

## 7. Chromatografia odwróconej fazy (*reversed phase chromatography* – RPC)

W technice RPC, podobnie jak i w HIC, podstawą separacji makromolekuł jest oddziaływanie hydrofobowych obszarów makromolekuł z ligandem, trwale umocowanym na powierzchni nośnika. W praktyce jednak obie techniki zasadniczo się różnią. Złoża dla RPC posiadają znacznie gęściej rozmieszczone hydrofobowe ligandy na powierzchni nośnika. Dla porównania, w technice HIC stosuje się ligandy o gęstości powierzchniowej rzędu 10 – 50  $\mu\text{moli}$  na mililitr żelu, podczas gdy w technice RPC gęstość powierzchniowa ligandów jest rzędu wielu setek  $\mu\text{moli/ml}$ . W technice RPC prawie wyłącznie stosuje się ligandy alkilowe o długości łańcuchów 4-18 atomów węgla ( $\text{C}_4 - \text{C}_{18}$ ). Zarówno duża gęstość powierzchniowa ligandów, jak i ich długość, jest przyczyną wielopunktowego wiązania makromolekuł. W związku z tym wiązanie makromolekuł z nieruchomymi ligandami jest bardzo silne. To z kolei wymaga stosowania niepolarnych solwentów do ich elucji, co w przypadku biomolekuł może być przyczyną nieodwracalnych zmian w ich aktywności biologicznej. Względy te decydują o ograniczonym zakresie stosowania techniki RPC do preparatywnej chromatografii enzymów i receptorów białkowych. W odniesieniu do niskocząsteczkowych związków organicznych metoda ta ma bardzo szerokie zastosowania praktyczne, tak w skali analitycznej, jak i w preparatywnej.

### 7.1. Podstawy teoretyczne chromatografii odwróconej fazy

Złoża do techniki RPC wykonywane są głównie w odmianach przeznaczonych dla chromatografii wysokociśnieniowej (HPLC). Kolumny wypełnione tymi złożami mogą pracować zarówno w technice izokratycznej, jak i w gradientowej. W technice izokratycznej system pomp, lub pojedyncza pompa, dostarcza na kolumnę solwent o składzie nie ulegającym zmianie w czasie rozdzału. Natomiast w technice gradientowej skład solwentu ulega zmianie w trakcie trwania rozdzału, przy czym zmiana ta jest dokładnie kontrolowana. W zależności od zastosowanej techniki uzyskuje się różne wyniki separacji makromolekuł. Powodowane jest to nieco odmiennymi procesami zachodzącymi w obrębie kolumny chromatograficznej w trakcie rozdzału.

Proces rozdzału biomolekuł metodą gradientową można podzielić na dwa etapy. W pierwszym etapie zachodzi sorpcja makromolekuł na hydrofobowym ligandzie. Warunki sorpcji dobierane są zawsze tak, aby zapewnić najlepszą ekspozycję hydrofobowych obszarów na powierzchni separowanych makromolekuł. W przypadku molekuł białkowych

kolumna jest zwykle równoważona zakwaszoną wodą. Następnie przemywa się kolumnę solwentem startowym celem usunięcia nieswoiście zaadsorbowanych cząsteczek. W drugim etapie system pomp dostarcza eluent o narastającym stężeniu niepolarnego rozpuszczalnika organicznego (metanol, acetonitryl i inne). W wyniku tego faza ruchoma staje się bardziej atrakcyjnym środowiskiem dla zaadsorbowanych na unieruchomionym ligandzie cząsteczek i dochodzi do zmiany preferowanej przez separowane cząsteczki fazy – z fazy nieruchomej na fazę ruchomą. Proces ten nazwano odwracaniem fazy. Selektowność eluowania cząsteczek z kolumny zależy bardzo silnie od szybkości narastania gradientu stężenia solwentu niepolarnego. Im wolniejszy proces formowania gradientu, tym selektowność rozdzielania jest lepsza. Niestety, wiąże się to również z wydłużeniem czasu trwania separacji. W celu polepszenia selektowności, przy niezmiennym czasie trwania rozdzielania, stosuje się metodę z gradientem nieliniowym lub metodę ze zróżnicowaną szybkością zmian gradientu w różnych odcinkach czasu. Zaletą metody gradientowej jest możliwość łatwego uzyskania informacji o stężeniu niepolarnego solwentu niezbędnym dla elucji z kolumny interesującej nas cząsteczki. Po uzyskaniu tej informacji program chromatografii można tak zmodyfikować, aby w możliwie krótkim czasie uzyskać stężenie nieco poniżej niezbędnego dla elucji, a następnie bardzo wolno dochodzić do warunków wymywania danej cząsteczki z kolumny.

