

KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK

CECHY UŻYTKOWE I KRYTERIA DOBORU DETEKTORÓW WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ HPLC STOSOWANYCH DO BADAŃ SKŁADNIKÓW ŻYWNOSCI

Streszczenie

W artykule przedstawiono przegląd detektorów HPLC, używanych w analizach składników żywności, przeznaczony dla początkujących analityków. Omówiono zasady działania i podstawowe właściwości detektorów spektrofotometrycznych UV-Vis, refraktometrycznych (RI), elektrochemicznych, fluorescencyjnych i masowych wraz z kryteriami ich doboru do konkretnych analiz. Podano przykłady analiz HPLC składników żywności.

Wysokosprawną chromatografią cieczową HPLC jest obecnie popularną techniką analizy instrumentalnej i znajduje bardzo wiele zastosowań do analizy różnorodnych substancji. W procesie analizy chromatograficznej niezmiernie ważny jest dobór odpowiedniej metody, na co obok zastosowania odpowiedniej kolumny i właściwej fazy ruchomej składa się wybór odpowiedniego detektora. Nie jest to zadanie łatwe, w szczególności dla niedoświadczonego analityka. Artykuł ten skierowany jest przede wszystkim do rozpoczynających prace z aparaturą HPLC, a jego celem jest przybliżenie właściwości współcześnie stosowanych detektorów, a przez to ułatwienie właściwego doboru tej istotnej części aparatu HPLC.

Aparat do wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC to zespół urządzeń składający się z pompy lub układu pomp i mieszalników gradientowych, z zaworu nastrzykowego często zwanego inżektorem, kolumny, detektora i urządzenia rejestrującego, czyli rejestratora, integratora lub obecnie najczęściej używanego komputera wraz z odpowiednim oprogramowaniem [1, 3]. Detektor jest urządzeniem pozwalającym zarejestrować i zidentyfikować substancje rozdzielane na kolumnie chromatograficznej. Wyodrębniony składnik próbki niesiony przez fazę ruchomą trafia do detektora

i jego komórki pomiarowej, gdzie ulega oddziaływaniom fizykochemicznym, które są w odpowiedni sposób rejestrowane. Oddziaływania te to najczęściej procesy optyczne (załamanie światła, absorpcja, fluorescencja) [1, 2, 3]. Wykorzystuje się też reakcje elektrochemiczne czy spektroskopię masową [1, 7].

Idealny detektor powinien charakteryzować się zarówno dużą czułością, pozwalającą na rejestrowanie niewielkich ilości substancji, jak również wysoką selektywnością. Powinien również charakteryzować się stabilnością pozbawionej szumu linii zerowej oraz nie wykazywać czułości na zmiany fazy ruchomej. Detektory stosowane w praktyce nigdy nie wykazują cech detektora idealnego, dlatego ważna jest znajomość cech poszczególnych typów detektorów i dobór odpowiedniego do danego rodzaju oznaczenia [1, 3].

Detektory można podzielić na dwie podstawowe grupy: 1) ogólne – rejestrujące każdą zmianę we właściwościach fizycznych fazy ruchomej, inaczej mówiąc dokonujące pomiaru różnicowego właściwości wspólnej dla próbki i fazy ruchomej, np. współczynnik załamania światła, konduktywność; 2) specyficzne – rejestrujące charakterystyczne właściwości analizowanej substancji, takie jak fluorescencja czy aktywność elektrochemiczna, przy czym rejestrowany sygnał jest mało zależny lub niezależny od fazy ruchomej [1, 2, 3]. Jedynym stosowanym w praktyce przykładem detektora pierwszego rodzaju jest detektor refraktometryczny [2], natomiast drugi typ to detektory absorpcyjne, spektrofotometryczne, fluorescencyjne, elektrochemiczne czy oparte na spektroskopii masowej [1, 3]. Podstawowe właściwości detektorów zestawiono w tab. 1.

