UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Vliv průtokové rychlosti na průběh a možnosti vyhodnocení různých reakcí v SIA systému

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Hradec Králové 2014 Vladěna Mrákotová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za laskavé vedení, odborné korekce a čas, který věnovala při vzniku této práce. Mé poděkování patří i ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie za vytvoření vhodných podmínek pro realizaci experimentální části.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Vladěna Mrákotová

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: **Vliv průtokové rychlosti na průběh a možnosti vyhodnocení různých reakcí v SIA systému**

Diplomová práce se zabývala testováním vlivu mísení a průtokové rychlosti na průběh a možnosti vyhodnocení různých reakcí v SIA systému se spektrofotometrickou detekcí. Byla měřena absorbance u dvou druhů chemických reakcí s rozdílnou rychlostí průběhu. U rychleji probíhající reakce bromthymolové modři (BTB) s hydroxidem sodným (NaOH) byla provedena změna pH a reakce byla hodnocena nárůstem absorbance modré formy/poklesem absorbance žluté formy BTB. Byl testován vliv průtokové rychlosti a způsob mísení (různé pořadí aspirace, různé poměry mísení pracovních roztoků). Stejné parametry byly testovány i u pomaleji probíhající dvojstupňové reakce stanovení dusitanů (D) s diazotačně-kopulačním činidlem (DKČ). Navíc byl měřen stop-flow technikou vliv zastavení toku v určitých částech průtokového systému. Byla testována i technika „sandwich“. Vyhodnocováno bylo pomocí hodnot výšek a ploch píků.

Výhodné bylo použití pomalejších průtokových rychlostí spolu s většími objemovými množstvími pracovních roztoků. Použití bylo příznivé z hlediska vyšší citlivosti měření, ale na druhou stranu rozšiřovalo píky a prodlužovalo dobu analýzy. Používání ekvivalentních poměrů pracovních roztoků se ukázalo jako nejvhodnější. Při reakci D s DKČ bylo dosahováno nejvyšších hodnot při nejdelším zastavení toku. Od doby zastavení toku na 60 - 80 s nedocházelo již k významnému navyšování signálu. Zastavení toku v mísící cívce a před detektorem se projevovalo nižšími hodnotami ploch než při zastavení toku v průtokové cele detektoru. Při hodnocení pomocí výšek píků nebyly pozorovány významnější rozdíly v hodnocení mezi místy zastavení toku. Použití sendvičové techniky, kde byla provedena aspirace vzorku mezi dvě zóny činidla, vykazovalo největší výtěžnost.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Vladěna Mrákotová

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Effect of flow rate on the kinetic and the possibility of evaluating different reactions in the SIA system**

The diploma thesis dealt with testing the effect of mixing and flow rate on the kinetic and the possibility of evaluating different reactions in the SIA system with spectrophotometric detection. Absorbance was measured for two kinds of chemical reactions with different reaction speed. For faster running reaction color change of bromothymol blue (BTB) with sodium hydroxide (NaOH) by the change in pH was evaluated by the increase in absorbance of blue form/decrease in absorbance of yellow form of BTB. The effect of flow rate and method of mixing (different sequence aspirations, different mixing ratio of working solution) was tested. The same parameters were also tested for slowly running two-step reaction of nitrites (D) with a diazo-coupling reagent (DKC). Furthermore, stop-flow technique was applied to see the effect of stopping the flow at certain parts of the flow system. The "sandwich" technique was tested too. The obtained results were evaluated using peak heights and peak areas.

In case of slower flow rates the larger volume amounts of working solutions were advantageous. Application was favorable in terms of higher measurement sensitivity, but on the other hand, peaks got wider and the time of analysis was prolonged. Using the equivalent ratio of the working solutions proved to be the most appropriate. For the reaction of nitrites with diazo-coupling reagent the highest values were achieved using the longest period of stopping the flow. Stopping the flow for 60 - 80 s did not bring a significant increase in the signal. Stop the flow in the holding coil and before the detector was reflected by lower values of peak area than stop the flow in the flow cell of the detector. In evaluation using the peak height significant differences using stop the flow in different places were not observed. Use of the sandwich technique where the aspiration of the sample was made between the two zones reagent showed the highest reaction yield.

OBSAH

ABSTRAKT 1

ABSTRACT 2

Obsah 3

Seznam zkratek 5

1. Úvod 6

2. Cíl a popis zadání práce 7

3. Teoretická část 8

3.1 Systém SIA 8

3.1.1 Instrumentace 8

3.1.2 Princip 9

3.1.3 Technika sandwich (Sandwich technique) 9

3.1.4 Technika zastavení toku (Stop flow technique) 10

3.2 Optimalizace parametrů programovatelného toku 11

3.2.1 Průtoková rychlost 11

3.2.2 Nástřik vzorku 11

3.2.3 Kontrolovaná disperze 12

3.2.4 Reprodukovatelný čas 14

4. Experimentální část 15

4.1 Přístroje 15

4.2 Chemikálie 15

4.3 Příprava roztoků 16

4.3.1 Příprava zásobních roztoků 16

4.3.2 Příprava pracovních roztoků 16

4.4 Postup měření 17

4.4.1 Systém SIA 17

4.4.2 Reakce bromthymolové modři s hydroxidem sodným 17

4.4.3 Reakce dusitanů se směsným diazotačně-kopulačním činidlem 18
4.4.4 Vyhodnocování výsledků 20
5. Výsledky a diskuse 21
5.1 Reakce bromthymolové modře s hydroxidem sodným 21
5.1.1 Vliv průtokové rychlosti na absorbanci žluté formy BTB 21
5.1.2 Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace BTB a NaOH na absorbanci modré formy BTB 25
5.1.3 Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace NaOH a BTB na absorbanci modré formy BTB 28
5.2 Reakce dusitanů s diazotačně-kopulačním činidlem 31
5.2.1 Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů 31
5.2.2 Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů 34
5.2.3 Vliv zastavení toku, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů 39
5.2.4 Vliv zastavení toku, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů 43
5.2.5 Vliv zastavení toku a pořadí aspirace pracovních roztoků při sendvičové metodě stanovení dusitanů 48
5.2.6 Měření délky trvání dosažení rovnováhy reakce při stanovení dusitanů... 52
6. Souhrn 55
6.1 Reakce bromthymolové modři s hydroxidem sodným 55
6.2 Reakce dusitanů s diazotačně-kopulačním činidlem 55
7. Závěr 57
8. Literatura 58
Seznam tabulek 59
Seznam obrázků 61

SEZNAM ZKRATEK

BTB	modř bromthymolová (bromothymol blue)
D	dusitany
DKČ	diazotačně-kopulační činidlo
MC	mísící cívka
MPV	vícecestný ventil (multi-position valve)
PD	před detektorem
PTFE	polytetrafluorethylen ~ teflon
R	činidlo (reagent)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
S	vzorek (sample)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SIA	sekvenční injekční analýza (sequential injection analysis)
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná oblast záření (ultraviolet-visible)
VD	v detektoru

1. ÚVOD

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) je druhou generací průtokových analytických technik. Když byla vynalezena, byla první analytickou metodou založenou na programování toku [1]. SIA je založena na programovatelném, obousměrně diskontinuálním toku přesně časově ovládaným počítačem. Podstatné je přizpůsobení a optimalizace jednotlivých kroků testování [2], jako je například průtoková rychlost, pořadí aspirace nebo poměr mísení reagencií.

Digitální zpracování získaného signálu, nízká spotřeba reagencií a univerzálnost metody činí SIA široce používaným nástrojem pro výzkum a kontinuální monitorování [1]. Průtoková analytická technika SIA se dá využít pro reakce s rychlým i pomalým průběhem [2]. Ve výzkumu je SIA využívána pro snadnou a rychlou optimalizaci, programovatelnou úpravu reakčních podmínek a sledování reakční kinetiky. Jednoduchá instrumentace - systém s jedním kanálem, realizace změny měřícího cyklu pomocí ovládacího programu, efektivní využívání chemikálií, minimalizace odpadu, snadnější manipulace s rizikovými látkami a zlepšení mísení reagencií pomocí obousměrného toku jsou hlavní výhody používání SIA [3].

Metoda SIA je využívána v oboru farmacie například pro stanovení obsahu účinné látky v substancích, lékových formách a biologických materiálech, dále pro monitorování disolučního procesu pevných lékových forem a zjišťování vazby léčiv na bílkoviny. Z dalších oborů je SIA aplikována v potravinářství, zemědělství, monitorování dlouhodobých procesů a kvality životního prostředí [3].

2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem diplomové práce je testování vlivu mísení a průtokové rychlosti na průběh a možnosti vyhodnocení různých reakcí v SIA systému. Testování se bude zabývat měřením absorbance u dvou druhů chemických reakcí, z nichž první má rychlejší a druhá pomalejší průběh. Testování bude probíhat pomocí SIA systému, který byl sestaven na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Za rychleji probíhající reakci byla pro účely diplomové práce zvolena acidobazická reakce bromthymolové modři (BTB) s hydroxidem sodným (NaOH), která bude hodnocena nárůstem absorbance modré formy/poklesem absorbance žluté formy BTB. Za pomaleji probíhající reakci byla zvolena dvojstupňová reakce stanovení dusitanů (D) s diazotačně-kopulačním činidlem (DKČ).

Při rychlejší reakci BTB s NaOH bude upravováno pH a tím bude docházet ke změně barevné formy - přechodu ze žluté na modrou. Bude testován vliv velkého rozmezí průtokové rychlosti a způsob mísení (různé pořadí aspirace, různé poměry mísení pracovních roztoků). Získaný signál bude vyhodnocován pomocí výšek, ale také ploch píků.

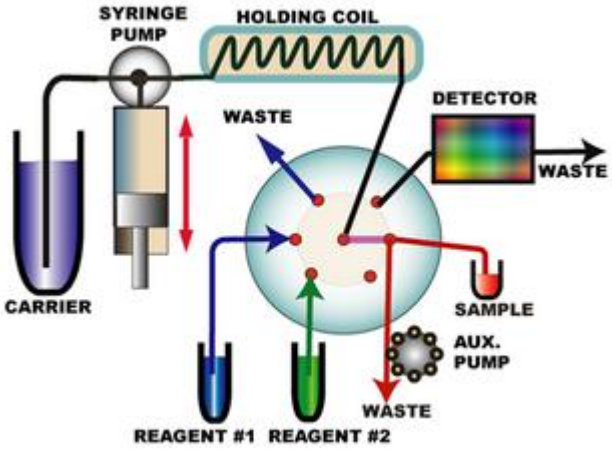
Při delším průběhu reakce stanovení dusitanů po diazotaci a kopulaci se směsným diazotačně-kopulačním činidlem bude testován vliv průtokové rychlosti ve velkém rozmezí, způsob mísení (různé pořadí aspirace, rozdílné poměry mísení pracovních roztoků) a zastavení toku v určitých částech průtokového systému. Opět bude vyhodnocováno hodnotami výšek i ploch píků.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 SYSTÉM SIA

3.1.1 Instrumentace

Systém SIA se skládá (Obrázek 1) z obousměrného čerpadla (*syringe pump*), mísící cívky (*holding coil*), vícecestného ventilu (*multi-position valve, MPV*) a detektoru (*detector*) [2]. Nejčastěji používaná detekční technika je UV-VIS spektrofotometrie [1].



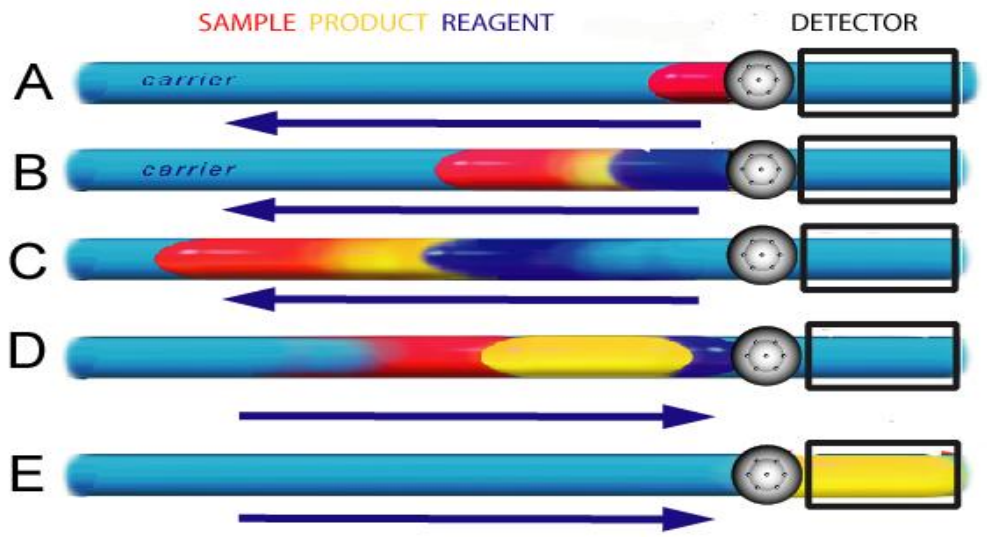
Obrázek 1 – Instrumentace systému SIA [1]

Klíčovým nástrojem systému SIA je vícecestný ventil. Jeho centrální port je připojen k obousměrnému čerpadlu, které se používá k aspiraci přesně definovaných množství roztoků - vzorku (*sample*) a činidel (*reagent #1, #2*) do mísící cívky [1]. Čerpadlo slouží též pro aspiraci a pohyb nosného proudu (*carrier*), do kterého jsou aspirovány roztoky vzorku a činidel.

Obrácením směru toku se navrstvené zóny roztoků pohybují dopředu přes ventil do detektoru pro sledování reakčního produktu [1]. Poté jsou roztoky odváděny do odpadu (*waste*) a po skončení měřícího cyklu je systém promýván.

Všechny funkce systému – průtoková rychlost, aspirované a dávkované objemy, ventilové pozice a sběr dat – jsou řízené počítačem a programovatelné [1].

3.1.2 Princip



Obrázek 2 – Princip systému SIA [4]

Měřící cyklus má následující kroky (Obrázek 2): **A)** Nástřiku vzorku se dosahuje aspirací přesného množství vzorku *(**sample**)* přes MPV do mísící cívky, po kterém následuje **B)** postupná aspirace zvoleného objemu činidla *(**reagent**)*. **C)** Jako navrstvené zóny se pohybují proti proudu a vzájemně se do sebe rozptylují a začíná se tvořit reakční produkt *(**product**)*. **D)** Po obrácení směru toku se zóny dále míchají a reagují. **E)** Reakční směs dosáhne průtokové cely detektoru, kde se monitoruje měřený signál reakčního produktu. Na konci měřícího cyklu je systém rychlou průtokovou rychlostí vymýván [2].

Vzhledem k tomu, že pohyb sekvenčně nastříknutých zón je řízen počítačem, časový interval mezi nástřikem vzorku (A) a detekcí produktu (E) je reprodukovatelný. Tímto způsobem jsou všechny vzorky zpracovány přesně stejným způsobem, který umožňuje jejich srovnání - standardů s neznámými vzorky [1].

3.1.3 Technika sandwich (Sandwich technique)

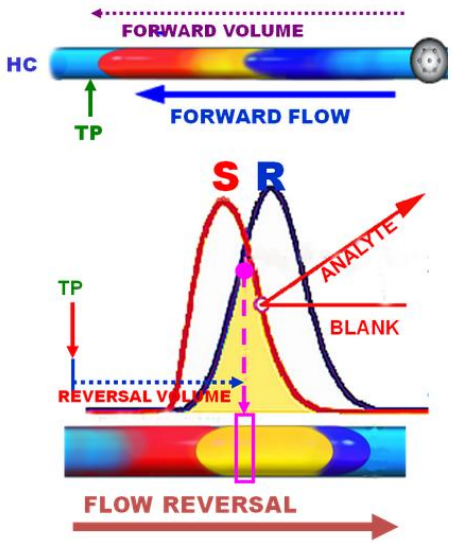
Sendvičová technika znamená, že vzorek (S) je aspirován mezi dvě zóny roztoku činidla (R_1, R_2). Aspirovaná sestava R_1 / S / R_2 v mísící cívce SIA systému je obrácením toku dopravena do průtokové cely detektoru [6]. Tato technika je výhodná z hlediska efektivního promísení vzorku a činidla i při použití většího objemu vzorku.

3.1.4 Technika zastavení toku (Stop flow technique)

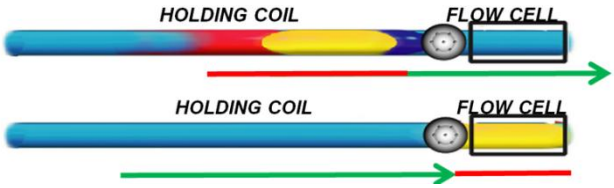
Vybrané části smíšené zóny vzorku a činidla mohou být zadrženy zastavením toku (Obrázek 4) buď - v mísící cívce nebo

- v průtokové cele detektoru.

Zadržením smíšené zóny v průtokové cele detektoru (Obrázek 3) jsou změny absorbance pouze v důsledku chemické reakce, která probíhá a získá se tak kinetická křivka odpovídající reakční rychlosti. Pouze přítomností analytu *(analyte)* je výsledkem zvyšující se zaznamenávaný signál, zatímco při absenci analytu bude zaznamenána vodorovná čára *(blank)* [1].



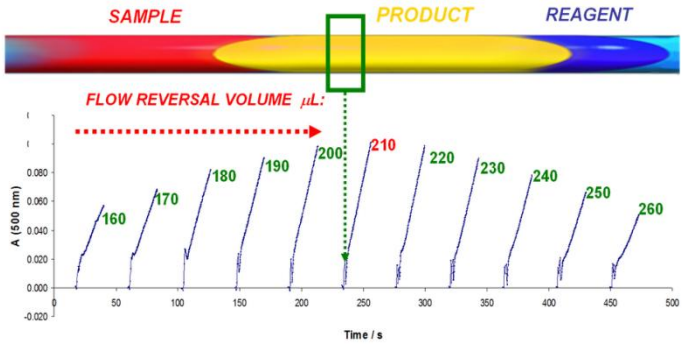
Obrázek 3 – Technika stop flow[1]



Obrázek 4 – Zastavení toku v mísící cívce *(holding coil)* a průtokové cele *(flow cell)*[1]

Optimalizace testovacích podmínek je dosaženo pomocí úpravy dávkovaného objemu *(reversal volume)* nejvhodněji vybraného poměru vzorek *(sample, S)* a činidlo *(reagent, R)*. Pro nejvyšší citlivost by se měl dávkovaný objem shodovat s maximem píku, který má výhodnou polohu zjištěnou měřením zastavením toku v mísící cívce (Obrázek 5) [1].

Dávkovaný objem určuje, jak daleko reakční směs cestuje zpět z mísící cívky přes MPV do průtokové cely detektoru. Příliš malý dávkovaný objem nedopraví produkt do průtokové cely detektoru, zatímco příliš velký dávkovaný objem průtokovou celou detektoru projde [1].



Obrázek 5 – Optimalizace poměru S/R [5]

3.2 OPTIMALIZACE PARAMETRŮ PROGRAMOVATELNÉHO TOKU

Jak již bylo zmíněno, systém SIA je založen na programovatelném toku, který je zcela ovládán počítačem. Kardinální je přizpůsobení a optimalizace jednotlivých kroků měřícího cyklu, jako je průtoková rychlost, pořadí aspirace nebo poměr mísení reagencií. Důležitá je i optimalizace následujících parametrů, které patří mezi základní kameny techniky SIA: nástřik vzorku, kontrolovaná disperze a reprodukovatelný čas [1].

3.2.1 Průtoková rychlost

Každý jednotlivý krok měřícího cyklu může být proveden různou průtokovou rychlostí. Optimalizace průtokové rychlosti je tedy důležitým kritériem při programování toku. Používají se následující kombinace průtokových rychlostí [1].

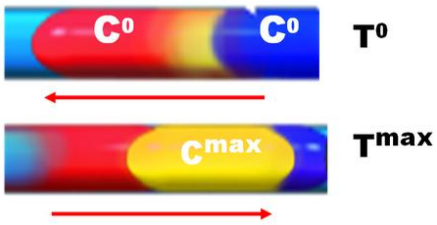
- Rychlý průtok
  - pro plnění nebo promývání systému nosným proudem (100 – 200 µl/s)
- Střední průtok
  - pro aspiraci pomocných látek (50 µl/s)
- Nízký průtok
  - pro aspiraci vzorku a činidla (20 µl/s)
- Velmi nízký průtok
  - pro průchod zóny detektorem (10 µl/s) – záleží na použité chemické reakci a stabilitě produktu, typu průtokové cely detektoru a citlivosti stanovení [3]
- Zastavení toku a držení reakční směsi v mísící cívce nebo průtokové cele detektoru pro měření reakční rychlosti [1]

3.2.2 Nástřik vzorku

Nástřik vzorku a činidla poskytuje počáteční vstup, který slouží jako výchozí bod pro počáteční koncentraci (C°) vzorku a činidla. Objem injikovaného vzorku by neměl překročit hodnotu $S_{1/2}$, která odpovídá disperznímu koeficientu (D) ne většímu než 2 [1]. Obrázek 8 níže popisuje vztah mezi hodnotami $S_{1/2}$ a D.

3.2.3 Kontrolovaná disperze

Kontrolovaná disperze probíhá v podobě navrstvených zón pohybujících se proti proudu v mísící cívce, které se pak vracejí zpět přes ventil do detektoru pomocí obráceného toku (Obrázek 6). Tento proces vytváří velmi dobře definovaný koncentrační gradient, který je pozorovatelný jako kontinuální prvky s různými koncentracemi vzorku, produktu a činidla. K vytvoření signálu, který je úměrný počáteční koncentraci vzorku, je nezbytné, aby došlo k překrytí zóny vzorku a činidla. Překrytí se hodnotí měřením disperzního koeficientu vzorku ($D = C° / C_{max}$), který je stupněm zředění vzorku. Vzhledem k tomu, že koncentrace činidla je vždy vyšší než vzorku ($D > 2$), bude existovat dostatečný přebytek činidla v reakční směsi [1].

