

WIESŁAW GUZEWSKI, STANISŁAW MUSZYŃSKI

CHROMATOGRAFIA CIENKOWARSTWOWA W WERSJI UPROSZCZONEJ

Jakościowa analiza chemiczna przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej znalazła powszechne zastosowanie przede wszystkim w różnego rodzaju badaniach naukowych. W porównaniu z chromatografią bibułową, chromatografia cienkowarstwowa jest metodą szybszą i tańszą. Obszerne omówienie zagadnień, związanych z chromatografią cienkowarstwową, znaleźć można w książce Opieńskiej-Blauth i in. (1967).

Spośród licznych wersji chromatografii cienkowarstwowej, najbardziej znanymi są opracowane przez Stahla oraz przez Shandona. Natomiast w Katedrze Genetyki SGGW stosowana jest z powodzeniem uproszczona wersja chromatografii cienkowarstwowej, opracowana w Instytucie Hodowli Roślin Sadowniczych w Balsgard (Szwecja) przez profesora Nilsa Nyboma (Nybom 1964, Muszyński 1964, 1968, Muszyński, Nybom 1968).

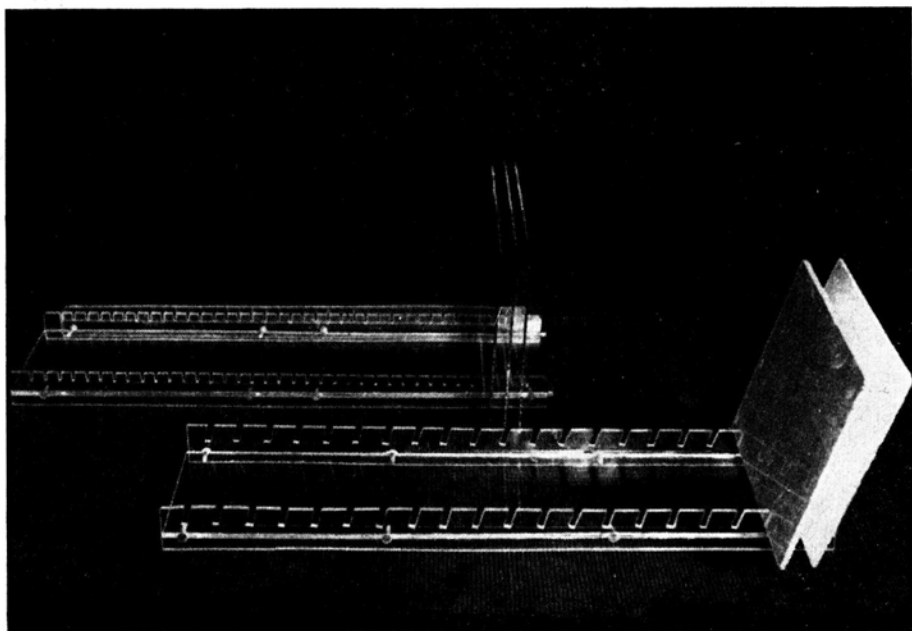
Wielką zaletą omawianej wersji jest wyjątkowo proste oprzyrządowanie, jakie może być wykonane w każdym chyba laboratorium.

Najważniejszym elementem chromatografii cienkowarstwowej są płytki szklane, które są następnie powlekane cienką warstwą adsorbenta. Szkło to winno charakteryzować się wyrównaną grubością i wyrównaną powierzchnią. Zazwyczaj stosuje się szkło odpowiednio szlifowane, jednakże szkło takie jest stosunkowo drogie. Można też stosować szkło z płyt fotograficznych, które jest o wiele tańsze. Płytki fotograficzne otrzymać można w niektórych pracowniach fotograficznych. Emulsję fotograficzną usuwa się łatwo przy użyciu mocnego ługu, najlepiej po uprzednim zamoczeniu przez okres jednej nocy.

Umyte płytki suszy się w odpowiednich podstawkach (ryc. 1). Podstawki te mogą również służyć do przechowywania płytek już powleczonych adsorbentem, po uprzednim złożeniu dwu płytek warstwą adsorbenta do środka.

