

## ÚLOHA č.2

### ITP (IZOTACHOFORÉZA)

## Stanovení kyseliny glutamové a glutamátů (glutamanů) v potravinách

### CÍLE ÚLOHY

- kvantitativně stanovit kyselinu glutamovou pomocí kapilárního elektroforetického analyzátoru EA 100 upraveného na EA 102, kde v horní koloně systému dochází k předseparaci vzorku a v koloně spodní, a separační analytické, probíhá vlastní rozdělení a konduktometrická detekce kyseliny.

### ÚKOLY:

#### 2.1. Seznámení s metodou ITP

##### 2.1.1. Obecná instrumentace

##### 2.1.2. Způsoby vyhodnocení ITP

#### 2.2. Stanovení kyseliny glutamové a glutamátů (glutamanů)

##### 2.2.1. Obecná charakteristika kyseliny glutamové a glutamátů (glutamanů)

##### 2.2.2. Příprava kalibračních roztoků.

##### 2.2.3. Měření kalibračních závislostí.

##### 2.2.4. Identifikace zóny kyseliny glutamové a kvantifikace kyseliny glutamové.

##### 2.2.5. Vyhodnocení analýzy

### Přístroje:

Kapilární elektroforetický analyzátor EA 100 upravený na EA 102

### Chemikálie:

10 mM histidin HIS ( $C_6H_9N_3O_2$ ,  $M = 155,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), 10 mM histidinchlorid HIS-Cl ( $C_6H_9N_3O_2\cdot HCl\cdot H_2O$ ,  $M = 209,63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), 1 % HEC (hydroxyethyl-celulosa), 5 mM kyselina morfolinethansulfonová MES,  $C_6H_{13}NO_4S\cdot H_2O$ ,  $M = 213,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), 10 mM kyselina glutamová ( $C_5H_9NO_4$ ,  $M = 147,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

### Sklo a pomůcky:

Injekční stříkačka 5 ml (4x), injekční stříkačka s plastovým nástavcem 5 ml (1x, odsávání elektrolytů a promývání), chemická lžička, váženka (2x), kádinka 50 ml (2x), 100 ml (1x), odměrná baňka 25 ml (4x), 50 ml (1x), 100 ml (1x), 250 ml (4x), pipetování balónek, pipeta nedělená 10 ml (1x), pipeta dělená 1 ml (1x), 2 ml (1x), 5 ml (2x).

## 2.1. SEZNÁMENÍ S METODOU ITP

### TEORIE:

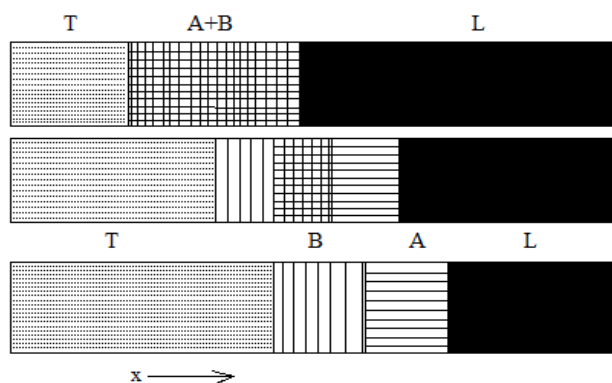
Izotachofóréza patří mezi elektromigrační separační metody, které využívají rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli. Od ostatních elektromigračních metod se liší tím, že vzorek je dávkován mezi **dva elektrolyty** - vedoucí (leading L) a koncový (terminating T), které musí být vybrány tak, aby pro jejich pohyblivosti (mobility) platilo:

$$u_L > u_{i,ef} > u_T$$

Během jedné analýzy se separují buď jenom anionty nebo jenom kationy (tj. pouze ionty jednoho znaménka). Izotachoforetický proces začne probíhat po připojení systému k elektrickému poli (stejnoseměrné napětí). Hodnoty konstantního proudu se pohybují v řádu desítek  $\mu\text{A}$ .

Proces analýzy můžeme rozdělit na dvě části. Nejprve dochází k oddělení složek vzorku, přičemž jednotlivé částice migrují ve směsné zóně různými rychlostmi. V druhé části, kterou můžeme považovat za ustálený stav se částice rozdělí a všechny se pohybují stejnou rychlostí.

Obr.1 – Dynamika separace směsi složek A a B



Obr.1

Dynamika separace směsi složek A a B, pro které platí  $u_A > u_B$  je ukázána na obr.1. Během separace se rychlejší částice dostávají dopředu a pomalejší se zpožďují. Po ustálení vzniká stacionární stav, ve kterém jsou již zóny poskládány podle pohyblivosti svých částic. Mezi zónami vzniklo ostré rozhraní a dále se pohybují všechny stejnou rychlostí (koncentrace iontů v každé zóně je konstantní).

$$v = u_L E_L = u_A E_A = u_B E_B = u_T E_T = \text{konst.}$$

Ostré rozhraní mezi jednotlivými zónami ve stacionárním stavu se popisuje pomocí tzv. **samozaostřovacího efektu**. Všechny ionty, ať pohyblivější nebo ty méně pohyblivé se pohybují stejnou rychlostí. Je to způsobeno rozdílným potenciálovým spádem v každé ze zón. Tento potenciálový spád (gradient)

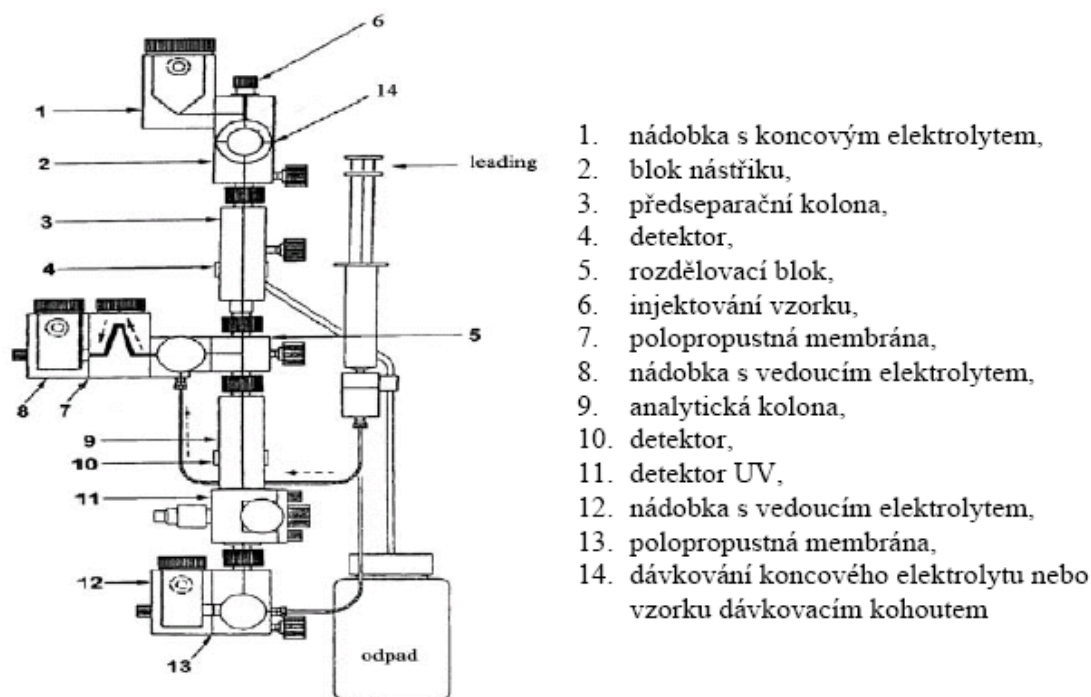
je tím vyšší, čím méně pohyblivé ionty se v zóně nacházejí. To znamená, že na pomalejší ionty působí větší hnací síla. Napěťový gradient se od zóny k zóně mění skokem, takže společný protiion R migruje v jednotlivých zónách se vzrůstající rychlostí a přenáší stále větší náboj. Protože celkový hnací proud musí být ve všech zónách stejný, dochází k přizpůsobení koncentrací v jednotlivých zónách vzhledem ke koncentraci vedoucího elektrolytu.

