

**ANNALES  
ACADEMIAE MEDICAE  
GEDANENSIS  
TOM XXXVI  
2005  
SUPPLEMENT 4**



AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Joanna Nowakowska

**ANALITYCZNE ASPEKTY BADANIA SUBSTANCJI  
FIZJOLOGICZNIE AKTYWNYCH POCHODZENIA  
NATURALNEGO METODĄ TLC I HPTLC**

*ANALYTICAL ASPECTS INVESTIGATION OF NATURAL  
OCCURRING SUBSTANCES WITH PHYSIOLOGICAL  
ACTIVITY BY TLC AND HPTLC METHOD*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej  
Wydziału Farmaceutycznego  
Kierownik Katedry: prof. dr hab. Jerzy Łukasiak

GDAŃSK 2005

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

**REDAKTOR NACZELNY**  
**PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD**

prof. dr Roman Kaliszan

**KOMITET REDAKCYJNY**  
**EDITORIAL BOARD**

prof. dr Marek Grzybiak (sekretarz), prof. dr Andrzej Hellmann,  
dr hab. Józef Jordan, prof. nadzw. AMG, prof. dr Janusz Limon,  
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

**ADRES REDAKCJI**  
**ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE**  
Annales Academiae Medicae Gedanensis  
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,  
80-210 Gdańsk, Poland  
e-mail: [annales@amg.gda.pl](mailto:annales@amg.gda.pl)

Artykuły opublikowane w Annales AMG  
są zamieszczane w bazie EMBASE  
Articles published In Annales AMG are covered  
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

---

Akademia Medyczna w Gdańsku

# SPIS TREŚCI

<b>WSTĘP .....</b>	<b>7</b>
<b>1. ANTYBIOTYKI MAKROCYKLICZNE .....</b>	<b>8</b>
1.1. MAKROLIDY .....	8
1.1.1. <i>Analiza chromatograficzna makrolidów .....</i>	<i>13</i>
1.2. WANKOMYCINA.....	15
1.2.1. <i>Analiza chromatograficzna wankomycyny.....</i>	<i>16</i>
1.3. ANSAMYCINY .....	18
1.3.1. <i>Analiza chromatograficzna ansamycyn .....</i>	<i>21</i>
1.4. ANTYBIOTYKI MAKROCYKLICZNE W SEPARACJI CHIRALNEJ .....	22
1.5. BADANIA WŁASNE .....	31
<b>2. PORFIRYNY .....</b>	<b>32</b>
2.1. METODY OZNACZANIA PORFIRYN .....	38
2.2. BADANIA WŁASNE .....	38
<b>3. KWASY - ROZMARYNOWY I WALERENOWY .....</b>	<b>39</b>
3.1. METODY OZNACZANIA KWASU WALERENOWEGO I ROZMARYNOWEGO .....	50
3.2. BADANIA WŁASNE .....	52
<b>CZĘŚĆ ANALITYCZNA.....</b>	<b>53</b>
<b>4. ADSORBENTY .....</b>	<b>53</b>
4.1. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA STOSOWANYCH ADSORBENTÓW .....	53
4.2. WIZUALIZACJA BADANYCH ZWIĄZKÓW .....	56
<b>5. ELUENTY .....</b>	<b>58</b>
5.1. WODNE FAZY RUCHOME .....	59
5.1.1. <i>Antybiotyki makrocykliczne na celulozowej fazie stacjonarnej .....</i>	<i>59</i>
5.1.2. <i>Antybiotyki makrocykliczne na poliamidowej fazie stacjonarnej.....</i>	<i>62</i>
5.1.3. <i>Kwas walerenowy i rozmarynowy na aminowej fazie stacjonarnej.....</i>	<i>66</i>
5.1.4. <i>Kwas walerenowy i rozmarynowy w układzie faz normalnych i odwróconych.....</i>	<i>68</i>
5.2. WODNE FAZY RUCHOME MODYFIKOWANE CHLORKIEM SODU.....	72
5.2.1. <i>Antybiotyki makrocykliczne w układzie faz normalnych i odwróconych.....</i>	<i>72</i>

5.3. NIEWODNE FAZY RUCHOME.....	78
5.3.1. <i>Kwas walerenowy i rozmarynowy na aminowej fazie stacjonarnej             oraz w układzie faz normalnych i odwróconych.....</i>	78
5.3.2. <i>Porfiryny na krzemionkowej, poliamidowej i celulozowej fazie             stacjonarnej.....</i>	79
5.4. NIEWODNE FAZY RUCHOME MODYFIKOWANE DMSO I HMDSO .....	84
5.4.1. <i>Porfiryny na krzemionkowej fazie stacjonarnej .....</i>	84
5.4.2. <i>Antybiotyki makrocykliczne na fazie stacjonarnej             LiChrospher Si 60 .....</i>	88
5.4.3. <i>Antybiotyki makrocykliczne na fazie stacjonarnej RP-18.....</i>	94
5.4.4. <i>Antybiotyki makrocykliczne w układzie faz normalnych             i odwróconych .....</i>	98
5.5. FAZY RUCHOME MODYFIKOWANE BUFOREM .....	103
5.5.1. <i>Wpływ pH na retencję chromatograficzną kwasu walerenowego             i rozmarynowego .....</i>	103
5.5.2. <i>Wpływ pH na parametry widma absorpcyjnego porfiryn.....</i>	110
<b>PODSUMOWANIE.....</b>	<b>115</b>
<b>WNIOSKI.....</b>	<b>118</b>
<b>STRESZCZENIE.....</b>	<b>119</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>120</b>
<b>WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH TREŚĆ PRACY HABILITACYJNEJ.....</b>	<b>121</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>122</b>

## WSTĘP

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) jest dynamicznie rozwijającą się metodą analityczną we współczesnej praktyce laboratoryjnej. Technika ta ponownie wzbudziła zainteresowanie, po długim okresie zapomnienia, w późnych latach 30-tych. A stało się to za sprawą Izmajłowa i Shraibera, którzy doszli do wniosku, że TLC jest narzędziem analitycznym szybszym, wygodniejszym oraz umożliwiającym lepszą separację w porównaniu z konwencjonalną kolumnową chromatografią cieczową. Lata 50-te to okres wytężonej pracy dwóch niezależnych naukowców - Stahla i Kirchnera. Położyli oni niejako podwaliny pod klasyczną kapilarną TLC, opracowując i ujednolicając procedury dotyczące polepszania separacji i odtwarzalności wyników oraz wnieśli wkład w rozwój wielu nowych jej zastosowań. W tym samym mniej więcej czasie rozpoczęła się komercjalizacja materiałów i urządzeń oraz dostępność techniki w wielu laboratoriach. To zwiastowało złoty wiek w ewolucji TLC, która szybko wyparła chromatografię bibułową i stała się główną chromatograficzną metodą separacji. W latach 70-tych nastąpił spadek zainteresowania TLC jako nowoczesną cieczową chromatografią kolumnową, natomiast rozpoczął się rozwój automatyzacji i całkowitej instrumentalizacji rozdzielania chromatograficznego. Dalsze optymalizowanie warunków TLC, bardziej powszechnie znanej jako HPTLC lub nowoczesnej TLC, nie zdołało podtrzymać wcześniejszego zainteresowania tą techniką. Przez lata 80-te nowoczesna TLC została całkowicie zinstrumentalizowana, jakkolwiek w tym samym czasie odłączyła się od głównego nurtu badań chromatograficznych. W swojej konwencjonalnej formie TLC jest nadal metodą szybką, niedrogą, „elastyczną” oraz „przenośną” stosowaną w analizie szeregu substancji. Z drugiej strony, nowoczesna TLC była właściwie coraz bardziej marginalizowana oraz niewidoczna na ważnych sympozjach chromatograficznych. Ponadto szkolenia w zakresie nowoczesnej TLC faktycznie nie istnieją zarówno w przemyśle i w szkolnictwie wyższym, co oznacza, że wielu współczesnych uczonych jest nieświadomych tego, że TLC może być metodą z wyboru w rozwiązywaniu pewnych problemów analitycznych. Jest nadzieja, że nowoczesna TLC przetrwa dzięki silnemu poparciu kilku entuzjastów, kontynuujących rozwój tej techniki oraz szerokiemu wykorzystywaniu wyników ich badań w celach komercyjnych.

## 1. ANTYBIOTYKI MAKROCYKLICZNE

Zjawiska powstawania kompleksów inkluzyjnych wchodzą w zakres chemii supramolekularnej, która jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin nauki. W chromatografii związki inkluzyjne są najczęściej wykorzystywane w analizie trudno rozdzielających się substancji jako modyfikatory faz ruchomych lub stacjonarnych. Pomimo sporej ilości prac dotyczących zastosowań związków inkluzyjnych, brak jest szerszych opracowań teoretycznych, a efektywną separację mieszanin uzyskuje się zazwyczaj metodą prób i błędów. Ze względu na rosnącą ilość syntetycznie otrzymywanych pochodnych antybiotyków makrocyklicznych, stale poszukuje się szybkich i wydajnych metod ich separacji. Najtańszą i najszybszą techniką wydaje się tu być chromatografia cienkowarstwowa. Znajduje ona również zastosowanie w rozdzielaniu mieszanin racemicznych z użyciem tej klasy związków jako selektorów chiralnych.

Antybiotyki makrocykliczne to zróżnicowana pod względem budowy klasa związków wykazujących, między innymi, właściwości inkluzyjne. Należą do niej: polieny makrocykliczne, glikopeptydy makrocykliczne, peptydy, związki ansa i wiele innych struktur. Generalnie podzielić je można na trzy grupy:

- 1) antybiotyki niepolienowe (w skrócie zwane makrolidami),
- 2) ansamycyny,
- 3) antybiotyki polienowe.

Grupa pierwsza i druga wykazuje działanie przeciwbakteryjne. W skład trzeciej wchodzi antybiotyki o działaniu przeciwgrzybiczym. Ciężary cząsteczkowe antybiotyków makrocyklicznych mieszczą się w granicach 600-2200. Posiadają charakter kwasowy, zasadowy bądź obojętny. Niektóre silnie absorbują światło w nadfiolecie [1].

### 1.1. Makrolidy

Pod względem chemicznym makrolidy stanowią połączenia glikozydowe, w których aglikonem jest wielocłonowy, bezazotowy pierścień laktonowy, natomiast częścią cukrową są deoksycukry, a wśród nich przynajmniej jeden aminosacharyd. Trzeciorzędowy azot aminocukru odpowiedzialny jest za słabo zasadowy charakter tych związków. Liczba atomów w pierścieniu, przeważnie parzysta, mieści się w zakresie od 12 do 24 i często stanowi podstawę klasyfikacji antybiotyków [2]. Najczęściej spotykane są makrolidy 14-cłonowe (erytromycyny A, B, C, D, E i F, oleandomycyna, troleandomycyna, roksytromycyna, dirytromycyna, klarytromycyna i flurytromycyna) lub 16-cłonowe (josamycy-



na, rosaramycyna, kitasamycyna, mirosamycyna, spiramycyna i tylozyna). Nietypowym, bo 15-członowym makrolidem jest azytromycyna, natomiast karbomycyna ma w swoim pierścieniu aż 17 atomów [3]. Są to związki o charakterze lipofilowym, trudno lub całkowicie nierozpuszczalne w wodzie; wykazują dobrą rozpuszczalność w alkoholach, acetonie, chloroformie [4]. Rozkład ich - przebiegający głównie w środowisku kwaśnym - związany jest ściśle z budową. Słabymi punktami są wiązania glikozydowe (ulegające pękaniu) oraz te miejsca w strukturze antybiotyku, z których możliwe jest oderwanie cząsteczki wody. Z powodu braku układów chromoforowych związki te wykazują słabą absorpcję promieniowania nadfioletowego w jego dolnym zakresie (< 220 nm). Dotyczy to w szczególności erytromycyny i oleandomycyny [5]. Z wyjątkiem rosaramycyny i mirosamycyny, które wyizolowano z gatunku *Micromonospora*, a także półsyntetycznych pochodnych erytromycyny A (roksytromycyny, dirytromycyny, klarytromycyny, flurytromycyny i azytromycyny) i oleandomycyny (troleandomycyna), makrolidy otrzymuje się z hodowli mikroorganizmów z rodzaju *Streptomyces*. Otrzymane w ten sposób stanowią mieszaninę homologicznych związków [3]. Antybiotyki makrolidowe posiadają właściwości bakteriostatyczne będące skutkiem hamowania syntezy białek. Leki te działają poprzez odwracalne wiązanie z receptorem 23S rRNA na podjednostce 50S rybosomu zaburzając w ten sposób reakcje translacji i wydłużania łańcuchów polipeptydowych [6]. Wszystkie makrolidy posiadają podobne właściwości przeciwbakteryjne. W stężeniu 0.1-0.2 µg/ml są aktywne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, łącznie z dwóinkami zapalenia płuc, paciorkowcami i maczugowcami błonicy oraz przeciwko niektórym bakteriom Gram-ujemnym, jak *Haemophilus influenzae* i *Legionella pneumophila* [6]. Nowsze pochodne erytromycyny wykazują aktywność wobec *Helicobacter pylori* i stąd ich zastosowanie w chorobie wrzodowej żołądka [5]. Wrażliwe na działanie makrolidów są także mykoplazmy, chlamydie i riketsje. Erytromycyna i jej analogi są często lekami z wyboru w zakażeniach wywołanych przez wyżej wymienione drobnoustroje i stanowią leki substytucyjne u chorych nadwrażliwych na penicyliny. Trzeba ponadto zaznaczyć, że stosowanie makrolidów w chemioterapii ogranicza ich hepatotoksyczność, a także rozwijająca się, zwłaszcza wśród gronkowców, oporność polegająca na metylacji receptora 23S rRNA [6]. Związki te, a w szczególności tylozyna, tylozyna i spiramycyna, znalazły zastosowanie w weterynarii w leczeniu infekcji dróg oddechowych bydła i świń [4,7], w zapaleniu wymion krów [8], jak również jako dodatek do pasz przyspieszających wzrost drobiu [4,7].

### ***Erytromycyna***

Erytromycyna (ryc. 1), antybiotyk wytwarzany przez promieniowce z gatunku *Streptomyces erythreus*, została odkryta przez McGuire'a w 1952 roku [9]. Jest to w zasadzie mieszanina blisko ze sobą spokrewnionych chemicznie związków oznaczonych literami A, B, C, D, E i F. Nazwa „erytromycyna”

zarezerwowana jest dla głównego reprezentanta tej grupy, erytromycyny A, o ciężarze cząsteczkowym 734. Zarówno w surowym produkcie biosyntezy, jak i w oczyszczonych preparatach erytromycyna A występuje w największej ilości (90%). Ma ona także najsilniejsze właściwości przeciwbakteryjne; erytromycyna B ma tylko 85% aktywności erytromycyny A, natomiast erytromycyna C 20% [2]. Aglikonowa część cząsteczki - erytronolid - to 14-członowy pierścień laktonowy, natomiast część cukrową tworzą dwa spośród trzech dezoksycukrów. Aminocukier - D-dezozamina - połączony jest wiązaniem  $\beta$ -glikozydowym z pierścieniem w pozycji C<sub>5</sub> i występuje we wszystkich erytromycynach. D-dezozamina jako III-rzędowa amina decyduje o zasadowym charakterze erytromycyny (pK<sub>a</sub> 8.8) [3]. Ta część cząsteczki wykorzystywana jest także do jej modyfikacji w wyniku estryfikacji grupy wodorotlenowej (z kwasem propionowym, etylowęgłowym i etylobursztynowym) lub na drodze tworzenia soli poprzez ugrupowanie dimetyloaminowe (laktobionian, glukohptonian i stearynian erytromycyny). Dwie pozostałe dezoksyheksozy, unikalne dla erytromycyny, to L-kladinoza - występująca w erytromycynach A, B, E i F oraz L-mykaroza - występująca w erytromycynie C i D. Obie przyłączone są do polihydroksylaktonu wiązaniem  $\beta$ -glikozydowym w pozycji C<sub>3</sub> [2,3]. Erytromycyna jest nietrwała w środowisku kwaśnym ulegając wewnątrzcząsteczkowej reakcji między grupą karbonylową w położeniu C<sub>9</sub> a grupą wodorotlenową w położeniu C<sub>6</sub>. W wyniku tej reakcji zachodzącej z odszczepieniem cząsteczki wody powstaje nieaktywny hemiketal anhydroerytrromycyny [2].

### ***Troleandomycyna***

Prekursorem troleandomycyny (trójacetylooleandomycyny, TAO) jest - biosynteżowana przez *Streptomyces antibioticus* - oleandomycyna, która budową i właściwościami pozostaje zbliżona do erytromycyny (ryc. 1) [10]. Aglikonem oleandomycyny jest 14-członowy pierścień laktonowy zwany oleandolidem połączony z dwoma sacharydami: D-dezozaminą, która występuje także w erytromycynie, i L-oleandrozą [11]. Zarówno aglikon, jak i każdy z cukrów posiada wolną grupę wodorotlenową, a całkowita acetylacja tych grup prowadzi do troleandomycyny o ciężarze cząsteczkowym 814. Powstaje dzięki temu związek o odmiennych właściwościach, w porównaniu z oleandomycyną, jest stabilniejszy, trwalszy w środowisku kwaśnym i słabiej rozpuszczalny w wodzie [2]. Spektrum działania tego półsyntetycznego antybiotyku pokrywa się w znacznej mierze z zakresem działania erytromycyny [9]. Troleandomycyna stosowana jest w infekcjach wywołanych przez gronkowce odporne na erytromycynę, penicylinę i tetracykliny [10]. Szczególnie skuteczna okazała się w zakażeniach górnych dróg oddechowych [2].





### 1.1.1. Analiza chromatograficzna makrolidów

W analizie antybiotyków makrocyklicznych odchodzi się od popularnych w latach 50-tych i 60-tych ubiegłego wieku metod mikrobiologicznych, fluorymetrycznych i spektrofotometrycznych z powodu ich małej specyficzności na rzecz metod chromatograficznych [3]. Wśród nich największą popularnością cieszą się: wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) z detekcją UV lub innymi detektorami (fluorymetrycznym, chemiluminescencyjnym, elektrochemicznym) [4], chromatografia gazowa (GC) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym, oznaczanie densytometryczne po uprzednim rozdzielaniu techniką HPTLC i elektroforeza kapilarna [3]. Do detekcji w chromatografii gazowej i cieczowej stosuje się także spektrometrię masową [4]. Do oznaczania antybiotyków makrolidowych techniką HPLC najczęściej wykorzystuje się układ faz odwróconych, a fazę ruchomą stanowi zazwyczaj metanol, acetonitryl i bufor fosforanowy lub octanowy. Separację przeprowadza się w środowisku kwaśnym, z wyjątkiem erytromycyny, która przy niższych wartościach pH jest niestabilna [12]. Chromatografię cieczową stosowano do rozdzielania erytromycyn, ich pochodnych oraz produktów degradacji [3-5,7,9,13-30], troleandomycyny [10,20,31] i tylozyny [3,4,7,12,32-39].

W surowicy, osoczu i moczu erytromycyna i inne makrolidy mogą być oznaczane metodą chromatografii cieczowej z detektorem UV osiągając czułość 0.25 µg/ml w surowicy i 1.0 µg/ml w moczu, lub z detektorem fluorymetrycznym osiągając czułość 50 ng/ml. Mimo małej specyficzności detektora UV pojawiają się wciąż nowe publikacje na temat tej metody. Zastosowanie detektora fluorymetrycznego podnosi specyficzność, jednakże przygotowanie do oznaczenia jest pracochłonne. Detektor elektrochemiczny okazuje się najbardziej odpowiedni w badaniach nad farmakokinetyką i biodostępnością makrolidów. Jest też z powodzeniem wykorzystywany w analizie śladowych ilości makrolidów w płynach biologicznych [3]. Przykładowo Taninaka i inni oznaczali parametry farmakokinetyczne erytromycyny, klarytromycyny, roksytromycyny i azytromycyny przy użyciu detektora amperometrycznego. Materiał stanowiło osocze szczurów, a eluentem była mieszanina acetonitrylu i 0.05 M buforu fosforanowego o pH 7.2 (43:57) [40]. Z kolei Kees i inni z powodzeniem użyli tej metody do oznaczania tych samych antybiotyków w ludzkim osoczu, ślinie, soku żołądkowym i lizacie limfocytów. Fazę stacjonarną stanowiła krzemionka cyjanopropylowa a fazę ruchomą mieszanina acetonitryl - metanol - bufor fosforanowy o pH w zakresie od 6.5 do 8.0 w zależności od oznaczanego antybiotyku [5]. Rozdzielenie troleandomycyny z zastosowaniem mieszaniny acetonitryl - bufor octanowo-amonowy (pH 6.0) - woda (45:5:50 v/v/v) jako fazy ruchomej był przedmiotem badań Chepkowny i współpracowników. Detektorem był spektrofotometr UV, a pomiarów dokonano przy długości fali 205 nm [10]. Ostatnio

zwraca się coraz większą uwagę na skażenie wód gruntowych antybiotykami, które najprawdopodobniej jest przyczyną pojawiania się infekcji opornych na działanie tych leków. Dlatego rosnące znaczenie ma oznaczanie poziomu antybiotyków w wodzie pitnej. Dotychczas stosowano metody oparte na chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią masową, są one jednak pracochłonne i mało uniwersalne. Kompleksowe badanie śladowych ilości antybiotyków jest możliwe dzięki chromatografii cieczowej z zastosowaniem spektrometru masowego, gdzie jony generowane są techniką elektrorozpylania. Dobre rezultaty, korzystając z tej metody, uzyskali Hirsch i współpracownicy oznaczając równocześnie obok makrolidów także tetracykliny, sulfonamidy i penicyliny [41]. Innym problemem jest obecność makrolidów w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego. Poza pojawianiem się szczepów opornych, może to być przyczyną występowania niepożądanych objawów przy długotrwałym spożywaniu skażonego mięsa. Przepisy Unii Europejskiej określają maksymalne stężenie antybiotyków, w tym także makrolidowych, w produktach mięsnych i mlecznych, konieczne jest więc znalezienie optymalnej metody do oznaczania jakościowego i ilościowego antybiotyków w żywności [4]. Leal i inni do określenia poziomu siedmiu występujących obok siebie makrolidów w mięsie kurcząt użył chromatografii cieczowej z detektorem UV. Badał wpływ pH i procentowości acetonitrylu na separację, a także sprawdził przydatność dwóch detektorów UV: detektora o programowanej zmianie długości fali i detektora typu „diode-array” [12]. Draisci i współpracownicy do oznaczenia poziomu tilmikozyny, tylozyny, erytromycyny i roksytromycyny w mięsie wołowym użył chromatografii cieczowej z dwoma sprzężonymi spektrometrami masowymi. Jako fazy ruchomej użył mieszaniny acetonitryl - metanol - 1% kwas trifluoroctowy (60:20:20 v/v/v) [4]. Dubois z zespołem oznaczał poziom tilmikozyny, tylozyny, erytromycyny, spiromycyny oraz josamycyny w mięsie, mleku i jajach tą samą metodą, lecz stosując elucję gradientową (zmienny w czasie stosunek stężeń acetonitrylu i 0.1 mol/l roztworu octanu amonu) [7]. Tylozynę analizowało również wielu innych badaczy w mleku i tkankach zwierzęcych [42-45]. Należy ponadto nadmienić, że oleandomycyna używana była jako standard wewnętrzny w analizie erytromycyny techniką chromatografii cieczowej [46-49].

Liczba publikacji na temat użycia chromatografii cieczowej w jakościowym i ilościowym oznaczaniu makrolidów świadczy o dużej popularności tej metody. Elektroforeza kapilarna zdaje się być jej godnym następcą, gdyż posiada zalety HPLC, a ponadto cechuje się szybkim czasem analizy i niskimi kosztami. Elektrokinezyczną chromatografią micelną posłużył się Tobback i współpracownicy do rozdzielenia tylozyny A od jej pochodnych. Rozpatrywano wpływ rodzaju buforu, pH, stężenia cholanu sodu i bromku cetylotrimetyloamonowego [50]. Elektroforezę kapilarną stosowano w analizie erytromycyny [51,51] oraz tylozyny [50].

Chromatografia gazowa została użyta do analizy ilościowej i separacji erytromycyny w mieszaninach zawierających erytromycynę A, B i C, anhydroerytromycynę A, erytrolozaminę i propionian erytromycyny przy użyciu detektora płomieniowo-jonizacyjnego. Podobnie, erytromycyna A i B były rozdzielane i oznaczane ilościowo w obecności erytromycyny C, anhydroerytromycyny A i erytrolozaminy w tabletkach zawierających erytromycynę. Chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią masową (GC-MS) wykorzystana została do oznaczenia erytromycyny w mięsie wieprzowym i wołowym. W toku analizy ilościowej erytromycyny w kapsułkach z etylobursztynianem erytromycyny użyto pirolityczną chromatografię gazową [3]. Danielson i inni separowali erytromycynę i troleandomycynę stosując metodę chromatografii gazowej [53].

Chromatografia cienkowarstwowa stanowi doskonałe uzupełnienie powyższych metod. Ramirez i współpracownicy oznaczali poziom kilku antybiotyków (m. in. erytromycyny) w mleku przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej połączonej z detekcją mikrobiologiczną (bioautografią) [8]. Technika chromatografii cienkowarstwowej została wykorzystana w separacji erytromycyny [54-63], troleandomycyny [64-66] oraz tylozyny [66,67].

## 1.2. Wankomycyna

Wankomycyna wyizolowana została z hodowli *Streptomyces orientalis*. Zaliczana jest, obok teikoplaniny, awoparacyny i rystocetyny A, do klasy antybiotyków glikopeptydowych [68]. Pod względem chemicznym wankomycyna stanowi trójpierścieniowy heptapeptyd o masie cząsteczkowej 1449 połączony glikozydowo z disacharydem wankozaminozyloglukozą (ryc. 3). Aglikon zbudowany jest z trzech makrocyklicznych części, w których wyróżnić można aminokwasy: N-metyloleucynę, kwas asparaginowy, chloro- $\beta$ -hydroksytyrozynę i fenyloglicynę. W swojej strukturze zawiera osiemnaście asymetrycznych centrów, pięć pierścieni aromatycznych, dziewięć grup wodorotlenowych, dwie grupy aminowe (I- i II-rzędową), siedem grup amidowych, jedną karboksylową i dwa atomy chloru. Posiada również trzy zdolne do dysocjacji grupy (dwie aminowe i jedna karboksylowa) [69]. Dzięki takiej różnorodności wankomycyna i inne antybiotyki tej grupy zdolne są do generowania szeregu oddziaływań, co ma istotne znaczenie dla ich enancjoselektywności. Makrocykliczny rdzeń jest wspólny dla wyżej wymienionych glikopeptydów - różnice sprowadzają się do rodzaju, ilości i miejsca podstawienia grup funkcyjnych, a także w przypadku teikoplaniny i rystocetyny A do dodatkowego pierścienia makrocyklicznego [3,69].

Wankomycyna posiada właściwości amfoteryczne. Dobrze rozpuszcza się w środowisku kwaśnym, nierozpuszczalna jest w roztworach o odczynie obojętnym, natomiast w środowisku zasadowym ulega rozkładowi [2]. Rozpuszczalność wankomycyny w wodzie zwiększa dodatek mocznika. Ponadto jest bardzo dobrze rozpuszczalna w polarnych rozpuszczalnikach aprotonowych takich jak dimetylosulfotlenek (DMSO) [69]. Z kolei chlorowodorek wankomycyny dobrze rozpuszcza się w wodzie, słabo w metanolu, nie rozpuszcza się w wyższych alkoholach i innych mniej polarnych rozpuszczalnikach organicznych. W roztworach wodnych wankomycyna może tworzyć dimer w zależności od właściwości danego roztworu i stężenia wankomycyny. Roztwory z wankomycyną są stabilne w warunkach chłodniczych i w buforze o wartości pH w zakresie 3-6 [2].

Glikopeptydy hamują syntezę ściany komórki bakteryjnej, wiążąc silnie D-alanylo-D-alaninę - jednostkę niezbędną do usieciowania peptydoglikanów - a pozbawiona ściany komórkowej bakteria ulega lizie na skutek dużego ciśnienia osmotycznego. Glikopeptydy działają więc silnie bakteriobójczo. Ponieważ wczesne etapy biosyntezy odbywają się wewnątrz błony cytoplazmatycznej, leki te muszą przez nią przenikać, aby mogły działać [6]. Nie jest to jednak jedyny mechanizm działania. Wybiórcze hamowanie syntezy RNA i zmiana właściwości fizykochemicznych błony cytoplazmatycznej choć mniej poznane, mogą być także odpowiedzialne za właściwości przeciwbakteryjne.

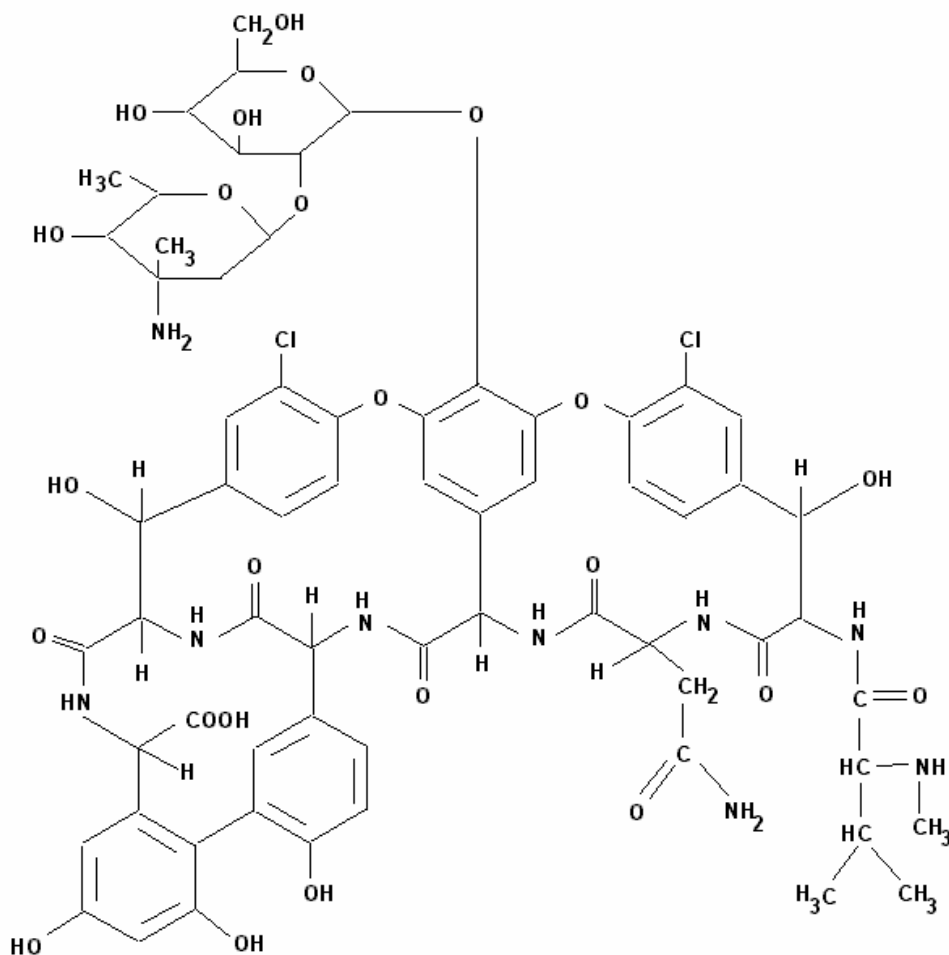
Zakres działania antybiotyków glikopeptydowych obejmuje przede wszystkim bakterie Gram-dodatnie: gronkowce, paciorkowce i enterokoki. W zakażeniach *Corynebacterium jeikeium* i *Clostridium difficile* są lekami pierwszego rzutu [70]. Stosuje się je także w rzekomobłoniastym zapaleniu jelit [6], w przypadku infekcji związanych z wszczepionymi chirurgicznie tworzywami sztucznymi [11], a także w posocznicy, zapaleniu wsierdza oraz szpiku kostnego wywołanych przez gronkowce odporne na inne antybiotyki. Stosowanie glikopeptydów z tej grupy wymaga ostrożności z uwagi na znaczną toksyczność. Wankomycyna może działać nefrotoksycznie, ototoksycznie i kardiotoxycznie [2]. Oporność na te antybiotyki występuje stosunkowo rzadko [70].

### 1.2.1. Analiza chromatograficzna wankomycyny

Del Nozal i współpracownicy wykazali wyższość metody chromatograficznej nad metodami enzymatycznymi, immunologicznymi, radioimmunologicznymi w rozdzielaniu wankomycyny w materiale biologicznym [71]. Antybiotyki makrocycliczne, w tym wankomycynę, rozdzielał Igloy i współpracownicy. Najlepszą separację osiągnięto kiedy fazą ruchomą była mieszanina alkoholu z niepolarnym rozpuszczalnikiem z dodatkiem 30% chlorku sodu oraz buforu [72]. Betina przebadał wankomycynę i 61 innych antybiotyków metodą chromatografii bibułowej. Podzielił je na pięć klas oraz czternaście podklas. Klasyfikacji



dokonał na podstawie wartości  $R_F$  i użytych układów rozpuszczalników [73]. Technika ta została również użyta przez innych badaczy analizujących wankomycynę [74-82]. Kitahashi i Furuta analizowali wankomycynę metodą elektroforezy kapilarnej [83]. Chromatografia cienkowarstwowa posłużyła także innym badaczom jako metoda identyfikacji 82 antybiotyków. Klasyfikacji dokonano stosując różne układy faz ruchomych [84].



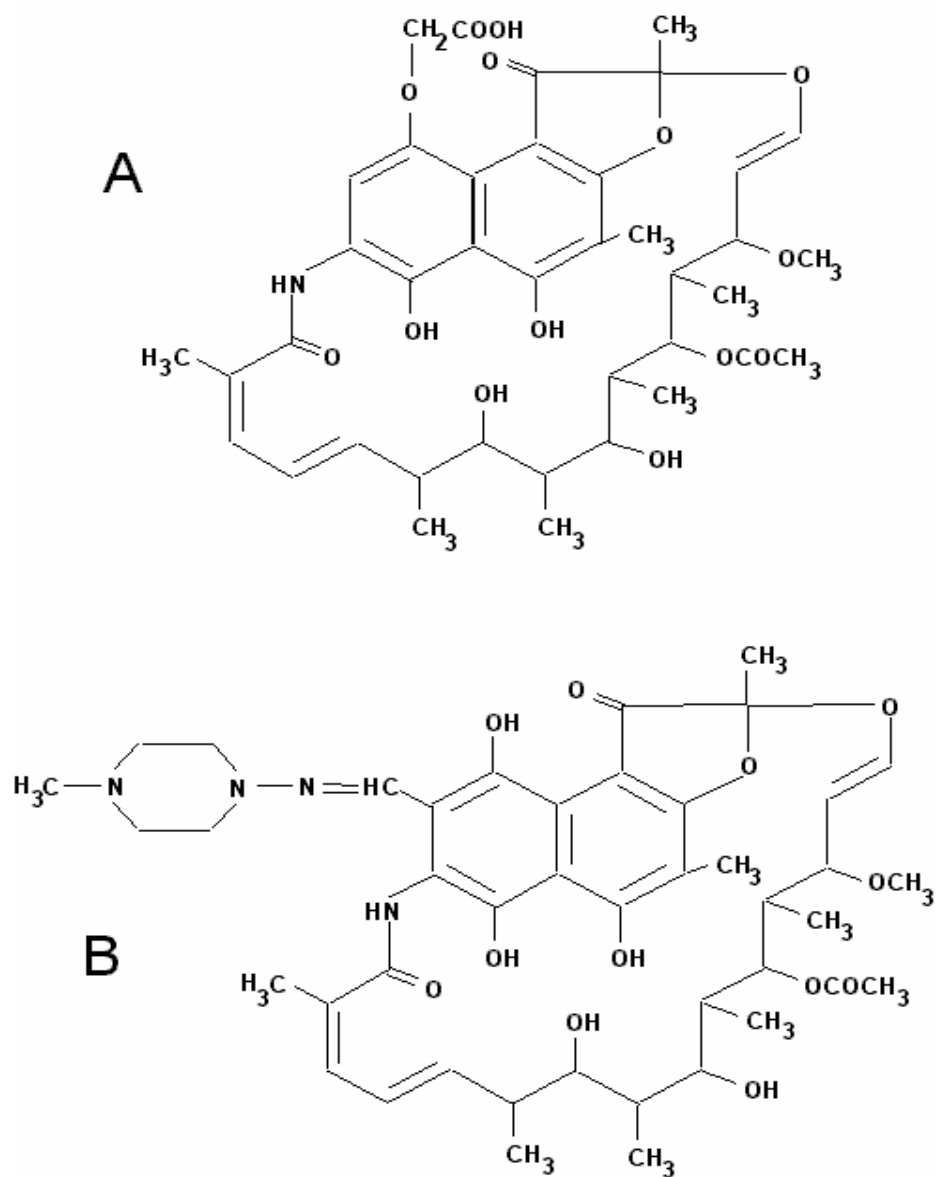
Ryc. 3. Budowa chemiczna wankomycyny.

Fig. 3. The chemical structure of vancomycin.

### 1.3. Ansamycyny

Ansamycyny (ryc. 4) są stosunkowo niedawno odkrytymi antybiotykami. W roku 1957 Sensi wyodrębnił ryfamycynę B ze szczepu *Nocardia mediterranea* [85]. Rdzeń ansamycyn stanowi planarny układ chromoforowy, którego skrajne atomy węgla spięte są długim nienasyconym łańcuchem alifatycznym. Powstaje w ten sposób makrocycliczny pierścień „ansa” [2]. Pochodzenie układu chromoforowego stanowi podstawę do podziału ansamycyn. Ryfamycyny, streptowarycyny i tolipomycyny posiadające aktywność przeciwbakteryjną są pochodnymi naftochinonu. Benzochinon jest natomiast fragmentem struktury ansamycyn o właściwościach chwastobójczych i przeciwnowotworowych, do których zaliczamy ansamytocyny (np. herbimycyna) oraz ansamakrolidy typu majtanzyny (w przeciwieństwie do innych ansamycyn wyodrębnione z roślin tropikalnych). Najnowszą klasą ansamycyn są mykotrieniny [86-88]. Składają się z 21-członowego makrocyclicznego pierścienia laktamowego i układu cykloheksylokarbonylu.

Układ chromoforowy występuje w dwóch formach: chinonowej i hydrochinonowej. Obie formy przechodzą jedna w drugą pod wpływem czynników utleniających i redukujących. Stopień utlenienia układu hydrochinonowego nie wpływa jednak istotnie na profil działania. O wiele ważniejsze dla zachowania aktywności biologicznej są inne fragmenty struktury antybiotyku, np. obecność dwóch tlenów fenolowych w położeniu 5 i 6 układu naftochinonu oraz wolne grupy wodorotlenowe w położeniu 17 i 19 łańcucha „ansa”. Te cztery grupy OH muszą być odpowiednio ułożone w przestrzeni. Ryfamycyna O zawierająca zablockowaną grupę wodorotlenową w pozycji 9 naftochinonu ulega hydrolizie do ryfamycyny S o dużo większej aktywności, co przemawia za tym, że także ta grupa wpływa na aktywność [2]. Ansamycyny, jako że zawierają chromoforowy układ naftohydrochinonu, silnie absorbują promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu światła widzialnego i nadfioletu. Z tej przyczyny roztwory z ryfamycyną B przyjmują w zależności od pH i użytego rozpuszczalnika zabarwienie pomarańczowe lub żółte, natomiast ryfampicyna w roztworze przyjmuje barwę pomarańczową. W postaci stałej antybiotyki te mają odpowiednio barwę żółtą i pomarańczowo-czerwoną. Ryfamycyna B i ryfampicyna słabo rozpuszczają się w wodzie, dobrze w metanolu, etanolu, chloroformie i acetonie [68].



Ryc. 4. Budowa chemiczna ryfamycyny B (A) i ryfampicyny (B).  
Fig. 4. The chemical structures of rifamycin B (A) and rifampicin (B).

Ansamycyny są antybiotykami o bardzo zróżnicowanej aktywności przeciwbakteryjnej, a także przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej [2]. Hamują wzrost większości Gram-dodatnich i niektórych Gram-ujemnych mikroorganizmów wskutek działania na DNA-zależną polimerazę RNA. Dzieje się tak za sprawą tworzenia trwałego kompleksu lek-enzym, blokując tym samym proces inicjacji formowania łańcucha w syntezie mRNA. Mechanizm działania na wirusy jest odmienny. Lek blokuje późne etapy budowy wirusów ospy, prawdopodobnie zakłócając tworzenie płaszcza białkowego [6]. Ryfamycyny działają także na RNA-zależną polimerazę DNA i dlatego są intensywnie badane jako inhibitory odwrotnej transkryptazy (RT), enzymu odpowiedzialnego za replikację i wirulencję wirusa HIV. Co prawda antybiotyki te wykazują *in vitro* aktywność wobec tego wirusa, jednak w badaniach klinicznych nie uzyskano zadowalających efektów. Niektórzy autorzy sugerują, że może to być skutkiem zmian konformacyjnych zachodzących w komórkach żywych, a ściślej rotacji wiązania między węglami w pozycjach 23 i 24. W zależności od warunków otoczenia wiązanie to „odsłania” lub „zasłania” wiążące się z enzymem grupy hydroksylowe w pozycjach 17 i 19 [89].

W niektórych krajach, w tym także w Polsce, ryfampicyna - główny przedstawiciel ansamycyn - stosowana jest wyłącznie w leczeniu gruźlicy, często w połączeniu z izoniazydem [9]. Jednak ryfampicyna hamuje wzrost nie tylko prątków, lecz także większości bakterii Gram-dodatnich i niektórych Gram-ujemnych. Jest skutecznym antybiotykiem w zwalczaniu zakażeń wywołanych przez *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Legionella pneumophila*, a także przez szczepy *Chlamydia* i wirusa ospy. Ryfampicyna jest już skuteczna w stężeniach poniżej 1 µg/ml, szybko jednak rozwija się na nią oporność [6,70]. Ostatnio wprowadzono do terapii gruźlicy ryfabutyne, która w przeciwieństwie do ryfampicyny skuteczna jest przeciw niedawno odkrytym prątkom *Mycobacterium avium* i *Mycobacterium intercellulare* odpowiedzialnym za trudne do wyleczenia infekcje u chorych na AIDS [89].

### **Ryfamycyna B**

Nieoczyszczony produkt biosyntezy *Streptomyces mediterranei* (*Nocardia mediterranea*) zawiera około pięć różnych substancji biologicznie czynnych (ryfamycynę B, O, S, L i SV), różniących się między sobą niektórymi fragmentami struktury chemicznej, a także stopniem utlenienia. Najaktywniejszym z tych antybiotyków jest ryfamycyna B [2] o masie cząsteczkowej 755.8, która zawiera 15-węglowy łańcuch alifatyczny połączony pierścieniowo z płaskim układem naftohydrochinonofuranowym z jednej strony mostkiem enoloketalowym, z drugiej zaś ugrupowaniem karboamidowym (ryc. 4). Jak już wspomniano ryfamycyna B charakteryzuje się małą rozpuszczalnością, ale dzięki obecności grupy karboksylowej tworzy trwałe sole, łatwo rozpuszczalne w wodzie. Podjęto także

próby modyfikacji ryfamycyny B. Przez podstawienie reszty hydroksylowej przy C<sub>9</sub> układu chromoforowego otrzymano wiele nowych związków o charakterze estrów, amidów i hydrazydów. Znaczenie praktyczne znalazł N-dimetyloamid ryfamycyny, zwany ryfamidem, a także ryfampicyna [2].

### ***Ryfampicyna***

Ten półsyntetyczny antybiotyk o ciężarze cząsteczkowym równym 823 został wprowadzony do leczenia w 1957 roku [70] i od tamtej pory zajmuje czołowe miejsce w leczeniu gruźlicy. Chemicznie jest to pochodna hydrazonowa formyloryfamycyny SV (ryc. 4) [11]. Ryfampicyna ma charakter amfoteryczny. Jest stosunkowo trwała w szerokim zakresie pH. W środowisku silnie kwaśnym ulega częściowo hydrolizie do produktów wyjściowych. Rozkład następuje także w środowisku alkalicznym, natomiast w środowisku obojętnym, w obecności tlenu atmosferycznego, układ hydrochinonu może utleniać się do chinonu [2]. W porównaniu z ryfamycyną jest jednak stabilniejsza i ma korzystniejsze parametry farmakokinetyczne [9].

#### **1.3.1. Analiza chromatograficzna ansamycyn**

Ansamycyny można z dużą precyzją i czułością oznaczać przy pomocy chromatografii cieczowej, jednak do badań orientacyjnych lub wstępnych z powodzeniem wykorzystano chromatografię cienkowarstwową i bibułową [90-92]. Sensi i współpracownicy badali chromatograficznie produkty transformacji ryfamycyny B. Do tego celu stosowali chromatografię bibułową oraz cienkowarstwową na żelu krzemionkowym, a jako fazy ruchomej użyli acetonu [93]. Wilson i inni przeprowadzili badania identyfikujące ryfamycyny, także za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym. Fazę ruchomą stanowiła tu mieszanina chloroform - metanol - woda (80:20:2.5 v/v) [90]. Jindal z zespołem wykorzystali wyżej wymieniony układ faz do monitorowania produktów degradacji ryfampicyny [91]. W innych badaniach ryfampicynę rozdzielano na płytkach krzemionkowych. Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę chloroform - etanol - 0.1 M chlorek sodu (84:15.9:0.1) [92]. Chromatografia cienkowarstwowa okazała się również przydatną techniką w pracach badawczych dotyczących produktów inaktywacji ryfampicyny przez drobnoustroje [94].

Połączoną metodę chromatografii cieczowej i spektrometrii masowej zastosowano w celu identyfikacji oraz separacji ryfampicyny, ryfamycyny SV i ryfamycyny B [95]. Marzo i Dal Bo zwrócili uwagę na zalety chromatografii cieczowej w analityce metabolitów ryfamycyn [9]. Inni badacze - Ishi i Ogata -

oznaczali ryfampicynę i jej metabolity: 25-deacetyloryfampicynę (DR), 3-formylo-25-deacetyloryfampicynę SV (FDR) i 3-formyloryfampicynę SV (FR) w ludzkim osoczu metodą HPLC [96]. Postępując podobnie Lau i współpracownicy oznaczali półsyntetyczną pochodną ryfampicyny - ryfabutyne - w osoczu ludzkim po oczyszczeniu przy użyciu ekstrakcji ciecz-ciało stałe [97]. Chromatografię cieczową stosowali również inni badacze w analizie ansamycyn [98,99].

#### **1.4. Antybiotyki makrocykliczne w separacji chiralnej**

Chiralność pozostaje ważnym aspektem wielu związków chemicznych takich jak leki, biomolekuły czy pestycydy. W wielu przypadkach tylko jeden spośród izomerów odpowiedzialny jest za pożądane działanie, podczas gdy inne mogą nie wykazywać terapeutycznej wartości, a nawet mogą być potencjalną przyczyną efektów ubocznych. W momencie, gdy dostrzeżono pozytywną zależność pomiędzy fizjologiczną aktywnością a stereochemią, konieczność zbadania farmakologicznych i toksykologicznych właściwości składników mieszanin enancjomerów stała się oczywista. We wczesnych latach 80-tych ubiegłego wieku szybkie analityczne rozdzielanie mieszaniny stereoizomerów było stosunkowo trudne. Jednak już na początku lat 90-tych dokonano znacznych postępów na polu separacji izomerów optycznych i wkrótce rozdzielanie enancjoselektywne stało się rutynowym i powszechnym procesem. Te postępy w dziedzinie separacji, a także wzrost świadomości na temat samych izomerów, przyczyniły się do zmian w zaleceniach FDA (Food and Drug Administration) dotyczących stereochemii leków i innych chemicznych związków mogących mieć wpływ na zdrowie ludzkie. Separacji chiralnej dokonuje się najczęściej przy pomocy chromatografii cieczowej (LC) i jej modyfikacji. W ostatnich latach dużą popularność zyskała również elektroforeza kapilarna (CE). Większość rozwiązań technicznych stosowanych w chromatografii cieczowej przy rozdzielaniu izomerów optycznych przeniesiono na grunt elektroforezy kapilarnej. W obu metodach stosuje się jako selektory chiralne także te same substancje (głównie cyklodekstryny i chiralne wymiennicze jonowe), z tym, że selektory w chromatografii cieczowej związane są przeważnie z fazą stacjonarną - przeciwnie niż w elektroforezie kapilarnej. W wielu pracach znaleźć można przegląd właściwości związków selektywnych chiralnie stosowanych w elektroforezie kapilarnej. Możliwość wyboru ogranicza niewystarczająca rozpuszczalność i problemy z wykrywaniem. Niewątpliwą przewagą elektroforezy nad chromatografią cieczową jest łatwość z jaką można zmieniać roztwór buforowy z selektorem, umożliwia to bowiem natychmiastowe zobrazowanie

wpływu zastosowanej fazy na rozdzielanie chiralne minimalnym nakładem kosztów i pracy. Poza chromatografią cieczową i elektroforezą pewne znaczenie ma także chromatografia gazowa (GC) i chromatografia cienkowarstwowa (TLC) [68].

