

- przedkolumna, usuwa z eluentu zanieczyszczenia mechaniczne, które mogłyby zniszczyć kolumnę chromatograficzną oraz zatrzymuje substancje, które w sposób nieodwracalny adsorbują się na wypełnieniu; najczęściej stosuje się wypełnienie identyczne lub porównywalne z właściwą kolumną chromatograficzną;
- kolumna (kolumny) chromatograficzna z odpowiednim wypełnieniem * żel krzemionkowy lub jego modyfikację polarnymi grupami (faza normalna, NP); * żel krzemionkowy modyfikowany grupami o niskiej polarności (faza odwrócona, RP), najczęściej grupami oktadecylowymi, C18; * wypełnienia polimerowe – bardzo odporne chemicznie, umożliwiają pracę w całym zakresie pH, ale ustępują możliwościom rozdzielczym wypełnień opartych na żelu krzemionkowym;
- termostat zapewniający zadaną temperaturę pracy kolumny (pracujący w zakresie najczęściej od 5 do 80 °C);
- detektor, który wykrywa obecność analitów w dopływającym do niego strumieniu fazy ruchomej. W chromatografii cieczowej wykorzystuje się wiele rodzajów detektorów, mogą nimi być przepływowe spektrofotometry UV-VIS, spektrofotometry fluorescencyjne, spektrometry mas, detektory laserowego światła rozproszonego, detektory refraktometryczne lub elektrochemiczne;
- zbiornik na zużyty eluent lub, w przypadku aparatów preparatywnych, kolektor frakcji (system naczyń zmienianych automatycznie po upływie zadanego czasu lub sterowanego sygnałami z detektora);
- komputer rejestrujący i zapisujący sygnał z detektora w postaci piku chromatograficznego.

1.2 Roztworzenie próbek stałych

Większość technik chromatograficznych wymaga uzyskania próbki w postaci ciekłej, dlatego wyodrębnienie oznaczanych analitów z próbek stałych często stanowi ogromne wyzwanie. Techniki przygotowania próbek stałych możemy podzielić na trzy kategorie: rozdrabnianie mechaniczne, trawienie enzymami, ekstrakcja. W przypadku próbek stałych przygotowanie często polega na ekstrakcji np. kwasami, co umożliwia uwolnienie składników do ekstrahenta. Nie dochodzi wówczas do całkowitego zniszczenia matrycy. Inną metodą jest hydroliza próbki, która umożliwia całkowite przeprowadzenie badanej próbki do roztworu, w wyniku czego uzyskuje się klarowną ciecz. Rozpuszczenie całej matrycy zapewnia całkowitą dostępność do analizowanego pierwiastka lub związku. W wielu przypadkach jest to proces długotrwały i należy rozważyć, czy konieczne jest przeprowadzenie całej próbki do roztworu. W przypadku analizy stopów metali na ogół konieczne jest całkowite przeprowadzenie próbki do roztworu, jednak analizując np. metale w glebie ekstrakcja może okazać się wystarczająca. Niektóre techniki analityczne dopuszczają również, analizę jednorodnych zawiesin.

W zależności od analizowanego materiału, w celu solubilizacji wykorzystuje się następujące czynności:

- rozpuszczanie - proces polegający na pokonaniu energii sieci ciał stałych przez energię solwatacji;
- roztwarzanie - obejmuje procesy zachodzące w roztworze kwasów, zasad, w których to rozpuszczanie próbki zachodzi poprzez reakcje chemiczne;
- stapianie - proces wysokotemperaturowego rozkładu próbek z topnikami, osiągany w temperaturze od 500 – 1200°C. Jest on prowadzony do momentu uzyskania fazy ciekłej w całej objętości próbka/topnik. Produkt poddaje się następnie rozpuszczaniu lub roztwarzaniu.
- spiekanie - proces polegający na ogrzewaniu substancji w temperaturze bliskiej temperatury topnienia, w wyniku czego pojawia się faza ciekła na granicy ziaren, dając po oziębieniu porowaty spiek. Uzyskany w ten sposób stop lub spiek jest rozpuszczalny w wodzie lub w roztworach kwasów;
- mineralizacja - całkowity rozkład matrycy organicznej:
 - mineralizacja sucha (spopielenie) – spalanie próbki w piecu w temperaturach w zakresie 400 – 600°C w tyglach kwarcowych. Otrzymany popiół składa się głównie z tlenków i węglanów i ulega rozpuszczeniu w kwasie lub mieszaninie kwasów;
 - mineralizacja mokra – rozkład matrycy organicznej odczynnikami utleniającymi. Proces może być wspomagany dodatkowo ultradźwiękami, promieniowaniem UV lub promieniowaniem mikrofalowym.

