

Paweł K. ZARZYCKI<sup>1</sup>, Magdalena B. ZARZYCKA<sup>1</sup>, Bronisław K. GŁÓD<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA KOSZALIŃSKA, WYDZIAŁ BUDOWNICTWA I INŻYNIERII ŚRODOWISKA,  
KATEDRA BIOLOGII ŚRODOWISKOWEJ, ZAKŁAD TOKSYKOLOGII I BIOANALITYKI

<sup>2</sup> AKADEMIA PODLASKA, INSTYTUT CHEMII, ZAKŁAD CHEMII ANALITYCZNEJ

## Oszacowanie ilości pasm możliwych do rozdzielania na mikroplatkach TLC w procesie rozwijania jedno oraz dwukierunkowego próbek wieloskładnikowych

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 z użyciem ciekłych faz ruchomych w analizie sterydów i substancji pochodnych. Jest autorem i współautorem ponad 170 komunikatów naukowych.

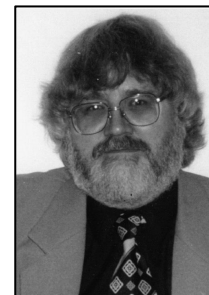
e-mail: pkwarz@wp.pl



Dr hab. Bronisław K. GŁÓD

Absolwent Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (1980). Obecnie kierownik Zakładu Chemii Analitycznej Instytutu Chemii Akademii Podlaskiej. Główne zainteresowania naukowe dotyczą teorii mechanizmu retencji chromatografii wykluczania jonowego, konstrukcji aparatury chromatograficznej oraz roli wolnych rodników w hipermetabolizmie i procesach starzenia. Jest autorem lub współautorem 120 publikacji, w tym 45 z tzw. listy filadelfijskiej.

e-mail: bkg@onet.eu



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



### Streszczenie

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) jest prostą i wydajną metodą analityczną powszechnie wykorzystywaną do rozdzielania oraz oznaczeń ilościowych szerokiej gamy substancji, obecnych w złożonych próbkach biologicznych, środowiskowych oraz preparatach farmaceutycznych. Główną zaletą TLC jest możliwość prostej detekcji rozdzielonych substancji przy pomocy bezpośredniej obserwacji płytki w świetle widzialnym lub fluorescencji plamek, uwidaczniającej się przy naświetleniu płytki promieniowaniem elektromagnetycznym z zakresu UV. Efektywne rozdzielanie mieszanin wieloskładnikowych może być uzyskane przy użyciu płytek o wymiarze nie przekraczającym 5 cm wzdłuż drogi rozwijania fazy ruchomej. Dzięki temu uzyskuje się znaczące skrócenie czasu analizy oraz polepszenie warunków detekcji do badań ilościowych. Nasze badania wskazują, że na płytce HPTLC typu RP o wymiarach 5 x 5 cm możliwe jest rozdzielanie ponad 240 plamek chromatograficznych, w trybie rozdzielania dwukierunkowego. W szczególności podano szereg przykładów rozdzielania jedno oraz dwukierunkowego mieszanin wieloskładnikowych wzorców sterydów, fulerenów, preparatów farmaceutycznych oraz ekstraktów barwników spiruliny.

**Słowa kluczowe:** chromatografia cienkowarstwowa, detekcja fluorymetryczna, densytometria, testosteron, sterydy, spirulina, ekstrakty ziołowe, fulereny, kwas fosforomolibdenowy.