Ponieważ parametry retencyjne pary enancjomerów znikomo się różnią w porównaniu z diastereoizomerami, często przed analizą upochadnia się enancjomery czystymi optycznie czynnikami chiralnymi. Powstałe w ten sposób diastereoizomery łatwiej jest rozdzielić. Jest to pośrednia metoda separacji, i choć wydajniejsza, to jednak obdarzona dużymi wadami - czynnik upochadniający musi być optycznie czysty, a rozdzielone związki trzeba przeprowadzić do stanu początkowego, co często prowadzi do racemizacji. Dlatego o wiele więcej uwagi poświęca się metodzie bezpośredniej, w której rozdzielanie opiera się na selektywnym i odwracalnym oddziaływaniu analitu z chiralnym odczynnikiem (selektorem). Mało jest związków, które zapewniają wysoki stopień selektywności, a jednocześnie posiadają szeroki zakres stosowalności. Antybiotyki makrocykliczne są najbardziej obiecującą grupą pod tym względem, i rzeczywiście, od chwili wprowadzenia ich przez Armstronga w 1994 roku znacząco wpłynęły na dziedzinę zajmującą się chiralną separacją [100]. Szybko zyskały popularność, podczas gdy przed rokiem 1994 blisko 90% wszystkich selektorów chiralnych stanowiły cyklodekstryny oraz pokrewne im związki. Od momentu wprowadzenia użyto ich do rozdzielania wielu związków różnymi metodami (m.in. w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC), elektroforezie (CE) i elektroforezie sprzężonej ze spektrometrią masową (CE-MS)). Nie stanowią one jedynie dodatkowej klasy związków o podobnych właściwościach do dobrze już poznanych cyklodekstryn, lecz oferują nową jakość pozwalającą uzyskać większą rozdzielczość i selektywność niż to było możliwe do tej pory i to w przypadku związków pozostających poza zasięgiem cyklodekstryn [68].

Antybiotyki makrocykliczne stanowią nową generację selektorów chiralnych. Wykazują zarówno bardzo wysoką selektywność, która jest charakterystyczna dla wielkocząsteczkowych selektorów pochodzenia biologicznego (białka), jak i wysoką wydajność, właściwą dla cyklodekstryn i innych związków tworzących kompleksy typu gość-gospodarz [70]. Nieodłącznym problemem jest natomiast ich mała stabilność chemiczna. Antybiotyki te często występują w formie zjonizowanej, posiadają części hydrofobowe i hydrofilowe oraz odznaczają się łatwością odkształceń, dzięki czemu łatwo dopasowują się do rozdzielanych analitów. Ostatnia wymieniona cecha oznacza również, że wraz ze zmianą środowiska zmienia się także ich enancjoselektywność. Mają także pewną ilość centrów chiralnych i grup funkcyjnych stanowiących potencjalne źródło oddziaływań międzycząsteczkowych z chiralną molekułą. Efekty decydujące o powinowactwie antybiotyku do cząsteczki analitu to oprócz wiązań jonowych, oddziaływania typu dipol-dipol, oddziaływania pomiędzy elektronami

$\pi$ , wiązania wodorowe, wiązania akceptorowo-donorowe i wykluczanie hydrofobowe. Niemalą rolę odgrywają też efekty steryczne. Poza miejscami hydrofobowymi, antybiotyki makrocykliczne posiadają w swojej cząsteczce również ugrupowania hydrofilowe, jak również grupy zdolne do jonizacji dające im dobrą rozpuszczalność w roztworach wodnych, a także w przypadku elektroforezy kapilarnej decydujące o ich ruchliwości. Najlepszą i najczęściej stosowaną jako selektory grupą antybiotyków wydają się być glikopeptydy, ale pozostałe grupy, takie jak ansamycyny, makrolidy, aminoglikozydy (kanamycyna, fradynomycyna B i C, streptomycyna), czy polipeptydy (tiosrepton) nie pozostają niezauważone [68].

### *Ansamycyny*

Ansamycyny, takie jak ryfamycyna B i ryfamycyna SV wyróżniły się tym, że jako pierwsze zastosowano je wyłącznie w elektroforezie kapilarnej, bez uprzednich badań nad ich zachowaniem w chromatografii cieczowej. Spośród ansamycyn ryfamycyna B była pierwszą zastosowaną w elektroforezie kapilarnej. Użyto jej do rozdzielania związków aminowych. Zarówno mostek alifatyczny, jak i pierścień chromoforowy, może być podstawiony na różne sposoby. Rodzaj, liczba i położenie podstawników decydują o powinowactwie ryfamycyn do izomerów optycznych, podczas gdy układ chromoforowy i mostek ansa pozostają bez zmian. Ryfamycyna B posiada dziewięć centrów chiralnych, cztery grupy wodorotlenowe, jedną cząsteczkę kwasu karboksylowego, trzy podwójne wiązania, jedną grupę karboksymetylową i jedno wiązanie amidowe. Wiadomo, że grupy funkcyjne tego typu zdolne są zapewnić wielorakie oddziaływania niezbędne do rozpoznawania chiralnego. Ryfamycyna B jest podwójnie dysocjującym kwasem. Jej  $pK_a$  wynosi odpowiednio 2.8 i 6.7, co przy wartości pH towarzyszącej przeważnie oznaczeniom nadaje jej ładunek ujemny i powoduje elektrostatyczne przyciąganie z kationowymi analitami, będąc tym samym ważnym czynnikiem chiralnego rozpoznawania. Ryfamycyna SV różni się od ryfamycyny B tylko wolną grupą wodorotlenową w pozycji C<sub>9</sub>. Oba te związki są spośród ansamycyn najczęściej stosowane jako selektory chiralne. Ryfamycyna B jest użyteczna w separacji hydrofilowych związków aminowych [68], zwłaszcza jednopierścieniowych [69], i uzupełnia w ten sposób zakres stosowania glikopeptydów, które dobrze radzą sobie z anionami. Spośród związków o charakterze kationowym wchodzących w interakcję z ryfamycyną B można wymienić leki zwężające naczynia, wazodylatory, leki przeciwartymiczne i  $\beta$ -blokery. Armstrong i inni badali wpływ stężenia buforu, stężenia ryfamycyny B, siły jonowej i rodzaju modyfikatora organicznego na zachowanie tych leków [100]. Ryfamycyna SV rozpoznaje z kolei cząsteczki anionowe i obojętne [68] zawierające w swojej strukturze dwa pierścienie aromatyczne [69], dopełniając w ten sposób ryfamycynę B. Interesujące jest, że mała zmiana w budowie polegająca na usunięciu grupy karboksylowej zmienia profil analityczny ryfamycyny SV. Selektor



ten reaguje z takimi związkami, jak kwas dansyloaspartamowy, heksobarbital czy glutetimid.

Ansamycyny, jako że zawierają chromoforowy układ naftohydrochinonu, silnie absorbują promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu światła widzialnego i nadfioletu. W przypadku ryfamycyny B (i SV) maksima na widmie występują przy długości fali 220, 304 i 425 nm, a minima w okolicach 275 i 350 nm. Ponadto ansamycyny stosowane są w chiralnej separacji w dużych stężeniach (20-25 mM), co w powiązaniu z silną absorbancją uniemożliwia bezpośrednio monitorowanie rozdzielania. Pośrednia detekcja opiera się na redukcji absorbancji silnego sygnału tła. Przy stężeniach powyżej 30 mM następuje niedopuszczalnie niski stosunek sygnału do szumu. Ward i współpracownicy zwrócili uwagę na fakt, że pomiar przy minimum absorbancji (275 nm) może złągodzić niekorzystnie wysokie pochłanianie tła, co znacznie podnosi czułość [68]. Co ciekawe, nie zaobserwowano właściwości enancjoselektywnych, jeżeli wcześniej nie dodano do roztworu z antybiotykiem modyfikatora organicznego. Ansamycyny przejawiają takie właściwości przy stężeniach modyfikatora w zakresie stężeń 10-40%. Wyjaśnieniem może być fakt, że ryfamycyny B i SV mają w roztworach wodnych właściwości agregacyjne prawie tak dobre jak teikoplanina (tworząca micelle). Dodatek rozpuszczalnika organicznego zmniejsza wzajemne oddziaływanie cząsteczek ryfamycyn i poprawia separację chiralną. Najlepszym modyfikatorem dla ansamycyn okazał się izopropanol (natomiast dla teikoplaniny acetonitryl).

### ***Glikopeptydy***

Glikopeptydy wydają się być najlepszymi, spośród antybiotyków makrocyclicznych, selektorami chiralnymi poznanymi do tej pory. Ta właściwość wynika z szybkiej kinetyki procesu separacji (duża liczba półek teoretycznych), a ponadto z ograniczonej dyfuzji kompleksu gość-gospodarz (duży ciężar cząsteczkowy glikopeptydów i dwukrotnie większy dimerów) [70]. Do tej klasy zaliczamy awoparacynę, rystocetynę A, teikoplaninę, wankomycynę i kilka jej pochodnych. Glikopeptydy zawierają w swojej cząsteczce aglikon otrzymany ze scalenia kilku pierścieni makrocyclicznych tworzących charakterystyczny „kosz” i z przyłączonej do „kosza” części cukrowej. Aglikonowy kosz składa się z trzech lub czterech skondensowanych pierścieni makrocyclicznych, złożonych z kolei z aminokwasów i różnie podstawionych fenoli. Część cukrową natomiast stanowią mono-, di- lub polisacharydy. Mają one możliwość swobodnej rotacji, dzięki czemu mogą się różnie orientować względem otoczenia. Pozwala to na otoczenie cząsteczki rozdzielanego związku i zamknięcie jej w koszu [68]. O kształcie kosza decyduje także kąt helikalnego skręcenia. Co prawda nie zależy on od rozmiaru cząsteczki, jednak wankomycyna, która posiada najmniejszy pierścień makrocycliczny spośród glikopeptydów, ma największą jego wartość [69].

Większość związków odpowiada wymiarom wolnej wnęki w cząsteczce glikopeptydu, stąd ich przewaga nad innymi antybiotykami makrocyklicznymi. Ponadto, gdy jeden spośród glikopeptydów powoduje tylko częściowe rozdzielanie, jest wielce prawdopodobne, że użycie innego glikopeptydu poprawi skuteczność. Tak dużą liczbę racematów można oznaczać z użyciem glikopeptydów z kilku powodów:

1. Glikopeptydy mają charakter amfoteryczny dzięki temu, że posiadają zdolne do dysocjacji grupy kwasowe i zasadowe.
2. W ich strukturze można rozróżnić wiele ugrupowań zdolnych do rozpoznawania izomerów optycznych.
3. Antybiotyki te zawierają zarówno grupy hydrofilowe, jak i hydrofobowe - dlatego wykazują dobrą rozpuszczalność i są stabilne w szerokim zakresie stosowanych zazwyczaj w elektroforezie kapilarnej roztworów buforowych.

Wszystkie antybiotyki należące do tej klasy zawierają w swojej cząsteczce kilka zdolnych do jonizacji grup odpowiedzialnych za wypadkowy ładunek glikopeptydów i za selektywne oddziaływanie z rozdzielanymi enancjomerami. Stopień jonizacji i ładunek zależy od pH buforu. Rystocetyna A, wankomycyna i awoparacyna mają zbliżone punkty izoelektryczne wynoszące odpowiednio 7.5, 7.2, 7.5. Przy pH poniżej wartości 7.5 są one naładowane dodatnio. Odmienne właściwości ma teikoplanina. Antybiotyki glikopeptydowe wykazują największą selektywność wobec ujemnie naładowanych, najczęściej kwasowych grup takich jak grupa karboksylowa, fosforanowa czy sulfonowa. Gasper i inni wykazali, że największy wpływ na rozróżnianie cząsteczki przez glikopeptydy mają grupy w pozycji  $\alpha$ ,  $\beta$  lub  $\gamma$  od centrum chiralnego. Jest to najbardziej widoczne w przypadku grupy karboksylowej, pierścienia aromatycznego i grupy amidowej [101]. Najlepszą selektywność wobec kwasów zaobserwowano przy pH nieco poniżej punktu izoelektrycznego antybiotyku. Ma on wtedy zjonizowaną grupę aminową, a pH nie jest na tyle niskie, aby kwas asocjował. Glikopeptydy mogą być stosowane w elektroforezie kapilarnej jako dodatek do roztworu buforowego przeważnie w ilości 1-5 mM, zarówno w kolumnach powlekanych, jak i niepowlekanych [68].

Glikopeptydy silnie pochłaniają promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie nadfioletu. W roztworach kwaśnych najwyższa absorpcja przypada na długość fali 250 nm z charakterystycznym minimum w okolicach 260 nm. W przeciwieństwie do ansamycyn dobrą separację można uzyskać już przy niewielkich ilościach (1-5 mM) dodanych do buforu. Jest to jeszcze jedna zaleta glikopeptydów [68].

### *Elektroforeza kapilarna*

Rozdzielenie dwóch enancjomerów może być przeprowadzone metodą elektroforezy kapilarnej z użyciem chiralnego środowiska. Selektor chiralny, który jest bądź rozpuszczony w buforze, bądź związany chemicznie ze ścianką kapilary lub immobilizowany w żelu, tworzy z analitem labilne diastereoizomery, które migrują w kierunku detektora z różnymi szybkościami, zależnymi od stałych trwałości kompleksu [69]. Mechanizm enancjoseparacji jest więc „chromatograficzny”, podczas gdy mechanizm migracji „elektroforetyczny” [102]. W porównaniu z innymi powszechnie używanymi w separacji stereoselektywnej metodami analitycznymi, elektroforeza łączy w sobie kilka cennych zalet - wysoką sprawność (liczba pól teoretycznych sięga 100 000, a nawet 200 000 [102]), wydajność rozdzielania, dużą moc elucyjną, pełną lub częściową automatyzację, szybkość oznaczenia i niskie koszty. Te ostatnie związane są z małymi objętościami buforu i analitu potrzebnymi do oznaczania [69]. Ważną cechą elektroforezy kapilarnej jest też jej komplementarność z innymi metodami analitycznymi. Podczas gdy techniki chromatograficzne stosowane są głównie do rozdzielania związków niepolarnych, elektroforeza skuteczna jest w separacji jonów i związków polarnych [96]. Ponadto enancjoselektywność może być łatwo regulowana przez stosowanie zarówno zwykłych, jak i powlekaných lub wiązanych chemicznie kapilar oraz modyfikację takich parametrów jak: rodzaj i stężenie antybiotyku, pH, siła jonowa, a także rodzaj i stężenie elektrolitu, czy modyfikatora organicznego i wiele innych [69].

Spośród glikopeptydów najczęściej stosowanym w elektroforezie kapilarnej antybiotykiem jest wankomycyna [68,69,101,103-108,115,116]. Wankomycyna została wprowadzona do elektroforezy kapilarnej jako selektor chiralny przez Armstronga i innych [100]. Zastosował on wankomycynę do rozdzielania ponad 100 racematów, włączając w to niesteroidowe leki przeciwzapalne, leki przeciwnowotworowe, pestycydy i wiele N-podstawionych aminokwasów. Vespalec i współpracownicy użyli tego antybiotyku do separacji zawierających siarkę i selen aminokwasów podstawionych 6-aminochinolono-N-hydroksy-bursztynimidylkarbaminianami (AQC) [109,110] Wan i Blomberg ocenili wankomycynę jako selektor chiralny w separacji innych pochodnych aminokwasów. Doszli do wniosku, że wysokie stężenia tego antybiotyku dają optymalną rozdzielczość, ale najlepsza wydajność występuje przy niskich stężeniach [111]. Było to zgodne z wcześniejszymi badaniami Armstronga i Rundletta, które wykazały, że wysokie stężenia (2-5 mM) wankomycyny powodowały jej adsorpcję na ściankach kapilar obniżając sprawność i wydłużając czasy migracji [112]. Używając wankomycyny Wan i Blomberg analizowali kilka di- i tripeptydów podstawionych 9-fluorometylochloromrówczanami (Fmoc) [113].

Podczas stosowania zwykłych kapilar zanotowano pewne niedogodności, związane z adsorpcją antybiotyków na ściankach i brakiem czułości pomiarów w niższym paśmie promieniowania UV stosowanym przeważnie w elektroforezie

kapilarnej (< 254 nm). Najsilniej spośród glikopeptydów zjawisku adsorpcji ulega wankomycyna, najmniej teikoplanina, co można wytłumaczyć jej hydrofobowym charakterem, obecnością tylko jednej grupy aminowej i tworzeniem miceli oraz agregatów. Rystocetyna A mimo podobnych do wankomycyny właściwości fizykochemicznych, ma większą cząsteczkę, co redukuje powinowactwo do ścianek kapilar. Konsekwencją adsorpcji są następujące efekty: obniżenie czułości, rozszerzenie pików, mała wydajność oraz drastyczny spadek przepływu elektroosmotycznego (EOF) i związane z tym wydłużenie czasów migracji. W celu zminimalizowania lub wyeliminowania adsorpcji cząsteczek antybiotyku w przypadku zwykłych kapilar stosuje się przemywanie przez długi czas wodą lub buforem bez antybiotyku. Innym sposobem zmniejszenia oddziaływania pomiędzy glikopeptydami a ściankami kapilar jest zwiększenie stężenia buforu, zwiększenie przyłożonego napięcia lub dodatek modyfikatora organicznego np. 2-propanolu [69]. Wan i Blomberg zaproponowali ustalenie wartości pH możliwie jak najbliżej punktu izoelektrycznego wankomycyny, wiadomo jednak, że podwyższenie pH buforu wpływa niekorzystnie na stabilność antybiotyków [111]. Kolejnym podejściem do problemu adsorpcji jest użycie powlekaných kapilar, jakkolwiek stwierdzono, że produkty rozpadu wankomycyny mogą reagować z powlekanymi kapilarami i wówczas konieczne jest przemywanie kapilary pomiędzy oznaczeniami w celu przywrócenia sprawności kapilary. Alternatywą dla powyższych rozwiązań jest elektroforeza przeciwwądowa. Tę metodę realizuje się poprzez użycie buforu o wartości pH, przy której analit i selektor są przeciwnie naładowane, dzięki czemu migrują w przeciwnych kierunkach. Modyfikacją tej metody jest technika częściowego wypełnienia, w której bufor z selektorem wypełnia tylko część kapilary, pozostawiając okienko detekcyjne wolne. Po przyłożeniu napięcia antybiotyk przesuwa się w kierunku katody lub anody (w zależności od ładunku), nie przecinając obszaru detekcji co pozwala na oznaczenie analitu z większą czułością. Modyfikacja ta wprowadzona została przez Valtchevą i innych [114]. Technikę tę, z zastosowaniem wankomycyny jako selektora chiralnego, użyto z powodzeniem do separacji i analizy leków oraz zanieczyszczeń środowiska. Uzyskano dużą powtarzalność, liniowość i odtwarzalność wyników. Z użyciem wankomycyny w stężeniach ułamka mili-mola udało się również rozdzielić siarkowe i selenowe aminokwasy podstawione AQC w układzie o odwróconej polarności, a także niektóre dansylowe pochodne aminokwasów [68]. Podobna metoda, tyle że z całkowitym wypełnieniem kapilary i z zatrzymaniem przepływu elektroosmotycznego przedstawiona została przez Warda i współpracowników [115]. Inną ciekawą alternatywą dla metody przeciwwądowej może być sprzężenie elektroforezy kapilarnej ze spektrometrią masową. Pokazano to na przykładzie oznaczania niesteroidowych leków przeciwwądalnych w moczu. Selektorem chiralnym była wankomycyna [69]. Fanali i inni posłużyli się metodą CE-ESI-MS do rozdzielania pochodnych kwasu arylopropionowego [116]. Stregę i współpracownicy zastosowali analog wankomycyny A82846B jako selektor chiralny do rozdzielania anionowych związków

z użyciem powlekanych i niepowlekanych kapilar ze stopionej krzemionki [117]. Analog okazał się lepszy od wankomycyny w rozdzielaniu flurbiprofenu, dansylolaliny i dansylotryptofanu. Wankomycyna i A82846B różnią się tym, że ich aminocukry są epimerami, a także tym, że analog zawiera dodatkowo resztę epiwankozaminy. Skutkiem tego A82846B ma charakter bardziej zasadowy i punkt izoelektryczny przy wartości pH ok. 9, co pociąga za sobą większy wypadkowy ładunek w porównaniu z wankomycyną przy tym samym pH. Z kolei pochodną A82846B powstałą przez dodanie do disacharydu reszty bifenylowej jest LY30599. Znalazła ona także zastosowanie w enancjoseparacji flurbiprofenu [68]. Wielu badaczy starało się wyjaśnić mechanizm chiralnego rozpoznawania. Punkt ciężkości z modelu statycznego teorii oddziaływania trzech punktów przesuwa się w stronę modelu dynamicznego, uwzględniając nie tylko przestrzenne uporządkowanie trzech punktów, ale również wpływ achiralnych składników środowiska. W swojej pracy Nair i inni starali się znaleźć miejsce wiązania odpowiedzialne za enancjoselektywność wankomycyny, badając zarówno strukturę krystalograficzną, jak i zdolność rozdzielczą kompleksu miedź – wankomycyna [118]. Tym miejscem okazała się II-rzędowa amina N-metyloleucyny, odgrywająca główną rolę w enancjorozpoznawaniu wankomycyny w roztworach wodnych. W istocie atomy miedzi, po przyłączeniu do II-rzędowej aminy wankomycyny, silnie redukują selektywność chiralną kompleksu i obniżają drastycznie rozdzielczość względem analizowanych enancjomerów (o charakterze kwasów).

### ***Chromatografia cieczowa***

Antybiotyki makrocykliczne stosowane jako stacjonarne fazy chiralne (CSP) od momentu ich wprowadzenia do chromatografii cieczowej cieszą się dużą popularnością. Najczęściej korzysta się z wankomycyny, rystocetyny A, teikoplaniny, awoparacyny, ryfamycyny B i polipeptydu tiostreptonu. Częstotki antybiotyków są kowalencyjnie związane z krzemionką przy pomocy łańcuchów o różnym charakterze chemicznym, które zapewniają im stabilność przy niezmiennych zdolnościach do rozpoznawania enancjomerów. Glikopeptydy i tiostrepton przyłączane są przez reakcję z zawierającymi grupy karboksylowe związkami krzemoorganicznymi, natomiast ryfamycyna B poprzez reakcję z aminami związków krzemoorganiczych. Inną reakcją pozwalającą związać glikopeptydy na żelu krzemionkowym jest reakcja z zawierającymi krzem epoksyzwiązkami. Analogicznie do cyklodekstryn, mogą być także immobilizowane przez działanie na nie zawierającymi krzem izocyjanianami w bezwodnym dimetyloformamidzie (DMF). Otrzymane w ten sposób CSP mogą być stosowane w układzie faz normalnych, odwróconych i polarnoorganicznym lub też mogą być dalej upochadniane. CSP z antybiotykami makrocyklicznymi muszą spełniać określone kryteria. Oprócz kryterium selektywności, powinny wykazywać dobrą wytrzymałość mechaniczną przy wypełnianiu lub immobilizowaniu i powinny

być dostępne w odpowiednich ilościach za rozsądną cenę. Fazy te są podobne do CSP na bazie białek lecz mają od nich większą chłonność i są stabilniejsze. Enancjoseparacja jest możliwa dzięki wiązaniom  $\pi$ - $\pi$ , kompleksowaniu, wiązaniom wodorowym, hydrofobowej inkluzji, oddziaływaniom sterycznym, oddziaływaniom dipoli, a także kombinacji powyższych. W przeciwieństwie do CSP bazujących na białkach makrocycliczne CSP można używać w układzie faz normalnych bez drastycznych zmian w enancjoselektywności i bez niebezpieczeństwa denaturacji. Mogą być także użyte w celach preparatywnych. Wankomycyna, ryfamycyna B i tiostrepton były pierwszymi w HPLC związanymi na fazach stałych antybiotykami makrocyclicznymi [1]. Spośród tych trzech, dotychczas tylko wankomycyna znalazła szersze zastosowanie. Dostępne w handlu kolumny z chiralnymi fazami stacjonarnymi bazują na razie na antybiotykach glikopeptydowych: Chirobiotic V na wankomycynie, Chirobiotic T na teikoplaninie i Chirobiotic R na rystocetynie A. Odpowiednia wersja dla awoparacyny powinna być niedługo dostępna na rynku. Ponad 70 chiralnych związków zostało przebadanych przez Armstronga i współpracowników [1], w przybliżeniu 95% spośród 45 związków udało się rozdzielić przy pomocy wankomycyny w układzie faz odwróconych, a 84% z 31 związków w układzie faz normalnych. Wankomycyna była także upochodniana 3,5-dimetylofenyloizocyjanianem (DMP) i w tej postaci stosowana w CSP. Tak zmodyfikowana wankomycyna rozpoznawała związki, których wcześniej nie udało jej się rozdzielić np. hydroksyzynę i altiazyd.

### ***Chromatografia gazowa***

Chromatografia gazowa ma ograniczone zastosowanie w rozdzielaniu mieszanin enancjomerów. Ze względu na duże ilości chiralnego selektora jakich trzeba byłoby użyć w celu modyfikacji fazy ruchomej, a także z powodu ich małej lotności selektory wiązane są wyłącznie z fazą stacjonarną. Z praktycznego punktu widzenia technika chromatografii gazowej może być stosowana jedynie do separacji izomerów optycznych narkotyków wziewnych [102].

### ***Chromatografia cienkowarstwowa***

Wankomycyna była także użyta jako chiralny dodatek do fazy ruchomej w chromatografii cienkowarstwowej (TLC) stosowanej do rozdzielania aminokwasów podstawionych AQC, racematów leków i dansylowych pochodnych aminokwasów. Autorzy wykazali, że natura fazy stacjonarnej i skład fazy ruchomej znacznie wpływają na rozdzielczość. Difenylowa faza stacjonarna z modyfikatorem organicznym odznaczała się najwydajniejszą separacją i krótkim czasem rozwijania [68]. W innym badaniu faza ruchoma składała się z wanko-

mycyny, 0.6 M chlorku sodu (który miał stabilizować wiązania na płytce) lub, dla niektórych substancji, z octanu trietyloamonowego (pH = 4.1) oraz acetonitrylu. Rozdzielano racematy różnych związków, między innymi dansyloaminokwasów, w przypadku których zaobserwowano, że D-enancjomery zawsze osiągały wyższe wartości współczynnika  $R_F$  w porównaniu z L-enancjomerami. Ponadto stwierdzono, że na efektywność chromatografii cienkowsarstwowej w separacji enancjomerów wpłynęła enancjoselektywność wankomycyny jako dodatku do fazy ruchomej oraz otrzymanie relatywnie małej wielkości plamki podczas rozwijania chromatogramu [119]. Bushan i Parshad rozdzielali dansylowe pochodne aminokwasów metodą TLC stosując eytromycynę jako chiralny modyfikator fazy stacjonarnej [120].

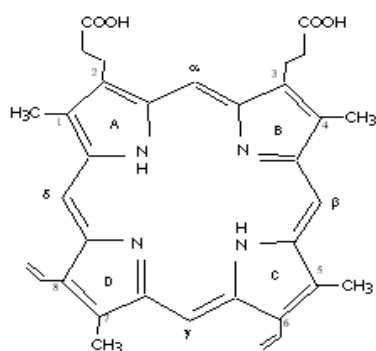
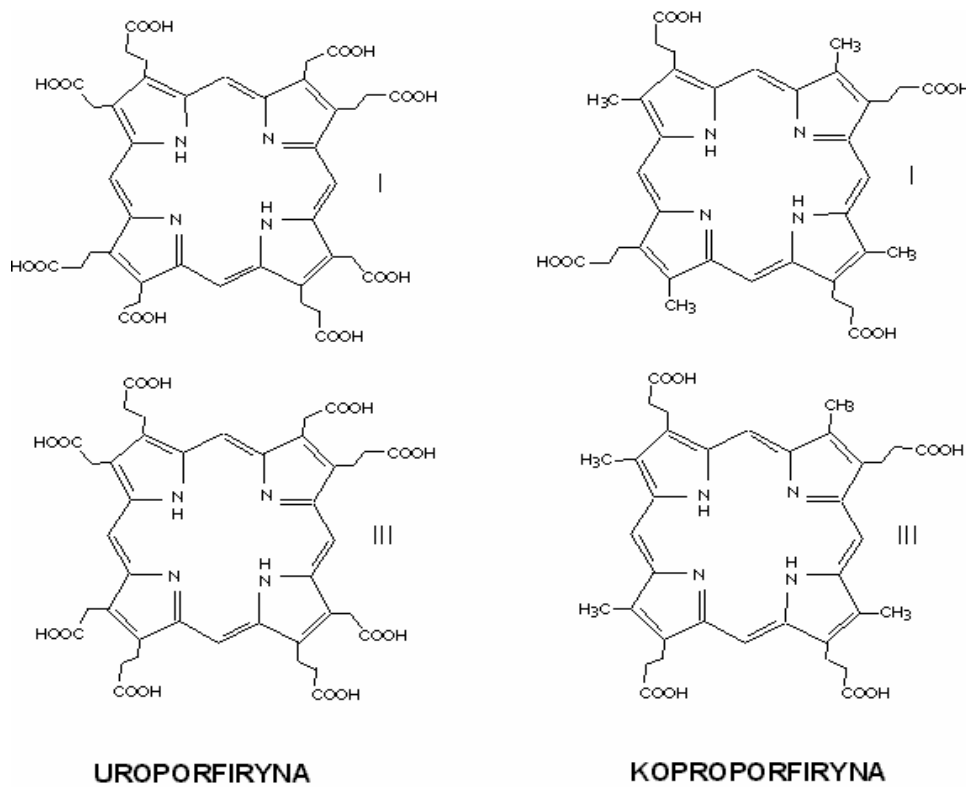
### 1.5. Badania własne

Metodą chromatografii cienkowsarstwowej zbadano właściwości chromatograficzne antybiotyków makrocyklicznych z grupy makrolidów (erytromycyna, troleandomycyna, tylozyna), ansamycyn (ryfamycyna B, ryfampicyna) oraz glikopeptydów (wankomycyna). Jako fazy ruchome zastosowano czyste rozpuszczalniki oraz ich mieszaniny binarne z wodą, NaCl, HMDSO i DMSO. Doświadczenia prowadzone były na płytkach pokrytych poliamidem, celulozą, różnego rodzaju żelem krzemionkowym oraz n-oktadecysilanem. Wyniki opublikowano w [467,468,472,477-479].

## 2. PORFIRYNY

Porfiryny są klasą naturalnie występujących, makrocyclicznych związków, które odgrywają bardzo ważną rolę w metabolizmie żywych organizmów [121]. Cząsteczka porfiryny zawiera cztery pierścienie pirolowe połączone mostkami metylowymi. Jądro porfiryny jest tetraedrycznym ligandem, w którym miejsce dostępne dla metalu koordynującego ma maksymalną średnicę około 3.7 Å [122]. Układ pierścienia porfiryny jest bardzo stabilny i wykazuje charakter aromatyczny (ryc. 5). Porfiryny posiadają właściwości kompleksowego wiązania jonów metali z atomami azotu występujących w poszczególnych pierścieniach pirolowych. Najważniejszy dla człowieka i organizmów zwierzęcych jest hem (kompleks protoporfiryn z dwuwartościowym żelazem), stanowiący grupę prostetyczną dla hemoprotein będących centrum wszystkich przemian tlenowych w hepatocytach – hemoglobiny, mioglobiny, cytochromów, cytoooksydazy, katalazy, peroksydazy oraz pirolazy tryptofanu. Fujii przeprowadził syntezę porfiryny z żelazem (IV) [123]. U bezkręgowców występuje erytrokroruyna pełniąca podobną rolę jak hemoglobina i będąca także białkiem żelazoporfirynowym [124]. Występują również połączenia kompleksowe porfiryn z dwuwartościowym magnezem, w wyniku czego powstaje chlorofil - barwnik roślinny biorący udział w fotosyntezie [125]. Połączenie porfiryn z dwuwartościowym kobaltem pośredniczy w syntezie witaminy B<sub>12</sub>. Związki te uwrażliwiają na światło – szczególnie skórę [126-129], co czyni je klinicznie odpowiedzialnymi za zjawisko zwane „fotosensibilitas” [130]. Poddanie porfiryn wpływowi światła prowadzi do powstania nadtlenu wodoru i nadtlenków lipidów, które niszczą błony komórkowe, powstają również wolne rodniki uszkadzające błony lizosomalne. Działanie fotodynamiczne mają głównie: uroporfiryna, porfiryna 7-karboksylowa i protoporfiryna. Kompleksy porfiryny z przejściowymi jonami metalu są bardzo trwałe. Większość metali tworzy kompleksy w stosunku 1:1, chociaż sód, potas i lit tworzą kompleksy 2:1 [122,131]. Kompleksy metaloporfiryn odgrywają ważną rolę w biologicznych czynnościach, co dotyczy przykładowo kompleksu żelaza w hemoproteinach, kompleksów magnezu w chlorofilu i kompleksu kobaltu w witaminie B<sub>12</sub>. Kompleksy wielu metali z różnymi porfirynami zaczęły być obszernie studiowane w celu zrozumienia biologicznej czynności i formowania naturalnych związków oraz zasadniczych procesów biologicznych.



**PROTOPORFIRYNA**

Ryc. 5. Budowa chemiczna badanych porfiryn.  
 Fig. 5. The chemical structures of investigated porphyrins.

Takie kompleksy znalazły rozmaite zastosowanie jako modele transportu elektronów, transportu tlenu i enzymów [132,133]. Metaloporfiryny występują jako mieszaniny związków organicznych w bardzo starych skałach, nie oczyszczonych olejach, węglu i skałach osadowych. W morskich osadach tworzone są przez modyfikację chlorofilu obecnego w organizmach fototroficznych. Pochodne porfiryn grają kluczową rolę w istotnych procesach biologicznych takich jak: fotosynteza, transport ditlenków i magazynowanie [122,134]. Z punktu widzenia koordynacji chemicznej, ligand porfiryn okazał się być bardzo uniwersalny, a prawie wszystkie metale mogą łączyć się z porfirynami. Związki te są aktywnym miejscem w wielu enzymach (cytochromach, katalazie, peroksydazie itp.). Dobrze znane kompleksy porfiryn z żelazem są nośnikiem tlenowym białek (hemoglobiny, mioglobiny). Z materiału biologicznego izolowane są wyłącznie izomery I i III, natomiast izomery II i IV są nadal słabo poznane [135].

Porfiryny tworzą charakterystyczne widma pod wpływem światła widzialnego, jak i nadfioletu. Na uwagę zasługuje fakt, że następuje silne pochłanianie w paśmie ok. 400 nm, charakterystyczne dla pierścienia porfirynowego niezależnie od łańcuchów bocznych porfiryn. Pasma to określane jest mianem **pasma Soreta** od nazwiska jego odkrywcy. Porfiryny tworzą się z porfirynogenów, które są nietrwałe w obecności tlenu i łatwo utleniają się do odpowiednich porfiryn. Porfirynogeny są bezbarwne i posiadają mostki metylenowe (-CH<sub>2</sub>-), natomiast barwne porfiryny zawierają mostki metinowe (-HC=) powodujące absorpcję i fluorescencję porfiryn. Porfiryny rozpuszczone w rozpuszczalnikach organicznych lub w mocnych kwasach i naświetlone UV fluoryzują silnie na czerwono. Pierścienie pirolowe oznaczone literami A, B, C, D są połączone między sobą mostkami metinowymi określanymi kolejno jako  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Miejsca podstawień łańcuchów bocznych w pierścieniach pirolowych oznaczane są cyframi od 1 do 8 (ryc. 5). W naturalnie występujących porfirynach grupy: winylowa (-CH=CH<sub>2</sub>), metylowa (-CH<sub>3</sub>), propionianowa (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>COO-), octanowa (-CH<sub>2</sub>COO-) - są typowymi podstawnikami [136].

Prawidłowa przemiana porfiryn rozpoczyna się od dwóch prostych związków – glicyny oraz bursztynylo-koenzymu A. Enzymem regulującym szybkość tej przemiany w wątrobie jest syntetaza kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego [137]. W układzie erytropoetycznym mechanizm regulacji jest inny, ale nie w pełni jeszcze poznany. U zdrowych osób wydalanie porfiryn i ich prekursorów jest niewielkie, a normy tego wydalania są określone [138]. Do zaburzenia przemiany hemu dochodzi, gdy co najmniej jeden z enzymów ma obniżoną aktywność. Powstaje blok enzymatyczny, przed którym gromadzą się produkty przemiany. Niektóre błędy w przemianie pirolowej powodują pojawienie się w moczu koproporfiryny i uroporfiryny, natomiast w kale koproporfiryny i protoporfiryny. Porfirie są grupą chorób metabolicznych, w których pierwotnym błędem jest niedobór przynajmniej jednego enzymu uczestniczącego w biosyntezie hemu, odmiennego dla każdego typu porfirii. Zależnie od miejsca bloku enzymatyczne-

go różny jest skład ilościowy porfiryn wytwarzanych, gromadzonych i wydalanych z organizmu. Rozpoznanie porfirii i jej różnicowanie opiera się na wynikach oznaczeń aktywności enzymów biosyntezy hemu oraz analizie ilościowej i identyfikacji porfiryn w krwinkach czerwonych, osoczu, moczu i kale. Nazewnictwo i klasyfikacja porfirii nie jest w pełni ujednoczona [139]. Porfirie mogą być klasyfikowane w oparciu o:

- I.** etiologię (wrodzone i objawowe),
- II.** kryteria kliniczne:
  - a** - ostre lub przewlekłe,
  - b** - jawne lub utajone,
  - c** - skórne, z objawami neurologicznymi lub brzuszными,
- III.** lokalizację nieprawidłowości enzymatycznej,
- IV.** miejsce niedoboru enzymu w kaskadzie biosyntezy hemu [140].

Podział porfirii dokonany według miejsca, w którym zaburzenie ujawnia się najmocniej, obejmuje porfirie wątrobowe i porfirie erytropoetyczne. Klinicznie wygodniej dzielić porfirie na ostre i nieostre. Każda z tych grup ma inne problemy diagnostyczne i lecznicze [141]. Porfirie - przed kilkudziesięciu laty rzadko spotykana - obecnie ujawnia się coraz częściej, prawdopodobnie na skutek działania niekorzystnych warunków środowiskowych, zanieczyszczeń powietrza, chemizacji życia. Badanie produktów przemiany porfiryn ma znaczenie diagnostyczne w rozmaitych wrodzonych i nabytych stanach chorobowych, w których dochodzi do częściowego bloku enzymatycznego na drodze biosyntezy hemu. Zaburzenia przemiany porfiryn mogą również występować w przebiegu innych schorzeń. Najczęstszym typem zaburzeń nie związanych z porfirią jest koproporfirinuria wtórna charakteryzująca się dużą zawartością koproporfiryn w moczu. Od dawna wiadomo, że występuje w zatruciu ołowiem i alkoholowym zapaleniu wątroby [142]. Koproporfirinurię opisano ponadto w licznych przypadkach innych chorób np. w anemii hemolitycznej, ziarnicy złośliwej, cukrzycy, niewydolności nerek oraz jako skutek działania różnych substancji toksycznych, związanych z czynnikami środowiskowymi, narażeniem zawodowym oraz przypadkowymi zatruciami [143]. Do związków chemicznych najsilniej zaburzających przemianę porfiryn należą m. in. dioksyna, chlorek winylu, heksachlorobenzen, difenole, węglowodory aromatyczne. Jakościowe i ilościowe oznaczanie porfiryn znalazło zastosowanie w biologicznych i biomedycznych naukach np. w diagnozie metabolicznych nieprawidłowości lub oszacowaniu wpływu środowiska [144]. Do wystąpienia objawów u nosicieli błędów metabolicznych dochodzi po zadziałaniu czynników zwanych porfiryngennymi. Zazwyczaj działają indukująco równocześnie dwa czynniki. Przyjmuje się, że do zachorowania na porfirie dochodzi u około 10-20% nosicieli defektywnego genu i że odsetek ten zwiększa się wraz ze wzrostem zanieczyszczeń środowiska i chemizacji życia [141]. Do czynników indukujących należą związki chemiczne, a wśród nich wiele leków, farby, lakiery, rozpuszczalniki organiczne, środki ochrony roślin,

alkohol, a także zaburzenia hormonalne, infekcje, stresy, niedobory kaloryczne - znane są przypadki zgonów młodych dziewcząt odchudzających się, a będących nosicielkami porfirii [138]. Powstałe niedowłady sprzyjają występowaniu powikłań oddechowych, krążeniowych, infekcyjnych. Na skutek takich powikłań w czasie pełno objawowych napadów umiera około 10% chorych. Zasadniczym postępowaniem w ostrych porfiriach jest zapobieganie napadom. Służą temu badania członków rodzin chorych mające na celu wykrycie defektu enzymatycznego i wdrożenie odpowiedniego postępowania [145].

W ostatnich latach porfiryny znalazły szerokie zastosowanie w chemii analitycznej, przede wszystkim jako wskaźnik w oznaczaniu metodami spektrofotometrycznymi jonów metali: jonów miedzi [134,146-153], kadmu [154], cynku [153,155-158], palladu [159], magnezu [160], bizmutu [161], srebra [162,163], niklu [164], litu [165,166], rtęci, ołowiu i kadmu [167], ołowiu [168,169], azotynów [170,171], nadtlenku wodoru [172-174], szczawianów [175], rodanków [176], tlenu [177-179] oraz w badaniu odczynu pH [153,180,181]. Elektroanalityczne stosowanie porfiryn można podzielić na trzy grupy - po pierwsze potencjometryczne metody oparte na użyciu porfiryn mogą służyć do oznaczania anionów nieorganicznych w wodzie [182,183], chlorków w surowicy ludzkiej [184], azotanów i fluorków [185], jodków [186,187], rodanków w moczu [183], salicylanów w moczu i surowicy [188], jonów niklu w czekoladzie [189], jonów kobaltu [190]. Po drugie porfiryny szeroko stosuje się w badaniach różnych związków metodami voltametrycznymi - między innymi oznaczano chlorki organiczne w wodzie [191], cukry [192], tlen [193-195], hydrazynę [196], fenole [197], tlenek azotu [198-203], tlenek azotu i azotany [204], azotyny i siarczyny [205], azotany i azotyny [206], azotany i siarczyny [207], jony niklu [208-210], jony miedzi i metali ciężkich [211], acetoaminofen w paracetamolu [212], alkohole [213], DNA [214-216], dopaminę [217,218]. Po trzecie porfiryny używano jako elektrochemiczne biosensory w badaniu glukozy [219,220], acetylocholinesterazy [221], aktywności enzymów [222]. Porfiryny stosowano również w oznaczaniu niektórych jonów metali metodą HPLC: jonów niklu miedzi i cynku [223,224], jonów kobaltu [225,226], manganu [227], lantanowców [228]. Wielu badaczy immobilizowało porfiryny na żelu krzemionkowym, co z kolei miało decydujące znaczenie w analizie różnych związków między innymi policyklicznych węglowodorów aromatycznych [229-232], fulerenów [233-235], aminokwasów [236-238], di- i triterpenów [239]. Kim i inni z powodzeniem zastosowali porfiryne chemicznie związane z żywicą XAD w celu zwiększenia wydajności ekstrakcji do fazy stałej fenolu i chlorofenoli [240].

Fotoaktywne właściwości porfiryn szeroko wykorzystano w produkcji ogniw słonecznych [241-247]. Ogniwa słoneczne są ważne w pozyskiwaniu energii, natomiast czynniki fotouczulające są nowością rynkową i wydają się być obiecujące w przetwarzaniu energii słonecznej. Porfiryny zajmują czołową pozycję w fotodynamicznej terapii nowotworowej (PDT), która polega na selektywnej

akumulacji czynnika fotouczulającego (np. porfiryn, psoralenów, ftalocyjanin, merocyjanin) wewnątrz tkanki rakowej. W wyniku naświetlania chorej tkanki dochodzi do uwolnienia pojedynczego tlenu, który uszkadza komórki nowotworowe i w końcowym efekcie prowadzi do śmierci tych komórek [248-253]. Stosowano hematoporfirynę w selektywnym leczeniu nowotworów [254].

Od niedawna wiadomo, że porfiryny tworzą kompleksy z cyklodekstrynami. Coraz więcej badaczy zajmuje się syntezą takich kompleksów [255-267] oraz analizą supramolekularnych oddziaływań kompleksu porfiryna-cyklodekstryna [268-272]. Zdolność porfiryn do tworzenia kompleksów z cyklodekstrynami daje szerokie możliwości stosowania ich w analizie DNA [273-280], w badaniu struktury DNA [281,282], porfiryny stosowane były również jako czynniki pośredniczące w procesie fragmentacji DNA [283-285]. Kompleks porfiryna-cyklodekstryna stosowano ponadto w badaniach aktywności enzymów [286] oraz w oznaczaniu jonów rtęci (wysoce selektywna metoda) [287,288]. Swamy i współpracownicy prowadzili badania nad kompleksem estradiol-porfiryna [289]. W przypadku leczenia raka piersi kompleks taki łączy się jądrowym receptorem estrogenowym. Sessler i inni opisali możliwość inhibicji wirusa HIV-1 przez porfiryny [290].

Uroporfiryny w odróżnieniu od koproporfiryny rozpuszczają się w eterze etylowym, co zostało wykorzystane do wyizolowania po raz pierwszy uroporfiryny z moczu przez Fischera, który zidentyfikował ten związek jako porfirynę należącą do izomerów I typu [291]. W 1934 roku Waldenström wyizolował z moczu chorych na ostrą porfirię substancję nazwaną później porfiryką Waldenströma, która długi czas uchodziła za uroporfirynę III [292]. Porfiryka ta izolowana była octanem etylu przy pH 3.0-3.4. Według Girsteina i współpracowników [293] oraz Watsona i współpracowników [294] porfiryka Waldenströma nie była substancją jednorodną. Składała się z przeważającej ilości uroporfiryny I oraz heptakarboksylowej porfiryny III. Nicholas i Rimington [295] doszli w wyniku swych badań do wniosku, że jest to mieszanina składająca się w 75% z uroporfiryny III i w 25% z uroporfiryny I. Za pomocą późniejszych dokładnych badań w roku 1955 Watson i współpracownicy [296] potwierdzili swój poprzedni pogląd, że w kompleksie Waldenströma przeważa uroporfiryna I. Wykazali oni, że mieszanina 80% uroporfiryny I oraz 20% heptakarboksylowej porfiryny zachowuje się chromatograficznie jak czysta uroporfiryna III.

