

**Tomasz MODZELEWSKI, Elżbieta WŁODARCZYK, Filip B. HARASIMIUK, Magdalena B. ZARZYCKA, Michał BARAN, Paweł K. ZARZYCKI**  
POLITECHNIKA KOSZALIŃSKA, WYDZIAŁ BUDOWNICTWA I INŻYNIERII ŚRODOWISKA,  
KATEDRA BIOLOGII ŚRODOWISKOWEJ, ZAKŁAD TOKSYKOLOGII I BIOANALITYKI

## Prosty przyrząd do wizualizacji plamek w chromatografii cienkowarstwowej w warunkach podwyższonej temperatury

**Dr inż. Tomasz MODZELEWSKI**

Absolwent Wydziału Biologii, Geografii i Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego (1985). Jest specjalistą w zakresie toksykologii metali ciężkich, zwłaszcza ich akumulacji w tkankach organizmów żywych. Prowadzi badania nad sposobami analizy metali ciężkich w środowiskach wodnych, z wykorzystaniem metod opartych o techniki absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej (ASA) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).



**Mgr Magdalena B. ZARZYCKA**

Absolwentka Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku (1992). Obecnie słuchaczka Studiów Doktoranckich na Wydziale Budownictwa i Inżynierii Środowiska Politechniki Koszalińskiej. Prowadzi badania nad zastosowaniem termostatowanej mikrochromatografii cienkowarstwowej dla celów analizy farmaceutycznej, głównie hormonów sterydowych oraz barwników chlorofilowych w złożonych preparatach farmaceutycznych.



*e-mail: mbzarz@wp.pl*

**Mgr inż. Elżbieta WŁODARCZYK**

Absolwentka Wydziału Rolniczego Akademii Rolniczej w Szczecinie (1999). Obecnie wykonuje pracę doktorską dotyczącą występowania oraz degradacji substancji typu Endocrine Disrupting Compounds w ściekach sztucznych, naturalnych oraz wodach powierzchniowych Pomorza Środkowego. Posiada duże doświadczenie w pracy badawczej z użyciem zaawansowanych technik separacyjnych, włączając w to techniki ekstrakcji na fazie stałej oraz zależną od temperatury wysokosprawną chromatografię cieczową.



*e-mail: ewlod@wbiis.tu.koszalin.pl*

**Dr Michał BARAN**

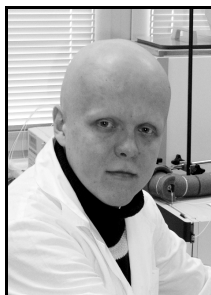
Absolwent Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego (1995). Specjalizuje się w genetyce oraz biologii komórki. Posiada duże doświadczenie zawodowe związane z problemami endokrynologii oraz fizjologii okresu okołoporodowego i postnatalnego zwierząt gospodarskich. Obecnie zainteresowania naukowe dotyczą opracowywania nowych metod analitycznych opartych o kolumnową i cienkowarstwową chromatografię cieczą oraz elektroferezę mikrokradłową.



*e-mail: michalba@wbiis.tu.koszalin.pl*

**Mgr inż. Filip B. HARASIMIUK**

Absolwent Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Akademii Rolniczej w Szczecinie (2006). Obecnie słuchacz Studiów Doktoranckich na Wydziale Budownictwa i Inżynierii Środowiska Politechniki Koszalińskiej. Swoje badania koncentruje nad analizą fulerenów C60/C70 metodą wysokosprawnej mikrochromatografii cienkowarstwowej w warunkach kontrolowanej temperatury oraz oceną wybranych procesów technologicznych za pomocą nowych metod mikroseparacyjnych.



*e-mail: filiphk@wbiis.tu.koszalin.pl*

**Dr hab. Paweł K. ZARZYCKI**

Absolwent Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku (1989). Obecnie kierownik Zakładu Toksykologii i Bioanalitiky w Katedrze Biologii Środowiskowej Politechniki Koszalińskiej. Główne zainteresowania naukowe dotyczą efektu termochromowego w chemii supramolekularnej oraz wykorzystania procesów separacyjnych w chemii analitycznej. Jest autorem i współautorem ponad 140 komunikatów naukowych, w tym 53 prac opublikowanych w czasopiśmie z tzw. listy filadelfijskiej.



*e-mail: pkzarz@wp.pl*

### Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań nad prostym urządzeniem stabilizującym temperaturę płytek chromatograficznych wywoływanych w warunkach podwyższonej temperatury np. we wnętrzu ciepłarki z grawitacyjnym obiegiem powietrza. Umożliwia ono precyzyjną kontrolę temperatury wygrzewania płytek, pomimo znacznych wahań temperatury powietrza oraz nierównomiernego rozkładu temperatury wewnątrz ciepłarki. Element stabilizujący temperaturę wykorzystano w badaniach nad optymalizacją parametrów wywoływania cholesterolu na płytkach typu HPTLC RP18W.

