

ÚLOHA č. 1

ANALÝZA SMĚSI METHYLYXANTINŮ POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE NA REVERZNÍ FÁZI

Pracovní roztoky standardů methylxantinů a polyfenolů o koncentraci $c = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ připravíme ze zásobních roztoků o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ pomocí mikropipety naředěním destilovanou vodou přímo do mikrozkušavky. Stejným způsobem si připravíme i směs methylxantinů a polyfenolů o koncentraci jednotlivých látek $c = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

ÚLOHA Č. 2

STANOVENÍ KYSELINY GLUTAMOVÉ POMOCÍ METOD KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZY A TENKOVRSŤVÉ CHROMATOGRRAFIE

2.2.2.2. PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO ROZTOKU 0,01 M KYSELINY GLUTAMOVÉ

Stanovení kyseliny glutamové provedeme pouze pomocí **metody přidavku standardu**.

K přípravě standardů pro přidavek použijeme zásobní roztok 10mM kyseliny glutamové. Vypočítáme navážku zásobního roztoku kyseliny glutamové do 50ml odměrné baňky. Navážku navážíme a rozpustíme v přibližně 25 ml destilované vody, kvantitativně převedeme do odměrné baňky a baňku doplníme po rysku destilovanou vodou. V případě nutnosti upravíme elektrolyt před doplněním baňky po rysku odplyněním v ultrazvukové lázni.

2.2.2.4. PŘÍPRAVA VZORKU PRO METODU PŘÍDAVKU STANDARDU

Připravíme si zásobní roztok vzorku obsahujícího kyselinu glutamovou (stanovovaná látka) tak, že kapalným vzorkem obsahující kyselinu glutamovou naředíme 100× do 100ml odměrné baňky.

Ze zásobního roztoku vzorku napipetujeme do čtyř 25ml odměrných baněk 2,5 ml zásobního roztoku a přidáme takové množství 10mM roztoku kyseliny glutamové, aby po doplnění destilovanou vodou po rysku byla koncentrace přidavků kyseliny glutamové 0,0 mM, 0,2 mM, 0,4 mM a 0,6 mM. Takto připravené roztoky použijeme pro určení neznámého množství kyseliny glutamové ve vzorku. Každý vzorek změříme 3x.

2.2.3. MĚŘENÍ VZORKŮ

Podle návodu k obsluze kapilárního elektroforetického analyzátoru EA 102 v kapitole Přístroje a přístrojové vybavení připravíme přístroj k měření.

Při dvoukolonové analýze v horní předseparační koloně (*Upper*) systému dochází k předseparaci vzorku a zaznamenává se konduktometrická křivka detektorem umístěným na horní koloně. V koloně spodní analytické (*Lower*) probíhá vlastní rozdělení a konduktometrická detekce složek vzorku.

Při jednokolonové analýze v horní analytické koloně (*Upper*) systému probíhá rovnou vlastní rozdělení a konduktometrická detekce složek vzorku.

Zapneme řídicí počítač a spustíme program *ITPPro32*. Otevře se hlavní okno programu, kde zvolíme *Run* a dostaneme se do nabídky *ITPPro Runtime Mode*. V měřicím okně v horní nabídce klikneme na ikonu pro výběr nové metody → pro dvoukrokovou analýzu zadáme následující dva kroky:

1. krok → doba analýzy 600 s, proud 250 μA ; 2. krok → doba analýzy 1000 s, proud 80 μA

Zadanou metodu potvrdíme stisknutím tlačítka *OK* a zahájíme analýzu. Naměřená data uložíme a potom zpracujeme.

2.4. VYHODNOCENÍ ANALÝZ SEPARAČNÍCH METOD A ZPRACOVÁNÍ DAT DO PROTOKOLU

Při vyhodnocení výsledků získaných metodou ITP použijeme **metodu přidavku standardu**. Každý připravený vzorek proměříme 3×. Do protokolu zpracujeme následující body:

1. **Identifikujeme kyselinu glutamovou v neznámém vzorku na základě testování shodnosti hodnoty výšky zóny RSH jednotlivých vzorků. Uvedeme chybu metody ITP pro stanovení kyseliny glutamové a zdůvodníme vhodnost metody pro její stanovení.**
2. **Koncentraci kyseliny glutamové zjistíme sestrojením závislosti délky zóny analytu na koncentraci roztoků jednotlivých přidavků standardu. Množství kyseliny glutamové uvádíme s příslušnou chybou vypočítanou z její průměrné hodnoty.**
3. **Na základě zjištěného obsahu kyseliny glutamové**
 - srovnáme její množství s deklarovaným obsahem v analyzované potravíně,
 - posoudíme její množství s běžně se vyskytujícím obsahem v potravinách (viz text v odstavci 2.2.1).
4. **V závěrečné diskuzi zhodnotíme průběh analýzy, zdůvodníme příčiny možného chybného stanovení a pokusíme se objasnit případné problémy, které nastaly během analýzy.**

Veškeré statistické vyhodnocení (testování odlehlosti, výpočty průměrů, směrodatných odchylek, relativních směrodatných odchylek, intervalů spolehlivosti) provádíme pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$. Je nutné si uvědomit, že se jedná o vyhodnocení malého počtu opakování a použít příslušné vzorce. Návod na statistické zpracování výsledků je v části Statistické vyhodnocení analytických výsledků a metod.

Výsledky budou přehledně zpracovány formou tabulek a grafů, v protokolu budou uvedeny veškeré výpočty zaokrouhlené na odpovídající počet platných míst.

ÚLOHA č. 3

ANALÝZA SYNTETICKÝCH A ROSTLINNÝCH BARVIV POMOCÍ TENKOVRSŤVÉ CHROMATOGRFIE

Výběr vyvíjecích soustavy *dle zadání vyučujícího*.

Připravíme vždy takové množství vyvíjecí soustavy, které bude odpovídat velikosti vyvíjecí nádoby (tak, aby hladina mobilní fáze dosahovala do výšky 8–10 mm).

ÚLOHA č. 4

STANOVENÍ ACETONU POMOCÍ PLYNOVÉ ROZDĚLOVACÍ CHROMATOGRFIE

PŘÍPRAVA VZORKU PRO URČENÍ LIMITU DETEKCE

Vzorek acetonu naředíme tak, aby byl v jednom chromatogramu měřitelný šum pozadí i signál vzorku,

tj. 100 000×.

PŘÍPRAVA NEZNÁMÉHO VZORKU PRO METODU KALIBRAČNÍ KŘIVKY

Vzorek rozpouštědla zředíme 100× do 10ml odměrné baňky a baňku doplníme destilovanou vodou po rysku. Roztok odplyníme v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Pokud bude odezva signálu vzorku příliš nízká, příp.vysoká, je potřeba vzorek vhodným způsobem (ředěním) dále upravit.

PŘÍPRAVA NEZNÁMÉHO VZORKU PRO METODU PŘÍDAVKU STANDARDU

Do 10ml odměrné napipetujeme 100 μl neznámého vzorku, přidáme 20 μl acetonu a baňku doplníme destilovanou vodou po rysku. Roztok odplyníme v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

ÚLOHA č. 7

STANOVENÍ MĚDI POMOCÍ ATOMOVÉ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE

7.2.4. STANOVENÍ MĚDI VE VÍNĚ METODOU KALIBRAČNÍ KŘIVKY

Kalibrační roztoky. Do 100ml odměrné baňky si připravíme ze zásobního roztoku mědi o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ pracovní roztok mědi ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, příp. $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) o koncentraci 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z takto získaného roztoku standardu připravíme do 100ml odměrné baňky roztok o koncentraci 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z tohoto roztoku ředěním připravíme kalibrační roztoky o následujících koncentracích – 0,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,06 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,08 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 0,12 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do 25ml odměrných baněk. Baňky doplníme po rysku 1% HNO_3 .

Slepý pokus. Stejným způsobem provedeme i přípravu slepého vzorku (blank).

Vzorek vína. Vzorek vína vhodně naředíme redestilovanou vodou (asi 5x) tak, aby se koncentrace analytu (Cu) nacházela přibližně uprostřed kalibrační závislosti, tj. do 25ml odměrné baňky napipetujeme 5 ml vzorku a doplníme po rysku 1% HNO_3 .

Roztoky proměříme na spektrometru novAA 300 po zvolení požadované metody (kalibrační roztoky 1×, slepý pokus 1×, vzorek vína 5×).

7.2.5. STANOVENÍ MĚDI VE VÍNĚ METODOU PŘÍDAVKU STANDARDU

Ze zásobního roztoku mědi o koncentraci 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (viz předchozí odstavec) připravíme roztok o koncentraci 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z tohoto roztoku pipetujeme do 25ml odměrných baněk 0,00 ml; 1,25 ml; 2,50 ml; 3,75 ml; 5,00 ml a 7,50 ml roztoku mědi. Do každé z odměrných baněk přidáme 5 ml nezředěného vzorku vína a doplníme 1% HNO_3 po rysku.