## 2.1. Metody oznaczania porfiryn

Technika chromatografii cienkowarstwowej (TLC) została wykorzystana w separacji oraz badaniach i ilościowych porfiryn w materiale biologicznym (mocz, kał, tkanki) [297-303]. Jak wynika z danych literaturowych szeroko stosowaną metodą separacji, określania poziomu w materiale biologicznym oraz badania właściwości chromatograficznych porfiryn w ostatnich latach jest chromatografia cieczowa [304,305]. Używano dwa typy detektorów. Detektora UV używano przy długości fali 400-404 nm w analizie ilościowej pochodnych metylowych porfiryn [306-315]. Najbardziej rozpowszechnionym jest detektor fluorescencyjny z uwagi na znaczne skrócenie czasu analizy oraz większą czułość [304,316-331]. Jacob i inni wykorzystali w analizie porfiryn chromatografię cieczową z parami jonowymi [332]. Stosowano ponadto metody: LC-MS [333-337], LC-MS-MS [338], GC-IRMS [339], spektrofluorometryczne [340], second-derivative spectroscopy [341], LDI-TOF MS [342], FAB-MS [343]. Najnowszą techniką jest elektroforeza mikrokapilarna [310,344-348]. Szybka separacja, obniżone zużycie próbek i rozpuszczalnika czynią ją efektywną i atrakcyjną techniką dla separacji porfiryn.

## 2.2. Badania własne

Analizowano zachowanie chromatograficzne wybranych porfiryn (uroporfiryna I i III, koproporfiryna I i III, protoporfiryna) metodą TLC. Stosowano niewodne fazy ruchome – czyste rozpuszczalniki oraz ich mieszaniny binarne z DMSO. Jako adsorbenty wykorzystano żel krzemionkowy, poliamid oraz celulozę. Ponadto badano wpływ pH roztworów buforowych oraz rodzaju buforu na parametry widma badanych porfiryn. Wyniki opublikowano w [475,476,484].

### 3. KWASY - ROZMARYNOWY I WALERENOWY

Od wieków zioła odgrywają ważną rolę w codziennym życiu człowieka. Stosowano je w gospodarstwie domowym, w kosmetyce, były także głównym źródłem leków. Błyskawiczny rozwój chemii, a przede wszystkim produkcja różnego rodzaju syntetyków spowodował, iż zioła znalazły się na drugim planie. Chemia zmieniła świat, ale także zaczęła go niszczyć. Stąd ponowne zainteresowanie ziołami i coraz głośniejsze nawoływania do powrotu do natury. Przez wiele lat leki naturalne, przede wszystkim zaś rośliny lecznicze, były główną, a nawet jedyną bronią w ręku lekarza oraz jedynym surowcem *materia medica* do wyrobu leków. Podobnie lecznictwo ludowe i fitofarmacja nie przestały nigdy korzystać z ziół, a nawet starały się podtrzymać tradycję terapeutyczną znaną od zarania ewolucji człowieka. Z biegiem lat można było obserwować zwiększenie się liczby poznanych roślin leczniczych. Odkrycie właściwości nowych gatunków ziół przywożonych zza oceanów i zastosowanie ich jako środka współdziałającego z preparatami chemicznymi, odkrycie wartości dietetycznej roślin oraz witamin, hormonów, substancji antybakteryjnych, antywirusowych i innych, przyczyniły się do odrodzenia i rozwoju fitoterapii [349]. Obecnie przemysł farmaceutyczny ponownie zaczyna się interesować zasobami naturalnymi i roślinami leczniczymi. Zakładane są duże plantacje zarówno doświadczałne, jak i handlowe. Uprawa roślin leczniczych staje się znów ważną dziedziną rolniczą, gdyż uzyskuje się z nich i produkuje surowce niezbędne do wyrobu leków. Jak zatem widać, nigdy nie przestano całkowicie interesować się roślinami leczniczymi, a najważniejsze jest to, że obecnie sami pacjenci starają się zdobyć więcej wiadomości o zastosowaniu roślin w leczeniu różnych chorób. Należy jednak pamiętać, że nie zawsze i nie w każdej chorobie użycie leków naturalnych jest właściwe [350].

Wiek XX, szczególnie po otrzymaniu przez Domagka w roku 1935 sulfonamidów, jest wiekiem leku syntetycznego. W połowie lat trzydziestych wprowadzono w krótkim czasie wiele leków syntetycznych działających silnie, szybko i skutecznie. Od tej pory lekarze praktykujący zaczęli domagać się leków o ściśle określonym wzorze chemicznym, mechanizmie działania i dawkowaniu. Leki roślinne tamtej doby, przy ówczesnej technologii ich wytwarzania i tradycyjnej postaci nie wytrzymały konkurencji z lekami syntetycznymi. Dopiero w połowie lat pięćdziesiątych, kiedy to coraz częściej stwierdzano, że leki syntetyczne mają wiele wad wyrażających się licznymi objawami niepożądanymi, a szczególnie depresyjnym wpływem na układ krwiotwórczy, działaniem hepatotoksycznym, neurotoksycznym, sporadycznie i teratogennym następowała powolna zmiana i zwrot ku lekom naturalnym, ziołowym przede wszystkim [351]. Rozkwit fitoterapii nastąpił dzięki rozwojowi fitochemii, farmakognozji, fitoanalizy, immunologii i farmakodynamiki. Należy jednak zaznaczyć, że leki roślinne nie mogą

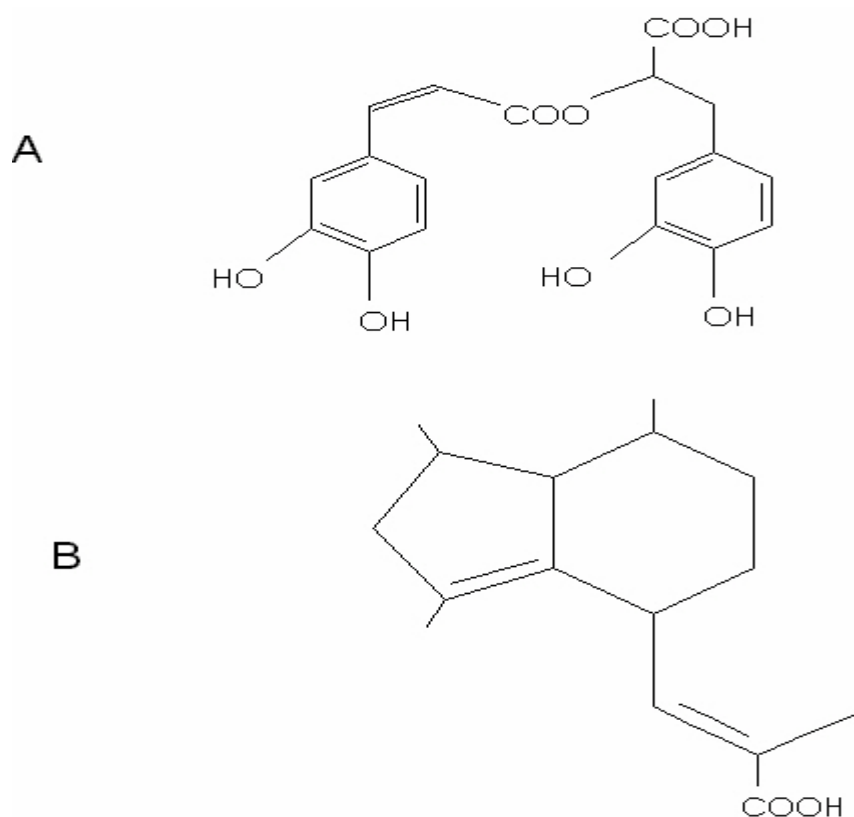
być przeciwstawiane lekom syntetycznym, ale powinny być stosowane łącznie, wzajemnie się uzupełniając. Zgodnie z artykułem 1 Dyrektywy Rady EEC (*European Economic Community*) nr 65/65 przetwory roślinne są traktowane jako środki lecznicze. Ujęcie to zostało potwierdzone przez CPMP (*Commission for Proprietary Medicinal Products*) w roku 1992. Odmienne regulacje prawne w poszczególnych krajach zostały ujednoczone, a zmiany uznano również za obowiązujące poza Unią Europejską [352]. Obecny kierunek rozwoju ziołolecznictwa jest stosowanie pojedynczych związków czynnych wyizolowanych z roślin, zidentyfikowanych i oczyszczonych, mających ściśle sprecyzowane właściwości farmakologiczne, punkt uchwytu, mechanizm działania, charakteryzujących się w większości stosunkowo małą toksycznością i nielicznymi działaniami niepożądanymi. Należy również zaznaczyć, że pod pojęciem leków roślinnych rozumie się środki lecznicze, których składniki stanowi wyłącznie materiał roślinny np. surowce pocięte lub sproszkowane, wydzieliny roślin (olejki, balsamy, żywice), soki lub wyciągi, głównie alkoholowe. Środkami leczniczymi nie są natomiast przetwory homeopatyczne, a także zdefiniowane składniki roślinne jak np. mentol, eugenol, tymol, czyste alkaloidy, glikozydy oraz antybiotyki naturalne. Pojęcie leku roślinnego jest przyjęte na płaszczyźnie międzynarodowej i zgodne z postanowieniami WHO [353]. Nowoczesna technologia stosowana przy produkcji leku roślinnego umożliwia standaryzację preparatów, produkcję innych formułacji farmaceutycznych takich jak drażetki, czopki, iniekcje z precyzyjnie określoną dawką wyizolowanej substancji czynnej [351]. Dostępność wiarygodnych metod analitycznych jest niezbędna dla kontroli jakościowej i identyfikacji substancji aktywnych.

### **Kwas rozmarynowy**

Kwas rozmarynowy należy do grupy związków zwanych depsydami. Depsydy stanowią połączenia dwóch lub więcej fenolokwasów. Są rozpowszechnione wśród roślin kwiatowych i porostów. Kwas rozmarynowy jest depsydem kwasu kawowego i kwasu  $\alpha$ -hydroksydihydrokawowego (ryc. 6) [11]. Związek ten zaliczany jest obecnie do kawotanoidów, grupy związków pokrewnych garbnikom, nie wykazujących jednak zdolności garbowania skóry surowej. W 1958 roku dwaj włoscy chemicy (Scarpati i Oriente) wyizolowali po raz pierwszy kwas rozmarynowy jako czysty związek i nazwali stosownie do rośliny, z której go wyodrębnili (*Rosmarinus officinalis*) [354]. Badania biogenetyczne rozpoczęto w roku 1970, kiedy to Ellis i Towers zasilali rośliny z rodzaju *Mentha* radioaktywnie znakowanymi aminokwasami [355]. Okazało się, że dwa aminokwasy aromatyczne – fenyloalanina i tyrozyna – wchodzi w skład struktury kwasu rozmarynowego. Najbardziej znaną pochodną kwasu rozmarynowego jest kwas litospermowy (łączący w swojej strukturze kwas rozmarynowy i kawowy) oraz kwas litospermowy B (dimer kwasu rozmarynowego) [356,357]. Długotrwałe



poszukiwania metody syntezy kwasu rozmarynowego zostały zwieńczone sukcesem w roku 1991 [358].



Ryc. 6. Budowa chemiczna kwasu rozmarynowego (A) i walerenowego (B).  
Fig. 6. The chemical structures of rosmarinic acid (A) and valerenic acid (B).

Współczesne badania wykazały obecność wolnego kwasu rozmarynowego w ponad stu gatunkach roślin w ilościach od 0.01 mg do 78 mg w 1 g surowca, głównie jednak w rodzinie *Lamiaceae* (*Labiatae*) [359]. Opisano również występowanie kwasu rozmarynowego w roślinach z innych rodzin np. w paprociach z rodziny *Blechnaceae*, w porostach oraz trawach morskich z rodziny *Zosteraceae*, w spokrewnionych *Potamogetonaceae*, jak również w *Cannaceae* [354]. Tak szeroka dystrybucja kwasu rozmarynowego powoduje niemożność stosowania tego kwasu jako wyznacznika chemotaksonomicznego, różnicującego poszczególne rodziny.

Rozpatrując szczegółowo, występowanie kwasu rozmarynowego stwierdzono w następujących taksonach:

- *Lamiaceae* w rodzajach *Agastache*, *Coleus*, *Dracocephalum*, *Esholtzia*, *Glechoma*, *Hyptis*, *Hyssopus*, *Lavandula*, *Majorana*, *Melisa*, *Mentha*, *Monarda*, *Nepeta*, *Ocimum*, *Origanum*, *Orthosiphon*, *Perilla*, *Prunella*, *Rabdosia*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*.
- *Apiaceae* w rodzaju *Sanicula*.
- *Boraginaceae* w rodzajach *Anchusa*, *Lithospermum*, *Symphytum*.
- *Plantaginaceae* w rodzaju *Plantago*.
- *Sterculiaceae* w rodzaju *Helicteres*.

Wśród wymienionych taksonów relatywnie wysoką koncentrację tego składnika posiada jedynie kilka powszechnie stosowanych w lecznictwie surowców roślinnych, jak melisa lekarska, szalwia lekarska, lebidka pospolita oraz rozmaryn lekarski [11,359].

W świecie roślinnym kwas rozmarynowy występuje w formie wolnej, estryfikowanej, glikozydowej oraz w formie połączeń o charakterze oligomerów. W wyniku szerokiej gamy właściwości farmakologicznych zioła zawierające w swoim składzie kwas rozmarynowy znalazły zastosowanie w leczeniu i zapobieganiu wielu chorób. Jako substancja naturalnie występująca, kwas rozmarynowy charakteryzuje się dużym potencjałem terapeutycznym wobec organizmów zwierzęcych, potwierdzonym w oparciu o badania przeprowadzone zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Stabilizuje on błony biologiczne [360], chroni przed szkodliwym wpływem promieniowania UV i reaktywnych form tlenu, w tym także wolnych rodników, działa przeciwutleniająco [361-369] przeciwzapalnie, antyproliferacyjnie [370], przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo [371,372], przeciwhormonalnie i najprawdopodobniej sedatywnie na centralny system nerwowy. Posiada ponadto nieznaczne właściwości przeciwalergiczne, a pochodne estrowe właściwości żółciotwórcze i żółciopędne. Biorąc pod uwagę powyższe właściwości Perry i inni zastosował ekstrakt z szalwii w leczeniu choroby Alzheimera [373-378]. Ponadto opisano jego działanie moczopędne oraz zwiększające wydalanie sodu oraz kwasu moczowego z moczem [379].

Wobec enzymów kwas rozmarynowy wykazuje cechy niespecyficznego inhibitora. W przeprowadzonych testach związek ten obniżał w różnym stopniu aktywność: cyklooksygenazy 1 i 2, lipooksygenazy, hialuronidazy,  $\beta$ -heksozaminidazy, dekarboksylazy ornitynowej, reduktazy aldozowej,  $\alpha$ -amylazy, karboksypeptydazy A, cyklazy adenylowej oraz dejodynazy jodotyroniny [359,380]. Cechuje go aktywność immunomodulująca. Pobudza produkcję prostaglandyny  $E_2$  oraz obniża syntezę leukotrienów  $B_4$  w ludzkich leukocytach różnokształtno-jądrowych. Na układ dopełniacza, spełniającego istotną rolę w odczynie zapalnym, działa hamująco. Obserwowany pod jego wpływem efekt antytrombinowy powstaje przypuszczalnie w drodze zapobiegania agregacji płytek krwi lub

ewentualnej promocji procesu fibrynolizy. Wywiera dodatkowo działanie ochronne na lipoproteiny osocza, w tym na frakcję LDL, głównego inicjatora procesu aterogenezy. W połączeniu z innymi związkami naturalnymi jak rutyna, kwas ursolowy czy likopen wykazuje cechy synergistyczne. U podłoża aktywności przeciwzapalnej kwasu rozmarynowego leży szereg uzupełniających się mechanizmów biologicznych, których suma dostarcza efekty porównywalne z siłą działania stosowanych od lat syntetycznych niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Nie odnotowano jednak wpływu na konwertazę C<sub>3</sub>. Obserwowany efekt przeciwzapalny jest wynikiem niespecyficznego hamowania enzymów biosyntezy prostanoidów – cyklooksygenaz i lipooksygenazy oraz enzymów uczestniczących w degradacji kwasu hialuronowego – hialuronidazy i β-hekso-zaminidazy. W wyniku przytoczonych właściwości związek ten zmniejsza przepuszczalność naczyń kapilarnych zapobiegając wnikaniu toksyn i drobnoustrojów. Obniża także poziom syntezy mediatorów stanu zapalnego (prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanu), znosząc ich wpływ na zakończenia czuciowe oraz zapobiega agregacji trombocytów. Powyższe obserwacje jak i wyniki przeprowadzonych dodatkowo licznych badań farmakologicznych sugerują możliwość zastosowania kwasu rozmarynowego lub dostarczających go surowców w profilaktyce i terapii pomocniczej stanów chorobowych przebiegających z odczynem zapalnym, m.in. w astmie oskrzelowej, wrzodach trawiennych, miażdżycy tętnic, chorobie niedokrwiennej serca i zaćmie [359,381].

Podobnie do innych związków fenolowych, kwas rozmarynowy wykazuje również właściwości przeciwdrobnoustrojowe (dezynfekujące). Aktywność wirusostatyczna skierowana przeciwko wirusom opryszczki typu 1 (HSV-1), a także wirusom ludzkiego niedoboru immunologicznego (HIV-1) powstaje w wyniku oddziaływania kwasu ze strukturami białkowymi zarówno czynnika zakaźnego jak i gospodarza, co w konsekwencji utrudnia adsorbcję wirusa na powierzchni komórek lub też upośledza jego namnażanie. Jako niespecyficzny inhibitor enzymatyczny, kwas rozmarynowy obniża *in vitro* aktywność kluczowych enzymów replikacji HIV, odwrotnej transkryptazy i integrazy, zapobiegając tym samym syntezie nici komplementarnego wirusowego DNA na matrycy RNA oraz jego połączeniu z chromosomem gospodarza. Preparaty zawierające w swoim składzie wyciągi z melisy lekarskiej znalazły zastosowanie m.in. w leczeniu opryszczki czerwieni wargowej (maść *Meliherp*) [359,382].

W medycynie nieoficynalnej od dawna znane są właściwości przeciwhormonalne surowców posiadających w zespole substancji aktywnych kwas rozmarynowy. Współcześnie we wspomagającej terapii zespołu Gravesa zalecane bywają: ziele karbieńca pospolitego (*Lycopi herba*), liście melisy lekarskiej (*Melissae folium*) oraz ziele nawrotu lekarskiego (*Lithospermi herba*). Przyczyną choroby jest wytwarzanie immunoglobulin klasy IgG, które pobudzając receptory tyreotropinowe (TSI) prowadzą do powiększenia tarczycy oraz nadmiernej niekontrolowanej biosyntezy trijodotyroniny (T<sub>3</sub>) i tyroksyny (T<sub>4</sub>). Prekursorem

hormonów tarczycy  $T_4$  i  $T_3$  jest duże białko tyreoglobulina, zawierające w swojej cząsteczce ok. 70% jodu w postaci nieaktywnych prekursorów monojodotyrozyny (MIT) i diiodotyrozyny (DIT). Jod uwolniony z nieaktywnych aminokwasów, dzięki aktywności enzymu dejodynazy, stanowi ważną pulę tego pierwiastka w obrębie tarczycy. Kwas rozmarynowy hamuje aktywność dejodynazy jodotyroniny i w konsekwencji enzymatyczne odszczepienie jodu od MIT i DIT [383, 384].

Kolejne badania ujawniły, iż ten powszechnie występujący w rodzinie *Lamiaceae* składnik jest przypuszczalnie również odpowiedzialny za uspokajające działanie niektórych surowców. W pojedynczej dawce 30 mg/kg m.c. kwas rozmarynowy osłabiał aktywność spontaniczną zwierząt doświadczalnych oraz aktywność stymulowaną amfetaminą. Nie zmieniał jednak właściwości układu dopaminowego. Nie odnotowano także pod jego wpływem działania przeciwlękowego i przeciwdrgawkowego, a mechanizm aktywności sedatywnej najprawdopodobniej związany jest z funkcjonowaniem układu adrenergicznego [359, 384].

Istotne znaczenie dla cech farmakologicznych kwasu rozmarynowego ma jego struktura polifenolowa (cztery wolne grupy wodorotlenowe pozostające względem siebie w pozycji *orto*) oraz obecność podwójnego wiązania w łańcuchu węglowym (ryc. 6). Wieloletnie badania przeprowadzane w grupie analogicznych związków naturalnych ujawniły, iż *orto*-dihydroksyle charakteryzuje aktywność przeciwutleniająca i przeciwwolnorodnikowa wynikająca ze zdolności oksydacyjno-redukcyjnych (donor protonów) oraz kompleksowania jonów metali (głównie żelaza i miedzi) uczestniczących w reakcji Fentona, tj. konwersji anionorodnika ponadtlenkowego w odpowiedzialny za efekty cytotoksyczne reaktywny rodnik wodorotlenkowy. Kwas rozmarynowy, podobnie jak kwas askorbowy, nie posiada zdolności hamowania oksydazy ksantynowej, enzymu katalizującego rozkład puryn z pobocznym wytworzeniem nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego [384]. Jednak wobec przemian anionorodnika ponadtlenkowego wykazuje aktywność znacznie wyższą w porównaniu z witaminą C. Aktywność ta jest rezultatem nałożenia się efektów obu budujących strukturę kwasu rozmarynowego cząstek – kwasów kawowego i dihydroksyfenylomlekowego. Zdolność inaktywowania wolnych rodników oraz znoszenia skutków ich toksycznego wpływu na struktury kwasów nukleinowych, białek, lipidów i kwasów tłuszczowych, także w obrębie błon biologicznych, stanowi naturalny czynnik prewencji procesów kancerogenezy i karcynogenezy. Polifenole roślinne zmniejszają przypuszczalnie ryzyko wystąpienia incydentów nowotworu w drodze blokowania metabolizmu prokarcynogenów prowadzącego do ich uaktywnienia lub zapobiegają łączeniu się już aktywnych karcynogenów z materiałem genetycznym. Potwierdzenie tej tezy znajdujemy w pracach prowadzonych na wyciągach polarnych z liści rozmarynu lekarskiego, które to hamowały etap inicjacji procesu powstawania nowotworu w badaniach *in vitro* na liniach komórkowych nabłonka oskrzelowego indukowanych

liniach komórkowych nabłonka oskrzelowego indukowanych benzo[a]pirenem oraz *in vivo* mysiego guza sutka wywołanego 7,12-dimetylo-benzo[a]antracemem [359,380]. Należy również nadmienić, że związki polifenolowe o analogicznej do kwasu rozmarynowego budowie są silnymi inhibitorami absorpcji żelaza w organizmie. Fakt ten powinien być brany pod uwagę w równoczesnej terapii preparatami żelaza [359].

Reasumując, przytoczone właściwości biologiczne kwasu rozmarynowego oraz wielopokoleniowe doświadczenia medycyny nieoficynalnej z roślinami z rodziny *Lamiaceae* pozwalają wysunąć wniosek, że wprowadzenie ich do codziennej diety może mieć pewne znaczenie w profilaktyce miażdżycy, niektórych schorzeń o podłożu zapalnym oraz w prewencji chorób nowotworowych. Przedstawione powyżej dane wskazują ponadto, iż gatunki te są nie tylko źródłem olejków eterycznych, szeroko opisanych w piśmiennictwie, lecz także związków polifenolowych z kwasem rozmarynowym na czele. Przemysł farmaceutyczny oferuje mnogość preparatów zawierających w swoim składzie omawiane surowce roślinne. Wymienić tu należy powszechnie stosowane herbaty ziołowe na bazie liści mięty pieprzowej (*Menthae fix*), melisy lekarskiej (*Melissae fix*) oraz różnego rodzaju mieszanki ziołowe: *Pulmobonisan* (liście mięty pieprzowej, ziele tymianku), *Nervinum* (liście melisy i mięty pieprzowej), *Nervosan* (ziele melisy i mięty pieprzowej), *Nervobonisan* (liście melisy), *Cardiobonisan* (liście melisy), *Septosan* (liście melisy, mięty pieprzowej, ziele tymianku) i wiele innych. Ponadto są one komponentami leków złożonych, takich jak: krople miętowe, *Melisal*, *Melis-Tonic*, *Melissana*, *Persen*, *Pectosol*, *Sirupus Thymi compositus*, *Tymsal*, *Tussispect*, *Dentosept*, *Salviasept*, *Ung. Salviae* czy *Lycoactin*. Jednak żaden z krajowych preparatów o kompozycji opartej o te surowce nie podlega standaryzacji na obecność kwasu rozmarynowego lub ogólnej sumy polifenoli w przeliczeniu na kwas kawowy, pomimo tak wysokiej ich zawartości. W konsekwencji, brak norm określających minimalny, dopuszczający do obrotu w lecznictwie, poziom kwasu rozmarynowego może być przyczyną różnic w efekcie terapeutycznym leków produkowanych na bazie tego samego surowca przez różnych producentów, a nawet nierównocенności preparatów tej samej wytwórni pochodzących natomiast z kolejnych zbiorów lub od innych dostawców. Należy zatem zadbać aby surowce i preparaty uzyskane z gatunków należących do rodziny *Lamiaceae*, obok olejku eterycznego posiadały zawsze odpowiedni zasób tych cennych składników leczniczych [359].

### **Kwas walerenowy**

Kwas walerenowy (ryc. 6) należy do izoprenoidów. Izoprenoidy jest to duża grupa naturalnych związków, których podstawowym prekursorem przemian jest „aktywny izopren” tj. izopentenylfosforan lub jego izomer dimetyloallilodifosforan. Główną reakcją biochemicznych przemian aktywnego izoprenu jest

polimeryzacja jego pięciowęglowych jednostek, w wyniku tej pierwotnej reakcji powstają związki o liczbie atomów węgla podzielnej przez pięć. Grupa izoprenoidów jest szersza niż grupa terpenów, gdyż na skutek reakcji wtórnych, oksydacji, cyklizacji, odszczepiania niektórych, powstają jeszcze inne cząsteczki, w których liczba atomów węgla nie jest podzielna przez pięć, np. steroidy [11]. Kwas walerenowy jest związkiem o piętnastu atomach węgla, czyli należy do grupy seskwiterpenów. Występuje w ilości 0.1–0.3% w korzeniach kozłka lekarskiego *Valeriana officinalis* z rodziny Kozłkowatych (*Valerianaceae*). Jest to gatunek wielopostaciowy, występujący w Europie, Ameryce Północnej i Azji na miejscach wilgotnych, rzadko jednak tworzący większe skupienia. W obrębie tego dużego gatunku zbiorowego istnieją podgatunki różniące się morfologicznie, zwłaszcza kształtem liści, kariologicznie (kariotypy), a także zawartością składników, głównie występujących w olejku lotnym. Jest ogólnie znanym faktem, że zawartość i skład związków aktywnych w ziołach w dużym stopniu zależy od wielu czynników takich jak: genotyp, klimat, zbiór oraz proces przygotowywania. Np. korzenie *V. wallichii* różnego pochodzenia mogą zawierać olejki eteryczne w granicach 0.09 do 1.30% (v/w) [385]. Opisano geograficzne różnice w składzie olejków eterycznych w trzech populacjach *V. officinalis* [386]. W czasach nam współczesnych *V. officinalis* jest nadal obecna w wielu farmakopeach - m. in. niemieckiej, szwajcarskiej, brytyjskiej, francuskiej, japońskiej, chińskiej, europejskiej. Ponad 200 innych gatunków *Valeriana* występuje na całym świecie - *V. wallichii* w Indiach, *V. edulis* w Meksyku, *V. officinalis* var. *latifolia* w Japonii i Chinach - również stosowane w medycynie ludowej [387]. Dwie główne grupy - mono- i seskwiterpeny - są uważane za substancje aktywne. Do seskwiterpenów należą hydrofilowe kwasy walerenowe oraz hydrofobowe walepotriaty. Farmakopea europejska wymaga wykrywania obecności zarówno walepotriatów, jak i kwasu walerenowego.

Surowcem farmakopealnym są narządy podziemne kozłka lekarskiego [11]. Występujący w Polsce dziko gatunek kozłka jest określany jako *Valeriana officinalis* var. *latifolia* Vahl. (*Valeriana exaltata* Mik.) oraz var. *tenuifolia* Vahl. (*Valeriana angustifolia* Tausch.) [11]. Korzeń kozłka lekarskiego jest surowcem olejkowym. Olejek eteryczny zawarty w ilości 0.5–2.0% oprócz kwasu walerenowego, zawiera również terpeny m. in.  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -felandren, seskwiterpeny: kariofilen,  $\gamma$ -kadinen, azulenogenne pochodne gwajanu: kessan, kessoglikol, estry borneolu, m.in. z kwasem izowalerianowym (zapach!), mrówkowym, octowym, estry eugenolu, waleranon, walerenal i związki pokrewne – ogółem kilkadziesiąt składników, przy czym skład jakościowy i ilościowy jest uzależniony od pochodzenia surowca i technologii otrzymywania olejku. W korzeniu kozłka jest ponadto zawarty bardzo nietrwały glikozydowy ester irydoidowy – walerozydat oraz ostatnio wykryte chlorowcopochodne walepotriatów, a także ich hydryny [11]. Trzy najważniejsze gatunki stosowane jako leki ziołowe (o działaniu łagodnie uspakajającym) to *Valeriana officinalis* L. s.l., *Valeriana wallichii* DC i *Valeriana edulis*. Stosowanie ekstraktu z korzeni oraz kłączy

kozłka w celu uspokojenia oraz złagodzenia problemów ze snaniem datuje się od XVIII wieku [389], natomiast nie znano wówczas składu preparatów sporządzanych z tej rośliny. W ciągu ostatnich 120 lat, kiedy to poszukiwano aktywnych substancji w gatunku *Valeriana*, wiele związków izolowano i identyfikowano, ale jak dotąd nie do końca wyjaśniono sposób ich działania [390,391]. Najszerszej poznanymi związkami są epoksyirydoidy zwane walepotriatami, ich produkty rozkładu – baldrynale oraz nietolne terpenoidy (pochodne kwasu walerenowego). Fernández i inni [392] poddali w wątpliwość znaczenie tych związków w wyjaśnianiu mechanizmu działania ekstraktu z kozłka. Zauważyli, że: (a) depresyjne działanie walepotriatów, waleranonu oraz olejku eterycznego na centralny układ nerwowy nie udowodniono na podstawie reakcji redukcji glukozy w cyklu metabolicznym w mózgu szczura [393]; (b) siła uspokajająca tych związków jest dosyć niska (> 30 mg/kg dla myszy); (c) walepotriaty ulegają szybkiemu rozkładowi w obecności wody, co przyczynia się do tego, że baldrynale są reaktywne chemicznie i mogą tworzyć polimery [390], stąd oba walepotriaty i baldrynale znikają szybko z ekstraktu; (d) korzenie i kłącza różnych gatunków *Valeriana* wykazują duże różnice w składzie np. *V. officinalis* zawiera głównie kwas walerenowy i pochodne, jak również walepotriaty i inne składniki, podczas gdy *V. wallichii* i *V. edulis* nie zawiera kwasu walerenowego i jego pochodnych [391].

Obiecującą propozycją wykrywania nowych aktywnych substancji w ekstrakcie z kozłka wydaje się być poszukiwanie ligandów posiadających zdolność łączenia się z głównymi receptorami mózgowymi, przeważnie związanymi z właściwościami anksjolitycznymi, uspokajającymi i/lub poprawiającymi sen [394]. Niestety, tego rodzaju badania dają generalnie nieprzekonujące rezultaty prawdopodobnie z powodu stosowania surowych ekstraktów do analiz [395,396]. Bodesheim i Hölzl stwierdzili, że lignan (+) hydroksypinorezynol, obecny w ekstrakcie z kozłka, jest w pewnym sensie podobnym ligandem dla receptora 5-HT, ale nie zbadano tego *in vivo* [397]. Wasowski i inni w metodzie „ligand-poszukiwana pochodna” używali możliwie najczystszych ekstraktów i opisali obecność 6-metyloapigeniny w *V. wallichii* i *V. officinalis* oraz udowodnili, że jest ona ligandem wiążącym benzodiazepinę [398]. Oni również po raz pierwszy opisali 2S (-) hesperydynę w *V. wallichii* i *V. officinalis* oraz stwierdzili, że ma ona właściwości uspokajające i ułatwiające zasypianie. Z kolei 6-metyloapigenina wykazuje działanie anksjolityczne oraz wzmacnia właściwości 2S (-) hesperydyny [399]. Fernández i inni opisali po raz pierwszy zidentyfikowany flawonoid glikozydowy linarynę w *V. officinalis*, jego właściwości uspokajające i ułatwiające zasypianie myszy, a także wzmacnianie tych efektów przez równoległe stosowanie kwasu walerenowego. [392].

W źle suszonym surowcu, a także w jego przetworach, jak *Tinctura Valerianae*, *Extractum Valerianae*, walepotriaty są zawarte w bardzo małych ilościach lub nie ma ich wcale, są natomiast wyżej wymienione nieczynne produkty

rozpadu [11,400]. Surowiec od dawna jest znany jako *sedativum*. Słowo „*Valeriana*” po raz pierwszy pojawia się już w pismach z IX i X w. Jest także wymieni- niane w anglosaskich pracach z XI w. Kozłek lekarski był ceniony nie tylko za swoje właściwości lecznicze, ale także jako przyprawa i dodatek do perfum. Obecnie jest stosowany jako środek uspokajający, spazmolityczny, wiatropędny. Nadal znaczne ilości wykorzystywane są przez przemysł perfumeryjny [401]. Surowiec jest również wykorzystywany w pułapkach na gryzonia (np. szczury), gdyż wabi je swoim charakterystycznym zapachem. Liście kozłka są dodawane do kompostu ze względu na bogactwo składników mineralnych. Roślinę sadi się przy warzywach, ponieważ zwiększa ilość niezbędnego do wegetacji fosforu [402]. Odkrycie walepotriatów zmieniło ocenę wartości surowca, która dotych- czas była przeprowadzana na podstawie oznaczenia zawartości olejku. Obecnie wprowadza się w wielu farmakopeach oznaczanie zawartości tych substancji czynnych. Stwierdzono, że ich zawartość wzrasta na jesieni i nie ma związku z zawartością olejku, zależy natomiast od podgatunku lub odmiany surowca [400]. Odkąd Bounthanh i współpracownicy [403] opisali właściwości cytotox- yczne i inhibujące syntezę DNA walepotriatów, rynek wymaga produktów o wysokiej zawartości kwasu walerenowego, natomiast niskiej walepotriatów. Ich występowanie ograniczone jest do rodziny *Valerianaceae*. Wyjątek stanowi 1- $\beta$ -aceacewaltrat, który był wcześniej izolowany z *Phyllactis pulvinata* Rauh et Willer (roślina rosnąca w peruwiańskich Andach) i opisany przez Beckera w roku 1986 [404]. Rodzaj *Phyllactis* jest niekiedy włączany do *Valeriana* lub uznawany za grupę *Valeriana* [405]. Ponadto charakteryzują się szczególnymi cechami strukturalnymi nie spotykanymi w budowie innych irydoidów. Glikozy- dy irydoidowe również były izolowane z tej rodziny. Poza *Valerianaceae* wystę- pują również w rodzaju *Viburnum* i *Sambucus* (*Caprifoliaceae* sensu Cronquist, 1981) [406,407] oraz, co jest zadziwiające, w rodzaju *Penstemon* (*Scrophularia- cae*) [408]. Poza produktami izolowanymi z gatunku *Valeriana* na uwagę zasłu- guje dihydrokornina. Związek ten izolowany z polarnej frakcji, dotychczas był nie znany w rodzinie *Valerianaceae*. Różni się zdecydowanie budową od pozosta- łych glikozydów irydoidowych występujących zazwyczaj w *Valeriana*. Dihy- drokornina najpierw była izolowana z *Viburnum dentata* (*Caprifoliaceae* sensu Cronquist, 1981) [409].

Właściwości substancji czynnych zostały wyjaśnione z chwilą wykrycia wa- lepatriatów. Związki te wykazują uspokajający wpływ na ośrodkowy układ ner- wowy. Ponieważ są nietrwałe, najlepiej działają przetwory ze świeżego surowca. Oprócz walepotriatów pewną rolę w działaniu uspokajającym odgrywa olejek eteryczny i kwas walerenowy. Wskazuje na to działanie uspokajające *Tinctura Valerianeae*, która na ogół nie zawiera walepotriatów [11]. Kwas walerenowy wywiera działanie pentobarbitalopodobne na centralny układ nerwowy. Niektóre walepotriaty posiadają antydepresyjne właściwości [410]. Ekstrakt z kozłka ob- niża ciśnienie krwi, działa przeciwdrgawkowo, uspokajająco i nasennie [411]. Problemem są interakcje walepotriatów z syntetycznymi lekami uspokajającymi



[412]. Kozłek lekarski jest składnikiem licznych preparatów galenowych i mieszanek ziołowych o działaniu uspokajającym oraz należy do najczęściej stosowanych surowców roślinnych. Surowiec znalazł zastosowanie głównie w postaci wyciągów etanolowych jako łagodny środek uspokajający i spazmolityczny, w dystonii wegetatywnej, wyczerpaniu nerwowym, niepokoju psychomotorycznym, w stanach napięcia i lęku. Ze względu na nierozpuszczalność związków estrowych w wodzie, podawanie wyciągów wodnych jako *nervinum* jest nieuzasadnione. Wyciągi etanolowe wchodziły w skład m.in.: *Species cardiaca*, *Species sedativae*, *Guttae stomachicae* oraz inne [413]. Ostatnie badania *in vitro* wykazały, że walepatriaty są grupą kontrowersyjną, gdyż mogą mieć działanie cytotoksyczne, mutagenne i karcynogenne [391,410]. Opierając się na ich potencjalnej toksyczności, można je postrzegać jako niepożądane w fitoterapii [400,414]. Potwierdzenie zagrożenia ze strony walepatriatów jest obecnie trudne, ponieważ podane doustnie prawdopodobnie ulegają szybkiemu rozkładowi w przewodzie pokarmowym jeszcze przed wchłonięciem [400]. Badania receptorowe wykazały interakcję wodnych wyciągów *V. officinalis* z miejscem wiązania benzodiazepin. Obserwacja wpływu ekstraktów na stopień wiązania (3H) flunitrazepamu w pełni to potwierdziła [415].

Trudno również nie wspomnieć o oddziaływaniu wodnych wyciągów *V. officinalis* z kwasem  $\gamma$ -aminomasłowym. Polega ono na zaburzeniu poziomu tego neuroprzekaźnika. Badania prowadzono na wyizolowanej korze mózgowej szczura. Następową inhibicja wychwytu i potęgowanie uwalniania (3H)GABA w obrębie hipokampa. Wyższy poziom (3H)GABA uwolnionego wydaje się być niezależny od aktywności  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-azy}$  i potencjału błonowego. Wyniki potwierdzają, że wyciągi z kozłka lekarskiego działają na receptory GABA(A), ale mogą również powodować interakcje z innymi presynaptycznymi składnikami neuronów GABA-ergicznych [410,415-417]. Wzrost wydzielania GABA oraz hamowanie jego wychwytu jest związane z tymi samymi receptorami jak benzodiazepiny, ale w mniejszym stopniu i łagodniejszym skutkiem [396]. Opiszano też oddziaływanie ekstraktu walerianowego oraz walerianowo-chmielowego z receptorami adenozynowymi [418]. Ponadto badano również zdolność kwasu walerenowego do inhibowania aktywności katalitycznej enzymów biorących udział w syntezie DNA [419]. Hendriks i inni [420] wykazali, że kwas walerenowy wywiera niespecyficzne działanie depresyjne na centralny układ nerwowy myszy po dootrzewnowym podaniu. W dawkach powyżej 100 mg/kg masy ciała, efekt był obserwowany w czynnościach ruchowych myszy. Wyższe dawki okazały się toksyczne. Spontaniczna aktywność ruchowa myszy była redukowana przez kwas walerenowy w dawce 50 mg/kg. Ci sami badacze wykonali również test polegający na przedłużaniu snu indukowanego barbituratem. Z kolei Hiller i Zetler [421] stwierdzili, że czysty kwas walerenowy – antagonistą pikrotoksyny – indukuje konwulsje u myszy w dawce 12.5 oraz 25 mg/kg.

Chociaż nie dokonano jeszcze całkowitej oceny bezpieczeństwa stosowania preparatów z *V. officinalis*, nie zanotowano bardziej niepokojących przypadków działań niepożądanych. Dostępność analitycznych metod jest niezbędna do kontroli jakościowej i identyfikacji profilu chemicznego różnych podgatunków i odmian kozłka oraz przy produkcji przemysłowej i standaryzacji preparatów. Pozwolą one również wykluczyć ewentualnie szkodliwe działanie mutagenne poszczególnych związków, dlatego niezbędne jest opracowanie metod separacji. Działania uboczne ekstraktu z kozłka to przede wszystkim ból głowy, kociokwik, pobudzenie paradoksalne, niepokój oraz zaburzenia sercowe. Przedawkowanie wywołuje bezład, hipotermię, obniżenie czucia, halucynacje oraz zwiększa zwiotczenie mięśni [422]. Ekstrakt z kozłka może potencjalnie wywierać efekt podobny do barbituratów, benzodiazepin, opiatów i alkoholu [421,423]. Przedłuża również sen indukowany przez tiopental i pentobarbital [3]. Pacjenci nie powinni prowadzić pojazdów oraz obsługiwać jakichkolwiek urządzeń po zażyciu preparatów z kozłka. Ekstraktu z kozłka nie powinno stosować się w ciąży. Dawka wynosi 450 mg przed snem [410].

### 3.1. Metody oznaczania kwasu walerenowego i rozmarynowego

Aby kontrola zawartości kwasu walerenowego i rozmarynowego w preparatach była możliwa, niezbędne jest opracowanie metody analizy jakościowej i ilościowej tych związków. Niewielka ilość doniesień naukowych w ciągu kilku ostatnich lat nie wpłynęła jednoznacznie na zamknięcie tego tematu, choć zainteresowanie kwasem walerenowym i rozmarynowym nie maleje. Wynika z tego, że wszelkie informacje dotyczące analitycznych aspektów oznaczania kwasu walerenowego i rozmarynowego mogą mieć istotne znaczenie.

Szeroko stosowaną metodą w analizie **kwasu rozmarynowego** i pochodnych jest chromatografia cieczowa. W większości prac wykorzystywano dwa rodzaje detektorów – UV [365,379,424-428] oraz DAD – [366,369,429-431]. Natomiast Dabkevicius i współpracownicy [368] do badania antyoksydantów (m. in. kwasu rozmarynowego) użyli detektora CL. Kasimu i inni oznaczali kwas rozmarynowy i jego pochodne metodą chromatografii cieczowej ze spektroskopią masową [432]. Ibanez i współpracownicy stosowali technikę ekstrakcji w stanie nadkrytycznym (SFE), a otrzymane frakcje poddane były analizie przy zastosowaniu dwóch metod: wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) oraz elektrokinetycznej chromatografii micelarnej (MEKC) [433]. Chromatografia gazowa wykorzystywana była jako metoda analityczna w celu separacji kwasu rozmarynowego i innych antyoksydantów [365,377,431] oraz kwasu rozmarynowego i jego pochodnych zawartych

w olejkach eterycznych *Melissa officinalis* [430] i *Salvia officinalis* [372]. Kilku badaczy za pomocą chromatografii cienkowarstwowej identyfikowało i separowało kwas rozmarynowy, jego pochodne oraz inne fenolokwasy [424,425, 429,434]. Andrade i współpracownicy [435] badali zawartość kwasu rozmarynowego i innych polifenoli w różnych rodzajach miodów, między innymi wrzosowym, lawendowym, akacjowym, rzepakowym, słonecznikowym, rozmarynowym, cytrynowym, rododendronowym, tymiankowym, kasztanowym. Stosując technikę elektroforezy mikrokapilarnej (CE) stwierdzili, że miód tymiankowy zawierał największą ilość kwasu rozmarynowego. Ta sama metoda analityczna posłużyła do oznaczania substancji fenolowych np. kwasu walerenowego i kawowego w ekstrakcie z *Lycopus europaeus* L. [428]. El-Mousallamy i inni wyizolowali oraz zidentyfikowali metodą EI-MS i FAB-MS dwa nowe naturalne fenole - teukrol, czyli kwas dekarboksyzromarynowy oraz jego triglikozyd, teukrozyd – z ziela ożanki z gatunku *Teucrium pilosum* (*Lamiaceae*) [436]. Ponadto wielu naukowców badało fenolokwasy i ich pochodne zarówno w surowcach roślinnych, jak i w żywności z wykorzystaniem różnych metod analitycznych [437-444]. Przy czym należy dodać, że dominowały metody z użyciem technik chromatograficznych.

Stahl i Schild [445] w roku 1969 opracowali i opublikowali pierwszą, kompletną metodę jakościową analizy **walepotriatów** (TLC) w korzeniu kozłka lekarskiego. Laufer i współpracownicy [446] stosowali udoskonaloną metodę Stahla i Schilda. Pierwsze ilościowe metody oznaczania substancji aktywnych zawartych w korzeniu kozłka lekarskiego z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej ukazały się w roku 1979 i 1981 [447-449]. W ostatnich latach metoda ta również była wykorzystywana w oznaczaniu walepotriatów [400,409]. Bos i inni opisali oznaczanie tych związków metodą GC, MS oraz CE [400]. Jak wynika z danych literaturowych, obecnie szeroko stosowaną metodą analityczną określającą zawartości **kwasu walerenowego** i pochodnych jest chromatografia cieczowa. Tittel i Wagner [450] rozdzielali oraz oznaczali ilościowo walepotriany w ekstraktach preparatów leczniczych. Bos i współpracownicy [451] analizowali kwas walerenowy, waltrat i izowaltrat w surowcu roślinnym *Valeriana officinalis* z różnych ogrodów botanicznych Europy. Bokstaller i Schmidt badali flawonoidy w *Passiflora incarnata* i seskwiterpeny w *Valeriana officinalis* [452] oraz oznaczali zawartość kwasu walerenowego, hydroksywalerenowego i acetyksywalerenowego w preparatach leczniczych [453]. W celu identyfikacji i standaryzacji naturalnych leków roślinnych zawierających kwas walerenowy i pochodne przeprowadzono szereg analiz metodą chromatografii cieczowej [454]. Kwas walerenowy i waltraty w ekstrakcie z korzenia kozłka, z użyciem tej techniki, analizowało jeszcze kilku innych badaczy [418,456,457]. Gränicher i współpracownicy zastosowali metodę chromatografii gazowej w celu określenia składu ekstraktu otrzymanego z korzenia *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia* [458]. Badano podobny surowiec na obecność kwasu walerenowego, 6-metyloapigeniny oraz 2S (-) hesperydyny techniką EI-MS [392].

### **3.2. Badania własne**

Badano retencję chromatograficzną kwasu rozmarynowego i walerenowego metodą TLC na płytkach aminowych oraz w układzie faz normalnych i odwróconych. Stosowano czyste rozpuszczalniki oraz ich mieszaniny binarne z wodą. Dokonano również oceny zależności parametru  $R_F$  obu badanych związków od pH użytych roztworów buforowych. Wyniki opublikowano w [469,470].

## CZEŚĆ ANALITYCZNA

### 4. ADSORBENTY

#### 4.1. Krótka charakterystyka stosowanych adsorbentów

##### *Celuloza (TLC Cellulose F)*

Chromatografia cienkowarstwowa na płytkach celulozowych jest rozwinięciem klasycznej chromatografii bibułowej. Separacja oparta jest głównie na chromatograficznych mechanizmach podziału, jakkolwiek nie należy wykluczać adsorpcji. Obecnie w chromatografii cienkowarstwowej stosuje się różne rodzaje celuloz odpowiednio przygotowywanych. Sproszkowana celuloza różni się w istotny sposób od bibuły chromatograficznej delikatnymi włóknami, które w przypadku bibuły są długie i zwarte. Krótkie włókna celulozy uniemożliwiają niemal natychmiastowe rozmycie plamek podczas rozwijania chromatogramu, co z kolei wpływa korzystnie na sprawność rozdzielczą i czułość wykrywania na chromatogramie. W separacji substancji o słabych właściwościach hydrofilnych stosuje się celulozę acetylowaną do chromatografii w odwróconym układzie faz z eluentami zawierającymi wodę [459]. Celuloza acetylowana jest wrażliwa na działanie niektórych rozpuszczalników, np. zawierających chlorowce, dioksanu, estrów i ketonów. Duży wpływ na proces separacji ma użyty rozpuszczalnik do sporządzania roztworu substancji badanej (na przykład występuje znaczna różnica w rozdzielaniu chromatograficznym, gdy substancja badana rozpuszczona jest w etanolu lub dimetyloformamidzie [460]). Celulozy jonowymienne w chromatografii cienkowarstwowej są używane głównie do separacji dużych cząsteczek: białek, aminokwasów, enzymów, kwasów nukleinowych, hormonów, wirusów. Przygotowywane są przez wprowadzenie do struktury celulozy grup jonogennych. Grupy te znajdują się zazwyczaj na powierzchni włókien celulozowych. Szeroko stosowana jest dietyloaminoetyloceluloza, karboksymetyloceluloza, fosforan celulozy, cytrynian celulozy oraz celulozy impregnowane na przykład polietylenoiminą, polifosforanem.