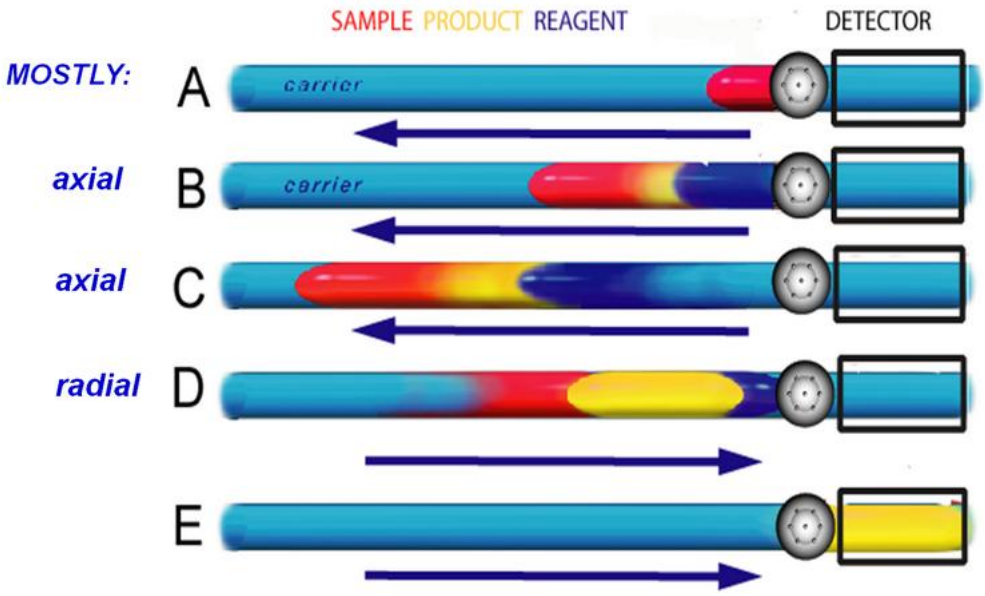


Obrázek 6 – Disperze vzorku [1]

Princip disperze

Existují dva typy disperze, které poskytují mísení vzorku s činidlem: ***axiální*** a ***radiální*** disperze (Obrázek 7). Nástřikem vzorku **(A)** a následně nástřikem činidla **(B)**, proniká činidlo do zóny vzorku díky axiální disperzi, jako navrstvené zóny se pohybují proti proudu **(C)**. Po obrácení směru toku **(D)** turbulentní proudění způsobí podporu radiální a axiální disperze reakční směsi, která prochází průtokovým kanálem do detektoru. Když reakční směs dosáhne průtokové cely detektoru **(E)** je radiální mísení téměř kompletní [1].

Odezva systému SIA je výsledkem dvou procesů, a to jak fyzikálního procesu disperze zóny vzorku a činidla, tak chemického procesu tvorby produktu na rozhraní navrstvených zón. Systém SIA musí být konstruován tak, aby byla maximalizovaná radiální disperze, zatímco axiální disperze, která určuje vzájemné pronikání zón vzorku a činidla by měla být optimalizovaná. Rychlost chemické reakce by měla být maximalizovaná za účelem dosažení vysoké vzorkovací frekvence [1].



Obrázek 7 – Princip disperze [1]

Faktory ovlivňující disperzi

Konstrukce systému SIA je v praxi závislá na použité chemické metodě a detekčním systému, který byl zvolen pro analýzu. V praxi lze změnou konstrukce systému postoupit ke kontrolované disperzi vzorku [8].

Mezi faktory ovlivňující disperzi vzorku patří zejména objem nastřikovaného vzorku, průtoková rychlost, délka a průměr průtokového kanálu [7].

1) Objem nastřikovaného vzorku (Obrázek 8)

Při zvyšujícím se objemu nastřikovaného vzorku se zvyšuje i maximum píku (výška) a snižuje se disperzní koeficient. Zatímco velký objem nastřikovaného vzorku zvyšuje citlivost tak zároveň rozšiřuje pík. Je tedy obvykle vhodnější použít menší objem vzorku, aby se zvýšila rychlost analýzy a zároveň zajistila dostatečná citlivost. Parametr $S_{1/2}$ je používán k označení objemu vzorku potřebného k získání D = 2 (tzn., že výška píku odpovídá polovičnímu signálu pro neředěný vzorek). Proto při objemu menším než $S_{1/2}$ je disperze nepřímo úměrná objemu nastřikovaného vzorku [7].

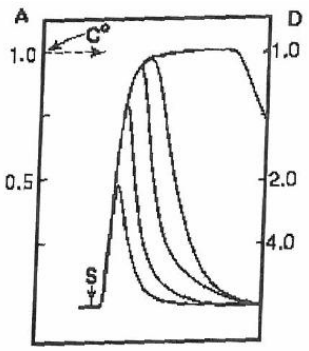


Figure 2.6 Influence of the sample volume on peak shape.

Obrázek 8 – Vliv objemu nastřikovaného vzorku na disperzi [7]

2) Délka a průměr průtokového kanálu

   S prodlužující se délkou a zvětšením průměru průtokového kanálu se prodlužuje reakční čas a dochází ke zvýšení disperze. Aby se dosáhnulo delší reakční doby bez zvyšující se disperze, musí se použít technika zastavení toku [7].

3) Průtoková rychlost

   Vliv průtokové rychlosti má opačný efekt oproti délce průtokového kanálu. Proto s danou délkou průtokového kanálu se zvyšující se průtokovou rychlostí se snižuje reakční čas a též disperze [7].

3.2.4 Reprodukovatelný čas

Pomocí precizního opakování jednotlivých naprogramovaných kroků měření v SIA systému je dosaženo přesného časování [3]. Opakovatelné kroky zahrnují (Obrázek 6) vrstvení vzorku a činidla do mísící cívky, transport navrstvených zón do detektoru a délku trvání do zastavení toku[1], ve které je systém promyt před nástřikem dalšího vzorku. Z tohoto důvodu je čas (T), který uplyne od nástřiku (T°) přes odečtení maxima signálu (T_{max}) do zastavení toku reprodukovatelný[1].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 PŘÍSTROJE

Analytické váhy SARTORIUS 2004 MP, Německo

Ultrazvuková lázeň SONOREX RK 100, BANDELIN electronic, Německo

Diode Array UV-VIS Spektrofotometr Hewlett Packard 8453, USA

Systém SIA

Počítač se speciálními kartami pro zpracování dat a komunikační rozhraní systému SIA s počítačem; programovací prostředí LabVIEW 8.5 (National Instruments, USA) s ovládacím programem FaFSIA vytvořeným na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové

Pístové čerpadlo Cavro XL 3000 s objemem 2,5 ml, Cavro Scientific Instruments, USA

Deseticestný selekční ventil Vici-Valco, Valco Instruments, USA

Průtoková Z-cela optická délka 20 mm

Světelný zdroj Ocean optics LS-1 Series Tungsten Halogen Light, Ocean optics, USA

Detektor UV-VIS Ocean optics USB 2000, Ocean optics, USA

Spojovací hadičky z teflonu (PTFE) o vnitřním průměru 0,50 a 75 mm, Watrex Praha, Česká republika

4.2 CHEMIKÁLIE

Modř bromthymolová ind. – LACHEMA s.p. Brno, Česká republika

Hydroxid sodný čistý – PENTA Chrudim, Česká republika

Dusitan sodný p.a. ≥ 99% – SIGMA-ALDRICH, Česká republika

N-(1-naftyl)ethylendiamin chlorid ≥ 99% – SIGMA-ALDRICH, Švýcarsko

Sulfanilamid ≥ 99% – SIGMA-ALDRICH, Čína

Methanol – SIGMA-ALDRICH, Česká republika

Ethanol 96%, denaturovaný methanolem, BIOFERM - lihovar Kolín, Česká republika

4.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Roztoky byly připravovány do skleněných odměrných baněk potřebných objemů. K přípravě roztoků byla používána demineralizovaná voda připravovaná na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové demineralizací systémem Milli-Q (Millipore, USA). Všechny roztoky byly po přípravě ponořeny na dobu 2 minut do ultrazvukové lázně. Roztoky byly uchovávány v lednici. Před měřením byly roztoky z lednice vyjmuty, aby získaly laboratorní teplotu, při které bylo prováděno měření.

4.3.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok bromthymolové modře o koncentraci 10^{-3} mol/l byl připraven rozpuštěním navážky 0,0624 g ve 2 ml methanolu a doplněn vodou po rysku 100 ml odměrné baňky.

Zásobní roztok hydroxidu sodného o koncentraci 10^{-1} mol/l byl připraven rozpuštěním navážky 0,4 g ve vodě a doplněním na 100 ml.

Zásobní roztok dusitanů o koncentraci 103 mg/l byl připraven rozpuštěním navážky 0,0154 g dusitanu sodného ve vodě a doplněním na 100 ml.

Zásobní roztok diazotačně-kopulačního činidla byl připraven rozpuštěním 1,0 g sulfanilamidu za stálého míchání v 5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a byl zředěn vodou na 40 ml. Bylo rozpuštěno 0,1 g *N*-(1-naftyl)ethylendiaminium chloridu ve 40 ml vody. Oba roztoky byly slity a doplněny vodou do 200 ml. Činidlo bylo uchováváno v tmavé láhvi. Zásobní roztok diazotačně-kopulačního činidla byl zároveň pracovním roztokem.

4.3.2 Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztok bromthymolové modře o koncentraci 10^{-5} mol/l byl připraven z 0,5 ml zásobního roztoku bromthymolové modře o koncentraci 10^{-3} mol/l a doplněn vodou do 50 ml.

Pracovní roztok hydroxidu sodného o koncentraci 10^{-3} mol/l byl připraven z 0,5 ml zásobního roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 10^{-1} mol/l a doplněn vodou do 50 ml.

Pracovní roztok dusitanů o koncentraci 2 mg/l byl připraven z 2 ml zásobního roztoku dusitanů o koncentraci 103 mg/l a doplněn vodou do 100 ml.

4.4 POSTUP MĚŘENÍ

4.4.1 Systém SIA

Jednotlivá měření byla prováděna pomocí systému SIA, který se skládal z pístové pumpy, mísící cívky, vícecestného selekčního ventilu a detektoru. Obousměrná pístová pumpa a dvoucestný ventil umožňovaly pohyb kapalin oběma směry a sloužily jako čerpadlo. Nosným proudem byla demineralizovaná voda – poloha pumpy IN umožnila nasávání nosného proudu do dutiny čerpadla. Poloha pumpy OUT umožnila spojení s mísící cívkou. Před začátkem denního měření byla prováděna inicializace pumpy (nastavení pumpy do nulové polohy) a byly promyty všechny porty – nejdříve vodou, následně ethanolem a nakonec opět vodou. Měření probíhalo podle předem naprogramovaného měřícího cyklu. Do mísící cívky byly pomocí vícecestného selekčního ventilu zvolenými porty aspirovány pracovní roztoky. Docházelo k vzájemnému mísení pracovních roztoků a chemické reakci v mísící cívce. Následně bylo nastaveno obrácení toku a došlo k dokonalému promísení zón roztoků. Objem mísící cívky a dutiny čerpadla byl poslán do průtokové cely detektoru a následně do odpadu. Vždy byla zvolena požadovaná průtoková rychlost a objem pro jednotlivé kroky měření. Při stejných reakčních podmínkách byly provedeny tři cykly měření a pro hodnocení byla vzata průměrná hodnota.

Detektor byl používán spektrofotometrický a byly zaznamenávány hodnoty absorbance. Dílčí měření v systému SIA byla proměřována při absorbančních maximech - vlnových délkách měřených produktů, které byly ověřeny na UV-VIS diode-array spektrofotometru. Nezbytnou součástí systému byl počítač s příslušným programovým vybavením. Výsledky měření byly hodnoceny pomocí ovládacího programu FaFSIA vytvořeného na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, z grafického záznamu byly odečítány hodnoty výšek a ploch píků.

4.4.2 Reakce bromthymolové modři s hydroxidem sodným

První byla proměřena žlutá forma pracovního roztoku bromthymolové modři (BTB) při vlnové délce 433 nm. Transport do detektoru byl proveden při čtyřech různých průtokových rychlostech (25, 50, 75 a 100 µl/s) v objemovém rozmezí 20 – 490 µl, kdy v rozmezí 20 – 100 µl byl jednotlivý přírůstek 10 µl a v rozmezí 100 – 490 µl byl jednotlivý přírůstek 30 µl.

Následovalo měření, kdy docházelo k úpravě pH hydroxidem sodným - docházelo ke změně barevné formy - přechodu ze žluté barvy na modrou. Měření bylo prováděno při vlnové délce 615 nm. Byly proměřeny průtokové rychlosti v rozmezí 10 – 120 µl/s, kdy jednotlivý přírůstek byl 10 µl a navíc byly proměřeny průtokové rychlosti 25 a 75 µl/s. Změřeny byly tři poměry mísení pracovních roztoků, konkrétně 1 : 5 (10 µl : 50 µl), 1 : 1 (50 µl : 50 µl) a 5 : 1 (50 µl : 10 µl), zároveň byl testován vliv aspiračního pořadí pracovních roztoků.

Tabulka 1 – Ukázka měřícího cyklu u reakce BTB s NaOH

syringe pump	valve position IN		pumpa poloha IN
detector	scan reference		
detector	on		
syringe pump	set flow rate [µl/s]	100	rychlost aspirace nosného proudu
syringe pump	aspirate [µl]	1000	aspirovaný objem vody
syringe pump	valve position OUT		pumpa poloha OUT
syringe pump	set flow rate [µl/s]	50	rychlost aspirace pracovních roztoků
multiport valve	set valve position	2	port 2 - BTB
syringe pump	aspirate [µl]	10	aspirovaný objem BTB
multiport valve	set valve position	3	port 3 - NaOH
syringe pump	aspirate [µl]	50	aspirovaný objem NaOH
syringe pump	set flow rate [µl/s]	60	rychlost transportu do detektoru
multi port valve	set valve position	8	port 8 – průtoková cela detektoru
syringe pump	empty syringe		detekce, vyprázdnění pumpy
*number of cycles		3	opakovat 3×

4.4.3 Reakce dusitanů se směsným diazotačně-kopulačním činidlem

Nejdříve byl proměřen vliv pořadí aspirace pracovních roztoků při mísení dusitanů (D) s diazotačně-kopulačním činidlem (DKČ). Měření bylo prováděno při vlnové délce 540 nm. Byly proměřeny průtokové rychlosti v rozmezí 10 – 150 µl/s, kdy jednotlivý přírůstek byl 10 µl a navíc byly proměřeny průtokové rychlosti 25 a 75 µl/s. Změřeny byly tři poměry mísení pracovních roztoků, konkrétně 1 : 5 (10 µl : 50 µl), 1 : 1 (50 µl : 50 µl) a 5 : 1 (50 µl : 10 µl).

Dále bylo testováno zastavení toku při reakci D s DKČ. Bylo zastavováno po 10 s v časovém rozmezí 0 – 60 s. Tok byl zastavován v mísící cívce, před detektorem a v detektoru (v průtokové detekční cele). Zastavení toku v požadovaném místě bylo dosáhnuto nastavením objemu pro transport vznikajícího reakčního produktu v měřícím programu následně – při zastavení v mísící cívce byl program zastaven před obrácením směru toku nosného proudu, při zastavení před detektorem byl objem dávkovaný ve směru k detekční cele 100 µl a při zastavení v detektoru byl objem nastaven individuálně dle poměru mísení a aspiračního pořadí pracovních roztoků - uvedeno

v tabulce 2 (dole). Byl zjišťován vliv aspiračního pořadí pracovních roztoků a byly proměřeny tři poměry mísení pracovních roztoků, konkrétně 1 : 5 (10 µl : 50 µl), 1 : 1 (50 µl : 50 µl) a 5 : 1 (50 µl : 10 µl). Měřeno bylo při průtokové rychlosti 100 µl/s, vlnové délce 540 nm. Před začátkem měření se zastavením toku u reakce D s DKČ byla vyměněna spojovací hadička mezi ventilem a detekční průtokovou celou za delší, než byla u předchozího proměřování vlivu aspiračního pořadí bez zastavování toku.

Tabulka 2 – Objem dávkovaný při zastavení toku v detektoru u reakce D s DKČ

	poměr mísení pracovních roztoků		
	1 : 5	1 : 1	5 : 1
aspirační pořadí	*dávkovaný objem [µl]*		
D - DKČ	195	230	165
DKČ - D	200	210	220

Další měření se zabývalo zastavením toku při sendvičovém mísení pracovních roztoků. Tzn., že aspirační pořadí pracovních roztoků bylo D-DKČ-D nebo DKČ-D-DKČ, a velikost aspirovaných objemů byla 25 - 50 - 25 µl. Sendvičové mísení pracovních roztoků tedy znamenalo 25 µl D - 50 µl DKČ - 25 µl D a obráceně 25 µl DKČ - 50 µl D - 25 µl DKČ. Tok byl zastavován po 10 s v časovém rozmezí 0 – 60 s v mísící cívce, před detektorem a v detektoru, toho bylo docíleno nastavením objemu dávkovaného v měřícím programu – při zastavení v mísící cívce byl program zastaven před obrácením směru toku nosného proudu, při zastavení před detektorem byl dávkovaný objem 100 µl a při zastavení v detektoru byl použit objem 210 µl. Bylo měřeno při vlnové délce 540 nm a průtokové rychlosti 100 µl/s.

Tabulka 3 – Ukázka měřícího cyklu při sendvičové metodě stanovení D

syringe pump	valve position IN		pumpa poloha IN
detector	scan reference		
detector	on		
syringe pump	set flow rate [µl/s]	100	rychlost aspirace nosného proudu
syringe pump	aspirate [µl]	1500	aspirovaný objem vody
syringe pump	valve position OUT		pumpa poloha OUT
syringe pump	set flow rate [µl/s]	50	rychlost aspirace pracovních roztoků
multiport valve	set valve position	2	port 2 - D
syringe pump	**aspirate [µl]**	**25**	aspirovaný objem D
multiport valve	set valve position	3	port 3 - DKČ
syringe pump	**aspirate [µl]**	**50**	aspirovaný objem DKČ
multiport valve	set valve position	2	port 2 - D
syringe pump	**aspirate [µl]**	**25**	aspirovaný objem D
syringe pump	set flow rate [µl/s]	100	rychlost transportu do detektoru a vyprázdnění pumpy
multi port valve	set valve position	8	port 8 – průtoková cela detektoru
syringe pump	dispense [µl]	100	objem rozmytí
timer	pause [s]	60	délka trvání zastavení toku
syringe pump	empty syringe		detekce, vyprázdnění pumpy
*number of cycles		3	opakovat 3×

Nakonec byla zjišťována u stanovení dusitanů délka trvání dosažení rovnováhy reakce, resp. maxima signálu. Měření bylo prováděno při průtokové rychlosti 100 µl/s a vlnové délce 540 nm. Byla změřena obě pořadí aspirace mísení pracovních roztoků a dále bylo měřeno sendvičovou metodou pro obě aspirační pořadí. Tok byl zastavován v detektoru a reakce sledována v intervalech (60, 120, 180 s). Použitý dávkovaný objem byl pro reakci D s DKČ dle pořadí aspirace a poměrů mísení pracovních roztoků podle hodnot uvedených v tabulce 2 (nahoře), pro sendvičovou metodu byl dávkovaný objem 210 µl. Při stejných reakčních podmínkách byl proveden pouze jeden cyklus měření oproti všem předchozím dílčím měřením, kde byly měřeny vždy tři cykly měření.

4.4.4 Vyhodnocování výsledků

Získaný signál byl vyhodnocen výškou i plochou píku. Opakovatelnost výsledků byla vyjadřována výpočtem směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD). Výpočty SD a RSD byly prováděny dle vzorců:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}$$

$$RSD = \frac{100 \cdot SD}{\bar{x}}\,[\%]$$

kde *SD* je směrodatná odchylka, *n* označuje počet opakování měření, $\bar{x}$ značí aritmetický průměr, $x_i - \bar{x}$ znamená absolutní odchylku jednotlivých výsledků od aritmetického průměru, *RSD* je relativní směrodatná odchylka vyjádřená v procentech.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 REAKCE BROMTHYMOLOVÉ MODŘE S HYDROXIDEM SODNÝM

5.1.1 Vliv průtokové rychlosti na absorbanci žluté formy BTB

Nejdříve byla proměřena žlutá forma BTB bez změny pH a zbarvení při vlnové délce 433 nm. Transport do detektoru byl při průtokových rychlostech 25, 50, 75 a 100 µl/s (Tabulka 4, Tabulka 5, Tabulka 6 a Tabulka 7).

Při hodnocení naměřených hodnot pomocí výšek píků (Obrázek 9) bylo pozorováno, že se zvyšujícím se objemem u všech průtokových rychlostí měřený signál rostl. Ovšem při průtokové rychlosti 100 µl/s bylo zjištěno, že získané hodnoty výšek píků byly nižší než u pomalejších rychlostí z důvodu již rychlého transportu detektorem. Přibližně do hodnoty objemu 250 µl signál u všech průtokových rychlostí rostl logaritmicky a v objemech větších lineárně.

