



CAMERA SEPARATORIA previously **POSTĘPY CHROMATOGRAFII**

Volume 3, Number 2 / December 2011, 253-270

**Anita SKRZYPCZAK¹, Mariusz JASZCZOŁT¹,
Aleksandra KRÓLICKA², Marian KAMIŃSKI^{1*}**

¹ Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechniki Gdańskiej, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk,

e-mail: mknkj@chem.pg.gda.pl*

² Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GU Med, Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Techniki i metody chromatografii cieczowej w rozdzielaniu, oznaczaniu oraz izolowaniu naftochinonów i flawonoidów z roślin

Liquid chromatography techniques and methods in separation, determination and isolation of naphthoquinones and flavonoids from plants

Streszczenie: *W niniejszej pracy przedstawiono przegląd technik oraz metod chromatografii cieczowej w zakresie rozdzielania, oznaczania oraz izolowania naftochinonów i flawonoidów z ekstraktów roślinnych w szczególności z ekstraktów roślin mięsożernych (řac. plantae carnivorae). Przedstawiono techniki najczęściej wykorzystywane podczas rozdzielania, oznaczania i izolowania metabolitów wtórnych, takie jak cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (Thin Layer Chromatography) oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa (High Performance Liquid Chromatography). Przeanalizowano metody i warunki rozdzielania w normalnym i odwróconym układzie faz (Normal- and Reversed- Phase) oraz w warunkach chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie LLPC (Liquid-Liquid Partition Chromatography).*

Słowa kluczowe: *naftochinony, flawonoidy, ekstrakty roślinne, cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (TLC), wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia podziałowa ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC).*

Abstract: *This work is a review of liquid chromatography techniques and methods used for separation, determination and isolation of naphthoquinones and flavonoids from the plants extracts, in particular, from the extracts of Carnivorous plants (plantae carnivorae). Presented techniques are the most frequently used during the processes of separation, determination and isolation of secondary metabolites i.e. thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Described and analyzed methods and separation conditions in normal and reversed phase (NP and RP) and Liquid-Liquid Partition Chromatography.*

Key words: *naphthoquinones, flavonoids, plants extracts, thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), Liquid-Liquid Partition Chromatography (LLPC).*

1. Wprowadzenie (Introduction)

Metabolity wtórne z grupy naftochinonów oraz flawonoidów wykazują właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, istnieją także doniesienia o właściwościach przeciwnowotworowych w przypadku naftochinonów [1-3]. Naftochinony, czyli diketonowe pochodne naftalenu, występują powszechnie w roślinach z rodzin *Bignoniaceae*, *Verbanaceae*, *Ebenaceae*, *Plumbaginaceae* oraz w roślinach owadożernych z rodzin: *Dionophyllaceae*, *Nepenthaceae* i *Droseraceae*. Zawarte są w liściach, owocach, korzeniach i drewnie [4, 5, 6].

Dowiedziano, że naftochinony posiadają właściwości cytostatyczne, przeciwzapalne, bakterio i grzybobójcze, wykazują działanie przeciwwirusowe, antymalaryczne oraz hamują rozwój pasożytów takich jak *Schistosoma mansoni* i *Trypanosoma cruzi* [5, 7]. Właściwości naftochinonów związane są ze zdolnością do generacji aktywnych form tlenu, inhibicją enzymów topizomeraz oraz ich oddziaływaniem z DNA [5]. Dzięki właściwościom oksydacyjnym naftochinony są zdolne do tworzenia nieodwracalnych kompleksów z aminokwasami, prowadząc często do inaktywacji białka. Dzięki wysokiemu potencjałowi redoks związki te mogą, także stymulować łańcuch oddechowy w komórkach bakterii prowadząc do powstania toksycznych rodników tlenowych i efektu bakterio-bójczego [8].

Flawonoidy pełnią w roślinach funkcję barwników, antyoksydantów, oraz stanowią ochronę przed promieniowaniem UV i patogenami. Dowiedziano ponadto, że flawonoidy są związkami farmakologicznie czynnymi. Posiadają one aktywność antywirusową, antybakteryjną, antyalergiczną, a także działają przeciwzapalnie i przeciwskurczowo. Efekty farmakologiczne flawonoidów wynikają z ich własności antyoksydacyjnych, zdolności do chelatowania jonów metali oraz do oddziaływania z enzymami, błonami komórkowymi i DNA [7, 9-12].

Z uwagi na aktywność farmakologiczną naftochinonów i flawonoidów dużego znaczenia nabrało opracowanie selektywnych i czułych metod rozdzielania, oznaczania i izolacji metabolitów wtórnych z ekstraktów roślinnych.