## 2.1.1. OBECNÁ INSTRUMENTACE

### ZDROJ NAPĚTÍ

Napěťový zdroj je konstruován jako ampérostat, konstantní hodnota proudu je udržována regulací napětí. Celkový odpor systému v průběhu separace roste (separační kapilára e postupně zaplňuje málo vodivým koncovým elektrolytem). Při běžně užívaných koncentracích vodícího elektrolytu (0,01 M) bývá počáteční napětí kolem 2 kV a postupně vzrůstá na 4 – 6 kV podle typu použitého koncového elektrolytu. Hnací proudy se v závislosti na průřezu kapiláry pohybují mezi 20 – 500  $\mu\text{A}$ . Napájecí zařízení je vybaveno napěťovou ochranou, která automaticky vypne obvod v případě, že odpor v separační kapiláře nadměrně vzroste (bublina v kapiláře).

Obr. 2– Schéma dvoukolonového ITP analyzátoru



1. nádobka s koncovým elektrolytem,
2. blok nástřiku,
3. předseparační kolona,
4. detektor,
5. rozdělovací blok,
6. injektování vzorku,
7. polopropustná membrána,
8. nádobka s vedoucím elektrolytem,
9. analytická kolona,
10. detektor,
11. detektor UV,
12. nádobka s vedoucím elektrolytem,
13. polopropustná membrána,
14. dávkování koncového elektrolytu nebo vzorku dávkovacím kohoutem

### SEPARAČNÍ KAPILÁRA

Používají se kapiláry z plastu (většinou teflonu) z důvodu minimalizace osmotického toku, který působí rušivě na ostrost rozhraní jednotlivých zón. K minimalizaci vlivu elektroosmózy jsou používány přísady neionogenních tenzorů (např. polyvinylalkoholu, hydroxyethylcelulózy) do vedoucího elektrolytu. Tenzid se adsorbuje na fázovém rozhraní, oddělí od sebe nábojové vrstvy a tím sníží hustotu náboje v povrchové vrstvě elektrolytu. Tenzid zároveň zvyšuje viskozitu elektrolytu, čímž přispívá ke stabilizaci zón. Separační kapacita kapiláry závisí na její délce a jejím průřezu.

## DETEKTOR

K detekci se využívá fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých separovaných zón. Z výše popsaného principu izotachoforetické separace vyplývá, že v jednotlivých zónách se postupně skokem zvyšuje napěťový gradient, roste výkon a tím i teplota v jednotlivých zónách a klesá koncentrace. Toho lze využít k univerzální detekci jednotlivých zón na konci separační kapiláry. Mohou se proto používat např. detektory potenciometrické, spektrofotometrické, teplotní nebo konduktometrické.

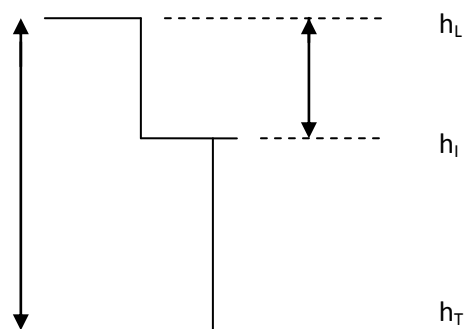
Nejběžnější je *detektor konduktometrický*, který měří vodivost v jednotlivých zónách. Elektrody jsou umístěny proti sobě a ostrost detekce je zajištěna tím, že jejich rozměr ve směru podélné osy kapiláry je velmi malý.

### 2.1.2. ZPŮSOBY VYHODNOCENÍ

#### KVALITATIVNÍ ANALÝZA

Kvalitativní vyhodnocení záznamů univerzálních detektorů je analogické s vyhodnocením chromatogramů. Určuje se relativní poloha (výška schodu) vzhledem k poloze vedoucího a koncového elektrolytu.

$$h_{rel} = \frac{h}{h_T}$$



Tato relativní výška se porovnává s relativními výškami zón látek, jejichž přítomnost ve vzorku předpokládáme. Potvrzením identity je přidavek standardu stanovované složky ve vzorku – identická zóna se vzhledem k ostatním zónám prodlouží.

#### KVANTITATIVNÍ ANALÝZA ANALÝZA

Nejčastěji se používají dva typy metod:

**Metoda kalibračního grafu** – je to metoda nejpoužívanější, kdy se připraví sada roztoků se známým množstvím stanovované látky, sestojí se kalibrační křivka a hodnota hledané veličiny neznámého vzorku se odečte z grafu.