### Estimation of micro-TLC plate peak capacity for one and two dimensional multiple sample separation

#### Abstract

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. The main advantage of TLC is that the bands or spots detected can be easily inspected under visible and UV light conditions and then digitalized using simple office scanners. In analytical practice, modern high-performance-thin-layer chromatography (HPTLC) involving a reversed phase (RP) plate is particularly suitable for efficient separation and sensitive visualization of active compounds from complex mixtures, including

pharmaceutical formulations. It is noteworthy that when using HPTLC plates, the mobile phase developing distance can be reduced to less than 50 mm. This conclusion is based on the observation that the minimum values of the plate height (H) can be achieved if the solvent migration distance along the HPTLC plate ranges from 30 to 40 mm. Under such conditions the total analysis time can be dramatically reduced in comparison to chromatographic separations performed on typical 10 or 20 cm long TLC plates. In this work there is estimated the micro-TLC plate peak capacity using one and two dimensional development performed in a temperature controlled, micro-TLC chamber (Fig. 1). The peak capacity estimation was based on the recorded densitometric profiles of HPTLC plates obtained from real samples, separated under 1D and 2D conditions, including: testosterone and its derivatives mixture (Figs. 2 and 3), the Azucalen herbs extract (Fig. 4), water and organic liquids extracts of the *Spirulina maxima* dyes (Fig. 5) as well as of C60 and C70 fullerenes mixture (Fig. 6). The experimental data show that micro-TLC plate working under 2D development protocol is capable of separation of more than 240 spots. It is also proved that this method can be useful for fast fingerprinting of complex biological mixtures.

**Keywords:** thin-layer chromatography, fluorimetric detection, densitometry, testosterone, steroids, spirulina, herbs extracts, fullerenes, phosphomolybdenic acid.

### 1. Wstęp

Chromatografia cienkowarstwowa (Thin-Layer Chromatography, TLC) jest jedną z podstawowych technik analitycznych służących do rozdzielania mieszanin związków chemicznych, prowadzonych z użyciem ciekłej fazy ruchomej. Do tych technik zalicza się między innymi, wysokosprawną chromatografię kolumnową (High-Performance Liquid Chromatography), chromatografię nadkrytyczną (Supercritical Fluid Chromatography) oraz szereg metod elektroseparatornych włączając w to elektroforezę żelową (Gel Electrophoresis), kapilarną (Capillary Electrophoresis) oraz techniki mikroukładowe (Microchip Electrophoresis) [1, 2]. W przeciwieństwie do technik kolumnowych, w technikach planarnych czas, jaki upływa od momentu rozpoczęcia rozwijania chromatogramu do jego zakończenia, jest jednakowy dla wszystkich substancji rozdzielanych. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż wartości współczynników retencji otrzymane techniką chromatografii planarnej można w prosty sposób przeliczyć na wartości współczynników retencji uzyskiwane w chromatografii kolumnowej, korzystając z powszechnie znanej zależności:

$$\log k = \log [(1/R_F)-1] \quad (1)$$

gdzie  $k$  oznacza współczynnik retencji w chromatografii kolumnowej a  $R_F$  współczynnik zatrzymania, który oblicza się bezpośrednio z chromatogramu cienkowarstwowego jako iloraz drogi przebytej przez plamkę związku analizowanego oraz czoła roz-

puszczalnika. Zależność ta jest bardzo przydatna w optymalizacji procesu rozdzielania, ponieważ dużą ilość eksperymentalnych danych retencyjnych znacznie szybciej uzyskuje się za pomocą „równoległej” techniki TLC niż „szeregowej” techniki kolumnowej.

Wśród głównych zalet TLC wymienia się możliwość jednoczesnej analizy kilku próbek (co znacznie skraca czas oraz koszt analizy), prostotę wykonania procesu rozdzielania (bardzo dobre wyniki analizy można uzyskać rozwijając płytkę TLC w zwykłej szklance) oraz detekcji analitów bez użycia złożonej aparatury analitycznej (stosując np. szereg prostych odczynników wywołujących oraz skaner biurowy lub aparat cyfrowy do rejestracji chromatogramu w świetle widzialnym lub UV). Nie bez znaczenia jest również możliwość zastosowania efektywnego rozdzielania wielokierunkowego (2D-TLC). Natomiast do głównych wad chromatografii planarnej należy zaliczyć relatywnie niską rozdzielczość fazy stacjonarnej, którą pokryta jest płytka TLC, oraz słabą powtarzalność wyników analiz ilościowych, jak również wąski zakres pomiarów retencji analitów, odpowiadający parametrowi retencyjnemu  $k$  w zakresie od 0.1 do 10. Tym niemniej, technika ta znajduje coraz większe zastosowanie, szczególnie w badaniach wstępnych przy rozdzielaniu wieloskładnikowych ekstraktów roślinnych dla celów farmacji lub jako szybka metoda potwierdzania obecności produktów reakcji w syntezie organicznej oraz badaniach biochemicznych [3]. W ostatnich latach atrakcyjność chromatografii cienkowarstwowej jako pełnowartościowej metody analitycznej znacząco wzrosła, głównie za sprawą opracowania szeregu prostych urządzeń sprzęgających, umożliwiających zastosowanie czułych detektorów identyfikujących anality w oparciu o spektrometrię mas [3,4]. Metoda TLC znalazła również szerokie zastosowanie w badaniach preparatywnych, szczególnie farmakognostycznych [5].

