

**Dominik KOŁODZIEJSKI^{1*}, Anita SKRZYPCZAK²,
Ewelina GILGENAST², Aleksandra KRÓLICKA³, Marian KAMIŃSKI²**

¹ Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny,
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności,
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
e-mail: *kolodziejski.dominik@gmail.com**

² Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny,
Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej,
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk

³ Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Wydział Biotechnologii,
ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Porównanie efektywności wybranych technik ekstrakcji/ługowania metabolitów wtórnych z suchego materiału roślin owadożernych z hodowli *in vitro*

A comparison of efficiency of secondary metabolites extraction/leaching techniques from carnivorous plants dry material from *in vitro* culture

Streszczenie: W roślinach owadożernych za efekt terapeutyczny odpowiadają głównie pochodne 1,4-naftochinonu (juglon) oraz flawonoidy. Ze względu na interesujące właściwości tych związków oraz możliwość synergicznego działania wielu innych metabolitów wtórnych na efekt terapeutyczny, podjęto pracę przygotowania technologii efektywnego wyodrębniania tych związków z tkanek roślinnych. W publikacji porównano efektywność różnych technik ekstrakcji i ługowania. Jako materiał badany posłużyły wysuszone i rozdrobnione rośliny owadożerne z rodziny Droseraceae: *Dionaea muscipula*, bogata w pochodną 1,4-naftochinonu-plumbaginę oraz *Drosera aliciae*, bogata w ramentaceon. Zbadany został wpływ temperatury na efektywność ekstrakcji/ługowania.

Wykazano, że zastosowane, nowoczesnej techniki ekstrakcji – ługowania pozwala na skrócenie czasu przygotowania wsadu do rozdzielania, bez utraty zawartości metabolitów w ekstraktach – ługach, w stosunku do stosowania technik i warunków tradycyjnych. Jednocześnie, w przypadku nietrwałych termicznie metabolitów wtórnych, krótki czas operacji i możliwość jej wykonywania w stosunkowo niskiej temperaturze, zapewnia wyższy stopień ekstrakcji/ługowania, niż stosowanie tradycyjnych technik i warunków. Otrzymane wyniki stanowią podstawę do opracowania technologii pozyskiwania w sposób ciągły, ekstraktów/ługów bogatych w metabolity roślinne lub grzybowe, a także składniki tkanek zwierzęcych, na większą skalę, do przemysłowej, włącznie.

Słowa kluczowe: Ekstrakcja, Ługowanie, Metabolity wtórne, 1,4-Naftochinony, Flawonoidy, Rośliny owadożerne

Abstract: Plants from the Droseraceae family are interesting because of the secondary metabolites profile that results from their way of nutrition. The use of carnivorous plants in medical treatment was

first mentioned in the 12th century. It was applied to heal human air passages infections. This therapeutic effect is caused by secondary metabolites. The most widely known are 1,4-naphthoquinones (for example: plumbagin, ramentaceone), which have antibacterial and anticancer activity. It is caused by the ability to generate Reactive Oxygen, inhibition of topoisomerase, and inactivation of DNA. Moreover, carnivorous plants contain flavonoids (quercetin and myricetin), which are stronger antioxidants than vit. C and E. Furthermore, in our research material we found more than 20 different, already identified and unrecognized metabolites. This variety of discovered substances could potentially indicate a synergic therapeutic effect.

This study was conducted to develop the most efficient procedure to isolate metabolites from plants or fungi using Droseraceae as an example of plants contained very important metabolites and in relative high concentration. The conclusions from this research should be valid also for extraction/leaching of metabolites from other plants. The following extraction/leaching techniques were compared: Soxhlet extraction in Soxtec[®] device, Microwave assisted extraction (MAE), Ultrawave assisted extraction (UAE), homogenization in a high-shear mixer and maceration with stirring. The influence of time and temperature was investigated, in order to find optimal conditions for each operation. As an experiment material plants from Droseraceae species were used: *Dionaea muscipula* and *Drosera aliciae* - which are riched in 1,4-naphthoquinones: plumbagin or ramentaceone.

It was concluded that modern extraction/leaching techniques using ultrawaves or microwaves are less time-consuming without causing any additional metabolites loss in comparison to traditional methods. Additionally, for metabolites with low thermal stability, shorter operation time is more preferable. It have been also concluded on the basis of our study, that some of searched operations can be relative simple apply for an industrial scale and continuous operation.

Key words: Extraction, Leaching, Metabolites, 1,4-Naphthoquinones, Flavonoids, Carnivorous Plants

1. Wstęp (Introduction)

Rośliny owadożerne należą do gromady roślin okrytonasiennych (Angiospermae) i obejmują ponad 600 gatunków [1, 2]. Znalazły się one w kręgu zainteresowania biologów i chemików ze względu na cudzożywny sposób odżywiania. Rekompensuje on braki w składnikach odżywczych w podłożu (miejsce występowania: bagna, torfowiska, tereny skalne). Jednakże taka forma odżywiania jest „energetycznie kosztowna”, dlatego też u roślin owadożernych ograniczona została aktywność fotosyntezy [3].

Już w medycynie ludowej znano zastosowanie roślin owadożernych w leczeniu: bronchitu, kaszlu czy astmy [4]. Obecnie wiadomo, że za właściwości lecznicze odpowiadają metabolity wtórne. Do najważniejszych należą związki z grupy naftochinów oraz flawonoidów. Naftochinony w roślinach owadożernych, m.in. w Droseraceae, to pochodne 1,4-naftochinonu (juglon). Badając poszczególne gatunki wykazano, że każdy z nich posiada jedną z pochodnych juglonu w stosunkowo wysokich stężeniach: plumbaginę (5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon; 2-metylojuglon) lub ramentaceon (5-hydroksy-7-metylo-1,4-naftochinon; 7-metylojuglon). Są one izomerami strukturalnymi. Posiadają więc podobne właściwości fizyko-chemiczne. Dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: eter etylowy, chloroform, dichlorometan, słabiej w metanolu, natomiast bardzo słabo w wodzie. Podstawową rolą naftochinonów syntetyzowanych przez rośliny owadożerne jest obrona przed mikroorganizmami, owadami i roślino-

żercami [5]. Związki te wykazują także aktywność przeciwnowotworową [6], a szczególnie aktywność przeciwbakteryjną, w stosunku do bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych (w tym do metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* – MRSA) oraz przeciw pasożytniczą [7, 8]. Właściwości te związane są ze zdolnością do generacji aktywnych form tlenu, inhibicją enzymów topozomeraz oraz oddziaływaniem z DNA [8].

