KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI
UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY
Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Rozdzielanie i identyfikacja aminokwasów w odżywce dla sportowców techniką strefowej elektroforezy kapilarnej

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z techniką strefowej elektroforezy kapilarnej na przykładzie rozdzielania i identyfikacji aminokwasów w odżywce dla sportowców. Ćwiczenie wykorzystuje aparat do elektroforezy kapilarnej zakupiony w ramach realizacji projektu „Kształcenie zamawiane na kierunkach Biotechnologia i Technologia chemiczna Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej", współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Odczynniki i roztwory

1. L-leucyna, roztwór wzorcowy o stężeniu 10 mg/ml
2. L-izoleucyna, roztwór wzorcowy o stężeniu 10 mg/ml
3. L-glutamina, roztwór wzorcowy o stężeniu 10 mg/ml
4. D-walina, roztwór wzorcowy o stężeniu 10 mg/ml
5. Wodorotlenek sodu (NaOH), roztwór o stężeniu 1 mol/l i 0,1 mol/l
6. Elektrolit roboczy – tetraboran sodu ($Na_2B_4O_7$), roztwór o stężeniu 0,02 mol/l (pH 9)
7. Woda dwukrotnie destylowana
8. Odżywka aminokwasowa dla sportowców do analizy

Aparatura

Aparat do elektroforezy kapilarnej, wyposażony w kapilarę kwarcową o średnicy wewnętrznej 50 μm i długości do okienka detekcji 50 cm oraz detektor spektrofotometryczny jednoczesnej detekcji.

Wykonanie ćwiczenia

I. Przygotowanie kapilary do pracy

W celu uaktywnienia powierzchni wewnętrznej kapilary oraz jej wykondycjonowania, korzystając z metody „aktywacja kapilary", kapilarę przemyć kolejno w czasie 2 min. wodą destylowaną, roztworem NaOH o stężeniu 1 mol/l i 0,1 mol/l, wodą destylowaną oraz elektrolitem roboczym.

II. Przygotowanie roztworu odżywki dla sportowców

W zlewce o poj. 50 ml odważyć na wadze analitycznej 0,2 g analizowanej odżywki. Odważkę rozpuścić w 40 ml cieplej wody destylowanej i po ostudzeniu roztwór przenieść ilościowo do kolby miarowej o poj. 50 ml. Dopełnić wodą destylowaną do kreski i wymieszać.

III. Identyfikacja sygnałów na elektroferogramie próbki analizowanej odżywki

Do pięciu fiolek, za pomocą pipety automatycznej, wprowadzić po 500 µl roztworu analizowanej odżywki i do jednej z nich dodać 50 µl roztworu wzorcowego waliny, do następnej – 160 µl roztworu leucyny i do kolejnych – po 70 µl roztworu glutaminy i izoleucyny. Wszystkie roztwory rozcieńczyć wodą do objętości 1 ml.

Do następnych czterech fiolek wprowadzić kolejno 50 µl roztworu wzorcowego każdego aminokwasu i rozcieńczyć wodą do objętości 1 ml.

Wykonać elektroferogramy pojedynczych roztworów wzorcowych oraz roztworu odżywki i roztworów odżywki z dodatkami wzorców, korzystając z metody „aminokwasy", przy napięciu +25 kV (natężenie prądu 20 mA, moc pola elektrycznego 1 W), wprowadzając próbkę do kapilary techniką hydrodynamiczną (ciśnienie 50 mbar, czas pobierania próbki 4 s) i rejestrując sygnał przy długości fali 200 nm.

III. Opracowanie wyników

Zidentyfikować sygnały na elektroferogramie analizowanej odżywki dla sportowców, porównując ich czasy migracji z czasami migracji pojedynczych wzorców oraz pola powierzchni pod nimi z polem powierzchni pod sygnałami, otrzymanymi dla roztworów analizowanej odżywki z dodatkami wzorców poszczególnych aminokwasów. Pola powierzchni wyznaczyć, korzystając z programu komputerowego do obsługi aparatu. Porównać krzywe absorpcji otrzymane dla składników odżywki i wzorców.

Rozdzielanie i identyfikacja barwników syntetycznych w produktach spożywczych techniką planarnej elektroforezy żelowej

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z techniką pracy z użyciem planarnej elektroforezy żelowej w żelu agarozowym na przykładzie rozdzielania i identyfikacji barwników syntetycznych w produktach spożywczych.

Odczynniki i roztwory

1. Agaroza
2. Bufor fosforanowy (0,5 mol l^{-1} Na_2HPO_4, 0,14 mol l^{-1} NaH_2PO_4, pH 7,0)
3. Bufor octanowy (20 mM)
4. Gliceryna ($C_3H_5(OH)_3$), 87% v/v
5. Barwniki syntetyczne – roztwory wodne 1 mg/ml:
    1 - tartrazyna (E 102)
    2 – żółcień chinolinowa (E104)
    3 - żółcień pomarańczowa (E 110)
    4 - czerwień koszenilowa (E 124)
    5 – czerwień Allura (E129)
    6 - fiolet krystaliczny
6. Produkty spożywcze zawierające barwniki syntetyczne

Aparatura

1. statyw do wylewania żelu
2. zestaw do planarnej elektroforezy żelowej w wersji poziomej

Wykonanie ćwiczenia

IV. Przygotowanie próbek barwników

Do fiolek pobrać za pomocą mikropipety automatycznej po 20 µl roztworów barwników i do każdej dodać po 10 µl gliceryny.

II. Przygotowanie żelu agarozowego

1. <u>Przygotowanie buforu fosforanowego</u>

Odczynniki:

- KH_2PO_4
- Na_2HPO_4

Wykonanie:

Rozpuścić 6 g KH_2PO_4 i 3 g Na_2HPO_4 w 2 l wody destylowanej.

2. Przygotowanie buforu octanowego

Odczynniki:

- CH_3COOH 99%
- CH_3COONa

Wykonanie:

Rozpuścić 1,58 g CH_3COONa w wodzie destylowanej, dodać 1,76 ml CH_3COOH i dopełnić do 1 l wodą destylowaną.

3. Przygotowanie żelu agarozowego

W zlewce o pojemności 100 ml odważyć 0,6 g agarozy i dodać 30 ml buforu elektroforetycznego. Podgrzać zawartość zlewki mieszając do rozpuszczenia agarozy. Po kilkuminutowym przestygnięciu, żel wylać na wypoziomowaną płytkę, umieścić w nim grzebień i pozostawić do spolimeryzowania na ok. 20 min.

IV. Rozdzielanie elektroforetyczne barwników

Spolimeryzowany żel umieścić w aparacie do elektroforezy. Ostrożnie wyjąć grzebień i wprowadzić do powstałych studzienek za pomocą mikropipety automatycznej po 15 µl próbek barwników i analizowanych produktów spożywczych. Ostrożnie napełnić buforem elektroforetycznym zbiorniki aparatu do elektroforezy tak, aby bufor nie wymył próbek barwników ze studzienek i pokrył żel warstwą o grubości ok. 2 mm. Aparat zamknąć pokrywą i podłączyć elektrody do zasilacza. Elektroforezę prowadzić przy napięciu 175 V, natężeniu prądu 40 mA i mocy 40 W w czasie ok. 20 min. Zakończyć analizę, wyłączając zasilacz.

V. Opracowanie wyników

Uszeregować badane barwniki w kolejności wzrastającego czasu migracji. Porównując położenie prążków pochodzących od barwników pojedynczych wzorców i analizowanych próbek, określić, które z nich wchodzą w skład badanych produktów spożywczych.