

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

¹ Politechnika 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

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

Opracowanie optymalnych warunków rozdzielania i identyfikacji metabolitów roślin z rodzaju *droseraceae*, z zastosowaniem wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej

A research on the composition of eluent for separation of plant metabolites by column reversed phase liquid chromatography

Streszczenie: *Od kilku lat na świecie trwają badania składników roślin owadożernych wykazujących atrakcyjne właściwości biologicznie czynne, tj. działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybowe, antyoksydacyjne, a być może, także, przeciwnowotworowe. Pozyskiwanie substancji biologicznie aktywnych z materiału naturalnego, na drodze hodowli in vitro a następnie ekstrakcji i rozdzielania jest bardziej korzystne pod względem ekonomicznym, niż ich wytwarzanie metodami syntezy chemicznej, która w wielu przypadkach składa się z wielu etapów, a wypadkowa efektywność jest często niezadowalająca.*

*W pracy zaprezentowano wyniki badań dotyczących opracowania najkorzystniejszych warunków rozdzielania oraz identyfikacji składników ekstraktów roślin owadożernych z czterech roślin rodziny Droseraceae, tzn., *Drosera binata*, *Drosera capensis*, *Drosera aliciae* oraz *Dionea muscipula*. Badania polegały na zaprojektowaniu optymalnego układu chromatograficznego oraz optymalnych warunków rozdzielania pozwalających w sposób możliwie jak najbardziej selektywny rozdzielić składniki z grupy naftochinonów oraz flawonoidów. Wykorzystano techniki kolumnowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej, w odwróconych układach faz (RP-HPLC). Porównano wyniki badań uzyskane z zastosowaniem elucji gradientowej. Za każdym razem stosowano przepływ zwrotny eluentu w kolumnie. Stosowanie elucji gradientowej jest celowe w badaniach składu metabolicznego roślin, identyfikacji oraz oznaczania zawartości składników w ekstraktach, a także w kontroli jakości i standaryzacji materiału zielarskiego.*

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

Abstract: *For several years have been carried out researches of chemical compounds with attractive biological activity (antimicrobial, antifungal, antioxidant and anticancer activity) founded in insectivorous plants. Production of plant metabolites from in vitro cultures by procedures consisting of the extraction methods and separation techniques is economically more advantageous, than "classic" methods of chemical synthesis, which are consisted of many steps, which final efficiency is unsatisfactory.*

A developed most favorable conditions for separation and identification of the components of extracts of four plants from Droseraceae: *Drosera aliciae*, *Dionea muscipula*, *Drosera binata* and *Drosera capensis* are presented in the paper. The optimal conditions of the chromatographic system provide a selective separation of naphthoquinones and flavonoids from the samples of plant extracts. Column chromatography techniques in reversed phase conditions were used in the researches. The paper presents a comparison of separations made in different chromatographic systems with gradient elution. After every separation the direction of the eluent flow in the column was inverted.

Application of gradient elution is significant in researches for identification of the compounds and quantitative determination of plant metabolites, as well as for the quality control and standardization of natural herbal materials.

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

1. Wstęp (Introduction)

W roślinach owadożernych zidentyfikowano szeroką gamę związków chemicznych, w tym między innymi takie związki chemiczne jak: naftochinony, flawonoidy, glukozydy i kwasy fenolowe. Niektóre z nich posiadają aktywność farmakologiczną i są stosowane w produkcji preparatów leczniczych. Przykładowo rosiczka, jest od dawna wymieniana w farmakopei. Poza tym stosowana jest w fitoterapii, homeopatii i leczeniu ludowym [1].

Wśród związków zawartych w roślinach z rodziny *Droseraceae* ze względu na właściwości lecznicze na uwagę zasługują zawarte w nich naftochinony tj.: plumbagina, chloroplumbagina, hydroksylplumbagina i ramentaceon oraz flawonoidy: kwercetyna i mirycetyna [2, 3].

Plumbagina wykazuje działanie: przeciwbakteryjne, przeciwmalaryczne, przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne oraz przeciwmiażdżycowe. Jej właściwości przeciwnowotworowe zostały potwierdzone wynikami eksperymentów *in vitro* na komórkach zarodkowych myszy [4]. Działanie cytotoksyczne plumbaginy prowadzi do apoptozy komórek rakowych. Plumbagina działa silnie bakteriobójczo m.in. na gronkowce, paciorkowce, prątki oraz dwoinki, które wywołują choroby układu oddechowego. Do efektów ubocznych stosowania plumbaginy należą biegunki, wysypki, zwiększanie liczby białych krwinek oraz wzrost stężenia fosforanów w surowicy krwi. Plumbagina jest ponadto szkodliwa dla wątroby [4, 5, 6].