Při hodnocení naměřených hodnot plochami píků (Obrázek 10) se zvyšujícím se objemem u všech testovaných průtokových rychlostí měřený signál rostl lineárně. Nejvyšších hodnot ploch píků bylo dosaženo při nejpomalejší použité rychlosti 25 µl/s, protože byl zajištěn pomalý transport detektorem a větší počet bodů odečtených detektorem. U rychlejších průtokových rychlostí bylo dosahováno nižších hodnot ploch píků z důvodu rychlejšího transportu detektorem. Při hodnocení vlivu průtokové rychlosti na absorbanci žluté formy BTB bylo pozorováno, že s použitím vyšší průtokové rychlosti rostou i hodnoty RSD. Pozorovatelné je to hlavně u použití menších objemů BTB u rychlejších průtokových rychlostí 75 a 100 µl/s.

Tabulka 4 – BTB, rychlost 25 µl/s

objem [µl]	∅ výška	SD	RSD [%]	∅ plocha	SD	RSD [%]
20	0,1077	0,01	7,96	0,1962	0,03	13,71
30	0,1415	0,00	0,48	0,3167	0,02	6,22
40	0,1580	0,00	1,55	0,4256	0,01	1,59
50	0,1674	0,01	3,86	0,5792	0,07	11,82
60	0,1784	0,01	3,98	0,6834	0,05	7,83
70	0,1871	0,00	1,58	0,7724	0,03	4,13
80	0,1908	0,00	1,31	0,9419	0,06	6,05
90	0,1983	0,00	2,35	1,0984	0,01	1,13
100	0,2007	0,00	1,54	1,1915	0,05	4,27
130	0,2217	0,00	2,01	1,6513	0,06	3,87
160	0,2202	0,00	1,37	1,8701	0,12	6,24
190	0,2128	0,00	1,14	2,4676	0,07	2,89
220	0,2136	0,00	0,71	2,4676	0,07	2,89
250	0,2322	0,00	0,67	2,8683	0,10	3,40
280	0,2356	0,00	2,10	3,2051	0,14	4,25
310	0,2495	0,01	2,17	3,5247	0,09	2,45
340	0,2504	0,01	2,15	3,8878	0,19	4,91
370	0,2597	0,01	2,34	4,3022	0,15	3,50
400	0,2646	0,01	2,49	4,5107	0,14	3,05
430	0,2729	0,01	2,01	4,9446	0,08	1,61
460	0,2883	0,01	1,92	5,4768	0,03	0,50
490	0,2897	0,00	1,41	5,7449	0,20	3,41

Tabulka 5 – BTB, rychlost 50 µl/s

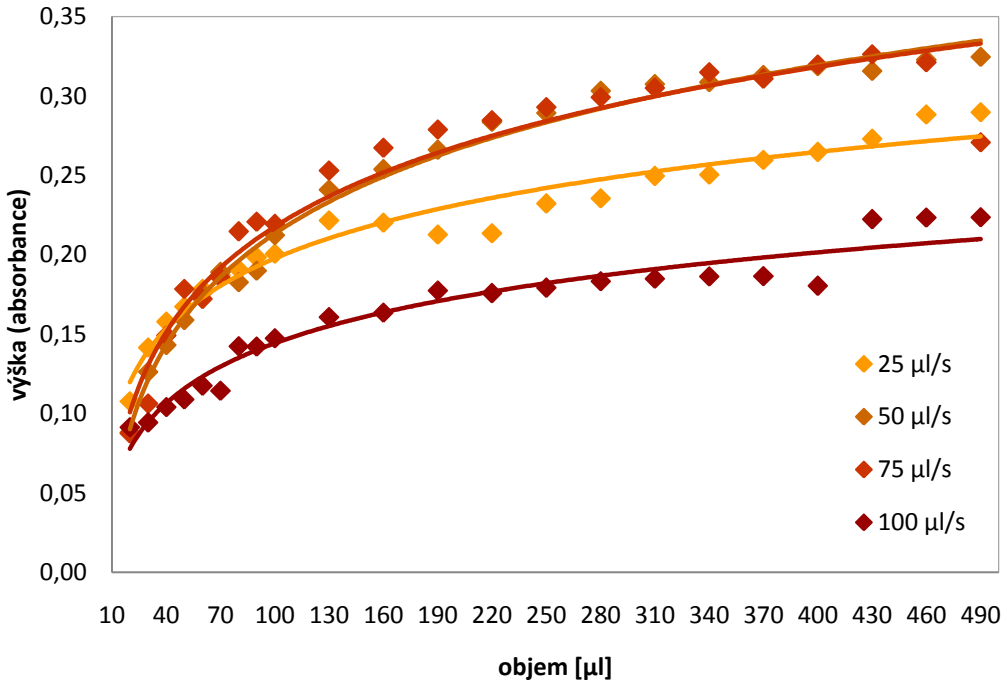
objem [µl]	∅ výška	SD	RSD [%]	∅ plocha	SD	RSD [%]
20	0,0882	0,01	13,06	0,1070	0,02	16,55
30	0,1261	0,00	2,64	0,1453	0,03	20,00
40	0,1431	0,01	9,42	0,2405	0,03	12,46
50	0,1588	0,00	2,03	0,2841	0,04	12,66
60	0,1761	0,01	3,63	0,3479	0,03	8,92
70	0,1890	0,01	3,48	0,4470	0,01	2,90
80	0,1827	0,00	1,06	0,3970	0,04	9,07
90	0,1899	0,00	2,33	0,4696	0,02	4,20
100	0,2123	0,00	1,33	0,6429	0,01	2,32
130	0,2410	0,00	1,54	0,8498	0,04	4,58
160	0,2537	0,00	1,15	1,0504	0,03	2,71
190	0,2660	0,01	2,09	1,2831	0,07	5,57
220	0,2837	0,00	1,61	1,5012	0,02	1,58
250	0,2893	0,00	0,61	1,6593	0,02	1,09
280	0,3032	0,00	1,46	1,8921	0,03	1,44
310	0,3074	0,00	1,15	2,1110	0,02	0,72
340	0,3087	0,00	0,72	2,2611	0,05	2,30
370	0,3130	0,01	2,09	2,4308	0,02	0,80
400	0,3188	0,01	1,89	2,6173	0,01	0,49
430	0,3157	0,00	0,58	2,7582	0,07	2,47
460	0,3227	0,00	1,26	2,9238	0,04	1,28
490	0,3246	0,00	0,97	3,0953	0,05	1,62

Tabulka 6 – BTB, rychlost 75 µl/s

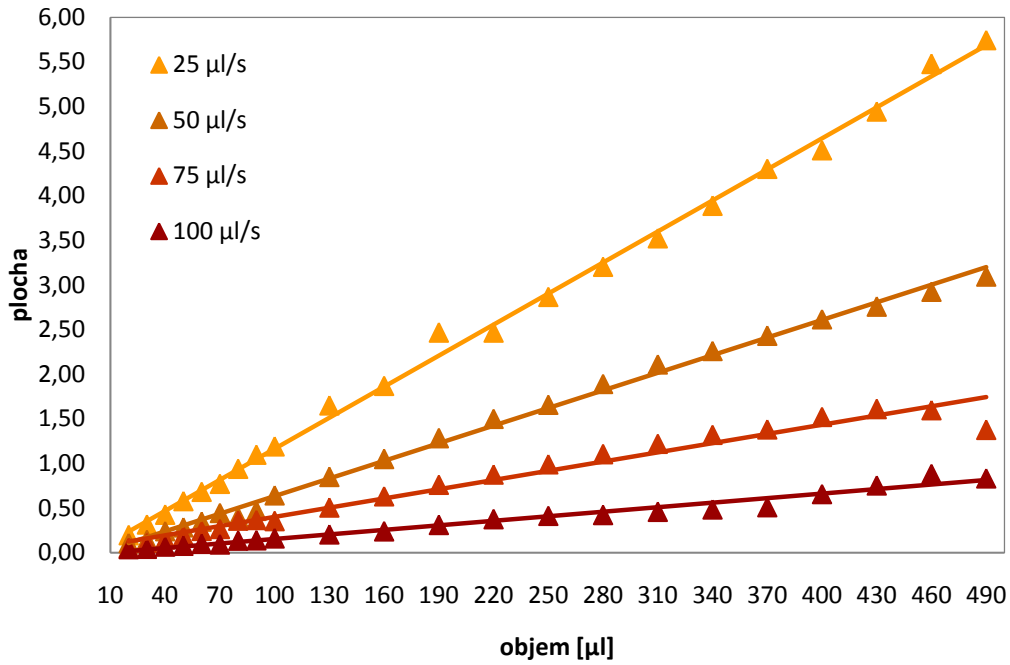
objem [µl]	∅ výška	SD	RSD [%]	∅ plocha	SD	RSD [%]
20	0,0875	0,01	6,96	0,0526	0,02	34,77
30	0,1064	0,01	11,49	0,1085	0,01	13,33
40	0,1493	0,02	11,81	0,1502	0,02	15,41
50	0,1784	0,01	3,01	0,1922	0,03	18,16
60	0,1721	0,02	12,38	0,2451	0,08	30,88
70	0,1855	0,01	3,12	0,2656	0,07	26,64
80	0,2147	0,02	8,92	0,3591	0,03	8,69
90	0,2209	0,01	4,52	0,3661	0,05	12,75
100	0,2193	0,01	5,90	0,3544	0,04	10,38
130	0,2531	0,01	2,76	0,5065	0,03	6,68
160	0,2673	0,00	1,72	0,6312	0,02	3,09
190	0,2788	0,01	3,24	0,7604	0,05	6,61
220	0,2847	0,01	2,96	0,8760	0,02	2,81
250	0,2930	0,00	0,86	0,9910	0,01	1,23
280	0,2992	0,01	2,01	1,1037	0,06	5,34
310	0,3050	0,01	3,45	1,2196	0,05	4,10
340	0,3149	0,00	1,41	1,3205	0,02	1,28
370	0,3108	0,01	2,62	1,3830	0,03	2,05
400	0,3197	0,01	2,67	1,5218	0,02	1,11
430	0,3262	0,01	2,26	1,6101	0,03	1,62
460	0,3212	0,01	1,72	1,5979	0,07	4,35
490	0,2708	0,00	1,03	1,3771	0,02	1,14

Tabulka 7 – BTB, rychlost 100 µl/s

objem [µl]	∅ výška	SD	RSD [%]	∅ plocha	SD	RSD [%]
20	0,0914	0,02	16,80	0,0412	0,00	7,47
30	0,0943	0,01	14,20	0,0433	0,00	3,46
40	0,1041	0,01	5,26	0,0682	0,00	5,84
50	0,1089	0,01	5,01	0,0784	0,01	16,92
60	0,1175	0,01	7,92	0,0996	0,01	6,15
70	0,1143	0,01	8,95	0,0921	0,01	10,09
80	0,1425	0,02	12,08	0,1350	0,02	12,00
90	0,1422	0,01	5,20	0,1390	0,01	6,46
100	0,1474	0,00	0,36	0,1603	0,01	8,34
130	0,1608	0,01	3,60	0,2058	0,00	1,78
160	0,1636	0,01	5,52	0,2391	0,05	22,01
190	0,1775	0,00	0,48	0,3118	0,01	1,85
220	0,1757	0,00	2,00	0,3765	0,02	6,03
250	0,1792	0,00	1,92	0,4145	0,03	6,43
280	0,1833	0,00	1,16	0,4228	0,01	3,08
310	0,1849	0,00	1,42	0,4586	0,01	3,23
340	0,1863	0,00	2,30	0,4855	0,01	1,07
370	0,1865	0,00	1,30	0,5107	0,02	3,98
400	0,1804	0,01	4,24	0,6583	0,15	23,43
430	0,2223	0,01	6,45	0,7547	0,17	22,90
460	0,2234	0,00	2,04	0,8838	0,13	14,82
490	0,2236	0,01	2,74	0,8327	0,08	9,62



Obrázek 9 – BTB při rychlostech 25, 50, 75 a 100 µl/s – hodnocení výškou píku



Obrázek 10 – BTB při rychlostech 25, 50, 75 a 100 µl/s – hodnocení plochou píku

5.1.2 Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace BTB a NaOH na absorbanci modré formy BTB

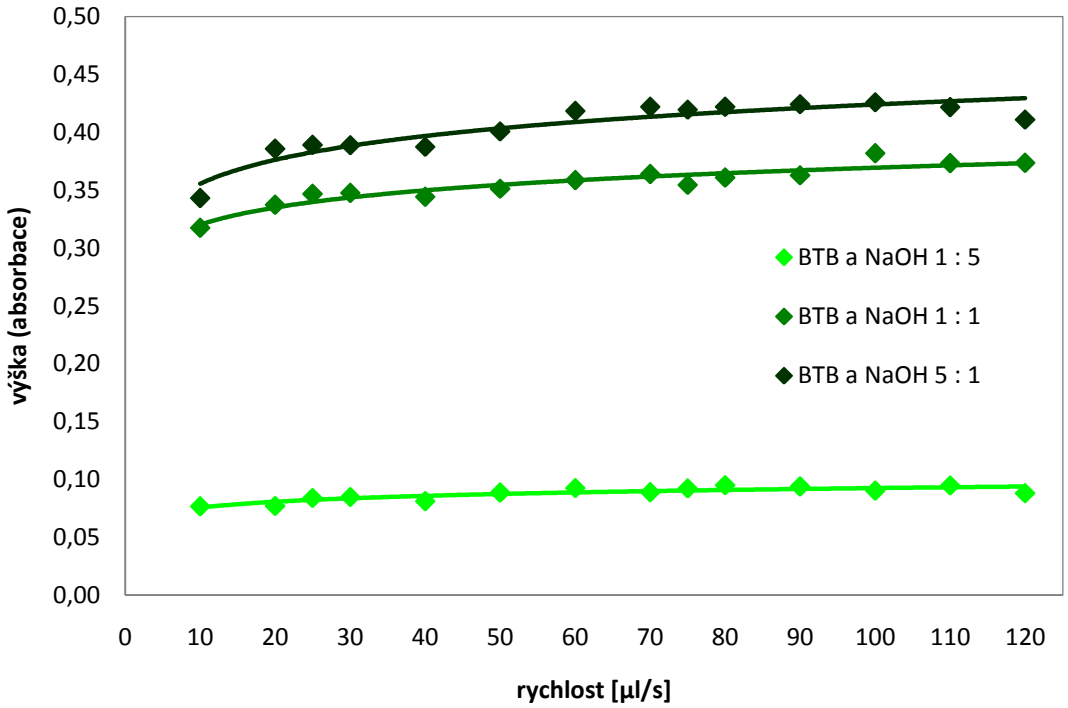
Následovalo měření, kdy byla zóna BTB mísena v průtokovém systému se zónou hydroxidu sodného - docházelo ke změně barevné formy BTB - přechodu ze žluté barvy na modrou. Byla měřena modrá forma BTB při vlnové délce 615 nm. Testováno bylo rozmezí průtokových rychlostí 10 – 120 µl/s. Byly změřeny tři poměry mísení pracovních roztoků v pořadí aspirace BTB a NaOH ~ 1 : 5 (10 µl BTB : 50 µl NaOH), 1 : 1 (50 µl BTB : 50 µl NaOH) a 5 : 1 (50 µl BTB : 10 µl NaOH).

Při hodnocení naměřených hodnot výškou píku (Tabulka 8, Obrázek 11) bylo pozorováno, že nejvyššího signálu bylo dosaženo při aspiračním poměru BTB a NaOH 5 : 1, z důvodu vzniku největšího množství měřeného produktu - modré formy BTB. Vliv zvyšující se průtokové rychlosti byl vykreslen rostoucími mírně logaritmickými křivkami.

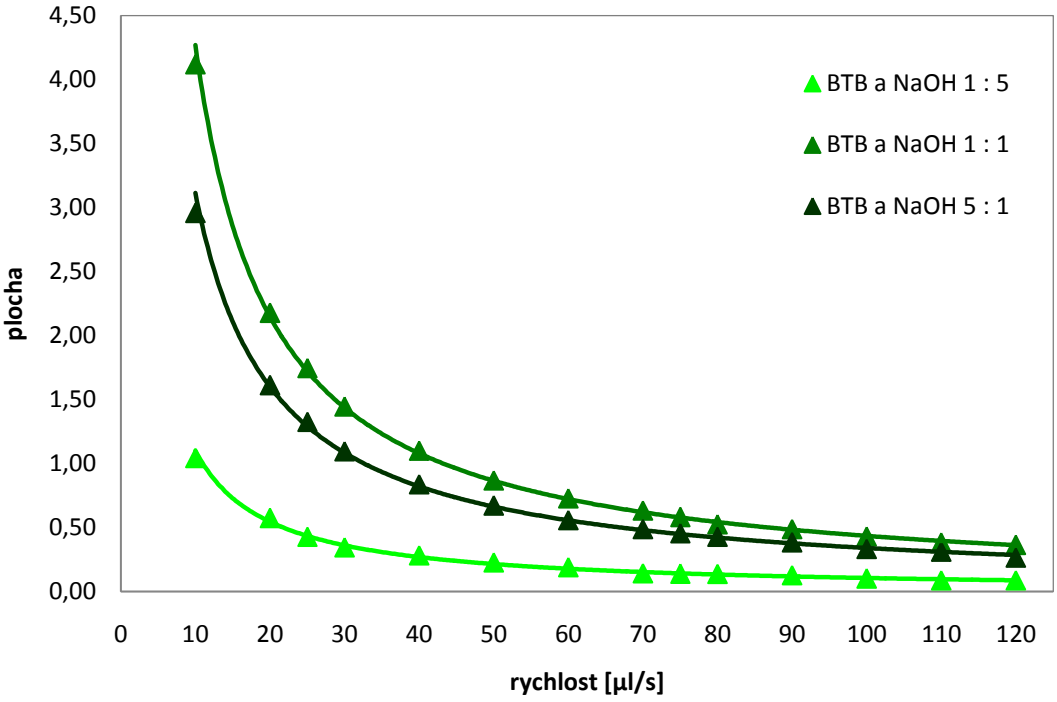
Při hodnocení naměřených hodnot plochou píku (Tabulka 8, Obrázek 12) bylo zjištěno, že nejvyšších hodnot ploch bylo dosáhnuto při aspiračním poměru BTB a NaOH 1 : 1, protože byly ekvivalentní aspirační objemy a docházelo k plynulému přechodu barevné formy BTB. Vliv zvyšující se průtokové rychlosti se projevil klesajícími mocninnými křivkami, které od průtokové rychlosti 75 µl/s a rychleji mají téměř lineární průběh.

Tabulka 8 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace BTB a NaOH na absorbanci modré formy BTB

	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
rychlost [µl/s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
10	0,0766	0,00	4,47	1,0450	0,06	6,04	0,3173	0,00	1,43	4,1208	0,07	1,74	0,3430	0,01	1,91	2,9584	0,04	1,42
20	0,0770	0,00	3,62	0,5755	0,01	1,48	0,3371	0,00	0,79	2,1782	0,01	0,34	0,3856	0,00	0,95	1,6129	0,03	1,67
25	0,0838	0,00	2,93	0,4293	0,02	4,28	0,3466	0,00	1,17	1,7477	0,01	0,75	0,3889	0,00	0,50	1,3268	0,03	2,04
30	0,0848	0,00	2,12	0,3471	0,01	4,02	0,3474	0,00	0,59	1,4462	0,01	0,65	0,3888	0,00	0,64	1,0960	0,00	0,29
40	0,0809	0,00	3,71	0,2838	0,01	1,82	0,3441	0,00	0,62	1,1018	0,06	5,37	0,3873	0,01	1,35	0,8390	0,02	1,88
50	0,0884	0,00	4,06	0,2285	0,01	5,36	0,3512	0,00	1,17	0,8684	0,04	4,39	0,4006	0,00	1,04	0,6729	0,01	1,45
60	0,0924	0,00	5,10	0,1919	0,02	8,52	0,3585	0,01	1,77	0,7290	0,03	4,66	0,4182	0,00	0,86	0,5588	0,00	0,45
70	0,0887	0,00	3,89	0,1439	0,01	6,35	0,3638	0,00	0,51	0,6345	0,02	3,47	0,4218	0,00	1,18	0,4891	0,01	2,25
75	0,0921	0,00	3,28	0,1402	0,01	6,88	0,3545	0,01	1,69	0,5826	0,02	4,28	0,4194	0,01	1,77	0,4565	0,01	2,89
80	0,0949	0,00	2,69	0,1392	0,01	3,97	0,3607	0,01	2,03	0,5269	0,02	3,22	0,4219	0,01	1,42	0,4285	0,00	1,11
90	0,0937	0,00	1,03	0,1285	0,00	3,32	0,3628	0,01	2,07	0,4892	0,01	2,07	0,4242	0,01	1,62	0,3853	0,00	0,84
100	0,0901	0,00	1,56	0,1029	0,01	12,59	0,3818	0,01	1,34	0,4312	0,01	2,36	0,4259	0,01	1,32	0,3344	0,01	3,16
110	0,0947	0,01	6,60	0,0889	0,01	10,44	0,3731	0,00	0,50	0,3826	0,01	1,75	0,4216	0,02	4,03	0,3124	0,01	2,04
120	0,0881	0,00	0,54	0,0885	0,01	9,91	0,3734	0,00	0,74	0,3656	0,01	2,44	0,4109	0,02	4,25	0,2659	0,02	8,46



Obrázek 11 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace BTB a NaOH na absorbanci modré formy BTB – hodnocení výškou píku



Obrázek 12 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace BTB a NaOH na absorbanci modré formy BTB – hodnocení plochou píku

5.1.3 Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace NaOH a BTB na absorbanci modré formy BTB

Měření bylo provedeno při stejných podmínkách jako předchozí měření, s tím rozdílem, že pracovní roztoky byly aspirovány v opačném pořadí. Byla měřena modrá forma BTB při vlnové délce 615 nm v rozmezí průtokových rychlostí 10 – 120 µl/s. Byly změřeny tři poměry mísení pracovních roztoků v pořadí aspirace NaOH a BTB ~ 1 : 5 (10 µl NaOH : 50 µl BTB), 1 : 1 (50 µl NaOH : 50 µl BTB) a 5 : 1 (50 µl NaOH : 10 µl BTB).

