

## Artigo

**Análise Quantitativa de Produtos Naturais em Plantas por CL-EM****Niculau, E. S.; de Freitas, S. D. L.; de Sá, I. C. G.; Fernandes, J. B.; da Silva, M. F. G. F.\****Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (1), 204-230. Data de publicação na Web: 7 de janeiro de 2016<http://rvq.sbq.org.br>**Quantitative Analysis of Natural Products in Plants by LC-MS**

**Abstract:** Plants are important sources of foods and are used in traditional medicine to prevent various diseases. The quantification of the main active principles of plants serves for quality control of the formulations with them. Gas chromatography (GC) and liquid chromatography with ultraviolet detection (LC-UV) have been used widely; however, these techniques have been replaced by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), mainly due to increased sensitivity. Thus, this study approached the quantification of natural products in plants by LC-MS focusing in the main analyzers, triple quadrupole and their hybrids.

**Keywords:** Natural products; hyphenated techniques; quantification.

**Resumo**

As plantas são fontes importantes de alimentos e são também usadas na medicina tradicional para combater várias doenças. A quantificação dos princípios ativos de plantas serve para o controle de qualidade das formulações com os mesmos. Cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (CL-UV) têm sido amplamente empregadas, entretanto, estas técnicas estão sendo substituída por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM), principalmente devido ao aumento da sensibilidade desta para a quantificação de produtos naturais. Dessa forma, este estudo abordou a quantificação de produtos naturais em plantas por CL-EM focando nos principais analisadores, triplo quadrupolo e seus híbridos.

**Palavras-chave:** Produtos naturais; técnicas hifenadas; quantificação.

\* Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, CEP 13565-905, São Carlos-SP, Brasil.

✉ [dmfs@ufscar.br](mailto:dmfs@ufscar.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20160014](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160014)

## **Análise Quantitativa de Produtos Naturais em Plantas por CL-EM**

**Edenilson S. Niculau, Sâmya Danielle L. de Freitas, Israel C. G. de Sá, João B. Fernandes, Maria Fátima G. F. da Silva\***

Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, CEP 13565-905, São Carlos-SP, Brasil.

\* [dmfs@ufscar.br](mailto:dmfs@ufscar.br)

*Recebido em 3 de janeiro de 2016. Aceito para publicação em 3 de janeiro de 2016*

### **1. Introdução**

### **2. Instrumentação**

#### **2.1. Fontes de ionização**

#### **2.2. Analisadores de massas**

### **3. Aplicações**

#### **3.1. Flavonoides**

#### **3.2. Triterpenos**

#### **3.3. Saponinas**

#### **3.4. Alcaloides**

#### **3.5. Cumarinas**

### **4. Conclusões**

## **1. Introdução**

As plantas representam uma extraordinária fonte de compostos ativos para diversas áreas de interesse. O perfil químico de extratos brutos não é uma tarefa fácil de ser estudado em razão da diversidade de classes de substâncias presente nas plantas. No entanto, o avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo daquelas hífenadas, proporcionou um papel importante no estudo de composições químicas complexas, com altos níveis de sensibilidade e seletividade. O acoplamento

da cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massas (CL-EM) é uma ferramenta analítica extremamente importante sendo mais eficiente e com maior sensibilidade do que as convencionais, tornando-se o método analítico utilizado em várias etapas de desenvolvimento de fármacos. Além disso, a técnica de Cromatografia Líquida individualmente e acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM), a Ultravioleta/Arranjos de fotodiodos (CL-UV/DAD) ou a Ressonância Magnética Nuclear (CL-RMN) desempenham um papel importante na análise de amostras ambientais, aplicações bioquímicas e

biotecnológicas, bem como em muitos outros campos de aplicação.<sup>1-9</sup> Dentre os sistemas de detecção acoplados a cromatografia líquida, a espectrometria de massa (CL-EM) é muito mais seletiva e mais sensível quando comparada, por exemplo, com CL-UV/DAD (Cromatografia Líquida acoplada a Ultravioleta/Arranjos de fotodiodo). O principal problema do uso da técnica de CL-EM na química de produtos naturais é a ionização simultânea de uma grande variedade de compostos existentes no extrato bruto, o que muitas vezes pode ocasionar um efeito matriz.<sup>10</sup>

Com o avanço da técnica de CL-EM tornou-se possível o estudo do extrato vegetal bruto, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a substâncias já conhecidas. Este procedimento é conhecido como desrepliação. Sendo assim, estratégias de triagem química e de quantificação têm sido desenvolvidas.<sup>11-15</sup>

Análises quantitativas é uma área de aplicação bastante importante, é extremamente necessária para acompanhar testes pré-clínicos e clínicos de fármacos e fornecer dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos.<sup>1</sup> As condições para o êxito do método quantitativo, são os limites de detecção baixos, seletividade excelente contra possíveis interferentes da matriz, quando operado em modo de SRM (monitoramento de reação selecionada) e a utilização de padrões internos ideais.

Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no acoplamento do sistema de cromatografia líquida com a espectrometria de massas foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais, muitas vezes, é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis.<sup>16</sup> O surgimento de fontes de ionização à pressão atmosférica, tais como a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por "electrospray" (ESI) tornaram a técnica de CL-EM aplicável a uma ampla diversidade de matrizes. Recentes estudos com fotoionização à pressão

atmosférica (APPI) conferiu ainda mais a universalidade à técnica, permitindo a análise de compostos com baixa massa molecular até proteínas.<sup>17</sup> As fontes de ionização normalmente produzem uma ionização branda dos metabólitos, podendo levar a informações da massa molecular dos compostos. Algumas informações obtidas durante a fragmentação como a perda de uma molécula de açúcar e perda neutra são essenciais na confirmação e na escolha de transições no monitoramento de reações para a análise quantitativa. Para obter um número maior de fragmentos característicos, o espectro de dissociação induzido por colisão pode ser obtido utilizando-se os sistemas EM/EM ou "ion trap".<sup>18</sup>

Esta revisão apresenta aplicações da técnica de CL-EM em análises quantitativas de produtos naturais em matrizes de plantas. Os dados são descritos em tópicos com diferentes tipos de metabólitos secundários e com ênfase especial a aplicabilidade da técnica, assim como os procedimentos metodológicos. O acoplamento, as fontes de ionização e os analisadores de massas mais usuais em estudos de quantificação também são apresentados.

## 2. Instrumentação

### 2.1. Fontes de ionização

A fonte de ionização é um componente extremamente importante em um espectrômetro de massas, e sua escolha é definida de acordo com a natureza da matriz, e no caso de plantas, é necessária a avaliação das características físico-químicas das substâncias que serão quantificadas. Em contraste com a espectrometria de massas de impacto eletrônico, a ionização sob pressão atmosférica (API), assim como por "electrospray" (ESI) e ionização química sob pressão atmosférica (APCI) resulta em grande quantidade de íon molecular e pouca fragmentação, sendo os íons mais fáceis de manipular do que as substâncias em fase

neutra. ESI é um método de gerar gotículas altamente carregadas a partir das quais os íons são ejetados por um processo de evaporação do solvente. Um campo elétrico é gerado na ponta de um pulverizador pela aplicação de alta tensão. Esta técnica é tipicamente realizada tanto no modo de infusão ou em combinação com CLAE ou eletroforese capilar.<sup>19</sup> A fonte APCI é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e termicamente estáveis.<sup>20,21</sup> Na ionização por APCI o eluente da cromatografia passa através de um nebulizador pneumático no qual gotas são geradas e dessolvatadas. O “spray” formado passa por uma região aquecida na qual parte do solvente pulverizado é evaporado, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente obtido da fase móvel encontra-se em maior concentração no “spray” que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito.<sup>16,20,22,23</sup> Esta técnica é especialmente adequada para compostos não-polar, e assim, como ESI, pode ser operado no positivo e modo negativo.<sup>24</sup> A fotoionização é uma técnica de ionização nova,<sup>25</sup> é considerada como alternativa para

compostos que são pouco ionizados por ESI e APCI, uma vez que certos grupos de compostos apolares e de baixa polaridade, como por exemplo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, só podem ser analisados por CLAE. Esta técnica normalmente requer a adição de um dopante, uma substância ionizada preferencialmente que atua como intermediário entre fótons e analitos.<sup>26,10</sup>

## 2.2. Analisadores de massas

A maioria dos trabalhos de quantificação por CL-EM são realizados em instrumentos com quadrupolos únicos e triplo quadrupolo.<sup>1</sup> Triplo quadrupolo é o analisador de massas mais utilizado na configuração EM/EM e também o mais versátil, e assim tornou-se um dos mais amplamente utilizados por causa de sua facilidade de manuseio, tamanho pequeno, e relativamente de baixo custo. Na configuração EM/EM, os íons podem ser fragmentados, onde o quadrupolo 1 serve como um filtro de massas, o quadrupolo 2 como uma cela de colisão (ocorrendo a fragmentação dos íons) e o quadrupolo 3 novamente como filtro de massas (Figura 1).

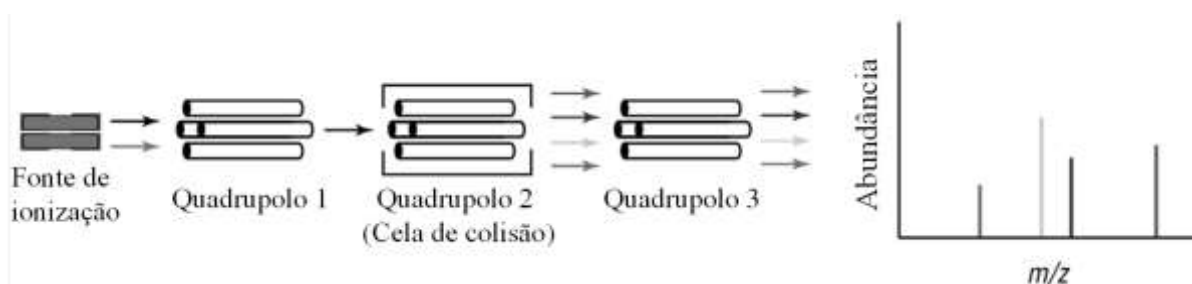


Figura 1. Esquema de um analisador triplo quadrupolo

Este tipo de analisador pode ser usado em vários modos de operação, como por exemplo, modo “Full Scan” (verificação de todos os íons), experimentos de íons produtos e íons precursores, monitoramento de reação selecionada (SRM), que também é

conhecido como monitoramento de reações múltiplas (MRM),<sup>27,28</sup> monitoramento de íon selecionado (SIM) e perda neutra (NL). Recentes estudos mostram que o desempenho do triplo quadrupolo (QqQ) para EM/EM é melhorado com o surgimento

do hexapolo<sup>29</sup> e octapolo,<sup>30</sup> o qual melhorou a transmissão e a qualidade dos íons produtos recolhidos durante a análise. O modo MRM fornece alta seletividade e sensibilidade necessária na análise quantitativa.<sup>27,31-33</sup> Técnicas como dissociação por colisão induzida na fonte (CID) pode ajudar, mas a especificidade oferecida por meio de experimentos em “tandem” como EM/EM (EM<sup>2</sup>), EM/EM/EM (EM<sup>3</sup>), através do EM<sup>n</sup> tem acrescentado valor do uso do CL-EM para análises quantitativas. Montoro e colaboradores<sup>34</sup> têm descrito duas configurações básicas: a “tandem-in-space” que utiliza múltiplos analisadores em sequência como o triplo quadrupolo e o quadrupolo por tempo de voo; enquanto o “tandem-in-time” refere-se à seleção de íons pais e sua subsequente fragmentação dentro do mesmo analisador, e isto é exemplificado pelo “ion trap”, o qual permite várias análises por meio de experimentos EM<sup>n</sup>.

