

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Přírodovědecká fakulta

Zdroje, metabolismus a stanovení kofeinu

Diplomová práce

Bc. Kateřina Lávičková

Školitelka: Ing. Pavla Fojtíková, Ph.D.

České Budějovice 2022

Lávičková, K., 2022: Zdroje, metabolismus a stanovení kofeinu. [Sources, metabolism and determination of caffeine. Mgr. Thesis, in Czech.] – 101 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá popisem přípravy a průběhu workshopu s názvem „Kofein“ pro studenty gymnázií. Teoretická část práce shrnuje základní poznatky o kofeinu, zabývá se zdroji, konzumací, metabolismem a vlivy na lidský organismus. Dále se zabývá didaktikou přírodních věd v souvislosti s workshopem. V experimentální části práce byla pro účely workshopu optimalizována a validována metoda pro stanovení kofeinu v různých nápojích. Dále byly připraveny a odzkoušeny doplňkové úlohy, proběhla analýza absorpčních spekter vzorků moči a extrakce pomocí ASE. Byly připraveny laboratorní návody, pracovní listy a dotazníky zpětné vazby pro pedagogy a žáky. Součástí práce bylo vedení středoškolské odborné činnosti. Diplomová práce vychází z obhájené bakalářské práce autorky.

Annotaion

This master thesis deals with description of the preparation and the process of workshop called “Caffeine” for students at grammar schools. The theoretical part of the thesis summarizes the basic knowledge about caffeine, discusses the sources, consumption, metabolism, effects on the human body. It also deals with didactics of science in the context of the workshop. In the experimental part of the work, a method for the determination of caffeine in different beverages was optimized and validated for the workshop. Further, additional tasks were prepared and tested, analysis of absorption spectra of urine samples and extraction using ASE was carried out. Laboratory manuals, worksheets and feedbacks questionnaires for teachers and students were prepared. Part of the work was the professional supervision of Student's Professional Activities. The master thesis is based on the author's defended bachelor thesis.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 8. 12. 2022

Bc. Kateřina Lávičková

Klíčová slova

Kofein, workshop, žáci, metabolismus, extrakce, analýza, kapalinová chromatografie, optimalizace, validace

Key words

Caffeine, workshop, students, metabolism, extraction, analysis, liquid chromatography, optimization, validation

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté rady a zkušenosti, které jsem díky této práci získala. Velmi jsem ocenila její přátelský přístup, ochotu vždy pomoci a velkou míru trpělivosti.

Dále bych ráda poděkovala zúčastněným pedagogům a žákům za možnost pro jejich školy workshop zorganizovat.

Za podporu během dosavadního studia bych ráda poděkovala i rodině a přátelům.

OBSAH

1 CÍLE PRÁCE	1
2 ÚVOD	2
2.1 KOFEIN	2
<i>Zdroje a konzumace</i>	2
<i>Kofein jako cizorodá látka</i>	3
<i>Účinky kofeinu na lidský organismus</i>	5
<i>Stanovení kofeinu</i>	5
2.2 EXTRAKCE ZA ZVÝŠENÉHO TLAKU (ASE)	6
<i>Způsoby přípravy kávy během workshopu</i>	6
2.3 PH KÁVY	7
2.4 PROPOJENÍ SŠ A VŠ	7
2.5 VÝCHOVNĚ-VZDĚLÁVACÍ CÍLE VÝUKY	7
2.5.1 Didaktické zásady	8
2.5.2 Didaktické prostředky	8
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	12
3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A VZORKY	12
3.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ LABORATOŘE	13
3.3 CHEMICKÉ NÁDOBÍ A SKLO	14
3.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	15
<i>Mobilní fáze</i>	15
<i>Příprava roztoků standardu kofeinu</i>	15
<i>Kalibrační roztoky kofeinu</i>	15
<i>Příprava zásobního směsného roztoku standardů kofeinu a jeho metabolitů</i>	17
<i>Úprava vzorku moči pro identifikaci analytů</i>	17
<i>Příprava neobohacených a obohacených vzorků</i>	18
<i>Příprava extraktů kávy pro analýzu HPLC</i>	18
<i>Příprava extraktů kávy pro měření pH a HPLC analýzu</i>	19
<i>Roztoky neznámých kyselin</i>	20
4 LABORATORNÍ ČÁST PŘÍPRAVY NA WORKSHOP	21
4.1 OPTIMALIZACE METODY PRO STANOVENÍ KOFEINU A JEHO METABOLITŮ VE VZORKU MOČI A METODY PRO STANOVENÍ KOFEINU V RŮZNÝCH NÁPOJÍCH	21

4.2 VALIDACE METODY PRO STANOVENÍ KOFEINU V NÁPOJÍCH	25
<i>Linearita</i>	25
<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	25
<i>Správnost a přesnost</i>	25
4.3 STANOVENÍ KOFEINU VE VZORCÍCH ČAJE – SOČ PRÁCE	26
4.4 ANALÝZA OBSAHU METABOLITŮ KOFEINU V MOČI A NÁSLEDNÉ VYHODNOCENÍ POMOCÍ ABSORPČNÍCH SPEKTER	27
5 VLASTNÍ PŘÍPRAVA WORKSHOPU	29
5.1 PŘÍPRAVA TEXTOVÝCH MATERIÁLŮ	31
5.2 PRAXE SŠ ŽÁKA	32
5.3 TEORETICKÁ PŘEDNÁŠKA NA SŠ	32
5.4 ŠKOLENÍ ASISTENTŮ	33
5.5 SAMOTNÝ DEN WORKSHOPU.....	33
6 HODNOCENÍ WORKSHOPU	37
6.1 PEDAGOGOVÉ.....	37
6.2 ŽÁCI.....	37
7 ZÁVĚR	40
8 CITOVANÁ LITERATURA	42
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	46
10 PŘÍLOHY	48
PŘÍLOHA A – VALIDACE	48
PŘÍLOHA B – ZADÁNÍ + PRACOVNÍ LIST „STANOVENÍ KOFEINU V NÁPOJÍCH.“	50
PŘÍLOHA C – ZADÁNÍ + PRACOVNÍ LIST „STANOVENÍ METABOLITŮ KOFEINU V MOČI.“	61
PŘÍLOHA D – ZADÁNÍ + PRACOVNÍ LIST „MĚŘENÍ PH.“	66
PŘÍLOHA E – KARTIČKY NÁPOJŮ	73
PŘÍLOHA F – ZPĚTNÁ VAZBA PEDAGOG + ŽÁK	75
PŘÍLOHA G – TEORETICKÁ PŘEDNÁŠKA PRO STUDENTY SŠ	82
PŘÍLOHA H – PREZENTACE VÝSLEDKŮ ANALÝZ EXTRAKTŮ KÁVY JEDNOTLIVÝCH FRAKcí ...	95
PŘÍLOHA I – FOTOGRAFIE Z WORKSHOPU	100

1 CÍLE PRÁCE

- Zavedení a validace metody pro rychlé stanovení kofeinu ve vzorcích nápojů pomocí kapalinové chromatografie
- Možnosti kvalitativní analýzy vybraných metabolitů kofeinu v moči pomocí kapalinové chromatografie
- Zpracování tématu formou „workshopu“ pro žáky středních škol:
 - Příprava laboratorních úloh tematicky souvisejících se stanovením kofeinu ve vybraných nápojích
 - Příprava materiálů k úlohám, jejich publikace na webových stránkách
 - Realizace workshopu s konkrétními žáky
 - Zpětná vazba od účastníků programu a její reflexe

2 ÚVOD

Diplomová práce se věnuje návykové a hojně konzumované látce – kofein. Vzhledem k současnému životnímu stylu dospívajících lidí byla snaha zpracovat téma nejen z pohledu analytické chemie, ale i s ohledem na zdravý vývoj mladých lidí. Problematika byla žákům středních škol podaná formou workshopu, který byl zahájen přednáškou. Další částí byl laboratorní program ve vysokoškolské analytické laboratoři. Shrnutí a prezentace výsledků, jakožto závěrečná část workshopu, probíhaly v přednáškové místnosti fakulty. Žáci si sami analýzou zjistili, jaké množství kofeinu je obsaženo v běžných nápojích. Průběžně byl diskutován i metabolismus kofeinu v lidském organismu, zdroje jeho příjmu a v neposlední řadě i jeho vliv na lidský organismus.

Vývoj analytické metody byl obsahem mé bakalářské práce [1], v diplomové práci byla metoda optimalizována a následně využita během programu workshopu. Pro žáky byly vytvořeny texty a online materiály, kde byly shrnuty jak teoretické informace ke kofeinu a jeho metabolismu, tak i ke kapalinové chromatografii jako analytické metodě. Druhá část programu, respektive textových materiálů, byla věnována měření pH, a to zejména měření pH extraktů kávy získaných extrakcí za zvýšeného tlaku (ASE) a extraktů získaných klasickou filtrací. Samotný program v laboratoři složený z mnoha dílčích úloh byl zhruba čtyřhodinový. Následně proběhlo vyhodnocení dat, vzájemné sdílení výsledků a formulace výsledků formou „minikonference“.

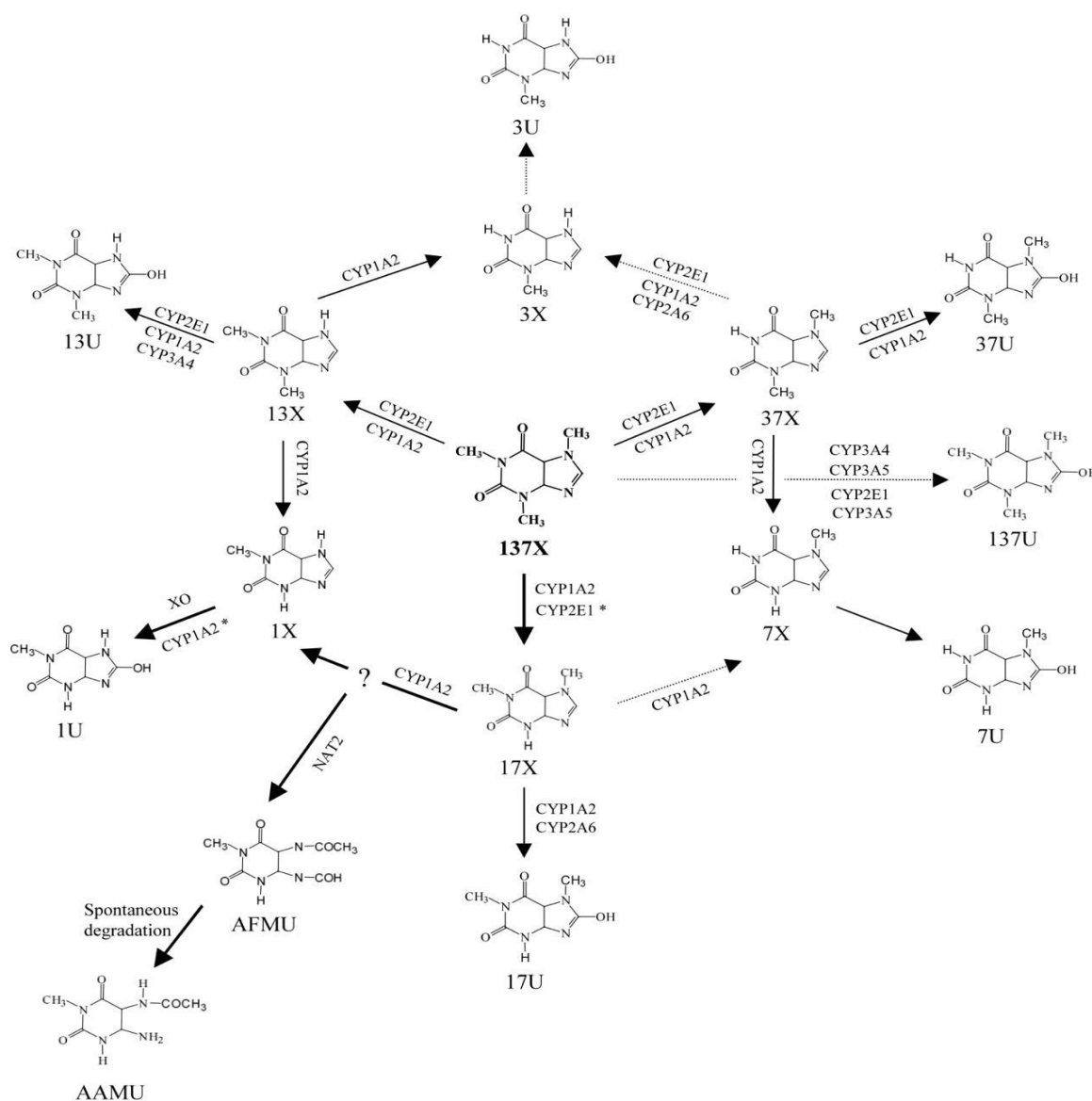
2.1 Kofein

Zdroje a konzumace

Kofein je lidmi nejpoužívanější psychoaktivní stimulant. Počátky jeho konzumace sahají až do roku 2737 př. n. l., kdy tehdejší čínský císař konzumoval odvar z čajových lístků [2]. První konzumace kávových plodů je datována do 9. stol. n. l., kdy si arabský pastevce koz všiml, že kozy mají po konzumaci kávových plodů více energie [3]. Běžnou součástí života se konzumace kávy stala až v 17. století [4]. Mezi jeho nejčastější zdroje patří káva a čaj. Kofein se nachází i v kakau, guaraně, kolových a energetických nápojích. Je rovněž přidáván do některých léků na bolest nebo doplňků stravy určených k redukci tělesné hmotnosti [5,6]. Doporučená jednorázová dávka kofeinu pro dospělého člověka je 200 mg. Denní dávka by pak neměla překročit hodnotu 400 mg [7].

Kofein jako cizorodá látka

Kofein (CAFF) je pro tělo cizorodá látka. Aby taková látka mohla mít na lidský organismus vliv, musí proběhnout základní toxikokinetické děje. Toxikokinetika cizorodých látek je obvykle dělena do čtyř stádií – vstřebávání, distribuce, biotransformace a vylučování [8]. Všechny biochemické procesy, včetně těch biotransformačních, jsou zpravidla enzymaticky katalyzovány. V případě cizorodých látek se často uplatňují enzymy z nadrodiny cytochromu P450. Metabolismus kofeinu je komplexní proces, během něhož vzniká více než dvacet metabolitů. Vzniká například 1-methylmočová kyselina (MUA), teobromin (THBM), 1,7-dimethylxantin (DMX) a teofylin (THEO), kterým je věnována pozornost v této práci. Na Obrázku 1 na další straně je vidět postupný vznik metabolitů, které se liší svou polaritou, čehož lze využít při chromatografické separaci. Na druhou stranu některé metabolity jsou izomerní látky, což naopak pro chromatografickou separaci přináší obtíže. Kromě enzymů z nadrodiny cytochromu P450 jsou přeměny katalyzovány i dalšími enzymy, které jsou typické pro odbourávání látek pro tělo cizorodých [9]. Konkrétní typy enzymů účastnících se biotransformace kofeinu jsou v Obrázku 1 uvedeny nad šipkou. Zároveň méně než 2 % z celkového přijatého množství kofeinu zůstává v nezměněné podobě [5,10–12]. Po konzumaci kofeinu lze v moči stanovit vedle jeho metabolitů tedy i samotný kofein (Obrázek 1).



Obrázek 1: Schéma biotransformace kofeinu.

NAT2 = N-acetyltransferáza; XO = xantinoxidáza;

137X = 1,3,7- trimethylxantin (kofein); 13X = 1,3- dimethylxantin (teofylin);

17X = 1,7-dimethylxantin (paraxantin); 37X = 3,7- dimethylxantin (teobromin),

1X = 1-methylxantin; 3X = 3-methylxantin; 7X = 7-methylxantin;

137U = 1,3,7- trimethylmočová kyselina; 13U = 1,3- dimethylmočová kyselina;

17U = 1,7-dimethylmočová kyselina; 37U = 3,7-dimethylmočová kyselina;

1U = 1-methylmočová kyselina; 3U = 3-methylmočová kyselina;

7U = 7-methylmočová kyselina;

AFMU = 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil;

AAMU = 5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil.

Převzato a upraveno z [10].

Účinky kofeinu na lidský organismus

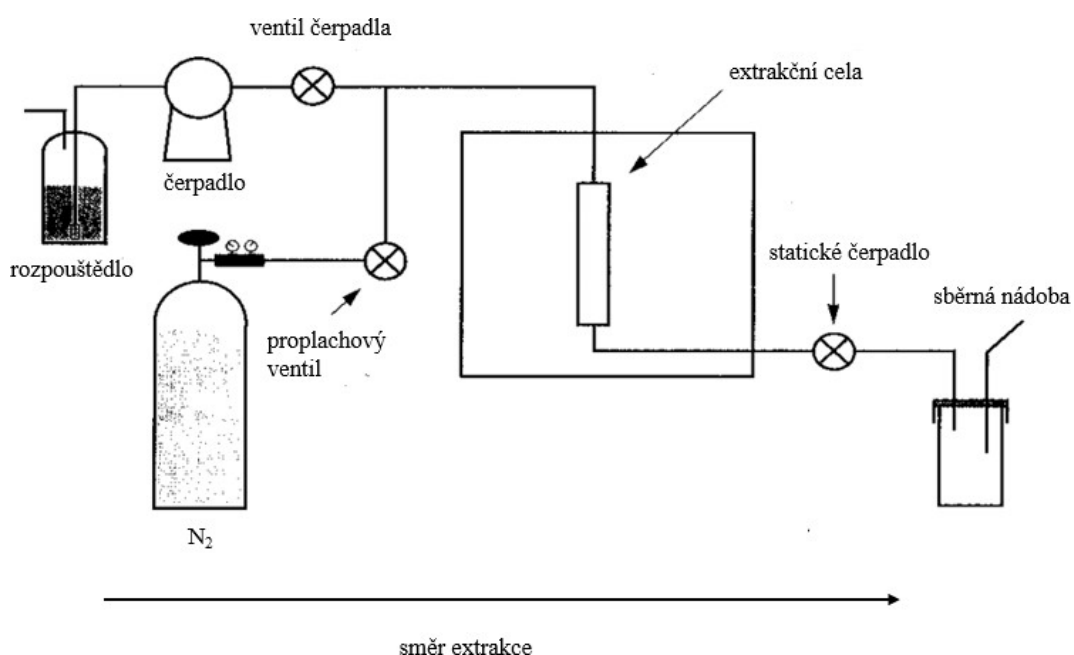
Účinky kofeinu na organismus člověka jsou závislé jednak na podané dávce, tak na citlivosti konkrétních jedinců. Při častém užívání dochází k oslabení účinků na tělo. Pokud nedochází k překročení maximální denní dávky (400 mg), má kofein na tělo neutrální až mírně pozitivní účinky [13]. Pozitivně kofein ovlivňuje pozornost, náladu a bdělost [14,15]. Má schopnosti vázat se na adenosinové přenašeče v mozku a dočasně tak obsadit místo navázání tlumících neuropřenašečů, čímž oddálí únavu a potřebu spánku [16]. Dále také podporuje soustředění, zrychluje metabolismus a spalování tuků. Mezi negativní vlivy kofeinu se řadí řidnutí kostí a zvýšení krevního tlaku. Lidé trpící kardiovaskulárními onemocněními by se měli vyvarovat společné konzumaci kofeinu a alkoholu. Snížit příjem kofeinu by měly i ženy, které se snaží otěhotnět, těhotné nebo kojící ženy [17]. K nadměrné konzumaci kofeinu dochází u adolescentů, kteří pravidelně a často konzumují různé energetické nápoje. V některých evropských zemích je dokonce jejich prodej omezen, podobně jako prodej alkoholu. V České republice podobné restrikce neplatí [18].

Stanovení kofeinu

K přesnému stanovení kofeinu a jeho metabolitů v kapalných vzorcích se používá kapalinová chromatografie s UV nebo MS detekcí. Vývoj metody pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů byl tématem mé bakalářské práce [1]. Bakalářská práce obsahovala podrobnou rešerši dříve zavedených a publikovaných HPLC metod. Následně byl popsán vývoj a validace metody u nás v laboratoři, která byla s menší úpravou využívána v průběhu diplomové práce.

2.2 Extrakce za zvýšeného tlaku (ASE)

Extrakce za zvýšeného tlaku (ASE) je moderní metoda, využívaná pro extrakci látek z pevného či polopevného vzorku kapalným médiem, respektive kapalnou mobilní fází. V analytických laboratořích se ASE nejvíce využívá při extrakci potravinových vzorků či vzorků životního prostředí. Přístroj je často napojen na HPLC systém, kde pak dochází k samotné analýze a vyhodnocení. Největší výhodou ASE, oproti tradičním extrakčním metodám, je zejména rychlost a automatizace celého procesu. Při tomto typu extrakce lze dosáhnout tlaku až 100x vyššího, než je běžný atmosférický tlak a teploty až 200 °C. Schéma zapojení systému je uvedeno na Obrázku 2 [19-21].



Obrázek 2: Schéma zapojení ASE. Upraveno z [21].

Způsoby přípravy kávy během workshopu

Přístroj pro provádění extrakce ASE byl při workshopu využit, aby imitoval pákový kávovar, který znají žáci z kaváren. Při takovémto způsobu přípravy kávy se využívá zvýšeného tlaku. Základním typem kávy připravované v pákovém kávovaru je espresso. Obvykle tlak v těchto kávovarech dosahuje kolem 9 barů. Tento tlak je pro správnou extrakci espressa uváděn jako nejvhodnější.

Dalším oblíbeným typem kávy je tzv. filtrovaná káva, kdy dochází k filtraci za atmosférického tlaku. Filtrovaná káva má mnoho dalších podtypů např. french press, aeropress či V60. Právě tzv. V60 je nejpodobnější klasické laboratorní filtraci přes hladký filtr [22,23], kterou žáci měli za úkol provádět při workshopu. Extrakty připravené při atmosférickém tlaku

kávy žáci porovnávali s kávou připravenou pomocí ASE. Při obou způsobech přípravy kávy je teplota přibližně 100 °C. Žáci pracovali se stejným vzorkem (značkou) mleté kávy při obou způsobech extrakce. Příprava se tedy lišila pouze v tlaku.

2.3 pH kávy

Extrakt z kávy je slabě kyselý roztok s hodnotou pH okolo 5,0. Vodný roztok kofeinu je přibližně neutrální s pH okolo 6,9 [24]. Za kyselý charakter kávy jsou zodpovědné kyseliny, které káva obsahuje. Hlavními kyselinami vyskytujícími se v kávě jsou chlorogenové kyseliny, kyselina citronová, kyselina jablečná a kyselina chinová. Nalézt lze ale i těkavé organické kyseliny - kyselinu octovou či kyselinu mravenčí [25–27].

Na množství přítomných kyselin v kávovém nápoji má vliv mnoho faktorů. Jedním z nich je způsob pražení kávy. Čím je pražení kávových zrn kratší, tedy čím jsou světlejší kávová zrna, tím je výsledná káva kyselejší, obsahuje větší množství kyselin. Dalším faktorem je mletí kávy. Čím je mletí jemnější, tím je výsledná acidita vyšší. Tento jev souvisí s větší styčnou plochou mezi kávou a vodou. I teplota při přípravě nápoje má vliv na výslednou kyselost. Například při přípravě kávy, tzv. cold-brew, kdy je káva připravována při nízké teplotě, je nápoj méně kyselý, než káva připravovaná při vyšší teplotě [28]. Na kyselost kávového nápoje má vliv i doba extrakce.

2.4 Propojení SŠ a VŠ

Jedním z cílů workshopu bylo i propojení mezi střední školou (SŠ) a vysokou školou (VŠ). Dle metodického materiálu [29] vyplývá, že pro žáky a pedagogy SŠ je kontakt s vysokoškolským prostředím prospěšný zejména v možnosti větší podpory mimořádně nadaných žáků, nabídce dalšího studia žáků na konkrétní VŠ či celoživotního vzdělávání učitelů SŠ. Ceněná je i praxe a sledování aktuálních trendů v daném oboru. Pro popularizaci dané VŠ jsou vhodné brožury, dny otevřených dveří, účasti na veletrzích vysokého školství, ale právě i praktické exkurze na VŠ. Přestože zmiňovaný metodický materiál byl vypracováván pro technické školy, lze jeho výsledky aplikovat i pro přírodovědné vzdělávání.

2.5 Výchovně-vzdělávací cíle výuky

Výchovně-vzdělávací cíle definují účel, záměr, výstup a výsledek výuky. Jsou děleny na cíle dlouhodobé a krátkodobé. Dlouhodobé cíle jsou dány rámcovým vzdělávacím programem (RVP), krátkodobé cíle jsou konkrétnější a učitel by si je měl stanovovat při každé vyučovací hodině. Své vzdělávací programy mají základní školy (RVP ZV), střední odborné školy (RVP SOV) upravené dle konkrétního zaměření a gymnázia (RVP G), opět upravené dle standardní doby studia či zaměření [30]. Dále lze dělit výukové cíle podle zaměření na oblast

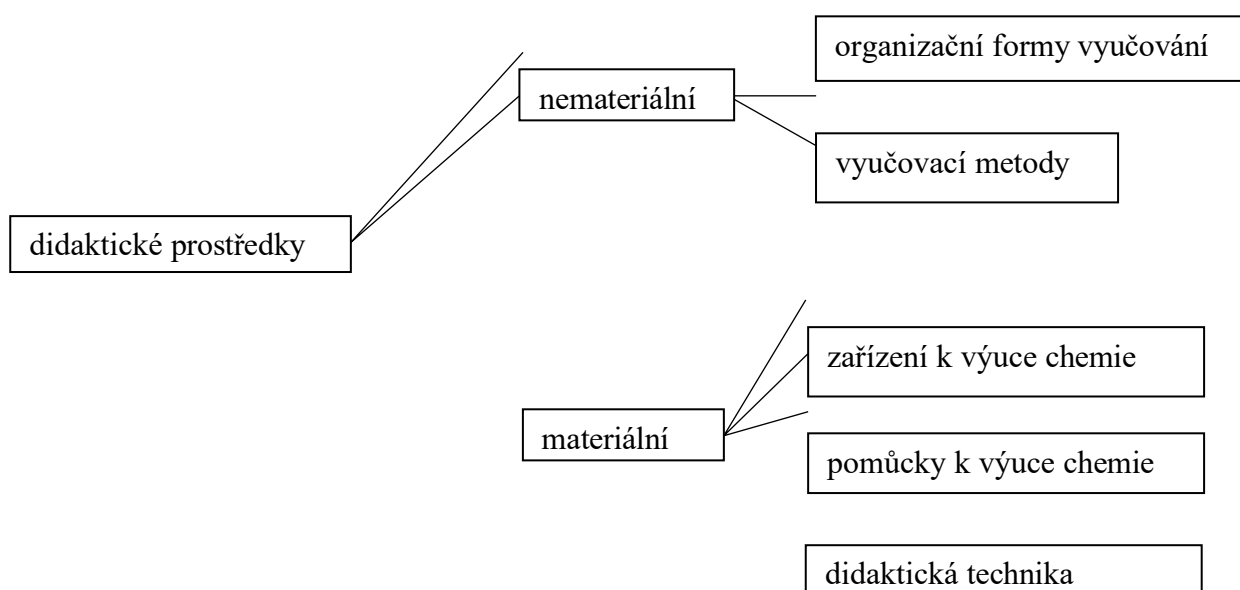
rozvoje osobnosti žáka na cíle kognitivní (vzdělávací), afektivní (postojové) a psychomotorické (výcvikové). K dosažení těchto cílů by měly být dodržovány didaktické zásady a aplikovány různé druhy didaktických prostředků a výukových metod.

2.5.1 Didaktické zásady

K dosažení výukových cílů jsou kromě jiného využívány didaktické zásady. Obecná didaktika uvádí tyto didaktické zásady: zásada uvědomělosti, zásada komplexního rozvoje žáka, zásada vědeckosti, zásada přiměřenosti, zásada individuálního přístupu, zásada emocionálnosti, zásada trvalosti, zásada názornosti, zásada soustavnosti a zásada zpětné vazby [31].

2.5.2 Didaktické prostředky

Didaktické prostředky jsou děleny na materiální (učebna s vybavením, didaktická technika, vyučovací a žákovské pomůcky) a nemateriální (vyučovací metody, organizační formy, vyučovací zásady). Rozdělení didaktických prostředků využívaných v chemii je vidět na následujícím Obrázku 3. Do didaktických prostředků lze zahrnout organizaci vyučovacího procesu, pomůcky, místnost a její zařízení [32].



Obrázek 3: Schéma výukových prostředků používaných v chemii podle [32].

Mezi nemateriální výukové prostředky lze kromě výukových metod diskutovaných níže zařadit i různé organizační formy vyučování – třídně vyučovací hodinu chemie, cvičení, exkurzi, praxi či odborný výcvik a pracovní vyučování (typické pro SOŠ a SOU), domácí

úkoly a formy týkajících se pouze části studentů – volitelné semináře, doučování, zájmové kroužky, olympiády, soutěže a středoškolské odborné činnosti (SOČ) [32].

K materiálním didaktickým prostředkům se řadí zařízení k výuce (učebna chemie, posluchárna, chemická laboratoř). K pomůckám využívaných v chemii se řadí přírodniny (např. minerály), chemikálie, modely, laboratorní pomůcky, obrazové pomůcky (nástěnné obrazy, video, náčrt atd.), písemné pomůcky (učebnice, pracovní listy, tabulky) [32].

