



Uniwersytet  
Gdański



# Katedra Analizy Środowiska

## Zaawansowana Chemia

### Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

Gdańsk, 2024



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

Znaczna część współczesnych analiz chemicznych, wykonywanych np. w laboratoriach badawczych i diagnostycznych, a także na potrzeby przemysłu farmaceutycznego czy spożywczego, opiera się na różnych technikach chromatograficznych. Pozwalają one na rozdzielenie składników mieszaniny, oczyszczenie związków badanych, a także - w różnym zakresie - na ich identyfikację i analizę ilościową. Stosowane są tu zarówno techniki bardzo proste i tanie (np. chromatografia cienkwarstwowa TLC), jak i kosztowne techniki sprzężone. Zastosowanie technik analitycznych o różnym poziomie skomplikowania i różnym koszcie pozwala obniżyć cenę pojedynczego oznaczenia i lepiej wykorzystać aparaturę badawczą. W przypadku dużych serii rutynowych analiz (np. oznaczanie substancji zabronionych w sporcie w płynach ustrojowych pobranych od zawodników) proste testy przesiewowe stosować można do wstępnego wytypowania próbek, które należy analizować dalej z wykorzystaniem technik instrumentalnych, np. wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Ostatnim ogniwem tego łańcucha są najbardziej kosztowne techniki pozwalające na jednoznaczne i bezsporne potwierdzenie obecności związków badanych w próbce, np. chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS).

### 1. Cel ćwiczenia:

W ramach ćwiczeń Studenci zapoznają się z metodami confirmacyjnymi i screeningowymi, wykorzystywanymi do wykrywania/lub i oznaczania wybranych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych.

- 1.1 Zastosowanie technik GC-FID i TLC do wykrywania skopolaminy w napojach (zajęcia 1)
- 1.2 Zastosowanie techniki SPE-HPLC-UV do oznaczania *N*-metyloefedryny w próbce krwi (zajęcia 2)
- 1.3 Zastosowanie szybkich testów do wykrywania wybranych alkaloidów w napojach (zajęcia 3)

Studenci zobowiązani są do zapoznania się z budową i zasadą działania chromatografu cieczowego i gazowego, podstawami chromatografii cienkwarstwowej, z podstawami techniki ekstrakcji do fazy stałej oraz metodami analizy ilościowej, stosowanymi w chromatografii, przedstawionymi w skrypcie pt. „Techniki Separacyjne” dostępnym pod adresem:

[https://chemia.ug.edu.pl/sites/chemia.ug.edu.pl/files/\\_nodes/strona/33539/files/techniki\\_separacyjne.pdf](https://chemia.ug.edu.pl/sites/chemia.ug.edu.pl/files/_nodes/strona/33539/files/techniki_separacyjne.pdf)



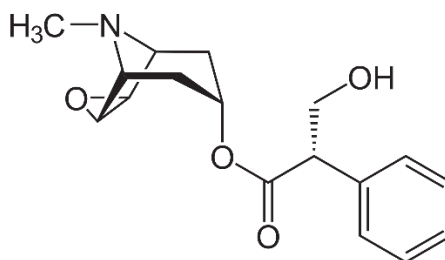
## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

### 2. Obiekt badań

#### 2.1 Skopolamina

Skopolamina (hioscyna, Rys. 1) jest alkaloidem tropanowym, który wraz z atropiną występuje w niektórych roślinach z rodziny psiankowatych (Solanaceae), np. w bieluniu dziędzierzawie (*Datura stramonium*) czy w tzw. trąbach anielskich (*Brugmansia suaveolens*), uprawianych jako roślina ozdobna. Związek ten bywa stosowany jako lek, ze względu na swoją aktywność jako antagonistą ośrodkowych i obwodowych receptorów muskarynowych mięśni gładkich oraz mięśnia sercowego. Skopolamina jest zatem używana w leczeniu stanów skurczowych mięśni gładkich, wykazuje także działanie przeciwwymiotne. Jednocześnie jednak, ze względu na znaczny wpływ na układ nerwowy (m.in. działanie halucynogenne, powodowanie senności oraz zaników pamięci), konieczne jest stosowanie takich form chemicznych tego związku, które nie przekraczają bariery krew – mózg (np. butylobromku). Podawana jest w formie tabletek lub plastrów. Poza zastosowaniem skopolaminy jako leku, znane są przypadki przyjmowania lub podania tego związku lub roślin go zawierających w celu popełnienia samobójstwa, zabójstwa lub innego przestępstwa, a w przeszłości także stosowania przez służby specjalne jako tzw. serum prawdy.



