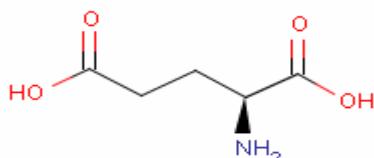
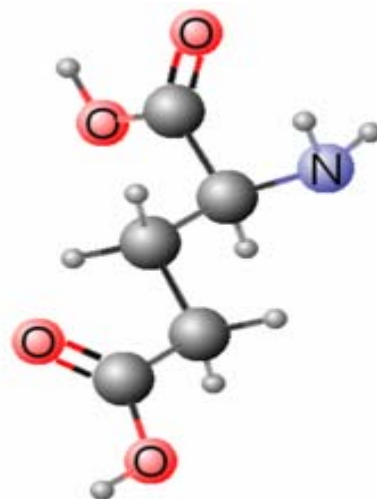


ITP

Stanovení kyseliny glutamové



Kyselina glutamová



Model molekuly kys. L-glutamové

Kyselina L-glutamová (symbol *Glu* nebo *E*) je kódovaná glukogenní neesenciální aminokyselina. V potravinářství se označuje kódem E 620. Její soli se nazývají glutamany (glutamáty). Jsou to ochucovadla („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.

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.

IZOTACHOFORÉZA

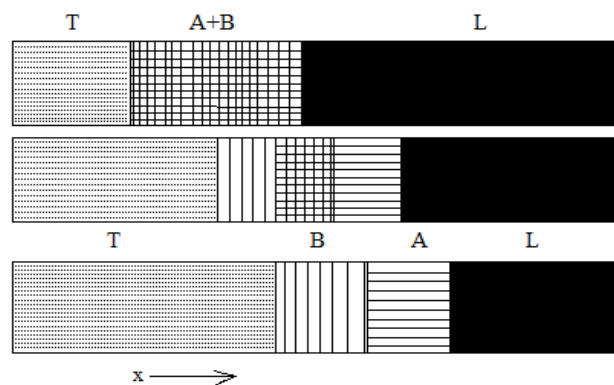
Úvod

Izotachoforéza 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). Pro jejich výběr platí:

$$u_L > u_{ief} > u_T$$

Během jedné analýzy mohou být separovány pouze ionty jednoho znaménka, buď anionty nebo kationty. Izotachoforetický proces začne probíhat po připojení systému k elektrickému poli. Hodnoty konstantního proudu se pohybují v řádu desítek μA .

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, 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 je tím vyšší, čím méně pohyblivé ionty se v zóně nacházejí. To znamená, že na pomalejší ionty působí větší hnací síla.

Analýza kyseliny glutamové

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

ÚKOL

1. Změřit kalibrační křivku (každý bod měřen 1x)
2. Změřit neznámý vzorek kyseliny glutamové (měřit 2 – 3x)
3. Identifikovat zónu kyseliny glutamové a kvantifikovat

POSTUP

1) Příprava vedoucího a koncového elektrolytu

Vedoucí elektrolyt: vypočítáme navážky $2 \cdot 10^{-2}$ M histidinu a $2 \cdot 10^{-2}$ M histidinchloridu do 250 ml, rozpustíme je v kádince asi ve 200ml vody a pak přidáme 50 ml 1% HEC (hydroxyethyl-celulóza) a doplníme do 250 ml odměrné baňky.

Koncový elektrolyt ($5 \cdot 10^{-3}$ M kyselina morfolinethansulfonová – MES): připravíme do 250ml odměrné baňky rozpuštěním předem vypočítaného množství MES v destilované vodě. pH neupravujeme, je adjustováno protiiontem z vedoucího elektrolytu.

2) Příprava kalibračních roztoků

K přípravě kalibračních roztoků použijeme zásobní roztok 10mM kyseliny glutamové. Z tohoto roztoku připravíme 0mM; 0,2mM; 0,4mM; 0,6mM; 0,8mM; 1mM roztoky kyseliny glutamové, které použijeme pro naměření kalibrační křivky.

