

Paweł PISZCZ, Magdalena TOMASZEWSKA, Bronisław K. GŁÓD*

Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Chemii, Wydział Nauk Ścisłych,
Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce.

*Autor do korespondencji, e-mail: bkg@onet.eu

O możliwości zastosowania chromatografii cienkowarstwowej do oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. Część I. Dobór warunków chromatograficznych.

Streszczenie: Do oznaczania aktywności antyoksydacyjnej próbek spożywczych najczęściej stosowana jest metoda wykorzystująca rodnik 1,1-difenyl-2-pikrylohydrazylowy (DPPH). Zmiany stężenia rodnika są w niej oznaczane fotometrycznie, przy 517 nm. Wadą tej metody jest interferencja zarówno przez zredukowaną postać rodnika jak i składniki badanej próbki absorbujące światło przy 517 nm. Dlatego, do oznaczania zmian stężenia rodnika DPPH zastosowano chromatografię cienkowarstwową. Celem pracy było rozdzielenie różnych form DPPH za pomocą TLC oraz zbadać możliwości zastosowania tej techniki do oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA).

Słowa kluczowe: chromatografia cienkowarstwowa, TLC; 1,1-difenyl-2-pikrylohydrazyl, DPPH; antyoksydanty; całkowity potencjał antyoksydacyjny, CPA.

About the possibility of application of thin layer chromatography to the measurements of the total antioxidant potential. Part I. Chromatographic conditions.

Abstract: The antioxidant activity of food samples usually is determined using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH). Changes of the radical concentration are determined photometrically at 517 nm. The disadvantage of this method is the interference by the reduced form of radical as well as the sample components absorbing light at 517 nm. Therefore, changes in the DPPH concentration were measured using thin layer chromatography. The aim of the study was the separation of the different forms of DPPH using TLC and examine its applicability to the determination of the total antioxidant potential (TAP).

Key words: thin layer chromatography, TLC; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH; antioxidants; total antioxidant potential, TAP.

1. Wprowadzenie /Introduction/

Wolne rodniki są cząsteczkami, jonami, atomami lub grupami atomów posiadającymi na powłoce walencyjnej (lub na ostatnim orbitalu) jeden lub więcej niesparowanych elektronów, nadającym im właściwości paramagnetyczne. Niektóre z nich są wysoce reaktywne, niestabilne, dążą do przyłączania elektronów lub wodorów od otaczających ich cząsteczek, prowadząc do ich utleniania. Wiąże się to ze zmianą biochemicznych właściwości utlenionych cząsteczek. Wolne rodniki mają zdolność uszkodzenia struktury błon komórkowych, lipidów, białek i kwasów nukleinowych w komórce. W konsekwencji może to doprowadzić do uszkodzenia funkcji życiowych komórek, tkanek organizmu i całego organizmu [1-3].

Rodniki odgrywają ważną rolę w wielu działach chemii, biologii, medycyny i są przedmiotem wielu badań związanych z problemami zdrowotnymi. Organizmy rozwinęły wiele mechanizmów obronnych, aby chronić się przed działaniami wolnych rodników. System obronny organizmów żywych przed wolnymi rodnikami można podzielić na trzy etapy: (i) zapobiegający ich wytwarzaniu (np. chelatory metali przejściowych - hemoglobina, laktoferyna), (ii) usuwający wolne rodniki (antyoksydanty lub zmiatacze wolnych rodników) oraz (iii) naprawiający uszkodzenia przez nie wywołane [4, 5]. Antyoksydanty są substancjami występującymi w stężeniach niskich w porównaniu ze składnikami utleniającymi i opóźniają bądź hamują utlenianie spowodowane przez wolne rodniki. Utrzymanie równowagi pomiędzy ilością wolnych rodników a antyoksydantami ma ogromne znaczenie dla zachowania zdrowia. Ekspozycja organizmu na działanie wolnych rodników określane jest mianem „stresu oksydacyjnego”. Intensywność stresu zależy od rodzaju i ilości wolnych rodników, sprawności organizmu i zasobu antyoksydantów istniejących w organizmie. Antyoksydanty tworzą barierę ochronną występując zarówno w części hydrofobowej jak i hydrofilowej (wodnej) znajduje się w cytoplazmie komórek i płynach pozakomórkowych [3, 6, 7].

Jedną z najczęściej stosowanych metod pomiaru sumarycznych właściwości antyoksydacyjnych, ze względu na prostotę, krótki czas analizy oraz stosunkowo wysoką dokładność i odtwarzalność wyników, jest metoda oparta o badanie stopnia przereagowania z próbką rodnika DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylohydrazylu). Wykorzystywana jest ona do pomiaru CPA (całkowitego potencjału antyoksydacyjnego) żywności, owoców, soków itp. Rodnik DPPH rozpuszcza się wyłącznie w rozpuszczalnikach organicznych, dlatego też metoda uniemożliwia oznaczenie antyoksydantów o charakterze hydrofilowym. Pomiar CPA polega na dodaniu do alkoholowego roztworu DPPH o barwie purpurowej, próbki zawierającej przeciwutleniacz, który redukuje rodnik do DPPH-H zabarwiony na żółto. Zmianę barwy roztworu mierzy się spektrofotometrycznie przy maksimum absorpcji - 517 nm. [8-10, 19]. W pracy przedyskutowano możliwość rozdzielania postaci utlenionej i zredukowanej rodnika DPPH za pomocą TLC.

