

**Mariusz JASZCZOŁT¹, Grzegorz BOCZKAJ¹,
Aleksander LEWANDOWSKI¹, Anita SKRZYPCZAK¹,
Aleksandra KRÓLICKA², Marian KAMIŃSKI^{1*}**

¹Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny,
Instytut Chemii, Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej,
ul. Gabriela Narutowicza 11/12,
80-233 Gdańsk

e-mail: mknkj@chem.pg.gda.pl*, mariusz.jaszczolt@gmail.com

²Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny,
Miedzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUM,
Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin,
ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Badania nad doбором najkorzystniejszego składu eluentu do rozdzielania metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem chromatografii planarnej w normalnym i odwróconym układzie faz

A research on the composition of the eluent for separation of plant metabolites by reverse phase planar chromatography

Streszczenie: *Badania nad opracowywaniem nowej metodyki rozdzielania składników o skomplikowanej budowie chemicznej z mieszanin o złożonym składzie pochodzenia naturalnego z wykorzystaniem kolumnowej chromatografii cieczowej ze względu na szereg czynników są w większości przypadków bardzo kosztowne. Dlatego w celu wstępnego doboru warunków rozdzielania korzystne jest stosowanie cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (ang. Thin Layer Chromatography - TLC). Relatywnie mniejsza ilość zużytych eluentów, prostota i łatwość wykonania, a także nieskomplikowana aparatura dowodzi temu, że na etapie optymalizacji składu eluentu chromatografia cienkowarstwowa jest techniką najkorzystniejszą. TLC umożliwia także równoległe prowadzenie rozdzielania dużej liczby różniących się składem mieszanin w jednym układzie chromatograficznym w tym samym czasie.*

W pracy przedstawiono wyniki badań retencji dla eluentów wieloskładnikowych w odwróconym układzie faz. Analiza otrzymanych danych pozwoliła wyselekcjonować składniki eluentu o korzystnych parametrach retencyjnych, które zostaną następnie wykorzystane do rozdzielania składników metanolowych ekstraktów roślin owadożernych z zastosowaniem techniki kolumnowej chromatografii cieczowej.

Słowa kluczowe: *plumbagina, ramentaceon, chloroplumbagina, droseron, mirycetyna, kwercetyna, TLC*

Abstract: *A development of the methodology for separation of components with complex chemical structure from natural origin complicated mixtures by column liquid chromatography techniques in most cases is very expensive. Therefore to obtain the consumption of the chemicals on a lower level, a thin layer chromatography as a main separation technique should be*

used in preselection studies of the eluent composition. In addition, the simplicity of the procedure and equipment are another advantages of TLC. A separation process of a few different mixtures can be proceeded on a one plate in the same time. The possibility to executing the orthogonal separation without any sophisticated equipment is another advantage of TLC technique.

In the paper the results of separation of plant extracts by RP-TLC with different composition of the eluents are presented. Analysis of retention data allowed to select components of the eluent with favorable retention parameters, which can be used in the future for separation of this type of plant extracts by column liquid chromatography techniques.

Key words: *plumbagin, ramentaceone, chloroplumbagin, droserone, myricetin, quercetin, TLC*

1. Wstęp (Introduction)

Rośliny, które potrafią chwycić i trawić zwierzęta, aby uzyskać składniki odżywcze nazywane są roślinami mięsożernymi, z ang. *carnivorous* (łac.: *Carnisi* - mięso; *Vorare* - połykać). Mięsożerność, w tym także owadożerność jest swoistym fenomenem w Królestwie Roślin. W czasie, gdy większość organizmów roślinnych stanowi grupę ścisłych producentów (niezbędne składniki odżywcze są produkowane ze składników nieorganicznych), to dla roślin owadożernych źródłem substancji organicznych są różnego rodzaju bezkręgowce, tj. owady, pajęczaki oraz mięczaki [1, 2]. Nisze ekologiczne zasiedlane przez rośliny owadożerne charakteryzują się dużym zróżnicowaniem. Zasiedlają one powierzchnie, praktycznie, całej kuli ziemskiej wyłączaając Antarktydę i Arktykę. Można spotkać je zarówno na terenach podmokłych, tj.: bagna, torfowiska, brzegi stawów i rzek, jak również w górach i dolinach. Cechą charakterystyczną tego typu siedlisk jest mała dostępność takich mikroelementów, jak: azot, fosfor i potas. To jest główny powód, dla którego rośliny owadożerne odżywiają się w tego rodzaju sposób [3].

W skład grupy roślin rosiczkowatych wchodzi rodziny: *Aldrovande* (aldrowanda), *Dioneae* (muchotłówka) oraz *Drosera* (rosiczka). Wśród roślin owadożernych szczególną przydatność w lecznictwie wykazują rośliny z rodzin: *Droseraceae* i *Sarraceniaceae*. Pierwsze wzmianki o wykorzystaniu roślin z rodziny *Droseraceae* w medycynie ludowej pochodzą z XII w. Przez dziesięciolecia rośliny te były wykorzystywane do leczenia m.in.: suchego kaszlu, zapalenia oskrzeli, koklusz, jak również astmy [2]. Dotychczas w roślinach rosiczkowatych, w szczególności w gatunkach: *Drosera binata*, *Drosera capensis*, *Drosera aliciae* oraz *Dionea muscipula*, zidentyfikowano szereg związków chemicznych (metabolitów wtórnych) wykazujących szereg interesujących właściwości biologicznie czynnych, m.in.: działanie immunomodulujące (zwiększenie aktywności układu odpornościowego), przeciwdrobnoustrojowe, przeciwskurczowe, a także przeciwnowotworowe [4, 5].

