



# I-sze Podlaskie Spotkania Chromatograficzne

*Reymontówka – Kotuń/Chlewiska*

---

POD HONOROWYM PATRONATEM PREZYDENTA MIASTA SIEDLCE  
I REKTORA AKADEMII PODLASKIEJ



20 – 23 września 2009

**Materiały konferencyjne**

## **KOMITET NAUKOWY**

### **Przewodniczący Komitetu Naukowego**

- Bronisław K. Głód – Siedlce

### **Członkowie**

- Tadeusz Dzido – Lublin
- Marian Kamiński – Gdańsk
- Teresa Kowalska – Katowice
- Mieczysław Sajewicz – Katowice
- Andrzej Stołyhwo – Warszawa
- Monika E. Waksmundzka-Hajnos – Lublin
- Zygfryd Witkiewicz – Kielce
- Paweł Zarzycki – Koszalin

## **KOMITET ORGANIZACYJNY**

### **Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego**

- Iwona Kiersztyn

### **Członkowie**

- Bronisław K. Głód
- Anna Lamert
- Paweł Piszcz
- Paweł Wantusiak

# **PROGRAM**

## **NIEDZIELA (20.09.2009)**

**16:00 – 19:00 Rejestracja uczestników**

**19:00 – ... Bankiet powitalny**

## **PONIEDZIAŁEK (21.09.2009)**

**8:00 – 9:00** Śniadanie

**9:00 – 9:15** Otwarcie konferencji

### **SESJA WYKŁADOWA I**

**Prowadząca obrady – prof. dr hab. Monika Waksmundzka-Hajnos**

**9:15 – 10:00**

- 1. ZASADY DOBORU OPTYMALNYCH WARUNKÓW ROZDZIELANIA W KOLUMNOWEJ ELUCYJNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ**

**Marian Kamiński**

**10:00 – 10:30**

- 2. CIŚNIENIOWA ELEKTROCHROMATOGRAFIA PLANARNA - POSTĘPY I WYZWANIA**

**Tadeusz Dzido, Paweł W. Płocharz, Piotr Ślązak, Adam Chomicki, Aneta Hałka-Grysińska, Beata Polak**

**10:30 – 11:00** przerwa na kawę

### **SESJA WYKŁADOWA II**

**Prowadzący obrady – prof. dr hab. Tadeusz Dzido**

**11:00 – 11:30**

- 3. DOZOWNIK LASEROWY DO DOZOWANIA PRÓBEK CIEKŁYCH DO KOLUMN PAKOWANYCH W CHROMATOGRAFII GAZOWEJ**

**Piotr M. Słomkiewicz, Zygfryd Witkiewicz**

**11:30 – 12:15**

- 4. OPTYMALIZACJA UKŁADÓW CHROMATOGRAFICZNYCH DO ROZDZIELANIA I WYZNACZANIA ICH PARAMETRÓW LIPOFILOWOŚCI ZWIĄZKÓW ZASADOWYCH**

**Monika Waksmundzka-Hajnos, Anna Petruczynek**

**12:15 – 13:00**

- 5. BADANIE SKŁADU WTÓRNEGO AEROZOLU ORGANICZNEGO NA PODSTAWIE REAKCJI ALFA-PINENU Z OZONEM**

**Konrad Kowalewski, Tomasz Gierczak**

**13:00 – 14:00 Obiad**

### **SESJA WYKŁADOWA III**

**Prowadzący obrady – prof. dr hab. Paweł K. Zarzycki**

**14:00 – 14:45**

- 6. WPLYW MODYFIKATORA ELEWENTU NA SELEKTYWNOŚĆ ROZDZIELENIA SUBSTANCJI W UKŁADACH ODWRÓCONYCH WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ**

**Anna Klimek-Turek, Tadeusz Dzido**

**14:45 – 15:30**

- 7. ZASTOSOWANIE DITLENKU WĘGLA W STANIE PODKRYTYCZNYM DO EKSTRAKCJI WAŻNYCH PRO-ZDROWOTNYCH SUBSTANCJI Z NIEKTÓRYCH ROŚLIN KRZYŻOWYCH. ANALIZA HPLC/DAD OTRZYMANYCH EKSTRAKTÓW**

**Andrzej Stołyhwo**

**15:30 – 16:00**

- 8. APPLICATION OF THERMOSTATED MICRO-THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY FOR PHARMACEUTICAL ANALYSIS AND PHYSICOCHEMICAL INVESTIGATIONS**

**Magdalena Zarzycka, Paweł Zarzycki, Bronisław K. Głód**

**16:00 – 16:15**

- 9. PREZENTACJA F-MY VARIAN/CANDELA**

**Lech Rombalski**

**16:15 – 16:30 przerwa na kawę**

### **SESJA POSTEROWA**

**Moderator – dr Monika Asztemborska, dr Anna Bielejewska**

**16:30 – 19:00**

**19:00 - ... OGNISKO**

## **WTOREK (22.09.2009)**

**8:00 – 9:00 Śniadanie**

**9:00 – 15:00 WYCIECZKA DO MUZEM, KOŚCIOŁA, PAŁACU OGIŃSKICH,  
ZWIEDZANIE SIEDLEC**

**15:00 – 16:00 Obiad**

### **SESJA WYKŁADOWA IV**

**Prowadzący obrady – prof. dr hab. Marian Kamiński**

**16:00 – 16:45**

**9. PRACTICAL APPROACH TO QUANTIFICATION OF STEROIDS AND RELATED LOW  
MOLECULAR MASS COMPOUNDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES USING  
TEMPERATURE-DEPENDENT INCLUSION CHROMATOGRAPHY**

**Paweł K. Zarzycki**

**16:45 – 17:15**

**10. OZNACZANIE LEKÓW I PESTYCYDÓW W WODACH POWIERZCHNIOWYCH**

**Józef Rzepa**

**17:15 – 17:30 przerwa na kawę**

### **PREZENTACJE/POKAZY FIRM**

**17:30 – 18:00**

**11. PREZENTACJA F-MY MERCK**

**Janusz Polkowski**

**18:00 – 18:30**

**12. PREZENTACJA F-MY SHIMADZU**

**Marek Szklarczyk**

**18:30 – 19:00**

**13. PREZENTACJA F-MY KNAUER**

**Witold Rytel**

**19:00 - ... KOLACJA / DYSKOTEKA**

**ŚRODA (23.09.2009)**

**8:00 – 9:00 Śniadanie**

**9:00 – Zakończenie i podsumowanie obrad**

**SESJA POSTEROWA (Poniedziałek 21.09.2009)**

**16:30 – 19:00**

**P 1**

***WYKORZYSTANIE TECHNIKI HPLC I LC – MS W BADANIACH PROCESÓW FOTODEGRADACJI DOKSAZOSYNY I TERAZOSYNY***

Joanna **KARPIŃSKA**, Aneta **SOKÓŁ**, Marta **HRYNIEWICKA**

**P 2**

***ZASTOSOWANIE EKSTRAKCJI MICELARNEJ DO CHROMATOGRAFICZNEJ ANALIZY FAMOTYDINY***

Barbara **STARCZEWSKA**, Ilona **KISZKIEL**, Monika **KASABUŁA**

**P 3**

***BADANIE LIPOFILOWOŚCI POCHODNYCH KWASU 4-FENYLO-1,2,4-TRIAZOLO-5-SULFANYLOOCTOWEGO METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ***

Anna **HAWRYŁ**, Ewelina **PIKULA**, Monika **WAKSMUNDZKA-HAJNOS**

**P 4**

***ROZDZIELENIE GLIKOZYDÓW FLAWONOIDOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ***

Anna **PETRUCZYNIK**, Danuta **SMOLARZ**, Monika **KRÓL**, Jakub **KRYSZEŃ**, Michał **HAJNOS**, Monika **WAKSMUNDZKA-HAJNOS**

**P 5**

***ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII DO BADANIA MIGRACJI SPECYFICZNEJ STABILIZATORÓW I ŚRODKÓW PRZECIWSTRARZENIOWYCH W KOMPOZYTACH ELASTOMEROWYCH PRZEZNACZONYCH DO KONTAKTU Z ŻYWNOŚCIĄ***

Teresa **KLEPS**, Teresa **PARYS**, Aneta **STĘPKOWSKA**, Marta **TOMASZEWSKA**, Jolanta **POPIELEWSKA**

**P 6**

***OZNACZANIE SKŁADNIKÓW PREPARATU CEFALGIN METODAMI CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ ELEKTROCHROMATOGRAFII PLANARNEJ***

Aneta **HAŁKA-GRYSIŃSKA**, Piotr **ŚLAŻAK**, Grzegorz **ZARĘBA**, Tadeusz H. **DZIDO**



**P 7**

***HPLC KWASÓW FENOLOWYCH ORZECHA WŁOSKIEGO***

Grzegorz **CHRZANOWSKI**, Bogumił **LESZCZYŃSKI**, Paweł **CZERNIEWICZ**, Henryk **MATOK**, Radosław **MATEJEK**

**P 8**

***OZNACZANIE WOLNEJ FRAKCJI INDOMETACYNY W OSOCZU LUDZKIM Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI HPLC/UV-VIS***

Krzysztof **KONDZIOŁA**, Andrzej L. **DAWIDOWICZ**

**P 9**

***FLAWONOIDY LUCERNY SIEWNEJ***

Sylwia **GOŁAWSKA**, Ireneusz **KAPUSTA**, Bogdan **JANDA**, Bogumił **LESZCZYŃSKI**

**P 10**

***APPLICATION HS-SPME/GC-MS FOR ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS OF WALNUT INDUCED BY APHID FEEDING***

Robert **KRZYŻANOWSKI**, Bogumił **LESZCZYŃSKI**

**P 11**

***EKSTRAKCJA PRZEGRZANĄ WODĄ W PROCEDURZE CHROMATOGRAFICZNEGO OZNACZANIA SKŁADU OLEJKU ETERYCZNEGO Z ZIELA TYMIANKU***

Ewelina **RADO**, Andrzej L. **DAWIDOWICZ**

**P 12**

***THE NEW METHOD TO STUDY MOLECULAR INTERACTIONS***

Anna **BIELEJEWSKA**, Andrzej **BYLINA**, Kazimiera **DUSZCZYK**

**P 13**

***CHROMATOGRAFICZNE OZNACZANIE CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO W OPARCIU O REAKCJE RODNIKÓW HYDROKSYLOWYCH Z KWASEM P-HYDROKSYBENZOESOWYM***

Paweł **PISZCZ**, Agnieszka **BETA**, Iwona **KIERSZTYN**, B. Krzysztof **GLÓD**

**P 14**

***ZASTOSOWANIE HPLC DO POMIARÓW CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO MIODÓW I MIODÓW PITNYCH***

Paweł WANTUSIAK, Paweł PISZCZ, Monika SKWAREK, Bronisław K. GŁÓD

**P 15**

***MECHANIZM RETENCJI KWASÓW KARBOKSYLOWYCH NA RÓŻNYCH KOLUMNACH HPLC***

Monika SKWAREK, Paweł WANTUSIAK, Paweł PISZCZ, B. Krzysztof GŁÓD

**P 16**

***ROZDZIAŁ KOMPLEKSÓW NIKLU Z ZASADAMI SCHIFFA ZA POMOCĄ HPLC Z DETEKcją UV I ELEKTROCHEMICZNĄ***

Iwona KIERSZTYN, Anita SIŁAK, Paweł PISZCZ, Krzysztof KURZAK, Bronisław K. GŁÓD

**P 17**

***CHROMATOGRAFICZNE I ELEKTROCHEMICZNE METODY WYZNACZANIA CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO MIODÓW I MIODÓW PITNYCH***

