

AGNIESZKA ORKUSZ

## PRZEGLĄD METOD CHROMATOGRAFICZNYCH STOSOWANYCH W ANALIZIE AMINOKWASÓW

### Streszczenie

Celem artykułu jest przegląd metod chromatograficznych stosowanych w analizie aminokwasów (chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa, elektrochromatografia, chromatografia gazowa, cieczowa – kolumnowa, wysokosprawną chromatografią cieczową). Szczegółowo omówiona zostanie metoda z zastosowaniem HPLC chromatografu AminoQuant 1090 seria II z detektorem UV-Vis (DAD) firmy Hewlett Packard.

Duża ilość metod oznaczania i chromatograficznego rozdzielania aminokwasów spowodowana jest poszukiwaniem dobrej metody ich rozdzielania (chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa, gazowa, cieczowa – kolumnowa, wysokosprawną chromatografią cieczową).

### Chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa

Aminokwasy były jedną z pierwszych klas związków, które udało się rozdzielić metodą chromatografii bibułowej, stosowaną początkowo do jakościowej identyfikacji poszczególnych aminokwasów, a następnie do ilościowego ich oznaczania. Jako pierwsi metodę chromatograficznego rozdzielania aminokwasów na bibule opracowali Condon M., Gordon A., Martin J. [18]. Po ukazaniu się pracy wyżej wymienionych autorów, wielu badaczy pracowało nad udoskonaleniem owej metody, m.in. Opieńska-Blauth, która ulepszyła bibułową chromatografię dwukierunkową opracowując zimny test ninhydrynowy – wywoływania aminokwasów w postaci barwnych plam, dzięki któremu udało się zidentyfikować 21 aminokwasów [17]. Metodę nadającą się do ilościowego oznaczania aminokwasów na bibule opracował Mc Farren [16, 18], który

rozdzielił mieszaninę aminokwasów na kilku chromatogramach jednokierunkowych, rozwijanych w różnych rozpuszczalnikach.

Metoda chromatografii bibułowej nie pozwalała na całkowite rozdzielenie mieszaniny wszystkich aminokwasów na jednym arkuszu bibuły, zanieczyszczenia bibuły powodowały powstawanie smug i zniekształcenia wywołanych plam aminokwasów. Wadą chromatografii bibułowej dwukierunkowej było stosunkowo duże zużycie bibuły i odczynników, długotrwałość postępowania oraz konieczność użycia dwóch niezależnych komór chromatograficznych.

Udoskonaleniem chromatografii bibułowej była chromatografia cienkowarstwowa (zamiast bibuły stosowano płytki pokryte warstwą sorbentu), dzięki której znacznie skrócono czas rozwijania chromatogramu, plamki były mniej rozmyte niż na bibule oraz można było wykrywać mniejsze ilości analizowanych substancji. Większa uniwersalność chromatografii cienkowarstwowej, w porównaniu z chromatografią bibułową, wynika również z możliwości stosowania różnych sorbentów, które są mniej niż bibuła wrażliwe na niszczące działanie rozpuszczalników stosowanych zarówno do rozwijania, jak i wywoływania chromatogramów [10].

Powszechnie używanymi układami rozpuszczalników do rozwijania chromatogramów w chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej były: n-butanol, kwas octowy, woda (12:3:5); fenol, woda (3:1); n-butanol, aceton, amoniak, woda (10:10:5:2); izopropanol, kwas mrówkowy, woda (20:1:5). Najczęściej używanym odczynnikiem do wywoływania aminokwasów była ninhydryna w acetonie [21,10] lub w butanolu [7]. Stosowano również modyfikacje odczynnika ninhydrynowego, przez związanie go z metalami, m.in.: z miedzią [20], rtęcią [5].

Mimo niewątpliwych zalet chromatografia cienkowarstwowa miała również wady. Różnice w strukturze sorbenta na poszczególnych płytkach oraz w warunkach panujących w komorach chromatograficznych w czasie procesu rozwijania chromatogramu, uniemożliwiały otrzymanie stałych, powtarzalnych wyników [23].