Metabolity wtórne, dawniej nazywane idiolitami są niezwykle szeroką, pod względem chemicznym, grupą związków chemicznych, w której skład wchodzi: fenole, chinony, terpenoidy, steroidy, karotenoidy, alkaloidy, kwasy tłuszczowe i woski. W większości są to związki chemiczne, produkowane

na różnych etapach cyklu życiowego roślin. Najczęściej, kiedy roślina poddawana jest działaniu czynników stresowych. W warunkach hodowli roślin owadożernih *in vitro* można wyróżnić kilka strategii mobilizacji organizmu do produkcji metabolitów wtórnych, m.in.: zmiana czynników fizycznych (temperatura, pH, zasolenie), zakażenie mikrobiologiczne (bakteriami i grzybami) oraz dodatek do pożywek elicytatorów, np.: takich jak: kwas jasmonowy, tlenek azotu, BION® zmiana temperatury, pH, zakażenie drobnoustrojami [6].

Rośliny owadożerne oprócz wymienionych klas związków chemicznych produkują także naftochinony i flawonoidy, związki chemiczne szeroko wykorzystywane w lecznictwie. Naftochinony to aromatyczne organiczne związki chemiczne obecne w organizmach należących zarówno do królestwa *Protista* (bakterie jelitowe), jak również *Eucaryota* (rośliny, grzyby) [7]. Związki z grupy naftochinonów są pochodnymi juglonu, powstające w szlaku poliketydowym [8]. Występują w szerokiej gamie roślin, m.in.: *Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, grzybów: *Marasmius gramineus* i *Verticillium dahliae* oraz drobnoustrojów: *Streptomyces* i *Fusarium* [9].

Aktywność biologiczna naftochinonów została zauważona i wykorzystana przez człowieka bardzo szybko. Afrykańskie plemię Zulu zamieszkujące południowe wybrzeże Afryki wykorzystywało korzenie *Euclea natalensis* do leczenia zapalenia oskrzeli, astmy, zakażeń układu moczowego oraz w leczeniu przebarwień skóry powodowanych przez *Mycobacterium leprae*, a także do leczenia takich dolegliwości, jakim jest ból głowy [10]. Obecnie wiadomo, że za farmakologicznie czynne właściwości roślin z rodziny *Droseraceae* odpowiadają głównie zawarte w nich naftochinony, w szczególności 2-metyljuglon oraz 7-metyljuglon. Zainteresowanie tą klasą związków jest powodowane tym, że wykazują one szeroki zakres aktywności biologicznej: od fitotoksycznej [11-13], owadobójczej [14], przeciwbakteryjnej [15-17], po grzybobójczą [16, 17]. Istnieją także doniesienia o właściwościach cytostaticznych [17] oraz przeciwnowotworowych [14]. Działanie cytostaticzne oraz przeciwdrobnoustrojowe ramentaceonu i plumbaginy wynika z tego, że związki te wykazują działanie inhibicyjne transportu elektronów w szlakach metabolicznych [18], są czynnikami hamującymi fosforylację oksydacyjną oraz posiadają zdolność interkalacji do podwójnej helisy DNA. Dodatkowo za ich pośrednictwem, w procesie cyklu redukcyjnego w warunkach tlenowych, powstają reaktywne formy tlenu, tzw. wolne rodniki [19-21].

Ramentaceon wykazuje działanie cytostaticzne przeciwko drożdżakom, a także odznacza się działaniem przeciwbakteryjnym [22, 23]. Najnowsza literatura donosi, że 2-metyljuglon bardzo dobrze hamuje aktywność 1,2-lipooksygenazy, enzymu, który wpływa na kancerogenezę. Dodatkowo naftochinon ten jest cytotoksyczny w stosunku do znacznej ilości nowotworów [23-25].

