

Mäuseburg-Center Zittau



Prof. Dr. Manfred Gey
Marschnerstrasse 22
D-02763 Zittau

www.papa-gey.de
papa-gey@gmx.de

14. Bioanalytik-Praktikum: 2018

1. Löslichkeiten von Analyten in Wasser, Ethanol und Heptan – Molekülstruktur versus Polarität
2. Liquid-liquid-extraction (LLE) und UV/VIS-Spektroskopie von Lycopin aus Tomatenmark
3. Solid-phase-extraction (SPE), UV/VIS-Spektroskopie von 4-Aminoazobenzol und Benzol
4. High-performance-liquid chromatography (HPLC) von Coffein in Cola und im Kaffee/entkoffeiniertem Kaffee
5. HPLC-Analytik von Vitamin C in Citrusfrüchten und verschiedenen farbigen Paprikaschoten
6. Proteintrennungen mittels sodium-dodecyl-sulfate—polyacrylamid-gel-electrophoresis (SDS-PAGE)

Versuch - 1

Bioanalytik-Praktikum

1. Löslichkeiten von Analyten in Wasser, Ethanol und Heptan – Molekülstruktur versus Polarität

1.1 Löslichkeit in Wasser, Ethanol, Heptan

gl: gut löslich

pl: partiell löslich

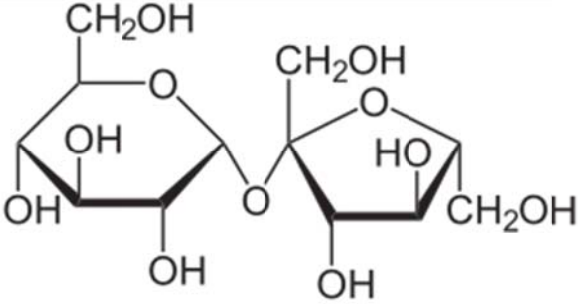
ul: unlöslich

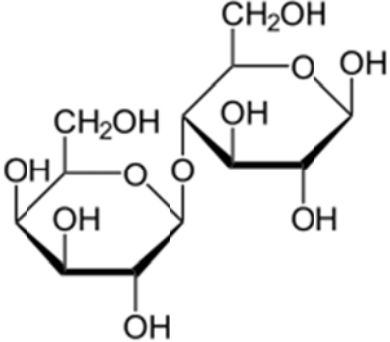
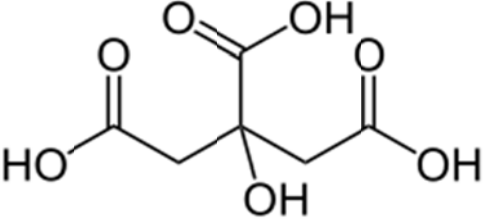
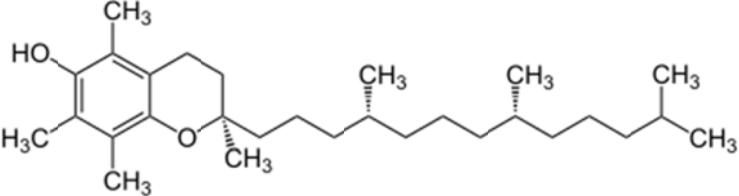
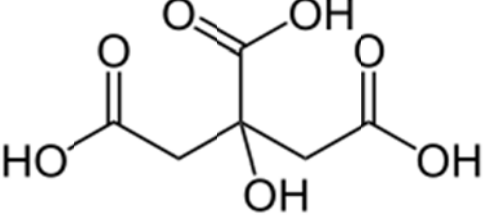
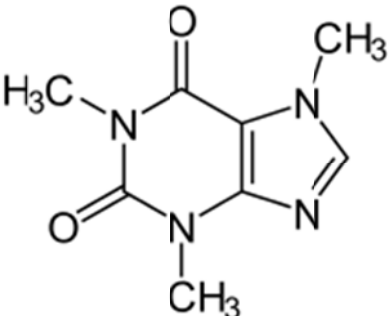
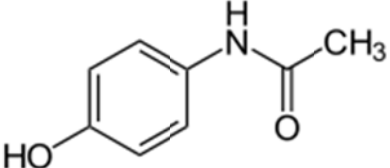
| Analyt | Wasser | Ethanol | Heptan |
|---------------|--------|---------|--------|
| Glucose | | | |
| Saccharose | | | |
| Lactose | | | |
| Vitamin C | | | |
| Vitamin E | | | |
| Citronensäure | | | |
| Coffein | | | |
| Paracetamol | | | |
| Glycin | | | |
| Phenylalanin | | | |

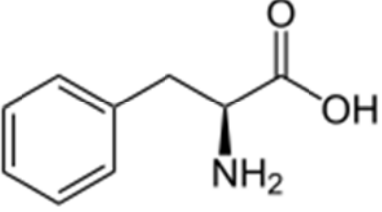
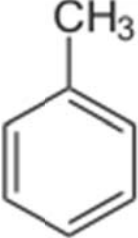
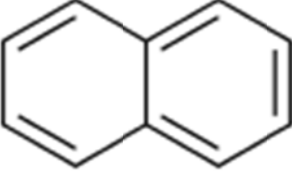
1.2 Strukturen & Eigenschaften der Lösungsmittel

| | |
|---------------------|---|
| Wasser | H₂O polar |
| Ethanol..... | CH₃-CH₂-OH unpolar-polar |
| Heptan | CH₃-(CH₂)₅-CH₃ unpolar |

1.3 Strukturen der Analyte

| | |
|-----------|--|
| Glucose | $ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $ |
| Sacharose |  |

| | |
|---------------|--|
| Lactose |  |
| Vitamin C |  |
| Vitamin E |  |
| Citronensäure |  |
| Coffein |  |
| Paracetamol |  |

| | |
|--------------|---|
| Glycin | $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{R} \end{array}$ |
| Phenylalanin |  |
| Toluol |  |
| Naphthalin |  |

Versuch – 1

Arbeitsplatz-Anleitung

1. Löslichkeiten von Analyten in Wasser, Ethanol und Heptan – Molekülstruktur versus Polarität

1.1 Materialien (Bitte prüfen!)

- Reagenzgläser mit Schliff & Stopfen
- Flaschen/Gefäße mit den zu lösenden Analyten
- Spatel zur Entnahme der Analyte
- Diverse Bechergläser
- 10ml-Standzylinder
- Vorratsbehälter für Wasser (dest.), Ethanol, Heptan
- Destilliertes Wasser, Ethanol, Heptan in Bechergläsern
- Saugtücher, Küchenkrepp,
- Laborhandschuhe
- Abfallbehältnisse (Waste)

1.2 Durchführung der Löseversuche

- Effektive Vorplanung der Versuche (Anordnung der Reagenzgläser – Wasser/Ethanol/Heptan vs. Analyte)
- Befüllen der Reagenzgläser mit ca. 3-4 ml Lösungsmittel mittels Standzylinder
- Einbringen der Analyte (je ca. 1 Spatelspitze) in das entsprechende Lösungsmittel
- Reagenzgläser mit Analyten gut schütteln (**Laborhandschuhe tragen!**) – prüfe dabei auch, **ob die Stopfen der Reagenzgläser richtig dicht sind!**
- Gleichzeitiger Vergleich des Analyten in Wasser, Ethanol und Heptan bzgl. Löslichkeit (**gl:** gut löslich; **pl:** partiell löslich; **ul:** unlöslich)
- Notiere die Beobachtungen: **Versuchsprotokoll-1**;
- Bei Unklarheiten bitte gesonderte Notiz anfertigen

1.3 Auswertung der Löseversuche

- H₂O ist polar; EtOH mittelpolar; Heptan unpolar!
- Ziehe Vergleiche zur Struktur der Analyte!
- Beachte die funktionellen Gruppen der Analyte!
- Warum ist der Analyt löslich/partiell/unlöslich?