## **Elektrochromatografia**

Haugaard i Kroner, jako pierwsi opracowali metodę rozdziału aminokwasów z zastosowaniem pola elektrycznego. Połączyli oni chromatografię bibułową z równoczesną elektroforezą. Metoda ta polegała na przyłożeniu napięcia do arkusza bibuły nasyconego buforem fosforanowym o  $\text{pH} = 6,2$  z równoczesnym rozdziałem chromatograficznym za pomocą fenolu jako fazy ruchomej. W ten sposób rozdzielili 10 aminokwasów [18]. Lepsze wyniki rozdziału mieszaniny aminokwasów otrzymano stosując elektrochromatografię wysokonapięciową, polegającą na stosowaniu wysokiego spadku potencjału (40 do 200 V/cm). Zaletą tej metody było zmniejszenie efektu dyfuzji i elektroosmozy, co pozytywnie wpłynęło na jakość rozdziału poszczególnych frakcji oraz krótki czas rozdziału. Główną wadą tej metody była konieczność odprowadzenia

dużej ilości energii cieplnej, jaka wytwarzała się w toku elektroforezy. Po raz pierwszy elektrochromatografię wysokonapięciową zastosowali Kickhöfen i Westphal, którzy rozdzielili aminokwasy najpierw elektroforetycznie (przy zastosowaniu spadku potencjału 70 V/cm w ciągu 200 min), a następnie – w kierunku prostopadłym do poprzedniego stosowali chromatografię rozdzielczą w układzie: pirydyna – kwas octowy – woda (50:75:15) w ciągu 17 godzin [11]. Metoda ta nie dawała całkowitego rozdziału wszystkich aminokwasów. Nad udoskonaleniem elektrochromatografii wysokonapięciowej pracował Masłowski, który przeprowadził dokładne badania dotyczące m.in.: doboru odpowiedniej komory elektroforetycznej, czasu rozwijania elektroforegramów oraz wysokości stosowanych napięć [14]. Skonstruował on komorę, w której odprowadzanie ciepła zachodziło przez bezpośrednie położenie zwilżonej buforem bibuły na ochłodzoną od zewnątrz płytę szklaną, a nie jak w komorze Michla [18, 24] zastosowanej w metodzie Kickhöfena i Westphala, za pomocą cieczy izolującej np. toluenu. Udało mu się również zmniejszyć do minimum elektroosmozę, przez zastosowanie folii celofanowej łączącej bibułę filtracyjną z buforem [14]. Masłowski wykazał, że stosowanie wysokich napięć: 120–150 V/cm skracало czas analizy, ale powodowało jednocześnie powstawanie dużych ilości ciepła. Zbyt niskie napięcia (poniżej 35 V/cm) nie dawały całkowitego rozdziału. Najodpowiedniejszym napięciem do rozdziału aminokwasów kwaśnych i zasadowych przy zastosowaniu buforu o pH 6,5, okazało się 50–60 V/cm, natomiast w przypadku aminokwasów obojętnych przy zastosowaniu buforu o pH = 2, 60–80 V/cm. Czas rozwijania elektroforegramów przy zastosowaniu powyższych napięć powinien wynosić 60 do 120 minut. Dłuższy czas na skutek dyfuzji powodował bowiem zwiększenie powierzchni plam, co wpływało negatywnie na rozdział aminokwasów leżących blisko siebie.

Metoda opracowana przez Masłowskiego pozwoliła na rozdzielenie mieszaniny 18 aminokwasów w postaci zwartych i symetrycznych plamek, co w ogromnej mierze ułatwiło oznaczenie ilościowe.