Aby proces przeprowadzania próbek do roztworu nie stał się źródłem błędów w dalszej analizie powinien przebiegać ilościowo, maksymalnie ograniczać możliwość zanieczyszczeń i strat analitu. Odczynniki powinny charakteryzować się wysoką czystością, a naczynia, w których przeprowadza się roztwarzanie nie mogą być potencjalnym źródłem oznaczanego składnika. Przy doborze odczynników należy rozważyć czy nadają się one do oznaczania danego składnika wybraną techniką.

Przy doborze odczynników roztwarzających należy zwrócić uwagę, czy aniony pochodzące od wprowadzanych kwasów nie tworzą nierozpuszczalnych soli z metalami, które ma się na celu oznaczyć. Takie niebezpieczeństwo może wystąpić w przypadku, gdy stosuje się kwas siarkowy lub solny. Przy roztwarzaniu w kwasie azotowym takie ryzyko właściwie nie występuje.

1.3 Cysteina – podstawowe informacje

Cysteina (Cys) - kwas α -amino- β -tiolopropionowy, jest aminokwasem białkowym, siarkowym, endogennym, tzn. wytwarzanym samodzielnie w procesach metabolicznych, koniecznym do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Źródłem naturalnej Cys i jej formy utlenionej - cystyny są zioła, np. czosnek, czarna rzepa, gorczyca, rukiew. Obecność Cys w organizmie człowieka jest niezbędna ponieważ aminokwas ten odgrywa pośrednią rolę w odtruwaniu wątroby z metali ciężkich, alkoholu, dymu tytoniowego, oraz paracetamolu w przypadku przedawkowania. Związek ten wykazuje silne działanie przeciwutleniające, chroniąc w ten sposób organizm przed stresem oksydacyjnym, wywołanym nagromadzeniem reaktywnych form tlenu. Dodatkowo, właściwości antyoksydacyjne Cys zmniejszają narażenie organizmu na choroby układu sercowo-naczyniowego, poprzez blokowanie utleniania się cholesterolu, co w przyszłości, prawdopodobnie może obniżyć zachorowalność na miażdżycę.

Cys bierze udział w wytwarzaniu keratyn i kolagenu, głównych składników włosów, paznokci, kości i skóry, odznaczających się dużą wytrzymałością mechaniczną. Keratyna jest włóknikowatym, nierozpuszczalnym białkiem, zawierającym w swym składzie do 17% Cys oraz 0,5% Met. Jest niezwykle odpornym białkiem na działanie czynników fizycznych i chemicznych oraz na trawienie wywołane obecnością enzymów proteolitycznych. Odporność keratyny, częściowo zależy od włóknistej struktury, wynikającej z określonego połączenia łańcuchów peptydowych w przestrzeni. Trwałość tej struktury uwarunkowana jest obecnością hydrofobowych mostków disiarczkowych cystyny.

Keratyna zbudowana jest w 40% z aminokwasów o charakterze hydrofilowym, a w 60% z aminokwasów hydrofobowych. W tej sekwencji aminokwasowej, największy udział przypisuje się Cys, tworzącej zwarte mostki S-S.

Degradacja białka keratynowego jest możliwa przy udziale podwyższonej temperatury, a także z wykorzystaniem enzymów, zasad i kwasów. Wysoki stopień usieciowienia keratyn powoduje, że są one nierozpuszczalne w wodzie, stąd też pierwszym etapem obróbki jest otrzymanie ich rozpuszczalnej postaci. W tym celu stosuje się dwie metody skutkujące otrzymaniem poszukiwanego białka. Pierwsza z nich powoduje zniszczenie struktury oraz właściwości charakterystycznych dla białka natywnego. Należy do niej hydroliza kwasowa, zasadowa, enzymatyczna, ale również podwyższenie temperatury do 100 – 150°C. Drugą metodą degradacji białka keratynowego, umożliwiającą zachowanie sekwencji aminokwasowej jest zastosowanie reagentów niszczących wiązania S-S, takich jak: merkaptoetanol, ditioteitol (DTT), mocznik, tiomocznik.