**Metoda standardního přídávku** – délka zóny  $l_x$  původního vzorku se srovnává s délkou zóny po přidavku standardu  $x$  do vzorku. Pro původní vzorek platí:

$$C_x = c$$

Přidavkem standardu o objemu  $V_s$  a koncentraci  $c_s$  ke vzorku o objemu  $V_p$  a koncentraci  $c_p$  vznikne roztok o koncentraci:

$$C_{x,s} = \frac{r \cdot \frac{V_p}{p} + \frac{V_s}{s}}{\frac{V_p}{p} + \frac{V_s}{s}} = \dots$$

Vydělením rovnic a úpravou získáme vztah pro koncentraci  $c_x$  v původním vzorku:

$$C_x = \frac{l_x \cdot \frac{V_s}{s}}{l_x \cdot \frac{V_s}{s} + \dots}$$

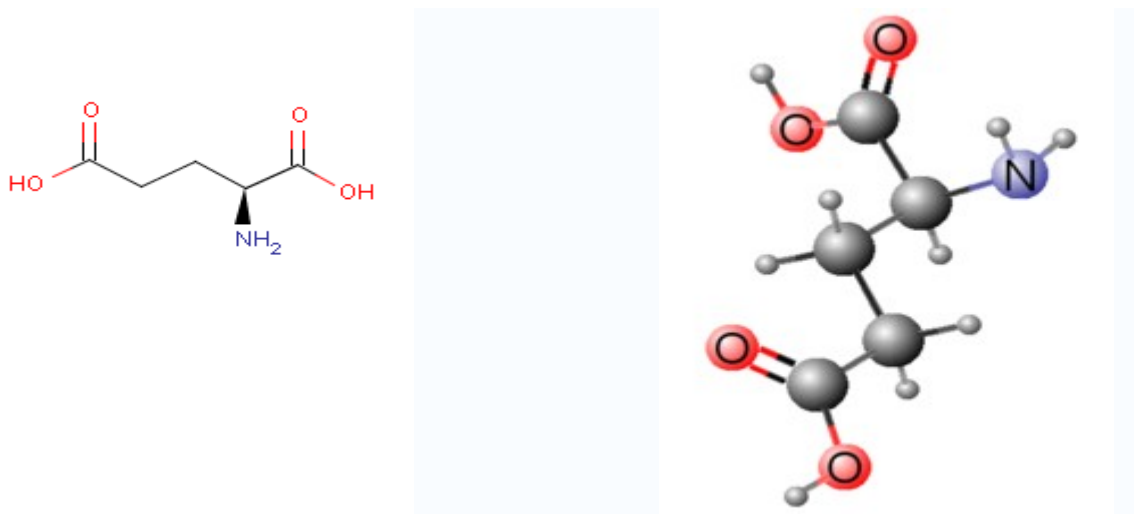
Vynesemím hodnot po jednotlivých přidávcích do grafu lze postupovat jako v předcházejícím případě. Určitým problémem zůstává správné odečtení délek jednotlivých zón. Rozhraní nejsou absolutně ostrá, schodovitý záznam závislosti vodivosti nebo potenciálového gradientu na čase není přesně pravouhlý, sestupné části mají sigmoidní charakter. Proto se délka vlny určuje jako vzdálenost dvou sousedních inflexních bodů. S výhodou lze použít záznamu derivační křivky, kde poloha inflexu je vyznačena maximem na derivační křivce.

## 2.2. STANOVENÍ KYSELINY GLUTAMOVÉ A GLUTAMÁTŮ

### 2.2.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA KYSELINY GLUTAMOVÉ A GLUTAMÁTŮ

Kyselina L-glutamová  $C_5H_9NO_4$  (symbol Glu nebo E) je kódovaná glukogenní neesenciální aminokyselina. V potravinářství se označuje kódem E 620. Její soli se nazývají glutamany (glutamáty).

Obr.3 – vzorec kyseliny glutamové a model kyseliny L-glutamové (kyseliny L-2-aminopentandiové)



Vzhledem k přítomnosti dvou karboxylových skupin v molekule vykazuje kyselina L-glutamová slabě kyselou reakci; proto se řadí ke kyselým aminokyselinám spolu s kyselinou L-asparagovou. Protože má v molekule jedno chirální centrum, uhlíkový atom, k němuž je připojena karboxylová a aminová skupina, existuje

kyselina glutamová ve dvou stereoizomerech, jako kyselina L-glutamová a kyselina D-glutamová, které mají stejné fyzikální vlastnosti s výjimkou optické aktivity. V živých organismech se však vyskytuje pouze L-forma. Její barnatá a zinečnatá sůl jsou špatně rozpustné ve vodě, čehož se využívá k jejímu dělení od směsi jiných aminokyselin.

Glutamany (glutamáty) jsou ochucovadla (tj. látky chuťové a povzbuzující) přidávaná do celé řady potravin jako koření. Při požívání ve větším množství jsou škodlivá, neměla by se vůbec dávat kojencům a dětem do 3 let.

E 620 Kyselina glutamová	E 623 Glutaman vápenatý
E 621 Glutaman sodný	E 624 Glutaman amonný
E 622 Glutaman draselný	E 625 Glutaman hořečnatý

Tyto látky se smějí používat jednotlivě nebo v kombinaci až do výše nejvyššího povoleného množství, počítáno jako kyselina glutamová. Při použití v kombinaci nesmí suma jejich množství překročit hodnotu nejvyššího povoleného množství (NPM). Přidatné látky, pro které není v této příloze stanoveno nejvyšší povolené množství číselnou hodnotou, lze použít při výrobě potravin v množství nezbytně nutném pro dosažení zamýšleného technologického účinku a při zachování zásad správné výrobní praxe (dále jen „nezbytné množství, NM). Použití látky přitom nesmí vést ke klamání spotřebitele.

Příloha č.1 k vyhlášce č. 298/1997 Sb.

Číslo E	Látka	Název potraviny	NPM mg.l <sup>-1</sup> , resp. Mg.kg <sup>-1</sup>
E 620 až 625	Kyselina glutamová	Potraviny obecně kromě nealkoholických nápojů	10 000
		Koření přípravky	NM
		Směsi koření se solí a glutamanem	NM

Glutamáty neboli soli kyseliny glutamové jsou však také přirozenou součástí mnoha potravin a v koncentraci 22 miligramů na 100 gramů ho najdeme dokonce i v mateřském mléce. Sójová omáčka obsahuje ve stejném množství 1090 miligramů a parmazán dokonce 1200 miligramů. Glutamát je v menším množství přítomen i v rajčatech (140 miligramů), v kuřecím a hovězím mase. Jedno vejce obsahuje 13 miligramů glutamátu. Lidské tělo obsahuje větší množství této sloučeniny, převážně však ve vázané podobě, například v kostech. Pouhých deset gramů je volných, z toho dva a půl gramu v mozku, kde slouží jako důležitý neurotransmitter.

Právě ona řídicí a přenosová úloha glutamátu v lidském mozku dává odborníkům důvod k obavám. Nevylučují, že by přebytek této látky mohl ovlivnit některé funkce našeho těla, například chuť k jídlu, pozornost, zrak nebo sexuální funkce. Oficiálně je glutamát považován za neškodnou látku. V USA je jako přídavek do potravin povolen od roku 1959, Evropská unie ho řadí k nejbezpečnějším aditivům. Stejně stanovisko vyjádřila i celá řada dalších kompetentních institucí. V poslední době se však množí zprávy o vedlejších účincích tohoto oblíbeného koření. Podle studie zveřejněné v roce 1997 způsobuje u citlivých osob bolesti hlavy, tuhnutí svalů, zarudnutí a pocit mravenčení nebo znecitlivění různých částí těla. Tyto příznaky mohou být doplněny bolestmi hlavy a křečemi a shodují se s takzvaným syndromem čínských restaurací, který poprvé popsal americký lékař Robert Ho Man Kwok v roce 1968. Za rizikový faktor se glutamát považuje u neurodegenerativních onemocnění, jako jsou roztroušená skleróza a Alzheimerova nebo Parkinsonova nemoc. Je pravděpodobné, že hematoencefalická bariéra, která u zdravých osob brání vstupu nevhodných látek do mozku, u takto postižených pacientů dobře nefunguje a glutamát poté zhoršuje celkové příznaky choroby.

