

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej



Rozprawa doktorska

**BADANIA NAD OPRACOWANIEM NOWYCH PROCEDUR
PRZYGOTOWANIA PRÓBKI, ROZDZIELANIA, OZNACZANIA
I IZOLACJI METABOLITÓW ROŚLINNYCH Z
ZASTOSOWANIEM ELUCYJNEJ CHROMATOGRAFII
CIECZOWEJ**

mgr inż. Anita Skrzypczak

Promotor: prof. dr hab. inż. Marian Kamiński

Gdańsk, 2011

*Dziękuję
Panu prof. dr hab. inż. Marianowi Kamińskiemu
za przekazaną wiedzę oraz pomoc
podczas badań i redagowania niniejszej pracy*

*Dziękuję mojemu kochanemu Mężowi,
za cierpliwość oraz wsparcie,
na które zawsze mogłam liczyć*

*Dziękuję mojej wspaniałej córce Aurelii,
za uśmiech, który dodawał mi sił*

*Dziękuję mojej córce Kornelii, za to,
że będąc w moim brzuszku,
pozwalała mi długo siedzieć nad niniejszą pracą*

*Szczególnie chciałabym podziękować mojej drogiej Mamie,
za troskę, opiekę i wiarę we mnie*

*Niniejszą pracę dedykuję mojej wspaniałej rodzinie-Mężowi, Córkom
oraz Drogiej Mamie*

SPIS TREŚCI

1. ZESTAWIENIE SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	8
2. WPROWADZENIE	10
3. PRZEGLĄD LITERATURY	13
3.1. TECHNIKI PRZYGOTOWANIA PRÓBKII / WSADU DO ROZDZIELANIA METABOLITÓW ROŚLINNYCH	13
3.1.1. Wprowadzenie.....	13
3.1.2. Wstępne przygotowanie próbki/ wsadu.....	13
3.1.3. Techniki ekstrakcji/ługowania metabolitów z materiału roślinnego.....	14
3.1.3.1. Ekstrakcja w aparacie soxhleta oraz w wersji zautomatyzowanej za pomocą aparatu SOXTEC®	22
3.1.3.2. Ekstrakcja na drodze maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem.....	24
3.1.3.3. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE)	24
3.1.3.4. Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE).....	25
3.1.3.5. Sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego albo łaźni ultradźwiękowej	26
3.1.3.6. Ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego o wysokiej szybkości ścinania.....	27
3.1.3.7. Podsumowanie	28
3.2. ROZDZIELANIE, OZNACZANIE I IZOLACJA METABOLITÓW Z GRUPY FLAWONOIDÓW I NAFTOCHINONÓW Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO.....	30
3.2.1. Wprowadzenie.....	30
3.2.2. Rozdzielanie, oznaczanie i izolowanie naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC)	31
3.2.3. Rozdzielanie, oznaczanie i izolowanie naftochinonów oraz flawonoidów z zastosowaniem kolumnowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)...	36
3.2.4. Podsumowanie.....	44
3.3. PROBLEMATYKA POWIĘKSZANIA SKALI KOLUMNOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ	45
3.3.1. Ogólne zasady i specyfika przenoszenia skali w chromatografii cieczowej	45
3.3.2. Kryteria optymalizacji procesu otrzymywania substancji – podstawowe ograniczenia	45
3.3.3. Zjawiska przeładowania kolumny i ich efektywne wykorzystanie.....	46
3.4. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH MATERIAŁÓW ROŚLINNYCH I ZAWARTYCH W NICH METABOLITÓW.....	48
3.4.1. Rośliny mięsożerne z rodziny <i>Droseraceae</i> , w szczególności z gatunku <i>Dionaea</i> i <i>Drosera</i>	49
3.4.2. Właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne wybranych metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów.....	52
3.4.3. Właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne wybranych metabolitów wtórnych z grupy flawonoidów	57

4. UZASADNIENIE CELOWOŚCI PODJĘTYCH BADAŃ I STOSOWANYCH METOD BADAWCZYCH ORAZ ZNACZENIE OTRZYMANYCH REZULTATÓW	60
5. CEL PRACY	62
6. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	64
6.1. MATERIAŁY	64
6.1.1. Rozpuszczalniki, eluenty.....	64
6.1.2. Substancje wzorcowe	64
6.1.3. Materiały i ekstrakty roślinne.....	64
6.1.4. Płytki TLC, kolumny chromatograficzne.....	65
6.2. APARATURA I WYPOSAŻENIE DODATKOWE	65
6.3. METODY POSTĘPOWANIA	67
6.3.1. Hodowla materiału roślinnego	67
6.3.2. Ekstrakcja metabolitów z próbek materiału surowego roślin mięsożernych	68
6.3.3. Hydroliza kwaśna glikozydów flawonoidowych zawartych w ekstraktach metanolowych z roślin mięsożernych.....	69
6.3.4. Metodyka oznaczania składników ekstraktów za pomocą NP-HPLC z wykorzystaniem elucji gradientowej.....	70
6.3.5. Metodyka badania wpływu rodzaju kwasu na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz	73
6.3.6. Dobór składników eluentu optymalnych dla selektywnego rozdzielania metabolitów z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych za pomocą RP-TLC	74
6.3.7. Dobór składników eluentu optymalnych dla selektywnego rozdzielania metabolitów z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych za pomocą NP-TLC	76
6.3.8. Optymalizacja warunków rozdzielania i oznaczania metabolitów w ekstraktach metanolowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC oraz elucji gradientowej.....	77
6.3.9. Optymalizacja warunków rozdzielania metabolitów w ekstraktach metanolowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC w warunkach elucji skokowej w skali modelowej.....	79
6.3.10. Optymalizacja warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów w ekstraktach chloroformowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej.....	82
6.3.11. Optymalizacja warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów z chloroformowych ekstraktów roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki NP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej.....	85
6.4. OPRACOWANIE WYNIKÓW	86
6.4.1. Opracowanie wyników badań efektywności wybranych technik ekstrakcji / ługowania	86
6.4.2. Opracowanie wyników badań wpływu rodzaju kwasu na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz	87

6.4.3. Opracowanie wyników badań nad doborem selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z ekstraktów metanolowych z roślin mięsożernych za pomocą RP-TLC i NP-TLC	88
6.4.4. Opracowanie wyników badań nad doborem warunków rozdzielania i oznaczania wybranych metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC oraz elucji gradientowej.....	88
6.4.5. Opracowanie wyników badań nad doborem warunków rozdzielania i oznaczania wybranych metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC oraz elucji skokowej	89
6.4.6. Optymalizacja warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów w ekstraktach chloroformowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC i NP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej	90
7. WYNIKI I DYSKUSJA	91
7.1. BADANIA NAD PORÓWNANIEM EFEKTYWNOŚCI WYBRANYCH TECHNIK EKSTAKCJI / ŁUGOWANIA METABOLITÓW ZAWARTYCH W MATERIALE MOKRYM ROŚLIN Z GATUNKU D. MUSCIPULA.....	91
7.1.1. Wprowadzenie.....	91
7.1.2. Wyniki badań efektywności ekstrakcji w aparacie SOXHLETA	92
7.1.3. Wyniki badań efektywności ekstrakcji w aparacie SOXTEC®	93
7.1.4. Wyniki badań efektywności ekstrakcji na drodze maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem.....	96
7.1.5. Wyniki badań efektywności ekstrakcji wspomaganiej promieniowaniem mikrofalowym	98
7.1.6. Wyniki badań efektywności sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej.....	101
7.1.7. Wyniki badań efektywności sonifikacji za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego	105
7.1.8. Wyniki badań efektywności ekstrakcji za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego o wysokiej szybkości ścinania	109
7.1.9. Porównanie efektywności badanych technik ekstrakcyjnych	113
7.2. BADANIA WPLYWU RODZAJU KWASU JAKO DODATKU DO ELUENTU NA ROZDZIELANIE FLAWONOIDÓW W ODWRÓCONYM UKŁADZIE FAZ	121
7.2.1. Wyniki badań nad wpływem rodzaju kwasu jako dodatku do eluentu na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz.....	121
7.3. BADANIA NAD DOBOREM SELEKTYWNYCH SKŁADNIKÓW ELUENTU DO ROZDZIELANIA METABOLITÓW Z EKSTRAKTÓW METANOLOWYCH ROŚLIN MIĘSOŻERNYCH ZA POMOCĄ CIENKOWARSTWOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (TLC).....	125
7.3.1. Wyniki badań nad doborem selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych za pomocą RP-TLC	125

7.3.2. Wyniki badań nad doбором selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych za pomocą NP-TLC	131
7.4. BADANIA NAD OPTYMALIZACJĄ WARUNKÓW ROZDZIELANIA OZNACZANIA I IDENTYFIKACJI WYBRANYCH METABOLITÓW W METANOLOWYCH EKSTRAKTACH ROŚLIN MIĘSOŻERNYCH Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI RP-HPLC ORAZ ELUCJI GRADIENTOWEJ	135
7.5. BADANIA NAD OPTYMALIZACJĄ WARUNKÓW ROZDZIELANIA I IZOLOWANIA WYBRANYCH METABOLITÓW Z EKSTRAKTÓW METANOLOWYCH ROŚLIN MIĘSOŻERNYCH Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI RP-HPLC ORAZ ELUCJI SKOKOWEJ W SKALI MODELOWEJ.....	154
7.6. BADANIA NAD OPTYMALIZACJĄ WARUNKÓW ROZDZIELANIA I IZOLOWANIA WYBRANYCH NAFTOCHINONÓW Z CHLOROFORMOWYCH EKSTRAKTÓW ROŚLIN MIĘSOŻERNYCH Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI RP-HPLC I NP-HPLC W WARUNKACH ELUCJI IZOKRATYCZNEJ W SKALI MODELOWEJ.....	159
7.6.1. Wyniki badań nad optymalizacją warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów z chloroformowych ekstraktów roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej.....	159
7.6.2. Wyniki badań nad optymalizacją warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów w ekstraktach chloroformowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki NP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej.....	169
8. STRESZCZENIE I WNIOSKI KOŃCOWE	174
9. ABSTRACT AND CONCLUSIONS.....	188
10. SPIS LITERATURY.....	201
11. WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO.....	209
12. ZAŁĄCZNIKI.....	213
12.1. ZAŁĄCZNIK 1. Chromatogramy cienkowarstwowe wraz z tabelami, zawierającymi zestawienie współczynników R_f dla badanych eluentów, w odwróconym układzie faz	213
12.2. ZAŁĄCZNIK 2. Chromatogramy cienkowarstwowe wraz z tabelami, zawierającymi zestawienie współczynników R_f dla badanych eluentów, w normalnym układzie faz.....	233
12.3. ZAŁĄCZNIK 3. Przykładowe chromatogramy i tabele z zestawieniami substancji „zidentyfikowanych” w ekstraktach otrzymane za pomocą odwróconego układu faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej w warunkach elucji gradientowej.....	247
12.4. ZAŁĄCZNIK 4. Zestawienie widm spektralnych, na podstawie którego dokonano identyfikacji substancji, zawartych w metanolowych ekstraktach roślin	

owadożernych, otrzymane z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej w odwróconym układzie faz w warunkach elucji gradientowej	259
12.5. ZAŁĄCZNIK 5 Zestawienie wartości pól powierzchni pików chromatograficznych dla związków chemicznych wyekstrahowanych z materiału roślinnego techniką ekstrakcji w aparacie SOXHLETA	264
12.6. ZAŁĄCZNIK 6. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem poszczególnych technik ekstrakcji / ługowania.....	265
12.7. ZAŁĄCZNIK 7 chromatogramy rozdzielania kwercetyny i mirycetyny, charakteryzujące wpływ rodzaju kwasu, jako dodatku do eluentu, na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz	283

1. ZESTAWIENIE SKRÓTÓW I SYMBOLI

Skrót/ symbol	Termin polskojęzyczny
α	Współczynnik selektywności
λ	Długość fali
AA	Kwas octowy
ACN	Acetonitryl
AcOEt	Octan etylu
ASE	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
C18	Żel krzemionkowy modyfikowany ugrupowaniem oktadecylowym
CC	Kolumnowa chromatografia cieczowa
CH ₂ Cl ₂	Dichlorometan
CN	Nitryloalkilowa faza stacjonarna chemicznie związana, najczęściej z żel krzemionkowym
DIOL	Dihydroksypropylowa faza stacjonarna chemicznie związana najczęściej z żel krzemionkowym
ECD	Detektor wychwytu elektronów
HILIC	Chromatografia oddziaływań hydrofilowych
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
hRf	Współczynnik opóźnienia pomnożony razy 100
IzPrOH	Izopropanol
k	Współczynnik retencji
LC- MS	Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas
LLPC lub LLPC/NP-W	Chromatografia podziałowa ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie
MAE	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym
MeOH	Metanol
MTBE	Eter tert-butylo-metylowy
NP	Normalny układ faz
NP-CC	Kolumnowa chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz
NP-HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz
NP-TLC	Chromatografia cienkowarstwowa w układzie faz normalnych
PLC	Preparatywna chromatografia cieczowa
P _t	Produktywność kolumny (wydajność)
R _f	Współczynnik opóźnienia
RID	Detektor refraktometryczny
RP 18	Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi

Skrót/ symbol	Termin polskojęzyczny
RP	Odwrócony układ faz
RP-HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych układzie faz
RP-TLC	Chromatografia cienkowarstwowa w odwróconych układzie faz
Si 60	Żel krzemionkowy o średniej wielkości porów 60 Å
t_0	Czas martwy kolumny
TFA	Kwas trifluorooctowy
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Chromatografia cienkowarstwowa/ chromatografia planarna
t_R	Czas retencji
UAE	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami
UV	Promieniowanie w zakresie ultrafioletu, detektor spektrofometryczny w zakresie ultrafioletu
UV	VIS spektrofotometria w zakresie nadfioletu i światła widzialnego
UV-VIS typu DAD UV-VIS/DAD	Detektor spektrofometryczny w zakresie nadfioletu z matrycą fotodiodową

2. WPROWADZENIE

W ostatnich latach dramatycznie rośnie ilość szpitalnych zakażeń bakteryjnych wieloantybiotykoopornymi szczepami bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, *Acinetobacter* czy *Staphylococcus*. Komercyjnie stosowane antybiotyki przestają być użyteczne z powodu selekcji opornych mutantów oraz wykształcania przez bakterie nowych mechanizmów oporności. Niestety substancje bakteriobójcze, które obecnie wprowadza się do produkcji są tzw. „analogami” już istniejących, natomiast brak jest doniesień o odkryciu nowych grup antybiotyków [1]. Obecnie w przemyśle farmaceutycznym istnieje wyraźna tendencja do poszukiwania związków leczniczych wśród metabolitów zawartych w roślinach lub mikroorganizmach. Ich mechanizm działania polega, podobnie jak powszechnie stosowane antybiotyki, na hamowaniu lub niszczeniu określonego celu molekularnego w komórce bakteryjnej. Poszukiwanie związków antybakteryjnych wśród metabolitów roślinnych daje dodatkowo, możliwość znalezienia substancji, które nie mają bezpośredniego wpływu na wzrost bakterii, natomiast zwiększają wrażliwość tych organizmów na właściwe antybiotyki. W ten sposób presja do selekcji opornych mutantów jest minimalna.

Drugą, niezwykle ważną gospodarczo grupą bakterii są patogeny roślin. Gatunki te charakteryzują się wysoką różnorodnością genotypową i fenotypową, zdolnością do wywoływania infekcji w różnych warunkach oraz szerokim zakresem gospodarzy (infekują wiele warzyw i roślin ozdobnych). Metabolity wtórne z grupy naftochinonów wykazują dużą aktywność przeciwbakteryjną, w związku z czym mogą być także potencjalnie skutecznym środkiem ochrony roślin przed patogenami roślin, do których należą: *Pectobacterium carotovorum*, *P. artrosepticum*, *Dickeya* sp. oraz *Brenneria* spp. [2]. Jest to niezwykle ważne zagadnienie gdyż, roczne straty w rolnictwie na świecie spowodowane chorobami wywołanymi przez te patogeny sięgają 50-100 mld dolarów. Do tej pory nie ma dostępnych skutecznych środków chemicznych do walki z tymi patogenami.

Badania nad metabolizmem roślin mają znaczenie w biologii, farmakognozji, biochemii, chemii organicznej, a także farmakologii i dla różnych obszarów technologii chemicznej i biotechnologii, prowadząc m.in. do coraz lepszego poznania składników komórek i tkanek roślin, a także procesów technologicznych otrzymywania metabolitów i ich pochodnych. W celu efektywnej realizacji takich badań i uzyskiwania wyczerpujących i wiarygodnych rezultatów, ważne znaczenie

ma umiejętność stosowania efektywnych technik przygotowania próbki lub wsadu do rozdzielania w większej skali, a następnie rozdzielania i identyfikacji oraz w końcowym etapie izolowania, szczególnie interesujących metabolitów. Ważne znaczenie ma, więc dobór, zarówno, najbardziej efektywnych technik ekstrakcji/ługowania oraz warunków przygotowania próbki / wsadu materiału roślinnego do badań, jak i warunków identyfikacji, rozdzielania i izolowania składników roślin.

Studia literatury problemu, obejmujące stosowane dotychczas, nowoczesne, potencjalnie wysoce efektywne techniki ekstrakcji i ługowania składników tkanek roślinnych oraz techniki rozdzielania i otrzymywania metabolitów roślinnych, wskazują, że problematyka ta nie jest w pełni opanowana. W miarę rozwoju techniki i technologii powstały nowe możliwości techniczne i operacyjne, których dokładniejsze zbadanie i ewentualna standaryzacja warunków stosowania wydaje się być szczególnie celowa.

Rozważania i badania przedstawione w rozprawie dotyczą zagadnień przygotowania próbki / wsadu do rozdzielania, oznaczania i izolowania wybranych metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów i flawonoidów zawartych w roślinach mięsożernych.

W tym celu, w pierwszym etapie badań uznano za konieczne zbadanie i porównanie efektywności najczęściej stosowanych „klasycznych” technik ekstrakcji / ługowania metabolitów z materiału roślinnego z technikami nowoczesnymi, ponieważ efektywność operacji przygotowania próbki bądź wsadu ma znaczący wpływ na dalsze etapy omawianych badań.

Za szczególnie konieczne uznano prace nad optymalizacją warunków rozdzielania, w celu identyfikacji składników ekstraktów z wybranych roślin z zastosowaniem elucji gradientowej. Miało to na celu opracowanie selektywnych i możliwie uniwersalnych procedur oznaczania jakościowego i ilościowego metabolitów w alkoholowych ekstraktach z materiałów roślinnych, zawierających z reguły składniki o szerokim spektrum polarności i hydrofobowości, w celu efektywnego badania składu ekstraktów z różnych roślin, a także dla kontroli czystości frakcji uzyskanych za pomocą chromatografii preparatywnej.

Ostatni etap badań dotyczył, opracowania procedur rozdzielania metabolitów w ekstraktach roślin mięsożernych, w skali modelowej i zbadania możliwości przeniesienia warunków rozdzielania na skale preparatywną, w celu izolacji

użytkowych ilości poszczególnych metabolitów, zwłaszcza z grupy naftochinonów oraz flawonoidów.

W badaniach w warunkach elucji gradientowej wykorzystano detektor spektrofotometrycznych typu UV-VIS/DAD, w celu zapewnienia możliwości identyfikacji metabolitów z wykorzystaniem biblioteki widm UV-VIS.

W badaniach wykonywanych z zastosowaniem elucji izokratycznej, techniką kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej w skali modelowej stosowano, dodatkowo, detektor refraktometryczny (RID), w celu zapewnienia możliwości detekcji składników nie wykazujących absorpcji światła, takich, jak cukry, aminy oraz niektóre składniki wosków.

Jednym z celów cząstkowych pracy było także dobranie optymalnych składników eluentów do rozdzielania metabolitów roślin mięsożernych, tak w warunkach normalnego (NP) jak i odwróconego (RP) układu faz. Ma to istotne znaczenie, tak dla optymalizacji warunków elucji gradientowej, jak i izokratycznej. Dodatkowo, otrzymane wartości parametrów retencji mogą w przyszłości posłużyć do wyznaczenia „kompleksowych” parametrów retencji według koncepcji przedstawionej przez M. Kamińskiego [3]. Tę część badań wykonywano głównie z wykorzystaniem cienkowarstwowej chromatografii cieczowej w warunkach normalnego, jak i odwróconego układu faz oraz wizualizację płytek w świetle widzialnym (identyfikacja składników barwnych), dla 254 nm na płytkach „F₂₅₄” (identyfikacja składników absorbujących UV oraz wykazujących fluorescencje w zakresie wzbudzenia światłem niskociśnieniowej lampy rtęciowej), a także z zastosowaniem światła o długości fali 365 nm, w celu identyfikacji substancji wykazujących fluorescencję w zakresie fali wzbudzenia 365 nm i innych długości fali światła emitowanego przez średniociśnieniową lampę rtęciową.

Badania prowadzone w celu ustalenia optymalnych warunków preparatywnego rozdzielania wykonano z zastosowaniem elucji izokratycznej, ponieważ warunki gradientowe są zdecydowanie mniej korzystne w preparatywnej chromatografii cieczowej (PLC), niż izokratycznej.

3. PRZEGLĄD LITERATURY

3.1. TECHNIKI PRZYGOTOWANIA PRÓBKII / WSADU DO ROZDZIELANIA METABOLITÓW ROŚLINNYCH

3.1.1. Wprowadzenie

Materiał roślinny charakteryzuje się najczęściej dużą liczbą związków chemicznych o szerokim zakresie polarności i hydrofobowości. Z tego powodu optymalizacja warunków realizacji etapu przygotowania próbki / wsadu materiału roślinnego do analizy, bądź do dalszych etapów rozdzielania i izolacji metabolitów w skali preparatywnej, jest bardzo istotnym problemem w analityce i technologii. Zastosowane techniki i warunki przygotowania próbki / wsadu oraz dobór warunków przeprowadzenia operacji jednostkowej może w sposób znaczący wpłynąć na wynik rozdzielania, w tym, oznaczenia jakościowego i ilościowego metabolitów w materiale roślinnym, jak i na wydajność procesu otrzymywania metabolitów.

3.1.2. Wstępne przygotowanie próbki/ wsadu

Wstępne przygotowanie surowca roślinnego obejmuje czynności takie jak: konserwacja (np. suszenie, liofilizacja) oraz rozdrabnianie (np. szatkowanie, mielenie, homogenizacja itp.). Pierwszą operacją wstępnej obróbki próbek wilgotnych jest najczęściej operacja rozdrabniania, chociaż najpierw często suszenia, a potem rozdrabniania. Bardzo często wykorzystuje się również proces liofilizacji, który umożliwia usunięcie wilgoci z uprzednio zamrożonego surowca na drodze sublimacji wody. W przypadku lotnych substancji stosuje się też tzw. suchą destylację najczęściej w strumieniu gazu obojętnego z wymrażaniem „destylatu” [4]. W celu wyodrębnienia nisko i średnio-polarnych, jednocześnie lotnych metabolitów, nierozpuszczalnych w wodzie stosuje się destylację z parą wodną z rozdrobionego materiału wilgotnego lub wysuszonego.

Nierzadko, badaniu poddaje się wilgotny materiał roślinny, szczególnie wówczas, gdy suszenie, liofilizacja, lub „sucha destylacja” powietrzem, może wiązać się z utratą metabolitów lub ich przekształceniem w składniki pochodne.

Czynnością niezbędną, przygotowującą materiał roślinny do badań jest rozdrabnianie. Wybór techniki rozdrabniania jest ściśle związany z konsystencją surowca roślinnego oraz jego stopniem twardości i zależy przede wszystkim od

żądanego uziarnienia końcowego. Czynności te przeprowadza się manualnie bądź z zastosowaniem różnego rodzaju młynków lub homogenizatorów mechanicznych [4].

3.1.3. Techniki ekstrakcji/ługowania metabolitów z materiału roślinnego

Po etapie wstępnego przygotowania surowca roślinnego, powszechne zastosowanie na etapie izolacji i wzbogacania metabolitów z próbek roślinnych znajdują techniki ekstrakcji / ługowania.

Ekstrakcja jest to operacja jednostkowa przygotowania próbki do analizy, bądź surowca do rozdzielania na poszczególne składniki w skali preparatywnej bądź przemysłowej. „Klasyczna” ekstrakcja polega na izolacji określonych związków chemicznych lub grup związków chemicznych na drodze podziału składników między dwie niemieszające się fazy ciekłe [5]. Natomiast, gdy przeprowadzamy do roztworu składniki z fazy stałej, proces ten nazywamy ługowaniem [5]. W praktyce, potocznie, w obu przypadkach stosowany jest termin „ekstrakcja”.

W przypadku ekstrakcji / ługowania substancji z surowca roślinnego, rozdrobniony materiał poddaje się działaniu rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników do momentu, gdy większość ekstrahowanych, zdolnych do ługowania składników przejdzie do fazy ciekłej. Proces ten jest w nowoczesnych technikach ekstrakcji/ługowania wspomagany różnymi oddziaływaniami fizycznymi takimi jak: oddziaływanie mikrofal, ultradźwięków, mieszania mechanicznego itp. Czynniki te stosuje się w celu zwiększenia efektywności tzn. przede wszystkim skrócenia czasu etapu przygotowania próbki/ wsadu do dalszych etapów rozdzielania, a także w celu uzyskania maksymalnego stężenia ekstraktu / ługu. W tym celu należy także dobrać optymalną temperaturę operacji ekstrakcji / ługowania.

W tabeli 1 zestawiono przykłady technik i metod ekstrakcji / ługowania metabolitów z materiału roślinnego. Zamieszczono tam również najważniejsze informacje dotyczące zasad postępowania oraz krytyczną ocenę stosowanych technik i metod.

Klasyczne metody wyodrębniania związków chemicznych zawartych w surowcu roślinnym opierają się głównie na różnicach w rozpuszczalności badanych substancji oraz substancji balastowych w wodzie i w rozpuszczalnikach organicznych [6].

W przypadku części roślin pozbawionych tłuszczów i wosków można przeprowadzić bezpośrednio ekstrakcję alkoholem. We wszystkich innych przypadkach najpierw należy materiał roślinny „odtłuścić” przez ekstrakcję eterem

naftowym lub czterochlorkiem węgla (obecnie najczęściej zastępowany chloroformem, dichlorometanem lub innymi niepolarnymi lub niskopolarnymi rozpuszczalnikami organicznymi). Większość związków flawonoidowych nie rozpuszcza się w niepolarnych lub niskopolarnych rozpuszczalnikach. Jakkolwiek, alkohole ekstrahują dobrze wszystkie związki polifenolowe, w tym flawonoidy, to także rozpuszcza się w nich wiele innych składników.

W celu uzyskania rozfrakcjonowania składników roślinnych można przeprowadzić ekstrakcję surowca kolejno 4-5 rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności, np. z powodzeniem stosowano ekstrakcję / ługowanie eterem naftowym, chloroformem, a następnie octanem etylu i wreszcie alkoholem metylowym [4,6].

W ostatnich latach klasyczne techniki ekstrakcji / ługowania metabolitów wtórnych z materiału roślinnego takie, jak kilkudniowa maceracja, długotrwałe ługowanie w warunkach mało intensywnego mieszania, bądź wytrząsanie w wodzie, w roztworze buforowym, albo w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku organicznym, czy wielogodzinna ekstrakcja w aparacie Soxhleta, są zastępowane bardziej nowoczesnymi technikami, takimi jak:

- ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika w aparacie Soxhtec®,
- przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE, *eng. Accelerated Solvent Extractor*),
- ekstrakcja wspomaganą działaniem fal mikrofalowych (MAE, *eng. Microwave Assisted Extraction*),
- sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej bądź za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego (UAE, *eng. Ultrasonic Assisted Extraction*),
- ekstrakcji za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego o wysokiej szybkości ścinania.

Te operacje są bardziej efektywne, wymagają użycia mniejszej ilości rozpuszczalników, a aparatura oraz procedura mogą być łatwiej automatyzowane [7,8].

Tabela 1. Zestawienie technik i metod ekstrakcji/ługowania metabolitów z materiału roślinnego, opisanych w literaturze.

Lp.	Materiał badany	Składnik podlegający ekstrakcji / ługowaniu/	Stosowana technika	Warunki Ekstrakcji	Materiał badany /rozpuszczalnik [g/ml]	Rozpuszczalnik	Uwagi	Lit.
1	<i>Propolis</i> -Propolis	Fenole, flawony, flawonoidy	UAE- łaźnia ultradźwiękowa	30 min, 25 °C	1 g / 20 ml 1 g / 10 ml	etanol : woda 7:3 v/v	Porównano wielkość odzysku grup metabolitów wyekstrahowanych za pomocą technik maceracji, MAE i UAE. Technika UAE okazała się najbardziej skuteczną, biorąc pod uwagę odzysk, wydajność procesu ekstrakcji, czas i selektywność.	[9]
			MAE	2 x 10 s, 25 °C				
			Maceracja	72 h				
2	<i>Drosera capensis</i> - <i>Rosiczka przylądkowa</i> , <i>Drosera rotundifolia</i> - <i>Rosiczka okrągłolistna</i> <i>Drosera aliciae</i> - <i>Rosiczka Alicji</i> <i>Sarracenia psittacina</i> - <i>Kapturnica papuzia</i>	Metabolity wtórne z grupy naftochinonów i flawonoidów	Soxhlet	Prowadzono proces ekstrakcji do momentu pojawienia się w ekstraktorze bezbarwnego, klarownego rozpuszczalnika.	b/d	eter naftowy (temp. 60 °C), chloroform (temp. 75 °C), oraz metanol (85 °C)	Materiał roślinny oczyszczono z pożywki przez jej opłukanie, a następnie suszono w temp. 50 °C. Następnie całość utarto w moździerzu.	[10]
			ASE	100 °C, 100 psi	1 g suchej masy/20 g piasku			
3	<i>Hypericum perforatum</i> - <i>Dziurawiec normalny</i>	Kwas chlorogenowy, rutyna, 3-O-glukozyd kwercetyny, izokwercytyna, kwercetyna, hiperycyna amentoflawon, pseudohiperycyna,	Soxhlet	24 h / temp. wrzenia.	1 g / 5 porcji po 200 ml	metanol	Materiał roślinny był mielony w temperaturze pokojowej, w ciemnym naczyniu. Skład otrzymanych ekstraktów badano za pomocą RP-HPLC-MS	[11]
4	<i>Mentha spicata L</i> - <i>Mięta</i>	Flawonoidy : katechiny, epikatechiny, rutyna, mirycetyna, luteolin,	Soxhlet	6 h / temp. wrzenia	1g / 50 ml	etanol		[12]

Lp.	Materiał badany	Składnik podlegający ekstrakcji / ługowaniu/	Stosowana technika	Warunki Ekstrakcji	Materiał badany /rozpuszczalnik [g/ml]	Rozpuszczalnik	Uwagi	Lit.
5	<i>Radix Astragali</i> - korzeń Traganka	Flawonoidy	MAE	110 °C, 5 min	1 g / 25 ml	90% etanol	Ziarnistość 10 mesh, suszenie w 60 °C,	[13]
6	<i>Laurus nobilis</i> -Wawrzyn szlachetny <i>Origanum vulgare</i> - Lebidka pospolita <i>Olea europaea</i> - Oliwka europejska <i>Hypericum perforatum</i> -Dziurawiec zwyczajny <i>Crataegus laevigata</i> - Głóg dwuszyjkowy	Kwercetyna mirycetyna kempferol luteolina, apigenina	UAE – łaźnia ultradźwiękowa	40 °C, 2 h	1 g / 100 ml	metanol	Po przeprowadzeniu operacji ekstrakcji / ługowania, przeprowadzono hydrolizę kwaśną w środowisku kwasu solnego, w celu oznaczania końcowego metabolitów w formie aglikonów.	[14]
7	<i>Euclea natalensis</i> - <i>Niegota</i>	Szianolon, 7-metlojuglon, diospyryna, izodiospyryna i neodiospyryna	UAE- dezintegrator	5 min, 25 °C	100 mg / 3 porcje po 2 ml	chloroform	Materiał roślinny suszono w temperaturze pokojowej, a następnie zhomogenizowano. 100 mg suchej masy roślinnej ekstrahowano trzema porcjami po 2 ml chloroformu. Zebrano warstwę organiczną, którą następnie odparowano w strumieniu azotu i dodano 2 ml acetonitrylu (eluent w analizach HPLC)	[15]
8	<i>Diospyros canaliculata</i> <i>Diospyros crassiflora</i> -Persemona, Hurma	Trzy związki z grupy naftochinonów, w tym plumbagina	Maceracja z wytrząsaniem	48 h , 25 °C	3 g / 10 ml	metanol	Przed Ekstrakcją materiał roślinny był suszony na powietrzu i rozdrobniony.	[16]

Lp.	Materiał badany	Składnik podlegający ekstrakcji / ługowaniu/	Stosowana technika	Warunki Ekstrakcji	Materiał badany /rozpuszczalnik [g/ml]	Rozpuszczalnik	Uwagi	Lit.
9	<i>Juglans regia-Orzech włoski</i>	Juglon (5-hydroksy-1,4-naftochinon)	ASE	2 cykle po 5 min., 150 bar, 40°C- heksan, acetonitryl 40, 50, 60 °C - metanol,	0,10 g ± 5 mg / 5 ml	heksan metanol acetonitryl	Za pomocą techniki ASE zbadano wpływ rodzaju rozpuszczalnika oraz temperatury na stopień odzysku juglonu z surowca roślinnego. Największy odzysk juglonu otrzymano z zastosowaniem metanolu, jako ekstrahenta. Temperatura, w której otrzymano najwyższe stężenie juglonu w ekstrakcie wynosiła 40 °C. Porównano wielkość odzysku juglonu z materiału roślinnego otrzymanego za pomocą ASE oraz UAE w optymalnych warunkach dla każdej z technik. Stwierdzono, że ilość otrzymanego juglonu za pomocą techniki UAE jest znacząco większa niż z wykorzystaniem ASE.	[17]
			UAE - dezintegrator	30 min, 40 °C 150 W, 38 kHz	0,02-0,1 g / 5 ml	metanol		
10	<i>Dionaea muscipula</i> <i>Drosera rotundifolia</i> <i>Impatiense glandulifera</i> <i>Paulownia tomentosa</i>	Plumbagina	UAE - dezintegrator	30 min, 40 °C 150 W, 38 kHz	0,1 g / 5 ml	metanol	Rośliny hodowano w warunkach <i>in vitro</i> na 20 ml podłoża Murashige Skoog, z sacharozą 30 g / l i węglem aktywnym 1,5 g / l. Materiał był liofilizowany w temp -51°C przez 48h, a następnie rozdrobniony w homogenizatorze wysokoobrotowym.	[17]
11	<i>Salvadoraceae,</i> <i>Combretaceae</i> - Rośliny z Sudanu	Galantamina, likoryna, pankratystatyna, likorycydyna , triterpeny, metoksyłowane flawonoidy	Maceracja z wytrząsaniem	25 °C	50 g / 200 ml	80% metanol	Badana była sucha masa roślinna.	[18]

Lp.	Materiał badany	Składnik podlegający ekstrakcji / ługowaniu/	Stosowana technika	Warunki Ekstrakcji	Materiał badany /rozpuszczalnik [g/ml]	Rozpuszczalnik	Uwagi	Lit.
12	<i>Thea sinensis leaves</i> - liście zielonej herbaty	Polifenole , teina	MAE	Czas pre-ługowania- 0-90 min. czas ekstrakcji - 0,5-8 min, temp.- 85-95°C, Optymalny czas pre-ługowania- 90 min. Optymalny czas operacji ługowania - 4 min.	10:1-25:1 ml / g Optymalny stosunek ekstrahenta do masy materiału roślinnego -1 g /20 ml	etanol, metanol, aceton i ich wodne mieszaniny Optymalny ekstrahent- etanol Optymalny skład EtOH:Woda 1:1 v/v	Praca opisuje dobór optymalnych warunków ekstrakcji za pomocą MAE, polifenoli oraz teiny zawartych w liściach zielonej herbaty. Zbadano czynniki tj. rodzaj rozpuszczalnika (etanol, metanol, aceton), stężenie etanolu (0-100%, v/v), czas operacji ekstrakcji (0,5-8 min), ilość rozpuszczalnika na masę surowca roślinnego (10:1-25:1 ml / g), czas pre-ługowania (0-90 min). Stwierdzono, że optymalne warunki prowadzenia ekstrakcji polifenoli i teiny z liści herbaty to: czas ekstrakcji - 4 min , ekstrahent 50% etanol, stosunek ekstrahenta do masy roślinnej 1g /20 ml. Porównano także wielkość odzysku polifenoli i teiny za pomocą MAE z wielkością odzysku za pomocą maceracji przez 20 h w temp. pokojowej oraz ekstrakcji za pomocą UAE przez 90 min. w temp. pokojowej. Wykazano, że wielkość odzysku otrzymana za pomocą MAE jest znacznie większa niż w przypadku pozostałych dwóch technik.	[19]

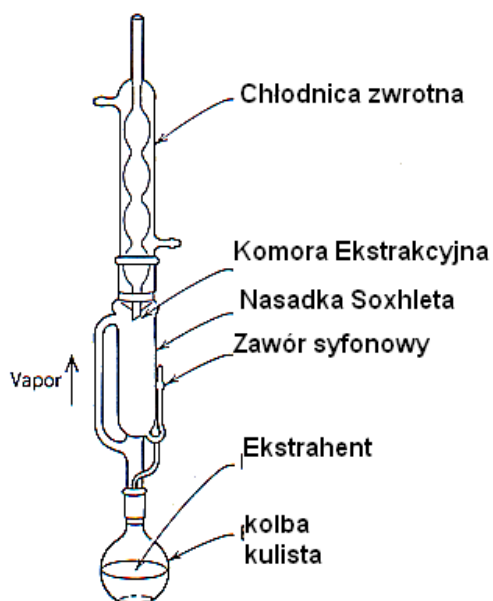
Lp.	Materiał badany	Składnik podlegający ekstrakcji / ługowaniu/	Stosowana technika	Warunki Ekstrakcji	Materiał badany /rozpuszczalnik [g/ml]	Rozpuszczalnik	Uwagi	Lit.
13	9 gatunków roślin z rodziny <i>Boraginaceae</i>	Naftochinony : szikonina, acetylszikonina deoksyzszikonina isobutyloszikonina β, β - dimetyloakryloszikonina	UAE	60 min	0,5-2 g /50 ml	MeOH	Ziarnistość 40 mesh, filtracja po ekstrakcji na filtrze membranowym 0,2μm	[20]
14	<i>Hierochloe odorata</i> - <i>Turówka wonna</i>	5,8-dihydroksykumaryna i 5-hydrokso-8-O- β -d- glukopiranozyl- benzopiranonu	MAE	Czas ekstrakcji 5 i 15 min; Temp.: 40 i 80 °C,	1g / 10 ml i 1g / 10 ml	eter dietylowy, octan etylu, aceton, aceton / heksan 1:1 v/v. Pierwszym etapem była ekstrakcja w aparacie Soxhleta i jako ekstrahent stosowano heksan.	Materiał roślinny suszono w 30 °C, a następnie zmielono. Dla każdej z trzech badanych technik, wykonano ekstrakcje jedno i dwu stopniową. W przypadku ekstrakcji antyoksydantów z turówki wonnej za pomocą SFE, ekstraktor umieszczono w łaźni ultradźwiękowej. Badanie wykazały, że zarówno ekstrakcja za pomocą techniki MAE jak i SFE może być stosowana, w celu izolacji przeciwutleniaczy z turówki	[21]

Lp.	Materiał badany	Składnik podlegający ekstrakcji / ługowaniu/	Stosowana technika	Warunki Ekstrakcji	Materiał badany /rozpuszczalnik [g/ml]	Rozpuszczalnik	Uwagi	Lit.
			SFE z wspomaganą	Temp.: 40 i 80 °C Ciśnienie: 25, 35 i 44 MPa Przepływ gazu: 0,5 dm ³ /min	0,5 g + 0,5 g szklanych kulek; 60 dm ³ gazu	CO ₂ oraz CO ₂ + etanol (2,5-30 % w/w) Pierwszym etapem była ekstrakcja 30 dm ³ CO ₂ , a następnie 60 dm ³ mieszaniny CO ₂ z etanolem (20% etanolu w/w)	wonnej. Etanol, jako ekstrahent zapewnia wyższą wartość odzysku związków, niż mniej polarny aceton i octanu etylu. Technika SFE z wysokim stężeniem modyfikatora (10-30%) jest w stanie wyodrębnić związki średniej polarności, jak przeciwutleniacze fenolowe.	
			Soxhlet	6 h	3 g / 150ml	heksan, eter dietylowy, octan etylu, aceton, izopropanol, 95% etanol, metanol / woda / kw. octowy 80/20/1 v/v		

3.1.3.1. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta oraz w wersji zautomatyzowanej za pomocą aparatu Soxtec®

Ekstrakcja w aparacie Soxhleta to jedna z najstarszych technik ekstrakcji / wługowania metabolitów z materiału roślinnego oprócz klasycznej maceracji lub maceracji z mieszaniem. Technika ta służy do izolacji i wzbogacania analitów nielotnych oraz nisko i średniolotnych, a jednocześnie termicznie trwałych [8].

Budowę aparatu Soxhleta przedstawia rys. 1 [22]. Składa się on z kolby kulistej, nasadki Soxhleta z gilzą z porowatej celulozy, w której umieszcza się rozdrobiony materiał badany oraz chłodnicy zwrotnej. Do kolby wprowadza się odpowiedni rozpuszczalnik. Łączy się poszczególne elementy i aparat umieszcza się w łaźni wodnej, doprowadzając do łagodnego wrzenia rozpuszczalnika. Pary wrzącego ekstrahentu, ochłodzone w chłodnicy zwrotnej, skraplają się i spływają do gilzy, gdzie rozpuszczalnik penetruje materiał badany, a następnie z wyługowanymi substancjami spływa do kolby. Proces ten powtarza się wielokrotnie, aż do momentu, gdy ekstrakcję uzna się za zakończoną.



Rys. 1. Aparat Soxhleta [22]

Ekstrakcja w aparacie Soxhleta była bardzo popularna ze względu na łatwy dostęp i stosunkowo niskie koszty aparatury. Jednak ze względu na długi czas operacji, znaczne zużycie rozpuszczalników, wody chłodzącej czy energii elektrycznej coraz częściej odchodzi się od stosowania tej techniki. Nie bez

znaczenia jest także okoliczność, iż temperatura skroplin rozpuszczalnika wpływającego do gilzy jest niższa od temperatury wrzenia rozpuszczalnika, przez co operacja ekstrakcji trudno rozpuszczalnych i trwałych termicznie metabolitów może być wówczas mniej skuteczna [23, 24]. Z drugiej strony, w przypadku składników nietrwałych termicznie może dochodzić do ich rozkładu. Należy jednak zwrócić uwagę, że ze względu na istnienie bogatej literatury, technika ta traktowana jest jako warunki „odniesienia”.

Wprowadzona w ostatnich latach zautomatyzowana odmiana aparatu Soxhleta- aparat Soxtec[®], częściowo redukuje wyżej wymienione wady, szczególnie jeśli chodzi o czas trwania operacji ekstrakcji. W aparacie typu Soxtec[®], gilza z próbką jest zanurzana we wrzącym rozpuszczalniku - etap tzw. „gotowania”, gdzie następuje maceracja. Etap ten nie występuje w przypadku klasycznego aparatu Soxhleta, a przyspiesza on znacznie uwalnianie analitów z ekstrahowanego materiału. Po pewnym czasie gilza zostaje podniesiona powyżej poziomu wrzącego rozpuszczalnika i materiał omywany jest skroplinami ekstrahentu, tak jak ma to miejsce przez cały czas operacji ekstrakcji w „klasycznym” aparacie Soxhleta. Różnica polega także na możliwości regulacji temperatury modułu grzejnego, a więc możliwa jest regulacja szybkości ogrzewania i intensywności wrzenia rozpuszczalnika. W przypadku, gdy jako ekstrahent stosowany jest metanol, zgodnie z zaleceniami producenta, temperatura płyty grzejnej aparatu powinna wynosić 200°C. Ustawienie odpowiedniej temperatury płyty grzejnej powoduje określoną szybkość przekazywania ciepła do układu, a więc określoną intensywność wrzenia rozpuszczalnika i określony strumień ekstrahentu płuczącego materiał zawarty w gilzie. Powoduje to skrócenie czasu operacji i zmniejszenie zużycia rozpuszczalnika.

Technika ta, jest obecnie, szeroko stosowana do izolowania wielu różnych rodzajów związków chemicznych- metabolitów stosunkowo trwałych termicznie, lipidów, policyklicznych węglowodorów aromatycznych z roślin (np. z kawy, orzechów kokosowych, grzybów, owoców i warzyw), w tym także bardzo często do przygotowania próbki do analiz w badaniach środowiska naturalnego [8].

3.1.3.2. Ekstrakcja na drodze maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem

Maceracja to jedna z najstarszych technik ekstrakcji / ługowania. W procesie maceracji surowiec, wcześniej odpowiednio rozdrobniony, umieszczany jest w zamkniętym naczyniu i zalewany odpowiednią ilością rozpuszczalnika, a następnie zostawia się go na wymagany okres czasu. Czas opracji wynosi od kilku godzin do kilkunastu dni. Po upływie odpowiedniego czasu, uzyskany ekstrakt dekantuje się z nad surowca, zbiera przez odciekanie lub stosując wirowanie [25, 26].

Technika ta jest mało efektywna, biorąc pod uwagę bardzo długi czas ekstrakcji, dlatego stosuje się pewne unowocześnienia, jak wprowadzenie mieszania bądź wytrząsania czy termostatowania w podwyższonej temperaturze. W przypadku maceracji z jednoczesnym mieszaniem bądź wytrząsaniem, surowiec oraz rozpuszczalnik umieszcza się w zbiorniku z mieszadłem albo odpowiednio w wytrząsarce i miesza w sposób ciągły, co podnosi wydajność procesu. Do zalet maceracji można zaliczyć prostotę, dostępność i niskie koszty aparatury. Jednakże długi czas trwania oraz brak możliwości całkowitego odzysku substancji czynnych z surowca, sprawia że coraz bardziej odchodzi się od stosowania tej techniki. Z techniką maceracji, ciągle można spotkać się na przykład przy produkcji wina [27].

3.1.3.3. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE)

W przypadku techniki ASE (ang. *Acclerated Solvent Extraction*) wykorzystuje się takie same rozpuszczalniki ciekłe, jak w metodach klasycznych, lecz pod zwiększonym ciśnieniem (ok. 100 – 140 atm.) i w podwyższonej temperaturze (50 – 200 °C). W tych warunkach posiadają one korzystne dla przebiegu ekstrakcji właściwości, takie, jak: niska lepkość, podwyższone współczynniki dyfuzji, co w konsekwencji prowadzi do dobrej kinetyki procesów rozpuszczania, jak i sprzyja desorpcji związków chemicznych z powierzchni ściany komórkowej, albo z organelli [28].

Próbka umieszczana jest w naczyniach ekstrakcyjnych wykonanych ze stali nierdzewnej. W chwili umieszczenia naczynia w „piecu”, pompa dostarcza rozpuszczalnik do naczynia ekstrakcyjnego. Pierwszym etapem operacji jest ogrzanie, w trakcie którego naczynie wraz z próbką jest podgrzewane do żądanej temperatury. Drugim etapem jest etap statyczny. Po ekstrakcji statycznej świeży ekstrahent przepływa (jest pompowany przy pomocy pompy wyporowej) strumieniem przez naczynie, aby przenieść ekstrahowane składniki do odbieralnika.

Na zakończenie procesu ekstrakcji pozostałość eluentu usuwana jest z naczynia za pomocą azotu pod ciśnieniem 1,04 MPa.

Czas trwania procesu ekstrakcji wynosi zwykle od 5 do 15 minut, a zużyta ilość rozpuszczalnika stanowi w przybliżeniu 150% objętości naczynia ekstrakcyjnego, czyli najczęściej ok. 30 ml. Ekstrakt zanim trafi do odbieralnika zostaje przepuszczony przez specjalny filtr, dzięki czemu w wielu przypadkach nie wymaga on dodatkowego filtrowania.

Technikę ASE można wykorzystywać do ekstrakcji / ługowania związków chemicznych z surowców roślinnych, żywnościowych, jak i z produktów farmaceutycznych. Zalety tej techniki to redukcja ilości stosowanych rozpuszczalników oraz skrócenie czasu ekstrakcji do kilku minut w porównaniu do metod klasycznych [28-30]. Wady, to wysoki koszt aparatury oraz brak możliwości znacznego powiększenia skali [28].

3.1.3.4. Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE)

Ekstrakcja wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (ang. *Microwave Assisted Extraction* – MAE) opiera się na zjawisku absorpcji energii mikrofalowej przez cząsteczki związków chemicznych, stanowiących materiał ekstrahowany i „balastowy” oraz ekstrahent (jeżeli jest polarny).

Absorbowana energia jest proporcjonalna do wartości stałej dielektrycznej absorbujących ją cząsteczek i powoduje wibrację oraz rotację dipoli w polu elektrycznym. Warunkiem podstawowym jest, aby moment dipolowy rozpuszczalnika był różny od zera, a materiał stały był polarny. W głównej części energię pola elektromagnetycznego absorbują cząsteczki rozpuszczalnika, ale także wszystkie średnio i wysoko polarne cząsteczki ekstrahowanych związków chemicznych i ich „nośnika”, szczególnie, posiadające wysoki moment dipolowy [8].

Z reguły w ekstrakcji związków chemicznych za pomocą techniki MAE, stosowane są urządzenia generujące promieniowanie o częstotliwości 2,45 GHz, jednakże w niższej częstotliwości może być również realizowana. Podwyższona temperatura rozpuszczalnika powoduje szybki przebieg izolacji termicznie stabilnych związków. Szybki wzrost dyfuzji, wywołany, zarówno falą elektromagnetyczną, jak i podwyższoną temperaturą powoduje przyspieszenie ekstrakcji [8, 31].

Ekstrakcję wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym prowadzi się zwykle w zamkniętym naczyniu teflonowym zwanym „bombą”, gdzie temperatura może dochodzić do 190°C.

Do zalet tej techniki należy skrócenie czasu trwania ekstrakcji, automatyzacja, oraz zmniejszenie ilości stosowanych rozpuszczalników, co bezpośrednio przekłada się na obniżenie kosztów oraz na aspekt proekologiczny.

Ekstrakcja wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym jest stosowana przede wszystkim do przygotowania środowiskowych, a także roślinnych czy grzybowych do analizy (np. w celu oznaczenia pestycydów, związków metaloorganicznych, fenoli, składników leków, hormonów, surfaktantów, metabolitów) [30].

3.1.3.5. Sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego albo łaźni ultradźwiękowej

Ultradźwiękami nazywamy fale akustyczne o częstotliwościach w zakresie od 16 kHz do 1 GHz, niesłyszalne dla ludzkiego ucha.

Procesy wymiany masy zachodzące np. w cieczach w polu ultradźwiękowym ulegają istotnemu przyspieszeniu. Intensyfikujące działanie ultradźwięków na procesy ekstrakcji wiąże się z przekroczeniem wartości progowych ciśnienia akustycznego, przy których występują przepływy wynikające z nieliniowej absorpcji w samym ośrodku i w warstwie przyściennej. W cieczach występuje wtedy zjawisko kawitacji istotnie wspomagające ekstrakcje. Zakres częstotliwości ultradźwięków stosowanych do wspomaganie ekstrakcji zależy przede wszystkim od poziomu tłumienia dźwięku w ośrodku oraz stopnia rozdrobnienia materiału i jego temperatury. Do prowadzenia ekstrakcji najlepiej nadają się fale akustyczne o niskich częstotliwościach i średnich natężeniach. Fala ultradźwiękowa powoduje lepszą penetrację komórek przez cząsteczki rozpuszczalnika oraz lepszy transfer masy [32-34].

Do zalet ekstrakcji wspomaganie falami ultradźwiękowymi należy również skrócenie czasu ekstrakcji oraz przyspieszenie ekstrakcji nisko cząsteczkowych związków. Średni czas ekstrakcji wspomaganie ultradźwiękami wynosi najczęściej od kilku do 30 min. W tym czasie osiąga się wartości odzysku porównywalne z tymi, jakie można uzyskać po kilkunastu godzinach prowadzenia ekstrakcji w aparacie Soxhleta [8].

Technikę tę stosuje się m.in. do otrzymywania cukru z buraków cukrowych [33], przy produkcji leków [34] czy ekstrakcji bioaktywnych związków z materiału roślinnego (związki aromatyczne, herbicydy, polisacharydy, flawony, polifenole itd.) [14, 20].

Operację ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami przeprowadza się na dwa sposoby: za pomocą łaźni ultradźwiękowej lub za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego. Różnica polega na jednostkowej, wprowadzanej mocy oraz na sposobie rozchodzenia się fali dźwiękowej. W łaźni ultradźwiękowej fala rozchodzi się w wodzie i dopiero z niej przechodzi do rozdrobionej próbki, pokonując przy tym barierę, którą jest ścianka naczynia. Natomiast, w dezintegratorze ultradźwiękowym fala jest emitowana bezpośrednio do próbki.

Użycie dezintegratora ultradźwiękowego jest bardziej efektywne. Niemniej, wydzielana zostaje duża ilość energii, co może wpływać na częściowy rozkład mniej trwałych związków chemicznych. Trudniejsze jest też stabilizowanie warunków operacji.

Zaletą ekstrakcji za pomocą łaźni ultradźwiękowej jest możliwość poddawania jednocześnie wielu próbek ekstrakcji.

3.1.3.6. Ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego o wysokiej szybkości ścinania

Homogenizacja jest to operacja wytwarzania jednolitej, trwałej mieszaniny z dwóch lub większej ilości składników, niemieszających się ze sobą w warunkach normalnych. Jest fundamentalną operacją wykorzystywaną w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, chemicznym czy w rolnictwie [35].

Homogenizacja, jako technika ekstrakcyjna polega na użyciu wyposażonego w szybkoobrotowe ostrza homogenizatora. Poprzez działanie sił ścinających uzyskujemy rozdrobnienie badanego materiału i uwolnienie związków chemicznych z materiału homogenizowanego do ekstrahentu.

Do zalet tej techniki należy krótki czas operacji oraz prostota urządzenia [35], a ponadto możliwość przeniesienia skali z analitycznej na pół-preparatywną i dalej na preparatywną. Problem może stanowić duża ilość wydzielanej energii, przez co trudniej jest kontrolować operacje ekstrakcji i może dochodzić do rozkładu metabolitów nietrwałych termicznie [35].

3.1.3.7. Podsumowanie

Na podstawie danych literaturowych, dotyczących charakterystyk wybranych technik ekstrakcji/ługowania stosowanych do izolacji metabolitów z materiału roślinnego, najbardziej efektywną wydają się być technika ekstrakcji wspomaganej działaniem mikrofal. Do zalet można zaliczyć skrócenie czasu trwania ekstrakcji do kilku, czasami kilkunastu minut oraz możliwość regulacji temperatury opracji [13, 19, 21].

W wielu źródłach literatury za optymalną, nowoczesną, technikę ekstrakcji/ługowania metabolitów wtórnych uważana jest ekstrakcja wspomagana falami ultradźwiękowymi w formie dezintegratora ultradźwiękowego jak i łaźni ultradźwiękowej [9, 14, 15, 17, 20].

Dużo rzadziej stosuje się ostatnio ekstrakcję w aparacie Soxhleta, bądź macerację z wytrząsaniem ze względu na ich małą efektywność i długi czas trwania operacji. Jednakże, ze względu na istnienie bogatej literatury, ekstrakcja w aparacie Soxhleta, jak i w aparacie Soxtec[®], traktowana jest jako „technika odniesienia”.

Z danych literaturowych można również wnioskować, że ogromny wpływ na efektywność technik ekstrakcji/ługowania mają takie czynniki, jak: temperatura, czas trwania operacji, dobór odpowiedniego rozpuszczalnika, stosunku masy materiału badanego do ilości użytego rozpuszczalnika do ekstrakcji oraz charakterystyka materiału badanego, w tym stopień jego rozdrobnienia czy homogenizacji.

Kluczowym zagadnieniem przy wykonywaniu ekstrakcji jest dobór odpowiedniego rozpuszczalnika bądź mieszaniny rozpuszczalników i ich wzajemnego stosunku [19, 21]. Dobór ten może dotyczyć rozpuszczalnika do selektywnej ekstrakcji określonego związku chemicznego, bądź grupy lub grup substancji chemicznych, należących do różnych klas związków chemicznych. Głównie stosuje się ekstrakcje / ługowanie rozpuszczalnikami o wzrastającej polarności, rzadziej malejącej [6, 8, 21], w zależności od tego, jaki charakter ma materiał badany oraz substancje będące przedmiotem badań. Najczęściej wykorzystywane do ekstrakcji/ługowania są rozpuszczalniki takie jak, heksan, chloroform, eter dietylowy, aceton, acetonitryl, etanol, metanol, woda lub ich mieszaniny.

Istotnym zagadnieniem jest również charakterystyka materiału badanego. Występują znaczne różnice w zawartości metabolitów w poszczególnych częściach badanej rośliny [6]. Ważny jest dobór optymalnych warunków ekstrakcji w

zależności od różnej zawartości wody w surowcu roślinnym [4, 6]. Kolejnym ważnym czynnikiem jest odpowiednie rozdrobnienie lub wręcz homogenizacja materiału przed wykonaniem operacji ekstrakcji/ługowania [4]. Odpowiedni dobór wielkości ziarna surowca, powoduje bardziej efektywną penetrację materiału przez rozpuszczalnik, zwiększa się powierzchnia wymiany masy między ekstrahentem a materiałem roślinnym, co zwiększa efektywność operacji.

Dobór najbardziej efektywnych technik i warunków ekstrakcji/ługowania metabolitów wtórnych zależy od wielu czynników, dlatego wymaga optymalizacji.

3.2. ROZDZIELANIE, OZNACZANIE I IZOLACJA METABOLITÓW Z GRUPY FLAWONOIDÓW I NAFTOCHINONÓW Z MATERIAŁU ROŚLINNEGO

3.2.1. Wprowadzenie

Metabolity wtórne z grupy naftochinonów oraz flawonoidów wykazują właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, istnieją także doniesienia o właściwościach przeciwnowotworowych w przypadku naftochinonów [36-38].

Naftochinony, czyli diketonowe pochodne naftalenu, występują powszechnie w roślinach z rodzin *Bignoniaceae*, *Verbanaceae*, *Ebenaceae*, *Plumbaginaceae* oraz w roślinach mięsożernych z rodzin: *Dionophyllaceae*, *Nepenthaceae* i *Droseraceae*. Zawarte są w liściach, owocach, korzeniach i drewnie [39-41].

Dowiedziano, że naftochinony posiadają właściwości cytostatyczne, przeciwzapalne, bakterio i grzybobójcze, wykazują działanie przeciwwirusowe, antymalaryczne oraz hamują rozwój pasożytów takich jak *Schistosoma mansoni* i *Trypanosoma cruzi* [40, 42]. Właściwości naftochinonów związane są ze zdolnością do generacji aktywnych form tlenu, inhibicją enzymów topoizomeraz oraz ich oddziaływaniem z DNA [40]. Dzięki właściwościom oksydacyjnym naftochinony są zdolne do tworzenia nieodwracalnych kompleksów z aminokwasami, prowadząc często do inaktywacji białka. Dzięki wysokiemu potencjałowi redoks związki te mogą, także stymulować łańcuch oddechowy w komórkach bakterii prowadząc do powstania toksycznych rodników tlenowych i efektu bakterioobójczego [43].

Flawonoidy pełnią w roślinach funkcję barwników, antyoksydantów, oraz stanowią ochronę przed promieniowaniem UV i patogenami. Dowiedziono ponadto, że flawonoidy są związkami farmakologicznie czynnymi. Posiadają one aktywność antywirusową, antybakteryjną, antyalergiczną, a także działają przeciwzapalnie i przeciwskurczowo. Efekty farmakologiczne flawonoidów wynikają z ich własności antyoksydacyjnych, zdolności do chelatowania jonów metali oraz do oddziaływania z enzymami, błonami komórkowymi i DNA [40, 44-47].

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

Chromatografia cieczowa jest najczęściej stosowaną techniką do rozdzielania, oznaczania i izolowania metabolitów wtórnych z ekstraktów roślinnych. Najstarszą

techniką analizy naftochinonów i flawonoidów jest chromatografia planarna, zarówno bibułowa, jak i cienkowarstwowa [48]. Obecnie badania ekstraktów roślinnych bogatych w substancje z grupy naftochinonów i flawonoidów wykonuje się przede wszystkim z wykorzystaniem techniki elucyjnej, kolumnowej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

3.2.2. Rozdzielanie, oznaczanie i izolowanie naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC)

Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa wykorzystywana jest przede wszystkim do stwierdzenia obecności poszukiwanego składnika w badanej mieszaninie lub stwierdzenia jego braku. Współczesne odmiany tej techniki, z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD oraz skanerów, pozwalają na identyfikację, jakościową jak i ilościową. Mimo wszystko, dokładność i precyzja oznaczania w chromatografii cienkowarstwowej są wyraźnie mniej korzystne, niż uzyskiwane z zastosowaniem techniki kolumnowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej – HPLC. Chromatografia cienkowarstwowa jest również wykorzystywana do celów semi-preparatywnych [52].

Do rozdzielania naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem cienkowarstwowej chromatografii cieczowej wykorzystuje się tak układy faz normalnych lub chromatografię podziałową ciec-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie, jak i odwrócone układy faz. W warunkach normalnego układu faz (NP) fazą stacjonarną najczęściej stosowaną, szczególnie w strasznej literaturze był żel krzemionkowy [49-57], a w przypadku odwróconych układów faz, żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi [52, 55]. W normalnych układach faz w postaci fazy ruchomej stosowano mieszaniny takich rozpuszczalników, jak: heksan, octan etylu, chloroform, benzen, eter etylo-metylowy [38, 49-51], w warunkach chromatografii podziałowej z dynamicznie generowaną fazą stacjonarną stosowano heksan, toluen, chloroform, octan etylu, kwas mrówkowy, kwas octowy, metanol oraz taki dodatek wody by był zbliżony do granicy rozpuszczalności [52-57], a w odwróconych układach faz najczęściej: acetonitryl, metanol, kwas octowy, zmieszane z wodą [52, 55]. Rozdzielanie substancji na cienkich warstwach fazy stacjonarnej wykonywano niekiedy wielokrotnie, rozwijając chromatogram kilkakrotnie w tej samej lub różnych fazach ruchomych.

Flawonoidy charakteryzują się względnie wysoką polarnością, dlatego do rozdzielania związków z tej grupy substancji, znajduje zastosowanie chromatografia podziałowa ciecz-ciecz z fazą stacjonarną dynamicznie generowaną (LLPC), szczególnie w zastosowaniach preparatywnych. LLPC charakteryzuje się znaczną pojemnością sorpcyjną, jednak nieliniową sorpcją. Fazą stacjonarną w LLPC jest polarny adsorbent, a mniej polarna faza ruchoma np. mieszanina dichlorometan – metanol, jest bliska nasyceniu. wodą i metanolem. W LLPC występują oddziaływania charakterystyczne zarówno dla układów podziałowych. W chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną dynamicznie generowaną, w przeciwieństwie do normalnego układu faz, oddziaływania niespecyficzne (dyspersyjne) mają znaczący wpływ i decydują o wartości współczynnika podziału i o związanych z nim parametrach, takich jak objętość i czas retencji (V_r i t_r).

W tabeli 2 przedstawiono zastosowane dotychczas w literaturze przedmiotu, warunki rozdzielania, oznaczania lub izolowania naftochinonów i flawonoidów zawartych w ekstraktach roślinnych w normalnych układach faz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (NP-TLC), w odwróconych układach faz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (RP-TLC) oraz w warunkach chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC).

Tabela 2. Warunki rozdzielania i detekcji naftochinonów i flawonoidów zawartych w ekstraktach roślinnych techniką cienkowarstwowej chromatografii w normalnych układach (NP-TLC) i odwróconych układach faz (RP-TLC) oraz w warunkach chromatografii podziałowej cieczi-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC).

Lp.	Odmiana techniki TLC	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Rozdzielane/ oznaczane metabolity	Materiał roślinny	Warunki detekcji	Uwagi	Lit.
1	NP-TLC	Si 60	CH ₃ Cl	plumbagina	<i>Drosera Peltata</i>	Obserwacja w świetle widzialnym oraz przy dł. fali 365 nm	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymanych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej	[49]
2	NP-TLC	Si 60 F ₂₅₄ ,	Heksan/ AcOEt, (85:15 v/v)	plumbagina, 3-o-metylo droseron, 6-hydroksy plumbagina, dihydroksynaftochinon, oraz szikiny	<i>Plumbago capensis</i>	Brak danych	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymanych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej	[50]
3	NP-TLC	Si 60	Heksan/ AcOEt (5:2 v/v)	plumbagina	<i>Plumbago auriculata</i>	Obserwacja w świetle UV o długości fali $\lambda_1=254$ i $\lambda_2=366$ nm	Analiza składu ekstraktu <i>Plumbago auriculata</i> w dichlorometanie	[51]
4	NP-TLC	Si 60 F ₂₅₄	Heksan/ AcOEt (90:10 v/v)	ramentaceon i jego dimery oraz inne naftochinony	<i>Euclea racemosa</i> ssp. <i>schimperi</i>	Brak danych	TLC zastosowano do analizy składu ekstraktów oraz frakcji zebranych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej	[38]
5	HILIC-TLC	Si 60	1-BuOH : AcOH : H ₂ O (4:1:5 v/v) oraz AcOH:H ₂ O (3:17 v/v)	4-O-glukozyd 7-metylohydroksyjuglonu i 4-O-glukozyd hydroksyplumbaginy	<i>Drosera rotundifoli</i> <i>Drosera intermedia</i>	Brak danych	Zastosowano dwuwymiarową cienkowarstwową chromatografię cieczową (2D-TLC)	[52]
6	LLPC-TLC	Si (20cm×20cm) płytki szklane	CHCl ₃ : MeOH (85:15, v/v)	3-o-β-d-galaktozyd kwercetyny, 3-o-β-l-arabinozyd kwercetyny	<i>Byrsonima crassa</i>	Obserwacja w świetle UV o długości fali $\lambda=254$ nm	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymanych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej	[53]

Lp.	Odmiana techniki TLC	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Rozdzielane/ oznaczane metabolity	Materiał roślinny	Warunki detekcji	Uwagi	Lit.
7	LLPC-TLC oraz HILIC-TLC	1) Si 60 F ₂₅₄ 2) Si 60 F ₂₅₄ 3) Celuloza MN300 4) Celuloza MN300 5) Celuloza MN300 6) Celuloza MN300	1) AcOEt: HCOOH: CH ₃ COOH:H ₂ O (100:11:11:26 v/v) 2) AcOEt: MeOH: H ₂ O (63:12:9 v/v) 3) 1-BuOH: AcOH: H ₂ O (60:15:75 v/v) 4) (2:98 v/v) 5) AcOH:H ₂ O (15:85 v/v) 6) CH ₃ Cl:AcOH: H ₂ O (50:45:5 v/v)	flawonoidy	<i>Cymbopogon citratus</i>	Spryskanie 1% roztw. boranu 2-aminoetylodifenylowego w MeOH oraz 5% roztw. PEG 400 w EtOH Dla układów od 2-6 stosowano obserwacje pod lampą UV przy λ=366 nm	Do analizy flawonoidów zawartych w frakcjach otrzymanych za pomocą chromatografii semi-prep. RP-HPLC zastosowano 6 układów chromatograficznych TLC	[54]
8	LLPC-TLC	Si 60 F ₂₅₄	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (85:15)	kwercetyna i jej glikozydy	<i>Nymphaea pulchella</i> , <i>gracilis</i> i <i>elegans</i>	Spryskanie roztworem [(NH ₄) ₄ Ce(SO ₄) ₄ *2H ₂ O]-H ₂ SO ₄	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymanych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej	[55]
9	LLPC-TLC	Si 60 F ₂₅₄	AcOEt:HCOOH:C H ₃ COOH:H ₂ O (100:11:11:26)	flawonoidy, w tym kwercetyna	<i>Acacia pennata</i>	Spryskanie płytek NP/PEG i obserwacja w świetle UV o λ=254 nm oraz λ=366 nm	Identyfikacja głównych grup składników zawartych w ekstraktach <i>Acacia pennata</i> otrzymanych za pomocą różnych ekstrahentów	[56]
10	LLPC-TLC	Si 60 F ₂₅₄ (20 cm × 20 cm, 0,2 mm)	<i>n</i> -heksan/AcOEt/MeOH (100/15/1 v/v)	naftochinony	<i>Arnebia densiflora</i>	Skaner TLC λ= 520 nm	Do analizy ilościowej naftochinonów zastosowano połączenie techniki TLC z densytometrią	[57]

Lp.	Odmiana techniki TLC	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Rozdzielane/ oznaczane metabolity	Materiał roślinny	Warunki detekcji	Uwagi	Lit.
11	RP-TLC	RP-18 F ₂₅₄	MeOH:H ₂ O 1:1 (v/v)	glukozyd 4-hydroksy naftochinonu; rossolizyd; glukozyd hydroplumbaginy, plumbagina; ramentaceon	<i>Drosera rotundifolia</i> <i>Drosera intermedia</i>	Obserwacja w świetle widzialnym oraz w świetle UV o $\lambda = 365$ nm	Analiza metabolitów zawartych w metanolowych ekstraktach z <i>D. rotundifolia</i> oraz <i>D. intermedia</i>	[52]
12	RP-TLC	RP-18 F ₂₅₄	H ₂ O : MeOH : CH ₃ CN (3:2:1)	kwercetyna i jej glikozydy	<i>Nymphaea pulchella</i> , <i>Nymphaea gracilis</i> i <i>Nymphaea elegans</i>	Spryskanie roztworem [(NH ₄) ₄ Ce(SO ₄) ₄ * 2H ₂ O]–H ₂ SO ₄	TLC, wykorzystano do analizy frakcji otrzymanych za pomocą kolumnowej chromatografii cieczowej	[55]

3.2.3. Rozdzielanie, oznaczanie i izolowanie naftochinonów oraz flawonoidów z zastosowaniem kolumnowej wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC)

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

W tabeli 3 przedstawiono przegląd literatury dotyczący warunków rozdzielania, oznaczania albo otrzymywania naftochinonów i flawonoidów w ekstraktach roślinnych w normalnych układach faz wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (NP-HPLC), odwróconych układach faz wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (RP-HPLC) oraz w warunkach chromatografii podziałowej cieczerw-cieczerw z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC).

Najczęściej są obecnie stosowane odwrócone układy faz (RP-HPLC), w warunkach izokratycznych, albo z zastosowaniem elucji gradientowej. Najczęściej stosowane są fazy stacjonarne o niepolarnych ugrupowaniach o osiemnastu atomach węgla (C18) [64-65, 67-69, 71-73]. Wykorzystuje się też fazy o dwunastu atomach węgla (C12) [66] oraz ośmiu atomach węgla-(C8) [20]. Średnica ziaren wypełnienia kolumny wynosi najczęściej 5 μm , rzadziej 4 lub 3 μm , a podczas rozdzielania semi-preparatywnego, mającego na celu izolację metabolitów, najczęściej stosowane jest wypełnienie kolumny o ziarnach 10 μm [38].

Jako eluenty wykorzystuje się mieszaniny wody oraz rozpuszczalnika organicznego [20, 64-73] tj.: metanolu, acetonitrylu, rzadziej tetrahydrofuranu. Często, dodatek do eluentu stanowi kwas np. mrówkowy, octowy lub trifluorooctowy, w celu zmiany pH eluentu, cofnięcia dysocjacji kwasowej, oraz zwiększenia w ten sposób hydrofobowości rozdzielanych substancji.

Składniki ekstraktów rozdziela się przeważnie przy użyciu warunków elucji gradientowej, ze względu na różnorodny skład. Uzyskuje się w ten sposób krótszy czas operacji i oszczędność eluentów. Alternatywą jest stosowanie elucji skokowej, albo tzw. rozdzielania wielowymiarowego [38].

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

Druga grupa warunków separacyjnych, stosowana często dawniej, a obecnie rzadziej to wysokosprawna chromatografia cieczowa w normalnych układach faz (NP-HPLC). Najczęściej wykorzystywaną fazą stacjonarną jest wówczas żel krzemionkowy 60 lub 100 Å. W literaturze opisano także stosowanie związanych faz stacjonarnych typu: CN, DIOL (odpowiednio cyjanopropylova [60] i dihydroksypropylova [61] faza stacjonarna związana z żel krzemionkowym), oraz mieszaniny n-heksanu, chloroformu, dichlorometanu, 2-propanolu, octanu etylu, dioksanu oraz tetrahydrofuranu, w różnym stosunku objętościowym, jako składniki eluentu [38, 58-63].

Chromatografia podziałowa ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC/NP-W) jest obecnie rzadko stosowana w technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Jednak podczas jednoczesnego rozdzielania naftochinonów oraz flawonoidów, różniących się znacznie polarnością, może być przydatna, ze względu na zmniejszenie retencji mniej polarnych metabolitów i wzrost retencji polarnych składników ekstraktów, a szczególnie glikozydów. Ma też miejsce wyraźne zwiększenie pojemności separacyjnej układu, stąd mimo wyraźnej asymetrii pików spowodowanej nieliniowością izoterm sorpcji, tego rodzaju układy rozdzielcze mają szczególnie korzystne właściwości w skali preparatywnej, zwłaszcza do rozdzielania alkaloidów i glikozydów, a być może też polifenoli [74]. Jako fazy stacjonarne w LLPC-HPLC stosuje się żel krzemionkowy lub żel krzemionkowy modyfikowany grupami dihydroksypropyłowymi (DIOL), a jako fazy ruchome wykorzystuje się mieszaniny eterów alifatycznych i cyklicznych lub węglowodory alifatyczne i ich chloropochodne, jako nisko-polarne składniki eluentu z metanolem, izopropanolem, acetonitrylem, jako polarne składniki eluentu, przy czym eluent posiada wodę w ilości zbliżonej do nasycenia nią eluentu, jednak poniżej nasycenia [63, 74-75].

Tabela 3. Warunki rozdzielania, oznaczania lub izolowania frakcji naftochinonów i flawonoidów z ekstraktów roślinnych w normalnych (NP-HPLC) i odwróconych układach faz (RP-HPLC) kolumnowej wysokosprawnej chromatografii ciekowej oraz w warunkach chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC) – przegląd literatury.

Lp.	Odmiana techniki HPLC	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Rozdzielane/ oznaczane metabolity	Materiał roślinny	Warunki detekcji	Uwagi	Lit.
1	NP-CC	Si 60	A:heksan B:AcOEt od 100% A do 0% A, skokowo co 10% B	naftochinony, np. ramentaceon	<i>Euclea racemosa</i>	UV-VIS	Wyizolowano 10 frakcji bogatych w poszczególne metabolity stosując elucję skokową, zwiększając zawartość octanu etylu co 10% v/v.	[38]
2	NP-CC	semi-prep Si (Merck, 0,063–0,200 mm)	heksan : AcOEt; 9:1, 8:2 do 1:1	oznaczano 6 naftochinonów, w tym: ramentaceon, 5,5' dihydroksy-7,7'-binaftochinon,	<i>Euclea natalensis</i>	B/d	W celu wyizolowania frakcji bogatych w poszczególne naftochinony zastosowano semi-preparatywną kolumnową chromatografię ciekową oraz elucję gradientową.	[58]
3	NP-CC	Si 60	DCM : AcOEt 20:80 v/v	flawonoidy, w tym: kwercetyna	<i>Buddleja globosa</i>	B/d	Do identyfikacji otrzymanych frakcji za pomocą chromatografii kolumnowej wykorzystano technikę TLC.	[59]
4	NP-HPLC	μBondapak-CN (300 mm x 3,9 mm, 10 μm)	heksan + 1% kw. octowego	plumbagina, ramentaceon, juglon, lawson, izodiospyrin, mamegakinone	<i>Diospyros Usambarensis</i> , <i>Roth</i>	UV λ=254nm	Za pomocą NP-HPLC rozdzielono i oznaczono 6 naftochinonów.	[60]

Lp.	Odmiana techniki HPLC	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Rozdzielane/ oznaczane metabolity	Materiał roślinny	Warunki detekcji	Uwagi	Lit.
5	NP-HPLC	Lichrospher DIOL (250mm x 4mm, 5µm)	A: heksan, B:THF 0-15 min 10-50%B 15-25 min 50% B	plumbagina, ramentaceon, kwercetyna i mirycetyna	<i>Dionaea muscipula</i> , <i>Drosera capensis</i>	UV-DAD	NP-HPLC zastosowano do oznaczania zawartości 2 naftochinonów oraz dwóch flawonoidów w ekstraktach z roślin poddanych elicytacji.	[61]
6	LLPC-HPLC	µSpherogel, (30 mm x 8mm, 10µm)	heksan :CH ₃ Cl : izopropanol (30:70:2 v/v/v)	1,4 naftochinon, plumbagina	<i>Plumbago zeylanica</i>	UV-VIS	Opracowana metoda ma służyć do szybkiego oznaczania wybranych naftochinonów w ekstraktach z <i>Plumbago zeylanica</i>	[62]
7	NP-HPLC oraz LLPC-HPLC	DIOL LiChrosorb (125mm x 4mm)	1) dioksan : heksan: (b/d, v/v/v) 2) dioksan : heksan : MeOH (40:40:20 v/v)	kwercetyna oraz kempferol	<i>Ginkgo Biloba</i>	1) UV-DAD 2) detektor elektrochemiczny ECD	Do oznaczania kwercetyny oraz kempferolu zastosowano dwa układy separacyjne, pierwszy NP-HPLC z detektorem UV-DAD oraz drugi LLPC-HPLC z detektorem ECD	[63]
8	RP-HPLC	RP-18 (250 mm x 10mm, 10µm)	CH ₃ CN : H ₂ O 0 min 1:1 v/v 40 min 100:0 v/v	naftochinony, np. ramentaceon	<i>Euclea racemosa</i>	UV-VIS	RP-HPLC zastosowano jako kolejny etap po chromatografii kolumnowej do wyizolowania frakcji bogatych w określone naftochinony	[38]

Lp.	Odmiana techniki HPLC	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Rozdzielane/ oznaczane metabolity	Materiał roślinny	Warunki detekcji	Uwagi	Lit.
9	RP-HPLC	RP 18 (150 mm x 4 mm)	CH ₃ CN : 0,1% COOH (25:75 v/v)	flawonoidy, w tym kwercetyna	<i>Buddleja globosa</i>	UV-DAD	RP-HPLC zastosowano do identyfikacji składników zawartych w frakcjach otrzymanych z zastosowaniem NP-CC	[59]
9	RP-HPLC	LiChrospher 100, RP18e (250 mm x 4 mm, 5µm)	H ₂ O : MeOH 0 min 2:98 10 min 50:50 30 min 100:0 40 min 100:0 (v/v)	plumbagina	<i>Plumbago zeylanica</i>	UV-DAD 254 nm	Opracowaną metodę zwalidowano i wyznaczono parametry tj. LOQ (0,06µg/ml), LOD (0,02 µg/ml), zakres liniowości (10–200 µg/ml)	[64]
10	RP-HPLC	LiChrospher C18 (250 mm x 4 mm)	MeOH : 0,5% H ₃ PO ₄ (46:54 v/v)	flawonoidy np. kwercetyna	<i>Ginkgo biloba</i>	RID oraz UV-DAD 370 nm	Do oznaczenia flawonoidów w <i>Ginkgo biloba</i> zastosowano detektor spektrofotometryczny typu DAD oraz detektor refraktometryczny. Temperatura termostataowania kolumny wynosiła 35°C.	[65]
11	RP-HPLC	Phenomenex C-12 (150mm x 4,6mm, 4µm)	H ₂ O:AcCN; Program elucji: 0 min 85:12 10 min 70:30 20 min 50:50 30 min 20:80	naftochinony	<i>Eleutherine americana</i>	UV-DAD 254 nm oraz detektor MS z pułapką jonową	Zarówno w analizach z zastosowaniem detektora UV-DAD jak i detektora MS wykorzystano te same warunki chromatograficzne z tym, że do eluentu w analizach MS dodano 0,01% kwas mrówkowy.	[66]

Lp.	Odmiana techniki HPLC	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Rozdzielane/ oznaczane metabolity	Materiał roślinny	Warunki detekcji	Uwagi	Lit.
12	RP-HPLC	Zorbax C18-AAA (150 mm x 4,6 mm, 3,5 μm)	0,1M CH ₃ COOH : MeOH (33:67 v/v)	naftochinony: 1,4-naftochinon, plumbagina, juglon, lawson	<i>Dionaea muscipula</i> , <i>D.rotundifolia</i> , <i>D.spathulata</i> , <i>D. capensis</i> , <i>J. regia</i> , <i>P. tomentosa</i>	UV-VIS-DAD 260 nm	Autorzy badali także eluenty z inną zawartością metanolu, jednakże ten uznali za najbardziej selektywny i stabilny.	[67]
13	RP-HPLC	Nucleosil 100-5 C18 (250 mm x 4 mm, 5μm)	2,5% HCOOH : 100% MeOH Program elucji: 0 min: 95:5 15 min 70:30 40 min 60:40 60 min 50:50 65 min 45:55 90-98 min 0:100	związki fenolowe	133 indyjskie rośliny lecznicze	UV-DAD	Opracowana metoda pozwoliła na oznaczenie jakościowe związków z grup tj. kwasy fenolowe, flawonoidy, kumaryny, chinony w 83-ech gatunkach roślin indyjskich.	[68]
14	RP-HPLC	Agilent C8 (250 mm x 4,6 mm, 5μm)	A: H ₂ O / HCOOH 100:0,2 v/v B: MeOH/THF 100:5 v/v Program elucji: 0 min 41: 59 40 min 31: 69 60 min 30: 70 70 min 28,5: 71,5 80 min 0:100	naftochinony	9 gatunków roślin z rodziny <i>Boraginaceae</i>	UV-DAD 214 nm 275 nm 520 nm	Opracowano metodę oznaczania jakościowego i ilościowego ośmiu naftochinonów w dziewięciu gatunkach roślin z rodziny <i>Boraginaceae</i>	[20]

Lp.	Odmiana techniki HPLC	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Rozdzielane/ oznaczane metabolity	Materiał roślinny	Warunki detekcji	Uwagi	Lit.
15	RP-HPLC	Hypersil-ODS (125 x 4,6 mm, 5µm)	0,025 M H ₃ PO ₄ : 100% MeOH Program elucji: 0 min -3 min 82:18 11 min -14 min 55:45 v/v	oznaczano 5 flawonoidów, w tym kwercetynę i kempferol	<i>Semen cuscutae</i>	UV-DAD 360 nm	Zbadano 40 próbek materiału roślinnego zebranego w różnych regionach Chin, w celu oznaczenia zawartości pięciu wybranych flawonoidów. Opracowana metoda charakteryzuje się liniowością > 0,999 w stosunkowo dużym zakresie stężeń metabolitów.	[69]
16	RP-HPLC	Brak danych	MeCN : H ₂ O : AcOH 62,5 : 32,5 : 5 v/v	oznaczano 5 naftochinonów, w tym ramentaceon oraz szikonine	<i>Euclea natalensis</i>	UV-DAD, 430 i 352 nm	Do oznaczenia ilościowego 4 naftochinonów zastosowano dł. fali 430 nm, a do oznaczenia szikoniny zastosowano dł. fali 352 nm	[70]
17	RP-HPLC	Hypersil BDS (250 x 4,6 mm, 5µm)	95% CH ₃ CN + 5% THF : 0,2 M CH ₃ COOH 38:62 v/v	naftochinony i flawonoidy	<i>D. rotundifolia</i> <i>D. madagascariensis</i>	UV-DAD	Opracowana metoda pozwoliła na jednoczesne oznaczenie naftochinonów oraz flawonoidów w dwóch gatunkach roślin.	[71]
18	RP-HPLC	Bondapak C18 (300 x 3,9 mm)	MeOH : H ₂ O 8:2 v/v + 0,1% TFA	plumbagina	<i>Plumbago rosea</i> L.	UV-VIS 254 nm	RP-HPLC zastosowano do oznaczania zawartości plumbaginy w ekstraktach z roślin poddanych elicytacji.	[72]

Lp.	Odmiana techniki HPLC	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Rozdzielane/ oznaczane metabolity	Materiał roślinny	Warunki detekcji	Uwagi	Lit.
19	RP-HPLC	Superspher100 RP18 250x2mm, 5 µm	A: H ₂ O:CH ₃ CN:HCOOH 94,5:5:0,5 v/v B:H ₂ O : CH ₃ CN:HCOOH 5:94,5:0,5 v/v Program elucji: 0-5 min A:B 90:10 5-32 min A:B 70: 30 32-40 min A:B 0: 100 v/v	naftochinony i flawonoidy, w tym plumbagina	<i>D. adelae</i> , <i>D. aliciae</i> , <i>D. capensis</i> , <i>D. cuneifolia</i> , <i>D. ramanacea</i> <i>D. binata</i>	UV-DAD 259 nm i ESI/MS	Opracowana metoda z zastosowaniem detektora UV-DAD i ESI/MS pozwoliła na zbadanie składu metabolicznego pięciu gatunków roślin oraz wyznaczenie gatunku, w którym występuje największe stężenie plumbaginy.	[73]

3.2.4. Podsumowanie

Chromatografia cieczowa, zarówno cienkowarstwowa jak i kolumnowa, znajduje szerokie zastosowanie w rozdzielaniu, oznaczaniu oraz izolacji frakcji metabolitów pierwotnych i wtórnych, z grupy naftochinonów i flawonoidów w ekstraktach z materiałów roślinnych.

Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej metabolity są rozdzielane w normalnych układach faz (NP-TLC) w warunkach adsorpcyjnych, bądź z zastosowaniem chromatografii podziałowej ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC-TLC), a rzadziej z wykorzystaniem odwróconych układów faz (RP-TLC). W przypadku rozdzielania i oznaczania naftochinonów i flawonoidów za pomocą elucyjnej, kolumnowej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej głównie stosowane są odwrócone układy faz (RP-HPLC), a rzadziej NP-HPLC w warunkach adsorpcyjnych lub LLPC-HPLC. Jednakże, do izolowania metabolitów roślinnych w skali semi-preparatywnej, bądź preparatywnej wykorzystywane są dotychczas, najczęściej normalne układy faz lub stosowana jest chromatografia podziałowa ciecz-ciecz z fazą stacjonarną generowaną dynamicznie (LLPC). Stopień złożoności składu ekstraktu z materiału roślinnego oraz rodzaj wykorzystywanego detektora, decyduje o zastosowaniu elucji izokratycznej bądź gradientowej. W wielu przypadkach stosuje się „pre-frakcjonowanie” z zastosowaniem elucji skokowej, a następnie rozdziela się frakcje w warunkach elucji izokratycznej. Bardzo celowe wydaje się też w praktyce stosowanie przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie.

W literaturze istnieje wiele procedur rozdzielania metabolitów roślinnych [49-73]. Nie opracowano jednak dotychczas uniwersalnej procedury, przydatnej do rozdzielania metabolitów większej grupy roślin. Warunki rozdzielania zaproponowane w literaturze są odpowiednie dla ekstraktów otrzymanych z konkretnych roślin, poddanych określonym warunkom hodowli bądź elicytacji i otrzymanych w określonych warunkach ekstrakcji / ługowania. W przypadku pojawienia się w ekstrakcie dodatkowych substancji, będących wynikiem zmiany warunków hodowli czy sposobu ekstrakcji stają się one z reguły tylko częściowo skuteczne.

3.3. PROBLEMATYKA POWIĘKSZANIA SKALI KOLUMNOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

3.3.1. Ogólne zasady i specyfika przenoszenia skali w chromatografii cieczowej

Pod pojęciem preparatywnej chromatografii cieczowej (PLC) rozumie się wykorzystanie tej techniki do otrzymywania substancji o określonej czystości w niewielkich ilościach (od 1mg do kilku gramów) i/lub otrzymywanie jej sporadycznie. Chromatografia cieczowa do zastosowań preparatywnych wykorzystuje wszystkie dotąd poznane mechanizmy rozdzielcze i wszystkie znane układy chromatograficzne. Najczęściej stosuje się kolumnową chromatografię elucyjną, wykorzystując te same wypełnienia kolumn jak w analitycznej chromatografii cieczowej lub o nieco większych średnicach ziaren oraz możliwie jak największy stopień przeładowania kolumny, warunkujący jak najwyższą wydajność otrzymywania substancji [75, 76].

W celu uzyskania optymalnych warunków rozdzielania w PLC dobiera się najpierw warunki w skali modelowej, tzn. przy zastosowaniu kolumny „modelowej” o małej średnicy (4-10 mm). Następnie, dokonując powiększenia skali rozdzielania, stosuje się kolumnę o odpowiednio większej średnicy, ale nie zmienia się jej długości ani rodzaju sorbentu, a także układu chromatograficznego i stężenia rozpuszczalnika. Średnice kolumny potrzebną do rozdzielania preparatywnego oblicza się zakładając odpowiednie zwiększenie objętości dozowanej mieszaniny substancji rozdzielanych, proporcjonalnie do stopnia zwiększenia przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny [75, 76].

3.3.2. Kryteria optymalizacji procesu otrzymywania substancji – podstawowe ograniczenia

W chromatografii cieczowej w warunkach modelowych podstawowym kryterium optymalizacji jest dążenie do uzyskania dostatecznie wysokich wartości współczynnika rozdzielania R_S przy minimalnym czasie trwania rozdzielania. W warunkach analitycznych najczęściej dąży się do uzyskania wartości R_S w przedziale 1,0 - 1,5. W chromatografii preparatywnej nadrzędnym kryterium optymalizacji jest dążenie do maksymalizacji efektywności ekonomicznej otrzymywania substancji o pożądanej czystości. Wysoka selektywność rozdzielania w warunkach braku przeładowania jest warunkiem wysokiej efektywności chromatografii w skali

preparatywnej lub procesowej. Kryterium optymalizacji warunków rozdzielania w skali procesowej jest maksymalizacja stopnia odzysku [77].

Podstawowymi ograniczeniami w preparatywnej chromatografii cieczerwowej są: możliwe do osiągnięcia natężenie przepływu eluentu (limitowane oporem przepływu cieczy), dopuszczalnym ciśnieniem pracy pompy oraz całej aparatury, stosunkowo wysokie ceny sorbentów potrzebnych, jako wypełnienia do kolumn preparatywnych oraz koszt nieodzyskiwanych rozpuszczalników organicznych [76, 77].

3.3.3. Zjawiska przeładowania kolumny i ich efektywne wykorzystanie

W warunkach chromatografii cieczerwowej w skali modelowej i przy stosowaniu warunków preparatywnych dąży się do uzyskania w maksymalnego stopnia przeładowania kolumny. Im wyższy udaje się osiągnąć stopień przeładowania, tym efektywniejszy pod względem ekonomicznym jest proces rozdzielania. Szczególnie efektywny jest proces rozdzielania w przypadku silnego przeładowania stężeniowego (ze względu na większe stężenie substancji w eluencie można uzyskać ponad 5-cio krotny wzrost wydajności kolumny) w stosunku do odpowiednich warunków przeładowania objętościowego [77]. Jednak może mieć to miejsce jedynie tylko wtedy, gdy rozpuszczalność rozdzielanych substancji w eluencie jest dostatecznie wysoka oraz gdy selektywność układu rozdzielczego jest odpowiednio wysoka.

Każdy rodzaj przeładowania kolumny powoduje poszerzenie pasma, a kształt pików zależy od typu izoterm sorpcji i stopnia nieliniowości detektora.

W przypadku przeładowania stężeniowego i izoterm sorpcji Langmuira, piki mają (teoretycznie) kształt trójkąta prostokątnego, gdy stężenie dozowanej substancji znajduje się w pobliżu prawie poziomego przebiegu tego typu izoterm lub obserwuje się wykładnicze zakrzywienie zstępującej części piku, w przypadku bardzo wysokich stężeń substancji w roztworze dozowanym (np. rzędu stężeń molowych) [77].

W przypadku przeładowania objętościowego (zwiększenie objętości dozowanej bez wzrostu stężenia) obserwuje się wzrost szerokości piku. Jeżeli objętość dozowana przekroczy graniczną wartość rzędu 1% objętości kolumny obserwuje się poszerzenie pasma piku (pojawi się plateau o stałej wysokości). Maksymalną objętość, którą powinno się dozować w celu zwiększenia wydajności procesu rozdzielania w warunkach przeładowania objętościowego można uzyskać z chromatogramu otrzymanego w skali modelowej. Jest to zmierzona na poziomie linii

podstawowej i wyrażona w jednostkach objętości eluentu „odległość” pomiędzy pikami substancji, które są celem rozdzielania [76].

Warunki jednoczesnego przeładowania stężeniowego i objętościowego można rozpoznać na chromatogramie, gdy pik chromatograficzny jest asymetryczny po stronie zstępującej i wykazuje jednocześnie plateau ma „szczyte piku”, jednakże, gdy w warunkach braku przeładowania pik jest symetryczny. Warunki takie mogą wystąpić w przypadku łatwych problemów rozdzielczych i stosunkowo niskiej rozpuszczalności rozdzielanych substancji, gdy dozowane są bardzo duże objętości niezbyt rozcieńczonego roztworu ($c_i > 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) oraz w przypadku średnio trudnego problemu rozdzielczego, gdy substancje rozdzielane charakteryzują się bardzo niewielkim zakresem liniowości izotermy sorpcji [77].

3.4. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH MATERIAŁÓW ROŚLINNYCH I ZAWARTYCH W NICH METABOLITÓW

Badania nad opracowaniem nowych procedur przygotowania próbki, rozdzielania, identyfikacji i izolacji wybranych metabolitów roślinnych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykonano na przykładzie roślin mięsożernych z rodziny *Droseraceae* z gatunków *Dionaea muscipula*, *Drosera binata*, *Drosera aliciae* oraz *Drosera capensis*.

Rośliny, z gatunków *Dionaea muscipula*, *Drosera binata*, *Drosera aliciae* oraz *Drosera capensis* zawierają substancje należące do różnych klas związków chemicznych, różniących się polarnością, hydrofobowością, rozpuszczalnością oraz wielkością cząsteczek. Jest to dobry przykład materiału roślinnego umożliwiającego m.in. uzyskanie obszernej charakterystyki selektywności wybranych faz stacjonarnych i eluentów, w zastosowaniu do rozdzielania i wyodrębniania metabolitów różnych grup. Ponadto w ekstraktach z tych roślin znajdują się substancje, mające bardzo podobne do siebie widma w zakresie UV-VIS. Podobieństwo widm UV-VIS oraz nieznaną strukturę chemiczną rozdzielanych substancji bardzo utrudnia opracowanie optymalnych warunków rozdzielania, ponieważ uniemożliwia zastosowanie współczesnych chemicznych programów optymalizacyjnych, w celu przewidywania retencji związków w określonych warunkach elucji.

Dodatkowym argumentem, za wykonaniem badań z zastosowaniem roślin z gatunków *Dionaea muscipula*, *Drosera binata*, *Drosera aliciae* oraz *Drosera capensis* jest możliwość ich hodowli w warunkach *in-vitro*. Za wykorzystaniem roślinnych kultur *in-vitro* przemawia niezależnie rozmnażania od sezonu wegetacyjnego i strefy klimatycznej (hodowle można prowadzić w dowolnym miejscu i czasie), niezależnie od warunków pogodowych. Dzięki technice mikrorozmnażania istnieje możliwość uzyskania dużej ilości jednolitego materiału, wolnego od patogenów.

Spośród substancji czynnych farmakologicznie pozyskiwanych z tkanek tych roślin, na uwagę zasługują: glikozydy flawonoidów, flawonoidy, naftochinony i kwasy fenolowe stosowane w leczeniu chorób układu oddechowego oraz jako czynniki zwiększające odporność na bakterie chorobotwórcze. Umiejętność ekstrakcji / ługowania, rozdzielania, identyfikacji i wyodrębniania tych związków, stwarza możliwość bieżącej kontroli ich zawartości w tkankach w czasie hodowli *in-*

vitro, co w konsekwencji ułatwia dobór czynników stymulujących ich wydzielanie. Badania były wykonywane także z zamiarem, by najkorzystniejsze warunki rozdzielania można było zaadoptować do otrzymywania określonych metabolitów w skali chromatografii preparatywnej.

3.4.1. Rośliny mięsożerne z rodziny *Droseracea*, w szczególności z gatunku *Dionaea* i *Drosera*

Rośliny mięsożerne (ang. *carnivorous plants*) należą do gromady roślin okrytonasiennych nazywanych również *Angiospermae*. Obejmują one około 600 gatunków, sklasyfikowanych w sześciu klasach taksonomicznych [78].

Posiadają one niezwykle sposób odżywiania oraz adaptacji w środowiskach ubogich w składniki odżywcze tj. azot, fosfor oraz sole mineralne. Podczas gdy większość roślin należy do ścisłych producentów, rośliny mięsożerne do swojego rozwoju potrzebują materię organiczną pochodzącą ze schwytanych owadów, pajęczaków, a także małych ssaków jak np. myszy [79, 80]. Z pochłanianych organizmów czerpią azot, fosfor, siarkę, chlor, wapń, cynk i jod. Ich liście są zmodyfikowane do postaci pułapek na owady, które np. zamykają się w czasie 100ms. Główne obszary naturalnego występowania roślin mięsożernych to bagna i grzęzawiska, wilgotne i nasłonecznione, w których są w stanie prowadzić fotosyntezę [80].

Rośliny mięsożerne są cennym źródłem wielu związków chemicznych takich jak: naftochinony, flawonoidy i antocyjany, kwasy fenolowe, które będąc związkami farmakologicznie czynnymi, są powszechnie pozyskiwane z różnych roślin i wykorzystywane do produkcji leków [81].

W medycynie ludowej wyciągi z roślin mięsożernych stosowane były od dawna, jako środki pobudzające wydzielanie śluzu, w bronchitach, kaszlu i koklusz. Ziele rosiczki (*Droserae*) jest od dawna surowcem wykorzystywanym do produkcji leków na takie dolegliwości jak: grypa, angina, gruźlica, szkarlatyna, zapalenia gardła i płuc, oraz w terapii astmy i zapalenia zatok. [41, 82].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o bakteriostatycznych i przeciwnowotworowych właściwościach związków zawartych w tkankach roślin mięsożernych, co na nowo zwróciło uwagę na te niezwykle organizmy [80, 81].

Wśród roślin mięsożernych, szczególną przydatnością w lecznictwie odznaczają się rośliny z rodziny rosiczkowatych (*Droseraceae*). Łacińska nazwa rosiczki

wywodzi się z greckiego słowa „drosos”- czyli rosa, stąd też polska nazwa rodziny-rosiczkowate [82]. Rośliny rosiczkowate (*Droseraceae*) wchodzą w skład flory Europy, Azji, Ameryki Północnej i Południowej, Afryki oraz Australii [83].

Spośród związków farmakologicznie czynnych pozyskiwanych z roślin rodzaju rodziny *Droseraceae* na uwagę zasługują związki fenolowe (kwas benzoesowy, kwas trans-cynamonowy), flawonoidy (kwercetyna, mirycetyna), naftochinony (plumbagina, ramentaceon, droseron, rossolizyd) [78].

Do rodziny *Droseraceae* należą m.in. *Dionaea muscipula*, *Drosera binata*, *Drosera aliciae*, *Drosera capensis*. *Dionaea muscipula* jest monotypowym rodzajem rośliny zawierającym tylko jeden gatunek, pozostałe trzy to rośliny należą do rodzaju rosiczek (*Drosera*) [84].

Muchołówka amerykańska (*Dionaea muscipula*) – występuje naturalnie tylko w Ameryce Północnej, na terenie Karoliny Północnej i Południowej Stanów Zjednoczonych (fot. 1). Teren jej występowania to bardzo nieurodzajne obszary o pH 3,5 – 4,9, w strefie klimatu wilgotnego o dużej rozpiętości temperatur w zimie i lecie. W swym naturalnym środowisku łąpie głównie mrówki i pająki. *D. muscipula* zawiera metabolity takie jak, z grupy flawonoidów np. mirycetynę i kwercetynę, z grupy naftochinonów np. plumbaginę, hydroksyplumbaginę, droseron, 3-chloroplumbaginę, 4-O- β -glukopizanozyd, a także kwasy fenolowe i enzymy trawienne [84-86, 92].

Rosiczka dwudzielna (*Drosera binata*) – pochodzi z Australii i Nowej Zelandii (fot. 2). Naturalnym jej środowiskiem są bagna, mokre torfowiska oraz okolice jezior. Rosiczka dwudzielna kiełkuje wczesną wiosną, liście usychają jesienią, a pąk pozostaje i może jeszcze przetrwać pierwsze przymrozki i śniegi. Wyróżnia się kilka odmian różniących się kolorem liści lub ilością rozgałęzień. Czysty gatunek (*D. binata*) ma liście dwudzielne, w kształcie litery Y [87].

Rosiczka Alicji (*Drosera aliciae*) - jest gatunkiem pochodzącym z obszaru Afryki Południowej (obecnie Republika Południowej Afryki, RPA), a jej siedliska zlokalizowane są na obszarze Prowincji Przylądkowej (fot. 3). Głównym miejscem bytowania tych roślin są torfowiska, co obecnie, na skutek robót melioracyjnych i eksploatacji torfowisk, sprawia, że Rosiczka Alicji jest gatunkiem zagrożonym i coraz rzadziej występuje w środowisku naturalnym. W warunkach odpowiedniej wilgotności i nasłonecznienia wybarwia swoje liście pigmentem antocyjanin, który pomaga w przywabianiu owadów, będących jej pożywieniem. Wytwarza

kwiatostany o ciekawych kształtach, oddalone o 30 cm od owadożernych liści. W ten sposób umożliwia przedłużanie gatunku przez owady przenoszące pyłek, chroniąc je przed strawieniem na powierzchni liści. Hodowla tego gatunku nie sprawia trudności w warunkach *in vitro* [78].

Rosiczka przylądkowa (*Drosera capensis*) – naturalnym miejscem jej występowania jest Południowa Afryka, okolice Kapsztadu i Przylądka Dobrej Nadziei (fot.4). Rośnie wśród niskich traw, w klimacie podzwrotnikowym morskim oraz zwrotnikowym suchym. Jest najodporniejszą na czynniki zewnętrzne rosziczką. Do chwytania zdobyczy używa włosków zakończonych lepkiem śluzem. Wydzielany on jest z gruczołów rozmieszczonych na szczytach włosków. Włoski gruczołowe pokrywają całą powierzchnię liścia. Zwabiony owad wchodzi na liść i grzęźnie w lepkiej cieczy. Jest to bodziec mechaniczny powodujący wydłużanie się części podstawnej włoska i zaginanie się go w kierunku ofiary. Jednocześnie liść ulega wpukleniu, co powoduje dodatkowe unieruchomienie schwytanego owada. Włoski gruczołowe reagują także na bodźce chemiczne. Wydzielany przez nie kwas mrówkowy rozkłada ciało ofiary powodując uwolnienie białek, które to z kolei pobudzają roślinę do wydzielania enzymów proteolitycznych, rozkładających owada. Powstała, bogata w substancje odżywcze ciecz jest wchłaniana przez roślinę [78].



Fot. 1. *Dionaea Muscipula*



Fot. 2. *Drosera binata*



Fot. 3. *Drosera aliciae*



Fot. 4. *Drosera capensis*

3.4.2. Właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne wybranych metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów

Naftochinony to związki powstające w szlaku poliketydowym posiadające właściwości allelopatyczne. W naturze występują głównie jako metabolity wtórne mikroorganizmów, grzybów i roślin. Ich obecność została potwierdzona w gatunkach roślin z rodzin: *Droseraceae*, *Juglandaceae*, *Nepenthaceae* i *Plumbaginaceae* [88]. Rośliny z gatunku *Droseraceae* pochodzące ze stanowisk naturalnych zawierają takie naftochinony jak: plumbagina (5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon) lub jej izomer ramentaceon (7-metylojuglon, 5-hydroksy-7-metylo-1,4-naftochinon), chloroplumbagina (3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon), droseron (2,8-dihydroksy-3-metylo-1,4-naftochinon, 2-hydroksyplumbagon) i 4-O glukozyd hydroksyplumbaginy [93]. Natomiast materiał roślinny z kultur *in vitro* zawiera ponadto 8,8'-biplumbaginę [86]. Ilość, skład i proporcje poszczególnych naftochinonów w materiale roślinnym mogą ulegać zmianie, w zależności od dostępności składników odżywczych, miejsca wzrostu, różnic środowiskowych i interakcji pomiędzy rośliną a glebą [15].

W tabeli 4 umieszczono, główne naftochinony, występujące w roślinach z rodziny *Droseraceae*.

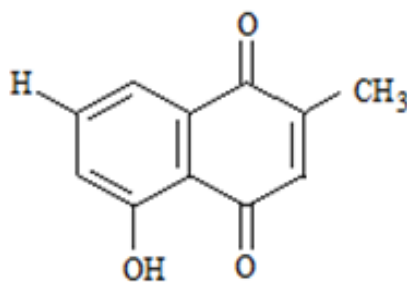
Naftochinony posiadają aktywność fitotoksyczną, antybakteryjną, grzybobójczą oraz właściwości cytostatyczne i przeciwnowotworowe. Właściwości cytostatyczne i przeciwnowotworowe naftochinony zawdzięczają m.in. ich udziałowi w inhibicji szlaków przenoszenia elektronów, roli w fosforylacji oksydacyjnej i produkcji reaktywnych rodników tlenowych biorących udział w reakcjach redoks w warunkach beztlenowych [88].

Tabela 4. Metabolity wtórne w postaci aglikonów lub glikozydów, należące do grupy naftochinonów z roślin z rodziny *Droseraceae*.

Grupa związków	Nazwa	Literatura
Naftochinony	plumbagina (5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon)	
	chloroplumbagina (3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon)	
	4-O- glukozyd hydroksyplumbaginy	[15]
	5-O-glukozyd hydroksyplumbaginy	[84]
	8-O-glukozyd hydroksyplumbaginy	[89]
	ramentaceon (5-hydroksy-7-metylo-1,4-naftochinon)	[90]
	biramentaceon	[91]
	ramenton (5,8-dihydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon)	[92]
	rossolizyd (4-O-glukozyd hydroksyramentaceonu)	
droseron (3,5-dihydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon)		

W badaniach skupiono się na czterech związkach z grupy naftochinonów takich jak, plumbagina, ramentaceon, chloroplumbagina i droseron.

Plumbagina- (5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon; 2-metylojuglon), masa molowa wynosi 188,18 g/mol, wzór sumaryczny ma postać $C_{11}H_8O_3$. Jest izomerem ramentaceonu. Jej nazwa pochodzi od nazwy rośliny, z której ją pierwotnie izolowano- *Plumbago*. Wzór strukturalny zamieszczono na rysunku 2. Plumbagina jest związkiem o kolorze pomarańczowym. Występuje między innymi w roślinach z rodzaju: *Plumbago*, *Drosera*, *Dionaea* oraz *Nepenthes*. Plumbagina dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych takich jak eter etylowy, chloroform, dichlorometan, słabiej w metanolu, natomiast bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie [17, 94].



Rys. 2. Wzór strukturalny cząsteczki plumbaginy.

Wykazano, że plumbagina posiada szereg aktywności biologicznych. W ostatnich latach dowiedziono, że plumbagina wykazuje aktywność przeciwnowotworową w przypadku raka: piersi, gruczołu krokowego, jajnika, trzustki, skóry, płuc, wątroby, szyjki macicy i białaczki [94].

W prowadzonych badaniach na temat raka BRCA u kobiet, stwierdzono pozytywną aktywność plumbaginy. Okazało się, że hamuje ona wzrost komórek BRCA, nie powodując uszkodzenia zdrowych komórek nabłonka piersi. Powoduje także skuteczne zahamowanie proliferacji komórek BRCA, indukuje apoptozę w tych komórkach, wpływa na zahamowanie ekspresji białek Bcl-2 i aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [94].

Pozytywne efekty wywarne przez plumbaginę zaobserwowano także w prowadzonych pracach na temat raka gruczołu krokowego określanego jako PCa, który powoduje jedną z największych liczb zgonów wśród mężczyzn. W badaniach prowadzonych na myszach wykazano, że hamowała ona inwazję komórek PCa i indukowała w nich apoptozę. Ograniczyła wzrost masy guza o około 90%, a co najważniejsze po jej odstawieniu nie zaobserwowano ponownego wzrostu. [94, 95].

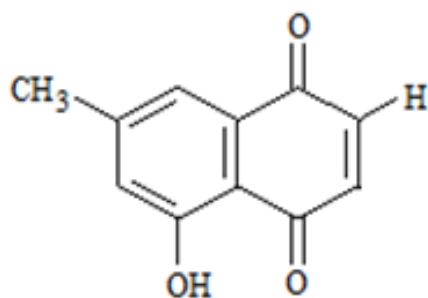
Stwierdzono również aktywność przeciwbakteryjną i udowodniono, że hamuje wzrost *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori* i bakterii z rodzaju *Mycobacterium* [94-96].

Plumbagina posiada także właściwości grzybobójcze, co udowodniono podczas badań na takich szczepach jak: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* i *Candida krusei*. W każdym z tych przypadków plumbagina powodowała zahamowanie wzrostu [94].

Przeprowadzono badania, w których dowiedziono, że 2-metylojuglon wykazuje właściwości cytotoksyczne, co udowodniono w testach z użyciem keratynocytów [97].

Pod koniec lat 80-tych ubiegłego wieku, ukazały się także doniesienia, że plumbagina posiada także właściwości pestycydu [98].

Ramentaceon- (5-hydroksy-7-metylo-1,4-naftochinon, 7-metylojuglon), izomer strukturalny plumbaginy, wzór sumaryczny ma postać $C_{11}H_8O_3$ [99]. Wzór strukturalny zamieszczono na rysunku 3. Związek o kolorze bursztynowym [98], temperatura topnienia wynosi $116^{\circ}C$ [100], dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych takich jak eter etylowy, chloroform, dichlorometan, słabiej w metanolu, natomiast bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie. W reakcjach ze związkami alkalicznymi daje barwne produkty [99]. Ramentaceon został znaleziony w roślinach z rodziny *Droseraceae* i *Ebenaceae*.

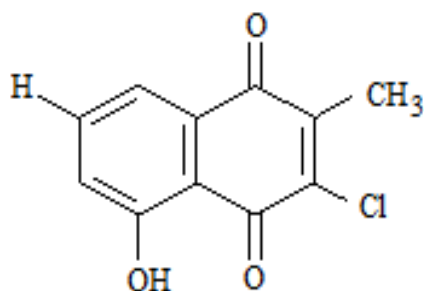


Rys.3. Wzór strukturalny cząsteczki ramentaceonu.

7-metylojuglon wykazuje właściwości przeciwbakteryjne np. w stosunku do *Neisseria gonorrhoeae*, przeciwgrzybowe do *Candida albicans*, *Cladosporium cucumerinum*, *Cryptococcus neoformans* i nitkowatym grzybom *Aspergillus Niger* [101]. Udowodniono, że hamuje on wzrost bakterii jamy ustnej powodujących próchnicę *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sanguis* oraz patogenów, wywołujących zapalenie przyzębia, *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia* [102].

Posiada także właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworu okrężnicy oraz działanie toksyczne na niektóre owady. Ponadto wykazuje działanie przeciwgruźlicze, a także jest inhibitorem kwasu 12-hydroksyeicosatetraenowego, który jest kluczowym przekaźnikiem sygnału w tworzeniu przerzutów i procesie miażdżycy [103, 104].

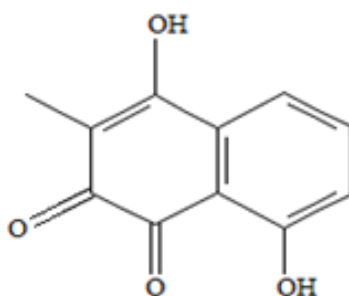
Chloroplumbagina- (3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4naftochinon), związek o barwie żółto-pomarańczowej, temperatura topnienia wynosi 115°C, wzór sumaryczny ma postać $C_{11}H_7ClO_3$, wzór strukturalny przedstawiono na rysunku 4 [81]. Dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach takich jak chloroform i toluen [81]. Występuje w roślinach z rodziny *Droseraceae* i *Plumbaginaceae*. W roślinach znajduje się w mniejszej ilości niż pozostałe naftochinony.



Rys.4. Wzór strukturalny cząsteczki chloroplumbaginy.

Działanie czystej chloroplumbaginy nie zostało dotychczas dokładnie zbadane [105]. Istnieją doniesienia o właściwościach grzybobójczych chloroplumbaginy wobec grzybiczych patogenów roślin [106].

Droseron- (2,8-dihydroksy-3-metylo-1,4-naftochinon, 2-hydroksyplumbagon), wzór sumaryczny ma postać $C_{11}H_8O_4$, wzór strukturalny przedstawiono na rysunku 5. W formie czystej droseron jest związkem koloru żółtego, dobrze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych takich jak dichlorometan, chloroform, heksan. Jego obecność wykryto w roślinach z rodziny *Droseraceae* m.in. w *Drosera capensis* i *Dionaea muscipula*. Podobnie jak chloroplumbagina występuje w roślinach w mniejszej ilości niż pozostałe naftochinony [81, 107].



Rys.5. Wzór strukturalny cząsteczki droseronu.

Droseron jest hydroksylową pochodną plumbaginy i podobnie jak plumbagina, wykazuje aktywność przeciwbakteryjną, hamując wzrost *Helicobacter pylori* [94-95] oraz także posiada właściwości grzybobójcze, udowodnione podczas badań na szczepach jak: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* i *Candida krusei* [94].

3.4.3. Właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne wybranych metabolitów wtórnych z grupy flawonoidów

Flawonoidy są klasą polifenolowych związków naturalnych, bardzo rozpowszechnionych w świecie roślinnym. Związki te zbudowane są z 15 atomów węgla i uważane są za pochodne 2-fenylochromanu [4, 41]. Większość flawonoidów występuje w postaci O-glikozydów i ma część cukrową złożoną z 1 do 5 cząsteczek cukrów prostych [41]. Ze względu na budowę chemiczną, flawonoidy możemy podzielić na: flawony, flawanony, izoflawony, flawonole, flawanonale, katechimy, antocyjanidyny. Występują w owocach, warzywach, orzechach, nasionach, kwiatach czy korze. Rolą flawonoidów w roślinach jest udział w produkcji energii, wzmacnianie właściwości przeciwutleniających, ochrona roślin przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego [108].

Flawonoidy posiadają szerokie spektrum właściwości biologicznych tj: przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwalergiczne, przeciwzapalne oraz rozszerzające naczynia krwionośne. Ponadto, hamują peroksydację lipidów, wpływają na agregację płytek krwi i przepuszczalność oraz wytrzymałość żył. Flawonoidy posiadają właściwości antyoksydacyjne [109]. Efekty farmakologiczne flawonoidów wynikają z ich własności antyoksydacyjnych, zdolności do chelatowania jonów metali oraz do oddziaływania z enzymami, błonami komórkowymi i DNA [108, 111].

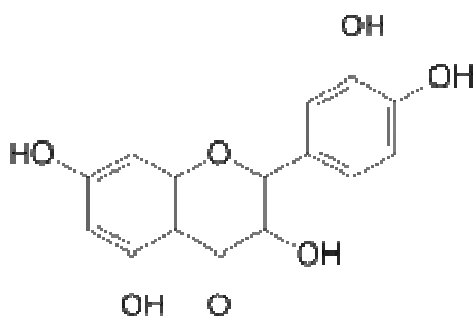
W tabeli 5 umieszczono główne flawonoidy występujące w roślinach z rodziny *Droseraceae*.

Tabela 5. Metabolity wtórne w postaci aglikonów lub glikozydów, należące do grupy flawonoidów z roślin z rodziny *Droseraceae*.

Grupa związków	Nazwa	Literatura
Flawonoidy	kwercetyna mirycetyna kempferol hyperozyd digalaktozyd kwercetyny izokwercetyna gossypetyna gossypitryna luteolina	[92]

W całej rodzinie *Droseraceae* z wyjątkiem *Drosophyllum lusitanicum*, występuje najliczniej kwercetyna i mniej licznie mirycetyna [92]. W związku z powyższym w niniejszej pracy skupiono się na tych dwóch wybranych flawonoidach.

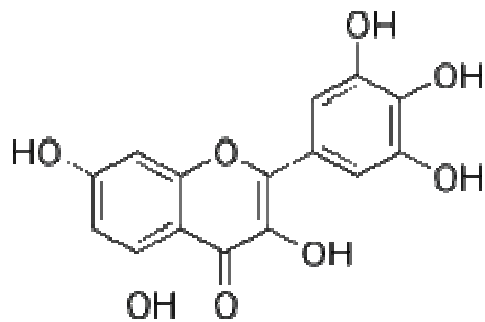
Kwercetyna- (3, 3',4',5,7-pentahydroksyflawnon), wzór sumaryczny ma postać $C_{15}H_{10}O_7$. Wzór strukturalny zamieszczono na rysunku 6. Występuje w roślinach, warzywach i owocach tj: cebula, jabłka czy jagody, w formie glikozydów o różnej postaci [108].



Rys.6. Wzór strukturalny cząsteczki kwercetyny.

Kwercetyna odznacza się właściwościami farmakologicznymi takim jak: właściwości przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, antyagregacyjne oraz rozszerzające naczynia krwionośne [110]. Do chwili obecnej działanie przeciwnowotworowe nie zostało jeszcze potwierdzone. Pewnym jest, iż kwercetyna przyjmowana z pożywieniem jest nieszkodliwa, nie dowiedzione jest natomiast działanie większych dawek czystej substancji. Wykazano skuteczne działanie kwercetyny w leczeniu zapalenia jelit oraz okrężnicy, a także działanie chroniące błony śluzowe przed owrzodzeniem [108].

Mirycetyna- (3,3',4',5,5',7-heksahydroksyflawon), wzór sumaryczny ma postać $C_{15}H_{10}O_8$. Wzór strukturalny zamieszczono na rysunku 7. Mirycetyna jest związkiem szeroko rozpowszechnionym w królestwie roślin. Występuje w herbacie, jagodach, owocach, warzywach i ziołach, przeważnie w formie glikozydów, rzadziej w postaci aglikonów [111].



Rys.7. Wzór strukturalny cząsteczki mirycetyny.

Mirycetyna posiada podobnie jak kwercetyna bardzo szeroki potencjał terapeutyczny. Właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe czynią z niej substancję, która zwraca uwagę naukowców. Potencjalne działanie szkodliwe staje się nieistotne w warunkach *in vivo*. Jej pozostałe korzystne właściwości to: przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe i przeciwwazopiętne [108, 110].

4. UZASADNIENIE CELOWOŚCI PODJĘTYCH BADAŃ I STOSOWANYCH METOD BADAWCZYCH ORAZ ZNACZENIE OTRZYMANYCH REZULTATÓW

Doniesienia naukowe o właściwościach farmakologicznych (antybakteryjne, przeciwrzybiczne, cytostatyczne i przeciwnowotworowe) oraz aktywności biologicznej np. aktywność fitotoksyczna, metabolitów wtórnych, z grupy naftochinonów oraz flawonoidów, zawartych w roślinach mięsożernych z rodziny *Droseraceae*, wpływają na wyraźną tendencję, w przemyśle farmaceutycznym do poszukiwania związków leczniczych, wśród metabolitów zawartych w roślinach oraz na zainteresowanie producentów preparatów biobójczych i środków ochrony roślin, pozyskiwaniem nowych substancji aktywnych przeciw patogenom bakteryjnym i grzybiczym roślin.

Niniejsza praca jest odpowiedzią na potrzeby rozwoju tych przemysłów.

W wyniku przeprowadzonych badań określono, która z obecnie stosowanych technik ekstrakcji/ługowania jest techniką efektywną do uzyskania ekstraktu zawierającego metabolity roślinne, biorąc pod uwagę wysoki stopień odzysku metabolitów z materiału roślinnego, w jak najkrótszym czasie, przy możliwie minimalnym nakładzie energii. Określenie stopnia przydatności poszczególnych technik ekstrakcji/ługowania do otrzymywania ekstraktów roślinnych oraz określenie, która z technik jest najlepsza pozwoli na zredukowanie kosztów procesu, a także na zwiększenie stopnia odzysku ekstrahowanych metabolitów co jest niezwykle ważne w produkcji farmaceutyków.

Ponadto, opracowane procedury do oznaczania i rozdzielania metabolitów roślinnych w skali modelowej powinny pozwolić w łatwy sposób na jakościowe i ilościowe oznaczenie metabolitów roślinnych w ekstraktach. Opracowane i opisane w niniejszej pracy procedury rozdzielania i oznaczania metabolitów roślinnych w ekstraktach, wykorzystywane są już obecnie w pracach dla firmy *Destylarnia Sobieski S.A.* do oznaczania zawartości kumaryny w napojach alkoholowych i maceratach na trawę żubrową.

Badania przeprowadzone w celu opracowania procedury izolacji w skali preparatywnej metabolitów z grupy naftochinonów i flawonoidów z roślin mięsożernych, powinny pozwolić na wykorzystanie ich jako leki bądź składniki leków, które mogą być alternatywą dla antybiotyków dostępnych na rynku lub mogą

znaleźć zastosowanie jako składniki środków ochrony roślin przed patogenami roślin.

5. CEL PRACY

Celem pracy było opracowanie nowych procedur przygotowania próbki / wsadu oraz dobór optymalnych technik i warunków ekstrakcji / ługowania metabolitów, jak również optymalnych warunków rozdzielania, identyfikacji i wyodrębniania metabolitów wtórnych z roślin mięsożernych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Przy wyborze metabolitów kierowano się ich właściwościami farmakologicznymi oraz potencjalnymi możliwościami wykorzystania ich w przemyśle farmaceutycznym, w związku z czym wybrano metabolity wtórne roślin mięsożernych z grupy naftochinonów i flawonoidów, gdyż wykazują one bogate właściwości farmakologiczne.

Cele cząstkowe badań sformułowano następująco:

1. Zbadanie i porównanie efektywności technik ekstrakcji / ługowania metabolitów wtórnych z materiału surowego roślin mięsożernych takich jak:

- ekstrakcja w aparacie Soxhleta,
- ekstrakcja w aparacie Soxhtec[®] (modyfikacja ekstrakcji w aparacie Soxhleta),
- ekstrakcja na drodze maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem,
- ekstrakcja wspomagana działaniem fal mikrofalowych,
- sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej,
- ekstrakcja wspomagana działaniem dezintegratora ultradźwiękowego,
- ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego o wysokiej szybkości ścinania.

2. Dobór selektywnych składników eluentu do rozdzielania związków chemicznych oraz wybranych metabolitów z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych w normalnych oraz odwróconych układach faz za pomocą cienkowarstwowej chromatografii cieczowej.

3. Opracowanie selektywnej i możliwie szybkiej metodyki rozdzielania i identyfikowania za pomocą widm UV-VIS wybranych flawonoidów: kwercetyny i mirycetyny oraz naftochinonów: chloroplumbaginy, hydroksyplumbaginy, plumbaginy i ramentaceonu w metanolowych ekstraktach z roślin mięsożernych, w warunkach odwróconych układów faz oraz elucji gradientowej.

4. Opracowanie metodyki rozdzielania i izolowania wybranych flawonoidów i grupy naftochinonów, zawartych w metanolowych ekstraktach za pomocą

wysokosprawnej chromatografii ciekowej w odwróconych układach faz w warunkach elucji skokowej.

5. Opracowanie metodyki rozdzielania i izolowania frakcji eluatu zawierającego wybrane naftochinony, zawarte w chloroformowych ekstraktach z roślin mięsożernych, z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej w warunkach normalnych i odwróconych układów faz oraz elucji izokratycznej, w skali modelowej, w warunkach braku przeładowania oraz w warunkach przeładowania kolumny.

6. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

6.1. MATERIAŁY

6.1.1. Rozpuszczalniki, eluenty

n-heksan do HPLC (Merck, Niemcy), heptan do HPLC (Merck, Niemcy), toluen cz.d.a Chempur (Polska), dichlorometan do HPLC (Merck, Niemcy), chloroform cz.d.a. (POCH, Polska), eter metylo-tetr-butylowy do HPLC (Merck, Niemcy), eter dietylowy (Chempur, Polska), formamid cz.d.a. (POCH, Polska), tetrahydrofuran (THF) do HPLC (Merck, Niemcy), dioksan cz.d.a. (POCH, Polska), acetonitryl (ACN) czystości do HPLC oraz gradient grade (Merck Niemcy), izopropanol cz.d.a. (POCH, Polska), metanol do HPLC (Merck, Niemcy), metanol do HPLC (POCH, Polska), etanol 96% (P.H.U. Standard, Polska), woda dejonizowana otrzymana z urządzenia Mili Q produkcji Milipore (USA), kwas solny cz..d.a. POCH (Polska), kwas trifluorooctowy o czystości gradient grade Merck (Niemcy), kwas ortofosforowy cz.d.a. (Merck, Niemcy), kwas siarkowy cz.d.a. (P.P.H. Standard, Polska), kwas octowy cz.d.a. (POCH, Polska)

6.1.2. Substancje wzorcowe

plumbagina (Sigma Aldrich), ramentaceon (nieдоступny na rynku, otrzymany przez autora niniejszej pracy w ramach badań [117], we własnym zakresie wyizolowany za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej), chloroplumbagina (nieдоступna na rynku, otrzymana syntetycznie na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej), hydroksyplumbagina - droseron (nieдоступna na rynku, otrzymana syntetycznie na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej), kwercetyna (Sigma Aldrich), mirycetyna (Sigma Aldrich)

6.1.3. Materiały i ekstrakty roślinne

Surowy materiał roślinny z gatunku *D. muscipula* oraz *D. aliciae*, ekstrakty chloroformowe uzyskane z roślin gatunku *D. muscipula* oraz *D. aliciae* oraz ekstrakty metanolowe uzyskane z roślin z gatunków *D. aliciae*, *D. capensis*, *D. muscipula*, *D. binata*. pochodziły z hodowli własnych in vitro Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG.

6.1.4. Płytki TLC, kolumny chromatograficzne

Kolumny chromatograficzne:

- LiChrospher RP18e, 5 μm , 250 x 4 mm (Merck, Niemcy),
- LiChrospher 100 RP-18e, 5 μm , 125 x 4 mm (Merck, Niemcy)
- LiChrospher 100 RP-18, 5 μm , 125 x 4 mm (Merck, Niemcy)
- LiChrospher 100 DIOL, 5 μm , 250 mm x 4 mm (Merck, Niemcy);
- Nucleosil Si 50Å, 7 μm ; 250mm x 4mm
- Nucleosil Si 50Å, 3 μm ; 250mm x 4mm
- Nucleosil RP18, 100Å, 5 μm ; 250mm x 4mm
- LiChrospher Si60, 5 μm , 250mm x 4mm, Merck (Niemcy).

Płytki TLC

- Płytki TLC Si 60 z fluoresceiną, o wymiarach 20 x 20 cm (Merck, Niemcy),
- Płytki TLC RP 18 z fluoresceiną, o wymiarach 5 x 10 cm (Merck, Niemcy);

6.2. APARATURA I WYPOSAŻENIE DODATKOWE

- Gradientowy chromatograf cieczowy LaChrom (Merck-Hitachi, Niemcy) wyposażony w czterokanałowy system elucji gradientowej z zaworami proporcjonującymi (tzw. gradient niskociśnieniowy), pompę L-7100, zawór dozujący Rheodyne Rh-7725i z pętlą dozującą 50 μL , kolumnę chromatograficzną, termostat L-7350 z systemem chłodzenia 7350i, detektor refraktometryczny L-7490, detektor UV-DAD 7450A, oprogramowanie HSM oraz, dodatkowo, w sześciodrogowy dwupołożeniowy zawór V 7226 (Knauer, Niemcy), w celu przełączania przepływu eluentu w kolumnie (zawór przepływu zwrotnego);
- Gradientowy chromatograf cieczowy LaChrom (Merck-Hitachi, Niemcy) wyposażony w czterokanałowy system elucji gradientowej z zaworami proporcjonującymi (tzw. gradient niskociśnieniowy), pompę L-6200, zawór dozujący Rheodyne Rh-7725i z pętlą dozującą 50 μl , kolumnę chromatograficzną lub kilku połączonych szeregowo kolumn, termostat, detektor UV - DAD 7450A, detektor fluorescencyjny F 1050, oprogramowanie HSM oraz, dodatkowo, w sześciodrogowy dwupołożeniowy zawór V 7226 (Knauer, Niemcy), do zmiany kierunku przepływu fazy ruchomej w kolumnie (zawór przepływu zwrotnego);

- Aparat Soxtec, model HT 6 1043 z jednostką grzewczą 1046 (Foss-Tecator), przepływ wody do 2L/min, temperatura płyty grzejnej do 200°C;
- Zestaw do ekstrakcji Soxhleta (Labart, Polska);
- Homogenizator wysokoobrotowy Ultraturrax T18 basic (IKA, Niemcy), obroty w zakresie 6000-30000 rpm;
- Łaźnia ultradźwiękowa Sonorex RK 250H (Bandelin, Niemcy), częstotliwość fali ultradźwiękowej 35kHz;
- Łaźnia ultradźwiękowa (Bandelin Sonorex, Berlin)
- Dezintegrator ultradźwiękowy UD-20 (TechPan, Polska) z płaszczem wodnym U10;
- Mikrofalowy system przygotowania próbki do analizy MARS 5 (CEM, USA);
- Wytrząsarka z łaźnią wodną GLS 400 (Grant Instruments, UK.);
- Łaźnia wodna 365D (Upipan, Polska);
- Waga analityczna z kalibracją wewnętrzną, z dokładnością do 0,0001g (Radwag, Polska);
- Wyparka obrotowa Laborota 4000 (Heidolph, Niemcy);
- Szklane komory do TLC (Labart, Polska)
- Lampa UV do wizualizacji płytek TLC, typ TB02 ze źródłem światła o długości 254nm i 365nm, produkcji polskiej.
- Zestaw laboratoryjny do odparowywania nadmiaru rozpuszczalnika w strumieniu azotu w skład, którego wchodzi: butla z gazem obojętnym (N₂), pokrywa firmy J. T. Baker wykonana z poliamidu wyposażona w igły oraz podłączenie gazu; metalowy statyw, w którym umieszcza się kolbki z ekstraktem.

6.3. METODY POSTĘPOWANIA

6.3.1. Hodowla materiału roślinnego

Materiał roślinny wykorzystywany w badaniach otrzymywany był w ramach wieloletniej współpracy z Zakładem Ochrony i Biotechnologii Roślin, należącym do Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w którym prowadzone są hodowle roślinnych kultur *in vitro*. Dzięki zastosowaniu roślinnych kultur *in vitro* można w krótkim okresie czasu uzyskać znaczne ilości roślin mięsożernych, co ma znaczenie ze względu na fakt, że pozyskiwanie tych roślin z naturalnych siedlisk jest niemożliwe, ze względu na zagrożenie ich wyginięciem i ochroną prawną.

Etap hodowli i wstępnego przygotowania materiału roślinnego był realizowany w następujący sposób. Rośliny mięsożerne hodowano przez okres 3 miesięcy w kulturach *in vitro* na pożywce Murashige i Skoog (1/2 MS) z dodatkiem sacharozy, węgla aktywnego oraz agaru. Hodowle prowadzono w fitotronie w temperaturze 20°C, z oświetleniem białym światłem fluorescencyjnym, z 16-to godzinnym fotoperiodycznością. Następnie całe rośliny, zawierające korzenie, łodygi i liście, były dokładnie odpłukiwane wodą destylowaną z pożywki.

Materiał roślinny z gatunku *Dionaea muscipula*, przeznaczony do badań nad porównaniem efektywności ekstrakcji/ługowania metabolitów z surowej masy roślinnej, za pomocą wybranych technik, był homogenizowany, a następnie przechowywany w temperaturze w -20°C.

Ekstrakty chloroformowe z *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae* sporządzono za pomocą ekstrakcji w aparacie Soxhleta. Ekstrakcja była prowadzona w temperaturze wrzenia chloroformu (61°C) przez 10 godzin. Cały proces przygotowania ekstraktu został wykonany w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roslin, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Uzyskano ekstrakty:

- z *Drosera aliciae* o stężeniu 33,3 g mokrej masy / 500 ml chloroformu,
- z *Dionaea muscipula* o stężeniu 32,0 g mokrej masy / 500 ml chloroformu.

Ekstrakty metanolowe roślin z gatunków *D. aliciae*, *D. capensis*, *D. muscipula*, *D. binata*, podobnie jak w przypadku ekstraktów chloroformowych, sporządzono w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin, za pomocą ekstrakcji w aparacie

Soxhleta- (65°C) przez 10 godzin. Uzyskano ekstrakty, z poszczególnych gatunków roślin, każdy o stężeniu 33g mokrej masy roślinnej / 500 ml metanolu.

6.3.2. Ekstrakcja metabolitów z próbek materiału surowego roślin mięsożernych

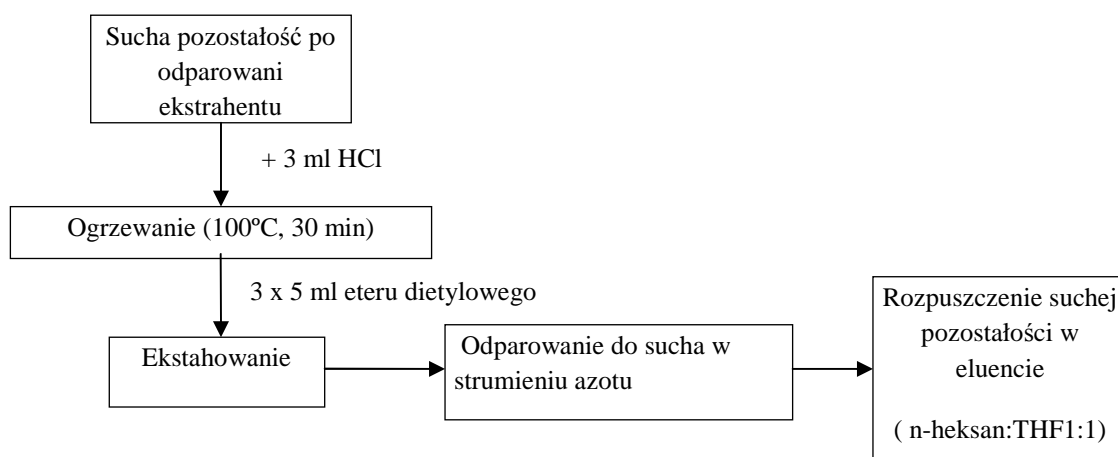
W każdym procesie ekstrakcji / ługowania użyto 1g mokrej masy roślinnej *Dionaea muscipula* oraz 30 ml metanolu o czystości *gradient grade*. Warunki przeprowadzania operacji ekstrakcji/ługowania metabolitów z roślin *D. muscipula* za pomocą badanych technik przedstawia tabela 6. Po przeprowadzeniu operacji ekstrakcji/ługowania otrzymany ekstrakt przesączano przy użyciu filtra celulozowego, a następnie za pomocą wyparki obrotowej odparowywano do sucha rozpuszczalnik. Otrzymaną suchą pozostałość poddawano hydrolizie kwaśnej w warunkach opisanych w punkcie 6.3.3 Zawartość metabolitów roślinnych oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz (NP-HPLC). Warunki analizy chromatograficznej przedstawione zostały w tabeli 8 w punkcie 6.3.4. Badania wszystkich próbek wykonano dwukrotnie.

Tabela 6. Warunki ekstrakcji / ługowania metabolitów z roślin *Dionaea muscipula* za pomocą wybranych technik.

Technika ekstrakcji/ługowania	Warunki prowadzenia operacji
Ekstrakcja w aparacie Soxhleta	Temperatura ekstrakcji: temp. wrzenia rozpuszczalnika Czas ekstrakcji: 15 h
Ekstrakcja w aparacie Soxhtec®	Temperatura ekstrakcji: temp. wrzenia rozpuszczalnika Temperatura płyty grzejnej: 200°C Czas ekstrakcji: 30, 60, 180 min.
Maceracja z wytrząsaniem	Temperatura ekstrakcji: 50°C Czas ekstrakcji: 5, 15, 25 h Częstotliwość: 100 rpm
Ekstrakcja wspomagana działaniem fal mikrofalowych	Temperatura ekstrakcji: 50°C Czas ekstrakcji: 2, 4, 8 min Częstotliwość fali : 2450 MHz
Sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej	Temperatura ekstrakcji: 30, 50 °C Czas ekstrakcji: 2, 4, 8 min Częstotliwość: 35 kHz
Ekstrakcja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego	Temperatura ekstrakcji: 30, 50 °C Czas ekstrakcji: 2, 4, 8 min
Ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego	Temperatura ekstrakcji: 30, 50 °C Czas ekstrakcji: 2, 4, 8 min Częstotliwość: 18800 rpm

6.3.3. Hydroliza kwaśna glikozydów flawonoidowych zawartych w ekstraktach metanolowych z roślin mięsożernych

Suchą masę roślinną uzyskaną po odparowaniu rozpuszczalnika, z ekstraktu metanolowego, otrzymanego po przeprowadzeniu operacji ekstrakcji/ługowania, poddano działaniu 3 ml roztwór kwasu solnego, o stężeniu 1 mol/dm³. Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml, w temperaturze 100°C, przez 30 minut. Następnie próbkę ekstrahowano 3- krotnie 5- cioma ml eteru dietylowego. Warstwę eterową zbierano i odparowywano do sucha w strumieniu azotu. Tak otrzymaną suchą masę rozpuszczano w 1 ml eluentu, którą stanowiła mieszanina heksan: tetrahydrofuran (1:1 v/v) i poddawano analizie chromatograficznej. Na rysunku 8 przedstawiono schemat hydrolizy kwaśnej.



Rys. 8. Etapy hydrolizy kwaśnej glikozydów flawonoidowych.

6.3.4. Metodyka oznaczania składników ekstraktów za pomocą NP-HPLC z wykorzystaniem elucji gradientowej

Zawartość metabolitów w ekstraktach z materiału surowego roślin mięsożernych, z gatunku *Dionaea muscipula*, wyznaczano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej w normalnym układzie faz, według metodyki opracowanej przez E. Gilgenast [112].

W badaniach zastosowano detektor UV-VIS typu DAD, w zakresie długości fali 200÷800 nm, w celu identyfikacji oznaczanych substancji na podstawie ich widm w zakresie UV-VIS oraz w celu określenia stopnia ewentualnego nałożenia stref substancji / grup substancji.

Zarówno mieszaniny wzorców flawonoidów i naftochinonów, jak i poszczególne próbki ekstraktów roślinnych, rozdzielano w temperaturze 20°C w warunkach elucji gradientowej. W tabeli 7 przedstawiono układ chromatograficzny oraz warunki analizy [112], w jakich dokonano rozdzielania i oznaczania zawartości metabolitów. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1,5 ml/min, objętość dozowania - 20 µl. Co 0,2 s rejestrowano w sposób automatyczny przez program D – 7000 HSM widmo w zakresie 220 do 800 nm, uzyskując w ten sposób tzw. „trójwymiarowy chromatogram”, w odwzorowaniu poziomicowym na ekranie monitora.

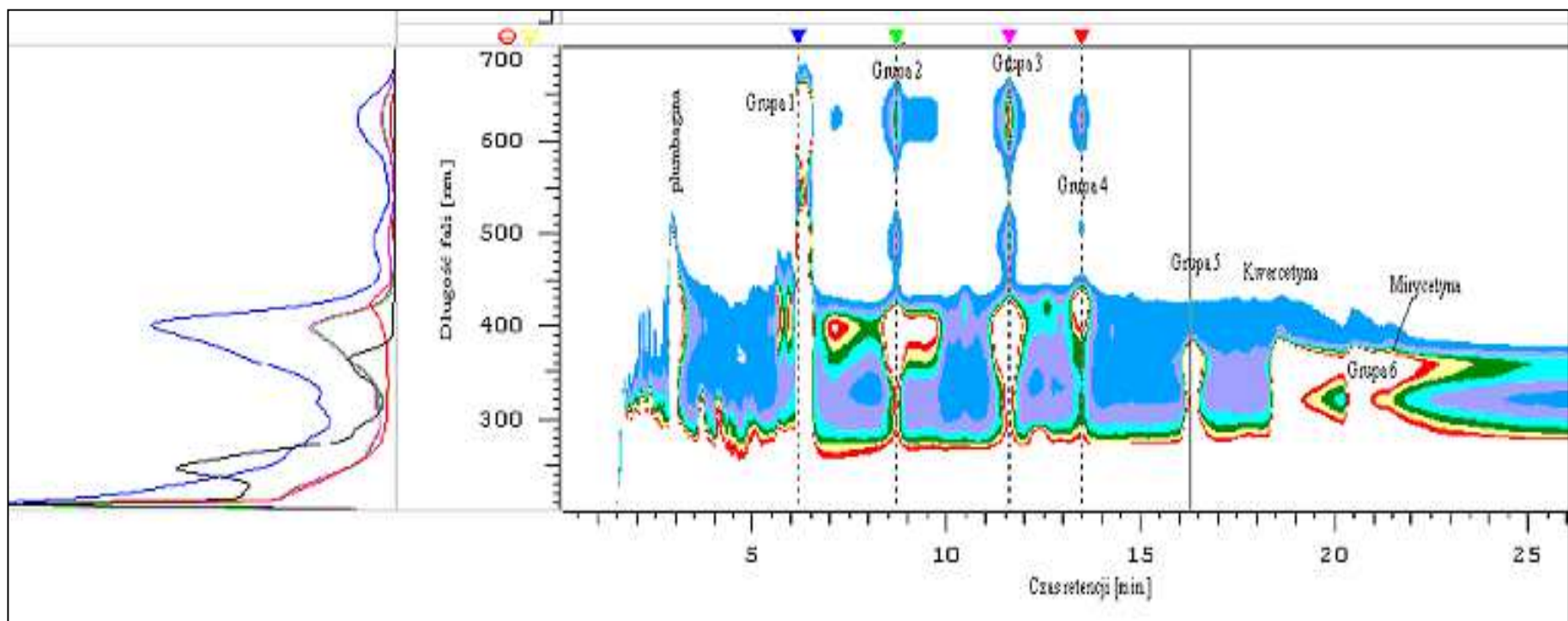
Tabela 7. Układ chromatograficzny i warunki elucji zastosowane w badaniach rozdzielania i oznaczania składników ekstraktów, w tym naftochinonów i flawonoidów w warunkach NP-HPLC.

Układ chromatograficzny	Eluent A	Eluent B	Kolumna chromatograficzna	Program elucji			Przepływ
				t [min]	A [% v/v]	B [% v/v]	
Normalny układ faz (NP-HPLC)	n-heksan	THF	LiChrospher 100 DIOL 5µm, 250 x 4mm	0	1	9	1,5 ml/min
				15	1	1	
				25	1	1	

Kryterium optymalizacji przebiegu programu elucji, zaproponowanego przez E. Gilgenast [112] było uzyskanie rozdzielania kwercetyny, mirycetyny oraz plumbaginy od pików substancji, albo grup substancji zawartych w ekstraktach i charakteryzujących się zbliżoną retencją. Pozostałe grupy substancji zostały

wydzielone arbitralnie jako grupy pików wzajemnie nałożonych, ale rozdzielonych od pozostałych.

Na rysunku 9 zamieszczono przykład chromatogramu UV-DAD ekstraktu metanolowego poddanego hydrolizie kwaśnej uzyskanego z surowej masy roślinnej z gatunku *D. muscipula* techniką HPLC w normalnym układzie faz. Każdy ekstrakt podzielono na 6 grup związków o wzrastającej polarności oraz wyróżniono i zidentyfikowano 3 pojedyncze metabolity: plumbaginę, kwercetynę i mirycetynę.



Rys. 9. Przykład chromatogramu UV-DAD uzyskanego podczas rozdzielania ekstraktu metanolowego z surowego materiału roślinnego *D. muscipula* poddanego hydrolizie kwaśnej z zastosowaniem techniki HPLC, w normalnym układzie faz, z podziałem na oznaczone metabolity i grupy substancji uwzględniane w badaniach; kolumna: LiChrospher DIOL, 5 µm, 250 mm x 4 mm, przepływ 1,5 ml/min, temperatura 20°C, objętość dozowana 20 µl, stężenie próbki 1g mokrej masy roślinnej / 1ml eluentu (heksan: THF 1:1 v/v).

Identyfikację badanych flawonoidów i naftochinonów oparto o porównanie wartości czasu retencji odpowiednich pików na chromatogramach, z wartością czasu retencji substancji wzorcowych oraz o porównanie widm w zakresie 220 nm do 800 nm, w tym wartości długości fali maksimum widm poszczególnych pików z widmami wzorców plumbaginy, kwercetyny i mirycetyny.

W celach porównawczych przy doborze odpowiedniego programu długości fali dla badanego ekstraktu spisywano pola powierzchni pików osobno dla plumbaginy, kwercetyny i mirycetyny, natomiast dla grup substancji sumowano je. Dla plumbaginy uwzględniano pole powierzchni pików na chromatogramie przy długości fali 410 nm, dla kwercetyny przy długości fali 365 nm, mirycetyny przy długości fali 382 nm, dla związków chemicznych z grupy 1-4 przy długości fali 406 nm, dla grupy 5 przy długości fali 354 nm oraz dla grupy 6 przy długości fali 382 nm.

6.3.5. Metodyka badania wpływu rodzaju kwasu na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz

W badaniach nad optymalizacją warunków rozdzielania flawonoidów pobierano do analiz 20 µl roztworu kwercetyny o stężeniu 9 mg/ 5 ml acetonitrylu i 20 µl roztworu mirycetyny o stężeniu 2 mg/ ml acetonitrylu i wprowadzano do pętli zaworu dozującego. Tak sporządzoną mieszaninę wzorców flawonoidów rozdzielano w warunkach RP-HPLC, z wykorzystaniem kolumny RP 18e 5 µm, 250 x 4 mm i eluentu acetonitryl : woda w stosunku objętościowym 3 : 7 v/v, do którego dodawano poszczególne kwasy takie jak: solny, ortofosforowy, trifluoroctowy, siarkowy, octowy do pH równego 3. Analizy przeprowadzono w temperaturze pokojowej, w warunkach elucji izokratycznej. Objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1,0 ml/min, a ciśnienie podczas analiz nie przekraczało 120 barów. Detekcji dokonano za pomocą detektora spektrofotometrycznego z matrycą fotodiodową (UV-VIS typu DAD). W sposób automatyczny przez program D – 6000 (HPLC Manager) rejestrowano widmo w zakresie 200 do 400 nm, uzyskując w ten sposób chromatogram, odwzorowany na ekranie monitora w formie poziomicowej. Wszystkie analizy roztworu wzorców flawonoidów, wykonano przynajmniej dwukrotnie, dla każdego z eluentów, a przedstawione wyniki są wartościami średnimi, dla co najmniej dwóch rezultatów nieróżniących się o więcej niż 5% względnych.

6.3.6. Dobór składników eluentu optymalnych dla selektywnego rozdzielania metabolitów z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych za pomocą RP-TLC

Badania nad doбором selektywnych rozpuszczalników jako składników eluentu, do rozdzielania w odwróconych układach faz, składników ekstraktów z roślin mięsożernych wykonano za pomocą cienkowarstwowej chromatografii cieczerwowej (RP-TLC).

W badaniach wykorzystano aluminiowe płytki RP18 (żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi) z fluoresceiną, o wymiarach 5 x 10 cm. Jako fazy ruchome zastosowano mieszaniny wody z różnymi rozpuszczalnikami organicznymi takimi jak: metanol, izopropanol, acetonitryl, tetrahydrofuran i dioksan, zakwaszone kwasem siarkowym do pH równego 3.

Zastosowano następujące eluenty:

MeOH : H₂O + H₂SO₄ do pH=3

— MeOH : H₂O 75 : 25 v/v + H₂SO₄ do pH=3

— MeOH : H₂O 50 : 50 v/v + H₂SO₄ do pH=3

— MeOH : H₂O 25 : 75 v/v + H₂SO₄ do pH=3

IzPrOH : H₂O + H₂SO₄ do pH=3

— IzPrOH : H₂O 65 : 35 v/v + H₂SO₄ do pH=3

— IzPrOH : H₂O 42 : 58 v/v + H₂SO₄ do pH=3

ACN : H₂O + H₂SO₄ do pH=3

— ACN : H₂O 65 : 35 v/v + H₂SO₄ do pH=3

— ACN : H₂O 45 : 55 v/v + H₂SO₄ do pH=3

THF + H₂O + H₂SO₄ do pH=3

— THF + H₂O 62 :38 v/v + H₂SO₄ do pH=3

— THF + H₂O 58 :42 v/v + H₂SO₄ do pH=3

Dioksan + H₂O + H₂SO₄ do pH=3.

— Dioksan + H₂O 62 :38 v/v + H₂SO₄ do pH=3

— Dioksan + H₂O 58 :42 v/v + H₂SO₄ do pH=3

Flawonoidy są słabymi kwasami i występują częściowo w formie zdysocjowanej. Forma zdysocjowana nie oddziałuje z wypełnieniem kolumny i wykazuje bardzo małą retencję. Dlatego też, w badaniach zastosowano jako dodatek do eluentu

rozcieńczony kwas siarkowy, w celu cofnięcia dysocjacji związków z grupy flawonoidów i zwiększenia ich czasu retencji.

W każdym doświadczeniu rozwijane były dwie płytki (A i B), na każdej znajdowały się 2 ekstrakty roślinne i 3 substancje wzorcowe, w nich występujące. Na płytkę chromatograficzną nakładano po 10 μ l metanолоwych ekstraktów roślinnych i po 2 μ l roztworów wzorców poszczególnych metabolitów, każdy o stężeniu 1 mg/ml metanolu. Na płytce A rozdzielane były ekstrakty z roślin: *Dionaea muscipula*, *Drosera binata* oraz wzorce: plumbagina, mirycetyna i chloroplumbagina. Natomiast na płytce B rozdzielano ekstrakty z: *Drosera aliciae*, *Drosera capensis* oraz wzorce: ramentaceon, kwercetyna, droseron. Kolejność dozowania była zawsze ta sama i następująca:

Płytką A: 1. *Dionaea muscipula*, 2. plumbagina, 3. *Drosera binata*, 4. mirycetyna, 5. chloroplumbagina;

Płytką B: 1. *Drosera aliciae*, 2. ramentaceon, 3. *Drosera capensis*, 4. kwercetyna, 5. droseron (hydroksyplumbagina).

Numery odpowiadające poszczególnym ekstraktom roślinnym bądź wzorcom substancji odpowiadają opisowi plamek na płytkach. Po nałożeniu ekstraktów i roztworów wzorców na płytkę, umieszczano ją w komorze chromatograficznej, w której znajdowała się faza ruchoma. Po rozwinięciu płytkę chromatograficzną suszono i analizowano w świetle widzialnym oraz pod lampą UV, przy dwóch długościach fali 254 nm oraz 365 nm. Otrzymane chromatogramy cienkowarstwowe przedstawiono w załączniku.

6.3.7. Dobór składników eluentu optymalnych dla selektywnego rozdzielania metabolitów z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych za pomocą NP-TLC

Wstępny dobór selektywnych składników eluentu do rozdzielania metanolowych ekstraktów z roślin mięsożernych, w normalnych układach faz wykonano za pomocą cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (NP-TLC).

W badaniach wykorzystano płytki aluminiowe pokryte żelalem krzemionkowym o średniej wielkości porów 60 Å, jako fazę stacjonarną. Jako fazę ruchomą, zastosowano wybrane rozpuszczalniki, którymi były: izopropanol, dioksan, tetrahydrofuran, octan etylu, formamid, eter tert-butyloowo-metylowy, chlorek metylu oraz chloroform.

W każdym doświadczeniu na płytkę chromatograficzną nakładano po 10 µl metanolowych ekstraktów *Drosera binata*, *Dionea muscipula*, *Drosera aliciae*, *Drosera capensis* oraz po 2 µl roztworów wzorców poszczególnych metabolitów, każdy o stężeniu 1 mg/ml metanolu. Kolejność dozowania była zawsze ta sama i następująca: 1. *D. binata*; 2. *D. muscipula*; 3. *D. aliciae*; 4. *D. capensis* 5. ramentaceon; 6. plumbagina; 7. chloroplumbagina; 8. droseron; 9. mirycetyna; 10. kwercetyna. Następnie rozwijano płytki chromatograficzne odpowiednio w różnych rozpuszczalnikach. Po rozwinięciu płytkę chromatograficzną suszono i analizowano w świetle widzialnym oraz pod lampą UV, pracującą przy dwóch długościach fali 254 nm oraz 365 nm. Uzyskane chromatogramy cienkowarstwowe przedstawiono w załączniku 2.

6.3.8. Optymalizacja warunków rozdzielania i oznaczania metabolitów w ekstraktach metanolowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC oraz elucji gradientowej

W pierwszym etapie badań poddano analizom metanolowy ekstrakt z *D. muscipula* i *D. aliciae*. Zastosowano kolumnę Lichrosphere 100, RP-18e, 5 μm , 125 x 4 mm oraz eluent, który stanowił mieszaninę 2 składnikową: składnik A stanowiła woda zakwaszona kwasem siarkowym do $\text{pH}=3$, a składnik B stanowił rozpuszczalnik organiczny, taki jak: izopropanol, metanol, tetrahydrofuran i acetonitryl. Etap ten wykonano w celu potwierdzenia rezultatów i wniosków, uzyskanych z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej. Próbkki ekstraktów oraz mieszanina substancji wzorcowych były rozdzielane w temperaturze 20°C w warunkach elucji gradientowej. Mieszaninę wzorców stanowiły substancje takie jak: plumbagina, ramentaceon, mirycetyna, kwercetyna, droseron oraz chloroplumbagina.

W tabeli 8 zestawiono programy elucji zastosowane w tym etapie badań.

Czas martwy wykorzystywanej w badaniach kolumny (t_0), wyznaczono przy przepływie fazy ruchomej 1ml/min. Do wyznaczenia czasu martwego wykorzystano azotan sodu, czyli substancję nie oddziałującą z fazą stacjonarną, ale wnিকającą we wszystkie pory wypełnienia oraz wykazującą silną absorpcję w zakresie UV.

Po wyciągnięciu i podsumowaniu wniosków płynących z badań nad rozdzielaniem i oznaczaniem dwóch ekstraktów roślinnych, wszystkie cztery ekstrakty z roślin mięsożernych poddano rozdzielaniu w trójskładnikowym eluencie, który składał się z wody zakwaszonej H_2SO_4 do $\text{pH}=3$ oraz dwóch rozpuszczalników organicznych.

W tabeli 9 przedstawiono skład eluentu trójskładnikowego oraz przebieg programu elucji, w którym poddano rozdzielaniu cztery ekstrakty z roślin mięsożernych.

W badaniach zastosowano detektor UV typu DAD w zakresie długości fali 200-800 nm (z wyjątkiem eluentu, którego składnikiem był tetrahydrofuran; w tym przypadku widmo rejestrowano w zakresie 220-800 nm, gdyż THF silnie absorbuje promieniowanie UV do 220 nm). We wszystkich analizach objętościowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1ml/min, a objętość dozowanej próbki 20 μl . W badaniach w sposób automatyczny poprzez program D-7000 HSM co 0,4 s rejestrowano widmo w zakresie 205 do 800nm. W wyniku rejestracji widma otrzymywano chromatogramy, w odwzorowaniu poziomicowym. W badaniach

zastosowano zawór zwrotny do przełączania kierunku przepływu eluentu do trybu wstecznego, w celu elucji z kolumny substancji silnie związanych z powierzchnią wypełnienia. Zawór był przełączany w 23-ciej minucie każdego rozdzielania.

Tabela 8. Zestawienie programów elucji oraz składu eluentów dwuskładnikowych zastosowanych do rozdzielania ekstraktów z dwóch roślin mięsożernych.

Nr układu chromatograficznego	Eluent		Kolumna chromatograficzna	Program elucji		
	A	B		t[min]	A	B
1	H ₂ O + H ₂ SO ₄ pH=3	IzPrOH	LiChrospher 100 RP-18e, 5 µm, 125 x 4 mm	0	95	5
				20	5	95
				30	5	95
2	H ₂ O + H ₂ SO ₄ pH=3	MeOH	LiChrospher 100 RP-18e, 5 µm, 125 x 4 mm	0	95	5
				20	5	95
				30	5	95
3	H ₂ O + H ₂ SO ₄ pH=3	THF	LiChrospher 100 RP-18e, 5 µm, 125 x 4 mm	0	95	5
				20	5	95
				30	5	95
4	H ₂ O + H ₂ SO ₄ pH=3	ACN	LiChrospher 100 RP-18e, 5 µm, 125 x 4 mm	0	95	5
				20	5	95
				30	5	95

Tabela 9. Przebieg programu elucji oraz skład eluentu trójskładnikowego zastosowanego do rozdzielania ekstraktów z czterech gatunków roślin mięsożernych.

Nr układu chromatograficznego	Eluent			Kolumna chromatograficzna	Program elucji			
	A	B	C		t[min]	A	B	C
5	H ₂ O + H ₂ SO ₄ pH=3	MeOH	IzPrOH	LiChrospher 100 RP-18e, 5 µm, 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

6.3.9. Optymalizacja warunków rozdzielania metabolitów w ekstraktach metanolowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC w warunkach elucji skokowej w skali modelowej

Na podstawie wyników badań, nad doбором selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych przeprowadzonych za pomocą RP-TLC, wytypowano najbardziej selektywne, względem badanych metabolitów rozpuszczalniki organiczne, które zastosowano jako składniki eluentu w badaniach za pomocą kolumnowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz.

Mieszanina wzorców naftochinonów i flawonoidów oraz składniki ekstraktów metanolowych z roślin *Dionaea muscipula*, *Drosera binata*, *Drosera aliciae*, *Drosera capensis* były rozdzielane z zastosowaniem warunków chromatograficznych przedstawionych w tabeli 10.

W badaniach zastosowano detektor UV typu DAD w zakresie długości fali 200-800nm. Objęściowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1,5 ml/min w przypadku analiz z zastosowaniem kolumn o wymiarach 125 x 4 mm oraz 1,2 ml/min w analizach z zastosowaniem kolumny o wymiarach 250 x 4 mm. Objętość dozowanych próbek ekstraktów jak i mieszaniny wzorców wynosiła 50µl. W badaniach w sposób automatyczny poprzez program D-7000 HSM co 0,4 s rejestrowano widmo w zakresie 210 do 800 nm. W wyniku rejestracji widma otrzymano chromatogram w odwzorowaniu poziomicowym.

Tabela 10. Zestawienie warunków rozdzielania, zastosowanych w badaniach, w odwróconych układach faz RP-HPLC w warunkach elucji skokowej.

Nr układu chromatograficznego	Eluent			Kolumna chromatograficzna	Przeływ [ml/min]	Program elucji			
	A	B	C			t[min]	A	B	C
1	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 90:7:3 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 64:30:6 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 5:65:30 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	LiChrospher 100 RP-18e, 5 µm, 125 x 4 mm	1,5	0-10	100	0	0
						10,1-23	0	100	0
						23,1-45	0	0	100
						45,1-60	100	0	0
2	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 90:7:3 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 64:30:6 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 5:65:30 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm	1,5	0-10	100	0	0
						10,1-23	0	100	0
						23,1-45	0	0	100
						45,1-60	100	0	0
3	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 90:7:3 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 64:30:6 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 5:65:30 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	Nucleosil 100 RP-18, 5 µm, 250 x 4 mm	1,2	0-24	100	0	0
						24,1-55,2	0	100	0
						55,3-108	0	0	100
						108,1-140	100	0	0
4	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 76:20:4 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	MeOH: IzPrOH 70:30 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	-	LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm	1,5	0-25	100		
						25,1-47		100	
						47,1-60	100		
5	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 71:25:4 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	MeOH: IzPrOH 75:25 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	-	LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm	1,5	0-25	100		
						25,1-47		100	
						47,1-60	100		

Tabela 10. c.d. Zestawienie warunków rozdzielania, zastosowanych w badaniach, w odwróconych układach faz RP-HPLC w warunkach elucji skokowej.

Nr układu chromatograficznego	Eluent			Kolumna chromatograficzna	Przepływ [ml/min]	Program elucji			
	A	B	C			t[min]	A	B	C
6	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 74:20:6 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	MeOH: IzPrOH 70:30 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	-	LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm	1,5	0-25	100		
						25,1-47		100	
						47,1-60	100		
7	H ₂ O : MeOH: IzPrOH 69:25:6 v/v + H ₂ SO ₄ pH=3	MeOH 100%	-	Nucleosil 100 RP-18, 5 µm, 250 x 4 mm	1,2	0-60	100	0	0
						60,1-70	0	100	0
						70,1-85	100	0	0

6.3.10. Optymalizacja warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów w ekstraktach chloroformowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej

W badaniach nad optymalizacją warunków rozdzielania, w odwróconych układach faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC), składników chloroformowych ekstraktów, pobierano po 6 ml ekstraktu *Drosera aliciae* i *Dionaea muscipula*, odparowywano do sucha w strumieniu azotu i rozpuszczano w 3 ml każdego z badanych rozpuszczalników, stanowiących organiczny składnik eluentu. Tak przygotowaną próbkę filtrowano za pomocą filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,45µm (Millipore Corporation, USA). Sporządzone próbki ekstraktów roślinnych rozdzielano w temperaturze 20°C w warunkach elucji izokratycznej, z przepływem zwrotnym eluentu w kolumnie. W tabeli 11 przedstawiono warunki rozdzielania składników ekstraktów z roślin *Drosera aliciae* i *Dionaea muscipula*, zastosowane w badaniach.

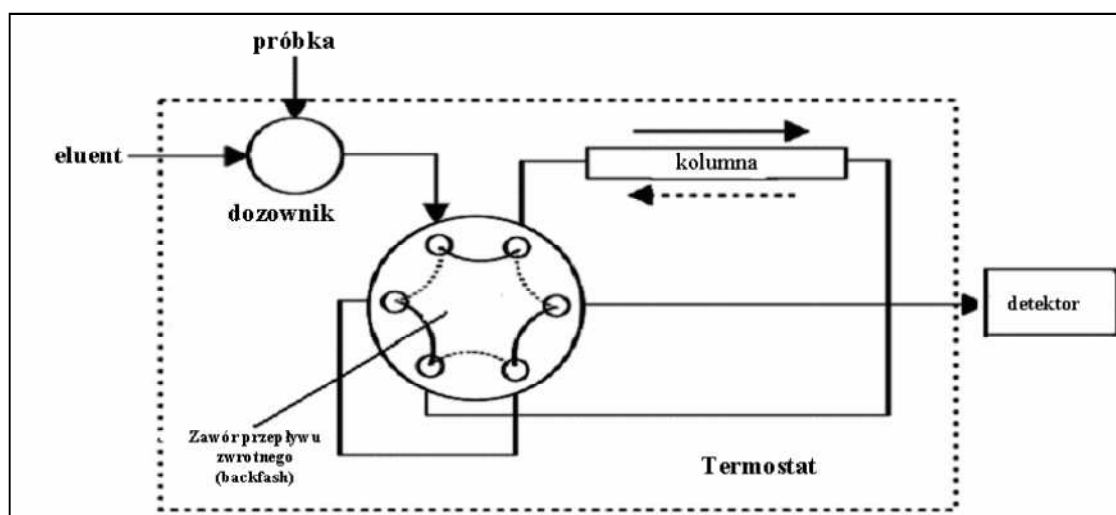
Tabela 11. Warunki rozdzielania składników zawartych w chloroformowych ekstraktach, za pomocą odwróconego układu faz RP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej, z przepływem zwrotnym eluentu w kolumnie.

	Warunki rozdzielania składników chloroformowych ekstraktów
Kolumna chromatograficzna	LiChrospher® RP18e, 5µm, 250x4mm; t ₀ =1,98 min.
Badane eluenty	1. acetonitryl : woda 45:55 v/v zakwaszony kw. siarkowym do pH=3
	2. acetonitryl : woda 40:60 v/v zakwaszony kw. siarkowym do pH=3
	3. metanol : woda 60:40 v/v zakwaszony kw. siarkowym do pH=3
	4. metanol : woda 50:50 v/v zakwaszony kw. siarkowym do pH=3
	5. tetrahydrofuran :woda 35:65 v/v zakwaszony kw. siarkowym do pH=3
	6. tetrahydrofuran :woda 30:70 v/v zakwaszony kw. siarkowym do pH=3
	7. dioksan:woda 35:65 v/v zakwaszony kw. siarkowym do pH=3
	8. dioksan:woda 40:60 v/v zakwaszony kw. siarkowym do pH=3
Przepływ	1,0 ml/min
Temperatura	20°C
Dozowano	Ekstrakty roślinne z <i>Drosera aliciae</i> i <i>Dionaea muscipula</i>
Detektor	UV-VIS typu DAD

Czas martwy wykorzystywanej w badaniach kolumny (t_0), wyznaczono dla przepływu fazy ruchomej 1ml/min. Do wyznaczenia czasu martwego wykorzystano azotan sodu, czyli substancję nie oddziałującą z fazą stacjonarną oraz wnikającą we wszystkie pory wypełnienia i wykazującą silną absorpcję w zakresie UV.

Objęściowe natężenie przepływu fazy ruchomej wynosiło 1,0 ml/min, objętość dozowanej próbki wynosiła 20 μ l. Co 0,2 s rejestrowano w sposób automatyczny przez program D – 7000 HSM widmo w zakresie 220 do 800 nm, uzyskując w ten sposób chromatogram w odwzorowaniu poziomicowym.

Po zakończeniu programu elucji, kolumnę przełączano do trybu elucji wstecznej, w celu elucji z kolumny substancji, silnie sorbowanych do powierzchni wypełnienia, tzn. charakteryzujących się wysokimi wartościami czasu retencji. Schemat ideowy wysokosprawnego chromatografu cieczowego zastosowanego w badaniach przedstawiono na rysunku 10.



Rysunek 10. Schemat ideowy wysokosprawnego chromatografu cieczowego (HPLC) z zastosowaniem przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie. Linia ciągła – droga przepływu fazy ruchomej przez zawór przepływu zwrotnego podczas przepływu eluentu w kolumnie w kierunku lewo - prawo. Linia kropkowa – droga przepływu fazy ruchomej w kolumnie w kierunku prawo – lewo [114].

Identyfikację ramentaceonu i plumbaginy oparto o porównanie czasu retencji piku na chromatogramach badanych ekstraktów z wartością czasu retencji wzorca ramentaceonu i plumbaginy oraz o porównanie widm UV metabolitów zawartych w rozdzielanych ekstraktach z widmami wzorców metabolitów w zakresie 220 nm do 500 nm, w tym maksimum długości fali.

W następnym etapie badań nad rozdzielaniem i izolowaniem wybranych naftochinonów z chloroformowych ekstraktów roślin mięsożernych w odwróconym układzie faz, w opracowanych optymalnych warunkach rozdzielania ekstraktów roślinnych *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae* zbadano możliwość powiększenia skali procesu rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów.

Zbadano produktywność kolumny oraz maksymalny stopień przeładowania stężeniowego dla plumbaginy zawartej w ekstrakcie *D. muscipula* oraz dla ramentaceonu zawartego w ekstrakcie *Drosera aliciae*.

