

Judyta KOSIŃSKA¹, Grażyna GAŁĘZOWSKA^{1,2}, Sebastian ZALEWSKI¹,
Marian KAMIŃSKI^{1*}

¹ Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, 80-233 Gdańsk, ul. Narutowicza 11/12

² Zakład Toksykologii Środowiska, Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, 80-204 Gdańsk, ul. Dębowa 23

* Autor do korespondencji, e-mail: markamin@pg.gda.pl

Chromatografia cienkowarstwowa i technika TLC-FID w badaniach składu grupowego, szczególnie, tłuszczów i produktów ich konwersji

Streszczenie: Praca dotyczy zbadania celowości stosowania oraz określenia korzystnych warunków wykorzystania "klasycznej" chromatografii cienkowarstwowej w normalnych układach faz (NP-TLC) oraz techniki chromatografii cienkowarstwowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (TLC-FID) na pręcikach kwarcowych, jako technik zapewniających oznaczenie składu grupowego, w badaniach nad:

- ustaleniem optymalnych warunków rozdzielania grupowego tłuszczów i produktów ich konwersji z zastosowaniem kolumnowej chromatografii elucyjnej w warunkach normalnych układów faz (NP-HPLC), albo w warunkach kolumnowej chromatografii wykluczania z jednoczesną adsorpcją o charakterze oddziaływań polarnych (GPC/SEC-NP),
- oceną składu grupowego, tzn. orientacyjnym oznaczaniem składu grupowego tego rodzaju produktów,
- oceną składu frakcji eluatu, tzn. oceny czystości kolekcjonowanych składników rozdzielanych techniką HPLC w skali semi-preparatywnej/preparatywnej.

W niniejszej pracy zwrócono też uwagę na możliwość wykorzystania klasycznej techniki NP-TLC do wstępnych badań nad opanowaniem korzystnych warunków wykorzystania wysokosprawnej kolumnowej elucyjnej chromatografii cieczowej wykluczania sterycznego (GPC-SEC) i słabej adsorpcji o charakterze oddziaływań polarnych, w normalnych układach faz (NP), tzn., wykorzystywania w sposób optymalny warunków GPC-SEC-NP do grupowego rozdzielania w/w produktów. Badania dotyczyły również określenia optymalnych warunków stosowania techniki TLC-FID do określania składu grupowego na przykładzie rozdzielania i oznaczania zawartości składników niektórych tłuszczów i produktów ich konwersji, a także, obecności i zawartości grup składników w technicznym FAME, tzn., estrach metylowych kwasów tłuszczowych, jako pochodnym tłuszczów roślinnych – bio-komponente paliwowym, dodawanym do „naftowego” oleju napędowego do zasilania silników Diesla.

Wnioski z badań i studiów niniejszej pracy dotyczą techniki NP-TLC lub NP-TLC-FID. Są też aktualne dla badań nad wykorzystaniem chromatografii kolumnowej wykluczania z jednoczesną adsorpcją – GPC-SEC-NP – do rozdzielania grupowego tłuszczów i produktów ich konwersji, a także dla badań nad podobnymi warunkami rozdzielania innych złożonych mieszanin związków chemicznych, z wykorzystaniem adsorpcji w normalnych układach faz, lub jednocześnie – wykluczania i słabej adsorpcji. Wyniki pokazują istotne korzyści ze stosowania techniki TLC, w "pilotowych" badaniach nad doбором korzystnych warunków wykorzystywania wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykluczania z jednoczesną kontrolowaną niskoenergetyczną adsorpcją, zwłaszcza z zastosowaniem normalnych układów faz, tzn. warunków GPC-SEC-NP.

Słowa kluczowe: chromatografia cienkowarstwowa w normalnych układach faz – NP-TLC, chromatografia cienkowarstwowa z detekcją płomieniowo-jonizacyjną – TLC-FID, rozdzielanie grupowe, tłuszcze i produkty ich konwersji, nielotne frakcje i produkty naftowe.

Thin-layer chromatography and TLC-FID technique in studies concerning group composition of, especially, fats and products of their conversion

Abstract: The work investigates a desirability of application and discusses determination of favorable conditions of "classic" normal phase thin-layer chromatography (NP-TLC) and thin layer chromatography with flame ionization detection (TLC-FID) on quartz rods as techniques enabling to determine group composition, in studies concerning:

- determination of optimal conditions for group separation of fats and products of their conversion by means of normal-phase liquid chromatography (NP-HPLC) or size exclusion liquid chromatography with simultaneous adsorption of polar interactions character (GPC/SEC-NP),
- evaluation of group composition, i.e. approximate determination of group composition of this type of products,
- evaluation of eluate fraction composition, i.e. assessment of collected components' purity, separated by HPLC in a semi-preparative/preparative scale.

In submitted work an attention was paid to possibilities of using "classic" NP-TLC for preliminary studies to select favorable conditions applicable for high performance size exclusion liquid chromatography (GPC-SEC) and weak adsorption of a polar interactions character, in normal phase (NP) systems, i.e. applying the conditions of GPC-SEC-NP group separation of aforementioned products in optimal manner.

The research was also aimed to determine the optimal conditions of TLC-FID technique used to specify the group composition basing on an example of presence determination and separation of some fats' components and products of their conversion, as well as, the presence and content of group components in a technical FAME, i.e. fatty acid methyl esters, as derivatives of vegetable fats – bio-fuel component added to diesel fuel used in diesel engines.

The conclusions of the research and studies concerns NP-TLC or NP-TLC-FID techniques. They are also valid for researches discussing the usage of high performance size exclusion chromatography with simultaneous adsorption – GPC-SEC-NP – for group separation of fats and products of their conversion, as well as, for researches based on similar separation conditions of other complex mixtures, using adsorption in normal phase systems, or simultaneously – exclusion and weak adsorption. The results indicate significant benefits which arise from usage of TLC technique, in the "pilot" studies concerning the selection of favorable conditions for size exclusion high performance liquid chromatography with simultaneous and controlled low energy adsorption, especially by using the normal-phase, i.e. GPC-SEC-NP conditions.

Key words: normal-phase thin-layer chromatography – NP-TLC, thin-layer chromatography with flame ionization detection – TLC-FID, group separation, fats and products of their conversion, non-volatile fractions and petroleum products.

1. Wprowadzenie (Introduction)

Klasyczna chromatografia cienkowarstwowa (TLC, *ang. Thin Layer Chromatography*), będąca odmianą chromatografii planarnej, jest stosowana powszechnie od lat 30-tych XX-wieku. W ostatnich latach – od czasu wprowadzenia tzw. skanerów, zwłaszcza typu UV-VIS DAD – przeżywa kolejny "renesans".

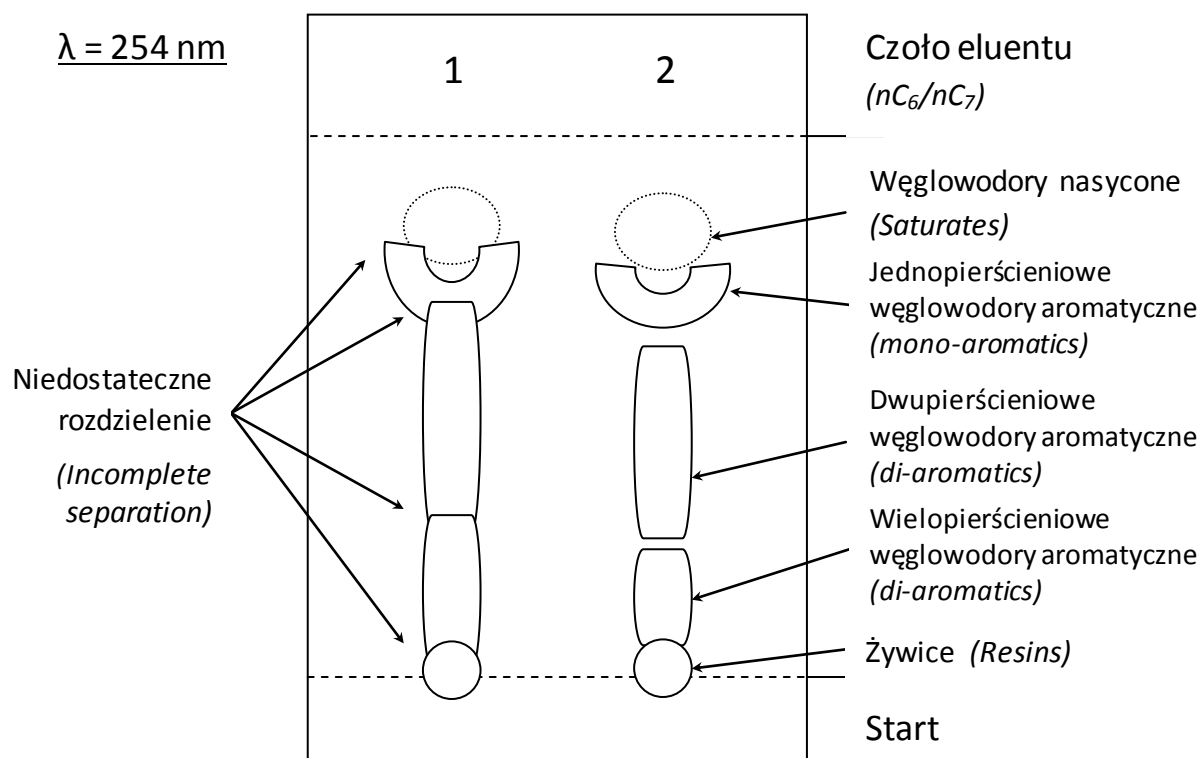
Chromatografia cienkowarstwowa posiada ogromną liczbę różnego rodzaju zastosowań rozdzielczych, w tym, w zastosowaniach mikro-preparawynych, a szczególnie, analitycznych – m.in. w ochronie zdrowia, badaniach leków, żywności, wyciągów roślinnych, grzybowych, w różnych gałęziach gospodarki i innych, a także w badaniach naukowych [1–16]. Największa grupa zastosowań, jak to wynika z literatury, dotyczy analityki zawartości określonych związków chemicznych, albo grup związków chemicznych w rozdzielanych mieszaninach. Wyraźnie mniej aplikacji technika TLC znalazła w zastosowaniu wyłącznie do rozdzielania grupowego. W tym przypadku jest ona wykorzystywana przede wszystkim jako metodyka tzw. „odcisku palca” (*ang. fingerprinting*), w badaniach złożonych mieszanin wieloskładnikowych, o niskolotnych albo nielotnych składnikach, np. do identyfikacji niskolotnych produktów naftowych w monitoringu środowiska czy diagnozowaniu miejsc przecieków w instalacjach procesowych rafinerii ropy naftowej itp. [17]. Technika TLC można również wykorzystać, jako narzędzie do identyfikacji źródeł skażenia środowiska. Z jej pomocą możemy np. szybko odróżnić skażenie środowiska niskolotnymi produktami pochodzenia naftowego od powęglowych, czy spożywczych, lub o innym charakterze [18, 19].

Innym niezwykle ważnym obszarem zastosowań techniki chromatografii cienkowarstwowej, NP-TLC oraz RP-TLC, jest łatwe oraz względnie mało kosztowne uzyskanie informacji o korzystnych warunkach rozdzielania określonych mieszanin z zastosowaniem HPLC [20–26]. Technika TLC jest wykorzystywana tutaj:

- do szybkiego "szacowania" składu złożonych mieszanin, zwłaszcza składu grupowego, a także zawartości określonych składników / grup składników w różnego typu mieszaninach. W pracy doktorskiej J. Gudebskiej [27] technika TLC była wykorzystywana m. in. w celu kontroli składu grupowego eluatu, a tym samym, w celu identyfikacji jakościowej grup związków, znajdujących się we frakcjach odbieranych z kolumny według zmodyfikowanej normy PN-72/C-04025 [28].

- w badaniach nad wstępnym doбором optymalnych warunków rozdzielania techniką HPLC/UPC, tzn., rodzaju fazy stacjonarnej, fazy ruchomej, czy doboru odpowiedniego składu eluentu w izokratycznych warunkach rozdzielania, a także do optymalizacji przygotowania próbki/wsadu do rozdzielania. Na rysunku 1 przedstawiono schematyczne porównanie stopnia rozdzielania poszczególnych grup składników dla oleju bazowego SAE30 (parafiny – nie widoczne w świetle ultrafioletowym, fluoryzujące pod wpływem światła o długości fali 365 nm „monoaromaty” jednopierścieniowe, podstawione alifatycznie/alicyklicznie węglowodory aromatyczne – jasnofioletowa plamka w górnej części płytki, „di aromaty” – pasmo intensywnie fioletowe pośrodku płytki, „poliaromaty” – skupione powyżej plamki nałożonej i żywice – plamka fioletowo-brązowa pozostająca na starcie), przy zastosowaniu warunków elucyjnego rozdzielania techniką sorpcji-desorpcji z elucją stopniową w kolumnie szklanej z żelem krzemionkowym jak w metodzie PN-72/C-04025, oraz po jej zmodyfikowaniu [27].