Rys. 1. Struktura chemiczna skopolaminy

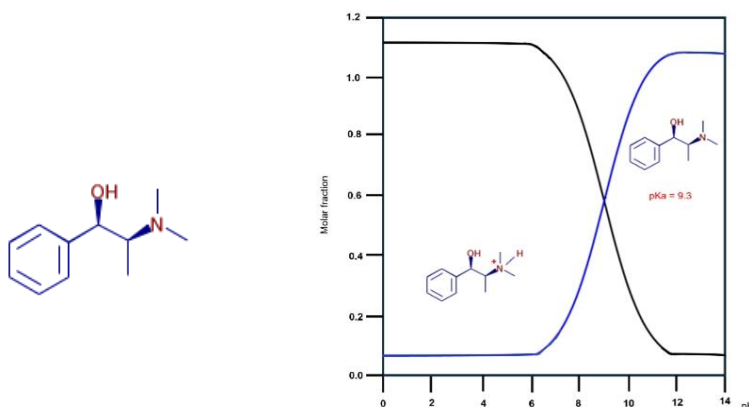
Skopolamina, wykorzystywana w celach przestępczych do przejmowania kontroli nad ludźmi, w tym pozbawiania ich świadomości, została okrzyknięta jednym z najbardziej niebezpiecznych preparatów psychoaktywnych na świecie[Motyka et al. 2015]. Ze względu na fakt, że substancja ta najczęściej podawana jest w napojach/drinkach, zasadne jest wdrożenie prostych i jednoznacznych metod stwierdzania jej obecności w takich matrycach, w tym w napojach zawierających inne substancje klasyfikowane jako alkaloidy.

## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

### 2.2. *N*-metyloefedryna

Alkaloidy efedryny, będące typowymi stymulantami, występującymi w kilku gatunkach roślin, znajdują się na liście substancji zabronionych przez Światową Agencję Antydopingową. Zaliczane do nich: efedryna, metyloefedryna (Rys. 2), pseudoefedryna, metylopseudoefedryna, norefedryna oraz katyna, są aminami sympatykomimetycznymi stosowanymi w schorzeniach astmy i oskrzeli. Substancje te wchodziły w skład leków na przeziębienie dostępnych bez recepty [Kojima et al. 2016]. Warto wspomnieć, że w przypadku efedryny czy metyloefedryny, ustalone są wartości progowe (stężenie w moczu > 10 µg/ml), dopiero powyżej których związki te zaliczane są do kategorii stymulantów [Segura et al. 2008].



Rys. 2. Struktura chemiczna *N*-metyloefedryny ( $pK_a = 9,3$ ) oraz jej formy jonowe w zależności od pH roztworu

Badaniom na zawartość środków antydopingowych poddaje się różne płyny ustrojowe. Rutynowo wykorzystywanym do badań antydopingowych materiałem jest mocz.

### 2.3. Identyfikacja i oznaczanie aktywnych biologicznie alkaloidów

Analiza próbek różnego pochodzenia pod kątem obecności substancji z grupy alkaloidów jest zazwyczaj dwuetapowa. Pierwszym etapem jest zastosowanie szybkich metod screeningowych, w celu wskazania obecności lub braku badanego związku (np. charakterystycznych reakcji strąceniowych/barwnych (Tabela 1), podczas których powstają trudno rozpuszczalne w wodzie osady



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

– głównie sole proste amin lub ich związki kompleksowe, czy też testów immunoenzymatycznych) oraz czułe i selektywne metody confirmacyjne.

Tabela 1. Zestawienie najpopularniejszych odczynników wykorzystywanych w reakcjach strąceniowych alkaloidów wraz z wynikiem reakcji [Kasprzykowska et. al.. 2010].