Paweł WANTUSIAK, Marcin BORUC, Monika SKWAREK, Paweł PISZCZ, Iwona KIERSZTYN i Bronisław K. GŁÓD

**P 18**

***pH ZALEŻNE CHROMATOGRAFICZNE POMIARY CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO***

Emila GOŁDYN, Paweł PISZCZ i Bronisław K. GŁÓD

**P 19**

***THE DEGRADATION BY FENTON SYSTEM***

Konrad ŻURAWSKI, Paweł PISZCZ i Bronisław K. GŁÓD

## **SESJA WYKŁADOWA**

# ZASADY DOBORU OPTYMALNYCH WARUNKÓW ROZDZIELANIA W KOLUMNOWEJ ELUCYJNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Marian **KAMIŃSKI**

*Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, 80-233 GDAŃSK, ul. Narutowicza 11/12, e-mail:  
[mknkj@chem.pg.gda.pl](mailto:mknkj@chem.pg.gda.pl), tel.: (601)40-18-24*

Przedmiotem referatu jest podsumowanie rezultatów studiów i badań nad optymalizacją warunków otrzymywania metabolitów o charakterze glikozydów i aglikonów, o masach molekularnych poniżej ok. 1000 Da z zastosowaniem kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczonej w skali preparatywnej, tzn., w warunkach maksymalnego możliwego do zastosowania przeładowania kolumny chromatograficznej. Jako kryterium optymalizacji przyjęto maksymalizację tzw. „jednostkowej produktywności kolumny” ( $P_1$ ), tzn., otrzymywanie jak najwyższej masy ( $m_i$ ) substancji o wymaganej czystości, lub rozdzielania maksymalnej masy mieszaniny składników jednorazowo dozowanej do kolumny w jednostce czasu, w przeliczeniu na jednostkę przekroju poprzecznego wypełnienia kolumny. Obszar zmienności badań dotyczył: chromatografii adsorpcyjnej, w warunkach faz odwróconych (RP) i normalnych (NP), podziałowo – adsorpcyjnej w warunkach oddziaływań hydrofilowych (HILIC) i podziałowej z dynamicznie generowaną fazą stacjonarną bogatą w wodę (NP-w). W każdym z rodzajów chromatografii badania dotyczyły: 1) optymalnej retencji i selektywności rozdzielania otrzymywanej substancji od najbliższych pików substancji „towarzyszących”, odpowiednio przed i po jej pik, 2) optymalnej wielkości ziaren wypełnienia ( $d_p$ ), 3) liniowej prędkości przepływu eluentu ( $u$ ), 4) minimalnej i optymalnej długości kolumny ( $L_c$ ) oraz „krytycznej” sprawności kolumny ( $N_{min}$ ), 5) stężenia ( $C_i$ ) oraz objętości ( $V_i$ ) wsadu wprowadzanego do kolumny, 6) rozdzielczości pików ( $R$ ) w powiązaniu najkorzystniejszym wyborem punktów zbierania frakcji. Rozpatrywano oddzielnie warunki sporadycznego rozdzielania i warunki procesu produkcji z zastosowaniem kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczonej. Opisane reguły dotyczą w ogólności także chromatografii jonowymiennej, natomiast, poza zakresem pracy znajdują się optymalne warunki stosowania chromatografii wykluczania do otrzymywania frakcji polimerów i bio-polimerów.

Badania potwierdziły większość reguł otrzymanych, na podstawie modelowania warunków przeładowania kolumny, dla mieszanin substancji modelowych. Potwierdziły krytyczne znaczenie selektywności oraz rozpuszczalności w eluencie. W referacie przedstawiono najważniejsze reguły optymalizacyjne. Zwrócono też uwagę, że w celu

otrzymywania substancji o wysokiej czystości w zastosowaniu preparatywnych kolumn HPLC, wypełnianych techniką zawiesinową, albo dynamicznej kompresji aksjalnej złoża (DAC), jest konieczne stosowanie warunków nieskończonej średnicy kolumny. Wyjaśniono przyczyny problemu oraz podano ogólne reguły optymalizacyjne.

# CIŚNIENIOWA ELEKTROCHROMATOGRAFIA PLANARNA – POSTĘPY I WYZWANIA

Tadeusz H. **DZIDO**, Paweł W. **PŁOCHARZ**, Piotr **ŚLĄZAK**,  
Adam **CHOMICKI**, Aneta **HAŁKA-GRYSIŃSKA**, Beata **POLAK**

*Zakład Chemii Fizycznej Katedry Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie*

*ul. Staszica 6, 20-081 Lublin, e-mail: tadeusz.dzido@umlub.pl*

W naszym Zakładzie zajmujemy się badaniami nad warunkami separacji mieszanin substancji metodą ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej (pressurized planar electrochromatography, PPEC) i konstrukcyjnymi rozwiązaniami urządzeń do tej metody. Pierwsza publikacja o metodzie PPEC pojawiła się w roku 2004 [1]. Również w tym samym roku nasz zespół opublikował artykuł na ten temat [2]. Na świecie jest kilka ośrodków zajmujących się problemami elektrochromatografii planarnej. Jednakże do tej pory metoda ta nie znalazła zbyt dużego zainteresowania społeczności naukowej, zaangażowanej w badania nad migracyjnymi metodami separacji. Niewątpliwie przyczynami tego stanu są trudności techniczne, które należy pokonać, by urządzenie do ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej umożliwiło sprawne i przyjazne dla użytkownika prowadzenie procesu separacji. Wyraźnym efektem tych trudności jest nadal brak komercyjnego urządzenia na rynku światowym. Autorzy niniejszej pracy są przekonani, że ten problem zostanie pokonany w niedalekiej przyszłości.

Przekonanie to opiera się na udokumentowanych zaletach ciśnieniowej elektrochromatografii planarnej jako metody separacji, która oferuje wiele korzystnych możliwości rozdzielania skomplikowanych mieszanin substancji. Do zalet tych należą: wysoka sprawność układów (na obecnym etapie rozwoju PPEC, jest porównywalna do HPLC), krótki czas separacji (nawet kilkunastokrotnie krótszy od czasu separacji metodą chromatografii cienkowarstwowej, TLC/HPTLC), możliwość rozwijania elektrochromatogramów na płycie chromatograficznej o długości 20 cm z warstwą adsorbentu typu C18. Rozwijanie zwykłych chromatogramów cienkowarstwowych na takim długim dystansie i z wykorzystaniem płytek typu C18 nie jest stosowane w praktyce laboratoryjnej - wymagałoby bardzo długiego czasu rozwijania chromatogramu. Ponadto układy separacyjne PPEC charakteryzują się odmienną selektywnością rozdzielania substancji ulegających dysocjacji w porównaniu do układów chromatografii cieczowej. Dzięki temu nadają się

bardzo dobrze do włączenia w wielowymiarowy proces separacji z tymi ostatnimi układami. Inną korzystną cechą metody PPEC jest prowadzenie procesu separacji w warunkach równowagowych od momentu jego rozpoczęcia. Ta cecha wyróżnia metodę PPEC spośród innych metod chromatograficznych i wydaje się być jednym z ważnych argumentów przemawiających za wykorzystaniem tej metody w praktyce laboratoryjnej.

#### Literatura:

- [1] Nurok, D.; Koers, J. M.; Novotny, A. L.; Carmichael, M. A.; Kosiba, J. J.; Santini, R. E.; Hawkins, G. L.; Replogle, R. W. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1690 – 1695.
- [2] Dzido, T. H.; Mróz, J.; Józwiak, G. W. *J. Planar. Chromatogr.* **2004**, *17*, 404 – 410.

# DOZOWNIK LASEROWY DO DOZOWANIA PRÓBEK CIEKŁYCH DO KOLUMN PAKOWANYCH W CHROMATOGRAFII GAZOWEJ

Piotr M. SŁOMKIEWICZ<sup>1</sup>, Zygfryd WITKIEWICZ<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> *Instytut Chemii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego, Kielce,*

<sup>2</sup> *COBRABiD, Warszawa,*

<sup>3</sup> *Instytut Chemii, Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa*

Opisano dozownik umożliwiającą dozowanie próbek ciekłych do kolumn pakowanych w chromatografii gazowej, w którym do odparowania ciekłej próbki wykorzystuje się energię światła laserowego. Jest przeznaczony do dozowania próbek o wysokich temperaturach wrzenia.

Dozownik o kształcie walca ma w swoim wnętrzu ogrzewaną komorę na próbkę. Do dozownika próbka jest wprowadzana za pomocą mikrostrzykawki i umieszczana w pojemniku próbki. Z tego pojemnika próbka jest odparowywana promieniem laserowym. Możliwa jest przy tym regulacja mocy światła laserowego i czasu nagrzewania próbki w trakcie odparowywania. Dozownik jest zasilany gazem nośnym poprzez system zaworów elektromagnetycznych, co umożliwi wybieranie różne warianty pracy dozownika.

Działanie dozownika laserowego porównano z działaniem dozownika klasycznego w tych samych warunkach. Dozowano olej parafinowy, fenantren i antracen w toluenie oraz metanol. Na podstawie otrzymanych chromatogramów stwierdzono, że zastosowanie dozownika laserowego do kolumn pakowanych w chromatografii gazowej umożliwia zmniejszenie rozmycia pasma początkowego i pików składników dozowanej próbki. Dozownik laserowy pozwala wstępnie odparować rozpuszczalnik i następnie za pomocą wiązki laserowej odparować wysokowrzące składniki próbki. Stosowanie wiązki laserowej o zróżnicowanej energii pozwala nie tylko odparować próbkę, ale także rozkładać anality na części składowe. Takie postępowanie może być przydatne w chromatografii gazowej z detektorem masowym.



# OPTIMALIZACJA UKŁADÓW CHROMATOGRAFICZNYCH DO ROZDZIELENIA I WYZNACZANIA ICH PARAMETRÓW LIPOFILOWOŚCI ZWIĄZKÓW ZASADOWYCH

Monika **WAKSMUNDZKA-HAJNOS** i Anna **PETRUCZYNIK**

*Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, 20-081 Lublin*

W przypadku analizowania związków o charakterze słabych zasad organicznych z zastosowaniem wodnych faz ruchomych, w których związki te ulegają częściowej dysocjacji, pojawia się szereg problemów analitycznych. Na chromatogramach uzyskuje się szerokie, asymetryczne piki, sprawność takich układów jest niska, a selektywność rozdzielania mieszanin tych związków niewystarczająca, co spowodowane jest różnym mechanizmem retencji obu form związków. Forma obojętna oddziałuje z fazą stacjonarną na zasadzie oddziaływań hydrofobowych typowych dla faz odwróconych, natomiast forma jonowa ulega procesowi wymiany jonowej na wolnych grupach silanolowych matrycy żelowej chemicznie związanych faz stacjonarnych.