Innymi metabolitami występującymi w roślinach owadożernych są flawony z rodziny flawonoidów [9]. W roślinach z rodziny Droseraceae są to głównie: kwercetyna (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon) oraz mirycetyna (3,3',4',5,5',7-heksahydroksyflawon). Związki te posiadają szereg właściwości biologicznych takich jak: przeciwalergiczną, przeciwzapalną, przeciwbakteryjną, przeciwzkrzepową, przeciwutleniającą, działają ochronnie na serce i rozszerzają naczynia krwionośne [10]. Wykazano skuteczne działanie flawonolów w leczeniu zapalenia jelit oraz okrężnicy, a także działanie chroniące błony śluzowe przed owrzodzeniem [11]. Ponadto związki te zakłócają transport ksenobiotyków w organizmie [12] oraz wspomagają leczenie cukrzycy typu II [13].

Ze względu na ciekawe właściwości wyżej opisanych metabolitów, cełowa jest optymalizacja procesu ich pozyskiwania z opisywanych roślin, z hodowli *in vitro* w także na skalę przemysłową. Takie procedury hodowli i otrzymywania związków biologicznie czynnych jest alternatywą dla często bardzo kosztownej i czasochłonnej syntezy chemicznej, jak również pod względem proekologicznym. Jednakże aby ten postulat zrealizować należało najpierw opracować optymalne warunki ekstrakcji/ługowania metabolitów z wysuszonego materiału roślinnego w skali laboratoryjnej, czego rezultatem jest niniejsza praca. Naszym celem było porównanie efektywności technik ekstrakcji/ługowania naturalnych związków bioaktywnych z wysuszonego materiału z roślin owadożernych: *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae*, hodowanych w warunkach *In vitro*. Na efektywność procesu wpływa wiele czynników, takich jak: zastosowana technika ekstrakcji/ługowania, temperatura, czas trwania operacji, dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, stosunku masy materiału badanego do objętości rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji oraz charakterystyka materiału badanego. Bardzo istotny jest stopień adsorpcji składników ekstrahowanych do powierzchni wysuszonych błon komórkowych i organelli. Gdy jest on wysoki konieczne jest zastosowanie rozpuszczalnika powodującego efektywną desorpcję. Należy również zwrócić uwagę na zastosowanie optymalnej temperatury operacji w zależności od trwałości termicznej metabolitów.

W tabeli 1 przedstawiono i scharakteryzowano opisane w literaturze warunki prowadzenia ekstrakcji/ługowania metabolitów z materiału roślinnego. Opisane są zarówno czasochłonne, klasyczne techniki ekstrakcji/ługowania: maceracja czy ekstrakcja w aparacie Soxhlet'a, jak również nowoczesne, szybkie techniki ekstrakcji/ługowania, wspomagane działaniem fal ultradźwiękowych (UAE-*Ultrawave Assisted Extraction*), mikrofalowych (MAE-*Microwave Assisted Extraction*) czy sił ścinających. W przypad-

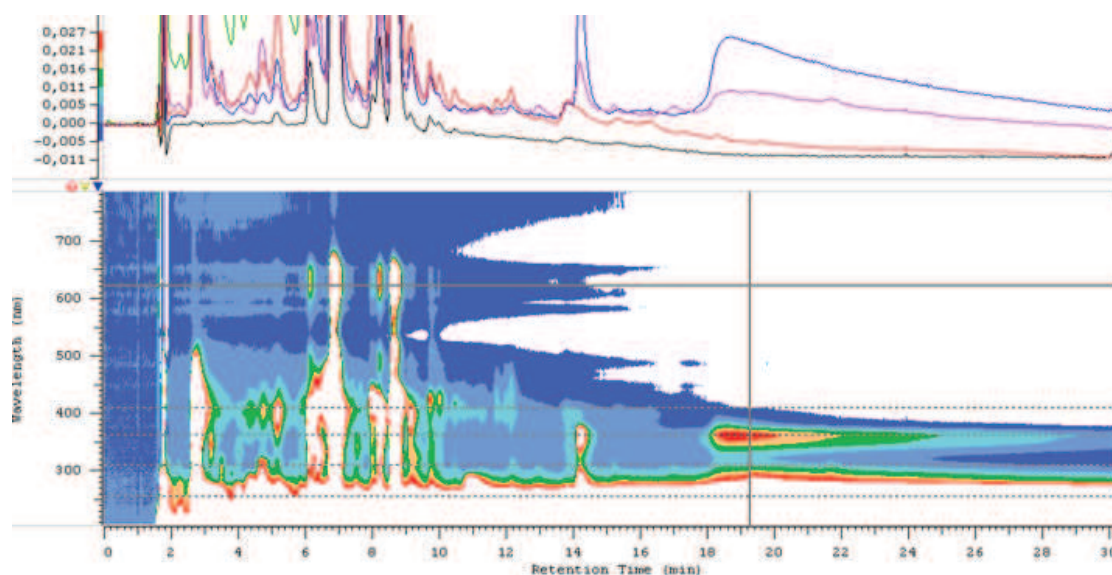
Tabela 1. Zestawienie przeglądu literatury dotyczącej technik ekstrakcji /ługowania metabolitów z materiału roślinnego**Table 1.** Results of literature review of metabolites extraction/leaching techniques from plant material