Chromatografia cieczowa jest najczęściej stosowaną techniką do rozdzielania, oznaczania i izolowania metabolitów wtórnych z ekstraktów roślinnych. Najstarszą techniką analizy naftochinonów i flawonoidów jest chromatografia planarna, zarówno bibułowa, jak i cienkwarstwowa [13]. Obecnie badania ekstraktów roślinnych bogatych w substancje z grupy naftochinonów i flawonoidów wykonuje się przede wszystkim z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

Rozdzielanie, oznaczanie i izolowanie naftochinonów oraz flawonoidów z zastosowaniem cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC) w normalnym i odwróconym układzie faz oraz w warunkach chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie
(Separation, determination and isolation of naphthoquinones and flavonoids using thin-layer chromatography (TLC) in normal and reverse phase and Liquid-Liquid Partition Chromatography)

Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa wykorzystywana jest przede wszystkim do stwierdzenia obecności poszukiwanego składnika w badanej mieszaninie lub stwierdzenia jego braku. Współczesne odmiany tej techniki, z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD oraz skanerów, pozwalają na identyfikację, jakościową jak i ilościową. Mimo wszystko, dokładność i precyzja chromatografii cienkowarstwowej są wyraźnie mniej korzystne, niż uzyskiwane z zastosowaniem techniki kolumnowej wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej – HPLC. Chromatografia cienkowarstwowa jest również wykorzystywana do celów semi-preparatywnych [18].

Do rozdzielania naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem cienkowarstwowej chromatografii cieczowej najczęściej wykorzystuje się układ faz normalnych lub chromatografię podziałową ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie, a rzadziej odwrócony układ faz. Jako fazę stacjonarną najczęściej stosowano żel krzemionkowy [14-23], a w przypadku odwróconego układu faz, żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi [18, 21]. W normalnym układzie faz w postaci fazy ruchomej stosowano mieszaniny takich rozpuszczalników, jak: heksan, octan etylu, chloroform, benzen, eter etylowo-metylowy [14-17], w warunkach chromatografii podziałowej z dynamicznie generowaną fazą stacjonarną stosowano heksan, toluen, chloroform, octan etylu, kwas mrówkowy, kwas octowy, metanol [18-23], a w odwróconym układzie faz stosowano: acetonitryl, metanol, kwas octowy, wodę [18, 21]. Rozdzielanie substancji na cienkich warstwach fazy stacjonarnej wykonywano niekiedy wielokrotnie, rozwijając chromatogram kilkakrotnie w tej samej lub różnych fazach ruchomych.

Flawonoidy charakteryzują się wysoką polarnością, dlatego w rozdzielaniu związków z tej grupy szczególne zastosowanie znajduje chromatografia podziałowa ciecz-ciecz z fazą stacjonarną dynamicznie generowaną (LLPC). Fazą stacjonarną w LLPC jest polarny adsorbent, a niepolarna faza ruchoma jest bliska nasyceniu polarnym rozpuszczalnikiem np. wodą bądź metanolem. W LLPC występują oddziaływania charakterystyczne zarówno dla układów adsorpcyjnych jak i podziałowych, a o przewadze danych oddziaływań decyduje rodzaj fazy stacjonarnej, rodzaj analitu, a także stopień wysycenia niepolarnego eluentu polarnym rozpuszczalnikiem. W chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną dynamicznie generowaną, oddziaływania niespecyficzne (dyspersyjne), w przeciwieństwie do normalnego układu faz, mają znaczący wpływ i decydują o wartości współczynnika podziału i związanych z nim wartości takich jak objętość i czas retencji (V_r i t_r).

W tabeli 1 przedstawiono zastosowane dotychczas w literaturze przedmiotu, warunki rozdzielania, oznaczania lub izolowania naftochinonów i flawonoidów w ekstraktach roślinnych w normalnym układzie faz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (NP-TLC), odwróconym układzie faz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (RP-TLC) oraz w warunkach chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC).

Tabela 1. Warunki rozdzielania, oznaczania lub izolowania naphthochinonów i flawonoidów w ekstraktach roślinnych w normalnym układzie faz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (NP-TLC), odwróconym układzie faz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (RP-TLC) oraz w warunkach chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC)

Table 1. Conditions of separation, determination and isolation of naphthoquinones and flavonoids from the plants extracts in normal phase thin layer chromatography (NP-TLC), reversed phase thin layer chromatography (RP-TLC) and Liquid-Liquid Partition Chromatography (LLPC)

Lp. (Nr)	Odmiana techniki TLC (Type of technique TLC)	Faza stacjonarna (Stationary phase)	Faza ruchoma (Mobile phase)	Rozdzielane/ oznaczone metabolity (Separated/ determined metabolites)	Material roślinny (Plant material)	Warunki detekcji (Detection conditions)	Lit. (Ref.)	Uwagi (Comments)
1	NP-TLC	Si 60	CH ₃ Cl	plumbagina	<i>Drosera Peltata</i>	Obserwacja w świetle wiązki przy dł. fali 365 nm	[14]	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymanych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej
2	NP-TLC	Si 60 F ₂₅₄	Heksan/ AcOEt, (85:15 v/v)	plumbagina, 3-O-metylo droseron, 6-hydroksy plumbagina, dihydroksynafthochinon, oraz szikinyony	<i>Plumbago capensis</i>	Brak danych	[15]	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymanych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej
3	NP-TLC	Si 60	Heksan/ AcOEt (5:2 v/v)	plumbagina	<i>Plumbago auriculata</i>	Obserwacja w świetle UV o długości fali λ ₁ =254 i λ ₂ =366 nm	[16]	Analiza składu ekstraktu <i>Plumbago auriculata</i> w dichlorometanie
4	NP-TLC	Si 60 F ₂₅₄	Heksan/ AcOEt (90:10 v/v)	ramentaceon i jego dimery oraz inne naphthochinony	<i>Euclea racemosa</i> ssp. <i>schimperii</i>	Brak danych	[17]	TLC zastosowano do analizy składu ekstraktów oraz frakcji zebranych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej

5	HILIC-TLC	Si 60	1-BuOH: AcOH:H ₂ O (4:1:5 v/v) oraz AcOH:H ₂ O (3:17 v/v)	4-O-glukozyd 7-metylohydrojglonu i 4-O-glukozyd hydroplumbaginy	<i>Drosera rotundifolia</i> <i>Drosera intermedia</i>	Brak danych	[18]	Zastosowano dwuwymiarową cienkowarstwową chromatografię cieczową (2D-TLC)
6	LLPC-TLC	Si (20 cm×20 cm) płytki szklane	CHCl ₃ :MeOH (85:15, v/v)	3-o-β-d-galaktozyd kwercetyny, 3-o-β-l-arabinozyd kwercetyny	<i>Byrsonima crassa</i>	Obserwacja w świetle UV o długości fali λ=254nm	[19]	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymanych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej
7	LLPC-TLC oraz HILIC-TLC	1) Si 60 F ₂₅₄ 2) Si 60 F ₂₅₄ 3) Celuloza MN300 4) Celuloza MN300 5) Celuloza MN300 6) Celuloza MN300	1) AcOEt: HCOOH: CH ₃ COOH:H ₂ O (100:11:1:26 v/v) 2) AcOEt: MeOH: H ₂ O (63:12:9 v/v) 3) 1-BuOH: AcOH: H ₂ O (60:15:75 v/v) 4) (2:98 v/v) 5) AcOH:H ₂ O (15:85 v/v) 6) CH ₃ Cl:AcOH: H ₂ O (50:45:5 v/v)	flawonoidy	<i>Cymbopogon citratus</i>	1) Spryskanie 1% roztw. boranu 2-aminoetylo-difenyloвого w MeOH oraz 5% roztw. PEG 400 w EtOH Dla ukladów od 2-6 stosowano obserwacje pod lampą UV przy λ=366 nm	[20]	Do analizy flawonoidów zawartych w frakcjach otrzymanych za pomocą chromatografii semiprep. RP-HPLC zastosowano 6 ukladów chromatograficznych TLC
8	LLPC-TLC	Si 60 F ₂₅₄	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (85:15)	kwercetyna i jej glikozydy	<i>Nymphaea pulchella</i> , <i>gracilis i elegans</i>	Spryskanie roztworem [(NH ₄) ₄ Ce(SO ₄) ₄ *2H ₂ O]-H ₂ SO ₄	[21]	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymanych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej
9	LLPC-TLC	Si 60 F ₂₅₄	AcO- Et:HCOOH:CH ₃ COOH:H ₂ O (100:11:1:26)	Flawonoidy, w tym kwercetyna	<i>Acacia pennata</i>	Spryskanie płetek NP/PEG i obserwacja w świetle UV o λ=254 nm oraz λ=366 nm	[22]	Identyfikacja głównych grup składników zawartych w ekstraktach <i>Acacia pennata</i> otrzymanych za pomocą różnych ekstrahentów

10	LLPC-TLC	Si60 F ₂₅₄ (20 cm×20 cm, 0,2 mm)	<i>n</i> -heksan/AcOEt/ MeOH (100/15/1(v/v))	naftochinony	<i>Arnebia densiflora</i>	Skaner TLC λ= 520 nm	[23]	Do analizy ilościowej naftochinonów zastoso- wano połączenie techniki TLC z densy- tometrią
11	RP-TLC	RP-18 F ₂₅₄	MeOH:H ₂ O 1:1 (v/v)	glukozyd 4-hydroksy naftochinonu; rossoli- zyd; glukozyd hydro- plumbaginy, plumbaga- gina; ramentaceon	<i>Drosera rotundifolia</i> <i>Drosera intermedia</i>	Obserwacja w świecie widzial- nym oraz w świe- tle UV o λ= 365 nm	[18]	Analiza metabolitów zawartych w metano- lowych ekstraktach z <i>D. rotundifolia</i> oraz <i>D. intermedia</i>
12	RP-TLC	RP-18 F ₂₅₄	H ₂ O:MeOH: CH ₃ CN (3:2:1)	kwercetyna i jej glikozydy	<i>Nymphaea pulchella</i> , <i>Nymphaea gracilis</i> i <i>Nymphaea elegans</i>	Spryskanie roz- tworem [(NH ₄) ₄ Ce(SO ₄) ₄ *2H ₂ O]-H ₂ SO ₄	[21]	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymana- nych za pomocą ko- lumnowej chromatogra- fii cieczowej

Rozdzielanie, oznaczanie i izolowanie naftochinonów oraz flawonoidów z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w normalnym i odwróconym układzie faz oraz w warunkach chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie

(Separation, determination and isolation of naphthoquinones and flavonoids using high performance liquid chromatography (HPLC) in normal and reverse phase and Liquid-Liquid Partition Chromatography)

Obecnie, najczęściej stosowaną techniką do rozdzielania, oznaczania bądź izolowania naftochinonów oraz flawonoidów jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC).

