CAMERA SEPARATORIA previously POSTĘPY CHROMATOGRAFII

Volume 3, Number 1 / June 2011, 87-99

Grzegorz BOCZKAJ[1], Mariusz JASZCZOŁT[1], Agata LEMAN[1], Anita SKRZYPCZAK[1], Aleksandra KRÓLICKA[2], Marian KAMIŃSKI[1]*

[1] Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny,
Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
e-mail*: mknkj@chem.pg.gda.pl**

[2] Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed,
ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Zastosowanie chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-LC) w rozdzielaniu i oznaczaniu polifenoli i naftochinonów w materiałach roślinnych

Reversed phase liquid chromatography (RP-LC) for separation and quantitative determination of polyphenols and naphtoquinones in plant materials

Streszczenie: *W pracy przedstawiono przegląd metod rozdzielania i oznaczania naftochinonów i polifenoli pochodzących z materiału roślinnego, z wykorzystaniem technik chromatografii w układzie faz odwróconych – RP-TLC (Reversed-Phase Thin Layer Chromatography) oraz RP-HPLC (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography).*

Uwzględniono procedury przygotowania próbki, etap rozdzielania, a także kontroli czystości zbieranych frakcji. Próbki materiału roślinnego są z reguły ekstrahowane rozpuszczalnikami organicznymi dla wydzielania składników nisko- i średniopolarnych, albo wodą dla wyodrębniania składników polarnych. Proces ekstrakcji najczęściej jest wspomagany ultradźwiękami. W ostatnich latach stosowane są do rozdzielania naftochinonów i polifenoli fazy stacjonarne typu RP18 oraz eluenty w postaci mieszaniny wody i metanolu lub acetonitrylu. W przypadku rozdzielania polifenoli, częściej niż przy rozdzielaniu naftochinonów, stosuje się elucję gradientową. Zastosowanie ortogonalnego rozdzielania, realizowanego poprzez rozdzielanie techniką TLC w układzie faz normalnych lub HILIC, składników frakcji uzyskanych techniką RP-HPLC, pozwala skutecznie kontrolować efektywność rozdzielania oraz czystość frakcji.

Słowa kluczowe: *cienkowarstwowa chromatografia cieczowa TLC, wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa HPLC, naftochinony, polifenole, ekstrakty, metabolity roślinne, odwrócone układy faz RP*

Abstract: *The paper presents a review of naphtoquinones and polyphenols separation and quantitative determination methods using reversed phase chromatographic techniques – Reversed-Phase Thin Layer Chromatography (RP-TLC) and Reversed-Phase High Performance Column Liquid Chromatography (RP-HPLC).*

The procedures of sample preparation, chromatographic separation, as well as fraction purity control, are described in details. Samples of the plant material are mostly extracted with organic solvents or with water. The extraction processes are usually assisted by sonication. The most popular separation systems include a RP18 stationary phase and eluent which consists water and methanol or acetonitrile. In the case of polyphenols separations, much more of-

ten than during naphtoquinones separations, the gradient elution is used. The use of orthogonal separations by NP-TLC or HILIC-TLC separation of the fractions collected during RP-HPLC, gives a possibility for the separation effectiveness and fraction purity control.

Key words: *Thin Layer Chromatography TLC, Reversed-Phase High Performance Column Liquid Chromatography RP HPLC, naphtoquinones, polyphenols, extracts, plant metabolites*

1. Wstęp *(Introduction)*

Kolumnowa chromatografia cieczowa - HPLC i chromatografia cienkowarstwowa TLC, są najważniejszymi technikami rozdzielania wykorzystywanymi w fitochemii [1]. Metabolity wtórne są związkami chemicznymi, często o skomplikowanej strukturze i o niezbyt wysokich masach molekularnych. Nie odgrywają one roli w podstawowym metabolizmie roślin, jednak mają ogromne znaczenie w przystosowaniu się rośliny do funkcjonowania w danym środowisku. W roślinach leczniczych metabolity wtórne pełnią rolę substancji czynnych. Do tej pory na świecie udało się już wyizolować kilkanaście tysięcy metabolitów wtórnych. Ze względu na strukturę, metabolity wtórne podzielono na trzy grupy: terpeny, metabolity fenolowe oraz metabolity zawierające azot. Z tych ostatnich udało się opisać już 14000 substancji, należących do grup, takich jak: aminy, aminokwasy niebiałkowe, alkaloidy, glikozydy cyjanogenne i glukozynolaty.

Metabolity wtórne w roślinnych tkankach występują w bardzo niewielkich stężeniach i akumulowane są w wakuolach. W roślinach ich główną funkcją jest obrona przed szkodnikami i patogenami.

