



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

Elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku

Electrochemical evaluation of dissolved oxygen

Bakalářská práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský technik

Autor bakalářské práce: Bibiana Kvasnicová

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Lenka Strnadová

Kladno 2019



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kvasnicová** Jméno: **Bibiana** Osobní číslo: **465416**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra biomedicínské techniky**
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**
Studijní obor: **Biomedicínský technik**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku

Název bakalářské práce anglicky:

Electrochemical evaluation of dissolved oxygen

Pokyny pro vypracování:

Navrhněte vhodné zapojení přístroje eDAQ a miniaturní kyslíkové elektrody pro elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku v biochemické laboratoři. Přístroj zprovozněte a pro sadu vzorků proveďte sérii amperometrických měření. Měření vyhodnoťte a diskutujte dosažené výsledky. Na základě získaných zkušeností sestavte jednoduchý návod pro používání přístroje, jeho kalibraci a měření obsahu rozpuštěného kyslíku ve vzorku.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Murugaiyan, S.B., Ramasamy, R., Gopal, N., Kuzhandaivelu, V., Biosensors in clinical chemistry: An overview, Advanced Biomedical Research, ročník 67, číslo 3, 2014
- [2] Kodíček, M., Valentová, O., Hynek, R., Biochemie, ed. 1., Vysoká škola chemicko-technologická Praha, 2015, ISBN 978-80-7080-927-3
- [3] Klouda, P., Moderní analytické metody, ed. 2, Pavel Klouda, Ostrava, 2003, ISBN 80-86369-07-2
- [4] Ramamoorthy, R., Dutta, P.K., Akbar, S.A., Oxygen sensors: Materials, methods, designs and applications, Journal of Materials Science, ročník 38, číslo 21, 2003
- [5] Clark, L.C. Jr., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z., Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography, Journal of Applied Physiology, ročník 6, číslo 3, 1953

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Lenka Strnadová

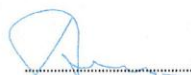
Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Ing. Zuzana Fílová

Datum zadání bakalářské práce: **18.02.2019**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2020**


prof. Ing. Peter Kneppo, DrSc.
podpis vedoucí(ho) katedry


prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku“ 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 15. 5. 2019



.....
Bibiana Kvasnicová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych vyjádřila upřímné poděkování své vedoucí práce, paní Ing. Lence Strnadové, za její ochotu, odbornou pomoc a čas, který mi věnovala během celého roku při naší spolupráci.

ABSTRAKT

Elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku

Elektrochemické stanovení kyslíku je běžnou metodou v klinické praxi. Cílem bakalářské práce je nalézt vhodné zapojení potenciostatu eDAQ a miniaturní kyslíkové elektrody pro elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku, následně zapojení a funkčnost měřicí soustavy otestovat na sadě vzorků, ve kterých proběhne amperometrické měření. K ověření byla použita koncentrační řada chloridu sodného o konstantní teplotě a vzorky s různou teplotou. Na základě výsledků byla metoda optimalizována. Pro průběh amperometrie bylo zvoleno konstantní napětí -680 mV se dvěma napěťovými pulzy s hodnotami -50 mV. Výstupem měření byl elektrický proud úměrný množství rozpuštěného kyslíku ve vzorku. Dle výsledků experimentů se potvrdilo klesající množství rozpuštěného kyslíku s rostoucí iontovou silou měřeného roztoku a klesající množství kyslíku s rostoucí teplotou vzorku.

Klíčová slova

amperometrie, rozpuštěný kyslík, elektrochemické stanovení

ABSTRACT

Electrochemical evaluation of dissolved oxygen

Electrochemical evaluation is a common method in clinical practice. The aim of the thesis is to wire given devices (potentiostat eDAQ and miniature oxygen probe) for the evaluation of dissolved oxygen, test the function of devices and perform a pilot amperometric measurement in chosen solutions. The pilot measurement was performed in the concentration row of sodium chloride of constant temperature and in water of different temperatures. Based on results of the measurement, conditions were optimized. The chosen voltage for the amperometric experiment was -680 mV with two additional impulses of -50 mV. The output of the experiment was an electric current proportional to the amount of dissolved oxygen in the solution. The results confirmed decreasing amount of oxygen in solutions with higher ionic strength and higher temperature.

Keywords

amperometry, dissolved oxygen, electrochemical evaluation

Obsah

Seznam symbolů a zkratek.....	9
1 Úvod	10
1.1 Cíle práce	10
2 Přehled současného stavu.....	12
2.1 Elektrochemie a základní pojmy	12
2.1.1 Elektrochemické metody	12
2.1.2 Elektrody	13
2.1.3 Amperometrie	15
2.1.4 Biosenzory.....	15
2.2 Fyzikální vlastnosti plynů	17
2.2.1 Daltonův zákon a parciální tlak.....	17
2.2.2 Henryho zákon	18
2.3 Kyslík	19
2.3.1 Význam kyslíku pro lidský organismus.....	19
2.3.2 Stanovení kyslíku v klinické praxi.....	20
2.3.2.1 Invazivní stanovení kyslíku	20
2.3.2.2 Neinvazivní stanovení kyslíku.....	23
2.4 Clarkova elektroda	26
3 Metody	29
3.1 Přístrojové vybavení.....	29
3.1.1 Potenciostat eDAQ ER466.....	29
3.1.2 Software EChem ES260.....	31
3.1.3 Miniaturní kyslíková elektroda	33
3.1.4 Elektrochemická cela TC4 a míchadlo ST1	34
3.1.5 Termostat MT-1	35
3.1.6 Výsledné zapojení	36
3.2 Chemikálie	37
3.2.1 Destilovaná voda.....	37
3.2.2 Roztok chloridu draselného.....	37
3.2.3 Roztok siřičitanu sodného	37

3.2.4	Roztoky chloridu sodného.....	37
4	Výsledky.....	38
4.1	Kalibrace a proměření koncentrační řady NaCl.....	38
4.2	Závislost elektrického signálu na teplotě vody	40
5	Diskuze.....	41
6	Závěr	43
	Seznam použité literatury	44
	Příloha A: Návod na provedení kalibrace a elektrochemického stanovení kyslíku	47

Seznam symbolů a zkratek

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
E	V	Elektroodový potenciál
E^0	V	Standardní elektroodový potenciál
R	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	Univerzální plynová konstanta
T	K	Termodynamická teplota
z	-	Mocenství prvku
F	$\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$	Faradayova konstanta
a	$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Chemická aktivita
p	kPa	Tlak
p_i	kPa	Parciální tlak plynu i
V_i	m^3	Objem plynu i
x_i	-	Molární zlomek
k_i	$\text{m}^3\cdot\text{kPa}\cdot\text{mol}^{-1}$	Absorpční koeficient
V	m^3	Objem
n	mol	Látkové množství
$p_a\text{O}_2$	mmHg	Parciální tlak kyslíku v arteriální krvi
$p_A\text{O}_2$	mmHg	Parciální tlak kyslíku v alveolách
m	g	Hmotnost
I	μA	Elektrický proud
c	$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Molární koncentrace
t	$^{\circ}\text{C}$	Teplota

Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ATP	Adenosintrifosfát
EKG	Elektrokardiografie
EEG	Elektroencefalografie
ABR	Acidobazická rovnováha
AC	Pulzní složka (alternating component)
DC	Stejnoseměrná složka (direct component)
PEEK	Polyetereterketon
RTD	Odporový teplotní senzor (resistance temperature detector)
PTE	Peltierův termoelektrický element

1 Úvod

Obsah kyslíku v lidském organismu je důležitým fyziologickým ukazatelem acidobazické rovnováhy. Nejčastěji měříme jeho obsah v krvi, v dýchacích plynech a v tkáních. V medicíně se setkáváme s řadou metod pro jeho stanovení, přičemž elektrochemické stanovení má své nezastupitelné místo, ať už jde o použití např. v analyzátoch krevních plynů dle Astrupa, v transkutánních senzorech či v biosenzorech, kde měřením kyslíku můžeme nepřímo určit jinou látku, např. glukózu.

Lidský organismus funguje aerobně, kyslík je tedy nezbytný pro lidský život. Je využíván při výrobě ATP, tedy molekuly, bez které neprobíhá žádný aktivní děj v těle. Na druhou stranu může vysoká koncentrace kyslíku organismu škodit. Při patologických stavech je tedy nutné monitorovat vnitřní prostředí pacienta. Typicky se měří velikost parciálního tlaku kyslíku.

Cílem této práce je zavést metodu měření kyslíku pomocí potenciostatu od firmy eDAQ a kyslíkové elektrody Clarkova typu, přičemž vytvořený protokol měření a návod může v budoucnosti sloužit jako součást praktické výuky při práci v laboratoři v různých předmětech zabývajících se elektrochemií či fyzikální chemií, jenž s touto problematikou úzce souvisí. Studentům práce přiblíží zejména principy stanovení kyslíku v analyzátoch acidobazické rovnováhy.

1.1 Cíle práce

Prvním cílem dle zadání bakalářské práce je navrhnout vhodné zapojení přístroje eDAQ (potenciostatu ER466) a miniaturní kyslíkové elektrody pro elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku v biochemické laboratoři. Postupováno bude dle dostupných technických manuálů a komunikace s výrobcem obou produktů. Zprovoznění celé měřicí soustavy bude, vzhledem k nárokům na podmínky měření, vyžadovat další vhodné přístrojové vybavení a v neposlední řadě vhodný software, jímž se bude potenciostat ovládat a jímž se budou vyhodnocovat naměřená data.

Dalším navazujícím cílem práce je měřicí soustavu zprovoznit a provést sérii amperometrických měření pro sadu vzorků. Dosažení cíle bude vyžadovat nalezení optimálních metod pro provedení experimentu, které zaručí stálost podmínek při měření, a dále bude vyžadovat vhodné zvolení vzorků, na nichž se bude měření provádět. Metody a vzorky budou zvoleny tak, aby se na nich daly demonstrovat fyzikální principy, jenž ovlivňují množství rozpuštěného kyslíku ve vzorcích a tím pádem i sílu generovaného elektrického signálu, jenž bude hlavním výstupem pro posuzování správnosti zapojení a interpretaci experimentů. Hlavními proměnnými budou teplota a iontová síla použitých roztoků.

Posledním zadaným cílem je sestavit jednoduchý návod pro používání přístroje, jeho kalibraci a měření rozpuštěného kyslíku ve vzorku. Sestavení návodu bude zahrnovat zkušenosti a znalosti získané v průběhu celého procesu zpracovávání tohoto tématu.

2 Přehled současného stavu

2.1 Elektrochemie a základní pojmy

Elektrochemie je vědní obor, který studuje děje a rovnováhy v homogenních i v heterogenních systémech, kde alespoň jedna složka obsahuje částice s elektrickým nábojem. Zkoumá vzájemné působení elektrických a chemických dějů, kdy nastávají chemické změny po průchodu elektrických proudem elektrodami. [1, 2]

2.1.1 Elektrochemické metody

Princip elektrochemických metod spočívá v závislosti elektrochemických vlastností roztoků na jejich složení a koncentraci. Základní prostředek těchto metod je elektrochemický článek. Je tvořený elektrodami ponořenými do roztoku analytu, které jsou zároveň připojené k měřicímu aparátu, jenž vyhodnocuje sledovanou elektrickou aktivitu. Elektrochemický článek označujeme buď jako galvanický, nebo jako elektrolytický. Galvanický článek je zdrojem napětí, na elektrolytickém článku probíhá elektrolýza, tedy vynucený děj. [1]

Pojem elektrochemické metody skrývá četné způsoby a přístupy měření. Obecně tyto metody dělíme na dvě větší skupiny, a sice na:

i) metody založené na měření elektrických vlastností vzorku – sem spadají metody označované jako dielektrimetrie (měření kapacity) a konduktometrie (měření vodivosti)

ii) metody založené na sledování elektrochemického děje – u těchto metod dále rozlišujeme, zda je proud nulový či nikoli.

V případě nulového proudu měříme rovnovážné napětí elektrochemického článku, jedná se o potenciometrii.

Je-li proud nenulový, rozlišujeme řadu metod, např.: voltametrii, polarografii, amperometrii, elektrogravimetrii či coulometrii.

2.1.2 Elektrody

Rozeznáváme elektrody prvního druhu, elektrody druhého druhu a elektrody membránové. [3]

a) Elektrody prvního druhu

Jsou tvořeny kovem ponořeným do roztoku soli, jejíž kationt je iontem materiálu elektrody. Při ponoření kovu do roztoku se kov začne rozpouštět a uvolňovat do roztoku své kationty, viz následující rovnice, kde M označuje kov:



Dle mocenství kationtu se tvoří příslušné množství elektronů. Ty se hromadí v tzv. vodivostním pásu na povrchu kovové elektrody a vytvářejí tak její záporný potenciál vůči roztoku. Při zvýšené koncentraci iontů může dojít i k opačnému jevu, kdy se elektroda nabije kladně tím, že elektrony spotřebuje k redukci kationtů v roztoku a dojde tak k vyloučení dané látky, tj. s oxidačním číslem nula. [3]

Velikost elektrodového potenciálu se dá vypočítat pomocí Nernstovy rovnice, kdy vycházíme ze zápisu elektrodové reakce ve směru redukce. Pak platí:

$$E = E^0 - \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{a_{\text{produkt}}}{a_{\text{reaktant}}}\right), \text{ kde} \quad (2.2)$$

E^0 je standardní elektrodový potenciál měřený vůči standardní vodíkové elektrodě, R je univerzální plynová konstanta, T je termodynamická teplota, z označuje mocenství prvku, F je Faradayova konstanta a a je aktivita kovu.

b) Elektrody druhého druhu

Jsou tvořeny kovem potaženým vrstvou špatně rozpustné soli, která brání přímému kontaktu kovu s roztokem. Kationt soli je stejný jako materiál kovu, aniont je pro změnu shodný s aniontem elektrolytu, se kterým se elektroda aplikuje. Nejznámější elektrody II. druhu jsou kalomelová a argentschloridová elektroda. Vzhledem k toxicitě rtuti se v biomedicině setkáváme právě s argentschloridovými elektrodami, jež nacházejí uplatnění jako referentní elektrody různých analytických systémů nebo jako snímací elektrody biologických signálů.

Kovem u argentschloridové elektrody je stříbro, sůl je typicky chlorid stříbrný a elektrolyt je libovolná sůl s obsahem chloridových aniontů. Její potenciál je možné vyjádřit upravenou Nernstovou rovnicí:

$$E_{\text{Ag|AgCl}} = 0,22 - \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln(a_{\text{Cl}^-}) \quad (2.3)$$

Ze vztahu plyne, že potenciál argentschloridové elektrody je při konstantní teplotě závislý pouze na koncentraci chloridových aniontů. Tento fakt se s výhodou využívá při potřebě aplikace referenční elektrody v měření. Je-li použit elektrolyt o stanovené koncentraci chloridových iontů, zůstává potenciál argentschloridové elektrody velmi stabilní v čase a elektroda je minimálně polarizovatelná. Elektrolyt je pro toto použití nutné oddělit od měřeného roztoku, aby se neměnila aktivita chloridových aniontů.

