

A. STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN

Pomůcky:

spektrofotometr, dělené pipety 1 ml a 5 ml, vaříč, kádinka 500 ml, zkumavka se zátkou (10x), nálevka malá (10x), odměrná baňka

Chemikálie:

96 % ethanol, fosfátový tlumivý roztok (pH = 7,2), roztok ninhydrinu, roztok komplexonu III, roztok alaninu

Roztok ninhydrinu (čerstvě připravený): do 50 ml odměrné baňky navažte 0,2 g ninhydrinu, rozpust'ete ve 30 ml ethanolu, přikápněte 0,4 ml CH₃COOH a doplňte po rysku ethanolem.

Roztok alaninu: na analytických vahách navažte 1,5 g alaninu (zaznamenejte přesnou navážku). Navážku kvantitativně převed'te do 250 ml odměrné baňky, rozpust'ete v destilované vodě, doplňte po rysku a promíchejte.

Vzorek:

džus Toma Relax pomeranč (deklarovaný obsah bílkovin cca 0,6%)

Pracovní postup:

1. Kalibrační křivka alaninu:

- Do 6 zkumavek se zátkou pipetujte 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 ml roztoku alaninu a doplňte destilovanou vodou vždy na objem 8 ml.
- Přidejte 3 ml fosfátového tlumivého roztoku a 1 ml ninhydrinového činidla do každé zkumavky.
- Obsah zkumavek promíchejte, do hrdla zkumavek vložte malé nálevky a všechny zkumavky ponořte na 10 min do vroucí vodní lázně.
- Zkumavky opatrně vyjměte a ochlaďte ponořením do kádinky s ledovou vodou.
- Do každého vzorku přidejte 0,1 ml roztoku komplexonu III, 5 ml ethanolu a dobře promíchejte.
- Do 100 ml odměrných baněk z každé zkumavky postupně odeberte pipetou 1,0 ml temně modře zabarveného vzorku a destilovanou vodou doplňte po rysku.
- Změřte absorbanci na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm oproti slepému vzorku.

2. Vzorek:

- Do zkumavky odpipetujte 3 ml džusu a 5 ml destilované vody, přidejte 3 ml fosfátového tlumivého roztoku a 1 ml ninhydrinového roztoku, promíchejte.
- Do hrdla zkumavky vložte malou nálevku a celou zkumavku ponořte na 10 min do vroucí vodní lázně. Obsah zkumavky ochlaďte v lázni s ledovou vodou.
- Ke vzorku přidejte 0,1 ml roztoku komplexonu III a 5 ml ethanolu. Dobře promíchejte.

- d. Do 100 ml odměrné baňky odeberte 1 ml vzorku a destilovanou vodou doplňte po rysku.
- e. Změřte absorbanci na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm oproti slepému pokusu.

3. Slepý pokus:

- a. Přípravu slepého vzorku proveďte stejně jako přípravu vzorku reálného, pouze v bodě 1, místo 3 ml džusu a 5 ml destilované vody, pipetujte do zkumavky pouze 8 ml destilované vody.

Vyhodnocení a závěr:

Obsah aminokyselin (mg.l^{-1}) ve vzorku vypočtete podle vztahu:

$$w_N = \frac{m_a r}{V} 1000$$

kde m_a = množství alaninu odečtené z kalibrační křivky v mg,

r = stupeň zředění,

V = objem vzorku pipetovaný na stanovení v ml.

Jako výsledek uveďte graf závislosti absorbance na koncentraci alaninu při vlnové délce 570 nm (kalibrační křivku) s vyznačeným bodem odpovídajícím naměřené hodnotě reálného vzorku. Uveďte, kolik mg aminokyselin je přítomno v 1 l džusu, porovnejte s hodnotou na obalu výrobku.