Pewnym przybliżeniem takiego podejścia jest metoda izokratyczna. Znając stężenie niepolarnego solwentu, konieczne do elucji interesującej nas cząsteczki, można prowadzić rozdzielanie chromatograficzne stosując solwent o ustalonym stężeniu tego rozpuszczalnika. Po zrównoważeniu kolumny chromatograficznej odpowiednio dobranym solwentem, nanosi się na nią separowaną próbkę. W trakcie przepływu przez kolumnę dochodzi, na całej jej długości, do oddziaływań hydrofobowych tych molekuł z hydrofobowymi łańcuchami liganda. Cząsteczki hydrofilowe przepłyną przez kolumnę bez oddziaływań. Hydrofobowe molekuły oddziałują z ligandem, przez co ich ruch będzie spowalniany. Im silniej hydrofobowe są molekuły tym wolniej przemieszczają się wzdłuż kolumny. Molekuły charakteryzujące się bardzo wysoką hydrofobowością zostaną związane przez ligand i nie opuszczą kolumny w tak zdefiniowanych warunkach. W celu ich usunięcia, po zakończeniu rozdzielania, należy kolumnę przemyć eluentem o wysokim stężeniu niepolarnego solwentu. Po tej operacji kolumnę można użyć ponownie.

## Zalety i wady chromatografii odwróconej fazy

Zalety:

- w technice gradientowej nie ma ograniczeń nałożonych na objętość nanoszonej na kolumnę próbki ani na stopień rozcieńczenia rozdzielanych substancji;
- możliwość pracy w technice izokratycznej, pozwalającej znacznie skrócić czas trwania rozdziału;
- technika RPC pozwala odsalać i wielokrotnie zateżać próbki;
- charakteryzuje się wysoką selektywnością oraz rozdzielczością;

Wady:

- technika RPC wymaga stosowania kosztownych, organicznych solwentów o najwyższej czystości;
- solwenty te mogą denaturować biomolekuły;
- wybór solwentów jest ograniczony;

## 7.2. Złoża stosowane w chromatografii odwróconej fazy

Złoża przeznaczone do chromatografii RPC w technice HPLC charakteryzują się dużą wytrzymałością mechaniczną i chemiczną. Wykonane są w postaci żelu silikonowego o małej średnicy ziaren oraz stosunkowo małej porowatości. Powoduje to znaczne opory przepływu solwentów, co skutecznie eliminuje te złoża z technik niskociśnieniowych. Jest to powodem, dla którego producenci proponują gotowe kolumny wypełnione odpowiednimi złożami. W handlu można spotkać dużą różnorodność kolumn o zbliżonych właściwościach, produkowanych przez różnych producentów. Niniejsze opracowanie nie pozwala na szczegółowe omówienie kolumn poszczególnych producentów, ale umożliwia pokazanie, że złoża o różnych rozmiarach ziaren i porowatości, posiadające ligandy o różnej długości hydrofobowych łańcuchów, przeznaczone są do różnych celów.

**Tabela 7.1.**

Porównanie złożów stosowanych w technice RPC przeznaczonych do prac w systemach HPLC. Dane zaczerpnięto z katalogów firmy Amersham Pharmacia Biotech (1999 r. i 2000 r.)

	Rozdział nukleotydów i aminokwasów	Rozdział małych molekuł organicznych	Rozdział peptydów i oligonukleotydów	Rozdział białek
Długość liganda	C <sub>18</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>4</sub> -C <sub>8</sub>	C <sub>4</sub>
Średnica ziarna nośnika (μm)	2-10	5-15	5-20	5-20
Rozmiar porów (nm)	8-10	10-15	10-30	10-30

Jednym z ostatnich osiągnięć technologicznych jest wprowadzenie złożeń typu **SOURCE**, charakteryzujących się bardzo niską wartością ciśnienia zwrotnego. Zastosowanie zmodyfikowanych ziaren, wykonanych z polistyrenu sieciowanego z dwuwinylobenzenem, pozwoliło uzyskać niezwykłą stabilność i odporność mechaniczną złoża przy znacznie obniżonym oporze przepływu. Rozwiązanie to pozwoliło wprowadzić złoża dla techniki RPC w zakresie niskich i średnich ciśnień przy utrzymaniu pożądanych parametrów selektywności i rozdzielczości metody.

