

### [Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)  
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)  
[.net](#)  
[Innowacje](#)  
[Nauka](#)  
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

## Chromatografia wykorzystująca hydrofobowe właściwości cząsteczek: chromatografia fazy odwróconej cz. II

✖ Zarówno paracetamol, teofilina jak i salicylany mogą być w łatwy sposób ekstrahowane z osocza, dzięki czemu możliwe jest określenie ich stężenia w osoczu. Ekstrakcję tych leków prowadzi się przy zastosowaniu mieszaniny chlorek metylenu/propanol występujących w stosunku 9:1.

Następnie, tak wyekstrahowany materiał rozdziela się metodą fazy odwróconej z zastosowanej kolumny C18 w izokratycznym systemie HPLC, który wyposażony jest w detektor UV oraz integrator

[1]. Identyfikację np. salicylanów dokonuje się na podstawie wyznaczonego czasu retencji, z kolei określenie ilości wyekstrahowanego leku dokonuje się na podstawie zastosowania wewnętrznego standardu. W przypadku salicylanów standardem jest 8-C1-teofilina [2].

## **Analityczne metody oznaczania leków w płynach fizjologicznych**

### **Wykonanie:**

Materiał do badań: Jako materiał należy wykorzystać osocze ludzkie wolne od leków, oraz osocze pochodzące od osoby chorej – musi to być osoba przyjmująca analizowane leki!

### **1) Przygotowanie próbek do chromatografii: ekstrakcja leków**

Na początku należy przygotować mieszaninę ekstrakcyjną wg przepisu: chlorek metylenu/2-propanol w stosunku 9:1, z dodatkiem wewnętrznego standardu (8-C1-teofilina) o stężeniu  $7\mu\text{M}$ . Z kontrolnego osocza, tj. wolnego od leków przygotować osocze wzorcowe w objętości 1 ml, zawierające: paracetamol (w stężeniu  $0,4\text{ mM}$ ), teofilinę ( $75\mu\text{M}$ ) oraz salicylan ( $1\text{ mM}$ ). Równolegle należy prowadzić ekstrakcję trzech próbek, tj:

- 1) Osocza wolnego od leków
- 2) Osocza wzorcowego oraz
- 3) Osocza, które zawiera nieznaną ilość leków.

Do 0,5 ml osocza dodać 0,5 ml 1M roztworu HCl, a także 5 ml mieszaniny ekstrakcyjnej. Całość mieszać przez 1 minutę, po czym odwirować przy  $10\,000g$  w ciągu 10 minut. Po wirowaniu, zebrać 3 ml powstałego supernatantu, w której znajdować się będą rozpuszczalniki organiczne, supernatant przenieść do szklanej probówki, po czym odparować w łaźni wodnej w temp.  $50^{\circ}\text{C}$  (w atmosferze azotu). Powstały osad rozpuścić w eluencie (13% metanol-75%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  -0,02M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) w obj.  $100\mu\text{L}$  i zastosować do rozdzielania na kolumnie C18(ODS2,  $5\mu\text{m}$ ,  $4\times 100\text{ mm}$ ). Zastosowana ekstrakcja charakteryzuje się dużą wydajnością, która dla badanych leków przekracza 90% [1].

### **1) Analiza zawartości leków w próbkach**

Kolumnę C18 należy zrównoważyć eluentem (13% metanol-75%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  -0,02M  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), prędkość przepływu ustalić na  $1\text{ ml/min}$ , zaś w detektorze UV wybrać długość fali równą  $\lambda=280\text{ nm}$ . Do pętli nanieść  $10\mu\text{l}$  analizowanej próbki, a po ustaleniu się warunków nastrzyknąć próbkę na kolumnę. Cały rozdział chromatograficzny prowadzić w czasie 20 minut, po kolei analizując przygotowane próbki.