Ze względu na fakt, że Cys nie posiada ugrupowań umożliwiających emisję sygnału rejestrowanego przez detektor UV, konieczne jest przeprowadzenie reakcji derywatywacji obecnego w próbce analitu.

1.4 Derywatywacja chemiczna

Derywatywacja polega na przeprowadzeniu analitów, za pomocą reakcji chemicznej, w odpowiednie pochodne o właściwościach umożliwiających ich oznaczenie. W wyniku reakcji derywatywacji substancje, które są przedmiotem analizy uzyskują właściwości odpowiednie dla danej metody analitycznej. Ponieważ większość tioli, w tym biologicznie ważnych związków nie posiada strukturalnych własności, które umożliwiałyby ich oznaczenie przy użyciu najbardziej rozpowszechnionych w laboratoriach detektorów, koniecznym staje się przeprowadzenie zabiegu derywatywacji chemicznej.

Grupa tiolowa jest szeroko rozpowszechniona w związkach obecnych w materiale biologicznym. Są to zarówno związki małocząsteczkowe, takie jak: Cys, Hcy, glutation, kwas liponowy czy koenzym A, jak również związki wielocząsteczkowe, takie jak: peptydy, enzymy i błony półprzepuszczalne. Wiele ważnych biologicznie reakcji, a mianowicie reakcje redox, przenoszenia grupy metylowej, wiązania dwutlenku węgla oraz reakcje z udziałem koenzymu A, są determinowane obecnością grupy -SH. Odczynniki stosowane w derywatywacji tioli można podzielić na kilka grup. Pierwszą z nich stanowią związki, które w wyniku reakcji z grupą tiolową, tworzą pochodne, które mogą być oznaczane z wykorzystaniem detekcji UV-Vis (np. kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) i N-etylomaleimid, halogenosulfonylobenzofurazany oraz monobromobimany), natomiast drugą odczynniki, które tworzą pochodne fluoryzujące (np. N-podstawione maleimidy, bimany, halogenosulfonylobenzofurazany, aldehyd *o*-ftalowy).

W niektórych przypadkach, w celu polepszenia właściwości analitów, wystarczy zastosować prostą reakcję fotochemiczną, termiczną, czy też reakcję kwas-zasada. Istnieje grupa związków, których modyfikacja wymaga

jednak bardziej złożonych reakcji chemicznych, efektem czego może być zmiana układu wiązań atomów w cząsteczce, jak również przyłączenie dodatkowego fragmentu do cząsteczki związku. W przypadku takiej reakcji mamy do czynienia z derywatyzacją chemiczną. W końcowym etapie uzyskujemy zmodyfikowany analit, którego właściwości fizyko-chemiczne czynią go kompatybilnym z aktualnie stosowanym sposobem detekcji.

Wymagane środki ostrożności

wdychać i pipetować ustami.

1999/45/WE):

Wodorotlenek sodu - C Produkt żrący R35

Acetonitryl - F Produkt wysoce łatwopalny R11, T Produkt toksyczny R23/24/25, R39/23/24/25

Kwas trichlorooctowy -C Produkt żrący R35, N Produkt niebezpieczny dla środowiska R50/53

Kwas solny - C Produkt żrący R34, Xi Produkt drażniący R37

- w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody.

- w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.

- jeżeli osoba poszkodowana oddycha, przenieść na świeże powietrze. Jeżeli osoba poszkodowana nie oddycha, zastosować sztuczne oddychanie. Zasięgnąć porady medycznej.

- w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.

- w razie spożycia: przepłukać usta wodą.

CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest przygotowanie próbki stałej do analizy za pomocą techniki HPLC z detekcją UV oraz zapoznanie się z analizą jakościową i ilościową cysteiny w próbkach paznokci. W pierwszej części ćwiczenia studenci wykonają kwasową hydrolizę próbki paznokcia. W drugiej części eksperymentu przygotowują krzywą kalibracyjną dla cysteiny w próbkach hydrolizatów paznokci, a następnie przeprowadzą analizę chromatograficzną przygotowanych przez siebie hydrolizatów na zawartość tego aminokwasu tiolowego.

