



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav analýzy potravin a výživy

***LABORATOŘ INSTRUMENTÁLNÍCH METOD
V ANALÝZE POTRAVIN***

**Vysoce účinná kapalinová chromatografie
s elektrochemickou detekcí**

Garant úlohy: doc. Dr. Ing. Karel Cejpek

VÝUKOVÉ CÍLE LABORATORNÍHO CVIČENÍ

- 1) Prohloubení teoretických znalostí v oblasti elektrochemické detekce.
- 2) Praktická demonstrace práce s instrumentací HPLC-ELD (elektrochemický detektor), specifika této techniky, práce s redoxními elektrodami (použití, skladování, čištění).
- 3) Osvojení si způsobu vývoje metody HPLC-ELD s důrazem na optimalizaci hodnoty pracovního potenciálu amperometrického detektoru pro účely konkrétní analýzy.

KRITÉRIA HODNOCENÍ PRÁCE

- Znalost základních principů redoxních dějů, možností praktického využití HPLC-ELD metod v analýze potravin a biologických materiálů a měření oxidačně-redukčního potenciálu.
- Praktické provedení práce.
- Dodržení pravidel pro práci v laboratoři (bezpečnost, čistota, pořádek).
- Protokol – přehlednost experimentálních údajů a výsledků, přiměřený závěr.

ČASOVÝ HARMONOGRAM PRÁCE

Krok č.	Činnost
1.	Výklad a přezkoušení teoretických základů (30 min)
2.	Ukázka ovládání separačního a elektrodového systému včetně vyhodnocení dat, vysvětlení specifik a nároků na nastavení systému HPLC-ELD (45 min)
3.	Příprava kapalinového chromatografu s EL detektorem k měření (60 min)
4.	Příprava ORP a pH elektrod k měření (10 min; lze i paralelně s přípravou kapalinového chromatografu)
5.	Příprava vzorků a kalibračních roztoků (30 min; lze i paralelně s přípravou kapalinového chromatografu)
6.	Sběr potřebných dat dle zadání (120-180 min)
7.	Vyhodnocení a zpracování dat (45 min)
8.	Příprava protokolu (30 min, lze vyhotovit též mimo laboratoř, po domluvě s vyučujícím)

TEORETICKÁ ČÁST

Objektem zkoumání elektrochemických metod, které využívají závislosti elektrochemického chování roztoků na jejich složení a koncentraci, je elektrochemický článek. Elektrochemický článek je systém, kde je analyzovaný roztok v kontaktu s elektrodami. Elektrody zprostředkují jeho spojení s měřicím přístrojem, který sleduje některou z elektrických veličin jako je proud, potenciál, vodivost, elektrický náboj, kapacita náboje, apod.

Elektrochemické metody se dělí na:

- A. Metody založené na elektrodovém ději ($\text{ox} + n.e^- \rightleftharpoons \text{red}$):
 1. Metody, kdy je elektrochemický článek v rovnovážném stavu (potenciometrie).
 2. Metody, kdy článkem prochází elektrický proud (elektrolytické metody)
 - a) koncentrace látky se elektrolýzou prakticky nemění (voltametrie, amperometrie)
 - b) dochází k úplné přeměně látky elektrolýzou (elektrogravimetrie, coulometrie).
- B. Metody založené na měření elektrických vlastností roztoků:
 1. Měří se vodivost roztoků (konduktometrie).
 2. Měří se kapacita (dielektrimetrie).

Dále se využívají metody založené na sledování migrace iontů v elektrickém poli (elektroforéza a izotachoforéza), které už ale patří mezi separační metody.

HPLC s elektrochemickými detektory

Elektrochemické detektory zkonstruované na základě voltametrických principů měří změnu určité elektrické veličiny (elektrodového potenciálu, proudu, kapacity) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektoru. V ní je umístěna elektroda s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce, a to v systému dvouelektrodového nebo třielektrodového zapojení. Jako další proměnná veličina se zaznamenává čas. Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství detekované složky. U elektrochemických detektorů se tedy sleduje závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací sledované složky. Podle podmínek měření můžeme rozdělit elektrochemické detektory na několik typů. Je-li elektrochemický článek v termodynamicky rovnovážném stavu (faradický proud je nulový), mluvíme o potenciometrii. Je-li v kinetickém stavu, jedná se o elektrolytické metody, kdy článkem protéká proud a jedním směrem probíhá elektrolýza. U elektrolytických metod se uplatňují čtyři závislé proměnné veličiny: potenciál elektrody (E), proud (I), čas (t) a koncentrace redoxně aktivní látky (c). Podle podmínek měření elektrolytických metod se rozdělují elektrolytické metody na metody potenciostatické, kdy se měří při konstantním potenciálu pracovní elektrody, a metody amperostatické, kdy se měří za konstantního proudu.

