

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Aneta Pastrňáková

OPTIMALIZACE EXPERIMENTÁLNÍHO USPOŘÁDÁNÍ PRO
CHEMILUMINISCENČNÍ STANOVENÍ KOBALTNATÝCH
IONTŮ

Optimization of experimental setup for chemiluminescent
determination of cobalt ions

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 12. srpna 2020

Bc. Aneta Pastrňáková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce, panu RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vstřícný přístup a cenné rady, které mi v průběhu zpracovávání mé diplomové práce poskytoval.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a blízkému okolí za pomoc a podporu během mého studia.

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá nalezením optimálního experimentálního uspořádání pro chemiluminiscenční stanovení kobaltnatých iontů technikou průtokové injekční analýzy (FIA) a sekvenční injekční analýzy (SIA) a porovnáním dosažených výsledků stanovení.

Základem stanovení je chemiluminiscenční reakce, jejíž podstatou je oxidace luminolu peroxidem vodíku v alkalickém prostředí v průtokovém systému za přítomnosti kobaltnatých iontů, které v reakci plní úlohu katalyzátoru.

V experimentální části práce bylo nalezeno vhodné uspořádání pro detekci chemiluminiscenčního záření a následně vhodné uspořádání FIA a SIA aparatury pro stanovení kobaltnatých iontů. Pro detekci záření byla nakonec zvolena skleněná spirálovitá trubice, která byla nejvhodnější pro chemiluminiscenční měření, na rozdíl od ostatních provedených experimentů.

V další části práce byly experimentálně nalezeny optimální podmínky pro stanovení kobaltnatých iontů. U FIA techniky byla optimalizována objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku, luminolu a kobaltnatých iontů. Dále pak hmotnostní procento peroxidu vodíku a koncentrace luminolu. V neposlední řadě byl optimalizován dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů a pH roztoku luminolu. U SIA techniky byly parametry optimalizovány na základě změn uspořádání SIA aparatury. Optimalizován byl dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů, objemová průtoková rychlost čerpadla, objemová průtoková rychlost roztoku kobaltnatých iontů, dávkované objemy reakčních činidel a objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku. Dále byla studována katalytická schopnost vybraných iontů (Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Al^{3+}), které by mohly ovlivňovat intenzitu chemiluminiscenčního záření.

V závěru práce byly za optimálních podmínek zjištěny základní charakteristiky stanovení pro kobaltnaté ionty metodou FIA a SIA. Následně byly tyto charakteristiky porovnány u obou metod. Důraz byl kladen především na dosaženou mez detekce a citlivost.

Klíčová slova

Průtoková injekční analýza, sekvenční injekční analýza, chemiluminiscence, luminol, kobaltnaté ionty

Abstract

The presented thesis deals with finding the optimal experimental setup for the chemiluminescent determination of cobalt ions by the technique of flow injection analysis (FIA) and sequential injection analysis (SIA) and comparing the achieved results of the determination.

The determination is based on a chemiluminescent reaction, essence of which is oxidation of luminol with hydrogen peroxide in an alkaline solution in a flow system in the presence of cobalt ions, which acts as a catalyst of the reaction.

In the experimental part of the work, a suitable setup for the detection of chemiluminescent light emission was found, followed by a suitable setup of the FIA and SIA systems for the determination of cobalt ions. For the detection of radiation, a glass spiral tube was selected, which was the most suitable for chemiluminescent measurement, compared to other experiments performed with different.

In the next part of the work, optimal conditions for cobalt ions determination were experimentally found. As for the FIA technique, the volume flow rate of hydrogen peroxide, luminol and cobalt ions solutions was optimized. Furthermore, the concentration of the hydrogen peroxide solution and luminol. Last but not least, the dosing volume of the cobalt ions solution and the pH of the luminol solution were optimized. For the SIA technique, the parameters were optimized based on changes in the setup of the SIA apparatus. The dosing volume of the cobalt ions solution, the volume flow rate of the pump, the volume flow rate of the cobalt ions solution, the dosing volumes of the reagents and the volume flow rate of the hydrogen peroxide solution were optimized. Furthermore, the catalytic ability of selected ions (Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Al^{3+}), which could affect the intensity of chemiluminescent radiation, was studied.

At the end of the work, under the optimized conditions, the basic characteristics of the determination for cobalt ions by FIA and SIA methods were determined. Subsequently, these characteristics were compared for both methods. Above all emphasis was placed on the limit of detection and sensitivity achieved.

Keywords

Flow injection analysis, sequential injection analysis, chemiluminescence, luminol, cobalt ions

OBSAH

1 ÚVOD	- 9 -
1.1 Cíle diplomové práce	- 9 -
2 TEORETICKÁ ČÁST	- 10 -
2.1 Průtokové techniky	- 10 -
2.1.1 Průtoková injekční analýza	- 12 -
2.1.2 Sekvenční injekční analýza	- 13 -
2.2 Luminiscence	- 14 -
2.2.1 Chemiluminiscence	- 16 -
2.3 Luminol.....	- 17 -
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 20 -
3.1 Použité přístroje a vybavení.....	- 20 -
3.2 Použité chemikálie	- 20 -
3.3 Příprava roztoků.....	- 21 -
3.4 Experimentální uspořádání pro detekci záření.....	- 22 -
3.5 Aparatura použita pro FIA	- 24 -
3.6 Aparatura použita pro SIA	- 24 -
3.7 Statistické zpracování výsledků.....	- 27 -
4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE	- 29 -
4.1 Optimalizace experimentálních parametrů (FIA)	- 29 -
4.1.1 Hmotnostní procento roztoku peroxidu vodíku	- 29 -
4.1.2 Objemová průtoková rychlost roztoku luminolu	- 30 -
4.1.3 Objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku.....	- 31 -
4.1.4 Objemová průtoková rychlost roztoku kobaltnatých iontů	- 32 -
4.1.5 Koncentrace roztoku luminolu	- 33 -
4.1.6 Dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů	- 34 -
4.1.7 pH roztoku luminolu	- 35 -
4.2 Souhrn optimalizovaných parametrů (FIA)	- 37 -
4.3 Kalibrační závislost stanovení kobaltnatých iontů (FIA)	- 37 -
4.4 Zjištění základních charakteristik (FIA)	- 38 -
4.5 Katalytická schopnost ostatních iontů	- 39 -
4.6 Optimalizace experimentálních parametrů (SIA)	- 41 -
4.6.1 Objemová průtoková rychlost čerpadla.....	- 41 -
4.6.2 Dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů	- 42 -
4.6.3 Objemová průtoková rychlost roztoku kobaltnatých iontů.....	- 43 -
4.6.4 Dávkované objemy reakčních činidel	- 44 -
4.6.5 Objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku.....	- 45 -

4.7	Souhrn optimalizovaných parametrů (SIA)	- 46 -
4.8	Kalibrační závislost stanovení kobaltnatých iontů (SIA)	- 47 -
4.9	Zjištění základních charakteristik (SIA)	- 49 -
4.10	Porovnání základních charakteristik	- 50 -
5	ZÁVĚR	- 51 -
6	použitá literatura	- 53 -

Seznam uvedených zkratek a symbolů

CFA	kontinuální průtoková analýza (z anglického <i>continuous flow analysis</i>)
c (luminol)	koncentrace roztoku luminolu [mmol L^{-1}]
c (Co^{2+})	koncentrace roztoku kobaltnatých iontů [mg L^{-1}]
CL	chemiluminiscence
FIA	průtoková injekční analýza (z anglického <i>flow injection analysis</i>)
I_{CH}	intenzita chemiluminiscenčního záření
MSFIA	„ <i>multisyringe</i> “ průtoková injekční analýza
LOD	mez detekce (z anglického <i>limit of detection</i>)
LOQ	mez stanovitelnosti (z anglického <i>limit of quantification</i>)
SFA	segmentová průtoková analýza (z anglického <i>segmented flow analysis</i>)
SIA	sekvenční injekční analýza (z anglického <i>sequential injection analysis</i>)
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
UV	ultrafialové záření (z anglického <i>ultraviolet</i>)
V (Co^{2+})	dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů [μL]
w (H_2O_2)	hmotnostní procento roztoku peroxidu vodíku [%]
\tilde{x}	medián
v (luminol)	objemová průtoková rychlost roztoku luminolu [mL min^{-1}]
v (Co^{2+})	objemová průtoková rychlost roztoku kobaltnatých iontů [mL min^{-1}]
v (H_2O_2)	objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku [mL min^{-1}]

1 ÚVOD

1.1 Cíle diplomové práce

Rámcovým cílem předkládané diplomové práce bylo hledání optimálního experimentálního uspořádání pro chemiluminiscenční stanovení kobaltnatých iontů ve spojení s technikou průtokové injekční analýzy (FIA) a sekvenční injekční analýzy (SIA) a porovnání dosažených výsledků stanovení.

Dílčími cíli této práce bylo nalezení optimálních experimentálních parametrů pro stanovení kobaltnatých iontů pomocí techniky FIA a SIA, zjištění základních charakteristik těchto metod pro stanovení kobaltnatých iontů a studium katalytické schopnosti dalších iontů (nikelnaté, železnaté, manganaté, zinečnaté, kademnaté, chromité, stříbrné, měďnaté a hlinité), které mohou ovlivňovat intenzitu chemiluminiscenčního záření.