Plumbagina charakteryzuje się szeregiem bardzo ciekawych właściwości. Oprócz działania przeciwdrobnoustrojowego na m.in. pałeczki gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*) i gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*), 2-metyljuglon powoduje inhibicję wzrostu bakterii jamy ustnej, takich jak Gram dodatnie szczepy *Streptococcus* spp., dzięki inhibicji syntetazy chi-

tyny (enzymu odpowiedzialnego za syntezę ściany komórkowej grzybów) wykazuje działanie przeciwwgrzybowe [5, 15]. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały interesujące pod względem właściwości farmakologicznych działanie oraz potencjalne zastosowanie 2-metylojuglonu. Plumbagina aktywuje szlak odpowiedzialny za odporność komórek nerwowych na stres oksydacyjny, tym samym hamuje cykl apoptotyczny. Rezultatem tego, jest ochrona przed niedokrwieniem mózgu [26]. Wykazano również, że plumbagina hamuje czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za progresję raka piersi oraz jest inhibitorem adhezji, migracji oraz inwazji komórek nowotworu wątroby [27, 28]. W literaturze istnieje niewielka ilość doniesień dotyczących aktywności biologicznej pochodnych plumbaginy, jednakże ostatnio pojawiła się informacja, że zarówno 2-metylojuglon, jak i jego chlorowana pochodna (chloroplumbagina), wykazują działanie inhibicyjne wobec odwrotnej transkryptazy (RT), czyli najważniejszego enzymu cyklu życiowego Ludzkiego Wirusa Niedoboru Odporności (HIV) [29].

Flawonoidy stanowią grupę polifenolowych metabolitów wtórnych, które powszechnie występują w roślinach. Wszystkie flawonoidy oparte są na szkieletcie flawonu. Jednak w przyrodzie o wiele częściej występują w postaci glikozydów, czyli połączeń aglikonu (pierścień polifenolowy) oraz glikonu (fragment węglowodanowy). Flawonoidy spełniają szereg ważnych funkcji w roślinach. Chronią roślinę przed atakiem owadów i grzybów oraz stanowią najważniejszą grupę pigmentów roślinnych o barwie w zakresie od czerwonego do żółtego [30]. Istnieją także doniesienia, że flawonoidy wykazują właściwości biologicznie czynne, tj. przeciwutleniające, chroniące przed promieniowaniem ultrafioletowym, a także przeciwalergiczne [30, 32].

Zarówno kwercetyna, jak i mirycetyna, wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae*. Nadmienić należy, że mirycetyna wykazuje silniejsze niż kwercetyna działanie wobec pałeczek zapalenia płuc (*Klebsiella pneumoniae*) [5]. Dodatkowo oba flawonoidy wykazują szereg odrębnych właściwości farmakologicznych. Dowiedziono, że kwercetyna hamuje wzrost ludzkich komórek nowotworowych różnego typu, ponieważ ma działanie inhibicyjne na zmutowane onkogeny (p53, Ras), czego skutkiem jest zablokowanie cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym fazą G1/S [33]. Dodatkowo flawonoid wykazuje działanie przeciwcukrzycowe, dzięki hamowaniu 11b-HSD1 (dehydrogenazy 11b-hydroksysteroidowej), enzymu specyficznego dla leków na bazie kortykosteroidów, które hamują aktywność insuliny. To skutkuje wzrostem stężenia glukozy we krwi. Z kolei mirycetyna chroni neurony przed toksycznym działaniem α -amyloidu, peptydu uważanego za jedną z przyczyn powstawania choroby Alzheimera [25, 34].

Badania przedstawione w artykule skupiły się na opracowaniu najkorzystniejszego składu eluentu do rozdzielania składników hydrolizatów ekstraktów roślin owadożernych z grupy naftochinonów, tj.: plumbagina, ramentaceon, chloroplumbagina oraz droseron (hydroksyplumbagina). Dodatkowo w artykule zamieszczono wyniki badań opracowania najkorzystniejszych składników eluentu do rozdzielania i identyfikacji mirycetyny i kwercetyny,

jako przykładów związków z grupy flawonoidów zawartych w ekstraktach roślin owadożernych.

2. Część eksperymentalna (Experimental)

Materiały i odczynniki (Materials and reagents)

Materiał roślinny gatunków: *Drosera aliciae*, *Drosera capensis*, *Drosera binata* oraz *Dioneae muscipula* hodowany w warunkach *in vitro* w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

W badaniach wykorzystywano następujące rozpuszczalniki: metanol, acetonitryl, izopropanol, tetrahydrofuran, 1,4-dioksan, eter metylowo-tert-butylowo, dichlorometan, heksan o czystości do HPLC (Merck, Niemcy). Woda dejonizowana otrzymana z urządzenia Milli Q (Millipore, USA).

Certyfikowane wzorce: plumbagina, mirycetyna, kwercetyna użyte w badaniach zostały zakupione w firmie Sigma Aldrich (USA). Substancje niedostępne na rynku, tj. chloroplumbagina i droseron zostały otrzymane na drodze syntezy chemicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Ramentaceon, którego wzorzec również nie jest dostępny w sprzedaży został wyizolowany z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii cieczowej (P-LC).

Aparatura (Equipment)

Eksperymenty z zastosowaniem chromatografii planarnej zostały przeprowadzone z wykorzystaniem szklanych płytek TLC RP18 z fluoresceiną o wymiarach 5 x 10 cm oraz płytek TLC Si60 z dodatkiem fluoresceiny o wymiarach 5 x 10 cm i 20 x 20 cm (Merck, Niemcy).

Procedura analityczna (Analytical procedure)

Procedura analityczna zastosowana w badaniach była zgodna z przedstawioną w pracy magisterskiej Aleksandra Lewandowskiego [35].