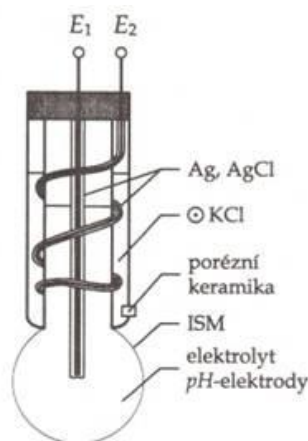
Jsou-li argentschloridové elektrody použity pro snímání biologických potenciálů (např. při EKG či EEG), opět je požadována stabilita elektrodového potenciálu neohledně na chemické změny na kontaktním povrchu pacienta. Stálá koncentrace chloridových iontů je zajištěna příslušným gelem, který funguje jednak jako elektrolyt, jednak jako solný můstek pro vodivé spojení elektrod a pacienta. [3]

c) Elektrody se semipermeabilní membránou

Z názvu je patrné, že tyto elektrody jsou opatřeny membránou. Ta může být dvojího druhu – může se jednat o osmoticky aktivní membránu či o iontově selektivní.

Osmoticky aktivní membrána propouští pouze molekuly vody a její činnost je řízená rozdílem osmotických tlaků na obou stranách membrány. Typickým příkladem je buněčná membrána.

Iontově selektivní membrány umožňují průchod jen vybraným iontům. Je-li vnitřní elektrolyt elektrody oddělen touto membránou od vnějšího měřeného roztoku, ionty tohoto vnějšího roztoku budou hnány koncentračním gradientem do vnitřního elektrolytu. Membrána ovšem propustí jen určitý druh iontů a vzniká tak membránový potenciál. Jeho velikost závisí na rozdílu aktivit sledovaného iontu na obou stranách membrány, dává tedy informaci o rozdílu potenciálů mezi oběma roztoky. Pro měření tohoto potenciálu je třeba využít referenční elektrodu. V současné době se vyrábějí kombinované iontově selektivní elektrody, jež obsahují měrnou i referenční elektrodu s příslušnými elektrolyty. Vhodným příkladem takové elektrody je např. pH elektroda (Obrázek 2.1), Severinghausova elektroda, etc.



Obrázek 2.1: Uspořádání kombinované pH elektrody [3]

2.1.3 Amperometrie

Tato elektrochemická metoda byla zmíněna již výše v klasifikaci metod. Pro potřeby této práce je blíže specifikována a je jí věnována vlastní kapitola. Principem amperometrie je sledování elektrochemického děje, kdy se na pracovní elektrodu vkládá konstantní potenciál, při kterém dochází k oxidaci či redukci analytu. Tyto změny vyvolají tok elektrického proudu, který se snímá v čase. Platí, že velikost proudu je přímo úměrná koncentraci sledované látky.

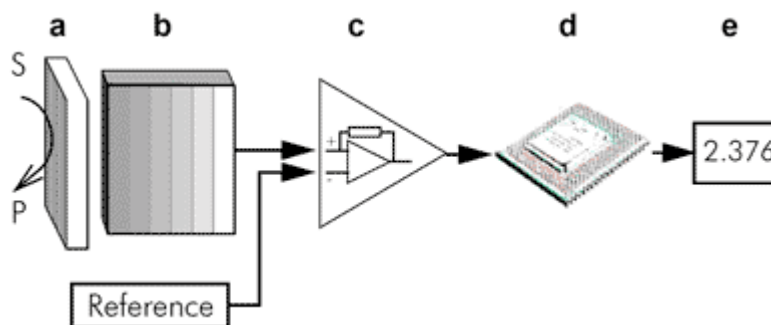
V praxi tento pojem zaštiťuje tzv. přímou amperometrii a amperometrickou titraci. Přímá amperometrie se používá pro měření koncentrace rozpuštěných plynů či pro měření koncentrace látek, které reagují s kyslíkem, případně chemickou reakcí kyslík generují.

Amperometrická titrace je založena na stanovení bodu ekvivalence dle měření změny intenzity elektrického proudu v závislosti na přidávaném objemu titračního činidla, zatímco je mezi pracovní a referenční elektrodou přivedena konstantní hodnota potenciálu.

2.1.4 Biosenzory

Obecně se jedná o analytická zařízení skládající se ze tří komponent: první je prvek přírodního původu, tzv. biorekogniční element, tím může být enzym, protilátka, organela aj. Druhou komponentou je fyzikálně-chemický převodník, jehož podstata je převést interakci biorekogničního elementu na měřitelnou fyzikální veličinu. Třetí komponenta je detektor.

Dle druhu použitého převodníku rozeznáváme biosenzory elektrochemické, optické, piezoelektrické (akustické) a kalorimetrické.

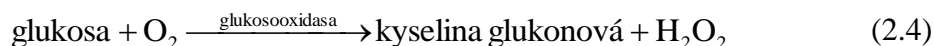


Obrázek 2.2: Schéma biosenzoru – a) biokatalyzátor reagující se substrátem tvořící produkt; b) elektro-chemický převodník; c) zesilovač signálu; d) procesor; e) zobrazení

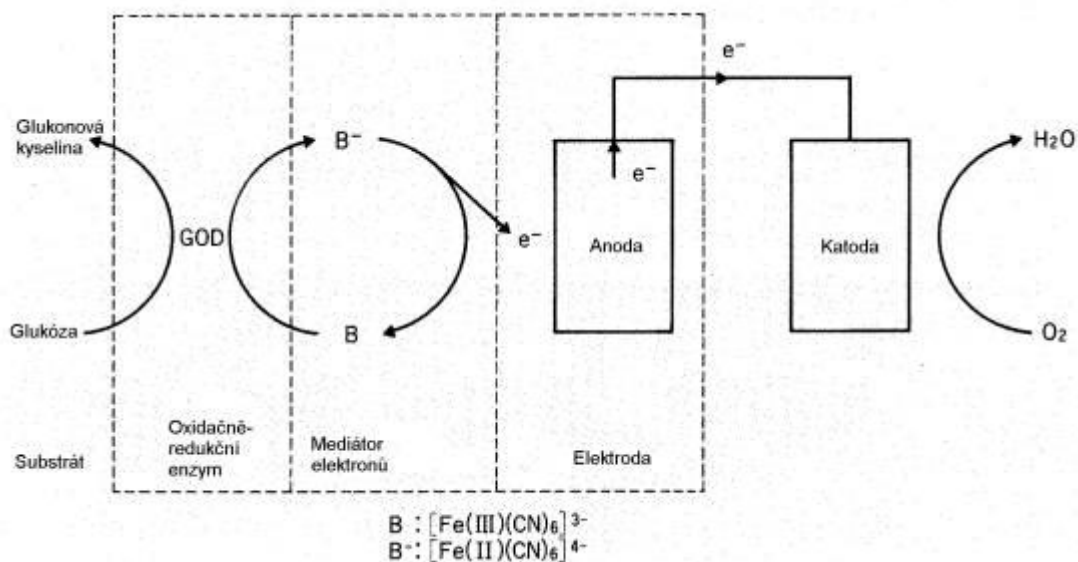
[4]

Hojně využívaným elektrochemickým biosenzorem využívající amperometrii je např. glukometr. Uspořádání a elementy elektrochemických glukometrů je celá řada (rozeznávají se tzv. generace glukometrů), pro ilustraci je uvedeno následující uspořádání:

Biorekogničním elementem je zde enzym glukosooxidasa, fyzikálně-chemický převodník modifikovaná Clarkova elektroda. Principem měření hladiny glukózy v krvi je enzymatická reakce enzymu a glukosy za vzniku kyseliny glukonové a peroxidu vodíku. [5]



Peroxid vodíku je následně oxidován na platinové elektrodě při konstantním napětí, přičemž vzniklý elektrický proud je přímo úměrný koncentraci glukózy v krvi.



Obrázek 2.3: Schéma uspořádání a funkce amperometrického glukometru. [2]

2.2 Fyzikální vlastnosti plynů

Pro popis množství plynu lze využít různé veličiny, ale ne vždy musí vyjadřovat skutečné množství plynu. Existují tzv. termodynamické stavové veličiny, jenž plyny charakterizují. Ty jsou celkem čtyři a jedná se o objem plynu V , látkové množství plynu n , tlak plynu p a termodynamickou teplotu plynu T . Vzájemný vztah mezi veličinami popisuje stavová rovnice ideálního plynu, která je ještě doplněna o univerzální plynovou konstantu R .

$$p \cdot V = n \cdot R \cdot T \quad (2.6)$$

Nutno podotknout, že uvedená rovnice ideálního plynu platí i pro plyny reálné, ale jen v určitém teplotním a tlakovém rozmezí. Pro teplotu 0 °C až 500 °C a tlaky 0 Pa až 5 MPa je možné stavovou rovnici používat pro ideální i reálné plyny. [3]

2.2.1 Daltonův zákon a parciální tlak

Ve směsi plynů jsou jednotlivé plyny dokonale promíseny a tvoří souvislou fázi. Jeden dílčí plyn i o parciálním tlaku p_i přispívá k celkovému tlaku p plyné směsi, přičemž parciální tlak p_i je definován jako tlak, který by jednotlivý plyn měl, kdyby zaujímal veškerý objem V celé směsi při konstantní teplotě.

Pro parciální tlak p_i plynu i , který zaujímá objem V_i ve směsi plynů o celkovém objemu V dále platí vztah 2.7, kde v_i je objemový zlomek a x_i je molární zlomek.

$$p_i = \frac{V_i}{V} \cdot p = v_i \cdot p = x_i \cdot p \quad (2.7)$$

Daltonův zákon pak říká, že celkový tlak p směsi plynů je roven součtu parciálních tlaků p_i jednotlivých složek (plynů) směsi:

$$\sum p_i = p \quad (2.8)$$

Spojením obou vztahů lze vyjádřit např. složení suchého vzduchu při atmosférickém tlaku 101 325 kPa.

Tabulka 1: Složení suchého vzduchu [11]

Plyn	Parciální tlak p_i plynu (kPa)	Objemový zlomek v (obj. %)
N ₂	79,12	78,09
O ₂	21,23	20,95
Ostatní (CO ₂ , Ar, etc.)	0,97	0,96

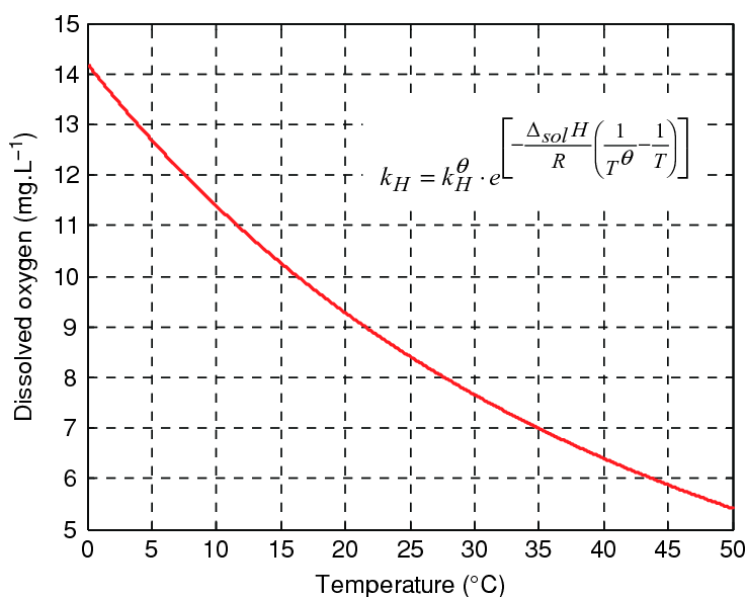
2.2.2 Henryho zákon

Fyzikální rozpouštění plynu v kapalině znamená, že se částice plynu rozptylují mezi částice kapaliny, aniž by mezi sebou částice kapaliny a plynu reagovaly, a vytvářejí v ní parciální tlak. Proces rozpouštění bude trvat tak dlouho, dokud se z kapaliny s plynem nestane nasycený roztok, tedy dokud není v rovnováze s nerozpuštěným plynem nad roztokem. Tento děj popsal William Henry, po němž je pojmenován Henryho zákon. Ten vyjadřuje skutečnost, že molární koncentrace x_i rozpuštěného plynu i v kapalině je za konstantní teploty přímo úměrná parciálnímu tlaku p_i plynu i nad její hladinou a absorpčnímu koeficientu k_i charakteristickému pro daný plyn, jenž je převrácenou hodnotou Henryho konstanty. [3, 9]

$$x_i = k_i \cdot p_i \quad (2.9)$$

Dále platí, že parciální tlak plynu v kapalině je roven parciálnímu tlaku tohoto plynu nad hladinou kapaliny. Podmínkou pro platnost pravidla rovnováhy na rozhraní kapaliny a plynu, které vychází z Daltonova zákona, je dostatek času na rozpuštění a ustanovení rovnováhy. Ekvilibrium je možné pozorovat např. na rozhraní plicních alveol a zakončení plicních kapilár, kde je za fyziologických podmínek dostatek času, aby nastal rovnovážný stav, potom platí: $p_{A\text{O}_2} = p_{a\text{O}_2}$, stejně tak $p_{A\text{CO}_2} = p_{a\text{CO}_2}$. [9, 16]

Totožné hodnoty parciálních tlaků ale neznamenají stejné množství, to totiž závisí nejen na parciálním tlaku, ale i na koeficientu rozpustnosti plynu, jenž je ovlivněn teplotou a okolním tlakem. Množství rozpuštěného plynu je nepřímo úměrné teplotě, skutečnost demonstruje graf níže. Taktéž má vliv vysolovací efekt, kdy s rostoucí koncentrací solí v roztoku klesá množství rozpuštěného plynu. [3, 12]

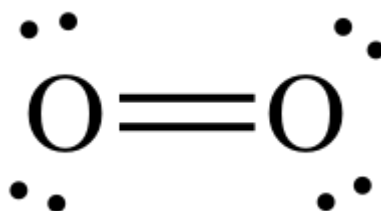


Graf 2.1: Závislost rozpustnosti kyslíku ve vodě na teplotě za standardního tlaku. [12]

2.3 Kyslík

Kyslík je nekovový prvek patřící do skupiny chalkogenů, náleží tedy do VI. hlavní podskupiny v periodické tabulce prvků a má šest valenčních elektronů. Jedná se o nejhojnější biogenní prvek, který se vyskytuje v mnoha alotropických formách. Nejčastěji se vyskytuje jako tripletový dikyslík, tedy jako dvouatomová molekula kyslíku se dvěma sdílenými elektronovými páry tvořící dvojnou kovalentní vazbu. Za standardních podmínek se nachází v plynném stavu. [7]

Jedná se o druhý nejvíce elektronegativní prvek, má tedy velkou kapacitu v přitahování valenčních elektronů jiných atomů, z toho plyne i jeho význam jako silného oxidačního činidla. Kyslík se spotřebovává v řadě klíčových biologických procesů aerobních organismů a je navrácen zpět do atmosféry skrz metabolismus fotosynteticky aktivních zelených rostlin a některých mikroorganismů. V atmosféře zaujímá kyslík 20,9 % objemu a podle Daltonova zákona je jeho parciální tlak ve vzduchu za standardních podmínek přibližně 21 kPa. [7]



