

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ NAFTOCHINONŮ V ROSTLINÁCH

PETR BABULA<sup>a</sup>, RADKA MIKELOVÁ<sup>b</sup>,  
VOJTĚCH ADAM<sup>b</sup>, DAVID POTĚŠIL<sup>b</sup>, JOSEF  
ZEHNÁLEK<sup>b</sup>, RENÉ KIZEK<sup>b</sup>, LADISLAV  
HAVEL<sup>c</sup> a ZDENĚK SLADKÝ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1/3, 612 46 Brno, <sup>b</sup>Ústav chemie a biochemie, <sup>c</sup>Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno  
petr\_babula@email.cz

Došlo 12. 12. 04, přepracováno 27. 9. 05, přijato 24.10.05.

Klíčová slova: naftochinony, 1,4-naftochinon, plumbagin, juglon, lawson, HPLC-DAD

#### Úvod

Naftochinony jsou většinou barevné pigmenty v rostlinách. V buňkách jsou uloženy ve vakuolách, kde jsou především glykosylovány<sup>1</sup>. Naftochinony jako skupina sekundárních metabolitů se v přírodě vyskytují v různých čeledích rostlin (*Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Ebenaceae*, *Boraginaceae*, *Dioncophyllaceae*, *Ancistrocladaceae*, *Iridaceae*, *Verbenaceae*, *Scrophulariaceae*, *Avicenniaceae*, *Balsaminaceae*, *Bignoniaceae*, *Gentianaceae*, *Droseraceae*, *Nepenthaceae*, *Lythraceae*, *Euphorbiaceae*)<sup>2–6</sup> a rovněž u hub a mikroorganismů, např. rodů *Streptomyces*, *Fusarium*<sup>7</sup>. Biosyntéza naftochinonů probíhá šesti možnými biosyntetickými cestami. Bylo zjištěno, že základním prekurzorem biosyntézy většiny naftochinonů je kyselina šikimová (3,4,5-trihydroxycyklohex-1-en-1-karboxylová kyselina, C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>).

Řada rostlin obsahující naftochinony roste ve velmi exponovaných, vlhkých podmínkách, kde se vyskytuje mnoho patogenních organismů, zejména pak plísni. Naftochinony, hlavně však plumbagin a jeho deriváty, mají výrazný antifungální efekt; mohou tedy sloužit jako aktivní obrana rostlin proti zmíněným patogenům. Naftochinony rovněž slouží jako látky bránící napadení rostlin škůdci, pro které mohou být tyto látky rovněž vysoce toxické. Extrakty z rostlin, které obsahují naftochinony, se již dlou-

hou dobu používají v tradičních medicínách různých národů. V Číně a některých dalších asijských zemích se používají extrakty z rostlin rodu olověnc ( *Plumbago*; *P. zeylanica*, *P. rosea*) k léčbě rakoviny, revmatoidní artritidy a bolestivé menstruace, zevně pak při léčbě otoků a zhmožděnin. V Indii má *Plumbago zeylanica* širokou tradici používání na různé nemoci, jako je průjem, poruchy trávení a různé kožní problémy; používání této drogy však může vést až k trvalé sterilitě a používá se i k vyvolání potratu<sup>8</sup>. Ve Francii se dosud používá *Plumbago europaea* ke zmírnění bolestí zubů. Kůra a listy z ořešáku (*Juglans nigra*) se využívají pro své svíravé, projímavé a detergentní účinky k léčbě kožních chorob, zejména ekzémů, oparů a kožních vředů. Kůra *Juglans regia* se používá pro mírně projímavé účinky. Tradiční medicíny ji doporučují rovněž k léčbě syfilis a parazitóz. Zevně se používá jako rubefaciens (látko dráždící pokožku a sliznice, která způsobuje jejich překrvení; tímto mechanismem ohraničují zánět a urychlují jeho průběh).

V českých zemích má dlouhou tradici (od 13. století) používání extraktů z rosnatky *Drosera rotundifolia* proti infekčním nemocem dýchacích cest, jako je nachlazení, bronchitida, kašel a astma. Přípravky z této rostliny se ještě dnes doporučují pro prevenci aterosklerózy, při cukrovce a jako silný antibakteriální a antivirální prostředek. Uvádí se rovněž účinek spasmolytický a sekretolytický<sup>1</sup>. V Americe jsou extrakty oblíbeny jako geriatikum. V indické tradiční medicíně se používá *Drosera burmannii* jako účinné rubefaciens, v Jižní Americe zase jiné druhy k léčbě bradavic, kuřích ok, keratóz a k odstranění pih.