Badania z zastosowanie techniki cienkowarstwowej chromatografii cieczowej prowadzono w warunkach odwróconego układu faz (żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi - RP18).

Po zakończeniu każdego rozdzielania dokumentowano otrzymane wyniki - zaznaczają miejsca, z którego i do którego migrowała w danym etapie rozdzielania plamka składnika ekstraktu lub substancji wzorcowej. Następnie wykonano fotografię płytki w świetle widzialnym (VIS) oraz w świetle UV o długości fali 254 nm oraz 365 nm. Etap dokumentacji był poprzedzony usunięciem pozostałości eluentu, w celu uniknięcia utleniania się składników

rozdzielanych, poprzez suszenie płytki w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu.

Celem badań było dobranie składników eluentu, zapewniającego najkorzystniejsze rozdzielanie składników zawartych w metanolowych ekstraktach roślin owadożernych.

RP-TLC

W badaniach z zastosowaniem RP-TLC użyto następujących eluentów (tab. 1):

Tabela 1. Zestawienie eluentów użytych w badaniach

Table 1. A composition of the eluents used in the researches

Nr układu chromatograficznego (Number of chromatographic system)	Składnik A (Component A)	Składnik B (Component B)	Stosunek A/B (v/v) Ratio A/B (v/v)	pH
1	Woda + H ₂ SO ₄	Metanol	3:1	3
2	Woda + H ₂ SO ₄	Metanol	1:1	3
3	Woda + H ₂ SO ₄	Metanol	1:3	3
4	Woda + H ₂ SO ₄	Izopropanol	65:35	3
5	Woda + H ₂ SO ₄	Izopropanol	42:58	3
6	Woda + H ₂ SO ₄	Acetonitryl	45:55	3
7	Woda + H ₂ SO ₄	Acetonitryl	65:35	3
8	Woda + H ₂ SO ₄	Tetrahydrofuran	65:35	3
9	Woda + H ₂ SO ₄	Tetrahydrofuran	58:42	3
10	Woda + H ₂ SO ₄	1,4- dioksan	62:38	3
11	Woda + H ₂ SO ₄	1,4- dioksan	58:42	3

Kwas siarkowy (VI) dodany do eluentu powodował cofnięcie dysocjacji flawonoidów, które są słabymi kwasami. W rezultacie mirycetyna i kwercetyna wykazywały większą retencję, w wyniku cofnięcia ich dysocjacji, a zatem zwiększenia powinowactwa do fazy stacjonarnej w układzie faz odwróconych.

W każdym doświadczeniu rozwijane były dwie płytki (A i B), na każdej znajdowały się 2 ekstrakty roślinne i 3 wzorce substancji występujących w rozdzielanych ekstraktach. W każdym doświadczeniu na płytkę chromatograficzną nakładano po 10 µl metanolowych ekstraktów roślinnych i po 2 µl wzorców.

Na płytce A rozdzielane były ekstrakty z roślin: *Dionaea muscipula*, *Drosera binata* oraz wzorce: plumbagina, mirycetyna i chloroplumbagina. Na płytce B: *Drosera aliciae*, *Drosera capensis* oraz wzorce: ramentaceon, kwercetyna, droseron.

Kolejność dozowania rozdzielanych składników była za każdym razem identyczna i została przedstawiona poniżej, w tabeli 2.

Tabela 2. Kolejność nakładania substancji na płytki TLC
Table 2. Injection sequence of the solutes on TLC plater

Nr plamki (Spot number)	Płytką A (Plate A)		Nr plamki (Spot number)	Płytką B (Plate B)	
	Substancja (Substance)	Nakładana objętość [μl] (Injected volume [μl])		Substancja (Substance)	Nakładana objętość [μl] (Injected volume [μl])
1	<i>D. muscipula</i>	10	6	<i>D. aliciae</i>	10
2	Plumbagina	2	7	Ramentaceon	2
3	<i>D. binata</i>	10	8	<i>D. capensis</i>	10
4	Mirycetyna	2	9	Kwercetyna	2
5	Chloroplumbagina	2	10	Droseron	2

Opracowanie wyników (Report results)

Na podstawie uzyskanych chromatogramów obliczono: współczynniki opóźnienia (1) i retencji (2) oraz selektywności (3) przy wykorzystaniu arkusza kalkulacyjnego programu Microsoft Excel (Microsoft Corp., USA).