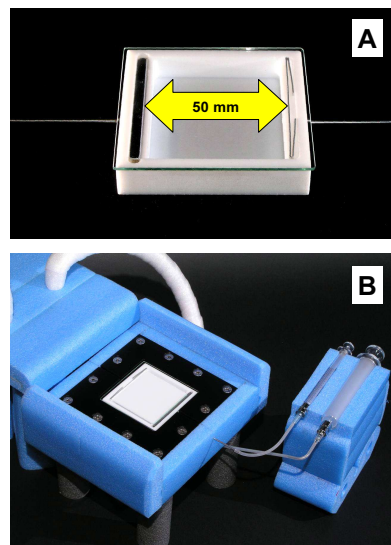
W praktyce, dla celów analitycznej chromatografii planarnej, opracowano szereg wysokosprawnych faz stacjonarnych (HPTLC), z użyciem których udaje się rozdzielić nawet do kilkunastu substancji na drodze rozwijania około 10 cm. Na uwagę zasługuje również fakt możliwości uzyskania efektywnego rozdzielania mieszanin wieloskładnikowych z użyciem płytek HPTLC o wymiarach nie przekraczających 5 cm, wzdłuż drogi rozwijania fazy ruchomej w granicach 4-4.5 cm. Jest to możliwe gdyż stwierdzono, że przy niewymuszonych zewnętrznym ciśnieniem przepływie fazy ruchomej jaki występuje w przypadku działania sił kapilarnych w procesie klasycznej TLC, korzystne minimalne wartości wysokości półki (H) obserwowane są dla migracji czoła rozpuszczalnika na odległość 30-40 mm od linii startu [6, 7]. Dodatkowo, zaletami ograniczenia drogi rozwijania do około 5 cm jest znaczne skrócenie czasu analizy chromatograficznej oraz zmniejszenie dyfuzyjnego rozmycia pasm, przy jednoczesnym zachowaniu dobrej zdolności rozdzielczej układu, co powoduje polepszenie warunków detekcji (zmniejszenie progu wykrywalności). Nie bez znaczenia jest również miniaturyzacja aparatury termostatującej komory służącej do rozwijania płytek oraz około 2-4 krotne obniżenie kosztów procesu w porównaniu do analiz z użyciem standardowych płytek 10 x 10 cm.

Celem pracy jest oszacowanie efektywności rozdzielania i udokumentowanie wysokiej sprawności jedno oraz dwukierunkowego procesu chromatograficznego, w rozdzielaniu mieszanin wieloskładnikowych z użyciem mikro-płytek TLC dla drogi rozwijania fazy ruchomej nie przekraczającej 45 mm.

## 2. Część eksperymentalna

Chromatogramy cienkowarstwowe wykonano przy użyciu mikrokomory przedstawionej na rys. 1, której konstrukcja i sposób działania został szczegółowo opisany w pracy [8]. Do rozdzielania mieszanin badanych substancji użyto płytek szklanych pokrytych warstwą fazy stacjonarnej HPTLC typu RP (Merck) o grubości warstwy czynnej 0.2 mm i średnicy ziaren adsorbenta 5-6  $\mu\text{m}$ . Płytki o fabrycznych wymiarach 10 x 10 cm zostały przycięte do wielkości 5 x 5 cm. Roztwory badane o objętości 1  $\mu\text{L}$  nanoszono na linię startową przy użyciu mikrostrzykawkki typu Hamilton.