Chloroplumbagina występuje m.in. w roślinie *Plumbago zeylanica* z rodziny *Plumbaginaceae*. Roślina ta posiada właściwości wykrztuśne, przeciwzapalne, przeciwreumatyczne oraz moczopędne. Jest stosowana w leczeniu niestrawności, biegunki oraz chorób skóry. Ekstrakty alkoholowe oraz wodne wykazują właściwości przeciwbakteryjne. Działanie czystej chloroplumbaginy nie zostało dotychczas zbadane [7].

Ramentaceon występuje w roślinach z gatunku *Drosera*, jego zawartość waha się w zależności od rodzaju gatunku oraz warunków hodowli. Występuje on również w roślinach z gatunku *Ebenaceae* [8]. 7-metylojuglon wykazuje właściwości przeciwbakteryjne w stosunku do bakterii z gatunku



Neisseria gonorrhoeae oraz działanie przeciwgrzybowe w stosunku do grzybów z gatunku *Cladosporium cucumerinum*, działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych raka okrężnicy oraz działanie toksyczne w stosunku do niektórych owadów. Ponadto posiada działanie przeciwgruźlicze, a także jest inhibitorem kwasu 12-hydroksyeicosatetraenowego, który jest kluczowym przekaźnikiem sygnału w tworzeniu przerzutów i procesie miażdżycy [7, 8].

Droseron występuje w większości roślin owadożernych. Związek ten posiada właściwości spazmolityczne (rozkurczające mięśnie gładkie), przeciwkaszlowe oraz właściwości antybiotyczne [7].

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.

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).

W badaniach wykorzystywano następujące rozpuszczalniki: metanol (MeOH), acetonitryl (ACN), izopropanol (izo-PrOH), tetrahydrofuran (THF), 1,4-dioksan (diox) o czystości do HPLC (Merck, Niemcy). Kwas siarkowy (cz.d.a.) został zakupiony w firmie P.P.H Standard (Polska). Woda dejonizowana stosowana w badaniach pochodziła z urządzenia Milli Q (Millipore, USA).

Aparatura (*Equipment*)

Gradientowy chromatograf cieczowy wyposażony w czterokanałowy system elucji gradientowej z zaworami proporcjonującymi (tzw. gradient niskociśnieniowy) i pompę L-6200 (Merck – Hitachi, Niemcy, Japonia), zawór dozujący Rh-7161 (Rheodyne, USA) z pętlą dozującą 20 µl, detektor UV-DAD 7450A, dodatkowo w sześciodrogowy dwupołożeniowy zawór Rh-7010 (Rheodyne, USA), do zmiany kierunku przepływu fazy ruchomej w kolumnie (backflash), oprogramowanie D 7000 HPLC System Manager (Merck - Hitachi, Niemcy, Japonia) został wykorzystany w badaniach.

Badania z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej zostały przeprowadzone z wykorzystaniem kolumny LiChrospher 100 RP-18e o średnicy ziarna 5 μm oraz wymiarach 125 mm x 4 mm (Merck, Niemcy).

Procedura analityczna (Analytical procedure)

Celem badań z zastosowaniem wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej było opracowanie procedury umożliwiającej najbardziej selektywne rozdzielanie składników zawartych w ekstraktach roślin owadożernych. W badaniach podjęto, także, próbę identyfikacji rozdzielonych składników zawartych w ekstraktach z roślin: *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae*.

Procedury rozdzielania zostały poprzedzone przygotowaniem mieszaniny substancji wzorcowych i ekstraktów z roślin owadożernych. Ekstrakty metanolowe roślin z gatunków *D. muscipula*, *D. aliciae*, *D. capensis* i *D. binata* pochodziły z hodowli *in vitro* Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. W badaniach wykorzystane zostały rośliny rozmnażane *in vitro*, ponieważ znajdują się one pod całkowitą ochroną.

W celu dokładnego wyznaczenia stężenia składników zawartych w ekstraktach metanolowych roślin owadożernych, 1 ml ekstraktu został przeniesiony do zważonej fiołki, następnie odparowany do sucha w strumieniu azotu i powtórnie zważony. Sucha masa została rozpuszczona w 1 ml metanolu.

W badaniach rozdzielano metanolowe ekstrakty roślin owadożernych z gatunku *D. muscipula* i *D. aliciae*, które posłużyły, jako materiały reprezentatywne. Autorzy badań założyli, że optymalne warunki rozdzielania dla gatunków wzorcowych będą optymalne również ekstraktów z innych gatunków roślin owadożernych. Dodatkowo zastosowanie ekstraktów metanolowych z jedynie dwóch gatunków roślin owadożernych był pozwolił zmniejszyć stopień zużycia eluentów oraz umożliwił znaczną oszczędność czasu. Eluent stanowiła mieszanina wody z dodatkiem kwasu siarkowego (VI) (pH 3) oraz składnika organicznego: metanol, izopropanol, tetrahydrofuran i acetonitryl. Etap badań miał na celu potwierdzenie wniosków wyciągniętych na podstawie wyników badań dotyczących opracowania najkorzystniejszego składu eluentu do rozdzielania składników ekstraktów roślin owadożernych z zastosowaniem chromatografii planarnej, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w warunkach elucji gradientowej.