Obrázek 2.4: Lewisův diagram dvouatomové molekuly kyslíku [8]

2.3.1 Význam kyslíku pro lidský organismus

Aerobní způsob života (dýchání a oxidativní fosforylace) je náročnější a složitější než způsob anaerobní (glykolýza). Má však daleko větší energetickou účinnost a znatelně snazší eliminaci odpadních produktů metabolismu, proto je uvolňování energie za spotřeby kyslíku o tolik výhodnější. [9]

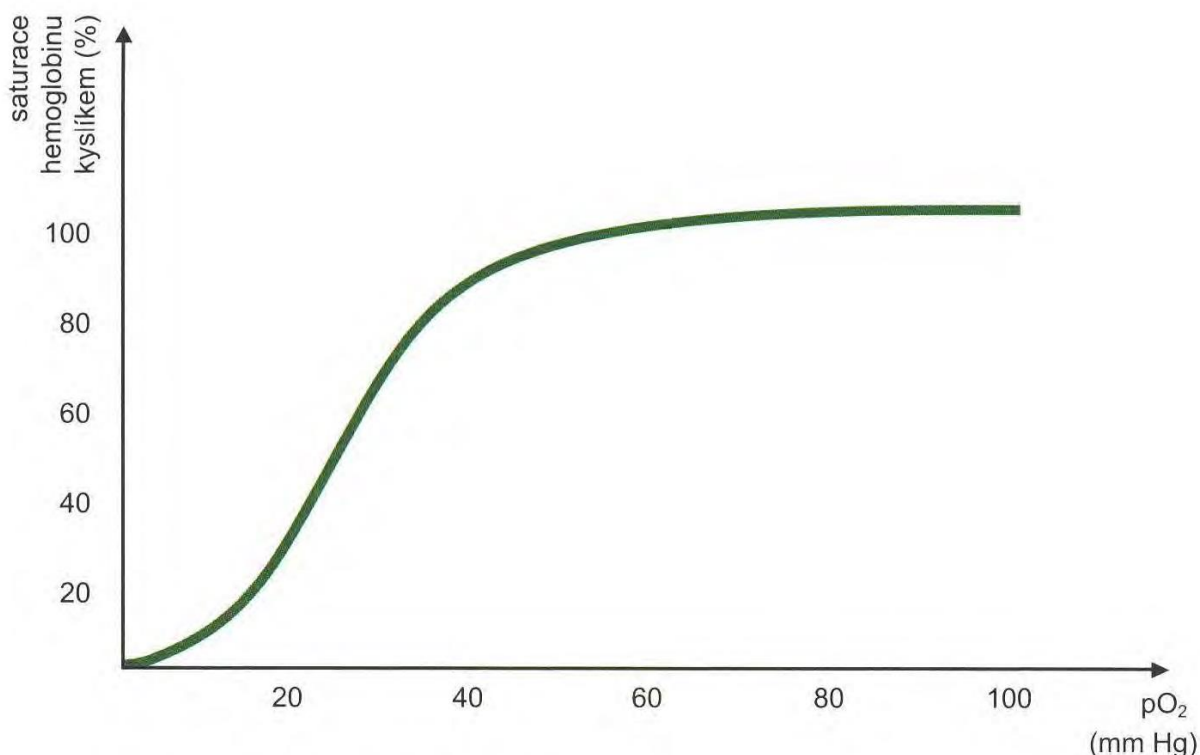
Dýchání se rozlišuje na vnitřní a vnější. Vnější dýchání znamená přenos kyslíku k buňkám, vnitřní dýchání pak probíhá uvnitř buněk v mitochondriích, kde jsou přijaté nutrienty z potravy odbourány reakcemi vyžadující kyslík za účelem uvolnění energie v podobě ATP (adenosintrifosfátu). Tyto procesy zajišťují fungování organismu na všech úrovních. [9, 10]

Člověk přijímá kyslík (O_2) z atmosféry, není však schopen ho dlouhodobě v těle kumulovat, se zásobami si vystačí maximálně několik jednotek minut. Přibližně 98,5 % kyslíku v lidském organismu je navázáno na hemoglobin, zbývajících 1,5 % se vyskytuje fyzikálně rozpuštěno v krevní plazmě. Důvod tohoto poměru tkíví v obtížné rozpustnosti kyslíku v kapalinách (viz kapitola 2.2.2); kdyby kyslík nebyl navázán na hemoglobin, znamenalo by to zvýšit minutový srdeční výdej cca 16x, aby byly pokryty nároky organismu na kyslík. Objem rozpuštěného kyslíku v krvi je dán součinem koeficientu

rozpuštěnosti (typicky 0,03 ml/l při 37 °C) a parciálního tlaku kyslíku, jenž je typicky udáván 80-100 mmHg pro fyziologicky okysličenou arteriální krev. V jednom litru krve se tedy fyzikálně rozpustí cca 3 ml kyslíku.

I tento malý objem má však velký vliv, a to hned z několika důvodů. Např. receptory pro O₂ detekují právě jen rozpuštěnou formu a dýchání je tak přímo ovlivněno p_aO₂, kdy na parciálním tlaku závisí i sycení hemoglobinu kyslíkem (viz obrázek 2.5). Dále je rozpuštěná forma potřebná pro realizaci difuze, která probíhá jednak mezi alveoly a erytrocyty, jednak mezi erytrocyty a tkání. [9]

Parciální tlak rozpuštěného kyslíku (a dalších plynů) v krvi měří i analyzátory acidobazické rovnováhy a na jeho základě se dopočítávají další parametry, například saturace hemoglobinu kyslíkem SpO₂.



Obrázek 2.5: Disociační křivka hemoglobinu pro kyslík [9]

2.3.2 Stanovení kyslíku v klinické praxi

2.3.2.1 Invazivní stanovení kyslíku: Analyzátory acidobazické rovnováhy

Pro invazivní měření parciálního tlaku kyslíku pO₂ (a dalších plynů) v krvi se používá analyzátor acidobazické rovnováhy (ABR), též se používá označení „Astrup“ podle dánského klinického chemika, jenž stojí za sestavením prvního analyzátoru krevních plynů. Analyzátory fungují na principu elektrochemického stanovení, kdy se používají různé druhy elektrod. Pro stanovení pH se využívá skleněná elektroda, pro oxid uhličitý Severinghausova elektroda a pro kyslík Clarkova elektroda, již je věnována samostatná kapitola. Zmíněné parametry standardně měří všechny analyzátory, jiné se dopočítávají.

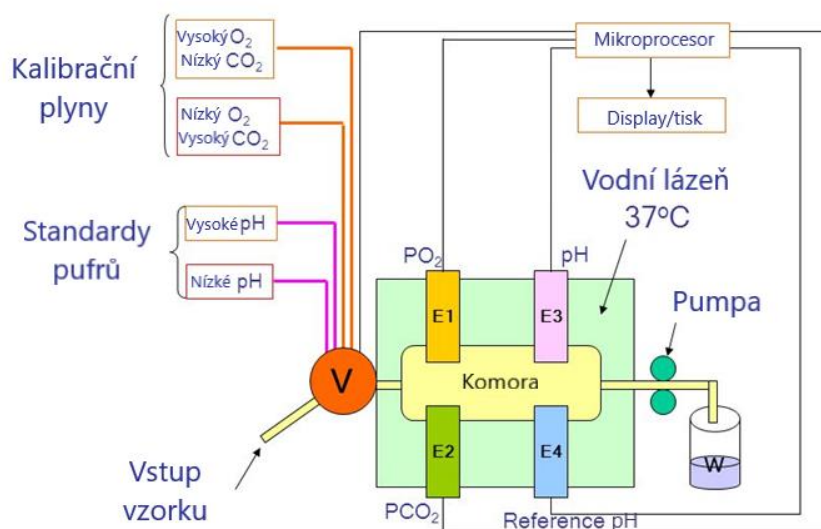
Pro ilustraci, dopočítávané parametry na základě pO₂ jsou saturace hemoglobinu kyslíkem (SO₂ v procentech), látková koncentrace kyslíku (ctO₂ v mmol/l) či alveoloarteriální diference parciální tenze kyslíku (AaDO₂ v kPa či mmHg). [2, 10]

V tabulce 2.2 jsou pro představu uvedeny různé parametry, jež jsou schopny analyzátoři stanovovat. Jedná se o modely přístrojů firmy Gastat.

Tabulka 2.2: Škála parametrů měřených analyzátoři značky Gastat [11]

Měřené parametry	710	720	730	735
pH	•	•	•	•
pCO ₂	•	•	•	•
pO ₂	•	•	•	•
cNa ⁺		•	•	•
cK ⁺		•	•	•
cCl ⁻		•	•	•
cCa ²⁺		•	•	•
cGlucose			•	•
cLactate			•	•
ctBil				•
cHb	•	•	•	
ctHb				•
sO ₂				•
FO ₂ Hb				•
FCOH b				•
FMetHb				•
FHH b				•

Analyzátoři ABR jsou dnes komplexní přístroje, jež se samy kalibrují pomocí kalibračních plynů, roztoků a pufrů, samy si dávkují množství vzorku, udržují stálé prostředí potřebné pro kvalitní provedení analýzy (zejména konstantní teplotu) a provádí základní úkony spojené s údržbou (proplach).

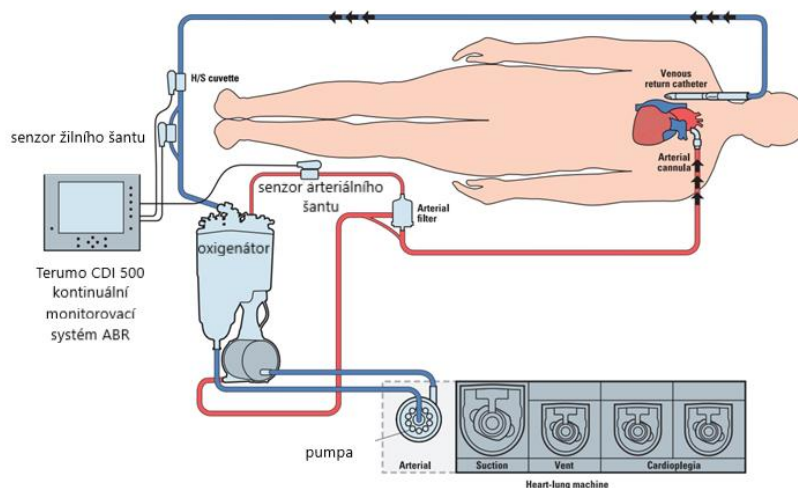


Obrázek 2.6: Schéma uspořádání analyzátoři krevních plynů (E1–E4 = elektrody) [12]

Odebraná krev určená pro analyzátory ABR je nejčastěji krev arteriální, na rozdíl od standardních laboratorních vyšetření, kde se používá krev žilní. Místo vpichu se ošetří dezinfekcí, následně zdravotnický personál nahmatá tepnu a pomocí plastové stříkačky s tenkou jehlou provede odběr malého množství krve. Tepenná oksyločená krev se obyčejně odebírá z artérie radialis. Moderním analyzátorům obvykle ke stanovení stačí objemy okolo 50 μl (z kapilár) či 200 μl (ze stříkačky). Kapiláry jsou určeny pro arteriolární (kapilární) krev odebranou např. z ušního lalůčku, u dětí z patičky. Jelikož se jedná o krev periferní, je nutné místo odběru hyperemizovat, tedy stimulovat arterioly k roztažení teplem nebo speciální masť. Pro zjištění systémového stavu pacienta se upřednostňuje arteriální odběr před kapilárním (arteriolárním), neboť $p\text{O}_2$ na periférii bude vždy nižší než v centrálním oběhu. [2, 10]

Odběr musí být anaerobní, tedy bez bublin – ty by zkreslovaly výsledky analýzy, $p_a\text{O}_2$ by byl falešně vyšší, $p_a\text{CO}_2$ falešně nižší a pH by bylo posunuto na alkalickou stranu. V kapilárách či ve stříkačce je přítomno množství heparinu pro zředění krve a zamezení vzniku sraženin, které by znemožňovaly vyšetření. Následně je nutné odebraný vzorek co nejrychleji podrobit analýze, nejpozději do 1-2 hodin, přičemž je potřeba vzorek vhodně uchovávat v ledové lázni, avšak krev nesmí zmrznout. Odebraná krev ve stříkačce či v kapiláře se aplikuje do analyzátoru, který si automaticky nadávkuje potřebné množství vzorku a provede analýzu.

Možná je i varianta kontinuálního snímání hodnot ABR, což má velký význam zejména u pacientů napojených na mimotělní oběh a u pacientů v kritických stavech napojených na umělou plicní ventilaci, kdy je výhodné mít vždy k dispozici aktuální hodnoty příslušných parametrů a sledovat vývoj v čase. Na obrázku níže je uspořádání mimotělního oběhu s kontinuálním snímáním, kdy do analyzátoru ABR vede venózní krev z pacienta a současně i oksyločená krev upravená oxygenátorem, což umožňuje okamžité porovnání daných hodnot a kontinuální kontrolu správného průběhu procedury.



Obrázek 2.7: Kontinuální systém firmy Terumo® pro monitoraci ABR [13]

2.3.2.2 Neinvazivní stanovení kyslíku

a) Spektrofotometrické měření saturace hemoglobinu O₂ pulzním oxymetrem

Pro přenos kyslíku v těle je využívána krev, konkrétně červené krvinky obsahující hemoglobin, jenž je schopen chemicky navázat až čtyři molekuly kyslíku; tedy je možné říci, že je molekula hemoglobinu saturována kyslíkem a označuje se jako oxyhemoglobin. Hemoglobin bez navázaného kyslíku se označuje jako redukovaný hemoglobin či deoxyhemoglobin.

