

CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

Zestawy do chromatografii cieczerwskiej składają się z precyzyjnego układu pompującego, kolumny chromatograficznej, czułego układu detekcyjnego oraz rejestratora. Dodatkowo mogą być wyposażone w układ termostatujący kolumnę, system odgazowywania buforów, program sterujący parametrami rozdziału chromatograficznego oraz oprogramowanie do opracowywania i interpretacji wyników.

Pompy stosowane w chromatografach muszą zapewniać regulowany przepływ buforów przy minimalnej pulsacji, zdolność utrzymywania wysokich ciśnień /do 400 atm. = 40 MPa/. Najczęściej stosuje się pompy tłokowe o ruchu postępowo-zwrotnym. Ponadto materiały z których są wykonane pompy muszą wykazywać wysoką odporność chemiczną. W przypadku post-kolumnowej detekcji spektrokolorymetrycznej oraz korzystania z wysokociśnieniowego urządzenia do wytwarzania gradientu stosuje się system składający się z dwóch niezależnych pomp.

Kolumny chromatograficzne wykonane są ze szkła, tworzyw sztucznych lub ze stali nierdzewnej /w zależności od stosowanych ciśnień/. Rozmiary kolumn uzależnione są od charakteru wykonywanych rozdziałów /analityczne, preparatywne/. Ponadto układ rozdzielczy wyposażony jest w dozownik próbek /injektor - nakładający określoną objętość próbki na kolumnę/ oraz często pre-kolumnę ochronną oraz termostat kolumny.

Detektory muszą gwarantować przede wszystkim wysoką czułość oraz linowość sygnału w szerokim zakresie stężeń analizowanych substancji. Najczęściej stosowanymi detektorami są detektory spektrofotometryczne, wykonujące pomiary absorpcji lub fluorescencji składników rozdzielanych próbek, pracujące w szerokim zakresie długości fali światła.

Rejestracja chromatogramu polega na wykreśleniu krzywej elucji substancji wymywanych z kolumny przez rejestrator sprzężony z detektorem. Specjalne programy komputerowe pozwalają na jakościową i ilościową obróbkę uzyskanych danych /czasy retencji, pola powierzchni piku/, a ponadto programowanie i kontrolę parametrów rozdziału chromatograficznego.

Dobór odpowiednich warunków rozdziału chromatograficznego zależy od składu chemicznego analizowanej próbki oraz celu analizy. Parametry wpływające na jakość rozdziału chromatograficznego to skład eluentu oraz jego zmiany /skokowe, gradientowe/, temperatura kolumny, zmiany przepływu w trakcie rozdziału.

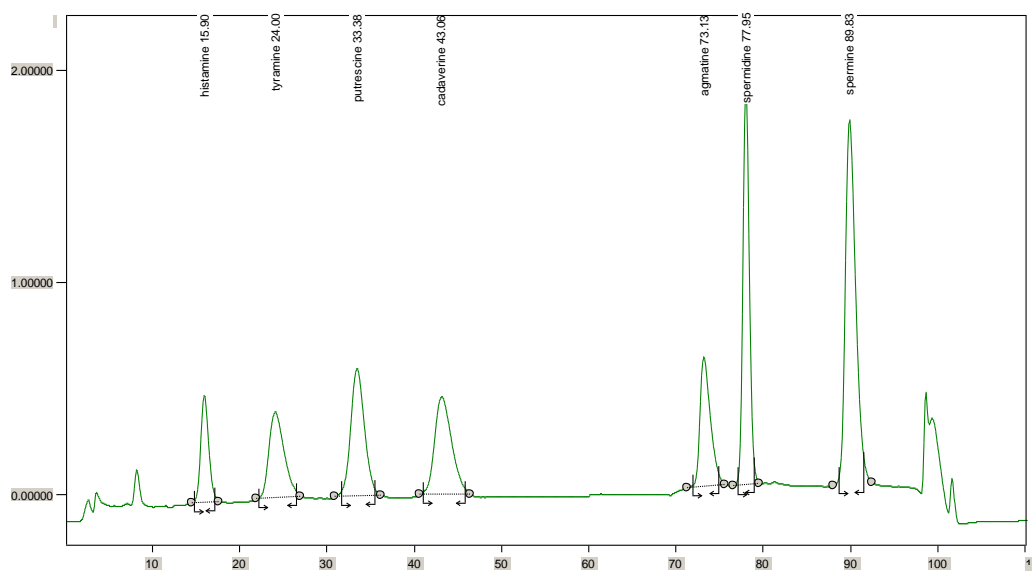
Związki o charakterze jonowym dobrze rozdzielają się metodami chromatografii jonowymiennej, gdyż substancja występująca w roztworze w formie jonu ulega retencji na odpowiednim wymienniczu jonowym dzięki obecności grup funkcyjnych o przeciwnych ładunkach. Jakość takiego rozdziału zależy od ustalenia optymalnej wartości pH i siły jonowej używanych buforów.