Wzory użyte przy obliczaniu parametrów retencyjnych przedstawiono poniżej:

$$hR_f = 100 * \frac{a}{b} \quad (1)$$

$$k = \frac{100 - hR_f}{hR_f} \quad (2)$$

gdzie:

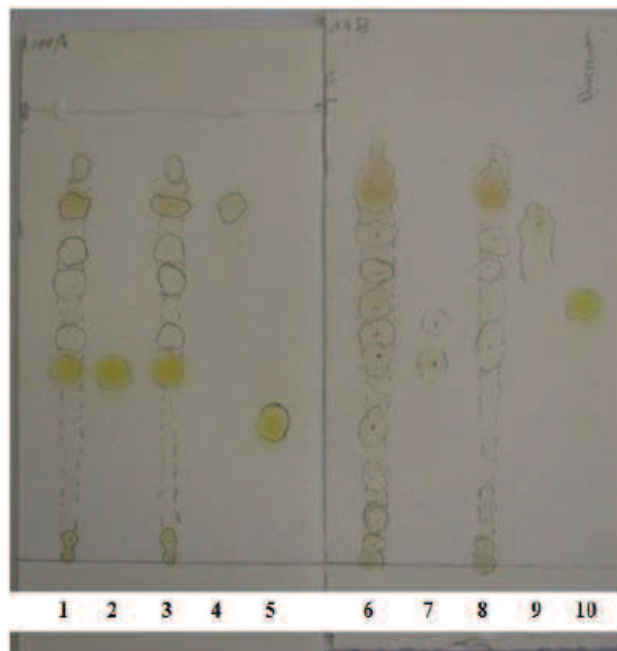
- hR_f – 100 –krotność współczynnika opóźnienia,
- a – droga migracji plamki rozdzielanego składnika
- b – droga migracji czoła fazy ruchomej
- k – współczynnik retencji

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

Przykłady reprezentatywnych chromatogramów uzyskanych z rozdzielania metanolowych ekstraktów roślinnych oraz wzorców naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem fazy stacjonarnej RP18 oraz eluentu: izopropanol:woda z dodatkiem kwasu siarkowego (VI) (pH 3) zostały przedstawione na rysunkach 1, 2 i 3.

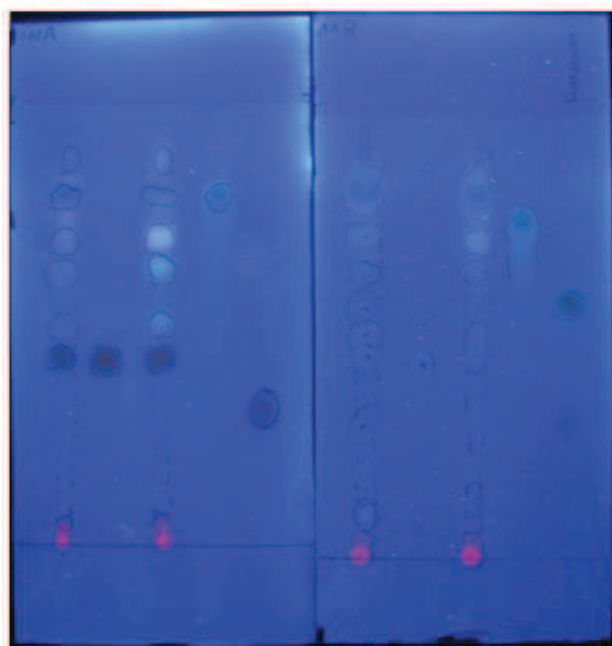
Parametry retencyjne, tj współczynnik opóźnienia (R_f) oraz współczynnik retencji (k) obliczone na podstawie otrzymanych chromatogramów, ze wzorów nr 1 i 2 zostały zamieszczone w tabeli 3.

Plamki naftochinononów obserwowane w świetle widzialnym (rys. 1 – plamki o numerach 2, 5, 7 i 10) wykazują barwę żółtą. W świetle o długości fali 365 nm te same substancje wykazują czerwono-różową fluorescencję, a przy długości fali 254 nm wykazują fluorescencję żółto-zieloną (rys. 2 i 3).



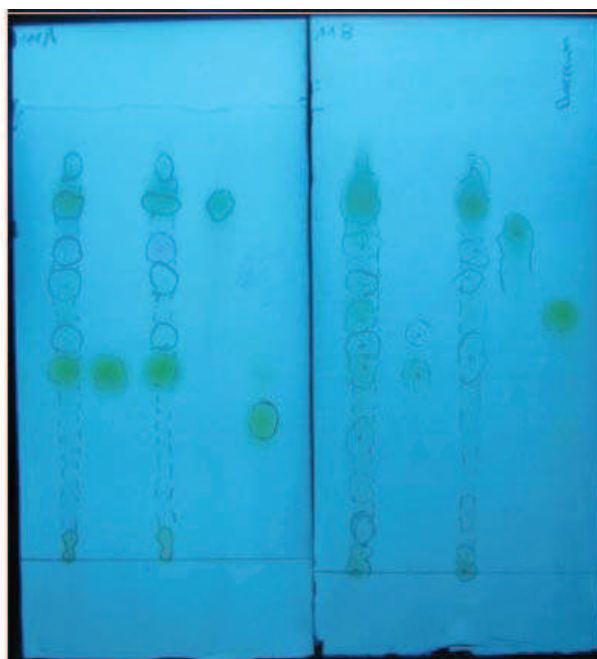
Rys. 1. Chromatogram w świetle widzialnym (VIS) rozwinięty z zastosowaniem eluentu izopropanol:woda 65:35 (v/v) z dodatkiem kwasu siarkowego (VI) do pH 3

