

Ewelina Kopciał, Zbigniew Marzec, Agnieszka Marzec¹⁾, Tadeusz H. Dzido²⁾

BADANIA NAD WARUNKAMI PROWADZENIA PROCESU ROZDZIELANIA SUBSTANCJI BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH TECHNIKAMI ELEKTROCHROMATOGRAFII PLANARNEJ CIŚNIENIOWEJ ORAZ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Katedra i Zakład Żywności i Żywienia, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik: dr hab. *Z. Marzec*

¹⁾ Zakład Dietetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik: dr n. med. *B. Szponar*

²⁾ Zakład Chemii Fizycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. *T. H. Dzido*

Zoptymalizowano warunki prowadzenia procesu rozdzielania wybranych substancji biologicznie aktywnych (dimenhydramina, kofeina, paracetamol, diklofenak, teofilina, furagina, metamizol, sulfogwajakol), obecnych w ogólnodostępnych preparatach farmaceutycznych oraz suplementach żywieniowych, przy zastosowaniu nowej techniki rozdzielania substancji, elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (PPEC) oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC). Proces rozdzielania prowadzono w układzie faz odwróconych (RP-18 WF_{254S}). Podczas realizowania badań określono wpływ stężenia modyfikatora organicznego, acetonitrylu, oraz pH buforu wodno-organiczej fazy ruchomej na dystans migracji badanych substancji w układach PPEC oraz retencję w układach HPTLC.

Hasła kluczowe: elektrochromatografia planarna ciśnieniowa, wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa, substancje biologicznie aktywne.

Key words: pressurized planar electrochromatography, high-performance thin-layer chromatography, biologically active substances.

Wysoka dostępność leków bez recepty oraz suplementów żywieniowych powoduje pogłębiające się wśród społeczeństwa zjawisko lekozależności. Niebezpieczeństwa płynące z nieprawidłowego przyjmowania ogólnodostępnych farmaceutyków dotyczą zarówno negatywnego wpływu substancji czynnych zażywanych w dużych dawkach, jak i występujących pomiędzy nimi interakcji. Jeżeli długotrwałemu przyjmowaniu leków towarzyszą objawy ogólnego wyczerpania organizmu lub wręcz wzrastającego zatrucia – to nałogu tego nie można już nazwać lekomanią, lecz toksykomanią. Dlatego też, mając na celu zdrowie pacjenta, niezbędne stało się opracowanie bardziej efektywnych metod analizy, opierających się na nowoczesnych technikach chromatograficznych, dzięki którym będzie możliwa efektywna identyfikacja potencjalnie toksycznych substancji chemicznych. Elektrochromatografia planarna ciśnieniowa to stosunkowo nowa metoda rozdzielcza, wprowa-

dzona przez Nuroka i wsp. (1), łącząca zalety chromatografii cienkowarstwowej oraz technik elektromigracyjnych. Migracja fazy ruchomej w przestrzeni międzyziarnowej fazy stacjonarnej w metodzie PPEC zachodzi dzięki zjawisku elektroosmozy. Generowanie przepływu elektroosmotycznego eluentu jest realizowane poprzez umieszczenie płytki chromatograficznej w polu elektrycznym. Dystans migracji analitów jest uzależniony od ich budowy cząsteczkowej, ładunku ich jonów oraz od rodzaju fazy ruchomej i stacjonarnej. W metodzie PPEC mechanizm separacji uzależniony jest od dwóch efektów: elektroforetycznego i podziału substancji pomiędzy fazę ruchomą i stacjonarną. Dlatego w układach tych w porównaniu do układów chromatografii cieczowej może mieć miejsce zmiana selektywności rozdzielania. Ponadto sprawność układów PPEC jest znacznie wyższa niż układów zwykłej HPTLC – jest porównywalna do sprawności uzyskiwanej w układach HPLC (2). Metoda PPEC charakteryzuje się także znacznie krótszym czasem separacji. Powyższe cechy PPEC sprawiają, że technika ta jest potencjalnie bardzo atrakcyjna do zastosowania w szeroko pojętej praktyce laboratoryjnej (3-7).

Podjęto próbę opracowania optymalnych warunków prowadzenia procesu rozdzielania wybranych substancji biologicznie aktywnych takich jak: dimenhydramina, kofeina, paracetamol, diklofenak, teofilina, furagina, metamizol, sulfogwajakol, obecnych w ogólnodostępnych preparatach farmaceutycznych oraz suplementach żywieniowych, przy zastosowaniu nowej techniki rozdzielania substancji – elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej.

