

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2017

**KATEŘINA
SEIDLOVÁ**



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

**Zavedení metody měření vitamínu C na
voltametrickém zařízení
eDAQ Potentiostat 466**

**Implementation of voltammetric
measurement of vitamin C on device
eDAQ Potentiostat 466**

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika
Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: Kateřina Seidlová
Vedoucí bakalářské práce: Ing. Zuzana Fílová

Kladno 2017

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2016/2017

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Kateřina Seidlová**
Obor: Biomedicínský technik
Téma: **Zavedení metody měření vitamínu C na voltametrickém zařízení eDAQ Potentiostat 466**
Téma anglicky: Implementation of voltammetric measurement of vitamin C on device eDAQ Potentiostat 466

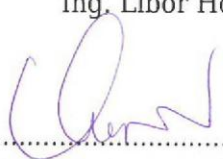
Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Navrhnete vhodné zapojení elektrochemického zařízení E-corder v biochemické laboratoři a přístroj zprovozníte. Provedte sérii měření na elektrochemickém standardu v módu cyklické voltametrie pro ověření metody. Provedte sérii voltametrických měření vitamínu C s cílem ověřit elektrochemické vlastnosti vitamínu C, klíčového antioxidantu v lidském organismu. Analyzujte vliv vnějších faktorů ovlivňujících měření. Na základě zjištění měření optimalizujte. Zhodnoťte možnosti voltametrického stanovení vitamínu C.

Seznam odborné literatury:

- [1] Fei, J., Wen, X., Zhang, Y., Yi, L., Chen, X., Cao, H. , Voltammetric determination of trace doxorubicin at a nano-titania/nafion composite film modified electrode in the presence of cetyltrimethylammonium bromide, *Microchimica acta*, ročník 164, číslo 1-2, 2009, 85-91 s.
[2] Klouda, P., *Moderní analytické metody*, ed. 2, Pavel Klouda: Ostrava, 2003, 132 s., ISBN 8086369072

Zadání platné do: 11.09.2018
Vedoucí: Ing. Zuzana Fílová
Konzultant: Ing. Libor Holík


vedoucí katedry / pracoviště


děkan

V Kladně dne 20.02.2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Zavedení metody měření vitamínu C na voltametrickém zařízení eDAQ Potentiostat 466“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně 19. 5. 2017

.....

Kateřina Seidlová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce, paní Ing. Zuzaně Fílové, za její odbornou pomoc při řešení práce a za čas, který mi věnovala při provádění měření v laboratoři. Další poděkování patří paní Ing. Martině Turchichové, která mi významně pomohla s opravami a dokončením práce.

ABSTRAKT

Zavedení metody měření vitamínu C na voltametrickém zařízení eDAQ Potentiostat 466

Bakalářská práce se zabývá zavedením měření vitamínu C (kyseliny askorbové) na voltametrickém přístroji ER466 Potentiostat od firmy eDAQ. Hlavním cílem práce je zapojení a zprovoznění přístroje v laboratoři a provedení zkušebních měření kyseliny askorbové v režimu cyklické voltametrie. Přístroj byl testován na modelové látce ferrikyanidu draselném a následně byl zkoumán vliv podmínek měření na výsledek cyklické voltametrie kyseliny askorbové. Na základě zjištěných výsledků byla metoda optimalizována na vhodné podmínky. Jako pomocný elektrolyt byl použit roztok chloridu draselného o koncentraci 0,1 mol/l. Měření bylo provedeno pomocí elektrochemického senzoru s platinovou pracovní elektrodou. Po optimalizaci metody byl sledován vliv koncentrace roztoku kyseliny askorbové a skenovací rychlosti na tvar voltamogramu a velikost proudu v píku, který přísluší sledované látce. Na základě výsledků lze potvrdit, že s rostoucí koncentrací stanovované látky v roztoku a se zvětšující se skenovací rychlostí roste výška příslušného proudového píku.

Klíčová slova

cyklická voltametrie, kyselina askorbová, optimalizace podmínek

ABSTRACT

Implementation of voltammetric measurement of vitamin C on device eDAQ Potentiostat 466

Bachelor's thesis deals with implementation of a voltammetric measurement of vitamin C (ascorbic acid) on a device ER466 Potentiostat manufactured by eDAQ. The main aim of the project is to wire and run the device in laboratory and to perform pilot measurement of ascorbic acid in cyclic voltammetry mode. The device was tested with a model compound potassium ferricyanide and then the influence of conditions on the measurement of the ascorbic acid was examined. Based on the results of the measurement suitable conditions were optimized. For the voltammetric measurement, 0.1M potassium chloride was used as a supporting electrolyte. The measurements were performed with electrochemical sensor with platinum working electrode. After optimization of the method the influence of the acid's concentration was investigated as well as the influence of the scan rate on the shape of voltammogram and the size of peak current, which corresponds with an observed substance. Based on the results of the measurement it can be confirmed that the peak current grows with increasing concentration of analyzed substance and with increasing scan rate.

Keywords

cyclic voltammetry, ascorbic acid, optimization of conditions

Obsah

Seznam symbolů a zkratk.....	9
1 Úvod	10
1.1 Přehled současného stavu.....	11
1.1.1 Elektrochemické metody	11
1.1.2 Voltametrie a polarografie.....	12
1.1.3 Polarografie	13
1.1.4 Voltametrie	16
1.1.5 Vitamin C (kyselina askorbová).....	19
1.2 Cíle práce.....	22
2 Metody	24
2.1 Měřicí soustava	24
2.1.1 Potenciostat 466 eDAQ	24
2.1.2 EChem software	25
2.1.3 Senzor	26
2.1.4 Konektor pro biochemické senzory.....	26
2.1.5 Schéma zapojení měřicí aparatury.....	27
2.2 Chemikálie	27
2.2.1 Ferrikyanid draselný (Hexakynoželezitan draselný)	27
2.2.2 Vitamin C (kyselina askorbová).....	28
2.2.3 Indiferentní elektrolyty.....	28
2.2.4 Pufř pro měření pH.....	28
2.3 Použitá metoda	29
2.3.1 Popis experimentů	29
2.3.2 Použité parametry.....	30
3 Výsledky.....	31
3.1 Cyklická voltametrie hexakynoželezitanu draselného	31
3.2 Vliv materiálu pracovní elektrody.....	33
3.3 Vliv indiferentního elektrolytu.....	34
3.4 Vliv koncentrace indiferentního elektrolytu	35
3.5 Vliv pH indiferentního elektrolytu.....	36

3.6	Vliv koncentrace kyseliny askorbové a vliv skenovací rychlosti	36
4	Diskuse	38
5	Závěr	42
	Seznam použité literatury	43
	Příloha A: Návod na provedení cyklické voltametrie na Potenciostatu 466 eDAQ.....	48
	Příloha B: Vliv pH indiferentního elektrolytu – voltamogramy	53

Seznam symbolů a zkratek

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
I_{pc}	A	Proud katodického píku
I_{pa}	A	Proud anodického píku
E_{pc}	V	Potenciál katodického píku
E_{pa}	V	Potenciál anodického píku
i_p	A	Velikost proudového píku
n	–	Počet elektronů účastnících se elektrodového děje
A	m^2	Obsah plochy elektrody
D	$m^2 \cdot s^{-1}$	Difuzní koeficient látky
c	mol/l	Koncentrace látky
v	$V \cdot s^{-1}$	Skenovací rychlost

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
AA	Ascorbic acid (kyselina askorbová)
DHA	Dehydroascorbic acid (kyselina dehydroaskorbová)
CV	Cyklická voltametrie

1 Úvod

Vitamin C je nejdůležitější vitamin pro lidskou výživu, který je tělu dodáván z ovoce a zeleniny a je široce rozšířen i v dalších rostlinných buňkách. Hlavní biologicky aktivní forma vitaminu C je kyselina askorbová (AA – ascorbic acid). V těle je kyselina askorbová oxidována za vzniku kyseliny dehydroaskorbové (DHA), která rovněž vykazuje biologickou aktivitu.

Většina obratlovců je schopna kyselinu askorbovou syntetizovat, ale některé druhy savců včetně primátů, člověka a morčat tuto schopnost nemají. Díky tomu, že lidské tělo není schopno kyselinu askorbovou vytvářet, musí být nedílnou součástí jídelníčku.

Hlavní biologické funkce této molekuly u rostlinného i živočišného metabolismu spočívají v jejích antioxidačních vlastnostech. Jedná se o silný antioxidant, který má schopnost eliminovat několik různých reaktivních forem kyslíku a působí jako kofaktor pro zachování aktivity řady enzymů udržováním kovových iontů v redukovaném stavu. Navíc hraje důležitou úlohu při odolnosti proti stresu, růstu organismu a chrání lidský organismus před různými chronickými onemocněními. [1,3,4] Nedostatek kyseliny askorbové vede k řadě onemocnění včetně známých kurdějí. [5] Přesné a specifické stanovení obsahu této látky v potravě je důležité pro pochopení vztahu mezi přijatými živinami a lidským zdravím. [2]

Voltametrie je elektroanalytická metoda odvozená od polarografie, která využívá elektrod z pevných materiálů. Jejím principem je měření proudu procházejícího zkoumaným roztokem mezi elektrodami, na které je vkládáno postupně se zvětšující napětí. Polarografii objevil český profesor Jaroslav Hejrovský, za což v roce 1959 obdržel Nobelovu cenu. Svým objevem položil základy celé voltametrie. [6]

Voltametrie se vyznačuje velmi vysokou citlivostí. Díky tomu lze s její pomocí stanovit i vzorky o velmi nízké koncentraci. Technika poskytuje výhodu v rychlé analýze a jednoduchosti a vyžaduje pouze malou nebo žádnou přípravu analyzovaného vzorku látky. Nepotřebuje žádné složité a nákladné zařízení, ani speciálně kvalifikovanou obsluhu a v porovnání s jinými technikami není příliš pracná, ani časově náročná. [7,8]

Práce se soustředí na jeden druh voltametrické techniky, na tzv. cyklickou voltametrii. Jedná se o nejrozšířenější techniku používanou pro získávání kvalitativních informací o elektrodoových dějích. Cyklická voltametrie je často vůbec první experiment, který se provádí v rámci elektroanalýzy. Během ní je na pracovní elektrodu vkládán signál trojúhelníkového průběhu. V závislosti na hledané informaci může být použit jeden nebo více cyklů. Během potenciálového cyklu měří potenciostat

procházející proud. Výsledná závislost naměřeného proudu na vkládaném napětí se nazývá cyklický voltamogram. [9]

Záznam a vyhodnocení cyklických voltamogramů se provádí pomocí speciálního laboratorního přístroje. Pro tuto práci byl použit přístroj ER466 Potentiostat od firmy eDAQ, který slouží ke sbírání, zobrazování a analýze signálu z mnoha laboratorních experimentů.

Hlavním cílem bakalářské práce je zavedení metody měření vitamínu C (kyseliny askorbové) na Potenciostatu 466. Mezi stěžejní kroky ke splnění tohoto cíle patří zapojení, zprovoznění a otestování přístroje.

1.1 Přehled současného stavu

1.1.1 Elektrochemické metody

Elektrochemické (elektroanalytické) metody vycházejí z poznatků elektrochemie. Elektrochemie je odvětví chemie zabývající se vzájemným působením elektrických a chemických účinků a zkoumá chemické změny způsobené průchodem elektrického proudu na elektrodách. Oblast elektrochemie se zabývá řadou dalších různých dějů (např. elektroforéza a koroze), zařízení (elektroanalytické senzory, baterie a palivové články) a technologií (např. galvanické pokovování a výroba hliníku a chloru).

Podstatou elektroanalytických metod je závislost elektrochemických vlastností roztoků na jejich složení a koncentraci. Zjišťování chování roztoků se provádí pomocí elektrochemického článku, který je tvořen elektrodami ponořenými do roztoku analytu. Elektrody jsou připojeny k měřicímu přístroji, který vyhodnocuje některou elektrickou veličinu. Elektrochemický článek, který je zdrojem napětí, označujeme jako galvanický. Elektrolytickým článkem označujeme takový článek, v němž dochází k elektrolýze. [10,11]

1.1.1.1 Rozdělení elektrochemických metod

První skupinou elektrochemických metod jsou metody založené na elektrodovém ději (oxidačně-redukční reakci). Patří sem

- potenciometrie, u které je elektrochemický článek v rovnovážném stavu,
- voltametrie, elektrogravimetrie, klasická polarografie a coulometrie, u kterých prochází článkem elektrický proud.

Mezi metody založené na měření elektrických vlastností roztoků spadá

- konduktometrie, při které se měří vodivost roztoků,
- dielektrometrie, která spočívá v měření kapacity. [10,12]

1.1.1.2 Význam elektrochemických metod

Rozvoj nanotechnologií v elektrochemii a použití mikro a nanoelektrod dalo silný impuls k výzkumu transportu elektronů v biologických systémech. Bioelektrochemie se stala silným zástupcem analytických metod v biomedicínském výzkumu společně s tradičními metodami „*in vivo*“ a „*in vitro*“, bioinformatikou a matematickou biologii. Byly vyvinuty vysoce citlivé elektrochemické metody pro biomedicínu, stejně tak elektrochemické senzory pro analýzu biologických objektů. [13]

1.1.2 Voltametrie a polarografie

Polarografie a voltametrie jsou elektrochemické metody, při kterých je mezi dvě elektrody ponořené do roztoku elektrolytu vkládáno měnící se elektromotorické napětí a je sledován procházející proud. Při voltametii se používají tuhé (stacionární) elektrody. V polarografii se měření provádějí pomocí rtuťové kapkové elektrody. [10,6]

1.1.2.1 Elektrody a polarizace elektrod

Ve voltametii a polarografii používáme jako měrnou (pracovní) takovou elektrodu, která je polarizovatelná (její potenciál je silně ovlivněn procházejícím proudem). Referenční (srovnávací) elektroda musí být naopak nepolarizovatelná, tedy její potenciál je jen málo závislý na hodnotě procházejícího proudu.

Polarizací se elektroda brání účinkům vloženého napětí. Polarizační napětí je dáno rozdílem potenciálů měrné a referenční elektrody. U dokonale polarizovatelné a dokonale nepolarizovatelné elektrody by se polarizační napětí rovnalo napětí vloženému.

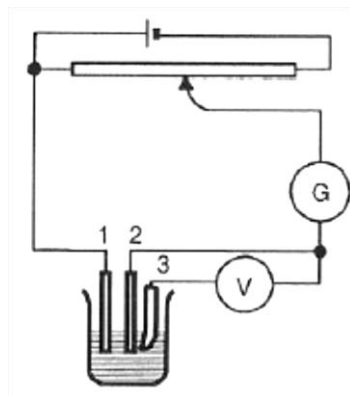
Polarizovatelná elektroda by měla mít co nejmenší povrch, aby se její polarizace mohla co nejvíce projevit. Oproti tomu nepolarizovatelná elektroda by měla mít povrch co největší, aby byla co nejméně ovlivnitelná procházejícím proudem.

K průchodu proudu a vylučování analytu na elektrodě dochází až po překročení tzv. rozkladného napětí. Vytvoříme-li na pracovní elektrodě záporný potenciál vůči referenční, elektroda je katodou. Elektrony přecházejí do roztoku, kde způsobují redukci látek. Přivedeme-li na pracovní elektrodu kladný potenciál oproti referenční, stává se anodou. Elektrony odcházejí z roztoku a látky oxidují. [10]

1.1.2.2 Zapojení elektrod

V polarografii a voltametii je nejčastěji používáno tříelektrodové zapojení (Obr. 1.1), pouze klasická polarografie využívá zapojení dvuelektrodové. První elektroda je měrná (polarizovatelná), druhá referenční (srovnávací, nepolarizovatelná) a třetí je pomocná elektroda. Jako referenční se používají elektrody II. druhu, nejčastěji argentschloridová a kalomelová. Pomocné elektrody mají větší povrch než pracovní a bývají vyrobeny z inertních materiálů jako platina a uhlík. [10,12]

Proud teče mezi pomocnou a pracovní elektrodou a potenciál pracovní elektrody je měřen mezi pracovní a referenční elektrodou. Elektrochemické reakce, které probíhají při průchodu proudu na pomocné elektrodě, sledovány nejsou. [14]



Obr. 1.1: Třielektrodové zapojení ve voltametrii a polarografii. 1 – pomocná elektroda, 2 – pracovní elektroda, 3 – referenční elektroda [10]

1.1.2.3 Děje na polarizovatelné elektrodě

Elektrolýza probíhá jen v nejbližším okolí povrchu pracovní elektrody. Transport iontů elektroaktivní látky může probíhat dvěma způsoby. Prvním z nich je difuze, která je dána koncentračním spádem, kdy ionty látky samovolně přecházejí do prostředí s nižší koncentrací v těsném okolí elektrody. Nízká koncentrace látky je zde způsobena úbytkem množství látky při elektrolýze. Druhým způsobem transportu látky je migrace způsobená průchodem proudu elektrolytem.