2. Część Eksperymentalna */Experimental/*

2.1. Aparatura */Apparatus/*

Pomiary chromatograficzne techniką TLC zostały wykonane przy użyciu komór chromatograficznych typu DS II D (Chromdes, Lublin) o wymiarach 10 x 5 cm i 20 x 20 cm oraz płytek szklanych pokrytych żelem krzemionkowym NP (Silicagel 60 i Silicagel 60 F_{254S}) oraz płytek szklanych pokrytych żelem krzemionkowym modyfikowanymi grupami oktadecylowymi (RP-18WF_{254S}) (Merck, Niemcy), 5 x 10 cm, grubość złoża 0,25 mm. Plamki zamieniono na chromatogramy za pomocą skanera HP Scanjet G210 oraz pakietu oprogramowania ScionImage oraz ImageJ [20].

2.2. Odczynniki chemiczne */Chemicals/*

Podczas badań wykorzystano następujące odczynniki: n-heksan cz.d.a., etanol cz.d.a 96,6 %, 2-propanol cz.d.a., wodorooortofosforandisodu, diwodorooortofosforan sodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), aceton cz.d.a (Stanlab, Lublin, Polska), metanol cz.d.a HPLC (Honeywell, Niemcy), dichlorometan HPLC, 33 % kwas solny cz.d.a., kwas galusowy (POCh, Gliwice, Polska), acetonitryl Chromasolv, DPPH (Sigma-Aldrich, Niemcy). Wszystkie roztwory wodne wykorzystane w badaniach przygotowano stosując wodę trójrotnie destylowaną z kwarcu. W pracy stosowano 1 mM metanolowy roztwór DPPH.

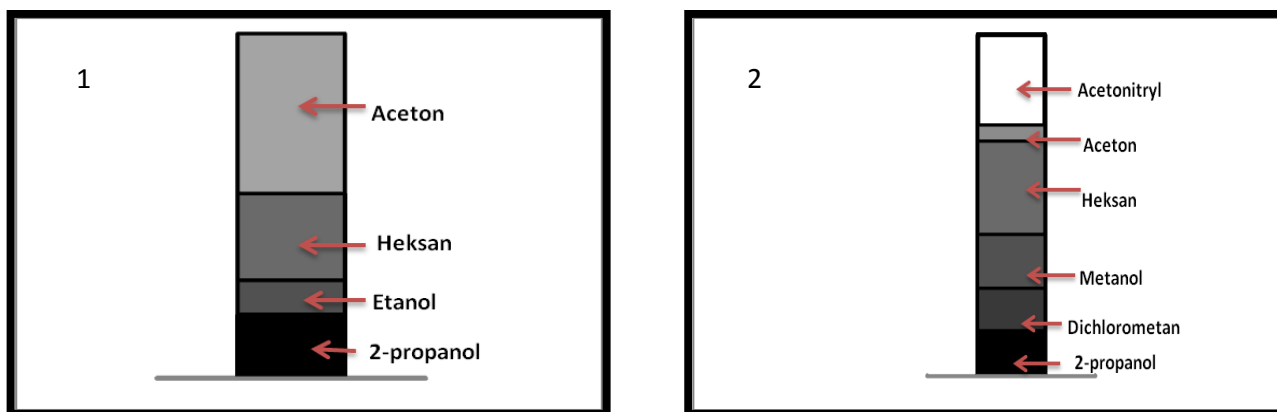
2.3. Możliwość zastosowania skanera biurowego w TLC */The ability to use office scanner in TLC/*

W pracy zbadano możliwość zastosowania skanera biurowego do przekształcenia w formę cyfrową obrazu płytki chromatograficznej [20]. Płytki skanowane były z rozdzielczością 300 DPI w trybie miliona kolorów i zapisywane w formacie TIFF. Następnie wyniki były poddawane obróbce: konwersji do skali szarości, przycięciu skanowanej płytki i redukcji szumu za pomocą metody Savitzkyego-Golay'a [11].

3. Wyniki i dyskusja */Results and Discussion/*

3.1. Retencja rozpuszczalników */Retention of solvents/*

Rozpuszczalniki możemy podzielić na polarne (np. woda, aceton) i niepolarne (np. heksan czy czterochlorek węgla). Niepolarne charakteryzują się niską stałą dielektryczną i momentem dipolowym. W chromatografii często stosowaną miarą polarności są współczynniki Hildebranda. Na R_f wpływa polarność zarówno fazy ruchomej jak i próbki. W układzie faz prostych wzrost polarności rozpuszczalnika zwiększa R_f [12, 13]. Składniki eluentów mogą być tak samo zatrzymywane na płytkach TLC jak inne (badane) związki. Zakłóca to pomiar chromatograficzny. Dlatego też we wstępnej fazie badań sprawdzono powinowactwa rozpuszczalników do fazy stacjonarnej. Na Rys. 1 i 2 oraz w Tabeli 1 pokazano odległości przebyte przez różne rozpuszczalniki w czasie 5 min oraz czasy potrzebne na przebycie całej płytki.



Rys. 1. Odległości przebyte przez różne rozpuszczalniki na płytce NP w czasie 5 min.

Fig. 1. Distance completed by different solvents on the NP plate in 5 min.

Rys. 2. Odległości przebyte przez różne rozpuszczalniki na płytce RP-18WF_{254S} w czasie 5 min.

Fig. 2. Distance completed by different solvents on the RP-18WF_{254S} plate in 5 min.

Tabela 1 Czasy, t [s], przebycia płytki przez rozpuszczalniki.

Table 1 The migration times t [s], of plates by the solvents.