Jako blank použijeme čistý roztok 1% HNO_3 .

7.2.6. VLIV INTERFERUJÍCÍCH LÁTEK NA ANALYTICKÝ SIGNÁL

Ze zásobního roztoku mědi o koncentraci 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ připravíme do 25ml odměrných baněk 6 roztoků mědi se stejnou koncentrací, tj. koncentrací 0,06 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a obsahem ethanolu od 0 do 5 % (v/v) ethanolu. Doplníme po rysku 1% HNO_3 a u každého z nich změříme 10× absorbanci.

Stejným způsobem připravíme do 25ml odměrných baněk 6 roztoků mědi se stejnou koncentrací, tj. koncentrací 0,06 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a obsahem KNO_3 od 0 do 5 % (připravíme si 25% roztok KNO_3). Doplníme po rysku 1% HNO_3 a u každého z nich změříme 10× absorbanci.

7.2.7. MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI

Mez detekce a mez stanovitelnosti vyhodnotíme následujícími způsoby:

- i) výpočtem ze změřené hodnoty absorbance roztoku standardu mědi o nejnižší koncentraci ($0,01 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), která odpovídá trojnásobku/desetinásobku hodnoty absorbance šumu. Hodnotu šumu získáme proměřením roztoku blanku (1% HNO_3). Oba roztoky proměříme 10×.
- ii) s využitím kalibrační křivky: parametry určíme jako podíl trojnásobku/desetinásobku směrodatné odchylky absorbance roztoku blanku a směrnice kalibrační přímky.

ÚLOHA č. 10

STANOVENÍ FLUORESCEINU POMOCÍ SPEKTROFLUORIMETRIE

ÚLOHA č. 11

STANOVENÍ CHLORIDŮ POMOCÍ NEFELOMETRIE

11.2.3. MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI A MÍRY ZAKALENÍ NEZNÁMÉHO VZORKU

KALIBRACE NEFELOMETRU

1. Spustíme kalibraci.
2. PRVNÍ BOD KALIBRACE: připravíme si prázdnou kyvetu, opláchneme ji a naplníme destilovanou vodou. POZOR! Hladina vody musí být při tomto testovacím měření doplněna po rysku. Tento objem je pro získání správných hodnot zákalu kritický.
3. Očistíme stěny kyvety měkkou látkou, která nepouští vlákna, nebo buničitou vatou, abychom se zbavili případných nečistot.
4. Uchopíme kyvetu za víčko a vložíme ji do senzoru zákalu. Značka na kyvetě musí směřovat ke značce senzoru (označena šipkou). Při každém měření zkontrolujeme, zda značky směřují k sobě.
5. Uzavřeme kryt senzoru zákalu, jako hodnotu NTU zadáme 0. Poté kyvetu se standardem vyjmeme.
6. DRUHÝ BOD KALIBRACE: vezmeme kyvetu s obsahem standardu zákalu 100 NTU a opatrně ji čtyřikrát překlopíme, aby se promíchaly částice, které se mohly usadit na dně. Kyvetu se standardem nemícháme. Mícháním by se v ní vytvořily malé bublinky, které by mohly ovlivnit měření.
7. Kyvetu uzavřeme víčkem. Očistíme stěny kyvety měkkou látkou nebo buničitou vatou.
8. Uchopíme kyvetu za víčko a vložíme ji do přístroje, značka na kyvetě musí směřovat směrem ke značce senzoru. Uzavřeme kryt senzoru.
9. Jako hodnotu NTU zadáme 100. Nefelometr je připraven pro měření zákalu.

ÚLOHA č. 12

STANOVENÍ MĚDI POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CHRONOPOTENCIOMETRIE

12.2. STANOVENÍ MĚDI VE VÍNĚ

12.2.1. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

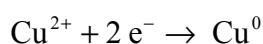
Ze zásobního roztoku síranu měďnatého $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci mědi $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ připravíme 100 ml pracovního roztoku síranu měďnatého ve vodě o koncentraci mědi $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Jako blank použijeme roztok elektrolytu R-013.