### 7.3. Przykłady zastosowań techniki RPC

#### Przykład 7.1.

##### Frakcjonowanie standardów peptydowych (1)

###### Wprowadzenie:

Enzymatyczne trawienie białka prowadzi do powstania licznych fragmentów rozpadu, wśród których znajdują się krótkie peptydy o zróżnicowanych właściwościach. Skład i właściwości tych peptydów mogą być określone tylko wtedy, gdy zostaną one wyodrębnione z mieszaniny. Procedura izolowania krótkich peptydów zawiera zwykle dwa etapy. W pierwszym etapie dokonuje się wstępnego frakcjonowania hydrolizatu białka i wybiera się te frakcje, które zawierają peptydy o oczekiwanej masie cząsteczkowej. W drugim etapie peptydy frakcjonuje się wykorzystując różnicę w ich hydrofobowości. Poniżej przedstawiony jest przykład separacji standardów peptydowych.

###### Material:

1. standardy peptydowe: bradykinina, insulina i pepstatyna

###### Aparatura:

1. System HPLC **ÄKTAexplorer 10** z kolektorem frakcji **FRAC-900**.
2. Kolumna HPLC **Sephasil Peptide C<sub>18</sub>** (4,6x250 mm).
3. Waga analityczna pozwalająca przygotować odważki 1 mg.
4. Wirówka laboratoryjna (10 000 x g).

###### Odczynniki:

1. Solwent A - 0,1% TFA w wodzie, pH około 2,0.
2. Solwent B - 0,1% TFA w acetonitrylu.

**Uwaga!** Bufory i próbki stosowane w chromatografii HPLC muszą być filtrowane przed użyciem (filtry o porowatości 0,45 µm).

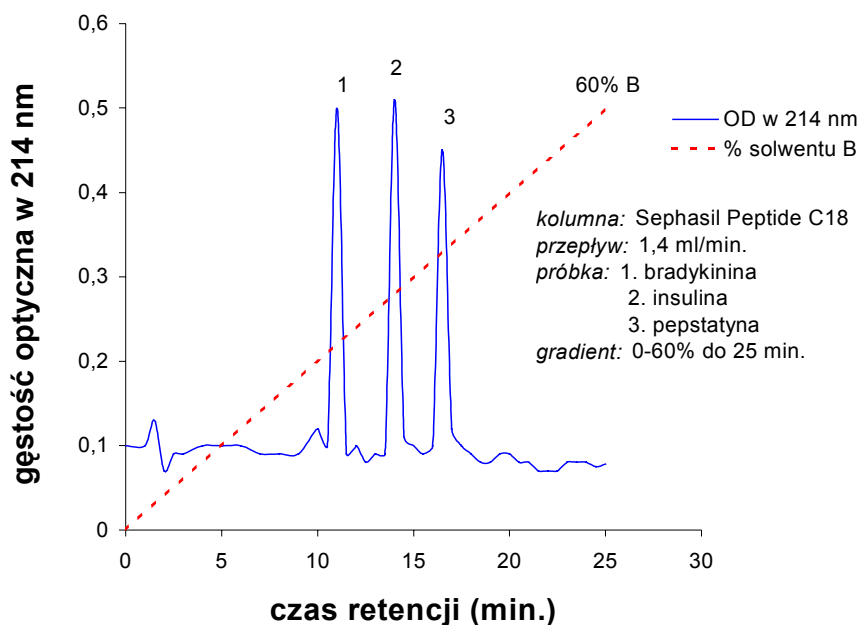
3. Woda do HPLC lub dejonizowana woda filtrowana w systemie MILLI Q.

### Przygotowanie próbek:

- Przygotować odważki peptydów po 1,0 mg każdego.
- Rozpuścić odważki w 1 ml Solwentu A
- Odwirować mieszaninę (10 min, 10 000 x g, RT).

