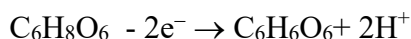


14. PRŮTOKOVÁ CHRONOPOTENCIOMETRIE

Stanovení kyseliny askorbové C₆H₈O₆

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

$$c(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) = 100 \text{ mg/l}$$

$$M(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) = 147,13 \text{ g/mol}$$

tj. $m(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) = 50 \text{ mg} \rightarrow$ převést do $V_0 = 500 \text{ ml}$, doplnit dest. H₂O

14.2. Příprava kalibračních roztoků kyseliny askorbové

Ze zásobního roztoku C₆H₈O₆ o $c = 100 \text{ mg/l}$ připravit do 50 ml odm.baněk následující koncentrace kyseliny askorbové, doplnit po rysku elektrolytem R-020T (NaCl < 1%, C₂H₄C₂ · 2H₂O < 1%, Triton X100 < 1%, dest. H₂O).

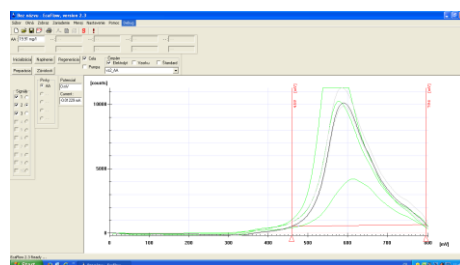
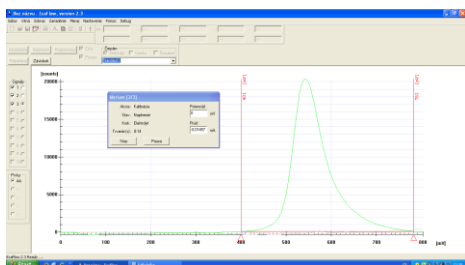
č.	c (mg/l)	V _{pip} (ml)	Δτ/ΔE (counts)
1.	10	5	
2.	20	10	
3.	30	15	

14.3. Příprava neznámého vzorku

Tabletu zvážíme a rozpustíme v cca 25 ml dest. H₂O, poté přefiltrujeme do 100 ml odm.baňky a doplníme dest. H₂O. Z takto připraveného zásobního roztoku pipetujeme 5 ml do 50 ml odm.baňky, doplníme po rysku dest. H₂O. Následně z tohoto zředěného roztoku pipetujeme 10 ml do 50 ml odm.baňky a doplníme elektrolytem R-020T (*změřit 5x; provést statistické vyhodnocení*).

Postup měření C₆H₈C₆ 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 C₆H₈C₆
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 cely
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* → vypsát 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