Niekorzystne oddziaływania kationów zasadowych analitów z grupami silanolowymi mogą być ograniczone przez: zastosowanie faz ruchomych o niskim pH w celu cofnięcia dysocjacji wolnych grup silanolowych; zastosowanie faz ruchomych o wysokim pH kiedy następuje cofnięcie dysocjacji analizowanych zasad; zastosowanie metody par jonowych w celu utworzenia obojętnych asocjatów; użycie faz ruchomych z dodatkiem odczynników blokujących wolne grupy silanolowe lub zmianę rodzaju zastosowanej fazy stacjonarnej. W celu dobrania najbardziej optymalnych warunków do jakościowej i ilościowej analizy związków zasadowych przeanalizowano wpływ pH fazy ruchomej, zastosowano dodatek różnych anionowych odczynników parotwórczych, różnych odczynników blokujących wolne grupy silanolowe na fazach stacjonarnych z chemicznie związanymi rodnikami powodującymi dodatkowe blokowanie oddziaływań z wolnymi silanolami.

Obecność obu form analitów w roztworach wodnych powoduje trudności w wyznaczeniu parametrów lipofilowości. Bardzo słabe korelacje pomiędzy wartościami  $\log P$  i  $\log k_w$  uzyskano wówczas gdy wartości  $\log k_w$  wyznaczono w układach zawierających mieszaninę organicznego modyfikatora z wodą lub buforem o pH kwasowym, również zastosowanie układów z dodatkiem odczynników blokujących wolne grupy silanolowe, dla których uzyskano najbardziej optymalny kształt pików oraz największą sprawność układów, nie prowadziło do poprawy korelacji. Najbardziej optymalne do wyznaczenia parametrów lipofilowości okazały się układy z dodatkiem buforów o pH zasadowym, a zwłaszcza z dodatkiem odczynników parotwórczych.

# BADANIE SKŁADU WTÓRNEGO AEROZOLU ORGANICZNEGO NA PODSTAWIE REAKCJI ALFA-PINENU Z OZONEM

Konrad KOWALEWSKI, Tomasz GIERCZAK

*Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego,*

*ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa, kkowalewski@chem.uw.edu.pl*

Aerozole atmosferyczne stanowią przedmiot badań ze względu na ich bezpośredni wpływ na klimat, porównywalny co do wielkości, ale przeciwny co do znaku, z gazami cieplarnianymi. Wtórne aerozole wywierają także pośredni wpływ na klimat, odgrywając rolę zarodków kondensacji chmur i tym samym wpływając na właściwości chmur oraz cykl hydrologiczny[1].

Wtórny aerzol powstaje w wyniku kondensacji średnio lotnych związków otrzymanych bezpośrednio w atmosferze, w trakcie reakcji chemicznych gazowych prekursorów z ozonem, rodnikiem hydroksylowym bądź rodnikiem azotanowym. Jednymi z najważniejszych prekursorów wtórnego aerzolu są monoterypeny, lotne związki organiczne emitowane przez rośliny. Szacuje się, że ich udział w tworzeniu aerzolu jest dominujący w porównaniu z węglowodarami pochodzenia antropogenicznego[2]. Najpowszechniej występującym monoterenem jest  $\alpha$ -pinen, węglowodór posiadający podwójne wiązanie i mogący szybko reagować z atmosferycznymi utleniaczami.

Do badania składu wtórnego aerzolu organicznego wykorzystano technikę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, która wymagała przeprowadzenia polarnych produktów w lotne pochodne. W tym celu przygotowano trójstopniową metodę analityczną obejmującą kolejno dodatek metoksyaminy, trimetylosililodiazometanu z metanolem oraz N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamidu, w celu otrzymania odpowiednio metoksymów z aldehydów i ketonów, estrów metylowych oraz eterów trimetylosililowych z alkoholi. Wszystkie etapy zoptymalizowano pod względem ilości dodawanego odczynnika i czasu reakcji. Dodatkowo optymalizacji poddano względny stosunek trimetylosililodiazometanu do metanolu. Obliczono wydajności reakcji estryfikacji dla wybranych kwasów mono- i dikarboksylovych.

Badania pokazały, że dominującymi produktami utleniania  $\alpha$ -pinenu ozonem są kwas cis-pinionowy oraz kwas cis-piniowy. Zidentyfikowano także, ze względu na dostępność wzorca, 2-hydroksy-3-pinanon. Ponadto, w próbce aerzolu wykryto także inne potencjalne produkty

utleniania. Jednakże ich identyfikacja jest utrudniona z powodu braku wzorców oraz złożonej fragmentacji związków.

#### Literatura:

1. Meinrat O. Andrea, Paul J. Crutzen, *Science* 1997, 276, 1052-1058.
2. A. Guenther, *Journal of Geophysical Research* 1995, 100, 8873-8892.

# WPLYW MODYFIKATORA ELEWENTU NA SELEKTYWNOŚĆ ROZDZIELENIA SUBSTANCJI W UKŁADACH ODWRÓCONYCH WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Anna **KLIMEK-TUREK**, Tadeusz H. **DZIDO**

*Department of Physical Chemistry, Chair of Chemistry, Medical University of Lublin*

*ul. Staszica 6, 20-081 Lublin, e-mail: [anna.klimek@am.lublin.pl](mailto:anna.klimek@am.lublin.pl)*

Wysokosprawną chromatografię cieczą znalazła szerokie zastosowanie w analizie farmaceutycznej, gdzie zastąpiła wiele metod spektroskopowych a także chromatografię gazową. Zaletą HPLC jest możliwość wpływania na zmiany retencji i selektywności rozdzielania analitów poprzez dobieranie polarności eluentu oraz zastosowanie modyfikacji fazy ruchomej, zależnie od właściwości analizowanych substancji - choćby poprzez dodatek odczynnika jonowo-asocjacyjnego. Szeroki wybór faz stacjonarnych daje dalszą możliwość poprawienia selektywności, a zastosowanie specyficznych, bardzo czułych detektorów, np. sprzężenie HPLC z spektrometrią mas (MS), pozwoliło na oznaczanie substancji na bardzo niskich poziomach stężeń. Mimo tak wysokiej pozycji chromatografii wśród innych metod analitycznych, zgromadzonej wiedzy oraz dużego zaawansowania technologicznego, niektóre aspekty procesu chromatograficznego nadal budzą wątpliwości, szczególnie te dotyczące kwestii przewidywania retencji i poprawy selektywności rozdzielania substancji. Dlatego tak ważne i pożądane jest wypracowanie nowego podejścia, które pozwoliłoby na prostszą i szybszą interpretację otrzymywanych wyników oraz dobór odpowiedniej fazy ruchomej. Takie podejście zostało zaproponowane wcześniej do wyjaśniania zmian selektywności rozdzielania węglowodorów aromatycznych z polarnymi grupami [1,2] oraz fenolokwasów [3]. Zakłada ono, że interpretacja zmian selektywności rozdzielania, gdy jeden modyfikator w układzie jest zamieniany na inny, może być przeprowadzona poprzez uwzględnianie jedynie oddziaływań międzycząsteczkowych substancji w fazie stacjonarnej, szczególnie z obecnym w niej modyfikatorem. W naszej prezentacji są udokumentowane następujące przykłady, które potwierdzają, że proponowane podejście może być z powodzeniem zastosowane do wyjaśniania zmian selektywności rozdzielania innych grup substancji - m. in. węglowodorów alifatycznych, związków fosforoorganicznych a także związków biologicznie aktywnych takich jak  $\beta$ -blokery czy antybiotyki. Podejście to może być także zaadaptowane do układów jonowo-asocjacyjnych wysokosprawną chromatografię cieczą, przyczyniając

się do lepszego zrozumienia mechanizmu zmian retencji i selektywności a w konsekwencji do łatwiejszego doboru optymalnych warunków prowadzenia procesu separacji.

References:

- [1] T. H. Dzido, H. Engelhardt, *Chromatographia* 1994, 39,51-61.
- [2] T. H. Dzido, T.E.Kossowski, D. Matosiuk, *J. Chromatogr. A*, 2002, 947, 167-183.
- [3] A. Klimek-Turek, T. H. Dzido, H. Engelhardt *LC-GC Europe* 2008, 21, 33-42.

# APPLICATION OF THERMOSTATED MICRO-THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY FOR PHARMACEUTICAL ANALYSIS AND PHYSICOCHEMICAL INVESTIGATIONS

Magdalena B. **ZARZYCKA\***, Paweł K. **ZARZYCKI\***,

Bronisław K. **GLÓD\*\***

*\* Zakład Toksykologii i Bioanalizy, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,  
Politechnika Koszalińska, ul. Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin*

*\*\* Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Chemii, Akademia Podlaska,  
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce*

Thin-layer chromatography (TLC) is still commonly used as a simple and efficient tool for separation and quantification of several analytes, which are present in complex pharmaceutical, biological, and environmental samples [1-3]. The main advantage of TLC is separation protocol simplicity. Principally, chromatographic process driven by capillary forces can be performed in small glass, metal or PTFE containers, without any additional and expensive equipment [4]. Liquid samples can be accurately transferred into the plate in form of small spots or thin bands via homemade sprayers [5]. Moreover, separated spots can be easily visualized by use of wide range of detection reagents and inspected under visible or UV light conditions and then digitalized using simple office scanners [6]. In analytical practice, a modern high-performance-thin-layer chromatography (HPTLC) is particularly suitable for efficient separation and sensitive visualization of active compounds from complex mixtures, including pharmaceutical formulations [7].

This contribution summarizes the author's research, which was recently focused on qualitative and quantitative determination of low molecular mass compounds using thermostated micro-thin-layer chromatography [4-10]. Particularly, the result of studies on separation of methyltestosterone, testosterone and its derivatives under NP and RP chromatographic systems conditions and wide range of temperature shows high capacity of micro-TLC method for efficient isocratic separation of analytes characterized by wide range of polarities. It has been proved that micro-TLC can be successfully applied for fast, accurate and robust quantification of testosterone residues in testosterone enanthate samples. Our experimental data have revealed that micro-TLC plate working under 2D development protocol is capable of separation of more than 240 spots. High separation throughput of one

and two dimensional chromatographic processes involving micro-plates was demonstrated by separation of complex samples including the Azucalen herbs extract as well as water and organic liquids extracts of the *Spirulina maxima* dyes derived from pharmaceutical formulations. The raw quantitative data obtained from microchromatograms acquired under visible light conditions were explored using cluster analysis and principal components analysis. Chemometric investigations revealed that the best extraction liquids for isolation of dye mixtures from *Spirulina* samples were methanol, ethanol, tetrahydrofuran, and dichloromethane. Moreover, it was found that the liquids' parachor values could be used for estimation of the dye extraction efficiency from complex samples. It has been also demonstrated that micro-TLC method may be useful for fast fingerprinting of complex biological mixtures as well as convenient tool for optimization of binary mobile phase composition for solid-phase extraction (SPE) procedures. Our research has revealed that based on micro-TLC retention data, the steroids SPE elution volumes may be predicted beyond the experimental data range that was available for solid-phase extraction experiment, particularly for mobile phases contained high level of water.