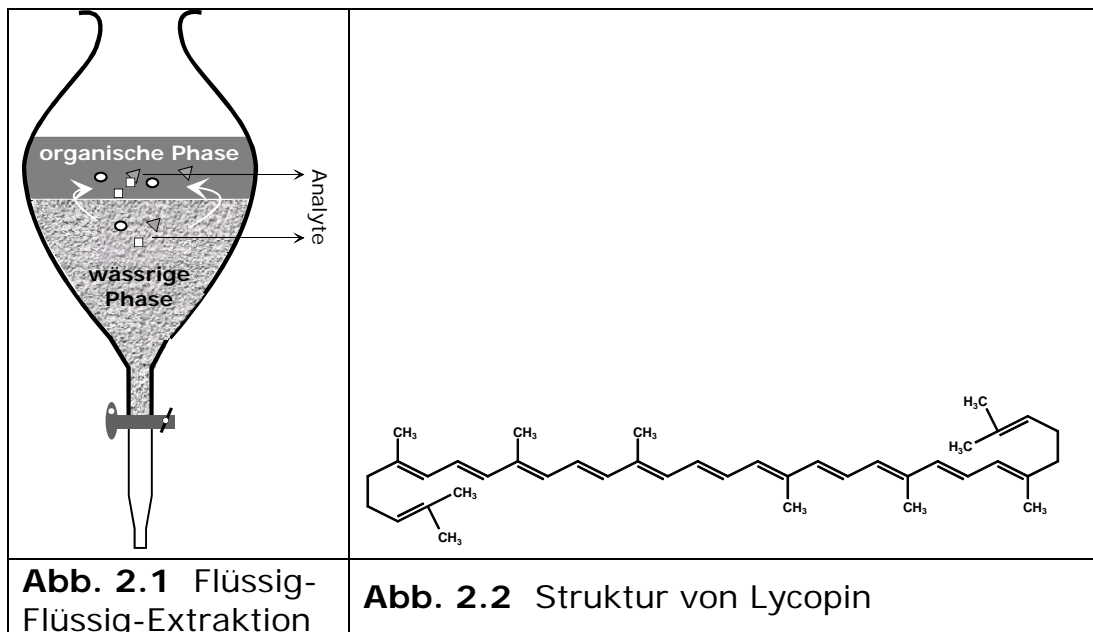
Versuch - 2

Bioanalytik-Praktikum

2. Liquid-liquid-extraction (LLE) und UV/VIS-Spektroskopie von Lycopin aus Tomatenmark

2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Extraktion bedeutet die Überführung eines oder mehrerer Analyte von einer Phase in die andere Phase. Klassisches Beispiel ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion (**Liquid-Liquid-Extraction, LLE**). Dabei wird eine wässrige Lösung mit einem in Wasser nicht löslichen bzw. nicht mischbaren organischen Lösungsmittel verwendet (Abb.2.1).



Im Versuch wird Tomatenmark (ca. 10 ml) mit 20 ml Heptan in einem Becherglas überschichtet. Das relativ „pastöse“ Tomatenmark stellt im Prinzip eine flüssige (**liquid**) Phase dar – könnte auch als eine Art „feste Phase“ (**solid**) fungieren!

Es erfolgt die Extraktion des Lycopins (Abb. 2.2) mit Hilfe von Ultraschall (10 Minuten). Dabei sollte öfters mit einem Glasstab das Tomatenmark im Heptan umgerührt werden, um das Lycopin besser zu extrahieren – es sollte eine gelbe bis dunkelgelbe Flüssigkeit entstehen.

Danach wird diese Flüssigkeit dekantiert und in 6 Epis mit je einem Volumen von ca. 1 ml überführt und 10 Minuten zentrifugiert.

Die Flüssigkeiten werden danach vereinigt und der UV/VIS-Spektroskopie zugeführt.

2.2 Aufnahme von UV/VIS-Spektren

Die Lycopin-Lösung wird in die Messküvette gefüllt – in der Vergleichsküvette befindet sich Heptan.

Die Spektrenaufnahme erfolgt zwischen 600 und 400 nm (sichtbarer Bereich) sowie zwischen 400 und 210 nm (UV-Bereich). Genaue Erläuterungen im Praktikum!

Danach erfolgt die Aufnahme des UV-Spektrums von einer Benzol-Lösung (ist im Praktikum vorhanden) zwischen 400 und 210 nm.

Beide Spektren werden verglichen, diskutiert, ggf. eingescannt und dokumentiert.

2.3 UV/VIS-Spektren aus früheren Versuchen

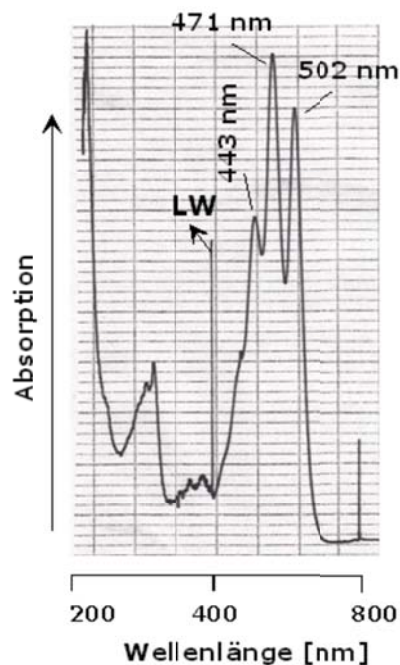


Abb. 2.3 UV/VIS-Spektrum von Lycopin

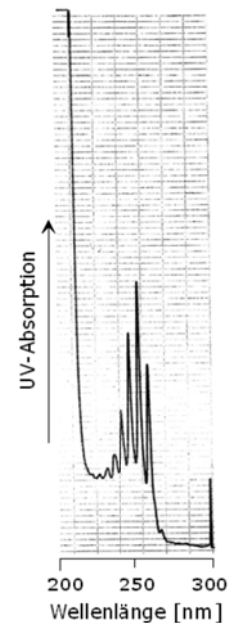


Abb. 2.4 UV-Spektrum von Benzol

Versuch – 2

Arbeitsplatz-Anleitung

2. Liquid-liquid-extraction (LLE) und UV/VIS-Spektroskopie von Lycopin aus Tomatenmark

2.1 Materialien (Bitte prüfen!)

- Diverse Eppis plus Ständer
- Ultraschallbad – **nur mit destill. Wasser füllen!**
- Mikrozentrifuge
- Tomatenmark
- Diverse Bechergläser mit Glasrührstab
- 10ml-Standzylinder
- 500µl-Dosierspritze oder 1ml-Dosierspritze
- Vorratsbehälter für Ethanol, Heptan, Isooctan
- Ethanol, Heptan oder Isooctan in Bechergläsern
- Saugtücher, Küchenkrepp,
- Laborhandschuhe
- Abfallbehältnisse (Waste)

2.2 Durchführung der Extraktion

- Tomatenmark im Becherglas (ist bereits vorbereitet) mit 20 ml Isooctan überschichten und mittels Glasstab gut umrühren
- 10 Minuten im Ultraschall extrahieren – ggf. gelegentlich zur besseren Extraktion etwas rühren
- Die resultierende Lösung sollte gelb bis dunkelgelb sein
- Je ca. 1-1,5 ml Lösung in 4 Eppis überführen und 10 Minuten zentrifugieren
- Danach die klaren Überstände in einen 5ml-Kolben überführen – mittels 500µl-Spritze/1ml-Spritze
- Die Lösung jetzt mittels UV/VIS-Spektroskopie analysieren (bitte Rücksprache nehmen!)
- **Die Benzollösungen sind vorhanden und können nach Rücksprache vermessen werden!**

2.3 Aufnahme der UV/VIS-Spektren

- Es erfolgt eine Einweisung in den Betrieb des UV/VIS-Spektrometers (Bitte Rücksprache nehmen!)
- Bitte zuvor die entsprechende Gerätebeschreibung des Spektrometers gründlich durchlesen!