O intuito de unir alta resolução com alta precisão e versatilidade para a quantificação, levou ao desenvolvimento de analisadores híbridos como do tipo quadrupolo - tempo de voo (Q-TOF), e do tipo quadrupolo - íon trap (Q-Trap). Embora desenvolvido pela primeira vez há 10 anos, espectrômetros de massas do tipo Q-TOF, têm sido utilizados pela comunidade analítica como um instrumento robusto com características peculiares.<sup>35</sup> Com este analisador, é possível combinar o alto desempenho do TOF e eficientes análises nos modos EM e EM/EM, com fontes de ionização amplamente utilizadas como ESI e APCI. O espectrômetro híbrido Q-TOF fornece alta sensibilidade para a determinação de metabólitos secundários.<sup>36</sup> No entanto, ele tem uma faixa linear dinâmica relativamente pobre para análises quantitativas, em comparação ao de instrumentos quadrupolo.<sup>37</sup>

A combinação do analisador do tipo triplo quadrupolo com “ion trap” é interessante, pois, une as funções de digitalização, tais como SRM, experimentos de íons produtos e íons precursores e de perda neutra, com a sensibilidade do “ion trap” com a realização de experimentos EM<sup>n</sup>. O espectrômetro

híbrido Q-Trap é extremamente sensível em análises quantitativas.<sup>38</sup>

### 3. Aplicações

#### 3.1. Flavonoides

Os flavonoides fazem parte de uma classe de metabólitos secundários de grande diversidade presentes em vários alimentos e plantas medicinais. Flavonoides específicos são conhecidos por terem atividades farmacológicas, particularmente antialérgicas, anti-inflamatória, antiviral e efeitos anticancerígenos.<sup>39-42</sup> Devido aos inúmeros benefícios à saúde, técnicas analíticas para a caracterização e quantificação são necessárias a fim de auxiliar o progresso da ciência medicinal.<sup>43-45</sup>

Em plantas, geralmente obtém-se uma mistura complexa de substâncias por extração com solventes.<sup>19</sup> Esta matriz é composta de uma grande diversidade de flavonoides com diferenças estruturais, as quais dependem do padrão de substituição, e suas formas glicosiladas frequentemente são encontradas em plantas. A grande vantagem do uso da técnica de CL-EM para análise de flavonoides é seu potencial para determinar ambas as formas livre e glicosiladas, ao contrário, por exemplo, do CG-EM. Dependendo da estrutura, os flavonoides glicosilados podem sofrer colisão induzida por clivagem da ligação O-glicosídica produzindo íons produtos de aglicona desprotonada. Algumas perdas neutras e fragmentos específicos como os da via de retro Diels-Alder são bem característicos para a identificação dos flavonoides.<sup>46</sup>

Devido à complexidade estrutural, à dificuldade de separação cromatográfica dos flavonoides glicosilados e à baixa volatilidade desses compostos, tem surgido um grande número de trabalhos envolvendo identificação estrutural e quantificação usando a técnica de CL-EM, principalmente, pela técnica de ESI-EM/EM.<sup>15,47</sup> Uma revisão

sobre a aplicação dos métodos de espectrometria de massas, incluindo CL-EM para a determinação de flavonoides em matrizes biológicas foi publicado em 2004.<sup>19</sup>

A análise quantitativa de flavonoides glicosilados, incluindo dihidrochalconas é relatada por Kazuno *et al.*<sup>48</sup> Neste trabalho é usado o modo "scan" de perda neutra e o monitoramento de reação selecionada (SRM). Os flavonoides aspalatina, notofagina, vitexina, orientina, isoorientina, isoquercitrina, rutina, hiperosídeo, luteolina-7-O-glicosídeo e isovitexina (Figura 2) foram os flavonoides quantificados em amostras de folhas de *Aspalathus linearis* (chá) não fermentado e em chá adquirido comercialmente, a fim de determinar as composições e concentrações dos flavonoides glicosilados em ambas as matrizes.<sup>48</sup> Um TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Electron) com fonte de ESI acoplado ao CLAE Gilson foi empregado na análise. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Develosil ODS UG-5, com fase móvel de água e acetonitrila, ambas com 0,1 % de ácido fórmico. Para as condições de ionização no modo positivo a temperatura do capilar foi de 280 °C, a tensão de spray foi de 5000 V, a variação do intervalo de massa para a fragmentação foi de  $m/z$  300 a 700, em energia de colisão de 15 e 30 eV. Para a análise quantitativa foi utilizado o método SRM no modo positivo, onde houve a combinação do íon precursor e íon produto em energia de 15 e 30 eV. Assim, foi possível a identificação eficaz dos flavonoides glicosilados pela perda neutra com base em características dos íons fragmentados da molécula de açúcar e comparação com a intensidade do pico em cada espectro dos íons provenientes de perda neutra. O método SRM envolveu as seguintes transições de íons ( $m/z$ ) para os respectivos flavonoides: aspalatina (453→333), notofagina (437→317), vitexina (433→313), orientina

(449→329), isoorientina (449→299), isoquercitrina (465→303), rutina (611→303), hiperosídeo (465→303), luteolina-7-O-glicosídeo (449→287) e isovitexina (433→283). O método foi específico, preciso e reprodutível para os flavonoides glicosilados, sendo que foi possível quantificar os compostos na faixa de 3,3 a 671,8 pmol/mL para o chá não fermentado e 5,2 a 313,2 pmol/mL para o chá comercial.

Sprenger and Cass<sup>49</sup> caracterizaram 4 espécies de *Phyllanthus* utilizando CL-EM/EM, tendo como modo de ionização "electrospray", identificando, além de diversos elagitaninos, os flavonoides orientina-2"-O-ramnosídeo, vitexina-2"-O-ramnosídeo, orientina, rutina, quercetina-3-O-glucosídeo, quercetina-3-O-glucuronídeo, quercetina, miricetina e kaempferol-3-rutinosídeo, permitindo caracterizar o perfil químico das 4 espécies. Neste trabalho foi utilizado o sistema de LC Shimadzu, Kyoto, Japan, consistindo de duas bombas LC-20AD, amostrador automático SIL 20A com "loop" de 2 mL e degaseificador DGU-20A5 e interface CBM-20A. Uma coluna analítica fenil-hexil Luna<sup>®</sup> (10µm, 150 mm × 4.6 mm), e uma Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> com pré-coluna (4mm × 3 mm) foram utilizadas. Este sistema foi acoplado ao MS Esquire 6000 IT (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) equipado com fonte ESI. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o programa Data Analysis<sup>®</sup> (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). O EM foi programado para realizar a análise em "full scan" e por MRM, selecionando os íons de  $m/z$  de interesse para cada composto. As seguintes condições foram também utilizadas: nebulizador 30 psi, gás seco 8 L min<sup>-1</sup>, temperatura de secagem 325 °C e voltagem do capilar 4000 V. Os espectros foram registrados no modo negativo entre  $m/z$  50 e 1100.

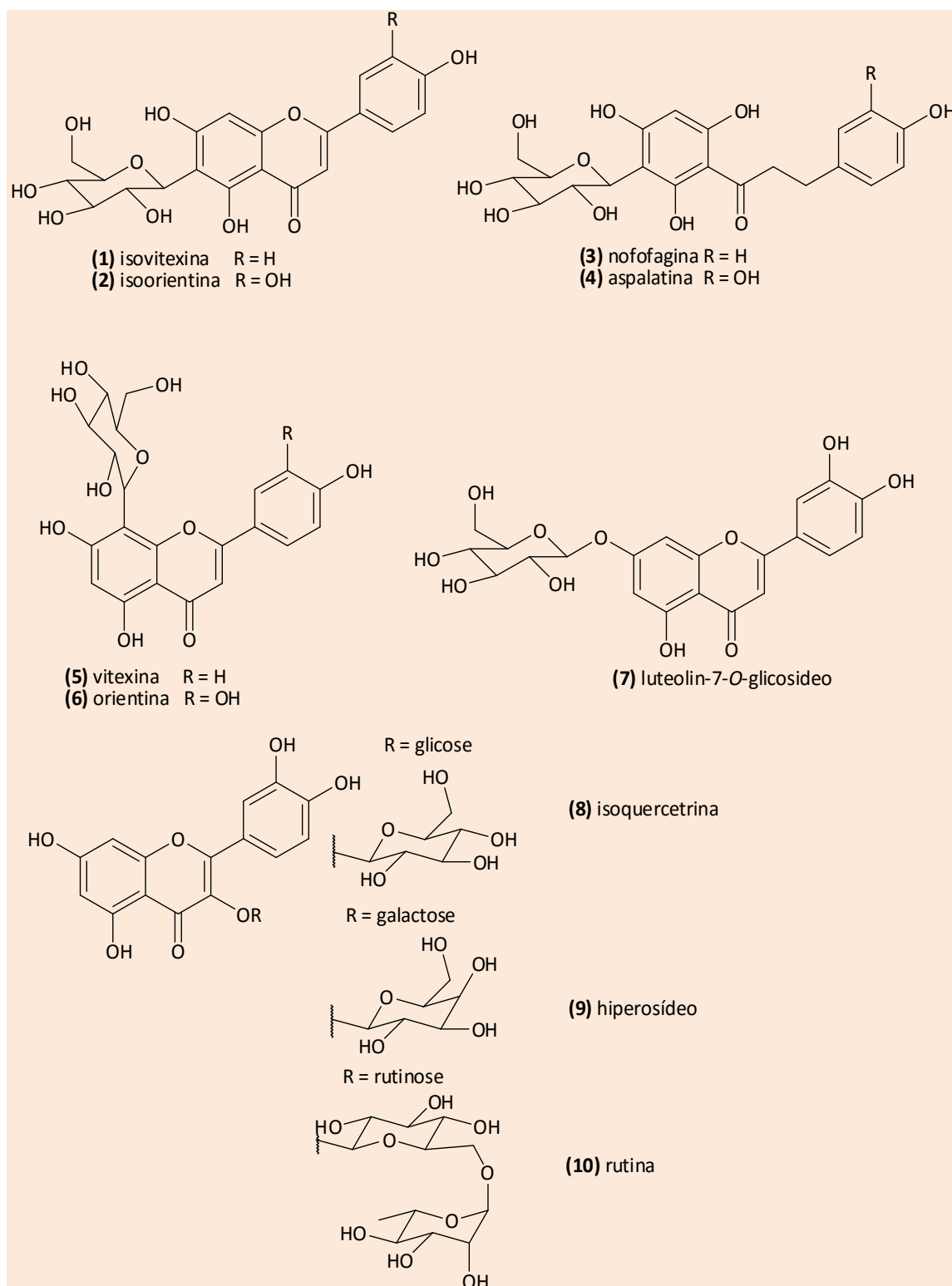


Figura 2. Estruturas químicas de alguns flavonoides quantificados por Kazuno *et al.*<sup>48</sup>

Em 2008, Islam *et al.*<sup>50</sup> relataram a quantificação de flavonoides glicosilados dos extratos de *Herba epimedii* como uma avaliação da qualidade das amostras coletadas de diferentes regiões da Coreia e

China para estudos clínicos. Um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo API 2000 (Applied Biosystem SCIEX) foi empregado neste estudo. A composição relativa dos flavonoides revelou

diferenças significativas entre os extratos, indicando que espécimes e ambientes diferentes podem resultar em perfis químicos distintos.

Com o uso dos analisadores híbridos do tipo Q-Trap para análises quantitativas com maior sensibilidade, um trabalho publicado em 2011 por Qiao *et al.*<sup>51</sup> relata a análise de flavonoides, incluindo alguns ácidos fenólicos de *Herba scutellariae barbatae* para estudo de quantificação de 18 lotes diferentes da espécie e 3 lotes de fontes distintas e de natureza confusa. O espectrômetro de massa utilizado foi um Q-Trap da série 3200 com fonte Turbo V (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O modo de ionização usado foi o modo negativo em uma fonte ESI. A separação simultânea destes compostos foi alcançada em coluna analítica C18 com modo gradiente de eluição com metanol e 0,1 % de ácido acético (v/v). Os íons precursores e produtos dos analitos foram monitorados no modo MRM. A validação completa do ensaio foi realizada incluindo precisão, linearidade,

recuperação, limites de detecção e quantificação.

Mais recentemente, em 2014, Jia *et al.*<sup>52</sup> realizaram a quantificação de cinco flavonoides, sendo dois glicosilados, em *Baeckea frutescens* por CLAE-DAD-Q-TOF/EM. Neste trabalho foi utilizado um CLAE-DAD Agilent 1100 equipado com uma bomba binária, amostrador automático, desgaseificador e um compartimento de controle da temperatura da coluna. Uma coluna analítica Grace Apollo (5 $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4.6 mm) foi utilizada. Este sistema foi acoplado ao EM Q-TOF Agilent 6530 equipado com fonte ESI. O EM foi programado para realizar a análise em "full scan" entre  $m/z$  100 - 1500 no modo positivo. A validação do ensaio foi realizada incluindo precisão, repetibilidade, linearidade, recuperação, limites de detecção, limite de quantificação e estabilidade.