##### *Poliamid (TLC Polyamid 11F)*

Poliamid (syntetyczny polimer polikondensacyjny) jest szeroko stosowanym adsorbentem w chromatografii cienkowarstwowej oraz kolumnowej. Ważną rolę odgrywają rozpuszczalniki stosowane jako fazy ruchome. Szereg eluotropowy rozpuszczalników o wzrastającej sile elucyjnej zestawiono w następujący sposób: woda < metanol < aceton < NaOH < formamid < dimetyloformamid [465].

Istotną cechą strukturalną poliamidu jest równoległe występowanie obszarów o różnym stopniu uporządkowania. Obszarom krystalicznym o wysokim stopniu uporządkowania towarzyszą obszary amorficzne (bezpостaciowe) [461]. Obszary krystaliczne (w przeciwieństwie do amorficznych) charakteryzują się wyprostowanymi łańcuchami, leżącymi w jednej płaszczyźnie, powiązаныmi międzycząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi. Proces sorpcji polarnych związków organicznych przebiega w przestrzeniach amorficznych (bezpостaciowych) poliamidu. Rozpuszczalniki polarne (np. metanol) wnikają w głąb struktury poliamidu, szczególnie do obszarów bezpostaciowych, nadając jej półpłynną konsystencję. Do wytworzonego w ten sposób żelu mogą dyfundować cząsteczki substancji badanej. Mechanizm separacji na poliamidzie jest procesem złożonym. Polega na przemiennej sorpcji cząsteczek substancji przez żel poliamidowy oraz desorpcji do rozpuszczalnika tworzącego fazę ruchomą. Metoda chromatografii cienkowarstwowej na poliamidzie stosowana jest głównie do izolacji i identyfikacji naturalnych związków posiadających fenolowe ugrupowania (np. antocyjany, antrachinony, flawonoidy) [460].

***Żel krzemionkowy (TLC i HPTLC Kieselgel 60 F; HPTLC LiChrospher Si 60 F; TLC Kieselgel 60 W)***

Kieselgel 60

Żel krzemionkowy jest najpopularniejszym adsorbentem wykorzystywanym w analizie. Proces adsorpcji odbywa się na zasadzie chemisorpcji, wskutek obecności na powierzchni, a częściowo i wewnątrz cząstek, grup silanolowych (Si-OH) oraz grup siloksanowych (Si-O-Si) i ich wzajemnego wiązania za pomocą mostków wodorowych z cząsteczkami cieczy [462]. W stosowanych w chromatografii cienkowarstwowej szerokoporowatych żelach krzemionkowych, przy całkowicie zhydroksylowanej powierzchni, odległość między sąsiednimi powierzchniowymi grupami -OH wynosi ok. 5 Å (0.5 nm), co nie pozwala na wytworzenie mostków wodorowych między sąsiednimi grupami wodorotlenowymi. Praktycznie więc o właściwościach adsorpcyjnych decydują swobodne grupy wodorotlenowe i grupy bliźniacze, natomiast udział grup związanych i uaktywnionych jest niewielki w odróżnieniu od żeli wąskoporowatych. [463]. Żel krzemionkowy wykazuje silne powinowactwo do substancji i rozpuszczalników donorowo-akceptorowych i elektronodonorowych. Ma też wyraźne, lecz mniejsze od tlenku glinu i glinokrzemianów, powinowactwo do związków z wiązaniami  $\pi$ . Najsilniejsze oddziaływania obserwuje się między krzemionką a związkami zawierającymi grupy amidowe (-CO<sub>2</sub>NH-), karboksylowe (-COOH), sulfotlenkowe (>S=O) i aminowe (-NH<sub>2</sub>). Umiarkowanie wiązane są grupy wodorotlenowe, karbonylowe, tioeterowe, eterowe, nitrylowe, nitrowe oraz azot II- i III-rzędowy. Żel krzemionkowy spełnia wszystkie wymagania

stawiane fazom stacjonarym w chromatografii cienkowarstwowej. Nie rozpuszcza się w wodzie, kwasach i rozcieńczonych zasadach oraz w rozpuszczalnikach organicznych. Jest praktycznie obojętny chemicznie - nie wchodzi w reakcje z rozdzielanymi związkami, rzadko reaguje z używanymi w chromatografii rozpuszczalnikami [462]. Nie posiada właściwości katalitycznych. Ponadto jest odporny na ekstremalne warunki panujące podczas wywoływania (silne kwasy, żrące rozpuszczalniki), procesu aktywacji (temperatura do 200 °C - powyżej tej wartości następuje kondensacja grup wodorotlenowych z nieodwracalną utratą aktywności [463]) i rozwijania w ciśnieniowej chromatografii cienkowarstwowej. W przeciwieństwie do faz stacjonarych na bazie celulozy lub poliamidu nie pęcznieje pod wpływem wody, ma też o wiele większą pojemność sorpcyjną od tlenku glinu.

#### LiChrospher Si 60

Żel krzemionkowy o sferycznym kształcie ziaren (ściśle określonej wielkości) umożliwiającym lepsze „upakowanie” warstwy adsorbentu. To z kolei warunkuje, że faza stacjonarna LiChrospher Si 60 charakteryzuje się bardzo krótkim czasem analizy przy najwyższej sprawności separacyjnej. W porównaniu z konwencjonalnym żelem krzemionkowym ten adsorbent charakteryzuje się przede wszystkim wysoką powtarzalnością oznaczeń i odtwarzalnością wyników. Ma jednorodną, bardziej odporną na uszkodzenia mechaniczne powierzchnię, małą średnicę drobin przejawiającą się silnie rozwiniętą powierzchnią międzyfazową, a także korzystny rozkład wielkości cząstek (homogenność). Plamki substancji chromatografowanej są mniejsze, wyraźniejsze, mniej rozmyte, bez smug i ogonów. Analiza charakteryzuje się lepszymi parametrami separacji - współczynnikiem selektywności ( $\alpha$ ) i zdolnością rozdzielczą ( $R_s$ ) [464].

#### Kieselgel 60 W

Konwencjonalny żel krzemionkowy, którego właściwości umożliwiają stosowanie czystej wody jako eluentu lub faz ruchomych zawierających duży dodatek wody [464].

#### ***RP-18W HPTLC***

Płytki pokryte fazą odwróconą C-18 (n-oktadecysilan) przystosowaną do ruchomych faz chromatograficznych z dużą zawartością wody (do 100%). Chromatogramy w układzie faz odwróconych mogą być rozwijane w czystych organicznych oraz organiczno/wodnych rozpuszczalnikach, jak również w czystej wodzie [464].

***NH<sub>2</sub> (TLC NH<sub>2</sub> F<sub>254s</sub>)***

Chemicznie modyfikowana faza aminopropylowa. Aminowa modyfikacja prowadzi do zobojętnienia warstwy, która jest zwilżalna zarówno przez czystą wodę jak i przez rozpuszczalniki organiczne. W ten sposób wszystkie konwencjonalne eluenty stosowane w chromatografii mogą być używane bez zastrzeżeń [460]. Ten średnio-polarny adsorbent posiadający słabo zasadowe właściwości jonowymienne, jest szczególnie rekomendowany do separacji wielowartościowych anionów np. fenoli, nukleotydów, kwasów sulfonowych i karboksylowych. Z sukcesem separowano również witaminy, steroidy, pestycydy [464].

**4.2. Wizualizacja badanych związków**

Analizę chromatograficzną przeprowadzono na płytkach firmy Merck (Darmstadt, Niemcy). Rozwijanie chromatogramów odbywało się w cylindrycznych szklanych komorach o wymiarach 70 x 110 mm nasyconych parami fazy ruchomej. Nasycenie komór parami uzyskiwano poprzez umieszczenie w nich bibuły zwilżonej fazą ruchomą. Proces chromatograficzny prowadzony był w temperaturze pokojowej ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Po rozpyleniu odczynnika wywołującego nad płytkami, umieszczano je na 10 minut w cieplarni o temperaturze  $120^\circ\text{C}$ . Po tym czasie badane związki, obserwowane w świetle widzialnym lub UV, uwiadczały się w postaci barwnych plam (tab. 1).



Tab. 1. Wykrywanie badanych związków.  
 Tab. 1. Detection of investigated compounds.

ZWIĄZEK <i>Compound</i>	ADSORBENT <i>Adsorbent</i>	WYKRYWANIE <i>Detection</i>	EFEKT (barwa plam) <i>Effect (colour of spots)</i>
<b>Antybiotyki makrocycliczne</b>  ER – erytromycyna TROL – troleandomycyna TYL – tylozyna WAN – wankomycyna RB – ryfamycyna B R – ryfampicyna	Celuloza	aldehyd anyżowy metanol (99.9%) kwas siarkowy (96%) 1:10:0.5 (v/v)	fioletowa
	Poliamid	aldehyd anyżowy metanol (99.9%) kwas octowy kwas o-fosforowy kwas siarkowy 1:100:10:10:5 (v/v)	fioletowa
	RP-18W	20% kwas nadchlorowy	ER fioletowa TROL zielona TYL brązowa WAN różowa RB brązowa R pomarańcz.
	Kieselgel 60 W	20% kwas nadchlorowy	ER fioletowa TROL zielona TYL brązowa WAN różowa RB brązowa R pomarańcz.
	LiChrospher Si 60 Kieselgel 60	kwas siarkowy stężony metanol 1:4 (v/v)	brązowa
<b>Porfiryny</b>	Celuloza	pary jodu	fioletowa
	Poliamid	UV	czerwona
	Kieselgel 60	UV	czerwona
<b>Kwas rozmarynowy</b> <b>Kwas walerenowy</b>  KR – kwas rozmarynowy KW – kwas walerenowy	NH <sub>2</sub>	kwas siarkowy stężony metanol 1:10 (v/v) ⇒ UV	KR żółta KW różowa
	RP-18	kwas siarkowy stężony metanol 1:4 (v/v) ⇒ UV	KR żółta KW różowa
	Kieselgel 60 W	kwas siarkowy stężony metanol 1:4 (v/v) ⇒ UV	KR żółta KW różowa

## 5. ELUENTY

Tab. 2. Rozpuszczalniki stosowane jako fazy ruchome.

Tab. 2. *The solvents used as mobile-phase components.*

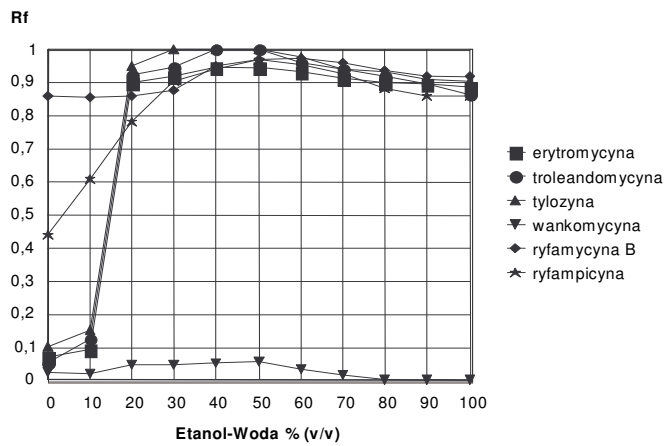
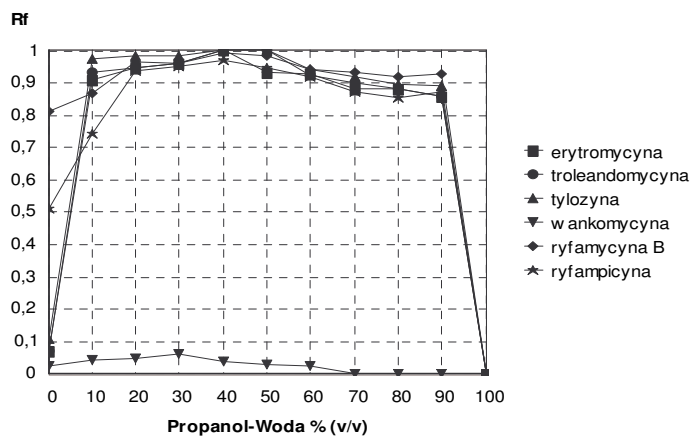
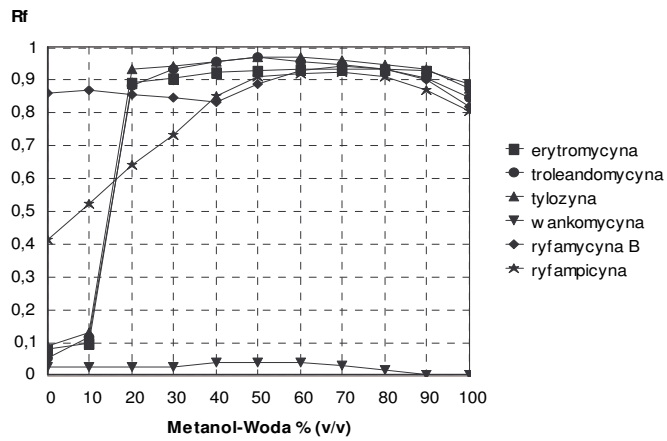
L.p.	Nazwa chemiczna	Nazwa zwyczajowa
1	Metanol	Alkohol metylowy Karbinol
2	Etanol	Alkohol etylowy
3	2-Metoksyetanol	Eter monometylenowy
4	1-Propanol	Alkohol propylowy
5	2-Propanol	Izopropanol Alkohol sec-propylowy
6	1-Butanol	Alkohol butylowy
7	2-Butanol	Alkohol sec-butylowy
8	2-Metylo-1-propanol	Izobutanol Alkohol izobutylowy
9	2-Metylo-2-propanol	tert-Butanol Trimetylokarbinol
10	2-Metylo-1-butanol	Alkohol n-amylowy
11	2-Metylo-2-butanol	Alkohol tert-amylowy Alkohol tert-pentylowy
12	3-Metylo-1-butanol	Alkohol izoamylowy Alkohol izopentylowy
13	2-Propen-1-ol	Alkohol alilowy
14	2-Pentanol	Alkohol sec-pentylowy Metylopropylokarbinol
15	Benzometanol	Alkohol benzyłowy
16	2-Bromoetanol	Bromohydryna glikolu etylenowego
17	2-Dietyloaminoetanol	N,N-Dietyloetanolamina
18	4-Hydrokso-4-metylo-2-pentanon	Alkohol diacetonowy
19	Aceton	Dimetyloketon
20	2-Butanon	Metyloetyloketon
21	3-Pentanon	Dietyloketon
22	Octan metylu	
23	Octan etylu	
24	Octan n-butylu	
25	Octan tert-butylu	
26	Octan n-amylu	Octan pentylu
27	Propionian propylu	
28	Mrówczan etylu	
29	Meta-ksylen	1,3-dimetylobenzen
30	Para-ksylen	1,4-dimetylobenzen
31	Acetonitryl	Cyjanid metylu
32	Tetrahydrofuran	THF Oksolan
33	Heksametylodisiloksan	HMDSO
34	Dimetylosulfotlenek	DMSO
35	Woda	

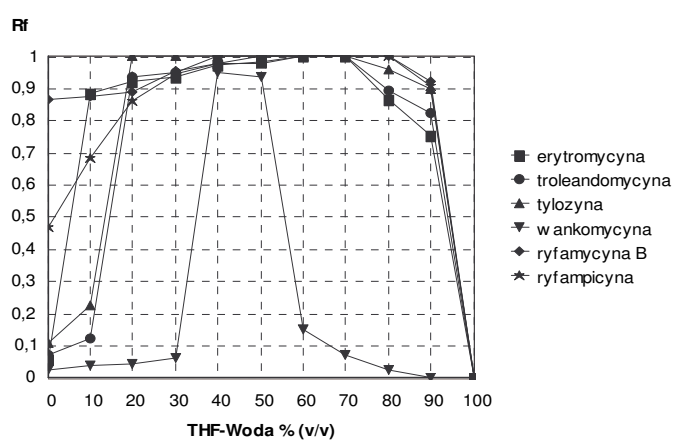
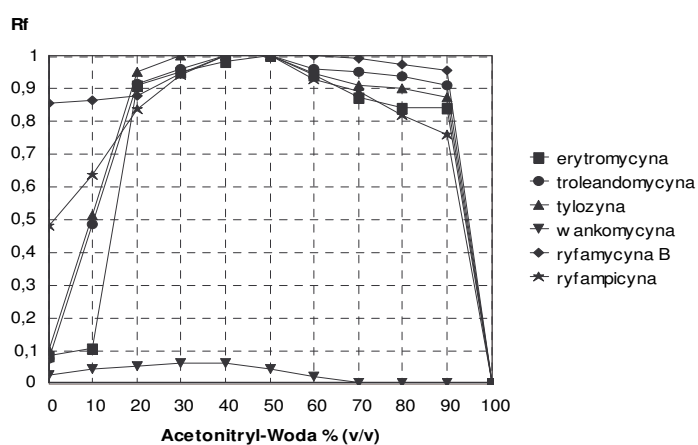
## 5.1. Wodne fazy ruchome

Jako fazy ruchome stosowane były następujące mieszaniny binarne: metanol-woda, etanol-woda, propanol-woda, acetonitryl-woda, THF-woda.

### 5.1.1. Antybiotyki makrocykliczne na celulozowej fazie stacjonarnej

Zaobserwowano silne oddziaływanie wankomycyny z fazą stacjonarną (ryc. 7). Wartości parametru  $R_F$  tego związku były bliskie lub równe zero (z wyjątkiem fazy ruchomej THF-woda w wąskim zakresie stężeń), co praktycznie wyklucza możliwość stosowania wankomycyny jako modyfikatora faz ruchomych. Tym niemniej, biorąc powyższe kryteria pod uwagę, można zasugerować używanie tego antybiotyku do modyfikowania fazy stacjonarnej. Jak wynika z danych otrzymanych w trakcie badań, występuje pewne podobieństwo wartości współczynników  $R_F$  badanych antybiotyków w szerokim zakresie stężeń faz binarnych. A zatem w analizowanych układach chromatograficznych wykluczona jest możliwość badania separacji erytromycyny, troleandomycyny, tylozyny oraz ansamycyn. Jedynie w przypadku użycia wodnej fazy ruchomej oraz mieszanin binarnych o zawartości powyżej 60% v/v wody uzyskano zadowalające rozdzielanie ansamycyn (ryfamycyny B i ryfampicyny). Na uwagę zwraca brak elucji ( $R_F = 0$ ) erytromycyny, troleandomycyny, tylozyny oraz ansamycyn po zastosowaniu 100% propanolu, acetonitrylu i THF. Uzyskane wyniki nie korelują z zależnością pomiędzy retencją chromatograficzną a rozpuszczalnością analitu w fazie ruchomej [465,466]. Retencja powinna wzrastać, kiedy rozpuszczalność w fazie ruchomej maleje. Wyżej wymienione antybiotyki są bardzo dobrze rozpuszczalne w tych eluentach. Natomiast są praktycznie nie rozpuszczalne w wodzie. Minimum retencji ( $R_F = 1$ ) zaobserwowano dla faz ruchomych o średniej zawartości etanolu, propanolu, acetonitrylu i THF. Maksymalne wymywanie w najszerszym zakresie stężeń miało miejsce w przypadku użycia jako fazy ruchomej mieszaniny THF w wodzie. W tych układach chromatograficznych badane antybiotyki makrocykliczne (z wyjątkiem wankomycyny) mogą być polecane jako modyfikatory faz ruchomych [467].





Ryc. 7. Zależność parametru  $R_F$  antybiotyków makrocyklicznych w funkcji zawartości modyfikatora organicznego w wodzie. **Faza stacjonarna: Celuloza.**

Fig. 7. Dependence of  $R_F$  parameter of macrocyclic antibiotics on concentration of organic modifier in water. **Support: Cellulose.**

### 5.1.2. Antybiotyki makrocykliczne na poliamidowej fazie stacjonarnej

Jak wynika z danych otrzymanych w trakcie badań (ryc. 8), transport antybiotyków wymagał wyższych stężeń modyfikatora organicznego. Badane związki nie były wymywane, kiedy fazą ruchomą była woda. W pewnym sensie można zgodzić się z sugestią niektórych badaczy mówiącą o zależności pomiędzy retencją chromatograficzną a rozpuszczalnością analizowanych związków w fazie ruchomej. Retencja rośnie, kiedy rozpuszczalność substancji w fazie ruchomej maleje. Makrolidy oraz ansamycyny są w zasadzie nie rozpuszczalne w wodzie. Dla wankomycyny oraz ansamycyn zakres występowania maksimum retencji ( $R_F = 0$ ) jest szerszy w porównaniu z pozostałymi antybiotykami. W związku z tym wankomycyna, ryfamycyna B oraz ryfampicyna mogą być polecane jako modyfikatory fazy stacjonarnej (wiązane fizycznie na sorbencie) w bardzo szerokim zakresie stężeń faz ruchomych. Retencja makrolidów (erytromycyna, troleandomycyna, tylozyna) była minimalna ( $R_F = 1$ ) dla faz ruchomych 60% v/v propanol-woda oraz 50% v/v THF-woda. Podobne zachowanie zaobserwowano w przypadku fazy ruchomej acetonitryl-woda, jednakże zakres stężeń, w którym występowało minimum retencji dla makrolidów był szerszy. Ponadto stosując 50% v/v acetonitryl w wodzie uzyskano maksymalną elucję wankomycyny. Z praktycznego punktu widzenia, możliwość zastosowania antybiotyków makrocyklicznych jako modyfikatorów fazy ruchomej warunkuje ich maksymalna migracja z fazą ruchomą (wartości parametru  $R_F$  antybiotyków powinny być bliskie lub równe jedności). A zatem makrolidy są świetnymi kandydatami na selektory chiralne w fazach ruchomych propanol-woda, THF-woda oraz acetonitryl-woda, natomiast wankomycyna w eluencie acetonitryl-woda. Dla serii alkoholi homologicznych badana zależność (parametr  $R_F$  w funkcji stężenia alkoholu w wodzie) wykazywała jedno maksimum dla dużego stężenia alkoholu w wodzie. Wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu, maksimum to przesuwa się w kierunku zmniejszonej zawartości alkoholu w wodzie. Zarazem rosła elucja ansamycyn i poprawie uległa separacja. Najlepszą separację makrolidów uzyskano dla fazy metanol-woda. Stwierdzono również, że w miarę wzrostu długości łańcucha węglowego alkoholu rozdzielczość tych antybiotyków pogorszyła się. Poza tym zaobserwowano, że w przypadku stosowania faz ruchomych metanol-woda i etanol-woda elucja makrolidów była niecałkowita ( $R_F < 1$ ) w całym zakresie stężeń faz ruchomych. Tym niemniej najlepszą separację makrolidów uzyskano stosując wyżej wymienione fazy alkoholowe. Dlatego te układy eluentów mogą być rekomendowane w analizie makrolidów. Wymywanie ansamycyn we wszystkich badanych układach binarnych faz ruchomych było niecałkowite. Z kolei separacja była zadowalająca, najlepsza dla fazy ruchomej THF-woda. Z praktycznego punktu widzenia użyte rozpuszczal-

niki oraz ich mieszaniny można stosować do badań nad właściwościami ansamycyn.

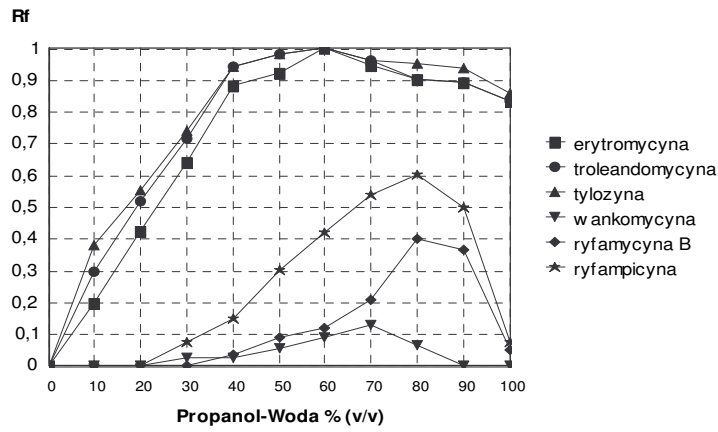
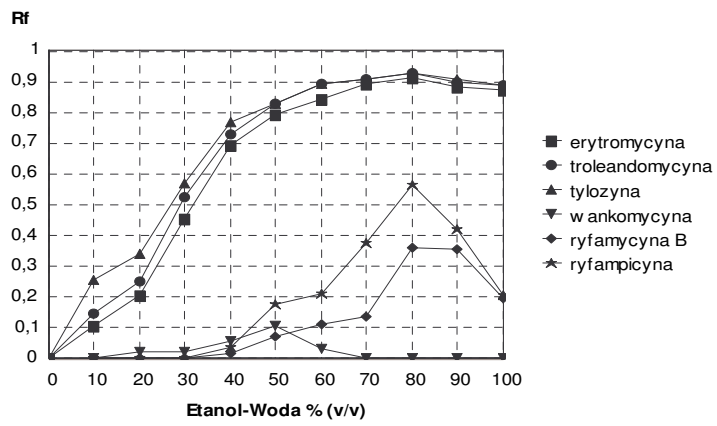
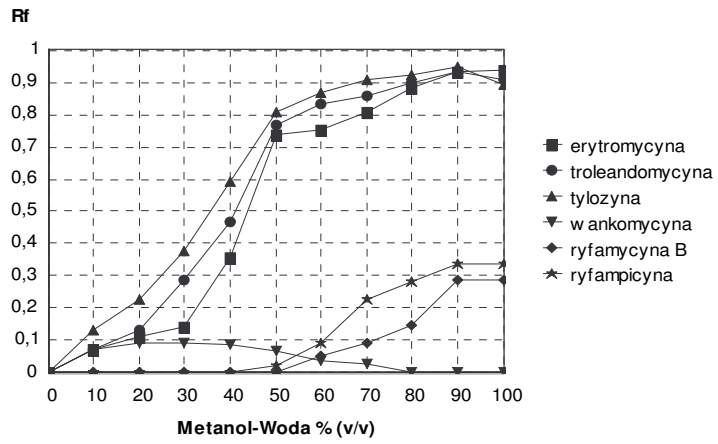
Tabela 3 zawiera wartości współczynników  $a$  i  $b$  obliczone z równania regresji liniowej ( $R_M = a \cdot \%S + b$ ; gdzie  $\%S$  oznacza kompozycję fazy ruchomej % v/v) po zastosowaniu fazy ruchomej metanol-woda w szerokim zakresie stężeń. Nieliniowe zachowanie ( $r < 0.9$ ) wykazała wankomycyna, w związku z czym można zasugerować złożony mechanizm retencji lub obecność wielorakich typów wiązań. Zmiany w konformacji oraz zmiany w obszarze, w którym faza ruchoma oddziałuje z analitem lub z fazą stacjonarną, prowadzą również do nieliniowości na wykresach. Dla faz ruchomych zawierających etanol, propanol, THF i acetonitryl współczynniki korelacji ( $r$ ) były niskie ( $r < 0.9$ ) w przypadku wszystkich badanych antybiotyków makrocyklicznych, z wyjątkiem erytromycyny chromatografowanej przy użyciu fazy ruchomej etanol-woda ( $r = 0.902$ ) [468].

Tab. 3. Współczynniki ( $a$ ,  $b$ ) oraz wartości współczynnika korelacji ( $r$ ) równania regresji liniowej  $R_M = a \cdot \%S + b$  antybiotyków makrocyklicznych.

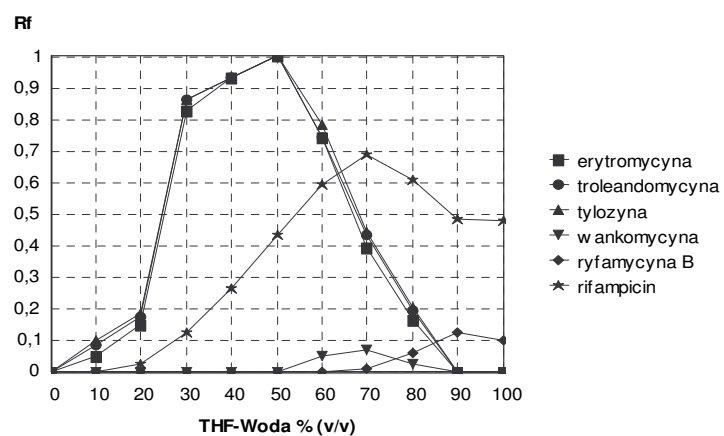
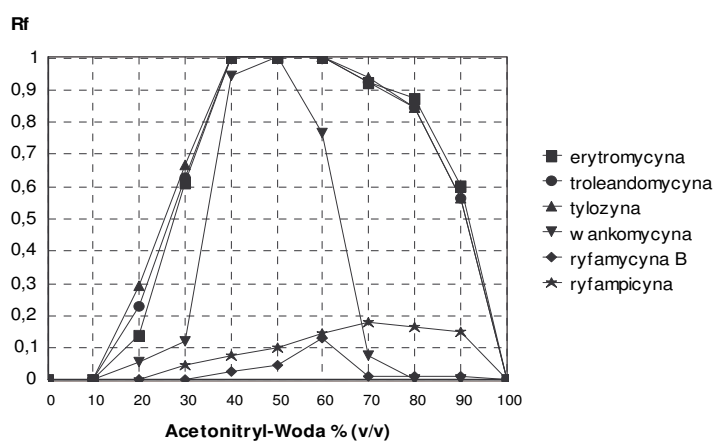
Tab. 3. *Regression coefficients ( $a$ ,  $b$ ) and correlation coefficient ( $r$ ) of regression equation  $R_M = a \cdot \%S + b$  for macrocyclic antibiotics.*

Antybiotyk Antibiotic	CH <sub>3</sub> OH (% v/v)	n	a	b	r
Erytromycyna	10-100	10	-0.028	1.352	0.975
Ryfamycyna B	60-100	5	-0.023	2.601	0.975
Troleandomycyna	10-100	10	-0.025	1.124	0.954
Tylozyna	10-100	10	-0.023	0.820	0.935
Ryfampicyna	50-100	6	-0.026	2.640	0.920
Wankomycyna	10-70	7	0.009	0.825	0.816

n – ilość prób





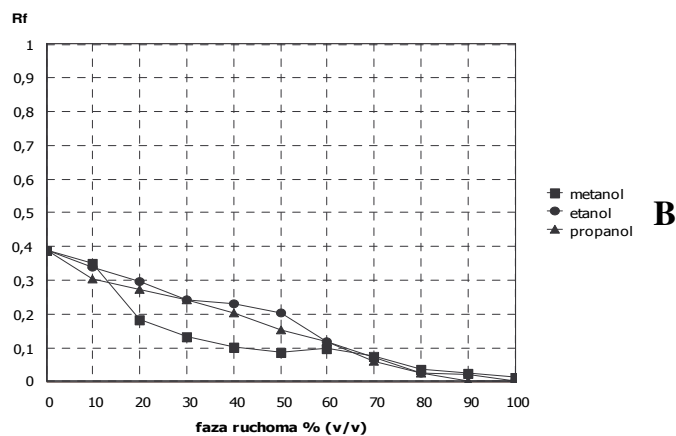
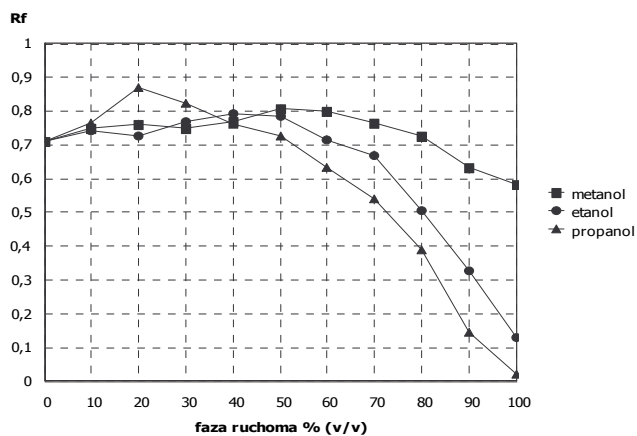


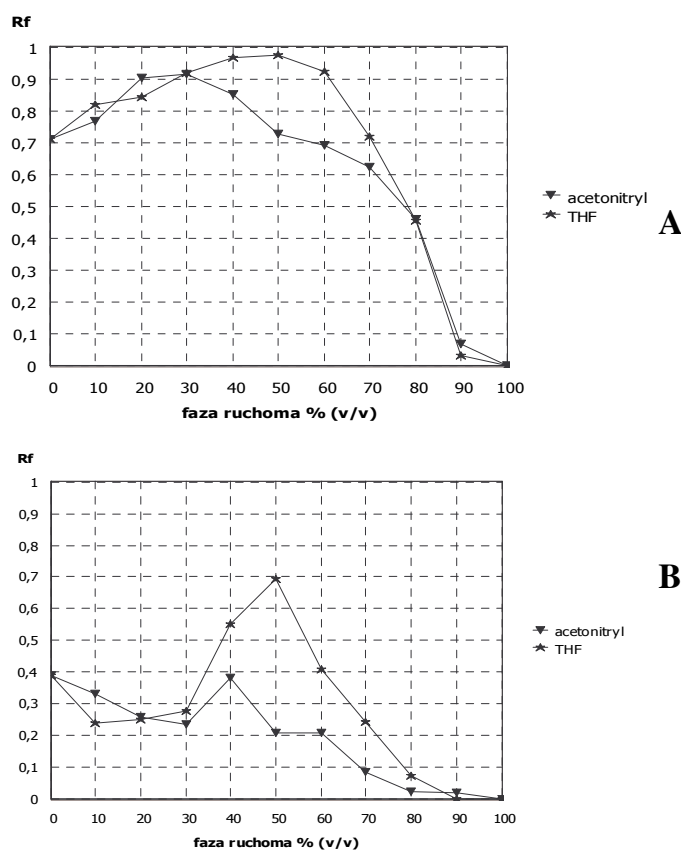
Ryc. 8. Zależność parametru  $R_F$  antybiotyków makrocyklicznych w funkcji zawartości modyfikatora organicznego w wodzie. **Faza stacjonarna: Poliamid.**

Fig. 8. Dependence of  $R_F$  parameter of macrocyclic antibiotics on concentration of organic modifier in water. **Support: Polyamide.**

### 5.1.3. Kwas walerenowy i rozmarynowy na aminowej fazie stacjonarnej

Jak wynika z danych otrzymanych w trakcie badań, w przypadku kwasu walerenowego, dla serii alkoholi homologicznych (ryc. 9) badana zależność (parametr  $R_F$  w funkcji stężenia alkoholu w wodzie) wykazuje jedno maksimum dla średniego i dużego stężenia wody w alkoholu. Wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu, maksimum to przesuwa się w kierunku zmniejszonej zawartości alkoholu w wodzie. Z kolei rodzaj użytego alkoholu nie miał większego wpływu na retencję chromatograficzną kwasu rozmarynowego. Jak można zauważyć jedynie wzrost zawartości alkoholu w binarnej fazie ruchomej zdecydowanie zmniejszał wymywanie tego związku. Fazy ruchome acetonitryl-woda oraz THF-woda wykazały silne właściwości elucyjne w stosunku do kwasu walerenowego przy średniej zawartości modyfikatora organicznego w wodzie.





Ryc. 9. Zależność parametru  $R_F$  kwasu walerenowego (A) i rozmarynowego (B) w funkcji zawartości modyfikatora organicznego w wodzie. **Faza stacjonarna:  $NH_2$ .**

Fig. 9. Dependence of  $R_F$  parameter of valerenic (A) and rosmarinic (B) acids on concentration of organic modifier in water. **Support:  $NH_2$ .**

Na uwagę zwraca brak elucji ( $R_F = 0$ ) kwasu walerenowego i rozmarynowego w przypadku użycia 100% acetonitrylu i tetrahydrofuranu. Uzyskane wyniki nie korelują z zależnością pomiędzy retencją chromatograficzną a rozpuszczalnością analitu w fazie ruchomej [465,466]. Retencja powinna wzrastać, kiedy rozpuszczalność substancji w fazie ruchomej maleje. Badane związki są bardzo dobrze rozpuszczalne w wyżej wymienionych eluentach, natomiast praktycznie nie rozpuszczalne w wodzie. Wpływ mieszaniny acetonitrylu i tetrahydrofuranu w wodzie na retencję chromatograficzną kwasu rozmarynowego był nieco mniejszy niż zaobserwowany w przypadku kwasu walerenowego. Tym niemniej tetrahydrofuran jako modyfikator organiczny okazał się dość dobrym eluentem

dla wyżej wymienionego związku. Maksimum retencji zaobserwowano dla faz ruchomych zawierających czysty acetonitryl oraz 100% i 90% v/v THF w wodzie.

Tabela 4 zawiera wartości współczynników  $a$  i  $b$  oraz  $r$  obliczone z równania regresji liniowej  $R_M = a \cdot \%S + b$ . Nieliniowe zachowanie ( $r < 0.9$ ) zaobserwowano dla kwasu walerenowego przy zastosowaniu faz ruchomych zawierających wodę, natomiast dla kwasu rozmarynowego dla mieszanin wody z acetonitrylem i THF [469].

Tab. 4. Współczynniki ( $a$ ,  $b$ ) oraz wartości współczynnika korelacji ( $r$ ) równania regresji liniowej  $R_M = a \cdot \%S + b$  kwasu walerenowego i rozmarynowego.

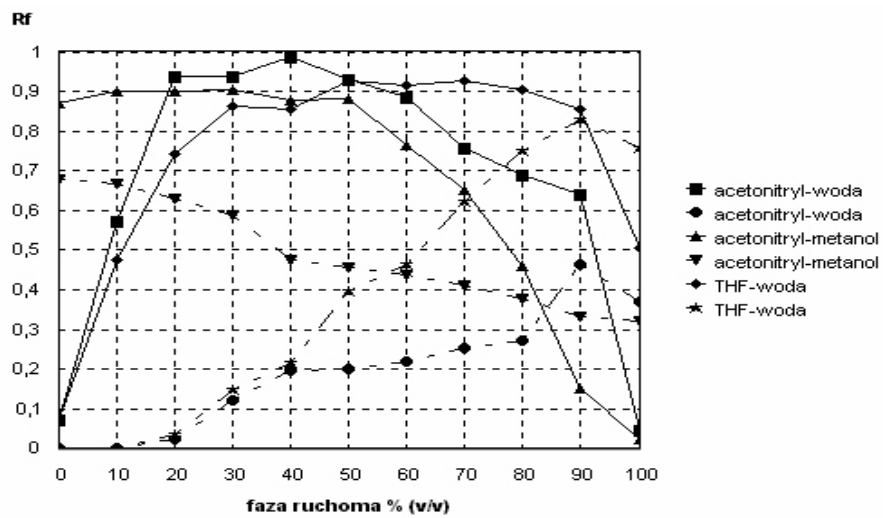
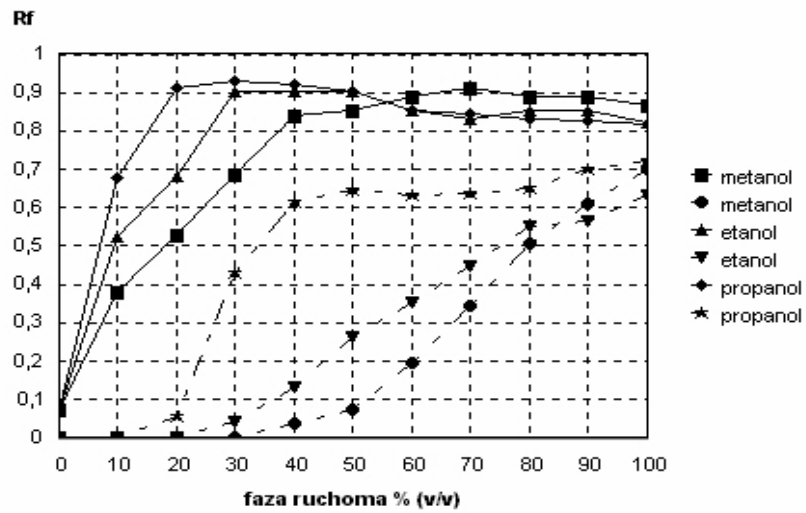
Tab. 4. Regression coefficients ( $a$ ,  $b$ ) and correlation coefficient ( $r$ ) of regression equation  $R_M = a \cdot \%S + b$  for valerenic and rosmarinic acids.

Eluent Eluent	$a$	$b$	$r$
<b>Kwas rozmarynowy</b> <i>Rosmarinic acid</i>			
<b>Metanol-woda</b>	0.015	0.222	0.9708
<b>Etanol-woda</b>	0.016	0.029	0.9503
<b>Propanol-woda</b>	0.016	0.098	0.9507
<b>Kwas walerenowy</b> <i>Valerenic acid</i>			
<b>Acetonitryl-metanol</b>	-0.021	1.765	0.9567

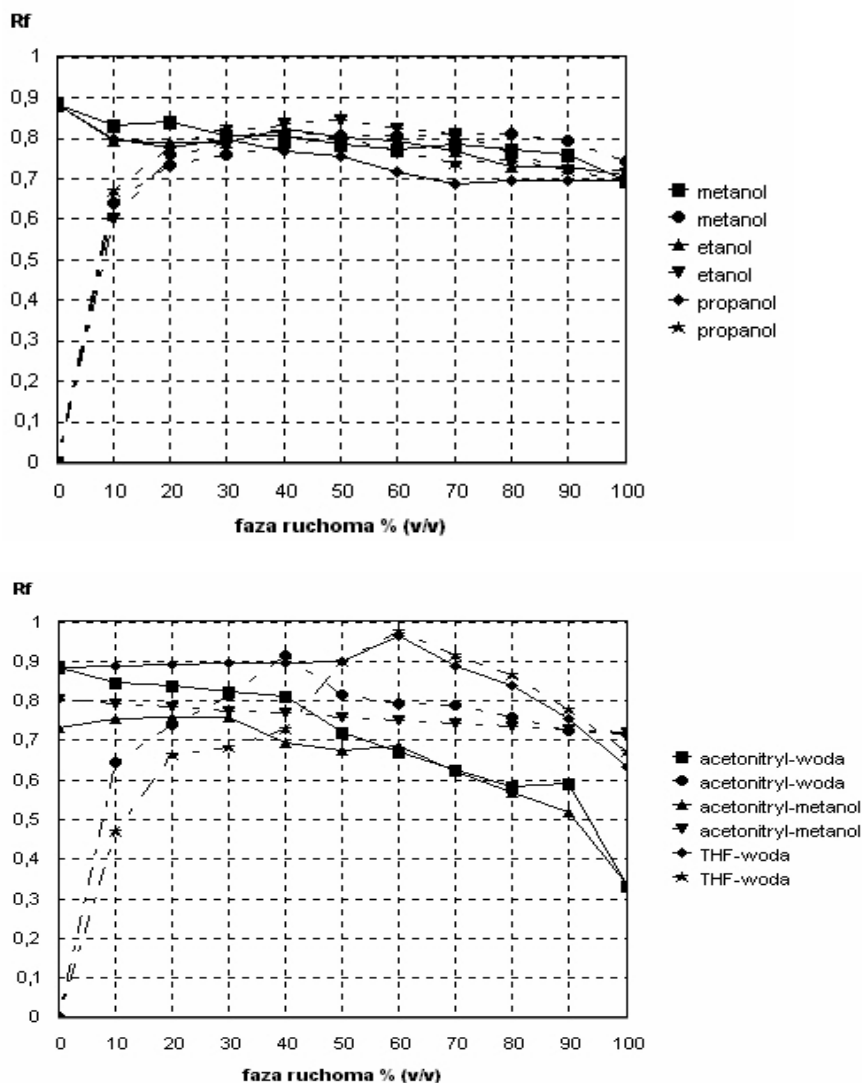
#### 5.1.4. Kwas walerenowy i rozmarynowy w układzie faz normalnych i odwróconych

W układzie faz odwróconych stwierdzono istotny wpływ długości łańcucha węglowego alkoholu na zdolność wmywania badanych związków, a zatem ze wzrostem długości łańcucha węglowego rosła siła elucyjna alkoholu. W przypadku kwasu rozmarynowego obserwowana elucja ( $R_F > 0$ ) odpowiada na wykresach obszarom o malejącej zawartości wody. Prawdopodobnie transport tego związku z początku wymagał wyższych stężeń metanolu, etanolu oraz propanolu. Podobnie zachowywał się kwas walerenowy w układzie faz normalnych i odwróconych przy zastosowaniu faz ruchomych z dodatkiem wody.

Adsorbent: RP-18



Adsorbent: Kieselgel 60W



Ryc. 10. Zależność pomiędzy kompozycją fazy ruchomej a parametrem  $R_F$  kwasu walerenowego (---) i rozmarynowego (—) w układzie faz normalnych i odwróconych.

Fig. 10. Relationships between mobile-phase composition and  $R_F$  values for valerenic (---) and rosmarinic (—) acids on normal- and reversed-phase.

W obu badanych układach faz stacjonarnych minimalne wartości współczynnika  $R_F$  zaobserwowano dla kwasu walerenowego w przypadku użycia wodnej fazy ruchomej oraz faz ruchomych z niewielką zawartością modyfikatora organicznego. Wy tłumaczyć to można zjawiskiem zatrzymywania tego związku przez fazę stacjonarną. Kwas rozmarynowy osiągnął wysokie wartości parametru  $R_F$  dla średnich zawartości acetonitrylu i tetrahydrofuranu w wodzie. Z kolei kwas walerenowy był lepiej wymywany w układzie faz normalnych przy użyciu wyżej wymienionych faz ruchomych.

W tabeli 5 zestawiono wartości współczynników  $a$ ,  $b$  oraz współczynnika korelacji  $r$  równania regresji liniowej  $R_M = a \cdot \%S + b$ . Nieliniowe zachowanie, w przypadku kwasu walerenowego, obserwowano w układzie faz normalnych, natomiast w przypadku kwasu rozmarynowego w układzie faz odwróconych [470].

Tab. 5 Współczynniki ( $a$ ,  $b$ ) oraz wartości współczynnika korelacji ( $r$ ) równania regresji liniowej  $R_M = a \cdot \%S + b$  kwasu walerenowego i rozmarynowego.