- potencjalnie może być wykorzystywana przy doborze i opracowaniu optymalnych warunków realizacji procedur wielokolumnowego (*multi column - NC*) i wielowymiarowego (*multidimensional - nD*) rozdzielania skomplikowanych mieszanin, szczególnie z elucją izokratyczną.



Rys. 1. Chromatogramy NP-TLC frakcji odebranych z kolumny chromatograficznej według PN-72/C-04025 (1) i zmodyfikowanej PN-72/C04025 (2) dla oleju bazowego SAE 30. Faza stacjonarna – żel krzemionowy. Faza ruchoma – n-heksan (nC_6) [27].

Fig.1. NP-TLC chromatograms of fractions collected from column chromatography according to PN-72/ C-04025 (1) and modified PN-72/C04025 (2) for SAE 30 base oil. Stationary phase – silica gel. Mobile phase – n-hexane (nC_6) [27].

Technika TLC może być również pomocna do wstępnego doboru korzystnych warunków z elucją gradientową, chociaż w tym przypadku korzyści z jej stosowania są znacznie mniejsze.

Szczególnie istotne znaczenie ma też informacja o tym, czy wszystkie nietolne i niskolotne składniki rozdzielanej mieszaniny są eluowane z kolumny z wykorzystaniem eluentu o określonym składzie oraz sile elucyjnej, w tym, o składzie odpowiadającym końcowemu składowi eluentu w warunkach elucji gradientowej. Z wykorzystaniem TLC można też uzyskać informacje o nierozpuszczalności bądź bardzo niskiej rozpuszczalności określonych składników w eluencie. Jeżeli – mimo kilkukrotnej elucji eluentem o określonym składzie – na starcie pozostaje plamka składników mieszaniny, która zupełnie nie „poruszyła się”, wówczas:

- ma miejsce tak wysoko energetyczna adsorpcja, która powinna zostać uznana za chemisorpcję [19], albo,

- ma miejsce całkowity brak rozpuszczalności określonych składników rozdzielanej mieszaniny w zastosowanym eluencie [19].

Mieszanina taka, wprowadzona do kolumny, spowoduje wyraźne przytkanie/zatkanie kolumny, a w rezultacie wytrącenia się nierozpuszczalnych składników, albo dezaktywację części/całej powierzchni sorpcyjnej kolumny, pod wpływem trwałej sorpcji bardzo silnie sorbowanych składników rozdzielanej mieszaniny. Składniki takie nie będą desorbowane nawet przez zastosowanie eluentu o najwyższej sile elucyjnej, zarówno w warunkach zwykłego przepływu eluentu w kolumnie (NF), jak i w warunkach zwrotnego przepływu eluentu w kolumnie (EBF) [19].

Obecnie technika TLC-FID, swoje zastosowanie znajduje głównie w rozdzielaniu grupowym i badaniu składu grupowego wieloskładnikowych, rozpuszczalnych w eluencie, niskolotnych lub nietolnych materiałów organicznych, w ich analizie technicznej oraz kontroli jakości. Służy głównie do szacunkowego badania składu grupowego w/w produktów/materiałów, w tym tłuszczów i produktów ich konwersji [29–34].

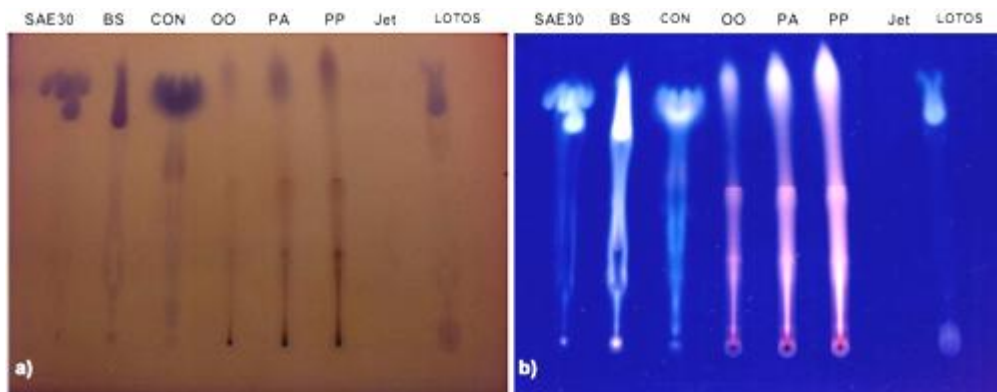
W badaniach "lipidów", w tym tłuszczów i ich pochodnych, wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej [35–41] ma miejsce zarówno w sposób tradycyjny, tzn. w normalnych układach faz (NP-TLC), jak i – jednak znacznie rzadziej – z zastosowaniem w sposób nietypowy odwróconych układów faz (RP). W normalnych układach faz stosowane są nadal naturalne adsorbenty, głównie żel krzemionkowy, ale też – chociaż znacznie rzadziej – tlenek glinu, krzemian magnezu, ziemia okrzemkowa oraz bezwodne, nisko i średnio polarne, jedno lub kilku składnikowe, eluenty. W ostatnich latach coraz szersze zastosowanie – także w TLC – znajdują adsorbenty typu NP, o grupach funkcyjnych związanych wiązaniami

siloksanowymi, na powierzchni porów żelu krzemionkowego. Są to sorbenty typu DIOL, NH₂, CN, AMID, SCX, SAX, o grupach funkcyjnych odpowiednio: alkilo-, lub arylo- diol, amina, nityl, amid, kwas sulfonowy, czy zasada amoniowa i inne, np. cyklodekstryny, kwas holowy, acetylocholina i inne – w zasadniczej większości związane na powierzchni porów wewnątrz-ziarnowych.

W podobny sposób wykorzystuje się również fazy stacjonarne do odwróconych układów faz (RP-TLC). Przy czym, raczej wyłącznie o fazie stacjonarnej typu C18 (oktadekan związany wiązaniem siloksanowym na powierzchni żelu krzemionkowego). Niekiedy też z wykorzystaniem faz stacjonarnych typu CN zastosowanych z bezwodnym, nisko- i średnio-polarnym eluentem. Jak dotychczas, bardzo rzadko prowadzi się tego rodzaju badania z wykorzystaniem TLC i grup funkcyjnych typu C8, lub PHENYL i innych, związanych z żelem krzemionkowym.

W związku ze szczególnie wysoką hydrofobowością tłuszczów i części produktów ich konwersji – szczególnie triacylogliceroli (TAG) oraz różnego rodzaju estrów kwasów tłuszczowych, czy esterów steroli, a w konsekwencji brakiem ich rozpuszczalności w polarnych rozpuszczalnikach organicznych, mających nawet niewielkie zawartości wody, a także w wodzie, w warunkach rozdzielania z wykorzystaniem sorbentów do RP-TLC, nie stosuje się jakiegokolwiek dodatku wody do eluentu, tak podczas rozdzielania jednoetapowego, jak i w pierwszym etapie rozdzielania kilkietapowego. W takim przypadku składnikami eluentu są: acetonitryl (AcCN), bezwodny metanol (MeOH) (rzadziej bezwodny etanol, który jest higroskopijny) czy izopropanol (IzOH), aceton (ACT), dichlorometan (DCM), dichloroetan (DCE), chloroform, etery, albo ich mieszaniny.

Jest oczywiste, że w warunkach normalnych układów faz (NP), podwyższanie polarności eluentu, powoduje wzrost jego siły elucyjnej, a podwyższanie polarności fazy stacjonarnej, powoduje wzrost energii oddziaływań składników układu rozdzielczego z powierzchnią sorpcyjną fazy stacjonarnej. Natomiast, zastosowanie faz stacjonarnych do chromatografii faz odwróconych z bezwodnym eluentem, jest przyczyną innych oddziaływań – tak na powierzchni fazy stacjonarnej, jak i w przestrzeni eluentu, niż w warunkach, gdy eluent zawiera wodę. Znacznie większą rolę odgrywają wówczas oddziaływania kwadrupolowe oraz dyspersyjne, niż ma to miejsce w obecności wody w eluencie. Wówczas, gdy rozdzielana mieszanina zawiera oprócz składników lipofilowych – głównie triacylogliceroli (TAG), czy "karotenów", "poliacetylenów", "izoprenoidów", lub tokoferoli itp. składników – też składniki polarne, np. glicerynę, monoacyloglicerole i względnie polarne, jak, wolne kwasy tłuszczowe, czy diacyloglicerole, lub polifenole, karotenoidy, albo sterole – wówczas w TLC, zarówno w normalnych (NP), jak i odwróconych (RP) układach faz, stosuje się wielo- (dwu, lub trójstopniowe) rozdzielanie [17] albo rozdzielanie dwuwymiarowe [42–45]. Przykłady rozdzielania trójstopniowego, w przypadku rozdzielania nielotnych produktów naftowych, przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Fotografie chromatogramów TLC po 3-stopniowej elucji w kierunku malejącej siły elucyjnej eluentu: eluent 1 – dichlorometan:metanol 95:5 (v/v) 3,5 cm, eluent 2 – toluen 5,5 cm, eluent 3 – heksan 9 cm, wizualizacja: a) $\lambda = 254$ nm, b) $\lambda = 366$ nm; próbki: SAE30 – olej bazowy SAE30; BS – olej bazowy Bright Stock; CON – ciężki olej napędowy; OO – olej opałowy; PA – pozostałość atmosferyczna; PP – pozostałość próżniowa; Jet – paliwo turbodrzutowych silników lotniczych; LOTOS – olej smarowy mineralny „LOTOS” [17].

Fig. 2. Photographs of TLC chromatograms after 3-step elution carried out towards decreasing elution strength: eluent 1 – dichloromethane:methanol 95:5 (v/v) 3.5 cm, eluent 2 – toluene 5.5 cm, eluent 3 – hexane 9 cm, visualization: a) $\lambda = 254$ nm, b) $\lambda = 366$ nm; samples: SAE30 – base oil SAE30; BS – base oil BrightStock; CON – heavy fuel oil; OO – heating oil; PA – atmospheric residue; PP – vacuum residue; Jet – aircraft fuel; LOTOS – mineral oil “LOTOS” [17].

Rozdzielanie wielostopniowe może odbywać się na dwa sposoby, zależnie od charakteru rozpuszczalności składników rozdzielanej mieszaniny w eluentach stosowanych w kolejnych etapach elucji, podobnie jak to opracował swego czasu autor i współpracownicy dla rozdzielania grupowego tzw. pozostałości próżniowych z destylacji ropy naftowej, asfaltów, czy tzw. "smół powęglowych" [19]. Postępuje się z zasady w ten sposób, by pierwszym eluentem był taki, w którym wszystkie składniki /grupy składników

rozdzielanej mieszaniny dobrze się rozpuszczają. Np. w przypadku mieszaniny zawierającej TAG'i, DAG'i, MAG'i, WKT oraz glicerynę, szczególnie, gdy zawartość dwóch ostatnich grup składników nie jest śladowa, to pierwszym eluentem powinien być eluent, w którym wszystkie w/w grupy składników się rozpuszczają, tzn., np. tetrahydrofuran (THF), dioksan, aceton, butanon (MEK – metylo-etylo-keton), czy etoksyetanol itp. lub mieszanina tych składników z nisko polarnym składnikiem eluentu, np. z dichlorometanem, chloroformem, eterem di-etylowym (Et-O-Et), eterem metylo-terbutylowym (MTBE), eterem etylo-terbutylowym (ETBE), n-heksanem (nC₆), octanem etylu itp. składnikami eluentu. W przypadku gdy stosowany eluent ma niską siłę elucyjną w konkretnych, zastosowanych warunkach rozdzielania, to elucję wykonuje się na prawie całą wysokość płytki TLC, albo pręcika TLC-FID. Natomiast, w przypadku zastosowania eluentu o wysokiej sile elucyjnej elucję wykonuje się na 1/3 do 2/3 wysokości płytki TLC / pręcika TLC-FID. Tzn., elucję wykonuje się na tym niższą wysokość płytki, im większą siłę elucyjną posiada eluent, będący dobrym rozpuszczalnikiem wszystkich składników rozdzielanej mieszaniny. W kolejnych etapach elucji stosuje się eluenty o odpowiednio: wyższej, albo niższej sile elucyjnej, niekoniecznie będące dobrymi rozpuszczalnikami wszystkich składników / grup składników rozdzielanej mieszaniny oraz elucję na o tyle wyższym dystansie, na płytce TLC, im niższa jest siła elucyjna zastosowanego eluentu. Należy jednak pamiętać, że w technice TLC nigdy nie może być stosowany eluent, w którym jakiś składnik mieszaniny zupełnie się nie rozpuszcza!