ĆWICZENIE I

Analiza związków biologicznie aktywnych w produktach spożywczych – wykrywanie amin biogennych metoda chromatograficzną

Aminy biogenne są produktami degradacji aminokwasów [dekarboksylacji], a także aminacji/transaminacji aldehydów i ketonów. Niektóre z nich pełnią istotne funkcje fizjologiczne, będąc naturalnymi produktami metabolizmu [dopamina, noradrenalina, adrenalina, histamina], inne są produktami metabolizmu roślin lub mikroorganizmów.

Chromatograficzna analiza amin biogennych jest możliwa m.in. z zastosowaniem silnych kationitów oraz odpowiedniego układu silnych buforów elucyjnych. Aminy biogenne dają pozytywną reakcję ninhydrynową [szczegółowy opis → ćwiczenie II], dzięki czemu możliwa jest detekcja spektrofotometryczna przy $\lambda=570$ nm.



Rys 1. Przykładowy chromatogram standardowej mieszanki amin biogennych [500 nmol/ml] na jonowymieniaczu OSTION Lg ANB [Ingos, Czechy].

WYKONANIE:

1. Przygotowanie buforów elucyjnych o następującym składzie:

[g/l]	Bufor A	Bufor B
Kwas cytrynowy	1.35	14.00
Cytrynian sodowy dwuwodny	21.00	-
NaCl	5.00	-
KCl	-	171.50
KBr	41.65	-
KOH 85%	-	10.00
Azydek sodu	-	-
Izopropanol	250.00 ml	0

UWAGA: Wszystkie buforu należy przefiltrować przez filtr 0,45 μm oraz odgazować w łaźni ultradźwiękowej pod próżnią.

2. Przygotowanie próbek: przygotować naważkę dostarczonej próbki i rozpuścić w 1 ml buforu próbkowego, odwirować, przefiltrować przez filtr strzykawkowy 0,45 μm i przeprowadzić analizę chromatograficzną.

Parametry rozdziału:

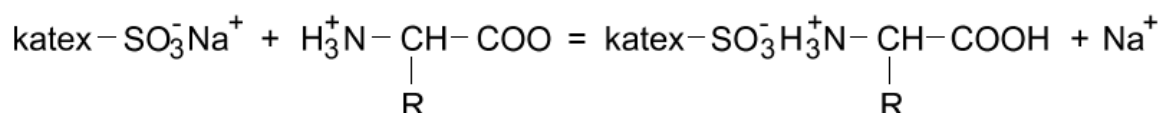
Czas [min]	Bufor elucyjny	Temperatura kolumny
0,00	Bufor A	65
60,00	Bufor B	65
86,00	0,2 M NaOH [regeneracja]	65
101,00 – 130,00	Bufor A [równoważenie kolumny]	65

3. Na podstawie chromatogramu wzorcowego zidentyfikować aminy biogenne obecne w próbce oraz obliczyć ich stężenie.

ĆWICZENIE II

Kontrola zgodności składu chemicznego środków spożywczych z informacjami podawanymi przez producenta – analiza aminokwasów metodą chromatografii jonowymiennej