Outras aplicações descrevendo a quantificação de flavonoides por CL-EM são sumarizadas na Tabela 1.<sup>53-56</sup>

**Tabela 1.** Exemplos de metodologias usadas na determinação quantitativa de flavonoides em plantas por CL-EM

Matriz	Equipamento	Condições do LC	Condições do MS	Ref.
<i>Lippia graveolens</i>	CLAE 1100 Agilent / MS- (Agilent LC/MSD SL)	Coluna Waters C18. A fase móvel consistiu em A (0,1% de ác. fórmico em H <sub>2</sub> O) e B (0,1 % de ác. fórmico em acetonitrila)	Fonte ESI. Foram monitorados nos modos de ionização, positivo e negativo.	53
<i>Albizia julibrissin</i>	CLAE Hewlett Packard 1100 / MS (Esquire Bruker)	Coluna Waters C18. Fase A (0,1% de ác. fórmico em H <sub>2</sub> O) e B (0,1 % de ác. fórmico em acetonitrila)	Foi operado no modo positivo de ionização em fonte ESI.	54
<i>Euonymus alatus</i> (Thunb.)	CLAE Shimadzu / MICROMASS Quattro Micro™ API.	Coluna Shim C18 e coluna de guarda Kromasil C18. Fase móvel (Metanol: H <sub>2</sub> O: ác. fórmico) numa proporção (42:57.5:0.5, v/v/v).	Modo positivo e negativo de ionização em fonte ESI.	55
<i>Saladas de rúcula</i>	CLAE 1100 Agilent / MS- (Agilent LC/MSD)	Coluna Zorbax SB C18. Fase B (0,1% de formiato de amônio em H <sub>2</sub> O) e B (acetonitrila) no modo gradiente	Modo negativo de ionização em fonte ESI.	56



### 3.2. Triterpenos

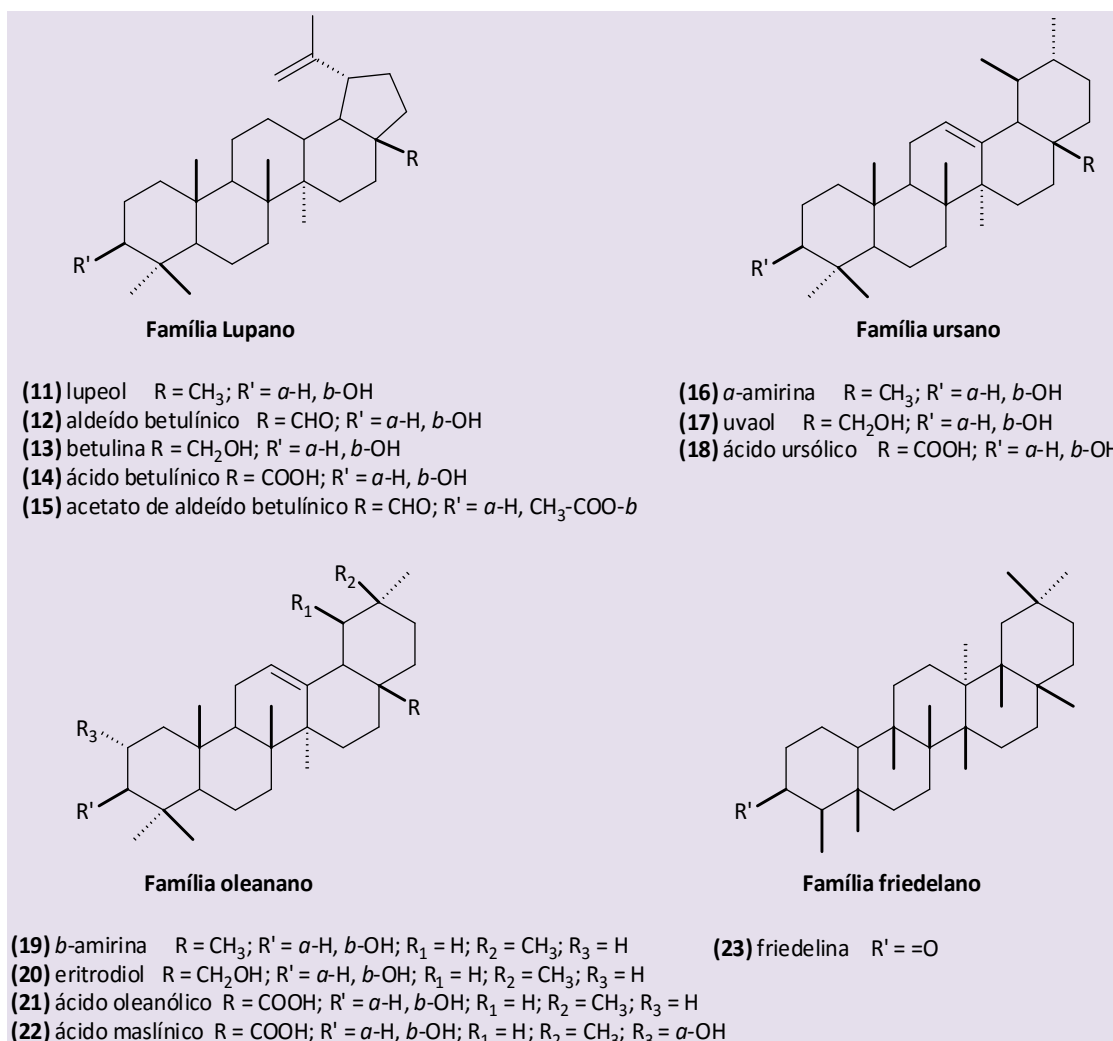
Os triterpenos são formados por 30 carbonos resultante da junção de duas unidades C15 de farnesildifosfato (FPP).<sup>57</sup> Os mais estudados são os esteroides (triterpenos modificados contendo o sistema do anel tetracíclico do lanosterol) e as saponinas (triterpenos glicosilados), mas muitos outros compostos também são analisados. Os compostos triterpênicos, oriundos de plantas, são responsáveis por diversas propriedades farmacológicas, entre as quais, anti-inflamatória,<sup>58</sup> antitumoral,<sup>59</sup> antifúngica,<sup>60</sup> antidiabética,<sup>61</sup> antiviral<sup>62</sup> e hepatoprotetiva<sup>63</sup> são as mais relatadas.

A identificação de triterpenos foi realizada durante muito tempo por cromatografia gasosa (CG), porém há a necessidade frequente de derivatização dos compostos, o que torna a análise desfavorável e tediosa devido aos longos tempos de reação. A cromatografia líquida (CL) com detecção por ultravioleta (UV) também é utilizada, mas há diversas desvantagens na utilização desta técnica na quantificação de triterpenos. Devido aos poucos grupos cromóforos que a maioria dos compostos possui, a utilização de CL-UV torna-se, muitas vezes, uma técnica com baixa especificidade levando a uma quantificação imprecisa desta classe de composto. Atualmente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) é a técnica mais adequada para identificação e quantificação de triterpenos, devido à alta sensibilidade e seletividade.

Vários métodos foram publicados para identificação de triterpenos, como os

apresentados na Figura 3, lupeol, aldeído betulínico, betulina, ácido betulínico, acetato de aldeído betulínico,  $\beta$ -amirina, uvaol, ácido ursólico,  $\beta$ -amirina, eritrodiol, ácido oleanólico e fridolina, porém poucos são relatados envolvendo a determinação quantitativa desta classe de compostos. Apenas poucos artigos são relatados na literatura envolvendo a determinação quantitativa de triterpenos em plantas por CL-EM. Destes trabalhos, dois utilizaram o analisador triplo quadrupolo: Rhourri-Frih *et al.*<sup>64</sup>, Sánchez-Ávila *et al.*<sup>65</sup> e apenas um utilizou o analisador ion trap: Novotny *et al.*<sup>66</sup>

A análise de triterpenos pentacíclicos realizada por Rhourri-Frih *et al.*<sup>64</sup> foi feita com CL-EM e avaliou a utilização de APCI e APPI como fontes de ionização para esta classe de composto, em três extratos de plantas. A análise cromatográfica foi realizada em equipamento Lachrom da Merck, sendo utilizada para a separação dos triterpenos, uma coluna Adsorbosphere UHS C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5  $\mu$ m) com eluição isocrático usando metanol e água. Para estudos no espectrômetro de massas foi utilizado um equipamento triplo quadrupolo, API3000 PE-SCIEX. Os compostos foram quantificados tanto no modo positivo quanto no negativo. No geral, APPI foi mais sensível do que APCI no modo positivo, enquanto APCI apresentou maior sensibilidade para quantificação de ácidos triterpênicos no modo negativo. Os limites de quantificação foram determinados por monitoramento de íon selecionado (SIM) e variação de 0,005 – 0,015 mg/l e 0,002 – 0,84 mg/l em APPI e APCI, respectivamente.



**Figura 3.** Estruturas químicas de triterpenos quantificados por CL-EM

Sánchez-Ávila *et al.*<sup>65</sup> realizaram a determinação e quantificação de cinco triterpenos (Figura 3) presentes em folhas de oliva utilizando diferentes transições de íons  $m/z$ , ácido oleanólico (transições 439→191 e 439→203), ácido ursólico (transições 439→191 e 439→203), ácido maslínico (transição 409→203), eritrodíol (transições 425→217 e 425→191) e uvaol (transições 425→217 e 425→191). A análise cromatográfica foi realizada em equipamento Agilent 1200 (CL), sendo utilizada para a separação dos triterpenos, uma coluna Inertsil ODS-2 C18 (5  $\mu\text{m}$ ) e fase móvel composta por 90% acetonitrila, 7,9% água e 2% metanol contendo 0,05% de amônia e 0,05% de formiato de amônia (pH 9,1) com eluição no modo isocrático. Para estudos no

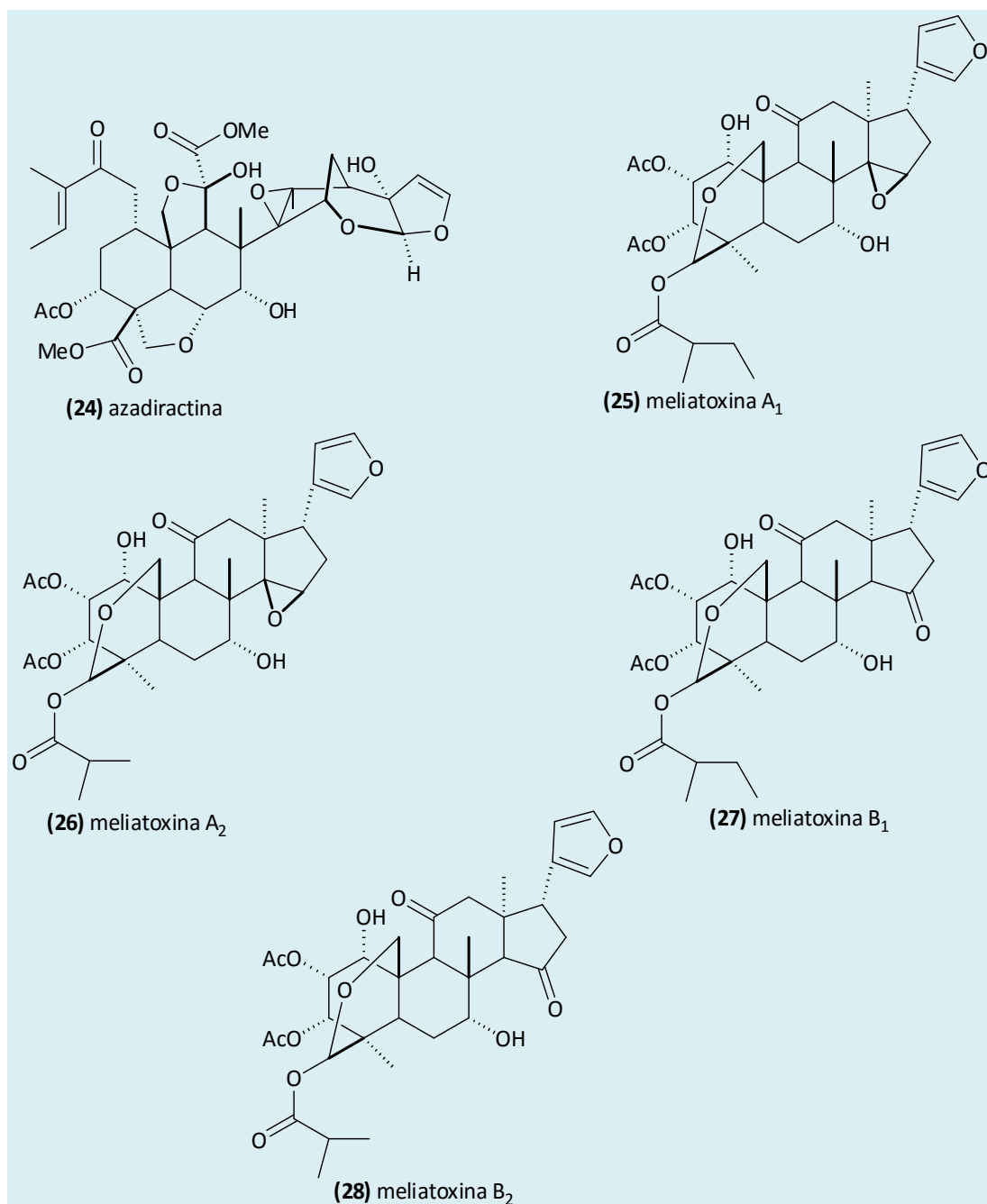
espectrômetro de massas foi utilizado um equipamento triplo quadrupolo, Agilent 6410, equipado com fonte electrospray (ESI). Os cinco triterpenos estudados no trabalho foram detectados e quantificados no modo positivo utilizando experimentos de monitoramento de reações múltiplas (MRM), sendo avaliados os parâmetros de validação, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e recuperação. Os autores conseguiram bons resultados de linearidade com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) acima de 0,979, limite de detecção variando entre 0,26 – 0,91 ng e limite de quantificação entre 0,87 – 3 ng para 10  $\mu\text{L}$  de injeção, assim como conseguiram realizar a determinação quantitativa em

pequenas quantidades com variações entre 2398 – 13028 µg/g na planta medicinal.