Glutamát se ve větším rozsahu používá především do sáčkových polévek a dalších pokrmů určených k rychlé přípravě. Najdeme ho i v chipsech, šunce a dalších uzeninách. Na etiketě jsou glutamáty označovány čísly

E620 až E625, jindy se skrývají pod dalšími názvy, například zesilovač chuti, maltodextrin, pšeničný protein nebo kvasnicový výtažek. Obvyklé množství glutamátu v těchto potravinách činí 0,3 až 0,8 procenta, tedy 300 až 800 miligramů na 100 gramů. V talíři sáčkové polévky tedy můžete mít až 1500 miligramů glutamátu.

Podle některých studií podporuje glutamát zřejmě i chuť k jídlu a může být jedním z faktorů vedoucích k obezitě. Pokusná zvířata se po požití glutamátu často pustila do jídla, i když předtím byla nasycena. Podobný efekt lze pozorovat dokonce i u rostlin. S přípravkem k posílení růstu rostlin používaným v USA pod názvem AuxiGro lze prý dosáhnout výrazně vyšší úrody brambor nebo mrkve. Tento růstový stimulant obsahuje volné glutamové kyseliny

## 2.2.2. PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ

### POSTUP:

#### 2.2.2.1. PŘÍPRAVA VEDOUCÍHO A KOCOVÉHO ELEKTROLYTU

##### 1. VEDOUCÍ ELEKTROLYT: $2 \cdot 10^{-2}$ M histidin + $2 \cdot 10^{-2}$ M histidinchlorid + 1% HEC (pH = 5,5 – 6,5)

Vypočítáme navážky  $2 \cdot 10^{-2}$  M histidinu a  $2 \cdot 10^{-2}$  M histidinchloridu do 250 ml odměrné baňky, rozpustíme je v kádince asi ve 200ml vody a poté přidáme 50 ml 1% HEC (hydroxyethyl-celulóza), který si předem připravíme do 50 ml odměrné baňky (20 - 30 minut rozpouštíme v ultrazvukové lázni). Po rozpuštění všech látek, roztok kvantitativně převedeme do odměrné baňky o objemu 250 ml. Doplníme odměrnou baňku po rysku. V případě nutnosti upravíme elektrolyt před doplněním po rysku odplyněním v ultrazvukové lázni.

##### 2. KONCOVÝ ELEKTROLYT: $5 \cdot 10^{-3}$ M kyselina morfolinethansulfonová – MES

Koncový roztok připravíme navážením a rozpuštěním předem vypočítaného množství MES v destilované vodě do 250 ml odměrné baňky, doplníme po rysku destilovanou vodou. Důkladného promíchání dosáhneme odplyněním v ultrazvukové lázni. pH neupravujeme, je adjustováno protiiontem z vedoucího elektrolytu.

#### 2.2.2.2. PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ

K přípravě kalibračních roztoků použijeme zásobní roztok 10 mM kyseliny glutamové. Vypočítáme navážku zásobního roztoku kyseliny askorbové do 50 ml odměrné baňky, navážíme a navážku rozpustíme v přibližně 25 ml destilované vody, kvantitativně převedeme do odměrné baňky na 50 ml a doplníme po rysku. V případě nutnosti upravíme elektrolyt před doplněním po rysku odplyněním v ultrazvukové lázni.

Z tohoto roztoku připravíme 0,0 mM, 0,4 mM, 0,8 mM a 1,2 mM kalibrační roztoky do 25 ml odměrných baněk, které použijeme pro naměření kalibrační křivky.

### 2.2.3. MĚŘENÍ KALIBRAČNÍCH ZÁVISLOSTÍ

#### POSTUP:

Podle návodu k obsluze připravíme přístroj k měření. Zvolíme optimální metodu a pomocí programu ITPWin provedeme analýzu. Získané výsledky graficky zpracujeme a spočítáme množství kyseliny glutamové v neznámém vzorku.

Kvantitativní stanovení kyseliny askorbové se provádí pomocí kapilárního elektroforetického analyzátoru EA 100 upraveného na EA 102. V horní koloně systému dochází k předseparaci vzorku a v koloně spodní, separační, probíhá vlastní rozdělení a konduktometrická i UV detekce složek vzorku.

#### Návod k obsluze kapilárního elektroforetického analyzátoru EA 102

##### 1. PŘÍPRAVA PŘÍSTROJE

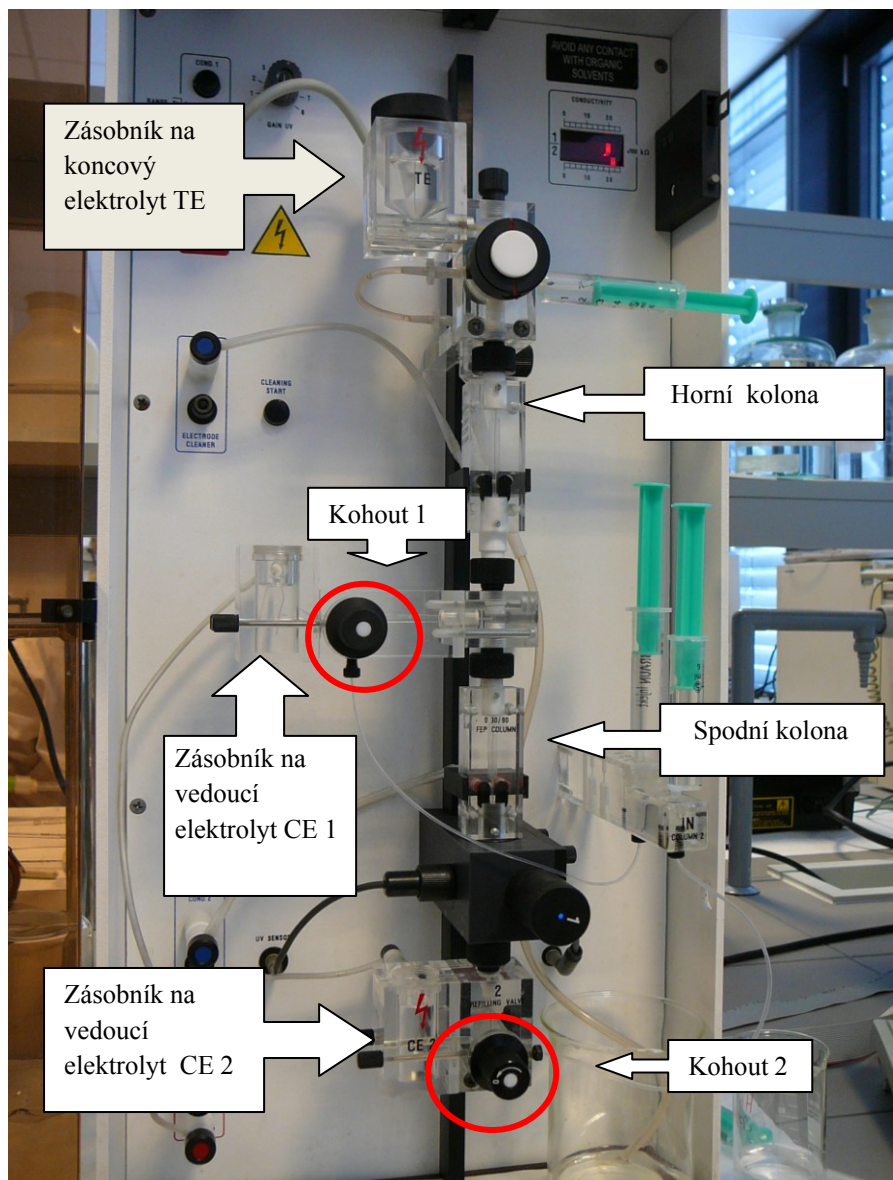
Před začátkem práce je nutné celý systém **promýt** destilovanou vodou:

- destilovanou vodou naplníme rezervoáry *TE*, *CE 1* a *CE 2*,
- injekční stříkačku s destilovanou vodou vložíme do otvoru *IN column 2*, otevřeme kohout **2** a mírným přerušovaným stlačováním injekční stříkačky proplachujeme spodní kolonu. Během tohoto proplachování musí být kohout **1** uzavřený a dávkovací kohout je v poloze **A**. Průtok kontrolujeme tak, že voda nám hadičkou proudí do odpadu. Injekční stříkačku po proplachu nevyndáváme a pod tlakem pomalu kohout **2** uzavřeme.
- druhou injekční stříkačku také naplněnou destilovanou vodou umístíme do otvoru *IN column 1*, otevřeme kohout **1** a opět mírným přerušovaným stlačováním propláchneme horní kolonu. Zkontrolujeme, zda máme dávkovací kohout stále v poloze **1** a kohout **2** musí zůstat samozřejmě zavřený. Pod tlakem kohout **1** uzavřeme. Obě kolony jsou nyní naplněny destilovanou vodou.

**!POZOR: Rezervoáry jsou od kolony odděleny pomocí tenkých membrán, příliš velký tlak při plnění by mohl způsobit jejich protržení, proto tyto činnosti provádíme opatně a jemně !**

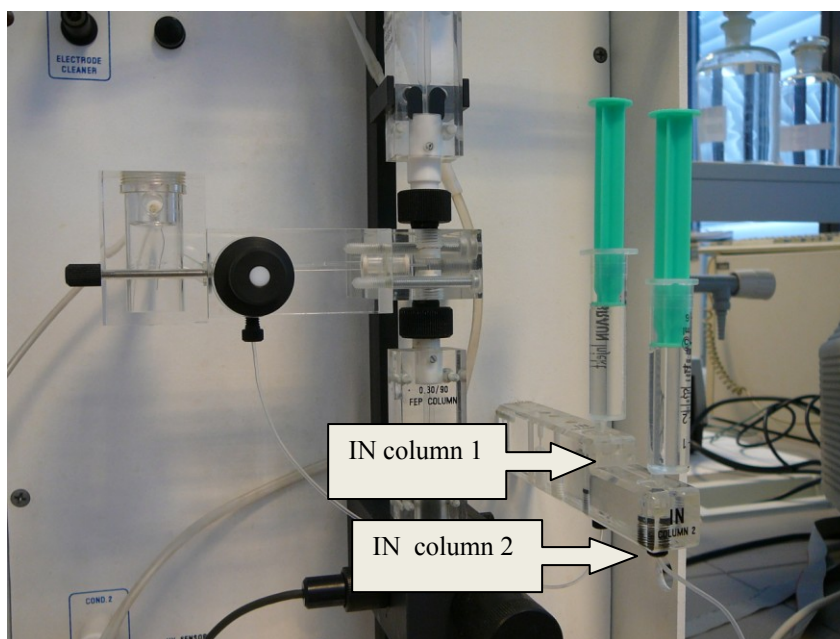
- propláchnutí dávkovacího kohoutu provedeme tak, že při naplněném rezervoáru *TE* otočíme dávkovací kohout do polohy **B** a sledujeme, zda voda odtéká do odpadu. V případě, že neodtéká, rezervoár uzavřeme a pomocí prázdné injekční stříkačky vytvoříme mírný přetlak.
- nyní, když máme celou kolonu propláchnutou destilovanou vodou, odsajeme ji z rezervoárů *CE 1* a *CE 2* pomocí prázdné injekční stříkačky se zúženým nástavcem. Z kolony ji odstraníme tak, že vyndáme obě stříkačky s destilovanou vodou ze střední části kolony, vyprázdníme je a vložíme je zpět na původní místa „naplněné vzduchem“ (kohouty **1** a **2** jsou uzavřené). Dávkovací kohout máme opět v poloze **A** a při mírném přerušovaném stlačování injekční stříkačky v otvoru *IN column 2* pomalu odstraňujeme destilovanou vodu ze spodní kolony (kohout **1** je uzavřený). Voda nám proudí do odpadu. Kohout **2** uzavřeme a za otevřeného kohoutu **1** uděláme totéž i s horní kolonou a injekční stříkačkou vloženou do otvoru *IN column 1*. Rezervoár *TE* vyprázdníme pootočením dávkovacího kohout do polohy **B** (zároveň tím kohout promyjeme).