2.5.3 Výukové metody

Výukovou metodu lze dle Maňáka a Švece definovat jako uspořádaný systém činností učitele a učebních aktivit žáka, který směřuje k dosažení výchovně-vzdělávacích cílů. Pouze po vzájemné spolupráci mezi pedagogem a žákem lze těchto cílů dosáhnout. Výukové metody zprostředkovávají přenos vědomostí a dovedností, pomocí nichž lze žáky aktivizovat či formovat jejich osobnost a názory [33,34].

Podle poznání a typu poznatku dělíme metody na: metody slovní, metody praktické a metody názorně – demonstrační. Metody slovní zahrnují jak monologické metody (přednáška, výklad, vyprávění, vysvětlování, instruktáž), tak dialogické metody (rozhovor, diskuse, dramatizace). Dále se sem řadí práce s textem či psaní písemných prací. Metody praktické, které jsou pro workshop nejdůležitější, se zabývají nácvikem pohybových a praktických dovedností studentským pokusem, výtvarnou činností nebo pracovními činnostmi v dílnách či exteriéru [35]. Metody názorně – demonstrační zahrnují pozorování, demonstraci (obrazů, modelů či pokusů) a statickou a dynamickou projekci. Metody využívány při workshopu jsou vyjmenovány ve výčtu níže.

Skupinová výuka

Při skupinovém vyučování pracují žáci zpravidla na složitějším úkolu. Žáci si svou práci musí naplánovat, rozdělit, vzájemně si pomáhají, radí si a diskutují. S ohledem na znalosti a dovednosti žáků může být skupina homogenní či heterogenní. Důležité je také dbát na počet členů ve skupině. V případě větších skupin o pěti a více členech může docházet k liknavosti některého ze členů skupiny [36]. Při workshopu žáci pracovali ve dvojicích, případně ve trojicích.

Výklad s demonstrací

Zahrnuje obvykle více metod – vyprávění, popis a vysvětlování. Optimální je tyto metody střídat. Při této metodě je aktivní zejména učitel a žáci se při ní významně nezapojují. Důležité je tedy dbát na pozornost žáků [37]. Tato metoda byla využita zejména při teoretické

přednášce na gymnáziích, v menší míře pak při samotném workshopu. Při teoretické přednášce byla žákům ukázána a popsána chromatografická kolona. Prezentace, která doprovázela výklad, je uvedena v Příloze G.

Práce s literaturou

Tato metoda využívá jednak textové materiály v papírové podobě (učebnice, pracovní listy, protokoly), ale i online zdroje, např. prezentace. Při práci s textem získá žák znalosti z daného oboru a zároveň podporuje svou čtenářskou gramotnost [37,38]. Při workshopu byly žáky využívány pracovní listy a zadání, texty na webových stránkách *Přírodověda.cz* či prezentace. Konkrétní zadání jednotlivých úkolů a pracovních listů používaných při workshopu jsou uvedeny v Přílohách B a C. Texty ze zadání byly s drobnými úpravami umístěny na zmíněných internetových stránkách. Prezentace, které byly použity během workshopu, jsou v Přílohách G a H.

Chemický pokus

Pokus může být vědecký a školní. Takovéto pokusy se liší svým cílem. Školní pokus si dává za cíl pozorovat již objevený jev. Pokusy mohou být pouze demonstrační – prováděny učitelem a žákovské, kdy experiment je prováděn samotným žákem. Velkou výhodou žákovského pokusu je fakt, že žáci rozvíjí kromě znalostí i své psychomotorické dovednosti. Zejména si osvojují tyto dovednosti: návrh a plánování experimentu, vyhodnocení sledovaných jevů, odečítání hodnot z grafů a tabulek, prezentování výsledků, ale například i převody jednotek. Při workshopu žáci využili a propojili znalosti z různých předmětů, konkrétně z chemie, matematiky, angličtiny a fyziky [39]. Rovněž rozvíjí své sociální kompetence, neboť spoluprací s ostatními žáky, a schopnost vyrovnat se s případným neúspěchem.

Metody práce s informačními technologiemi

Ve výuce se čím dál častěji využívají výukové aplikace či počítače. V předmětu chemie se s oblibou využívá i video, díky kterému lze sledovat průběh nebezpečného chemického pokusu nebo nahlédnout do běžně nepřístupných míst. Pro žáky je video atraktivní forma výuky. Nejčastěji se jako zdroj videí využívá platforma YouTube. Další možností práce je využití počítačových programů. V průběhu workshopu šlo zejména o ovládací software kapalinového chromatografu – program Chromeleon a přístroje pro ASE. V průběhu vyhodnocení dat používali žáci program Excel. Video, které žákům sloužilo jako doplněk ke slovnímu výkladu o ASE, bylo v angličtině. Byl zde tak prostor pro další možnost

propojování jednotlivých školních předmětů a posilování mezipředmětových vztahů, v tomto případě chemie s informatikou, matematikou a anglickým jazykem [37].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a vzorky

- Kofein – čistota pro HPLC ~ 100 % (Sigma Aldrich)
- Teobromin – čistota pro HPLC ~ 99 % (Sigma Aldrich)
- 1,7-dimethylxantin – čistota pro HPLC ~ 98 % (Sigma Aldrich)
- Teofylin – čistota pro HPLC ~ 100 % (Sigma Aldrich)
- 1-methylmočová kyselina – neuvedeno (Sigma Aldrich)
- Methanol pro HPLC (Merck)
- Kyselina octová – 100 % (Merck)
- Kyselina mravenčí – 98-100 % (Merck)
- Kyselina sírová – 96 % (PENTA)
- Kalibrační roztok pH = 4 (Fisher Scientific)
- Kalibrační roztok pH = 7 (Fisher Scientific)
- Chlorid draselný – 99 % (Sigma Aldrich)
- Dusík 4.0 (Linde)
- Pitná voda
- Led
- Vzorky:
 - A. Potravinové:
 - Připravované nápoje: káva Jihlavanka (-), káva Nescafé (-), káva Jihlavanka (+), káva Nescafé (+), káva Jacobs 3v1, káva Mokaté, černý čaj Ahmad, černý čaj PIGI
 - Nápoje v PET lahvi/plechovce: zelený čaj BIO, ledový čaj černý, ledový čaj zelený, Coca-cola, Pepsi, Kofola, RedBull, Big Shock
 - Nekofeinové vzorky (na měření pH): pomerančový džus, ovocný nápoj Jupík, ocet, výluh z červeného zelí
 - B. Biologické: vzorek moči 0 hod, vzorek moči 2 hod po požití kofeinového nápoje

3.2 Přístrojové vybavení laboratoře

- Kapalinový chromatograf: UltiMate 3000 (Thermo Scientific) vybavený spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem DAD-3000RS, ovládání pomocí programu Chromeleon 7.2
- Chromatografická kolona: ARION® Plus C18; délka 150 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 5 µm (Chromservis)
- Chromatografická předkolonka: SecurityGuard™; C18; délka 4 mm; vnitřní průměr 3,0 mm (Phenomenex)
- ASE extraktor: Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extractor (Thermo Scientific)
- Ultračistá voda (Milli-Q®) generovaná přístrojem Smart2Pure 5 UV/UF (Thermo Scientific)
- Automatická dávkovací pipeta: BioPettePLUS o objemu 10-100 µl (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta: BioPettePLUS o objemu 100-1000 µl (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta: Transferette® o objemu 1-10 ml (Brand)
- pH metr s elektrodou: VOLTCRAFT® pH – 100 ATC
- Odstředivka MiniSpin (Eppendorf)
- Analytické váhy: MS105DU (Mettler Toledo™)
- Rychlovarná konvice
- Mobilní telefon se stopkami

3.3 Chemické nádobí a sklo

- Kádinky o objemu 25-500 ml
- Odměrné baňky o objemu 5-500 ml
- Skleněné lahve s GL uzávěrem na mobilní fázi o objemu 250, 500 a 1000 ml
- Skleněné vzorkovnice pro měření pH
- Skleněná pipeta dělená (různé objemy)
- Skleněná pipeta nedělená (různé objemy)
- ASE: kovová cela, násypka, filtr – aqua, sběrné vialky, skleněné kuličky
- Filtrační kruh
- Laboratorní stojan
- Filtrační nálevka
- Křížová svorka
- Skleněná tyčinka
- Petriho miska
- Krimpovací kleště
- Stříčka na destilovanou vodu
- Plastová slánka
- Plastové sítko
- Nůžky
- Kuchyňská lžička
- Spotřební materiál: plastové špičky, vialky z čirého skla s hliníkovým uzávěrem s pryžovým septem, centrifugační zkumavky, buničina, filtrační papír

3.4 Příprava roztoků

3.5 Mobilní fáze

Optimalizací složení MF se zabývala má bakalářská práce [1]. Používaná MF byla tvořena mobilní fází A (MFA) a mobilní fází B (MFB), jako MFA byl připravován roztok 1 obj. % kyseliny octové ve vodě. MFB byl 100% methanol.

Příprava roztoků standardu kofeinu

Zásobní roztok standardu kofeinu ($\text{STD}_{\text{CAFF-zás.}}$) byl připraven navážením přesně asi 5 mg kofeinu, kvantitativním převedením do 5ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku. Tímto způsobem byl připraven $\text{STD}_{\text{CAFF-zás.}}$ o koncentraci 1178 mg/l (Tabulka 1). Tento roztok byl následně ředěn na pracovní roztok (STD_{CAFF}) pro kalibraci o $c = 100 \text{ mg/l}$.

Tabulka 1: Příprava zásobního roztoku standardu CAFF ($\text{STD}_{\text{CAFF-zás.}}$).

Standard	M [g/mol]	Čistota [%]	m [mg]	V [ml]	Rozpouštědlo	c [mg/l]
CAFF	194,19	100	5,89	5	H ₂ O	1178

Kalibrační roztoky kofeinu

Z připraveného pracovního roztoku kofeinu bylo následně připraveno devět kalibračních úrovní ve třech na sobě nezávislých opakováních. Kalibrační roztoky byly připraveny do čirých vialek o objemu 1,8 ml. Nejprve byl do vialek dle kalibračního stupně napipetován automatickou pipetou příslušný objem vody ($V_{\text{H}_2\text{O}}$), poté byl připipetován daný objem STD_{CAFF} . Příprava kalibračních roztoků je shrnuta v Tabulce 2.

Tabulka 2: Příprava kalibračních roztoků.

Koncentrační úroveň	Označení	c [mg/l]	V _{H₂O} [μl]	V _{STD_{CAFF}} [μl]	Celkový objem [μl]
K1	K1A	0,1	999	1	1000
	K1B				
	K1C				
K2	K2A	0,5	995	5	
	K2B				
	K2C				
K3	K3A	1	990	10	
	K3B				
	K3C				
K4	K4A	2,5	975	25	
	K4B				
	K4C				
K5	K5A	5	950	50	
	K5B				
	K5C				
K6	K6A	10	900	100	
	K6B				
	K6C				
K7	K7A	25	750	250	
	K7B				
	K7C				
K8	K8A	50	500	500	
	K8B				
	K8C				
K9	K9A	100	0	1000	
	K9B				
	K9C				

c udává výslednou koncentraci kofeinu v kalibračním roztoku, V_{H₂O} objem rozpouštědla (vody) a V_{STD_{CAFF}} udává objem pracovního roztoku kofeinu.

Příprava zásobního směsného roztoku standardů kofeinu a jeho metabolitů

Zásobní roztoky 1-methylmočové kyseliny (MUA), teobrominu (THBM), 1,7- dimethylxantinu (DMX), teofylin (THEO) a kofeinu (CAFF) byly připraveny navážením jednotlivých standardů a kvantitativním převedením do odměrných baněk. Popis přípravy je uveden v Tabulce 3. Z jednotlivých zásobních roztoků standardů analytů byl následně připraven směsný roztok standardů (STD_{mix}). Z každého roztoku byl odpipetován daný objem do 10ml odměrné baňky, aby výsledná koncentrace všech analytů v STD_{mix} byla 80 mg/l, roztok byl doplněn deionizovanou vodou po rysku. Postup přípravy STD_{mix} je popsán v Tabulce 4.

Tabulka 3: Příprava roztoků standardů (STD_r).

STD	M [g/mol]	Čistota [%]	m [mg]	V [ml]	Rozpouštědlo	c [mg/l]
MUA	182,14	neuvedena	1,18	5	H ₂ O (25 µl NH ₄ OH + 10 µl CH ₃ COOH)	236
THBM	180,16	99	2,03	10	H ₂ O	201
DMX	180,16	98	6	5	H ₂ O	1176
THEO	180,16	100	5,8	5	H ₂ O	1160
CAFF	224,22	100	5,89	5	H ₂ O	1178

Tabulka 4: Příprava směsného roztoku standardů.

Metabolit	V [µl] /10 ml	c [mg/l]
MUA	3390	80
THBM	3981	80
DMX	680	80
THEO	690	80
CAFF	679	80

Úprava vzorku moči pro identifikaci analytů

Pro identifikaci metabolitů kofeinu (MUA, THBM, DMX a THEO) i kofeinu samotného v moči byly analyzovány vzorky moči v čase 0 hod, tedy vzorek těsně před požitím kofeinového nápoje, a dále vzorky 2,5-3 hod, 4 hod a 8 hod po požití kofeinového nápoje. Vzorky moči (VZ_{MOČ}) byly odstředovány rychlostí 10 000 otáček/min po dobu 10 min. Poté byl z odstředovacích zkumavek odpipetován supernatant a dále naředěn deionizovanou vodou do vialek určených k HPLC analýze, případně obohacen o směsný roztok standardu (STD_{mix}). Postup přípravy je uveden v Tabulce 5.

Tabulka 5: Příprava vzorků moči k HPLC analýze.

Složení vzorku k analýze	V (VZ _{Moč}) [μl]	V (STD) [μl]	V (H ₂ O) [μl]	Celkový objem [μl]
Roztok STD _{MIX} ve vodě	0	200	800	1000
Moč 0 hod	800	0	200	
Moč 0 hod + roztok STD _{MIX}	800	200	0	
Moč 2,5 hod	800	0	200	
Moč 2,5 hod + roztok STD _{MIX}	800	200	0	

Příprava neobohacených a obohacených vzorků kofeinových nápojů

Pro validaci metody pro stanovení kofeinu byly pro všech 16 typů analyzovaných nápojů, které jsou uvedeny v Tabulce 6 v následující podkapitole, přichystány dvě sady roztoků ve třech opakováních. Neobohacené vzorky (unspiked) byly připraveny smícháním 980 μl již naředěného nápoje (VZ_{CAFF}) a 20 μl rozpouštědla (H₂O). Obohacené vzorky (spiked) byly připraveny smícháním 980 μl VZ_{CAFF} a 20 μl STD_{CAFF} o koncentraci 250 mg/l.

Příprava kofeinových vzorků pro analýzu HPLC

Úprava kofeinových nápojů se lišila dle jejich druhu. V případě nápojů v PET lahvi/plechovce se daný nápoj nejprve naředil a poté odstředil. Konkrétní ředění je uvedeno v Tabulce 6. Ředění bylo záměrně různé, aby si žáci procvičili přípravu roztoku a jednotlivá zadání se vzájemně lišila. Získaný supernatant byl pak použit pro HPLC analýzu. Ostatní nápoje, tzv. připravované nápoje (instantní kávy, čaje apod.), bylo potřeba nejdříve navážit. Vždy bylo snahou navažovat množství podobné používanému množství při běžné konzumaci (zpravidla dvě kávové lžičky či obsah čajového sáčku apod.). Navážené množství bylo následně zalito 200 ml horké vody po rysku v 250ml kádince. Roztok byl promíchán skleněnou tyčinkou a překryt Petriho miskou. Pokud se jednalo o některý typ rozpustné kávy, roztok byl ihned chlazen v ledu, pokud šlo o mletou kávu či čaj, ponechal se nápoj po zalití 3 min vylouhovat. Poté byl roztok přeceděn přes plastové sítko a až poté byl ochlazen. Po ochlazení na přibližně laboratorní teplotu byly jednotlivé roztoky naředěny dle Tabulky 6. Ředění vzorků se lišilo pro dílčí úlohy z důvodů zajištění variability v zadání pro žáky. Jednotlivé vzorky kofeinových nápojů byly následně odstředěny při 10 000 otáčkách/min po dobu 5 min. Poté byl ze vzorků odebrán supernatant, který byl použit k analýze. Žáci se při workshopu řídili kartičkami, jejichž podoba je uvedena v Příloze E.

Tabulka 6: Příprava kofeinových nápojů k HPLC analýze.

Název nápoje	Ředění	Objem roztoku [ml]
Nescafé (-)	10x	25
Jihlavanka (-)	10x	25
Nescafé (+)	150x	250
Jihlavanka (+)	10x	100
Jacobs 3v1	150x	25
Mokaté	150x	50
Černý AHMAD	70x	25
Černý PIGI	30x	5
Zelený čaj BIO	30x	10
Ledový čaj – černý	10x	10
Ledový čaj – zelený	10x	5
Coca-cola	10x	25
Pepsi	10x	50
Kofola	10x	5
RedBull	50x	100
Big Shock	100x	100

Příprava extraktů kávy pro měření pH a HPLC analýzu

Byly připravovány dva typy extraktů kávy – extrakt získaný z ASE a extrakt získaný klasickou filtrací přes hladký filtr. Pro obě extrakce byl použit stejný typ mleté kávy.

Se záměrem připodobnit přípravu domácím podmínkám byly na analytických vahách naváženy dvě kávové lžičky vzorku mleté kávy. V případě ASE extrakce bylo toto množství přesypáno do kovové cely s filtrem určeným pro extrakci vodnou mobilní fází. Poté byla káva pomocí tloučku upěchována a objem cely doplněn skleněnými kuličkami přibližně 0,5 cm pod okraj cely. Takto připravený vzorek byl použit k extrakci a k získání čtyř frakcí. V případě klasické filtrace bylo navážené množství kávy vsypáno do filtrační nálevky s hladkým filtrem a čtyřikrát zalíván horkou vodou (přibližně 100 °C). Při prvním zalití bylo použito nepatrně větší množství vody, další tři zalití už byla prováděna stejným množstvím vody. Pro odměření potřebného objemu vody byla pro účely workshopu vytvořena speciální odměrka. Po každém zalití byl odebírána filtrát. Celkem byly tedy získány opět čtyři filtráty, respektive frakce o přibližně stejném objemu. Všechny získané frakce byly v průběhu workshopu před měřením pH opět zchlazeny na laboratorní teplotu, obdobně jako roztoky pro přípravu vzorků k HPLC analýze v předcházející kapitole. Takto připravené frakce byly rovněž v přípravné fázi workshopu analyzovány pomocí HPLC. S výsledky analýzy byly v průběhu workshopu žáci seznámeni pomocí prezentace, která je uvedena v Příloze H.

Roztoky neznámých kyselin

Pro přípravu úlohy rozlišení roztoků kyselin byly připraveny tři roztoky kyselin (kyseliny mravenčí, kyseliny octové a kyseliny sírové). Každá z těchto kyselin byla připravena v koncentraci 1 obj. %. Do každé odměrné baňky s deionizovanou vodou byl připipetován 1 ml dané kyseliny a poté byl objem doplněn vodou po rysku.

4 LABORATORNÍ ČÁST PŘÍPRAVY NA WORKSHOP

4.1 Optimalizace metody pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů ve vzorku moči a metody pro stanovení kofeinu v různých nápojích

Vývojem HPLC metody pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů – THBM, DMX, THEO a MUA jsem se zabývala ve své bakalářské práci (BP) [1]. Metoda vycházela z literatury zpracované v rešeršní části mé BP [10,40–42]. V průběhu diplomové práce (DP) byla validovaná metoda z BP optimalizována na novou kolonu (Chromservis, ARION® Plus C18). Jednak byla zavedena metoda pro analýzu kofeinu a jeho metabolitů na nové koloně, dále také metoda pro rychlou analýzu obsahu kofeinu v různých matricích kofeinových nápojů. Původní metoda z BP byla modifikována jednak z důvodu změny kolony, ale i za účelem zkrácení doby analýzy pro vzorky, kde byl analyzován pouze obsah kofeinu.

Úprava metody pro stanovení metabolitů kofeinu v moči zahrnovala optimalizaci podmínek separace při použití kolony se stejnými rozměry a se shodnou stacionární fází jako byla původní kolona použitá v BP. Nová kolona se lišila jejím výrobcem. Nově optimalizovaná metoda pro analýzu kofeinu a jeho metabolitů byla následně použita nejen pro účely workshopu, ale i do databáze analytických metod výrobce chromatografické kolony [43]. V průběhu optimalizace metody bylo nutné upravit složení mobilní fáze a teplotu kolonového prostoru. Objem nástřiku byl optimalizován za účelem zvýšení meze detekce pro jednotlivé metabolity kofeinu ve vzorku moči. Analýza probíhala dle gradientu, který téměř odpovídal metodě použité v BP. Pouze došlo ke zvýšení podílu MFB z 15 % na 25 %. Zvýšením došlo k zrychlení celé analýzy. Parametry původní i optimalizované analytické metody a konkrétní průběh eluce jsou uvedeny v Tabulce 7 a v Tabulce 8.

Tabulka 7: Porovnání parametrů chromatografické separace v BP a DP (analýza metabolitů ve vzorcích moči).

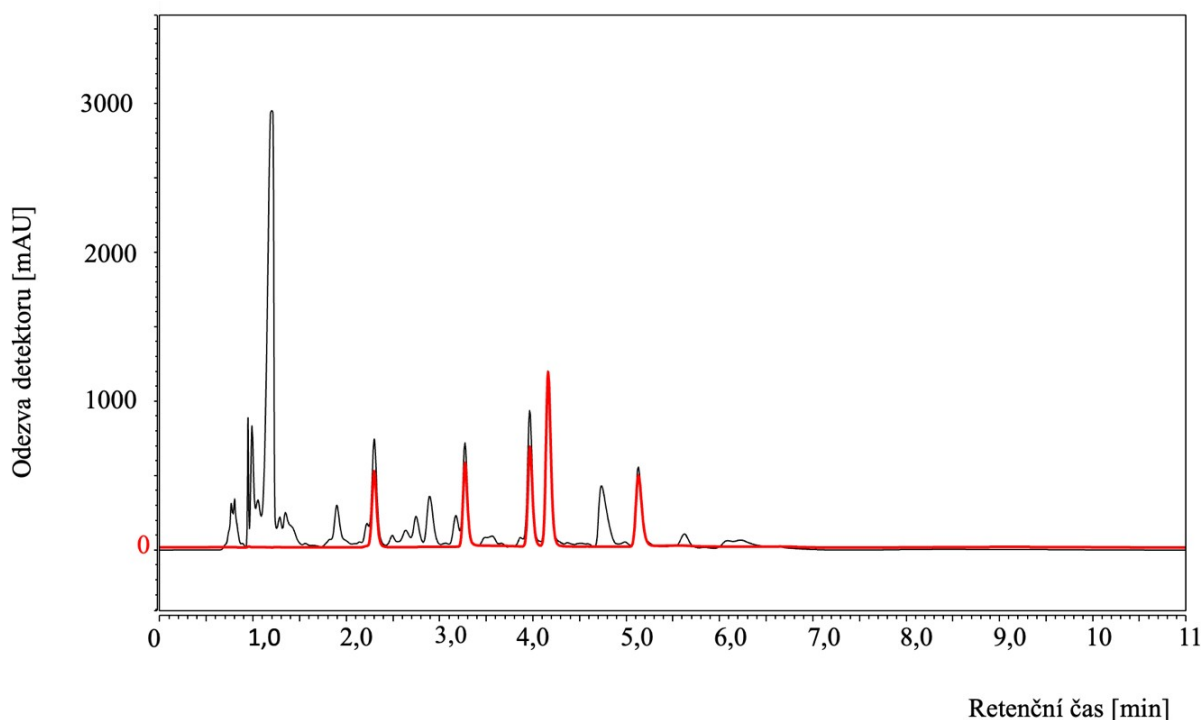
BP		
Chromatografická kolona	KinetexEvo C18; délka 150 x 3 mm; 5 µm	
Mobilní fáze	MFA	voda + 1 obj.% kyselina octová
	MFB	methanol
Teplota [°C]	30	
Objem nástřiku vzorku [µl]	10	
Průtok MF [ml/min]	1	
Délka analýzy [min]	11	

DP		
Chromatografická kolona	ARION® Plus C18; 150 x 3 mm, 5 µm	
Mobilní fáze	MFA	voda + 1 obj.% kyselina octová
	MFB	methanol
Teplota [°C]	35	
Objem nástřiku vzorku [µl]	65	
Průtok MF [ml/min]	1	
Délka analýzy [min]	11	

Tabulka 8: Srovnání gradientové eluce v BP a DP.

BP			DP		
Čas [min]	Průtok MF [ml/min]	Podíl MFB [%]	Čas [min]	Průtok MF [ml/min]	Podíl MFB [%]
0	1	6	0	1	6
3		15	3		25
5,5		15	5,5		25
11		6	11		6
11		6	11		6

Na Obrázku 4 jsou společné chromatogramy analýzy směsného roztoku standardů (STD_{mix}) a reálného vzorku moči po požití kofeinového nápoje. Přičemž analýza STD_{mix} je v chromatogramu červenou barvou a analýza reálného vzorku je pak černou barvou.



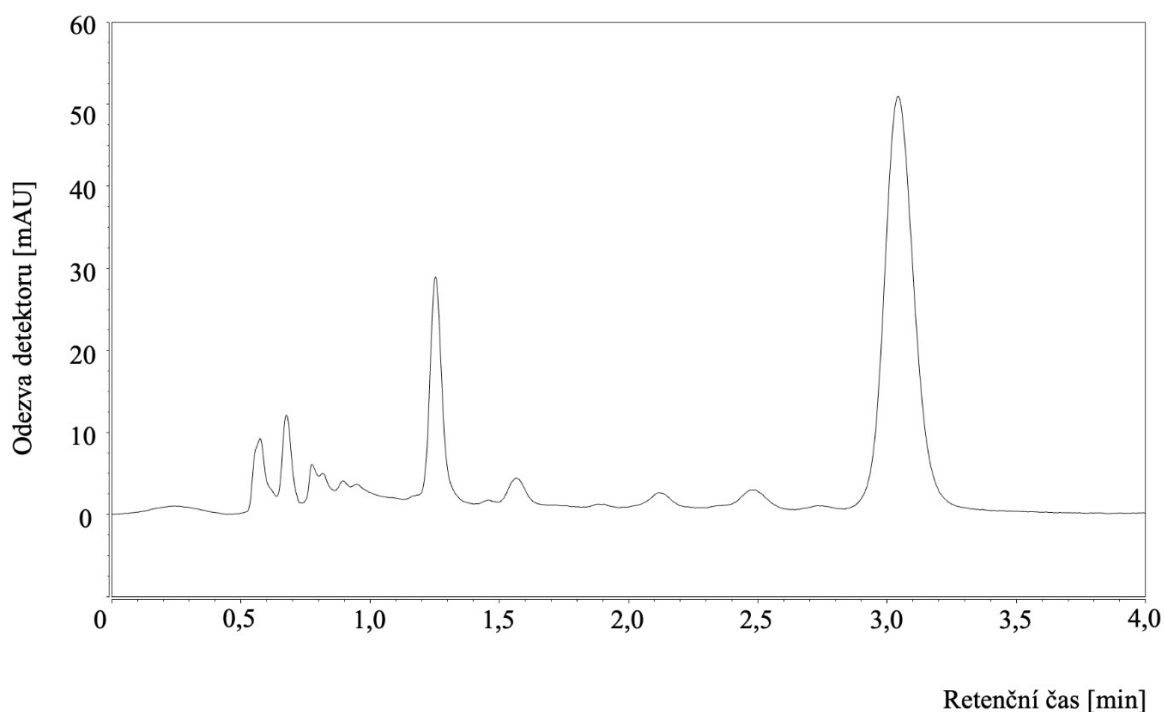
Obrázek 4: Chromatogramy analýzy směsného standardu (STD_{mix}) - červená a analýzy reálného vzorku moči – černá.

Dalším krokem byla optimalizace analytické metody na podmínky umožňující rychlou analýzu obsahu kofeinu v nápojích. Bylo důležité zavést takovou metodu, která bude aplikovatelná na různé matrice a zároveň bude dostatečně rychlá pro účely workshopu žáků. Optimalizace chromatografických podmínek této metody je předmětem maturitní práce žákyně Gymnázia J.V. Jirsíka Kateřiny Černé. Parametry optimalizované analytické metody pro stanovení kofeinu jsou shrnuty v Tabulce 9. Následně byla tato metoda validována za účelem využití nově optimalizované metody pro kvantitativní analýzu kofeinu v různých nápojích.

Tabulka 9: Parametry chromatografické separace pro stanovení kofeinu v nápojích.