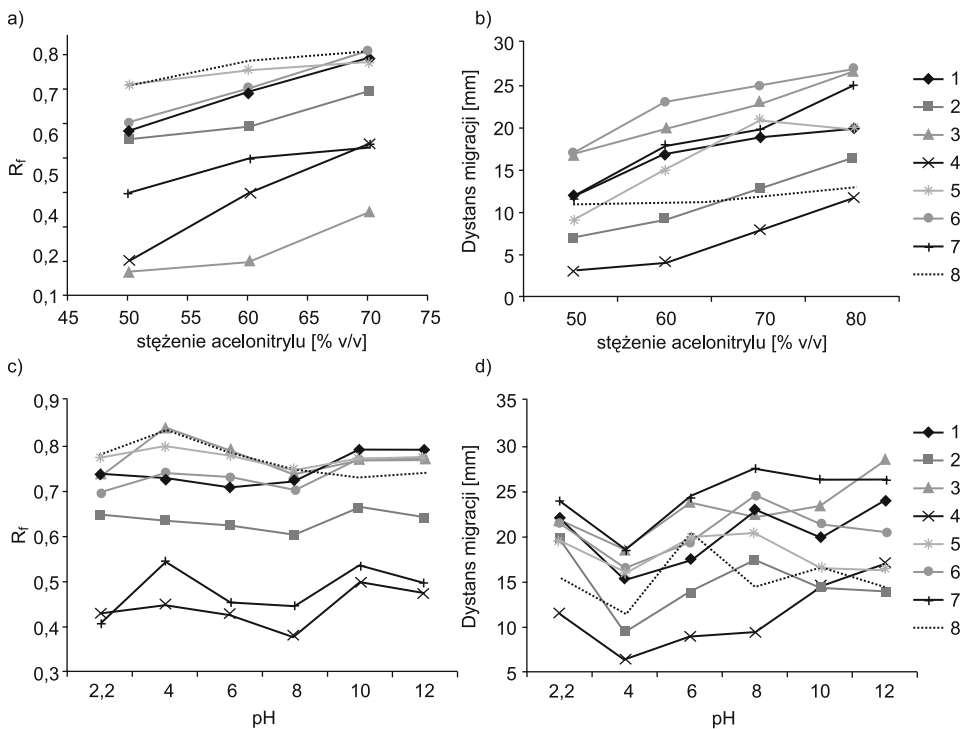
MATERIAŁ I METODY

Proces rozdzielania prowadzono w układzie faz odwróconych z fazą stacjonarną HPTLC RP-18 WF_{254S} firmy Merck. Podczas realizowania badań określono, między innymi, wpływ stężenia modyfikatora organicznego – acetonitrylu oraz pH buforu wodno – organicznej fazy ruchomej na dystans migracji badanych substancji w układach PPEC oraz retencję w układach HPTLC. Roztwory wodno-organiczne fazy ruchomej przygotowywano przez zmieszanie odpowiedniej objętości acetonitrylu, dejonizowanej wody i roztworu buforowego. Roztwory substancji wzorcowych przygotowywano przez rozpuszczenie 2 mg substancji czystej w 1 ml acetonu. Procedura przeprowadzania separacji chromatograficznych metodami HPTLC oraz PPEC została opisana w publikacji (6). Chromatogramy rozwijano w poziomych komorach DS-II 10 x 10 firmy Chromdes na dystansie 40 mm. Strefy badanych substancji obserwowano i dokumentowano za pomocą wideo-skanera TLC firmy Camag. Widma absorpcyjne stref badanych substancji rejestrowano skanerem TLC firmy Camag.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Optymalizację warunków prowadzenia procesu rozdzielania rozpoczęto od zbadania zależności retencji (współczynnika opóźnienia, R_F) poszczególnych stref badanych substancji w układzie HPTLC od stężenia modyfikatora organicznego (acetonitrylu) w wodno-organicznej fazie ruchomej (ryc. 1a). Podczas prowadzonych

badan zaobserwowano stopniową regresję retencji wszystkich badanych substancji wraz ze wzrostem stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej. Malejące zatrzymywanie badanych substancji przez fazę stacjonarną ze wzrostem stężenia acetonitrylu wynika ze wzrostu siły elucyjnej eluentu. Najlepszą selektywność rozdzielania otrzymano przy stężeniu acetonitrylu równym 60% v/v, przy tym stężeniu badane substancje charakteryzowały się największym zakresem zmian retencji. Następnie przy zastosowaniu tego samego składu ilościowego i jakościowego fazy stacjonarnej i ruchomej, jak w układach HPTLC, przeprowadzono proces rozdzielania badanych substancji techniką PPEC (ryc.1b). Podczas prowadzenia tych badań zaobserwowano



Ryc. 1. **a)** Zależność współczynnika R_F badanych substancji w układzie HPTLC od stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej (pH buforu 4,0). **b)** Zależność dystansu migracji badanych substancji w układzie PPEC od stężenia acetonitrylu w fazie ruchomej (pH buforu 4,0). **c)** Zależność współczynnika R_F badanych substancji od pH buforu wodno-organicznej fazy ruchomej zawierającej 60% acetonitrylu. **d)** Zależność dystansu migracji badanych substancji od pH buforu wodno-organicznej fazy ruchomej zawierającej 60% acetonitrylu. Potencjał przyłożony do elektrod 1,00 kV. Czas eksperymentu 5 min. Oznaczenia badanych substancji jak w tabeli I.