Tabela 1

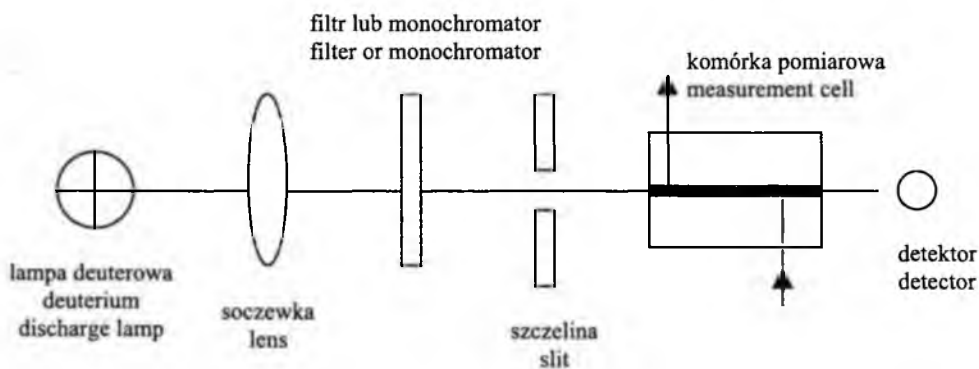
Właściwości detektorów HPLC.

Properties of HPLC detectors.

Typ detektora Detector type	Czułość Sensitivity	Selektywność Selectivity	Zakres zastosowań Range of application	Zastawianie w układach gradientowych Application at concentration gradient system	Koszt Costs
UV-Vis	dobra	dobra	bardzo szeroki	tak	niski
UV-Vis DAD	dobra	bardzo dobra	bardzo szeroki	tak	wysoki
Fluorescencyjny	bardzo dobra	bardzo dobra	wąski	tak	wysoki
refraktometryczny	bardzo słaba,	słaba	szeroki	nie	średni
Elektrochemiczny	bardzo dobra	bardzo dobra	rosnący	raczej nie	wysoki
Spektroskop masowy	słaba	bardzo dobra	wąski	możliwe	bardzo wysoki

Dobór detektora warunkowany jest rozdziałem próbki na kolumnie chromatograficznej [2]. Jeżeli następuje pełny rozdział możliwe jest użycie zarówno detektora uniwersalnego, reagującego na wszystkie składniki mieszaniny, jak i detektora specyficznego, rejestrującego tylko wybrany składnik. Jeżeli rozdział nie jest pełny, wówczas ze względu na nakładanie się pików w detektorze uniwersalnym należy stosować detektor specyficzny dla danego składnika. Kryteria doboru detektora związane są ściśle z postawionym celem analizy, tzn. oznaczenie wszystkich, kilku lub tylko jednego najważniejszego składnika. Istotne znaczenie ma skład badanej próbki, tj. liczba składników i ich właściwości fizyczne i chemiczne oraz skuteczność rozdziału w danym układzie chromatograficznym. To znów wiąże się z typem stosowanej kolumny, składem fazy ruchomej oraz sposobem elucji (izokratyczny lub gradientowy) [1, 2].

Detektorem o szerokim zastosowaniu jest detektor absorpcyjny UV-Vis [1, 2, 4]. Prostota jego konstrukcji, stosunkowo niewielki koszt i duża liczba aplikacji czyni go najbardziej popularnym wśród detektorów HPLC. Detektor taki jest zwykle częścią podstawowego wyposażenia zestawu HPLC [1, 2]; jest on również szeroko stosowany w badaniach składników żywności. [2] Należy jednak pamiętać, że analizowany składnik musi charakteryzować się absorpcją światła o długości fali z zakresu UV-Vis, a więc nie jest możliwe zastosowanie tego detektora np. do oznaczania alkoholi, w tym polioli oraz aldoz (np. glukozy, maltozy), natomiast niekiedy może być używany do oznaczania ketoz (np. fruktozy).