Proces rozwijania chromatogramów prowadzono w warunkach kontrolowanej temperatury, w komorze nienasyconej parami fazy ruchomej. Optymalizację procesu rozdzielania omawianych analitów (mieszanina testosteronu i jego pochodnych, fulereny C60/C70, ekstrakty spiruliny oraz preparat ziołowy Azucalen) opisano w pracach [9-11]. Szczegółowe warunki analizy chromatograficznej przedstawiono w opisach poszczególnych rysunków. Cyfrową obróbkę zarejestrowanych chromatogramów oraz ich profile densytometryczne wykonano przy użyciu programu Scion Image wersja alpha 4.0.3.2, 2000-2001 Scion Corporation ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com); freeware).

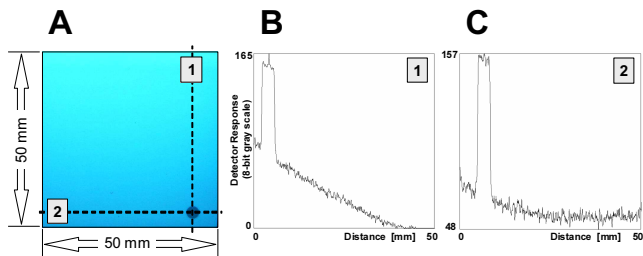


Rys. 1. Widok ogólny wymiennego modułu horizontalnej komory do mikrochromatografii TLC (A) umieszczonego w bloku termostatycznym (B)

Fig. 1. Perspective view of a removable horizontal micro-TLC chamber unit (A) placed in the temperature controlled oven (B)

## 3. Dyskusja wyników

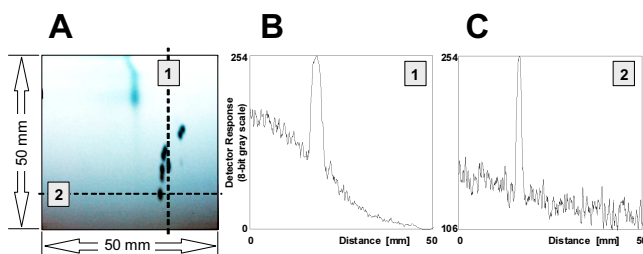
Rys. 2A przedstawia typowy obraz mikroplątki chromatograficznej (widoczny w świetle widzialnym po oświetleniu lampą UV 254 nm) z naniesioną mieszaniną badanych substancji (8 sterydów: metylotestosteron, testosteron i jego estry) i przygotowaną do rozwijania w układzie 2D-TLC. Punkt startowy zlokalizowano w prawym dolnym rogu, w odległości 5 mm (pierwszy kierunek rozwijania) oraz 7 mm (drugi kierunek rozwijania) od brzegów płytki. Średnica plamki została oszacowana na podstawie zarejestrowanych densytogramów (rys. 2A, B) i wynosi ona w przybliżeniu 4 mm. Jest to wartość typowa, uzyskiwana na warstwie adsorbenta grubości 0.2 mm oraz uziarnieniu 5-6  $\mu\text{m}$ , przy nanoszeniu cieczy (metanol) w ilości 1  $\mu\text{L}$ . Zakładając dostępną drogę migracji środka plamki wzdłuż pierwszego oraz drugiego kierunku rozwijania, na odpowiednio 45 oraz 43 mm, jak również brak np. dyfuzji wirowej oraz deformacji kształtu plamki, można przyjąć, że na płytce o wymiarach 50 x 50 mm uda się rozdzielić “do podstawy” 11 plamek (pasm chromatograficznych) w procesie jednokierunkowym oraz 11 x 11 = 121 plamek w procesie dwukierunkowym. W praktyce, podczas rozdzielania chromatograficznego plamka analitu na skutek wielu zjawisk m.in. dyfuzji oraz procesów związanych z nieliniowym przebiegiem izoterm adsorpcji, może ulec rozmyciu oraz deformacji kształtu. Dla danej fazy stacjonarnej temperaturę procesu rozdzielania, skład fazy ruchomej oraz stężenie analitów dobiera się tak, aby maksymalnie zmniejszyć niekorzystne efekty związane z asymetrycznym rozmyciem pasm (najczęściej ogonowaniem), przy jednoczesnym całkowitym rozdzieleniu składników analizowanej mieszaniny.