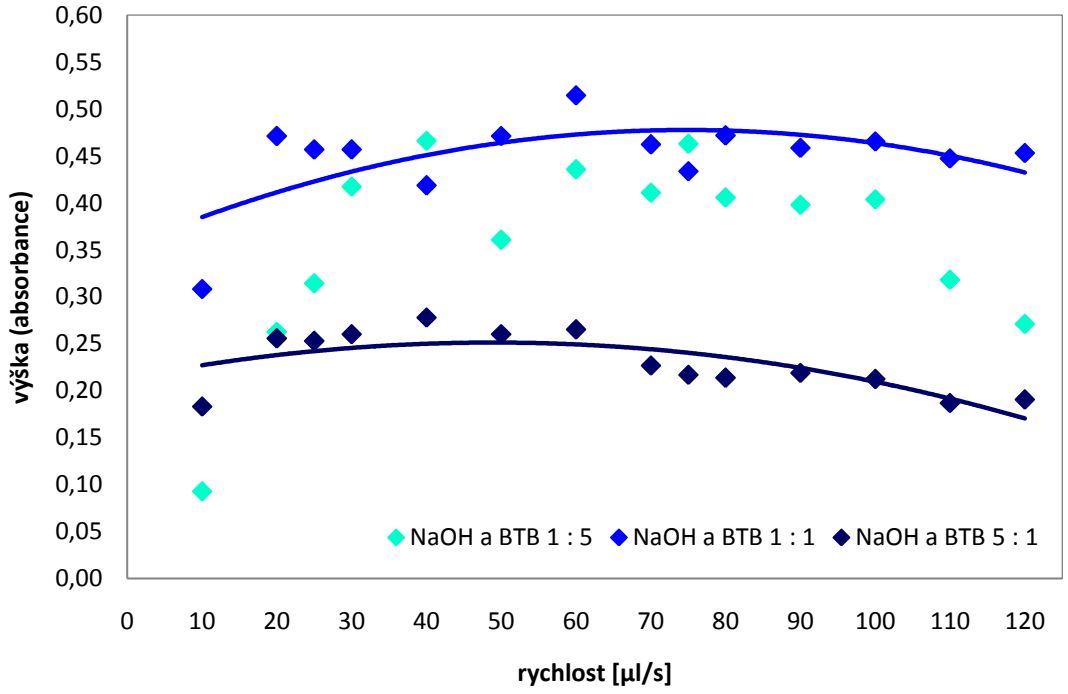
Aspirační pořadí NaOH a BTB bylo měřeno v jiný den než předcházející měření s pořadím aspirace BTB a NaOH. Během testování byl nalezen problém s nadměrnou tvorbou bublin v SIA systému, a tak probíhalo několikeré promývání systému SIA v průběhu měření jednotlivých cyklů. Odchylky mezi jednotlivými hodnotami byly zjištěny až při zpracovávání příslušných hodnot.

Při hodnocení naměřených hodnot pomocí výšek píků (Tabulka 9, Obrázek 13) byly zaznamenány nejvyšší hodnoty u poměru NaOH a BTB 1 : 1, tedy pro stejné množství pracovních roztoků, dostatku NaOH, které přeměnilo žlutou formu BTB na měřenou modrou. O něco málo nižších hodnot dosáhl poměr NaOH a BTB 1 : 5, kde byl aspirován pětkrát menší objem NaOH, který byl nedostačující na objemovou přeměnu barevné formy BTB jako u poměru NaOH a BTB 1 : 1.

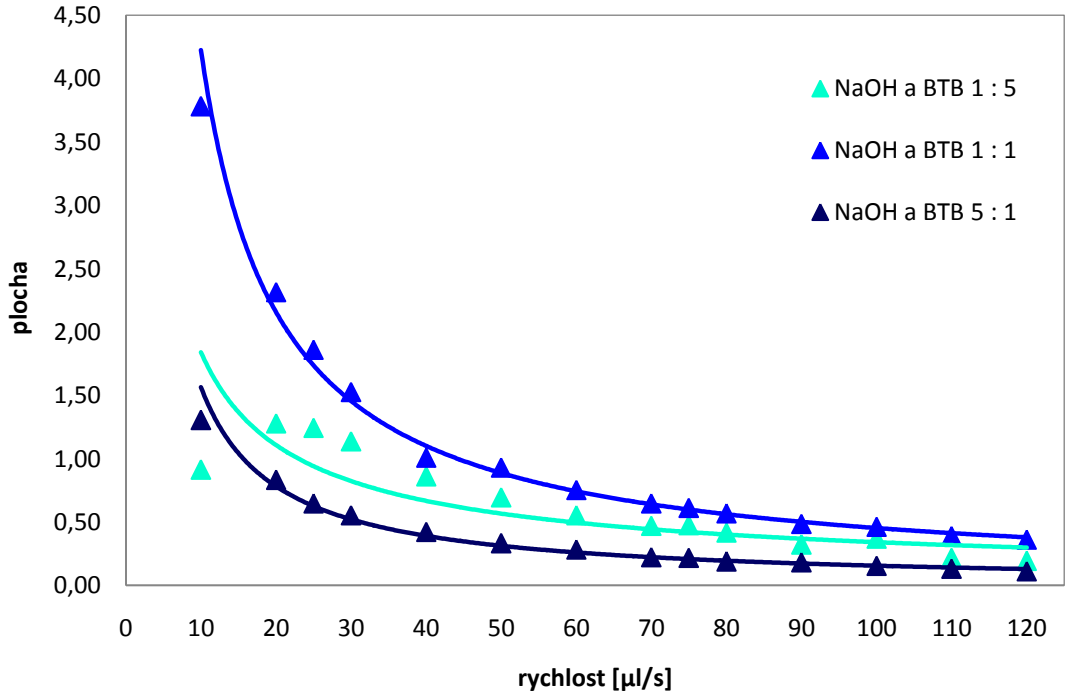
Při hodnocení naměřených hodnot plochou píku (Tabulka 9, Obrázek 14) nejvyšších hodnot ploch píků bylo dosaženo u poměru NaOH a BTB 1 : 1, protože docházelo k mísení zón ekvivalentních objemů pracovních roztoků a žlutá forma přecházela na měřenou modrou formu BTB. Vliv zvyšující se průtokové rychlosti byl vyjádřen klesajícími mocninnými křivkami, které od průtokové rychlosti 80 µl/s a rychleji mají téměř lineární průběh. Zároveň u použití vyšších průtokových rychlostí byly zjištěny velké hodnoty relativních směrodatných odchylek. Zejména u poměru NaOH a BTB 5 : 1, kde nejen při hodnocení plochou, ale i při hodnocení výškou, byl zhruba od průtokové rychlosti 70 µl/s a rychleji zjištěn trend zvyšování RSD.

Tabulka 9 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace NaOH a BTB na absorbanci modré formy BTB

	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
rychlost [µl/s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
10	0,0928	0,01	5,59	0,9147	0,04	4,36	0,3082	0,02	5,45	3,7830	0,17	4,37	0,1831	0,00	1,23	1,3067	0,05	4,11
20	0,2626	0,01	3,98	1,2794	0,04	3,46	0,4710	0,01	2,00	2,3164	0,08	3,24	0,2555	0,00	1,77	0,8340	0,02	2,08
25	0,3144	0,01	3,23	1,2455	0,03	2,43	0,4568	0,01	2,20	1,8605	0,07	3,59	0,2527	0,00	0,54	0,6489	0,03	4,13
30	0,4174	0,01	2,40	1,1386	0,02	1,82	0,4568	0,00	0,39	1,5277	0,06	3,73	0,2601	0,01	2,15	0,5558	0,02	3,58
40	0,4661	0,00	0,93	0,8617	0,01	0,79	0,4185	0,01	2,61	1,0090	0,03	3,25	0,2778	0,01	3,84	0,4242	0,02	4,84
50	0,3606	0,00	0,15	0,6960	0,02	3,30	0,4713	0,01	1,55	0,9322	0,03	3,29	0,2602	0,01	3,22	0,3341	0,03	8,22
60	0,4355	0,03	6,31	0,5542	0,02	3,88	0,5145	0,00	0,87	0,7549	0,01	0,84	0,2650	0,01	2,98	0,2849	0,02	6,21
70	0,4108	0,02	3,82	0,4712	0,02	3,83	0,4622	0,04	7,64	0,6482	0,03	4,05	0,2267	0,01	6,25	0,2247	0,02	11,00
75	0,4630	0,01	2,59	0,4762	0,02	4,69	0,4337	0,01	1,28	0,6124	0,03	4,73	0,2168	0,01	4,46	0,2191	0,02	7,70
80	0,4055	0,00	0,96	0,4179	0,02	4,56	0,4717	0,01	1,15	0,5702	0,02	3,70	0,2136	0,01	4,50	0,1898	0,01	7,09
90	0,3978	0,00	1,08	0,3242	0,02	5,29	0,4587	0,00	0,62	0,4860	0,02	3,20	0,2188	0,01	6,03	0,1838	0,01	3,36
100	0,4036	0,01	1,33	0,3710	0,02	5,51	0,4654	0,02	4,98	0,4634	0,04	8,27	0,2122	0,02	7,46	0,1553	0,04	26,64
110	0,3180	0,07	20,95	0,2186	0,01	3,36	0,4474	0,01	1,42	0,3903	0,03	6,57	0,1869	0,02	12,40	0,1322	0,00	3,49
120	0,2710	0,01	4,60	0,1950	0,01	7,40	0,4532	0,00	0,15	0,3636	0,00	1,28	0,1903	0,02	9,88	0,1124	0,03	24,76



Obrázek 13 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace NaOH a BTB na absorbanci modré formy BTB – hodnocení výškou píku



Obrázek 14 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace NaOH a BTB na absorbanci modré formy BTB – hodnocení plochou píku

5.2 REAKCE DUSITANŮ S DIAZOTAČNĚ-KOPULAČNÍM ČINIDLEM

5.2.1 Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů

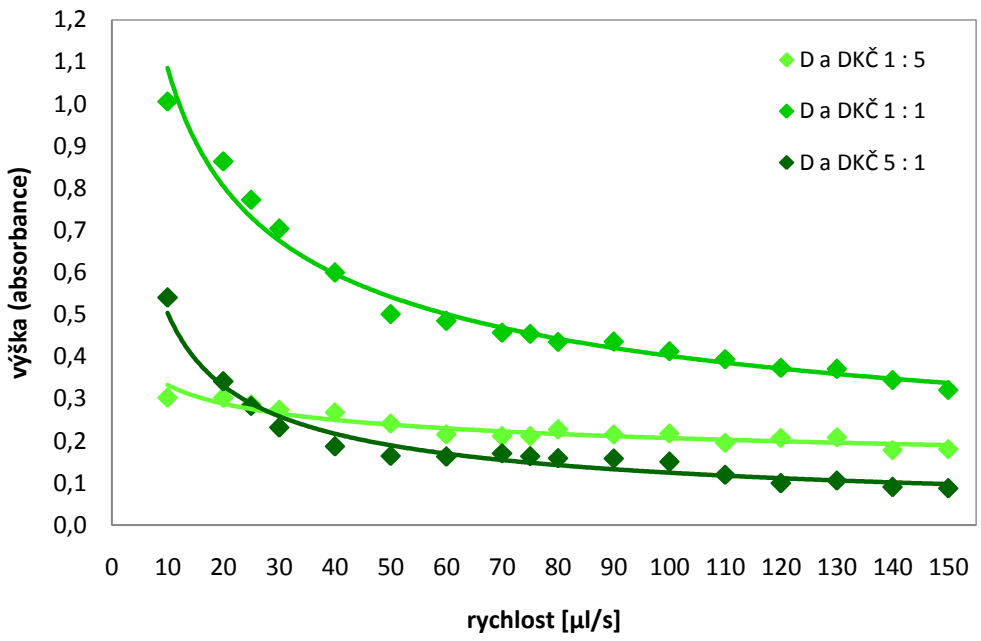
Jako první u pomaleji probíhající reakce byl proměřen vliv aspiračního pořadí D a DKČ. Byl zjišťován vliv průtokové rychlosti v rozmezí 10 – 150 µl/s. Změřeny byly tři poměry mísení D a DKČ, konkrétně 1 : 5 (10 µl D : 50 µl DKČ), 1 : 1 (50 µl D : 50 µl DKČ) a 5 : 1 (50 µl D : 10 µl DKČ). Měření bylo prováděno při vlnové délce 540 nm.

Při hodnocení získaných hodnot pomocí výšek píků (Tabulka 10, Obrázek 15) bylo zjištěno, že nejvyšších hodnot dosáhl poměr D a DKČ 1 : 1, stejné objemy pracovních roztoků daly u pomaleji probíhající reakce vzniknout největšímu množství měřeného produktu. Vliv vzrůstající průtokové rychlosti se projevil klesajícími hodnotami výšek píků z důvodu rychlejšího transportu produktu detektorem (nedostatečným průběhem pomalejší reakce).

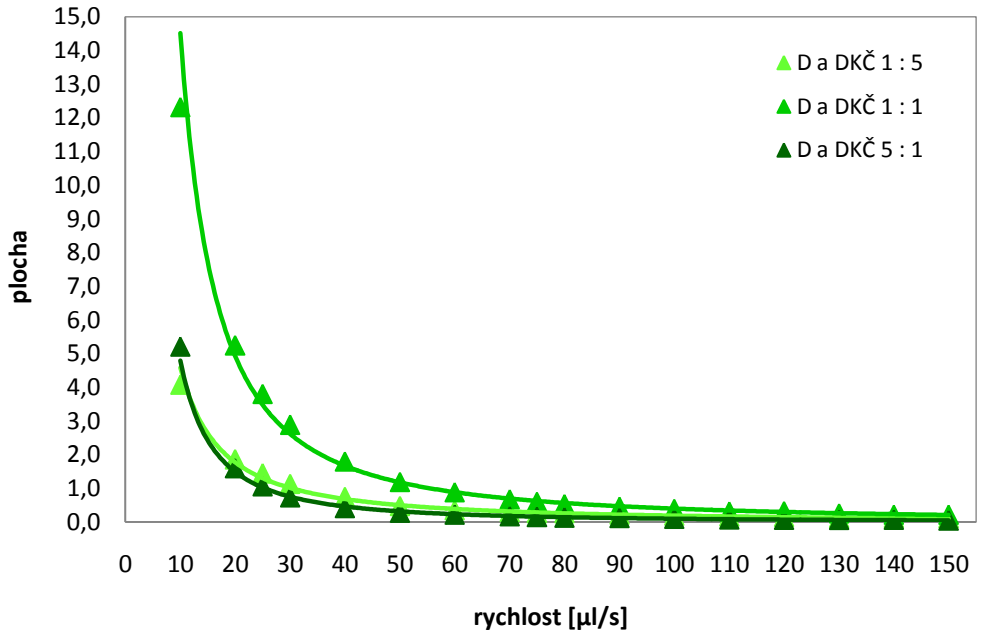
Při hodnocení naměřených hodnot pomocí ploch píků (Tabulka 10, Obrázek 16) bylo dosaženo nejvyšších hodnot při nižších rychlostech, u poměru D a DKČ 1 : 1 byl signál nejvyšší. Při pomalé rychlosti měly ekvivalentní objemy pracovních roztoků postačující čas na reakci a tedy vznik největšího množství měřeného produktu. Vliv zvyšující se průtokové rychlosti byl vyjádřen klesajícími mocninnými křivkami, které přibližně od průtokové rychlosti 90 µl/s a rychleji měly lineární průběh. U použití vyšších průtokových rychlostí – od 100 µl/s a rychleji byly pozorovány vyšší hodnoty relativních směrodatných odchylek, patrné je to hlavně u aspiračního pořadí D a DKČ poměru 5 : 1.

Tabulka 10 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů

	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
rychlost [μl/s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
10	0,3028	0,01	2,02	4,0811	0,06	1,45	1,0058	0,05	5,42	12,3192	0,45	3,68	0,5404	0,00	0,81	5,2117	0,07	1,27
20	0,3025	0,00	0,41	1,8626	0,00	0,20	0,8640	0,01	1,59	5,2447	0,03	0,64	0,3413	0,01	2,56	1,6036	0,05	2,82
25	0,2870	0,00	0,42	1,4438	0,03	1,97	0,7725	0,00	0,63	3,8034	0,02	0,43	0,2830	0,00	1,32	1,0646	0,04	3,72
30	0,2741	0,00	0,77	1,1363	0,02	1,33	0,7039	0,00	0,39	2,8890	0,05	1,73	0,2318	0,00	1,61	0,7367	0,01	1,51
40	0,2678	0,00	0,65	0,7420	0,01	1,13	0,5996	0,02	2,68	1,7976	0,04	2,14	0,1870	0,01	3,27	0,4188	0,01	1,21
50	0,2413	0,00	1,24	0,4801	0,01	2,05	0,5013	0,00	0,93	1,1956	0,01	0,54	0,1647	0,00	1,03	0,2784	0,01	2,39
60	0,2153	0,01	3,16	0,3565	0,00	1,09	0,4849	0,01	2,63	0,8889	0,02	2,36	0,1626	0,01	3,90	0,2205	0,00	1,78
70	0,2116	0,01	2,85	0,3006	0,01	2,61	0,4572	0,03	6,05	0,6783	0,01	1,26	0,1708	0,00	2,76	0,1731	0,00	2,13
75	0,2119	0,01	4,29	0,2729	0,01	3,94	0,4542	0,02	3,52	0,6016	0,01	1,84	0,1637	0,00	1,54	0,1511	0,00	0,85
80	0,2274	0,00	1,95	0,2664	0,01	3,19	0,4351	0,01	1,87	0,5389	0,02	4,32	0,1595	0,01	4,90	0,1318	0,01	10,67
90	0,2156	0,01	3,48	0,2296	0,00	1,33	0,4356	0,00	1,12	0,4614	0,01	1,68	0,1585	0,01	4,48	0,1252	0,00	2,28
100	0,2177	0,01	3,04	0,1976	0,01	4,72	0,4131	0,00	0,86	0,3964	0,01	2,21	0,1505	0,01	3,62	0,1015	0,01	6,50
110	0,1959	0,02	7,87	0,1728	0,01	3,53	0,3941	0,01	2,54	0,3190	0,01	2,75	0,1200	0,01	5,74	0,0808	0,01	8,35
120	0,2069	0,01	2,83	0,1594	0,01	5,48	0,3735	0,01	2,68	0,3259	0,01	4,49	0,0997	0,00	2,74	0,0728	0,00	2,38
130	0,2084	0,01	4,40	0,1294	0,00	3,29	0,3708	0,01	1,77	0,2619	0,01	5,27	0,1060	0,00	1,72	0,0674	0,01	11,51
140	0,1782	0,00	1,51	0,1263	0,01	8,76	0,3446	0,01	1,56	0,2260	0,01	2,27	0,0904	0,01	7,55	0,0705	0,01	17,03
150	0,1807	0,01	2,92	0,1180	0,01	5,35	0,3210	0,01	3,67	0,2236	0,03	11,41	0,0874	0,01	8,66	0,0490	0,02	32,87