1.1.2.4 Indiferentní elektrolyt

Koncentrace elektroaktivní látky je závislá na její difuzi. Pro zjištění této koncentrace bychom proto měli co nejvíce potlačit migraci iontů. Z tohoto důvodu se do zkoumaného roztoku přidává tzv. pomocný (indiferentní) elektrolyt, jehož ionty přenášejí velkou část náboje, a migrace zkoumaného analytu je zanedbatelně malá. Koncentrace nosného elektrolytu by měla být přibližně stonásobná oproti elektroaktivní látce a měl by být takový, aby u něj v co největším rozmezí potenciálů nedocházelo k depolarizaci a nerušil tak stanovení. Používají se chloridy, chlorečnany, chloristany, sírany alkalických kovů a vápníku nebo soli kvartérních bází. V alkalickém prostředí je vhodný uhličitan sodný a draselný, hydroxid lithný, vápenatý a tetramethylamonný. [10,6]

1.1.3 Polarografie

Polarografie byla poprvé objevena jako metoda napětově kontrolované elektrolýzy se rtuťovou kapkovou elektrodou. Později se s vývojem jiných typů indikačních elektrod stala formálně součástí voltametrie. V současné době, více než 90 let po jejím

vzniku, nemá slovo polarografie původní význam jedné elektrochemické metody, ale představuje celé odvětví elektrochemie. Polarografie je tedy část voltametrie využívající rtuťovou kapkovou elektrodu s odkapávající rtuť. [11,6,15]

1.1.3.1 Klasická polarografie

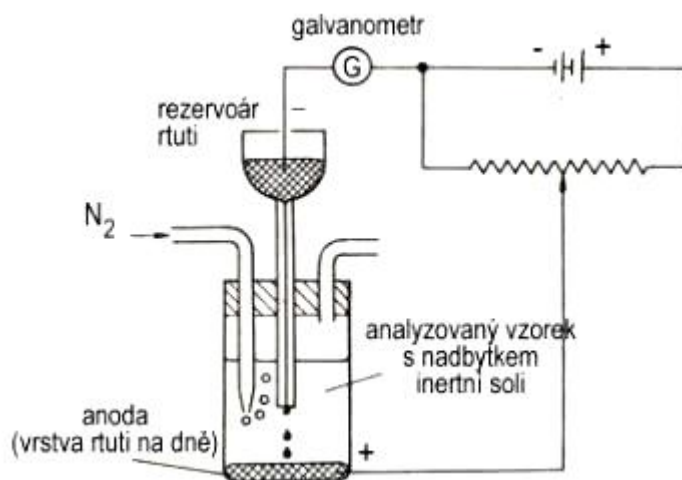
Rtuťová kapková elektroda

Klasická rtuťová elektroda s odkapávající kapkou se skládá z úzké kapiláry a zásobníku rtuti umístěného 20 až 100 cm vysoko, ve kterém se nachází vodivý platinový drát. Hotová kapka má průměr kolem jednoho milimetru. Neustálé obnovování povrchu elektrody umožňuje dokonalou reprodukovatelnost měření. Další výhodou této elektrody je, že elektrolyze podléhá jen malé množství látky. Proto je stanovení možné vícekrát opakovat s tímž vzorkem. [11,6,16,17]

Statická rtuťová kapková elektroda je automatizované zařízení, ve kterém je tok rtuti řízen ventilem. Ze zásobníku ve výšce asi 10 cm je rtuť vedena prostřednictvím kapiláry se širokým průměrem, pokud je ventil otevřen v reakci na elektrický signál. Růst se zastaví uzavřením ventilu, který zůstává na místě až do obdržení dalšího elektronického signálu. [11]

Základní zapojení v klasické polarografii

Měřený roztok je umístěn v polarografické nádobce a zasahuje do něj rtuťová kapková elektroda. Referenční elektrodu tvoří rtuťové dno vzniklé nakapanou rtuťí a zasahuje do něj platinový drátek. Citlivým galvanometrem se měří proud při vkládání zvyšujícího se napětí na rtuťovou kapkovou elektrodu. Kapková elektroda je běžně zapojena jako katoda a dochází na ní k redukci. Referenční elektroda je použita jako anoda a dochází na ní k rozpouštění rtuti na rtuťné ionty (Obr. 1.2). [10,6,17]



Obr. 1.2: Základní dvouelektrodové zapojení v klasické polarografii [18]

1.1.3.2 Polarografické (I – E) křivky a vlny

V polarografii se měří proud jako funkce potenciálu. Závislost proudu na potenciálu znázorňuje polarografická křivka. Za přítomnosti depolarizátoru (látky, která podléhá elektrodové reakci – způsobuje depolarizaci elektrody) vznikají polarografické vlny. Polohu křivky a depolarizátor charakterizuje tzv. půlvlnový potenciál, který se měří jako vzdálenost x-ové souřadnice v polovině výšky vlny od počátku souřadného systému. Tvar polarizační křivky závisí na složení roztoku. [10,6]

Na polarizační křivce rozlišujeme tři oblasti:

- a) polarizace (nabíjecí proud) – vložené napětí je nižší než rozkladné napětí, proud roztokem téměř neprochází
- b) depolarizace – po překročení rozkladného napětí se na katodě začne redukovat elektroaktivní látka (depolarizátor)
- c) limitní difúzní proud – úbytek přeměněných látek v okolí elektrody se vyrovnává difúzi, zvyšování napětí již neurychluje redukci látky, velikost limitního difúzního proudu je rovna výšce vlny [6]

1.1.3.3 Polarografické stanovení

Z polarizační křivky lze určit druh (kvalitativní údaj) a koncentraci (kvantitativní údaj) depolarizátoru. Kvalitativně lze určit depolarizátor pomocí půlvlnového potenciálu, kdy každá vlna odpovídá konkrétní elektroaktivní látce. Polarograficky lze stanovovat několik složek současně, pokud mají dostatečně rozdílné hodnoty půlvlnového potenciálu.

Koncentrace depolarizátoru je úměrná výšce příslušné vlny. Tato výška odpovídá hodnotě limitního difúzního proudu. Tento údaj se určuje porovnáním s referenční vlnou pomocí dvou metod.

První z nich je metoda kalibrační přímky, při které se u roztoků se známou rostoucí koncentrací měří závislost výšky polarografické vlny (píku) na koncentraci. Z naměřené kalibrační závislosti se následně určuje koncentrace neznámého vzorku.

Druhou metodou je metoda standardního přídavku, u které měříme dva roztoky stejného objemu. Prvním je samotný stanovovaný roztok a druhým tento stejný roztok s přídavkem známého množství stanovované látky. Rozdíl výšek polarografických vln je úměrný množství přidané látky a koncentraci stanovované látky dopočítáme. [6]

1.1.3.4 Pulzní polarografie

Normální pulzní polarografie

Normální pulzní polarografie je poměrně nový a výkonný nástroj pro zkoumání reakční adsorpce v redoxních reakcích. Adsorpce reagujících složek má za následek výskyt charakteristického maxima na polarogramu a snížení hodnoty proudu v oblasti,

kde se žádná adsorpce nevyskytuje. Teorie normální pulzní polarografie je dobře vyvinuta jak pro systémy s adsorpcí reaktantu, tak s adsorpcí produktu. [19,20]

Tato metoda využívá rtuťovou kapkovou elektrodu. Rostoucí rtuťová kapka je udržována na určitém potenciálu E_1 . V pevně daném čase během „života“ kapky je potenciál skokově zvýšen na jinou hodnotu E_2 . Po čekací době (která je potřeba ke snížení nabíjecího proudu na zanedbatelnou hodnotu) je měřen procházející proud. Další kapka je po stejně dlouhou dobu udržována na původním potenciálu E_1 , který je následně skokově změněn na odlišnou hodnotu potenciálu E_2 , než u první kapky. Proud je měřen opět po čekací době. Synchronizace potenciálových kroků a měření proudu s růstem kapky je běžně zajištěno odkápnutím kapky po měření proudu a měřením času od tohoto okamžiku. Normální pulzní polarogram má stejný tvar jako u klasické polarografie. [21]

Diferenční pulzní polarografie

Metoda diferenční pulzní polarografie používá opět rtuťové kapkové elektrody. Mezi tyto elektrody a referenční elektrody se tentokrát vkládá lineárně se zvyšující napětí, které je měněno po malých přírůstcích pro každou novou kapku. Před koncem „života“ kapky se k tomuto napětí přidává obdélníkový napěťový pulz. Proud je měřen vždy před začátkem a koncem pulzu, přičemž je zjištěna diference mezi těmito proudy. Polarogram zobrazuje závislost proudové difference na vkládaném napětí. Největší diference proudu se nachází v oblasti půlvlnového potenciálu, výsledná křivka má proto tvar píku. Tato metoda je mnohem citlivější, než klasická polarografie. Lze s její pomocí stanovovat vzorky i s koncentrací okolo 10^{-8} mol/l. [10]

1.1.4 Voltametrie

Ve voltametii se na rozdíl od polarografie používají elektrody s konstantní velikostí povrchu, tedy stacionární elektrody. Naměřená závislost proudu na napětí se nazývá voltamogram. [10,6] Bakalářská práce se soustředí na jeden druh voltametrické techniky, tzv. cyklickou voltametrii, která je proto níže popsána důkladněji. Popisem ostatních voltametrických metod se zabývá Semestrální projekt, na který tato práce navazuje.

1.1.4.1 Výhody voltametrie

K analytickým výhodám voltametrických metod patří vynikající citlivost s velkým rozsahem koncentrací jak anorganických, tak organických látek (10^{-12} až 10^{-1} M), velké množství použitelných rozpouštědel a elektrolytů, široký rozsah teplot, krátké doby analýzy (v sekundách), současné stanovení několika analytů, schopnost stanovit kinetické a mechanické parametry reakcí, dobře rozvinutá teorie a tím i schopnost správně odhadovat hodnoty neznámých parametrů, snadná generace potenciálových křivek a možnost měřit velmi malé proudy. [8]

1.1.4.2 Stacionární elektrody

Tuhé (pevné) elektrody

Povrch tuhých elektrod není homogenní, v průběhu elektrolýzy se na nich tvoří vrstvičky látek. Materiál elektrody může podléhat oxidaci nebo redukci. Voltametrie s tuhými elektrodami je proto experimentálně náročnější než s elektrodami rtuťovými. Na rozdíl od rtuti lze s pevnými elektrodami pracovat v oblasti pozitivních potenciálů a stanovovat látky oxidací. Využívají se pro detekci u separačních metod a měření v průtoku. Mohou se vyskytovat i ve formě mikroelektrod. Nejběžnějšími tuhými materiály elektrod jsou platina, zlato a různé formy uhlíku (např. skelný uhlík). Tuhé elektrody se nejčastěji používají ve tvaru drátku, plíšku nebo disku. Lze je také rozdělit podle pohybu na rotující a vibrující. K vibracím dochází v horizontálním nebo vertikálním směru a rotující diskové elektrody využívají laminárního a turbulentního proudění roztoku. [12,6,14,22]

Rtuťové elektrody

Ve srovnání s tuhými elektrodami má rtuť řadu předností. Povrch rtuti je homogenní a snadno obnovitelný, můžeme s ní pracovat v neutrálních roztocích při velmi negativních potenciálech. Často se používá visící rtuťová kapková elektroda, kdy celé měření probíhá na jedné visící kapce, která je obnovena před každým dalším experimentem. [12,14]

1.1.4.3 Cyklická voltametrie (CV)

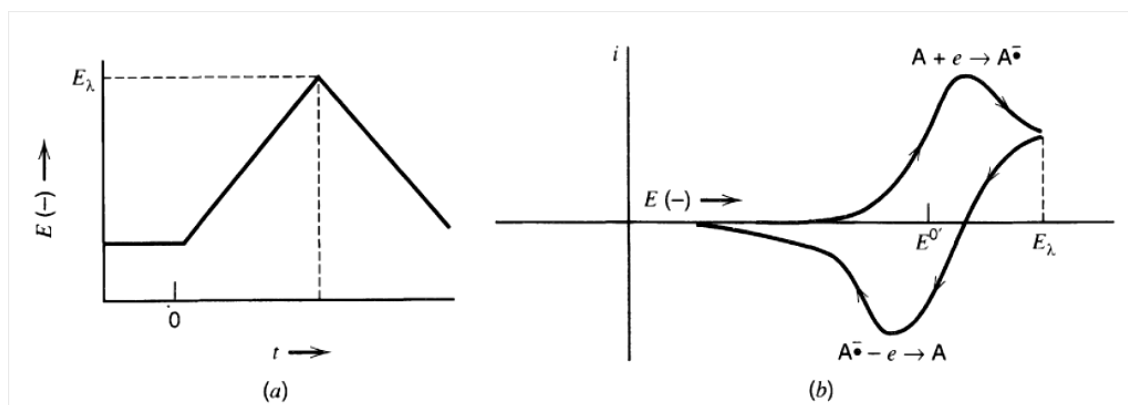
Cyklická voltametrie (CV) se stala velmi populární technikou pro elektrochemické studie nových systémů a ukázala se jako velmi užitečný nástroj pro získávání informací o poměrně složitých elektrodových reakcích.

Na pracovní elektrodu je vkládán potenciál trojúhelníkového průběhu s různou rychlostí změny (Obr. 1.3). Napěťový průběh začíná na zvoleném počátečním potenciálu E_1 , pokračuje přes vrcholový potenciál E_2 a zpět do konečného potenciálu E_1 . Cyklický voltamogram je funkce řady chemických a fyzikálních parametrů a obsahuje jeden nebo více píků. [12,11,23]

Důležité parametry cyklické voltametrie jsou proudy (I_{pc} , I_{pa}) a potenciály (E_{pc} , E_{pa}) katodických a anodických píků. Koncentrace elektroaktivní látky závisí na velikosti proudu v příslušném píku podle Randles-Ševčíkovy rovnice, která má pro 25 °C následující tvar:

$$i_p = 2,686 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot c \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad (1), [8]$$

i_p je velikost proudového píku v ampérech, n je počet elektronů účastnících se elektrodového děje, A je obsah plochy elektrody, D je difuzní koeficient látky, c je koncentrace látky a v je použitá skenovací rychlost.



Obr. 1.3: a) Trojúhelníkový napěťový průběh při cyklické voltametii, b) cyklický voltamogram [11]

1.1.4.4 Využití voltametrie v medicíně

Obecné použití

Analytická chemie běžně používá voltametrických technik pro kvantitativní stanovení různých rozpustných anorganických a organických látek. Anorganická chemie, fyzikální chemie a biochemie hojně využívají voltametrii pro sledování oxidačních a redukčních procesů v různých médiích, studium adsorpce na povrchu, přenosu elektronů a reakčních mechanismů, kinetiky přenosu elektronů a termodynamických vlastností rozpuštěných látek. Voltametrické metody jsou také použity pro stanovení sloučenin ve farmacii. [8]

Stanovení biologicky aktivních látek

Voltametricky lze stanovit endogenní nebo exogenní látky, různá léčiva a jejich metabolity v tělních tekutinách a jiném biologickém materiálu. Jedná se o standardní analytické postupy zahrnující předběžnou úpravu vzorku, hlavně za použití extrakce sledované látky. [24] Důležité je také stanovení látek souvisejících s lidským zdravím. Patří sem skupiny látek jako mykotoxiny, syntetické antioxidanty, přírodní antioxidanty (např. rutin, morin a luteolin) a steroidní hormony (např. progesteron). [25]

Elektrochemické biosenzory

Biosenzor je analytické zařízení, které kombinuje biologický prvek s fyzikálně-chemickým převodníkem pro generování měřitelného signálu při detekci analytu. Skládá se ze tří základních komponent: detektoru biomolekul, převodníku pro převod snímané veličiny na výstupní signál a obvodu zpracování signálu. [26]

Elektrochemické biosenzory měří elektrochemické změny, které se vyskytují na snímací ploše elektrod při interakci s analytem. Výhodou elektrochemických biosenzorů je, že jsou díky použitým elektrodám jednoduché a cenově dostupné. Elektrody mohou být snadno miniaturizovány a použity pro výrobu implantovatelných biosenzorů. [27]

Voltametrie „in vivo“

Tato metoda slouží ke sledování látek produkovaných v živém organismu (endogenních látek). Biologicky významné látky jsou sledovány přímo v místě jejich působení, uvnitř lidského organismu. Jedná se o invazivní měření, kdy se do tkáně zavádí mikroelektroda, která poskytuje kontinuální měření koncentrace metabolitů nebo léčiv v nervové tkáni nebo artériích. Nejčastěji je tato metoda používána v mozku ke sledování neurotransmiterů a v buňkách pro pozorování chemických dějů uvnitř cytoplasmy.

Toxikologická analýza a lékařská diagnostika s pomocí DNA

Voltametrie se využívá při studiu toxikologických účinků látek a různých druhů záření působících na DNA zhoubným způsobem. Denurací (porušením) molekuly DNA vznikají na elektrodě nukleotidové zbytky dostupné k redukci. Tato redukce vyvolá změny na voltametrické křivce. Pomocí koncentrace nukleotidových zbytků lze stanovit stupeň poškození DNA molekuly. Díky DNA lze také vytvořit modifikovanou elektrodu pomocí imobilizace DNA na elektrodě. Tato metoda dosahuje velmi vysoké citlivosti při zjišťování porušení DNA.