#### References:

1. P.E. Wall: *Thin-Layer Chromatography. A Modern Practical Approach*, Springer-Verlag, RSC, Cambridge, 2006.
2. J. Sherma, B. Fried: *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, 3rd edn. Marcel Dekker, New York, 2003.
3. T. Kowalska, J. Sherma: *Preparative layer chromatography*. Chromatographic Science Series, vol.95., CRC Press, Boca Raton, 2006.
4. P.K. Zarzycki: *Simple horizontal chamber for thermostated micro-thin-layer chromatography*; J. Chromatogr. A. 1187 (2008) 250–259.
5. P.K. Zarzycki, M.B. Zarzycka; *Low Cost, Efficient TLC Sprayer*, J. Planar Chromatogr. 21/3 (2008) 221-223.
6. T. Modzelewski, E. Włodarczyk, F.B. Harasimiuk, M.B. Zarzycka, M. Baran, P.K. Zarzycki; *Simple device for TLC spots visualisation at elevated temperatures*; *Pomiary Automatyka Kontrola*, 54(4) (2008) 184-186.
7. P.K. Zarzycki, M.B. Zarzycka, B.K. Głód, *Estimation of micro-TLC plates peaks capacity for one and two dimensional multiple samples separation*, *Pomiary Automatyka Kontrola* (2009) in press.
8. P.K. Zarzycki, M.B. Zarzycka; *Evaluation of the Water and Organic Liquids Extraction Efficiency of the Spirulina maxima Dyes Using Thermostated Micro-Thin-Layer Chromatography*, J. AOAC Int. Vol.91(5) (2008), 1196-1202.
9. P.K. Zarzycki, M.B. Zarzycka; *Application of temperature-controlled micro planar chromatography for separation and quantification of testosterone and its derivatives*; *Anal. Bioanal. Chem.*; 391(6) (2008) 2219-2225.
10. P.K. Zarzycki, E. Włodarczyk, M.B. Zarzycka, B.K. Głód, *Optimization of Solid-Phase Extraction Protocol for Fractionation of Selected Steroids Using Retention Data from Micro Thin-layer Chromatography*, *Anal. Sci.* (2009).

# **PRACTICAL APPROACH TO QUANTIFICATION OF STEROIDS AND RELATED LOW MOLECULAR MASS COMPOUNDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES USING TEMPERATURE-DEPENDENT INCLUSION CHROMATOGRAPHY**

**Paweł K. ZARZYCKI**

*Zakład Toksykologii i Bioanalizy, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,  
Politechnika Koszalińska, ul. Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin*

Quantification of Endocrine Disrupting Compounds (EDCs), particularly steroid hormones, in biological and environmental samples presents unique challenges for sample pre-purification, extraction, concentration and separation. From chromatographic point of view, steroids and related low-molecular mass substances form a non homogeneous group of solutes and therefore, many problems with extraction efficiency and good separation of multicomponent mixtures using common separation techniques were observed [1]. Despite of number of high throughput techniques like MS-MS detectors available, simultaneous measurement of the multiple forms of steroids like compounds, especially optical enantiomers in complex materials is still an unsolved analytical problem and real challenge for chromatographers.

This research communication summarize an application of temperature-dependent inclusion chromatography for quantification of wide range of steroids (estrogens, progestogens, testosterone) as well as known and unidentified yet low-molecular mass compounds, which may act as the endocrine disrupting compounds (EDCs) in natural environment [1-8]. Number of examples for quantification of above mentioned chemicals in real samples including urine, blood, surface waters, treated and untreated sewage waters as well as activated sludge material will be given. Particularly, problem of efficient and fast samples pre-concentration, components of interest purification and stability, internal standard selection as well as optimization of HPLC separation of complex biological samples characterized by high contents of interfering peaks will be discussed from practical point of view. Based on the own quantitative chromatographic data, clinical and environmental object classification involving multivariate statistics procedures like Cluster Analysis or Principal Components Analysis will be also presented and discussed.

## References :

1. H. Lamparczyk, *Analysis and Characterization of Steroids*, CRC Press, Boca Raton, 1992.



2. H. Lamparczyk, P.K. Zarzycki, J. Nowakowska, R.J. Ochocka, *Application of  $\alpha$ -cyclodextrin for the analysis of estrogenic steroids in human urine by high-performance liquid chromatography*, *Chromatographia*, 38 (1994) 168-172.
3. P. K. Zarzycki, R. Smith, *Separation of steroids using temperature-dependent inclusion chromatography*, *J. Chromatogr. A.*, 912 (2001) 45-52.
4. P.K. Zarzycki, K.M. Kulhanek, R. Smith, V.L. Clifton; *Determination of steroids in human plasma using temperature-dependent inclusion chromatography for metabolomic investigations*, *J. Chromatogr. A*, 1104 (2006) 203-208.
5. V.L. Clifton, A. Bisits, P.K. Zarzycki, *Characterization of human fetal cord blood steroid profiles in relation to fetal sex and mode of delivery using temperature-dependent inclusion chromatography and principal component analysis (PCA)*; *J. Chromatogr. B* 855(2) (2007) 249-254.
6. P.K. Zarzycki, H. Ohta, Y. Saito, K. Jinno; *Interaction of native  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin and  $\gamma$ -cyclodextrin and their hydroxypropyl derivatives with selected organic low molecular mass compounds at elevated and subambient temperature under RP-HPLC conditions*; *Anal. Bioanal. Chem.*; 391(8) (2008) 2793-2801.
7. P.K. Zarzycki, E. Włodarczyk, M.J. Baran, *Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography. Part I: Optimization of separation protocol*, *JCA* (2009) in press.
8. P.K. Zarzycki, E. Włodarczyk, M.J. Baran, *Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography. Part II: Fast screening of free steroids and related low molecular mass compounds fraction in the environmental samples derived from surface waters, treated and untreated sewage waters as well as activated sludge material*, *JCA* (2009) in press.

## **SESJA POSTEROWA**

# WYKORZYSTANIE TECHNIKI HPLC I LC – MS W BADANIACH PROCESÓW FOTODEGRADACJI DOKSAZOSYNY I TERAZOSYNY

Joanna **KARPIŃSKA**, Aneta **SOKÓŁ**, Marta **HRYNIEWICKA**

*Uniwersytet w Białymstoku, Instytut Chemii, ul. Hurtowa 1, 15 – 399 Białystok*

*e-mail: [anetka\\_w@uwb.edu.pl](mailto:anetka_w@uwb.edu.pl)*

Postęp cywilizacji sprawia, iż w wielu krajach obserwowany jest wzrost zużycia środków farmaceutycznych, które w wyniku niecałkowitego zatrzymania w oczyszczalniach ścieków mogą przedostawać się do środowiska naturalnego. Szczególnie istotna jest kontrola zawartości farmaceutyków i ich metabolitów w wodach powierzchniowych. W środowisku wodnym organiczne związki mogą ulegać różnorodnym przemianom pod wpływem światła słonecznego, mocy promieniowania, innych związków chemicznych oraz mikroorganizmów obecnych w środowisku wodnym. Końcowymi produktami rozkładu pod wpływem procesów biotycznych i abiotycznych są m.in. CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O, jednak powstające produkty pośrednie odznaczają się innymi właściwościami fizykochemicznymi niż wyjściowy związek - często wykazują większą toksyczność, inną trwałość i aktywność biologiczną. Dodatkowo, długie przebywanie tych związków w ekosystemach wodnych stwarza wysokie prawdopodobieństwo ich bioakumulacji. Fakty te potwierdzają słuszność wykonywanych badań eksperymentalnych dotyczących identyfikacji produktów fotodegradacji związków aktywnych biologicznie.

W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki badań procesu fotorozkładu doksazosyny (DOX) i terazosyny (TR). Leki te należą do  $\alpha$ -adrenolityków o działaniu hipotensyjnym, stosowane są także w leczeniu łagodnego przerostu gruczołu krokowego, niewydolności serca oraz chorób naczyń obwodowych. DOX i TR charakteryzują się dużą trwałością i długim czasem połowicznego rozpadu. Roztwory wodne leków poddano promieniowaniu UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz zastosowano klasyczną i fotokatalityczną reakcję Fentona. Następnie wykorzystano technikę HPLC oraz LC/ESI/MS do identyfikacji powstałych produktów fotorozkładu. Do rozdzielania chromatograficznego zastosowano kolumnę ODS2. Faza ruchoma składała się z mieszaniny acetonitrylu, metanolu, wody, kwasu octowego i amoniaku (v/v; 35:40:25:1:0,017), a szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Celem pracy była interpretacja uzyskanych chromatogramów i widm masowych badanych próbek.

## ZASTOSOWANIE EKSTRAKCJI MICELARNEJ DO CHROMATOGRAFICZNEJ ANALIZY FAMOTYDYNY

Barbara **STARCZEWSKA**, Ilona **KISZKIEL**, Monika **KASABUŁA**

*Uniwersytet w Białymstoku, Instytut Chemii, ul. Hurtowa 1, 15 – 399 Białystok*

*e-mail: [i.kiszkiel@uwb.edu.pl](mailto:i.kiszkiel@uwb.edu.pl)*

Obecność w środowisku rozmaitych grup farmaceutyków, szkodliwie wpływa na zdrowie ludzi i zwierząt. Wzrastająca liczba pozostałości leków w otaczającej nas przyrodzie wiąże się ze wzmożoną ich produkcją i z oddziaływaniem przemysłu farmaceutycznego na środowisko. Należą do nich leki (tzw. antagoniści receptorów histaminowych H<sub>2</sub>), których główna rola polega na zmniejszeniu nadmiernego wydzielania kwasu solnego w żołądku. Używane są w leczeniu schorzeń układu pokarmowego. Najsilniejsze działanie farmaceutyków tej grupy wykazuje dobrze rozpuszczalna w wodzie famotydyna, o zasadowym charakterze chemicznym.

Wzrasta zapotrzebowanie na rozwijanie metod wydzielania, umożliwiających czułe i selektywne oznaczenie omawianych zanieczyszczeń środowiska (występujących w nim na poziomie stężeń ng/l lub µg/l). Wymóg ten zostaje spełniony podczas zastosowania jako metody przygotowania próbek, ekstrakcji micelarnej. Proces rozdziału przebiega z udziałem związków powierzchniowo czynnych (surfaktantów), których monomery, wraz ze wzrostem stężenia, łączą się między sobą. Powyżej granicy, zwanej krytycznym stężeniem micelizacji (CMC), tworzą skupiska o koloidalnych rozmiarach (agregaty micelarne). Anality obecne w badanej próbce, są zdolne do podziału oraz przejścia w kierunku niepolarnego rdzenia miceli. Badania miały na celu wydzielenie i oznaczenie zawartości famotydyny w próbce wody rzecznej. Ekstrakcję micelną wykonywano z zastosowaniem anionowego związku powierzchniowo czynnego: dodecylosiarczanu (VI) sodu oraz jego mieszaniny z niejonowym surfaktantem: Tritonem X-114. Proces przeprowadzano (na modelowej próbce wody) z dodatkiem elektrolitu (chlorku sodu) gdyż wzrastająca siła jonowa roztworu powoduje zwiększenie się liczby agregacji i sprzyja rozdziałowi dwóch faz. Zoptymalizowano odpowiednie parametry ekstrakcji micelarnej, mianowicie: stężenie wybranego związku powierzchniowo czynnego oraz elektrolitu, pH próbki, czas wytrząsania oraz wirowania. Warstwę micelną rozpuszczano w metanolu i badano spektrofotometrycznie przy  $\lambda=285\text{nm}$ .

