



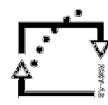
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Praktické cvičení

Stanovení proteinů potravin chromatografickými metodami.

Vypracoval: RNDr. Ivana Borkovcová, Ph.D.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Stanovení proteinů potravin chromatografickými metodami.

HPLC/UHPLC analýza proteinů a peptidů je poměrně novou záležitostí, nicméně separační mechanismus je obdobný tomu klasickému.

Metody používané k přípravě vzorků proteinů

- Izoelektrické srážení na pH 4,6 při teplotě 20 ° C.
- Ultracentrifugace (100 000 g/1 hod.)
- Vysolovací metody ((NH₄)₂SO₄; nasycené NaCl)
- Ultrafiltrace a mikrofiltrace
- Gelová filtrace, Size Exclusion Chromatography, SEC, GPC., dělení podle velikosti molekul

Pro separaci mléčných bílkovin se používá iontově-výměnná chromatografie a v současné době stále více kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Iontově-výměnná chromatografie

Chromatografii na měničích iontů (IEC) můžeme definovat jako vratnou výměnu iontů mezi mobilní a stacionární fází. Separace peptidů/proteinů probíhá na základě jejich schopnosti vázat se na ionexové pryskyřice. Ionty, které jsou elektrostaticky vázané ke stacionární fázi se reverzibilně vyměňují s ionty v roztoku. Dělení látek je způsobeno rozdílem ve velikosti náboje. Ionty se stejným nábojem se hromadí na stejném místě a jsou eluovány současně. Peptidové fragmenty jsou detekovány UV detektorem či fluorescenčním detektorem. Dnes je tato metoda stále více nahrazována vysoce účinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi.

Chromatografie na reverzní fázi

Vysoce účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) se stává v současné době nejrozšířenější metodou používanou ke stanovení proteinů a peptidů. . Dělí látky na základě různě silných hydrofobních interakcí s chromatografickým nosičem obsahujícím hydro-fobní skupiny. RP-HPLC používá jako stacionární fázi nepolární kolonu plněnou mikro-částicemi modifikovaného silikagelu, ke kterému je vázán alkyl o 4, 8 nebo 18 uhlících. Nejčastěji používaná mobilní fáze je směs vody, acetonitrilu a kyseliny trifluoroctové (TFA). TFA se používá v koncentraci 0,1% a působí jako slabé hydrofobní iontově párovací činidlo, které zároveň udržuje pH na hodnotě asi 2 a minimalizuje tak interakce mezi proteinem/peptidem a mobilní fází. Separace je prováděna s použitím gradientu. Separované peptidy/proteiny jsou detekovány UV nebo hmotnostními detektory.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



FAKULTA VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ
BRUNNENSIS

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Metodický přístup při stanovení proteinů:

- Klasická strategie: chromatografie intaktních proteinů
- „Shot Gun“ strategie: štěpení všech proteinů (trypsin), pak chromatografie peptidů

Experimentální část – stanovení syrovátkových proteinů RP HPLC

Pracovní postup:

- Odstranění tuku ze vzorku mléka odstředěním a mechanickým odebráním horní tukové vrstvy
- Vysrážení vzorku odstředěného mléka 10% kyselinou octovou na pH = 4,6 za stálého míchání
- centrifugace při 5 000ot/min po dobu 5 min
- filtrace supernatantu do HPLC vialek přes membránový nylonový filtr 0,22 um
- HPLC analýza

Podmínky HPLC stanovení:

chromatografická kolona: Aeris WIDEPOR 3,6 um XB-C8, 150 x 4,6 mm

velikost nástřiku 5 ul

teplota kolony 45°C

velikost nástřiku 5 ul

detekce UV/PDA při 205 nm

průtok 1,0 ml/min. gradientová eluce, m.f. A: voda:acetonitril:TFA (95:5:0,1), m.f. B:

voda:acetonitril:TFA (5:95:0,1)