Předběžné laboratorní pokusy ukazují na možnost uplatnění při diagnostice některých druhů virů a bakterií. Na elektrodě je imobilizováno vlákno DNA mající určité pořadí bází, aby mohlo dojít ke spojení s bakteriální či virovou DNA ve vzorku hybridizací na základě komplementárnosti.

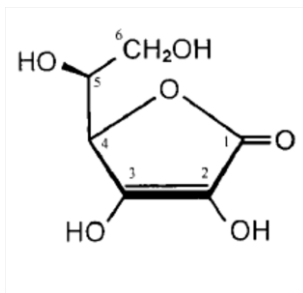
Imunologie

Adsorptivní „stripping“ voltametrii lze využívat při imunologických měřeních, kdy jsou antigen a protilátka adsorpcí nahromaděny na elektrodě a na výsledné křivce je sledována jejich interakce. Měření pomocí této metody jsou velmi citlivá a mohou poskytnout informace jinými metodami obtížně dostupné. [24]

1.1.5 Vitamin C (kyselina askorbová)

1.1.5.1 Obecné chemické vlastnosti

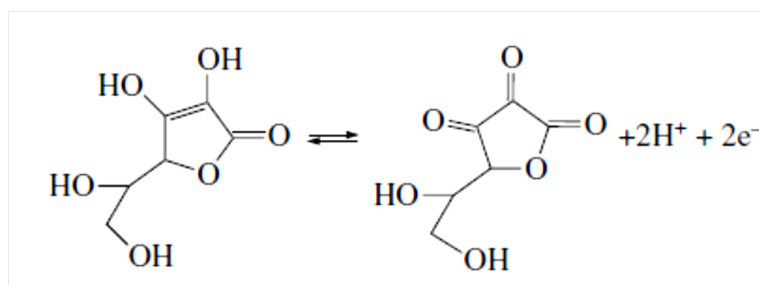
Kyselina askorbová patří strukturně mezi nejjednodušší vitaminy. Její sumární vzorec je $C_6H_8O_6$. Látka má formu bílého, nebo lehce nažloutlého prášku. [7] Kyselina askorbová je v pevném skupenství stabilní, ale její roztoky snadno oxidují, zejména v přítomnosti stopových množství mědi, železa a zásad. [1] Je dobře rozpustná ve vodě, omezeně v alkoholech a nerozpustná v chloroformu, etheru a benzenu. [28]



Obr. 1.4: Struktura kyseliny askorbové [1]

1.1.5.2 Elektrochemické vlastnosti

Kyselina askorbová je nejběžnější elektrochemicky aktivní biologická sloučenina. Při oxidaci kyseliny askorbové se uvolňují dva protony a dva elektrony za vzniku kyseliny dehydroaskorbové. Poté následuje irreverzibilní reakce při pH nižším než 4. Elektroodový mechanismus oxidace kyseliny askorbové je popsán následující rovnicí [29]:



1.1.5.3 Funkce kyseliny askorbové v organismu

Kyselina askorbová plní v lidském organismu tři základní funkce. Působí jako enzymatický kofaktor, zachytávač radikálů, a jako donor nebo akceptor při přenosu elektronů přes buněčnou membránu.

Funkce enzymatického kofaktoru

První funkcí kyseliny askorbové v těle je umožňovat řadu důležitých enzymatických reakcí. Enzymy ovlivňované touto látkou jsou mono- nebo dioxygenázy, jejichž aktivní místo obsahuje železo nebo měď a pro svoji aktivitu potřebují kyselinu askorbovou, která působí jako redukční činidlo. Kyselina askorbová se jako kofaktor u živočichů podílí na biologické syntéze kolagenu. Je také nezbytná pro normální fungování fibroblastů a osteoblastů, syntézu karnitinu, kyseliny listové a hormonu nadledvinek a hojení ran. Zvyšuje také biologickou dostupnost adrenalinu.

Antioxidační účinky

V těle kyselina askorbová enzymaticky i neenzymaticky interaguje s různými kyslíkovými radikály a jejich deriváty. Tyto detoxikační reakce lze považovat za nedílnou součást „úklidu“ v eukaryotických buňkách. O velkém významu těchto buněčných procesů svědčí vysoká intracelulární koncentrace kyseliny askorbové. [1]

1.1.5.4 Analytické stanovení kyseliny askorbové

Pro stanovení kyseliny askorbové existuje řada metodik. Lze je použít například pro měření jeho obsahu v léčivech, ovoci, zelenině a biologických tekutinách. Velký důraz je kladen na analýzu biologických tekutin, především krve. Měření kyseliny askorbové v krvi je důležité, protože její obsah odráží zdravotní stav člověka. Z tohoto důvodu je nezbytné používat přesné analytické metody s vysokou senzitivitou a selektivitou. [30]

1.1.5.5 Metody stanovení kyseliny askorbové

- **Titrace** patří mezi klasické analytické metody
- **Spektrofotometrické metody** postrádají dostatečnou senzitivitu a specifitu reakce.
- **Chromatografické metody**
 - **HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie)** se vyznačuje vysokou senzitivitou a selektivitou.
 - **LC (kapalinová chromatografie)**
- **HPCE (vysoce účinná kapilární elektroforéza)** je rychlejší než HPLC a vyžaduje menší množství vzorku. [1,31]
- **Elektrochemické metody**
 - **Polarografická analýza** využívající elektrochemické oxidace kyseliny askorbové na rtuťové kapkové elektrodě se používá pro její stanovení v potravinách, ovoci a zelenině, nebo farmaceutikách s použitím acetátového, fosfátového nebo citrátového pufru jako indiferentního elektrolytu. Metoda však vyžaduje předběžné zpracování vzorku pomocí formaldehydu.
 - **Voltametrie** poskytuje menší spolehlivost než polarografie z hlediska použitých elektrod, protože pevné elektrody se opakovaným použitím znečišťují oxidačními produkty. Neskonale výhodou pevných elektrod je však jejich netoxicita (oproti rtuti) a využitelnost jako mikroelektrod v biosenzorech. Díky tomu je voltametrie zvláště vhodná pro stanovení látek v biologických tekutinách. Metoda vyniká také nízkým detekčním limitem a nízkými finančními náklady. Pro analýzu kyseliny askorbové se používá především „stripping“ voltametrie, „square-wave“ voltametrie, diferenční pulzní voltametrie a cyklická voltametrie. [30,32]
 - **Amperometrie** kyseliny askorbové je prováděna nejčastěji na platinových, uhlíkových a nejrůznějších modifikovaných elektrodách. Pro zvýšení selektivity oxidační reakce jsou využívány enzymy, čehož se využívá i pro konstrukci amperometrických biosenzorů. [33]
 - **Potenciometrie** využívá pro stanovení kyseliny askorbové iontově selektivní elektrody. Pro stanovení kyseliny askorbové v léčivech se používají

elektrody s kapalnou membránou, existuje však celá řada nejrůznějších druhů iontově selektivních membrán.

- **Potenciometrická titrace** kyseliny askorbové nejčastěji využívá mědi v acetonitrilu jako titračního činidla. Slouží pro její stanovení ve vodných roztocích mnoha farmaceutických přípravků. [34]
- **Chemiluminiscenční metody** spočívají v přidavku luminoforu k analyzované látce, který díky probíhající chemické reakci způsobí luminiscenci. Nejčastěji používaným luminoforem je luminol. Technika je velmi citlivá, ale vyžaduje použití modifikovaného spektrofotometru. Vyznačuje se nedostatkem selektivity, který omezuje její přímou aplikaci na analýzu reálných vzorků.
- **Kinetické metody** mají omezené použití pouze na reakce, u nichž probíhá dosažení chemické rovnováhy pomalu. Díky tomu vzniklo pouze velmi málo metod pro detekci kyseliny askorbové, jako je např. kinetická spektrofotometrie.
- **Fluorometrické metody** spočívají v tvorbě fluorescenčního produktu reakcí dehydroaskorbové kyseliny s o-fenylendiaminem. Metoda se používá pro stanovení kyseliny askorbové v lidské krevní plazmě. [30]

1.1.5.6 Cyklická voltametrie kyseliny askorbové

Voltametrická měření kyseliny askorbové probíhají nejčastěji na pracovních elektrodách platinových [7], uhlíkových [35] a zlatých [36]. Pomocná elektroda je nejčastěji vyrobena z platiny a referenční elektroda je argentchloridová [35] nebo kalomelová [37]. Současným trendem je vytváření speciálních modifikovaných pracovních elektrod. Základní materiál elektrody (kov nebo skelný uhlík) je potahován vrstvou nanostrukturního materiálu, nanočástic kovu nebo oxidu kovu [38,35].

Jako pomocný (indiferentní) elektrolyt se při cyklické voltametii kyseliny askorbové běžně používá roztok chloridu draselného (KCl) o koncentracích nejčastěji 0,1 M a 0,34 M [7,37,38]. Dalším vhodným pomocným elektrolytem se ukázal být také 0,1M KH_2PO_4 [35] a acetátový nebo fosfátový pufr. [39] Důležitým faktorem při měření v pufru je jeho pH. Optimální hodnota pH bývá častým předmětem řady studií. [35,38]

Koncentrace samotného roztoku kyseliny askorbové v pomocných elektrolytech se v běžných experimentech pohybuje v řádech desetin a jednotek mmol/l. [35,37]

1.2 Cíle práce

Prvním cílem bakalářské práce v souladu se zadáním je provedení vhodného zapojení přístroje ER466 Potentiostat v biochemické laboratoři. Při zapojování bude postupováno na základě dostupných technických manuálů. Souvisejícím cílem je zprovoznění přístroje, které vyžaduje dovednost ovládat hardwarovou jednotku

i software. Na základě získaných zkušeností bude sepsán návod na provedení cyklické voltametrie na tomto přístroji.

Dalším cílem práce je ověření metody na elektrochemickém standardu. Ověření proběhne v režimu cyklické voltametrie pro modelovou látku ferrikyanid draselný, jejíž roztoky budou proměřeny při různých koncentracích stanovované látky a při různých skenovacích rychlostech.

Dále bude pozornost zaměřena na stanovení vitamínu C (kyseliny askorbové) pomocí cyklické voltametrie. Práce si klade za cíl analyzovat vliv vnějších faktorů na stanovení této látky. Bude zkoumán vliv materiálu pracovní elektrody, vliv složení rozpouštědla kyseliny askorbové (druhu indifferentního elektrolytu), koncentrace roztoku pomocného elektrolytu a pH rozpouštědla na výsledek měření. Na základě zjištěných údajů bude měření kyseliny askorbové na zařízení eDAQ Potentiostat 466 optimalizováno.

Po nalezení vhodných podmínek a optimalizaci metody bude provedena série měření s roztoky kyseliny askorbové při různých koncentracích látky a při různých skenovacích rychlostech. Na základě výsledků optimalizovaného měření kyseliny askorbové bude zhodnoceno její stanovení pomocí cyklické voltametrie.

2 Metody

2.1 Měřicí soustava

2.1.1 Potenciostat 466 eDAQ

Potenciostat 466 od firmy eDAQ tvoří společně se softwarem EChem (dostupné jsou také softwary Chart a Scope) a s počítačem s operačním systémem Windows všestranný elektrochemický analyzátor určený k zaznamenávání, zobrazení a analýze experimentálních dat. Jednotka potenciostatu umožňuje snadné připojení k počítači pomocí USB. Na předním panelu přístroje (Obr. 2.1) se nachází konektor pro připojení vodičů pracovní, referenční a pomocné elektrody. Pro elektrochemické aplikace se využívá právě toto tříelektrodové zapojení.



Obr. 2.1: Hardwarová jednotka Potenciostatu 466 (eDAQ) [40]

2.1.1.1 Módy přístroje

Potenciostat umožňuje několik módů použití:

- Potenciostat – Chart a EChem software
- Galvanostat – Chart software
- ZRA (zero resistance ammeter – ampérmetr s nulovým odporem) – Chart software
- High Z (vysokoimpedanční voltmetr) – Chart nebo EChem software

V rámci projektu bylo použito módu Potenciostat spolu se softwarem EChem. Výběr módu se provádí prostřednictvím příslušného softwaru.

Přístroj je vybaven vnitřním zkušebním obvodem („Dummy“) s odporem 100 k Ω pro použití v režimu potenciostatu a galvanostatu. Tento obvod je fyzicky připojen, pokud není zařízení přepnuto do režimu pro měření na elektrodách („Real“).

2.1.1.2 Přesnost přístroje

Potenciostat je kalibrován v rámci výroby. Kalibrace signálu je obvykle prováděna funkcí převodu jednotek. Původní napěťový signál je převeden tak, že jsou data zobrazena v odpovídajících jednotkách. Tímto procesem je efektivně odstraněn jakýkoli posun původního signálu. Rozsáhlejší kalibrace může být provedena pomocí softwaru Chart. Přesnost uváděná výrobcem pro rozsahy měřeného proudu 1 mA nebo menší je 0,2 %. Pro proudový rozsah 10 mA a větší je přesnost 1 %. Chyba způsobená změnou teploty je $\pm 0,3 \text{ mV}/^\circ\text{C}$. [41]

2.1.2 EChem software

2.1.2.1 Popis softwaru

EChem ES260 je sofistikovaný program pro provádění voltametriických a amperometriických elektrochemických experimentů. EChem společně s hardwarovou jednotkou potenciostatu a počítačem funguje také jako dvoukanálový osciloskop a funkční generátor. Pomocí tohoto softwaru je možné provádět celou řadu elektrochemických metod.

Software umožňuje přepínání různých režimů os zobrazovaných grafů. Zobrazení proudu, napětí a času může mít různé formáty. Nejběžnějším formátem pro elektrochemické experimenty je závislost měřeného proudu na napětí vkládaném na elektrody. Možné je také měnit barvu a styl zobrazené křivky a vzor a barvu pozadí grafu.

Výsledky měření mohou být vytisknuty, upraveny a uloženy. Pro rychlejší práci se softwarem je též možno uložit soubor s nastavením programu. Naměřené grafy mohou být převedeny na text nebo obrázek a exportovány do jiných programů.

2.1.2.2 Techniky EChem

Standardní techniky:

- Lineární „sweep“ voltametrie
- Diferenční pulzní voltametrie
- „Square wave“ voltametrie
- Normální (a zpětná) pulzní voltametrie

„Stripping“ techniky:

- Lineární „sweep stripping“ voltametrie
- Diferenční pulzní „stripping“ voltametrie
- „Square wave stripping“ voltametrie
- Normální pulzní „stripping“ voltametrie

Speciální techniky:

- Cyklická voltametrie
- Multipulzní voltametrie
- Pulzní amperometrie [42]

2.1.3 Senzor

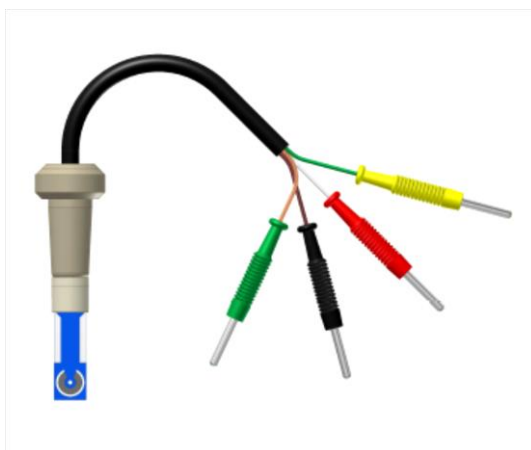
Pro měření byl použit elektrochemický senzor AC1.W*.RS od firmy BVT Technologies (Obr. 2.2). Senzor obsahuje pracovní, referenční a pomocnou elektrodu. V rámci práce byly použity čtyři typy senzoru s různými materiály pracovní elektrody: grafitová (AC1.W4.RS), platinová (AC1.W2.RS), stříbrná (AC1.W3.RS) a zlatá (AC1.W1.RS). Referenční elektroda senzoru je stříbrná. Senzor je zakončen stříbrnými kontakty, které jsou propojeny s aktivními částmi senzoru. Struktura vodičů senzoru je překryta dielektrickou ochrannou vrstvou. [43]



Obr. 2.2: Elektrochemický senzor AC1.W*.RS (BVT Technologies), skutečný rozměr senzoru je 25×7 mm [zdroj: autor]

