

Raport servicii

1. Determinarea acizilor organici cu catena scurta (SCFAs) din probe de culturi bacteriene prin electroforeza capilara zonala (CZE)

Materiale si metoda

Toti reactivii utilizati au fost de puritate analitica (puritatea > 98%): DL- acidul lactic si acidul butiric au fost achizitionati de la Fluka (Buchs Elvetia) acidul acetic de la Riedel-de-Haën (Germania) acidul L-(+) tartaric, acidul formic, acidul citric, acidul benzoic, acidul succinic, acidul malic, acidul LD-p-hidroxifenil lactic, acidul fenil lactic, acidul izovaleric si acidul propionic au fost achizitionati de la from Sigma-Aldrich (USA).

Acidul fosforic 85% si acidul oxalic au fost achizitionati de la Merck (Germania) bromura de cetiltrimetilamoniu (CTAB) de la Loba Chemie (Austria) iar apa de puritate HPLC solutiile de NaOH 01 N si 1N de la Agilent Technologies (USA), Solventii probele si celelalte solutii au fost filtrate cu ajutorul unor membrane cu porii de diametru 02 µm (Millipore Bedford MA USA) si degazate inainte de utilizare.

Solutiile stoc de standarde au fost preparate in apa la o concentratie de 10 mg/mL cu exceptia acidului benzoic 0.95mg/mL, acidul oxalic 0,8 mg/mL, acidul LD-p-hidroxifenil lactic 0.55 mg/mL, acidul fenil lactic 0.6 mg/mL, acidul succinic 12.5 mg/mL si acidul lactic 33.1 mg/mL Solutiile stoc au fost pastrate la +4 °C. Dilutiile solutiilor standard au fost realizate zilnic.

Pentru separarea acizilor grasi cu catena scurta s-a utilizat o metoda electroforetica zonala de polaritate inversa. Separarea SCFA s-a realizat pe un aparat de electroforeza capilara Agilent G7100 (Agilent Technologies, Ratingen, Germany) prevazut cu un detector cu sir de diode (DAD). Capilara utilizata pentru separare a fost o capilara standard de silica de diametru 50 µm, cu o lungime efectiva de 63 cm. Tamponul de migrare, pH=6,24, a fost compus din H₃PO₄, 0,5 M, CTAB 0,5 mM (pH ajustat cu NaOH la 6.24) si 15 % methanol. Separarile au avut loc la o temperatura de 25 C⁰ si un voltaj de -20Kv. Injectia probei s-a realizat hidrodinamic timp de 10 sec la o presiune de 35 mbarr. Detectia s-a realizat pe un detector cu sir de diode la o lungime de unda λ=200 nm. Intre migrari capilara a fost spalata 2 minut cu NaOH 1M, 2minut apa ultrapura si 3 minute BGE. Curbele de calibrare au fost realizate pe diferite domenii de concentratie

(tabelul1). Ordinea in care au fost eluati acizii organici a fost: acidul formic, acidul oxalic, acidul succinic, acidul acetic, acidul propionic, acidul lactic, acidul butyric, acidul benzoic, acidul izovaleric, acidul fenil lactic si acidul hidroxi fenil lactic iar timpul de analiza a fost de 30 min.

Probele au fost filtrate cu ajutorul unor membrane cu porii de diametru 02 μm (Millipore Bedford MA USA) si degazate inainte de injectie.

In figurile urmatoare sunt prezentate electroforegramele inregistrate pentru probele analizate.