2.4 Gerätebeschreibung UV/VIS-Spektralphotometer

- Im Spektrometer befinden sich 2 Lichtquellen – eine Deuteriumlampe für die Registrierung des UV-Bereiches (ca. 200-400 nm) und eine Wolframlampe zur Aufnahme von Spektren im sichtbaren (visible) Spektralbereich (ca. 400-800 nm).
- Der Küvettenraum enthält eine Meßküvette (vorn positioniert) und eine Vergleichsküvette (dahinter!).
- Die Küvetten haben 2 matte und 2 durchsichtige Seiten – diese werden im Strahlengang angeordnet.
- Nach Befüllen der Meßküvette (Rücksprache nehmen) mit der Probelösung (ca. $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ des Küvettenvolumens) und der Vergleichsküvette (identisches) und reines Lösungsmittel (z.B. Isooctan) werden beide Küvetten vorsichtig im UV/VIS-Spektrometer positioniert.
- Die Finger der Hand packen an den matten Seiten an und führen die Küvetten in die entsprechenden Halterungen ein. Der Deckel wird geschlossen
- Der Spektrometerschalter (links unten) befindet sich noch in der Position „**off**“.
- Die Wellenlängen-Startposition (**Kurbel rechts!**) wird erneut geprüft – für die Aufnahme des Spektrums beginnend im **visible** sind z.B. 600 nm einzustellen; die Registrierung des UV-Spektrum beginnt i.d.R. bei 400 nm und endet bei ca. 210 nm.

Beachte!!!

- a) Die manuelle Einstellung der Wellenlängen mittels Kurbel darf nur in der Position „**off**“ erfolgen (s.o.)!
- b) Bei der Aufnahme von Spektren im UV/VIS Bereich muss der Lampenschalter bei 400 nm umgelegt werden (Rücksprache nehmen!).

- **Wenn alles eingestellt ist, kann die**
 - **Spektrenaufnahme beginnen:**
 - Der Spektrometerschalter (links unten) wird in die Position „**on**“ geschaltet.
 - Danach diesen Schalter auf „**scan**“ drehen und gleichzeitig den Schreiber starten (Rücksprache!).
 - Das Spektrum aufnehmen und die Absorptionsmaxima notieren!
 - Nach Beendigung der Registrierung – spätestens bei ca. 210 nm – wird der Schreiber ausgeschaltet und gleichzeitig der Spektrometerschalter (links unten) von der Position „**scan**“ über „**on**“ auf die Ausgangsposition „**off**“ geschaltet.
 - Die Spektrenaufnahme kann erneut beginnen – entweder das Spektrum erneut registrieren (nur die Wellenlänge in der Position „**off**“ und Lampe erneut richtig positionieren!)
- oder:**
- Auch die Küvetteninhalte entsprechend austauschen!
 - **Beachte!** Lösungsmittelmischbarkeit! Im Zweifelsfall die Küvetten mit Ethanol reinigen/spülen und die Außenwände mit Küchenkrepp o.ä. trocknen und vorsichtig lagern!

Versuch - 3

Bioanalytik-Praktikum

3. Solid-phase-extraction (SPE), UV/VIS-Spektroskopie von 4-Aminoazobenzol und Benzol

3.1 Analyte und Eigenschaften

Der gelbliche Farbstoff 4-Aminoazobenzol soll als Analyt für die transparente Durchführung einer Festphasenextraktion (**SPE: solid phase extraction**) dienen. Aus seiner Struktur (Abb. 3.1) ist ersichtlich, dass sowohl polare Gruppen als auch unpolare Regionen im Molekül vorhanden sind.

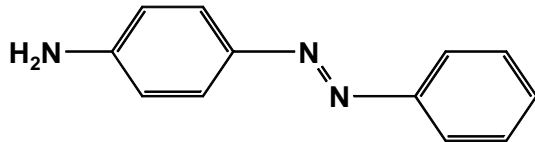


Abb. 3.1 Struktur von 4-Aminoazobenzol (4-AAB)

3.2 Prinzip der Festphasenextraktion

Die SPE-Apparatur besteht aus einer Glaskammer (Abb. 3.2), die mit einem gut abdichtenden Deckel verschlossen wird. Sie enthält im Inneren diverse Auffangröhrchen und ist mit einer Pumpe zur Erzeugung von Unterdruck (Vakuum) verbunden. Dadurch werden die Extraktionsröhrchen, die mit 40- μ m-Material gefüllt sind, zügig eluiert.

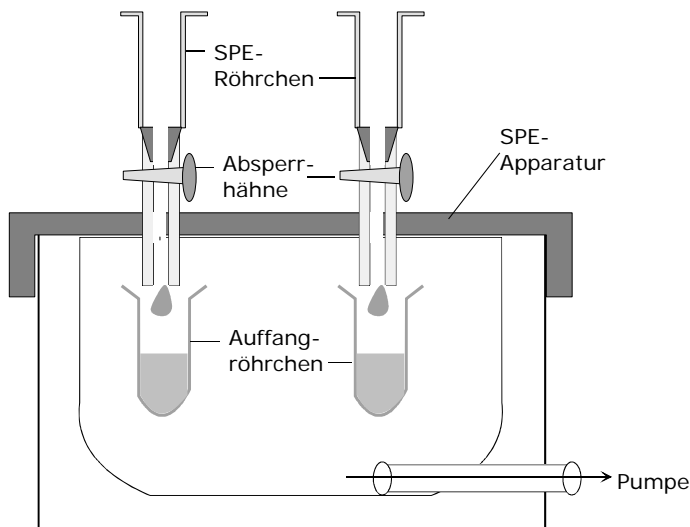


Abb. 3.2 Festphasenextraktions-Apparatur (SPE)

Zur besseren Regulierung der Elutionsprozedur sind Absperrhähne zwischen den einzelnen Röhrchen und der Abdichtplatte der Vakuumkammer angeordnet.

Die überschüssige Flüssigkeit (das Eluat) wird innerhalb der Vakuumkammer aufgefangen.

Dazu dienen einzelne kleine Bechergläser oder spezielle Elutionsröhrchen mit Eichmarkierung.

Die Extraktionsröhrchen (7 x 1 cm i.D.) bestehen aus Polypropylen oder Glas und enthalten die stationäre Phase (Abb. 3.3).

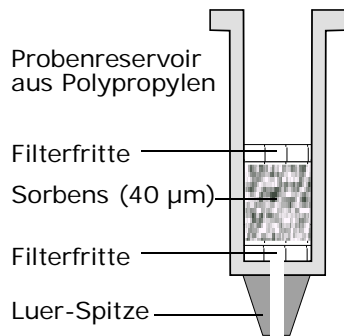


Abb. 3.3 Extraktionssäule für die SPE

Die einzelnen Arbeitsschritte (Abb. 3.4) können in der Festphasenextraktion in Abhängigkeit des Analysenproblems variieren bzw. auch relativ unterschiedlich ausfallen und gehandhabt werden.