Um método simples foi desenvolvido por Novotny *et al.*<sup>66</sup> para determinação quantitativa de ácido ursólico (Figura 3) presentes em folhas e galhos de *Staphylea holocarpa* Hemsl, utilizando equipamento equipado com analisador ion trap programado no modo positivo e monitoramento de íon selecionado (SIM) para quantificação do composto. Apesar dos autores utilizarem um equipamento com baixa sensibilidade para quantificação, se comparado com o analisador triplo quadrupolo, obtiveram bons resultados de linearidade ( $r > 0,99$ ) e recuperação (média de 97,8%). A quantidade percentual do ácido ursólico nas folhas foi 0,95% e nos galhos 0,25%.

Forim e colaboradores<sup>6,7,9</sup> tem utilizado CL, CL-EM e CL-EM/EM para caracterizar e quantificar azadiractina e seus homólogos em extratos de *Azadirachta indica* (Neem) e *Melia azedarachta* e suas formulações (Figura 4). Estes compostos pertencem a classe dos limonoides que são triterpenos degradados característicos das famílias Rutaceae, Meliaceae e Cneoraceae,<sup>67</sup> O CL utilizado foi um sistema contendo duas bombas Shimadzu LC-10AD (Kyoto, Japan), misturador SUS (Stainless steel), amostrador automático SIL-10AF, auto injetor, detector espectrofotométrico SPD-10A UV-vis e

detector de arranjo de fotodiodo SPD-10AVP e interface CBM-10A. A aquisição de dados foi realizada utilizando o programa CLASS LC10, o CLAE 2695 (Waters, Manchester, UK) acoplado com um EM Quattro LC e um Thermo Finnigan (San Jose, CA) LTQ com fonte vMALDI LTQ para alinhar ao 2D quadrupolo ion trap. Na separação foi utilizada uma coluna de fase reversa analítica C18 (Phenomenex-Luna II; 150 × 4.6 mm, 5 µm) equipada com pré-coluna (Phenomenex; 4 × 3 mm, 5 µm). As amostras foram ionizadas por "electrospray" (ESI) operando no modo negativo. A temperatura do bloco da fonte e do probe foram respectivamente 135 e 300°C. O nebulizador e o desolvatador do fluxo de gás (nitrogênio) foram respectivamente de 51 e 350 L/h. O capilar foi ajustado em 2.94 kV para todos os experimentos. Foi utilizado o modo SRM selecionando duas faixas  $m/z$  719 → 486 e 719 → 211 (para a azadiractina), usando 39 V no cone e a energia de colisão de 20 eV. A pressão do gás de colisão (argônio) foi de 5.70 e-3 mbar. Todos os dados de MS foram adquiridos e processados usando o programa MassLynx NT 4.0 (Waters, Cheshire, UK). Os íons necessários para a identificação da meliatoxina A<sub>1</sub> foram:  $m/z$  681; 579 e 557, para a meliatoxina A<sub>2</sub> foram:  $m/z$  667; 579 e 557, para a meliatoxina B<sub>1</sub> foram:  $m/z$  681; 579 e 557 e para a meliatoxina B<sub>2</sub> foram:  $m/z$  667; 579 e 557.



**Figura 4.** Estruturas químicas de triterpenos limonioides e seus homólogos quantificados por Forim e colaboradores.<sup>6,7,9</sup>

### 3.3. Saponinas

Saponinas são glicosídeos de triterpenos e esteroides que são encontradas usualmente em plantas superiores. As unidades de açúcares encontradas em saponinas são hexoses (glicose, galactose), 6-deoxihexoses (rhamnose), pentoses (arabinose, xilose),

ácidos urônico (ácido glucurônico) ou aminoaçúcares (glucosaminose). Estas unidades se ligam às sapogeninas (agliconas do tipo triterpenóides ou esteroidal) por um ou múltiplos sítios de glicosilação (Figura 5). Esta classe de compostos possui diversas atividades biológicas e é amplamente utilizada em alimentos, medicina e cosméticos.<sup>68</sup> Devido aos pouquíssimos

grupos cromóforos, as saponinas são detectadas no detector UV em curtos comprimentos de onda, 200 – 210 nm, sendo muitas vezes, difícil de realizar análise cromatográfica por CL-UV principalmente quando a detecção é necessária em pequenas quantidades. Por esse motivo, o espectrômetro de massas é o detector mais apropriado para a análise cromatográfica dessa classe de composto.

A maioria dos trabalhos existentes na literatura aborda a utilização do CL-EM para o controle de qualidade de plantas medicinais, sendo algumas saponinas os principais compostos responsáveis pelas atividades. As saponinas quantificadas em plantas podem ser divididas em duas grandes subclasses, as com padrões triterpenos e as com padrões esteroides contidos no esqueleto básico dos compostos.

Zu *et al.*<sup>69</sup> realizaram a determinação e quantificação de quatro astragalosídeos, saponinas triterpenóides, tanto na planta medicinal *Radix astragali*, quanto em fármacos (comprimidos) contendo estes compostos (Figura 5). A análise cromatográfica foi realizada em equipamento Agilent 1100, sendo utilizada para a

separação das saponinas uma coluna Eclipse XDB (ODS)-C18 (5 µm) e fase móvel composta por 0,05% de ácido fórmico em água e acetonitrila com eluição no modo gradiente. Para estudos no espectrômetro de massas foi utilizado um equipamento triplo quadrupolo, API3000, equipado com fonte electrospray (ESI). As quatro saponinas, astragalosídeos I, II, III e IV, estudadas no trabalho foram detectadas e quantificadas no modo positivo utilizando MRM. As transições utilizadas foram  $m/z$  869,9 → 143,1 para o astragalosídeo I,  $m/z$  827,7 → 143,1 para o astragalosídeo II,  $m/z$  785,8 → 143,1 para os astragalosídeos III e IV. Nesta análise foram usados como parâmetros de validação, a linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e recuperação (Tabela 2). Os autores conseguiram bons resultados de linearidade com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) acima de 0,9912, limite de detecção variando entre 0,003 – 0,006 µg/ml, limite de quantificação entre 0,010 – 0,015 µg/ml, assim como realizaram a determinação quantitativa das saponinas em pequenas quantidades com variações entre 0,196 – 0,779 mg/g para a planta medicinal e 0,142 – 0,323 mg/g para os fármacos.

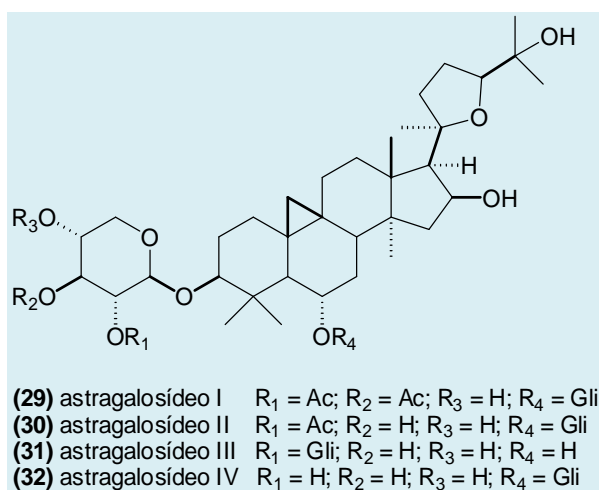


Figura 5. Estruturas químicas de saponinas triterpenóides quantificadas por Zu *et al.*<sup>69</sup>

**Tabela 2.** Metodologias empregadas na determinação quantitativa de saponinas triterpenoidais e esteroidais em plantas por CL-EM. ACN: Acetonitrila; Q: Single quadrupolo; QqQ: Triplo quadrupolo.

Classe de composto	Preparação de amostra	Condições-LC	Modo de detecção e quantificação	Parâmetros para validação	Ref.
Saponinas triterpenoidais	Extração assistida por micro-ondas	Eclipse XDB (ODS)-C18 (5 $\mu$ m), 0,05% ác. fórmico em água e acetonitrila (gradiente)	ESI, QqQ, modo positivo, MRM	Linearidade, LOD, LOQ, precisão, recuperação	69
	Ultrassonicação, SPE	Acquity HSS T3 C18 (1,8 $\mu$ m), 0,05% ác. fórmico em água e ACN (gradiente)	ESI, QqQ, modo positivo, SRM	Linearidade, seletividade, precisão, exatidão	70
	Partição líquido-líquido, ultrassonicação, centrifugação	Zorbax eclipse XDB-C18 (1,8 $\mu$ m), 0,1% ác. fórmico em água e em ACN (gradiente)	ESI, QqQ, modo negativo, MRM	Linearidade, LOD, LOQ, precisão, exatidão	71
	Ultrassonicação	Capcell pak C18 (3 $\mu$ m) e pré-coluna (0,5 $\mu$ m), água e ACN (isocrático)	ESI, QqQ, modo positivo, MRM	Linearidade, LOD, LOQ, seletividade, precisão, exatidão, robustez	72
	Ultrassonicação	Sapphire C18 (5 $\mu$ ), 0,1% ác. fórmico em metanol e em água (gradiente)	ESI, Q-Trap, modo positivo e negativo, MRM	Linearidade, LOD, LOQ, precisão, exatidão, recuperação, estabilidade	73
Saponinas esteroidais	Extração com líquido pressurizado, Soxhlet, ultrassonicação	XTerra MS C-18 (5 $\mu$ m), 0,5% ác. fórmico em água e 0,5% ác. fórmico ACN:2-propanol (gradiente)	ESI, Q, modo positivo	Linearidade, LOD, LOQ, precisão, exatidão, recuperação	74
	Partição com solvente, centrifugação	Atlantis C18 (5 $\mu$ m), 0,05% ác. trifluoracético em água e ACN (gradiente)	ESI, QqQ, modo positivo, MRM	Linearidade, LOD, LOQ, precisão, exatidão	75

Em 2010, Foubert *et al.*<sup>70</sup> relataram a quantificação de 14 maesasaponinas (saponinas triterpênicas) na planta medicinal *Maesa lanceolata* por UPLC-EM/EM (Tabela 2). As frações metanólicas de folhas, previamente sonicadas e purificadas por extração em fase sólida (EFS), foram purificadas no modo reverso utilizando uma coluna C18 (Acquity HSS T3; 1,8 $\mu$ m) usando 0,05% de ácido fórmico em água e acetonitrila como fase móvel. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada em aparelho triplo quadrupolo com fonte ESI no modo positivo utilizando experimento de monitoramento de reação selecionada (SRM). Todas as maesasaponinas foram quantificadas utilizando transições contendo adultos de sódio, sendo que todas apresentaram fragmentações partindo dos respectivos adultos pseudo-moleculares para o íon m/z 349 em uma energia de colisão de 60 eV e para o íon m/z 301 em uma energia de colisão de 49 eV. As condições ótimas encontradas foram: voltagem do capilar 4000 V, voltagem do extrator 4 V, voltagem do cone 90 V, temperatura da fonte 150 °C e temperatura de dessolvatação 450 °C. A quantificação das 14 saponinas foi realizada obtendo-se bons resultados de linearidade ( $r^2 > 0,99$ ), precisão intra- e inter-dia e recuperação.