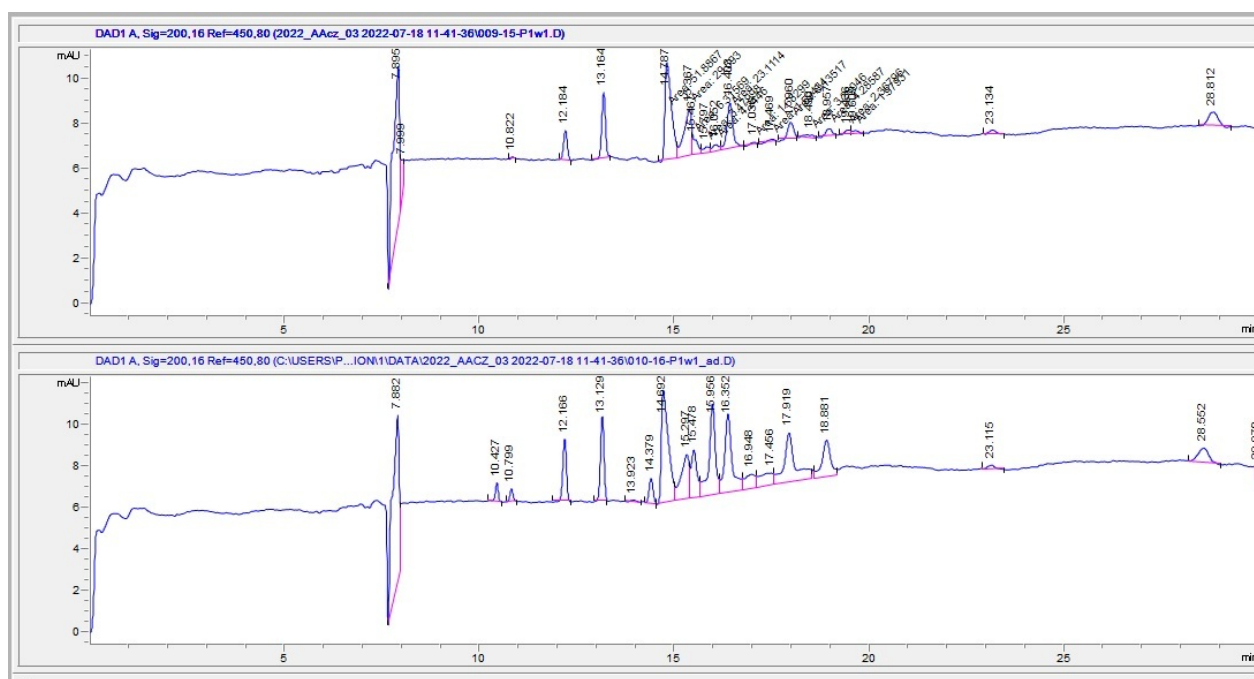


Fig.1.1 Electroforegrama proba P1w1 si P1w1 cu aditie standard

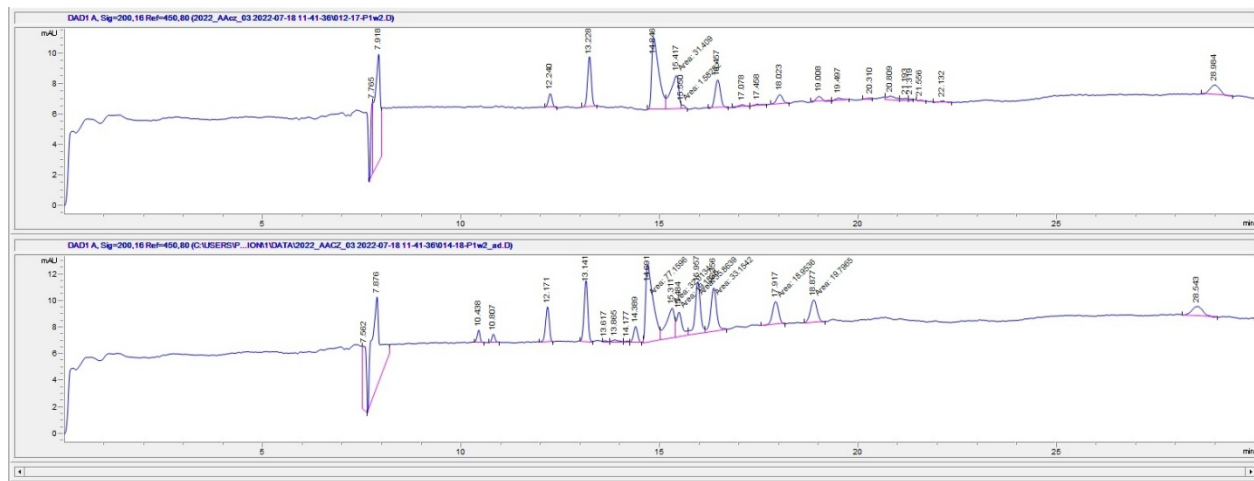


