

Paweł K. ZARZYCKI, Magdalena M. ŚLĄCZKA

POLITECHNIKA KOSZALIŃSKA, WYDZIAŁ BUDOWNICTWA I INŻYNIERII ŚRODOWISKA, ZAKŁAD TOKSYKOLOGII I BIOANALITYKI Śniadeckich 2, 75-453 Koszalin

Optymalizacja procesu rozdzielania tryptofanu i proliny w układzie faz odwróconych z wykorzystaniem mikrochromatografii cienkowarstwowej (micro-TLC) w warunkach kontrolowanej temperatury

Dr hab. Paweł K. ZARZYCKI

Absolwent Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku (1989). Obecnie kierownik Zakładu Toksykologii i Bioanalitik Politechniki Koszalińskiej. Główne zainteresowania naukowe dotyczą wpływu temperatury na procesy inkluzyjne z udziałem związków makrocyklicznych (cyklodekstryny, kaliksareny) oraz efektu termochromowego w chemii supramolekularnej. Ponadto, badania ukierunkowane są na wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz mikrochromatografii planarnej (mikro-TLC).



e-mail: pkzarz@wp.pl

Mgr Magdalena M. ŚLĄCZKA

Absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (2002). Obecnie słuchaczka Studiów Doktoranckich na Wydziale Budownictwa i Inżynierii Środowiska Politechniki Koszalińskiej. Główne zainteresowania naukowe dotyczą oznaczania ksenobiotyków organicznych w próbkach wody i gleby metodą chromatografii gazowej, z wykorzystaniem różnych detektorów m.in. płomieniowo-jonizacyjnego oraz spektrometrii mas.



e-mail: magdalena1977@hotmail.co.uk

Streszczenie

Chromatografia cienkowarstwowa jest dogodną metodą do tzw. analiz przesiewowych (z ang. *screen analysis*) oraz szybkiego badania profili retencji z użyciem różnych faz ruchomych. Nasze badania dotyczą zastosowania termostatowanej mikrochromatografii cienkowarstwowej do optymalizacji procesu rozdzielania wybranych aminokwasów tryptofanu i proliny w układzie faz odwróconych (RP). Uzyskane dane retencyjne umożliwiły określenie optymalnych warunków rozdzielania przy zastosowaniu prostego parametru optymalizacji: maksymalnej wartości współczynnika rozdzielania (α_{max}). Parametr ten był obliczany z dokładnością 2% stężenia binarnej fazy ruchomej w zakresie od 0 do 100%, na podstawie danych eksperymentalnych uzyskanych z rozdzielczością 20%. Wybrane kryterium optymalizacji umożliwia bezpośrednie przeniesienie uzyskanych wyników na systemy rozdzielania typu RP z użyciem kolumny zamiast płytek np. wysokosprawnej chromatografii kolumnowej (HPLC).

Słowa kluczowe: mikrochromatografia cienkowarstwowa (micro-TLC), tryptofan, prolina, aminokwasy, ninhydrina, współczynnik rozdzielania (α).

Optimization of separation protocol of tryptophan and proline in a reversed-phase system using temperature-controlled micro-thin-layer chromatography (micro-TLC)

Abstract

Thin-layer chromatography (TLC) and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) are commonly used in separation, identification, purification and quantification of different analytes present in complex biological, environmental and pharmaceutical samples. Planar chromatography can be also applied to screen analysis and fast exploration of chromatographic retention profiles using different concentrations of mobile phases components. This method does not require expensive equipment, tedious and time-consuming sample pretreatments and, what is important, allows a parallel separation of many samples at the same time. The spots or bands sprayed onto the TLC plate can be easily detected under visible and UV light (usually 254nm, 366nm) or by post-chromatographic derivatization with visualization reagents, and then digitalized using office scanners. It should be noted that the great advantage of micro-planar chromatography compared to the regular sized TLC is low consumption of the eluents (usually less than 1 mL per analytical run) as well as short analysis time, due to mobile phase migration distance less than 50 mm. Under particular cases (high temperature and low viscosity eluents like acetone, dichloromethane or *n*-hexane), non-forced eluent flow micro-chromatographic analysis can be completed within less than 5 minutes. This work is focused on optimization of separation process of two amino acids including tryptophan and proline (Fig. 1) under reversed-phase micro-chromatographic conditions. Particularly, selected amino acids were chromatographed on HPTLC RP-18W (wetable with water) 25 x 50 mm cutted plates using thermostated horizontal micro-chamber and unsaturated conditions (Fig. 2). The target components were sprayed on the start line (1 µg per lane) using a semi-automatic sampler (Linomat 5, Camag). The plates were developed with *n*-propanol: water