Při kašli a nachlazení se používá v ČR schválený přípravek Tussilen® kapky, který obsahuje extrakt z druhu *Drosera rotundifolia*. Jiné zdroje doporučují homeopatické zpracování *Drosera rotundifolia* pro nemoci dýchacích cest; schválená homeopatika z *Drosera rotundifolia* jsou dostupná v četných lékových formách – tablety, roztok, čípky, masti v několika homeopatických ředěních. Mucholapka podivná (*Dionaea muscipula*) nemá v současnosti v ČR terapeutické využití. V Německu se však vyrábí přípravek Carnivora® – extrakt z mucholapky - v lékových formách kapky a injekce – použití jako imunomodulans při malignitách, jako imunostimulans, podpůrná léčba Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitis. V České republice však není schválen a registrován. Extrakt z mucholapky je dostupný v USA, kde je vyráběn firmou Vital Health Products jako potravinový doplněk. Naftochinony mají pro své výrazné cytotoxické účinky nepochybně budoucnost v terapii různých onemocnění, včetně nádorových<sup>9–11</sup>. Z tohoto důvodu vzrůstá zájem o stanovení a charakterizaci derivátů 1,2- a 1,4-naftochinonů v různých biologických vzorcích. Práci zabývající se přímým stanovením naftochinonů v biologickém materiálu je velmi málo. Mezi nejčastěji používané metody pro jejich kvantifikaci patří vy-

sokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí (HPLC-UV) a hmotnostní detekcí<sup>12</sup>. Navíc byly pro analýzu využity některé elektrochemické metody, které mají značný význam v konstrukci senzorů<sup>13–18</sup>.

Protože se naftochinony v rostlinném materiálu nevytvářejí samostatně, ale s celou řadou primárních a sekundárních metabolitů, bylo nutné zvolit a optimalizovat vhodnou metodu pro jejich stanovení. Pro současné stanovení biologicky aktivních sekundárních metabolitů se osvědčila vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s diodovým polem (HPLC-DAD) nebo s elektrochemickým detektorem<sup>19–21</sup>. Proto jsme se i zde rozhodli využít kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem pro analýzu několika naftochinonů současně (lawson, 1,4-naftochinon, juglon a plumbagin).

## Experimentální část

### Materiál a metody

Rostliny *Dionaea muscipula* Ell. pocházely z explantátových kultur (Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně), kde byly kultivovány na médiu Murashige-Skoog Medium (MS)<sup>22</sup> s přidávkou sacharosu ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ) a aktivního uhlí ( $1,5 \text{ g l}^{-1}$ ) v 50 ml Erlenmayerových baňkách. Kultivace probíhala v kultivačních boxech (Luminex); box byl zajištěn osvětlením o intenzitě 5000 luxů (zářivky Fluora). Délka fotoperiody byla 14 h, teplota byla konstantní,  $26,5 \text{ }^\circ\text{C}$  a vlhkost 60 %. *Drosera rotundifolia* a *Drosera spathulata* pocházely z explantátových kultur Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně a byly pěstovány za stejných kultivačních podmínek v Laboratoři tkáňových kultur (Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně). Části *Paulownia tomentosa* (listy, plody) byly sbírány z rostliny pěstované v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně 26. 8. 2004.

### Chemikálie

Jako standardy čistoty p.a. byly použity naftochinony 1,4-naftochinon, juglon (5-hydroxy-1,4-naftochinon), lawson (2-hydroxy-1,4-naftochinon) a plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naftochinon) (Sigma-Aldrich, USA). Methanol pro HPLC a ostatní analytická činidla byla ACS čistoty (Sigma-Aldrich, USA). Standardní roztoky naftochinonů byly připraveny o koncentraci  $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  v ACS methanolu (Sigma Aldrich, USA) a uchovávány ve tmě při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Všechny roztoky byly filtrovány přes  $0,45 \text{ } \mu\text{m}$  teflonové membránové filtry (MetaChem, Torrance, USA) před dávkováním do systému HPLC.

Analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí diodovým polem

HP 1100 chromatografický systém (Hewlett-Packard,

Waldbronn, Německo) byl vybaven vakuovým odplyňovačem (G1322A), kvartérní pumpou (G1311A), automatickým dávkovačem (G1313A), kolonovým termostatem (G1313A) a UV/VIS detektorem s diodovým polem (model G1315B). ChemStation software (Rev A07.01) byl použit pro obsluhu celého systému. Naftochinony byly separovány izokratickou elucí na chromatografické koloně s reverzní fází Zorbax C18-AAA ( $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ , velikost částic  $3,5 \text{ } \mu\text{m}$ , Agilent Technologies, USA). Mobilní fáze byla 0,1 % (v/v) octová kyselina a methanol (35 : 65 v/v). Průtok mobilní fáze byl  $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ . Teplota kolony byla  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Spektra byla snímána v rozmezí 190–400 nm; pro chromatografickou analýzu byla vybrána vlnová délka 254 nm. Bylo dávkováno  $5 \text{ } \mu\text{l}$  vzorku.

### Příprava reálného vzorku

Části rostlin byly lyofilizovány při teplotě  $-51 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 48 h (CHRIST-Alpha 1-2). Poté byly jednotlivé části rostlin nahruho drceny v třecí misce a nejmenno homogениzovány v mlýnku (Ika A11 Basic). Navážka (0,02 až 0,10 g) biologického vzorku byla přenesena do 5 ml methanolu a ultrazvukována při 38 kHz, 150 W (K5, Kraintek) za laboratorní teploty po dobu 30 min. Vzorky rostlinného extraktu byly před dávkováním do systému HPLC filtrovány přes  $0,45 \text{ } \mu\text{m}$  teflonové membránové filtry (MetaChem, Torrance, CA, USA).

### Návratnost

Návratnost naftochinonů byla vyhodnocena pomocí přidavku  $100 \text{ } \mu\text{l}$  standardu (koncentrace byla  $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  anebo  $500 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) k připraveným homogenátům ( $100 \text{ } \mu\text{l}$ ). Postup přípravy homogenátu je uveden výše. Koncentrace naftochinonů ve vzorku byla stanovena pomocí kalibrační křivky.

## Výsledky a diskuse

### Optimalizace stanovení naftochinonů

#### Vodná složka mobilní fáze

Při volbě vodné složky mobilní fáze jsme testovali kyselinu mravenčí a kyselinu octovou<sup>23</sup>. Retenční čas všech čtyř separovaných naftochinonů byl u kyseliny octové nižší než u kyseliny mravenčí. Výška píků naftochinonů byla srovnatelná pro obě testované kyseliny, zatímco plocha píků a jejich symetrie byla větší při použití kyseliny octové. Proto jsme pro následující experimenty zvolili kyselinu octovou. Dále byl studován vliv koncentrace kyseliny octové na průběh separace. Se změnou koncentrace kyseliny octové (0,025; 0,050; 0,075; 0,100; 0,125 a  $0,150 \text{ mol l}^{-1}$ ) se rozlišení jednotlivých látek významněji neměnilo. Výšky i plochy chromatografických piků byly nejvyšší při koncentraci  $0,100 \text{ mol l}^{-1}$ , přičemž v intervalu studovaných koncentračních hodnot se výšky a plochy piků jednotlivých naftochinonů pohybovaly do 90 %

z nejvyšší hodnoty.

#### Organická složka mobilní fáze

Jako organická část mobilní fáze byl testován acetonitril a methanol. Při použití acetonitrilu byla plocha, výška i symetrie píků nižší a zóny jednotlivých studovaných naftochinonů byly širší než při použití methanolu, který byl proto použit při dalších experimentech.

#### Poměr složek mobilní fáze

Byl testován interval 40–90 % methanolu v mobilní fázi. Se vzrůstajícím obsahem methanolu se významně snižoval retenční čas pro všechny naftochinony až do 70 % methanolu v mobilní fázi. Při vyšším obsahu methanolu (70–90 %) se retenční čas všech studovaných naftochinonů snižoval již jen nepatrně. Plocha signálů se s různým poměrem fázi měnila jen nepatrně. Jako nejvhodnější byl zvolen poměr 35 % vodné složky (kyselina octová) a 65 % organické složky (methanol). Při zvoleném poměru výška píků jednotlivých naftochinonů dosahovala maxima a byla zřejmě maximální symetrie píků.

