

ÚLOHA č.8

ITP (IZOTACHOFORÉZA)

Seznámení s metodou, stanovení kyseliny askorbové, citronové, benzoové a sorbové v ovoci, džusech a potravinářských doplňcích (vitamínových preparátech)

ÚKOLY:

- 8.1. Seznámení s metodou ITP
 - 8.1.1. Obecná instrumentace
 - 8.1.2. Způsoby vyhodnocení ITP
- 8.2. Stanovení kyseliny askorbové
 - 8.2.1. Obecná charakteristika kyseliny askorbové
 - 8.2.2. Příprava kalibračních roztoků.
 - 8.2.3. Měření kalibračních závislostí.
 - 8.2.4. Identifikace zóny kyseliny askorbové a kvantifikace kyseliny askorbové.
- 8.3. Vyhodnocení analýzy

Přístroje:

Kapilární elektroforetický analyzátor EA 100 upravený na EA 102

Chemikálie:

10 mM HCl, 20 mM β -alanin ($C_3H_7NO_2$, $M = 89,90 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), 0,1 % HPMC (hydroxypropylmethyl celuloza), 5 mM kyselina glutamová ($M = 147,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Sklo:

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 (3x), 100 ml (1x), 250 ml (3x), pipetování balónek, pipeta nedělená 10 ml (1x).

8.1. SEZNÁMENÍ S METODOU ITP

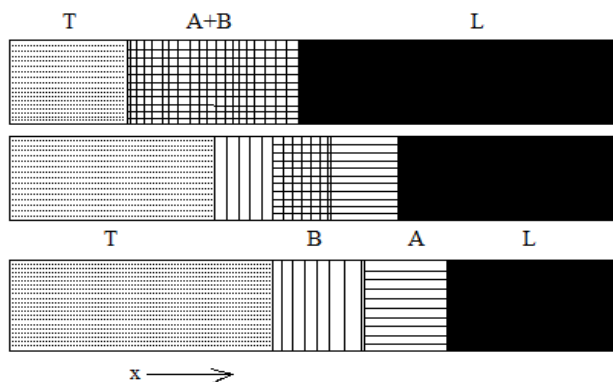
TEORIE:

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), 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 kationty. Izotachoforetický proces začne probíhat po připojení systému k elektrickému poli (stejnoseměrné napětí). 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).

$$v = u_L E_L = u_A E_A = u_B u_B = u_T E_T = konst.$$

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 protiproud 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.

8.1.1. 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 μ A. Napájecí zařízení je vybaveno napěťovou ochranou, která automaticky vypne obvod v případě, že odpor v separační kapiláře nadměrně vzroste (bublina v kapiláře).

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 přídavky 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.

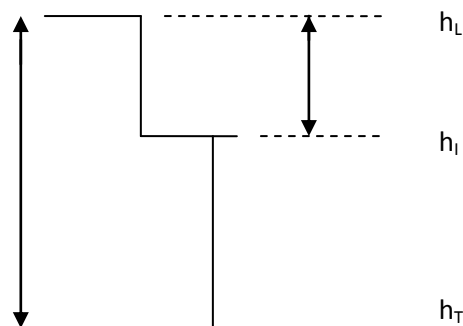
8.1.2. ZPŮSOBY VYHODNOCENÍ

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.

$$h_{rel} \left(\text{cm} \right) = \frac{h_I - h_L}{h_T - h_L}$$

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, sestrojí 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 přidávku standardu x do vzorku. Pro původní vzorek platí:

$$c_x = k \cdot l_x$$

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

$$c_{x,s} = \frac{c_x V_p + c_s V_s}{V_p + V_s} = k \cdot l_{x,s}$$

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

$$c_x = \frac{l_x \cdot c_s \cdot V_s}{V_p + V_s \cdot l_{x,s} - V_p \cdot l_x}$$

Vynesením hodnot po jednotlivých přidavcích 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 pravoúhlý, 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.