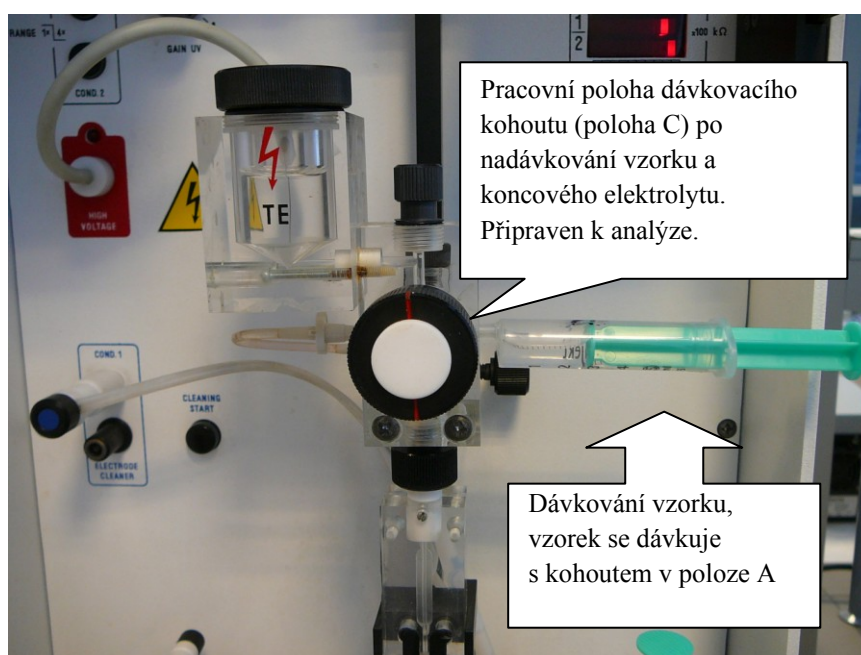
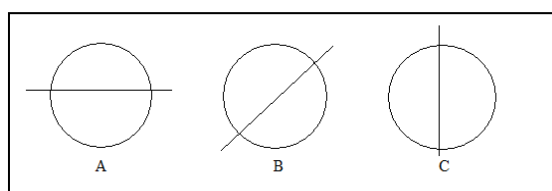


## 2. PLNĚNÍ A PŘÍPRAVA NA ANALÝZU

- koncovým elektrolytem naplníme horní rezervoár *TE* tak, aby byla ponořena elektroda (dávkovací kohout v poloze *A*). Pootočením do polohy *B* necháme malé množství odtéct do odpadu, kvůli eliminaci možných vzduchových bublin (neteče-li použijeme přetlak) a kohout vrátíme do polohy *A*.
- rezervoáry *CE 1*, *CE 2* naplníme vedoucím elektrolytem, dáváme pozor aby se nevytvořili bublinky.
- jednu injekční stříkačku naplníme dostatečným množstvím vedoucího elektrolytu a umístíme do otvoru *IN column 2*. Stejně jako při proplachování kolonu naplníme (kohout *1* je zavřený) a pod tlakem kohout *2* uzavřeme. Musíme zkontrolovat, zda nám v kapiláře ve spodní koloně nezůstaly žádné vzduchové bublinky. Znemožnily by sepnutí elektrického obvodu. Injekční stříkačku po celou dobu práce nevyndáváme. V případě vzniku bublinek je buď pulzně odstraníme nebo v horším případě znovu „promyjeme vzduchem“ a opět naplníme elektrolytem.
- do otvoru *IN column 1* dáme druhou injekční stříkačku naplněnou vedoucím elektrolytem, kohout *1* otevřeme a pomalu plníme. Po naplnění kohout opět pod tlakem uzavřeme. Máme-li v systému bublinky, postupujeme stejně jako v předchozím bodu. Pomocí krytů všechny rezervoáry zašroubujeme.

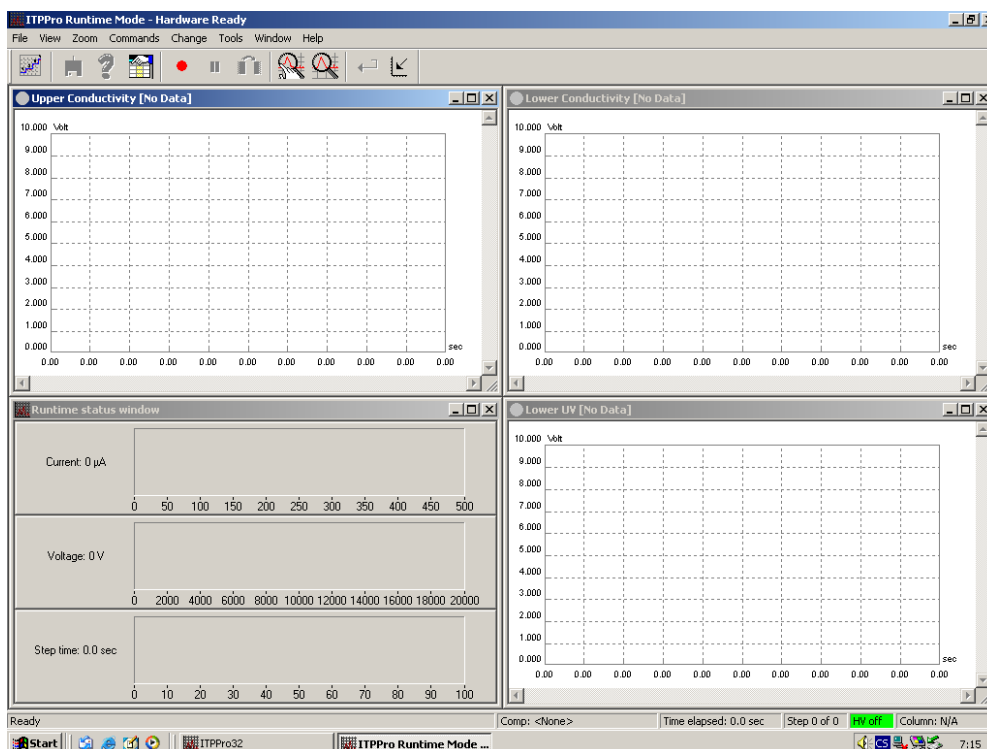


POLOHY DÁVKOVACÍHO KOHOUTU:

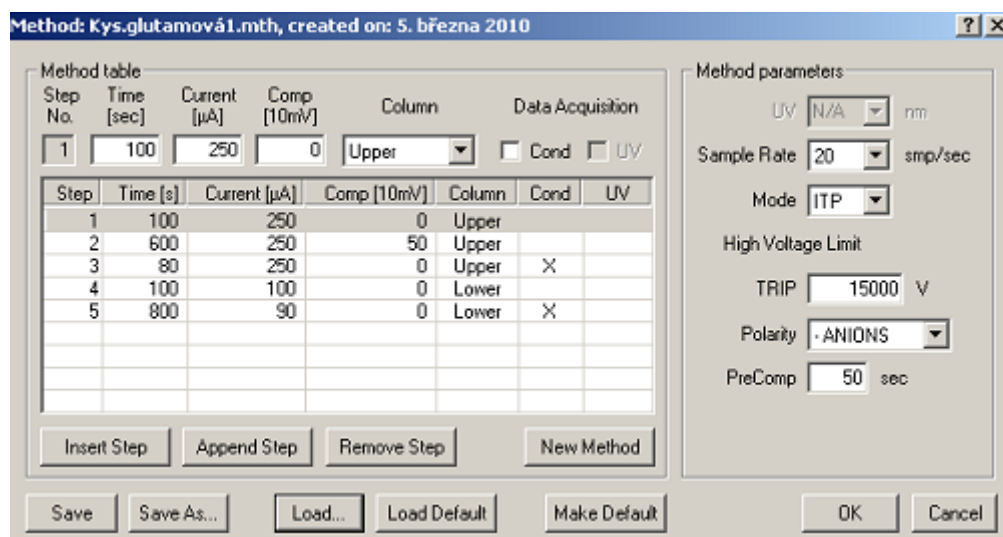


### 3. PŘÍPRAVA ŘÍDÍCÍHO POČÍTAČE A INJEKTÁŽ VZORKU

- zkontrolujeme připojení jednotky EA 102 a řídicího počítače do sítě. Na izotachoretickém přístroji zapneme spínač umístěný vzadu vlevo dole. Naskočí displej vodivosti (v horní pravé části panelu).
- zapneme řídicí počítač, není-li zapnut a spustíme program *ITPWin* umístěný na ploše počítače. Otevře se nám okénko *Main ITPWin Window*, kde zvolíme *RUN*:



- naskočí nám měřící okno, kde v horní nabídce vybereme *METHOD* a zvolíme metodu *KYSELINA GLUTAMOVÁ 1*. Zkontrolujeme zadané hodnoty nastavení časů a napětí:



- připravený vzorek nasajeme do injekční stříkačky a vsuneme do otvoru v horní části separační jednotky (vede do dávkovacího kohoutu). Dávkovací kohout máme v poloze *A* a malé množství vzorku prostříkneme do odpadu. Nyní máme naplněn objem 30µl. Dávkovací kohout pootočíme do polohy *B* a sledujeme zda v zásobníku *TE* ubývá elektrolyt, po pár mim přepneme do polohy *C*. Teď je systém připraven pro analýzu.

- e) dávkovací kohout máme tedy v pracovní poloze a zavřeme dvířka přístroje. Spustíme analýzu příkazem **START**. Rozsvítí se červená kontrolka **HIGH VOLTAGE** signalizující zapnuté napětí.

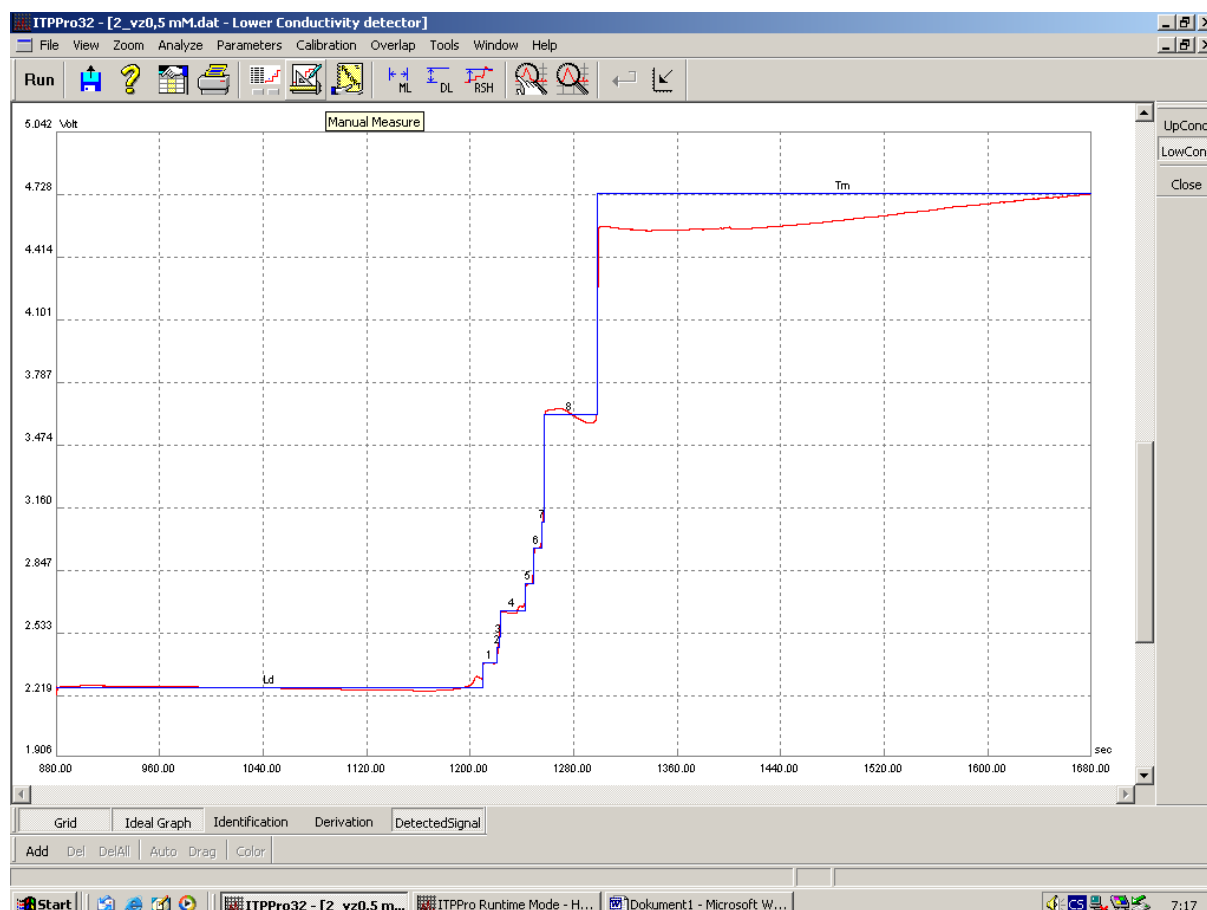
**!POZOR: Neotvírejte dvířka při probíhající analýze (při svítící kontrolce **HIGH VOLTAGE**)!**

**!POZOR:** V případě, že se v systému vyskytují bublinky, se analýza nerozběhne a počítač nás upozorní, je třeba systém opětovně propláchnout vedoucím elektrolytem a znovu nadávkovat vzorek.

**!POZOR: Po doběhnutí analýzy otevřeme dvířka a dávkovací kohout musíme vrátit do polohy **A**!**

#### 4. PRŮBĚH ANALÝZY

- a) v prvním kroku probíhá předseparace v horní koloně (**Upper**), na obrazovce se objeví postupující čas velikost proudu a velikost napětí. Zároveň se zaznamenává konduktometrická křivka detektorem umístěným na horní koloně
- b) po přepnutí na dolní kolonu (**Lower**) se objeví podobný panel s odlišnými parametry. Po skončení analýzy se program automaticky zastaví a zeptá se na uložení. Dávkovací kohout otočíme zpět do polohy **A** a připravíme pro další analýzu. Naměřená data tedy uložíme a později zpracujeme.



#### 5. PŘÍPRAVA OPAKOVANÉ ANALÝZY

- a) dávkovací kohout máme v poloze **A**, obě kolony propláchneme stejným způsobem jako při naplnění kolony. Na propláchnutí kolony stačí přibližně 2 ml vedoucího elektrolytu z injekčních stříkaček.