### **Chromatografia gazowa**

Rozdział aminokwasów przeprowadzano również stosując metodą chromatografii gazowej, w której konieczne było przeprowadzenie aminokwasów w ich lotne pochodne, takie jak: N-acetylowe, trinitroacetylowe [3] trimetylosililowe [26] estry n-butyłowe N-trifluoroacetyloaminokwasów. Jako fazy stacjonarne stosowano glikobursztynian neopentylu lub też bursztynian polibutanodiolu [3]. Trudności w tej metodzie sprawiało przeprowadzanie aminokwasów w ich lotne pochodne.

## Chromatografia kolumnowa jonowymienna

Z wielu metod chromatografii cieczowej powszechne uznanie zyskała chromatografia jonowymienna z użyciem żywicy polistyrenowo-sulfonowej Dowex 50. Chromatografia na jonitach pozwalała na jednorazowe rozdzielanie stosunkowo dużych ilości oznaczanych aminokwasów, a także charakteryzowała się małym błędem metodycznym. Metoda opracowana przez Moorea i Steina, zaliczana do metod klasycznych, polegała na przepuszczaniu przez jonit mieszaniny aminokwasów i eluowaniu ich buforami cytrynianowymi o wzrastającym pH [18, 21]. Frakcje zbierano za pomocą kolektora frakcji, będącego jednym z pierwszych automatycznie działających aparatów do zbierania frakcji wycieku [18], w uzyskanych frakcjach aminokwasy oznaczano ilościowo odczynnikami ninhydrynowymi. Z biegiem lat kolektor frakcji zastąpiono detektorami przepływowymi, które w sposób ciągły rejestrują strumień eluentu, automatycznie wskazują kiedy analizowane związki opuszczają kolumnę chromatograficzną [12]. Dalsze usprawnienia w końcowym efekcie doprowadziły do konstrukcji automatycznych analizatorów aminokwasów.

Do rozdzielania aminokwasów stosowano również kolumny wypełnione jonitami skompleksowanymi z kationami cynku lub miedzi [13].

## Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Dużym osiągnięciem w analizie aminokwasów jest wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa, będąca metodą w pełni zautomatyzowaną, sterowaną komputerowo, z systemem przetwarzania danych. Powstała ona w oparciu o tradycyjną chromatografię kolumnową, dzięki m.in.: zmniejszeniu długości kolumn oraz ich średnicy wewnętrznej i ulepszeniu systemów detekcji. Stosowane w klasycznej kolumnowej chromatografii cieczowej kolumny do oznaczania aminokwasów miały różnorodną długość 100 cm [8], 150 cm [9], i średnicę, np. 5,5 mm [18]. Obecnie do oznaczania aminokwasów stosowane są kolumny o dł. 20 cm [22] – 25 cm [4], i średnicy 2,1 mm [22] i 4,6 mm [1]. Konsekwencją redukcji długości kolumny i jej średnicy jest m.in. zmniejszenie zużycia kosztownych rozpuszczalników stosowanych w HPLC, skrócenie czasu analizy, lepsza odtwarzalność wyników [19, 25]. Najczęściej stosowanymi obecnie detektorami do oznaczania aminokwasów są: detektory UV-Vis [2, 22] i detektory fluorescencyjne [1, 6, 15].

Przykładem urządzenia do przeprowadzania oznaczeń aminokwasów metodą HPLC jest w pełni zautomatyzowany AminoQuant 1090 firmy Hewlett Packard (czynności manualne sprowadzają się tylko do przygotowania próbki i wzorca oraz do uruchomienia komputera), którego podstawowe elementy stanowią: automatyczny dozownik, prekolumna (20x2,1 mm), właściwa kolumna chromatograficzna (200x2,1

mm), detektor UV-Vis (Diode-Array Detector) lub fluorescencyjny oraz komputer z odpowiednim oprogramowaniem.

Automatyczny dozownik umożliwia wprowadzenie badanej próbki oraz fazy ruchomej na kolumnę chromatograficzną. Przy dozowniku znajduje się stojak, w którym kolejne pięć miejsc zajmują: odczynniki służące do przeprowadzania aminokwasów w pochodne (orto-ftalaldehyd-OPA i 9-fluoroenylometylochloroform-FMOC), bufor boranowy i trzy wzorce zawierające mieszaniny tych samych aminokwasów, ale o różnych stężeniach; kolejne miejsca (do 99) zajmują próby badane.