W tabeli 2 przedstawiono warunki rozdzielania, oznaczania lub izolowania naftochinonów i flawonoidów w ekstraktach roślinnych w normalnym układzie faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (NP-HPLC), odwróconym układzie faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC) oraz w warunkach chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC).

Najczęściej stosowanym układem chromatograficznym do analizy zawartości naftochinonów i flawonoidów w ekstraktach roślinnych jest układ faz odwróconych (RP-HPLC) w warunkach izokratycznych, albo z zastosowaniem elucji gradientowej. Od wielu lat, i najczęściej także obecnie, jako fazy stacjonarne stosowane są fazy wiązane z niepolarnymi ugrupowaniami o osiemnastu atomach węgla (C18) [30-31, 33-34, 36, 38-40], dwunastu atomach węgla (C12) [32] oraz ośmiu atomach węgla (C8) [35]. Średnica ziaren wypełnienia kolumny, podczas rozdzielania i oznaczania metabolitów, wynosi najczęściej 5 µm, rzadziej 4 lub 3 µm, a podczas rozdzielania semi-preparatywnego, mającego na celu izolację metabolitów, najczęściej stosowane jest wypełnienie kolumny o ziarnach 10 µm [17].

Jako eluenty wykorzystuje się mieszaniny wody oraz rozpuszczalnika organicznego [30-40] tj.: metanolu, acetonitrylu, rzadziej tetrahydrofuranu. Często, dodatek do eluentu stanowi kwas np. mrówkowy, octowy lub trifluoroctowy, w celu zmiany pH eluentu, cofnięcia dysocjacji kwasowej, oraz zwiększenia w ten sposób hydrofobowości rozdzielanych i oznaczanych substancji.

Składniki ekstraktów rozdziela się i oznacza przeważnie przy użyciu warunków elucji gradientowej, ze względu na różnorodny skład ekstraktu roślinnego, uzyskuje się w ten sposób krótszy czas analizy i oszczędność eluentów. Alternatywą jest stosowanie elucji skokowej, albo tzw. rozdzielania wielowymiarowego.

Najczęstszym detektorem w przypadku rozdzielania i oznaczania składników ekstraktów roślinnych techniką HPLC jest detektor spektrofotometryczny z matrycą fotodiodową (UV-VIS/DAD), lub spektrometr masowy (ESI-MS), rzadziej detektor refraktometryczny (RI) i oczywiście tylko w warunkach elucji izokratycznej.

Druga grupa metod separacyjnych, stosowana często dawniej, a obecnie rzadziej to wysokosprawna chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz (NP-HPLC). Fazą stacjonarną najczęściej wykorzystywaną jest wówczas żel krzemionkowy 60 lub 100 Å. W literaturze opisano także stosowanie związanych faz stacjonarnych typu: - CN, DIOL (odpowiednio cyjanopropylowa [26] i dihydroksypropylowa [27] faza związana z żelem krzemionkowym), oraz mieszaniny n-heksanu, chloroformu, dichlorometanu, 2-propanolu, octanu etylu, dioksanu oraz tetrahydrofuranu, w różnym stosunku objętościowym jako składniki eluentu [17, 24-29].

Chromatografia podziałowa ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC/NP-W) jest rzadko stosowana w technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Jednak podczas jednoczesnego rozdzielania naftochinonów oraz flawonoidów, różniących się znacznie polarnością, jest ona przydatna, ze względu na zmniejszenie retencji rozdzielanych metabolitów i wzrost retencji polarnych składników ekstraktów oraz ma miejsce wyraźne zwiększenie pojemności separacyjnej układu, stąd mimo wyraźnej asymetrii pików spowodowanej nieliniowością izoterm sorpcji, tego rodzaju układy rozdzielcze mają szczególnie korzystne właściwości w skali preparatywnej [41]. Jako fazy stacjonarne w LLPC-HPLC stosuje się żel krzemionkowy lub żel krzemionkowy modyfikowany grupami dihydroksypropylowymi (DIOL), a jako fazy ruchome wykorzystuje się mieszaniny eterów alifatycznych i cyklicznych lub węglowodory alifatyczne i ich chloropochodne jako nisko-polarne składniki eluentu z metanolem, izopropanolem, acetonitrylem, jako polarne składniki eluentu, przy czym eluent posiada wodę w ilości zbliżonej do nasycenia się nią eluentu [29, 41-42].

Tabela 2. Warunki rozdzielania, oznaczania lub izolowania naftochinonów i flawonoidów w ekstraktach roślinnych w normalnym układzie faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (NP-HPLC), odwróconym układzie faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC) oraz w warunkach chromatografii podziałowej cieczy-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC)

Table 2. Conditions of separation, determination and isolation of naphthoquinones and flavonoids from the plants extracts in normal phase high performance liquid chromatography (NP-HPLC), reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and Liquid-Liquid Partition Chromatography (LLPC)