- b) nadávkujeme vzorek, pootočíme dávkovací kohout do polohy **B**, necháme odtéct trochu koncového elektrolytu a otočíme do pracovní polohy **C**. V horním panelu spustíme **START**.

**!POZOR:** Před každým dávkováním vzorku injekční stříkačku propláchneme destilovanou vodou, kontrolujeme zda se nám do kolony nedostali bublinky!

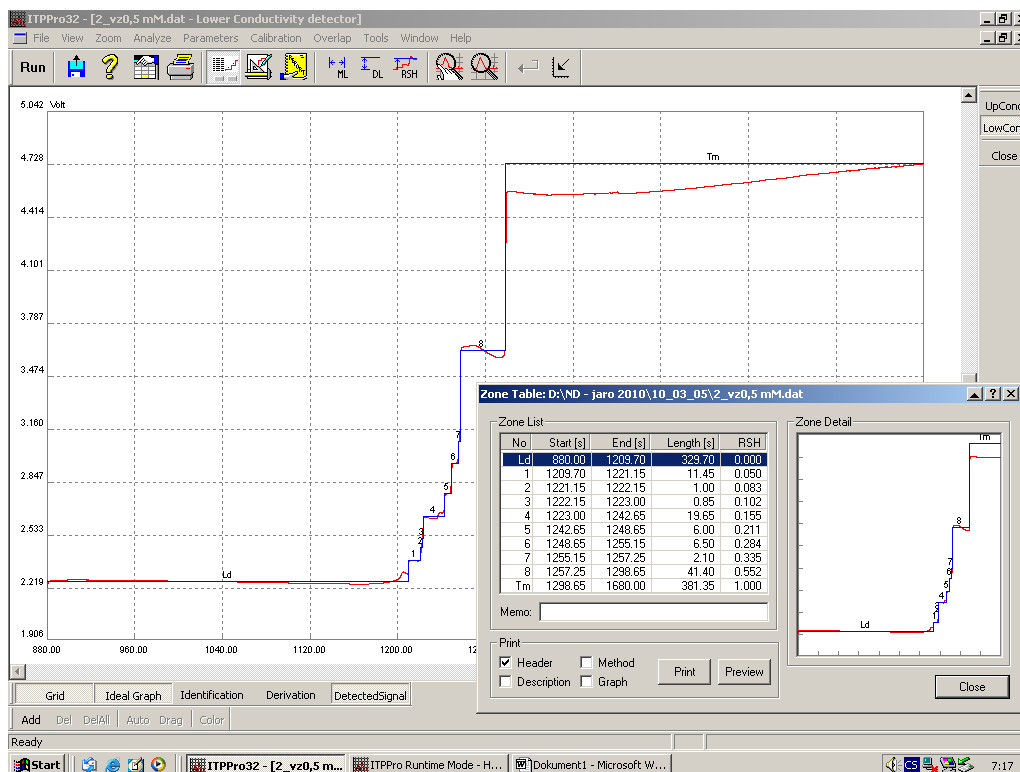
## 6. UKONČENÍ ANALÝZY

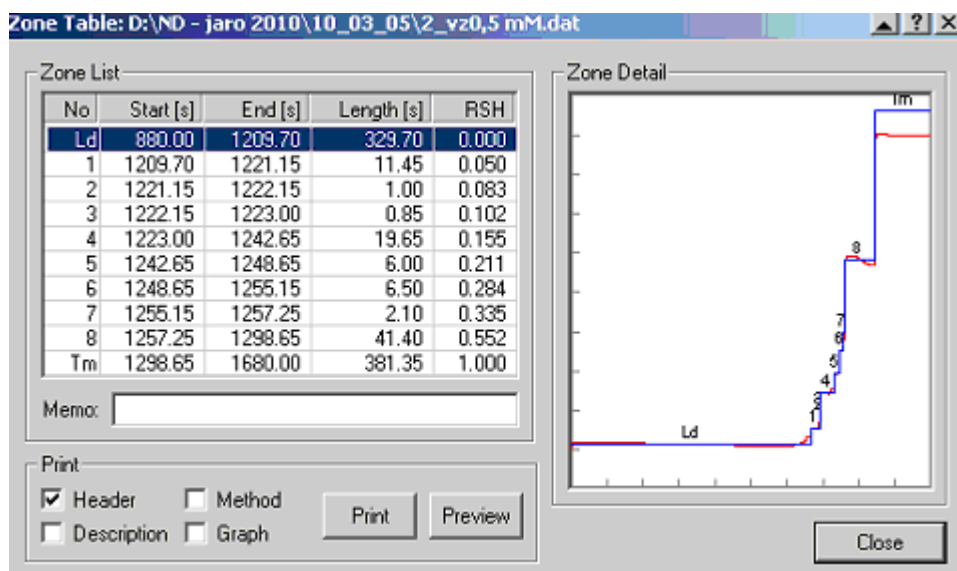
- po naměření poslední analýzy vypneme spínač na zadní straně
- roztoky z rezervoárů odsajeme a z kolony je pod tlakem prázdnými injekčními stříkačkami vytlačíme do odpadu, poté promyjeme destilovanou vodou stejně jako v předchozích případech
- všechny použité injekční stříkačky propláchneme destilovanou vodou a uložíme. Odpad z nádobky vylejeme a pomocí krytů zašroubujeme všechny rezervoáry.

**!POZOR:** Celý systém zůstane naplněný destilovanou vodou.

## 7. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

- tlačítkem **RUN** přepneme na vyhodnocení a v hlavní liště vybereme naměřený soubor.
- po zobrazení grafu označíme ve spodní nabídce **IdealGraph** (grafem se proloží ideální tvar a číselným označením píků). V horní nabídce **ANALYZE** zvolíme **ZoneTable** a zobrazí se nám tabulka s čísly píků, pro pík odpovídající kyselině askorbové odečteme délku (Length).





- c) do grafu vynášíme délku píku v závislosti na koncentraci kyseliny askorbové. Množství neznámého vzorku získáme pomocí kalibrační přímky z rovnice regrese.

## 2.2.5. VYHODNOCENÍ ANALÝZY

Při vyhodnocení použijeme **metodu kalibrační křivky**. Každý bod v kalibrační křivce proměříme 2x. Neznámý vzorek kyseliny glutamové změříme 2, identifikujeme zónu kyseliny glutamové a kvantifikujeme ji.

Do závěru uvedeme:

1. **Hodnoty nalezených množství kyseliny glutamové zaokrouhlené na platný počet míst, tabulky a grafy.**
2. **Srovnání deklarovaného obsahu kyseliny glutamové v neznámém vzorku s obsahem námi zjištěným, zdůvodnění rozdílů.**
3. **Zdůvodnění možného chybného stanovení, zhodnocení případných problémů během analýzy.**