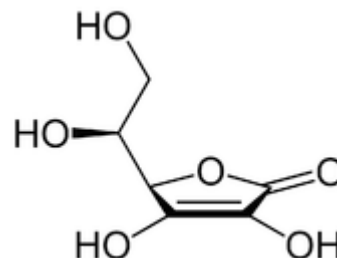
Kvantitativní stanovení kyseliny askorbové se provádí pomocí kapilárního elektroforetického analyzátoru EA 100 upraveného na EA 102. V horní koloně systému dochází k předseparaci vzorku a v koloně spodní, separační, probíhá vlastní rozdělení a konduktometrická i UV detekce složek vzorku.

8.2. STANOVENÍ KYSELINY ASKORBOVÉ

8.2.1. OBECNÁ CHARAKTERISTIKA KYSELINY ASKORBOVÉ

Kyseliny benzoová, sorbová a askorbová jsou významná konzervační činidla, která jsou přidávána do potravin z důvodu prodloužení jejich trvanlivosti. Obsahy těchto látek jsou deklarovány státními normami a jejich použité množství je uvedeno na obalech výrobků. Pomocí izotachoforetického analyzátoru lze kontrolovat obsahy těchto konzervačních látek. Vedle těchto konzervovadel lze stanovit také obsah kyseliny citronové, u analýz nápojů je možné kyselinu citronovou předem stanovit na předseparační koloně.

Vitamín C je ve vodě rozpustná živná látka (živina) a vitamín nezbytný k životu a udržení tělesného zdraví, v lidském těle plní vitamín C mnoho důležitých funkcí. Je citlivý na teplo a vysoce citlivý na oxidaci. Jeho přesný chemický název je kyselina L-askorbová neboli L-enantiomer (optický izomer, optický antipod) kyseliny askorbové, její sumární vzorec je $C_6H_8O_6$.



Chemicky byl vitamín C poprvé izolován v roce 1928 maďarským biochemikem, laureátem Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství z roku 1937 Albertem Szent-Györgyi, tehdy pod názvem kyselina hexuronická. V roce 1942 Charles Glen King z Pittsburské univerzity dokázal, že se jedná o stejnou chemickou látku, která je obsažena například v ovoci a zabraňuje kurdějím (nezávisle na něm a přibližně ve stejné době k tomuto objevu dospěl i Albert Szent-Györgyi). Sir Walter Norman Haworth z Birminghamské univerzity, držitel Nobelovy ceny za chemii z roku 1937, dokázal jako první vypracovat přesnou chemickou strukturu vitamínu C a vyrobit ho syntetickou cestou. Doporučená denní dávka vitamínu C je 75 mg.

8.2.2. PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ

POSTUP:

8.2.2.1. PŘÍPRAVA VEDOUCÍHO A KOCOVÉHO ELEKTROLYTU

1. VEDOUCÍ ELEKTROLYT: 10 mM HCl + 20 mM β -alanin + 0,1 % HPMC (pH = 3,6)

Do kádinky na 100 ml naplněné asi 50 ml destilované vody napipetujeme tolik konc. HCl, aby její výsledná

koncentrace po převedení obsahu kádinky do 250 ml odměrné baňky byla 10 mM, a přidáme vypočítanou navážku 0,02 M β -alaninu. Po rozpuštění všech látek přidáme 20 ml 0,1 % HPMC a roztok kvantitativně převedeme do odměrné baňky o objemu 250 ml. V případě nutnosti upravíme elektrolyt před doplněním po rysku odplyněním v ultrazvukové lázni. Doplníme odměrnou baňku po rysku

2. KONCOVÝ ELEKTROLYT: 5 mM kyselina glutamová

Koncový roztok připravíme navážením kyseliny glutamové do 100 ml odměrné baňky, doplníme po rysku. Důkladného promíchání dosáhneme odplyněním v ultrazvukové lázni. pH neupravujeme, je adjustováno protiiontem z vedoucího elektrolytu.

8.2.2.2. PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ

K přípravě kalibračních roztoků použijeme zásobní roztok 10 mM kyseliny askorbové. Kyselina askorbová se musí připravovat vždy čerstvá. Vypočítáme navážku zásobního roztoku kyseliny askorbové do 100 ml odměrné baňky, navážíme a navážku rozpustíme v přibližně 50 ml destilované vody, kvantitativně převedeme do odměrné baňky na 100 ml a doplníme po rysku.

Z tohoto roztoku připravíme 0,25 mM, 0,50 mM a 0,75 mM kalibrační roztoky do 25 ml odměrných baněk, které použijeme pro naměření kalibrační křivky.