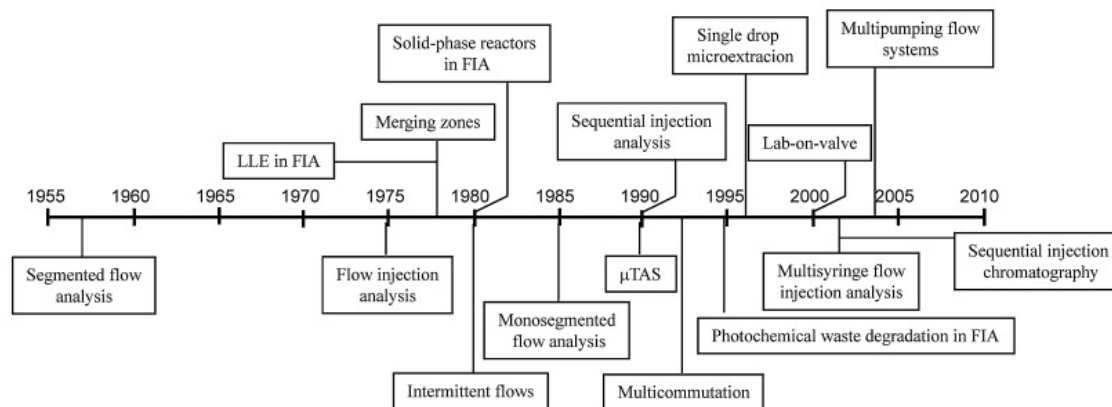
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Průtokové techniky

Nepostradatelnou součástí analytické chemie je proces zvaný chemická analýza. Dílčí postupy každé chemické analýzy mohou být prováděny buď manuálně analytickým chemikem, nebo je lze s výhodou převést do průtokového uspořádání, kdy vnější zásah analytického chemika je minimální. K vývoji průtokových analytických technik vedly požadavky na zvýšení produktivity práce, snížení nákladů na analýzy a snaha o zlepšení metrologických parametrů [1].

V dnešní době jsou průtokové analytické techniky považovány za výkonné nástroje v analytické chemii zejména díky jednoduché konstrukci, snadnému ovládnutí, kompatibilitě s různými detekčními systémy a nízkým nákladům [2]. Mimo jiné umožňují rychlá, přesná a levná měření díky dávkování velmi malých objemů vzorků a nízké spotřebě použitých činidel. V podstatě lze říci, že průtokové metody plně nahrazují manuálně prováděné chemické analýzy. Minimalizují chyby obsluhy, umožňují více analýz, mohou být miniaturizovány a lze je snadno automatizovat [3]. V současné době jsou neodmyslitelnou součástí klinických, agrochemických a environmentálních laboratoří [1].

Průtokové techniky lze rozdělit na neseparační (segmentová průtoková analýza – SFA, průtoková injekční analýza – FIA, sekvenční injekční analýza – SIA, „*multisyringe*“ injekční analýza – MSFIA) a separační (kapilární elektroforéza, chromatografické metody). Neseparační průtokové techniky lze rozdělit do dvou generací. První generací jsou techniky, u kterých jsou průtokové systémy ovládány manuálně (SFA a FIA). Druhou generací tvoří techniky, kde je průtokový systém řízen počítačovým programem (SIA a MSFIA) [4]. Časová osa vývoje průtokových technik je zobrazena na Obr. 2.1.



Obr. 2.1: Časová osa vývoje průtokových technik (převzato z [5])

Nejstarší průtokovou technikou je segmentová průtoková analýza, kterou vyvinul J. Skeggs v roce 1957 [6]. SFA se stala během svého vývoje dominantní technikou v klinické analýze. Rychlé přijetí této techniky bylo způsobeno její jednoduchostí, nízkou cenou a vysokou spolehlivostí flexibilního systému využívající pouze dvě pohyblivé části (peristaltické čerpadlo, autosampler). SFA dosáhla svého vrcholu v osmdesátých letech v důsledku přechodu na vysoce automatizované systémy vyžadující menší zapojení operátora a nižší spotřebu činidel. SFA je v dnešní době využívána k analýze půdních a rostlinných extraktů, tabáku, potravin a nápojů [7].

Mezi první generaci průtokových technik patří průtoková injekční analýza. Základní komponenty se prakticky neliší od komponentů techniky SFA. Rozdílem mezi SFA a FIA je v rozdílném proudění. Vzhledem k použití hadiček s menším průměrem dochází u FIA k laminárnímu proudění, zatímco u SFA dochází k turbulentnímu proudění. Dalším rozdílem je, že u FIA nedochází ke vzduchovému segmentování [8].

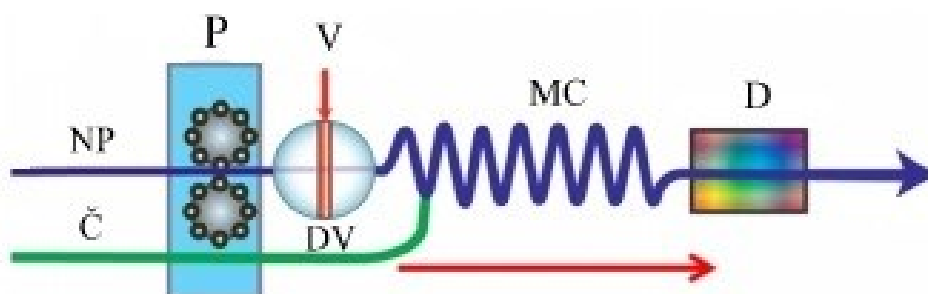
Druhou generací průtokových technik je sekvenční injekční analýza. Tato technika pracuje jednodušším a ekonomičtějším způsobem než technika FIA a to především díky výraznému snížení spotřeby vzorku a činidel. Jednosměrný kontinuální tok, který je využíván u FIA, byl nahrazen diskontinuálním obousměrným tokem, což má za následek lepší disperzi vzorku a činidla [8].

V analýzách s omezeným objemem reakčních činidel, při manipulaci s vysoce nebezpečnými chemikáliemi nebo kdy je produkce odpadu kritickým parametrem, je nutností další omezení manipulace s roztokem. Za účelem překonání těchto nedostatků byly vyvinuty techniky tzv. třetí generace SIA-Lab-on-valve a mikroSIA-Lab-on-valve [9].

2.1.1 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza byla popsána v roce 1975 E. Hansenem a J. Růžičkou. Rychlý a intenzivní vývoj této metody byl způsoben několika faktory nezbytnými pro rutinní analytická stanovení, jako je například velmi omezená spotřeba vzorku, krátká doba analýzy založená na měření signálu v průtokovém detektoru a fyzikálně-chemická přeměna analytů na detekovatelnou formu [10].

FIA je založena na vstřikování kapalného vzorku do kontinuálního proudu nosné kapaliny. Vstřikovaný vzorek tvoří zónu, která je v nosné kapalině rozmývána a následně transportována směrem k detektoru, který průběžně zaznamenává signál. Analytickým signálem je pík. Jeho výška, šířka nebo plocha odpovídá koncentraci analytu ve vzorku. Časové rozpětí od nadávkování vzorku po maximální hodnotu píku je doba, během níž probíhá chemická reakce. Tok kapaliny je zajišťován pomocí peristaltického čerpadla [11]. Schéma aparatury pro FIA je zobrazeno na Obr. 2.2.



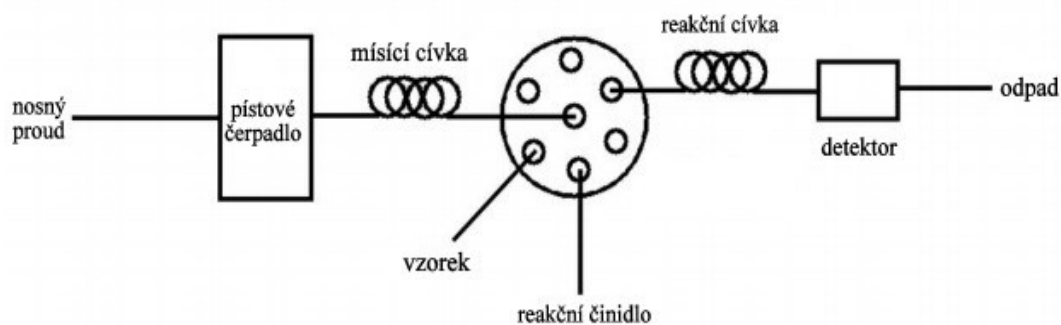
Obr. 2.2: Schéma aparatury pro průtokovou injekční analýzu (převzato a upraveno z [12])
(Č – činidlo, NP – nosný proud, V – vzorek, DV – dávkovací ventil, P – peristaltické čerpadlo, MC – mísící cívka, D – detektor)

Ve srovnání s jinými technikami je výhodou FIA techniky její rychlost, citlivost, stabilita, přesnost a nízký požadavek na objem vzorku [13]. Bylo prokázáno, že FIA je výkonným nástrojem pro monitorování a řízení průmyslových procesů. Tuto techniku lze využít pro specifické účely v různých průmyslových odvětvích jako je např. chemický průmysl, biotechnologie, potravinářský a nápojový průmysl a kontrola odpadních vod [7].

2.1.2 Sekvenční injekční analýza

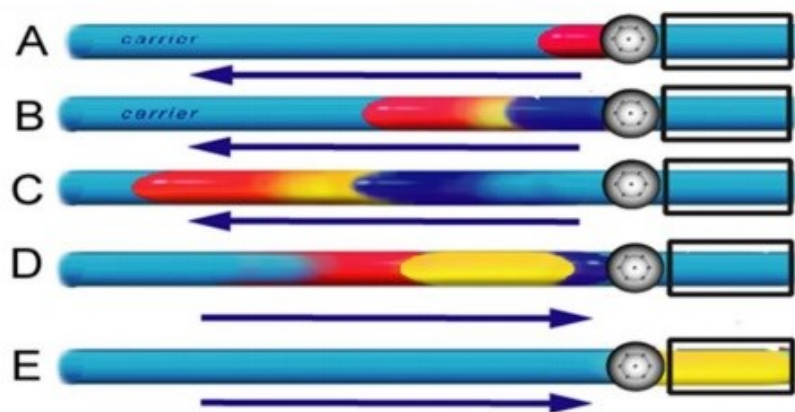
Sekvenční injekční analýza byla poprvé představena v roce 1990 Růžičkou a Marshalllem z Washingtonské univerzity [14]. V zásadě je SIA založena na stejných principech jako FIA [15], avšak hlavním cílem bylo odstranění nedostatků a nevýhod techniky FIA, a to především nepřetržitou spotřebu činidel v průběhu chemické analýzy [16]. U FIA dochází během jednoho měření ke spotřebě alespoň 1 ml činidla za minutu, když to SIA obvykle využívá 50 μ l činidla. Hlavní výhodou SIA je tedy nižší spotřeba činidel a tím pádem i menší množství vyprodukovaného odpadu. Další výhodou SIA je plná automatizace systému, rychlost, jednoduchost a flexibilita [17].