6.3.11. Optymalizacja warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów z chloroformowych ekstraktów roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki NP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej

Wstępne badania nad doбором optymalnego układu chromatograficznego do rozdzielania naftochinonów z chloroformowych ekstraktów roślin mięsożernych w warunkach NP-HPLC wykonano w ramach pracy magisterskiej Ł. Żuka [115], pod opieką autorki niniejszej pracy. Rezultaty opublikowano w streszczeniu w czasopiśmie z „listy filadelfijskiej” [116].

W następnym etapie badań wykonanych w ramach niniejszej pracy, w opracowanych optymalnych warunkach rozdzielania [115] ekstraktów roślinnych *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae*, zbadano możliwość powiększenia skali procesu rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów. Zbadano produktywność kolumny oraz maksymalny stopień przeładowania stężeniowego dla plumbaginy zawartej w ekstrakcie *D. muscipula* oraz dla ramentaceonu zawartego w ekstrakcie *Drosera aliciae*.

Do badań pobierano po 6 ml każdego z ekstraktów chloroformowych z roślin *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae*, a następnie odparowywano do sucha w strumieniu azotu. Do otrzymanych suchych pozostałości dodano po 3 ml dichlorometanu. Tak przygotowane próbki filtrowano przez filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,45µm (Millipore Corporation, USA). Do zatężania ekstraktów z roślin mięsożernych zastosowano dichlorometan, gdyż przeprowadzone wcześniej badania [117] wykazały, że charakteryzuje się on bardzo dobrą (lepszą niż chloroform) rozpuszczalnością wielu związków organicznych, będących składnikami ekstraktów roślin owadożernych.

Na otrzymanych chromatogramach, zastosowano następujące oznaczenia pików dla ramentaceonu i plumbaginy odpowiednio: R– pik pochodzący od ramentaceonu, P – pik pochodzący od plumbaginy oraz odpowiednie oznaczenia zanieczyszczeń występujących „przed” i „za” pikiem ramentaceonu i pikiem plumbaginy:

- R1, R2, R3 – piki substancji „przed” pikiem ramentaceonu;
- RA, RB, RC - piki substancji „za” pikiem ramentaceonu;
- P1, P2, P3 - piki substancji „przed” pikiem plumbaginy;
- PA, PB, PC - piki substancji „za” pikiem plumbaginy.

6.4. OPRACOWANIE WYNIKÓW

6.4.1. Opracowanie wyników badań efektywności wybranych technik ekstrakcji/ługowania

Dane, z badań nad porównaniem efektywności wybranych technik ekstrakcji/ługowania, opracowano statystycznie w programie Microsoft Excel.

W celu odrzucenia błędów grubych został przeprowadzony test Q-Dixona, pozwalający wykryć wynik obciążony błędem grubym przy małych zestawach wartości zmiennej ($n < 10$). Test zakłada rozkład normalny zmiennej w populacji generalnej. Przed wykonaniem testu należy uszeregować wyniki, w porządku wzrastających wartości ($x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_{n-1} \leq x_n$).

Błędem grubym może być obciążona największa (x_n) lub najmniejsza (x_1) wartość wyniku. Dla tych wyników obliczane są odpowiednio parametry Q_{\max} i Q_{\min} , gdzie $Q_{\min} = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1}$, a $Q_{\max} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1}$.

Uzyskane wartości statystyki Q należy porównać z tablicową wartością krytyczną Q_{kr} . Jeżeli parametr Q jest większy bądź równy Q_{kr} to punkt odbiegający zostaje odrzucony [113].

6.4.2. Opracowanie wyników badań wpływu rodzaju kwasu na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz

Na podstawie otrzymanych chromatogramów, obliczono dla piku kwercetyny i mirycetyny wartości wybranych parametrów takich jak: liczba pól teoretycznych (N), współczynnik asymetrii piku wyznaczony w połowie wysokości ($As_{0,5}$), współczynnik asymetrii piku wyznaczony na poziomie 10% wysokości piku ($As_{0,1}$), czas retencji (t_r) oraz współczynnik retencji (k). Powyższe parametry obliczono na podstawie poniższych zależności [76]:

- liczba pól teoretycznych (N)

$$N = 5,545 \times (l_r / w_{1/2h})^2 \quad (1)$$

gdzie: l_r – odległość maksimum piku od punktu dozowania, $w_{1/2}$ – szerokość piku w połowie wysokości;

- współczynnik asymetrii piku w połowie wysokości ($As_{0,5}$)

$$As_{0,5} = b_{0,5} / a_{0,5} \quad (2)$$

gdzie: $b_{0,5}$ – część szerokości po stronie zstępującej, w połowie wysokości piku, $a_{0,5}$ – część szerokości po stronie wstępującej, w połowie wysokości piku;

- współczynnik asymetrii piku w połowie wysokości ($As_{0,1}$)

$$As_{0,1} = b_{0,1} / a_{0,1} \quad (3)$$

gdzie: $b_{0,1}$ – część szerokości po stronie zstępującej, w jednej dziesiątej wysokości piku, mierzac od podstawy, $a_{0,1}$ – część szerokości po stronie wstępującej, w jednej dziesiątej wysokości piku, mierzac od podstawy;

- współczynnik retencji (k)

$$k = (t_r - t_0) / t_0 \quad (4)$$

gdzie: t_r – czas retencji badanego związku, t_0 – czas martwy kolumny, wyznaczony dla substancji nieoddziałującej z fazą stacjonarną, ale wnikaącą we wszystkie pory wypełnienia.

Wszystkie rozdzielania wzorców flawonoidów, dla każdego z badanych eluentów, wykonano co najmniej dwukrotnie. Uzyskane wyniki są wartościami średnimi z co najmniej dwóch niezależnych oznaczeń, których różnica nie jest większa niż 5% względnych.

6.4.3. Opracowanie wyników badań nad doborem selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z ekstraktów metanolowych z roślin mięsożernych za pomocą RP-TLC i NP-TLC

Na podstawie otrzymanych chromatogramów cienkowarstwowych, dla każdej z rozdzielonych substancji obliczono współczynniki opóźnienia hR_f . Współczynniki opóźnienia hR_f zostały obliczone na podstawie równania (5).

$$hR_f = \frac{a}{b} \times 100 \quad (5)$$

gdzie: a - odległość od miejsca zadozowania (linii startowej) do środka plamki (pasma stężeniowego) badanej substancji,

b - odległość od miejsca zadozowania (linii startowej) do czoła fazy ruchomej.

Wyznaczone z dwóch pomiarów dane zostały uśrednione i stabelaryzowane, rozwinięte chromatogramy zostały zilustrowane w świetle widzialnym oraz przy długości fali 254 i 365nm za pomocą fotografii. Plamki na płytkach zostały ponumerowane zgodnie z kolejnością dozowania. Plamki substancji pochodzących z ekstraktów roślinnych numerowano od dołu płytki do góry. Plamki pochodzące od substancji wzorcowych zostały nazwane, ponadto określono ich barwy w świetle widzialnym oraz przy długości fali 254 i 365nm. Wybrane chromatogramy cienkowarstwowe i tabele z zestawionymi wartościami hR_f przedstawiono w załączniku 1 i 2.

6.4.4. Opracowanie wyników badań nad doborem warunków rozdzielania i oznaczania wybranych metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC oraz elucji gradientowej

Na podstawie otrzymanych chromatogramów obliczono parametry takie jak: współczynnik retencji k - równanie (4) (rozdział 6.4.2.) oraz współczynnik selektywności α - równanie (6).

- współczynnik selektywności α

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (6)$$

gdzie: k_2 , k_1 - współczynniki retencji, odnoszące się do pików chromatograficznych substancji, dla których liczymy α , odpowiednio następnego i poprzedniego.

Współczynniki retencji k zostały obliczone dla wszystkich zidentyfikowanych substancji, a współczynniki selektywności wyznaczono natomiast dla związków, będących głównym przedmiotem badań oraz dla substancji powtarzających się w badanych ekstraktach. Współczynnik selektywności α_1 dotyczył odległości pomiędzy maksimami pików badanego i go poprzedzającego, α_2 pików badanego i znajdującego się za nim.

Na podstawie otrzymanych chromatogramów podjęto także próbę identyfikacji maksymalnej ilości substancji zawartych w ekstraktach roślinnych. Widma spektralne posłużyły do identyfikacji metabolitów, o dostępnych wzorcach, a także do identyfikacji substancji „powtarzających się” w każdym z eluentów. Zestawienie widm spektralnych, na podstawie którego dokonano identyfikacji substancji znajduje się w załączniku 4. Otrzymane w trakcie badań widma spektralne po weryfikacji, okazały się być przesunięte batochromowo o + 4,5 nm.

Piki substancji, zidentyfikowanych na podstawie posiadanych 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.

Wszystkie analizy wykonano co najmniej dwukrotnie. Wartości czasu retencji wykorzystane w pracy stanowią wartość średnią, z wyników nie różniących się co najwyżej niż 1%.

6.4.5. Opracowanie wyników badań nad doбором warunków rozdzielania i oznaczania wybranych metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernih z wykorzystaniem techniki RP-HPLC oraz elucji skokowej

Na podstawie otrzymanych chromatogramów obliczono parametry takie jak: współczynnik retencji k - równanie (4) (rozdział 6.4.2.) oraz współczynnik selektywności α - równanie (6) (rozdział 6.4.4.).

Współczynniki retencji k zostały obliczone dla wszystkich zidentyfikowanych substancji, a współczynniki selektywności wyznaczono dla metabolitów, będących przedmiotem badań. Współczynnik selektywności α_p dotyczył odległości pomiędzy maksimami pików badanego metabolitu i go poprzedzającego pików substancji, α_z pików badanego metabolitu i znajdującego się za nim pików substancji.

6.4.6. Optymalizacja warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów w ekstraktach chloroformowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC i NP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej

Dla dwuskładnikowych eluentów sporządzono wykresy $\log k=f(x_{\text{mol}})$, gdzie k – współczynnik retencji, x_{mol} – ułamek molowy składnika eluentu o większej sile elucji. Wykresy te sporządzono dla ramentaceonu i plumbaginy oraz towarzyszącym im bezpośrednio zanieczyszczeniom, które występują przed i za oznaczanym naftochinonem. Na podstawie tych wykresów określono optymalne składy faz ruchomych.

W optymalnych warunkach rozdzielania ekstraktów roślinnych *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae* zbadano możliwość powiększenia skali procesu rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów.

Zbadano produktywność kolumny oraz maksymalny stopień przeładowania stężeniowego dla plumbaginy zawartej w ekstrakcie *D. muscipula* oraz dla ramentaceonu zawartego w ekstrakcie *Drosera aliciae*.

Produktywność kolumny (wydajność) wyznaczano na podstawie wzoru (7) [76]:

$$P_t = \frac{Q_r}{Q_i} \times \frac{Q_i}{t_c \times A} \quad (7)$$

gdzie: P_t - produktywność kolumny (wydajność), wyrażona jako masa substancji, otrzymana w ciągu jednostki czasu i dla danej jednostki powierzchni przekroju kolumny; Q_i - masa substancji wprowadzona do kolumny; Q_r - masa substancji otrzymana z kolumny; t_c - czas trwania procesu rozdzielania; A - powierzchnia przekroju poprzecznego kolumny.

Maksymalny stopień przeładowania stężeniowego dla wybranego naftochinonu obliczano jako ilość suchej masy ekstraktu chloroformowego [w gramach] na masę sorbentu [w gramach].

7. WYNIKI I Dyskusja

7.1. BADANIA NAD PORÓWNIANIEM EFEKTYWNOŚCI WYBRANYCH TECHNIK EKSTAKCJI / ŁUGOWANIA METABOLITÓW ZAWARTYCH W MATERIALE MOKRYM ROŚLIN Z GATUNKU D. MUSCIPULA

7.1.1. Wprowadzenie

Na podstawie przedstawionego w rozdziale 3.1 przeglądu literaturowego można stwierdzić, że mimo wielu lat badań nad efektywnością poszczególnych technik ekstrakcji / ługowania metabolitów z materiału roślinnego, w związku z postępowaniem techniki i technologii nie można znaleźć niewątpliwie pewnych i uniwersalnych informacji, które z dostępnych obecnie technik są najbardziej efektywne w praktyce. Ponadto, w literaturze brakuje jednoznacznych informacji dotyczących zakresu zastosowań opisywanych procedur przygotowania próbki / wsadu materiału roślinnego pozwalających na maksymalizację osiągalnych stężeń badanych metabolitów. W związku z powyższym, uznano za celowe podjęcie badań nad porównaniem efektywności technik ekstrakcji / ługowania, które najczęściej stosowane są do izolowania metabolitów z materiału roślinnego. Dodatkowo, uwzględniono możliwość powiększania skali operacji ekstrakcji / ługowania, w celu przemysłowego otrzymywania substancji, w szczególności związków organicznych z tkanek roślin mięsożernych.

Podstawowymi parametrami wpływającymi na efektywność ekstrakcji / ługowania jest temperatura, czas ekstrakcji oraz zużycie energii na jednostkę masy produktu otrzymanego w wyniku ekstrakcji.

Inną miarą efektywności ekstrakcji może być także selektywność, ale tylko wówczas, gdy celem jest selektywna izolacja określonych grup związków chemicznych lub poszczególnych związków.

W badaniach, których celem jest otrzymanie metabolitów roślinnych należących do różnych grup związków stosuje się rozpuszczalniki o różnej polarności, takie jak chloroform, dichlorometan, eter dietylowy, aceton, czasem także wiele innych ekstrahentów. Koszty oraz pracochłonność przygotowania ekstraktów z podziałem na określone grupy związków są znacznie wyższe ze względu na zużycie dużej ilości rozpuszczalników.

Inne podejście opiera się na stosowaniu względnie polarnego rozpuszczalnika ekstrahującego szerokie spektrum związków chemicznych. Jest to najczęściej metanol, czasem etanol lub acetonitryl. Następnie uzyskany ekstrakt rozdziela się z wykorzystaniem innych technik rozdzielczych. Zaletą tego typu podejścia jest niski koszt odzysku rozpuszczalnika po zakończonej operacji ekstrakcji. Wadą, niekiedy jest stosunkowo niski stopień wyekstrahowania substancji nisko-polarnych.

Każda technika ekstrakcji / ługowania wymaga z reguły optymalizacji kilku parametrów, często innych dla różnych technik. Parametrem wspólnym jest zawsze temperatura oraz czas ekstrakcji.

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wykorzystano rozpuszczalnik nieselektywny, rozpuszczający wiele grup związków chemicznych o różnorodnej polarności tzn. metanol. Badania wykazały, że metanol ekstrahuje / ługuje związki polarne, ale również nisko- i średnio polarne m.in. naftochinony, obecne w materiale roślinnym. Dzięki temu, możliwe było określenie wpływu parametrów badanych technik ekstrakcji / ługowania, na efektywność izolacji szerokiej gamy naturalnych związków chemicznych. Uzyskane ekstrakty rozdzielano na poszczególne grupy składników oraz pojedyncze związki techniką chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz.

Wyniki badań nad optymalnymi warunkami prowadzenia operacji ekstrakcji / ługowania metabolitów z materiału surowego roślin mięsożernych za pomocą poszczególnych technik przedstawiono w postaci diagramów (z wyjątkiem techniki ekstrakcji w aparacie Soxhlet'a). Przedstawiają one zależność powierzchni pików bądź grupy pików (F) wyekstrahowanych składników od czasu trwania operacji, dla poszczególnych temperatur.

7.1.2. Wyniki badań efektywności ekstrakcji w aparacie Soxhleta

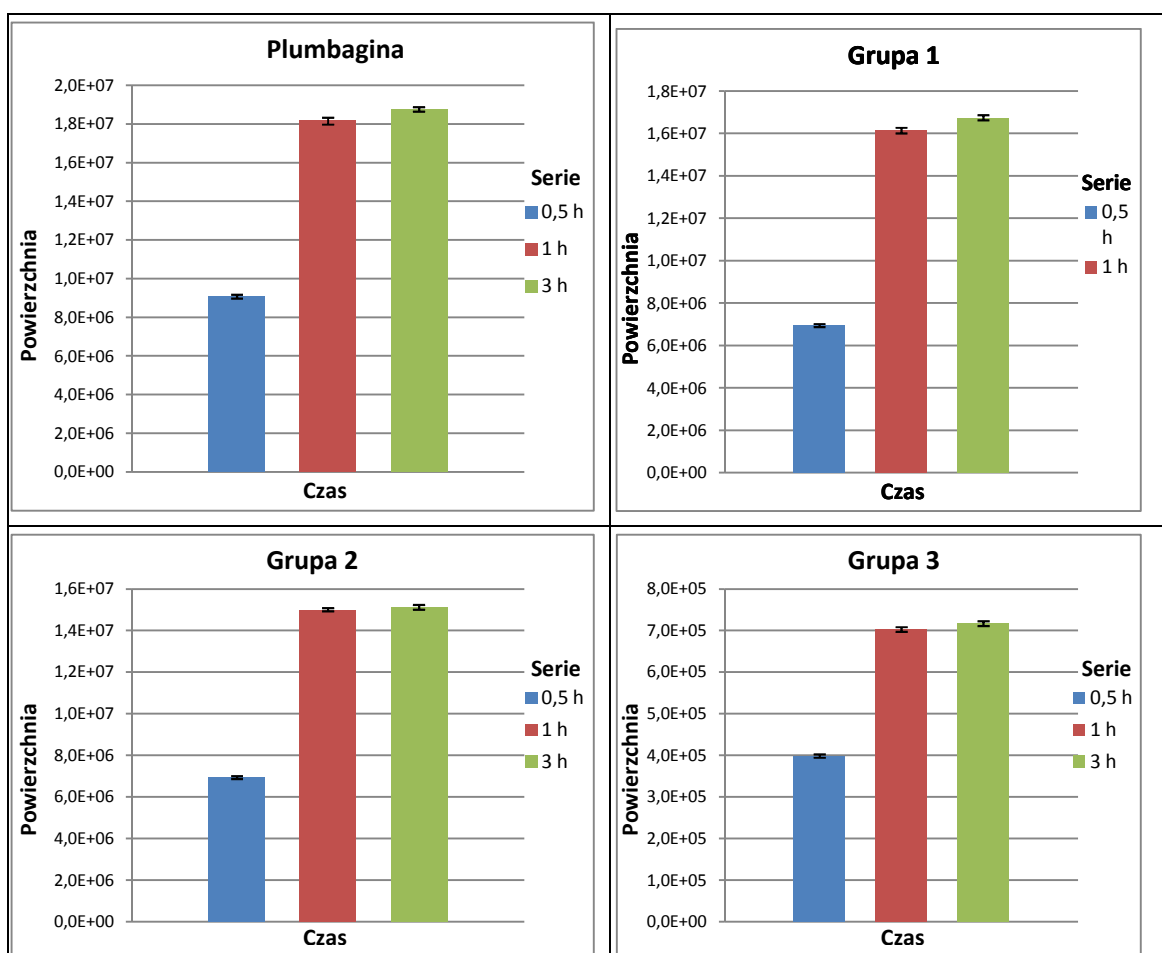
Ekstrakcja w aparacie Soxhleta to jedna z najstarszych technik ekstrakcji metabolitów z materiału roślinnego. Dlatego traktowana jest obecnie jako „technika odniesienia” [8].

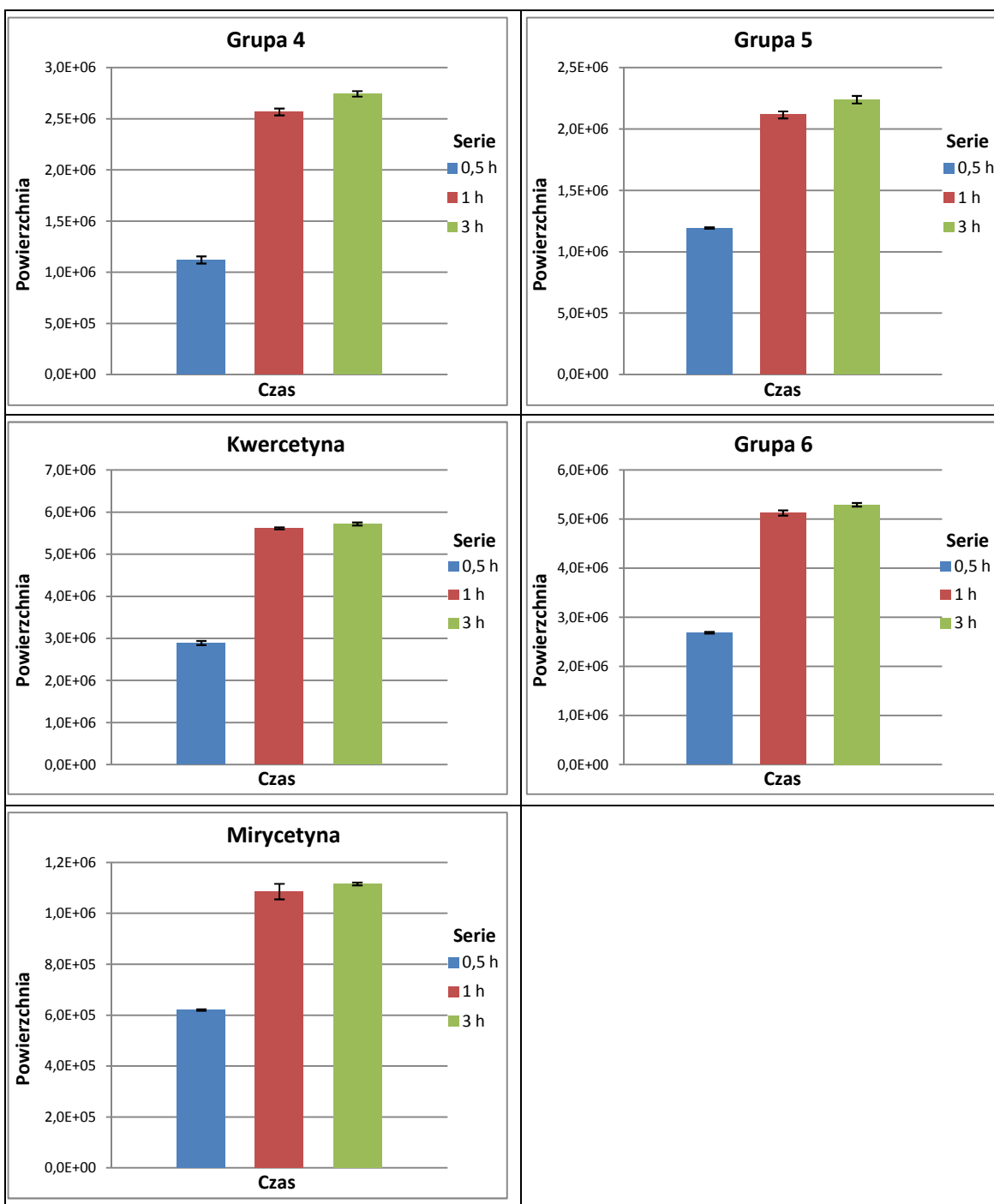
W ramach niniejszej pracy, przeprowadzono badania za pomocą tej techniki, w celu odniesienia otrzymanych wyników do wyników uzyskanych z wykorzystaniem innych technik. W załączniku 5 w tabeli 1 przedstawiono wartości pola powierzchni pików pochodzących od określonych grup substancji oraz pojedynczych

metabolitów, uzyskane z zastosowaniem techniki ekstrakcji w aparacie Soxhleta, metanolu jako ekstrahenta oraz 15-godzinnego czasu ekstrakcji.

7.1.3. Wyniki badań efektywności ekstrakcji w aparacie Soxtec[®]

W tym etapie badań dokonano optymalizacji czasu procesu ekstrakcji / ługowania metabolitów z surowego materiału roślinnego w temperaturze wrzenia ekstrahenta – metanolu (temperatura płyty grzejnej: 200°C - jest to temperatura zalecana przez producenta aparatu Soxtec[®], w związku z powyższym zdecydowano, że nie ma konieczności przeprowadzania optymalizacji temperatury procesu ekstrakcji w badaniach z wykorzystaniem tej techniki). Wpływ czasu procesu ekstrakcji / ługowania w aparacie Soxtec[®] na zawartość wyekstrahowanych metabolitów jak i grup substancji przedstawiono na rysunku 11.





Rys.11. Wpływ czasu procesu ekstrakcji / ługowania w aparacie Soxtec[®] na zawartość wyekstrahowanych, poszczególnych metabolitów, jak i grup substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Proces prowadzony w temperaturze wrzenia ekstrahenta.

Z wykresów pola powierzchni pików poszczególnych metabolitów i pola powierzchni pików grup metabolitów od czasu, wynika że optymalny czas procesu ekstrakcji związków z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* wynosi 1 godzinę. Prowadzenie procesu ekstrakcji w aparacie Soxtec[®] powyżej 1 godziny nie

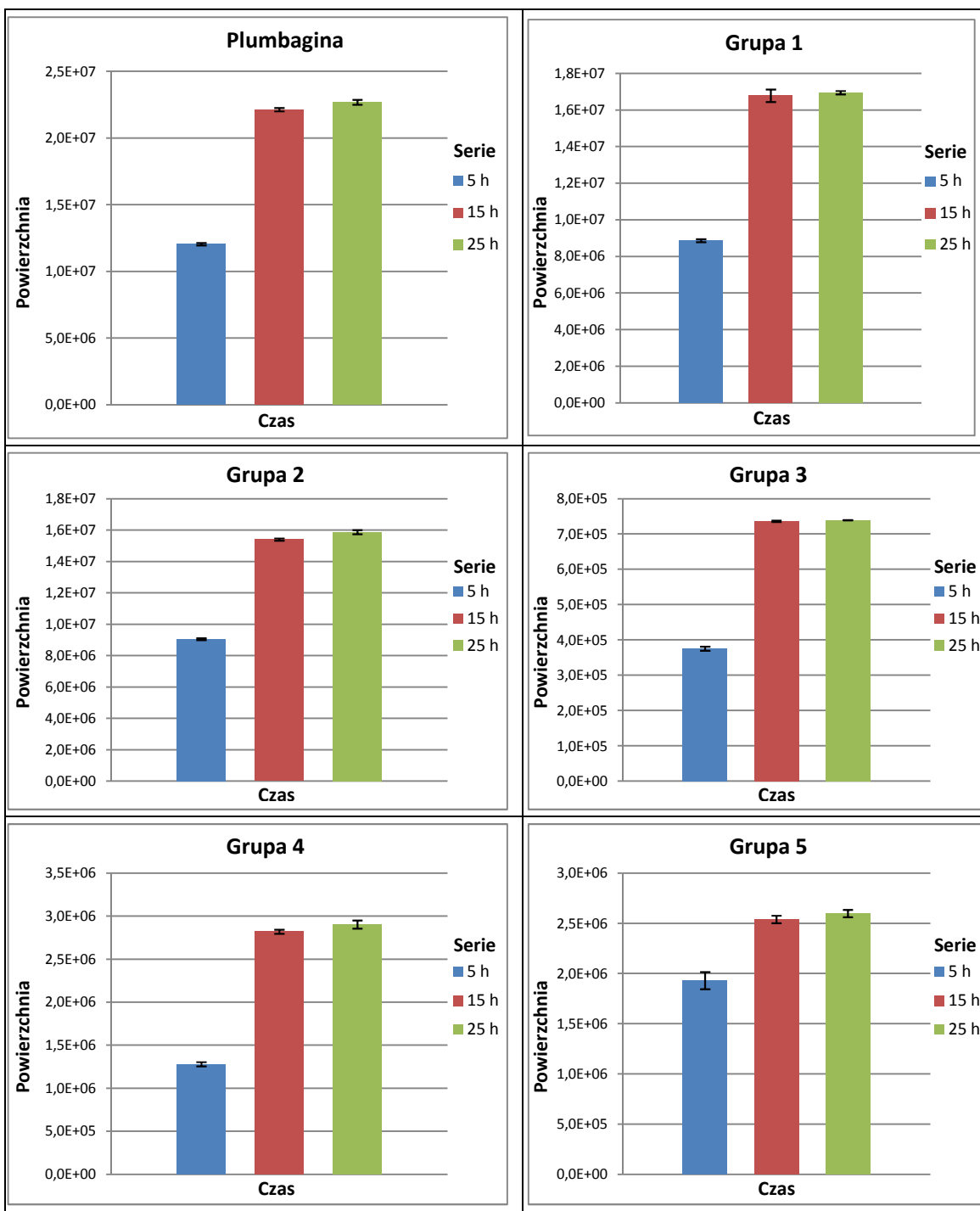
prowadziło do zwiększenia zawartości wyekstrahowanych metabolitów bądź grup substancji lub przyrost ten był bardzo nieznaczny.

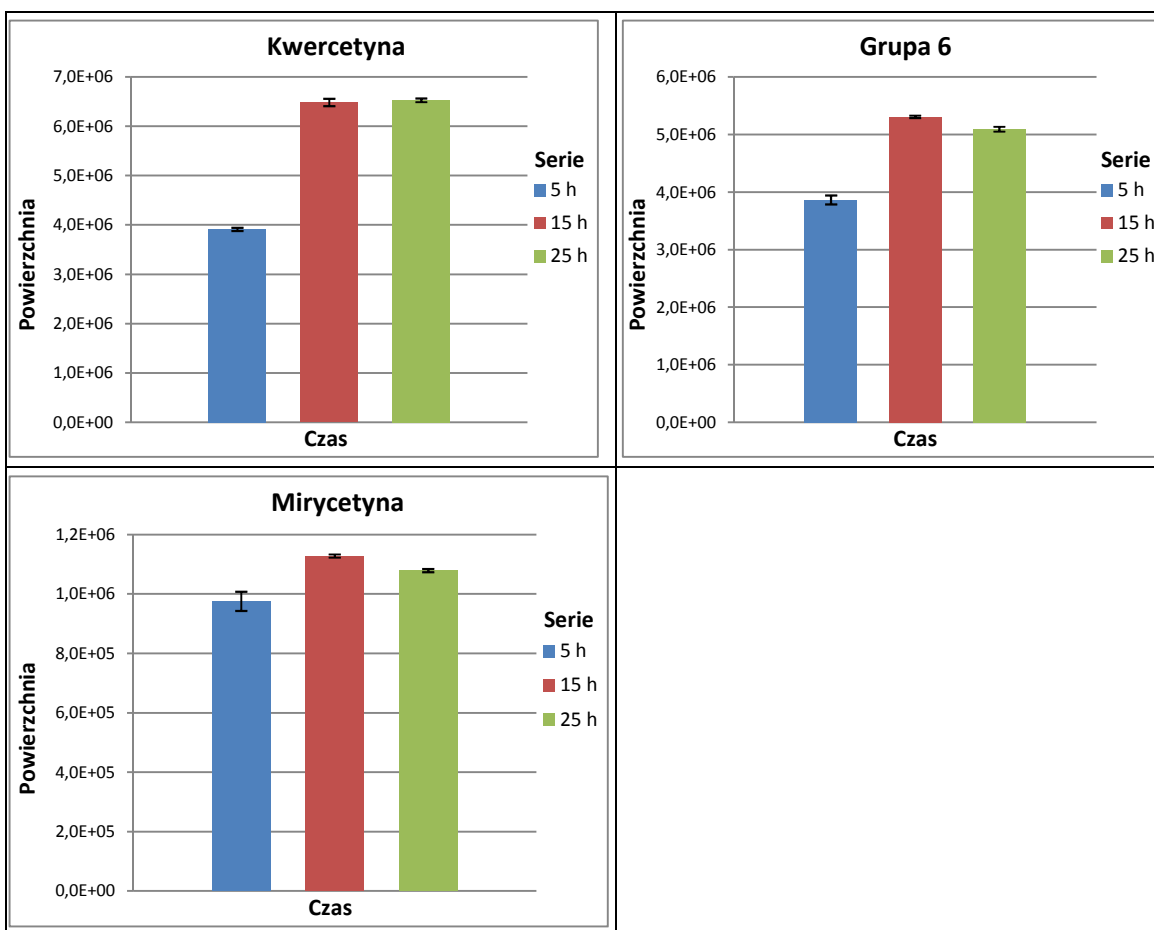
Wyniki zawartości (mierzone wartością pola powierzchni) wyekstrahowanych metabolitów bądź grup substancji, otrzymane z zastosowaniem techniki ekstrakcji w aparacie Soxtec[®], były porównywalne lub nieznacznie mniejsze z wynikami zawartości substancji, otrzymanymi z zastosowaniem aparatu Soxhleta. Powtarzalność wyników z zastosowaniem obydwu technik także była podobna. Należy, w tym miejscu zaznaczyć, że dzięki zastosowaniu zautomatyzowanej odmiany aparatu Soxhleta czas procesu ekstrakcji uległ znacznemu skróceniu z 15 godzin do 1 godziny.

Uzyskane wyniki zgodne są z wnioskami z wcześniej prowadzonych badań E.Gilgenast [112] nad efektywnością ekstrakcji / ługowania metabolitów z materiału roślinnego, które także wykazały, że optymalny czas procesu ekstrakcji substancji z materiału roślinnego to 1 godzina.

7.1.4. Wyniki badań efektywności ekstrakcji na drodze maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem

Maceracje z jednoczesnym wytrząsaniem zrealizowano w wytrząsarce z termostowaniem. Jest to prosta i łatwa w wykonaniu operacja, dość powszechnie stosowana. Wpływ czasu na proces ekstrakcji / ługowania substancji z materiału roślin mięsożernych, przeprowadzony w temperaturze 50 °C, przedstawiono na rysunku 12.





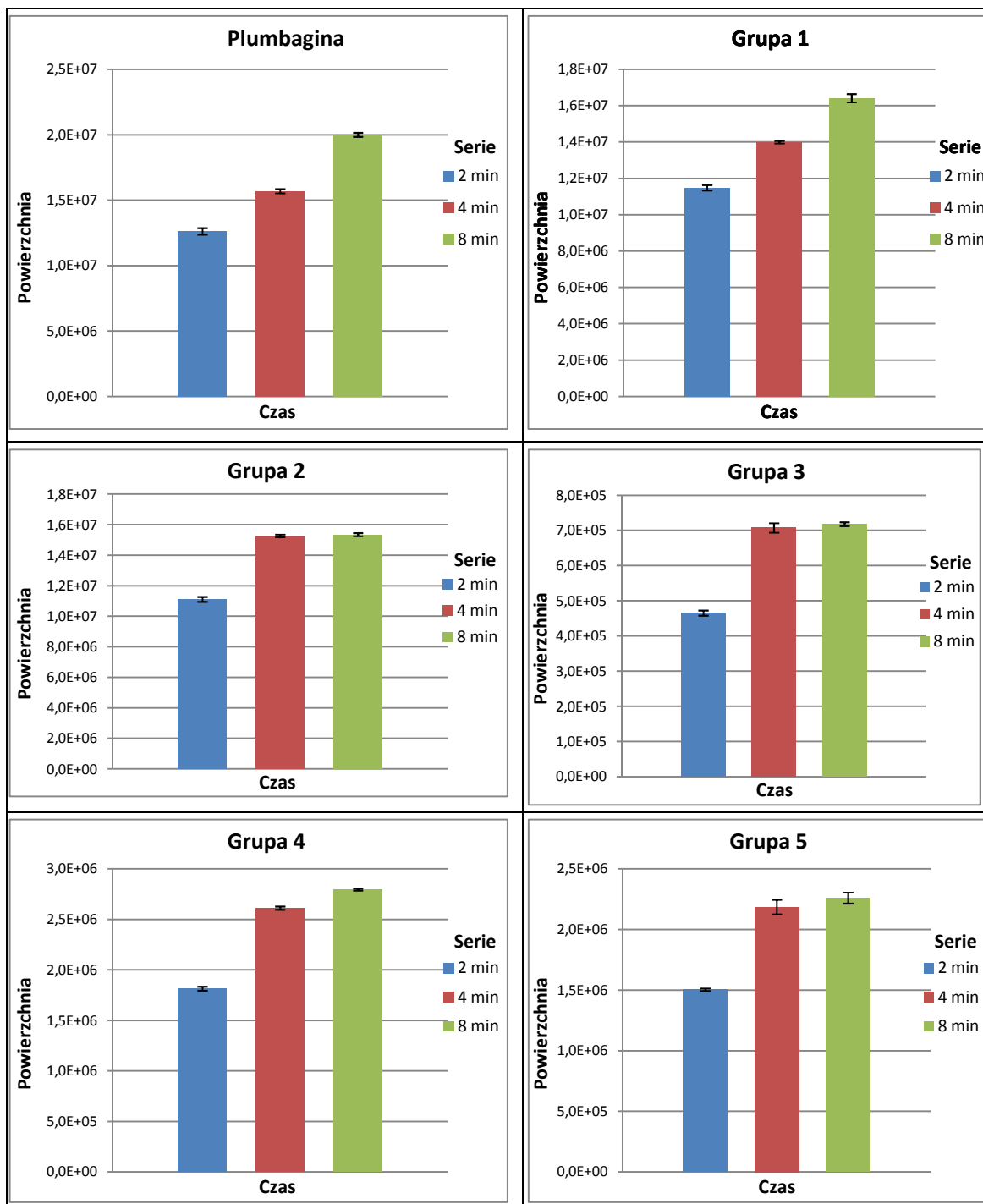
Rys.12. Wpływ czasu procesu maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem na zawartość wyekstrahowanych, poszczególnych metabolitów, jak i grup substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Proces prowadzony w temperaturze 50 °C.

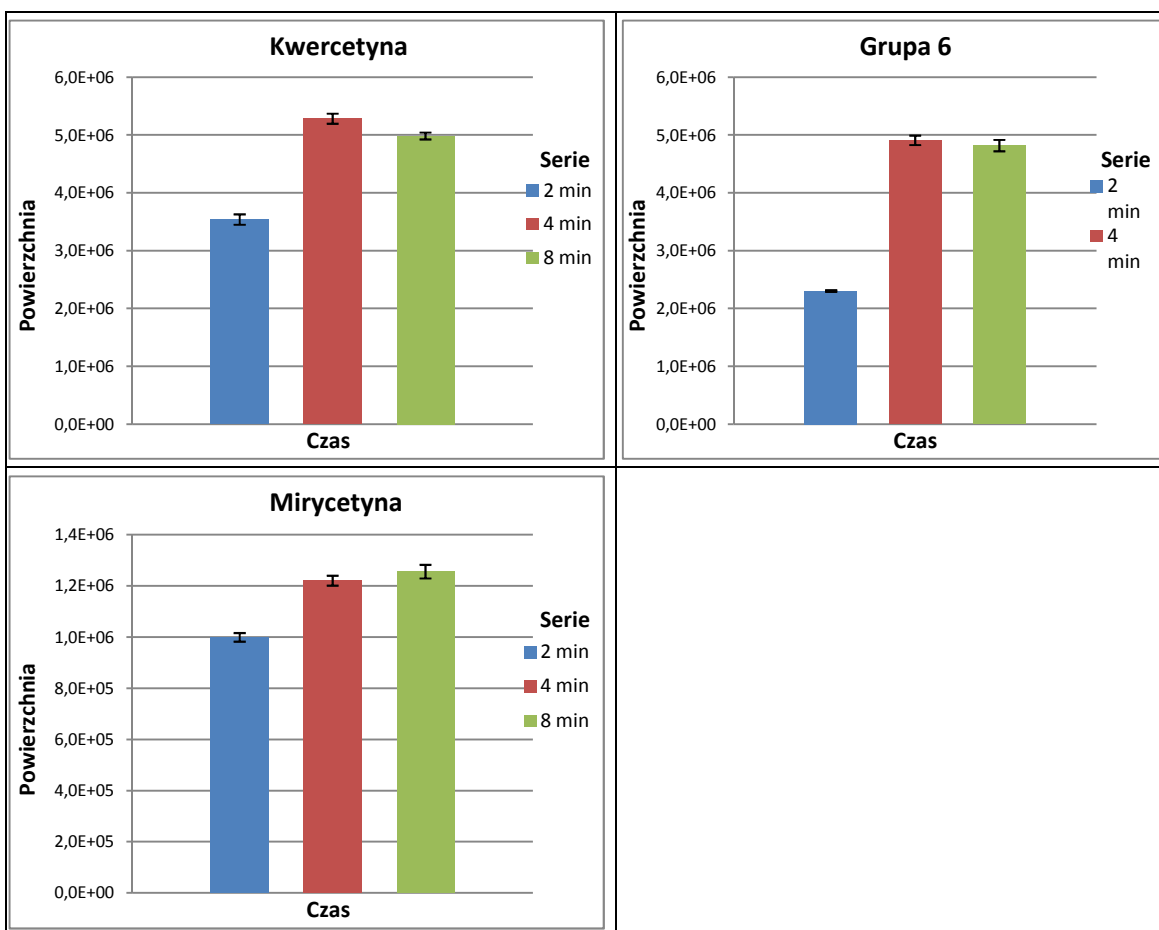
Z przeprowadzonych badań wynika, że optymalny czas operacji maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem to 15 godzin. Prowadzenie procesu maceracji dłużej niż 15 godzin nie zwiększyło znacznie zawartości wyekstrahowanych metabolitów oraz innych związków, a w przypadku mirycetyny oraz związków sklasyfikowanych w grupie 6 zawartość ich, w otrzymanym powyżej 15 godzin ekstrakcie, spadła.

Zastosowanie mieszania (wytrząsania) podczas procesu maceracji wydaje się korzystnie wpływać na optymalny czas prowadzenia operacji. Przedstawiony w literaturze czas operacji maceracji metabolitów z materiału roślinnego bez mieszania jest o wiele dłuższy (72 h - [9]), 48 h - [16]).

7.1.5. Wyniki badań efektywności ekstrakcji wspomaganey promieniowaniem mikrofalowym

Na rysunku 13 przedstawiono wpływ czasu ekstrakcji wspomaganey promieniowaniem mikrofalowym na zawartość składników materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*.





Rys.13. Wpływ czasu procesu ekstrakcji wspomaganego działaniem mikrofal na zawartość wyekstrahowanych, poszczególnych metabolitów, jak i grup substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Proces prowadzony w temperaturze 50 °C.

Z przeprowadzonych badań wynika, iż nie można jednoznacznie określić optymalnego czasu prowadzenia operacji ekstrakcji za pomocą techniki MAE, dla wszystkich składników zawartych w materiale roślinnym.

Dla składników materiału roślinnego sklasyfikowanych w grupach 2 - 6 oraz dla kwercetyny i mirycetyny optymalny czas prowadzenia procesu ekstrakcji wynosi 4 minuty. Ekstrakcja prowadzona powyżej 4 minut powoduje rozkład substancji (w przypadku kwercetyny i grupy 6) lub praktycznie nie zmienia zawartości wyekstrahowanych substancji (grupa 2 - 5 oraz mirycetyna).

Dla plumbaginy oraz składników zawartych w grupie 1-wszej optymalny czas prowadzenia ekstrakcji wyniósł 8 minut.

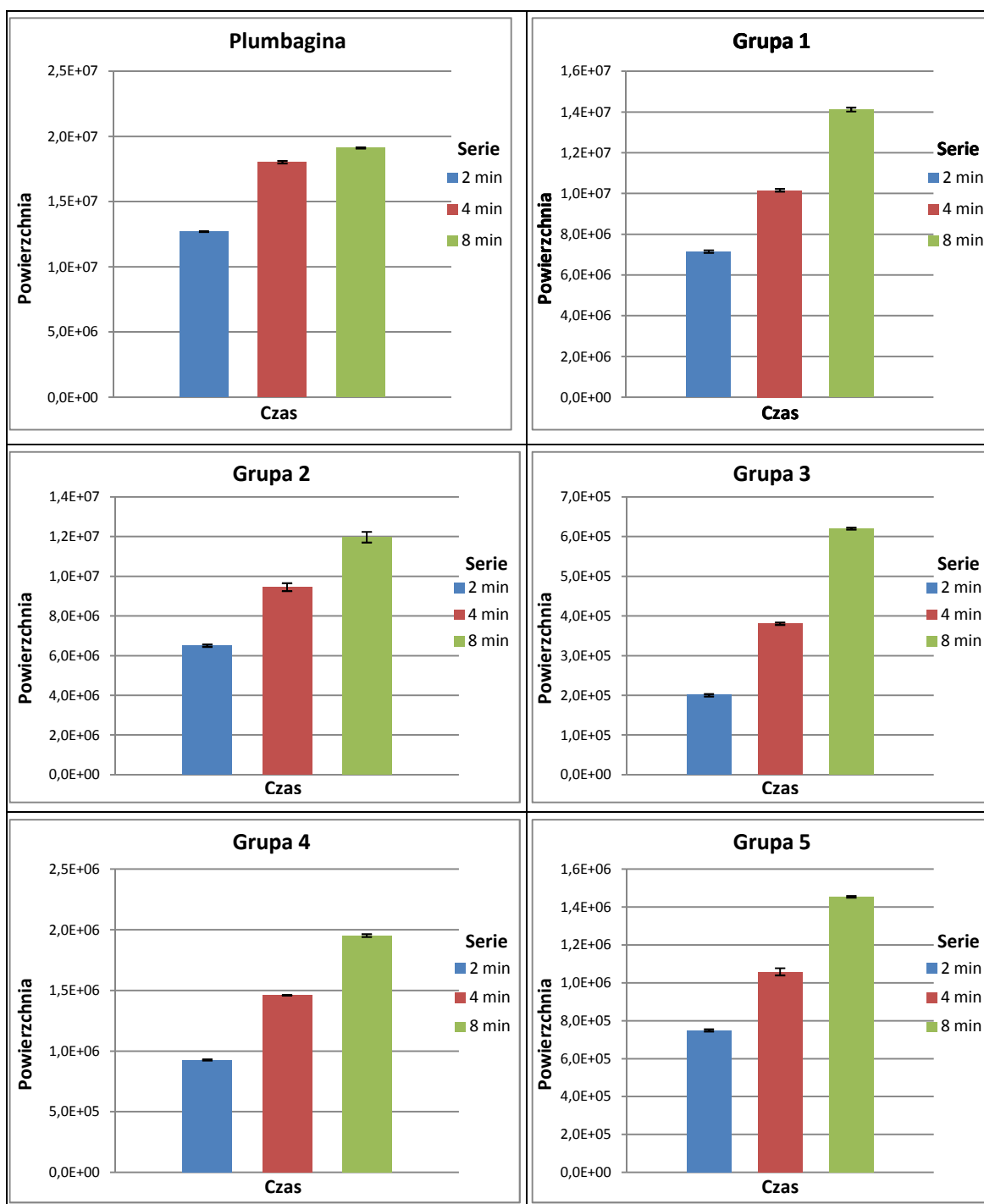
Różnice w optymalnym czasie operacji ekstrakcji za pomocą mikrofal dla składników materiału roślinnego wynikają z różnicy w ich polarności, czyli z różnej wartości elektrycznego momentu dipolowego.

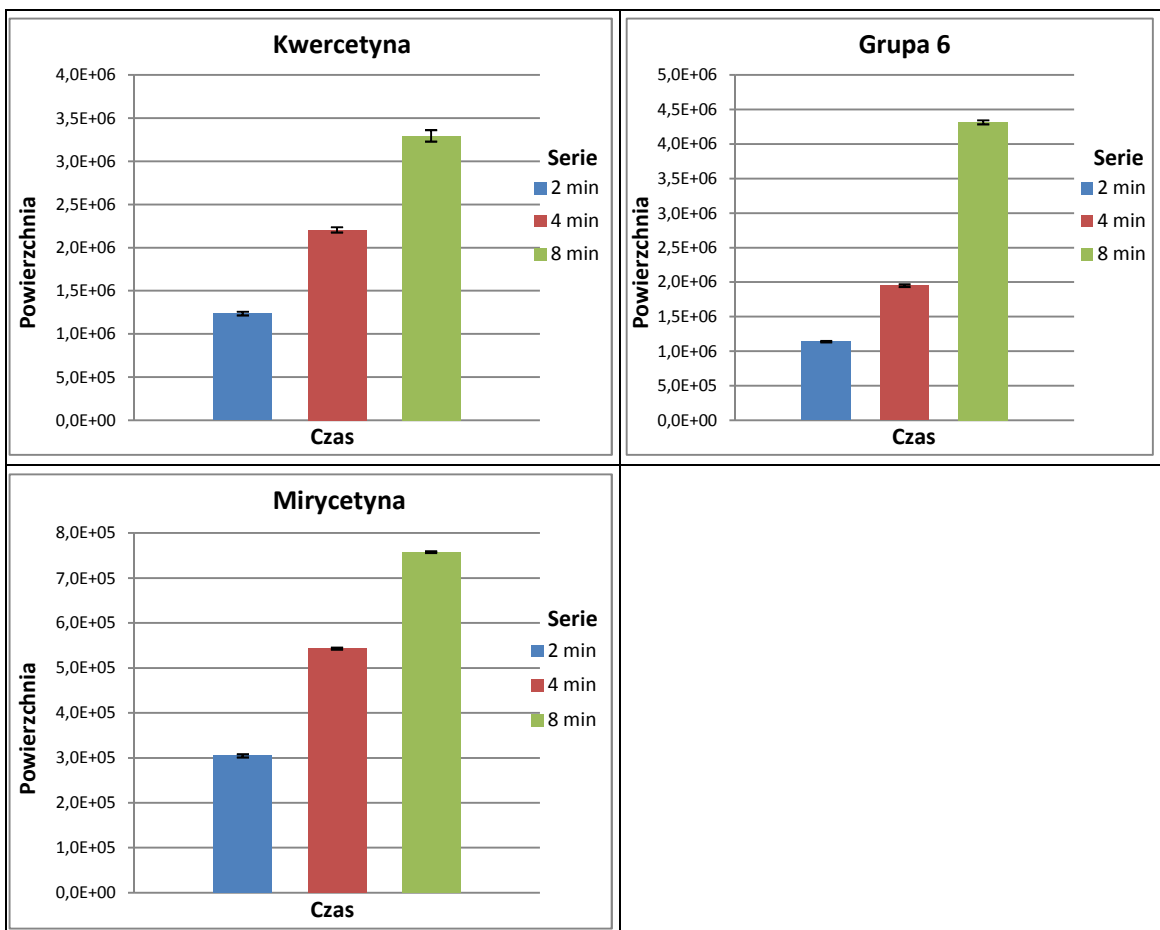
Promieniowanie mikrofalowe może być pochłaniane przez materię na dwa różne sposoby. Pierwszym z nich jest zjawisko strat dielektrycznych, głównie na skutek polaryzacji orientacyjnej (dipolowej), a drugi mechanizm polega na przewodnictwie jonowym. W przypadku pochłaniania promieniowania mikrofalowego na skutek polaryzacji dipolowej, jeśli w materiale są cząsteczki chemiczne będące dipolami, to w wyniku działania fali elektromagnetycznej, starają się one ustawić zgodnie z kierunkiem i zwrotem tego pola. Pole elektryczne przekazuje dipolom energię, która jest następnie rozpraszana w materiale w postaci ciepła. Mechanizm polaryzacji dipolowej, odpowiada za ogrzewanie tylko tych substancji, których cząsteczki są dipolami.

W związku z powyższym związki takie jak plumbagina oraz substancje sklasyfikowane w grupie pierwszej, charakteryzujące się niską polarnością (niską wartością momentu dipolowego) pobierają mniejszą ilość energii podczas procesu ekstrakcji wspomaganiej mikrofalami niż związki takie jak flawonoidy (kwercetyna i mirycetyna) oraz składniki grup 2-6.

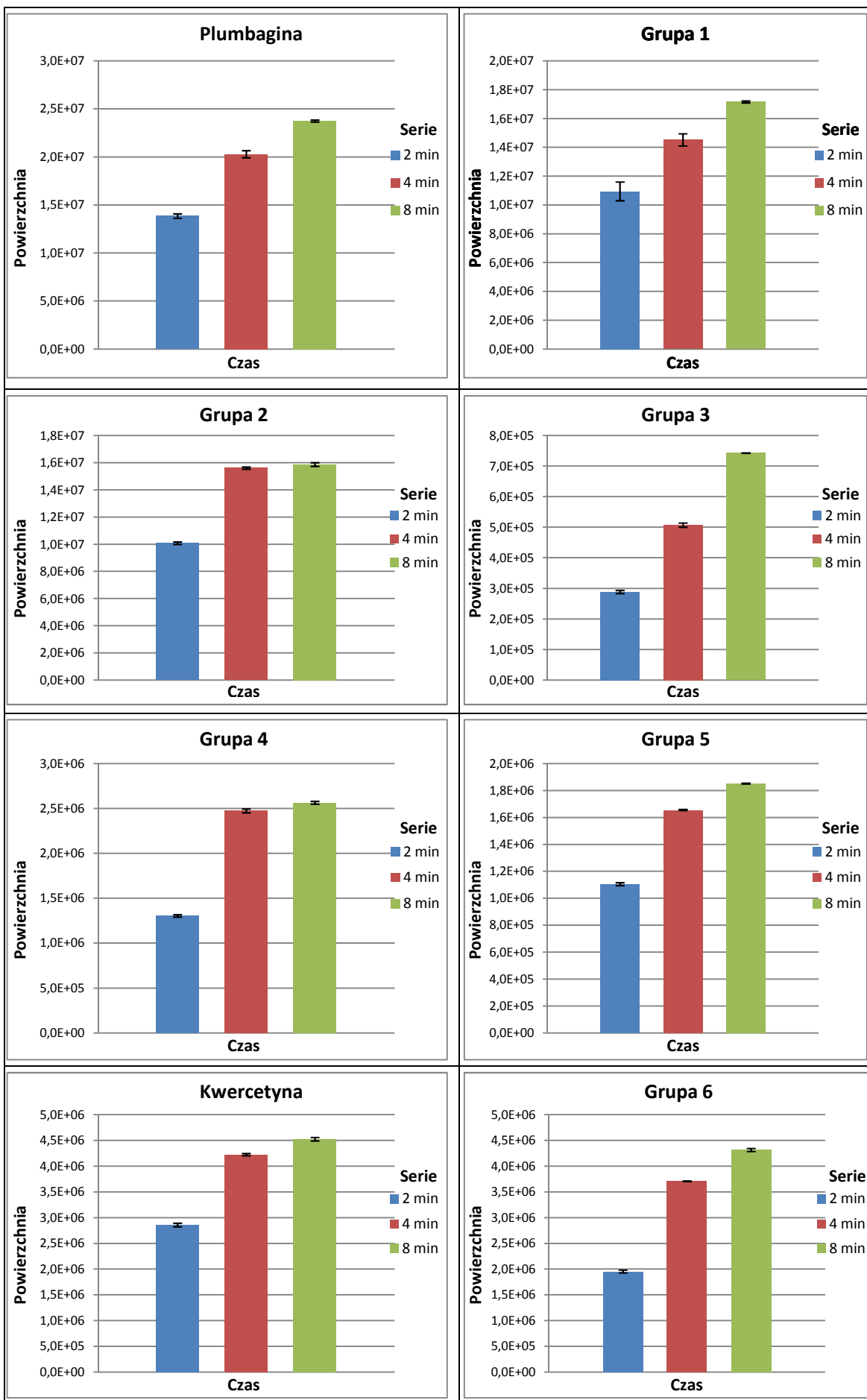
7.1.6. Wyniki badań efektywności sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej

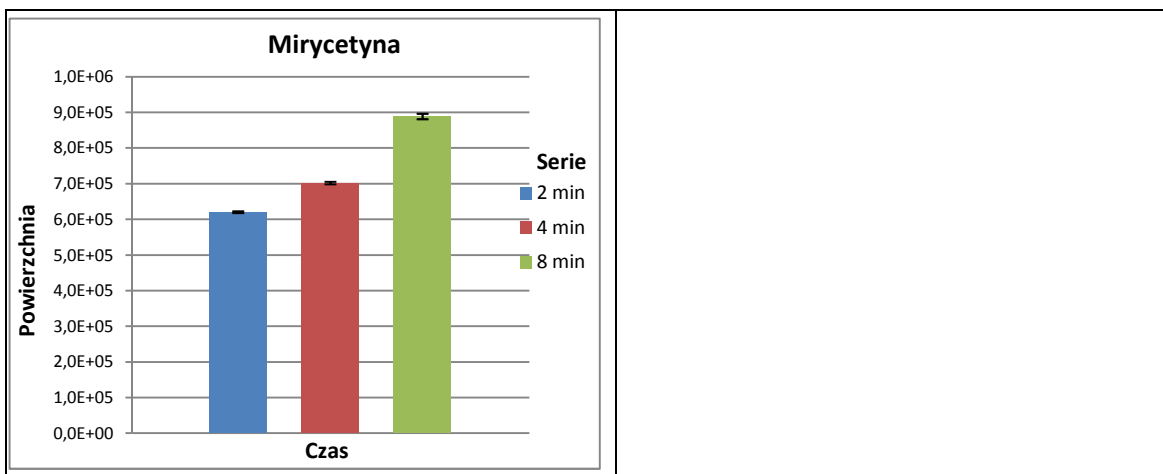
Badania efektywności ekstrakcji wspomaganego działaniem ultradźwięków za pomocą łaźni ultradźwiękowej obejmowały dobór optymalnej temperatury oraz czasu operacji ekstrakcji / ługowania. Izolację badanych metabolitów oraz poszczególnych grup związków zbadano w temperaturze 30 °C w czasie 2, 4 i 8 minut oraz w temperaturze 50 °C, analogicznie w czasie 2, 4 i 8 minut. Wpływ czasu sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej prowadzonej w temperaturze 30 °C przedstawiono na rysunku 14 oraz w temperaturze 50 °C na rysunku 15.





Rys.14. Wpływ czasu procesu ekstrakcji wspomaganego działaniem ultradźwięków w łaźni ultradźwiękowej na zawartość wyekstrahowanych, poszczególnych metabolitów, jak i grup substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Proces prowadzony w temperaturze 30 °C.



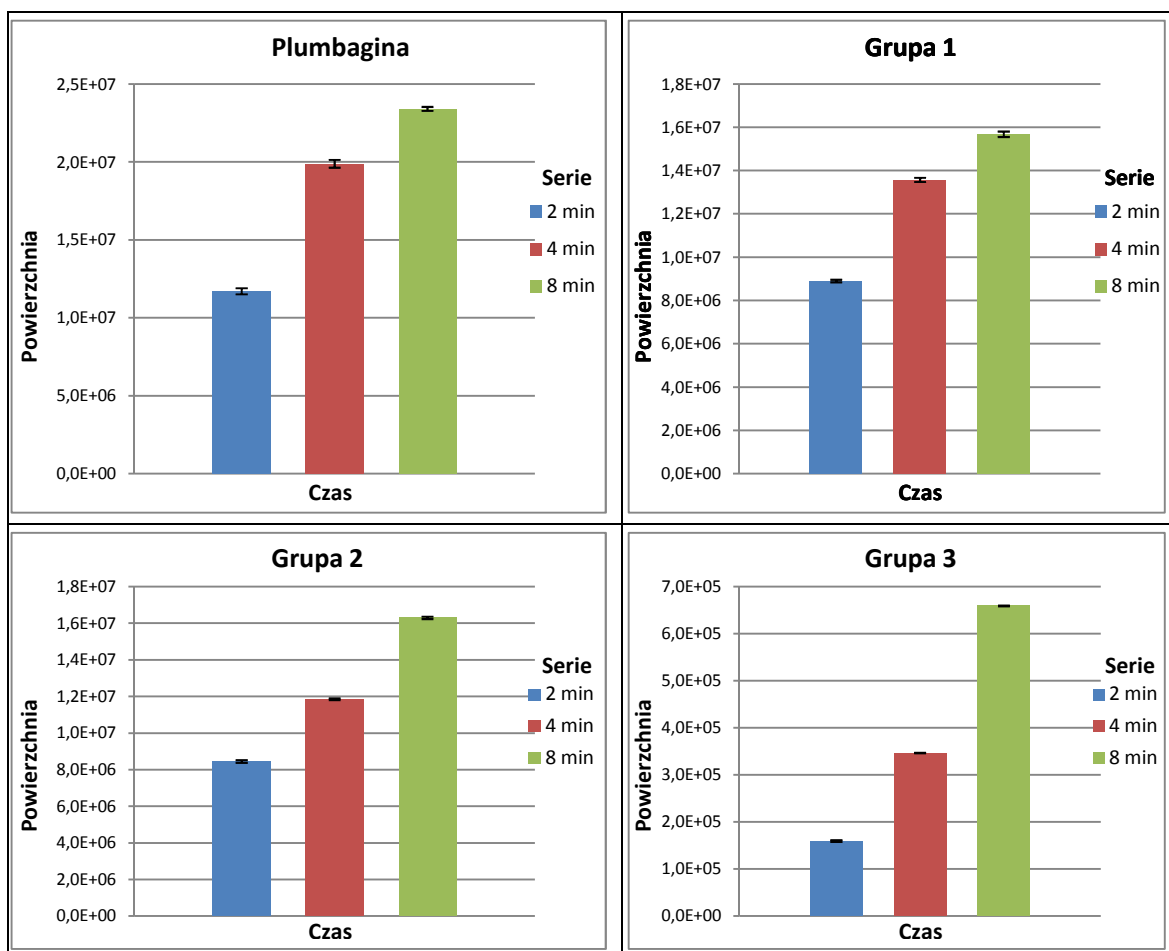


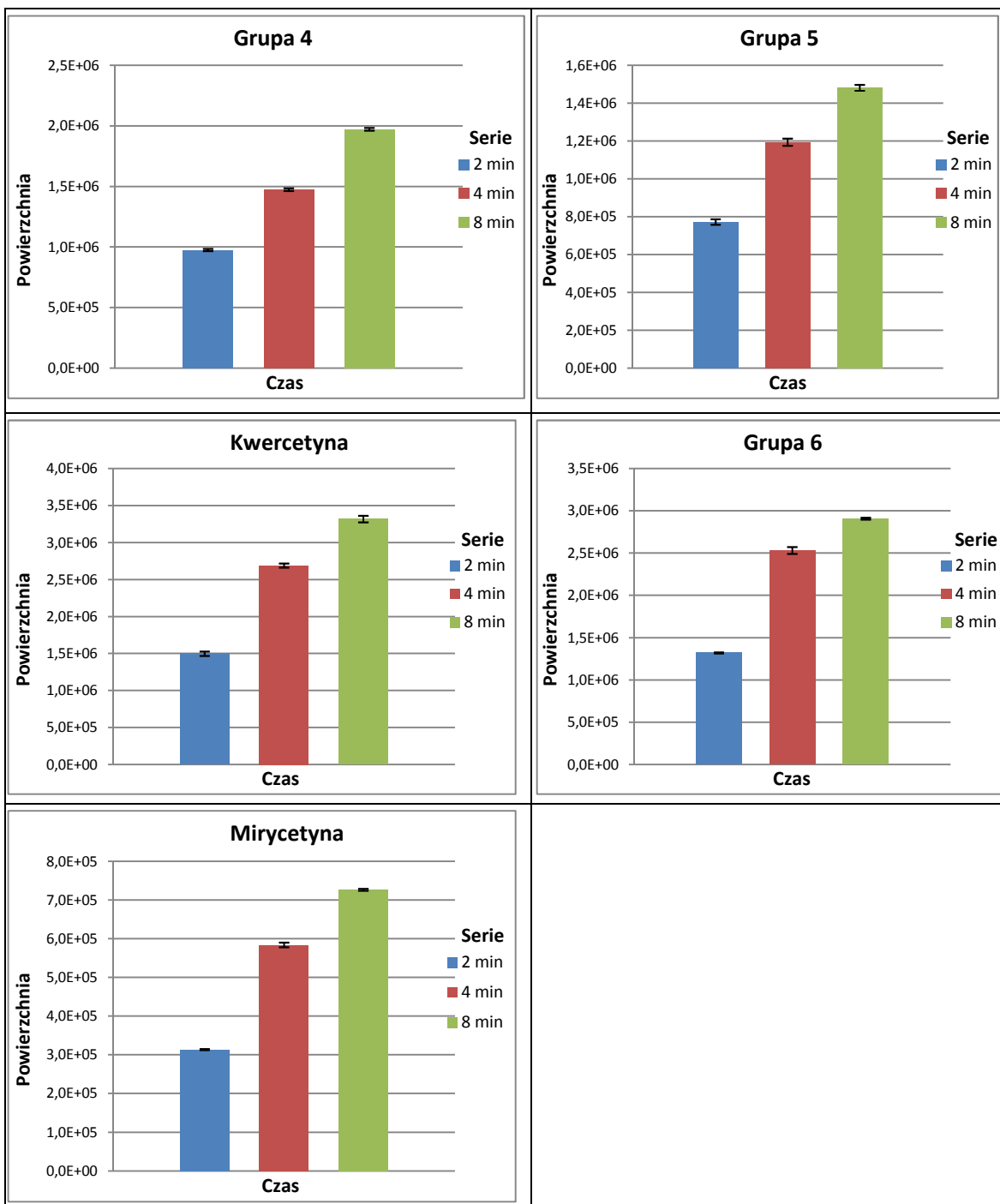
Rys.15. Wpływ czasu procesu ekstrakcji wspomaganej działaniem ultradźwięków w łaźni ultradźwiękowej na zawartość wyekstrahowanych, poszczególnych metabolitów, jak i grup substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Proces prowadzony w temperaturze 50 °C.

Z powyższych diagramów można wnioskować, że wzrost temperatury procesu ekstrakcji wpłynął na zwiększenie zawartości wyekstrahowanych metabolitów roślinnych. Podniesienie temperatury operacji ekstrakcji z 30 °C na 50 °C wpłynęło na wyższą rozpuszczalność metabolitów w ekstrakcie, a także na wzrost oddziaływań desorpcyjnych. Jako optymalny czas prowadzenia procesu ekstrakcji za pomocą ultradźwięków w łaźni ultradźwiękowej uznano 8 minut.

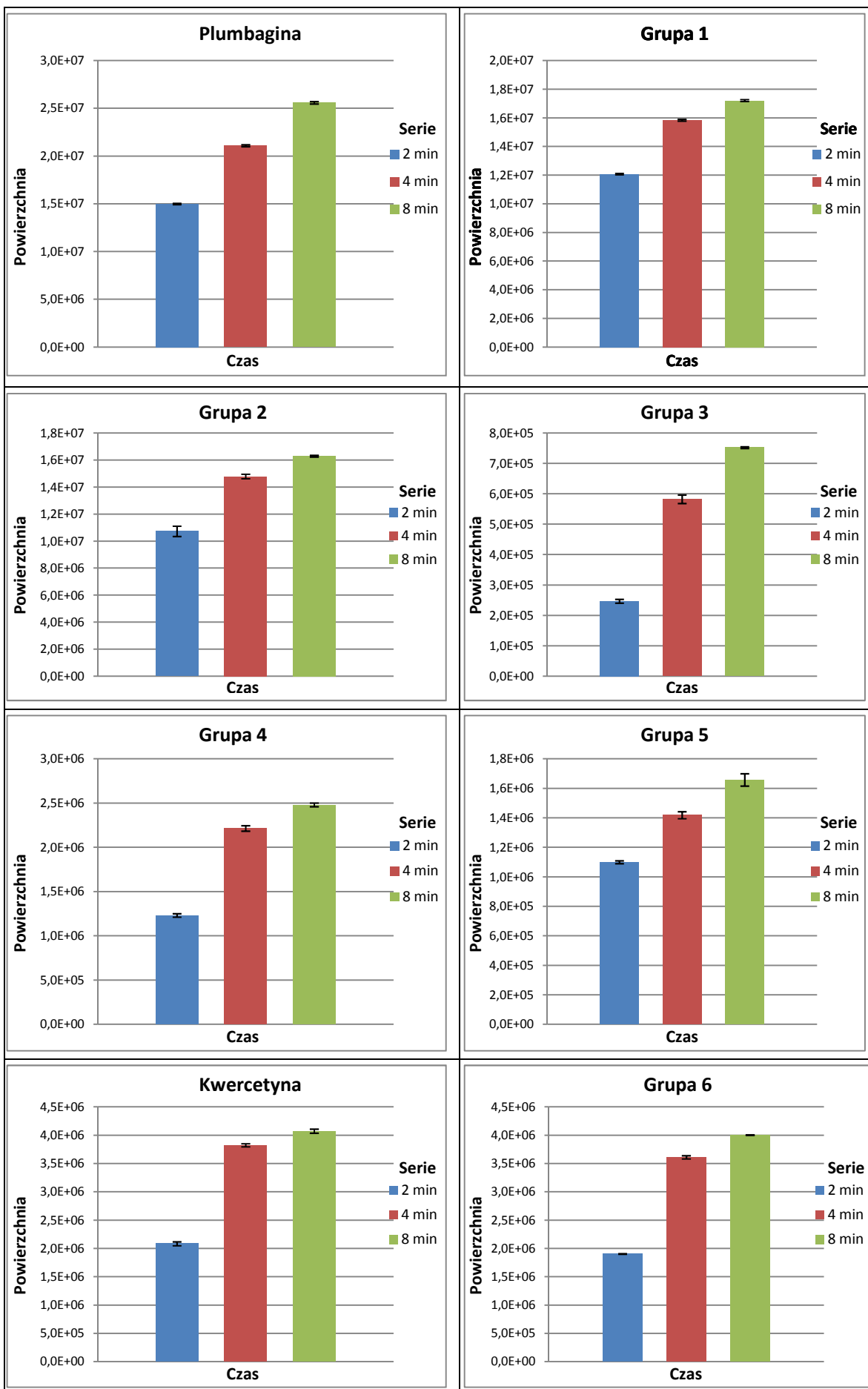
7.1.7. Wyniki badań efektywności sonifikacji za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego

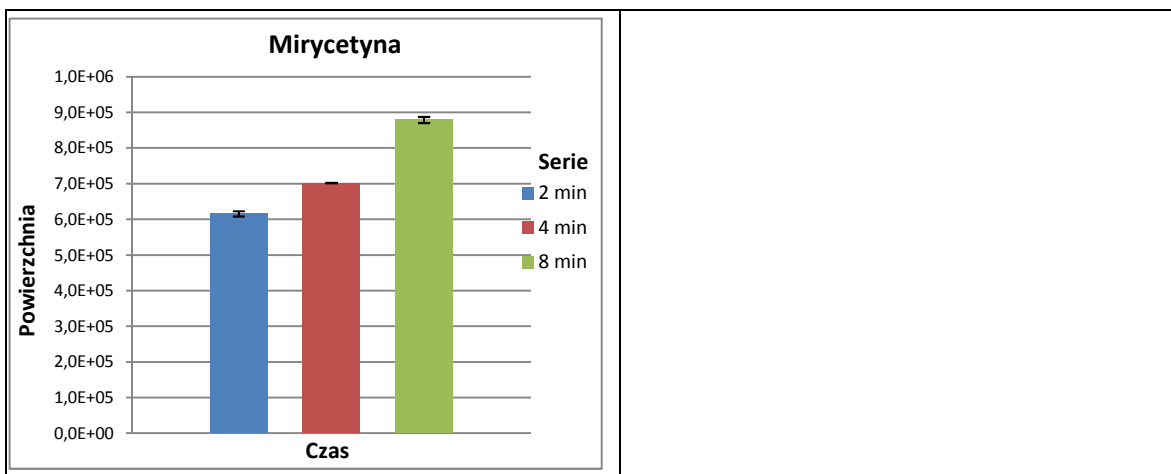
Badania efektywności ekstrakcji za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego obejmowały dobór optymalnej temperatury oraz czasu operacji ekstrakcji / ługowania. Izolację badanych metabolitów oraz poszczególnych grup związków zbadano w temperaturze 30 °C w czasie 2, 4 i 8 minut oraz w temperaturze 50 °C, analogicznie w czasie 2, 4 i 8 minut. Wpływ czasu sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej prowadzonej w temperaturze 30 °C przedstawiono na rysunku 16 oraz w temperaturze 50 °C na rysunku 17.





Rys.16. Wpływ czasu procesu ekstrakcji prowadzonego za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego na zawartość wyekstrahowanych, poszczególnych metabolitów, jak i grup substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Proces prowadzony w temperaturze 30 °C.





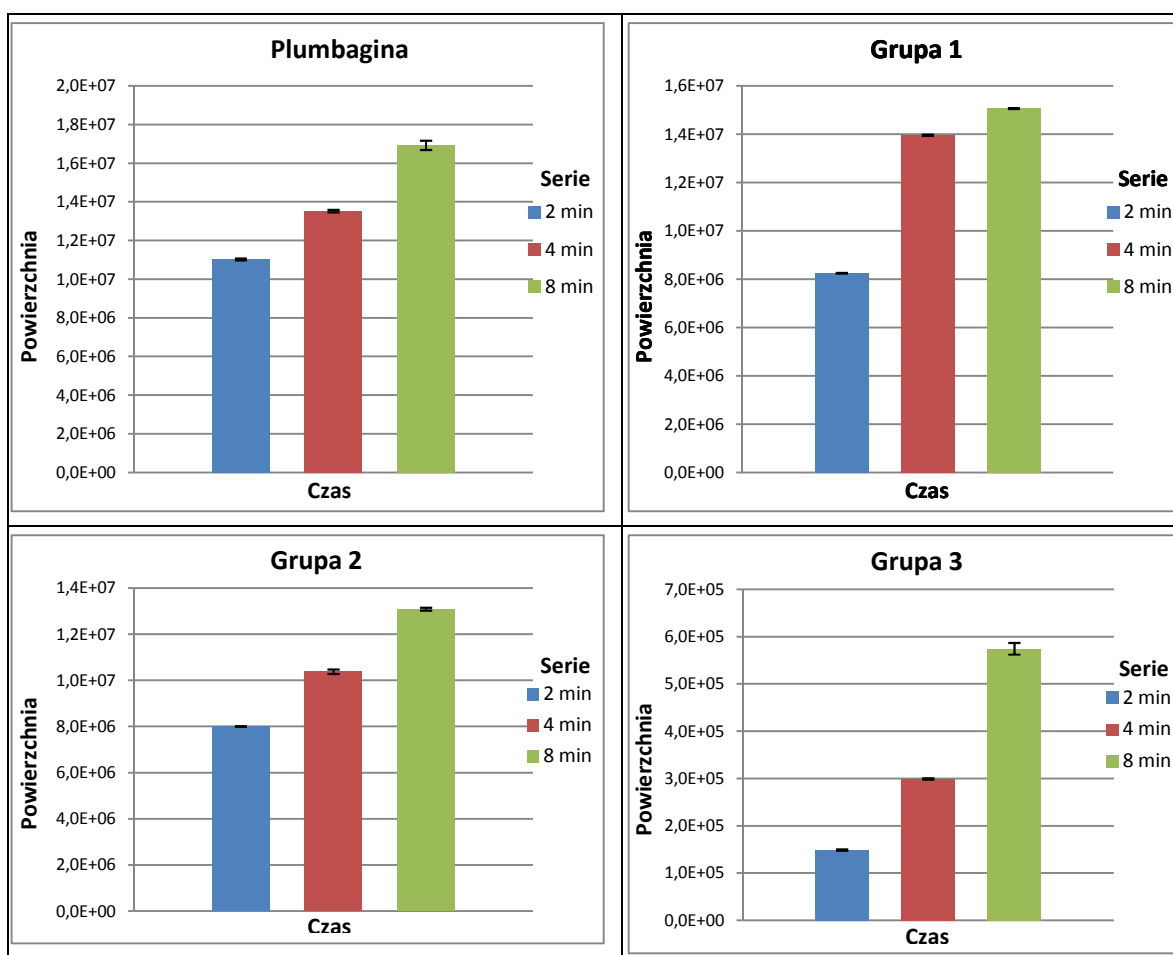
Rys.17. Wpływ czasu procesu ekstrakcji prowadzonego za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego na zawartość wyekstrahowanych, poszczególnych metabolitów, jak i grup substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Proces prowadzony w temperaturze 50 °C.

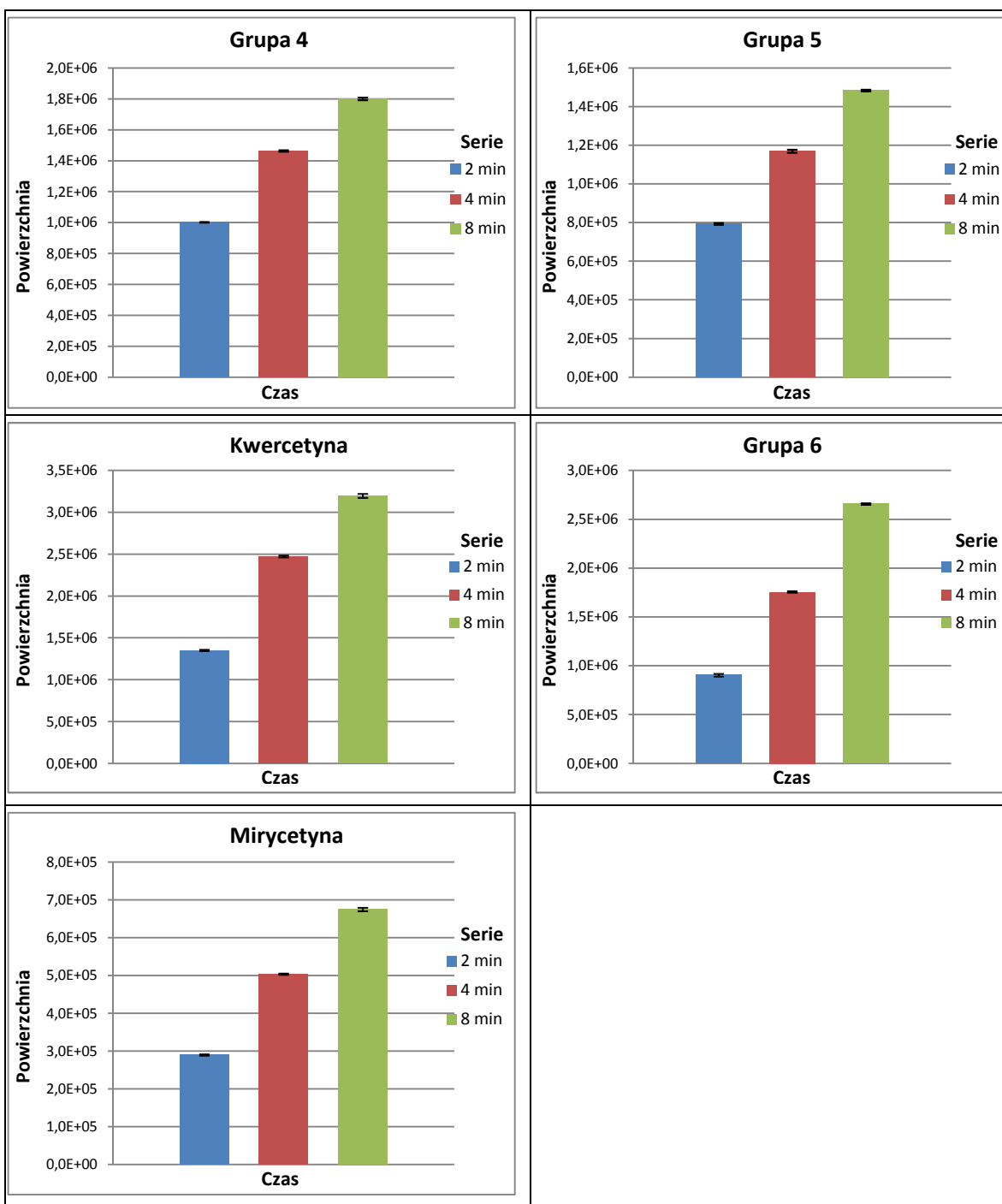
Przeprowadzone badania wykazały, że tak jak w przypadku ekstrakcji związków z materiału roślinnego w łaźni ultradźwiękowej, wzrost temperatury operacji wpłynął na zwiększenie zawartości wyekstrahowanych metabolitów roślinnych. Podniesienie temperatury procesu z 30 °C na 50 °C wpłynęło na wyższą rozpuszczalność metabolitów roślinnych w ekstrakcji, a także na wzrost oddziaływań desorpcyjnych.

Optymalny czas prowadzenia procesu ekstrakcji za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego dla wszystkich grup substancji oraz plumbaginy, kwercetyny i mirycetyny wyniósł 8 minut.

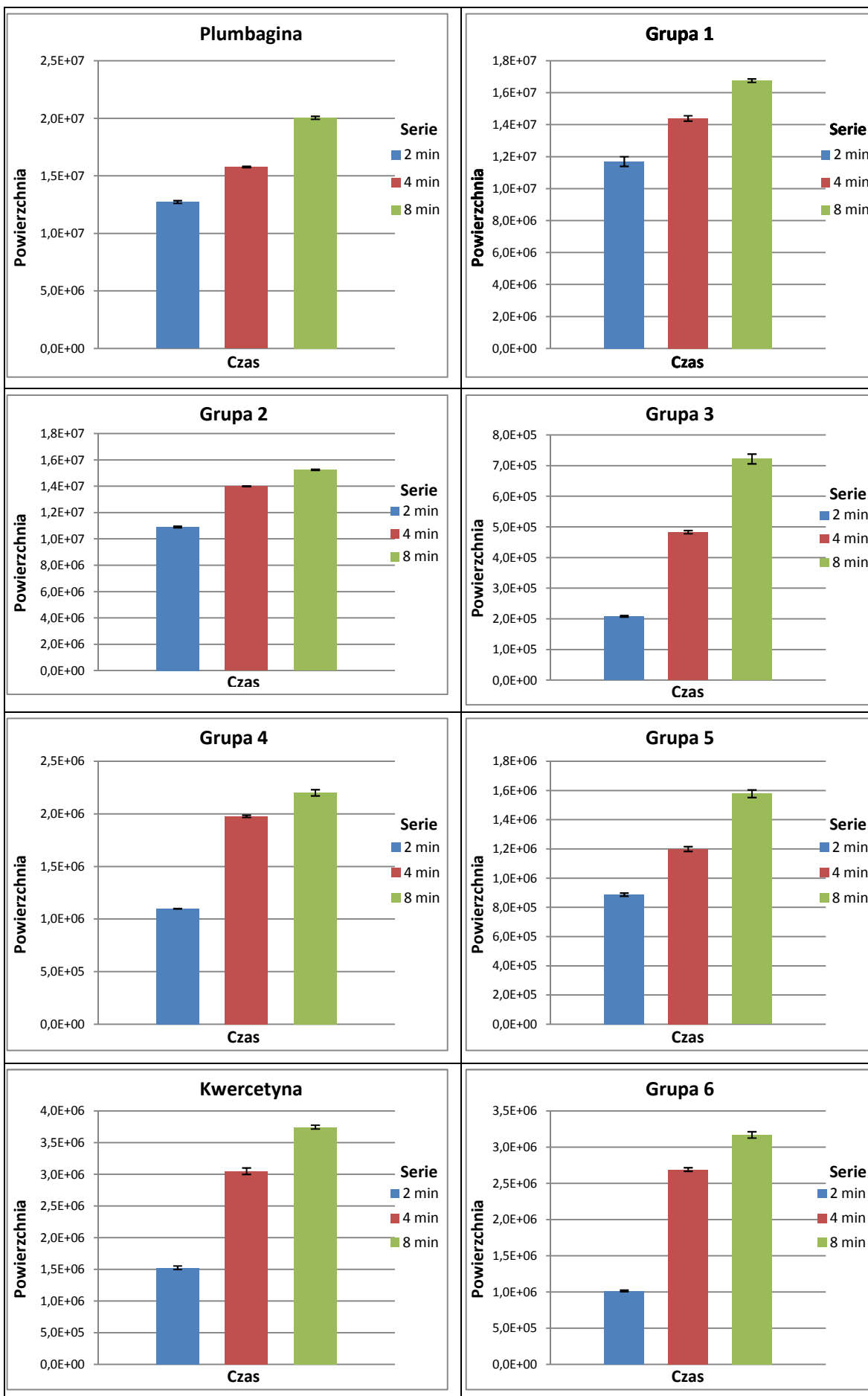
7.1.8. Wyniki badań efektywności ekstrakcji za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego o wysokiej szybkości ścinania

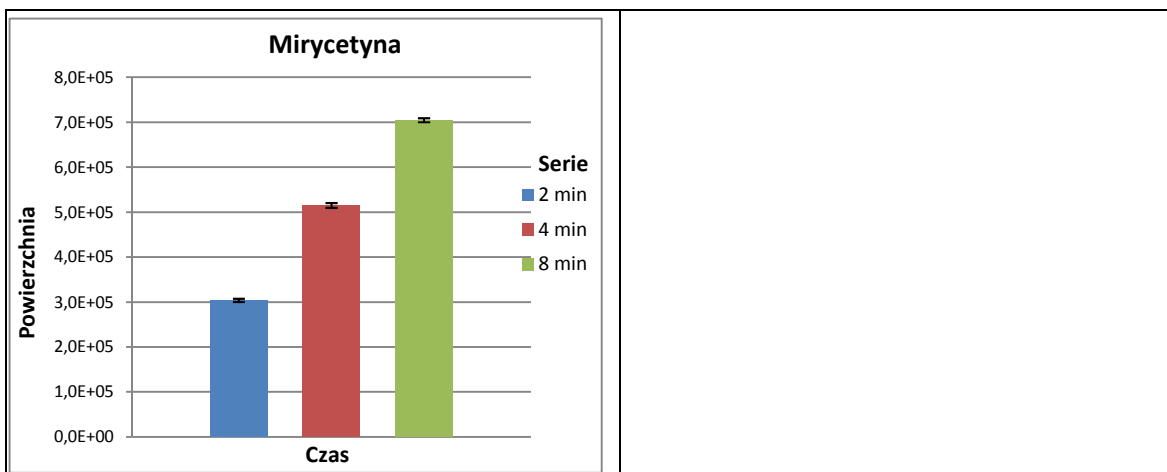
Badania efektywności procesu ekstrakcji za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego o wysokiej szybkości ścinania wykonano przy szybkości obrotów 18800 rpm. Obejmowały one dobór optymalnej temperatury oraz czasu procesu ekstrakcji / ługowania. Operacje ekstrakcji metabolitów oraz poszczególnych grup przeprowadzono w temperaturze 30 °C w czasie 2, 4 i 8 minut oraz w temperaturze 50 °C, analogicznie w czasie 2, 4 i 8 minut. Wpływ czasu ekstrakcji za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, prowadzonej w temperaturze 30 °C przedstawiono na rysunku 18 oraz w temperaturze 50 °C na rysunku 19.