Fig.1.2 Electroforegrama proba P1w2 si P1w2 cu aditie standard

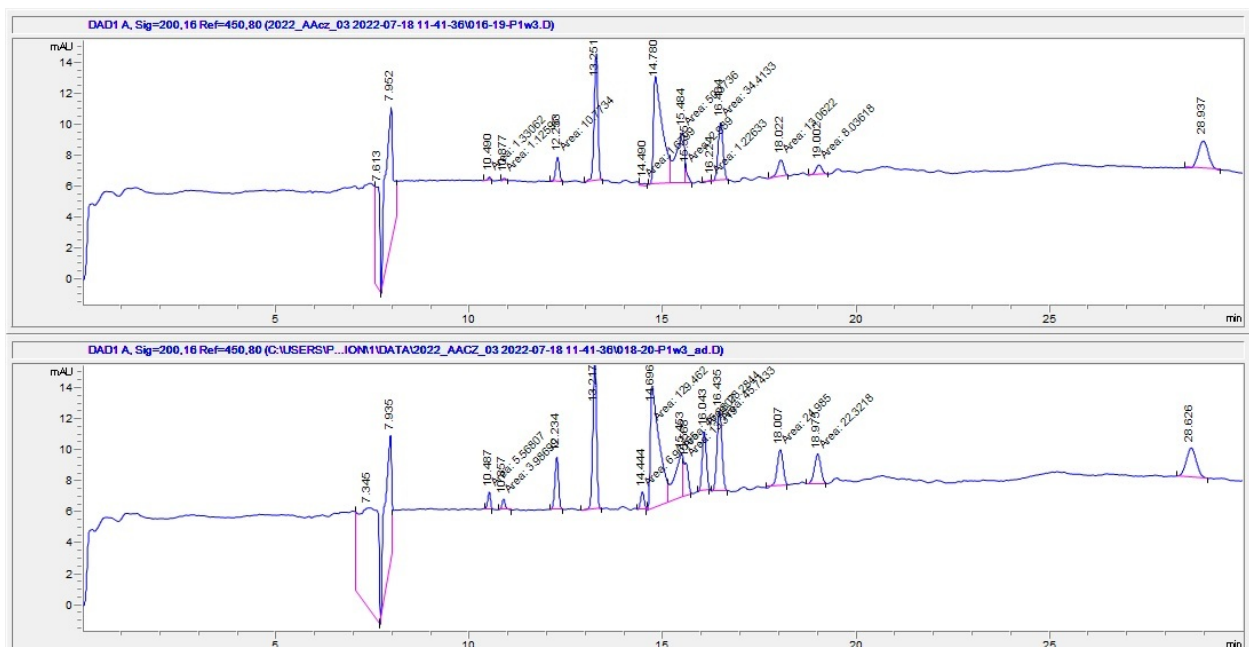


Fig.1.3 Electroforegrama proba P1w3 si P1w3cu aditie standard