3) Vlastní měření

Podle přiloženého návodu připravíme přístroj k měření. Zvolíme optimální metodu (v našem případě metodu určí vyučující) a pomocí programu ITPWin provedeme analýzu. Získané výsledky graficky zpracujeme a spočítáme množství kyseliny glutamové v neznámém vzorku.

Návod k obsluze kapilárního elektroforetického analyzátoru EA 100

1. Příprava přístroje

Před začátkem práce je nutné celý systém promýt destilovanou vodou:

- a) destilovanou vodou naplníme rezervoáry TE, CE 1 a CE 2
- b) injekční stříkačku s destilovanou vodou vložíme do otvoru IN column 2, otevřeme kohout 2 a mírným přerušovaným stlačováním injekční stříkačky proplachujeme spodní kolonu.

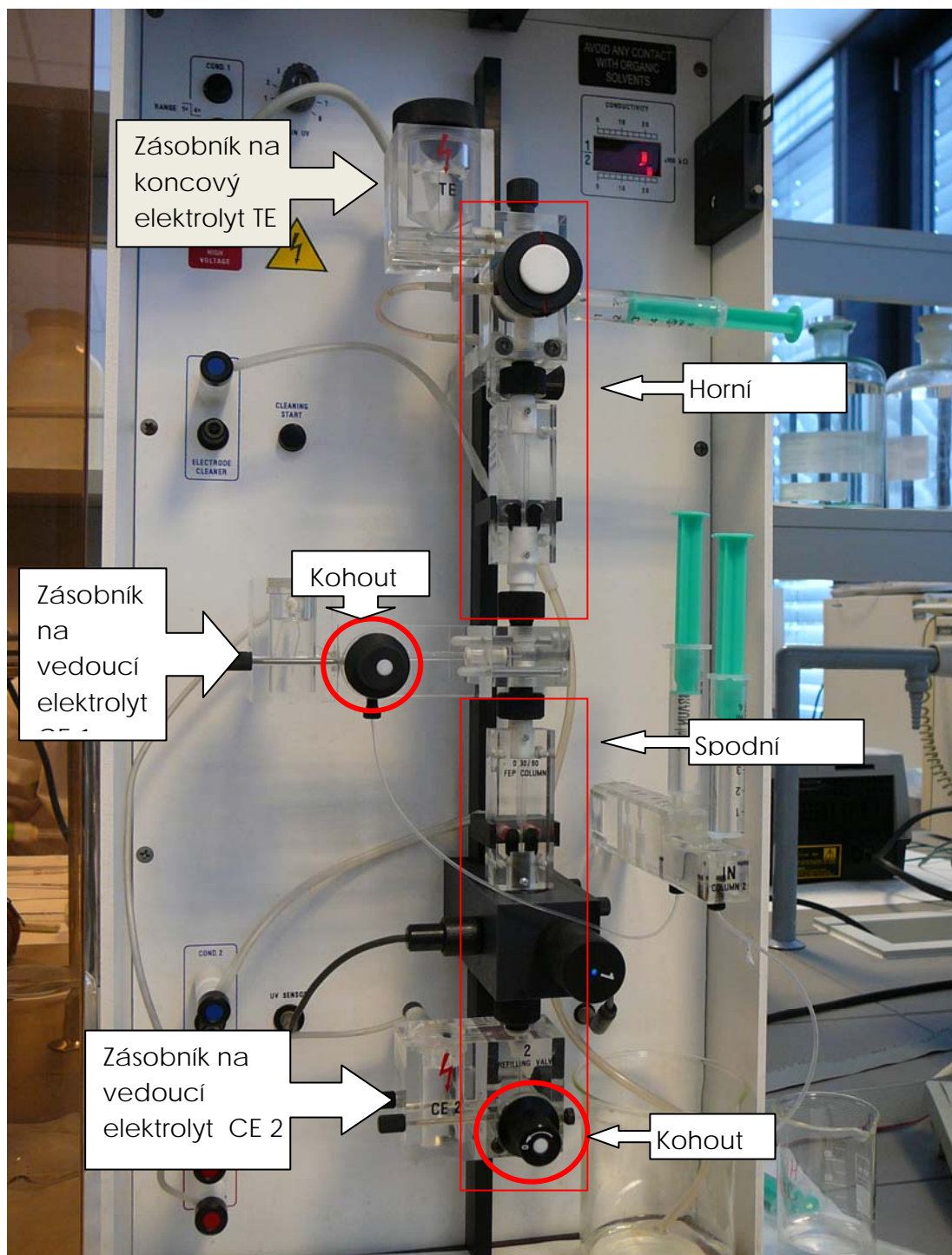
Během tohoto proplachování musí být kohout 1 uzavřený a dávkovací kohout je v poloze A. Průtok kontrolujeme tak, že voda nám hadičkou proudí do odpadu. Injekční stříkačku po proplachu nevyndáváme a pod tlakem pomalu kohout 2 uzavřeme.