W prekolumnie (20x2,1 mm), której wypełnienie stanowi ODS Hypersil (C<sub>18</sub>) o wielkości ziaren 5 µm następuje przeprowadzanie aminokwasów w pochodne orto-ftalaldehydowe i 9-fluoroenylometylochloroformowe.

We właściwej kolumnie chromatograficznej (200x2,1 mm), której niepolarne, stałe wypełnienie stanowi Vydac (C<sub>18</sub>) o wielkości ziaren 5 µm następuje wymywanie aminokwasów za pomocą układu dwóch rozpuszczalników (chromatografia gradientowa), które stanowią polarną fazę ruchomą. W skład pierwszego rozpuszczalnika wchodzi: octan sodu, trietyloamina i tetrahydrofuran; skład drugiego to: octan sodu, acetonitryl i metanol. W elucji gradientowej wymywanie aminokwasów zaczyna się eluentem o małej sile elucji, a następnie dodaje eluent o dużej sile. Sumaryczna objętość eluentu przepływającego przez kolumnę w jednostce czasu jest stała, natomiast różne są objętości poszczególnych eluentów (początek analizy 100% rozpuszczalnika A, 0% rozpuszczalnika B, w 18 min 0% rozpuszczalnika A i 100% rozpuszczalnika B).

Jako, że wypełnienie kolumny jest niepolarne, a faza ruchoma jest polarna, mamy do czynienia z odwróconym układem faz, który jest obecnie stosowany znacznie częściej niż normalny układ faz. Jest to spowodowane tym, że polarne adsorbenty używane w normalnym układzie faz silnie adsorbują wodę obecną w rozpuszczalnikach nawet w ilościach śladowych, w wyniku czego aktywność adsorbentu maleje, a kolumna traci swoje początkowe właściwości rozdzielcze. Zjawisko to nie występuje na niepolarnych wypełnieniach kolumny chromatograficznej [8]. Czas rozdziału wynosi 18 minut.

W skład AminoQuantu 1090 wchodzi detektor UV-Vis (Diode Array Detector), który może być używany do detekcji przy ośmiu różnych długościach fal jednocześnie (w zakresie długości fal od 190 nm do 950 nm), ale tylko dwie długości fali są używane do oznaczania aminokwasów, tj. 262 nm dla aminokwasów – pochodnych FMOC oraz 338 nm dla aminokwasów będących pochodnymi OPA. Detektor diodowy może być zastąpiony przez detektor fluorescencyjny, który jest detektorem bardziej czułym od opisanego powyżej.

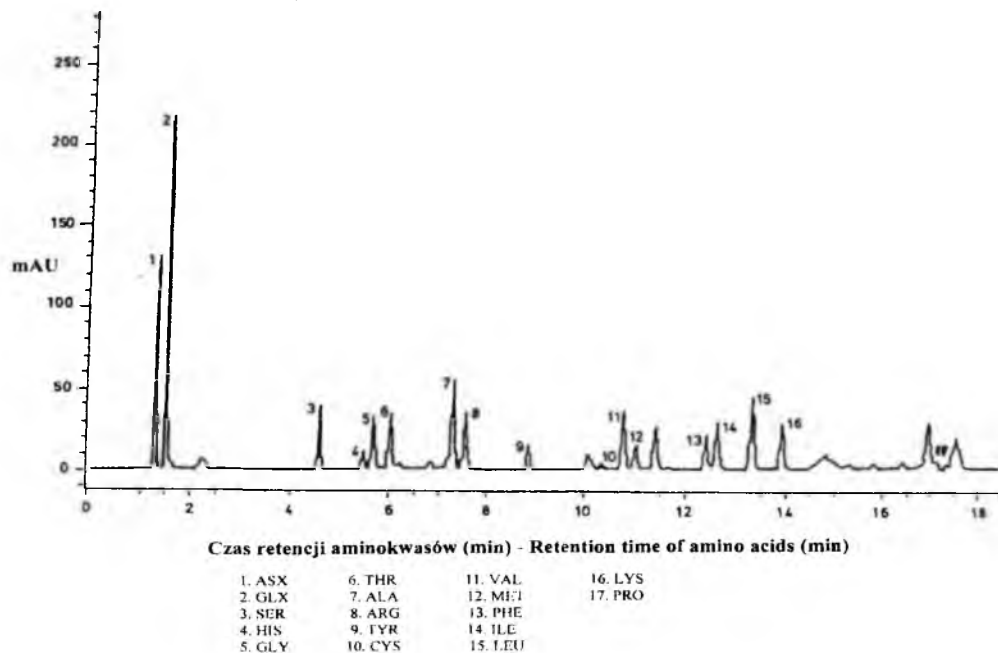
Cały proces analizy aminokwasów kontrolowany jest za pomocą zintegrowanego układu, w skład którego wchodzi: komputer, monitor i klawiatura. Wszystkie operacje: ich ilość, czas, kolejność, są zaprogramowane przed przystąpieniem do analizy (np.:

przeprowadzanie aminokwasów w pochodne, kolejność dodawania odczynników do badanej próbki, szybkość i czas trwania mieszania tych odczynników z badaną próbką).

Komputer rejestruje sygnały wychodzące z detektora, charakteryzujące poszczególne piki (rejestruje czas retencji, powierzchnię pików); oblicza ilościowy skład próbki oraz identyfikuje poszczególne składniki analizowanej mieszaniny na podstawie chromatogramów aminokwasów wzorcowych wprowadzonych do pamięci komputera.

Łączny czas analizy – od momentu pobrania próbki przez dozownik do wydruku wyników – wynosi 35 min.

Wydruk wyników otrzymuje się w postaci chromatogramu (przykładowy chromatogram ilustruje rys. 1) oraz tabeli. Chromatogram przedstawia rozdział mieszaniny aminokwasów. Na osi x znajduje się czas retencji, na osi y wskazanie detektora. Aminokwasy wymywane są z kolumny chromatograficznej w kolejności, jak pokazano na rys. 1. W oparciu o czas retencji dokonuje się identyfikacji poszczególnych aminokwasów. Tabela zawiera kolejno: nr aminokwasu, czas retencji, długość fali świetlnej, przy której jest oznaczany, nazwę aminokwasu, powierzchnię piku, zawartość aminokwasu (ng/μl wprowadzonej próbki), stężenie aminokwasu (pmol/μl wprowadzonej próbki), które w zależności od sposobu prezentacji wyników, można przeliczać na: azot, białko, surowiec użyty do analizy.



Rys. 1. Rozdział aminokwasów z mięsnego hydrolizatu.

Fig. 1. The chromatogram of amino acids from meat hydrolyzate.