Dla porządku, należy też wspomnieć o potencjalnej możliwości wykorzystywania warunków oddziaływań hydrofilowych (HILIC) w chromatografii cienkowarstwowej – TLC-HILIC. Warunki te, znajdują jednak zastosowanie tylko do rozdzielania polarnych składników / grup składników o względnie dobrej rozpuszczalności w wodzie. W przypadku składników tłuszczów i produktów ich konwersji dobrze rozpuszcza się w wodzie tylko gliceryna. W związku z czym, warunki HILIC nie mają zastosowania w rozdzielaniu tłuszczów i produktów ich konwersji, tak w warunkach TLC, jak i HPLC lub UPLC.

W chromatografii adsorpcyjnej na retencję i selektywność rozdzielania ma wpływ temperatura. Jednakże, szczególnie w normalnych układach faz z bezwodnymi eluentami, ale też i z hydrofobowymi fazami stacjonarnymi, gdy eluent nie zawiera wody, na retencję i selektywność rozdzielania ma wpływ aktywność powierzchni sorpcyjnej adsorbentu, a także stopień nasycenia komory TLC oparami eluentu i stopień równowagi na/w bezpośrednim sąsiedztwie powierzchni sorpcyjnej między warstwą adsorbentu a oparami eluentu. W konsekwencji, w bezwodnych warunkach układów faz normalnych, a także w warunkach hydrofobowych faz stacjonarnych – tak, z bezwodnymi, jednoskładnikowymi, jak i z wieloskładnikowymi, eluentami – bezpośrednie przenoszenie optymalnych warunków oraz otrzymywanych wówczas parametrów retencji (k) i selektywności (α) podczas rozdzielania TLC do chromatografii kolumnowej (HPLC), nie prowadzi do identycznych wartości współczynnika retencji (k). Ogólnie można stwierdzić, że określony eluent – nawet jednoskładnikowy – ma zawsze niższą, czasem tylko niewiele niższą, siłę elucyjną w warunkach NP-TLC, niż w warunkach NP-HPLC [19,26].

Niektórzy badacze donoszą, że w przypadku gdy wartość współczynnika retencji (k) obliczona na podstawie R_f z zależności (1), wynosi k_{TLC} :

$$k_{TLC} = (1-R_f)/R_f \quad (1)$$

gdzie R_f , to współczynnik retencji w chromatografii cienkowarstwowej, obliczany jako stosunek drogi migracji środka plamki/pasma wzdłuż płytki TLC, do drogi migracji czoła eluentu wyznaczany dla jednostopniowej elucji w TLC,

$$\text{to:} \quad k_{HPLC} = a k_{TLC} \quad (2)$$

$$\text{gdzie:} \quad a \in < 1 ; 1/2 > \quad (3)$$

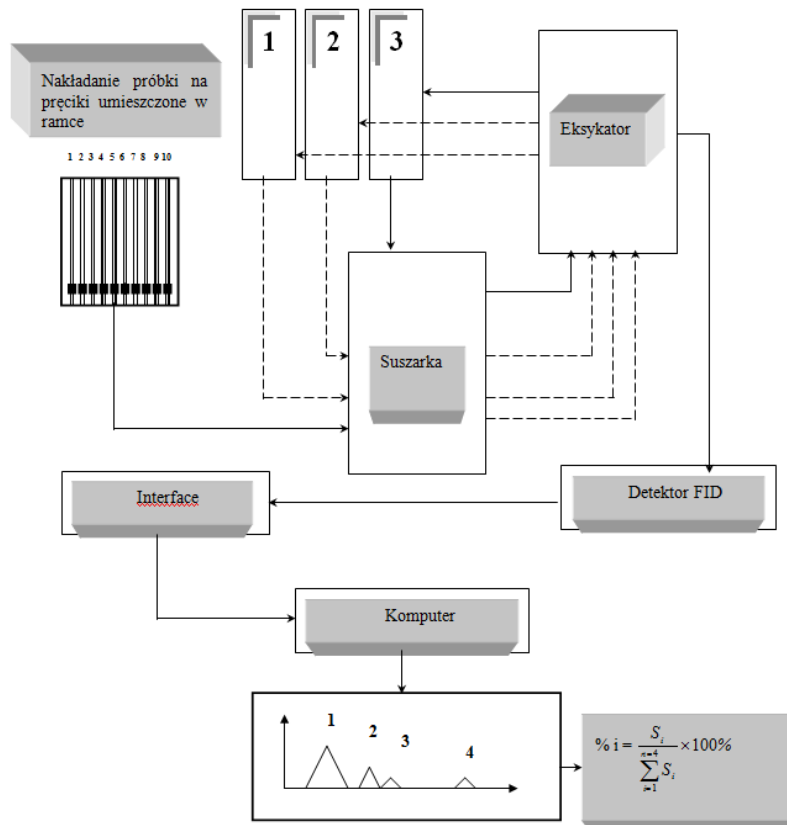
czyli, wartość k określonego składnika / grupy eluowanych składników, dla warunków NP HPLC może być nawet dwukrotnie niższa, niż w warunkach TLC [25]. Wynika to z okoliczności, że w warunkach NP-TLC, eluent nie znajduje się w równowadze z powierzchnią sorpcyjną fazy stacjonarnej (zróżnicowane wartości tzw. stopnia nasycenia komory TLC parami składników eluentu), gdy równowaga taka, tzn., między składnikami eluentu, powierzchnią fazy stacjonarnej kolumny - w warunkach chromatografii kolumnowej i elucji izokratycznej ze stałym składem eluentu - ma miejsce. Dodatkowo, duży wpływ na to ma adsorpcja wody na powierzchni sorpcyjnej płytek, a jej ilość jest różna, w różnych warunkach prowadzenia badań (zależna od wilgotności względnej powietrza), co za tym idzie, może nastąpić częściowa dezaktywacja fazy stacjonarnej [26].

W przypadku bezwodnych eluentów i hydrofobowych faz stacjonarnych, także ma miejsce podobna reguła, z tym że, dla względnie wysoce hydrofobowych "analitów", różnice wartości k_{TLC} i k_{HPLC} są bardzo niewielkie. Przyczyną tego jest mniejszy wpływ warunków rozdzielania na właściwości sorpcyjne fazy stacjonarnej w przypadku rozdzielania substancji średnio i nisko polarnych [26].

W warunkach TLC może też mieć miejsce tzw. efekt demiksji. Zjawisko to obserwujemy gdy składniki, dwu- lub wieloskładnikowego eluentu, różnią się znacznie siłą elucyjną. Dodatkowo, istotne znaczenie ma też jednoczesna różnica lepkości poszczególnych składników eluentów. Następuje powstawanie tzw. „frontu demiksji”, tzn. granicy frontu elucji eluentu bogatego w składnik o wyraźnie wyższej sile elucyjnej, często o dodatkowo wyższej lepkości i napięciu powierzchniowym. Wówczas wyniki rozdzielania w układach rozdzielczych TLC, szczególnie NP-TLC, mogą mieć tylko orientacyjne znaczenie dla przewidywania rozdzielania w NP-HPLC.

Warto też zwrócić uwagę na korzyści, ale także niedogodności, techniki cienkowarstwowej chromatografii cieczowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną TLC-FID, tzn., odmiany chromatografii cienkowarstwowej (TLC), z zastosowaniem kwarcowych pręcików pokrytych mikro-ziarnistą, specjalnie spreparowaną fazą stacjonarną z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (FID). Jest to technika umożliwiająca otrzymanie jedno- lub kilkustopniowego rozdzielania w/g zasady chromatografii cienkowarstwowej, a następnie "ilościowych" rezultatów oznaczenia zawartości organicznych niskolotnych składników i grup składników badanej mieszaniny w formie pików chromatograficznych, dzięki przeprowadzeniu wysuszonego pręcika TLC z rozdzielonymi frakcjami składników rozdzielanej mieszaniny "immobilizowanych" na powierzchni sorpcyjnej, przez płomień powietrzno-wodorowy wewnątrz głowicy detekcyjnej detektora płomieniowo-jonizacyjnego FID [42, 46–48].

Schemat ideowy zasady działania i detekcji systemu TLC-FID zamieszczono na rysunku 3. Należy mieć świadomość, że uzyskanie zadowalającej precyzji oznaczania składu mieszanin związków organicznych techniką TLC-FID, wymaga bardzo starannej powtarzalności wykonania wszystkich etapów badania oraz znacznej wprawy operatora. Mimo to, oznaczenia są wielokrotnie mniej dokładne i znacznie mniej precyzyjne, niż ma to miejsce w chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (GC-FID) [49]. Wynika to z okoliczności wprowadzania do płomienia detektora TLC-FID składników badanej mieszaniny, znajdujących się na powierzchni fazy stacjonarnej w postaci stałej, ewentualnie ciekłej, a nie jak w technice GC-FID, w postaci oparów w gazie nośnym. W przypadku GC-FID, sygnał detekcyjny w postaci prądu elektrycznego spowodowanego przez strumień karbokationów CH_2^+ powstaje natychmiast w przestrzeni detekcyjnej. W detektorze typu TLC-FID musi najpierw nastąpić odparowanie "analitu" z powierzchni sorpcyjnej, jego piroliza (w części spalanie), a dopiero wytworzenie w/w karbokationów. Przy typowej prędkości przemieszczania pręcika wynoszącej ok. 2 mm/sek, prowadzi to do uzyskiwania wielokrotnie niższej czułości detektora TLC-FID, niż GC-FID. W konsekwencji badanie składu mieszanin techniką TLC-FID może dotyczyć tylko składników występujących w badanej mieszaninie na względnie wysokim poziomie zawartości, a granica oznaczalności (LOQ) wynosi orientacyjnie od 0.05 % m/m, do ok. 0.5 % m/m. Jest tym niższa, im większa jest prędkość ruchu pręcika przez płomień.



Rys. 3. Schemat stanowiska pomiarowego TLC-FID Iatroscan i procedury postępowania w czasie oznaczania składu grupowego tą metodą.

Fig. 3. The scheme of TLC-FID Iatroscan measurement site and procedures applied while determining the group composition by this method.

Badanie składu mieszanin związków organicznych techniką klasycznej chromatografii TLC z fotometrycznym oznaczaniem intensywności plamek jest, jednakże, bardziej utrudnione, często też jeszcze mniej dokładne i mniej precyzyjne, niż techniką TLC-FID. Przede wszystkim jednak, w warunkach wykonywania oznaczeń z zastosowaniem "klasycznej" TLC, nie można wykorzystać metodyki "prostej normalizacji", jaką często stosuje się w TLC-FID.

W technice klasycznej chromatografii cienkowarstwowej (TLC) - w przypadku gdy anality nie wykazują barwy w świetle widzialnym - mamy do dyspozycji kilka metod wizualizacji plamek/pasm na powierzchni płytek, dzięki czemu można wykonać analizę obrazu i na podstawie jej wyników, wykonać oznaczenie masy / stężenia analitu / analitów. Są to:

1. Oświetlenie powierzchni płytek za pomocą lampy emitującej promieniowanie UV 365 nm (*koniecznie w okularach ochronnych, absorbujących całkowicie światło w zakresie UV!*). W takim przypadku widoczna jest fluorescencja wzbudzona przez światło 365 nm, widoczna w zakresie widzialnym tych składników rozdzielanej mieszaniny, które zjawisko fluorescencji wykazują w sposób naturalny. Jest to metoda wizualizacji o szczególnie wysokiej czułości.