Fig. 1. **a)** Relationship between R_F of solutes and acetonitrile concentration in the mobile phase for HPTLC system (buffer pH 4.0). **b)** Relationships between the migration distances of solutes and acetonitrile concentration in the mobile phase for PPEC system (buffer pH 4.0). **c)** Relationship between R_F of solutes and buffer pH of organic-aqueous mobile phase (60 % v/v acetonitrile + 40 % v/v aqueous buffer). **d)** Relationship between migration distance of solutes and buffer pH of the organic-aqueous mobile phase (60 % v/v acetonitrile + 40 % v/v aqueous buffer). Potential 1.00 kV and the experiment time 10 min. The solute legend as in Tab.I.

wzrost dystansu migracji badanych substancji wraz ze zwiększającym się stężeniem acetonitrylu w fazie ruchomej. Zależności dystansów migracji od stężenia acetonitrylu wodno-organicznej fazy ruchomej badano w zakresie stężeń 50-80% v/v acetonitrylu. Stosowany zakres stężeń modyfikatora organicznego w metodzie PPEC był szerszy, niż ten użyty w układach HPTLC (50-70% v/v). Warto podkreślić fakt, że w układach PPEC w przeciwieństwie do układu HPTLC, za wzrost dystansów migracji badanych substancji odpowiada zarówno wzrost siły elucyjnej fazy ruchomej jak i ruchliwość elektroosmotyczna roztworu fazy ruchomej oraz ruchliwość elektroforetyczna. Najlepszą selektywność rozdzielania osiągnięto w układzie PPEC zawierającym 60% v/v acetonitrylu w fazie ruchomej. Porównując układy chromatograficzne zawierające obu metod, zawierające 60% v/v acetonitrylu, zaobserwowano zmiany selektywności rozdzielnia badanych substancji. W kolejnych eksperymentach prowadzono badania nad wpływem pH buforu wodno-organicznej fazy ruchomej na retencję poszczególnych stref substancji w układach HPTLC (ryc. 1c) oraz na ich dystans migracji w układach PPEC (ryc. 1d). W obu układach stosowano wodno-organiczną fazę ruchomą zawierającą 60% v/v acetonitrylu i odpowiedni roztwór buforowy. Zakres stężeń składników buforowych w fazie ruchomej wynosił odpowiednio 0,07–2,45 mM dla kwasu cytrynowego i 0,1–4,86 mM dla wodorofosforanu(V) disodu oraz 1,15–1,56 mM dla glicyny i 0,94–1,35 mM dla wodorotlenku sodu. Optymalizację procesu rozdzielania prowadzono w szerokim zakresie pH 2,2–12,0 ze względu na zróżnicowane wartości pK_A badanych substancji, które mieściły się w zakresie 0,6–9,55 (tabela I). Na podstawie danych, przedstawionych na rycinie 1c, zaobserwowano niewielkie zmiany retencji badanych substancji wraz ze wzrostem pH buforu wodno-organicznej fazy ruchomej układów HPTLC. Wartości współczynników opóźnienia stref badanych substancji mieściły się w zakresie 0,33–0,79. Dla pH równego 4,0 zaobserwowano największe zróżnicowanie współczynnika R_F pasm badanych substancji. Analizując zależności przedstawione na ryc. 1d) zaobserwowano znaczące zmiany dystansu migracji badanych substancji od pH zastosowanego buforu w układach PPEC. Wartości dystansów migracji badanych substancji mieściły się w zakresie 6–28 mm. Największe rozsuniecie pasm badanych substancji zaobserwowano przy pH 8,0. Porównując zależności dystansów migracji badanych substancji w układach PPEC oraz współczynniki R_F układów HPTLC od pH buforu wodno-organicznej fazy ruchomej, zaobserwowano istotne zmiany selektywności badanych substancji. W celu zaobserwowania zmian selektywności badanych substancji, wykonano wykresy korelacji zestawiając dystanse migracji badanych substancji i ich współczynniki R_F , przy określonej wartości pH buforu wodno-organicznej fazy ruchomej. Wzrost wartości otrzymanych współczynników determinacji, R^2 , był następujący: 0,002 (pH 10,0) < 0,006 (pH 12,0) < 0,026 (pH 2,2) < 0,071 (pH 8,0) < 0,183 (pH 6,0) < 0,250 (pH 4,0). Niskie wartości współczynników R^2 wskazują na fakt bardzo słabej korelacji obydwu wielkości. Wyniki te potwierdzają oczekiwania, że selektywność rozdzielania badanych substancji uzyskana w układach obu metod jest odmienna. To dowód, że w metodzie PPEC, migracja pasm badanych substancji, które ulegają dysocjacji, w dużym stopniu zależy zarówno od ich podziału między fazą ruchomą i stacjonarną oraz od ruchliwości elektroforetycznej. Ponadto kolejność dystansów migracji pasm badanych substancji w układach z fazą ruchomą o różnych wartościach pH buforu wodno-organicznej