Material badany (Plant Material)	Składnik podlegający ekstrakcji /ługowaniu (Extracted /leached compounds)	Stosowana technika (Used technique)	Warunki operacji (Operation parameters)	Udział: materiał / rozpuszczalnik (Material / solvent participation)	Rozpuszczalnik (Solvent)	Lit. / Ref.
Propolis - Propolis	Fenole, Flawonoidy	UAE - łaźnia	30 min, 25°C	1 g / 20 ml	70% EtOH 30% H ₂ O	[14]
	Inne metabolity	MAE	2 x 10 s, 25°C	1 g / 10 ml		
Hypericum perforatum - Dziurawiec zwyczajny	Kwas chlorogenowy, rutyna, 3-O-glukozyd kwercetyny izokwercetyna, kwercetyna, amantoflawon, pseudohipercyna	Soxhlet	24 h / temp. wrzenia	1 g / 200 ml		[15]
Citrus latifolia Citrus sinensis - cytryny	Flawonoidy	UAE - łaźnia	30-60 min; 40°C, 60 kHz		MeOH	[16]
Mentha spicata L. - Mięta zielona	Flawonoidy: katechiny, epikatechiny, rutyna, mirycetyna, luteolin,	Soxhlet	6 h / temp. wrzenia	1 g / 50 ml	EtOH	[17]
Radix Astragali - korzeń Traganka	Flawonoidy	MAE	110°C, 5 min	1 g / 25 ml	90% EtOH 10% H ₂ O	[18]
Vitis vinifera - winorośl właściwa (skórka)	Antocyjaniany i Flawonole: kwercetyna, mirycetyna, kemferol, larycytyna	UAE	20 min	1 g / 10 ml	50% MeOH 50% H ₂ O	[19]
Diospyros canaliculata Diospyros crassiflora -Persemona, Hurma	Plumbagina	Maceracja z wytrząsaniem	48 h , 25°C	3 g / 10 ml	MeOH	[20]
Dionaea muscipula , - muchołówka amerykańska	Plumbagina	UAE - dezintegrator	30 min, 40°C 150W, 38 kHz	1 g / 5 ml	MeOH	[21]

ku tych drugich korzystne jest znaczne skrócenia czasu operacji co ułatwia realizację operacji w sposób ciągły, a także umożliwia stosowanie względnie niskich temperatur. Materiał roślinny, bywa najczęściej przed operacją rozdrabniany w zakresie 10-80 mesh. Do ekstrakcji/ługowania używa się rozpuszczalników polarnych głównie metanolu i etanolu oraz ich mieszanin z wodą, szczególnie gdy ekstrahowane/ługowane są metabolity polarne i ich glikozydy. W przypadku, gdy mamy do czynienia ze związkami nisko i średnio polarnymi zastosowanie mają takie rozpuszczalniki jak: chloroform, eter

etylowy, dichlorometan, itd. Stosunek materiału badanego do rozpuszczalnika wynosi od 0,005 do 0,1. Wiele spośród metabolitów jest nietrwała termicznie, co również przedstawiają otrzymane wyniki, dlatego bezcelowe jest znaczne podwyższanie temperatur operacji.

Literatura dotycząca badań nad efektywnością technik ekstrakcji/ługowania metabolitów z materiału roślinnego jest stosunkowo uboga. Nasuwa się wniosek o istotności prowadzenia badań naukowych w tej dziedzinie. Jest to dość czaso- i praco-chłonne, ze względu na dobór warunków prowadzenia najefektywniejszej techniki ekstrakcji/ługowania dla danego materiału roślinnego. Chociaż można przewidzieć właściwości fizykochemiczne danych związków, to dochodzi do tego odmienna budowa roślin oraz współzależności pomiędzy innymi metabolitami. Na przykład w roślinach owadożernych oprócz wspomnianych już metabolitów występują ponad 20 innych związków (rys.1) m.in. karetonoidy, chlorofil, oraz związki do tej pory nie zidentyfikowane.



Rys. 1. Przykład chromatogramu UV-DAD uzyskanego podczas rozdzielania ekstraktu metanoleowego. Ekstrakcję/ługowanie wykonano z zastosowaniem dezintegratora ultradźwiękowego w czasie 4 min w 50°C z rozdrobnionego materiału roślinnego *Dionaea muscipula* poddanego hydrolizie kwaśnej. Chromatogram uzyskany z zastosowaniem techniki NP-HPLC, kolumna: LiChrospher DIOL, 5 μ m, 250 mm x 4 mm, przepływ 1,5 ml/min do 30 min i 2 ml/min od 30 min, backflush w 30 minucie, temperatura 20°C, objętość dozowana 20 μ l, stężenie próbki 0,1 g suchej masy roślinnej / 1 ml ekstrahentu, eluenty A:n-heksan B:THF, program elucji w gradiencie stężeń: 0-15 min 90:10 (A:B, v/v) 15-45 min 50:50 (A:B, v/v) 45-48 min 90:10 (A:B v/v)

Fig. 1. An example of UV-DAD chromatogram of methanol extract separation. Extraction /leaching operation was made using Ultrasonic disintegration by 4 min. in 50°C. As a dry plant material, *Dionaea muscipula* was used. Also acid hydrolysis of glycosides was made. Separation conditions: column-LiChrospher DIOL, 5 μ m, 250 mm x 4 mm, flow-1,5 ml/min to 30 min i 2 ml/min from 30 min, backflush w 30 min., temperature 20°C, sample volume 20 μ l, sample concentration 0.1 g plant dry mass / 1 ml solvent, solvents A:n-hexan B:THF, gradient elution program: 0-15 min 90:10 (A:B, v/v) 15-45 min 50:50 (A:B, v/v) 45-48 min 90:10 (A:B v/v)

Celem niniejszej pracy jest porównanie efektywności wybranych technik ekstrakcji/ługowania metabolitów wtórnych, przede wszystkim z grupy naftochinonów oraz flawonoidów z wysuszonego materiału roślinnego, roślin owadożernych *Drosera aliciae* i *Dionaea muscipula*. Do badań wybrano zarówno techniki „klasyczne”: ekstrakcja/ługowanie metodą Soxhleta[®] czy macerację z mieszaniem, ponieważ są ciągle powszechnie stosowane i stanowią swoisty „stan odniesienia”. Spośród technik nowoczesnych wybrano przede wszystkim te, które można realizować w warunkach ciągłych. Warunkiem dokonywania porównania jest taka sama metodyka wstępnego przygotowania wsadu.

Opis stosowanych technik ekstrakcji/ługowania można znaleźć we wcześniejszej pracy przeglądowej [22].