Zmywanie adsorbenta dokonywane jest łatwo przy pomocy wody z dodatkiem detergentów, np. płynu „FF“. Szczególną uwagę należy przy tym zwrócić na to, by płytki nie uległy zatłuszczeniu.

Najważniejszym elementem omawianej wersji jest uproszczenie procesu powle-



Ryc. 1. Podstawki na płytki

kania płytek. Płytki układane są w szeregu na podstawie wykonanej z drewna, zaopatrzonej na rogach i pośrodku w urządzenia do regulacji poziomu, kontrolowanego poziomicą murarską. Powierzchnia tej podstawy winna być bardzo gładka i pokryta tworzywem sztucznym (np. gumoleum), na którym przed ułożeniem płytek rozprowadzamy niewielką ilość wody, co zapewnia dobre przyleganie płytek do powierzchni (ryc. 2). Ułożone w ten sposób płytki nie ulegają przesunięciom podczas powlekania. Równy szereg płytek otrzymuje się przy pomocy odpowiedniej linii, wykonanej bądź ze szkła organicznego, bądź z innego materiału, odpornego na działanie wody.

Powlekanie płytek adsorbentem dokonywane jest przy pomocy specjalnego powlekaacza, wykonanego ze szkła organicznego (por. ryc. 2). Wymiary powlekaacza muszą odpowiadać wielkości powlekanych płytek. Obie ścianki boczne powlekaacza są podwójne, przy czym wewnętrzne są nieco niższe. Powlekaacz spoczywa na płytkach swymi ściankami wewnętrznymi, natomiast ścianki zewnętrzne unoszą się nieco nad powierzchnią stołu na zewnątrz od płytek. Przednia ścianka powlekaacza jest nieco zaokrąglona, co ułatwia ślizganie się po płytkach przy przesuwaniu z jednej płytki na drugą. Tylna ścianka jest przymocowana na stałe do ścianek bocznych w ich tylnej części, przy czym tuż za miejscami połączenia przymocowane są do ścianek bocznych dwa ślizgacze, których położenie może być zmieniane w kierunku pionowym. Poprzez odpowiednie ustawienie tych ślizgaczy reguluje się wielkość