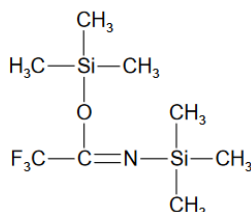
Odczynnik	Wynik reakcji
odczynnik Mayera (jodortęcian potasowy)	biały lub żółtawy osad
odczynnik Dragendorffa (jodobizmutan (III) potasowy)	żółtopomarańczowe lub czerwone osady
Odczynnik Chen-Kao (siarczan (VI) miedzi (II))	Niebieski/zielony osad
odczynnik Wagnera (roztwór jodu w wodnym roztworze jodku potasowego)	jasnokawowe lub ciemnobrunatne kłaczkowate osady
kwasy pikrynowy (nasycony na zimno roztwór wodny)	żółty, krystaliczny lub bezpostaciowy osad
odczynnik Sonnenscheina (kwas molibdenianofosforowy)	jasno żółte lub brunatno-żółte bezpostaciowe osady zmieniające barwę na błękitną lub zieloną
odczynnik Scheiblera (kwas wolframianofosforowy)	kłaczkowate osady
kwasy chloroplatynowy	jasnożółte lub pomarańczowe osady

Niektóre substancje, takie jak salbutamol, morfina, katyna, efedryna, metyloefedryna, pseudoefedryna i karboksy-tetrahydrokanabinol wymagają przeprowadzenia pomiaru ilościowego, gdyż uznawane są za substancje zabronione tylko powyżej stężenia progowego. Do metod confirmacyjnych zalicza się przede wszystkim techniki chromatograficzne: chromatografię gazową (GC, ang. *Gas chromatography*) lub cieczową (LC, ang. *Liquid chromatography*), najlepiej sprzężone ze spektrometrią mas (MS, ang. *Mass spectrometry*). Analiza alkaloidów z wykorzystaniem tych technik jest zwykle poprzedzona wieloetapową procedurą ekstrakcji analitów z wybranej matrycy. W przypadku techniki GC, niezbędnym krokiem jest zwykle także derywatywacja alkaloidów do odpowiednich lotnych trimetylosililowych (TMSi) pochodnych, zsyntezowanych przy użyciu wielu popularnych odczynników, m. in. *N,O*-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamidu (BSTFA) (Rys. 3) [Śramska et al. 2017].



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych



Rys. 3. Wzór strukturalny *N,O*-bis(trimetylosilylo)trifluoroacetamidu (BSTFA)

Do technik stosowanych zarówno w metodzie screeningowej jak i confirmacyjnej należy chromatografia cienkowarstwowa (TLC, ang. *Thin Layer Chromatography*). Wśród podstawowych zalet tej techniki wymienić można niski koszt, krótki czas analizy oraz niewielkie zużycie rozpuszczalników.

### III. Wykonanie ćwiczenia

#### Zajęcia 1

##### 3.1 Zastosowanie technik GC-FID i TLC do wykrywania skopolaminy w napojach

###### 3.1.1 Ekstrakcja skopolaminy z napojów

- do 6 cylindrów miarowych wprowadzić po 25 ml (1) coca coli, (2) coca coli z dodatkiem skopolaminy, (3) toniku, (4) toniku z dodatkiem skopolaminy, (5) herbaty z pokrzywy oraz (6) herbaty z pokrzywy z dodatkiem skopolaminy;
- zalkalizować wszystkie próbki przy użyciu kilku kropel wody amoniakalnej i sprawdzić pH za pomocą papierków lakmusowych;
- wykonać ekstrakcję ciecz-ciecz w rozdzielaczu za pomocą 15 ml chloroformu. Zebrać **warstwę organiczną (dolną)** do kolby stożkowej;
- wprowadzić ponownie 15 ml chloroformu do rozdzielacza i wytrząsać przez kilka sekund regulując ciśnienie. Zebrać warstwę chloroformową do tej samej kolby stożkowej;
- usunąć pozostałą w rozdzielaczu warstwę wodną, zastępując ją zebraną frakcją chloroformową;
- zubożyć roztwór poprzez przeprowadzenie trzykrotnego wytrząsania warstwy organicznej z 25 ml wody dejonizowanej (3 x po 25 ml świeżej porcji wody).
- przesączyć zebrane frakcje organiczne do kolby sercowki po uprzednim przesączeniu przez środek suszący oraz zatężyć do objętości 1 ml na odparowywaczu obrotowym.
- wykonać analizę TLC oraz GC uzyskanych ekstraktów.