#### Průtok mobilní fáze

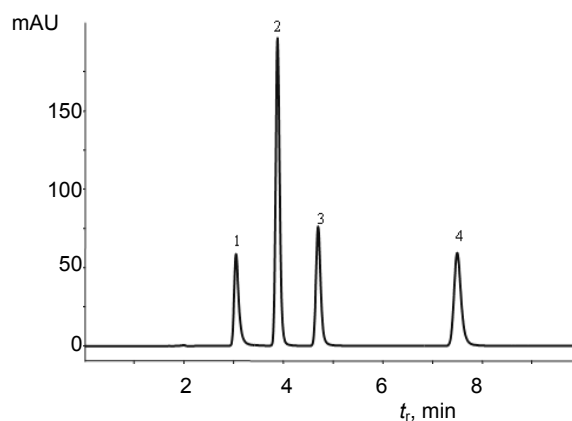
Byl sledován vliv průtoku mobilní fáze na průběh separace v rozsahu 0,5 až 1 ml min<sup>-1</sup>. Retenční čas pozorovaných signálů se se vzrůstajícím průtokem snižoval, symetrie píků povolna rostla, ale při průtoku vyšším než 0,9 ml min<sup>-1</sup> se neúměrně zvyšoval tlak v chromatografické soustavě. Jako nejvhodnější byl proto zvolen průtok 0,8 ml min<sup>-1</sup>, při kterém byly píky naftochinonů nejvíce symetrické, výška a plocha píků dosahovaly maxima.

#### Teplota při separaci na chromatografické koloně

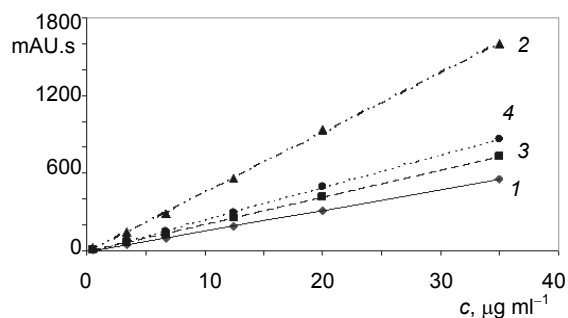
Vliv teploty na separaci a detekci naftochinonů prováděné v HPLC-DAD chromatografickém systému byl testován v rozmezí 10 °C až 40 °C. Teplota 40 °C byla zvolena jako maximální možná pro známou termolabilitu naftochinonů. Se zvyšující se teplotou kolony se snižoval retenční čas separovaných naftochinonů, zvyšovala se výška píků, zatímco symetrie a plocha píků byly téměř konstantní (odchylka okolo 5 %). Pro analýzu byla jako optimální vybrána teplota 40 °C.

#### Kalibrační závislosti naftochinonů stanovené pomocí HPLC-DAD

Při nejvhodnějších podmínkách separace (mobilní fáze 0,1 mol l<sup>-1</sup> kyselina octová a methanol v poměru 35 : 65; průtok mobilní fáze 0,8 ml min<sup>-1</sup>; teplota 40 °C) jsme získali velmi dobře separované a symetrické píky jednotlivých naftochinonů (obr. 1). Závislost absorbance snímané detektorem s diodovým polem (DAD) při vlnové délce 254 nm na koncentraci jednotlivých naftochinonů byla ve sledovaném koncentračním intervalu (0,5 až 35,0 mg ml<sup>-1</sup>) lineární pro všechny studované naftochinony (obr. 2). Relativní střední chyba (RSD) se pohybovala do 3 % ( $n = 5$ ); rovnice kalibračních přímek a R<sup>2</sup> závislosti



Obr. 1. HPLC-DAD chromatogram naftochinonů (lawson (1), 1,4-naftochinon (2), juglon (3) a plumbagin (4)); mobilní fáze 0,1 mol l<sup>-1</sup> kyselina octová a methanol (35 : 65 v/v); průtok mobilní fáze 0,8 ml min<sup>-1</sup>; teplota 40 °C; vlnová délka 254 nm. Koncentrace naftochinonů byla 12,5 µg ml<sup>-1</sup>



Obr. 2. Závislost plochy píku na koncentraci jednotlivých naftochinonů, (lawson (1), 1,4-naftochinon (2), juglon (3) a plumbagin (4)); chromatografické podmínky jako na obr. 1

plochy píku na koncentraci jednotlivých analyzovaných naftochinonů a limity detekce a stanovitelnosti jsou uvedeny v tabulce I.