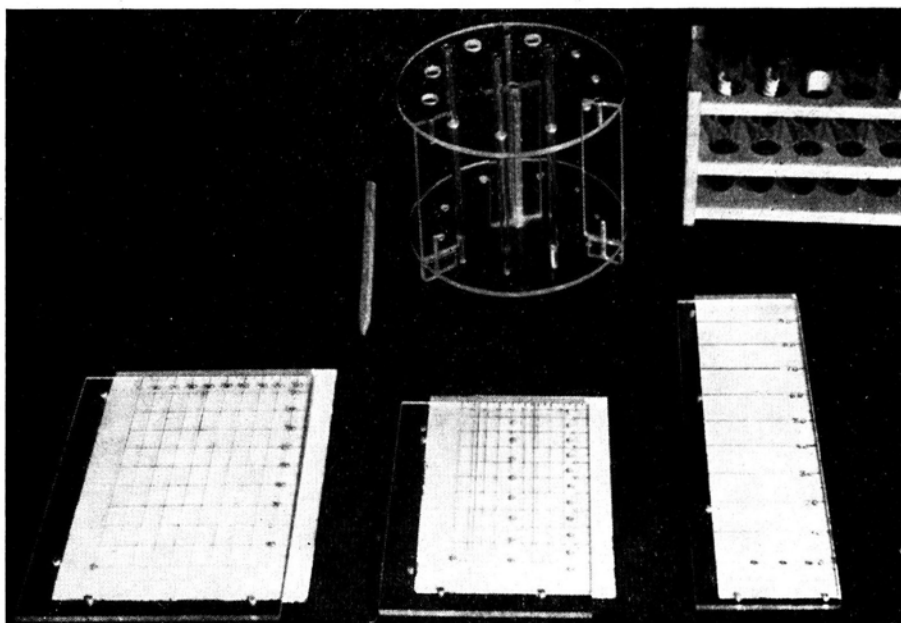


Ryc. 2. Powlekacz płytek

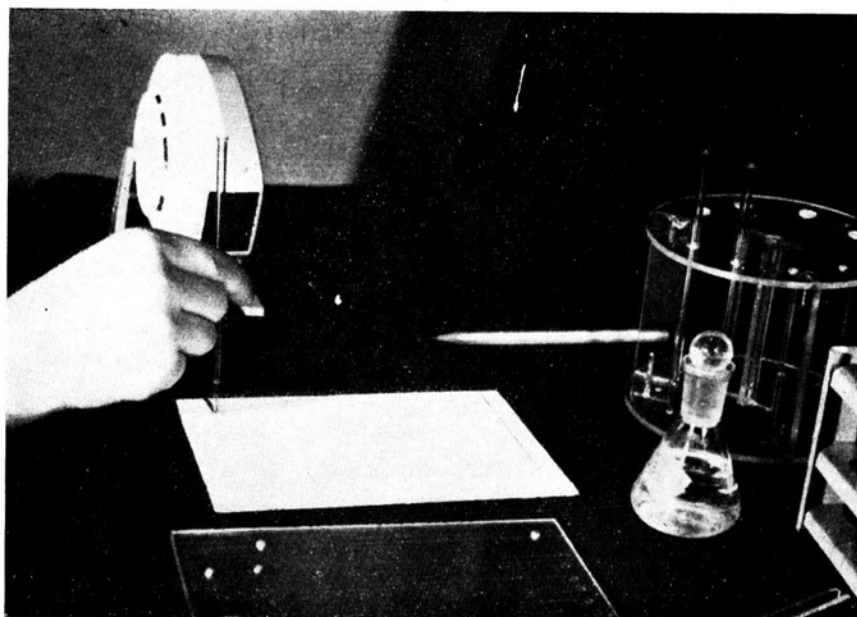
szczeliny, jaka powstaje między tylną ścianką powlekcza a powierzchnią płytek. Wielkość szczeliny decyduje o grubości warstwy adsorbenta.

W celu wykonania powlekania, powlekacz ustawia się na pierwszej płytce w rzędzie. Odpowiednio przygotowaną zawiesinę adsorbenta wlewa się do powlekcza, a następnie przesuwają powlekcza wzdłuż szeregu płytek. Tak pokryte płytki pozostawia się na stole przez pewien czas celem przeschnięcia. Wysychanie płytek może zostać przyspieszone przez umieszczenie ich w suszarce.

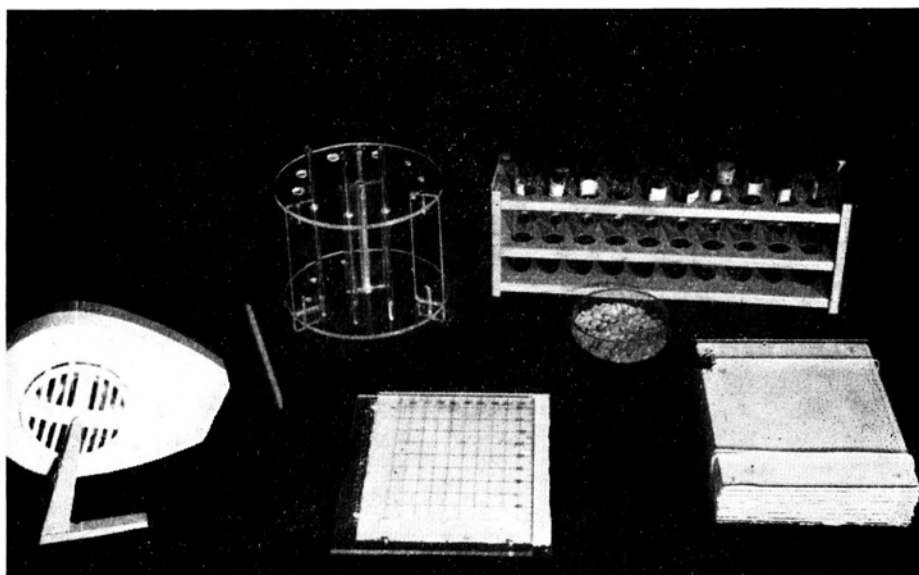
Trzeba zaznaczyć, że część płytek będzie wykazywać nierównomierności w pokryciu, jakie powstają na skutek wstrząsów powlekcza przy przechodzeniu z jednej płytki na drugą. Należy jednak podkreślić, że jakość pokrycia zależy od wprawy powlekającego, stąd też wskazane jest, by powlekanie wykonywane było przez tę samą osobę, co zapewni dobrą jakość płytek.