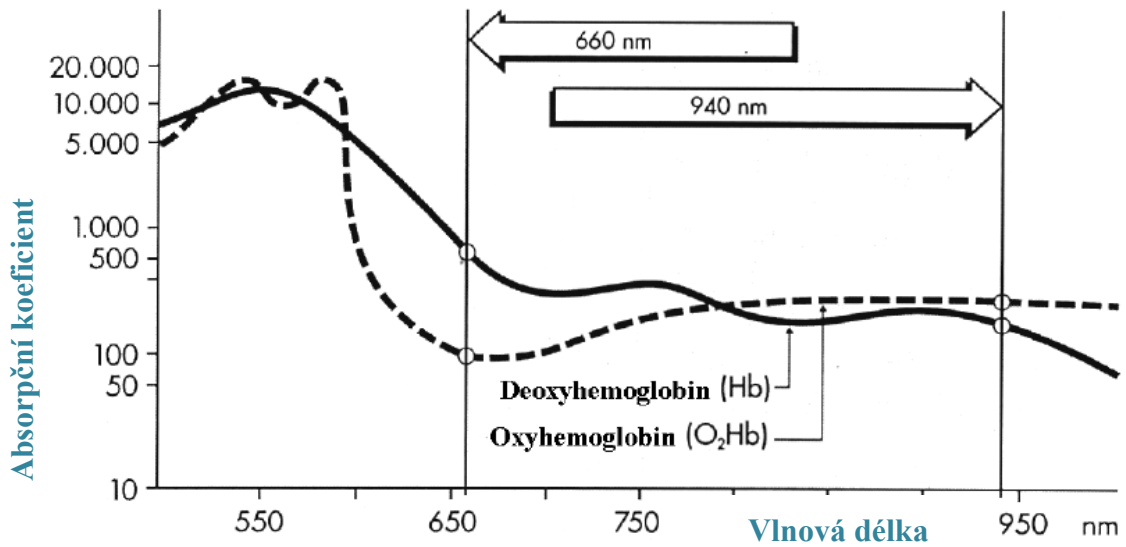
Metoda měření saturace krve kyslíkem pulzním oxymetrem je založená na dvou hlavních skutečnostech [14]:

- Světelná absorbance oxyhemoglobinu a deoxyhemoglobinu je rozdílná. Obě látky mají rozdílná absorpční spektra, jenž jsou pro jednotlivé formy hemoglobinu charakteristická (Obrázek 2.8).
- Absorbance arteriální krve má pulzační složku díky změnám objemu krve v arteriích.

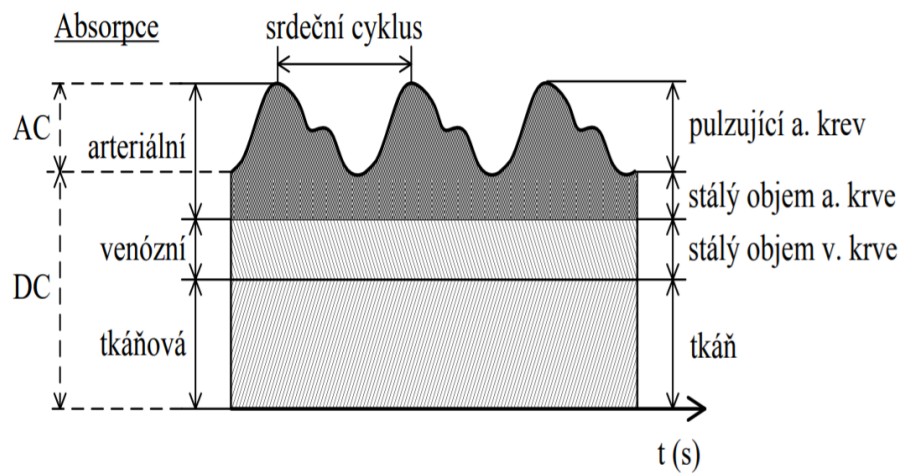
V principu se k měření využívají zdroje elektromagnetického záření (světla) o dvou specifických vlnových délkách, které prochází tkání, kde se z části absorbuje, a neabsorbovanou složku světla snímá detektor. K výpočtu výsledné absorbance se využívá Lambert-Beerův zákon. Zdroj světla je typicky tvořen dvěma LED diodami, z nichž jedna emituje červené viditelné světlo o vlnové délce cca 660 nm, druhá emituje blízké infračervené světlo o vlnové délce cca 940 nm. Světlo prochází částí těla (typicky prstem nebo ušním lalůčkem), prošlé světlo detekují fotodetektory. [14]

Světlo je absorbováno tkáněmi, žilní a arteriální krví (Obrázek 2.9). Pro pulzní oxymetrii má výpovědní hodnotu pouze arteriální složka. Pro výpočet saturace arteriální krve se stanovuje poměr R, tedy poměr signálu pulzující (AC) a nepulzující složky (DC) pro obě vlnové délky, viz vztah 2.10. Tento poměr lze přepočítat na hodnotu saturace podle empirické křivky (Obrázek 2.10). [14]

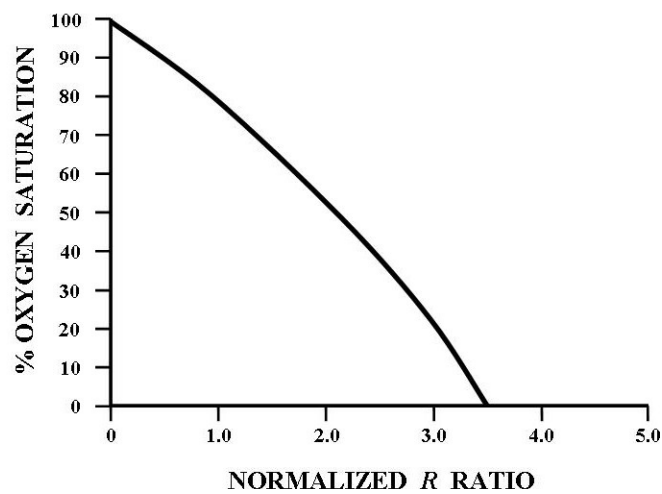
$$R = \frac{\frac{AC_{660}}{DC_{660}}}{\frac{AC_{920}}{DC_{920}}} \quad (2.10)$$



Obrázek 2.8: Absorpční spektra oxyhemoglobinu a deoxyhemoglobinu [15]



Obrázek 2.9: Absorpce světla tkání a krvi; pulzující (AC) a nepulzující (DC) složka [17]



Obrázek 2.10: Empirická křivka pro stanovení saturace z poměru R [14]

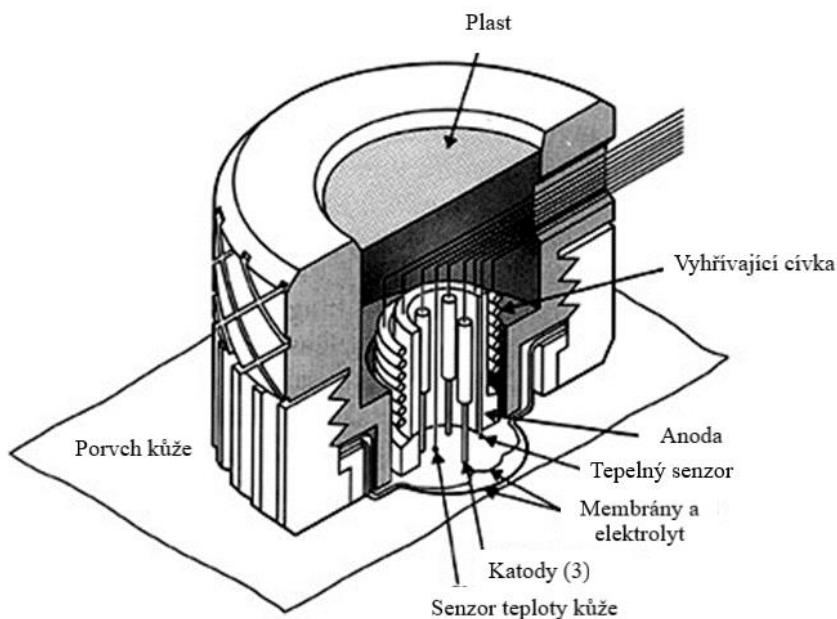
b) Transkutánní oxymetrie

Jedná se o elektrochemické stanovení parciálního tlaku kyslíku, který difunduje skrz prohřátou pokožku do speciálně uzpůsobené sondy s Clarkovým článkem. Zde probíhá redukce kyslíku a množství vzniklého proudu je přímo úměrné parciálnímu tlaku kyslíku ve tkáni pod sondou.

Transkutánní oxymetrie je doplňková diagnostická metoda cévní soustavy, která poskytuje informace o stavu metabolismu buněk v periferiích těla a o prokrvení kůže na kapilární úrovni. Doplnuje tak klinické, statické a dynamické vyšetřovací metody, jako jsou např.: angiografie (statická), duplexní ultrazvuk či pletysmografie (dynamická). [18, 19]

Parciální kyslík v tkáni je důležitým parametrem pro hojení ran, je důležitý zejména u pacientů trpících diabetem II. typu, kteří často trpí bérčovými vředy či syndromem diabetické nohy. Komplikace spojené s touto civilizační chorobou pak často vyústí v amputaci končetin, přičemž transkutánní sonda umožňuje určit ideální rozsah amputace. Zabraňuje tedy tomu, aby pacient musel buď zákrok opakovat, nebo aby mu byla odňata zbytečně větší část končetiny. Indikace k amputaci je parciální tlak kyslíku v tkáni menší než 30 mmHg. U méně závažných poruch okysličení tkáně může být doporučena terapie v hyperbarické komoře, kde je dle Daltonova zákona větší parciální tlak kyslíku, a proto i organismus pacienta bude více okysličen. [18]

Výsledky měření transkutánní sondou ovlivňují systémové faktory (anémie), lokální faktory (tloušťka kůže, edém tkáně) a technické podmínky měření (okolní teplota a tlak).



Obrázek 2.11: Řez transkutánním senzorem kyslíku [19]

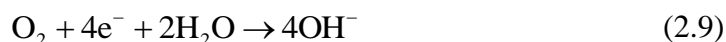
2.4 Kyslíková elektroda Clarkova typu

Clarkova elektroda, jak je známá dnes, je používána už od 50. let 20. století, kdy ji sestrojil Leland C. Clark. Technicky vzato se nejedná o elektrodu, nýbrž o elektrolytický článek či amperometrický senzor, avšak označení elektroda se již vžilo natolik, že je tento pojem běžně používán i v odborné literatuře.

Senzor se skládá z polarizovatelné elektrody zatavené ve skle, nepolarizovatelné elektrody, elektrolytu a semipermeabilní membrány propustnou pro kyslík. Principem Clarkova článku je přivedení napětí na polarizovatelnou elektrodu, kde probíhá redukce kyslíku, a následné snímání množství proudu mezi elektrodami, který je úměrný koncentraci kyslíku v měřeném vzorku, v němž je článek ponořen.

Kyslík obsažený ve vzorku difunduje skrz polopropustnou membránu. Membrána je vyrobena např. z teflonu, polyetyleny či polypropylenu. Kyslík se dostává do vnitřního elektrolytu článku po koncentračním spádu a putuje směrem k polarizovatelné elektrodě.

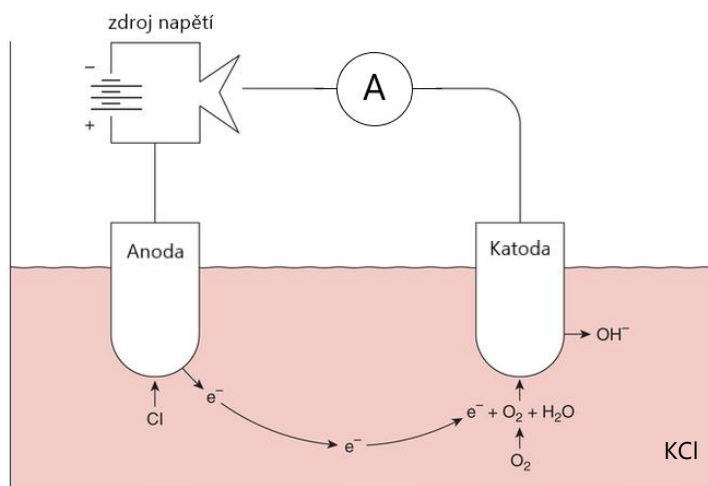
Polarizovatelná elektroda (katoda) je měrná, typicky zhotovená z ušlechtilého kovu jako je platina či zlato. Na ní je přivedeno rozkladné napětí pro kyslík, jehož hodnota se pohybuje v rozmezí od -600 mV do -800 mV. Tím dochází k redukci rozpuštěného vzdušného (tripletového) kyslíku a ke vzniku proudu elektronů mezi elektrodami. Jedná se o čtyřelektronový proces, viz následující rovnice:



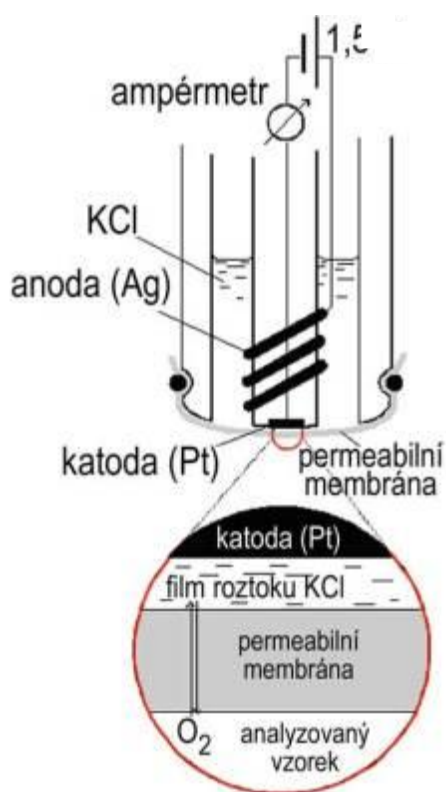
Proud teče mezi polarizovatelnou (měrnou) a nepolarizovatelnou (referenční) elektrodou. Referenční elektroda (anoda) je nejčastěji obtočená ve spirále okolo zatavené platinové elektrody a jedná se o argentschloridovou či stříbrnou elektrodu se stabilním potenciálem. Jako výše zmíněný vnitřní elektrolyt se používá roztok chloridu draselného, jenž může být smíchán s puftrem pro stabilizaci pH.

Na referenční elektrodě pak probíhají níže uvedené reakce. Reakce 2.10 generuje elektrony potřebné pro redukci kyslíku. Tento elektrický proud teče, pouze pokud se uskutečňuje daná reakce na katodě. Proud je úměrný množství redukováných kyslíkových molekul.



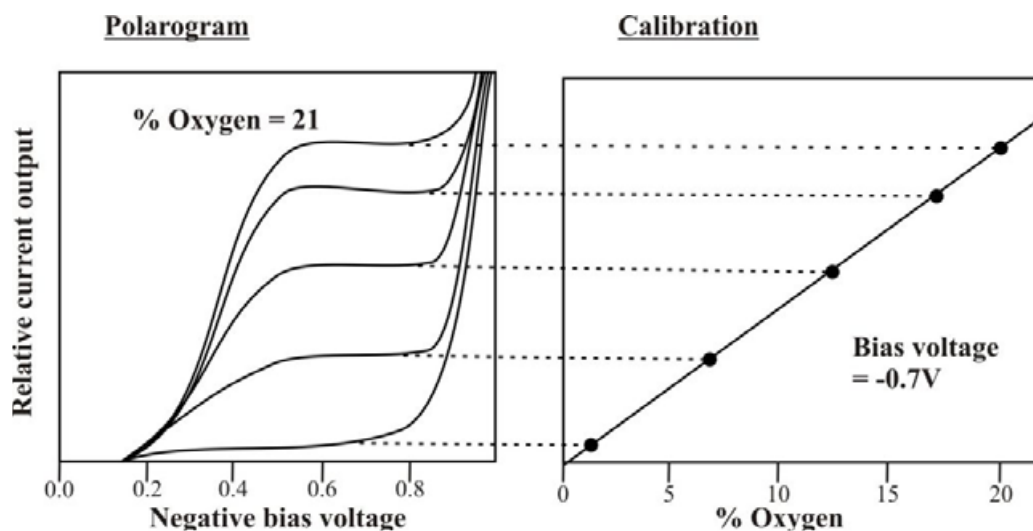


Obrázek 2.12: Schéma reakce v Clarkově článku [20]



Obrázek 2.13: Schéma Clarkova kyslíkového senzoru [2]

Hodnota rozkladného napětí kyslíku, které se přivádí mezi elektrody, není náhodná hodnota. Vychází z polarogramu, tedy ze závislosti proudu na napětí (viz Obrázek 2.7). Právě hodnoty v rozmezí 600–800 mV odpovídají lineárnímu úseku na polarizační křivce (viz Obrázek 2.14).