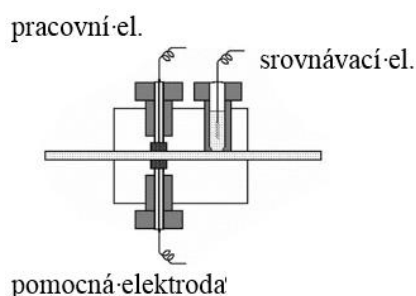
Amperometrický detektor

Amperometrické detektory jsou založeny na měření difusního elektrolytického proudu procházejícího článkem při konstantním potenciálu pracovní elektrody, který je vyvolán průchodem redukované nebo oxidované látky průtočnou celou detektoru. Naměřený difusní proud je přímo úměrný koncentraci elektroaktivní látky ve vzorku. Jako měrné elektrody se u amperometrických detektorů používají tuhé elektrody zhotovené ze skelného uhlíku, grafitových vláken, zlata, platiny, mědi či jiného kovu. Povrch všech těchto materiálů se může zanášet produkty oxidace či redukce a nečistotami z mobilní fáze nebo vzorku, a to pak vyžaduje čištění těchto elektrod. Elektrody se čistí buďto mechanicky po demontáži (extrémnější situace nebo u starších typů detektorů) nebo

otočením polarity elektrodového systému, čímž dojde k rozpouštění vyloučených látek na povrchu elektrody, nebo vkládáním střídavého napětí na elektrodu (pulsní technika).

Mobilní fáze omývá povrch pracovní elektrody; v tomto případě elektrochemická reakce probíhá pouze ve velmi tenké vrstvě - oxidačně-redukční reakci na povrchu elektrody podléhá méně než 10 % přítomného analytu. Konstrukce měrných cel má několik technických řešení. Elektrické zapojení je u většinou stejné, liší se pouze geometrickým uspořádáním. U válcové měrné cely prochází efluent kapilárou ve středu matky, ve které je umístěn držák s měrnou elektrodou, při tryskové konstrukci (wall-jet) vytéká efluent z trysky a omývá přímo měrnou elektrodu. Průtokové měrné cely lze snadno miniaturizovat pro práci s mikrokolonami nebo kapilárními kolonami. Vnitřní objem průtokových cel se obvykle pohybuje v rozmezí 1-700 nl. Amperometrický detektor je značně selektivní a citlivý, LOD může dosahovat až hodnot 0,01-1 ng.

Jako srovnávací se dříve používala kalomelová nebo chloridostříbrná elektroda, dnes častěji s výhodou bezúdržbová vodíková Hy-REF™ elektroda. Účinnost elektrochemické reakce je limitována dvěma faktory. Prvním je difuze elektroaktivních látek k povrchu pracovní elektrody, kde probíhá samotná reakce a druhým faktorem je rychlost průtoku mobilní fáze. V důsledku toho je signál z amperometrického detektoru (na rozdíl od coulometrického) závislý na průtoku mobilní fáze. Účinnost amperometrické elektrody je silně závislá na ploše povrchu znečištění díky elektrodepozicím a adsorpci, která na povrchu elektrody probíhá. Přitom klesá hodnota analytického signálu.



Cela amperometrického detektoru

Coulometrický detektor

Coulometrický detektor měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou detektoru, čímž se dosahuje vyšší citlivosti detekce než u amperometrického detektoru. Účinnost elektrochemické reakce je možné zvýšit použitím elektrody fritového typu, kdy mobilní fáze protéká porézní grafitovou pracovní elektrodou. Výhodou této coulometrické elektrody je její vysoká účinnost, stabilita (snižuje se poměr signálu k šumu) a selektivita. Tato elektroda má oproti klasické elektrodě daleko větší povrch a oxidačně-redukční reakci na povrchu elektrody podléhá více jak 90 % přítomného analytu.