Wyznaczono współczynnik zaęźania famotydyny podczas wydzielania analitu z zastosowaniem ekstrakcji micelarnej. Zbadano interferujący wpływ niektórych substancji, najczęściej występujących w wodach powierzchniowych.

Po przeprowadzeniu zoptymalizowanej procedury ekstrakcji micelarnej, badane próbki rzeczywiste poddano chromatograficznemu oznaczeniu na obecność omawianego przedstawiciela antagonistów receptora H<sub>2</sub>. Sporządzono wykres kalibracyjny w oparciu o matrycę modelowej próbki wody. Wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) ze spektrofotometryczną detekcją w ultrafiolecie.

# BADANIE LIPOFILOWOŚCI POCHODNYCH KWASU 4-FENYLO-1,2,4-TRIAZOLO-5-SULFANYLOOCTOWEGO METODĄ CHROMATOLOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Anna HAWRYŁ\*, Ewelina PIKULA, Monika WAKSMUNDZKA-HAJNOS

*Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, 20-081 Lublin*

Wstępne badania nowych związków, potencjalnych leków przeprowadza się w kierunku wyznaczenia lipofilowości tych substancji, ponieważ właściwość ta ma istotny wpływ na ich aktywność farmakologiczną. Tradycyjna metoda wyznaczania tego parametru (*shake-flask method*) jest bardzo pracochłonna i mało precyzyjna. Dlatego stosuje się obecnie nowe pośrednie metody, wśród których bardzo ważne są metody chromatograficzne.

Wyznaczono lipofilowość pochodnych kwasu 4-fenylo-1,2,4-triazolo-5-sulfanylooctowego metodą chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz przy użyciu adsorbentu typu RP-18 oraz jako fazy ruchomej mieszaniny wody i polarnego modyfikatora (metanol, dioksan, tetrahydrofuran, aceton, acetonitryl) poprzez ekstrapolację zależności retencja – skład eluentu:

$$R_M = R_M^0 - S \cdot \varphi \quad (1)$$

gdzie  $R_M$  - współczynnik retencji analitu,  $\varphi$  - ułamek molowy modyfikatora

Opierając się na powyższej zależności współczynnika retencji od stężenia polarnego modyfikatora w odwróconym układzie faz (zmodyfikowane równanie Soczewińskiego-Wachtmeistera) wyznaczono chromatograficzne parametry lipofilowości takie jak  $R_M^0$  (przecięcie, retencja badanego analitu w czystej wodzie, najczęściej stosowany parametr lipofilowości w analizie QSAR),  $S$  (nachylenie, parametr hydrofobowości, szczególnie w przypadku analizy związków o podobnej budowie) oraz  $\varphi_0$  (stężenie modyfikatora organicznego przy współczynniku retencji równym zero, stosunek współczynnika  $R_M^0$  i parametru  $S$ ). Następnie wykreowano wykresy zależności współczynnika retencji od składu fazy ruchomej oraz korelacje poszczególnych parametrów lipofilowości z wartościami  $\log P$  obliczonymi w programie Hyper-Chem dla wszystkich analizowanych związków. Wyniki przeprowadzonych badań opracowano statystycznie, wyznaczając współczynniki regresji, błąd standardowy estymacji, poziom istotności oraz statystykę F.

## ROZDZIELENIE GLIKOZYDÓW FLAWONOIDOWYCH METODĄ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

Anna **PETRUCZYNIK**<sup>\*</sup>, Danuta **SMOLARZ**<sup>\*\*</sup>, Monika **KRÓL**<sup>\*\*\*</sup>, Jakub  
**KRYSZEŃ**<sup>\*\*\*</sup>, Michał **HAJNOS**<sup>\*\*\*\*</sup> i Monika **WAKSMUNDZKA-HAJNOS**<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>*Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, 20-081 Lublin*

<sup>\*\*</sup>*Zakład Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytet Medyczny w Lublinie 20-093 Lublin*

<sup>\*\*\*</sup>*Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu  
Medycznego*

<sup>\*\*\*\*</sup>*Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny w Lublinie 20-093 Lublin*

Flawonoidy są grupą substancji, których działanie biologiczne związane jest przede wszystkim z naczyniami krwionośnymi i układem krążenia. Jednak niektóre z nich wywierają również szerszy wpływ na cały organizm. W ostatnim czasie zwrócono również uwagę na właściwości przeciwutleniające flawonoidów i zaczęto je wykorzystywać jako naturalne antyoksydanty i jako tak zwane wymiatacze wolnych rodników – cząsteczek odpowiedzialnych między innymi za powstawanie nowotworów, czy procesy starzenia komórkowego. Flawonoidy mogą również przyspieszać rozkład innych egzogennych (pochodzących z poza organizmu) substancji o działaniu rakotwórczym.

Chromatografia cienkowarstwowa jest często stosowaną metodą do analizy związków flawonoidowych. Najczęściej glikozydy flawonoidowe były analizowane metodami chromatograficznymi po przeprowadzeniu ich hydrolizy w środowisku kwasowym prowadzącej do otrzymania cukru i aglikonu. Jako fazy stacjonarne do analizy tych związków był stosowany głównie żel krzemionkowy, celuloza, rzadziej chemicznie związane fazy stacjonarne typu RP, natomiast jako eluenty wodne mieszaniny octanu etylu, wody i kwasu mrówkowego lub octowego, a jako eluenty niewodne mieszaniny toluenu, dioksanu, octanu etylu, chloroformu, metanolu zawierające kwas mrówkowy lub octowy.

Do rozdzielania 6 glikozydów flawonoidowych bez przeprowadzania procesu ich hydrolizy zastosowano metodę dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej z wykorzystaniem gradientu fazy stacjonarnej i metody rozwijania wielokrotnego. Dobre rozdzielanie analizowanych związków uzyskano stosując w pierwszym etapie rozwijanie wielokrotne na fazie cyjanopropyłowej przy zastosowaniu eluentów wodnych, a następnie przenoszono plamki na płytkę z fazą aminopropyłową, która była rozwijana eluentem niewodnym. Zastosowanie gradientu fazy stacjonarnej i rozwijania w dwóch różnych układach

faz (eluenty wodne i niewodne) pozwoliło na wykorzystanie różnych mechanizmów retencji i uzyskanie dobrej selektywności rozdzielania związków o zbliżonej strukturze chemicznej. Najbardziej optymalne układy chromatograficzne zostały wykorzystane do rozdzielania glikozydów flawonoidowych w ekstraktach roślinnych.



# ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII DO BADANIA MIGRACJI SPECYFICZNEJ STABILIZATORÓW I ŚRODKÓW PRZECIWSTRZENIOWYCH W KOMPOZYTACH ELASTOMEROWYCH PRZEZNACZONYCH DO KONTAKTU Z ŻYWNOŚCIĄ

Teresa **KLEPS**, Teresa **PARYS**, Aneta **STĘPKOWSKA**,  
Marta **TOMASZEWSKA**, Jolanta **POPIELEWSKA**

*Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników w Toruniu, Oddział Zamiejscowy  
Elastomerów i Technologii Gumy w Piastowie, ul. Harcerska 30, 05 – 820 Piastów,  
[www.ipgum.pl](http://www.ipgum.pl)*

W przemyśle gumowym w kompozytach i nanokompozytach elastomerowych – w charakterze przyspieszaczy wulkanizacji, stabilizatorów czy środków przeciwstarzeniowych – stosuje się kilkadziesiąt substancji, w tym także związki o udowodnionym działaniu rakotwórczym oraz podejrzewane o takie działanie [1, 2]. Na działanie szkodliwych dla zdrowia związków narażeni są zarówno pracownicy przemysłu gumowego, pracujący bezpośrednio z tymi surowcami, jak i użytkownicy wyrobów gumowych, gdyż substancje te mogą przechodzić z gumy do kontaktującej się z nią żywności lub bezpośrednio do organizmu. Miarą tego zagrożenia jest poziom migracji substancji szkodliwych.

Wyroby gumowe (kompozyty elastomerowe) przeznaczone do kontaktu z żywnością, w myśl Rozporządzenia (WE) nr 1935/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady [3], powinny być produkowane zgodnie z dobrą praktyką produkcyjną, tak by nie dochodziło do migracji ich składników do żywności w ilościach, które mogłyby stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka lub powodować niemożliwe do przyjęcia zmiany w składzie żywności, albo pogorszenie jej cech organoleptycznych.

Aby ograniczyć szkodliwość wyrobów gumowych przeznaczonych do kontaktu z żywnością lub ciałem człowieka, prawodawstwo większości krajów normuje ich produkcję i wprowadza

---

<sup>1</sup> Wilczyńska U., Szeszenia-Dąbrowska N., Sobala W., „Zagrożenia chorobami nowotworowymi pracowników zakładów przemysłu gumowego w Polsce”, *Elastomery*, 1(7), 17-25 (2003)

<sup>2</sup> Paraszewicz W. „Analiza zagrożeń chemicznych w procesach przetwórczych przemysłu gumowego”, *Elastomery* 5(1), 17-28 (2001)

<sup>3</sup> Rozporządzenie (WE) nr 1935/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 października 2004 r. w sprawie materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością oraz uchylające dyrektywy 80/590/EWG i 89/109/EWG

obowiązek badania np. w Polsce Propozycję krajowej listy substancji dozwolonych do produkcji gumy [4] opracowano już w 2002 r. Zabrania się stosowania surowców stanowiących bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia oraz wymaga odpowiednich badań przed wprowadzeniem wyrobów do obrotu.

Celem pracy było opracowanie metody badania migracji specyficznej związków szkodliwych dla zdrowia, pochodnych aminowych i fenolowych, z artykułów gumowych przeznaczonych do kontaktu ze środkami spożywczymi i ciałem ludzkim. Zastosowano metody chromatografii: cienkowarstwowej i gazowej na kolumnie kapilarnej, z zastosowaniem detektora FID.

Analiza wyników uzyskanych przy zastosowaniu w/w metod wykazała ich przydatność do badania migracji specyficznej substancji szkodliwych na poziomie 0,01 mg/kg, co pozwoli na zastosowanie ich do badań rutynowych wyrobów gumowych przeznaczonych do kontaktu z żywnością, a także umożliwi optymalizację składu surowcowego kompozytów i nanokompozytów elastomerowych.

---

<sup>4</sup> Materiały i wyroby do kontaktu z żywnością. Propozycja krajowej listy substancji dozwolonych do produkcji gumy, PZH (2002)

# OZNACZANIE SKŁADNIKÓW PREPARATU *CEFALGIN* METODAMI CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ ELEKTROCHROMATOGRAFII PLANARNEJ

Aneta **HAŁKA-GRYSIŃSKA**, Piotr **ŚLĄZAK**, Grzegorz **ZARĘBA**  
i Tadeusz H. **DZIDO**

*Zakład Chemii Fizycznej, Katedra Chemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie*

Elektrochromatografia planarna w układzie zamkniętym (PPEC) jest stosunkowo nową techniką chromatograficzną. Po raz pierwszy została opisana przez Nuroka i współpracowników 5 lat temu [1].

