

ELEKTROFOREZA ŻELOWA BARWNIKÓW SPOŻYWCZYCH

Instrukcja wykonana w Katedrze Chemii Środowiska

ELEKTROFOREZA

Elektroforeza jest ruchem fazy rozproszonej względem fazy rozpraszanej, zachodzącym pod wpływem przyłożonej zewnętrznie różnicy potencjałów elektrycznych. Istotę zjawiska elektroforezy stanowi wędrówka w polu elektrycznym cząsteczek mających dodatni lub ujemny ładunek elektryczny i proces rozdzielania tych cząsteczek na skutek różnicy szybkości ich "wędrowania" w roztworze (elektroforeza swobodna) bądź w nośnikach (elektroforeza w nośnikach= elektroforeza strefowa = elektroforeza pasmowa). Nośnikami mogą być najróżniejsze substancje, jak bibuła oraz żele: krzemionkowy, dekstranowy, agarowy, skrobiowy, agarozowy i syntetyczny żel poliakrylamidowy.

Naładowane cząsteczki poruszają się w kierunku elektrody o przeciwnym ładunku. Różnorodność ich ładunków i mas, zdolność do dysocjacji lub tworzenia kompleksów z obdarzonymi ładunkiem składnikami środowiska sprawia, iż w rezultacie różne cząstki mieszaniny poruszają się z różną prędkością.

Jeżeli w trakcie doświadczenia zachowane zostaną stałe parametry:

- różnica potencjałów
- natężenie prądu
- pH środowiska
- temperatura roztworu
- przewodność roztworu
- lepkość roztworu

to dana cząstka będzie poruszać się ze stałą prędkością.

Rozdzielanie na drodze elektroforezy jest oparte na różnicy w prędkości migracji cząsteczek w polu elektrycznym. Prędkość poruszania się jonu (v) opisana jest wzorem:

$$v = \mu_e E$$

gdzie:

μ_e - ruchliwość elektroforetyczna [cm^2/Vs]

E - pole elektryczne [V/cm]

Pole elektryczne jest funkcją przyłożonego napięcia i długości kapilary. Ruchliwość dla danego jonu czy medium jest stała i jest to cecha charakterystyczna tego jonu. Ruchliwość elektroforetyczną opisuje wzór:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

gdzie:

q - ładunek jonu

η - lepkość roztworu

r - promień jonu

Z równania wynika, że małe, obdarzone wysokim ładunkiem cząstki charakteryzują się wysoką ruchliwością, podczas gdy cząstki duże, obdarzone małym ładunkiem mają małą ruchliwość.

Czynniki wpływające na ruchliwość elektroforetyczną:

- rodzaj buforu
- stężenie buforu
- pH buforu
- temperatura
- natężenie pola elektrycznego
- właściwości i rodzaj rozdzielanego materiału

Zazwyczaj określa się względną ruchliwość elektroforetyczną R_f , czyli stosunek odległości migracyjnej badanej substancji do odległości migracyjnej odnośnika. Podstawę rozdzielania cząstek za pomocą elektroforezy stanowi różnica prędkości migracji cząstek w elektrolicie.

TECHNIKI ROZDZIELANIA ELEKTROFORETYCZNEGO

Prosta elektroforeza

Technika, podczas której rozdzielanie cząstek odbywa się na podstawie ich ruchliwości w elektrolicie o stałym pH i w stałym polu elektrycznym.

Izotachoforeza

Jest techniką służącą głównie do analizy jakościowej. Podczas izotachoforezy

rozdzielanie prowadzone jest w nieciągłym systemie buforów. Zjonizowana próbka wędruje pomiędzy „szybkim” elektrolitem prowadzącym a „wolnym” elektrolitem kończącym. Cząstki o najwyższej ruchliwości elektroforetycznej poruszają się tuż za prowadzącymi jonami, a te o najmniejszej ruchliwości elektroforetycznej wędrują bezpośrednio przed elektrolitem kończącym. Tworzą się pasma zależne od stężenia rozdzielanych substancji.

Ogniskowanie izoelektryczne

Jest to technika stosowana do rozdzielania substancji amfoterycznych np. białek i peptydów. Rozdzielanie prowadzone jest w gradiencie pH. Cząstki przesuwają się w kierunku anody lub katody do momentu osiągnięcia położenia w gradiencie pH, w którym ich sumaryczny ładunek będzie wynosił zero. Ta wartość pH to tzw. punkt izoelektryczny.

Istotnym kryterium wyboru techniki elektroforetycznej jest rodzaj i charakter analizowanej substancji. Makrocząsteczki takie jak białka są często wrażliwe na pewne wartości pH i buforu. Źle dobrane warunki mogą powodować zmiany konformacji, denaturację, tworzenie związków kompleksowych i interakcje wewnątrzcząsteczkowe. Należy również unikać efektu przeładowania (zbyt wysokiego stężenia rozdzielanej substancji w roztworze). Odpowiednio dobrane stężenie odgrywa ważną rolę w momencie przejścia substancji z roztworu w żel. Do elektroforezy w warunkach denaturujących (z solą sodową siarczanu dodecylu (SDS)) próbki muszą być denaturowane, czyli przekształcone w agregaty cząsteczka-detergent. Rodzaj stabilizującego środowiska, np. żelu zależy od rozmiaru cząstki, która ma być analizowana.