Další výhodou coulometrické elektrody je možnost zvýšení selektivity sériovým zapojením dvou a více elektrod, na nichž je vloženo různé napětí. Protože je analyt na coulometrické elektrodě totálně elektrolyzován, efluent neobsahuje již žádnou elektroaktivní komponentu, která by mohla podléhat elektrochemické reakci při daném vloženém napětí. V případě, že existují v daném systému dva separované analyty lišící se svými elektrochemickými vlastnostmi (půlvolným potenciálem, $E_{1/2}$) alespoň o 60 mV, je možné je takto voltametriky rozlišit. Zapojením čtyř až šestnácti

coulometrických elektrod je možné získat detektor obdobný detektoru diodového pole tzv. CoulArray™.

Coulometrický detektor má větší aplikační potenciál než amperometrický, neboť v sériovém uspořádání dosahuje lepší selektivity a snadnější identifikace látek. Je to však nákladnější a méně robustní zařízení.

Charakteristiky a specifika elektrochemických detektorů

Elektrochemické detektory dosahují vysoké citlivosti a jsou srovnatelné s citlivostí těch fluorimetrických. Elektrochemická detekce je kompatibilní jak s reverzními tak normálními fázemi. Protože však musí být mobilní fáze vodivá, používá se téměř výhradně reverzní fáze. Vysoká čistota mobilní fáze (voda a aditiva /pufry/ mobilní fáze, nízký obsah kovů) a odstranění zejm. rozpuštěného kyslíku jsou podmínkou k dosažení stabilní základní linie a reprodukovatelnosti výsledků. Z aditiv mobilní fáze jsou vhodné fosfáty, octany a citráty, naopak aminy jsou nevhodné. Vodivost mobilní fáze se může zvýšit přidávkem chloristanů, obsah organické složky (zejména methanolu) ve vodně-organických mobilních fázích by měl být naopak co nejnižší. Potřeba konstantní koncentrace elektrolytů implikuje používání isokratické eluce, za dodržení jistých podmínek lze však s úspěchem použít i eluci gradientovou. Přítomnost kyslíku a kovů (může docházet k vymývání stop kovů z chromatografického systému) v mobilní fázi může způsobit významné odezvové pozadí a tudíž i zvýšený šum a drift základní linie. Snížení obsahu kyslíku lze dosáhnout také např. přidávkem siřičitanů do mobilní fáze. Na průběh voltametrické křivky má významný vliv hodnota pH mobilní fáze, jejíž optimum může být zcela nekompatibilní s vhodnou hodnotou pH mobilní fáze pro separaci analytů.

Výběr pracovního potenciálu detekce (E_a) je obvykle kompromisem mezi citlivostí, stabilitou signálu a selektivitou založeným na faktu, že se zvýšením potenciálu detekce dojde sice ke zvýšení odezvy, ale současně dojde ke zvýšení šumu a driftu základní linie a snížení selektivity. Selektivita detekce může být ovlivněna také designem a složením elektrody.

Oblasti využití HPLC s elektrolytickými detektory

Při analýze potravin lze uvažovat především dva dobré důvody pro použití amperometrického nebo coulometrického detektoru:

a) umožňují až vysoce selektivní detekci redoxně aktivních látek, a to jak v módu oxidace, tak redukce (redukující sacharidy, catecholaminy, fenoly, chinony, hydrazony, ...)

b) jsou relativně objektivní alternativou k řadě rozličných metod, založených na různých principech a s různým módem měření, které se používají pro stanovení antioxidační kapacity potravin aj. materiálů. Umožňují detekci a stanovení jednotlivých potenciálních antioxidantů a zároveň kvantifikaci podílu jednotlivých aktivních složek separované směsi na celkové antioxidační (= redukční) kapacitě analyzovaného vzorku (extraktu). V praxi se obvykle vkládá na pracovní elektrodu napětí +0,7 V nebo +0,8 V. Pomocí metody HPLC-ELD lze tak detekovat a stanovit všechny za podmínek vloženého napětí oxidovatelné látky, tj. ty, které za daných podmínek vykazují redukční vlastnosti.