Obrázek 2.14: Závislost proudu na aplikovaném napětí na Clarkově elektrodě pro různé parciální tlaky kyslíku (vlevo) a kalibrační křivka (vpravo) [21]

3 Metody

Po nalezení vhodného zapojení všech komponent, uspořádání a nastavení měřicí soustavy je třeba amperometricky proměřit sadu vzorků. Amperometrické stanovení kyslíku spočívá ve snímání elektrického proudu, který teče mezi elektrodami v Clarkově článku při daném redukčním napětí pro kyslík.

Dílčím cílem měření je sestavení kalibrační křivky, jenž udává množství kyslíku ve vzorku pro danou teplotu, a následně proměření sady vzorků o stejné teplotě. Kalibrace je provedena dvoubodově, kdy se proměřuje proudová odpověď elektrody ponořené ve standardu (destilované vodě) s přirozeně nejvyšším možným obsahem kyslíku (dle Henryho zákona) a následně je proměřena odpověď na 0% koncentraci rozpuštěného kyslíku. Jako sada vzorků je použita koncentrační řada roztoků NaCl, na kterých se demonstruje klesající množství rozpuštěného kyslíku v závislosti na salinitě. Další měření se věnuje závislosti množství rozpuštěného kyslíku na teplotě vody.

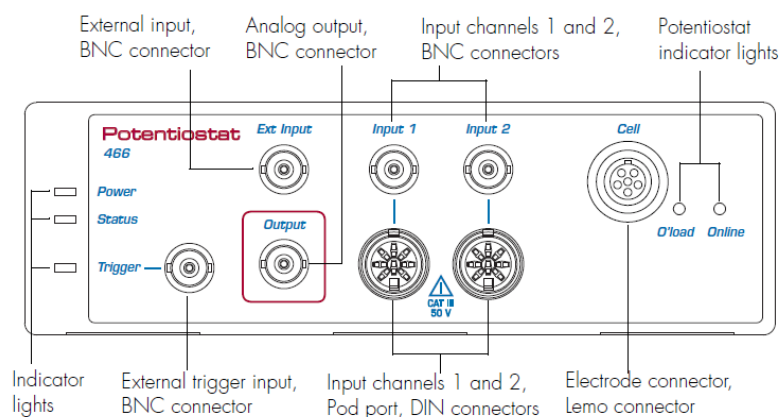
Podrobný návod pro provedení experimentu je vytvořen jako příloha bakalářské práce.

3.1 Přístrojové vybavení

3.1.1 Potenciostat eDAQ ER466

Integrovaný potenciostat firmy eDAQ je přístroj umožňující řadu režimů pro elektrochemická měření. Vedle potenciostatu funguje i jako galvanostat, ampérmetr s nulovým odporem (zero resistance ammeter) či voltmetr (high impedance voltmeter). Navíc umožňuje využití dvou víceúčelových kanálů (*Input 1* a *Input 2*) pro simultánní nahrávání pomocných signálů – např. teploty, intenzity světla, tlaku. Tyto vstupy je taktéž možné propojit s přídatnými zařízeními firmy eDAQ, tzv. isoPody, které jsou specializované (měření pH, vodivosti, rozpuštěného kyslíku). Přístroj funguje i jako generátor funkcí, které vytváří pomocí digitálně-analogového převodníku; též je možné připojit externí generátor do příslušného vstupu (*External Input*).

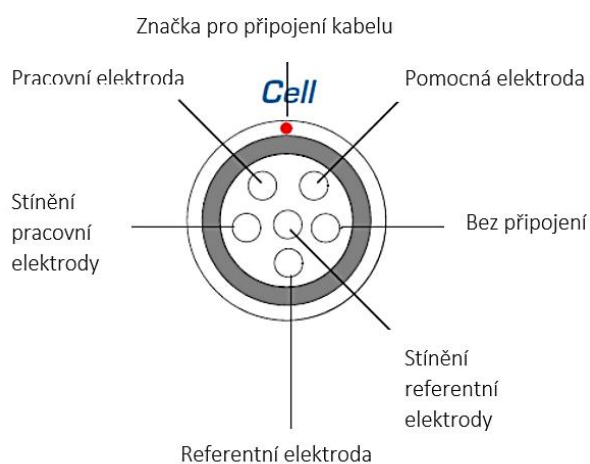
Dále nabízí sofistikované zpracování signálů s vysokým rozlišením a nízkým podílem šumu. Připojuje se do počítače standardním USB portem a společně s přístrojem je dodáván i software, na výběr je software eDAQ Chart či EChem ES260, přes který se nastavují parametry potenciostatu a provádí se vyhodnocení experimentu. [22]



Obrázek 3.1: Přední panel přístroje Potenciostat 466 [22]

Elektrochemické experimenty, jenž je možné provádět a nahrávat pomocí tohoto přístroje, zahrnují různé lineární techniky (cyklická voltametrie, lineární „sweep“ voltametrie), diferenciální techniky (pulzní diferenciální voltametrie či amperometrie) či sledování veličin v čase, zatímco se aplikuje konstantní proud nebo potenciál (chronoamperometrie, chronocoulometrie, chronopotenciometrie). [22]

Pro potřeby této práce byl použit vstup Cell, jenž slouží k připojení kabelu k elektrodám. Tento kabel se připojuje k potenciostatu pomocí šestipinového Lemo konektoru, který je s výhodou možné použít jako alternativu k BNC konektoru, protože výrazně šetří místo. Kabel je stíněný a obsahuje tři vodiče ukončené banánky o průměru 2 mm s odnímatelnými krokodýlky. Každý z vodičů má jiné barevné označení a vede k příslušné elektrodě (viz tabulka 3.1).



Obrázek 3.2: Vstup potenciostatu Cell pro kabel k elektrodám [22]

Tabulka 3.1: Barevné označení propojovacího kabelu potenciostatu a elektrod [22]

Barva	Elektroda
zelená	Pracovní
žlutá	Referenční
červená	Pomocná



Obrázek 3.3: Propojovací kabel potenciostatu a elektrod [23]

Měření má dvuelektrodové uspořádání, vodiče na kabelu jsou ovšem tři, proto se společně zapojuje vodič pro referenční (žlutou) a pomocnou (červenou) elektrodu oproti jedné měrné elektrodě, viz Obrázek 3.9.

Kalibrace a přesnost potenciostatu

Přístroj je kalibrován od výrobce a při každém spuštění přístroj provádí vnitřní operace pro eliminaci offsetu či chyb v zesílení. Při použití potenciostatu je výrobcem doporučeno přístroj ponechat 15 minut zapnutý v klidu, aby se vnitřní obvod dostal do rovnováhy a na konstantní teplotu. Rozsáhlejší kalibrace je možná v rámci nastavení příslušného softwaru. Přesnost měřeného proudu udávaná výrobcem je pro hodnoty v řádech jednotek mA či menší rovna 0,2 %, pro proudy v řádech desítek mA a větší je přesnost 1 %. Odchylka způsobená teplotní změnou je udána $\pm 0,3 \text{ mV}/^\circ\text{C}$. [22]

3.1.2 Software EChem ES260

EChem ES260 je software kompatibilní s potenciostatem firmy eDAQ a umožňuje provádění, vyhodnocování a vizualizaci elektrochemických experimentů. Společně s potenciostatem a počítačem umožňuje fungování jako dvoukanálový osciloskop a generátor funkcí.

Je možné graficky zobrazit průběh napětí a proudu. Základní nastavení nabízí sledování závislosti proudu na vloženém napětí či časovou závislost proudu a napětí. Získané grafy lze modifikovat co do barev a stylu. Grafy i naměřená data lze exportovat do jiných programů.

Software má přednastavené techniky, jenž jsou následovně rozděleny:

Standardní techniky:

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

„Stripping“ techniky:

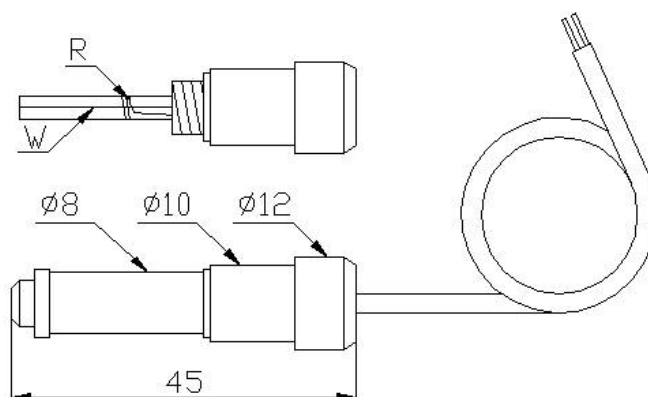
- Lineární „sweep stripping“ voltametrie
- Diferenční pulzní „stripping“ voltametrie
- „Square wave stripping“ voltametrie
- Normální pulzní „stripping“ voltametrie

Speciální techniky:

- Cyklická voltametrie
- Multipulzní voltametrie
- Multipulzní amperometrie

3.1.3 Miniaturní kyslíková elektroda

Miniaturní kyslíková elektroda od firmy BVT, typ OE1, je vysoce citlivá kyslíková elektroda, která umožňuje rozlišení kontinuálně měřeného proudu až 0,01 %. Slouží ke stanovování obsahu kyslíku v roztoku, reaguje i na změny atmosférického tlaku v laboratoři. Použit lze i při enzymatických reakcích, kde vzniká kyslík. Elektroda je kompatibilní s elektrochemickou celou TC4 od stejného výrobce.



Obrázek 3.4: Náčrtek miniaturní elektrody OE1 s vyznačenými rozměry v mm;
W – pracovní elektroda, R – referenční elektroda []

Skládá se z těla vyrobeného z plastové hmoty PEEK (polyetereterketon), pracovní platinové elektrody, stříbrné referenční elektrody, mechanismu pro upevnění membrány a plastového krytu s membránou. Připojení elektrod je u konkrétního použitého modelu realizováno dvěma BNC konektory. Červený vodič je pro pracovní elektrodu, modrý pro referenční elektrodu.



Obrázek 3.5: Miniaturní kyslíková elektroda s membránou a BNC konektory (vlevo); miniaturní kyslíková elektroda bez krytu a membrány (vpravo)

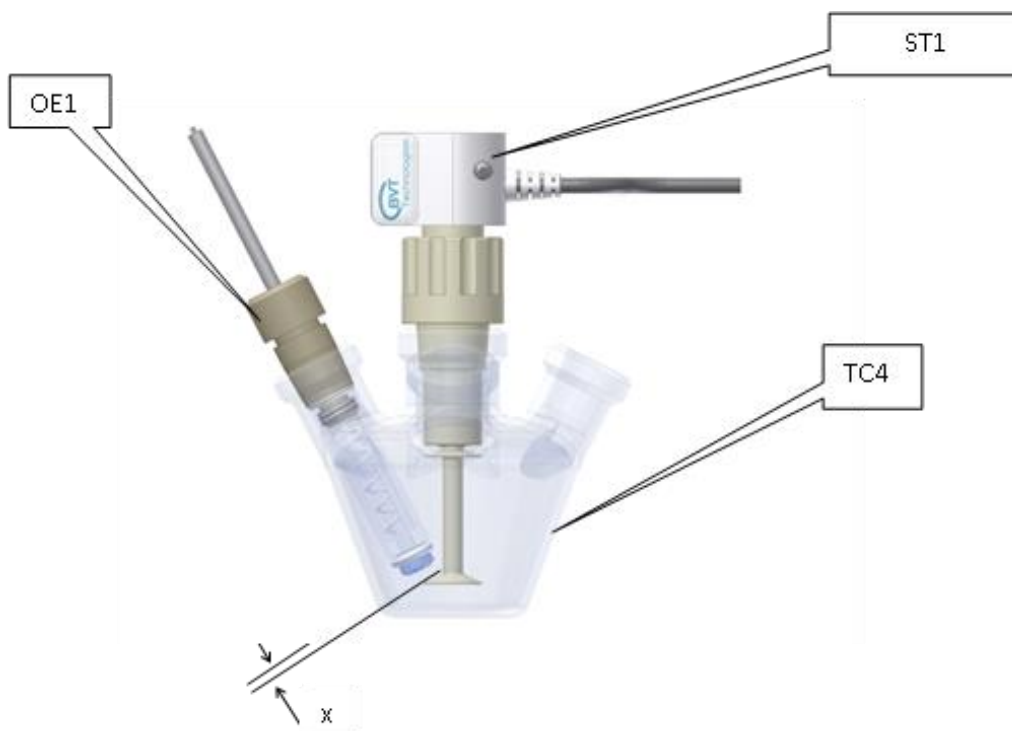
Pracovní platinová elektroda (katoda) je zatavena ve skle. Jedná se o platinový drátek o průměru 1000 μm , z něhož přichází do styku s vnitřním elektrolytem pouze dolní kruhový průřez. Na elektrodu je přivedeno redukční napětí pro kyslík (kapitola 2.4) a probíhá zde redukce kyslíku dle rovnice 2.9. Stříbrná referenční elektroda (anoda) je navinuta okolo skleněné vrstvy téměř po celé délce elektrody (viz Obrázek 3.5).

Součástka s membránou a elektrolytem se připojuje zašroubováním závitů. Jako vnitřní elektrolyt se používá 1M chlorid draselný (KCl). Membrána, jež zaručuje selektivní průchod kyslíku z měřeného roztoku do vnitřního elektrolytu, je vyrobena z teflonu.

3.1.4 Elektrochemická cela TC4 s míchadlem ST1

Skleněná elektrochemická cela firmy BVT je určena k elektrochemickým experimentům za použití rozměrově kompatibilních elektrod, teploměru a míchadla. Obsahuje čtyři menší otvory (primárně určené pro elektrody) a jeden velký pro míchadlo ST1. Všechny otvory jsou uzavíratelné pomocí gumových zátek. Cela je vhodná k použití s termostatem od firmy BVT.

Geometrie cely pro měření kyslíku pomocí příslušné elektrody OE1 a míchadla ST1 zaručuje optimální proudění roztoku k elektrodě. Vzdálenost x mezi míchadlem a membránou elektrody by měla být v rozmezí od 0,5 do 1 mm.