Chromatografická kolona		ARION® Plus C18; 150 x 3,0 mm, 5 µm
Mobilní fáze	MFA 78 %	voda + 1 obj. % kyseliny octové
	MFB 22 %	methanol
Průtok MF [ml/min]		1
Teplota [°C]		35
Objem nástřiku vzorku [µl]		5
Délka analýzy [min]		4

Na Obrázku 5 je chromatogram analýzy vzorku rozpustné kávy Nescafé (+). Retenční čas kofeinu při analýze za podmínek uvedených v Tabulce 9 byl 3,0 min. Délka analýzy byla 4 min, což bylo pro účel analýz relativně velkého množství vzorků v krátkém čase ideální.



Obrázek 5: Chromatogram analýzy vzorku kávy Nescafé (+) – 15x naředěno.

4.2 Validace metody pro stanovení kofeinu v nápojích

Po optimalizaci metody byla provedena základní validace analytické metody. Použitými validačními parametry byly: linearita, správnost a přesnost, mez detekce a mez stanovitelnosti.

Linearita

V průběhu hodnocení linearity bylo potřeba nalézt vhodný koncentrační rozsah metody a prokázat přímou úměru mezi koncentrací kofeinu ve vzorku a odezvou detektoru. Hodnocení linearity bylo provedeno dle kritérií přijatelnosti: korelační koeficient $R \geq 0,9900$ a QC koeficient $\leq 5,00 \%$ [44]. Pro nalezení koncentračního rozsahu metody bylo použito celkem devět koncentračních úrovní, přičemž každá koncentrační úroveň byla proměřena ve třech na sobě nezávislých opakováních. Při hodnocení linearity metody analyt kofein splňoval veškerá kritéria přijatelnosti v koncentračním rozsahu 0,5–100 mg/l (Tabulka 10).

Tabulka 10: Validační parametry – linearita.

Parametr	Kritérium přijatelnosti	Hodnota parametru
Směrnice [mg/l]	-	0,1688
Intercept [l]	-	-0,01929
Korelační koeficient [l]	$\geq 0,9900$	1,000
QC koeficient [%]	$\leq 5,00$	1,30

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Dalšími z hodnocených parametrů byly mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Kritéria byla hodnocena dle [44] pro LOD hodnota $S/N \geq 3$ a pro LOQ $S/N \geq 10$. LOD byla vyhodnocována na základě analýz roztoku STD o koncentraci 0,10 mg/l. LOQ pak byla vyhodnocována z výsledků analýz roztoku STD o koncentraci 0,50 mg/l. LOD bylo stanoveno na 0,10 mg/l, LOQ pak na 0,30 mg/l.

Správnost a přesnost

Jedním z cílů workshopu bylo zjistit obsah kofeinu v různých nápojích. Bylo tedy potřeba připravit takovou analytickou metodu, s jejímž využitím lze stanovit koncentraci kofeinu přesně a správně v různých maticích. Celkem bylo pro workshop připraveno šestnáct různých kofeinových nápojů, včetně vzorků s mlékem, které mohly být potenciálně problémové v průběhu analýzy. Pro všechny vzorky bylo nejprve nalezeno optimální ředění a následně ověřeno, že analýza splňuje podmínky přesnosti a správnosti.

Správnost metody, vyjadřovaná jako výtěžnost, je definována jako těsnost mezi experimentálně zjištěnou hodnotou koncentrace analytu a referenční hodnotou. Přesnost je pak vyjadřována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky analýz referenčního vzorku [45]. K ověření správnosti byly analyzované dvě sady vzorků – neobohacené vzorky (VZ + H₂O) a obohacené referenční vzorky – vzorek + standard (VZ + STD_{CAFF}), každá sada byla prováděna ve třech opakováních (viz 3.4 – Příprava neobohacených a obohacených vzorků).

Porovnání experimentálně získaných hodnot pro správnost a přesnost s kritérii přijatelnosti vycházejícími z doporučení AOAC [46] je uvedeno v Tabulce 11, zdrojová data v Příloze A. Požadovaná kritéria správnosti těsně nesplňovaly tři vzorky, konkrétně jeden z analyzovaných vzorků s mlékem – Jacobs 3v1, jedna z analýz vzorku RedBull a Coca-coly. Průměr třech opakování měření těchto vzorků již ale podmínky splňoval, což je pro využití metody pro účely žákovského workshopu považováno za dostačující. Ostatní vzorky již splňovaly požadovaná kritéria pro všechna měření a průměrná správnost třech opakování byla v rozmezí 81-98 %. Přesnost žádného z neobohacených ani obohacených vzorků nepřekročila 7,3 %, tato hodnota byla vypočtena pro vzorek čaje AHMAD, respektive vzorek kávy Jacobs 3v1. Pro ostatní analyzované vzorky byla hodnota přesnosti nižší. Lze konstatovat, že jak pro přesnost, tak pro správnost byla kritéria přijatelnosti dle doporučení AOAC splněna.

Tabulka 11: Validační parametry – správnost Re a přesnost RSD.

Správnost Re [%]			
Koncentrační úroveň	Kritérium přijatelnosti	Rozsah průměrné Re [%]	
10 ⁻⁵	80-110	81–98	
10 ⁻⁶	80-110		
Přesnost RSD [%]			
Koncentrační úroveň	Kritérium přijatelnosti	Neobohacený (rozsah)	Obohacený (rozsah)
10 ⁻⁵	≤ 7,3	0,43-0,79	0,5-0,73
10 ⁻⁶	≤ 11	1,0-7,5	1,3-7,3

4.3 Stanovení kofeinu ve vzorcích čaje – SOČ práce

Součástí příprav na workshop bylo i vedení práce studentky Gymnázia J.V. Jirsíka Kateřiny Černé, která pracovala na optimalizaci metody stanovení kofeinu. Mým úkolem bylo Kateřinu v laboratoři vést, plánovat její práci a následně jí pomoci s psaním její práce. Optimalizovanou analytickou metodu Kateřina využívala při analýze vzorků čaje. Analyzovala obsah kofeinu v sedmi vzorcích čaje, včetně méně obvyklého bílého čaje či zeleného čaje matcha. Také se zabývala kinetikou uvolňování kofeinu v průběhu louhování

čaje. Odebírala vzorky čaje v průběhu extrakce po 20, 40, 60, 180, 900 a 3600 sekundách. V současné době se práce zpracovává.

4.4 Kvalitativní analýza kofeinu a jeho metabolitů v moči

Pro kvalitativní analýzu kofeinu a jeho metabolitů ve vzorcích moči byly použity chromatogramy HPLC analýz vzorků moči ve spojení s vyhodnocením snímaných absorpčních spekter. Pomocí metody absorpční spektrofotometrie lze určit, které vlnové délky a jakou mírou vzorek pohlcuje. Spojení metody retenčních časů a absorpční spektroskopie je poměrně spolehlivou cestou k identifikaci analytů ve vzorku. V této práci je používán detektor s diodovým polem UV-VIS, který umožňuje snímat celé absorpční spektrum v reálném čase v průběhu celé chromatografické analýzy. V průběhu analýz vzorků moči byla porovnávána vždy absorpční spektra získaná analýzou roztoku standardů (MUA, THBM, DMX, THEO a CAFF) a vzorku moči v čase 0; 2,5; 4 a 8 hod.

Při přípravě roztoku standardu MUA dochází často k částečnému rozkladu, jako možné vysvětlení se nabízí přeměně původní látky v jiný izomer. Vznik izomeru lze usuzovat dle znalostí metabolismu kofeinu. V chromatogramu analýzy roztoku standardu lze následně pozorovat dva koelující píky (retenční časy 2,2, resp. 2,4 min). Rovněž analýza vzorku moči prokázala přítomnost těchto dvou píků. Při porovnání absorpčních spekter získaných analýzou roztoku standardů pro píky analytů s retenčními časy $t_R = 2,2$ min a $t_R = 2,4$ min jsou sledována téměř totožná absorpční maxima, konkrétně 230 a 286 nm a u druhého píku, produktu přeměny původní látky MUA jsou maxima s vlnovou délkou 229 a 286 nm. Poměr intenzit absorpčních maxim je identický. Absorpční spektrum vzorku moči před požitím zdroje kofeinu v daném retenčním čase vykazuje absorpční maxima v odlišných vlnových délkách, konkrétně 222 a 276 nm, respektive 222 a 282 nm. Ve vzorcích moči 2,5 hod, 4 hod a 8 hod od požití zdroje kofeinu, je v chromatogramu měřeném při vlnové délce 270 nm detekován široký pík s retenčním časem $t_R = 2,4$ min, jehož intenzita s přibývajícím časem roste. Při podrobné analýze absorpčních spekter lze říct, že shodné absorpční spektrum s absorpčním spektrem standardu MUA bylo získáno pouze pro vzorek moči odebraný po 8 hod od požití zdroje kofeinu. Poměr intenzit i vlnová délka maxim jsou identické, konkrétně 230 a 286 nm. U vzorků moči 2,5 hod a 4 hod obsahuje absorpční spektrum maxima při vlnových délkách 222 a 276 nm, respektive 223 a 281 nm, obdobně jako u vzorku 0 hod. Případná detekce MUA pouze ve vzorku moči odebraném až po 8 hod od požití zdroje kofeinu pravděpodobně souvisí s faktem, že MUA je produkt postupné metabolické přeměny

trimethylxanthinu na dimethylxantinu, dále na methylxantin a následně na methylmočovou kyselinu (MUA) [10].

Porovnáním absorpčních spekter pro metabolit THBM ($t_R = 3,3$ min) pro analýzy vzorku roztoku standardu moči v čase 0, 2,5 a 8 hod a stejných vzorků moči obohacených standardem je vidět, že intenzita metabolitu THBM ve vzorcích moči s časem roste. Rovněž vzhledem k absorpčním spektrům, kde nedochází ke změně poměru intenzit absorpčních maxim a rovněž nedochází k významným změnám vlnových délek těchto maxim, lze říct, že koncentrace THBM v analyzovaných vzorcích moči s časem roste a nepředpokládá se koeluce s jiným analytem ve vzorku moči. THBM byl detekován i ve vzorku moči v čase 0 hod, tedy před požitím zdroje kofeinu. Na základě naměřených dat lze usuzovat, že THBM ve vzorku moči nemusí mít původ pouze v metabolismu kofeinu právě požitého nápoje. U vzorku 0 hod bez přidání STD byla vlnová délka absorpčních maxim 220 a 274 nm, při přidání STD pak 223 a 274 nm. Ve vzorku 2,5 hod bez přidání STD byly vlnové délky 224 a 274 nm. Stejně hodnoty byly získány pro ostatní analyzované vzorky. Lze tedy předpokládat, že píky v chromatogramu v daném retenčním čase opravdu přísluší THBM.

Na základě analýzy vzorku roztoku standardu DMX byl získán retenční čas tohoto analytu ($t_R = 4,0$ min) a informace o vlnových délkách absorpčních maxim (226 a 271 nm). Absorpční spektrum v ($t_R = 4,0$ min) vzorku moči v čase 0 hod má absorpční maxima při vlnových délkách 223 a 275 nm. V chromatogramech získaných analýzou vzorků moči po požití kofeinu sledujeme jak vlnové délky maxim standardu DMX, tak analytu detekovaného ve vzorku moči před požitím kofeinu. Předpoklad, že dochází ke koeluci více sloučenin, potvrzuje i analýza spekter vzorků s přidáním standardem. Metabolit THEO nebyl ve vzorcích moči detekován.

Analýza spekter v retenčním čase odpovídajícím analytu CAFF ($t_R = 5,2$ min) naznačuje koeluci analytů. Například pro vzorek moči v čase 2,5 hod bylo získáno spektrum s maximy 220 a 268 nm a po přidavku standardu 220 a 274 nm, současně došlo ke změně vzájemného poměru intenzit jednotlivých maxim. Obdobné výsledky byly získány i pro ostatní analyzované vzorky při porovnání spekter získaných pro analýzu moči bez a s přidáním standardem.

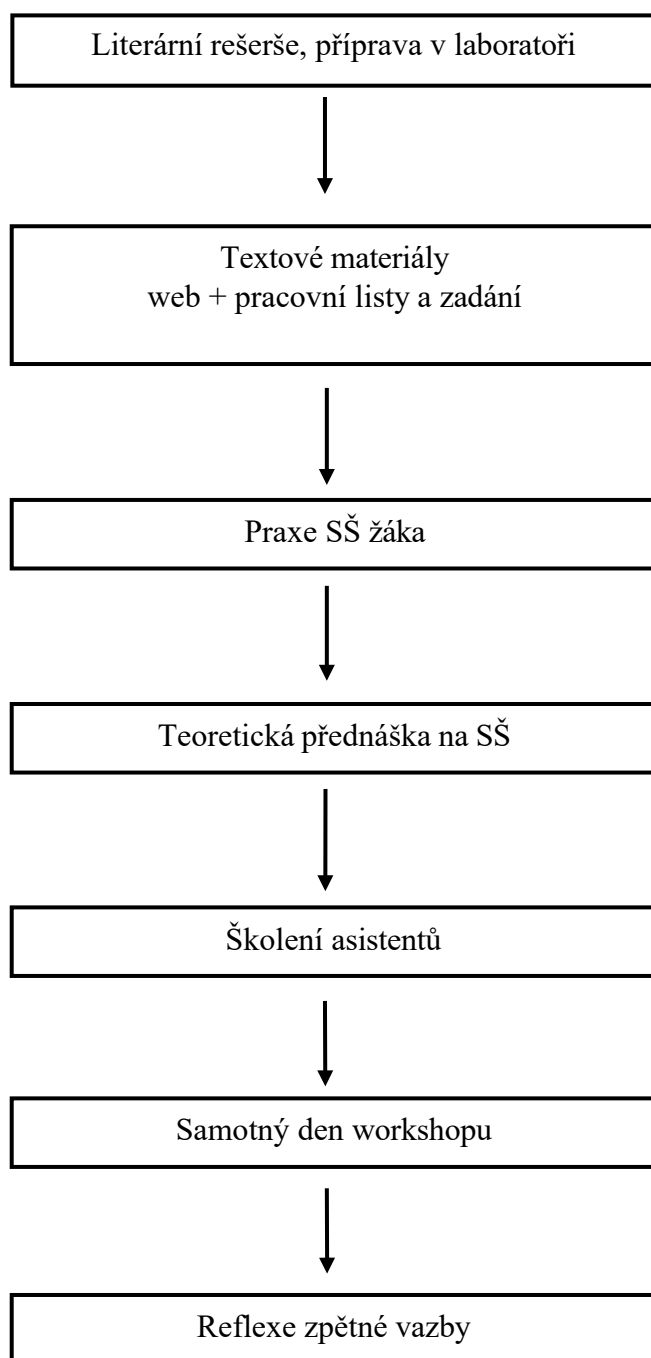
Přesnější informace ohledně přítomnosti konkrétních metabolitů a případné koeluci s jinými látkami by mohla přinést následná analýza pomocí LC/MS. Tímto tématem se ve své bakalářské práci zabývala studentka Kateřina Tesaříková [46].

5 VLASTNÍ PŘÍPRAVA WORKSHOPU

Konání workshopu předcházela pečlivá příprava. V BP byla zpracována literární rešerše o kofeinu s důrazem na jeho metabolismus v lidském organismu. Také byla v bakalářské práci vyvinuta metoda pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů v reálných vzorcích moči. Na základě těchto poznatků byly připraveny textové materiály potřebné pro workshop – zadání, pracovní listy a články na webových stránkách. V tomto bodě přípravy již bylo potřeba pečlivě rozplánovat program, brát v úvahu časovou náročnost dílčích úloh, dbát na komplexnost, vyváženost a srozumitelnost zadávaných úkolů. K ověření, zda jsou texty a úkoly dobře zpracované, srozumitelně popsané a vhodné pro vybranou cílovou skupinu, byl osloven žák SŠ, který v laboratoři analytické chemie vykonával svou povinnou praxi.

Přibližně týden před vlastním workshopem proběhla teoretická přednáška na střední škole, během níž byli žáci seznámeni se základními informacemi o kofeinu a také s principem kapalinové chromatografie. Těsně před workshopem proběhlo i školení asistentů (studentů PřF JČU), kteří pomáhali účastníkům v laboratoři v průběhu programu workshopu.

Na žáky a jejich pedagogický doprovod v den workshopu čekal přibližně 5-6hodinový program, který kromě práce v laboratoři obsahoval i úvodní instruktáž včetně opakování bezpečnosti práce v laboratoři a shrnující minikonference výsledků v závěru programu. Těsně před odchodem byli přítomní žáci i pedagog požádáni o vyplnění zpětné vazby do dotazníků. Po proběhnutí prvních dvou workshopů byla zpětná vazba vyhodnocena a využita ke zlepšení programu při dalším turnusu. Bodově je celý proces přípravy shrnut na Obrázku 6 níže.



Obrázek 6: Průběh přípravy workshopu.

5.1 Příprava textových materiálů

Textové materiály tvořily jednak zadání úloh, která obsahovala krátké teoretické úvody k jednotlivým úlohám, tak postupy práce pro dílčí úlohy. Dále byly vytvořeny pracovní listy, kam si žáci zaznamenávali průběh jejich práce, potřebné výpočty a vypracovávali doplňující cvičení vztahujících se k tématům. Textové materiály byly tvořeny se záměrem přiblížit žákům teoretický základ k úlohám. V teoretickém úvodu byl největší důraz kladen na princip kapalinové chromatografie, průběh měření a následné vyhodnocení naměřených dat. Pro většinu žáků SŠ je obvykle kapalinová chromatografie zcela nové téma. Žáci měli také k dispozici rozšířenou verzi teoretických úvodů na webových stránkách *Přírodověda.cz*, které byly pro tento účel vytvořeny. Vzhled webových stránek je uveden na Obrázku 7.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta
Centrum pro přírodovědné vzdělávání

Vyhledávání

Úvod Studium učitelství pro SŠ Pro školy a CZV Nabídka SOC Didaktické materiály Výzkum a rozhovory O nás

Úvod > Didaktické materiály > Chemie > Kofein - workshop pro studenty SŠ

Kofein - workshop pro studenty SŠ

Program pro studenty středních škol na téma kofein - analýza obsahu kofeinu v nápojích a metabolitů kofeinu v moči, měření pH, extrakce kofeinu

Obecné informace o kofeinu

28.04.2022

CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C(=O)N2C

Vliv kofeinu na lidský organismus

07.04.2022

Biotransformace kofeinu

05.04.2022

Kapalinová chromatografie

01.04.2022

Síla kyselin/zásad

01.01.2022

HCOOH vs. H₂SO₄ vs. HCl

Měření pH

01.03.2022

Extrakce za zvýšeného tlaku (ASE)

01.02.2022

Obrázek 7: Vzhled webové stránky *Přírodověda.cz*.

Materiály na webových stránkách jsou rozšířenou verzí textů, které jsou uvedeny v úvodu zadání úloh. Texty o HPLC a kofeinu byly tvořeny na základě rešerše v mé bakalářské práci [1], texty o pH zejména ze středoškolských učebnic [48,49] a texty o ASE byly tvořeny z aplikačních listů a z webových stránek výrobce [50,51]. Veškeré laboratorní úkoly vychází z výsledků experimentů popsanych a diskutovaných v předcházející části textu (Kapitola 4). Zadání jednotlivých úloh workshopu spolu s pracovními listy jsou uvedeny jako Přílohy B a C diplomové práce. Výklad teoretických základů proběhl v průběhu přednášky na SŠ (Kapitola 5.4), jejíž podoba je uvedena v Příloze G.

5.2 Praxe SŠ žáka

První verze zadání a pracovních listů byla předložena žákovi 3. ročníku SOŠ chemického zaměření, který na PřF v laboratoři analytické chemie absolvoval svou povinnou praxi. Jeho úkolem bylo provést úlohy dle předložené verze zadání a v průběhu práce vyplnit pracovní listy. Jeho podněty a připomínky následně posloužily při úpravě materiálů. Zejména šlo o bližší vysvětlení některých pojmů. Na základě jeho podnětů byly do prezentace pro žáky SŠ před workshopem (Příloha G) přidány fotografie vybraných laboratorních pomůcek jako například: odstředivací zkumavka, vialka a krimpovací kleště.

5.3 Teoretická přednáška na SŠ

Přibližně týden před plánovaným dnem workshopu se konala teoretická přednáška na konkrétním gymnáziu. Přednáška byla věnována teoretickému základu kapalinové chromatografie, dále kofeinu a jeho metabolismu v lidském organismu. Poslední část přednášky byla zaměřena na organizaci workshopu včetně vybrání dvojice, která následně na workshopu analyzovala vzorek moči. Vybranému žákovi byly na přednášce předány zkumavky na odběr vzorků. Přednáška obsahovala často i neformální části, které pomohly k navázání bližšího vztahu s žáky. Během přednášky byly pokládány žákům otázky, které se týkaly konzumace kofeinu, působení této látky na lidský organismus a zdroje kofeinu. Na konci byl ponechán prostor pro dotazy žáků. Využita byla i vyřazená chromatografická kolona, kterou si měli žáci možnost prohlédnout. Žáci byli rovněž seznámeni s webovými stránkami *Přírodověda.cz*. Použitá prezentace je v Příloze G diplomové práce.

5.4 Školení asistentů

Vzhledem k poměrně velké náročnosti a různorodosti úkolů během workshopu bylo potřeba zapojit asistenty. Záměrně byli osloveni studentky a studenti učitelství, kteří si touto formu měli možnost vyzkoušet práci se středoškolskými žáky v laboratoři.

Asistenti byli před vlastním workshopem proškoleni. Školení probíhalo přímo v místě konání workshopu – laboratoř analytické chemie. K dispozici bylo i autorské řešení pracovních listů. Při každém školení byl vybrán jeden z asistentů, který byl primárně určen pro dvojici analyzující vzorek moči. Zároveň byli asistenti seznámeni se základními principy fungování kapalinové chromatografie.

5.5 Samotný den workshopu

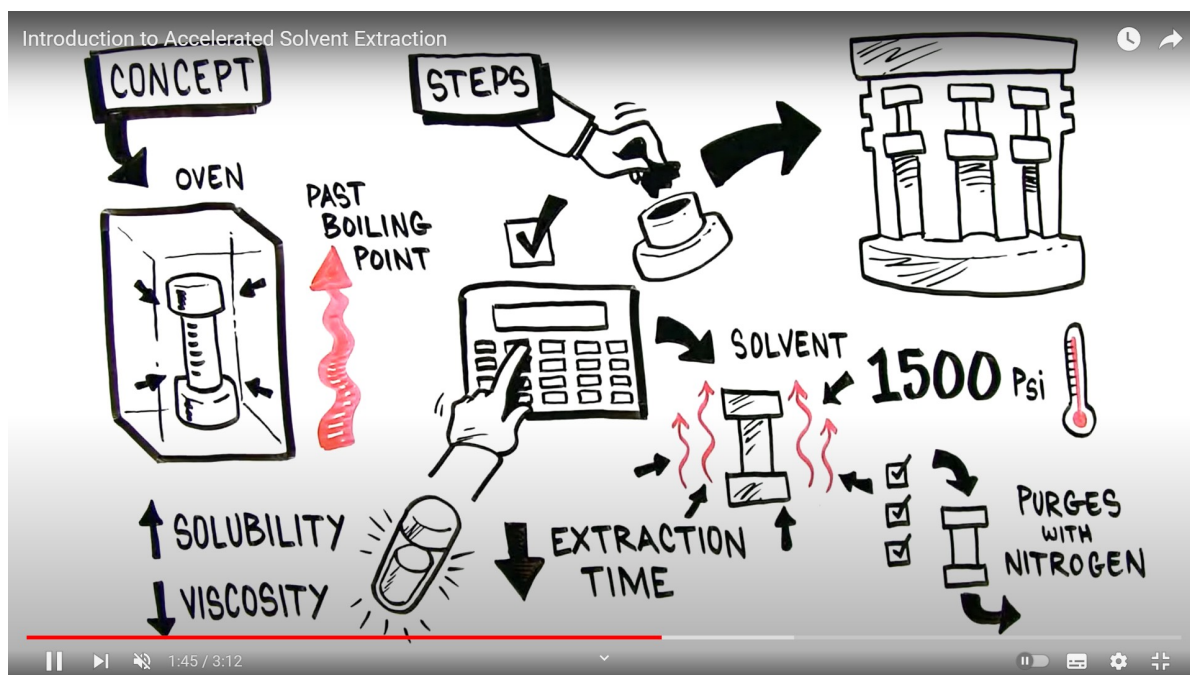
Workshopy probíhaly ve dvou turnusech vždy podle gymnázií, pro které byly organizovány. První turnus byl pro žáky z Gymnázia České Budějovice, Jírovцова 8 v termínech 19. a 20. dubna 2022. Druhý byl pro Gymnázium J. V. Jirsíka (GJVJ), který se konal 24. a 26. května. 2022. Délka programu workshopu byla cca 5-6 hod, záviselo na časových možnostech daných žáků a pedagogů. Program workshopu je uveden na Obrázku 8.

PROGRAM WORKSHOPU	
8:00 – 12: 00 Práce v laboratoři	
○ Stanovení kofeinu a jeho metabolitů ve vzorku moči – kvalitativní hodnocení	
○ Stanovení kofeinu v nápojích – kvantitativní hodnocení	
○ Měření pH nápojů	
12:15 – 13:15 minikonference (vyhodnocení výsledků)	

Obrázek 8: Program workshopu.

Před začátkem samotného programu workshopu byli žáci seznámeni s bezpečností práce v laboratoři a s body programu. V laboratoři byl zopakován princip kapalinové chromatografie. Vše bylo ukázáno přímo na přístroji a přístrojovém počítači. Rovněž byli žáci seznámeni s fungováním ASE, jehož popis byl navíc doplněn o video v anglickém jazyce – ukázka níže (Obrázek 9). Byla provedena i instruktáž práce s automatickou pipetou a

analytickými váhami. Kromě instruktáže práce s laboratorním vybavením byl s žáky zopakován i postup přípravy odměrného roztoku.

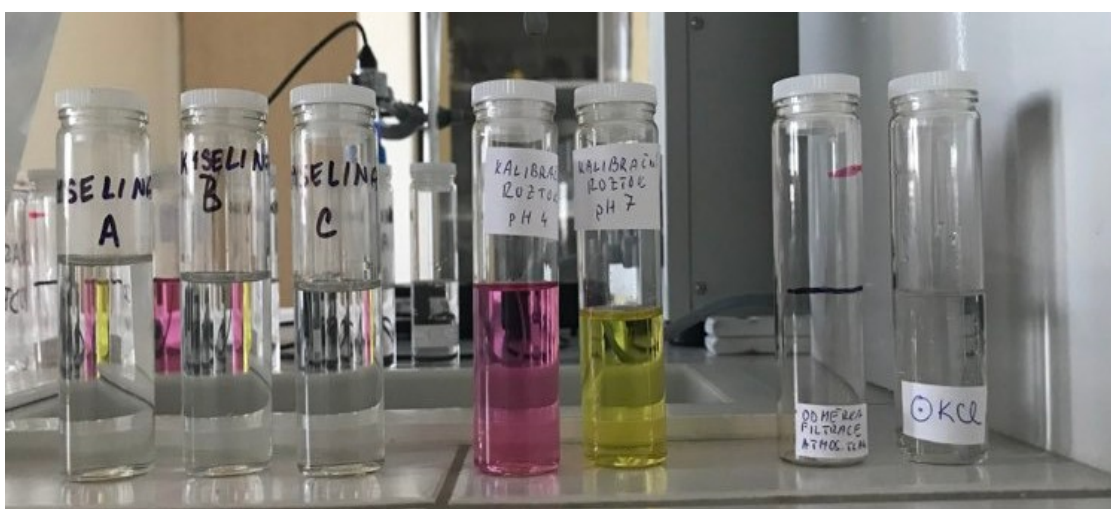


Obrázek 9: Snímek obrazovky videa o principu ASE. Video dostupné na [51-52].

Po teoretickém úvodu se již přešlo k práci. Žáci byli rozděleni do dvojic a bylo jim přiděleno pracovní místo. Celkem bylo v laboratoři připraveno sedm pracovních míst. Každou dvojici (kromě dvojice analyzující moč) byla vylosována i kartička (Příloha E), na které byly uvedeny druhy nápojů, které měli za úkol analyzovat. Vzhled takového místa je uveden na obrázcích níže (Obrázek 10 a Obrázek 11). Na pracovním místě bylo vše potřebné pro přípravu vzorků k HPLC analýze i pro měření pH. Pracovní místa žáků byla vybavena aparaturou pro filtraci, roztoky pro kalibraci pH metru, skleněnou elektrodou a pH metrem, byly připraveny pipety, kádinky o objemu 250 ml a vysoké nádoby s víčkem využívané k měření pH. Žáci měli k dispozici skleněnou tyčinku, slánky, nůžky a popisovače. Dále měli připravené roztoky neznámých kyselin, udržovací roztok ke skleněné elektrodě, vzorky ovocného nápoje a džusu. Byly k dispozici i tři nádoby na odpad: plastový odpad, odpad buničina a na odpad po oplachu elektrody.



Obrázek 10: Pracovní místo žáků.



Obrázek 11: Detail roztoků na pracovním stole.

Cílem nebylo stihnout vše, spíše si vyzkoušet zejména to, co žáky zajímá a osvojit si potřebnou laboratorní praxi. Ve chvílích, kdy například museli žáci čekat na vychladnutí připravovaných nápojů, byl prostor pro vypracování úloh v pracovním listu, které se vztahovaly k prováděným experimentům – chemické názvosloví, početní úlohy.