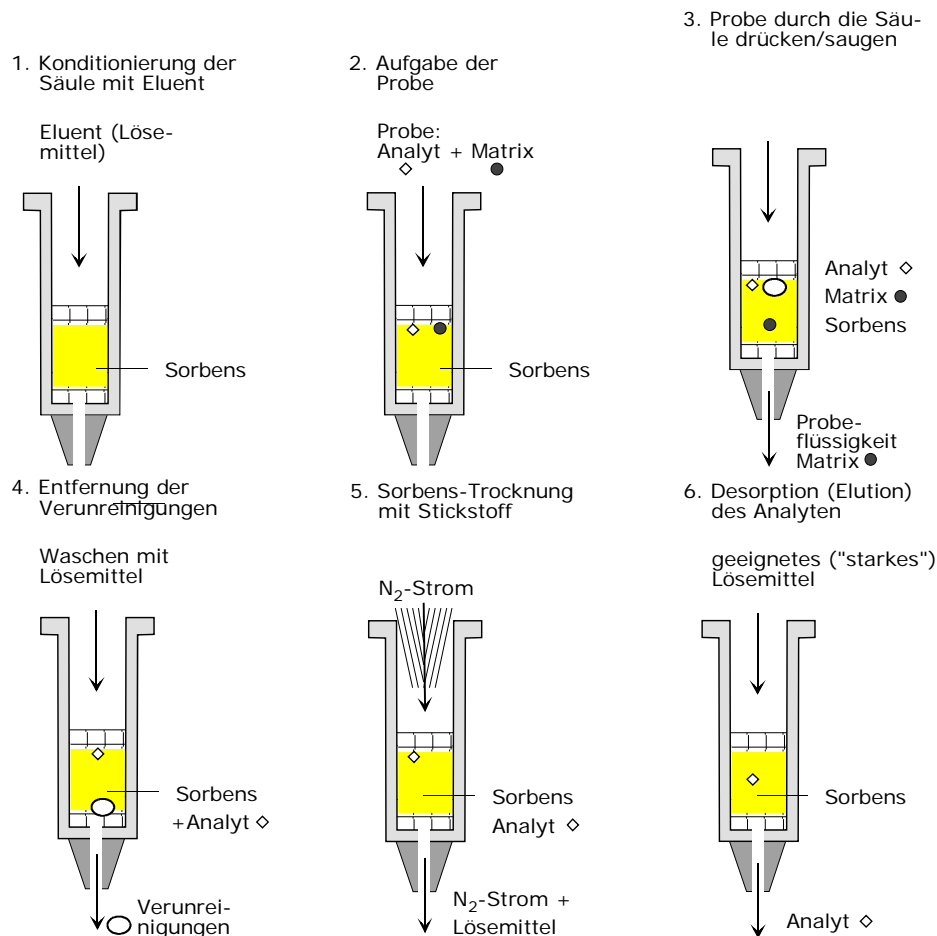


Abb. 3.4 Prinzipielle Abläufe während einer Festphasenextraktion

Versuch – 3

Arbeitsplatz-Anleitung

3. Solid-phase-extraction (SPE), UV/VIS-Spektroskopie von 4-Aminoazobenzol und Benzol

3.1 Materialien (Bitte prüfen!)

- SPE-Apparatur mit Pumpe
- SPE-Kartuschen mit RP-Phasen („Octadecyl“)
- Wässrige Lösung mit 4-Aminoazobenzol
- Wässrige Benzollösung
- Testlösung von Benzol in Ethanol
- Bechergläser mit destilliertem Wasser und Ethanol
- Diverse Reagenzgläser mit Schliff und Stopfen
- Diverse Eppis plus Ständer
- Ultraschallbad – **nur mit destill. Wasser füllen!**
- Mikrozentrifuge
- Diverse andere Bechergläser
- 10ml-Standzylinder
- 500µl-Dosierspritze oder 1ml-Dosierspritze
- Vorratsbehälter für Ethanol, destilliertes Wasser
- Saugtücher, Küchenkrepp,
- Laborhandschuhe
- Abfallbehältnisse (Waste)

3.2 Durchführung der SPE

- Einweisung in die SPE-Apparatur
- 4-Aminoazobenzol und auch Benzol werden extrahiert
- Zuvor wird die hydrophobe Kartusche mit Wasser konditioniert – Auffangen im gesondertem Becherglas
- Ca. **3-4 ml der 4-AAB-Lösung** werden mittels Becherglas in das SPE-Röhrchen gefüllt, welches bereits auf der SPE-Apparatur angeordnet ist
- Alle Hähne sind geschlossen – der Hauptabsperrhahn wird langsam und mit Gefühl zgedreht
- Die Pumpe wird gestartet – das Wasser aus dem SPE-Röhrchen wird gesondert im **Reagenzglas A** auffangen
- **Beobachten Sie den „Kopf“ des SPE-Röhrchens!**

- Danach kann erneut mit destilliertem Wasser das SPE-Röhrchen konditioniert werden – Wasser wird auch hier ins gesonderte Becherglas eluiert.
- Jetzt wird die SPE-Kartusche mit ca. **3-4 ml Ethanol** befüllt und die Pumpe wird gestartet – das Eluat wird nun im **Reagenzglas B** aufgefangen.
- Notieren Sie Ihre Beobachtungen!
- Die ethanolische 4-AAB-Lösung steht jetzt für weitere analytische Untersuchungen bereit (Rücksprache!)
- Die Lösung kann z.B. zentrifugiert werden und es können auch UV/VIS-Spektren von den Reagenzglas-Lösungen aufgenommen werden (Bitte um Rücksprache!).
- Die **wässrige Benzollösung** kann in gleicher Art und Weise wie das 4-AAB mittels **SPE** bearbeitet und mit der **UV/VIS-Spektroskopie** analysiert werden (Bitte Rücksprache nehmen).

3.3 Aufnahme der UV/VIS-Spektren

- Es erfolgt eine Einweisung in den Betrieb des UV/VIS-Spektrometers (Bitte Rücksprache nehmen!)
- Bitte zuvor die entsprechende Gerätebeschreibung des Spektrometers gründlich durchlesen!

3.4 Gerätebeschreibung UV/VIS-Spektralphotometer

- Im Spektrometer befinden sich 2 Lichtquellen – eine Deuteriumlampe für die Registrierung des UV-Bereiches (ca. 200-400 nm) und eine Wolframlampe zur Aufnahme von Spektren im sichtbaren (visible) Spektralbereich (ca. 400-800 nm).
- Der Küvettenraum enthält eine Meßküvette (vorn positioniert) und eine Vergleichsküvette (dahinter!).
- Die Küvetten haben 2 matte und 2 durchsichtige Seiten – diese werden im Strahlengang angeordnet.
- Nach Befüllen der Meßküvette (Rücksprache nehmen) mit der Probelösung (ca. $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ des Küvettenvolumens) und der Vergleichsküvette (identisches) und reines Lösungsmittel (z.B. Isooctan) werden beide Küvetten vorsichtig im UV/VIS-Spektrometer positioniert.

- Die Finger der Hand packen an den matten Seiten an und führen die Küvetten in die entsprechenden Halterungen ein. Der Deckel wird geschlossen
- Der Spektrometerschalter (links unten) befindet sich noch in der Position „off“.
- Die Wellenlängen-Startposition (**Kurbel rechts!**) wird erneut geprüft – für die Aufnahme des Spektrums beginnend im **visible** sind z.B. 600 nm einzustellen; die Registrierung des UV-Spektrum beginnt i.d.R. bei 400 nm und endet bei ca. 210 nm.

Beachte!!!

- Die manuelle Einstellung der Wellenlängen mittels Kurbel darf nur in der Position „off“ erfolgen (s.o.)!**
 - Bei der Aufnahme von Spektren im UV/VIS Bereich muss der Lampenschalter bei 400 nm umgelegt werden (Rücksprache nehmen!).
- **Wenn alles eingestellt ist, kann die Spektrenaufnahme beginnen:**
 - Der Spektrometerschalter (links unten) wird in die Position „on“ geschaltet.
 - Danach diesen Schalter auf „scan“ drehen und gleichzeitig den Schreiber starten (Rücksprache!).
 - Das Spektrum aufnehmen und die Absorptionsmaxima notieren!
 - Nach Beendigung der Registrierung – spätestens bei ca. 210 nm – wird der Schreiber ausgeschaltet und gleichzeitig der Spektrometerschalter (links unten) von der Position „scan“ über „on“ auf die Ausgangsposition „off“ geschaltet.
 - Die Spektrenaufnahme kann erneut beginnen – entweder das Spektrum erneut registrieren (nur die Wellenlänge in der Position „off“ und Lampe erneut richtig positionieren!) **oder:**
 - Auch die Küvetteninhalte entsprechend austauschen!
 - **Beachte!** Lösungsmittelmischbarkeit! Im Zweifelsfall die Küvetten mit Ethanol reinigen/spülen und die Außenwände mit Küchenkrepp o.ä. trocknen und vorsichtig lagern!

Versuch - 4

Bioanalytik-Praktikum

4. High-performance liquid chromatography (HPLC) von Coffein in Cola und im Kaffee/entkoffeinierten Kaffee

4.1 Was ist Coffein?

1820 gelang dem Apotheker und Chemiker Runge erstmals, aus den Kaffeebohnen reines Coffein zu isolieren. Er kann somit als Entdecker des Coffeins angesehen werden.

Coffein (auch Koffein, Tein oder Thein) ist ein Alkaloid aus der Stoffgruppe der Xanthine (Struktur des Coffeins, s. Abb. 4.1). Es ist eine sogenannte psychotrope Substanz und gehört zur Gruppe der Stimulantien. Coffein ist der anregend wirkende Inhaltsstoff von Genussmitteln wie Kaffee, Tee, Cola, Mate oder auch Energy-Drinks. Im Kakao kommt der Wirkstoff nur in geringeren Mengen vor. In reiner Form tritt es als weißes, geruchloses, kristallines Pulver mit bitterem Geschmack auf. Coffein ist weltweit die am häufigsten konsumierte pharmakologisch aktive Substanz.