**Słowa kluczowe:** temperatura, chromatografia cienkowarstwowa, detekcja, kwas fosfomolibdenowy, cholesterol.

### Simple device for TLC spots visualisation at elevated temperatures

#### Abstract

The temperature inside commonly used gravity convection ovens is stable enough for drying or sterilizing applications, because the total heating time is long. In case of TLC application the typical heating time is relatively short. Usually is ranging from 5 to 10 minutes. Therefore, the rate of heating and drop in temperature after the oven door opening are playing important role for the average temperature of the chromatographic plate. In this communication we are discussing the use of the simple aluminium made temperature-stabilizing device that can be used for robust visualization

of chromatographic spots on the TLC plates. The device can be placed inside of any gravity convection ovens. Using this small unit the TLC chromatograms can be detected under stable and reproducible temperature conditions.

**Keywords:** temperature, planar chromatography, detection, phosphomolybdenic acid, cholesterol.

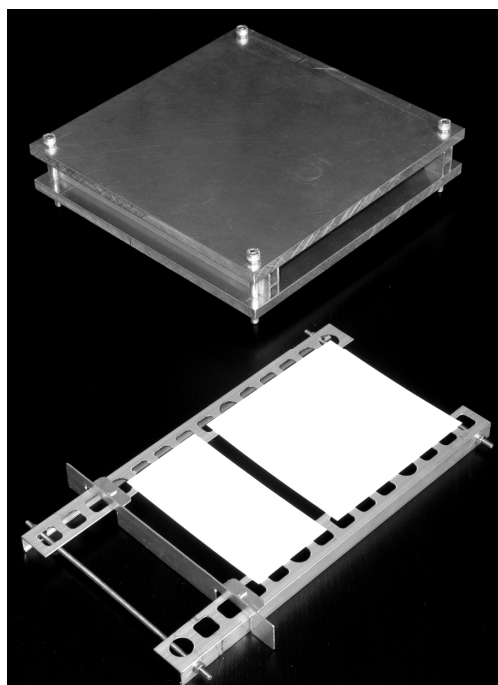
### 1. Wstęp

Ocena ilościowa wyników uzyskanych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej wymaga zastosowania procesów wspomagających wizualizację. Nie dotyczy to substancji barwnych lub rozwijanych na płytkach ze wskaźnikami detekcyjnymi. W przypadku substancji przezroczystych w zakresie promieniowania widzialnego oraz ultrafioletowego, jedną z częściej stosowanych metod jest pokrycie płytki odpowiednim roztworem detekcyjnym (np. metanolem roztworem kwasu fosfomolibdenowego), a następnie wygrzanie w odpowiedniej temperaturze [1-3]. Do wygrzewania stosuje się zazwyczaj laboratoryjne suszarki lub sterylizatory powietrzne. Są one wyposażone w dwie lub trzy grzałki oraz termostat, a obieg powietrza jest jedynie konwekcyjny. Uzyskanie w takim procesie stabilnej temperatury wygrzewania jest trudne, a temperatura płytki ma bezpośrednie przełożenie na powtarzalność wyników. Ma to szczególne znaczenie

nie przy zastosowaniu techniki chromatografii planarnej w analizie ilościowej próbek wieloskładnikowych, w których oznaczane anality znacznie różnią się stężeniem i występują w otoczeniu substancji maskujących [4-7].

## 2. Część eksperymentalna

Blok stabilizujący temperaturę płytek chromatograficznych umieszczono w standardowym sterylizatorze SP-65G z konwekcyjnym obiegiem powietrza. Pomiary prowadzono w zakresie temperatur od 40 do 140 °C monitorując wnętrze sterylizatora, powierzchnię szklanej płytki TLC pokrytej żelom krzemionkowym oraz blok stabilizujący (rysunek 1 i 2).



Rys. 1. Blok aluminiowy wraz ze stelażem na płytki TLC  
Fig. 1. Aluminium unit and TLC plates holder



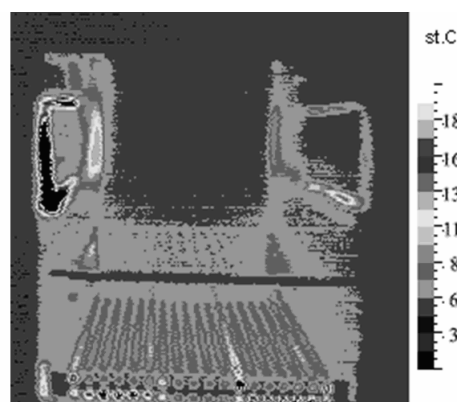
Rys. 2. Blok aluminiowy umieszczony wewnątrz sterylizatora SP-65G z grawitacyjnym obiegiem powietrza  
Fig. 2. Aluminium unit placed inside gravity convection air oven SP-65G

Element ten został wykonany z płyt aluminiowych grubości 6mm oddalonych od siebie o 20 mm. Płytkę TLC umieszczono we wnętrzu bloku przy pomocy aluminiowego rusztu.