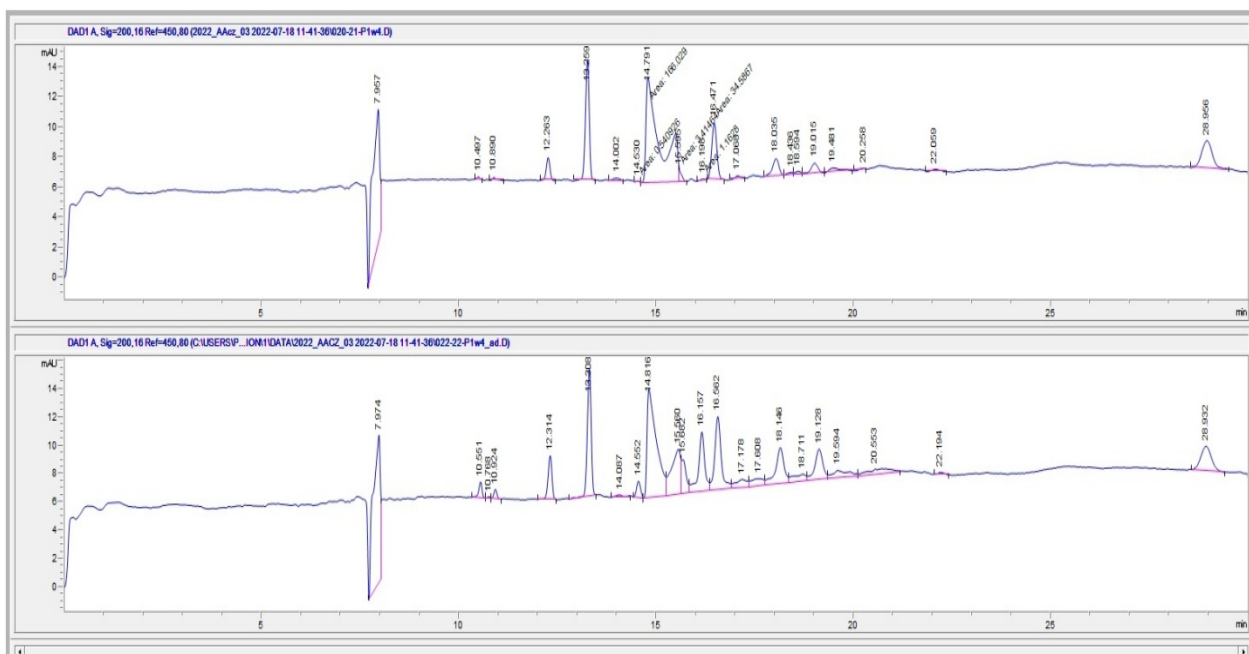
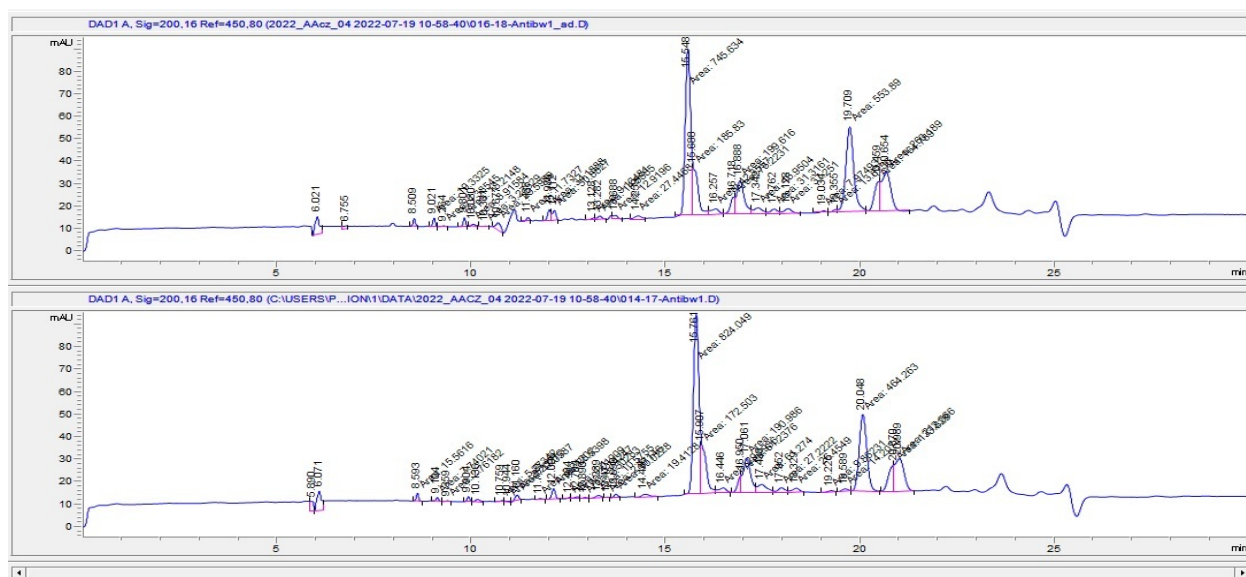
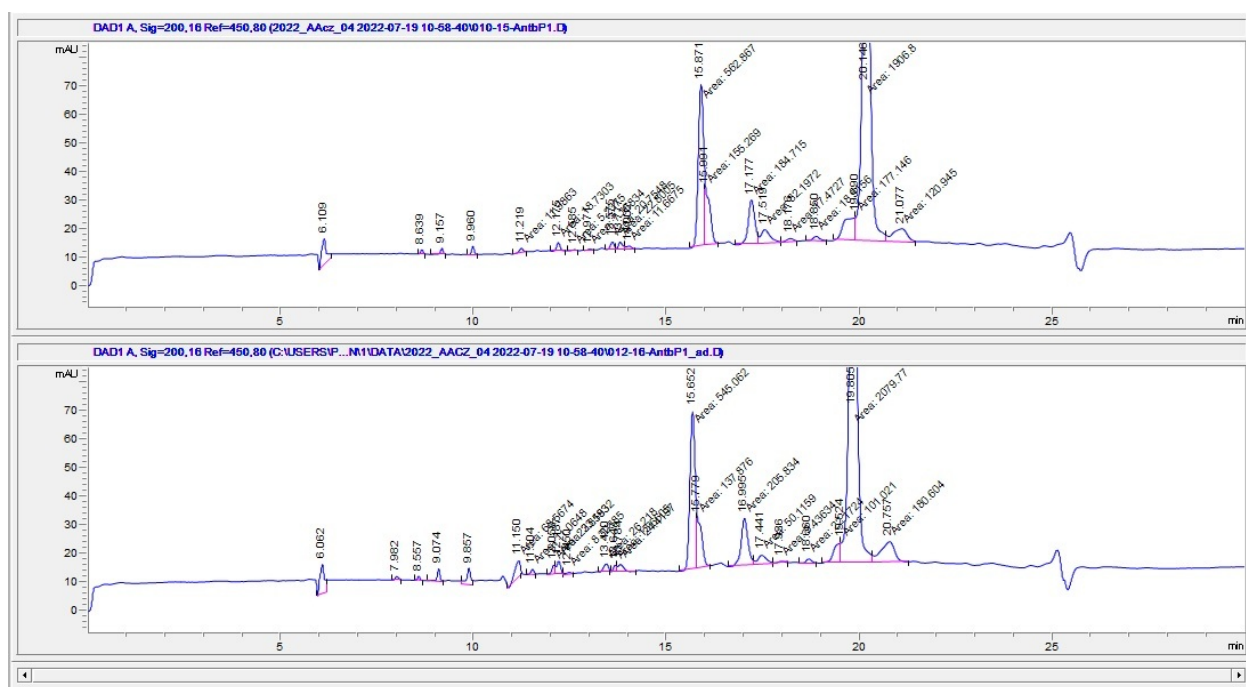
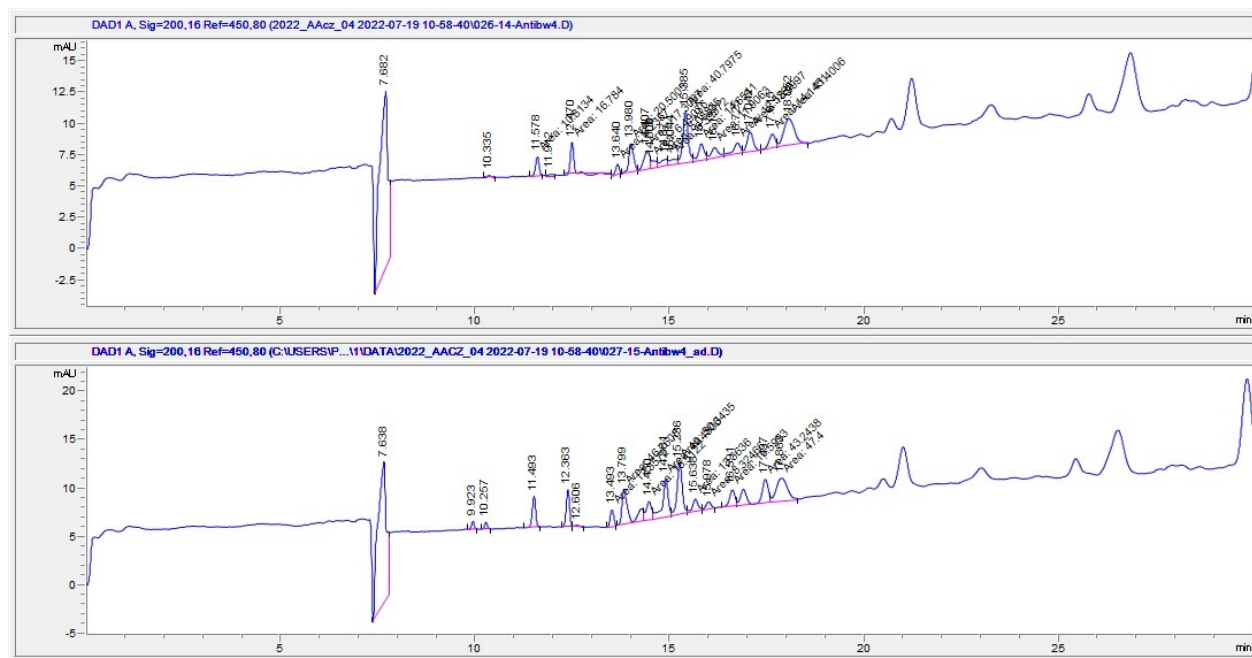