### Przygotowanie systemu i kolumny chromatograficznej:

- Podłączyć kolumnę **Sephasil Peptide C<sub>18</sub>** do systemu, uważając aby nie wprowadzić powietrza do wejścia kolumny.
- Przygotować 1 litr wody oraz 1 litr acetonitrylu. Do obu solwentów dodać TFA do końcowego stężenia 0.1%.
- Ponieważ system **ÄKTAexplorer 10** wyposażony jest w ogranicznik przepływu (flow restrictor), nie ma potrzeby odpowietrzania solwentów, ale należy je przefiltrować (filtr o porach 0.45 µm).
- Wodę z dodatkiem 0.1% TFA podać do pojemnika oznaczonego jako **Solwent A**.
- Acetonitryl, również z dodatkiem 0.1% TFA, podać do pojemnika przeznaczonego dla **Solwentu B**.
- Uruchomić pompy i manualnie przepuścić przez system około 10 ml mieszaniny (1:1) **Solwentów A i B**, wykorzystując "bypass" (pozycja 1) omijający zamontowaną kolumnę.
- Zmienić kompozycję solwentów na 0% B, przepuścić przez kolumnę 5 ml **Solwentu A**.
- Przygotować program chromatograficzny, bazując na gotowym wzorze programu **UNICORN**, wprowadzając następujące parametry:
  - a) prędkość przepływu 1,4 ml/min,
  - b) detekcja w 214 nm,
  - c) frakcje 2 ml,
  - d) 0% B w czasie 5 min.,
  - e) iniekcja próbki,
  - f) 0-60% B w czasie 25 min.,
  - g) 60-0% B w czasie 5 min.,
  - h) 0% B w czasie 5 min.,



Rys 7.1.

Przykładowa separacja standardów peptydowych w technice chromatografii odwróconej fazy z zastosowaniem systemu ÄKTAexplorer 10.

**Przebieg doświadczenia:**

- Przy pomocy strzykawki wyposażonej w filtr (0,45  $\mu\text{m}$ ) nanieść do pętli zaworu iniekcyjnego 200  $\mu\text{l}$  przygotowanej mieszaniny peptydów.
- Uruchomić przygotowany program chromatograficzny.

**Oczekiwane wyniki:**

W warunkach silnego zakwaszenia środowiska wszystkie trzy peptydy przejawiają silne właściwości hydrofobowe. W związku z tym dość łatwo zwiążą się z kolumną. Usunięcie ich z kolumny wymaga dostarczenia znacznych ilości acetonitrylu. Jako pierwsza eluowana będzie bradykinina (około 25% B), insulina (32% B), a na końcu pepstatyna (39% B).

**Regeneracja i przechowywanie kolumny:**

Po zakończeniu programu kolumna jest gotowa do ponownego użycia. Jeśli jednak przez czas dłuższy niż kilkanaście godzin kolumna nie będzie używana, należy ją zrównoważyć 20% acetonitrylem lub metanolem i przechowywać w temperaturze pokojowej.

**Uwagi:**

1. Zawsze należy filtrować solwenty stosowane w chromatografii HPLC
2. Próbkę powinny być przed naniesieniem odwirowane (10 000 x g), a następnie przepuszczone przez filtr o porowatości nie większej niż 0,45  $\mu\text{m}$ .
3. Stosując system z rodziny **ÄKTA** nie ma potrzeby odgazowywania solwentów. W innych systemach, pozbawionych ogranicznika przepływu lub automatycznego odgazowywania solwentów, należy bardzo dokładnie odpowietrzyć wszystkie płyny przed użyciem. W przeciwnym razie w celce detektora mogą pojawić się pęcherzyki powietrza, skutecznie zakłócające odczyt.
4. Należy pamiętać, że im wolniejszy jest przepływ przez kolumnę RPC, tym lepsza jest jej rozdzielczość, natomiast selektywność jest tym lepsza, im wolniej zmienia się stężenie rozpuszczalnika polarnego.

**Przykład 7.2.****Analityczna metoda oznaczania zawartości salicylanów w płynach fizjologicznych (2)****Wprowadzenie:**

Salicylany, szczególnie w formie acetylowanej (acetylosalicylany), są obecnie najczęściej stosowanymi lekami przeciwbólowymi, przeciwzapalnymi i antypłytkowymi. Lek ten wchłania się drogą jelitową i wiąże się z licznymi białkami osoczwymi. Efektywne stężenie salicylanów w osoczu nie powinno przekroczyć wartości 2.5 mM. Kumulacja leku i przekroczenie stężenia efektywnego może być przyczyną poważnych zaburzeń metabolicznych oraz niekontrolowanych, lokalnych krwawień. Lek ten można stosunkowo

łatwo ekstrahować z osocza, stosując mieszaninę chlorku metylenu i propanolu (9:1), i w ten sposób określić jego stężenie osoczowe. Powyższa metoda ekstrakcji nie jest swoista dla salicylanów. Wraz z nimi ekstrahują się i inne leki, przykładowo paracetamol czy teofilina. Leki te są często przyjmowane przez pacjentów w terapii skojarzonej i należy oczekiwać ich obecności w trakcie prowadzonej analizy. Ekstrahowany materiał rozdziela się techniką odwróconej fazy, stosując kolumnę C<sub>18</sub>, pracującą w systemie izokratycznym. Identyfikację salicylanu dokonuje się na podstawie czasu retencji, natomiast określenie jego ilości możliwe jest dzięki zastosowaniu wewnętrznego standardu, w tym przypadku 8-Cl-teofiliny.