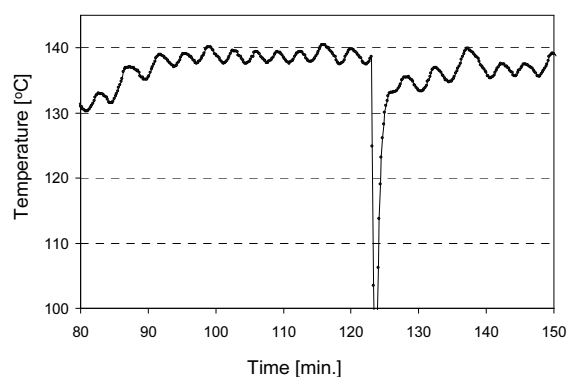
Eksperyment prowadzono dla różnych czasów wygrzewania w zakresie od 2 do 40 min, oraz obecności lub nie płytki TLC wewnątrz bloku. Zdjęcia w zakresie promieniowania podczerwonego wykonano przy pomocy kamery termowizyjnej V20 (VIGO-System). Interpretacji wyników dokonano w oparciu o program firmy VIGO-System LTD (wersja 1.95f). Akwizycji obrazu wywołanych płytek chromatograficznych dokonano za pomocą skanera biurowego Mustek Scanexpress 6000P pracującego w trybie odcieni szarości (8-bit). Chromatogramy wygenerowano z pomocą oprogramowania ScionImage (freeware).

## 3. Dyskusja wyników

Rysunek 3 przedstawia wykonaną w podczerwieni fotografię wnętrza sterylizatora powietrznego typu SP-65G wykorzystywanego do wizualizacji płytek TLC. Sterylizator był wygrzewany do momentu osiągnięcia żądanej temperatury 140 °C. Jak widać, rozkład temperatury jest niejednorodny i zmienny w czasie (rysunek 4).



Rys. 3. Obraz w podczerwieni rozkładu temperatury we wnętrzu sterylizatora SP-65G  
Fig. 3. Infra-red picture of the temperature distribution inside oven SP-65G

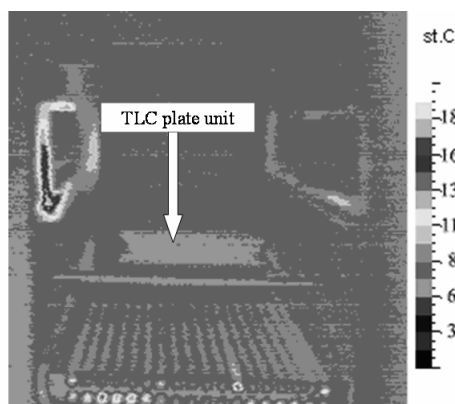


Rys. 4. Zarejestrowane zmiany temperatury powietrza we wnętrzu sterylizatora SP-65G  
Fig. 4. Temperature changes of the air measured inside SP-65G oven

W zależności od jakości termostatu, wahania temperatury mogą osiągnąć amplitudę kilku stopni Celsjusza. Dodatkowo każde otwarcie ciepłarki powoduje skokowy spadek temperatury utrzymujący się przez kilka minut. Powoduje to problemy

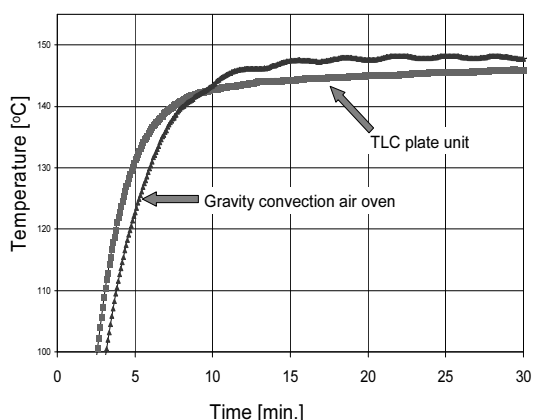
z określeniem rzeczywistej temperatury i znacząco wpływa na powtarzalność uzyskiwanych wyników. W celu precyzyjnej kontroli temperatury płytek w cieplarni ze swobodnym obiegiem powietrza, koniecznym staje się zastosowanie elementu stabilizującego temperaturę. Rolę taką może pełnić testowany przez nas blok aluminiowy.

