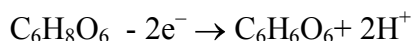


14. PRŮTOKOVÁ CHRONOPOTENCIOMETRIE

Stanovení kyseliny askorbové $C_6H_8O_6$

V coulometrii a chronopotenciometrii se měří elektrický náboj potřebný k úplné přeměně stanovované látky na jinou formu v rozdílném oxidačním stupni.

Při stanovení kyseliny askorbové se měří náboj potřebný na úplný průběh kvantitativní oxidace kyseliny askorbové na dehydroaskorbovou kyselinu uvnitř porézní uhlíkové elektrody E53C pomocí konstantního proudu.



14.1. Příprava zásobního roztoku kyseliny askorbové

$$c(C_6H_8O_6) = 100 \text{ mg/l}$$

$$M(C_6H_8O_6) = 147,13 \text{ g/mol}$$

tj. $m(C_6H_8O_6) = 50 \text{ mg} \rightarrow$ převést do $V_0 = 500 \text{ ml}$, doplnit dest. H_2O

14.2. Příprava kalibračních roztoků kyseliny askorbové

Ze zásobního roztoku $C_6H_8O_6$ o $c = 100 \text{ mg/l}$ připravit do 50 ml odm. baněk následující koncentrace kyseliny askorbové, doplnit po rysku elektrolytem R-020T ($NaCl < 1\%$, $C_2H_4C_2 \cdot 2H_2O < 1\%$, Triton X100 $< 1\%$, dest. H_2O).

| č. | c (mg/l) | V_{pip} (ml) | $\Delta\tau/\Delta E$ (counts) |
|----|----------|----------------|--------------------------------|
| 1. | 10 | 5 | |
| 2. | 20 | 10 | |
| 3. | 30 | 15 | |
| 4. | 40 | 20 | |
| 5. | 50 | 25 | |
| 6. | 60 | 30 | |

14.3. Příprava neznámého vzorku

Tabletu zvážit \rightarrow rozpustit v cca 25 ml dest. H_2O a přefiltrovat do 100 ml odm. baňky + H_2O

↓

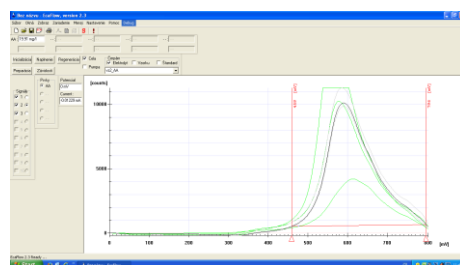
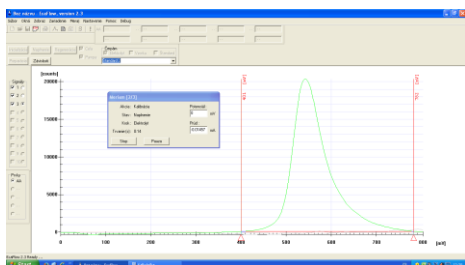
pipetovat 5 ml do 50 ml odm. baňky + dest. H_2O

↓

pipetovat 10 ml do 50 ml odm. baňky + elektrolyt R-020T (změřit 3x, příp. 6x)