Rys.18. Wpływ czasu procesu ekstrakcji za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego na zawartość wyekstrahowanych, poszczególnych metabolitów, jak i grup substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Proces prowadzony w temperaturze 30 °C.





Rys.19. Wpływ czasu procesu ekstrakcji za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego na zawartość wyekstrahowanych, poszczególnych metabolitów, jak i grup substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Proces prowadzony w temperaturze 50 °C.

W wyniku przeprowadzonych badań można stwierdzić, że tak jak w przypadku ekstrakcji związków z materiału roślinnego za pomocą ultradźwięków, wzrost temperatury podczas operacji ekstrakcji wpłynął korzystnie na zwiększenie zawartości wyekstrahowanych metabolitów roślinnych. Podniesienie temperatury procesu z 30 °C na 50 °C wpłynęło korzystnie na wyższą rozpuszczalność metabolitów roślinnych w ekstrakcji, a także na wzrost oddziaływań desorpcyjnych.

Optymalny czas prowadzenia procesu ekstrakcji za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego dla wszystkich grup substancji oraz plumbaginy, kwercetyny i mirycetyny wyniósł 8 minut.

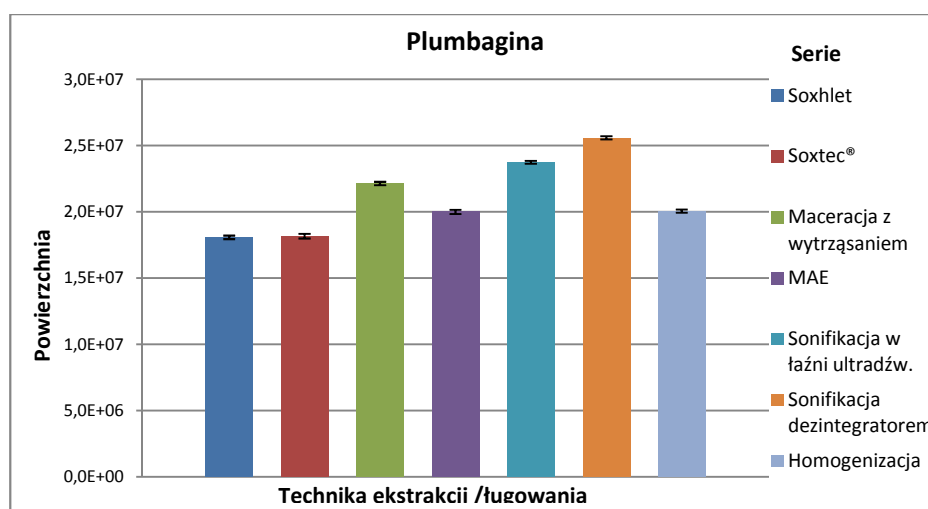
7.1.9. Porównanie efektywności badanych technik ekstrakcyjnych

Porównanie efektywności badanych technik ekstrakcji / ługowania dokonano w optymalnych, specyficznych dla poszczególnej techniki warunkach prowadzenia operacji izolacji metabolitów zawartych w materiale roślinnym z gatunku *Dionaea muscipula*. W tabeli 12 zestawiono optymalne warunki izolacji metabolitów z materiału roślinnego dla każdej z badanych technik. Przy porównaniu efektywności technik ekstrakcji / ługowania uwzględniano maksymalne wartości osiąganych powierzchni poszczególnych badanych metabolitów oraz sum powierzchni pików sklasyfikowanych w poszczególnych grupach. Na rysunkach 20 – 29 przedstawiono diagramy umożliwiające porównanie zawartości poszczególnych metabolitów i grup substancji, osiągniętych w optymalnych warunkach dla każdej z badanych technik.

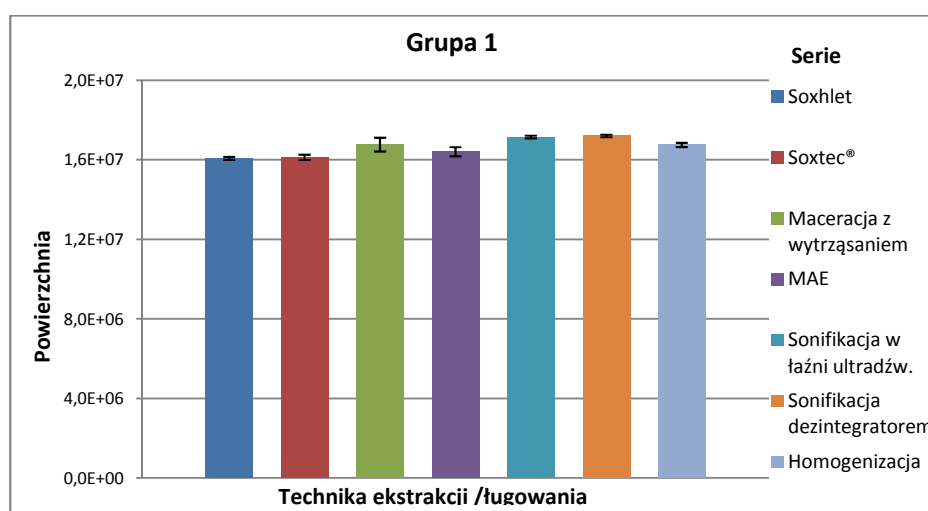
Tabela 12. Podsumowanie optymalnych warunków (czas i temperatura) prowadzenia operacji ekstrakcji/ ługowania metabolitów z materiału roślinnego dla poszczególnych technik.

Nazwa metabolitu	Technika ekstrakcji/ ługowania													
	Soxhlet		Soxhtec®		Maceracja z wytrząsaniem		Ekstrakcja za pomocą homogenizatora		MAE		Sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej		Sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego	
	temp. [°C]	czas [h]	temp. [°C]	czas [h]	temp. [°C]	czas [h]	temp. [°C]	czas [min]	temp. [°C]	czas [min]	temp. [°C]	czas [min]	temp. [°C]	czas [min]
plumbagina	*	15	*	1	50 °C	15	50 °C	8	50 °C	8	50 °C	8	50 °C	8
grupa 1	*	15	*	1	50 °C	15	50 °C	8	50 °C	8	50 °C	8	50 °C	8
grupa 2	*	15	*	1	50 °C	15	50 °C	8	50 °C	4	50 °C	8	50 °C	8
grupa 3	*	15	*	1	50 °C	15	50 °C	8	50 °C	4	50 °C	8	50 °C	8
grupa 4	*	15	*	1	50 °C	15	50 °C	8	50 °C	4	50 °C	8	50 °C	8
grupa 5	*	15	*	1	50 °C	15	50 °C	8	50 °C	4	50 °C	8	50 °C	8
kwercetyna	*	15	*	1	50 °C	15	50 °C	8	50 °C	4	50 °C	8	50 °C	8
grupa 6	*	15	*	1	50 °C	15	50 °C	8	50 °C	4	50 °C	8	50 °C	8
mirycetyna	*	15	*	1	50 °C	15	50 °C	8	50 °C	4	50 °C	8	50 °C	8

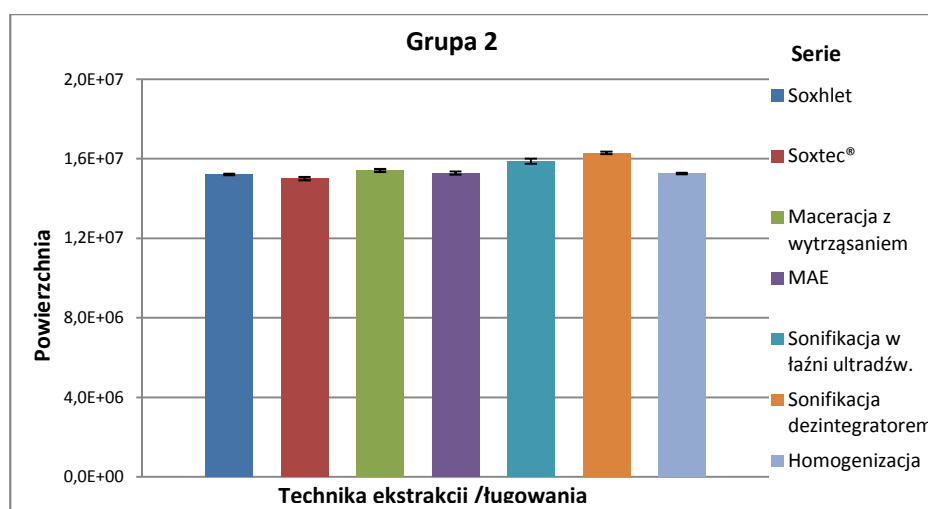
* - proces prowadzony w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika



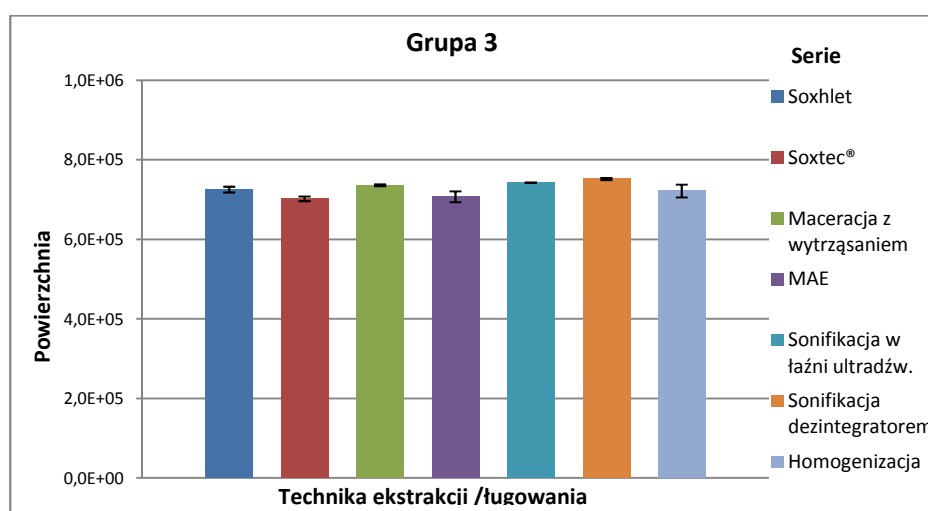
Rys.20. Porównanie efektywności ekstrakcji / ługowania plumbaginy z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* z wykorzystaniem wybranych technik izolacji, takich jak: Soxhlet, Soxtec®, maceracja z jednoczesnym wytrząsaniem, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej, sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, w optymalnych warunkach prowadzenia operacji ekstrakcji dla każdej z technik.



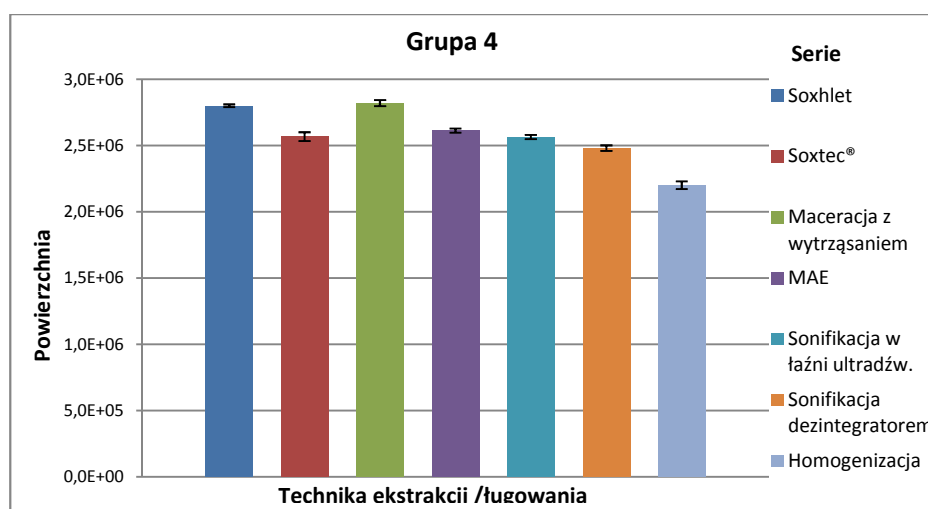
Rys.21. Porównanie efektywności ekstrakcji / ługowania substancji sklasyfikowanych w grupie 1, z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* z wykorzystaniem wybranych technik izolacji, takich jak: Soxhlet, Soxtec®, maceracja z jednoczesnym wytrząsaniem, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej, sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, w optymalnych warunkach prowadzenia operacji ekstrakcji dla każdej z technik.



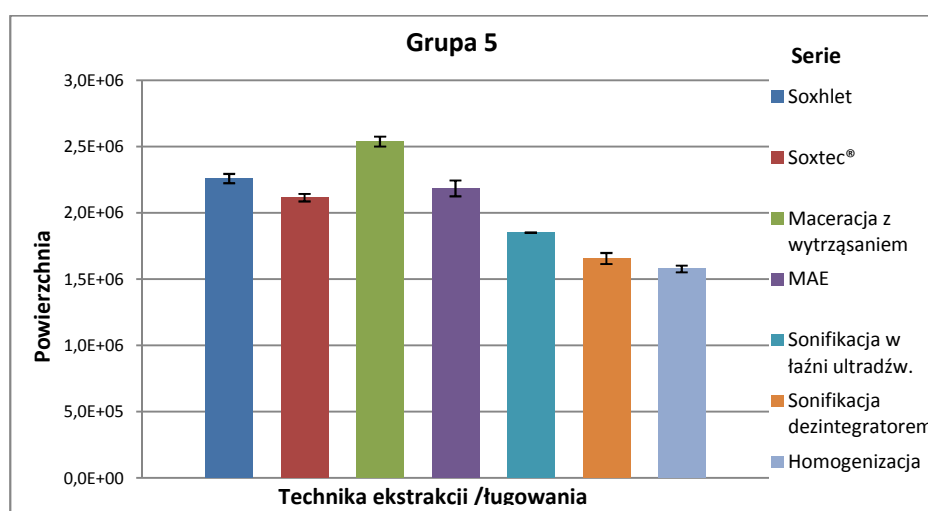
Rys.22. Porównanie efektywności ekstrakcji / ługowania substancji sklasyfikowanych w grupie 2, z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* z wykorzystaniem wybranych technik izolacji, takich jak: Soxhlet, Soxtec®, maceracja z jednoczesnym wytrząsaniem, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej, sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, w optymalnych warunkach prowadzenia operacji ekstrakcji dla każdej z technik.



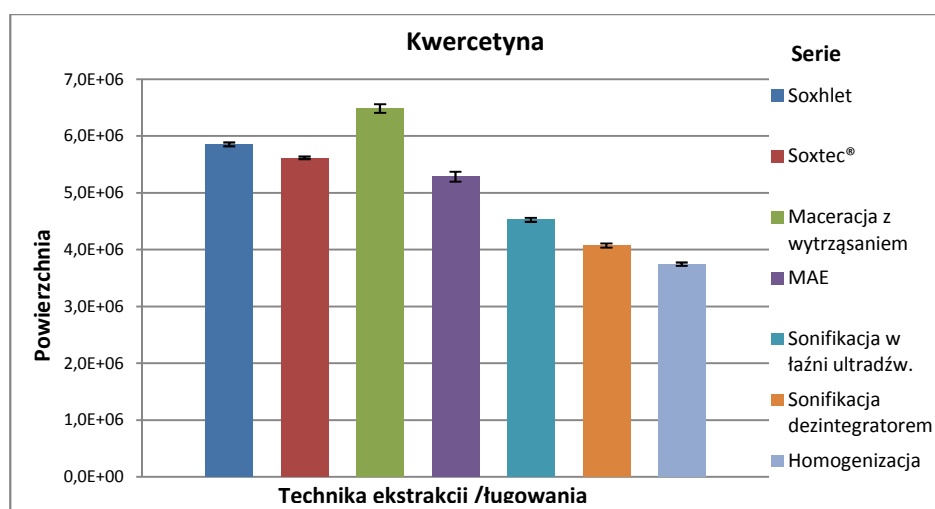
Rys.23. Porównanie efektywności ekstrakcji / ługowania substancji sklasyfikowanych w grupie 3, z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* z wykorzystaniem wybranych technik izolacji, takich jak: Soxhlet, Soxtec®, maceracja z jednoczesnym wytrząsaniem, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej, sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, w optymalnych warunkach prowadzenia operacji ekstrakcji dla każdej z technik.



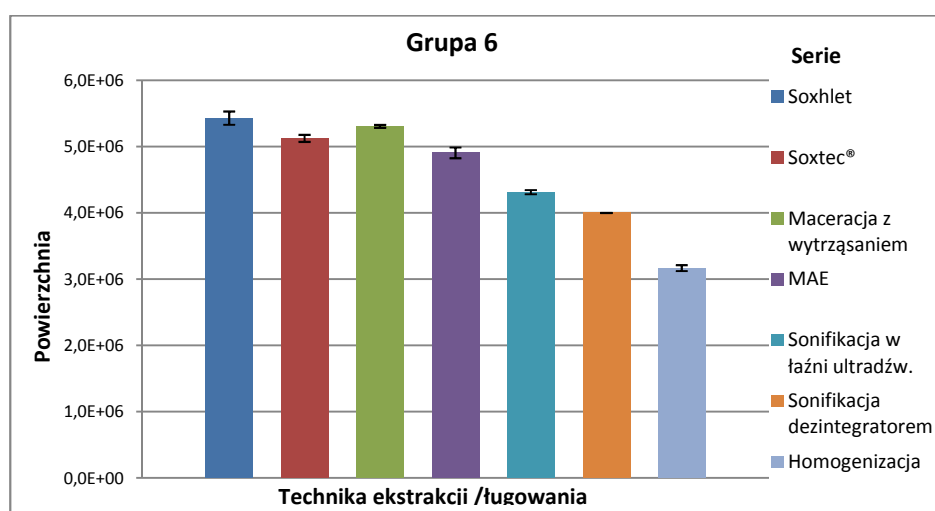
Rys.24. Porównanie efektywności ekstrakcji / ługowania substancji sklasyfikowanych w grupie 4, z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* z wykorzystaniem wybranych technik izolacji, takich jak: Soxhlet, Soxtec®, maceracja z jednoczesnym wytrząsaniem, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej, sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, w optymalnych warunkach prowadzenia operacji ekstrakcji dla każdej z technik.



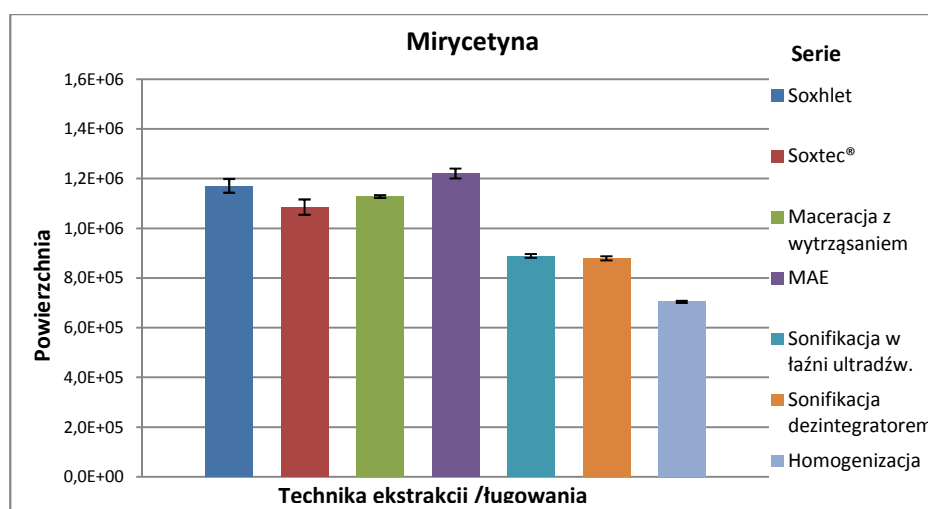
Rys.25. Porównanie efektywności ekstrakcji / ługowania substancji sklasyfikowanych w grupie 5, z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* z wykorzystaniem wybranych technik izolacji, takich jak: Soxhlet, Soxtec®, maceracja z jednoczesnym wytrząsaniem, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej, sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, w optymalnych warunkach prowadzenia operacji ekstrakcji dla każdej z technik.



Rys.26. Porównanie efektywności ekstrakcji / ługowania kwercetyny, z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* z wykorzystaniem wybranych technik izolacji, takich jak: Soxhlet, Soxtec®, maceracja z jednoczesnym wytrząsaniem, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej, sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, w optymalnych warunkach prowadzenia operacji ekstrakcji dla każdej z technik.



Rys.27. Porównanie efektywności ekstrakcji / ługowania substancji sklasyfikowanych w grupie 6, z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* z wykorzystaniem wybranych technik izolacji, takich jak: Soxhlet, Soxtec®, maceracja z jednoczesnym wytrząsaniem, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej, sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, w optymalnych warunkach prowadzenia operacji ekstrakcji dla każdej z technik.



Rys.28. Porównanie efektywności ekstrakcji / ługowania mirycetyny, z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* z wykorzystaniem wybranych technik izolacji, takich jak: Soxhlet, Soxtec®, maceracja z jednoczesnym wytrząsaniem, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej, sonifikacja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego, w optymalnych warunkach prowadzenia operacji ekstrakcji dla każdej z technik.

Z diagramów przedstawionych na rysunkach 20-28 wynika, że technika ekstrakcji w aparacie Soxhleeta, jak i jej zautomatyzowana wersja typu Soxtec®, pozwala osiągnąć bardzo podobne zawartości wyekstrahowanych substancji z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*. Jednakże, należy zaznaczyć, że biorąc pod uwagę czas trwania operacji ekstrakcji z zastosowaniem tychże dwóch technik, to ekstrakcja w aparacie typu Soxtec® jest znacznie efektywniejsza, gdyż optymalny czas ekstrakcji w aparacie Soxtec® trwa tylko godzinę, a nie 15 godzin, jak w przypadku ekstrakcji w aparacie Soxhleeta.

Analizując wyniki pod względem najwyższych zawartości wyekstrahowanych metabolitów z materiału roślinnego można stwierdzić, że najwyższą zawartość plumbaginy osiągnięto z zastosowaniem techniki sonifikacji za pomocą deintegratora ultradźwiękowego.

Dla substancji sklasyfikowanych w grupach 1-3 wszystkie techniki dały porównywalne rezultaty wyekstrahowanej zawartości substancji, przez co można stwierdzić, że substancje sklasyfikowane w tychże grupach są dobrze rozpuszczalne w ekstrakcji i szybko ulegają procesowi ekstrakcji z materiału roślinnego.

Najwyższą zawartość kwercetyny oraz substancji z grupy 4 i 5 osiągnięto z zastosowaniem maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem. Niestety czas operacji maceracji z wytrząsaniem to aż 15 godzin. Dlatego bardziej korzystne jest

zastosowanie techniki ekstrakcji wspomaganej mikrofalami. Zawartość substancji z grupy 4 i 5 oraz kwercetyny osiągnięta z wykorzystaniem tej techniki, nie była znacznie niższa niż uzyskana za pomocą maceracji z wytrząsaniem, a należy zaznaczyć, że optymalny czas prowadzenia operacji ekstrakcji za pomocą techniki MAE to 4 min.

Wysoką zawartość wyizolowanych substancji z grupy 6 uzyskano z wykorzystaniem czterech technik: ekstrakcji w aparacie Soxhleta, ekstrakcji w aparacie Soxtec[®], maceracji z wytrząsaniem oraz ekstrakcji wspomaganej mikrofalami. Biorąc pod uwagę optymalny czas prowadzenia operacji ekstrakcji każdej z tych czterech technik, najkorzystniejsze wydaje się stosowanie techniki MAE.

Najwyższą zawartość mirycetyny wyizolowanej z materiału roślinnego uzyskano z zastosowaniem techniki MAE, co uwzględniając stosunkowo wysoką polarność tego związku wydaje się całkowicie zrozumiałe.

Podsumowując wyniki badań nad efektywnością ekstrakcji / ługowania metabolitów z materiału roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula* za pomocą wybranych technik można stwierdzić, że biorąc za miarę efektywności ekstrakcji ilość wyekstrahowanego metabolitu oraz czas trwania operacji, techniką optymalną do izolowania plumbaginy oraz substancji z grup 1-3 (związki stosunkowo mało polarne) z materiału roślin mięsożernych jest ekstrakcja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego (UAE). Technika ekstrakcji / ługowania optymalna dla substancji z grupy 4-6 oraz dla flawonoidów- kwercetyny i mirycetyny (związki stosunkowo polarne), to ekstrakcja za pomocą mikrofal (MAE).

7.2. BADANIA WPŁYWU RODZAJU KWASU JAKO DODATKU DO ELUENTU NA ROZDZIELANIE FLAWONOIDÓW W ODWRÓCONYM UKŁADZIE FAZ

Celem tego etapu badań było zbadanie wpływu wybranych kwasów, będących dodatkiem do eluentu, na rozdzielanie w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) flawonoidów, zawartych w metanolowych ekstraktach roślin mięsożernych.

W przypadku gdy w próbce ekstraktu roślinnego zawarte są związki chemiczne o charakterze słabych kwasów, istnieje konieczność zastosowania, w odwróconym układzie faz, dodatkowego składnika eluentu, takiego jak kwas lub zasada. Dodatek kwasu do eluentu powoduje „cofnięcie” dysocjacji elektrolitycznej substancji o charakterze kwaśnym w fazie ruchomej oraz zwiększenie hydrofobowości fazy ruchomej. Kwas zmniejsza również asymetrię pików chromatograficznych. pH eluentu powinno być niższe od pKa najbardziej kwaśnego składnika rozdzielanego ekstraktu oraz wyższe od najniższej wartości „bezpiecznej” dla fazy stacjonarnej w kolumnie chromatograficznej. Podobną funkcję pełni dodatek zasadowego składnika do eluentu (np. trietyloaminy) wobec substancji rozdzielanych o charakterze zasad organicznych. Dodatkową funkcją kwasu dodawanego do eluentu w warunkach odwróconego układu faz jest solwatacja grup funkcyjnych o charakterze elektrono dodatnim. Najczęściej stosuje się takie kwasy jak siarkowy (VI), solny, octowy, trifluoroctowy lub ortofosforowy [76].

7.2.1. Wyniki badań nad wpływem rodzaju kwasu jako dodatku do eluentu na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz

Po zakończeniu procesu chromatograficznego rozdzielania mieszaniny wzorców flawonoidów, uzyskano chromatogramy, na podstawie których obliczono parametry takie jak: liczba pól teoretycznych (N), asymetria pików w połowie wysokości ($As_{0,5}$), współczynnik asymetrii wyznaczony na poziomie 10% wysokości pików ($As_{0,1}$), czas retencji (t_r) i współczynnik retencji (k). W tabeli 13 i 14 zestawiono odpowiednio dla kwercetyny oraz mirycetyny wartości poszczególnych parametrów chromatograficznych. Wyznaczone wartości wybranych parametrów pozwoliły na określenie wpływu poszczególnych kwasów, zastosowanych jako dodatek do eluentu, na rozdzielanie kwercetyny i mirycetyny.

Tabela 13. Zestawienie wartości parametrów: liczba pólk teoretycznych (N), asymetria pików w połowie wysokości ($As_{0,5}$), współczynnik asymetrii wyznaczony na poziomie 10% wysokości pików ($As_{0,1}$), czas retencji (t_r) i współczynnik retencji (k), uzyskanych z zastosowaniem różnych kwasów jako dodatków do eluentu, przy rozdzielaniu kwercetyny, w odwróconym układzie faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Lp.	Rodzaj kwasu	N	$As_{0,5}$	$As_{0,1}$	t_r		k	
1	H_3PO_4	13223,13	1	2	9,09	9,035	3,59	3,56
		10975,45	1	1,57	8,98		3,53	
2	HCl	6211,75	1,2	1,86	9,31	9,285	3,70	3,69
		6113,29	1,08	1,86	9,26		3,68	
3	H_2SO_4	13495,29	1	1,6	9,15	9,15	3,62	3,62
		13295,98	1	1,43	9,15		3,62	
4	CH_3COOH	7157,77	1,5	2	10,30	10,295	4,20	4,195
		7179,75	1,5	1,75	10,29		4,19	
5	TFA	5025,44	1,5	2,2	9,18	9,21	3,64	3,65
		5190,74	1,5	1,86	9,23		3,66	

Tabela 14. Zestawienie wartości parametrów: liczba pólk teoretycznych (N), asymetria pików w połowie wysokości ($As_{0,5}$), współczynnik asymetrii wyznaczony na poziomie 10% wysokości pików ($As_{0,1}$), czas retencji (t_r) i współczynnik retencji (k), uzyskanych z zastosowaniem różnych kwasów jako dodatków do eluentu, przy rozdzielaniu mirycetyny, w odwróconym układzie faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Lp.	Rodzaj kwasu	N	$As_{0,5}$	$As_{0,1}$	t_r		k	
1	H_3PO_4	6872,055	1,5	2	5,04	5,03	1,55	1,54
		7739,81	1,5	2,16	5,02		1,53	
2	HCl	4198,1	1,33	2,2	5,25	5,21	1,65	1,625
		4142,73	0,9	1,66	5,16		1,60	
3	H_2SO_4	11620,13	1	1,6	5,08	5,08	1,57	1,57
		10816,91	0,99	1,5	5,08		1,57	
4	CH_3COOH	6342,57	1,5	1,85	5,65	5,64	1,85	1,845
		5944,16	1,5	2	5,63		1,84	
5	TFA	4193,40	1	2,5	5,18	5,20	1,61	1,62
		4535,46	2	2,2	5,21		1,63	

Chromatogramy z analiz roztworów wzorców kwercetyny i mirycetyny, z których obliczono poszczególne parametry charakteryzujące wpływ rodzaju kwasu, jako dodatku do eluentu, na rozdzielanie flawonoidów, w odwróconym układzie faz przedstawiono w załączniku 7.

Z danych zestawionych w tabelach 13 oraz 14 można stwierdzić, że biorąc pod uwagę asymetrię piku oraz liczbę pólk teoretycznych dla kwercetyny jak i mirycetyny najlepszym modyfikatorem fazy ruchomej okazał się kwas siarkowy.

Z kolei zaobserwowano zdecydowanie większy czas retencji oraz współczynnik retencji flawonoidów przy zastosowaniu kwasu octowego, jako dodatku do eluentu. Oznacza to, że obecność metylowych grup funkcyjnych w kwasie octowym i efekt solwatacji wpływa na wzrost hydrofobowości rozdzielanych solwatów. Piki analizowanych flawonoidów przy użyciu fazy ruchomej, w skład której wchodził kwas octowy, cechuje większe rozmycie (dyspersja) oraz większa asymetria niż w przypadku analiz z wykorzystaniem kwasu siarkowego. Jest to spowodowane tym, że kwas octowy tworzy większe solwaty, niż kwas siarkowy, przez co rośnie wartość współczynnika dyfuzji.

Zastosowanie kwasu trifluorooctowego (TFA), który jak można zauważyć w literaturze jest obecnie najczęściej stosowanym modyfikatorem fazy ruchomej w RP-HPLC, nie jest korzystne. Wyniki wskazują, że liczba pólk teoretycznych jest stosunkowo mała w porównaniu do liczby pólk teoretycznych uzyskanych z zastosowaniem kwasu siarkowego. Wartość współczynnika asymetrii $As_{0,5}$ oraz $As_{0,1}$ pików kwercetyny i mirycetyny, w analizach przy zastosowaniu TFA jest dość duża, co także może niekorzystnie wpływać na proces ich rozdzielania i oznaczania w ekstraktach roślinnych. Czas retencji i współczynnik retencji także nie są wartościami zadowalającymi w porównaniu do wyników jakie uzyskano dla kwasu octowego.

Biorąc pod uwagę wnioski, z przeprowadzonych badań nad wpływem rodzaju kwasu, jako dodatku do eluntu, na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz, zdecydowano iż najkorzystniejsze jest stosowanie w dalszych badaniach dwóch kwasów, siarkowego i octowego.

W badaniach nad rozdzielaniem, oznaczaniem i identyfikacją metabolitów zawartych w materiale roślin mięsożernych zdecydowano się na stosowanie kwasu siarkowego.

W badaniach nad opracowaniem warunków rozdzielania i izolacji metabolitów z materiału roślin mięsożernych, podjęto decyzję o stosowaniu kwasu octowego. Kwas octowy jest kwasem dużo słabszym od kwasu siarkowego, a przede wszystkim jest bardziej lotny, co umożliwia łatwiejsze usunięcie go, z otrzymanych po procesie chromatograficznym w skali preparatywnej frakcji, bogatych w poszczególne metabolity.

7.3. BADANIA NAD DOBOREM SELEKTYWNYCH SKŁADNIKÓW ELUENTU DO ROZDZIELANIA METABOLITÓW Z EKSTRAKTÓW METANOLOWYCH ROŚLIN MIĘSOŻERNYCH ZA POMOCĄ CIENKOWARSTWOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (TLC)

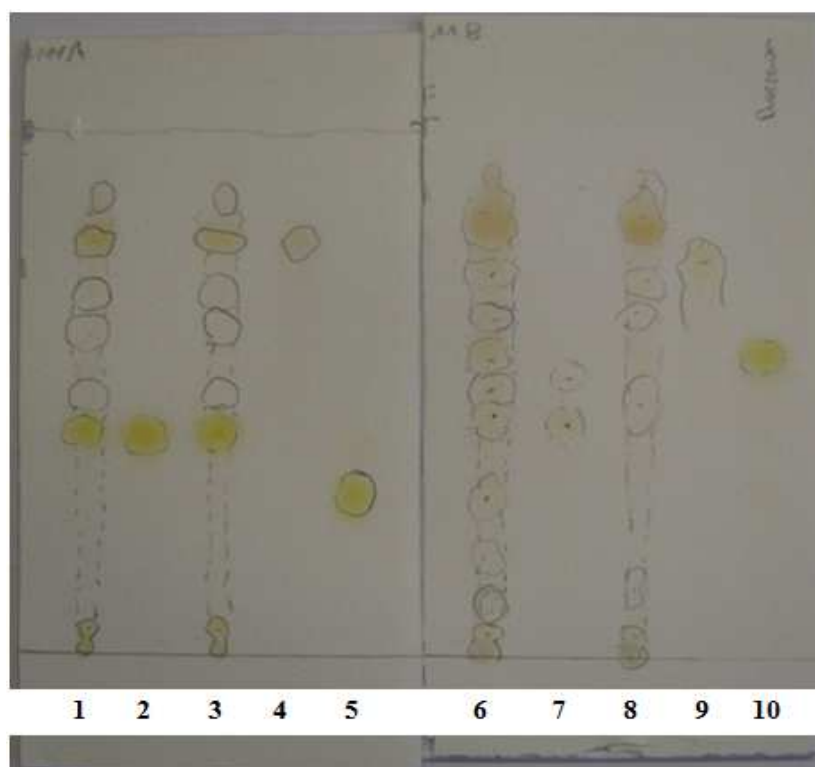
Realizując niniejsze badania, postawiono za cel dokonanie wyboru najbardziej korzystnych składników eluentów, będących częścią układu chromatograficznego, służącego rozdzielaniu i identyfikacji składników ekstraktów roślinnych w normalnym i odwróconym układzie faz.

Do realizacji tego celu wykorzystano technikę cienkowarstwowej chromatografii cieczonej (TLC), co pozwoliło w sposób względnie łatwy i szybki efektywnie zbadać wpływ rozpuszczalników organicznych na selektywność rozdzielania. Dodatkowo, w istotny sposób został zredukowany czas wykonywania badań oraz ilość zużywanych rozpuszczalników. Jednocześnie należy mieć świadomość, że w związku z efektem demiksji oraz niecałkowitego nasycenia komory rozwijania chromatogramów TLC, parami składników eluentu, przenoszenie parametrów retencji z warunków chromatografii cienkowarstwowej do kolumnowej może nie być całkowicie dokładne.

7.3.1. Wyniki badań nad doбором selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych za pomocą RP-TLC

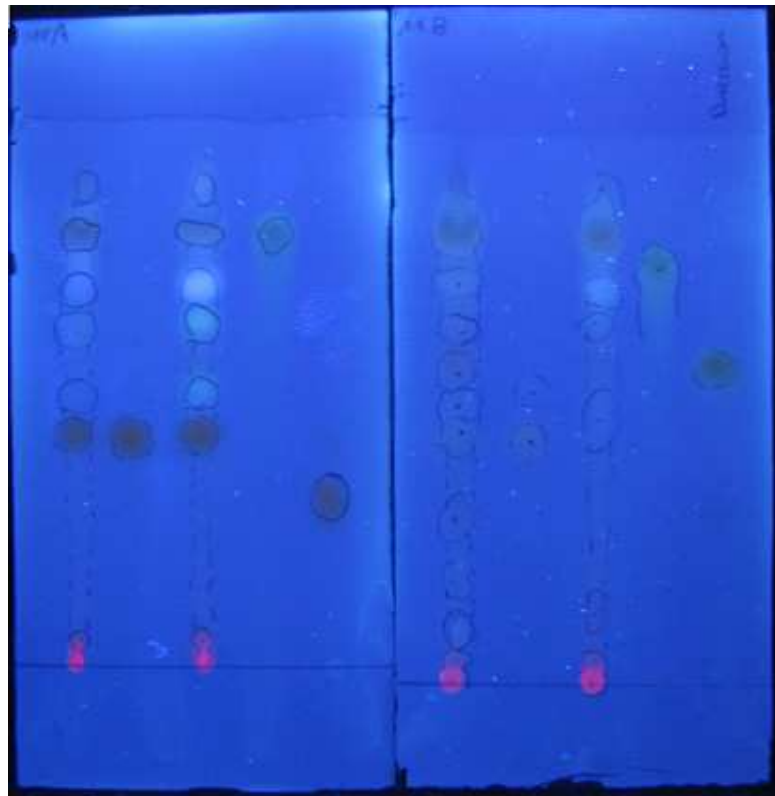
Na podstawie przeprowadzonych analiz metanolowych ekstraktów, uzyskanych z roślin z gatunków *D. aliciae*, *D. capensis*, *D. muscipula*, *D. binata*, za pomocą chromatografii planarnej w odwróconych układach faz, obliczono wartości współczynników opóźnienia hR_f dla każdego składnika ekstraktów, rozdzielonego z zastosowaniem jako eluentu mieszanin wody, w różnych proporcjach z wybranymi rozpuszczalnikami organicznymi.

Przykład reprezentatywnego zestawienia cienkowarstwowych chromatogramów przedstawiono na rysunkach 29, 29a, 29b. W tabeli 15 przedstawiono zestawienie współczynników opóźnienia hR_f dla rozdzielonych składników ekstraktu metanolowego roślin mięsożernych. Pozostałe chromatogramy cienkowarstwowe wraz z tabelami, zawierającymi zestawienie współczynników hR_f , zamieszczono w załączniku 1.

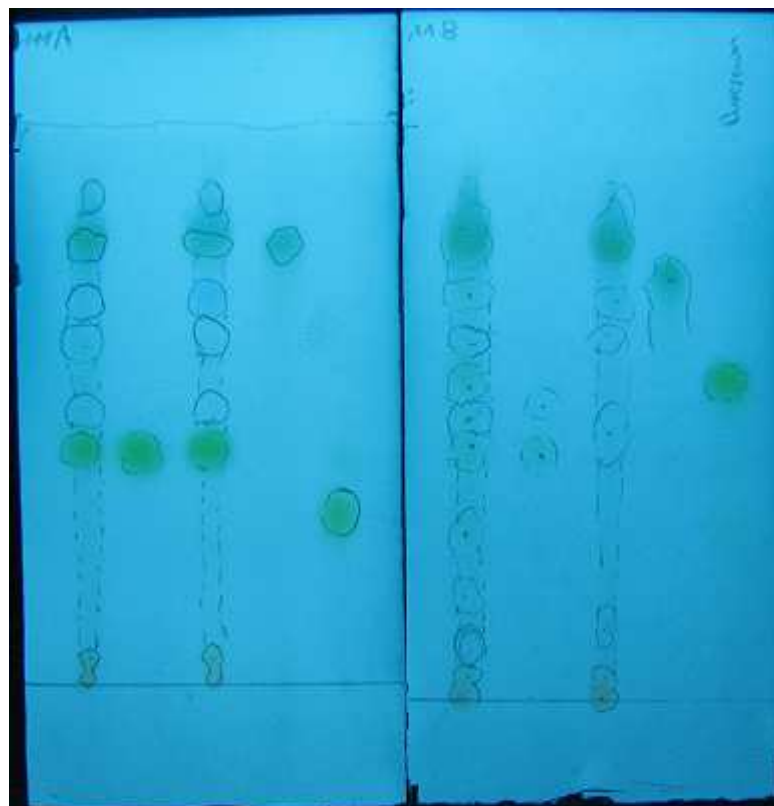


Rys 29. Przykład cienkowarstwowego chromatogramu, w świetle widzialnym, rozwiniętego w układzie chromatograficznym: faza stacjonarna- żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi (RP 18) oraz faza ruchoma- IzPrOH : H₂O w stosunku objętościowym 65:35 z dodatkiem H₂SO₄ do pH=3; Numery od 1 do 10 na chromatogramie dotyczą analizowanych ekstraktów bądź wzorców wybranych metabolitów, nakładanych na linię startową. Numerom odpowiadają: 1. ekstrakt z *D. muscipula*, 2. plumbagina, 3. ekstrakt z *D. binata*, 4. mirycetyna, 5. chloroplumbagina, 6. ekstrakt z *D. aliciae*, 7. ramentaceon, 8. ekstrakt z *D. capensis*, 9. kwercetyna, 10. droseron.

Kolejne chromatogramy cienkowarstwowe, na których nie zamieszczono numeracji, posiadają taką samą kolejność nałożenia próbek badanych ekstraktów i wzorców wybranych metabolitów.



Rys. 29 a. Przykład chromatogramu jak na rys. 29., widoczny w świetle o długości fali 365 nm.



Rys. 29b. Przykład chromatogramu jak na rys. 29., widoczny w świetle o długości fali 254 nm.

Tabela 15. Zestawienie wartości współczynników opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: IzPrOH : H₂O w stosunku objętościowym 65:35 z dodatkiem H₂SO₄ do pH=3

Płytki 11A			Płytki 11B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1	x	4,29	6.1	x	4,23
1.2	x	42,86	6.2	x	9,86
1.3	x	50,00	6.3	x	18,31
1.4	x	61,43	6.4	x	29,58
1.5	x	68,57	6.5	x	45,07
1.6	x	78,57	6.6		49,30
1.7	x	87,14	6.7	x	54,93
2	plumbagina	42,86	6.8	x	63,38
3.1	x	4,9	6.9	x	70,42
3.2	x	42,86	6.10	x	81,69
3.3	x	50,00	7.	ramentaceon	45,07
3.4	x	61,43	8.1	x	4,23
3.5	x	68,57	8.2	x	12,68
3.6	x	78,57	8.3	x	47,89
3.7	x	87,14	8.4	x	63,38
4.	mirycetyna	78,57	8.5	x	70,42
5.	chloroplumbagina	31,43	8.6	x	81,69
			9.	kwercecytna	74,65
			10.	droseron	56,34

Plamki naftochinonów (plamki 2, 5, 7, 10), w świetle widzialnym posiadają barwę żółtą, przy długości fali 365 nm wykazują czerwono-różową fluorescencję, a przy długości fali 254 nm wykazują fluorescencję żółto-zieloną. Plamki flawonoidów: mirycetyny i kwercecytny (plamki 4 i 9) w świetle widzialnym są koloru pomarańczowego, przy długości fali 365 nm wykazują żółtą fluorescencję, a przy długości fali 254 nm wykazują fluorescencję błękitno-szarą.

Zastosowanie wodnych mieszanin metanolu o składzie MeOH : H₂O 75 : 25 v/v i 50 : 50 v/v, zakwaszonych kwasem siarkowym do pH=3, doprowadziło do rozdzielania dużej ilości składników ekstraktów roślinnych. Natomiast, eluent o składzie MeOH : H₂O 25 : 75 v/v + H₂SO₄ do pH=3 posiadał zbyt małą siłę

elucyjną i składniki ekstraktów, w większości pozostały na linii startowej lub w jej pobliżu. Eluenty o składzie MeOH : H₂O 75 : 25 v/v i 50:50 v/v zakwaszone kwasem siarkowym do pH=3 wpływały selektywnie na rozdzielanie flawonoidów względem siebie, największą ilość rozdzielonych składników ekstraktów zaobserwowano przy zastosowaniu eluentu o składzie MeOH : H₂O 75 : 25 v/v + H₂SO₄ do pH=3.

Wykorzystanie wodnych mieszanin izopropanolu zakwaszonych kwasem siarkowym do pH=3 pozwoliło zaobserwować największą ilość rozdzielonych substancji z ekstraktów roślin mięsożernych. Eluent IzPrOH: H₂O 42 : 58 v/v + H₂SO₄ do pH=3 odznaczał się odpowiednią siłą elucji, a także pozwolił uzyskać rozdzielanie chloroplumbaginy i droseronu z spośród składników ekstraktu *Drosera aliciae*. Eluent, o większej sile elucyjnej lepiej wypłynął na rozdzielanie chloroplumbaginy i droseronu, natomiast mało selektywnie na rozdzielanie flawonoidów zawartych w ekstraktach.

Wodna mieszanina acetonitrylu ACN : H₂O 65 : 35 v/v + H₂SO₄ do pH=3 pozwoliła selektywnie rozdzielić mirycetynę i kwercetynę, jednakże pozostałe substancje zawarte w ekstraktach zostały rozdzielone mało selektywnie.

W badaniach z zastosowaniem mieszaniny wody i tetrahydrofuranu uzyskano dużą ilość rozdzielonych substancji zawartych w ekstraktach roślinnych, a także widoczne było 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, pojawiają się substancje poniżej plamki chloroplumbaginy, które są niewidoczne przy rozdzielaniu składników ekstraktów, z zastosowaniem innych wodnych roztworów rozpuszczalników organicznych. Rozdzielenie flawonoidów z zastosowaniem THF-u odznacza się małą selektywnością, o czym świadczy mała różnica w wartościach współczynnika hRf.

Badania, z zastosowaniem dioksanu jako organicznego składnika eluentu pokazują, że eluent ten niezależnie od zawartości rozpuszczalnika organicznego odznacza się niewielką przydatnością do rozdzielania składników ekstraktów roślin mięsożernych. Rozdzieleniu ulega mała ilość składników, ponadto substancje rozdzielone są mało selektywnie.

Podsumowując, badania metanолоwych ekstraktów roślin mięsożernych 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, oznaczenia i identyfikacji wszystkich składników ekstraktów. Składnikami eluentu powinny być następujące rozpuszczalniki:

- izopropanol, gdyż przy zastosowaniu tego rozpuszczalnika rozdzielaniu ulega największa ilość substancji z ekstraktów roślinnych, jednakże mało selektywnie rozdziela on flawonoidy,
- metanol, ponieważ wpływa na selektywne rozdzielanie flawonoidów: mirycetyny i kwercetyny,
- tetrahydrofuran, gdyż jego obecność w eluencie powoduje selektywne rozdzielanie chloroplumbaginy i droseronu w większości badanych ekstraktów.

Badania, z wykorzystaniem chromatografii planarnej wskazują, iż do rozdzielania i oznaczania składników ekstraktów z roślin mięsożernych, należy wykorzystać elucję gradientową, ze względu na liczną ilość składników ekstraktów o bardzo zróżnicowanej hydrofobowości. Jej program powinien się rozpoczynać od wysokiej zawartości wody i niskiego stężenia składników organicznych, a następnie powinien przebiegać liniowy wzrost stężenia składników organicznych w eluencie. Po uzyskaniu rozdzielania większości składników próbki, program elucji powinien jeszcze przebiegać izokratycznie z największą siłą elucyjną, w celu wyeluowania z kolumny substancji silnie związanych z powierzchnią wypełnienia. Dodatkowo możliwe jest zastosowanie przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie, w celu całkowitego oczyszczenia kolumny, po zakończeniu rozdzielania składników ekstraktów roślinnych.

7.3.2. Wyniki badań nad doбором selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych za pomocą NP-TLC

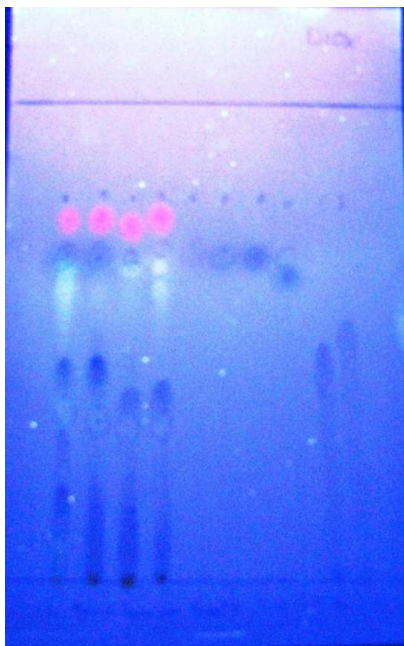
Na podstawie przeprowadzonych analiz rozdzielania składników metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych, za pomocą chromatografii planarnej w układzie faz normalnych, obliczono wartości współczynników opóźnienia R_f dla każdego składnika ekstraktu, rozdzielonego z zastosowaniem różnych rozpuszczalników organicznych, będących fazą ruchomą.

Przykład reprezentatywnego zestawienia cienkowarstwowych chromatogramów przedstawiono na rysunkach 30, 30a, 30b. W tabeli 16 przedstawiono zestawienie współczynników opóźnienia R_f dla rozdzielonych składników metanolowego ekstraktu roślin mięsożernych. W załączniku 2 przedstawiono pozostałe chromatogramy cienkowarstwowe, uzyskane z zastosowaniem rozpuszczalników takich jak: formamid, chloroform, chlorek metylenu, eter metylotetrbutylowy, tetrahydrofuran, dioksan oraz izopropanol. W tabelach pod chromatogramami zestawiono także wartości współczynników opóźnienia R_f dla każdego składnika ekstraktu, rozdzielonego z zastosowaniem różnych rozpuszczalników organicznych.

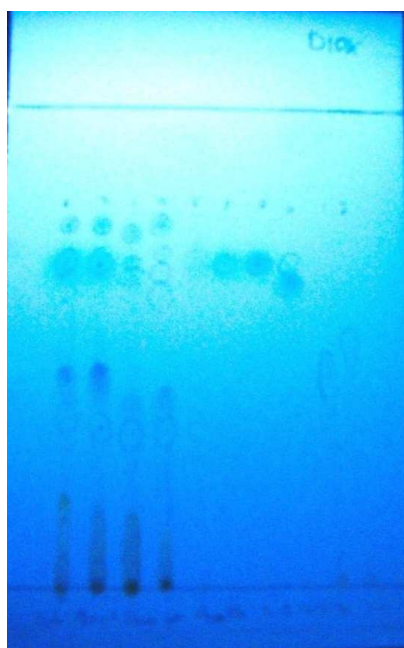


Rys. 30. Przykład chromatogramu cienkowarstwowego, w świetle widzialnym, rozwiniętego w układzie chromatograficznym: faza stacjonarna- żel krzemionkowy Si60 F₂₅₄, eluent- 100% dioksan. Kolejność nałożenia plamek: 1. *D. binata*, 2. *D. muscipula*, 3. *D. aliciae*, 4. *D. capensis*, 5. ramentaceon, 6. plumbagina, 7. chloroplumbagina, 8. droseron, 9. mirycetyna, 10. kwercetyna

Kolejne chromatogramy cienkowarstwowe, na których nie zamieszczono numeracji, posiadają taką samą kolejność nałożenia próbek badanych ekstraktów i wzorców wybranych metabolitów.



Rys. 30a. Przykład chromatogramu jak na rys. 30., widocznego w świetle o długości fali 365 nm.



Rys. 30b. Przykład chromatogramu, jak na rys. 30., widocznego w świetle o długości fali 254 nm.

Tabela 16. Zestawienie wartości współczynników opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w fazie ruchomej – 100% dioksan.

Nazwa metabolite/ substancja	<i>D. muscipula</i>	<i>D. aliciae</i>	<i>D. capensis</i>	<i>D. binata</i>	Wzorce
	hR _f	hR _f	hR _f	hR _f	hR _f
1	77,39	71,77	73,17	x	x
chloroplumbagina	65,32	x	x	x	66,4
ramentaceon	x	67,53	67,53	x	67,2
2	x	35,48	59,68	x	x
plumbagina	65,32	x	x	65,32	66,4
3	42,74	x	x	x	x
droseron	x	x	x	57,26	57,26
4	x	x	x	42,74	x
kwercetyna	x	0	0	0	51,2
mirycetyna	x	0	0	0	46,4

W wyniku otrzymanych chromatogramów cienkowarstwowych, w normalnych układach faz z zastosowaniem wybranych rozpuszczalników jako faza ruchoma, sformuowano następujące wnioski.

W przypadku zastosowania jako fazy ruchomej izopropanolu oraz octanu etylu zaobserwowano, iż rozdzielaniu uległo najwięcej składników ekstraktów roślinnych. Jednakże różnice pomiędzy wartościami współczynników opóźnienia hR_f dla poszczególnych składników ekstraktów roślinnych przy zastosowaniu izopropanolu są mniejsze. Należy także zaznaczyć, że na chromatogramach uzyskanych z zastosowaniem izopropanolu oraz octanu etylu widoczne jest zjawisko „ogonowania” plamek odpowiadającym flawonoidom.

Zastosowanie tetrahydrofuranu oraz dioksanu jako fazy ruchomej pozwala uzyskać rozdzielanie podobnej ilości składników z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych, lecz jest ona mniejsza niż przy wykorzystaniu podczas rozdzielania składników ekstraktów izopropanolu bądź octanu etylu. Zastosowanie dioksanu podczas rozdzielania ekstraktów roślinnych pozwala otrzymać większe, w porównaniu do rozdzielania z wykorzystaniem THF-u, różnice wartości współczynników hR_f pomiędzy poszczególnymi składnikami, a szczególnie pomiędzy flawonoidami.

MTBE spowodował stosunkowo dobre rozdzielanie składników ekstraktu, dodatkowo chloroplumbagina i hydroksyplumbagina posiadają znacznie różniące się długości drogi migracji. Podobnie jak w przypadku wykorzystania izopropanolu

i octanu etylu do rozdzielania składników ekstraktów można zauważyć zjawisko „ogonowania” plamek kwercetyny i mirycetyny.

Chlorek metylenu wykazał dość dobre zdolności rozdzielania składników ekstraktów roślinnych, biorąc pod uwagę różnicę w wartościach hR_f dla poszczególnych substancji. Jednak ilość rozdzielonych składników nie jest zadowalająca.

Chloroform wykazał bardzo małą przydatność do rozdzielania składników ekstraktów z roślin owadożernych, gdyż ilość rozdzielonych substancji była najmniejsza. Wartość współczynnika R_f dla flawonoidów przy zastosowaniu chloroformu wyniósł zero, co świadczy o tym, że w ogóle nie „ruszyły” one z miejsca zadozowania próbek wzorców flawonoidów oraz ekstraktów z roślin.

Badania z zastosowaniem formamidu jako fazy ruchomej wykazały, że posiada on zbyt dużą siłę elucji, o czym świadczy to, iż wszystkie składniki naniesionych próbek podążyły wraz z czołem fazy ruchomej. Dlatego nie można było wyznaczyć drogi migracji poszczególnych składników, a co za tym idzie współczynników hR_f .

Wykonane badania w normalnych układach faz chromatografii cienkowarstwowej z wykorzystaniem eluentów jednoskładnikowych wykazały, że rozpuszczalniki, które powinny być użyte w dalszym etapie badań nad optymalnym składem eluentu do rozdzielania, oznaczania i identyfikacji składników metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych, to:

- octan etylu lub izopropanol, gdyż z zastosowaniem tych rozpuszczalników rozdzielaniu uległo najwięcej składników ekstraktów roślinnych. Jednakże, ze względu na to, iż izopropanol wykazuje wyższą lepkość, niż octan etylu, co zwiększy opory przepływu na wlocie do kolumny chromatograficznej, zalecane jest zastosowanie octanu etylu,
- eter t-butylo-metylowy (MTBE), ponieważ spowodował stosunkowo dobre rozdzielanie składników ekstraktu, a dodatkowo chloroplumbagina oraz hydroksyplumbagina wykazały znacznie różniące się długości drogi migracji.

7.4. BADANIA NAD OPTYMALIZACJĄ WARUNKÓW ROZDZIELANIA OZNACZANIA I IDENTYFIKACJI WYBRANYCH METABOLITÓW W METANOLOWYCH EKSTRAKTACH Z ROŚLIN MIĘSOŻERNYCH Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI RP-HPLC ORAZ ELUCJI GRADIENTOWEJ

Metanolowe ekstrakty z roślin mięsożernych charakteryzują się bardzo bogatym składem. Zawierają one zarówno dość mało polarne naftochinony, jak również względnie polarne flawonoidy. Badania składu takich ekstraktów wymagają umiejętności rozdzielania jednocześnie wielu różnych grup związków chemicznych od nisko- i średnio- do wysoko-polarnych. Wymaga to w warunkach odwróconego układu faz stosowania elucji gradientowej. Pozwala ona na optymalizację warunków rozdzielania, oznaczania i identyfikacji składników mieszanin substancji, o istotnie różniących się właściwościach retencji, pod względem czasu i kosztów procesu.

Celem tego etapu badań było opracowanie metodyki umożliwiającej jednoczesne rozdzielanie, oznaczanie i identyfikację składników, zawartych w czterech ekstraktach z roślin owadożernych, w szczególności flawonoidów i naftochinonów.

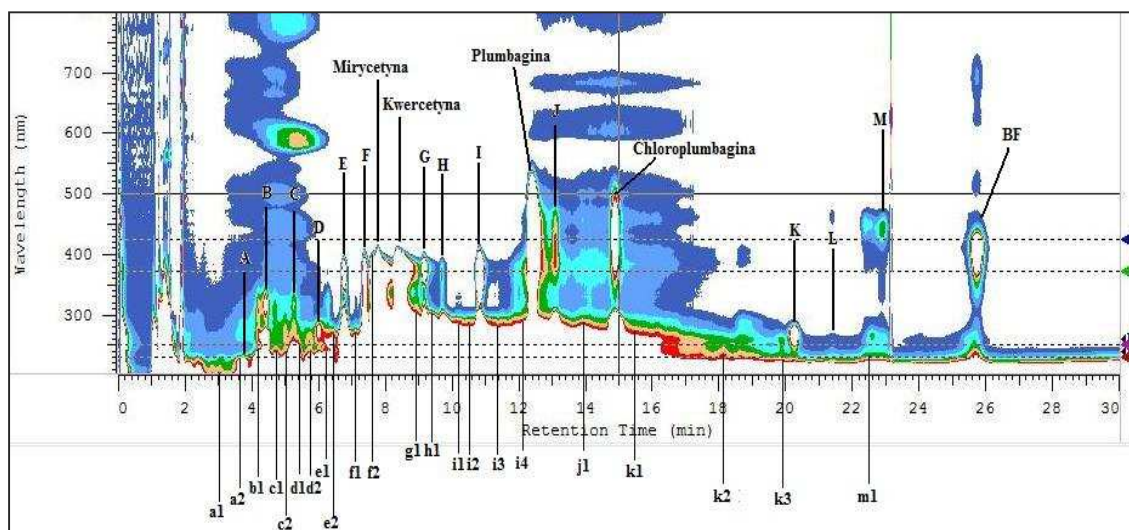
W pierwszym etapie badań dobierano optymalne warunki chromatograficzne w celu rozdzielania i oznaczenia składników ekstraktów z roślin *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae*. Etap ten, wykonano w celu potwierdzenia wyników uzyskanych z zastosowaniem chromatografii cienkowsarstwowej, w warunkach elucji w kolumnie.

Następnie w drugiej części badań, z zastosowaniem optymalnego układu chromatograficznego oraz programu elucji podjęto próbę rozdzielania i identyfikacji maksymalnej ilości składników zawartych w czterech ekstraktach z roślin *Dionaea muscipula*, *Drosera aliciae*, *Drosera binata*, *Drosera capensis*.

Na podstawie wyników badań nad doбором selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych za pomocą RP-TLC (rozdz. 7.3.1.) opracowano składy eluentów dwuskładnikowych oraz program elucji (tabela 8. rozdz. 6.3.8.) z zastosowaniem, którego rozdzielano i oznaczano składniki ekstraktów z roślin *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae*.

Przykładowe zestawienie wyznaczonych danych dla eluentu, którego składnikiem organicznym (B) był izopropanol przedstawiają tabele 17 i 18. Tabela 17 zawiera dane dla składników ekstraktu z *Dionaea muscipula*, natomiast tabela 18 przedstawia dane dla składników ekstraktu z *Drosera aliciae*. Chromatogramy oraz tabele dla pozostałych eluentów zawiera załącznik 3.

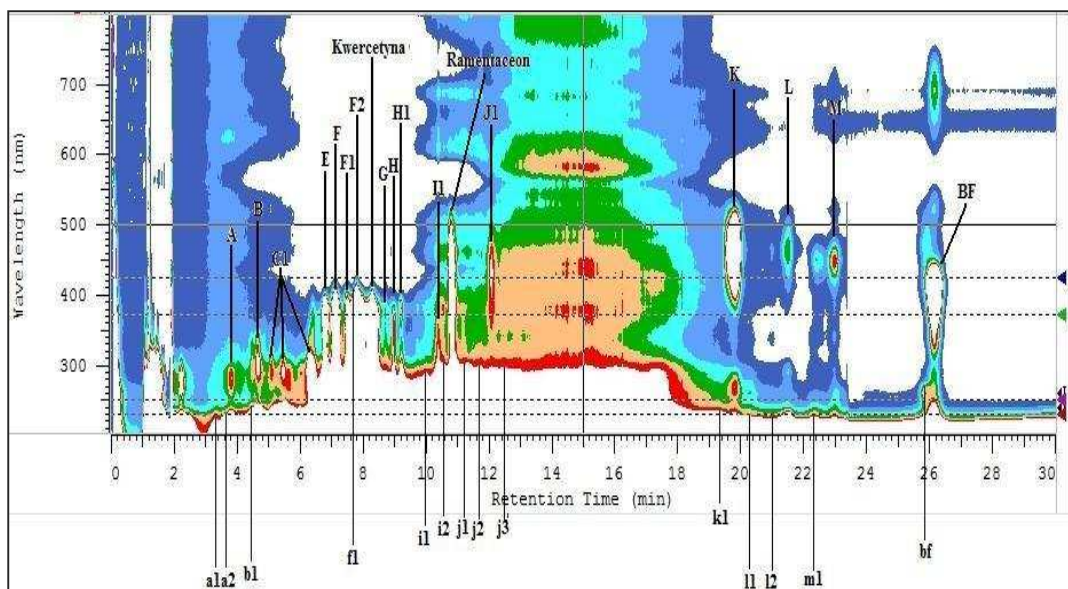
W tabeli 19 i 20 przedstawiono zestawienie substancji, które powtarzały się w badanych ekstraktach. Identyfikacje substancji na chromatogramach przeprowadzono na podstawie zebranych widm spektralnych, które znajdują się w załączniku 4.



Rys. 31. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymany z wykorzystaniem detektora UV-DAD, podczas rozdzielania próbki ekstraktu roślinnego z muchówki amerykańskiej (*Dionaea muscipula*) dozowanej w metanolu. Kolumna: Lichrospher 100 RP 18e, 125 x 4 mm, 5 μ m; Eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3, B: IzPrOH; przepływ 1 ml/min; temperatura 20⁰C; objętość dozowanej próbki 20 μ l; przełączenie zaworu elucji wstecznej w kolumnie ok. 23 min.

Tabela 17. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Dionaea muscipula*, rozdzielanych w eluencie, którego składnikiem organicznym był izopropanol.

Chromatogram <i>D. muscipula</i> w IzPrOH					
Lp.	Dane Substancja	$t_0=1,05$			
		tr	k	α_1	α_2
1	a1	3,07	1,92		
2	a2	3,59	2,42		
3	A	3,74	2,56		
4	b1	4,21	3,01		
5	B	4,40	3,19		
6	c1	4,71	3,49		
7	c2	5,00	3,76		
8	C	5,22	3,97		
9	d1	5,40	4,14		
10	d2	5,75	4,48		
11	D	6,02	4,73		
12	e1	6,19	4,90		
13	e2	6,43	5,12		
14	E	6,76	5,44		
15	f1	7,10	5,76		
16	F	7,37	6,02		
17	f2	7,63	6,27		
18	mirycetyna	7,78	6,41	1,02	1,08
19	kwercetyna	8,34	6,94	1,08	1,08
20	g1	8,93	7,50		
21	G	9,16	7,72		
22	h1	9,49	8,04		
23	H	9,70	8,24		
24	i1	10,20	8,71		
25	i2	10,44	8,94		
26	I	10,82	9,30		
27	i3	11,29	9,75		
28	i4	12,15	10,57		
29	plumbagina	12,54	10,94	1,04	1,05
30	J	13,10	11,48		
31	j1	13,90	12,24		
32	chloroplumbagina	14,86	13,15	1,07	1,04
33	k1	15,43	13,70		
34	k2	18,14	16,28		
35	k3	19,90	17,95		
36	K	20,26	18,30		
37	L	21,41	19,39		
38	m1	22,39	20,32		
39	M	22,91	20,82		
40	BF	25,71	23,49		



Rys. 32. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymany z wykorzystaniem detektora UV-DAD podczas rozdzielania próbki ekstraktu roślinnego z rośliczki Alicji (*Drosera aliciae*) dozowanej w metanolu. Kolumna: Lichrospher 100 RP18e, 125 x 4 mm, 5 μ m; eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3, B: IzPrOH; przepływ 1ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 μ l; przełączenie zaworu elucji wstecznej w kolumnie ok. 23 min.

Tabela 18. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Drosera aliciae* rozdzielanych w eluencie, którego składnikiem organicznym był izopropanol.

Chromatogram <i>D. aliciae</i> w IzPrOH					
Dane		$t_0=1,05$			
Lp.	Substancja	tr	k	α_1	α_2
1	a1	3,30	2,14		
2	a2	3,60	2,43		
3	A	3,80	2,62		
4	b1	4,46	3,25		
5	B	4,64	3,42		
6	C1	5,10	3,86		
7	C1	5,45	4,19		
8	C1	6,31	5,01		
9	E	6,78	5,46		
10	F	7,11	5,77		
11	F1	7,50	6,14		
12	f1	7,70	6,33		
13	F2	7,80	6,43		
14	kwercetyna	8,30	6,90	1,07	1,06
15	G	8,70	7,29		
16	H	8,96	7,53		
17	H1	9,20	7,76		
18	i1	9,95	8,48		
19	I1	10,38	8,89		
20	i2	10,54	9,04		
21	ramentaceon	10,80	9,29	1,03	1,04
22	j1	11,20	9,67		
23	j2	11,72	10,16		
24	J1	12,07	10,50		
25	j3	12,46	10,87		
26	k1	19,37	17,45		
27	K	19,84	17,90		
28	l1	20,33	18,36		
29	l2	21,00	19,00		
30	L	21,52	19,50		
31	m1	22,30	20,24		
32	M	22,97	20,88		
33	bf	25,82	23,59		
34	BF	26,15	23,90		

Tabela 19. Zestawienie substancji „powtarzających się” w ekstrakcie *Dionaea muscipula* wraz z wyznaczonymi współczynnikami retencji k oraz współczynnikami selektywności α , rozdzielanych z wykorzystaniem programów elucji zamieszczonych w tabeli 8 (rozdział 6.3.8.)

<i>D. muscipula</i> w IzPrOH					<i>D. muscipula</i> w MeOH				
Substancja	tr	k	α_1	α_2	Substancja	tr	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
mirycetyna	7,78	6,41	1,06	1,08	mirycetyna	13,73	12,08	1,05	1,10
kwercetyna	8,34	6,94	1,08	1,34	kwercetyna	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
-	-	-	-	-	I2	16,20	14,43	1,02	1,11
plumbagina	12,54	10,94	1,18	1,05	plumbagina	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	14,86	13,15	1,15	-	chloroplumbagina	20,09	18,13	1,06	-
<i>D. muscipula</i> w THF					<i>D. muscipula</i> w ACN				
Substancja	tr	k	α_1	α_2	Substancja	tr	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	-	-	-	-	-
mirycetyna	10,43	8,93	1,04	1,05	mirycetyna	7,70	6,33	1,05	1,09
kwercetyna	10,94	9,42	1,05	1,15	kwercetyna	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	12,80	11,19	1,03	1,05	plumbagina	14,03	12,36	1,10	1,15
J	13,33	11,70	1,05	1,09	-	-	-	-	-
chloroplumbagina	14,42	12,73	1,09	-	chloroplumbagina	15,92	14,16	1,15	-

Tabela 20. Zestawienie substancji „powtarzających się” w ekstrakcie *Drosera aliciae* wraz z wyznaczonymi współczynnikami retencji k oraz współczynnikami selektywności α , rozdzielanych z wykorzystaniem programów elucji zamieszczonych w tabeli 8 (rozdział 6.3.8.)

<i>D. aliciae</i> w IzPrOH					<i>D. aliciae</i> w MeOH				
Substancja	tr	k	α_1	α_2	Substancja	tr	k	α_1	α_2
-	-	-	-	-	A1	4,04	2,85	-	1,21
A	3,80	2,62	-	1,47	A	4,66	3,44	1,21	2,08
-	-	-	-	-	B z <i>D. aliciae</i>	8,57	7,16	2,08	1,11
C1	5,10	3,86	1,47	1,09	C1	9,37	7,92	1,11	1,18
C1	5,45	4,19	1,09	1,20	C1	10,89	9,37	1,18	1,09
C1	6,31	5,01	1,20	1,09	-	-	-	-	-
E	6,78	5,46	1,09	1,06	-	-	-	-	-
F	7,11	5,77	1,06	1,06	F	12,13	10,55	1,03	1,03
F1	7,50	6,14	1,06	1,05	F1	12,42	10,83	1,03	1,02
F2	7,80	6,43	1,05	1,07	F2	11,81	10,25	1,09	1,03
-	-	-	-	-	I2	12,67	11,07	1,02	1,05
kwercetyna	8,30	6,90	1,07	1,06	mirycetyna	13,20	11,57	1,05	1,05
G	8,70	7,29	1,06	1,07	kwercetyna	13,82	12,16	1,05	1,09
-	-	-	-	-	droseron	14,93	13,22	1,09	1,11
H1	9,20	7,76	1,07	1,20	-	-	-	-	-
ramentaceon	10,80	9,29	1,20	1,13	ramentaceon	16,48	14,70	1,11	1,08
J1	12,07	10,50	1,13	-	J1	17,67	15,83	1,08	-
<i>D. aliciae</i> w THF					<i>D. aliciae</i> w ACN				
Substancja	tr	k	α_1	α_2	Substancja	tr	k	α_1	α_2
-	-	-	-	-	A1	2,95	1,81	-	2,22
A	4,32	3,11	-	1,47	A1	5,27	4,02	2,22	1,06
B z <i>D. aliciae</i>	5,85	4,57	1,47	1,19	B z <i>D. aliciae</i>	5,51	4,25	1,06	1,10
C1	6,74	5,42	1,19	1,06	C1	5,95	4,67	1,10	1,04
C1	7,10	5,76	1,06	1,17	C1	6,17	4,88	1,04	1,03
-	-	-	-	-	C1	6,31	5,01	1,03	1,20
E	8,15	6,76	1,17	1,10	-	-	-	-	-
F	9,55	8,10	1,05	1,05	-	-	-	-	-
F1	8,86	7,44	1,10	1,03	F1	8,24	6,85	1,05	1,32
F3	9,13	7,70	1,03	1,05	F3	7,91	6,53	1,04	1,05
-	-	-	-	-	I2	10,57	9,07	1,32	1,11
mirycetyna	9,98	8,50	1,05	1,05	mirycetyna	7,37	6,02	1,20	1,04
kwercetyna	10,42	8,92	1,05	1,07	kwercetyna	7,65	6,29	1,04	1,04
droseron	11,08	9,55	1,07	1,03	droseron	12,90	11,29	1,12	-
H1	11,43	9,89	1,03	1,03	-	-	-	-	-
ramentaceon	11,72	10,16	1,03	1,07	ramentaceon	11,59	10,04	1,11	1,12
J1	12,51	10,91	1,07	-	-	-	-	-	-

Zastosowanie eluentu do rozdzielania i oznaczania składników ekstraktów z roślin mięsożernych, będącego mieszaniną izopropanolu i wody z dodatkiem H_2SO_4 do $pH=3$, pozwoliło rozdzielić 40 substancji w ekstrakcie *Dionaea muscipula* i 34 w ekstrakcie *Drosera aliciae*. Współczynniki retencji k dla 27-miu zidentyfikowanych substancji z ekstraktu *Dionaea muscipula* mieściły się w optymalnym przedziale od $1 \div 10$. Ponadto, współczynniki retencji wybranych metabolitów z grupy naftochinonów, nieznacznie wykraczały poza ten przedział, $k=10,94$ dla plumbaginy i $k=13,15$ dla chloroplumbaginy. W ekstrakcie *Drosera aliciae* współczynniki retencji k dla 22-wóch substancji mieściły się w optymalnym przedziale, natomiast współczynnik k dla kolejnych trzech substancji odbiegał tylko o nie więcej niż 0,87 od przedziału optymalnego. Dla ekstraktu roślinnego z gatunku *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 otrzymujemy również dobre rozdzielanie od substancji im towarzyszących przy wartości współczynnika k niewiele powyżej 10-ciu. Dla ekstraktu roślinnego z gatunku *Drosera aliciae*, układ chromatograficzny zawierający jako składnik eluentu izopropanol, pozwolił zidentyfikować tylko dwa badane metabolity z grupy naftochinonów oraz flawonoidów i posiadały one współczynniki retencji mniejsze od 10. Należy zaznaczyć, że rozdzielanie ramentaceonu od innych składników ekstraktu w tym układzie chromatograficznym jest najlepsze spośród badanych układów.

Wykorzystanie jako eluentu mieszaniny metanolu i wody z dodatkiem H_2SO_4 do $pH=3$ pozwoliło w ekstrakcie *Dionaea muscipula* zidentyfikować 41 substancji, a w ekstrakcie z *Drosera aliciae* 38 substancji. W tym układzie chromatograficznym tylko 15 współczynników retencji k dla związków zawartych w ekstraktach z *Dionaea muscipula* i z *Drosera aliciae* mieści się w przedziale od $1 \div 10$. Można uznać, że wartości współczynników k dla wybranych flawonoidów nieznacznie wykraczają poza optymalny przedział, a w przypadku naftochinonów wartości współczynników retencji są zbyt duże. Podczas stosowania eluentu, zawierającego metanol i wodę z dodatkiem H_2SO_4 do $pH=3$, rozdzielanie flawonoidów było najlepsze spośród badanych układów.

Badania, w których składnikiem eluentu była mieszanina tetrahydrofuranu i wody z dodatkiem H_2SO_4 do $pH=3$, pozwoliło w ekstrakcie *Dionaea muscipula*

uzyskać rozdzielanie 34-ech substancji, a w ekstrakcie z *Drosera aliciae* 39-ciu. W tym układzie chromatograficznym, dla 18-tu substancji, zawartych w ekstrakcie *Dionaea muscipula* oraz dla 22-wóch substancji, zawartych w ekstrakcie z *Drosera aliciae*, wartości współczynników retencji k mieszczą się w optymalnym przedziale. Dla kolejnych 8-miu składników ekstraktu *Dionaea muscipula* wartość k odbiega tylko o nie więcej niż 2,73, a dla kolejnych 7-miu związków zawartych w ekstrakcie z *Drosera aliciae* wartości k odbiegają tylko o nie więcej niż 1,18 od optymalnego przedziału. Przykładowo, dla plumbaginy zawartej w ekstrakcie metanolem z *Dionaea muscipula* współczynnik k wynosi $k=11,19$, a dla chloroplumbaginy $k=12,73$. Zastosowanie tetrahydrofuranu jako eluentu spowodowało mniej selektywne rozdzielanie badanych związków, niż w układach gdzie organicznym składnikiem eluentu był metanol lub izopropanol.

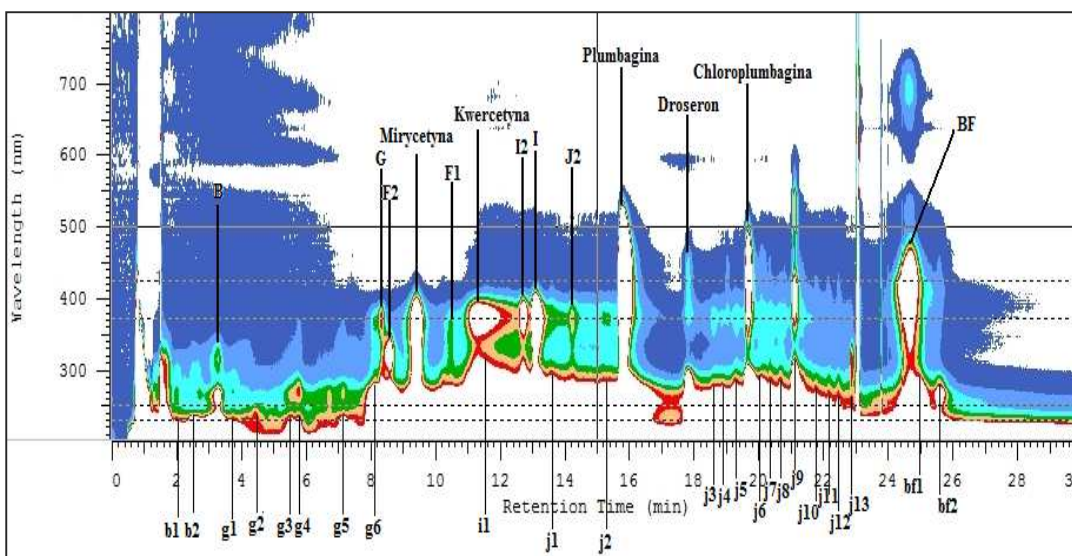
Mieszanka acetonitylu z wodą z dodatkiem H_2SO_4 do $pH=3$ pozwoliła rozdzielić z ekstraktu roślinnego *Dionaea muscipula* 33 składniki, a z ekstraktu *Drosera aliciae* 39. Dla 17-stu składników ekstraktu roślinnego *Dionaea muscipula* wartości współczynników retencji k oraz dla 25-ciu składników ekstraktu *Drosera aliciae*, znajdowały się w odpowiednim przedziale wartości. Wartość współczynnika retencji plumbaginy $k=12,36$ można uznać za nieznacznie odbiegający. W tym układzie, uzyskano najlepsze rozdzielanie kwercetyny od substancji towarzyszących, zawartych w ekstrakcie z *Dionaea muscipula* oraz mirycetyny zawartej w ekstrakcie z *Drosera aliciae* od substancji o mniejszym czasie retencji. Rozdzielenie naftochinonów zawartych w ekstrakcie z *Dionaea muscipula* było selektywne, aczkolwiek wartości współczynników k były znacznie większe niż w przypadku analiz, w których składnikiem eluentu był izopropanol bądź THF. Naftochinony zawarte w ekstrakcie z *Drosera aliciae* zostały rozdzielone mniej selektywnie w porównaniu do eluentu, którego składnikiem organicznym był izopropanol.

Podsumowanie powyższych wyników doprowadziło do stworzenia programu elucji gradientowej (tabela 9 rozdział 6.3.8.), którego eluent zawiera dwa składniki organiczne. Z zastosowaniem tego programu elucji rozdzielono cztery ekstrakty roślin mięsożernych: *D. muscipula*, *D. aliciae*, *D. capensis*, *D. binata*.

Podczas analizy chromatograficznej ekstraktu roślinnego z gatunku *Dionaea muscipula*, przedstawionej na rysunku 33, uzyskano rozdzielanie 38-miu substancji. Wartości współczynników retencji 15-stu substancji znajdowały się w optymalnym

przedziale, kolejne 4 odbiegały o nie więcej niż 1,94. Zastosowany układ chromatograficzny pozwolił selektywnie rozdzielić flawonoidy. Naftochinony odznaczały się wartościami współczynników retencji większymi od 10-ciu, jednakże ich rozdzielenie było selektywne. Jedynie względem chloroplumbaginy wartości współczynników selektywności α_1 i α_2 były bliskie 1 (1,02).

W tabeli 21 zestawiono substancje „zidentyfikowane” w ekstrakcie z *Dionaea muscipula*, rozdzielone w elucie trójskładnikowym, zawierającym jako organiczne składniki eluentu izopropanol i metanol.

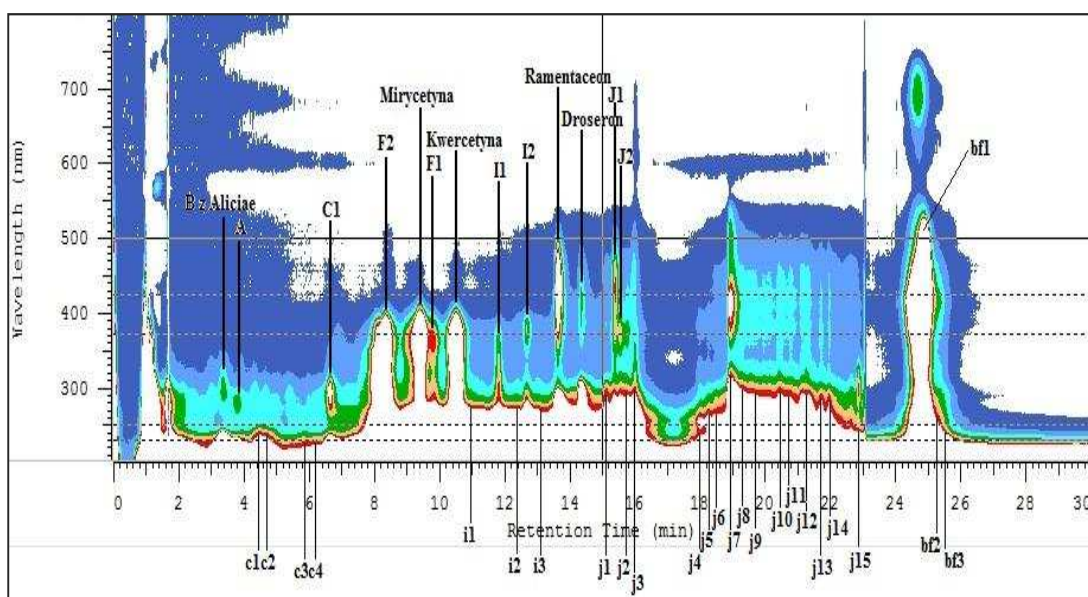


Rys. 33. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD, podczas rozdzielania próbki ekstraktu metanolowego z muchówki amerykańskiej (*Dionaea muscipula*). Kolumna: Lichrospher 100 RP18e, 125 x 4 mm, 5 μ m; Eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B: MeOH C: IzPrOH; przepływ 1 ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 μ l; przełączenie zaworu elucji wstecznej w kolumnie ok. 23 min.