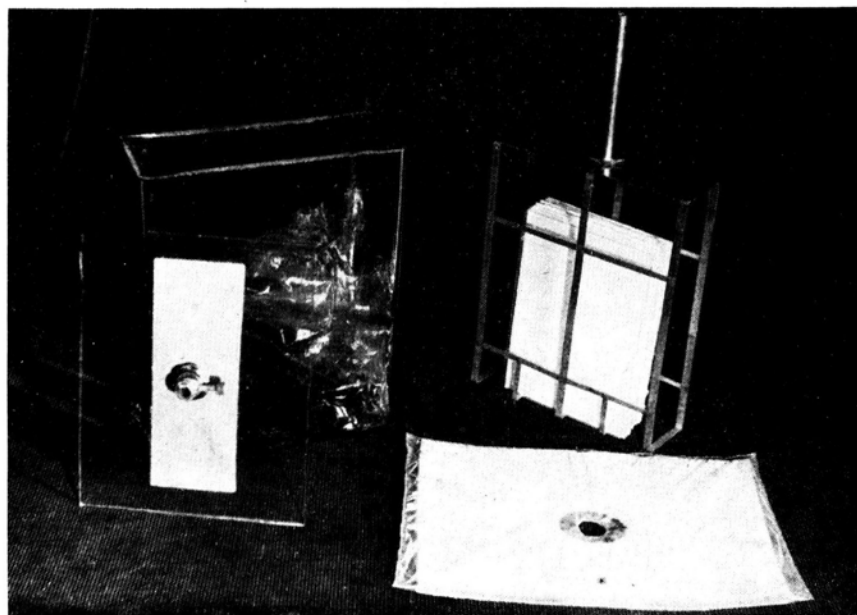
Ryc. 3. Szablon do oznaczania miejsca startu i marginesu linii frontu



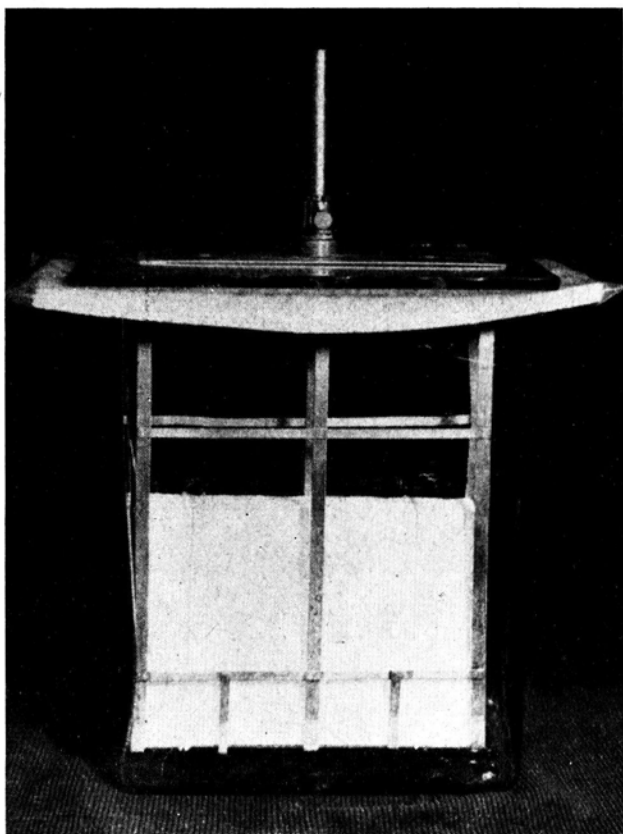
Ryc. 4. Suszenie próbek



Ryc. 5. Rozwijanie chromatogramów



Ryc. 6. Kamery



Ryc. 7. Kosze do zrównoważenia par

Dalszym usprawnieniem, zastosowanym w omawianej wersji, jest użycie specjalnych szablonów do zaznaczania zarówno miejsca startu, jak i marginesu, do którego dochodzi linia frontu. Dzięki temu na wszystkich płytkach odległość od startu do frontu jest taka sama, wskutek czego również wartości R_f odczytać można przy pomocy odpowiednich szablonów. Punkt startowy zaznacza się lekko ołówkiem, zaś margines powstaje przez przerwanie warstwy adsorbenta przy pomocy odpowiedniego rylca, wykonanego także ze szkła organicznego. Ten sam szablon, dzięki naniesionej skali, służy do odczytywania wartości R_f (ryc. 3).