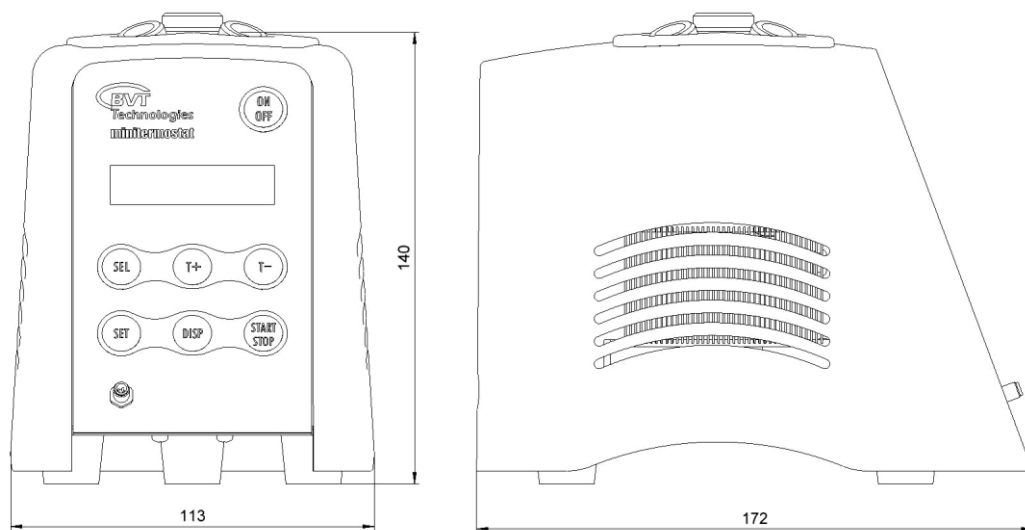
Obrázek 3.6: Uspořádání elektrochemické cely pro měření. [25]

Míchadlo ST1 je vybaveno elektronicky řízeným motorem, který umožňuje přesné nastavení otáček v rozsahu 10–1300 otáček·min⁻¹.

3.1.5 Termostat MT-1

Minitermostat firmy BVT je kompaktní zařízení, které umožňuje udržování konstantní teploty v rozmezí -10 °C až 50 °C, udávaná přesnost je 0,1 °C. Výrobce umožňuje přizpůsobení konstrukce termobloku pro elektrochemické cely BVT a některé typy zkumavek. Přístroj je napájen ze sítě. Ovládání je zajištěno sedmi tlačítky na předním panelu. Dále je možné připojit externí tepelný senzor.

Minitermostat obsahuje čtyři proudem napájené odporové teplotní senzory (RTD); měří teploty na horní a spodní straně Peltierova termoelektrického článku (PTE) uvnitř přístroje, měří teplotu hliníkového termobloku a teplotu vkládaného vzorku.

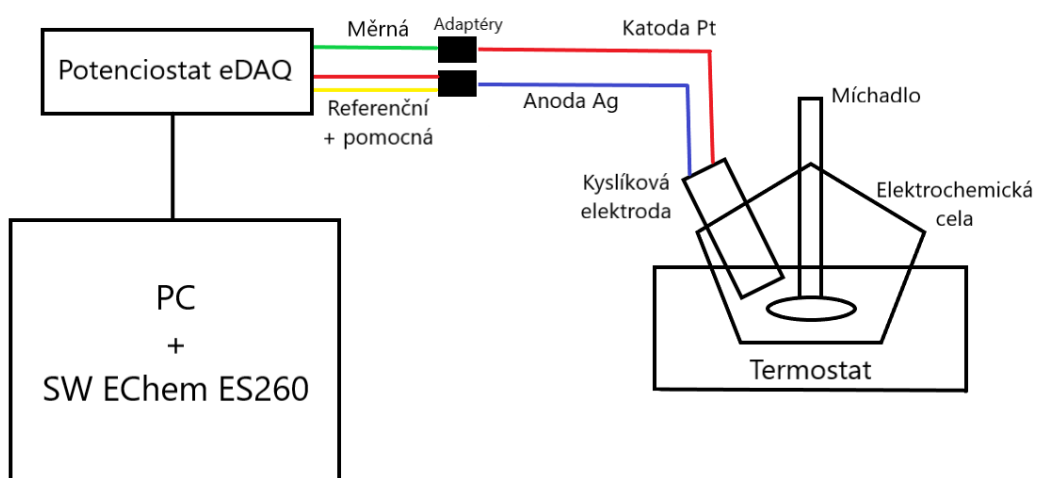


Obrázek 3.7: Minitermostat MT-1 firmy BVT se zakótovanými rozměry v milimetrech [24]



Obrázek 3.8: Minitermostat MT-1 s elektrochemickou celou TC4

3.1.6 Výsledné zapojení



Obrázek 3.9: Schéma měřicí soustavy pro stanovení množství rozpuštěného kyslíku

3.2 Chemikálie

3.2.1 Destilovaná voda

Pro kalibraci miniaturní kyslíkové elektrody pro danou teplotu a daný okolní tlak se využívá destilované vody, jenž by po čase potřebném na ustálení rovnováhy a vhodném promíchávání měla dosáhnout maximálního možného obsahu rozpuštěného kyslíku dle Henryho zákona, kdy by se parciální tlak kyslíku ve vodě měl rovnat parciálnímu tlaku kyslíku ve vzduchu, zaujímá tedy cca 21 % okolního tlaku vzduchu.

3.2.2 Roztok chloridu draselného

Plastový kryt s teflonovou membránou se plní čerstvým 1M roztokem chloridu draselného. Plní zde funkci vodivého média a chloridové anionty reagují se stříbrem dle rovnice 2.11.

Roztok 1M KCl byl připraven z navážky chloridu o hmotnosti 7,456 g rozpuštěného v destilované vodě a doplněného na objem 100 ml. Objem potřebný do miniaturní elektrody není pevně stanoven, běžně byly použity cca 2 ml.

3.2.3 Roztok siřičitanu sodného

Roztok Na_2SO_3 plní funkci při kalibraci elektrody. Má za úkol reagovat s kyslíkem dle rovnice



kdy se siřičitan oxiduje a tím vyčerpává kyslík ze svého okolí. Výsledkem je roztok s 0% obsahem rozpuštěného kyslíku. Roztok o potřebné koncentraci se připravuje přidáním 1 g Na_2SO_3 na 5 ml destilované vody.

3.2.4 Roztoky chloridu sodného

Koncentrační řada chloridu sodného byla připravena dle následující tabulky:

Tabulka 3.2: Poměry soli a vody pro roztoky koncentrační řady

Navážka NaCl	Hmotnost vody	Hmotnostní %
m_{NaCl} (g)	$m_{\text{H}_2\text{O}}$ (g)	
3,50	10	35
2,50	10	25
1,50	10	15
0,50	10	5

4 Výsledky

4.1 Kalibrace a proměření koncentrační řady NaCl

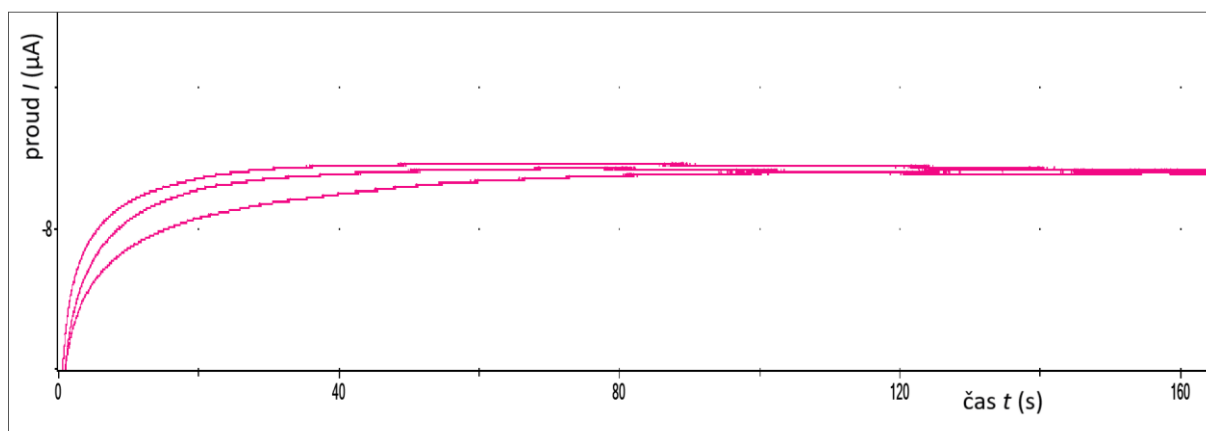
Kalibrace i proměření koncentrační řady byly provedeny vždy třikrát a poté byly hodnoty zprůměrovány. Byla udržována stálá teplota 23 °C.

Tabulka 4.1: Hodnoty stálených proudů při kalibraci OE1

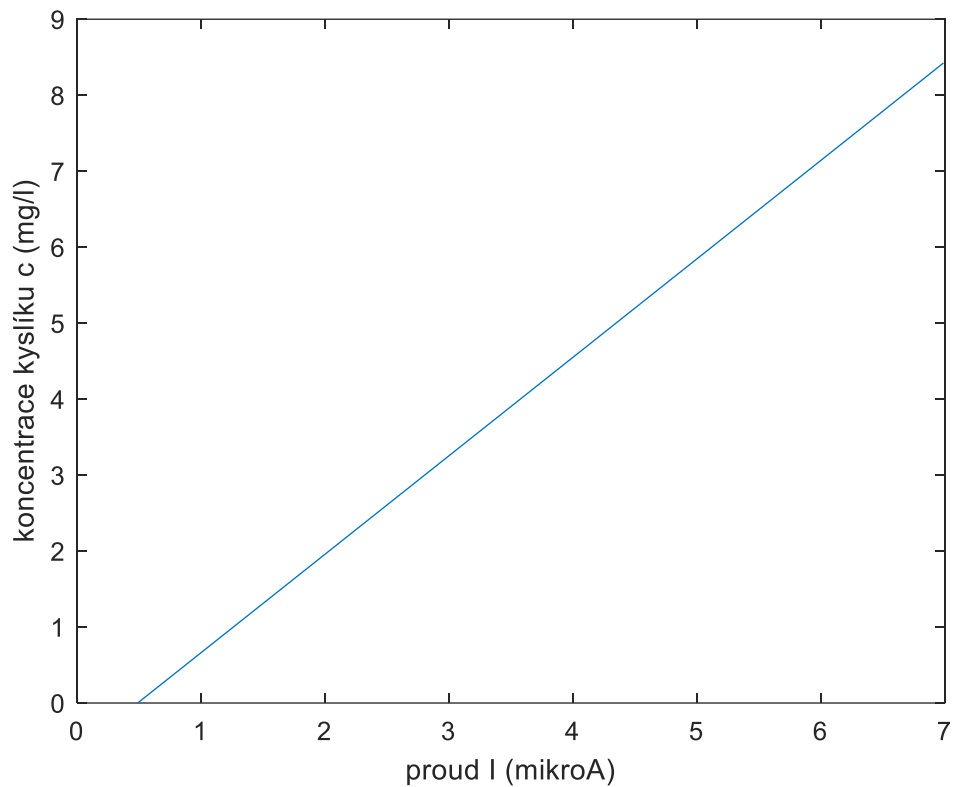
Číslo pokusu	Elektrický proud O ₂ max	Elektrický proud O ₂ min
	I_{\max} (μA)	I_{\min} (μA)
1	-7,14	-0,54
2	-7,10	-0,48
3	-7,09	-0,46
průměr	-7,11	-0,49

Tabulka 4.2: Hodnoty proudu a koncentrací rozpuštěného kyslíku pro kalibrační křivku dle tabelovaných hodnot pro 23 °C a atmosférický tlak 101,3 kPa

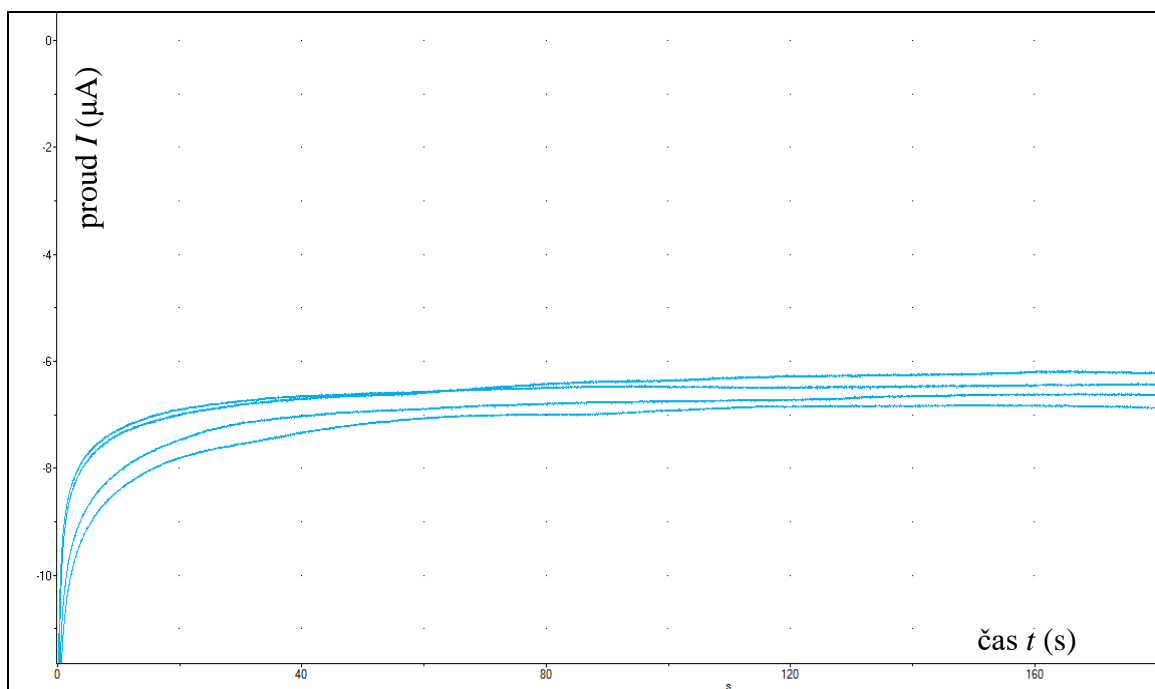
Elektrický proud	Koncentrace O ₂
I (μA)	c (mg·l ⁻¹)
-7,11	8,58
-0,49	0,00



Graf 4.1: Opakovaná kalibrace miniaturní kyslíkové elektrody (OE1) při dané teplotě a tlaku v destilované vodě; software EChem: režim pulzní amperometrie se stejnosměrnou složkou napětí -680 mV



Graf 4.2: Kalibrační křivka OE1 pro teplotu 23 °C



Graf 4.3: Amperometrické měření koncentrační řady vzorků NaCl pro teplotu 23 °C

Tabulka 4.3: Přehled naměřených hodnot proudu z kyslíkové elektrody pro koncentrační řadu NaCl

Koncentrace roztoku NaCl	Naměřený proud I_1 (μA)	Naměřený proud I_2 (μA)	Naměřený proud I_3 (μA)	Průměrný proud I_{NaCl} (μA)
35 %	-6,08	-6,14	-6,10	-6,11
25 %	-6,38	-6,38	-6,37	-6,38
15 %	-6,68	-6,66	-6,59	-6,64
5 %	-6,86	-6,78	-6,77	-6,80

Tabulka 4.4: Naměřené hodnoty proudů pro koncentrační řadu roztoků NaCl při dané teplotě

Koncentrace roztoku NaCl	Průměrný naměřený proud I_{NaCl} (μA)
35 %	-6,11
25 %	-6,38
15 %	-6,64
5 %	-6,80
0%	-7,11

4.2 Závislost elektrického signálu na teplotě vody

Tabulka 4.5: Naměřené hodnoty proudů pro vzorky vody o různých teplotách

Teplota vody t ($^{\circ}\text{C}$)	Elektrický proud I_t (μA)
8	-7,88
23	-7,11
37	-6,71

5 Diskuze

Hlavním zjištěním provedených experimentů bylo, že elektrický signál z miniaturní kyslíkové elektrody, a tím pádem i množství fyzikálně rozpuštěného kyslíku, klesá s rostoucí iontovou silou měřeného roztoku (Tabulka 4.4) a taktéž klesá s rostoucí teplotou vody (Tabulka 4.5).