Potenciometrie

Ke sledování elektrochemických vlastností méně stabilních sloučenin, jako jsou např. reduktony, jsou vhodnější metody potenciometrické. Potenciometrie je metoda založená na měření rovnovážného napětí článku mezi dvojicí elektrod. Potenciál indikační (měrné) elektrody (obvykle

platinové) je závislý na složení elektrolytu (roztoku analyzovaného vzorku), do kterého je elektroda ponořena. Tato závislost se vyjadřuje Nernstovou rovnicí. Běžně používanými referenčními elektrodami jsou kovové elektrody ponořené do roztoku vlastních iontů. Referenční (srovnávací) elektrody mají konstantní potenciál. Vzhledem k tomuto potenciálu se měří potenciál indikační elektrody jako napětí. Příkladem srovnávací elektrody je chloridostříbrná (Ag/AgCl/KCl) či kalomelová elektroda (Hg/Hg₂Cl₂/KCl).

Nernstova rovnice, někdy také Nernstova-Petersova rovnice, je rovnice definující vztah mezi potenciálem kovové elektrody a aktivitou jejích iontů v roztoku u jejího povrchu. Byla odvozena W. H. Nernstem a Kurtem Petersem z úvahy o ustavení dynamické rovnováhy v elektrodovém ději.

Pro elektrodový děj $ox + ne^- \rightleftharpoons red$ platí rovnice v následujícím tvaru:

$$E = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{red}}{a_{ox}} = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}, \text{ kde je}$$

E - elektrický potenciál elektrody

E⁰ – standardní elektrodový (redoxní) potenciál

R – molární plynová konstanta (8,314 J/K.mol)

T – teplota v K (teplota ve °C + 273,15)

z – počet vyměněných elektronů

F – Faradayova konstanta (96485 C/mol)

a – aktivita oxidované nebo redukované formy

Někdy se rovnice uvádí ve zjednodušené podobě a s dekadickým logaritmem (platí pro 25 °C):

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{z} \log \frac{a_{red}}{a_{ox}} = E^0 + \frac{0,0592}{z} \log \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

U zředěných roztoků se místo aktivity používá molární koncentrace.

Měření redoxního (oxidačně-redukčního) potenciálu (ORP)

ORP je potenciál roztoku v mV způsobený oxidovanými a redukovánými formami složek, které jsou přítomné ve vodném roztoku. Měří se jako rozdíl potenciálu článku, který sestává z inertní indikační (měrné) elektrody a elektrody referenční (srovnávací). Při měření ORP se obvykle používá platinová a chloridostříbrná elektroda.

Absolutní potenciál samotného článku nelze měřit. Používají se proto relativní hodnoty potenciálu elektrod vzhledem k dohodnutému standardu, kterým je tzv. standardní vodíková elektroda (SHE). Její potenciál se považuje při všech teplotách za nulový. Proto se ke změřené hodnotě ORP proti srovnávací elektrodě musí přičíst potenciál referenční elektrody proti SHE, který např. pro AgCl/Ag⁺ s 3M Cl⁻ při 25 °C činí 207 mV:

$$E_H = E_M + E_{ref}, \text{ kde}$$

E_H = potenciál vztažený k SHE

E_M = změřený potenciál

E_{ref} = potenciál referenčního systému vztažený k SHE.

V redoxních reakcích často figurují protony, takže je zřejmé, že standardní redoxní potenciál je ovlivněn hodnotou pH. Hodnota E^0 se stává se zvyšující se hodnotou pH negativnější, a to asi o - 60 mV/jednotku pH. Proto se zjištěný ORP koriguje na hodnotu pH a vyjadřuje se jako tzv. relativní protonové (vodíkové) skóre (rH). Vliv hodnot pH na naměřený redoxní potenciál lze vyjádřit z upravené Nernstovy rovnice (Nernst-Clarkovy rovnice) za daných podmínek ($T = 298,15 \text{ K}$, $R = 8,314 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$, $F = 96500 \text{ C/mol}$) následujícím způsobem:

$$E = E_{H_3O^+/H_2}^0 + \frac{RT}{2F} \ln \frac{c_{H_3O^+}^2}{c_{H_2}}$$

$$E = \frac{RT}{2F} \ln \frac{c_{H_3O^+}^2}{c_{H_2}} = 0,0296 \cdot \log \frac{c_{H_3O^+}^2}{c_{H_2}}$$

$$E = 0,0591 \cdot \log c_{H_3O^+} - 0,0296 \cdot \log c_{H_2}$$

$$E = -0,0591 \cdot \mathbf{pH} + 0,0296 \cdot \mathbf{rH}$$

$$\mathbf{rH} = \frac{E + 0,0591 \cdot \mathbf{pH}}{0,0296} = \frac{E[\text{mV}]}{30} + 2 \cdot \mathbf{pH}$$

$$\mathbf{rH} = \frac{E[\text{mV}] + E_{Ag/AgCl}[\text{mV}]}{30} + 2 \cdot \mathbf{pH}$$

Po korekci na chloridostříbrnou elektrodu je konečný výraz pro rH skóre následující:

$$\mathbf{rH} = \frac{E[\text{mV}] + 200}{30} + 2 \cdot \mathbf{pH}$$

kde rH = (0; 42) a střední bod je 28.