Przykłady takich farmakologicznie czynnych związków naturalnych, którymi są metabolity wtórne roślin, to [2]:

- terpenoidy
  - monoterpeny, sekwiterpeny – kamfora
  - diterpeny, tetraterpeny – taksol, karotenoidy
  - triterpeny – glikozydy nasercowe
  - wieloterpeny – kauczuk
- alkaloidy
  - indolowe – winkrystyna
  - tropanowe – atropina, skopolamina
  - pirydynowe i purynowe – nikotyna, kofeina
- związki fenolowe
  - proste fenole – kw. cynamonowy
  - fenole dwupierścieniowe – flawony, flawonole, flawonoidy, antocyjany
  - wielopierścieniowe – garbniki
  - kumaryny
  - furanokumaryny
- chinony
  - naftochinony – szikonina, plumbagina, juglon.

Rozdzielanie i oznaczanie naftochinonów z zastosowaniem chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych

W tabelach 1 i 2 zestawiono warunki chromatograficzne zastosowane do rozdzielania naftochinonów w ekstraktach wybranych materiałów pochodzenia roślinnego z wykorzystaniem odpowiednio TLC i HPLC.

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 1, najczęściej do rozdzielania związków z grupy naftochinonów z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej w układzie faz odwróconych (RP-TLC) stosuje się płytki z fazą stacjonarną typu C18 [3], a eluent stanowią wodne roztwory metanolu lub kwasu mrówkowego. Detekcję plamek prowadzi się świetle UV.

W przypadku zastosowania wysokosprawnej chromatografii cieczowej (tabela 2) w odwróconym układzie faz, fazę stacjonarną, podobnie jak w przypadku TLC, stanowi żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi [4-8, 10], często dla wyeliminowania powierzchniowych oddziaływań z grupami OH wykorzystywane są kolumny „encappowane" RP18e [9]. Dobry efekt rozdzielczy uzyskano także z zastosowaniem krótszych łańcuchów węglowodorowych – faza stacjonarna C8 [10]. W przeważającej ilości metodyk stosowana jest elucja izokratyczna [4-8, 10] z eluentem w postaci wodnych roztworów acetonitrylu [6-8] lub metanolu [4-5, 9-10] z dodatkiem kwasu octowego lub mrówkowego. Do detekcji substancji z grupy naftochinonów powszechnie stosowane są detektory spektrofotometryczne UV-VIS, korzystnie z matrycą fotodiodową (DAD) [4, 6-10], a także detektor fluorescencyjny [5].

Zastosowanie elucji izokratycznej jest korzystne z punktu widzenia zastosowania opracowanych metodyk do preparatywnego lub procesowego otrzymywania frakcji substancji z zastosowaniem techniki chromatografii cieczowej. Takie podejście pozwala na łatwiejszy odzysk składników eluentu, co czyni zaprojektowany proces rozdzielczy bardziej ekonomicznym.

Rozdzielanie i oznaczanie polifenoli z zastosowaniem chromatografii czieczowej w układzie faz odwróconych

W tabelach 3 i 4 zestawiono warunki chromatograficzne zastosowane do rozdzielania polifenoli w ekstraktach wybranych materiałów pochodzenia roślinnego z wykorzystaniem odpowiednio TLC i HPLC.

W poniższych tabelach opisano także metodyki nie zaliczane do układu faz odwróconych, ale stosowanych jako jeden z etapów przygotowania próbki lub uzupełniająco, w pracach, w których na etapie „właściwego" rozdzielania polifenoli stosowano RP. Ma to miejsce szczególnie w przypadku rozdzielania polifenoli z zastosowaniem cienkowarstwowej chromatografii cieczowej. W przypadku zbierania frakcji polifenoli rozdzielanych z zastosowaniem RP-HPLC, na etapie kontroli czystości frakcji, przeważnie, stosowano TLC w układzie faz normalnych lub z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych (ang. *Hydrophilic interaction chromatography* - HILIC) [11-13]. Zastosowanie warunków rozdzielania ortogonalnego, pozwala na skuteczną kontrolę czystości zbieranej frakcji na etapie RP-HPLC, poprzez zastosowanie odmiennego mechanizmu separacyjnego na etapie kontrolnym realizowanego z wykorzystaniem TLC.