Na podstawie uzyskanych wyników, w dalszych badaniach nad rozdzielaniem składników czterech ekstraktów metanolowych zastosowano trójskładnikowy eluent, w którego skład wchodziła woda z dodatkiem H_2SO_4 (pH 3) oraz dwa składniki organiczne tj: metanol i izopropanol. W tabeli 1 przedstawiono skład eluentu trójskładnikowego oraz przebieg programu elucji, w którym poddano rozdzielaniu cztery metanolowe ekstrakty roślin: *D. muscipula*, *D. aliciae*, *D. capensis* i *D. binata*.

Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1 ml/min, objętość dozowanej próbki wynosiła 20 μl . W badaniach w sposób automatyczny poprzez program D - 7000 HSM co 0,4 s rejestrowano widmo w za-



kresie 205 do 800 nm (z wyjątkiem eluentu, którego składnikiem był THF tutaj widmo rejestrowano w zakresie 220-800 nm, gdyż THF silnie absorbuje promieniowanie UV do 220 nm). W wyniku rejestracji widma otrzymano 3-wymiarowy chromatogram, który odwzorowany był na ekranie monitora w formie poziomicowej. W badaniach stosowano zawór do przepływu zwrotnego eluentu, w celu wyeluowania z kolumny substancji silnie związanych z powierzchnią sorpcyjną. Zawór był przełączany w 23 minucie każdego analizy, aby wyeluowane zostały substancje niskopolarne, tj. chlorofile, karotenoidy oraz woski.

Przedstawiona procedura analityczna zgodna z przedstawioną w pracy dyplomowej Aleksandra Lewandowskiego [8].

Tabela 1. Program elucji oraz skład eluentów dwuskładnikowych

Table 1. A Comparison of the elution programs and the composition of 2-component eluents

Nr układu chromatograficznego (Number of chromatographic system)	Składniki eluentu (Eluent component)		Kolumna chromatograficzna (Chromatographic column)	Program elucji (Elution program)			
	A	B		t [min]	A	B	
1	H ₂ O + H ₂ SO ₄ (pH=3)	izo-PrOH (2-	LiChrospher RP-18e, 5 mm, 125 x 4 mm	100			
					t [min]	A	B
				0	95	5	
			20	5	95		
			30	5	95		
2	H ₂ O + H ₂ SO ₄ (pH=3)	MeOH	LiChrospher RP-18e, 5 mm, 125 x 4 mm	100			
					t [min]	A	B
				0	95	5	
			20	5	95		
			30	5	95		
3	H ₂ O + H ₂ SO ₄ (pH=3)	THF	LiChrospher RP-18e, 5 mm, 125 x 4 mm	100			
					t [min]	A	B
				0	95	5	
			20	5	95		
			30	5	95		
4	H ₂ O + H ₂ SO ₄ (pH=3)	ACNI	LiChrospher RP-18e, 5 mm, 125 x 4 mm	100			
					t [min]	A	B
				0	95	5	
			20	5	95		
			30	5	95		

Tabela 2. Program elucji oraz skład eluentu trójskładnikowego**Table 2.** A Comparison of the elution programs and the composition of 3-component eluents

Nr układu chromatograficznego (Number of chromatographic system)	Składniki eluentu (Eluent komponent)			Kolumna chromatograficzna (Chromatogr. kolumn)	Program elucji (Elution program)			
	A	B	C		t[min]	A	B	C
5	H ₂ O + H ₂ SO ₄ pH=3	MeOH)	izo-PrOHI	LiChrospher 100 RP-18e, 5 mm, 125 x 4 mm	0	90	5	5
					14	30	65	5
					14,1	45	50	5
					20	10	50	40
					30	10	50	40

Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

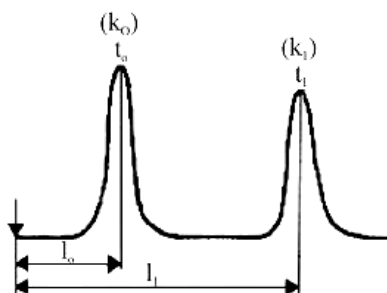
Tabela 3. Zestawienie substancji rozdzielonych w ekstrakcie *Dionaea muscipula* wraz z wyznaczonymi współczynnikami retencji k oraz współczynnikami selektywności α , rozdzielanych z wykorzystaniem programów elucji zamieszczonych w tabeli 1-2

Table 3. A comparison of the substances separated in *Dionaea muscipula* extract and calculated values of retention coefficient (k) and selectivity coefficient (α) of separated substances with the use of elution programs listed in tab. 1-2