Najważniejszą cechą odróżniającą PPEC od chromatografii cienkowarstwowej (TLC) jest przepływ fazy ruchomej, który jest wywoływany przez efekt elektroosmotyczny w pierwszej metodzie, i działanie sił kapilarnych w drugiej. Dzięki temu, w metodzie PPEC, przepływ fazy ruchomej ma wartość stałą, niezależną od czasu prowadzenia eksperymentu i dystansu migracji rozdzielanych substancji. Ponadto sprawność układów PPEC jest znacznie większa niż w układach zwykłej chromatografii cienkowarstwowej. Dodatkowym atutem PPEC jest krótki czas analizy, w porównaniu do zwykłej chromatografii TLC. Powyższe cechy elektrochromatografii planarnej sprawiają, że metoda ta jest bardzo atrakcyjna do zastosowania w analizie chemicznej, w tym także w analizie farmaceutycznej.

Mając na uwadze zalety PPEC, przeprowadzono pierwsze próby wykorzystania tej metody do oznaczeń ilościowych. W celu zweryfikowania wyników, analogiczne oznaczenia wykonano konwencjonalną metodą TLC. Do analizy wybrano preparat o działaniu przeciwbólowym i przeciwgorączkowym, „Cefalgin”, zawierający trzy substancje aktywne farmakologicznie: propyphenazon (150mg), paracetamol (250mg) oraz kofeinę (50 mg). Analizowane próbki oraz wzorce dozowano na wcześniej przygotowane płytki chromatograficzne HPTLC RP18W (Merck) za pomocą aplikatora aerozolowego Linomat 5 (Camag). Fazę ruchomą stanowił 20%(v/v) r-r acetonitrylu w buforze cytynianowo-fosforowym o pH=5. Po każdym eksperymencie płytki suszono w temperaturze pokojowej, a następnie skanowano za pomocą skanera DAD J&M (Aalen, Niemcy). Uzyskane wyniki świadczą o tym, iż obie metody mogą być stosowane do oznaczeń ilościowych – oferują podobną dokładność i precyzję oznaczeń. Z uwagi na krótki dystans rozwijania chromatogramów cienkowarstwowych i elektrochromatografów planarnych nie zanotowano

dużych różnic sprawności obu układów. Jednakże czas prowadzenia separacji badanych leków metodą PPEC może być kilkunastokrotnie krótszy od czasu procesu TLC. Należy podkreślić, że metoda PPEC jest obecnie na etapie rozwoju i aby jej zalety mogły być w pełni wykorzystane, wymaga dalszych badań, związanych z rozwiązaniem niektórych problemów metodycznych oraz konstrukcyjnych.

[1] Nurok D, Koers JM, Novotny AL, Carmichael MA, Kosiba JJ, Santini RE, Hawkins GL, Replogle RW (2004) *Anal Chem.* 76: 1690 – 1695.

# HPLC KWASÓW FENOLOWYCH ORZECHA WŁOSKIEGO

Grzegorz **CHRZANOWSKI**, Bogumił **LESZCZYŃSKI**, Paweł  
**CZERNIEWICZ**, Henryk **MATOK** i Radosław **MATEJEK**

*Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Akademia Podlaska  
ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce, e-mail: grzegorz@ap.siedlce.pl*

Kwasy fenolowe uczestniczą w odpowiedziach roślin na stresy wywoływane przez czynniki środowiskowe, posiadają ponadto właściwości antyoksydacyjne oraz farmakologiczne. W ich strukturze chemicznej występuje pierścień aromatyczny podstawiony jedną lub kilkoma grupami hydroksylowymi lub także metoksyłowymi. Funkcyjna grupa karboksylowa przyłączona jest bezpośrednio do pierścienia (kwasy fenolowe), bądź stanowi element nienasyconego łańcucha alifatycznego, tworząc kwasy fenylopropenowe. Orzech włoski (*Juglans regia* L.) wykazuje właściwości allelopatyczne, jednak ich chemiczna natura nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Celem prezentowanej pracy było określenie składu jakościowego i ilościowego kwasów fenolowych w tkankach kwiatostanów męskich, liści i zielonych okrywach owoców orzecha włoskiego.

Kwasy fenolowe ekstrahowano z liofilizatu materiału roślinnego, używając 80% metanolu. W otrzymanym supernatancie, po odwirowaniu i oczyszczeniu eterem naftowym, oznaczono wolne kwasy fenolowe (po alkalizacji, przy pomocy  $\text{NaHCO}_3$  i ponownym zakwaszeniu) oraz otrzymane w wyniku kwaśnej hydrolizy (pH 2, hydroliza 24h, temp. 80°C). Ponadto w osadzie (po ekstrakcji metanolem) poddanej kwaśnej hydrolizie, określono zawartość związanych kwasów fenolowych. Do rozdzielania HPLC wykorzystano izokratyczny system Varian, wyposażony w pompę ProStar 210 i detektor z matrycą fotodiodową ProStar 335. Rozdział wykonano na kolumnie Microsorb MV C18, stosując 25% roztwór metanolu z 1% dodatkiem kwasu octowego, jako fazę ruchomą.

Przeprowadzone badania wykazały obecność 12 kwasów fenolowych w tkankach orzecha włoskiego. Kwas benzoesowy obecny był jedynie w osadzie, a kwas *trans*-cynamonowy nie występował w ekstrakcie metanolowym poddanej kwaśnej hydrolizie. Spośród kwasów monofenolowych, zidentyfikowano kwas *p*-hydroksybenzoesowy oraz kwasy *o*- i *p*-kumarowy. Pochodna kwasu benzoesowego była obecna w tkankach wszystkich organów orzecha, niezależnie od analizowanej frakcji, jednak największy jej poziom obserwowano w roztworze alkalizowanym wodorowęglanem sodu. Kwas *o*-kumarowy dominował w

hydrolizacie metanolowego ekstraktu z lipcowych liści i zielonych okryw owoców orzecha. Zawartość kwasu *p*-kumarowego w ekstrakcie metanolowym z liści była na podobnym poziomie, niezależnie od tego czy ekstrakt poddawany był hydrolizie. Spośród kwasów, których pierścień aromatyczny zawiera dwa podstawniki, stwierdzono obecność kwasu: wanilinowego, kawowego, ferulowego oraz chlorogenowego (depsydu kwasów kawowego i chinowego). Głównym składnikiem męskich kwiatostanów orzecha był wolny kwas wanilinowy. W ekstrakcie z liści dominowały kwasy: kawowy i ferulowy, natomiast w tkankach zielonych okryw owoców kwas chlorogenowy. Stężenie kwasów fenolowych z dwoma podstawnikami, w zhydrolizowanym osadzie, było znacznie niższe niż w ekstrakcie metanolowym. Kwas ferulowy nie występował w męskich kwiatostanach orzecha włoskiego. Spośród kwasów z trzema podstawnikami, stwierdzono obecność kwasu syryngowego i galusowego oraz kwasu taninowego, będącego polimerem kwasu galusowego. Kwas taninowy występował głównie w ekstrakcie metanolowym, którego hydroliza powodowała wzrost zawartości kwasu galusowego. Kwas syryngowy w najwyższym stężeniu występował w zielonych okrywach owoców orzecha.

Uzyskane wyniki sugerują, że allelopatyczne oddziaływania orzecha włoskiego mogą być związane z obecnością szerokiej gamy kwasów fenolowych w jego tkankach.

# OZNACZANIE WOLNEJ FRAKCJI INDOMETACYNY W OSOCZU LUDZKIM Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI HPLC/UV-VIS

Krzysztof **KONDZIOLA**, Andrzej L. **DAWIDOWICZ**

*Zakład Metod Chromatograficznych, Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej*

*Pl. M. Curie-Skłodowskiej 5, 20-031 Lublin*

*krzysztof\_kondziola@tlen.pl, dawid@poczta.umcs.lublin.pl*

Dla większości leków miejsce ich podania jest odległe od miejsca działania. Z tego powodu substancja aktywna musi zostać przetransportowana poprzez krew do tkanki docelowej. We krwi można wyróżnić dwie frakcje leku - wolną oraz związaną z białkami osocza. Jedynie wolny (niezwiązany) lek posiada możliwość pokonywania błon biologicznych, a dzięki temu trafienia do miejsca działania. Fakt ten powoduje, że w rzeczywistości tylko wolna frakcja leku jest aktywna farmakologicznie, a stężenie leku jej odpowiadające pozostaje w ścisłym związku z efektem terapeutycznym. Frakcja związana może być traktowana jako „magazyn”, z którego lek jest stopniowo uwalniany w przypadku zaburzenia równowagi reakcji tworzenia kompleksu lek - białko. Możliwość oszacowania stężenia wolnego leku na podstawie stężenia całkowitego w oparciu o zasadę stałości ułamka wolnej frakcji leku nie zawsze jest możliwa. Takie czynniki jak np. pewne stany chorobowe, wiek oraz stan pacjenta, a także osobnicze własności układu lek - białko mogą powodować odstępstwa od wartości ułamka wolnej frakcji leku przyjętego jako normalny. Z wyżej wymienionych powodów, w przypadku niektórych leków, uzasadnione jest zatem monitorowanie bezpośrednio stężenia wolnego leku we krwi.

Indometacyna (pochodna kwasu indolooctowego) należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Wykazuje ona silne działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe oraz przeciwgorączkowe. Indometacyna jest lekiem silnie wiążącym się z albuminą ludzkiego osocza (ok. 97%). Bezpośrednie oznaczanie stężenia jej wolnej frakcji we krwi odgrywa znaczącą rolę w kontrolowaniu bezpiecznego poziomu tego leku oraz osiągnięciu wysokiej efektywności terapii. Prezentowana praca opisuje prostą i czułą metodę oznaczania wolnej frakcji indometacyny w próbkach ludzkiego osocza z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją w ultrafiolecie (UV). Na etapie przygotowania próbki wykorzystano technikę ultrafiltracji z późniejszą ekstrakcją ciecz - ciecz (LLE) charakteryzującą się wysokim odzyskiem (ok. 97%). Opracowana metoda wnosi znaczące

ulepszenia w stosunku do już istniejących metod oznaczania indometacyny w osoczu ludzkim. Spełnia jednocześnie wymogi dobrze zwalidowanej procedury analitycznej, a jako metoda oznaczania wolnej frakcji tego leku może okazać się dominująca.