Tabela 1. Zestawienie warunków rozdzielania naftochinonów techniką TLC
Table 1. *A comparison of the separation conditions of naphtoquinones by TLC technique*

Lp. Nr	Materiał roślinny *(Plant material)*	Analizowane substancje *(Analyzed substances)*	Faza stacjonarna *(Stationary phase)*	Eluent	Wartości *(Values)* Rf	Warunki Detekcji *(Detection conditions)*	Uwagi *(Comments)*	Lit.
1.	*Drosera rotundifolia, Drosera intermedia*	1) 4-O-glukozyd 7-metylohydrojuglonu 2) 4-O-glukozyd hydroplumbaginy	C18	MeOH:H_2O 1:1 (v/v)	1) 0,38 2) 0,48	UV przy 365 nm Kolor plamek: 1) fioletowo-niebieski 2) niebieska Widzialne również w świetle dziennym po kilku godzinach – brązowienie na skutek rozkładu pod wpływem powietrza. Czerwony kolor zarówno pod UV jak i w świetle dziennym po wcześniejszym działaniu 1% $AlCl_3$.	W pełni rozwiniętą *D. rotundifolia* otrzymano z kultury *in vitro* poprzez namnożenie na podłożu MS i na podłożu Reinert-Mohr'a. *D. intermedia* uzyskano również na podłożu Reinert-Mohr'a. Świeże rośliny ekstrahowano metanolem.	[3]
2.	Korzenie *Echium italicum L.*	1) szikonina 2) alkanina 3) produkty saponifikacji	chiralna faza stacjonarna do RP - impregnowana nanokrzemianem z dodatkiem Cu^{2+} z sektorem chiralnym	MeOH:HCOOH 20:1 (v/v)	Szikonina 0,7 Alkanina 0,68 Produkty saponifikacji 0,7	Dokumentacja płytek TLC została przeprowadzona 12-bitową kamerą CCD połączoną z systemem dokumentacji DigiStore 2 (Camag)	Korzeń poddano liofilizacji, a naskórek oddzielono od rdzenia korzenia i sproszkowano. Naftochinony ekstrahowano ze sproszkowanych korzeni używając heksanu. Rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w MeOH, wytrącone woski odfiltrowano. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w heksanie.	[4]

Tabela 2. Zestawienie warunków rozdzielania naftochinonów techniką wysokosprawnej chromatografii kolumnowej – HPLC

Table 2. *A comparison of the separation conditions of naphtoquinones by High Performance Column Chromatography technique – HPLC*

Lp. Nr	Materiał roślinny *(Plant material)*	Analizowane substancje *(Analyzed substances)*	Kolumna *(Column)*	Eluent/program elucji; Natężenie przepływu *(elution program, flow rate)*	Detektor *(Detector)*	Uwagi *(Comments)*	Lit.
1.	Pomidor, groch, Rzodkiewnik pospolity, kukurydza, ryż, marchew, ziemniaki.	1)filochinon (wit. K_1) 2)menachinon-4 (K_2)	Discovery C18 250x4.6 mm, 5 μm Supelco	MeOH:EtOH 80:20, v/v (+ 1 mM CH_3COONa, + 2 mM CH_3COOH, + 2 mM $ZnCl_2$) Elucja izokratyczna Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 1 ml/min	Fluorescencyjny: λ_{ex}: 238 nm, λ_{em}: 426 nm.	tkanki warzyw pobierano bezpośrednio przed ekstrakcją (EtOH:H_2O 95:5). Czas od pobrania próbki do zakończenia ekstrakcji wynosił 30 s.	[5]
2.	*Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc.* (hodowla komórek i korzeni)	deoksyszikonina; szikonina; acetyloszikonina; izobutyloszikonina; β,β-dimetylkoakryloszikonina; izowarelyroszikonina; α-metylo-n-butyloszikonina; 8-hydroksyizowarelyroszikonina.	LS-410 ODS Sil., (Toyo-soda Co., Ltd.)	CH_3CN:H_2O:TEA:CH_3COOH 70:30:0,3:0,3 (v/v/v/v) Elucja izokratyczna. Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 1,1 ml/min	Detector UV-VIS - 520 nm	Szikoniny ekstrahowano Et_2O przez okres 3 h w aparacie Soxhleta. Et_2O usunięto w próżni. Pozostałość suszono, a następnie rozpuszczono w CH_3CN.	[6-7]
3.	*Angelica radix* *Lithospermum radix* *Cera flava* *Adeps suillus*	Szikonina; Acetyloszikonina; β,β-dimetyloakryloszikonina; izobutyloszikonina; deoksyszikonina; izowarelyroszikonina; kwas ferulowy.	ThermoQuest C18	CH_3CN: (H_2O+ CH_3COOH) 47:53 (v/v) (pH 2,56) Elucja izokratyczna. Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 1,0 ml/min	Detektor UV-VIS - 280 nm	Sproszkowany *Angelica radix* dodano do wcześniej zmieszanych i stopionych w 130-140°C: 15 g oleju sezamowego, 12,5 g smalcu i 7,5 g żółtego wosku. Gdy kolor dodanego korzenia stał się brązowawy i utrzymywał się dłużej niż 15 minut dodano 5 g *Lithospermum radix*. Otrzymany produkt filtrowano na gorąco.	[7-8]