<i>D. muscipula</i> / Składnik organiczny eluentu: izopropanol (<i>D. muscipula</i> / Organic component of the eluent: isopropanol)					<i>D. muscipula</i> / Składnik organiczny eluentu: izopropanol (<i>D. muscipula</i> / Organic component of the eluent: methanol)				
Substancja (Substance)	t_R	k	α_1	α_2	Substancja (Substance)	t_R	k	α_1	α_2
A	3,74	2,56	-	1,25	A	6,04	4,75	-	1,44
B	4,40	3,19	1,25	1,70	B	8,23	6,84	1,44	1,61
E	6,76	5,44	1,70	1,11	E	12,60	11,00	1,61	1,04
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	7,37	6,02	1,11	1,06	F	13,07	11,45	1,04	1,05
Mirycecytna (<i>Mirycetin</i>)	7,78	6,41	1,06	1,08	Mirycecytna (<i>Mirycetin</i>)	13,73	12,08	1,05	1,10
Kwercetyna (<i>Quercetin</i>)	8,34	6,94	1,08	1,34	Kwercetyna (<i>Quercetin</i>)	15,00	13,29	1,10	1,07
I	10,82	9,30	1,34	1,18	I	15,91	14,15	1,07	1,02
-	-	-	-	-	I ₂	16,20	14,43	1,02	1,11

Plumbagina (Plumbagin)	12,54	10,94	1,18	1,05	Plumbagina (Plumbagin)	17,87	16,02	1,11	1,07
J	13,10	11,48	1,05	1,15	J	19,02	17,11	1,07	1,06
Chloroplumbagina (Chloroplumbagin)	14,86	13,15	1,15	-	Chloroplumbagina (Chloroplumbagin)	20,09	18,13	1,06	-
D. muscipula/ Składnik organiczny eluentu: tetrahydrofuran (D. muscipula / Organic component of the eluent: tetrahydrofuran)					D. muscipula/ Składnik organiczny eluentu: acetonitrylu (D. muscipula / Organic component of the eluent: acetonitrile)				
Substancja (Substance)	t_R	k	α_1	α_2	Substancja (Substance)	t_R	k	α_1	α_2
-	-	-	-	-	A	5,13	3,89	-	1,17
B	5,13	3,89	-	1,75	B	5,81	4,53	1,17	1,33
E	8,21	6,82	1,75	1,16	E	7,36	6,01	1,33	1,05
F1	9,34	7,90	1,16	1,09	F1	8,29	6,90	1,09	1,11
F	10,08	8,60	1,09	1,04	-	-	-	-	-
Mirycecytyna (Mirycetin)	10,43	8,93	1,04	1,05	Mirycecytyna (Mirycetin)	7,70	6,33	1,05	1,09
Kwercetytyna (Quercetin)	10,94	9,42	1,05	1,15	Kwercetytyna (Quercetin)	9,07	7,64	1,11	1,19
I	12,45	10,86	1,15	1,03	I	12,89	11,28	1,24	1,10
-	-	-	-	-	I2	10,60	9,10	1,19	1,24
Plumbagina (Plumbagin)	12,80	11,19	1,03	1,05	Plumbagina (Plumbagin)	14,03	12,36	1,10	1,15
J	13,33	11,70	1,05	1,09	-	-	-	-	-
Chloroplumbagina (Chloroplumbagin)	14,42	12,73	1,09	-	Chloroplumbagina (Chloroplumbagin)	15,92	14,16	1,15	-

Współczynniki retencji k zostały obliczone dla wszystkich zidentyfikowanych substancji, współczynniki selektywności wyznaczono natomiast dla substancji, dla których posiadano wzorce oraz dla substancji powtarzających się w badanych ekstraktach. Współczynnik selektywności określa stopień rozdzielania pików dwóch sąsiednich składników rozdzielanej mieszaniny. Na rys. 1 przedstawiony jest sposób wyznaczenia parametru na podstawie chromatogramu, korzystając ze wzoru (1) oraz wzoru (2) [9]. W tabeli 3 kreski „-”, w rubryce dotyczącej współczynników selektywności oznaczają, że dana substancja nie jest poprzedzona wcześniejszą substancją bądź za nią nie ma już pików kolejnej substancji.