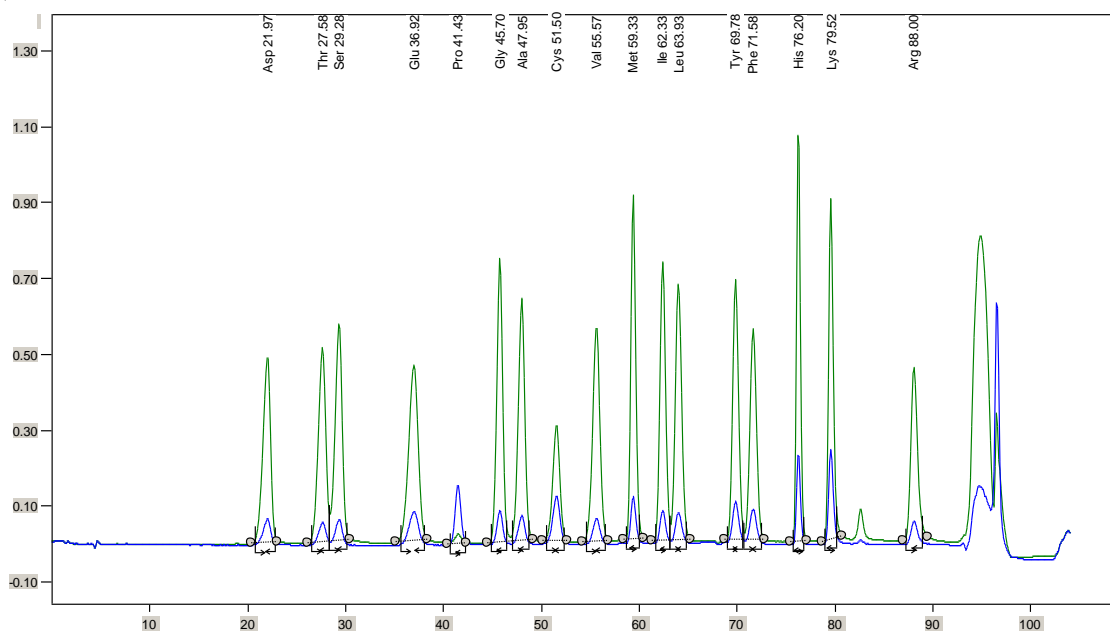
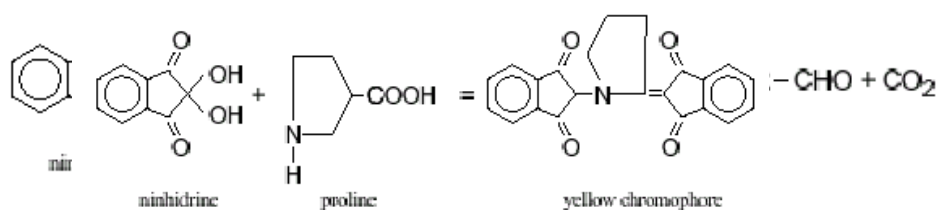
Analiza aminokwasów metodą chromatografii jonowymiennej jest rutynowo stosowana w wielu laboratoriach. Najczęściej używa się silnych kationitów z grupami – SO₃⁻ H⁺. Kolumnę równoważy się buforem o odpowiednio niskim pH, zawierającym kationy Na⁺, wiążące się z grupami –SO₃⁻. Na tak przygotowaną kolumnę nakładana jest mieszanina aminokwasów (hydrolizat białka) w buforze o pH 2,2. Przy tej wartości pH cząsteczki wszystkich aminokwasów są kationami, więc zostają zaadsorbowane na jonowymieniaczu (zamiast kationów Na⁺).



W trakcie przemywania kolumny sekwencją buforów o rosnących wartościach pH oraz wzrastającej sile jonowej przy podwyższonej temperaturze kolumny, poszczególne aminokwasy odrywają się od kationitu w określonej kolejności, uzależnionej od siły z jaką zostały na niej zaadsorbowane (siła tych oddziaływań zależy od pI aminokwasu). Stężenie aminokwasów oznaczane jest spektrofotometrycznie po przeprowadzeniu reakcji ninhydrynowej - eluat wypływający z kolumny jest mieszany z odczynnikiem ninhydrynowym