Fig. 1. A chromatogram in visible light (VIS). Eluent: isopropanol and water in ration 65:35 (v/v) with sulfuric acid addition (pH 3)



Rys. 2. Chromatogram dla długości fali 365 nm. Warunki rozdzielania, jak na rysunku 1

Fig. 2. Chromatogram at 365 nm wavelength. Separation conditions were the same as in Fig. 1



Rys. 3. Chromatogram dla długości fali 365 nm. Warunki rozdzielania, jak na rysunku 1
 Fig. 3. Chromatogram at 365 nm wavelength. Separation conditions were the same as in Fig. 1

Tabela 3. Zestawienie współczynników opóźnienia oraz współczynników retencji otrzymane dla najkorzystniejszego układu chromatograficznego
Table 3. A comparison of retardation and retention factors calculated for optimal conditions of chromatographic process

	Płytki A (Plate A)				Płytki B (Plate B)		
	Nazwa (Name)	hR _f	k		Nazwa (Name)	hR _f	k
<i>D. muscipula</i>	1,1	4,29	22,33	<i>D. aliciae</i>	6,1	4,23	22,67
	1,2	42,86	1,33		6,2	9,86	9,14
	1,3	50,00	1,00		6,3	18,31	4,46
	1,4	61,43	0,63		6,4	29,58	2,38
	1,5	68,57	0,46		6,5	45,07	1,22
	1,6	78,57	0,27		6,6	49,30	1,03
	1,7	87,14	0,15		6,7	54,93	0,82
Plumbagina (Plumbagin)	2	42,86	1,33	6,8	63,38	0,58	
<i>D. binata</i>	3,1	4,29	22,33	6,9	70,42	0,42	
	3,2	42,86	1,33	6,10	81,69	0,22	
	3,3	50,00	1,00	Ramentaceon (Ramentaceone)	7	45,07	1,22
	3,4	61,43	0,63	<i>D. capensis</i>	8,1	4,23	22,67
	3,5	68,57	0,46		8,2	12,68	6,89
	3,6	78,57	0,27		8,3	47,89	1,09
3,7	87,14	0,15	8,4		63,38	0,58	
Mirycecytyna (Mirycetin)	4	78,57	0,27		8,5	70,42	0,42
Chloroplumbagina (Chloroplumbagin)	5	31,43	2,18	8,6	81,69	0,22	
				Kwercetytyna (Quercetin)	9	74,65	0,34
				Droseron (Droseone)	10	56,34	0,78

Plamki flawonoidów: mirycetyny i kwercetyny (plamki 4 i 9 rys. 1) w świetle widzialnym wykazują zabarwienie pomarańczowe (rys. 1), przy długości fali 365 nm wykazują żółtą fluorescencję (rys. 2), a przy długości fali 254 nm wykazują fluorescencję błękitno-szara (rys. 3).

Eluent o składzie MeOH:H₂O 25:75 (v/v) z dodatkiem kwasu siarkowego (pH 3) wykazywał zbyt małą siłę elucyjną i składniki w większości pozostały na linii startowej lub w jej pobliżu. Zastosowanie eluentu o składzie MeOH:H₂O 75:25 (v/v) i 50:50 (v/v) z dodatkiem kwasu siarkowego (pH 3) doprowadziło do rozdzielania ekstraktów roślinnych. W tych warunkach uzyskano selektywne rozdzielanie poszczególnych składników z grupy flawonoidów. Przy tym składzie eluentu zaobserwowano także większą, niż poprzednio, liczbę rozdzielonych substancji.

Eluenty będące mieszaninami wody (pH 3) oraz izopropanolu zmieszanych w stosunkach 42:35 i 65:35 (v/v) pozwoliły natomiast na rozdzielanie największej liczby składników z ekstraktów roślin owadożernych. Eluent o składzie izopropanol:H₂O 42:58 (v/v) (pH 3) odznaczał się korzystną wartością siły elucyjnej, a także pozwolił uzyskać zadowalające rozdzielanie chloroplumbaginy i droseronu z ekstraktu *Drosera aliciae*. Eluent o większej sile elucyjnej, tj. ten, w którym stosunek składnika organicznego do wody wynosił 65:35 (v/v) zapewnił rozdzielanie chloroplumbaginy i droseronu, natomiast nie zapewniał dostatecznie selektywnych warunków do rozdzielania flawonoidów.

Mieszanina acetonitrylu i wody o składzie 65:35 (v/v) (pH 3) selektywnie rozdziela flawonoidy - mirycetynę i kwercetynę, pozostałe interesujące substancje są jednak słabo rozdzielone.

W badaniach z zastosowaniem mieszaniny wody i tetrahydrofuranu uzyskano dużą liczbę rozdzielonych substancji, a także stwierdzono rozdzielanie chloroplumbaginy w ekstraktach z roślin *Drosera binata* i *Drosera aliciae* oraz droseronu w ekstraktach z roślin *Drosera capensis* i *Drosera aliciae*. Dodatkowo, należy podkreślić, że przy zastosowaniu THF-u do rozdzielania składników ekstraktów roślinnych, można zauważyć pojawiające się substancje poniżej plamki chloroplumbaginy niewidoczne przy rozdzielaniu ekstraktów z zastosowaniem innych roztworów rozpuszczalników, co oznacza zapewnienie selektywnych warunków do rozdzielania substancji z grupy naftochinonów. Rozdzielenie flawonoidów z zastosowaniem THF-u odznacza się małą selektywnością (mała różnica w wartościach współczynnika k_{RF} oraz wartości współczynników retencji, mieszczące się w przedziale od 0,67 dla mirycetyny do 1,47 dla kwercetyny).