EXPERIMENTÁLNÍ A DEMONSTRAČNÍ ČÁST

Náplň a cíle úlohy

Studenti by se během laboratoře měli seznámit s těmito dovednostmi a osvojit si je:

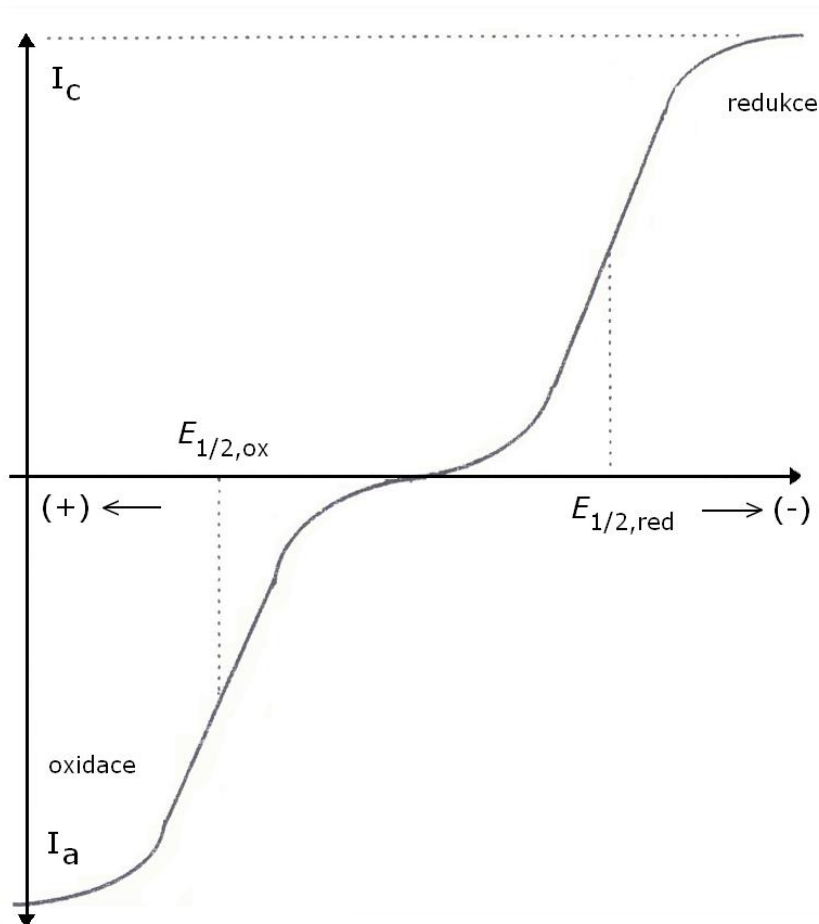
- výběr a příprava vhodné mobilní fáze pro HPLC-ELD na RP kolonách - složení, čistota, organická složka, pH, iontová síla (elektrolyt), odstranění kyslíku, požadavky na vlastnosti HPLC systému (inertnost, pasivace), čistota solí, použití pufrů (elektrolytů) v závislosti na složení mobilní fáze (rozpuštěnost solí v organické složce)
- aplikace jednotlivých druhů pracovních elektrod – vhodnost pro konkrétní analyty, tolerance k pH, uspořádání a rozměry cely, referenční elektrody
- optimalizace odezvy detektoru výběrem vhodného vloženého napětí na pracovní elektrodě – vztaheno ke složení separované směsi – selektivita, citlivost, snížení šumu signálu; určení půlvlnových potenciálů ($E_{1/2}$)
- módy měření amperometrického detektoru – (i) měření proudu za konstantního napětí, (ii) skenovací mód a (iii) pulsní mód; aplikace jednotlivých módů pro konkrétní účely
- spolehlivé měření redoxního potenciálu (ORP) ve vzorcích (extraktech) potravin
- troubleshooting – řešení chybových a nefunkčních situací během měření jak v systému HPLC-PDA-ELD, tak při měření ORP.