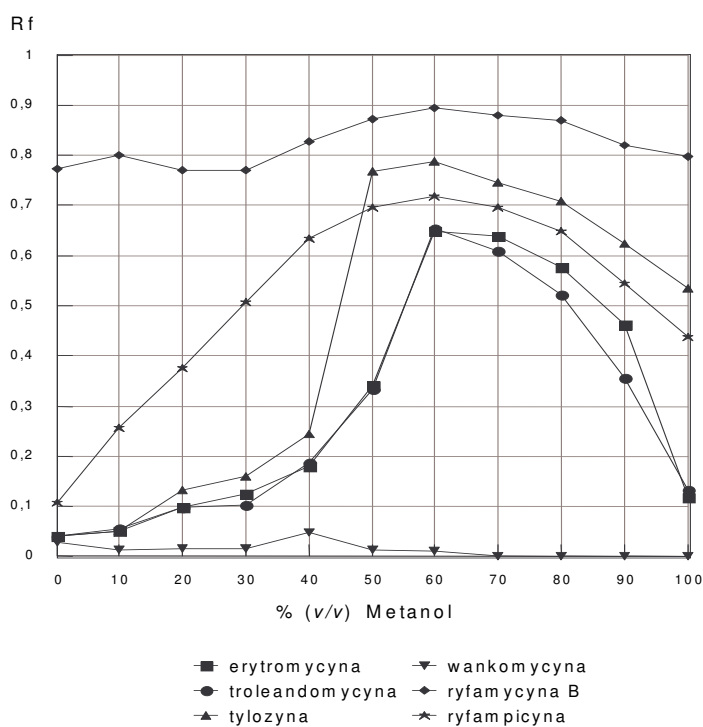
Tab. 5. *Regression coefficients ( $a$ ,  $b$ ) and correlation coefficient ( $r$ ) of regression equation  $R_M = a \cdot \%S + b$  for valerenic and rosmarinic acids.*

Adsorbent <i>Adsorbent</i>	Eluent <i>Eluent</i>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
Kwas rozmarynowy <i>Rosmarinic acid</i>				
K-60	Metanol-woda	0.003	-0.788	0.9233
K-60	Acetonitryl-woda	0.010	-0.925	0.9609
Kwas walerenowy <i>Valerenic acid</i>				
K-60	Acetonitryl-metanol	0.001	-0,601	0.9942
RP-18	Acetonitryl-metanol	0.006	-0.330	0.9824
RP-18	Metanol-woda	-0.030	2.536	0.9862
RP-18	Etanol-woda	-0.021	1.684	0.9441
RP-18	THF-woda	-0.024	1.568	0.9593

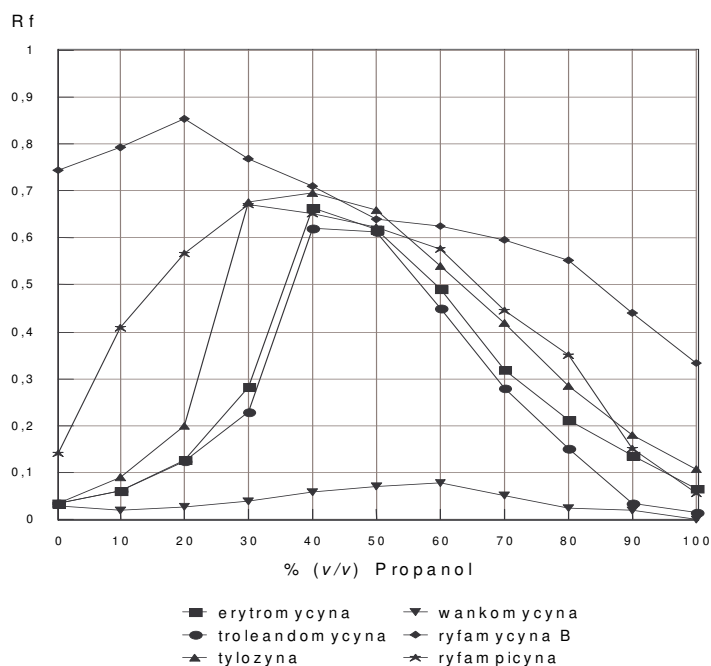
## 5.2. Wodne fazy ruchome modyfikowane chlorkiem sodu

### 5.2.1. Antybiotyki makrocykliczne w układzie faz normalnych i odwróconych

Wartości  $R_F$  badanych związków makrocyklicznych były mierzone w szerokim zakresie stężeń (0-100% v/v) metanolu i 1-propanolu w wodzie. Na **krzemionkowej fazie stacjonarnej** (ryc. 11) retencja związków malała w przypadku niskich oraz średnich stężeń fazy organicznej. Jak można zauważyć, wankomycyna była silnie adsorbowana przez krzemionkę, a zakres występowania maksimum retencji był szeroki. Z tego względu związek ten może być dobrym selekto-rem chiralnym wiązany fizycznie na sorbencie w bardzo szerokim zakresie stężeń binarnej fazy ruchomej.



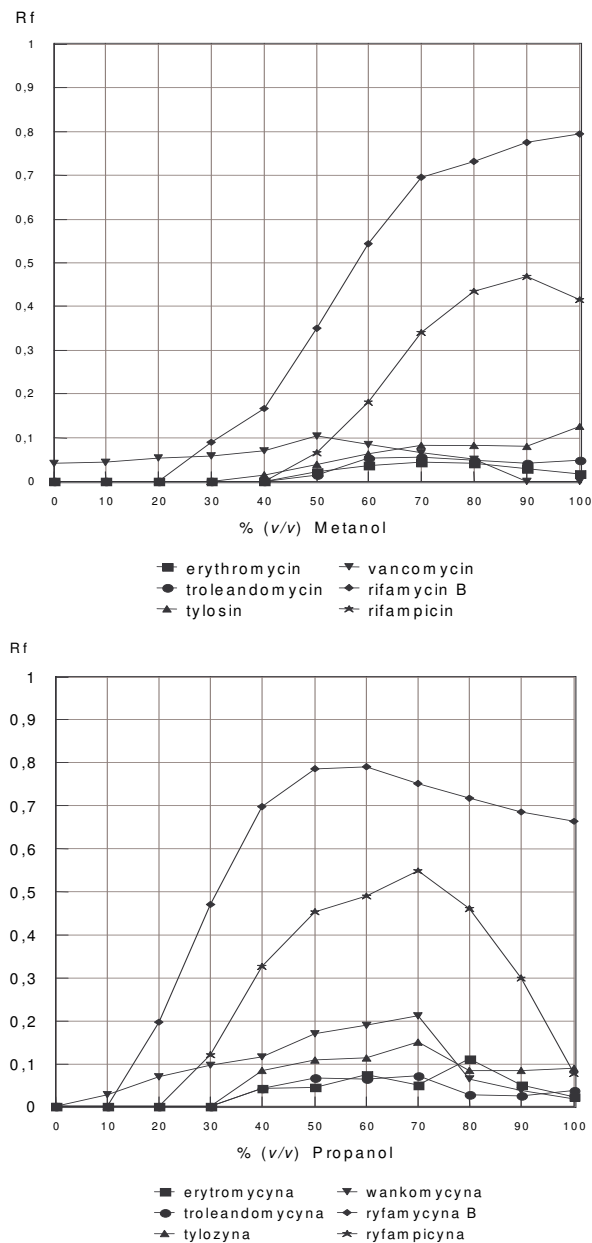




Ryc. 11. Zależność parametru  $R_F$  antybiotyków makrocyklicznych w funkcji zawartości metanolu i propanolu w wodzie. **Adsorbent: Kieselgel 60W.**

Fig. 11. Relationships between methanol- and propanol-water, mobile phase composition and  $R_F$  of macrocyclic antibiotics. **Support: Kieselgel 60W.**

W układzie faz odwróconych (ryc. 12) makrolidy i ansamycyny nie były eluowane, kiedy stężenie wody w binarnej organiczno-wodnej fazie ruchomej było bliskie 100%. Zakres, w którym miała miejsce maksymalna retencja ( $R_F = 0$ ) był szeroki. Z tego punktu widzenia związki te mogą być polecane jako modyfikatory fazy stacjonarnej (selektory chiralne). Separacja antybiotyków makrocyklicznych była generalnie gorsza w układzie faz normalnych niż w układzie faz odwróconych.

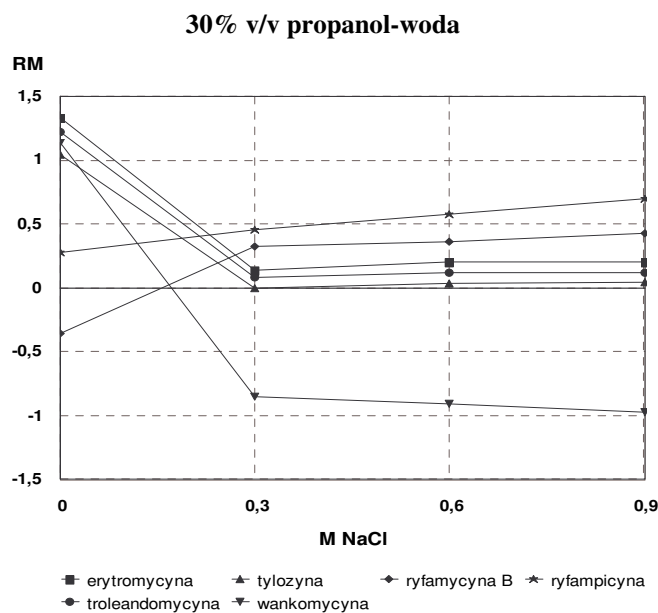
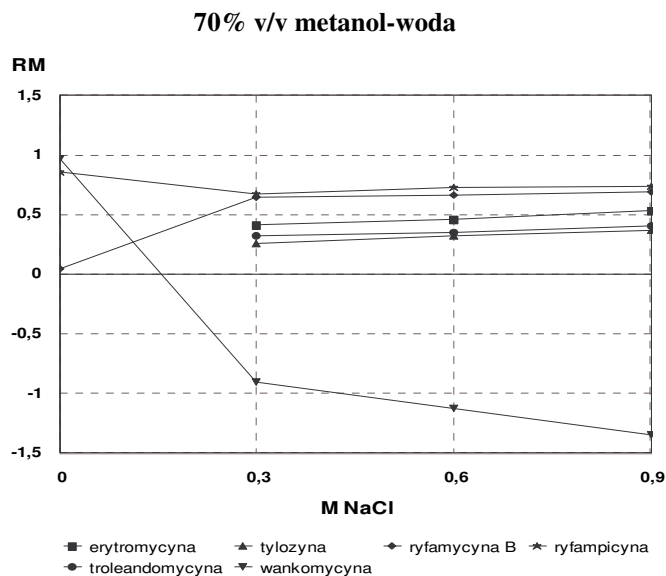


Ryc. 12. Zależność parametru  $R_F$  antybiotyków makrocyklicznych w funkcji zawartości metanolu i propanolu w wodzie. **Adsorbent: RP-18W.**

Fig. 12. Relationships between methanol- and propanol-water, mobile phase composition and  $R_F$  of macrocyclic antibiotics. **Support: RP-18W.**

Najlepszą separację otrzymano dla ansamycyn w przypadku użycia wodnej fazy ruchomej (na płytkach krzemionkowych), natomiast na fazie stacjonarnej RP-18, kiedy stężenie metanolu lub propanolu w fazie ruchomej było  $> 10\%$  v/v. Elucja makrolidów na obu badanych fazach stacjonarnych przy zastosowaniu zarówno fazy ruchomej metanol-woda jak i propanol-woda, była niecałkowita ( $R_F < 1$ ) w całym zakresie stężeń faz ruchomych. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje dotyczące tego, że ani metanol ani propanol nie mogą być polecane jako fazy ruchome modyfikowane antybiotykami makrocyklicznymi. Tym niemniej, oba rozpuszczalniki mogą być z powodzeniem stosowane w analizie makrolidów. Na rycinie 13 przedstawiono wyniki otrzymane po modyfikacji chlorkiem sodu dwóch faz ruchomych: 70% v/v metanolu w wodzie i 30% v/v propanolu w wodzie, przy zastosowaniu układu faz odwróconych.

Najbardziej spektakularny wpływ chlorku sodu na retencję zaobserwowano dla wankomycyny. Retencja malała przy niskich stężeniach NaCl, co jest jednoznaczne z bardzo dobrym wymywaniem tego antybiotyku ( $R_F > 0.9$ ). A zatem w wyżej wymienionych układach chromatograficznych wankomycyna może być z powodzeniem stosowana jako modyfikator fazy ruchomej. Szkielet wankomycyny zawiera kilka grup funkcyjnych - grupy karboksylowe, wodorotlenowe, aminowe, amidowe oraz pierścienie aromatyczne. Trzy naładowane grupy (dwie aminowe i jedna karboksylowa) są głównie odpowiedzialne za jonizację wankomycyny. Selektywność tego antybiotyku w stosunku do kwasów jest związana z grupami aminowymi, stąd na żelu krzemionkowym była silnie wiązana niemalże niezależnie od stężenia eluentu. Można to częściowo wyjaśnić tym, że kwasowy charakter sorbentu (obecność wolnych grup silanolowych) ma również decydujące znaczenie nawet po nałożeniu warstwy i pozwala na wiązanie związków zawierających zasadowe ugrupowania. Jak widać na rycinach 11 i 12, z wyjątkiem wąskiego zakresu stężeń alkoholu w wodzie, wankomycyna wykazuje wysoką retencję. Jest to związane z tymi samymi interakcjami, niekompletnie zinaktywowanej wankomycyny, z grupami oktadecysilanowymi. Jest znanym fakt, że w układzie faz odwróconych sorbent częściowo zachowuje swój charakter adsorpcyjny nawet po uwarstwieniu. Efekt silanofilowy może być eliminowany przez chlorek sodu dodany do eluentu. Jony wiążą się do pozostałych centrów adsorpcyjnych krzemionki, co z kolei neutralizuje je lub obniża ich wpływ na retencję oraz hamuje dysocjację polarnych ugrupowań. W związku z czym następuje redukcja charakteru kwasowego żelu krzemionkowego. W stosunku do powyższego wankomycyna jest prawie całkowicie eluowana ( $R_F > 0.9$ ); elucja jest efektywniejsza przy zastosowaniu propanolu niż metanolu.



Ryc. 13. Zależność parametru  $R_M$  antybiotyków makrocyklicznych w funkcji zawartości chlorku sodu w fazie ruchomej. **Faza stacjonarna: RP-18.**

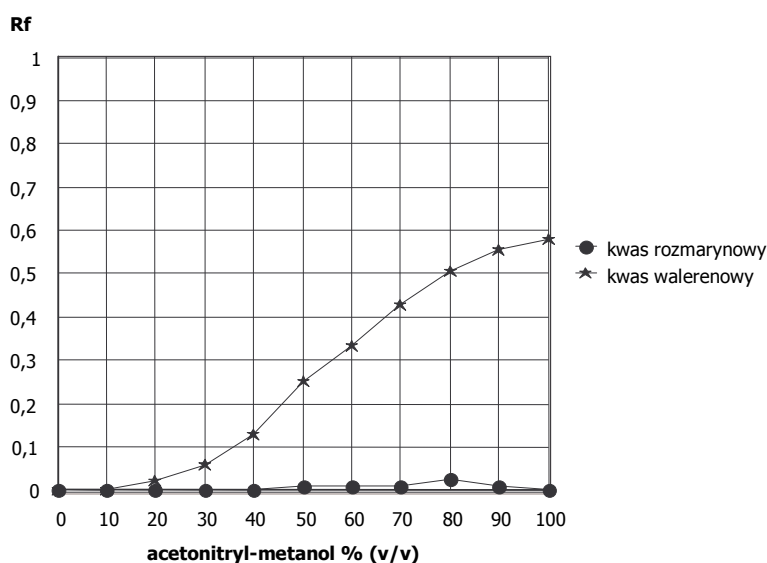
Fig. 13. Dependence of  $R_M$  of macrocyclic antibiotics on concentration of sodium chloride in mobile phase. **Support: RP-18.**

Dodatek NaCl do faz ruchomych spowodował istotne różnice w migracji pozostałych badanych antybiotyków. Elucja makrolidów rosła, kiedy stężenie NaCl w obu fazach ruchomych wynosiło 0.3 M. Lipofilowość obniża się liniowo ze wzrostem stężenia NaCl w fazie ruchomej [471]. Można to wyjaśnić przypuszczalnie tym, że jony dysocjującej soli zajmują centra adsorpcyjne na powierzchni krzemionki nie pokrytej impregnantem, w rezultacie czego dochodzi do zmniejszenia objętości retencji. To stwierdzenie wskazuje również na to, że dodatek soli do fazy ruchomej znacznie modyfikuje retencję tych związków w układzie faz odwróconych. Poza opisanym mechanizmem, zmiana w stałej dielektrycznej fazy ruchomej prawdopodobnie również wpływa na separację tych związków metodą TLC. Przeciwnie, elucja ansamycyn malała ze wzrostem stężenia NaCl w fazach ruchomych. Dane retencyjne makrolidów otrzymane w trakcie badań w układzie faz normalnych i odwróconych zależały od oddziaływań pomiędzy grupami silanolowymi a grupami funkcyjnymi antybiotyków (np. wodorotlenowymi). Zatem modyfikacja faz ruchomych chlorkiem sodu znacząco polepszyła wmywanie makrolidów. Ansamycyny (ryc. 4) są szczególnie wyjątkową grupą antybiotyków, posiadającą charakterystyczną strukturę „ansa” (struktura pierścienia lub chromoforu spięta jest łańcuchem alifatycznym). Różnią się od siebie typem oraz położeniem podstawników w pierścieniu naftohydrochinonowym. W zależności od natury ugrupowań i warunków związki te mogą być naładowane dodatnio, ujemnie lub też mogą być obojętne. Poza tym wszystkie ryfamycyny posiadają podstawiony mostek alifatyczny. Grupy wodorotlenowe przy pierścieniach aromatycznych ulegają jonizacji, stąd ryfamycyna B istnieje jak dizasadowy kwas słabo rozpuszczalny w wodzie. Ich kwasowe właściwości redukują niejako oddziaływanie z grupami silanolowymi adsorbentu [472].

### 5.3. Niewodne fazy ruchome

#### 5.3.1. Kwas walerenowy i rozmarynowy na aminowej fazie stacjonarnej oraz w układzie faz normalnych i odwróconych

W celu sprawdzenia, czy elucja badanych kwasów walerenowego i rozmarynowego jest zależna od specyficznych właściwości wody na **aminowej fazie stacjonarnej** (ryc. 14), przeprowadzono badania w układzie acetonitryl-metanol. Dla kwasu rozmarynowego zaobserwowano minimalne wartości współczynnika  $R_F$  w szerokim zakresie stężeń acetonitrylu w metanolu. Stąd można wywnioskować, że transport tego związku wymagał dodatku wody do fazy ruchomej. Z kolei ze wzrostem stężenia metanolu w acetonitrylu malała retencja chromatograficzna kwasu walerenowego [469].



Ryc. 14. Zależność parametru  $R_F$  kwasu walerenowego i rozmarynowego w funkcji zawartości acetonitrylu w metanolu. **Faza stacjonarna:  $NH_2$ .**

Fig. 14. Dependence of  $R_F$  parameter of valerenic and rosmarinic acids on concentration of acetonitrile in methanol. **Support  $NH_2$ .**

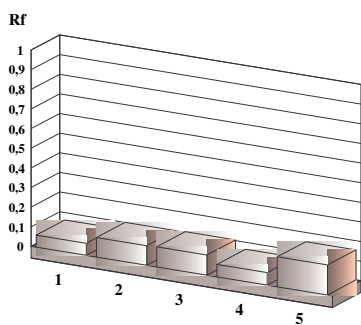
W **układzie faz normalnych i odwróconych** (ryc. 10) wykorzystano mieszaninę metanolu z acetonitrylem. Jak wynika z danych otrzymanych w trakcie badań w układzie faz odwróconych brak dodatku wody do fazy ruchomej miał zdecydowany wpływ na retencję chromatograficzną obu badanych kwasów. Natomiast w układzie faz normalnych dla kwasu rozmarynowego zauważono

pewne podobieństwo wyników do otrzymanych dla fazy metanol-woda. Można przypuszczać, że retencja tego związku nie jest bezpośrednio związana z właściwościami wody [470].

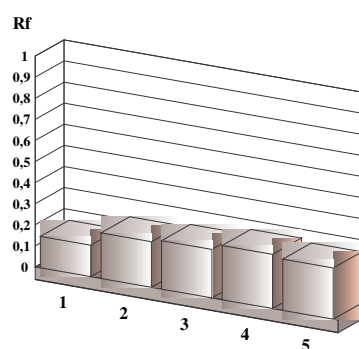
### **5.3.2. Porfiryny na krzemionkowej, poliamidowej i celulozowej fazie stacjonarnej**

Jako fazy ruchome zastosowano metanol, etanol, propanol, butanol, acetonitryl i tetrahydrofuran. Dla serii alkoholi homologicznych, w przypadku stosowania **żelu krzemionkowego** jako fazy stacjonarnej (ryc. 15) zaobserwowano, że ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu zwiększeniu ulegała elucja porfiryn. Stąd można wywnioskować, że transport badanych związków wymagał bardziej polarnej alkoholowej fazy ruchomej.

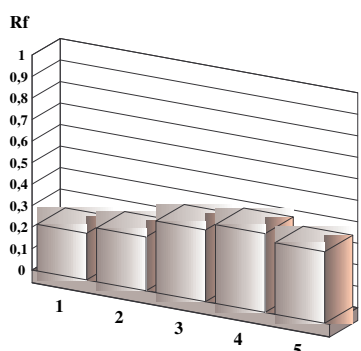
## METANOL



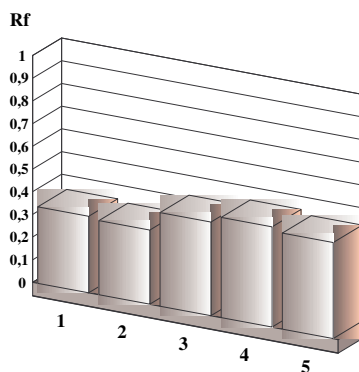
## ETANOL



## PROPANOL



## BUTANOL

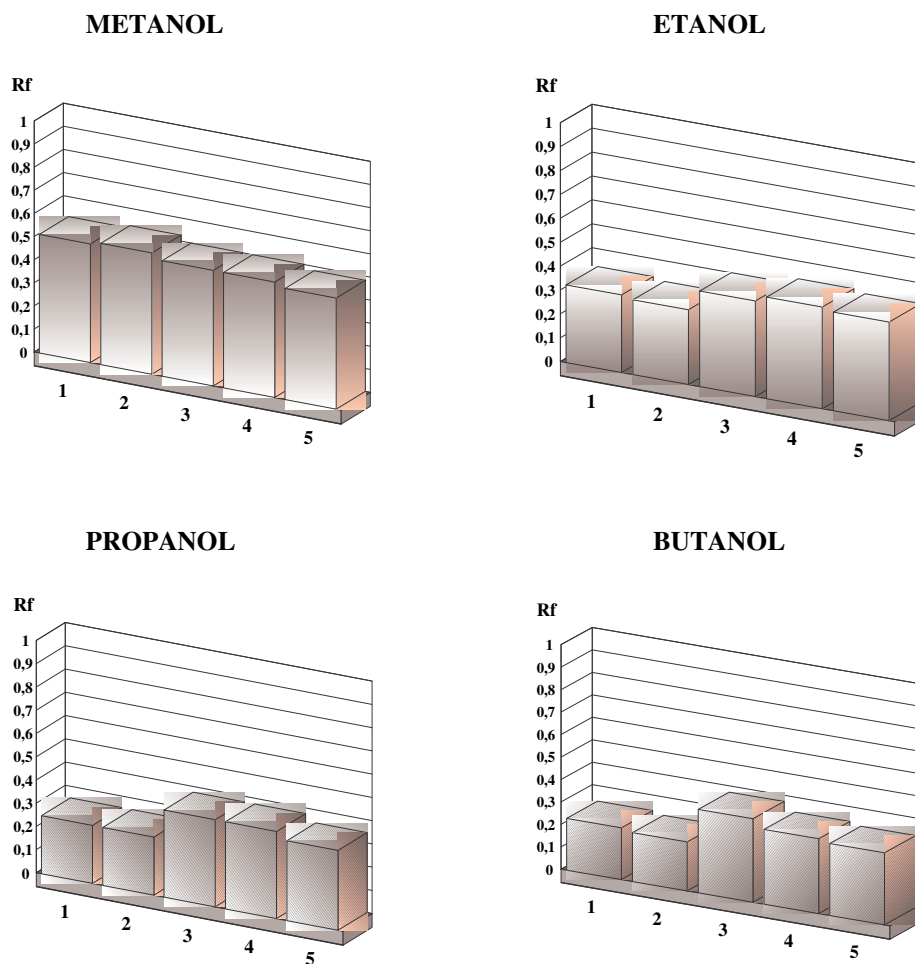


Ryc. 15. Wpływ fazy ruchomej na wartości  $R_F$  uoporfiryny I (1), uoporfiryny III (2), koproporfiryny (3), koproporfiryny III (4) i protoporfiryny IX (5). **Adsorbent:** **Kieselgel 60F**<sub>254s</sub>.

Fig. 15. Effect of mobile phase on  $R_F$  values of uoporphyrin I (1), uoporphyrin III (2), coproporphyrin (3), coproporphyrin III (4) and protoporphyrin IX (5). **Support:** **Kieselgel 60F**<sub>254s</sub>.



Z kolei na **poliamidowej** fazie stacjonarnej (ryc. 16) retencja chromatograficzna uroporfiryny I, uroporfiryny III, koproporfiryny I, koproporfiryny III i protoporfiryny malała w miarę wydłużania się łańcucha węglowego alkoholu.



Ryc. 16. Wpływ fazy ruchomej na wartości  $R_F$  uroporfiryny I (1), uroporfiryny III (2), koproporfiryny I (3), koproporfiryny III (4) i protoporfiryny IX (5). **Adsorbent: Poliamid 11F<sub>254</sub>.**

Fig. 16. Effect of mobile phase on  $R_F$  values of uroporphyrin I (1), uroporphyrin III (2), coproporphyrin I (3), coproporphyrin III (4) and protoporphyrin IX (5). **Support: Polyamide 11F<sub>254</sub>.**

A zatem metanol okazał się najkorzystniejszą fazą ruchomą. Na uwagę zwraca brak elucji badanych porfiryn na **celulozowej** fazie stacjonarnej dla alkoholowych faz ruchomych. Z tego względu użycie tej fazy stacjonarnej w dalszych badaniach dotyczących porfiryn jest bezcelowe. Fakt zatrzymywania przez fazę stacjonarną porfiryn częściowo można wyjaśnić oddziaływaniami tych związków z celulozą. Z danych otrzymanych przy użyciu acetonitrylu i tetrahydrofuranu jako faz ruchomych oraz badanych faz stacjonarnych wynika niewielka przydatność wymienionych rozpuszczalników w analizie porfiryn. Elucja uzyskana w tych warunkach jest niezadowolająca - maksymalne wartości współczynnika  $R_F$  otrzymane na poliamidowej fazie stacjonarnej nie przekraczają 0.2.

W tabeli 6 zestawiono wartości współczynników  $a$ ,  $b$  oraz wartości współczynnika korelacji  $r$  równań regresji liniowej  $\log (1/R_F) = a \cdot \alpha_e + b$ . Obserwowane współczynniki korelacji pomiędzy wartościami  $\log (1/R_F)$  i polaryzowalnością alkoholu ( $\alpha_e$ ) dla danej porfiryny są wysokie i w prawie każdym przypadku przekraczają wartość 0.95.

Tab. 6. Współczynniki ( $a$ ,  $b$ ) oraz wartości współczynnika korelacji ( $r$ ) równania regresji liniowej  $\log (1/R_F) = a \cdot \alpha_e + b$  porfiryn.

Tab. 6. Regression coefficients ( $a$ ,  $b$ ) and correlation coefficient ( $r$ ) of regression equation  $\log (1/R_F) = a \cdot \alpha_e + b$  for porphyrins.

<b>Faza stacjonarna – Kieselgel 60</b> <i>Stationary phase – Kieselgel 60</i>			
<b>porfiryra</b> <i>porphyrin</i>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
uoporfiryra I	-0.130	1.574	0.9805
uoporfiryra III	-0.088	1.219	0.9422
koproporfiryra I	-0.108	1.271	0.9603
koproporfiryra III	-0.147	1.525	0.9107
protoporfiryra	-0.080	1.051	0.9897
<b>Faza stacjonarna – Poliamid</b> <i>Stationary phase – Polyamide</i>			
<b>porfiryra</b> <i>porphyrin</i>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
uoporfiryra I	0.063	0.125	0.9544
uoporfiryra III	0.014	0.102	0.9586
koproporfiryra I	0.023	0.253	0.8893
koproporfiryra III	0.032	0.202	0.9975
protoporfiryra	0.033	0.216	0.9864

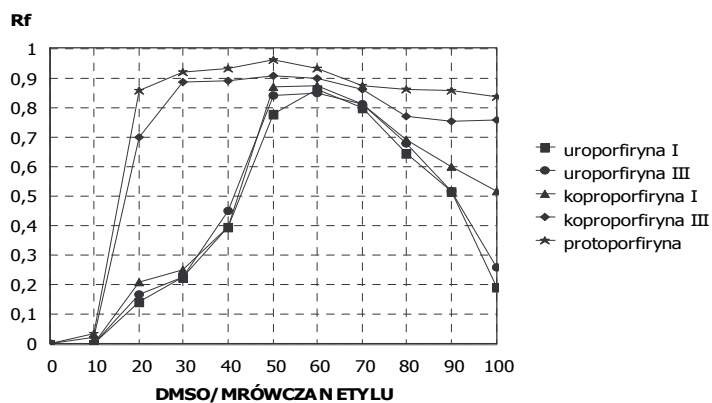
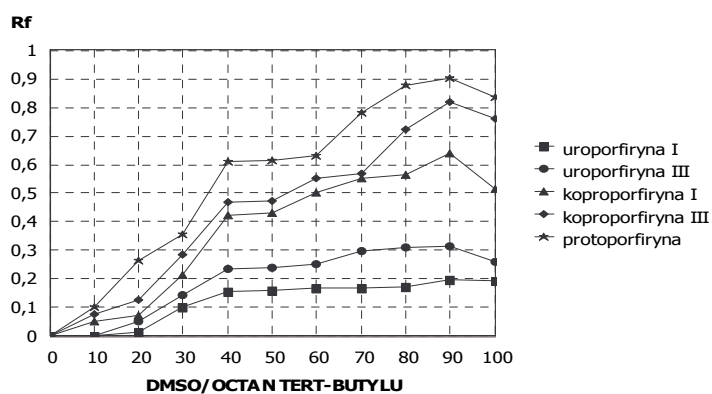
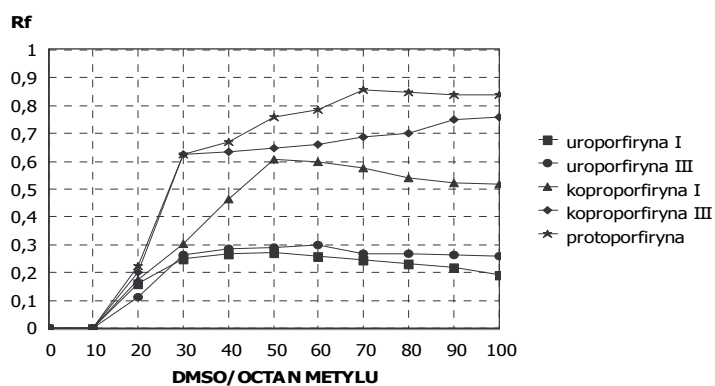
Stanowi to potwierdzenie hipotezy o podstawowej roli oddziaływań elektrostatycznych w procesie separacji chromatograficznej w badanych układach. W przypadku stosowania jako fazy stacjonarnej żelu krzemionkowego współczynniki regresji liniowej a mają wartości ujemne. W związku z tym użycie fazy ruchomej o wyższej polaryzowalności powoduje wzrost wartości parametru  $R_F$  badanej porfiryny, natomiast wartość  $\log(1/R_F)$  maleje. Tego typu zachowanie obserwowano już uprzednio w przypadku policyklicznych węglowodorów aromatycznych badanych w układzie faz odwróconych [473, 474]. Współczynniki regresji a i b uzyskane na poliamidowej fazie stacjonarnej mają wartości dodatnie. Niewątpliwie jest to efekt związany z fazą stacjonarną. Z tego względu można zasugerować, że na parametr retencyjny mają wpływ różnice w sile oddziaływań elektrostatycznych badanych porfiryn z fazą ruchomą, jak i stacjonarną. Podsumowując, należy stwierdzić, że ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu elucja porfiryn na krzemionkowej fazie stacjonarnej rośnie, na poliamidowej fazie stacjonarnej maleje. W obu przypadkach maksymalne wartości parametru  $R_F$  były równe około 0.5, a zatem opisane układy chromatograficzne mogą być polecane do dalszej analizy porfiryn. Otrzymane wyniki na celulozowej fazie stacjonarnej sugerują znikomą przydatność tej fazy oraz serii alkoholi homologicznych jako faz ruchomych w badaniach dotyczących porfiryn. Ponadto stosowanie acetonitrylu i THF przy użyciu wszystkich trzech faz stacjonarnych nie przyniosło zadowalających efektów. Na krzemionkowej i poliamidowej fazie stacjonarnej zaobserwowano liniową zależność między  $\log(1/R_F)$  a polaryzowalnościami molekularnymi alkoholi stosowanych jako fazy ruchome. Otrzymane wysokie współczynniki korelacji r potwierdziły hipotezę o podstawowej roli oddziaływań elektrostatycznych w procesie separacji porfiryn na badanych fazach stacjonarnych [475].

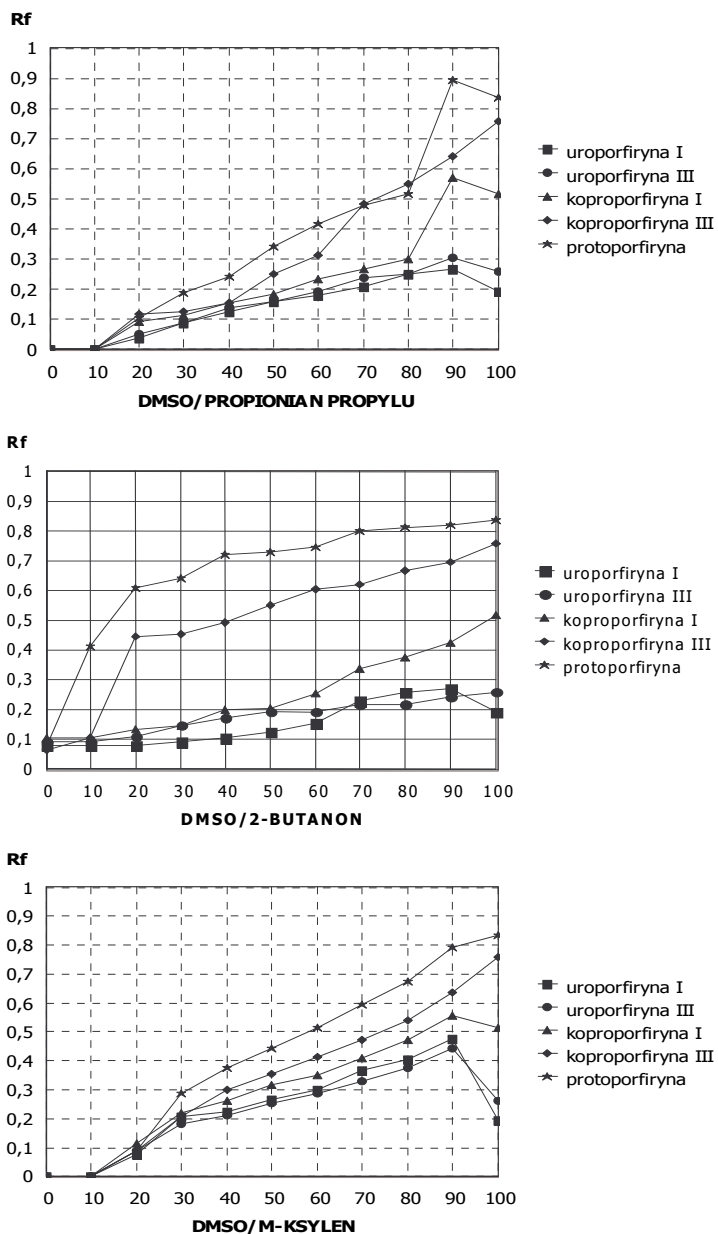
## 5.4. Niewodne fazy ruchome modyfikowane DMSO i HMDSO

### 5.4.1. Porfiryny na krzemionkowej fazie stacjonarnej

Fazy binarne sporządzano przez zmieszanie odpowiednich ilości czystych estrów, ketonów oraz ksylenów z DMSO w proporcjach od 0 do 100% v/v. Na uwagę zwraca silne oddziaływanie badanych związków z fazą stacjonarną w przypadku stosowania faz ruchomych zawierających 100% rozpuszczalników (z wyjątkiem acetonu i 2-butanonu) oraz faz z niewielkim dodatkiem DMSO. A zatem transport porfiryn wymagał obecności DMSO w fazie ruchomej. Najprawdopodobniej DMSO oddziałując z grupami silanolowymi fazy stacjonarnej i blokując je zarazem, powodowało wzrost wymywania porfiryn wraz ze zwiększającą się zawartością DMSO w fazie ruchomej. Analizując otrzymane wyniki przy zastosowaniu szeregu homologicznego estrów stwierdzono, że ze wzrostem długości łańcucha węglowego estru rosła retencja chromatograficzna badanych porfiryn. Z kolei octan tert-butyłu wpłynął zadowalająco na separację uroporfiryn w zakresie stężeń 40-100% v/v DMSO/octan tert-butyłu. Największy wpływ na elucję porfiryn miał mrówczan etylu (ryc. 17), powodując ich znaczną migrację. Przy czym należy również dodać, że separacja badanych związków uległa pogorszeniu, kiedy fazą ruchomą była mieszanina DMSO/mrówczan etylu. Octan metylu i mrówczan etylu - estry o jednakowej długości łańcucha węglowego oraz jednakowej masie - miały bardzo zróżnicowany wpływ na zachowanie chromatograficzne porfiryn. Należy przypuszczać, że przyczyną tego było położenie grup metylowych w strukturze obu estrów. Generalnie estry zawarte w fazie ruchomej miały większy wpływ na retencję oraz separację koproporfiryn i protoporfiryny niż na uroporfiryny. Zaobserwowano, że podobnie jak w przypadku szeregu homologicznego estrów, długość łańcucha węglowego ketonów miała zdecydowany wpływ na retencję badanych związków. I tak ze wzrostem długości łańcucha malała elucja porfiryn, szczególnie koproporfiryny III oraz protoporfiryny. Maksymalna retencja wystąpiła, kiedy faza ruchoma złożona była ze 100% 3-pentanonu lub zawierała 10% v/v dodatek DMSO (z wyjątkiem protoporfiryny). Stosując fazy ruchome zawierające ketony otrzymano najlepszą separację koproporfiryn. Porównując dane otrzymane po rozwinięciu chromatogramów przy zastosowaniu jako faz ruchomych mieszanin DMSO/para-ksylen i DMSO/meta-ksylen stwierdzono niewielkie różnice w zachowaniu chromatograficznym porfiryn. Jedynie protoporfiryna była lepiej wymywana, kiedy faza ruchoma składała się z DMSO i para-ksylenu. Ponadto stosując ksylenowe fazy ruchome zaobserwowano dobrą separację koproporfiryn i protoporfiryny. Godnym uwagi jest fakt, że sekwencja elucji porfiryn zależała od ich masy cząsteczkowej. Stąd najwolniej wymywane były uroporfiryny (m.cz. 943.0), następnie koproporfiryny (m.cz. 710.8), najszybciej protoporfiryna (m.cz. 590.7). W tabeli 7 zestawiono wartości współczynników  $a$ ,  $b$  oraz współczynnika korelacji  $r$

równania regresji liniowej  $R_M = a \cdot \%S + b$ . Zaobserwowano, że liniowe zachowanie porfiryn w dużej mierze zależało od długości łańcucha węglowego estrów [476].





Ryc. 17. Przykładowe zależności pomiędzy składem fazy ruchomej a parametrem  $R_F$  porfiryn. **Faza stacjonarna: Kieselgel 60 HPTLC.**

Fig. 17. Examples of relationships between mobile phase composition and the  $R_F$  values of the porphyrins. **Support: Kieselgel 60 HPTLC.**

Tab. 7. Współczynniki  $a$ ,  $b$  oraz wartości współczynnika korelacji  $r$  równania regresji liniowej  $R_M = a \cdot \%S + b$  porfiryn.

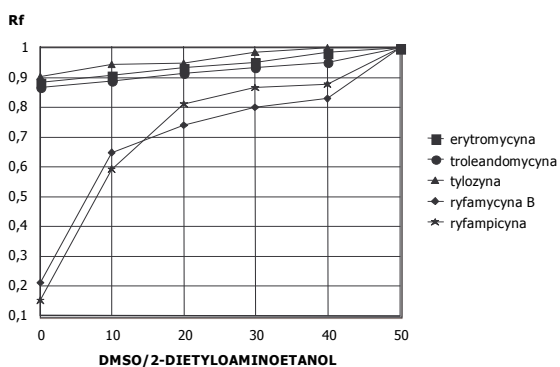
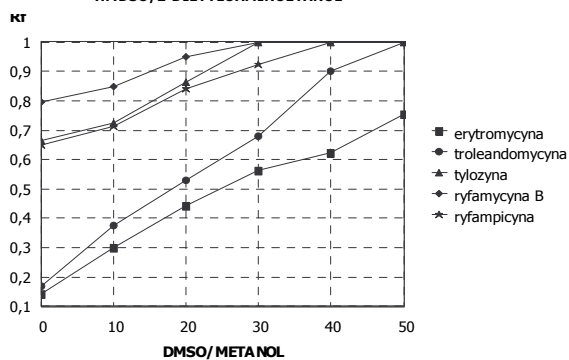
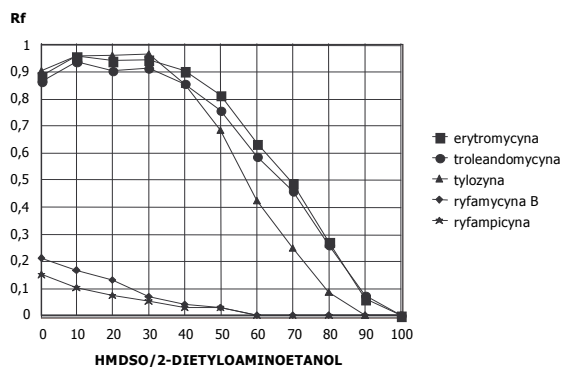
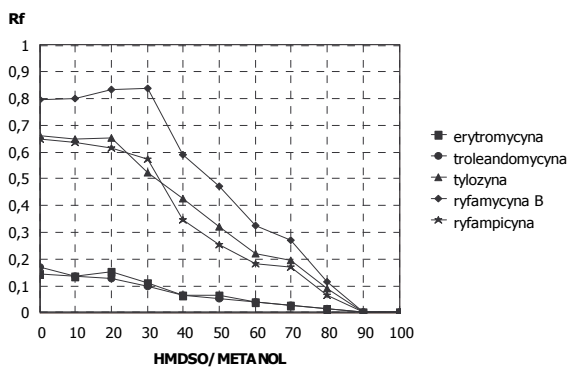
Tab. 7. Regression coefficients ( $a$ ,  $b$ ) and correlation coefficient ( $r$ ) of regression equation  $R_M = a \cdot \%S + b$  for porphyrins.

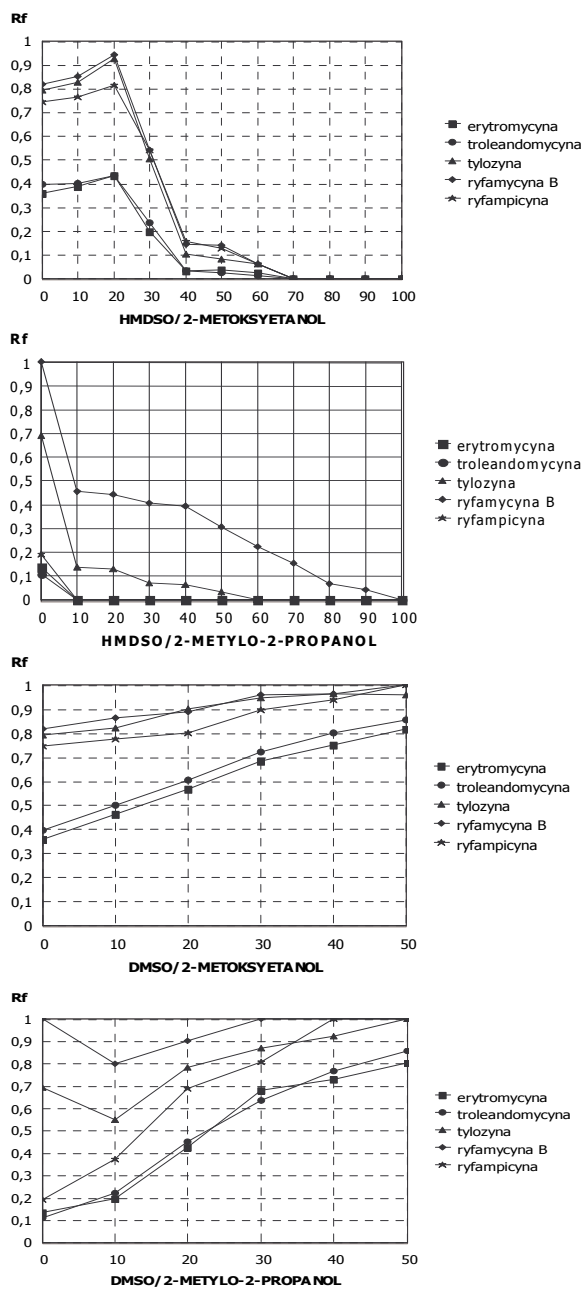
Eluent <i>Eluent</i>	Porfiryra <i>Porphyrin</i>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
DMSO/OCTAN ETYLU	koproporfiryra I	-0.016	1.409	0.9448
DMSO/OCTAN N-BUTYLU	uoporfiryra I	-0.009	1.525	0.9885
	uoporfiryra III	-0.010	1.564	0.9881
	koproporfiryra III	-0.021	1.364	0.9396
	protoporfiryra	-0.015	0.649	0.9493
DMSO/OCTAN TERT-BUTYLU	koproporfiryra III	-0.017	1.043	0.9565
	protoporfiryra	-0.019	0.837	0.9476
DMSO/OCTAN N-AMYLU	uoporfiryra I	-0.011	1.562	0.9126
	uoporfiryra III	-0.012	1.597	0.9327
	koproporfiryra I	-0.015	1.499	0.9888
	koproporfiryra III	-0.022	1.746	0.9843
	protoporfiryra	-0.025	1.666	0.9715
DMSO/PROPIONIAN PROPYLU	uoporfiryra III	-0.010	1.288	0.9379
	koproporfiryra I	-0.013	1.303	0.9672
	koproporfiryra III	-0.018	1.363	0.9903
	protoporfiryra	-0.020	1.347	0.9516
DMSO/ACETON	uoporfiryra III	-0.004	0.702	0.9019
	koproporfiryra I	-0.006	0.687	0.9753
DMSO/2-BUTANON	uoporfiryra I	-0.007	1.142	0.9227
	uoporfiryra III	-0.005	0.980	0.9670
	koproporfiryra I	-0.009	1.010	0.9907
DMSO/3-PENTANON	koproporfiryra I	-0.014	1.393	0.9273
	koproporfiryra III	-0.021	1.335	0.9241
	protoporfiryra	-0.019	0.997	0.9711

#### 5.4.2. Antybiotyki makrocykliczne na fazie stacjonarnej LiChrospher Si 60

Jako fazy ruchome zastosowano mieszaniny binarne alkoholi i ketonów z HMDSO w proporcjach od 0 do 100% v/v oraz z DMSO w proporcjach od 0 do 50% v/v. Oba rozpuszczalniki zastosowano po raz pierwszy jako eluenty w TLC. Analizując otrzymane wyniki dla serii alkoholi homologicznych w mieszaninie z HMDSO, można zauważyć, że ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu oraz dodatku HMDSO do fazy ruchomej retencja makrolidów (erytromycyna, troleandomycyna, tylozyna) rosła, a minimalne wartości współczynnika  $R_F$  występowały w coraz szerszym zakresie stężeń HMDSO w alkoholu (w przypadku mieszanin binarnych HMDSO z 1-butanołem, 2-butanołem oraz 2-pentanołem miała miejsce maksymalna retencja w całym badanym zakresie stężeń 0-100% v/v). Użycie wyżej wymienionych faz ruchomych powodowało coraz lepszą separację obu badanych grup antybiotyków. Uzyskane wartości parametru  $R_F$  dla ryfamycyny B były najwyższe w porównaniu z wartościami  $R_F$  pozostałych antybiotyków, a najlepszym eluentem okazała się mieszanina 60% v/v HMDSO/etanol ( $R_F > 0.9$ ). Ryfamycyna B była silnie wiązana przez fazę stacjonarną w przypadku użycia faz ruchomych zawierających 100% HMDSO lub niewielki dodatek alkoholu. Z kolei oddziaływanie ryfampicyny było większe - maksymalna retencja miała miejsce w całym badanym zakresie stężeń 0-100% v/v dla mieszanin HMDSO z 2-butanołem i 2-pentanołem. Należy również nadmienić, że zatrzymywanie tego antybiotyku przez fazę stacjonarną rosło ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholi. Ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu polepszyła się separacja ansamycyn. Porównując zachowanie chromatograficzne badanych antybiotyków dla faz ruchomych składających się z HMDSO oraz 1-propanolu, 2-propanolu, 1-butanolu i 2-butanolu, zaobserwowano większy wpływ na retencję alkoholi z grupą wodorotlenową podstawioną w pozycji 2 - retencja rosła w przypadku użycia takich mieszanin binarnych. Wszystkie antybiotyki (z wyjątkiem ryfamycyny B) były słabo eluowane w szerokim zakresie stężeń HMDSO w 2-metylo-1-propanolu, 2-metylo-2-propanolu, 2-metylo-1-butanolu, 2-metylo-2-butanolu i 3-metylo-1-butanolu. A zatem można zasugerować zastosowanie badanych antybiotyków jako modyfikatorów fazy stacjonarnej. Minimum retencji zaobserwowano dla ryfamycyny B w przypadku użycia 100% 2-metylo-2-propanolu. Ten antybiotyk może być polecany jako modyfikator fazy ruchomej w wyżej wymienionym układzie chromatograficznym. W przypadku użycia mieszaniny DMSO/2-metylo-2-propanol minimum retencji wystąpiło w najszerszym zakresie stężeń. Ansamycyny były lepiej wymywane w porównaniu z makrolidami.