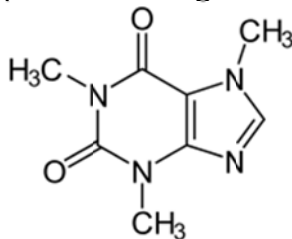


Abb. 4.1 Struktur von Coffein

4.2 Aufbau eines Flüssigchromatographen

In Abbildung 4.2 ist der prinzipielle Aufbau einer HPLC-Apparatur (**HPLC**: high performance liquid chromatography) dargestellt. Der Eluent (**1**) wird i.d.R. mit einem Inertgas (Helium) entgast und von einer Hochdruckpumpe (**2**) zum Injektor (**3**) gefördert.

Die Aufgabe der Probe erfolgt mit Hilfe einer Dosierspritze über den Injektor (**3**). Dabei wird eine Metallkapillarschleife, die ein definiertes Probenvolumen (z.B. 20 µl) aufweist, gefüllt; die überschüssige Probeflüssigkeit landet in einem Abfallgefäß (Waste – hier nicht dargestellt!).

Die Analyte der applizierten Probe werden nun in der HPLC-Säule (**4**) nach unterschiedlichen Wechselwirkungen getrennt.

Danach passieren sie einzeln die Mikrodurchflussküvette eines Detektors (**5**).

Die Substanz-Pfropfen werden bei der Registrierung in Form von Peaks z.B. auf einem Schreiber (6) sichtbar gemacht wird. In einem UV/VIS-Detektor erfolgt die Messung der Absorption der Analytmoleküle. Nach der Mikrodurchflussküvette des Detektors wird das Eluat in Waste (7) überführt.

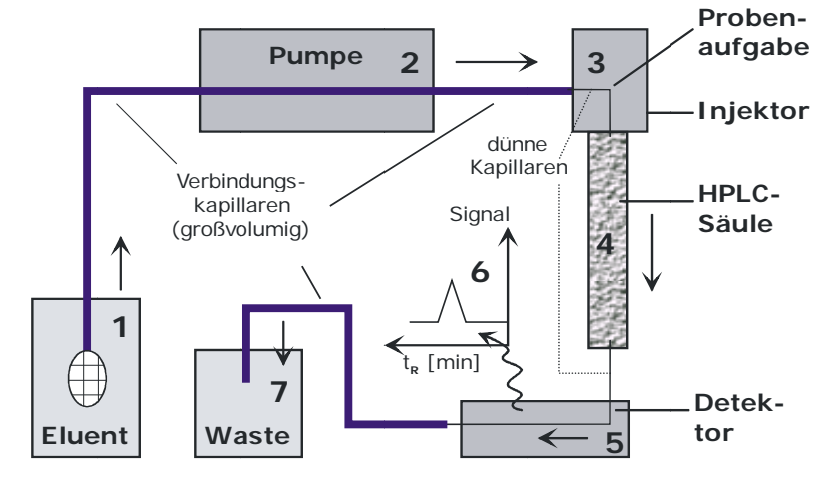


Abb. 4.2 Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur

4.3 HPLC-Chromatogramme

In einem Chromatogramm wird auf der Ordinate ein Signal (z.B. die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge; für Coffein bei 270 nm) und auf der Abszisse die Retentionszeit (t_R in Minuten) aufgetragen (s. Abb. 4.3).

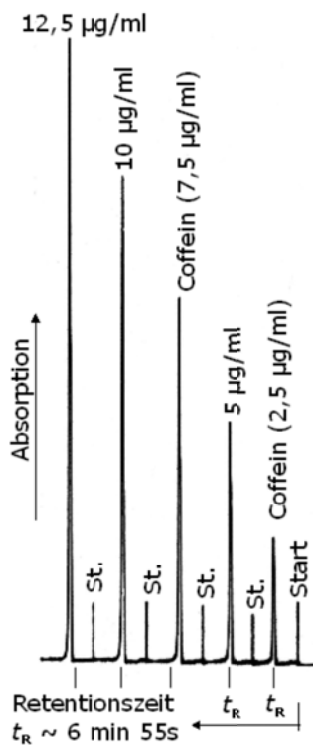


Abb. 4.3 HPLC-Chromatogramme von Coffein-Testlösungen

Versuch – 4

Arbeitsplatz-Anleitung

4. High-performance liquid chromatography (HPLC) von Coffein in Cola und im Kaffee/entkoffeinierten Kaffee

4.1 Materialien (Bitte prüfen!)

- Apparatur mit UV-Detektion, RP-LC, MeOH/H₂O
- Testlösungen von Coffein (Absprache)
- Diverse Cola- und Kaffee-Produkte
- Bechergläser mit Eluent (MeOH/H₂O-Gemische)
- Ultraschallbad – **nur mit destill. Wasser füllen!**
- Diverse andere Bechergläser
- 10ml-Standzylinder
- 500µl-Dosierspritze oder 1ml-Dosierspritze
- Saugtücher, Küchenkrepp,
- Laborhandschuhe
- Abfallbehältnisse (Waste)

4.2 Durchführung der HPLC

- Einweisung in die HPLC-Apparatur
- **Besonders wichtig: Dosierung der Proben!**
- Injektion von Coffein-Testgemischen
- Ermittlung der Retentionszeit für Coffein
- Was bedeutet „Totzeit“ bzw. Durchbruchskurve?
- Herstellung von Cola-Proben (Rücksprache nehmen!)
- Dosierung von Cola-Proben
- Dosierung von verschiedenen Kaffee-Proben

4.3 Auswertung der Coffein-Analytik

- Komplexität von Kaffee-Proben?
- Komplexität von Cola-Proben?
- „Normaler“ vs. entkoffeiniertes Kaffee?
- Berechnung von Coffein-Gehalten?

Versuch - 5

Bioanalytik-Praktikum

5. HPLC-Analytik von Vitamin C in Citrusfrüchten und verschieden farbigen Paprikaschoten

5.1 Was sind Vitamine?

Vitamine sind lebenswichtige organische Wirkstoffe, die in fettlösliche (Vitamin A, D, E) und wasserlösliche (Vitamin B₁, B₂, B₆, B₁₂ und C) Species unterteilt werden. „*Vita*“ bedeutet Leben und „*Amin*“ weist auf die aminartige Reaktion speziell von Vitamin B₂ hin.

Vitamin C wird oft in Zusammenhang mit der Vorbeugung von Erkältungen gebracht sowie mit der legendären Krankheit „Skorbut“, die bedingt durch Mangel an Vitamin C bereits im Mittelalter bei Seefahrern Zahnausfall verursachte.

Die Ascorbinsäure ist ein farb- und geruchloser, kristalliner und gut wasserlöslicher Feststoff, der einen sauren Geschmack aufweist.

Für eine flüssigchromatographische Analyse des Zielanalyten Ascorbinsäure ist demzufolge ein wässriger Eluent auszuwählen. „Gleiches löst sich im Gleichen“ oder der zu bestimmende Analyt muss in einer entsprechenden mobilen Phase löslich sein, damit die LC-Methodik erfolgreich angewandt werden kann.

Wasserlösliche Ascorbinsäure (Vitamin C) soll aus Paprikaschoten isoliert werden. Vitamin C ist anhand der Retentionszeit einer entsprechenden Testsubstanz zu

Zu vergleichen sind auch die Ascorbinsäure- und Citronensäure-Peaks (Strukturen siehe Abb. 5.1 und 5.2) zwischen frisch ausgepressten Zitronen und dem in gelben „Plastikfässchen“ enthaltenen Zitronensaft.