#### **Material:**

1. Osocze ludzkie wolne od leków
2. Osocze pochodzące od chorego przyjmującego aspirynę.

#### **Aparatura:**

1. Zestaw HPLC **ÄKTAbasic** z autosamplerem.
2. Kolumna HPLC **Sephasil Peptide C<sub>18</sub>** (4.6x100 mm).

#### **Odczynniki:**

1. Solwent A - 13% metanol (v/v), 0,75% kwas octowy (v/v), 0,02 M octan sodu.
2. Salicylan.
3. 8-Cl-Teofilina (wewnętrzny standard)
4. 1 M HCl.
5. Chlorek metylenu /2-propanol (9:1).
6. Gazowy azot.

**Uwaga!** Bufory i próbki stosowane w chromatografii HPLC muszą być filtrowane (filtry o porowatości 0,45 µm) przed użyciem.

#### **Przygotowanie systemu i kolumny chromatograficznej:**

- Ponieważ system **ÄKTAbasic** wyposażony jest w ogranicznik przepływu (flow restrictor), nie ma potrzeby odpowietrzania solwentów, ale należy je przefiltrować (filtr o porach 0,45 µm).
- Przygotowany solwent podać do naczynia oznaczonego jako Solwent A.
- Uruchomić pompy i przepuścić przez system około 10 ml Solwentu A.
- Uruchomić pozostałe składniki systemu (detektor UV oraz autosampler).
- Podłączyć kolumnę **Sephasil Peptide C<sub>18</sub>** do systemu uważając, aby nie wprowadzić powietrza do wejścia kolumny.
- Przepuszczać przez kolumnę solwent A przy szybkości przepływu 1 ml/min, aż do uzyskania stabilnej linii bazowej w 280 nm.
- Zatrzymać system do momentu naniesienia próbki.
- Przygotować program chromatograficzny (pod **UNICORNEM**) wprowadzając następujące parametry:
  - a) **prędkość przepływu 1,0 ml/min,**
  - b) **detekcja w 280 nm,**
  - c) **0% B (przepływ izokratyczny)**
  - d) **iniekcja próbki po czasie 5 min. od startu,**
  - e) **czas separacji 20 min. od momentu iniekcji**

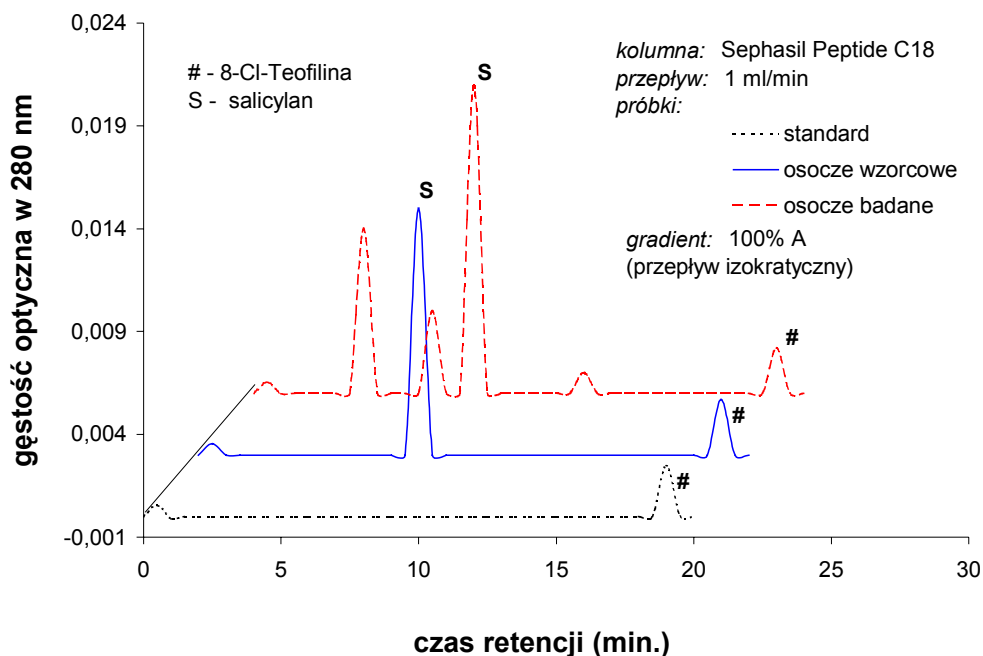
## Przebieg doświadczenia:

### a) Przygotowanie próbek do chromatografii.

- Do mieszaniny ekstrakcyjnej (chlorek metylenu/2-propanol, 9/1) dodać wewnętrzny standard, 8-Cl-Teofilinę (końcowe stężenie 7 mM).
- Przygotować osocze wzorcowe, dodając salicylan do osocza kontrolnego (1 ml) (stężenie końcowe: 1 mM).
- Prowadzić równoczesną ekstrakcję trzech próbek:
  - 1) osocza wolnego od leku,
  - 2) osocza wzorcowego,
  - 3) osocza zawierającego nieznaną ilość leku.
- Zmieszać 0,5 ml osocza z 0,5 ml 1M kwasu solnego i dodać 5 ml mieszaniny ekstrakcyjnej.
- Mieszać przez 1 minutę, następnie odwirować (10 min, 10000xg).
- Zebrać i przenieść 3 ml supernatantu (warstwa zawierająca rozpuszczalniki organiczne) do szklanej probówki.
- Odparować w łaźni wodnej (50°C) w atmosferze azotu.
- Osad rozpuścić w solwencie A
- Porcje po 200 µl nanieść do ampulek w autosamplerze.
- Wydajność ekstrakcji dla badanych leków przekracza 90%.

### b) Analiza zawartości leku w próbkach.

- W programie zaznaczyć położenie próbek w autosamplerze.
- Uruchomić program z kontrolowanym podawaniem próbek z autosamplera.
- System wykona automatycznie wszystkie zaprogramowane rozdziały.



Rys. 7.2.

Analiza zawartości salicylanów w osoczu krwi ludzkiej. Pierwszy z chromatogramów przedstawia rozdział materiału zawierającego jedynie wewnętrzny standard (8-Cl-Teofilina). Środkowy chromatogram reprezentuje rozdział osocza kontrolnego o znanej ilości salicylanu. Natomiast trzeci z chromatogramów przedstawia separację różnych substancji z osocza pacjenta. Ocena liczbowej zawartości salicylanu podana jest w tekście poniżej.



### Oczekiwane wyniki:

W próbce wolnej od leków powinien pojawić się tylko wewnętrzny standard (8-Cl-Teofilina), przy czasie retencji około 19 minut. W próbce wzorcowej powinien pojawić się dodatkowo pik odpowiadający salicylanowi (około 8 min.). Standard wewnętrzny powinien pojawić się dokładnie w tym samym miejscu (około 19 min.), jak w przypadku osocza wolnego od leków. W próbce badanej, o nieznannej zawartości leków, piki od poszczególnych leków powinny pojawić się przy różnych czasach retencji, ale pik od salicylanu powinien znaleźć się w tym samym miejscu jak dla wzorca (około 8 minuty). Wysokość piku zależy od stężenia leku w osoczu. W zakresie badanych stężeń oraz mierzonych przez detektor zmian w gęstości optycznej przepływającej cieczy można przyjąć liniową zależność mierzonej gęstości optycznej od stężenia leków. Uwzględniając wartość absorbancji uzyskanych dla wewnętrznego standardu w rozdzielach próbki wzorcowej oraz badanej, można policzyć stężenie salicylanu w próbce badanej, korzystając ze wzoru:

$$c_l = c_{wz} \cdot (A_{lp} / A_{lwz}) \cdot (A_{stwz} / A_{stp})$$

gdzie:  $c_l$  i  $c_{wz}$  - oznaczają stężenia badanego leku, odpowiednio w osoczu badanym i w osoczu wzorcowym;  
 $A_{lp}$  i  $A_{lwz}$  - oznaczają zmierzone wartości absorbancji maksymalnej w pikach badanego leku, odpowiednio w próbach badanej i wzorcowej;  
 $A_{stwz}$  i  $A_{stp}$  - oznaczają zmierzone wartości absorbancji maksymalnej w pikach odpowiadającym standardowi wewnętrznemu, odpowiednio w próbach wzorcowej i badanej.

### Regeneracja i przechowywanie kolumny:

Po zakończeniu oznaczeń, kolumnę przemyć 20% metanolem (30 ml) i przechowywać w temperaturze pokojowej, szczelnie zamkniętą z obu końców, lub podłączoną do systemu HPLC.