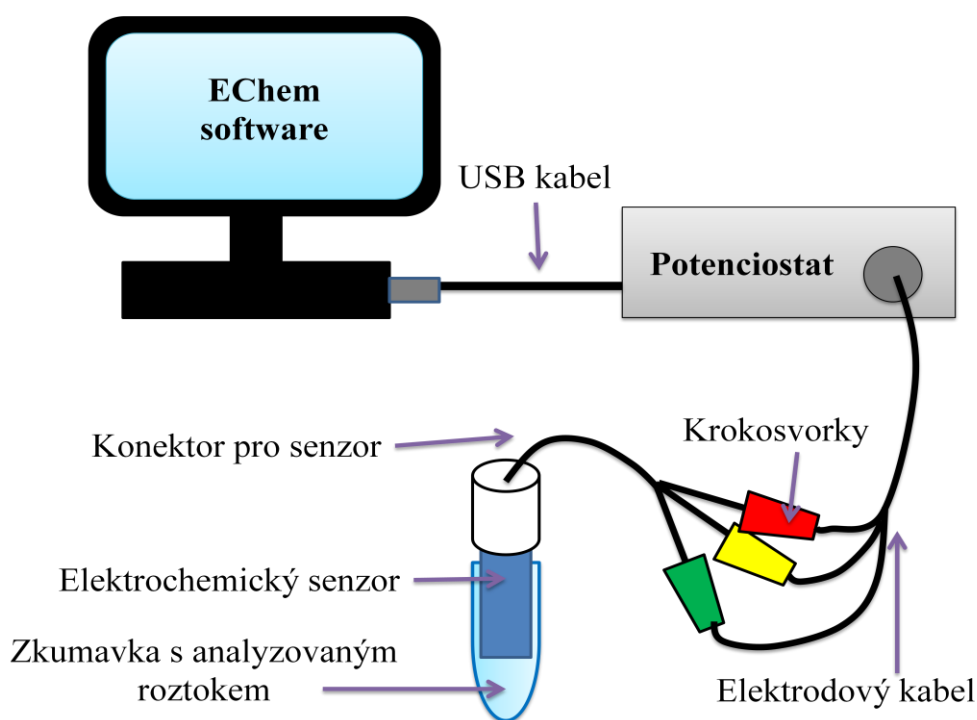
2.1.4 Konektor pro biochemické senzory

Pro připojení elektrochemického senzoru k jednotce potenciostatu pomocí elektrodových kabelů byl použit kuželový konektor KA1C.5 od firmy BVT Technologies (Obr. 2.3). Konektor je na jedné straně zakončen banánkovými kolíčky, které slouží pro připojení krokodýlkových sponek elektrodových vodičů potenciostatu. Druhý konec je vybaven zdíčkou pro zasunutí elektrochemického senzoru. [44]



Obr. 2.3: Kuželový konektor pro elektrochemické senzory typu KA1C.5 (BVT Technologies) [44]

2.1.5 Schéma zapojení měřicí aparatury

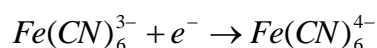


Obr. 2.4: Zapojení přístroje Potentiostat 466 v biochemické laboratoři [zdroj: autor]

2.2 Chemikálie

2.2.1 Ferrikyanid draselný (Hexakynoželezitan draselný)

Ferrikyanid se na elektrodě redukuje na hexakynoželezitan a na kovových elektrodách probíhá tento redoxní děj reverzibilně. Redoxní pár $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ se pro své vhodné elektrochemické chování používá jako elektrochemický standard. [45] Redukce ferrikyanidu je popsána rovnicí [46]:



V rámci práce byly připraveny čtyři standardní roztoky ferrikyanidu draselného (Lach-Ner, s.r.o., p.a.) o koncentracích 1 mM, 2 mM, 5 mM a 10 mM. Na těchto roztocích byla testována funkčnost zařízení a vhodnost použité metody.

2.2.2 Vitamin C (kyselina askorbová)

Pro měření byla vytvořena celá řada roztoků kyseliny askorbové (Lach-Ner, s.r.o., p.a.) o různých koncentracích. Roztoky byly připravovány odvážením příslušného množství kyseliny na analytických vahách a rozpuštěním v příslušném rozpouštědle.

2.2.3 Indiferentní elektrolyty

Jako součást jednoho experimentu byly testovány různé druhy pomocných (indiferentních) elektrolytů. Jejich seznam obsahuje Tabulka 2.1.

Tabulka 2.1: Indiferentní elektrolyty použité v rámci měření

Název chemikálie	Vzorec	Výrobce	Čistota látky
Chlorid draselný	KCl	Lach-Ner, s.r.o.	p.a.
Chloristan draselný	KClO ₄	Penta, s.r.o.	p.a.
Chlorid amonný	HN ₄ Cl	Sigma-Aldrich, s.r.o.	p.a.
Hydrogenfosforečnan didraselný	K ₂ HPO ₄	Lach-Ner, s.r.o.	p.a.
Dusičnan draselný	KNO ₃	Lach-Ner, s.r.o.	p.a.
Dihydrogenfosforečnan draselný	KH ₂ PO ₄	Dorapis	p.a.

2.2.4 Pufr pro měření pH

Příprava pufru o pH 3 až 12 proběhla postupným přidavkem kyseliny chlorovodíkové (Lach-Ner, s.r.o., p.a.) nebo hydroxidu sodného (Lach-Ner, s.r.o., p.a.) do 0,1M roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného.

2.3 Použitá metoda

2.3.1 Popis experimentů

Pro měření v rámci bakalářské práce byla použita metoda cyklické voltametrie. Metoda byla testována na pěti různých experimentech, pomocí nichž byly hledány nejvhodnější podmínky pro měření kyseliny askorbové.

2.3.1.1 Měření s ferrikyanidem draselným

Cílem měření s ferrikyanidem draselným bylo ověřit funkčnost zapojení a provozu měřicí aparatury s využitím faktu, že ferrikyanid draselný vykazuje vhodné elektrochemické chování. Měření byla provedena pro roztoky o různé koncentraci (1 mM, 2 mM, 5 mM a 10 mM) a pro 2mM roztok při různých skenovacích rychlostech (0,1 V/s, 1 v/s, 2 V/s, 5 V/s). Na základě Randles-Ševčíkovy rovnice (1) pro velikost proudu v příslušném píku při cyklické voltametii byly odvozeny následující dvě hypotézy:

- Hypotéza 1: Se zvyšující se koncentrací roztoku roste velikost proudu v příslušném píku cyklického voltamogramu.
- Hypotéza 2: S rostoucí skenovací rychlostí se zvětšuje velikost proudu v příslušném píku na cyklickém voltamogramu.

2.3.1.2 Měření kyseliny askorbové pro různé materiály pracovní elektrody senzoru

V prvním experimentu s kyselinou askorbovou (5mM, 0,1M KCl) byl ověřen vliv materiálu pracovní elektrody na tvar voltamogramu. Použity byly senzory s grafitovou, platinovou, stříbrnou a zlatou pracovní elektrodou.

2.3.1.3 Měření kyseliny askorbové v různých indierentních elektrolytech

Další experiment si kladl za cíl otestovat různé pomocné (indierentní) elektrolyty a jejich vliv na výsledný voltamogram. Seznam těchto elektrolytů shrnuje Tabulka 2.1. Použity byly 5mM roztoky kyseliny askorbové v 0,1M indierentních elektrolytech.

2.3.1.4 Měření kyseliny askorbové pro různé koncentrace chloridu draselného

Po otestování různých indierentních elektrolytů bylo nutné zjistit vhodnou koncentraci tohoto elektrolytu. Použit byl KCl o koncentracích 0,001 M, 0,01 M, 0,1 M a 1 M. Pomocí těchto roztoků byly připraveny 5mM roztoky kyseliny askorbové.

2.3.1.5 Měření kyseliny askorbové pro různá pH prostředí

Další experiment měl zjistit vhodné pH pro stanovení kyseliny askorbové. Jako pomocný elektrolyt byl použit 0,1M dihydrogenfosforečnan draselný, ze kterého lze

snadno připravit pufr o příslušné hodnotě pH pouhým přikapáváním roztoku silné kyseliny (HCl) nebo silné zásady (NaOH). Hodnota pH roztoku byla kontinuálně měřena pomocí kapesního digitálního pH metru Hütermann HP-07. Zhotoveny byly roztoky o pH 3 až 12, z nichž byly připraveny roztoky kyseliny askorbové o koncentraci 3,5 mM.

2.3.1.6 Měření kyseliny askorbové pro různé koncentrace a různé skenovací rychlosti

Závěrem byl sledován vliv koncentrace kyseliny askorbové a vliv skenovací rychlosti na tvar cyklického voltamogramu a výšku proudu v píku, pro kterou platí Hypotézy 1 a 2, stejně jako pro ferrikyanid draselný. Jako indiferentní elektrolyt byl použit chlorid draselný o koncentraci 0,1 M. Připraveny byly roztoky kyseliny askorbové o koncentracích 1 mM, 2 mM a 5 mM. Roztok s koncentrací 2 mM byl proměřen pro skenovací rychlosti 0,1 V/s, 0,5 V/s a 1 V/s.

2.3.2 Použité parametry

Metoda cyklické voltametrie je podmíněna vhodnou volbou parametrů. Tabulka 2.2 ukazuje parametry použité pro měření ferrikyanidu draselného v KCl a všechna měření kyseliny askorbové.

Tabulka 2.2: Parametry cyklické voltametrie pro všechny experimenty

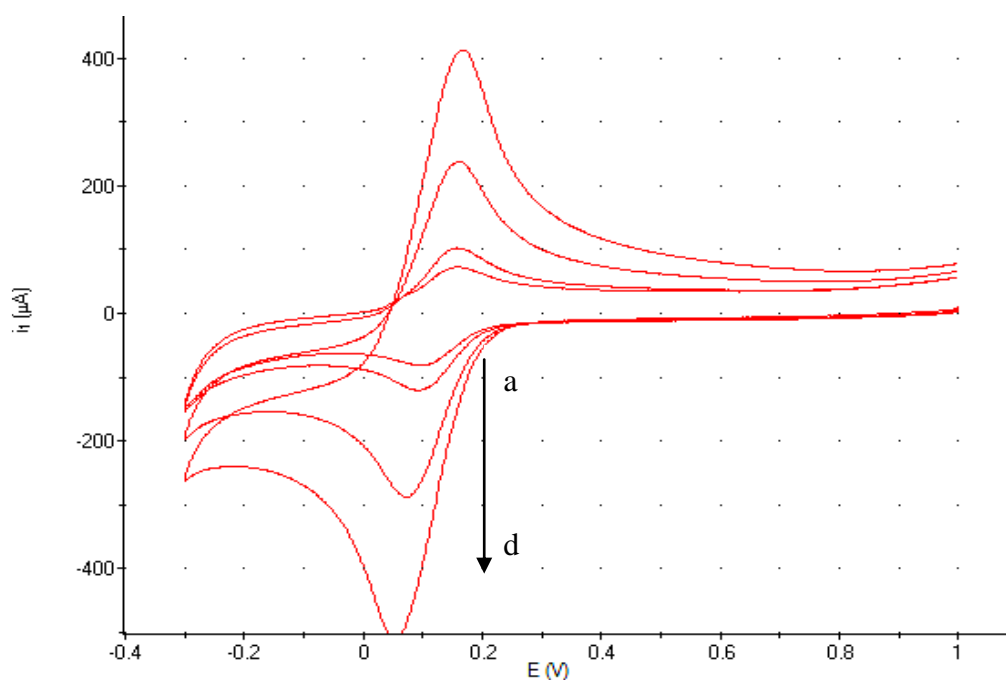
Počáteční a konečný potenciál (mV)	1000
Horní potenciálový limit (mV)	1000
Spodní potenciálový limit (mV)	-300
Počet cyklů	3

3 Výsledky

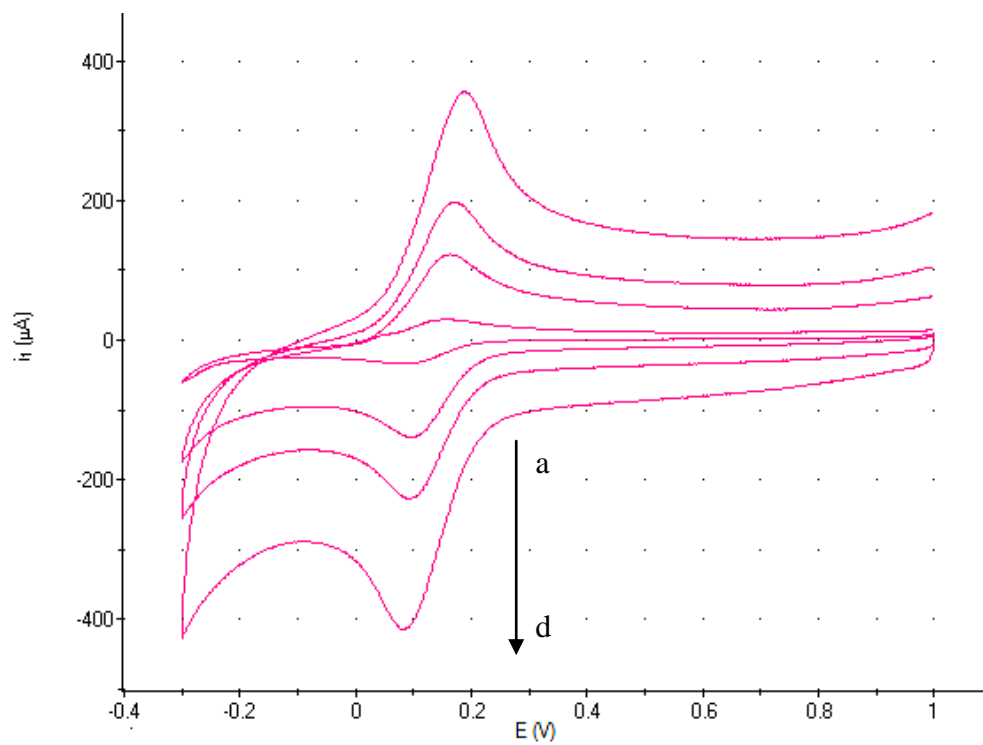
Stěžejním výsledkem celé práce je, že se podařilo úspěšně zapojit zařízení Potentiostat 466 od firmy eDAQ a uvést ho do provozu. Následující kapitola obsahuje soubor výsledků, převážně cyklických voltamogramů, naměřených jako součást bakalářské práce při ověřování metody cyklické voltametrie na nově zprovozněném přístroji. Je rozdělena do pěti podkapitol, které představují jednotlivé druhy provedených experimentů.

3.1 Cyklická voltametrie hexakynoželezitanu draselného

Jako první v rámci práce bylo provedeno měření s modelovou látkou ferrikyanidem draselným pro ověření metody. Měření proběhlo pro různé koncentrace ferrikyanidu (Obr. 3.1) a různé skenovací rychlosti cyklické voltametrie (Obr. 3.2).



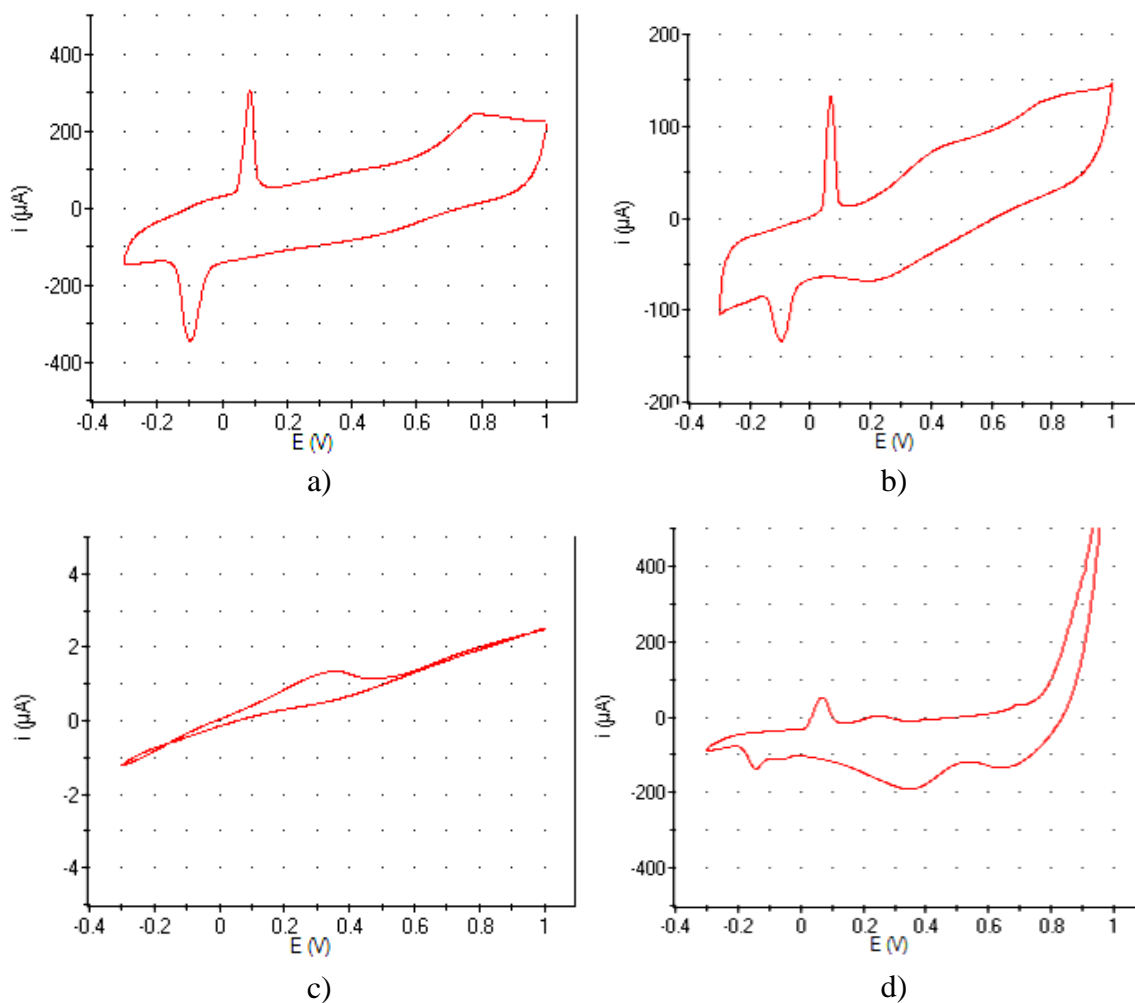
Obr. 3.1: Voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ o koncentracích a) 1 mM, b) 2 mM, c) 5 mM a d) 10 mM v 0,1M KCl při skenovací rychlosti 1 V/s