Po skončení laboratorní části byl program přesunut zpět do posluchárny, kde byl prostor pro občerstvení a vyplnění zpětné vazby. Po pauze následovala minikonference s vyhodnocením prováděných experimentů. Minikonference byla plánována v délce asi 1 hod.

V první části minikonference bylo úkolem žáků vyhodnotit výsledky chromatografických analýz kofeinových nápojů s využitím vzdáleného přístupu k přístrojovému počítači v laboratoři a následně dle získaných hodnot pokračovat ve výpočtech uvedených v pracovním listu (Příloha B-C). Úkolem dvojice pracující na analýze biologických vzorků bylo věnovat se identifikaci píků analytů v získaných chromatogramech.

Další část minikonference byla věnována prezentaci výsledků. První vždy prezentovala dvojice analyzující vzorky moči. Žáci v krátkosti popsali průběh jejich práce a pomocí chromatogramů uvedli rozdíly v analýzách vzorku moči před a po vypití kofeinového nápoje.

Žáky byl i objasněn důvod přidávání roztoku standardů do reálných vzorků. Dále probíhala prezentace a vzájemné porovnání výsledků analýz kofeinových nápojů. Výsledky byly psány do excelové tabulky, která byla promítána na plátno, aby bylo možné porovnávat obsah kofeinu v různých nápojích a množství konkrétního kofeinového nápoje, které lze za den vypít, aniž by byla překročena denní doporučená dávka. Současně byla na tabuli vytvořena škála pH, kam žáci zaznamenávali naměřené hodnoty pH nápojů.

6 HODNOCENÍ WORKSHOPU

6.1 Pedagogové

Po každém dni workshopu byl přítomný středoškolský pedagog požádán o vyplnění dotazníku, který sloužil jako zpětná vazba. Konkrétní zpětnovazební dotazník je uveden v Příloze F. Na spolupráci byli osloveni vždy pedagogové, kteří chemii, konkrétně seminář z chemie, vyučují. Otázky se týkaly zejména organizace workshopu, časovému rozložení úloh, náročnosti úloh nebo také vhodnosti zařazení podobných programů do výuky na gymnáziích. Nejdůležitější pro mě byla zpětná vazba po prvním turnusu workshopu, díky níž jsem mohla udělat změny do turnusu druhého. Shrnutí zpětné vazby pedagogů je uvedeno v Tabulce 12.

Tabulka 12: Zpětná vazba – pedagogové.

Zpětná vazba – pedagogové	
pozitiva	praktická výuka moderních analytických metod
	pestrost programu
	propojení s každodenním života
	práce přímo na VŠ
	vhodné pro žáky 3. ročníku chemického semináře
	přítomnost asistentů
	teoretická přednáška před workshopem
	web <i>Přírodověda.cz</i>
negativa	dlouhý teoretický úvod v laboratoři – instruktáž práce s centrifugou
	anglické video o ASE

Hodnocení pedagogů bylo vesměs kladné. Při prvním turnusu byla zmíněna zbytečně dlouhá instruktáž. Do druhého turnusu byla tedy vynechána instruktáž práce s centrifugou a celkově byl kladen důraz na nejdůležitější zásady práce. Video v angličtině, které doplňovalo vysvětlení fungování ASE, bylo dle zpětné vazby pedagogů kvůli cizímu jazyku spíše nevhodné. Video bylo animované s anglickými titulky, zároveň bylo po skončení ještě shrnuto. Jelikož se negativní reakce na angličtinu ve videu neobjevila v žádné ze zpětných vazeb žáků, bylo rozhodnuto, že bude v programu workshopu ponecháno.

6.2 Žáci

Na workshop byli pozváni žáci 3. ročníku čtyřletého gymnázia a odpovídajícího ročníku víceletého gymnázia, kteří navštěvovali chemický seminář. Workshop proběhl celkem čtyřikrát. Dohromady přišlo více než čtyři desítky žáků, u kterých lze předpokládat zájem o

chemii, popřípadě úmysl pokračovat ve studiu přírodních věd na vysoké škole. Žáci byli požádáni o vyplnění zpětné vazby. Dotazník pro žáky se lišil od dotazníku pro pedagogy. Jeho konkrétní podoba je uvedena v Příloze F. Otázky se týkaly stejně jako u pedagogů průběhu workshopu, časové dotace, náročnosti jednotlivých úloh. Zajímalo nás také, zda se již žáci s kapalinovou chromatografií setkali a jaké jsou jejich plány pro vysokoškolské studium. Shrnutí zpětné vazby žáků je uvedeno v Tabulce 13.

Tabulka 13: Zpětná vazba – žáci.

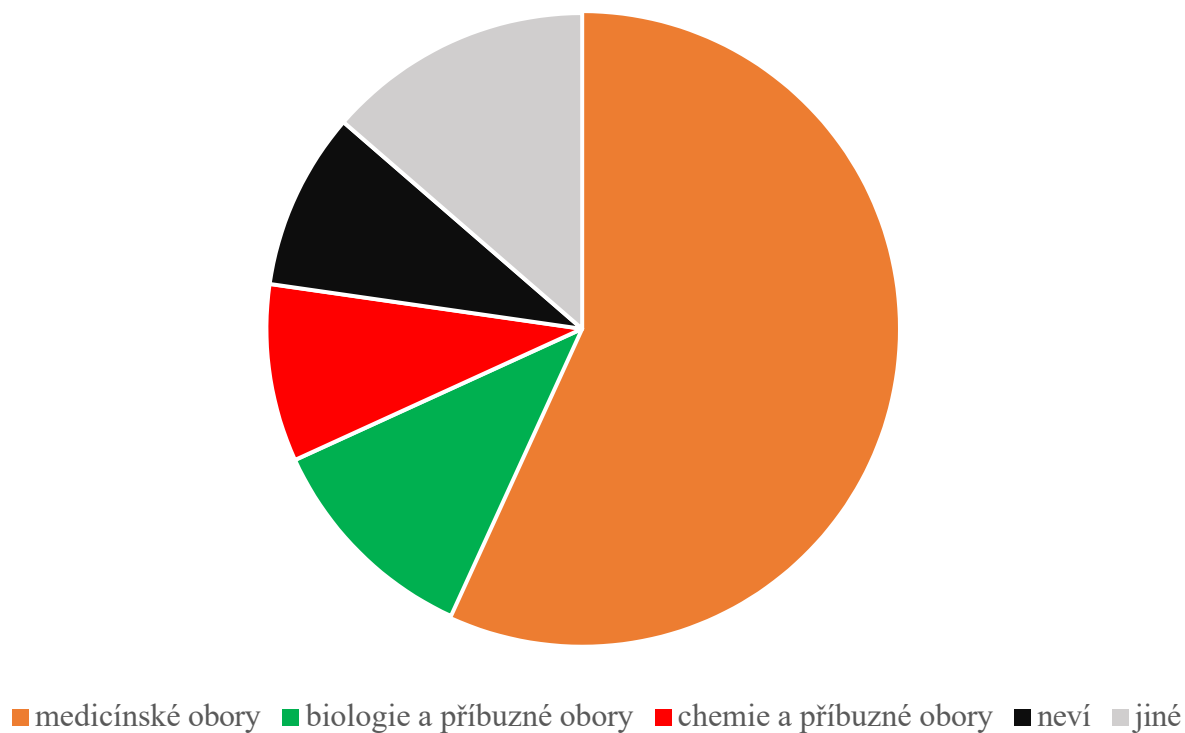
Zpětná vazba – žáci	
pozitiva	podrobný pracovní postup
	možnost vyzkoušet si práci v profesionální laboratoři
	propojení chemie s každodenním životem
	přátelská atmosféra
	důležitost webu <i>Přírodověda.cz</i>
negativa	mírný chaos
	málo pauz na občerstvení
	nemožnost si vyzkoušet ASE
	krátký program
	dlouhý program

Ze zpětné vazby po prvním turnusu vyplývalo, že by byl u žáků zájem vyzkoušet si práci s ASE. Při prvním turnusu byla extrakce prováděna ve čtyřech opakováních, ale pouze jednou dvojicí. Do dalšího turnusu došlo tedy ke změně. Možnost vyzkoušet si extrakci byla umožněna více dvojicím, ale pouze s jedním opakováním.

S praktickou prací s HPLC se před workshopem setkala čtveřice žáků. Jednalo se o den otevřených dveří katedry chemie PřF UK, ostatní při práci na svých středoškolských odborných pracích. Dva žáci současně uvádí i svou teoretickou zkušenost jeden z KSICHT (Korespondenčního semináře s chemickou tematikou) a jedna žákyně z korespondenčního semináře organizovaného Farmaceutickou fakultou UK, tzv. FARMAKOSu.

Ukázala se důležitost materiálů na webových stránkách. Přestože žáci byli informováni, aby se před workshopem na stránky podívali a články si přečetli, většina účastníků prvního turnusu to neudělala. Ve zpětných vazbách žáci často uznali, že kdyby si alespoň částečně informace po teoretické přednášce zopakovali pomocí online článků, usnadnilo by jim to následnou práci v laboratoři. Před druhým turnusem byli žáci v průběhu teoretické přednášky více na web upozorněni, což vedlo následně i k lepší přípravě na samotný laboratorní program ze strany žáků prostřednictvím materiálů na webu.

Jedna z otázek ve zpětné vazbě byla zaměřena na záměr studia na VŠ. Záměrem bylo oslovit zejména žáky, u nichž je předpoklad, že se v dalším studiu s chemií jakýmkoli způsobem setkají. V odpovědích se tento předpoklad potvrdil. Více než $\frac{3}{4}$ účastníků zmínilo nějaký obor přírodních věd, nejvíce byly zmíněny medicínské obory. Jak je vidět z grafu na Obrázku 12, přímo o studiu chemie uvažuje asi 10 % zúčastněných žáků



Obrázek 12: Preference žáků dalšího studia na VŠ.

7 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce si kladla za cíl připravit a uskutečnit workshop pro žáky středních škol na téma Kofein. Celý tento proces zahrnoval teoretickou a laboratorní přípravu veškerých úloh pro žáky, zpracování didaktických materiálů, vlastní program s žáky, sesbírání, vyhodnocení a reflexi zpětné vazby.

V teoretické části je zpracována literární rešerše na téma kofein, zdroje jeho příjmu, biotransformace a vliv kofeinu na organismus člověka. Druhá část teoretického úvodu je věnována didaktice přírodních věd s důrazem na chemii, jsou shrnuty cíle výuky a možnosti jejich dosažení. Největší důraz je kladen na výukové metody a možnosti jejich začlenění v průběhu laboratorního workshopu, zmíněny jsou i didaktické prostředky a didaktické zásady.

Praktická část práce shrnuje laboratorní přípravu jednotlivých úloh z programu workshopu. Nejprve byla optimalizována metoda pro stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí kapalinové chromatografie. Podařilo se převést v bakalářské práci zavedenou analytickou metodu na novou kolonu a také provést optimalizaci podmínek pro rychlou analýzu kofeinu v nápojích. Metoda pro analýzu kofeinu v nápojích byla následně validována v koncentračním rozsahu 0,5 – 100 mg/l. Pro účely workshopu byla věnována pozornost možnostem využití zavedených metod pro kvalitativní analýzu metabolitů kofeinu a kofeinu samotného ve vzorcích moči a kvantitativní analýzu kofeinu v nápojích. Při workshopu měli žáci možnost stanovit obsah kofeinu v šestnácti různých nápojích. Byly vyzkoušeny různé způsoby extrakce kofeinu z kávy – extrakce za vyššího tlaku (ASE) a klasická filtrace. Na základě provedeného měření pH a HPLC analýzy byly porovnány vlastnosti získaných extraktů. Postupně se podařilo vše spojit a vymyslet souvislý laboratorní program.

Pro žáky byly připraveny textové materiály k daným úlohám, které se vždy skládaly z teoretického zadání a pracovního listu, který sloužil žákům jako výstup z workshopu. Byly vytvořeny tři typy úloh – stanovení metabolitů kofeinu, stanovení kofeinu v nápojích a měření pH. Textové materiály byly žákům k dispozici i na webové stránce *Přírodověda.cz*. Dále byla pro žáky připravena úvodní teoretická přednáška shrnující základní poznatky o kofeinu a princip kapalinové chromatografii. Důraz byl kladen i na zpracování zpětné vazby přítomných pedagogů a žáků.

Workshop proběhl celkem čtyřikrát. Po úvodní přednášce následoval přibližně pětihodinový program v laboratoři. Následně proběhlo vyhodnocení a prezentace dat formou minikonference. Žáci si díky návštěvě workshopu mohli vyzkoušet přístroje, se kterými se při laboratorních cvičeních na SŠ nesetkají. Rovněž si vyzkoušeli práci na komplexnějším tématu

a zároveň měli mimořádnou možnost vidět profesionální laboratoř. Podařilo se propojit znalosti a dovednosti nejen z jednotlivých přírodních věd, ale i procvičit angličtinu.

Součástí diplomové práce bylo také vedení žákyně ze střední školy, která si téma kofein a stanovení jeho obsahu v různých čajích vybrala jako téma pro maturitní práci a středoškolskou odbornou činnost. Tato práce zatím nebyla zveřejněna.

8 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] K. Lávičková, *Metabolismus kofeinu v lidském organismu, stanovení vybraných metabolitů metodou HPLC*, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2021.
- [2] J.B. Blumberg, *Introduction to the proceedings of the fifth international scientific symposium on tea and human health* 1-4, Am. J. Clin. Nutr. 98 (2013) 1526–1528. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.060186>.
- [3] Coffee Research Institute, *Coffee history*, (2006). <http://www.coffeeresearch.org/coffee/history.htm>.
- [4] B.B. Fredholm, Notes on the history of caffeine use, Handb. Exp. Pharmacol. 200 (2011) 1–9. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_1.
- [5] A. Nehlig, *Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption*, Pharmacol. Rev. 70 (2018) 384–411. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014407>.
- [6] S. Sosková, *Možnosti Přípravy nanočástic a nanovláken s antimikrobiální složkou*, Vysoké učení technické v Brně, 2017.
- [7] EFSA, *Scientific Opinion on the safety of caffeine*, EFSA J. 13 (2015). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4102>.
- [8] I. Linhart, *Toxikologie: interakce škodlivých látek živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*, VŠCHT (2. vydání, 2014), Praha, 2014.
- [9] N. Thi, V. Thi, N. Thanh, T. Duc, Chemico-Biological Interactions Association of N-acetyltransferase-2 and glutathione S-transferase polymorphisms with idiopathic male infertility in Vietnam male subjects, Chem. Biol. Interact. 286 (2018) 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.03.001>.
- [10] M.S. Caubet, W. Elbast, M.C. Dubuc, J.L. Brazier, Analysis of urinary caffeine metabolites by HPLC-DAD: The use of metabolic ratios to assess CYP1A2 enzyme activity, J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 261–270. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00546-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00546-5).
- [11] L.L. Furge, K.J. Fletke, *HPLC determination of caffeine and paraxanthine in urine: An assay for cytochrome P450 1A2 activity*, Biochem. Mol. Biol. Educ. 35 (2007) 138–144. <https://doi.org/10.1002/bmb.28>.
- [12] C. Willson, *The clinical toxicology of caffeine: A review and case study*, Toxicol. Reports. 5 (2018) 1140–1152. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.11.002>.
- [13] N.L. Benowitz, *Clinical pharmacology of caffeine*, Annu. Rev. Med. 41 (1990) 277–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.41.020190.001425>.

- [14] A. Cano-Marquina, J.J. Tarín, A. Cano, *The impact of coffee on health*, Maturitas. 75 (2013) 7–21. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.02.002>.
- [15] J.H. O’Keefe, S.K. Bhatti, H.R. Patil, J.J. Dinicolantonio, S.C. Lucan, C.J. Lavie, *Effects of habitual coffee consumption on cardiometabolic disease, cardiovascular health, and all-cause mortality*, J. Am. Coll. Cardiol. 62 (2013) 1043–1051. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.06.035>.
- [16] L. McGachy, P. Tomášová, Z. Rošková, *Toxikologie a ekotoxikologie I*, VŠCHT, Praha, 2021.
- [17] E.G. de Mejia, M. V. Ramirez-Mares, Impact of caffeine and coffee on our health, Trends Endocrinol. Metab. 25 (2014) 489–492. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.07.003>.
- [18] C. Heller, U.K. Supermarkets Ban Energy Drinks for Shoppers Under 16, (2018). <https://www.bbc.com/news/uk-43287125>.
- [19] Pragolab, *Extrakce za zvýšeného tlaku a teploty – ASE*, (2015). <https://www.pragolab.cz/extrakce-za-zvyseneho-tlaku-a-teploty>.
- [20] H. Giergielewicz-Mozajska, L. Dabrowski, J. Namieśnik, Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples - Some aspects of theory and practice, Crit. Rev. Anal. Chem. 31 (2001) 149–165. <https://doi.org/10.1080/20014091076712>.
- [21] B.E. Richter, C. Pohl, B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, D. Corporation, T. Way, P.O. Box, *Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation*, (1996).
- [22] Doubleshot, *Příprava kávy*, (2020). <https://pripravakavy.cz/#clever-dripper>.
- [23] L. Bržňová, Svět kávy. *Jak poznáme kvalitu?*, Sdružení českých spotřebitelů pro Českou technologickou platformu pro potraviny, Praha, 2012.
- [24] Caffeine – *Chemistry Of Caffeine – Water, Compound, Molecules, and Effects*, Sci. Encycl. (2022). <https://science.jrank.org/pages/1111/Caffeine-Chemistry-caffeine.html>.
- [25] KOFIO, Keňa MOSES KAMURA – washed, (b.r.). <https://www.kofio.cz/kava/kena-moses-kamura-washed-sweet-beans-coffee/8359>.
- [26] M. Vnevková, *Proč je káva kyselá a jak kyselost kávy ovlivnit*, (2021). <https://www.lazenskakava.cz/kyselost-v-kave/>.
- [27] M. Lamichová, Vliv pražení kávy na obsahu antioxidantů a alkaloidů, 2018.

- [28] N.Z. Rao, M. Fuller, Acidity and Antioxidant Activity of Cold Brew Coffee, *Sci. Rep.* (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34392-w>.
- [29] HEPLTECH, *Inovovaný systém spolupráce škol*, (2013). https://www.dakol-karvina.cz/cz/projekty-skol-dakol/projekt-helptech/#article_15003.
- [30] Ministerstvo školství mládeže a tělovýchovy, *Rámcový vzdělávací program pro gymnázia RVP G*, (2021) 98. https://www.edu.cz/wp-content/uploads/2021/09/001_RVP_GYM_uplne_zneni.pdf.
- [31] L. Zormanová, *Obecná didaktika: Pro studium a praxi*, Grada, Praha, 2014.
- [32] B. Dušek, *Kapitoly z didaktiky chemie*, VŠCHT, Praha, 2000.
- [33] M. Josef, Š. Vlastimil, *Výukové metody*, Paido, 2003.
- [34] L. Zormanová, *Výukové metody v pedagogice: tradiční a inovativní metody, transmisivní a konstruktivistické pojetí výuky, klasifikace výukových metod*, Grada, Praha, 2012.
- [35] A. Vališová, M. Kovaříková, *Obecná didaktika a její širší pedagogické souvislosti v úkolech a cvičeních*, Pedagogika (GRADA), Praha, 2021.
- [36] L. Zormanová, *Výukové metody komplexní - I. část*, Metod. portál RVP.CZ. (2012). <https://clanky.rvp.cz/clanek/15019/VYUKOVE-METODY-KOMPLEXNI-1-CAST.html>.
- [37] Z. Chocholoušková, L. Hajerová Müllerová, *Didaktika biologie ve vztahu mezi obecnou a oborovou didaktikou*, Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň, 2019.
- [38] Výzkumný ústav pedagogický, Čtenářská gramotnost v RVP ZV, (2011). <https://clanky.rvp.cz/clanek/12433/CTENARSKA-GRAMOTNOST-V-RVP-ZV.html>.
- [39] M. Vít, *Pokus jako významný motivační prvek ve výuce chemie*, Masarykova univerzita, 2014.
- [40] Merck, *HPLC Analysis of Caffeine Metabolites and Analogs on Discovery® C18*, (2021). <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical-applications/hplc/hplc-analysis-of-caffeine-metabolites-and-analogs-g005684.html>.
- [41] H.J. Kim, M.S. Choi, S. Ur Rehman, Y.S. Ji, J.S. Yu, K. Nakamura, H.H. Yoo, *Determination of urinary caffeine metabolites as biomarkers for drug metabolic enzyme activities*, *Nutrients*. 11 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11081947>.

- [42] R. del C. Lopez-Sanchez, V.J. Lara-Diaz, A. Aranda-Gutierrez, J.A. Martinez-Cardona, J.A. Hernandez, *HPLC Method for Quantification of Caffeine and Its Three Major Metabolites in Human Plasma Using Fetal Bovine Serum Matrix to Evaluate Prenatal Drug Exposure*, J. Anal. Methods Chem. 2018 (2018).
<https://doi.org/10.1155/2018/2085059>.
- [43] Chromservis, *Aplikační listy*, (b.r.). <https://www.chromservis.eu/cz/hplc-application-lists>.
- [44] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha, 2013.
- [45] D. Kahoun, *Úloha č.5: Stanovení fenolu a α – naftolu ve vodě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na obrácených fázích se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti (RP-HPLC-UV)*, 5 (2020) 1–19.
- [46] Association of Analytical Communities. *Official Methods of Analysis., Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, (2016).
http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.
- [47] L. Nováková, M. a kolektiv Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, Praha, 2013.
- [48] K. Tesaříková, *Stanovení kofeinu a jeho metabolitů pomocí HPLC/MS*, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2022.
- [49] V. Jiří, *Přehled středoškolské chemie*, Pedagogické nakladatelství, 1999.
- [50] M. Aleš, H. Jaroslav, *Chemie pro čtyřletá gymnázia 1. díl*, 1998.
- [51] Dionex Corporation, *Determination of Aucubin, Geniposide, and Pinoselin Diglucoside in Cortex Eucommiae Using ASE and HPLC*, (2005) 1–2.
- [52] ThermoFischer SCIENTIFIC, What is Accelerated Solvent Extraction?, (b.r.).
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/chromatography/chromatography-sample-preparation/automated-sample-preparation/accelerated-solvent-extraction-ase.html>.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1U	1-methylmočová kyselina
1X	1-methylxantin
13U	1,3-dimethylmočová kyselina
13X	1,3-dimethylxantin (teofylin)
17U	1,7-dimethylmočová kyselina
17X	1,7-dimethylxantin (paraxantin)
3U	3-methylmočová kyselina
3X	3-methylxantin
37U	3,7-dimethylmočová kyselina
37X	3,7-dimethylxantin (teobromin)
7U	7-methylmočová kyselina
AAMU	5-acetylamo-6-amino-3-methyluracil
AFMU	5-acetylamo-6-formylamo-3-methyluracil
AOAC	The Association of Official Analytical Chemist
ASE	extrakce za zvýšeného tlaku
BP	bakalářská práce
CAFF	kofein
CYP1A2	člen nadrodiny enzymů cytochromu P450
CYP2A6	člen nadrodiny enzymů cytochromu P450
CYP2E1	člen nadrodiny enzymů cytochromu P450
CYP3A4	člen nadrodiny enzymů cytochromu P450
CYP3A5	člen nadrodiny enzymů cytochromu P450
DMX	1,7-dimethylxantin
DP	diplomová práce
FARMAKOS	korespondenční seminář organizovaný Farmaceutickou fakultou UK
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KSICHT	korespondenční seminář s chemickou tematikou
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MF	mobilní fáze
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze B
MUA	1-methylmočová kyseliny
NAT2	N-acetyltransferáza
PřF JČU	Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
QC	koeficient kvality lineární regrese
R	korelační koeficient
RSD	přesnost

RVP	rámcový vzdelávací program
RVP G	rámcový vzdelávací program pro gymnázia
RVP SOV	rámcový vzdelávací program pro střední odborné vzdelávání
RVP ZV	rámcový vzdelávací program pro základní vzdelávání
SD	směrodatná odchylka
S/N	poměr signálu a šumu
SOČ	středoškolská odborná činnost
SOŠ	střední odborná škola
SOU	střední odborné učiliště
SŠ	střední škola
STD _{CAFF}	roztok standardu kofeinu
STD _{CAFF-zásob.}	zásobní roztok standardu kofeinu
STD _{MIX}	roztok směsného standardu metabolitů kofeinu
STD _r	zásobník roztoky standardů analytů metabolitů v moči
t _R	retenční čas
THBM	teobromin
THEO	teofylin
UV/VIS	oblast viditelného a ultrafialového světla
VŠ	vysoká škola
VZ _{CAFF}	vzorek kofeinového nápoje
VZ _{MOČ}	vzorek moči
XO	xantinoxidáza
(-)	bezkofeinový nápoj
(+)	kofeinový nápoj

10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha A – validace

Název nápoje	Neobohacený vzorek (unspiked)			
	c [mg/l]	Průměr koncentrací [mg/l]	SD [mg/l]	RSD [%]
Mokaté	2,5614	2,546	0,02005	0,79
	2,5230			
	2,5522			
Jacobs 3v1	3,0106	3,011	0,01650	0,55
	2,9947			
	3,0277			
Big Shock	3,1372	3,123	0,05184	1,7
	3,0649			
	3,1654			
Jihlavanka (-)	0,4985	0,4855	0,01133	2,3
	0,4780			
	0,4799			
Jihlavanka (+)	5,9089	5,910	0,06260	1,1
	5,8478			
	5,9729			
RedBull	4,2695	4,284	0,06369	1,5
	4,2282			
	4,3532			
Kofola	7,4296	7,556	0,1450	1,9
	7,5244			
	7,7143			
Coca-Cola	8,2106	8,242	0,05850	0,71
	8,3093			
	8,2056			
Pepsi	4,1261	4,111	0,03055	0,74
	4,0753			
	4,1301			
Ledový čaj – černý	5,1725	5,234	0,05369	1,0
	5,2678			
	5,2630			
Ledový čaj – zelený	4,9012	4,855	0,06719	1,4
	4,8868			
	4,7783			
Nescafé (-)	2,0386	1,974	0,06535	3,3
	1,9744			
	1,9079			
Černý čaj – PIGI	1,5670	1,594	0,07867	4,9
	1,6827			
	1,5325			
Černý čaj – AHMAD	1,6179	1,650	0,1199	7,3
	1,7827			
	1,5495			
Zelený čaj	0,5968	0,6371	0,04509	7,1
	0,6287			
	0,6858			
Nescafé (+)	8,1963	8,16	0,03538	0,43
	8,1541			
	8,1260			

Název nápoje	Obohacený vzorek (spiked)					Re [%]
	c [mg/l]	Průměr koncentrací [mg/l]	SD [mg/l]	RSD [%]	Rei [%]	
Mokaté	6,8346	6,874	0,03434	0,50	85	87
	6,8895				87	
	6,8978				87	
Jacobs 3v1	7,3246	7,405	0,5393	7,3	86	88
	6,9107				78	
	7,9802				99	
Big Shock	7,6168	7,555	0,1233	1,6	90	89
	7,6352				91	
	7,4131				85	
Jihlavanka (-)	4,7511	4,821	0,07395	1,5	85	87
	4,8143				87	
	4,8985				88	
Jihlavanka (+)	10,5011	10,35	0,3243	3,1	92	89
	10,5674				94	
	9,9755				80	
RedBull	7,8979	8,493	0,5364	6,3	73	84
	8,9388				94	
	8,6429				86	
Kofola	11,9862	11,80	0,1699	1,4	91	85
	11,6531				83	
	11,7612				81	
Coca-Cola	11,5242	12,31	0,6880	5,6	66	81
	12,6015				86	
	12,8041				92	
Pepsi	8,671	8,620	0,04843	0,56	91	90
	8,5745				90	
	8,6155				90	
Ledový čaj - černý	9,5811	9,727	0,1266	1,3	88	90
	9,8098				91	
	9,7895				91	
Ledový čaj - zelený	9,4462	9,502	0,006955	0,73	91	93
	9,4791				92	
	9,5797				96	
Nescafé (-)	6,1689	6,138	0,1231	2,0	83	83
	6,0023				81	
	6,2426				87	
Černý čaj - PIGI	6,5901	6,487	0,2632	4,1	100	98
	6,6830				100	
	6,1878				93	
Černý čaj - AHMAD	6,0960	6,229	0,2201	3,5	90	92
	6,4830				94	
	6,1078				91	
Zelený čaj	5,1696	5,205	0,03340	0,64	91	91
	5,2359				92	
	5,2098				90	
Nescafé (+)	12,6037	12,70	0,1857	1,5	88	91
	12,9103				95	
	12,5755				89	

10.2 Příloha B – zadání + pracovní list „Stanovení kofeinu v nápojích.“

Stanovení kofeinu v nápojích metodou HPLC

Úvod:

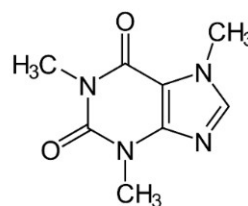
Kofein je celosvětově nejvíce konzumovanou psychoaktivní drogou. Jde tedy chemickou látku, která působí na centrální nervovou soustavu, čímž způsobuje dočasnou pozitivní změnu chování, pozornosti a nálady. Dle odhadů denně konzumuje kofein až 80 % lidské populace. Nejčastěji je kofein konzumován skrze praženou kávu nebo čajové listy. Nalézt ho ale lze i v kakau, plodech guarany nebo listech yerba-maté. Dále také ve slazených a energetických nápojích a čokoládě. Uměle se přidává do léků na bolest, ale i do léků proti nevolnosti (např. Panadol, Coldrex, Ataralgin nebo Kinedryl). Doporučená jednorázová dávka kofeinu u dospělého člověka by neměla překročit 200 mg a celková denní dávka by pak neměla překročit 400 mg.