Badania z zastosowaniem eluentu będącego mieszaniną wody i dioksanu pokazują, iż eluent ten niezależnie od zawartości rozpuszczalnika organicznego odznacza się niewielką przydatnością do rozdzielania ekstraktów roślin owadożernych, ponieważ rozdzielaniu ulega mała ilość substancji od 3 dla *D. capensis* do 6 dla *D. muscipula*. Ponadto substancje obecne w ekstraktach roślinnych rozdzielone są mało selektywnie, tzn. wartość współczynników rozdzielania (α), mieści się na poziomie od 1,2 do 1,5.

4. Podsumowanie

Badania metanолоwych ekstraktów roślin owadożernych z gatunków: *D. muscipula*, *D. binata*, *D. aliciae*, *D. capensis* przy użyciu cienkowarstwowej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC) wskazują na konieczność zastosowania elucji gradientowej, w celu selektywnego rozdzielania wszystkich składników. Składnikami eluentu powinny być następujące rozpuszczalniki:

- izopropanol
- metanol.

Badania z wykorzystaniem chromatografii planarnej wskazują, iż najbardziej efektywne w rozdzielaniu ekstraktów z roślin owadożernych byłoby wykorzystanie elucji gradientowej ze względu na bardzo dużą liczbę składników ekstraktów o różnej hydrofobowości. Dodatkowo, możliwe jest zastosowanie elucji wstecznej eluentu w kolumnie w celu całkowitego oczyszczenia kolumny po zakończeniu rozdzielania składników ekstraktów roślinnych. Jednak, alternatywnie, można wykorzystać także elucję skokową, która pozwoliłaby na odzysk składników eluentów. Tego typu postępowanie w znaczny sposób zmniejszy ilości zużytych rozpuszczalników, co wpłynie na zmniejszenie emisji substancji o właściwościach ekotoksycznych. Dodatkowo recyrkulacja rozpuszczalników pozwoli na zmniejszenie kosztów otrzymywania składników o aktywności farmakologicznej z ekstraktów roślinnych, co zwiększy opłacalność procedury preparatywnego otrzymywania składników farmakologicznie aktywnych z ekstraktów roślin owadożernych.

Conclusions

*Results of research with thin layer chromatography in reversed phase system (RP-TLC) of methanol extracts of carnivorous plants: *D. muscipula*, *D. binata*, *D. aliciae*, *D. capensis* reveals that for selective separation of compounds from all investigated groups, a gradient elution is necessary. The eluent should be composition of:*

- *isopropanol*
- *methanol.*

Research with planar chromatography revealed that most effective separation of carnivorous plants extracts regarding to the number of compounds and its hydrophobicity will be observed at gradient elution conditions. Additionally a back-flush elution after separation of target group of compounds is also possible for complete elution of all injected compounds. Alternatively, it is also possible to use the step elution. In this mode an recovery of the eluent is more possible. This methodology minimizes the volumes of organic solvents, which minimize the emission of substances with ecotoxic properties. Additionally recycling of solvent minimizes the costs and enlarges the profitability of production of compounds with pharmacologically activeness from carnivorous plants extracts.

Literatura (Literature)