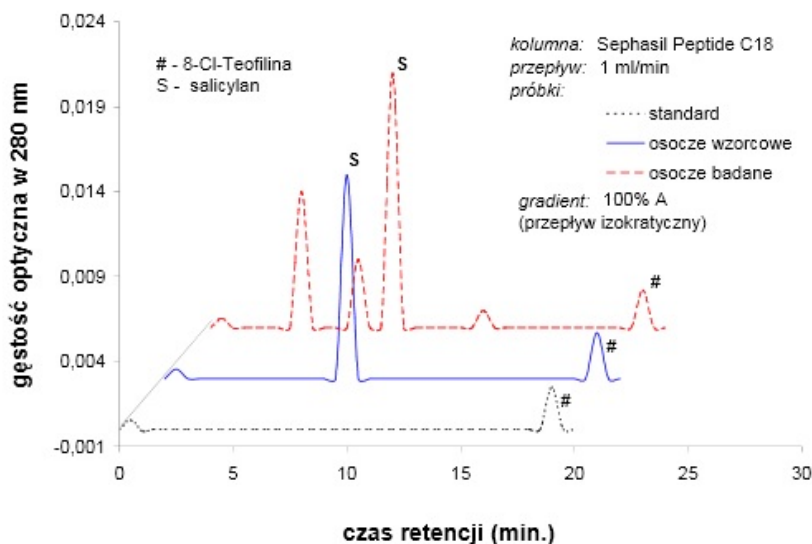
W próbce, która jest wolna od leków powinien pojawić się tylko wewnętrzny standard czyli 8-C1-teofilina. Czas retencji dla tej próbki to ok. 19 min.

W próbce wzorcowej powinny pojawić się dokładnie 3 szczyty chromatograficzne, które odpowiadają:

- paracetamolowi (ok. 4 min)
- teofilinie (ok. 7 min)
- oraz salicylanowi (ok. 8 min).

Wewnętrzny standard powinien pojawić się dokładnie w tym samym miejscu co w osoczu, które było wolne od leków, z kolei w próbce badanej (charakteryzującej się nie znaną zawartością leków), szczyty chromatograficzne odpowiadające poszczególnym lekom powinny pojawiać się przy tych

samych czasach retencji co w osoczu wzorcowym. Należy mieć jednak na uwadze, że szczyty te mogą być różnej wysokości w porównaniu do osocza wzorcowego. Wysokość każdego szczytu chromatograficznego zależy od stężenia danego leku w osoczu. W zakresie badanych stężeń oraz mierzonych przez detektor zmian gęstości optycznej przepływającej cieczy, można przyjąć liniową zależność mierzonej gęstości optycznej od stężenia każdego z leków [1].



Zdjęcie: Analiza salicylanów w osoczu krwi ludzkiej, [2].

Pierwszy z chromatogramów przedstawia rozdział materiału zawierającego jedynie wewnętrzny standard (8-Cl-teofilina). Środkowy chromatogram reprezentuje rozdział osocza kontrolnego (wzorzec o znanej ilości salicylanu). Trzeci chromatogram prezentuje separację różnych substancji z osocza pacjenta [2].

Korzystając z poniższego wzoru możliwe jest policzenie stężenia ( $c$ ) każdego z analizowanych leków w próbce badanej, gdzie uwzględnia się wartości absorbancji uzyskane dla wewnętrznego standardu:

$$C_{\text{leku}} = C_{\text{wzorca leku}} \times (A_{\text{leku próby}} / A_{\text{leku wzorca}}) \times (A_{\text{standardu wzorca}} / A_{\text{standardu próby}})$$

Gdzie:

**C leku** i **C wzorca leku** – stężenia badanego leku, odpowiednio w osoczu badanym i wzorcowym;

**A leku próby** i **A leku wzorca** – zmierzone wartości maksymalnej absorbancji w szczycie badanego leku, odpowiednio w próbce badanej i wzorcowej;

**A standardu wzorca** i **A standardu próby** – zmierzone wartości maksymalnej absorbancji w szczycie odpowiadającym standardowi wewnętrznemu, odpowiednio w próbce wzorcowej i badanej [1].

Po zakończeniu rozdziału chromatograficznego i oznaczeń, kolumnę należy przemyć 20% metanolem w objętości 30 ml i przechowywać kolumnę w temperaturze pokojowej. Kolumna musi być przechowywana szczelnie zamknięta (z obu końców) lub podłączona do systemu HPLC [1], [2].