Ryc. 18. Przykładowe zależności pomiędzy składem fazy ruchomej a parametrem  $R_F$  antybiotyków makrocyklicznych. **Faza stacjonarna: LiChrospher Si 60 F<sub>254s</sub>.**

Fig. 18. Examples of relationships between mobile phase composition and the  $R_F$  values of the macrocyclic antibiotics. **Support: LiChrospher Si 60 F<sub>254s</sub>.**

Należy również nadmienić, że miała miejsce dobra separacja ansamycyn dla faz ruchomych zawierających 100% alkoholu lub 10 i 20% v/v dodatek DMSO do alkoholu. Zaobserwowano zdecydowanie większy wpływ 2-dietyloaminoetanolu (ryc. 18) na wymywanie makrolidów niż ansamycyn. W zakresie stężeń 10-30% v/v HMDSO/2-dietyloaminoetanol wartości parametru  $R_F$  makrolidów osiągnęły wartość najwyższą ( $R_F > 0.9$ ). Najlepszą separację makrolidów uzyskano w zakresie stężeń 50-60% v/v HMDSO/alkohol, natomiast najlepsza separacja ansamycyn wystąpiła w zakresie stężeń 0-20% v/v HMDSO/alkohol. Ansamycyny silnie oddziaływały z fazą stacjonarną w szerokim zakresie stężeń HMDSO – mogą być stosowane jako modyfikatory fazy stacjonarnej. Minimum retencji dla makrolidów zaobserwowano w szerszym zakresie stężeń DMSO w porównaniu z ansamycynami, co daje możliwość stosowania makrolidów jako modyfikatorów faz ruchomych. Uzyskano również lepszą separację ansamycyn niż makrolidów przy zastosowaniu fazy ruchomej DMSO/2-dietyloaminoetanol. Maksymalne wymywanie badanych antybiotyków makrocyklicznych zaobserwowano dla fazy ruchomej 20% v/v HMDSO/2-metoksyetanol, przy czym najwyższe wartości parametru  $R_F$  osiągnęła ryfamycyna B oraz tylozyna. Stosując fazę ruchomą HMDSO/2-metoksyetanol zaobserwowano dobrą separację ansamycyn w zakresie stężeń 0-20% v/v HMDSO/alkohol. Z kolei minimum retencji zaobserwowano dla ansamycyn w przypadku użycia fazy ruchomej 50% v/v DMSO/2-metoksyetanol. Ponadto uzyskano dobrą separację ansamycyn w zakresie stężeń 0-20% v/v DMSO/alkohol. Podczas stosowania jako fazy ruchomej mieszaniny HMDSO/alkohol allilowy miała miejsce zadowalająca separacja ansamycyn w szerokim zakresie stężeń. Makrolidy oraz ryfamycyna zatrzymywane były przez fazę stacjonarną w zakresie stężeń 60-100% v/v HMDSO/alkohol allilowy, w związku z czym wymienione antybiotyki mogą być stosowane jako modyfikatory fazy stacjonarnej. Minimum retencji zaobserwowano dla ansamycyn oraz tylozyny od 40% v/v DMSO/alkohol allilowy. Natomiast dobra separacja ansamycyn wystąpiła w zakresie stężeń 0-20% v/v DMSO/alkohol allilowy. Następujące alkohole: benzyłowy, diacetonowy oraz 2-bromoetanol nie mieszały się z HMDSO. Stąd możliwa była tylko analiza badanych antybiotyków makrocyklicznych przy użyciu faz ruchomych zawierających wyżej wymienione alkohole i DMSO. Najszerszy zakres stężeń, w którym parametr  $R_F$  osiągnął maksymalną wartość zaobserwowano dla ryfamycyny B w przypadku użycia jako dodatku do fazy ruchomej alkoholu benzyłowego oraz diacetonowego. Z kolei mieszanina DMSO/2-bromoetanol dobrze eluowała wszystkie badane antybiotyki, najlepiej wymywana była tylozyna. Separacja ansamycyn była najlepsza, kiedy fazą ruchomą była mieszanina DMSO/alkohol diacetonowy, a separacja makrolidów zadowalająca w przypadku użycia faz ruchomych DMSO/alkohol benzyłowy. Wszystkie badane antybiotyki (z wyjątkiem ryfamycyny B) były słabo eluowane przez mieszaninę HMDSO/2-butanon w zakresie stężeń 0-20% v/v. Zaobserwowano silne oddziaływanie wszystkich badanych antybiotyków (z wyjątkiem ryfamycyny B) z fazą stacjonarną, kiedy

fazą ruchomą była mieszanina HMDS/3-pentanon. Godnym uwagi jest fakt, że retencja antybiotyków rosła ze wzrostem długości łańcucha węglowego ketonu. Natomiast użycie DMSO w fazie ruchomej spowodowało, że ze wzrostem łańcucha węglowego ketonu elucja badanych związków malała oraz pogorszyła się separacja ansamycyn. Minimum retencji zaobserwowano dla ansamycyn w szerokim zakresie stężeń DMSO/2-butanon. Uzyskano dobrą separację ansamycyn w szerszym zakresie stężeń DMSO/2-butanon niż DMSO/3-pentanon. Można zasugerować zatem, że długość łańcucha węglowego ketonu miała decydujący wpływ na separację ryfamycyny B i ryfampicyny. Wankomycyna jako jedyny antybiotyk nie była eluowana przez wszystkie rozpuszczalniki użyte do sporządzenia faz ruchomych. Jedynie w przypadku fazy ruchomej DMSO/alkohol diacetonowy zaobserwowano wymywanie tego związku. Na ryc. 18 przedstawiono przykłady wpływu kompozycji fazy ruchomej na wartości parametru  $R_F$  badanych antybiotyków.

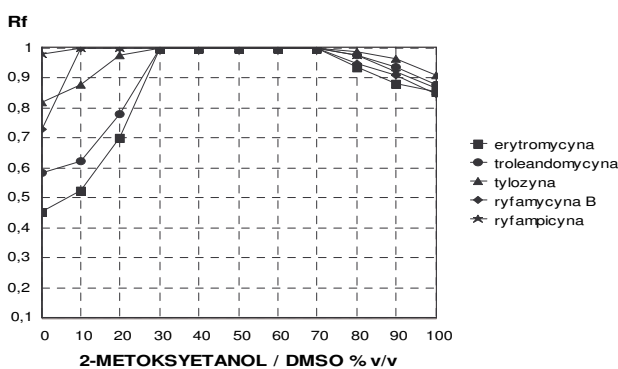
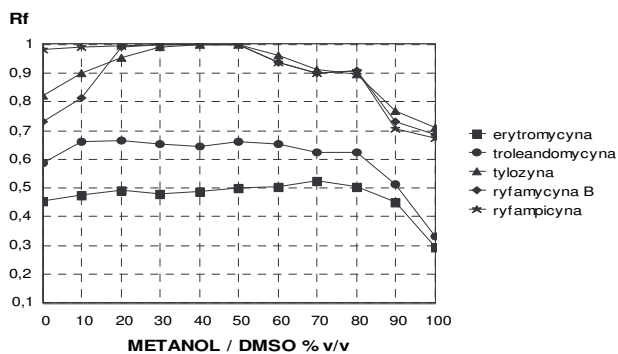
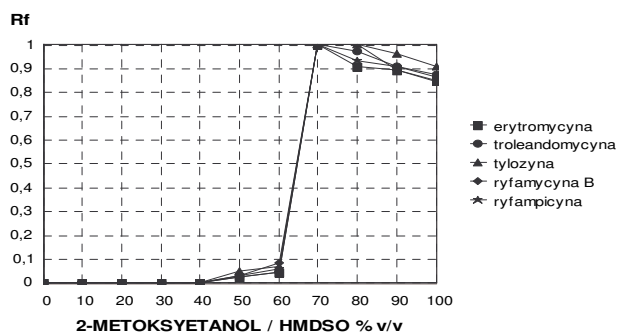
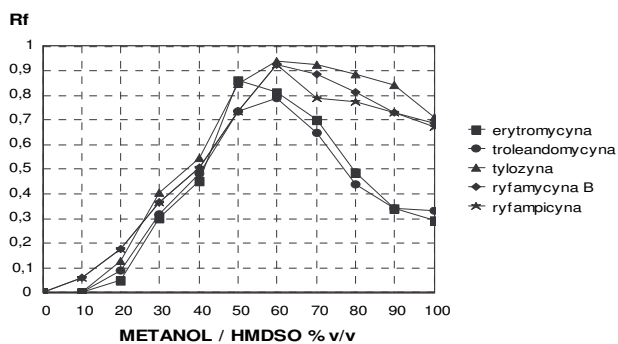
Warto zaznaczyć, że choć analizowane antybiotyki makrocykliczne rozpuszczają się w niższych alkoholach (z wyjątkiem wankomycyny) i częściowo w ketonach, to nie dysocjują w takim stopniu w jakim dysocjowałyby w wodzie. Powodem tego jest to, że pomimo względnie wysokich wartości momentów dipolowych alkoholi i ketonów (decydujących o rozpuszczalności) mają one niską stałą dielektryczną, będącą z kolei miarą zdolności rozpuszczalnika do jonizacji substancji rozpuszczonej [462]. Utrata naładowanych grup może grozić spadkiem właściwości enancjoselektywnych antybiotyków makrocyklicznych. Tabela 8 odzwierciedla nieliniowe zachowanie chromatografowanych antybiotyków [477].

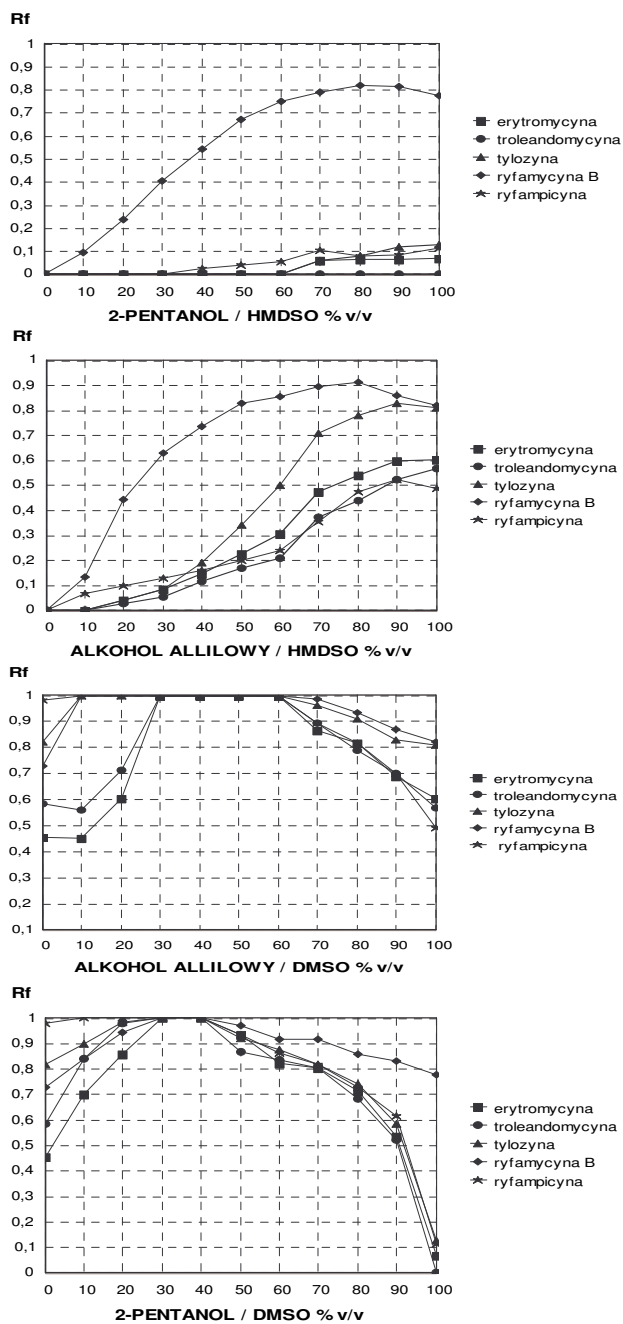
Tab. 8. Nieliniowe zachowanie chromatografowanych antybiotyków.  
 Tab. 8. *Non-linear behavior of chromatographed antibiotics.*

<b>faza ruchoma</b> <i>mobile phase</i>	<b>antybiotyk</b> <i>antibiotic</i>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
HMDSO/ETANOL	Erytromycyna	0.003	1.319	0.5787
	Troleandomycyna	0.007	1.364	0.7977
	Ryfamycyna B	0.008	-0.761	0.3085
HMDSO/2-METOKSYETANOL	Tylozyna	0.009	-1.046	0.8872
	Ryfamycyna B	0.037	-1.135	0.8835
DMSO/2-DIETYLOAMINOETANOL	Ryfamycyna B	-0.028	0.281	0.8902
HMDSO/1-PROPANOL	Ryfamycyna B	0.004	-0.672	0.8315
	Ryfampicyna	0.004	0.929	0.8834
HMDSO/2-PROPANOL	Ryfamycyna B	0.002	-0.419	0.8768
DMSO/2-PROPANOL	Ryfamycyna B	0.015	-0.404	0.8508
HMDSO/1-BUTANOL	Ryfamycyna B	0.003	-0.593	0.8151
HMDSO/2-BUTANOL	Ryfamycyna B	0.003	-0.311	0.8353
HMDSO/2-METYLO-1-PROPANOL	Ryfamycyna B	0.014	-0.305	0.8439
HMDSO/2-METYLO-2-PROPANOL	Tylozyna	0.007	0.089	0.8827
HMDSO/2-METYLO-1-BUTANOL	Ryfamycyna B	0.018	-0.775	0.8952
	Ryfampicyna	0.006	1.241	0.7974
HMDSO/3-METYLO-1-BUTANOL	Ryfamycyna B	0.003	-0.527	0.8930
HMDSO/ALKOHOL ALLILOWY	Erytromycyna	0.001	1.426	0.8944
HMDSO/2-PENTANOL	Ryfamycyna B	0.003	-0.405	0.8731
DMSO/ALKOHOL BENZYLOWY	Troleandomycyna	0.011	0.990	0.8983
	Tylozyna	0.030	0.552	0.8684
DMSO/ALKOHOL DIACETONOWY	Erytromycyna	0.005	0.273	0.8421

### 5.4.3. Antybiotyki makrocykliczne na fazie stacjonarnej RP-18

Fazy binarne przygotowano przez zmieszanie odpowiednich ilości czystych alkoholi z HMDSO oraz z DMSO w proporcjach od 0 do 100% v/v. Analizując otrzymane wyniki dla serii alkoholi homologicznych zawierających dodatek **HMDSO** można zauważyć, że ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu, wymywanie badanych antybiotyków makrocyklicznych malało (z wyjątkiem ryfamycyny B). Ponadto stwierdzono silne oddziaływanie antybiotyków z fazą stacjonarną w przypadku stosowania faz ruchomych z czystym HMDSO lub z dodatkiem niewielkiej ilości alkoholu. A zatem transport badanych związków wymagał obecności alkoholu w fazie ruchomej. Maksymalna retencja wystąpiła w najszerszym zakresie stężeń 2-pentanolu w HMDSO, szczególnie w przypadku makrolidów. Najsilniej zatrzymywana była troleandomycyna w całym zakresie badanych stężeń fazy ruchomej 2-pentanol/HMDSO. Dlatego można polecić makrolidy jako modyfikatory fazy stacjonarnej przy użyciu wyżej wymienionej fazy ruchomej oraz faz ruchomych zawierających czysty HMDSO lub niewielki dodatek alkoholu. Parametr  $R_F$  tylozyny i ryfamycyny B osiągnął maksymalną wartość dla faz ruchomych 80% v/v etanol/HMDSO - z tego względu oba antybiotyki mogą być stosowane jako modyfikatory wymienionej fazy ruchomej. Separacja ansamycyn w porównaniu z makrolidami (z wyjątkiem fazy ruchomej metanol/HMDSO) była zadowalająca w szerokim zakresie stężeń faz ruchomych. Natomiast najlepszą separację makrolidów zaobserwowano przy użyciu fazy ruchomej etanol/HMDSO, propanol/HMDSO, butanol/HMDSO z dużym dodatkiem alkoholu do fazy binarnej. Należy nadmienić, że separacja pogarszała się ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu. Porównując zachowanie chromatograficzne badanych związków (ze szczególnym uwzględnieniem tylozyny i ryfamycyny B) dla faz ruchomych złożonych z HMDSO oraz 1-propanolu, 2-propanolu, 1-butanolu i 2-butanolu, zaobserwowano większą elucję antybiotyków, kiedy faza ruchoma składała się z alkoholu z grupą wodorotlenową podstawioną w pozycji 1. Na podstawie obserwacji wyników otrzymanych po zastosowaniu faz ruchomych zawierających **DMSO** i alkohole homologiczne stwierdzono, że retencja chromatograficzna badanych związków malała ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu. Minimum retencji ansamycyn wystąpiło w szerszym zakresie stężeń faz ruchomych niż makrolidów. Tym niemniej wszystkie badane antybiotyki mogą być polecane jako modyfikatory faz ruchomych, szczególnie faz etanol/DMSO, 1-propanol/DMSO, 2-propanol/DMSO, 2-butanol/DMSO oraz 2-pentanol/DMSO.





Ryc. 19. Przykładowe zależności pomiędzy składem fazy ruchomej a parametrem  $R_F$  antybiotyków makrocyclicznych. **Faza stacjonarna: RP-18.**

Fig. 19. Examples of relationships between mobile phase composition and the  $R_F$  values of the macrocyclic antibiotics. **Support: RP-18.**



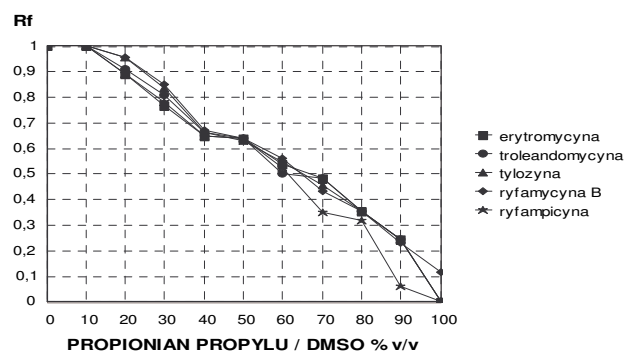
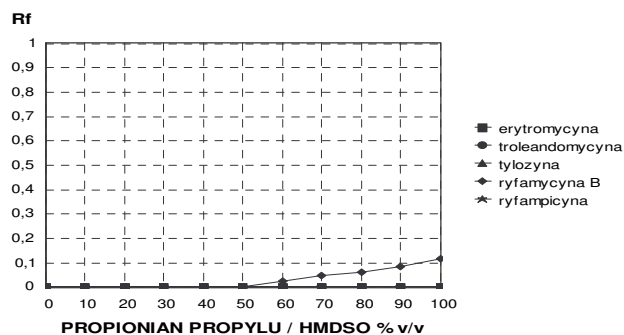
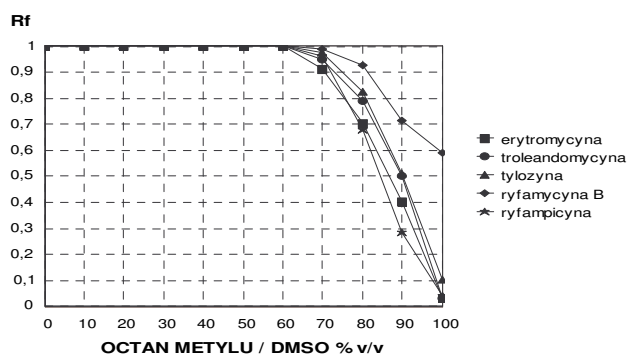
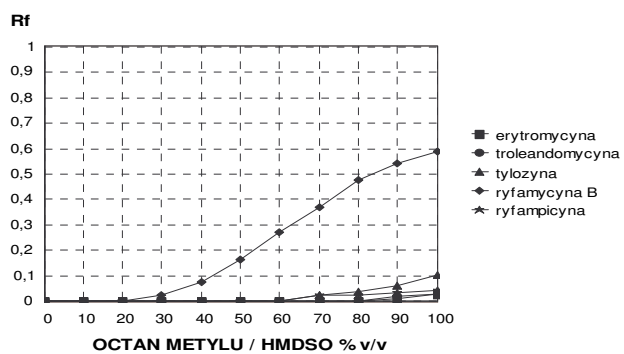
Uzyskano zadowalającą separację obu grup antybiotyków, która pogarszała się ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu. Godnym uwagi jest zachowanie chromatograficzne badanych antybiotyków makrocyklicznych przy zastosowaniu jako fazy ruchomej mieszaniny 2-metoksyetanol/HMDSO. W tym wypadku chromatografowane związki oddziaływały zarówno z fazą stacjonarną (w szerokim zakresie stężeń fazy ruchomej), jak i z fazą ruchomą. A zatem można zasugerować dwojakie zastosowanie antybiotyków jako modyfikatorów i fazy stacjonarnej (w zakresie stężeń 0-40% v/v 2-metoksyetanol/HMDSO) i fazy ruchomej (wszystkich antybiotyków dla mieszaniny 70% v/v 2-metoksyetanol/HMDSO oraz tylozyny i ryfamycyny B dla 80% v/v 2-metoksyetanol/HMDSO). W przypadku stosowania fazy ruchomej złożonej z 2-metoksyetanolu i DMSO parametry  $R_F$  badanych związków osiągnęły maksymalną wartość w szerokim zakresie stężeń fazy ruchomej, co ułatwia precyzyjny dobór modyfikowanych faz ruchomych używanych w separacji chiralnej. Dla faz ruchomych złożonych z alkoholi metylopodstawionych (2-metylo-1-propanol, 2-metylo-1-butanol, 2-metylo-2-butanol, 3-metylo-1-butanol) oraz HMDSO otrzymane wyniki są w zasadzie podobne, z wyjątkiem ryfamycyny B, na retencję której badane fazy ruchome miały największy wpływ. Pozostałe antybiotyki nie były eluowane w szerokim zakresie faz ruchomych, co z praktycznego punktu widzenia daje możliwość stosowania ich jako modyfikatorów fazy stacjonarnej. Uzyskano również zadowalającą separację ansamycyn. Minimum retencji ansamycyn wystąpiło w szerszym zakresie stężeń faz ruchomych alkohol metylopodstawiony/DMSO niż makrolidów. W przypadku stosowania mieszaniny 2-dietyloaminoetanolu z HMDSO maksymalna retencja obserwowana była dla faz ruchomych niezawierających alkoholu lub jego niewielki dodatek - 10% v/v dla ryfamycyny B oraz 10 i 20% v/v dla ryfampicyny oraz uzyskano zadowalającą separację ansamycyn. Z kolei minimalna retencja miała miejsce w zakresie stężeń 60-100% v/v 2-dietyloaminoetanolu/HMDSO dla makrolidów oraz 70-90% v/v dla ryfamycyny B. Parametry  $R_F$  badanych związków osiągnęły maksymalną wartość w szerokim zakresie stężeń fazy ruchomej 2-dietyloaminoetanolu/DMSO, szczególnie tylozyna i ryfamycyna B. Zaobserwowano, że faza ruchoma alkohol allilowy/HMDSO najlepiej wymywała ryfamycynę B, parametry  $R_F$  pozostałych antybiotyków osiągnęły wartości poniżej 0.9. Zaobserwowano słabe oddziaływanie badanych antybiotyków z fazą stacjonarną. W całym badanym zakresie stężeń otrzymano bardzo dobrą separację ansamycyn. Natomiast dla mieszaniny alkoholu allilowego z DMSO - minimum retencji wystąpiło w zakresie stężeń 10-60% v/v dla tylozyny i ansamycyn oraz 30-60% v/v dla erytromycyny i troleandomycyny. Alkohol benzylowy i diacetonowy nie mieszały się z HMDSO. A zatem możliwa była analiza badanych antybiotyków makrocyklicznych przy użyciu faz ruchomych zawierających wyżej wymienione alkohole i DMSO. Najszerszy zakres stężeń, w którym parametr  $R_F$  osiągnął maksymalną wartość ( $R_F = 1$ ) zaobserwowano dla ryfamycyny B w przypadku użycia jako fazy ruchomej mieszaniny alkohol benzylowy/DMSO 10-100% v/v, dla ryfampicyny

10-90% v/v, tylozyny 20-60% v/v oraz pozostałych makrolidów 40-60% v/v. Natomiast mieszanina alkohol diacetonowy/DMSO najlepiej eluowała tylozynę oraz ryfamycynę B ( $R_F = 1$  w zakresie stężeń 10-70% v/v) Na ryc. 19 przedstawiono przykłady wpływu kompozycji fazy ruchomej na wartości parametru  $R_F$  badanych antybiotyków. W przypadku stosowania HMDSO jako dodatku do faz ruchomych zaobserwowano (w większości otrzymanych wyników) liniowe zachowanie antybiotyków makrocyclicznych, natomiast nieliniowe stosując DMSO w mieszaninie z alkoholami [478].

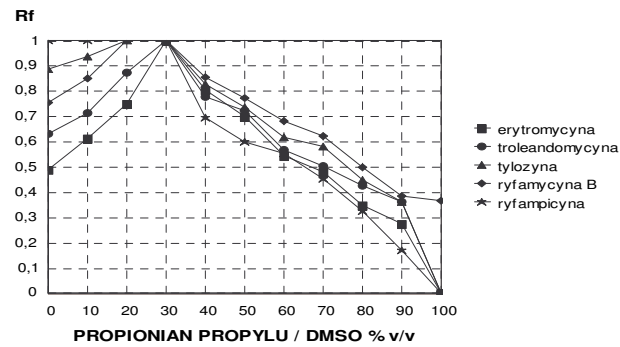
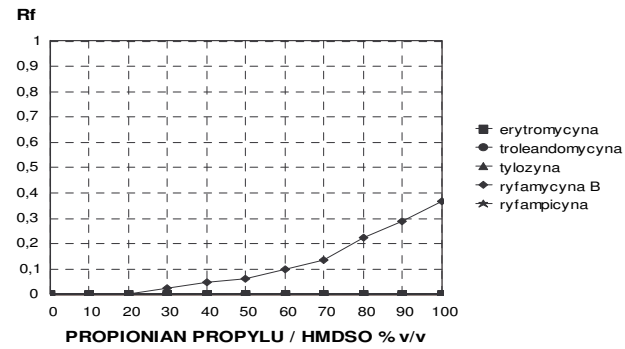
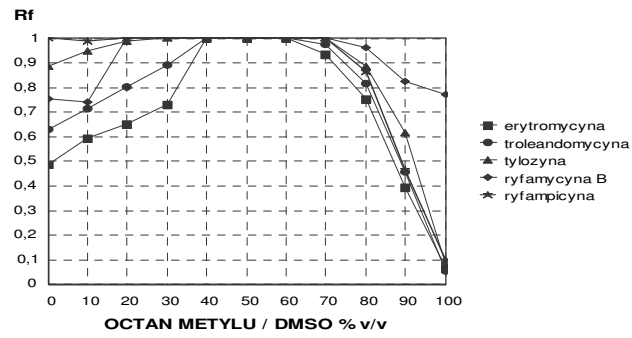
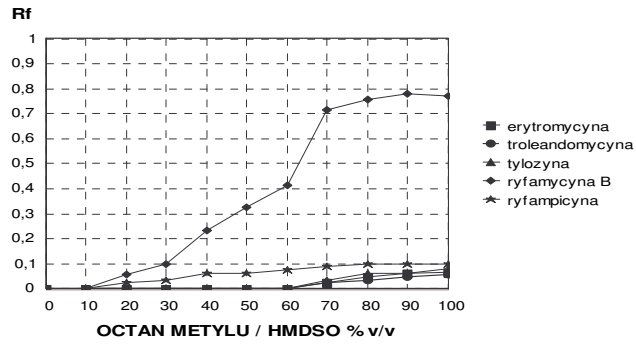
#### **5.4.4. Antybiotyki makrocycliczne w układzie faz normalnych i odwróconych**

Do sporządzenia faz ruchomych użyto estrów i ketonów mieszając je z HMDSO oraz DMSO w proporcjach od 0 do 100% v/v. Stosując HMDSO jako dodatek do faz ruchomych, zarówno w układzie faz normalnych jak i odwróconych, zaobserwowano silne oddziaływanie badanych antybiotyków z fazą stacjonarną. Z wyjątkiem ryfamycyny B, maksymalna retencja występowała w bardzo szerokim zakresie stężeń faz ruchomych. Powyższe obserwacje sugerują możliwość stosowania tychże antybiotyków makrocyclicznych jako dodatków modyfikujących obie stosowane fazy stacjonarne w opisanych warunkach chromatograficznych. Obserwując zachowanie chromatograficzne ryfamycyny B w obu badanych układach faz stacjonarnych można śmiało zasugerować, że wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego w szeregu homologicznym estrów elucja tego związku malała. Podobne wyniki otrzymano w przypadku stosowania serii ketonów. Elucja pozostałych antybiotyków makrocyclicznych miała miejsce jedynie w przypadku użycia faz ruchomych nie zawierających HMDSO lub jego niewielki dodatek - octan metylu/HMDSO, keton/HMDSO. Na ryc. 20 przedstawiono przykłady wpływu kompozycji fazy ruchomej na wartości parametru  $R_F$  badanych antybiotyków.

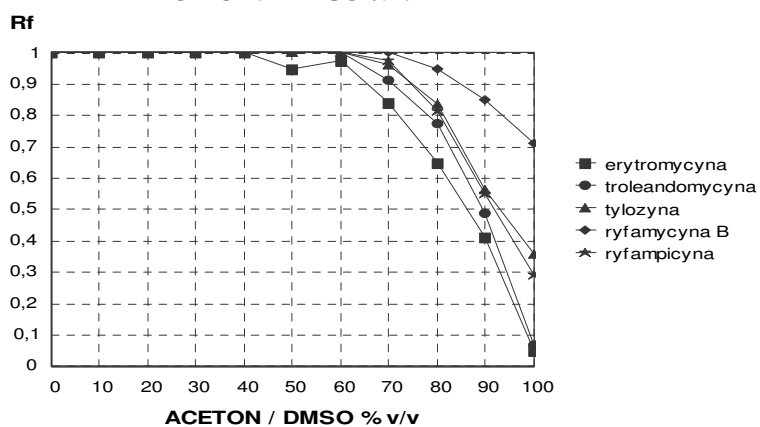
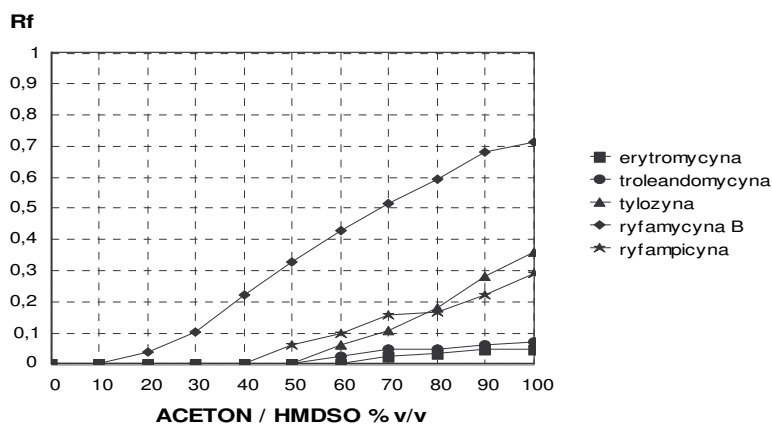
## Adsorbent: Kieselgel 60



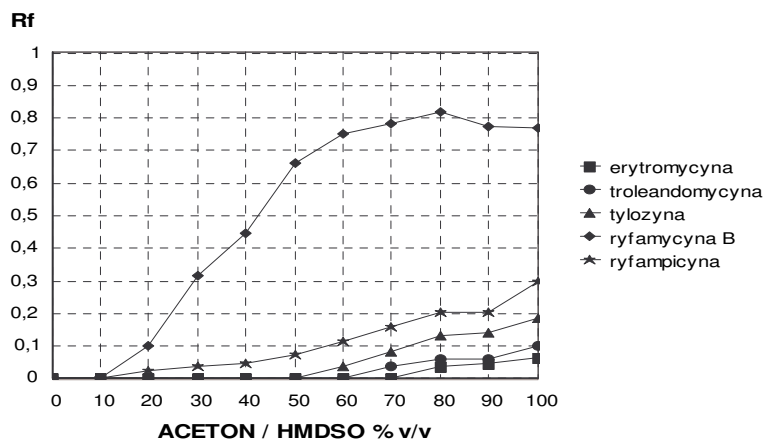
## Adsorbent:RP-18



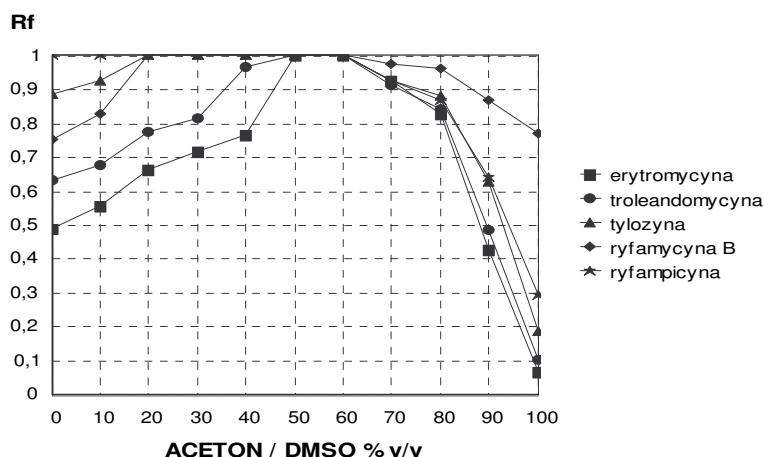
## Adsorbent: Kieselgel 60



## Adsorbent: RP-18



## Adsorbent:RP-18



Ryc. 20. Przykładowe zależności pomiędzy składem fazy ruchomej a parametrem  $R_F$  antybiotyków makrocyklicznych w układzie faz normalnych i odwróconych.

Fig. 20. Examples of relationships between mobile phase composition and the  $R_F$  values of the macrocyclic antibiotics on normal and reversed phases.

Na uwagę zwraca silne oddziaływanie ryfamycyny B z fazą stacjonarną przy użyciu faz ruchomych zawierających niewielki dodatek estru lub ketonu do HMDSO - a zatem transport antybiotyku wymagał dużej zawartości estrów lub ketonów w fazie ruchomej. Zaobserwowano ponadto zadowalającą separację ansamycyn. W badanych układach eluentów (ester/DMSO oraz keton/DMSO) minimum retencji wystąpiło w szerszym zakresie stężeń na **krzemionkowej fazie stacjonarnej**. Umożliwia to precyzyjny dobór faz ruchomych, modyfikowanych badanymi antybiotykami makrocyklicznymi, stosowanych w separacji chiralnej. Należy również dodać, że zakres stężeń faz ruchomych ester/DMSO, w którym miała miejsce maksymalna elucja badanych związków malał ze wzrostem długości łańcucha węglowego estru. Zadowalającą separację badanych związków zaobserwowano w przypadku stosowania faz ruchomych zawierających 90% v/v dodatek octanu metylu, octanu etylu oraz mrówczanu etylu do DMSO. Przy stosowaniu wszystkich binarnych faz ruchomych uzyskano dobrą separację ansamycyn. **W układzie faz odwróconych** najszerszy zakres stężeń, w którym parametry  $R_F$  badanych antybiotyków makrocyklicznych osiągnęły maksymalną wartość zaobserwowano dla faz ruchomych octan metylu/DMSO oraz mrówczan etylu/DMSO. Najlepiej wmywanym antybiotykiem okazała się ryfampicyna. Najlepszą separację badanych związków uzyskano w przypadku

użycia faz ruchomych nie zawierających estrów lub ketonów lub ich niewielki dodatek. Porównując wartości współczynników korelacji  $r$  zaobserwowano, że w układzie faz odwróconych liniowe zachowanie badanych antybiotyków występowało w przypadku stosowania HMDSO jako dodatku do faz ruchomych, z kolei w układzie faz normalnych modyfikacja eluentów DMSO powodowała uzyskanie liniowości [479].

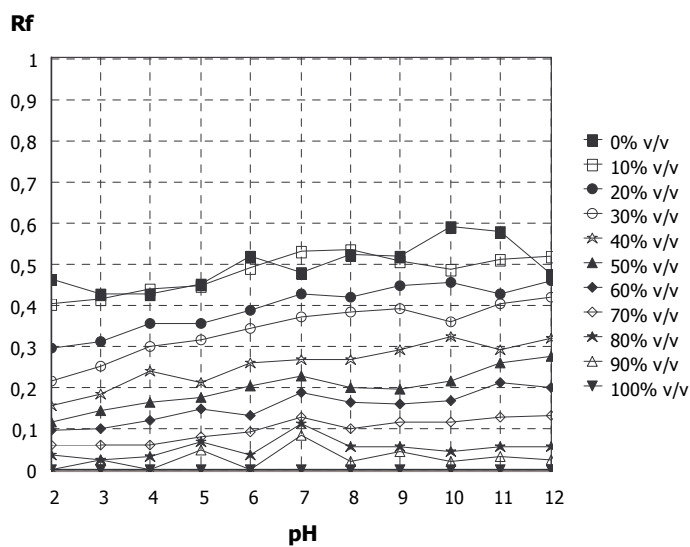
## 5.5. Fazy ruchome modyfikowane buforem

### 5.5.1. Wpływ pH na retencję chromatograficzną kwasu walerenowego i rozmarynowego

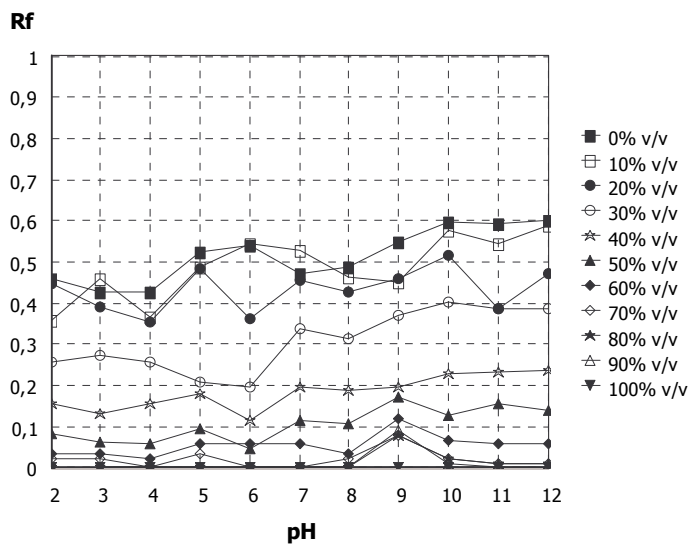
Jako binarne fazy ruchome stosowano mieszaniny buforu wg Brittona-Robinsona z acetonitrylem oraz metanolem. Zbadano wpływ pH fazy ruchomej na retencję badanych związków na **aminowej fazie stacjonarnej**. Ryc. 21 obrazuje zależność parametru  $R_F$  w funkcji pH. Zaobserwowano minimalny wpływ pH na retencję chromatograficzną kwasu walerenowego i rozmarynowego w badanych układach [469].

Zbadano wpływ pH fazy ruchomej na retencję badanych związków w **układzie faz normalnych i odwróconych** (ryc. 22 i 23). W układzie faz normalnych zdecydowany wzrost wymywania kwasu rozmarynowego i walerenowego zaobserwowano w przypadku faz ruchomych zawierających czysty bufor oraz faz z niewielkim dodatkiem modyfikatora organicznego. W układzie faz odwróconych pH fazy ruchomej wpłynęło na retencję kwasu rozmarynowego w zakresie stężeń faz ruchomych metanol-bufor i acetonitryl-bufor 0-10% v/v. Na uwagę zwraca brak elucji kwasu walerenowego dla fazy ruchomej metanol-bufor w granicach stężeń 0-40 % v/v w całym badanym zakresie pH oraz w granicach 50-60 % v/v dla faz ruchomych o pH 2-5 [470].