Tabela 21. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Dionaea muscipula*, rozdzielanych w eluencie trójskładnikowym: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3, B: MeOH, C: IzPrOH

Chromatogram <i>D. muscipula</i>					
Dane		t ₀ =1,05			
Lp.	Substancja	tr	k	α ₁	α ₂
1	b1	1,65	0,57		
2	b2	2,01	0,91		
3	b3	2,50	1,38		
4	B	3,29	2,13		
5	g1	3,74	2,56		
6	g2	4,44	3,23		
7	g3	5,52	4,26		
8	g4	5,78	4,50		
9	g5	7,17	5,83		
10	g6	8,13	6,74		
11	G	8,30	6,90		
12	F2	8,60	7,19		
13	mirycetyna	9,40	7,95	1,11	1,13
14	F1	10,46	8,96		
15	kwercetyna	11,28	9,74	1,09	1,03
16	i1	11,56	10,01		
17	I2	12,70	11,10		
18	I	13,10	11,48		
19	j1	13,59	11,94		
20	J2	14,24	12,56		
21	j2	15,30	13,57		
22	plumbagina	15,87	14,11	1,04	1,13
23	droseron	17,84	15,99	1,13	1,05
24	j3	18,62	16,73		
25	j4	18,88	16,98		
26	j5	19,31	17,39		
27	chloroplumbagina	19,70	17,76	1,02	1,02
28	j6	20,01	18,06		
29	j7	20,39	18,42		
30	j8	20,71	18,72		
31	j9	21,17	19,16		
32	j10	21,78	19,74		
33	j11	22,19	20,13		
34	j12	22,51	20,44		
35	j13	22,88	20,79		
36	BF	24,67	22,50		
37	bf1	24,96	22,77		
38	bf2	25,55	23,33		

W ekstrakcie *Drosera aliciae* zidentyfikowano 38 substancji. Na rysunku 34 przedstawiono chromatogram tej analizy. W tabeli 22 zestawiono substancje „zidentyfikowane” w ekstrakcie z *Drosera aliciae*, rozdzielone w elucji trójskładnikowym, zawierającym jako organiczne składniki eluentu izopropanol i metanol. Wartości współczynników retencji dla 12-stu związków znajdowały się w optymalnym przedziale, kolejnych 6 odbiegało o nie więcej niż 2,68. Zastosowany układ chromatograficzny pozwolił selektywnie rozdzielić flawonoidy. Naftochinony zostały również selektywnie rozdzielone, jednakże ich współczynniki retencji wyniosły: $k=11,97$ dla ramentaceonu oraz $k=12,68$ dla droseronu.

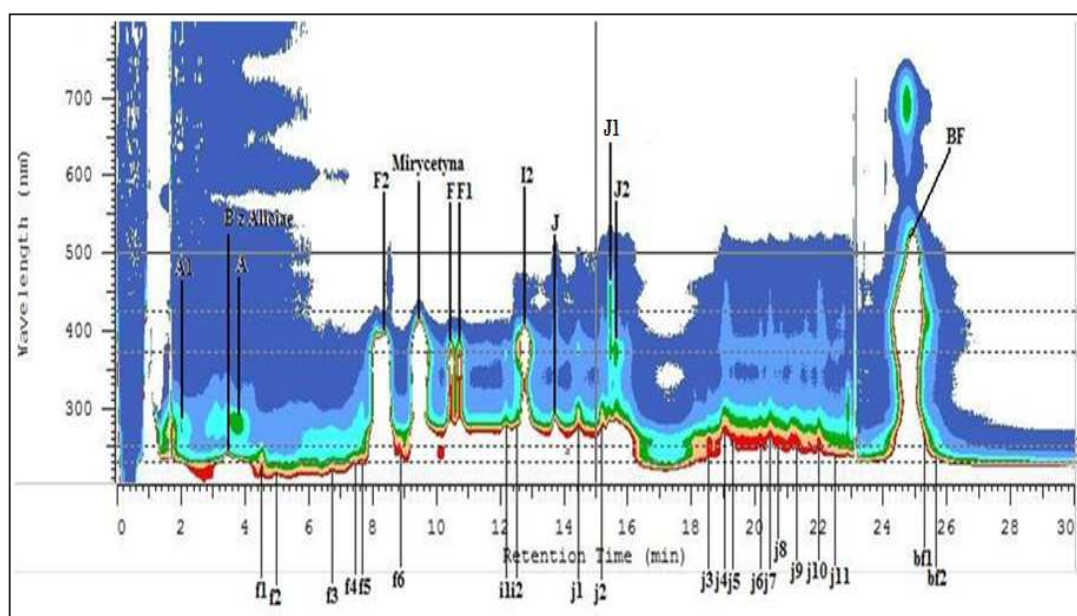


Rys. 34. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD, podczas rozdzielania próbki ekstraktu metanolowego z rosziczki alicji (*Drosera aliciae*). Kolumna: Lichrospher 100 RP18e, 125 x 4 mm, 5 μ m; Eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B: MeOH C: IzPrOH; przepływ 1 ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 μ l; przełączenie zaworu elucyjnej wstecznej w kolumnie ok. 23 min.

Tabela 22. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Drosera aliciae*, rozdzielanych w eluencie trójskładnikowym: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3, B: MeOH, C: IzPrOH

Chromatogram <i>D. aliciae</i>					
Dane		t ₀ =1,05			
Lp.	Substancja	tr	k	α ₁	α ₂
1	B z <i>D. aliciae</i>	3,35	2,19		
2	A	3,79	2,61		
3	c1	4,39	3,18		
4	c2	4,70	3,48		
5	c3	5,87	4,59		
6	c4	6,19	4,90		
7	C1	6,64	5,32		
8	F2	8,30	6,90		
9	mirycetyna	9,43	7,98	1,16	1,05
10	F1	9,87	8,40		
11	kwercetyna	10,49	8,99	1,07	1,05
12	i1	10,98	9,46		
13	I1	11,83	10,27		
14	i2	12,37	10,78		
15	I2	12,69	11,09		
16	i3	13,10	11,48		
17	ramentaceon	13,62	11,97	1,04	1,06
18	droseron	14,36	12,68	1,06	1,06
19	j1	15,13	13,41		
20	J1	15,39	13,66		
21	J2	15,54	13,80		
22	j2	15,77	14,02		
23	j3	15,97	14,21		
24	j4	18,01	16,15		
25	j5	18,27	16,40		
26	j6	18,50	16,62		
27	j7	18,96	17,06		
28	j8	19,31	17,39		
29	j9	19,72	17,78		
30	j10	20,45	18,48		
31	j11	20,74	18,75		
32	j12	21,26	19,25		
33	j13	21,72	19,69		
34	j14	21,98	19,93		
35	j15	22,91	20,82		
36	bf1	24,90	22,71		
37	bf2	25,25	23,05		
38	bf3	25,59	23,37		

W ekstrakcie z *Drosera capensis* rozdzielono 33 substancje. Na rysunku 35 przedstawiono chromatogram omawianej analizy. W tabeli 23 zestawiono substancje „zidentyfikowane” w ekstrakcie z *Drosera capensis*, rozdzielone w eluencie trójskładnikowym, zawierającym jako organiczne składniki eluentu izopropanol i metanol. Wartości współczynników retencji dla 13-stu składników ekstraktu znajdowały się w optymalnym przedziale k od 1 do 10, kolejne 3 różniły się o nie więcej niż 1,16. Analiza chromatogramu pozwoliła zidentyfikować jakościowo jedynie mirycetynę. Rozdzielenie mirycetyny od substancji jej towarzyszących było w pełni selektywne.

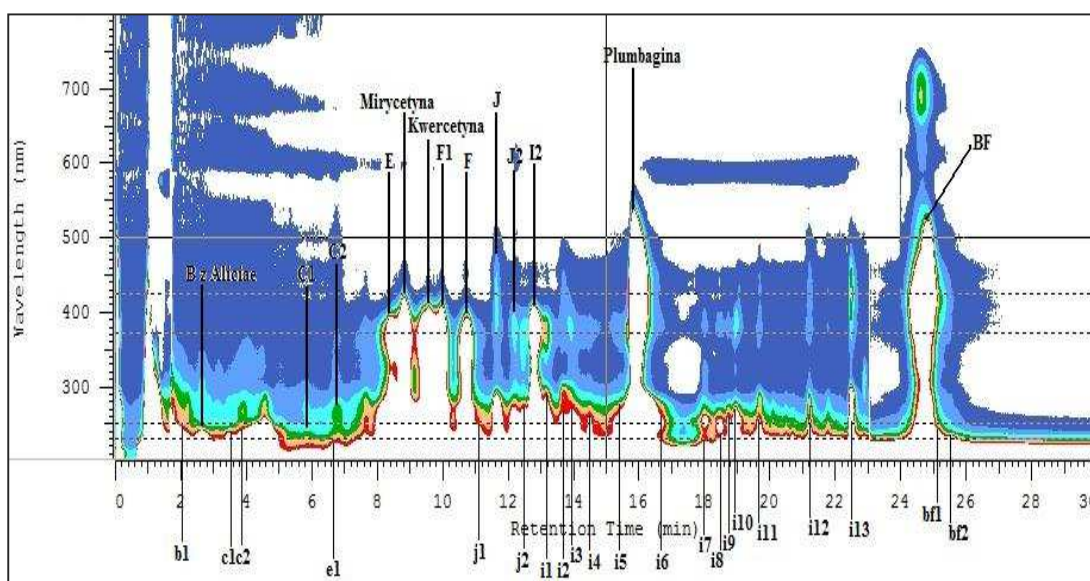


Rys. 35. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD, podczas rozdzielania próbki ekstraktu metanolowego z rosziczki przylądkowej (*Drosera capensis*). Kolumna: Lichrospher 100 RP18e, 125 x 4 mm, 5 μ m; eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B: MeOH C: IzPrOH; przepływ 1 ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 μ l; przełączenie zaworu elucji wstecznej w kolumnie ok. 23 min.

Tabela 23. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Drosera capensis*, rozdzielanych w eluencie trójskładnikowym: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3
B:MeOH C: IzPrOH

Chromatogram <i>D. capensis</i>					
Dane		t ₀ =1,05			
Lp.	Substancja	tr	k	α ₁	α ₂
1	A1	2,00	0,90		
2	B z <i>D. aliciae</i>	3,46	2,30		
3	A	3,83	2,65		
4	f1	4,53	3,31		
5	f2	5,00	3,76		
6	f3	6,74	5,42		
7	f4	7,43	6,08		
8	f5	7,67	6,30		
9	F2	8,83	7,41		
10	f6	8,89	7,47		
11	mirycetyna	9,47	8,02	1,07	1,12
12	F	10,45	8,95		
13	F1	10,73	9,22		
14	i1	12,17	10,59		
15	i2	12,52	10,92		
16	I2	12,77	11,16		
17	J	13,71	12,06		
18	j1	14,43	12,74		
19	j2	15,19	13,47		
20	J1	15,46	13,72		
21	J2	15,65	13,90		
22	j3	18,56	16,68		
23	j4	19,02	17,11		
24	j5	19,31	17,39		
25	j6	20,18	18,22		
26	j7	20,47	18,50		
27	j8	20,74	18,75		
28	j9	21,29	19,28		
29	j10	22,01	19,96		
30	j11	22,91	20,82		
31	BF	24,76	22,58		
32	bf1	25,30	23,10		
33	bf2	25,67	23,45		

W ekstrakcie *Drosera binata* zidentyfikowano 34 substancje. Na rysunku 36 przedstawiono chromatogram analizy tego ekstraktu roślinnego. W tabeli 24 zestawiono substancje „zidentyfikowane” w ekstrakcie z *Drosera binata*, rozdzielone w eluencie trójskładnikowym, zawierającym jako organiczne składniki eluentu izopropanol i metanol. Wartości współczynników retencji dla 13-stu składników ekstraktu znajdowały się w optymalnym przedziale od 1 - 10, a dla kolejnych sześciu składników wartość współczynnika k była większa niż 12. Zastosowany układ chromatograficzny pozwolił selektywnie rozdzielić flawonoidy. Jedynym oznaczonym jakościowo naftochinonem w ekstrakcie z *Drosera binata* była plumbagina, która posiadała współczynnik retencji $k=14,09$.



Rys. 36. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD, podczas rozdzielania próbki ekstraktu metanolowego z rosziczki dwudzielnej (*Drosera binata*). Kolumna: Lichrospher 100 RP18e, 125 x 4 mm, 5 μ m; Eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B: MeOH C: IzPrOH; przepływ 1 ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 μ l; przełączenie zaworu elucji wstecznej w kolumnie ok. 23 min.

Tabela 24. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Drosera binata*, rozdzielanych w eluencie trójskładnikowym: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3, B: MeOH, C: IzPrOH

Chromatogram <i>D. binata</i>					
Dane		t ₀ =1,05			
Lp.	Substancja	tr	k	α ₁	α ₂
1	b1	2,03	0,93		
2	B z <i>D. aliciae</i>	2,64	1,51		
3	c1	3,51	2,34		
4	c2	3,89	2,70		
5	C1	5,85	4,57		
6	C2	6,72	5,40		
7	e1	7,67	6,30		
8	E	8,43	7,03		
9	mirycetyna	8,83	7,41	1,05	1,09
10	kwercetyna	9,56	8,10	1,09	1,05
11	F1	9,96	8,49		
12	F	10,74	9,23		
13	j1	11,12	9,59		
14	J	11,64	10,09		
15	J2	12,19	10,61		
16	j2	12,46	10,87		
17	l2	12,78	11,17		
18	i1	13,18	11,55		
19	i2	13,65	12,00		
20	i3	13,94	12,28		
21	i4	14,52	12,83		
22	i5	15,39	13,66		
23	plumbagina	15,84	14,09	1,03	1,06
24	i6	16,68	14,89		
25	i7	18,01	16,15		
26	i8	18,47	16,59		
27	i9	18,73	16,84		
28	i10	18,96	17,06		
29	i11	19,69	17,75		
30	i12	21,26	19,25		
31	i13	22,48	20,41		
32	BF	24,62	22,45		
33	bf1	25,18	22,98		
34	bf2	25,54	23,32		

Podsumowując wyniki badań nad opracowaniem procedury rozdzielania, oznaczania i identyfikowania składników metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) w warunkach elucji gradientowej, można sformułować następujące wnioski:

- 1) Izopropanol, będący organicznym składnikiem eluentu, nadaje mu odpowiednią siłę elucyjną. Ponadto, jego zastosowanie pozwala selektywnie rozdzielić flawonoidy oraz naftochinony od substancji im towarzyszących. Wartości współczynników retencji składników ekstraktów, rozdzielanych przy użyciu eluentu, którego składnikiem jest izopropanol, znajdują się w optymalnym przedziale wartości.
- 2) Eluent, którego składnik stanowił metanol charakteryzował się słabą siłą elucyjną, aczkolwiek bardzo selektywnie pozwolił rozdzielić flawonoidy między sobą. Wartości współczynników retencji substancji rozdzielanych są wyższe od 10, co wpływa na długi czas analizy ekstraktów.
- 3) Zastosowanie tetrahydrofuranu, jako organicznego składnika eluentu, spowodowało mniej selektywnie niż w przypadku izopropanolu i metanolu rozdzielanie badanych związków.
- 4) Układ chromatograficzny, w którym zastosowano acetonitryl jako organiczny składnik eluentu, wpłynął bardzo selektywnie na rozdzielanie kwercetyny od substancji jej towarzyszących w ekstrakcie z *Dionaea muscipula* oraz mirycetyny zawartej w ekstrakcie z *Drosera aliciae* od substancji jej towarzyszących. Rozdzielenie naftochinonów z zastosowaniem acetonitrylu okazało się selektywne, aczkolwiek wartości k substancji rozdzielanych były znacznie większe niż w przypadku izopropanolu czy THF-u.
- 5) Badania z wykorzystaniem RP-HPLC potwierdziły wnioski dostarczone dzięki badaniom za pomocą techniki RP-TLC i wskazały na konieczność zastosowania eluentu wieloskładnikowego do rozdzielania, oznaczania i identyfikacji składników metanolowych ekstraktów z roślin mięsożernych.
- 6) Do opracowania optymalnego programu elucji do rozdzielania i oznaczania składników ekstraktów roślinnych, wybrano mieszaninę wody z kwasem siarkowym o pH=3 oraz składniki organiczne: metanol i izopropanol. Metanol, ponieważ wpłynął na selektywne rozdzielanie flawonoidów oraz izopropanol, gdyż pozwolił na selektywne rozdzielanie naftochinonów.

- 7) Wyniki analiz rozdzielania, oznaczania i identyfikacji ekstraktów roślin mięsożernych, za pomocą eluentu trójskładnikowego w RP-HPLC z wykorzystaniem elucji gradientowej są zadowalające dla metanolowych ekstraktów roślin z gatunku *D. muscipula* oraz *D. aliciae*. Dla ekstraktów z *D. capensis* i *D. binata* program elucji wymaga jeszcze modyfikacji, która spowoduje, iż rozdzielenie zawartych w nich substancji będzie bardziej selektywne i pozwoli rozdzielić więcej składników ekstraktów.
- 8) Ekstrakt metanolowy z rośliny owadożernej *Drosera aliciae* zawiera największą ilość składników wśród badanych ekstraktów roślinnych.
- 9) Badania za pomocą RP-HPLC potwierdziły rezultaty doświadczeń z RP-TLC, iż najprawdopodobniej ekstrakt z *D. capensis* nie zawiera chloroplumbaginy, a ekstrakt z *D. binata* nie zawiera droseronu lub występują one w stężeniach poniżej granicy wykrywalności.

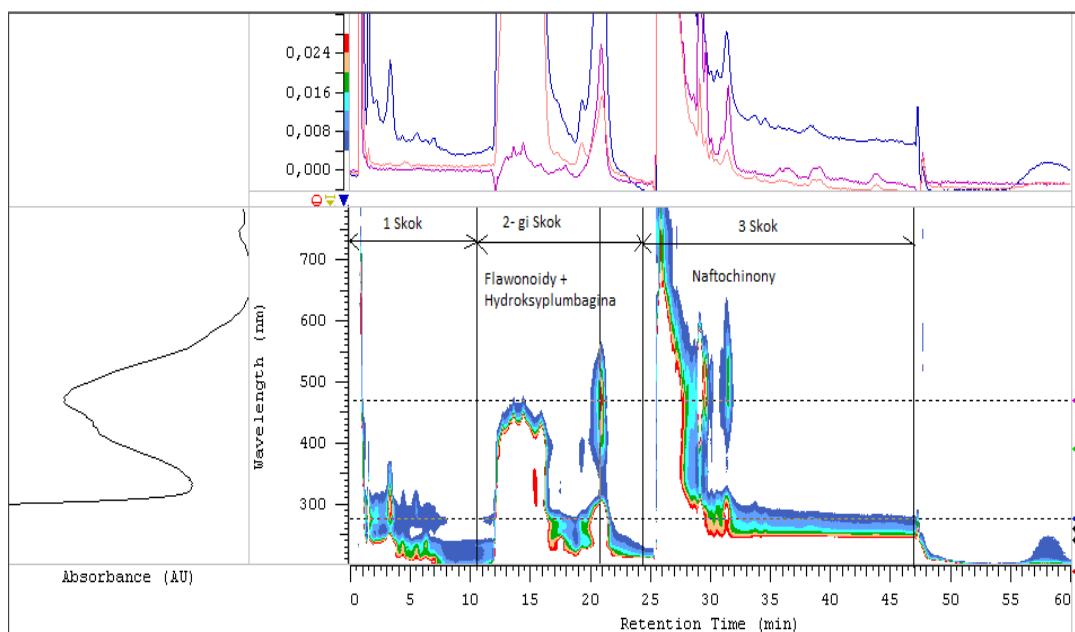
7.5. BADANIA NAD OPTYMALIZACJĄ WARUNKÓW ROZDZIELANIA I IZOLOWANIA WYBRANYCH METABOLITÓW Z EKSTRAKTÓW METANOLOWYCH ROŚLIN MIĘSOŻERNYCH Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI RP-HPLC ORAZ ELUCJI SKOKOWEJ W SKALI MODELOWEJ

W ramach niniejszej pracy postawiono sobie również za cel opracowanie optymalnych warunków rozdzielania i izolowania wybranych flawonoidów i hydroksyplumbaginy oraz pozostałych naftochinonów w postaci jednej grupy z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych.

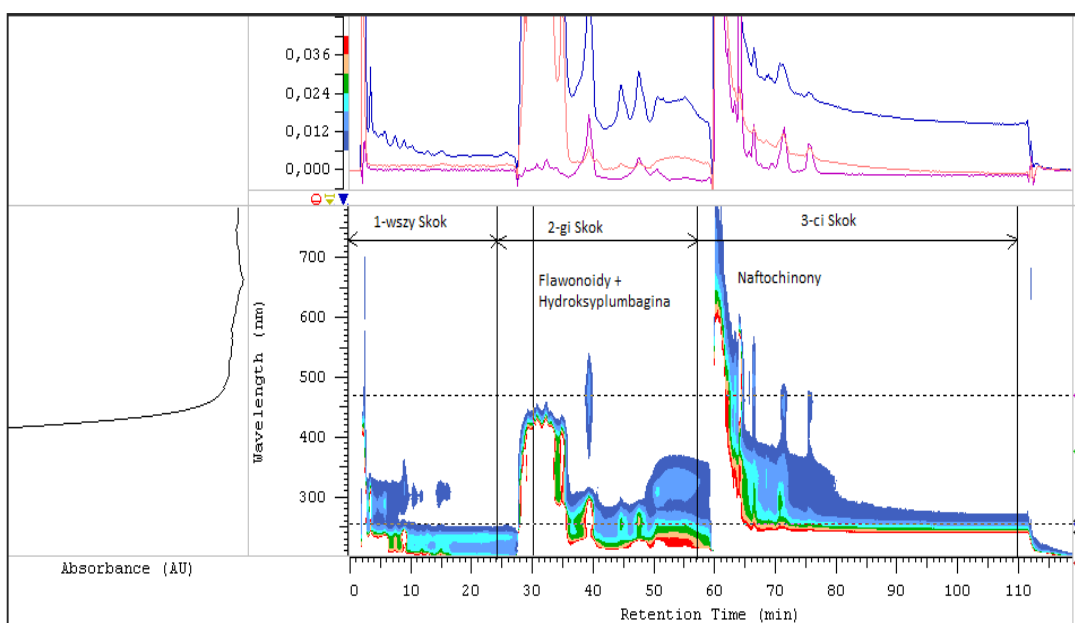
Jako kryterium optymalizacji warunków rozdzielania przyjęto wartość współczynnika selektywności pomiędzy rutyną, kwercetyną, mirycetyną i hydroksyplumbaginą, a towarzyszącymi im bezpośrednio zanieczyszczeniom wyższą od jedności. Założono również, że w opracowanej metodzie naftochinony zawarte w ekstraktach z roślin mięsożernych, za wyjątkiem hydroksyplumbaginy, nie będą rozdzielane na poszczególne związki, ale eluowane i zbierane w postaci jednej frakcji, by następnie za pomocą normalnego układu faz rozdzielić wyizolowaną frakcję na poszczególne naftochinony.

W pierwszym etapie badań na podstawie wyników z przeprowadzonych doświadczeń za pomocą cienkowsarstwowej chromatografii cieczowej (rozd. 7.3.1.) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem elucji gradientowej (rozd. 7.4.) zaprojektowano program elucji składający się z trzech skoków eluentu (tabela 10). Z wykorzystaniem trzech kolumn oraz trójskokowego programu elucji rozdzielono cztery ekstrakty roślin mięsożernych. Eluent, w każdym ze skoków zawierał zakwaszoną kwasem octowym wodną mieszaninę metanolu i izopropanolu w różnym stosunku objętościowym.

Przykładowe chromatogramy rozdzielania flawonoidów oraz naftochinonów z ekstraktu roślinnego z *Drosera aliciae* z zastosowaniem układu chromatograficznego 2 i 3 z tabeli 10. przedstawiono na rysunkach 37 i 38. Przykładowe zestawienie wyznaczonych parametrów k i α dla wybranych flawonoidów oraz hydroksyplumbaginy z ekstraktu roślinnego z *Drosera aliciae* przedstawiono w tabeli 25.



Rys. 37. Przykład chromatogramu detektora UV – DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników próbki metanolowego ekstraktu roślinnego *Drosera aliciae*. Dozowano 100 μ l ekstraktu. Kolumna- LiChrospher[®] RP18(5 μ m, 150 x 4 mm). Układ chromatograficzny 2 z tabeli 10.



Rys. 38. Przykład chromatogramu detektora UV – DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników próbki metanolowego ekstraktu roślinnego *Drosera aliciae*; Dozowano 100 μ l ekstraktu. Kolumna- Nucleosil 100 RP 18 (5 μ m, 250 x 4 mm). Układ chromatograficzny 3 z tabeli 10.

Tabela 25. Zestawienie wyznaczonych parametrów k i α dla wybranych flawonoidów oraz hydroksyplumbaginy z metanolowego ekstraktu roślinnego z *Drosera aliciae*

Związek chemiczny	Układ chromatograficzny 2		Układ chromatograficzny 3	
	k	* α_p / α_z	k	* α_p / α_z
Rutyna	16,25	1,07/1,1	18,22	1,04/1,06
Mirycetyna	17,93	1,10/1,11	19,78	1,05/1,14
Hydroksyplumbagina	23,95	1,09/-	22,47	1,14/1,14
Kwercetyna	-	-	31,93	1,03/-

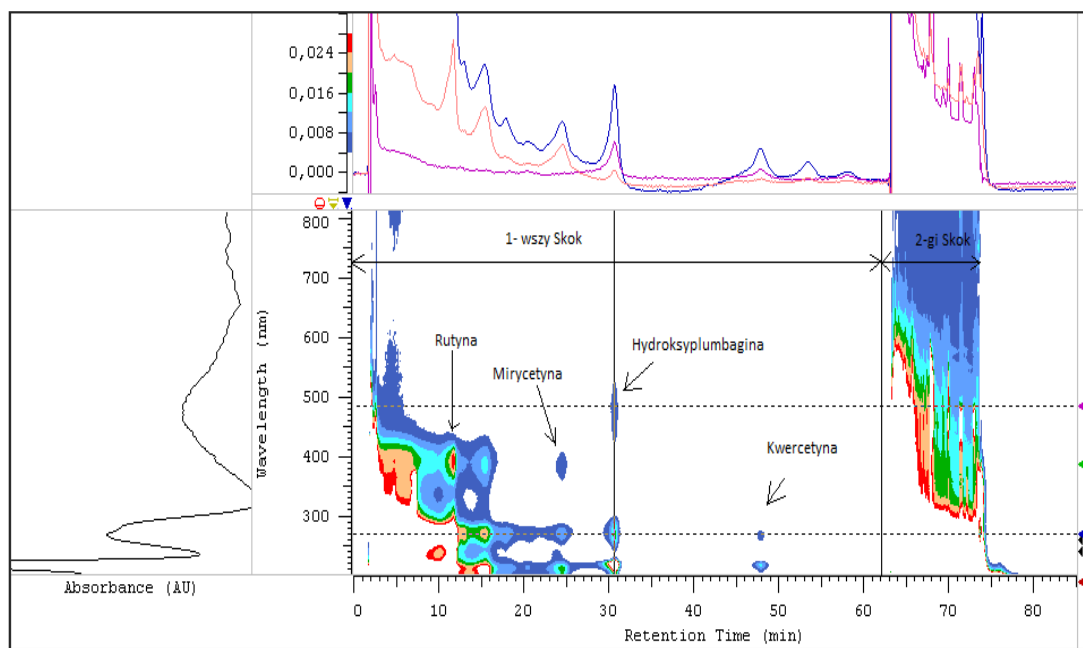
* α_p -współczynnik selektywności względem wybranego metabolitu i substancji występującej bezpośrednio przed metabolitem;

* α_z -współczynnik selektywności względem wybranego metabolitu i substancji występującej bezpośrednio za metabolitem;

Na podstawie przeprowadzonych badań z zastosowaniem trójskokowego programu elucji, stwierdzono, że nie ma konieczności stosowania trzech skoków eluentu podczas rozdzielania składników ekstraktów roślinnych. W pierwszym etapie rozdzielania eluowane są tylko substancje silnie polarne, odznaczające się bardzo niewielką retencją, więc wyeliminowanie pierwszego etapu rozdzielania nie będzie miało wpływu na selektywne rozdzielenie flawonoidów- rutyny, kwercetyny i mirycetyny oraz hydroksyplumbaginy.

W związku z powyższym przeprowadzono badania z zastosowaniem programów elucji zawierających dwa skoki eluentu (układy chromatograficzne 4-7, tabela 10), w których w pierwszym etapie rozdzielane są flawonoidy oraz hydroksyplumbagina, a w drugim etapie eluują w postaci jednego lub kilku nierozdzielonych pików wszystkie naftochinony, które następnie rozdzielane i izolowane będą w układzie faz normalnych.

W wyniku otrzymanych rezultatów stwierdzono, że optymalnym układ chromatograficzny do rozdzielania poszczególnych flawonoidów i hydroksyplumbaginy oraz naftochinonów w postaci jednej frakcji to układ chromatograficzny 7., składający się z kolumny Nucleosil 100 RP 18, 5 μ m, 250 x 4 mm oraz programu elucji, w którym w pierwszym skoku eluent ma skład- H₂O : MeOH : IzPrOH 69:25:6 v/v + H₂SO₄, pH=3 oraz w drugim 100% metanol. Przykład chromatogramu rozdzielania flawonoidów oraz naftochinonów z metanolowego ekstraktu roślinnego *Drosera aliciae*, z zastosowaniem układu chromatograficznego 7 z tabeli 10., przedstawiono na rysunku 39. Przykład zestawienia wyznaczonych parametrów k i α dla wybranych flawonoidów oraz hydroksyplumbaginy rozdzielonych w ekstrakcie roślinnym *Drosera aliciae*, z zastosowaniem układu chromatograficznego 7, przedstawiono w tabeli 26.



Rys. 39. Przykład chromatogramu detektora UV – DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników próbki metanolowego ekstraktu roślinnego *Drosera aliciae*. Dozowano 100 μ l ekstraktu. Kolumna: Nucleosil 100 RP 18 (5 μ m, 250 x 4 mm). Układ chromatograficzny 7 z tabeli 10.

Tabela 26. Zestawienie wyznaczonych parametrów k i α dla wybranych flawonoidów oraz hydroksyplumbaginy rozdzielonych z zastosowaniem układu chromatograficznego 7 z tabeli 10.

Związek chemiczny	Układ chromatograficzny 7	
	k	* α_p / α_z
Rutyna	6,13	1,38/1,35
Kwercetyna	27,68	1,15/1,13
Mirycetyna	13,73	1,23/1,26
Hydroksyplumbagina	17,26	1,26/1,4

* α_p -współczynnik selektywności względem wybranego metabolitu i substancji występującej bezpośrednio przed metabolitem;

* α_z -współczynnik selektywności względem wybranego metabolitu i substancji występującej bezpośrednio za metabolitem;

Podsumowując, wyniki badań nad opracowaniem procedury rozdzielania i izolowania wybranych metabolitów z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych, z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) w warunkach elucji skokowej, można sformułować następujące wnioski:

- 1) Metanolowe ekstrakty z roślin mięsożernych charakteryzują się bardzo bogatym składem. Zawierają one zarówno dość mało polarne naftochinony, jak również w dużej ilości względnie polarne flawonoidy. W celu uzyskania optymalnych warunków rozdzielania flawonoidów, z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych, należy zastosować etapowe rozdzielanie składników ekstraktów roślinnych z wykorzystaniem elucji skokowej.
- 2) Opracowany program dwustopniowej elucji skokowej pozwolił w pierwszym etapie, z zadawalającym współczynnikiem selektywności rozdzielić wybrane metabolity z grupy flawonoidów, takie jak rutyna, kwercetyna, mirycetyna, jak również hydroksyplumbaginę od substancji bezpośrednio im towarzyszących. W drugim etapie programu elucji opracowanej metodyki eluują pozostałe naftochinony zawarte w ekstraktach roślinnych, takie jak chloroplumbagina, plumbagina bądź ramentaceon.
- 3) Frakcja zawierająca naftochinony (za wyjątkiem hydroksyplumbaginy), uzyskana za pomocą opracowanej metodyki, powinna w dalszym etapie badań być rozdzielona na poszczególne związki chemiczne za pomocą chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz.
- 4) Zaproponowany układ chromatograficzny odznacza się stosunkowo wysokimi współczynnikami selektywności α , co powinno pozwolić na osiągnięcie wysokiego, maksymalnego stopnia przeładowania kolumny. Ma to ogromne znaczenie, biorąc pod uwagę fakt, iż efektywność rozdzielania i izolowania wybranych flawonoidów oraz hydroksyplumbaginy, z metanolowych ekstraktów, w skali preparatywnej z zastosowaniem proponowanego układu chromatograficznego mogła by być wysoka.

7.6. BADANIA NAD OPTYMALIZACJĄ WARUNKÓW ROZDZIELANIA I IZOLOWANIA WYBRANYCH NAFTOCHINONÓW Z CHLOROFORMOWYCH EKSTRAKTÓW ROŚLIN MIĘSOŻERNYCH Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI RP-HPLC I NP-HPLC W WARUNKACH ELUCJI IZOKRATYCZNEJ W SKALI MODELOWEJ

7.6.1. Wyniki badań nad optymalizacją warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów z chloroformowych ekstraktów roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki RP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej

W pierwszym etapie badań nad optymalizacją warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów z chloroformowych ekstraktów roślin mięsożernych, sprawdzono możliwość wykorzystania znanych z literatury warunków rozdzielania z zastosowaniem elucji izokratycznej [43, 72].

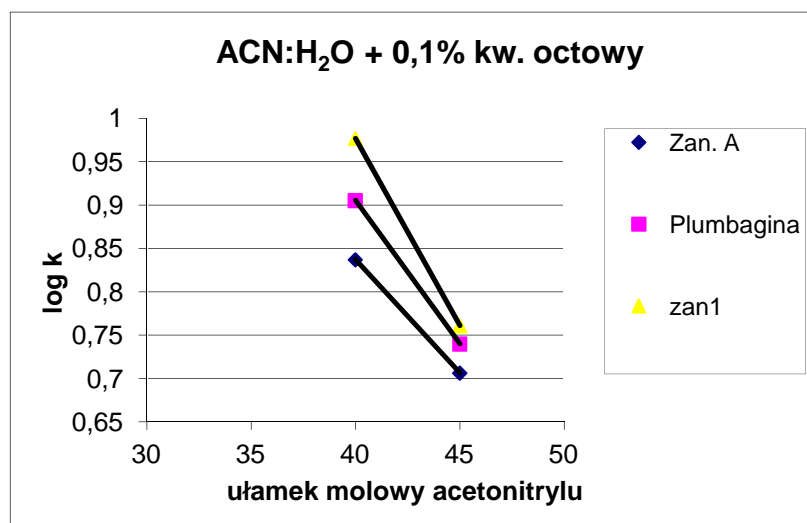
W tym celu, przeprowadzono rozdzielania chloroformowych ekstraktów roślinnych z gatunku *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae*. Zastosowano kolumnę LiChrospher RP 18e (5 μ m, 250 x 4 mm) oraz eluenty podane w literaturze [43, 72] odpowiednio MeOH : H₂O 6:4 v/v + 0,1% TFA oraz MeOH : H₂O 8:2 v/v + 0,1% TFA.

Stosując warunki podane w literaturze nie uzyskano zadawalającego stopnia rozdzielania ramentaceonu i plumbaginy od substancji balastowych. Badania te doprowadziły do wniosku o konieczności zmiany warunków rozdzielania opracowanych dotychczas w literaturze dla naftochinonów, w taki sposób by układ chromatograficzny odznaczał się wysoką selektywnością, wobec wybranych naftochinonów.

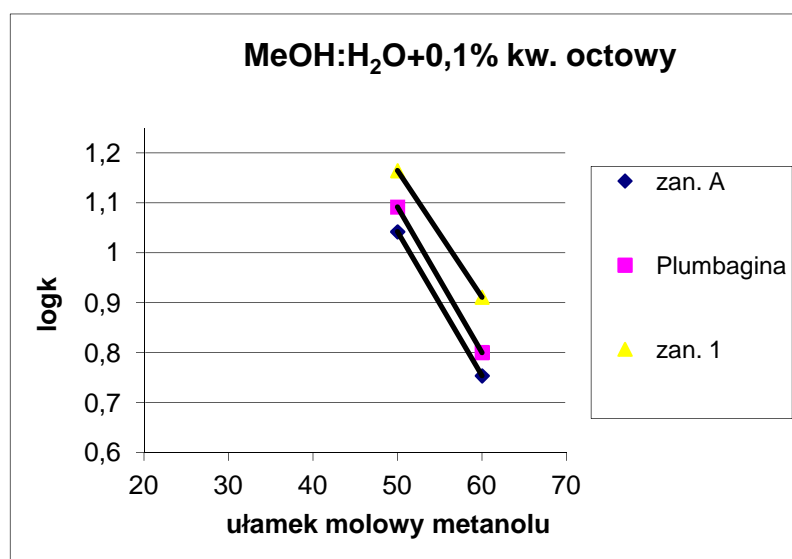
W celu optymalizacji warunków rozdzielania metabolitów zbadano selektywność różnych układów chromatograficznych dla tych substancji, wykorzystując oddzielnie metanol, acetonitryl, tetrahydrofuran oraz dioksan jako organiczne składniki eluentu zmieszane z wodą i kwasem octowym.

Dla badanych eluentów sporządzono wykresy $\log k=f(x_{\text{mol}})$, gdzie k – współczynnik retencji, x_{mol} – ułamek molowy składnika eluentu o większej sile elucji. Wykresy te sporządzono dla ramentaceonu i plumbaginy oraz towarzyszącym im bezpośrednio zanieczyszczeniom, które występują przed i za

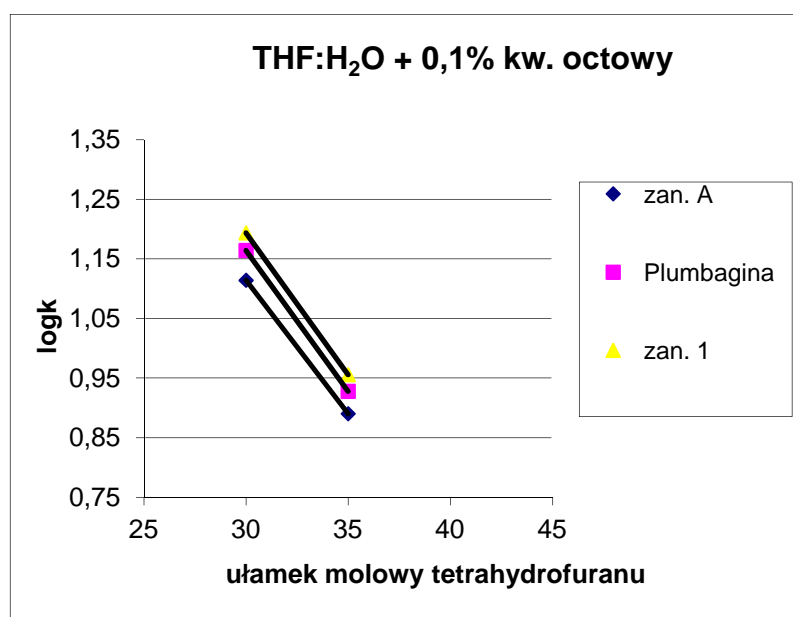
oznaczanym naftochinonem. Na rysunkach 40-47 przedstawiono wykresy zależności $\log k$ od ułamka molowego składnika o większej sile elucji.



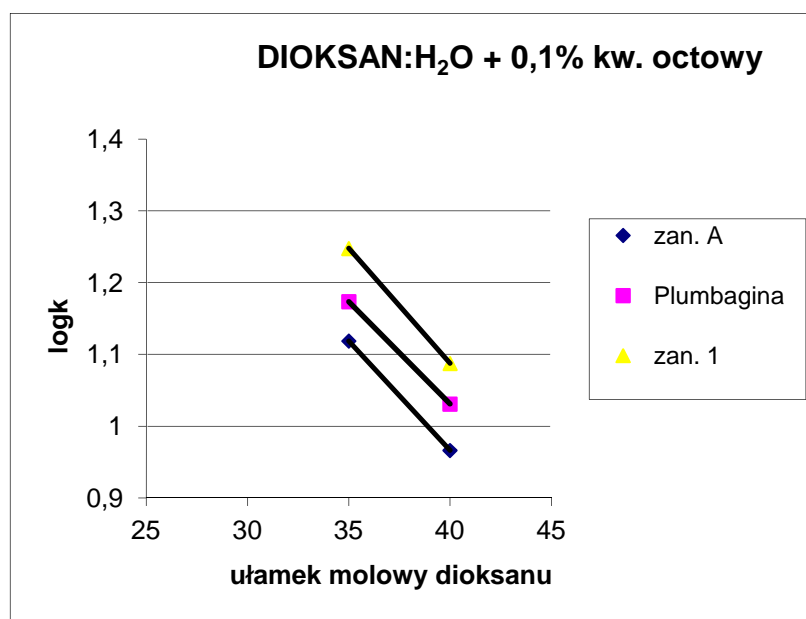
Rys. 40. Wykres przedstawiający zależność $\log(k)$ plumbaginy oraz substancji znajdujących się bezpośrednio przy metabolizmie od ułamka molowego acetonitrylu ($x_{\text{mol-ACN}}$). Kolumna LiChrospher RP 18e, 5 μm , 250 x 4 mm. Ekstrakt z *Dionaea muscipula*.



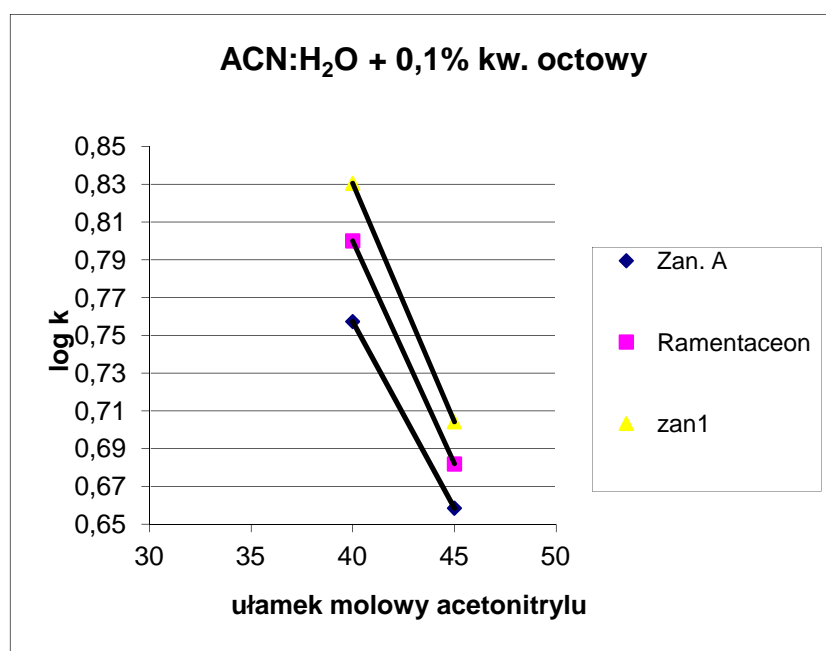
Rys. 41. Wykres przedstawiający zależność $\log(k)$ plumbaginy oraz substancji znajdujących się bezpośrednio przy metabolizmie od ułamka molowego metanolu ($x_{\text{mol-MeOH}}$). Kolumna LiChrospher RP 18e, 5 μm , 250 x 4 mm. Ekstrakt z *Dionaea muscipula*.



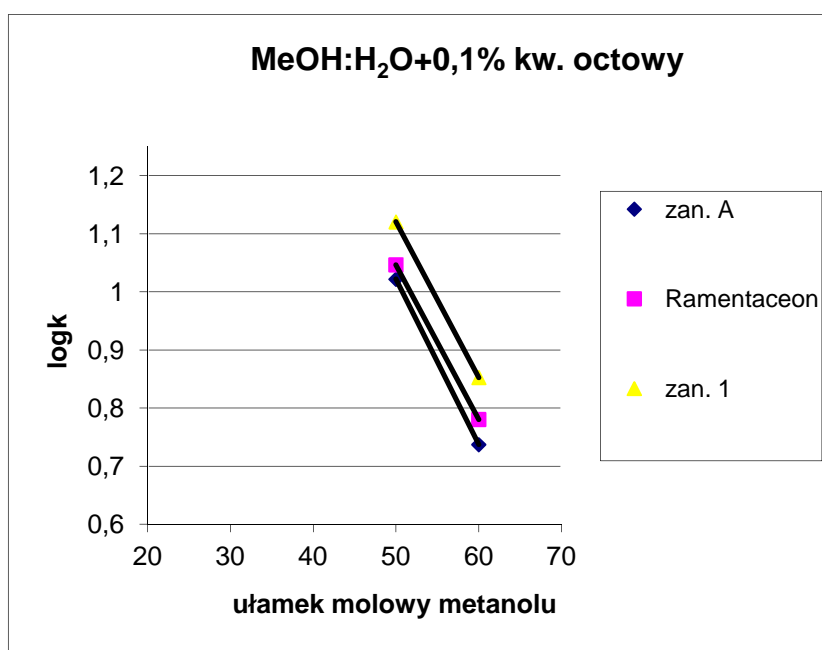
Rys. 42. Wykres przedstawiający zależność $\log(k)$ plumbaginy oraz substancji znajdujących się bezpośrednio przy metabolizmie od ułamka molowego tetrahydrofuranu ($x_{\text{mol-THF}}$). Kolumna LiChrospher RP 18e, 5 μm , 250 x 4 mm. Ekstrakt z *Dionaea muscipula*.



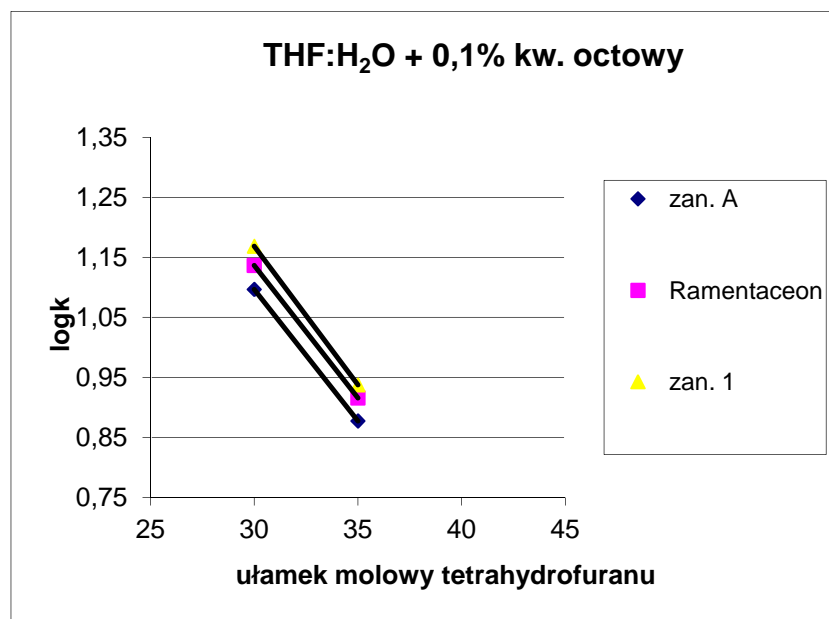
Rys. 43. Wykres przedstawiający zależność $\log(k)$ plumbaginy oraz substancji znajdujących się bezpośrednio przy metabolizmie od ułamka molowego dioksanu ($x_{\text{mol-dioksan}}$). Kolumna LiChrospher RP 18e, 5 μm , 250 x 4 mm. Ekstrakt z *Dionaea muscipula*.



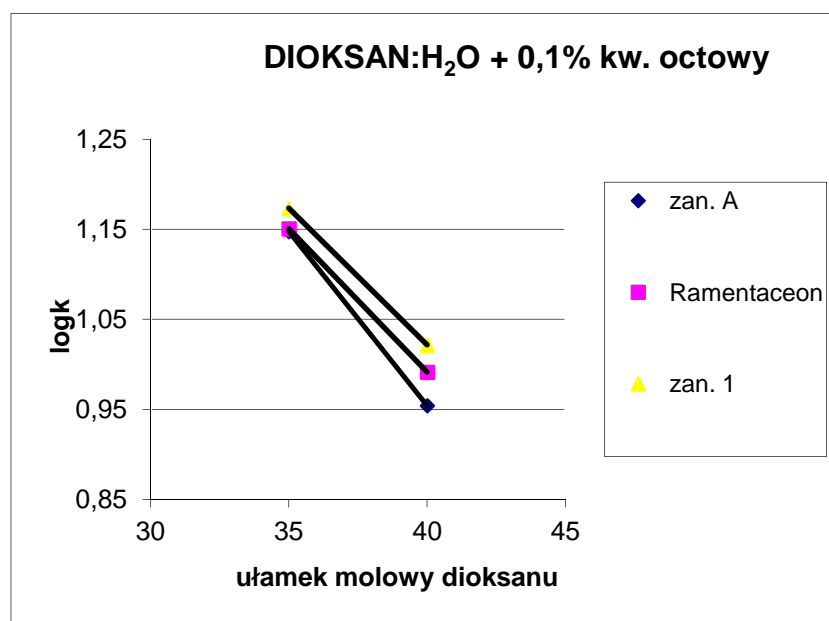
Rys. 44. Wykres przedstawiający zależność $\log(k)$ ramentaceonu oraz substancji znajdujących się bezpośrednio przy metabolizmie od ułamka molowego acetonitrylu ($x_{\text{mol-ACN}}$). Kolumna LiChrospher RP 18e, 5 μm , 250 x 4 mm. Ekstrakt z *Drosera aliciae*.



Rys. 45. Wykres przedstawiający zależność $\log(k)$ ramentaceonu oraz substancji znajdujących się bezpośrednio przy metabolizmie od ułamka molowego metanolu ($x_{\text{mol-MeOH}}$). Kolumna LiChrospher RP 18e, 5 μm , 250 x 4 mm. Ekstrakt z *Drosera aliciae*.



Rys. 46. Wykres przedstawiający zależność $\log(k)$ ramentaceonu oraz substancji znajdujących się bezpośrednio przy metabolizmie od ułamka molowego tetrahydrofuranu ($x_{\text{mol-THF}}$). Kolumna LiChrospher RP 18e, $5\mu\text{m}$, 250×4 mm. Ekstrakt z *Drosera aliciae*.

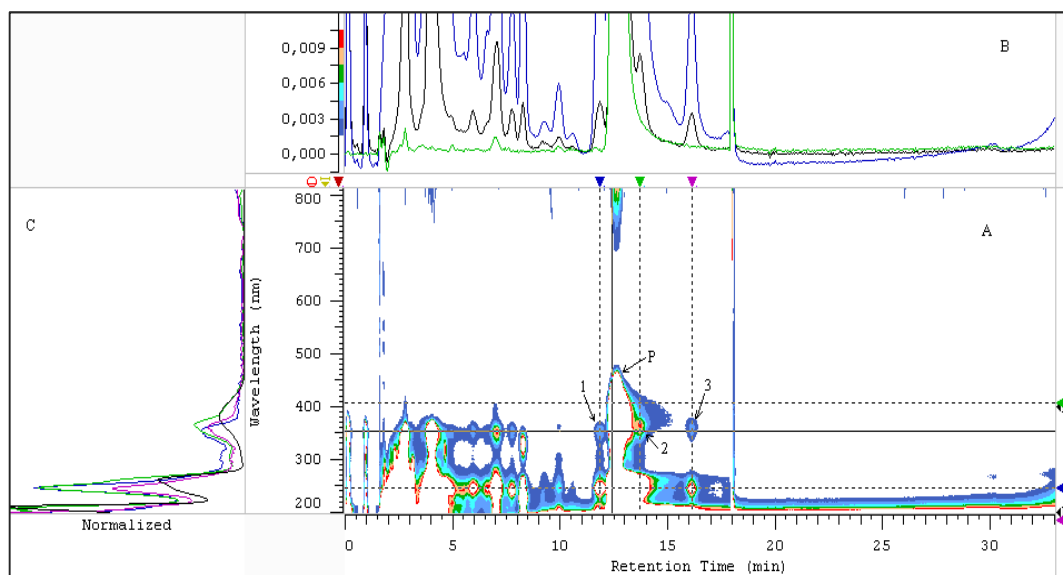


Rys. 47. Wykres przedstawiający zależność $\log(k)$ ramentaceonu oraz substancji znajdujących się bezpośrednio przy metabolizmie od ułamka molowego dioksanu ($x_{\text{mol-dioksan}}$). Kolumna LiChrospher RP 18e, $5\mu\text{m}$, 250×4 mm. Ekstrakt z *Drosera aliciae*.

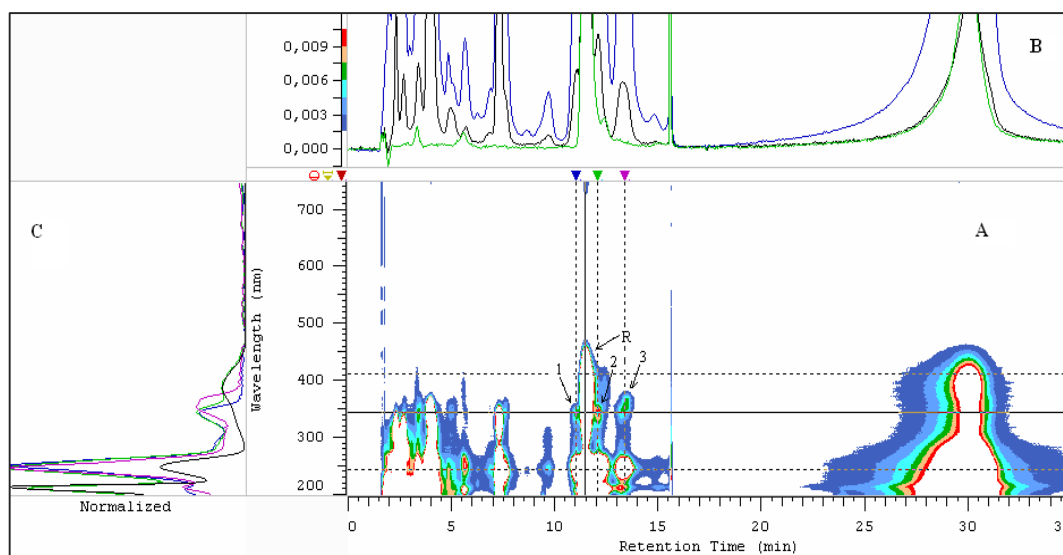
Za kryterium optymalizacji procedury rozdzielania składników ekstraktów z roślin *Drosera aliciae* i *Dionaea muscipula*, w tym w szczególności wybranych naftochinonów tj. plumbaginy i ramentaceonu, przyjęto wartość współczynnika selektywności pomiędzy ramentaceonem (7-metylojuglon) bądź plumbaginą (2-metylojuglon) a towarzyszącymi im bezpośrednio substancjami wyższą od jedności. Optymalna siła elucyjna fazy ruchomej powinna być taka, a żeby wartość współczynnika retencji ostatniej substancji eluowanej przed przełączeniem zaworu przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie, była niższa niż 10.

Na podstawie przeprowadzonych rozdzielen i uzyskanych wyników dobrano optymalny, pod względem selektywności oraz czasu trwania rozdzielania, układ chromatograficzny składający się z kolumny z wypełnieniem LiChrospher RP 18e, 5 µm, 250 x 4 mm i eluentu ACN: H₂O 45:55 + 0,1 % kwasu octowego v/v.

Na rysunku 48 i 49 zamieszczono przykładowe chromatogramy rozdzielania składników chloroformowego ekstraktu *Dionaea muscipula* i *Drosera aliciae*, otrzymane za pomocą detektora UV-DAD (w zakresie od 200 do 780 nm) [część rysunku oznaczona symbolem- A] oraz chromatogramy przy wybranych długościach fali (410 nm- długość fali, przy której występuje maksimum absorpcji dla plumbaginy i ramentaceonu, 350 nm oraz 250 nm - długość fali, przy której występuje maksimum absorpcji dla substancji balastowych).



Rys. 48. A- Przykład chromatogramu detektora UV – VIS typu DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników chloroformowego ekstraktu roślinnego *Dionaea muscipula*, dozowanego po odparowaniu chloroformu w organicznym składniku eluentu; B– Chromatogram UV-DAD przy wybranych długościach fali (410 nm, 350 nm, 250 nm); C – Widmo substancji zaznaczonych kolorowymi markerami na części A rysunku. Kolumna: LiChrospher® RP18e, 5 µm, 250 x 4 mm; Eluent: acetonitryl : woda 45:55 + 0,1 % kwasu octowego v/v; w= 1,0 ml / min; Symbole: P- plumbagina, 1, 2, 3 – odpowiednio substancje balastowe przed i po plumbaginie.



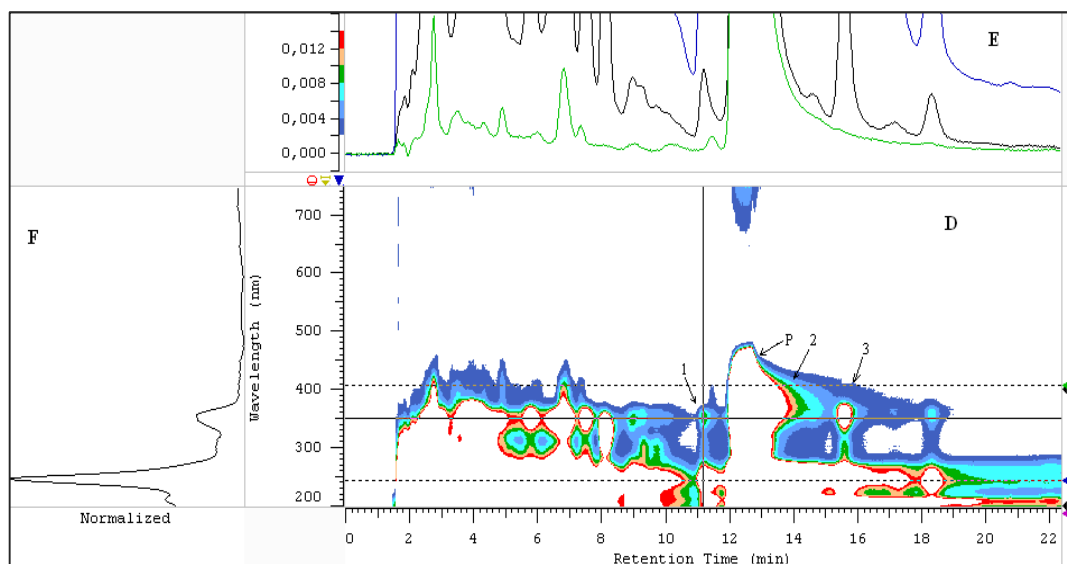
Rys. 49. A- Przykład chromatogramu detektora UV – VIS typu DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników chloroformowego ekstraktu roślinnego *Drosera aliciae*, dozowanego po odparowaniu chloroformu w organicznym składniku eluentu; B– Chromatogram UV-DAD przy wybranych długościach fali (410 nm, 350 nm, 250 nm); C – Widmo substancji zaznaczonych kolorowymi markerami na części A rysunku. Kolumna: LiChrospher® RP18e, 5 µm, 250 x 4 mm; Eluent: acetonitryl : woda 45:55 + 0,1% kwasu octowego v/v; w= 1,0 ml / min; Symbole: R- ramentaceon, 1, 2, 3– substancje balastowe przed i po ramentaceonie.

Układ chromatograficzny składający się z kolumny LiChrospher RP 18e, 5 μm , 250 x 4 mm i eluentu ACN : H₂O 45:55 + 0,1 % kwasu octowego v/v, odznaczał się największą selektywnością rozdzielania w skali modelowej. W związku z powyższym zbadano możliwość powiększenia skali procesu rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów, z zastosowaniem tego układu. Przykładowe chromatogramy rozdzielania chloroformowego ekstraktu z *D. muscipula* i *D. aliciae*, uzyskane w skali analitycznej, w warunkach przeładowania zamieszczono na rysunkach 50 i 51.

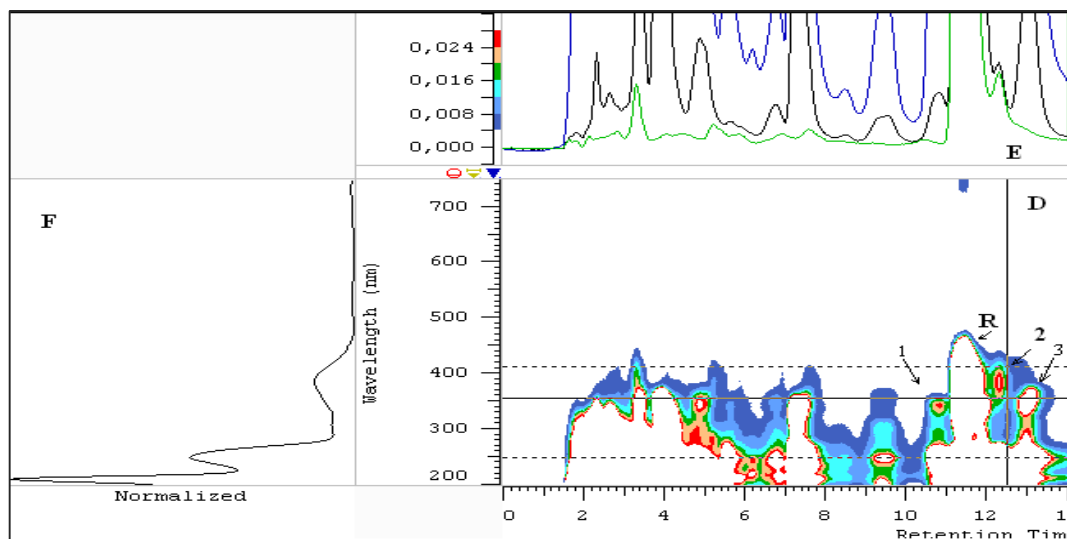
Badania wykazały, że maksymalny stopień przeładowania stężeniowego wynosi odpowiednio dla plumbaginy ok. $1,7 \times 10^{-4}$ g/g sorbentu oraz dla ramentaceonu $1,13 \times 10^{-4}$ g/g sorbentu.

Następnie, w warunkach optymalnego przeładowania stężeniowego kolumny rozdzielono plumbaginę oraz ramentaceon od towarzyszących im składników ekstraktów roślinnych z *D. muscipula* i *D. aliciae* oraz zebrano frakcję zawierającą powyższe naftochinony. Czystość frakcji bogatej w plumbaginę bądź w ramentaceon zbadano w opracowanych, optymalnych warunkach normalnego układu faz wysokosprawnej chromatografii ciekowej (NP-HPLC) do rozdzielania naftochinonów (rozdział 7.6.2.). Czystość frakcji bogatych w plumbaginę lub ramentaceon, otrzymanych z zastosowaniem przeładowania stężeniowego wynosiła odpowiednio dla plumbaginy – 92 % oraz dla ramentaceonu 99,99%.

Produktywność kolumny wyrażona w [g / m²h] wynosiła dla plumbaginy -32,2, a dla ramentaceonu – 48,1.



Rys. 50. D- Przykład chromatogramu detektora UV – VIS typu DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników chloroformowego ekstraktu roślinnego *Dionaea muscipula*, dozowanego po odparowaniu chloroformu w organicznym składniku eluentu, z zastosowaniem warunków przeładowania kolumny; E– chromatogram UV-DAD przy wybranych długościach fali (410 nm, 350 nm, 250 nm); F – widmo substancji zaznaczonej markerem na rysunku D. Kolumna: LiChrospher® RP18e, 5µm, 250 x 4 mm; Eluent: acetonitryl : woda 45:55 + 0,1 % kwasu octowego v/v; w= 1,0 ml / min; Symbole: P- plumbagina, 1, 2, 3 – odpowiednio substancje balastowe przed i po plumbaginie.



Rys. 51. D-przykład chromatogramu detektora UV – VIS typu DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników chloroformowego ekstraktu roślinnego *Drosera aliciae*, dozowanego po odparowaniu chloroformu w organicznym składniku eluentu, z zastosowaniem warunków przeładowania kolumny; E– chromatogram UV-DAD przy wybranych długościach fali (410 nm, 350 nm, 250 nm); F – widmo substancji zaznaczonej markerem na rysunku D. Kolumna: LiChrospher® RP18e, 5µm, 250 x 4 mm; Eluent: acetonitryl : woda 45:55 + 0,1% kwasu octowego v/v; w= 1,0 ml / min; Symbole: R- ramentaceon, 1, 2, 3– substancje balastowe przed i po ramentaceonie.

Uzyskane podczas przeprowadzonych badań wyniki posłużyły do sformułowania następujących wniosków:

- 1) Optymalny układ chromatograficzny do rozdzielania składników chloroformowych ekstraktów z *Drosera aliciae* i *Dionaea muscipula*, to żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi, poddany procesowi usuwania resztkowych grup hydroksylowych (ang. *endcapped*) jako faza stacjonarna i dwuskładnikowy eluent, składający się z wody oraz acetonitrylu z dodatkiem kwasu octowego w proporcjach objętościowych acetonitryl : woda 45:55 + 0,1% kwasu octowego v/v.
- 2) Fazy ruchome, będące mieszaniną wody z metanolem, tetrahydrofuranem lub dioksanem nie wykazują selektywności rozdzielania plumbaginy i ramentaceonu od substancji towarzyszących na optymalnym poziomie lub współczynnik retencji rozdzielanych naftochinonów jest dużo wyższy od optymalnego (>10).
- 3) W celu elucji składników ekstraktów silnie sorbowanych do powierzchni fazy stacjonarnej zastosowano elucje zwrotną w kolumnie tzw. „backflash”, co skróciło czas całego procesu rozdzielania. Dzięki takiemu rozwiązaniu nie było potrzeby stosowania elucji skokowej w końcowym etapie rozdzielania. Jest to oczywiście rozwiązanie korzystne, ponieważ omija się etap kondycjonowania kolumny chromatograficznej początkowym eluentem.
- 4) W układzie chromatograficznym, w którym zastosowano kolumnę LiChrospher RP 18e, 5 µm, 250 x 4 mm oraz eluent acetonitryl : woda 45:55 + 0,1% kwasu octowego v/v, zbadano możliwość powiększenia skali rozdzielania i izolowania plumbaginy oraz ramentaceonu. Badania wykazały, że maksymalny stopień przeładowania stężeniowego wynosi odpowiednio dla plumbaginy ok. $1,7 \times 10^{-4}$ g/g sorbentu oraz dla ramentaceonu $1,13 \times 10^{-4}$ g/g sorbentu.
- 5) Czystość frakcji bogatych w plumbagine lub ramentaceon, otrzymanych w opracowanych, optymalnych warunkach z zastosowaniem przeładowania stężeniowego, wynosiła dla plumbaginy – 92% oraz dla ramentaceonu 99,99%.
- 6) Produktywność kolumny wyrażona w [g / m²h] wynosiła dla plumbaginy -32,2, a dla ramentaceonu – 48,1.

7.6.2. Wyniki badań nad optymalizacją warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów w ekstraktach chloroformowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki NP-HPLC w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej

Wstępne badania nad doбором optymalnego układu chromatograficznego do rozdzielania naftochinonów z chloroformowych ekstraktów roślin mięsożernych w warunkach NP-HPLC wykonano w ramach pracy magisterskiej Ł. Żuka [115], pod opieką autorki niniejszej pracy. Rezultaty opublikowano w streszczeniu w czasopiśmie z „listy filadelfijskiej” [116].

Optymalny układ chromatograficzny [115] do rozdzielania składników chloroformowych ekstraktów z *Drosera aliciae* i *Dionaea muscipula*, to żel krzemionkowy jako faza stacjonarna i dwuskładnikowy eluent, składający się z heptanu (n-heksan) oraz dioksanu z dodatkiem kwasu octowego w proporcjach objętościowych odpowiednio dla ekstraktu z *Drosera aliciae* (98,5 : 1,5 v/v + 0,05% kwasu) oraz dla ekstraktu z *Dionaea muscipula* (99,6 : 0,4 v/v + 0,05% kwasu).

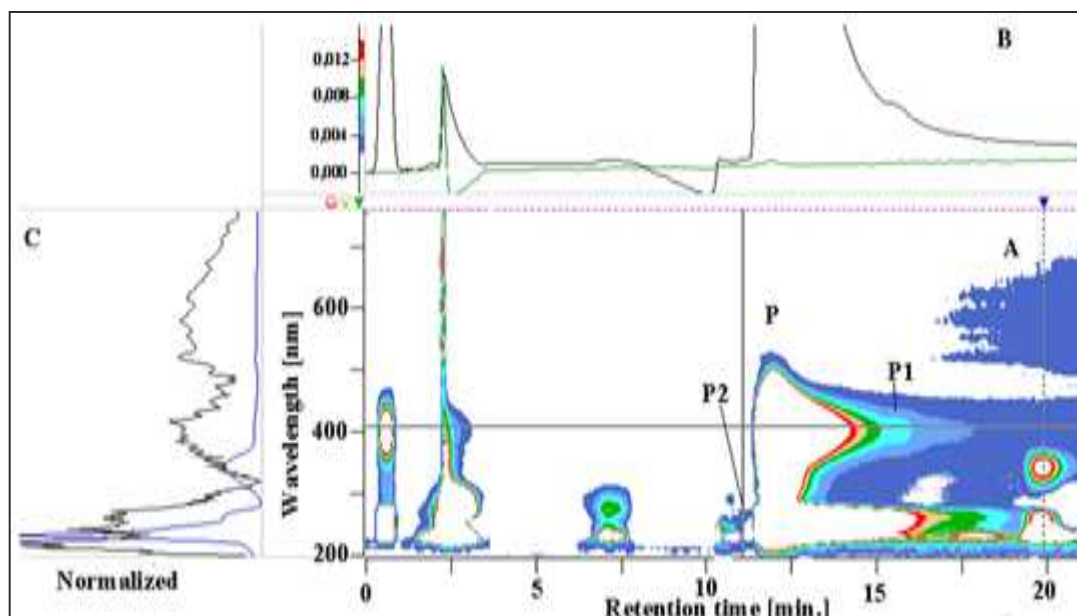
W tych warunkach zbadano możliwość powiększenia skali procesu rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów, to jest plumbaginy i ramentaceonu. Przykładowe chromatogramy rozdzielania chloroformowego ekstraktu z *D. muscipula* i *D. aliciae*, uzyskane w skali analitycznej, w warunkach przeładowania kolumny oraz braku przeładowania zamieszczono na rysunkach 52 - 55.

Badania wykazały, że maksymalny stopień przeładowania stężeniowego wynosi odpowiednio dla plumbaginy ok. $1,1 \times 10^{-4}$ g/g sorbentu oraz dla ramentaceonu $3,3 \times 10^{-4}$ g/g sorbentu.

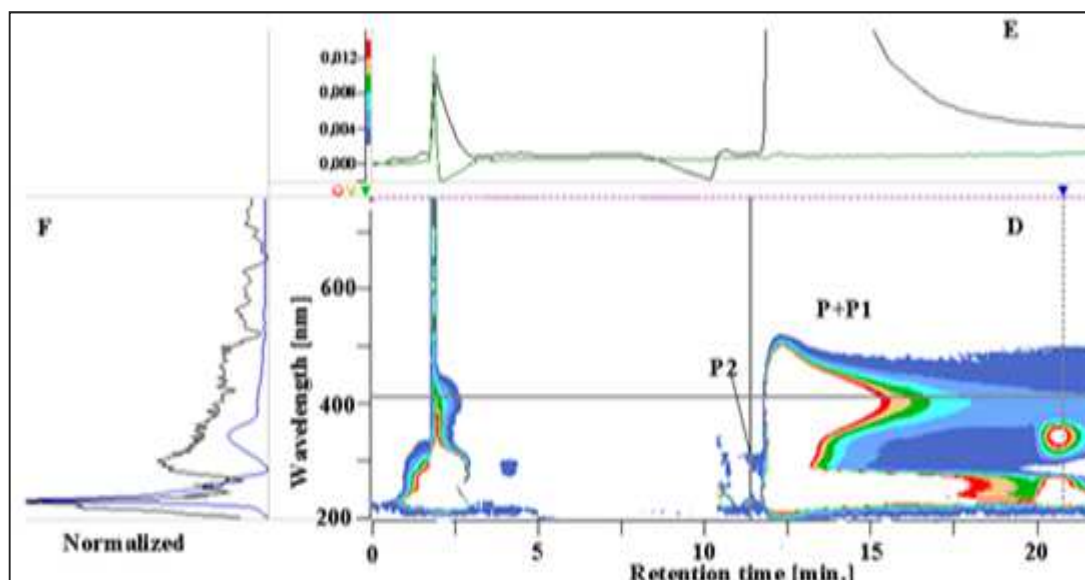
Następnie, w warunkach optymalnego przeładowania stężeniowego kolumny rozdzielono plumbagine oraz ramentaceon od towarzyszących im składników ekstraktów roślinnych z *D. muscipula* i *D. aliciae* oraz zebrano frakcje zawierające wybrane naftochinony.

Czystość frakcji bogatej w plumbagine bądź w ramentaceon zbadano w opracowanych, optymalnych warunkach odwróconego układu faz wysokosprawnej chromatografii ciekowej (RP-HPLC) do rozdzielania naftochinonów (rozdział 7.6.1.). Czystość frakcji bogatych w plumbagine lub ramentaceon, otrzymanych z zastosowaniem przeładowania stężeniowego wynosiła odpowiednio dla plumbaginy – 97,5% oraz dla ramentaceonu 99,95%.

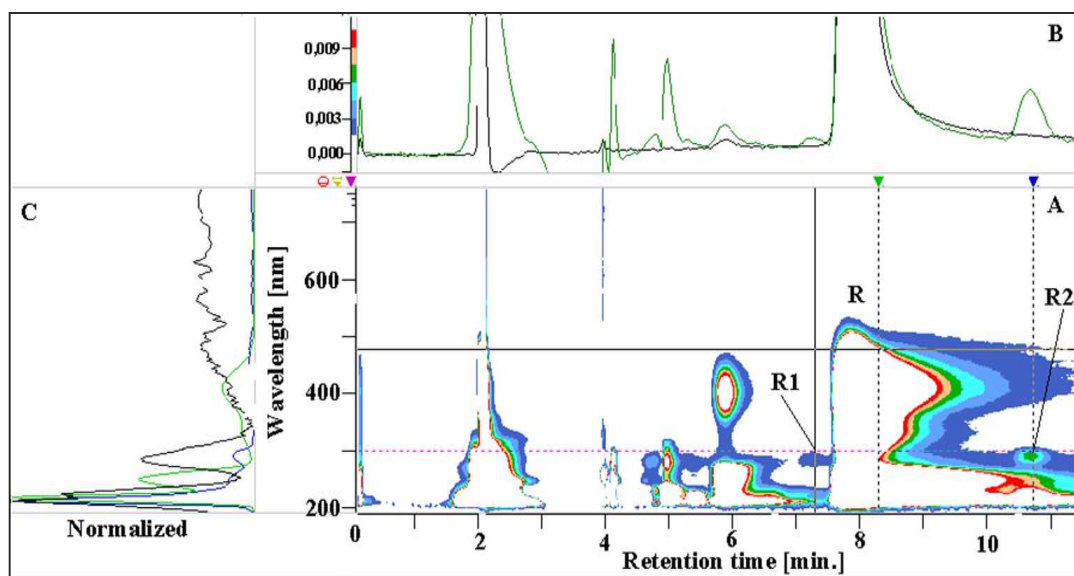
Produktywność kolumny wyrażona w [g / m²h] wynosiła dla plumbaginy -30,1, a dla ramentaceonu – 50,9.



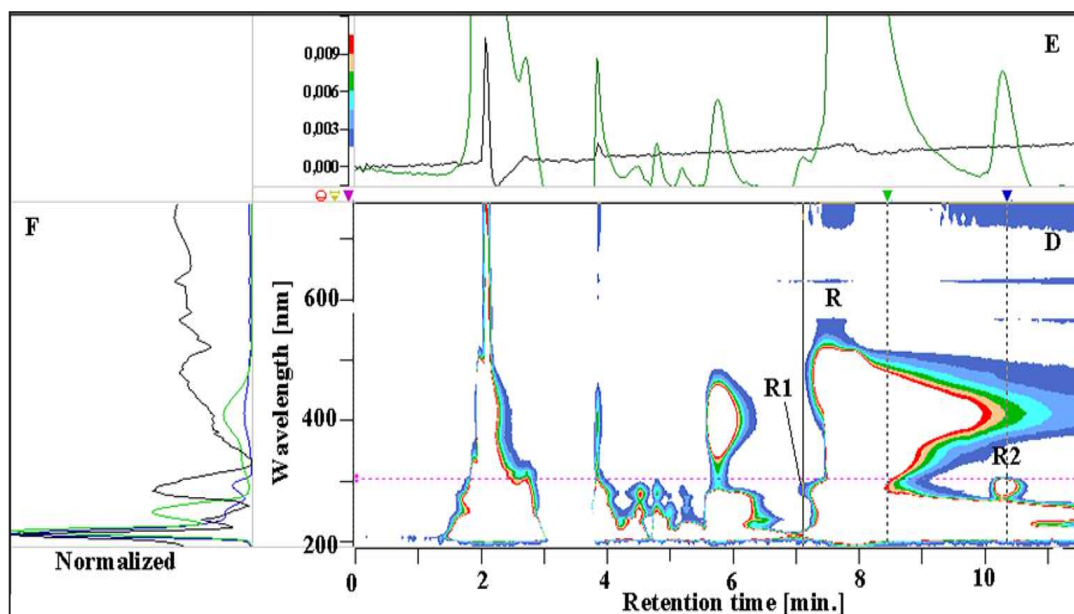
Rys. 52. A- Przykład chromatogramu detektora UV – VIS typu DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników chloroformowego ekstraktu roślinnego *Dionaea muscipula*, dozowanego w dichlorometanie, w warunkach braku przeładowania kolumny; B– chromatogram UV-DAD przy wybranej długości fali - 410 nm; C – widmo substancji zaznaczonej markerem na rysunku A. Kolumna: Nucleosil 50Å, 3 µm, 250 x 4 mm; Eluent: n-heksan : dioksan 99,6 : 0,4 + 0,05% kwas octowy v/v; w= 1,5 ml / min; Symbole: P- plumbagina, P1, P2 – odpowiednio substancje balastowe po i przed plumbaginie.



Rys. 53. D- Przykład chromatogramu detektora UV – VIS typu DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników chloroformowego ekstraktu roślinnego *Dionaea muscipula*, dozowanego w dichlorometanie, z zastosowaniem warunków przeładowania kolumny; E– chromatogram UV-DAD przy wybranej długości fali - 410 nm; F – widmo substancji zaznaczonej markerem na rysunku D. Kolumna: Nucleosil 50Å, 3 μm, 250 x 4 mm; Eluent: n-heksan : dioksan 99,6 : 0,4 + 0,05% kwas octowy v/v; w= 1,5 ml / min; Symbole: P- plumbagina, P1, P2 – odpowiednio substancje balastowe po i przed plumbaginie.



Rys. 54. A- Przykład chromatogramu detektora UV – VIS typu DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników chloroformowego ekstraktu roślinnego *Drosera aliciae*, dozowanego w dichlorometanie, w warunkach braku przeładowania kolumny; B– chromatogram UV-DAD przy wybranych długościach fali – 300 i 480 nm; C – widmo substancji zaznaczonej markerem na rysunku A. Kolumna: Nucleosil 50Å, 3μm, 250 x 4 mm; Eluent: n-heksan : dioksan 98,5:1,5 + 0,05% kwas octowy v/v; w= 1,5 ml / min; Symbole: R- ramentaceon, R1, R2 – odpowiednio substancje balastowe przed i po ramentaceon.



Rys. 55. D- Przykład chromatogramu detektora UV – VIS typu DAD, otrzymanego podczas rozdzielania składników chloroformowego ekstraktu roślinnego *Drosera aliciae*, dozowanego w dichlorometanie, z zastosowaniem warunków przeładowania kolumny; E– chromatogram UV-DAD przy wybranej długości fali – 300 nm; F – widmo substancji zaznaczonej markerem na rysunku A. Kolumna: Nucleosil 50Å, 3 µm, 250 x 4 mm; Eluent: n-heksan : dioksan 98,5:1,5 + 0,05% kwas octowy v/v; w= 1,5 ml / min; Symbole: R- ramentaceon, R1, R2 – odpowiednio substancje balastowe przed i po ramentaceonie.

Uzyskane podczas przeprowadzonych badań wyniki posłużyły do sformułowania następujących wniosków:

- 1) Optymalne układ chromatograficzny do rozdzielania i izolowania składników chloroformowych ekstraktów z *Drosera aliciae* i *Dionaea muscipula*, to żel krzemionkowy jako faza stacjonarna i dwuskładnikowy eluent, składający się z n-heptanu (n-heksan) oraz dioksanu z dodatkiem kwasu octowego w proporcjach objętościowych odpowiednio dla ekstraktu z *Drosera aliciae* (98,5 : 1,5 v/v + 0,05% kwasu octowego) oraz dla ekstraktu z *Dionaea muscipula* (99,6 :0,4 v/v + 0,05% kwasu octowego).
- 2) W celu elucji składników ekstraktów silnie sorbowanych do powierzchni fazy stacjonarnej zastosowano elucje zwrotną eluentu w kolumnie tzw. „backflash”, co skróciło czas całego procesu rozdzielania. Dzięki takiemu rozwiązaniu, nie było potrzeby stosowania elucji skokowej w końcowym etapie rozdzielania. Jest to oczywiście rozwiązanie korzystne, ponieważ omija się etap kondycjonowania kolumny chromatograficznej początkowym eluentem.

- 3) W układzie chromatograficznym, w którym zastosowano kolumnę Nucleosil 50Å, (3 μm, 250 x 4 mm) oraz eluent *n*-heksan : dioksan + 0,1% kw. octowego zbadano możliwość powiększenia skali rozdzielania i izolowania naftochinonów. Badania wykazały, że maksymalny stopień przeładowania stężeniowego wynosi odpowiednio dla plumbaginy ok. $1,1 \cdot 10^{-4}$ g/g sorbentu oraz dla ramentaceonu $3,3 \cdot 10^{-4}$ g/g.
- 4) Czystość frakcji bogatych w plumbagine lub ramentaceon, otrzymanych w opracowanych, optymalnych warunkach z zastosowaniem przeładowania stężeniowego wynosiła dla plumbaginy – 97,5% oraz dla ramentaceonu 99,95%.
- 5) Produktywność kolumny wyrażona w [g / m²h] wynosiła dla plumbaginy -30,1, a dla ramentaceonu – 50,9.

8. STRESZCZENIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest zgłębienie i opanowanie problemu doboru optymalnych warunków przygotowania próbki do analizy bądź wsadu do procesu rozdzielania i otrzymywania poszczególnych składników lub grup składników materiału roślinnego, jakimi są rośliny mięsożerne (zwłaszcza owadożerne) oraz opracowanie jak najbardziej uniwersalnych procedur rozdzielania, oznaczania i izolowania metabolitów wtórnych z tego typu roślin.

Rośliny mięsożerne są cennym źródłem wielu związków chemicznych takich jak: naturalne naftochinony, kwasy fenolowe, glikozydy i aglikony flawonoidów, a także i innych grup naturalnych związków chemicznych, które, będąc związkami farmakologicznie czynnymi, są powszechnie pozyskiwane z roślin i wykorzystywane do produkcji leków.

W medycynie ludowej i homeopatii wyciągi z roślin mięsożernych stosowane były od dawna jako środki pobudzające wydzielanie śluzu, leczniczo, w bronchitach, kaszlu i kokluszu. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o bakteriostatycznych i przeciwnowotworowych właściwościach związków zawartych w tkankach roślin mięsożernych, co na nowo zwróciło uwagę na te niezwykle organizmy. Metabolity wtórne z grupy naftochinonów oraz flawonoidów wykazują właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, istnieją także doniesienia o właściwościach przeciwnowotworowych w przypadku naftochinonów.

Z uwagi na aktywność farmakologiczną naftochinonów i flawonoidów dużego znaczenia nabrało opracowanie selektywnych i czułych metodyk przygotowania próbki/wsadu do rozdzielania, oznaczania i izolacji frakcji metabolitów wtórnych lub grup tychże z ekstraktów roślinnych.

Chromatografia cieczowa jest najczęściej stosowaną techniką do rozdzielania, w celu określenia struktury, identyfikacji, oznaczania, a także otrzymywania metabolitów wtórnych z ekstraktów roślinnych. Najstarszą techniką analityki naftochinonów i flawonoidów jest chromatografia planarna, zarówno bibułowa, jak i cienkowarstwowa. Obecnie badania ekstraktów roślinnych bogatych w substancje z grupy naftochinonów i flawonoidów wykonuje się przede wszystkim z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w skali analitycznej, a otrzymywanie czystych składników z zastosowaniem

preparatywnej chromatografii cieczowej (PLC). W przyszłości można się spodziewać otrzymywania na skalę procesową określonych składników roślin mięsożernych. By tego rodzaju operacje i procesy były efektywne, należy opracować optymalne warunki ich realizacji.

W części wprowadzającej pracy dokonano przeglądu literatury i poddano krytycznej ocenie istniejące techniki i metody przygotowania próbki / wsadu, rozdzielania, identyfikacji i oznaczania oraz izolowania metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów i flawonoidów z materiału roślin mięsożernych.

Przegląd literatury wykazał, że istnieje tam wiele procedur przygotowania próbki, rozdzielania, oznaczania, a także, izolowania metabolitów roślinnych, jednak dotychczas nie opracowano procedur uniwersalnych, przydatnych do selektywnego rozdzielania metabolitów większej grupy roślin, nawet „tylko” mięsożernych. Warunki rozdzielania zaproponowane w literaturze są odpowiednie do rozdzielania składników ekstraktów otrzymanych z konkretnych roślin, poddanych określonym warunkom elicytacji i otrzymanych w określonych warunkach ekstrakcji/ługowania. W przypadku pojawienia się w ekstrakcie dodatkowych substancji, będących wynikiem zmiany warunków hodowli roślinnej (uprawy) czy sposobu i warunków ekstrakcji / ługowania, stają się one nieskuteczne, albo tylko częściowo skuteczne.

W części doświadczalnej pracy opisano metody postępowania, które zostały zastosowane w badaniach.

Metodyka przygotowania próbki / wsadu do dalszych etapów rozdzielania składników materiału roślinnego ma znaczący wpływ na efektywność analityki, a szczególnie preparatyki. W pierwszym etapie badań uznano za konieczne zbadanie i porównanie efektywności, znanych dotychczas „klasycznych” i często nadal stosowanych technik i warunków operacji ekstrakcji/ługowania oraz nowoczesnych technik i metod, które powinny być znacznie bardziej efektywne od tradycyjnych.

Na podstawie przeglądu literatury dotyczącej technik i metod ekstrakcji/ługowania wytypowano do porównawczych badań efektywności izolacji metabolitów wtórnych z materiału roślinnego następujące techniki:

- ekstrakcja w aparacie Soxhlet’a,
- ekstrakcja w aparacie Soxhtec[®] (modyfikacja ekstrakcji w aparacie Soxhlet’a),
- ekstrakcja na drodze maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem,
- ekstrakcja wspomagana działaniem fal mikrofalowych,

- sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej,
- ekstrakcja wspomagana działaniem dezintegratora ultradźwiękowego,
- ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego o wysokiej szybkości ścinania.

Badania dotyczące rozdzielania, oznaczania, identyfikowania i izolacji metabolitów wtórnych z materiału roślinnego wykonano z zastosowaniem następujących technik rozdzielania:

- cienkowarstwowej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC)
- cienkowarstwowej chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz (NP-TLC)
- wysokosprawnej chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz (NP-HPLC);
- wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC);

W badaniach uwzględniono następujące techniki detekcji: spektrofotometria UV – VIS – detektor spektrofotometryczny z matrycą fotodiodową (UV-VIS typu DAD).

Cele cząstkowe badań sformułowano następująco:

1. Zbadanie i porównanie efektywności technik ekstrakcji / ługowania metabolitów wtórnych z materiału surowego roślin mięsożernych takich jak:
 - ekstrakcja w aparacie Soxhleta,
 - ekstrakcja w aparacie Soxhtec[®] (modyfikacja ekstrakcji w aparacie Soxhleta),
 - ekstrakcja na drodze maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem,
 - ekstrakcja wspomagana działaniem fal mikrofalowych,
 - sonifikacja w łaźni ultradźwiękowej,
 - ekstrakcja wspomagana działaniem dezintegratora ultradźwiękowego,
 - ekstrakcja za pomocą homogenizatora wysoko obrotowego o wysokiej szybkości ścinania.
2. Dobór selektywnych składników eluentu do rozdzielania związków chemicznych oraz wybranych metabolitów z metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych w normalnych oraz odwróconych układach faz za pomocą cienkowarstwowej chromatografii cieczowej.

3. Opracowanie selektywnej i możliwie szybkiej metodyki rozdzielania i identyfikowania za pomocą widm UV-VIS wybranych flawonoidów: kwercetyny i mirycetyny oraz naftochinonów: chloroplumbaginy, hydroksyplumbaginy, plumbaginy i ramentaceonu w metanolowych ekstraktach z roślin mięsożernych, w warunkach odwróconych układów faz oraz elucji gradientowej.
4. Opracowanie metodyki rozdzielania i izolowania wybranych flawonoidów i grupy naftochinonów, zawartych w metanolowych ekstraktach za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej w odwróconych układach faz w warunkach elucji skokowej.
5. Opracowanie metodyki rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów, zawartych w chloroformowych ekstraktach z roślin mięsożernych, z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej w warunkach normalnego i odwróconego układu faz oraz elucji izokratycznej, w skali modelowej, w warunkach braku przeładowania oraz w warunkach przeładowania kolumny.

W części „Wyniki i dyskusja” zamieszczono najważniejsze rezultaty i szczegółowe wnioski.

Na podstawie studiów literaturowych oraz wyników badań tej pracy sformułowano poniższe wnioski końcowe.

Badania nad porównaniem efektywności wybranych technik ekstrakcji / ługowania metabolitów z materiału mokrego *Dionaea muscipula*

1. Optymalny czas operacji ekstrakcji, w aparacie Soxtec[®], substancji z materiału roślinnego z gatunku *D. muscipula* wynosi 1 godzinę. Prowadzenie procesu ekstrakcji w aparacie Soxtec[®] powyżej 1 godziny nie prowadziło do zwiększenia zawartości wyekstrahowanych metabolitów bądź grup substancji lub przyrost ten był bardzo nieznaczny.
2. Optymalny czas maceracji z jednoczesnym wytrząsaniem to 15 godzin. Prowadzenie procesu maceracji dłużej niż 15 godzin nie zwiększyło znacznie zawartości wyekstrahowanych metabolitów oraz innych związków. W przypadku mirycetyny oraz związków sklasyfikowanych w grupie 6, ich zawartość w otrzymanym powyżej 15 godzin ekstrakcie spadła. Zastosowanie

mieszania (wyrząsania) podczas maceracji wydaje się korzystnie wpływać na optymalny czas prowadzenia procesu, gdyż przedstawiony w literaturze czas maceracji metabolitów z materiału roślinnego bez mieszania jest o wiele dłuższy (72 h - [9]), 48 h - [16]).

3. Z przeprowadzonych badań nad doбором optymalnych warunków ekstrakcji / ługowania za pomocą mikrofal metabolitów z roślin mięsożernych wynika, iż nie można jednoznacznie określić optymalnego czasu prowadzenia operacji ekstrakcji dla wszystkich składników zawartych w materiale roślinnym.

Dla składników materiału roślinnego sklasyfikowanych w grupach 2 - 6 oraz dla kwercetyny i mirycetyny optymalny czas prowadzenia operacji ekstrakcji wynosi 4 minuty. Ekstrakcja prowadzona powyżej 4 minut powoduje rozkład substancji (w przypadku kwercetyny i grupy 6) lub praktycznie nie zmienia zawartości wyekstrahowanych substancji (grupa 2 - 5 oraz mirycetyna).

Dla plumbaginy oraz składników zawartych w grupie 1-wszej optymalny czas prowadzenia ekstrakcji wyniósł 8 minut.

Różnice w optymalnym czasie procesu ekstrakcji za pomocą mikrofal dla składników materiału roślinnego wynikają z różnicy w ich polarności, czyli z różnej wartości elektrycznego momentu dipolowego. W związku z powyższym związki takie, jak plumbagina oraz substancje sklasyfikowane w grupie pierwszej, charakteryzujące się niską polarnością (niską wartością momentu dipolowego) pobierają mniejszą ilość energii podczas procesu ekstrakcji wspomaganiej mikrofalami niż takie związki, jak flawonoidy (kwercetyna i mirycetyna) oraz składniki grup 2-6.

4. Wzrost temperatury operacji ekstrakcji za pomocą ultradźwięków w łaźni ultradźwiękowej oraz z wykorzystaniem dezintegratora ultradźwiękowego, jak również za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego wpłynął na wyższy stopień wyekstrahowanych metabolitów roślinnych z materiału roślinnego. Podniesienie temperatury procesu z 30 °C na 50 °C wpłynęło na wyższą rozpuszczalność metabolitów w ekstrakcie, a także na wzrost oddziaływań desorpcyjnych. Jako optymalny czas prowadzenia procesu ekstrakcji za pomocą ultradźwięków w łaźni ultradźwiękowej oraz za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, jak również za pomocą homogenizatora wysokoobrotowego uznano 8 minut.

5. Biorąc za miarę efektywności ekstrakcji ilość wyekstrahowanego metabolitu oraz czas trwania operacji, techniką optymalną do izolowania plumbaginy oraz substancji z grup 1-3 (związki stosunkowo mało polarne) z materiału roślin mięsożernych jest ekstrakcja za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego (UAE).
6. Technika ekstrakcji / ługowania optymalna dla substancji z grupy 4-6 oraz dla flawonoidów- kwercetyny i mirycetyny (związki stosunkowo polarne), to ekstrakcja za pomocą mikrofal (MAE).
7. Stężenia poszczególnych grup związków lub pojedynczych metabolitów uzyskane w optymalnych, specyficznych warunkach dla danej techniki ekstrakcyjnej, są porównywalne i niezależne od zastosowanej techniki ekstrakcji/ługowania, natomiast czas ekstrakcji/ługowania jest bardzo zróżnicowany.
8. W przypadku trwałych związków korzystne jest podwyższenie temperatury operacji, co ewidentnie powoduje wzrost efektywności. Jednakże, w przypadku nietrwałych związków należy prowadzić ekstrakcję/ługowanie w obniżonej temperaturze, w atmosferze gazu obojętnego oraz przy zaciemnieniu.

Badania wpływu rodzaju kwasu jako dodatku do eluentu na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz

1. Z przeprowadzonych badań dotyczących wpływu rodzaju kwasu na rozdzielanie flawonoidów, wynika, że biorąc pod uwagę asymetrię piku oraz liczbę pól teoretycznych dla kwercetyny jak i mirycetyny najlepszym modyfikatorem fazy ruchomej okazał się kwas siarkowy.
2. Z kolei zaobserwowano zdecydowanie większy czas retencji oraz współczynnik retencji flawonoidów przy zastosowaniu kwasu octowego jako dodatku do eluentu. Oznacza to, że obecność metylowych grup funkcyjnych w kwasie octowym i efekt solwatacji wpływa na wzrost hydrofobowości rozdzielanych solwatów. Piki analizowanych flawonoidów przy użyciu fazy ruchomej, w skład której wchodził kwas octowy, cechuje większe rozmycie (dyspersja) oraz większa asymetria niż w przypadku analiz z wykorzystaniem kwasu siarkowego. Jest to spowodowane tym, że kwas octowy tworzy większe solwaty, niż kwas siarkowy, przez co rośnie wartość współczynnika dyfuzji.

3. Zastosowanie kwasu trifluorooctowego (TFA), który jak można zauważyć w literaturze jest obecnie najczęściej stosowanym modyfikatorem fazy ruchomej, nie jest korzystne. Wyniki wskazują, że liczba pól teoretycznych jest stosunkowo mała w porównaniu do liczby pól teoretycznych uzyskanych z zastosowaniem kwasu siarkowego. Wartość współczynnika asymetrii $As_{0,5}$ oraz $As_{0,1}$ pików kwercetyny i mirycetyny, w analizach przy zastosowaniu TFA jest dość duża, co także może niekorzystnie wpływać na proces ich rozdzielania i oznaczania w ekstraktach roślinnych. Czas retencji i współczynnik retencji także nie są wartościami zadowalającymi w porównaniu do wyników jakie uzyskano dla kwasu octowego.
4. Biorąc pod uwagę wnioski, z przeprowadzonych badań nad wpływem kwasu, jako dodatku do eluentu, do rozdzielania flawonoidów w odwróconym układzie faz, zdecydowano iż najkorzystniejsze jest stosowanie w dalszych badaniach dwóch kwasów, siarkowego i octowego.

W badaniach nad rozdzielaniem, oznaczaniem i identyfikacją metabolitów zawartych w materiale roślin mięsożernych zdecydowano się na stosowanie kwasu siarkowego.

W badaniach nad opracowaniem warunków rozdzielania i izolacji metabolitów z materiału roślin mięsożernych zdecydowano o konieczności stosowania kwasu octowego. Kwas octowy jest kwasem dużo słabszym od kwasu siarkowego, a przede wszystkim jest bardziej lotny, dzięki czemu usunięcie go z otrzymanych po procesie chromatograficznym w skali preparatywnej frakcji bogatych w poszczególne metabolity jest łatwiejsze.

Badania nad doбором selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych za pomocą cienkowsarstwowej chromatografii ciekowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC)

1. Badania metanolowych ekstraktów roślin mięsożernych z gatunków: *D. muscipula*, *D. binata*, *D. aliciae*, *D. capensis*, przy użyciu cienkowsarstwowej chromatografii ciekowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC), wskazują, na konieczność zastosowania elucji gradientowej, w celu selektywnego rozdzielania, oznaczenia i identyfikowania wszystkich składników ekstraktów roślinnych.

Składnikami eluentu w odwróconym układzie faz powinny być następujące rozpuszczalniki:

- izopropanol, gdyż przy zastosowaniu tego rozpuszczalnika rozdzielaniu ulega największa ilość substancji z ekstraktów roślinnych, jednakże mało selektywnie rozdziela on flawonoidy,
- metanol, ponieważ wpływa na selektywne rozdzielanie flawonoidów: mirycetyny i kwercetyny,
- tetrahydrofuran, gdyż jego obecność w eluencie powoduje selektywne rozdzielanie chloroplumbaginy i droseronu, w większości badanych ekstraktów.

2. Badania, z wykorzystaniem chromatografii planarnej wskazują, iż do rozdzielania i oznaczania składników ekstraktów z roślin mięsożernych, należy wykorzystać elucję gradientową, ze względu na dużą ilość składników ekstraktów o bardzo zróżnicowanej hydrofobowości. Jej program powinien się rozpoczynać od wysokiej zawartości wody i niskiego stężenia składników organicznych, a następnie powinien przebiegać liniowy wzrost stężenia składników organicznych w eluencie. Po uzyskaniu rozdzielania większości składników próbki, program elucji powinien jeszcze przebiegać izokratycznie z największą siłą elucyjną, w celu wyeluowania z kolumny substancji silnie związanych z powierzchnią wypełnienia. Dodatkowo możliwe jest zastosowanie przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie, w celu całkowitego oczyszczenia kolumny po zakończeniu rozdzielania składników ekstraktów roślinnych.

Badania nad doбором selektywnych składników eluentu do rozdzielania metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych za pomocą cienkowarstwowej chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz (NP-TLC)

1. W przypadku zastosowania jako fazy ruchomej izopropanolu oraz octanu etylu zaobserwowano, iż rozdzielaniu uległo najwięcej składników ekstraktów roślinnych, jednakże różnice pomiędzy wartościami współczynników opóźnienia R_f dla poszczególnych składników ekstraktów roślinnych przy zastosowaniu izopropanolu są mniejsze. Należy także zaznaczyć, że na chromatogramach uzyskanych z zastosowaniem izopropanolu oraz octanu etylu widoczne jest zjawisko „ogonowania” plamek, odpowiadającym flawonoidom.

2. Zastosowanie tetrahydrofuranu oraz dioksanu jako fazy ruchomej pozwala uzyskać rozdzielanie podobnej ilości składników z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych, lecz jest ona mniejsza niż przy wykorzystaniu podczas rozdzielania składników ekstraktów jako fazę ruchomą izopropanolu bądź octanu etylu. Należy zaznaczyć, że zastosowanie dioksanu podczas rozdzielania ekstraktów roślinnych pozwala otrzymać większe, w porównaniu do rozdzielania z wykorzystaniem THF-u, różnice wartości współczynników hRf pomiędzy poszczególnymi składnikami, a szczególnie pomiędzy flawonoidami.
3. Eter tert-butylo-metylowy spowodował stosunkowo dobre rozdzielanie składników ekstraktu, dodatkowo chloroplumbagina i hydroksylumbagina mają znacznie różniące się długości drogi migracji. Podobnie, jak w przypadku wykorzystania izopropanolu i octanu etylu do rozdzielania składników ekstraktów można zauważyć zjawisko „ogonowania” plamek kwercetyny i mirycetyny.
4. Chlorek metylenu wykazał dość dobre zdolności rozdzielania składników ekstraktów roślinnych, biorąc pod uwagę, różnicę w wartościach współczynników opóźnienia dla poszczególnych substancji. Jednak ilość rozdzielonych składników ekstraktów nie była zadowalająca.
5. Chloroform wykazał bardzo małą przydatność do rozdzielania składników ekstraktów z roślin owadożernych, gdyż ilość rozdzielonych substancji była najmniejsza. Wartość współczynnika R_f dla flawonoidów przy zastosowaniu chloroformu wyniósł zero, co świadczy o tym, że w ogóle nie „ruszyły” one z miejsca zadozowania próbek wzorców flawonoidów oraz ekstraktów z roślin.
6. Badania, z zastosowaniem formamidu jako fazy ruchomej wykazały, że posiada on zbyt dużą siłę elucji, o czym świadczy to, iż wszystkie składniki naniesionych próbek podążyły wraz z czołem fazy ruchomej. Dlatego nie można było wyznaczyć drogi migracji poszczególnych składników, a co za tym idzie współczynników hR_f .
7. Wykonane badania w normalnym układzie faz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem eluentów jednoskładnikowych wykazały, że rozpuszczalniki, które powinny być użyte w dalszym etapie badań nad optymalnym składem eluentu do rozdzielania metanolowych ekstraktów roślin owadożernych, to octan etylu lub izopropanol, gdyż z zastosowaniem tych rozpuszczalników rozdzielaniu uległo najwięcej składników ekstraktów

roślinnych. Jednakże, ze względu na to, iż izopropanol wykazuje wyższą lepkość, niż octan etylu, co zwiększy opory przepływu na wlocie do kolumny chromatograficznej, zalecane jest zastosowanie octanu etylu. Korzystne jest również wykorzystanie eteru t-butylo-metylowego (MTBE), ponieważ w przeprowadzonych badaniach spowodował stosunkowo dobre rozdzielanie składników ekstraktu, a dodatkowo chloroplumbagina oraz hydroksyplumbagina wykazały znacznie różniące się długości drogi migracji.

Badania nad optymalizacją warunków rozdzielania, oznaczania i identyfikacji wybranych metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki HPLC w warunkach odwróconego układu faz oraz elucji gradientowej

1. Izopropanol, będący organicznym składnikiem eluentu, nadaje mu odpowiednią siłę elucyjną, ponadto jego zastosowanie pozwala selektywnie rozdzielić flawonoidy oraz naftochinony od substancji im towarzyszących. Wartości współczynników retencji składników ekstraktów, rozdzielanych przy użyciu eluentu, którego składnikiem jest izopropanol, znajdują się w optymalnym przedziale wartości.
2. Eluent, którego składnik stanowił metanol wykazuje słabą siłę elucyjną, aczkolwiek bardzo selektywnie pozwala rozdzielić flawonoidy między sobą. Wartości współczynników retencji substancji rozdzielanych są wyższe od 10, co wpływa na długi czas analizy ekstraktów.
3. Zastosowanie tetrahydrofuranu, jako organicznego składnika eluentu, pozwala mniej selektywnie niż w przypadku izopropanolu i metanolu rozdzielić badane związki.
4. Układ chromatograficzny, w którym wykorzystano acetonitryl jako składnik eluentu, wpłynął na bardzo selektywne rozdzielanie kwercetyny od substancji jej towarzyszących w ekstrakcie z *Dionaea muscipula* oraz mirycetyny zawartej w ekstrakcie z *Drosera aliciae* od substancji jej towarzyszących. Rozdzielenie naftochinonów z zastosowaniem acetonitrylu okazało się selektywne, aczkolwiek wartości k substancji rozdzielanych były znacznie większe niż w przypadku izopropanolu czy THF-u.
5. Badania wykonane z zastosowaniem RP-HPLC potwierdziły rezultaty otrzymane za pomocą techniki RP-TLC i wskazały na konieczność zastosowania

eluentu wieloskładnikowego do rozdzielania i oznaczania metanolowych ekstraktów z roślin mięsożernych.

6. Do stworzenia optymalnego programu elucji do rozdzielania, oznaczania i identyfikacji składników ekstraktów roślinnych wybrano mieszaninę wody z kwasem siarkowym o pH=3 oraz rozpuszczalniki organiczne: metanol i izopropanol. Metanol, ponieważ wpływał na selektywne rozdzielanie flawonoidów oraz izopropanol, gdyż pozwolił na selektywne rozdzielenie naftochinonów.
7. Wyniki analiz rozdzielania, oznaczania i identyfikacji składników ekstraktów roślin mięsożernych, za pomocą eluentu trójskładnikowego w RP-HPLC z wykorzystaniem elucji gradientowej są zadowalające dla metanolowych ekstraktów roślin z gatunku *D. muscipula* oraz *D. aliciae*. Dla ekstraktów z *D. capensis* i *D. binata* program elucji wymaga jeszcze modyfikacji, która sprawi, iż rozdzielanie zawartych w nich substancji będzie bardziej selektywne i pozwoli rozdzielić więcej składników ekstraktów.
8. Ekstrakt metanolowy z rośliny mięsożernej *Drosera aliciae* zawiera największą ilość składników wśród badanych ekstraktów roślinnych.
Badania za pomocą RP-HPLC potwierdziły rezultaty otrzymane z zastosowaniem RP-TLC, iż najprawdopodobniej ekstrakt z *D. capensis* nie zawiera chloroplumbaginy, a ekstrakt z *D. binata* nie zawiera droseronu lub występują one w stężeniach poniżej granicy wykrywalności.
9. Stwierdzono celowość stosowania detektora UV – VIS typu DAD oraz wykorzystania widm w UV, tworzonych przez ten detektor, do identyfikacji substancji oraz określenia stopnia nałożenia pików chromatograficznych.

Badania nad optymalizacją warunków rozdzielania i izolowania wybranych metabolitów z ekstraktów metanolowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki HPLC w odwróconym układzie faz w warunkach elucji skokowej

1. Metanolowe ekstrakty z roślin mięsożernych charakteryzują się bardzo bogatym składem. Zawierają one zarówno dość mało polarne naftochinony, jak również w dużej ilości względnie polarne flawonoidy. W celu uzyskania optymalnych warunków rozdzielania flawonoidów z metanolowych ekstraktów roślin

mięsożernych należy zastosować etapowe rozdzielanie składników ekstraktów roślinnych z wykorzystaniem elucji skokowej.

2. Opracowany program dwustopniowej elucji skokowej pozwolił w pierwszym etapie, z zadawalającym współczynnikiem selektywności rozdzielić wybrane metabolity z grupy flawonoidów, takie jak rutyna, kwercetyna, mirycetyna, jak również hydroksylumbaginę od substancji bezpośrednio im towarzyszącym. W drugim etapie programu elucji opracowanej metodyki eluują pozostałe naftochinony zawarte w ekstraktach roślinnych, takie jak chloroplumbagina, plumbagina bądź ramentaceon.
3. Frakcja, uzyskana za pomocą opracowanej metodyki, zawierająca naftochinony (za wyjątkiem hydroksylumbaginy) powinna w dalszym etapie badań być rozdzielona na poszczególne związki chemiczne za pomocą chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz.
4. Zaproponowany układ chromatograficzny odznacza się stosunkowo wysokimi współczynnikami selektywności α , co powinno pozwolić na osiągnięcie wysokiego, maksymalnego stopnia przeładowania kolumny. Ma to ogromne znaczenie biorąc pod uwagę fakt, iż efektywność rozdzielania i izolowania wybranych flawonoidów oraz hydroksylumbaginy z ekstraktów metanolowych w skali preparatywnej z zastosowaniem proponowanego układu chromatograficznego mogła by być wysoka.

Badania nad optymalizacją warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów z ekstraktów chloroformowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki HPLC w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej

1. Optymalny układ chromatograficzny do rozdzielania składników chloroformowych ekstraktów z *Drosera aliciae* i *Dionaea muscipula*, to żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi, poddany procesowi usuwania resztkowych grup hydroksylowych (ang. *endcapped*) jako faza stacjonarna i dwuskładnikowy eluent, składający się z wody oraz acetonitrylu z dodatkiem kwasu octowego w proporcjach objętościowych acetonitryl : woda 45:55 + 0,1% kwasu octowego v/v.
2. Fazy ruchome, będące mieszaniną wody z metanolem, tetrahydrofuranem lub dioksanem nie wykazują selektywności rozdzielania plumbaginy i ramentaceonu

- od substancji towarzyszących na optymalnym poziomie lub współczynnik retencji rozdzielanych naftochinonów jest dużo wyższy od optymalnego (>10).
3. W celu elucji składników ekstraktów silnie sorbowanych do powierzchni fazy stacjonarnej, zastosowano przepływ zwrotny eluentu w kolumnie tzw. „backflash”, co skróciło czas całego procesu rozdzielania. Dzięki takiemu rozwiązaniu nie było potrzeby stosowania elucji skokowej w końcowym etapie rozdzielania. Jest to oczywiście rozwiązanie korzystne, ponieważ omija się etap kondycjonowania kolumny chromatograficznej początkowym eluentem.
 4. W układzie chromatograficznym, w którym zastosowano kolumnę LiChrospher RP 18e, 5 µm, 250 x 4 mm oraz eluent acetonitryl : woda 45:55 + 0,1% kwasu octowego v/v, zbadano możliwość powiększenia skali rozdzielania i izolowania plumbaginy oraz ramentaceonu. Badania wykazały, że maksymalny stopień przeładowania stężeniowego wynosi odpowiednio dla plumbaginy ok. $1,7 \times 10^{-4}$ g/g sorbentu oraz dla ramentaceonu $1,13 \times 10^{-4}$ g/g sorbentu.
 5. Czystość frakcji bogatych w plumbagine lub ramentaceon, otrzymanych w opracowanych, optymalnych warunkach z zastosowaniem przeładowania stężeniowego wynosiła dla plumbaginy – 92% oraz dla ramentaceonu 99,99%.
 6. Produktywność kolumny wyrażona w [g / m²h] wynosiła dla plumbaginy -32,2, a dla ramentaceonu – 48,1.

Badania nad optymalizacją warunków rozdzielania i izolowania wybranych naftochinonów z ekstraktów chloroformowych roślin mięsożernych z wykorzystaniem techniki HPLC w normalnym układzie faz (NP-HPLC) w warunkach elucji izokratycznej w skali modelowej

1. Optymalny układ chromatograficzny do rozdzielania składników chloroformowych ekstraktów z *Drosera aliciae* i *Dionaea muscipula*, to żel krzemionkowy jako faza stacjonarna i dwuskładnikowy eluent, składający się z n-heptanu (n-heksan) oraz dioksanu z dodatkiem kwasu octowego w proporcjach objętościowych odpowiednio dla ekstraktu z *Drosera aliciae* (98,5:1,5 v/v + 0,05% kwasu) oraz dla ekstraktu z *Dionaea muscipula* (99,6:0,4 v/v + 0,05% kwasu).
2. W celu wyeluowania składników ekstraktów silnie sorbowanych do powierzchni fazy stacjonarnej zastosowano przepływ zwrotny eluentu w kolumnie tzw. „backflash”, co skróciło czas całego procesu rozdzielania.

3. W układzie chromatograficznym, w którym zastosowano kolumnę Nucleosil 50Å, (3µm, 250 x 4mm) oraz eluent *n*-heksan : dioksan + 0,1% kw. octowego zbadano możliwość powiększenia skali rozdzielania i izolowania naftochinonów. Badania wykazały, że maksymalny stopień przeładowania stężeniowego wynosi odpowiednio dla plumbaginy ok. $1,1 \cdot 10^{-4}$ g/g sorbentu oraz dla ramentaceonu $3,3 \cdot 10^{-4}$ g/g.
4. Czystość frakcji bogatych w plumbagine lub ramentaceon, otrzymanych w opracowanych, optymalnych warunkach z zastosowaniem przeładowania stężeniowego wynosiła dla plumbaginy – 97,5% oraz dla ramentaceonu 99,95%.
5. Produktywność kolumny wyrażona w [g / m²h] wynosiła dla plumbaginy -30,1, a dla ramentaceonu – 50,9.

9. ABSTRACT AND CONCLUSIONS

The purpose of this dissertation is to explore and master the problem of selection the optimal conditions of preparation sample for analysis or charge to the process of separation and yield of individual components or groups of plant material, such as carnivorous plants (especially insectivores) and development of the most versatile procedures of separation, characterization and isolation of secondary metabolites of this type of plant.

Carnivorous plants are a valuable source of many chemical compounds such as: natural naphthoquinones, phenolic acids, glycosides and aglucones of flavonoids, as well as other groups of natural compounds, which as pharmacologically active compounds are generally derived from plants and used to produce drugs.

In natural medicine and homeopathy carnivorous plant extracts have been used for a long as agents stimulating the secretion of mucus, therapeutically in bronchitis, cough and whooping cough. In recent years there have been reports of bacteriostatic and anti-cancer properties of compounds present in the tissues of carnivorous plants, which once again drawn attention to these extraordinary organisms. Secondary metabolites from the group naphthoquinones and flavonoids exhibit antibacterial and antifungal activities, there are also reports of anti-cancer properties of naphthoquinones.

Due to the pharmacological activity of naphthoquinones and flavonoids a great importance was gained by development of selective and sensitive methodologies for preparation of sample/charge for separation, characterization and isolation of the fraction of secondary metabolites or groups of them from plant extracts.

Liquid chromatography is the most widely used technique for the separation, in order to determine the structure, identification, characterization, and yield of secondary metabolites from plant extracts. The oldest technique for analysis of naphthoquinones and flavonoids is planar chromatography, both paper and thin layer. Currently, the study of plant extracts rich in substances from the group of naphthoquinones and flavonoids and performed primarily using high performance liquid chromatography technique (HPLC) in an analytical scale, and preparation of pure components using preparative liquid chromatography (PLC). In the future it can expected to yield the specific components of carnivorous plants in a process scale. To assure the effectiveness of these operations and processes, the optimal implementation conditions must be developed.

In the introduction there was performed a review of the available literature and subjected to critical evaluation were existing techniques and methods of sample preparation /charge, separation, identification and determination and isolation of secondary metabolites from group of naphthoquinones and flavonoids from carnivorous plant material.

Review of the literature showed that there where many procedures for sample preparation, separation, characterization, and also isolation of plant metabolites, but have not yet developed any universal procedures, useful for the selective separation of a larger group of plant metabolites, even "just" carnivores. Separation conditions proposed in the literature are suitable for separation of extracts components obtained from specific plants, subject to certain elicitation conditions received under particullar conditions of extraction / leaching. If there are any additional substances present in the extract as a result of changes in the conditions of plant cultivation (crops) or the manner and conditions of the extraction / leaching, they become ineffective, or only partially effective.

In the experimental part of this work the methods used in the research were described.

Methodology of sample/charge preparation for further stages of separation of ingredients from plant material has a significant impact on the effectiveness of analytic, especially the preparation. In the first stage of the research it was considered necessary to examine and compare the effectiveness of previously known as "classic" and often still in use techniques and conditions of the extraction/leaching operations and modern techniques and methods which should be much more efficient than traditional ones.

Based on review of the literature on techniques and methods of extraction/leaching the following techniques were selected for comparative effectiveness studies of secondary metabolites isolated from plant material:

- Soxhlet extraction
- Soxhtec[®] extraction (Soxhlet extraction modification)
- extraction through maceration with simultaneous shaking
- extraction supported by microwaves
- sonification in ultrasonic bath
- extraction supported by ultrasonic disintegrator
- extraction with high shear mixer

Research on separation, characterization, identification and isolation of secondary metabolites from plant material was performed using the following techniques of separation:

- reverse phase – thin layer chromatography (RP-TLC)
- normal phase – thin layer chromatography (NP-TLC)
- normal phase – high performance liquid chromatography (NP-HPLC)
- reverse phase – high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

In the studies the following detection techniques were used: spectrophotometry UV - VIS - spectrophotometric detector photodiode matrix (UV-VIS-type DAD).

Research sub-goals were defined as:

1. Examination and comparison of the effectiveness of extraction / leaching techniques of secondary metabolites from the raw material of carnivorous plants such as:
 - Soxhlet extraction
 - Soxhtec[®] extraction (Soxhlet extraction modification)
 - extraction through maceration with simultaneous shaking
 - extraction supported by microwaves
 - sonification in ultrasonic bath
 - extraction supported by ultrasonic disintegrator
 - extraction with high shear mixer
2. The choice of selective components of the eluent for the separation of chemical compounds and selected metabolites from methanol extracts of carnivorous plants using normal and reversed-phase thin layer chromatography.
3. Development of selective and rapid separation and identification methods using UV-VIS spectra of selected flavonoids: quercetin and mirycetin and naphthoquinones: chloroplumbagin, hydroksyplumbagin, plumbagin and ramentaceone in methanol extracts from carnivorous plant, in conditions of reversed-phases and gradient elution.
4. Development of methodology for separation and isolation of selected flavonoids and group of naphthoquinones contained in the methanol extracts using reversed-phase high performance liquid chromatography in the step elution conditions.
5. Development of methodology for separation and isolation of selected naphthoquinones contained in chloroformic extracts of carnivorous plant, using

normal and reversed phase high performance liquid chromatography and isocratic elution, in a model scale, in conditions of none-overloading and overloading of the column.

In the "Results and Discussion" section there were included for the most important results and the detailed conclusions.

Based on the study of literature and research results of this work the following conclusions were formulated.

Research on the comparison of the effectiveness of selected techniques for extraction/leaching of metabolites from the raw plant material of *Dionaea muscipula*

1. The optimum time for extraction process in the Soxtec[®] apparatus for substances from plant material of the *D. muscipula* species is 1 hour. Keeping the extraction process in the Soxtec[®] apparatus for more than 1 hour did not lead to an increase in the content of extracted metabolites or groups of substances or growth was very slight.
2. The optimal duration of the maceration process with shaking is 15 hours. Conducting the process of maceration for more than 15 hours did not increase significantly the content of extracted metabolites and other compounds, additionally for miricetin and compounds classified in group 6 their content in extract gained after more than 15 hours decreased. The implementation of mixing (shaking) during the maceration process appears to affect positively the optimum time of process, because described in the literature processes time of maceration of metabolites from plant material without mixing is much longer (72 h - [9]), 48 h - [16]).
3. Studies on selection of optimal conditions for extraction/leaching using microwave for metabolites of carnivorous plants shows that the optimal extraction process time cannot be clearly determined for all components contained in plant material.

For components of plant material classified in groups 2, 3, 4, 5, 6, and also for quercetin and miricetin optimum extraction process time is 4 minutes. Extraction carried out over four minutes causes destruction of a substance (for quercetin

and group 6) or practically does not change the content of extracted substances (group 2, 3, 4, 5 and miricetin).

For plumbagin and components from group 1 optimal extraction time was 8 minutes.

Differences in the optimum time duration of the extraction process via microwaves for components of plant material come from the differences of their polarity, i.e. from different values of the electric dipole moment. Therefore, compounds such as plumbagin and substances classified in the first group, characterized by low polarity (low value of dipole moment) are accumulating less energy during the microwaves supported extraction process than compounds such as flavonoids (quercetin and miricetin) and components of groups 2-6.

4. Temperature increase of the extraction process in an ultrasonic bath and using ultrasonic disintegrator, as well as using a high shear mixer resulted in a higher level of plant metabolites extracted from plant material. Raising the process temperature from 30 °C to 50 °C resulted in a higher solubility of metabolites in extract, as well as an increase of desorption interactions. As an optimal time of the extraction process in an ultrasonic bath and using ultrasonic disintegrator, as well as using a high shear mixer was 8 minutes.
5. Using as the measure of the extraction efficiency the amount of extracted metabolite and operation time, the optimal technique for the isolation of plumbagin and for substances of the groups 1-3 (relatively less polar compounds) of the carnivorous plant material is extraction with an ultrasonic disintegrator (UAE).
6. The technique of extraction/leaching optimal for substances of groups 4-6 and for the flavonoids - quercetin and miricetin (relatively polar compounds), is the microwaves extraction (MAE).
7. Concentrations of particular groups of compounds or individual metabolites obtained in the optimum, specific to the extraction techniques conditions are comparable and independent of the extraction / leaching technique, however the extraction/leaching time is very diverse.
8. In the case of stable compounds it is advantageous to increase operation temperature, which obviously results in higher efficiency. However, in the case of unstable compounds extraction / leaching process should be performed at low temperature in an inert atmosphere and in obscurity.

Studies on impact of acid addition to the eluent for separation of flavonoids in reverse phased system

1. Studies on the impact of acid type on the separation of flavonoids, shows that taking into account the peak asymmetry and the number of theoretical plates for quercetin and miricetin best modifier of the mobile phase was sulfuric acid.
2. There was observed much greater retention time and retention factor of flavonoids when the acetic acid as an additive to the eluent was used. This means that the presence of methyl functional groups in acetic acid and the solvation effect, increases the hydrophobicity of the separated solvates. Peaks of flavonoids analyzed using mobile phase, which consisted of acetic acid is characterized by more blur (dispersion) and a greater asymmetry than the analysis with the use of sulfuric acid. This is because the acetic acid creates larger solvates than sulfuric acid, thereby increasing the value of diffusion coefficient.
3. Usage of trifluoroacetic acid (TFA), which as can be found in the literature is currently the most widely used mobile phase modifier, it is not beneficial, as the results indicate that the number of theoretical plates is relatively small comparing to the number of theoretical plates obtained with the use of sulfuric acid. A value of the asymmetry factor $As_{0.5}$ and $As_{0.1}$, of the peaks of quercetin and miricetin, in the analysis using TFA is quite large, which can also adversely affect the process of their separation and determination of plant extracts. Retention time and retention factor values are also not satisfactory in comparison to the results obtained for acetic acid.
4. Taking into account the conclusions of the study on the effects of acid addition to eluent, for separating the components of plant extracts of reverse phase, it was decided that the best is to use in further studies the sulfuric acid and acetic acid. In studies on the separation, characterization and identification of metabolites contained in the carnivorous plant material decided to use sulfuric acid. In studies on the development of conditions for separation and isolation of metabolites from the carnivorous plant material used acetic acid. Acetic acid is a much weaker acid than sulfuric acid, and above all, is more volatile, thus removing it from received after the preparative scale chromatographic fractions rich in the various metabolites is easier.

Studies on the selective choice of the eluent components for separation of the metabolites from methanol extracts of carnivorous plants using reversed phase thin-layer chromatography (RP-TLC)

1. Studies on the methanol extracts of the species of carnivorous plants: *D. muscipula*, *D. binata*, *D. aliciae*, *D. capensis*, using reversed phase thin layer chromatography (RP-TLC), indicate the need for gradient elution in order to selective separation, determination and identification all components of plant extracts.

The components of the eluent for reversed phase should be the following solvents:

- isopropanol – using this solvent separated is the largest quantity of a substance from plant extracts, however selectivity of flavonoids separation is low,
- methanol, because it results in the selective separation of flavonoids: miricetin and quercetin,
- tetrahydrofuran, because his presence in the eluent results in the selective separation of chloroplumbagin and droseron in most of the extracts.

2. Studies with use of planar chromatography indicate that for separation and determination of components of carnivorous plant extracts, it is recommended to use a gradient elution, due to the large number of components in extracts with a very diverse hydrophobicity. The process program should start with a high water content and low concentrations of organic compounds, and then must pass a linear increase in the concentration of organic components in the eluent. After the separation of most components of the sample, the program should still run as isocratic elution of greatest strength elution to elute from the column the substances strongly associated with the surface of the stationary phase. Additionally, it is possible to use reverse elution of the eluent in the column to completely clean the column after the separation of components of plant extracts.

Studies on the composition of selective components of the eluent for the separation of the metabolites from methanol extracts of carnivorous plants using normal phase thin-layer chromatography (NP-TLC)

1. If as a mobile phase isopropanol and ethyl acetate were used, it was observed that many components of plant extracts were separated, but the differences between the values of the delay coefficients hR_f for individual components of plant extracts while using isopropanol are smaller. It should also be noticed that on the chromatograms obtained with the use of isopropanol and ethyl acetate there is a phenomenon "tailing" of spots seen corresponding to the flavonoids.
2. Usage of tetrahydrofuran (THF) and dioxane as the mobile phase allows the separation of a similar amount of components from methanol extracts of carnivorous plants, but it is less than with use as the mobile phase of isopropanol or ethyl acetate. It should be noticed that use of dioxane for the separation of plant extracts allows to receive larger, comparing to separation using THF, differences in coefficients hR_f between the individual components, especially between the flavonoids.
3. Tert-butyl-methyl ether resulted in a relatively good separation of the extract components, in addition chloroplumbagin and hydroksylplumbagina have significantly different migration distance. Similar to use of isopropanol and ethyl acetate to separate the extract components it can be observed phenomenon of "tailing" of quercetin and mirycetyny spots.
4. Methylene chloride showed a fairly good ability to separate the components of plant extracts, taking into account the difference in the values of the delay coefficients for individual substances, but the number of separated components of the extracts was not satisfactory.
5. Chloroform showed very little usefulness for separation of insectivorous plants extracts components, as the amount of separated substances was the lowest. hR_f coefficient value of flavonoids using chloroform was zero, which proves the fact that they did not "move" from the place of sampling of flavonoids standards and plant extracts.
6. Studies with use of formamide as the mobile phase showed that it has too high elution strength, as evidenced by the fact that all components of samples plotted followed along with the forehead of the mobile phase. Therefore it was

impossible to determine the migration routes of individual components, and thus the R_f coefficients.

7. Studies performed in normal-phase thin-layer chromatography using mono-solvent eluents showed that the solvents which should be used in the later stage of research on the optimal composition of the eluent for the separation of methanol extracts of insectivorous plants are the ethyl acetate or isopropanol, as the use of these solvents has given separation of the largest components of plant extracts. However, due to the fact that isopropanol has a higher viscosity than ethyl acetate, which increases the flow resistance at the inlet of the HPLC column, it is recommended to use of ethyl acetate. It is also preferred to use the tert-butyl-methyl ether (MTBE), because studies performed have resulted in relatively good separation of the components of the extract, and in addition chloroplumbagina and hydroksyplumbagin showed significantly different migration distances.

Studies on optimization of conditions for separation, characterization and identification of selected metabolites of methanol extracts of carnivorous plants using reversed phase HPLC in gradient elution

1. Isopropanol, an organic component of the eluent, generates an appropriate elution strength, and also allows selectively separate flavonoids and naphthoquinones from accompanying substances. Values of the retention coefficients of the extracts components, separated using eluent which contains isopropanol are in optimal range of values.
2. Eluent, which contain methanol exhibits weak elution strength, although allows to separate flavonoids very selectively among themselves. Retention factors of separated substances are higher than 10, which results in the long time of extracts analysis.
3. Usage of tetrahydrofuranu (THF), as an organic component of the eluent, allows less selectively than in the case of isopropanol and methanol separate the analyzed compounds.
4. Chromatographic system, in which acetonitrile was used as a component of eluent, contributed to a very selective separation of quercetin from accompanying substances in the extract of *Dionaea muscipula* and miricetin contained in the extract of *Drosera aliciae* from accompanying substances.

Separation of naphthoquinones using acetonitrile was selective, although the k' values of separated substances were significantly higher than in case of isopropanol or THF.

5. Studies carried out using RP-HPLC confirmed the results obtained by RP-TLC technique and indicated a need for multi-component eluent for the separation and determination of methanol extracts of carnivorous plants.
6. To create the optimal program of elution for the separation, characterization and identification of plant extracts components, a mixture of water and sulfuric acid of pH 3, and organic ingredients: methanol and isopropanol, was chosen. Methanol, because the effect on the selective separation of flavonoids and isopropanol because allows selective separation of naphthoquinones.
7. The results of analyses of the separation and determination of carnivorous plant extracts, using the ternary eluent in RP-HPLC with gradient elution, are satisfactory for methanol extracts of plants of the species *D. muscipula* and *D. aliciae*. For extracts of *D. capensis* and *D. binata* elution program still requires modification to make separation of substances contained in them more selective and capable to separate more components of extracts.
8. Methanol extract of insectivorous plant *Drosera aliciae* contains the largest number of components of the plant extracts tested. Studies using RP-HPLC confirmed the findings of the RP-TLC that the most probably extract from *D. capensis* does not contain chloroplumbagin, and the extract of *D. binata* does not contain droseron or their concentration is below the detection limit.
9. Usefulness of the detector UV - VIS DAD and the UV spectra, created by the detector, to identify the substance and determine the degree of chromatographic peaks imposed, was proved.

Studies on optimization of separation and isolation conditions for selected metabolites from methanol extracts of carnivorous plants using reversed phase HPLC in the step elution conditions

1. Methanol extracts of carnivorous plants are characterized by a very rich composition. They contain relatively low polar naphthoquinones, as well as large amounts of relatively polar flavonoids. In order to define optimum conditions for separation of flavonoids from methanol extracts of carnivorous

plants, there is required a phased separation of components of plant extracts using the step elution.

2. Two-step elution program which was developed allows a in the first stage, with a satisfactory selectivity coefficient of selected to separate metabolites from the group of flavonoids such as rutin, quercetin, miricetin, as well as hydroksyplumbagin from the substances directly accompanying. In the second stage of the elution program for the methodology developed, there is elution of naphthoquinones present in plant extracts, such as chloroplumbagin, plumbagin and ramentaceon.
3. Fraction, obtained using the methodology developed, containing naftochinony (except hydroksyplumbagin) should afterwards be separated into individual compounds by normal phase liquid chromatography.
4. The proposed chromatographic system is characterized by a relatively high selectivity coefficients α , which should allow to achieve a high maximum degree of overloading the column. This is very important considering the fact that the efficiency of separation and isolation of selected flavonoids and hydroksyplumbagin from methanol extracts in a preparative scale using the proposed chromatographic system could be high.

Studies on optimization of separation and isolation conditions of selected naphthoquinones from chloroformic extracts of carnivorous plant using reverse phase HPLC (RP-HPLC) in isocratic elution conditions at a model scale

1. Optimal conditions for separation of components of chloroformic extracts of *Drosera aliciae* and *Dionaea muscipula*, consist of a silica gel modified with oktadecyl groups, subjected to the process of removal of residual hydroxyl groups (endcapped) as a stationary phase and a binary eluent consisting of water and acetonitrile with the addition of acetic acid in the volume proportions of acetonitrile: water 45:55 + 0.1% acetic acid v / v.
2. Mobile phases which are the mixtures of water with methanol, tetrahydrofuran or dioxane shows no selectivity in separation of plumbagin and ramentaceon from accompanying substances at an optimal level or retention factor of separated naphthoquinones is much higher than optimal (> 10).

3. In order to elute the components of extracts strongly sorbed to the surface of the stationary phase, the backflash elution of the eluent in the column was used, which additionally shortened the time of the separation process. With this solution there was no need for an step elution in the final stage of separation. This is a very good solution because it avoids the stage of conditioning of the HPLC column with initial eluent.
4. In the chromatographic system using LiChrospher RP 18e (5 μm , 250 x 4 mm) column and eluent acetonitrile: water 45:55 + 0.1% acetic acid v / v, there was examined the possibility of enlargement of separation and isolation scale for ramentaceon and plumbagin. Studies have shown that the maximum degree of concentration overloading is for plumbagin about 1.7×10^{-4} g / g of sorbent and for ramentaceon 1.13×10^{-4} g / g sorbent.
5. Purity of fractions rich in plumbagin and/or ramentaceon yield in developed, optimal conditions with concentration overloading was for plumbagin 92% and for ramentaceon 99.99%.
6. Productivity of the column, expressed in [g/m²h] was for plumbaginy 32.2, and for ramentaceon 48.1.

Studies on optimization of conditions for separation and isolation of selected naphthoquinones from chloroformic extracts of carnivorous plant using normal phase HPLC (NP-HPLC) in isocratic elution conditions at a model scale

1. Optimal conditions for separation of components of chloroformic extracts of *Drosera aliciae* and *Dionaea muscipula*, consist of a silica gel as a stationary phase and a binary eluent consisting of n-heptane (n-hexane) and dioxane with the addition of acetic acid in a volume/volume ratio respectively for the *Drosera aliciae* extract (98.5:1.5 v/v + 0.05% acid) and for *Dionaea muscipula* extract (99.6:0.4 v/v + 0.05% acid).
2. In order to elute the components of extracts strongly sorbed to the surface of the stationary phase, the backflash elution of the eluent in the column was used, which additionally shortened the time of the separation process. With this solution there was no need for an step elution in the final stage of separation. This is a very good solution because it avoids the stage of conditioning of the HPLC column with initial eluent.

3. In the chromatographic system using Nucleosil 50Å (3µm, 250 x 4mm) column and eluent n-heksane: dioksan + 0.1% acetic acid v / v, there was examined the possibility of enlargement of separation and isolation scale for naphthoquinones. Studies have shown that the maximum degree of concentration overloading is for plumbagin about 1.1×10^{-4} g / g of sorbent and for ramentaceon 3.3×10^{-4} g / g sorbent.
4. Purity of fractions rich in plumbagin and/or ramentaceon yield in developed, optimal conditions with concentration overloading was for plumbagin 97.5% and for ramentaceon 99.95%.
5. Productivity of the column, expressed in [g/m²h] was for plumbaginy 30.1, and for ramentaceon 50.9.

10. SPIS LITERATURY

- 1) W. Hryniewicz, B. Mazińska, *Europejski Dzień Wiedzy o Antybiotykach – dlaczego potrzebny?*, Pol. Merk. Lek., **160**, (2009), XXVII, 261;
- 2) M. Waleron, K. Waleron, E. Łojkowska, *Charakterystyka, identyfikacja, różnicowanie i taksonomia bakteryjnych patogenów roślin z rodzaju Erwinia*, Post. Mikrobiol., **43(3)**, 2004, 297;
- 3) M. Kamiński, *Concept of standardized isolation, 2D-HPLC separation and identification of plant and fungal metabolites*, W: 5th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP) : The Application of Chromatographic Methods in Phytochemical Analysis, book of abstracts, Lublin, June 19-22, 2006, s. 25
- 4) Z. Jerzmanowska, *Substancje roślinne. Metody wyodrębniania*. PWN, Warszawa, 1967;
- 5) S. Bursa, *Chemia fizyczna*. Wyd. 2 popr. PWN, Warszawa, 1979;
- 6) Sz. Nyiredy, *Separation strategies of plant constituents—current status*, J. Chromatogr. B, **812**, 2004, 35;
- 7) H. Giergielewicz-Możajska, Ł. Dąbrowski, J. Namieśnik, *Przegląd technik ekstrakcyjnych wykorzystywanych na etapie wyodrębniania analitów z próbek stałych. Część I*, Ekologia i Technika, **6(48)**, 2000, 159 [Review of the extraction methods form the solid samples – part I];
- 8) G. Romanik, E. Gilgenast, A. Przyjazny, M. Kamiński, *Techniques of preparing plant material for chromatografic separation and analysis*, J. Biochem. Biophys. Methods, **70**, 2007, 253;
- 9) B. Trusheva, D. Trunkova, V. Bankova, *Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study*, Chem. Centr. J., **1**, 2007, 13;
- 10) A. Dziabas, Praca magisterska, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG, Gdańsk 2003;
- 11) F. B. Williams, L. C. Sander, S. A. Wise, J. Girard, *Development and evaluation of methods for determination onaphthodianthrones and flavonoids in St. John's wort*, J. Chromatogr. A. 1115, 93, (2006);
- 12) 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 (Men-tha Spicata L.) leaves*, Eur. J. Sci. Res., **33(4)**, 2009, 679;
- 13) W. Xiaoa, L. Hana, B. Shib, *Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix Astragali*, Sep. Purif. Technol., **62(3)**, 2008, 614;
- 14) M. Skerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A. R. Hras, M. Simoni, Z. Knez, *Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities*, Food Chem., **89**, 2005, 191;
- 15) M. J. Bapela, N. Lall, J.J.M. Meyer, *Seasonal variation of naphthoquinones in Euclea natalensis subspecies natalensis*, J. S. Afr. Bot., **74**, 2008, 218;

- 16) V. Kuete, J. G. Tangmouo, J.J. Marion Meyer, N. Lall, *Diospyrone, crassiflorone and plumbagin: three antimycobacterial and antigonorrhoeal naphthoquinones from two Diospyros spp.*, *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **34**, 2009, 322;
- 17) 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;
- 18) H. Ali, G.M. Konig, S.A. Khalid, A.D. Wright, R. Kaminsky, *Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity*, *J. Ethnopharmacol.* **83**, 2002, 219;
- 19) X. Pan, G. Niu, H. Liuet, *Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves*, *Chem. Eng. Process.* **42**, 2003, 129;
- 20) Y. Hu, Z. Jiang, K.S. Leung, Z. Zhao; *Simultaneous determination of naphthoquinone derivatives in Boraginaceous herbs by high performance liquid chromatography*, *Anal. Chim. Acta*, **577**, 2006, 26;
- 21) D. Grigonisa P.R. Venskutonis, B. Sivik, M. Sandahl, C.S Eskilsson, *Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (Hierochloë odorata)*, *J. Supercrit. Fluid.*, **33**, 2005, 223;
- 22) witryna internetowa : <http://www.lab-szklo.com.pl>
- 23) F. Hofler, B. Richter, D. Felix, *Accelerated Solvent Extraction*, Prospekt reklamowy firmy DIONEX, U.S.A., (1995)
- 24) R. C. Lao, Y.Y Shu, J. Holmes, C. Chiu, *Environmental sample cleaning and extraction procedures by microwave-assisted process (MAP) technology*. *Microchem. J.*, 53(1), 1996, 99;
- 25) I. Gonzalez – Manzano, J. Rivas – Gonzala, C. Santos – Buelaga, *Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration*, *Anal. Chim. Acta*, **513 (1)**, 2004, 283;
- 26) A. Sae-Yun, Ch. Ovatlarnporn, A. Itharat, R. Wiwattanapatapee, *Extraction of rotenone from Derris elliptica and Derris malaccensis by pressurized liquid extraction compared with maceration*, *J. Chromatogr. A.*, **1125**, 2006, 172;
- 27) I. Alvarez, J. L. Aleixandre, M. J. Garcia, V. Lizama, *Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines*, *Anal. Chim. Acta*, **563**, 2006, 109;
- 28) K. Schafer, *Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material*, *Anal. Chim. Act.*, **358**, 1998, 69;
- 29) M. Gfrerer, S. Cheu, E. Lankmayr, X. Quan, F. Yang, *Comparison of different extraction techniques for the determination of chlorinated pesticides in animal feed*, *Anal. and Bioanal. Chem.*, **378**, 2004, 7;
- 30) M. Waksmundzka – Hajnos, A. Petruczynik, A. Dragan, D. Wianowska, A. L. Dawidowicz, I. Sowa, *Influence of the extraction mode on the yield of some furanocoumarins from Pastinaca sativa fruits*, *J. Chromatogr. B.*, **800**, 2004, 181;

- 31) L. Sanchez-Prado, C. Garcia-Jares, M. Llompart, *Microwave-assisted extraction: Application to the determination of emerging pollutants in solid samples*, J. Chromatogr. A. **1217**, 2010, 2390;
- 32) A. Śliwiński, *Ultradźwięki i ich zastosowania*, WNT, Warszawa, 2001;
- 33) D. M. Stasiak, *Wykorzystanie ultradźwięków do przyspieszenia wodnej ekstrakcji cukru z krajanki buraka cukrowego*, Acta Sci. Pol. **4**, 2005, 31;
- 34) T. J. Mason, L. Paniwnyk, L. P. Lorimer, *The uses of ultrasound in food technology*, Ultrasonics Sonochem. **3**, 1996, 253;
- 35) Y. Sato; H. Nakamura, S. Watano, *Numerical analysis of agitation torque and particle motion in a high shear mixer*, Powder Technology 186, 2008,130;
- 36) F. Gafner, J. C. Chapuis, J. D. Msonthi, K. Hostettmann, *Cytotoxic naphthoquinones, molluscicidal saponins and flavonols from Diospyros zombensis*, Phytochemistry, **26**, 1987, 2501;
- 37) P. P. Mebe, G. A. Cordell, J. M. Pezzuto, *Pentacyclic triterpenes and naphthoquinones from Euclea divinorium*, Phytochemistry, **47**, 1998, 311;
- 38) 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. Schimperi*, J. Ethnopharmacol, **102**, 2005, 191;
- 39) G. Bringmann, D. Feineis, *Stress-related polyketide metabolism of Dioncophyllaceae and Ancistrocladaceae*, J Exp Bot., **52**, 2001, 2015;
- 40) K. C. G. De Moura, F. S. Emerya, C. Neves-Pintoa, M.C.F.R. Pinto, A. P. Dantas, K. Salomão, S. L. Castro, A.V. Pinto, *Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from Tabebuia and Some Heterocyclic Derivatives: A Review from an Interdisciplinary Study*, J Braz Chem Soc., **12**, 2001, 325;
- 41) S. Kohlmünzer, *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003;
- 42) M. M. Cowan, *Plant Products as Antimicrobial Agents*, Clin Microbiol, **12**, 1999, 564;
- 43) T. Tokunaga, N. Takada, M. Ueda, *Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defense in carnivorous plant*, Tetrahedron Lett., **45**, 2004, 7115;
- 44) T. P. Cushnie, A. J. Lamb., *Antimicrobial activity of flavonoids*, J. Antimicrob Agents, **26**, 2005, 343;
- 45) E. Middleton Jr., C. Kandaswami, T. C. Theoharides, *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*, Pharmacol Rev, **52**, 2000, 673;
- 46) P. G. Pietta, *Flavonoids as Antioxidants*, J Nat Prod, **63**, 2000, 1035
- 47) Z. Zhu, C. Li, N. Q. Li, *Electrochemical studies of quercetin interacting with DNA*, Microchem J., **71**, 2002, 57;
- 48) Z. Jerzmanowska, *Substancje roślinne. Metody wyodrębniania*, Tom II, PWN, Warszawa 1970;
- 49) N. Didry, L. Dubreuil, F. Trotin, M. Pinkas, *Antimicrobial activity of aerial parts of Drosera peltata Smith on oral bacteria*, J. Ethnopharmacol., **60**, 1998, 91;

- 50) T. Sreelatha, A. Hymavathi, J. Madhusudhana Murthy, P. U. Rani, J. Madhusudana Rao, K. Suresh Babu, *A new benzil derivative from *Derris scandens*: Structure-insecticidal activity study*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 2010, 549;
- 51) J. J. Marion-Meyer, F. Kooy, A. Joubert, *Identification of plumbagin epoxide as a germination inhibitory compound through a rapid bioassay on TLC*, *S. Afr. J. Bot.*, **73**, 2007, 654;;
- 52) J. Budzianowski, *Naphthoquinone glucosides of *Drosera rotundifolia* and *D. intermedia* from in vitro cultures*, *Phytochem.*, **44**, 1996, 1145;
- 53) M. Sannomiya et al., *Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts*, *J. Ethnopharmacol.*, **97**, 2005, 1;
- 54) A. Figueirinha, A. Paranhos, J. J. Pe´rez-Alonso, C. Santos-Buelga, M. T. Batista, *Cymbopogon citratus* leaves: *Characterisation of flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols*, *Food Chemistry*, **110**, 2008, 718;
- 55) S. Marquina, J. Bonilla-Barbosa, L. Alvarez, *Comparative phytochemical analysis of four Mexican *Nymphaea* species*, *Phytochem.*, **66**, 2005, 921;
- 56) A.B. Dongmo, T. Nguelefack, M. A. Lacaille-Dubois, *Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Acacia pennata* wild (*Mimosaceae*)*, *J. Ethnopharmacol.*, **98**, 2005, 201;
- 57) B. Bozan, K. H. C. Baser, S. Kara, *Quantitative Determination of Naphthoquinones of *Arnebia densiflora* by TLC-Densitometry*, *Fitoterapia*, **70**, 1999, 402;
- 58) F. van der Kooy, J. J. M. Meyer, N. Lall, *Antimycobacterial activity and possible mode of action of newly isolated neodiospyrin and other naphthoquinones from *Euclea natalensis**, *S. Afr. J. Bot.*, **72**, 2006, 349;
- 59) N. Backhouse, L. Rosales, C. Apablaza, L. Goity, S. Erazo, R. Negrete, C. Theodoluz, J. Rodriguez, C. Delporte, *Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, *Buddlejaceae**, *J. Ethnopharmacol.*, **116**, 2008, 263;
- 60) A. Marston, K. Hostettmann, *High-performance liquid chromatography of some naturally occurring naphthoquinones*, *J. Chromatogr.*, **295**, 1984, 526;
- 61) A. Krolicka, A. Szpitter, E. Gilgenast, G. Romanik, M. Kaminski, E. Lojkowska, *Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in in vitro carnivorous plants by addition of elicitors*, *Enzym. Microb. Tech.*, **42**, 2008, 216;
- 62) M. M. Gupta, R. K. Verma, G. C. Uniyal, S. P. Jain, *Determination of plumbagin by normal-phase high-performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr.*, **637**, 1993, 209;
- 63) R. Aguilar-Sánchez, F. A´huatl-García, M. M. Davila-Jimenez, M. P. Elizalde-Gonzalez, M. R. G. Guevara-Villa, *Chromatographic and electrochemical determination of quercetin and kaempferol in phytopharmaceuticals*, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, **38**, 2005, 239;

- 64) Y. Wang, T. Huang; *High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-Helicobacter pylori compound of Plumbago zeylanica L.*, J. Chromatogr. A; **1094**, 2005, 99;
- 65) K. Chiu, Y. Cheng, J. Chen, C.J. Chang, P. Yang; *Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids*, J. Supercritical Fluids, **24**, 2002, 77;
- 66) S. Paramapojn, M. Ganzera, W. Gritsanapan, H. Stuppner; *Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant Eleutherine americana by RP-HPLC and LC-MS*, J. Pharm. Biomed. Anal.; **47**, 2008, 990;
- 67) 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;
- 68) S. Surveswaran, Y. Cai, H. Corke, M. Sun; *Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants*, Food chemistry; **102**, 2007, 938;
- 69) M. Ye, Y. Li, Y. Yan, H. Liu, X. Ji; *Determination of flavonoids in Semen Cuscutae by RP-HPLC*, J. Pharm. Biomed. Anal., **28**, 2002, 621;
- 70) M. J. Bapela, N. Lall, J. J. M. Meyer, *Seasonal variation of naphthoquinones in Euclea natalensis subspecies natalensis*, J. S. Afr. Bot., **74**, 2008, 218;
- 71) D. H. Paper, E. Karall, M. Kremser, L. Krenn; *Comparison of the antiinflammatory effects of Drosera rotundifolia and Drosera madagascariensis in the HET-CAM assay*, Phytother. Res., **19**, 2005, 323;
- 72) P. Komaraiah, R. Naga Amrutha, P. B. Kavi Kishor, S. V. Ramakrishna, *Elicitor enhanced production of plumbagin in suspension cultures of Plumbago rosea L.*, Enzyme and Microbial Technology, **31**, 2002, 634;
- 73) Ł. Marczak, A. Kawiak, E. Łojewska, M. Stobiecki, *Secondary metabolites in in vitro cultured plants from the Drosera genus*, Phytochem. Anal., **16**, 2005, 143;
- 74) M. Kamiński, B. Śledzińska, J. Klawiter, *Studies on the optimization of parameters of preparative liquid chromatographic columns for production of cardiac glycosides*, J. Chromatogr., **367**, 1986, 45;
- 75) V. R. Meyer, *Practical high-performance liquid chromatography*, John Wiley & Sons 1988;
- 76) M. Kamiński, *Chromatografia Cieczowa*, (praca zbiorowa), Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk, 2004;
- 77) M. Kamiński, *Problemy stosowania kolumnowej chromatografii cieczowej jako metody otrzymywania substancji*. Rozprawa habilitacyjna. Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk, 1991;
- 78) B. E. Juniper, R. J. Robins, D. M. Joel, *The carnivorous plants*. Academic Press, inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 1989;
- 79) D. H. Benzing, *The origin and rarity of botanical carnivory*, Trends Ecol Evol., **2(12)**, 1987, 364;

- 80) A. M. Ellison, N. J. Gotelli, *Evolutionary ecology of carnivorous plants*, Trends Ecol Evol., **16**, 2001, 623;
- 81) B. Kreher, A. Neszmelyi, H. Wagner, *Naphthoquinones from Dionaea muscipula*, Phytochemistry, **29**, 1990, 605;
- 82) M. Nowiński, *Dzieje upraw i roślin leczniczych*, Państwowe Wydawnictwo Rolne i Leśne, 1980;
- 83) Ł. M. Kołodziejczyk, *Drapieżniki wśród roślin*, Przyroda Polska, **2**, 2005;
- 84) I. L. I. Hook, *Naphthoquinone contents of in vitro cultured plants and cell suspensions of Dionaea muscipula and Drosera species*, Plant cell, tissue and organ culture, **67**, 2001, 281;
- 85) T. Tokunaga, N. Takada, M. Ueda, *Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defense in carnivorous plant*, Tetrahedron Lett., **45**, 2004, 7115;
- 86) G. Pakulski, J. Budzianowski, *Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of Dionaea muscipula from in vitro cultures*, Phytochemistry, **41**, 1996, 775;
- 87) B. Salmon, *Carnivorous Plants of New Zealand*, Ecosphere Publications, 2001
- 88) P. Babula, V. Adam, R. Kizek, Z. Sladky, L. Havel, *Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death*, Environ. Exp. Bot., **65**, 2009, 330;
- 89) J. F. Finnie, J. van Staden, , *XII Drosera spp. Sundew*, Medicinal and Aromatic Plants V, **24**, 1993, 174;
- 90) K. Kukułczanka, J. Budzianowski, *Dionaea muscipula Ellis (Venus flytrap): in vitro cultures and in vitro production of secondary metabolites*, Medicinal Plants and Aromatic XII., **51**. 1996, 50;
- 91) J. Budzianowski, *Naphthoquinone glucosides of Drosera gigantea from in vitro cultures*, Planta Med., **66(7)**, 2000, 667;
- 92) G. Pakulski, *Związki fenolowe z gatunku Dionaea muscipula Ellis, pochodzącego z kultur in vitro*, Rozprawa doktorska, Politechnika w Poznaniu, Poznań 1994
- 93) H. M. Zenk, M. Furbringer, W. Steglich, *Occurrence and distribution of 7-methyljuglon and plumbagin in the Droseraceae*, Phytochemistry, **8**, 1969, 2199;
- 94) S. Padhye, P. Dandawate, M. Yusufi, A. Ahmad, F. H. Sarkar, *Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs*, Medicinal Research Reviews, 2010, DOI: 10.1002/med.20235
- 95) Y.C. Wang, T.L. Huang, *Anti-Helicobacter pylori activity of Plumbago zeylanica L.*, Immunol Med Microbiol, **43**, 2005, 407;
- 96) N. Didry, M. Pinkas, L. Debreuil, *Antimicrobial activity of some naphthoquinones found in plants*, Ann. Pharm. Fr., **44**, 1986, 73;
- 97) J. J. Inbaraj, C.F. Chignell, *Cytotoxic Action of Juglone and Plumbagin: A Mechanistic Study Using HaCaT Keratinocytes*, Chem. Res. Toxicol., **17**, 2004, 55;
- 98) G. T. Gujar, *Plumbagin, a naturally occurring naphthoquinone. Its pharmacological and pesticidal activity*, Fitoterapia, **61**, 1990, 387;

- 99) E. Leistner, *Biosynthesis of plant quinones. The biochemistry of plants. Secondary plant products.*, Academic Press, **7**, 1981, 413;
- 100) J. Q. Gu, T. N. Graf, D. Lee, H. B. Chai, Q. Mi, L. B. S. Kardono, F. M. Setyowati, *Cytotoxic and Antimicrobial Constituents of the Bark of Diospyros maritima Collected in Two Geographical Locations in Indonesia*, J. Nat. Prod., **67(7)**, 2004, 1156;
- 101) T. Kämäräinen, J. Uusitalo, J. Jalonen, K. Laine, A. Hohtola, *Regional and habitat differences in 7-methyljuglone content of Finnish Drosera rotundifolia*, Phytochemistry, **63**, 2003, 309;
- 102) 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(3)**, 2000, 909;
- 103) H. D. Neuwinger, *African ethnobotany: poisons and drugs*, Chapman & Hall, London, United Kingdom, 1996;
- 104) S. M. Ziaratnia, K. J. Kunert, N. Lall, *Elicitation of 7-methyljuglone in Drosera capensis*, S. Afri. J. Bot; **75**, 2009, 97;
- 105) N. S. Chauhan, *Medicinal and aromatic plants of Himachal Pradesh*, Indus Publishing Co. 1999;
- 106) A. V. B. Sankaram, T. N. Srinivasan, A. S. Indulkar, *Fungicidal activity of some naturally occurring naphthaquinones*, Pesticide Science, **6(2)**, 1975, 165;
- 107) G. Bringmann, H. Rischer, M. Wohlfarth, J. Schlauer, L. A. Assi, *Droserone from cell cultures of Triphyophyllum peltatum (Dioncophyllaceae) and its biosynthetic origin*, Phytochemistry, **53**, 2000, 339;
- 108) 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;
- 109) N. C. Cook, S. Samman, *Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources*, J. Nutr. Biochem., **7**, 1996, 66
- 110) I. Erlund, *Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and narigenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology*, Nutr. Res., **24**, 2004, 851;
- 111) K. C. Ong, H. Khoo, *Biological effects of myricetin*, Gen. Pharmac., **29(2)**, 1997, 121
- 112) E. Gilgenast, *Wielowymiarowa chromatografia cieczowa jako technika przygotowania próbki i oznaczania składu grupowego skomplikowanych substancji*, Rozprawa doktorska, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, 2008;
- 113) J. Mazerski, *Podstawy Chemometrii*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2000;
- 114) M. Kaminski, E. Gilgenast, A. Przyjazny, G. Romanik, *Procedure for and results of simultaneous determination of aromatic hydrocarbons and fattyacids methyl ester in diesel fuels by high performance liquid chromatography*, J. Chromatogr.A, **1122**, 2006, 153

- 115) Ł. Żuk, „*Badania retencji i dobór optymalnej selektywności rozdzielania ramentaceonu, i plumbaginy z ekstraktów roślin owadożernych Drosera aliciae i Dionaea muscipula z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w układzie faz normalnych, w warunkach elucji izokratycznej*”, Praca magisterska, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, 2008;
- 116) E. Gilgenast, Ł. Żuk, **A. Skrzypczak**, A. Królicka, E. Łojkowska, M. Kamiński, “*Optimal conditions of ramentaceone and plumbagin separation and isolation from carnivorous plants extracts using normal phase–high performance liquid chromatography (NP-HPLC).*” 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF; abstracts, 3-8 August 2008, Athens, Planta Medica Vol. 74, August (2008), s. 1085;
- 117) A. Maciejewska*, *Badania nad opracowaniem warunków rozdzielania i otrzymywania ramentaceonu z ekstraktu roślinnego Drosera aliciae z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w skali preparatywnej*, Praca magisterska, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, 2007; * nazwisko panięskie autora niniejszej rozprawy doktorskiej

11. WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

Współautor zgłoszenia patentowego:

1. Kamiński M., Gilgenast E., Romanik G., **Skrzypczak A.**, Królicka A., „Sposób otrzymywania naftochinonów oraz flawonoidów z ekstraktów roślinnych, zwłaszcza z hodowli tkankowych roślin” Zgłoszenie patentowe nr P 385795 z dnia 31.08.2008

Współautor publikacji w czasopiśmie z tzw. „listy filadelfijskiej”:

1. Królicka A., Szpitter A., Stawujak K., Baranski R., Gwizdek-Wisniewska A., **Skrzypczak A.**, Kaminski M., Łojkowska E., „*Teratomas of Drosera capensis var. alba as a source of naphthoquinone: ramentaceone*”, Plant Cell Tiss Organ Cult, (2010) 103:285–292

Współautor publikacji w czasopismach recenzowanych:

1. **Skrzypczak A.**, Jaszczółt M., Królicka A., Kamiński M., „*Techniki i metody chromatografii cieczowej w rozdzielaniu, oznaczaniu oraz izolowaniu naftochinonów i flawonoidów z roślin*”, praca przyjęta do druku, Camera Separatoria, 3 (2011)
2. **Skrzypczak A.**, Kamiński M., „*Nowa metoda oznaczania kumaryny w napojach alkoholowych oraz w maceratach z turówki wonnej (hierochloe odorata) z wykorzystaniem RP-HPLC i przepływu zwrotnego eluentu w kolumnie*”, praca przyjęta do druku, Camera Separatoria, 3 (2011)
3. Kołodziejski D., **Skrzypczak A.**, Gilgenast E., Królicka A., Kamiński M., „*Porównanie efektywności wybranych technik ekstrakcji / ługowania metabolitów wtórnych z suchego materiału roślin owadożernych z hodowli in vitro*”, Camera Separatoria, **3(1)**, 2011, 185;
4. Jaszczółt M., Boczkaj G., Lewandowski A., **Skrzypczak A.**, Królicka A., Kamiński M., „*Badania nad dobozem najkorzystniejszego składu eluentu do rozdzielania metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem chromatografii planarnej w normalnym i odwróconym układzie faz*”, Camera Separatoria, **3(1)**, 2011, 147;
5. Boczkaj G., Jaszczółt M., Leman A., **Skrzypczak A.**, Królicka A., Kamiński M., „*Zastosowanie chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-LC) w rozdzielaniu i oznaczaniu polifenoli i naftochinonów w materiałach roślinnych*”, Camera Separatoria, **3(1)**, 2011, 87;

Współautor monografii:

1. Jastrzębski D., Romanik G. Kamiński M. M., **Skrzypczak A.**, Królicka A., Kamiński M. „*Kolumnowa chromatografia cieczowa w rozdzielaniu i analizie peptydów i białek*” Postępy chromatografii / red. B. K. Głód. - Siedlce : Oficyna Wydawnicza Akademii Podlaskiej, 2009. - Monografie nr 111. - S. 113-137;

Współautor komunikatów publikowanych w recenzowanych w czasopismach z tzw. „listy filadelfijskiej”:

1. Jaszczolt M., **Skrzypczak A.**, Królicka A., Lewandowski A., Kamiński M., *Optimal conditions of naphthoquinones separation from carnivorous plants extracts using thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography*, *Planta Medica*, Vol. 77 (12), 2011, 1275
2. Jaszczolt M., **Skrzypczak A.**, Królicka A., Lewandowski A., Kamiński M., *Liquid chromatography techniques for separation of flavonoids from Droseraceae*, *Planta Medica*, Vol. 77 (12), 2011, 127
3. **Skrzypczak A.**, Gilgenast E., Romanik G., Królicka A., Łojkowska E., Kamiński M., *“Optimal conditions of ramentaceone and plumbagin separation and isolation from carnivorous plants extracts using reverse phase–high performance liquid chromatography (RP-HPLC).” 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF; abstracts, 3-8 August 2008, Athens, **Planta Medica**, Vol. 74, August (2008), s. 1090;*
4. Gilgenast E., Żuk Ł., **Skrzypczak A.**, Królicka A., Łojkowska E., Kamiński M., *“Optimal conditions of ramentaceone and plumbagin separation and isolation from carnivorous plants extracts using normal phase–high performance liquid chromatography (NP-HPLC).” 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF; abstracts, 3-8 August 2008, Athens, **Planta Medica** Vol. 74, August (2008), s. 1085;*
5. Gilgenast E., Romanik G., **Maciejewska A.***, Królicka A., Kamiński M., *“The efficiency comparison of ramentaceone receiving from Drosera aliciae plants using normal and reverse phase preparative liquid chromatography techniques.” 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research; abstracts, September 2-6, 2007 Graz; Vol. 73, nr 9 August (2007), s. 911; * nazwisko panięskie autora niniejszej rozprawy doktorskiej*

Współautor komunikatów ustnych, opublikowanych w formie streszczeń w Materiałach Konferencyjnych:

1. **Skrzypczak A.**, Kołodziejcki D., Królicka A., Łojkowska E., Kamiński M., *„Porównanie efektywności wybranych technik ekstrakcji/tugowania metabolitów z suszu liści, z zastosowaniem HPLC” II Podlaskie Spotkanie Chromatograficzne, Rejmontka – Kotuń/Chelewiska , 12-15 września 2010, str. 24;*
2. **Skrzypczak A.**, *„Badania nad opracowaniem nowych procedur przygotowania próbki, rozdzielania, oznaczania i izolacji w skali preparatywnej metabolitów roślinnych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej” Sesja Sprawozdawcza Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej : materiały, Gdańsk, 27-28.09.2010 / red. A. Kołodziejczyk / Studium Doktoranckie Wydział Chemiczny Politechnika Gdańska. - Gdańsk : Wydż. Chem. Politech. Gdań., 2010, str. 92;*

3. Kamiński M., Romanik G., Trznadel M., **Skrzypczak A.**, “*Application of the eluent back flush in column liquid chromatography*” 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Method and 15th International Symposium on Separation Science : book of abstracts, Siófok, Hungary, 02-04 September 2009- Hungarian Society for Separation Sciences. - Pécs, Hungary : Kontraszt Pécs Bt., 2009, s. 47-48;
4. Kamiński M., Romanik G., **Skrzypczak A.**, Trznadel M., „*Korzyści ze stosowania przepływu zwrotnego eluentu w kolumnowej chromatografii ciekowej = Advantiges of practical application of back flush of the eluent in column liquid chromatography*” 52. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego: streszczenia, Łódź, 12-16 września 2009 / Politech. Łódź. ; Uniw. Łódź. ; PAN- Łódź : MEZA, 2009, s. 172;
5. Kamiński M., Gilgenast E., Zyska I., **Skrzypczak A.**, Romanik G., Królicka A., Łojkowska A. “*Research on optimalization of selected techniques and operation conditions of extraction/leaching of plant metabolites*”, Materiały: 19th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, PBA 2008, Gdańsk 8-12 czerwca 2008; str. 58;
6. Kamiński M., Gilgenast E., Zyska I., **Skrzypczak A.**, Romanik G., Królicka A., Łojkowska A. “*Research on optimalization of selected techniques and operation conditions of extraction/leaching of plant metabolites*” 6th International symposium on Chromatography of Natural Products, ISCNP, Lublin 15-18 czerwca 2008;
7. Romanik G., **Skrzypczak A.**, Kamiński M. „*Procedura identyfikacji źródła zanieczyszczenia piwa z zastosowaniem techniki chromatografii ciekowej*” XIII Sesja Sekcji Młodej Kadry Naukowej Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności; Łódź 28-29 maja 2008; str. 29;
8. **Skrzypczak A.**, Romanik G., Kamiński M. „*Metodyka oznaczania zawartości i otrzymania, albo usuwania laktoalbuminy z serwatki z zastosowaniem chromatografii ciekowej*” XIII Sesja Sekcji Młodej Kadry Naukowej Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności; Łódź 28-29 maja 2008; str. 28;

Współautor komunikatów posterowych, opublikowanych w formie streszczeń w Materiałach Konferencyjnych:

1. **Skrzypczak A.**, Gilgenast E., Jaszczolt M., Żuk Ł., Kamiński M „*Badania nad doбором optymalnych składników eluentu do rozdzielania oraz nad metodyką identyfikacji aglikonów roślin owadożernych technikami chromatografii ciekowej ortogonalnej*” II Podlaskie Spotkanie Chromatograficzne, Rejmontka – Kotuń/Chelewiska , 12-15 września 2010, str. 15;
2. Kasproicz A., Szpitter A., **Maciejewska A.**, Kamiński M., Łojkowska E., Królicka A., „*In vitro cultures of Drosera binata as a source of compounds with antimicrobial activity*” 12th National Conference ‘In vitro Cultures, Poznań 9-11wrzesień 2009, Acta Biologica Cracoviensia, Vol.51 suppl.1, str.43

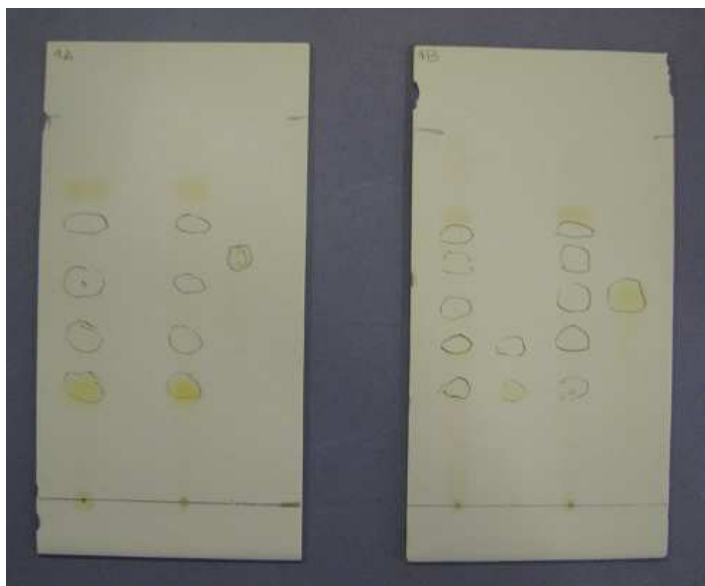
3. Szpitter A., Królicka A., **Skrzypczak A.**, Kamiński M. Łojkowska E., "Influence of *Dionaea muscipula* extract on viability and pectinolytic enzyme production by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Artrosepticum*" 4th Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology, 21-25 Wrzesień 2009 Kraków, Acta Biologica Cracoviensia, Vol.51 supp.2, str. 99;
4. Romanik G., Trznadel M., **Skrzypczak A.**, Kamiński M. "Results of Experiments Confirmed Particular Advantages of Application of the Eluent Back Flush (EBF) in the Elution Column Liquid Chromatography" 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Method and 15th International Symposium on Separation Science : book of abstracts, Siófok, Hungary, 02-04 September 2009 - Hungarian Society for Separation Sciences. - Pécs, Hungary : Kontraszt Pécs Bt., 2009, str. 84-85;
5. **Skrzypczak A.** Szpitter A., Królicka A., Łojkowska E., Kamiński M., "Efficiency Comparison of Selected Extraction/Leaching Techniques of Metabolites Contained in Plants of the *Dionaea Muscipula* Species" 8th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods and 15th International Symposium on Separation Science : book of abstracts, Siófok, Hungary, 02-04 September 2009 - Hungarian Society for Separation Sciences. - Pécs, Hungary : Kontraszt Pécs Bt., 2009, str 128
6. **Skrzypczak A.**, Gilgenast E., Romanik G., Zyska I., Królicka A., Łojkowska E., Kamiński M. "Efficiency comparison of selected extraction/leaching techniques of metabolites contained in plants of the *Dionaea muscipula* species." 19th International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis, PBA 2008, Gdańsk 8-12 czerwca 2008; str. 247;
7. **Skrzypczak A.**, Gilgenast E., Romanik G., Zyska I., Królicka A., Łojkowska E., Kamiński M. "The efficiency comparison of selected extraction/leaching techniques of metabolites contained on plants of *Dionaea muscipula* species. " 6th International symposium on Chromatography of Natural Products, ISCNP, Lublin 15-18 czerwca 2008; str.175;
8. Romanik G., Zalewski S., Zabiegała B., Kosikowska M., **Skrzypczak A.**, Kamiński M. „Research on compounds of industrial effluents after oxidation of asphalt responsible for odors and bio-toxicity” 35th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry; ISEAC 35, Gdańsk 22-26 czerwca 2008; str. 30;