Fig.1.4 Electroforegrama proba P1w4 si P1w4 cu aditie standard





W2	0.422± 0.039	0.100± 0.002	0.259±0. 014	1.190± 0.036	0.346±0.0 03	1.423± 0.056	1.179± 0.061	0.417±0.0 01	1.583±0.0 31	0.110± 0.004	0.020±0.000
W3	-	0.009± 0.00	0.354±0. 003	0.744± 0.052	0.162±0.0 0	2.270± 0.029	0.495± 0.04	-	0.688±0.0 20	-	0.052±0.001
W4	-	0.006± 0.00	0.306±0. 012	0.584± 0.026	0.179±0.0 18	2.001± 0.020	0.518± 0.006	-	0.601±0.0 10	-	0.011±0.000
P2 - CARD IO	0.374± 0.003	0.024± 0.002	0.079± 0.009	1.402± 0.013	0.119± 0.011	9.216± 0.105	0.062± 0.004	-	0.982± 0.120	0.024± 0.003	-
P3 - GLYC EMIC	0.323± 0.010	-	0.080± 0.009	1.117± 0.026	0.084± 0.009	10.04± 0.124	0.033± 0.001	-	0.748± 0.123	-	0.020±0.001

2. Analiza compusilor polifenolici din probe prin electroforeza capilara zonala

Materiale si metoda

Separarea electroforetică a fost efectuată folosind un instrument Agilent CE (software ChemStation) cu detector de diode (DAD) si o capilara de silica standard CE (Agilent Technologies, Germania) cu diametrul intern de 50 µm si lungimea efectiva de 72 cm pentru toate separarile electroforetice. Inainte de utilizare, capilara a fost spalata succesiv cu solutii bazice: 10 min cu NaOH 1 N, 10 min cu NaOH 0,1 N urmata de apa ultrapura timp de 10 min si tampon timp de 20 min. Capilarul a fost spalat intre migrari cu NaOH 0,1 M timp de 1 min, apa pura timp de 1 min si electrolit de migrare timp de 2 min. Electrolitul a fost reimprospatat dupa 3 rulari consecutive.

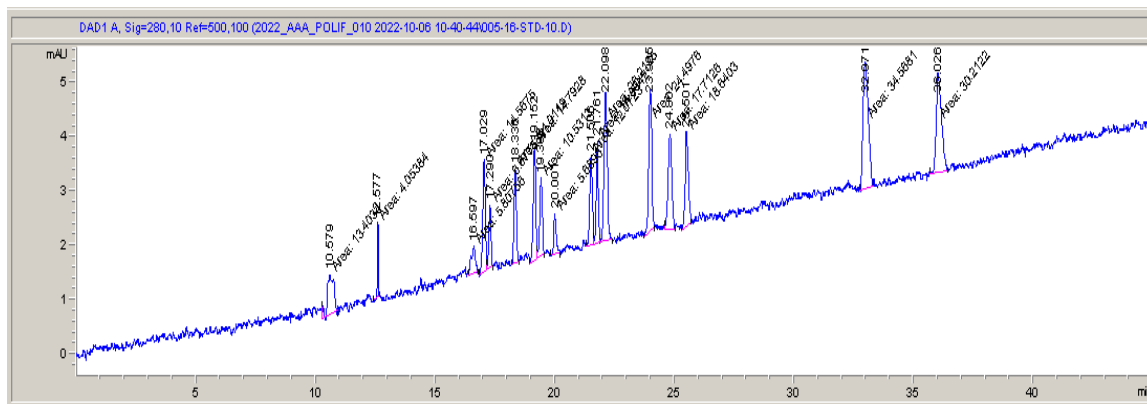
Injectarea probei a fost efectuată utilizand modul hidrodinamic (35 00 Pa, 12 sec) in timp ce capilarul a fost mentinut la o temperatura constanta de 30°C.

Separarea simultana a polifenolilor (acizi polifenolici si flavonoide) a fost realizata folosind tampon tetraborat 45 mM cu SDS 0,9 mM (pH=9,035 ajustat cu HCl 1 M) ca electrolit de migrare (BGE). BGE a fost filtrat pe membrane de 0,2 µm (Millipore, PTFE, Bedford, MA, SUA) si degazat inainte de utilizare. Tensiunea aplicata a fost de 25 kV; detectia compusilor care prezinta absorbtie a UV a fost efectuata in domeniul 200 la 360 nm iar cuantificarea probelor a fost efectuata la 280 nm.

Standardele utilizate au fost: acid galic, catechin, hesperidin, acid cinamic, acid clorogenic, acid cafeic, acid cumaric, acid ferulic, naringenin, rutin, izoquercetin, mirecetin, quercetin,

kaemferol, acid siringic, acid sinapic, luteolin. Stocurile de standarde au fost preparate in metanol in concentratie de 1 mg mL^{-1} .

Probele au fost filtrate cu ajutorul unor membrane cu porii de diametru $02\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore Bedford MA USA) si degazate inainte de utilizare. In figurile urmatoare sunt prezentate cromatogramele inregistrate pentru probe.