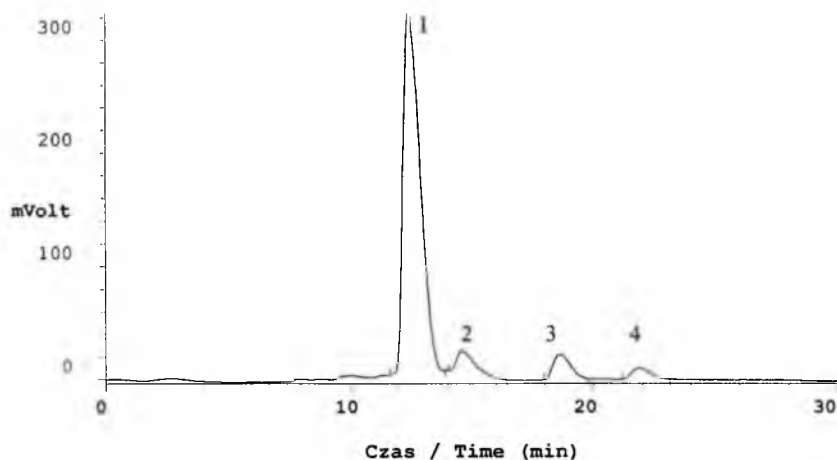
Rys. 1. Schemat detektora UV (jednopromieniowy).

Fig. 1. Diagram of UV detector (single-beam).

W układzie optycznym najprostszego detektora absorpcyjnego, światło o określonej długości fali ze źródła jest skupiane na komórce pomiarowej, przez którą przepływa faza ruchoma (rys. 1) [1, 2, 3]. Natężenie światła po przejściu przez komórkę jest mierzone przez fotodetektor. Za źródłem światła znajduje się urządzenie regulacji dłu-

gości fali. Ulepszeniem takiego detektora jest układ dwupromieniowy, w którym promień światła jest rozszczepiany na dwa, przy czym jeden przechodzi przez komórkę pomiarową, drugi poprzez zwierciadło i komórkę odniesienia kierowany jest na fotodetektor odniesienia [4]. Układ odniesienia służy do wyeliminowania zakłóceń powodowanych przez tzw. dryf i szumy. Układy elektroniczne detektora wzmacniają słabe sygnały do poziomu odpowiedniego dla integratora lub rejestratora, jednocześnie eliminując krótkotrwałe szumy [4].

Większość obecnie używanych detektorów UV-Vis to detektory o zmiennej długości fali. Wybór długości fali zależy od maksimum absorpcji oznaczanego składnika, jak również od stosowanej fazy ruchomej. Przykład zastosowania detektora UV przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Rozdział kwasów karboksylowych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej, detektor UV 210 nm. Kwasy: 1 – pirogronowy, 2 – bursztynowy, 3 – octowy, 4 – propionowy. Stężenia kwasów: po 5 g/dm³. Kolumna Aminex HPX 87 H, faza ruchoma: 0,004 M H₂SO₄, temp. 50°C, przepływ 0,5 ml/min.

Fig. 2. Separation of carboxylic acids by high performance liquid chromatography, UV detector 210 nm. Acids: 1 – pyruvic, 2 – succinic, 3 – acetic, 4 – propionic. Concentration of each acid: 5 g/dm³. Aminex HPX 87 H column, mobile phase: 0.004 M H₂SO₄, temp. 50°C, flow rate 0.5 ml/min.

Stosunkowo nowym osiągnięciem w dziedzinie detektorów UV-Vis są detektory spektrofotometryczne pozwalające rejestrować widma absorpcyjne substancji rozdzielanych na kolumnie [1, 2]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku analizowania substancji o nieznanym składzie, gdzie nie wiadomo jakie maksimum absorpcji wykazują oznaczane składniki. Najważniejszym elementem takiego detektora jest linijka diodowa (ang. diode array), stąd też detektory te zwane są detektorami DAD. W oma-