Vlastnosti kofeinu a kávy:

Vlastnosti kofeinu jsou shrnuty v Tab. 1. Káva jako nápoj je kyselá a její pH lze ovlivnit přípravou, použitými kávovými zrny i hrubostí mletí. Káva obsahuje celou řadu organických kyselin, např. kyselinu kávovou, kyselinu jablečnou, kyselinu chinovou, ale i kyselinu mravenčí a octovou. Poměrně velký vliv na obsah kyselin v nápoji má doba extrakce, tedy doba, po kterou bude přes namletou kávu protékat voda. Při přípravě v pákovém kávovaru, který se nejčastěji používá v kavárnách, se doporučuje doba extrakce okolo 30 sekund. Při kratší extrakci (cca 20 sekund) má káva vyšší aciditu a při delší extrakci je naopak získán extrakt o vyšším pH.

Tab. 1: Vlastnosti kofeinu.

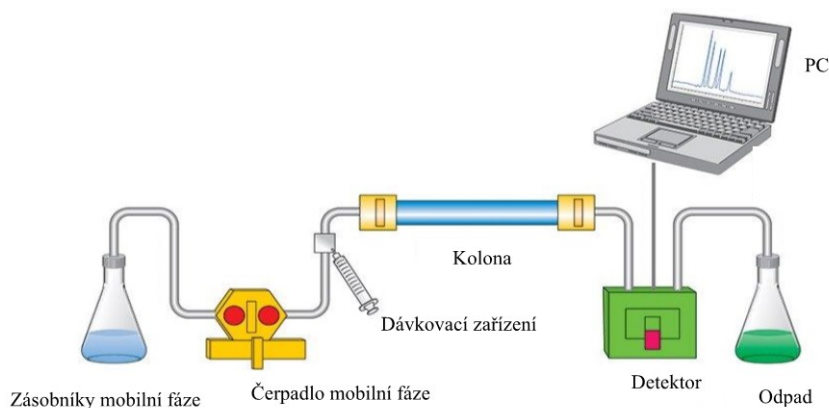
triviální název	kofein
systematický název	1,3,7-trimethylxantin
sumární vzorec	$C_8H_{10}N_4O_2$
CAS	58-08-2
barva	bílá
skupenství	pevné (prášek)
rozpuštěnost	18,7 g/l
molární hmotnost	194,19 g/mol



Obr. 1: Struktura kofeinu.

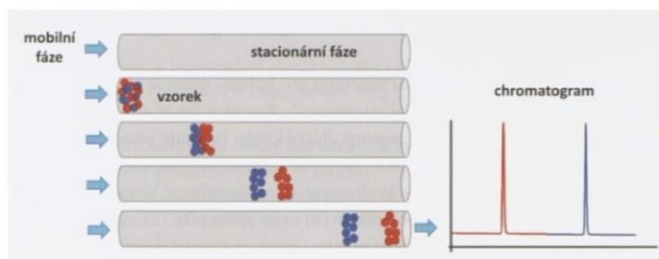
Kapalinový chromatograf:

Pro stanovení a určení koncentrace kofeinu v nápojích je vhodná metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Obecně principem chromatografických metod je dělení analytů vzorku mezi mobilní (pohyblivou) fázi a stacionární (nepohyblivou) fázi. V případě kapalinové chromatografie je mobilní fáze tvořena rozpouštědly o různé polaritě (např. voda, metanol, acetonitril) a jako stacionární fáze je vhodný sorbent například modifikovaný silikagel s navázanými dlouhými uhlíkatými řetězci. Na Obr. 2. je schéma kapalinového chromatografu. Chromatograf se skládá z těchto částí: zásobníky mobilní fáze, čerpadlo mobilní fáze, dávkovací zařízení, kolona, detektor, PC a nádoba na odpad.



Obr. 2: Schéma kapalinového chromatografu

Mobilní fáze je čerpána ze zásobníku pod vysokým tlakem. Do proudu mobilní fáze je nastříknut malý objem analyzovaného vzorku, který je poté společně s mobilní fází unášen na kolonu. Kolona je umístěna v termostatu. Složky vzorku (analyty) jsou unášeny tokem mobilní fáze a interagují se stacionární fází. Na koloně dochází k zadržování a postupnému rozdělování stanovovaných složek vzorku (analytů). Každý analyt interaguje se stacionární fází „jinak intenzivně“, proto se složky vzorku rozdělí. Doba, za kterou jsou eluovány („vymyty“) z kolony, se nazývá retenční čas. Na základě retenčních časů se následně určuje, o jakou látku se jedná. Níže (Obr. 3) je vidět, že červený analyt interaguje se stacionární fází méně „intenzivně“, vidíme ho v chromatogramu jako první, má tedy kratší retenční čas.



Obr. 3: Chromatografická separace vzorku se dvěma analyty.

UV-VIS detektor:

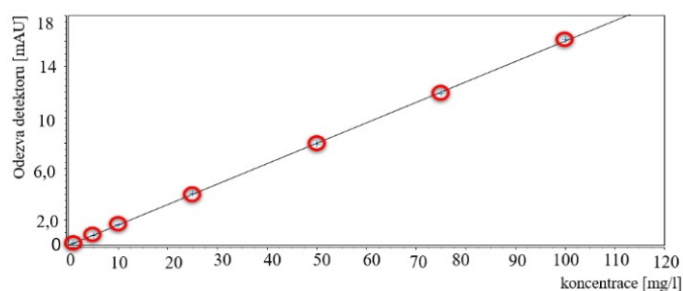
Za kolonou je umístěn detektor, který vysílá signál do počítače. Detektor je v tomto případě spektrofotometrický (UV/VIS). Časový záznam signálu detektoru se nazývá chromatogram. Ten je následně vyhodnocován na PC. Spektrofotometrický detektor pracuje na principu měření absorbance eluátu („vymyté látky“). Pokud se pracuje s detektorem s diodovým polem, jako tento případ může se měřit v celém spektru vlnových délek (190 až 780 nm) v jeden okamžik. Spektrofotometrický detektor pracuje na principu Lambert-Beerova zákona, který vyjadřuje vztah mezi délkou optické dráhy l , koncentrací absorbující složky c a absorbancí A . Konstanta ε , tzv. molární absorpční koeficient, který je charakteristický pro určitou látku a vlnovou délku absorbovaného záření.

$$A = l \cdot \varepsilon \cdot c$$

Aby molekula mohla absorbovat záření, musí ve své struktuře obsahovat tzv. *chromofor*. Takovouto strukturou je systém konjugovaných dvojných vazeb, násobné vazby mezi atomy nebo atomy s volným elektronovým párem, O, N a S.

Vyhodnocování výsledků:

Potřebná data pro kvalitativní i kvantitativní analýzu jsou získány využitím chromatografického programu, v tomto případě v programu Chromeleon. Ke kvalitativnímu hodnocení látek jsou v HPLC používány retenční časy. K identifikaci píku (peaku) lze i částečně používat absorpční spekter při použití detektoru s diodovým polem (DAD detektor), který je používán při této analýze. Určení koncentrace stanovené látky (analytu) ve vzorku je analýza kvantitativní. Informace o koncentraci dané látky poskytuje plocha píku, která se získá integrací (určením plochy pod křivkou v chromatogramu). Při kvantitativním hodnocení se hledá vztah mezi plochou píku analytu v chromatogramu a množstvím eluované látky. Nejjednodušším způsobem, jak kvantitativně hodnotit analyzované látky ve vzorku, je metoda kalibrační křivky. Nejprve je analyzována série kalibračních roztoků, roztoků stanovených látek – v tomto případě kofein pro vzorky nápojů. Kalibrační roztoky se připraví rozpuštěním standardů (čistých látek). Kalibrační roztoky mají různé, ale známé koncentrace. Obvykle je připravováno 5-7 kalibračních roztoků (roztoků standardů s postupně rostoucí koncentrací). Tyto roztoky jsou analyzovány pomocí kapalinové chromatografie. Na Obr. 4 je znázorněna grafická závislost plochy píku na koncentraci.



Obr. 4: Kalibrační křivka roztoků standardu kofeinu o koncentraci 1-100 mg/l.

Je vidět, že s rostoucí koncentrací lineárně roste odezva detektoru, tedy plocha píku. Tento graf není nutno konstruovat ručně nebo v excelu, lze využít ovládací software Chromeleon. Ten ze získané závislosti stanoví rovnici kalibrační křivky a pomocí ní pak přímo vypočítává koncentrace látek v roztoku. Pro každou analyzovanou látku je vlastní kalibrační přímka.

Pro kalibrační přímku platí vztah rovnice přímky, tedy:

$$y = k * c + q$$

Kde y je hodnota odezvy detektoru pro koncentraci c , k je směrnice kalibrační přímky vyjadřující citlivost metody, q je úsek na ose y , respektive absorbanci. Na základě rovnice kalibrační křivky se pomocí softwaru vypočítá koncentrace analytu v analyzovaném vzorku, tedy v nápoji nebo moči. Zároveň platí, že koncentrace analytu ve vzorku nesmí být nižší ani vyšší, než je rozsah kalibrační řady.

Úkol:

V případě, že je u úkolu „(A)“, je doporučeno, abyste si řekli o pomoc asistentům. Samozřejmě se ptejte i pokud v úkolu „(A)“ není. V průběhu plnění úkolů si ved'te záznamy do pracovních listů.

1. Příprava vzorku horkého nápojů k analýze
2. Příprava vzorku slazeného nápojů k analýze
3. Analýza vzorků pomocí HPLC
4. Srovnání obsahu kofeinu v jednotlivých vzorcích nápojů s ostatními dvojicemi.

Přístroje, pomůcky a chemické nádobí:

- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf se spektrofotometrickou detekcí (HPLC), varná konvice, odstředivka, automatické pipety
- Plastové špičky, odstřed'ovací zkumavky, vialky, hliníková víčka
- Krimpovací kleště
- Kádinky (250 ml, 25 ml)
- Skleněné pipety (dělené/nedělené)
- Odměrné baňky
- Plastové sítko
- Kuchyňská lžička
- Petriho miska
- Skleněná tyčinka

Chemikálie a roztoky:

- Vzorky nápojů obsahující kofein
- Destilovaná voda
- Horká voda

Postup:

1. Úprava a příprava vzorku horké horkého nápoje k analýze:

- Dle návodu na kartičce si připravte horký nápoj (kávu/čaj). Na kartičce je uveden způsob přípravy horkého nápoje, ředění a celkový objem roztoku včetně doporučeného pojmenování.
- Dle údajů na kartičce ho nechte louhovat, pokud je uvedeno na kartičce, slejte ho přes plastové sítko a nechte ho chladnout na přibližně pokojovou teplotu. V době chladnutí se věnujte dalším úkolům nebo plňte úkoly v pracovním listu.
- Vychladlý nápoj nařed'te dle údajů na kartičce. Řed'te do odměrných baněk podle údajů na kartičce. K ředění použijte deionizovanou vodu.
- Poté pomocí automatické pipety napipetujte 1 ml vzorku do řádně označené odstřed'ovací zkušavky - eppendorfký.
- Vzorky odstřed'ujte při 3500 otáčkách/min po dobu 10 min. (Dodržte pravidla správného odstřed'ování – vyvážení, uzavření odstřed'ovacích zkušavek).
- Z odstředěných vzorků napipetujte 0,7 ml supernatantu (kapalinu nad sedimentem) do skleněné vialky určené na analýzu v HPLC a zakrimpujte pomocí krimpovacích kleští. Vialky popište lihovým fixem.

2. Úprava vzorku slazeného nápoje k analýze:

- Dle kartičky nařed'te slazený nápoj. Řed'te do odměrných baněk dle objemu na kartičce. K ředění použijte deionizovanou vodu.
- Pomocí automatické pipety odeberte 1 ml roztoku slazeného nápoje do eppendorfký a odstřed'ujte při 3500 otáčkách/min po dobu 10 min (Dodržte pravidla správného odstřed'ování vyvážení, uzavření odstřed'ovacích zkušavek).
- Z odstředěného vzorku odeberte 0,7 ml supernatantu (kapalinu nad sedimentem) do skleněné vialky určené na analýzu v HPLC a zakrimpujte pomocí krimpovacích kleští. Vialky popište lihovým fixem.

3. Analýza vzorku pomocí kapalinového chromatografu

- (A) Proveďte kontrolu nastavených parametrů chromatografické analýzy porovnáním údajů v ovládacím softwaru Chromeleon s údaji v Tab. 2.
- (A) V ovládacím softwaru Chromeleon se podívejte na již provedené analýzy tzv. kalibračních standardů (roztoků standardů o známé koncentraci) a na kalibrační křivku.
- (A) Do zásobníku vzorků vložte připravené vialky se vzorky, vypište názvy vzorků do seznamu analýz a proveďte měření (analýzu).

Tab. 2: Parametry chromatografické separace.

Chromatografická kolona		Chromservis C18; 150 x 3 mm; 5 μ m
Mobilní fáze	MFA 78 %	voda + 1 obj.% kyseliny octové
	MFB 22 %	metanol
Průtok MF [ml/min]		1
Teplota [°C]		35
Objem nástřiku vzorku [μ l]		5
Délka analýzy [min]		4

4. Vyhodnocení měření.

- (A) Proveďte integraci píku kofeinu v chromatogramech z analýz vašich vzorků. S využitím již naměřené kalibrace následně zjistěte koncentraci kofeinu v analyzovaném vzorku a zapište si ji do pracovního listu. Následně proveďte do pracovního listu požadované výpočty.

Pracovní list – Stanovení kofeinu v nápojích

Hodnoty uvádějte na tři platné číslice.

Ad úkol č.1:

Navážka pro přípravu horkého nápoje (kávy/čaje):

$$m =$$

Ad úkol č.2:

Názvy nápojů ze seznamu analýz.

Nápoj	Název v seznamu analýz

Ad úkol č.3:

Zapište údaje do tabulky a vypočtete reálnou koncentraci kofeinu ve vašem nápoji. Analýzou vzorku pomocí HPLC zjistíte koncentraci kofeinu ve vialce. Je třeba ji přepočítat – na základě ředění před analýzou na koncentraci v daném nápoji.

Název nápoje	Koncentrace kofeinu ve vzorku (jednotky)	Ředění	Koncentrace kofeinu v nápoji (jednotky)

Prostor pro výpočet:

[illegible]

Jaké je množství kofeinu v porci vašeho nápoje? Jaké maximální množství vašeho horkého i studeného nápoje můžete vypít (myšleno kolik lahví, plechovek, šáleků = porce), abyste nepřekročili doporučenou denní dávku kofeinu pro dospělého člověka?

Název nápoje	Množství v jedné porci (šálku, plechovce, lahvi) (jednotky)	Max. množství porcí, které můžete vypít

Prostor pro výpočet:

1. Spojte pojmy s jejich správnými definicemi.

1	izokratická eluce	A	dobu, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky
2	chromatogram	B	produkt biotransformace
3	biotransformace	C	chemická přeměna látek v organismu
4	stacionární fáze	D	analytický přístroj
5	chromatograf	E	časová závislost intenzity veličiny sledované detektorem
6	mobilní fáze	F	směs rozpouštědel, která unáší vzorek na kolonou
7	retenční čas	G	náplň chromatografické kolony, kde probíhá separace
8	gradientová eluce	H	je eluce, během které se mění složení mobilní fáze
9	metabolit	I	je eluce, během které se nemění složení mobilní fáze

1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	

2. Doplňte rozměry chromatografické kolony do tabulky.

délka chromatografické kolony	
průměr chromatografické kolony	
velikost částic	

3. Porovnejte význam gradientové a izokratické eluce při analýze nápojů a při analýze metabolitů v moči.

4. Jaká část molekuly umožňuje detekci pomocí UV/VIS (v oblasti vlnových délek 200-800 nm) detektoru?

10.3 Příloha C – zadání + pracovní list „Stanovení metabolitů kofeinu v moči.“

Stanovení kofeinu a jeho metabolitů v moči metodou HPLC

Úvod:

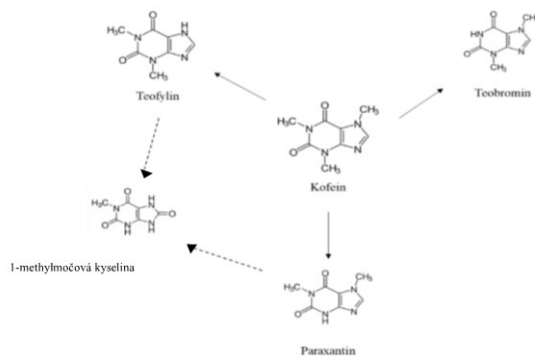
Kofein je celosvětově nejvíce konzumovanou psychoaktivní drogou. Jde o chemickou látku, která působí na centrální nervovou soustavu, čímž způsobuje dočasnou pozitivní změnu chování, pozornosti a nálady. Dle odhadů denně konzumuje kofein až 80 % lidské populace. Nejčastěji je kofein konzumován skrze praženou kávu nebo čajové listy. Nalézt ho ale lze i v kakau, plodech guarany nebo listech yerba-maté. Dále také ve slazených a energetických nápojích a čokoládě. Uměle se přidává do léků na bolest, ale i do léků proti nevolnosti (např. Panadol, Coldrex, Ataralgin nebo Kinedryl). Doporučená jednorázová dávka kofeinu u dospělého člověka by neměla překročit 200 mg a celková denní dávka by pak neměla překročit 400 mg.

Kofein jako cizorodá látka:

Kofein je pro lidské tělo cizorodá látka (tzv. *xenobiotikum*). Aby cizorodá látka mohla na tělo působit musí se dostat k cílovému orgánu (v tomto případě mozku). Osud xenobiotik v těle se dělí do čtyř stádií: vstřebávání, distribuce, biotransformace a vylučování. Míra vstřebávání je ovlivněna zejména fyzikálními a chemickými vlastnostmi podané látky, pitným režimem a konzumovanou stravou. Kofein je distribuován ke tkáním, a následně k cílovému orgánu pomocí tělních tekutin, zejména krevní plazmou, pupečnickovou krví a mozkomíšním mokem. Kvůli jeho lipofilním vlastnostem prochází hematoencefalickou bariérou, která tvoří přechod mezi cévami v mozku a samotnou mozkovou tkání.

Biotransformace kofeinu:

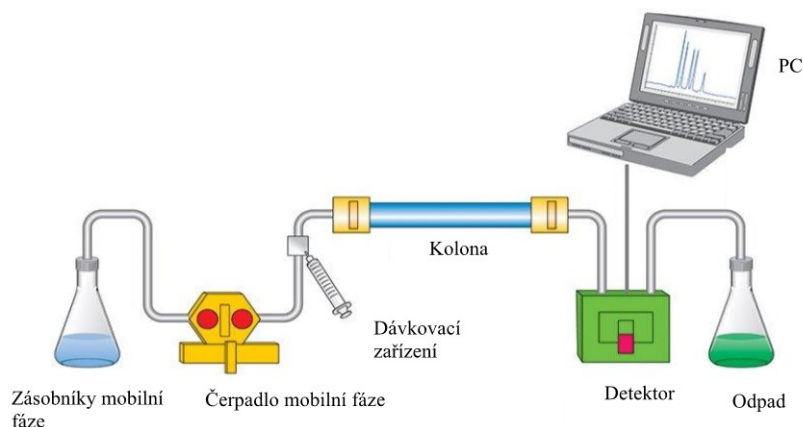
Proces *biotransformace* je proces přeměny cizorodých látek v lidském organismu. Zpravidla se jedná o enzymaticky katalyzované reakce. Kofein je primárně metabolizován v játrech, která jsou centrem většiny metabolických procesů v těle. Během biotransformace kofeinu vzniká více než 20 různých látek, tzv. *metabolitů*. Většina přijatého kofeinu se vyloučí ve formě metabolitů močí, ale i stolicí. Nejvíce vzniká paraxantinu (80 %), teobrominu (11 %) a teofylinu (5 %). Zároveň zůstává zhruba 2 % kofeinu v nezměněné formě. Na Obr. 1 je zjednodušeně znázorněn vznik jednotlivých metabolitů. Většina reakcí je katalyzována enzymy ze skupiny cytochromu P450, který je typický pro biotransformaci xenobiotik.



Obr. 1: Zjednodušené schéma biotransformace kofeinu.

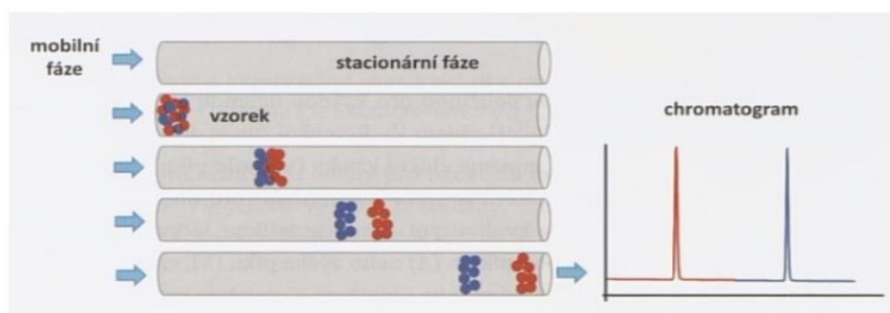
Kapalinový chromatograf:

Pro stanovení a určení koncentrace kofeinu a jeho metabolitů v moči je vhodná metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Principem chromatografických metod je dělení analytů vzorku mezi mobilní (pohyblivou) fázi a stacionární (nepohyblivou) fázi. V případě kapalinové chromatografie je mobilní fáze tvořena rozpouštědly o různé polaritě (např. voda, metanol, acetonitril) a jako stacionární fáze je vhodný sorbent například modifikovaný silikagel s navázanými dlouhými uhlíkatými řetězci. Na Obr. 2 je schéma kapalinového chromatografu. Chromatograf je složen z těchto částí: zásobníky mobilní fáze, čerpadlo mobilní fáze, dávkovací zařízení, kolona, detektor, PC a nádoba na odpad.



Obr. 2: Schéma chromatografu.

Mobilní fáze je čerpána ze zásobníku pod vysokým tlakem. Do proudu mobilní fáze je nastříknut malý objem analyzovaného vzorku, který je poté společně s mobilní fází unášen na kolonu. Kolona je umístěna v termostatu. Složky vzorku (analyty) jsou unášeny tokem mobilní fáze a interagují se stacionární fází. Na koloně dochází k zadržování a postupnému rozdělování stanovovaných složek vzorku (analytů). Každý analyt interaguje se stacionární fází „jinak intenzivně“, proto se složky vzorku rozdělí. Doba, za kterou jsou eluovány („vymyty“) z kolony se nazývá retenční čas. Na základě retenčních časů se následně určuje, o jakou látku se jedná. Níže (Obr. 3) je vidět, že červený analyt interaguje se stacionární fází méně „intenzivně“, vidíme ho v chromatogramu jako první, má kratší retenční čas.



Obr. 3: Chromatografická separace vzorku s dvěma analyty.

UV-VIS detektor:

Za kolonou je umístěn detektor, který vysílá signál do počítače. Detektor je v tomto případě spektrofotometrický (UV/VIS). Časový záznam signálu detektoru se nazývá chromatogram. Ten se následně vyhodnocuje na PC. Spektrofotometrický detektor pracuje na principu měření absorpce eluátu („vymyté látky“). Pokud se pracuje s detektorem s diodovým polem (tento případ) může se měřit v celém spektru vlnových délek (190 až 780 nm) v jeden okamžik. Spektrofotometrický detektor pracuje na principu Lambert-Beerova zákona, který vyjadřuje vztah mezi délkou optické dráhy l , koncentrací absorbující složky c a absorpční A . Konstanta ε , tzv. molární absorpční koeficient, který je charakteristický pro každou látku a vlnovou délku absorbovaného záření.

$$A = l \cdot \varepsilon \cdot c$$

Aby molekula mohla absorbovat záření musí ve své struktuře obsahovat tzv. *chromofor*. Takovouto strukturou je systém konjugovaných dvojných vazeb, násobné vazby mezi atomy nebo atomy s volným elektronovým párem, O, N a S.

Vyhodnocování výsledků:

Potřebná data pro kvalitativní i kvantitativní analýzu jsou získány využitím chromatografickým programů, v tomto případě v programu Chromeleon. Ke kvalitativnímu hodnocení látek jsou v HPLC používány retenční časy. K identifikaci píku (peak) lze i částečně používat absorpční spekter při použití detektoru s diodovým polem (DAD detektor). Takovýto detektor je používán při této analýze. Pro ověření správnosti identifikace analytů v reálném vzorku (např. v moči) lze využít srovnání analýz vzorků moči s analýzami vzorků moči obohacenými roztokem standardů. Standardy jsou čisté analyty, komerčně dodávané látky. Určení koncentrace stanovované látky (analytu) ve vzorku je analýza kvantitativní. Informace o koncentraci dané látky poskytuje plocha píku, která se získá integrací (určením plochy pod křivkou v chromatogramu). Při kvantitativním hodnocení se hledá vztah mezi plochou píku analytu v chromatogramu a množstvím eluované („vymyté“) látky. Nejjednodušším způsobem, jak kvantitativně hodnotit analyzované látky ve vzorku, je metoda kalibrační křivky. Nejprve je analyzována řada kalibračních roztoků. To jsou roztoky stanovovaných látek – v tomto případě kofein a jeho metabolity. Kalibrační roztoky se připraví rozpuštěním standardů (čistých látek). Kalibrační roztoky mají různé, ale známé koncentrace. Obvykle se připravuje 5-7 kalibračních bodů (roztoků standardů s postupně rostoucí koncentrací). Tyto roztoky jsou analyzovány pomocí kapalinové chromatografie. Na Obr. 4 je znázorněna grafická závislost plochy píku na koncentraci. Je vidět, že s rostoucí koncentrací lineárně roste odezva detektoru, tedy plocha píku. Tento graf není nutno konstruovat ručně nebo v excelu, lze využít ovládací software Chromeleon. Ten ze získané závislosti stanoví rovnici kalibrační křivky a pomocí ní pak přímo vypočítává koncentrace látek v roztoku. Pro každou analyzovanou látku je vlastní kalibrační přímka.

Pro kalibrační přímku platí vztah rovnice přímky (lineární rovnice), tedy:

$$y = k \cdot c + q$$

Kde y je hodnota odezvy detektoru pro koncentraci c , k je směrnice kalibrační přímky vyjadřující citlivost metody, q je úsek na ose y , respektive absorpce. Na základě rovnice kalibrační křivky se pomocí softwaru vypočítá koncentrace analytu v analyzovaném vzorku, tedy v moči. Zároveň platí, že koncentrace analytu ve vzorku nesmí být nižší ani vyšší, než je rozsah kalibrační řady.

Úkol:

V případě, že je u úkolu „(A)“, je doporučeno, abyste si řekli o pomoc asistentům. Samozřejmě se ptejte i pokud v úkolu „(A)“ není. V průběhu plnění úkolů si ved'te záznamy do pracovních listů.

1. Úprava vzorků moči a příprava k analýze
2. Analýza vzorků pomocí HPLC
3. Porovnání chromatogramů roztoků standardů a vzorků moči v čase 0 a 2,5 hod
4. Kvalitativní zhodnocení vzorků moči

Přístroje, pomůcky, laboratorní sklo

- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf se spektrofotometrickou detekcí (HPLC)
- Automatické pipety
- Odšťědivka
- Krimpovací kleště
- Zkumavky, vialky, hliníková víčka, plastové špičky

Chemikálie a roztoky:

- Směsný standard o koncentraci 80 mg/l (1-methylmočová kyselina, teobromin, paraxantin, teofylin a kofein)
- Kyselina octová (čistota pro HPLC 100 %)
- Vzorky moči odebrané do plastových zkumavek v čase 0 a 2,5 hod od vypití kofeinového nápoje
- Destilovaná voda

Postup:

V průběhu práce pracujte s rukavicemi. Je třeba mít na zřeteli, že se jedná o analýzu biologických vzorků. Veškeré vzorky a použité zkumavky následně zlikvidujte dle pokynů.

1. Úprava reálného vzorku a příprava k analýze:

- Pomocí automatické pipety (100-1000 µl) odeberte 1 ml moči do řádně označené odstředivací zkumavky (eppendorfký). Odeberte z každého vzorku moči (0 hod a 2,5 hod) 2x, tedy celkem budete mít 4 eppendorfký. Pro vzorek 0 hod a 2,5 hod použijte novou špičku.
- (A) Vzorky moči odstředíte při 10 000 otáčkách/min po dobu 10 min. (Dodržte pravidla správného odstředování – vyvážení, uzavření odstředivacích zkumavek, správně nasazené víko odstředivací komory.)
- (A) Dle Tab.1 si připravte 5 vialek do stojánku a označte je dle označení v tabulce níže. Vzorek moči po odstředění připravte k analýze. Pipetujte pomocí automatické pipety objemy vzorku moči dle Tab.1. Odebírejte pouze tekutinu nad usazeninou tzv. supernatant. Dále dle tabulky přidávejte automatickou pipetou roztok standardů (STD), respektive vodu. Vialky překryjte hliníkovými víčky a pomocí krimpovacích kleští uzavřete. Vialky popište lihovým fixem.