Rys. 2. Płytkę do chromatografii cienkowarstwowej z naniesioną mieszaniną sterydów (testosteron oraz 7 pochodnych) przygotowaną do rozdzielania dwukierunkowego (A) wraz z profilami densytometrycznymi wykonanymi wzdłuż pierwszego (B) oraz drugiego (C) kierunku rozwijania (Scion Image freeware). Warunki wykonania analizy: masa analitów naniesiona na punkt startowy - 1 µg; faza stacjonarna - HPTLC RP18WF<sub>254</sub>S (Merck); detekcja - fluorescencja ( $E_x = 254$  nm,  $E_m =$  światło widzialne) (A). Urządzenie rejestrujące chromatogram: aparat cyfrowy 5 Mpix Olympus Camedia 5050 Zoom, wyposażony w filtr UV 43 nm.

Fig. 2. TLC plate spotted with steroids mixture (testosterone and 7 derivatives) and prepared for two dimensional development (A) as well as densitometric profile plots (Scion Image freeware) related to 1st (B) and 2nd (C) chromatographic runs. Analytical conditions: analytes mass on the spot - 1 µg; stationary phase - HPTLC RP18WF<sub>254</sub>S (Merck); detection - fluorescence ( $E_x = 254$  nm,  $E_m =$  visible light) (A). Chromatogram acquisition device: 5.0 Mega pixel digital camera Olympus Camedia 5050 Zoom equipped with a 43 nm UV filter

Jak wynika z danych przedstawionych na rys. 3A, proces rozwijania dwukierunkowego umożliwia efektywne rozdzielanie substancji badanych. Z punktu widzenia sprawności, w trakcie procesu rozdzielania, plamki poszczególnych analitów uległy poszerzeniu do ok. 4.5 mm wzdłuż pierwszego kierunku rozwinięcia (rys. 3B, faza ruchoma metanol:woda) oraz zawężeniu do ok. 2 mm wzdłuż drugiego kierunku rozwinięcia (rys. 3C, faza ruchoma aceton: *n*-heksan), przy jednoczesnym zachowaniu symetrii pasm chromatografowanych sterydów. Biorąc pod uwagę dane doświadczalne uzyskane przy użyciu wyżej wymienionych faz ruchomych, ilość plamek możliwych do rozdzielania na użytej mikroplątce można oszacować na  $10 \times 22 = 242$  plamki rozdzielne do podstawy.

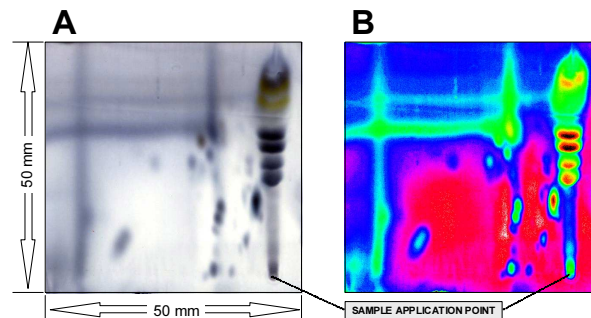


Rys. 3. Chromatogram 2D (A) mieszaniny 8 sterydów (Rys. 2) oraz profile densytometryczne wykonane wzdłuż pierwszego (B) oraz drugiego (C) kierunku rozwijania. Warunki wykonania analizy: temperatura procesu rozwijania +20°C; skład faz ruchomych - rozwinięcie w pierwszym kierunku 80:20 metanol:woda (v/v), w drugim kierunku 20:80 aceton: *n*-heksan (v/v); pozostałe warunki analizy oraz rejestracji obrazu są analogiczne jak dla płytki przedstawionej na rys. 2