wianym detektorze światło ze źródła Z jest rozszczepiane na dwa promienie, z których jeden po skupieniu przechodzi przez komórkę pomiarową, drugi przez komórkę odniesienia. Następnie po rozszczepieniu na siatce dyfrakcyjnej promienie kierowane są na linijki diodowe, odpowiednio pomiarową i odniesienia. Ponieważ rejestrowane jest dyskretne (nieciągłe) widmo absorpcyjne, możliwe jest otrzymywanie chromatogramów trójwymiarowych. W związku z tym możliwe jest badanie czystości rozdzielanych substancji, a także analiza ilościowa dwóch substancji o tym samym czasie retencji. Detektory DAD znajdują coraz więcej zastosowań, ciągle powstają nowe metody analizy z ich wykorzystaniem, jednakże koszt takiego detektora jest ciągle zbyt wysoki. Ponadto rejestracja danych wymaga bardziej skomplikowanego oprogramowania.

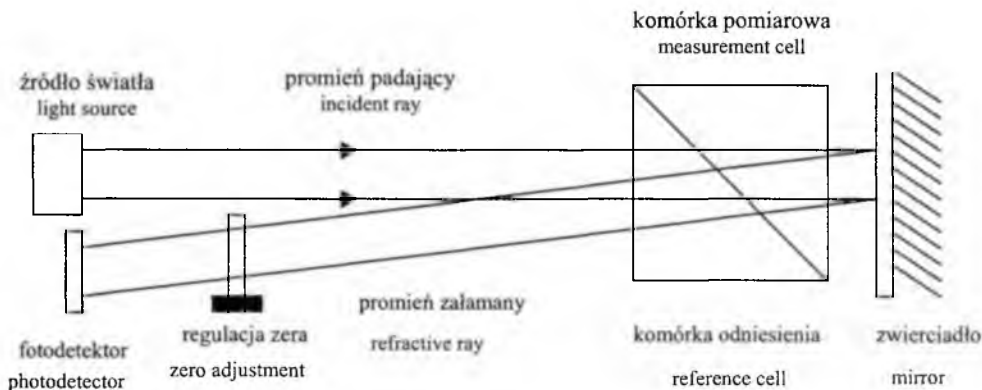
Ciekawą alternatywą proponowaną przez producentów sprzętu są detektory posiadające cechy użytkowe detektorów UV-Vis o zmiennej długości fali, jednakże o budowie opartej na technologii DAD, tzn. zamiast fotodetektora i urządzenia do regulacji długości fali wyposażone są w linijkę diodową. Urządzenia takie zwykle charakteryzują się parametrami lepszymi niż klasyczne detektory spektrofotometryczne, a ponadto dają możliwość rozbudowy do detektora diodowego wykazującego wszystkie cechy typowego urządzenia DAD, czyli możliwość rejestracji widma absorpcyjnego [7].

Innym typem detektora jest detektor fluorescencyjny [1, 2, 3]. Jego zasada działania oparta jest na zjawisku oddawania przez cząsteczki wzbudzone energii w postaci światła o określonej długości fali (czyli fluorescencji). Komórka pomiarowa detektora fluorescencyjnego oświetlana jest światłem o określonej długości fali. Światło emitowane przez substancję przepływającą przez komórkę jest skupiane filtrowane w ten sposób, że określona długość fali (odpowiadająca emisji analizowanej substancji) trafia na fotodiody, skąd odbierany jest sygnał pomiarowy. W układzie optycznym znajduje się też fotodiody odniesienia, na którą kierowany jest sygnał bezpośrednio ze źródła światła. Pomimo, że czułość tego detektora jest znacznie większa niż czułość detektora absorpcyjnego UV-Vis, detektor fluorescencyjny stosunkowo rzadko używany jest w badaniach składników żywności. Za jego pomocą można oznaczać tylko substancje wykazujące właściwość fluorescencji lub ulegające derywatywacji do takich substancji. Ilość aplikacji dotyczących składników żywności jest niewielka.

Zasada działania detektora refraktometrycznego oparta jest na refrakcji opisanej równaniem Lorentza-Lorentza i prawem Sneliusa, które wiąże współczynnik refrakcji z kątem załamania [5]. W detektorze mierzy się natężenie oświetlenia fotokomórki przez promień załamany na komórce pomiarowej, co związane jest ze zmianami kąta załamania, które są proporcjonalne do współczynnika załamania ośrodka, a więc do stężenia substancji zawartej w fazie ruchomej (rys. 3) [1].

