

Univerzita Karlova

Pedagogická fakulta

Katedra chemie a didaktiky chemie (41-KCHDCH)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Tenkvrstvá chromatografie ve výuce chemie na střední škole

Thin layer chromatography in teaching of chemistry on secondary school

Petr Obořil

Vedoucí práce: prof. Ing. Karel Kolář, CSc.

Studijní program: Specializace v pedagogice (B7507)

Studijní obor: B BI-CH (7507R045, 7504R009)

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie na střední škole potvrzuji, že jsem ji vypracoval pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

9.7.2021 ve Velkém Chlumci

Mé poděkování patří především prof. Ing. Karlovi Kolářovi, CSc. za odborné vedení a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce v této nelehké době věnoval. Děkuji také paní laborantce Janě Fiřtové za její trpělivost a ochotu v rámci praktického výzkumu, Ing. Eduardovi Poláchovi za věcnou diskuzi a Mgr. Jířině Kordulové a Pavlíně Obořilové za podporu a pomoc při gramatické kontrole této práce.

ABSTRAKT

Bakalářská práce na Téma tenkovrstvá chromatografie ve výuce na střední škole pojednává o využití této separační metody v oblasti chemického vzdělávání na gymnáziích. Teoretická část práce se zabývá fyzikálně-chemickou podstatou této separační metody a jejím praktickým využitím k analýze komerčních nápojů v prostředí středních škol. Teoretická část se dále zabývá také klasifikací a chemickým složením komerčních nápojů z hlediska obsahu potravinářských aditiv, především pak kyseliny askorbové, kofeinu, kyseliny sorbové, a taurinu a stručně popisuje chemické i biologické vlastnosti, zařazení z hlediska produkce potravin a účinky těchto aditiv na lidský organismus. V rámci teoretické části je provedena rešerše obsahu učiva středoškolských učebnic chemie se zaměřením na nápojová aditiva a separační metody pro determinaci cílové skupiny laboratorních úloh, které jsou hlavním výstupem této práce. Praktická část práce cílí na ověření vhodných postupů pro využití tenkovrstvé chromatografie k analýze komerčních nápojů a na využití této metody pro semikvantitativní důkazy potravinových aditiv s cílem potvrdit reprodukovatelnost výsledků a zajistit jednoduchou znovuproveditelnost experimentů. Primárním cílem práce je na základě experimentálně získaných dat a ověřených postupů sestavit soubor laboratorních úloh na téma důkazů běžných potravinových aditiv pomocí tenkovrstvé chromatografie pro zájemce z řad žáků i učitelů středních škol, či studentů vysokých škol z oboru učitelství přírodovědných oborů. Úlohy lze zařadit do učiva chemie čtvrtých ročníků gymnázií, ale i do volnočasových aktivit v rámci různých workshopů či přírodovědných kroužků.

KLÍČOVÁ SLOVA

tenkovrstvá chromatografie, výuka chemie, střední škola, askorbová kyselina, kofein, sorbová kyselina, taurin

ABSTRACT

The bachelor's thesis on the topic of Thin layer chromatography in teaching of chemistry on secondary school deals with the use of this separation method in the field of chemical education in grammar schools. The theoretical section deals with the physico-chemical principle of this separation method and its practical use for the analysis of commercial beverages in high schools. The theoretical section also deals with the classification and chemical composition of commercial beverages in terms of food additives, especially ascorbic acid, caffeine, sorbic acid, and taurine and briefly describes the chemical properties, classification in terms of food production and the effects of these additives on the human body. Within the theoretical section, a search of the content of the curriculum of secondary school chemistry textbooks is performed, focusing on beverage additives and separation methods for determining the target group of laboratory tasks, which are the main output of this thesis. The practical section aims to verify suitable procedures for the use of thin layer chromatography for the analysis of commercial beverages and to use this method for semi-quantitative evidence of food additives in order to confirm the reproducibility of results and ensure easy repeatability of experiments. The primary goal of the thesis is based on experimentally obtained data and verified procedures to compile a set of laboratory tasks on the evidence of common food additives using thin layer chromatography for students and high school teachers, or university students in science teaching. Tasks can be included in the chemistry curriculum of the fourth years of grammar schools, but also in leisure activities within various workshops or science groups.

KEYWORDS

Thin layer chromatography, chemistry teaching, high school, ascorbic acid, caffeine, sorbic acid, taurine

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	9
2.1	Nápoje jako potravinářské výrobky	9
2.2	Klasifikace nápojů.....	10
2.3	Složení nápojů – barviva, chuťová aditiva, konzervanty, vitaminy aj.....	11
2.4	Kyselina askorbová v nápojích	17
2.5	Kofein v nápojích.....	23
2.6	Další vybrané látky v nápojích.....	26
2.7	Vitamin C a kofein v rámci učiva chemie na gymnáziu	27
2.8	Tenkovrstvá chromatografie ve výuce na gymnáziu	30
3	Cíl práce.....	32
4	Experimentální část.....	33
4.1	Použité chemikálie	33
4.2	Použitá laboratorní technika.....	33
4.3	Metodika chromatografické analýzy.....	34
5	Výsledky a diskuze	40
5.1	Důkaz kofeinu v komerčních nápojích	51
5.2	Důkazy dalších látek v komerčních nápojích.....	62
5.2.1	Kyselina sorbová v nápojích.....	62
5.2.2	Taurin v nápojích	65
5.3	Návody chemických experimentálních úloh.....	68
6	Závěr	69
7	Seznam použitých informačních zdrojů	70
8	Seznam příloh	74

9	Příloha 1	78
10	Příloha 2	82
11	Příloha 3	86
12	Příloha 4	90

1 Úvod

Papírová a tenkovrstvá chromatografie jsou separační a identifikační metody, které vzhledem k jednoduchosti jsou použitelné ve výuce chemie na střední i základní škole. Pomocí těchto metod lze jednoduše demonstrovat složení různých typů směsí chemických látek a jejich identifikaci.

Papírová chromatografie je v této souvislosti dlouhodobě používána například pro demonstraci složení barviv obsažených ve fixech, případně barevných látek, které jsou součástí listové zeleně – chlorofylu. Existuje řada způsobů, jak ukázat studentům nebo žákům, že některé barvy obsažené ve fixech netvoří pouze jedna látka, ale směs různých látek. Podobně je možné ukázat, že i zeleň listová je složena z velkého počtu chemických látek přírodního původu, například karotenoidů. Také vlastní uspořádání experimentu je pro žáky i studenty motivující. Chromatografii je možné provádět tradičním způsobem na filtračním papíře v uspořádání jako chromatografii vzestupnou, sestupnou, jako kruhovou chromatografii atd. Těchto postupů se na základní i střední škole běžně používá, a to obzvláště mimo hlavní výuku předmětu chemie v rámci různých zájmových, často mimoškolních aktivit. Tyto experimenty mají v podstatě dvojí charakter. Ukazují, jak bylo již dříve zmíněno, že jedno a totéž barvivo ve fixu nemusí být tvořeno jen jednou složkou, ale i dvěma a více látkami, totéž platí pro listovou zeleň. Umožňují také pomocí standardů identifikovat jednotlivé látky ve směsi. Shodou okolností široce v pedagogické praxi používaný experiment demonstrace jednotlivých komponent listové zeleně je spojen s objevem chromatografie ruským botanikem Michaiilem Seminovichem Tsvetem, který provedl rozdělení komponent listové zeleně na sloupci uhličitanu vápenatého (v roce 1904).

Ve školní praxi však chromatografie slouží především k motivačním experimentům. Naší snahou je ukázat, že této jednoduché metody lze použít k získání celé řady informací o chemických látkách, například o jejich čistotě. Dále je možné provést identifikaci neznámé látky i kvantitativní posouzení obsahu jednotlivých látek ve směsi. V tomto smyslu byla také provedena řada pokusů, které mají výrazný aplikační charakter. V této oblasti se ve vztahu k výuce bez pochyby osvědčila analýza přírodních látek, zemědělských a potravinářských produktů. Byl například prováděn důkaz aminokyselin, důkazy vitaminů, či důkazy aditiv v různých potravinářských produktech,

v ovoci a zelenině apod. Identifikace jednoduchých látek z přírodních zdrojů je jednou ze základních cest využití papírové a tenkovrstvé chromatografie ve výuce, ale existuje celá řada dalších možností. Těmi jsou například: kontrola kvality produktů organických reakcí, monitoring průběhu organických reakcí, studium reakčních mechanismů atd.

Naším záměrem bylo přispět k oblasti výukových aplikací papírové a tenkovrstvé chromatografie analýzou potravinářských produktů. Ústředním tématem se stala chromatografická analýza nápojů. Jednalo se o různé typy nealkoholických nápojů, ale i přírodních šťáv atd. V této souvislosti jsme se zaměřili na důkaz kofeinu a kyseliny askorbové v nápojích. Kromě toho jsme v některých vzorcích identifikovali i konzervační přípravky (kyselina sorbová) a některé speciální látky, které se přidávají do tzv. energetických nápojů (např. taurin). Veškeré experimenty jsou založeny na využití tenkovrstvé chromatografie. Jedná se o tenkou vrstvu silikagelu jako sorbentu.

Tato bakalářská práce by se měla stát podkladem pro experimentální úlohy použitelné obzvláště ve výuce chemie na střední škole všeobecně vzdělávacího charakteru (gymnáziu), a to v rámci různých typů workshopů či zájmových činností atd. Naším cílem je přiblížit tuto jednoduchou analytickou a separační metodu studentům a žákům s přihlédnutím ke každodennímu životu, což je také cílem této bakalářské práce.

2 Teoretická část

2.1 Nápoje jako potravinářské výrobky

Současný potravinářský průmysl produkuje obrovské množství různých druhů nápojů, které jsou celosvětově distribuovány pod široké veřejnosti známými značkami, spojenými nejen s výživou.

Nápoje pomáhají člověku především doplňovat ztráty vody a předejít tak dehydrataci. Kromě vody mohou nápoje obsahovat celou řadu tělu prospěšných látek, jako jsou vitaminy, sacharidy, bílkoviny, tuky a ionty, které spolu s vodou tvoří základní živiny nutné pro správné fungování lidského organismu (Coulter 2001). Nápoje mohou také obsahovat i jiné sloučeniny, jako například konzervanty, které udrží nápoje déle čerstvé, barviva, jež učiní nápoje atraktivní pro lidský zrak, či různá dochucovadla, která napomáhají dodat různé příchutě.

Nápoje mají jistou roli i ve společenském životě. Spousta zvláště alkoholických nápojů je totiž nedílnou součástí kulturních zvyklostí po celém světě.

2.2 Klasifikace nápojů

Nápoje můžeme klasifikovat dle nezměrného počtu kritérií, která mohou být velmi subjektivní. Nejběžnějším kritériem je rozlišení dle obsahu alkoholu, který nápoje rozděluje do dvou hlavních skupin na alkoholické a nealkoholické. Lze také zohlednit původ nápojů, v tomto případě lze nápoje rozčlenit na průmyslově zpracované čili umělé a přírodní. Dle obsahu oxidu uhličitého lze nápoje rozčlenit na sycené a nesycené, sycené lze dále dělit dle množství CO₂, například na jemně sycené apod. Z hlediska sladidel je možné nápoje rozdělovat na produkty s přidaným cukrem, bez něho, či dokonce zcela bez cukru, kde se využívá umělých sladidel jako náhražek bez kalorické hodnoty pro lidský organismus. Nejčastěji se jedná o aspartam, cyklamát nebo sacharin. Ve většině obchodních řetězců s potravinami je rozčlenění nápojů podobné. V jednotlivých skupinách lze najít ovocné džusy, balené vody, sycené limonády, energetické drinky, piva, vína a lihoviny.

Klasifikaci nápojů z legislativního hlediska zmiňuje vyhláška č. 335/1997 Sb. Ministerstva zemědělství ČR, nápoje jsou zde klasifikovány v prvních čtyřech oddílech, které specifikují konkrétní kritéria.

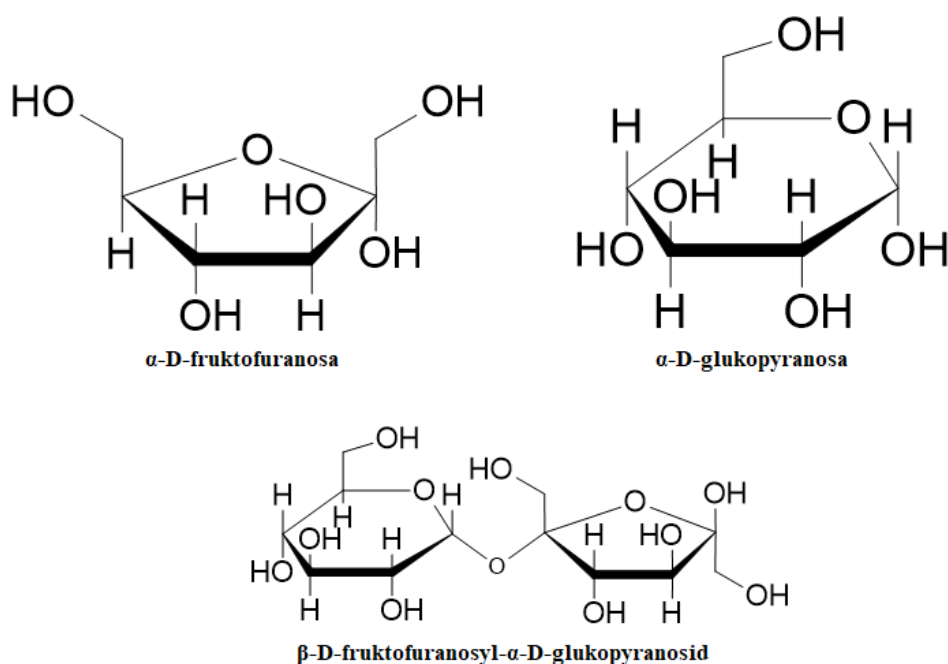
- Oddíl 1 – Nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů
- Oddíl 2 – Ovocná vína, ostatní vína a medovina
- Oddíl 3 – Pivo a nápoje na bázi piva
- Oddíl 4 – Konzumní líc, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje

Mezi nealkoholické nápoje lze také zařadit mléko a nápoje z něj vyrobené. Mléku a mléčným výrobkům se věnuje vyhláška č. 397/2016 Sb. Ministerstva zemědělství ČR. Mezi mléčné nápoje můžeme zařadit samotné mléko, které se prodává v několika variantách dle obsahu tuku, či podle obsahu laktosy pro osoby s laktosovou intolerancí. Dále pak různé ochucené nápoje, podmáslí a kefíry (Odstrčil a Odstrčilová 2006).

2.3 Složení nápojů – barviva, chuťová aditiva, konzervanty, vitaminy aj.

Základní složkou všech nápojů je voda. Jedná se o jednu z nejrozšířenějších sloučenin v přírodě. Lidské tělo je tvořeno vodou asi ze 70 %, voda samotná se účastní i vzniká při spoustě metabolických reakcí. Nápoje slouží primárně k vyrovnání ztrát vody během dne, které činí 2,5-3 litry za den. V případě, že je ztráta celkového objemu vody v těle 10 % a více, jedná se o velmi vážnou dehydrataci, hodnoty nad 20 % jsou již fyziologicky nepřijatelné. Lidské tělo má na regulaci vody vyvinutou celou řadu mechanismů. V případě jejího nedostatku mozek vyvolává pocit žízně, ledviny vytvoří za den asi 180 litrů primární moče, působením antidiuretického hormonu je pak resorpcí vytvořeno kolem dvou litrů sekundární moče. K doplnění tekutin je nutné využívat pouze zdravotně nezávadnou vodu určenou především ke konzumaci. Aby mohla být voda klasifikována jako pitná, musí projít celou řadou úprav. Na naší planetě se veškerá voda rozděluje do dvou skupin dle výskytu, a to na vodu povrchovou a vodu spodní. Samotná spodní voda může být vhodná ke konzumaci bez jakýchkoliv úprav, může se jednat o různé minerální prameny, které jsou díky vysokému obsahu různých iontů vysoce osmotické a nedovolují tak přežití nežádoucích mikroorganismů. Povrchová voda musí být před konzumací na pitnou upravena. Úprava surové povrchové vody na pitnou je rozdělena do čtyř fází, během kterých je zbavena všech toxických látek či mikroorganismů. Výsledkem úpravy je pitná voda splňující určitá kritéria, především nesmí obsahovat choroboplodné zárodky, či látky toxické pro živé organismy, její reakce by měla být neutrální až slabě zásaditá a měla by obsahovat dost minerálních solí. Minerální vody jsou velmi vhodným zdrojem těchto anorganických solí, právě proto je můžeme najít i na pultech obchodů. Minerální vody obsahují ionty makrobiogenních (C, H, O, N, K, Na, Ca, Mg, S, P, Cl) a mikrobiogenních (Cu, Fe, I, F, Co, Se, Zn apod.) prvků. Organismus tyto ionty potřebuje ke správnému fungování metabolismu a CNS, a právě minerální vody jsou jejich bohatým zdrojem. Velmi populární jsou vody sycené. Pitná voda je pod tlakem prosycena oxidem uhličitým. Mimo charakteristické chuťové zbarvení je to vhodné i z hlediska konzervace. Oxid uhličitý je kyselinotvorný a rozpustný ve vodě, díky tomu dochází k posunutí pH do kyselé oblasti a zvýšení osmotického tlaku, což zamezuje množení většiny

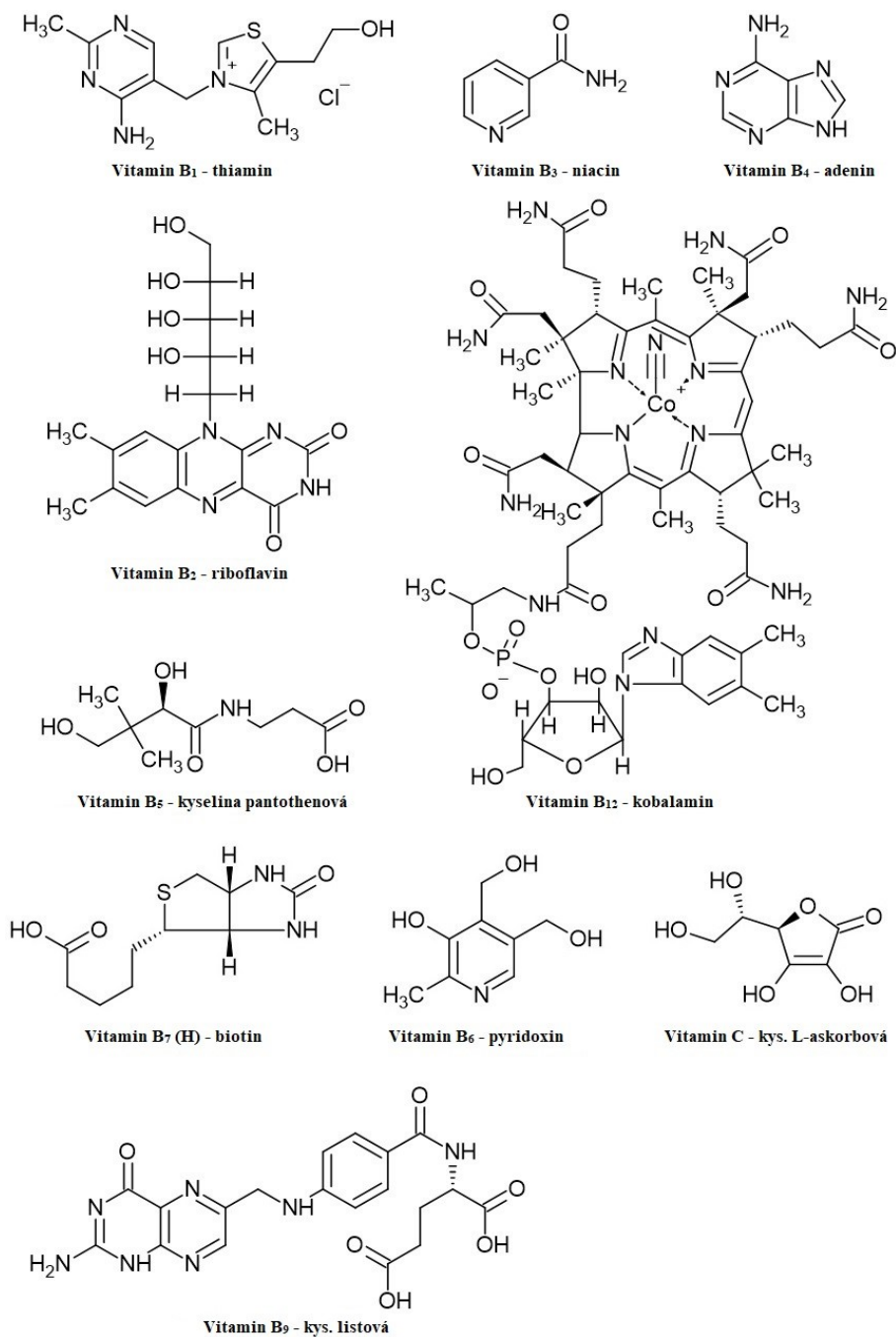
nežádoucích mikroorganismů. Přemíra oxidu uhličitého však není zcela žádoucí, oxid uhličitý je pro tělo v podstatě odpadní látkou, proto může nadměrné užívání sycených nápojů způsobit acidózu. Nadbytek oxidu uhličitého může mít také projímavé účinky. Jelikož oxid uhličitý stimuluje dechové centrum v CNS, zvyšuje jeho nadbytek krevní tlak a srdeční tep. Základní složky výživy jsou proteiny, sacharidy a lipidy. Největší obsah proteinů najdeme především v mléce a nápojích z mléka. Existují také různé dehydratované suplementy s vysokým obsahem proteinů, vhodné obzvláště pro fitness. Lipidy se pak běžně vyskytují převážně v pevné stravě, z hlediska nápojů jsou významným zdrojem opět hlavně nápoje živočišného původu, tedy mléko a mléčné výrobky, které obsahují tuk v podobě kapének. Jednoduché cukry, jako je glukosa či fruktosa, jsou velmi častým aditivem v podobě glukoso-fruktosového sirupu. Fruktosa, glukosa i sacharosa se ale přirozeně vyskytují v různých ovocných šťávách či extraktech (Odstrčil a Odstrčilová 2006).