Rys. 1. Schemat sposobu wyznaczania współczynnika selektywności [9]
 Fig. 1. Scheme of method of calculation selectivity factor [9]

$$k_i = \frac{t_i - t_m}{t_m} \quad (1)$$

gdzie:

k_i – współczynnik retencji i-tej substancji,
 t_i – czas retencji i-tej substancji,
 t_m – czas martwy [min].

$$\alpha = \frac{k_1}{k_0} \quad (2)$$

gdzie:

α – współczynnik selektywności,
 k_0 – współczynnik retencji substancji słabiej oddziałującej z fazą stacjonarną
 k_1 – współczynnik retencji substancji silniej oddziałującej z fazą stacjonarną

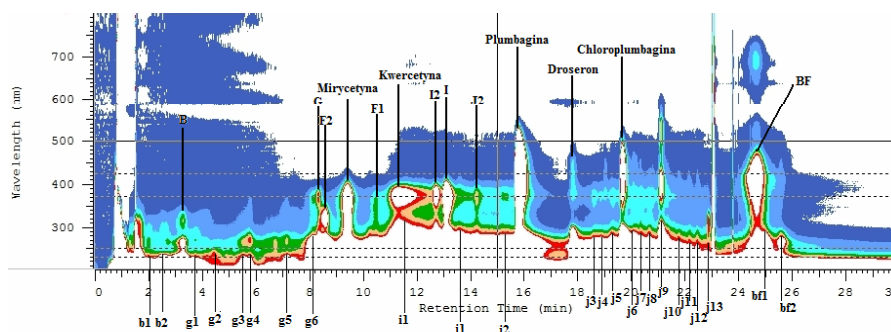
Na podstawie otrzymanych chromatogramów podjęto także próbę identyfikacji substancji zawartych w ekstraktach roślinnych. Widma spektralne posłużyły do identyfikacji metabolitów, o dostępnych wzorcach – identyfikacja na podstawie dwóch parametrów – widma i wartości czasu retencji, a także do identyfikacji substancji „powtarzających się” w każdym z eluentów. Piki substancji, zidentyfikowanych na podstawie wzorców zostały opisane na chromatogramach za pomocą nazw wzorców, pozostałym substancjom zostały przypisane symbole dużych liter alfabetu. Substancje występujące w niskich stężeniach zostały opisane na chromatogramach małymi literami alfabetu.

Zastosowanie do rozdzielania składników ekstraktów z roślin owadozernych eluentu, będącego mieszaniną izopropanolu i wody zakwaszonej H_2SO_4 do pH 3, pozwoliło stwierdzić obecność 40 substancji w ekstrakcie *Dionaea muscipula* i 34 w ekstrakcie *Drosera aliciae*. Współczynniki retencji



k dla 27-miu zaobserwowanych substancji z ekstraktu *Dionaea muscipula* mieściły się w optymalnym przedziale od 1÷10. Ponadto metabolity, których wzorce były w posiadaniu nieznacznie wykraczały poza ten przedział, $k = 10,94$ dla plumbaginy i $k = 13,15$ dla chloroplumbaginy. W ekstrakcie *Drosera aliciae* współczynniki k dla 22 substancji mieściły się w optymalnym przedziale, natomiast współczynnik k dla kolejnych trzech substancji odbiegał tylko o 0,87 od przedziału optymalnego. Dla *Dionaea muscipula* analiza chromatogramów rozdzielania metabolitów, których wzorce były dostępne, pozwala stwierdzić, iż flawonoidy są w tym układzie najlepiej rozdzielone od substancji im towarzyszących, natomiast dla naftochinonów otrzymano bardzo dobre rozdzielanie od substancji im towarzyszących przy wartości współczynnika k niewiele powyżej 10. Dla *Drosera aliciae* układ z eluentem zawierającym izopropanol pozwolił zidentyfikować tylko dwa metabolity, których wzorce były dostępne i posiadały one współczynniki retencji mniejsze od 10. Należy zaznaczyć, że rozdzielanie ramentaceonu od innych składników ekstraktu jest najlepsze spośród badanych układów chromatograficznych.

Wykorzystanie, jako elentu mieszaniny metanolu i wody zakwaszonej H_2SO_4 do pH 3 pozwoliło w ekstrakcie *Dionaea muscipula* stwierdzić obecność 41 substancji a w ekstrakcie z *Drosera aliciae* 38 substancji. W tym układzie tylko dla 15 substancji współczynniki retencji k z ekstraktu *Dionaea muscipula* i z *Drosera aliciae* mieszczą się w przedziale od 1÷10. Można uznać, że współczynniki k dla mirycetyny oraz dla kwercetyny tylko nieznacznie wykraczają poza optymalny przedział, w przypadku naftochinonów różnice są natomiast już zbyt duże. W tym eluencie rozdzielanie flawonoidów między sobą jest najlepsze spośród badanych układów.