/pompowanym przez pompę II/. Mieszanina reakcyjna przepływa następnie przez cewkę reakcyjną o odpowiedniej długości, umieszczoną w reaktorze zapewniającym wysoką temperaturę niezbędną do przeprowadzenia reakcji. Aminokwasy reagując z ninhydriną (wodzianem triketohydrindenu) w wysokiej temperaturze ulegają dekarboksylacji i oksydacyjnej deaminacji. Produktami tej reakcji są: aldehyd o mniejszej liczbie atomów węgla od aminokwasu (-1), amoniak i dwutlenek węgla oraz hydrindantyna (zredukowana ninhydryna). Uwolniony amoniak reaguje z hydrindantyną oraz kolejną cząsteczką ninhydryny, tworząc barwny związek – purpurę Ruhemanna. Intensywność fioletowego zabarwienia jest proporcjonalna do zawartości grup α -aminowych w próbce. Aminokwasy nie zawierające grupy α -aminowej, reagują z ninhydriną tworząc produkt o barwie żółtej (prolina, hydroksyprolina).

Po opuszczeniu reaktora produkty reakcji przepływają przez spektrofotometryczną kuetę pomiarową /pomiar przy $\lambda=440$ i 570 nm/. Wartości pomiarów z detektora rejestrowane są przez komputer, kreślący krzywe elucyjne. Program komputerowy oprócz sterowania warunkami rozdzielania, zapewnia również integrację uzyskanych danych.



Rys 2. Przykładowy chromatogram standardowej mieszaniny aminokwasów [250 nmol/ml].

WYKONANIE:

1. Przygotowanie próbek: produkt należy rozdrobnić przy pomocy młynka lub moździerza, aby wielkość cząstek nie przekraczała 0,5 mm [test - sito laboratoryjne].
2. Przygotowanie hydrolizatu: odważyć ok. 50 mg próbki do fiolki hydrolizacyjnej, dodać 2,5 ml 6 M HCl i zamknąć szczelnie w atmosferze gazu obojętnego. Hydrolizę prowadzić przez 24 godz. w temperaturze 110°C. Hydrolizat zliofilizować i przechowywać w 4°C. Bezpośrednio przed analizą chromatograficzną liofilizat hydrolizatu rozpuścić w buforze do próbek i przefiltrować przez filtr strzykawkowy 0,45 µm.
3. Przygotowanie buforów elucyjnych – według poniższej tabeli:

Tabela.1. Zestawienie składu buforów elucyjnych.

	Bufor I	Bufor II	Bufor III	Bufor IV
pH buforu	2,65	3,00	4,25	7,90
tiodiglikol (ml)	2,50	2,50	2,50	-
Kwas cytrynowy (g/l)	11,54	10	7,53	-
Cytrynian sodu (g/l)	3,45	5,6	9,06	19,60
Chlorek sodu (g/l)	9,65	8,36	18	52,60
Azydek sodu (g/l)	0,10	0,10	0,10	0,10
Kwas borowy (g/l)	-	-	-	2,05
NaOH 50% w/v (ml)	-	-	-	1,5

UWAGA: Wszystkie bufony należy przefiltrować przez filtr 0,45 µm oraz odgazować w łaźni ultradźwiękowej pod próżnią.

3. Parametry rozdziału chromatograficznego:

Czas [min]	Bufor	Temperatura kolumny [°C]	Eluowane aminokwasy
0	Bufor cytrynianowo-sodowy pH 2,65	60	Asp, Thr, Ser, Glu
10	Bufor cytrynianowo-sodowy pH 3,0	60	Pro, Gly, Ala, Cys, Val
36	Bufor cytrynianowo-sodowy pH 4,25	60	Met, Ile, Leu
66	Bufor cytrynianowo-sodowy pH 7,9	74	Tyr, Phe, His, Lys, NH ₃ , Arg
78	0.2 M NaOH	74	Regeneracja jonowymieniacza
88	Bufor cytrynianowo-sodowy pH 2,65	74	Równoważenie złoża
107	Bufor cytrynianowo-sodowy pH 2,65	69	Zakończenie analizy

4. Wykonać analizę chromatograficzną mieszaniny standardowej aminokwasów oraz przygotowanego hydrolizatu.
5. Opierając się na chromatogramie roztworu wzorcowego [stężenie 250 nmol/ml] zidentyfikować aminokwasy obecne w badanej próbce oraz wyznaczyć skład aminokwasowy próbki przy zastosowaniu oprogramowania *Chromulan*.