#### Určení obsahu naftochinonů v rostlinách

Optimalizovaná metoda stanovení naftochinonů vysokoučinnou kapalinnou chromatografií s detekcí diodovým polem byla použita pro studium obsahu naftochinonů v několika rostlinných druzích, o kterých je známo, že naftochinony obsahují. Návratnost přidavku známého množství analyzovaných naftochinonů do rostlinného materiálu je uvedena v tabulce II. Získané hodnoty se pohybovaly mezi 95 až 104 %.

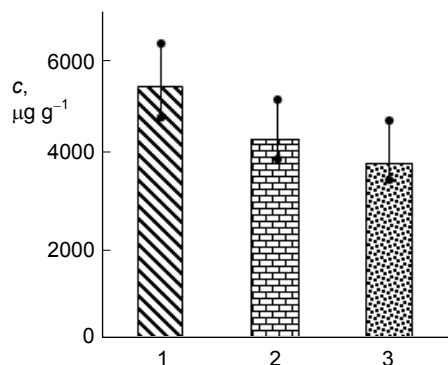
Tabulka I  
HPLC-DAD charakteristiky analyzovaných naftochinonů

Naftochinon	$t_R$ [min]	Regresní rovnice <sup>a</sup>		$R^2$	LOD <sup>b</sup> [ng ml <sup>-1</sup> ]	LOQ <sup>c</sup> [ng ml <sup>-1</sup> ]	RSD [%]
		směrnice [mAU mg <sup>-1</sup> ml]	úsek [mAU]				
1,4-Naftochinon	3,8	47,733	- 9,0435	0,9999	50,5	168,3	1,91
Juglon	4,7	20,756	- 5,6828	0,9998	75,6	252,0	2,25
Lawson	3,0	15,951	- 5,2675	0,9997	65,3	217,7	2,86
Plumbagin	7,4	24,416	- 6,0176	0,9998	38,5	128,3	1,11

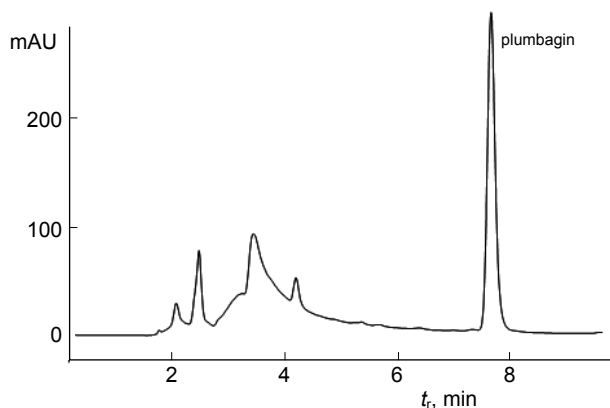
<sup>a</sup> Koncentrační interval byl 0,5 až 35,0 mg ml<sup>-1</sup>, <sup>b</sup> LOD – limit detekce, <sup>c</sup> LOQ – limit kvantifikace

#### *Dionaea muscipula*

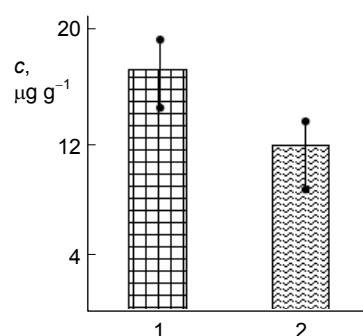
Obsah naftochinonů byl v případě této „masožravé rostliny“ analyzován v jednotlivých rostlinných orgánech (list, kořen a květ). Zjistili jsme, že nejvíce plumbaginu obsahovaly listy (nerozdělené na řapík a čepel listu) –



Obr. 3. Obsah plumbaginu v listu (1), kořenu (2) a květu (3) *Dionaea muscipula*; chromatografické podmínky jako na obr. 1