4.	Włókna tekstylne	lawson (2-hydroksy-1,4-naftochinon); juglon (5-hydroksy-1,4-naftochinon); lapachol (2-hydroksy-3-(3-metylobut-2-enylo)-1,4-nafrochinon); antrachinony.	Purospher RP18e (5 µm) (Merck), wym. 125x4 mm	MeOH:H_2O Program elucji: 3 min – elucja izokratyczna 40% MeOH (v/v) Następnie gradient do 95% MeOH przez 15 min Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 0,6 ml/min	Detektor UV-VIS-DAD - monitorowana dł. fali 270 nm	Włókna ekstrahowano przez 10 minut pod chłodnicą zwrotną HCl-H_2O-MeOH (2:1:1, v/v/v). Do HPLC wykorzystano supernatant po wirowaniu ekstraktu.	[9]
5.	Dzbanecznik	lawson; 1,4-naftochinon; juglon; plumbagina; 2,2'-(3-hydroksy)-1,4-binaftochinon;	C8 i C18	0,1 ml/l CH_3COOH: MeOH 35:65 (%, v/v) Elucja izokratyczna. Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 0,75 ml/min	Detektor UV-VIS - 260 nm	Analiza HPLC ekstraktów dzbanecznika.	[10]
6.	Korzenie *Echium italicum L.*	szikonina; acetyloszikonina; propionyloszikonina; izobutyloszikonina; 3,3-dimetyloakryloszikonina; 2-metylo-n-butyryloszikonina; Izowarelyroszikonina; Alkanina.	Kolumna ze stali nierdzewnej BDS Hypersil C18 250×10 mm I.D., 5 µm (Thermo, USA)	THF:CH_3CN:H_2O:HCOOH 30:20:50:0.5, (v/v/v/v) Elucja izokratyczna. Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 3,5 ml/min	Detektor UV-VIS-DAD – monitorowana dł. fali 518 nm	Jak opisano powyżej dla TLC.	[4]

Tabela 3. Zestawienie warunków rozdzielania polifenoli techniką chromatografii cienkowarstwowej TLC
Table 3. *A comparison of the separation conditions of polyphenols by TLC technique*

Lp.	Materiał roślinny	Analizowane substancje	Faza stacjonarna	Eluent	Wartości Rf	Warunki Detekcji	Uwagi	Lit.
1.	Żurawina	glikozyd flawonolu; galaktozyd; kwercetyny; arabinozy; kwercetyny.	żel krzemionkowy	Octan etylu	Brak danych	Lampa UV	Owoce żurawiny macerowano w 70% wodnym roztworze metanolu, a następnie otrzymaną zawiesinę filtrowano. Rozpuszczalnik usunięto w wyparce obrotowej. Wodny roztwór ekstrahowano dwukrotnie eterem naftowym. Frakcje eteru etylowego połączono, filtrowano, a następnie zagęszczono w wyparce obrotowej. TLC – służyło wyłącznie do wstępnego wydzielenia frakcji. Dalsze rozdzielania prowadzono techniką HPLC.	[11]
2.	Zielona herbata	(-)epikatechina; (-)epigallokatechina; (-)galusan-3-epikatechiny; (-)galusan-3-epigallokatechiny.	żel krzemionkowy	$CHCl_3$:MeOH: H_2O 65:35:10, (v/v/v)	- epikatechina - 0,39 - epigallokatechina - 0,28 - galusan-3-epikatechiny - 0,3 - galusan-3-epigallokatechiny - 0,19	Reakcja barwna wywołana odczynnikiem vanilina+kwas solny	Katechiny z surowej herbaty ekstrahowano wodą w temperaturze 80°C. Ekstrakt rozdzielano z zastosowaniem kolumnowej chromatografii cieczowej. TLC – zastosowano w celu uzyskania dodatkowych informacji nt. frakcji uzyskiwanych w RP-HPLC.	[12]
3.	Trzcina cukrowa	Flawonoidy; C-glikozydy: witeksyna; orientyna; aglikony; flawonoidowe.	żel krzemionkowy	Octan etylu: kwas mrówkowy:woda 6:1:1 (v/v/v)	Brak danych	Reakcja barwna z estrem β- aminoetylowym kwasu difenylo-borowego (fluoryzujące plamy w świetle UV przy 360 nm)	Wytłoki z trzciny cukrowej poddano maceracji wspomaganej promieniowaniem ultradźwiękowym w roztworze metanol:woda (1:1, v/v) przez 1,5 min w temperaturze pokojowej. Następnie ekstrakt oczyszczano z zastosowaniem SPE, frakcję flawonoidów eluowany metanolem. TLC – zastosowano w celu kontroli efektywności oczyszczenia ekstraktu na SPE oraz potwierdzenia obecności flawonoidów.	[13]