**Zastosowanie chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych do rozdzielania**

## **i oznaczania naftochinonów.**

Naftochinony to pochodne naftalenu. Zazwyczaj są to: 1,4-naftochinony albo 1,4-naftohydrochinony- często występujące z wbudowaną grupą fenolową. Związki te występują u bakterii, grzybów i roślin wyższych. Ich rozpowszechnienie w świecie roślinnym jest dość ograniczone, choć czasami stanowią składniki czynne niektórych surowców roślinnych [3], [15].

Do najważniejszych barwników naftochinonowych należą: juglon, plumbagina, droseron czy szikonina. Pochodne naftochinonu wykazują wielokierunkową aktywność farmakologiczną, zaś szczególnie dużo leczniczych właściwości posiada właśnie szikonina. Przeciwwzapalne właściwości szikoniny, oraz przyspieszające gojenie ran znane są już od dawna i wykorzystywane do leczenia ciężkich owrzodzeń oraz oparzeń skóry, a także egzemy czy odleżyn [4]. Jak wykazały badania, przeciwzapalne działanie szikoniny (oraz jej pochodnych) związane jest wieloma mechanizmami, w tym m.in. z hamowaniem biosyntezy leukotrienu B<sub>4</sub> i kwasu 5-hydroksyeikozatetraenowego, które zaliczane są do mediatorów stanu zapalnego [5]. Ponadto, zmniejszeniem produkcji TNF- $\alpha$ , interleukiny 1-b i tlenku azotu, a także inhibicją cyklooksygenazy-2 [6], [15].

Szikonina i jej pochodne wykazują również aktywność antybakteryjną. Działanie takie odnosi się zarówno do bakterii Gram-dodatnich (G+), np. *Staphylococcus aureus* [7], [8], jak również bakterii Gram-ujemnych (G-) w tym *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* (Karyagina et al., 2001). Inny barwnik: plumbagina- wykazuje działanie przeciwko *Helicobacter pylori* [9].

Jak udowodniono, działanie przeciwdrobnoustrojowe naftochinonów nie ogranicza się tylko do bakterii i grzybów. Związki te posiadają także aktywność przeciwwirusową, dzięki czemu mogą być one stosowane np. przeciwko wirusowi zapalenia wątroby HCV [10], z kolei wykazano, że szikonina posiada działanie supresyjne na wirusa HIV-1 [11]. Ponadto, w wielu doniesieniach udowodniono przeciwnowotworowe właściwości szikoniny oraz jej pochodnych. Działanie to wynika z kilku mechanizmów, w tym m.in. z hamowania proliferacji komórek nowotworowych [12], inhibicji DNA topoizomerazy-I [13] czy indukcji apoptozy [14], [15].

Najczęściej do rozdzielania związków należących do grupy naftochinonów z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej w układzie faz odwróconych (tzw. chromatografia RP-TLC), stosuje się płytki z fazą stacjonarną (C18). Jako eluent wykorzystuje się wodne roztwory metanolu bądź kwasu mrówkowego. Detekcję przeprowadza się w świetle UV.

W przypadku zastosowania wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz, jako fazę stacjonarną stosuje się żel krzemionkowy, który poddawany jest modyfikacji z wykorzystaniem grup oktadecylowych. W większości stosowanych metodyk rozdzielania związków wykorzystuje się elucję izokratyczną, gdzie eluentem jest wodny roztwór acetonitrylu lub metanolu, z dodatkiem kwasu octowego bądź mrówkowego.

Do detekcji związków należących do grupy naftochinonów powszechnie wykorzystuje się detektory spektrofotometryczne UV-VIS (z matrycą fotodiodową – DAD, lub z detektorem fluorescencyjnym).

Zastosowanie elucji izokratycznej pozwala na łatwiejsze odzyskanie składników eluentu, a ponadto wpływa na bardzo ważny aspekt całej metodyki: czyni zaprojektowany proces rozdzielczy bardziej ekonomicznym [16].