Tab. 1: Příprava vzorků moči k analýze.

Složení vzorku k analýze	V (vzorku) [µl]	V (STD) [µl]	V (H ₂ O) [µl]	Celkový V[µl]	Označení
roztok STD ve vodě	0	300	700	1000	STD
moč 0 hod	700	0	300		0 hod
moč 0 hod + roztok STD	700	300	0		0 hod + STD
moč 2,5 hod	700	0	300		2,5 hod
moč 2,5 hod + roztok STD	700	300	0		2,5 hod + STD

2. Analýza vzorků pomocí kapalinového chromatografu.

- (A) Proveďte kontrolu nastavených parametrů chromatografické analýzy porovnáním údajů v ovládacím softwaru Chromeleon s údaji v Tab. 2 a Tab. 3.
- (A) Do zásobníku vzorků vložte připravené vialky se vzorky, vypište názvy vzorků do sekvence analýz a proveďte měření (analýzu)

Tab. 2: Parametry chromatografické separace.

Chromatografická kolona		Chromservis C18; 150 x 3 mm; 5 µm
Mobilní fáze	MFA	voda + 1 obj.% CH ₃ COOH
	MFB	metanol
Průtok MF [ml/min]		1
Teplota [°C]		35
Objem nástřiku vzorku [µl]		65

Tab.3 Časový průběh gradientové eluce

Čas [min]	Průtok MF [ml/min]	% MFB
0	1	6
3		15
5		15
5,5		6
11		6

10.5 Příloha D – zadání + pracovní list „Měření pH.“

Měření pH nápojů

Úvod:

Pomocí stupnice pH se vyjadřuje kyselost a zásaditost libovolného roztoku. Hodnota pH (potential of hydrogen) vyjadřuje aktivitu, respektive, koncentraci oxoniových kationtů. Roztok je neutrální, pokud je $pH = 7$, kyselý, pokud je $pH < 7$ a zásaditý při $pH > 7$.

Výpočet pH:

U velmi zředěných roztoků se pro výpočet pH často používá zjednodušený vztah:

$$pH = -\log[H_3O^+]$$

Pro výpočet pH silných jednosytných kyselin (HA) platí, že pH je rovno zápornému přirozenému logaritmu koncentrace kyseliny (c_A) v roztoku. Dle definice platí:

$$pH = -\log c_A$$

Pro výpočet pH vícesytných kyselin se pak násobí koncentrace kyseliny počtem vodíků v kyselině. Obdobně lze definovat pH silných zásad. Protože platí:

$$pH = 14 + \log[OH^-],$$

potom pH silné jednosytné zásady B vypočteme dle vztahu:

$$pH = 14 + \log c_B.$$

Pro výpočet pH slabých kyselin platí tento vztah:

$$pH = \frac{1}{2} (pK_a - \log c_A).$$

kde c_A vyjadřuje koncentraci kyseliny a pK_a je disociační konstanta kyseliny. Je třeba vzít v potaz, že disociace neprobíhá u slabých kyselin a zásad zcela, jako je tomu u silných kyselin a zásad.

Síla kyselin/zásad:

Síla kyselin je dána ochotou odevzdávat a v případě zásad přijímat proton H^+ . Tento děj se nazývá disociace a podle úrovně disociace se určuje síla kyseliny, respektive zásady. Pro každou kyselinu a zásadu je tabelovaná hodnota pK_A (pro kyselinu) a pK_B (pro zásadu) podle míry, kterou daná látka disociuje. Pro kyseliny platí, že s klesající hodnotou pK_A roste síla kyseliny. Pro zásady pak platí, že s klesající hodnotou pK_B roste jejich síla. Míru disociace vyjadřuje disociační konstanta látky. K_A je disociační konstanta kyseliny ($pK_A = -\log K_A$) a K_B je disociační konstanta zásady ($pK_B = -\log K_B$). Čím je kyselina/zásada silnější, tím je její konjugovaná zásada/kyselina slabší. Hodnoty disociačních konstant jsou pro vybrané kyseliny uvedeny v Tab. 1.

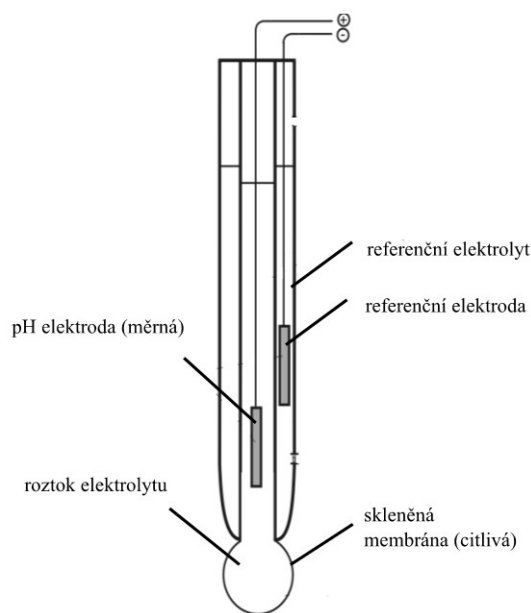
Pokud neznáme konkrétní hodnotu disociační konstanty, můžeme uplatnit následující pravidla: Organické kyseliny jsou v porovnání s anorganickými kyselinami slabší. Při porovnání síly anorganických kyslíkatých kyselin se porovnává počet vodíků a kyslíků, čím je tento rozdíl vyšší, tím je kyselina silnější. Například kyselina chlorná ($HClO$) je slabá kyselina a kyselina chloristá ($HClO_4$) silná kyselina. V případě bezkyslíkatých halogenvodíkových kyselin, kyselost stoupá s rostoucím protonovým číslem atomu halogenu.

Tab. 1: Hodnoty K_A a pK_A vybraných kyselin.

Kyselina	Vzorec	K_A	pK_A
kyselina dusičná	HNO_3	$2,00 \cdot 10^1$	-1,30
kyseliny dusitá	HNO_2	$5,10 \cdot 10^{-4}$	3,30
kyselina chlorovodíková	HCl	$1,30 \cdot 10^6$	-6,10
kyselina mravenčí	HCOOH	$1,77 \cdot 10^{-4}$	3,75
kyselina octová	CH_3COOH	$1,75 \cdot 10^{-5}$	4,76
kyselina sírová	H_2SO_4	$1,00 \cdot 10^3$	-3,00
kyselina uhličitá	H_2CO_3	$4,30 \cdot 10^{-7}$	6,37
kyselina fosforečná	H_3PO_4	$7,52 \cdot 10^{-3}$	2,12

Měření pH:

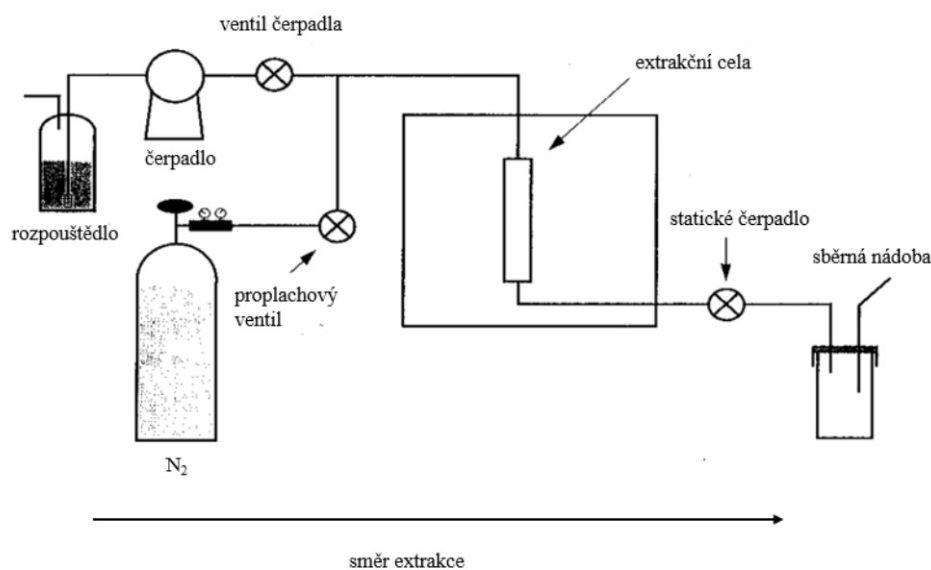
Zařízení pro měření pH by mělo být citlivé na vodíkové ionty H^+ (H_3O^+), jejichž koncentrace v roztoku udává hodnotu pH. Pro tato měření se v praxi používá skleněná kombinovaná elektroda (Obr. 1). Tenkostěnná skleněná membrána, tvořící baničku na konci skleněné elektrody, je citlivá na vodíkové ionty. Při ponoření elektrody do měřeného roztoku dojde ke vzniku potenciálového rozdílu. Pokud bychom sledovali pouze potenciál měrné elektrody, nemůžeme ještě určit pH roztoku. Pro určení je potřeba další elektroda, tzv. referenční elektroda. Pro stanovení potřebujeme rozdílný (diferenční) potenciál obou elektrod. Odezva měrné elektrody je závislá na koncentraci vodíkových iontů H^+ , čímž poskytuje informaci a kyselosti/zásaditosti roztoku. Naopak referenční elektroda tuto informaci neposkytuje. Referenční elektroda je zdrojem konstantního potenciálu, ke kterému se pak vztahuje potenciál měrné elektrody. Potenciál mezi dvěma elektrodami určuje množství vodíkových iontů H^+ , který pak definuje pH roztoku.



Obr. 1: Schéma kombinované elektrody.

Extrakce za zvýšeného tlaku – ASE:

Pojmem ASE (*accelerated solvent extraction*) označujeme extrakci látek z pevné fáze kapalinou za zvýšené teploty a zvýšeného tlaku až 10 MPa. V ASE je uveden tlak v jednotkách PSI (*pound per square pinch*), jež jsou používány v Severní Americe a platí, že $1 \text{ PSI} = 6895 \text{ Pa}$. V průběhu ASE dosahuje tlak hodnot okolo 1500 PSI. Teplota v průběhu ASE může dosahovat až 200°C . Oproti tradičním extrakčním metodám (Soxhletova extrakce, sonikace) je tato metoda méně časově náročná, má nižší provozní náklady a spotřeba rozpouštědla je výrazně nižší. Lze provádět postupně extrakci látek z jednoho vzorku do rozpouštědel různých vlastností. Navíc jde o automatizovanou, a tudíž i snadno opakovatelnou metodu. V praxi se ASE využívá zejména ve farmaceutickém průmyslu a při extrakci vzorků životního prostředí. Zapojení ASE je vidět na obrázku (Obr. 2).



Obr. 2: Schéma zapojení ASE.

Úkoly:

- Příprava vzorků kávy extrakcí pomocí ASE a vzorků kávy připravené filtrací (extrakcí) při atmosférickém tlaku
- Kalibrace pH metru
- Měření pH slazeného nápoje a horkého nápoje (kávy/čaje)
- Měření pH vzorků kávy připravených extrakcí ASE a extrakcí za atmosférického tlaku
- Okyselování výluhu z červeného zelí

Přístroje, pomůcky, laboratorní sklo:

- ASE extraktor
- pH metr
- kádinky, skleněné nádoby na měření pH, odměrná baňka
- filtrační nálevka
- kruh na filtraci
- laboratorní stojan
- křížová svorka
- filtrační papír
- skleněná tyčinka
- stříčka s destilovanou vodou
- buničina
- kuchyňská lžička

Chemikálie:

- kalibrační roztoky pH (pH = 4; pH = 7)
- nasycený roztok NaCl
- výluh z červeného zelí
- pitná voda
- nápoje
- káva, čaj
- led

Postup:

V případě, že je u úkolu „(A)“, je doporučeno, abyste si řekli o pomoc asistentům. Samozřejmě se ptejte i pokud v úkolu „(A)“ není. V průběhu plnění úkolů si ved'te záznamy do pracovních listů.

Úkol č. 1: Příprava vzorků kávy extrakcí v ASE a extrakcí při atmosférickém tlaku.

- (A) Příprava vzorků kávy v ASE
 - Na analytických vahách navažte do 25ml kádinky 2 lžičky mleté kávy. Navážku si запиšte do pracovního listu.
 - Rozšroubujte kovovou celu a postavte ji tak, aby nápis *Thermo* byl dole. Pomocí pinzety vložte na dno celý filtr a celu zašroubujte. Dbejte na to, aby filtr nepřišel do kontaktu s ničím jiným než s pinzetou, došlo by tak ke kontaminaci.
 - Na dno (na filtr) nasype pomocí trychtýře navážku kávy, upěchujte pomocí tloučku a zasypte skleněnými kuličkami tak, aby jejich hladina dosahovala téměř pod okraj cely.
 - Celu zašroubujte a umístěte do zásobníku cel v horní části extraktoru na pozici 1.
 - Do zásobníku vialek umístěte 4 vialky a popište je v horní části čísly 1 – 4 podle pořadí extrakce.
 - S pomocí lektora spusťte extrakci a z displeje si opište její parametry – tlak, teplota.
 - Získané extrakty přelijte do označených uzavíratelných skleněných nádobek, nechte vychladnout. Následně použijete pro měření pH.
- Příprava vzorku kávy extrakcí za atmosférického tlaku
 - Na analytických vahách navažte do 25ml kádinky 2 lžičky mleté kávy. Navážku si запиšte.
 - Z filtračního papíru si vytvořte hladký filtr a umístěte ho do filtrační nálevky tak, aby jeho okraj byl cca 1,5 cm pod okrajem nálevky.
 - Připravte si čtyři skleněné uzavíratelné nádoby pro jímání extraktu. Nádoby popište v horní části čísly 1 – 4, podle pořadí zalévání.
 - Pod nálevku umístěte kádinku a poté navlhčete filtrační papír destilovanou vodou ve stříčce. Kádinku s přebytečnou vodou vyměňte za suchou skleněnou nádobku pro jímání prvního extraktu.
 - Do nálevky opatrně nasype naváženou kávu (nejlépe do středu).
 - Proveďte extrakci, postupně jímejte 4 různé frakce. Podle odměrky na skleněné nádobce zalijte kávu horkou vodou. Při prvním zalití použijte červenou rysku. Následně vyměňte nádobku na extrakt a opět zalijte vodou z odměrky, tentokrát menším objemem – použijte černou rysku. Takto opakujte ještě 2x.
 - Vzorky nechte vychladnout na pokojovou teplotu a až poté měřte pH.

Úkol č. 2: Kalibrace pH metru

Před vlastním měřením pH je potřeba provést kalibraci pH metru. Kalibraci proveďte kalibračními roztoky o $\text{pH} = 7$ a $\text{pH} = 4$.

- Vyjměte elektrodu z neutrálního roztoku NaCl, opláchněte ji destilovanou vodou, osušte buničinou a vložte do neutrálního kalibračního roztoku. Pokud displej neukazuje pH rovno 7, pomocí přiloženého klíče hodnotu upravte. Srovnání proveďte točením šroubku v dolní části pH metru u písmene N.
- Vložte elektrodu do kyselého kalibračního roztoku (opět nezapomeňte omýt destilovanou vodou a osušit buničinou). Pokud není pH rovno 4, srovnajte opět pomocí šroubku, tentokrát u písmene S.
- Elektrodu opět opláchněte a osušte buničinou.
- Po kalibraci vložte elektrodu zpět do neutrálního roztoku NaCl nebo pokračujte měřením pH nápojů.

Úkol č. 3: Měření pH slazených nápojů a čaje/kávy připravované pro HPLC analýzu.

- Nalijte do cca $\frac{3}{4}$ uzavíratelné skleněné nádoby slazený nápoj podle své kartičky. Do další skleněné nádoby odeberte stejné množství i z připravovaného nápoje (kávy, čaje).
- Při měření nezapomínejte na pečlivé omytí a osušení elektrody mezi každým měřením. Vyjměte elektrodu z neutrálního roztoku a vložte ji do prvního nápoje. Zapište si hodnotu pH a pokračujte měřením všech dalších nápojů. Veškeré naměřené hodnoty pH si zapište do pracovního listu.

Úkol č. 4: Měření pH extraktu kávy z ASE a měření pH extraktu vzniklého filtrací při atmosférickém tlaku.

- Měření pH vzorků kávy z ASE
 - Před měřením pH vizuálně zhodnoťte jednotlivé vzorky a své pozorování si zapište do pracovního listu.
 - Vzorky protřepáním zamíchejte.
 - Postupně změřte pH všech čtyřech vzorků. Před každým měřením opláchněte elektrodu destilovanou vodou a osušte buničinou.
- Měření pH vzorků kávy z filtrace za atmosférického tlaku
 - Před měřením pH vizuálně zhodnoťte jednotlivé vzorky a své pozorování si zapište do pracovního listu.
 - Vzorky protřepáním zamíchejte.
 - Postupně změřte pH všech čtyřech vzorků. Před každým měřením opláchněte elektrodu destilovanou vodou a osušte buničinou.

Úkol č. 5: Určení druhu kyselin v roztoku dle hodnoty pH

- Změřte pH neznámých roztoků A, B a C a zapište do pracovního listu.
- Podle získaných hodnot pH a hodnot pK_A (naleznete v tabulce v teoretickém úvodu) určete, o roztok, jaké kyseliny se jedná. Objemová koncentrace kyselin je ve všech roztocích stejná. Vyberte z těchto možností: roztok H_2SO_4 , CH_3COOH a HCOOH .
- Do pracovního listu zapište vaše řešení.

Úkol č. 7: Okyselování výluhu z červeného zelí.

- Do výluhu z červeného zelí ponořte elektrodu a запиште hodnotu pH.
- Na mobilním telefonu si připravte časovač nebo stopky.
- Jeden z dvojice stopuje 90 sekund, druhý po tuto dobu vdechuje do výluhu pomocí brčka vzduch. Ten, kdo stopuje čas, pozoruje změnu zbarvení a pH a po uplynutí 90 sekund запише hodnotu pH.

10.5 Příloha E – kartičky nápojů

č.1

Nápoje	Nescafé (-)*	Big shock
Ředění	10x	100x
Objem roztoku	25 ml	100 ml

* (-) bezkofeinová káva

Nescafé (-): navažte dvě lžičky do 250ml kádinky a zalijte 200 ml horké vody, nechte vychladnout, nařed'te a poté odstřed'te

Big shock: nařed'te a poté odstřed'te

č.2

Nápoje	Nescafé (+)*	Kofola
Ředění	150x	10x
Objem roztoku	250 ml	5 ml

* (+) kofeinová káva

Nescafé (+): navažte dvě lžičky do 250ml kádinky, zalijte 200 ml horké vody, nechte vychladnout, nařed'te a poté odstřed'te

Kofola: nařed'te a poté odstřed'te

č.3

Nápoje	Jacobs 3v1	Pepsi
Ředění	150x	10x
Objem roztoku	25 ml	50 ml

Jacobs 3v1: navažte obsah sáčku do 250ml kádinky, zalijte 200 ml horké vody, nechte vychladnout, nařed'te a poté odstřed'te

Pepsi: nařed'te a poté odstřed'te

č.4

Nápoje	Mokaté	Coca-cola
Ředění	150x	10x
Objem roztoku	50 ml	25 ml

Mokaté: navažte pět lžiček do 250ml kádinky, zalijte 200 ml horké vody, nechte vychladnout, nařed'te a poté odstřed'te

Coca-cola: nařed'te a poté odstřed'te

č.5

Nápoje	Jihlavanka (+)	Ledový čaj (černý)
Ředění	10x	10x
Objem roztoku	100 ml	10 ml

* Jihlavanka (+) kofeinová káva

Jihlavanka (+): navažte dvě lžičky do 250ml kádinky, zalijte 200 ml horké vody, 3 minuty louhujte, sced'te, nechte vychladnout, nařed'te a poté odstřed'te

č.6

Nápoje	Jihlavanka (-)	Ledový čaj (zelený)
Ředění	10x	10x
Objem roztoku	25 ml	10 ml

* Jihlavanka (-) bezkofeinová káva

Jihlavanka (-): navažte 2 lžičky do 250ml kádinky, zalijte 200 ml horké vody, 3 minuty louhujte, sced'te, nechte vychladnout, nařed'te a poté odstřed'te

Ledový čaj (zelený): nařed'te a poté odstřed'te

č.7

Nápoje	Černý čaj AHMED	RedBull
Ředění	70x	50x
Objem roztoku	25 ml	100 ml

Černá čaj AHMED: navažte 2 lžičky do 250ml kádinky zalijte 200 ml, horké vody, louhujte 3 minuty, sceďte, nechte vychladnout, nařed'te a poté odstřed'te.

č.8

Nápoje	Černý čaj PIGI	RedBull
Ředění	30x	50x
Objem roztoku	5 ml	100 ml

* (+) kořeinová káva

Nescařé (+): navažte obsah sáčku do 250ml kádinky, zalijte 200 ml horké vody, nechte vychladnout, nařed'te a poté odstřed'te.

Kofola: nařed'te a odstřed'te

č.9

Nápoje	Zelený čaj BIO	Coca-cola
Ředění	30x	10x
Objem roztoku	25 ml	25 ml

Jacobs 3v1: navažte obsah sáčku do 250ml kádinky, zalijte 200 ml horké vody, nechte vychladnout, odstřed'te a nařed'te.

Pepsi: nařed'te a odstřed'te

10.6 Příloha F – Zpětná vazba pedagog + žák

Jméno a příjmení:

Datum:

DOTAZNÍK

Tento dotazník slouží jako zpětná vazba k workshopu, úvodní přednášce a webu Přírodověda.cz. Odpovídejte, prosím, stručně a konkrétně. Děkuji.

1. Jak hodnotíte organizaci workshopu?

2. Jaké změny byste uvítala?

3. Je podle Vás důležité praktické seznámení s moderními analytickými metodami, jako kapalinová chromatografie, důležité i pro studenty všeobecného gymnázia?

4. Pokud byste měli možnost přijít se svými žáky na workshop znova, přišli byste?

5. Je něco, co byste určitě vynechala z programu workshopu?



6. Co se Vám na workshopu líbilo?



7. Jak bylo podle Vás zpracováno zadání? Navrhujete nějaké změny?



8. Doplnoval a navazoval vhodně pracovní list na zadání? Navrhujete nějaké změny.



9. Měli žáci dostatek prostoru a příležitostí se ptát?

10. Byly všechny otázky žáků dostatečně odpovězeny?

11. Máte pocit, že žáky workshop zaujal? Pokud ne, navrhuje v tomto směru nějaké změny?

12. Přišel Vám workshop svou náročností adekvátní studentům chemického semináře ve 3. ročníku všeobecného gymnázia? Pokud ne, co by mělo být lépe vysvětleno nebo zcela vynecháno?

13. Jak hodnotíte úvodní přednášku, která předcházela workshopu? Doplnovala vhodně workshop?

14. Jak hodnotíte informace na webu Přírodověda.cz? Doplnuje vhodně workshop?

15. Navrhujete nějaké změny (přednáška, web i workshop)?

Ročník studia:

Datum:

DOTAZNÍK

Tento dotazník slouží jako zpětná vazba k workshopu, úvodní přednášce a webu Přírodověda.cz. Odpovídej, prosím, stručně a konkrétně. Děkuji.

1. Zakroužkuj, jaký typ úloh/y jsi vypracovával/a:

Stanovení metabolitů v moči, Stanovení kofeinu v nápojích, Měření pH nápojů.

2. Dozvěděl/a jsi se během workshopu něco nového? Pokud ano, uveď konkrétní příklad/y.

3. Co bylo pro Tebe opakování? Přišlo Ti opakování užitečné nebo zbytečná ztráta času?

4. Připadal Ti návod k úlohám dostatečně srozumitelný? Pokud ne, uveď konkrétní příklady, kde Ti nebylo něco jasné.

5. Jaký obor pánuješ studovat na VŠ?

6. Uvítal/a bys nějaké změny (organizační, výběry úloh, úroveň obtížnosti)? Uveď konkrétní příklady.

7. Máš pocit, že jsi porozuměl/a, jak funguje kapalinový chromatograf?

8. Setkal/a jsi se během svého dosavadního studia (včetně mimoškolních aktivit – SOČ, chemické olympiády apod.) s kapalinovou chromatografií? Pokud ano, uveď, kdy a při jaké příležitosti, zda jen teoreticky nebo i prakticky.

9. Uvítal/a bys, aby se podobné praktické aktivity zařazovaly více do výuky?

10. Dozvěděl/a jsi se na teoretické přednášce, která předcházela workshopu, co od něho očekávat a jaké bude jeho hlavní zaměření?

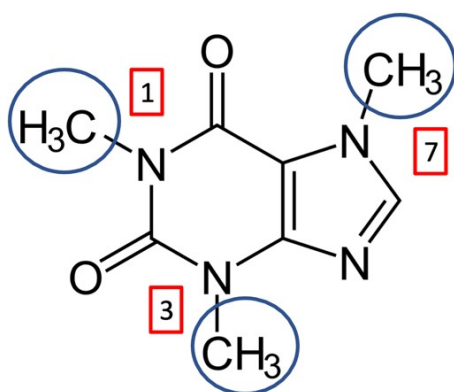
11. Měl/a jsi dostatek času na úlohy, které jsi chtěl/a stihnout?

12. Bylo rozložení času mezi teorií, praktickou část v laboratoři, vyhodnocení výsledků a vyvození závěru vyhovující? Kde bys případně udělal/a změnu?

13. Co Tě v průběhu workshopu nejvíce bavilo?

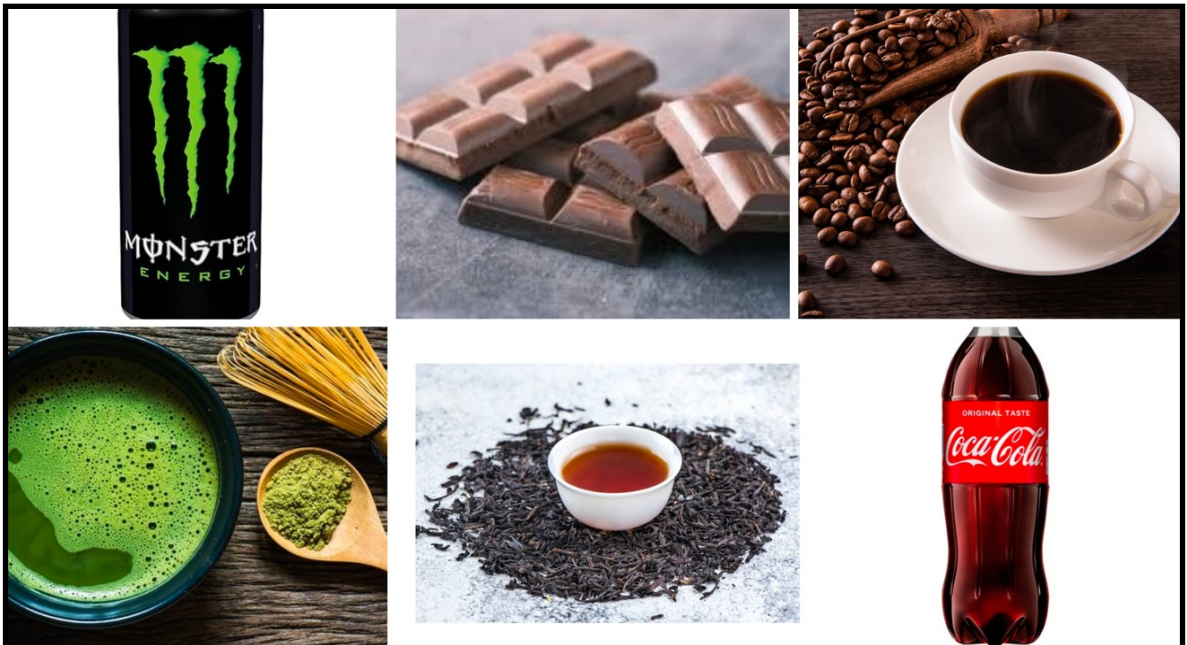
14. Co Ti v průběhu workshopu přišlo spíše nudné či zbytečné?

15. Navštívil jsi před začátkem workshopu webovou stránku Přírodověda.cz, kde jsou rozšiřující informace vztahující se k workshopu? Pokud ano, uveď, jaký máš ze stránek dojem, co bys vylepšil/a?