2. Część eksperymentalna (Experiment)

2.1 Materiały i odczynniki (Materials and reagents)

Materiał roślinny: rośliny owadożerne z gatunku *Drosera aliciae* oraz *Dionaea muscipula* były hodowane w kulturach *in vitro* w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Rośliny owadożerne hodowano na zestalonej 0,7% agarze pożywce Murashige i Skoog [23] o pH 5,6, z obniżoną o połowę ilością makroelementów ($\frac{1}{2}$ MS), zredukowaną ilością sacharozy (20 g/l), z dodatkiem 0,2% węgla aktywnego. Rośliny owadożerne hodowano w fitotronie w temp. 20 - 22°C, przy sztucznym oświetleniu (Philips, TLD 58W/84o, 30-35 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiod 16/8 h) przez 90 dni. Rośliny wyjęte z pożywki i opłukane wodą destylowaną suszono w strumieniu powietrza w temp. 40°C i mielono w młynku na proszek.

Odczynniki, rozpuszczalniki i substancje wzorcowe: metanol - Merck (Niemcy), gradient grade; kwas solny - J.T. Baker, cz.d.a.; eter dietylowy - POCH (Polska), cz.d.a.; n-heksan - Merck (Niemcy), do HPLC; tetrahydrofuran - Merck (Niemcy), do HPLC; eter dietylowy - POCH (Polska), cz.d.a.; wzorzec ramentaceonu - izolacja z materiału roślinnego przy pomocy HPLC na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej; wzorzec plumbaginy - stężenie $\geq 96\%$ (Sigma Aldrich, U.S.A., 2002); wzorzec kwercetyny - stężenie $\geq 96\%$ (Sigma Aldrich, U.S.A., 2002).

Inne: kolumna LiChrosphere 100 DIOL 250 x 4 mm dp = 5 μm ; filtry celulozowe, Grade: 3W, Dia. 11 cm, Qty-100.

Aparatura: aparat Soxtec[®] HT 6 1043 +1046 (Foss-Tecator, U.S.A.); homogenizator wysokoobrotowy Ultraturrax T18 basic (IKA, Niemcy); łaźnia ultradźwiękowa Sonorex RK 250H (Bandelin, Niemcy), dezintegrator ultradźwiękowy UD-20 (TechPan, Polska); MAE MARS 5 (CEM, USA); wytrząsarka z łaźnią wodną GLS 400 (Grant Instruments, U.K.); wyparka obrotowa Laborota 4000 (Heidolph, Niemcy); łaźnia wodna 365D (Upipan, Polska);

Gradientowy chromatograf cieczowy LaChrom (Merck-Hitachi, Niemcy, Japonia) sześciokanałowy system elucji gradientowej, pompę L-7100, zawór dozujący Rheodyne Rh-7725i, termostat L-7350 z systemem chłodzenia 7350i, detektor UV-DAD 7450A, oprogramowanie HSM oraz dodatkowo w sześciodrogowy, dwupołożeniowy zawór V 7226 (Knauer, Niemcy).

2.2 Metodyka (Methods)

Odważano 0,1 g suchej masy roślinnej *D. muscipula* / *D. aliciae* oraz używano 30 mL metanolu czystości gradient grade jako ekstrahentu. W przypadku ekstrakcji wspomaganej mikrofalami - MAE (*microwave assisted extraction*) pobierano 0,05 g suchej masy roślinnej i zalewano 15 mL rozpuszczalnika z powodu ograniczeń aparaturowych. Warunki prowadzenia operacji ekstrakcji/ługowania przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Warunki przeprowadzenia operacji ekstrakcji/ługowania metabolitów z roślin owadożernych *Drosera aliciae* oraz *Dionaea muscipula*

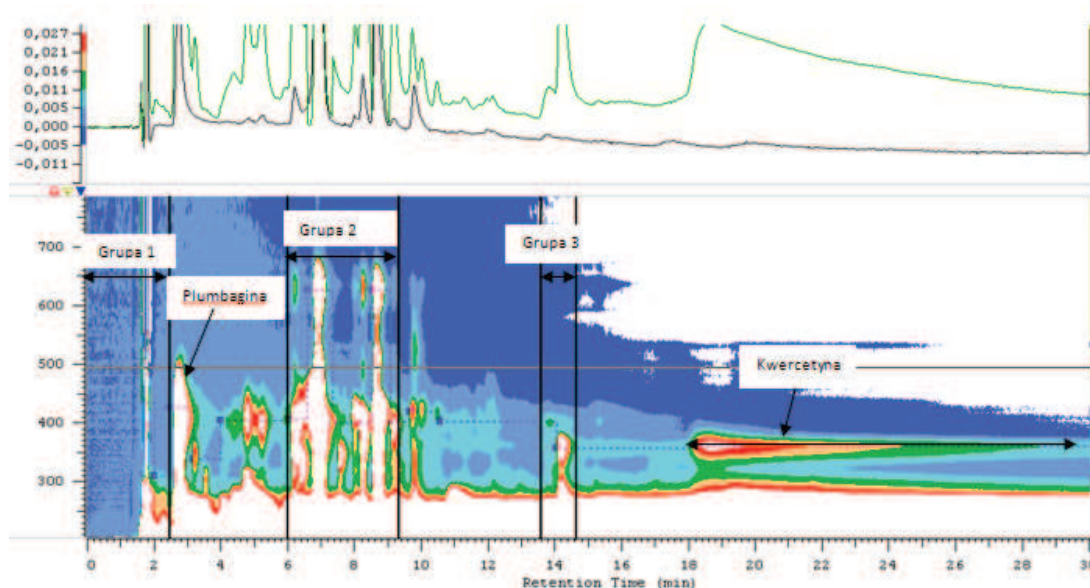
Table 2. Conditions of metabolites extraction/leaching operations from carnivorous plants: *Drosera aliciae* and *Dionaea muscipula*

Technika ekstrakcji / ługowania (Extraction/leaching technique)	Warunki operacji (Operation parameters)
Ekstrakcja w aparacie Soxtec® (Extraction in Soxtec® device)	Temperatura: temp. wrzenia rozpuszczalnika Czas trwania: 30, 60, 180 min Temperatura płyty grzejnej: 200°C
Ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego (Extraction by homogenization in High-Shear mixer)	Temperatura: 25°C; 50°C Czas trwania: 2, 4, 8 min Obroty: 22000 rpm
Ekstrakcja wspomagana dezintegratorem ultradźwiękowym (UAE by Ultrasonic disintegration)	Temperatura: 25°C; 50°C Czas trwania: 2, 4, 8 min
„Sonifikacja” w łaźni ultradźwiękowej (UAE in Ultrasonic Bath)	Temperatura: 25°C; 50°C Czas trwania: 2, 4, 8 min Częstotliwość: 35 kHz
Ekstrakcja wspomagana działaniem mikrofal (MAE)	Temperatura: 25°C; 50°C Czas trwania: 2, 4, 8 min Częstotliwość fali: 2450 MHz
Maceracja z wytrząsaniem (Maceration with Stirring)	Temperatura: 25°C; 50°C Czas trwania: 5, 15, 25 h

Dla rośliny owadożernej *D. aliciae* badania zostały wykonane z zastosowaniem wszystkich techniki ekstrakcji/ługowania zawartych w tabeli 2, następnie dla dwóch efektywnych technik i techniki Soxtec'a - jako techniki odniesienia zostały wykonane eksperymenty z użyciem suszu rośliny owadożernej *D. muscipula*.