Fig. 3. Chromatogram 2D (A) of 8 steroids mixture (Fig. 2) and densitometric profile plots related to 1st (B) and 2nd (C) chromatographic runs. Analytical conditions: development temperature +20°C; mobile phase composition - 1st run 80:20 methanol:water (v/v), 2nd run 20:80 acetone: *n*-hexane (v/v); remaining analysis conditions and data acquisition parameters are similar to those described for the plate presented in Fig. 2

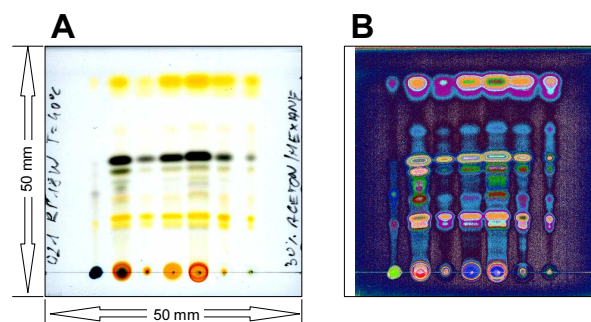
W praktyce, bardzo dobrą sprawność procesu rozdzielania na mikroplątkach HPTLC typu RP z użyciem jedno oraz dwuskładnikowych faz ruchomych, uzyskuje się dla wielu związków chemicznych o różnych właściwościach fizykochemicznych, szczególnie nie zdefiniowanych ściśle substancji wchodzących w skład wieloskładnikowych preparatów farmaceutycznych. Przykładowo, metoda ta umożliwia szybkie uzyskanie tzw. „odcisku palca” preparatów ziołowych (rys. 4), jednoczesną analizę wielu próbek w badaniach efektywności izolacji barwników chlorofilowych

z cyjanobakterii przy pomocy różnych rozpuszczalników (rys. 5) jak również analizę ilościową mieszanin fulerenów C60/C70 (rys. 6).



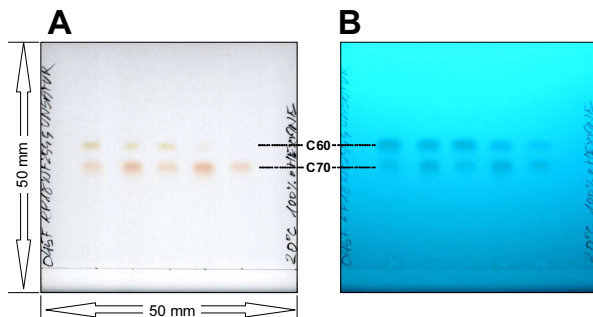
Rys. 4. „Odcisk palca” ekstraktu ziołowego Azucalen (*Chamomillae extractum fluidum* and *Calendulae extractum fluidum*, 1:1) (A) uzyskany w procesie rozwijania dwukierunkowego (A) oraz odpowiadający mu obraz uzyskany za pomocą filtra cyfrowego Spectrum (Scion Image freeware). Warunki wykonania analizy: temperatura procesu rozwijania +20°C; stężenie analitów - oryginalny ekstrakt rozcieńczony metanolem w proporcji 1:1; faza stacjonarna - HPTLC RP18WF<sub>254</sub>S (Merck); skład faz ruchomych - rozwinięcie w pierwszym kierunku 80:20 metanol:woda (v/v), w drugim kierunku 20:80 aceton:*n*-heksan (v/v); detekcja - rozwinięta i wysuszona płytka zanurzona w cieczy wywołującej o składzie 10% (w/v) metanolewowy roztwór kwasu fosfomolibdenowego a następnie ogrzewana przez 10 minut w temperaturze 100°C; Urządzenie rejestrujące chromatogram: obraz na płytce zeskanowano w świetle widzialnym przy użyciu skanera biurowego Plustek OpticPro S12 USB