c) druhou injekční stříkačku též s 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 vodou.

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

d) 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.

e) 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).

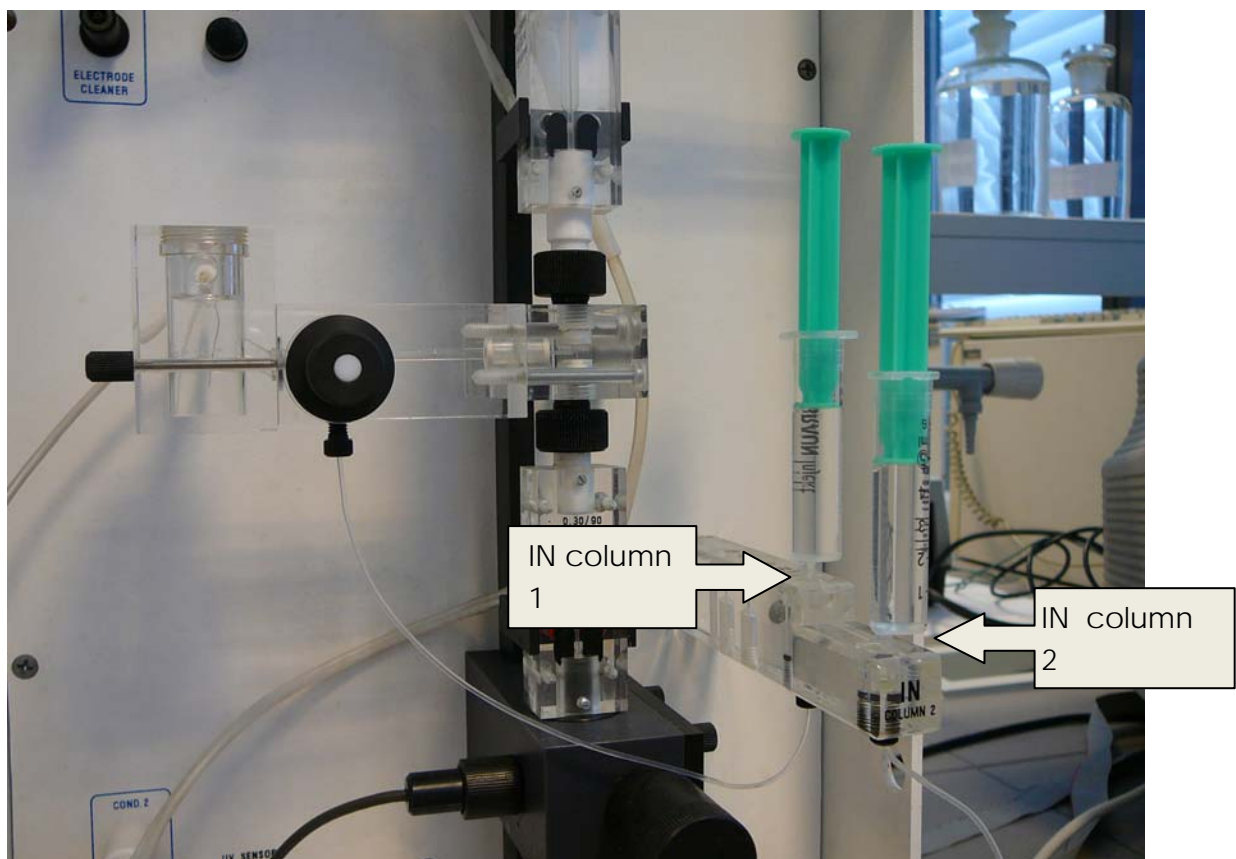


2. Plnění a příprava na analýzu

- a) koncovým elektrolytem naplníme horní rezervoár TE tak, aby byla ponořena elektroda (dávkovací kohout je 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.
- b) rezervoáry CE 1, CE 2 naplníme vedoucím elektrolytem, dáváme pozor aby se nevytvořili bublinky.