Po wykonaniu każdej operacji ekstrakcji/ługowania, ekstrakt przesączaano w temperaturze prowadzenia operacji odparowywano rozpuszczalnik. Do pozostałości dodawano 3 mL 1 M HCl aby przekształcić obecne w ekstrakcie glikozydy w aglikony. W tym celu mieszaninę ogrzewano w łaźni wodnej, pod chłodnicą zwrotną, w temperaturze 100°C, przez 30 minut. Następnie próbkę ekstrahowano eterem dietylowym (3 x 5 mL). Warstwę eterową zbierano i odparowywano rozpuszczalnik w strumieniu azotu, a suchą masę rozpuszczano w 1 mL eluentu, tzn. w mieszaninie heksan: tetrahydrofuran (1:1 v/v).

Zawartość metabolitów wtórnych w ekstraktach z roślin owadożernych *D. aliciae* oraz *D. muscipula* wyznaczono techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz normalnych (NP-HPLC) z detektorem UV-DAD w zakresie długości fali 200÷800 nm. Opis układu chromatograficznego oraz warunków elucji znajdują się w opisie do rysunku 1 i 2.



Rys. 2. Przykład chromatogramu UV-DAD uzyskanego podczas rozdzielania ekstraktu metanowego z roślin *Dionaea muscipula* poddanego hydrolizie kwaśnej z zastosowaniem techniki HPLC w układzie faz normalnych z podziałem na substancje i grupy substancji uwzględnione w badaniach; kolumna: LiChrospher DIOL, 5 μ m, 250 mm x 4 mm, przepływ 1,5 ml/min do 30 min i 2 ml/min od 30 min, przepływ zwrotny (*backflush*) w 30 minucie, temperatura 20°C, objętość dozowana 20 μ l, stężenie próbki: 0,1 g suchej masy roślinnej / 1ml ekstrahentu, eluenty A: n-heksan B: THF, program elucji w gradiencie stężeń: 0-15 min 90:10 (A:B, v/v) 15-45 min 50:50 (A:B, v/v) 45-48 min 91:10 (A:B v/v)

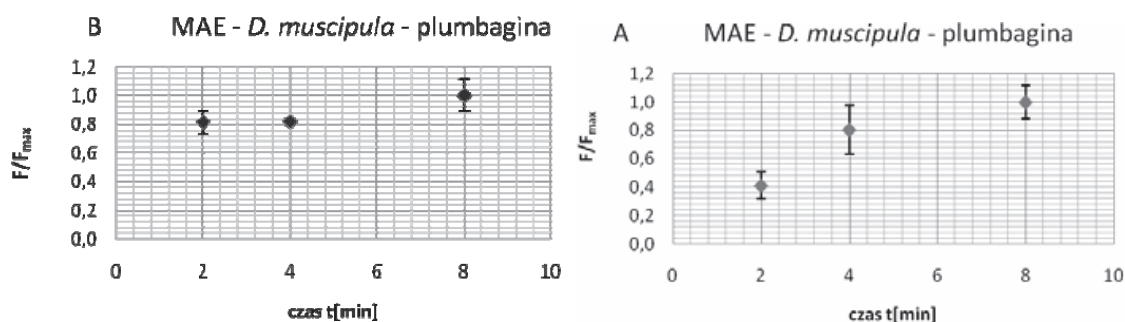
Fig. 2. An example of UV-DAD chromatogram of *Dionaea muscipula* methanol extract separation by NP-HPLC technique with dividing on the metabolites and groups of metabolites acid hydrolysis of glycosides was made. Separation conditions: column-LiChrospher DIOL, 5 μ m, 250 mm x 4 mm, flow-1,5 ml/min to 30 min and 2 ml/min from 30 min, backflush w 30 min., temperature 20°C, sample volume 20 μ l, sample concentration 0.1 g plant dry mass/ 1 ml solvent, solvents A: n-hexan B: THF, gradient elution program: 0-15 min 90:10 (A:B, v/v) 15-45 min 50:50 (A:B, v/v) 45-48 min 90:10 (A:B v/v)

Po zakończeniu programu elucji (30 min), kolumnę przełączono do trybu elucji wstecznej, w celu elucji z kolumny, zawartych w ekstrakcie substancji, silnie sorbowanych do powierzchni wypełnienia oraz rozpuszczalnych w eluencie.

Kryterium optymalizacji przebiegu programu elucji było uzyskanie rozdzielania kwercetyny i plumbaginy bądź ramentaceonu od pików substancji albo grup substancji zawartych w ekstraktach i charakteryzujących się zbliżoną retencją. Pozostałe grupy substancji zostały wydzielone arbitralnie jako grupy związków wzajemnie nałożonych ale rozdzielonych od pozostałych. Mirycetyna występuje w bardzo małym stężeniu, często poniżej granicy oznaczalności dlatego została pominięta. Przykład chromatogramu rozdzielania ekstraktu metanolowego z zaznaczonymi metabolitami i grupami metabolitów pokazano na rysunku 2.

3. Wyniki (Results)

Wyniki badań efektywności poszczególnych technik ekstrakcji/ługowania metabolitów z wysuszonego materiału roślinnego zilustrowano w postaci diagramów, które przedstawiają zależność stosunku powierzchni pików/grupy pików (F) ekstrahowanych składników do maksymalnej osiągniętej powierzchni pików/grupy pików (F_{\max}), od czasu trwania operacji, dla określonych wartości temperatury. Na rysunku 3 zamieszczono przykładowy diagram przedstawiający zależność stosunku powierzchni pików (F) plumbaginy do maksymalnej powierzchni pików (F_{\max}) tego metabolitu w czasie trwania operacji dla ekstrakcji wspomagananej działaniem mikrofal dla dwóch różnych temperatur 25 i 50°C.