Obr. 3.2: Voltamogram $K_3[Fe(CN)_6]$ o koncentraci 2 mM v 0,1M KCl při skenovacích rychlostech
a) 0,1 V/s, b) 1 V/s, c) 2 V/s, d) 5 V/s

3.2 Vliv materiálu pracovní elektrody

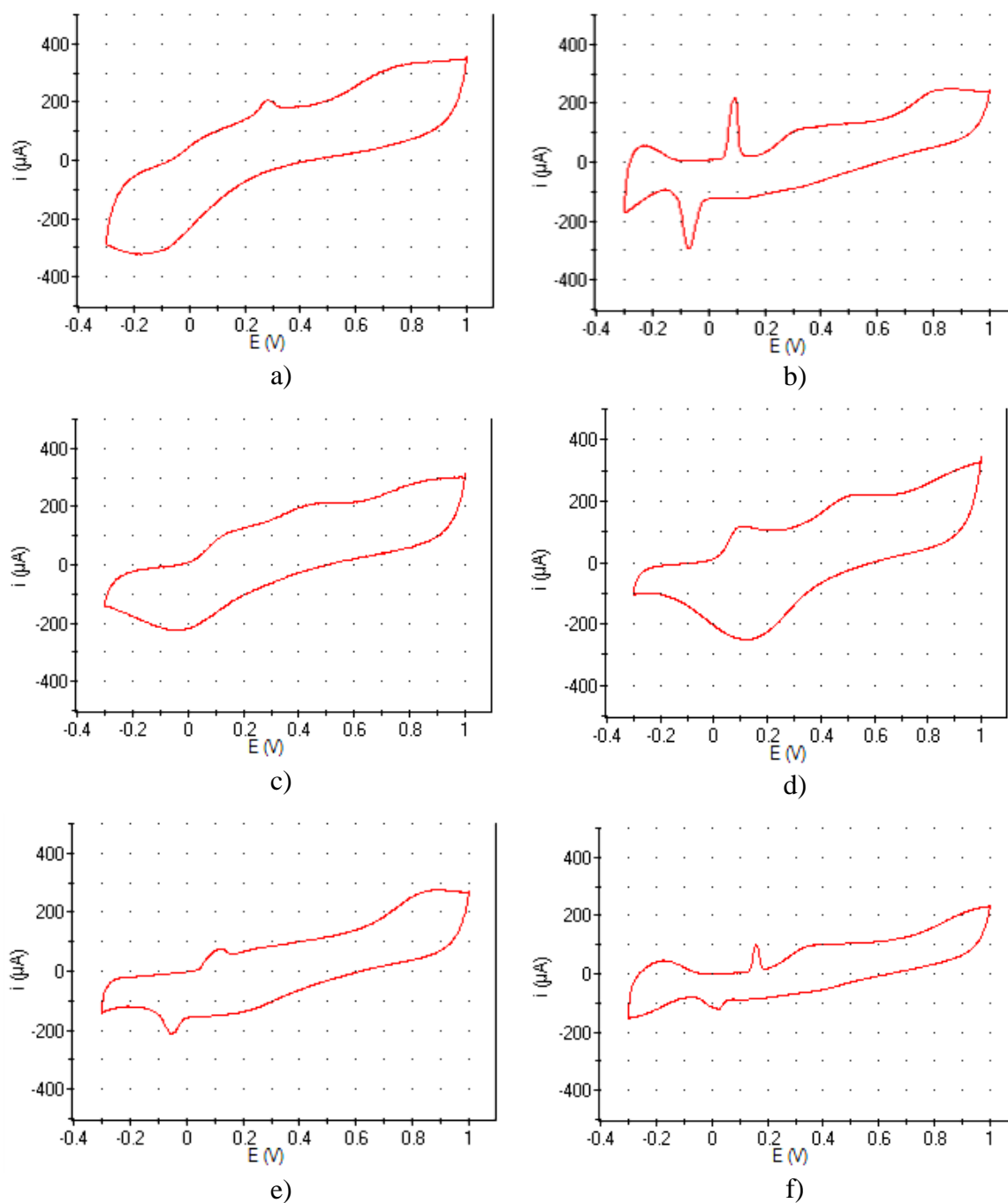
Při druhém experimentu již byl měřen roztok kyseliny askorbové. Jeho cílem bylo zjistit vliv materiálu pracovní elektrody elektrochemického senzoru na výsledný cyklický voltamogram. Byly použity čtyři různé typy senzorů, a to s grafitovou (Obr. 3.3-a), platinovou (Obr. 3.3-b), stříbrnou (Obr. 3.3-c) a zlatou (Obr. 3.3-d) pracovní elektrodou.



Obr. 3.3: Cyklické voltamogramy pro 5mM kyselinu askorbovou v 0,1M KCl při rychlosti skenu 1 V/s. a) Grafitová, b) platinová, c) stříbrná a d) zlatá pracovní elektroda senzoru.

3.3 Vliv indiferentního elektrolytu

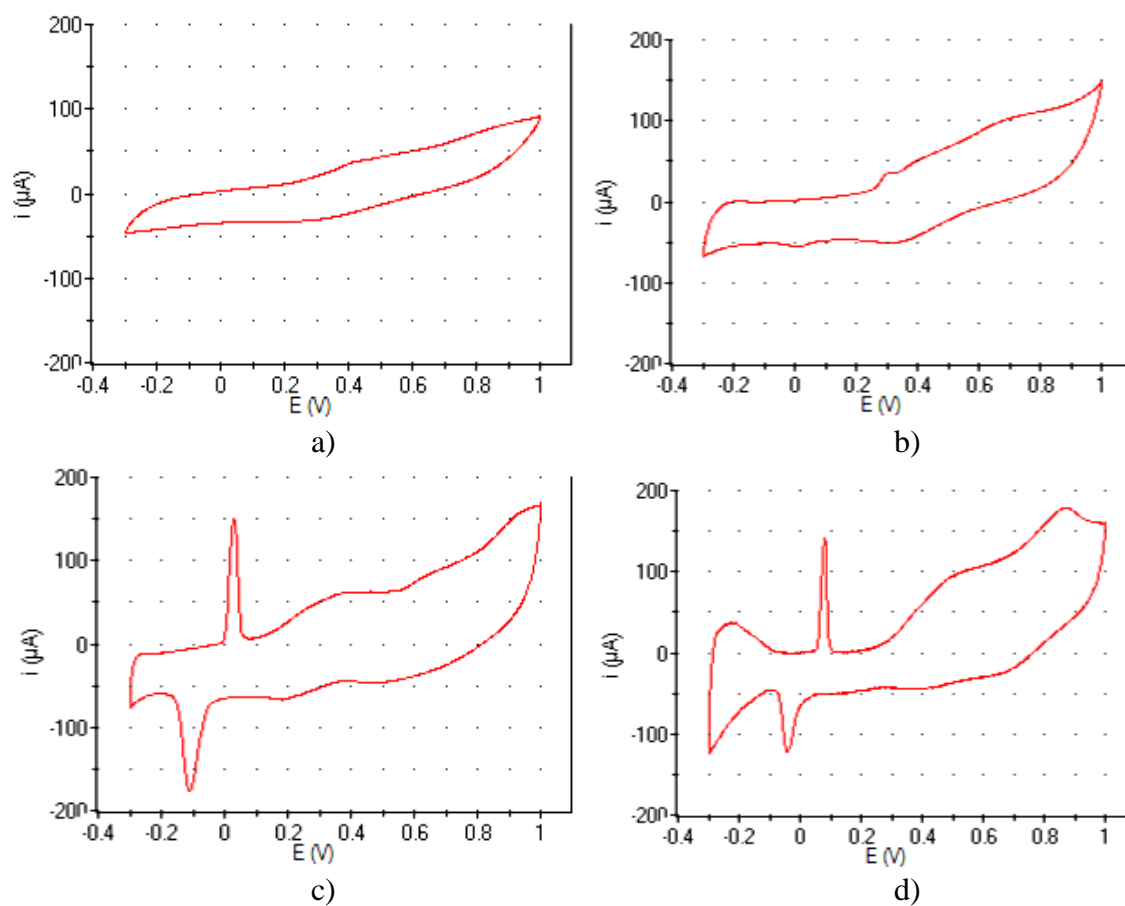
Jako rozpouštědla pevných látek při elektrochemických metodách se používají tzv. indiferentní (pomocné) elektrolyty. Tento experiment měl zjistit, jaký elektrolyt je nejvhodnější jako rozpouštědlo kyseliny askorbové. Naměřené voltamogramy ukazuje Obr. 3.4. Podrobnosti k jednotlivým elektrolytům se nacházejí v Tabulce 2.1.



Obr. 3.4: Cyklické voltamogramy pro 5mM kyselinu askorbovou v různých pomocných elektrolytech při rychlosti skenu 1 V/s. a) K₂HPO₄, b) KCl, c) KClO₄, d) KH₂PO₄, e) KNO₃, f) HN₄Cl. Koncentrace pomocných elektrolytů byla 0,1 M.

3.4 Vliv koncentrace indierentního elektrolytu

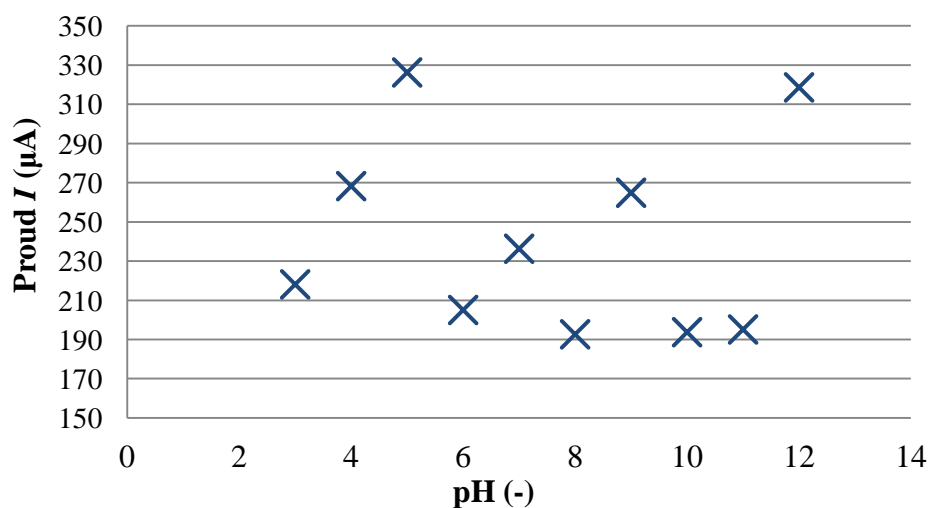
Předchozí experiment ukázal, že nejvhodnější pomocný elektrolyt pro kyselinu askorbovou je chlorid draselný. V dalším experimentu bylo zjišťováno, jaká by měla být řádově jeho koncentrace pro dosažení nejlepšího výsledku. Voltamogramy naměřené při tomto experimentu se nacházejí na Obr. 3.5.



Obr. 3.5: Cyklické voltamogramy pro 5mM kyselinu askorbovou a různé koncentrace KCl při rychlosti skenu 1 V/s. a) 0,001M KCl, b) 0,01M KCl, c) 0,1M KCl a d) 1M KCl.

3.5 Vliv pH indiferentního elektrolytu

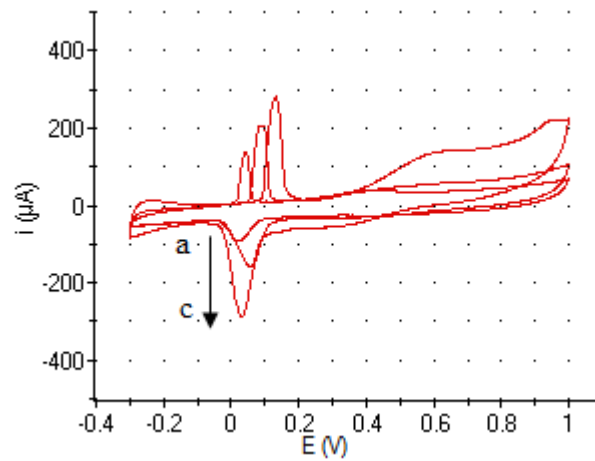
Důležitým parametrem elektrochemického měření je pH rozpouštědla. Tento experiment ukazuje, jak se mění velikost proudového píku při různých hodnotách pH (Obr. 3.6). Celkem bylo naměřeno 10 cyklických voltamogramů, které se nacházejí v Příloze B.



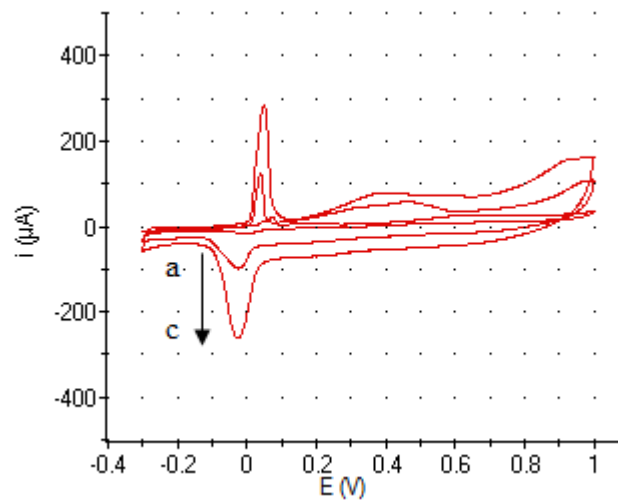
Obr. 3.6: Závislost proudu v píku na pH pomocného elektrolytu (0,1M KH_2PO_4) pro 3,5mM kyselinu askorbovou při rychlosti skenu 1 V/s.

3.6 Vliv koncentrace kyseliny askorbové a vliv skenovací rychlosti

Poslední experiment měl za cíl ověřit, zda použitá metoda funguje správně pro kyselinu askorbovou stejně, jako pro ferrikyanid draselný. Sledován byl vliv koncentrace kyseliny askorbové (Obr. 3.7) a vliv skenovací rychlosti (Obr. 3.8) na výsledný voltamogram.



Obr. 3.7: Voltamogram kyseliny askorbové o koncentracích a) 1 mM, b) 2 mM, c) 5 mM v 0,1M KCl při skenovací rychlosti 1 V/s



Obr. 3.8: Voltamogram kyseliny askorbové o koncentraci 2 mM v 0,1M KCl při skenovacích rychlostech a) 0,1 V/s, b) 0,5 V/s, c) 1 V/s

4 Diskuse

Hlavním zjištěním bakalářské práce je, že přístroj ER466 Potentiostat od firmy eDAQ podává spolehlivé výsledky při měření kyseliny askorbové a je vhodný pro voltametrická měření v biochemické laboratoři.

Stěžejní částí práce bylo provedení zapojení přístroje v laboratoři a jeho zprovoznění. Použité zapojení se ukázalo jako vhodné, protože fungovalo podle očekávání a nevyskytly se problémy. Pro měření vzorků byl použit speciální elektrochemický senzor. Velká výhodou zapojení s elektrochemickým senzorem je, že pro analýzu roztoku stačí díky malým rozměrům senzoru pouze malé množství analyzovaného vzorku. V případě měření v rámci této práce se objem stanovovaného roztoku pohyboval okolo hodnoty 1 ml, což svědčí o značné úspornosti použité metody.

V rámci měření modelové látky bylo zjištěno, že cyklické voltamogramy ferrikyanidu draselného mají očekávaný průběh [47]. Při měření různých koncentrací roztoku ferrikyanidu draselného v 0,1M KCl byla potvrzena Hypotéza 1. S rostoucí koncentrací stanovované látky ve vzorku roste výška proudového píku na voltamogramu. Výsledek tohoto měření znázorňuje Obr. 3.1. Pro měření roztoku ferrikyanidu draselného v 0,1M KCl při různých rychlostech skenu byla ověřena Hypotéza 2, kdy s rostoucí skenovací rychlostí roste také proud v píku (Obr. 3.2). Na této modelové látce byla ověřena funkčnost zařízení a vhodnost metody. Ferrikyanid je elektrochemický standard, který vykazuje vhodné elektrochemické vlastnosti [45], díky čemuž je velmi často využíván právě pro testování nových zařízení.