Aparatura SIA, která je zobrazena na Obr. 2.3 se skládá z vícecestného selekčního ventilu, jednokanálového dvousměrného pístového čerpadla, mísící (zadržovací) cívky, spojovacího materiálu (obvykle plastické hadičky), detektoru a řídicího počítače [18]. Výběr detektoru v SIA závisí na typu chemické reakce použité ke stanovení analytu. Nejčastěji využívanými detektory jsou spektrofotometrické, elektrochemické a spektrofluorimetrické [19].



Obr. 2.3: Schéma aparatury pro sekvenční injekční analýzu (převzato a upraveno z [20])

Technika FIA a SIA se liší geometrií nosného proudu. FIA využívá kontinuální jednosměrný tok nosné kapaliny, oproti tomu SIA využívá diskontinuální obousměrný tok, který je naprogramovaný počítačem a tím je dosaženo vyššího stupně konverze na produkt [21]. Na Obr. 2.4 jsou znázorněny jednotlivé fáze analýzy.



Obr. 2.4: Fáze analýzy při SIA (převzato z [22])

Ve fázi A dochází k nasávání roztoku analytu (červená zóna) vysoce přesným pístovým čerpadlem přes vícecestný selekční ventil do mísící cívky. Ve fázi B je selekční ventil přepnut do další pozice a dochází k nasátí reakčního činidla (tmavě modrá zóna). Ve fázi C dochází ke vzniku produktů (žlutá zóna) díky promísení jednotlivých zón. Následně je tok nosné kapaliny obrácen, čímž dochází k dalšímu mísení a selekční ventil je přepnut směrem k detektoru (fáze D). V konečné fázi E jsou reakční produkty vedeny do průtokové cely, kde je zaznamenán signál [23].

Vzhledem k možnosti analyzovat velké série vzorků a sledovat změny koncentrace analytu v průběhu procesů, je technika SIA vhodná k rutinním analýzám potravin, krve, moči a monitorování hladin léčiv a jejich metabolitů [18]. Dále je díky své robustnosti využívána k provádění dlouhodobého stanovení, například při monitorování průmyslových procesů [24, 25]. Univerzálnost SIA umožňuje automatizovat různé kroky analytického postupu, například ředění vzorku, automatickou kalibraci, extrakci kapalina-kapalina a dialýzu [26].

2.2 Luminiscence

Pojem luminiscence (česky světélkování) byl poprvé použit a formulován v roce 1888 německým fyzikem Eilhardtem Wiedemannem [27]. Luminiscence je často označována jako „studené světlo“, jelikož luminiscenční záření mohou emitovat látky nezávisle na jejich teplotě. Ve většině případů roste síla luminiscence s klesající teplotou. Luminiscence zahrnuje jak fluorescenci, tak fosforescenci. Fluorescence je druh

„studeného světla“, které po ukončení budícího působení ihned vymizí, zatímco fosforescence je dlouhotrvající, její intenzita klesá postupně. Fluorescence může být také definována jako luminiscence v průběhu působení excitace a fosforescence jako luminiscence po ukončení excitace [28]. Druhy luminiscence jsou rozdělovány na základě budící energie (viz Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Rozdělení luminiscenčních dějů podle typu budící energie [29]

Druh luminiscence	Budící energie
Radioluminiscence	krátkovlnné elektromagnetické záření
Termoluminiscence	tepelná
Elektroluminiscence	Elektrická
Katodová luminiscence	elektrony urychlené v elektrickém poli
Triboluminiscence	mechanická – tření, stlačování
Chemiluminiscence	chemická reakční
Fotoluminiscence	světelné záření popř. UV záření
Sonoluminiscence	Ultrazvuk

Luminiscenční látky, které přeměňují různé druhy energie v energii světelnou, se nazývají luminofory (dříve také fosfory). Luminofory mohou být rozděleny například na fotoluminofory, elektroluminofory a katodoluminofory [30]. Mezi tyto látky lze zařadit například fosfor, soli lehkých kovů (sulfid zinečnatý, sulfid vápenatý, chlorid sodný) a krystalické látky aktivované příměsmi těžkých kovů (měď, mangan, olovo) [31].

Organické látky jako aromatické uhlovodíky a organická barviva vykazují luminiscenci. Luminiscenci mohou vykazovat i látky anorganické (polovodiče, iontové krystaly), avšak příčina luminiscence v obou případech je značně odlišná. Nositel luminiscenčního záření v organických látkách je molekula. Tudíž má luminiscenční záření podobné rysy (spektrální složení a dobu dohasínání), jak v krystalickém stavu, tak i v roztoku. U organických látek je možné odvodit základní rysy luminiscence z energetické struktury z komplikovaných organických molekul. U anorganických látek

v pevném stavu je luminiscence podmíněna schopností vytvoření souboru o desítkách atomů (tzv. klastr) [32].

Luminiscence je využívána v zářivkách (fluorescenční lampy), v různých druzích obrazovek, ve scintilačních detektorech a laserech [30].

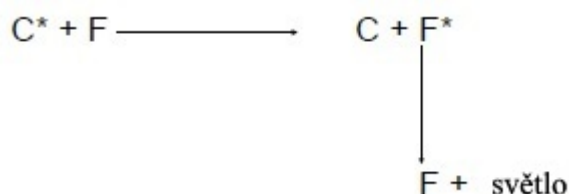
2.2.1 Chemiluminiscence

Chemiluminiscence (CL) je jev, při kterém v důsledku chemické reakce dochází k emisi elektromagnetického záření ve formě světla. Tato reakce nastává při přechodu molekuly z energeticky bohatého excitovaného stavu do základního stavu [33]. Světlo může být emitováno ve viditelné, ultrafialové a infračervené oblasti [34]. Měření světla z chemické reakce může být velmi užitečné, jelikož za vhodných experimentálních podmínek je intenzita výstupního světla přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku, což umožňuje přesnou a citlivou kvantitativní analýzu [35]. Obecné schéma CL reakce je prezentováno na Obr. 2.5.



Obr. 2.5: Přímá deexcitace (převzato a upraveno z [34])

kde (*) značí elektronově excitovaný stav. Excitovaný produkt (C*) se může energie zbavit různými pochody. V prvním případě dochází k emitaci energie ve formě fotonů při přechodu do základního stavu (přímá deexcitace - viz Obr. 2.5). V druhém případě přenáší excitovaný produkt svoji přebytečnou energii na vhodný flouorfor přidaný do systému, který energii pojme a následně vyzáří (nepřímá deexcitace - viz Obr. 2.6) [34].



Obr. 2.6: Nepřímá deexcitace (převzato a upraveno z [34])

V současné době je známo mnoho anorganických a organických CL reakcí. CL reakcí se v případě anorganických sloučenin mohou účastnit prvky ze skupiny alkalických kovů, těžké kovy, jako je rtuť a olovo, ale také nekovy, jako jsou kyslík, síra, dusík a halogeny. Sloučeniny křemíku, který následuje ve IV. skupině periodické tabulky po uhlíku, mohou také vyvolávat chemiluminiscenci. Rovněž jsou známé CL reakce v plynné fázi kovových par, jako například alkalických kovů ve směsi s halogeny. CL je také zodpovědná za emisi světla v různých plamenech, například sulfanu, sirouhlíku nebo oxidu uhelnatého spalovaného ve vzduchu nebo kyslíku [36].

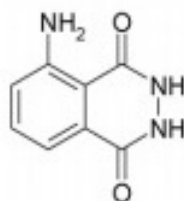
Organické CL reakce mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin. První skupinou jsou oxidační reakce vyžadující kyslík nebo nějaký z jeho metabolitů a druhou skupinou jsou reakce vyžadující přenos elektronů, obzvláště reakce zahrnující radikály a jejich přeměny. Mezi organické reakce patří dvě zvláště dobře studované reakce, oxidace luminolu a akridinových solí vyzařující modré až modro-zelené světlo. Další reakcí je oxidace pyrogallolu produkující červené světlo. Kvantový výtěžek a barva mohou být výrazně ovlivněny polaritou rozpouštědla. Například luminol oxidovaný ve vodném alkalickém roztoku emituje modro-fialové světlo, zatímco při použití dimethylsulfoxidu, je světlo modro-zelené [36].

Při CL není na rozdíl od fotoluminiscenčních a absorpčních technik vyžadován zdroj excitačního světla, což má za následek nižší signály pozadí, nízké limity detekce a široké dynamické rozsahy [35]. Z analytického hlediska jsou CL reakce využívány díky vysoké citlivosti, rychlejší reakční rychlosti a často vysoké selektivitě ke stanovení environmentálních polutantů, vitamínů, proteinů a nukleových kyselin [37].