Rys. 3. Diagram zależności stosunku F/F_{\max} w funkcji czasu trwania operacji ekstrakcji wspomagananej działaniem mikrofal, otrzymane dla plumbaginy z suszu rośliny owadożernej *Dionaea muscipula*, w temperaturze 25°C (A) oraz 50°C (B)

Fig. 3. Diagram of dependence F/F_{\max} in function of extraction / leaching operation time in MAE operation for plumbagin from dry plant material in temperature 25°C (A) and 50°C (B)

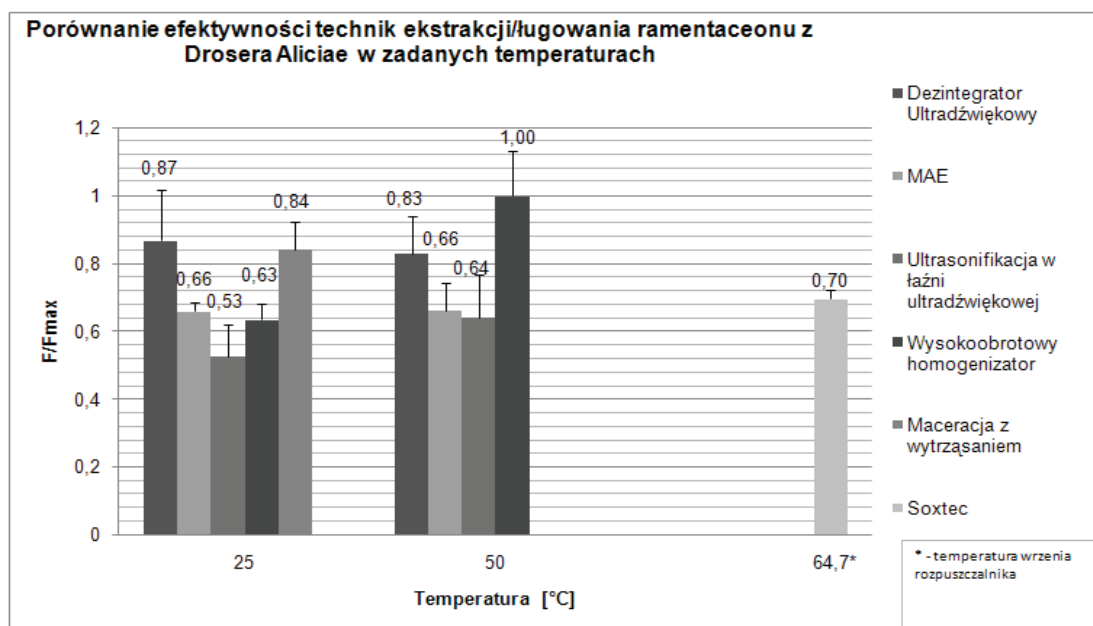
Tabela 3. Zestawienie optymalnych warunków ekstrakcji/ługowania metabolitów wtórnych z roślin owadożernych: *Drosera aliciae* (A) oraz *Dionaea muscipula* (B) dla badanych technik

Table 3. Optimal conditions (time and temperature) of metabolite/group of metabolites extraction/leaching operation from carnivorous plants: *Drosera aliciae* (A), *Dionaea muscipula* (B) for investigated techniques

A	OPTYMALNE WARUNKI EKSTRAKЦИИ/ŁUGOWANIA METABOLITÓW OKREŚLONĄ TECHNIKĄ (OPTIMAL PARAMETERS OF METABOLITES EXTRACTION/LEACHING OPERATION IN DIFFERENT TECHNIQUES)											
	Soxtec®		Dezintegrator Ultradźwiękowy (Ultrasonic disintegration)		MAE		„Sonifikacja” w łaźni ultradźwiękowej (UltraSonification in bath)		Wysokoobrotowy homogenizator ścinający (high-shear mixer homogenization)		Maceracja z wytrząsaniem (Maceration with stirring)	
	Czas/Time [min]	Temp. [°C]	Czas/Time [min]	Temp. [°C]	Czas/Time [min]	Temp. [°C]	Czas/Time [min]	Temp. [°C]	Czas/Time [min]	Temp. [°C]	Czas/Time [min]	Temp. [°C]
Ramentaceon	60	64,7	4	25-50	2	50	8	50	4	50	15	50
Kwercetyna	30	64,7	4	25-50	2	50	8	50	4	50	5	50
Grupa 1	60	64,7	4	25-50	2	50	8	50	4	50	5	25
Grupa 2	180	64,7	4	25-50	2	50	8	50	4	50	5	50
Grupa 3	60	64,7	4	25-50	2	50	8	50	4	50	5	50