Tabela 4. Zestawienie warunków rozdzielania polifenoli techniką HPLC
Table 4. *A comparison of the separation conditions of polyphenols by HTLC technique*

Lp.	Materiał roślinny	Analizowane substancje	Kolumna	Eluent/program elucji; Natężenie przepływu	Detektor	Uwagi	Lit.
1.	Jabłka	kw. chlorogenowy; (+)katechina; (-)epikatechina; florentyna; procyjanid B1; procyjanid B2; procyjanid C1.	Intersil ODS-3 (GL Sciences Inc. Japonia) wym. 250x4,6 mm i.d.	A: 10 mM KH_2PO_4 (pH 2,0) B: MeOH Elucja gradientowa: 10% B – 10 min 10-50% B – 40 min 50% B – 15 min 10% B – 10 min Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 1,0 ml/min	Detektor UV-VIS - 280 nm	Przez rozdrobnione owoce przepuszczono 10% $Na_2S_2O_5$, zastosowano enzymy proteolityczne w celu sklarowania soku po czym mieszaninę odwirowano i oczyszczano z zastosowaniem ziemi okrzemkowej.	[14]
2.	Jabłka (wino jabłkowe Cydr)	(+)katechina; (-)epikatechina; tyrozol; katechol; kw. benzoesowe; kw. hydroksycynamonowe; kw. ferulowy; kw. chlorogenowy; glikozydy kwercytynowe.	Nucleosil 120 C18 3 µm wym. 250x4,6 mm i.d., (Teknokroma, Barcelona, Hiszpania)	A: uwodniony 2% CH_3COOH B: 100% MeOH Elucja gradientowa: 0-45% B – 55 min Dalej Elucja izokratyczna przez 20 min Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 0,8 ml/min	Detektor UV-VIS DAD monitorowane dł. fali: 280 nm, 313 nm, 355 nm	Próbki 8 Hiszpańskich win jabłkowych odgazowano w łaźni ultradźwiękowej przez 10 min, filtrowano przez filtr z octanu celulozy (0,45 µm). Filtrat dozowano bezpośrednio do HPLC.	[15]
3.	Winogrona *cv. Rebula*	estry kwasów hydroksycynamonowych	C18 Luna 3 µm (Phenomenex) wym.150x2 mm,	A: 2,3% HCOOH, pH 2,1 B: acetonitryl Elucja gradientowa: 0 min – 12% B 15 min – 22% B 20 min – 55% B 25 min – 12% B 50 min – 12% B Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 1,3 ml/min	Detektor UV-VIS DAD, monitorowana dł. fali - 320 nm	Do winogron dodano 2 g pirosiarczanu potasu w celu zahamowania oksydazy polifenolowej. Wyciśnięto sok z winogron, a skórki ekstrahowano 3 razy po 10 min 60 ml kwasu nadchlorowego o stężeniu 6%. Sok i ekstrakty połączono a następnie sączono przez filtr PTFE 0,45 µm (Chromafil).	[16]
4.	Winogrona	cis-resweratrol; trans-resweratrol; kwercytyna; rutyna.	Hypersil ODS 5 µm wym. 150x4.6 mm, (Technochroma, Hiszpania)	A: acetonitryl B: H_2O:CH_3COOH:CH_3CN 87:3:10, (v/v/v) Elucja gradientowa: 5% A – 0 min 25% A – 25 min Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 1,0 ml/min	detektor UV-VIS-DAD monitorowana dł. fali - 306 nm	Analiza HPLC ekstraktów metanolowych.	[17]