8.2.3. 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 askorbové v neznámém vzorku.

Návod k obsluze kapilárního elektroforetického analyzátoru EA 102

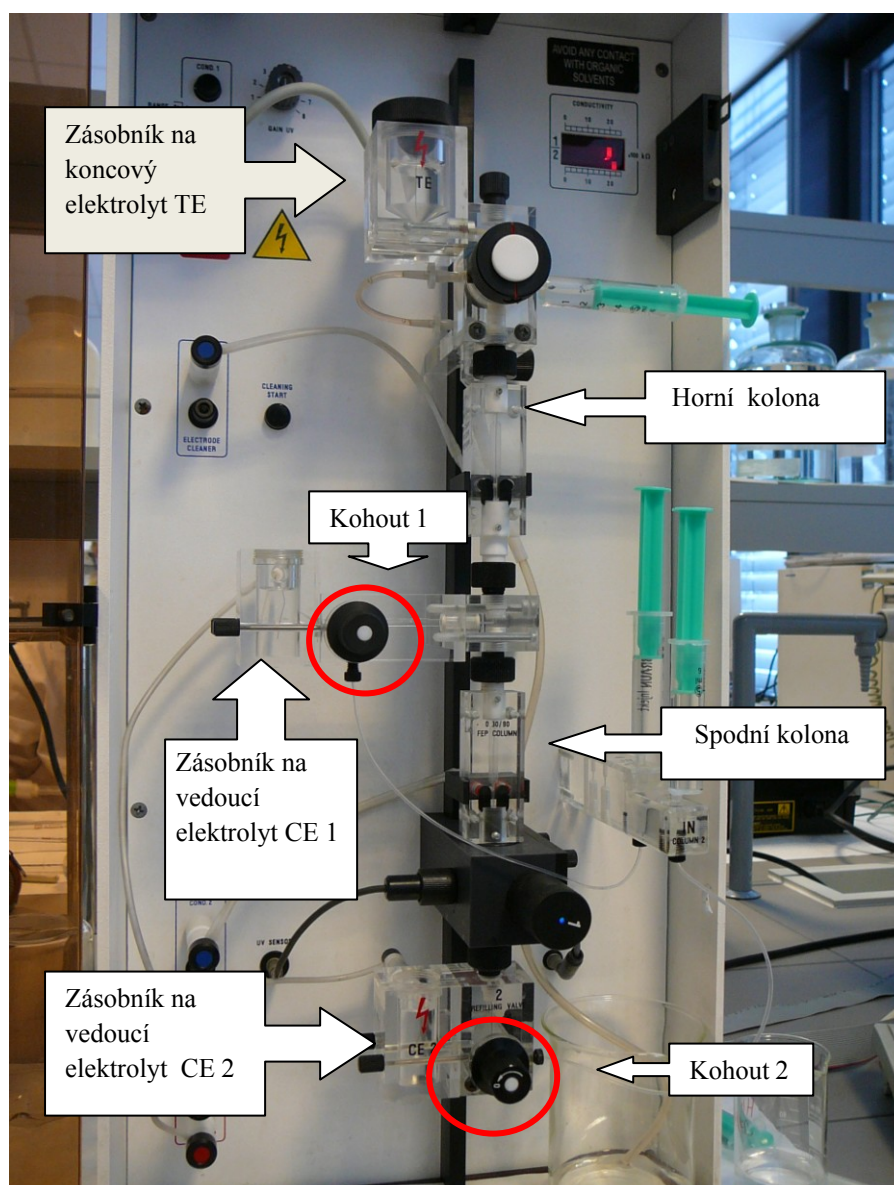
1. PŘÍPRAVA PŘÍSTROJE

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.