binary mixtures as the mobile phases. Different concentrations of alcohol ranging from 0 to 100% (v/v) with steps of 20% were applied. The temperature of chromatographic separation was set at 40°C and chromatographic runs were completed within 10-30 minutes, depending on the water concentration in the mobile phase. The amino acids were visualized by dipping the plates in ninhydrin solution (prepared for concentration 0.3% in ethanol) followed by heating at 120°C for 10 minutes. Picture acquisition was performed using a Plustek OpticPro S12 scanner with an 8-bit per channel color deep mode, 300 DPI resolution, and saved as TIFF files. Retention data were derived from the plates *via* densitometric scans obtained with help of ImageJ freeware (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Using the raw retention data set (R_f values, retardation factor), the chromatographic profiles of amino acids were calculated with step of 2% (Fig. 3A). Based on the curves observed and relationship $R_M = \log k$, where R_M and k correspond to mobility and retention factors, respectively, a simple optimization criterion expressed as a separation factor (α) was calculated (Fig. 3B). Using this plot, the best separation conditions of target components were selected taking into account the maximum value of the separation factor (α_{max}). Due to the equal spot shape of amino acids investigated across the whole range of the mobile phases composition, such approach involving the α values allows fast optimization of separation in planar chromatography and direct application of selected conditions into column chromatographic systems based on *e.g.* high-performance liquid chromatography (HPLC). It should be noted that the advantages of retention data screening using micro-TLC are very low mobile phase consumption (at level of 300 µL per chromatographic run), short analysis time and effective detection of UV-Vis transparent substances using simple visualization reagent.

Keywords: micro-chromatography (micro-TLC), amino acids, tryptophan, proline, ninhydrin, separation factor (α).

1. Wstęp

Aminokwasy są substancjami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Substancje te mogą być wytwarzane przez organizm samodzielnie (tzw. aminokwasy endogenne) lub muszą być systematycznie przyjmowane wraz z pożywieniem. Określamy je wtedy nazwą egzogennych. U większości kręgowców oraz człowieka do aminokwasów tego typu zalicza się fenylalaninę, izoleucynę, leucynę, lizynę, metioninę, treoninę, walinę oraz tryptofan [1]. Ponieważ z aminokwasów zbudowane są białka (tzw. aminokwasy biogenne), jak również ich cząsteczki funkcjonują w organizmach jako samodzielne związki chemiczne biorące udział w rozmaitych procesach metabolizmu, istnieje potrzeba oznaczania tych substancji np. w żywności przygotowywanej dla ludzi jak i zwierząt hodowlanych [2]. Do współczesnych metod analitycznych, które stosuje się w analizie aminokwasów należą: wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia gazowa (GC), elektroforeza kapilarna (CE) oraz chromatografia cienkowarstwowa (TLC). Wszystkie wyżej wymienione techniki wymagają użycia zaawansowanych technologicznie urządzeń pomiarowych. Za wyjątkiem TLC