5.	Miazga kakao	(-)epikatechina; (+)katechina; flawan-3-ol; procyjanid B2; procyjanid C1; pro antocyjany.	Semipreparatywne HPLC: Supelcosil LC-Si 5 µm wym. 250x21,2 mm	CH_2Cl_2:MeOH:HCOOH:H_2O A: 5:43:1:1 (v/v/v/v) B: 41:7:1:1 (v/v/v/v) Elucja gradientowa: 0-20% A – 40 min 20-100% A 5 min Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 20 ml/min	Detektor UV - 280 nm	Miazgę z ziarenek kakao poddano 3-krotnej ekstrakcji n-heksanem w temp. pokojowej przez 30 minut, w celu usunięcia tłuszczy. 0,5 g odtłuszczonej miazgi 3-krotnie ekstrahowano 80% acetonem.	[18]
			Analiza katechin: Develosil ODS HG-5 (Nomura Chemical Co. Ltd., Aichi, Japonia) 250x4,6 mm I.D. 5 µm	A: 0,1% TFA w CH_3CN B: 0,1% TFA w H_2O Elucja gradientowa: 0-10% A – 5 min 10-25% A – 25 min 25-100% A – 5 min Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 0,8 ml/min	Detektor UV - 280 nm		
6.	Kakao (sproszkowane kakao CocoanOX)	procyjanidy (mono-, di- i trimery); (-)epikatechina; (+)katechina.	Zorbax Eclipse XDB-C18 150x2.1 mm, 5 µm	A: H_2O:HCOOH 99,9:0,1 (v/v) B: CH_3CN Elucja gradientowa: 20 min - 6-10% B 5 min – 10-13% B 5 min - 13-15% B 10 min – 15-10% B 5 min – 10-6% B Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 0,6 ml/min	Detektor UV-VIS DAD - 280 nm	Ekstrakcja mieszaniną MeOH:HCl, 99,7:0,22 (v/v), wirowanie, zatężanie pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały ekstrakt rozcieńczono wodą i filtrowano (filtr 0,45 µm PTFE).	[19]
7.	Herbata	Katechina; Galusan; epikatechiny; Galusan; epigallokatechiny; Epikatechina; Epigallokatechina.	Kolumna Zorbax SB-C18 250x4.6 mm I.D. 5 µm	H_2O:MeOH:CH_3COOH 70:30:0,1 (v/v/v) Elucja izokratyczna. Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 1,0 ml/min	Detektor UV –VIS 270 nm	Próbki suchej herbaty ekstrahowano wrzącą wodą przez 1 godzinę. Następnie roztwór filtrowano (filtr membranowy 0,45 µm).	[20]
8.	Herbata	(-)epikatechina; (-) epigallokatechina; (-)galusan-3-epikatechiny; (-)galusan-3- -epigallokatechiny.	Hilbar RT 250 x 10 mm z Lichrosorb RP -18 7 µm (Merck, Darmstadt, Niemcy)	H_2O:CH_3CN:MeOH:CH_3COOH 79,5:18:2:0,5 (v/v/v/v) Elucja izokratyczna. Objętościowe natężenie przepływu eluentu: 3 ml/min	Detektor UV-VIS	Katechiny wyekstrahowano z Chińskiej zielonej herbaty przy użyciu wody o temperaturze 80 °C w ciągu 1 h (mieszanie ciągłe). Oczyszczanie ekstraktu z zastosowaniem SPE.	[12]

Rozdzielanie polifenoli obecnych w ekstraktach roślinnych techniką HPLC w warunkach RP realizowane jest z zastosowaniem typowych układów chromatograficznych, tj. fazy stacjonarnej którą stanowi z żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi (C18) [12, 14-20] oraz eluentów składających się z wody oraz metanolu [14-15, 20] lub acetonitrylu [16-19]. W większości przypadków stosowano elucję gradientową [14-19], rzadziej izokratyczną [20]. Powszechnie stosowanym w tego typu badaniach jest detektor UV, często z matrycą fotodiodową (DAD).