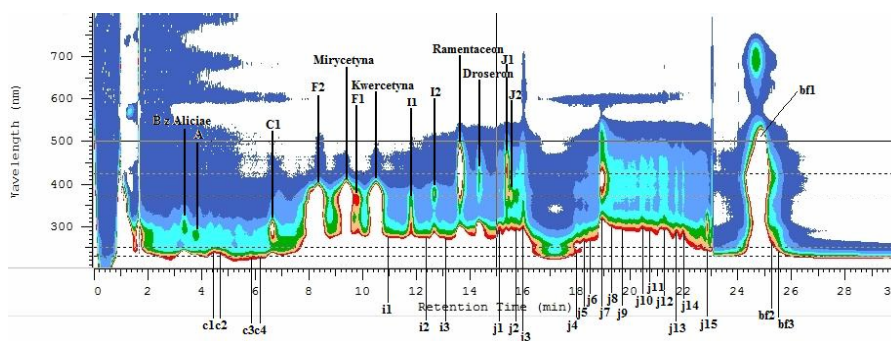


Rys. 2. Chromatogram detektora UV-VIS (typ DAD) rozdzielania ekstraktu metanolowego *D. muscipula* eluentu izopropanol : woda 65:35 (v/v) z dodatkiem kwasu siarkowego (VI) do pH 3, kolumna LiChrosphere RP18e 125 x 4 mm, 5 μ m, natężenie przepływu, objętość dozowania 20 μ l

Fig. 2. The UV-VIS/DAD detector chromatogram of *D. muscipula* methanol extract. Eluent: isopropanol : water in addition H_2SO_4 (pH 3) 65:35 (v/v), column: LiChrosphere RP18e 125 x 4 mm, 5 μ m, flow rate 1ml/min, injection volume 20 μ l

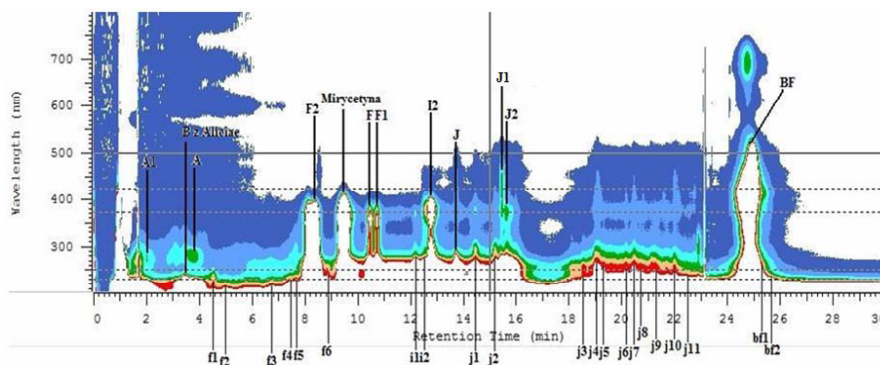
Program elucji (*Elution program*):

t[<i>min</i>]	A	B	C
0	90	5	5
14	30	65	5
14,1	45	50	5
20	10	50	40
30	10	50	40



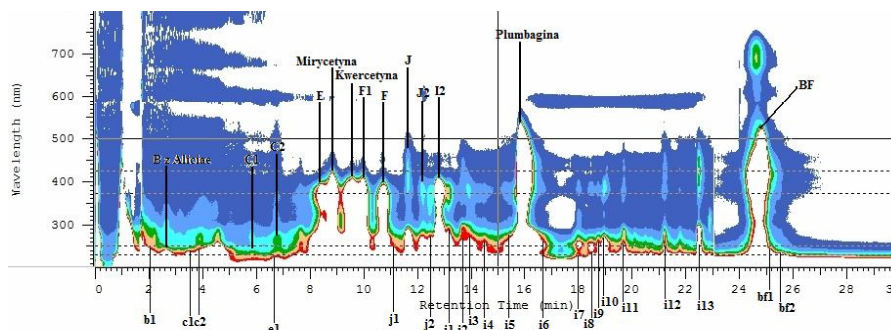
Rys. 3. Chromatogram detektora UV-VIS (typ DAD) rozdzielania ekstraktu metanolowego *D. aliciae*. Warunki rozdzielania, jak na rys. 2

Fig. 3. The UV-VIS/DAD detector chromatogram of *D. aliciae* methanol extract. Separation conditions were the same as in Fig. 2



Rys. 4. Chromatogram detektora UV-VIS (typ DAD) rozdzielania ekstraktu metanolowego *D. capensis*. Warunki rozdzielania, jak na rys. 2

Fig. 4. The UV-VIS/DAD detector chromatogram of *D. capensis* methanol extract. Separation conditions were the same as in Fig. 2



Rys. 5. Chromatogram detektora UV-VIS (typ DAD) rozdzielania ekstraktu metanolowego *D. binata*. Warunki rozdzielania, jak na rys. 2

Fig. 5. The UV-VIS/DAD detector chromatogram of *D. binata* methanol extract. Separation conditions were the same as in Fig. 2