Lp. (Nr)	Odmiana techniki HPLC (Type of technique HPLC)	Faza stacjonarna (Stationary phase)	Faza ruchoma (Mobile phase)	Rozdzielane/ oznaczone metabolity (Separated/ determined metabolites)	Materiał roślinny (Plant material)	Warunki detekcji (Detection conditions)	Lit. (Ref.)	Uwagi (Comments)
1	NP-CC	Si 60	A: hex B: AcOEt od 100%A do 0%, skokowo co 10% B	Naftochinony, np. ramentaceon	<i>Euclea racemosa</i>	UV-VIS	[17]	Wyzolowano 10 frakcji bogatych w poszczególne metabolity stosując elucję skokową, zwiększając zawartość octanu etylu o 10% v/v
2	NP-CC	semi-prep Si (Merck, 0.063-0.200 mm)	hex : AcOEt; 9:1, 8:2 do 1:1	Oznaczano 6 naftochinonów, w tym: ramentaceon, 5,5'-Dihydroksy-7,7'-binaftochinon	<i>Euclea natalensis</i>	B/d	[24]	W celu wyizolowania frakcji bogatych w poszczególne naftochinony zastosowano semi-preparatywną kolumnową chromatografię cieczową oraz elucję gradientową
3	NP-CC	Si 60	DCM: AcOEt (20:80),	Flawonoidy, w tym: kwercetyna	<i>Buddleja globosa</i>	B/d	[25]	Do identyfikacji otrzymanych frakcji za pomocą chromatografii kolumnowej wykorzystano technikę TLC

4	NP-HPLC	μ Bondapak-CN(300 mm x 3,9 mm, 10 μ m)	CHCOOH: hex, 1% kw. octowego (brak danej dot. stosunku)	plumbagina, ramentaceon, juglon, lawson, izodiospyrin, mamegakinone	<i>Diospyros Usambarensis</i> , Roth	UV $\lambda=254$ nm	[26]	Za pomocą NP-HPLC rozdzielono i oznaczono 6 naftochinonów
5	NP-HPLC	Lichrospher DIOL 250 mm x 4 mm, 5 μ m	A:hex, B:THF 0-15 min 10-50%B 15-25 min 50%B	plumbagina, ramentaceon, kwercetyna i mirycetyna	<i>Dionaea muscipula</i> , <i>Drosera capensis</i>	UV-DAD	[27]	NP-HPLC zastosowano do oznaczania zawartości 2 naftochinonów oraz dwóch flawonoidów w ekstraktach z roślin poddanych elicytacji
6	LLPC-HPLC	μ Spherogel, 30 mm x 8 mm, 10 μ m	hex:CH ₃ Cl: izopropanol (30:70:2 v/v/v)	1,4 naftochinon, plumbagina	<i>Plumbago zeylanica</i>	UV-VIS	[28]	Opracowana metoda ma służyć do szybkiego oznaczania wybranych naftochinonów w ekstraktach z <i>Plumbago Zeylanica</i>
7	NP-HPLC oraz LLPC-HPLC	DIOL LiChrosorb 125 mm x 4 mm	1) Dioksan: heksan: (b/d, v/v/v) 2) dioksan: heksan:MeOH (40:40:20 v/v/v).	Kwercetyna oraz kempferol	<i>Ginkgo Biloba</i>	1) UV-DAD 2) detektor elektrochemiczny ED	[29]	Do oznaczania kwercetyny oraz kempferolu zastosowano dwa układy separacyjne, pierwszy NP-HPLC z detektorem UV-DAD oraz drugi LLPC-HPLC z detektorem ED
8	RP-HPLC	RP-18 (250 mmx10 mm, 10 μ m)	CH ₃ CN:H ₂ O 0 min. 1:1 v/v 40 min. 100:0 v/v	Naftochinony, np. ramentaceon	<i>Euclea racemosa</i>	UV-VIS	[17]	RP-HPLC zastosowano jako kolejny etap po chromatografii kolumnowej do wyizolowania frakcji bogatych w określone naftochinony
9	RP-HPLC	RP 18 (150 mmx4 mm)	CH ₃ CN:0,1% COOH (25:75 v/v)	Flawonoidy, w tym kwercetyna	<i>Buddleja globosa</i>	UV-DAD	[25]	RP-HPLC zastosowano do identyfikacji składników zawartych w frakcjach otrzymanych z zastosowaniem NP-CC