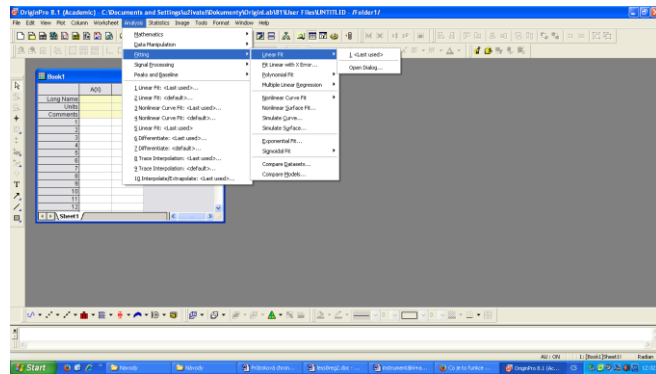
vzorků a stlačit *Start*

18. Uložit naměřená data → File → Export

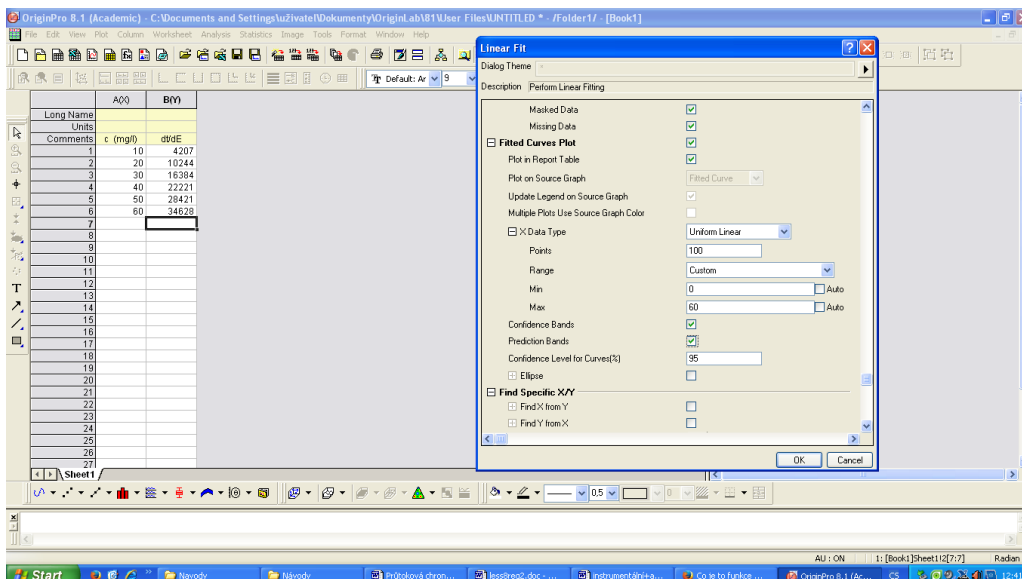
19. Hodnoty uložené v PC převést do souboru v Excelu, sestavit kalibrační závislost $f(c) = \Delta\tau/\Delta E$.

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:

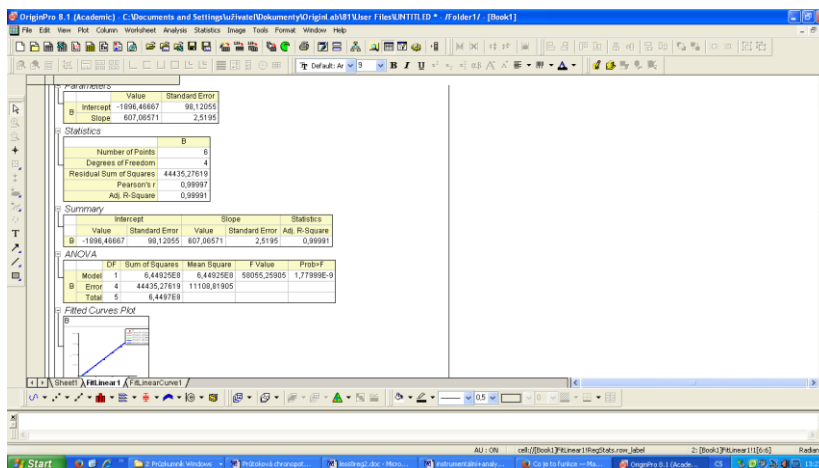
Long Name	A1(X1)	A2(Y1)	A3(Y1)	A4(Y1)	A5(Y1)	A6(Y1)	A7(X2)	A8(Y2)	A9(Y2)
Parameters									
0		-1898,48687	-2168,893	-1624,04033	-2298,27922	-1496,65412	10	32,80952	32,80952
1	0,60806	-1528,54805	-1797,17066	-1259,92544	-1925,77856	-1131,31755	20	-0,84762	-0,84762
2	1,21212	-1168,62844	-1425,46156	-895,79732	-1555,10655	-765,95233	30	86,49524	86,49524
3	1,81818	-792,71982	-1053,79827	-529,65938	-1194,96375	-400,5579	40	-165,1619	-165,1619
4	2,42424	-424,79221	-682,0854	-167,49901	-814,45072	-35,13369	50	-35,81905	-35,81905
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	695,80935			
7	4,24242	676,96384	432,86407	925,06221	296,8039	1061,32337			
8	4,84848	1048,98225	804,48046	1289,28405	666,89199	1426,87251			
9	5,45455	1414,80087	1176,07683	1653,5229	1037,14735	1792,45438			
10	6,06061	1782,71948	1547,65834	2017,78082	1407,36937	2158,08959			
11	6,66667	2150,6391	1919,2181	2392,05809	1777,55743	2523,71976			
12	7,27273	2518,55871	2290,75716	2746,35626	2147,71091	2889,40251			
13	7,87879	2886,47832	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	3839,35833	3257,95757	3986,66754			
16	9,69697	3990,23117	3776,86539	4203,77695	3627,96639	4352,49595			
17	10,30303	4358,14978	4148,10464	4568,19483	3997,93744	4718,36213			
18	10,90909	4726,0684	4519,48621	4932,64059	4367,87007	5084,26672			
19	11,51515	5093,98701	4890,85866	5297,11536	4737,78363	5450,21039			
20	12,12121	5461,90563	5262,1905	5661,62075	5107,61747	5816,19379			
21	12,72727	5829,82424	5633,48014	6026,15035	5477,43062	6182,21756			
22	13,33333	6197,74286	6004,75586	6390,72985	5847,20334	6548,25237			
23	13,93939	6565,66147	6375,98589	6755,33705	6216,93408	6914,38887			
24	14,54545	6933,58009	6747,17821	7119,88186	6586,62247	7280,53771			