É possível destacar outros trabalhos na literatura que realizaram a quantificação de saponinas do tipo triterpenóides, em plantas medicinais por CL-EM, dos quais se pode citar Zhu *et al.*<sup>71</sup> utilizando um equipamento Agilent RRLC 1200 triplo quadrupolo; Kim *et al.*<sup>72</sup> utilizando um equipamento Alliance 2795 triplo quadrupolo e Xu *et al.*<sup>73</sup> utilizando um equipamento CL Agilent 1200 acoplado com um híbrido quadrupolo-ion trap (Q-Trap), 3200 QTRAP da Applied Biosystems (Tabela 2).

Apenas cinco artigos foram encontrados na literatura envolvendo a determinação quantitativa de saponinas esteroidais em plantas por CL-EM. Paul *et al.*<sup>74</sup> trabalharam com a planta *Solanum xanthocarpum*, muito

utilizada na medicina indiana para tratamento de asma e bronquite. A quantificação de três saponinas esteroidais, (solasonina, solamargina e  $\beta$ -2-solamargina) foi realizada por CL-EM utilizando um equipamento com analisador quadrupolo único (Q). Além disso, também foram avaliadas três metodologias de extração, extração com líquido pressurizado, Soxhlet e ultrassonicação, para otimização do rendimento dos compostos de interesse (Figura 6, Tabela 2). Um trabalho recente de Montoro *et al.*<sup>75</sup> realizou a determinação quantitativa de seis compostos da classe saponina esteroidal: iucaloesídeo A, B, C, E, degalactotigonina e gitogenina 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosil- $\beta$ -licotetraosídeo. As quantidades obtidas desses compostos por CL-EM/EM nas folhas de *Yucca gloriosa* variaram de 5,83 – 54,03  $\mu$ g/mg. Detalhes das condições utilizadas para separação dos compostos, bem como, para validação do método estão descritos na Tabela 2.

Os demais trabalhos com o intuito de quantificar saponinas esteroidais são relatados por Zhang *et al.*,<sup>76</sup> Munafo e Gianfagna<sup>77</sup> e Skhirtladze *et al.*<sup>78</sup> Zhang *et al.*<sup>76</sup> publicaram um método para análise qualitativa de 11 saponinas desta classe em extratos de *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* e *Paris polyphylla* var. *chinensis* por CL-EM/EM, utilizando o analisador de massas ion trap e outro método para análise quantitativa utilizando o analisador triplo quadrupolo. Os autores encontraram bons valores de linearidade ( $\geq 0,992$ ), baixos limites de detecção (0,5 – 10 ng/ml) e quantificação (2 – 34 ng/ml), excelentes precisão intra- e inter-dia, exatidão com recuperações entre 92 – 102% e quantidades dos compostos variando entre 0,00094 – 8,25 mg/g. Skhirtladze *et al.*<sup>78</sup> realizaram a determinação quantitativa de 9 saponinas nos extratos butanólicos dos rizomas da planta *Yucca gloriosa* L.. Munafo e Gianfagna<sup>77</sup> trabalharam na análise quantitativa de 5 saponinas obtidas de diversos órgãos da planta *Lilium longiflorum* Thunb.

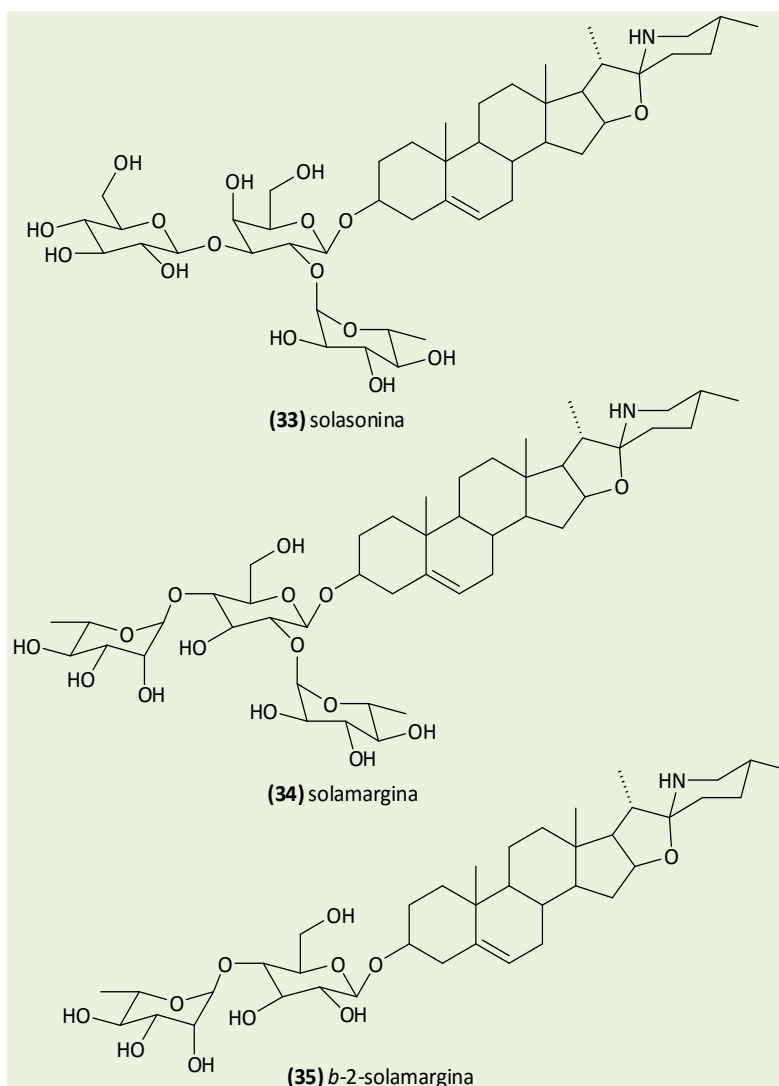


Figura 6. Estruturas químicas das saponinas esteroidais quantificadas por Paul *et al.*<sup>74</sup>

Estes dois artigos mostraram que a técnica CL-EM/EM pode ser usada para análise qualitativa e quantitativa de saponinas de forma mais eficiente que o sistema CL-UV.

### 3.4. Alcaloides

Plantas que contêm alcaloides têm sido úteis à humanidade desde épocas antigas. De fato, alguns dos mais antigos registros escritos de transações comerciais envolvendo plantas medicinais são aquelas contendo alcaloides. O interesse pelos estudos destes compostos surgiu com intensidade no início

do século 19 quando começaram as investigações sobre as mais significativas plantas medicinais e tóxicas da Europa. Esses estudos incluíram o ópio, *Colchicum autumnale* ou açafrão-do-prado, *Nux vomica* (*Strychnos nux-vomica* L.) também conhecida como noz-vômica, noz-vomitória ou fava-de-santo-inácio, ipeca, beladona, e pimenta. Como se verificou que os compostos isolados biologicamente ativos eram os alcaloides, intensificaram-se as investigações sobre a diversidade desta classe de produtos naturais.<sup>79</sup> O primeiro avanço foi o grande aumento no número de alcaloides estruturalmente únicos e complexos isolados de plantas, o que definiu o novo campo da química de heterocíclicos.

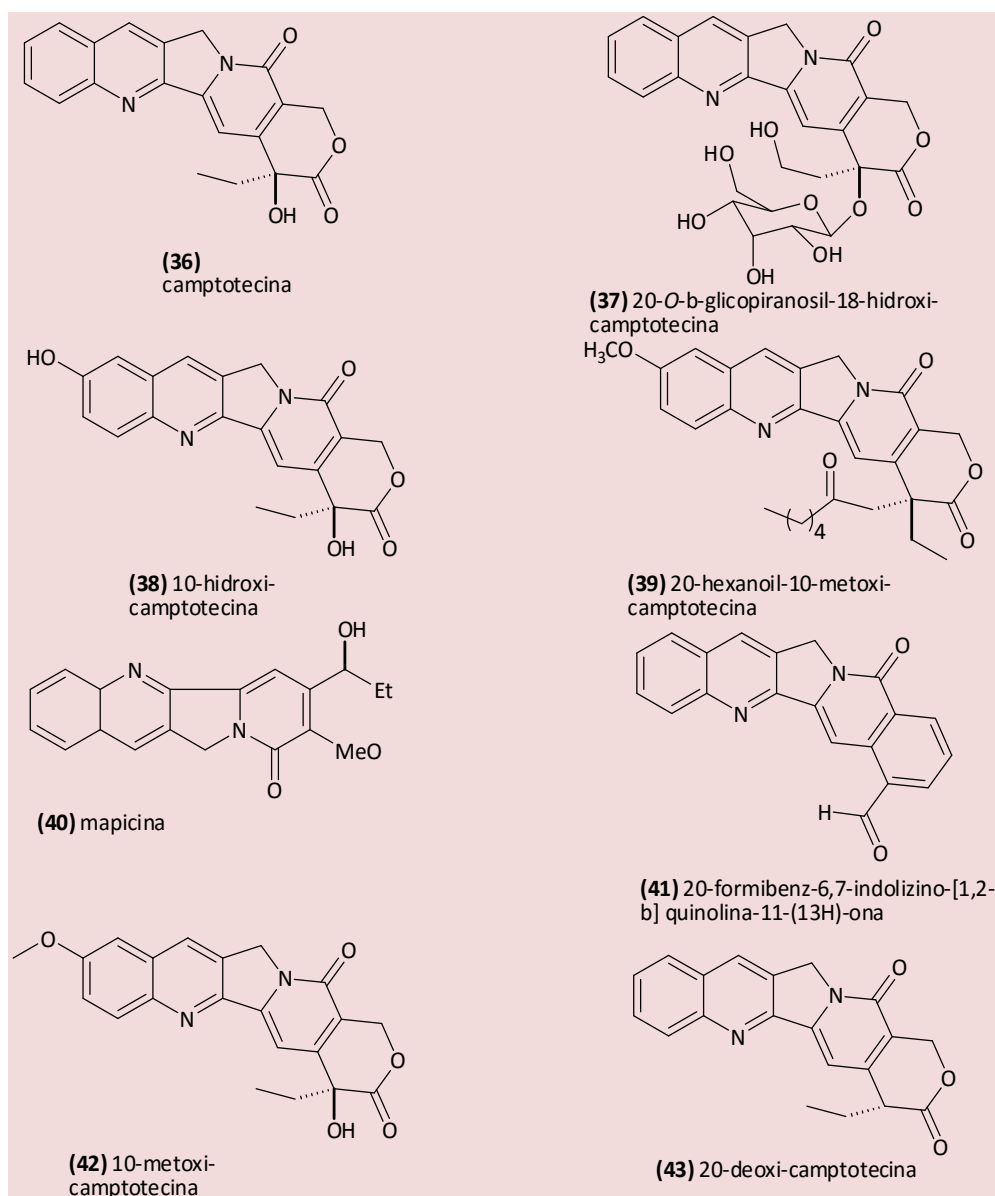


O conhecimento mais aprofundado da química das plantas levou à utilização de técnicas espectroscópicas e espectrométricas cada vez mais sofisticadas. Desde meados dos anos 1990, o desenvolvimento da técnica CL-EM resultou em uma tecnologia analítica de amplo uso em várias áreas da ciência. Combinada com as mais variadas e eficientes técnicas de extração, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CL-EM) se tornou uma importante ferramenta para análises qualitativas e quantitativas de alcaloides, tendo como destaque a CL-EM/EM.<sup>80</sup> A obtenção de um método eficiente e sensível para quantificar metabólitos em uma determinada matriz, como por exemplo, alcaloides em plantas, requer a otimização tanto de parâmetros de cromatografia quanto parâmetros do espectrômetro de massas.