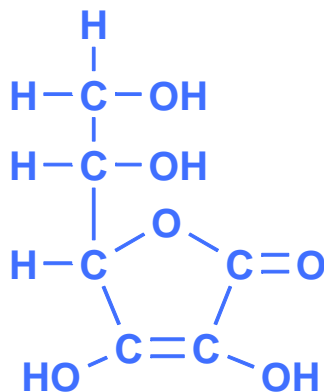


Abb. 5.1 Vitamin C (AS)

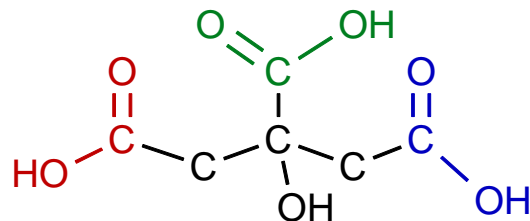


Abb. 5.2 Citronensäure (CS)

5.2 Aufbau eines Flüssigchromatographen

In Abbildung 5.2 ist der prinzipielle Aufbau einer HPLC-Apparatur (**HPLC**: high performance liquid chromatography) dargestellt. Der Eluent (**1**) wird i.d.R. mit einem Inertgas (Helium) entgast und mittels pulsationsarmer Hochdruckpumpe (**2**) zum Injektor (**3**) gefördert.

Die Aufgabe der Probe erfolgt mit Hilfe einer Dosierspritze über den Injektor (**3**). Dabei wird eine Metallkapillarschleife, die ein definiertes Probenvolumen (z.B. 20 µl) aufweist, gefüllt; die überschüssige Probeflüssigkeit landet in einem Abfallgefäß (Waste – hier nicht dargestellt!).

Die Analyte der applizierten Probe werden nun in der HPLC-Säule (**4**) nach unterschiedlichen Wechselwirkungen getrennt.

Danach passieren sie einzeln die Mikrodurchflussküvette eines Detektors (**5**).

Die Substanz-Pfropfen werden bei der Registrierung in Form von Peaks z.B. auf einem Schreiber (**6**) sichtbar gemacht wird.

In einem UV/VIS-Detektor erfolgt die Messung der Absorption der Analytmoleküle. Nach der Mikrodurchflussküvette des Detektors wird das Eluat in Waste (**7**) überführt.

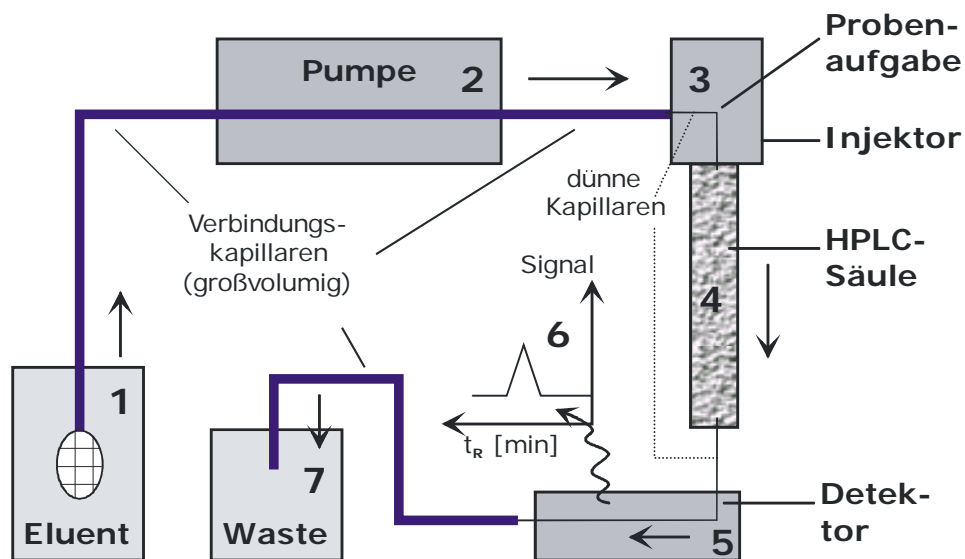


Abb. 5.3 Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur

5.3 HPLC-Chromatogramme

In einem Chromatogramm wird auf der Ordinate ein Signal (z.B. die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge; für Vitamin C im UV-Bereich von ca. 210 nm...250 nm) und auf der Abszisse die Retentionszeit (t_R in Minuten) aufgetragen (s. Abb. 5.4).

Zur HPLC-Trennung dient eine Polymersäule auf der Basis von Styren-Divinylbenzen. Die Elution der Citronen- und Ascorbinsäure erfolgt mit destilliertem Wasser, das einen pH-Wert von 3,0 aufweist.

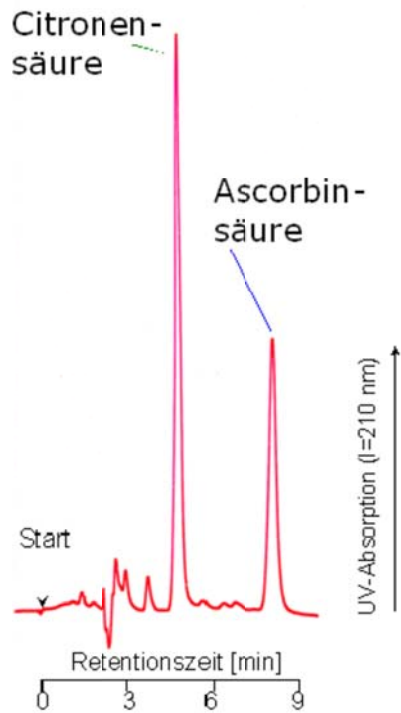


Abb. 5.4 HPLC-Chromatogramm von Citronensäure & Vitamin C

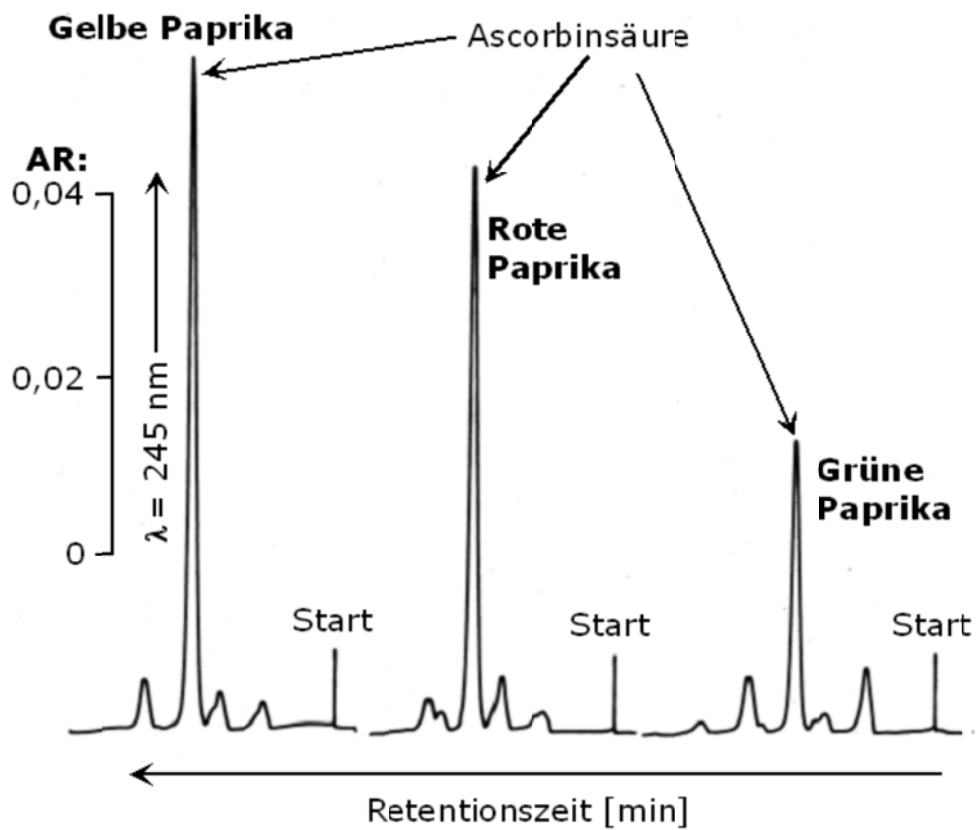


Abb. 5.5 HPLC-Chromatogramme von Ascorbinsäure aus verschiedenen Paprikaschoten (gelb-rot-grün)