Badania, w których składnikiem eluentu była mieszanina tetrahydrofuranu i wody zakwaszonej H_2SO_4 do pH 3 pozwoliło w ekstrakcie *Dionaea muscipula* uzyskać rozdzielanie 34 substancji a w ekstrakcie z *Drosera aliciae* 39 substancji. W tym układzie 18 współczynników retencji k z ekstraktu *Dionaea muscipula* oraz 22 z ekstraktu *Drosera aliciae* mieści się w optymalnym przedziale. Dla *Dionaea muscipula* kolejnych 8 odbiega tylko o 2,73 a dla *Drosera aliciae* kolejnych 7 wartości k odbiega tylko o 1,18 od optymalnego przedziału. Przykładowo dla *Dionaea muscipula* współczynnik k dla plumbaginy wynosi $k = 11,19$, a dla chloroplumbaginy $k = 12,73$. Zastosowanie tetrahydrofuranu jako eluentu pozwala uzyskać mniej selektywne rozdzielanie badanych związków, niż w układach gdzie organicznym składnikiem eluentu był metanol lub izopropanol.

Mieszanina acetonitylu z wodą zakwaszoną H_2SO_4 do pH 3 pozwoliła wyodrębnić w ekstrakcie *Dionaea muscipula* 33, a w ekstrakcie *Drosera aliciae* 39 substancji. Dla ekstraktu *Dionaea muscipula* współczynniki retencji k 17 a dla ekstraktu *Drosera aliciae* 25 substancji znajdowały się w odpowiednim przedziale wartości. Współczynnik retencji plumbaginy $k = 12,36$ można również uznać za nieznacznie odbiegający. W tym układzie uzyskano najlepsze rozdzielanie kwercetyny z ekstraktu *Dionaea muscipula* od substancji towarzyszących oraz mirycetyny z ekstraktu *Drosera aliciae* od substancji o mniejszym czasie retencji t_R . Rozdzielenie naftochinonów z ekstraktu *Dionaea muscipula* było bardzo selektywne, aczkolwiek współczynniki k były znacznie większe niż w przypadku izopropanolu czy THF. Dla ekstraktu *Drosera aliciae* rozdzielanie naftochinonów było lepsze tylko w przypadku eluentu, którego składnikiem organicznym jest izopropanol.

Podsumowanie powyższych wyników doprowadziło do stworzenia optymalnego programu elucji (w tab. 2), w którym rozdzielono ekstrakty 4 roślin owadożernych: *D. muscipula*, *D. aliciae*, *D. capensis*, *D. binata* (chromatogramy na rys. 1, 2, 3 i 4). Parametry retencyjne i rozdzielcze miały zadowalające wartości.

W ekstrakcie *Dionaea muscipula* uzyskano rozdzielanie 38 substancji (chromatogram na rys. 2). Współczynniki retencji k 15 substancji znajdowały się w optymalnym przedziale (2÷10). Zastosowany układ chromatograficzny pozwolił selektywnie rozdzielić flawonoidy. Naftochinony odznaczają się współczynnikami retencji większymi od 10, ich rozdzielanie jest selektywne, jedynie chloroplumbagina posiada niską wartość współczynnika selektywności α_1 i $\alpha_2 = 1,02$.

W ekstrakcie *Drosera aliciae* zidentyfikowano 38 substancji (rys. 3). Współczynniki retencji k 12 substancji znajdowały się w optymalnym przedziale, kolejnych 5 odbiegały o 1,97. Zastosowany układ chromatograficzny pozwolił selektywnie rozdzielić flawonoidy. Naftochinony również są selektywnie rozdzielone, jednakże ich współczynniki retencji wynoszą k = 11,97 dla ramentaceonu oraz k = 12,68 dla droseronu.

Ekstrakt z *Drosera capensis* rozdzielono 33 substancji (rys. 4). Współczynniki retencji k 13 substancji znajdowały się w przedziale 1÷10, kolejne 3 różniły się tylko o 1,16 k. Analiza chromatogramu pozwoliła jedynie zidentyfikować mirycetynę. Rozdzielenie mirycetyny było w pełni selektywne.

W ekstrakcie *Drosera binata* zidentyfikowano 34 substancje (rys. 5). Współczynniki retencji k 13 substancji znajdowały się w optymalnym przedziale 1÷10, kolejnych 6 odbiegały o dwie jednostki k. Zastosowany układ chromatograficzny pozwolił selektywnie rozdzielić flawonoidy. Jedynym zidentyfikowanym naftochinonem była plumbagina, która posiadała współczynnik retencji k = 14,09. Współczynniki selektywności α wskazują, iż zostało uzyskane lepsze rozdzielanie tego naftochinonu od substancji towarzyszących eluowanych po plumbaginie.