## FLAWONOIDY LUCERNY SIEWNEJ

Sylwia GOŁAWSKA<sup>1</sup>, Ireneusz KAPUSTA<sup>2</sup>, Bogdan JANDA<sup>2</sup>

i Bogumił LESZCZYŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Podlasie, ul. Prusa 12,  
08-110 Siedlce, Poland, E-mail: [sylwia@ap.siedlce.pl](mailto:sylwia@ap.siedlce.pl)*

<sup>2</sup>*Department of Biochemistry, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Czartoryskich 8,  
24-100 Puławy, Poland*

Flawonoidy to grupa związków polifenolowych występująca powszechnie w królestwie roślin i spełniająca wielorakie funkcje fizjologiczne i ekologiczne. Jedną z najważniejszych jest ich udział w obronie roślin przed negatywnym wpływem biotycznych czynników środowiskowych. Przykładowo, aktywność owadobójcza flawonoidów jest związana z ich oddziaływaniem jako deterentów pokarmowych, inhibitorów trawienia, a także bezpośrednich toksykantów. Wiedza na temat występowania flawonoidów w lucernie siewnej, będącej jedną z głównych roślin pastewnych nie jest pełna, dlatego celem przeprowadzonych badań było zidentyfikowanie i porównanie zawartości flawonoidów w powszechnie użytkowanych odmianach lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.). Badaniom poddano trzy odmiany lucerny: Radius, Sapko i Sitel, które rosły w komorze klimatyzacyjnej. Ekstrakcję flawonoidów przeprowadzono z 6-miesięcznych roślin przy pomocy metanolu wg zmodyfikowanej metody Oleszka i Stochmal (2002). Rozdział i identyfikację flawonoidów wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) sprzężonej ze spektrometrią mas.

Stwierdzono, że flawonoidy badanych odmian lucerny były glikozydami czterech flawonów: apigeniny, luteoliny, trycyny i chryzoeriolu. W łańcuchu cukrowym wszystkich glikozydów występował kwas glukuronowy, a niektóre z nich były arylowane kwasem ferulowym, kumarowym bądź synapinowym. Wykazano, że dominującymi związkami były pochodne trycyny i apigeniny. Łączna zawartość glikozydów apigeniny i luteoliny wahała się w granicach 65 do 72% sumy flawonów badanych lucern. Zawartość glikozydów luteoliny i chryzoeriolu nie przekraczała 30% sumy flawonów. Dla odmian Radius i Sapko związkiem dominującym był glikozyd trycyny, którego maksymalne stężenie (2.49 mg/ g s.m.) odnotowano w tkankach odmiany Radius. W przypadku odmiany Sitel w najwyższych ilościach występował glikozyd apigeniny (1.31 mg/ g s.m.).

W pracy przedyskutowano różnice w składzie i zawartości flawonoidów lucerny.

Badania wykonano dzięki wsparciu finansowemu Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

# APPLICATION HS-SPME/GC-MS FOR ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS OF WALNUT INDUCED BY APHID FEEDING

Robert KRZYŻANOWSKI and Bogumił LESZCZYŃSKI

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Podlasie, B. Prusa 12, Siedlce 08-110, Poland; e-mail:krzyzanowski\_r@yahoo.pl or leszczb@ap.siedlce.pl*

It is well known that injured plant tissues emit various volatile semiochemicals. Such phenomenon also occurs while the herbivorous insects feeding on their host plants. The present paper reports on emission of the plant volatile compounds (VOCs) from walnuts (*Juglans regia* L.) leaves under feeding of two aphid species *Callaphis juglandis* (Goeze) and *Chromaphis juglandicola* (Kaltenbach).

GC-MS analysis of the VOCs was performed on a Shimadzu series GC 17A gas chromatograph equipped with split/splitless injector and interfaced to QP-5050 Shimadzu mass spectrometer. The carrier gas was helium, and the separation was done on a capillary column Equity-5 (30 m x 0.25 mm I.D. with 0.25  $\mu$ m film thickness). The separation was controlled by software CLASS 5000 with NIST Mass Spectra Database 107 and 21.

The VOCs profile emitted by the green leaves of *J. regia* at early June allowed to identify the following compounds:  $\alpha$ -pinene (CAS 80-56-8),  $\beta$ -pinene (CAS 127-91-3),  $\beta$ -myrcene

(CAS 123-35-3), (Z)-3-hexen-1-ol acetate (CAS 3681-71-8), limonene (CAS 138-86-3), eucalyptol (CAS 470-82-6), santolina triene (CAS 2153-66-4),  $\gamma$ -cadinene (CAS 39029-41-9),  $\beta$ -farnesene (CAS 18794-84-8),  $\alpha$ -farnesene (CAS 502-61-4) and  $\gamma$ -muurolene (CAS 30021-74-0). When the aphid fed on the walnut leaves the VOCs profile showed some significant changes. Several of the identified volatile compounds, including  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -myrcene, limonene, santolina triene and  $\alpha$ -farnesene was emitted stronger. Emission of such compounds (Z)-3-hexen-1-ol acetate and  $\gamma$ -cadinene was drastically reduced. Moreover, the aphid feeding induced emission of two novel compounds: cis- $\beta$ -terpineol and  $\beta$ -farnesene. Changes in level of the volatile compounds of the *J. regia* and its significance for the chemical interactions in the environment is discussed.

# **EKSTRAKCYJA PRZEGRZANĄ WODĄ W PROCEDURZE CHROMATOGRAFICZNEGO OZNACZANIA SKŁADU OLEJKU ETERYCZNEGO Z ZIELA TYMIANKU**

**Ewelina RADO, Andrzej L. DAWIDOWICZ**

*Zakład Metod Chromatograficznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,  
Pl. M. Curie Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin,  
email: [ewelina.rado@gmail.com](mailto:ewelina.rado@gmail.com), [dawid@poczta.umcs.lublin.pl](mailto:dawid@poczta.umcs.lublin.pl)*

Rosnące zainteresowanie olejkami eterycznymi powoduje konieczność zastosowania odpowiedniej metody ich wydajnej i selektywnej izolacji zarówno w celach analitycznych jak i preparatywnych, która nie powodowałaby degradacji poszczególnych składników.

Klasyczną metodą otrzymywania olejku eterycznego jest destylacja z parą wodną prowadzona w aparacie Deryng'a. Z uwagi na długi czas jej trwania nie jest ona wygodna w celach analitycznych. Dlatego też pod uwagę bierze się możliwość wykorzystania innych, szybszych technik, spośród których należy wymienić techniki ekstrakcyjne, zarówno te rozpuszczalnikowe: ekstrakcja w aparacie Soxhleta, maceracja, przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (PLE), jak i bezrozsączalnikowe: ekstrakcja nadkrytyczna (SFE), mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME). Korzystną cechą technik rozpuszczalnikowych jest to, że ujawniany przy ich pomocy skład olejku jest podobny do składu jaki otrzymuje się w przypadku olejku pozyskiwanego z wykorzystaniem destylacji z parą wodną, zaś negatywną to, że wykorzystuje się w nich mało przyjazne człowiekowi i środowisku rozpuszczalniki organiczne. Rozpuszczalnikiem co do którego nie ma tego typu zastrzeżeń jest woda. Wprawdzie należy ona do rozpuszczalników polarnych, lecz w odpowiednich warunkach, w temperaturze od 100°C do 374°C i pod ciśnieniem na tyle wysokim, by utrzymać ją w stanie ciekłym, ekstrahuje związki niepolarne i średnio polarne. Ekstrakcję przegrzaną wodą (SWE) wykorzystuje się do ekstrakcji zanieczyszczeń o różnej polarności, pestycydów, poliaromatycznych węglowodorów, a także istnieją próby wykorzystania jej do izolacji składników olejkowych z matryc roślinnych.

Ekstrakcję przegrzaną wodą, prowadzoną w warunkach statycznych i dynamicznych, wykorzystano do izolacji składników olejkowych z ziela tymianku. W eksperymencie badano wpływ temperatury, ciśnienia, czasu ekstrakcji oraz prędkości przepływu na całkowity uzysk składników olejkowych. Otrzymane wodne ekstrakty poddano analizie jakościowej (GC-MS) i ilościowej (GC-FID) wykorzystując procedurę SPE w celu zmiany matrycy próbki na kompatybilną z zastosowaną techniką analityczną.

## THE NEW METHOD TO STUDY MOLECULAR INTERACTIONS

Anna **BIELEJEWSKA**, Andrzej **BYLINA**, Kazimiera **DUSZCZYK**

*Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Science,*

*Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland, Email: annab@icgf.edu.pl*

Information about complex formation is an important factor in many fields of chemical and biological science. There is a special need to study this type of interaction in solution where the most biological important reaction take place. For example drug–protein binding influences its pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters (i.e. distribution, efficacy and toxicity).

The new approach for investigation of macromolecule-ligand binding using the measurements of molecular diffusion coefficient of ligand during the flow through the capillary with and without complexing agent is presented. The study has been exemplified by investigation of the binding of 4-nitrophenol to cyclodextrin (CD) and warfarin, salicylic acid and sodium dodecyl sulphate (SDS) to bovine serum albumin (BSA). The obtained results are in good agreement with literature data and with results obtained in chromatographic method.

# CHROMATOGRAFICZNE OZNACZANIE CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO W OPARCIU O REAKCJE RODNIKÓW HYDROKSYLOWYCH Z KWASEM P-HYDROKSYBENZOESOWYM

Paweł **PISZCZ**, Agnieszka **BETA**, Iwona **KIERSZTYN** i B. Krzysztof **GLÓD**

*Zakład Chemii Analitycznej; Akademia Podlaska, ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce, Polska*

Wolne rodniki niekorzystnie modyfikują cząsteczki aktywne biologicznie jak również całe komórki, a przez to są przyczyną wielu chorób zwyrodnieniowych oraz procesu starzenia. W wielu innych chorobach są ich skutkiem bądź produktem ubocznym. Wiele tych zmian można uniknąć stosując egzogenne antyoksydanty. W związku z tym istnieje potrzeba opracowania metody umożliwiającej oznaczenie i porównanie siły działania konkretnych antyoksydantów, celem wyselekcjonowania tych o najwyższym potencjale antyoksydacyjnym. Okazuje się jednakże, że, w przypadku próbek biologicznych, często więcej informacji dostarcza pomiar Całkowitego Potencjału Antyoksydacyjnego (CPA), niż stężenia poszczególnych antyoksydantów oddzielnie.

W literaturze można znaleźć opisy wielu metod oznaczania rodników hydroksylowych przy użyciu HPLC. Oparte są one na reakcji tych rodników z pułapką spinową. Produkty tej reakcji mogą być monitorowane używając zarówno detekcję elektrochemiczną jak i fluorescencyjną. Metody te mogą być zastosowane również do pomiarów CPA. W tym przypadku rodniki hydroksylowe generowane są w reakcji analogicznej do reakcji Fentona. Miarą CPA jest zmiana powierzchni piku chromatograficznego produktu ich reakcji z tzw. *detektorem*. W poprzednich pracach wykazaliśmy możliwość ich oznaczania za pomocą: (i) kwasu *p*-hydroksybenzoowego (*p*-HBA) i detekcji elektrochemicznej lub (ii) kwasu tereftalowego (TFA) z detekcją fluorescencyjną. W prezentacji przedstawione zostaną pomiary CPA z zastosowaniem *p*-HBA (pułapka spinowa) i detekcji fluorescencyjnej. Opracowana metoda zostanie przetestowana na napojach alkoholowych jak również na czystych związkach chemicznych takich jak indole, flawony i triazyny.