### Uwagi:

1. Zastosowanie mają wszystkie uwagi do przykładu 7.1.
2. Zaprezentowany sposób postępowania można zastosować również dla innych leków, takich jak teofilina czy paracetamol, ekstrahujących się z osocza w takich samych warunkach. Wprowadzając do osocza wzorcowego znane ilości teofiliny i paracetamolu, analizę zawartości tych leków w osoczu można przeprowadzić równocześnie z analizą zawartości salicylanu.

## Przykład 7.3.

### Ocena hydrofobowości związków organicznych z zastosowaniem techniki RPC (3)

#### Wprowadzenie:

Jest dobrze udokumentowane, że koniugaty S-glutationu, będące produktem transferazy S-glutationowej, są usuwane z komórek z nakładem energii przez pompę wykazującą aktywność  $Mg^{2+}$ -ATPazy. Wykazano, że transport najważniejszego produktu transferazy – 2,4-dinitrofenyl S-glutationu – hamowany jest kompetycyjnie przez szereg hydrofobowych substancji, niekoniecznie będących koniugatami S-glutationu. Hamowanie to jest tym silniejsze, im bardziej hydrofobowy jest kompetytor. W badaniach tych niezwykle istotnym etapem jest dokładne uszeregowanie substancji w funkcji ich hydrofobowości. Jedną z uznanych metod porównania i oceny hydrofobowości substancji jest chromatografia cieczowa wykorzystująca hydrofobowe właściwości złoża. W poniższym przykładzie zademonstrowana jest ocena hydrofobowości kilku wybranych koniugatów S-glutationu.

#### Material:

1. Koniugaty S-glutationu:
  - butyl-S-glutation (B-SG)
  - nitrofenyl-S-glutation (N-SG)
  - hexyl-S-glutation (H-SG)
  - octyl-S-glutation (O-SG)

#### Aparatura:

1. Zestaw HPLC **ÄKTApurifier**.
2. Kolumna HPLC **Sephasil Peptide C<sub>8</sub>** (4.6x100 mm).
3. Wirówka laboratoryjna (10 000 x g)

#### Odczynniki:

1. Solwent A - 0.1% TFA w wodzie.
2. Solwent B - 0,1% TFA w acetonitrylu.

**Uwaga!** Bufory i próbki stosowane w chromatografii HPLC muszą być filtrowane (filtry o porowatości 0,45  $\mu$ m) przed użyciem.

3. Woda do HPLC lub dejonizowana woda filtrowana w systemie MILLI Q

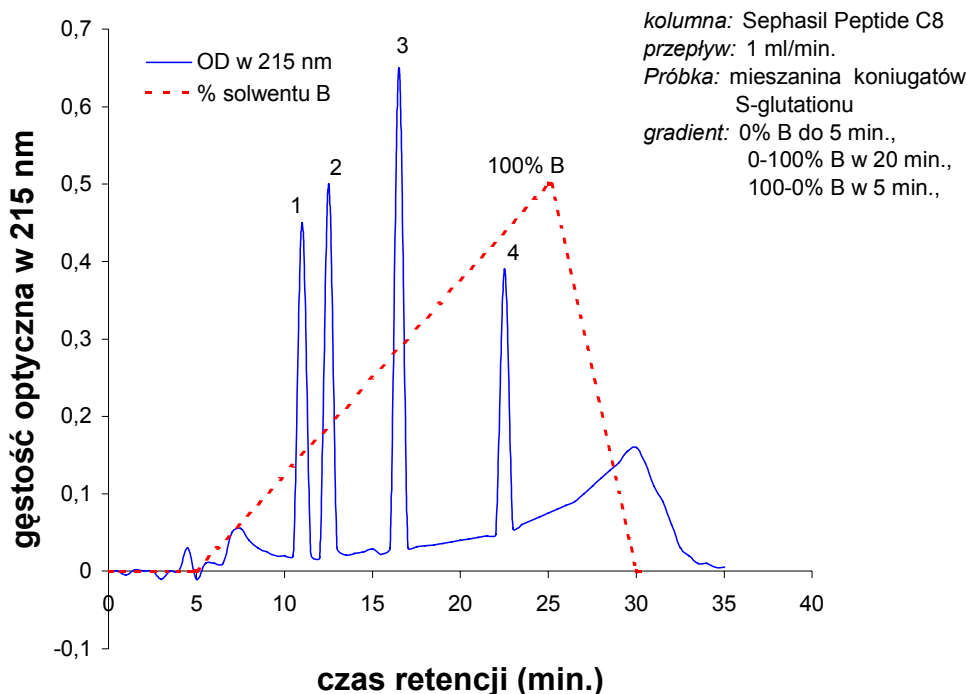
#### Przygotowanie systemu i kolumny chromatograficznej:

- Podłączyć kolumnę **Sephasil Peptide C<sub>8</sub>** do systemu, uważając aby nie wprowadzić powietrza do wejścia kolumny.
- Przygotować 1 litr wody oraz 1 litr acetonitrylu. Do obu solwentów dodać TFA do końcowego stężenia 0,1%.
- Ponieważ system **ÄKTApurifier** wyposażony jest w ogranicznik przepływu (flow restrictor), nie ma potrzeby odpowietrzania solwentów, ale należy je przefiltrować (filtr o porach 0,45  $\mu$ m).
- Wodę z dodatkiem 0,1% TFA podać do pojemnika oznaczonego jako Solwent A.