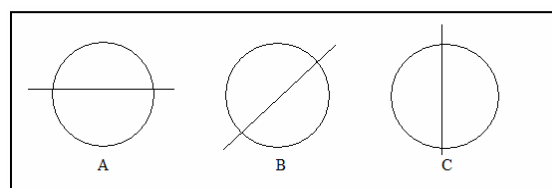
c) jednu injekční stříkačku naplníme dostatečným množstvím vedoucího elektrolytu a umístíme do otvoru IN column 2. Stejně jako při proplachování kolonu naplníme (kohout 1 je zavřený) a pod tlakem kohout 2 uzavřeme. Musíme zkontrolovat, zda nám v kapiláře ve spodní koloně nezůstaly žádné vzduchové bublinky. Znemožnily by sepnutí elektrického obvodu. Injekční stříkačku po celou dobu práce nevyndáváme. V případě vzniku bublinek je buď pulzně odstraníme nebo v nejhorším případě znovu „promyjeme vzduchem“ a opět naplníme elektrolytem.

d) 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.



!! Pozor na vzduchové bubliny!!

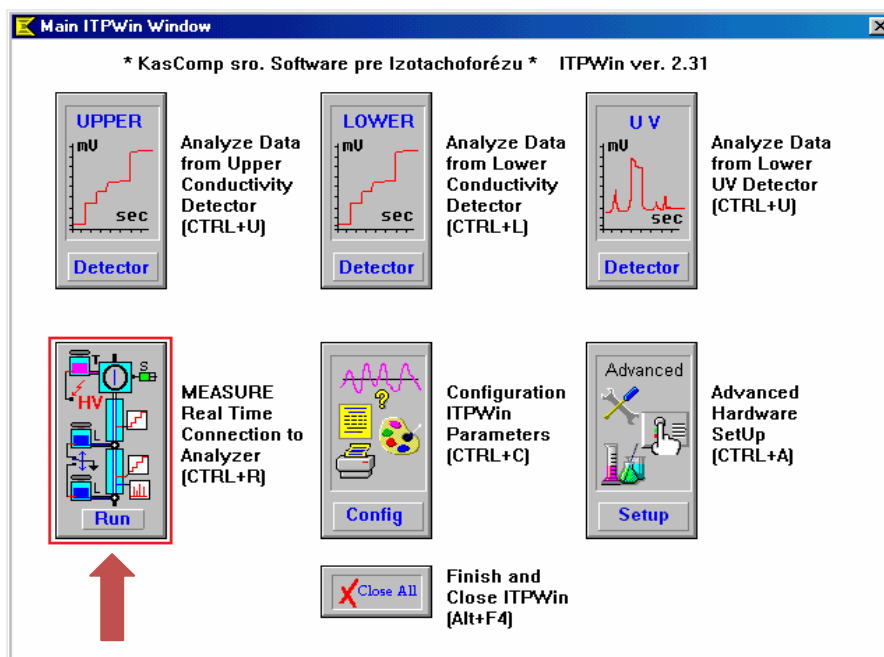
Polohy dávkovacího kohoutu



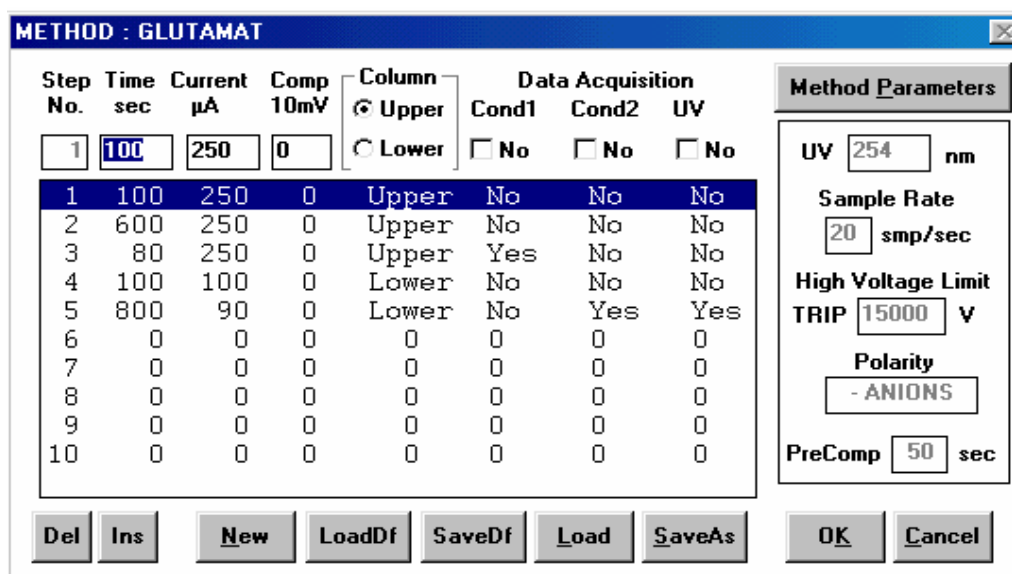