Versuch – 5

Arbeitsplatz-Anleitung

5. HPLC-Analytik von Vitamin C in Citrusfrüchten und verschieden farbigen Paprikaschoten

5.1 Materialien (Bitte prüfen!)

- Apparatur mit UV-Detektion, RP-LC, MeOH/H₂O
- Zitronenpressen, Reibegläser
- Testlösungen von Coffein (Absprache)
- Diverse Cola- und Kaffee-Produkte
- Bechergläser mit Eluent (MeOH/H₂O-Gemische)
- Ultraschallbad – **nur mit destill. Wasser füllen!**
- Diverse andere Bechergläser
- 10ml-Standzylinder
- 500µl-Dosierspritze oder 1ml-Dosierspritze
- Saugtücher, Küchenkrepp,
- Laborhandschuhe
- Abfallbehältnisse (Waste)

5.2 Durchführung der HPLC

- Einweisung in die HPLC-Apparatur
- **Besonders wichtig: Dosierung der Proben!**
- Injektion von VitaminC-/Citronensäure-Testgemischen
- Ermittlung der Retentionszeit VitaminC/Citronensäure
- Was bedeutet „Totzeit“ bzw. Durchbruchskurve?
- Proben aus Citrusfrüchten und Paprikaschoten (s. 5.3)

5.3 Aufarbeitung der Proben

Citrusfrüchte:

- Proben wie z.B. Zitronen werden ausgepresst und der Saft wird in ein Becherglas überführt
- 4 Eppis werden mit ca. 1,0 bis 1,5 ml Saft befüllt und 10 Minuten zentrifugiert
- Die Überstände werden mittels Dosierspritz aufgenommen und in ein Reagenzglas überführt
- Verdünnungen der Proben erfolgen ggf. – dann mit dem sauren Eluenten (Rücksprache nehmen!)
- Danach erfolgt das Applizieren in die HPLC-Apparatur!

Paprikaschoten:

- Von den Paprikaschoten (gelb, rot, grün) werden ca. 1/3 der Frucht in einer Glasschalen-Reibe zu Saft gemacht
- Ca. 1 bis 2 ml Saft sind ausreichend
- Je 2 Eppis (ca. 1 ml) werden mit dem gelben, roten und grünen Saft befüllt und 10 Minuten zentrifugiert
- Die Überstände werden mittels Dosierspritz aufgenommen und in ein Reagenzglas überführt
- Verdünnungen der Proben erfolgen ggf. – dann mit dem sauren Eluenten (Rücksprache nehmen!)
- Danach erfolgt das Applizieren in die HPLC-Apparatur!

5.4 Auswertung Ascorbin-/Citronensäure-Analytik

- Frisch gepresster Zitronensaft vs. „Plastik“-Zitronensaft?
- Unterschiede in den Säften der Paprika-Schoten?

Versuch - 6

Bioanalytik-Praktikum

6. Proteintrennung mit sodium-dodecyl-sulfate—polyacrylamid-gel-electrophoresis, SDS-PAGE

6.1 Was ist Elektrophorese?

Das naturwissenschaftliche Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung von elektrisch geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld (Abb. 6.1 und 6.2). Die Trennung der Analyte (Proteine) findet bei der „slab gel electrophoresis“ in einem Gel und mithilfe einer Pufferlösung statt.

Elektrophorese: Trennprinzipien

(Wanderung von geladenen Analyten im elektrischen Feld)

Anode (+): positiv geladener Pol **An-genehm** ist positiv)
Kathode (-): negativ geladener Pol **Kat-astrophe** ist negativ)

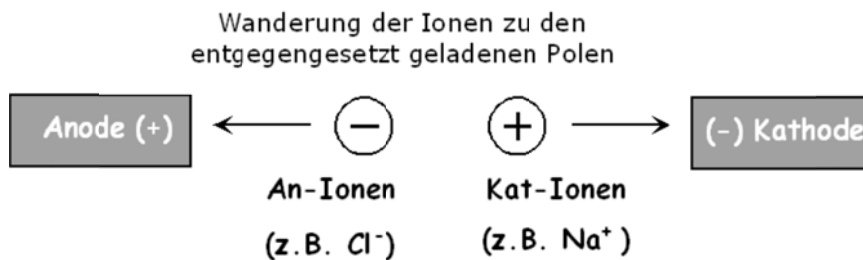


Abb. 6.1 Elektrophorese: Trennprinzipien

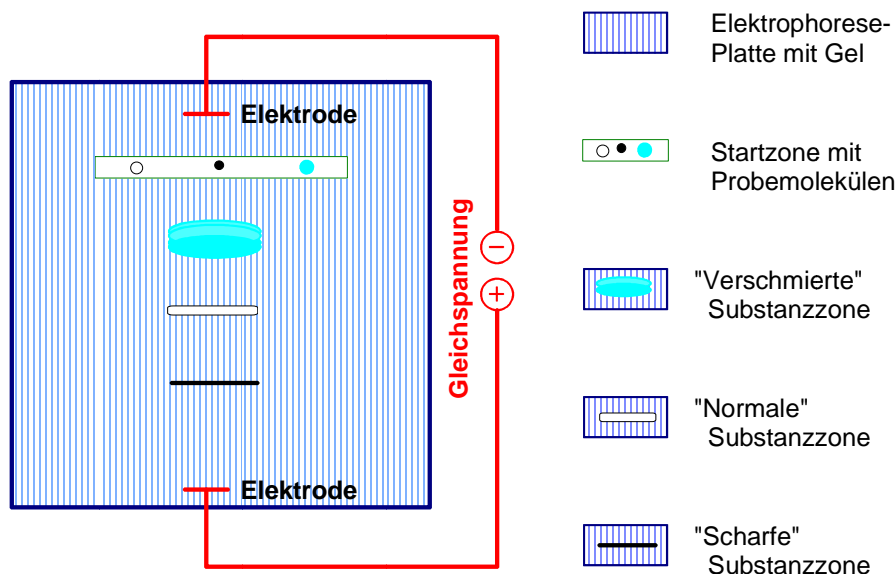


Abb. 6.2 Prinzip der slab gel electrophoresis

Die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide-gel-electrophoresis) ist eine elektrophoretische Trennmethode zur Separation von Proteinen nach ihrer Molekülgröße bzw. nach der Molekülmasse, (MW: molecular weight) unter denaturierenden Bedingungen. Dabei sind die Proteine mit SDS „überschichtet“, so dass alle Proteine negativ geladen sind und zur Anode wandern (Abb. 6.3 und 6.4). Kleine Proteine migrieren schneller als große Proteine, so dass unterschiedliche Rf-Werte (Abstände von der Startzone zu den Proteinbanden) resultieren (Abb. 6.5). Wie diese Abbildung zeigt, besitzen kleine Proteine auf Grund der schnelleren Migration auch größere Rf-Werte.