2.3 Luminol

Luminol (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion) je žlutá až nahnědlá krystalická látka omezeně rozpustná ve vodě [28]. Je důležitou a nejběžněji používanou

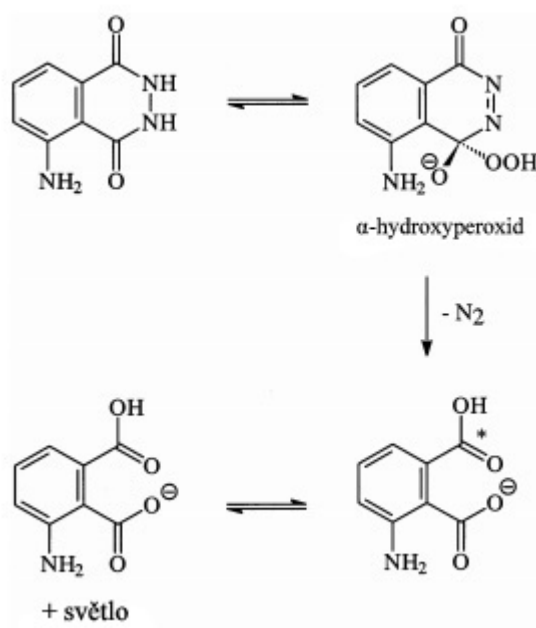
chemiluminiscenční látkou. Strukturální vzorec luminolu je zobrazen na Obr. 2.7. Luminol se v současné době používá ke stanovení iontů těžkých kovů, peroxidů a různých organických sloučenin, dále je používán v soudním lékařství a farmaceutickém průmyslu [38].



Obr. 2.7: Strukturální vzorec luminolu (převzato z [39])

Chemiluminiscence luminolu byla poprvé popsána v roce 1928 německým chemikem H. O. Albrechtem [40]. Reakční mechanismus chemiluminiscence je založen na oxidaci luminolu oxidačním činidlem (nejčastěji H_2O_2) za přítomnosti katalyzátoru (enzymy, ionty přechodných kovů - Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} nebo jejich komplexy) v alkalickém prostředí, což vede k emisi světla v rozmezí 425 – 435 nm [41, 42].

Klíčovým meziproduktem chemiluminiscenční reakce je α -hydroxyperoxid získaný oxidací heterocyklického kruhu. Jeho rozklad vede ke vzniku 3-aminoftalátu, přičemž dochází k emisi modrého světla (viz Obr. 2.8) [43].



Obr. 2.8: Zjednodušený reakční mechanismus luminolu (převzato a upraveno z [43])

Rozklad meziproduktu vedoucí k excitovanému stavu a následné emisi světla je unikátní a závisí výhradně na pH systému. V aprotickém rozpouštědle (dimethylsulfoxid, dimethylformamid) je vyžadován pouze kyslík a silná báze k zahájení chemiluminiscenční reakce. V protickém rozpouštědle (voda, vodné roztoky, nižší alkoholy) může být luminol oxidován různými molekulami obsahující kyslík (molekulární kyslík, peroxidy, superoxidový anion), avšak podmínkou je přítomnost enzymu nebo minerálního katalyzátoru [43, 44].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a vybavení

- Spektrofluorimetr AMINCO-Bowman Series 2 (Thermo Electron Corp., USA)
- FIALab - 3500 Sequential and Flow Injection Analyzer (FIALab, USA)
- Peristaltické čerpadlo Masterflex L/S (Cole-Parmer Instrument Company, USA)
- Peristaltické čerpadlo REGLO - CPF Digital (Ismatec, USA)
- Analytické váhy 2004 MP (Sartorius, Česká republika)
- Laboratorní váhy EW600-2M (Gottl. KERN & Sohn GmbH, Německo)
- pH-metr AD1000 (Adwa, Maďarsko)
- MilliporeMili plus Q systém (USA)
- Tygonové hadičky o vnitřním průměru 1,42 mm (Ismatec, USA)
- Dávkovací cívky o objemech 100; 200; 250; 500 a 1000 μL
- Šesticestný a osmicestý dávkovací ventil

3.2 Použité chemikálie

- Luminol (3-aminophthalhydrazide), čistota 97 % (Sigma - Aldrich, USA)
- H_2O_2 , roztok 30 %, p. a. (Analytika, Česká republika)
- HNO_3 , roztok 65 %, p. a. (Lach-Ner Neratovice, Česká republika)
- HCl , roztok 34 - 37 %, ANALPURE® (Analytika, Česká republika)
- NaOH , perly č. (Lach-Ner Neratovice, Česká republika)
- Na_2CO_3 , bezvodý, p. a. (Penta, Česká republika)
- NaHCO_3 , pevný, p. a. (Penta, Česká republika)
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pevný, p. a. (Lach-Ner Neratovice, Česká republika)
- $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pevný, p. a. (Lachema Brno, Česká republika)

- Roztoky iontů Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} o koncentraci 500 mg L^{-1} , připraveny rozpuštěním pevných solí $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Lachema Brno, Česká republika)
- Roztok iontů Cr^{3+} o koncentraci 500 mg L^{-1} , připraven rozpuštěním pevné soli $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (P.P.H. „POCh“, Polsko)
- Roztok iontů Cu^{2+} o koncentraci 500 mg L^{-1} , připraven rozpuštěním pevné soli $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Lach-Ner Neratovice, Česká republika)
- Roztok iontů Ag^+ o koncentraci 500 mg L^{-1} , připraven rozpuštěním pevné soli AgNO_3 (Safina Vestec, Česká republika)
- Deionizovaná voda, která neměla odpor menší než $18,2 \text{ M}\Omega$

3.3 Příprava roztoků

- *Příprava 100 mL 16,9 mmol L⁻¹ roztoku luminolu v uhličitanovém pufru o pH 9,0:*

Roztok luminolu v uhličitanovém pufru byl připraven dle experimentu O. Šimůnka [45]. V 60 mL deionizované vody bylo nejprve rozpuštěno 0,4 g uhličitanu sodného a 0,3 g luminolu, poté přidáno 2,4 g hydrogenuhličitanu sodného a 5 g uhličitanu amonného. S ohledem na rozpustnost luminolu při daném pH, bylo potřeba přidávat látky v přesně daném pořadí. Vše bylo důkladně promícháno a doplněno po rysku deionizovanou vodou. Výsledné pH připraveného roztoku bylo 8,9, přičemž na dně bylo pozorováno zbylé množství nerozpuštěného luminolu. Za stálého míchání a měření pH-metrem bylo přidávkem pevného hydroxidu sodného upraveno pH na požadovanou hodnotu. Při optimalizaci pH roztoku luminolu bylo zjištěno, že se zvyšujícím se pH rozpustnost luminolu stoupá.
- *Příprava 100 mL 0,5% roztoku peroxidu vodíku:*

Do 100mL odměrné baňky bylo pomocí automatické pipety odpipetováno 1,67 mL 30% peroxidu vodíku, doplněno po rysku deionizovanou vodou a důkladně promícháno.

- *Příprava 100 mL standardního roztoku kobaltnatých iontů o koncentraci 1000 mg L⁻¹:*

Bylo naváženo 0,48 g síranu kobaltnatého a kvantitativně převedeno do 100mL odměrné baňky. Roztok byl doplněn po rysku deionizovanou vodou a důkladně promíchán.

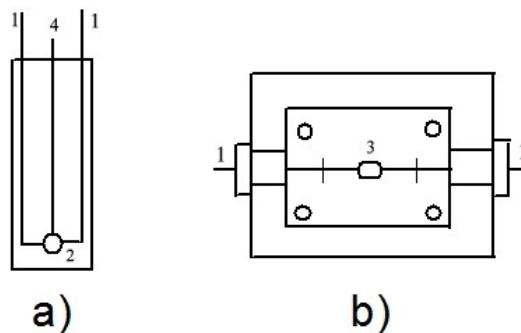
3.4 Experimentální uspořádání pro detekci záření

V prvotních experimentech byla využita kontinuální průtoková analýza (CFA), kdy jednotlivé roztoky byly zaváděny samostatně pomocí peristaltické pumpy. K dávkování roztoku kobaltnatých iontů nebyl využit šesticestný dávkovací ventil, nýbrž byl tento roztok zaváděn kontinuálně pomocí peristaltické pumpy.

Pro první experiment byla využita skleněná kyveta, na jejíž dno byly přiváděny roztoky pomocí hadiček, přičemž roztoky kobaltnatých iontů a luminolu byly míseny před vstupem do kyvety. Zároveň byla do kyvety zavedena i odpadní hadička. Dalším experimentem bylo využití různých skleněných trubic (L-trubice, Y-trubice, T-trubice, krátká rovná trubice), na jejichž začátek byly napojeny hadičky pro přívod roztoků a na konec těchto trubic byla připojena odpadní hadička. Stejně jako při prvním experimentu byly roztoky kobaltnatých iontů a luminolu míseny před vstupem do trubice. Ve všech uvedených případech docházelo k chemiluminiscenční reakci mimo optickou dráhu detektoru.

Díky těmto experimentům bylo zjištěno, že prostor, ve kterém dochází k chemiluminiscenční reakci musí být dostatečně malý, aby došlo k dokonalému promíchání roztoků a aby došlo k promíchání okamžitě na začátku spoje. Zároveň nesmí docházet k turbulentnímu víření, které vytváří velký šum základní linie.

Po těchto experimentech byly v laboratoři zkonstruovány dvě průtokové detekční cely o rozměrech 5 cm, které jsou zobrazeny na Obr. 3.1. U těchto průtokových detekčních cel byl pozorován problém spočívající v netěsnosti mezi přívodními hadičkami a vlastním materiálem detekční cely (plexisklo). V obou případech byl pozorován velmi nízký signál, opět především kvůli nevhodné geometrii. Z těchto důvodů nebyly tyto detekční cely dále využity k vlastnímu měření.