V prvním experimentu s vitamínem C (kyselinou askorbovou) bylo zjišťováno, jaký materiál pracovní elektrody elektrochemického senzoru je pro stanovení kyseliny askorbové nejvhodnější. K dispozici byly celkem čtyři druhy senzorů (s grafitovou, platinovou, stříbrnou a zlatou pracovní elektrodou). Výborný výsledek poskytlo měření s grafitovou elektrodou (Obr. 3.3-a), pro které proudový pík dosáhl nejvyšší hodnoty. Velmi uspokojivý byl i tvar voltamogramu. O vhodnosti grafitové pracovní elektrody svědčí i její použití v rámci jiných vědeckých studií [38,47]. Velikost proudového píku pro platinovou pracovní elektrodu byla o něco nižší, než u elektrody grafitové (Obr. 3.3-b), tvar voltamogramu byl však také souměrný. V literatuře se proto můžeme často setkat právě s použitím platinové pracovní elektrody [7,40,48]. Měření se stříbrnou pracovní elektrodou senzoru neposkytlo žádný smysluplný výsledek. Vzniklou křivku (Obr. 3.3-c) nelze považovat za cyklický voltamogram. Nejen, že zcela postrádá proudové píky, ale také se na dvou místech kříží. Stříbrná pracovní elektroda senzoru se proto jeví jako krajně nevhodná pro cyklickou voltametrii kyseliny askorbové. Voltamogram naměřený se zlatou pracovní elektrodou (Obr. 3.3-d) zobrazuje pouze drobné proudové píky. Kromě nich křivka obsahuje ještě určité nerovnosti, které

deformují její tvar, a na jedné straně není cyklus křivky uzavřen. Ačkoli se v literatuře lze setkat s použitím zlaté pracovní elektrody pro stanovení kyseliny askorbové [39,49], pro měření v rámci této práce se použití zlaté pracovní elektrody ukázalo jako nevhodné. Z naměřených voltamogramů pro různé materiály pracovní elektrody (Obr. 3.3) vyplývá, že pro cyklickou voltametrii kyseliny askorbové je vhodný senzor s grafitovou nebo platinovou pracovní elektrodou. V rámci této práce byla použita elektroda platinová.

Pro rozpouštění kyseliny askorbové se používá celá řada pomocných (indiferentních) elektrolytů. Ty slouží pro snížení odporu roztoku, zabránění migrace iontů a udržování stálé iontové síly roztoku. [9] Transport stanovené látky v roztoku mezi elektrodami probíhá převážně difuzí nebo migrací. Voltametrické stanovení látek je závislé na difuzi jejich iontů, která je dána koncentrací látky v roztoku. Difuze je určena koncentračním spádem při elektrolýze. Oproti tomu migrace je pohyb iontů v důsledku působení elektrického pole elektrod, který ruší voltametrické stanovení. Migraci iontů se proto vždy snažíme potlačit, k čemuž slouží právě indiferentní elektrolyty. [10] Jako součást testování metody byl sledován vliv různých 0,1M vodných roztoků těchto elektrolytů na výsledek cyklické voltametrie. Použité elektrolyty byly nejprve proměřeny bez přídavku kyseliny askorbové, aby byla vyloučena přítomnost nečistot v jejich roztocích. Na žádném z voltamogramů samotných indiferentních elektrolytů se žádný pík neobjevil, což vypovídá o čistotě použitých rozpouštědel. Elektrolyty byly nadále použity pro měření s kyselinou askorbovou. Výsledek jejího měření v roztoku hydrogenfosforečnanu draselného ukazuje pouze jeden drobný kladný pík (Obr. 3.4-a). Při měření s roztokem chloristanu draselného se dokonce žádný pík neobjevil (Obr. 3.4-c). O něco lepší výsledek vznikl při experimentu s dusičnanem draselným, jehož cyklický voltamogram obsahuje dva nízké píky (Obr. 3.4-e). Voltamogram kyseliny askorbové v dihydrogenfosforečnanu draselném má deformovaný tvar (Obr. 3.4-d), který byl zapříčiněn prováděním tohoto experimentu při neutrálním pH. Vlastnostmi dihydrogenfosforečnanu draselného jako rozpouštědla pro kyselinu askorbovou při různých hodnotách pH se zabývá jeden z následujících experimentů. Dosud nejlepší výsledný voltamogram vznikl pro chlorid amonný, který obsahuje dva nižší píky, z nichž jeden je velmi zřetelný (Obr. 3.4-f). Na první pohled nejvyšší a nejvýraznější píky se nacházejí na cyklickém voltamogramu kyseliny askorbové rozpuštěné v chloridu draselném. Z tohoto důvodu byl chlorid draselný vybrán jako nejvhodnější rozpouštědlo pro měření kyseliny askorbové pro ostatní prováděné experimenty. Obecně lze tvrdit, že pro cyklickou voltametrii kyseliny askorbové jsou jako rozpouštědla vhodné právě chloridy. Vhodnost chloridu draselného potvrzuje článek [41], na jehož základě byla vybrána většina indiferentních elektrolytů použitých v rámci tohoto experimentu.

Předchozí experiment ukázal, že nejvhodnějším pomocným elektrolytem pro měření kyseliny askorbové v rámci této práce je chlorid draselný. Dále bylo nutné

zjistit, jakou koncentraci by měl přibližně mít, aby bylo dosaženo co nejlepšího výsledku, protože se změnou koncentrace pomocného elektrolytu se mění i tvar voltamogramu a výška proudového píku [50]. Nejnižší použitá koncentrace chloridu draselného v tomto experimentu byla 0,001 M. Na naměřeném voltamogramu (Obr. 3.5-a) se neobjevuje žádný pík, protože díky nízké koncentraci chloridu draselného nebyla pravděpodobně potlačena migrace iontů v roztoku. Při koncentraci chloridu draselného 0,01 M se již drobný pík objevil (Obr. 3.5-b), ale protože je velmi drobný a nevýrazný, není daná koncentrace pro stanovení použitelná. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo pro 0,1M chlorid draselný (Obr. 3.5-c). Voltamogram ukazuje vysoký a zřetelný pík a jeho tvar je pravidelný. Při měření kyseliny askorbové v 1M chloridu draselném došlo k opětovnému snížení proudového píku (Obr. 3.5-d). Koncentrace 1 M je již totiž poměrně vysoká a při elektrodových dějích začíná hrát roli celková iontová síla roztoku, která má díky jeho vysoké koncentraci značnou hodnotu. Iontová síla totiž ovlivňuje šířku elektrické dvojvrstvy [9]. Zvyšování velikosti proudového píku při koncentracích chloridu draselného 0,001 M, 0,01 M a 0,1 M a její opětovné snížení při koncentraci 0,1 M je v souladu s [50]. Z uvedených důvodů byla pro měření v rámci práce zvolena koncentrace chloridu draselného 0,1 M, která se jeví jako nejvhodnější.

V dalším experimentu byl sledován vliv pH pomocného elektrolytu na elektrochemickou reakci kyseliny askorbové. Použitým elektrolytem byl roztok dihydrogenfosforečnanu draselného, který byl zkoumán na rozsahu pH 3 až 12. Hodnota pH byla upravována přidávkem malého množství hydroxidu sodného nebo kyseliny chlorovodíkové. Závislost velikosti proudového píku na voltamogramu na pH pomocného roztoku při stanovení kyseliny askorbové znázorňuje Obr. 3.6. Proudový pík se zvyšuje s rostoucím pH od 3 do 5, přičemž při pH 5 dosahuje maximální naměřené hodnoty. Od pH 6 se proudový pík střídavě snižuje a zvyšuje až do poslední naměřené hodnoty při pH 12. Mezi pH 6 a 11 se pík udržuje na nižších hodnotách, zatímco při pH 12 opět prudce narůstá. Znamená to, že oxidační proces kyseliny askorbové je závislý na odstranění protonů z molekuly, které je snazší při nižších hodnotách pH. Při vyšších hodnotách pH je elektrokatalytická reakce v důsledku nedostatku protonu obtížnější. [51] Uvedené výsledky jsou v souladu s článkem [51], kromě kolísavého charakteru v rozmezí pH 6 a 11. Tyto odlišnosti výsledku byly pravděpodobně zapříčiněny odlišnými parametry metody. Pokud porovnáme tvar voltamogramů v tomto experimentu (Příloha B), zjistíme, že při pH 3 a 4 byl naměřen drobný, ale jasně ohraničený pík kyseliny askorbové. Při pH 5 se ukázal pík ze všech měření nejvyšší a nejvíce zřetelný. Voltamogramy naměřené pro vyšší hodnoty pH (6 až 12) ukazují pík sice vysoký, ale nijak ostřeji ohraničený. U všech naměřených cyklických voltamogramů byl výraznější vždy pík záporný, proto byla pro určení závislosti velikosti proudového píku na pH (Obr. 3.6) použita velikost záporného píku. Nejdůležitějším výsledkem experimentu je, že nejvyšší hodnota proudu v píku byla zjištěna pro pH 5 a hodnoty blízké tomuto pH se proto jeví jako nejvhodnější pro

stanovení kyseliny askorbové v 0,1M roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného. Výsledek odpovídá použité literatuře [51], v rámci které byla kyselina askorbová měřena v 0,1M roztoku KH_2PO_4 o pH 5,2.

Všechny dosud provedené experimenty měly jeden hlavní společný cíl – najít optimální podmínky pro měření roztoků kyseliny askorbové na přístroji Potentiostat 466. Z uvedených výsledků vyplývá, že nejvhodnější je měření kyseliny askorbové rozpuštěné v roztoku chloridu draselného o koncentraci 0,1 mol/l pomocí elektrochemického senzoru s platinovou pracovní elektrodou. Vhodné podmínky cyklické voltametrie jsou následující: počáteční a konečná hodnota vkládaného potenciálu 1 V, horní potenciálový limit 1 V, spodní potenciálový limit $-0,3$ V a počet cyklů 3.

Za určených optimálních podmínek již mohly být ověřeny hypotézy stanovené pro provádění cyklické voltametrie kyseliny askorbové o různých koncentracích a při různých skenovacích rychlostech. Při měření roztoku kyseliny askorbové o různých koncentracích byla potvrzena Hypotéza 1, tedy že s rostoucí koncentrací elektroaktivní látky v roztoku roste výška proudového píku na cyklickém voltamogramu (Obr. 3.7). Měření roztoku kyseliny askorbové při různých skenovacích rychlostech ukázalo, že platí Hypotéza 2, kdy výška proudového píku roste se zvyšující se skenovací rychlostí (Obr. 3.8). Při porovnání voltamogramů kyseliny askorbové (Obr. 3.7 a 3.8) s voltamogramy ferrikyanidu draselného (Obr. 3.1 a 3.2) je zřejmé, že elektrodový mechanismus oxidace kyseliny askorbové probíhá složitěji, než je tomu u ferrikyanidu, protože její voltamogramy nemají tolik pravidelný průběh. Pozorovaný jev svědčí o vhodnosti ferrikyanidu draselného jako elektrochemického standardu.

Z bakalářské práce vyplývá, že cyklická voltametrie je spolehlivá metoda, která má celou řadu výhod a nabízí možnost kvalitativního i kvantitativního stanovení velkého množství látek. Vyniká vysokou citlivostí, je použitelná pro široký rozsah koncentrací elektroaktivních látek a pro množství pomocných elektrolytů jako rozpouštědel. Analýza je také velmi rychle proveditelná a umožňuje současné měření více analytů a stanovení kinetických i dynamických parametrů elektrodových reakcí. [8] Elektrody na voltametii mohou být snadno miniaturizovány a použity pro měření koncentrace kyseliny askorbové přímo uvnitř lidského organismu po zavedení mikroelektrody do příslušné tkáně. [27,30] Metoda je však velmi náročná na správné nastavení parametrů a nalezení vhodných podmínek pro měření. Na měření kyseliny askorbové má kromě faktorů zkoumaných v této práci (materiálu pracovní elektrody, druhu indiferentního elektrolytu a jeho koncentrace, pH rozpouštědla a parametrů cyklické voltametrie) dále vliv např. teplota a celková iontová síla roztoku [8]. K realizaci správně fungujícího senzoru pro měření kyseliny askorbové proto často vede dlouhá cesta, během které je nutno danou metodu optimalizovat. Po nalezení vhodných podmínek a přizpůsobení zařízení těmto podmínkám již bývá měření cyklickou voltametrií bezproblémové a spolehlivé.

5 Závěr

V rámci bakalářské práce bylo provedeno zapojení přístroje eDAQ ER466 Potentiostat v biochemické laboratoři a došlo k jeho zprovoznění. Jako součást práce byl sepsán návod na provedení cyklické voltametrie na tomto přístroji.

Zařízení bylo otestováno měřením roztoků ferrikyanidu draselného v 0,1M KCl v režimu cyklické voltametrie pro různé koncentrace sledované látky a při různých skenovacích rychlostech. Byly potvrzeny obě stanovené hypotézy, tedy že se zvyšující se koncentrací roztoku a rostoucí skenovací rychlostí roste velikost proudu v příslušném píku cyklického voltamogramu.

Dále byl analyzován vliv podmínek měření na voltametrické stanovení kyseliny askorbové. Měření proběhla pro různé materiály pracovní elektrody elektrochemického senzoru, několik pomocných elektrolytů, více koncentrací nejvhodnějšího pomocného elektrolytu a řadu hodnot pH rozpouštědla. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s roztokem chloridu draselného o koncentraci 0,1 mol/l a s platinovou a grafitovou pracovní elektrodou elektrochemického senzoru. Při měření v dihydrogenfosforečnanu draselném bylo nejvíce vyhovující pH 5. Nejvhodnější parametry cyklické voltametrie jsou: počáteční a konečný vkládaný potenciál 1 V, horní potenciálový limit 1 V, spodní potenciálový limit $-0,3$ V a počet cyklů 3.

Po optimalizaci podmínek měření byla provedena cyklická voltametrie kyseliny askorbové. Pro oba provedené experimenty byly potvrzeny stanovené hypotézy. S rostoucí koncentrací roztoku kyseliny askorbové se zvyšoval proudový pík na cyklickém voltamogramu a rostl také s rostoucí skenovací rychlostí. Závěrem byly zhodnoceny možnosti voltametrického stanovení kyseliny askorbové, z nichž vyplývá, že cyklická voltametrie je pro tento účel vhodnou metodou.

Seznam použité literatury

- [1] DAVEY, Mark W, Marc Van MONTAGU a Dirk INZÉ. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2000, **80**(7), 36 [cit. 2017-02-07]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<825::AID-JSFA598>3.3.CO;2-Y. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7%3C825::AID-JSFA598%3E3.0.CO;2-6/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7%3C825::AID-JSFA598%3E3.0.CO;2-6/abstract)
- [2] HERNÁNDEZ, Yurena, M. Gloria LOBO a Mónica GONZÁLEZ. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry* [online]. 2006, **96**(4), 654-664 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.012. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460500302X>
- [3] ARRIGONI, Oreste a Mario C. DE TULLIO. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2002, **1569**(1-3), 1-9 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1016/S0304-4165(01)00235-5. ISSN 03044165. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416501002355>
- [4] KLEIN, Barbara P.; KURILICH, Anne C. Processing effects on dietary antioxidants from plant foods. *HortScience*, 2000, 35.4: 580-584.
- [5] ARYA, S.P, M MAHAJAN a P JAIN. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2000, **417**(1), 1-14 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)00909-0. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267000009090>
- [6] PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. 1. vydání. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
- [7] WAWRZYNIAK, Jolanta, RYDZIECKI, Antoni, ZEMBRZUSKI, Włodzimierz. APPLICATION OF VOLTAMMETRY TO DETERMINE VITAMIN C IN APPLE JUICES. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.*, 2005, 4.2: 5 - 16.
- [8] SETTLE, Frank A. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall PTR, c1997. ISBN 0131773380.
- [9] WANG, Joseph. *Analytical electrochemistry*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-VCH, c2006. ISBN 0-471-67879-1.
- [10] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [11] BARD, Allen J. a Larry R. FAULKNER. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, c2001. ISBN 0-471-04372-9.