Nanoszenie badanej substancji w punkcie startowym dokonywane jest przy pomocy skalowanych mikropipet, najczęściej o pojemności 1 mikrolitra. Niektóre spółdzielnie szklarskie wykonują takie pipety na zamówienie. Do suszenia наносzonych próbek służy zwykła suszarka do włosów (ryc. 4).

Rozwijanie chromatogramów zostało zmodyfikowane w ten sposób, że w jednej kamerze rozwija się kilka do kilkunastu chromatogramów jednocześnie. Jest to możliwe, gdy płytki układa się w stosy, przy czym sąsiednie płytki oddzielone są



Ryc. 8. Homogenizator

specjalnymi separatorami, wykonanymi najczęściej z polietylenu. Doskonale nadają się do tego celu zużyte wkłady do długopisów, pocięte na dwumilimetrowe odcinki. Każdy stos jest następnie związany niemi polietylenowymi (ryc. 5).

Jako kamery wykorzystywane są akwaria o odpowiednich rozmiarach (ryc. 6). Przykrywane są one płytami z grubego szkła. Uszczelnianie uzyskuje się przez użycie gąbki z tworzywa sztucznego, umieszczonej w kopercie z folii polietylenowej. Płytę szklaną można następnie obciążyć, co zapewnia dostateczną szczelność kamery.

Niektóre solwenty wymagają, by w kamerze nastąpiło zrównoważenie par przed rozpoczęciem właściwego rozwijania chromatogramów. Osiąga się je przez zawieszenie chromatogramów nad solwentem w odpowiednich koszach ze stali kwasoodpornej (ryc. 7). Wymiary koszy zależne są od wielkości kamer oraz od rozmiarów płytek. Trzeba jednak zwrócić uwagę, by umożliwiały one rozwijanie chromatogramów w obydwu kierunkach.

W Katedrze Genetyki stosuje się chromatografię cienkowarstwową do oznaczania barwników antocyjanowych w kwiatach roślin wyższych oraz do oznaczania fenoli

roślinnych dla celów chemotaksonomicznych. W obu przypadkach stosuje się płytki powleczone zawiesiną proszku celulozowego w wodzie. Celuloza tworzy wyjątkowo trwałą warstwę i jest szczególnie dogodna do tego rodzaju badań, jakie są prowadzone w Katedrze Genetyki. Jedyłą trudnością jest uzyskanie właściwej zawiesiny celulozy w wodzie, co możliwe jest jedynie przy zastosowaniu wysokiej klasy homogenizatora (ryc. 8). Wydaje się, że produkowany w kraju homogenizator „Unipan“ będzie spełniał wymagania, stawiane przez chromatografię cienkowarstwową. (Wszystkie zdjęcia wykonał W. Guzewski).

Katedra Genetyki SGGW Warszawa 25, Ursynów

LITERATURA

- Muszyński S., 1964. A survey of anthocyanidins in *Petunia*. *Physiologia Plantarum* **17**, 975—979.
- Muszyński S., 1968. A survey of anthocyanins in *Petunia*. *Acta Soc. Bot. Polon.* **37**, (w druku).
- Muszyński S., Nybom N., 1968. The relationship between *Prunus avium*, *Prunus mahaleb* and *Prunus fontanesiana* studied by means of thin layer chromatography, (w druku).
- Nybom N., 1964. Thin-layer chromatographic analysis of anthocyanidins. *Physiologia Plantarum* **17**, 157—164.
- Opieńska-Blauth J., Kraczkowski H., Brzuszkiewicz H., 1967. Zarys chromatografii cienkowarstwowej. PWRiL, Warszawa.