Rozpuszczalniki Solvents	t [s]/ time	
	NP	RP
2-propanol	1320	2032
etanol	860	-
heksan	456	390
aceton	244	365
dichlorometan	-	1046
metanol	-	648
acetonitryl	-	268

Okazało się, że zaobserwowano tę samą kolejność szybkości poruszania się rozpuszczalników wzdłuż obu płytek. Najpowolniejszy przepływ, około 22 min dla płytki NP i 33 min dla RP-18W, zaobserwowano dla 2-propanolu (Tabela 1). Acetonitryl i aceton migrują dosyć szybko przez płytkę RP-18W, około 4,5 minuty. Wyniki te wskazują na to, że może dojść do niekontrolowanego rozdzielania substancji oznaczanej i pojawienia się innych plamek wskutek rozdzielania rozpuszczalników. Dlatego należy unikać mieszaniny wielu rozpuszczalników i dobrać proste fazy układy.

3.2. Rozdzielanie różnych postaci DPPH za pomocą chromatografii cienkowarstwowej /Separation of the different forms of DPPH by TLC/

Możliwość rozdzielania różnych form DPPH zbadano stosując różne modyfikacje układu chromatograficznego (i) fazy stacjonarne (NP lub RP), (ii) fazy ruchome, (iii) temperaturę, (iv) nasycenie lub jego brak, komory, (v) krotność rozwijania oraz (vi) krotność niecałkowitego rozwijania. W Tabelach 2 (płytki NP) i 3 (płytki RP-18W) przedstawiono zależność współczynników retencji i opóźnienia różnych form rodnika DPPH od stężeń rozpuszczalników i współczynników Hildebranda faz ruchomych (Tabela 4).

Tabela 2. Wartości współczynników retencji (k) i opóźnienia (R_f) różnych form rodnika DPPH oraz stężeń rozpuszczalników i współczynników Hildebranda (δ) faz ruchomych w układzie faz normalnych.

Table 2. The values of retention (k) and delay (R_f) coefficients of various forms of DPPH and concentrations of solvents, and the Hildebrand (δ) coefficients of mobile phases in the normal phase systems.

Faza ruchoma <i>Mobile phase</i>	Stężenie acetonu [%]	δ	R_{fDPPH}	$R_{fDPPH-H}$	k_{DPPH}	k_{DPPH-H}
heksan/aceton	14,52	7,6051	0,28	0,25	3,00	2,57
heksan/aceton	14,68	7,6087	0,36	0,31	2,23	1,78
heksan/aceton	14,82	7,6111	0,31	0,3	2,33	2,23
heksan/aceton	14,97	7,6139	0,24	0,21	3,76	3,17
heksan/aceton	15,11	7,6173	0,32	0,28	2,57	2,13
heksan/aceton	15,25	7,6213	0,39	0,34	1,94	1,56
heksan/aceton	15,97	7,6360	0,22	0,19	4,26	3,55
heksan/aceton	16,67	7,6469	0,24	0,205	3,88	3,17
heksan/aceton	17,36	7,6646	0,24	0,21	3,76	3,17
heksan/aceton	18,03	7,6786	0,17	0,145	5,90	4,88
heksan/aceton	18,69	7,6926	0,2	0,19	4,26	4,00
heksan/aceton	19,35	7,7027	0,32	0,28	2,57	2,13
heksan/aceton	20	7,7200	0,43	0,38	1,63	1,33
heksan/aceton	20,13	7,7224	0,31	0,27	2,70	2,23
heksan/aceton	20,26	7,7263	0,36	0,31	2,23	1,78
heksan/aceton	20,38	7,7280	0,28	0,26	2,85	2,57
heksan/aceton	20,51	7,7298	0,29	0,25	3,00	2,45
heksan/aceton	20,63	7,7329	0,34	0,3	2,33	1,94
heksan/aceton	24,81	7,8208	0,44	0,43	1,33	1,27
heksan/aceton	29,97	7,9294	0,52	0,49	1,04	0,92
heksan/aceton	34,98	8,0346	0,53	0,52	0,92	0,89
heksan/aceton	65,23	8,6696	1	1	1	1
aceton	100	9,4000	0,96	0,99	0,04	0,01
heksan/aceton/ EtOH	40	8,9200	0,98	0,98	0,02	0,02
heksan/aceton/ EtOH	35,71	8,4669	0,71	0,66	0,4	0,51
heksan/EtOH	33,33	8,5991	0,8	0,8	0,25	0,25
2-propanol/ aceton/EtOH	27,78	9,1000	0,27	0,27	2,70	2,70
2-propanol/ aceton	33,33	9,9323	0,24	0,24	3,17	3,17
2-propanol	100	10,2000	0,89	0,89	0,12	0,12
acetonitryl/woda	11	12,7108	1	1	0	0
acetonitryl/ MeOH	11	11,9089	1	1	0	0
acetonitryl	100	11,8000	1	1	0	0

Tabela 3. Wartości współczynników retencji (k) i opóźnienia (R_f) różnych form rodnika DPPH oraz stężeń rozpuszczalników i współczynników Hildebranda (δ) faz ruchomych w układzie faz odwróconych.

Table 3. The values of retention (k) and delay (R_f) coefficients of various forms of DPPH and concentrations of solvents, and the Hildebrand (δ) coefficients of mobile phases in the reversed phase systems.