## KWAS ROZMARYNOWY



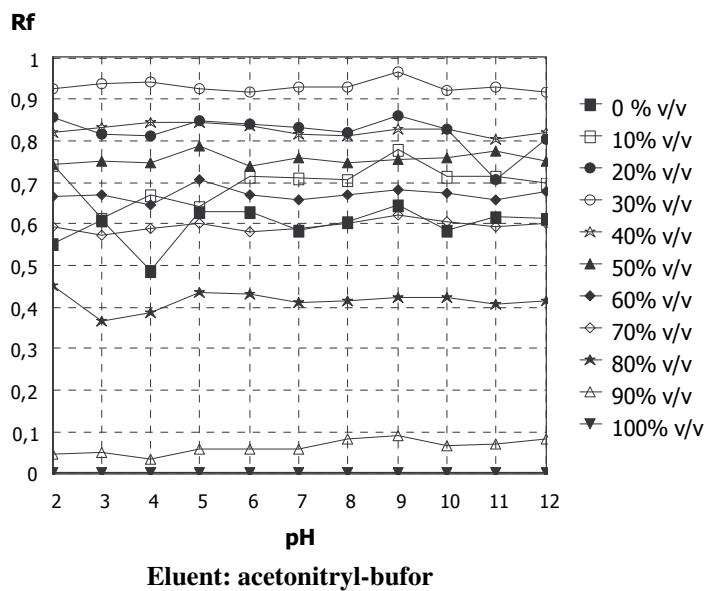
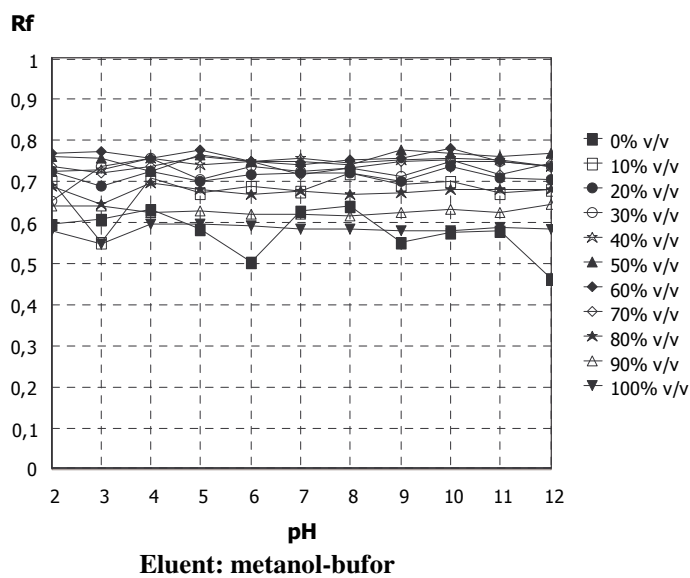
Eluent: metanol-bufor



Eluent: acetonitryl-bufor



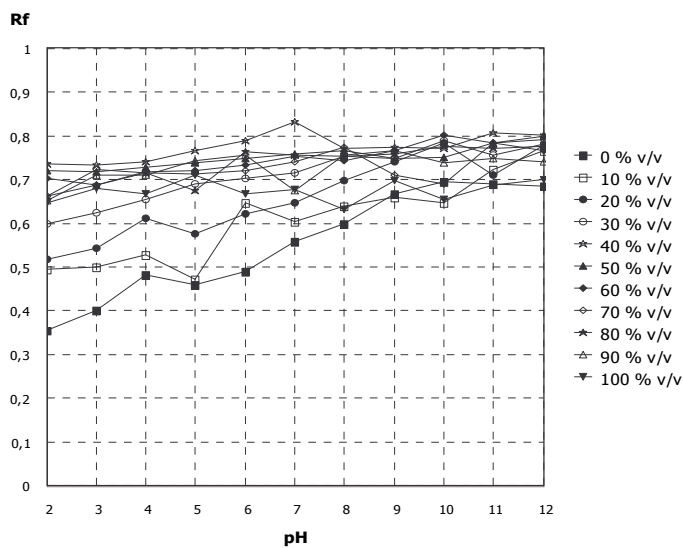
## KWAS WALERENOWY



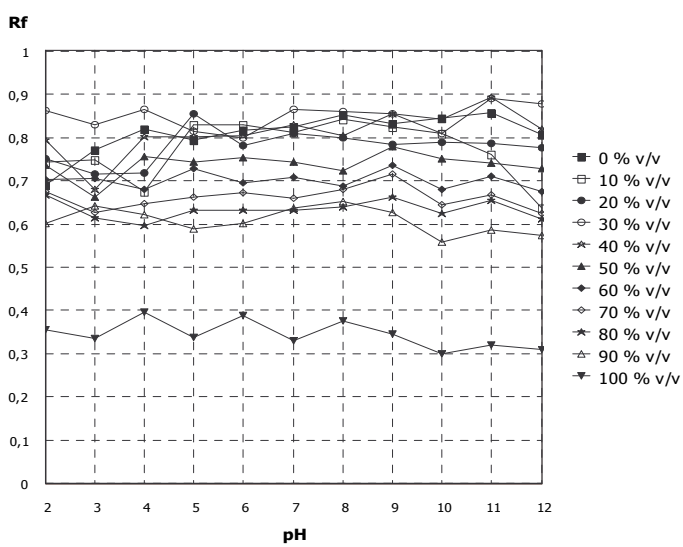
Ryc. 21. Wpływ pH na retencję chromatograficzną kwasu walerenowego i rozmarynowego. **Faza stacjonarna:  $\text{NH}_2$ .**

Fig. 21. Effect of pH on the chromatographic retention of valeric and rosmarinic acids. **Support:  $\text{NH}_2$ .**

## KWAS ROZMARYNOWY

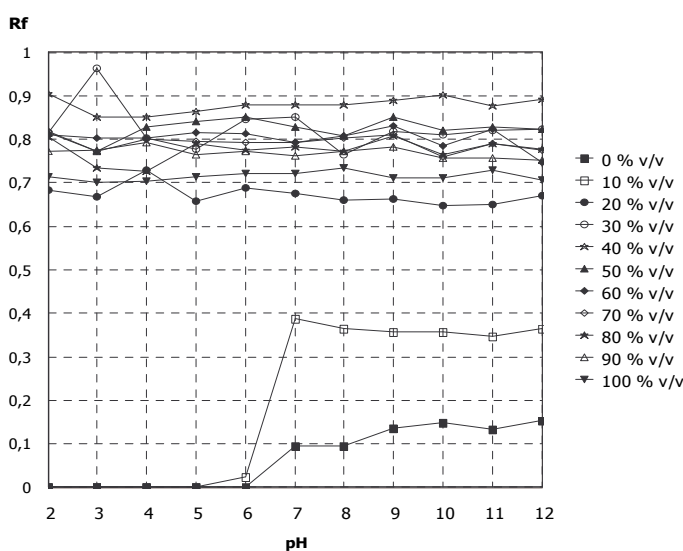
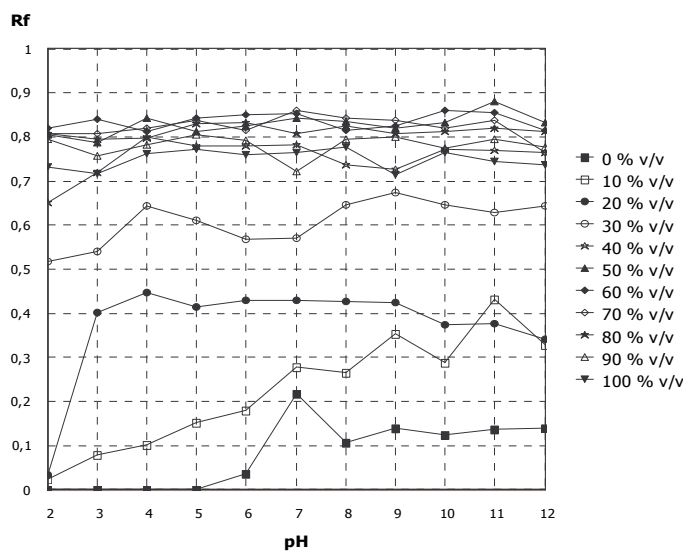


Eluent: metanol-bufor



Eluent: acetonitryl-bufor

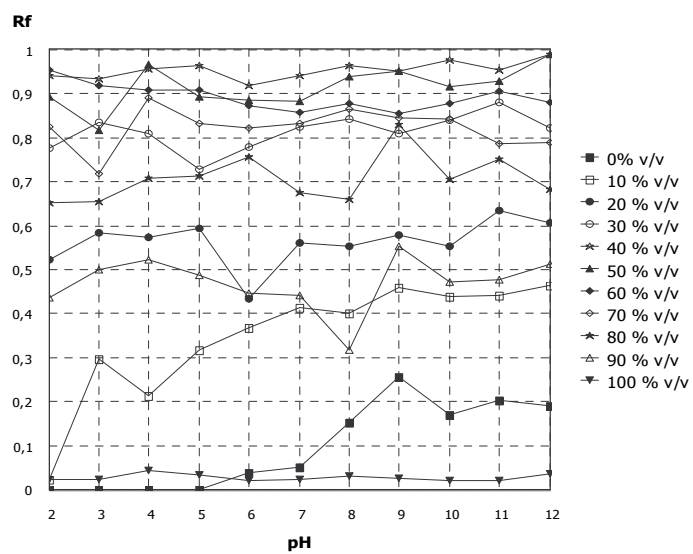
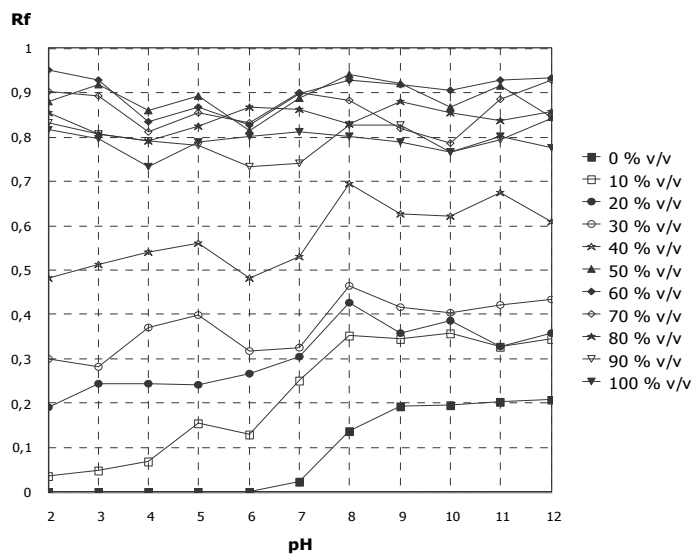
## KWAS WALERENOWY



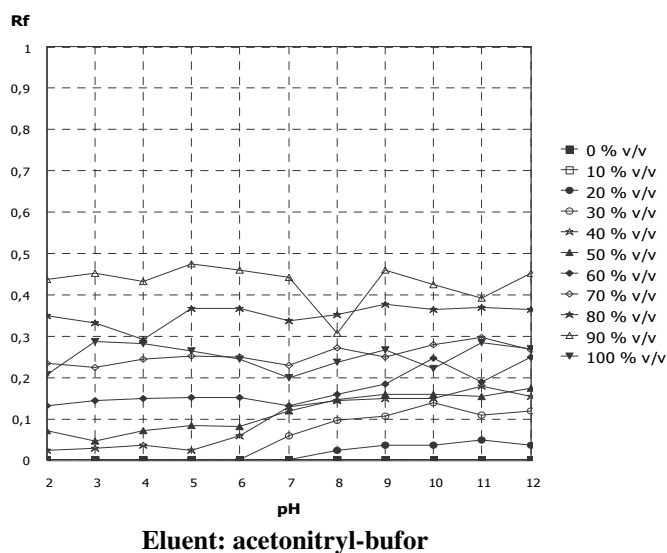
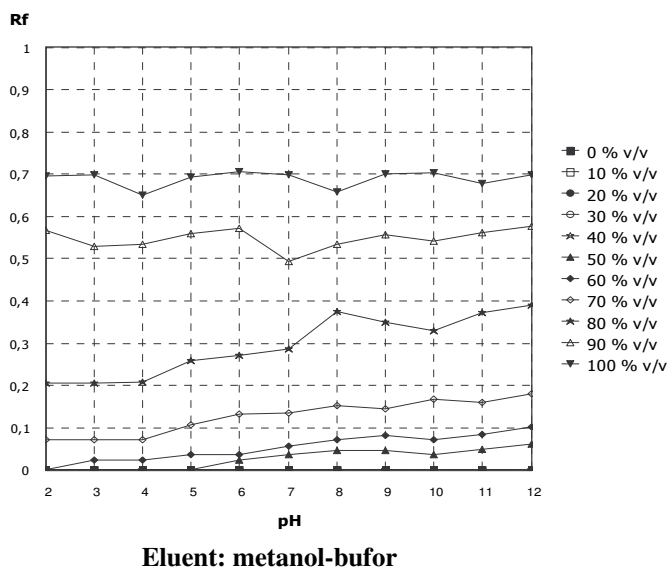
Ryc. 22. Wpływ pH na retencję chromatograficzną kwasu walerenowego i rozmarynowego. **Faza stacjonarna: Kieselgel 60W.**

Fig. 22. Effect of pH on the chromatographic retention of valerenic and rosmarinic acids. **Support: Kieselgel 60W.**

## KWAS ROZMARYNOWY



## KWAS WALERENOWY



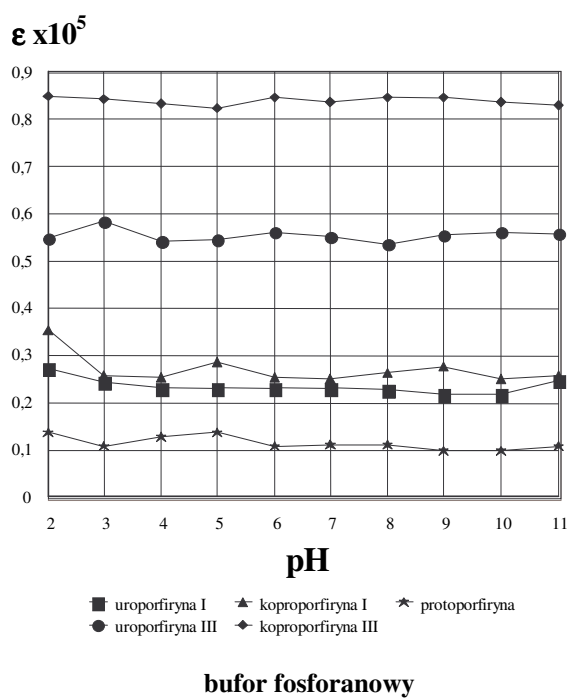
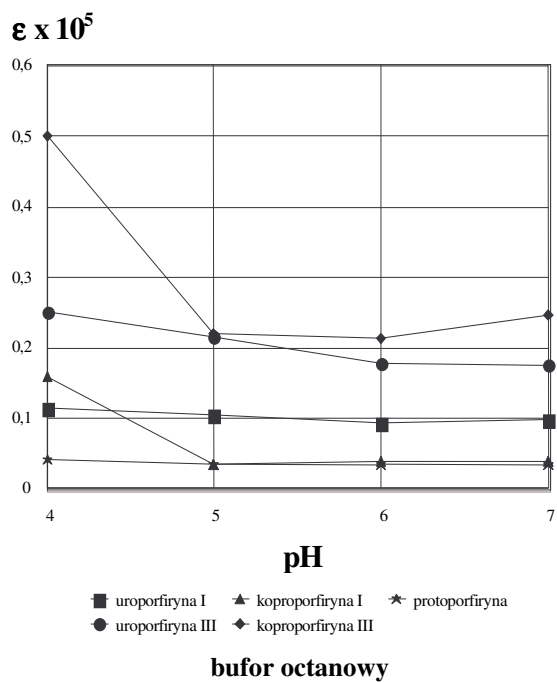
Ryc. 23. Wpływ pH na retencję chromatograficzną kwasu walerenowego i rozmarynowego. **Faza stacjonarna: RP-18.**

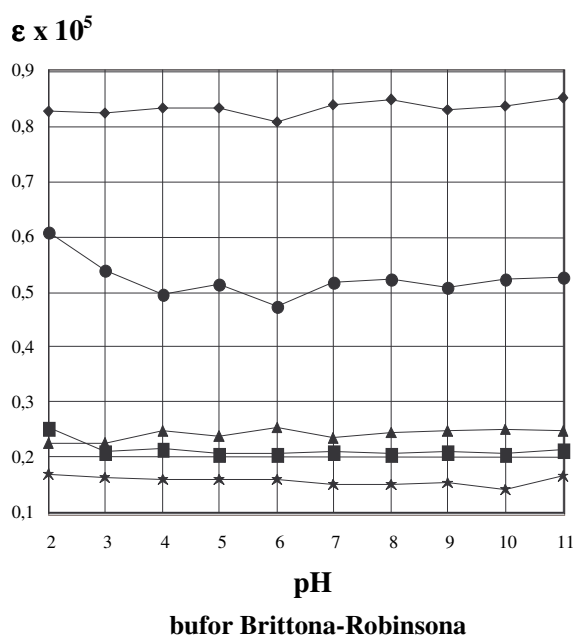
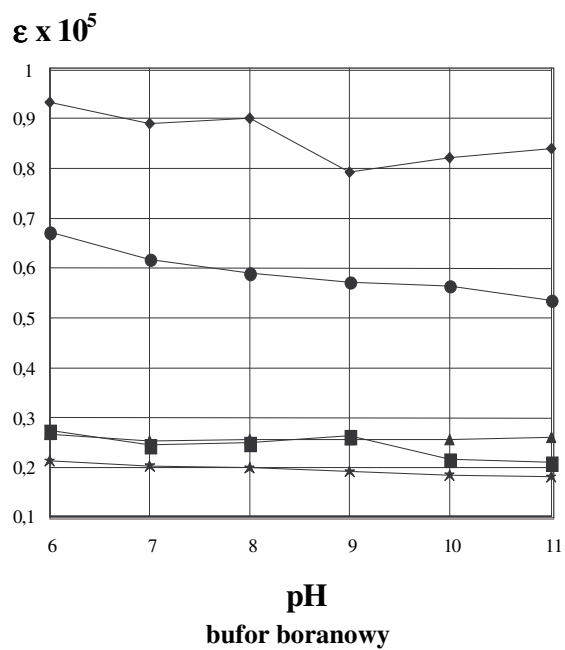
Fig. 23. Effect of pH on the chromatographic retention of valerenic and rosmarinic acids. **Support: RP-18.**

### 5.5.2. Wpływ pH na parametry widma absorpcyjnego porfiryn

Metodą spektrofotometrii w zakresie UV-VIS zbadano wpływ pH czterech roztworów buforowych – buforu Brittona-Robinsona, fosforanowego, boranowego oraz octanowego - na parametry widma uroporfiryny I, uroporfiryny III, koproporfiryny I, koproporfiryny III i protoporfiryny.

W elektronowych widmach absorpcyjnych porfiryn w zakresie 400-700 nm występują pasma pochodzące głównie od przejść  $\pi \rightarrow \pi^*$  ( $\pi$  - orbital wiążący,  $\pi^*$  - orbital antywiązący). Elektrony  $\pi$  odpowiedzialne są za wiązania podwójne, a ich funkcje charakterystyczne i gęstości ładunku mają płaszczyzny węzłowe i znajdują się na orbitalach, których oś symetrii jest prostopadła do osi wiązania chemicznego. Przejście spektralne elektronów związane z pochłonięciem promieniowania odpowiada przejściu z orbitala wiążącego na wyższy energetycznie orbital antywiązący. Przejścia  $\pi \rightarrow \pi^*$  charakteryzują się dużą intensywnością, zmieniającą się w zależności od liczby i rodzaju wiązań wielokrotnych w cząsteczce. Zwiększenie liczby wiązań sprzężonych powoduje zbliżenie poziomów  $\pi$  i  $\pi^*$ , zwiększenie prawdopodobieństwa przejścia i intensywności widma. W widmie porfiryn dominuje pasmo Soreta (B,  $\gamma$ ) przy około 400-420 nm ( $\epsilon \sim 10^5$ ), a ponadto występują słabsze pasma między 500-600 nm zwane pasmami  $\alpha$  ( $Q_0$ ) oraz  $\beta$  ( $Q_1$ ) ( $\epsilon \sim 10^4$ ). Pasma Soreta i  $\beta$  odpowiadają przejściom  $\pi \rightarrow \pi^*$ , podczas gdy pasmo  $\alpha$  powstaje na skutek sprzężenia wibronowego [480]. Pasma  $\alpha$  oraz  $\beta$  nie wystąpiło w przypadku stosowania buforu octanowego. Sprzężenie wibronowe [481] lub jak podaje inny autor [482] wibroniowe odnosi się do przejść, które są wzbronione ze względu na symetrię, ale wskutek drgań oscylacyjnych i wibracyjnych symetria cząsteczki ulega zmianie i wówczas na krótki moment zakazy zostają zniesione i pojawiają się wąskie pasma w prawie jednakowych odległościach od siebie oraz o niewielkiej intensywności. Zręby atomowe w molekule wykonują drgania, które zmieniają moment dipolowy [481]. Jak wynika z powyższego położenie pasm w ultrafiolecie i w zakresie widzialnym zależy od oddziaływań między elektronami walencyjnymi, a tylko wtórnie od pierwiastka, jaki uczestniczy w układzie chromoforowym. Dlatego widma w zakresie 200-800 nm informują raczej o rodzaju układu chromoforowego, niż o grupach funkcyjnych obecnych w cząsteczce – co jest domeną innych metod spektroskopowych, jak podczerwieni i magnetycznego rezonansu jądrowego. Tym niemniej mając wstępne informacje o budowie cząsteczki, widma elektronowe pozwalają na ustalenie subtelnych elementów struktury, takich jak rozmieszczenie wiązań podwójnych. Bardzo wysokie wartości molowych współczynników absorpcji  $\epsilon$  (w prawie wszystkich przypadkach  $\epsilon = 10^5$ ) potwierdzają fakt obecności dużej ilości ugrupowań chromoforowych.





Ryc. 24. Zależność molowego współczynnika absorpcji porfiryn w funkcji pH buforu.  
Fig. 24. Dependence of the molar absorption coefficient of porphyrins on pH of buffer.



Różne ugrupowania atomów związane z grupą chromoforową mogą powodować przesunięcie pasma absorpcyjnego i zmianę wartości  $\epsilon$ . Przyczyną tego są ogólnie efekty mezomeryczne i indukcyjne. Należy również nadmienić, że detekcja jest tym większa, im większy jest molowy współczynnik absorpcji. Porównując wartości molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon$  uroporfiryny I, uroporfiryny III, koproporfiryny I, koproporfiryny III i protoporfiryny (ryc. 24) otrzymane w zależności od rodzaju użytego roztworu buforowego, na uwagę zwraca fakt, że najniższe wartości  $\epsilon$  otrzymano w przypadku stosowania buforu octanowego. Należy również dodać, że pH tego buforu miało zdecydowany wpływ na wartości molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon$  koproporfiryn w wąskim zakresie pH 4-5 (za wzrostem pH molowy współczynnik absorpcji malał). Zaobserwowano występowanie przesunięć batochromowych dla pasm absorpcji badanych porfiryn wraz ze wzrostem stężenia. Jonizacja odczynników spektrofotometrycznych ze zmianą pH deformuje elektronową strukturę cząsteczki, co prowadzi do batochromowego przesunięcia się maksimum absorpcji [483]. Ponadto w przypadku stosowania buforu octanowego dla pasm absorpcji koproporfiryn nastąpiło przesunięcie hipsokromowe ze wzrostem pH. W tabeli 9 zestawiono wartości współczynników  $a$ ,  $b$  oraz wartości współczynnika korelacji  $r$  równań regresji liniowej  $\epsilon = a \cdot pH + b$ . Otrzymano niskie współczynniki korelacji pomiędzy wartościami  $\epsilon$  i pH stosowanych roztworów buforowych. A zatem nie występuje liniowa zależność molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon$  od pH buforu. Jedynie dla uroporfiryny III przy stosowaniu buforu boranowego i octanowego oraz dla protoporfiryny przy stosowaniu buforu octanowego – współczynniki korelacji  $r$  przekroczyły wartość 0.95. Nieliniowa zależność może sugerować złożony mechanizm oddziaływań pomiędzy badanymi porfirynami a roztworami buforowymi. Badania elektronowych widm absorpcyjnych pozwalają nie tylko ustalić typy przejść elektronowych i wyciągnąć wnioski dotyczące elektronowej i geometrycznej struktury cząsteczek. Pomiar spektrofotometryczny w nadfiolecie i widzialnej części widma są jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod identyfikacji związków i badania ich czystości. Różnice w położeniu i natężeniu elektronowych pasm absorpcyjnych różnych form cząsteczkowych są często wykorzystywane do badania równowag, jakie ustalają się pomiędzy nimi w roztworach. Można tu wymienić równowagi pomiędzy różnymi tautomerami, izomerami (np. formami *cis* i *trans* badanego związku), równowagi asocjacyjne, wyznaczenie stałych nietrwałości kompleksów itp. [484].

Tab. 9. Współczynniki  $a$ ,  $b$  oraz wartości współczynnika korelacji  $r$  równania regresji liniowej  $\varepsilon = a \cdot pH + b$  porfiryn.

Tab. 9. Regression coefficients ( $a$ ,  $b$ ) and correlation coefficient ( $r$ ) of regression equation  $\varepsilon = a \cdot pH + b$  for porphyrins.

<b>Bufor Brittona-Robinsona</b> <i>Britton-Robinson buffer</i>			
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
Uroporfiryna I	-0.002	0.231	0.5219
Uroporfiryna III	-0.004	0.550	0.3608
Koproporfiryna I	0.002	0.228	0.6963
Koproporfiryna III	0.002	0.817	0.5979
Protoporfiryna	-0.001	0.168	0.5094
<b>Bufor fosforanowy</b> <i>Sodium phosphate buffer</i>			
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
Uroporfiryna I	-0.003	0.254	0.5360
Uroporfiryna III	-0.0001	0.556	0.0299
Koproporfiryna I	-0.005	0.305	0.4941
Koproporfiryna III	-0.0005	0.843	0.1975
Protoporfiryna	-0.003	0.135	0.6869
<b>Bufor boranowy</b> <i>Boric acid buffer</i>			
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
Uroporfiryna I	-0.012	0.341	0.8435
Uroporfiryna III	-0.024	0.799	0.9600
Koproporfiryna I	-0.0008	0.265	0.3989
Koproporfiryna III	-0.022	1.054	0.7861
Protoporfiryna	-0.006	0.247	0.9844
<b>Bufor octanowy</b> <i>Ammonium acetate buffer</i>			
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
Uroporfiryna I	-0.006	0.135	0.8257
Uroporfiryna III	-0.026	0.349	0.9521
Koproporfiryna I	-0.035	0.261	0.7527
Koproporfiryna III	-0.077	0.716	0.7196
Protoporfiryna	-0.002	0.048	0.7683

## PODSUMOWANIE

Chromatografia cienkowarstwowa posłużyła jako bardzo dogodne narzędzie w analizie związków inkluzyjnych z grupy antybiotyków makrocyklicznych, ponadto porfiryn oraz kwasu walerenowego i rozmarynowego. Za cel postawiono sobie zbadanie wpływu adsorbentów i eluentów (modyfikowanych bądź nie) na retencję oraz separację badanych związków. Podjęto się również próby wyjaśnienia niektórych mechanizmów odpowiedzialnych za zachowanie chromatograficzne tychże substancji.

### *Antybiotyki makrocykliczne*

Zastosowanie różnego rodzaju związków makrocyklicznych posiadających zdolność inkludowania w swoim wnętrzu cząsteczki gościa, w celu modyfikacji faz w chromatografii cienkowarstwowej, może być dwojakiego rodzaju. Po pierwsze można je adsorbować na fazie stacjonarnej, jeżeli wartości parametru  $R_F$  tych związków są zbliżone lub równe zero. W drugim przypadku tj. w celu modyfikacji nimi fazy ruchomej, ich parametry  $R_F$  powinny być bliskie lub równe jedności.

Generalnie wankomycyna była antybiotykiem najsilniej adsorbowanym przez fazę stacjonarną niezależnie od jej rodzaju. Maksymalna retencja ( $R_F = 0$ ) badanych antybiotyków makrocyklicznych obserwowana była na poliamidowej fazie stacjonarnej w przypadku użycia wody jako fazy ruchomej oraz faz z niewielkim dodatkiem modyfikatora organicznego (szerszy zakres stężeń dla ansamycyn niż makrolidów). Makrolidy ponadto nie były wymywane w 100% acetonitrylu i THF. Te dwa rozpuszczalniki oraz propanol nie były zdolne do elucji badanych antybiotyków na celulozie. W układzie faz odwróconych makrolidy oddziaływały najsilniej z fazą stacjonarną. Dodatek HMDSO do fazy ruchomej, użyty w układzie faz normalnych i odwróconych, silnie wpływał na retencję chromatograficzną badanych związków, powodując jej wzrost, w przeciwieństwie do DMSO, który to związek zwiększał migrację antybiotyków makrocyklicznych - minimalna retencja ( $R_F = 1$ ). Maksymalną migrację makrolidów zaobserwowano w wąskim zakresie stężeń faz ruchomych na poliamidowej i celulozowej fazie stacjonarnej, ansamycyn na celulozie. Na uwagę zwraca minimalna retencja wankomycyny osiągnięta na poliamidzie w przypadku zastosowania jako fazy ruchomej 50% v/v acetonitrylu w wodzie oraz 40% v/v THF w wodzie na celulozie. Dodatek roztworu chlorku sodu do faz ruchomych w największym stopniu wpłynął na wymywanie wankomycyny. Parametr  $R_F$  osiągnął najwyższą wartość ( $R_F > 0.9$ ) dla 70% v/v metanolu w wodzie zawierającego 0.9 M chlorek sodu oraz dla 30% v/v propanolu w wodzie z 0.6 M i 0.9 M chlorkiem sodu.

Sugeruje to możliwość wykorzystania tego związku jako potencjalnego modyfikatora tak sporządzonych faz ruchomych. W przypadku makrolidów modyfikacja faz ruchomych roztworem chlorku sodu wpłynęła pozytywnie na elucję tych antybiotyków, tym niemniej wartości parametru  $R_F$  nie przekroczyły 0.5 dla fazy ruchomej 70% v/v metanol-woda oraz 0.4 dla fazy 30% v/v propanol-woda. Z kolei obserwując zachowanie chromatograficzne ansamycyn stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia chlorku sodu w fazie ruchomej pogarszało się ich wymywanie.

Długość łańcucha węglowego oraz pozycja grupy wodorotlenowej alkoholi, stosowanych jako eluenty, miała wpływ na retencję i separację badanych antybiotyków makrocyklicznych. Np. na fazie stacjonarnej LiChrospher Si 60 alkohole z grupą OH podstawioną w pozycji 2 w mieszaninie z HMDSO najsilniej hamowały elucję antybiotyków. Uzyskano zadowalającą separację ansamycyn, bez względu na rodzaj stosowanego układu chromatograficznego.

Uzyskane wyniki badań sugerują możliwość stosowania analizowanych antybiotyków makrocyklicznych jako modyfikatorów inkluzyjnych fazy stacjonarnej i ruchomej w wybranych układach chromatograficznych.

### **Porfiryny**

Jak wynika z danych otrzymanych w trakcie badań wybranych porfiryn, ze wzrostem długości łańcucha węglowego alkoholu elucja porfiryn na krzemionkowej fazie stacjonarnej rosła, na poliamidzie malała. Z kolei celuloza silnie adsorbowała badane związki. Stosując jako fazy ruchome mieszaniny binarne estrów, ketonów i ksylenów z DMSO oraz płytki pokryte żelazem krzemionkowym zaobserwowano, że sekwencja wymywania porfiryn zależała od ich masy cząsteczkowej. Transport badanych porfiryn wymagał obecności DMSO w fazie ruchomej. Fazy ruchome zawierające estry miały największy wpływ na retencję i separację koproporfiryn. Położenie grup metylowych w układach strukturalnych estrów miało wpływ na zachowanie chromatograficzne porfiryn. Ze wzrostem długości łańcucha węglowego w szeregu homologicznym estrów i ketonów rosła retencja chromatograficzna porfiryn. Największy wpływ na elucję porfiryn miała mieszanina DMSO/mrówczan etylu, powodując ich znaczną migrację, jednocześnie pogarszając rozdzielczość badanych związków. Najlepszą separację koproporfiryn uzyskano stosując mieszaniny DMSO/keton. Badane układy chromatograficzne mogą być stosowane w dalszej analizie porfiryn.

Metodą spektrofotometrii w zakresie UV-VIS zbadano wpływ pH czterech roztworów buforowych – buforu Brittona-Robinsona, fosforanowego, boranowego oraz octanowego - na parametry widma porfiryn. Stwierdzono, że w elektronowych widmach porfiryn występują pasma Soreta i  $\beta$  związane z przejściem

$\pi \rightarrow \pi^*$  oraz pasmo  $\alpha$  powstające na skutek sprzężenia wibronowego, które nie występuje w przypadku stosowania buforu octanowego. Wysokie wartości molowych współczynników absorpcji  $\epsilon$  porfiryn potwierdzają fakt obecności dużej ilości ugrupowań chromoforowych w strukturze tych związków, co z kolei zwiększa czułość ich wykrywania. pH buforu octanowego miało zdecydowany wpływ na wartości molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon$  koproporfiryn w wąskim zakresie pH 4-5 (ze wzrostem pH molowy współczynnik absorpcji malał). Wraz ze wzrostem stężenia porfiryn wystąpiły przesunięcia batochromowe dla pasm absorpcji tych związków. Ponadto w przypadku stosowania buforu octanowego dla pasm absorpcji koproporfiryn nastąpiło duże przesunięcie hipsochromowe wraz ze wzrostem pH. Obserwowane współczynniki korelacji pomiędzy wartościami  $\epsilon$  i pH stosowanych roztworów buforowych były niskie. A zatem nie występowała liniowa zależność molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon$  od pH buforu, co może sugerować złożony mechanizm oddziaływań pomiędzy badanymi porfirynami a roztworami buforowymi.

### ***Kwas walerenowy i rozmarynowy***

Stosując aminową fazę stacjonarną w analizie chromatograficznej kwasu walerenowego i rozmarynowego stwierdzono, że długość łańcucha węglowego alkoholu miała wpływ jedynie na retencję kwasu walerenowego. Kwas rozmarynowy był silniej adsorbowany przez fazę stacjonarną. Ponadto transport tego związku wymagał dodatku wody do fazy ruchomej, co zaobserwowano stosując mieszaninę acetonitryl-metanol. Badane kwasy nie były eluowane w przypadku użycia jako fazy ruchomej 100% acetonitrylu i THF, czyli wystąpił brak korelacji pomiędzy otrzymanymi wynikami a zależnością retencja chromatograficzna-rozpuszczalność analitu w fazie ruchomej.

Wpływ pH na retencję chromatograficzną kwasu walerenowego i rozmarynowego był minimalny w badanych układach. W układzie faz odwróconych i normalnych długość łańcucha węglowego alkoholu miała wpływ na retencję badanych substancji. Wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego rosła siła elucyjna użytych alkoholi. W układzie faz normalnych i odwróconych transport kwasu walerenowego wymagał dodatku modyfikatora organicznego do fazy ruchomej. W układzie faz odwróconych lepiej wymywany był kwas rozmarynowy. Retencja chromatograficzna obu badanych kwasów w układzie faz normalnych zależała w istotny sposób od pH fazy ruchomej w przypadku stosowania czystej fazy buforowej oraz faz zawierających niewielki dodatek metanolu lub acetonitrylu. Natomiast w układzie faz odwróconych wymywanie kwasu rozmarynowego zależało od pH fazy ruchomej w zakresie stężeń 0-10% v/v faz binarnych metanol-bufor i acetonitryl-bufor.

## WNIOSKI

Zastosowano po raz pierwszy HMDSO i DMSO jako eluenty w chromatografii cienkowarstwowej.

W trakcie szeregu doświadczeń, mających na celu zbadanie zachowania chromatograficznego antybiotyków makrocyklicznych i porfiryn, otrzymano wyniki interesujące pod względem praktycznym. Okazało się bowiem, że HMDSO silnie hamuje wymywanie antybiotyków makrocyklicznych.

Natomiast transport zarówno badanych antybiotyków jak i porfiryn wymagał obecności DMSO w fazie ruchomej. Praktycznie rzecz ujmując ma to istotne znaczenie w wykorzystaniu badanych antybiotyków makrocyklicznych jako inkluzyjnych modyfikatorów faz ruchomych lub stacjonarnych w separacji chiralnej trudno rozdzielających się substancji.

Również dodatek chlorku sodu do faz ruchomych, podobnie jak HMDSO i DMSO, miał ogromny wpływ na retencję chromatograficzną analizowanych antybiotyków, szczególnie wankomycyny.

Z kolei badania w środowisku buforu dały wyniki może nie tak spektakularne jak powyższe, tym nie mniej ciekawe.

Ponadto należy dodać, że retencja oraz separacja badanych związków zależała głównie od składu faz ruchomych oraz rodzaju zastosowanego adsorbentu, co jak wykazały badania, ma kluczowe znaczenie w analizie wybranych substancji.

## STRESZCZENIE

Zbadano właściwości fizykochemiczne i chromatograficzne wybranych antybiotyków makrocyklicznych, porfiryn oraz kwasu walerenowego i rozmarynowego. Wszystkich pomiarów dokonano metodą chromatografii cienkowarstwowej. Stosując wodne fazy ruchome analizowano antybiotyki makrocykliczne na celulozowej i poliamidowej fazie stacjonarnej oraz kwas walerenowy i rozmarynowy w układzie faz normalnych i odwróconych. Binarne mieszaniny wodne modyfikowano chlorkiem sodu i tak sporządzone eluenty użyto w badaniach antybiotyków makrocyklicznych w układzie faz normalnych i odwróconych. Z kolei niewodne fazy ruchome zostały wykorzystane w analizie chromatograficznej kwasu walerenowego i rozmarynowego na aminowej fazie stacjonarnej oraz w układzie faz normalnych i odwróconych, a także w analizie porfiryn na adsorbencie krzemionkowym, celulozowym i poliamidowym. Rozpuszczalniki organiczne z dodatkiem DMSO lub HMDSO stosowano jako eluenty (nie opisane wcześniej) w badaniu retencji antybiotyków makrocyklicznych w układzie faz normalnych i odwróconych oraz porfiryn na krzemionkowej fazie stacjonarnej. Badano również wpływ pH na zachowanie chromatograficzne kwasu walerenowego i rozmarynowego oraz wpływ pH na parametry widma absorpcyjnego porfiryn, stosując binarne fazy ruchome zawierające bufor. Rodzaj adsorbentu, skład faz ruchomych oraz modyfikacja eluentów miały zdecydowany wpływ na zachowanie chromatograficzne badanych związków. Z całą pewnością zasugerować można praktyczne zastosowanie otrzymanych wyników w analizie wybranych substancji.

Wszystkie wyniki badań zostały opublikowane (wykaz publikacji str. 121). W ramach dorobku naukowego osiągnięto sumaryczny Impact Factor równy 27.739.

## SUMMARY

The physicochemical and chromatographic properties of macrocyclic antibiotics, porphyrins and valerenic and rosmarinic acids were studied by using the thin-layer chromatography. The macrocyclic antibiotics have been examined on Cellulose and Polyamide TLC plates, valerenic and rosmarinic acid on normal and reversed-phases using aqueous mobile phases. The binary aqueous solvent mixtures were modified with sodium chloride. Using these eluents, the macrocyclic antibiotics on normal and reversed-phases were studied. The non-aqueous mobile phases were used in the chromatographic analysis of valerenic and rosmarinic acid on an amino stationary phase and on normal and reversed-phases. Porphyrins have been studied on silica gel, Cellulose and Polyamide plates. The retention behavior of macrocyclic antibiotics has been examined on normal and reversed-phases, porphyrins on silica gel plates, when the organic solvents with hexamethyldisiloxane (HMDSO) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were used as mobile phases (it never has been described before). The dependance of the  $R_F$  of valerenic and rosmarinic acid on buffer solution pH and the effect of pH on absorption spectra of porphyrins were also studied. The type of adsorbents, mobile phase composition and the modification of eluents have an major effect on the chromatographic behavior of investigated compounds. From practical point of view, the application of chromatographic retention data in the analysis of selected substances can be evident suggested.

All obtained results were published (list of references page 121). The total Impact Factor of research practice is equal 27.739.



## WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH TREŚĆ PRACY HABILITACYJNEJ

- (1) J. Nowakowska, J. Łukasiak, I. Maksimowicz „Analityczne aspekty oznaczania antybiotyków makrocyclicznych metodą TLC” – *Farmacja Polska* 2001, 17, 804-809.
- (2) J. Nowakowska, J. Halkiewicz, J. W. Łukasiak, „The retention behaviour of selected macrocyclic antibiotics on Polyamide TLC plates” – *J. Planar Chromatogr.* 2001, 14, 350-354.
- (3) J. Nowakowska, J. Halkiewicz, J.W. Łukasiak „Thin-layer chromatographic determination of selected macrocyclic antibiotics on normal and reversed phases” – *Chromatographia* 2002, 56, 367-373.
- (4) J. Nowakowska „The influence of pH on the absorption spectra of porphyrins” *Annales Acad.Med.Ged.* 2002, 32, 281-292.
- (5) J. Nowakowska, M. Marszał „Retention properties of rosmarinic and valerenic acids on hydrophilic layer with amino modification” *J. Planar Chromatogr.* 2003, 16, 369-373.
- (6) J. Nowakowska „Normal and reversed phases TLC determination of rosmarinic and valerenic acids” *J. Planar Chromatogr.* 2004, 2, 149-153.
- (7) J. Nowakowska „Analysis of selected macrocyclic antibiotics by HPTLC with non-aqueous binary mobile phases” *J. Planar Chromatogr.* 2004, 3, 200-206.
- (8) J. Nowakowska „Use of HPTLC with non-aqueous binary mobile phases for determination of selected porphyrins” *J. Planar Chromatogr.* 2004, 5, 388-390.
- (9) J. Nowakowska „Zastosowanie techniki TLC w analizie porfiryn” - *Farmacja Polska* (w druku).
- (10) J. Nowakowska „Normal and reversed phase TLC separations of some macrocyclic antibiotics with non-aqueous mobile phases” – *Chromatographia* (w druku).
- (11) J. Nowakowska „Effect of non-aqueous mobile phase compositions on the retention of macrocyclic antibiotics by RP-TLC”- *Chromatographia* (w druku).

**LITERATURA**

- [1] Armstrong D.W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill Ch., Chen J.R.: *Anal. Chem.* 1994, 66, 1473-1484.
- [2] Zejc A., Gorczyca M.: *Chemia leków*, PZWL Warszawa, 1998.
- [3] Kamfer I., Skinner M.F., Walker R.B.: *J. Chromatogr.* 1998, 812, 255-286.
- [4] Draisci R., Palleshi L., Ferretti E., Ahene L., Cecilia A.: *J. Chromatogr.* 2001, 926, 97-104.
- [5] Kees F., Spangler S., Wellenhofer M.: *J. Chromatogr.* 1998, 812, 287-293.
- [6] Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A.: *Przegląd mikrobiologii lekarskiej*, PZWL Warszawa, 1991.
- [7] Dubois M., Fluhard D., Sior E., Delahaud Ph.: *J. Chromatogr.* 2001, 753, 189-202.
- [8] Ramirez A., Gutierrez R., Diaz G., Gonzales C., Perez N., Vega S., Noa M.: *J. Chromatogr.* 2003, 784, 315-322.
- [9] Marzo A., Dal Bo L.: *J. Chromatogr.* 1998, 812, 17-34.
- [10] Chepkwony H.K., Roets E., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr.* 2001, 914, 53-58.
- [11] Kohlmünzer S.: *Farmakognozja*, PZWL Warszawa, 1998.
- [12] Leal C., Codone R., Compano R., Granados M., Prat M.D.: *J. Chromatogr.* 2001, 910, 285-290.
- [13] Paesen J., Roets E., Hoogmartens J.: *Chromatographia* 1991, 32, 162-166.
- [14] Janeček M., Quiliam M.A., Bailey M.R., North D.H.: *J. Chromatogr.* 1993, 619, 63-69.
- [15] Paesen J., Claeys P., Roets E., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr.* 1993, 630, 117-122.
- [16] Ridlen J.S., Skotty D.R., Kissinger P.T., Nieman T.A.: *J. Chromatogr.* 1997, 694, 393-400.
- [17] Tsuji K., Goetz J.F.: *J. Chromatogr.* 1978, 147, 359-367.
- [18] Pellegatta G., Carugati G.P., Coppi G.J.: *J. Chromatogr.* 1983, 269, 33-39.
- [19] Grgurinovich N., Matthews A.: *J. Chromatogr.* 1988, 433, 298-304.
- [20] Siemann M., Andersson L.I., Mosbach K.J.: *J. Antibiot.* 1997, 50, 89-91.
- [21] Tsuji J.: *J. Chromatogr.* 1978, 158, 337-348.
- [22] Kibwage I.O., Roets E., Hoogmartens J., Vanderhaeghe H.: *J. Chromatogr.* 1985, 330, 275-286.

- 
- [23] Croteau D., Vallee F., Bergeron M.G., LeBel M.: *J. Chromatogr.* 1987, 419, 205-212.
- [24] Cachet Th., Haest G., Busson R., Janssen G., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr.* 1988, 445, 290-294.
- [25] Geria T., Hong W.-H., Daly R.E.: *J. Chromatogr.* 1987, 396, 191-198.
- [26] Cachet Th., Kibwage I.O., Roets E., Hoogmartens J., Vanderhaeghe H.: *J. Chromatogr.* 1987, 409, 91-100.
- [27] Kokkonen P.S., Niessen W.M.A., Tjaden U.R., Van der Greef J.: *J. Chromatogr.* 1991, 396, 265-275.
- [28] Cachet Th., Lannoo P., Paesen J., Janssen G., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr.* 1992, 600, 99-108.
- [29] Torano J.S., Guchelaar H.-J.: *J. Chromatogr.* 1998, 720, 89-97.
- [30] Niessen W.M.A.: *J. Chromatogr.* 1998, 812, 53-75.
- [31] Stubbs C., Haigh J.M., Kanfer I.: *J. Chromatogr.* 1986, 353, 33-38.
- [32] Bhuwathanapun S., Gray P.: *J. Antibiot.* 1977, 8, 673-674.
- [33] Kennedy J.H.: *J. Chromatogr. Sci.* 1978, 16, 493-495.
- [34] Kennedy J.H.: *J. Chromatogr.* 1983, 281, 288-292.
- [35] Wu-Kuang Y., Bauer N.J., Dotzlar J.E.: *J. Chromatogr.* 1984, 288, 157-165.
- [36] Fish B.J., Carr G.P.R.: *J. Chromatogr.* 1986, 353, 39-50.
- [37] Roets E., Beirinckx P., Quintens I., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr.* 1993, 630, 159-166.
- [38] Paesen J., Claeys P., Cypers W., Roets E., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr.* 1995, 699, 93-97.
- [39] Neely F.L.: *Chromatographia* 1992, 34, 51-55.
- [40] Taninaka Ch., Ohtani H., Hanada E., Kotaki H., Sato H., Iga T.: *J. Chromatogr.* 2000, 738, 405-411.
- [41] Hirsch R., Ternes T.A., Haberer K., Mehlich A., Ballwanz F., Kratz K.L.: *J. Chromatogr.* 1998, 815, 213-223.
- [42] Shaikh B., Moats W.A.: *J. Chromatogr.* 1993, 643, 369-378.
- [43] Kennedy D.G., McCracken R.J., Cannavan A., Hewitt S.A.: *J. Chromatogr.* 1998, 812, 77-98.
- [44] Horie M., Saito K., Ishii R., Yoshida T., Haramaki Y., Nakazawa H.: *J. Chromatogr.* 1998, 812, 295-302.
- [45] Fedeniuk R.W., Shand Ph.J.: *J. Chromatogr.* 1998, 812, 3-15.
- [46] Stubbs C., Haigh J.M., Kanfer I., *J. Pharm. Sci.* 1985, 74, 1126-1128.

- 
- [47] Nilsson L.G., Walldorf B., Paulsen O.: *J. Chromatogr.* 1987, 423, 189-197.
- [48] Stubbs C., Kanfer I.: *J. Chromatogr.* 1988, 427, 93-101.
- [49] Laakso S., Scheinin M., Anttila M.: *J. Chromatogr.* 1990, 526, 475-486.
- [50] Tobback H., Li Y.M., Pizarro N.A., De Smedt I., Smeets T., Van Shepdael A., Roets E., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr.* 1999, 857, 313-320.
- [51] Lalloo A.K., Chattaraj S.C., Kanfer I.: *J. Chromatogr.* 1997, 704, 333-341.
- [52] Lalloo A.K., Kanfer I.: *J. Chromatogr.* 1997, 704, 343-350.
- [53] Danielson N.D., Holeman J.A., Bristol D.C., Kirzner D.H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, 11, 121-130.
- [54] Anderson T.: *J. Chromatogr.* 1964, 14, 127-129.
- [55] Banaszek A., Krowicki K., Zamojski A.: *J. Chromatogr.* 1968, 32, 581-583.
- [56] Stephens V.C., Pugh C.T., Davis N.E., Hoehn M.M., Ralston S., Sparks M.C., Thompkins L.: *J. Antibiot.* 1969, 11, 551-557.
- [57] Richard G., Radecka C., Hughes D.W., Wilson W.L.: *J. Chromatogr.* 1972, 67, 69-73.
- [58] Easterbrook N.M., Hersey J.A.: *J. Chromatogr.* 1976, 121, 390-394.
- [59] Graham K.C., Wilson W.L., Vilim A.: *J. Chromatogr.* 1976, 125, 447-450.
- [60] Kobrehel G., Tamburasev Z., Djokic S.: *J. Chromatogr.* 1977, 133, 415-419.
- [61] Kibwage I.O., Janssen G., Roets E., Hoogmartens J., Vanderhaeghe H.: *J. Chromatogr.* 1985, 346, 309-319.
- [62] Cachet Th., Roets E., Hoogmartens J., Vanderhaeghe H.: *J. Chromatogr.* 1987, 403, 343-349.
- [63] Kibwage I.O., Roets E., Verbruggen A., Hoogmartens J., Vanderhaeghe H., *J. Chromatogr.* 1988, 434, 177-186.
- [64] Lees T.M., DeMuria P.J., Boegemann W.H.: *J. Chromatogr.* 1961, 5, 126-130.
- [65] Bossuyt R., Van Renterghem R., Waes G., *J. Chromatogr.* 1976, 124, 37-42.
- [66] Kibwage I.O., Roets E., Hoogmartens J.: *J. Chromatogr.* 1983, 256, 164-171.
- [67] Kirst H.A., Wild G.M., Baltz R.H., Seno E.T., Hamill R.L., Paschal J.W., Dorman D.E.: *J. Antibiot.* 1983, 4, 376-382.
- [68] Ward T.J., Farris III A.B.: *J. Chromatogr.* 2001, 906, 73-89.
- [69] Desiderio C., Fanali S.: *J. Chromatogr.* 1998, 807, 37-56.
- [70] Kostowski W.: *Farmakologia*, PZWL Warszawa, 2001.
- [71] Del Nozal M.J., Bernal J.L., Pampliega A., Marinero P., Lopez M.I., Cocco R.: *J. Chromatogr.* 1996, 727, 231-238.

- 
- [72] Igloy M., Mizsei A., Chorvatch J.: *J. Chromatogr.* 1965, 20, 379-392.
- [73] Betina V.: *J. Chromatogr.* 1964, 15, 295-298.
- [74] Najjar T.A., Al.-Dhu Mewailie A.A., Tekle A.: *J. Chromatogr.* 1995, 627, 295-299.
- [75] Bauchet J., Pussard E., Garaud J.J.: *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1987, 414, 472-476.
- [76] Greene S.V., Abdalla T., Morgan S.L.: *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1987, 417, 121-128.
- [77] Hosotsubo H.: *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1989, 487, 421-427.
- [78] Hu M.W., Anne L., Forni T., Gottwald K.: *Ther. Drug Monit.* 1990, 12, 562-569.
- [79] Luksa J., Marusic A.: *J. Chromatogr.* 1995, 667, 277-281.
- [80] Kitahashi T.: *Jpn. J. Clin. Lab. Automat.* 1997, 22, 205-208.
- [81] Backes D.W., Aboleneen H.J., Simpson J.A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 16, 1281-1287.
- [82] Furuta I., Kitahashi T., Kuroda T., Nishio H., Oka Ch., Morishima Y.: *Clin. Chim. Acta* 2000, 301, 31-39.
- [83] Kitahashi T., Furuta I.: *Clin. Chim. Acta* 2001, 312, 221-225.
- [84] Aszalos A., Davis S., Frost D.: *J. Chromatogr.* 1998, 37, 487-491.
- [85] Sensi P., Greco A. M., Balota R.: *J. Chromatogr.* 1959-1960, 262.
- [86] Sugita M., Natori Y., Sasaki T., Shimazu A., Seto H., Otake N.: *J. Antibiot.* 1982, 35, 1460-1467.
- [87] Sugita M., Sasaki T., Furihata K., Seto H., Otake N.: *J. Antibiot.* 1982, 35, 1467-1474.
- [88] Sugita M., Natori Y., Sueda N., Furihata K., Seto H., Otake N.: *J. Antibiot.* 1982, 35, 1474-1481.
- [89] Santos L., Medeiros M.A., Santos S., Costa M.C., Tavares R., Curto M.J.M.: *J. Molec. Struc.* 2001, 563-564, 61-78.
- [90] Wilson W.L., Graham K.C., Lebel M.J.: *J. Chromatogr.* 1977, 144, 270-274.
- [91] Jindal K.C., Chaudhary L.S., Gangwal S.S., Singla A.K., Khanna S.: *J. Chromatogr.* 1984, 685, 195-199.
- [92] Kolos O.T., Eidus L.L.: *J. Chromatogr.* 1972, 68, 294-295.
- [93] Sensi P., Corelli C., Nicolaus B.J.E.: *J. Chromatogr.* 1961, 5, 519-525.
- [94] Daabs E.B., Yazawa K., Tanaka Y., Mikami Y., Miyaji M.: *J. Antybiot.* 1995, 48, 815-819.