10	RP-HPLC	LiChrospher 100 RP18e (250 mm x 4,0 mm, 5 µm)	H ₂ O:MeOH Program elucji: 0 min 2:98 10 min 50:50 30 min 100:0 40 min 100:0 (v/v)	plumbagina	<i>Plumbago zeylanica</i>	UV-DAD 254 nm	[30]	Opracowaną metodę zwalidowano i wyznaczono parametry tj. LOQ (LOQ=0,06 µg/ml), LOD (LOD=0,02 µg/ml), zakres liniowości (10–200 µg/ml)
11	RP-HPLC	LiChrospher C18 (250 mm x 4 mm)	MeOH:0,5% H ₃ PO ₄ (46:54 v/v)	Flawonoidy np. kwercytyna	<i>Ginkgo biloba</i>	RID oraz UV-DAD 370 nm	[31]	Do oznaczenia flawonoidów w <i>Ginkgo biloba</i> zastosowano detektor spektrofotometryczny typu DAD oraz detektor refraktometryczny. Temperatura termostataowania kolumny wynosiła 35°C.
12	RP-HPLC	Phenomenex C-12 (150 mm x 4,6 mm, 4 µm)	H ₂ O:AcCN; Program elucji: 0 min 85:12 10 min 70:30 20 min 50:50 30 min 20:80	Naftochinony	<i>Eleutherine americana</i>	UV-DAD 254 nm oraz detector MS z pułapką jonową	[32]	Zarówno w analizach z zastosowaniem detektora UV-DAD jak i detektora MS wykorzystano te same warunki chromatograficzne z tym, że do eluentu w analizach MS dodano 0,01% kwas mrówkowy.
13	RP-HPLC	Zorbax C18-AAA 150 mm x 4,6 mm, 3,5 µm	0,1 M CH ₃ COOH: MeOH (33:67 v/v)	Naftochinony: 1,4-naftochinon, plumbagina, juglon, lawson	<i>Dionaea muscipula</i> , <i>D. rotundifolia</i> , <i>D. spatulata</i> , <i>D. capensis</i> , <i>J. regia</i> , <i>P. tomentosa</i> .	UV-VIS-DAD 260 nm	[33]	Autorzy badali także eluenty z inną zawartością metanolu, jednakże ten uznali za najbardziej selektywny i stabilny.
14	RP-HPLC	Nucleosil 100-5 C18 250 mm x 4 mm 5 µm	2,5% HCOOH:100% MeOH Program elucji: 0 min: 95:5 15 min 70:30 40 min 60:40	Związki fenolowe	133 indyjskie rośliny lecznicze	UV-DAD	[34]	Opracowana metoda pozwoliła na oznaczenie jakościowe związków z grup tj. kwasy fenolowe, flawonoidy, kumaryny,

15	RP-HPLC	Agilent C8 250 mm x 4,6 mm 5 µm	60 min 50:50 65 min 45:55 90-98 min 0:100 A: H ₂ O/HCOOH 100:0,2 v/v B: MeOH/THF 100:5 v/v Program elucji: 0 min 41: 59 40 min 31: 69 60 min 30: 70 70 min 28,5: 71,5 80 min 0:100	Naftochinony	9 gatunków roślin z rodziny <i>Boraginaceae</i>	UV-DAD 214 nm 275 nm 520 nm	[35]	Opracowano metodę oznaczania jakościowego i ilościowego ośmiu naftochinonów w dziewięciu gatunkach roślin z rodziny <i>Boraginaceae</i>
16	RP-HPLC	Hypersil-ODS 125 mm x 4,6 mm 5 µm	0,025M H ₃ PO ₄ :100% MeOH Program elucji: 0 min-3 min 82:18 11 min-14 min 55:45	Oznaczano 5 flawonoidów, w tym kwercycytynę i kempferol	<i>Semen cuscutae</i>	UV-DAD 360 nm	[36]	Zbadano 40 próbek materiału roślinnego zebranego z różnych regionów Chin w celu oznaczenia zawartości pięciu wybranych flawonoidów. Opracowana metoda charakteryzuje się liniowością >0,999 w szerokim zakresie stężeń metabolitów.
17	RP-HPLC	Brak danych	MeCN:H ₂ O:AcOH 62,5:32,5:5	Oznaczano 5 Naftochinonów, w tym ramentaceon oraz szikoninę	<i>Euclea natalensis</i>	UV-DAD, 430 i 352 nm	[37]	Do oznaczenia ilościowego 4 naftochinonów zastosowano dł. fali 430 nm, a do oznaczenia szikoniny zastosowano dł. fali 352 nm
18	RP-HPLC	Hypersil BDS 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	95%CH ₃ CN+5%THF; 0,2M CH ₃ COOH 38:62	Naftochinony i flawonoidy	<i>D.rotundifolia</i> <i>D.madagascariensis</i>	UV-DAD	[38]	Opracowana metoda pozwoliła na jednoczesne oznaczenie naftochinonów oraz flawonoidów w dwóch gatunkach roślin

19	RP-HPLC	Bondapak C18 300x3,9 mm	MeOH:H ₂ O 8:2 + 0,1% TFA	plumbagina	<i>Plumbago rosea</i> L.	UV-VIS 254 nm	[39]	RP-HPLC zastosowano do oznaczania zawartości plumbaginy w ekstraktach z roślin poddanych elicytacji
20	RP-HPLC	Superspher 100 RP18 250x2 mm, 5 µm	A: H ₂ O:CH ₃ CN: HCOOH 94,5:5: 0,5 v/v B: H ₂ O:CH ₃ CN: HCOOH 5:94,5: 0,5 v/v Program elucji: 0-5 min. A:B 90:10 5-32 min A:B 70:30 32-40 min A:B 0:100	Naftochinony i Fla- wonoidy, w tym plumbagina	<i>D. adelae</i> , <i>D. aliciae</i> , <i>D. capensis</i> , <i>D. cuneifolia</i> , <i>D. ramanacea</i> <i>D. binata</i>	UV-DAD 259 nm i ESI/MS	[40]	Opracowana metoda z zastosowaniem detekto- ra UV-DAD i ESI/MS pozwoliła na zbadanie składu metabolicznego pięciu gatunków roślin oraz wyznaczenie gatun- ku, w którym występuje największe stężenie plumbaginy

2. Podsumowanie (Conclusion)

Chromatografia cieczowa, zarówno cienkowarstwowa jak i kolumnowa, znajduje szerokie zastosowanie w rozdzielaniu, oznaczaniu oraz izolacji metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów i flawonoidów w materiale roślinnym.

Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej metabolity rozdzielane są w układzie faz normalnych (NP-TLC) w warunkach adsorpcyjnych, bądź z zastosowaniem chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC-TLC), a rzadziej z wykorzystaniem odwróconego układu faz (RP-TLC). W przypadku rozdzielania i oznaczania naftochinonów i flawonoidów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej głównie stosowany jest odwrócony układ faz (RP-HPLC), a rzadziej NP-HPLC w warunkach adsorpcyjnych lub LLPC-HPLC. Jednakże do izolowania metabolitów roślinnych w skali semi-preparatywnej bądź preparatywnej wykorzystywana jest najczęściej kolumnowa chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz lub z zastosowaniem chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC). Złożoność matrycy próbki materiału roślinnego oraz rodzaj wykorzystywanego detektora, decyduje o zastosowaniu elucji izokratycznej bądź gradientowej.

W literaturze istnieje wiele procedur rozdzielania metabolitów roślinnych [14-41], jednak dotychczas nie opracowano procedury uniwersalnej, przydatnej do rozdzielania metabolitów większej grupy roślin. Warunki rozdzielania zaproponowane w literaturze są odpowiednie dla ekstraktów otrzymanych z konkretnych roślin, poddanych określonym warunkom elicytacji i otrzymanych w określonych warunkach ługowania. W przypadku pojawienia się w ekstrakcie dodatkowych substancji, będących wynikiem zmiany hodowli czy sposobu ekstrakcji stają się one nieskuteczne, albo tylko częściowo skuteczne.

3. Podziękowania (Acknowledgments)

Praca realizowana dzięki wsparciu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu promotorskiego Nr N N405 3757 37.

Praca współfinansowana przez Unie Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Projekt systemowy Województwa Pomorskiego pn. "InnoDoktorant - stypendia dla doktorantów, II edycja.

Literatura (Literature)

1. F. Gafner, J.C. Chapuis, J.D. Msonthi, K. Hostettmann, *Cytotoxic naphthoquinones, molluscicidal saponins and flavonols from Diospyros zombensis*, *Phytochemistry*, **26**(1987)2501.

2. P.P. Mebe, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, *Pentacyclic triterpenes and naphthoquinones from Euclea divinorium*, *Phytochemistry*, **47**(1998)311.
3. A. Wube, B. Streit, S. Gibbons, K. Asres, F. Bucar, *In vitro 12(S)-HETE inhibitory activities of naphthoquinones isolated from the root bark of Euclea racemosa ssp. Schimperii*, *J. Ethnopharmacol.*, **102**(2005)191.
4. G. Bringmann, D. Feineis, *Stress-related polyketide metabolism of Dioncophyllaceae and Ancistrocladaceae*, *J. Exp. Bot.*, **52**(2001)2015.
5. K.C.G. De Moura, F.S. Emerya, C. Neves-Pinto, Pinto MCFR, Dantas AP, Salomão K, Castro S.L., Pinto A.V., *Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from Tabebuia and Some Heterocyclic Derivatives: A Review from an Interdisciplinary Study*, *J. Braz. Chem. Soc.*, **12**(2001)325.
6. S. Kohlmünzer, „Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji.” Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003.
7. M.M. Cowan, *Plant Products as Antimicrobial Agents*, *Clin. Microbiol.*, **12**(1999)564.
8. T. Tokunaga, N. Takada, M. Ueda, *Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defense in carnivorous plant*, *Tetrahedron Lett.*, **45**(2004)7115.
9. T.P. Cushnie, A.J. Lamb, *Antimicrobial activity of flavonoids*, *J. Antimicrob. Agents.*, **26**(2005)343.
10. E. Jr. Middleton, C. Kandaswami, T.C. Theoharides, *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*, *Pharmacol. Rev.*, **52**(2000)673.
11. P.G. Pietta, *Flavonoids as Antioxidants*, *J. Nat. Prod.*, **63**(2000)1035.
12. Z. Zhu, C. Li, N.Q. Li, *Electrochemical studies of quercetin interacting with DNA*, *Microchem. J.*, **71**(2002)57
13. Z. Jerzmanowska, *Substancje roślinne. Metody wyodrębniania*, PWN, Warszawa 1970.
14. N. Didry, L. Dubreuil, F. Troitin, M. Pinkas, *Antimicrobial activity of aerial parts of Drosera peltata Smith on oral bacteria*, *J. Ethnopharmacol.*, **60**(1998)91.
15. T. Sreelatha, A. Hymavathi, J. Madhusudhana Murthy, P.U. Rani, J. Madhusudana Rao, K. Suresh Babu, *A new benzil derivative from Derris scandens: Structure-insecticidal activity study*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**(2010)549.
16. J.J. Marion-Meyer, F. Kooy, A. Joubert, *Identification of plumbagin epoxide as a germination inhibitory compound through a rapid bioassay on TLC*, *S. Afr. J. Bot.*, **73**(2007)654.
17. A. Wube, B. Streit, S. Gibbson, K. Ares, F. Bucar, *In vitro 12(S)-HETE inhibitory activities of naphthoquinones isolated from the root bark of Euclea racemosa ssp. Schimperii*, *J. Ethnopharm.*, **38**(2005)325.
18. J. Budzianowski, *Naphthoquinone glucosides of Drosera rotundifolia and D. intermedia from in vitro cultures*, *Phytochem.*, **44**(1996)1145.
19. M. Sannomiya et al., *Flavonoids and antiulcerogenic activity from Byrsonima crassa leaves extracts*, *J. Ethnopharmacol.*, **97**(2005)1.