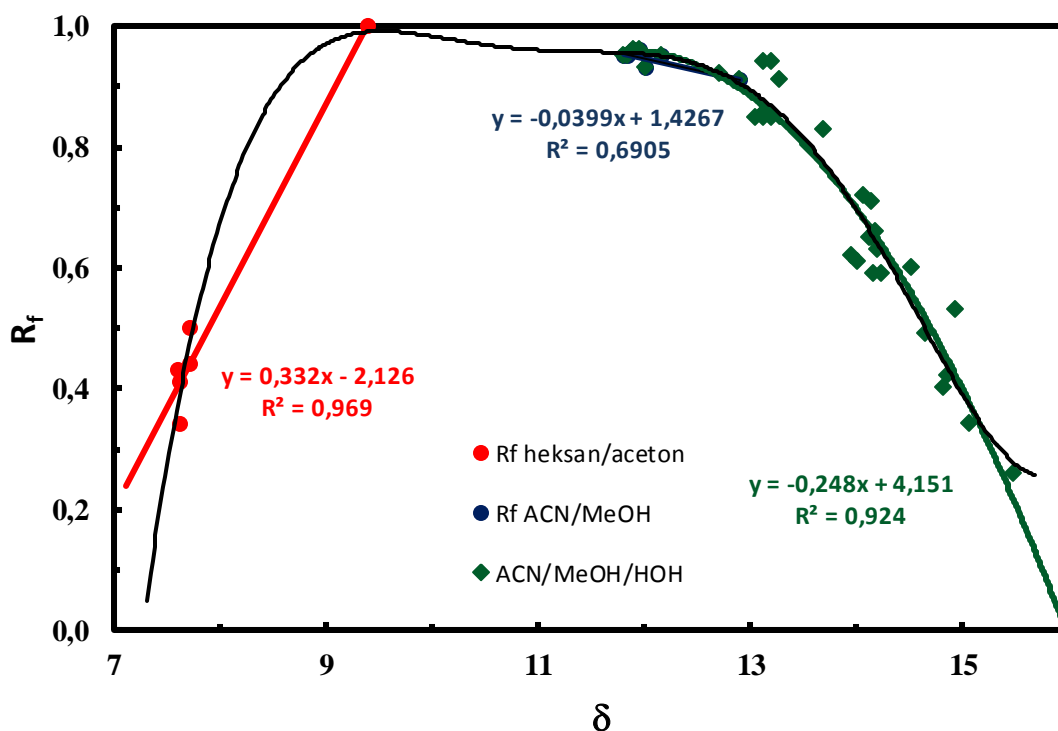
Rozpuszczalniki Solvents	Stężenie acetonu [%]	δ	R_{fDPPH}	$R_{fDPPH-H}$	k_{DPPH}	k_{DPPH-H}
heksan/aceton	14,68	7,6087	0,43	0,47	1,33	1,11
heksan/aceton	15,25	7,6213	0,34	0,39	1,96	1,57
heksan/aceton	15,40	7,6234	0,41	0,46	1,44	1,17
heksan/aceton	20,00	7,7200	0,5	0,55	2,17	1,81
heksan/aceton	20,26	7,7263	0,44	0,49	1,28	1,03
aceton	100	9,4	1	1	0	0
2-propanol	100	10,2	0,86	0,86	0,16	0,16
acetonitryl	100	11,8	0,95	0,98	0,05	0,02
Rozpuszczalniki	Stężenie MeOH [%]	δ	R_{fDPPH}	$R_{fDPPH-H}$	k_{DPPH}	k_{DPPH-H}
acetonitryl/MeOH	4,76	11,8524	0,95	0,99	0,05	0,01
acetonitryl/MeOH	9,91	11,9089	0,96	0,99	0,04	0,01
acetonitryl/MeOH	15,25	11,9683	0,96	0,98	0,04	0,02
acetonitryl/MeOH	20,00	12,02	0,93	0,95	0,08	0,05
acetonitryl/MeOH	33,33	12,1654 5	0,95	0,96	0,05	0,04
MeOH	100	12,9	0,91	0,94	0,1	0,07
Rozpuszczalniki	Stężenie wody [%]	δ	R_{fDPPH}	$R_{fDPPH-H}$	k_{DPPH}	k_{DPPH-H}
MeOH/woda	1,96	13,0620	0,85	0,91	0,18	0,1
MeOH/woda	2,91	13,1430	0,86	0,9	0,16	0,11
MeOH/woda	3,85	13,2115	0,85	0,89	0,18	0,13
MeOH/woda	4,76	13,2855 6	0,91	0,94	0,1	0,07
MeOH/woda	9,91	13,7019	0,83	0,87	0,2	0,15
MeOH/woda	13,04	13,9562	0,62	0,67	0,62	0,49
MeOH/woda	13,79	14,0169	0,61	0,66	0,64	0,51
MeOH/woda	14,53	14,0769	0,72	0,71	0,39	0,42
MeOH/woda	15,11	14,1239	0,65	0,69	0,54	0,45
MeOH/woda	15,25	14,1393	0,71	0,76	0,41	0,32
MeOH/woda	15,40	14,1474	0,65	0,7	0,54	0,43
MeOH/woda	15,54	14,1639	0,59	0,62	0,68	0,61
MeOH/woda	15,82	14,1814	0,66	0,7	0,51	0,43
MeOH/woda	15,97	14,196	0,63	0,69	0,59	0,45
MeOH/woda	16,67	14,2443	0,59	0,66	0,54	0,45
MeOH/woda	20,00	14,52	0,6	0,67	0,66	0,5
Rozpuszczalniki	Stężenie wody [%]	δ	R_{fDPPH}	$R_{fDPPH-H}$	k_{DPPH}	k_{DPPH-H}
acetonitryl/woda	9,91	12,7108	0,92	0,95	0,08	0,05
acetonitryl/woda	14,38	13,1230	0,94	0,95	0,07	0,05
acetonitryl/woda	14,53	13,1368	0,85	0,95	0,18	0,05

acetonitryl/woda	14,68	13,1524	0,86	0,96	0,16	0,04
acetonitryl/woda	15,25	13,2076	0,94	0,96	0,07	0,04
acetonitryl/woda	31,03	14,6473	0,49	0,56	1,03	0,8
acetonitryl/woda	32,89	14,8259	0,4	0,45	0,9	1,22
acetonitryl/woda	33,33	14,8652	0,42	0,48	1,41	1,08
acetonitryl/woda	34,21	14,9473	0,53	0,42	0,9	1,36
acetonitryl/woda	35,48	15,0642	0,34	0,39	1,93	1,55
acetonitryl/woda	40,12	15,4910	0,26	0,34	2,78	1,96

Tabela 4. Wartości współczynnika Hildebranda czystych rozpuszczalników.
Table 4. The values of Hildebrand parameters of pure solvents.