Postup měření $C_6H_8C_6$ pomocí EcaFlow 150GLP

1. Spustit program EcaFlow Autosampler
2. *Nastavení* → *Parametry* → *Všeobecné* → zvolit číslo metody – metoda č.36 Ascorbic Acid a vybrat mód měření *Bezkalibračně*, mód měření pozadí *Před každým měřením*
3. *Nastavení* → *Parametry* → *Měření* → změnit hodnotu průtoku na 6 ml/min
4. *Nastavení* → *Parametry* → *Kalibrace* → rozkliknout modré políčko a změnit jednotky na mg/l
5. *Nastavení* → *Parametry* → *Vzorky* → *Přidat* → v zobrazené tabulce uvést číslo nádoby, název (kód) vzorku, počet opakování (1x) a zatrhnout *Analyzuj* → OK
6. Barevně označené hadičky ponořit do příslušných roztoků:
 - modrá hadička → roztok základního elektrolytu R-020T (dle aplikač. listu)
 - červená hadička → roztok blanku (elektrolyt R-020T)
 - žlutá hadička → roztok $C_6H_8C_6$
7. Přítlačné rameno peristaltického čerpadla přitlačit (zacvaknout) k hadičce
8. Pod držák filtru umístit kádinku → kliknout na možnost *Naplnění*
9. Po naplnění systému elektrolytem odstranit kádinku a zapojit hadičky celý
10. Stisknout možnost *Preparace* (příprava elektrody k měření)
11. Spustit měření → **!** a *Start*
12. Naměřenou křivku porovnat se vzorovým záznamem v aplikačním listě. Pokud záznam vyhovuje (kontrola porézní uhlíkové elektrody) lze přistoupit k analýze vzorku a měření kalibračních závislostí



13. *Nastavení* → *Parametry* → *Všeobecné* → vybrat mód měření *Kalibrační přímka*, mód měření pozadí *Před každým měřením*
14. *Nastavení* → *Parametry* → *Kalibrace* → vypsat políčka *Kalibrační přímky Cstd1, Cstd2, Cstd3* (první tři kalibrační roztoky)
15. *Nastavení* → *Parametry* → *Vzorky* → *Přidat* → v zobrazené tabulce uvést číslo nádoby, název (kód) vzorku, počet opakování měření standardů (1x), počet opakování měření vzorku (3x) a zatrhnout *Analyzuj* → OK, pravým tlačítkem zrušit měření srovnávacího vzorku (předchozí vzorek)
16. Spustit měření → **!**, označit měření standardů a stlačit *Start*
17. Po ukončení měření → *Nastavení* → *Parametry* → *Vzorky* → pravým tlačítkem zrušit měření prvních tří kalibračních roztoků → OK → spustit měření → **!**, označit měření