Istotnym czynnikiem jest również dobór odpowiedniego buforu. Elektroforetyczne rozdzielanie prowadzi się w buforze o ściśle określonym pH i stałej sile jonowej.

Siła jonowa roztworu μ dla mocnych elektrolitów wyraża się równaniem:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i \cdot Z_i^2$$

gdzie: n – liczba rodzajów jonów

C_i – stężenie i -tego jonu w $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Z_i – wartościowość i -tego jonu.

Siła jonowa powinna być jak najniższa. Im wyższa jest siła jonowa, tym większe jest przewodnictwo buforu i ruchliwość rozdzielanych cząstek maleje. Duże rozcieńczenie buforu może natomiast powodować wypadanie niektórych białek z roztworu. Konsekwencją przepływu prądu przez roztwór jest wydzielanie ciepła Joule'a, które powoduje powstawanie prądów konwekcyjnych, utrudniających należyte rozdzielenie.

W przypadku gdy roztwór jest stabilizowany (np. bibułą czy żelem), to wydzielające się ciepło powoduje zagęszczenie elektrolitu na pasku, czego konsekwencją są znaczne zmiany natężenia pola elektrycznego zachodzące wzdłuż paska w czasie trwania elektroforezy. Dlatego lepiej stosować w zasilaczu stałe natężenie (mA) niż stałe napięcie prądu (V).

Zastosowanie elektroforezy

- preparatywne i ilościowe wydzielenie z badanych mieszanin czystych frakcji
- określenie czystości i jednorodności badanych substancji
- zastosowanie do celów statystycznych i badawczych
- oznaczanie punktu izoelektrycznego badanych substancji
- oznaczanie masy cząsteczkowej badanych substancji
- zakres zastosowania rozciąga się od całych komórek i cząstek przez kwasy nukleinowe, białka, peptydy, aminokwasy, organiczne kwasy i zasady do narkotyków, pestycydów, nieorganicznych kationów i anionów (czyli wszystkiego, co może nosić ładunek).

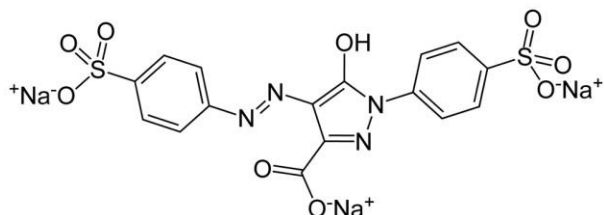
Agar-agar należy do substancji żelujących pochodzenia roślinnego, wytwarzany jest z krasnorostów morskich w związku z czym zawiera sporo jodu, sodu, potasu, wapnia i magnezu. Jego głównym składnikiem jest galaktoza, cukier bardzo słabo przyswajalny przez człowieka. Agar-agar jest bardzo dobrze rozpuszczalny w gorącej wodzie (90-100°C), po ochłodzeniu w temperaturze 40-50°C tworzy żel i ponownie roztapia się po podgrzaniu do ok. 90°C. Agar-agar ma zastosowanie w przemyśle spożywczym jako środek żelujący stosowany zamiast żelatyny głównie przy produkcji słodczy, w laboratoriach mikrobiologicznych jako podkład do pożywek w hodowli bakterii oraz w technikach analitycznych i preparatywnych biologii molekularnej. Żel agarowy jest stosowany jako podłoże do elektroforetycznego rozdzielania kwasów nukleinowych. Zmodyfikowany chemicznie agar może być także wykorzystywany jako podłoże w chromatografii powinowactwa oraz jako sito molekularne (sito cząsteczkowe).

Barwniki spożywcze to chemiczne dodatki do żywności nadające lub przywracające barwę produktom spożywczym. Barwniki obejmują naturalne składniki żywności normalnie same niespożywane jako żywność i nieużywane jako charakterystyczne jej składniki. Barwnikami są również preparaty otrzymane w procesie fizycznej lub chemicznej ekstrakcji, w której ekstrahuje się selektywnie pigmenty. Surowce stosowane z powodu właściwości aromatycznych, smakowych lub odżywczych, a posiadające oprócz tego właściwości barwiące

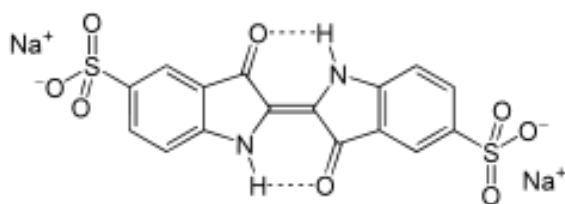
nie są traktowane jako barwniki. Surowcami takimi mogą być np. suszona papryka, kurkuma czy szafran. Barwa produktów żywnościowych uwydatnia ich walory smakowe, zwłaszcza wyrobów cukierniczych oraz napojów. Przez dodanie barwników przywraca się naturalną barwę produktowi zmienioną w wyniku obróbki technologicznej, intensyfikuje się barwy naturalnie występujące w żywności lub uzyskuje całkiem nową barwę.