Obr. 4. HPLC-DAD chromatogram analýzy listů *Dionaea muscipula*; chromatografické podmínky jako na obr. 1



Obr. 5. Množství plumbaginu v listu (1) a plodu (2) *Paulownia tomentosa*; chromatografické podmínky jako na obr. 1

5338 µg g<sup>-1</sup>, méně plumbaginu obsahovaly kořeny – 4230 µg g<sup>-1</sup>, nejméně pak květy – 3698 µg g<sup>-1</sup> (obr. 3). Odpovídající chromatogram je na obr. 4, UV spektra standardu plumbaginu a plumbaginu detegovaného byla identická. Další naftochinony nebyly detegovány. Literatura uvádí ještě případný výskyt 3-chloroplumbaginu, hydroplumbagin 4-*O*-β-glukopyranosidu a 8,8'-biplumbaginu<sup>24–26</sup>, rovněž látky fylogeneticky spjaté s plumbaginem, diomuscipulon a diomuscinon, postrádající však strukturu 1,4-naftochinonu, nebyly detegovány<sup>26–28</sup>.

#### *Paulownia tomentosa*

Bylo pro nás překvapením, že jsme naftochinon plumbagin detegovali rovněž v listech a plodech (mesokarp) stromu paulovnie plstnaté (*Paulownia tomentosa*, *Scrophulariaceae*), kde tento naftochinon dosud nebyl detegován. Jeho obsah byl relativně nízký – 17 µg g<sup>-1</sup> v listech a 11 µg g<sup>-1</sup> v plodech v mesokarpu (obr. 5). Tato rostlina je pro farmacii zajímavá díky obsahu flavonoidních a iridoidních látek.

Tabulka II

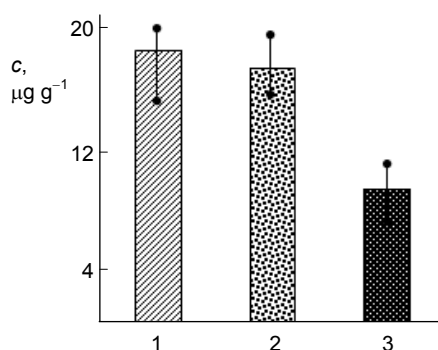
Návratnost naftochinonů v listech *Dionaea muscipula*, *Drosera rotundifolia* a *Paulownia tomentosa* ( $n = 3$ )

Rostlinný druh (list)	Naftochinon	Vzorek [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] <sup>a, b</sup>	Standardní přídavek [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] <sup>a</sup>	Vzorek + standardní přídavek [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ] <sup>a</sup>	Návratnost [%]
<i>Dionaea muscipula</i>	lawson	nd <sup>c</sup>	10,1 ± 0,3 (3,0)	10,5 ± 0,4 (3,8)	104
	1,4-naftochinon	nd <sup>c</sup>	10,2 ± 0,1 (1,0)	10,4 ± 0,3 (2,9)	102
	juglon	nd <sup>c</sup>	9,8 ± 0,2 (2,0)	10,1 ± 0,4 (4,0)	103
	plumbagin	5338 ± 120 (2,2)	508 ± 16,9 (3,3)	5889 ± 195 (3,3)	97
<i>Drosera rotundifolia</i>	lawson	nd <sup>c</sup>	10,5 ± 0,6 (5,7)	10,8 ± 0,5 (4,6)	95
	1,4-naftochinon	nd <sup>c</sup>	10,4 ± 0,4 (3,8)	10,9 ± 0,7 (6,4)	95
	juglon	nd <sup>c</sup>	9,8 ± 0,3 (3,1)	10,1 ± 0,6 (5,9)	99
	plumbagin	18,0 ± 0,6 (3,3)	9,9 ± 0,5 (5,1)	26,7 ± 1,1 (4,1)	96
<i>Paulownia tomentosa</i>	lawson	nd <sup>c</sup>	10,8 ± 0,8 (7,4)	11,2 ± 0,9 (8,0)	96
	1,4-naftochinon	nd <sup>c</sup>	10,2 ± 0,5 (4,9)	10,4 ± 0,6 (5,8)	98
	juglon	nd <sup>c</sup>	9,6 ± 0,2 (2,1)	9,8 ± 0,4 (4,1)	98
	plumbagin	17,1 ± 0,8 (4,7)	10,4 ± 0,6 (5,8)	26,3 ± 1,8 (8,3)	96