fazy ruchomej jest odmienna, co jest korzystne ze względu na dodatkową możliwość wykorzystania do optymalizacji warunków ich rozdzielania.

Tab e l a I. Wartości pK_A* badanych substancji.

Table I. The pK_A* values of investigated compounds

Lp.	Badane substancje	pK _A	Lp.	Badane substancje	pK _A	Lp.	Badane substancje	pK _A	Lp.	Badane substancje	pK _A
1	dimenhydramina	8,87	3	paracetamol	9,46	5	teofilina	7,82	7	metamizol	–
2	kofeina	0,6	4	furagina	4,0	6	furagina	4,71	8	sulfogwajakol	9,55

* <http://www.chemicalize.org>

WNIOSKI

1. Na podstawie uzyskanych wyników badań możliwe stało się opracowanie optymalnych warunków prowadzenia procesu rozdzielania substancji biologicznie aktywnych.
2. Różnice selektywności rozdzielania badanych substancji, otrzymane przy zastosowaniu układów obu wykorzystywanych technik rozdzielczych, pozwalają na wybranie metody, umożliwiającej łatwiejszą separację wybranych substancji biologicznie aktywnych obecnych w produktach spożywczych, lekach i suplementach diety.

E. Kopciał, Z. Marzec, A. Marzec, T. Dzido

THE INVESTIGATION OF SEPARATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES WITH PRESSURIZED PLANAR ELECTROCHROMATOGRAPHY AND HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Summary

Separation of some biologically active substances, such as: dimenhydramine, caffeine, paracetamol, diclofenac, theophyllin, furagin, metamizol, guaiacolsulfonate, has been investigated with pressurized planar electrochromatography (PPEC) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) in a reversed-phase system. The mobile phase consisted of acetonitrile and aqueous buffer. The influence of concentration of organic modifier in the mobile phase and the mobile phase buffer pH on migration distance (PPEC) and the retardation factor (HPTLC) has been investigated and compared.

PIŚMIENNICTWO

1. Nurok D., Koers J.M., Novotny A.L., Carmichael M.A., Kosiba J.J., Santini R.E., Hawkins G.L., Replogle R.W.: Apparatus and initial results for pressurized planar electrochromatography. *Anal Chem.*, 2004, 76(6):1690-1695. – 2. Plochacz P., Klimek-Turek A., Dzido T.H.: Pressurized planar electrochromatography, high-performance thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography – Comparison of performance. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217 (29): 4868-4872. – 3. Halka A., Plochacz P. W., Torbicz A., Dzido T. H.: Reversed-phase pressurized planar electrochromatography and planar chromatography of acetylsalicylic acid, caffeine, and acetaminophen. *J. Planar Chromatogr.* 2010, 23(6): 420-425. – 4.

Płocharz P.W., Ślęzak P., Halka-Grysińska A., Chomicki A., Dzido T. H.: Planar electrochromatography in closed system. *Wiad. Chem.* 2010 64(1): 61-80. – 5. *Kopciał E., Polak B., Pietras R., Dzido T. H.*: The Effect of Mobile Phase Composition on Separation of Some Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs of the 2-Arylpropanoic Acid Derivatives in System of Reversed-Phase Pressurized Planar Electrochromatography and High-Performance Thin-Layer. *Curr. Iss. Pharm. Med. Sci.* 2012, 25(3):282-285. – 6. *Kopciał E., Polak B., Pietras R., Mączka P., Dzido T. H.*: Effect of mobile phase buffer pH on separation selectivity of some isoquinoline alkaloids in reversed-phase systems of Pressurized Planar Electrochromatography and High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Curr. Iss. Pharm. Med. Sci.* 2013, 26(1): 45-49. – 7. *Polak B., Halka A., Dzido T. H.*: Pressurized planar electrochromatographic separation of the enantiomers of tryptophan and valine. *J. Planar Chromatogr.*, 2008, 21(1) :33-37.

Adres: 20-093 Lublin, ul. Chodźki 4a