APARATURA

waga analityczna, łopatką ze stali nierdzewnej, kolby o pojemności 10 ml, próbówki typu Eppendorf, statyw na próbówki, ampułki szklane, termostat, chromatograf cieczowy, pipety automatyczne.

WYKONANIE EKSPERYMENTU

1. Przygotowanie naważki próbki paznokcia o masie około 2 mg.
2. Przemycie próbki za pomocą 250 μL roztworu $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1). Osuszenie próbki.
3. Przeniesienie próbki do nowej próbówki i wprowadzenie 200 μL roztworu HCl o stężeniu 6 mol/L.
4. Hydroliza kwasowa próbek w temperaturze 120°C w czasie 30 min. Pamiętać przekłuć wieczka próbówki.
5. Po hydrolizie do sześciu próbek pobrać po 5 μL hydrolizatu i odparować do sucha w temp. 120°C.
6. Osad po hydrolizie rozpuścić w 50 μL buforu fosforanowego (PB) o stężeniu 0,2 mol/L, pH=8,0.
7. Przygotowanie próbek hydrolizatu paznokcia do analizy.

Próbki hydrolizatu (w próbkach po odparowaniu próbki – 3 próbki):

50 μL hydrolizat

480 μL PB 0,2 mol/L, pH = 8,0

5 μL TCEP 0,25 mol/L (15 min redukcji)

10 μL CMQT 0,1 mol/L (5 min derywatywacji)

60 μL PCA 3 mol/L

Próbki hydrolizatu bez derywatywacji (w próbkach po odparowaniu próbki – 3 próbki):

50 μL hydrolizat

490 μL PB 0,2 mol/L, pH = 8,0

5 μL TCEP 0,25 mol/L (15 min redukcji)

60 μL PCA 3 mol/L

Przygotowane próbki przenieść do fiolek do HPLC.

7. Przygotowanie roztworów roboczych do krzywej kalibracyjnej z roztworu wzorcowego Cys o stężeniu 0,1 mol/L w jednym powtórzeniu, objętości wg poniższej tabeli, kolumna 5. Doszczepienie o objętości 10 μ L. Do badań zastosowano objętość hydrolizatu równą 50 μ L.

Stężenie Cys [nmol/mL hydrolizatu]	Liczba moli Cys doszczepionych do próbki [nmol]	Objętość doszczepienia [μ l]	Stężenie roztworu roboczego Cys [nmol/mL]	Objętość roztworu wzorcowego Cys [μ l]	Objętość końcowa roztworu roboczego Cys [mL]
0	0	0	0	0	1
50	5	10	250	2,5	1
100	10	10	500	5	1
200	20	10	1000	10	1
400	40	10	2000	20	1
600	60	10	3000	30	1
800	80	10	4000	40	1

8. Przygotowanie próbek do kalibracji.

Kalibracja (we fiolkach do autosamplera):

50 μ l hydrolizat

470 μ l PB 0,2 mol/L, pH = 8,0

10 μ l buforu lub roztworu roboczego o stężeniu: 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 nmo/mL

5 μ l TCEP 0,25 mol/L (15 min redukcji)

10 μ l CMQT 0,1 mol/L (5 min derywatywacji)

60 μ l PCA 3 mol/L

9. Analiza chromatograficzna próbek: kolumna chromatograficzna ZORBAX SB-C18 (4,6 \times 155 mm); faza ruchoma: 35% acetonitryl, 65% kwas trichlorooctowy o stężeniu 0,1 mol/L doprowadzony do pH = 1,65 za pomocą NaOH o stężeniu 1 mol/L, prędkość przepływu fazy ruchomej 1 mL/min, długość fali λ = 355 nm, czas analizy 3,5 min.

10. Sprawozdanie

- A. Metodą najmniejszych kwadratów wykreślić krzywą kalibracyjną, wyznaczyć jej równanie oraz współczynnik korelacji R^2 .
- B. Obliczyć zawartość Cys w próbce hydrolizatu paznokcia. Wyliczyć zawartość Cys w płytce paznokcia.
- C. Wyliczyć względne odchylenie standardowe oraz odzysk dla stężenia badanej próbki.
- D. Skomentować wyniki uzyskane dla próbek po dodaniu CMQT i bez CMQT..