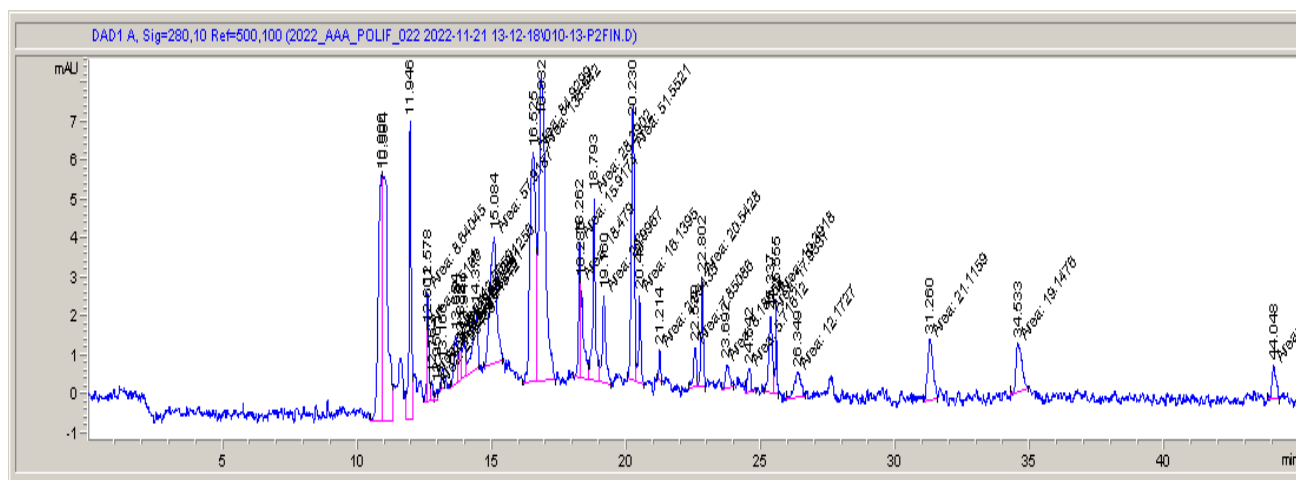


Figura 2.3. Electroferograma P2

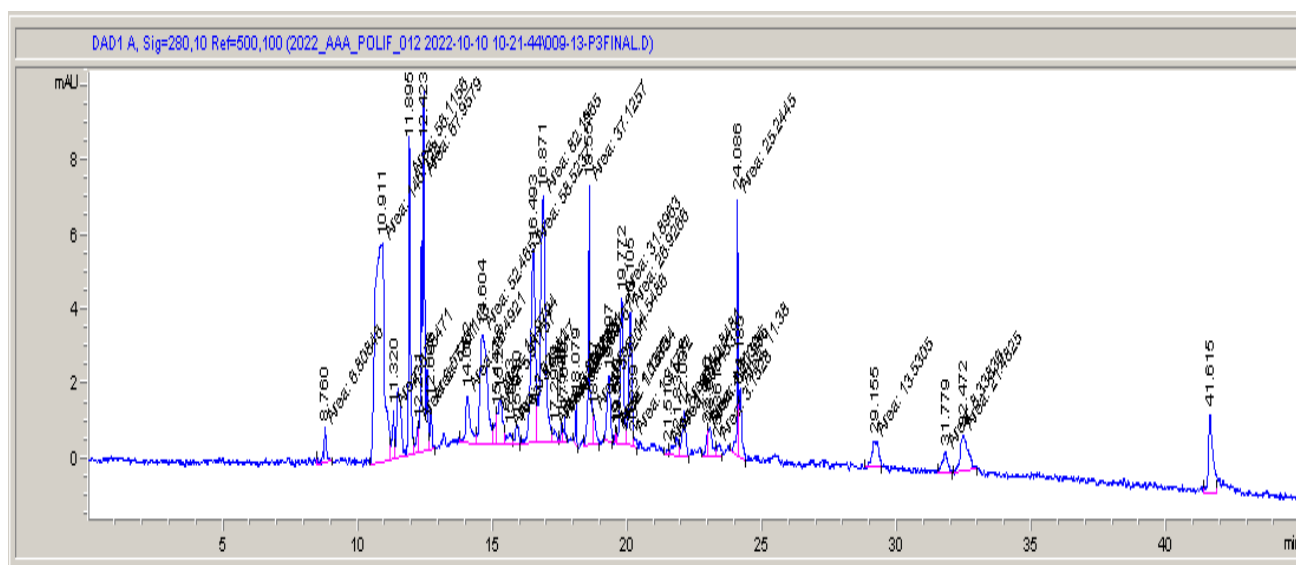


Figura 2.4. Electroferograma P3

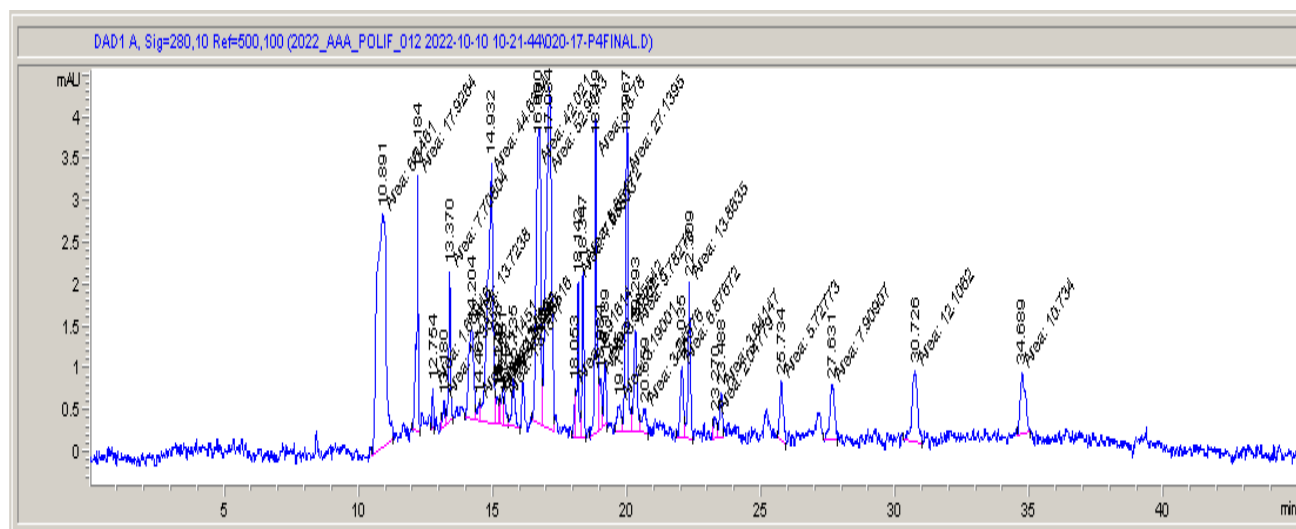


Figura 2.5. Electroferograma P4

Tabelul 2. Concentratiile de polifenoli in probele analizate

Nr	Compusi	P1 mg g su ⁻¹	P2 mg g su ⁻¹	P3 mg g su ⁻¹	P4 mg g su ⁻¹
1	Hesperidin	17.97±0.62	6.43±0.16	18.70±0.88	16.32±0.32
2	Catechin	83.94±0.14	41.90±0.43	31.34±0.83	77.44±0.56
3	Naringenin	17.08±0.17	2.20±0.20	1.12±0.07	16.27±0.12
4	Rutin	311.48±3.44	357.48±8.88	466.52±5.45	309.83±6.43
5	Cinnamic acid	6.83±0.06	1.99±0.118	1.13±0.07	2.20±0.03
6	Chlorogenic acid	9.24±0.17	2.31±0.191	2.01±0.06	6.93±0.87
7	Sinapic acid	22.80±0.11	-	2.71±0.10	7.34±0.72
8	Syringic acid	8.10±0.10	13.71±0.339	8.64±0.65	-
9	Ferulic acid	7.22±0.04	3.09±0.225	5.37±0.21	1.30±0.03
10	Myricetin	3.39±0.02	1.07±0.021	3.83±0.03	3.82±0.02
11	Caffeic acid	-	2.24±0.19	-	2.12±0.01
12	Quercetin	-	1.44±0.01	-	-

3. Determinarea continutului de monozaharide

Materiale si metoda

Manoza, xiloza, arabinoza, glucoza, riboza, ramnoza, manoza, fucoza, galactoza, acidul glucuronic, acidul glucuronic, 1-fenil-3-metil-pirazolona (PMP), H_2SO_4 , NaOH, HCl au fost achizitionate de la Sigma.

Apa ultrapura, solutia 0,1N si 1N de hidroxid de sodium au fost achizitionate de la Agilent Technologies (Germania). Solventii (Merck, Germania) si solutiile au fost filtrate cu ajutorul unor membrane cu o dimensiune a porilor de 0,2 mm (Millipore, Bedford, MA, USA) si au fost degazate inainte de utilizare.

Solutiile stoc de standarde au fost preparate prin dizolvare in apa distilata si au fost depozitate la +4 °C pe toată perioada determinarilor. Dilutiile solutiilor de standarde au fost preparate zilnic in apa distilata.

Prelucrarea probelor

Probele au fost supuse procesului de deproteinizare pentru eliminarea interferentelor pe parcursul analizei continutului de monozaharide. Deproteinizarea s-a realizat prin amestecarea probei cu reactiv Sevag (alcool butilic:cloroform, 1:5 v/v) si centrifugarea acesteia la 5000 rpm. Operatia s-a repetat pana la disparitia totala a precipitatului de proteine. Proba polizaharidica deproteinizata a fost apoi liofilizata cu ajutorul unui liofilizator Christ.