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

### 3.1.2 Analiza TLC ekstraktów

- przygotować 3 płytki chromatograficzne, pokryte żelem krzemionkowym, o wymiarach: 4 x 6,5 cm
- Na każdej płytce zaznaczyć na linii startu ołówkiem 4 pkt. Następnie, na każdej płytce wprowadzić punktowo za pomocą kapilary chloroformowy roztwór skopolaminy o  $C = 1 \text{ mg/ml}$  oraz parę ekstraktów: ekstrakt z coli i coli wzbogaconej skopolaminą (płytką 1); ekstrakt z toniku oraz z toniku wzbogaconego skopolaminą (płytką 2); ekstrakt z herbaty z pokrzywy oraz herbaty z pokrzywy wzbogaconej skopolaminą (płytką 3);
- Przygotować 10 ml fazy ruchomej: chloroform: metanol:  $\text{H}_2\text{O}$ : woda amoniakalna (7:3:0.4:0.2, v/v/v/v);
- 3 komory chromatograficzne napełnić 3 ml fazy ruchomej, przykryć wieczkiem i pozostawić na 3 min w celu wysycenia parami rozpuszczalnika;
- Wprowadzić płytki do komór i rozwijać chromatogramy do momentu, gdy czoło rozpuszczalnika znajdzie się w odległości 1 cm od górnego brzegu płytki;
- wyjąć i wysuszyć płytki. Po rozwinięciu spryskać obficie odczynnikiem Dragendorffa. Czynność powtórzyć dwukrotnie. Po spryskaniu, plamy alkaloidów barwią się na pomarańczowo.
- wyznaczyć współczynniki opóźnienia  $R_F$ .

### 3.1.3 Analiza GC-FID ekstraktów

#### 3.1.3.1 Derywatywacja

Składniki uzyskanych ekstraktów oraz wzorzec skopolaminy należy przeprowadzić w lotne, trimetylosililowe pochodne za pomocą mieszaniny sililującej BSTFA/TMCS (99:1).

- **po 50  $\mu\text{l}$**  każdego z ekstraktów oraz **50  $\mu\text{l}$**  roztworu wzorcowego skopolaminy (o stężeniu  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) przenieść do oddzielnych, zakręcanych buteleczek i odparować w strumieniu azotu do sucha;
- dodać **po 50  $\mu\text{l}$**  odczynnika sililującego i ogrzewać w temperaturze  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  przez 10 min (buteleczki przed umieszczeniem w bloczku grzejmym należy dodatkowo zabezpieczyć taśmą teflonową).
- po ostudzeniu wykonać analizę GC w warunkach opisanych w rozdziale 3.1.3.2.



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

### 3.1.3.2 Wykrywanie skopolaminy techniką GC-FID

Wykonać analizę chromatograficzną roztworu wzorcowego skopolaminy oraz ekstraktów zgodnie z poniższymi warunkami:

Chromatograf Shimadzu GC-2010 z detektorem FID

- Kolumna chromatograficzna RTX-5 30 m, 0,25 mm średnica wewnętrzna, 0,25  $\mu\text{m}$  grubość fazy stacjonarnej,
- Program temperaturowy: 200 - 300  $^{\circ}\text{C}$ , narost 8 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ,
- Temperatura dozownika: 300  $^{\circ}\text{C}$ ,
- Temperatura detektora: 300  $^{\circ}\text{C}$ ,
- Dzielnik przepływu: 1:20,
- Gaz nośny: argon, stały przepływ 1 ml  $\text{min}^{-1}$ ,
- Ciśnienie gazów: powietrze: 350 kPa, wodór: 35 kPa
- Czas analizy: 12,5 min

## Zajęcia 2

### 3.2 Zastosowanie techniki SPE-HPLC-UV do oznaczania *N*-metyloefedryny w próbce krwi

#### 3.2.1 Ekstrakcja *N*-metyloefedryny z próbek krwi

Podczas eksperymentu zostaną wykorzystane dwie procedury ekstrakcji SPE. Ekstrakcji należy poddać 2 próbki (wzbogaconą analitem i ślepią próbę). W celu przygotowania próbek wzbogaconych, do 2 próbek krwi ( $V=5$  ml) umieszczonych w plastikowych falkonach, należy wprowadzić za pomocą strzykawki odpowiednią objętość roztworu podstawowego *N*-metyloefedryny o stężeniu 1 mg/ml, aby ilość związku w próbce wyniosła 50  $\mu\text{g}$ .