12.2.2. PŘÍPRAVA VZORKU K ANALÝZE

Víno zahřejeme k varu, ochladíme. Z pracovního roztoku napipetujeme do pěti 50ml odměrných baněk 5 ml vzorku vína a přidáme takové množství pracovního roztoku síranu měďnatého, aby po doplnění elektrolytem R-013 po rysku byla koncentrace mědi v jednotlivých odměrných baňkách $0,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; $0,05 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; $0,15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a $0,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Odměrné baňky vložíme na 10 minut do ultrazvukové lázně. Každý vzorek změříme 3x.

12.2.3. ANALÝZY KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ A VZORKU VÍNA

Použijeme průtokovou rozpouštěcí chronopotenciometrii. Průtokovou celu naplníme stanovovaným vzorkem, měďnaté ionty se vyloučí na porézní pracovní uhlíkové elektrodě (E53Au) jako kov. Dochází k redukci mědi podle rovnice:




Vyloučená měď, tzv. depozit, se v dalším kroku rozpustí konstantním proudem. Tento proces se zaznamená jako signál *chronopotenciogram* a pomocí softwaru se vypočítá koncentrace mědi ve vzorku.

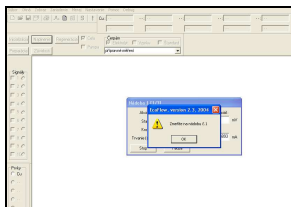
POSTUP MĚŘENÍ

1. Zapneme přístroj EcaFlow 150GLP (tlačítko ON/OFF je umístěno na zadním panelu).
2. Zapneme počítač a spustíme program *EcaFlow Autosampler*.
3. V okně *Nastavení* **S** zvolíme číslo metody – metodu č. 53 *Stanovení Cu ve víně (Nastavení – Všeobecné)*:
4. V záložce *Měření (Nastavení – Měření)* změníme hodnotu průtoku na $6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a stiskneme *OK*.
5. Okno *Nastavení parametrů* zavřeme kliknutím na *OK*.
6. Barevně označené hadičky ponoříme do příslušných roztoků:

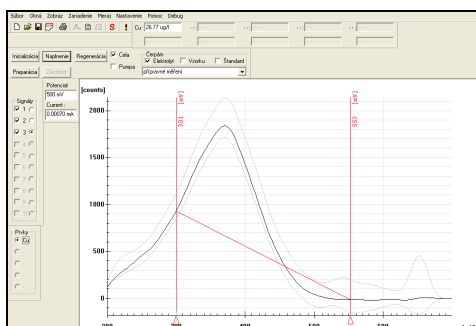
MODRÁ	ČERVENÁ	ŽLUTÁ
roztok elektrolytu R-013	blank	standard Cu


7. Přítlačné ramínko čerpadla zasuneme do pracovní polohy (musí zacvaknout).
8. Pod držák filtru umístíme kádinku (25ml), potom klikneme na možnost *Naplnění*, systém se automaticky naplní příslušnými roztoky.
9. Po ukončení možnosti *Naplnění* odstraníme kádinku a zapojíme obě hadičky průtokové cely v přední části přístroje.
10. V hlavním okně (nabídce) klikneme na možnost *Preparace* (proběhne příprava elektrody a průtokové cely k měření).
11. V okně *Nastavení* **S**, záložka *Všeobecné* nastavíme *Bezkalibrační mód měření* a měření pozadí *Před každým měřením*:

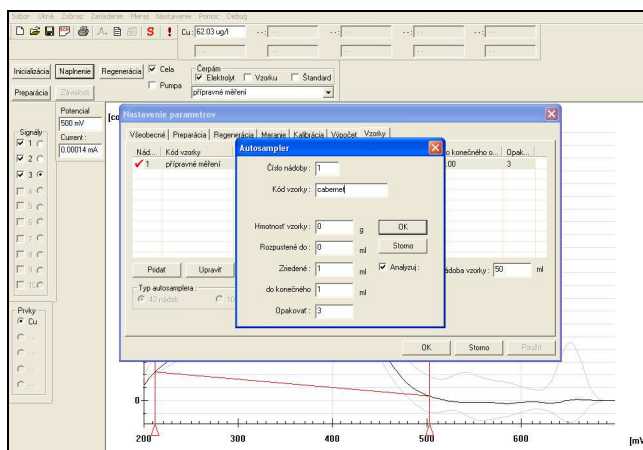
12. V záložce *Vzorky* nadefinujeme přípravné měření kliknutím na možnost *Přidat*. Měření pojmenujeme *Přípravné měření*, do možnosti opakovat zapíšeme číslo 3 a zaškrtneme možnost *Analyzuj*, klikneme na *OK*:
13. Opět klikneme na *OK* (aby se zavřelo okno s hlavní nabídkou), pak na možnost *Spustit*  a následně na *Start*, čímž se spustíme přípravné měření:
14. Během měření se objeví nápis *Změňte na nádobu č. 1*. Aniž bychom cokoliv měnili, klikneme na *OK*:




15. Po ukončení měření se zobrazí naměřená křivka. Zaklikneme vlevo dole možnost *Cu*. Objeví se kurzory odpovídající rozsahu napětí na x-ose pro přednastavenou metodu, které upravíme, aby rozpouštěcí pík mědi ležel uprostřed. Naměřenou křivku porovnáme se vzorovým záznamem, leželi pik v rozsahu kurzorů, můžeme přejít k analýze kalibračních roztoků a vzorku vína.:



16. Nejprve definujeme vzorek na analýzu, potom přístroj nastavíme na měření přídatku standardu.
17. Opět klikneme na *Nastavené* , záložka *Vzorky* a následně možnost *Přidat*. Vzorek pojmenujeme, změníme číslo nádoby, nastavíme počet měření na 3 opakování, zaškrtneme možnost *Analyzuj* a klikneme na *OK*:



18. V okně *Vzorky* klikneme pravým tlačítkem myši na nápis *Přípravné měření*, tím zabráníme, aby se přípravné měření opakovalo:
19. Pak klikneme na možnost *Všeobecné*, přepneme na techniku *Přídavek standardu* a měření pozadí *S každým novým vzorkem nebo standardem*:
20. Klikneme na záložku *Kalibrace*, v levé části zobrazeného okna nastavíme *Cu*, v pravé $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, vyplníme kolonky pro kalibrační přímku a klikneme na *OK*:
21. Žlutou hadičku zasuneme do vzorku č. 1, modrou a červenou umístíme do elektrolytu, klikneme na možnost *Spustit*, nastavíme počet měření na 3 opakování a stiskneme *Start*, tím zahájíme kalibraci:
22. Během měření budeme přístrojem vyzváni k výměně standardů. Nejprve příslušný vzorek vyměníme a poté výměnu potvrdíme kliknutím na *OK*.
23. Po proměření jednotlivých roztoků vhodně nastavíme kurzory na x-ose.
24. V hlavním okně programu klikneme na možnost *Závislosti* a získané grafy zkopírujeme do *Pdf* formátu. Dále uložíme všechny naměřené signály pomocí ikonky *Export*.
25. V okně *Show Results*  jsou uvedené naměřené hodnoty, které si zaznamenáme.

POSTUP UKONČENÍ PRÁCE S PŘÍSTROJEM

1. Z jednotlivých roztoků vyjmeme hadičky a ponoříme je do kádinky s destilovanou vodou. Hadičky celý odpojíme a injekční stříkačkou z nich vysajeme zbylou kapalinu.
2. V hlavním okně programu klikneme na možnost *Naplnění*. Dojde k promytí hadiček.
3. Po promytí systému ukončíme program *EcaFlow Autosampler*. Hadičky dáme do prázdné kádinky a *vycvakneme* ramínko čerpadla. Pod držák filtru umístíme prázdnou 25ml kádinku.
4. Přístroj vypneme tlačítkem ON/OFF na zadním panelu.

12.3 VYHODNOCENÍ ANALÝZY A POKYNY PRO ZPRACOVÁNÍ DAT DO PROTOKOLU

Do protokolu uvedeme následující výpočty a přiložíme jednotlivé vytištěné záznamy:

1. **Vypočítáme obsah mědi ve vzorku vína. Obsah mědi vyjádříme s odpovídající chybou stanovení (výpočet intervalu spolehlivosti).**
2. **Porovnáme námi zjištěný obsah mědi ve vzorku s předpokládaným množstvím mědi v analyzovaném víně.**
3. **V závěrečné diskusi zhodnotíme průběh stanovení, zdůvodníme příčiny možného chybného stanovení a pokusíme se objasnit případné problémy, které nastaly během cvičení.**

Veškeré statistické vyhodnocení vychází z použití příslušných rovnic pro daný soubor dat ($n < 7$) a při hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Podklady ke statistickému zpracování výsledků jsou v části Statistické