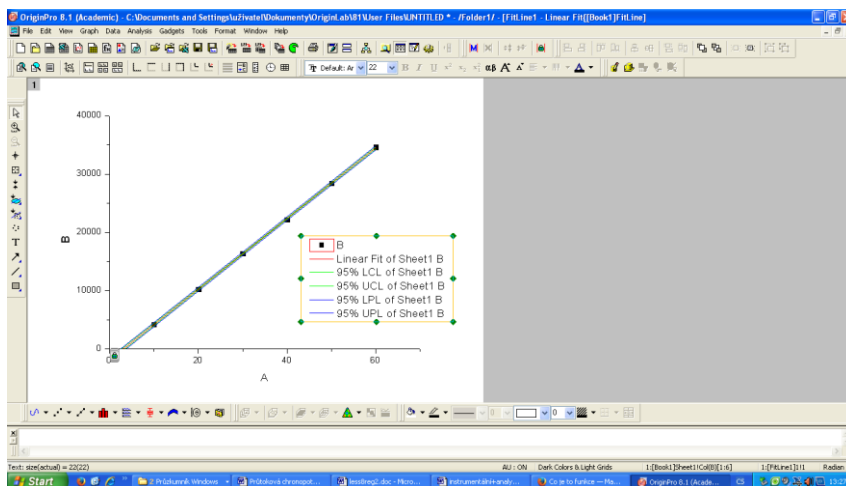
Nejprve se podíváme na hodnoty ve sloupci **A6(Y1)**, který obsahuje hodnoty „horního“ predikčního pásu (nad kalibrační přímkou) a zjistíme první hodnotu v tomto sloupečku (např. v uvedené tabulce je to číslo -1496,65412). Poté se podíváme do sloupečku **A5(Y1)**, který obsahuje hodnoty „dolního“ predikčního 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.

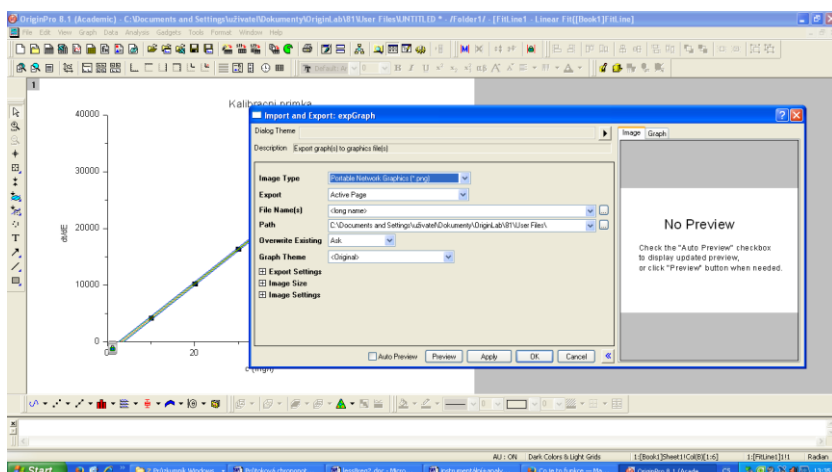
Pokud 2x kliknete na graf „Fitted Curves plot“, graf se zvětší na celé okno a lze ho dále upravovat (popsat osy, změnit legendu, ...)





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 vystříhaných píků.

14.4. Vyhodnocení analýzy

Při vyhodnocení stanovení obsahu kyseliny askorbové v neznámém vzorku v protokolu do závěru uvést:

1. **Hodnoty nalezených koncentrací kyseliny askorbové; obsah kyseliny askorbové v tableť vitamínu C zaokrouhlené na platný počet míst, vyplněné tabulky, výpočty a vyhodnocené grafy.**
2. **Statistické vyhodnocení výsledku analýz.**
3. **Zdůvodnění možného chybného stanovení.**