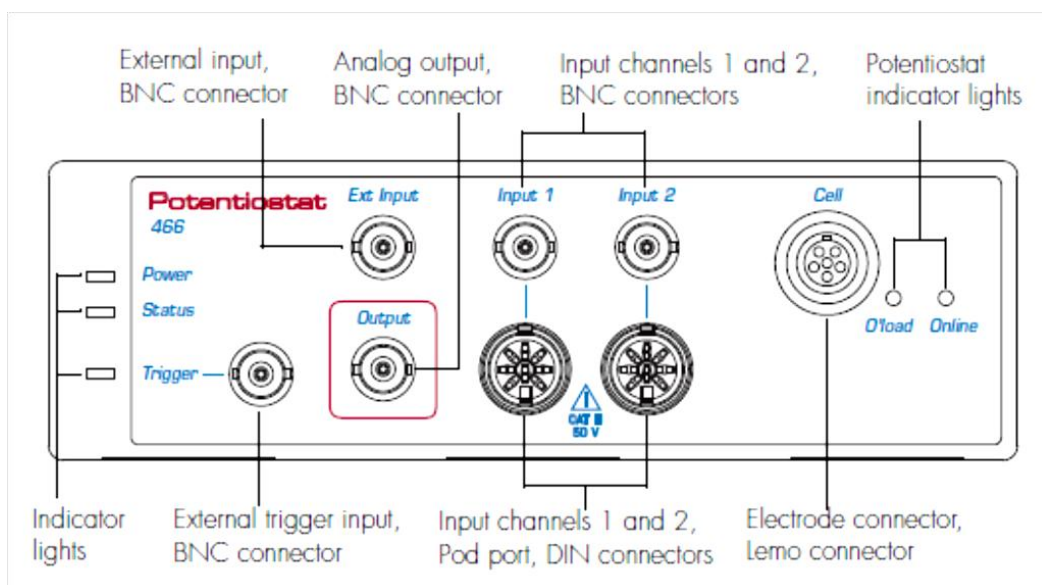
- [12] BAREK, Jiří, František OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1146-5.
- [13] SHUMYANTSEVA, V. V., T. V. BULKO, E. V. SUPRUN, A. V. KUZIKOV, L. E. AGAFONOVA a A. I. ARCHAKOV. Electrochemical methods in biomedical studies. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* [online]. 2015, **9**(3), 228-243 [cit. 2016-10-18]. DOI: 10.1134/S1990750815030087. ISSN 1990-7508. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1990750815030087>
- [14] HELÁN, V. *Elektroanalytické metody: sborník přednášek z kurzu*. 1. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2001. Analytical standards and equipment. ISBN 80-86380-07-6.
- [15] HEYROVSKÝ, Michael. Polarography—past, present, and future. *Journal of Solid State Electrochemistry* [online]. 2011, **15**(7-8), 1799-1803 [cit. 2016-10-18]. DOI: 10.1007/s10008-010-1244-0. ISSN 1432-8488. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10008-010-1244-0>
- [16] KRÍŽENECKÁ, Sylvie a Václav SYNEK. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 978-80-7414-804-0.
- [17] LAKSHMINARAYANAN, V. Polarography. *Resonance* [online]. 2004, **9**(9), 51-61 [cit. 2016-10-19]. DOI: 10.1007/BF02837592. ISSN 0971-8044. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02837592>
- [18] Difúze v nestacionárním stavu - polarografie. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. 2015 [cit. 2016-10-19]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JVAMG.htm>
- [19] LUKASZEWSKI, Zenon, Krzysztof TOMASZEWSKI a Waldemar MENDYK. Experimental verification of theoretically predicted effects of reactant adsorption in normal pulse polarography. *Journal of Electroanalytical Chemistry* [online]. 1993, **344**(1-2), 13-24 [cit. 2016-10-21]. DOI: 10.1016/0022-0728(93)80043-H. ISSN 15726657. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002207289380043H>
- [20] GALCERAN, Josep, José SALVADOR, Jaume PUY, Joan CECÍLIA, Miquel ESTEBAN a Francesc MAS. Influence of adsorption on calibration curves in normal pulse polarography. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1995, **305**(1-3), 273-284 [cit. 2016-10-21]. DOI: 10.1016/0003-2670(94)00372-S. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000326709400372S>
- [21] OSTERYOUNG, Janet G., Joseph H. CHRISTIE a Robert A. OSTERYOUNG. Electroanalytical Applications of Pulse Polarography and Voltammetry. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges* [online]. 1975, **84**(6), 647-656 [cit. 2016-10-21]. DOI: 10.1002/bscb.19750840610. ISSN 00379646. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bscb.19750840610>

- [22] ZÝKA, Jaroslav. *Analytická příručka*. 3., přeprac., rozš. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1979.
- [23] THOEGERSEN, Niels., Jiri. JANATA a Jaromir. RUZICKA. Flow injection analysis and cyclic voltammetry. *Analytical Chemistry* [online]. 1983,**55**(12), 1986-1988 [cit. 2016-10-22]. DOI: 10.1021/ac00262a035. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00262a035>
- [24] KALVODA, R. Netradiční použití voltametrie/polarografie. *Chemické listy*. 2000, 94(1), 8.
- [25] EDITORS, Yuki Saito and Takumi Kikuchi. *Voltammetry: theory, types and applications*. 2013. ISBN 9781629480589.
- [26] KAZEMI-DARSANAKI, R., A. AZIZADEH, M. NOURBAKHS, G. RAEISI a M. AZIZOLLAHIALIABADI. Biosensors: Functions and Applications. *Journal of Biology and Today's World* [online]. 2013, **2**(1), - [cit. 2016-10-29]. DOI: 10.15412/J.BTW.01020105. ISSN 23223308. Dostupné z: <http://journals.lexispublisher.com/jbtw/paper/10094>
- [27] GOUVEA, Cibele. Biosensors for health applications. *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity* [online]. InTech, 2011 [cit. 2016-10-29]. DOI: 10.5772/16983. ISBN 978-953-307-443-6. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biosensors-for-health-environment-and-biosecurity/biosensors-for-health-applications>
- [28] PISOSCHI, Aurelia, Aneta POP, Gheorghe Petre NEGULESCU a Aurel PISOSCHI. Determination of Ascorbic Acid Content of Some Fruit Juices and Wine by Voltammetry Performed at Pt and Carbon Paste Electrodes. *Molecules* [online]. 2011, **16**(12), 1349-1365 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.3390/molecules16021349. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/2/1349/>
- [29] KISSINGER, Peter T. a William R. HEINEMAN. *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c1996. ISBN 0824794451.
- [30] ARYA, S.P, M MAHAJAN a P JAIN. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2000, **417**(1), 1-14 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)00909-0. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267000009090>
- [31] HERNÁNDEZ, Yurena, M. Gloria LOBO a Mónica GONZÁLEZ. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry* [online]. 2006, **96**(4), 654-664 [cit. 2017-02-10]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.012. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460500302X>

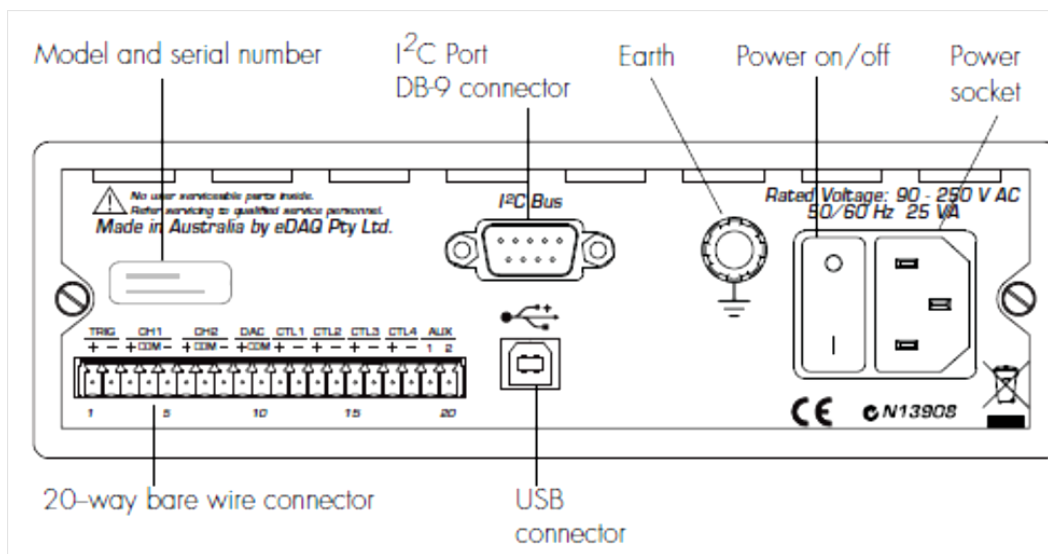
- [32] ŠKROVÁNKOVÁ, Soňa, et al. Determination of ascorbic acid by electrochemical techniques and other methods. *International Journal of Electrochemical Science*, 2015.
- [33] TOMITA, I. N., A. MANZOLI, F. L. FERTONANI a H. YAMANAKA. Amperometric biosensor for ascorbic acid. *Eclética Química* [online]. 2005, **30**(2), - [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1590/S0100-46702005000200005. ISSN 0100-4670. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-4670200500200005&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- [34] STANIĆ, Zorka a Jelena STEPANOVIĆ. Potentiometric determination of ascorbic acid in water–acetonitrile solution using pyrite and chalcopyrite electrodes. *Journal of Solid State Electrochemistry* [online]. 2016, **20**(10), 2879-2893 [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1007/s10008-016-3295-3. ISSN 1432-8488. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10008-016-3295-3>
- [35] NGAI, Koh Sing, et al. Voltammetry detection of ascorbic acid at glassy carbon electrode modified by single-walled carbon nanotube/zinc oxide. *Int. J. Electrochem. Sci*, 2013, 8: 10557-10567.
- [36] BEHFAR, Abdol Azim, et al. Determination of L-ascorbic acid in plasma by voltammetric method. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 2010, 123-128.
- [37] PISOSCHI, Aurelia Magdalena, Andrei Florin DANET a Slawomir KALINOWSKI. Ascorbic Acid Determination in Commercial Fruit Juice Samples by Cyclic Voltammetry. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry* [online]. 2008, **2008**, 1-8 [cit. 2017-01-07]. DOI: 10.1155/2008/937651. ISSN 1463-9246. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jamc/2008/937651/>
- [38] GANCHIMEG, P., W.T. TAN, N.A. YUSOF a J.K. GOH. Voltammetric Oxidation of Ascorbic Acid Mediated by Multi-Walled Carbon Nanotubes/Titanium Dioxide Composite Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of Applied Sciences* [online]. 2011-5-1, **11**(5), 848-854 [cit. 2017-02-17]. DOI: 10.3923/jas.2011.848.854. ISSN 18125654. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jas.2011.848.854>
- [39] ERDURAK-KILIÇ, C. S., B. USLU, B. DOGAN, U. OZGEN, S. A. OZKAN a M. COSKUN. Anodic voltammetric behavior of ascorbic acid and its selective determination in pharmaceutical dosage forms and some Rosa species of Turkey. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2006, **61**(11), 1113-1120 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1134/S106193480611013X. ISSN 1061-9348. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S106193480611013X>
- [40] Potentiostat 466 System (Model ER466). *EDAQ* [online]. 2016 [cit. 2016-12-19]. Dostupné z: https://www.edaq.com/product_sheets/bundles/ER466_Potentiostat.pdf
- [41] *Potentiostat 466: User Manual*. Denistone East, Australia: eDAQ Pty, 2010.

- [42] *EChem User's Guide: & using Chart & Scope software for Electrochemistry*. Castle Hill, Australia: ADInstruments Pty, 1999.
- [43] ELEKTROCHEMICKÝ SENZOR Typ: AC1.W*.R* (*). *BVT Technologies, a.s.* [online]. 2016 [cit. 2016-12-19]. Dostupné z: http://www.bvt.cz/_ftp/CZ/Senzory/01-CZ-AC1.pdf
- [44] KONEKTOR PRO ELEKTROCHEMICKÉ SENZORY TYPY AC1, AC4, AC11, AP1, CC1, CC2, TS1 Typ: KA1C.*. *BVT Technologies, a.s.* [online]. 2016 [cit. 2016-12-19]. Dostupné z: http://www.bvt.cz/_ftp/CZ/Konektory/CZ-KA1C.pdf
- [45] Univerzita Palackého v Olomouci. Katedra fyzikální chemie. [online]. [cit. 2016-12-11]. Dostupné z: http://fch.upol.cz/skripta/pok1/Cyklicka_voltametrie.pdf
- [46] ADAMS, Ralph N. *Electrochemistry at solid electrodes*. New York: Marcel Dekker, 1969. Monographs in electroanalytical chemistry and electrochemistry.
- [47] CAI, Weihua, Ting LAI, Haijun DU a Jianshan YE. Electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on an exfoliated graphite paper electrode: A high performance flexible sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2014, **193**, 492-500 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1016/j.snb.2013.12.004. ISSN 09254005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400513014767>
- [48] PISOSCHI, Aurelia, Aneta POP, Gheorghe Petre NEGULESCU a Aurel PISOSCHI. Determination of Ascorbic Acid Content of Some Fruit Juices and Wine by Voltammetry Performed at Pt and Carbon Paste Electrodes. *Molecules* [online]. 2011, **16**(12), 1349-1365 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.3390/molecules16021349. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/2/1349/>
- [49] DURSUN, Zekerya, Levent PELIT a Isao TANIGUCHI. Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Dopamine Simultaneously at a Single Crystal Au(111) Electrode. *Turkish Journal of Chemistry* [online]. 2009, **33**(2), 9 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.3906/kim-0802-30. Dostupné z: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-70349123380&origin=inward&txGid=43E1EB1D57CC971C232D37F4D73FD7BE.wsnAw8kcdt7IPYLO0V48gA%3a7>
- [50] VITTAL, R. Surfactant Promoted Enhancement in Electrochemical and Electrochromic Properties of Films of Prussian Blue and Its Analogs. *Journal of The Electrochemical Society* [online]. **146**(2), 786- [cit. 2017-03-22]. DOI: 10.1149/1.1391682. ISSN 00134651. Dostupné z: <http://jes.ecsdl.org/cgi/doi/10.1149/1.1391682>
- [51] NGAI, Koh Sing, et al. Voltammetry detection of ascorbic acid at glassy carbon electrode modified by single-walled carbon nanotube/zinc oxide. *Int. J. Electrochem. Sci*, 2013, 8: 10557-10567.

Příloha A: Návod na provedení cyklické voltametrie na Potenciostatu 466 eDAQ



Obr. A.1: Čelní panel Potenciostatu 466 [41]



Obr. A.2: Zadní panel Potenciostatu 466 [41]

1. Připojte potenciostat do síťové zásuvky napájecím kabelem, který byl dodán spolu se zařízením. Zdířka pro napájecí kabel se nachází na zadní straně přístroje a na Obr. A.2 je označena jako „Power socket“.
2. Zapněte vypínač na zadním panelu potenciostatu („Power on/off“ na Obr. A.2).
3. a) Po každém zapnutí provádí potenciostat self-test, který je doprovázen indikací světelnými kontrolkami. Indikační světélka se nacházejí v levé části čelního panelu

(„Indicator lights“ na Obr. A.1). Všechna tři indikační světélka na čelním panelu by se měla ihned po zapnutí krátce rozsvítit. Indikátor zapnutí („Power“) by měl svítit modře, pokud je potenciostat zapnutý. Pokud vnitřní diagnostická kontrola nenajde žádný problém, indikátor stavu („Status“) by se měl rozsvítit žlutě a dále svítit zeleně. Trigger indikátor („Trigger“) by se měl nejprve rozsvítit žlutě a poté zhasnout.

b) Pokud se indikátor zapnutí po zapnutí přístroje nerozsvítí modře, je zde problém s napájecím zdrojem, napájecím kabelem nebo samotným přístrojem. Zkontrolujte proto všechna připojení.

c) Pokud se vyskytne chyba během self-testu, indikátor stavu začne blikat červeně, což značí chybu hardwaru. Vše vypněte a nejdříve po pěti sekundách opět zapněte potenciostat, což může přechodný problém vyřešit. Pokud indikátor stavu bliká červeně i nadále, je potřeba potenciostat opravit a měli byste kontaktovat výrobce.

d) Pokud se všechny indikátory rozsvítí tak, jak mají, pak je potenciostat připravený k bezpečnému připojení k počítači.

4. Připojte potenciostat k počítači pomocí USB kabelu, který byl dodán spolu se zařízením, nebo pomocí jiného standardního vysokorychlostního USB kabelu. Konektor pro USB se nachází na zadním panelu potenciostatu (na Obr. A.2 je označen jako „USB connector“). Nevypojujte USB, pokud je používán software, vypněte software před odpojením USB kabelu.

5. a) K potenciostatu připojte elektrodový kabel. Elektrodový konektor je umístěn na pravé straně čelního panelu potenciostatu (na Obr. A.1 je označen jako „Electrode connector“). Elektrodový kabel je vybaven konektorem, který pasuje do této zdířky. Pro vypojení jednoduše zatáhněte. Potenciostat je dodán s elektrodovým kabelem složeným ze třech vodičů, z nichž každý je vybaven miniaturní krokodýlovou sponkou. Krokodýlci umožňují připojení široké škály elektrod a vodiče jsou kódovány barevně pro rozlišení typu elektrody (Tabulka A.1).

b) Vyhněte se namočení krokodýlků, zvláště v roztoku elektrolytu, který může urychlit korozi. Po namočení okamžitě odpojte krokodýlové sponky od potenciostatu a opláchněte je deionizovanou vodou pro odstranění elektrolytu a ihned vysušte papírovým ubrouskem. Nikdy neponořujte žádnou část elektrodového kabelu do vody nebo jiné kapaliny.