<sup>a</sup> Množství naftochinonu na gram sušiny, <sup>b</sup> výsledky jsou vyjádřené jako průměrná hodnota ± SD (RSD), <sup>c</sup> nd – nedetegováno

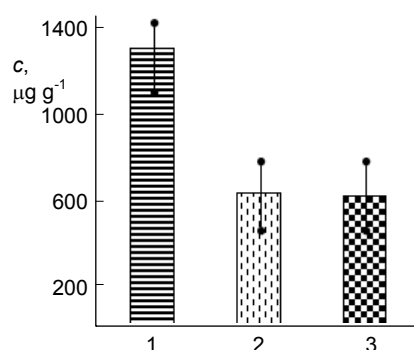
*Drosera*

U tří druhů rostlin rodu rosnatka (*Drosera*) – *D. rotundifolia*, *D. spathulata* a *D. capensis* byl studován obsah naftochinonů v celých listech, tedy nerozdělených na řapík a čepel listu. Na základě našich analýz byl detegován nejvyšší obsah plumbaginu v *D. rotundifolia* – 18  $\mu\text{g g}^{-1}$ , dále pak v *D. spathulata* – 16  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Je také zajímavé, že dosud nebyl potvrzen výskyt plumbaginu v případě *in vitro* pěstované *D. rotundifolia*. Nejnižší obsah plumbaginu byl detegován v *D. capensis* – 8  $\mu\text{g g}^{-1}$  (obr. 6). Podle známých údajů druhy *D. rotundifolia* a *D. capensis* obsa-



Obr. 6. Obsah plumbaginu v listech *Drosera rotundifolia* (1), *Drosera spathulata* (2) a *Drosera capensis* (3); chromatografické podmínky jako na obr. 1

hují ze všech naftochinonů nejvíce plumbaginu<sup>29</sup>. Nám se však podařilo ve všech analyzovaných druzích rosnatek detegovat značné obsahy derivátu juglonu, pravděpodobně 7-methyljuglonu (porovnáním UV-spekter a údajů z literatury o látkách obsažených v zástupcích rodu *Drosera*). Nejvyšší obsah 7-methyljuglonu byl zjištěn v *D. rotundifolia* – 1297  $\mu\text{g g}^{-1}$  v *D. spathulata* a *D. capensis* byl podobný – 623 a 608  $\mu\text{g g}^{-1}$  (obr. 7).



Obr. 7. Obsah 7-methyljuglonu v listech *Drosera rotundifolia* (1), *Drosera spathulata* (2) a *Drosera capensis* (3); chromatografické podmínky jako na obr. 1

## Závěr

Byla optimalizována metoda současného stanovení naftochinonů 1,4-naftochinonu, lawsonu, juglonu a plumbaginu technikou HPLC-DAD, která umožnila stanovení těchto látek v pikogramových množstvích. Optimalizovaná metoda byla aplikována na stanovení naftochinonů v rostlinách, které naftochinony běžně obsahují. Optimalizovanou metodou byl nalezen plumbagin v paulovнии plstnaté (*Paulownia tomentosa*), v níž nebyl dosud zjištěn.

*Příspěvek vznikl za podpory IGA FaF VFU IG342012, IGA MZLU 250061/2005 a GAČR č. 525/04/P132.*