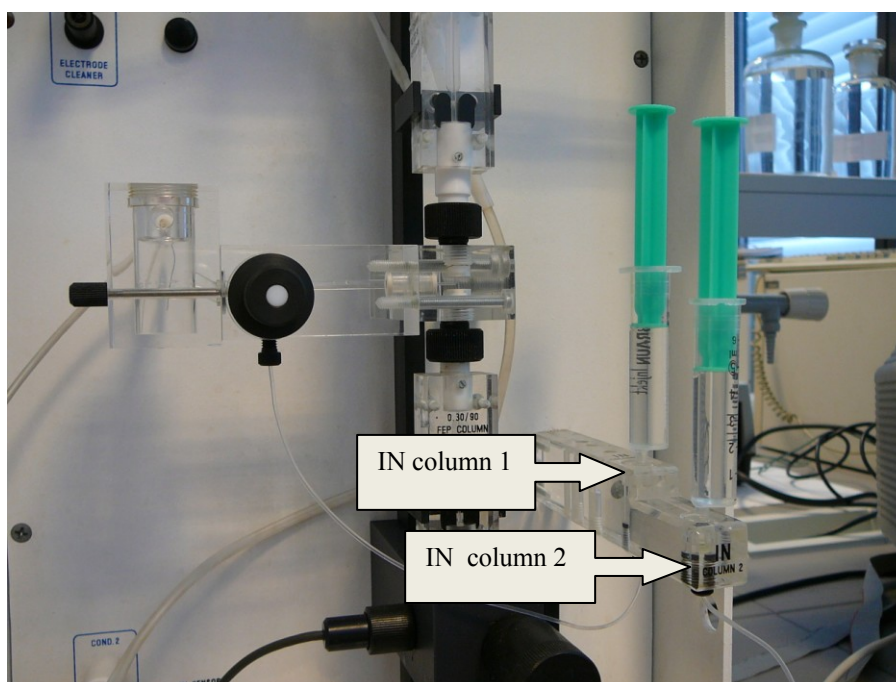
!POZOR: Rezervoáry jsou od kolony odděleny pomocí tenkých membrán, příliš velký tlak při plnění by mohl způsobit jejich protržení, proto tyto činnosti provádíme opatrně a jemně !

- 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).

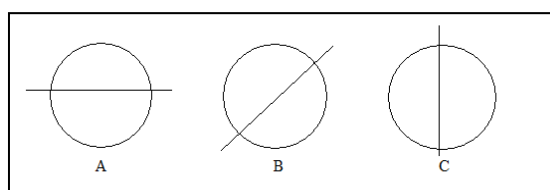


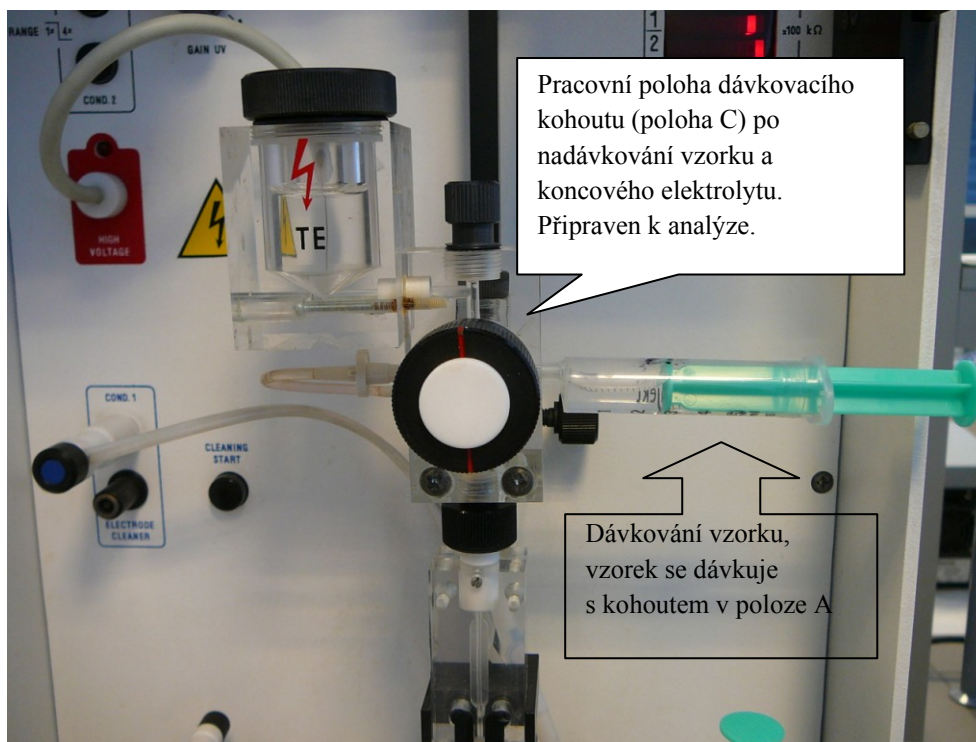
2. PLNĚNÍ A PŘÍPRAVA NA ANALÝZU

- 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 horším 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.