Hidroliza polizaharidelor

20 mg proba de polizaharide au fost introduse intr-o eprubeta peste care s-a adaugat 2mL acid triflor acetic 4M. Hidroliza polizaharidelor s-a realizat timp de 8 ore la 120°C. Dupa hidroliza, proba a fost racită si adusa la sec într-un evaporator Eppendorf prin adaugare de alcool etilic. Proba a fost apoi reluata in apa distilata si filtrate.

Derivatizarea cu PMP

Într-o eprubetă se pipetează 200 µL soluție de amestec de standarde sau hidrolizat de polizaharide, 100µL 0,5M PMP (preparată în metanol) și 100µL 0,3M de NaOH. Amestecul se lasă 30 minute la 70°C pentru desfășurarea reacției. După răcire, se adaugă 100µL 0,3M de HCl. Excesul de PMP se înlătură prin amestecarea probei cu 2mL cloroform. Amestecul se centrifughează 10 minute la 6500 rpm. Supernatantul se filtrează printr-un filtru de 0,45µm și se injectează direct în coloana capilară.

Separarea electroforetică a derivaților PMP s-a realizat pe un sistem CE Agilent cu detector cu șir de diode (DAD). Pentru separare s-a utilizat o capilară de silica (fused-silica, Agilent Technologies, Germany) cu diametru intern de 50 μm și lungime efectivă de 72 cm. Înainte de orice determinare capilara a fost spălată succesiv cu NaOH 1N timp de 10 min; NaOH 0,1 N timp de 10 min; apă ultra pură ultra 10 min; tampon 20 min. Între separări capilara a fost condiționată cu NaOH 0,1M timp de 1 min, H₂O pentru 1 min și electrolit de migrare timp de 2 min. După trei migrări succesive tamponul de migrare a fost înlocuit.

Injectia probei s-a realizat în mod hidrodinamic, (35 mbar/10 sec) iar temperatura de separare a fost de 25°C.

Separarea simultană a derivaților PMP s-a realizat cu ajutorul unui tampon de migrare format din acid boric 90 mM adus la valoarea de pH=9,8 cu NaOH 1 M. Voltajul aplicat a fost de 30 kV iar detecția s-a realizat la o lungime de undă de 245 nm. Pentru analiza datelor s-a utilizat programul ChemStation (Agilent).

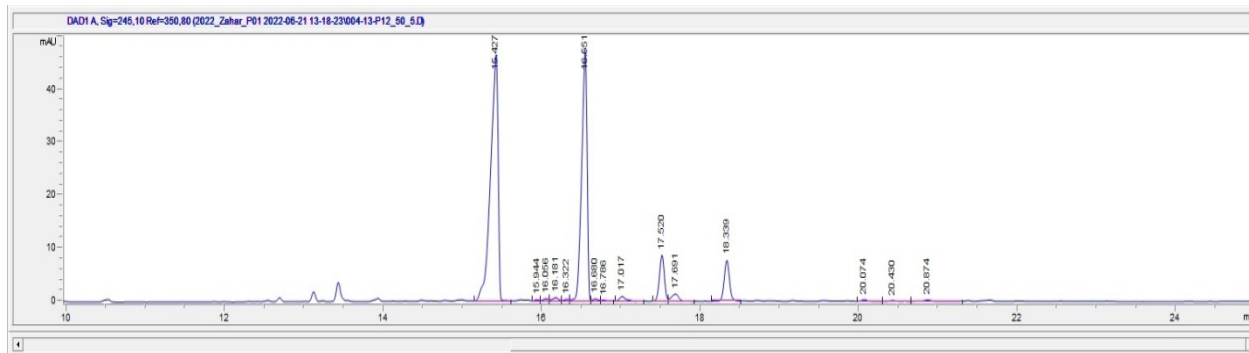


Figura 3.1. Electroforegrama amestecului de derivați PMP obținuți pentru fracția polizaharidică P1.