Rozpuszczalnik /Solvent/	heksan	aceton	2propanol	etanol	acetonitryl	metanol	woda
δ	7,3	9,4	10,2	11,2	11,8	12,9	21

Dobierając rozpuszczalnik(i) o odpowiednim współczynniku Hildebranda można sterować retencją i selektywnością rozdzielania. Na Rys. 3 zostały przedstawione zależności współczynnika opóźnienia DPPH, R_f , od współczynnika Hildebranda δ fazy ruchomej. Największe wartości R_{fDPPH} otrzymano dla współczynników Hildebranda równych ok. 12.



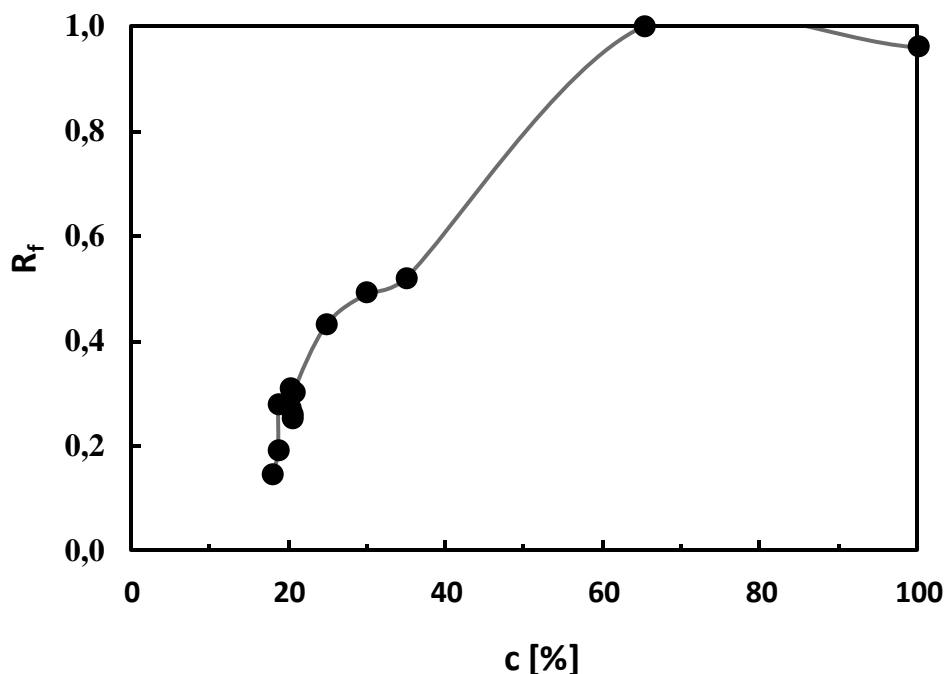
Rys. 3. Wpływ współczynnika Hildenbranda na wartości R_f . Warunki chromatograficzne: płytka RP-18W, 20°C, wysycona komora.

Fig. 3. The influence of Hildebrand parameter on R_f values. Chromatographic conditions: plate - RP-18, temp. - 20°C, chamber - saturated.

3.3. Dobór fazy ruchomej do rozdzielania dwóch form rodnika DPPH /Selection of the mobile for the separation of two forms of the DPPH radical/

Najlepsze rozdzielanie DPPH od DPPHH, zarówno na płytkach RP jak i NP, uzyskano dla mieszaniny dwuskładnikowej heksan – aceton (80:20 v/v). Na płytkach RP zaobserwowano brak elucji ($R_f = 0$) rodnika DPPH gdy fazą ruchomą był czysty heksan. Minimum retencji ($R_f = 1$) i rozdzielania z kolei otrzymano dla metanolu, acetonitrylu, acetonu, dichlorometanu oraz 2-propanolu. W przypadku mieszanin dwuskładnikowych takich jak metanol - woda od 5 do 10 % wody następuje spadek współczynnika opóźnienia, od 0,9 do 0,8. Powyżej 20% wody plamka DPPH[•] ulega całkowitemu rozmyciu. A zatem współczynnik opóźnienia maleje, wraz ze wzrostem stężenia rozpuszczalnika bardziej polarnego. Dodatek wody spowodował nieznaczne rozdzielanie dwóch form od siebie. Lepsze rozdzielanie otrzymano w układzie heksan – aceton. Wraz ze wzrostem acetonu od 15-20 % współczynnik opóźnienia wzrasta. Plamki pochodzące od obu form nie są do końca rozdzielone, ale obie barwy są bardzo wyraźne. Współczynnik opóźnienia mieści się w granicach 0,4-0,5. Stosowanie innych faz ruchomych, takich jak acetonitryl/woda czy acetonitryl/metanol nie poprawiało rozdzielania. Dodatek wody (10 do 15%) współczynnik opóźnienia. Wzrost zawartości wody powyżej 30% zmniejszał R_f i zmieniał kolejność wymywania (DPPH-H > DPPH).

Również na płytkach NP nie zaobserwowano elucji ($R_f = 0$) dla heksanu. Dla acetonu, dichlorometanu, 2-propanolu, dichlorometanu/metanolu oraz dichlorometanu/etanolu zaobserwowano minimalną retencję ($R_f \approx 1$) DPPH[•]. Najlepsze rozdzielanie otrzymano dla mieszaniny heksan/aceton (ok. 32% acetonu). Wzrost stężenia acetonu (powyżej 65%) likwiduje retencję (Rys. 4).