Obrázek 1

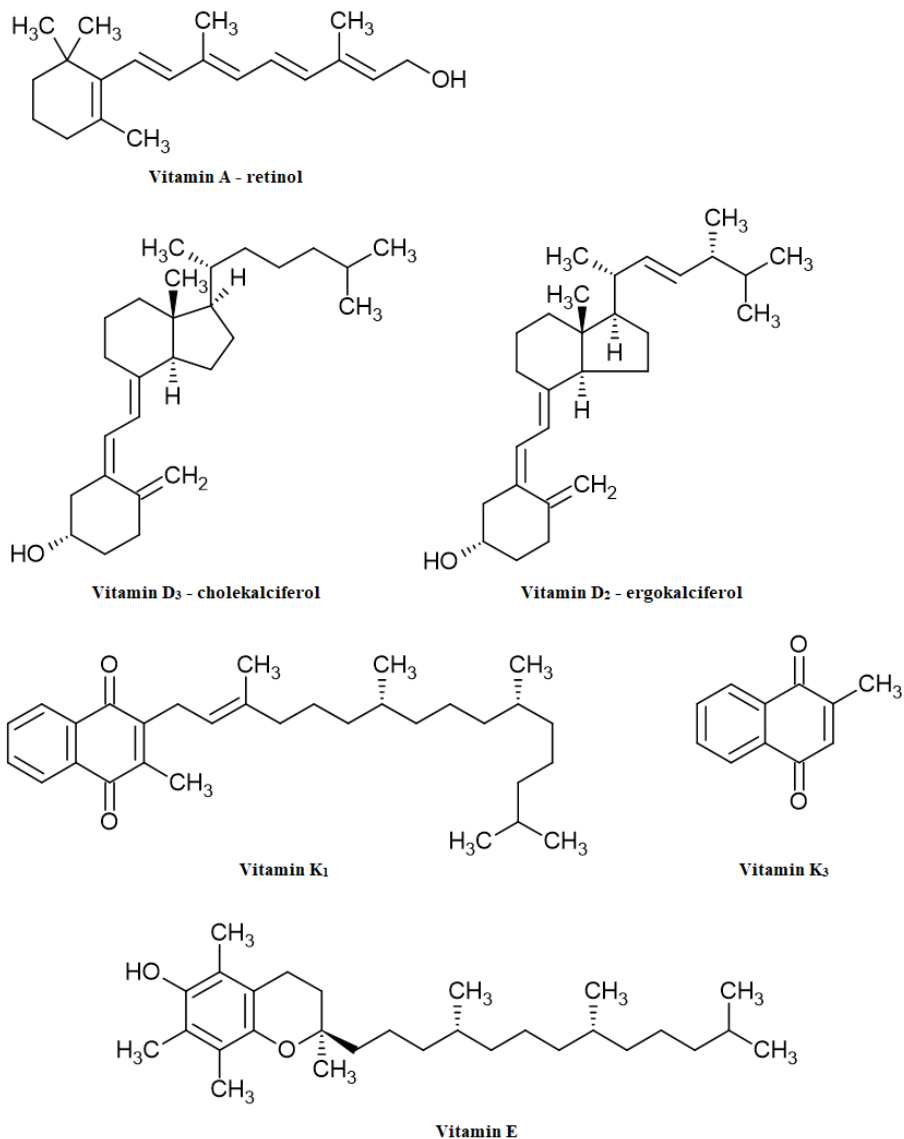
Přírodní sacharidy v Haworthově projekci, fruktosa (vlevo nahoře), glukosa (vpravo nahoře) a sacharosa (dole uprostřed)

Vitaminy jsou další přírodní látky, které se v nápojích vyskytují. V nápojích na bázi vody se běžně vyskytují vitaminy rozpustné ve vodě (skup. B, C, H).



Obrázek 2
Vitaminy rozpustné ve vodě

V mléku a mléčných nápojích se pak vyskytují i vitaminy rozpustné v tucích (D, E, K, A).



Obrázek 3
Vitaminy rozpustné v tucích

Vitaminy jsou pro lidský organismus podstatnou složkou výživy – jsou nutné pro správné fungování enzymů, jejichž jsou velmi často součástí, v biochemii jsou tyto složky označovány jako koenzymy (Odstrčil a Odstrčilová 2006).

Velmi velkou část komerčních produktů tvoří alkoholické nápoje obsahující ethanol. Výrobě nápojů obsahujících alkohol se věnuje rozsáhlá část potravinářského průmyslu

zahrnující zvláště lihovarnictví, pivovarnictví a vinařství. Výroba piva a vína je historicky zakořeněna ve všech kulturách, a i dodnes se v hojné míře pro výrobu těchto nápojů využívají kromě moderních průmyslových metod tradiční postupy výroby, předávané v rodech z generace na generaci. Hlavní surovinou pro výrobu lihovin jsou brambory, řepa či cukrová třtina. Všechny tyto suroviny jsou bohaté na sacharidy, které jsou enzymatickými reakcemi rozloženy na ethanol. V případě piva se využívá obilného sladu a při výrobě vína samozřejmě bobule vinné révy (Odstrčil a Odstrčilová 2006).

Nápoje obsahují jako produkty potravinářského průmyslu celou řadu průmyslových aditiv, o kterých pojednává vyhláška č.298/1997 Sb. Obsah aditiv ve výrobku musí být náležitě uveden na etiketě a každá substance má svoji určenou designaci, tak zvaný E-kód. Aditiva mají mnoho funkcí. Zejména se používají konzervační aditiva pro prodloužení doby trvanlivosti a zamezení znehodnocování potravin působením vzdušného kyslíku, dále se velmi často používají chuťová nebo aromatizační aditiva pro přidání či úpravy stávající chuti a vůně. Legislativa ČR rozlišuje tato aditiva do čtyř hlavních kategorií:

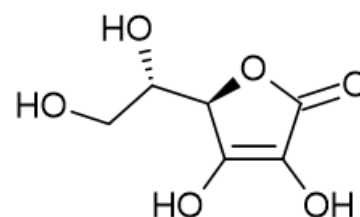
- Přídavné látky – většina aditiv (antioxidanty, barviva, konzervanty, sladidla, stabilizátory, emulgátory aj.)
- Pomocné látky – látky využívané v technologii výroby, potraviny mohou obsahovat jejich stopy
- Látky k aromatizaci – díky těmto aditivům potraviny získají chuť či vůni, které jinak nemají
- Potravinové doplňky – biologicky aktivní látky (vitaminy, minerály, aminokyseliny aj.)

Nejpoužívanějšími druhy aditiv jsou konzervanty, využívají se k uchování potravin, tedy k prodloužení trvanlivosti. Konzervanty chrání potraviny před působením nežádoucích mikroorganismů. Jedná se o anorganické i organické sloučeniny. Z anorganických sloučenin se používají soli kyseliny dusité a dusičné, z organických sloučenin například kyselina benzoová (E210), sorbová či mravenčí. Antioxidanty se využívají k zamezení nežádoucí oxidace, jedná se tedy o látky s redukčními vlastnostmi. Nejpoužívanějšími látkami jsou například kyselina askorbová (E300,

i když se vyskytuje přirozeně, často je přidávána nad rámec přirozeného množství, považuje se proto i za aditivum a potravinový doplněk), tokoferoly aj. Velmi často se do nápojů přidávají sladidla, ta mohou být jak přírodní, tak syntetická. Z hlediska výživy je možné sladidla rozlišit na látky kalorické a nekalorické. Mezi kalorická sladila patří běžně známé sacharidy, přírodním nekalorickým sladidlem je například stévie. Často používaná umělá sladila jsou například aspartam, acetsulfam, sacharin aj. Dalším druhem aditiv mohou být látky povzbuzující a hořké, ty se získávají z přírodních zdrojů – jedná se o výtažky z bylin, jako je například chmel či pelyněk. Mezi povzbuzující látky se řadí i kofein (oproti ostatním aditivům kofein nemá přiřazený E-kód) (Odstrčil a Odstrčilová 2006).

2.4 Kyselina askorbová v nápojích

Kyselina L-askorbová je ve vodě rozpustná látka, která nemá strukturu tradičních organických kyselin. Z chemického hlediska se jedná o 2,3-endiol γ -laktonu 2-oxo-L-gulonové kyseliny. V čistém stavu se jedná o bílé krystaly rozpustné ve vodě. Teplota tání kyseliny L-askorbové je 190 °C, hustota má hodnotu 1,65 g/cm³. Laická veřejnost označuje k. L-askorbovou jako vitamin

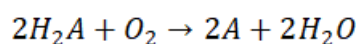


Obrázek 4

kyselina. L-askorbová

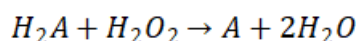
C, ve skutečnosti se tak označuje celý redoxní systém, kterého je kyselina L-askorbová součástí jako výchozí látka. U kyseliny L-askorbové může v tomto systému dojít k jednoelektronové a dvouelektronové oxidaci. V prvním případě vzniká kyselina L-monodehydroaskorbová, v případě druhém pak kyselina L-dehydroaskorbová. Všechny látky se při fyziologickém pH vyskytují ve formě aniontů. Kyselina L-askorbová zastává v lidském těle mnoho funkcí, význam mají obzvláště její redukční vlastnosti – působí tedy jako přírodní antioxidant. Díky svým antioxidačním účinkům v těle vylučuje volné radikály a reaguje s oxidovanými formami vitamínu E, také redukuje železité ionty na železnaté. Kromě antioxidačních vlastností se kyselina L-askorbová podílí například na resorpci železa v zažívacím traktu, stimuluje transport sodných, chloridových a vápenatých iontů, účastní se metabolismu cholesterolu či biosyntézy mukopolysacharidů. Největšími přírodními zdroji vitamínu C pro člověka je čerstvé ovoce a zelenina. Jeho množství napříč jednotlivými druhy se velmi liší, záleží také na podmínkách během pěstování, a také na stupni zralosti. Velmi významným zdrojem vitamínu C jsou brambory, avšak při jejich skladování obsah vitamínu C rychle klesá. Bohatými zdroji jsou například černý rybíz, šípky, brokolice, či kapusta, paprika, kiwi. V potravinách živočišného původu lze vitamin C také najít, nicméně množství je oproti rostlinným zdrojům zanedbatelné. Nejvýznamnějším živočišným zdrojem jsou játra. Ve struktuře této kyseliny se nacházejí dvě enolové skupiny a dva chirální uhlíky (C4 a C5), díky kterým tvoří kyselina askorbová celkem 4 stereoizomery – vždy po dvou enantiomerech. Konkrétně jde o kyseliny L-askorbovou a D-askorbovou, dalšími dvěma enantiomery jsou L-isoaskorbová a D-isoaskorbová kyselina. Pouze enantiomer L-askorbové kyseliny vykazuje

biologickou aktivitu. Doporučený denní příjem vitamínu C je cca 200 mg. Hypovitaminóza se projevuje únavou, nejznámějším syndromem spojeným s deficitem vitamínu C jsou kurděje. Hypervitaminóza vitamínu C takřka neexistuje. Nadbytečný vitamín C je spojen s možností tvorby močových kamenů, avšak toto riziko je u zdravých jedinců velmi nízké. Při dávkách nad 5 g může způsobit průjem. Kyselina askorbová má díky svým antioxidačním vlastnostem využití v potravinářském průmyslu jako konzervant, konkrétně se tak využívá její sodná sůl askorbát sodný, který je dobře rozpustný ve vodě. V masných výrobcích se využívá palmitoyl-L-askorbová kyselina, která má lipofilní charakter a inhibuje tvorbu nitrosaminů. Stejným způsobem se využívají i stabilnější nepolární acetyly kyseliny askorbové. Vitamin C – kyselina askorbová se v kombinaci s kyselinou citronovou velmi často přidává do ovocných džusů a ke konzervovanému a mraženému ovoci, aby tak zamezila nežádoucím oxidacím látek, které zajišťují aroma. Samotná kyselina askorbová se přidává do piva pro zamezení vzniku zákalů a zamezení změny chuti a aromatu. V případě výroby vína se kyselina askorbová využívá jako pomocná látka při tzv. síření, tedy ukončení alkoholového kvašení oxidem siřičitým. V pekařství se kyselina askorbová využívá pro zlepšení vlastností mouky. Oxidace kyseliny askorbové může dojít působením vzdušného kyslíku, či jinými oxidačními činidly. Oxidace na dehydroaskorbovou kyselinu probíhá působením enzymů ze skupiny antivitaminů C, jde o vratnou reakci. Hlavním enzymem je askorbát oxidasa. Oxidace však může nastat i působením některých peroxidas. Askorbát oxidasa oxiduje kyselinu askorbovou vzdušným kyslíkem. Reakci lze zapsat jednoduchou rovnicí, kde H_2A je kyselina askorbová a A je kyselina dehydroaskorbová viz Rovnice 1.



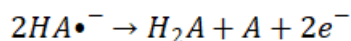
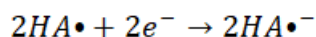
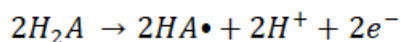
Rovnice 1 - reakce kyseliny askorbové s kyslíkem

Reakce s askorbátperoxidasou probíhá dle zjednodušeného zápisu viz Rovnice 2.



Rovnice 2 - reakce kyseliny askorbové s peroxidem vodíku

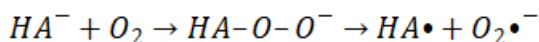
V obou případech vzniká askorbylradikál ($HA\bullet$), který je rezonancí stabilizován. Následně dochází k disproportionaci a vzniku ekvimolární směsi kyseliny askorbové a dehydroaskorbové.



Rovnice 3 – sled reakcí askorbylradikálu

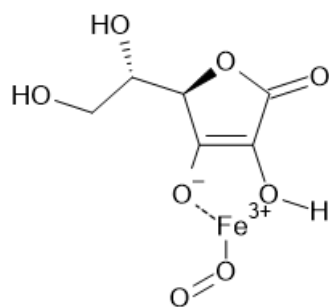
K této reakci dochází cyklicky, dokud není veškerá askorbová kyselina zoxidována. Tato reakce je však vratná, kyselina dehydroaskorbová může být redukována zpět na askorbovou reakcí s thioley či hydrochinony (Velíšek a Hajšlová 2009).

Nejvýznamnější reakcí je autooxidace kyseliny askorbové. Díky této vlastnosti dochází k většině ztrát v potravinách bohatých na vitamin C během skladování nebo zpracování. Rychlost reakce záleží i od hodnoty pH, v alkalickém prostředí je nejrychlejší (Velíšek a Hajšlová 2009).



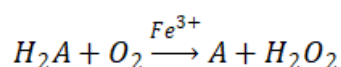
Rovnice 4 – autooxidace kyseliny askorbové

Reakcí s kyslíkem vzniká hyperoxidový aniont kyseliny askorbové, který se sám rozpadá na askorbylradikál a superoxidový radikál. Ionty kovů mohou u této reakce působit katalyticky. Kyselina askorbová totiž s kovy tvoří komplexní sloučeniny, ve kterých vystupuje jako aniont. To má za následek urychlení reakce při zvyšování pH. Iont kovu pomáhá v komplexu přenést dva elektrony z kyseliny askorbové na kyslík, následně dojde k disociaci komplexu, dochází tak ke vzniku dehydroaskorbové kyseliny.



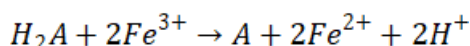
Obrázek 5

Komplex kyseliny askorbové s železitým iontem



Rovnice 5 – reakce kyseliny askorbové s kyslíkem za přítomnosti železitých iontů

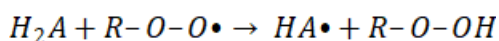
Kyselina askorbová může při určitých podmínkách ionty kovů redukovat. Většinou reaguje s železitymi a měďnatými ionty.



Rovnice 6 – redukce kyselinou askorbovou železitých iontů na železnaté

Redukované ionty Fe^{2+} a Cu^+ následně reagují se vzdušným kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu. Železité a měďné ionty mohou také reagovat s peroxidem vodíku za vzniku hydroxylových radikálů, které se uplatňují v oxidačních reakcích biologických systémů. V důsledku toho dochází u potravin k nežádoucím změnám barvy a chuti. V případě, že je kyselina askorbová v dostatečné koncentraci, dochází ke kompetitivní reakci nezreagované kyseliny askorbové a iontů kovu s volnými radikály. V těchto případech tedy kyselina askorbová funguje skutečně jako antioxidant (Velíšek a Hajšlová 2009).

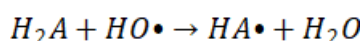
Kyselina askorbová zachytává a reaguje s volnými radikály, které by jinak oxidačně působily na lipidy a další složky potravin náchylných k oxidaci. Rovnice reakce s peroxidovým radikálem mastné kyseliny je následující:



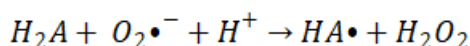
Rovnice 7 – reakce kyseliny askorbové s volnými radikály

Vzniká tak askorbylradikál, který disproportionuje na směs kyselin askorbové a dehydroaskorbové. Řetězová oxidace tak již není dále možná (Velíšek a Hajšlová 2009).

Podobná je reakce kyseliny askorbové s hydroxylovým či superoxidovým radikálem. Vzniklý askorbylradikál opět disproportionuje, a znemožňuje tak další oxidační reakce (Velíšek a Hajšlová 2009).



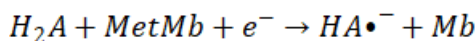
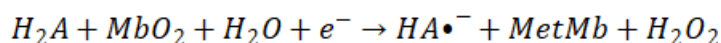
Rovnice 8 – reakce kyseliny askorbové s hydroxylovým radikálem



Rovnice 9 – reakce kyseliny askorbové se superoxidovým radikálem

Kyselina askorbová snadno podléhá oxidaci vzdušným kyslíkem, je tedy časté, že při skladování potravin, které jsou zdrojem vitamínu C, dochází k postupnému snižování jeho obsahu. Největší příčinou ztráty vitamínu C při skladování bez přístupu vzduchu má její kysele katalyzovaná degradace. V kyselých nápojích, tedy především ovocných džusech, dochází k jejímu postupnému rozkladu za uvolňování oxidu uhličitého a vody. Finálním produktem postupného rozkladu je furan-2-karbaldehyd (Velíšek a Hajšlová 2009).

Kyselina askorbová může také reagovat s hemovými barvivy. Díky svým redukčním vlastnostem reaguje s oxomyoglobinem a metmyoglobinem za vzniku myoglobinu. Tento sled reakcí je popsán zjednodušenou rovnicí (Velíšek a Hajšlová 2009).