Rysunek 5 przedstawia rozkład temperatury w sterylizatorze oraz w bloku aluminiowym stabilizującym temperaturę płytki TLC. Rysunek 6 ilustruje narastanie temperatury szklanych płytek TLC umieszczonych bezpośrednio w cieplarni oraz wewnątrz bloku. Jak widać w zakresie typowego czasu wygrzewania (do 10 minut), uprzednio nagrany blok zapewnia szybsze narastanie temperatury powierzchni płytek. Dodatkowo, element ten redukuje niekorzystne wahania temperatury.



Rys. 5. Obraz w podczerwieni rozkładu temperatury we wnętrzu sterylizatora SP-65G wraz z blokiem aluminiowym

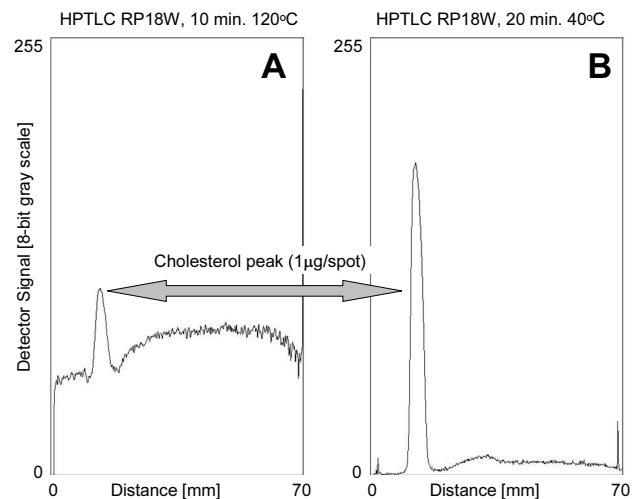
Fig. 5. Infra-red picture of the temperature distribution inside oven SP-65G with TLC plate unit



Rys. 6. Zmiana temperatury płytek TLC umieszczonych bezpośrednio w sterylizatorze oraz w bloku aluminiowym

Fig. 6. Heating plots for TLC plates measured inside gravity convection air oven and TLC plate aluminium unit

Na rysunku 7 przedstawiono wyniki badań wpływu czasu i temperatury wygrzewania płytki HPTLC RP18W w celu detekcji cholesterolu. Jak widać, poprzez odpowiedni dobór tych parametrów, możliwe jest znaczne zredukowanie szumów pochodzących z powierzchni płytki oraz zwiększenie czułości detekcji badanego sterydu.



Rys. 7. Wpływ temperatury i czasu wygrzewania na intensywność sygnału cholesterolu ( $1\mu\text{g/plamkę}$ ) oraz poziom szumów płytki chromatograficznej HPTLC RP18W pokrytej kwasem fosfomolibdenowym

Fig. 7. Effect of temperature and heating time on the signal intensity of cholesterol ( $1\mu\text{g/spot}$ ) and background noise of HPTLC RP18W plate covered with phosphomolybdic acid

#### 4. Wnioski

Typowe urządzenia grzejne stosowane w laboratoriach chemicznych (sterylizatory, cieplarki) nie posiadające wymuszonego obiegu powietrza, nie gwarantują stabilnej temperatury procesu wygrzewania płytek TLC. Zastosowanie biernych elementów magazynujących ciepło i umieszczanych we wnętrzu urządzeń grzejnych skutecznie ogranicza wahania temperatury, niekorzystne z punktu widzenia wywoływania płytek cienkowarstwowych. Dobór temperatury i czasu wygrzewania płytek w znaczący sposób wpływa na rezultaty analizy ilościowej z wykorzystaniem odczynników wywołujących np. kwasu fosfomolibdenowego.

Praca naukowa współfinansowana ze środków na naukę w latach 2007-2009 jako projekt badawczy N 523 043 32/1477.

#### 5. Literatura

- [1] J. Sherma, B. Fried: Handbook of Thin-Layer Chromatography, 3rd edn. Marcel Dekker, New York, 2003.
- [2] C.F. Poole: The Essence of Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- [3] P.E. Wall: Thin-Layer Chromatography. A Modern Practical Approach, Springer-Verlag, RSC, Cambridge, 2006.
- [4] T. Kowalska, J. Sherma: Preparative layer chromatography. Chromatographic Science Series, vol.95., CRC Press, Boca Raton, 2006.
- [5] P.K. Zarzycki, J. Chromatography A, Elsevier, 971, 2002.
- [6] P.K. Zarzycki, M.A. Bartoszek, A.I. Radziwoń, Optimization of TLC by Phosphomolybdic Acid Staining for Robust Quantification of Cholesterol and Bile Acids, Journal of Planar Chromatography, Modern TLC, Vol.19, January/February 2006.
- [7] P.K. Zarzycki, M. Baran, E. Włodarczyk, Acta Chromatographica, Institute of Chemistry, University of Silesia, vol.18, 2007