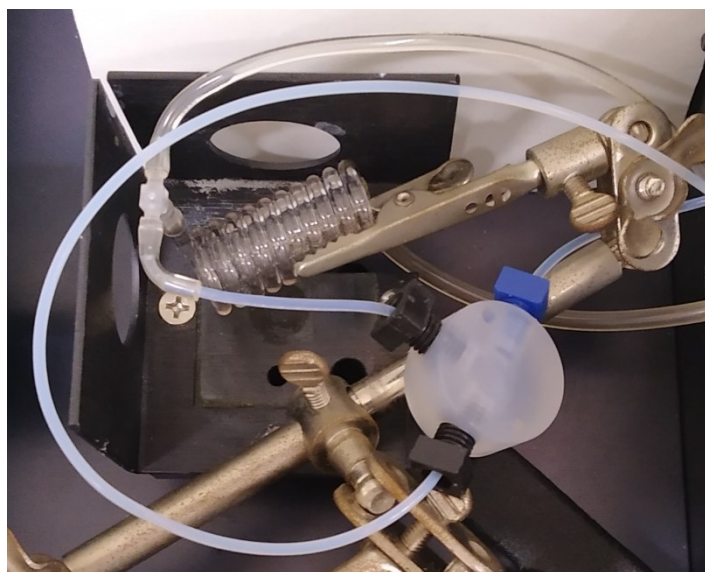


Obr. 3.1: Průtokové detekční cely

a) průtoková detekční cely z plexiskla (pohled z boku), b) průtoková detekční cely z teflonu s vrchní destičkou z plexiskla (pohled shora)

(1 – přívodní hadičky pro reakční činidla, 2 – místo pro chemiluminiscenční reakci, 3 – místo pro chemiluminiscenční reakci s hadičkou pro odvod odpadu ve spodní části destičky, 4 – hadička pro odvod odpadu)

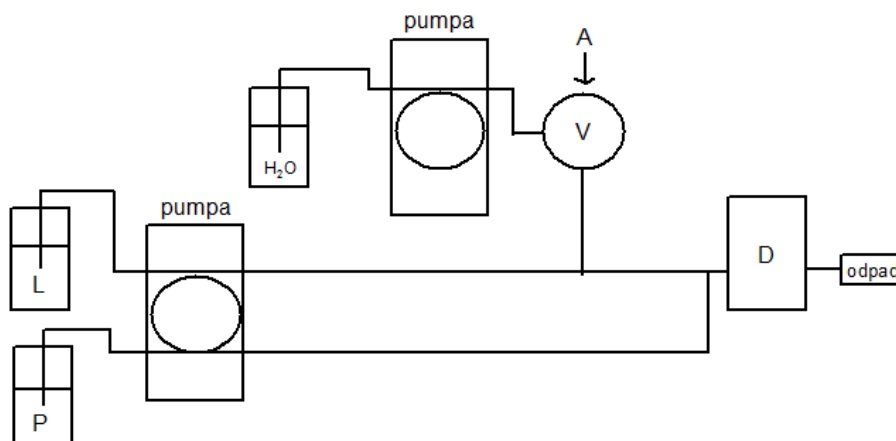
Posledním experimentem bylo využití skleněné spirálovité trubice o délce 5 cm a průměru 1 cm (Obr. 3.2) s dostatečně úzkým prostorem pro dokonalé promíchání roztoků. K chemiluminiscenční reakci docházelo na začátku této trubice v optické dráze detektoru a zároveň byl poskytnut dostatečně stabilní signál. Toto experimentální uspořádání pro detekci záření bylo zvoleno pro vlastní měření.



Obr. 3.2: Experimentální uspořádání pro detekci záření využité k vlastnímu měření

3.5 Aparatura použita pro FIA

Ke stanovení analytu (kobaltnatých iontů) technikou FIA s chemiluminiscenční detekcí byla sestavena aparatura, která je znázorněna na Obr. 3.3.



Obr. 3.3: Schéma FIA aparatury pro měření intenzity chemiluminiscenčního záření (*L* – roztok luminolu, *P* – roztok peroxidu vodíku, *A* – přívod analytu, *H₂O* – deionizovaná voda, *V* – šesticestný dávkovací ventil, *D* – spektrofluorimetrický detektor)

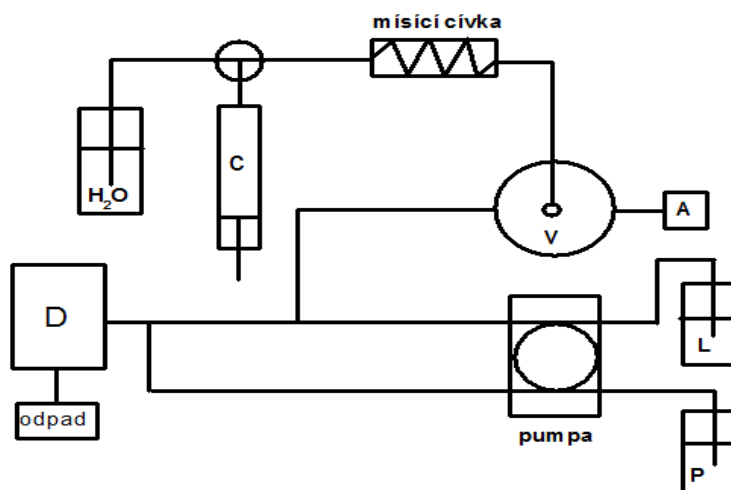
Analyt je v tomto uspořádání dávkován do nosného toku vody šesticestným dávkovacím ventilem. Před průtokovou detekční celou je zaváděn roztok luminolu, který je v tomto místě promíchán s analytem dávkovaným do nosného proudu. Směs luminolu s analytem je vedena do průtokové detekční cely, kde je do optické dráhy zaváděn roztok peroxidu vodíku po směru proudu. Při smíchání směsi s roztokem peroxidu vodíku dochází k oxidaci a následné excitaci luminolu. Při přechodu luminolu do základního energetického stavu dojde k emisi záření o vlnové délce s maximem při 425 nm, které je detekováno spektrofluorimetricky. Kobaltnaté ionty slouží při reakci jako katalyzátor.

3.6 Aparatura použita pro SIA

Ke stanovení analytu (kobaltnatých iontů) technikou SIA s chemiluminiscenční detekcí byla využita komerční aparatura s názvem FIALab-3500. Byl proveden experiment, při němž bylo měněno uspořádání SIA aparatury a jeho cílem bylo porovnat,

při jakém uspořádání bude dosaženo nejnižší meze detekce a nejvyšší citlivosti pro stanovení kobaltnatých iontů.

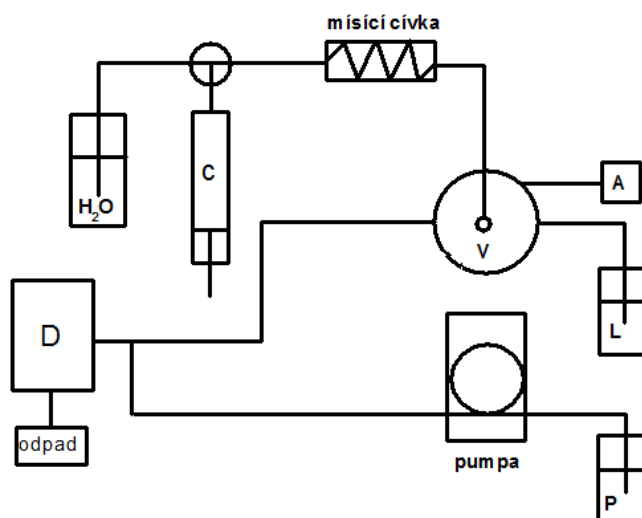
První uspořádání je zobrazeno na Obr. 3.4. V tomto uspořádání je do mísicí cívky nasáván přesně definovaný objem analytu pomocí pístového čerpadla a vhodné polohy osmicestného selekčního ventilu. Následně je analyt pomocí obráceného pohybu pístového čerpadla transportován přes selekční ventil do optické dráhy detektoru. V tomto okamžiku dochází ke spuštění peristaltického čerpadla, které čerpá roztok peroxidu vodíku a luminolu o vhodné koncentraci do optické dráhy a dochází k chemiluminiscenční reakci.



Obr. 3.4: Uspořádání SIA aparatury č. 1

(L – roztok luminolu, P – roztok peroxidu vodíku, H_2O – deionizovaná voda, A – analyt, D – detektor, V – osmicestný selekční ventil, C – pístové čerpadlo)

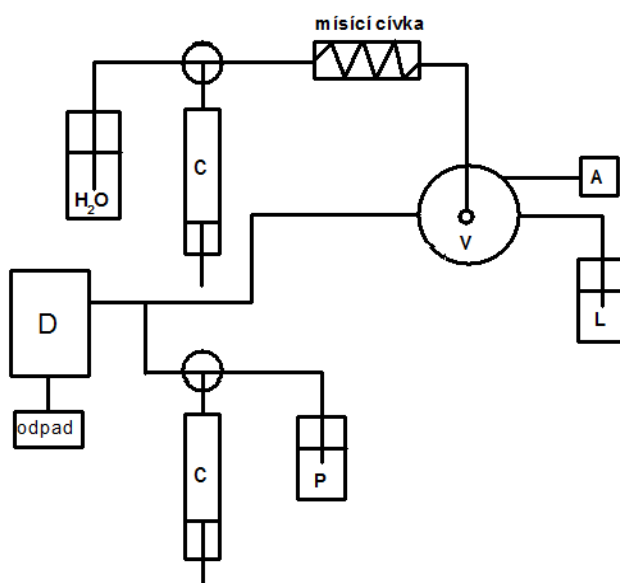
Při druhém uspořádání (viz Obr. 3.5) je do mísicí cívky nasáván nejprve definovaný objem analytu a následně definovaný objem roztoku luminolu. Obrácením pohybu pístového čerpadla dochází k promísení zón analytu a roztoku luminolu a následně je tato směs transportována k detektoru. Roztok peroxidu vodíku je stejně jako v předchozím uspořádání přiváděn pomocí peristaltického čerpadla.