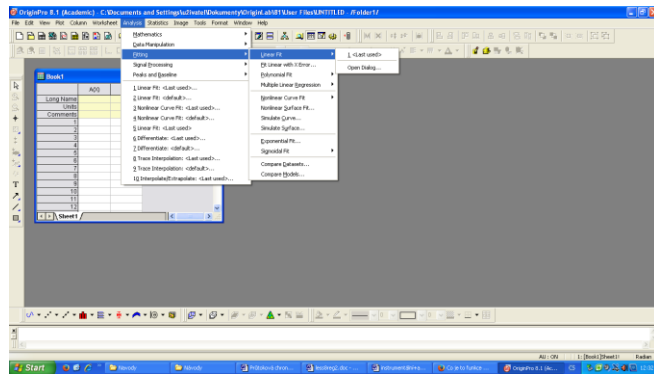
vzorků a stlačit *Start*

18. Uložit naměřená data → File → Export

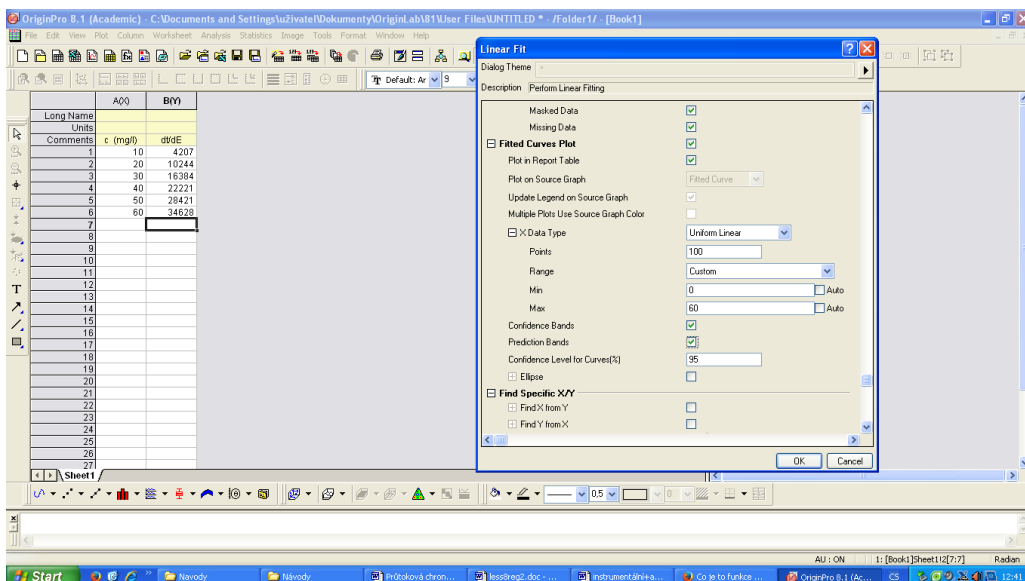
19. Hodnoty uložené v PC převést do souboru v Excelu, sestavit kalibrační závislost $f(c) = \Delta\tau/\Delta E$.

Stanovení limitu detekce a meze stanovitelnosti pomocí programu OriginPro 8.1.

1. Spustit program OriginPro 8.1.
2. Do sloupceku **A(X)** napsat hodnoty, které leží na ose x (např. koncentrace). Do sloupceku **B(Y)** napsat hodnoty, které mají být vyneseny na ose y (např. $\Delta\tau/\Delta E$). Program OriginPro 8.1 je kompatibilní s Excelem, hodnoty tedy lze nakopírovat z excelovského souboru. Vyplnit názvy sloupců v řádku *Comments* (koncentrace, $\Delta\tau/\Delta E$).
3. Hodnoty, ze kterých má být vytvořen graf označit → na horní liště → *Analysis* → *Fitting* → *Linear Fit* (předpokládáme lineární závislost) → *Open Dialog ...*



4. V nově otevřeném okně „Linear Fit“ → *Fitted Curves plot* → zakliknout *Confidence bands* (pásky spolehlivosti) a *Prediction bands*. Škálu „Range“ zvolit *Custom* (běžnou) a minimální hodnotu nastavit na 0 (v případě, že chceme bod [0,0] → poté *OK*.



- V pracovním sešitu „BOOK1“ se vytvoří dva nové listy – *FitLinear1* a *FitLinearCurve1*.
- Otevřít list *FitLinearCurve1* → zde jsou souřadnice bodů lineární závislosti i jednotlivých pásů. **Limit detekce** odečíst následujícím způsobem:

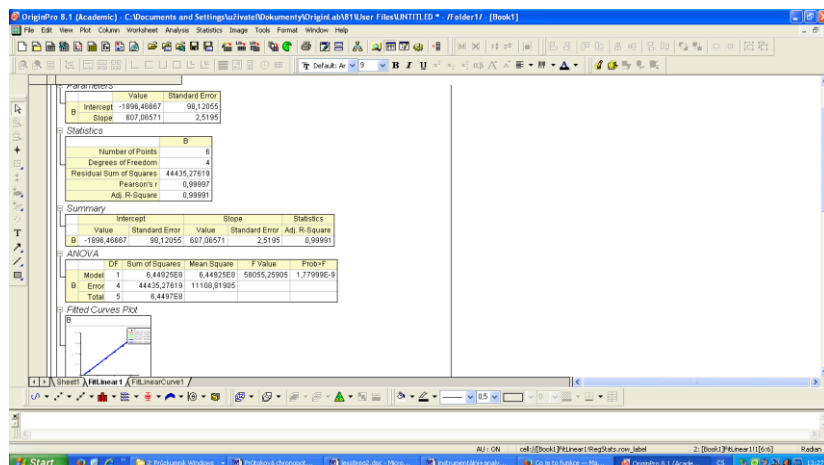
| Long Name | A1(Y1) | A2(Y1) | A3(Y1) | A4(Y1) | A5(Y1) | A6(Y1) | A7(X2) | A8(Y2) | A9(Y2) |
|-----------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|-----------|-----------|
| 0 | 0 | -1096,46667 | -2168,893 | -1624,04033 | -2296,27922 | -1496,65412 | 10 | 32,80952 | 32,80952 |
| 1 | 0,60906 | -1526,54805 | -1797,17066 | -1259,92544 | -1925,77856 | -1131,31755 | 20 | -0,84762 | -0,84762 |
| 2 | 1,21212 | -1166,92444 | -1425,48156 | -895,79732 | -1565,30555 | -765,95233 | 30 | 66,49524 | 66,49524 |
| 3 | 1,81818 | -792,71082 | -1053,78627 | -531,65538 | -1194,86375 | -400,5579 | 40 | -165,1619 | -165,1619 |
| 4 | 2,42424 | -424,79221 | -682,0854 | -167,49901 | -814,45072 | -35,13369 | 50 | -35,91905 | -35,91905 |
| 5 | 3,0303 | -56,87359 | -310,4196 | 196,87241 | -444,08805 | 330,32086 | 60 | 100,52381 | 100,52381 |
| 6 | 3,63636 | 311,04502 | 61,23046 | 560,85958 | -73,71631 | 695,80035 | | | |
| 7 | 4,24242 | 676,96384 | 432,86407 | 925,06221 | 296,8039 | 1061,32337 | | | |
| 8 | 4,84848 | 1046,98225 | 804,48046 | 1269,29405 | 666,89199 | 1426,87261 | | | |
| 9 | 5,45455 | 1414,80087 | 1176,07883 | 1653,5229 | 1037,14735 | 1792,45438 | | | |
| 10 | 6,06061 | 1782,71948 | 1547,65834 | 2017,78062 | 1407,36937 | 2158,08959 | | | |
| 11 | 6,66667 | 2150,6381 | 1919,2181 | 2392,05809 | 1777,55743 | 2523,71976 | | | |
| 12 | 7,27273 | 2518,55671 | 2290,75716 | 2746,35626 | 2147,71091 | 2889,40251 | | | |
| 13 | 7,87879 | 2886,47532 | 2662,27451 | 3110,67614 | 2517,82919 | 3255,12146 | | | |
| 14 | 8,48485 | 3254,39394 | 3033,76809 | 3475,01879 | 2887,91162 | 3620,87626 | | | |
| 15 | 9,09091 | 3622,31255 | 3405,23978 | 3839,38533 | 3257,95757 | 3986,66754 | | | |
| 16 | 9,69697 | 3990,23117 | 3776,66539 | 4203,77695 | 3627,96639 | 4352,49595 | | | |
| 17 | 10,30303 | 4358,14978 | 4148,10464 | 4568,19483 | 3997,93744 | 4718,38213 | | | |
| 18 | 10,90909 | 4726,0684 | 4519,48621 | 4932,64059 | 4367,87007 | 5084,26672 | | | |
| 19 | 11,51515 | 5093,98701 | 4890,85866 | 5297,11536 | 4737,76363 | 5450,15039 | | | |
| 20 | 12,12121 | 5461,90563 | 5262,1905 | 5661,62075 | 5107,61747 | 5816,19379 | | | |
| 21 | 12,72727 | 5829,82424 | 5633,48014 | 6026,15935 | 5477,43092 | 6182,21756 | | | |
| 22 | 13,33333 | 6197,74286 | 6004,75586 | 6390,72985 | 5847,20334 | 6548,28237 | | | |
| 23 | 13,93939 | 6565,66147 | 6375,98589 | 6755,33705 | 6216,93408 | 6914,38887 | | | |
| 24 | 14,54545 | 6933,58009 | 6747,17821 | 7119,89186 | 6586,62247 | 7280,53771 | | | |

