wsp. Verification of chemical composition of commercially available propolis extracts by gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J Med Food* 2015; 18:584-91.
3. Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31:3-15.
4. Guo S, Fu S, Shen Z i wsp. Chemical composition, biological activity and application in animal science of propolis – a review. *Adv Biomed Engin* 2011; 98-101.
5. Huang S, Zhang C-P, Wang K i wsp. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 2014; 19:19610-32.
6. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM i wsp. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement* 2013; 2013:Article ID 697390, 13 pages.
7. Abu-Melal A, Koolaji N, Duke RK i wsp. Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity.

- Phytochem 2012; 77:251-9. **8.** Aliboni A, D'Andrea A, Massanisso P. Propolis specimens from different locations of central Italy: chemical profiling and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) quantitative analysis of the allergenic esters benzyl cinnamate and benzyl salicylate. *J Agric Food Chem* 2011; 59:282-8. **9.** Fernandes-Silva CC, Salatino A, Salatino MLF i wsp. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. *Quimica Nova* 2013; 36:237-40. **10.** Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda RA i wsp. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem* 2012; 131:645-51. **11.** Guo X, Chen B, Luo L i wsp. Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of Chinese propolis. *J Agric Food Chem* 2011; 59:12610-6. **12.** Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA i wsp. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rep* 2011; 28:925-36. **13.** Christov R, Trusheva B, Popova M i wsp. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat Prod Res* 2006; 20:531-6. **14.** Gardjeva PA, Dimitrova SZ, Kostadinov ID i wsp. A study of chemical composition and antimicrobial activity of Bulgarian propolis. *Folia Med* 2007; 49:63-9. **15.** Maciejewicz W, Daniewski M, Dzido TH i wsp. GC-MS and HPLC analysis of phenolic acids extracted from propolis and from *Populus nigra* bud exudate. *Chem Anal* 2002; 47:21-30. **16.** Kędzia B. Pochodzenie propolisu w świetle teorii i badań naukowych. *Herba Pol* 2008; 54:179-86. **17.** Johnstone RAW, Rose ME. Spektrometria mas. Wyd Nauk PWN, Warszawa 2001; 56-103, 131-69. **18.** Lavagnini I, Magno F, Seraglia R i wsp. Quantitative application of mass spectrometry. John Wiley & Sons LTD, Atrium, Chichester 2006; 1-35. **19.** Siuzdak G. The expanding role of mass spectrometry in biotechnology. MCC Press San Diego 2006; 1-48. **20.** Falcao SI, Vale N, Gomes P i wsp. Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochem Anal* 2013; 24:309-18. **21.** Gardana C, Scaglianti M, Pietta P i wsp. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45:390-9. **22.** Ristivojevic P, Trifkovic J, Gasic U i wsp. Ultrahigh-performance liquid chromatography and mass spectrometry (UHPLC-LTQ/Orbitrap/MS/MS) study of phenolic profile of Serbian poplar type propolis. *Phytochem Anal* 2015; 26:127-36. **23.** Nunes CA, Guerreiro MC. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. *J Sci Food Agric* 2012; 92:433-8. **24.** Pellati F, Orlandini G, Pinetti D i wsp. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 55:934-48. **25.** Chang R, Pilo-Veloso D, Morais SAL i wsp. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Braz J Pharmacogn* 2008; 18:549-56. **26.** Marquez-Hernandez I, Cuesta-Rubio O, Campo-Fernandez M i wsp. Studies on the constituents of yellow Cuban propolis: GC-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *J Agric Food Chem* 2010; 58:4725-30. **27.** Choudhari MK, Puneekar SA, Ranade RV i wsp. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra. *J Ethnopharmacol* 2012; 141:363-7. **28.** Gao X, Williams SJ, Woodman OL i wsp. Comprehensive two-dimensional gas chromatography, retention indices and time-of-flight mass spectra of flavonoids and chalcones. *J Chromatogr A* 2010; 1217:8317-26. **29.** Isidorov VA, Szczepaniak L, Bakier S. Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry* 2014; 142:101-6. **30.** Markiewicz-Zukowska R, Car H, Naliwajko SK i wsp. Ethanol extract of propolis, chrysin, CAPE inhibit human astroglia cells. *Adv Med Sci* 2012; 57:208-16. **31.** Popova M, Silici S, Kaftanoglu O i wsp. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomed* 2005; 12:221-8. **32.** Morlock GE, Ristivojevic P, Chernetsova ES i wsp. Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and direct analysis in real time mass spectra for profiling of natural products like propolis. *J Chromatogr A* 2014; 1328:104-12. **33.** Szliszka E, Sokol-Letowska A, Kucharska AZ i wsp. Ethanol extract of Polish propolis: chemical composition and TRAIL-R2 death receptor targeting apoptotic activity against prostate cancer cells. *Evid Based Complement* 2013; 2013:Aritele ID 757628, 12 pages. **34.** Restivo A, Degano I, Ribechini E i wsp. Development and optimisation of an HPLC-DAD-ESI-Q-ToF method for the determination of phenolic acids and derivatives. *Plos One* 2014; 9:e88762. **35.** Kasote D, Ahmad A, Chen W i wsp. HPTLC-MS as an efficient hyphenated technique for the rapid identification of antimicrobial compounds from propolis. *Phytochem Lett* 2015; 11:326-31. **36.** Witkiewicz Z, Kałużna-Czaplińska J. Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych. WNT, Warszawa 2012:119-32.

Konflikt interesów**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 27.05.2015

zaakceptowano/accepted: 10.11.2015

Adres/address:

*Urszula Czyżewska

ul. Kilińskiego 1, 15-089 Białystok

tel. +48 (85) 748-57-35

e-mail: urszula.czyzewska@umb.edu.pl