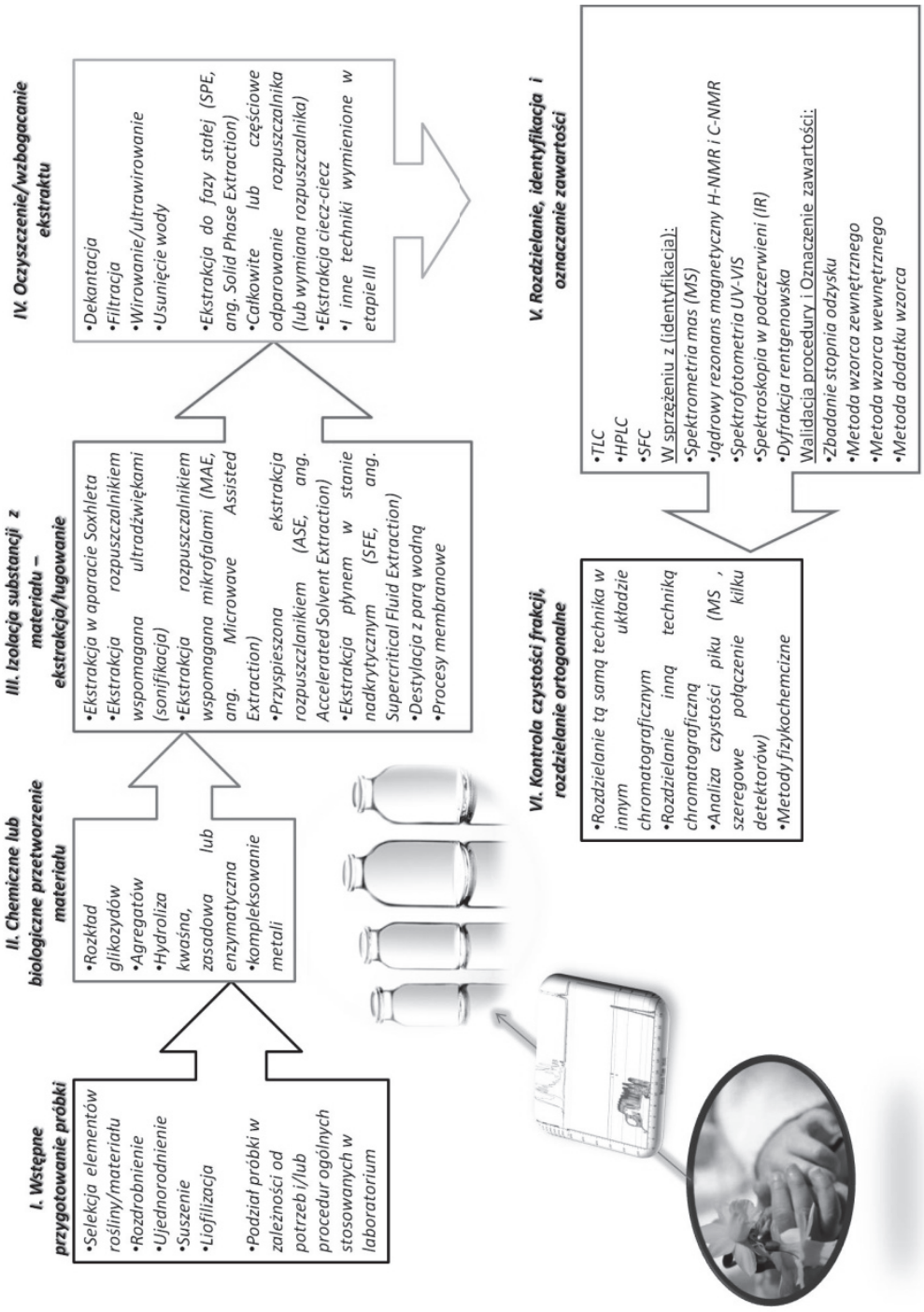
2. Podsumowanie

Warunki rozdzielania substancji z grupy naftochinonów oraz polifenoli są stosunkowo dobrze opracowane. Odpowiednia procedura przygotowania próbki do analizy chromatograficznej pozwala na zastosowanie typowych układów separacyjnych stosowanych w RP.

Dobór optymalnych technik oraz warunków przygotowania próbki jest podyktowany typem rośliny (zawartości tłuszczów [18], obecności kutykuli, budowy tkanek), z jakiej prowadzona będzie izolacja substancji, a także od rodzaju metabolitów wtórnych w niej zawartych - ich właściwości fizykochemicznych i struktury.

Powszechnie stosowaną techniką izolacji substancji z materiału roślinnego do analizy naftochinonów i polifenoli jest ekstrakcja cieczą, często z zastosowaniem aparatu Soxhleta [6-7], albo z maceracją [11]. Do ekstrakcji polifenoli z herbaty zastosowano gorącą wodę [12, 20], co jest rozwiązaniem korzystnym z punktu widzenia zielonej chemii, a przede wszystkim ekonomicznym. Wysoką efektywność ekstrakcji uzyskiwano w przypadku zastosowania, jako czynnika wspomagającego, ultradźwięków [13, 15, 21]. Uzyskane ekstrakty poddawano wirowaniu, a uzyskany supernatant poddawano dalszemu oczyszczaniu, głównie z zastosowaniem SPE [12-13], lub dodatkowo filtrowano i poddawano analizie HPLC lub TLC. W przypadku analizy próbek ciekłych, tj. soków, wina, stosowano wyłącznie filtrację próbki, którą bezpośrednio analizowano z zastosowaniem technik chromatografii cieczowej [15].

Ogólny schemat etapów procedury przygotowania próbki, rozdzielania i oznaczania polifenoli i naftochinonów przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Etapy analizy ekstraktów roślinnych z zastosowaniem chromatografii cieczowej jako techniki rozdzielania i oznaczania

Fig. 1. Steps of analysis of the plant extracts with the use of liquid chromatography as a separation and quantitative determination technique

Conclusions

A conditions for separation of naphthoquinone or polyphenol groups of compounds are quite good developed. An appropriate procedure of the sample preparation for chromatographic analysis, allows to use a typical chromatographic Reversed Phase conditions.

The selection of optimal technique and conditions of sample preparation regards to the type of plant (a lipids or cuticula content [8],the tissue composition) from which the isolation will be made as well as to the type of secondary metabolites which are included in the plant – its physiochemical properties and structure.