Barwniki spożywcze wykorzystywane w trakcie ćwiczenia:

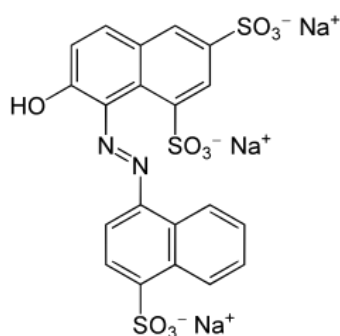
E102 – Tartrazyna



E132 – Indygokarmin



E124 – Czerwień koszenilowa A



CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

PRZYGOTOWANIE ŻELU AGAROWEGO I ROZDZIELENIE BARWNIKÓW

Materiały

- Płaszcz grzejny
- Zlewka szklana

- Cylinder miarowy
- Pojemnik plastikowy spożywczy
- Druciki metalowe - elektrody
- Zasilacz z kablami
- Bibuła
- Szkiełko zegarkowe
- Pipeta 0,5 -10 μ l
- Pęseta
- Nożyk

Odczynniki chemiczne:

- Agar-agar
- Barwniki E104, E132, E124, E102+E132
- Woda dejonizowana
- 0,2% soda oczyszczona

Wymagane środki ostrożności

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):
 - Akryloamid - T Produkt toksyczny R25, R48/23/24/25, R45, R46, R62; Xn Produkt szkodliwy R20/21; Xi Produkt drażniący R36/38, R43
 - Nadsiarczany amonu - O Produkt utleniający R 8; Xn Produkt szkodliwy R22; Xi Produkt drażniący R36/37/38, R42/43
 - TEMED - F Produkt wysoce łatwopalny R11; C Produkt żrący R34; Xn Produkt szkodliwy R20/22
- ✓ Pierwsza pomoc:
 - 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.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

Sposób przeprowadzenia ćwiczenia

1. Na szkiełku zegarkowym uformować 5 malutkich kuleczek z bibuły. Na uformowane kuleczki za pomocą pipety automatycznej wprowadzić po 2 μ l przygotowanych barwników.
2. Przygotować dwie naważki 0,6 g agaru.
3. Naważkę przenieść do zlewki, wprowadzić 100 ml 0,2% roztworu sodы oczyszczonej. Zlewkę umieścić w płaszczu grzejnym. Rozpuścić agar często mieszając, pamiętać o unikaniu doprowadzenia roztworu do wrzenia.
4. Pod plastikowym pojemnikiem umieścić białą kartkę. Roztwór przelać do plastikowego pojemnika spożywczego, tak aby grubość wytworzonego żelu wynosiła około 3 mm. Roztwór pozostawić na czas polimeryzacji żelu.
5. Po zastygnięciu żelu z dwóch jego stron wyciąć paski o szerokości około 1,5 cm – w ten sposób utworzone zostaną zbiorniki na bufor.
6. Zabarwione kuleczki umieścić w żelu używając do tego celu pęsety. Za każdym razem oczyścić pęsetę. Kuleczki umieścić w odległości około 1 cm od siebie.
7. W miejsca usuniętego żelu wprowadzić elektrody (czarny krokodylek „-” umieścić przy linii startu, czerwony „+” przy linii końcowej).
8. Ostrożnie wlać bufor (0,2% roztwór sodы oczyszczonej) tak, aby całkowicie przykryć powierzchnię żelu.
9. Podłączyć elektrody do zasilacza.
10. Włączyć zasilacz i ustawić napięcie o wartości 65 V.

Sprawozdanie

W sprawozdaniu z wykonanych ćwiczeń należy umieścić krótki wstęp teoretyczny. Podać cel ćwiczenia i opisać poszczególne jego etapy. Przeprowadzić analizę żelu (umieścić zdjęcie żelu wraz z opisem). Zmierzyć drogę migracji poszczególnych barwników. Wykonać wykres zależności drogi migracji od stosunku ładunku cząsteczki do masy cząsteczkowej. Przeprowadzić dyskusję wyników i podać wnioski.

Literatura

1. "Techniki elektromigracyjne - teoria i praktyka" [Red.] Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M., Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2012, ISBN 978-83-925269-9-5.
2. Berg J.M, Tymoczko J.L, Stryer L. (2005) Biochemia. (według V wyd. amerykańskiego) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
3. Józwiak Z., Bartosz G. Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. PWN (2007)
4. <http://www.kucharczyk.com.pl/> (Przepisy i porady)