Rys. 4. Zależność współczynnika opóźnienia (R_f) DPPH od stężenia acetonu. Warunki chromatograficzne: faza ruchoma – aceton-woda, płytka - NP, temp. - 20°C, komora - wysycona.

Fig. 4. The dependence of delay factor (R_f) of DPPH on acetone concentration. Chromatographic conditions: mobile phase - acetone-water, plate - NP, temp. - 20°C, chamber - saturated.

3.4. Rozdzielanie dwóch form rodnika DPPH za pomocą HPLC/UV /Separation of two forms of DPPH using HPLC/UV/

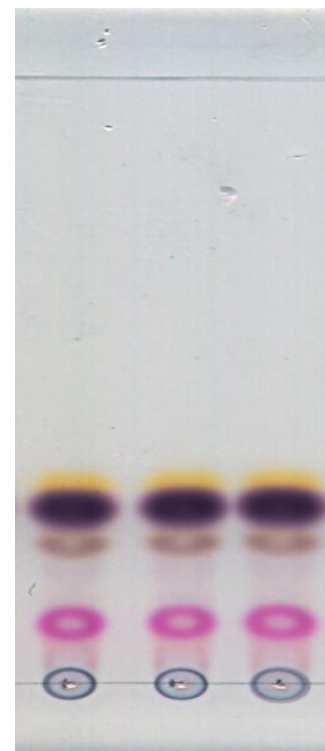
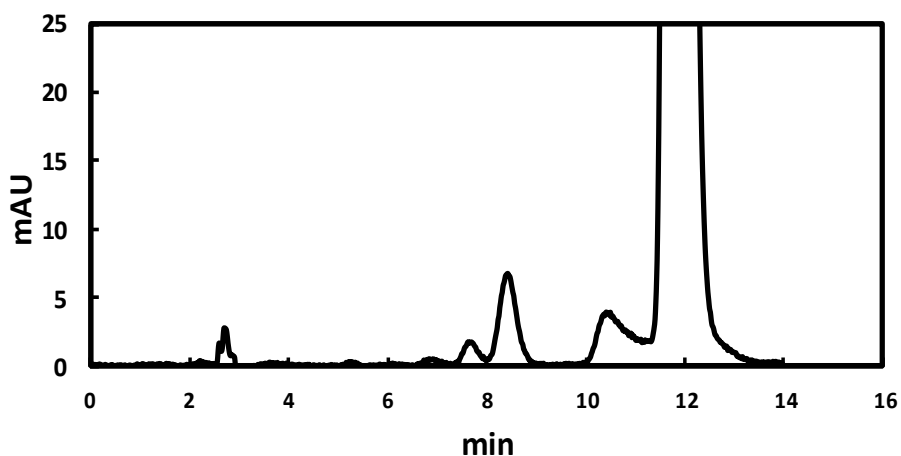
Do rozdzielania formy utlenionej od zredukowanej rodnika DPPH można zastosować wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Na rys. 5 przedstawiono chromatogram 1 mM DPPH po reakcji z kwasem galusowym (faza ruchoma - metanol/woda, 80:20, v/v) oraz skan płytki RP-18W rozwiniętej mieszaninie heksan/aceton. Wynika z niego, że większą selektywnością charakteryzuje się HPLC niż TLC. Plamki TLC nie są dobrze rozdzielone. Dodatkowe piki/plamki spowodowane są przez zanieczyszczenia i/lub produkty utlenienia/redukcji DPPH.

3.5. *Rozwijanie płytek* */Developing of TLC plates/*

Do najważniejszych metod rozwijania chromatogramów w TLC zaliczamy metodę mikrocyrkulacji, wstępującą, spływową (zstępującą), horyzontalną, dwukierunkową (2-D, dwuwymiarową), kołową [14, 15]. Dobór odpowiedniej techniki rozwijania w dużej mierze wpływa na retencję próbki. Do najczęściej stosowanych technik zalicza się stopniowe rozwijanie, rozwijanie wielokrotne, gradientowe, „stref klinowych”, poziome [16, 17]. Na Rys. 6 przedstawiono wielokrotne rozwijanie tej samej płytki NP za pomocą tego samego rozpuszczalnika. Okazało się, że technika ta jest nieskuteczna, nie uzyskano lepszego rozdzielania DPPH[•] (plamka fioletowa) od DPPH-H (plamka o barwie żółtej). To samo dotyczy rozwijania stopniowego i dwukierunkowego.

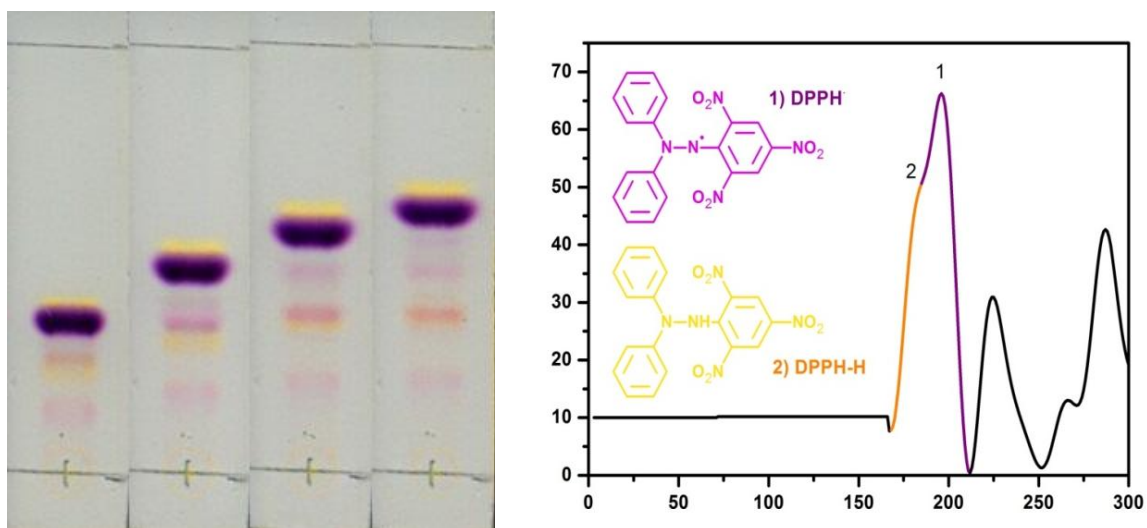
3.6. *Retencja DPPH w komorze wysyczonej i niewysyczonej* */Retention of DPPH in the saturated and unsaturated chamber/*