Obr. 3.5: Uspořádání SIA aparatury č. 2

(*L* – roztok luminolu, *P* – roztok peroxidu vodíku, *H₂O* – deionizovaná voda, *A* – analyt, *D* – detektor, *V* – osmicestný selekční ventil, *C* – pístové čerpadlo)

Při třetím uspořádání (viz Obr. 3.6) je roztok luminolu a analytu přiváděn k detektoru stejným způsobem jako u druhého uspořádání. K čerpání roztoku peroxidu vodíku je využito druhé pístové čerpadlo. Toto čerpadlo je naprogramováno tak, aby byl roztok peroxidu vodíku vytlačen k detektoru ve stejný okamžik, kdy dochází k obrácení pohybu prvního pístového čerpadla, které transportuje směs roztoku luminolu a analytu.



Obr. 3.6: Uspořádání SIA aparatury č. 3

(*L* – roztok luminolu, *P* – roztok peroxidu vodíku, *H₂O* – deionizovaná voda, *A* – analyt, *D* – detektor, *V* – osmicestný selekční ventil, *C* – pístové čerpadlo)

3.7 Statistické zpracování výsledků

V rámci této diplomové práce bylo každé měření prováděno pětkrát, aby byla zajištěna dostatečná přesnost měření. Z těchto hodnot byl zvolen medián, který odpovídá střední hodnotě z naměřených signálů. Následně byla vypočtena směrodatná odchylka ze všech naměřených hodnot, která znázorňuje chybové úsečky v grafickém zobrazení.

Medián

Medián je označován jako střední hodnota z výsledků měření seřazených podle velikosti. Přičemž při lichém počtu naměřených výsledků je medián určen jako střední hodnota. U sudého počtu je medián určen jako průměr dvou prostředních hodnot [46].

Odhad směrodatné odchylky

Směrodatnou odchylku lze charakterizovat jako šířku intervalu (vychýlení od střední hodnoty), ve které se nacházejí výsledky z opakovaného měření [46]. K odhadu směrodatné odchylky pro nízký počet měření lze využít vztah:

$$s = k_n \cdot R$$

kde k_n je tabelovaný koeficient pro daný počet měření a R představuje rozpětí výsledků (rozdíl mezi největší a nejmenší naměřenou hodnotou).

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) jsou termíny používané k popisu nejnižší koncentrace měřené veličiny, kterou lze s určitou spolehlivostí změřit analytickým postupem [47]. LOD je nejnižší koncentrace analytu vyvolávající odezvu měřícího zařízení a jejíž signál je statisticky odlišný od šumu. LOD lze vypočítat z následujícího vztahu:

$$LOD = \frac{3 * s}{a}$$

kde s značí směrodatnou odchylku šumu, a značí směrnici kalibrační přímky.

LOQ je nejnižší koncentrace, při které lze analyt s definovanou přesností kvantitativně stanovit. LOQ lze vypočítat z následujícího vztahu:

$$LOQ = \frac{10 * s}{a}$$

kde s značí směrodatnou odchylku šumu, a značí směrnici kalibrační přímky.

Citlivost

Citlivost je míra schopnosti dané analytické metody rozlišit dvě koncentrace. Citlivost analytické metoda je u metod s dostatečně lineární kalibrační závislostí popsána směrnici kalibrační přímky. Pokud není kalibrační závislost lineární, může se měnit citlivost s koncentrací analytu [48].

Opakovatelnost

Opakovatelnost je vyjádřena jako těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření totožného analytu, které jsou provedeny stejnou metodu, stejným operátorem, na stejném měřicím systému, na stejném místě a za stejných podmínek v krátkém časovém úseku. Opakovatelnost není vlastností výsledku, ale metody [48]. Opakovatelnost lze vypočíst ze vztahu pro relativní směrodatnou odchylku:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}$$

Relativní směrodatná odchylka je dána podílem směrodatné odchylky a mediánu.

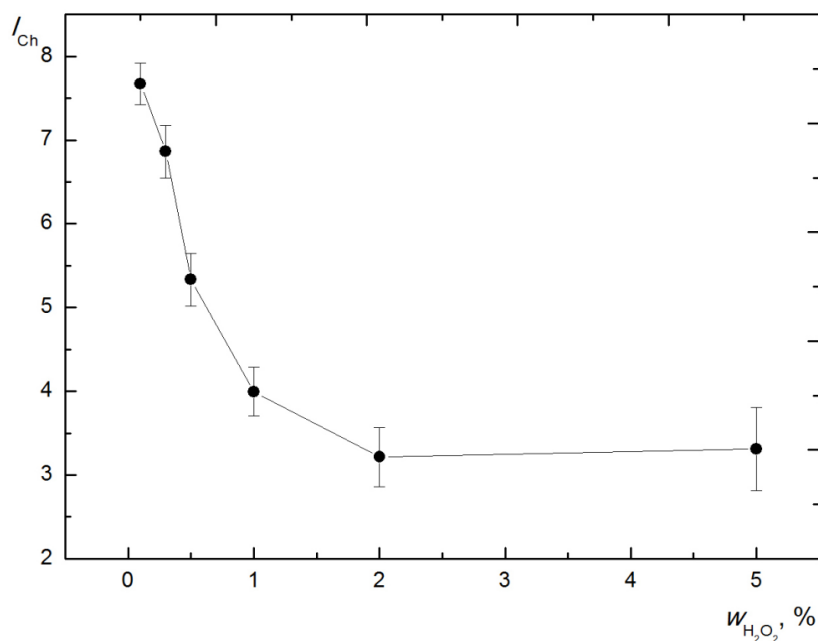
4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

4.1 Optimalizace experimentálních parametrů (FIA)

V této části diplomové práce byla pozornost věnována optimalizaci experimentálních parametrů pro dosažení maximální citlivosti stanovení. Optimalizována byla objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku, luminolu a analytu. Dále pak hmotnostní procento roztoku peroxidu vodíku a koncentrace roztoku luminolu. V neposlední řadě byl optimalizován dávkovaný objem roztoku analytu a pH roztoku luminolu.

4.1.1 Hmotnostní procento roztoku peroxidu vodíku

Pro tuto optimalizaci bylo připraveno šest roztoků peroxidu vodíku o hmotnostním procentu 0,10; 0,30; 0,50; 1,0; 2,0; 5,0 %. Tyto roztoky byly postupně proměřeny, přičemž ostatní parametry zůstaly neměnné (viz Obr. 4.1). Byla měřena závislost intenzity záření na hmotnostním procentu peroxidu vodíku. Výsledné hodnoty intenzity záření jsou uvedeny na Obr. 4.1. Mezi jednotlivá měření byl zařazen promývací krok zředěnou kyselinou dusičnou (1:1) a následně deionizovanou vodou, čímž bylo dosaženo lepší opakovatelnosti měření.



Obr. 4.1: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na hmotnostním procentu roztoku peroxidu vodíku

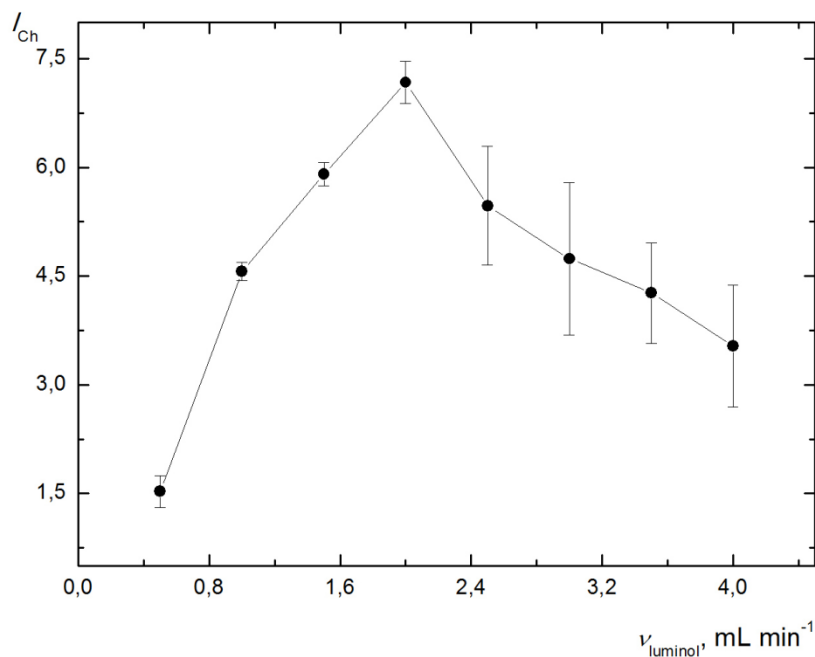
$V_{(Co^{2+})} = 100 \mu L$; $c(Co^{2+}) = 1000 \text{ mg } L^{-1}$; $c(\text{luminol}) = 16,9 \text{ mmol } L^{-1}$; $pH = 9,0$;
 $v(\text{luminol}) = 1,5 \text{ mL } min^{-1}$; $v(H_2O_2) = 1,5 \text{ mL } min^{-1}$; $v(H_2O) = v(Co^{2+}) = 1,5 \text{ mL } min^{-1}$

Z uvedeného grafu je patrné, že intenzita záření se zvyšujícím se hmotnostním procentem peroxidu vodíku klesá. Po tomto experimentu byl z ekonomických důvodů připraven roztok luminolu o poloviční koncentraci ($8,47 \text{ mmol } L^{-1}$) a za stejných podmínek byly proměřeny dva roztoky peroxidu vodíku, při nichž bylo dosaženo nejvyšší intenzity záření (0,1 % a 0,3 %). Pro vlastní měření byl zvolen 0,3% roztok peroxidu vodíku, který poskytoval nižší, avšak stabilnější signál. Pro 0,3% roztok byla směrodatná odchylka 0,18 % a pro 0,1% roztok 0,32 %.