Obrázek 15 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku

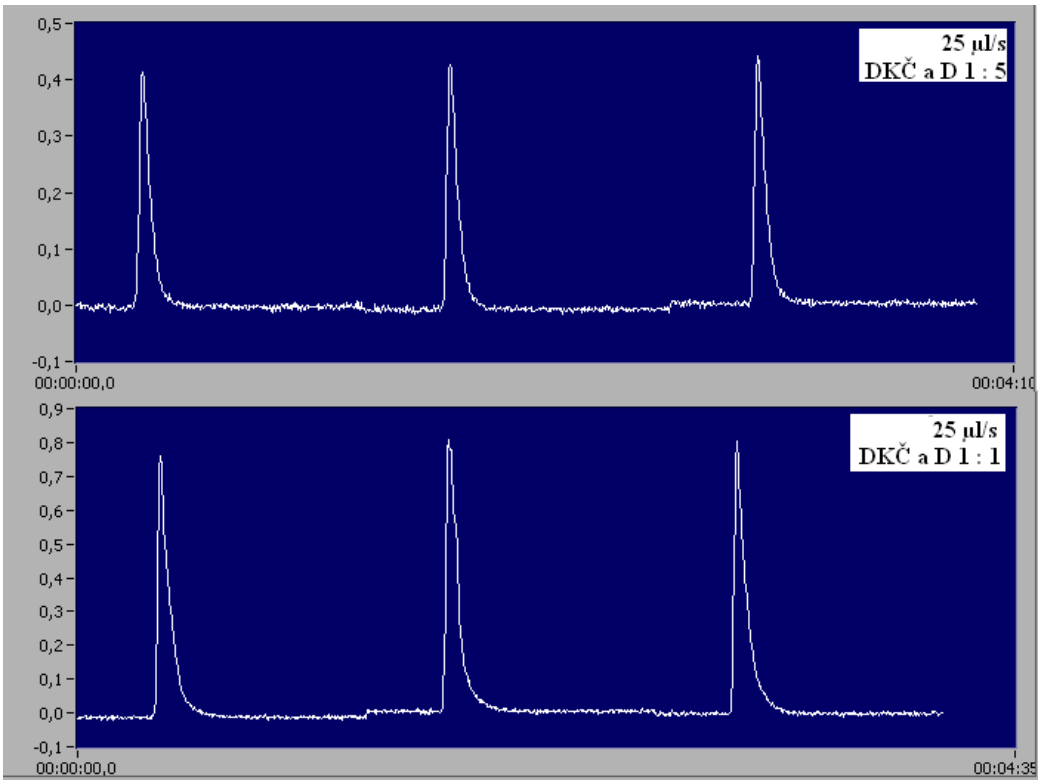


Obrázek 16 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku

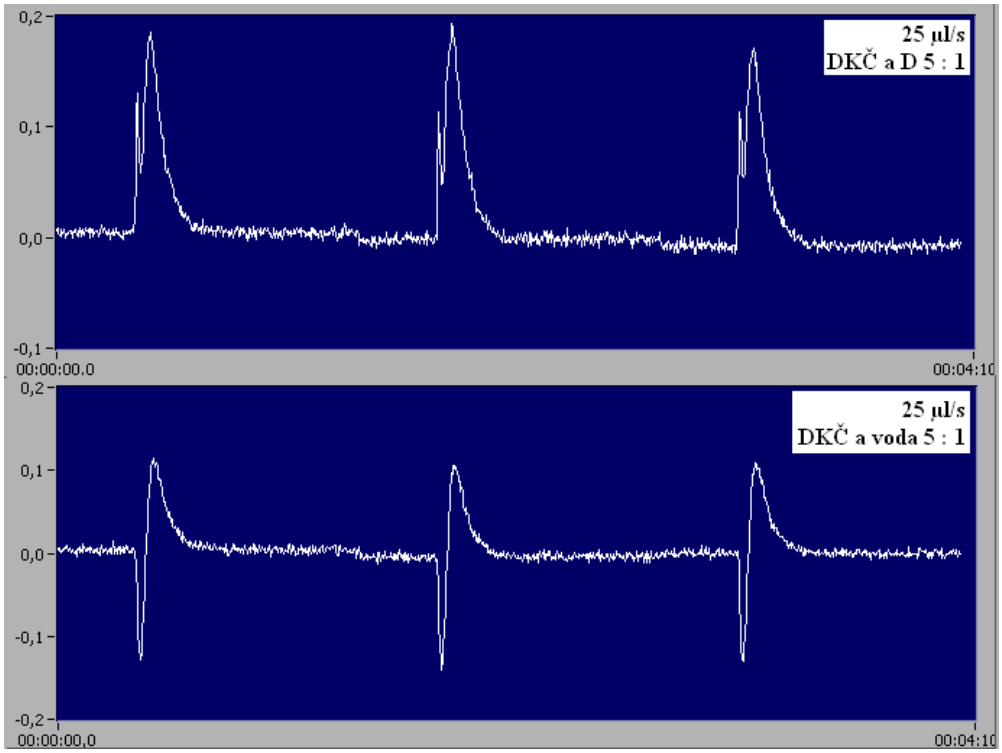
5.2.2 Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů

V dalším testování byl proměřen vliv opačného aspiračního pořadí než v předcházejícím měření, bylo tedy testováno pořadí aspirace DKČ a D. Jinak bylo měřeno při stejných reakčních podmínkách. Byly proměřeny průtokové rychlosti v rozmezí 10 – 150 µl/s. Změřeny byly tři poměry mísení DKČ a D, konkrétně 1 : 5 (10 µl DKČ : 50 µl D), 1 : 1 (50 µl DKČ : 50 µl D) a 5 : 1 (50 µl DKČ : 10 µl D). Měření bylo prováděno při vlnové délce 540 nm.

Hodnoty pro aspirační pořadí DKČ a D poměr 5 : 1 nebyly hodnoceny. Z důvodu pětinásobně menšího objemového množství D oproti DKČ nebylo možno naměřit při vyšších rychlostech odpovídající hodnoty. DKČ je samo o sobě barevné a byl očekáván slepý signál, který byl následně porovnán měřením s vodou místo se vzorkem. Hodnocení v některých případech pak bylo složité a nebyl získán dostatečný rozdíl měřeného signálu od slepého. Na grafickém znázornění měření byly pozorovány dva píky, a to z důvodu, že bylo jako první do detektoru transportováno malé množství měřeného produktu (první pík), které stačilo vzniknout při pomalejších rychlostech a následně bylo transportováno větší množství DKČ (druhý pík). Z grafických výsledků při vyšších rychlostech nebylo možno poznat, zda byl měřen produkt nebo samotné DKČ. Byl proveden pokus, kdy místo dusitanů byla aspirovaná voda. Měřeno bylo za původních podmínek, ale pouze při průtokových rychlostech 25, 50, 75 a 100 µl/s (Obrázek 18), a bylo potvrzeno, že naměřené hodnoty odpovídaly DKČ. Proto hodnoty aspiračního pořadí DKČ a D poměru 5 : 1 nebyly zhodnoceny, nevznikalo dostatečné množství produktu, které by mohlo být změřeno.



Obrázek 17 – Záznamy měření aspiračního pořadí DKČ a D v poměrech 1 : 5 a 1 : 1 při průtokové rychlosti 25 µl/s



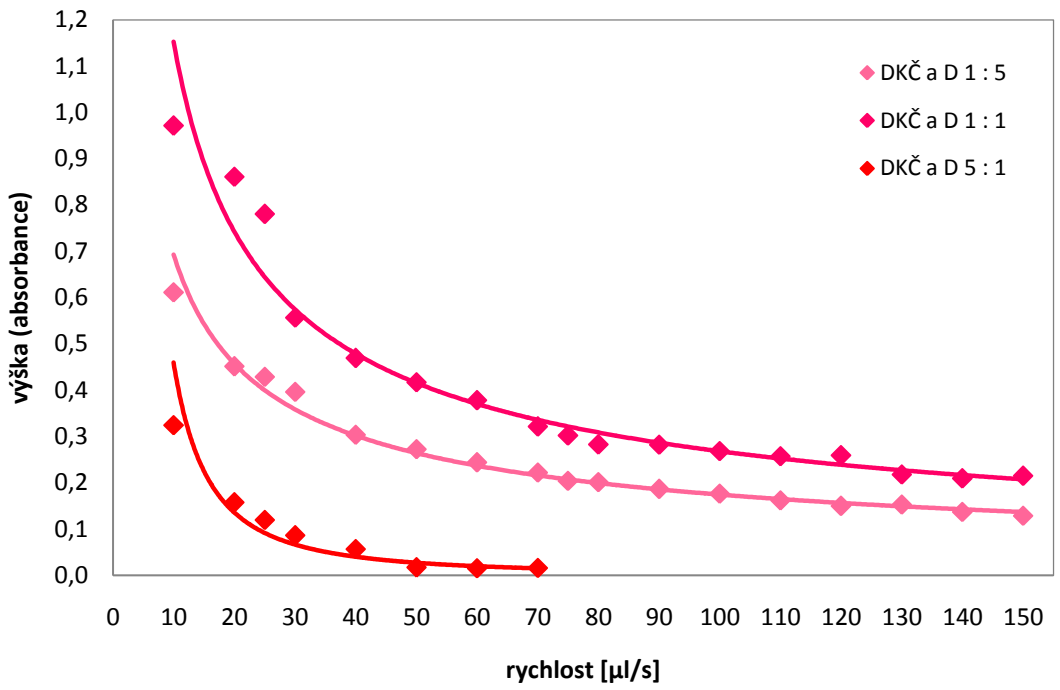
Obrázek 18 – Záznamy měření aspiračního pořadí DKČ a D/voda v poměru 5 : 1 při průtokové rychlosti 25 µl/s

Při hodnocení získaných hodnot pomocí výšek píků (Tabulka 11, Obrázek 19) bylo dosaženo nejvyšších hodnot při pomalejších rychlostech a největších hodnot u poměru DKČ a D 1 : 1. Zrychlování průtokových rychlostí se projevilo klesajícími mocninnými křivkami. Poměr DKČ a D 5 : 1 byl uveden jen pro pomalejší rychlosti (10 – 70 µl/s), kdy bylo možné odečíst hodnoty výšek píků, které patřily měřenému produktu a rozlišit je od výšek píků, které patřily DKČ. Při vyšších rychlostech nestihlo vzniknout dostatečné množství měřitelného produktu a nebylo tedy možné odečíst hodnoty výšek píků produktu, byly pozorovány pouze hodnoty výšek DKČ.

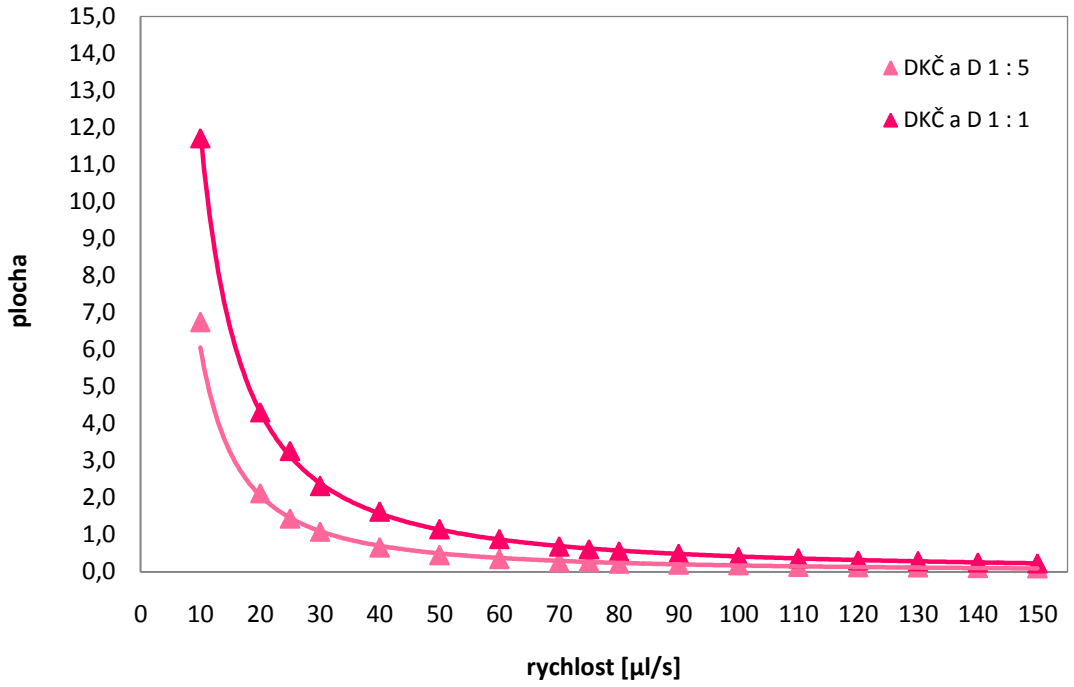
Při hodnocení získaných hodnot pomocí ploch píků (Tabulka 11, Obrázek 20) byly hodnoceny poměry 1 : 1 a 1 : 5 aspiračního pořadí DKČ a D, protože při poměru 5 : 1 nebylo možno z grafického záznamu odečíst příslušné hodnoty ploch píků – nebylo rozlišitelné, ani při pomalých průtokových rychlostech, zda plocha patřila produktu nebo DKČ. Nejvyšších hodnot ploch píků bylo dosaženo při pomalejších rychlostech a největší hodnoty byly pozorovány u ekvivalentního množství aspirovaných objemů pracovních roztoků, tedy poměru 1 : 1 aspiračního pořadí DKČ a D. Vliv vzrůstající průtokové rychlosti byl popsán klesajícími mocninnými křivkami, kdy při pomalejších rychlostech (10 – 70 µl/s) bylo prudké klesání a při měřených vyšších průtokových rychlostech, byl pokles křivek velmi mírný.

Tabulka 11 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů

	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
rychlost [µl/s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
10	0,6112	0,02	2,59	6,7448	0,11	1,57	0,9712	0,04	4,13	11,7139	0,15	1,31	0,3243	0,00	0,36	-	-	-
20	0,4510	0,01	2,45	2,1260	0,01	0,57	0,8611	0,03	3,27	4,3121	0,05	1,18	0,1573	0,01	5,84	-	-	-
25	0,4286	0,01	2,88	1,4439	0,03	2,13	0,7802	0,03	3,23	3,2651	0,12	3,56	0,1197	0,01	4,37	-	-	-
30	0,3961	0,00	0,96	1,0881	0,02	1,98	0,5566	0,02	3,98	2,3196	0,04	1,81	0,0861	0,00	3,74	-	-	-
40	0,3035	0,00	0,74	0,6596	0,01	1,35	0,4691	0,02	3,65	1,6280	0,01	0,50	0,0568	0,01	18,45	-	-	-
50	0,2721	0,00	0,90	0,4511	0,02	4,02	0,4168	0,00	0,69	1,1520	0,03	2,31	0,0168	0,01	35,10	-	-	-
60	0,2437	0,01	2,65	0,3475	0,02	5,23	0,3777	0,01	2,89	0,8882	0,03	3,54	0,0151	0,01	49,49	-	-	-
70	0,2218	0,00	1,82	0,2614	0,01	5,01	0,3211	0,00	1,03	0,6845	0,02	2,23	0,0157	0,00	15,25	-	-	-
75	0,2038	0,00	1,75	0,2682	0,03	9,72	0,3016	0,01	4,82	0,6130	0,00	0,50	-	-	-	-	-	-
80	0,2012	0,01	3,54	0,2251	0,01	2,23	0,2823	0,01	2,65	0,5477	0,01	1,12	-	-	-	-	-	-
90	0,1863	0,00	1,88	0,1953	0,00	1,87	0,2821	0,02	6,32	0,4907	0,01	2,65	-	-	-	-	-	-
100	0,1762	0,00	1,71	0,1770	0,01	6,17	0,2683	0,01	4,59	0,4070	0,03	6,49	-	-	-	-	-	-
110	0,1615	0,01	3,15	0,1387	0,00	1,57	0,2571	0,02	7,11	0,3660	0,01	1,52	-	-	-	-	-	-
120	0,1496	0,01	4,47	0,1282	0,01	7,34	0,2589	0,02	6,84	0,3081	0,01	4,11	-	-	-	-	-	-
130	0,1526	0,00	1,95	0,1236	0,01	8,02	0,2178	0,01	4,03	0,2869	0,02	7,69	-	-	-	-	-	-
140	0,1366	0,00	2,18	0,1051	0,00	4,06	0,2091	0,01	4,04	0,2566	0,01	4,63	-	-	-	-	-	-
150	0,1286	0,00	3,59	0,0981	0,00	0,87	0,2146	0,02	7,59	0,2323	0,01	2,88	-	-	-	-	-	-



Obrázek 19 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku



Obrázek 20 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku

5.2.3 Vliv zastavení toku, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů

Bylo proměřeno aspirační pořadí D a DKČ. Měření bylo prováděno při vlnové délce 540 nm při průtokové rychlosti 100 µl/s a změřeny byly tři následující poměry mísení pracovních roztoků, konkrétně 1 : 5 (10 µl D : 50 µl DKČ), 1 : 1 (50 µl D : 50 µl DKČ) a 5 : 1 (50 µl D : 10 µl DKČ). Tok roztoků v systému SIA byl zastavován v časovém rozmezí 0 – 60 s v mísící cívce, před detektorem a v detektoru. Zastavení toku v potřebném místě bylo dosaženo nastavením dávkovaného objemu (Tabulka 2) v předem naprogramovaném měřícím cyklu.

Při hodnocení naměřených hodnot pomocí výšek píků (Tabulka 12 a Obrázek 21, Tabulka 13 a Obrázek 22, Tabulka 14 a Obrázek 23) bylo možno pozorovat rostoucí křivky v závislosti na prodlužujícím se čase zastavení toku. Největších hodnot píků bylo dosaženo u poměru D a DKČ 1 : 1 při všech typech zastavení toku. U poměru D a DKČ 5 : 1 bylo zjištěno, že křivky, které popisují zastavení toku před detektorem a v detektoru měly stoupající charakter v závislosti na prodlužujícím se čase zastavení toku. Zatímco křivky popisující zastavení toku v mísící cívce u poměru D a DKČ 1 : 5 s prodlužujícím se časem zastavení toku zůstávaly v okolí podobných hodnot a nevykazovaly prudce rostoucí charakter.

Při hodnocení naměřených hodnot pomocí ploch píků (Tabulka 12 a Obrázek 24, Tabulka 13 a Obrázek 25, Tabulka 14 a Obrázek 26) byl pozorován stejný průběh jako při hodnocení pomocí výšek píků, avšak při zastavení toku v detektoru byl sledován markantní vzrůst hodnot ploch píků a jimi znázorněných křivek.

Tabulka 12 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů

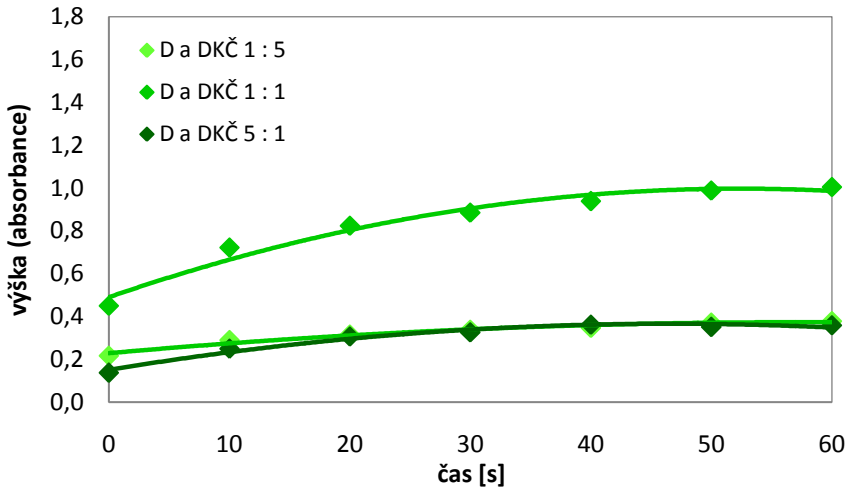
	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
čas [s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
0	0,2166	0,01	3,77	0,2223	0,01	2,66	0,4494	0,01	1,34	0,5380	0,03	6,47	0,1367	0,01	3,76	0,1351	0,00	1,77
10	0,2901	0,01	3,50	0,3248	0,01	3,43	0,7217	0,00	0,68	0,8395	0,04	4,41	0,2498	0,02	6,24	0,2610	0,01	4,12
20	0,3156	0,00	0,50	0,3579	0,02	5,35	0,8235	0,02	2,05	0,9897	0,02	2,12	0,3063	0,01	4,01	0,3316	0,03	7,75
30	0,3377	0,00	0,70	0,3630	0,01	2,57	0,8847	0,01	1,51	1,0640	0,02	1,53	0,3260	0,00	1,15	0,3285	0,01	2,22
40	0,3468	0,00	0,66	0,3826	0,01	2,61	0,9380	0,02	1,63	1,1154	0,04	3,66	0,3620	0,00	0,30	0,3472	0,00	1,05
50	0,3698	0,00	0,86	0,4144	0,00	1,08	0,9881	0,01	0,80	1,1611	0,01	1,13	0,3507	0,02	7,05	0,3631	0,00	1,25
60	0,3779	0,01	1,94	0,4136	0,02	3,68	1,0048	0,01	1,09	1,1817	0,02	1,69	0,3584	0,01	2,18	0,3789	0,01	1,42

Tabulka 13 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů

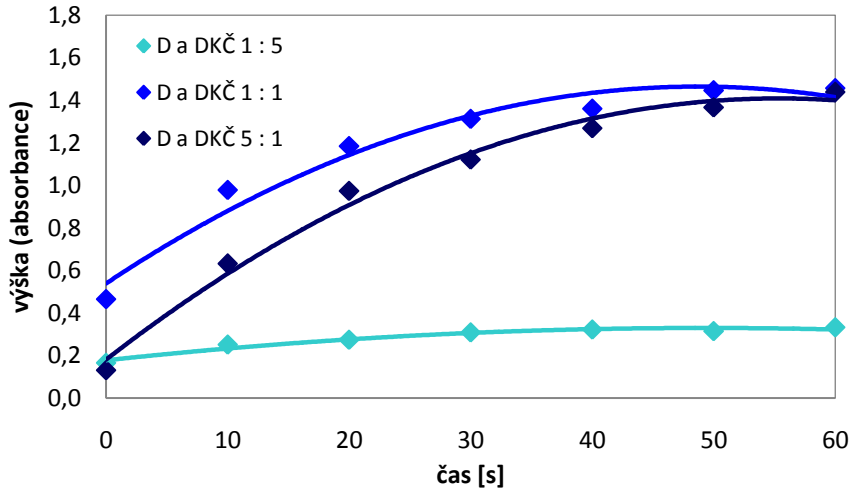
	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
čas [s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
0	0,1667	0,01	6,38	0,2298	0,01	4,06	0,4653	0,01	1,72	0,5535	0,02	3,35	0,1318	0,00	0,55	0,1386	0,01	3,81
10	0,2523	0,01	3,89	0,3026	0,00	0,96	0,9783	0,01	1,36	1,1390	0,02	2,13	0,6320	0,02	2,85	0,6082	0,01	1,27
20	0,2742	0,00	1,19	0,3263	0,03	8,62	1,1849	0,01	0,81	1,3001	0,01	0,68	0,9736	0,03	3,49	0,8805	0,03	3,26
30	0,3090	0,01	1,78	0,3827	0,01	1,37	1,3125	0,02	1,48	1,4332	0,00	0,24	1,1218	0,04	3,46	1,0836	0,02	1,76
40	0,3225	0,01	4,23	0,3757	0,02	5,14	1,3607	0,01	1,01	1,5155	0,04	2,87	1,2685	0,01	0,49	1,2216	0,03	2,31
50	0,3154	0,00	0,99	0,3506	0,01	1,62	1,4456	0,03	1,79	1,5939	0,05	3,16	1,3666	0,03	2,10	1,3430	0,05	3,82
60	0,3336	0,02	4,71	0,3837	0,03	7,26	1,4573	0,03	1,75	1,6063	0,03	1,63	1,4383	0,02	1,48	1,4152	0,04	2,75