3. Příprava řídicího počítače a injekce vzorku

- a) zkontrolujeme připojení jednotky EA 100 a řídicího počítače do sítě. Na izotachforetickém přístroji zapneme spínač umístěný vzadu vlevo dole. Naskočí displej vodivosti.
- b) zapneme řídicí počítač, není-li zapnut a spustíme program ITPWin umístěný na ploše počítače. Otevře se nám okénko Main ITPWin Window, kde zvolíme MEASURE.



c) naskočí nám měřicí okno, kde v horní nabídce vybereme METHOD a zvolíme požadovanou metodu. V našem případě je to metoda GLUTAMAT



d) 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 mm 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.

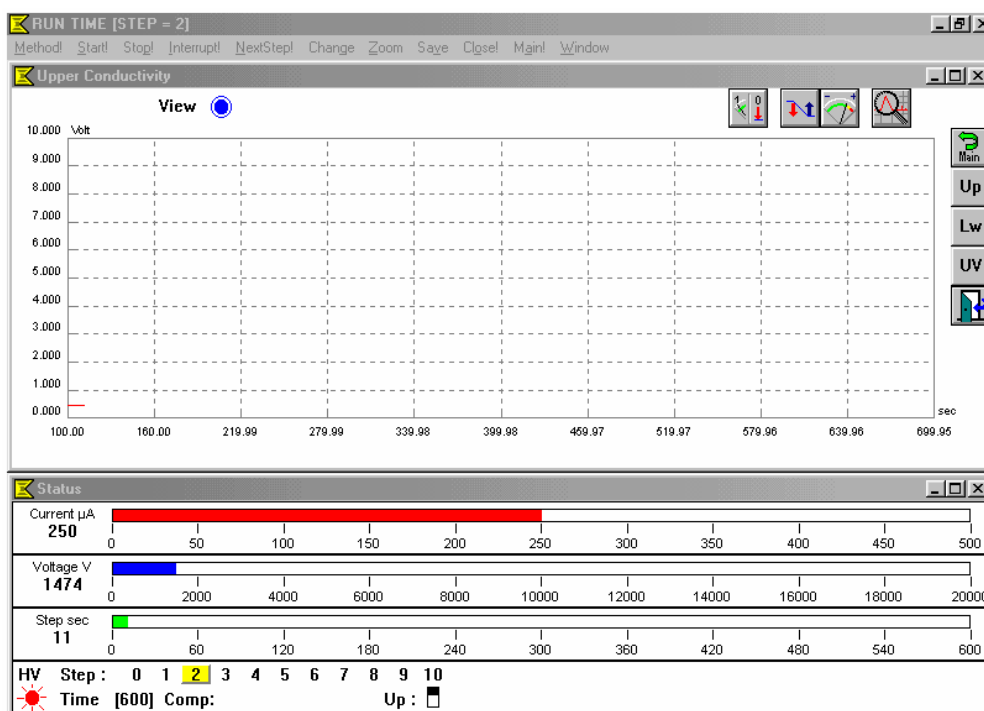
!! Zásadně neotvírejte dvířka při probíhající analýze (při svítící kontrolce HIGH VOLTAGE)!!

pozn. 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.