Rovnice 10 – sled reakcí kyseliny askorbové s hemovými barvivy

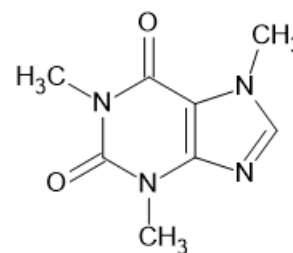
V případě skladování mléka a mléčných výrobků jsou ztráty kyseliny askorbové poměrně velké. V případě ošetření mléka za pomoci UHT (ultra-high temperature) se ztráty vitamínu C pohybují v rozmezí 10–30 %. V případě sušeného mléka baleného

v inertní atmosféře s uměle přídanou kyselinou askorbovou jsou úbytky minimální (Velíšek a Hajšlová 2009).

Kyselina dehydroaskorbová se často podílí na neenzymovém hnědnutí potravin. K tomuto dochází při reakcích s aminy, aminokyselinami a bílkovinami v potravinách se sníženým obsahem vody a vysokým obsahem vitamínu C, například dehydratované ovocné džusy. Stejně jako v případě redukujících cukrů jsou primárním produktem iminy. Finálním produktem jsou příslušné aminy, či skorbanová kyselina. Celý sled těchto reakcí se označuje jako Steckerova degradace aminokyselin (Velíšek a Hajšlová 2009).

2.5 Kofein v nápojích

Kofein se spolu s dalšími strukturně podobnými látkami, jako je theobromin a theofylin, řadí mezi purinové alkaloidy. Přirozeně se nachází v plodech a listech rostlin, kde zastává funkci přírodního pesticidu. V izolovaném čistém stavu se jedná o bílé krystalky nebo prášek, který je bez zápachu s lehce nahořklou chutí. Jeho účinky na lidský organismus byly známy už starým civilizacím, nicméně jeho objev se datuje až do roku 1819, kdy jej poprvé identifikoval německý vědec Friedlieb Ferdinand Runge



Obrázek 6
kofein

chemickým rozбором kávy. Z farmaceutického hlediska se řadí mezi psychostimulancia (psychotronika), což jsou obecně látky se schopností stimulovat centrální nervovou soustavu. Kofein je širokou veřejností považován za nejrozšířenější a velmi oblíbenou „legální drogu“, jelikož jeho distribuce není nijak zásadně omezena. Díky svým schopnostem prodlužovat bdělost během únavy a zlepšovat náladu je kofein součástí celé řady doplňků stravy, nápojů i potravin, avšak právě díky těmto vlastnostem může na kofein vzniknout i závislost. Mezi nápoje s největším obsahem kofeinu se bezesporu řadí velice oblíbené energetické nápoje, a také kolové limonády. Bezesporu nejběžnějšími nápoji s obsahem kofeinu jsou káva a čaj, jež jsou v mnohém spojeny s lidskou kulturou již po staletí. Kofein je v dnešním světě opravdu široce rozšířená a užívaná látka. V dnešním potravinářském průmyslu se využívá především synteticky připravený kofein. Účinky na CNS, potažmo lidský organismus, jsou totožné, jedná se tak o levnější alternativní zdroj oproti izolaci z přírodních zdrojů. Největším zdrojem přírodního kofeinu je káva. Jedná se o nápoj připravovaný z pražených semen plodů kávovníku, což je rostlina z čeledi mořenovitých. Káva je po ropě druhou neobchodovanější komoditou na světě. Obsah kofeinu se velmi liší v závislosti na způsobu přípravy kávového nápoje. Například v instantní kávě je průměrný obsah kofeinu 30-90 mg, u překapávané 40-130 mg a ve filtrované kávě 90-140 v závislosti na konkrétní odrůdě (ve 100 ml kávy). Dokonce i dekofeinovaná káva obsahuje 1-6 mg. Pro výrobu dekofeinované kávy se využívá extrakce organickými rozpouštědly, nejčastěji dichlormetanem či modernější metodou za použití superkritického oxidu uhličitého. Extrahovaný kofein se posléze používá k obohacování nealkoholických

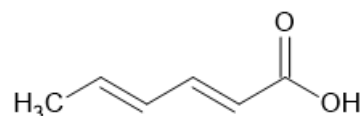
kolových limonád či ve farmacii. Kromě kávovníku je kofein obsažen také v čajových listech a kakaových bobech. V případě běžného šálku čaje je ale obsah kofeinu oproti šálku kávy poloviční. Guaranové ořechy jsou též zdrojem přírodního kofeinu, jež se často využívají k přípravě různých druhů nápojů. Znamé kolové nápoje obsahují kofein původem z kolových ořechů, v některých případech je ale kofein doplněn z jiných zdrojů, jako například již zmíněná dekofeinovaná káva (Velíšek 1999).

Kofein pomáhá zlepšovat psychomotoriku, koncentraci a paměť a pomáhá oddalovat únavu. Nadměra kofeinu však může způsobit hypertenzi, úzkost, dokonce i zvýšení srdeční frekvence nad fyziologicky přípustnou hodnotu (tachykardie). Při nadužívání kofeinu může dojít ke vzniku závislosti. I přes to je kofein vnímán jako relativně bezpečná látka, letální dávka zdravého jedince je přibližně 10 g. Vzhledem k tomu, že průměrný šálek kávy obsahuje přibližně 80-100 mg kofeinu, je téměř nepravděpodobné, že by k předávkování došlo. Kofein, systematickým názvem 1,3,7-trimethylxanthin, se řadí mezi purinové alkaloidy, konkrétně patří do skupiny methylových derivátů xantinu. Sumární vzorec kofeinu je $C_8H_{10}N_4O_2$, molární hmotnost má hodnotu 194,19 g/mol. Kofein taje při teplotě 235-238 °C a jeho hustota je 1,2 g/cm³. Díky aromatickému skeletu je jeho vlnová délka absorpčního maxima 275 nm, čehož se využívá při detekci na tenké vrstvě pomocí zdroje UV záření. Po pozření je jeho biologický poločas (v plazmě) přibližně 3-7 hodin. Mechanismus účinku kofeinu spočívá obzvláště v blokaci adenosinových receptorů v CNS. Pokud se na příslušný receptor neuronu naváže adenosin, dochází k utlumení nervových vzruchů, a tím k rozšíření mozkových cév, což má za následek pocit únavy. Kofein se díky podobné struktuře dovede na tyto receptory také navázat, čímž tak zamezí navázání adenosinu. Kofein pak působí přesně opačně, tedy zrychluje šíření nervových signálů a jeho působením dochází ke kontrakci mozkových cév. Tímto kofein oddálí pocit únavy, zároveň ale nedochází k blokaci dopaminových receptorů, proto kofein i nepřímě zlepšuje celkovou náladu. Dalším možným mechanismem účinku je inhibice enzymu fosfodiesterasy, což má za následek zvýšení koncentrace c-AMP. Na zvýšenou koncentraci cyklického AMP pak tělo reaguje zvýšením lipolýzy a vyplavením katecholaminů. Metabolismus kofeinu probíhá především v játrech, kde je kofein pomocí enzymů cytochrom P450, xantinoxidasou (XO) a N-acetyltransferasou (NAT) přeměněn. Z metabolitů kofeinu jsou nejdůležitější

paraxantin, theobromin a theofilin. Na paraxantin je přeměněno asi 84 % vstřebaného kofeinu. Paraxantin způsobuje zvýšení lipolýzy. Theobrominu vzniká přibližně 12 %, theobromin působí močopudně a dilatuje cévy. Theofilin vzniká z přibližně 4 %, působí na hladké svalstvo průdušnic, které svým působením uvolňuje. Struktura kofeinu je také velmi podobná kyselině močové, což způsobuje již zmíněnou močopudnost (Velíšek 1999).

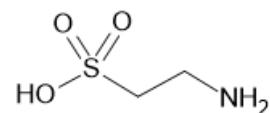
2.6 Další vybrané látky v nápojích

Kyselina sorbová je semitriviální název pro (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienovou kyselinu. Kyselina sorbová a odvozené soli zvané sorbáty se využívají pro své antimikrobiální účinky – inhibují růst plísní, kvasinek a některých bakterií. Mechanismus účinku spočívá v inhibici enzymů oxidujících především mastné kyseliny (žluknutí tuků). Kyselina sorbová může podléhat autooxidaci, produkty oxidace mohou reagovat s aminokyselinami a proteiny, čímž vizuálně způsobují hnědnutí potravin ošetřených kyselinou sorbovou (Velíšek 1999).



Obrázek 7
kyselina sorbová

Taurin je triviální název pro 2-aminoethansulfonovou kyselinu. Triviální název souvisí s první izolací této látky z býčí žluči Friedrichem Tiedemanem. Jedná se o látku, která vzniká v organismu z cysteinu dekarboxylací a oxidací thiolové skupiny na sulfoskupinu. Přirozeně se vyskytuje v mateřském mléku, mozku, žlučníku a svalech. V lidském těle podporuje trávení lipidů a tlumí CNS. Přidává se jako aditivum hlavně do energetických nápojů (Huxtable 1992).



Obrázek 8
taurin

2.7 Vitamin C a kofein v rámci učiva chemie na gymnáziu

Učivo základní školy se tématu potravin a nápojů věnuje okrajově ve výuce v deváté třídě. Jedná se o učivo zahrnující problematiku životního prostředí a výživy. Informace o kofeinu je do učiva zařazena v rámci prevence před užíváním návykových látek. Žáci se dozví o jeho účincích na organismus a o nebezpečí vzniku závislosti. Žáci jsou také informováni o výskytu kofeinu v kávě, a zejména pak velmi populárních energetických nápojích. Vitaminy jsou zařazeny do učiva spolu s enzymy a hormony. V rámci zdravé výživy je důraz kladen hlavně na nutnost pestré stravy bohaté na vitaminy právě pro jejich funkci v organismu v podobě kofaktorů enzymů. Obsahem výuky je základní rozdělení vitaminů do dvou skupin dle rozpustnosti v tucích a vodě, dále jsou žáci seznámeni s potravinami a nápoji bohatými na vitaminy.

Pro základní školy je určena učebnice *Základy Chemie 2* (nakladatelství Fortuna, Beneš P., Pumpr V., Banýr J., 2010). Zde jsou vitaminy zmíněny na stranách 68-69 v kapitole věnované biokatalyzátorům. Zajímavostí je jednoduchý návod důkazu vitaminu C, který využívá stejného principu jako naše důkazové reakce v praktické části této práce, tedy využití redukčních vlastností kyseliny L-askorbové (např. vylučování stříbra z roztoku dusičnanu stříbrného). Kofein je zmíněn na straně 76 v učivu věnujícímu se drogám a prevenci. Můžeme tedy říci, že žáci základní školy získají o vitamínech a kofeinu základní povědomí, které může být při studiu na středních školách dále rozvíjeno, především pak na gymnáziích či chemicky zaměřených středních odborných školách (Beneš et al. 2010).

V učebních plánech vyššího gymnázia se žáci setkávají s kofeinem ve třetím ročníku v učivu organické chemie, v kapitolách pojednávajících o heterocyklických sloučeninách. V této souvislosti se žáci naučí poznávat základní heterocyklické sloučeniny a jejich nejběžnější deriváty, jejich fyzikální a chemické vlastnosti. Poznatky o kofeinu jsou dále rozvíjeny ve čtvrtém ročníku v kapitole o léčivech a drogách, kde je žákům vysvětlen účinek kofeinu na lidský organismus (Balada 2007)

S vitamíny se žáci poprvé setkávají až ve čtvrtém ročníku, kdy jsou již obeznámeni s převážnou částí učiva organické chemie a věnují se biochemii. Učí se o vitamínech v kapitole zahrnující enzymy a jejich kofaktory, seznamují se s vitaminovou abecedou

a s rozlišením dle jejich rozpustnosti. Toto učivo je pak zásadním způsobem rozpracováno v samostatném předmětu Seminář z chemie, který je volitelný. Zde se žáci učí obecně o přírodních látkách a jsou také seznámeni se strukturními vzorci jednotlivých vitaminů (Balada 2007).

V případě, že žáci projeví hlubší zájem o konkrétní kapitoly, zpracovávají v rámci domácí přípravy různé referáty či prezentace. Praktická část výuky chemie v podstatě z učebních plánů gymnázií vymizela, a to jednak z důvodů časových, kdy pedagog usiluje o splnění požadavků, vyplývajících z učebního plánu, tak z důvodů legislativních, kdy manipulace s chemickými látkami v laboratořích gymnázií jsou značně omezeny v souvislosti s platnými zásadami bezpečnosti práce. Omezení nakládání nezletilých žáků gymnázií s chemickými látkami cituje nařízení vlády č. 361/2007 Sb. Vzhledem k tomu, že při manipulaci nezletilých s vybranými látkami je nutný nepřetržitý dozor, jsou pedagogovy možnosti během praktických částí výuky chemie značně omezené (Holzhauser a Matuška 2019).

Učební materiály se dle objemu informací značně liší. Výuka může být po stránce obsahu individuální. Přírodovědně zaměřeni žáci gymnázií a jejich vyučující budou jistě preferovat obsahově bohatší učebnice, případně využijí alternativní zdroje v podobě internetu, či dokonce úryvků z učebnic určených pro vysoké školy.

Učebnice Chemie/organická a biochemie II pro gymnázia (nakladatelství SPN, Kolář K., Kodíček M., Pospíšil J., 2005) zmiňuje vitaminy na stránkách 82,86,97 a 117. Učivo základní školy je zde obohaceno o další poznatky. Na straně 82 je zmíněna strukturní příbuznost kyseliny L-askorbové se sacharidy, jelikož se jedná o jednu z nejdůležitějších cukerných kyselin. Na straně 97 jsou uvedeny vitaminy jako kofaktory enzymů, celá kapitola Enzymologie pak přibližuje žákům problematiku katalyzovaných reakcí, na straně 117 jsou uvedeny vzorce vybraných vitaminů a kofeinu, který v této učebnici není jinak zmíněn (Kolář et al. 2005).

Chemie v kostce pro SŠ (nakladatelství FRAGMENT, Růžičková K., Kotlík B., 2009) zmiňuje pouze vitaminy na straně 195 jako kofaktory v kapitole věnované enzymům (Růžičková a Kotlík 2009).

Učebnice Chemie pro studijní obory SOŠ a s SOU nechemického zaměření (nakladatelství SPN, Blažek J., Fabini J., 1999) uvádí vitaminy na straně 195 jako přírodní látky a součásti enzymů. Vitaminy jsou zde vyjmenovány s využitím základní vitaminové abecedy a rozčleněny do dvou klasických skupin dle rozpustnosti v tucích a vodě. Žáci jsou i upozorněni na možnosti přebytku vitaminů – hypervitaminózy a nedostatku vitaminů – hypovitaminózy v lidském organismu (Blažek a Fabini 1999).

Mezi žáky je velmi populární série učebnic Odmaturuj! z V učebnici Odmaturuj! z chemie (nakladatelství DIDAKTIS, Benešová M., Satrapová H., 2002) je kapitola věnující se vitaminům na stranách 186–188 nejobsáhlejší ze všech zmíněných učebnic. Vitaminy jsou zde nejprve obecně popsány jako přírodní látky, které člověk potřebuje pro správnou funkci enzymů, dále jsou uvedeny jejich základní vlastnosti a rozdělení. V poznámkách je kladen důraz i na správnou a pestrou výživu pro zamezení vzniku hyper a hypovitaminózy, historie objevení vitaminů či napojení na kapitolu o enzimech formou odkazů na další stránky z učebnice, kde jsou vitaminy zmíněny jako kofaktory či jejich prekurzory. Následně jsou zde všechny vitaminy vyjmenovány jak prostřednictvím klasické vitaminové abecedy, tak jejich triviálních názvů. U každého vitamínu jsou uvedeny informace ve smyslu jejich funkce v organismu, zdrojových potravinách, projevy nedostatku a doporučená denní dávka. Znalost strukturních vzorců není pro žáky středních škol nutná, v této učebnici tedy vzorce vitaminů nejsou vyobrazeny. Kofein je zmíněn dvakrát, nejdříve na straně 150 v rámci kapitoly pojednávající o heterocyklických sloučeninách, kde je připomenuta jeho příslušnost mezi deriváty purinu. Další zmínka o kofeinu je na straně 182 v kapitole věnující se alkaloidům. Kofein je uveden jako purinový alkaloid, jeho účinky na organismus a jeho obsah v kávě. Žáci jsou opět formou poznámek v pravé části stránky upozorněni na možnost vzniku závislosti a také na fakt, že by denní dávka kofeinu neměla překročit 1,5g (Benešová a Satrapová 2002).

Bohužel se o těchto látkách ve vztahu k potravinám nenacházející v učivu téměř žádné informace.

2.8 Tenkovrstvá chromatografie ve výuce na gymnáziu

Žáci na základních školách se s pojmem chromatografie setkávají již v osmém ročníku v úvodu do učiva chemie. Na některých školách se dokonce provádějí jednoduché pokusy s lihovými fixy a filtračním papírem, kde je žákům vysvětlen princip chromatografie ve vztahu k separaci jednotlivých barevných složek fixů. Mobilní fázi zde zpravidla bývá ethanol, který lze za dozoru vyučujícího bezpečně použít.

V současných učebních plánech středních škol je tenkovrstvá chromatografie spolu s ostatními separačními metodami v podstatě pouze zmíněna v učivu prvního ročníku. Žáci rozvíjejí znalosti týkající se směsí a jejich dělení získané na základní škole. Separací metody jsou však pouze vyjmenovány, případně je jejich fyzikálně-chemická podstata zpřístupněna ve zjednodušené podobě. Žáci posledních ročníků gymnázií si zpravidla volí chemii a seminář z chemie jakožto povinně volitelné předměty v případě dalšího přírodovědného zaměření na vysoké škole. Díky tomu jsou některé kapitoly týkající se separačních metod dále rozšířeny v rámci přípravy na maturitní zkoušku z chemie. Chromatografie a její různé typy jsou vyučovány v kapitolách věnujících se základům analytické chemie, kde je i blíže popsána podstata fungování těchto metod z fyzikálně-chemického hlediska.

Učebnice Chemie obecná/anorganická (nakladatelství SPN, Flemr V., Dušek B., 2001) zmiňuje chromatografii na stranách 96 a 97, na kterých je této separační metodě věnován celý odstavec. Žákům jsou vysvětleny rozdíly mezi jednotlivými typy chromatografie a je zde i jednoduše popsán princip této metody (Flemr a Dušek 2001).

Učebnice Odmaturuj! z chemie (nakladatelství DIDAKTIS, Benešová M., Satrapová H., 2002) zmiňuje chromatografii na straně 7 v úvodní kapitole. Metoda je zde pouze uvedena a stručně vysvětlena (Benešová a Satrapová 2002).

Tenkovrstvá chromatografie není v podstatě v učivu středních škol uvedena. V případě mé práce a návodů experimentálních úloh v příloze této práce se tak jedná o učivo nad rámec běžných učebních plánů. Úlohy na důkaz kofeinu či vitamínu C bych doporučil provádět v rámci seminářů z chemie v případě, že vyučující má k dispozici časovou rezervu a chce žáky motivovat ke studiu přírodních věd. Bohužel složení mobilních fází je pro výuku na gymnáziích nevhodné, žáci by v podstatě z legislativního hlediska

neměli přijít s použitými chemikáliemi do styku. Práci žáků je třeba omezit na přípravu vzorků a tenkých vrstev, zatímco vyučující připravuje mobilní fázi a sám již připravené tenké vrstvy vkládá do chromatografické komory. Žáci tak nepřijdou do styku s nevhodnými chemikáliemi, ale v závěru práce mají možnost výsledky sami vyhodnocovat. Je vhodné zaměřit se především na kofein, jelikož je jeho detekce za použití UV lampy jednodušší, a také z důvodu oblíbenosti energetických nápojů mezi žáky středních škol.