Fig. 4. Fingerprinting of the Azucalen herbs extract (*Chamomillae extractum fluidum* and *Calendulae extractum fluidum*, 1:1) with the use of two-dimensional separation (A) as well as artificial colour representation of the original scan using Spectrum filter (Scion Image freeware) (B). Analytical conditions: development temperature +20°C; analytes concentration - original extract mixed with pure methanol 1:1; stationary phase - HPTLC RP18WF<sub>254</sub>S (Merck); mobile phase composition - 1st run 80:20 methanol:water (v/v), 2nd run 20:80 acetone:*n*-hexane (v/v); detection - developed and dry plate dipped in the spots visualization mixture consisted of 10% (w/v) phosphomolybdic acid in methanol and heated for 10 min. at 100°C; chromatogram acquisition method - digital scan performed under visible light conditions using Plustek OpticPro S12 USB office scanner



Rys. 5. Mikro-TLC chromatogram wodnego i organicznych ekstraktów barwników *Spirulina Maxima* (od lewej: woda, metanol, acetonitryl, aceton, tetrahydrofuran, toluen oraz *n*-heksan) uzyskanych z preparatu farmaceutycznego (A) oraz odpowiadający mu obraz uzyskany za pomocą filtra cyfrowego System Colour Table (Scion Image freeware) (B). Warunki wykonania analizy: temperatura procesu rozwijania +40°C; stężenie analitów - 200 mg sproszkowanego preparatu *Spirulina extrahowano* 2 mL odpowiedniego rozpuszczalnika; faza stacjonarna - HPTLC RP18W (Merck); skład fazy ruchomej - 30:70 aceton:*n*-heksan (v/v); detekcja - bezpośrednia w świetle widzialnym; Urządzenie rejestrujące chromatogram: obraz na płytce zeskanowano przy użyciu skanera biurowego Plustek OpticPro S12 USB

Fig. 5. Micro-TLC chromatogram of water and organic liquids extracts of the *Spirulina maxima* dyes (from the left: water, methanol, acetonitrile, acetone, THF, toluene and *n*-hexane) obtained from the pharmaceutical formulation (A) and corresponding artificial colour representation of the original scan using System Colour Table filter (Scion Image freeware) (B). Analytical conditions: development temperature +40°C; analytes concentration - 200 mg of powdered *Spirulina* sample was extracted with 2 mL of given solvent; stationary phase - HPTLC RP18W (Merck); mobile phase composition - 30% (v/v) acetone/*n*-hexane; detection - direct observation under visible light; chromatogram acquisition method - direct digital scan using Plustek OpticPro S12 USB office scanner



Rys. 6. Rozdzielenie mieszaniny fulerenów C60 i C70 obserwowane w warunkach oświetlenia światłem w zakresie widzialnym (A) oraz UV (B). Warunki wykonania analizy: temperatura procesu rozwijania +20°C; masy analitów na punkcie startowym - (C60/C70 od lewej) 0.25/0.05µg, 0.2/0.1µg, 0.2/0.05µg, 0.1/0.1µg, 0.05/0.05µg; faza stacjonarna - HPTLC RP18WF<sub>254</sub>S (Merck); skład fazy ruchomej - czysty *n*-heksan; detekcja - bezpośrednia obserwacja w warunkach oświetlenia światłem widzialnym oraz fluorescencja ( $E_x = 254$  nm,  $E_m =$  światło widzialne). Urządzenie rejestrujące chromatogram: skaner biurowy Plustek OpticPro S12 USB (światło widzialne; A) oraz aparat cyfrowy 5 Mpix Olympus Camedia 5050 Zoom, wyposażony w filtr UV 43 mm (fluorescencja; B)