Em 1984, Cooks e Roush<sup>81</sup> relataram a utilização de espectrometria de massas com quadrupolos integrados para a análise de alcaloides quaternários e identificação de isômeros. Montoro *et al.*<sup>82</sup> relatou a quantificação do alcaloide camptotecina e seus derivados (Figura 7) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com triplo quadrupolo, usando ESI como fonte de ionização e o método MRM para quantificação. Plantas da espécie *Camptotheca acuminata* coletadas na Itália em diferentes períodos, (agosto de 2003, agosto de 2004, setembro e outubro de 2004). A quantidade de 1 g das amostras foi extraída com 10,0 mL de etanol/água 7:3, com agitação em ultrassom por 10 minutos, e

em seguida armazenadas no escuro. Em seguida, as amostras foram filtradas e diluídas na proporção de 1:100 em etanol/água 7:3. A análise cromatográfica foi feita utilizando uma coluna XTerra C18 (150 mm x 2,0 mm, 5 µm) Waters, onde as amostras foram eluídas com um gradiente de ácido trifluoroacético 0,05% em água e TFA na mesma concentração em acetonitrila. A análise quantitativa dos extratos de *C. acuminata* foi feita com um cromatógrafo Agilent 1100 acoplado a um espectrômetro de massas API 2000 da Applied Biosystems. A fonte ESI foi ajustada utilizando um padrão de camptotecina a 1 µg/mL em metanol. A vazão na fonte foi de 10 µL/min., DP de 100 eV, FP de 170 eV, EP 10 eV, energia de colisão de 50 eV, e potencial de saída de 5 eV. Foi avaliada a linearidade, precisão e exatidão inter e intra-dia, e o limite de detecção alcançado foi menor que 15 ng/mL.

A classe dos alcaloides pirrolizidínicos tem grande ocorrência em plantas, mais de 350 compostos desta classe foram identificados em mais de 6000 espécies de plantas pertencentes às famílias Boraginaceae, Fabaceae e Asteraceae.<sup>83</sup> Muitos desses compostos são hepatotóxicos, pneumotóxicos, genotóxicos e cancerígenos e ocorrem como constituinte de várias espécies de ervas utilizadas na culinária, temperos, mel, e podem contaminar outros tipos de alimentos de origem animal, utilizados pelo ser humano.<sup>84</sup> Consequentemente, regulamentos que regem a exposição humana a esses tipos de alcaloides pirrolizidínicos requer o desenvolvimento de métodos eficientes de análise, utilizando técnicas como CL-EM.<sup>85</sup>



**Figura 7.** Estruturas químicas de alguns alcaloides quantificadas por Montoro *et al.*<sup>82</sup>

Apesar da N-oxidação de alcaloides pirrolizidínicos ser um mecanismo desintoxicante em mamíferos, tem sido demonstrado que a ingestão de N-óxidos pode provocar intoxicação.<sup>86</sup> Desde que se descobriu a biossíntese de alcaloides pirrolizidínicos com seus N-óxidos, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas tem sido aplicada para verificar o teor desses compostos em plantas.<sup>87</sup> Combinando EFS-CL-EM pode-se obter uma maior sensibilidade para análise quantitativa desses alcaloides e seus N-óxidos. A extração dos

alcaloides pirrolizidínicos e seus derivados das fontes vegetais é o passo fundamental para se obter uma boa análise por CL-EM. Alguns métodos de extração têm sido descritos, dentre os quais, um que consiste apenas no tratamento com metanol aquoso e subsequente microfiltração com filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ , sem qualquer tratamento posterior. No entanto, o metanol aquoso irá extrair muito mais compostos além dos alcaloides, o que pode resultar em um cromatograma mais complicado, que pode se tornar um empecilho na quantificação. A disponibilidade da extração em fase sólida

(EFS) facilita o processo de limpeza da amostra e permite uma alta taxa de transferência do seu analito, porém o sucesso da sua aplicação depende da escolha certa da fase adsorvente e do solvente de eluição. A utilização da resina de troca catiônica (SCX) à base de sílica, por exemplo, fornece tanto a extração eficiente dos alcaloides pirrolizidínicos, eluindo com metanol com íon amônio. A eluição de um baixo volume de metanol com amônio permite a fácil evaporação do solvente e reconstituição em metanol para injetar no CL-EM. Em contraste, com o uso de uma resina de poliestireno (SCX) que, apesar de ser eficiente para a extração dos alcaloides, requer grandes volumes de solução de ácido acético para a eluição, além de necessitar de uma posterior extração ácido/base para concentração e análise por CL-EM.<sup>88</sup>

O ácido trifluoroacético (TFA) tem sido muito utilizado como aditivo para fases móveis na análise de alcaloides, uma vez que

melhora a forma do pico, proporcionando um pH controlado para a fase móvel, no entanto ele pode suprimir a ionização do analito através da formação de pares de íons carregados positivamente. Uma maneira para reduzir essa supressão é infundir uma solução de ácido propiônico em isopropanol no eluente pós-coluna.<sup>89</sup> Isto proporciona uma fonte alternativa para emparelhamento de íons com TFA, deixando os íons do analito livres.

Tem sido demonstrado através da comparação de fontes de ionização que, quando uma sequência muito grande de amostras é injetada, a fonte APCI é mais estável do que a ESI para quantificação.<sup>90</sup> No entanto, a fonte ESI é mais sensível para detecção dos alcaloides pirrolizidínicos-N-óxidos.

A Tabela 3 mostra diferentes condições e instrumentação para a análise de alcaloides por CL-EM/EM.

**Tabela 3.** Técnicas de análise de alcaloides em sistema CL-EM

Preparo de amostra	Fase estacionária	MS/MS	Ref.
Centrifugação e EFS	Sílica C8	ESI-EM/EM e APCI-EM/EM Q-Trap.	91
Dissolução e filtro de 0,45 µm	Sílica C18	ESI-EM/EM triplo quadrupolo	92
Extração, filtração, DMFS	Sílica C18	ESI-EM/EM	93
Microcentrifugação e filtragem.	Sílica C18	ESI-EM/EM triplo quadrupolo	94
Extração e centrifugação	Sílica C18	ESI-EM/EM Q-Trap	95

DMFS: Dispersão da matriz em fase sólida

### 3.5. Cumarinas

Cumarinas são amplamente distribuídas em plantas e são comumente encontradas em famílias como Apiaceae e Rutaceae. Estas substâncias geralmente têm odor e sabor adocicado e tem sido utilizado em alimentos,

tabaco e cosméticos para aroma e fragrância estimulante. A cumarina mais simples, sem substituintes, foi relatada causar hepatotoxicidade em animais e foi banida para uso como aditivo alimentar nos EUA desde 1956.<sup>96,97</sup> A análise de cumarinas via CL-EM é pouco descrita na literatura. Fizeram-se alguns estudos de quantificação

de cumarinas com o intuito de comparar as técnicas hífenadas de CL-UV e CL-EM considerando o uso de diferentes detectores. Park *et al.*<sup>98</sup> utilizaram cumarinas para diferenciação de técnicas hífenadas na análise de controle de qualidade. Cinco cumarinas (simples e furanocumarinas), oxipeucedanina (51), imperatorina (52), isoimperatorina (54), biakangelicol (55) e felopterinina (56) (Figura 8) presentes em *Angelicae dahuricae Radix*, uma planta medicinal com atividade analgésica, antibacteriana, anti-inflamatória e agente diurética, foram quantificadas por diferentes métodos de CLAE-UV e CL-ESI-EM/EM e assim estas metodologias foram desenvolvidas e validadas. A análise quantitativa via CL-EM foi desenvolvida em um Waters Quattro micro API equipado com fonte de ESI e acoplado com CLAE Alliance 2795 (Waters), no modo positivo de ionização e a detecção foi realizada no modo MRM. Para calibrar o espectrômetro de massas, 1 mg/mL de solução das cinco cumarinas foram dissolvidas em acetonitrila 50% e bombeadas na fonte ESI a uma taxa de 10 mL/min. Para a separação cromatográfica as condições foram: coluna Zorbax RX-C8 (2.1 × 150 mm, 5 µm) e uma coluna pré-filtro (0.5 µm, Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA) at 40 °C; fase móvel: mistura de 1 mM de acetato de amônio e ACN (35/65, v/v%) com 0.1 % de ácido acético; vazão: 0.2 mL/min; volume de injeção: 10 µL. Os espectros de massas obtidos no modo positivo das cinco cumarinas revelou que os íons  $[M + H]^+$  apresentaram as maiores intensidades. O método de CLAE-UV seria adequado para a análise das cinco cumarinas, porém com maior limites de detecção e tempo de execução. Jager *et al.* em 2007,<sup>99</sup> desenvolveram um método de CL-EM para quantificar os níveis de vanilina, vanilina etílica e cumarina em extratos de *Vanilla*. Neste trabalho foi utilizado um

espectrômetro do tipo LC-MSD quadrupolo (Agilent) com uma fonte ESI operando no modo positivo de ionização. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna ODS C18 (Phenomenex) e a fase móvel foi composta de acetonitrila e H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido fórmico e a detecção dos sinais através de monitoramento de íons selecionados (SIM). O método de validação de dados e os resultados foram comparados com os obtidos por monitoramento de sinal de UV. O método de CL-EM forneceu um resultado mais preciso devido ao seu alto nível de especificidade.

Em 2010 com o avanço e consequente melhoria das análises quantitativas no uso dos instrumentos híbridos, Zheng *et al.*<sup>100</sup> relataram a quantificação de 11 cumarinas (Figura 8) em *Angelicae dahuricae Radix* utilizando um equipamento do tipo Q-Trap na análise. As cumarinas estudadas foram escopoletina (44), ostol (45), xantotoxol (46), xantotoxina (47), psoraleno (48), isopimpinellina (49), bergapteno (50), oxipeucedanina (51), imperatorina (52), cnidilina (53) e isoimperatorina (54). Um espectrômetro Q 3200 TRAP CL-EM/EM, equipado com uma fonte de íons ESI (Applied Biosystems / MDS Sciex, EUA) foi empregado na análise. A otimização das condições de análise das cumarinas foi alcançada em infusão de injeção de cada composto separadamente. A separação cromatográfica foi realizada no sistema Agilent Quaresma 1200 CLAE (Agilent, EUA) usando uma coluna Waters SunFire™ C18 em uma fase móvel de metanol/ água (75:25, v / v) com 0.1% de ácido fórmico. O modo de ionização positivo foi otimizado como mais sensível para todas as cumarinas, estas exibiram seus íons quase-moleculares  $[M + H]^+$ ,  $[M + Na]^+$ ,  $[M + NH_4]^+$ ,  $[M + K]^+$  e íons fragmentos  $[M + H-CO]^+$ ,  $[M + H-C_5H_9O]^+$ ,  $[M + H-C_5H_8]^+$ ,  $[M + H-C_5H_8-CO]^+$ ,  $[M + H-C_5H_8-CO_2]^+$ ,  $[M + H-CH_3]^+$ . Portanto o método foi rápido, sensível e reprodutível.