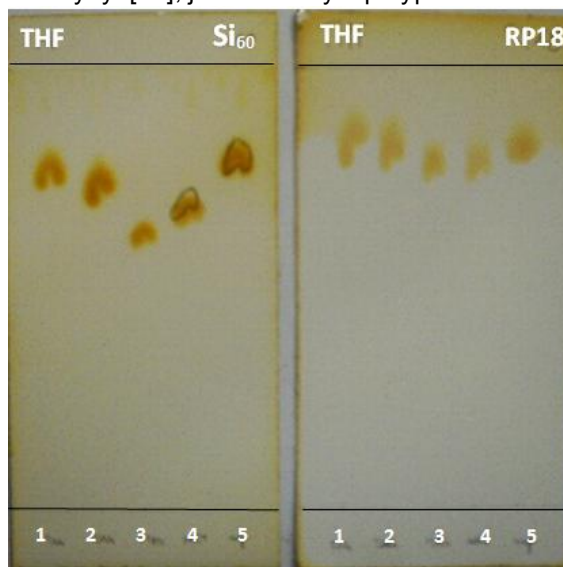
2. Wykorzystanie płytek "F₂₅₄", lub "F₂₅₄₊₃₆₅" z trwale obecnym w bardzo niewielkich ilościach, immobilizowanym na powierzchni sorpcyjnej płytki TLC – luminoforem, którym często bywa siarczek cynku (ZnS), lub innego rodzaju „fluoresceina”. Nie ma ona, jednocześnie, wpływu na retencję i selektywność rozdzielania. „Luminofor”, pod wpływem odpowiedniego rodzaju światła UV, zapewnia powstawanie białej, zielonkawej, żółtawej, albo innej barwy luminescencji powierzchni sorpcyjnej płytki TLC, w zakresie światła widzialnego. Płytkę TLC umieszczoną po rozwinięciu i wysuszeniu, w świetle odpowiedniego rodzaju lampy UV ("niskociśnieniowej" – głównie 254 nm lub "średnio-ciśnieniowej" – głównie 280 i 365 nm) pokazuje obraz obecności plamek tych składników rozdzielanej mieszaniny, które absorbują odpowiednie światło UV w formie "szarości" o zróżnicowanej intensywności – proporcjonalnej do masy/zawartości badanego składnika w obrębie plamki. Nie jest to sposób o wysokiej czułości, jednak stosunkowo uniwersalny, gdyż bardzo wiele organicznych związków chemicznych posiada struktury molekularne absorbujące światło UV o długości fali 254 nm. Niektóre, także 365 nm.

3. Jedną ze stosowanych metod wizualizacji w TLC, jest „chemiczne” wywoływanie barwy plamek, w zakresie światła widzialnego. Należy wyróżnić dwie odrębne metodyki:

a) Wywoływanie "uniwersalne", ale o niezbyt wysokiej czułości i o nie najlepszej powtarzalności rezultatów "ilościowych", tzn.,

- Wywoływanie brązowej / żółto-brązowej barwy plamek w oparach jodu (I₂) – rysunek 4,

- Wywoływanie zaczemienia, albo zszarzenia plamek składników mieszaniny na płytce poprzez spryskanie jej powierzchni przy pomocy nebulizera, mgłą stężonego kwasu siarkowego H₂SO₄. Uniwersalność w/w metodyk jest jednak ograniczona. Sprowadza się do wywoływania barwy plamek tylko organicznych związków chemicznych, jednak nie węglowodorów nasyconych (alkanów i cykloalkanów), a w przypadku olefin, posiadających jedynie pojedyncze wiązania podwójne, czułość jest bardzo niewielka. Barwę łańcuchów alifatycznych, albo cykloalifatycznych, można wywołać poprzez spryskiwanie wysuszonej płytki TLC, roztworem siarczanu berberyjny [50], jednak i w tym przypadku czułość jest bardzo mała.



Rys. 4. Przykład chromatogramów uzyskanych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, TLC. Fotografie płytek TLC: po lewej Si₆₀ F₂₅₄, po prawej RP₁₈ F₂₅₄. Eluent: THF. Oznaczenia: linia ciągła – plamki widoczne przy 254 nm, plamki koloru brązowego – plamki widoczne po wywoływaniu w parach jodu. 1-TAG, 2-DAG, 3-MAG, 4-WKT, 5-olej rzepakowy. Próbki 1-3 – oleiniany, próbka 4 – kwas erukowy. Stężenie wszystkich próbek wynosiło 10 mg/mL, na płytkę TLC наносило po 5 μL każdej z próbek [51].

Fig. 4. Exemplary chromatograms obtained by means of thin layer chromatography, TLC. Photographs of TLC plates: on the left Si₆₀ F₂₅₄, on the right RP₁₈ F₂₅₄. Eluent: THF. Meaning of lines: a solid line - spots visible at 254 nm, brown spots - spots visible after development in iodine vapor. 1-TAG, 2-DAG, 3-MAG, 4-WK, 5-rapeseed oil. Samples 1-3 – oleates, sample 4 - erucic acid. Concentration of all samples was equal 10 mg/ml, on the TLC plate was applied 5 μL of each sample [51].

b) "Specyficzne" metodyki wywoływania barwy określonych grup związków chemicznych, albo jonów, tak organicznych, jak i nieorganicznych – o określonych grupach funkcyjnych lub jonach, albo wręcz określonych indywiduów chemicznych – dzięki przeprowadzeniu na powierzchni sorbentu reakcji chemicznych, prowadzących do utworzenia pochodnych wykazujących barwę w świetle widzialnym, albo znacznie częściej, wykazujących fluorescencję (rzadziej luminescencję lub fosforescencję) w świetle widzialnym, pod wpływem oświetlenia płytki światłem UV 254 nm, lub/i 365 nm. W ostatnich latach metodyki te nie są już raczej rozwijane, posiadają jednak bardzo bogatą literaturę, wśród której należy przede wszystkim, wyróżnić prace J.F.K. York'a [52–54]. Ostatniego rodzaju procedury wywoływania barwy opracowano również dla tłuszczów i ich pochodnych, jednakże, w ramach badań niniejszej pracy nie będą one stosowane.

Badania niniejszej pracy, w zakresie wykorzystywania techniki klasycznej chromatografii cienkowsarstwowej, mają charakter nie-ilościowy, dlatego ograniczono się do wykorzystania wywoływania barwy plamek parami jodu.

Celem badań niniejszej pracy jest określenie celowości stosowania oraz ustalenie korzystnych warunków wykorzystania technik "klasycznej" chromatografii cienkowsarstwowej (TLC) w normalnych (NP-TLC F₂₅₄) z wykorzystaniem żelu krzemionkowego jako adsorbentu oraz żelu krzemionkowego ze związanymi grupami C18 („RP-TLC F₂₅₄”), a także chromatografii cienkowsarstwowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną (NP-TLC-FID), w badaniach nad opanowaniem optymalnych warunków rozdzielania grupowego oraz badania składu grupowego i otrzymywania grup składników będących tłuszczami i produktami ich konwersji, a także, wykorzystania tych technik rozdzielczych i analitycznych, jako metod „fingerprintingu” i szacunkowego badania składu grupowego tłuszczów i produktów ich konwersji.

Odległym – jednakże, jak się wydaje, coraz bardziej realnym - celem tej serii badań, jest opracowanie optymalnych warunków stosowania kolumnowej wysokosprawnej elucyjnej chromatografii cieczowej (HPLC/UPC) w trybie wielokolumnowym i wielowymiarowym, oraz w sposób zautomatyzowany, w rozdzielaniu, identyfikacji i oznaczaniu składu, tzn. oznaczaniu zawartości poszczególnych izomerów acylogliceroli - w tym z rozdzielaniem ich izomerów optycznych, a także izomerów cis i trans. Opanowanie takich metod rozdzielania i oznaczania, powinno także umożliwić, otrzymywanie wysokiej czystości składników tłuszczów i ich pochodnych, jako grup składników albo indywiduów chemicznych, w skali semi-preparatywnej lub preparatywnej.

2. Część doświadczalna (*Experimental*)

2.1. Materiały i próbki:

W badaniach wykorzystano: aluminiowe płytki TLC silica gel 60 F₂₅₄ oraz TLC silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S, pręciki kwarcowe Chromarod SIII pokryte żelazem krzemionkowym, metanol cz.d.a. POCh (Polska), chlorek metylenu cz.d.a. POCh (Polska), n-heksan do HPLC Merck (Niemcy), tetrahydrofuran cz.d.a. POCh (Polska), izopropanol cz.d.a. POCh, kwas trifluoroctowy 99% Sigma-Aldrich (Niemcy).

2.2. Sprzęt i wyposażenie:

Komory do chromatografii cienkowsarstwowej; analizator TLC-FID IATROSCAN produkcji Iatron Labs. (Japonia). Uzupełnienie wyposażenia stanowiły: automatyczny dozownik próbek SES 3200/IS-01, suszarka pręcików TLC TK-8, przetwornik analogowo-cyfrowy i oprogramowanie do obróbki danych Chomik (Polska), urządzenie do wizualizacji plamek na płytkach TLC z lampą UV 254/365nm.

2.3. Procedura prowadzenia badań TLC / TLC-FID:

W badaniach techniką TLC-FID, wykorzystano analizator IATROSCAN oraz pręciki kwarcowe Chromarod SIII pokryte żelazem krzemionkowym. W przypadku klasycznej techniki TLC wykorzystano płytki pokryte żelazem krzemionkowym typu „H60” oraz typu „RP”, w obu przypadkach zawierającym wskaźnik fluorescencyjny odpowiednio typu „F254”. Fazę ruchomą lub składniki fazy ruchomej, stanowiły: dichlorometan (DCM), toluen (T), chloroform, izomeryzat, n-heksan (n-C6), metanol (MeOH), izopropanol (izoOH) oraz ich mieszaniny.

Elucję wykonywano:

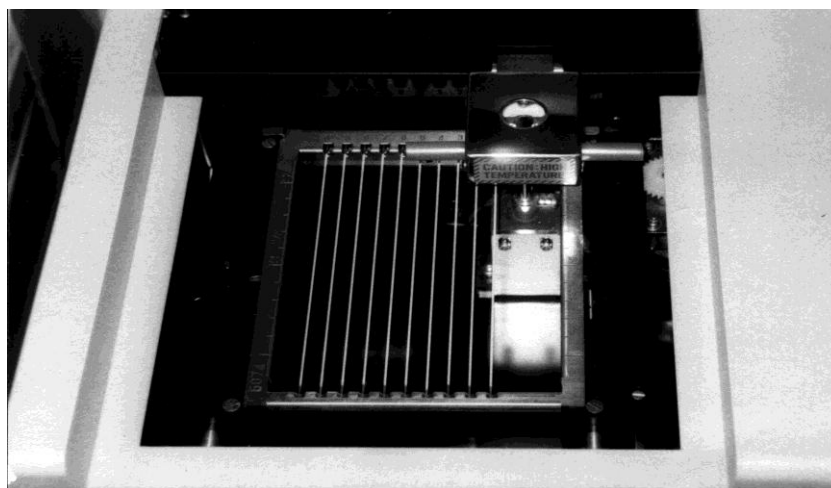
- rozwijanie trójstopniowe (dichlorometan:metanol 95:5 v/v, toluen, n-heksan – w dwóch kierunkach, tj. w kierunku rosnącej oraz malejącej siły elucyjnej),
- rozwijanie jednostopniowe (n-heksan:izopropanol 95:5v/v + 0,075% TFA),
- rozwijanie jednostopniowe (n-heksan:izopropanol 97:3 v/v + 0,075% TFA),
- rozwijanie jednostopniowe (n-heksan:izopropanol 95:5 v/v + 0,5% CH₃COOH),
- rozwijanie jednostopniowe (n-heksan:izopropanol 97:3 v/v + 0,5% CH₃COOH).

W celu cofnięcia dysocjacji kwaśnej rozdzielanych związków chemicznych stosowano kwas trifluoroctowy jako dodatek do eluentu w stężeniu 0,075% lub kwas octowy w stężeniu 0,5%. Bezpośrednio przed każdym rozdzielaniem, ramkę z pręcikami aktywowano w płomieniu wodorowym detektora FID,

trzykrotnie w czasie 35s, 50s, 50s, natomiast płytki TLC wygrzewano w suszarce w temp. 110°C, w czasie 5 h. Aktywowane płytki TLC oraz ramki z pręcikami TLC-FID przechowywano przez 10 min w eksykatorze, w celu ochłodzenia. Plamki nakładano z wykorzystaniem automatycznego aplikatora, dozując 1µl roztworu o stężeniu 0,5 mg badanej mieszaniny/mL heksanu. W celu przyspieszenia odparowywania rozpuszczalnika, powierzchnię pręcika/płytki ogrzewano strumieniem ciepłego powietrza. Po nałożeniu plamek zarówno pręciki jak i płytki TLC suszono przez 5 minut w suszarce, w temperaturze 50°C, po czym umieszczano je na 10 min w eksykatorze. Po tym czasie wieszano nad rozpuszczalnikiem w komorze chromatograficznej (10 minut) i poddawano rozwijaniu. Schemat stanowiska przedstawiono na rysunku 3.

Detekcja z zastosowaniem techniki TLC-FID następowała podczas przejścia każdego pręcika, w czasie 35 sekund, przez płomień wodorowy detektora FID z jednoczesną cyfrową rejestracją sygnału z elektrometru. Na rysunku 5 przedstawiono widok ramki z pręcikami TLC Chromarods SIII, umieszczonej w komorze detektora, analizatora Iatroscan.

W przypadku techniki TLC, po rozwinięciu płytek, wykonywano wizualizację pod lampą UV przy 254nm oraz 365nm. Rozdzielnie i oznaczania każdej próbki wykonano trzykrotnie.



Rys. 5. Widok ramki z dziesięcioma pręcikami TLC umieszczonej w komorze detektora FID, w aparacie Iatroscan.