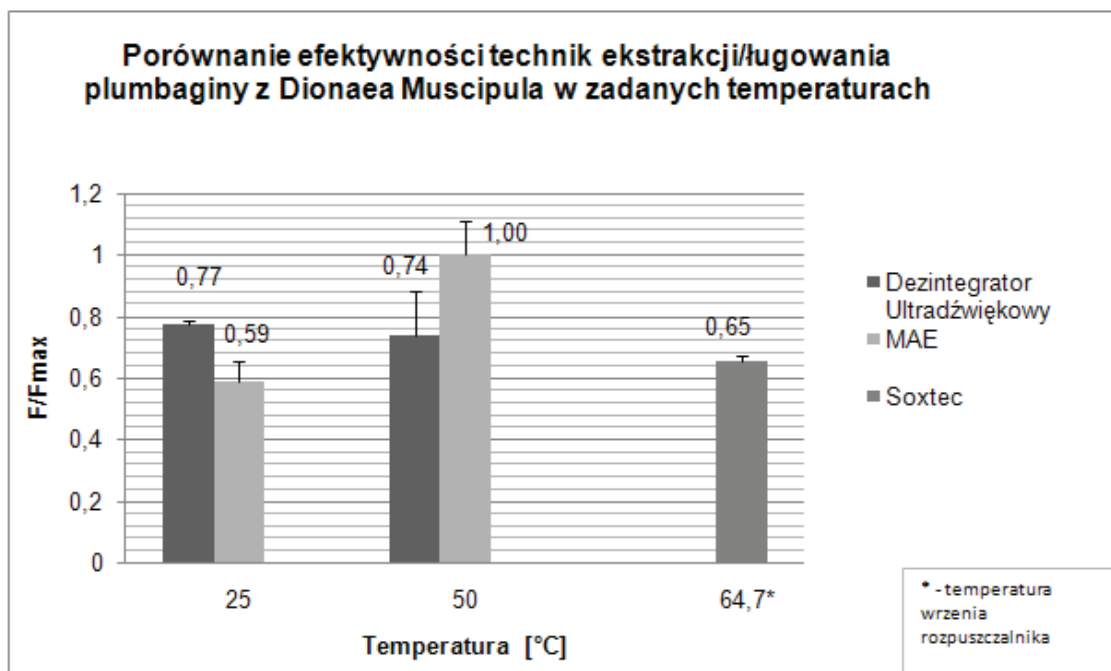
B	OPTYMALNE WARUNKI EKSTRAKЦИИ/ŁUGOWANIA METABOLITÓW OKREŚLONĄ TECHNIKĄ (OPTIMAL PARAMETERS OF METABOLITES EXTRACTION/LEACHING OPERATION IN DIFFERENT TECHNIQUES)					
	Soxtec®		Dezintegrator ultradźwiękowy (Ultrasonic disintegration)		MAE	
	Czas/time [min]	Temp. [°C]	Czas/time [min]	Temp. [°C]	Czas/time [min]	Temp. [°C]
Plumbagina	30	64,7	2	50	2	50
Kwercetyna	60	64,7	2	50	2	50
Grupa 1	30	64,7	2	50	2	50
Grupa 2	30	64,7	2	50	2	50
Grupa 3	30	64,7	2	50	2	50

Analiza tego typu diagramów pozwala określić optymalne warunki ekstrakcji/ługowania metabolitów bądź grup metabolitów dla określonej techniki i warunków ekstrakcji/ługowania. Podobne diagramy otrzymano dla pozostałych metabolitów/grup metabolitów. W tabeli 3 zestawiono optymalne warunki: czasu trwania i temperatury, ekstrakcji/ługowania metabolitu/grupy metabolitów dla określonych technik. Na podstawie tych rezultatów porównano efektywności ekstrakcji/ługowania metabolitów dla optymalnych wartości czasu trwania operacji poszczególnych substancji/grup substancji, z roślin owadożernych *D. aliciae* oraz *D. muscipula* w określonych temperaturach. Przykładowy diagram porównania efektywności ekstrakcji/ługowania ramentaceonu znajduje się na rysunku 4 natomiast plumbaginy na rysunku 5. Zestawienie efektywności technik ekstrakcji/ługowania dokonano porównanie stosunku pola powierzchni pików/piku metabolitów/grup metabolitów osiągniętego przy danej technice do maksymalnego osiągniętego pola powierzchni dla danego metabolitu/grupy metabolitów.



Rys. 4. Porównanie efektywności technik ekstrakcji/ługowania ramentaceonu, przy optymalnych wartościach czasu prowadzenia operacji, z rośliny owadożernej *Drosera aliciae* w temperaturach 25°C i 50°C

Fig. 4. Comparison of ramentaceone extraction/leaching techniques efficiency in optimal operation time from carnivorous plant *Drosera aliciae* in temperature 25°C and 50°C



Rys. 5. Porównanie efektywności technik ekstrakcji/ługowania plumbaginy przy optymalnych wartościach czasu prowadzenia operacji, z rośliny owadożernej *Dionaea muscipula* w temperaturach 25°C i 50°C

Fig. 5. Comparison of plumbagin extraction/leaching techniques efficiency in optimal operation time from carnivorous plant *Dionaea muscipula* in temperature 25°C and 50°C

Na podstawie przeanalizowanych danych wybrano przybliżone optymalne warunki ekstrakcji/ługowania całego profilu metabolitów wtórnych z badanych roślin owadożernych. Przedstawione zostało to w tabeli 4.

Tabela 4. Optymalne warunki prowadzenia ekstrakcji/ługowania metabolitów z roślin owadożernych *D. aliciae* oraz *D. muscipula*

Table 4. Optimal conditions of metabolites extraction/leaching operation from carnivorous plants *D. aliciae* and *D. muscipula*

Lp.	Technika ekstrakcji/ługowania (Extraction/leaching technique)	Optymalne warunki (Optimal conditions)			
		<i>Drosera aliciae</i>		<i>Dionaea muscipula</i>	
		Czas (Time)	Temp.	Czas (Time)	Temp.
1	Ekstrakcja w aparacie Soxtec® (Extraction in Soxtec® device)	60 min	64,7°C*	60 min	64,7°C*
2	Ekstrakcja wspomagana dezintegratorem ultradźwiękowym (UAE by Ultrasonic disintegration)	4 min	50°C	4 min	50°C
3	Ekstrakcja wspomagana działaniem mikrofal (MAE)	2 min	50°C	2 min	50°C
4	Ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego (Extraction by homogenization in High-Shear mixer)	4 min	50°C	-	-
5	Sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej (UAE in Ultrasonic Bath)	8 min	50°C	-	-
6	Maceracja z wytrząsaniem (Maceration with Stirring)	5h	50°C	-	-

* - temperaturę wrzenia rozpuszczalnika pod ciśnieniem atmosferycznym

4. Wnioski (Conclusions)

Ekstrakcja/ługowanie metabolitów z suchego materiału roślinnego z wykorzystaniem maceracji jest podstawą każdej badanej techniki w ramach niniejszej pracy. Technika maceracji z wytrząsaniem w temperaturze podwyższonej jest techniką łatwo dostępną i wymagającą niskich nakładów finansowych na zakup aparatury. Jest ona skuteczna, ponieważ umożliwia osiągnięcie równowagi. Jednakże ze względu na długi czas trwania jest mało efektywna. Podobne rezultaty uzyskuje się również dla ekstrakcji metodą Soxhleta w aparacie Soxtec®. Jednak czas ekstrakcji, który w porównaniu ze starszą wersją – ekstrakcji w aparacie Soxhleta, uległ skróceniu, jednak nadal pozostaje relatywnie długi w porównaniu do nowoczesnych technik. Pierwszy etap tej techniki – „etap gotowania”, polegający na maceracji we wrzącym rozpuszczalniku wydaje się być kluczowym. W przypadku metabolitów nie trwałych termicznie metoda Soxhleta nie powinna być stosowana gdyż wykorzystuje się ekstrahent w fazie wrzenia.