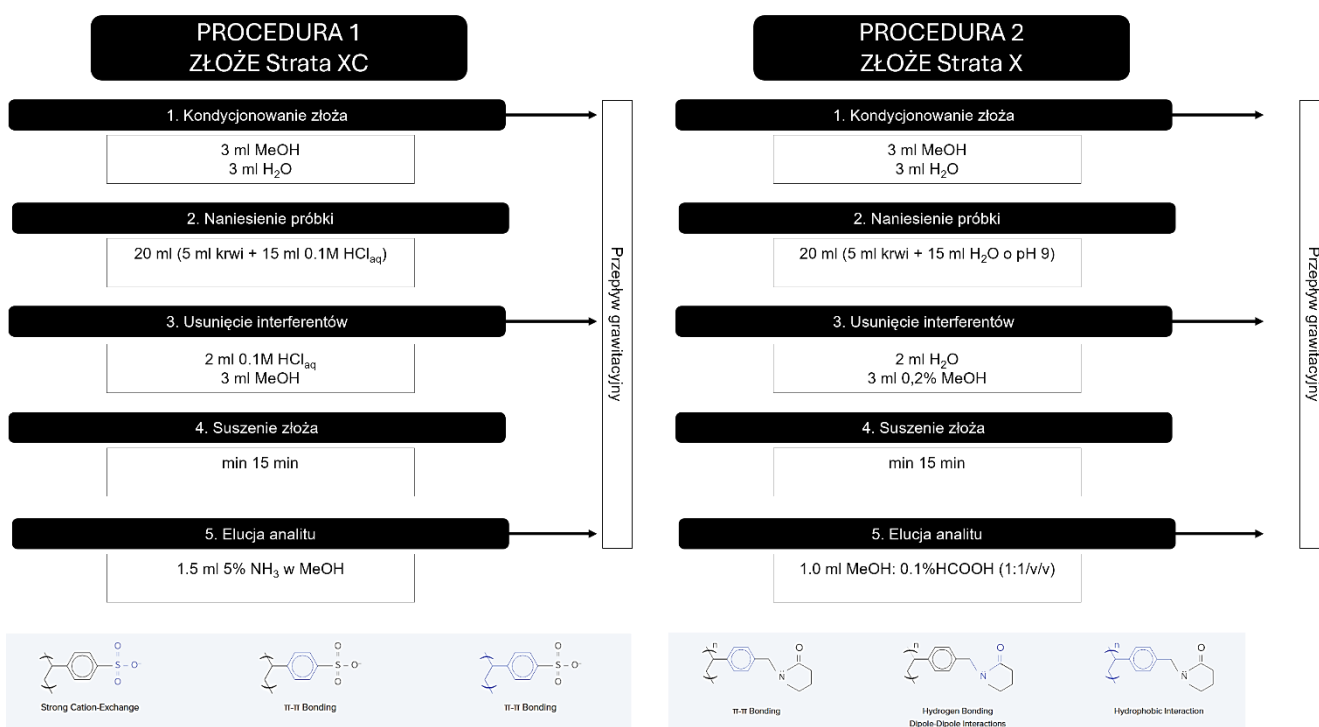
W następnej kolejności do dwóch próbek krwi (wzbogaconej i ślepej) wprowadzić po 15 ml roztworu 0.1M  $\text{HCl}_{\text{aq}}$ , a do pozostałych dwóch po 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  doprowadzonej do pH 9 za pomocą NaOH. Zawartość dokładnie wymieszać korzystając z wytrząsarki orbitalnej. Probki krwi nanieść za pomocą



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

pipet Pasteura na uprzednio przygotowane (skondycjonowane) złoża SPE, umieszczone na szklanych kolbach. Procedury ekstrakcji zostały przedstawione na Rys 4.



**Rys. 4.** Procedury ekstrakcji *N*-metylofedryny z próbki krwi z wykorzystaniem techniki SPE ([zmodyfikowane: Zhang et al. 2014]) wraz z strukturami złożeń SPE i charakterystycznymi oddziaływaniami fizykochemicznymi.