są one narażone na uszkodzenia kolumn i detektorów podczas analizy nieodpowiednio przygotowanych próbek, charakteryzujących się wysokim poziomem substancji interferujących. W przypadku chromatografii cienkowarstwowej proces analityczny może być wykonywany z użyciem próbek nieoczyszczonych, gdyż płytka chromatograficzna używana jest tylko raz. Ponadto, chromatografia cienkowarstwowa nie wymaga zastosowania skomplikowanego i drogiego sprzętu jak również, o czym wspomniano wyżej, nie zachodzi potrzeba wieloetapowego przygotowania i oczyszczania próbki. Dodatkowo, zaletą tej metody jest możliwość jednoczesnej, równoległej analizy wielu próbek w trakcie jednego procesu analitycznego, co w znaczący sposób skraca czas potrzebny do wykonania analiz seryjnych [3]. Co więcej, metoda ta umożliwia prostą i taną detekcję rozdzielonych substancji, przy pomocy bezpośredniej obserwacji płytki w świetle widzialnym lub fluorescencji plamek uwidaczniającej się przy naświetleniu płytki promieniowaniem elektromagnetycznym z zakresu UV [4]. Istotne jest, że do detekcji większości substancji przezroczystych w zakresie promieniowania UV-Vis, możliwe jest zastosowanie prostych reagentów wizualizacyjnych, powodujących fluorescencję lub wybarwienie pasm np. roztworem ninhydryny w przypadku aminokwasów.

W pracy podjęto próbę optymalizacji procesu rozdzielania wybranych aminokwasów tryptofanu i prolina z wykorzystaniem mikrochromatografii cienkowarstwowej (micro-TLC) w układzie faz odwróconych oraz warunkach izotermicznych (40°C). Do badań użyto fazy stacjonarnej typu HPTLC RP-18W (płytki o rozmiarze 25 x 50 mm) oraz binarnych faz ruchomych o składzie *n*-propanol:woda, w pełnym zakresie stężeń od 0 do 100%.

2. Część eksperymentalna

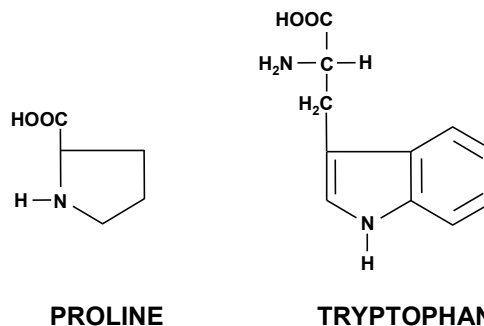
Wzorce L-tryptofanu oraz L-proliny były wyprodukowane przez firmę Fluka (Buchs, Szwajcaria). Do badań wykorzystano roztwory aminokwasów o stężeniu 1 mg/mL sporządzone w 20% metanolu (Merck, Darmstadt, Niemcy). Roztwór ninhydryny (Fluka, Buchs, Szwajcaria) przygotowano w 96% etanolu (Polmos "Wrocław", Wrocław, Polska). Zastosowano stężenie ninhydryny 0.3% (m/v). Do sporządzenia faz ruchomych użyto *n*-propanolu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy) i wodę redestylowaną.

Do rozdzielania badanych związków zastosowano płytki szklane HPTLC typu RP-18W (Merck, Darmstadt, Niemcy). Płytki o fabrycznych wymiarach 20 x 10 cm zostały przycięte do wielkości 2.5 x 5 cm. Linia startu została umieszczona na odległości 5 mm od krawędzi płytki przez co droga rozwijania wyniosła 45 mm. Analizowane roztwory o objętości 1 µL zostały naniesione na płytki w postaci pasm o 5 mm długości, za pomocą półautomatycznego urządzenia dozującego (Linomat 5, Camag, Szwajcaria), kontrolowanego przez oprogramowanie winCATS (1999-2008, wersja 1.4.4.6337). Proces chromatograficzny prowadzono w temperaturze 40°C i w mikrokomorze nienasyconej parami fazy ruchomej. Temperatura mikrokomory była kontrolowana z dokładnością ±0.05°C, przy użyciu termostatu cyrkulacyjnego (FP51-SL, Julabo, Seelbach, Niemcy). Mikrokomora oraz jej działanie została opisana w pracy [5]. Przed rozpoczęciem rozwijania, płytki z naniesionymi aminokwasami były termostatowane w komorze przez 15 minut, do uzyskania założonej temperatury chromatografowania (40°C). Proces rozwijania płytek eluentem przerywano w momencie, gdy faza ruchoma przemieściła się wzdłuż całej długości płytki (czoło fazy ruchomej osiągnęło przeciwniegi koniec płytki). Do rozwijania chromatogramów użyto binarnych alkoholowo-wodnych faz ruchomych o składzie 0, 20, 40, 60, 80, 100% (v/v; *n*-propanol:woda). Plamki aminokwasów wywoływano za pomocą etanolowego roztworu ninhydryny (0.3 %; m/v), poprzez zanurzenie płytek w roztworze wywoływacza, a następnie ich wygrzanie w temperaturze 120°C przez 10 minut. Po tym czasie aminokwasy uwidaczniały się w postaci purpurowo-fioletowych (tryptofan) i pomarańczowo-różowych