Parciální úlohy

Studenti (laboratorní skupina) experimentálně provedou několik dílčích úloh z níže uvedených, a to podle pokynů vyučujícího. Výsledky jiných úloh budou demonstrovány vyučujícím. Mezi dílčí úlohy patří:

A. HPLC-PDA-ELD

- tvorba voltametrické křivky pro čistý cílový analyt prostřednictvím série nástřiků při krokově se měnícím pracovním napětí od 0,1 V až 0,9 V po 0,05 V (0,1 V) podle pokynů vyučujícího
- tvorba voltametrické křivky pro čistý analyt jeho rozpuštěním v mobilní fázi FIA analýzou ve skenovacím módu detektoru
- stanovení L-askorbové kyseliny nebo jiných cílových analytů o koncentraci např. 0; 0,1; 1; 10; 100 mg/100 ml metodou HPLC-ELD ($E_a = 0,8$ V).
- posouzení rozdílů v selektivitě a hodnotách LOQ cílových analytů ve vybraných vzorcích analyzovaných metodou HPLC-ELD při různých pracovních napětích (+0,8 V, +0,5 V a +0,2 V)
- porovnání kalibračních křivek získaných pro konkrétní analyt z odezvy elektrochemického a PDA detektoru (detektor s diodovým polem).
- srovnání stupně separace a LOQ pro L-askorbovou kyselinu a další cílové analyty z chromatografických záznamů testovaných vzorků získaných metodami HPLC-ECD a HPLC-PDA.



Voltametrická křivka

B. Měření ORP (rH)

Měření redoxního potenciálu probíhá za použití kombinované *Pt* a *Ag/AgCl, Cl⁻ sat.* elektrody napojené na voltmetr. Kalibrace je provedena použitím dvou standardních redoxních roztoků s ORP 220 mV a 465 mV při 25 °C. Elektrody jsou při měření vloženy do 50ml Erlenmeyerovy baňky nebo kádinky, kde je alespoň 20 ml vzorku (roztoku standardu). Před měřením je odstraněn kyslík (vzduch) vložení na 10 min do ultrazvukové lázně, event. 10min aplikací proudu N₂. Vzorek je měřen po dobu, než je dosažen stabilní potenciál (min. 20 min při 25 °C). Stabilními podmínkami se míní změna menší než 1 mV během 3 min. Další úlohy:

- kalibrace pH elektrody
- stanovení hodnot ORP pro vzorky (jejich extrakty) a roztoky čistých redoxně aktivních látek; 18 MΩ voda, bez užití ultrazvuku a s užitím ultrazvuku pro eliminaci rozpuštěného kyslíku; např. stanovení oxidačně-redukčního potenciálu roztoků L-askorbové kyseliny o koncentraci 0; 0,1; 1; 10; 100 mg/100 ml.
- stanovení hodnot pH pro vzorky (jejich extrakty) a roztoky čistých redoxně aktivních látek
- výpočet hodnot rH skóre pro vzorky (jejich extrakty) a roztoky čistých redoxně aktivních látek.

C. Srovnání výsledků z HPLC-ELD a ORP

- korelace ELD odezvy (při $E = 0,8$ V) pro vzorky (jejich extrakty), vyjádřené jako plocha odezvy, resp. v koncentračních ekvivalentech gallové kyseliny (GAE) nebo Troloxu (TE) nebo $E_{1/2}$ u konkrétních látek s příslušnými zjištěnými hodnotami rH skóre.

Analyty

- L-askorbová kyselina
- rutin
- kvercetin
- kávová kyselina
- skořicová kyselina
- norfuraneol
- Trolox
- gallová kyselina
- glukosa, fruktosa, sacharosa aj. cukry
- další.

Analyzované vzorky

- víno, svažené víno (zahřáté - var 20 min pod zpětným chladičem)
- ovocné a zeleninové šťávy
- ovocné sirupy a extrakty
- černý a zelený čaj (2 g čaje/100 ml nálevu – navážka přesně na 3 platné cifry)
- pivo odplyněné (10 min na ultrazvuku)
- limonády (různé stáří)
- další vzorky s předpokládaným významným zastoupením redukujících látek, vč. vybraných nutraceutik.