**Autor: Lidia Koperwas**

## Literatura:

- [1]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 172 - 176
- [2]. <http://www.biofizyka.p.lodz.pl/ch7.pdf>
- [3]. Kohlmünzer S. (2007). Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. Wyd. V unowocześnione. PZWL, Warszawa: 150-198, 253-277, 377-379, 531
- [4]. Papageorgiou V.P., Assimpoulou A.N., Couladouros E.A., Hepworth D., Nicolaiu K.C. (1999). The chemistry and biology of alkannin, shikonin and related naphthazarin natural products. *Angewandte Chemie International Editio*, 38: 270-300
- [5]. Wang W.J., Bai J.Y., Liu D.P., Xue L.M., Zhu X.Y. (1994). The antiinflammatory activity of shikonin and its inhibitory effect on leukotriene B<sub>4</sub> biosynthesis. *Yaoxue Xuebao*, 29: 161-165
- [6]. Nam K.N., Son M.-S., Park J.-H., Lee E.H. (2008). Shikonins attenuate microglial inflammatory responses by inhibition of ERK, Akt, and NF- $\kappa$ B: neuroprotective implications. *Neuropharmacology*, 55 (5): 819-825
- [7]. Shen C.C., Syu W.J., Li S.Y., Lin C.H., Lee G.H., Sun C.M. (2002). Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *Journal of Natural Products*, 65(12): 1857-1862
- [8]. Pietrosiuk A., Kędzia B., Hołderna-Kędzia E., Wiedenfeld H., Malinowski M., Furmanowa M. (2003). Antimicrobial activity of naphthoquinones from *Lithospermum canescens* Lehm. *Herba Polonica*, 49(3/4): 209-215
- [9]. Wang Y.-C., Huang T.-L. (2005). High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-*Helicobacter pylori* compound of *Plumbago zeylanica* L. *Journal of Chromatography A*, 1094: 99-104
- [10]. Ho T.Y., Wu S.L., Lai I.L., Cheng K.S., Kao S.T., Hsiang C.Y. (2003). An in vitro system combined with an in-house quantitation assay for screening hepatitis C virus inhibitors. *Antiviral Research*, 58: 199-208
- [11]. Chen X., Yang L., Hang N., Turbin J.A., Buckheit R.W., Sterling C., Oppenheim J.J., Howard O.M.Z. (2003a). Shikonin, a component of Chinese herbat medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses Human Immunodeficiency Virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9): 2810-2816
- [12]. Sankawa U., Otsuka H., Kataoka Y., Iitaka Y., Hoshi A., Kureitani K. (1981). Antitumor activity of shikonin, alkannin and their derivatives. II. X-Ray analysis of cyclo-alkannin leucoacetate, tautomerism of alkannin and cyclo-alkannin and antitumor activity of alkannin derivatives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 29(1): 116-122
- [13]. Ahn B.Z., Baik K.U., Kreon G.R., Lim K., Hwang B.D. (1995). Acylshikonin analogues: synthesis and inhibition of DNA topoisomerase-I. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38: 1044-1047
- [14]. Gao D., Hiromura M., Yasui H., Samurai H. (2002). Direct reaction between shikonin and thiols induces apoptosis in HL60 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(7): 827-832
- [15]. <http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/1101Bolonkowska/Bolonkowska.html>
- [16]. Boczkaj G., Jaszczolt G., Leman A., Skrzypczak A., Królicka A., Kamińska M., 2011. Zastosowanie chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-LC) w rozdzielaniu i oznaczaniu polifenoli i naftochinonów w materiałach roślinnych. *Camera Separatoria (previously Postępy Chromatografii)*, Volume 3, Numer 1/June 2011, 87-99. [http://dach.ich.uph.edu.pl/cs/download/cs\\_vol3\\_no1/\\_cs\\_2011\\_87-100.pdf](http://dach.ich.uph.edu.pl/cs/download/cs_vol3_no1/_cs_2011_87-100.pdf)

<http://laboratoria.net/artukul/18813.html>

**Informacje dnia:** [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#)

## **Partnerzy**