(prolina) pasm na jasnym tle. Wywołane chromatogramy skanowano za pomocą skanera biurowego Plustek OpticPro S12 w trybie 8-bitowej głębi sygnału RGB, przy rozdzielczości 300 DPI i zachowywano w formacie TIFF. Profile densytometryczne uzyskiwano przy pomocy oprogramowania ImageJ (freeware, ver. 1.42q Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). W badanym układzie chromatograficznym błąd pomiaru retencji nie przekraczał 10%, mierzony przy pomocy parametru RSD (CV%).

3. Dyskusja wyników i wnioski

Określanie zawartości aminokwasów w żywności ma zasadnicze znaczenie z punktu widzenia jej wartości spożywczej, jak również właściwości sensorycznych. Wybrane przez nas do badań chromatograficznych aminokwasy, których wzory chemiczne przedstawiono na rysunku 1, należą do grupy związków egzogennych (tryptofan) oraz endogennych (prolina). Obecnie, istnieje potrzeba ich oznaczania w szeregu produktach spożywczych, takich jak np. miód (prolina) [6], czy płatki śniadaniowe i mąka z nasion roślin strączkowych (tryptofan) [7], głównie metodami chromatografii cieczowej.



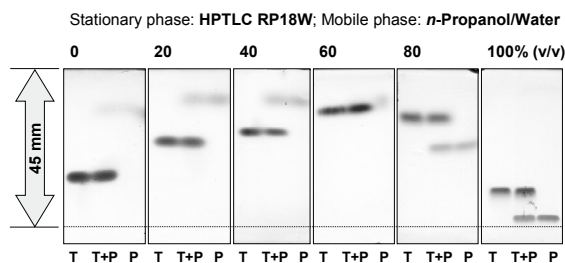
Rys. 1. Wzory strukturalne prolina i tryptofanu
Fig. 1. Structures of proline and tryptophan

Z praktycznego punktu widzenia istotne znaczenie ma fakt, że dane retencyjne otrzymane techniką planarną można w prosty sposób przeliczyć na dane retencyjne dla kolumny, wykorzystując powszechnie znaną zależność pomiędzy współczynnikami retencji w chromatografii cienkowarstwowej (R_F – współczynnik zatrzymania; R_M – współczynnik migracji) oraz kolumnowej (k – współczynnik retencji):

$$R_M = \log k = \log [1/R_F - 1]$$

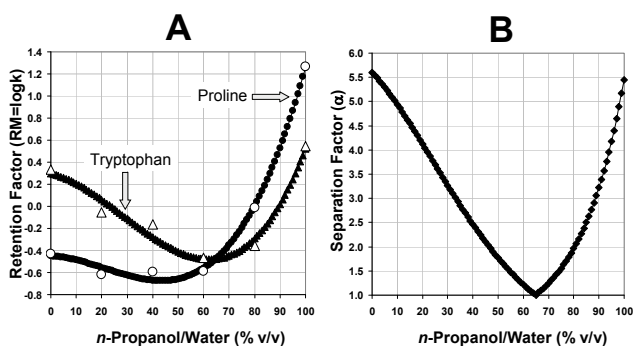
Zależność ta umożliwia wykorzystanie danych retencyjnych uzyskanych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej dla optymalizacji procesów rozdzielania z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej. Istotne jest również to, że za pomocą chromatografii planarnej można bardzo szybko wygenerować dużą ilość danych retencyjnych, gdyż w przeciwieństwie do chromatografii kolumnowej, jednocześnie może być analizowanych kilka próbek [8]. Uzyskuje się przez to znaczną oszczędność czasu oraz kosztów analizy (małe ilości faz ruchomych).