Fig. 5. View of frame with ten rods placed in the TLC-FID chamber in Iatroscan apparatus.

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

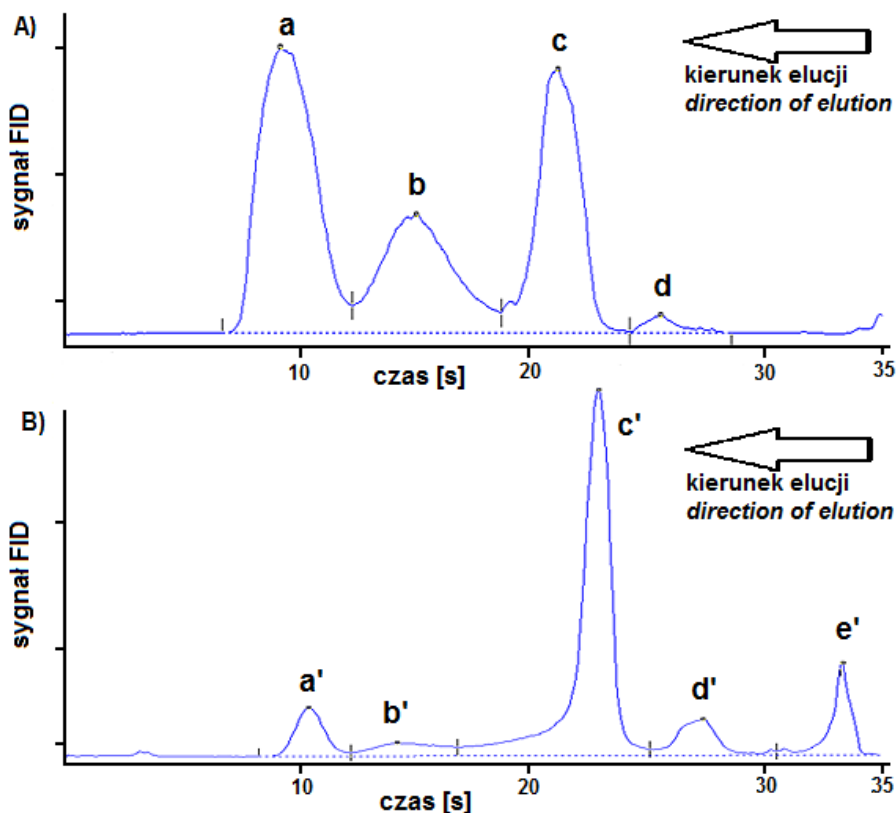
Technika TLC i TLC-FID w rozdzielaniu grupowym niskolotnych produktów naftowych

Na rysunku 6-tym zamieszczono przykład dwóch chromatogramów TLC-FID, przedstawiających rezultaty rozdzielania grupowego na pręcikach Chromarods SIII i detekcji za pomocą detektora FID w aparacie IATROSCAN, odpowiednio: oleju bazowego typu bright stock, otrzymanego w rezultacie rafinacji pozostałości próżniowej z ropy naftowej – na rys. 6A oraz pozostałości z destylacji próżniowej, z której brightstock został otrzymany – rys. 6B.

Elucja była wykonywana po dwukrotnej aktywacji pręcika w płomieniu wodorowym w czasie 35 i 50s, n-heksanem (nC6) na dystansie ok. 95% długości warstwy fazy stacjonarnej, toluenem (T) na dystansie ok. 55% wysokości tej warstwy oraz mieszaniną dichlorometan-metanol w stosunku objętościowym 95:5 (v/v) (DCM/MeOH 95:5), na dystansie ok. 30%. Z tym, że w przypadku brightstocku – w kolejności malejącej siły elucyjnej, tzn kolejno: nC6, T, DCM-MeOH 95:5, a w przypadku pozostałości próżniowej, w kierunku spadku siły elucyjnej na tym samym dystansie wysokości jak dla oleju bazowego. Piki na tych chromatogramach to, odpowiednio: a,a' – frakcja węglowodorów alifatycznych i alicyklicznych, z nieznaczną, najprawdopodobniej zawartością jednopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z rozbudowanymi strukturami alifatycznymi i alicyklicznymi, co powoduje brak możliwości adsorpcyjnych oddziaływań pierścienia aromatycznego z powierzchnią sorbentu, b,b' – nietolne jednopierścieniowe węglowodory aromatyczne w ten sposób podstawione alifatycznie i alicyklicznie, że możliwa jest sorpcja pierścienia aromatycznego do powierzchni aktywnego żelu krzemionkowego, c,c' – jedno- i dwu- oraz wyżej-pierścieniowe podstawione alifatycznie i alicyklicznie węglowodory aromatyczne o powinowactwie sorpcyjnym do powierzchni SiO₂ zbliżonym do 1-metylnaftalenu, fenantrenu, pirenu, benzo(a)pirenu itp.; d,d' – tzw. żywice" (resins) – węglowodory polarne, zawierające w strukturze molekularnej pierwiastki inne niż C/H, tzn. N, O, SH, Ni, Fe; e' – asfalteny – podstawione alifatycznie/alicyklicznie – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne,

zawierające grupy karboksylowe i inne struktury z N, S, O, o dotychczas bliżej nie określonych, skomplikowanych strukturach molekularnych, jednocześnie nierozpuszczalne w n-alkanach.

Technika TLC-FID okazała się niezwykle przydatna w badaniach składu grupowego nisko lotnych i nielotnych frakcji i produktów naftowych różnego rodzaju, otrzymywanych podczas operacji destylacji próżniowej ropy naftowej, w tym z pozostałości próżniowej. Ta technika okazuje się też przydatna dla rozdzielania oraz badania składu grupowego innego rodzaju wieskładnikowych mieszanin, organicznych związków chemicznych. Przy czym dobór warunków rozdzielania jest uprzednio wykonywany z zastosowaniem „klasycznej” techniki cienkowarstwowej chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Technika TLC jest też przydatna do wstępnego doboru warunków rozdzielania grupowego dla techniki HPLC/UPLC (UPC), mimo podanych powyżej ograniczeń z prostym przenoszeniem parametrów retencji i selektywności z techniki TLC do HPLC/UPLC.



Rys. 6. Przykład chromatogramu TLC-FID po 3-stopniowej elucji gdzie eluentami były – dichlorometan:metanol 95:5 (v/v), toluen, heksan, A) olej bazowy Bright Stock, elucja w „kierunku” wzrostu siły elucyjnej kolejnych eluentów; B) pozostałość próżniowa, elucja w „kierunku” spadku siły elucyjnej kolejnych eluentów.

Fig. 6. TLC-FID chromatograms after 3-step elution where the eluents were – dichloromethane:methanol 95:5 (v/v), toluene, hexane, A) base oil Bright Stock, elution carried out towards increasing elution strength; B) atmospheric residue, elution carried out towards decreasing elution strength.

Dobór warunków rozdzielania grupowego acylogliceroli i ich pochodnych

Wstępny dobór składników i składu eluentu dla chromatografii kolumnowej w układach faz normalnych wykonano z zastosowaniem „zwykłej” chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z płytkami z żelem krzemionkowym. Wpłynęło to na skrócenie czasu i zmniejszenie kosztów badań, ponieważ – jak wiadomo – na jednej płytce TLC można rozdzielać kilka próbek równocześnie. Dodatkowo, widać czy w przypadku zastosowania określonych eluentów „na starcie” nie pozostają plamki substancji bardzo silnie sorbowanych. Wartości liczbowe parametrów R_f i k uzyskanych dla różnych warunków rozdzielania acylogliceroli (TAG, DAG, MAG), estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME), kwasów tłuszczowych (FA) w układzie faz normalnych z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej na płytkach z żelem krzemionkowym ($\text{SiO}_2 - \text{F}_{254}$) zestawiono w Tabeli 1. Zamieszczono tam także wartości k obliczone na podstawie R_f .

Badania obejmowały wykorzystanie różnych zawartości izopropanolu w eluencie, jako modyfikatora zwiększającego siłę elucji fazy ruchomej, jak również dodatku do eluentu dwóch rodzajów kwasu - octowego i trifluorooctowego.

W przypadku stosowania żelu krzemionkowego jako fazy stacjonarnej, korzystne jest zastosowanie silniejszego eluentu – mieszaniny heksanu i izopropanolu w stosunku objętościowym 95:5 oraz modyfikatora kwasowego – kwasu trifluorooctowego. W przypadku stosowania pręcików z naniesioną fazą stacjonarną konieczne jest aktywowanie powierzchni pręcików przez poddanie ich ogrzewaniu i jednoczesnym spalaniu zanieczyszczeń w płomieniu wodorowym (3 razy przez 50 sekund).

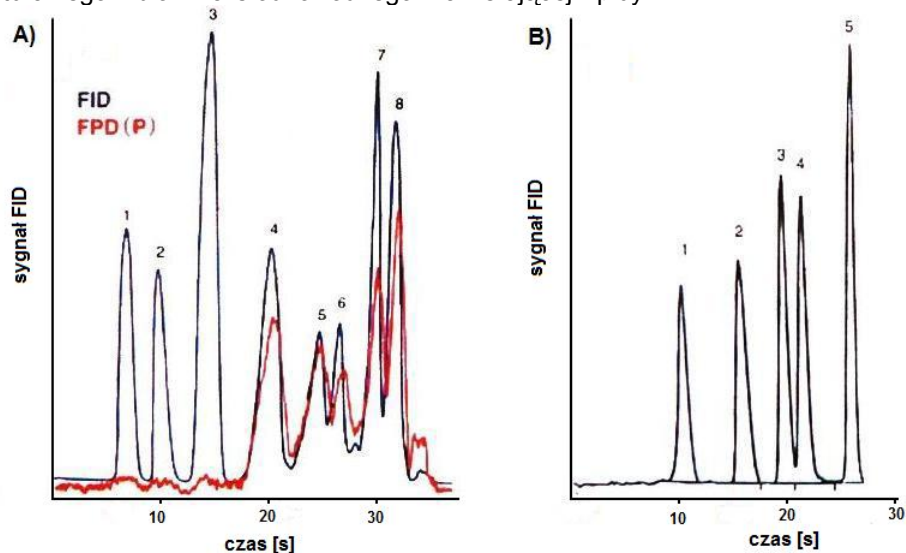
Tabela 1. Wartości współczynników Rf oraz k dla mono-, di-, tri-acylogliceroli (MAG, DAG, TAG), estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME), kwasów tłuszczowych (FA) oraz glicerolu; faza stacjonarna: SiO₂ - F₂₅₄, faza ruchoma: zgodnie ze wskazaniem w tabeli.

Table 1. The values of Rf and k for mono-, di-, tri-acylglycerols (MAG, DAG, TAG), fatty acid methyl esters (FAME), fatty acids (FA) and glycerol; stationary phase: SiO₂ - F₂₅₄, mobile phase: as indicated in table.

Substancje (Substances)	WARTOŚCI Rf i k (Rf and k values)									
	97% n-heksanu, 3% izopropanolu (97% of hexane, 3% of isopropanol)					95% n-heksanu, 5% izopropanolu (95% of hexane, 5% of isopropanol)				
	0,5% CH ₃ COOH		0,075% TFA		0,5% CH ₃ COOH		0,075% TFA			
	płytki nieaktywowane (non-activated plates)		płytki aktywowane (activated plates)							
	Rf	k	Rf	k	Rf	k	Rf	k	Rf	K
TAG	0,28	2,57	0,48	1,1	0,56	0,8	0,57	0,8	0,58	0,7
DAG	0,05	19,0	0,21	3,8	0,30	2,3	0,33	2,0	0,35	1,9
MAG	0,04	24,0	0,11	8,1	0,16	5,3	0,21	3,8	0,23	3,3
FAME	0,02	49,0	0,03	32,3	0,13	6,7	0,04	24,0	0,18	4,6
FA	0	∞	0	∞	0,04	24,0	0	∞	0,40	1,5
Glycerol (glycerol)	0	∞	0	∞	0	∞	0	∞	0	∞

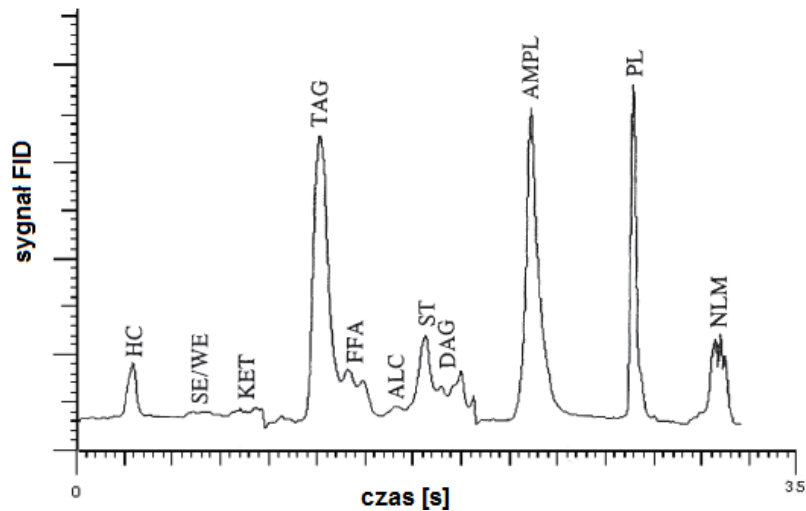
Badania z zastosowaniem chromatografii cieczowej z wykorzystaniem pręcików pokrytych sorbentem oraz detektora płomieniowo-jonizacyjnego – TLC-FID

Z przeglądu literatury wynika, iż chromatografia planarna jest powszechnie stosowana do rozdzielania grupowego frakcji mono-, di-, tri-acylogliceroli (MAG, DAG, TAG), kwasów tłuszczowych (FA), estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) [30, 55]. Przykład chromatogramu TLC-FID rozdzielania mieszaniny wzorców lipidów oraz mieszaniny wzorców acylogliceroli i kwasów tłuszczowych przedstawiono na rysunku 7. Natomiast na rysunku 8 zamieszczony został przykładowy chromatogram rozdzielania próbki pobranej z naturalnego zbiornika słodkowodnego zawierającej lipidy.