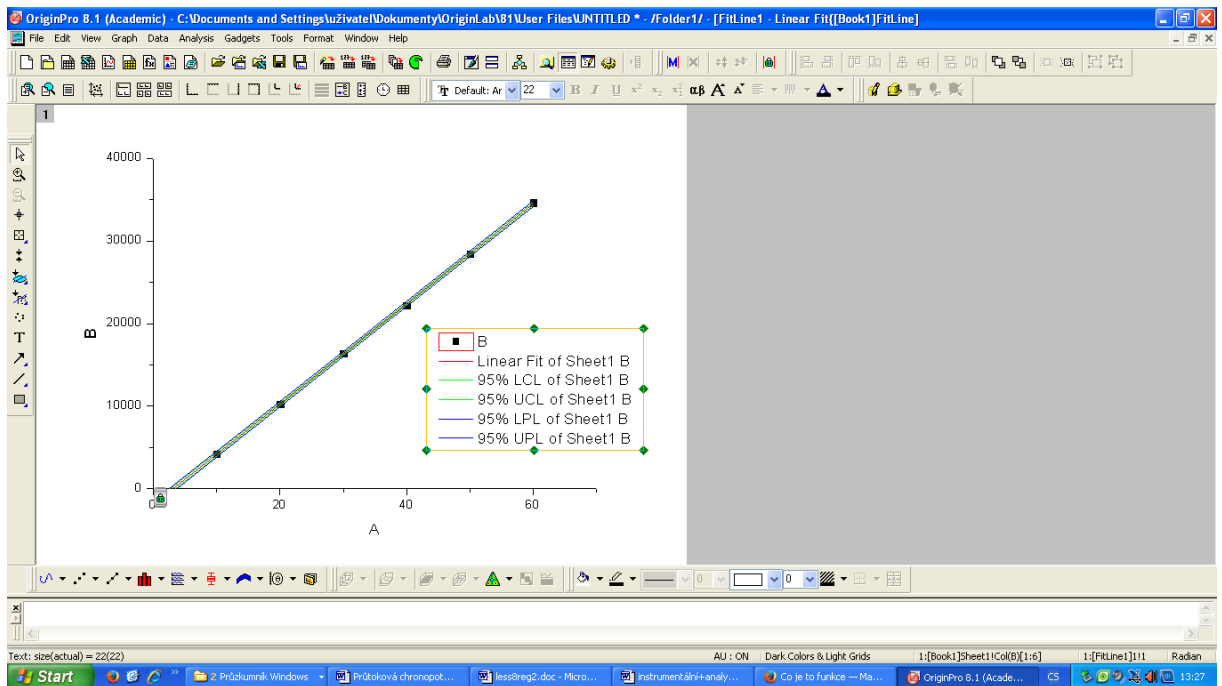
Nejprve se podíváme na hodnoty ve sloupci **A6(Y1)**, který obsahuje hodnoty „horního“ predikčního pásu (nad kalibrační přímkou) a zjistíme první hodnotu v tomto sloupečku (např. v uvedené tabulce je to číslo -1496,65412). Poté se podíváme do sloupečku **A5(Y1)**, který obsahuje hodnoty „dolního“ predikčního pásu (pod kalibrační přímkou). V tomto sloupečku budeme hledat hodnotu, která se nejvíce blíží číslu nalezenému ve sloupci **A6(Y1)**. Tato hodnota odpovídá nejnižšímu možnému signálu analytu (vynesen na ose y), který lze detekovat.

Pro nás je ale nejdůležitější zjistit, která hodnota na ose x tomuto signálu odpovídá. Tuto hodnotu naleznete ve sloupečku **A1(X1)** (v tomto sloupečku jsou vyneseny hodnoty osy x – v našem případě koncentrace). Hodnota LOD se bude nacházet na stejném řádku jako číslo nalezené ve sloupci **A5(Y1)**.