- [95] Korfmacher W.A., Bloom J., Churchwell M.I., Getek T.A., Hansen Jr. E.B., Holder C.L., McManus K.T.: *J. Chromatogr. Sci.* 1993, 31, 498-501.
- [96] Ishi M., Ogata H.: *J. Chromatogr.* 1988, 426, 412-419.
- [97] Lau Y.Y., Hanson G.D., Carel B.J.: *J. Chromatogr.* 1996, 676, 125-131.
- [98] Lecaillon J.B., Febvre N., Metayer J.P., Souppart C.: *J. Chromatogr.* 1978, 145, 319-324.
- [99] Vlášáková V., Beneš J., Živný K.: *J. Chromatogr.* 1978, 151, 199-205.
- [100] Armstrong D.W., Rundlett K.L., Reid I. G. L.: *Anal. Chem.* 1994, 66, 1690-1695.
- [101] Gasper M.P., Berthold A., Nair U.B., Armstrong D.W.: *Anal. Chem.* 1996, 68, 2501-2514.
- [102] Blaschke G., Chankvetyadze B.: *J. Chromatogr.* 2000, 875, 3-25.
- [103] Liu J., Volk K.J., Lee M.S., Pucci M.: *Anal. Chem.* 1994, 66, 2412-2416.
- [104] Arai T., Nimura N., Kinoshita T.: *J. Chromatogr.*, 1996, 736, 303-311.
- [105] Desiderio C., Polcaro C.M., Padiglioni P., Fanali S.: *J. Chromatogr.* 1997, 781, 503-513.
- [106] Ward T.J., Oswald T.M.: *J. Chromatogr.* 1997, 792, 309-325.
- [107] Kang J.W., Yang Y.T., You J.M., Ou Q.Y.: *J. Chromatogr.* 1998, 825, 81-87.
- [108] Gübitz G., Schmid M.G.: *J. Chromatogr.* 1997, 792, 179-225.
- [109] Vespalec R., Corstjens H., Billiet H.A.H., Frank J., Luyben K.Ch.A.M.: *Anal. Chem.* 1995, 67, 3223-3228.
- [110] Vespalec R., Billiet H.A.H., Frank J., Bocek P.: *Electrophoresis* 1996, 17, 1214-1219.
- [111] Wan H., Blomberg L.: *Electrophoresis* 1996, 17, 1938-1943.
- [112] Armstrong D.W., Rundlett K.L., Chen J.R.: *Chirality* 1994, 6, 496-509.
- [113] Wan H., Blomberg L.: *J. Microcol. Sep.* 1996, 8, 339-345.
- [114] Valtcheva L., Mohammed J., Pettersson G., Hjerten S.: *J. Chromatogr.* 1993, 638, 263-270.
- [115] Ward T.J., Farris III A.B., Woodling K.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 2001, 48, 163-174.
- [116] Fanali S., Desiderio C., Schulte G., Heitmeier S., Strickmann D., Hankvedatze B., Blaschke G.: *J. Chromatogr.* 1998, 800, 1998 69-76.
- [117] Strega M.A., Huff B.E., Risley D.S.: *LC - GC* 1996, 14, 144-154.
- [118] Nair U.B., Chang S.S.C., Armstrong D.W., Rawjee Y.Y., Egglester D.S., Mcardle, J.V.: *Chirality* 1996, 8, 590-595.
- [119] Armstrong D.W., Zhou Y.: *J. Liq. Chromatogr.* 1994, 17, 1695-1707.

- [120] Bhushan R., Parshad V.: *J. Chromatogr.* 1996, 736, 235-238.
- [121] Seubert A., Seubert S.: *Meth. in Enzym.* 1986, 123, 346-352.
- [122] Biesaga M., Pyrzyńska K., Trojanowicz M.: *Talanta* 2000, 51, 209-224.
- [123] Fujii H.: *Coor. Chem. Rev.* 2002, 226, 51-60.
- [124] Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Biochemia Harpera*, PZWL Warszawa, 1995.
- [125] Ercoc S., Ercoc F.: *J. Mol. Struc.* 2002, 579, 41-44.
- [126] Moore M.R., Disler P.B.: *Clin. Dermatol.* 1985, 3, 7-23.
- [127] Poh-Fitzpatrick M.B.: *Clin. Dermatol.* 1985, 3, 41-82.
- [128] Afonso S.G., Polo C.F., Enriquez de Salamanca R., Batlle A.: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1996, 28, 415-420.
- [129] Afonso S.G., Enriquez de Salamanca R., Batlle A.: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2001, 33, 1208-1214.
- [130] Harvey, Bell C.H., Paller A.S.: *J. Pediatr.* 1992, 121, 749-756.
- [131] Charvátová J., Käsicka V., Král V., Deyl Z.: *J.Chromatogr.* 2002, 770, 165-175.
- [132] Ravikanth M.: *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 3709-3712.
- [133] Gupta I., Ravikanth M.: *Tetrahedron Lett.* 2002, 43, 9453-9455.
- [134] Guo L., Liang Y.-Q.: *Spectrochim. Acta* 2003, 59, 219-227.
- [135] Jacob K., Kossien I., Egeler E., Knedel M.: *J. Chromatogr.* 1988, 441, 171-180.
- [136] Lim C.K., Famei L., Peters T.J.: *J. Chromatogr.* 1988, 429, 123-153.
- [137] Ho J., Guthrie R., Tieckelmann H.: *J. Chromatogr.* 1986, 375, 57-63.
- [138] Kostrzewska E., Kucharski W.: *Porfirie*, Warszawa, 1996.
- [139] Bonkovsky H. L., Barnard G. F.: *Seminars in Liver Dideas* 1998, 18, 57-65.
- [140] Danik E., Pindycka-Piaszczyńska M., Filipowska B.: *Przegląd Pediatryczny* 1995, T. XXV, Nr 1 43-51.
- [141] Kostrzewska E., Gregor A.: *Gazeta Lekarska* 1997,1, 1-3.
- [142] Both P., Frank M., Merkel H. G., Doss M.: *Z. Gastroenterol.* 1988, 26, 416-420.
- [143] Goljan J.: *Acta Biol. et Med. Soc. Gedan.* 1992, 19, 103-114.
- [144] Magi E., Ianni C., Rivarolo P., Frache R.: *J.Chromatogr.* 2001, 905, 141-149.
- [145] Hindmarsh J.T.: *Clin. Chem.* 1986, 7, 1255-1263.
- [146] Watanabe H., Ohimori H.: *Talanta* 1981, 28, 774-782.
- [147] Itoh J., Yotsuyanagi Y., Aomura K.: *Anal. Chim. Acta* 1975, 74, 53-62.
- [148] Ishi H., Koh H., Mizogushi T.: *Anal. Chim. Acta* 1978, 101, 423-429.

- [149] Ishi H., Koh H.: *Talanta* 1977, 24, 417-421.
- [150] Makino T., Itoh J.: *Clin. Chim. Acta* 1981, 111, 1-6.
- [151] Tabata M., Kaneko K., *Analyst* 1987, 112, 141-150.
- [152] Giovanetti R., Bartocci V., Feraro S., Gausteri M., Passamonti P.: *Talanta* 199, 42, 1913-1919.
- [153] Purrello R., Gurrieri S., Lauceri R.: *Coordination Chem. Rev.* 1999, 192, 683-706.
- [154] Kawamura K., Igrashi, S., Yotsuyanagi T.: *Anal. Sci.* 1988, 4, 175-182.
- [155] Ishi H., Tsuchiai H.: *Anal. Sci.* 1987, 3, 229-237.
- [156] Tabata M., Kajhara N.: *Anal. Sci.* 1989, 5, 719-724.
- [157] Peng X., Mao Q., Cheng J.: *Huaxue Fence* 1992, 28, 170-178.
- [158] Tabata M.: *Analyst* 1987, 112, 149-155.
- [159] Igrashi S., Yotsuyanagi T., Aomura K.: *Buseki Kagaku* 1976, 25, 781-788.
- [160] Tabata M., Tanaka M.: *Micrichim. Acta* 1982, 2, 149-157.
- [161] Fan M., Hu S.K.: *Huaxue Fence* 1994, 30, 219-222.
- [162] Pang Z.T., Xu M.Y.: *Fenxi Shiyanshi* 1994, 13, 65-69.
- [163] Ishi H., Kohata K.: *Talanta* 1991, 38, 511-517.
- [164] Wu Q., Weng S., Huang Z., He S.: *Yeji Fenxi* 1993, 13, 15-20.
- [165] Tabata M., Kusano T., Nishimoto J.: *Anal. Sci.* 1997, 13, 157-162.
- [166] Tabata M., Nishimoto J., Kusato K.: *Talanta* 1998, 46, 703-710.
- [167] Tanaka M.: *Pure Appl. Chem.* 1983, 55, 151-158.
- [168] Tabata M.: *Analyst* 1987, 11, 141-148.
- [169] Tabata M., Tanaka M.: *Trends Anal. Chem.* 1991, 10, 128-133.
- [170] Kawakami T., Igrashi S.: *Anal. Chim. Acta* 1996, 333, 175-180.
- [171] Kawakami T., Igrashi S.: *Anal. Chim. Acta* 1997, 354, 159-164.
- [172] Nakano T., Takahashi A.: *Anal. Sci.* 1990, 6, 823-826.
- [173] Matsubara C., Kawamoto N., Takamura K.: *Analyst* 1992, 117, 1781-1788.
- [174] Mifune M., Mukano T., Tani M., Iwado A., Odo J., Motahashi N., Saito Y.: *Anal. Sci.* 1998, 14, 519-522.
- [175] Matsubara C., Yokoi Y., Tsuji M., Takamura K.: *Anal. Sci.* 1995, 11, 245-249.
- [176] Czolk R.: *Sensors Actuators B* 1996, 30, 61-65.
- [177] Lee S.K., Okura I.: *Analyst* 1997, 122, 81-86.
- [178] Lee S.K., Okura I.: *Anal. Chim. Acta* 1997, 342, 181-185.



- [179] Rösli S., Pretsch E., Morf W.E., Tsuchida E., Nishide H.: *Anal. Chim. Acta* 1997, 338, 119-123.
- [180] Blair T.L., Allen J.R., Daunert S., Backs L.G.: *Anal. Chem.* 1993, 65, 2155-2159.
- [181] Igashi S., Kuwae K., Yotsuyanagi T.: *Anal. Sci.* 1994, 10, 821-827.
- [182] Bekker E., Malinowska E., Schiller R.D., Meyerhoff M.E.: *Talanta* 1994, 41, 881-887.
- [183] Gao D., Li J.Z., Yu R.Q.: *Anal. Chem.* 1994, 66, 2245-2250.
- [184] Yoon J., Shin J.H., Paeng I.R., Nam H., Cha G.S., Paeng K.J.: *Anal. Chim. Acta* 1998, 367, 175-180.
- [185] Antonisse M.M.G., Smellink-Rubel B.H.M., Engbersen J.F.J., Reihoudt D.N.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1998, 2, 773-780.
- [186] Kliza D.M., Meyerhoff M.E.: *Electroanalysis* 1992, 4, 841-846.
- [187] Sun C., Zhao J., Xu H., Sun Y., Zhang X., Shen J.: *Talanta* 1998, 46, 15-19.
- [188] Chaniotakis N.A., Park S.B., Meyerhoff M.E.: *Anal. Chem.* 1989, 61, 566-569.
- [189] Gupta V.K., Jain A.K., Singh L.P., Khurana U.: *Anal. Chim. Acta* 1997, 355, 33-40.
- [190] Jain A.K., Gupta V.K., Singh L.P., Khurana U.: *Analyst* 1997, 122, 583-587.
- [191] Dobson D.J., Saini S.: *Anal. Chem.* 1997, 69, 3532-3537.
- [192] Sugawara K., Jamamoto F.: *J. Electr. Chem.* 1995, 394, 263-266.
- [193] Wu X., Li Y., Yu N.T., Rennebrg R.: *Electroanalysis* 1997, 9, 1288-1291.
- [194] D'Souza F., Hsieh Y.Y., Wickman H., Kutner W.: *Electroanalysis* 1997, 9, 1033-1038.
- [195] Yuasa M., Nagaiwa T., Kaoto M., Sekine I., Hagashi S.: *J. Electrochem. Soc.* 1995, 142, 2612-2620.
- [196] Guerra S.V., Xavier C.R., Nakagaki S., Kabata L.T.: *Electroanalysis* 1998, 10, 462-468.
- [197] Dall'Orto V.C., Danilowicz C., Hurst J., Balbo A.L., Rezzano I.: *Electroanalysis* 1998, 10, 127-132.
- [198] Ciszewski A., Mielczarek G., Kubaszewski E., Kozyński M.: *Electroanalysis* 1998, 10, 628-634.
- [199] Ciszewski A., Kubaszewski E., Kozyński M.: *Electroanalysis* 1996, 8, 293-298.
- [200] Mesáros S., Grunfeld S., Mesárova A., Bustin D., Malinski T.: *Anal. Chim. Acta*, 1997, 339, 265-271.
- [201] Malinski T., Taha Z.: *Nature* 1992, 358, 676-682.

- [202] Malinski T., Taha Z., Grunfeld S., Burewicz A., Tombouliau P., Kiechle F.: *Anal. Chim. Acta* 1993, 279, 135-141.
- [203] Yu A.M., Zhang H.L., Chen H.Y.: *Anal. Lett.* 1997, 30, 1013-1019.
- [204] Bedioui F., Trevin S., Albin V., Villegas M., Dewynek J.: *Anal. Chim. Acta* 1997, 341, 177-181.
- [205] Azvedo C.M.N., Araki K., Angnes L., Toma H.E.: *Electroanalysis* 1998, 10, 467-470.
- [206] Rocha J.R.C., Angnes L., Bertotti M., Araki K., Toma H.E.: *Anal. Chim. Acta* 2002, 452, 23-28.
- [207] Araki K., Angnes L., Azvedo C.M.N., Toma H.E.: *J. Electroanal. Chem.* 1995, 397, 205-210.
- [208] Malinski T., Ciszewski A., Fish J.R., Czuchajowski L.: *Anal. Chem.* 1990, 62, 909-911.
- [209] Bailey F., Malinski T., Kiechle F.: *Anal. Chem.* 1991, 63, 395-400.
- [210] Malinski T., Bailey F., Fish J.R., Kiechle F.: *Anal. Chim. Acta* 1991, 249, 35-39.
- [211] Frey H.H., McNeil C.J., Keay R.W., Bannister J.V.: *Electroanalysis* 1998, 10, 480-483.
- [212] Huang S.S., Tang H., Li B.F.: *Microchim. Acta* 1998, 128, 37-42.
- [213] Ciszewski A., Milczarek G.: *J. Electroanal. Chem.* 1996, 413, 137-141.
- [214] Qu F., Li N.Q., Jiang Y.Y.: *Anal. Chim. Acta* 1997, 344, 97-102.
- [215] Qu F., Li N.Q., Jiang Y.Y.: *Microchem. J.* 1998, 58, 39-47.
- [216] Qu F., Li N.Q., Jiang Y.Y.: *Talanta* 1998, 45, 787-792.
- [217] Duong B., Arechabaleta R., Tao N.J.: *J. Electroanal. Chem.* 1998, 447, 63-69.
- [218] Angnes L., Azvedo C.M.N., Araki K., Toma H.E.: *Anal. Chim. Acta* 1996, 329, 91-96.
- [219] Atanasov P., Gamburgzev S., Wilkins E.: *Electroanalysis* 1996, 8, 158-166.
- [220] Dong S., Kuwanawa T.: *Electroanalysis* 1991, 3, 485-492.
- [221] Deng Q., Dong S.: *Analyst* 1996, 121, 1123-1129.
- [222] Iwado A., Mifune M., Harada R., Mukuno T., Motohashi N., Saito Y.: *Anal. Sci.* 1998, 14, 515-520.
- [223] Saitoh K., Suzuki N.: *Anal. Chim. Acta* 1985, 178, 169-177.
- [224] Xu F., Chen J.R., Ying L., Chen B.L.: *Chin. J. Anal. Chem.* 1994, 22, 970-974.
- [225] Xu F., Ying L., Hu B., Tang F.L.: *Chin. J. Chromatogr.* 1994, 12, 208-211.
- [226] Xu F., Ying L., Chen J.R., Tang F.L.: *Chin. J. Instrum. Anal.* 1995, 14, 46-50.

- [227] Xu X.J., Zhang H.S., Zhang C.Y., Cheng J.K.: *Anal. Chem.* 1991, 63, 2532-2539.
- [228] Saitoh K., Shibata Y., Suzuki N.: *J. Chromatogr.* 1991, 542, 351-357.
- [229] Kibbey C.E., Meyerhoff M.E.: *Anal. Chem.* 1993, 65, 2189-2195.
- [230] Kibbey C.E., Meyerhoff M.E.: *J. Chromatogr.* 1993, 641, 49-55.
- [231] Xiao J., Kibbey C.E., Coutant D.E., Martin G.B., Meyerhoff M.E.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1996, 19, 2901-2905.
- [232] Chen S., Meyerhoff M.E.: *Anal. Chem.* 1998, 70, 2523-2528.
- [233] Kibbey C.E., Savina M.R., Parseghian B.K., Meyerhoff M.E.: *Anal. Chem.* 1993, 65, 3717-3721.
- [234] Xiao J., Meyerhoff M.E.: *J. Chromatogr. A* 1995, 715, 19-23.
- [235] Kele M., Compton R.N., Guiochon G.: *J. Chromatogr. A* 1997, 786, 31-39.
- [236] Xiao J., Meyerhoff M.E.: *Anal. Chem.* 1996, 68, 2818-2822.
- [237] Biesaga M., Orska J., Trojanowicz M.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 1998, 43, 647-651.
- [238] Trojanowicz M., Martin G.B., Meyerhoff M.E.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 1996, 41, 521-527.
- [239] Biesaga M., Orska J., Fiertek D., Izdebski J., Trojanowicz M.: *Fraesenius J. Anal. Chem.* 1999, 364, 160-164.
- [240] Kim D., Jung M.-W., Paeng I.R., Rhee J.-S., Paeng K.-J.: *Microchem. J.* 1999, 63, 134-139.
- [241] Wamser C.C., Kim H.-S., Lee J.-K.: *Optical Mat.* 2002, 21, 221-224.
- [242] O'Regan B., Grätzel M.: *Nature* 1991, 353, 737-740.
- [243] Hagfeldt A., Grätzel M.: *Acc. Chem. Res.* 2000, 33, 269-273.
- [244] Smestad G.: *Solar En. Mat. and Solar Cells* 2003, 76, 1-2.
- [245] Cao F., Oskam G., Searson P.C.: *J. Electrochem. Soc.* 1997, 80, 3157-3160.
- [246] Murakoshi K., Kogure R., Wada Y., Yanagida S.: *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* 1998, 55, 113-117.
- [247] Kim H.S., Kim C.H., Ha C.S., Lee J.K.: *Synth. Met.* 2001, 117, 289-293.
- [248] Sibata C.H., Colussi V.C., Oleinick N.L., Kinsella T.J.: *Expert. Opin. Pharmacother.* 2001, 6, 917-921.
- [249] Dalla Via L., Marciani Mangano S.: *Curr. Med. Chem.* 2001, 12, 1405-1410.
- [250] Bonnett R.: *Chem. Soc. Rev.* 1995, 24, 19-22.
- [251] Lissi E.A., Encias M.V., Lemp E., Rubio M.A.: *Chem Rev.* 1993, 93, 699-712.
- [252] Dougherty T.J., Pottery W.R., Weishaupt K.R.: *Porphyrim Localization and Treatment of Tumors*, Liss New York, 1984.

- [253] Lapeš M., Petera J., Jirsa M.: *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 1996, 36, 205-211.
- [254] Feng X.Z., Jing R.X., Qu Y., He X.W.: *Chem. J. Chinese Univer.* 1996, 17, 866-873.
- [255] Lang K., Kral V., Kapusta P., Kubat P., Vasek P.: *Tetrahedron Lett.* 2002, 43, 4919-4922.
- [256] Mosinger J., Deumié M., Lang K., Kubát P., Wagnerová D.M.: *Photobiol. A : Chem.* 2000, 130, 13-20.
- [257] Breslow R., Zhan X., Huang Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 4535-4536.
- [258] Yang J., Breslow R.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 2000, 39, 2694-2694.
- [259] French R.R., Holzer P., Leuenberger M.G., Woggon W.D.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 2000, 39, 1267-1269.
- [260] Weber L., Imiolczyk I., Haufe G., Rehored D., Henning H.: *J. Chem. Commun.* 1992, 232, 301-303.
- [261] Kuroda Y., Ito M., Sera T., Ogoshi H.: *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 7003-7004.
- [262] Carofiglio T., Fornasier R., Lucchini V., Simonato L., Tonellato U.: *J. Org. Chem.* 2000, 65, 9013-9021.
- [263] Chen W.H., Yan J.M., Tagashira Y., Yamaguchi M., Fujita K.: *Tetrahedron Lett.* 1990, 40, 891-894.
- [264] Diane L.D., Tata Venkata S.R., Dienes S., David S.L.: *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 2564-2570.
- [265] Josep M.R., Anton F.J., Maria L.V, Albert V.: *Tetrahedron* 1995, 51, 3705-3711.
- [266] Hamai S., Koshijata T.: *J. Photochem. Photobiol. A : Chem.* 1999, 127, 135-141.
- [267] Mosseri S., Mialocq J.C., Radiat B.P.: *Phys. Chem.* 1992, 39, 223-228.
- [268] Hamai S., Koshiyama T.: *Spectrochim. Acta* 2001, 57, 985-992.
- [269] Yang R.H., Wang K.M., Xiao D., Yang X.H.: *Microchem. J.* 2000, 64, 213-218.
- [270] Yang R.H., Wang K.M., Xiao D., Yang X.H., Zhang L.D.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 367, 429-436.
- [271] Yang R.H., Wang K.M., Xiao D., Yang X.H.: *Spectrochim. Acta A* 2001, 59, 1595-1602.
- [272] Yang R.H., Wang K.M., Xiao D., Yang X.H., Zhang L.D.: *Chem. J. Chin. Univ.* 2001, 22, 38-45.
- [273] Carofiglio T., Fornasier R., Gennari G., Lucchini V., Simonato L., Tonwillato U.: *Tetrahedron Lett.* 1997, 45, 7919-7922.
- [274] Wang X.-P., Pan J.-H., Li W.-H., Zhang Y.: *Talanta* 2001, 54, 805-810.
- [275] Tabata M., Sarker A.K., Nyarko E.: *J. Inorg. Biochem.* 2003, 94, 50-58.

- [276] Pasternack R.F., Wilians A.P., Gibbs E.J., Villafranca J.: *J. Biochem.* 1983, 22, 2406-2414.
- [277] Sari M.A., Dupre D.: *Biochemistry* 1990, 29, 4205-4216.
- [278] Tabata M., Sarker A.K., Watanabe K.: *Chem. Lett.* 1998, 325-326.
- [279] Nyarko E., Tabata M.: *Porphyrins Phthalocyanines* 2001, 5, 873-880.
- [280] Nyarko E., Hara T., Grab D.J., Tabata M., Fukuma T.: *Chem. Biol. Interact.* 2002, 139, 177-185.
- [281] Pasternack R.F., Gibbs E.J.: *ACS Symp. Ser.* 1989, 402, 59-73.
- [282] Ward B., Skorobogorty A., Dabrowiak J.C.: *Biochemistry* 1986, 25, 6875-6883.
- [283] Fouquet E., Bernadou J., Meunier B.J., Pratviel G.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987, 125, 1169-1171.
- [284] Bernadou J., Lauretta B., Pratviel G., Meunier B.J.: *C.R. Acad. Sci. Ser. III* 1989, 309, 409-414.
- [285] Onuki J., Ribas A.V., Medeiros M.H.G., Araki K., Toma H.E., Catalani L.H., Mascio P.D.: *Photochem. Photobiol.* 1996, 63, 272-277.
- [286] Tabata M., Nakajima K., Nyarko E.: *J. Inorg. Biochem.* 2000, 28, 383-389.
- [287] Yang R., Li K., Wang K., Liu F., Li N., Zhao F.: *Anal. Chim. Acta* 2002, 469, 285-293.
- [288] Plaschke M., Czolk R., Ache H.J.: *Anal. Chim. Acta* 1995, 304, 107-111.
- [289] Swamy N., James D.A., Mohr S.C., Hanson R.N., Ray R.: *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10, 3237-3243.
- [290] Sessler J.L., M.J., Lynch V.: *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 2810-2821.
- [291] Fischer H.: *Z. Physiol.Chem.* 1915, 95.
- [292] Gutniak O., Dancewicz A.M.: *Medycyna Pracy* 1958, 1, 1-10.
- [293] Grinstein M., Schwartz S., Watson C.J.: *J.Biol.Chem.* 1945, 157.
- [294] Watson J., Schwartz S., Hawkinson V.: *J.Biol.Chem.* 1945, 157.
- [295] Nicholas R.E.H., Rimington C.: *Biochem J.* 1951, 50.
- [296] Watson C.J., Berg M., Hawkinson V.: *J.Biol.Chem.* 1955, 214.
- [297] Petryka Z.J., Watson C.J.: *J.Chromatogr.* 1979, 179, 143-149.
- [298] Henderson M.J.: *Clin.Chem.* 1989, 6, 1043-1044.
- [299] Huie C., Williams W.R.: *Anal.Chem.* 1989, 61, 2288-2292.
- [300] Lai Ch.-K., Lam Ch.-W., Chan Y.-W.: *Clin.Chem.* 1994, 11, 2026-2029.
- [301] Elder G.H., Smith S.G., Smyth S.J.: *Ann. Clin. Biochem.* 1990, 27, 395-412.
- [302] Smith S.G.: *J. Dermatol.* 1975, 93, 291-296.

- [303] Hezel U.: *Amer. Lab.* 1978, 10, 91-108.
- [304] Hahn M.E., Gasiewicz T.A.: *J. Chromatogr.* 1991, 563, 363-368.
- [305] Bowers M.A., Aicher L.D., Davis H.A., Woods J.S.: *J. Lab. Clin. Med.* 1992, 120, 272-277.
- [306] Evans N., Jackson A.H., Martlin S.A., Towill R.: *J. Chromatogr.* 1976, 125, 345-355.
- [307] Lim C.K., Peters T.J.: *Clin.Chim. Acta* 1984, 139, 55-63.
- [308] Lim C.K., Peters T.J.: *Meth. In Enz.* 1986, 123, 383-389.
- [309] Lim C.K., Li F., Peters T.J.: *J. Chromatogr.* 1988 429 123-153.
- [310] Lim C.K., Razzaque M.A., Luo J., Farmer P.B.: *Biochem. J.* 2000, 347, 757-761.
- [311] Kachadourian R., Menzeleev R., Agha B., Bocckino S.B., Day B.J.: *J.Chromatogr.* 2002, 767, 61-67.
- [312] Grubina L.A., Gurinovich I.F., Demidchik E.P., Trofimovich S.V.: *J. Chromatogr.* 1986, 380, 232-234.
- [313] Sanitrák J., Krijt J., Čoupek J., Janoušek V., Magnus J.: *J. Chromatogr.* 1987, 415, 129-135.
- [314] McCarroll N.A.: *Clin. Chem.* 1988, 11, 2390-2391.
- [315] Suzuki Y., Tanabe K., Shioi Y.: *J. Chromatogr.* 1999, 839, 85-91.
- [316] Zelt D.T., Owen J.A., Marks G.S.: *J. Chromatogr.* 1980, 189, 209-216.
- [317] Lockwood W.H., Poulos V., Rossi E., Curnow D.H.: *Clin. Chem.* 1985, 7, 1163-1167.
- [318] Takayama N.: *J. Chromatogr.* 1987, 423, 313-318.
- [319] Dellinger M., Brault D.: *J. Chromatogr.* 1987, 423, 73-84.
- [320] Baukeveld G.J.J., Wolthers B.G., Saene J.M., de Haan T.H., Ruyter-Buitenhuis L.W., van Saene R.F.: *Clin. Chem.* 1987, 12, 2164-2170.
- [321] Kennedy S.W., Maslen A.L.: *J. Chromatogr.* 1989, 493, 53-62.
- [322] Aiken J.H., Huie C.W., Terzian J.A.: *J. Chromatogr.* 1992, 584, 181-187.
- [323] Brykina G.D., Lazasera E.E., Shpigun O.A.: *Chromatographia* 1999, 50, 716-720.
- [324] Gedreraas O.A., Berg K., Romslo I.: *Cancer Lett.* 2000, 150, 205-213.
- [325] Pudek M.R., Schreiber W.E., Jamani A.: *Clin. Chem.* 1991, 37, 826-831.
- [326] Blake D., McManus J., Cronin V., Ratnaike S.: *Clin. Chem.* 1992, 38, 96-100.
- [327] Kennedy S.W., James C.A.: *J. Chromatogr.* 1993, 619, 127-132.
- [328] Tsukahara S., Saitoh K., Suzuki N.: *J. Chromatogr.* 1993, 493, 138-142.

- 
- [329] Wassif W.S., Deacon A.C., Floderus Y., Thunell S., Peters T.J.: *Eur. J.Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1994, 32, 915-921.
- [330] Hindmarsh J.T., Oliveras L., Greenway D.C.: *Clin. Chem.* 1999, 45, 1070-1076.
- [331] Hindmarsh J.T., Oliveras L., Greenway D.C.: *Clin. Biochem.* 1999, 32, 609-619.
- [332] Jacob K., Egeler E., Neumeier D., Knedel M.: *J. Chromatogr.* 1989, 468, 329-338.
- [333] Ausió X., Grimalt J.O., Ozalla D., Herrero C.: *Anal. Chem.* 2000, 72, 4874-4877.
- [334] Sundaraman P., Vestal C.: *Org. Geochem.* 1993, 20, 1099-1111.
- [334] Van Berkel G.J., Quinones M.A., Quirke J.M.E.: *Energy Fuels* 1993, 7, 411-419.
- [336] Rosell-Melé A., Maxwell J.R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 209-215.
- [337] Dale M.J., Costello K.F., Jones A.C., Langridge-Smith P.R.: *J. Mass Spectrom.* 1996, 31, 590-567.
- [338] Bu W., Myers N., McCarty J.D., O'Neill T., Hollar S., Stetson P.L., Sved D.W.: *J.Chromatogr.* 2003, 783, 411-423.
- [339] Yu Z., Sheng G., Fu J., Peng P.: *J. Chromatogr.* 2000, 903, 183-191.
- [340] Westerlund J., Pudek M., Schreiber W.E.: *Clin. Chem.* 1988, 34, 345-351.
- [341] Van de Giessen A.W., van Wijk E.M.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1990, 28, 605-609.
- [342] Jones R.M., Lamb J.H., Lim C.K.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995, 9, 921-932.
- [343] Luo J., Lamb J.H., Lim C.K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 15, 1289-1293.
- [344] Weiberger R., Sapp E., Moring S.: *J. Chromatogr.* 1990, 516, 271-277.
- [345] Yao Y.J., Lee H.K., Li S.F.Y.: *J. Chromatogr.* 1993, 637, 195-200.
- [346] Dixon D.W., Pu G., Wojtowicz H.: *J. Chromatogr.* 1998, 802, 367-380.
- [347] Ackley K.L., Day J.A., Caruso J.A.: *J. Chromatogr.* 2000, 888, 293-298.
- [348] Zhang W., Zhang L., Ping G., Zhang Y., Kettrup A.: *J. Chromatogr.* 2002, 768, 211-214.
- [349] Lesley B.: *Wielka Księga Ziół, Wiedza i Życie* Warszawa, 1991.
- [350] Volak J., Stodola J.: *Rośliny lecznicze*, Polska Oficyna Wydawnicza „BGW” Warszawa, 1992.
- [351] Ożarowski A.: *Ziołolecznictwo*, PZWL Warszawa, 1982.
- [352] Samochowiec L.: *Kompendium ziołolecznictwa*, Wydawnictwo medyczne Urban & Partner Wrocław, 2002.
- [353] Borkowski B.: *Rośliny lecznicze w fitoterapii*, Instytut Roślin i Przetworów Zielarskich, Poznań, 1994.

- [354] Petersen M., Simmonds M.S.J.: *Phytochemistry* 2003, 62, 121-125.
- [355] Ellis B.E., Towers G.H.N.: *Biochem. J.* 1970, 118, 291-297.
- [356] Kelley C.J., Mahajan J.R., Brooks L.C., Neubert L.A., Breneman W.R., Carmack M.: *J. Org. Chem.* 1975, 40, 1804-1815.
- [357] Tanaka T., Morimoto S., Nonaka G., Nishioka I., Yokozawa T., Chung H.Y., Oura H.: *Chem. Pharm. Bull.* 1989, 37, 340-344.
- [358] Zinsmeister H.D., Becker H., Eicher T.: *Angew. Chem.* 1991, 103, 134-151.
- [359] Fecka I., Mazur A., Cisowski W.: *Postępy Fitoterapii* 2002, 8, 1-2.
- [360] Liu G.T., Zhang T.M., Wang B.E., Wang Y.W.: *Biochem. Pharmacol.* 1992, 43, 147-52.
- [361] D'Amelio F.S.: *Botanicals*, CRC Press Londyn, 1990.
- [362] Halliwell B., Aeschbach R., Löliger J., Aruoma O.I.: *Fd Chem. Toxic.* 1995, 33, 601-617.
- [363] Maillard M.N., Giampaoli P., Cuvelier M.E.: *Talanta* 1996, 34, 339-347.
- [364] Kovatcheva E.G., Koleva I.I., Ilieva M., Pavlov A., Mincheva M., Konushlieva M.: *Food Chem.* 2001, 72, 295-300.
- [365] Debersac P., Vernevaut M.F., Amiont M.J., Suschetet M., Siess M.H.: *Food Chem. Toxic.* 2001, 39, 109-117.
- [366] Santos-Gomes P.C., Seabra R.M., Andrade P.B., Fernandes-Ferreira M.: *Plant Sci.* 2002, 162, 981-987.
- [367] Liu J., Shen H.M., Ong Ch.N.: *Cancer Lett.* 2000, 153, 85-93.
- [368] Dabkevicius A., van Beek T.A., Niederländer H.A.G.: *J. Chromatogr. A* 2001, 912, 73-82.
- [369] Žiaková A., Brandšteterová E., Blahová E.: *J. Chromatogr. A* 2003, 983, 271-275.
- [370] Makino T., Ono T., Muso E., Yoshida H., Honda G., Sasayama S.: *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 1140-1145.
- [371] Szabo E., Thelen A., Petersen M.: *Plant Cell Reports*, 1999, 18, 485-489.
- [372] Radulescu V., Chiliment S., Oprea E.: *J. Chromatogr. A* 2004, 1027, 121-126.
- [373] Perry N., Court G., Bidet N., Court J., Perry E.: *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 1996, 11, 1063-1069.
- [374] Perry N.S.L., Houghton P.J., Theobald A.E., Jenner P., Perry E.K.: *J. Pharm. Pharmacol.* 2000, 52, 895-902.
- [375] Perry N.S.L., Houghton P.J., Sampson J., Theobald A.E., Hart S., Lis-Balchin M.: *J. Pharm. Pharmacol.* 2001 53 1347-1357.
- [376] Perry N.S.L., Houghton P.J., Jenner P., Keith A., Perry E.K.: *Phytomedicine* 2002, 9, 48-52.



- 
- [377] Perry N.S.L., Bollen C., Perry E.K., Balard C.: *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003, 75, 651-659.
- [378] Savelev S., Okello E., Perry N.S.L., Wilkins R.M., Perry E.K.: *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003, 75, 661-668.
- [379] Olah N.K., Radu L., Mogoşan C., Hanganu D., Gocan S.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33, 117-123.
- [380] Nakamura Y., Ohto Y., Torikai K., Tanaka T., Ohigashi H.: *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4545-4550.
- [381] Sahu A. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 1999, 57, 1439-1444.
- [382] Hooker C.W., Lott W.B., Harrich D.: *J. Virol.* 2001, 75, 3095-3104.
- [383] Brinker F.: *Journal of Naturopathic Medicine*, 1989.
- [384] Aufmkolk M.: *Endocrinology* 1985, 116, 1677-1683.
- [385] Bos R., Woerdenbag H.J., Hedriks H., Smit H.F., Wikstrom H.V., Scheffer J.C.: *Flavour Fragrance J.* 1997, 12, 123-131.
- [386] Lokar L.C., Moneghini M.: *Biochem. Systemat. Ecol.* 1989, 17, 563-568.
- [387] Morazzoni P., Bombardelli E.: *Fitoterapia* 1995, 66, 99-112.
- [388] Bos R., Woerdenbag H.J., van Putten F.M.S., Hendriks H., Scheffer J.J.C.: *Planta Med.* 1998, 64, 143-159.
- [389] Madus G.: *Lehrbuch der biologischen Heilmittel*. Hildesheim: Georg Olms Verlag, 1976.
- [390] Bos R., Woerdenbag H.J., Hendriks H., Zwaving J.H., De Smet P., Tittel G., Wikström H.V., Scheffer J.J.C.: *Phytochem. Anal.* 1996, 7, 143-151.
- [391] Houghton P.J.: *J. Pharm. Pharmacol.* 1999, 51, 505-512.
- [392] Fernández S., Wasowski C., Paladini A.C., Marder M.: *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2004, 77, 399-404.
- [393] Hölzl J.: *The pharmacology and therapeutics of Valeriana*. W: P.J. Houghton, ed. Holandia: Harwood, 1997.
- [394] Marder M., Paladini A.C.: *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2, 853-867.
- [395] Hölzl J., Godau P.: *Planta Med.* 1989, 55, 642-648.
- [396] Mennini T., Bernasconi P., Bombardelli E., Morazzoni P.: *Fitoterapia* 1993, 64, 291-300.
- [397] Bodesheim U., Hölzl J.: *Pharmazie* 1997, 52, 386-391.
- [398] Wasowski C., Marder M., Viola H., Medina J.H., Paladini A.C.: *Planta Med.* 2002, 68, 934-936.
- [399] Marder M., Viola H., Wasowski C., Fernandez S., Medina J.H., Paladini A.C.: *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003, 75, 737-745.

- [400] Bos R., Woerdenbag H.J., Pras N.: *J. Chromatogr.* 2002, 967, 131-146.
- [401] Evans W.C.: *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 14<sup>th</sup> Edition, WB Saunders Company Ltd., 1996.
- [402] Ożarowski A., Jaroniewski W.: *Rośliny lecznicze*, IWZZ Warszawa, 1987.
- [403] Bounthanh C., Bergmann L., Beck J., Haag-Berruier M., Anton R.: *Planta Med.* 1981, 41, 21-28.
- [404] Becker H., Chavadej S., Tauscher B., Abram A.P., Finner E., Borchers F.: *Phytochemistry* 1986, 25, 1250-1255.
- [405] Eriksen B.: *Nord. J. Bot.* 1989, 9, 179-183.
- [406] Bock K., Jensen S.R., Nielsen B.J., Norn V.: *Phytochemistry* 1978 17 753-759.
- [407] Boros C.A., Stermitz F.R.: *J. Nat. Prod.* 1991, 54, 1173-1179.
- [408] Jensen S.R. w: J.B. Harborne, F.A. Tomas-Barberan, (Eds.), *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Clarendon Press Oxford, 1991.
- [409] Salles L.A., Silva A.L., Rech S.B., Zanatta N., von Poser G.L.: *Biochem. Syst. Ecol.* 2000, 28, 907-910.
- [410] Tesch B.J.: *Dis. Mon.* 2002, 48, 671-696.
- [411] Houghton P.J.: *J. Ethnopharmacol.* 1988, 22, 121-142.
- [412] Tyler V.E., Brady L.R., Robbers J.E.: *Pharmacognosy*, 9<sup>th</sup> Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, 1988.
- [413] Borkowski B.: *Zarys farmakognozji*, PZWL Warszawa, 1974.
- [414] Hude W., Scheutwinkel-Reich M., Braun R.: Bacterial mutagenicity of the tranquilizing constituents of Valerianaceae roots.
- [415] Ortiz J.G., Nieves-Natal J., Chavez P.: *Neurochem. Res.* 1999, 24, 1373-1378.
- [416] Santos M.S., Ferreira F., Cuhna A.P., Caravahlo A.P., Ribeiro C.F., Macedo T.: *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1994, 327, 220-231.
- [417] Santos M.S., Ferreira F., Cunha A.P.: *Planta Med.* 1994, 60, 278-279.
- [418] Müller C.E., Schumacher B., Brattström A., Abourashed E.A., Koetter U.: *Life Sci.* 2002, 71, 1939-1949.
- [419] Zou L., Harkey M.R., Henderson G.L.: *Life Sci.* 2002, 71, 1579-1589.
- [420] Hendriks H., Bos R., Woerdenbag H.J., Koster A.S.: *Planta Med.* 1985, 51, 28-37.
- [421] Hiller K.O., Zetler G.: *Phytother. Res.* 1996, 10, 145-151.
- [422] Hobbs C.: *Herbal Gram.* 1989, 21, 19-34.
- [423] Capasso A., Defeo V., DeSimon F.: *Physiother. Res. Int.* 1996, 10, 309-312.
- [424] Kovatcheva E., Pavlov A., Koleva I.I., Ilieva M., Mincheva M.: *Phytochemistry* 1996, 43, 1243-1244.

- [425] Zgórką G., Główniak K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 26, 79-87.
- [426] Lu Y., Foo L.Y.: *Phytochemistry* 1999, 51, 91-94.
- [427] Park S.H., Kang S.H., Lim S.H., Oh H.S., Lee K.H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 3455-3459.
- [428] Wojciechowski H., Gumbinger H.G., Vahlensieck U., Winterhoff H., Nahrstedt A., Kemper F.H.: *J. Chromatogr. A* 1995, 717, 261-270.
- [429] Exarchou V., Troganis A., Gerathanassis I.P., Tsimidou M., Boskou D.: *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2-8.
- [430] Carnat A.P., Carnat A., Fraisse D., Lamaison J.L.: *Pharm. Acta Helv.* 1998, 72, 301-305.
- [431] Skoula M., Abbes J.E., Johnson C.B.: *Biochem. Systems Ecol.* 2000, 28, 551-561.
- [432] Kasimu R., Tanaka K., Tezuka Y., Gong Z., Li J., Basnet P., Namba T., Kadota S.: *Chem. Pharm. Bull.* 1998, 46, 500-504.
- [433] Ibanez E., Cifuentes A., Crego A.L., Senorans F.J., Cavero S., Reglero G.: *J. Agric. Food Chem.* 2000, 9, 4060-4065.
- [434] Dey G., Sachan A., Ghosh S., Mitra A.: *Ind. Crops and Prod.* 2003, 18, 171-176.
- [435] Andrade P., Ferreres F., Gil M.I., Tomás-Barberán F.A.: *Food Chem.* 1997, 60, 79-84.
- [436] El-Mousallamy A.M.D., Hawas U.W., Hussein S.A.M.: *Phytochemistry* 2000, 55, 927-931.
- [437] Gerathanassis I.P., Exarchou V., Lagouri V., Troganis A., Tsimidou M., Boskou D.: *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4185-4192.
- [438] Kanazawa K., Kawasaki H., Samejima K., Ashida H., Danno G.: *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 404-409.
- [439] Kikuzaki H., Nakatani N.: *Agric. Biol. Chem.* 1989, 53, 519-524.
- [440] Nardini M., D'Aquino M., Tomassi G., Di Felice M., Piccolelle E., Scaccini C.: *Free Radical Biol. Med.* 1995, 19, 541-552.
- [441] Nardini M., Pisu P., Gentili V., Natella F., Di Felice M., Piccolelle E., Scaccini C.: *Free Radical Biol. Med.* 1998, 25, 1098-1105.
- [442] Pearson A.D., Frankel E.N., Aeschbach R., German J.B.: *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 578-582.
- [443] Teissedre P.L., Frankel E.N., Waterhouse A.L., Peleg H., German J.B.: *J. Sci. Food Agric.* 1996, 70, 55-61.
- [444] Vergeer L.H.T., Develi A.: *Aquat. Bot.* 1997, 58, 65-72.
- [445] Stahl E., Schild W.: *Arzneim.-Forsch.* 1969, 19, 314-317.
- [446] Laufer J.L., Seckel B., Zwaving J.H.: *Pharm. Weekbl.* 1970, 105, 609-611.

- [447] Hazelhoff B., Weert B., Malingré Th.M.: Pharm. Weekbl. 1981, 116, 810-816.
- [448] Hazelhoff B., Weert B., Denee R., Malingré Th.M.: Pharm. Weekbl. 1979, 114, 956-958.
- [449] Rucker G., Neugebauer M., El Din M.S.: Planta Med. 1981, 43, 299-303.
- [450] Tittel G., Wagner H.: J. Chromatogr. 1978, 148, 459-468.
- [451] Bos R., Woerdenbag H.J., Hendriks H., Scheffer J.J.C.: Sci. Pharm. 1997, 65, 165-168.
- [452] Bokstaller S., Schmidt P.C.: Pharmazie 1997, 52, 552-557.
- [453] Bokstaller S., Schmidt P.C.: Sci. Pharm. 1997, 65, 181-194.
- [454] Lazarovych N.J., Pekos P.: Drug Inform. J. 1997, 32, 497-512.
- [456] Gao X.Q., Björk L.: Fitoterapia 2000, 71, 19-24.
- [457] Merfort I.: J. Chromatogr. A. 2002, 967, 115-130.
- [458] Gränicher F., Christen P., Kapetanidis I.: Phytochemistry 1995, 40, 1421-1424.
- [459] Witkiewicz Z.: Podstawy chromatografii, WNT Warszawa, 1995.
- [460] Thin Layer Chromatography - materiały informacyjne firmy Macherey-Nagel, Duren (Szwajcaria).
- [461] Szumiło H., Soczewiński E.: Farmacja Polska 1973, 4, 319.
- [462] Janicki S., Fiebig A., Sznitowska M.: Farmacja stosowana, PZWL Warszawa, 2002.
- [463] Borkowski B.: Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej, PZWL Warszawa, 1973.
- [464] ChromBook 2 - materiały informacyjne firmy Merck (Darmstadt, Niemcy).
- [465] Locke C.: J. Chromatogr. Sci. 1974, 12, 433-437.
- [466] Hanai T.: J. Chromatogr. 1991, 550, 313-324.
- [467] Nowakowska J., Łukasiak J., Maksimowicz I.: Farmacja Polska 2001, 17, 804-809.
- [468] Nowakowska J., Halkiewicz J., Łukasiak J.: J. Planar Chromatogr. 2001, 14, 350-354.
- [469] Nowakowska J., Marszał M.: J. Planar Chromatogr. 2003, 16, 369-373.
- [470] Nowakowska J.: J. Planar Chromatogr. 2004, 2, 149-153.
- [471] Cserhati T.: J. Planar Chromatogr. 1995, 8, 107-111.
- [472] Nowakowska J., Halkiewicz J., Łukasiak J.: Chromatographia 2002, 56, 367-373.
- [473] Lamparczyk H., Ochocka R.J.: Chromatographia 1987, 23, 337-340.
- [474] Lamparczyk H., Ochocka R.J.: Chromatographia 1988, 25, 643-646.

- 
- [475] Nowakowska J.: Farmacja Polska (w druku).
- [476] Nowakowska J.: J. Planar Chromatogr. 2004, 5, 388-390.
- [477] Nowakowska J.: J. Planar Chromatogr. 2004, 3, 200-206.
- [478] Nowakowska J.: J. Planar Chromatogr. (w druku).
- [479] Nowakowska J.: Chromatographia (w druku).
- [480] Twardowski J.: Biospektroskopia tom 4, PWN Warszawa, 1990.
- [481] Kęcki Z.: Podstawy spektroskopii molekularnej, PWN Warszawa, 1998.
- [482] Cisak A.: Chemiczna analiza instrumentalna, tom CCXII AMŁ Łódź, 1996.
- [483] Marczenko Z., Balcerzak M.: Spektroskopowe metody w analizie chemicznej, PWN Warszawa, 1998.
- [484] Nowakowska J.: Annales Acad. Med. Ged. 2002, 32, 281-292.