Promień ze źródła światła jest kierowany na element zbudowany z komórki pomiarowej i komórki odniesienia, następnie odbija się od zwierciadła, przechodzi przez

plytkę regulacji zera i trafia na fotodiode (fotodetektor) (rys. 3) [2]. Komórkę odniesienia wypełnia się czystą fazą ruchomą. Gdy przez komórkę pomiarową przepływa faza ruchoma, wykonuje się ustawienie zera, wówczas dioda naświetlana jest promieniem o maksymalnym natężeniu. Gdy w komórce pomiarowej wraz z eluentem pojawi się substancja, promień świetlny ulegnie załamaniu, w związku z tym na fotodiode trafi tylko część promienia. Różnica w natężeniu oświetlenia, a więc różnica napięcia na fotodiodzie jest wprost proporcjonalna do stężenia substancji w fazie ruchomej.



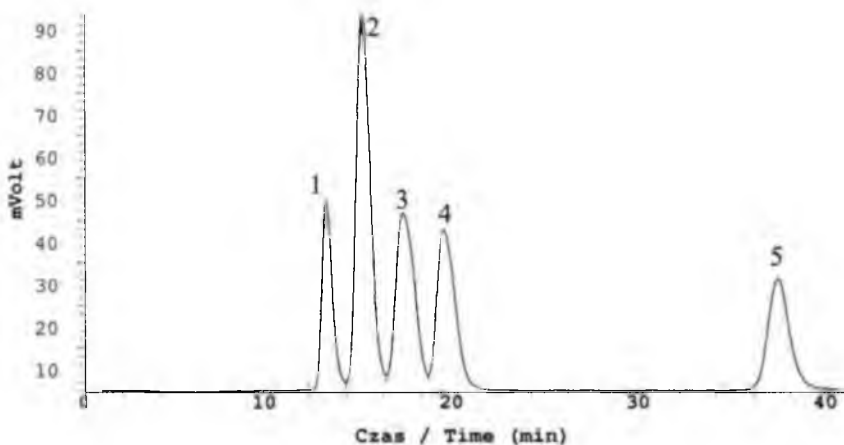
Rys. 3. Schemat detektora RI.

Fig. 3. Diagram of RI detector.

Detektor refraktometryczny (detektor RI – *ang.* refractive index) jest detektorem o charakterze uniwersalnym. Z tego względu charakteryzuje się małą czułością i wrażliwością na wiele czynników. Ta cecha decyduje, że jest to detektor nie nadający się do pracy w układach gradientowych. Jeśli stosuje się wieloskładnikowe fazy ruchome, należy raczej sporządzić mieszaninę i podawać ją za pomocą pompy izokratycznej niż korzystać z układu pomp i mieszalników. Na pracę detektora duży wpływ ma pulsacja pompy – wymagania stawiane pompie współpracującej z detektorem RI są pod tym względem o wiele wyższe niż w przypadku pracy z innymi detektorami. Jeśli w układzie stosuje się kilka połączonych szeregowo detektorów, detektor RI musi zawsze być ostatni w szeregu. [2] W przeciwnym razie opór powodowany przez następny detektor mógłby stwarzać zakłócenia w przepływie fazy ruchomej wpływającej z detektora RI, co oddziaływałoby na sygnał. Niemniej ważnym czynnikiem jest zachowanie stałej temperatury, dlatego też korzystne, a w niektórych przypadkach konieczne jest termostatowanie. Pomimo tych wszystkich niedogodności detektor RI jest bardzo często stosowany w badaniach żywności. Jest on niezbędny przy analizie cukrów, których nie da się oznaczać przy użyciu detektora UV. W związku z tym detektor RI powinien być częścią wyposażenia każdego laboratorium wykonującego rutynowe oznaczenia cu-

krów, alkoholi i kwasów organicznych. Przykład zastosowania detektora RI przedstawiono na rys. 4.