Fig. 6. Separation of C60 and C70 fullerenes mixture observed under visible (A) and UV (B) light. Analytical conditions: development temperature +20°C; analytes mass on the spot - (C60/C70 from the left) 0.25/0.05µg, 0.2/0.1µg, 0.2/0.05µg, 0.1/0.1µg, 0.05/0.05µg; stationary phase - HPTLC RP18WF<sub>254</sub>S (Merck); mobile phase composition - pure *n*-hexane; detection - direct observation under visible light and fluorescence ( $E_x = 254$  nm,  $E_m =$  visible light). chromatogram acquisition method - direct digital scan using Plustek OpticPro S12 USB office scanner (visible light conditions; A) and 5.0 Mega pixel digital camera Olympus Camedia 5050 Zoom equipped with a 43 mm UV filter (fluorescence; B)

#### 4. Wnioski

W pracy wykazano, że efektywne rozdzielanie mieszanin wieloskładnikowych jest możliwe do uzyskania na mikroplótkach chromatograficznych o wymiarach 50 x 50 cm dla drogi rozwija-

nia fazy ruchomej nie przekraczającej 45 mm. Na podstawie uzyskanych danych eksperymentalnych oszacowano, iż w przypadku chromatografii dwukierunkowej (2D-TLC) sprawność badanych systemów chromatograficznych wykorzystujących płytki HPTLC typu RP, pozwala na pełne rozdzielanie ponad 240 pasm (plamek). W praktyce, zastosowana metoda okazała się przydatna w rozdzielaniu jedno oraz dwukierunkowym, złożonych mieszanin sterydów, substancji wchodzących w skład ekstraktów ziołowych, barwników spiruliny oraz cząsteczek fulerenów C60/C70.

#### 5. Literatura

- [1] B.K. Głód, P. Piszcz: Wysokosprawna chromatografia cieczowa. Podstawy teoretyczne, Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce, 2007.
- [2] P.K. Zarzycki: Wybrane elementy teorii i praktyki chromatografii cieczowej. Wydawnictwo Politechniki Koszalińskiej, Koszalin, 2006.
- [3] J. Sherma, B. Fried: Handbook of Thin-Layer Chromatography, 3rd edn. Marcel Dekker, New York, 2003.
- [4] P.E. Wall: Thin-Layer Chromatography. A Modern Practical Approach, Springer-Verlag, RSC, Cambridge, 2006.
- [5] T. Kowalska, J. Sherma: Preparative layer chromatography. Chromatographic Science Series, vol.95., CRC Press, Boca Raton, 2006.
- [6] L.S. Litvinova, J. Planar Chromatogr., Springer, 19, 2006.
- [7] E. Reich, A. Blatter, B. Meier, TLC for the Analysis of Herbal Drugs, Camag Scientific Note, Camag, 2003, <http://www.camag.ch/index.php>
- [8] P.K. Zarzycki, J. Chromatogr. A, Elsevier, 1187, 2008.
- [9] P.K. Zarzycki, M.B. Zarzycka, Anal. Bioanal. Chem., Springer, 391, 2008.
- [10] P.K. Zarzycki, M.B. Zarzycka, J. AOAC Int., Association of Analytical Communities International, 91, 2008.
- [11] P.K. Zarzycki, H. Ohta, F.B. Harasimiuk, K. Jinno; Anal. Sci., The Japan Society for Analytical Chemistry, 23, 2007.

Artykuł recenzowany

## INFORMACJE

### Zapraszamy do prenumeraty czasopisma PAK w 2009 roku

Cena prenumeraty rocznej: 192,00 zł netto/1 egz.

Prenumeratę i kolportaż prowadzą:

**WYDAWNICTWO POMIARY AUTOMATYKA KONTROLA**  
ul. Świętokrzyska 14A, pok. 530,  
00-050 Warszawa,  
tel./fax: 022 827 25 40

**Redakcja czasopisma POMIARY AUTOMATYKA KONTROLA**  
ul. Akademicka 10, pok. 30b,  
44-100 Gliwice,  
tel./fax: 032 237 19 45,  
e-mail: [wydawnictwo@pak.info.pl](mailto:wydawnictwo@pak.info.pl),  
[www.pak.info.pl](http://www.pak.info.pl)