Rys. 7. Chromatogramy TLC-FID oraz TLC-FPD: **A) mieszaniny wzorców lipidów:** 1. Ester cholesterolu, 2. TAG, 3. Cholesterol, 4. Fosfatydyoetanolina, 5. Fosfatydylocholina, 6. Fosfatydyloinozytol, 7. Sfingomieliina, 8. Lizofosfatydylocholina; warunki rozdzielania: pręciki Chromarod SIII; elucja: 1) chloroform-metanol-woda-25%amoniak 47:20:2,5:0,28 – 7cm; 2) heksan-eter dietylowy 63:7 – 10cm. **B) mieszaniny wzorców glicerydów:** 1. TAG (tripalmitin), 2. FA (kwas palmitynowy), 3. 1,3-DAG (1,3-dimirystin), 4. 1,2-DAG (1,2-dipalmitin), 5. MAG (monopalmitin); warunki rozdzielania: pręciki Chromarod SIII; elucja: benzen / chloroform / kwas octowy 50:20:0,7 – 10cm [55].

Fig. 7. TLC-FID and TLC-FPD chromatograms: A) lipids standards mixture: 1. Cholesterol ester, 2. TAG, 3. Cholesterol, 4. Phosphatidyl ethanolamine, 5. Phosphatidyl choline, 6. Phosphatidyl inositol, 7. Sphingomyelin, 8. Lysophosphatidyl choline; separation conditions: Chromarod SIII rods; elution: 1st. Chloroform-Methanol-Water-25%Ammonia 47:20:2.5:0.28 – 7cm; 2nd. Hexane-Diethyl ether 63:7 – 10cm; **B) glycerides standards mixture:** 1. TAG (tripalmitin), 2. FA (palmitic acid), 3. 1,3-DAG (1,3-dimyristin), 4. 1,2-DAG (1,2-dipalmitin), 5. MAG (monopalmitin); separation conditions: Chromarod SIII rods; elution: Benzene / Chloroform / Acetic acid 50:20:0.7 – 10cm [55].



Rys. 8. Chromatogram TLC-FID otrzymany dla próbki, zawierającej głównie okrzemki z rodziny *Asterionella* sp., *Fragilaria* sp., and *Tabellaria* sp., pobranej z nowofundlandzkiego strumienia w maju 2005r., poprzez holowanie sieci o drobnych oczkach (20 μ m). Iatroscan – warunki rozdzielania: przepływ powietrza 2,0 L/min, H₂ 190 mL/min. HC – węglowodory; SE/WE – estry sterolowe i woskowe; KET – ketony; TAG – triacyloglicerole; FFA – wolne kwasy tłuszczowe; ALC – alkohole; ST – sterole; DAG – diacyloglicerole; AMPL – lipidy polarne rozpuszczalne w acetonie; PL – fosfolipidy; NLM – materiał nie-lipidowy [za zgodą 56].

Fig. 8. TLC-FID chromatogram of a net-tow sample (20- μ m mesh, consisted mainly of the pennate diatoms *Asterionella* sp., *Fragilaria* sp., and *Tabellaria* sp., taken from a Newfoundland stream in May, 2005. Iatroscan conditions: air flow 2.0 L/min, H₂: 190 mL/min. HC – hydrocarbon; SE/WE – sterol and wax esters; KET – ketone; TAG – triacylglycerol; FFA – free fatty acid; ALC – alcohol; ST – sterol; DAG – diacylglycerol; AMPL – acetone-mobile polar lipids; PL – phospholipid; NLM – nonlipid material [with the consent of 56].

Widać, że technika TLC-FID może być bardzo przydatna do badań składu grupowego tłuszczów i produktów ich konwersji, co jest przedmiotem badań niniejszej pracy. Powyższe wnioski z przeglądu literatury zmobilizowały do wykonania badań techniką TLC-FID w celu sprawdzenia czy nie okaże się ona konkurencyjna wobec techniki NP-HPLC w badaniach składu grupowego materiałów zawierających tłuszcze i wybrane produkty ich konwersji. W przypadku pozytywnych wyników możnaby stosować w/w techniki zamiennie, w zależności od wyposażenia laboratorium i dostępności odpowiedniej aparatury.

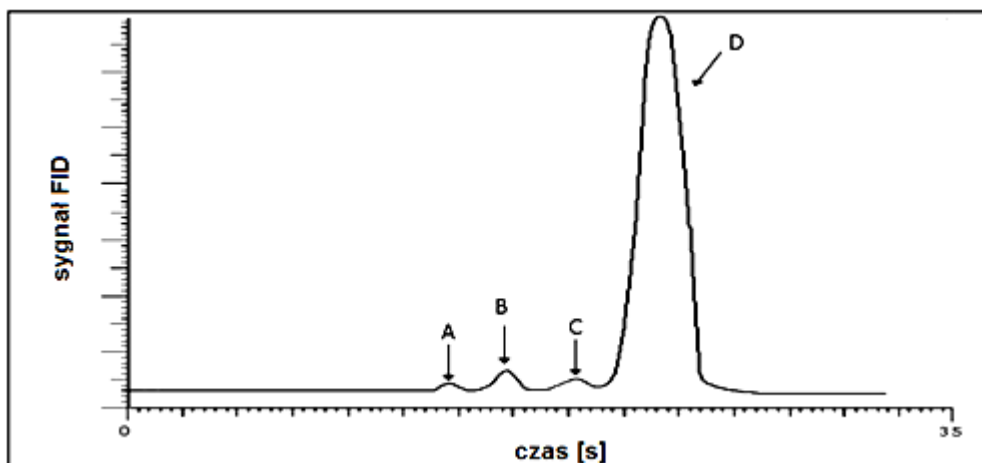
Przykłady chromatogramów otrzymanych z zastosowaniem TLC-FID w badaniach składu grupowego oleju palmowego „bielonego” oraz handlowego FAME przedstawiono na rysunkach 9 i 10.

Wykonane badania wykazały, że zastosowanie techniki TLC-FID do rozdzielania acylogliceroli i ich pochodnych wymaga bardzo powtarzalnej realizacji procedury postępowania. Zmiana czasu kondycjonowania pręcików w komorze nad rozpuszczalnikiem nie wpływa na przeciętne udziały powierzchni pików poszczególnych grup substancji, lecz pogarsza się powtarzalność wyników oznaczeń. Natomiast, takie parametry, jak zawartość wody w eluencie, a szczególnie czas przebywania pręcików nad powierzchnią eluentu, w jego oparach, oraz stężenie próbki nanoszona na pręcik, mają wpływ na stopień rozdzielania pików.

Otrzymane wyniki wykazują, że precyzja oznaczeń składu grupowego oznaczania MAG, DAG, TAG, FAME, FA metodą TLC-FID, wyznaczona dla odchylenia standardowego, mieści się w granicach około 5% (\pm 2,5%) zawartości oznaczanych grup związków chemicznych i jest wyraźnie gorsza od rezultatów otrzymanych techniką HPLC.

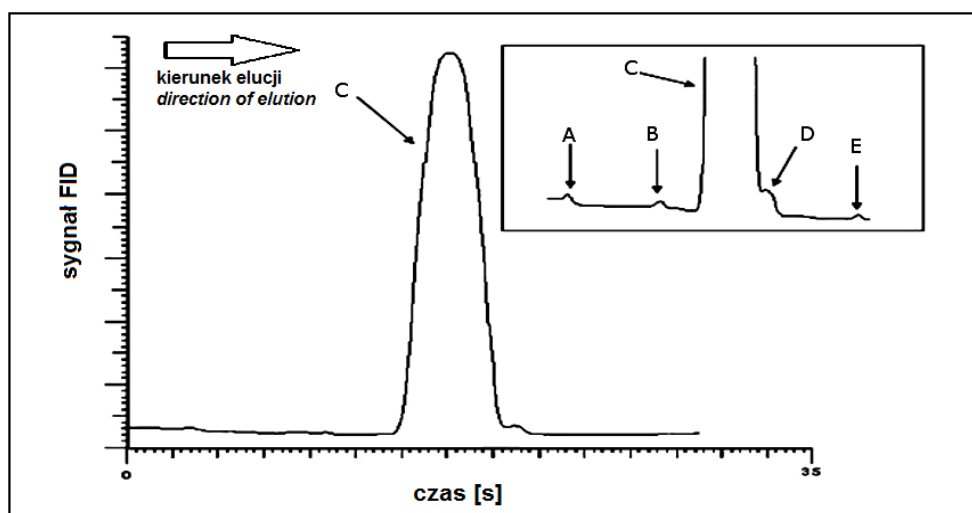
Rozdzielanie i analityka z wykorzystaniem wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej (HPLC) jak również chromatografii cienkowarstwowej TLC-FID stanowi doskonały wybór dla badań składu grupowego różnych materiałów. Klasyczna chromatografia cienkowarstwowa (TLC) pozwala jednakże tylko na jakościowe zapoznanie się ze składem grupowym badanego materiału.

Przedstawione procedury są konkurencyjne do procedury przedstawionej w normie EN 14105 [57], w której zanieczyszczania FAME oznacza się z wykorzystaniem kapilarnej chromatografii gazowej (CGC) i „prekolumnową” derywatacją metanolem kwasów tłuszczowych powstałych w rezultacie hydrolizy do lotnych, metylowych pochodnych.



Rys. 9. Chromatogram TLC-FID rozdzielania składników „olej palmowy-bielony” z zastosowaniem żelu krzemionkowego jako fazy stacjonarnej na kwarcowych pręcikach „SIII”, eluent: mieszanina n-heksan : izopropanol 95: 5 (v/v) z 0,075% TFA, gdzie: A – monoacyloglicerole (MAG), B – FAME, C – diacyloglicerole (DAG), D – triacyloglicerole (TAG).

Fig. 9. TLC-FID chromatogram of "blanched palm oil" components separation using silica gel as a stationary phase on quartz rods „SIII”, eluent: n-hexane : isopropanol 95: 5 (v/v) with 0.075% TFA, A – monoacylglycerols (MAG), B – FAME, C – diacylglycerols (DAG), D – triacylglycerols (TAG).



Rys. 10. Chromatogram TLC- FID rozdzielania składników handlowego „FAME” z zastosowaniem żelu krzemionkowego jako fazy stacjonarnej na kwarcowych pręcikach „SIII”, eluent: mieszanina n-heksan : izopropanol 95: 5 (v/v) z 0,075% TFA, gdzie: A – kwasy tłuszczowe i glicerol, B – monoacyloglicerole (MAG), C – FAME, D – diacyloglicerole (DAG), E – triacyloglicerole (TAG).

Fig. 10. TLC-FID chromatogram of commercial "FAME" components separation using silica gel as a stationary phase on the quartz rods „SIII”, eluent: n-hexane : isopropanol 95: 5 (v / v) with 0.075% TFA, A - fatty acids and glycerol, B – monoacylglycerols (MAG), C – FAME, D – diacylglycerols (DAG), E – triacylglycerols (TAG).