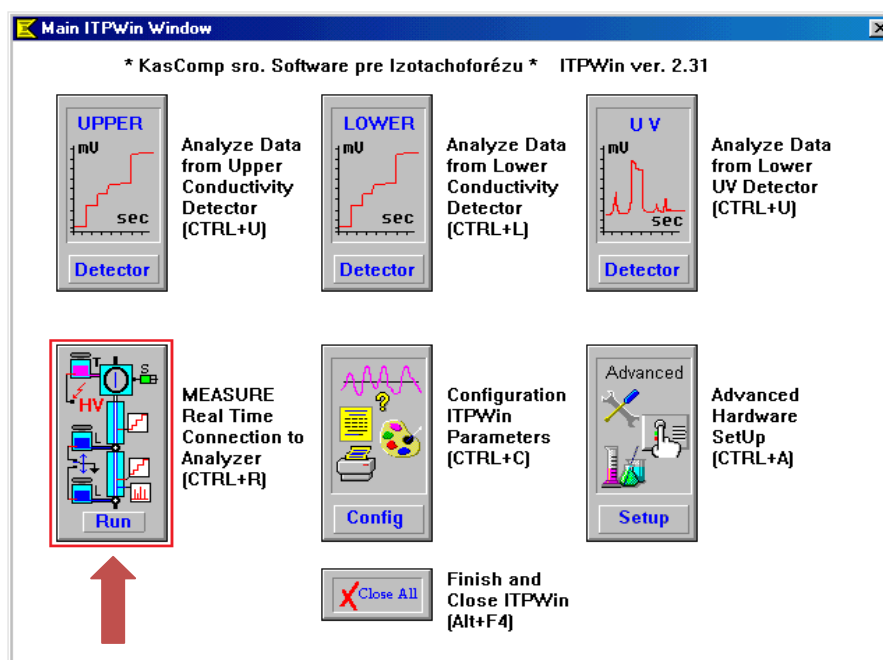
POLOHY DÁVKOVACÍHO KOHOUTU:





3. PŘÍPRAVA ŘÍDÍČÍHO POČÍTAČE A INJEKTÁŽ VZORKU

- a) zkontrolujeme připojení jednotky EA 102 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.

METHOD : GLUTAMAT

Step No.	Time sec	Current μ A	Comp 10mV	Column	Data Acquisition		
				<input checked="" type="radio"/> Upper <input type="radio"/> Lower	Cond1	Cond2	UV
1	100	250	0	Upper	No	No	No
2	600	250	0	Upper	No	No	No
3	80	250	0	Upper	Yes	No	No
4	100	100	0	Lower	No	No	No
5	800	90	0	Lower	No	Yes	Yes
6	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0

Method Parameters

UV nm

Sample Rate smp/sec

High Voltage Limit TRIP V

Polarity

PreComp sec

Del Ins New LoadDf SaveDf Load SaveAs OK Cancel

- 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 30 μ l. 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.