3 Cíl práce

Cílem práce je analyzovat komerčně vyráběné nápoje, dokázat přítomnost přírodních složek i potravinářských aditiv a zjištěné poznatky pak prezentovat v přehledné formě. Zhodnotit vybrané tematické okruhy se záměrem využít je pro potřeby výuky na středních všeobecněvzdělávacích školách. Dalším cílem je zajistit jednoduchost provedení a reprodukovatelnost pokusů a následně vytvořit soubor návodů pro potřeby vybraných chemických praktik a workshopů pro zájemce z řad žáků i učitelů gymnázií.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

název	Udaná čistota	výrobce	stát
aceton	99,50 %	Lach-Ner	ČR
chloroform	99,60 %	Sharlau	ES
butan-1-ol	95 %	Lachema	ČR
amoniak	vodný roztok 25 %, p.a.	Lach-Ner	ČR
propan-2-ol	p.a.	Lach-Ner	ČR
cyklohexan	p.a.	Lach-Ner	ČR
kyselina octová	99,80 %	Lach-Ner	ČR
kofein	p.a.	Sigma-Aldrich	USA
kyselina sorbová	99 %	Fluka Chemika	SRN
kyselina askorbová		Kulich HK	ČR
taurin	99 %	Fluka Chemika	SRN
dusičnan stříbrný	p.a.	Penta	ČR
ethanol	p.a., 99,8 %	Penta	ČR
ninhydrin	p.a.	CDK Organic Synthesis	ČR

4.2 Použitá laboratorní technika

název	výrobce	stát
chromatografická komora	Macherey-Nagel	SRN
UV lampa	A. KRÜSS Optronics	SRN
tenká vrstva se silikagelem ALUGRAM SIL G	Macherey-Nagel	SRN
tenká vrstva se silikagelem ALUGRAM SIL G/UV ₂₅₄	Macherey-Nagel	SRN
sušárna TFC120	Chromservis	ČR
fěn	Sencor	ČR
kádinky 100-250 ml	Fisherbrand	ČR
odměrný válec 100 ml	Simax	ČR
kapiláry		

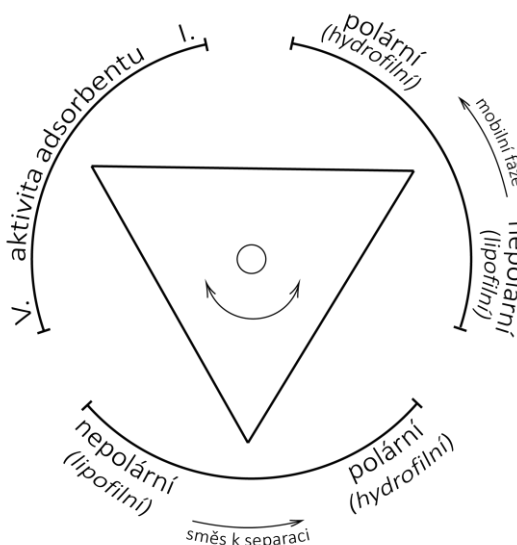
4.3 Metodika chromatografické analýzy

Pro analýzu nápojů byla využita metoda tenkovrstvé chromatografie. Princip této separační a identifikační metody spočívá v interakcích chromatografovaných látek se sorbentem stacionární fáze na tenké vrstvě a rozpouštědlem jako mobilní fází (Gasparič a Churáček 1981, Fried a Sherma 1994, Daecke 1974, Engler 1983, Kolář 1996, Richtr a Kraitr 2004).

V tenkovrstvé chromatografii lze využít hned několik typů sorbentů, nejčastěji se využívá silikagelu a oxidu hlinitého. Tenké vrstvy lze manuálně připravit v laboratoři nanášením na skleněné destičky, nicméně v současné době je na trhu velké množství již hotových produktů, splňující potřebné standardy. U těchto produktů se často využívá tenkých hliníkových destiček a sorbent obsahující podíl pojiva, například sádry, ale i jiného materiálu. Samotný silikagel má v tenkovrstvé chromatografii široké využití, dá se říci, že se jedná o nejrozšířenější typ sorbentu. Struktura silikagelu je tvořena sítí vazeb Si-O s volnými hydroxylovými skupinami, díky kterým chromatografované látky s tenkou vrstvou silikagelu interagují a vytvářejí tak vodíkové můstky. Směs chromatografovaných látek se tak na tenké vrstvě separuje v závislosti na míře interakcí s tenkou vrstvou silikagelu a s rozpouštědlem – mobilní fází. Při volbě vhodného materiálu stacionární fáze je nutné přihlédnout k vlastnostem chromatografovaných látek. V případě látek rozpustných v organických rozpouštědlech se využívá, jak již bylo zmíněno silikagelu či oxidu hlinitého. Silikagel je určen pro látky neutrální a kyselé, oxid hlinitý pak pro látky neutrální a bazické. Silikagel lze využít i pro látky rozpustné ve vodě. Při volbě mobilní fáze je nutné vzít v úvahu jaké vlastnosti má chromatografovaná látka. Samotné rozpouštědlo je adsorbováno na tenkou vrstvu. Pokud je chromatografovaná látka polárnější než mobilní fáze, tím pevněji se váže na stacionární fázi. V případě, že je rozpouštědlo polárního charakteru, prodlužuje se i v případě využití silikagelu doba nezbytná k vyvíjení chromatogramu, jelikož mobilní fáze interaguje se silikagelem. Běžná rozpouštědla jsou sestavena do posloupné tzv. eluoptopní řady (Gasparič a Churáček, 1981).

Při volbě vhodných sorbentů a mobilní fáze se aplikují čtyři základní pravidla:

- Chromatografované látky se musí v mobilní fázi přiměřeně rozpouštět, v případě příliš dobré rozpustnosti hrozí, že se látky nebudou adsorbovat a vymyjí se.
- Chromatografované látky se musí přiměřeně vázat na sorbent stacionární fáze. Pokud se budou pevně vázat, zůstanou na startu a nedojde k separaci, pokud se nebudou vázat, či jen slabě, prochází směs chromatogramem, aniž by došlo k jejímu rozdělení.
- Chromatografované látky nesmí reagovat s rozpouštědly a sorbenty.
- Pro pozměnění elučního účinku konkrétního rozpouštědla můžeme využít sousední rozpouštědla eluotropní řady v různém poměru.



Obrázek 9

**Diagram pro jednodušší orientaci při výběru vhodné mobilní a stacionární fáze
dle Egon Stahla**

Při chromatografii je vhodné používat čistá rozpouštědla, jelikož různé příměsi mohou značně ovlivňovat jejich vlastnosti, například přítomnost vody může způsobit vyšší fixaci na sorbent a tím celý proces chromatografie značně zpomalí. Pro lepší orientaci při volbě vhodných rozpouštědel a sorbentů byl německým farmaceutem Egonem

Stahlem navržen diagram vyobrazený na Obrázku 9. Trojúhelník se otáčí okolo středové osy, pokud jedním vrcholem označíme polární charakter chromatografované látky nebo směsi, zbylé dva vrcholy nám naznačí, jaký sorbent a jaké rozpouštědlo je vhodné použít (Gasparič a Churáček, 1981).

K nanášení vzorků na tenkou vrstvu se využívají mikropipety či kapiláry. Vzorky se nanášejí rozpuštěné po kapkách na vyznačenou startovací linii. Při tomto experimentu byla startovací linie vyznačena 2 cm od spodního okraje tenké vrstvy. Vzorky se musí nanést v dostatečné vzdálenosti mezi sebou, jinak je zde riziko fúzování skvrn, a tím i zkreslení výsledků. Po nanesení vzorků je nutné nechat vypařit rozpouštědlo. V případě, že tak není učiněno, může opět docházet k tvorbě nepravidelných skvrn či pruhů (Gasparič a Churáček, 1981).

V tomto experimentu byly tenké vrstvy vyvíjeny vzestupně ve skleněné komoře. Deska s nanesenými vzorky je umístěna do komory tak, aby hladina mobilní fáze byla cca 1 cm pod startovací linií. V případě vyvíjení více destiček je nutné použít držák nebo stojánek. Dále je nutné chromatografickou komoru uzavřít – nejčastěji jsou komory již vybaveny víkem se zabroušenou hlavou. Páry těkavého rozpouštědla pak nasytí celý prostor komory (Gasparič a Churáček, 1981).

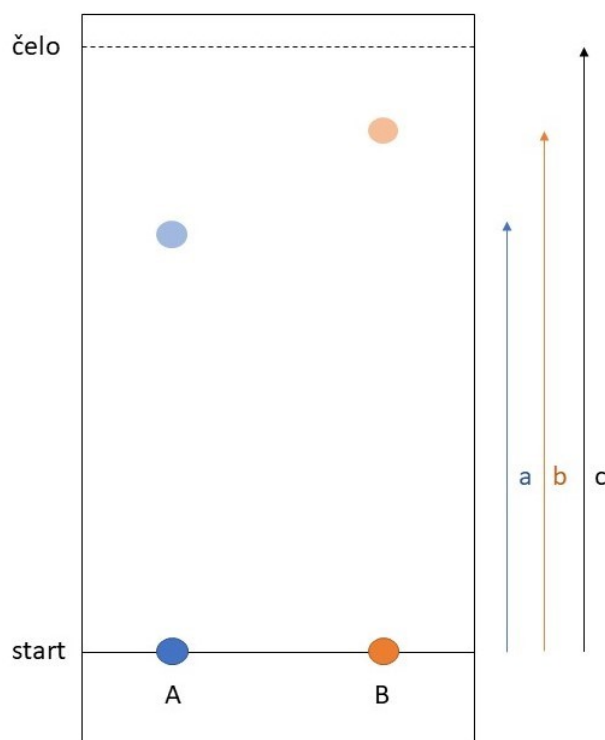
Po určitém čase mobilní fáze vystoupá tenkou vrstvou do požadované výšky. V tento moment je nutné tenkou vrstvu vyjmout a případně označit čelo. Dále je nutné tenké vrstvy vysušit a zbavit tak zbytků mobilní fáze. V obou experimentech byly použity poměrně těžké sloučeniny, pro vysušení tedy stačilo využít fén, avšak v případě vitamínu C bylo třeba postupovat obezřetně a použít fén pouze bez ohřevu vzduchu, jelikož by mohlo dojít k oxidaci separované kyseliny askorbové. V případě kofeinu, který je oproti kyselině askorbové vůči kyslíku stabilní, bylo možné využít i horký vzduch pro urychlení vysušení (Gasparič a Churáček, 1981).

Speciálně určené vrstvy pro detekci pomocí UV světla obsahují luminiscenční indikátor, pokud chromatografované látky zhášejí luminiscenci, je vhodné tyto vrstvy použít. Detekce pak probíhá ozářením vrstvy UV světlem a zakreslením skvrn. Další možností je využití detekčního roztoku, který se nanáší ve formě mlhy přímo na tenkou vrstvu. V tomto případě se využívá chemických vlastností chromatografované látky, která

reaguje s detekčním roztokem, a poskytuje tak barevný produkt, díky kterému je skvrna viditelná na tenké vrstvě, a je tak možné určit retardační faktor R_F (Gasparič a Churáček, 1981).

Hodnotu R_F u tenkovrstvé chromatografie může ovlivnit celá řada faktorů, například různé příměsi, teplota či nečistoty.

Chromatografovanou látku ve směsi je vhodné porovnat se standardem, což je sledovaná látka v čistém stavu. Retardační faktor R_F je bezrozměrná veličina udávající míru zdržení chromagrafované látky za čelem mobilní fáze. Pro určení hodnoty R_F je nutné pravítkem změřit vzdálenosti mezi startem a skvrnou chromatografované látky a startem a čelem mobilní fáze, a následně tyto hodnoty dosadit do vzorce, kde V_M označuje vzdálenost mezi startem a skvrnou a V_R vzdálenost startu od čela.



Obrázek 10
Obecné schéma tenké vrstvy

$$R_F = \frac{V_M}{V_R}$$

Obrázek 10 naznačuje obecné schéma tenké vrstvy po ukončeném vyvíjení a detekci látek. Pro výpočet retardačního faktoru látky A použijeme vzorec:

$$R_{FA} = \frac{a}{c}$$

Pro výpočet retardačního faktoru látky B pak použijeme vzorec:

$$R_{FB} = \frac{b}{c}$$

Retardační faktor nabývá hodnot v intervalu <0-1>, jestliže je hodnota retardačního faktoru 0, látka se nachází na startu, v případě, že retardační faktor nabývá hodnoty 1, látka putuje s čelem.

Tenkovrstvou chromatografií lze využít ke kvalitativní i kvantitativní analýze. Kvalitativní spočívá v separaci a důkazu chromatografované látky. V případě kvantitativní analýzy je nutné nanášet vzorky o známém objemu. V rámci experimentů s kofeinem a vitamínem C byla využita metoda vizuálního zhodnocení. Jedná se v podstatě o semikvantitativní metodu, vzorky byly nanášeny v přibližně stejných objemech, po vyhodnocení byly pozorovány rozdíly v intenzitách zbarvení skvrn a jejich velikosti. V případě objektivního hodnocení by bylo možné využít spektrofotometrické metody ke zjištění přesné hodnoty zbarvení – pozorují se transmise či remise (Gasparič a Churáček, 1981).

Výsledné chromatogramy lze vhodnými způsoby dokumentovat. Můžeme je například překreslit či ofotografovat, eventuálně lze chromatogramy fixovat bezbarvým lakem nebo průhlednou páskou. Ve všech případech je však nutné nejprve označit a popsat důležitá data (Gasparič a Churáček, 1981).

Při chromatografii sacharidů je třeba vzít v potaz jejich hydrofilní vlastnosti. Obsažené hydroxylové skupiny mohou interagovat se sorbentem tenké vrstvy. Čím více hydroxylových skupin sacharid obsahuje, tím více bude interagovat, proto je třeba zvolit i vhodnou mobilní fázi. Při detekci sacharidů se využívá jejich redukčních vlastností, kdy sacharidy reagují s detekčním roztokem, který zredukuje na barevný produkt. Pro tento způsob detekce se využívá celá řada detekčních roztoků, nejčastěji amoniakální dusičnan stříbrný spolu se zahřátím reakční směsi, kyselina jodistá a Schiffovo činidlo (Gasparič a Churáček, 1981).

V případě cukerných kyselin a laktonů je nutné dbát na volbu mobilní fáze. Kyseliny by měly být chromatografované v dostatečně kyselé mobilní fázi, pro laktony je vhodné i prostředí neutrální (Gasparič a Churáček, 1981).

Postupy vypracované pro chromatografii purinů a pyrimidinů byly využívány při výzkumu struktur nukleových kyselin. Detekce zpravidla využívá UV záření za použití destiček s luminiscenčním indikátorem. Jiným způsobem detekce je redukce stříbrných solí. (Gasparič a Churáček, 1981).

5 Výsledky a diskuze

V praktické části jsme se zaměřili na běžně dostupné komerční nápoje obsahující vitamin C a kofein. Pomocí metodiky analýzy nápojů jsme postupně z každé kategorie vyseletovali produkty, ve kterých se příslušné látky nacházely. Pokusy byly zopakovány pro získání relevantních dat. Výsledky získaných retardačních faktorů jsou přehledně shrnuty do tabulek. Kromě dvou výše zmíněných složek jsme se u konkrétních produktů zaměřili i na další vybraná aditiva, jako je například kyselina sorbová a taurin. Po vyhodnocení výsledků jsme připravili návody pro laboratorní práci.

Chromatogramy byly vyhodnocovány následujícím způsobem:

Velikost skvrny:

- velká skvrna (3)
- střední skvrna (2)
- malá skvrna (1)

Intenzita zbarvení:

- tmavá skvrna (3)
- střední skvrna (2)
- světlá skvrna (1)

Celkové hodnocení využívá formátu **Velikost skvrny/Intenzita zbarvení**, např. 2/1 znamená středně velká světlá skvrna, 3/3 velká tmavá skvrna. V tomto smyslu jsou hodnoceny všechny chromatogramy. Tento postup je značně subjektivní, ale do jisté míry umožňuje alespoň přibližně semikvantitativní vyhodnocení chromatogramů.

Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích

Při zkoumání přítomnosti vitamínu C v nápojích byly komerční produkty rozčleněny celkem do tří kategorií: ovocné džusy, doplňky stravy a sycené limonády. V průběhu výzkumu byly sycené nápoje vyloučeny z experimentu, jelikož se přítomnost kyseliny askorbové nepodařilo prokázat, dle etikety je kyselá chuť určena především kyselinou citronovou. Ovocné džusy s příchutí citrusových plodů byly naopak velmi vhodné, především díky jejich výrobě z ovocných extraktů. Doplnky stravy, jako jsou například šumivé tablety, byly také velmi vhodnými vzorky, jelikož jejich účelem je přímo doplňovat organismu živiny, hlavně pak vitamíny. Celkem byly provedeny **tři pokusy** o důkaz přítomnosti kyseliny L-askorbové v komerčních nápojích. Při volbě sorbentu a mobilní fáze jsme vycházeli z literatury ale i vlastních zkušeností. Zajímavá je studie vlivu složení elučního činidla na hodnotu retardačního faktoru, sorbentem je silikagel s využitím tenkých vrstev pro HPTLC (Trineeva et al. 2018).

Eluční činidlo	R_F
chloroform	0,01
benzen	0,01
etanol-hexan (1:1)	0,01
butan-1-ol-mravenčí kyselina-voda (25:2,5:29,5)	0,66
butan-1-ol-mravenčí kyselina-voda (5:0,5:2)	0,63
butan-1-ol-octová kyselina-voda (4:1:5)	0,57
propan-1-ol-konc. vodný roztok amoniaku (6:4)	0,92
ethanol- konc. vodný roztok amoniaku (16:4,5)	0,69
ethyl-acetát-mravenčí kyselina-voda (3:1:1)	0,63
ethyl-acetát-octová kyselina-mravenčí kyselina-voda (100:11:11:25)	0,67
ethyl-acetát-octová kyselina (80:20)	0,54
ethyl-acetát-octová kyselina (85:15)	0,42
ethyl-acetát-octová kyselina (90:10)	0,37

ethyl-acetát-octová kyselina (95:5)	0,26
aceton-methanol-octová kyselina (3:1:1)	0,53
aceton-toluen-mravenčí kyselina (6:3:1)	0,99

Pro chromatografii na tenké vrstvě silikagelu navrhuji autoři (Rábek et al. 1977.) kromě osvědčené mobilní fáze ethylacetát-kyselina octová také dvourozměrnou chromatografii za použití mobilních fází:

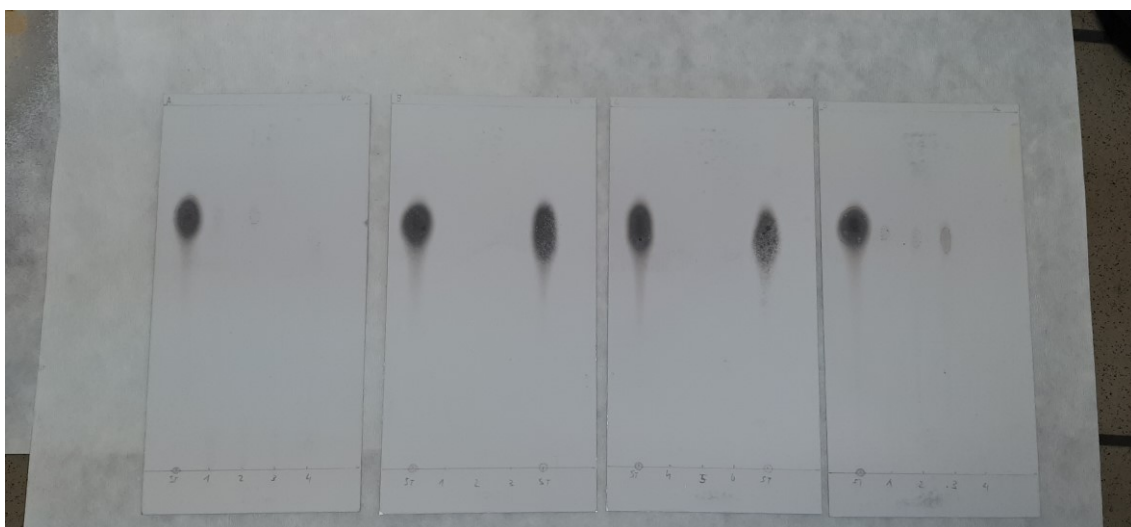
- 1) benzen-methanol-octová kyselina-aceton (70:20:5:5)
- 2) benzen-methanol-octová kyselina-aceton (55:35:5:5)

V našem případě bylo jako sorbentu použito silikagelu. Mobilní fáze byla složena z cyklohexanu, acetonu a kyseliny octové v poměru 1:2:1. V této mobilní fázi byla předpokládaná hodnota retardačního faktoru $R_F = 0,70$. Chromatogram byl detekován 1 % roztokem dusičnanu stříbrného v 25% roztoku amoniaku ve vodě. Díky redukčním vlastnostem kyseliny L-askorbové se na tenké vrstvě silikagelu objevily šedé až černé skvrny tvořené elementárním stříbrem, jež tak posloužilo k detekci chromatogramu a jeho vyhodnocení.