4.1.2 Objemová průtoková rychlost roztoku luminolu

Po zvolení vhodného hmotnostního procenta roztoku peroxidu vodíku byla volena různá objemová průtoková rychlost roztoku luminolu v rozmezí $0,5 - 4,0 \text{ mL } min^{-1}$. Vzhledem k dostatečné intenzitě záření byl nadále používán roztok luminolu o poloviční koncentraci ($8,47 \text{ mmol } L^{-1}$). K dispozici byly dvě peristaltické pumpy, přičemž jedna čerpala roztok peroxidu vodíku a vodu, která sloužila jako nosná kapalina pro analyt

(kobaltnaté ionty) a druhá čerpala roztok luminolu, u kterého byla měněna objemová průtoková rychlost. Výsledné hodnoty intenzity záření jsou uvedeny na Obr. 4.2.



Obr. 4.2: Závislost chemiluminiscenčního záření na objemové průtokové rychlosti roztoku luminolu

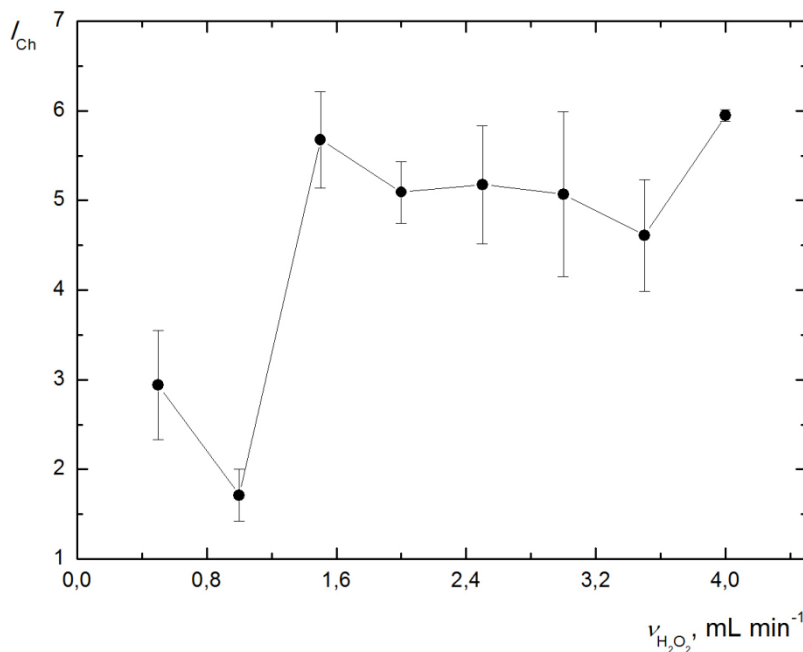
$$V(\text{Co}^{2+}) = 100 \mu\text{L}; c(\text{Co}^{2+}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}; c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}; 0,3\% \text{ H}_2\text{O}_2; \\ \text{pH} = 9,0; v(\text{H}_2\text{O}_2) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}; v(\text{H}_2\text{O}) = v(\text{Co}^{2+}) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$$

Z uvedeného grafu je patrné, že nejvyšší intenzity záření bylo dosaženo při objemové průtokové rychlosti $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. Avšak vzhledem k vyšší nestabilitě signálu, byla pro vlastní měření zvolena nižší objemová průtoková rychlost ($1,5 \text{ mL min}^{-1}$), při níž byl signál v podstatně stabilnější. Dále bylo zaznamenáno, že se zvyšující se objemovou průtokovou rychlostí, docházelo ke zvýšení směrodatné odchylky a tím pádem ke zhoršení opakovatelnosti měření.

4.1.3 Objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku

Dalším parametrem, který byl optimalizován, byla objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku. Byla volena různá objemová průtoková rychlost v rozmezí $0,5 - 4,0 \text{ mL min}^{-1}$. Jedna peristaltická pumpa čerpala vodu a roztok luminolu, jehož objemová průtoková rychlost byla optimalizovaná v předchozím experimentu.

Druhá pumpa sloužila k čerpání roztoku peroxidu vodíku, u kterého byla měněna objemová průtoková rychlost. Výsledné hodnoty intenzity záření jsou uvedeny na Obr. 4.3.



Obr. 4.3: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na objemové průtokové rychlosti roztoku peroxidu vodíku

$$V(Co^{2+}) = 100 \mu L; c(Co^{2+}) = 1000 \text{ mg } L^{-1}; c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol } L^{-1}; 0,3\% H_2O_2;$$

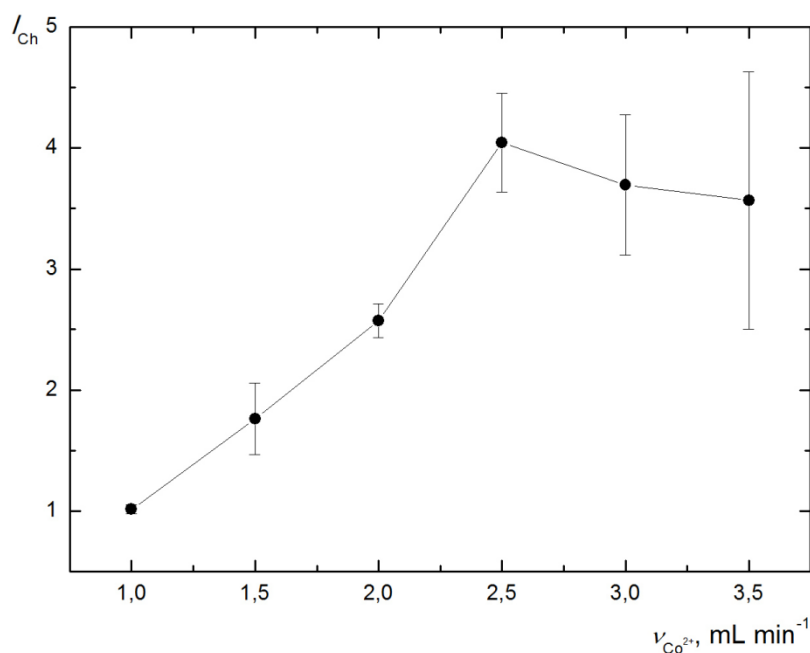
$$pH = 9,0; v(\text{luminol}) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}; v(H_2O) = v(Co^{2+}) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$$

Z grafu je patrné, že v rozmezí objemových průtokových rychlostí 1,5 – 4,0 mL min⁻¹ byla odezva poměrně stabilní, a tedy k vlastnímu měření byla z ekonomických důvodů zvolena objemová průtoková rychlost 1,5 mL min⁻¹.

4.1.4 Objemová průtoková rychlost roztoku kobaltnatých iontů

Pro optimalizaci tohoto parametru byla měněna objemová průtoková rychlost vody, což odpovídalo změně objemové průtokové rychlosti analytu (kobaltnatých iontů). Stejně jako v předchozích experimentech, byla první peristaltická pumpa využita pro čerpání již optimalizovaných objemových průtokových rychlostí roztoku luminolu a peroxidu vodíku (1,5 mL min⁻¹). Druhá pumpa čerpala vodu, u které byla měněna

objemová průtoková rychlost v rozmezí 0,5 – 3,5 mL min⁻¹. Výsledné hodnoty intenzity záření jsou uvedeny na Obr. 4.4.



Obr. 4.4: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na objemové průtokové rychlosti roztoku kobaltnatých iontů

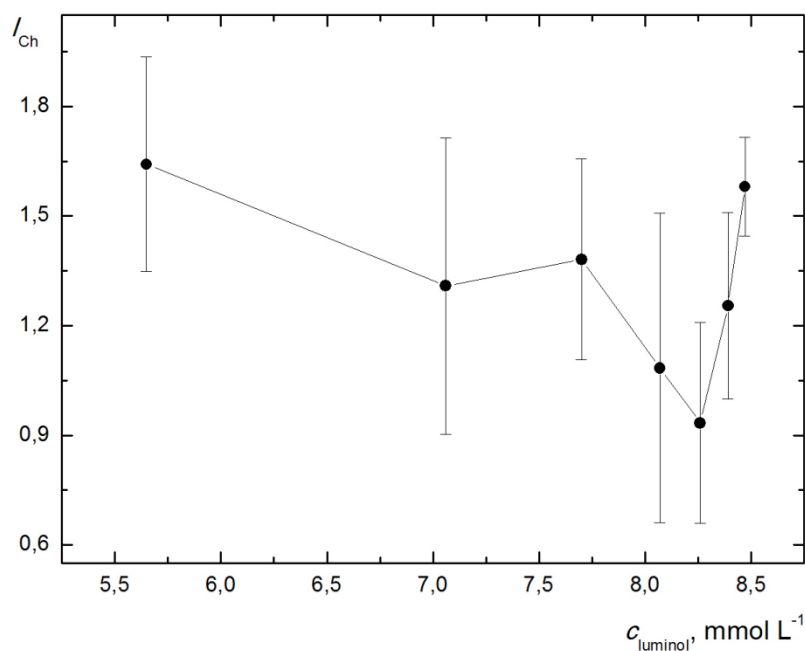
$$V(\text{Co}^{2+}) = 100 \mu\text{L}; c(\text{Co}^{2+}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}; c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}; 0,3\% \text{ H}_2\text{O}_2; \\ \text{pH} = 9,0; v(\text{luminol}) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}; v(\text{H}_2\text{O}_2) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$$

Z grafu je patrné, že v rozmezí objemových průtokových rychlostí 2,5 – 3,5 mL min⁻¹, byla pozorována poměrně stabilní odezva, přičemž však docházelo ke zhoršení opakovatelnosti s rostoucím průtokem a tudíž pro vlastní měření byla zvolena objemová průtoková rychlost 2,5 mL min⁻¹. Při nastavení objemové průtokové rychlosti na 0,5 mL min⁻¹ nedošlo k žádné odezvě detektoru. Při takto nízké objemové průtokové rychlosti se nejspíše roztoky dostatečně nepromísily a tím pádem nedošlo k dostatečnému vyzáření.