Retencja próbki zależy od jej oddziaływania zarówno z fazą ruchomą jak i stacjonarną. Z kolei oddziaływanie składników obu tych faz zależy od stopnia wysycenia komory (zwilżenia fazy stacjonarnej). Duży wpływ na współczynnik retencji, k , ma stopień nasycenia komory parami rozpuszczalnika. Wykazano, że dla dwuskładnikowego rozpuszczalnika, heksan/acetone najlepiej jest zastosować płytkę w wysyczonej komorze (rys. 7).



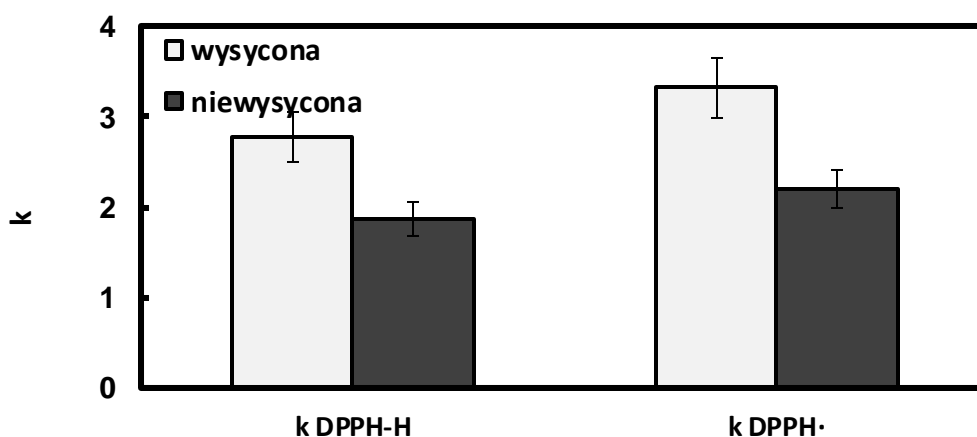
Rys. 5. HPLC chromatogram oraz skan płytki chromatograficznej TLC 1 mM DPPH po częściowej redukcji kwasem galusowym. Warunki chromatograficzne HPLC: kolumna - COSMOSIL 5 μ m, 4,6 x 250 mm, 5C18-AR-II (Waters), temp. - 5°C, faza ruchoma - metanol/woda (80:20, v/v), szybkość przepływu - 1 ml/min, detektor - UV 517 nm. Warunki chromatograficzne TLC: płytka - RP-18W, obj. nastryku - 30 μ l, temp. - 5°C, faza ruchoma - heksan/acetone (80:20% v/v), komora - wysyczona.

Fig. 5. HPLC chromatogram and scan of the TLC chromatographic plate of 1 mM DPPH after its partial reduction by gallic acid. Chromatographic conditions, HPLC: column - Cosmosil 5 mm, 4.6 x 250 mm, 5C18-AR-II (Waters), temp. - 5°C, mobile phase - methanol / water (80:20, v/v), flow rate - 1 ml/min., detector - UV 517 nm. Chromatographic conditions, TLC: plate - RP-18W, volume - 30 μ l, temp. - 5°C, mobile phase - hexane / acetone (80:20% v/v), chamber - saturated.



Rys. 6. TLC chromatogram 1 mM DPPH. Warunki chromatograficzne: płytka - NP, temp. - 20°C, faza ruchoma – heksan/aceton (80:20% v/v), komora - wysycona.

Fig. 6. TLC chromatogram of 1mM DPPH. Chromatographic conditions: plate - NP, temp. - 20°C, mobile phase – hexane/acetone (80:20% v/v), chamber - saturated.



Rys. 7. Zależność współczynnika retencji k utlenionej i zredukowanej formy rodnika DPPH• od stanu wysycenia komory chromatograficznej.

Fig. 7. The dependence of retention coefficient k of oxidized and reduced forms of DPPH• on the state of saturation of the chromatographic chamber.

3.7. Wpływ temperatury na rozdzielanie dwóch form DPPH

/Effect of temperature on the separation of the two forms of the DPPH radicals/

Temperatura wpływa na sprawność (zmniejszenie lepkości rozpuszczalnika), retencję i selektywność rozdzielania chromatograficznego. W Tabeli 5 przedstawiono zależność współczynnika retencji k od temperatury, w zakresie od -26°C do +20°C. Najwyższe współczynniki retencji otrzymano w -10°C dla płytki RP-18W, zaś dla płytki NP w +5°C. W trakcie trwania procesu chromatograficznego zmiana temperatury spowodowała wystąpienie różnych zmian w rozdzielczości i tempie migracji cząsteczek badanego związku.

Tabela 5. Wartość współczynnika retencji, k , oraz współczynnika selektywności, α , dla dwóch form rodnika DPPH na różnych płytkach w zależności od temperatury.