Zastosowanie technik ekstrakcji/ługowania wspomaganych: falami ultradźwiękowymi, mikrofalami, wysokoobrotowym homogenizatorem istotnie przyspiesza operację. Pozwala osiągnąć wysokie poziomy zawartości metabolitów w ekstraktach, w krótkim czasie - nawet kilku minut. Wzrasta w ten sposób efektywność. Przeszkodą stosowania tych technik ekstrakcji/ługowania jest stosunkowo wysoki koszt aparatury.

W przypadku ekstrakcji/ługowania termicznie trwałych substancji korzystne jest podniesienie temperatury. W przypadku nietrwałych metabolitów, które w czasie trwania operacji ulegają rozkładowi termicznemu oraz utlenianiu (w tym również katalizowanemu światłem) sugeruje się stosowanie niskich temperatur operacji lub/i w atmosferze gazu obojętnego. Zawsze korzystny jest brak dostępu światła.

Przedstawione w pracy wyniki wydają się być przydatne przy opracowaniu optymalnych warunków procesu pozyskiwania metabolitów z roślin owadożernych gatunku *D. aliciae* oraz *D. muscipula* na skalę preparatywną lub procesową. Celowe byłoby opracowanie optymalnych warunków procesu ekstrakcji/ługowania jako procesu ciągłego.

Celowe jest wykonanie kolejnych badań w celu dokładniejszej optymalizacji najbardziej efektywnych technik ekstrakcji/ługowania szczególnie w związku z powiększeniem skali operacji.

Najważniejsze wnioski uzyskane w rezultacie badań tej pracy na przykładzie ekstrakcji/ługowania metabolitów z roślin owadożernych są prawdopodobnie aktualne także dla innych roślin.

Badania tej pracy wykazały dodatkowo, że *Dionaea muscipula* jest bogatsza w metabolity wtórne niż *Drosera aliciae*, dlatego stanowi bardziej korzystne źródło pozyskiwania tych substancji na skalę przemysłową.

Literatura (Literature)

1. A.M. Ellison, N.J. Gotelli, *Nitrogen availability alters the expression of carnivory in the northern pitcher plant, Sarracenia purpurea*, Trends. Ecol. Evol., **16**(2001)623.
2. B. Rice, *Carnivorous plants- classic perspectives and new research*, Biologist, **49**(2002)245.
3. S. Porembski, W. Barthlott, *Advances in Carnivorous Plants Research*, Plant Biol. **8**(2006)737.
4. B.E. Juniper, R.J. Robins, D. Joel, *The Carnivorous Plants*, Academic Press, Londyn 1986.
5. T. Tokunaga, A. Dohmura, N. Takada, M. Ueda, *Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defence in carnivorous plant.*, Tetrahedron Lett., **45**(2004)7115.
6. M. Itoigawa, C. Ito, H.T. Tan, M. Okuda, H. Tokuda, H. Nishino, H.Furukawa, *Cancer chemopreventive activity of naphthoquinones and their analogs from Avicennia plants*, Cancer Lett., **174**(2001)135.

7. A. Riffel, L.F. Medina, V. Stefani, R.C. Santos, D. Bizani, A. Brandelli, *In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones*, Braz. J. Med. Biol. Res, **35**(2002)811.
8. A. Kawiak, J. Piosik, G. Stasiłojc, *Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II*, Toxicol. Appl. Pharm., **223**(2007)267.
9. G. Dinelli, A. Bonetti, M. Minelli, I. Marotti, P. Catizone, A. Mazzanti, *Content of flavonols In Italian bean (Phaseolus vulgaris L.) ecotypes*, Food Chem., **90**(2006)105.
10. C. Manach, A. Mazur, A. Scalbert, *Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases*, Curr. Opin. Lipidol., **16**(2005)77.
11. M. Harwood, B. Danielewska-Nikiel, J.F. Borzelleca, G.W. Flamm, G.M. Williams, T.C. Lines, *A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties*, Food Chem. Toxicol., **45**(2007)2179.
12. A.B. Shapiro, V. Ling, *Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein*, Biochem. Pharmacol., **53**(1997)587.
13. K.C. Ong, H-E. Khoo, *Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter translocation*, Biochem. Pharmacol., **51**(1996)423.
14. B.Trusheva, D. Trunkova, V. Bankova, *Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study*, Chem. Centr. J., **1**(2007)13.
15. F.B. Williams, L.C. Sander, S.A. Wise, J.Girard, *Development and evaluation of methods for determination of naphthodianthrones and flavonoids in St. John's wort*, J. Chromatogr. A., **1115**(2006)93.
16. J. Londoño-Londoño, V.R.D. Lima, O. Lara, A. Gil, T.B.C. Pasa, G.J. Arango and J.R.R. Pineda, *Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method*, Food Chem., **119**(2010)81.
17. M. Bimakr, R.A. Rahman, F.S. Taip, L.T. Chuan, A. Ganjloo, J. Selamat, A. Hamid, *Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of bioactive flavonoid compounds from spearmint (Mentha Spicata L.) leaves*, Eur. J. Sci. Res., **33**(2009)679.
18. W. Xiao, L. Han, B. Shi, *Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix Astragali* Sep. Purif. Technol., **62**(2008)614.
19. M. Downey, S. Rochfort, *Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin*, J. Chromatogr. A, **1201**(2008)43.
20. V. Kuete, J.G. Tangmouo, J.J. Meyer and N. Lall, *Diospyrone, crassiflorone, and plumbagin: three antimycobacterial and antigonorrheal naphthoquinones from two Diospyros species*, Int. J. Antimicrob. Ag., **34**(2009)322.

21. P. Babula, R. Mikelova, V. Adam, R. Kizek, L. Havel, Z. Sladky, *Using of liquid chromatography coupled with diode array detector for determination 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.
22. G. Romanik, E. Gilgenast, A. Przyjazny, M. Kaminski, *Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis*, J. Biochem. Biophys. Methods, **70**(2007)253.
23. T. Murashige, F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*, Physiol. Plant., **15**(1962)497.