Uzyskane eluaty odparować w strumieniu azotu do sucha. Następnie suchą pozostałość rozpuścić w 1ml mieszaniny MeOH:0.1%HCOOH<sub>aq</sub> (1:1, v/v) i przefiltrować do osobnych naczynek chromatograficznych z wykorzystaniem filtrów strzykawkowych. Na koniec ćwiczeń laboratoryjnych wykonać analizę HPLC przygotowanych próbek w warunkach przedstawionych w sekcji 3.2.2. Identyfikacji analitu dokonać na podstawie czasu retencji. Zawartość *N*-metylofedryny w próbce krwi wyznaczyć korzystając z równania krzywej kalibracyjnej.



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

### 3.2.2 Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

Z metanolowego roztworu podstawowego *N*-metyloefedryny o stężeniu 1 mg/ml przygotować 6 roztworów roboczych o stężeniu: 0 µg/ml, 10 µg/ml; 30 µg/ml, 50 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml. W tym celu, metanolową porcję roztworu podstawowego, pobranego za pomocą szklanej strzykawki, umieszczoną w naczynku chromatograficznym, odparować w strumieniu azotu do sucha, a następnie suchą pozostałość rozpuścić w 1 ml mieszaniny MeOH:0.1% HCOOH<sub>aq</sub> (1:1, v/v). Wykonać dwukrotną analizę HPLC-UV roztworów wzorcowych *N*-metyloefedryny zgodnie z poniższymi warunkami:

- Kolumna chromatograficzna: Hypersil Gold C18 aq
- Faza ruchoma: (B) MeOH; (A) 0.1% HCOOH<sub>aq</sub>
- Program elucji: izokratyczny: 42 % B 58% A
- Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej: 1 ml min<sup>-1</sup>
- Analityczna długość fali: 210 nm

Sporządzić wykres zależności powierzchni sygnału chromatograficznego analitu od stężenia. Wyznaczyć równanie krzywej kalibracyjnej oraz wartość współczynnika R<sup>2</sup>.

### 3.2.3 Ocena skuteczności ekstrakcji

Wiedząc, że przy 100% efektywności ekstrakcji stężenie *N*-metyloefedryny w ekstrakcie wyniosłoby 50 µg/ml należy ocenić wartość odzysku analitu korzystając z poniższych zależności:

$$AR = \frac{P_{przed-ext} - P_{ślepa}}{P_{wzorca}} \times 100\% \quad (1)$$

Gdzie AR – odzysk; P<sub>przed-ext</sub> – pole powierzchni analitu zarejestrowane w próbce wzbogaconej substancją przed ekstrakcją; P<sub>ślepa</sub> – pole powierzchni analitu zarejestrowane w próbce niewzbogaconej; P<sub>wzorca</sub> – pole powierzchni analitu zarejestrowane dla próbki wzorcowej.

$$AR = \frac{C_{ext}}{C_{wzorca}} \times 100\% \quad (2)$$

Gdzie AR – odzysk; C<sub>ext</sub> – stężenie analitu wyznaczone w próbce z wykorzystaniem równania krzywej kalibracyjnej; C<sub>wzorca</sub> – stężenie nominalne.



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

### Zajęcia 3

#### 3.3. Zastosowanie szybkich testów do wykrywania alkaloidów w napojach

Wykonać szybkie próby jakościowe zarówno z odczynnikiem Chen-Kao jak i Dragendorffa dla próbek napojów (coca coli, toniku, herbaty z pokrzywy) według procedury opisanej poniżej. Jako próbę odniesienia wykorzystać wodny roztwór skopolaminy o stężeniu  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ .

##### Reakcja z odczynnikiem Dragendorffa:

- do 7 probówek szklanych wprowadzić za pomocą pipety po 2 ml coca coli, coca coli wzbogaconej skopolaminą, toniku, toniku wzbogaconego skopolaminą, herbaty z pokrzywy, herbaty z pokrzywy wzbogaconej skopolaminą oraz wodnego roztworu skopolaminy;
- dodać po 500  $\mu\text{l}$  odczynnika Dragendorffa do każdej z próbek;
- wytrząsać przez 1 min;
- odstawić na 2 min.