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

f) 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

g) 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.



4. 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. Nadávkujeme vzorek, pootočíme dávkovací kohout do polohy B, necháme odtéct trochu koncového elektrolytu a otočíme do pracovní polohy C. V horním panelu spustíme Start.

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

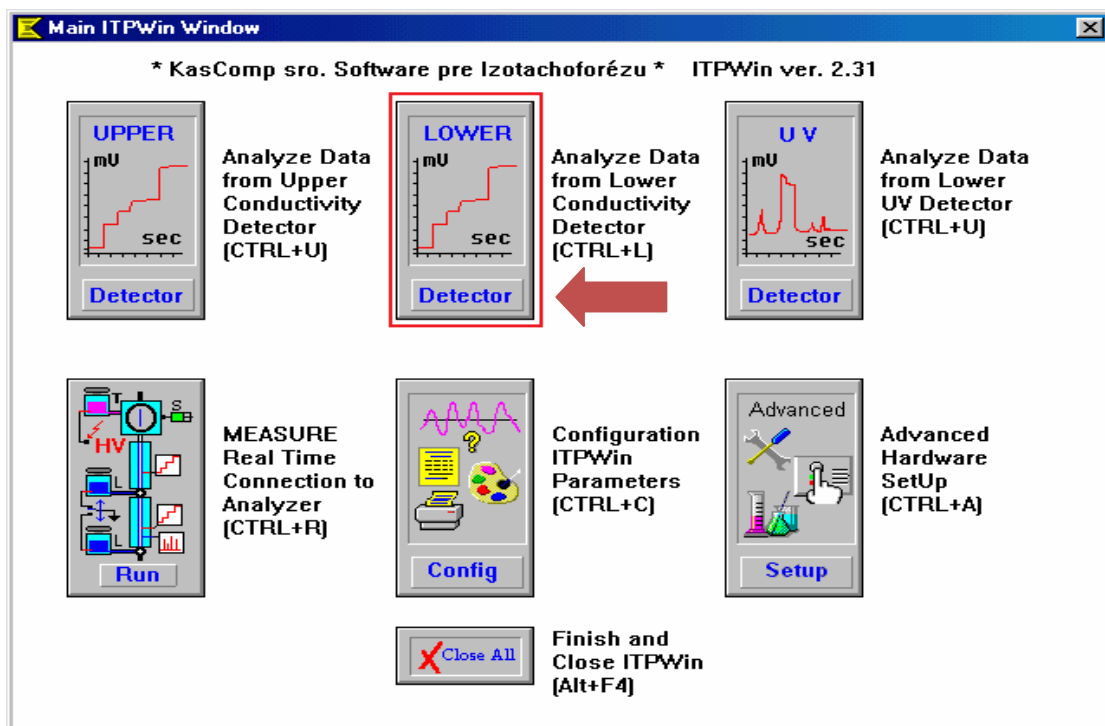
5. Ukončení analýzy

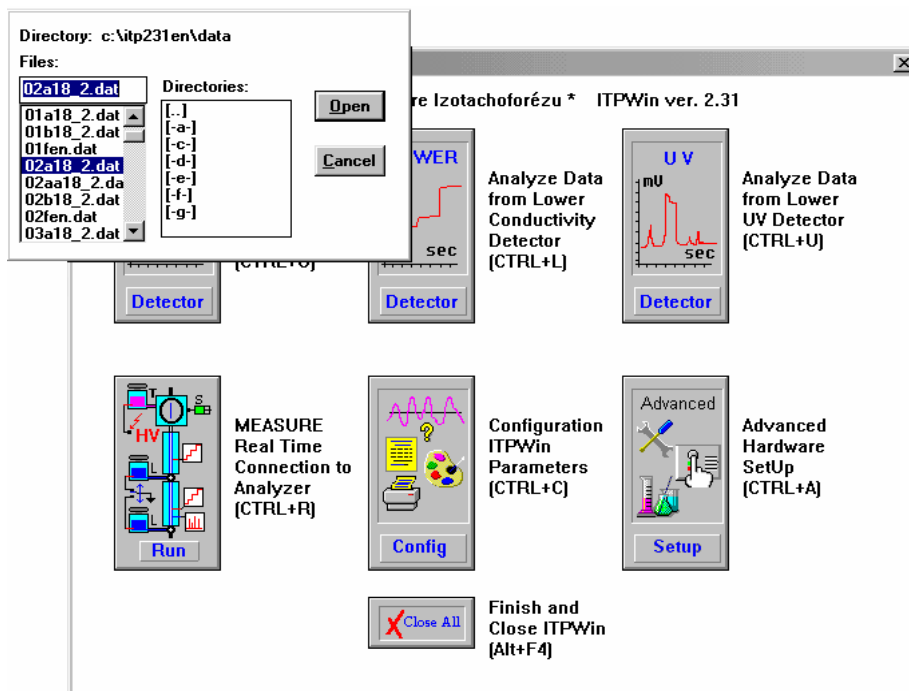
- a) po naměření poslední analýzy vypneme spínač na zadní straně