# ZASTOSOWANIE HPLC DO POMIARÓW CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO MIODÓW I MIODÓW PITNYCH

Paweł **WANTUSIAK**, Paweł **PISZCZ**, Monika **SKWAREK**  
i Bronisław K. **GLÓD**

*Zakład Chemii Analitycznej; Akademia Podlaska, ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce, Polska*

Wolne rodniki i antyoksydanty mają zasadniczy wpływ na życie ludzkie zarówno z fizjologicznego jak i patologicznego punktu widzenia. Ich stężenie zmienia się w trakcie procesu starzenia, chorób i po spożyciu żywności. Mogą być one analizowane przy użyciu HPLC. Okazuje się jednakże, że często więcej informacji dostarcza oznaczenie sumarycznej wielkości – Całkowitego Potencjału Antyoksydacyjnego (CPA).

Ogólnie, HPLC może być użyta w metodzie pośredniego pomiaru wolnych rodników, po ich reakcji z *detektorem* zwanym pułapką spinową. Pomiar CPA oparte są na generowaniu odpowiednich rodników (w naszym przypadku jest to rodnik hydroksylowy) i ich reakcji z *detektorem*. Następnym etapem jest dodanie do takiego układu badanej próbki. Wygenerowane rodniki zmiatane są zarówno przez *detektor* jak i badaną próbkę. Jeżeli próbka reaguje z rodnikiem, wówczas powoduje to zmniejszenie wysokości piku chromatograficznego produktu reakcji *detektora* z rodnikiem. Wynikiem tak przeprowadzonego pomiaru CPA jest różnica w polu powierzchni piku chromatograficznego przed i po dodaniu próbki.

Jako pułpkę spinową wykorzystuje się kwas *p*-hydroksybenzoesowy (pHBA). Produkt jego reakcji z rodnikami hydroksylowymi, kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy (3,4DHBA), jest analizowany stosując wykluczanie jonowe lub wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych. Poprzednio opisywano zastosowanie detekcji elektrochemicznej i fluorescencyjnej w tych pomiarach. Głównym celem tej pracy jest sprawdzenie możliwości zastosowania detekcji UV. Metoda ta została zastosowana do oznaczenia CPA próbek różnych miodów i miodów pitnych. Inna metoda pomiaru, oparta jest na wyznaczeniu całkowitego pola powierzchni wszystkich zarejestrowanych pików na detektorze amperometrycznym. Selektywność ostatniej metody może być łatwo kontrolowana przez zmianę wartości potencjału.

# MECHANIZM RETENCJI KWASÓW KARBOKSYLOWYCH NA RÓŻNYCH KOLUMNACH HPLC

Monika **SKWAREK**, Paweł **WANTUSIAK**, Paweł **PISZCZ**

i B. Krzysztof **GLÓD**

*Zakład Chemii Analitycznej; Akademia Podlaska*

*ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce, Polska*

Kwasy karboksylowe odgrywają ważną rolę jako komponenty zapachowe (alifatyczne), konserwanty (aromatyczne), składniki produktów żywnościowych, antyoksydanty i leki. Dlatego też ich analiza jest znacząca dla wielu dyscyplin naukowych. Często do ich oznaczania stosowana jest Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa (HPLC). W prezentacji dyskutowany jest mechanizm retencji kwasów na różnych kolumnach chromatograficznych. W układzie faz odwróconych głównym mechanizmem retencji jest hydrofobowa adsorpcja. Zdysocjowane grupy karboksylowe, w zasadzie, nie oddziałują z fazą stacjonarną. Dodatek związków tworzących tzw. *pary jonowe* do fazy ruchomej zwiększa retencję kwasów. Z drugiej strony związki inkluzyjne, takie jak cyklodekstryny, zmniejszają retencję.

W chromatografii wykluczania jonowego (IEC) zdysocjowane formy kwasów są odpychane od fazy stacjonarnej, która posiada ten sam znak ładunku elektrycznego. Dodatkowe efekty takie jak hydrofobowa adsorpcja i efekt ekranowania wydłużają lub skracają retencję. Kwasy aromatyczne są silniej zatrzymywane niż alifatyczne ze względu na ich  $\pi$ -elektronowe oddziaływania ze szkieletem żywicy.

Bardzo silne  $\pi$ -elektronowe oddziaływania, i w konsekwencji większa retencja, obserwowane są na kolumnie z wypełnieniem grafitowym (Porous Graphitized Carbon - PGC). Dodatkowo indukowane dipole odpowiedzialne są za oddziaływania polarnych (lub jonowych) związków z wypełnieniem PGC. Jest to tak zwany Polarny Efekt Retencji Grafitu (PREG).

Opisane efekty są dyskutowane i eksperymentalnie potwierdzone dla kwasów alifatycznych i aromatycznych.

# ROZDZIAŁ KOMPLEKSÓW NIKLU Z ZASADAMI SCHIFFA ZA POMOCA HPLC Z DETEKcją UV I ELEKTROCHEMICZNĄ

Iwona **KIERSZTYN**, Anita **SILAK**, Paweł **PISZCZ**, Krzysztof **KURZAK**  
i Bronisław K. **GLÓD**

*Zakład Chemii Analitycznej; Akademia Podlaska  
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce, Poland*

Kompleksy metali z zasadami Schiffa znane są od końca XIX wieku. Związki te wzbudzają zainteresowanie z punktu widzenia chemii koordynacyjnej jak również procesów metabolicznych zachodzących w organizmach żywych. Zasady Schiffa są iminami  $RCH=NR'$  z charakterystycznym ugrupowaniem typu  $-C=N-$ . Wykazują one zdolność kompleksowania metali przejściowych, stabilizującego ich różne stopnie utleniania. W pracy przedyskutowano rozdział kompleksów niklu (II) z pięcioma ligandami, zasadami Schiffa. Zostały one rozdzielone w układzie faz odwróconych. Okazało się, że najlepszy rozdział otrzymano dla niskich temperatur ( $5^{\circ}C$ ). Jednakże w przypadku kompleksu Ni(salpn) otrzymany w tej temperaturze pik był bardzo rozmyty co, prawdopodobnie, spowodowane jest efektami kinetycznymi. Dobre parametry detekcyjne otrzymane zostały na detektorze UV (DAD). Z danych literaturowych wiadomo, że zarówno jon centralny jak i ligandy badanych kompleksów ulegają reakcją zarówno utleniania, jak i redukcji. Z tego powodu przetestowany został detektor elektrochemiczny (amperometryczny) do ich oznaczania. Otrzymane na nim chromatogramy były nieodtwarzalne i mało czułe. Elektrochemiczne własności kompleksów zbadano za pomocą voltamperometrii cyklicznej. Okazało się, że niektóre z nich tworzyły przewodzące polimery na powierzchni elektrody, w rozpuszczalnikach o niskiej liczbie donorowej.



**CHROMATOGRAFICZNE I ELEKTROCHEMICZNE METODY  
WYZNACZANIA CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU  
ANTYOKSYDACYJNEGO MIODÓW I MIODÓW PITNYCH**

**Paweł WANTUSIAK, Marcin BORUC, Monika SKWAREK, Paweł PISZCZ,  
Iwona KIERSZTYN i Bronisław K. GŁÓD**

*Zakład Chemii Analitycznej; Akademia Podlaska,  
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce, Polska*

Wolne rodniki i RFT mają zasadniczy wpływ na życie ludzkie zarówno z fizjologicznego jak i patologicznego punktu widzenia. Niekorzystnie modyfikują cząsteczki aktywne biologiczne jak również całe komórki, a przez to są przyczyną wielu chorób zwyrodnieniowych oraz procesu starzenia.

W związku z tym istnieje potrzeba opracowania metody umożliwiającej oznaczenie i porównanie siły działania konkretnych antyoksydantów, celem wyselekcjonowania tych o najwyższym potencjale antyoksydacyjnym.

Technika HPLC może być użyta w metodzie pośredniego pomiaru wolnych rodników, po ich reakcji z detektorem zwanym pułapką spinową.

Oznaczanie CPA za pomocą woltametrii pulsowej różnicowej (DPV) polegało na wykonaniu woltamogramu próbki miodu o stężeniu 50 g/l w zakresie potencjałów E [0-1,2 V] przy czasie modulacji 0,005 s i czasie odstępu pomiędzy skokami potencjału  $t=0,1$  s. W tym przypadku miarą CPA było pole powierzchni powstałych pików.

Przeprowadzone badania umożliwiły oznaczenie szeregu antyoksydacyjnego miodów i miodów pitnych pochodzących z różnych rejonów Polski.

# **pH ZALEŻNE CHROMATOGRAFICZNE POMIARY CAŁKOWITEGO POTENCJAŁU ANTYOKSYDACYJNEGO**

**Emila GOŁDYN, Paweł PISZCZ i Bronisław K. GŁÓD**

*Zakład Chemii Analitycznej; Akademia Podlaska,*

*ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce, Polska*

W organizmach żywych wolne rodniki są wytwarzane w warunkach fizjologicznych i patologicznych. W pierwszym przypadku dochodzi do ich unieczynnienia w wyniku mechanizmów antyoksydacyjnych. W drugim mogą powodować degradację i obumieranie komórek, gdyż z reguły reagują ze wszystkimi ich składnikami uszkadzają lipidy, białka i DNA. Podejrzewa się, że są przyczyną wielu problemów zdrowotnych takich jak: choroby Alzheimera i Parkinsona, cukrzyca, miażdżycy. Zmiataczami wolnych rodników są przeciwutleniacze, które możemy wprowadzać do organizmu wraz z żywnością. Wydają się być istotnym oznaczanie sumarycznej ilości antyoksydantów (CPA).

Oznaczanie poszczególnych przeciwutleniaczy w próbkach biologicznych nie daje tylu informacji, co określenie ich sumarycznego stężenia. Poszczególne odcinki układu pokarmowego człowieka charakteryzują się różnym pH. Badając produkty spożywcze wydaje się uzasadnione uwzględnienie wpływu pH środowiska na wielkość CPA.

W tym przypadku były wygenerowane rodniki hydroksylowe w reakcji Fentona. Wykrywano je za pomocą kwasu *p*-hydroksybenzoesowego (*p*-HBA) przy detekcji elektrochemicznej i fluorescencyjnej.

## THE DEGRADATION BY FENTON SYSTEM

Konrad **ŻURAWSKI**, Paweł **PISZCZ** i Bronisław K. **GLÓD**

*Institute of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, University of Podlasie,*

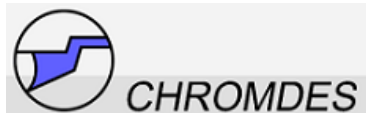
*3 Maja 54, 08-110 Siedlce*

In more numerous cases, natural ecosystems are no longer capable of neutralizing effectively contaminants contained in the industrial wastewater and this may cause accumulation of contaminants and occurrence of irreparable changes in the environment. The only way to stop those tendencies is to remove contaminants hardly or not degradable biologically by disintegration leading even to full mineralization.

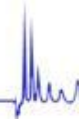
The efficiency of Fenton-related oxidative process such as Fenton model compound in simulated and industrial wastewater. A batch study was conducted to optimize parameters like pH, hydrogen peroxide concentration and ferrous ion concentration governing the Fenton process. At optimum conditions, Fenton-related processes were compared for the degradation.

The maximum mineralizing efficiency for acids with Fenton. In Fenton process, carboxylic acids like salicylic acid and acetylsalicylic acid, both these acids degradation and were oxidized completely at 10 min of their action time.

## SPONSORZY



HPLC · SMB · OSMOMETRIE



**KNAUER**



CARSEO Sp. j.