- Acetonitryl, również z dodatkiem 0,1% TFA, podać do pojemnika przeznaczonego dla Solwentu B.
- Uruchomić pompy i manualnie przepuścić przez system około 10 ml mieszaniny (1:1) Solwentów A i B.
- Zmienić kompozycję solwentów na 0% B, przepuścić przez kolumnę 15 ml Solwentu A.
- Przygotować program chromatograficzny, bazując na gotowym wzorze programu UNICORN, wprowadzając następujące parametry:
  - a) **prędkość przepływu 1 ml/min,**
  - b) **detekcja w 215 nm,**
  - c) **0% B w czasie 5 min.,**
  - d) **iniekcja próbki,**
  - e) **0 %B w czasie 5 min.,**
  - f) **0-100% B w czasie 20 min.,**
  - g) **100-0% B w czasie 5 min.,**
  - h) **0% B w czasie 5 min.,**

#### Przebieg doświadczenia:

- Przygotować mieszaninę (100 mM) koniugatów S-glutajonu w solwencie B.
- Odwirować przygotowaną mieszaninę (10 min, 10 000 x g).
- Rozcieńczyć mieszaninę dziesięciokrotnie w solwencie A.
- Przy pomocy strzykawki wyposażonej w filtr (0,45 µm) nanieść 200 µl mieszaniny do pętli.
- Uruchomić program chromatograficzny.



Rys. 7.3.

Ocena hydrofobowości koniugatów S-glutajonu dokonana metodą chromatografii odwróconej fazy. Kolejność eluowanych koniugatów: butyl-S-glutajon (1), nitrofenyl-S-glutajon (2), hexyl-S-glutajon (3), oktyl-S-glutajon (4).

### **Oczekiwane wyniki:**

Technika chromatograficzna RPC opiera się na wykorzystaniu hydrofobowych oddziaływań separowanych molekuł z unieruchomionymi ligandami. Im bardziej hydrofobowa jest mobilna molekula, tym silniej oddziałuje z unieruchomionym ligandem. W związku z tym można powiedzieć, że najwcześniej kolumnę opuszczą te substancje, które są najslabiej hydrofobowe, a najpóźniej te, które wykazują wysoki stopień hydrofobowości. Biorąc pod uwagę hydrofobowość i rozmiary zastosowanych koniugatów S-glutationu, należy spodziewać się, że w pierwszej kolejności eluowany będzie butyl-S-glutation, a następnie fenyl-, hexyl- i oktyl-S-glutation.

### **Regeneracja i przechowywanie kolumny:**

Po zakończeniu programu, kolumna jest gotowa do ponownego użycia. Jeśli jednak przez czas dłuższy niż kilkanaście godzin kolumna nie będzie używana, należy ją zrównoważyć 20% acetonitrylem lub metanolem i przechowywać w temperaturze pokojowej.

### **Uwagi:**

1. Zastosowanie mają wszystkie uwagi jak w przykładzie 7.1.
2. Często identyfikacja związków eluowanych z kolumny nastęca poważnych trudności. Można częściowo ominąć te kłopoty określając czasy retencji poszczególnych separowanych substancji i dokonywać ich identyfikacji na tej podstawie. Sposób ten jest jednak możliwy tylko wtedy, gdy dobrze zdefiniowany jest skład próbki. W innych przypadkach należy zawsze brać pod uwagę prawdopodobne błędy wynikające z możliwości występowania tych samych czasów retencji dla różnych substancji.

## **7.4. LITERATURA**

1. Reversed Phase Chromatography. Principles and Methods. Amersham Pharmacia Biotech. 18-1134-16, 1999.
2. Wallinder H. *Application Note 368*, LKB Bromma, Sweden.
3. Sokal A., Walkowiak B., Kaluzna A., Krol K., Cieslak M., Rychlik B., Sychowski R., Bartosz. G. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **37**, 73-79, 1995.