12. ZAŁĄCZNIKI

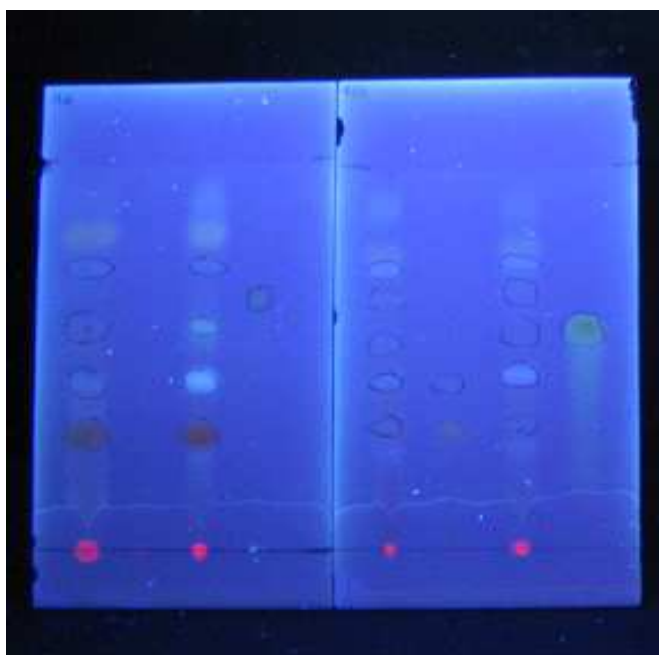
12.1. Załącznik 1. Chromatogramy cienkowarstwowe wraz z tabelami, zawierającymi zestawienie współczynników R_f dla badanych eluentów, w odwróconym układzie faz

I. Metanol:H₂O+H₂SO₄ roc. do pH=3

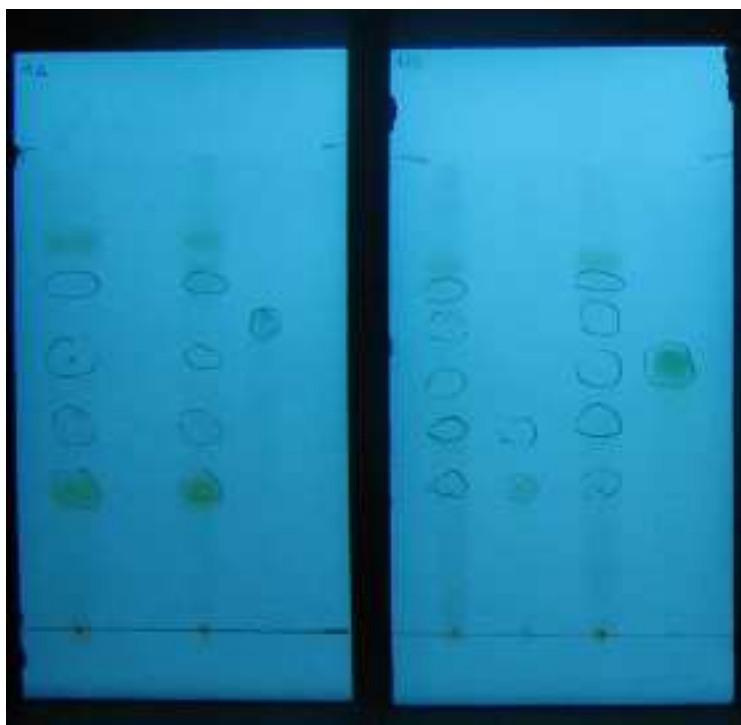
A. Eluent MeOH:H₂O 75%:25% + H₂SO₄ pH=3



Rys. 1. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys. 1 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



Rys. 1 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

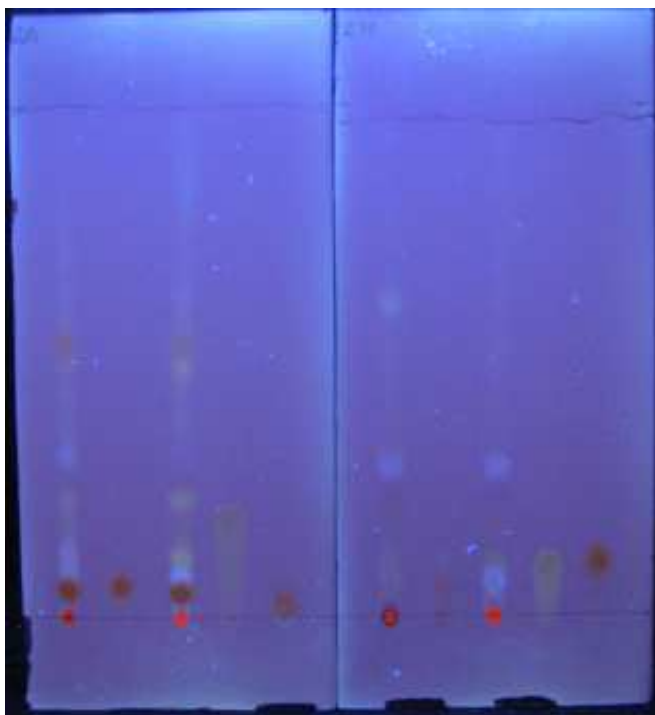
Tabela 1. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: MeOH:H₂O 75%:25% + H₂SO₄ pH=3

Płytki 1A			Płytki 1B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1	x	29,73	6.1	x	27,40
1.2	x	42,57	6.2	x	31,51
1.3	x	56,08	6.3	x	43,15
1.4	x	72,97	6.4		52,74
1.5	x	81,08	6.5	x	64,38
3.1	x	31,08	6.6	x	72,60
3.2	x	43,24	6.7	x	78,08
3.3	x	57,43	6.8	x	89,04
3.4	x	72,97	7.1	Ramentaceon	31,50
3.5	x	81,08	7.2	Ramentaceon	43,15
4	Mirycetyna	64,19	8.1	x	27,40
			8.2	x	31,50
			8.3	x	45,21
			8.4	x	56,16
			8.5	x	66,44
			8.6	x	73,97
			8.7	x	78,08
			8.8	x	89,04
			9	Kwercetyna	56,16

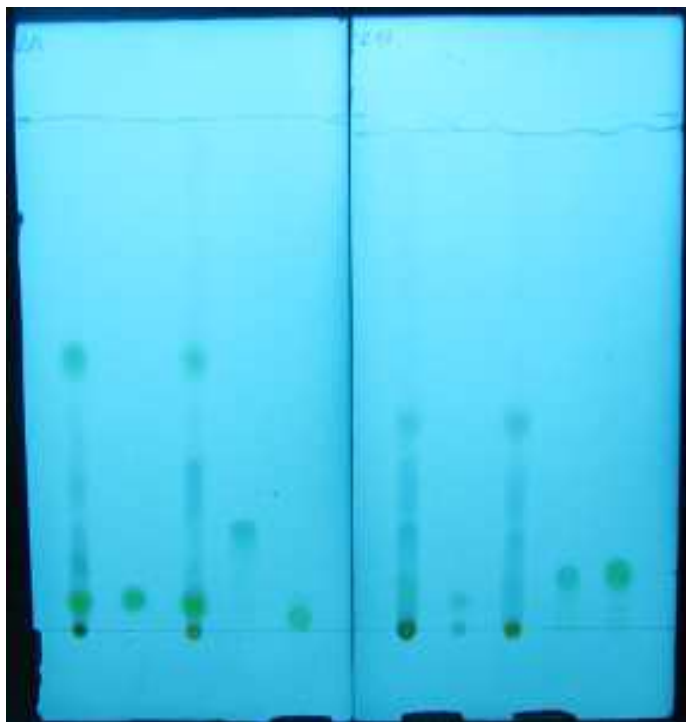
A. Eluent MeOH:H₂O 50%:50% + H₂SO₄ pH=3



Rys. 2. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys. 2 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm

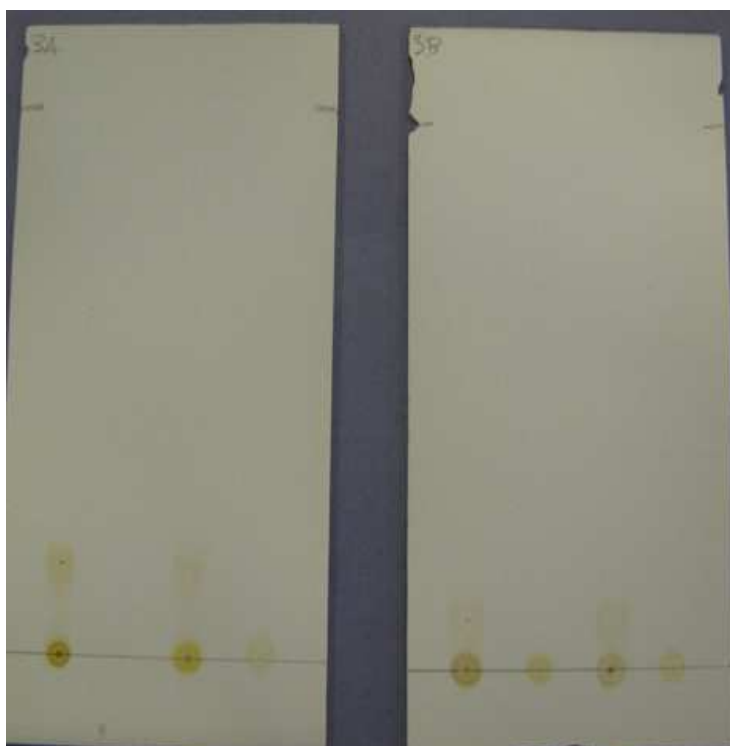


Rys. 2 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

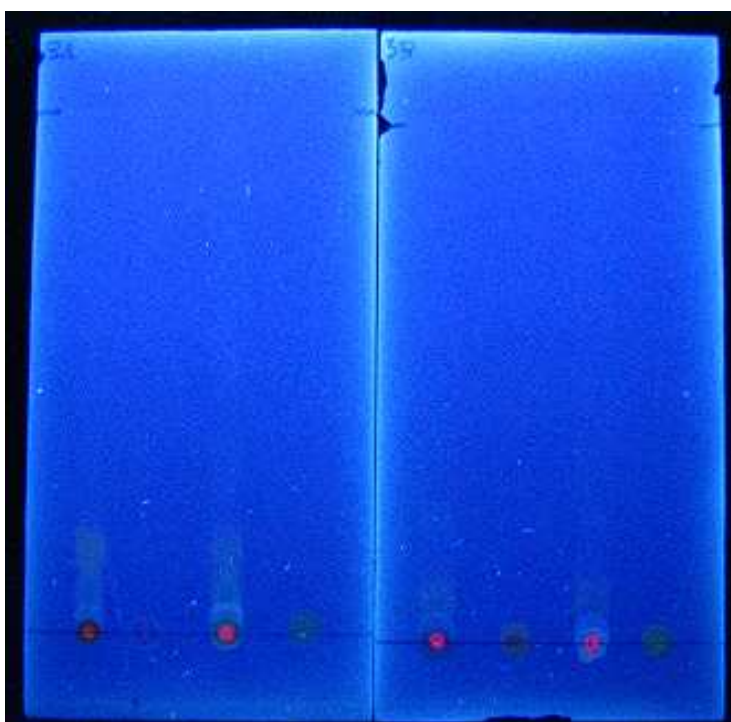
Tabela 2. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: MeOH:H₂O 50% : 50% + H₂SO₄ pH=3

Płytko 2A			Płytko 2B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1		5,48	6.1		10,00
1.2		12,33	6.2		18,57
1.3		19,18	6.3		27,14
1.4		27,40	6.4		32,86
1.5		53,42	6.5		42,86
2	plumbagina	6,85	6.6		64,29
3.1		5,48	7	ramentaceon	5,71
3.2		12,33	8.1		8,57
3.3		30,14	8.2		17,14
3.4		53,42	8.3		25,71
4	mirycetyna	19,18	8.4		31,43
5	chloroplumbagina	2,74	8.5		42,86
			9	kwercecyta	10,71
			10	droseron	12,14

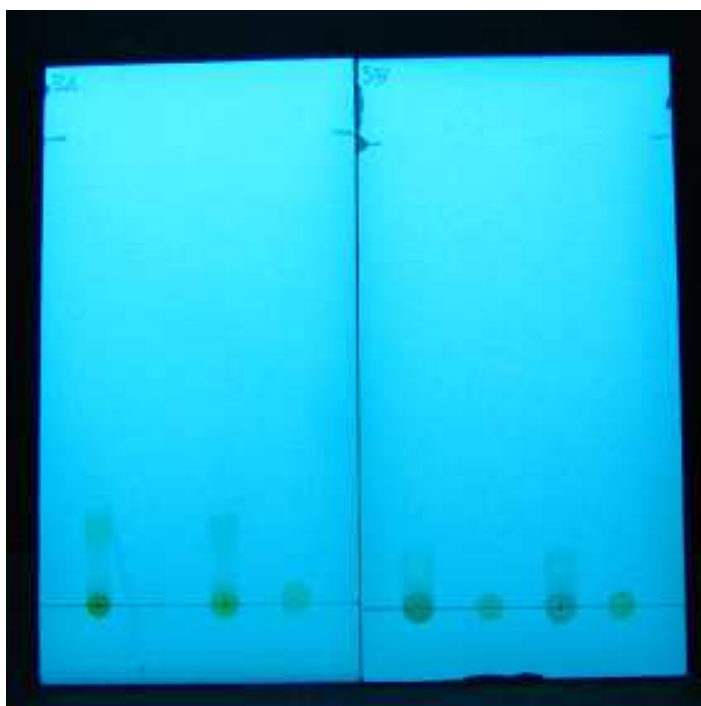
B. Eluent MeOH:H₂O 25%:75% + H₂SO₄ rozc



Rys. 3. Chromatogram w świetle widzialnym



Rys. 3 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



Rys. 3 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

Tabela 3. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: MeOH:H₂O 50% : 50% + H₂SO₄ pH=3

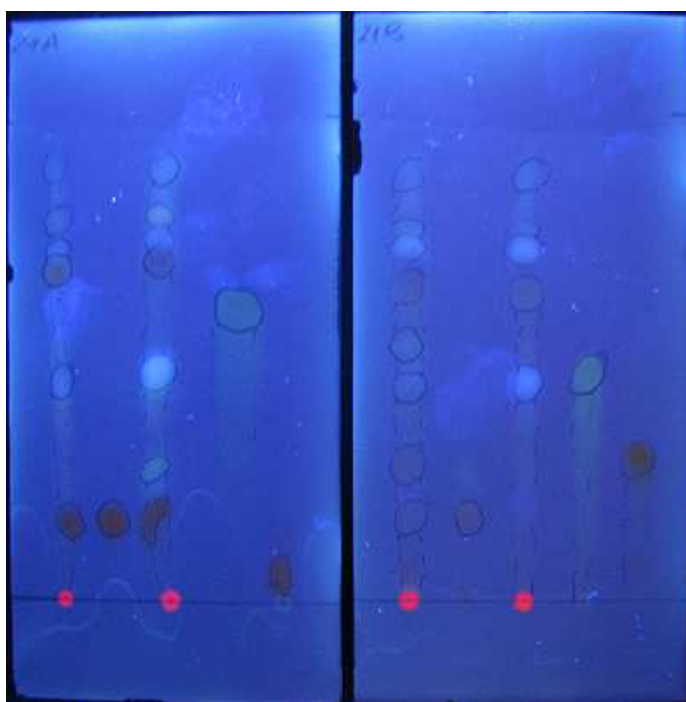
Płytką 3A			Płytką 3B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1		18,01	6		7,33
3		16,95	8		7,40
4	Kwercetyna	8,61			

II. Izopropanol:H₂O+H₂SO₄ pH=3

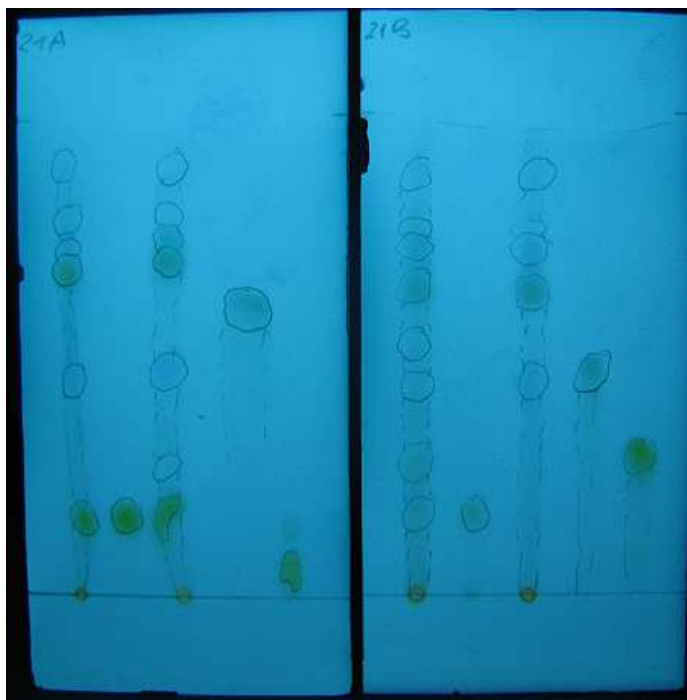
A. Eluent: izopropanol:H₂O 42%:58%+H₂SO₄ pH=3



Rys. 4. Chromatogram cienkowiarskowy w świetle widzialnym



Rys. 4 a. Chromatogram cienkowiarskowy przy długości fali 365 nm



Rys. 4b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

Tabela 4. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: izopropanol:H₂O 42%:58%+H₂SO₄ pH=3

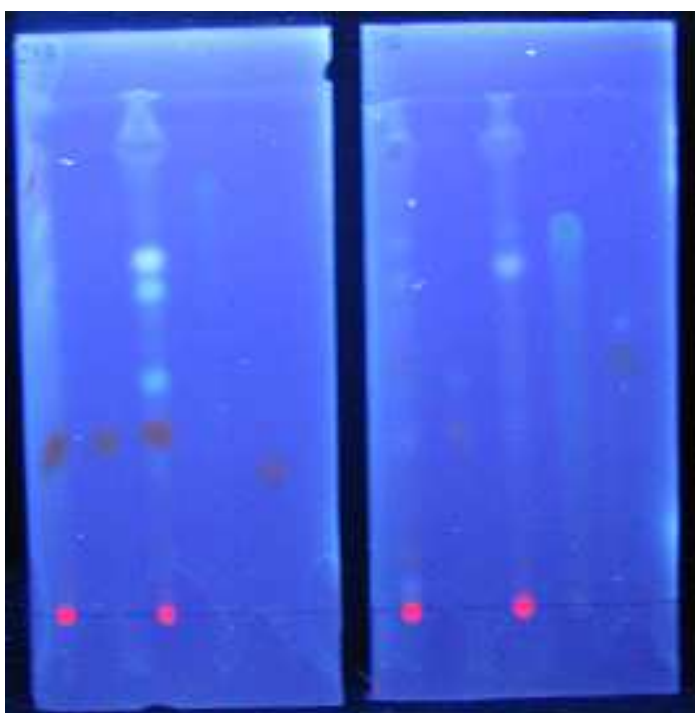
Płytki 21A			Płytki 21B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1	x	17,14	6.1	x	17,65
1.2	x	45,71	6.2	x	29,41
1.3	x	68,57	6.3	x	47,06
1.4	x	74,29	6.4	x	54,41
1.5	x	80,00	6.5	x	66,18
1.6	x	90,00	6.6	x	73,53
2	plumbagina	17,14	6.7	x	77,94
3.1	x	17,14	6.8	x	89,71
3.2	x	28,57	7	plumbagina	17,65
3.3	x	47,14	8.1	x	47,06
3.4	x	70,00	8.2	x	64,71
3.5	x	75,71	8.3	x	73,53
3.6	x	80,00	8.4	x	77,94
3.7		90,00	8.5	x	89,71
4	mirycetyna	60,00	9	kwercetyna	48,53
5	chloroplumbagina	7,14	10	droseron	30,88

III. Acetonitryl:H₂O+H₂SO₄ pH=3

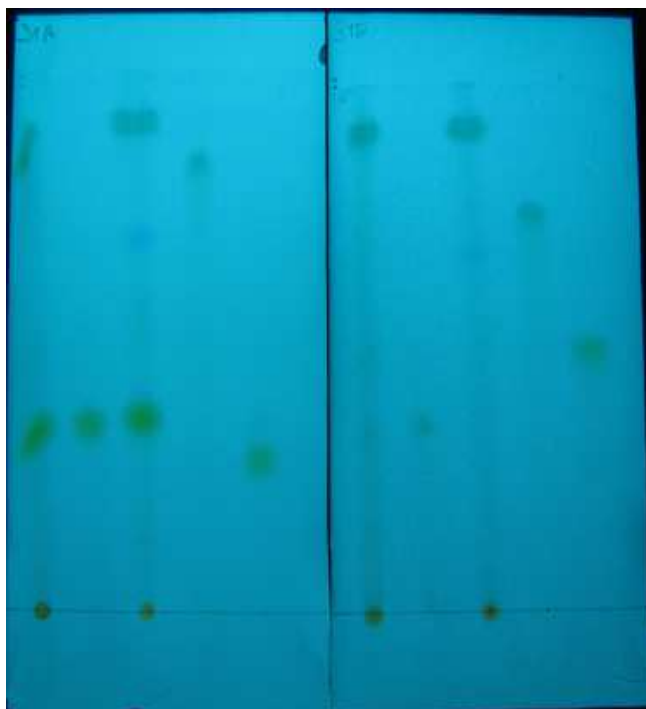
A. acetonitryl:H₂O 65%:35% +H₂SO₄ pH=3



Rys. 5. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys. 5 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm

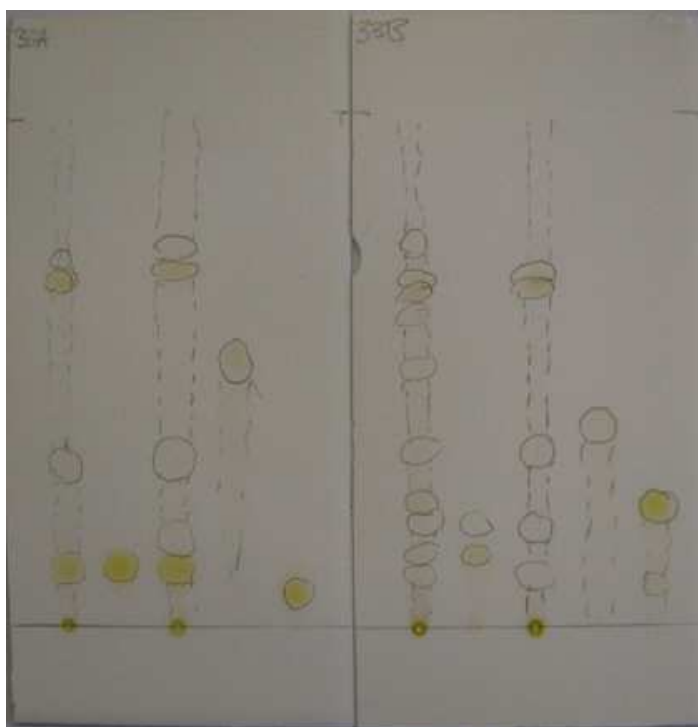


Rys. 5 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

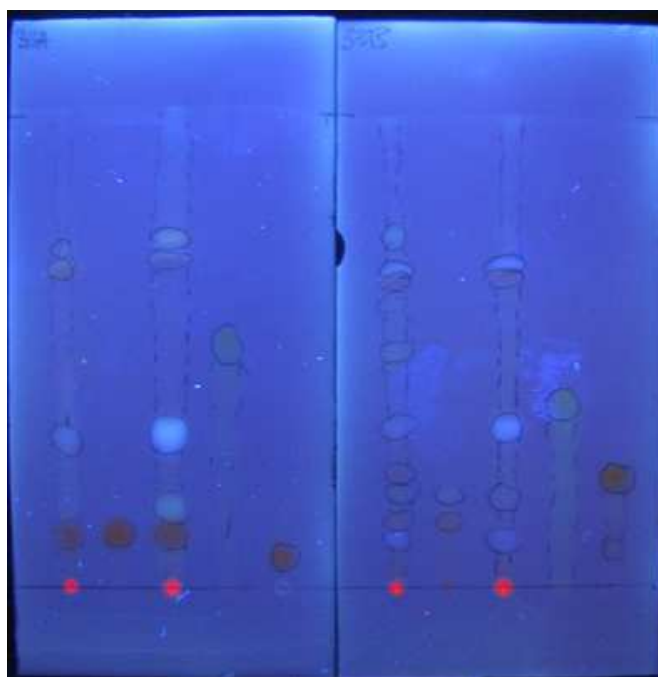
Tabela 5. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: acetonitryl:H₂O 65%:35% +H₂SO₄ pH=3

Płytko 31A			Płytko 31B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1	x	32,89	6.1	x	4,00
1.2	x	64,47	6.2	x	10,67
1.3	x	68,42	6.3	x	34,67
1.4	x	75,66	6.4	x	47,33
1.5	x	85,53	6.5	x	57,33
2	plumbagina	34,21	6.6	x	64,67
3.1	x	30,26	6.7	x	72,67
3.2	x	35,53	6.8	x	90,67
3.3	x	46,05	7.1	ramentaceon	34,67
3.4	x	63,82	7.2	ramentaceon	44,67
3.5	x	69,74	8.1	x	34,67
3.6	x	90,79	8.2	x	44,67
4	mirycetyna	82,24	8.3	x	57,33
5	chloroplumbagina	27,63	8.4	x	68,00
			8.5	x	72,67
			8.6	x	90,67
			9	kwercetyna	72,67
			10.1	droseron	48,00
			10.2	droseron	56,00

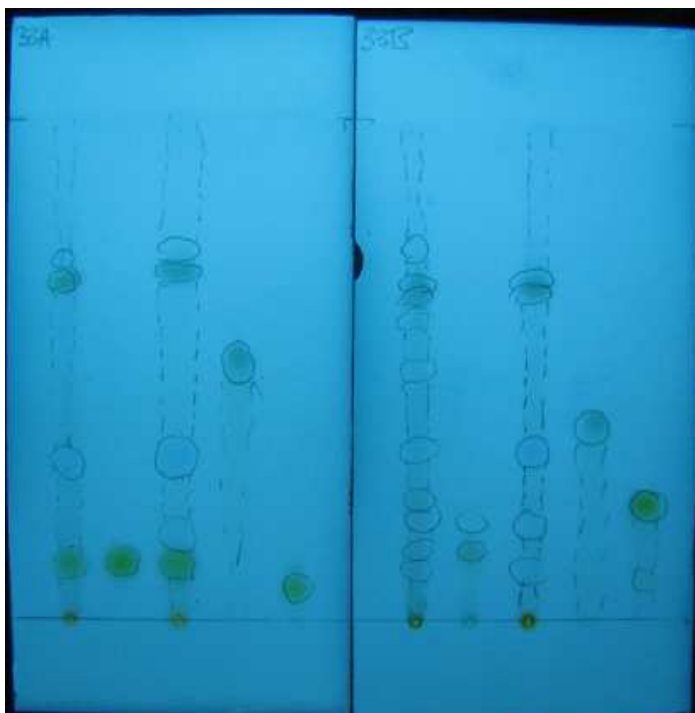
B. Acetonitryl:H₂O 45%:55% +H₂SO₄ pH=3



Rys. 6. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys. 6 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



Rys. 6 b. Chromatogram przy długości fali 254 nm

Tabela 6. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: acetonitryl:H₂O 45%:55% +H₂SO₄ pH=3

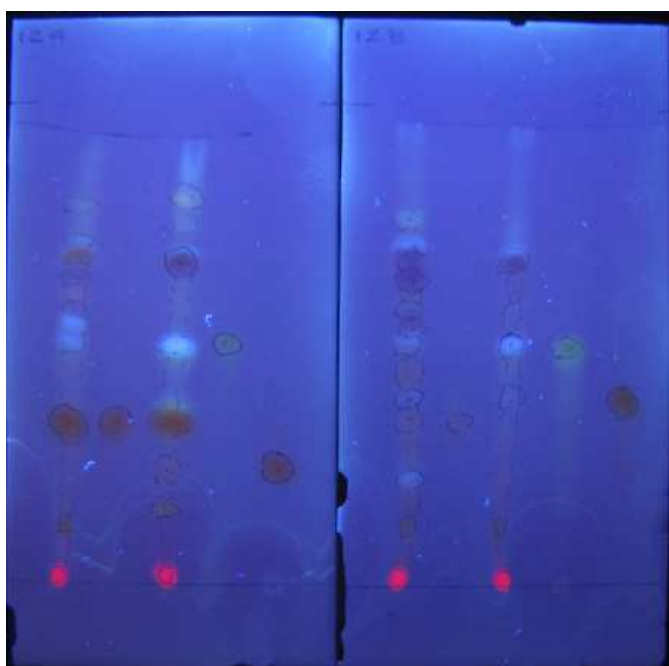
Płytko 33A			Płytko 33B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1	x	11,27	6.1	x	9,86
1.2	x	30,99	6.2	x	14,08
1.3	x	69,01	6.3	x	18,31
1.4	x	71,83	6.4	x	22,54
2	plumbagina	11,27	6.5	x	33,80
3.1	x	11,27	6.6	x	49,30
3.2	x	18,31	6.7	x	59,15
3.3	x	30,99	6.8	x	64,79
3.4	x	69,01	6.9	x	67,61
3.5	x	73,24	6.10	x	73,24
4	mirycetyna	50,70	7.1	ramentaceon	14,08
5	chloroplumbagina	7,04	7.2	ramentaceon	18,31
			8.1	x	9,86
			8.2	x	18,31
			8.3	x	33,80
			8.4	x	64,79
			8.5	x	67,61
			9	kwercetyna	38,03
			10.1	droseron	8,45
			10.2	droseron	22,54

IV. THF+H₂O+ H₂SO_{4r} pH=3

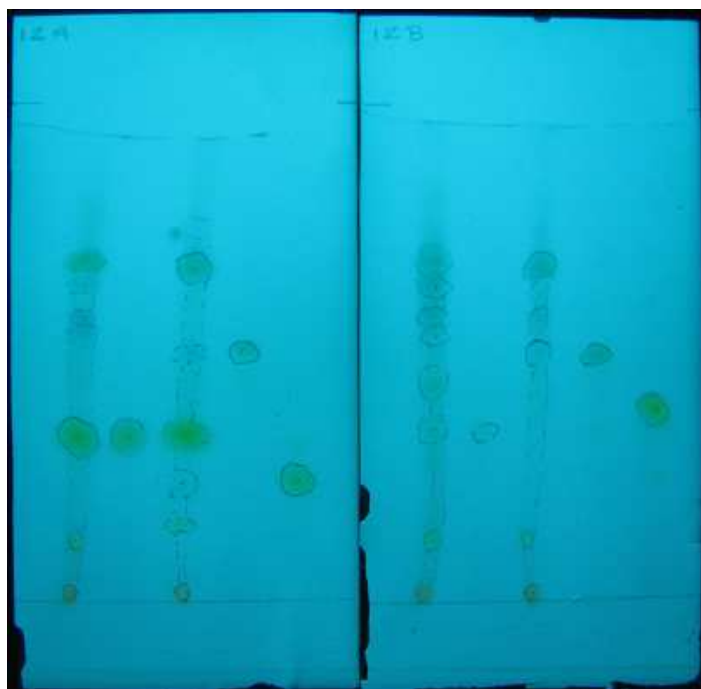
A. THF+H₂O 58%:42% + H₂SO₄ pH=3



Rys. 7. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys. 7 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm

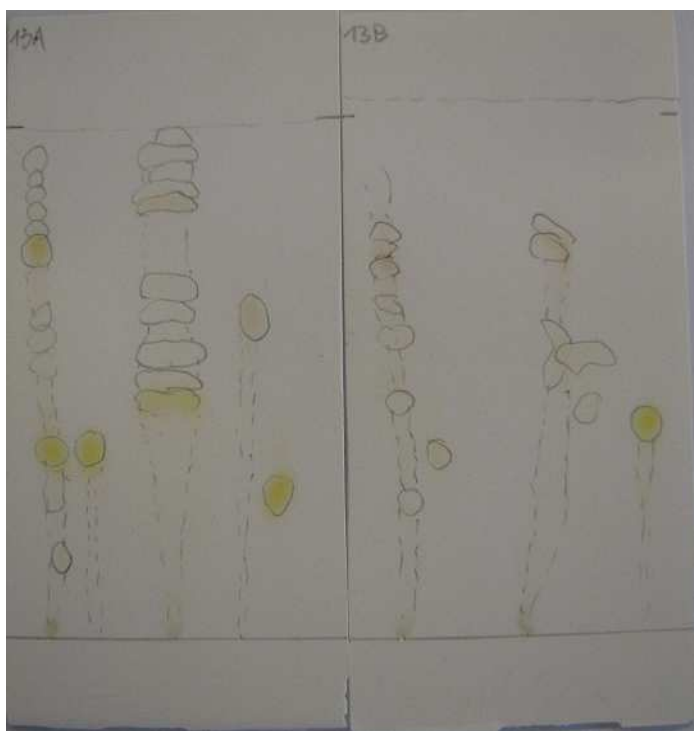


Rys. 7 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

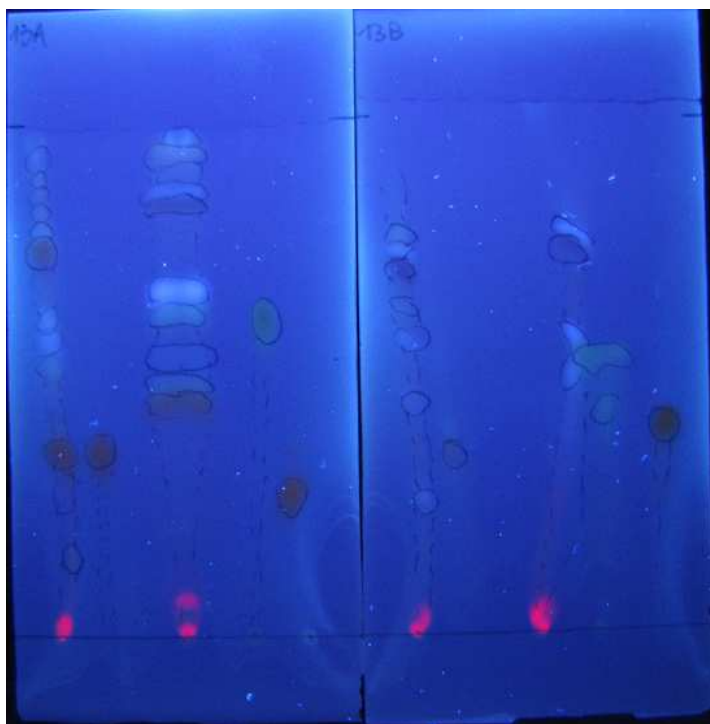
Tabela 7. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: THF: H₂O 58%:42% + H₂SO₄ pH=3

Płytko 12A			Płytko 12B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1	x	2,17	6.1	x	2,11
1.2	x	13,04	6.2	x	12,68
1.3	x	36,23	6.3	x	22,54
1.4	x	52,17	6.4	x	36,62
1.5	x	56,52	6.5	x	40,85
1.6	x	59,42	6.6	x	45,07
1.7	x	66,67	6.7	x	52,11
1.8	x	72,46	6.8	x	54,93
1.9	x	75,36	6.9	x	59,15
1.10	x	86,96	6.10	x	66,20
2	plumbagina	36,23	6.11	x	70,42
3.1	x	2,17	6.12	x	80,28
3.2	x	15,94	7	ramentaceon	35,21
3.3	x	25,36	8.1	x	2,11
3.4	x	36,23	8.2	x	12,68
3.5	x	52,17	8.3	x	40,85
3.6	x	72,46	8.4	x	52,11
3.7	x	79,71	8.5	x	59,15
3.8	x	86,96	8.6	x	70,42
4	mirycetyna	52,17	9	kwercecytna	52,11
5	chloroplumbagina	25,36	10	droseron	40,85

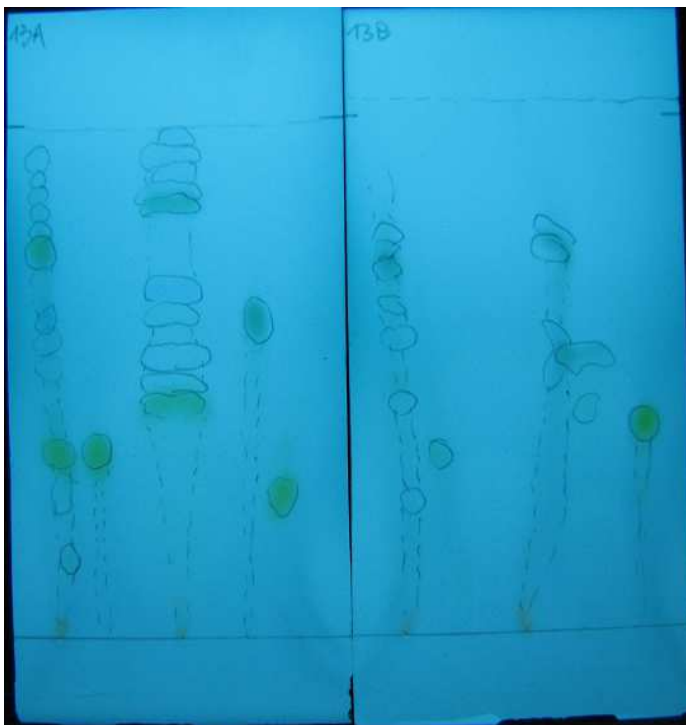
B. THF+H₂O 62%:38% + H₂SO₄ pH=3



Rys.8. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys. 8 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



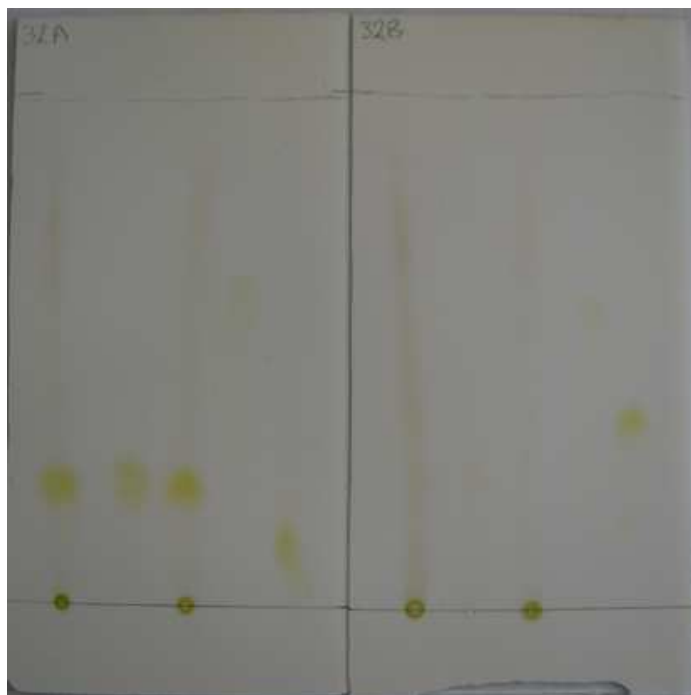
Rys. 8 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

Tabela 8. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: THF: H₂O 62% : 38% + H₂SO₄ pH=3

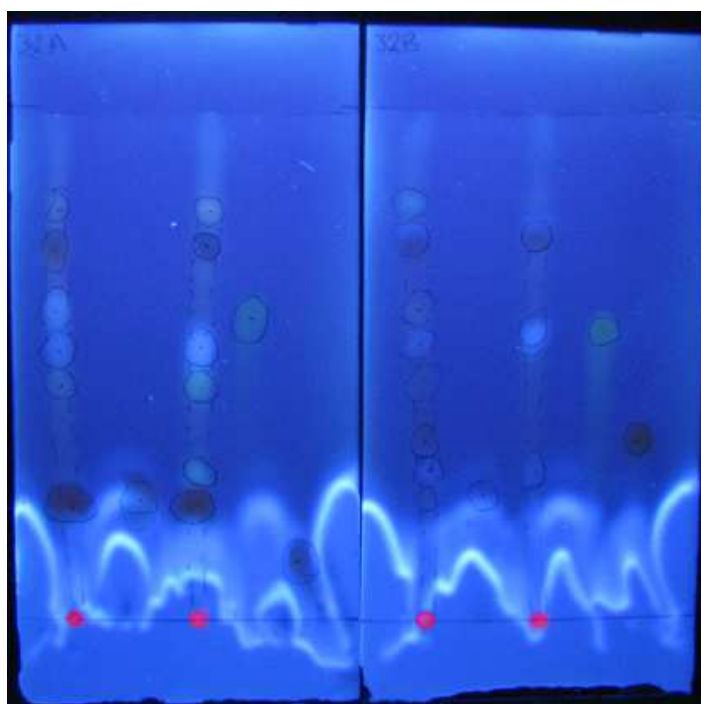
Płytki 13A			Płytki 13B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1	x	15,28	6.1	x	24,32
1.2	x	27,78	6.2	x	43,24
1.3	x	34,72	6.3	x	54,05
1.4	x	52,78	6.4	x	60,81
1.5	x	56,94	6.5	x	67,57
1.6	x	62,50	6.6	x	70,27
1.7	x	73,61	6.7	x	74,32
1.8	x	79,17	7	ramentaceon	33,11
1.9	x	81,94	8.1	x	51,35
1.10	x	84,72	8.2	x	68,92
1.11	x	87,50	8.3	x	74,32
1.12	x	91,67	9.1	kwercetyna	40,54
2	plumbagina	34,72	9.2	kwercetyna	50,00
3.1	x	44,44	10	droseron	37,84
3.2	x	48,61			
3.3	x	52,78			
3.4	x	62,50			
3.5	x	66,67			
3.6	x	83,33			
3.7	x	86,11			
3.8	x	88,89			
3.9	x	92,36			
3.10	x	95,83			
4	mirycetyna	59,72			
5	chloroplumbagina	27,78			

V. Dioksan+H₂O+ H₂SO₄ do pH=3

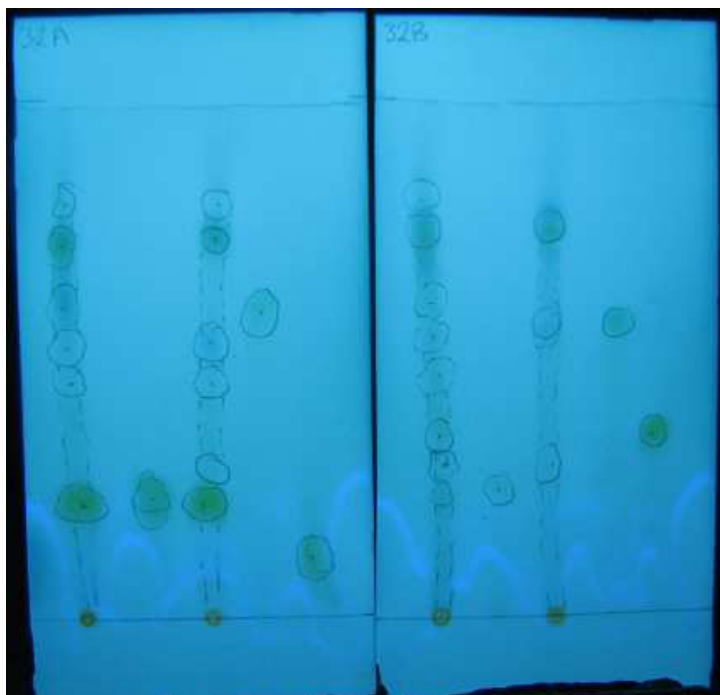
A. Dioksan+H₂O 58%:42% + H₂SO₄ do pH=3



Rys. 9. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys. 9 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm

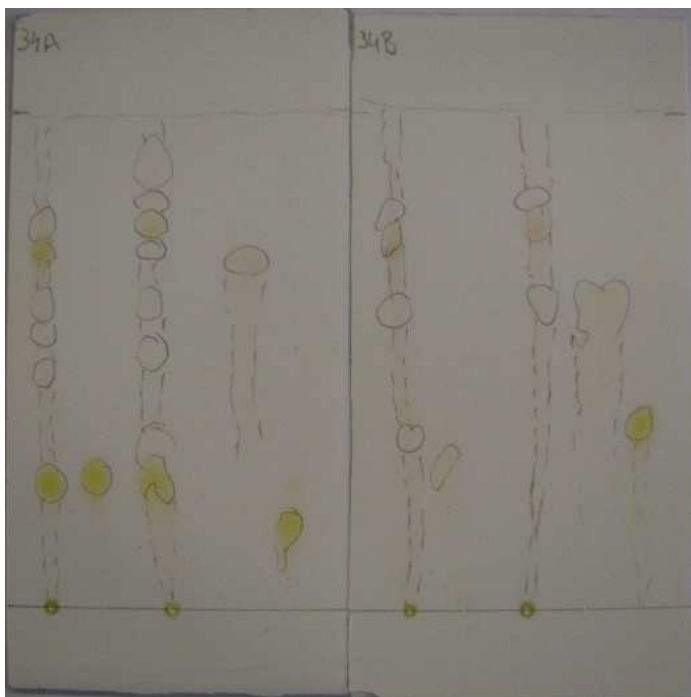


Rys. 9 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

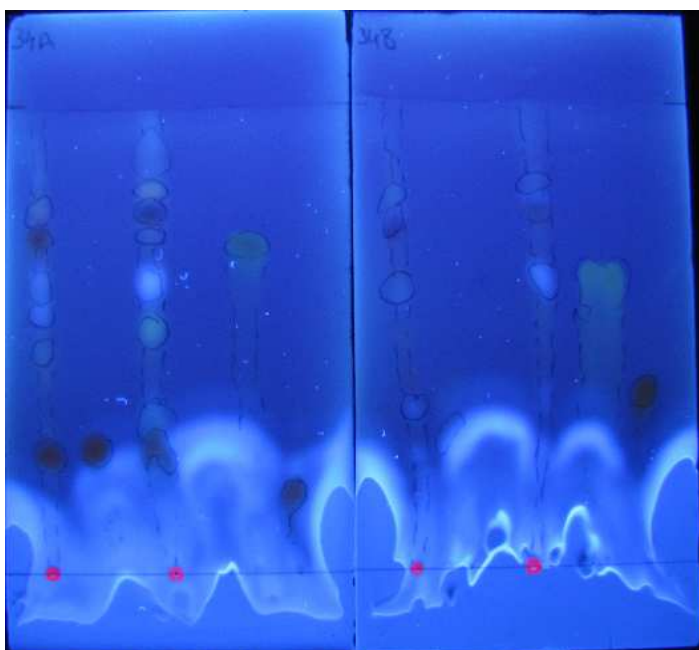
Tabela 9. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: dioksan: H_2O 58% : 42% + H_2SO_4 pH=3

Płytki 32A			Płytki 32B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1	x	22,97	6.1	x	25,33
1.2	x	48,65	6.2	x	30,67
1.3	x	55,41	6.3	x	36,00
1.4	x	60,81	6.4	x	48,00
1.5	x	74,32	6.5	x	56,00
1.6	x	81,08	6.6	x	62,67
2	plumbagina	22,97	6.7	x	70,67
3.1	x	22,97	6.8	x	76,00
3.2	x	29,73	6.9	x	81,33
3.3	x	47,30	7	ramentaceon	25,33
3.4	x	55,41	8.1	x	30,67
3.5	x	74,32	8.2	x	57,33
3.6	x	81,08	8.3	x	70,67
4	mirycetyna	60,81	8.4	x	76,00
5	chloroplumbagina	12,16	9	kwercetyna	57,33
			10	droseron	36,00

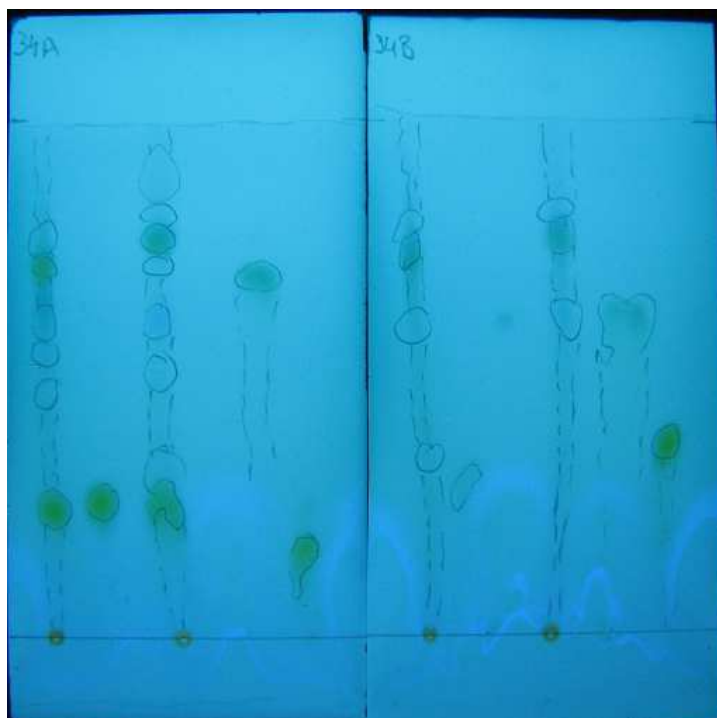
B. Dioksan+H₂O 62%:38% + H₂SO₄ pH=3



Rys. 10. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys. 10 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



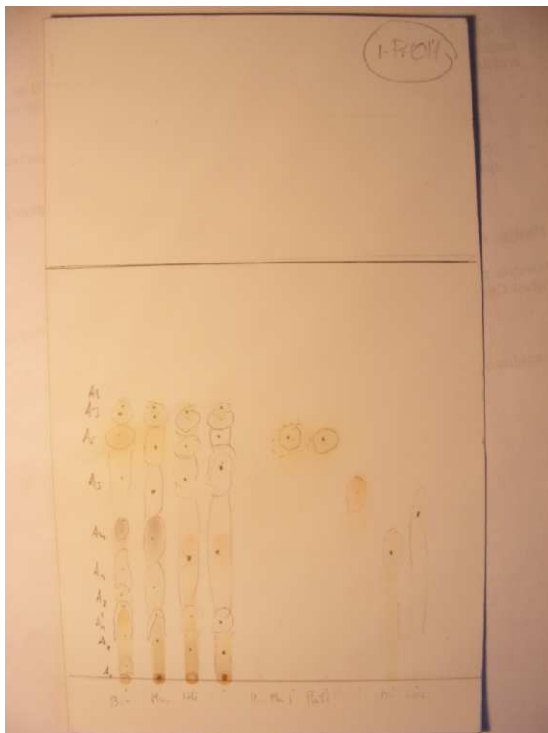
Rys. 10 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

Tabela 10. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eluencie: dioksan: H_2O 62% : 38% + H_2SO_4 pH=3

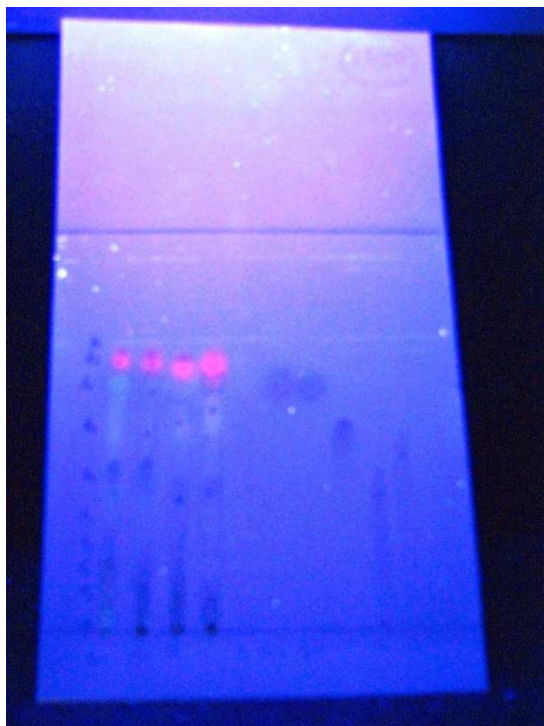
Płytki 34A			Płytki 34B		
Numer plamki	Substancja	hR_f	Numer plamki	Substancja	hR_f
1.1	x	25,00	6.1	x	32,88
1.2	x	47,22	6.2	x	58,90
1.3	x	54,17	6.3	x	72,60
1.4	x	59,72	6.4	x	76,71
1.5	x	72,22	7	x	27,40
1.6	x	76,39	8.1	x	58,90
2	plumbagina	26,39	8.2	x	75,34
3.1	x	26,39	8.3	x	80,82
3.2	x	33,33	9	x	58,90
3.3	x	50,00	10	x	36,30
3.4	x	59,72			
3.5	x	72,22			
3.6	x	76,39			
3.7	x	81,94			
3.8	x	88,89			
4	mirecytyna	69,44			
5	chloroplumbagina	15,28			

12.2. Załącznik 2. Chromatogramy cienkowarstwowe wraz z tabelami, zawierającymi zestawienie współczynników R_f dla badanych eluentów, w normalnym układzie faz

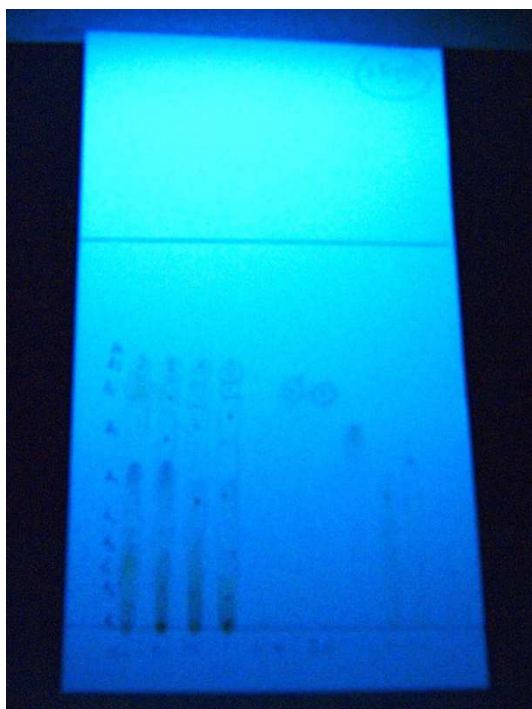
I. Eluent: izopropanol



Rys.1. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys.1 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm

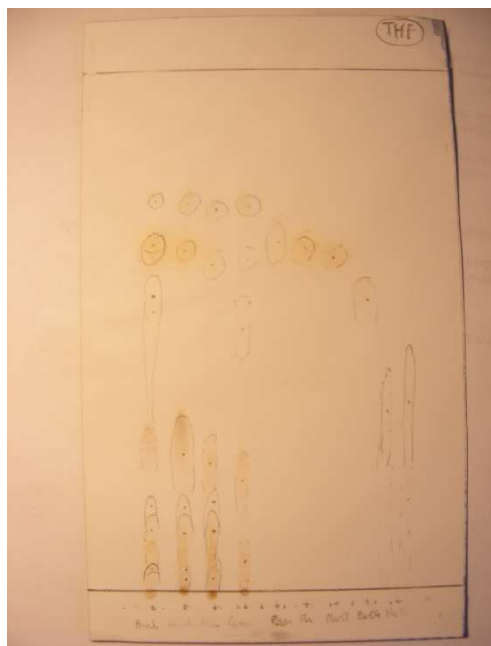


Rys.1 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

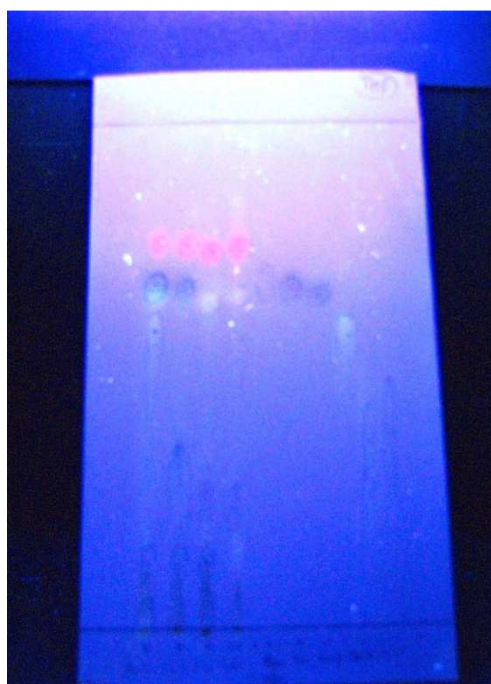
Tabela 1. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w izopropanolu jako fazie ruchomej

Nazwa metabolitu / substancji	<i>D. muscipula</i>	<i>D. aliciae</i>	<i>D. capensis</i>	<i>D. binata</i>	Wzorce
	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f
1	64,29	64,29	64,29	64,29	
chloroplumbagina	59,18				60,2
ramentaceon					61,73
2					
plumbagina	60,20	60,20	60,20	60,20	61,22
droseron	47,96				50
3		53,06	53,06		
kwercetyna		44,89	44,89		44,89
mirycetyna		36,73	36,73		36,73
4		16,33	16,33		

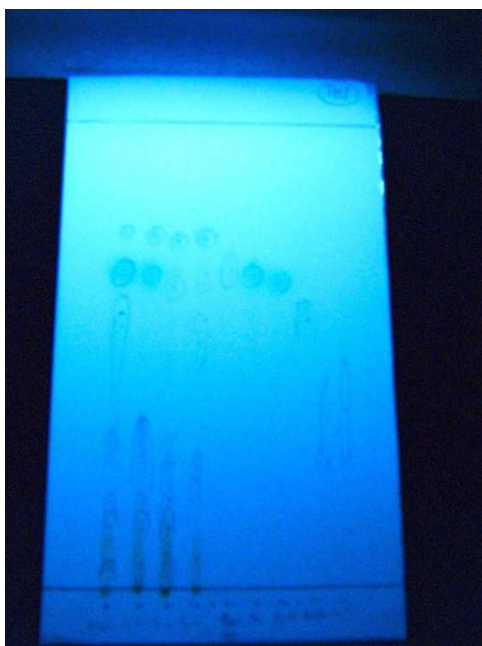
II. Eluent: tetrahydrofuran



Rys.2. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys.2 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm

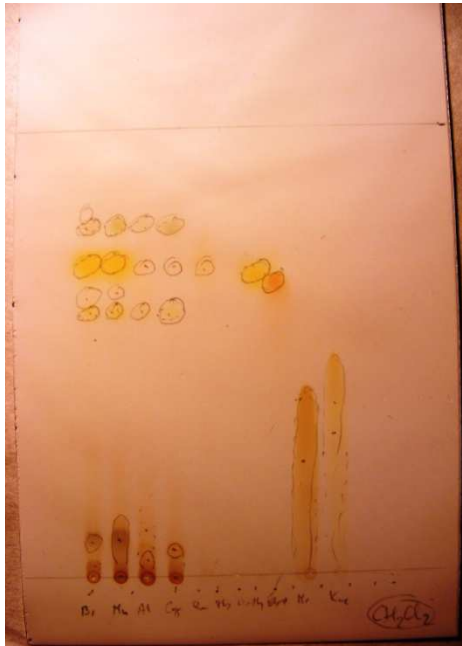


Rys.2 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

Tabela 2. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w tetrahydrofuranie jako fazie ruchomej

Nazwa metabolitu / substancji	<i>D. muscipula</i>	<i>D. aliciae</i>	<i>D. capensis</i>	<i>D. binata</i>	Wzorce
	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f
chloroplumbagina					70,4
ramentacoen		64,75	64,75		73,6
1		29,50	61,87		
plumbagina	64,75			64,75	72
2	28,78				
droseron			55,57		61,6
3			30,93		
kwercetyna					40
mirycetyna					38,4

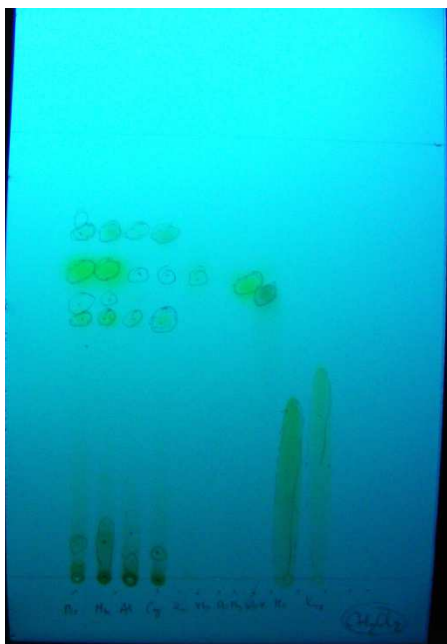
III. Eluent: dichlorometan



Rys.3. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys.3 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



Rys.3 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

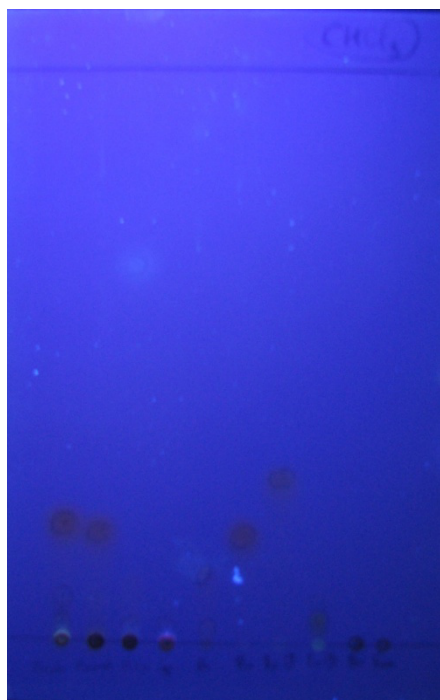
Tabela 3. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w dichlorometanie jako fazy ruchomej

Nazwa metabolitu / substancji	<i>D. muscipula</i>	<i>D. aliciae</i>	<i>D. capensis</i>	<i>D. binata</i>	Wzorce
	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f
chloroplumbagina					28,57
ramentaceon		18,57			12,14
plumbagina	18,57				17,86
1				17,86	
droseron	3,57			5,37	3,57
2	1,07			2,14	
kwercetyna	-	-	-	-	0
mirycetyna	-	-	-	-	0

IV. Eluent: chloroform



Rys.4. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys.4 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



Rys.4 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

Tabela 4. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w chloroformie jako fazie ruchomej

Nazwa metabolitu / substancji	<i>D. muscipula</i>	<i>D. aliciae</i>	<i>D. capensis</i>	<i>D. binata</i>	Wzorce
	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f
1	77,32	77,32	77,32	77,32	
chloroplumbagina					80,63
ramentaceon		67,53			68,04
3		59,79			
plumbagina	70,01				70,01
2	62,88			5,71	
droseron	5,37			55,37	64,95
4	1,07			22,14	
kwercetyna					41,24
mirycetyna					39,17

V. Eluent: octan etylu



Rys.5. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys.5 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



Rys.5 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

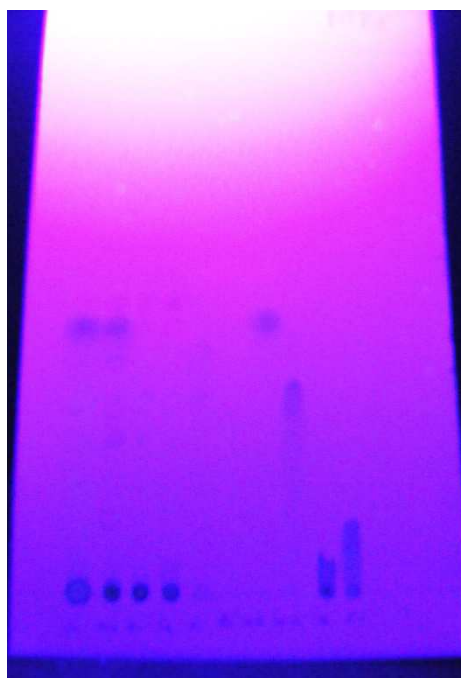
Tabela 5. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia hR_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w octanu etylu, jako fazy ruchomej

Nazwa metabolitu / substancji	<i>D. muscipula</i>	<i>D. aliciae</i>	<i>D. capensis</i>	<i>D. binata</i>	Wzorce
	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f	hR_f
1	91,47	91,47	91,47	91,47	
chloroplumbagina					75,19
ramentaceon	75,97	76,74	76,74	75,97	76,74
2	71,32	69,77	69,77		
plumbagina	75,19				75,19
3	71,32				
droseron	55,81				55,81
4	44,19				
5		38,76	40,31	34,88	
kwercetyna		25,58		26,36	25,58
mirycetyna		19,38	17,98	17,98	19,38
5		5,43	5,43	7,75	

VI. Eluent: eter *tert*-butylowo-metylowy



Rys.6. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



Rys.6 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



Rys.6 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

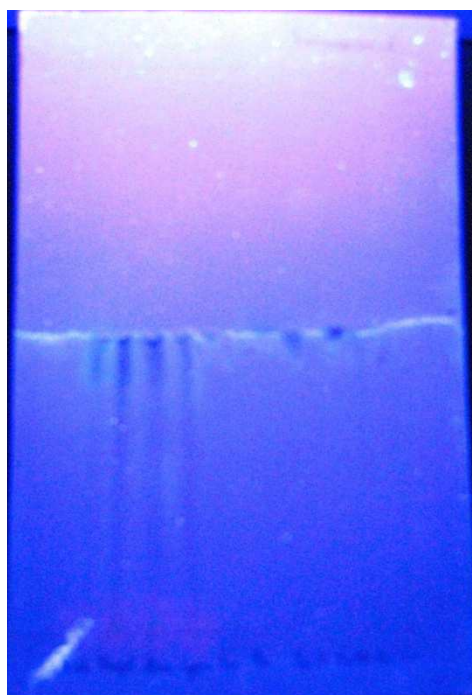
Tabela 6. Zestawienie wartości współczynnika opóźnienia R_f substancji rozdzielonych na cienkowarstwowym chromatogramie, rozwiniętym w eterze *tert*-butyloowo-metylowym, jako fazy ruchomej

Nazwa metabolitu / substancji	<i>D. muscipula</i>	<i>D. aliciae</i>	<i>D. capensis</i>	<i>D. binata</i>	Wzorce
	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f
1	85,00		85,00	85,00	
chloroplumbagina	78,75			78,75	78,75
ramentaceon			62,59		62,59
2			57,55	55,00	
plumbagina	77,5				77,5
3	66,25				
droseron	57,55			57,55	57,55
4	43,75				
5	43,75		57,55		
kwercetyna	45,32		45,32		45,32
mirycetna					40,29

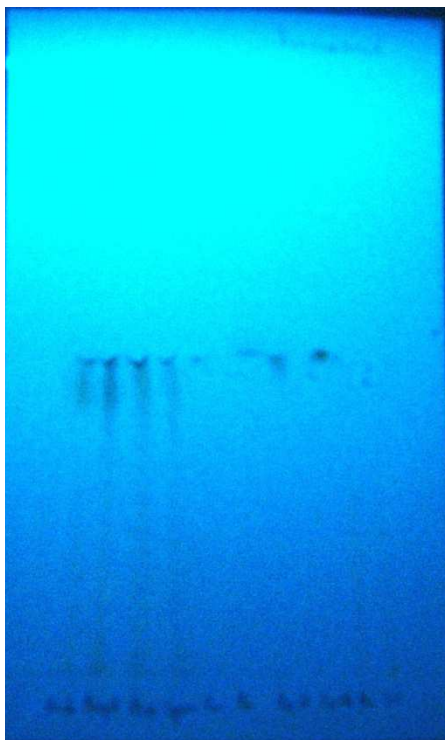
VII. Eluent: formamid



Rys.7. Chromatogram cienkowarstwowy w świetle widzialnym



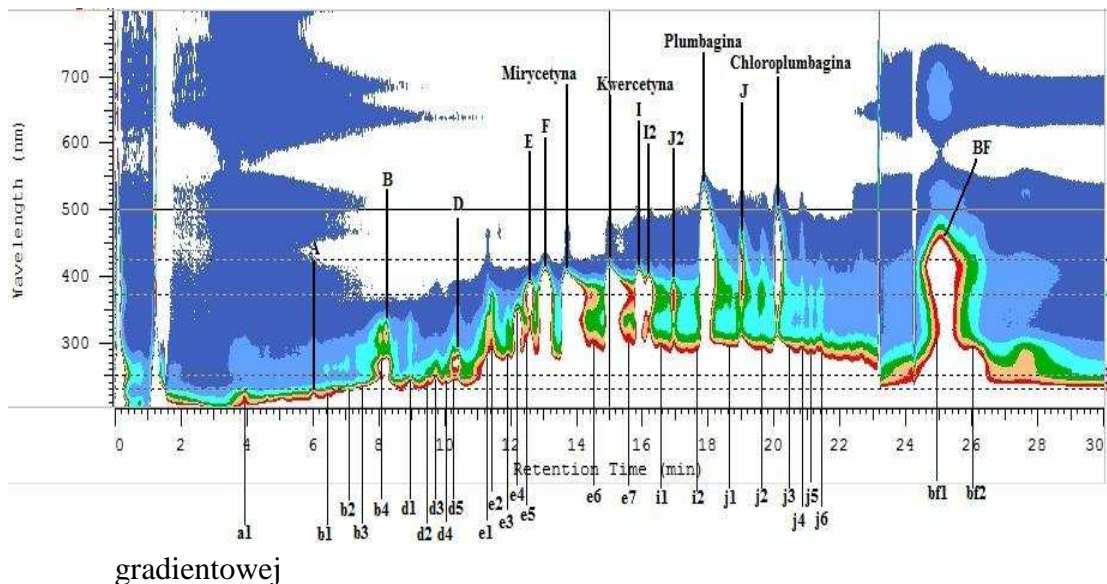
Rys.7 a. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 365 nm



Rys.7 b. Chromatogram cienkowarstwowy przy długości fali 254 nm

Formamid wykazał zbyt dużą siłę elucji, w związku z czym, składniki ekstraktów roślinnych oraz substancje wzorcowe migrowały z czołem eluentu. Dlatego też nie zamieszczono zestawienia tabelarycznego wartości współczynników opóźnienia dla tego eluentu.

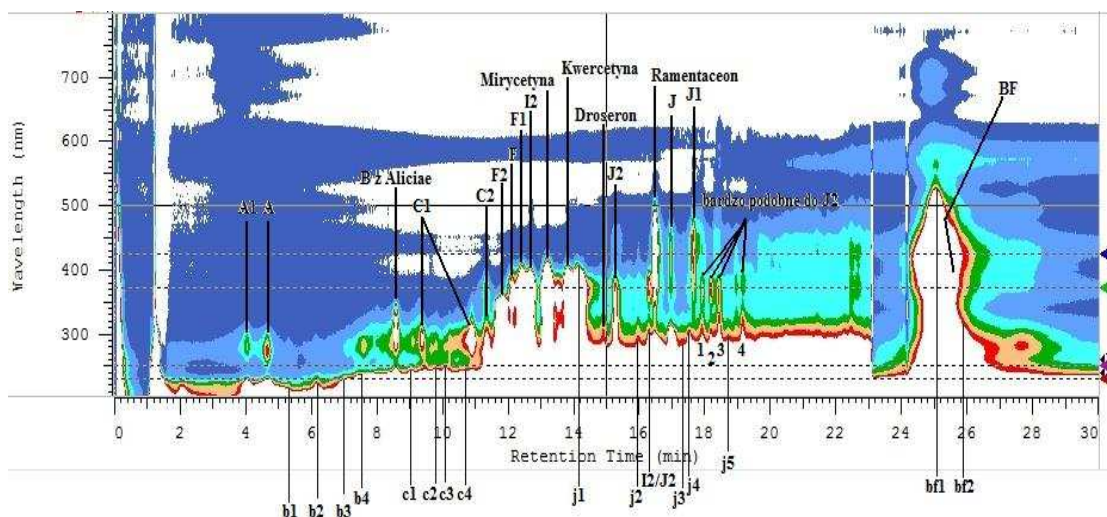
12.3. Załącznik 3. Przykładowe chromatogramy i tabele z zestawieniami substancji „zidentyfikowanych” w ekstraktach otrzymane za pomocą odwróconego układu faz wysokosprawnej chromatografii ciekowej w warunkach elucji



Rys. 1. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD podczas rozdzielania próbki ekstraktu roślinnego z muchówki amerykańskiej (*Dionaea muscipula*) dozowanej w metanolu. Kolumna Lichrospher 100: Rp18e 125x4mm 5 μ m; eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B:MeOH; przepływ 1ml/min; temperatura 20⁰C; objętość dozowanej próbki 20 μ l; przełączenie zaworu elucji wstecznej ok. 23min

Tabela 1. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Dionaea muscipula* w metanolu

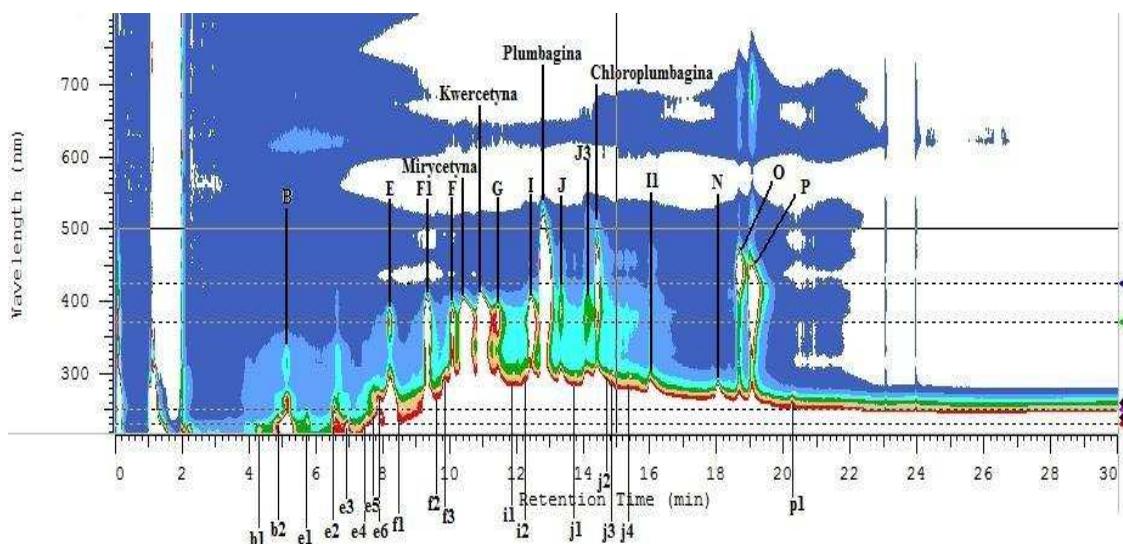
Chromatogram 462 <i>D.muscipula</i> w MeOH					
Dane		t ₀ =1,05			
Np.	Substancja	tR	k	α 1	α 2
1	a1	3,92	2,73		
2	A	6,04	4,75		
3	b1	6,68	5,36		
4	b2	7,03	5,70		
5	b3	7,50	6,14		
6	b4	8,03	6,65		
7	B	8,23	6,84		
8	d1	8,95	7,52		
9	d2	9,48	8,03		
10	d3	9,73	8,27		
11	d4	10,02	8,54		
12	d5	10,28	8,79		
13	D	10,41	8,91		
14	e1	11,31	9,77		
15	e2	11,44	9,90		
16	e3	11,92	10,35		
17	e4	12,20	10,62		
18	e5	12,43	10,84		
19	E	12,60	11,00		
20	F	13,07	11,45		
21	mirycetyna	13,73	12,08	1,05	1,06
22	e6	14,47	12,78		
23	kwercetyna	15,00	13,29	1,04	1,05
24	e7	15,67	13,92		
25	I	15,91	14,15		
26	I2	16,20	14,43		
27	i1	16,56	14,77		
28	J2	16,95	15,14		
29	i2	17,64	15,80		
30	plumbagina	17,87	16,02	1,01	1,05
31	j1	18,64	16,75		
32	J	19,02	17,11		
33	j2	19,60	17,67		
34	chloroplumbagina	20,09	18,13	1,03	1,02
35	j3	20,48	18,50		
36	j4	20,84	18,85		
37	j5	21,12	19,11		
38	j6	21,42	19,40		
39	bf1	24,98	22,79		
40	BF	25,06	22,87		



Rys. 2. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD podczas rozdzielania próbki ekstraktu roślinnego z rosziczki alicji (*Drosera aliciae*) dozowanej w metanolu. Kolumna: Lichrospher 100 RP18e 125x4mm 5µm; Eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B: MeOH; przepływ 1 ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 µl; przełączenie zaworu elucji wstecznej w kolumnie ok. 23min

Tabela 2. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Drosera aliciae* w metanolu

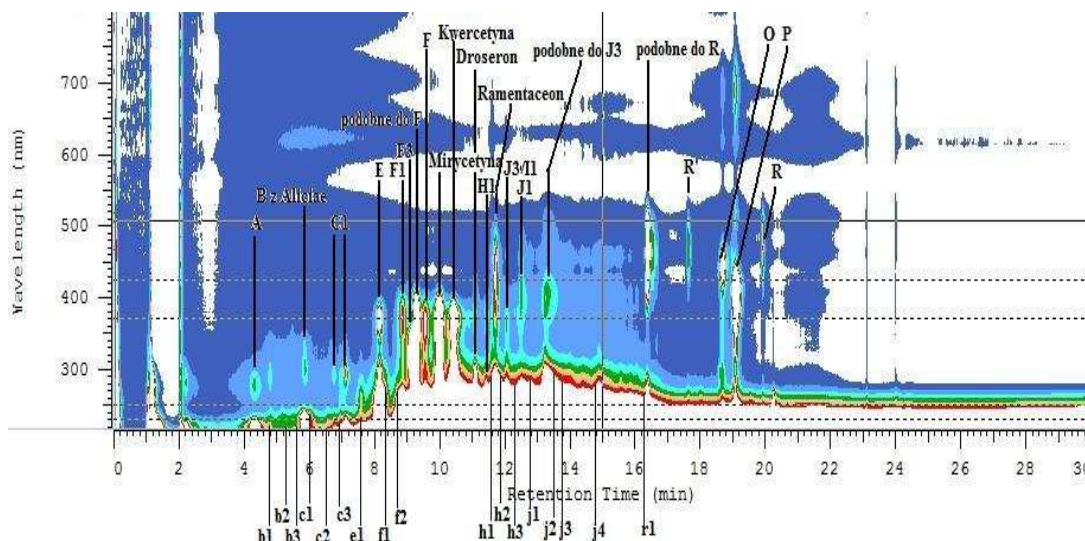
Chromatogram 463 <i>D. aliciae</i> w MeOH					
Dane		t0=	1,05		
Np..	Substancja	tR	k	α 1	α 2
1	A1	4,04	2,85		
2	A	4,66	3,44		
3	b1	5,31	4,06		
4	b2	6,14	4,85		
5	b3	7,00	5,67		
6	b4	7,58	6,22		
7	B z <i>D. aliciae</i>	8,57	7,16		
8	c1	9,07	7,64		
9	C1	9,37	7,92		
10	c2	9,81	8,34		
11	c3	10,07	8,59		
12	c4	10,68	9,17		
13	C1	10,89	9,37		
14	C2	11,32	9,78		
15	F2	11,81	10,25		
16	F	12,13	10,55		
17	F1	12,42	10,83		
18	I2	12,67	11,07		
19	mirycetyna	13,20	11,57	1,05	1,05
20	kwercetyna	13,82	12,16	1,05	1,02
21	j1	14,13	12,46		
22	droseron	14,93	13,22	1,06	1,03
23	J2	15,28	13,55		
24	j2	15,98	14,22		
25	I2/J2	16,30	14,52		
26	ramentaceon	16,48	14,70	1,01	1,03
27	J	16,96	15,15		
28	j3	17,34	15,51		
29	j4	17,50	15,67		
30	J1	17,67	15,83		
31	Podobny do J2 (1)	17,92	16,07		
32	Podobny do J2 (2)	18,19	16,32		
33	Podobny do J2 (3)	18,45	16,57		
34	j5	18,71	16,82		
35	Podobny do J2 (4)	19,17	17,26		
36	bf1	25,05	22,86		
37	BF	25,60	23,38		
38	bf2	25,92	23,69		



Rys. 3. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD, podczas rozdzielania próbki ekstraktu roślinnego z muchówki amerykańskiej (*Dionaea muscipula*) dozowanej w metanolu. Kolumna Lichrospher 100 RP18e 125 x 4mm 5 μ m; Eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B: THF; przepływ 1 ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 μ l; przełączenie zaworu elucji wstecznej w kolumnie ok. 23 min

Tabela 3. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Dionaea muscipula* w THF.