Tabulka 14 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů

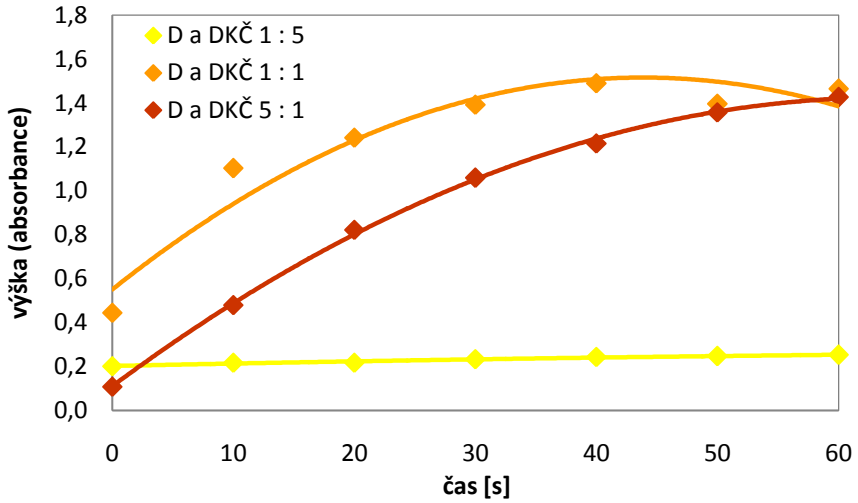
	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
čas [s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
0	0,2016	0,01	5,64	0,2465	0,01	4,62	0,4449	0,01	2,67	0,6101	0,02	4,05	0,1079	0,01	5,73	0,1634	0,01	5,21
10	0,2171	0,01	3,42	2,0171	0,01	0,27	1,1029	0,06	5,62	9,6106	0,58	5,99	0,4793	0,01	2,13	3,1109	0,15	4,86
20	0,2177	0,01	2,66	4,0971	0,03	0,69	1,2416	0,01	1,11	20,6276	0,29	1,40	0,8217	0,02	2,16	9,9660	0,24	2,37
30	0,2335	0,00	1,86	6,4458	0,01	0,08	1,3919	0,02	1,39	34,7652	0,51	1,47	1,0587	0,03	2,97	19,9630	0,59	2,95
40	0,2434	0,01	3,23	8,6927	0,12	1,37	1,4899	0,02	1,24	49,9308	0,27	0,55	1,2160	0,02	1,68	31,8409	0,41	1,27
50	0,2472	0,01	5,05	11,2510	0,17	1,52	1,3966	0,02	1,15	59,4836	0,36	0,61	1,3570	0,02	1,51	44,9506	0,40	0,88
60	0,2530	0,00	1,38	13,8206	0,13	0,94	1,4640	0,03	2,06	74,4332	1,16	1,56	1,4264	0,01	0,73	59,3545	0,99	1,67



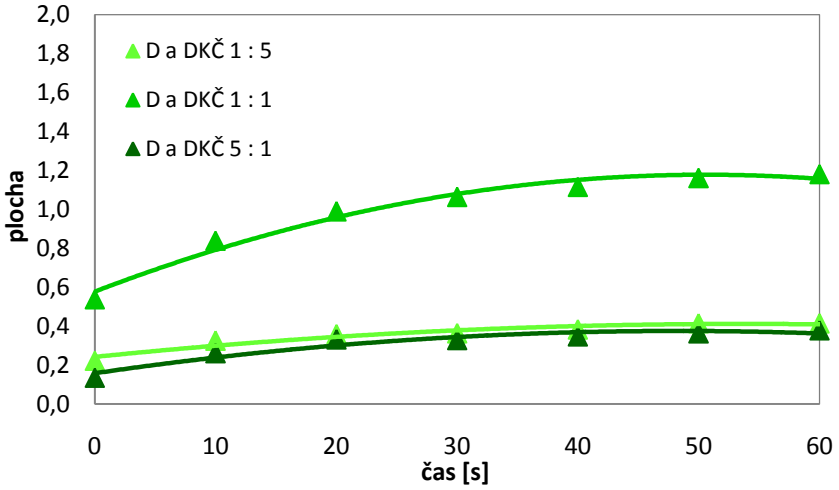
Obrázek 21 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku



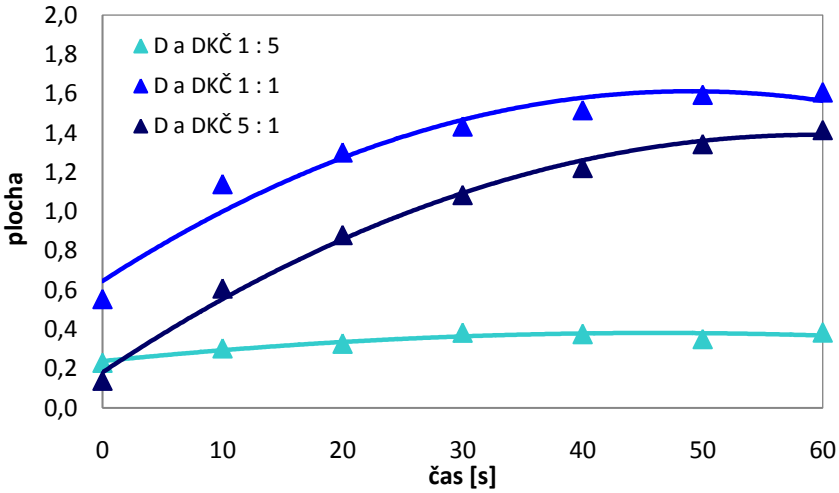
Obrázek 22 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku



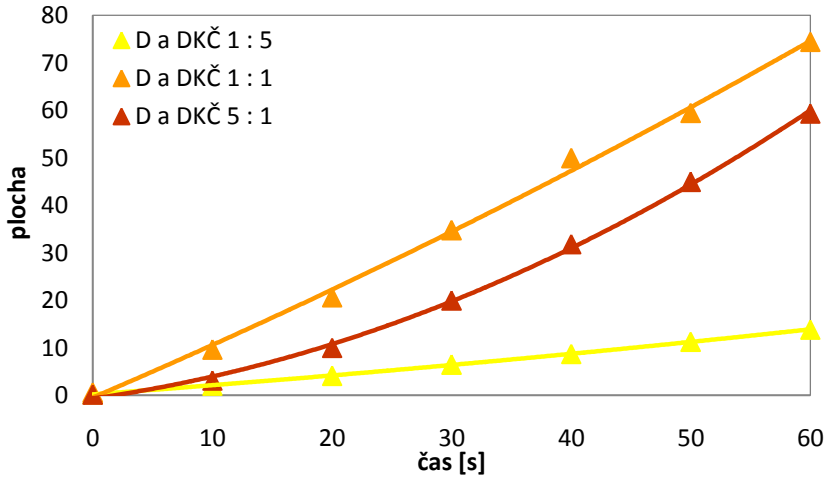
Obrázek 23 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku



Obrázek 24 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku



Obrázek 25 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku

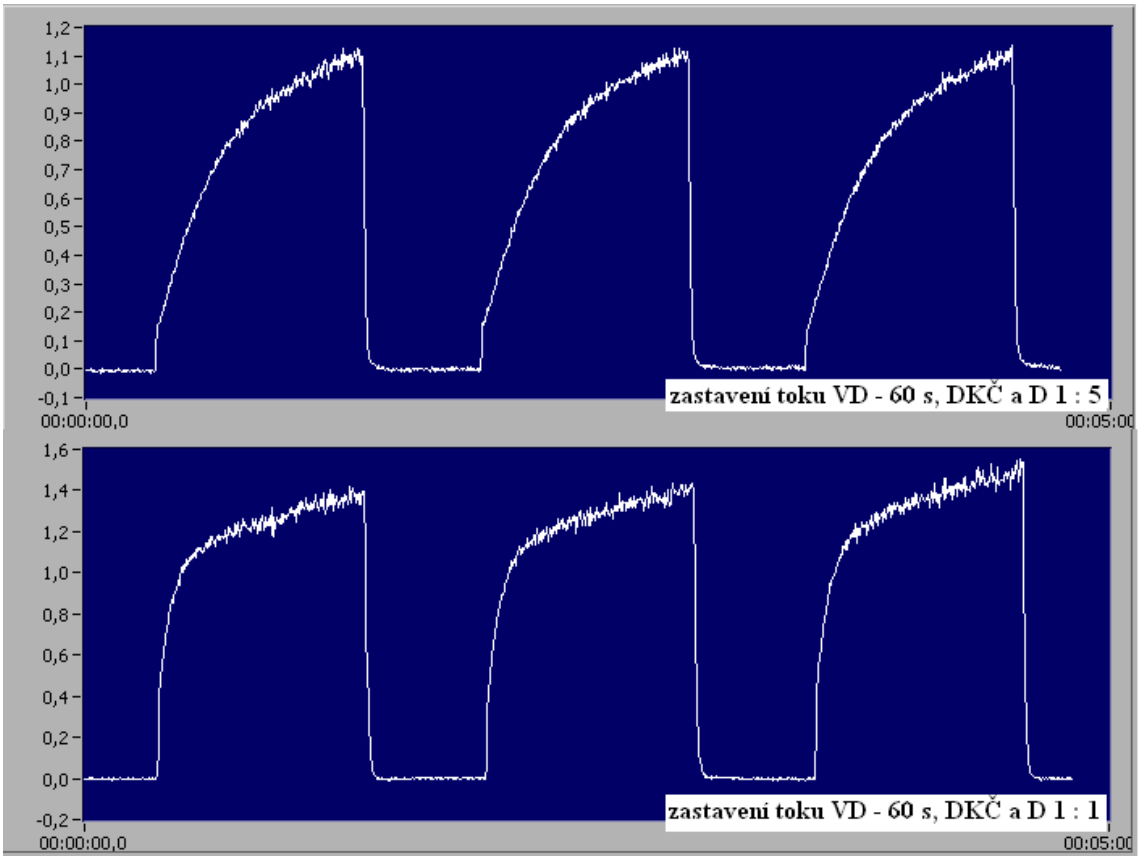


Obrázek 26 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku

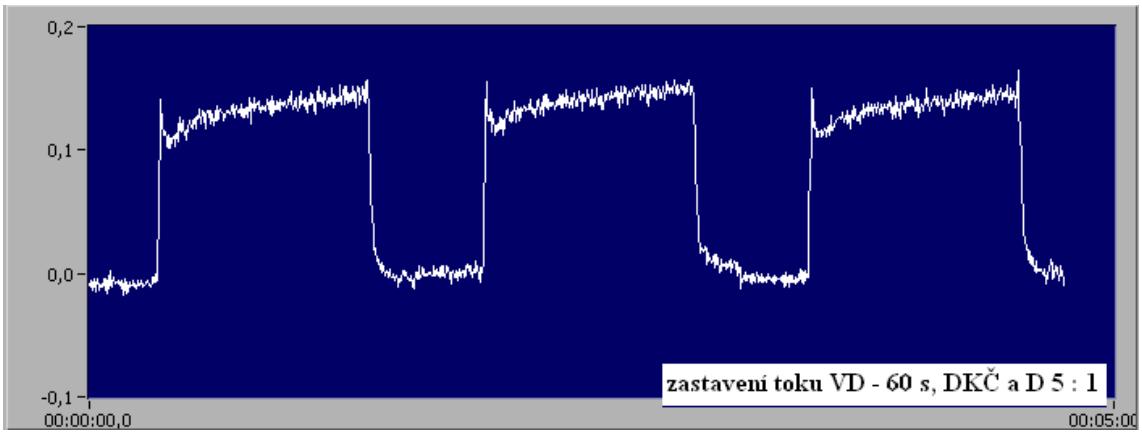
5.2.4 Vliv zastavení toku, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů

Bylo testováno aspirační pořadí DKČ a D při stejných podmínkách jako v předchozím měření. Bylo měřeno při vlnové délce 540 nm a průtokové rychlosti 100 µl/s. Změřeny byly tři typy poměrů mísení 1 : 5 (10 µl DKČ : 50 µl D), 1 : 1 (50 µl DKČ : 50 µl D) a 5 : 1 (50 µl DKČ : 10 µl D). Tok roztoků v systému SIA byl opět zastavován v mísící cívce, před detektorem a v detektoru. Zastavení toku bylo testováno v časovém rozmezí 0 – 60 s.

Hodnoty při zastavení toku v detektoru u poměru DKČ a D 5 : 1 nebyly odečteny, protože nebylo rozeznatelné na grafickém vyhodnocení, zda se jednalo o hodnotu měřeného produktu nebo DKČ, které bylo v pětinásobné převaze aspirováno oproti dusitanům. Bylo ukázkově změřeno v časech 0, 30 a 60 s (Obrázek 28).



Obrázek 27 – Záznamy měření zastavení toku v detektoru na 60 s aspiračního pořadí DKČ a D v poměrech 1 : 5 a 1 : 1



Obrázek 28 – Záznam měření zastavení toku v detektoru na 60 s aspiračního pořadí DKČ a D v poměru 5 : 1

Při hodnocení naměřených hodnot pomocí výšek píků (Tabulka 15 a Obrázek 29, Tabulka 16 a Obrázek 30, Tabulka 17 a Obrázek 31) byly pozorovány s prodlužujícím se časem zastavení toku vzrůstající křivky výšek píků. U aspiračního pořadí DKČ a D poměru 1 : 1 byly zjištěny nejvyšší hodnoty výšek píků při všech třech typech zastavení toku. Poměr DKČ a D 5 : 1 byl při zastavení toku v mísící cívce a před detektorem na srovnatelných hodnotách výšek píků, zatímco při zastavení toku v detektoru nebyly naměřené údaje hodnoceny, protože nešlo rozeznat, zda údaj výšky patří měřenému produktu nebo DKČ.

Při hodnocení naměřených hodnot pomocí ploch píků (Tabulka 15 a Obrázek 32, Tabulka 16 a Obrázek 33, Tabulka 17 a Obrázek 34) byl průběh podobný jako při hodnocení pomocí výšek píků, s tím rozdílem, že při zastavení toku v detektoru byl pozorován markantní vzrůst hodnot ploch píků oproti zastavení toku v mísící cívce nebo před detektorem. Protože, když byl tok zastaven v detektoru, bylo přímo sledováno navyšování signálu díky vznikajícímu produktu. Zatímco při transportu z místa zastavení toku - ať už v mísící cívce nebo před detektorem - bylo dopravováno již určité množství produktu, které detektorem prošlo a množství vznikající produktu bylo zanedbatelné vzhledem ke krátké době zdržení v detektoru. Při použití poměru DKČ a D 5 : 1 bylo pozorováno nepatrné zvýšení hodnot RSD.

Tabulka 15 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů

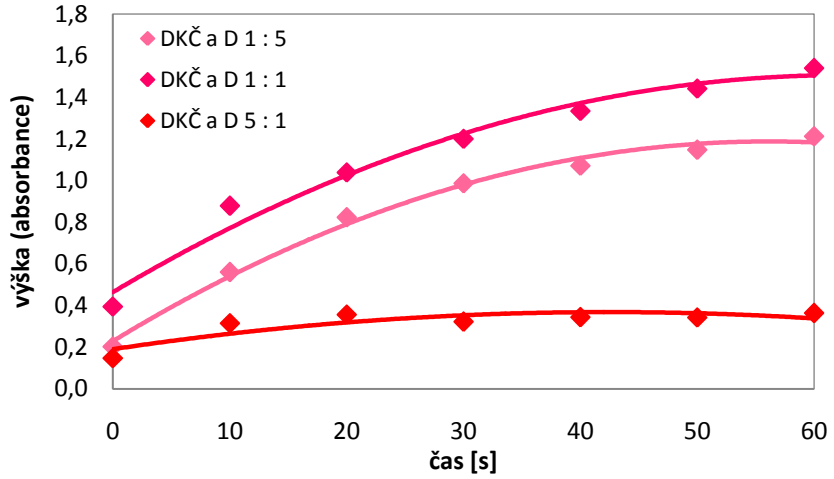
	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
čas [s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
0	0,2026	0,01	3,03	0,1841	0,01	6,32	0,3951	0,02	4,75	0,5296	0,02	3,95	0,1478	0,01	3,92	0,1698	0,01	7,58
10	0,5600	0,02	4,35	0,5795	0,01	2,49	0,8787	0,01	0,91	1,0876	0,02	2,29	0,3153	0,02	6,98	0,3568	0,01	1,96
20	0,8233	0,02	2,35	0,8158	0,02	2,64	1,0391	0,03	2,41	1,3163	0,06	4,59	0,3562	0,01	2,79	0,4186	0,01	3,15
30	0,9870	0,00	0,29	1,0195	0,01	0,71	1,2005	0,03	2,43	1,4920	0,06	4,09	0,3219	0,01	3,97	0,4738	0,03	5,69
40	1,0714	0,01	1,35	1,1389	0,05	4,79	1,3346	0,01	0,90	1,6687	0,02	1,50	0,3435	0,01	3,16	0,4857	0,00	0,37
50	1,1473	0,01	0,52	1,2033	0,04	3,23	1,4424	0,07	4,93	1,7238	0,02	1,36	0,3430	0,02	4,84	0,4952	0,01	2,17
60	1,2128	0,01	0,57	1,3086	0,00	0,32	1,5395	0,02	1,01	1,7765	0,03	1,73	0,3634	0,01	3,38	0,4989	0,01	2,22

Tabulka 16 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů

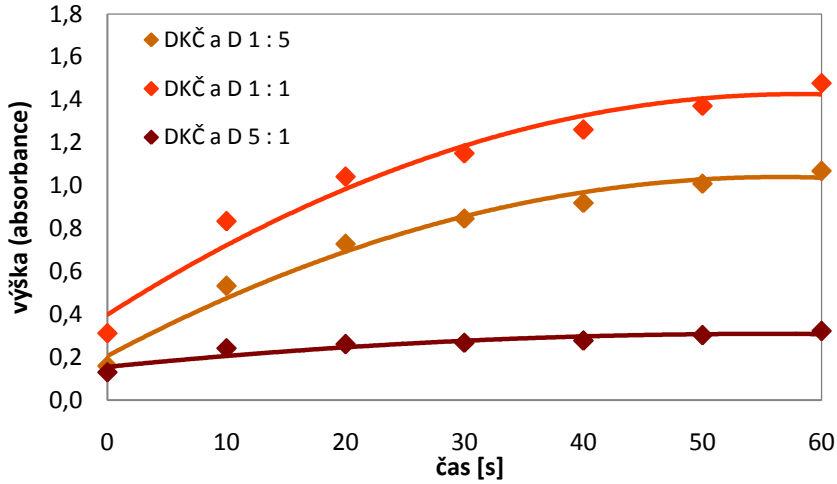
	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
čas [s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
0	0,1592	0,00	0,97	0,1758	0,00	0,42	0,3121	0,01	3,27	0,4897	0,01	1,74	0,1297	0,01	5,22	0,1522	0,02	10,05
10	0,5322	0,01	1,71	0,5350	0,00	0,72	0,8335	0,02	2,69	0,9900	0,01	1,20	0,2420	0,00	1,00	0,3083	0,01	3,47
20	0,7279	0,04	5,34	0,7524	0,04	5,12	1,0411	0,03	2,54	1,1950	0,01	1,14	0,2605	0,00	1,35	0,3184	0,02	6,79
30	0,8467	0,01	1,19	0,8916	0,01	1,10	1,1503	0,05	4,26	1,3563	0,02	1,50	0,2669	0,00	1,79	0,3447	0,01	1,97
40	0,9200	0,01	1,04	0,9859	0,04	4,10	1,2605	0,01	0,71	1,4328	0,01	0,47	0,2770	0,00	1,02	0,3504	0,02	5,24
50	1,0094	0,02	1,98	1,0744	0,02	1,66	1,3718	0,04	2,97	1,4357	0,06	4,15	0,3024	0,01	3,28	0,3370	0,02	6,01
60	1,0682	0,01	0,91	1,1285	0,03	2,74	1,4780	0,04	2,68	1,5308	0,02	1,31	0,3216	0,03	9,30	0,3526	0,02	6,04