## LITERATURA

1. Wagner H.: *Pharmaceutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe*. Gustav Fischer, Stuttgart 1993.
2. Zhong S. M., Waterman P. G., Jeffreys J. A. D.: *Phytochemistry* 23, 1067 (1984).
3. Zakaria M. B., Jeffreys J. A. D., Waterman P. G., Zhong S. M.: *Phytochemistry* 23, 1481 (1984).
4. Dinda B., Das S. K., Hajra A. K.: *Indian J. Chem., Sect. B* 34, 525 (1995).
5. Binder R. G., E. B. M., Flath R. A.: *Phytochemistry* 28, (1989).
6. Budzianowski J.: *Phytochemistry* 42, 1145 (1996).
7. Moore S. B., Hopke N. J.: *Chem. Biochem.* 2, 35 (2001).
8. Premakumari P., Rathinam K., Santhakumari G.: *Ind. J. Med. Res.* 65, 829 (1977).
9. Inbaraj J. J., Chignell C. F.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 55 (2004).
10. Hussain M. A., Gorski M. S.: *Asian J. Plant. Sci.* 3, 177 (2004).
11. Jaiswal A. S., Bloom L. B., Narayan S.: *Oncogene* 21, 5912 (2002).
12. de Paiva S. R., Fontoura L. D., Figueiredo M. R., Mazzei J. L., Kaplan M. A. C.: *Quim. Nova* 25, 717 (2002).
13. Adam V., Petřlová J., Potěšil D., Zehnálek J., Sures B., Trnková L., Jelen F., Kizek R.: *Electroanalysis* 17, 1649 (2005).
14. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Kubáň V.: *Chem. Listy* 97, 1003 (2003).
15. Gupta M. M., Verma R. K., Uniyal G. C., Jain S. P.: *J. Chromatogr.* 637, 209 (1993).
16. Girzu M., Fraise D., Carnat A. P., Carnat A., Lamaison J. L.: *J. Chrom., A* 805, 315 (1998).
17. de Abreu F. C., Tonholo J., Bottecchia O. L., Zani C. L., Goulart M. O. F.: *J. Electroanal. Chem.* 462, 195 (1999).
18. Goulart M. O. F., Falkowski P., Ossowski T., Liwo A.: *Bioelectrochemistry* 59, 85 (2003).
19. Klejdus B., Petřlová J., Potěšil D., Adam V., Mikelová R., Vacek J., Kizek R., Kubáň V.: *Anal. Chim. Acta* 520, 57 (2004).
20. Klejdus B., Vacek J., Adam V., Zehnálek J., Kizek R., Trnková L., Kubáň V.: *J. Chromatogr., B* 806, 101 (2004).
21. Klejdus B., Zehnálek J., Adam V., Petřek J., Kizek R., Vacek J., Trnková L., Roland R., Havel L., Kubáň V.: *Anal. Chim. Acta* 520, 117 (2004).
22. Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
23. Lobstein A., Brenne X., Feist E., Metz N. W. B., Anton R.: *Phytochem. Anal.* 12, 202 (2001).
24. Kreher B., Neszmelyi A., Wagner H.: *Phytochemistry* 29, 605 (1990).
25. Hook I. L. I.: *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 67, 281 (2001).
26. Pakulski G., Budzianowski J.: *Phytochemistry* 41, 775 (1996).
27. Miyoishi E., Shizuri Y., Yamamura S.: *Phytochemistry* 23, 2385 (1984).
28. Teng W. L.: *Plant Cell Rep.* 18, 363 (1999).
29. Repeck M., Galambosi B., Takkunen N.: *Biologia* 55, 429 (2000).

**P. Babula<sup>a</sup>, R. Mikelová<sup>b</sup>, V. Adam<sup>b</sup>, D. Potěšil<sup>b</sup>, J. Zehnálek<sup>b</sup>, R. Kizek<sup>b</sup>, L. Havel<sup>c</sup>, and Z. Sladký<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup>Department of Natural Drugs, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, <sup>b</sup>Department of Chemistry and Biochemistry and <sup>c</sup>Department of Botany and Plant Physiology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno): **Chromatographic Analysis of Naphthoquinones in Plants**

The aim of the work was to optimize the high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector for the determination of naphthoquinones (1,4-naphthoquinone, lawsonone, juglone and plumbagin). The optimal conditions were: mobile phase 0.1 mol l<sup>-1</sup> acetic acid – methanol (35 : 65 v/v), flow rate 0.8 ml min<sup>-1</sup>, column and detector temperature 40 °C. Detection limits (3 S/N) were 65 ng ml<sup>-1</sup>, 50 ng ml<sup>-1</sup>, 75 ng ml<sup>-1</sup> and 39 ng ml<sup>-1</sup> for lawsonone, 1,4-naphthoquinone, juglone and plumbagin, respectively. The optimized method was used for the determination of the mentioned naphthoquinones in plants (*Dionaea muscipula*, *Drosera rotundifolia*, *Drosera spathulata*, *Drosera capensis* and *Paulownia tomentosa*).