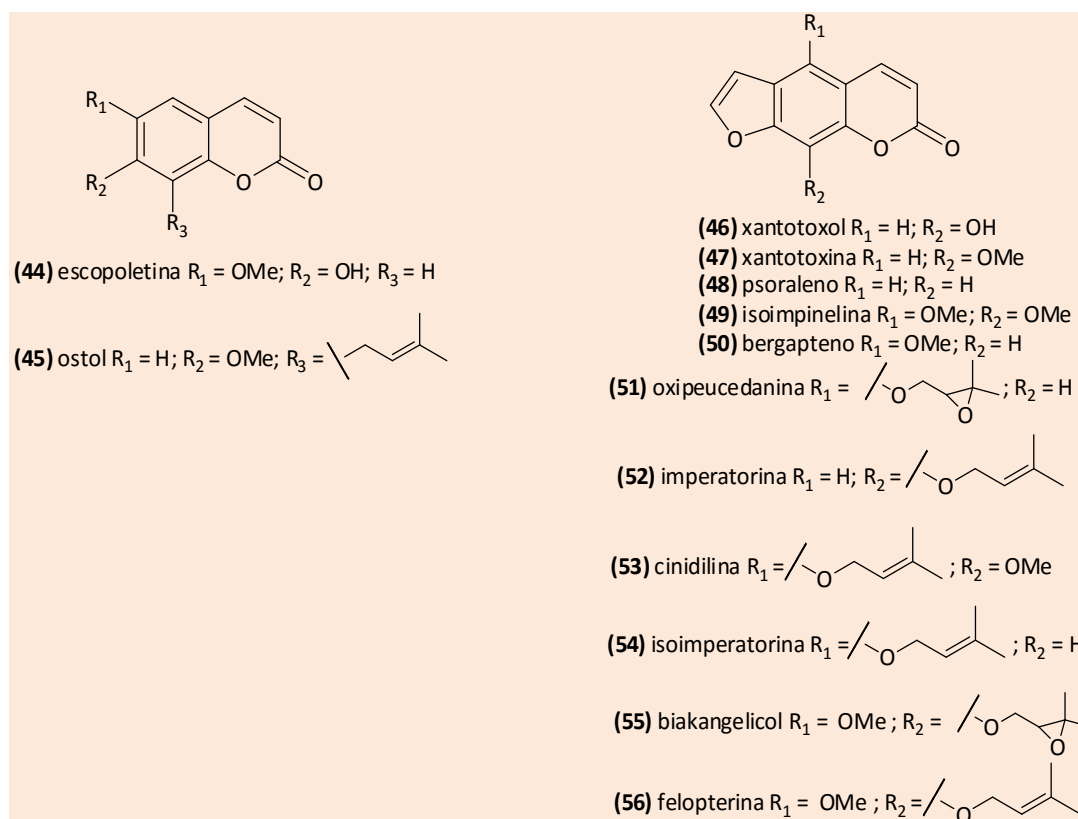


Figura 8. Estruturas químicas das cumarinas quantificadas por Zheng *et al.*<sup>100</sup>

#### 4. Conclusões

Esta revisão relata avanços nas aplicações em CL-EM para a análise quantitativa de produtos naturais (flavonoides, triterpenos, saponinas, alcaloides e cumarinas) em plantas. Através de exemplos de aplicação, mostra que a utilização das técnicas CG-EM e CL-UV podem ser substituída por CL-EM devido, principalmente, à maior sensibilidade desta última. Relata que uma variedade de fontes de ionizações está disponível no mercado, sendo que as mais usadas para análises de metabólitos secundários de plantas são as fontes ESI, APCI, além de APPI, usada para grupos de compostos de baixa polaridade. Por fim, sugere-se que espectrômetros como o triplo quadrupolo e o híbrido do tipo Q-Trap sejam os mais recomendados para análises quantitativas, uma vez que podem operar na configuração EM/EM e no modo MRM fornecendo alta seletividade e sensibilidade adequadas para esses tipos de análises.

Apesar da grande seletividade da técnica, extratos brutos de plantas são matrizes muito complexas, nos quais muitas vezes há interferentes presentes, que podem interferir nos resultados a serem alcançados. Em alguns dos trabalhos relatados, ficou evidente a dificuldade em obter o sinal do analito livre de interferências, indicando assim que bons métodos de preparo de amostra, como por exemplo, a extração em fase sólida, deve ser utilizada a fim de minimizar estes interferentes.

#### Referências Bibliográficas

- Niessen, W. M. A. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1999**, 856, 179. [CrossRef] [PubMed]
- Gallo, M. B. C.; Beltrame, F. L.; Vieira, P. C.; Cass, Q. B.; Fernandes, J. B.; Da Silva, M. F. J. F. Quantitative determination of 20-hydroxyecdysone in methanolic extract of

- twigs from *Vitex polygama* Cham. *Journal of Chromatography B* **2006**, *832*, 36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>3</sup> Cassiano, N. M.; Barreiro, J. C.; Martins, L. R. R.; Oliveira, R. V.; Cass, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova* **2009**, *32*, 1021. [[CrossRef](#)]
- <sup>4</sup> Beltrame, F. L.; Mainardes, R. M.; Khalil, N. M.; Prestes, R. A.; Nogueira, A.; Demiate, I. M.; Cass, Q. B. A quantitative validated method using liquid chromatography and chemometric analysis for evaluation of raw material of *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. *Química Nova* **2012**, *35*, 327. [[CrossRef](#)]
- <sup>5</sup> Schefer, A. B.; Braumann, U.; Tseng, L-H.; Spraul, M.; Soares, M. G.; Fernandes, J. B.; da Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Ferreira, A. G. Application of high-performance liquid chromatography–nuclear magnetic resonance coupling to the identification of limonoids from mahogany tree (*Swietenia macrophylla*, Meliaceae) by stopped-flow 1D and 2D NMR spectroscopy. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1128*, 152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>6</sup> Forim, M. R.; Matos, A. P.; Da Silva, M. F. G. F.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B. Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de Nim: reprodutibilidade da ação inseticida. *Química Nova* **2010**, *33*, 1082. [[CrossRef](#)]
- <sup>7</sup> Forim, M. R.; Cornélio, V. E.; Da Silva, M. F. G. F.; Rodrigues-Filho, E.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C.; Matinez, S. S.; Napolitano, M. P.; Yost, R. A. Chemical characterization of *Azadirachta indica* grafted on *Melia azedarach* and analyses of azadirachtin by HPLC-MS-MS (SRM) and meliatoxins by MALDI-MS. *Phytochemical Analysis* **2010**, *21*, 363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>8</sup> Perlatti, B.; Da Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Forim, M. R. Validation and application of HPLC–ESI-MS/MS method for the quantification of RBBR decolorization, a model for highly toxic molecules, using several fungi strains. *Bioresource Technology* **2012**, *124*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>9</sup> Forim, M. R.; Costa, E. S.; Da Silva, M. F. G. F.; Fernandes, J. B.; Mondego, J. M.; Junior, A. L. B. Development of a New Method To Prepare Nano-/microparticles Loaded with Extracts of *Azadirachta indica*, Their Characterization and Use in Controlling *Plutella xylostella*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 9131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>10</sup> Steinmann, D. M. G. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *55*, 744. [[CrossRef](#)]
- <sup>11</sup> Queiroz, E. F.; Hostettmann, K. A. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos. *Revista Fitos* **2003**, *2*, 39. [[Link](#)]
- <sup>12</sup> Wolfender, J. L.; Hostettmann, K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the investigation of medicinal plants. Em *Phytochemistry of Medicinal Plants*. (Arnason, J. T.; Marta, R.; Romeo, J. eds.). Plenum Press: New York, 1995, pp. 189.
- <sup>13</sup> Rodríguez-Rivera, M. P.; Lugo-Cervantes, E.; Winterhalter, P.; Jerz, J. Metabolite profiling of polyphenols in peels of Citrus limetta Risso by combination of preparative high-speed countercurrent chromatography and LC–ESI–MS/MS. *Food chemistry* **2014**, *158*, 139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>14</sup> Cottet, K.; Genta-Jouve, G.; Fromentina, Y.; Odonne, G.; Duplais, C.; Laprévotte, O.; Michel, S.; Lallemand, M-C. Comparative LC–MS-based metabolite profiling of the ancient tropical rainforest tree *Symphonia globulifera*. *Phytochemistry* **2014**, *108*, 102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>15</sup> Stobiecki, M.; Kachlicki, P.; Wojakowska, A.; Marczak, L. Application of LC/MS systems to structural characterization of flavonoid glycoconjugates. *Phytochemistry Letters* **2015**, *11*, 358. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Ardrey, R. E. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. Wiley: Huddersfield, 2003. [[CrossRef](#)]
- <sup>17</sup> Pereira, A. S.; Bicalho, B.; Lilla, S.; De Nucci, G. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. *Química Nova* **2005**, *28*, S107. [[CrossRef](#)]

- <sup>18</sup> Wolfender, J. L.; Rodriguez, S.; Hostettmann, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. *Journal of Chromatography A* **1998**, *794*, 299. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>19</sup> Prasain, J. K.; Wang, C. C.; Barnes, S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, *37*, 1324. [CrossRef]
- <sup>20</sup> Vékey, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A* **2001**, *921*, 227. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>21</sup> Núñez, O.; Moyano, E.; Galceran, M. T. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2005**, *24*, 683. [CrossRef]
- <sup>22</sup> Smeraglia, J.; Baldrey, S. F.; Watson, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. *Chromatographia* **2002**, *55*, 95. [CrossRef]
- <sup>23</sup> Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova* **2008**, *31*, 623. [CrossRef]
- <sup>24</sup> Soler, C.; Manes, J.; Pico, Y. The Role of the liquid chromatography-mass spectrometry in pesticide residue determination in food. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2008**, *38*, 93. [CrossRef]
- <sup>25</sup> Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3653. [CrossRef]
- <sup>26</sup> Marchi, I.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L. Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: A review. *Talanta* **2009**, *78*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>27</sup> Kopka, J.; Fernie, A.; Weckwerth, W.; Gibon, Y.; Stitt, M. Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biology* **2004**, *5*, 109. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>28</sup> Lu, W.; Bennett, B. D.; Rabinowitz, J. D. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *Journal of Chromatography B* **2008**, *871*, 236. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>29</sup> Micromass, M, UK, Disponível em: <http://www.micromass.co.uk>. Acesso em: 16 outubro 2014.
- <sup>30</sup> Thermoquest, S. J, CA, Disponível em: <http://www.finnigan.com>. Acesso em: 16 outubro 2014.
- <sup>31</sup> Xing, J.; Yan, H. X.; Zhang, S. Q.; Ren, G. L.; Gao, Y. H. A high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of artemisinin in rat plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 1463. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>32</sup> Prasain, J. K.; Jones, K.; Brissie, N.; Moore, R.; Wyss, J. M.; Barnes, S. Identification of Puerarin and Its Metabolites in Rats by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3708. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>33</sup> Li, K.; Chen, X. Y.; Xu, J. H.; Li, X.; Zhong, D. F. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies of 20(R)-ginsenoside Rg3 in dog. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 813. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>34</sup> Montoro, P.; Maldini, M.; Piacente, S.; Macchia, M.; Pizza, C. Metabolite fingerprinting of *Camptotheca acuminata* and the HPLC-ESI-MS/MS analysis of camptothecin and related alkaloids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 405. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>35</sup> Chernushevich, I. V.; Loboda A. V.; Thomson, B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36*, 849. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>36</sup> Kostianen, R.; Kotiaho, T.; Kuuranne, T.; Auriola, S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38*, 357. [CrossRef] [PubMed]

- <sup>37</sup> Qian, T. X.; Cai, Z. W.; Wong, R. N. S.; Jiang, Z. H. Liquid chromatography/mass spectrometric analysis of rat samples for *in vivo* metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rh2. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 3549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>38</sup> Hopfgartner, G.; Varesio, E.; Tschäppät, V.; Grivet, C.; Bourgogne, E.; Leuthold, L. A. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>39</sup> Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomas-Barberan, F. A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S. S. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* **2004**, *59*, 113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>40</sup> Veitch, N. C.; Grayer, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports* **2008**, *25*, 555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>41</sup> Szliszka, E.; Czuba, A. P.; Jernas, K.; Krol, W. Dietary Flavonoids Sensitize HeLa Cells to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). *International Journal of Molecular Sciences* **2008**, *9*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>42</sup> Hoensch, H. P.; Kirch, W. Potential role of flavonoids in the prevention of intestinal neoplasia. *International Journal of Gastrointestinal Cancer* **2005**, *35*, 187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>43</sup> Huang, W. Y.; Cai, Y. Z.; Xing, J.; Corke, H. Sun, M. Comparative Analysis of Bioactivities of Four *Polygonum* Species. *Planta Medica* **2008**, *74*, 43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>44</sup> Tu, Y.; Zhu, L.; Wang, G. J.; Zhao, L. H.; Xiang, B. G. Development and Validation of a LC-ESI-MS Assay for Determination of Icarin in Rat Plasma after Administration of Herba Epimedii. *Chromatographia* **2008**, *67*, 591. [[CrossRef](#)]
- <sup>45</sup> Yi, T.; Chen, H. B.; Zhao, Z. A.; Jiang, Z. H.; Cai, S. Q.; Wang, T. M. Identification and Determination of the Major Constituents in the Traditional Uighur Medicinal Plant *Saussurea involucreata* by LC-DAD-MS. *Chromatographia* **2009**, *69*, 537. [[CrossRef](#)]
- <sup>46</sup> Ma, Y. L.; Li, Q. M.; van den Heuvel, H.; Claeys, M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1357. [[CrossRef](#)]
- <sup>47</sup> Xing, J.; Xie, C.; Lou, H. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in natural products bioanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *44*, 368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>48</sup> Kazuno, S.; Yanagida, M.; Shindo, N.; Murayama, K. Mass spectrometric identification and quantification of glycosyl flavonoids, including dihydrochalcones with neutral loss scan mode. *Analytical Biochemistry* **2005**, *347*, 182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>49</sup> Sprenger, R. F.; Cass, Q. B. Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1291*, 97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>50</sup> Islam, N. M.; Yoo, H. H.; Lee, M. W.; Dong, M.; Park, Y. I.; Jeong, H. S.; Kim, D. Simultaneous quantitation of five flavonoid glycosides in herba *Epimedii* by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* **2008**, *19*, 71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>51</sup> Qiao, S.; Shi, R.; Liu, M. A.; ZhaQng, C.; Yang, W.; Shi, X.; Jiang, X.; Wang, C.; Qiao, W. Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in Herba *Scutellariae barbatae* and its confused plants by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **2011**, *129*, 1297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>52</sup> Jia, B-X.; Huangfu, Q-Q.; Renc, F-X.; Jia, L.; Zhang, Y-B.; Liu, H-M.; Yang, J.; Wang, Q. Identification and quantification of flavonoids and chromes in *Baeckea frutescens* by using HPLC coupled with diode-array detection and quadruple time-of-flight mass spectrometry. *Natural Product Research* **2014**, 800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>53</sup> Lin, L.; Mukhopadhyay, S.; Robbins, R. J.; Harnly, J. M. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis.