1. D.H. Benzig, *The origin and rarity of botanical carnivory*, Elsevier, 1987.
2. B.E. Juniper, R.J. Robins, *Carnivorous plants*, Academic press, London, 1989.
3. S. Porembski, W. Barthlott, *Advances in carnivorous plants research*, Plant Biology, **8**(2006)737.
4. A. Krolicka, A. Szpitter, E. Gilgenast, G. Romanik, M. Kamiński, E. Łojkowska, *Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors*, Enzym. Microb. Tech., **42**(2008)216.
5. A. Gurib-Fakim, *Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow*, Mol. Aspect. Med., **27**(2006)1.
6. T. Tran, E. Saheba, A.V. Arcerio, V. Chavez, Q. Li, L.E. Martinez, T.P. Prim, *Quinones as antimycobacterial agents*, Bioorg. Med. Chem., **12**(2004)4809.
7. P. Babula, V. Adam, René Kizek, Z. Sladky, L. Have, *Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death*, Environ. Exp. Bot., **65**(2009)330.
8. N. Lall, O. Weiganand, A.A. Hussein, J.J.M. Meyer, *Antifungal activity of naphthoquinones and triterpenes isolated from the root bark of *Euclea natalensis**, S. Afr. J. Bot., **72**(2006) 579.
9. R.A. Baker, J.H. Tatum, S. Nemec, *Toxin production by *Fusarium solani* from fibrous roots of blight-diseased citrus*, Phytopatholog., **71**(1981)951.
10. S. Nemec, R.A. Baker, J.H. Tatum, *Toxicity of dihydro- fusarubin and isomarticin from *Fusarium solani* to citrus seedlings*, Soil Biol. Chem., **20**(1988)493.
11. J. Marcinkowska, J.M. Kraft, L.Y. Marquis, *Phytotoxic effects of cell-free cultural filtrates of *Fusarium solani* isolates on virulence*, Can. J. Plant Sci., **62**(1982)1027.
12. A.G. Medentsev, V.K. Akimenko, *Naphthoquinone metabolites of the fungus*, Phytochem., **47**(1998)935.
13. R.A. Baker, J.H. Tatum, S. Nemec, *Antimicrobial activity of naphthoquinones from *Fusaria**, Mycopatholog., **111**(1990)9.
14. I. Kurobane, N. Zaita, A. Fukuda, *New metabolites of *Fusarium martii* related to dihydrofusarubin*, J. Antibiot., **39**(1986)205.
15. J.H. Tatum, R.A. Baker, R.E. Berry, *Naphthoquinones and derivatives from *Fusarium**, Phytochem., **26**(1987)2499.
16. T.J. Monks, R.P. Hanzlik, G.M. Cohen, D. Ross, D.G. Graham, *Quinone chemistry and toxicity*, Toxicol. Appl. Pharm., **112**(1992)2.
17. L. Cai, G.X. Wei, P. van der Bijl, C.D. Wu, *Namibian chewing stick, *Diospyros lycioides*, contains antibacterial compounds against oral pathogens*, J. Agric. Food Chem., **48**(2000)909.

18. J.Q. Gu, T.N. Graf, D. Lee, H.B. Chai, *Cytotoxic and antimicrobial constituents of the bark of Diospyros maritima collected in two geographical locations in Indonesia*, J. Nat. Prod., **67**(2004)1156.
19. 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.
20. F. Gafner, J.C. Chapuis, J.D. Msonthi, K. Hostettmann, *Cytotoxic naphthoquinones molluscicidal saponins and flavonols from Diospyros-zombe*, Phytochem., **26**(1987)2501
21. P. Mebe, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, Phytochem., **47**(1998)311.
22. S.P.N. Mativandlela, J.J. M. Meyer, A.A. Hussein, P.J. Houghton, C.J. Hamilton, N. Lall, *Activity against Mycobacterium smegmatis and M. tuberculosis by extract of South African medicinal plants*, Phytother. Res., **22**(2008)841
23. F. Galeotti, *Flavonoids from carnation (Dianthus caryophyllus) and their antifungal activity*, Phytochem. Lett., **1**(2008)44.
24. M. Kumar, A. Ahmad, P. Rawat, M. Faheem Khan. Naila Rasheed, P. Gupta, B Sathiamoorthy, G. Bhatia, G. Palit, R. Maurya, *Antioxidant flavonoid glycosides from Evolvulus Alsinoides*, Fitoterapia, **81**(2009)234.
25. M.M Cowan, *Plant products as antimicrobial agents*, Clin. Microbiol., **12**(1999)564.
26. T.G. Son, *Plumbagin, a novel Nrf2/ARE activator, protects against cerebral ischemia*, J. Neurochem., **112**(2010)1316.
27. J.L. Vennerstrom, J.W. Eaton, *Oxidants, oxidant drugs and malaria*, J. Med. Chem., **31**(1988)1269.
28. P.A.L. Ferraz, F.C. de Abreu, A.V. Pinto, V. Glezer, J. Tonholo, M.O.F. Goulart, *Electrochemical aspects of the reduction of biologically active 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones*, J. Electroanal. Chem., **507**(2001)275.
29. L. Cai, G.X. Wei, P. Van der Bijl, C.D. Wu, *Namibian chewing stick, Diospyros lycioides, contains antibacterial compounds against oral pathogens*, J. Agric. Food Chem., **48**(2000)909.
30. J.Q. Gu, T.N. Graf, D. Lee, H.B. Chai, *Cytotoxic and antimicrobial constituents of the bark of Diospyros Maritima collected in two geographical locations in Indonesi*, J. Nat. Prod., **67**(2004)1156.
31. 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.
32. F. Gafner, J.C. Chapuis, J.D. Msonthi, K. Hostettmann, *Cytotoxic naphthoquinones molluscicidal saponins and flavonols from Diospyros-zombensis*, Phytochem., **26**(1987)2501.
33. S.P.N. Mativandlela, *Activity against Mycobacterium smegmatis and M. tuberculosis by extract of South African medicinal plants*, Phytother. Res., **22**(2008)841.

34. S.J. Yang, S.C. Chang, H.C. Wen, C.Y. Chen, J.F. Liao, C.H. Chang, *Plumbagin activates ERK1/2 and act via superoxide*, Src and PI3-kinase in 3T3-L1 Cells, *Eur. J. Pharma.*, **638**(2010)21.
35. A. Lewandowski, praca magisterska, Politechnika Gdańska 2010.