Vrstva A – vzorky	A	C	R_F	Obsah Vitaminu C	Výsledek
ST (AscAcid)	12,10	17,50	0,69		3/3
1 Relax Pomeranč	11,90	17,50	0,68	6 mg/100 cm ³	1/1
2 Happy Day Pomeranč	12,00	17,50	0,69	32 mg/100 cm ³	1/1
3 Pfanner Pomeranč	12,10	17,50	0,69	25 mg/100 cm ³	1/1
4 Caprisun Multivitamin	11,00	17,50	0,63	15 mg/100 cm ³	1/1
Vrstvy B a C – vzorky	A	C	R_F	Obsah Vitaminu C	Výsledek
ST (AscAcid)	12,00	17,50	0,69		3/3
1 Korunní Citron	0	17,50	0	Ne	0/0
2 Ondrášovka Citron	0	17,50	0	Ne	0/0
Vrstva D – vzorky	A	C	R_F	Obsah Vitaminu C	Výsledek
ST (AscAcid)	11,80	17,50	0,67		3/3
1 Dr Witt Citron	11,45	17,50	0,65	28 mg/100 cm ³	1/1
2 Haas Multivitamin	11,25	17,50	0,64	80 mg v jedné tabletě	1/2
3 Haas Vitamin C	11,50	17,50	0,66	80 mg v jedné tabletě	2/2
4 Geladrink	0	17,50	0	60 mg v denní dávce (12 g)	0/0
Vrstva A1 – vzorky	A	C	R_F	Obsah Vitaminu C	Výsledek
ST (AscAcid)	8,90	13,20	0,67		3/3
1 Relax Pomeranč	7,10	13,20	0,54	6 mg/100 cm ³	1/1
2 HappyDay Pomeranč	8,50	13,20	0,64	32 mg/100 cm ³	1/2
3 Pfanner Pomeranč	8,00	13,20	0,61	25 mg/100 cm ³	1/2
4 Caprisun Multivitamin	9,00	13,20	0,68	15 mg/100 cm ³	1/1
Vrstva D1 – vzorky	A	C	R_F	Obsah Vitaminu C	Výsledek
ST (AscAcid)	8,80	13,40	0,66		3/3
1 Dr Witt Citron	9,80	13,40	0,73	28 mg/100 cm ³	1/2
2 Haas Multivitamin	9,30	13,40	0,69	60 mg v jedné tabletě	1/2
3 Haas Vitamin C	10	13,40	0,75	60 mg v jedné tabletě	2/2
4 Geladrink	0	13,40	0	60 mg v denní dávce (12 g)	0/0

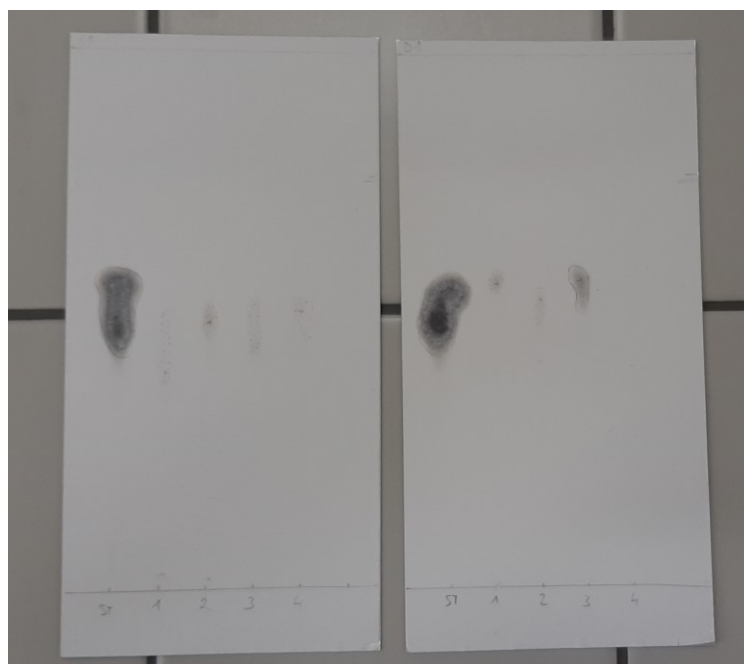
Tabulka 1
Výsledky prvního experimentu
Důkaz vitaminu C v komerčních nápojích

Výsledky prvního experimentu byly shrnuty do tabulky 1. Nápoje byly rozčleněny do tří kategorií. Na vrstvu A byly nanášeny vzorky ovocných džusů. Jednalo se komerční produkty značek Relax, HappyDay, Pfanner a Caprisun. Doba vyvíjení chromatogramu činila 167 min. U všech zmíněných vzorků se podařilo detekovat kyselinu L-askorbovou. Intenzita zbarvení a velikost skvrn korespondovala s množstvím vitamínu C uvedeným na etiketách. U vzorku 2, který dle etikety obsahuje 32 mg vitamínu C na 100 cm³ (nejvíce ze všech testovaných vzorků) byla skvrna v porovnání s ostatními vzorky na vrstvě A nejintenzivnější. Následoval vzorek 3 s obsahem 25mg/100 cm³ s méně zřetelnou, ale stále dobře viditelnou skvrnou. Skvrny vzorků 1 a 4 byly jen velmi málo patrné, což opět korespondovalo s relativně malým obsahem vitamínu C oproti vzorkům 2 a 3. Na vrstvách B a C byly nanášeny vzorky sycených nápojů s příchutí citrusových plodů. U vzorků 1 a 2 se detekce kyseliny askorbové nepředpokládala, jelikož nebyla uvedena na etiketě. Kyselou příchut' těchto nápojů způsobuje především kyselina citronová, která je dle etikety obsažena. Skvrny na vrstvě B byly natolik nezřetelné, že nebylo možné změřit potřebné údaje. Vzorky na vrstvě D se podařilo detekovat až na vzorek 4 - Geladrink. Jednalo se o doplňky stravy s vysokým obsahem vitamínu C. Na vrstvě D byl očekáván pozitivní důkaz přítomnosti kyseliny askorbové u všech vzorků, nicméně vzorek Geladrinku byl po datu expirace a nebyl správně skladován – bez víčka. Lze tedy předpokládat, že vitamin C byl již s větší měrou oxidován, a tudíž byla jeho koncentrace příliš nízká vzhledem k možnosti úspěšné detekce. Experiment byl pro vrstvy A a D zopakován ve snaze dosáhnout zřetelnější detekce. Na vrstvy A1 a D1 byly nanášeny totožné vzorky o dvojnásobné koncentraci oproti vrstvám A a D. Doba vyvíjení chromatogramu v tomto případě činila 78 min, experiment byl ukončen zhruba ve třech čtvrtinách tenké vrstvy. Detekce všech vrstev byla provedena amoniakálním roztokem dusičnanu stříbrného pomocí rozprašovače. Pro urychlení reakce byly vrstvy na pár vteřin vloženy do sušárny ohřáté na teplotu 85°C. Po detekci byly tyto skvrny obkresleny a byla provedena fotodokumentace chromatogramů. Experimentálně zjištěné hodnoty retardačního faktoru R_F jsou uvedeny v Tabulce 1.



Obrázek 11

**Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích
Vrstvy A až D z prvního experimentu (viz Tabulka 1)**



Obrázek 12

**Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích
Vrstvy A1 a D1 z prvního experimentu (viz Tabulka 1)**

Vrstva A – vzorky	A	C	R_F	Obsah Vitaminu C	Výsledek
ST (AscAcid)	15,00	17,50	0,86		3/3
1 Relax Pomeranč	15,50	17,50	0,89	6 mg/100 cm ³	1/1
2 Relax Multivitamin	15,20	17,50	0,87	12 mg/100 cm ³	1/2
3 HappyDay Pomeranč	15,70	17,50	0,90	32 mg/100 cm ³	1/2
4 Pfanner Pomeranč	14,80	17,50	0,85	25 mg/100 cm ³	1/1
Vrstva B – vzorky	A	C	R_F	Obsah Vitaminu C	Výsledek
ST (AscAcid)	15,30	17,50	0,87		3/3
1 Dr Witt Citron	15,10	17,50	0,86	28 mg/100 cm ³	3/2
2 Haas Multivitamin	15,50	17,50	0,89	80 mg v jedné tabletě	3/2
3 Haas Vitamin C	16,00	17,50	0,91	80 mg v jedné tabletě	2/2
4 Geladrink	15,40	17,50	0,88	60 mg v denní dávce (12 g)	1/2
5 Semtex	15,70	17,50	0,90	uveden na etiketě	1/1

Tabulka 2

Výsledky druhého experimentu

Důkaz vitaminu C v komerčních nápojích

V rámci druhého experimentu byl u ovocných džusů byl vitamin C detekován se 100 % úspěšností. Během experimentu byl porovnán obsah vitaminu C mezi výrobky značky Relax různých příchutí. Konkrétně se jednalo o Relax Pomeranč a Relax Multivitamin. Obsah vitaminu C dle etiket již naznačil, že multivitaminová příchut' obsahuje dvakrát více vitaminu C než příchut' čistě pomerančová. Výsledek experimentu korespondoval s množstvím uvedeným na obalu, jelikož skvrna vzorku Relax Multivitamin byla přibližně dvakrát intenzivnější než u vzorku pomerančové příchutě, která byla relativně slabě viditelná. U doplňků stravy se taktéž povedlo detekovat vitamin C ve všech vzorcích. V tomto případě byl vitamin C detekován i u vzorku Geladrinku, ačkoliv se jednalo o stejnou dózu po datu expirace. Před rozpuštěním vzorku a jeho nanesením na silikagel byl obsah dózy promíchán. Dá se tedy předpokládat, že pro experiment byl nabrán prášek ze dna dózy, který nebyl tolik exponovaný ve vztahu ke vzdušnému kyslíku, tudíž v něm zbylo malé množství nezreagované kyseliny L-askorbové. Experimentálně zjištěné hodnoty retardačních faktorů jsou shrnuty v Tabulce 2.



Obrázek 13

**Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích
Vrstva A druhého experimentu
(viz Tabulka 2)**



Obrázek 14

**Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích
Vrstva B druhého experimentu
(viz Tabulka 2)**

Vrstva A – vzorky	A	C	R_F	Obsah Vitaminu C	Výsledek
ST (AscAcid)	13,80	17,50	0,79		3/3
1 Relax Pomeranč	16,60	17,50	0,78	6 mg/100 cm ³	3/2
2 HappyDay Pomeranč	12,90	17,50	0,74	32 mg/100 cm ³	2/2
3 HappyDay Pomeranč zvětralý	12,80	17,50	0,73	32 mg/100 cm ³	2/1
4 Pfanner Pomeranč	12,40	17,50	0,71	25 mg/100 cm ³	2/1
5 Pfanner Pomeranč zvětralý	12,70	17,50	0,73	25 mg/100 cm ³	0/0
Vrstva B – vzorky	A	C	R_F	Obsah Vitaminu C	Výsledek
ST (AscAcid)	13,30	17,50	0,77		3/3
1 Dr Witt Citron	14,10	17,50	0,81	28 mg/100 cm ³	1/1
2 Haas Multivitamin	14,50	17,50	0,81	80 mg v jedné tabletě	2/2
3 Haas Vitamin C	14,25	17,50	0,81	80 mg v jedné tabletě	1/2
4 Geladrink	13,60	17,50	0,78	60 mg v denní dávce (12 g)	1/1

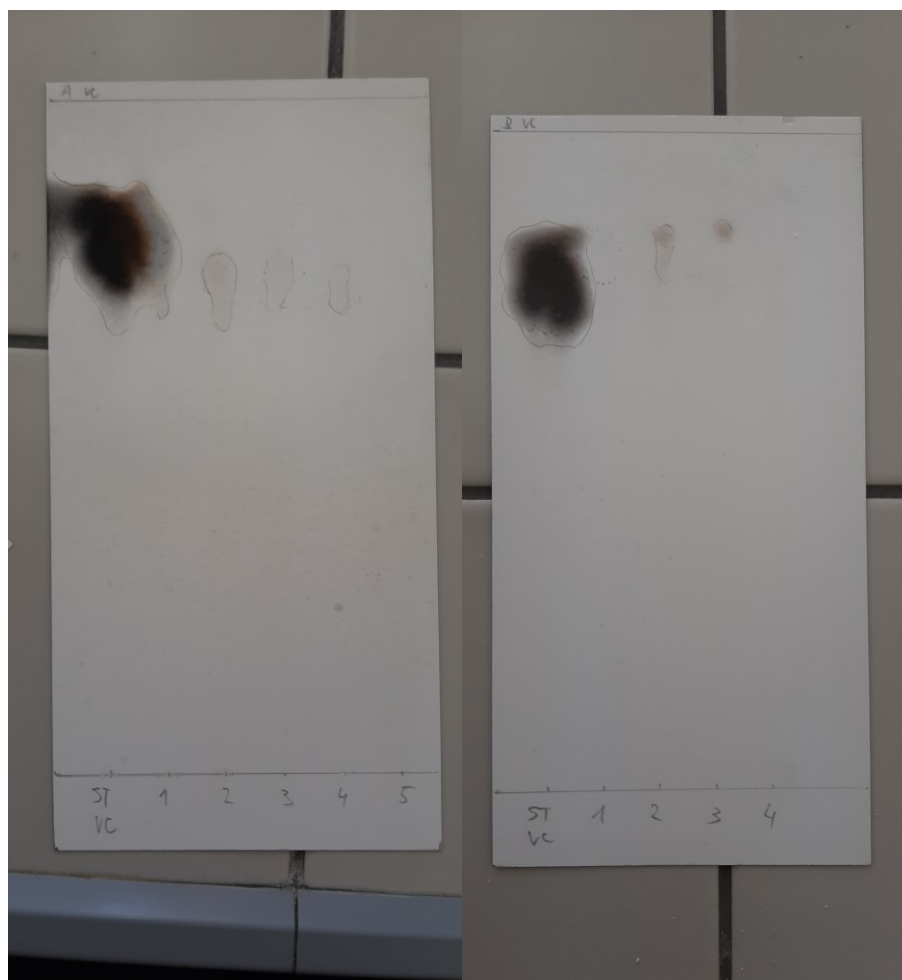
Tabulka 3

Výsledky třetího experimentu

Důkaz vitaminu C v komerčních nápojích

V rámci třetího experimentu jsme se zaměřili pouze na vzorky, u kterých bylo možné detekovat kyselinu askorbovou v předchozích dvou experimentech. Kromě ověření dat předchozích dvou experimentů byl proveden pokus se zvětranými džusy. Dva vzorky džusů byly ponechány pouze v kádinkách a odloženy v digestoři po 10 dní. Snahou bylo dokázat tendenci kyseliny askorbové k autooxidaci vzdušným kyslíkem. Vzorky byly opět zkoncentrovány jako v případě druhého experimentu u vrstev A1 a D1 v prvním experimentu. Celkový čas vyvíjení chromatogramu činil 179 min. Při detekci došlo k fúzi skvrn standartu kyseliny L-askorbové a vzorku 1. Bylo možné určit retardační faktor, ale již nebylo možné vyčíst intenzitu zabarvení skvrny. Při porovnávání nově zakoupených a zvětralých džusů byl ve vzorcích patrný úbytek vitaminu C. Skvrna vzorku 3 byla skutečně méně intenzivní než u vzorku 2. V případě vzorku 5 zřejmě došlo k oxidaci většiny obsaženého vitaminu C, jelikož jej již oproti vzorku 4 nebylo možné detekovat vůbec. U vzorku číslo 5 byla navíc již viditelná plíseň na sražené dužině, lze tedy předpokládat, že tento výrobek obsahuje i méně konzervačních látek oproti vzorku 2 a 3. V případě vrstvy B se opět dle očekávání podařilo detekovat vitamin C u vzorků 1, 2 a 3. U vzorku 4 se, jako v případě prvního

experimentu, nepodařilo vitamin C prokázat. Dóza Geladrinku po datu expirace nebyla před nabráním práškového vzorku promíchána a vzorek byl nabrán z horní vrstvy, která byla vystavena působení vzdušného kyslíku. Hodnoty retardačních faktorů jsou shrnuty v Tabulce 3.



Obrázek 15

**Důkaz vitaminu C v komerčních nápojích|
Vrstvy A a B třetího experimentu (viz Tabulka 3)**

Vzorky	R_F				Průměr
	1. exp	2. exp	3. exp		
Relax Pomeranč	0,68	0,86	0,78		0,77
Happy Day Pomeranč	0,69	0,9	0,74	0,73	0,77
Pfanner Pomeranč	0,69	0,85	0,71	0,73	0,75
Dr Witt Citron	0,73	0,86	0,81		0,80
Hass Multivitamin	0,69	0,89	0,81		0,80
Hass Vitamin C	0,75	0,91	0,81		0,82

Tabulka 4

**Shrnutí hodnot retardačních faktorů vzorků a průměrná hodnota
Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích**

Na základě podobnosti retardačních faktorů R_F standardů a vzorků lze s jistotou říci, že byl obsah kyseliny askorbové v těchto vzorcích potvrzen. Odchylky od přepokládané hodnoty jsou zřejmě způsobeny interakcí s ostatními obsaženými látkami, případně jde o běžné odchylky v rámci fluktuace kvality vrstev či vzorků, případně nepřesnosti v nanášení vzorků a nedostatečné vysušení rozpouštědla.

5.1 Důkaz kofeinu v komerčních nápojích

V rámci experimentů zaměřených na důkaz přítomnosti kofeinu byly hlavním vzorkem především různé druhy kávy a energetických nápojů, u nichž se výskyt kofeinu dá předpokládat. Jako další vzorky byly zkoumány především kolové nápoje, ale zde se nepodařilo opakovaně kofein za daných podmínek dokázat. Experiment byl tedy primárně zaměřen na kávu a energetické nápoje. Celkem byly provedeny **tři pokusy** o důkaz přítomnosti kofeinu v komerčních nápojích. Kromě kofeinu byla v energetických nápojích prokázána přítomnost i kyseliny sorbové a taurinu. Pro chromatografii na tenké vrstvě silikagelu byla navržena např. soustava chloroform-aceton (1:1), retardační faktor kofeinu je 0,50 (Pavlik 1973), při použití soustavy ethyl-acetát-methanol-konc. hydroxid amonný (85:10:5) byl nalezen retardační faktor kofeinu 0,63 - 0,65 (Palacios et al. 2017), v soustavě methanol-ethyl-acetát (3:1) je retardační faktor kofeinu 0,50 (Torres et al. 2015). Při použití tenké vrstvy celulosy a mobilní fáze butan-1-ol-chlorovodíková kyselina- voda v poměru 100:11:28 byly nalezeny následující hodnoty retardačních faktorů purinových alkaloidů: kofein-0,46, theofylin-0,37 a theobromin-0,27 (Jalal a Collin 1976). V našem případě mobilní fáze při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu obsahovala aceton, chloroform, butan-1-ol a 25% vodný roztok amoniaku v poměru 3:3:4:1 (Kolář et al. 2001). Pro tento experiment byla využita tenká vrstva silikagelu, umožňující detekci UV zářením na principu zhášení luminiscence. Předpokládaná hodnota retardačního faktoru při použití výše zmíněné mobilní fáze byla $R_F = 0,78$. Pro detekci byla použita UV lampa se zdrojem záření o vlnové délce $\lambda = 254$ nm. Kofein díky své struktuře zháší luminiscenci, na chromatogramu se objeví tmavě růžová skvrna na žlutozeleném světélkujícím pozadí.