- b) roztoky z rezervoárů odsajeme a z kolony jej pod tlakem prázdnými injekčními stříkačkami vytlačíme do odpadu, poté promyjeme destilovanou vodou stejně jako v předchozích případech.
- c) všechny použité injekční stříkačky propláchneme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

pozn. Celý systém zůstane naplněný destilovanou vodou

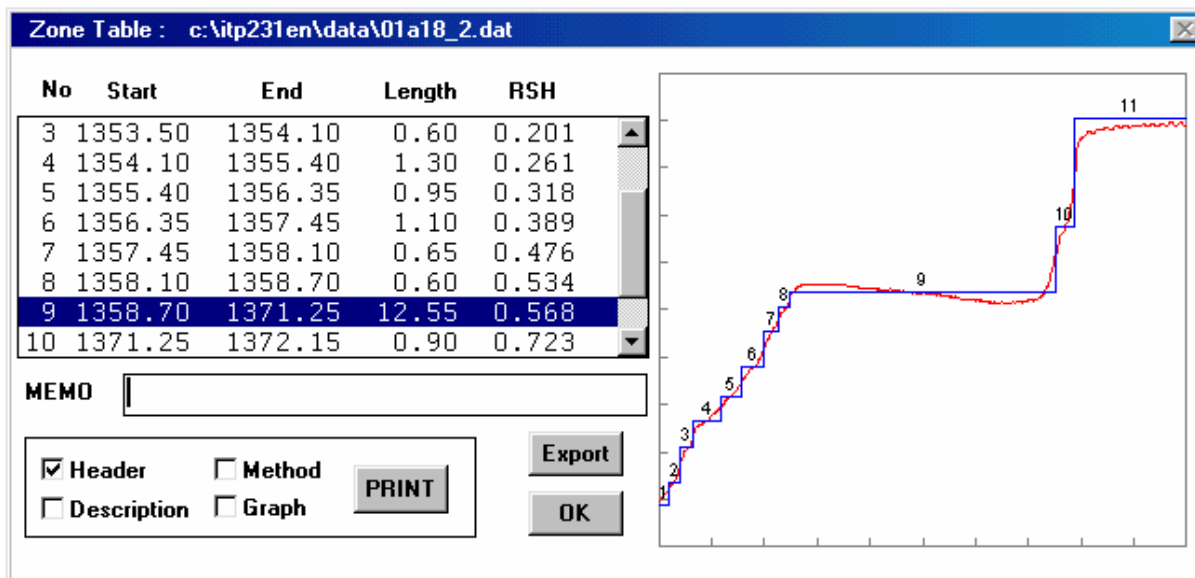
6. Vyhodnocení výsledků

- a) v hlavní nabídce otevřeme okno LOWER detektor a vybereme naměřený soubor.





b) po zobrazení grafu označíme ve spodní nabídce IdealGr (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 glutamové odečteme délku (Lenght).



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