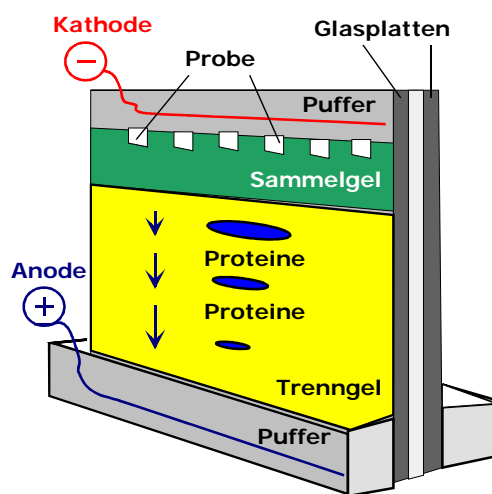


Abb. 6.3 Vertikale SDS-PAGE

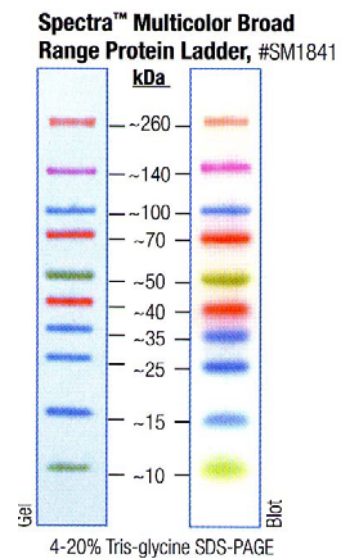


Abb. 6.4 Elektropherogramme farbiger Proteine

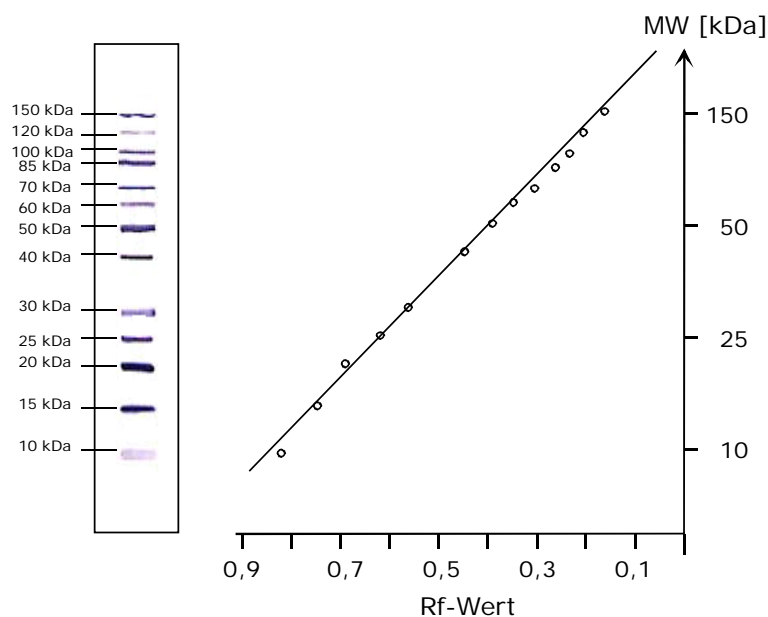


Abb. 6.5 Ermittlung der Molekulargewichte von Proteinen

Versuch – 6

Arbeitsplatz-Anleitung

6. Proteintrennung mit sodium-dodecyl-sulfate— polyacrylamid-gel-electrophoresis, SDS-PAGE

6.1 Materialien (Bitte prüfen!)

- Elektrophorese **Consort E835**
- Lämmli-Puffer (250 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS, pH = 8,3)
- Elektrophorese-Gel Tris/Glycin Gel 4–20%, 1 mm
- **Protein-Mix** 01 bestehend aus Myosin (220 kDa), β -Galactosidase (116), Glycogen-Phosphorylase (97,0), Albumin (66,0), Glutamat-Dehydrogenase (55,6), Lactat-Dehydrogenase (36,5), Carbonic Anhydrase (29,0), Trypsin-Inhibitor (20,0), Lysozyme (14,0), Aprotinin (6,1), Insulin A (3,4) und Insulin B (2,5 kDa)
- 500 μ l-Dosierspritze oder 1ml-Dosierspritze
- Saugtücher, Küchenkrepp,
- Laborhandschuhe
- Abfallbehältnisse (Waste)

6.2 Vorbereitung der Elektrophorese

- Einweisung in die Elektrophorese-Apparatur
- 100 ml eines kommerziellen Lämmli-Puffers werden auf 1 Liter mit entionisiertem Wasser aufgefüllt
- In der Geltüte befindet sich ein Verpackungspuffer, der mit 0,01 % Natriumazid zum Abtöten von Mikroorganismen versetzt ist.
- Beim Hantieren mit den Gelen ist unbedingt Schutzbekleidung (Handschuhe, Schutzbrille) zu tragen!

Arbeitsanleitung für Fertiggele

1. Öffnen Sie die Geltüte mit einer Schere, entnehmen Sie die Gelkassette!
2. Verwerfen Sie den Verpackungspuffer und spülen Sie die Gelkassette mit entionisiertem Wasser ab!
3. Entfernen Sie das Klebeband am unteren Ende der Kassette sowie den „Kamm“ am oberen Teil. Befreien Sie den Geldurchtrittsspalt mithilfe von Küchenkrepp oder Laborpapier von anhaftenden Klebstoffresten!
4. Setzen Sie die Kassette vorsichtig in die Elektrophoresezelle ein, sodass die Aufschrift der Kassette nach vorn zeigt (Absprache!). Bitte ziehen Sie die Verschraubungen der Zelle kreuzweise und mit viel Gefühl (!) an. Achten Sie darauf, dass die Gelkassette und die Elektrophoresezelle dicht sind! Überprüfen Sie das, indem Sie zuerst nur wenig Puffer in die Kammer einfüllen!
5. Befüllen Sie nun die Elektrophoresezelle auf der Kathoden- und Anodenseite mit Laufpuffer. Auf der Kathodenseite erfolgt das so weit, bis die Geldaschen mit Puffer „geflutet“ worden sind. Der anodische Kammerteil im unteren Teil der Zelle wird bis zum „Fluid-Level“ befüllt. Bitte nehmen Sie auch Rücksprache!
6. Tragen Sie jetzt die Proteinproben (5 ... 10 µl pro Tasche) mit einer µl-Spritze möglichst nahe am Taschenboden auf und beachten Sie, dass keine Luftblasen eingetragen werden (Probe ggf. mehrfach mittels Dosierspritze aufziehen! Rücksprache nehmen!)
7. Schließen Sie die Zelle und verbinden Sie die Stromkabel mit der Spannungsversorgung!
8. Für den Geltyp Tris-Glycin-SDS wird eine Spannung von 150 V, eine Stromstärke von 60 mA und eine Laufdauer von 1,5 Stunden eingestellt (Rücksprache!).
9. Starten Sie die Elektrophorese – drücken Sie auf „run“!
10. Kontrollieren Sie jetzt, ob die eingestellten Parameter auch angezeigt werden, wobei die Stromstärke zu niedrigeren Werten absinkt. Notieren Sie deshalb die Stromstärkewerte in Abständen von 5 Minuten! Zu niedrige Stromstärken deuten darauf hin, dass die Zelle nicht ausreichend mit Puffer gefüllt ist bzw. dass sie undicht geworden ist.

11. Zwei sehr kleine farbige Proteine (rot: Phenolrot, blau: Bromphenolblau) dienen zur Visualisierung der Probenfront.
12. Die Elektrophorese ist beendet, wenn diese Marker das Gelende erreicht haben (s. Level 6 auf den rechten Gelkassettenrand) und gerade nicht mehr sichtbar sind. An diesem Zeitpunkt wird die Elektrophorese durch Ausschalten des Gerätes beendet!
13. Entfernen Sie die Stecker und den Deckel vom Gerät!
14. Die Laufpuffer sind von der Anoden- und Kathodenseite zu entfernen. Gießen Sie vor allem den Kathodenpuffer mit „Schwung“ die den Abfallbehälter!
15. Nehmen Sie die Kassette vorsichtig aus der Zelle. Schaffen Sie sich zuvor ausreichend Platz auf dem Labortisch!
16. Öffnen Sie die Kassette, indem Sie ein Gelmesser in den Spalt zwischen oberer und unterer Platte einführen und diese auseinander hebeln. Wiederholen Sie diesen Handgriff an allen drei verschlossenen Seiten der Kassette! Dabei sollte die ausgeschnittene Seite der Kassette nach oben zeigen. Entfernen Sie nun die obere Platte, das Gel sollte jetzt auf der unteren Platte liegen.
17. Trennen Sie nun mit dem Gelmesser die Verdickung des Gels an der Stromdurchgangsplatte ab und nehmen Sie dann das Kassettenteil mit dem Gel in die Hand!
18. Führen Sie das Gelmesser vorsichtig ca. 5 mm unter die Unterkante des Gels. Halten Sie nun die Platte mit dem Gel nach unten zeigend über eine Schale. Helfen Sie mit dem Gelmesser ein wenig nach, sodass sich das Gel von der Platte löst. Schaben Sie das Gel aber auf keinen Fall aus dem Kassettenteil heraus!
19. Jetzt können Sie das Gel nach Arbeitsvorschrift fixieren, blotten oder färben.
20. Hinweise zur Haltbarkeit:
Aufgrund der Hydrolyse von Polyacrylamid (PAA) in Gegenwart von pH-Werten > 8 haben PAA-Gele eine begrenzte Haltbarkeit, die vom Geltyp abhängig ist und 6–16 Wochen ab Produktion beträgt. Dabei gilt: Je höher die Polyacrylamid-Konzentration, desto kürzer die Haltbarkeit. Das Haltbarkeitsdatum finden Sie auf der Kassette unterhalb der Chargen-Nummer.