Vrstvy A a B – vzorky	A	C	R_F	Obsah Kofeinu	Výsledek
ST (Caff)	9,20	11,40	0,81		3/3
1 Monster	9,30	11,40	0,82	0,03 % (V) 500 cm ³	3/2
2 RedBull	9,30	11,40	0,83	32 mg/100 cm ³	2/1
3 BigShock	9,25	11,40	0,81	32 mg/100 cm ³	1/1
4 Kong	9,30	11,40	0,82	30 mg/100 cm ³	1/1
5 Clever Energy	9,30	11,40	0,82	32 mg/100 cm ³	1/1
Vrstvy D a E – vzorky	A	C	R_F	Obsah Kofeinu	Výsledek
ST (Caff)	9,00	11,20	0,80		3/3
1 Clever instantní káva	8,90	11,20	0,79	uveden na etiketě	2/1
4 Starbucks Espresso	9,05	11,20	0,81	47 mg/100 cm ³	1/1
5 Ledová káva Bohušov.	8,90	11,20	0,79	50 mg/100 cm ³	1/1
6 Mazagrande Forte	9,00	11,20	0,80	32 mg/100 cm ³	1/1

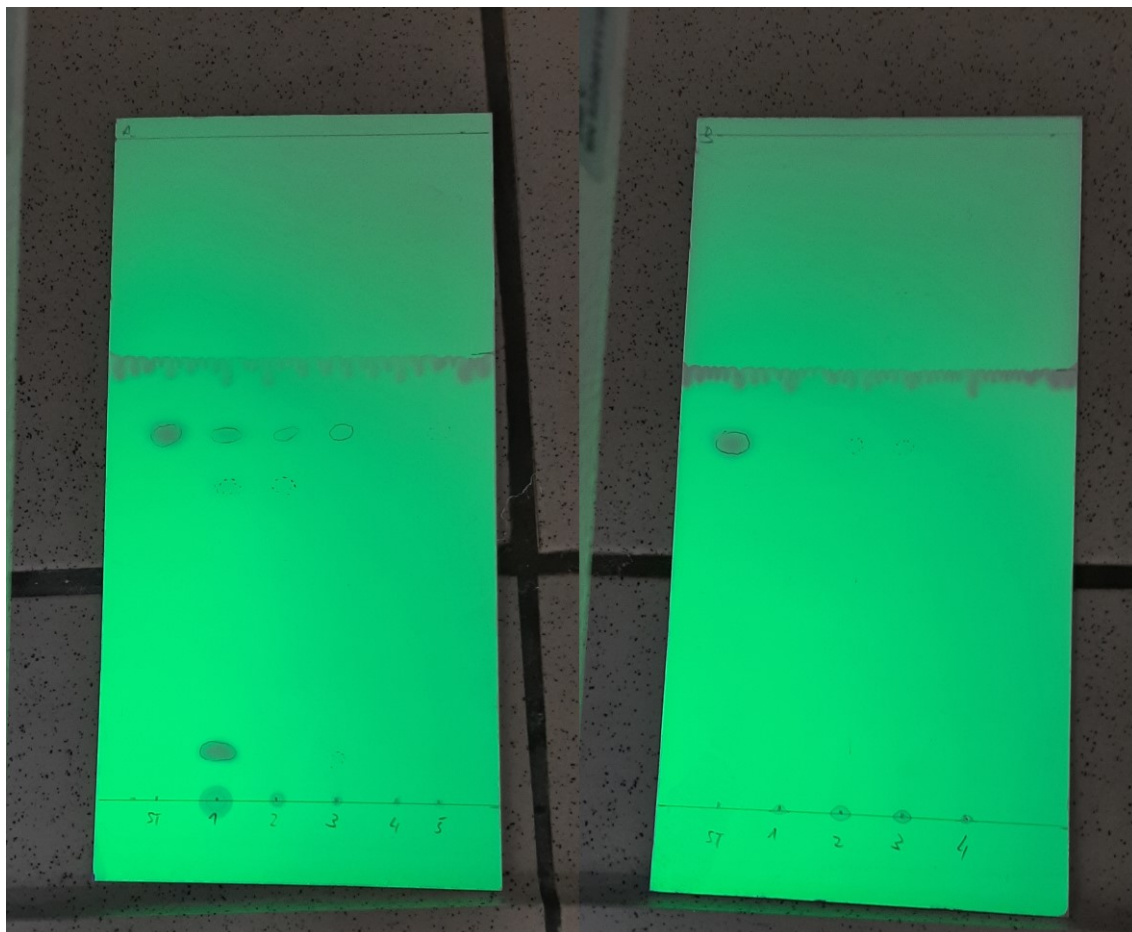
Tabulka 5

Výsledky prvního experimentu

Důkaz kofeinu v komerčních nápojích

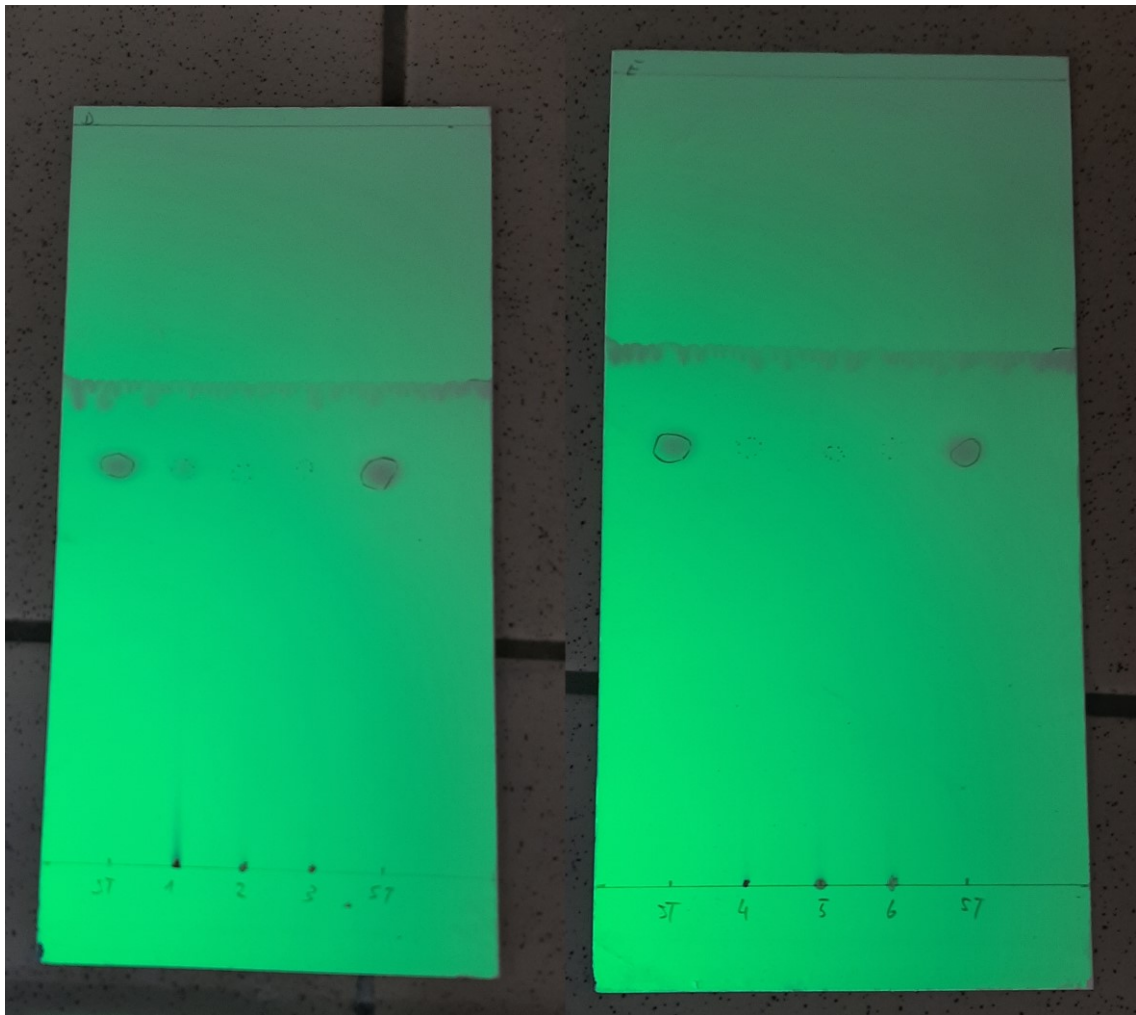
Výsledky prvního experimentu jsou shrnuty v Tabulce 6. Nápoje obsahující kofein byly rozděleny do dvou hlavních skupin – energetické drinky a kávy. U kávy a energetických nápojů se dala přítomnost kofeinu s jistotou očekávat, tento předpoklad byl výsledky experimentu potvrzen. Vzorky energetických nápojů byly nanášeny mikrokapilárami přímo na vrstvu silikagelu. Podobně tomu bylo i v případě již hotových kávových nápojů. U vzorku instantní kávy Clever byla rozpuštěna jedna čajová lžička sypkého granulátu v přibližně 100 cm³ horké vody, což odpovídá běžnému šálku kávy. Vyvíjení chromatogramu trvalo celkem 103 minut a bylo ukončeno přibližně ve dvou třetinách délky tenké vrstvy. Po vyjmutí tenkých vrstev z chromatografické komory bylo pro detekci nejdříve nutné tenké vrstvy vysušit. Následně byly tenké vrstvy podrobeny detekci pomocí UV záření, skvrny byly zakresleny. Po dokumentaci byly tenké vrstvy vyhodnoceny. Zjištěné hodnoty retardačních faktorů jsou shrnuty v Tabulce 5. Kromě kofeinu byla na vrstvě A detekována u vzorků Monster a BigShock skvrna ve spodní části chromatogramu. Vzhledem ke složení produktů se předpokládalo, že se jedná o kyselinu sorbovou, jelikož oba energetické nápoje uvádějí obsah tohoto aditiva na

etiketách. Bohužel nebylo možné tento výsledek porovnat se standardem kyseliny sorbové, který nebyl během prvního experimentu k dispozici.



Obrázek 16

Důkaz kofeinu v komerčních nápojích
Vrstvy A a B prvního experimentu (viz Tabulka 5)



Obrázek 17

Důkaz kofeinu v komerčních nápojích
Vrstvy D a E prvního experimentu (viz Tabulka 5)

Vrstvy A a B – vzorky	A	C	R_F	Obsah Kofeinu	Výsledek
ST (Caff)	15,10	17,50	0,86		3/3
1 Monster	15,35	17,50	0,88	0,03 % (V) 500 cm ³	2/2
2 RedBull	15,40	17,50	0,88	32 mg/100 cm ³	2/2
3 BigShock	15,45	17,50	0,88	32 mg/100 cm ³	2/2
4 Kong	15,35	17,50	0,88	30 mg/100 cm ³	2/2
5 Clever Energy	15,25	17,50	0,87	32 mg/100 cm ³	2/2
6 Semtex	15,30	17,50	0,87	32 mg/100 cm ³	2/2
Vrstva D – vzorky	A	C	R_F	Obsah Kofeinu	Výsledek
ST (Caff)	15,20	17,45	0,87		3/3
1 Clever instantní káva	15,35	17,45	0,88	uveden na etiketě	2/2
2 Starbucks Espresso	15,30	17,45	0,88	47 mg/100 cm ³	2/1
3 Ledová káva Bohušov.	15,60	17,45	0,89	50 mg/100 cm ³	2/2
4 Mazagrande Forte	15,40	17,45	0,88	32 mg/100 cm ³	1/1

Tabulka 6

Výsledky druhého experimentu

Důkaz kofeinu v komerčních nápojích

Při druhém experimentu byly dvojnásobně zvýšené koncentrace oproti experimentu prvnímu. V rámci kategorie energetických nápojů se podařilo detekovat kofein i v novém vzorku 6 Semtex, který byl již podroben analýze na přítomnost vitamínu C. Dle etikety tento nápoj obsahuje obě složky a tuto informaci se podařilo ověřit. Ve všech kávových nápojích se opět podařilo prokázat kofein bez výjimek. U vzorků Monster a BigShock se opět podařilo detekovat skvrny ve spodní části tenké vrstvy. Při porovnání se standardem kyseliny sorbové v totožné mobilní fázi byl retardační faktor skvrn v rámci odchylek shodný. Vyvíjení chromatogramu bylo ukončeno po 243 min.



Obrázek 18

**Důkaz kofeinu v komerčních nápojích
Vrstvy A a B druhého experimentu (viz Tabulka 6)**



Obrázek 19

**Důkaz kofeinu v komerčních nápojích
Vrstvy C a D druhého experimentu (viz Tabulka 6)**

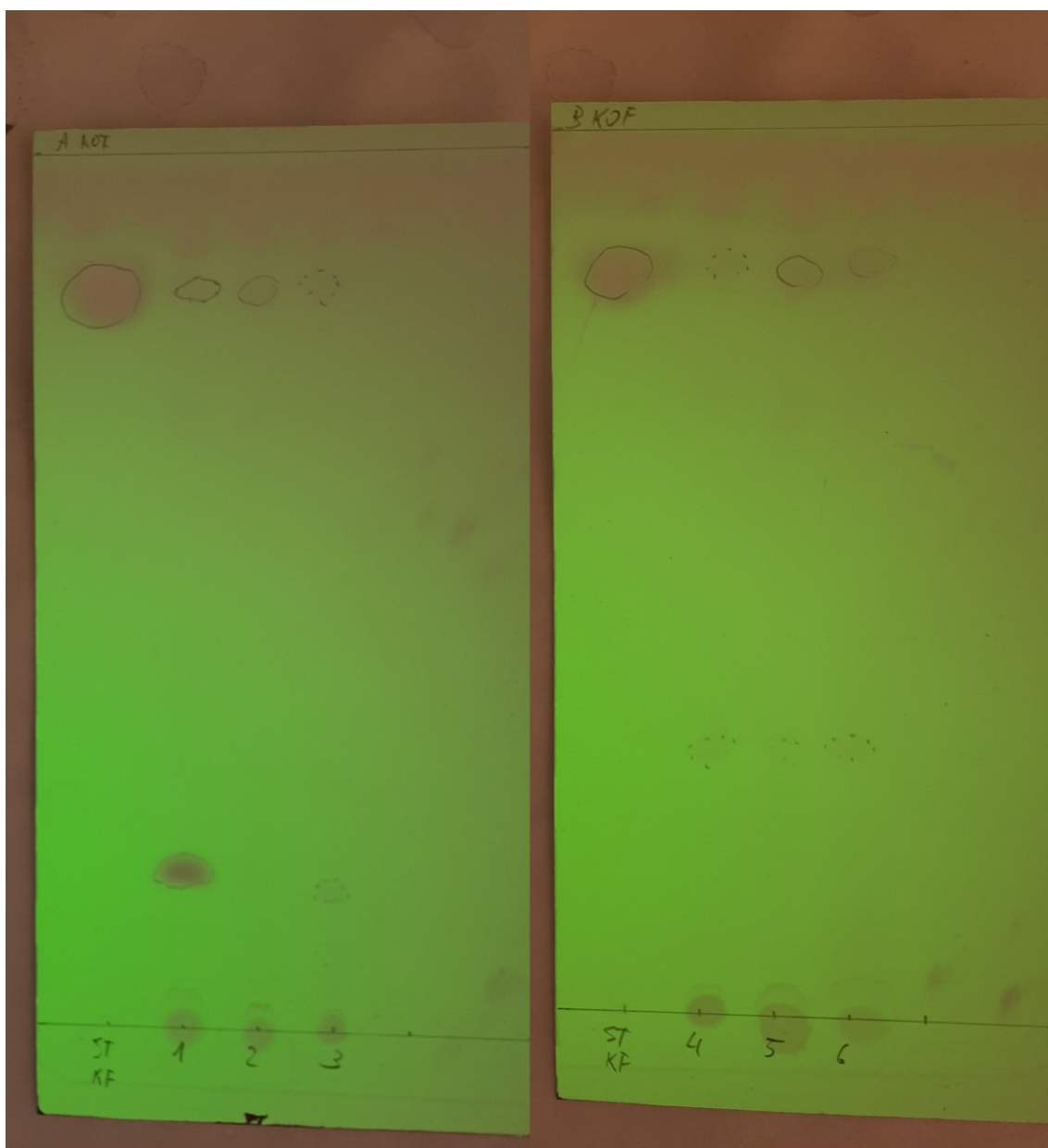
Vrstvy A a B – vzorky	A	C	R_F	Obsah Kofeinu	Výsledek
ST (Caff)	14,20	17,50	0,81		3/3
1 Monster	14,00	17,50	0,80	0,03 % (V) 500 cm ³	2/2
2 RedBull	14,75	17,50	0,84	32 mg/100 cm ³	2/2
3 BigShock	14,90	17,50	0,85	32 mg/100 cm ³	2/2
4 Kong	14,80	17,50	0,85	30 mg/100 cm ³	2/2
5 Clever Energy	14,70	17,50	0,84	32 mg/100 cm ³	2/2
6 Semtex	14,85	17,50	0,85	32 mg/100 cm ³	2/2
Vrstva C – vzorky	A	C	R_F	Obsah Kofeinu	Výsledek
ST (Caff)	15,00	17,50	0,86		3/3
1 Clever instantní káva	14,90	17,50	0,85	uveden na etiketě	2/1
2 Starbucks Espresso	14,95	17,50	0,85	47 mg/100 cm ³	2/1
3 Ledová káva Bohušov.	14,60	17,50	0,83	50 mg/100 cm ³	1/1
4 Mazagrande Forte	15,20	17,50	0,87	32 mg/100 cm ³	2/1

Tabulka 7

Výsledky třetího experimentu

Důkaz kofeinu v komerčních nápojích

V rámci třetího experimentu se u energetických a kávových nápojů opět podařilo kofein prokázat bez výjimek. Hodnoty retardačních faktorů byly zaznamenány pro finální analýzu. I v tomto případě se u vzorků Monster a BigShock podařilo detekovat kyselinu sorbovou. Celková doba vyvíjení chromatogramu v tomto případě činila celkem 235 min.



Obrázek 20

Důkaz kofeinu v komerčních nápojích
Vrstvy A a B třetího experimentu (viz Tabulka 7)



Obrázek 21

**Důkaz kofeinu v komerčních nápojích
Vrstvy C a D třetího experimentu (viz Tabulka 7)**

Vzorky	R_F			Průměr
	1. exp	2. exp	3. exp	
Monster	0,82	0,88	0,80	0,83
RedBull	0,83	0,88	0,84	0,85
BigShock	0,81	0,88	0,85	0,85
Kong	0,82	0,88	0,85	0,85
Clever Energy	0,82	0,87	0,84	0,84
Clever instantní káva	0,79	0,88	0,85	0,84
Starbucks Espresso	0,81	0,88	0,85	0,85
Ledová káva Bohušov.	0,79	0,89	0,83	0,84
Mazagrande Forte	0,80	0,88	0,87	0,85

Tabulka 8

**Shrnutí hodnot retardačních faktorů vzorků a průměrná hodnota
Důkaz kofeinu v komerčních nápojích**

Na základě podobnosti retardačních faktorů R_F standardů a vzorků lze potvrdit obsah kofeinu ve všech vzorcích. Malé odchylky od přepokládané hodnoty jsou zřejmě opět jako v případě důkazů vitamínu C způsobeny interakcí s ostatními obsaženými látkami, případně jde o běžné odchylky v rámci fluktuace kvality vrstev či vzorků, případně nepřesnosti v nanášení vzorků a nedostatečné vysušení rozpouštědla.

5.2 Důkazy dalších látek v komerčních nápojích

5.2.1 Kyselina sorbová v nápojích

Během experimentů orientovaných na důkaz kofeinu jsme se zaměřili na další látky obsažené v energetických nápojích, především pak na taurin a kyselinu sorbovou. Pro chromatografii kyseliny sorbové na tenké vrstvě silikagelu byla navržena např. mobilní fáze toluen-ethyl-acetát-mravenčí kyselina (25:20:5)- $R_F=0,56$, nebo toluen-ethyl-acetát-chloroform-mravenčí kyselina (25:13:10:2)- $R_F=0,46$ (Ríos,1972). Kyselina sorbová byla v našem případě identifikována v rámci důkazů kofeinu za použití totožné mobilní fáze. Při prvním pokusu byly na výsledné tenké vrstvě kromě kofeinu viditelné i další skvrny zhášející luminiscenci, při porovnání retardačního faktoru těchto skvrn se standardem kyseliny sorbové jsme usoudili, že se jedná právě o toto aditivum. Při druhém pokusu byl již k dispozici standard sorbové kyseliny. Při porovnání dat z prvního experimentu jsme došli k závěru, že se s největší pravděpodobností jedná o skvrny kyseliny sorbové, v tomto smyslu byly provedeny další dva experimenty. Výsledky všech tří experimentů jsou shrnuty v Tabulce 11.