2. Podsumowanie

Badania z zastosowaniem eluentów dwuskładnikowych do rozdzielania ekstraktów z roślin *D. muscipula* i *D. aliciae* za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz doprowadziły do szeregu wniosków:

- Izopropanol będący organicznym składnikiem eluentu, nadaje mu odpowiednią siłę elucyjną, ponadto jego zastosowanie pozwala selektywnie rozdzielić flawonoidy oraz naftochinony od substancji im towarzyszących,
- Współczynniki retencji k substancji z ekstraktów rozdzielanych przy użyciu eluentu, którego składnikiem jest izopropanol znajdują się w optymalnym przedziale wartości 1÷10.
- Eluent, którego składnik stanowił metanol wykazuje słabą siłę elucyjną, aczkolwiek bardzo selektywnie pozwala rozdzielić między sobą składniki z grupy flawonoidów.
- Układ chromatograficzny, w którym użyto acetonitrylu bardzo selektywnie rozdzielał kwercetynę z ekstraktu *Dionaea muscipula* oraz mirycetynę z ekstraktu *Drosera aliciae* od substancji towarzyszących.

- Rozdzielenie naftochinonów z zastosowaniem acetonitrylu okazało się selektywne, aczkolwiek współczynniki k substancji rozdzielonych były znacznie większe niż w przypadku izopropanolu czy THF.
- Do opracowania możliwie optymalnego programu elucji do rozdzielania i oznaczania składników ekstraktów roślinnych wybrano wodę z kwasem oraz składniki organiczne: metanol i izopropanol. Metanol, ponieważ selektywnie rozdzielał flawonoidy, izopropanol, gdyż selektywnie rozdzielał naftochinony.
- Dla ekstraktów z *D. capensis* i *D. binata* program elucji wymaga jeszcze pewnych modyfikacji, które sprawią iż rozdzielenie zawartych w nich substancji będzie bardziej selektywne, co pozwoli rozdzielić więcej substancji.
- Trudne, a w wielu przypadkach niemożliwe jest opracowanie uniwersalnej metodyki rozdzielania ekstraktów roślin różnych gatunków, które często wykazują znaczne różnice składu jakościowego i ilościowego.

Summary

*The research on using binary mixtures as eluent for separation of plant extracts *D. muscipula* i *D. aliciae* with HPLC gave conclusions, which are listed below:*

- *Isopropanol as a component of the eluent gives him an adequate elution strength, furthermore its application gives selective conditions for separation of flavonoids and naphthoquinones from other accompanying compounds,*
- *The k values of substances from chromatographed extracts with the use of isopropanol are in optimal range from 1 to 10,*
- *Methanol as component of the eluent has weak elution strength, however very selective conditions for separation of flavonoid compounds were reported,*
- *The chromatographic system in which the acetonitrile was used has a selective properties for separation of quercetin in respect to other components in *Dionaea muscipula* extract and of myricetin in respect to other compounds of *Drosera aliciae* extract,*
- *The separation of naphthoquinones with the use of acetonitrile was selective, however the k values of separated substances were much higher than with the use of isopropanol or THF,*
- *The optimal composition of the eluent for optimal elution program for separation and identification of plant extracts components must include water with acid addition and organic components: methanol and isopropanol. Methanol gives selective properties for separation of flavonoids and isopropanol for separation of naphthoquinones,*
- *For *D. capensis* and *D. binata* extracts the elution program needs much more modifications, which influence its properties for selective separation of more components of the extracts,*

- *It is hard and even in many cases impossible to develop a universal methodology for separation of different kind of plant extracts, which very often have very different qualitative and quantitative properties.*

Literatura (Literature)

1. M. Nowiński, „Dzieje upraw i roślin leczniczych“, *History of crops and medicinal plants*, Państwowe Wydawnictwo Rolne i Leśne, Warszawa 1980.
2. A. Krolicka, A. Szpitter, E. Gilgenast, G. Romanik, M. Kaminski, E. Lojkowska, *Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors*, *Enzyme Microb. Tech.*, **42**(2008)216.
3. 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.
4. M.J. Bapela, N. Lall, J.J.M. Meyer, *Variation of active constituents in Euclea natalensis based on seedling stages, seasons and fertilizers*, *J. S. Afr. Bot.*, **74**(2008)218.
5. <http://www.rozanski.cal.pl/>
6. Y.P. S. Bajaj; *Medicinal and aromatic plants XI*; Springer Verlag, New York, NY, 1999.
7. B. Hazra, M. D. Sarma, U. Sanyal *Separation methods of quinonoid constituents of plants used in Oriental traditional medicines*, *J. Chromatogr. B*, **812**(2004)259.
8. S.M. Ziaratnia, K.J. Kunert, N. Lall, *Isolation and identification of a novel chlorophenol from a cell suspension culture of Helichrysum aureonitens*, *J. S. Afr. Bot.*, **75**(2009)97.
9. M. Kamiński (ed.), „Chromatografia cieczowa”, *Liquid chromatography*, CEEAM, Gdańsk 2004.
10. A. Lewandowski, praca magisterska, Politechnika Gdańska 2010.