Badania techniką TLC i TLC-FID oraz odniesienie ich rezultatów do HPLC, dla typowego rozdzielania grupowego oraz dla rozdzielania w warunkach GPC/SEC-NP/RP

Badania realizowane z zastosowaniem techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC) – żel krzemionkowy, DIOL, CN, NH₂, RP18 z i bez „fluoresceiny 254 nm”, miały dwa cele:

- wyjaśnienie, czy inne fazy stacjonarne, niż powszechnie stosowane w grupowym rozdzielaniu lipidów i produktów konwersji tłuszczów, nie posiadają na tyle bardziej korzystnej selektywności, by było celowe zastąpienie nimi żelu krzemionkowego w rozdzielaniu grupowym tej klasy produktów i materiałów, techniką HPLC, albo klasycznej preparatywnej chromatografii kolumnowej,

a także,

- wyjaśnienie na drodze doświadczalnej, czy i w jakim stopniu technika TLC, może być przydatna w doborze optymalnej fazy stacjonarnej, składników oraz składu eluentu do rozdzielania grupowego lipidów i produktów konwersji tłuszczów w warunkach chromatografii wykluczania, z jednoczesną adsorpcją.

Uzyskane wyniki potwierdziły znaną z literatury zasadę celowości stosowania techniki TLC do doboru najbardziej korzystnych składników eluentu oraz do wstępnego doboru optymalnego składu eluentu do rozdzielania grupowego w warunkach, tak chromatografii w normalnych układach faz (NP) do grupowego rozdzielania lipidów i produktów konwersji w tłuszczu, a także – choć w mniejszym stopniu – przydatność TLC do rozdzielania składników poszczególnych grup, z zastosowaniem hydrofobowej fazy stacjonarnej C18 F₂₅₄ oraz bezwodnych eluentów o różnych zakresach polarności (RP-TLC F₂₅₄).

Szczególnie celowe jest stosowanie do takich badań płytek HPTLC (szczególnie typu F₂₅₄), z żelem krzemionkowym, jako fazą stacjonarną, o drodze rozwijania chromatogramu TLC w zakresie 3÷6 cm, i dokonywanie kilkietapowej „wizualizacji”, tzn. fotografii cyfrowej, w celu dokumentowania, a także wykonania cyfrowego przetwarzania obrazu w zwykłe chromatogramy.

Wizualizację oraz fotografie cyfrowe płytek wykonywano po kolejnych etapach rozwijania i wysuszeniu płytki:

- pod lampą UV 254 nm widoczne są plamki / pasma składników, absorbujące światło niskociśnieniowej lampy rtęciowej, gdy ich zawartość w dozowanej na płytkę próbce, przekracza ok. 0,1–0,5 % m/v, albo znacznie niższe zawartości, jeśli substancja, albo grupa substancji wykazuje fluorescencję / luminescencję pod wpływem światła lampy rtęciowej niskociśnieniowej („254 nm”);

- pod lampą UV 360 nm widoczne są tylko plamki/pasma składników fluoryzujących pod wpływem światła lampy rtęciowej „365 nm” – najczęściej fluorescencja niebieska, w przypadku węglowodorów aromatycznych.

Po ostatnim etapie rozwijania płytki oraz jej wysuszeniu dokonywano wizualizacji po ekspozycji płytki w oparach jodu w czasie ok. 10 minut w temperaturze pokojowej (możliwość zaobserwowania obecności dużej części nielotnych organicznych składników / grup składników próbki, występujących w stężeniu w mieszaninie badanej, wyższym od ok. 0,1–0,5%. Po ekspozycji płytki w parach jodu i wizualizacji w świetle widzialnym, a następnie, odparowaniu jodu (co najmniej 24 godziny), możliwe jest ewentualne zastosowanie, dodatkowo, spryskania, albo zanurzenia płytki w odpowiednim roztworze „wywołującym” barwę, albo fluorescencję / luminescencję lipidów i produktów ich konwersji, albo tylko wybranych grup związków chemicznych, lub określonych substancji, w celu ich „wizualizacji” i oceny stężenia. Istnieje bardzo bogata literatura metodyczna w tym zakresie. Do tego rodzaju badań, można z przekonaniem polecić publikacje i podręczniki prof. H. Jork’a i współpracowników [52–54]. W ramach opisywanych tu badań, „selektywne wywoływanie” wykonywano tylko w przypadku niektórych badanych próbek, tzn., tylko w celu wizualizacji i oceny stężenia – polioxy-glicerydów, nad-kwasów tłuszczowych, czy cholesterolu i innych steroli (wyniki nie prezentowane w tej pracy). Natomiast, w przypadku wszystkich badań wykonywanych techniką TLC, dokonywano wizualizacji płytek w świetle UV-254 nm, 360 nm, a na końcu w świetle widzialnym, po „uniwersalnym” wywołaniu barwy plamek na płycie TLC za pomocą par jodu, dokonując ekspozycji każdej płytki TLC, zawsze w takich samych warunkach i przez taki sam okres czasu.

4. Wnioski końcowe (Conclusions)

Bazując na danych literatury oraz na wykonanych badaniach, dobrano warunki rozdzielania grupowego wzorców, reprezentujących główne składniki tłuszczów i produktów ich konwersji, a także, dla wieloskładnikowych próbek z różnych etapów procesu technologicznego przetwarzania tłuszczów, otrzymanych z zakładów tłuszczowych oraz z zakładów wytwarzających/stosujących FAME. Zastosowano chromatografię cienkowarstwową w normalnych układach faz z żelem krzemionkowym, jako fazą stacjonarną – „NP-TLC-F₂₅₄” i „NP-HPTLC-F₂₅₄”, a także technikę NP-TLC-FID na pręcikach Chromarod SIII, gdy faza stacjonarna to warstewka mikro-ziarnistego żelu krzemionkowego o specjalnej preparatyce na pręcikach kwarcowych o średnicy 2mm. Studia i badania dotyczyły też chromatografii cienkowarstwowej z n-oktedecylosiloksanem (C18) jako fazą stacjonarną – płytki aluminiowe „RP-TLC-F₂₅₄” i „RP-HPTLC-F₂₅₄”, pokryte fazą stacjonarną C18. Wykorzystywano warunki elucji izokratycznej jedno-, lub kilkustopniowej, z jedno- lub dwu składnikowymi eluentami o różnych składach, dostosowanych do celu rozdzielania.

Na podstawie wyników studiów literatury oraz wykonanych badań, należy sformułować następujące wnioski, aktualne nie tylko dla tłuszczów i produktów ich konwersji, ale także dla rozdzielania różnego rodzaju innych złożonych mieszanin związków chemicznych, z wykorzystaniem wykluczania i słabej adsorpcji (GPC-SEC-NP lub GPC-SEC-RP):

- Ze wszech miar korzystne jest wykorzystywanie techniki TLC, w badaniach "pilotowych" nad doбором korzystnych warunków wykorzystania wysokosprawnej, kolumnowej chromatografii cieczowej, tak typowej adsorpcyjnej, jak i w warunkach jednoczesnego wykluczania oraz kontrolowanej adsorpcji polarnej w normalnych układach faz, tzn., warunków GPC-SEC-NP;

- Jest także celowe wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej z niepolarną, hydrofobową fazą stacjonarną typu C18 oraz organicznych bezwodnych eluentów o różnej polarności dla określenia optymalnych warunków rozdzielania tłuszczów i produktów ich konwersji z wykorzystaniem faz

stacjonarnych typu C18 oraz bezwodnych eluentów o różnej polarności, a także do badania wykluczania i słabej adsorpcji w warunkach hydrofobowych (lipofilowych) (GPC-SEC-RP);

- Technika TLC-FID, oddaje nieocenione usługi w rozdzielaniu grupowym oraz ocenie składu grupowego tłuszczów i produktów ich konwersji. Podobnie jak w badaniach tego typu innych nietłucznych, albo bardzo nisko-lotnych skomplikowanych mieszanin związków chemicznych [58–62];
- Natomiast, wykorzystywanie techniki TLC-FID w badaniach "pilotowych" nad doborem korzystnych warunków wykorzystania wysokosprawnej, kolumnowej chromatografii cieczowej w warunkach jednoczesnego wykluczania oraz kontrolowanej adsorpcji w normalnych układach faz (GPC-SEC-NP), nie wydaje się celowe, tak ze względu, tak na stosunkowo wysokie koszty stosowania, jak i względnie dużą pracochłonność wykonania badań;
- Odległym, jednakże – jak się wydaje – coraz bardziej realnym celem opisywanych badań, jest opracowanie optymalnych warunków stosowania kolumnowej wysokosprawnej elucyjnej chromatografii cieczowej (HPLC / UPC) w trybie wielokolumnowym (NC) i wielowymiarowym (nD) oraz w sposób zautomatyzowany, w rozdzielaniu, identyfikacji, oznaczaniu, a także otrzymywaniu w skali semi-preparatywnej lub preparatywnej, wysokiej czystości składników tłuszczów i ich pochodnych – jako grup składników, albo, indywidualów chemicznych.

Conclusions

Conditions for group separation of chemical standards, representing main constituents of fats and products of their conversion, as well as, multi-component samples obtained from different stages of fats processing, were selected basing on literature data and conducted studies. During studies normal-phase thin layer chromatography (with silica gel as stationary phase) – „NP-TLC-F₂₅₄” i „NP-HPTLC-F₂₅₄”, and NP-TLC-FID technique utilizing Chromarod SIII rods were used. Studies and research were also concerning thin layer chromatography with n-octadecyl-siloxane (C18) as the stationary phase – aluminum plates "RP-TLC-F₂₅₄" and "RP-HPTLC-F₂₅₄", covered with C18 stationary phase. Isocratic elution conditions were used in one- or several steps mode, with one- or two- component mobile phases having different compositions, adapted to the purpose of separation.

Based on the results of literature studies and conducted research utilizing GPC-SEC-NP or GPC-SEC-RP, the following conclusions which are valid not only for fats and products of their conversion, but also for separation of many other complex mixtures, can be drawn:

- *It is highly advantageous to use TLC technique in "pilot" studies performed to select favorable conditions for high performance liquid column chromatography, in typical adsorption mode, as well as during simultaneous exclusion and controlled polar adsorption in normal phase systems, ie., GPC SEC-NP conditions;*
- *It is also advisable to use thin-layer chromatography with a non-polar, hydrophobic stationary phase, type C18, and organic anhydrous mobile phases of different polarity to determine the optimum conditions for the separation of fats and products and to examine exclusion and poor adsorption in hydrophobic (lipophilic) conditions (GPC-SEC-RP);*
- *TLC-FID is an inestimable technique in group separation and group composition analysis of fats and products of their conversion. TLC-FID is also very useful in other studies of this type, concerning non-volatile or low-volatile very complex mixtures of chemical compounds [58-62];*
- *On the other hand, the usage of TLC-FID technique in "pilot" studies applied to selection of favorable separation conditions for high performance liquid column chromatography under simultaneous exclusion and controlled adsorption in normal phase (GPC-SEC-NP), does not seem to be appropriate, because this technique is relatively time-consuming, quite expensive in use, as well as, labour-consuming;*
- *A distant, but - as it seems - more and more real aim of this research is to develop optimal conditions for high performance elution chromatography (HPLC/UPC) in a multi-column (NC), multidimensional (ND), and automated manner, for separation, identification and determination, as well as, production of fats and products of their conversion in semi-preparative or preparative scale, as pure chemical compounds or groups of compounds.*

Podziękowania

Acknowledgements

Prace były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki numer rejestracyjny projektu badawczego: N N312 417237, numer umowy: 4172/B/P01/2009/37, pt. "Wykorzystanie chromatografii wykluczania i adsorpcji do rozdzielania i oznaczania grupowego lipidów i produktów konwersji w tłuszczach jadalnych".