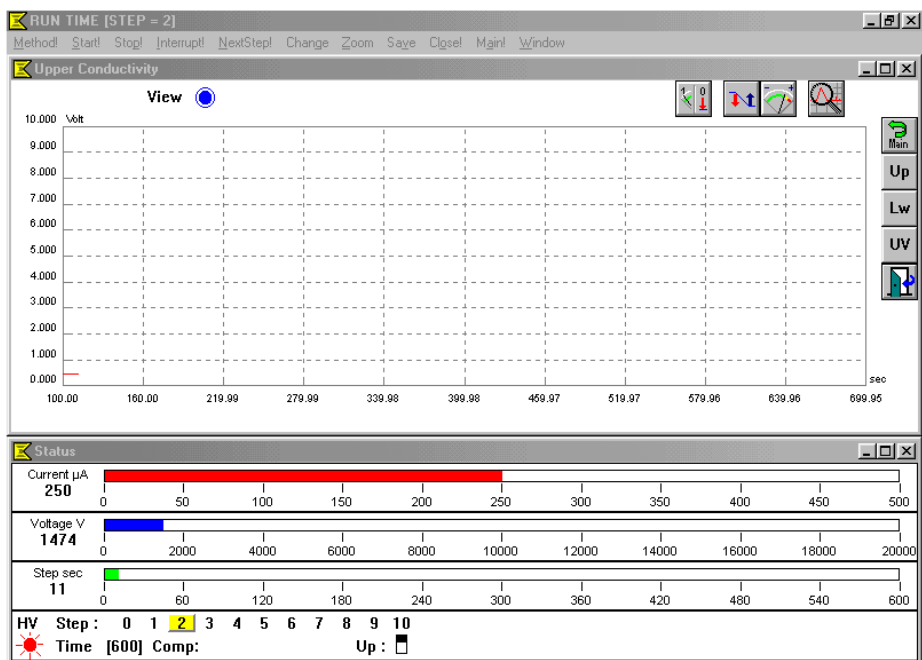
!POZOR: Neotvírejte dvířka při probíhající analýze (při svítící kontrolce *HIGH VOLTAGE*)!

!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.



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. Nadávkuje 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!

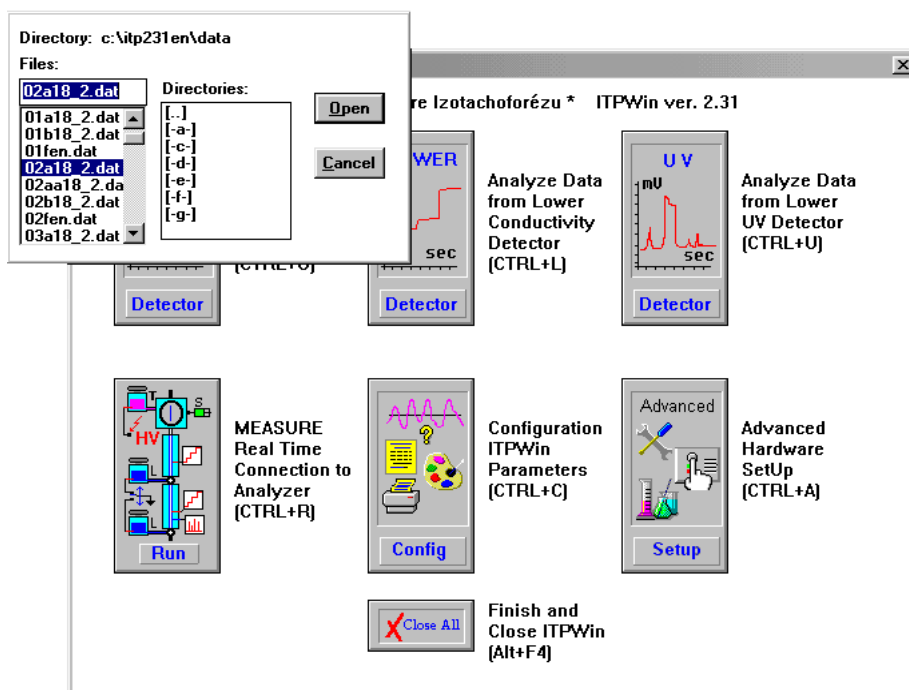
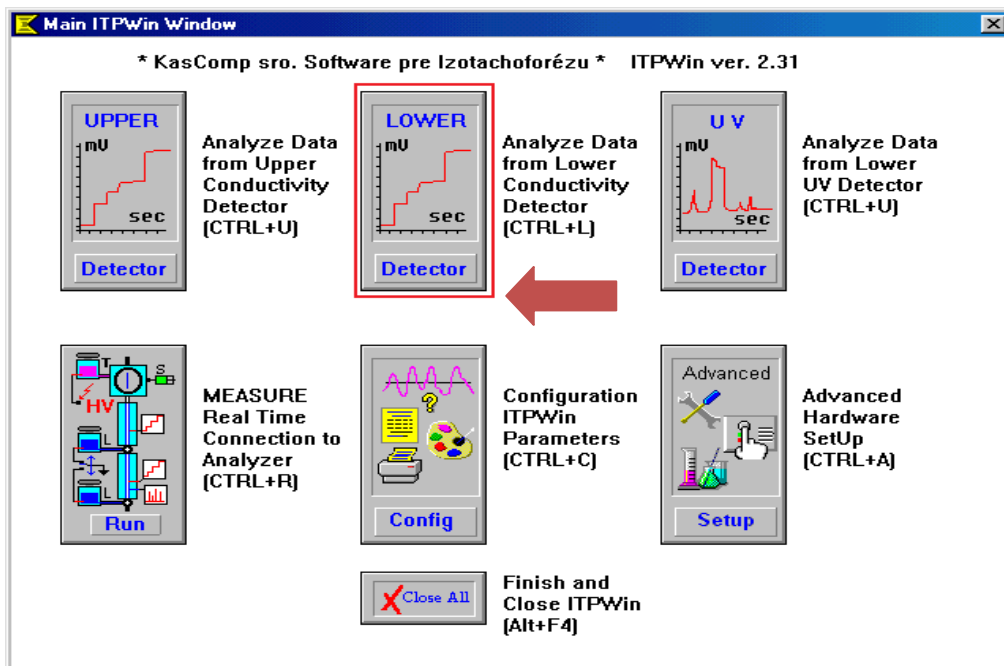
5. UKONČENÍ ANALÝZY