20. A. Figueirinha, A. Paranhos, J.J. Pe´rez-Alonso, C. Santos-Buelga, M.T. Batista, *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols, *Food Chem.*, **110**(2008)718.
21. S. Marquina, J. Bonilla-Barbosa, L. Alvarez, *Comparative phytochemical analysis of four Mexican Nymphaea species*, *Phytochem.*, **66**(2005)921.
22. A.B. Dongmo, T. Nguiefack, M.A. Lacaille-Dubois, *Antinociceptive and anti-inflammatory activities of Acacia pennata wild (Mimosaceae)*, *J. Ethnopharmacol.*, **98**(2005)201.
23. Bozan B., Baser K.H.C., Kara S., *Quantitative Determination of Naphthoquinones of Arnebia densiflora by TLC-Densitometry*, *Fitoterapia*, **70**(1999)402.
24. F. van der Kooy, J.J.M. Meyer, N. Lall, *Antimycobacterial activity and possible mode of action of newly isolated neodiospyrin and other naphthoquinones from Euclea natalensis*, *S. Afr. J. Bot.*, **72**(2006)349.
25. N. Backhouse, L. Rosales, C. Apablaza, L. Goity, S. Erazo, R. Negrete, C. Theodoluz, J. Rodriguez, C. Delporte, *Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of Buddleja globosa, Buddlejaceae*, *J. Ethnopharmacol.*, **116**(2008)263.
26. A. Marston, K. Hostettmann, *High-performance liquid chromatography of some naturally occurring naphthoquinones*, *J. Chromatogr.*, **295**(1984)526.
27. A. Krolicka, A. Szpitter, E. Gilgenast, G. Romanik, M. Kaminski, E. Lojkowska, *Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in in vitro carnivorous plants by addition of elicitors*, *Enzym. Microb. Tech.*, **42**(2008)216.
28. M.M. Gupta, R.K. Verma, G.C. Uniyal, S.P. Jain, *Determination of plumbagin by normal-phase high-performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr.*, **637**(1993)209.
29. R. Aguilar-Sánchez F. A´huatl-García, M.M. Davila-Jimenez, M.P. Elizalde-Gonzalez, M.R.G. Guevara-Villa, *Chromatographic and electrochemical determination of quercetin and kaempferol in phytopharmaceuticals*, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, **38**(2005)239.
30. Y. Wang, T. Huang; *High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-Helicobacter pylori compound of Plumbago zeylanica L.*, *J. Chromatogr. A*; **1094**(2005)99.
31. K. Chiu, Y. Cheng, J. Chen, C.J. Chang, P. Yang; *Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids*, *J. Supercritical Fluids*; **24**(2002)77.
32. S. Paramapojn, M. Ganzera, W. Gritsanapan, H. Stuppner; *Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant Eleutherine americana by RP-HPLC and LC-MS*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **47**(2008)990.
33. P. Babula, R. Mikelova, V. Adam, R. Kizek, L. Havel, Z. Sladky, *Using of liquid chromatography coupled with diode array detector for determi-*

- nation of naphthoquinones in plants and for investigation of influence of pH of cultivation medium on content of plumbagin in Dionaea muscipula*, J. Chromatogr. B, **842**(2006)28.
34. S. Surveswaran, Y. Cai, H. Corke, M. Sun; *Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants*, Food Chem., **102**(2007)938.
 35. Y. Hu, Z. Jiang, K.S. Leung, Z. Zhao; *Simultaneous determination of naphthoquinone derivatives in Boraginaceous herbs by high-performance liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta, **577**(2006)26.
 36. M. Ye, Y. Li, Y. Yan, H. Liu, X. Ji; *Determination of flavonoids in Semen Cuscutae by RP-HPLC*, J. Pharm. Biomed. Anal., **28**(2002)621.
 37. M.J. Bapela, N. Lall, J.J.M. Meyer, *Seasonal variation of naphthoquinones in Euclea natalensis subspecies natalensis*, J. S. Afr. Bot., **74**(2008)218.
 38. D.H. Paper, E. Karall, M. Kremser, L. Krenn; *Comparison of the anti-inflammatory effects of Drosera rotundifolia and Drosera madagascariensis in the HET-CAM assay*, Phytother. Res., **19**(2005)323.
 39. P. Komaraiah, R. Naga Amrutha, P.B. Kavi Kishor, S.V. Ramakrishna, *Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of Plumbago rosea L.*, Enzyme and Microbial. Technology, **31**(2002)634.
 40. Ł. Marczak, A. Kawiak, E. Łojewska, M. Stobiecki, *Secondary metabolites in in vitro cultured plants from the Drosera genus*, Phytochem. Anal., **16**(2005)143.
 41. M. Kamiński, B. Śledzińska, J. Klawiter, *Studies on the optimization of parameters of preparative liquid chromatographic columns for production of cardiac glycosides*, J. Chromatogr., **367**(1986)45.
 42. V.R. Meyer, *Practical high-performance liquid chromatography*, John Wiley & Sons 1988.