A technique commonly used for isolation of the compounds from the plant material for naphthoquinones and polyphenols analysis is liquid extraction, often in the Soxhlet Apparatus [6-7] or with maceration [11]. The extraction of polyphenols from tea was made by extraction with hot water [12, 20], which is a valuable solution form the green chemistry point of view and also very economical. A high effectiveness of the extraction was achieved in the case of the ultra-wave extraction [13, 15, 21]. The extracts were then centrifuged, and the supernatant was purified with another processes, often by SPE [12, 13] or additionally filtrated and than analyzed by HPLC or TLC. In the case of the liquid samples analysis i.e. juices, vines, only filtration of the sample was used before the chromatographic process made by LC [15].

A general scheme describing the steps of sample preparation, separation and determination of polyphenols and naphthoquinones procedure is presented in figure 1.

3. Podziękowania *(Acknowledgements)*

Praca współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Projekt systemowy Województwa Pomorskiego pn. „InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów”, II edycja.

Literatura *(Literature)*

1. A. Marston, *Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry,* Phytochem., **68**(2007)2785.
2. E. Leistner, *Biosynthesis of plant quinones. The biochemistry of plants. Secondary plant products.* (red. E.E. Conn), Academic Press, **7**(1981)413.
3. J. Budzianowski, *Naphthohydroquinone glucoside od Drosera rotundifolia and D. intermedia drom in vitro cultures,* Psychochem., **42**(1996)1145.
4. A. Albrehta, I. Vovka, B. Simonovskaa, M. Srbinoska, *Identification of shikonin and its ester derivatives from the roots of Echium Italicum L.,* J. Chromatogr. A, **1216**(2009)3156.

5. C. Oostende, J. R. Widhalm, G.J.C. Basset, *Detection and quantification of vitamin K1 quinol in leaf tissues,* Phytochem., **69**(2008)2457.
6. Y. Fujita, Y. Maeda, C. Suga, T. Morimoto, *Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of lithospermum erythrorhizon. Comparison of shikonin derivatives of cultured cells and ko-shikon,* Plant Cell Reports, **2**(1983)192.
7. B. Hazra, M. Das Sarma, U. Sanyal, *Separation methods of quinonoids constituents of plants used in Oriental traditional medicines,* J. Chromatogr. B, **812**(2004)259.
8. P.C. Wu, Y.B. Huang, I.C. Lin, Y.H. Tsai, A *rapid, simple high performance liquid chromatography method for the determination of traditional chinese medicine ointment Shiunko,* J. Food Drug Anal., **12**(2004)311.
9. P. Novotna, V. Pacáková, Z. Bosáková, K. Štulìk, *High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles,* J. Chromatogr. A, **863**(1999)235.
10. P. Babula, V. Adam, L. Havel, R. Kizek, *Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones – their occurrence, pharmacological properties and analysis,* Cur. Pharm. Anal., **5**(2009)47.
11. H. Chen, Y. Zuo, *Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit,* Food Chem., **101**(2007)1374.
12. R. Amarowicz, F. Shahidi, *A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea, Food Res. Intern.*, **29**(1996)71.
13. R. Colombo, F.M. Lancas, J.H. Yariwake, *Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection,* J. Chromatogr. A, **1103**(2006)118.
14. T. Shoji, Y. Akazome, T. Kanda, M. Ikeda, *The toxicology and safety of apple polyphenol extract,* Food Chem. Toxicol., **42**(2004)959.
15. B. Suárez, N. Palacios, N. Fraga, R. Rodríguez, *Liquid chromatographic method for quantifying polyphenols in ciders by direct injection,* J. Chromatogr. A, **1066**(2005)105.
16. B. Mozetič, I. Tomažič, A. Škvarč, P. Trebše, *Determination of polyphenols in white grape berries cv. Rebula,* Acta Chim. Slov., **53**(2006)58.
17. O. Palomino, M.P. Gómez-Serranillos, K. Slowing, E. Carretero, A. Villar, *Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography,* J. Chromatogr. A, **870**(2000)449.
18. M. Natsume, N. Osakabe, M. Yamagishi, T. Takizawa, T. Nakamura, H. Miyatake, T. Hatano, T. Yoshida, *Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC,* Biosci. Biotechnol. Biochem., **64**(2000)2581.
19. E. Cienfuegos-Jovellanos, M. del Mar Quiñones, B. Muguerza, L.Moulay, M. Miguel, A. Aleixandre, A*ntihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans,* J. Agric. Food Chem., **57**(2009)6156.

20. M. Ding, H. Yang, S. Xiao, *Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography,* J. Chromatogr. A, **849**(1999)637.
21. D. Kołodziejski, praca magisterska, „Porównanie efektywności wybranych technik ekstrakcji/ługowania metabolitów wtórnych z suchego materiału roślin owadożernych", *An effectiveness comparison of selected techniques for extraction/leaching of secondary metabolities for dry insectivorous plant material*, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2010.