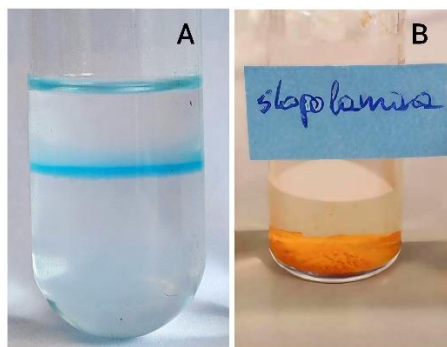
##### Reakcja z odczynnikiem Chen-Kao:

- do 7 probówek szklanych wprowadzić za pomocą pipety po 2 ml coca coli, coca coli wzbogaconej skopolaminą, toniku, toniku wzbogaconego skopolaminą, herbaty z pokrzywy, herbaty z pokrzywy wzbogaconej skopolaminą oraz wodnego roztworu skopolaminy;
- dodać po 0,4 ml 2%  $\text{CuSO}_4$  i 4-6 krople 15% roztworu  $\text{NaOH}$  do każdej z próbek;
- wytrząsać przez 1 min;
- dodać po 4 ml eteru dietylowego do każdej probówki;
- wytrząsać ponownie przez 1 min;
- odstawić na 15 min

**Pojawienie się niebieskiej lub zielonej warstwy (A) oraz żółtopomarańczowego lub czerwonego osadu (B) świadczy o obecności alkaloidów w próbce (Rys. 5).**

## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych



**Rys. 5.** Pozytywny wynik reakcji chemicznych skopolaminy z siarczanem miedzi (II) [A] i odczynnikiem Dragendorffa [B].

W przypadku zaobserwowania pozytywnych wyników w ślepych próbach oraz obecności dodatkowych substancji na płytkach TLC (zajęcia 1) wykonać szybkie testy dla roztworów wzorcowych innych alkaloidów oraz analizy GC-FID roztworów wzorcowych innych alkaloidów po derywatywacji (punkt 3.1.3.1).

### Sprawozdanie:

- Przetwócić w formie schematu blokowego część eksperymentalną (procedury ekstrakcji, identyfikacji i oznaczania alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych z uwzględnieniem warunków przeprowadzonych etapów/analiz);
- Dokonać identyfikacji analitów na podstawie współczynników opóźnienia (TLC) oraz czasu retencji (GC i HPLC);
- Omówić wyniki z szybkich testów oraz ocenić ich przydatność w analityce alkaloidów;
- Wyznaczyć stężenie *N*-metyloefedryny w ekstraktach z krwi oraz ocenić efektywność ekstrakcji;
- Wyznaczyć instrumentalną granicę oznaczalności i wykrywalności metody z poniższych zależności:

$$LOQ = \frac{10xSD}{b}$$

$$LOD = \frac{3,3xSD}{b}$$

gdzie: LOQ – instrumentalna granica oznaczalności [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]; LOD – instrumentalna granica wykrywalności [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]; SD – odchylenie standardowe wyrazu wolnego; b – wartość wyrazu wolnego

- Przedstawić chromatogramy zarejestrowane podczas zajęć;



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

- Na podstawie cen odczynników oraz faz ruchomych oszacować koszt analiz, wykonanych różnymi technikami.

## Literatura

- Kasprzykowska, R.; Kołodziejczyk, A.S. *Skrypt z Chemii Leków, Uniwersytet Gdański*; 2010; ISBN 978-83-7326-713-8.
- Motyka, M.; Marcinkowski, J.T. Nowe Metody Odurzania Się. Cz. IX. Skopolamina – Nienowy Lek Wkomponowywany w Nowe Preparaty Stosowane w Celach Przystępczych: „oddech Diabła”. *Probl Hig Epidemiol* **2015**, *96*, 839–844.
- Segura J, Ventura R, Marcos J, Gutiérrez Gallego R. Chapter 21 Doping substances in human and animal sport. *Handb Anal Sep.* 2008;6:699–744.
- Śramka, P.; Maciejka, A.; Topolewska, A.; Stepnowski, P.; Haliński, Ł.P. Isolation of Atropine and Scopolamine from Plant Material Using Liquid-Liquid Extraction and EXTrelut® Columns. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1043*, 202–208,
- Zhang L, Wang ZH, Li H, Liu Y, Zhao M, Jiang Y, et al. Simultaneous determination of 12 illicit drugs in whole blood and urine by solid phase extraction and UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2014;955–956(1):10–9.