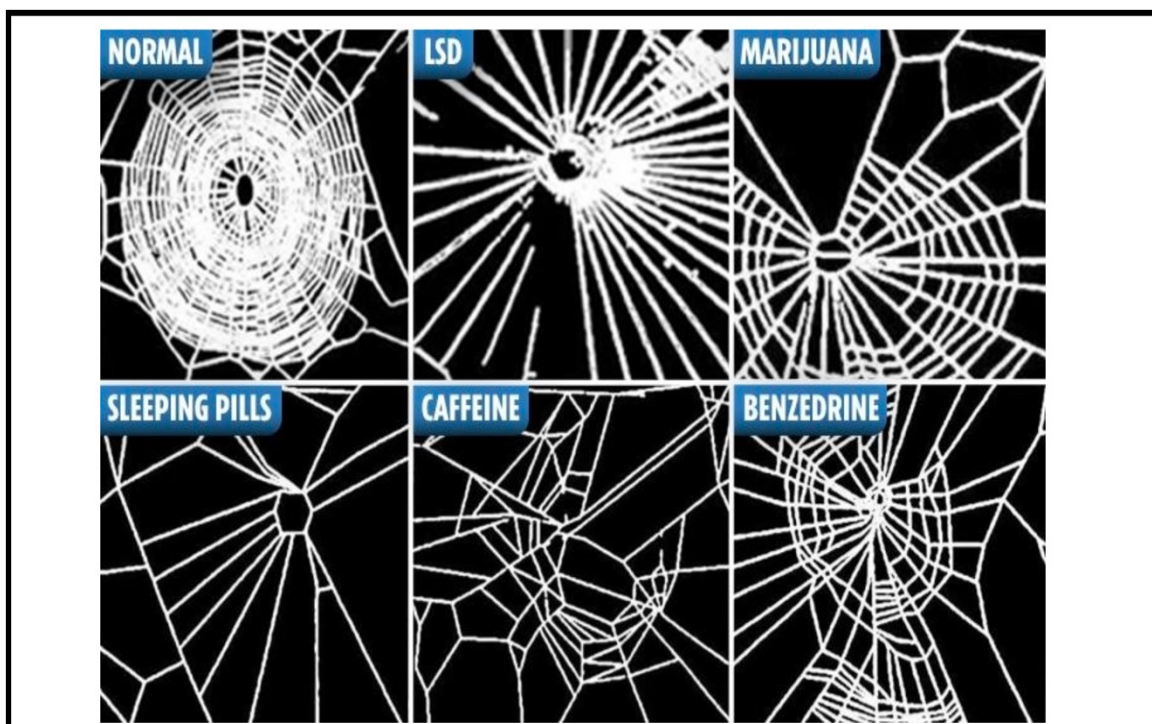
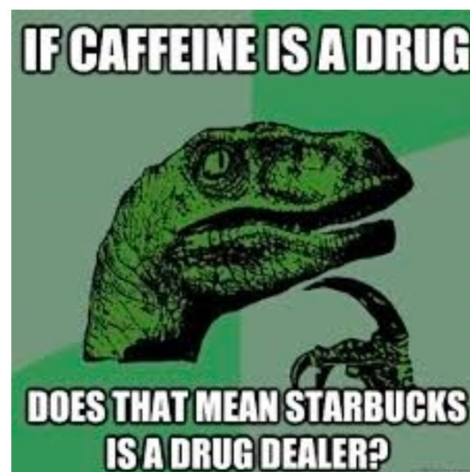


1,3,7-trimethylxantin

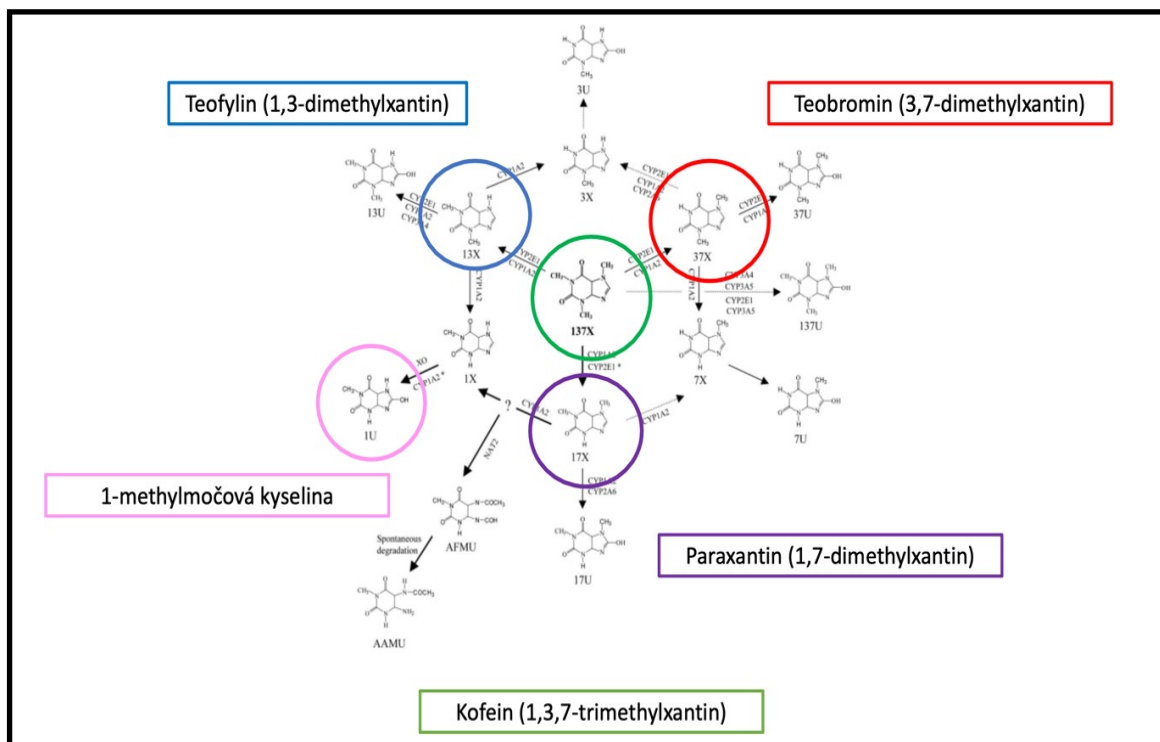
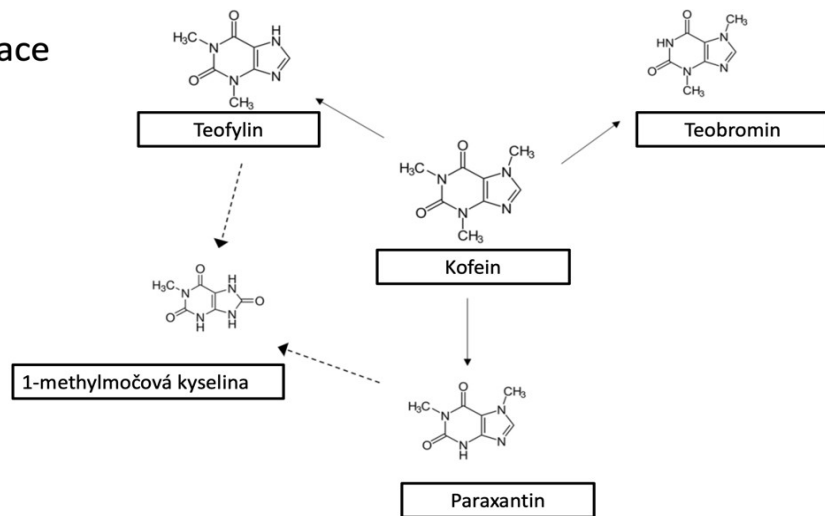
Kde všude ho najdeme?

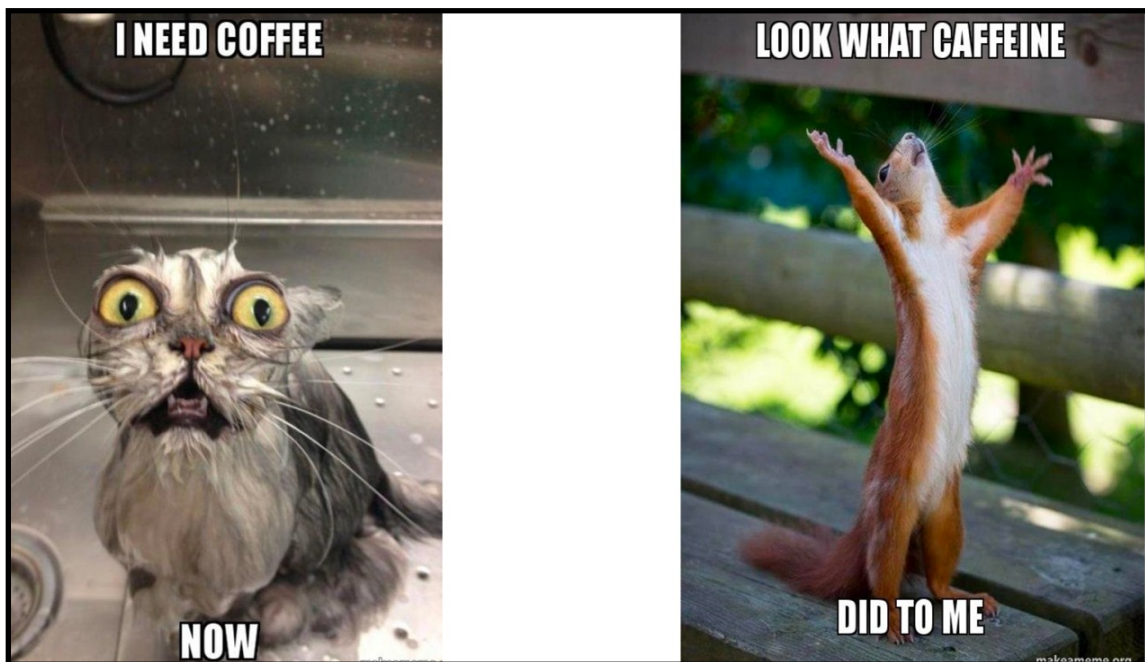


- Kofein je celosvětově nejpoužívanější psychoaktivní drogou.
- Doporučená denní dávka by neměla překročit 400 mg.



Biotransformace

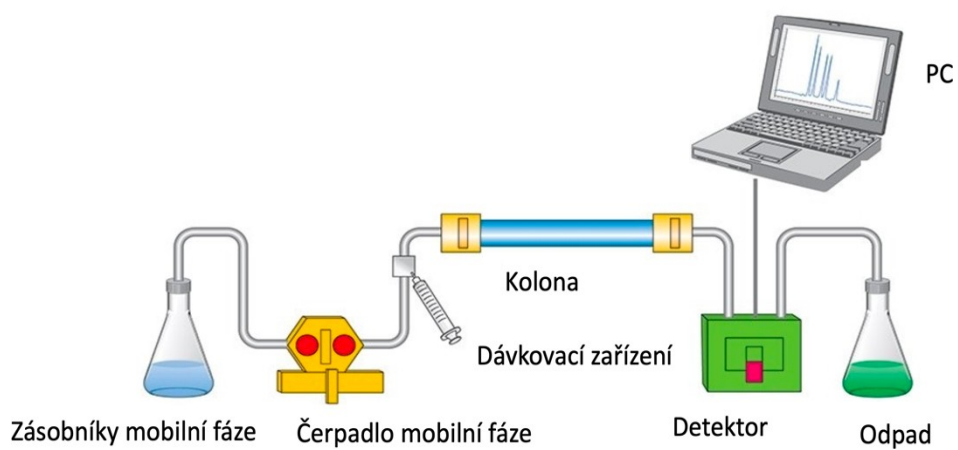




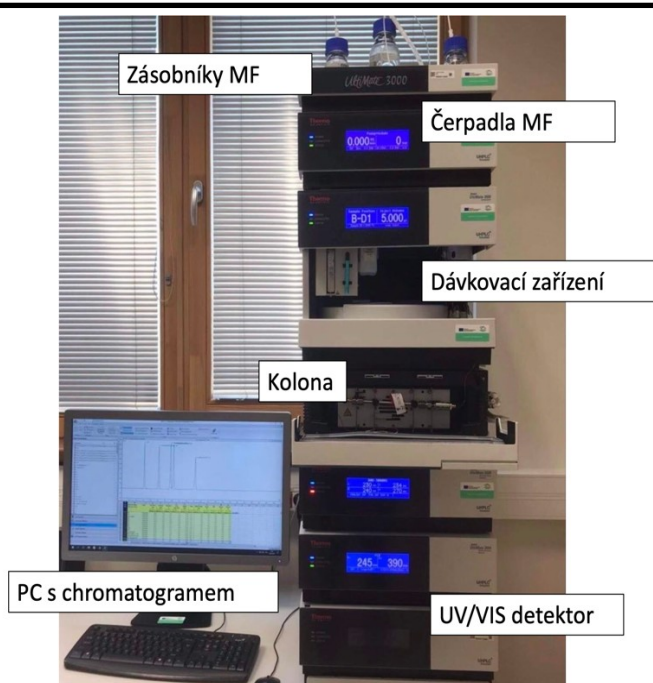
Experimentální část

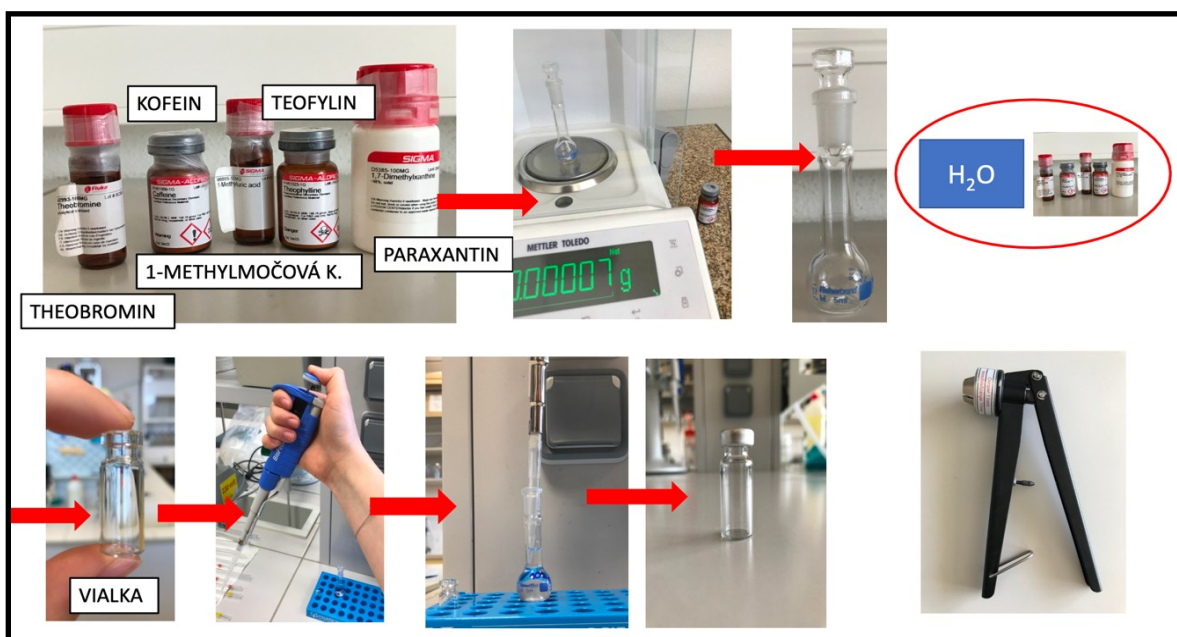
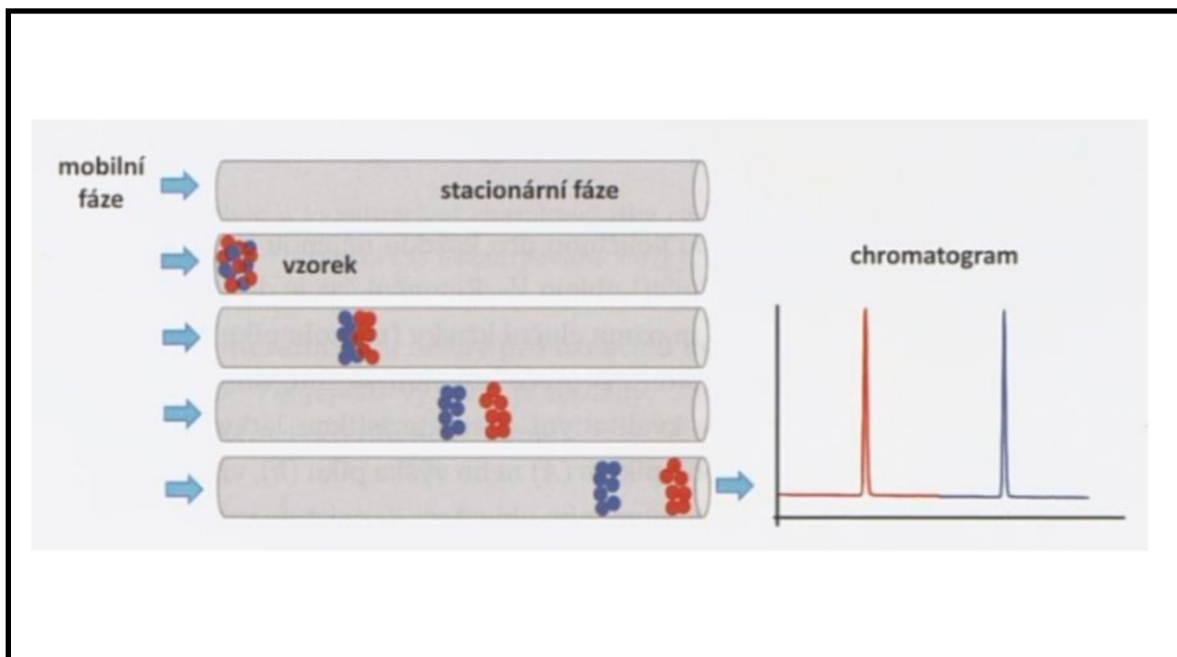
- Stanovení kofeinu a jeho metabolitů ve vzorku moči – kvalitativní hodnocení
- Stanovení kofeinu v nápojích - kvantitativní hodnocení
- Měření pH nápojů

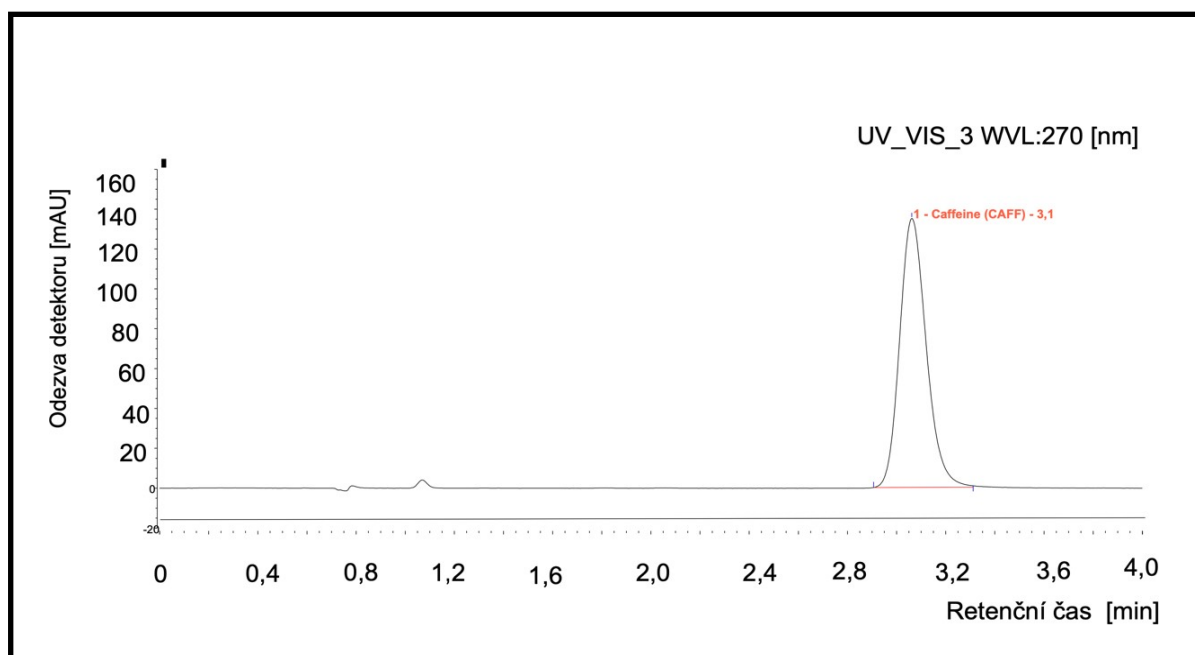
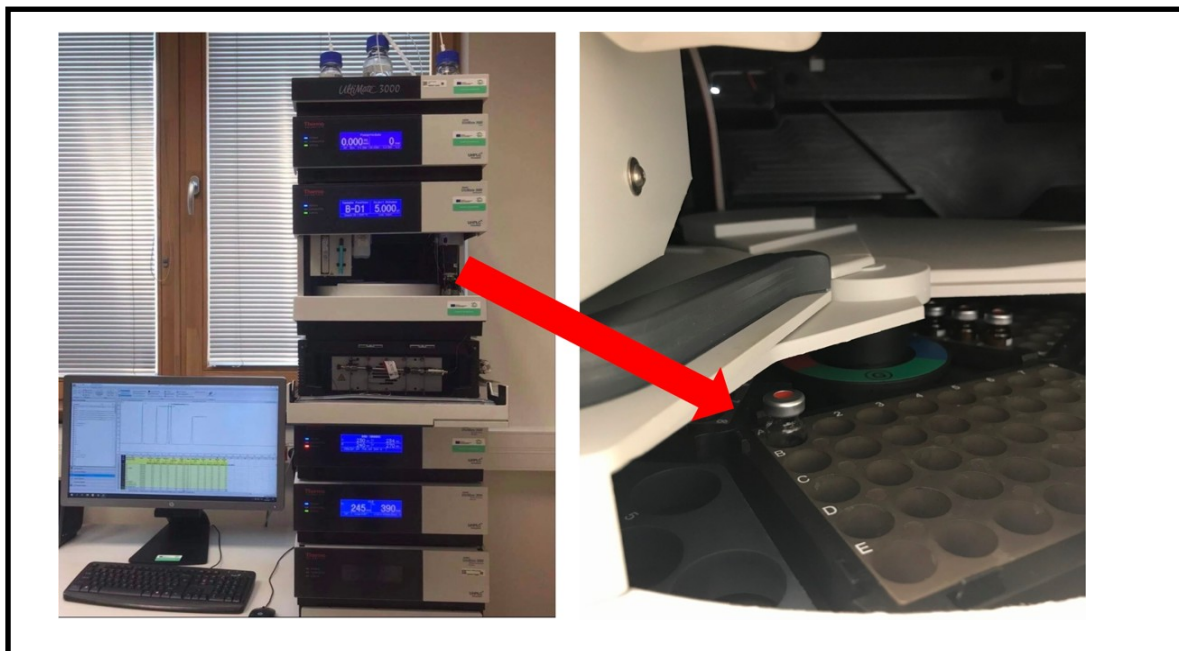
Kapalinová chromatografie = HPLC

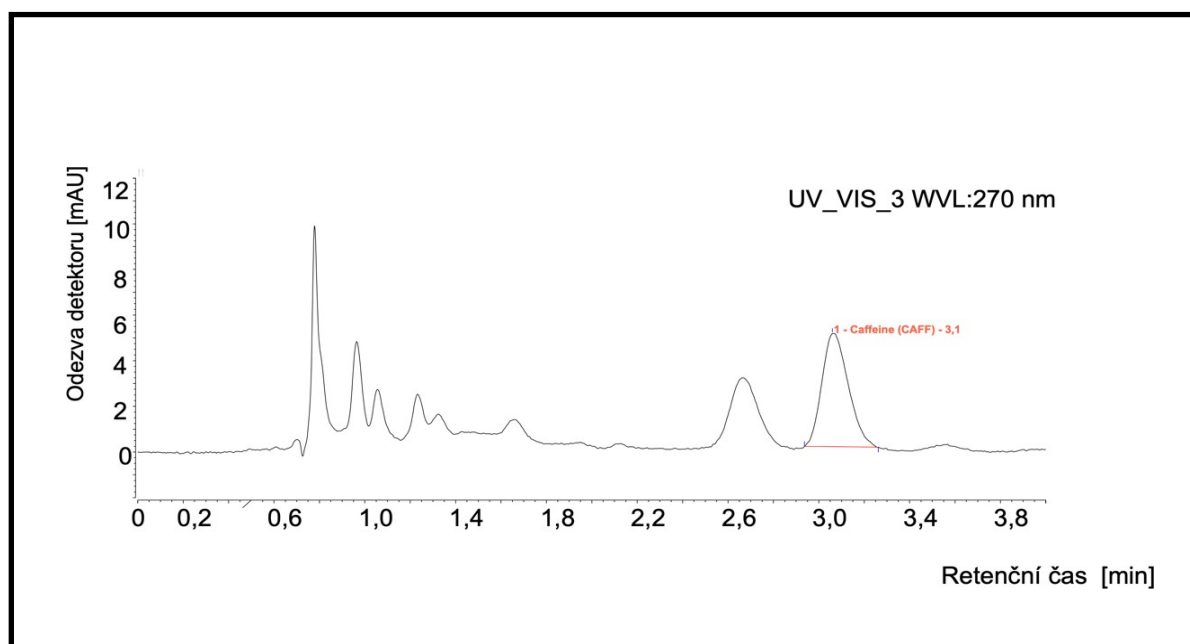
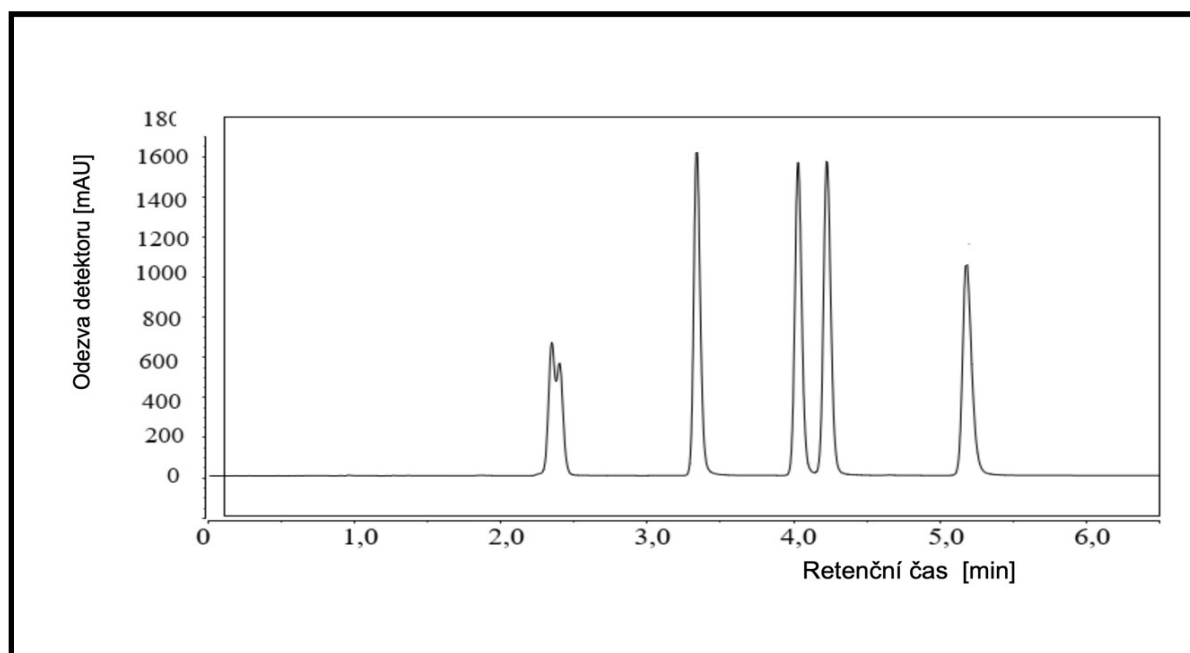