Zasada działania detektora elektrochemicznego opiera się na utlenianiu lub redukcji analizowanej substancji w komórce przepływowej przy udziale przyłożonego stałego potencjału [2, 6]. Kompensacje zmian powodowanych utlenieniem lub redukcją stanowią sygnał pomiarowy. Zakres zastosowania detektorów elektrochemicznych jest dość szeroki. Detektor elektrochemiczny może pracować w trzech trybach: stałego potencjału (DC mode) – detektor klasyczny, stosuje się do oznaczania substancji łatwo ulegających utlenianiu (np. fenol, aminy aromatyczne, tiole) lub redukcji (np. chinony, nitrozoaminy); tryb pulsacyjny (pulse mode) – zastosowanie do substancji nie dających się oznaczać w trybie DC, takich jak cukry, alkohole, niektóre aminy, aminokwasy i związki siarkowe; oraz tryb przemiatania (scan mode) – zmienny potencjał, inne, specjalne zastosowania. Ważnym czynnikiem jest też rodzaj elektrody stosowanej w komórce pomiarowej. Detektor elektrochemiczny charakteryzuje się dużą czułością w odniesieniu do substancji łatwo ulegających utlenianiu lub redukcji (np. pochodne fenolowe), co przy potencjalnie szerokim zakresie zastosowań czyni je bardzo cennym

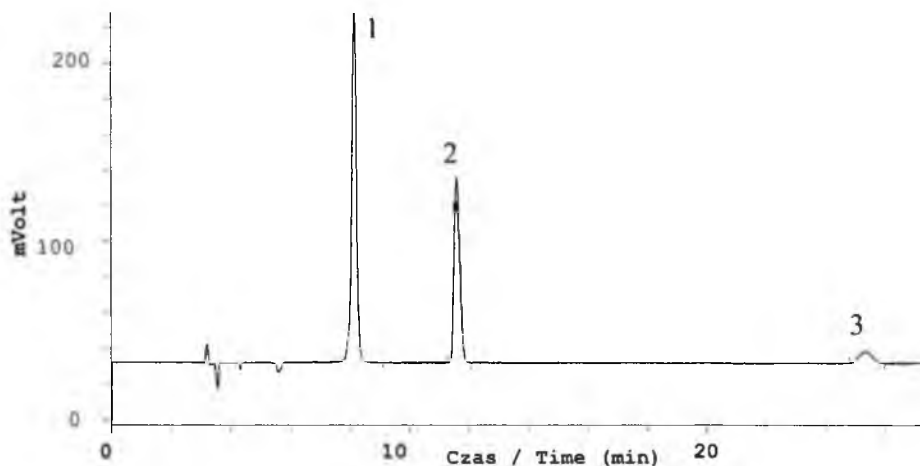


Rys. 4. Rozdział cukrów i polioliu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Detektor RI. 1 – rafinoza $0,05 \text{ g/dm}^3$, 2 – laktoza $0,084 \text{ g/dm}^3$, 3 – glukoza $0,062 \text{ g/dm}^3$, 4 – galaktoza $0,064 \text{ g/dm}^3$, 5 – ksylitol $0,068 \text{ g/dm}^3$. Kolumna Aminex HPX 87 C, faza ruchoma: woda, temp. 85°C , przepływ $0,4 \text{ ml/min}$.

Fig. 4. Separation of sugars and polyol by high performance liquid chromatography. RI detector. 1 – raffinose 0.05 g/dm^3 , 2 – lactose 0.084 g/dm^3 , 3 – glucose 0.062 g/dm^3 , 4 – galactose 0.064 g/dm^3 , 5 – xylitol 0.064 g/dm^3 . Aminex HPX 87 C column, mobile phase: water, temp. 85°C , flow rate 0.4 ml/min .

narzędziem analizy. Detektory elektrochemiczne są dość podatne na zakłócenia elektrochemiczne (zanieczyszczenia fazy ruchomej), elektryczne (pochodzące od układów elektronicznych: złe połączenia, złe uziemienie itp.) czy mechaniczne (pulsacja pompy). W związku z tym konieczny jest odpowiedni dobór urządzeń współpracujących. Ponadto detektory elektrochemiczne i ich wymienne komórki pomiarowe charakteryzują się wysoką ceną.