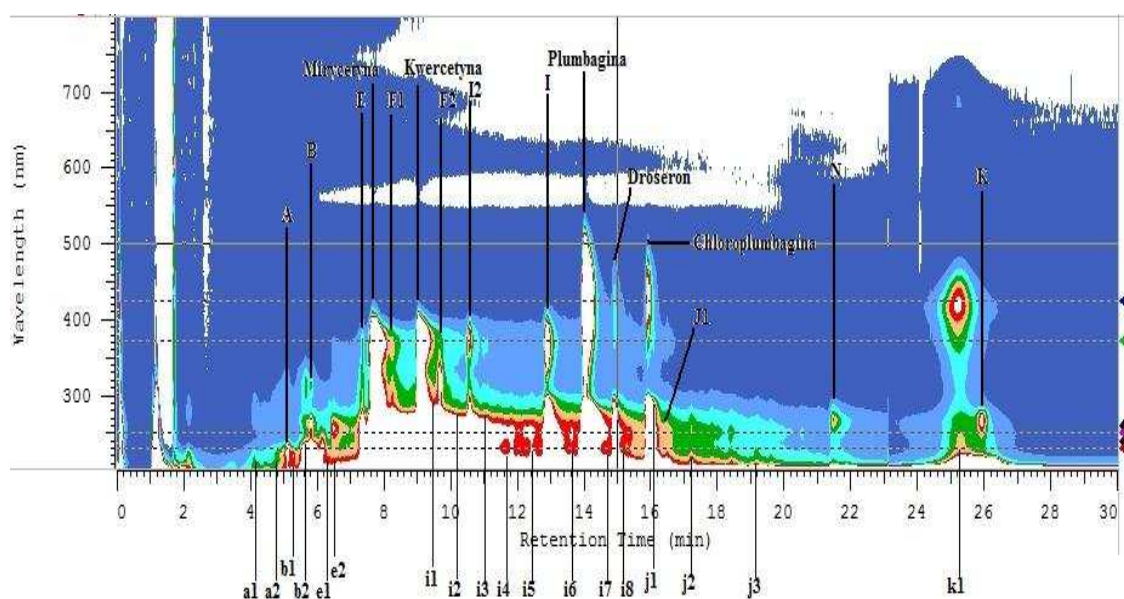
Chromatogram 467 <i>D. muscipula</i> w THF					
Dane		t0=	1,05		
Np.	Substancja	tR	k	α 1	α 2
1	b1	4,30	3,10		
2	b2	4,82	3,59		
3	B	5,13	3,89		
4	e1	5,72	4,45		
5	e2	6,56	5,25		
6	e3	6,93	5,60		
7	e4	7,46	6,10		
8	e5	7,73	6,36		
9	e6	7,86	6,49		
10	E	8,21	6,82		
11	f1	8,50	7,10		
12	F1	9,34	7,90		
13	f2	9,72	8,26		
14	f3	9,88	8,41		
15	F	10,08	8,60		
16	mirycetyna	10,43	8,93	1,04	1,05
17	kwercetyna	10,94	9,42	1,05	1,05
18	G	11,43	9,89		
19	i1	11,83	10,27		
20	i2	12,25	10,67		
21	I	12,45	10,86		
22	plumbagina	12,80	11,19	1,03	1,05
23	J	13,33	11,70		
24	j1	13,76	12,10		
25	J3	14,10	12,43		
26	chloroplumbagina	14,42	12,73	1,02	1,02
27	j2	14,71	13,01		
28	j3	14,86	13,15		
29	j4	15,35	13,62		
30	II	16,02	14,26		
31	N	18,04	16,18		
32	O	18,67	16,78		
33	P	19,06	17,15		
34	p1	20,26	18,30		



Rys. 4. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD, podczas rozdzielania próbki ekstraktu roślinnego z rosiczki alicji (*Drosera aliciae*) dozowanej w metanolu. Kolumna: Lichrospher 100 RP18e 125 x 4mm, 5µm; Eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B: THF; przepływ 1 ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 µl; przełączenie zaworu elucji wstecznej w kolumnie ok. 23 min.

Tabela 4. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Drosera aliciae* w THF.

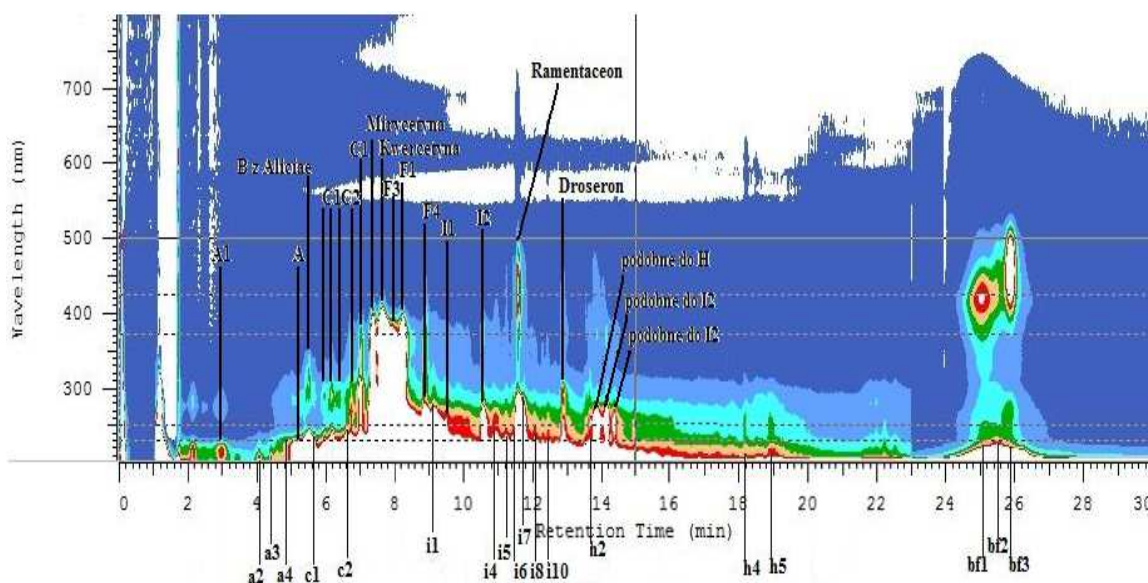
Chromatogram 469 <i>D. aliciae</i> w THF					
Dane		t0=	1,05		
Np.	Substancja	tR	k	α 1	α 2
1	A	4,32	3,11		
2	b1	4,78	3,55		
3	b2	5,17	3,92		
4	b3	5,30	4,05		
5	B z <i>D. aliciae</i>	5,85	4,57		
6	c1	6,03	4,74		
7	c2	6,56	5,25		
8	C1	6,74	5,42		
9	c3	6,95	5,62		
10	C1	7,10	5,76		
11	e1	7,57	6,21		
12	E	8,15	6,76		
13	f1	8,37	6,97		
14	f2	8,72	7,30		
15	F1	8,86	7,44		
16	F3	9,13	7,70		
17	podobne do F	9,28	7,84		
18	F	9,55	8,10		
19	mirycetyna	9,98	8,50	1,05	1,05
20	kwercetyna	10,42	8,92	1,05	1,07
21	droseron	11,08	9,55	1,07	1,03
22	H1	11,43	9,89		
23	h1	11,59	10,04		
24	ramentaceon	11,72	10,16	1,01	1,01
25	h2	11,87	10,30		
26	J3/I1	12,06	10,49		
27	h3	12,29	10,70		
28	J1	12,51	10,91		
29	j1	12,79	11,18		
30	podobne do J3	13,25	11,62		
31	j2	13,59	11,94		
32	j3	13,79	12,13		
33	j4	14,89	13,18		
34	r1	16,24	14,47		
35	podobne do R	16,39	14,61		
36	R'	17,64	15,80		
37	O	18,70	16,81		
38	P	19,09	17,18		
39	R	19,93	17,98		



Rys. 5. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD, podczas rozdzielania próbki ekstraktu roślinnego z muchówki amerykańskiej (*Dionaea muscipula*) dozowanej w metanolu. Kolumna: Lichrospher 100 RP18e, 125 x 4mm 5 μ m; Eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B: ACN; przepływ 1 ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 μ l; przełączenie zaworu elucji wstecznej w kolumnie ok. 23 min.

Tabela 5. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Dionaea muscipula* w ACN.

Chromatogram 475 <i>D. muscipula</i> w ACN					
Dane		t0=	1,05		
Np.	Substancja	tR	k	α 1	α 2
1	a1	4,11	2,91		
2	a2	4,89	3,66		
3	A	5,13	3,89		
4	b1	5,28	4,03		
5	b2	5,65	4,38		
6	B	5,81	4,53		
7	e1	6,15	4,86		
8	e2	6,49	5,18		
9	E	7,36	6,01		
10	mirycetyna	7,70	6,33	1,05	1,09
11	F1	8,29	6,90		
12	kwercetyna	9,07	7,64	1,11	1,04
13	i1	9,42	7,97		
14	F2	9,69	8,23		
15	i2	10,20	8,71		
16	I2	10,60	9,10		
17	i3	11,03	9,50		
18	i4	11,85	10,29		
19	i5	12,42	10,83		
20	I	12,89	11,28		
21	i6	13,62	11,97		
22	plumbagina	14,03	12,36	1,03	1,05
23	i7	14,67	12,97		
24	droseron	14,91	13,20	1,02	1,02
25	i8	15,18	13,46		
26	chloroplumbagina	15,92	14,16	1,05	1,01
27	j1	16,09	14,32		
28	J1	16,48	14,70		
29	j2	17,22	15,40		
30	j3	19,18	17,27		
31	N	21,48	19,46		
32	k1	25,23	23,03		
33	K	25,93	23,70		



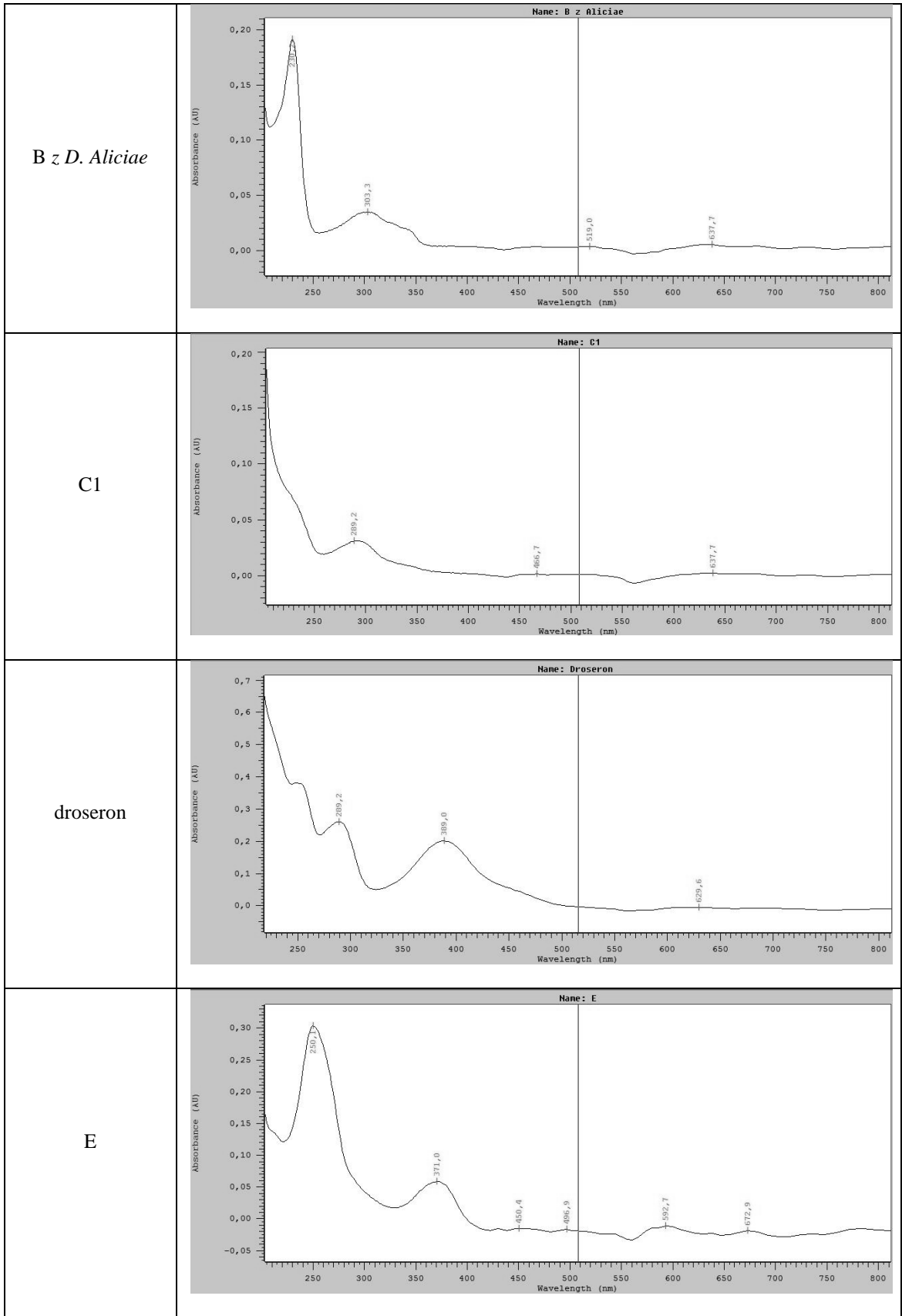
Rys. 6. Przykład chromatogramu z oznaczonymi substancjami, otrzymanego z wykorzystaniem detektora UV-DAD, podczas rozdzielania próbki ekstraktu roślinnego z rosziczki alicji (*Drosera aliciae*) dozowanej w metanolu. Kolumna Lichrospher 100 RP18e, 125 x 4mm, 5µm; Eluent: A: H₂O + H₂SO₄ pH=3 B: ACN; przepływ 1 ml/min; temperatura 20 °C; objętość dozowanej próbki 20 µl; przełączenie zaworu elucyjnej wstecznej w kolumnie ok. 23 min.

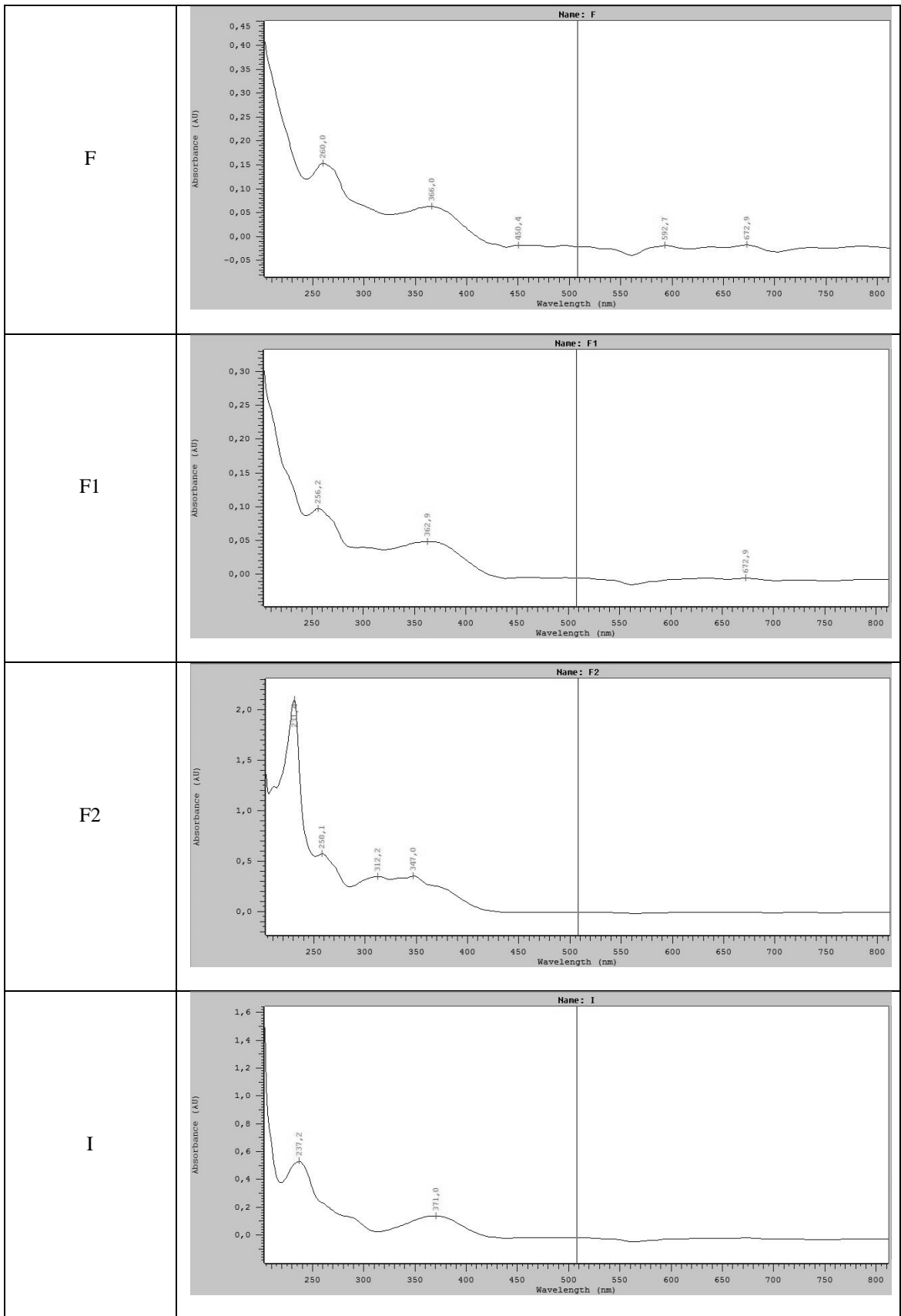
Tabela 6. Zestawienie substancji „zidentyfikowanych” w ekstrakcie *Drosera aliciae* w ACN.

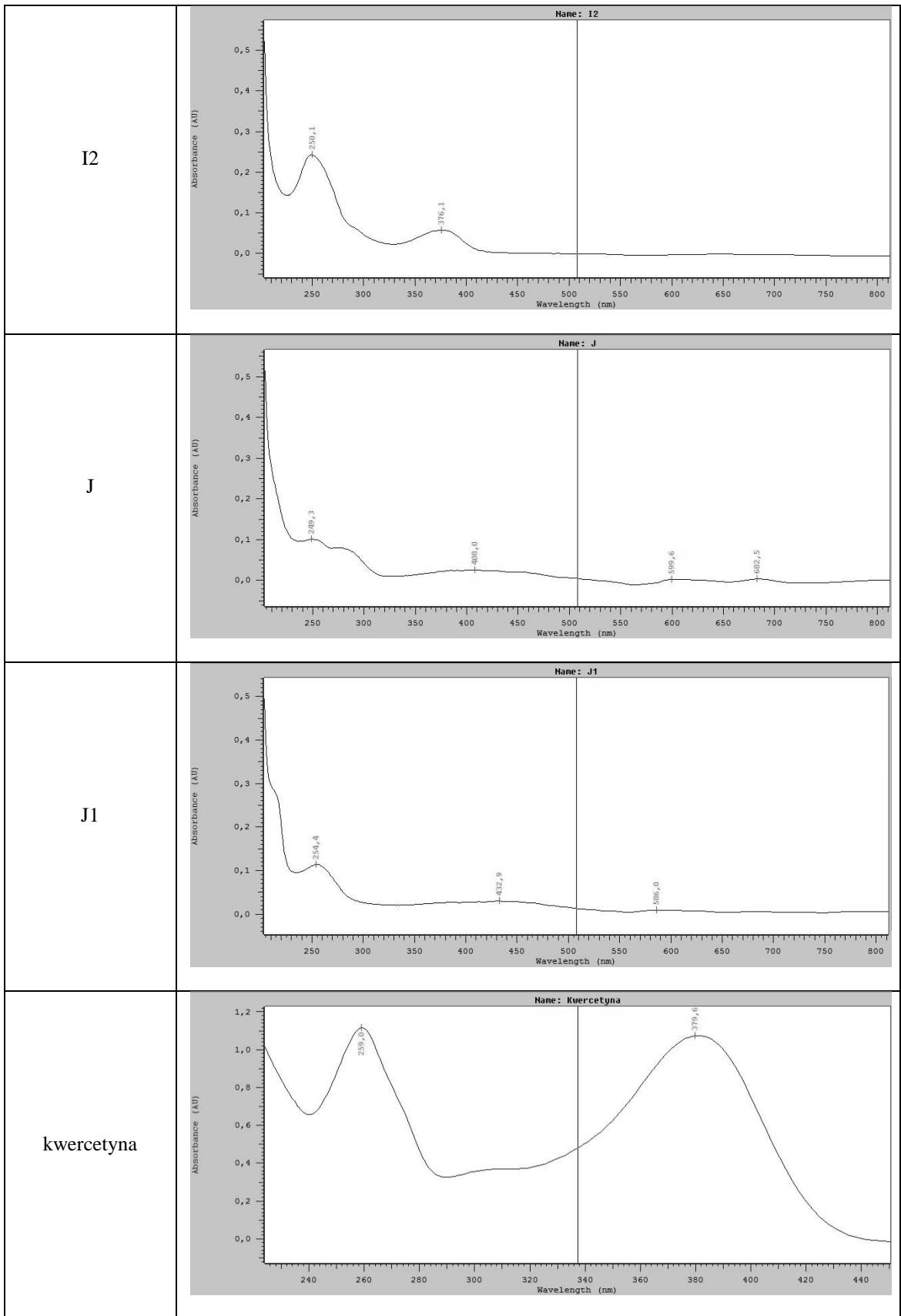
Chromatogram 477 <i>D. aliciae</i> w ACN					
Dane		t0=	1,05		
Np.	Substancja	tR	k	α 1	α 2
1	A1	2,95	1,81		
2	a2	4,07	2,88		
3	a3	4,42	3,21		
4	a4	4,82	3,59		
5	A	5,27	4,02		
6	B z <i>D. aliciae</i>	5,51	4,25		
7	c1	5,67	4,40		
8	C1	5,95	4,67		
9	C1	6,17	4,88		
10	C1	6,31	5,01		
11	c2	6,61	5,30		
12	C2	6,73	5,41		
13	C1	7,00	5,67		
14	mirycetyna	7,37	6,02	1,06	1,04
15	kwercetyna	7,65	6,29	1,04	1,04
16	F3	7,91	6,53		
17	F1	8,24	6,85		
18	f1	8,56	7,15		
19	F4	8,86	7,44		
20	i1	9,10	7,67		
21	I1	9,50	8,05		
22	I2	10,57	9,07		
23	i4	10,94	9,42		
24	i5	11,24	9,70		
25	i6	11,44	9,90		
26	ramentaceon	11,59	10,04	1,01	1,01
27	i7	11,74	10,18		
28	i8	12,07	10,50		
29	i10	12,43	10,84		
30	droseron	12,90	11,29	1,04	1,06
31	h2	13,66	12,01		
32	podobne do H	13,89	12,23		
33	podobne do I2	14,15	12,48		
34	podobne do I2	14,38	12,70		
35	h4	18,17	16,30		
36	h5	18,89	16,99		
37	bf1	25,05	22,86		
38	bf2	25,48	23,27		
39	bf3	25,87	23,64		

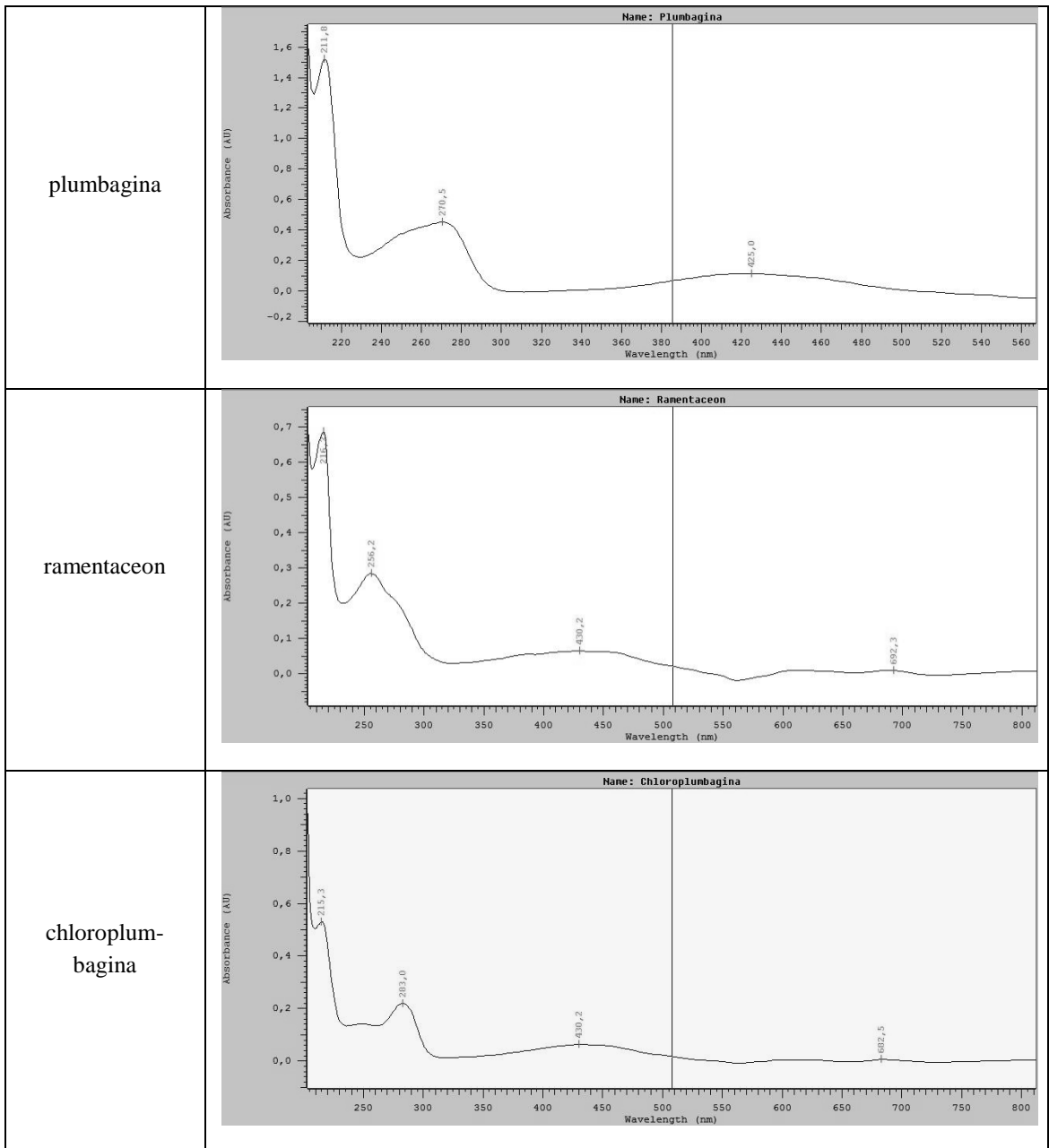
12.4. Załącznik 4. Zestawienie widm spektralnych, na podstawie którego dokonano identyfikacji substancji, zawartych w metanolowych ekstraktach roślin owadożernych, otrzymane z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz w warunkach elucji gradientowej

Nazwa/symbol substancji	Widmo UV/VIS
A	<p>Name: A</p>
A1	<p>Name: A1</p>
B	<p>Name: B</p>









12.5. Załącznik 5 Zestawienie wartości pól powierzchni pików chromatograficznych dla związków chemicznych wyekstrahowanych z materiału roślinnego techniką ekstrakcji w aparacie Soxhleta

Tabela 1. Zestawienie wartości pól powierzchni pików chromatograficznych odpowiadających określonym grupą związków chemicznych lub pojedynczym metabolitom wyekstrahowanych z materiału roślinnego techniką ekstrakcji w aparacie Soxhleta.

Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności	Długość fali
15h	plumbagina	18219604	18119044	18018484	17917924	18068764	129822	0,72	406 nm
15h	1	16145812	16040176	15998721	16110214	16073731	74696	0,46	406 nm
15h	2	15222731	15278757	15219870	15115112	15209118	39616	0,26	406 nm
15h	3	730120	719916	720089	731002	725282	7215	0,99	406 nm
15h	4	2806653	2792626	2800799	2800021	2799640	9919	0,35	406 nm
15h	5	2260136	2210253	2269901	2300589	2260220	35273	1,56	354 nm
15h	kwercetyna	5888122	5842159	5799901	5880324	5852627	32501	0,56	354 nm
15h	6	5519915	5378471	5342000	5481009	5430349	100016	1,84	354 nm
15h	mirycetyna	1133635	1172788	1199923	1178239	1171146	27685	2,36	382 nm

12.6. Załącznik 6. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem poszczególnych technik ekstrakcji / ługowania

Tabela 1. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem techniki Soxtec®.

Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
0,5h	plumbagina	8987956	9198124	8999560	9100892	9071633	98408	1,08
1h		18368720	18139000	17929880	18179560	18154290	180012	0,99
3h		18816739	18683212	18649685	18896158	18761449	115204	0,61
0,5h	1	6851223	6942112	7000031	7003092	6949115	71035	1,02
1h		16274920	16056003	15986986	16218169	16134020	134956	0,84
3h		16727121	16600298	16895475	16741612	16741127	120903	0,72
0,5h	2	6975329	6856646	6887963	6989080	6927255	64969	0,94
1h		15001099	14900101	14999103	15098105	14999602	80841	0,54
3h		15024921	15218211	15011501	15204791	15114856	111865	0,74
0,5h	3	392123	399900	400677	400454	398289	4123	1,04
1h		710250	702524	696798	700072	702411	5728	0,82
3h		713021	722081	721141	710201	716611	5900	0,82
0,5h	4	1171063	1118890	1099717	1094544	1121054	34946	3,12
1h		2521906	2572001	2602096	2572191	2567049	33252	1,30
3h		2778066	2726658	2720250	2753842	2744704	26584	0,97

0,5h	5	1201425	1186670	1191915	1197160	1194293	6399	0,54
1h		2157222	2109722	2102262	2094792	2116000	28149	1,33
3h		2248417	2280046	2211675	2219304	2239861	31118	1,39
0,5h	kwercetyna	2941472	2824652	2907832	2891012	2891242	49100	1,70
1h		5649230	5602111	5598992	5607873	5614552	23410	0,42
3h		5772433	5709244	5696055	5702866	5720150	35269	0,62
0,5h	6	2700216	2659721	2699226	2688731	2686974	18897	0,70
1h		5095201	5202443	5089685	5116927	5126064	52260	1,02
3h		5327790	5318870	5279950	5251030	5294410	35606	0,67
0,5h	mirycetyna	617001	620078	623155	620232	620117	2514	0,41
1h		1102540	1101004	1039468	1097932	1085236	30572	2,82
3h		1114870	1108602	1122334	1116066	1115468	5627	0,50

Tabela 2. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem techniki maceracji z wytrząsaniem, w temperaturze 50 °C.

Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
5h	plumbagina	11924229	12027111	12129993	12092875	12043552	90209	0,75
15h		22197732	22282011	22006290	22050569	22134151	128114	0,58
25h		22430181	22668121	22806061	22844001	22687091	187205	0,83
5h	1	8954339	8856002	8757665	8859328	8856834	80309	0,91
15h		16261050	16967004	16979132	16888670	16773964	344285	2,05
25h		16930500	16807032	17008157	17002955	16937161	93714	0,55
5h	2	9000289	9108432	9006747	9099003	9053618	58038	0,64
15h		15393095	15330043	15396991	15503939	15406017	72132	0,47
25h		15989083	15894907	15920731	15686555	15872819	130378	0,82
5h	3	369985	380159	380333	370507	375246	5778	1,54
15h		733987	735603	737219	738835	736411	2086	0,28
25h		740233	739799	739365	738931	739582	560	0,08
5h	4	1291021	1298500	1244201	1285604	1279832	24335	1,90
15h		2792984	2810666	2828348	2846030	2819507	22827	0,81
25h		2863910	2970012	2876114	2902216	2903063	47406	1,63
5h	5	1839225	1874041	2000757	2003673	1929424	85253	4,42
15h		2572281	2562009	2531931	2488953	2538794	37379	1,47
25h		2555383	2600131	2644879	2589627	2597505	36912	1,42
5h	kwercetyna	3873222	3948224	3923796	3899028	3911068	32248	0,82
15h		6521816	6437892	6403968	6570044	6483430	76078	1,17

25h		6560100	6508200	6551728	6484492	6526130	35891	0,55
5h	6	3813656	3779874	3946092	3912310	3862983	78910	2,04
15h		5330288	5321833	5283425	5295017	5307641	22061	0,42
25h		5079731	5071528	5063402	5155236	5092474	42369	0,83
5h	mirycetyna	931212	1007190	973168	989146	975179	32439	3,33
15h		1122804	1132020	1122795	1132067	1127422	5337	0,47
25h		1076387	1072559	1080765	1084971	1078671	5374	0,50

Tabela 3. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem techniki ekstrakcji wspomaganiej działaniem fal mikrofalowych, w temperaturze 50 °C.

Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
2 min.	plumbagina	12323407	12536358	12715819	12895280	12617716	244883	1,94
4 min.		15498651	15761014	15857097	15618710	15683868	157597	1,00
8 min.		19802100	19926801	20125280	20106746	19990232	154089	0,77
2 min.	1	11599785	11268978	11538170	11507363	11478574	144918	1,26
4 min.		14031285	13985302	14039318	13893335	13987310	67018	0,48
8 min.		16238562	16671430	16204297	16537165	16412863	228173	1,39
2 min.	2	11252726	10948260	11238774	10998788	11109637	158620	1,43
4 min.		15391153	15217170	15213186	15292093	15278400	83472	0,55
8 min.		15460025	15220110	15364145	15364100	15352095	98925	0,64
2 min.	3	456987	462631	468275	473919	465453	7286	1,57
4 min.		721384	699302	716046	692877	707402	13501	1,91
8 min.		716004	713427	726310	716173	717979	5695	0,79
2 min.	4	1789531	1834270	1809008	1823740	1814137	19402	1,07
4 min.		2635332	2599312	2603415	2610526	2612146	16136	0,62
8 min.		2792352	2782001	2802057	2800021	2794108	9089	0,33
2 min.	5	1505008	1505030	1514162	1488394	1503149	10739	0,71
4 min.		2205993	2099901	2198001	2238793	2185672	59843	2,74
8 min.		2281660	2195200	2262234	2298793	2259472	45376	2,01
2 min.	kwercecyta	3523321	3668609	3482099	3479297	3538332	89153	2,52
4 min.		5209538	5300928	5397919	5221009	5282349	87112	1,65

8 min.		4953621	5040195	5026769	4913343	4983482	60281	1,21
2 min.	6	2290085	2299920	2300687	2322060	2303188	13476	0,59
4 min.		4823007	4872770	4922084	5013975	4907959	81433	1,66
8 min.		4696321	4816945	4937568	4819105	4817485	98495	2,04
2 min.	mirycetyna	1020300	981209	990119	1003007	998659	16977	1,70
4 min.		1220328	1231201	1237114	1193007	1220413	19548	1,60
8 min.		1256897	1222457	1288018	1255785	1255789	26777	2,13

Tabela 4. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem techniki sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej, w temperaturze 50 °C.

Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
2 min.	plumbagina	13928250	13502875	13975620	13988080	13848706	231990	1,68
4 min.		20198802	20829877	20098000	20005569	20283062	372986	1,84
8 min.		23732980	23760001	23582770	23849991	23731436	111018	0,47
2 min.	1	11054309	11202100	11500099	10009320	10941457	648493	5,93
4 min.		14221007	14967585	14779520	14100058	14517043	421662	2,90
8 min.		17085203	17209950	17208751	17102205	17151527	67130	0,39
2 min.	2	10120145	10196340	10002119	9999879	10079621	95970	0,95
4 min.		15593000	15510256	15698799	15623454	15606377	77999	0,50
8 min.		15989083	15894907	15920731	15686555	15872819	130378	0,82
2 min.	3	292121	289952	280932	291246	288563	5165	1,79
4 min.		503070	515641	509750	500899	507340	6694	1,32
8 min.		742555	744028	742009	742930	742881	853	0,11
2 min.	4	1320005	1298756	1287560	1305789	1303028	13581	1,04
4 min.		2450098	2499820	2465877	2478891	2473672	21035	0,85
8 min.		2565440	2578500	2569982	2540998	2563730	16093	0,63
2 min.	5	1101751	1120598	1096999	1100177	1104881	10663	0,97
4 min.		1657557	1654229	1649992	1659900	1655420	4302	0,26
8 min.		1848875	1852009	1849900	1854493	1851319	2486	0,13
2 min.	kwercetyna	2895520	2810225	2855780	2865540	2856766	35336	1,24

4 min.		4249778	4209650	4199522	4229394	4222086	22241	0,53
8 min.		4572201	4520992	4499910	4500098	4523300	34069	0,75
2 min.	6	1952000	1920500	1987560	1950085	1952536	27443	1,41
4 min.		3700098	3699850	3711205	3709675	3705207	6076	0,16
8 min.		4296207	4358766	4300240	4300587	4313950	29943	0,69
2 min.	mirycetyna	617001	620078	623155	620232	620117	2514	0,41
4 min.		702156	706992	698871	699920	701985	3608	0,51
8 min.		892360	896864	879900	885203	888582	7520	0,85

Tabela 5. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem techniki sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej, w temperaturze 30 °C.

Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
2 min.	plumbagina	12658881	12688120	12717359	12746598	12702740	37747	0,30
4 min.		17925201	18155450	17985699	18015948	18020575	97511	0,54
8 min.		19085989	19156410	19069549	19145585	19114383	43035	0,23
2 min.	1	7090254	7205412	7101252	7201568	7149622	62384	0,87
4 min.		10155888	10248878	10115989	10099888	10155161	66766	0,66
8 min.		14025889	14255200	14100555	14102658	14121076	96281	0,68
2 min.	2	6520104	6498720	6587012	6437021	6510714	61871	0,95
4 min.		9675520	9201558	9520114	9435870	9458266	197843	2,09
8 min.		12355440	11987500	11756290	11820900	11980033	268558	2,24
2 min.	3	199655	197225	200795	204365	200510	2970	1,48
4 min.		384520	382100	379680	377260	380890	3124	0,82
8 min.		621045	617229	623413	619597	620321	2593	0,42
2 min.	4	926778	920155	932011	930211	927289	5228	0,56
4 min.		1458723	1459821	1460919	1462017	1460370	1418	0,10
8 min.		1965245	1956420	1947595	1938770	1952008	11393	0,58
2 min.	5	756520	750016	743512	747008	749264	5519	0,74
4 min.		1034580	1052015	1069450	1076885	1058233	18902	1,79
8 min.		1448500	1452221	1455942	1459663	1454082	4804	0,33
2 min.	kwercetyna	1222566	1258580	1214594	1250608	1236587	21296	1,72

4 min.		2245780	2209522	2173264	2197006	2206393	30259	1,37
8 min.		3372200	3320257	3268314	3216371	3294286	67058	2,04
2 min.	6	1152520	1142300	1132080	1131860	1139690	9843	0,86
4 min.		1923020	1956320	1969620	1952920	1950470	19668	1,01
8 min.		4296207	4358766	4300240	4300587	4313950	29943	0,69
2 min.	mirycetyna	305655	303010	300365	308720	304438	3580	1,18
4 min.		540256	542054	543852	545650	542953	2321	0,43
8 min.		755520	756864	758208	759552	757536	1735	0,23

Tabela 6. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem techniki sonifikacji, za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, w temperaturze 50 °C.

Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
2 min.	plumbagina	14898985	15020098	15000248	14998721	14979513	54561	0,36
4 min.		21205988	21110689	20998880	21006566	21080531	97957	0,46
8 min.		25501560	25682010	25690057	25440998	25578656	126472	0,49
2 min.	1	12000569	12100059	12100580	12099540	12075187	49747	0,41
4 min.		15822888	15892290	15877520	15755223	15836980	62144	0,39
8 min.		17210566	17248777	17255559	17111099	17206500	66613	0,39
2 min.	2	11126605	10990005	10410119	10399879	10731652	381310	3,55
4 min.		14756330	14589220	14822099	14989901	14789388	165766	1,12
8 min.		16230078	16380052	16288922	16270599	16292413	63388	0,39
2 min.	3	244555	254490	239990	247600	246659	6086	2,47
4 min.		598800	587220	565220	578509	582437	14171	2,43
8 min.		752000	751298	756300	749985	752396	2734	0,36
2 min.	4	1245600	1220032	1207230	1246659	1229880	19482	1,58
4 min.		2254988	2215870	2190068	2189992	2212730	30693	1,39
8 min.		2450068	2489920	2478882	2498880	2479438	21219	0,86
2 min.	5	1085992	1110005	1099560	1100127	1098921	9864	0,90
4 min.		1400557	1450009	1399900	1420669	1417784	23547	1,66
8 min.		1650009	1687542	1688800	1599910	1656565	41839	2,53
2 min.	kwercetyna	2095220	2029985	2100680	2100552	2081609	34510	1,66

4 min.		3856200	3789990	3820005	3820555	3821688	27080	0,71
8 min.		4026989	4055960	4099825	4100660	4070859	35934	0,88
2 min.	6	1902525	1901520	1900075	1911100	1903805	4966	0,26
4 min.		3650009	3600525	3591041	3591557	3608283	28156	0,78
8 min.		3996200	3998520	4000840	4003160	3999680	2995	0,07
2 min.	mirycetyna	607120	612003	620090	623000	615553	7297	1,19
4 min.		701995	702902	700999	701598	701874	799	0,11
8 min.		889960	869865	880640	875400	878966	8548	0,97

Tabela 7. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem techniki sonifikacji, za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego, w temperaturze 30 °C.

Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
2 min.	plumbagina	11985665	11654800	11523935	11693070	11714368	194824	1,66
4 min.		19550058	19852040	20054022	20100004	19889031	250335	1,26
8 min.		23556200	23456801	23357560	23258056	23407154	128283	0,55
2 min.	1	8956200	8856620	8857040	8957460	8906830	57738	0,65
4 min.		13598874	13458005	13558901	13692500	13577070	97136	0,72
8 min.		15587563	15568870	15789004	15789505	15683736	122082	0,78
2 min.	2	8542078	8465201	8388324	8381447	8444263	75457	0,89
4 min.		11810509	11815655	11889801	11895947	11852978	46184	0,39
8 min.		16230078	16380052	16288922	16270599	16292413	63388	0,39
2 min.	3	156988	159800	160612	161424	159706	1929	1,21
4 min.		345980	345968	346956	346944	346462	564	0,16
8 min.		658920	658089	659258	659427	658924	595	0,09
2 min.	4	965058	970258	985458	980658	975358	9349	0,96
4 min.		1459820	1468905	1477990	1487075	1473448	11729	0,80
8 min.		1985620	1978256	1960892	1963528	1972074	11829	0,60
2 min.	5	789650	778592	760534	759476	772063	14643	1,90
4 min.		1169805	1189250	1208695	1208140	1193973	18474	1,55
8 min.		1498724	1489520	1465916	1471112	1481318	15402	1,04
2 min.	kwercetyna	1458965	1487560	1516155	1524750	1496858	29848	1,99

4 min.		2657849	2678950	2700051	2721152	2689501	27241	1,01
8 min.		3355898	3259640	3345897	3310477	3317978	43501	1,31
2 min.	6	1325897	1324598	1314598	1315840	1320233	5836	0,44
4 min.		2578994	2548907	2508820	2488733	2531364	40423	1,60
8 min.		2895450	2899950	2914450	2918950	2907200	11273	0,39
2 min.	mirycetyna	311489	312891	314293	315695	313592	1810	0,58
4 min.		578955	578922	588894	589865	584159	6041	1,03
8 min.		723580	725459	728338	729217	726649	2600	0,36

Tabela 8. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem techniki ekstrakcji za pomocą homogenizatora, w temperaturze 50 °C.

Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
2 min.	plumbagina	12623520	12636265	12789999	12865110	12728724	118283	0,93
4 min.		15698500	15801010	15803520	15806030	15777265	52550	0,33
8 min.		19896555	19995200	20093845	20192490	20044523	127350	0,64
2 min.	1	11986265	11298712	11655009	11856690	11699169	299752	2,56
4 min.		14589870	14459898	14329926	14199954	14394912	167793	1,17
8 min.		16665989	16790711	16675433	16890155	16755572	106136	0,63
2 min.	2	10952726	10845600	10910550	10956000	10916219	51428	0,47
4 min.		14000699	14006625	14008889	14002449	14004666	3756	0,03
8 min.		15300068	15220078	15240088	15260098	15255083	34152	0,22
2 min.	3	205555	210005	210058	209951	208892	2225	1,07
4 min.		489625	478921	485202	478992	483185	5206	1,08
8 min.		699969	720656	730558	736545	721932	16041	2,22
2 min.	4	1100555	1099585	1098615	1097645	1099100	1252	0,11
4 min.		1985220	1970556	1965251	1985520	1976637	10315	0,52
8 min.		2236555	2165699	2198872	2200558	2200421	28947	1,32
2 min.	5	899985	875555	882555	889962	887014	10458	1,18
4 min.		1216550	1190009	1210255	1182020	1199709	16349	1,36
8 min.		1546660	1599820	1598552	1566623	1577914	25885	1,64
2 min.	kwercetyna	1559920	1502698	1500059	1536641	1524830	28718	1,88

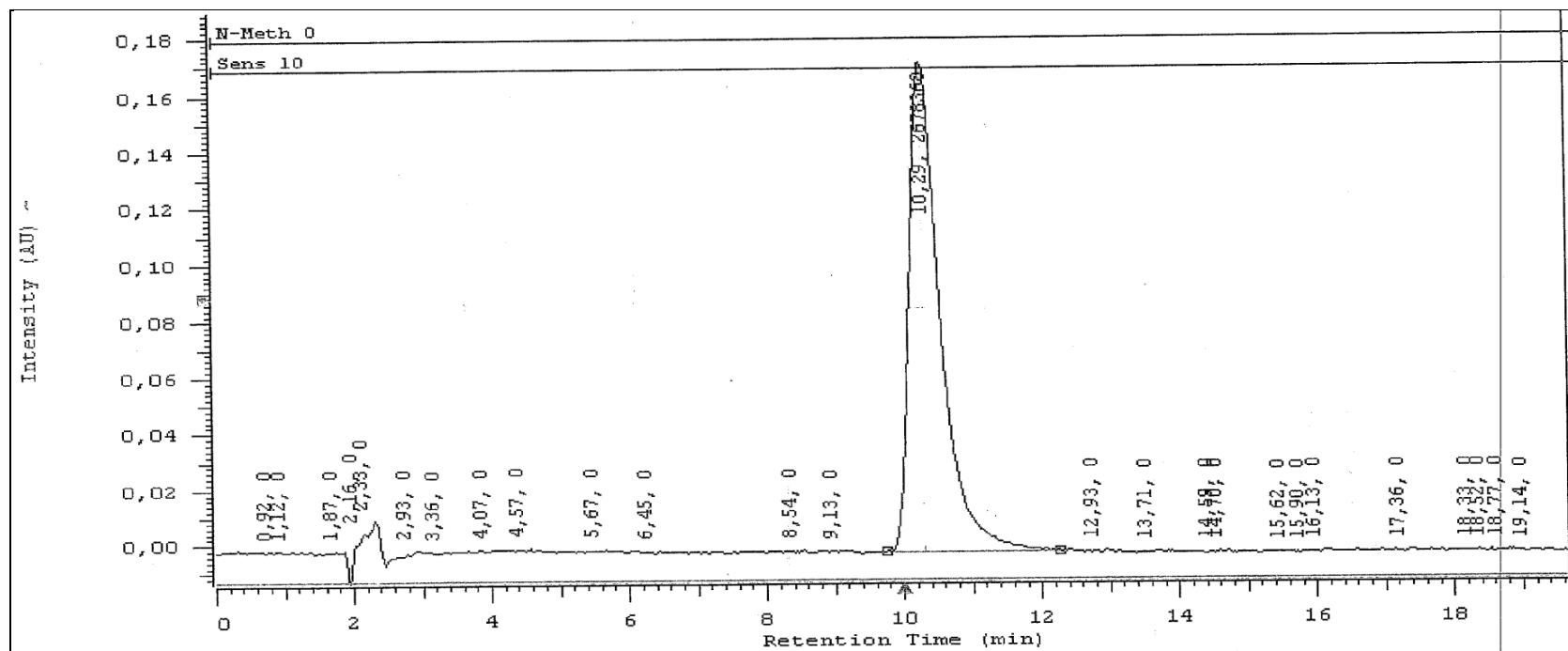
4 min.		3052585	3120009	3007058	3014559	3048553	51639	1,69
8 min.		3756521	3762220	3758200	3699954	3744224	29610	0,79
2 min.	6	1000659	1011235	1022558	1022544	1014249	10514	1,04
4 min.		2654489	2698855	2698550	2709552	2690362	24456	0,91
8 min.		3201598	3155660	3112559	3205559	3168844	43828	1,38
2 min.	mirycetyna	306982	306998	300249	301002	303808	3687	1,21
4 min.		522069	510069	515620	512009	514942	5279	1,03
8 min.		705599	700559	701558	709995	704428	4304	0,61

Tabela 9. Zestawienie wartości powierzchni bądź sum powierzchni pików chromatograficznych wraz z odchyleniem standardowym i współczynnikiem zmienności dla wybranych metabolitów oraz grup substancji, otrzymanych z zastosowaniem techniki ekstrakcji za pomocą homogenizatora, w temperaturze 30 °C.

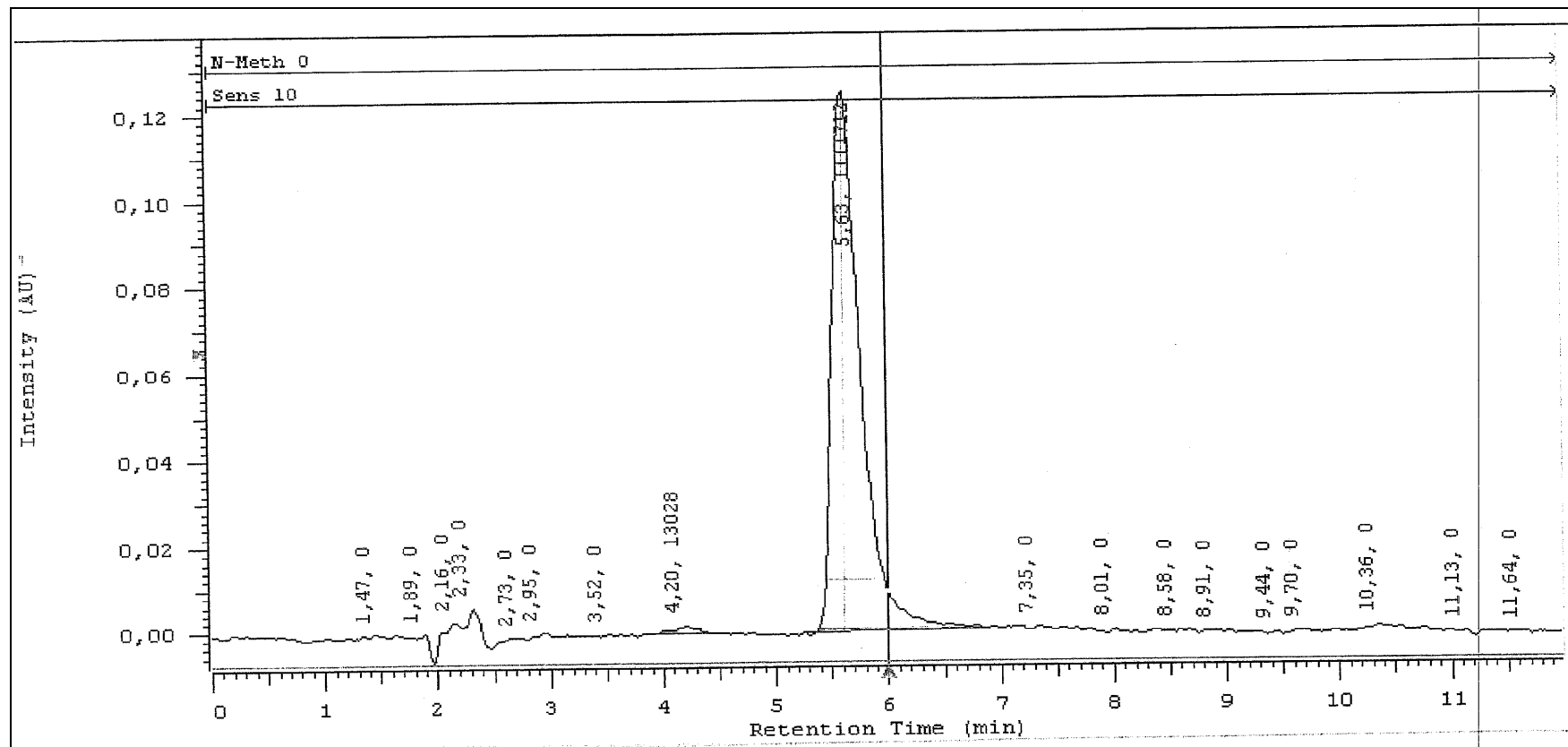
Czas ekstrakcji	Metabolit / Grupa	Powierzchnia 1	Powierzchnia 2	Powierzchnia 3	Powierzchnia 4	Średnia powierzchnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności
2 min.	plumbagina	10987820	10998750	11099680	11020610	11026715	50517	0,46
4 min.		13599450	13548991	13498532	13448073	13523762	65142	0,48
8 min.		16658920	16788920	17118920	17148920	16928920	242899	1,43
2 min.	1	8244547	8225560	8266573	8267586	8251067	20054	0,24
4 min.		13952065	13975895	13999725	13923555	13962810	32611	0,23
8 min.		15098585	15078695	15058801	15038927	15068752	25674	0,17
2 min.	2	7985045	7995442	8005839	8000236	7996641	8821	0,11
4 min.		10245688	10345808	10445921	10446003	10370855	95875	0,92
8 min.		13021485	13025859	13130233	13134607	13078046	62836	0,48
2 min.	3	146889	147852	149852	149850	148611	1485	1,00
4 min.		297556	298520	299484	300448	299002	1245	0,42
8 min.		588520	578952	569384	559816	574168	12352	2,15
2 min.	4	1001213	1006200	1001005	1000002	1002105	2781	0,28
4 min.		1458820	1459804	1465788	1468772	1463296	4776	0,33
8 min.		1789950	1798820	1807690	1806560	1800755	8211	0,46
2 min.	5	798522	794855	791188	787521	793022	4734	0,60
4 min.		1159200	1167892	1176584	1175276	1169738	8000	0,68
8 min.		1478950	1479927	1485904	1488881	1483416	4767	0,32
2 min.	kwercetyna	1345669	1358980	1349894	1346894	1350359	6015	0,45

4 min.		2459985	2468750	2479515	2486280	2473633	11614	0,47
8 min.		3228894	3201598	3174302	3187006	3197950	23451	0,73
2 min.	6	885620	917560	910500	901440	903780	13788	1,53
4 min.		1756548	1745693	1754848	1763992	1755270	7519	0,43
8 min.		2648994	2654898	2660802	2666706	2657850	7622	0,29
2 min.	mirycetyna	287692	289750	291808	289866	289779	1681	0,58
4 min.		502568	502005	504687	504872	503533	1460	0,29
8 min.		678520	678520	670520	670520	674520	4619	0,68

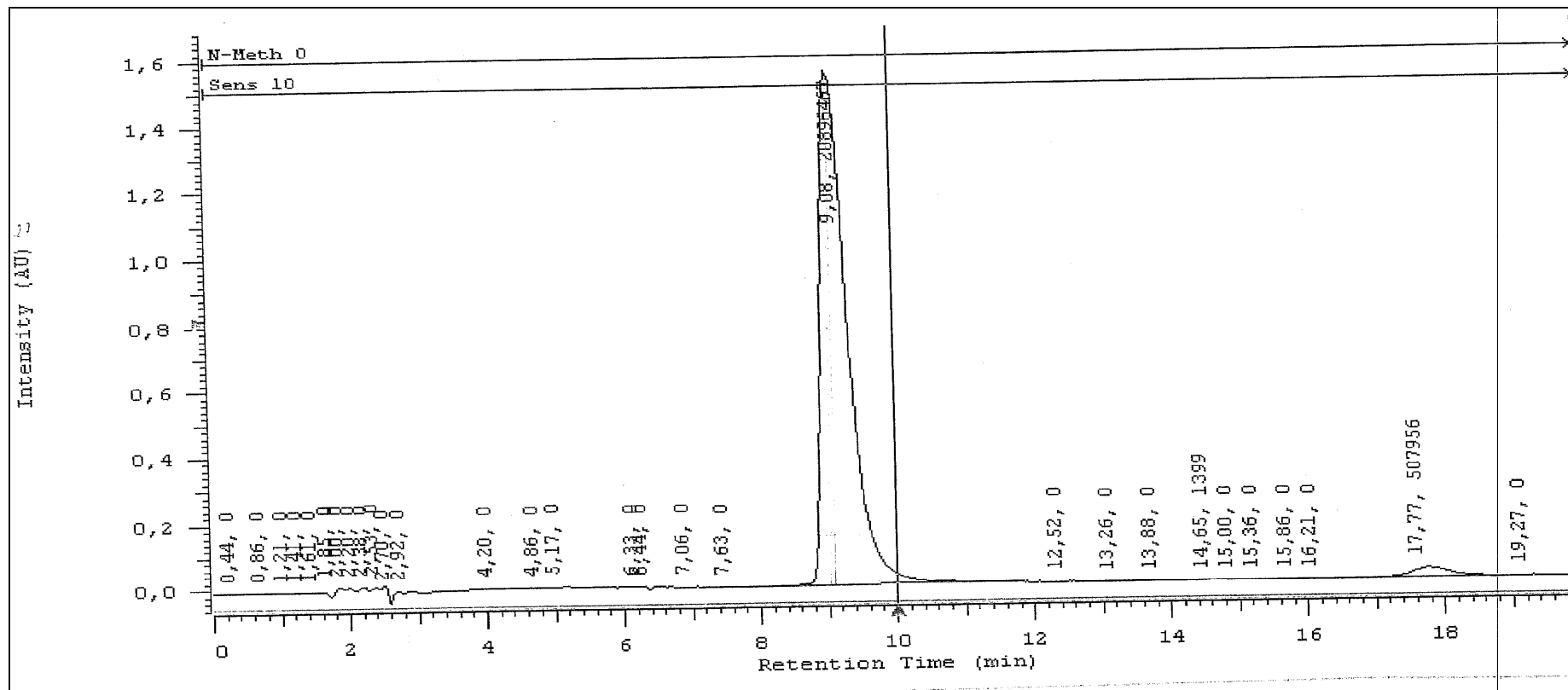
12.7. Załącznik 7 Chromatogramy rozdzielania kwercetyny i mirycetyny, charakteryzujące wpływ rodzaju kwasu, jako dodatku do eluentu, na rozdzielanie flawonoidów w odwróconym układzie faz



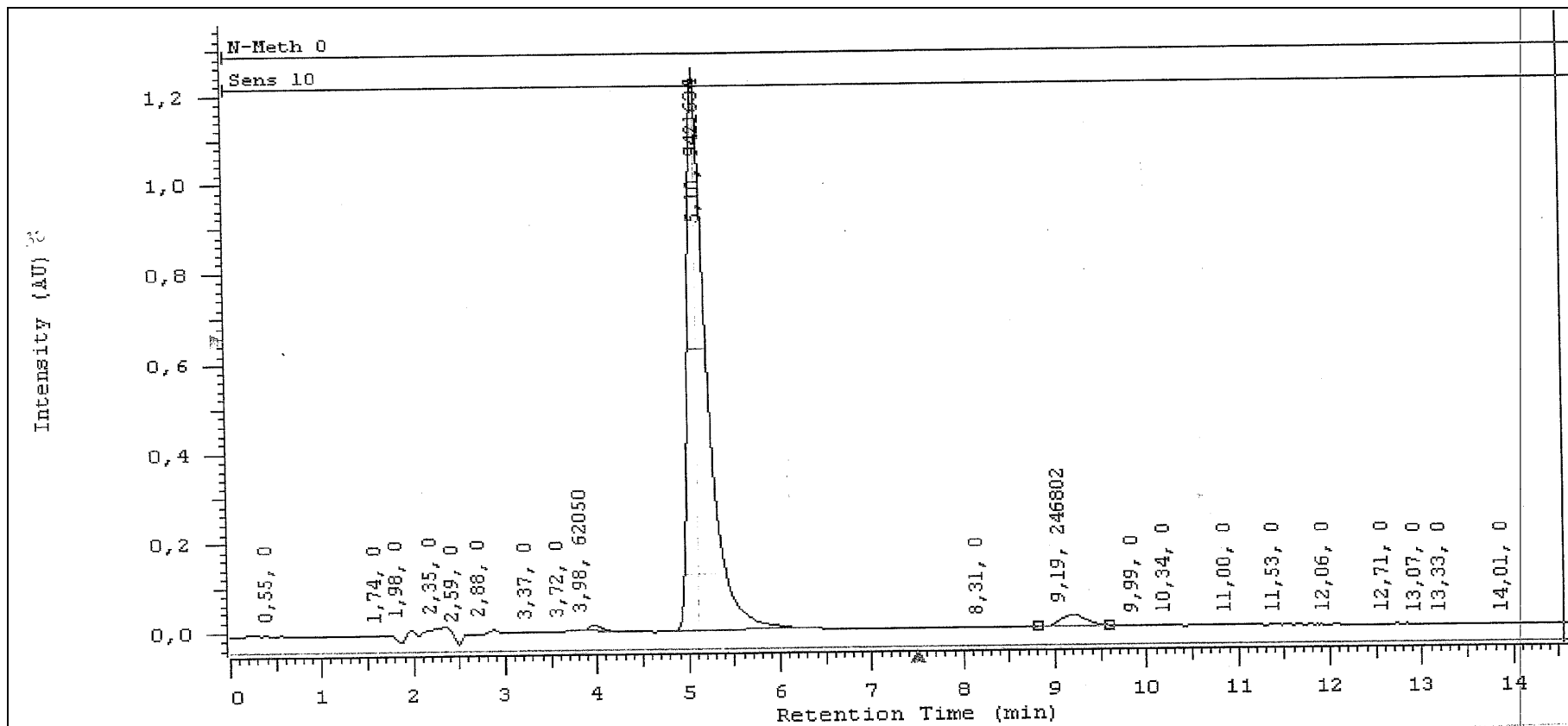
Rys.1. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca kwercetyny w acetonitrylu, o stężeniu 9 mg / ml ACN. Dozowano 20 μ l roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 μ m; Eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,1 % kwasu octowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 365 nm.



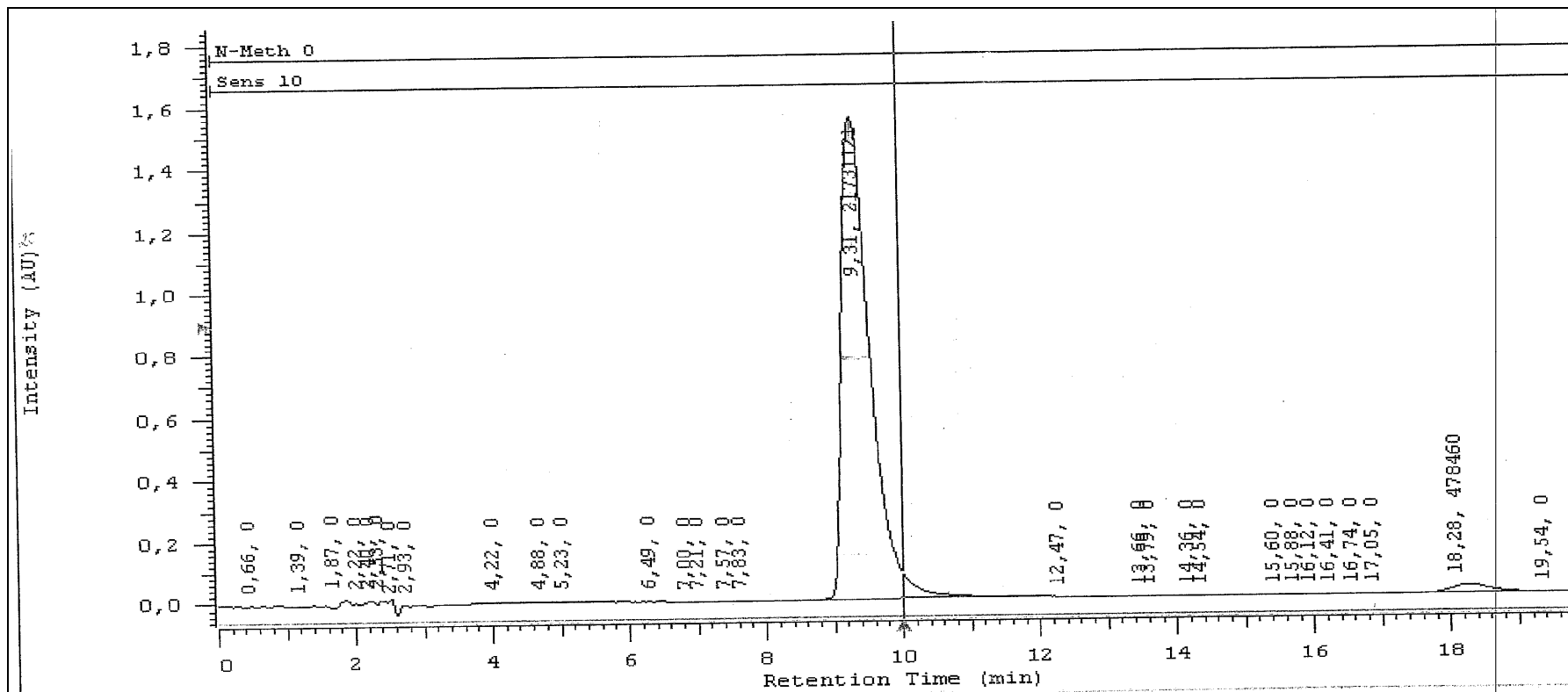
Rys.2. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca mirycetyny w acetonitrylu, o stężeniu 2 mg / ml ACN. Dozowano 20 μ l roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 μ m; Eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,1 % kwasu octowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 370 nm.



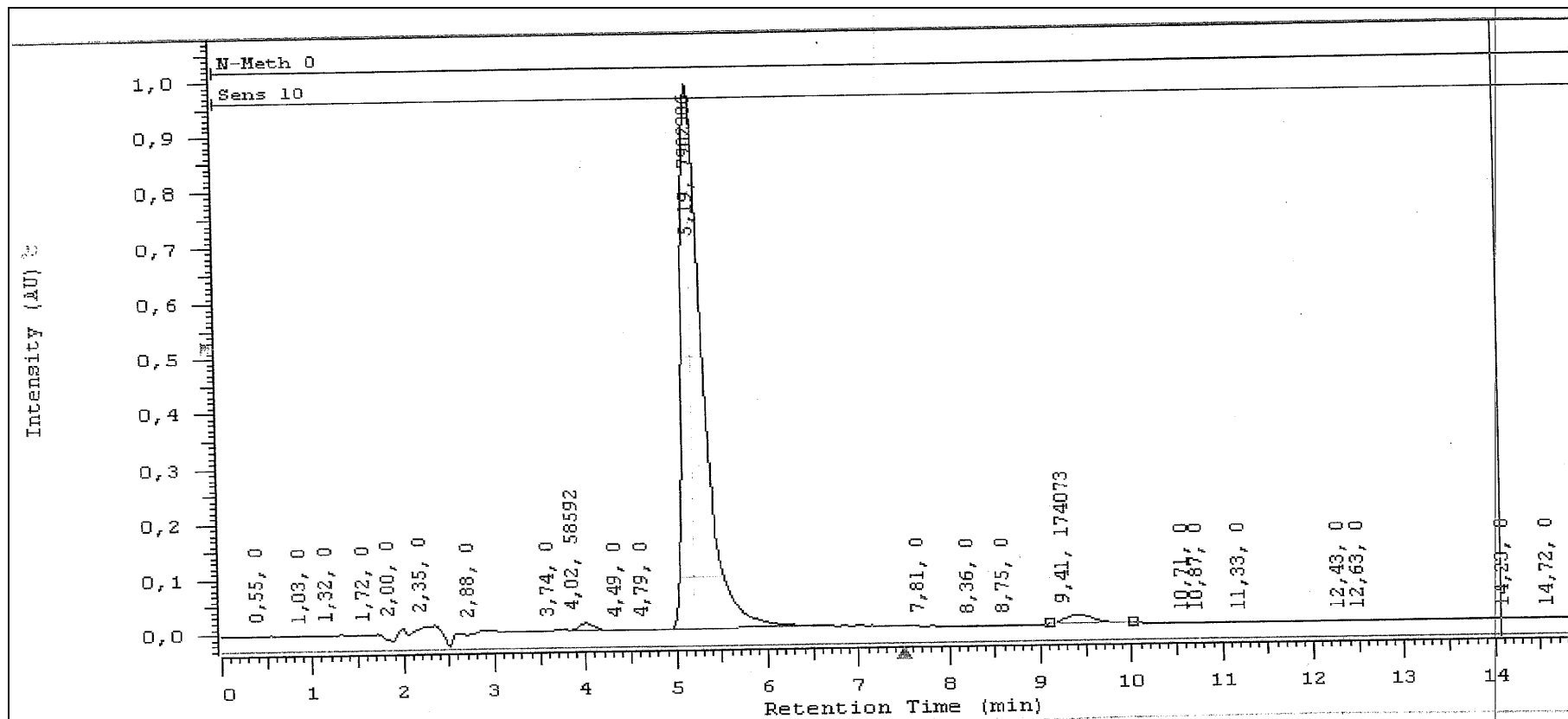
Rys.3. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca kwercetyny w acetonitrylu, o stężeniu 9 mg / ml ACN. Dozowano 20 µl roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 µm; eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,05 % kwasu trifluorooctowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 365 nm.



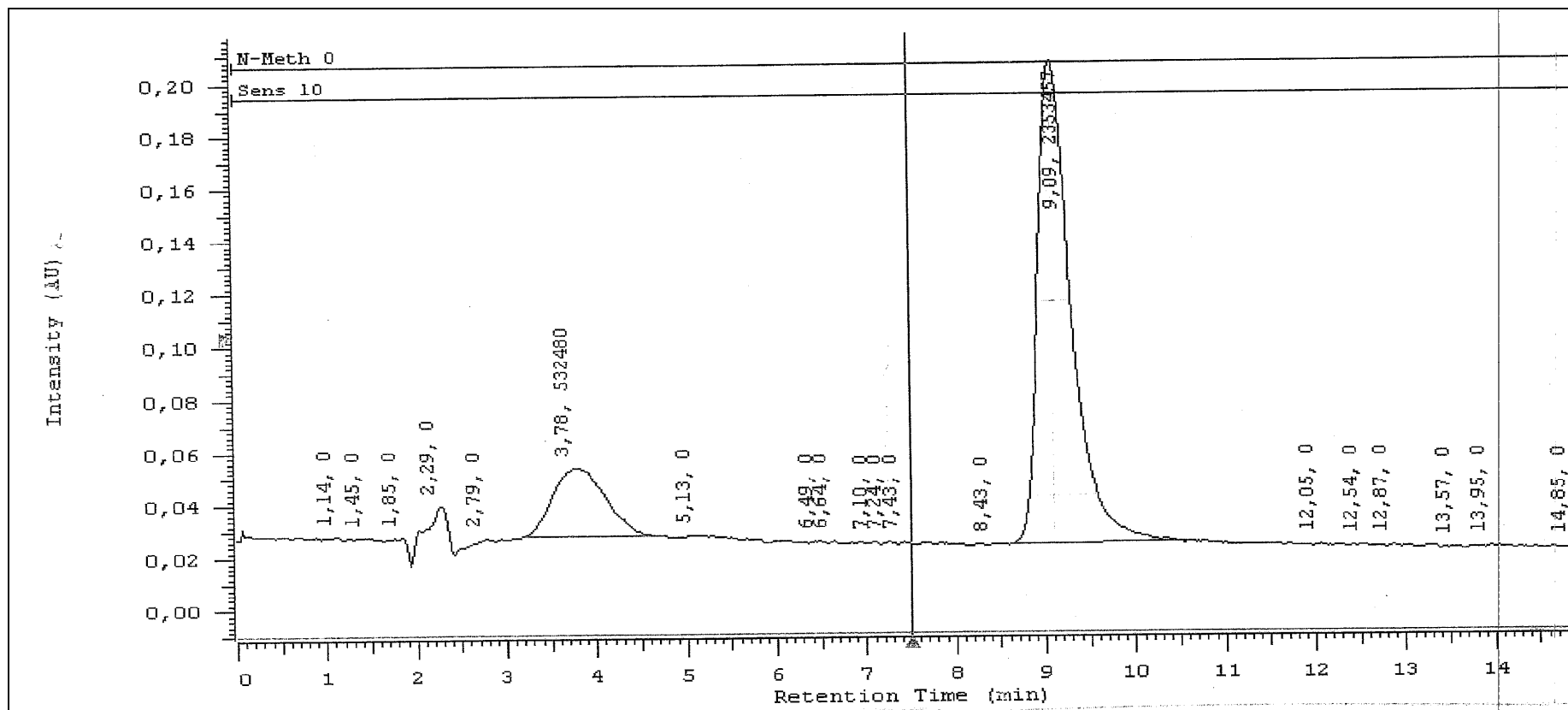
Rys.4. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca mirycetyny w acetonitrylu, o stężeniu 2 mg / ml ACN. Dozowano 20 µl roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 µm; Eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,05 % kwasu trifluorooctowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 370 nm.



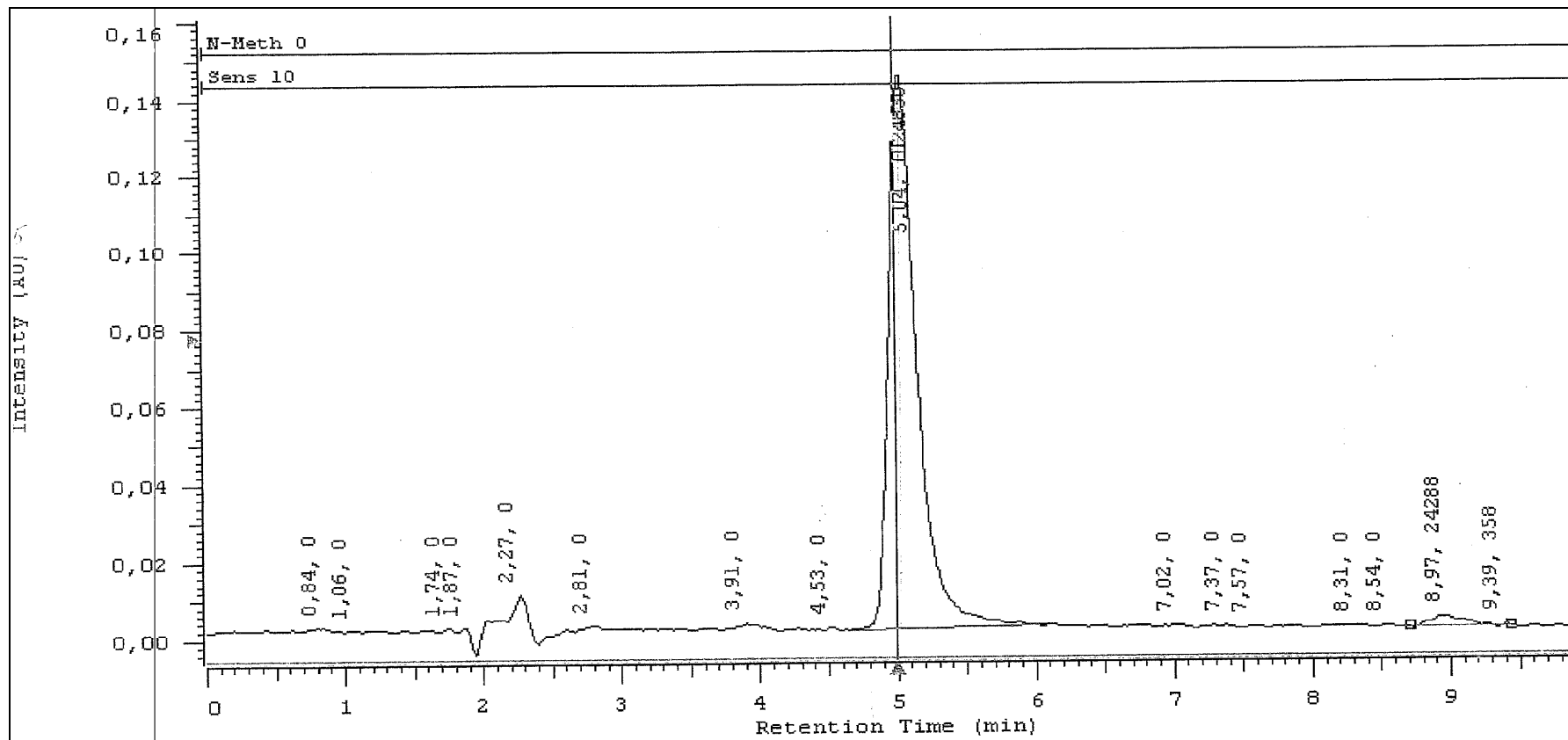
Rys.5. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca kwercetyny w acetonitrylu, o stężeniu 9 mg / ml ACN. Dozowano 20 μ l roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 μ m; Eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,1 % kwasu chlorowodorowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 365 nm.



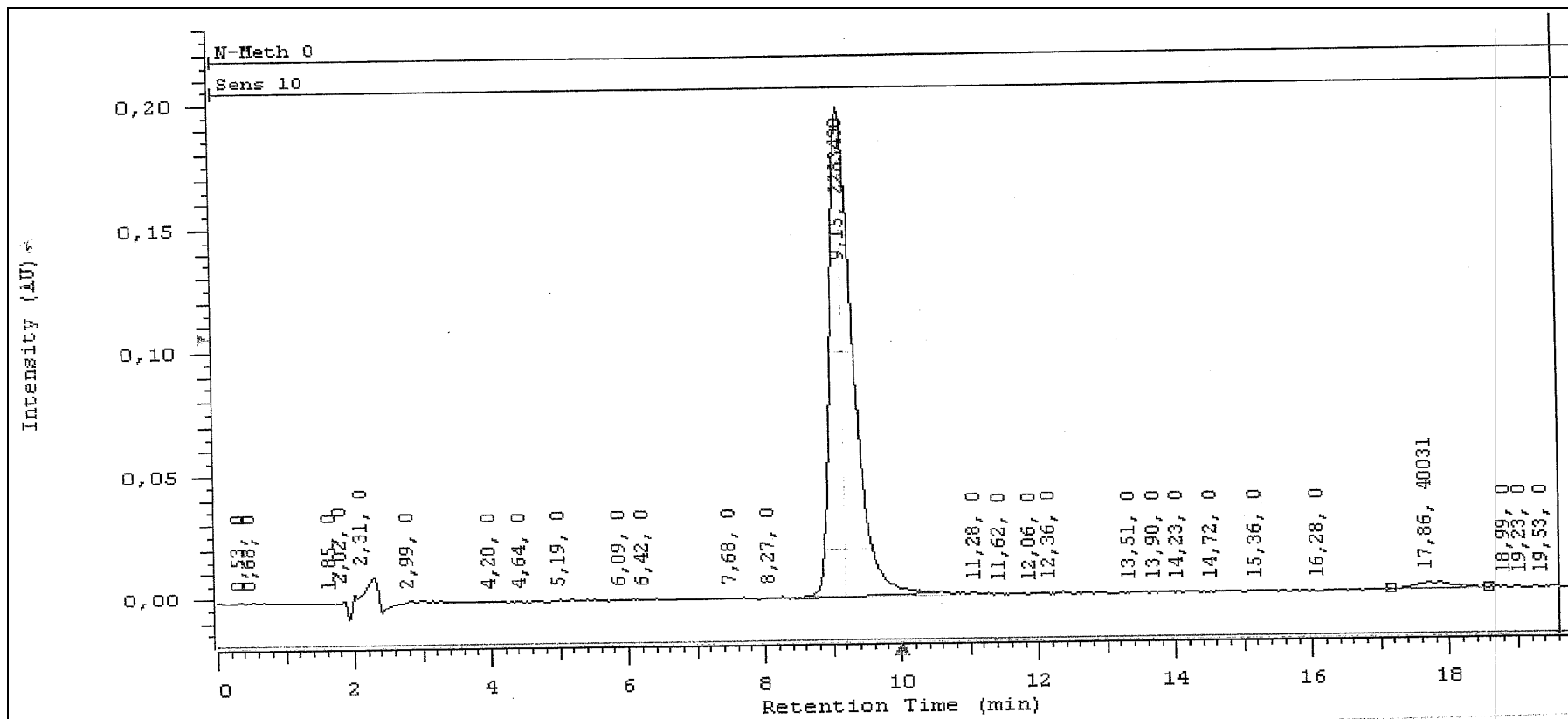
Rys.6. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca mirycetyny w acetonitrylu, o stężeniu 2 mg / ml ACN. Dozowano 20 μ l roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 μ m; Eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,1 % kwasu chlorowodorowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 370 nm.



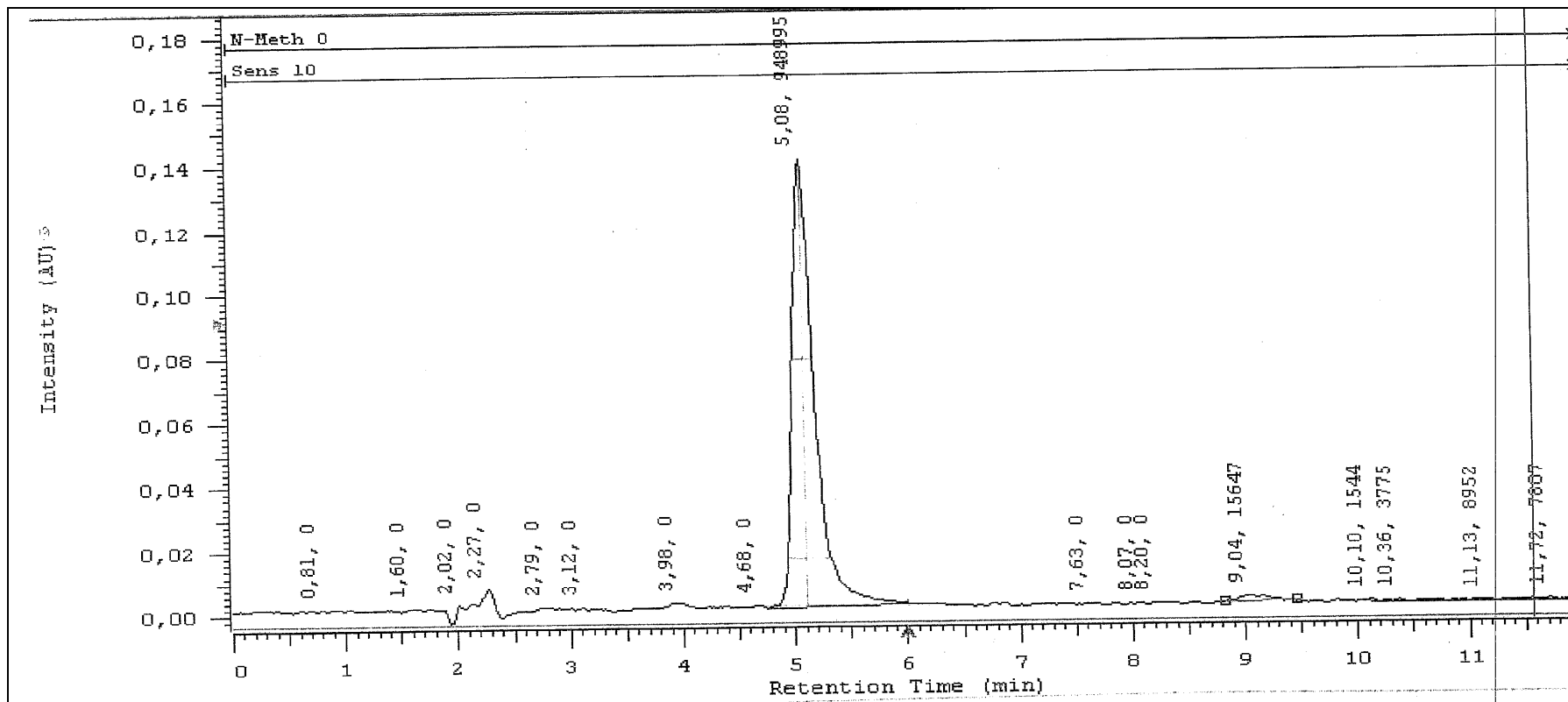
Rys.7. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca kwercetyny w acetonitrylu, o stężeniu 9 mg / ml ACN. Dozowano 20 μ l roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 μ m; Eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,1 % kwasu ortofosforowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 365 nm.



Rys.8. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca mirycetyny w acetonitrylu, o stężeniu 2 mg / ml ACN. Dozowano 20 μ l roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 μ m; Eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,1 % kwasu ortofosforowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 370 nm.



Rys.9. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca kwercetyny w acetonitrylu, o stężeniu 9 mg / ml ACN. Dozowano 20 µl roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 µm; Eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,05 % kwasu siarkowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 365 nm.



Rys.10. Przykład chromatogramu, otrzymanego z zastosowaniem detektora UV-VIS typu DAD, roztworu wzorca mirycetyny w acetonitrylu, o stężeniu 2 mg / ml ACN. Dozowano 20 μ l roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 4 x 250 mm, 5 μ m; Eluent: acetonitryl : woda, w stosunku 3:7 v/v + 0,05 % kwasu siarkowego, przepływ 1 ml/min, długość fali 370 nm.