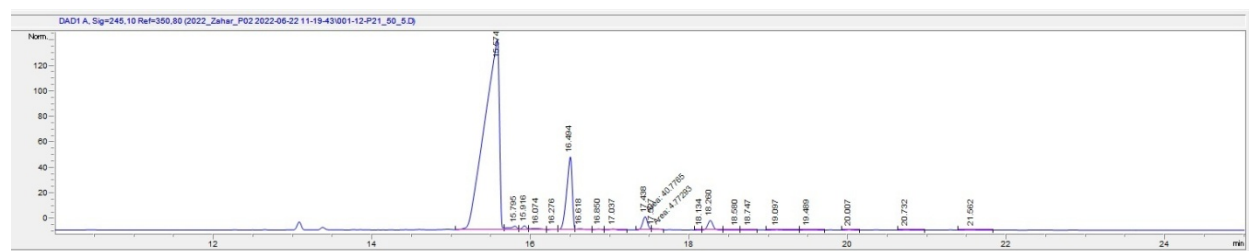


Figura 3.2. Electroforegrama amestecului de derivați PMP obținuți pentru fracția polizaharidică P2.

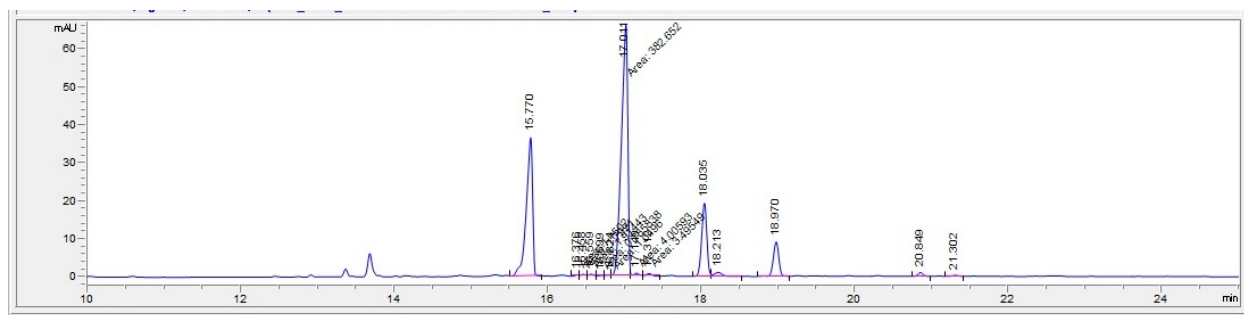


Figura 3.3. Electroforegrama amestecului de derivati PMP obtinuti pentru fractia polizaharidica P3.

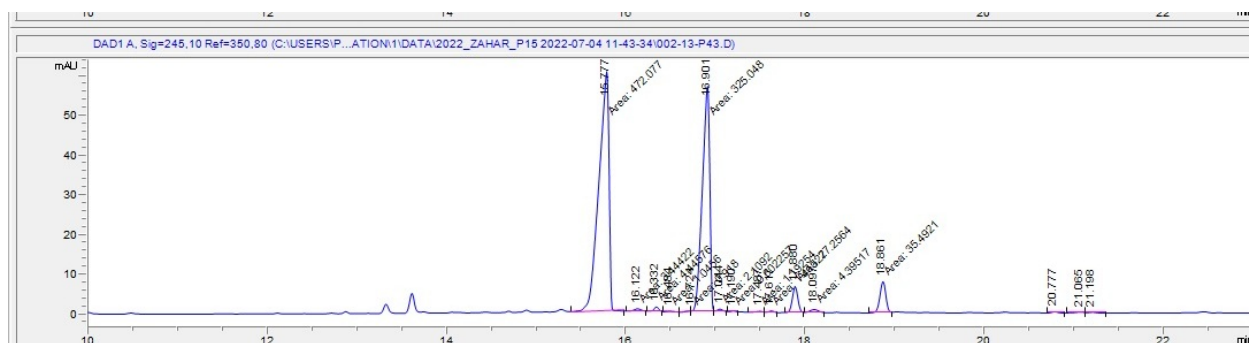


Figura 3.4. Electroforegrama amestecului de derivati PMP obtinuti pentru fractia polizaharidica P4.

Continutul in monozaharide ale probelor polizaharidice

Nr.c rt	Prob a	Xiloza mg g ⁻¹	Arabino za mg g ⁻¹	Glucoza mg g ⁻¹	Riboza mg g ⁻¹	Ramnoz a mg g ⁻¹	Manoza mg g ⁻¹	Fucoza mg g ⁻¹ a	Galactoza mg g ⁻¹	Acid galactu ronic mg g ⁻¹
1	P1	0.006	0.001	0.804	0.003	0.009	0.055	0.018	0.042	0.002
2	P2	0.007	0.003	0.744	0.009	0.010	0.078	0.020	0.048	0.001
3	P3	0.009	0.004	0.612	0.009	0.006	0.186	0.024	0.073	0.007
4	P4	0.007	0.001	0.814	0.009	0.012	0.049	0.017	0.050	0.001

Responsabil,
CSII Gatea Florentina