Sprzężenie chromatografii ciekowej ze spektroskopią masową, podobnie jak w przypadku GC-MS jest bardzo interesującym rozwiązaniem analitycznym [7]. Detektory MS mają potencjalnie szeroki zakres zastosowań w analizach HPLC, również do analizy składników żywności. Dysponując odpowiednią biblioteką widm masowych analityk posiada bardzo duże możliwości identyfikacji. Pomimo to zastosowania są ograniczone ze względu na wysoki koszt samego detektora. Jest to więc rozwiązanie dla ściśle wyspecjalizowanych, dysponujących dużym budżetem laboratoriów. Ponadto HPLC-MS jest techniką stosunkowo nową, tak więc biblioteki widm ciągle są tworzone i nie są jeszcze dostępne dla wszystkich grup możliwych do oznaczania substancji.



Rys. 5. Rozdział amin i aminokwasów za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej. Detektor elektrochemiczny pracujący w trybie stałonapięciowym. 1 – 3,4-dihydroksyfenyloamina $0,01 \text{ mM/dm}^3$, 2 – tyrozyna 2 mM/dm^3 , 3 – 3-nitrotyrozyna 2 mM/dm^3 . Kolumna RP 18, faza ruchoma: metanol, temp. 35°C , przepływ $0,5 \text{ ml/min}$.

Fig. 5. Separation of amines and amino acids by high performance liquid chromatography. Electrochemical DC-mode detector. 1 – 3,4-dihydroxyphenylamine 0.01 mM/dm^3 , 2 – tyrosine 2 mM/dm^3 , 3 – 3-nitrotyrosine 2 mM/dm^3 . RP 18 column, mobile phase: methanol, temp. 35°C , flow rate 0.5 ml/min .

Wśród innych detektorów HPLC, rzadziej lub nie stosowanych przy badaniach żywności, można wymienić detektory radioaktywności, detektory aktywności optycznej i detektory płomieniowo-jonizacyjne [1, 3].

Przedstawione powyżej cechy i związane z nimi kryteria doboru detektorów HPLC są interesującym tematem samym w sobie, ale należy podkreślić że stanowią one jedynie fragment metodologicznej problematyki analiz HPLC, uwzględniającej wszystkie elementy tej techniki badawczej.

LITERATURA

- [1] Lough W.J., Wainer I.W. (ed.): High performance liquid chromatography. Fundamental, principles and practice. Blackie Academic & Professional, Glasgow 1992.
- [2] Macrae R. (ed.): HPLC in food analysis. Academic Press, London 1988.
- [3] Hamilton R.J., Sewell P.A.: Wysokosprawna chromatografia cieczowa. PWN, Warszawa 1982.
- [4] Instrukcje detektora HPLC: Variable wavelength monitor No. A0293. Operating manual No. 0890 version V7026. Knauer.
- [5] Instrukcje detektora HPLC: Differential-Refractometer with auto-zero for analytical and semi-preparative use No. A0298. Knauer.
- [6] Instrukcje detektora HPLC: Decade digital electrochemical Amperometric detector. Antec Leyden.
- [7] Materiały reklamowe firmy Agilent Technologies.

FUNCTIONAL FEATURES AND CHOICE CRITERIA OF HPLC DETECTORS USED IN FOOD COMPONENTS ANALYSIS

S u m m a r y

Review of HPLC detectors used in food components analysis, meant for beginning analyst. The principles of operation and basic properties of spectrophotometric UV-Vis, refractive index (RI), electrochemical, fluorescence, and mass detectors with criteria of choice for particular analysis are discussed. The examples of HPLC analysis of food components are given. ☒