Vrstva A	A	C	R_F	Obsah Kys. sorbové	Výsledek
1. exp					
ST (SA)	0	0	0		
1 Monster	2,90	17,50	0,17	uvedena na etiketě	2/2
3 BigShock	2,75	17,50	0,16	uvedena na etiketě	2/1
2. exp					
ST (SA)	2,20	13,20	0,17		3/3
1 Monster	2,00	13,20	0,15	uvedena na etiketě	2/2
3 BigShock	2,10	13,20	0,16	uvedena na etiketě	2/1
3. exp					
ST (SA)	3,45	17,00	0,20		3/3
1 Monster	3,70	17,00	0,22	uvedena na etiketě	2/2
3 BigShock	4,10	17,00	0,24	uvedena na etiketě	1/1

Tabulka 9
Výsledky experimentů
Důkaz kyseliny sorbové v komerčních nápojích



Obrázek 22

Důkaz kyseliny sorbové v komerčních nápojích

Vrstva E třetího experimentu na důkaz kofeinu se standardem kyseliny sorbové
(viz Tabulka 9)

Vzorky	R _F			Průměr
	1. exp	2. exp	3. exp	
Monster	0,17	0,15	0,22	0,18
BigShock	0,16	0,16	0,24	0,19

Tabulka 10

Shrnutí hodnot retardačních faktorů vzorků a průměrná hodnota

Důkaz kyseliny sorbové v komerčních nápojích

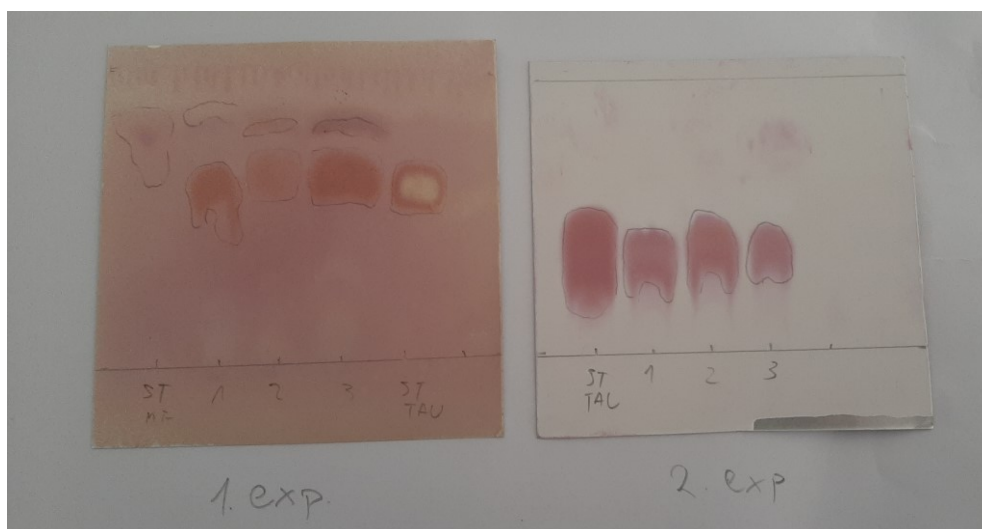
Na základě podobnosti hodnot retardačního faktoru standardů a vzorků a vzhledem ke skutečnosti, že oba testované vzorky na etiketách uvádějí obsah kyseliny sorbové, můžeme konstatovat, že byla přítomnost tohoto konzervačního aditiva v obou vzorcích skutečně potvrzena.

5.2.2 Taurin v nápojích

Paralelně s důkazem kyseliny sorbové byl uskutečněn experiment na důkaz v taurinu ve stejných vzorcích – energetické nápoje Monster, BigShock a Semtex. Taurin byl vyvíjen na tenké vrstvě silikagelu v odlišné mobilní fázi o složení isopropylalkohol: voda v poměru 8:2, retardační faktor, uvedený v literatuře je 0,24 (Oberle a Griesinger 2018). Existují i jiné mobilní fáze, např. propan-1-ol-ethanol-voda-octová kyselina (5,2:0,8:2:2), retardační faktor je 0,62, dalšími soustavami jsou chloroform-ethanol-octová kyselina-aceton-voda (54:27:10:2:2) nebo butan-1-ol-octová kyselina-ethanol-voda (4:2:3:3) (Teo et al. 2013). Tyto mobilní fáze byly využity při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu (HPTLC). Pro detekci byl použit 0,2% ethanolový roztok ninhydrinu. Tato metoda se využívá především pro detekci tradičních aminokyselin (tj. aminokarboxylových kyselin), taurin (vzniká v organismu z cysteinu), který patří mezi aminosulfonové kyseliny lze díky obdobné struktuře touto metodou také detekovat. Oproti modře a modrofialově zbarveným produktům při detekci aminokyselin však zde vzniká produkt sytě růžové barvy. Při prvním experimentu činila doba vyvíjení chromatogramu celkem 105 min, při druhém experimentu pak 90 min. V obou případech byla využita pouze polovina standardní tenké vrstvy. Vzhledem k polárnímu charakteru mobilní fáze je doba vyvíjení značně dlouhá. Po vyjmutí z chromatografické komory byla vrstva vysušena a byl proveden nástřík detekčního roztoku ninhydrinu. Následně byla vrstva vložena na cca 40 sek do sušárny ohřáté na teplotu 80 °C. Skvrny s obsahem taurinu se následně výrazně zbarvily do sytě růžové barvy. Výsledky experimentů jsou shrnuty v Tabulkách 11 a 12.

Vrstva A	A	C	R _F	Obsah taurinu	Výsledek
1. exp					
ST (Tau)	4,40	7,70	0,57		3/3
1 Monster	4,50	7,70	0,58	uveden na etiketě	3/3
3 BigShock	4,80	7,70	0,62	uveden na etiketě	3/3
6 Semtex	4,70	7,70	0,51	uveden na etiketě	3/3
2. exp					
ST (Tau)	3,10	6,90	0,45		3/3
1 Monster	3,50	6,90	0,51	uveden na etiketě	3/3
3 BigShock	3,00	6,90	0,43	uveden na etiketě	3/3
6 Semtex	3,30	6,90	0,48	uveden na etiketě	3/3

Tabulka 11
Výsledky experimentů
Důkaz taurinu v komerčních nápojích



Obrázek 23
Důkaz taurinu v komerčních nápojích
Vrstvy prvního a druhého experimentu na přítomnost taurinu po detekci ninhydrinem
(viz Tabulka 11)

Vzorky	R _F		Průměr
	1. exp	2. exp	
Monster	0,58	0,51	0,55
BigShock	0,62	0,43	0,53
Semtex	0,51	0,48	0,50

Tabulka 12

**Shrnutí hodnot retardačních faktorů vzorků a průměrná hodnota
Důkaz taurinu v komerčních nápojích**

Na základě podobnosti hodnot retardačních faktorů R_F standardů a vzorků lze potvrdit, že výše uvedené vzorky energetických nápojů taurin skutečně obsahují. Výsledky se také shodují s poskytnutou literaturou. Odchyly jsou opět zřejmě způsobeny nedostatečným vysušením rozpouštědla či fluktuací v kvalitě vzorků.

5.3 Návodý chemických experimentálních úloh

Na základě experimentálně získaných dat jsme vytvořili celkem čtyři návody laboratorních úloh, zaměřených na důkazy askorbové a sorbové kyseliny, kofeinu a taurinu. Vzhledem ke složení mobilních fází jsou tyto úlohy vhodné spíše pro budoucí učitele či workshopy a zájmové kroužky. Způsob výuky týkající se kofeinu a vitamínu C jsem měl možnost prodiskutovat s ředitelem a též učitelem chemie na ZŠ Hostomice, panem Ing. Eduardem Poláchem. Bohužel v prostředí základní školy jsou tyto experimenty takřka neproveditelné. Úlohy by naopak mohly najít uplatnění ve výuce seminářů z chemie maturitních ročníků gymnázií. Bohužel dvě největší komplikace jsou především časová náročnost experimentu a použité chemikálie. Druhá překážka se dá překonat omezením práce žáků pouze na práci s tenkými vrstvami, kdy pedagog sám obstará přípravu mobilní fáze a bude chromatogramy sám vkládat a vyjímat z komory. Časová náročnost je v tomto případě větší překážkou, jelikož experiment může trvat i déle než dvě hodiny. V tomto případě by bylo vhodné použít pouze polovinu tenké vrstvy o standardních rozměrech 10x10 cm a aplikovat tyto úlohy během dvouhodinových laboratorních cvičení ihned po zahájení. V případě taurinu, kofeinu a kyseliny sorbové je zde možnost omezit práci žáků pouze na přípravu tenké vrstvy. Pedagog by v tomto případě mohl po vyvíjení tenké vrstvy vyjmout a uschovat je na další vyučovací hodinu, kde by žáci jen provedli analýzu. Toto bohužel není aplikovatelné pro kyselinu askorbovou, jelikož při uchovávání tenkých vrstev hrozí její oxidace, a tím znehodnocení výsledků. V případě zájmových kroužků či workshopů nejsou obě tyto skutečnosti limitující.

Při vytváření úloh jsme vzhledem k obsahu cílili především na žáky středních škol. Úlohy obsahují stručný teoretický úvod, podrobný postup a doplňující úlohy a otázky k zamyslení. Žáci mají za úkol semikvantitativně posoudit obsah jednotlivých složek v nápojích na čtyřbodové stupnici (neobsahuje, obsahuje málo, obsahuje středně, obsahuje hodně). V rámci doplňujících úkolů se žáci mají zamyslet nad dalším možným postupem v případě detekování dalších neznámých látek na chromatogramu. V případě zájmu ze strany žáků je tak možnost pokračovat další navazující úlohou.

6 Závěr

Bakalářská práce byla zaměřena na důkaz přítomnosti některých složek nealkoholických nápojů.

Analýza nápojů byla prováděna prostřednictvím chromatografie na tenké vrstvě.

Ve vybraných nealkoholických nápojích byla prokazována přítomnost následujících látek: kyselina askorbová, kofein, kyselina sorbová a taurin.

- Kofein je zástupcem psychostimulačních látek.
- Askorbová kyselina (vitamin C) je látka obecně prospěšná lidskému organismu, která působí jako antioxidant.
- Sorbová kyselina je přidávána do nealkoholických nápojů jako konzervační prostředek.
- Taurin je přidáván pro stimulaci GIT.

Bylo zjištěno, které z vybraných nápojů obsahují jednotlivé komponenty a jaké je jejich semikvantitativní zastoupení.

Byly zkoumány změny obsahu kyseliny askorbové v závislosti na způsobu skladování nápoje, jestliže je zamezen přístup vzdušného kyslíku k nápoji, obsah kyseliny askorbové se nemění. Pokud byl nápoj vystaven působení vzdušného kyslíku, dochází k poklesu obsahu kyseliny askorbové.

Na základě podkladů z jednotlivých experimentů byly vypracovány návrhy čtyř experimentálních úloh:

- Kofein v nápojích a způsob jeho identifikace
- Kyselina askorbová v nápojích a způsob její identifikace
- Důkaz kyseliny sorbové v nápojích
- Důkaz taurinu v nápojích

Soubor experimentálních úloh je určen pro workshopy a speciální praktická cvičení maturitních ročníků gymnázií, ale i pro vybraná laboratorní cvičení a workshopy na vysokých školách, vzdělávajících budoucí učitele.

7 Seznam použitých informačních zdrojů

- BALADA, Jan, 2007. *Rámcový vzdělávací program pro gymnázia: RVP G*. Praha: Výzkumný ústav pedagogický v Praze. ISBN 978-80-87000-11-3.
- BENEŠ, Pavel, Václav PUMPR a Jiří BANÝR., 2010. *Základy praktické chemie 2: pro 9. ročník základní školy*. Vyd. 3., upr. Ilustroval Ludvík BÁČA. Praha: Fortuna. ISBN 978-80-7373-065-9.
- BENEŠOVÁ, Marika a Hana SATRAPOVÁ. 2002. *Odmaturuj! z chemie*. Brno: Didaktis. Odmaturuj! ISBN 80-86285-56-1.
- BLAŽEK, Jaroslav a Ján FABINI, 1999. *Chemie pro studijní obory SOŠ a SOU nechemického zaměření*. Praha: SPN - pedagogické nakladatelství. ISBN 80-7235-104-4.
- COULTATE, T.P., 2001. *Food: The Chemistry of Its Components*. 3rd Ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85404-513-9.
- DAECKE, Herbert, 1974. *Laborbücher Chemie, Chromatographie (unter besonderer Berücksichtigung der Papier- und Dünnschicht-Chromatographie)*, Diesterweg Salle, Frankfurt am Main, Berlin, München, ISBN 3-425-05072-9
- ENGLER, Rudolph, 1983. *Papier Chromatographie, Dünnschicht Chromatographie und Elektrophorese im Naturwissenschaftlichen Unterricht*, Verlag Dr Flad, Stuttgart, ISBN 3-8837-019-X
- FLEMR, Vratislav a Bohuslav DUŠEK, 2001. *Chemie pro gymnázia*. Praha: SPN - pedagogické nakladatelství. ISBN 80-7235-147-8.
- FRIED, Bernard and Joseph SHERMA, 1994. *Thin-Layer Chromatography, Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, ISBN 0-8247-9171-1
- GASPARIČ, Jiří a Jaroslav CHURÁČEK, 1981. *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin: laboratorní příručka*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury. Moderní metody v chemické laboratoři.

- HOLZHAUSER, PETR a RADEK MATUŠKA, 2019. Použití chemických látek při výuce a v rámci volnočasových aktivit žáků ve věku 15–18 let. *Chemické Listy*. Praha: Česká společnost chemická, 113(7), 6. ISSN 1213-7103.
- HUXTABLE, R. J, 1992. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews* [online]. 72(1), 101-163 [cit. 2021-7-1]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.1992.72.1.101
- JALAL, M. A. F. a H. A. COLLIN, 1976. ESTIMATION OF CAFFEINE, THEOPHYLLINE AND THEOBROMINE IN PLANT MATERIAL. *New Phytologist* [online]. 76(2), 277-281 [cit. 2021-7-2]. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.1976.tb01461.x
- KOLÁŘ, Karel, 1996. *Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie*. Hradec Králové: Gaudeamus. ISBN 80-7041-793-5.
- KOLÁŘ, Karel, Milan KODÍČEK a Jiří POSPÍŠIL, 2005. *Chemie II: (organická a biochemie) : pro gymnázia. 2., upr. a dopl. vyd.* Praha: SPN - pedagogické nakladatelství. ISBN 80-7235-283-0.
- KOLÁŘ, Karel, NÁDVORNÍKOVÁ, Iveta a Karel MYŠKA, 2001. *Purinové alkaloidy v potravinách jako výukový projekt*, In: 53. zjazd chemických spoločností, UMB, Banská Bystrica, s. 108–109
- Nařízení vlády č. 361/2007 Sb., *kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci*.
- OBERLE, Michaela and Hans GRIESINGER, 2018. *Detection and Determination of Caffeine, Taurine and Arginine in Shampoos by HPTLC* [online]. [cit. 7 July 2021]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/thin-layer-chromatography/caffeine-taurine-and-arginine-in-shampoos-by-hptlc>
- ODSTRČIL, Jaroslav a Milada ODSTRČILOVÁ, 2006. *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. ISBN 80-7013-435-6.
- PALACIOS, Carmen, Maria L. F. SALATINO a Antonio SALATINO, 2017. TLC Procedure for Determination of Approximate Contents of Caffeine in Food and

Beverages. *World Journal of Chemical Education* [online]. **5**(5), 148-152 [cit. 2021-7-2]. ISSN 2375-1665. Dostupné z: doi:10.12691/wjce-5-5-1

- PAVLIK, James W, 1973. TLC detection of caffeine in commercial products. *Journal of Chemical Education* [online]. **50**(2) [cit. 2021-7-2]. ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/ed050p134
- RÁBEK, Vlastimil, PITRA, Josef, HORÁK, Pavel, PROCHÁZKA, Želimír, CHUNDELA, Bohuslav a Miloš VOTRUBA, 1977. Sbíрка předpisů pro aplikaci desek SILUFOL, Kavalier, Votice
- RICHTER, Václav, KRAJČEK Milan, 2004. *Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie*, CHEMIE XX, Sborník Katedry chemie Západočeské univerzity v Plzni, ZČU, Plzeň, s. 57-71
- RÍOS, Víctor M, 1972. Dünnschichtchromatographische Isolierung und remissionsphotometrische Bestimmung von Sorbinsäure in Wein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* [online]. **147**(6), 331-335 [cit. 2021-7-2]. ISSN 0044-3026. Dostupné z: doi:10.1007/BF01638068
- RŮŽIČKOVÁ, Květoslava a Bohumír KOTLÍK, 2009. *Chemie v kostce: pro střední školy*. Praha: Fragment. Maturita v kostce. ISBN 978-80-253-0599-7.
- TEO, Peishan, Fucui MA a Daicheng LIU, 2013. Evaluation of Taurine by HPTLC Reveals the Mask of Adulterated Edible Bird's Nest. *Journal of Chemistry* [online]. **2013**, 1-5 [cit. 2021-7-8]. ISSN 2090-9063. Dostupné z: doi:10.1155/2013/325372
- TORRES Y TORRES, Janelle L., Shauna L. HILEY, Steven P. LORIMOR, Jonathan S. RHOAD, Benjamin D. CALDWELL, Gerald L. ZWEERINK a Michael DUCEY, 2015. Separation of Caffeine from Beverages and Analysis Using Thin-Layer Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chemical Education* [online]. **92**(5), 900-902 [cit. 2021-7-2]. ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/ed500977r
- TRINEEVA, O. V., E. F. SAFONOVA and A. I. SLIVKIN, 2018. Method Development for Quantitative Determination of Ascorbic Acid by High-

Performance Thin-Layer Chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal* [online]. **51**(10), 938-944 [cit. 2021-7-2]. ISSN 0091-150X. Dostupné z: doi:10.1007/s11094-018-1719-3

- VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-17-6.
- VELÍŠEK, Jan., 1999. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS. ISBN 8090239153.
- Vyhláška č. 298/1997 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné.
- Vyhláška č. 335/1997 Sb., kterou se provádí §18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní lih, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí.
- Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje

8 Seznam příloh

Příloha 1:

Laboratorní práce na téma: Kyselina askorbová v nápojích a způsob její identifikace

Příloha 2:

Laboratorní práce na téma: Kofein v nápojích a způsob jeho identifikace

Příloha 3:

Laboratorní práce na téma: Důkaz kyseliny sorbové v nápojích

Příloha 4:

Laboratorní práce na téma: Důkaz taurinu v nápojích

Seznam obrázků

Obrázek 1 Přírodní sacharidy v Haworthově projekci, fruktosa (vlevo nahoře), glukosa (vpravo nahoře) a sacharosa (dole uprostřed).....	12
Obrázek 2 Vitaminy rozpustné ve vodě.....	13
Obrázek 3 Vitaminy rozpustné v tucích	14
Obrázek 4 kyselina. L-askorbová	17
Obrázek 5 Komplex kyseliny askorbové s železitým iontem.....	20
Obrázek 6 kofein.....	23
Obrázek 7 kyselina sorbová.....	26
Obrázek 8 taurin.....	26
Obrázek 9 Diagram pro jednodušší orientaci při výběru vhodné mobilní a stacionární fáze dle Egona Stahla.....	35
Obrázek 10 Obecné schéma tenké vrstvy	37
Obrázek 11 Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích Vrstvy A až D z prvního experimentu (viz Tabulka 1).....	45
Obrázek 12 Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích Vrstvy A1 a D1 z prvního experimentu (viz Tabulka 1).....	45
Obrázek 13 Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích Vrstva A druhého experimentu (viz Tabulka 2).....	47
Obrázek 14 Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích Vrstva B druhého experimentu (viz Tabulka 2).....	47
Obrázek 15 Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích Vrstvy A a B třetího experimentu (viz Tabulka 3).....	49
Obrázek 16 Důkaz kofeinu v komerčních nápojích Vrstvy A a B prvního experimentu (viz Tabulka 5).....	53
Obrázek 17 Důkaz kofeinu v komerčních nápojích Vrstvy D a E prvního experimentu (viz Tabulka 5).....	54

Obrázek 18 Důkaz kofeinu v komerčních nápojích Vrstvy A a B druhého experimentu (viz Tabulka 6).....	56
Obrázek 19 Důkaz kofeinu v komerčních nápojích Vrstvy C a D druhého experimentu (viz Tabulka 6).....	57
Obrázek 20 Důkaz kofeinu v komerčních nápojích Vrstvy A a B třetího experimentu (viz Tabulka 7).....	59
Obrázek 21 Důkaz kofeinu v komerčních nápojích Vrstvy C a D třetího experimentu (viz Tabulka 7).....	60
Obrázek 22 Důkaz kyseliny sorbové v komerčních nápojích Vrstva E třetího experimentu na důkaz kofeinu se standardem kyseliny sorbové (viz Tabulka 9)	63
Obrázek 23 Důkaz taurinu v komerčních nápojích Vrstvy prvního a druhého experimentu na přítomnost taurinu po detekci ninhydrinem (viz Tabulka 11)	66

Seznam tabulek

Tabulka 1 Výsledky prvního experimentu Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích.	43
Tabulka 2 Výsledky druhého experimentu Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích.	46
Tabulka 3 Výsledky třetího experimentu Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích....	48
Tabulka 4 Shrnutí hodnot retardačních faktorů vzorků a průměrná hodnota Důkaz vitamínu C v komerčních nápojích	50
Tabulka 5 Výsledky prvního experimentu Důkaz kofeinu v komerčních nápojích	52
Tabulka 6 Výsledky druhého experimentu Důkaz kofeinu v komerčních nápojích.....	55
Tabulka 7 Výsledky třetího experimentu Důkaz kofeinu v komerčních nápojích	58
Tabulka 8 Shrnutí hodnot retardačních faktorů vzorků a průměrná hodnota Důkaz kofeinu v komerčních nápojích.....	61
Tabulka 9 Výsledky experimentů Důkaz kyseliny sorbové v komerčních nápojích.....	62
Tabulka 10 Shrnutí hodnot retardačních faktorů vzorků a průměrná hodnota Důkaz kyseliny sorbové v komerčních nápojích.....	64
Tabulka 11 Výsledky experimentů Důkaz taurinu v komerčních nápojích.....	66
Tabulka 12 Shrnutí hodnot retardačních faktorů vzorků a průměrná hodnota Důkaz taurinu v komerčních nápojích	67

9 Příloha 1

Laboratorní práce č. 1

Téma

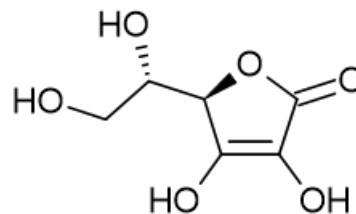
Kyselina askorbová v nápojích a způsob její identifikace

Úkol

Pomocí chromatografie na tenké vrstvě proveďte důkaz kyseliny askorbové v různých druzích nápojů.