Tabulka 17 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů

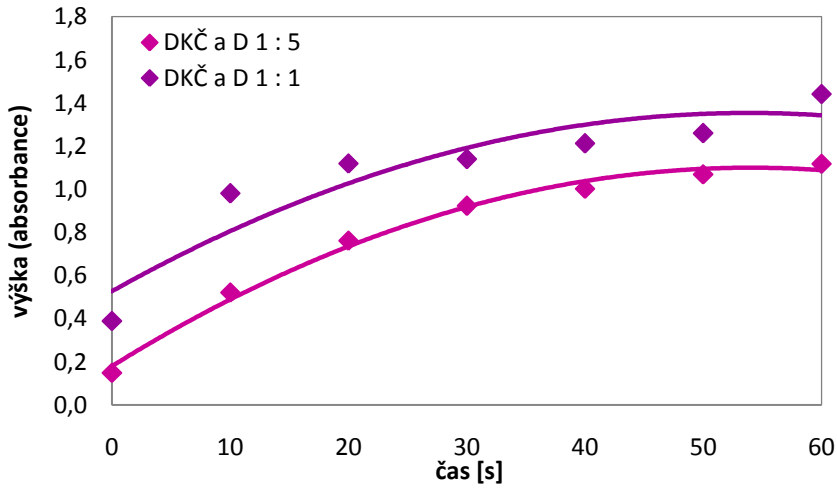
	výška – poměr 1 : 5			plocha – poměr 1 : 5			výška – poměr 1 : 1			plocha – poměr 1 : 1			výška – poměr 5 : 1			plocha – poměr 5 : 1		
čas [s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
0	0,1481	0,00	1,33	0,2108	0,01	3,24	0,3892	0,00	0,89	0,6521	0,00	0,56	-	-	-	-	-	-
10	0,5209	0,01	1,06	3,8136	0,05	1,41	0,9801	0,01	1,40	8,9185	0,15	1,73	-	-	-	-	-	-
20	0,7612	0,03	3,54	10,5021	0,18	1,76	1,1196	0,01	1,17	19,8995	0,29	1,47	-	-	-	-	-	-
30	0,9227	0,01	1,60	19,5492	0,34	1,75	1,1390	0,05	4,54	30,8160	1,58	5,14	-	-	-	-	-	-
40	1,0020	0,02	1,78	29,4067	0,22	0,76	1,2121	0,02	1,81	43,2926	0,15	0,36	-	-	-	-	-	-
50	1,0683	0,02	1,81	40,0039	0,36	0,91	1,2593	0,02	1,26	56,2851	1,02	1,81	-	-	-	-	-	-
60	1,1180	0,01	0,81	50,2110	0,43	0,86	1,4415	0,07	4,55	75,8701	3,12	4,11	-	-	-	-	-	-



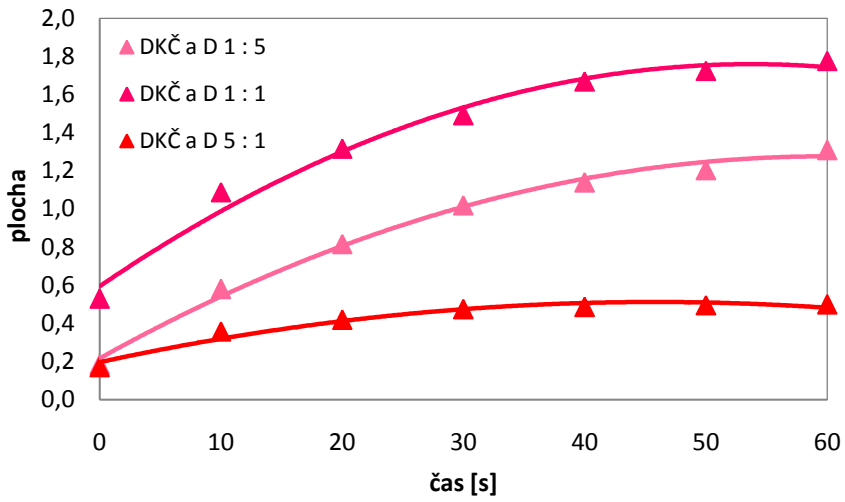
Obrázek 29 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku



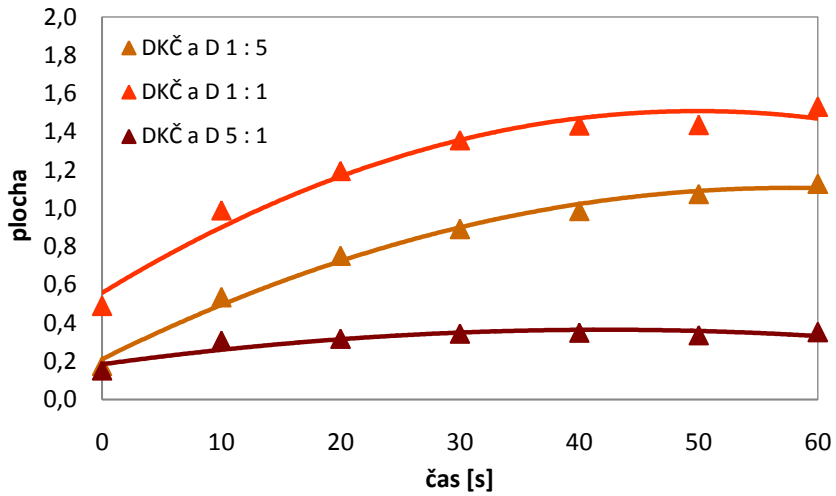
Obrázek 30 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku



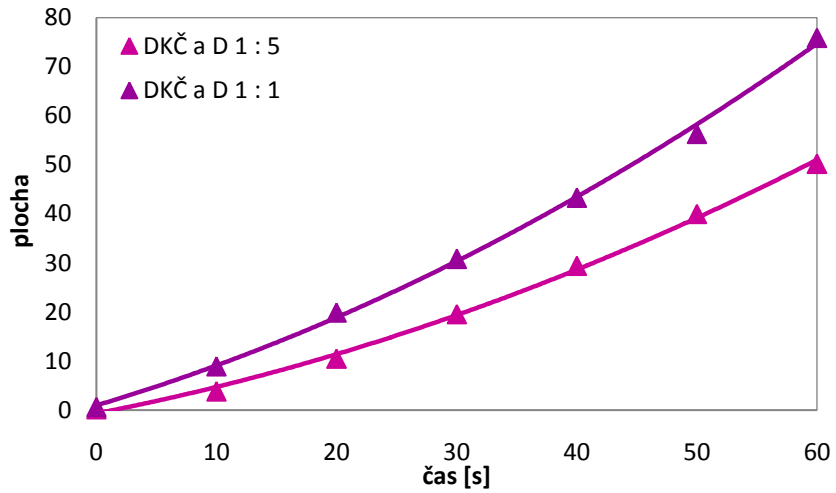
Obrázek 31 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku



Obrázek 32 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku



Obrázek 33 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku



Obrázek 34 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku

5.2.5 Vliv zastavení toku a pořadí aspirace pracovních roztoků při sendvičové metodě stanovení dusitanů

Bylo testováno zastavení toku při sendvičovém mísení pracovních roztoků. Sendvičová metoda znamenala, že aspirované objemy roztoků byly 25 µl D - 50 µl DKČ - 25 µl D nebo s obráceným aspiračním pořadím 25 µl DKČ - 50 µl D - 25 µl DKČ. V časovém rozmezí 0 – 60 s byl zastavován tok roztoků v mísící cívce (MC), před detektorem (PD) a v detektoru (VD). Zastavení toku v požadovaném místě bylo dosáhnuto dávkovaným objemem, který byl nastaven v měřícím programu. Při zastavení toku v mísící cívce byl program zastaven před obrácením směru toku nosného proudu, při zastavení před detektorem byl dávkovaný objem 100 µl a při zastavení v detektoru byl použit dávkovaný objem 210 µl.

Naměřené hodnoty výšek a ploch píků aspiračního pořadí D-DKČ-D byly tabelovány (Tabulka 18) a graficky vykresleny (Obrázek 35 a Obrázek 36).

Naměřené hodnoty výšek a ploch píků aspiračního pořadí DKČ-D-DKČ byly přehledně sepsány (Tabulka 19) a graficky vykresleny (Obrázek 37 a Obrázek 38).

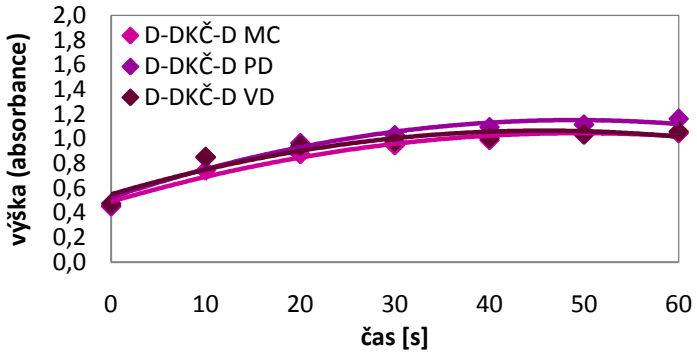
Při aspiračním pořadí DKČ-D-DKČ byla pozorována zvýšená výtěžnost stanovení dusitanů oproti aspiračnímu pořadí D-DKČ-D (Obrázek 42). Při prodlužujícím se zastavení toku ve všech požadovaných místech byly pozorovány vzrůstající hodnoty jak ploch, tak výšek píků. Markantní vzrůst naměřených hodnot ploch píků byl sledován při zastavení toku v detektoru, protože bylo přímo pozorováno navyšování signálu díky vznikajícímu produktu, zatímco při transportu z místa zastavení toku - ať už v mísící cívce nebo před detektorem - bylo dopravováno již určité množství produktu, které detektorem prošlo a množství vznikající produktu bylo zanedbatelné vzhledem ke krátké době zdržení v detektoru (Obrázek 39).

Tabulka 18 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace D-DKČ-D na stanovení dusitanů sendvičovou metodou

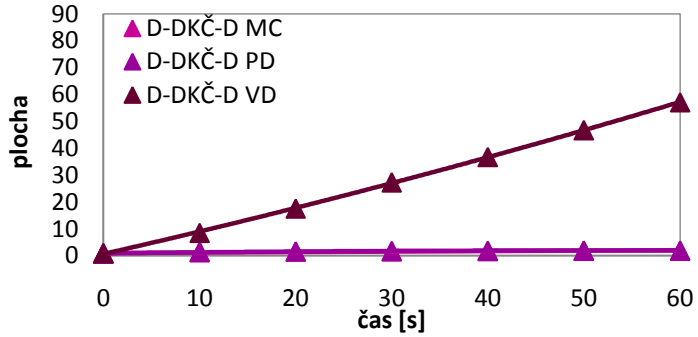
	výška – mísící cívka			plocha – mísící cívka			výška – před detektorem			plocha – před detektorem			výška – v detektoru			plocha – v detektoru		
čas [s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
0	0,4515	0,01	2,63	0,7629	0,05	6,70	0,4580	0,00	0,91	0,7710	0,02	3,06	0,4755	0,01	2,06	0,9557	0,07	7,52
10	0,7434	0,01	1,09	1,3313	0,02	1,81	0,8477	0,00	0,48	1,4440	0,02	1,62	0,8540	0,01	1,20	8,5189	0,03	0,33
20	0,8756	0,02	2,28	1,5552	0,01	0,34	0,9649	0,01	1,40	1,6507	0,02	1,42	0,9436	0,02	1,73	17,6089	0,13	0,76
30	0,9483	0,02	2,05	1,6949	0,11	6,69	1,0307	0,02	1,73	1,7306	0,03	1,74	0,9765	0,02	1,66	27,3238	0,08	0,31
40	0,9893	0,02	2,01	1,7675	0,02	1,24	1,0957	0,02	2,14	1,8565	0,04	2,42	1,0053	0,01	1,41	36,8089	0,05	0,15
50	1,0321	0,02	2,04	1,8488	0,04	1,96	1,1171	0,02	1,42	1,9365	0,03	1,59	1,0383	0,01	0,79	46,7465	0,24	0,51
60	1,0452	0,02	2,31	1,8469	0,06	3,06	1,1622	0,03	2,48	1,9992	0,05	2,67	1,0599	0,02	1,78	57,1595	0,24	0,42

Tabulka 19 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace DKČ-D-DKČ na stanovení dusitanů sendvičovou metodou

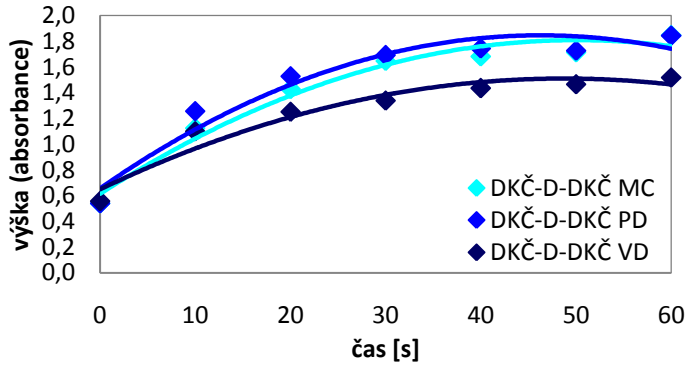
	výška – mísící cívka			plocha – mísící cívka			výška – před detektorem			plocha – před detektorem			výška – v detektoru			plocha – v detektoru		
čas [s]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]	∅výška	SD	RSD[%]	∅plocha	SD	RSD[%]
0	0,5395	0,00	0,69	0,8744	0,01	1,40	0,5398	0,01	2,38	0,8947	0,05	5,49	0,5555	0,01	2,21	1,0252	0,01	0,56
10	1,1243	0,01	1,19	1,6413	0,01	0,36	1,2570	0,02	1,57	1,7354	0,06	3,48	1,0989	0,03	2,69	10,2609	0,08	0,76
20	1,4285	0,04	2,75	1,8836	0,03	1,49	1,5280	0,05	3,15	1,9869	0,04	2,21	1,2505	0,03	2,78	22,3982	0,21	0,95
30	1,6468	0,05	2,77	2,0861	0,03	1,49	1,6909	0,02	1,40	2,0730	0,03	1,66	1,3387	0,02	1,75	35,8658	0,33	0,93
40	1,6822	0,02	1,00	2,1278	0,06	2,65	1,7449	0,00	0,28	2,1789	0,06	2,88	1,4344	0,00	0,30	49,9059	0,93	1,87
50	1,7130	0,02	1,04	2,1559	0,04	1,72	1,7262	0,08	4,88	2,1904	0,07	3,13	1,4648	0,02	1,15	64,0022	0,42	0,66
60	1,8452	0,12	6,32	2,2315	0,02	1,10	1,8433	0,08	4,31	2,2904	0,07	2,95	1,5178	0,03	2,16	80,0703	1,35	1,68



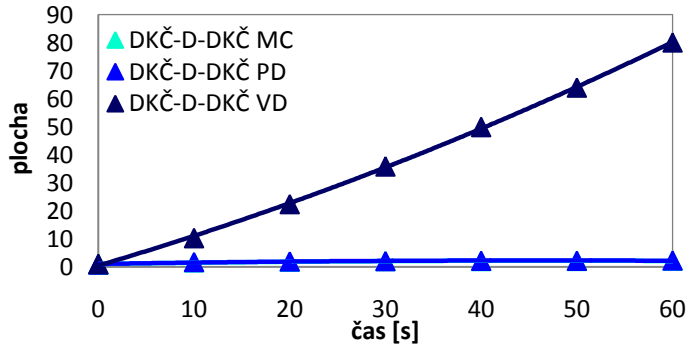
Obrázek 35 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace D-DKČ-D na stanovení dusitanů sendvičovou metodou – hodnocení výškou píku



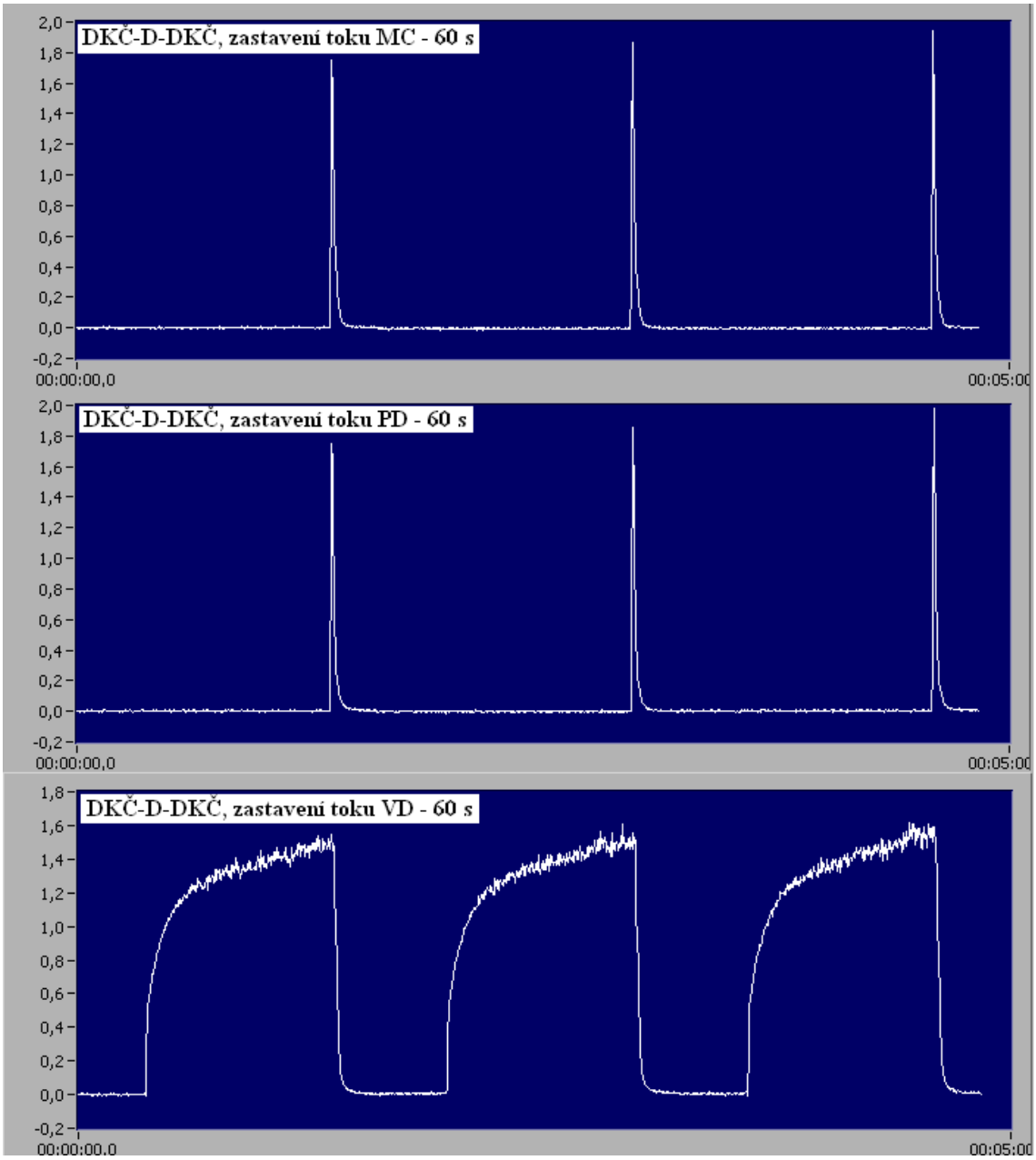
Obrázek 36 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace D-DKČ-D na stanovení dusitanů sendvičovou metodou – hodnocení plochou píku



Obrázek 37 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace DKČ-D-DKČ na stanovení dusitanů sendvičovou metodou – hodnocení výškou píku



Obrázek 38 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace DKČ-D-DKČ na stanovení dusitanů sendvičovou metodou – hodnocení plochou píku



Obrázek 39 – Záznamy měření zastavení toku v mísící cívce, před detektorem a v detektoru na 60 s při stanovení dusitanů sendvičovou metodou DKČ-D-DKČ

5.2.6 Měření délky trvání dosažení rovnováhy reakce při stanovení dusitanů

Při tomto měření byla zjišťována délka trvání dosažení rovnováhy reakce, resp. maxima signálu při stanovení dusitanů. Měření bylo prováděno při průtokové rychlosti 100 µl/s a vlnové délce 540 nm. Byla změřena obě pořadí aspirace mísení D s DKČ (Tabulka 20 a Tabulka 21), stejně tak bylo pro obě aspirační pořadí měřeno sendvičovou metodou (Tabulka 22 a Tabulka 23). Tok byl zastavován na 60, 120 a 180 s v detektoru, dávkovaný objem byl pro reakci D s DKČ dle aspiračního pořadí a poměrů mísení pracovních roztoků podle hodnot dříve uvedených (Tabulka 2), pro sendvičovou metodu byl použit dávkovaný objem 210 µl.

Pro aspirační pořadí DKČ a D poměr 5 : 1 nebyly odečteny hodnoty z důvodu nemožnosti rozeznat, zda hodnota výšky či plochy patřila měřenému produktu či DKČ.