Na rysunku 2 zestawiono typowe mikro-chromatogramy cienkowarstwowe uzyskane w układzie faz odwróconych, z użyciem binarnych faz *n*-propanol:woda. Zastosowane pokrycie płytek chromatograficznych fazą stacjonarną o średniej gęstości łańcuchów oktadecylsilanowych (RP18W; *wettable with water*), umożliwia zastosowanie eluentów z dużą zawartością wody nawet do 100%. Jak widać, w całym zakresie proporcji składników badane aminokwasy tworzyły zwarte i w większości przypadków symetryczne pasma, wzdłuż drogi rozwijania eluentu.



Rys. 2. Rozdzielanie badanych wzorców aminokwasów: tryptofanu (T) oraz prolina (P) przy zastosowaniu mikroplatek HPTLC RP-18W oraz faz ruchomych *n*-propanol:woda. Warunki wykonania analizy chromatograficznej: sposób naniesienia roztworów wzorców - pasmo długości 5 mm techniką natryskową; ilość wzorca 1 μ L; komora nienasycona; temperatura procesu rozwijania 40°C; detekcja pasm - płytki z rozwiniętymi chromatogramami zanurzone w 0.3% (w/v) etanolowym roztworze ninhydriny i wygrzewane przez 10 minut w temperaturze 120°C; rejestracja chromatogramów - obraz na płytkach zeskanowano przy użyciu skanera biurowego Plustek OpticPro S12

Fig. 2. Separation of examined amino acids: tryptophan (T) and proline (P) using HPTLC RP-18W micro-plates and *n*-propanol:water mobile phases. Analytical conditions: sample application - 5 mm using spray-on technique; sample volume: 1 μ L; unsaturated chamber; separation temperature 40°C; bands visualization: developed chromatograms dipped in 0.3% (w/v) ninhydrin in ethanol and heated for 10 minutes at 120°C; chromatograms acquisition method - direct digital scan under visible light conditions using Plustek OpticPro S12 scanner



Rys. 3. Profile retencji tryptofanu i prolina na wysokosprawnych płytkach chromatograficznych typu HPTLC RP-18W z użyciem binarnych faz ruchomych *n*-propanol:woda (A). Dane uzyskane w wyniku eksperymentu oznaczono białymi kółkami i trójkątami. Profil retencji tryptofanu i prolina z dokładnością 2% stężenia alkoholu w wodzie wyznaczono przy użyciu funkcji wielomianu trzeciego stopnia, aproksymując dane doświadczalne (tryptofan: $y = 5E-06x^3 - 0.0004x^2 - 0.0052x + 0.2966$; prolina: $y = 5E-06x^3 - 0.0003x^2 - 0.001x - 0.4513$). Rysunek B przedstawia wykres optymalizacji rozdzielania mieszaniny aminokwasów przy zastosowaniu współczynnika rozdzielania (α) jako ilościowego kryterium stopnia rozdzielania

Fig. 3. Retention profile plots for tryptophan and proline observed using HPTLC RP-18W micro-plates and binary mixtures composed of *n*-propanol and water as the eluents (A). White triangles and circles correspond to the raw experimental data points. Chromatographic profiles of amino acids were calculated with step of 2% of alcohol in water, using third degree polynomial equation based on the raw retention data set (tryptophan: $y = 5E-06x^3 - 0.0004x^2 - 0.0052x + 0.2966$; prolina: $y = 5E-06x^3 - 0.0003x^2 - 0.001x - 0.4513$). Corresponding values of the separation factor (α) used as a simple optimization parameter are presented in graph B