V případě měření vlivu iontové síly na rozpustnost kyslíku a kalibraci elektrody bylo nutné dbát na udržení konstantních podmínek (teploty roztoků, otáčky míchání, uspořádání měření) a na dostatečně dlouhou dobu, aby se mohla ustavit rovnováha mezi parciálním tlakem kyslíku ve vzduchu a v roztocích/ve vodě. Roztoky i voda byly ponechány volně na vzduchu cca hodinu a před samotným měřením byly promíchávány v elektrochemické cele bez víček 15–30 minut. Otáčky byly nastaveny na 200/min po celou dobu měření, přičemž rychlost otáčení se volila tak, aby se vytvořil vodní vír, elektroda byla zcela ponořená a aby byla zajištěna ideální cirkulace vody ke kyslíkové elektrodě. Vzdálenost míchadla od membrány elektrody by měla být cca 1 mm, avšak je nutné počítat s oscilacemi míchadla a dbát na to, aby se míchadlo nedotklo membrány, protože by ji nevratně mechanicky poškodilo. Konstantní teplotu zajišťoval termostat nastavený na teplotu 23 °C. Jelikož je zcela kompatibilní s termostatem, bylo možné roztok zahřívat současně s mícháním v rámci ustavení rovnováhy. Roztoky koncentrační řady byly zvoleny tak, aby se na nich dala demonstrovat závislost rozpuštěného kyslíku a aby nekontaminovaly membránu elektrody. Z toho důvodu byl zvolen chlorid sodný, jelikož je dostupný, iontová síla i molární koncentrace je stejná a nezanáší membránu elektrody, na rozdíl od většiny organických látek.

Kalibraci bylo možné provádět jednobodově či dvoubodově. Při jednobodové kalibraci se nepřidává siřičitan sodný a neměří se odpověď elektrody na roztok s vyčerpaným rozpuštěným kyslíkem, signál se rovnou stanoví roven nule. Jednobodová kalibrace ovšem nezohledňuje množství kyslíku přítomné ve vnitřním elektrolytu elektrody, jenž se na signálu také účastní. V rámci práce byla provedena dvoubodová kalibrace s roztokem siřičitanu sodného, jehož koncentrace (1 g siřičitanu na 5 ml vody) byla osobně doporučena pracovníkem firmy BVT. Nicméně ani vyšší navážka siřičitanu (1,5 g) měření neškodila, naopak byly změny signálu rychlejší. Větší množství siřičitanu ovšem může působit problémy při rozpouštění. Roztok Na_2SO_3 bylo třeba připravit vždy čerstvý a dobře ho před použitím uzavřít, neboť ochotně reaguje s kyslíkem a oxiduje se, viz rovnice 3.1.

V průběhu kalibrace na 0% obsah O_2 byly provedeny celkem tři přídavky 100 μl roztoku siřičitanu, přičemž mezi dávkami se čekalo na ustálení signálu, což zpravidla

trvalo přibližně 1–2 minuty. Ponechal-li se roztok delší čas v cele, opět se nasýtil kyslíkem a signál z elektrody rostl. Během fáze přidávání siřičitanu je vhodné celu zavřít zátkami, aby roztok uvnitř nepřicházel do kontaktu s okolním vzdušným kyslíkem, jinak se kalibrace na maximální obsah kyslíku a proměrování sady vzorků provádělo bez zátek, protože tam byl kontakt s okolním kyslíkem žádoucí.

Výsledky v tabulce 4.2 jsou doplněny o koncentrace rozpuštěného kyslíku v mg/l, kdy signál pro maximální obsah kyslíku ve vzorku při teplotě 23 °C teoreticky odpovídá tabelované hodnotě koncentrace rozpuštěného kyslíku v čisté vodě při tlaku 101,3 kPa a teplotě 23 °C, jenž je 8,58 mg/l. Pomocí této kalibrační křivky lze určit koncentraci kyslíku čisté vody o stejné teplotě. Nelze ji však použít pro koncentrační řadu soli ani pro vodu o různých teplotách, jelikož obě závislosti koncentrace rozpuštěného O₂ na iontové síle a na teplotě nejsou lineární.

Výsledky měření mohly být ovlivněny měnící se kvalitou vnitřního elektrolytu elektrody v průběhu měření; změnami v uspořádání měřicí soustavy po každé výměně roztoku v elektrochemické cele, kdy bylo nutné vyndat míchadlo i elektrodu; stářím membrány; nečistotami na zoxidované stříbrné elektrodě, které ani čištěním nebylo možné zcela odstranit a v neposlední řadě spojením kyslíkové elektrody a potenciostatu pomocí adaptérů, které by při vhodnější kombinaci přístrojů nebyly zapotřebí.

Pro spolehlivější výsledky měření by bylo dobré zakoupit plně funkční potenciostat (používaný přístroj měl některé vstupy porouchané) a elektrodu s plně kompatibilním zakončením, které by nevyžadovalo použití adaptérů.

Co se týče přípravy měřicí aparatury, je třeba dbát na správné zapojení dle obrázku 3.9, zejména na pospojování kabelů potenciostatu s katodou a anodou kyslíkové elektrody. U elektrodového kabelu potenciostatu je, poněkud nestandardně, kabel měrné elektrody zelený, červený kabel je k pomocné elektrodě. Miniaturní kyslíkovou elektrodu bylo třeba přiměřeně naplnit roztokem KCl a vyhnout se vzduchovým kapsám či bublinám, které by měření hrubě zkreslovaly. Tělo s elektrodami a plastový kryt s membránou je spojen závitem. Míra utažení ovlivňuje měření, nejlepším řešením se ukázalo ponechání vůle cca 1 mm mezi membránou a platinovou elektrodou. Rozhraní „roztok–membrána–vnitřní elektrolyt–platinová elektroda“ by mělo zůstat po dobu měření bez větších změn.

Program EChem lze spustit a nastavit jen pokud je zapnutý i potenciostat, a to i v případě, že se otvírají soubory pouze pro čtení. Pro měření byl použit režim „multipulzní amperometrie“, kde bylo potřeba vhodně nastavit parametry. V praxi se osvědčilo použít stejnosměrnou složku napěťového signálu -680 mV se dvěma pulzy o hodnotě -50 mV, viz příloha. Získaný signál byl méně zašuměný a kyslíková elektroda dávala adekvátní signál v řádech jednotek μA . Získaný naměřený proud je v záporných hodnotách, protože na katodu se přivádí záporný potenciál.

6 Závěr

Bylo navrženo zapojení potenciostatu firmy eDAQ a miniaturní kyslíkové elektrody. Měřicí aparatura byla doplněna o další přístroje potřebné k udržení optimálních a stálých podmínek pro elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku. Měřicí soustava byla vyobrazena do blokového schématu.

Byla provedena dvoubodová kalibrace pro maximální a minimální obsah kyslíku v čisté destilované vodě pro konkrétní teplotu 23°C, podle které lze určit koncentraci rozpuštěného kyslíku v čisté destilované vodě v jednotkách mg.l^{-1} . Bylo provedeno měření pro ověření funkčnosti soustavy na sadě vzorků, konkrétně na koncentrační řadě chloridu sodného o konstantní teplotě a na vzorcích s různou teplotou. Získaný elektrický signál se pohyboval v řádech jednotek mikroampér. Na výsledcích měření se demonstrovala závislost klesajícího množství kyslíku v roztocích o větší iontové síle a vyšší teplotě.

Byl sepsán stručný návod v bodech doplněný fotografiemi pro provedení amperometrického měření a kalibrace. Návod byl vložen jako příloha.

Seznam použité literatury

[1] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upravené a doplněné vydání, Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.

[2] JABOR, Antonín a Miroslav ZÁMEČNÍK, *Encyklopedie laboratorní medicíny I* [online]. Pardubice: SEKK, 2002 [cit. 2019-04-10]. ISBN 80-238-9775-6. Dostupné z: <http://www.demo4.smitka.eu/homepage/charakteristika>

[3] ROUBÍK, Karel. *Fyzikální chemie pro biomedicínské inženýrství*. Praha: Nakladatelství ČVUT, 2007. ISBN 978-80-01-03788-1.

[4] Schematic diagram showing the main components of a biosensor. In: *Enzyme Technology* [online]. Cambridge University Press, 2014 [cit. 2019-05-14]. Dostupné z: http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/images/fig6_1.gif

[5] GONZALEZ-NAVARRO, Felix, Margarita STILIANOVA-STOYTICHEVA, Livier RENTERIA-GUTIERREZ, Lluís BELANCHE-MUÑOZ, Brenda FLORES-RIOS a Jorge IBARRA-ESQUER. Glucose Oxidase Biosensor Modeling and Predictors Optimization by Machine Learning Methods. *Sensors*. 2016, **16**(11). DOI: 10.3390/s16111483. ISSN 1424-8220. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/16/11/1483>

[6] HAŠEK, Pavel. *Tabulky pro tepelnou techniku*. 2. Ostrava: Vysoká škola báňská, 1980, 247 s.

[7] TÁBORSKÁ, Eva, Hana BOCHOŘÁKOVÁ, Jiří DOSTÁL, Hana PAULOVÁ, Jaromír SLÁMA, Jiří SLANINA, Jaroslava TALLOVÁ a Josef TOMANDL. *Lékařská chemie I. Obecná a anorganická chemie*. 3. dotisk 2., přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2012. 156 s. učební text. ISBN 978-80-210-3790-8.

[8] Lewis structure of O₂. In: <https://socratic.org/questions/why-is-o2-paramagnetic> [online]. [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: <http://i.stack.imgur.com/oLDFc.png>

[9] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.

[10] MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-702-8.

- [11] Prospekt Medesa Acidobazická rovnováha. In: *Medesa* [online]. [cit. 2019-05-14]. Dostupné z: <https://portal.medesa.cz/produkty/download/220558?file=7c8a1aea-2a99-4d1d-9980-99e1ab5ded19>
- [12] Blood Gas Analyzer. In: *Slide Player* [online]. Palestine Polytechnic University Engineering, 2017 [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEWjY14jU4PrhAhXJjqQKHbccBAgQjRx6BAgBEAU&url=https%3A%2F%2Fslideplayer.com%2Fslide%2F11281741%2F&psig=AOvVaw3rNjko0YD7K6j5jXB5jnKM&ust=1556814645924003>
- [13] Circuit Diagram with the CDI Blood Parameter Monitoring System 500. In: *Terumo Cardiovascular Group* [online]. Ann Arbor, USA, 2014 [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: https://www.terumo-europe.com/Relevant%20Product%20Info/M_CDI500_Brochure_HiRes_SinglePgs_855432.pdf
- [14] MENDELSON. Pulse oximetry: theory and applications for noninvasive monitoring. *Clinical Chemistry* [online]. 1992, **38**(9), 1601-1607 [cit. 2019-05-04]. ISSN 1530-8561. Dostupné z: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/38/9/1601>
- [15] *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2009, **50**(1) [cit. 2019-04-21]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390802248585>
- [16] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský kurz*. 2005. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 978-80-7080-559-6.
- [17] SYNEK, Josef. *Pulsní oxymetr v LabView*. Brno, 2010. Bakalářská práce. VUT.
- [18] STON, Robert. Transkutánní oxymetrie a diabetická noha. *Medical Tribune* [online]. 2011, **2011**(4) [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/21677-traskutanni-oxymetrie-a-diabeticka-noha>
- [19] HUCH, Albert a Renate HUCH. Transcutaneous, Noninvasive Monitoring of pO₂. *Hospital Practice*. 2016, **11**(6), 43-52. DOI: 10.1080/21548331.1976.11706949. ISSN 2154-8331. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21548331.1976.11706949>
- [20] *Basic electrochemistry of PO₂ electrode*. [online]. In: . 2016 [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: https://thoracickey.com/wpcontent/uploads/2016/07/B9780721684222500072_gr2.jpg

- [21] AFLORI, Magda, I. NEACȘU a V. MELNIG. *ANALYSIS METHODS OF OXYGEN CONSUMPTION IN BIOLOGICAL SYSTEMS* [online]. [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/239920841_ANALYSIS_METHODS_OF_OXYGEN_CONSUMPTION_IN_BIOLOGICAL_SYSTEMS
- [22] *Potenciostat 466: User manual*. Denistone East, Australia: eDAQ Pty, 2010.
- [23] EC162 Electrode Cable for Potentiostats. In: *EDAQ - data recording made simple* [online]. [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: https://www.edaq.com/highslide/images/huge/EC162_Electrode_Cable_for_Potentiostats.jpg
- [24] *Minithermostat MT-1: User manual*. BVT Technologies, a.s.
- [25] Universal stirrer for screen printed and classical electrodes - ST1.*. *BVT Technologies, a.s.* [online]. 2011 [cit. 2019-05-15]. Dostupné z: http://bvt.cz/_ftp/Product%20Lists%202018/pdf%20web/11-ST1.pdf

Příloha A: Návod na provedení kalibrace a elektrochemického stanovení kyslíku

Seznam chemikálií

- Destilovaná voda
- Roztok siřičitanu sodného (3x100 μ l)
- Roztok 1M chloridu draselného
- Koncentrační řada chloridu sodného: 35, 25, 15 a 5 %(m/m)

Seznam vybavení

- Potenciostat 466
- Miniaturní kyslíková elektroda
- Míchadlo ST1
- Elektrochemická cela TC4
- Termostat MT-1
- 2x Adaptér BNC/banana plug
- Počítač se softwarem EChem
- Automatická pipeta 100 μ l

