

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU SJALOWEGO W MATERIALE BIOLOGICZNYM METODĄ SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ

Metoda ta polega na tworzeniu barwnych związków z rezorcynolem przez pochodne kwasu sjalowego powstające po odwodnieniu przez stężone kwasy. Modyfikacja polegająca na utlenianiu kwasu sjalowego kwasem jodowym (VII) (nadjodowy) powoduje, że jest to metoda czuła i specyficzna, gdyż w reakcji tej nie biorą udziału inne związki, takie jak lipidy, aminokwasy i pozostałe cukry.

Celem ćwiczenia jest oznaczenie całkowitej zawartości kwasu sjalowego w materiale biologicznym.

APARATURA:

Spektrofotometr UV-VIS

ODCZYNNIKI:

- kwas nadjodowy, rezorcynol, siarczan (VI) miedzi (II), alkohol tert-butyłowy, kwas sjalowy, woda dejonizowana;
- 0,04M kwas jodowy (VII) otrzymany po rozpuszczeniu 0,45g kwasu nadjodowego w 100 ml wody dejonizowanej,
- odczynnik rezorcynolowy otrzymany w wyniku rozpuszczenia 0,6g rezorcynolu w roztworze zawierającym 60ml 28% HCl, 1 ml 25mM CuSO₄ i 39 ml wody destylowanej,
- 95% alkohol tert-butyłowy,
- roztwór wzorcowy kwasu sjalowego o stężeniu 20 μmoli/10ml otrzymany poprzez rozpuszczenie 6,2mg kwasu sjalowego w 10 ml wody dejonizowanej.

WYKONANIE ĆWICZENIA:

1. Do 250 μl roztworu badanego lub wzorcowego dodać 50μl 0,04M kwasu nadjodowego.
2. Wymieszać ostrożnie i inkubować w łaźni lodowej przez 35 min.

3. Po inkubacji dodać 625µl odczynnika rezorcynolowego, wymieszać i pozostawić w łaźni lodowej przez 5 minut, po czym ogrzewać przez 15 minut w temperaturze 100°C.
4. Ochłodzić pod bieżącą wodą i dodać 625 µl alkoholu tert-butyłowego i dobrze wymieszać.
5. Następnie w celu stabilizacji barwy wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 37°C, po czym chłodzić do temperatury pokojowej.
6. Dokonać odczytu absorbancji przy długości fali 630 nm. Wartość absorbancji jest proporcjonalna do stężenia kwasu sjałowego w zakresie 0,012-0,2 µmole kwasu sjałowego.

OPRACOWANIE WYNIKÓW

1. Wyznaczyć krzywą wzorcową w zakresie 0,012-0,2 µmole kwasu sjałowego.
2. Stężenie kwasu sjałowego w materiale biologicznym wyznaczyć na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej i opisującego ją równania.
3. Przeprowadzić dyskusję otrzymanych wyników.

WYMAGANIA:

Struktury chemiczne kwasu neuraminowego. Występowanie i funkcje biologiczne kwasów sjałowych w organizmie. Oznaczanie kwasu sjałowego zmodyfikowaną metodą rezorcynolową.

LITERATURA:

1. Jourdian G.W., Dean L., Roseman S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 430-435.
2. Kątnik-Prastowska I., (2003) Adv. Clin. Exp. Med., 12, 5, 653-663
3. Stryer L. Biochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
4. Materiały przygotowane przez prowadzącego.