Kapalinový chromatograf



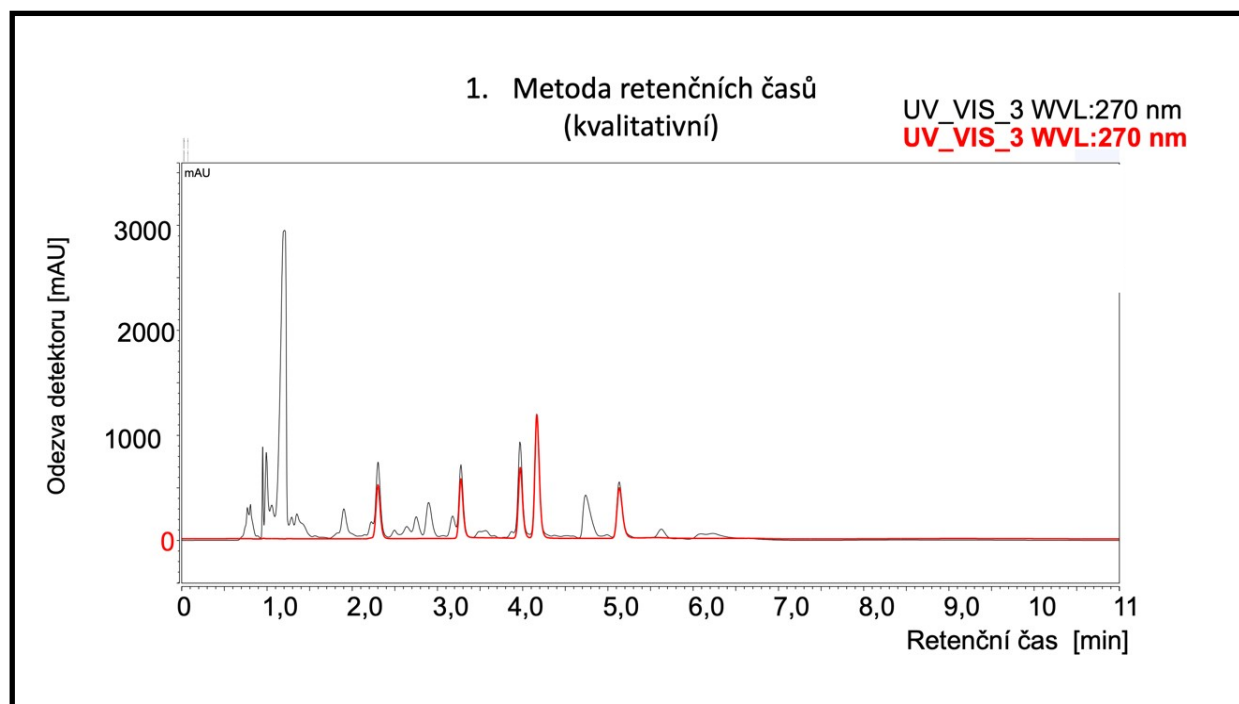




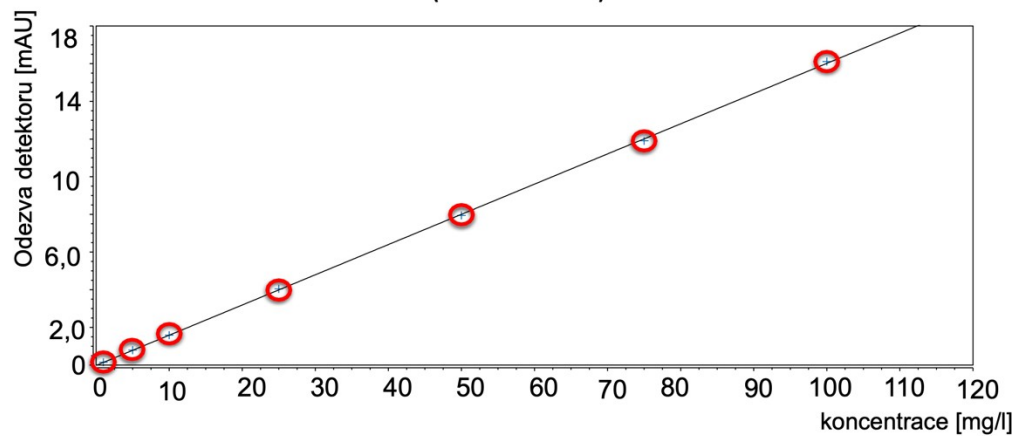


Vyhodnocení dat

1. Kvalitativní hodnocení – retenční časy (moč)
2. Kvantitativní hodnocení – metoda kalibrační křivky (nápoje)



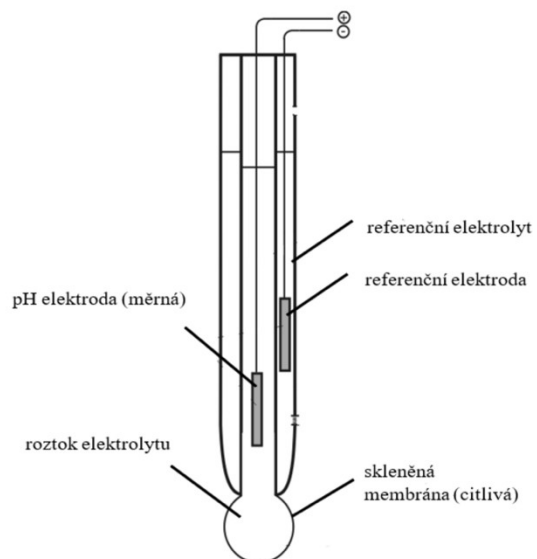
2. Metoda kalibrační křivky (kvantitativní)

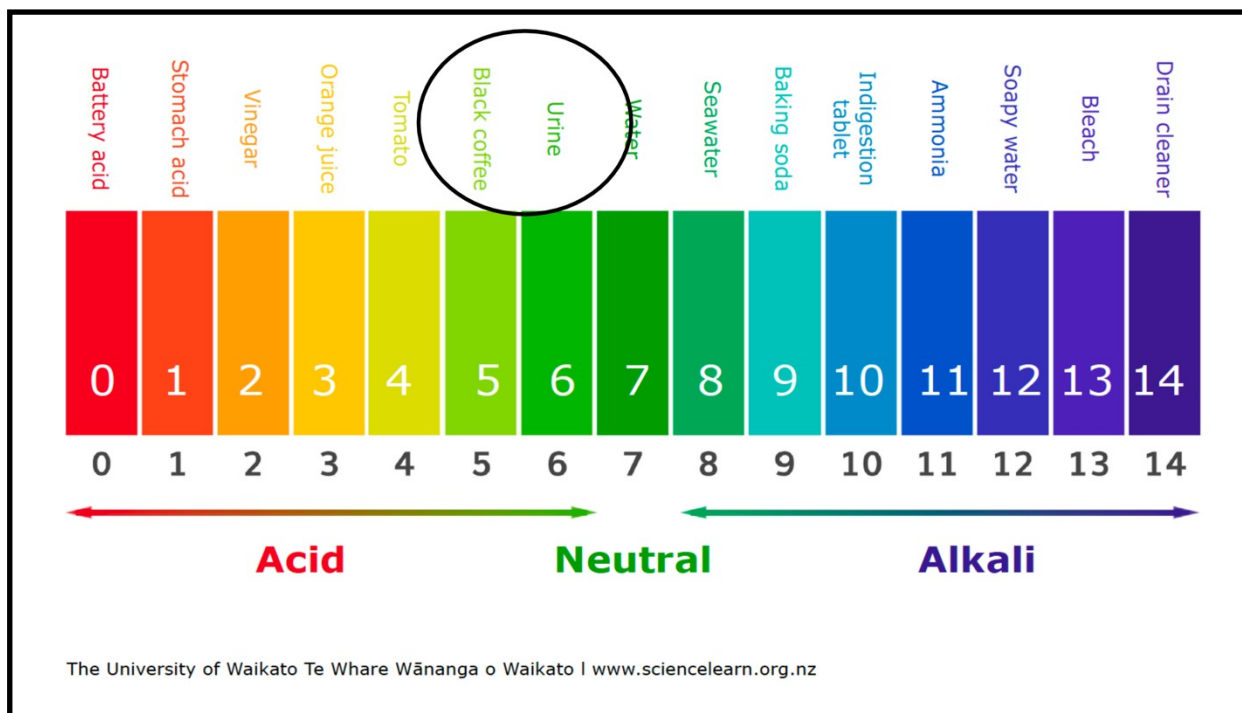


Skleněná elektroda



$$K_A(\text{CH}_3\text{COOH}) = \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}$$





Bezpečnost práce

- Metanol ✓
- V laboratoři pracuji jen se svými přístroji, roztoky, látkami ✓
- Každé (i drobné) zranění nahlásím ✓
- Přesto, že pracuji s potravinovými vzorky, z kádinek nepiju ✓
- Při práci s biologickými vzorky používám rukavice ✓

Program workshopu

- Sraz 24.5./26.5. v 8:00 před budovou C PřF JČU (Branišovská 1760, České Budějovice)
- Práce v laboratoři (8:00-12:00)
 - Stanovení kofeinu a jeho metabolitů ve vzorku moči – kvalitativní hodnocení
 - Stanovení kofeinu v nápojích - kvantitativní hodnocení
 - Měření pH nápojů
- Vyhodnocení (12:15-13:15)

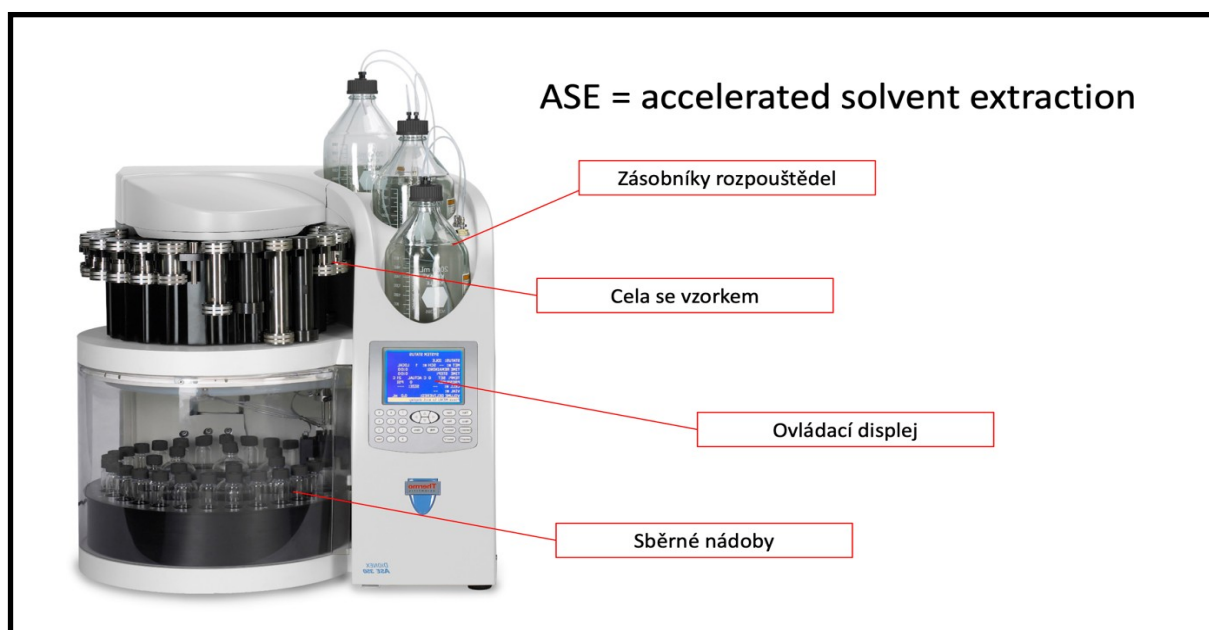
Co si nezapomenout vzít do laboratoře?

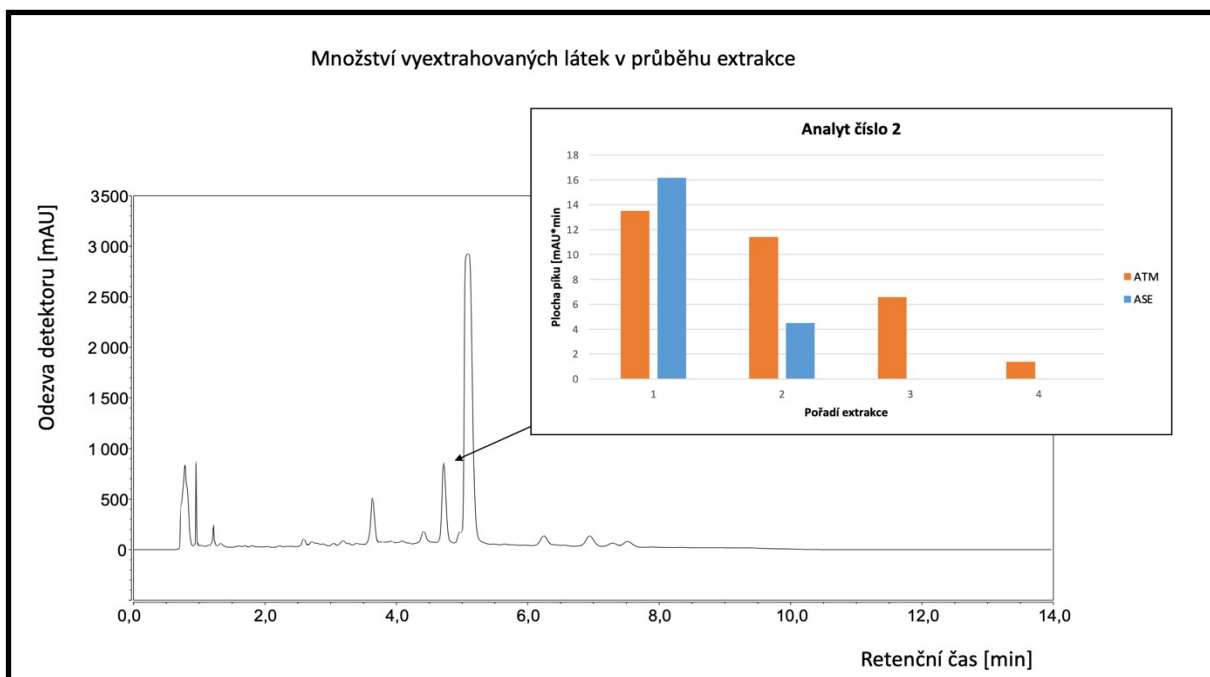
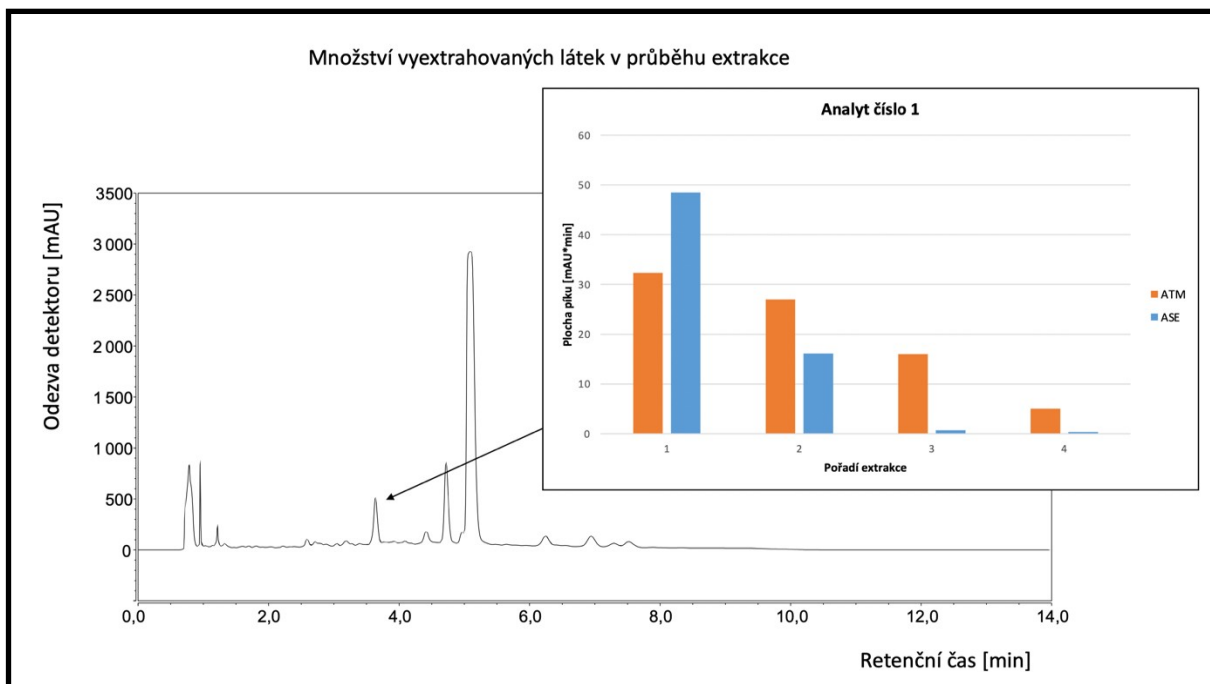
- Laboratorní plášť
- Přezůvky
- Kalkulačku
- Psací potřeby
- Dvojice, která bude analyzovat moč – vzorek moči 0 hod a 2,5 hod; popsat!
- Svačina ☺

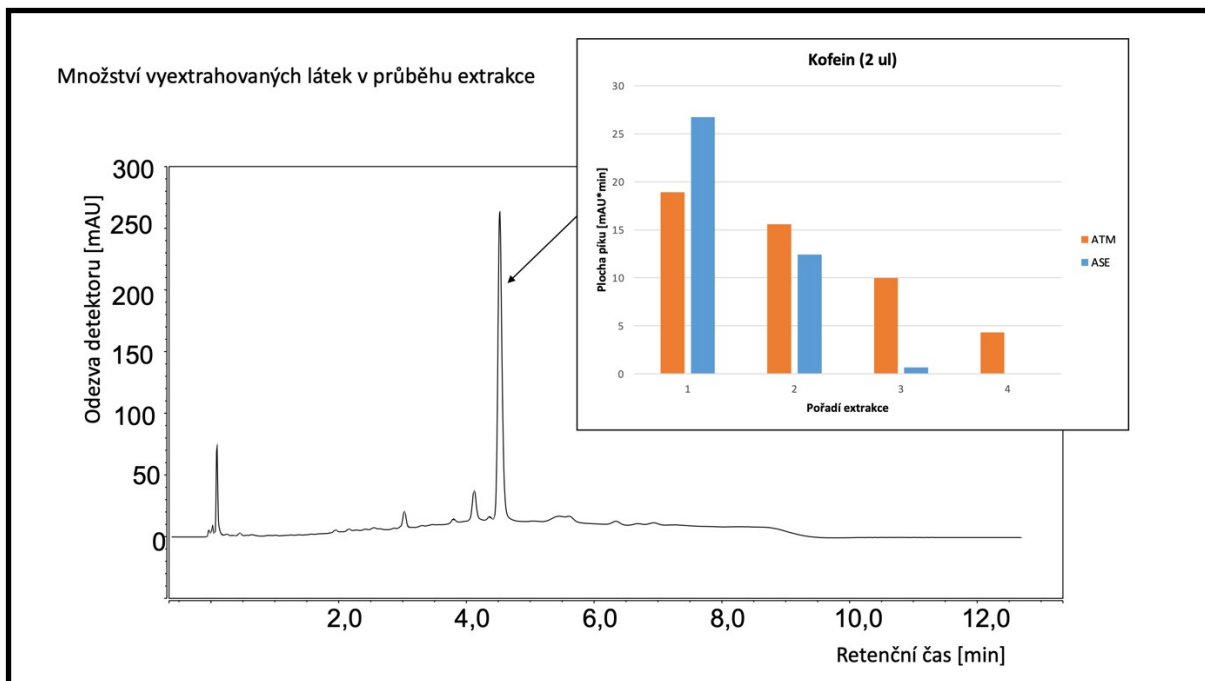
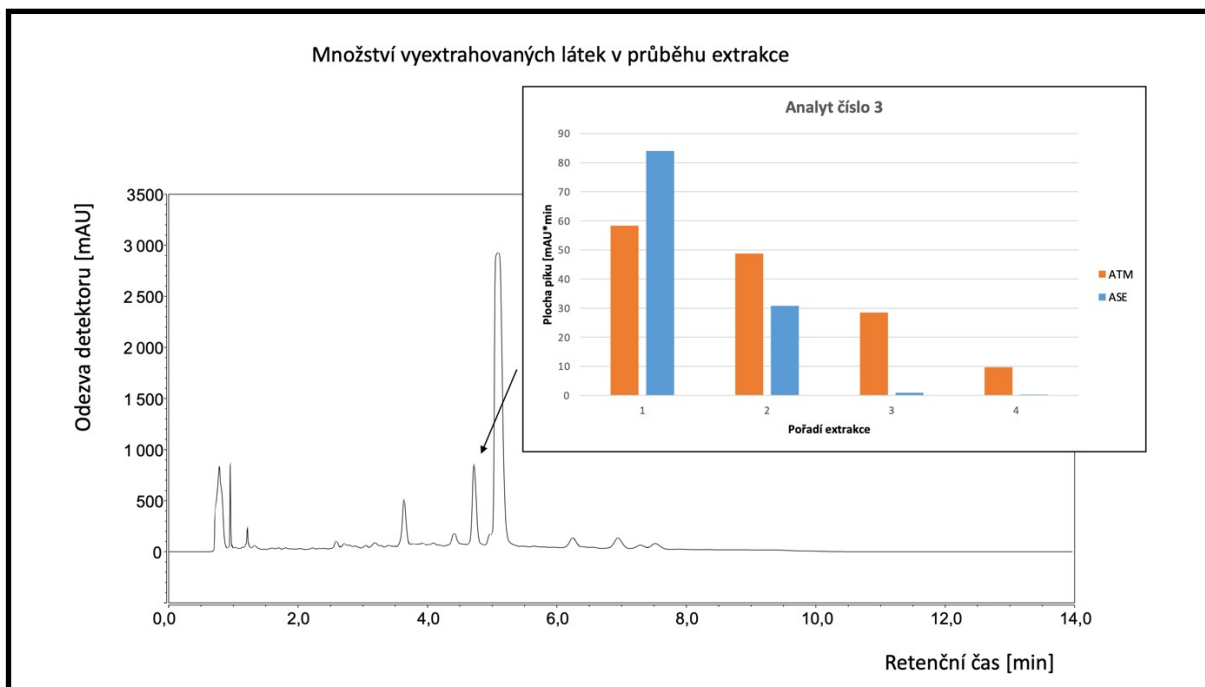
<http://www.prirodoveda.cz/>

ASE

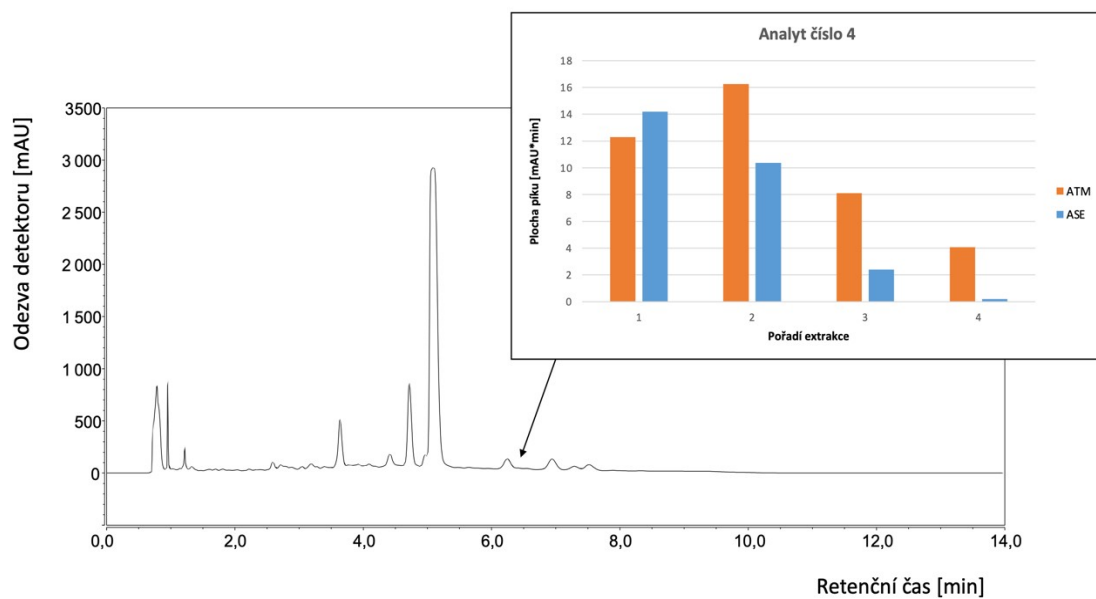
= accelerated solvent extraction



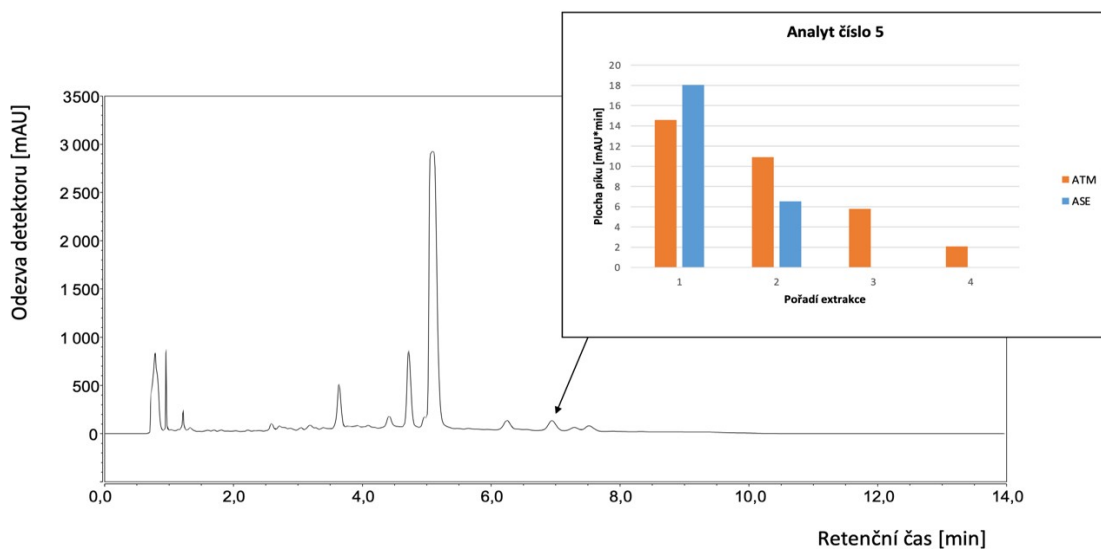




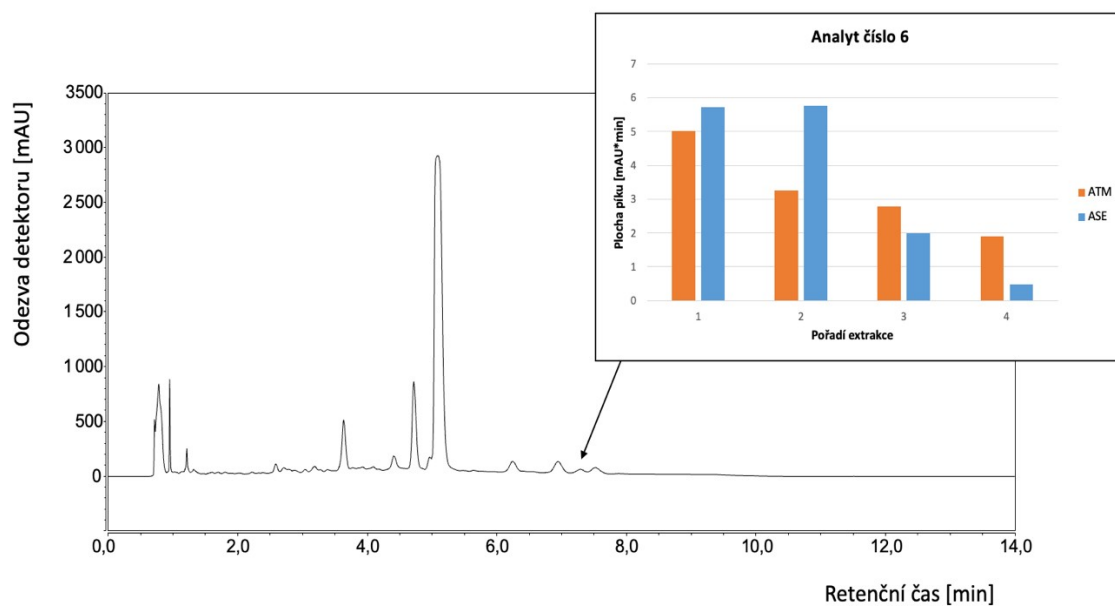
Množství vyextrahovaných látek v průběhu extrakce



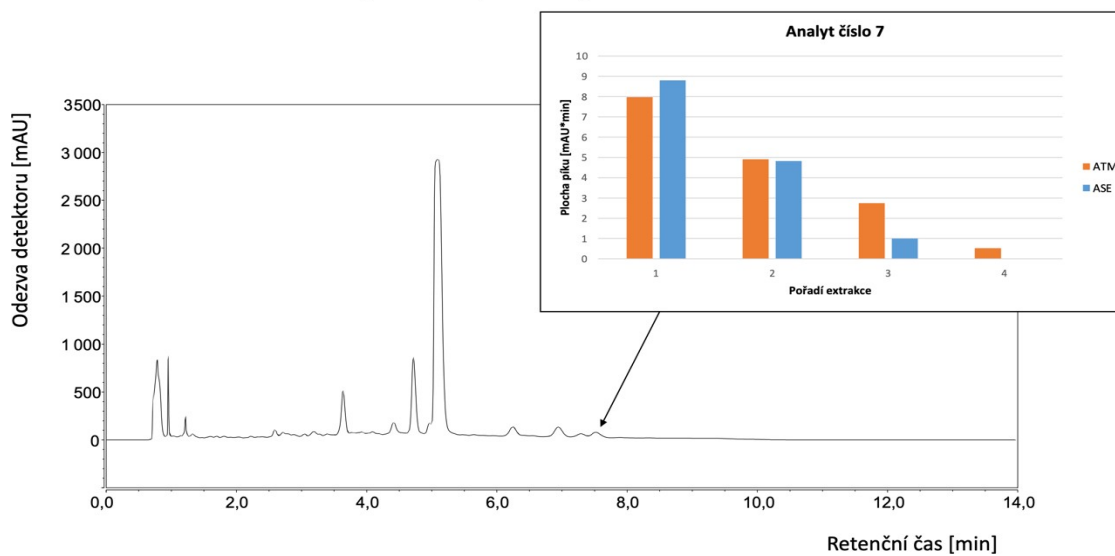
Množství vyextrahovaných látek v průběhu extrakce



Množství vyextrahovaných látek v průběhu extrakce



Množství vyextrahovaných látek v průběhu extrakce



10.9 Příloha I – fotografie z workshopu