Postup

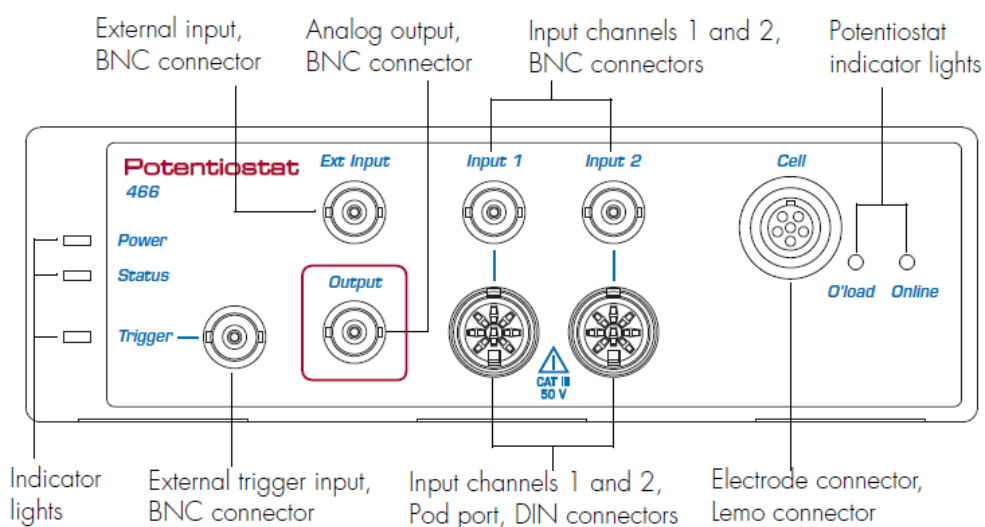
1. Napipetujte 10 ml destilované vody do elektrochemické cely a celu umístěte do termostatu. Termostat zapojte do sítě a stiskněte tlačítko „ON/OFF“.
2. Nastavte termostat na teplotu, pro kterou chcete dělat kalibraci. Na displeji ponechte nastavení $T_w = T_b$ a tlačítkem „SEL“ se proklikajte k nastavení teploty. Teplotu nastavte pomocí tlačítek T- a T+. Volbu potvrďte tlačítkem „SET“ a stiskněte „START/STOP“ pro zahájení výhřevu/ochlazování (Obrázek A.1).
3. Do cely ponořte elektrické míchadlo zapojené do zásuvky a nastavte 200 otáček/min pomocí otočného šroubu. Takto promíchávanou vodu v cele bez zátek ponechte cca 30 minut, poté je možné zahájit měření. Míchadlo i termostat budou stále zapnuty.
4. V mezičase připravte roztoky koncentrační řady chloridu sodného (10 ml x 4) daných koncentrací. Sůl pečlivě rozmíchejte. Roztoky ponechte v kádinkách na vzduchu.
5. Připravte 50 ml 1M roztoku chloridu draselného do odměrné baňky a dobře uzavřete.
6. Připravte 5 ml roztoku siřičitanu sodného v koncentraci 1–1,5 g na 5 ml čerstvé destilované vody a dobře uzavřete.

7. Zapojte potenciostat do sítě pomocí napájecího kabelu, který byl dodán společně s přístrojem. Zdířka pro tento kabel je označena jako „Power socket“ na obrázku A.3.
8. Kolébkový vypínač („Power on/off“, Obrázek A.3) dejte do polohy „zapnuto“.
9. Pozorujte, zda se rozsvítily indikační světélka („Indicator lights“, Obrázek A.2) při úvodním self-testu přístroje, který se provede při každém zapnutí. Kontrolka „Power“ by se měla rozsvítit modře; „Status“ žlutě a poté zeleně; „Trigger“ žlutě a poté zhasnout. Takto je potenciostat připraven k použití a připojení k počítači.
10. Připojte potenciostat k počítači pomocí USB kabelu přes „USB connector“ (Obrázek A.3). Kabel byl dodán společně s přístrojem.
11. Počítač zapněte a otevřete software EChem. Na potenciostatu by se mělo zeleně rozsvítit světlo „Online“ na předním panelu (Obrázek A.2).
12. Připravte miniaturní kyslíkovou elektrodu OE1. Naplňte cca z 60 % plastový kryt s membránou roztokem KCl a zbavte ho bublin přiměřeným poklepáváním na stěnu krytu. Dbejte na opatrnou manipulaci s membránou.
13. Jemně zašroubujte kovové elektrody do krytu s membránou. Závit neutahujte, ponechte cca 1 mm mezi membránou a hrotem platinové elektrody.
14. Elektrodu ponořte do promíchávaného roztoku tak, aby byla membrána od míchadla vzdálená 0,5–1 mm (Obrázek A.4). Membrána by měla být zcela ponořená.
15. K potenciostatu připojte elektrodový kabel (Obrázek A.5) do zdířky „Cell“ na čelním panelu potenciostatu.
16. Propojte měřicí soustavu dle obrázku A.6: Od kyslíkové elektrody vedou dva kabely – červený a modrý – zakončené BNC konektory. Červený je pro platinovou katodu (pracovní elektrodu), modrý pro stříbrnou (referenční) elektrodu. Červený kabel spojte adaptérem se zeleným kabelem potenciostatu; modrý kabel spojte s červeným a žlutým elektrodovým kabelem potenciostatu pomocí stejného adaptéru.
17. Soustava by měla být připravena k provozu a nastavení softwaru EChem. Postupujte dle obrázků A.7 až A.9.
18. Na obrazovce počítače stiskněte tlačítko „Start“ vpravo dole a nechte měření běžet. Zopakujte třikrát a ustálené hodnoty zprůměrujte. Takto byla provedena kalibrace signálu elektrody pro maximální možné množství rozpuštěného kyslíku pro danou teplotu. Signál by měl být záporný v řádech jednotek μA .

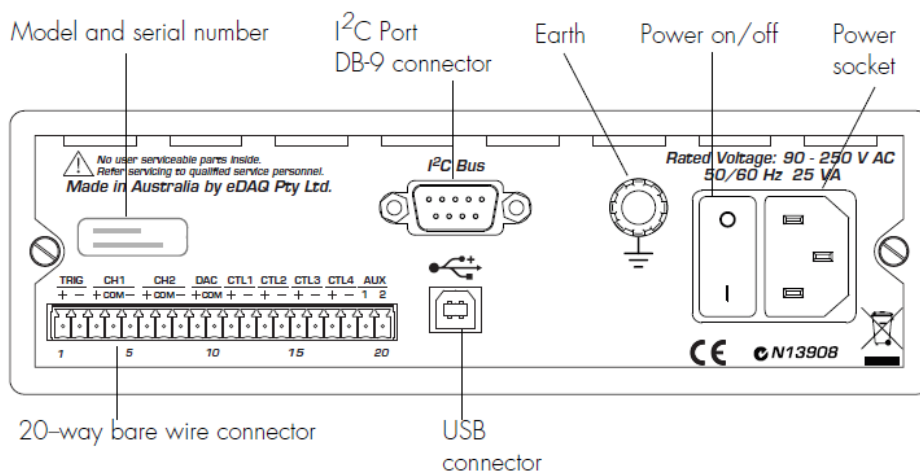
19. Proved'te měření pro 0% množství kyslíku v roztoku. Prodlužte dobu nahrávání změnou parametru „Steps“ (Obrázek A.8) na 20 000. Spusťte měření a po ustálení signálu (cca 1 minuta) přidejte první dávku siřičitanu (100 μ l). Vyčkejte na ustálení (1–2 minuty) a proved'te další přídavek. Stejně postupujte u třetího přídavku.
20. Pro měření koncentrační řady elektrochemickou celu důkladně umyjte, elektrodu opláchněte destilovanou vodou a vyměňte vnitřní elektrolyt.
21. Do cely nalijte roztok soli, ponořte míchadlo a nechte ustálit na požadovanou teplotu v termostatu.
22. Po dosažení požadované teploty roztoku ponořte kyslíkovou elektrodu a spusťte měření jako při prvním měření destilované vody. Každý roztok proměřte třikrát a hodnoty zprůměrujte.



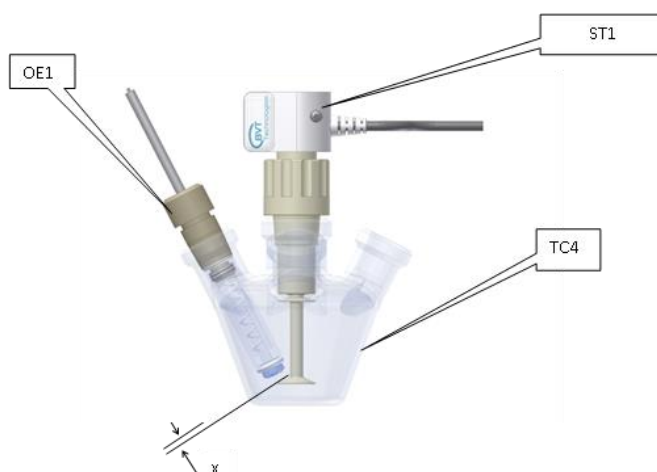
Obrázek A.1: Termostat MT-1 s elektrochemickou celou, míchadlem a elektrodou.



Obrázek A.2: Přední panel potenciostatu eDAQ 466 [22]



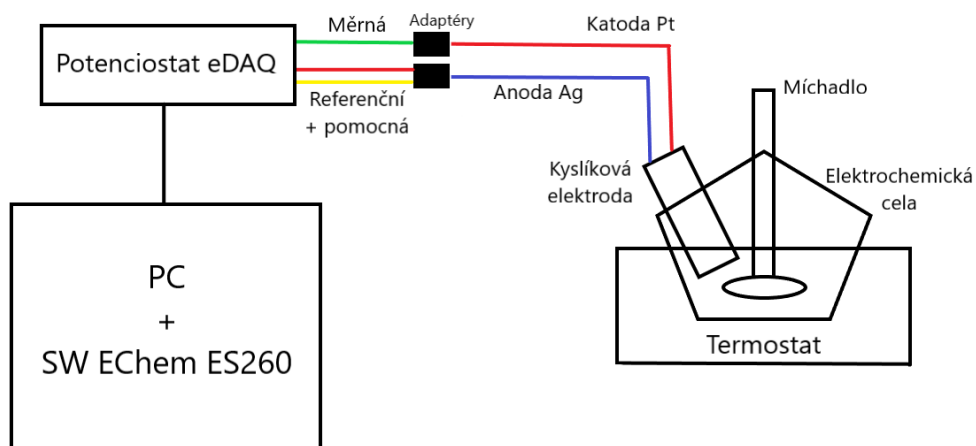
Obrázek A.3: Zadní panel potenciostatu eDAQ 466 [22]



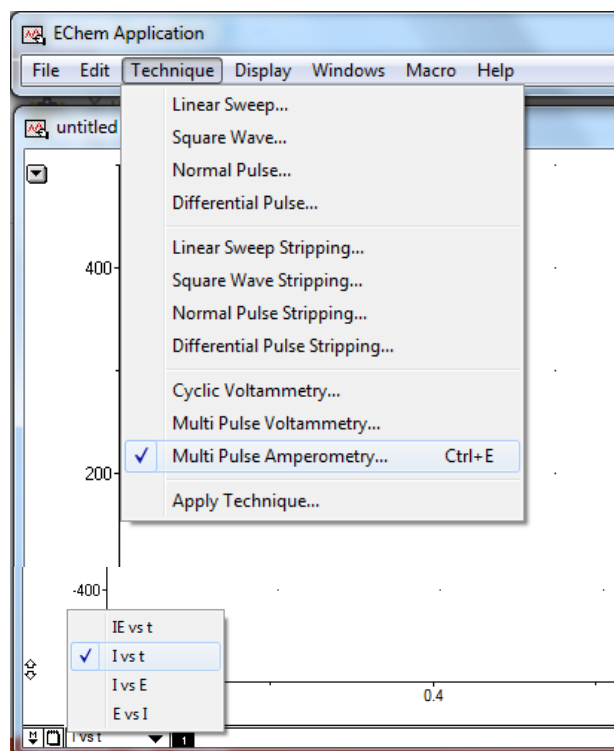
Obrázek A.4: Elektrochemická cela s míchadle a kyslíkovou elektrodou [25]



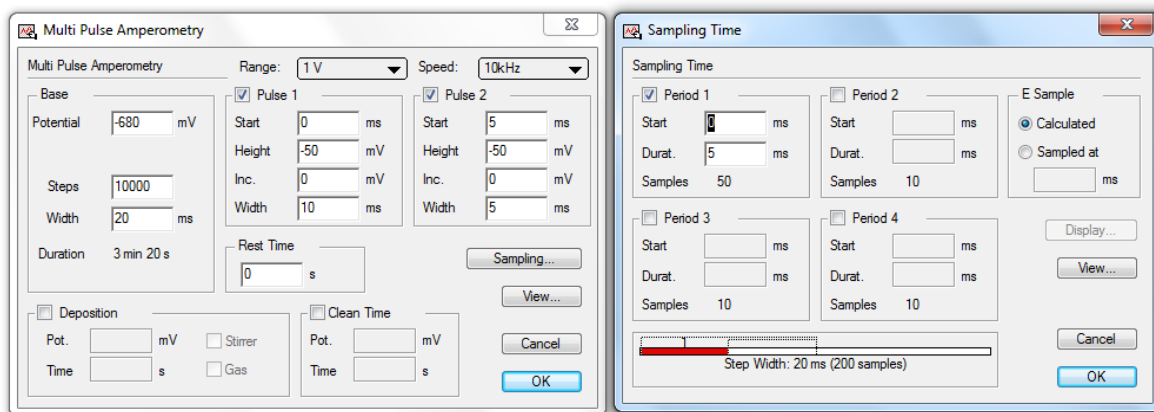
Obrázek A.5: Elektrodotový kabel [23]



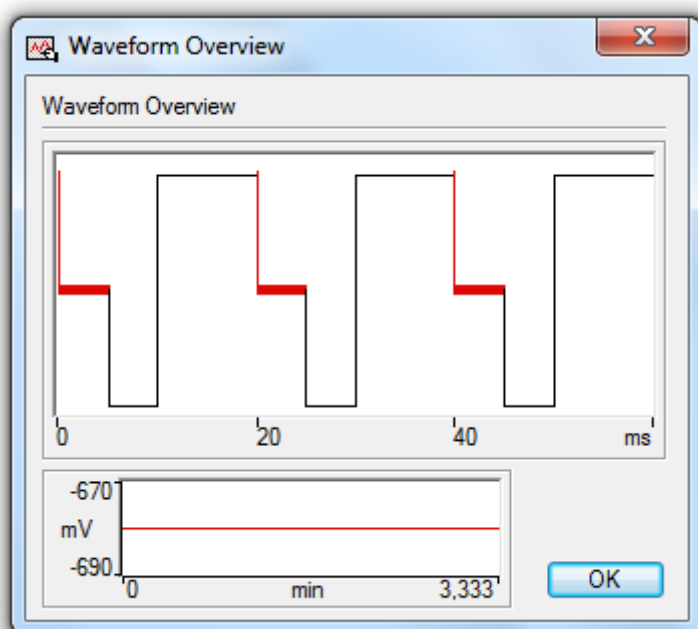
Obrázek A.6: Schéma měřicí soustavy pro stanovení množství rozpuštěného kyslíku



Obrázek A.7: Ovládací panel programu EChem



Obrázek A.8: Nastavení parametrů amperometrického měření v softwaru EChem



Obrázek A.9: Tvar budičícího napěťového impulzu