## LITERATURA

- [1] Ashworth R.B.: Amino acid analysis for meat protein evaluation. *J. Assoc. of Anal. Chem.*, **1**, 1987, 80.
- [2] Aristoy M.C., Toldra F.: Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1991, 1792.
- [3] Berthillier A.: *Chromatografia i jej zastosowania*. PWN, Warszawa 1975.
- [4] Biesaga M., Orska J., Trojanowicz M.: HPLC of amino acids using tetraphenylporphyrin-silica stationary phases. *Chem. Anal.*, **43** (4), 1998, 647.
- [5] Borkowski T., Madecka-Borkowska I.: Oznaczanie aminokwasów metodą chromatografii bibułowej. *Chem. Anal.*, **1-2**, 1959, 119.
- [6] Chuaqui-Offermans N., McDougall T.: An HPLC method to determine o-tyrosine in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.*, **39** (2), 1991, 300.
- [7] Gowat T.H. (red.): *Nowoczesne metody instrumentalne analizy*. WNT, Warszawa 1976.
- [8] Hamilton R.J., Sewell P.A.: *Wysokosprawna chromatografia cieczowa*. PWN, Warszawa 1982.
- [9] Hirs C.H., Moore S., Stein W.: The chromatography of Amino Acids on ion exchange resins. Use of volatile acids for elution. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1954, 6063.
- [10] Jarosz M., Malinowska E.: *Pracownia chemiczna. Analiza instrumentalna*. WSiP, Warszawa 1999.
- [11] Kickhöfen B., Westphal O.: *Z. Naturforsch.*, **7b**, 1952, 659.
- [12] Kirkland J. (red.): *Współczesna chromatografia cieczowa*. PWN, Warszawa 1976.
- [13] Masłowska J., Gasińska E.: Nowe metody rozdzielania mieszaniny aminokwasów na kolumnach jonitowych obsadzonych kationami cynku lub miedzi. *Chem. Anal.*, **29** (2), 1984, 163.
- [14] Masłowski P.: Wysokonapięciowa elektrochromatografia bibułowa aminokwasów w różnych okresach kiełkowania *Hordeum sativum*. *Roczn. Nauk Roln.*, **81**, 1960, 561.
- [15] Meier W., Buerger R., Froehlich D.: Analysis of o-tyrosine as a method for the identification of irradiated chicken meat. *Beta Gamma*, **1**, 1988, 34.
- [16] Muszkatowa B.: Badania nad składem aminokwasowym i uzupełnianiem się białek produktów spożywczych z zastosowaniem ilościowej chromatografii bibułowej. *Roczniki PZH*, **XIV** (3), 1963, 249.
- [17] Opieńska-Blauth J.: Wykrywanie aminokwasów w analizie chromatograficznej. *Chem. Anal.*, **2**, 1957, 123.
- [18] Opieńska-Blauth J., Waksmundzki A., Kański M.: *Chromatografia*. PWN, Warszawa 1957.
- [19] Peak.: *From the HP bookshelf*. Hewlett Packard, **4**, 1992.
- [20] Sanecka-Obacz M.: Przystosowanie testu ninhydryno-miedziowego do identyfikacji aminokwasów w płynach ustrojowych. *Chem. Anal.*, **6**, 1961, 419.
- [21] Skrabka T.: Chromatograficzny rozdział aminokwasów niektórych hydrolizatów z surowców odpadkowych przemysłu rolno-spożywczego. *Zesz. Nauk. WSE*, Wrocław 1963, 111.
- [22] Skrabka-Błotnicka T., Rosiński A., Przysiężna E.: The effect of dietary formulation supplemented with herbal mixture on the goose breast muscle quality. Report 1: The effect on the chemical composition. *Arch. Geflügelk.*, **61** (3), 1997, 135.
- [23] Suprynowicz Z., Różyło J.K., Kowalczyk S., Staszewski R., Malzacka M.: Ilościowa analiza chromatograficzna cieczowa i gazowa. PAN 1973.
- [24] Szyszko E.: *Instrumentalne metody analityczne*. PZWL, Warszawa 1975.
- [25] Tyszkiewicz S. (red.): *Postęp w analizie żywności*. Wyd. IPMiT, Warszawa 1993.
- [26] Żegota A., Żegota H.: Chromatograficzny rozdział izomerów tyrozyny. O-tyrozyna jako produkt radiacyjnej hydroksylacji fenyloalaniny i wskaźnik napromieniowania żywności. *Żywność. Technologia. Jakość.*, **4** (13), 1997, 37.

**REVIEW OF CHROMATOGRAPHIC METHODS  
USED FOR ANALYSIS OF AMINO ACIDS**

**S u m m a r y**

The review of the chromatographic methods (paper, thin-layer, electrochromatography, gas, liquid – column and high pressure liquid chromatography) used for the analysis of amino acids in the paper is presented. The method with using of the Hewlett Packard's HPLC chromatograph AminoQuant 1090 series II with a diode array detector is especially exhibited. ☒