Literatura (Literature)

1. Y. W. Wang, T. F. Yen, *Rapid separation and characterization of fuels by Thin Layer Chromatography*, Journal of Planar Chromatography, 3 (1990) 376-380.
2. Vreven F., "Neue Perspektiven in der chemischen Analytik von Bindemitteln wie Bitumen und Teer", *New perspectives in the chemical analytics of binders such as bitumen and tar*, Asphalt, 1 (1994).
3. K. Dunn, G.V. Chilingarian, H. Lian, Y.Y. Wang, T.F.Yen, *Chapter 11 Analysis of Asphalt and Its Components by Thin-Layer Chromatography*, Developments in Petroleum Science, 40, part B (2000) 305.
4. S. Chattopadhyay, S. Das, R. Sen, *Rapid and precise estimation of biodiesel by high performance thin layer chromatography*, Applied Energy, 88 (2011) 5188.
5. S. Agatonovic-Kustrin, Ch. M. Loescher, *Qualitative and quantitative high performance thin layer chromatography analysis of Calendula officinalis using high resolution plate imaging and artificial neural network data modeling*, Analytica Chimica Acta, 798 (2013) 103–108.
6. M. A. Hawrył, M. Waksmundzka-Hajnos, *Two-dimensional thin-layer chromatography of selected Polygonum sp. extracts on polar-bonded stationary phases*, Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 2812–2819.
7. M. Jaszczółt, G. Boczkaj, A. Lewandowski, A. Skrzypczak, A. Królicka, M. Kamiński, „Badania nad doбором najkorzystniejszego składu eluentu do rozdzielania metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem chromatografii planarnej w normalnym i odwróconym układzie faz”, *A research on the composition of the eluent for separation of plant metabolites by reverse phase planar chromatography*, Camera Separatoria, 3:1 (2011) 147-160.
8. H. A. Khan, I. A. Arif, J. B. Williams, A. M. Champagne, M. Shobrak, *Skin lipids from Saudi Arabian birds*, Saudi Journal of Biological Sciences (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.09.008>
9. M. J. Baran, P. K. Zarzycki, „Szybka metoda frakcjonowania lipidów i substancji niepolarnych w piórach ptaków z wykorzystaniem termostатовanej mikrochromatografii planarnej (micro-TLC)”, *Fast method for fractionation of lipids and related non-polar substances from birds' feathers using thermostated micro-TLC*, Camera Separatoria, 3:1 (2011) 221-227.
10. P. K. Zarzycki, M. M. Ślącza, E. Włodarczyk, M. J. Baran, *Micro-TLC Approach for Fast Screening of Environmental Samples Derived from Surface and Sewage Waters*, Chromatographia, 76 (2013) 1249–1259.
11. P. K. Zarzycki, M. M. Ślącza, M. B. Zarzycka, M. A. Bartoszek, E. Włodarczyk, M. J. Baran, *Temperature-controlled micro-TLC: A versatile green chemistry and fast analytical tool for separation and preliminary screening of steroids fraction from biological and environmental samples*, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 127 (2011) 418–427.
12. M. Jeleń, B. Morak-Młodawska, K. Pluta, *Thin-layer chromatographic detection of new azaphenothiazines*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55 (2011) 466–471.
13. D. D. Joshi, *Herbal Drugs and Fingerprints*, 2012 Evidence Based Herbal Drugs, Springer India 2012, http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-81-322-0804-4_3#
14. A. Puscas, A. Hosu, C. Cimpoi, *Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration*, Journal of Chromatography A, 1272 (2013) 132– 135.
15. M. Kucharska, J. Grabka, *A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes*, Talanta, 80 (2010) 1045–1051.
16. A. A. Herod and M.-J. Lazaro, *Thin-Layer (Planar) Chromatography*, Encyclopedia of Separation Science.
17. J. Kosińska, G. Boczkaj, J. Gudebska, M. Kamiński, „Fingerprinting niskolotnych frakcji i produktów naftowych techniką cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC) w identyfikacji przecieków procesowych oraz skażenia środowiska”, *Fingerprint comparison of low-volatile petroleum products by means of Thin Layer Chromatography (TLC) for identification of process leakages and environmental pollution*, Camera Separatoria 5:2 (2013) 55-69.
18. Z. Wang, M. Fingas, D. S. Page, *Oil spill identification*, Journal of Chromatography A 843 (1999) 369–411.
19. M. Kamiński, wyniki niepublikowanych badań własnych, *the results of own unpublished studies*.
20. M. Jaszczółt, G. Boczkaj, A. Lewandowski, A. Skrzypczak, A. Królicka, M. Kamiński, „Badania nad doбором najkorzystniejszego składu eluentu do rozdzielania metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem chromatografii planarnej w normalnym i odwróconym układzie faz”, *A research on the composition of the eluent for separation of plant metabolites by reverse phase planar chromatography*, Camera Separatoria 3:1 (2011) 147-160.
21. W. Gołkiewicz, M. Jaroniec, *Continuous TLC as a pilot technique for optimization of gradient HPLC. 1. Theoretical considerations for stepwise gradient TLC with binary mobile phase*, Journal of High Resolution Chromatography 1:5 (1978) abstract.

22. W. Gołkiewicz, *TLC as a pilot technique for the optimization of gradient HPLC II. Use of data obtained from RP-18 plates for the prediction of gradient programs in reversed-phase liquid chromatography*, *Chromatographia* 14:11 (1981) 629-632.
23. T. Tuzimski, *Thin-Layer Chromatography (TLC) as Pilot Technique for HPLC. Utilization of Retention Database (Re) vs. Eluent Composition of Pesticides*, *Chromatographia* 56 (2002) 379-381.
24. J. K. Różyło, M. Janicka, R. Siembida, *Advantages of TLC as a Pilot Technique for HPLC*, *Journal of Liquid Chromatography* 17:17 (1994) abstract.
25. E. Soczewiński, T. Wawrzynowicz, *Thin-layer chromatography as a pilot technique for the optimization of preparative column chromatography*, *Journal of Chromatography A* 218 (1981) 729-732.
26. S. Reuke, H.E. Hauck, *Thin-layer chromatography as a pilot technique for HPLC demonstrated with pesticide samples*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 351 (1995) 739-744.
27. J. Gudebska, rozprawa doktorska pt. „Chromatografia cieczowa w oznaczaniu składu grupowego olejów bazowych i asfaltów drogowych”, *PhD thesis entitled: Liquid chromatography for the determination of group composition of base oils and road bitumens*, Gdańsk (1999) 1-92.
28. Norma PN-72/C-04025 – „Oznaczanie składu grupowego węglowodorów metodą chromatografii elucyjnej”, *PN-72/C-04025 Standard – Determination of hydrocarbons group composition by elution chromatography*.
29. R.J. Hamilton, *Thin-layer chromatography–flame ionization detection for lipid analysis (chapter 1.4)* in *Lipid Analysis in Oils and Fats*, Springer Science & Business Media (2012).
30. L. Striby, R. Lafont, M. Goutx, *Improvement in the latroscan thin-layer chromatography–flame ionisation detection analysis of marine lipids. Separation and quantitation of mono- and diacylglycerols in standards and natural samples*, *Journal of Chromatography A* 849 (1999) 371.
31. S. Zhou, *Quantitation of Lipid Classes by Thin-Layer Chromatography with Flame Ionization Detection*, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* D:D1:D1.6 (2003) D1.6.1.
32. J.-L. Sebedio, *Utilization of Thin-Layer Chromatography-Flame Ionization Detection for Lipid Analyses (chapter 4)* in *New Trends in Lipid and Lipoprotein Analyses*, The American Oil Chemists Society (1995).
33. T. Ohshima, R.G. Ackman, *New Developments in Chromarod/Latroscan TLC-FID: Analysis of Lipid Class Composition*, *Journal of Planar Chromatography* 4 (1991) 27-57.
34. A. Timmins, R. G. Ackman, *TLC-FID with Special Reference to Marine Lipids and Other High-Molecular-Weight Organic Compounds (chapter 11)* in *Lipid Analysis and Lipidomics: New Techniques and Applications*, American Oil Chemists' Society Publishing (2006) 261-270.
35. P. Dudley, R. Anderson, *Separation of polyunsaturated fatty acids by argentation thin-layer chromatography*, *Lipids* 10 (1975) 113.
36. R. Wilson, J.R. Sargent, *High-resolution separation of polyunsaturated fatty acids by argentation thin-layer chromatography*, *Journal of Chromatography A* 623 (1992) 403.
37. B. Fuchs, R. Suess, K. Teuber, M. Eibisch, J. Schiller, *Lipid analysis by thin-layer chromatography – a review of the current state*, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 2754.
38. J.J. Myher, A. Kuksis, *General strategies in chromatographic analysis of lipids*, *Journal of Chromatography B* 671 (1995) 77.
39. D. Allan, S. Cockroft, *A modified procedure for thin-layer chromatography of phospholipids*, *Journal of Lipid Research* 23 (1982) 1373.
40. Casimir C. Akoh, David B. Min (ed.), *Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, second ed. revised and expanded, Marcel Dekker, Inc., USA, (2002).
41. M. Buchgraber, F. Ulberth, H. Emons, E. Anklam, *Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques (a review)*, *European Journal of Lipid Science and Technology* 106 (2004) 621–648.
42. R.J. Hamilton, *Lipid analysis using thin-layer chromatography and the latroscan (chapter 1)* in *Lipid Analysis in Oils and Fats*, Springer Science & Business Media (2012).
43. G. Gałęzowska, M. Kamiński, „Nowa metoda oznaczania komponentów skomplikowanych mieszanin typu specyfiki farmaceutyczne z wykorzystaniem rozdzielania grupowego i wielowymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej”, *New method of complex mixtures like pharmaceutical specifics determination using multidimensional high performance liquid chromatography and group type separation*, *Camera Separatoria* 3:1 (2011) 201–219.
44. G. Boczkaj, M. Jaszczół, M. Kamiński, „Nowe metodyki oznaczania dodatków do paliw z zastosowaniem rozdzielania wielowymiarowego”, *New procedures for fuel additives determination by multidimensional separation systems*, *Camera Separatoria* 3:1 (2011) 115–127.
45. K. Awai, R. Matsuoka, Y. Shioi, *Lipid and fatty acid compositions of Symbiodinium strains*, *Proceedings of the 12th International Coral Reef Symposium*, 6A Cell and molecular biology of symbiosis, Cairns, Australia (9-13 July 2012).
46. M. Ranny, *Methods of Thin-Layer Chromatography with Flame Ionization Detection (TLC-FID) in Thin-Layer Chromatography with Flame Ionization Detection*, Springer Science & Business Media, (2012).

47. M. Kamiński, J. Gudebska, T. Górecki, R. Kartanowicz, *Optimized conditions for hydrocarbon group type analysis of base oils by thin-layer chromatography–flame ionisation detection*, *Journal of Chromatography A* 991 (2003) 255–266.
48. B.-J. Yang; L. Zheng; X.-T. Han; M.-G. Zheng, *Development of TLC-FID technique for rapid screening of the chemical composition of microalgae diesel and biodiesel blends*, *Fuel* 111 (2013) 344–349.
49. T. Hooper, Ch. C. Parrish, *Profiling neutral lipids in individual fish larvae by using shortcolumn gas chromatography with flame ionization detection*, *Limnology and Oceanography: Methods* 7 (2009) 411–418.
50. V. L. Bebolla, L. Membrado, M. P. Domingo, P. Henrion, R. Garriga, P. González, F. P. Cossío, A. Arrieta, J. Vela, *Quantitative Applications of Fluorescence and Ultraviolet Scanning Densitometry for Compositional Analysis of Petroleum Products in Thin-Layer Chromatography*, *Journal of Chromatographic Science* 37 (1999) 219-226.
51. J. Kosińska, wyniki niepublikowanych badań własnych, *the results of own unpublished studies*.
52. H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer, *Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods, Volume 1a – Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents I*, VCH, Weinheim, 1990.
53. C. Weins, H. Jork, *Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography*, *Journal of Chromatography A* 750 (1996) 403.
54. H. Struck, H. Karg, H. Jork, *Thin-layer chromatographic determination of testosterone and delta4-androstene-3,17-dione from bovine foetal testicular tissue*, *Journal of Chromatography A* 36 (1968) 74.
55. IATROSCAN technical information from catalogue IATROSCANTM MK-6 TLC-FID/FPD Dual Detection System, Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.
56. C.C. Parrish, *Determination of Total Lipid, Lipid Classes, and Fatty Acids in Aquatic Samples in Lipids in Freshwater Ecosystems*, edited by M.T. Arts, B.C. Wainman, Springer-Verlag New York, Inc., New York (1998) 4–20.
57. Norma PN-EN 14105 – „Produkty przetwarzania olejów i tłuszczów – Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) - Oznaczanie zawartości wolnego i ogólnego glicerolu oraz mono-, di- i triacylogliceroli”, *PN-EN Standard – Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of free and total glycerol and mono-, di-, tri-glyceride content* (2003).
58. B.N. Barman, *Hydrocarbon-Type Analysis of Base Oils and Other Heavy Distillates by Thin-Layer Chromatography with Flame-Ionization Detection and by the Clay-Gel Method*, *Journal of Chromatographic Science* 34 (1996) 219–225.
59. S. Bharati, R. Patience, N. Mills, T. Hanesand, *A new North Sea oil-based standard for Iatroscan analysis*, *Organic Geochemistry* 26 (1997) 49–57.
60. J. Vela, L. Membrado, V.L. Cebolla, A.C. Ferrando, *Suitability of Thin-Layer Chromatography-Flame Ionization Detection with Regard to Quantitative Characterization of Different Fossil Fuel Products. II. Calibration Methods Concerning Quantitative Hydrocarbon-Group Type Analysis*, *Journal of Chromatographic Science* 36 (1998) 487–494.
61. V.L. Cebolla, J. Vela, L. Membrado, A.C. Ferrando, *Coal-Tar Pitch Characterization by Thin-Layer Chromatography with Flame Ionization Detection*, *Chromatographia* 42 (1996) 295–299.
62. B.N. Barman, *Behavioral differences between group I and group II base oils during thermo-oxidative degradation*, *Tribology International* 35 (2002) 15–26.