- Journal of Food Composition and Analysis* **2007**, *20*, 361. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>54</sup> Lau, C. S.; Carrier, D. J.; Beitle, R. R.; Bransby, D. I.; Howard, L. R.; Lay Jr., J. O.; Liyanage, R.; Clausen, E. C. Identification and quantification of glycoside flavonoids in the energy crop *Albizia julibrissin*. *Bioresource Technology* **2007**, *98*, 429. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>55</sup> Zhao, Z.; Dong, L.; Lin, F.; Wu, L. Simultaneous characterization and quantification of flavonoids in *Euonymus alatus* (Thunb.) Siebold from different origins by HPLC-PAD-MS. *Arabian Journal of Chemistry* **2013**, *6*, 205. [CrossRef]
- <sup>56</sup> Bell, L.; Oruna-Concha, M. J.; Wagstaff, C. Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC-MS: Highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. *Food Chemistry* **2015**, *172*, 852. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>57</sup> Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3a. ed., John Wiley and Sons: Chichester, 2009.
- <sup>58</sup> Siqueira, J. M.; Peters, R. R.; Gazola, A. C.; Krepsky, P. B.; Farias, M. R.; Giles, A.; de Brum-Fernandes, A. J.; Ribeiro do Valle, R. M. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Life Sciences* **2007**, *80*, 1382. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>59</sup> Akihisa, T.; Nakamura, T.; Tagata, M.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Uchiyama, E.; Suzuki, T.; Kimura, Y. Anti-Inflammatory and Anti-Tumor-Promoting Effects of Triterpene Acids and Sterols from the Fungus *Ganoderma lucidum*. *Chemistry & Biodiversity* **2007**, *4*, 224. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>60</sup> Rocha, A. D.; de Oliveira, A. B.; de Souza Filho, J. D.; Lombardi, J. A.; Braga, F. C. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytotherapy Research* **2004**, *18*, 463. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>61</sup> Villasenor, I. M.; Canlas, A. P.; Faustino, K. M.; Plana, K. G. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *92*, 53. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>62</sup> Wu, Z. J.; Ouyang, M. A.; Wang, C. Z.; Zhang, Z. K.; Shen, J. G. Anti-Tobacco Mosaic Virus (TMV) Triterpenoid Saponins from the Leaves of *Ilex oblonga*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 1712. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>63</sup> Mankani, K. L.; Krishna, V.; Manjunatha, B. K.; Vidya, S. M.; Singh, S. D.; Manohara, Y. N.; Kuppast, I. J. Hepatoprotective Effects of the Triterpenes Isolated from the Stem Bark of *Diospyros cordifolia* Roxb. *Journal of Natural Remedies* **2006**, *6*, 147. [CrossRef]
- <sup>64</sup> Rhourri-Frih, B.; Chaimbault, P.; Claude, B.; Lamy, C.; André, P.; Lafosse, M. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *44*, 71. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>65</sup> Sánchez-Ávila, N.; Priego-Capote, F.; Ruiz-Jiménez, J.; De Castro, M. D. L. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. *Talanta* **2009**, *78*, 40. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>66</sup> Novotny, L.; Abdel-Hamid, M. E.; Hamza, H.; Masterova, I.; Grancai, D. Development of LC-MS method for determination of ursolic acid: application to the analysis of ursolic acid in *Staphylea holocarpa* Hemsl. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, *31*, 961. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>67</sup> Da Silva, M. F. G. F.; Gottlieb, O. F. Evolution of quassinoids and limonoids in the rutales. *Biochemical Systematics and Ecology* **1987**, *15*, 85. [CrossRef]
- <sup>68</sup> Yang, M.; Sun, J.; Lu, Z.; Chen, G.; Guan, S.; Liu, X.; Jiang, B.; Ye, M.; Guo, D. Phytochemical analysis of traditional Chinese medicine using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 2045. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>69</sup> Zu, Y.; Yan, M.; Fu, Y.; Liu, W.; Zhang, L.; Gu, C.; Efferth, T. Determination and quantification of astragalosides in Radix Astragali and its medicinal products using LC-

- MS. *Journal of Separation Science* **2009**, *32*, 517. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>70</sup> Foubert, K.; Cuyckens, F.; Vleeschouwer, K.; Theunis, M.; Vlietinck, A.; Pieters, L.; Apers, S. Rapid quantification of 14 saponins of *Maesa lanceolata* by UPLC–MS/MS. *Talanta* **2010**, *81*, 1258. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>71</sup> Zhu, K. Y.; Fu, Q.; Xie, H. Q.; Cheung, A. W. H.; Zheng, K. Y. Z.; Luk, W. K. W.; Choi, R. C. Y.; Lau, D. T. W.; Dong, T. T. X.; Jiang, Z. Y., Chen, J. J.; Tsim, K. W. K. Q. Quality assessment of a formulated Chinese herbal decoction, Kaixinsan, by using rapid resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry: A chemical evaluation of different historical formulae. *Journal of Separation Science* **2010**, *33*, 3666. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>72</sup> Kim, J. H.; Park, S.; Lim, H. K.; Park, A. Y.; Kim, J. S.; Kang, S. S.; Youm, J.; Han, S. B. Quantitative Evaluation of Radix Astragali through the Simultaneous Determination of Bioactive Isoflavonoids and Saponins by HPLC/UV and LC-ESI-MS/MS. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2007**, *28*, 1187. [CrossRef]
- <sup>73</sup> Xu, H.; Shi, X.; Ji, X.; Du, Y.; Zhu, H.; Zhang, L. Qualitative and quantitative determination of nine main active constituents in *Pulsatilla cernua* by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **2011**, *34*, 308. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>74</sup> Paul, A. T.; Vir, S.; Bhutani, K. K. Liquid chromatography–mass spectrometry-based quantification of steroidal glycoalkaloids from *Solanum xanthocarpum* and effect of different extraction methods on their content. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1208*, 141. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>75</sup> Montoro, P.; Skhirtladze, A.; Perrone, A.; Benidze, M. Determination of steroidal glycosides in *Yucca gloriosa* flowers by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *52*, 791. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>76</sup> Zhang, T.; Liu, H.; Liu, X.; Xu, D.; Chen, X.; Wang, Q. Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 114. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>77</sup> Munafò, J. P.; Gianfagna, T. J. Quantitative Analysis of Steroidal Glycosides in Different Organs of Easter Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 995. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>78</sup> Skhirtladze, A.; Perrone, A.; Montoro, P.; Benidze, M.; Kemertelidze, E.; Pizza, C.; Piacente, S. Steroidal saponins from *Yucca gloriosa* L. rhizomes: LC–MS profiling, isolation and quantitative determination. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 126. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>79</sup> Buckingham, J.; Baggaley, K. H.; Roberts, A. D.; Szabó, L. R. *Dictionary of alkaloids*, 2a ed., 2010.
- <sup>80</sup> Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology*, Wiley: New York, 2007.
- <sup>81</sup> Cooks, R. G.; Roush, R. A. Characterization of Alkaloids and Other Secondary Metabolites by Multiple Stage Mass Spectrometry. *Journal of Natural Products* **1984**, *47*, 197. [CrossRef]
- <sup>82</sup> Montoro, P.; Maldini, M.; Piacente, S.; Macchia, M.; Pizza, C. Metabolite fingerprinting of *Camptotheca acuminata* and the HPLC–ESI-MS/MS analysis of camptothecin and related alkaloids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 405. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>83</sup> Stegelmeier, B. L.; Edgar, J. A.; Colegate, S. M.; Gardner, D. R.; Schoch, T. K.; Coulombe, R. A.; Molyneux, R. J. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *Journal of Natural Toxins* **1999**, *8*, 95. [PubMed]
- <sup>84</sup> Colegate, S.M.; Edgar, J. A.; Stegelmeier, B. L. Em *Plant-associated toxins in the human food supply*, Rose J. *Environmental Toxicology: Current Developments*, Gordon and Breach: Amsterdam, 1998, cap. 15.
- <sup>85</sup> Edgar, J. A.; Roeder, E.; Molyneux, R. J. Honey from Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: A Potential Threat to Health.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 2719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>86</sup> Chou, M. W.; Wang, Y. P.; Yan, J.; Yang, Y. C.; Beger, R. D.; Williams, L. D.; Doerge, D. R.; Fu, P. P. Riddelliine N-oxide is a phytochemical and mammalian metabolite with genotoxic activity that is comparable to the parent pyrrolizidine alkaloid riddelliine. *Toxicology Letters* **2003**, *145*, 239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>87</sup> Hartmann, T.; Toppel, G. Senecionine n-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1639. [[CrossRef](#)]

<sup>88</sup> Beales, K. A.; Betteridge, K.; Colegate, S. M.; Edgar, J. A. Solid-Phase Extraction and LC-MS Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids in Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 6664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>89</sup> Kuhlmann, F. E.; Apffel, A.; Fischer, S. M.; Goldberg, G.; Goodley, P. C. Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic and other strong acid modifiers by postcolumn addition of propionic acid and isopropanol. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1995**, *6*, 1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>90</sup> Beales, K. A.; Colegate, S. M.; Edgar, J. A. Experiences with the trace analysis of pyrrolizidine alkaloids using GC-MS and LC-MS, Acamovic, T. Stewart, C. S. Pennycott T. W. *Poisonous Plants and Related Toxins*, CABI Publishing: Wallingford, 453-458, 2003.

<sup>91</sup> Beyer, J.; Peters, F. T.; Kraemer, T.; Maurer, H. H. Detection and validated quantification of toxic alkaloids in human blood plasma—comparison of LC-APCI-MS with LC-ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42*, 621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>92</sup> Ding, B.; Zhou, T.; Fan, G.; Hong, Z.; Wu, Y. Qualitative and quantitative determination of ten alkaloids in traditional Chinese medicine *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *45*, 219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>93</sup> Krska, R.; Stubbings, G.; Macarthur, R.; Crews, C. Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>94</sup> Smith, D.; Smith, L.; Shafer, W.; Klotz, J.; Strickland, J. Development and Validation of an LC-MS Method for Quantitation of Ergot Alkaloids in Lateral Saphenous Vein Tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 7213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>95</sup> Sawaya, A.; Abreu, I. N.; Andrezza, N. L.; Eberlin, M. N.; Mazzafera, P. HPLC-ESI-MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. *Molecules*. **2008**, *13*, 1518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>96</sup> Hazleton, L. W.; Tusing, T. W.; Zeitlin, B. R.; Thiessen, R.; Murer, H. K. Toxicity of coumarin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1956**, *118*, 348. [[PubMed](#)]

<sup>97</sup> Code of Federal Regulations, Title 21 Part 189.130, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2006.

<sup>98</sup> Park, A. Y.; Park, S. Y.; Lee, J.; Jung, M.; Kim, J.; Kang, S. S.; Youm, J. R.; Han, S. B. Simultaneous determination of five coumarins in *Angelicae dahuricae* Radix by HPLC/UV and LC-ESI-MS/MS. *Biomedical Chromatography* **2009**, *23*, 1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>99</sup> Jager, L. S.; Perfetti, G. A.; Diachenko, G. W. Determination of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1145*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

<sup>100</sup> Zheng, X.; Zhang, X.; Sheng, X.; Yuan, Z.; Yang, W.; Wang, Q.; Zhang, L. Simultaneous characterization and quantitation of 11 coumarins in *Radix Angelicae Dahuricae* by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]