Příprava vzorků

A. Stanovení L-askorbové kyseliny aj. redukujících látek metodou HPLC-PDA-ELD a měření rH skóre

Do centrifugační zkušavky se naváží příslušné množství vzorku (2 g pro vzorky plodů, šťávy a sirupy, nebo podle pokynů vyučujícího) s přesností na 3 platné cifry a smíchá se s 23 ml 2 % kyseliny *meta*-fosforečné. Směs se míchá 5 min na orbitální třepačce při 250 rpm, potom se vloží na 5 min do ultrazvukové lázně a nakonec se 5 min odstředuje při 20 °C a 15 000 rpm. Supernatant se přefiltruje pomocí plastové stříkačky a nylonového mikrofiltru (0,45 μm) do tmavé vialky a následně se analyzuje metodou HPLC-PDA-ELD. Alikvot takto připravených vzorků se použije také pro měření ORP.

Podobně lze měřit další látky podle pokynů vyučujícího – např. kvercetin, rutin, skořicovou kyselinu, kávovou kyselinu, norfuraneol atd. po naměření příslušných kalibračních křivek (např. 10 mg/100 ml, 1 mg/100 ml, 0,1 mg/100 ml).

B. Určení změn ORP a koncentrací elektrochemicky aktivních látek v zahříváných reakčních směsích cukrů – tvorba reduktonů

Zjišťuje se změna potenciálů před a po zahřevu modelových systémů sacharidů s β-alaninem. V kontrolních experimentech jsou použity sacharidy a jejich deriváty (D-sorbitol, 2-deoxy-D-glukosa a D-xylytol), které se neúčastní Maillardovy reakce, tedy látky neschopné vytvářet Amadoriho sloučeniny a následně reduktony. Zároveň se reakční směsi analyzují metodou HPLC-PDA-ELD a stanovuje se celkový nárůst EL odezvy a koncentrace norfuraneolu nebo dihydrohydroxymaltolu. Konkrétní zadání poskytne vyučující.

Instrumentace a podmínky stanovení

A. HPLC se sériově zapojenými detektory fotodiodového pole a elektrochemickým

Analýza se provádí na kapalinovém chromatografu firmy WATERS (Milford, MA, USA) se dvěma vysokotlakými pumpami 515 HPLC PUMP v binárním uspořádání. Pro současné stanovení měřených analytů je použit detektor s fotodiodovým polem (PDA) WATERSTM996 se sériově zapojeným elektrochemickým detektorem (ECD) WATERSTM 2465 s průtokovou celou 3 mm Gold WEs, Hy-REFTM o objemu 0,08 μ l. Další podmínky analýzy jsou uvedeny v Tabulce. Pro stanovení redukční kapacity byla použita odezva elektrochemického detektoru při pracovním napětí elektrody $E_a = 0,8$ V.

Tabulka (podmínky měření mohou být upřesněny vyučujícím).

Kolona	Atlantis® dC18 o rozměrech 150 x 3,9 mm a zrněním 3 μ m		
Mobilní fáze	A – voda: acetonitril 94:6 (v/v) s 20mM LiClO ₄ B – acetonitril : voda 94:6 (v/v) s 20mM LiClO ₄		
Průtok	0,7 ml/min		
Nástřiková smyčka	20 μ l		
Gradient			
Čas (min)	Průtok (ml/min)	A (%)	B (%)
0	0,7	100	0
5	0,7	100	0
17	0,7	75	25
20	0,7	55	45
24	0,7	0	100
26	0,7	0	100
28	0,7	100	0

B. Redoxní elektroda

Měření redoxních potenciálů probíhalo na kombinované skleněné redoxní elektrodě SenTix ORP (fy WTW) s voltmetrem. Jako referenční elektrolyt byl použit 3mol.l⁻¹ roztok KCl.

PROTOKOL

- 1) Úvod – skupina, studenti.
- 2) Použité početní vzorce, příklady u všech typů výpočtů, tabelované výsledky, obrazová dokumentace.
- 3) Zaznamenané všechny odchylky od původního postupu, plánované i neplánované
- 4) Diskuse výsledků, porovnání jednotlivých vzorků a metod, porovnání s daty předloženými vyučujícím.
- 5) Závěr.

Pozn. Mimo diskusi a závěr nemusíte uvádět žádný souvislý text s postupy práce ani principy využitých technik.