Tabulka A.1: Barevné označení elektrodových vodičů

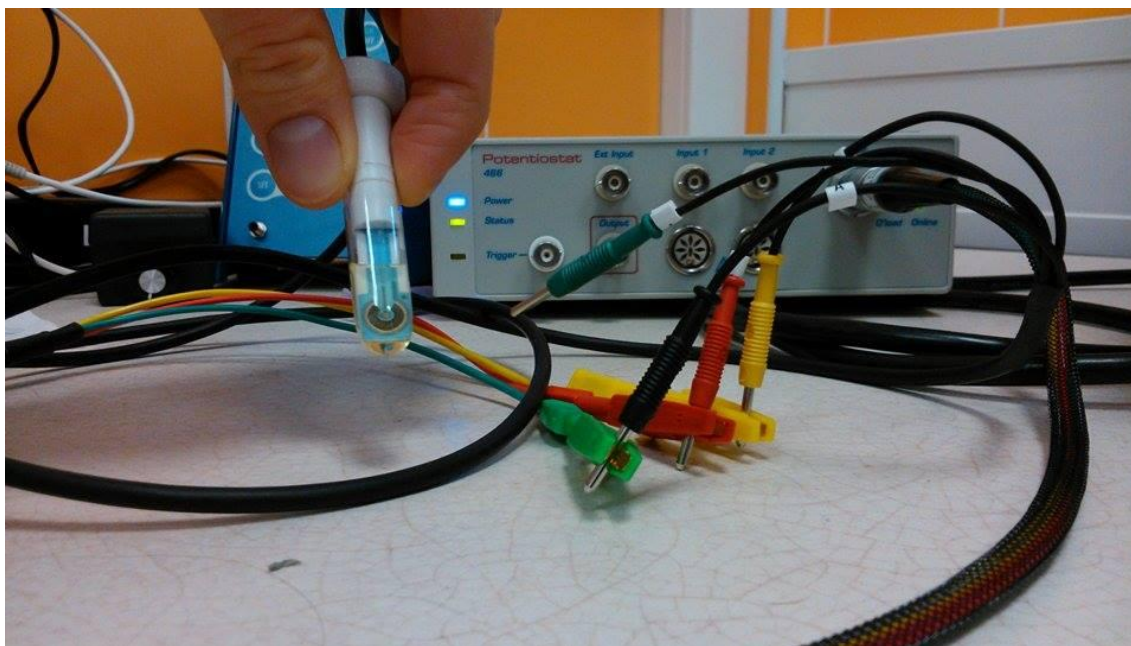
Barva	Elektroda
žlutá	referenční
zelená	pracovní
červená	pomocná

6. Propojte elektrodové vodiče potenciostatu s konektorovým kabelem elektrochemického senzoru. Žlutou a červenou krokodýlkovou sponku připojte na konec konektorového kabelu příslušné barvy. Zelenou krokodýlkovou sponku připojte na černý konec konektorového kabelu.

7. Připojte elektrochemický senzor do konektorového kabelu spojujícího senzor a elektrodový kabel potenciostatu.

8. Ponořte senzor do malé nádobky se zkoumaným elektrolytem.

Zapojení provedené v krocích 6. až 8. je znázorněno na Obr. A.3.

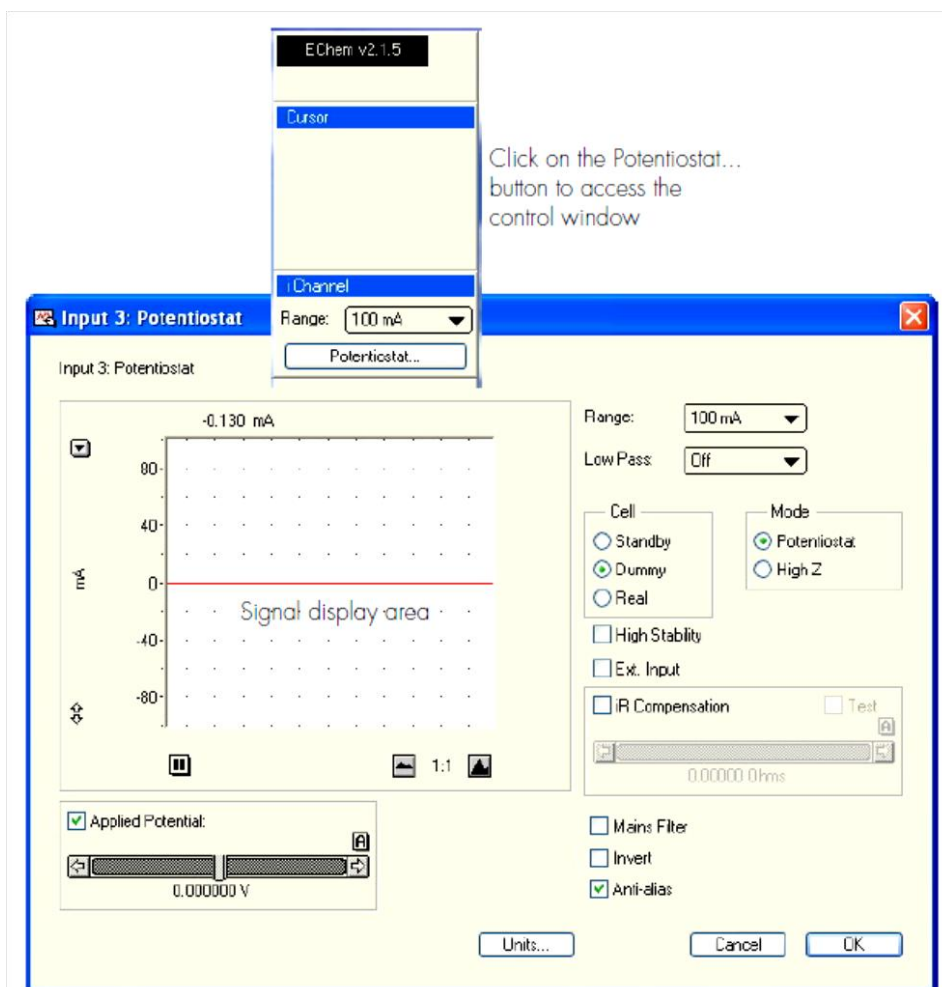


Obr. A.3: Zapojení konektoru elektrochemického senzoru k elektrodovým vodičům potenciostatu
[zdroj: autor]

9. Pokud se kdykoli během experimentu rozsvítí indikátor přetížení, znamená to obvykle rozpojený obvod, nebo nadměrný odpor elektrochemické cely. S vyšším odporem se můžeme často setkat, když jsou elektrody znečištěny produkty elektrolýzy. Indikátor přetížení je umístěn v pravé části čelního panelu (na Obr. A.1 jako „O'load“ pod „Potentiostat indicator lights“). Při jeho rozsvícení přístroj slyšitelně pípne a kontrolka zůstane svítit, dokud nebude zaznamenávání zastaveno a restartováno. Veškerá data získaná v této době jsou nespolehlivá a měla by být smazána.

10. Spusťte EChem software kliknutím na jeho ikonu v počítači. Pokud dojde k inicializaci potenciostatu softwarem, rozsvítí se online indikátor umístěný v pravé části čelního panelu (na Obr. A.1 se nachází pod „Potentiostat indicator lights“).

11. a) Na panelu v pravé části okna EChem softwaru klikněte na ikonu „Potentiostat...“. Otevře se Řídicí okno potenciostatu znázorněné na Obr. A.4.



Obr. A.4: Řídicí okno potenciostatu [41]

b) Přepněte potenciostat do režimu „Real“ v nabídce „Cell“, čímž se aktivují elektrodové vodiče ponořené do roztoku elektrolytu.

c) Pomocí rolovacího menu „Range“ lze měnit proudový rozsah na elektrodách a tím i rozsah potenciálu aplikovaného na elektrody.

d) Posuvníkem „Applied Potential“ nebo zadáním přesné hodnoty pomocí kliknutí na symbol „A“ lze měnit použitý potenciál na elektrodách.

e) Potvrďte nastavení potenciostatu kliknutím na „OK“ v řídicím okně, které se tímto uzavře.

12. a) Na horní liště okna softwaru rozbalte menu „Technique“ a zvolte metodu, např. „Cyclic Voltammetry“.

b) Zobrazí se okno (Obr. A.5), pomocí něhož nastavíte parametry uvedené metody. Potvrďte nastavení parametrů kliknutím na „OK“.

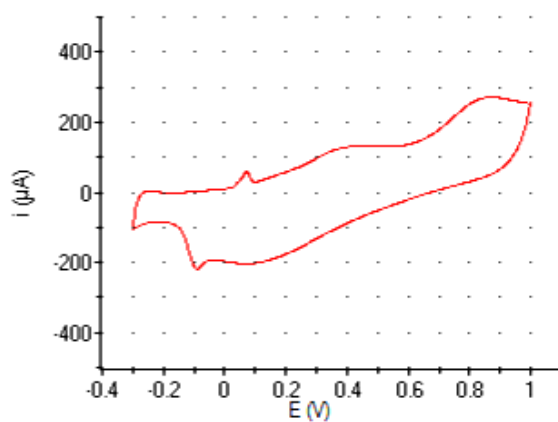
Staircase Cyclic Voltammetry		Range: 2000mV
Ramp	Limits	Speed: 10kHz
Initial: -500 mV	Upper: 1000 mV	S. Period: 5 ms
Final: -500 mV	Lower: -1000 mV	Rest Time: 2 s
Rate: 100 mV/s	Cycles	
Width: 20 ms	Number of Cycles: 3	
Height: 2 mV	<input checked="" type="checkbox"/> + Initial Direction	
Steps: 2000		<input type="button" value="View..."/>
<input type="checkbox"/> Deposition	<input type="checkbox"/> Clean Time	<input type="button" value="Cancel"/>
Pot. [] mV	Pot. [] mV	<input type="button" value="OK"/>
Time [] s	Time [] s	
<input type="checkbox"/> Stirrer		
<input type="checkbox"/> Gas		

Obr. A.5: Okno pro nastavení parametrů cyklické voltametrie [42]

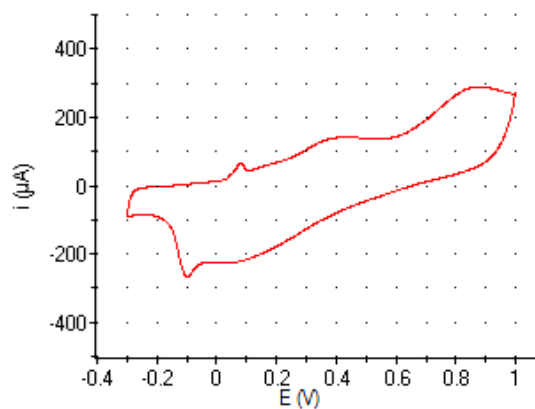
13. V levé části horní lišty softwarového okna klikněte na „File“ a zvolte „New“. Zobrazí se nové okno, do kterého bude vykreslen voltamogram probíhajícího experimentu.

14. Pro spuštění zaznamenávání voltametrické křivky klikněte na tlačítko „Start“ v pravém dolním rohu softwarového okna. [41,42]

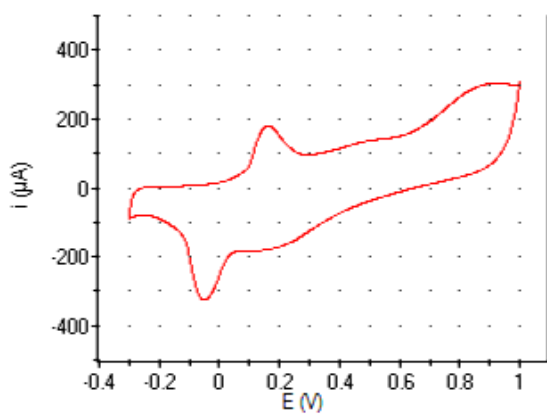
Příloha B: Vliv pH indifferenty elektrolytu – voltamogramy



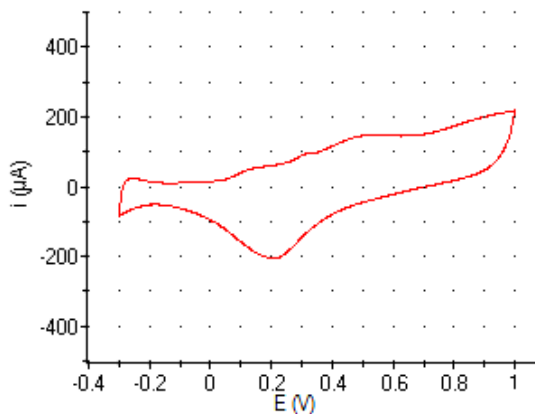
a)



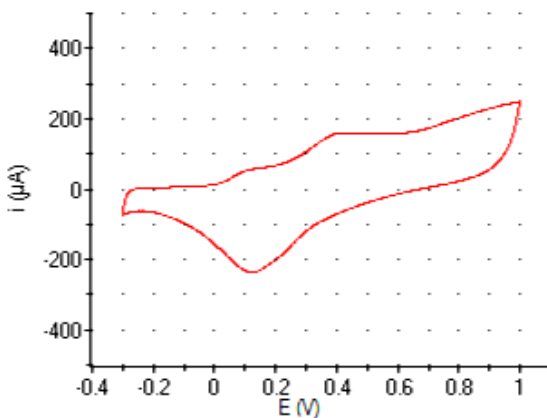
b)



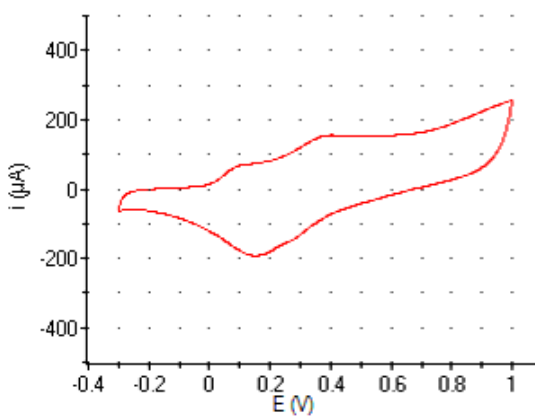
c)



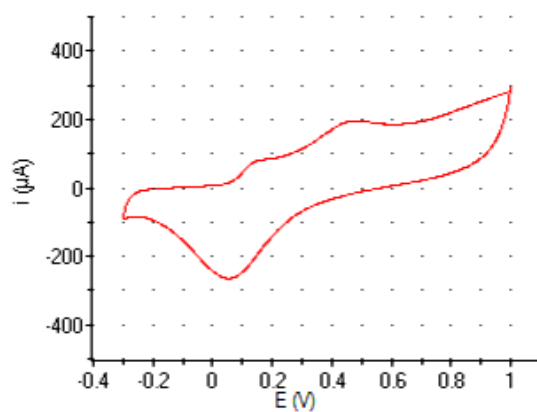
d)



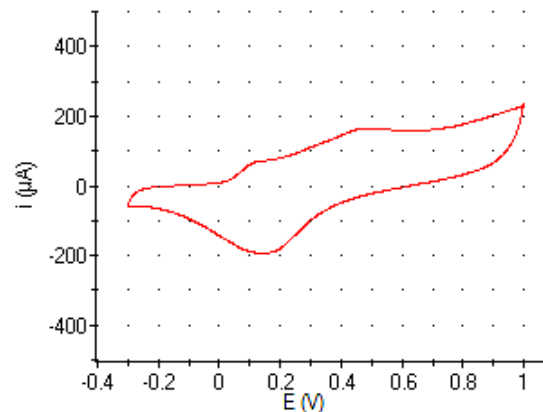
e)



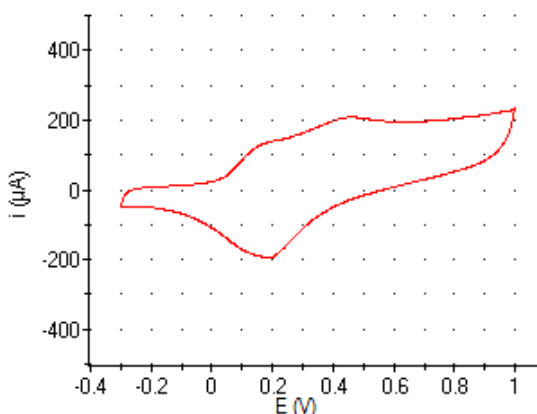
f)



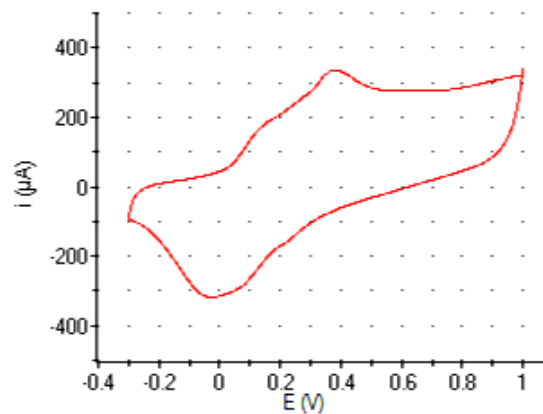
g)



h)



i)



j)

Obr. B.1: Voltamogramy kyseliny askorbové (3,5mM) v 0,1M KH_2PO_4 o pH a) 3, b) 4, c) 5, d) 6, e) 7, f) 8, g) 9, h) 10, i) 11 a j) 12 při skenovací rychlosti 1 V/s