

### [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 mM), teofilinę ( $75\mu\text{M}$ ) oraz salicylan (1 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 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.

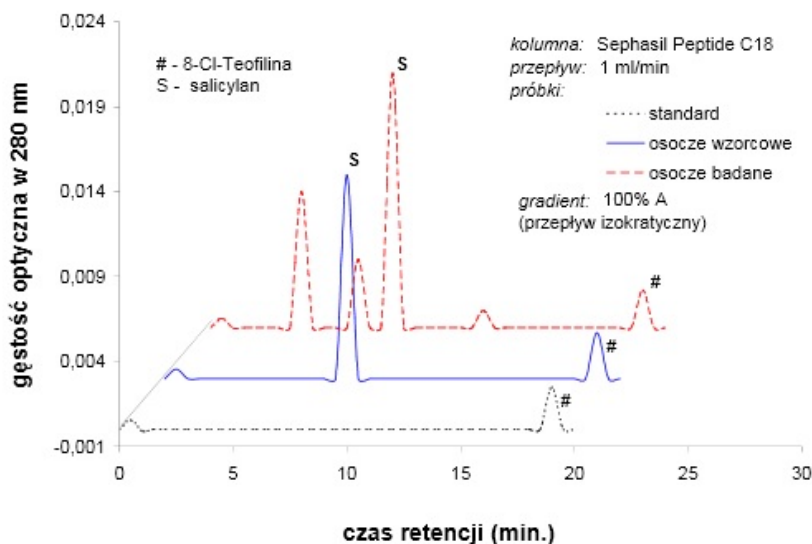
W próbce, która jest wolna od leków powinien pojawić się tylko wewnętrzny standard czyli 8-C1-teofilina. Czas retencji dla tej próbki to ok. 19 min.

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 (wzorec 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 B4 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): 819825
- [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., Kuretani 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:** [Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14](#)

## **Partnerzy**