- a) po naměření poslední analýzy vypneme spínač na zadní straně
- b) 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.
- c) všechny použité injekční stříkačky propláchneme destilovanou vodou a uložíme. Odpad z nádoby vylejeme a pomocí krytů zašroubujeme všechny rezervoáry.

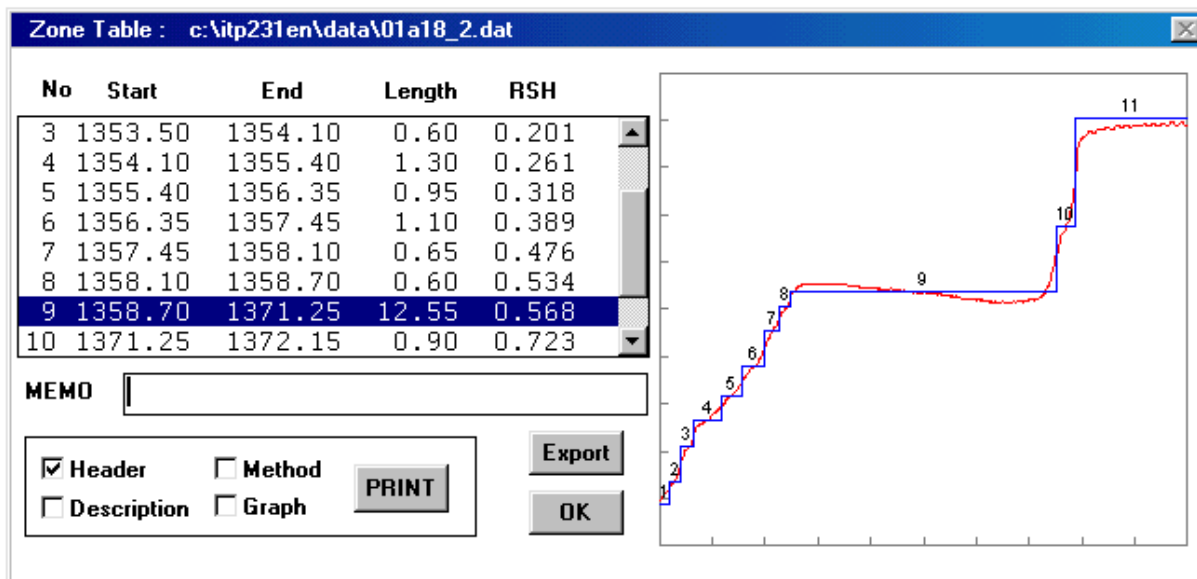
!POZOR: Celý systém zůstane naplněný destilovanou vodou.

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 askorbové odečteme délku (Lenght).



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

8.3. VYHODNOCENÍ ANALÝZY

Při vyhodnocení použijeme **metodu kalibrační křivky**.

Do závěru uvedeme:

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