- V listu *FitLinear1* v horní tabulce jsou zapsány hodnoty úseku (*Intercept*) a směrnice (*Slope*) kalibrační přímky.

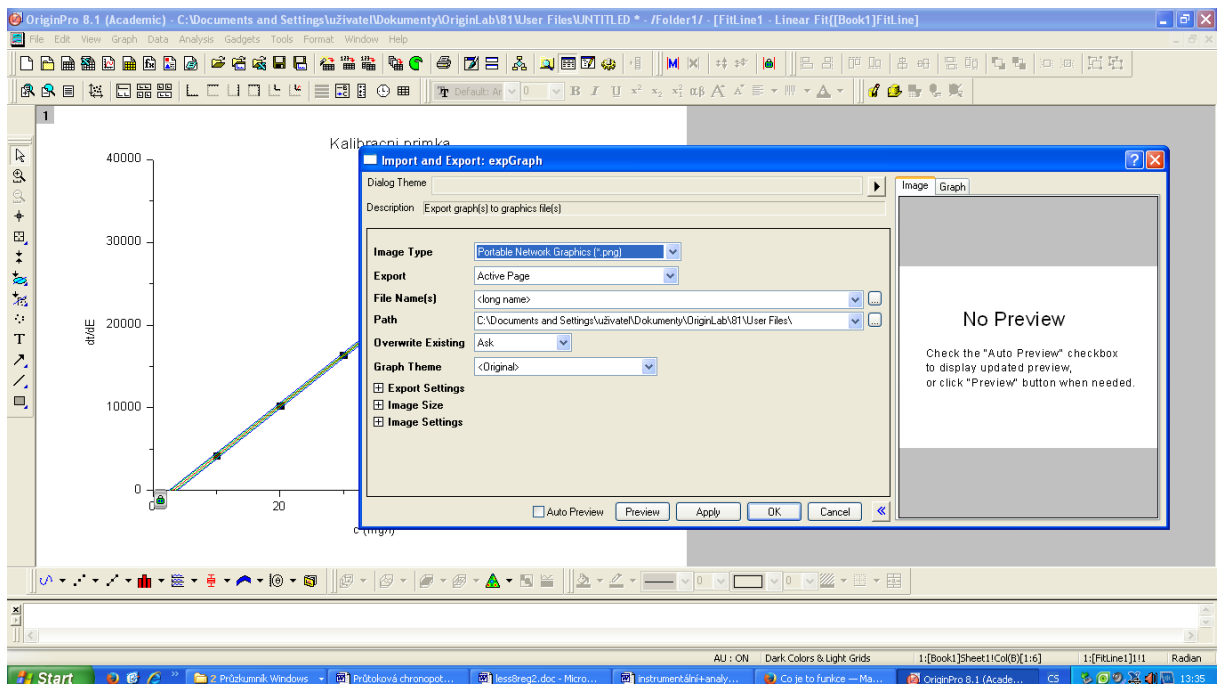
Pokud 2x kliknete na graf „Fitted Curves plot“, graf se zvětší na celé okno a lze ho dále upravovat (popsat osy, změnit legendu, ...)





Pro export grafu postupujte následovně: *File* → *Export Graphs* → *Open dialog ...*

V novém okně je nutné zvolit **typ obrázku** – *Image type* (jpg, png, ...), do pole *File Name* napsat jméno, do pole *Path* zvolit místo umístění obrázku (např. Plocha – desktop) → *OK*.



Poznámka:

Pokud jsou píky symetrické, jako kvantitativní ukazatel obvykle používáme výšku v maximu píku. Pokud chceme pracovat přesněji, měříme plochu píku.. Pro zjištění plochy nejjednodušeji postupujeme tak, že pik aproximujeme trojúhelníkem, protože pak pro výpočet plochy plochy můžeme použít vzorec pro výpočet obsahu trojúhelníku.

Přesnější postupy jsou mechanická integrace (planimetrie) nebo vážení vystřihaných píků.