Teoretická část

Kyselina askorbová neboli vitamin C, (na obrázku) je nezbytnou součástí výživy. Kyselina L-askorbová zastává v lidském těle mnoho funkcí, význam mají především její redukční vlastnosti – působí tedy jako přírodní antioxidant. Díky svým antioxidačním účinkům v těle vychytává volné radikály. Kromě antioxidačních vlastností se kyselina L-askorbová podílí například na resorpci železa v zažívacím traktu, stimuluje transport sodných, chloridových a vápenatých iontů, účastní se metabolismu cholesterolu či biosyntézy mukopolysacharidů. Kyselina askorbová je součástí řady potravin. Nachází se v ovoci, např. kiwi, v zelenině, např. paprika. Kromě toho je součástí řady nápojů. Je přirozenou složkou různých džusů, např. pomerančový džus, do jiných nápojů je přidávána. Přítomnost kyseliny askorbové v potravinářských produktech je možné prokázat pomocí tenkovrstvé chromatografie.



Chromatografie se provádí na tenké vrstvě silikagelu s elučním činidlem o složení cyklohexan, aceton a kyselina octová v poměru 1:2:1. Detekce chromatogramu se provádí pomocí nástřiku detekčního činidla rozprašovačem přímo na tenkou vrstvu (před zahájením detekce je zapotřebí vysušit chromatogram). Detekčním činidlem je 1 % roztok dusičnanu stříbrného ve 25 % vodném roztoku amoniaku. Díky redukčním vlastnostem askorbové kyseliny dojde k vyloučení elementárního stříbra, které na

chromatogramu vytvoří tmavě šedé až černé skvrny. Předpokládaná hodnota retardačního faktoru $R_F=0,70$.

Pomůcky a chemikálie

Pomůcky

- tenká vrstva silikagelu pro chromatografii
- chromatografická komora
- rozprašovač
- obyčejná tužka
- nůžky
- pravítko
- kapiláry nebo mikropipety
- stříčka
- kádinky
- odměrný válec

Chemikálie

- aceton
- kyselina octová
- cyklohexan
- amoniak
- dusičnan stříbrný
- destilovaná voda
- kyselina askorbová

Praktická část

1. Na tenkou vrstvu o rozměrech 20x10 cm vyznačte měkkou tužkou start ve vzdálenosti 2 cm od spodního okraje.
2. Na tenkou vrstvu silikagelu mikrokapilárami naneste standard a stejné objemy různých druhů nealkoholických nápojů.
3. Nanesené vzorky vysušte fénem (bez ohřevu, pouze proudem vzduchu, kyselina askorbová by se mohla oxidovat).
4. Tenkou vrstvu s nanesenými vzorky vložte do chromatografické komory, která obsahuje cca 1 cm vrstvu mobilní fáze a komoru zakryjte víkem.
5. Ponechte chromatogram postupně vyvíjet elučním činidlem. Dále připravte 50 ml 1 % roztoku dusičnanu stříbrného ve 25 %vodném roztoku amoniaku.
6. Když dosáhne čelo chromatogramu přibližné vzdálenosti 1 cm od horního okraje, vyjměte chromatogram z komory a měkkou tužkou vyznačte čelo chromatogramu.
7. Chromatogram vysušte fénem – ne horkým vzduchem (pracujte v digestoři) a proveďte detekci postříkem detekčním roztokem. (postřík provádějte v horizontální poloze, tenkou vrstvu podložte filtračním papírem, aby nedošlo k znečištění digestoře).
8. Kyselina askorbová redukuje dusičnan stříbrný. Dojde k vyloučení elementárního stříbra, které se na chromatogramu projeví jako šedé až černé skvrny. V případě, že reakce neprobíhá, vložte tenké vrstvy na cca 30 vteřin do sušárny, ohřáté na 80 °C.
9. Skvrny kyseliny askorbové opatrně obkreslete měkkou tužkou.
10. Změřte vzdálenost těžiště skvrny-start a čelo-start.
11. Z naměřených hodnot vypočtete retardační faktor kyseliny askorbové.
12. Na základě chromatografické analýzy vyhodnoťte zastoupení a její obsah v nápojích.

Výsledky a diskuze

Byly analyzovány nápoje A, B, C, D..., ve kterých:

A) byla prokázána (+) B) nebyla prokázána (-)

přítomnost kyseliny askorbové a v jakém množství.

V případě malého množství použijte symbol (+), v případě středního množství použijte symbol (++) a v přípravě velkého množství použijte symbol (+++)

Závěr

Pomocí tenkovrstvé chromatografie byla (nebyla) prokázána přítomnost kyseliny askorbové v jednotlivých nápojích:

Otázky a úkoly

- Napište, v kterých nápojích byla prokázána přítomnost kyseliny askorbové.
- Pokuste se odhadnout množství kyseliny askorbové obsažené v jednotlivých nápojích (velký obsah, střední obsah, malý obsah).
- Objevili jste v jednotlivých nápojích i jiné látky, které mají redukující účinky?

10 Příloha 2

Laboratorní práce č. 2

Téma

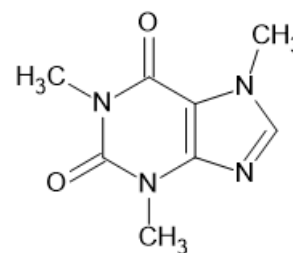
Kofein v nápojích a způsob jeho identifikace

Úkol

Pomocí chromatografie na tenké vrstvě proveďte důkaz kofeinu v různých druzích nápojů.

Teoretická část

Kofein (na obrázku) je purinový alkaloid běžně se vyskytující především v kávových a kakaových bobech. Obsažen je ve velké míře v kávě a čaji a také v energetických nápojích. Díky podobné struktuře s adeninem je schopen vázat se v CNS na adeninové receptory a zrychlovat tak přenos nervových vzruchů, tím kofein pomáhá zlepšovat psychomotoriku, koncentraci a paměť a oddaluje únavu.



Chromatografie se provádí na tenké vrstvě silikagelu s elučním činidlem o složení aceton, chloroform, butan-1-ol, amoniak v poměru 3:3:4:1.

Detekce chromatogramu se provádí pomocí UV lampy při vlnové délce $\lambda=254\text{nm}$. Kofein zháší luminiscenci a tvoří tmavé skvrny na žlutozeleném pozadí. (před zahájením detekce je zapotřebí vysušit chromatogram) Předpokládaná hodnota retardačního faktoru $R_F=0,78$.

Pomůcky a chemikálie

Pomůcky

- tenká vrstva silikagelu s luminiscenčním indikátorem ($\lambda=254\text{nm}$)
- chromatografická komora
- UV lampa
- obyčejná tužka
- nůžky
- pravítko
- kapiláry nebo mikropipety
- stříčka
- kádinky
- odměrný válec

Chemikálie

- aceton
- chloroform
- butan-1-ol
- amoniak
- destilovaná voda
- kofein

Praktická část

1. Na tenkou vrstvu o rozměrech 20x10 cm s obsahem luminiscenčního indikátoru vyznačte měkkou tužkou start ve vzdálenosti 2 cm od spodního okraje.
2. Na tenkou vrstvu silikagelu mikrokapilárami naneste standard a stejné objemy různých druhů nealkoholických nápojů.
3. Nanesené vzorky vysušte fénem.
4. Tenkou vrstvu s nanesenými vzorky vložte do chromatografické komory, která obsahuje cca 1 cm vrstvu mobilní fáze a komoru zakryjte víkem.
5. Ponechte chromatogram postupně vyvíjet elučním činidlem.
6. Když dosáhne čelo chromatogramu přibližné vzdálenosti 1 cm od horního okraje, vyjměte chromatogram z komory a měkkou tužkou vyznačte čelo chromatogramu.
7. Chromatogram vysušte fénem (pracujeme v digestoři!) a proveďte detekci UV zářením při vlnové délce $\lambda=254\text{nm}$ (pozor na UV záření, lampu umístěte vždy směrem od sebe, je zde nebezpečí vzniku zánětu spojivek!).
8. Kofein zhasí luminiscenci a na tenké vrstvě se objevuje jako tmavě růžová skvrna na žlutozeleném pozadí.
9. Skvrny kofeinu je třeba opatrně obkreslit měkkou tužkou.
10. Změřte vzdálenost těžiště skvrny-start a čelo-start.
11. Z naměřených hodnot vypočtete retardační faktor kofeinu.
12. Na základě chromatografické analýzy vyhodnoťte zastoupení a jeho obsah v nápojích.

Výsledky a diskuze

Byly analyzovány nápoje A, B, C, D..., ve kterých:

A) byla prokázána (+) B) nebyla prokázána (-) přítomnost kofeinu a do jaké míry.

V případě malého množství použijte symbol (+), v případě středního množství použijte (++) a v přípravě velkého množství použijte (+++)

Závěr

Pomocí tenkovrstvé chromatografie byla prokázána přítomnost kofeinu v jednotlivých nápojích...

Otázky a úkoly

- Napište, v kterých nápojích byla prokázána přítomnost kofeinu.
- Pokuste se odhadnout množství kofeinu obsažené v jednotlivých nápojích (velký obsah, střední obsah, malý obsah).
- Objevili jste v jednotlivých nápojích i jiné látky, které zhášejí luminiscenci?
- V nápoji Monster je obsažena kyselina sorbová jako konzervant. Je možné přítomnost této látky v nápoji odhalit pomocí detekce chromatogramu UV lampou?

11 Příloha 3

Laboratorní práce č.3

Téma

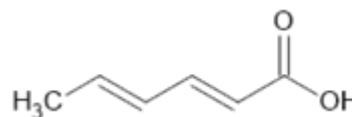
Důkaz kyseliny sorbové v nápojích.

Úkol

Pomocí chromatografie na tenké vrstvě proveďte důkaz kyseliny sorbové v různých druzích nápojů.

Teoretická část

Kyselina sorbová (na obrázku) je semitriviální název pro (2E,4E)-hexa-2,4-dienovou kyselinu. Kyselina sorbová a odvozené soli zvané sorbáty se využívají pro své



antimikrobiální účinky – inhibují růst plísní, kvasinek a některých bakterií. Mechanismus účinku spočívá v inhibici enzymů oxidujících především mastné kyseliny (žluknutí tuků). Kyselina sorbová může podléhat autooxidaci, produkty oxidace mohou reagovat s aminokyselinami a proteiny, čímž vizuálně způsobují hnědnutí potravin ošetřených kyselinou sorbovou.

Chromatografie se provádí na tenké vrstvě silikagelu s elučním činidlem o složení aceton, chloroform, butan-1-ol, 25% vodný roztok amoniaku v poměru 3:3:4:1.

Detekce chromatogramu se provádí pomocí UV lampy při vlnové délce $\lambda=254\text{nm}$. Kyselina sorbová zhasí luminiscenci a tvoří tmavé skvrny na žlutozeleném pozadí. (před zahájením detekce je zapotřebí vysušit chromatogram). Předpokládaná hodnota retardačního faktoru $R_F=0,19$

Pomůcky a chemikálie

Pomůcky

- tenká vrstva silikagelu s fluorescenčním indikátorem ($\lambda=254\text{nm}$)
- chromatografická komora
- UV lampa
- obyčejná tužka
- nůžky
- pravítko
- kapiláry nebo mikropipety
- stříčka
- kádinky
- odměrný válec

Chemikálie

- aceton
- chloroform
- butan-1-ol
- amoniak
- destilovaná voda
- kyselina sorbová

Praktická část

1. Na tenkou vrstvu s obsahem luminiscenčního indikátoru o rozměrech 20x10 cm vyznačte měkkou tužkou start ve vzdálenosti 2 cm od spodního okraje.
2. Na tenkou vrstvu silikagelu mikrokapilárami naneste standard a stejné objemy různých druhů nealkoholických nápojů.
3. Nanesené vzorky vysušte fénem.
4. Tenká vrstva s nanesenými vzorky se vloží do chromatografické komory, která obsahuje cca 1 cm vrstvu mobilní fáze a komoru zakryjte víkem.
5. Ponechte chromatogram postupně vyvíjet elučním činidlem.
6. Když dosáhne čelo chromatogramu přibližné vzdálenosti 1 cm od horního okraje, vyjměte chromatogram z komory a měkkou tužkou vyznačte čelo chromatogramu.
7. Chromatogram vysušte fénem (pracujte v digestoři!) a proveďte detekci UV zářením při vlnové délce $\lambda=254\text{nm}$ (pozor na UV záření, lampu umístěte tak, aby záření směřovalo od Vás, je zde nebezpečí vzniku zánětu spojivek!).
8. Kyselina sorbová zhasí luminiscenci a na tenké vrstvě se objevuje jako tmavě růžová skvrna na žlutozeleném pozadí.
9. Skvrny kyseliny sorbové opatrně obkreslete měkkou tužkou.
10. Změřte vzdálenost těžiště skvrny-start a čelo-start.
11. Z naměřených hodnot vypočítejte retardační faktor kyseliny sorbové.
12. Na základě chromatografické analýzy vyhodnoťte zastoupení a její obsah v nápojích.

Výsledky a diskuze

Byly analyzovány nápoje A, B, C, D..., ve kterých:

A) byla prokázána (+) B) nebyla prokázána (-) přítomnost kyseliny sorbové a do jaké míry.

V případě malého množství použijte symbol (+), v případě středního množství použijte (++) a v přípravě velkého množství použijte (+++)

Závěr

Pomocí tenkovrstvé chromatografie byla prokázána přítomnost kyseliny sorbové v jednotlivých nápojích...

Otázky a úkoly

- Napište, v kterých nápojích byla prokázána přítomnost kyseliny sorbové.
- Pokuste se odhadnout množství kyseliny sorbové obsažené v jednotlivých nápojích (velký obsah, střední obsah, malý obsah).
- Objevili jste v jednotlivých nápojích i jiné látky, které zhášejí luminiscenci?
- Hlavní složkou nápoje Monster je kofein. Je možné přítomnost této látky v nápoji odhalit pomocí detekce chromatogramu UV lampou?

12 Příloha 4

Laboratorní práce č. 4

Téma

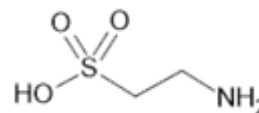
Důkaz taurinu v nápojích

Úkol

Pomocí chromatografie na tenké vrstvě proveďte důkaz taurinu v různých druzích nápojů.

Teoretická část

Taurin (na obrázku) je triviální název pro 2-aminoethansulfonovou kyselinu. Triviální název souvisí s první izolací této látky z býčí žluči Friedrichem Tiedemanem. Jedná se o sloučeninu, která vzniká v organismu z cysteinu. Přirozeně se vyskytuje v mateřském mléku, mozku, žlučníku a svalech. V lidském těle podporuje trávení lipidů a tlumí CNS. Přidává se jako aditivum především do energetických nápojů.



Chromatografie se provádí na tenké vrstvě silikagelu s elučním činidlem o složení isopropylalkohol: voda v poměru 8:2. V důsledku použití polárního elučního činidla je vyvíjení dlouhodobou záležitostí. Proto je vhodné zahájit chromatografickou analýzu co nejdříve a použít poloviční tenké vrstvy o rozměrech 10x10 cm.

Detekce chromatogramu se provádí pomocí nástřiku detekčního činidla rozprašovačem přímo na tenkou vrstvu (před zahájením detekce je zapotřebí vysušit chromatogram). Detekčním činidlem je 0,2 % ethanolový roztok ninhydrinu. Ninhydrin se běžně používá na detekci aminokyselin, taurin má jako derivát cysteinu podobné vlastnosti. Při reakci s ninhydrinem vzniká barevný produkt, který na chromatogramu zaznamenáme jako sytě růžovou skvrnu. Předpokládaná hodnota retardačního faktoru $R_F = 0,51$.

Pomůcky a chemikálie

Pomůcky

- tenká vrstva silikagelu
- chromatografická komora
- rozprašovač
- obyčejná tužka
- nůžky
- pravítko
- kapiláry nebo mikropipety
- stříčka
- kádinky
- odměrný válec

Chemikálie

- isopropylalkohol
- destilovaná voda
- ethanol
- ninhydrin
- taurin

Praktická část

1. Na tenkou vrstvu o rozměrech 10x10 cm vyznačte měkkou tužkou start ve vzdálenosti 2 cm od spodního okraje.
2. Na tenkou vrstvu silikagelu mikrokapilárami naneste standard a stejné objemy různých druhů nealkoholických nápojů.
3. Nanesené vzorky vysušte fénem.
4. Tenkou vrstvu s nanesenými vzorky vložte do chromatografické komory, která obsahuje cca 1 cm vrstvu mobilní fáze a komoru zakryjte víkem.
5. Ponechte chromatogram postupně vyvíjet elučním činidlem. Dále připravte 50 ml 0,2 % roztoku ninhydrinu v ethanolu.
6. Když dosáhne čelo chromatogramu přibližné vzdálenosti 1 cm od horního okraje, vyjměte chromatogram z komory a měkkou tužkou vyznačte čelo chromatogramu.
7. Chromatogram vysušte fénem (pracujte v digestoři!) a pomocí rozprašovače naneste na chromatogram detekční činidlo (detekci provádějte v horizontální poloze, tenkou vrstvu podložte filtračním papírem, aby nedošlo k znečištění digestoře).
8. Tenkou vrstvu s naneseným detekčním roztokem vložte na cca 30 vteřin do sušárny, zahřáté na 80 ° C.
9. Ninhydrin reaguje s uvolněným amoniakem za vzniku barevného produktu, který se na chromatogramu projeví jako sytě růžová skvrna.
10. Skvrny taurinu opatrně obkreslete měkkou tužkou.
11. Změřte vzdálenost těžiště skvrny-start a čelo-start.
12. Z naměřených hodnot vypočtete retardační faktor taurinu.
13. Na základě chromatografické analýzy vyhodnoťte zastoupení a jeho obsah v nápojích.

Výsledky a diskuze

Byly analyzovány nápoje A, B, C, D..., ve kterých:

A) byla prokázána (+) B) nebyla prokázána (-) přítomnost taurinu a do jaké míry.

V případě malého množství použijte symbol (+), v případě středního množství použijte (++) a v přípravě velkého množství použijte (+++)

Závěr

Pomocí tenkovrstvé chromatografie byla prokázána přítomnost taurinu v jednotlivých nápojích...

Otázky a úkoly

- Napište, v kterých nápojích byla prokázána přítomnost taurinu.
- Pokuste se odhadnout množství taurinu obsažené v jednotlivých nápojích (velký obsah, střední obsah, malý obsah).
- Objevili jste v jednotlivých nápojích i jiné látky, které reagují s ninhydrinem za vzniku barevného produktu?