Tabulka 20 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce u pořadí aspirace D-DKČ

	1 : 5 = (10 µl : 50 µl)		1 : 1 = (50 µl : 50 µl)		5 : 1 = (50 µl : 10 µl)	
čas [s]	výška	plocha	výška	plocha	výška	plocha
60	0,2910	15,7951	1,3374	68,5528	1,3785	65,0066
120	0,3087	34,0764	1,3880	148,7244	1,5075	152,9059
180	0,3066	51,9026	1,4071	235,0918	1,5759	248,3224

Tabulka 21 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce u pořadí aspirace DKČ-D

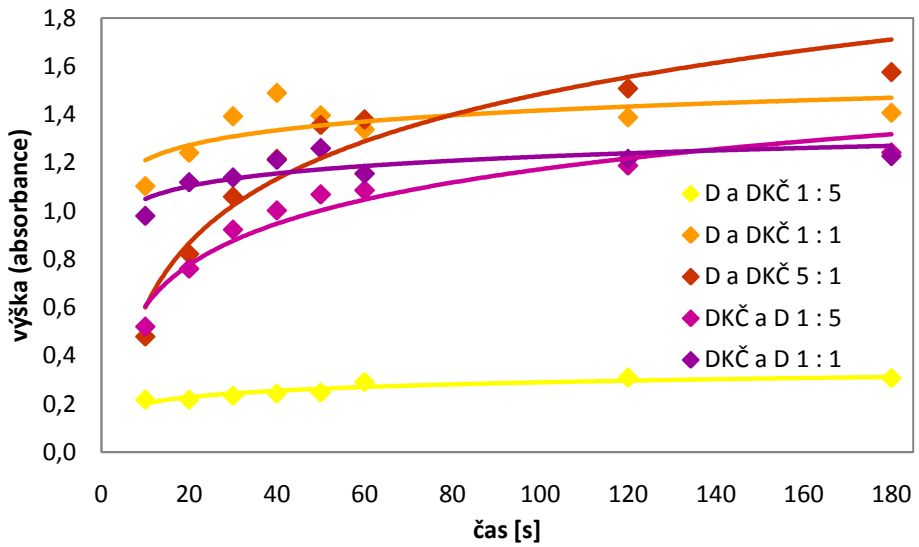
	1 : 5 = (10 µl : 50 µl)		1 : 1 = (50 µl : 50 µl)		5 : 1 = (50 µl : 10 µl)	
čas [s]	výška	plocha	výška	plocha	výška	plocha
60	1,0851	51,2141	1,1550	59,8027	-	-
120	1,1882	122,1998	1,2164	130,9442	-	-
180	1,2426	194,5436	1,2272	208,2038	-	-

Tabulka 22 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce u pořadí aspirace D-DKČ-D

čas [s]	výška	plocha
60	0,9964	54,2272
120	1,0774	115,5436
180	1,0448	176,4433

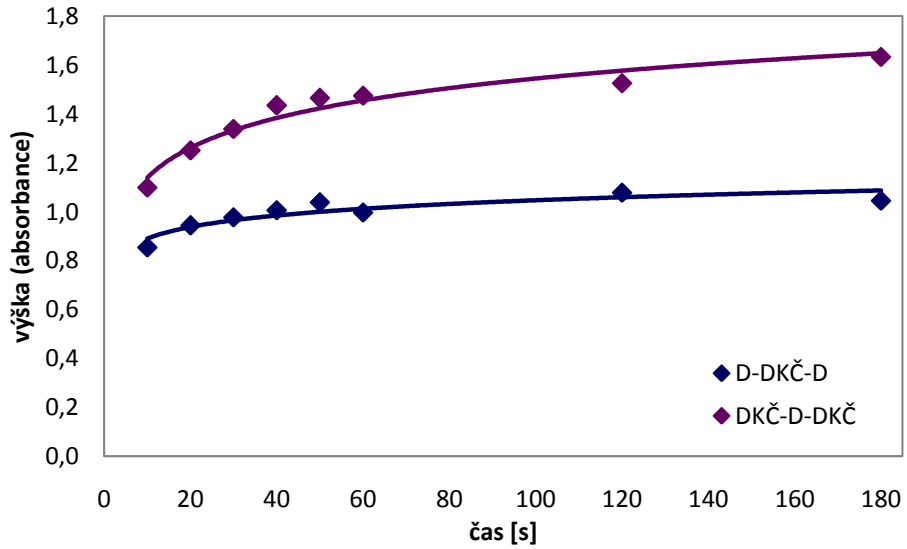
Tabulka 23 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce u pořadí aspirace DKČ-D-DKČ

čas [s]	výška	plocha
60	1,4741	76,7878
120	1,5254	165,7523
180	1,6333	257,8459



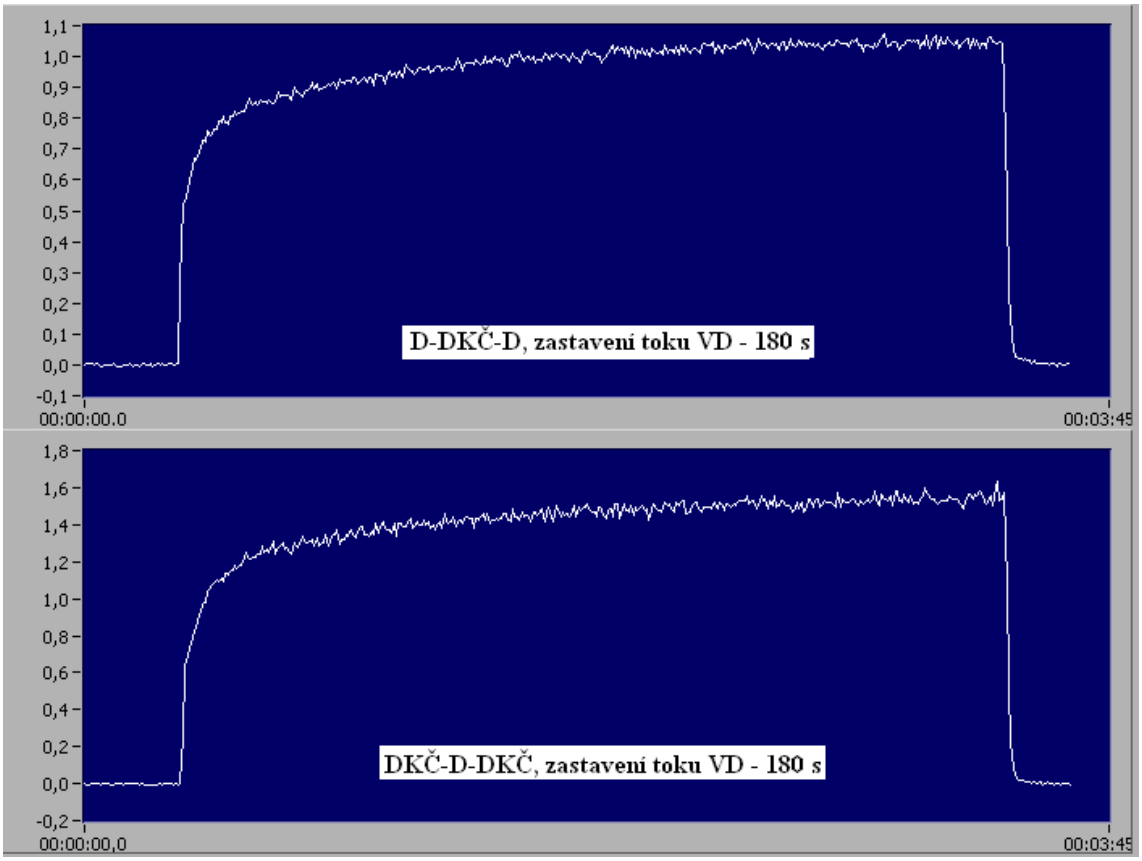
Obrázek 40 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce D s DKČ u obou pořadí aspirace

Rovnováhy reakce bylo dosaženo u obou pořadí aspirace mísení D s DKČ (Obrázek 40) při zastavení toku na 60 – 80 s, poté nedocházelo k významnému navyšovaní maxima signálu. Pouze u pětinásobně většího objemového množství D oproti DKČ bylo pozorováno ještě mírné zvýšení signálu po dobu zastavení toku na 120 s, ale při delším čase zastavení toku již nebyl pozorován podstatný vzrůst hodnot výšek píků.



Obrázek 41 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce D s DKČ sendvičovou metodou

Při stanovení dusitanů pomocí sendvičové techniky (Obrázek 41, Obrázek 42) bylo rovnováhy reakce dosaženo u obou pořadí aspirace přibližně při zastavení toku v detektoru na 80 s, při delším čase zastavení toku už není pozorovatelné významné zvýšení signálu.



Obrázek 42 – Záznamy měření zastavení toku v detektoru na 180 s při stanovení dusitanů sendvičovou metodou

6. SOUHRN

6.1 REAKCE BROMTHYMOLOVÉ MODŘI S HYDROXIDEM SODNÝM

Nejprve byl změřen vliv průtokové rychlosti na absorbanci žluté formy BTB. Jako optimální se ukázaly pomalejší průtokové rychlosti (25 a 50 µl/s) s použitím větších objemových množství BTB (90 – 490 µl), v těchto hranicích se RSD pohybovaly v rozmezí 0,49 – 6,24 %. Při hodnocení pomocí ploch píků jednotlivé křivky vykazovaly lineární průběh (Obrázek 10), zatímco při hodnocení pomocí výšek píků křivky vykreslovaly logaritmický průběh (Obrázek 9).

Poté bylo u rychleji probíhající reakce upravováno pH a byl testován vliv průtokové rychlosti a způsobu mísení (různé pořadí aspirace, různé poměry mísení pracovních roztoků) na absorbanci modré formy BTB (Obrázek 11 – Obrázek 14). Pomalejší průtokové rychlosti do 90 µl/s vykazovaly menší hodnoty RSD. Nejvhodnější bylo použití ekvivalentního množství pracovních roztoků – poměr mísení 1 : 1 – 50 µl BTB a 50 µl NaOH, vyhovující byl i poměr pětinásobně většího množství BTB vůči NaOH (50 µl BTB a 10 µl NaOH). Vliv aspiračního pořadí byl patrný při hodnocení výškou píku, kde bylo optimální pořadí aspirace NaOH a BTB, zatímco při hodnocení pomocí ploch píků nebyly pozorovány významnější rozdíly mezi použitými aspiračními pořadími.

6.2 REAKCE DUSITANŮ S DIAZOTAČNĚ-KOPULAČNÍM ČINIDLEM

Při delším průběhu reakce stanovení D s DKČ byl nejprve testován vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace na stanovení dusitanů (Obrázek 15 a Obrázek 16, Obrázek 19 a Obrázek 20). Optimální bylo použití pomalejších průtokových rychlostí (10 – 70 µl/s), pro hranice těchto hodnot průtokových rychlostí byly hodnoty relativních směrodatných odchylek v rozmezí 0,20 – 6,05 %. Vhodný poměr mísení byl 1 : 1, tedy stejné objemové množství D a DKČ. Aspirační pořadí D a DKČ bylo výhodnější u ekvivalentních objemových množství pracovních roztoků a též bylo optimální u poměru pětkrát většího objemového množství DKČ oproti D. Zatímco opačné pořadí aspirace – DKČ a D bylo vhodné při pětinásobně větším objemovém množství D oproti DKČ. Jako nepoužitelné se projevilo aspirační pořadí

DKČ a D poměr 5 : 1, protože při pomaleji probíhající reakci nestačí u tohoto aspiračního pořadí a poměru vzniknout dostatečné množství měřeného produktu.

Další testování se zabývalo vlivem zastavení toku, poměru mísení a pořadí aspirace pracovních roztoků na stanovení dusitanů. Při hodnocení dat pomocí výšek a ploch píků (Obrázek 21 - Obrázek 26, Obrázek 29 - Obrázek 34) bylo dosahováno největších hodnot při nejdelším zastavení toku (60 s). Markantní vzrůst naměřených dat byl pozorován při hodnocení pomocí ploch píků při zastavení toku v průtokové detekční cele díky většímu počtu bodů odečtených detektorem. Optimální poměr mísení byl 1 : 1, tedy použití stejného množství pracovních roztoků pro obě aspirační pořadí. Vhodné pro měření byly i poměry, kde bylo pětinásobně větší objemové množství dusitanů. Jako nepoužitelné se projevilo aspirační pořadí DKČ a D poměr 5 : 1, protože při pomaleji probíhající reakci nestačí u tohoto aspiračního pořadí a poměru vzniknout dostatečné množství měřeného produktu. Při zastavení toku v mísící cívce bylo vhodnější aspirační pořadí DKČ a D, zatímco při zastavení toku před detektorem a v průtokové detekční cele bylo optimální pořadí aspirace D a DKČ. Hodnoty RSD byly v rozmezí 0,08 – 10,05 %.

Poté byl pomocí sendvičové metody testován vliv zastavení toku, poměru mísení a aspirační pořadí pracovních roztoků na stanovení dusitanů (Obrázek 35 – Obrázek 38). Vyšší výtěžnost byla u aspiračního pořadí a poměru mísení 25 µl DKČ - 50 µl D - 25 µl DKČ při hodnocení pomocí ploch i výšek píků. Markantní vzrůst hodnot byl pozorován při hodnocení pomocí ploch píků při zastavení toku v průtokové cele detektoru díky většímu počtu bodů odečtených detektorem. Hodnoty relativních směrodatných odchylek byly v rozmezí 0,15 – 7,52 %.

Jako poslední bylo měření délky dosažení rovnováhy reakce při stanovení dusitanů (Obrázek 40 a Obrázek 41). Při použití obou pořadí aspirace mísení pracovních roztoků, tak pomocí sendvičové techniky, bylo zjištěno, že od určité doby nedocházelo k významnému navyšování signálu, proto je dostatečná doba odpovídající zastavení toku na 60 – 80 s. Pouze u pětinásobně většího objemového množství D vůči DKČ bylo pozorováno ještě mírné zvýšení signálu při zastavení toku na 120 s, ale již při delším čase zastavení toku nedochází k podstatnému vzrůstu signálu.

7. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo testování vlivu mísení a průtokové rychlosti na průběh a možnosti vyhodnocení různých reakcí v SIA systému - rychleji probíhající reakce BTB s NaOH a pomaleji probíhající dvojstupňové reakce stanovení D s DKČ.

Při rychlejší reakci BTB s NaOH i při delším průběhu reakce stanovení D po diazotaci a kopulaci s DKČ bylo výhodnější použití pomalejších průtokových rychlostí, protože byl poskytnut delší reakční čas. Použití větších objemových množství pracovních roztoků bylo příznivé z hlediska vyšší citlivosti měření, ale zároveň použití velkých objemových množství rozšiřovalo píky a prodlužovalo dobu analýzy. Z toho vyplývá, že je příhodné používat takový menší objem vzorku, který poskytuje ještě dostačující citlivost při současném zrychlení analýzy. Používání ekvivalentních poměrů pracovních roztoků se ukázalo jako nejvhodnější, z důvodu dostatečné axiální i radiální disperze vzorku a efektivního promísení zón při transportu do detektoru. Vhodné byly i poměry kde bylo pětinásobně větší množství vzorku oproti činidlu.

Při delším průběhu reakce stanovení dusitanů po diazotaci a kopulaci DKČ bylo dosahováno nejvyšších hodnot při nejdelším zastavování toku, protože byl poskytnut pracovním roztokům delší čas zadržení a tedy reakce. Při měření délky trvání dosažení rovnováhy reakce bylo zjištěno, že od doby zastavení toku na 60 - 80 s nedocházelo již k významnému navyšování signálu. Zastavování toku přináší delší dobu zadržení bez zvýšení disperzního koeficientu. Zastavování toku v mísící cívce a před detektorem se projevovalo nižšími hodnotami ploch než při zastavení v průtokové cele detektoru, kde byl pozorován markantní vzrůst naměřených dat díky většímu počtu odečtených bodů detektorem. Při hodnocení pomocí výšek píků nebyly pozorovány významnější rozdíly v hodnocení mezi místy zastavení toku. Při použití sendvičové techniky bylo z důvodu vyšší výtěžnosti vhodnější vložení většího objemu vzorku mezi dvě zóny činidla, kdy vznikalo větší množství produktu. Zároveň je při stanovení dusitanů sendvičová technika efektivnější oproti oběma aspiračním pořadím mísení ekvivalentních objemových množství pracovních roztoků.

8. LITERATURA

[1] Ruzicka, J. *Flow Injection Analysis: Tutorial & News on Flow Based micro Analytical Techniques* [Online]; 2014th ed.; http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.0%20Sequential%20Injection.html (accessed Mar 21, 2014).

[2] Ruzicka, J. *Flow Injection Analysis*, 4th ed. [Online]; http://www.flowinjection.com/images/Sequential_Injection.pdf (accessed Mar 21, 2014).

[3] Sklenářová, H. Neseparační průtokové metody. Podklady k přednášce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, CZ; https://docs.faf.cuni.cz/KACH/?path=farmacie\speci%C3%A1ln%C3%AD+metody+instrument%C3%A1ln%C3%AD+anal%C3%BDzy\p%C5%99edn%C3%A1%C5%A1ky (accessed Apr 15, 2014).

[4] Ruzicka, J.; *Flow Injection Analysis*, 4th ed. [CD-ROM]; **2009**.

[5] Decuir, M. S.; Boden, H. M.; Carroll, A. D.; Ruzicka, J. Principles of micro sequential Injection Analysis in the Lab-on-Valve format and its Introduction into a Teaching Laboratory. In *Journal of Flow Injection Analysis* [Online]; **2007**, 2, pp. 103-108. http://www.flowinjectiontutorial.com/files/JFIA24%282%29%282007%29pp103-108.pdf (accessed Mar 21, 2014)

[6] Zagatto, E. A. G.; Oliveira, C. C.; Townshend, A.; Worsfold, P. J. *Flow Analysis with Spectrophotometric and Luminometric Detection*; Elsevier: Waltham, USA, 2012; pp. 243-263.

[7] Cerdà, A.; Cerdà, V. *An Introduction to Flow Analysis*; Palma de Mallorca, 2009; pp. 29-43.

[8] Karlberg, B.; Pacey, G. E. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*; Flow injection analysis a practical guide; Elsevier: Amsterdam, 1989; 10, pp. 16-28.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Ukázka měřícího cyklu u reakce BTB s NaOH 18
Tabulka 2 – Objem dávkovaný při zastavení toku v detektoru u reakce D s DKČ 19
Tabulka 3 – Ukázka měřícího cyklu při sendvičové metodě stanovení D 19
Tabulka 4 – BTB, rychlost 25 µl/s 22
Tabulka 5 – BTB, rychlost 50 µl/s 22
Tabulka 6 – BTB, rychlost 75 µl/s 23
Tabulka 7 – BTB, rychlost 100 µl/s 23
Tabulka 8 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace BTB a NaOH na absorbanci modré formy BTB 26
Tabulka 9 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace NaOH a BTB na absorbanci modré formy BTB 29
Tabulka 10 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů 32
Tabulka 11 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů 37
Tabulka 12 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů 40
Tabulka 13 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů 40
Tabulka 14 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů 40
Tabulka 15 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů 45
Tabulka 16 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů 45
Tabulka 17 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů 45
Tabulka 18 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace D-DKČ-D na stanovení dusitanů sendvičovou metodou 49
Tabulka 19 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace DKČ-D-DKČ na stanovení dusitanů sendvičovou metodou 49
Tabulka 20 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce u pořadí aspirace D-DKČ 52

Tabulka 21 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce u pořadí aspirace DKČ-D..... 52
Tabulka 22 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce u pořadí aspirace D-DKČ-D.... 52
Tabulka 23 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce u pořadí aspirace DKČ-D-DKČ..... 52

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Instrumentace systému SIA [1] 8
Obrázek 2 – Princip systému SIA [4] 9
Obrázek 3 – Technika stop flow[1] 10
Obrázek 4 – Zastavení toku v mísící cívce *(holding coil)* a průtokové cele *(flow cell)*[1] . 10
Obrázek 5 – Optimalizace poměru S/R [5] 10
Obrázek 6 – Disperze vzorku [1] 12
Obrázek 7 – Princip disperze [1] 13
Obrázek 8 – Vliv objemu nastřikovaného vzorku na disperzi [7] 13
Obrázek 9 – BTB při rychlostech 25, 50, 75 a 100 µl/s – hodnocení výškou píku 24
Obrázek 10 – BTB při rychlostech 25, 50, 75 a 100 µl/s – hodnocení plochou píku..... 24
Obrázek 11 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace BTB a NaOH na absorbanci modré formy BTB – hodnocení výškou píku 27
Obrázek 12 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace BTB a NaOH na absorbanci modré formy BTB – hodnocení plochou píku ... 27
Obrázek 13 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace NaOH a BTB na absorbanci modré formy BTB – hodnocení výškou píku 30
Obrázek 14 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace NaOH a BTB na absorbanci modré formy BTB – hodnocení plochou píku..... 30
Obrázek 15 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku 33
Obrázek 16 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku 33
Obrázek 17 – Záznamy měření aspiračního pořadí DKČ a D v poměrech 1 : 5 a 1 : 1 při průtokové rychlosti 25 µl/s 35
Obrázek 18 – Záznamy měření aspiračního pořadí DKČ a D/voda v poměru 5 : 1 při průtokové rychlosti 25 µl/s 35
Obrázek 19 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku 38
Obrázek 20 – Vliv průtokové rychlosti, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku 38
Obrázek 21 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku 41

Obrázek 22 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku 41
Obrázek 23 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku 41
Obrázek 24 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku 42
Obrázek 25 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku 42
Obrázek 26 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace D a DKČ na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku 42
Obrázek 27 – Záznamy měření zastavení toku v detektoru na 60 s aspiračního pořadí DKČ a D v poměrech 1 : 5 a 1 : 1 43
Obrázek 28 – Záznam měření zastavení toku v detektoru na 60 s aspiračního pořadí DKČ a D v poměru 5 : 1 44
Obrázek 29 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku 46
Obrázek 30 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku 46
Obrázek 31 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení výškou píku 46
Obrázek 32 – Vliv zastavení toku v mísící cívce, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku 47
Obrázek 33 – Vliv zastavení toku před detektorem, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku 47
Obrázek 34 – Vliv zastavení toku v detektoru, poměru mísení a pořadí aspirace DKČ a D na stanovení dusitanů – hodnocení plochou píku 47
Obrázek 35 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace D-DKČ-D na stanovení dusitanů sendvičovou metodou – hodnocení výškou píku 50
Obrázek 36 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace D-DKČ-D na stanovení dusitanů sendvičovou metodou – hodnocení plochou píku 50
Obrázek 37 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace DKČ-D-DKČ na stanovení dusitanů sendvičovou metodou – hodnocení výškou píku 50
Obrázek 38 – Vliv zastavení toku a pořadí aspirace DKČ-D-DKČ na stanovení dusitanů sendvičovou metodou – hodnocení plochou píku 50

Obrázek 39 – Záznamy měření zastavení toku v mísící cívce, před detektorem a v detektoru na 60 s při stanovení dusitanů sendvičovou metodou DKČ-D-DKČ 51
Obrázek 40 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce D s DKČ u obou pořadí aspirace 53
Obrázek 41 – Délka trvání dosažení rovnováhy reakce D s DKČ sendvičovou metodou... 53
Obrázek 42 – Záznamy měření zastavení toku v detektoru na 180 s při stanovení dusitanů sendvičovou metodou 54