Analizując chromatogramy przedstawione na rysunku 2, należy zwrócić uwagę na fakt, iż zależność pomiędzy retencją aminokwasów (określaną za pomocą parametru R_F obliczanego bezpośrednio z chromatogramów na rysunku 2, jako iloraz odległości środka plamki od linii startu do odległości czoła rozpuszczalnika od linii startu) oraz składem procentowym fazy ruchomej jest nieliniowa. Ponadto, nie ma charakteru sigmoidalnego, w przeciwieństwie do większości związków chemicznych o niskich ma-

sach cząsteczkowych takich jak np. sterydy, chromatografowanych w podobnych warunkach. Wynikać to może z wysokiej polarności aminokwasów i rozmiarów ich cząsteczek, umożliwiającą wnikanie pomiędzy łańcuchy oktadecylsilanowej fazy stacjonarnej i oddziaływanie z polarnymi grupami hydroksylowymi krzemionki.

Na podstawie uzyskanych danych retencyjnych wyznaczono profile retencji obu aminokwasów z dokładnością 2% stężenia alkoholu w wodzie, przy użyciu funkcji wielomianu trzeciego stopnia (rys. 3A). Jak widać, kolejność migracji badanych aminokwasów ulega zmianie w punkcie leżącym pomiędzy 60 i 70% *n*-propanolu. Rysunek 3B przedstawia wykres optymalizacji rozdzielania mieszaniny aminokwasów przy zastosowaniu współczynnika rozdzielania (α) jako ilościowego kryterium stopnia rozdzielania. Wysokie wartości tego parametru ($\alpha_{max} = 5.6$) wraz z dużymi różnicami w retencji obu analitów (R_F w zakresie od 0 do 0.8), wskazują na możliwość doboru optymalnych warunków rozdzielania, w przypadku analizy próbek o dużej zawartości substancji interferujących. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż ze względu na podobną szerokość pasm w całym zakresie proporcji składników faz ruchomych, parametr α może być z powodzeniem stosowany w określaniu optymalnego rozdzielania badanych aminokwasów na płycie cienkowarstwowej, a uzyskane wyniki mogą służyć jako dogodny wskaźnik doboru warunków rozdzielania za pomocą chromatografii kolumnowej.

4. Podsumowanie

W pracy wykazano, że metoda mikro-chromatografii cienkowarstwowej umożliwia szybkie zebranie dużej ilości danych retencyjnych, w szczególności dotyczących tryptofanu oraz prolina. W układzie faz odwróconych z użyciem płytek typu RP18W oraz stosując prosty układ faz binarnych *n*-propanol:woda, uzyskano dane o profilach retencji badanych aminokwasów, w pełnym zakresie eluentów od 0 do 100%. Zastosowanie jako kryterium optymalizacji współczynnika rozdzielania (α) umożliwia wykorzystanie wyników zarówno w chromatografii planarnej jak i kolumnowej. Uzyskane wyniki badań mogą być wykorzystane w optymalizacji procedur analizy aminokwasów w próbkach różnego pochodzenia, między innymi w żywności i suplementach diety.

5. Literatura

- [1] Solomons T.W.G.: Organic Chemistry, J. Wiley & Sons, INC, United States of America, 1996.
- [2] Gałkowska D., Gałkowska-Pachota M.: Laboratorium, 9-10, 2010.
- [3] Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. (Eds.): Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, CRC Press/Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2008.
- [4] Srivastava M. (Ed.): High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011.
- [5] Zarzycki P.K.: Journal of Chromatography A, Elsevier, 1187, 2008.
- [6] Hermosin I., Chicon R.M., Cabezudo M.D.: Food Chemistry, Elsevier, 83, 2003.
- [7] Comai S., Bertazzo A., Bailoni L., Zancato M., Costa C.V.L., Allegri G.: International Congress Series, Elsevier, 1304, 2007.
- [8] Zarzycki P.K., Zarzycka M.B.: Analytical and Bioanalytical Chemistry, Springer, 391, 2008.