Table 5. The retention, k , and selectivity, α , coefficients of two forms of DPPH radicals at different plates and temperatures.

temperatura [°C]	-26	-20	-15	-10	+5	+20
RP						
$k_{DPPH^{\cdot}}$	1,35	1,41	1,52	3,12	2,50	1,28
k_{DPPH-H}	1,16	1,19	1,28	2,50	2,03	1,03
α_{DPPH}	1,16	1,19	1,19	1,25	1,23	1,24
NP						
$k_{DPPH^{\cdot}}$	2,32	3,60	2,69	2,79	5,48	3,33
k_{DPPH-H}	2,00	2,91	2,22	2,32	4,04	2,79
α_{DPPH}	1,16	1,24	1,21	1,20	1,36	1,19

Zależność współczynnika selektywności od temperatury opisuje równanie van't Hoffa:

$$\ln \alpha = \ln \frac{k_2}{k_1} = - \frac{\Delta \Delta H^{\circ}}{RT} + \frac{\Delta \Delta S^{\circ}}{R}$$

gdzie: α –współczynnik selektywności, $\Delta \Delta H^{\circ}$, $\Delta \Delta S^{\circ}$ – zmiana entalpii i entropii procesu, k – współczynnik retencji, R – stała gazowa, T – temperatura [K].

Brak liniowej zależności $\ln \alpha$ od $1/T$ sugeruje, że retencja DPPH nie jest opisana jednym mechanizmem oddziaływań.

4. Wnioski

/Conclusions/

TLC można zastosować do rozdzielania formy utlenionej rodnika DPPH od zredukowanej DPPH-H. Najkorzystniejsze warunki występują przy zastosowaniu dwuskładnikowej fazy ruchomej heksanu/acetonu (80:20% v/v) w układzie faz odwróconych. Temperatura ma wpływ na selektywność rozdzielania. W części 2 pracy przedstawiona zostanie możliwość zastosowania chromatografii cienkowarstwowej do oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) różnych gatunków mięs.

5. Literatura

/References/

- [1] P. Socha, Zastosowanie zmiataczy wolnych rodników w leczeniu chorób przewodu pokarmowego i w leczeniu żywieniowym dzieci, *Pediatrica Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 3, 2, 129-133, 2001.
- [2] B.K. Głód, P. Piszcz, I. Kiersztyn, A. Lamert, P. Zarzycki, Zastosowanie HPLC do oznaczania wolnych rodników, antyoksydantów oraz całkowitego potencjału antyoksydacyjnego, *Postępy Chromatografii, Monografia nr 111*, 41-66, wydawnictwo Akademia Podlaska, 2009.
- [3] V. Jakus, The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease, *Bratislavské Lekárske Listy*, 101, 10, 541-551, 2000.
- [4] E. Syweński, M. Gryboś, Disease of Free Radicals, Chorobawolnych rodników, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 14, 3, 573-582, 2005.
- [5] Ś. Ziemiański, M. Wartanowicz, Rola antyoksydantów żywieniowych w stanie zdrowia i choroby, *Pediatrica Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 1, 2/3, 97-105, 1999
- [6] H. Puzanowska-Tarasiewicz, L. Kuźmicka, Tarasiewicz, Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 43, 1, 9-14, 2010.
- [7] A.R. Ndhala, M. Moyo, J. V. Staden, Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules?, *Molecules*, 15, 6905-6930, 2010.
- [8] K. Mishra, H. Ojha, N. K. Chaudhury, Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results, *Food Chemistry*, 130, 1036-1038, 2012.
- [9] P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2, 211-219, 2004.

- [10] P. Ionita, Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?, *Chemical Papers*, 59, 1, 11-15, 2005.
- [11] M. Zarzycka, Praca doktorska, Zastosowanie termostатовanej mikrochromatografii cienkowsarstowej dla celów analizy farmaceutycznej, Zakład Toksykologii i Bioanalitiky na Wydziale Budownictwa i Inżynierii Środowiska Politechniki Koszalińskiej, Koszalin 2011.
- [12] J.C. Touchstone, J. C. Chen, K. M. Beaver, Improved separation of phospholipids In Thin Layer Chromatography, *LIPIDS*, 15, 1, 61-62, 1979.
- [13] Z. Witkiewicz, Podstawy chromatografii, 232-275, Wydawnictwa Naukowo Techniczne, Warszawa 2000.
- [14] M.F. Striegel, J. Hill, Thin-Layer Chromatography for Binding Media Analysis, The Getty Conservation Institute, Los Angeles, 1996.
- [15] L. Ciesła, M. Waksmundzka-Hajnos, Multidimensional and multimodal separations by HPTLC in phytochemistry, in High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC), M.M. Srivastava, Ed., Springer, Berlin, Germany, 69-92, 2011.
- [16] J. Sherma, B. Fried, Handbook of Thin-Layer Chromatography, Marcel Dekker, Inc, New York, 2003.
- [17] R. Kocjan, Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Analiza instrumentalna 2, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2000.
- [18] M. Kowalczyk, Praca doktorska, Cholany jako układy samoorganizujące się w technikach rozdzielczych, Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa 2009.
- [19] P.M. Wantusiak, P. Piszcz, M. Skwarek, B.K. Głód, Właściwości antyoksydacyjne miodów wyznaczone metodami chromatograficznymi, *Camera Separatoria*, 3, 2, 297-317, 2011.
- [20] B.K. Głód, P.M. Wantusiak, P. Piszcz, E. Lewczuk, P.K. Zarzycki, Application of micro-TLC to the total antioxidant potential (TAP) measurement. *Food Chemistry*, 173, 749-754, 2015.