## Szkło, odczynniki i akcesoria

- Bezwodny siarczan magnezu
- Bezwodny siarczan sodu
- Chloroform (250 ml)
- 1 M NaOH (50 ml)
- 1 M HCl (50 ml)
- Metanol (25 ml)
- Metanol do osuszania szkła
- 25% roztwór wody amoniakalnej (10 ml)
- Herbata z pokrzywy – blank (50 ml)
- Herbata z pokrzywy – wzbogacona skopolaminą (50 ml)
- Coca cola – blank (50 ml)
- Coca cola – wzbogacona skopolaminą (50 ml)
- Tonik – blank (50 ml)
- Tonik – wzbogacony skopolaminą (50 ml)
- odczynnik siliujący: 99% BSTFA + 1% TMCS



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

- odczynnik Dragendorffa (10 ml)
- Eter dietylowy (50 ml)
- wodny roztwór skopolaminy o stężeniu  $1 \text{ mg ml}^{-1}$
- chloroformowy roztwór skopolaminy o stężeniu  $1 \text{ mg ml}^{-1}$
- Metanolowy roztwór *N*-metyloefedryny o stężeniu  $1 \text{ mg ml}^{-1}$
- 5%  $\text{NH}_3$  w MeOH (10 ml)
- 0.1M  $\text{HCl}_{\text{aq}}$  (50 ml)
- MeOH (50 ml)
- 0.1% HCOOH (100 ml)
- 0.1% HCOOH (1000 ml) - odgazowana
- MeOH (2000 ml) - odgazowany
- Woda odgazowana (1000 ml)
- 2%  $\text{CuSO}_4$  (10 ml)
- 15% NaOH (10 ml)
- rozdzielacz poj. 100 ml – 6 szt
- statyw – 6 szt
- łapy – 6 szt
- bloczek grzejny
- kolby stożkowe z korkiem poj. 100 ml – 6 szt
- kolby sercowe z korkiem poj. 100 ml – 6 szt
- kapilarki
- cylinder miarowy poj. 50 ml – 6 szt
- cylinder miarowy poj. 25 ml – 6szt
- cylinder miarowy  $V = 10 \text{ ml}$  – 4 szt
- zlewka  $V = 100 \text{ ml}$  – 3 szt
- reduktor do odparowywacza
- pipety Pasteura + smoczki
- bagietka szklana
- lejek średni – 6 szt. + pasujące sączki
- pipeta  $V = 5 \text{ ml}$  (4 szt.)
- pipeta  $V = 1 \text{ ml}$  (4 szt)
- pipeta  $V = 2 \text{ ml}$  (2 szt)
- buteleczki ciemne poj. 2 ml – 15 szt
- probówki szklane 15 szt



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

- 3 komory chromatograficzne do TLC
- buteleczka do spryskiwania
- Kolumnienki Strata XC (200 mg/3ml; 2 szt)
- Kolumnienki Strata X (200 mg/3ml; 2 szt)
- Kolby szklane do SPE (4 szt)
- Vortex
- Zestaw do odparowywania pod azotem
- Falkony z 5 ml krwi (4 szt)
- Cylinder miarowy 50 ml (2 szt)
- Filtry strzykawkowe (4 szt)
- Strzykawki do filtrów strzykawkowych (4 szt)
- Bagietka szklana (2 szt)
- Naczynka chromatograficzne (1,5 ml, 10 szt)
- Strzykawki do HPLC (2 szt, 50 ml i 100 ml)
- Pipety miarowe 2 ml (2 szt)
- Pipety miarowe 1 ml (2 szt)
- Pipety miarowe 5 ml (2 szt)
- Cenki
- Bibuła laboratoryjna ochronna
- płytki do TLC *silica gel 60* firmy Merck
- papierki lakmusowe
- łyżka metalowa
- ołówek
- linijka
- nożyczki
- metalowa pęseta
- podstawki pod kolby sercówki
- taśma teflonowa
- cenki
- zbiornik na zlewki
- pH-metr
- bloczek grzejny
- strzykawka do GC poj. 10  $\mu$ l – 1 szt



## Zaawansowana chemia

Wykorzystanie technik chromatograficznych i szybkich testów do oznaczania biologicznie aktywnych alkaloidów w napojach i płynach ustrojowych

- strzykawka do GC poj. 100  $\mu$ l – 1 szt