4.1.5 Koncentrace roztoku luminolu

Pro tuto optimalizaci byl připraven roztok luminolu o koncentraci 8,47 mmol L⁻¹, jehož ředěním bylo připraveno šest roztoků o koncentracích 8,39; 8,26; 8,07; 7,70; 7,06

a $5,65 \text{ mmol L}^{-1}$. Takto připravené roztoky byly postupně proměřeny od nejnižší koncentrace. Výsledné hodnoty intenzity záření jsou uvedeny na Obr. 4.5.

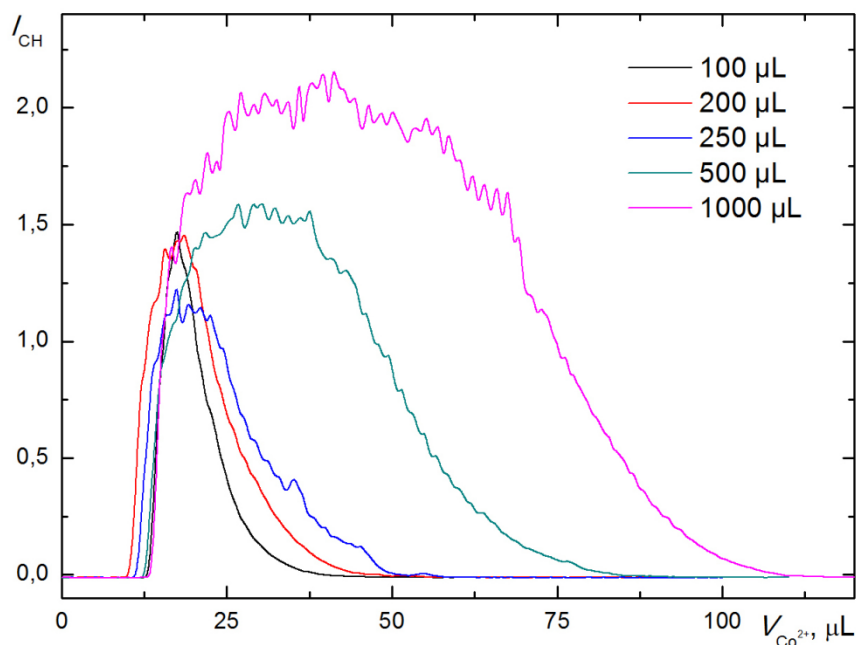


Obr. 4.5: Závislost chemiluminiscenčního záření na koncentraci roztoku luminolu
 $V(\text{Co}^{2+}) = 100 \mu\text{L}$; $c(\text{Co}^{2+}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}$; $0,3\% \text{ H}_2\text{O}_2$; $v(\text{luminol}) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$;
 $v(\text{H}_2\text{O}_2) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$; $v(\text{H}_2\text{O}) = v(\text{Co}^{2+}) = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$; $\text{pH} = 9,0$

Z grafu je patrné, že v rozmezí koncentrací $5,65 - 8,39 \text{ mmol L}^{-1}$ docházelo k nízké míře opakovatelnosti, a proto byl k vlastnímu měření použit původní roztok o koncentraci $8,47 \text{ mmol L}^{-1}$, který poskytoval značně stabilnější signál s nižší směrodatnou odchylkou.

4.1.6 Dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů

Předposledním experimentálním parametrem, který byl optimalizován, byl objem analytu dávkovaného do proudu nosné kapaliny. Bylo proměřeno pět objemů a to 100; 200; 250; 500 a $1000 \mu\text{L}$. Výsledky měření jsou zobrazeny na Obr. 4.6.



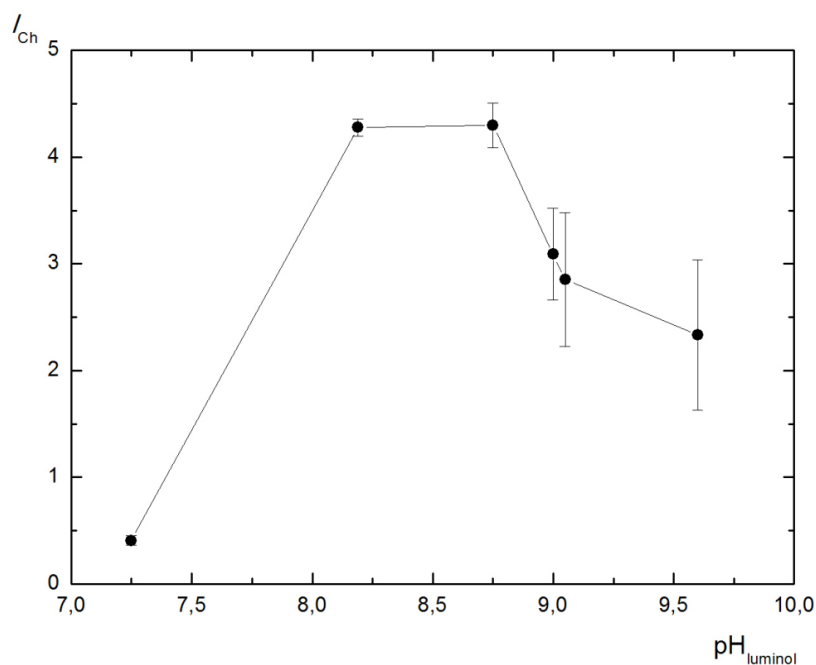
Obr. 4.6: Závislost chemiluminiscenčního záření na dávkovaném objemu roztoku kobaltnatých iontů

$c(Co^{2+}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}$; $0,3\% H_2O_2$; $c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}$; $pH = 9,0$;
 $v(\text{luminol}) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$; $v(H_2O_2) = 1,5 \text{ mL min}^{-1}$; $v(H_2O) = v(Co^{2+}) = 2,5 \text{ mL min}^{-1}$

Z grafu je patrné, že se zvyšujícím se objemem roste doba trvání analýzy. Oproti tomu intenzita chemiluminiscenčního záření se již výrazně nezvyšovala. Vzhledem k dostatečné intenzitě signálu byl k vlastnímu měření zvolen optimální objem 100 μL .

4.1.7 pH roztoku luminolu

Pro tuto optimalizaci bylo připraveno šest roztoků luminolu o koncentraci $8,47 \text{ mmol L}^{-1}$ s různými hodnotami pH. Výchozí pH bylo nejprve zvýšeno na požadovanou hodnotu přidáním pevného hydroxidu sodného. Tímto krokem došlo zároveň k úplnému rozpuštění luminolu. U takto připraveného roztoku bylo postupně snižováno pH přidáním kyseliny chlorovodíkové. Roztoky o pH 9,6; 9,3; 9,0; 8,8; 8,2 a 7,3 byly proměřeny při optimálních hodnotách objemové průtokové rychlosti. Výsledné hodnoty intenzit záření jsou uvedeny na Obr. 4.7.



Obr. 4.7: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na pH roztoku luminolu
 $V(Co^{2+}) = 100 \mu L$; $c(Co^{2+}) = 1000 mg L^{-1}$; $c(luminol) = 8,47 mmol L^{-1}$; $0,3\% H_2O_2$;
 $v(luminol) = 1,5 mL min^{-1}$; $v(H_2O_2) = 1,5 mL min^{-1}$; $v(H_2O) = v(Co^{2+}) = 2,5 mL min^{-1}$

Z grafu je patrné, že intenzita chemiluminiscenčního záření je výrazně závislá na pH prostředí. K vlastnímu měření byl použit roztok o pH 8,8, při němž bylo dosaženo nejvyšší intenzity záření. S dalším zvyšováním pH docházelo k poklesu intenzity záření a zhoršení opakovatelnosti.

4.2 Souhrn optimalizovaných parametrů (FIA)

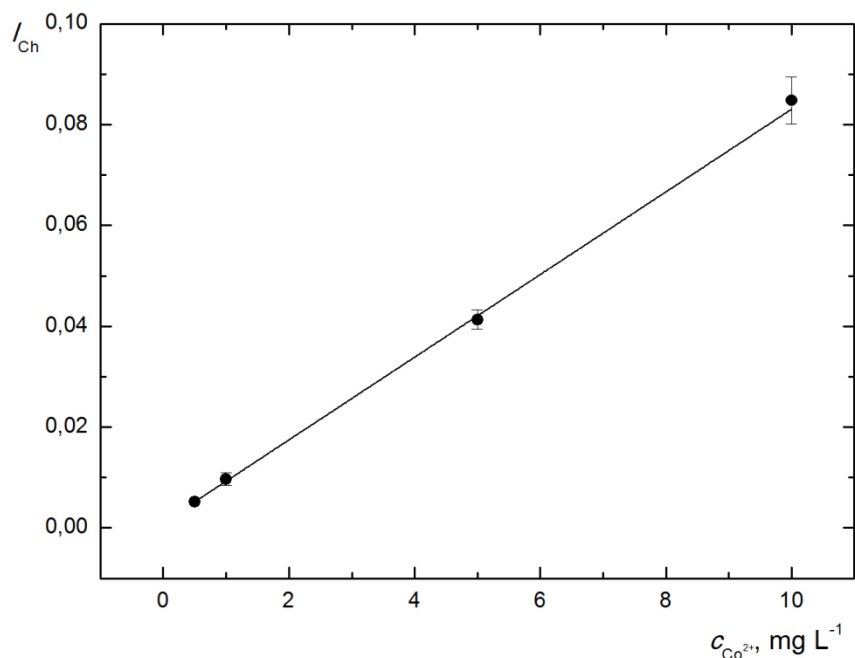
V Tab. 4.1 jsou uvedené veškeré experimentální parametry, které byly získané z výše uvedených optimalizací. Tyto parametry byly při dalších experimentech dodržovány z důvodů zajištění maximální citlivosti stanovení.

Tab. 4.1: Výsledky optimalizací experimentálních parametrů

Optimalizovaný parametr	Hodnota
Hmotnostní procento peroxidu vodíku [%]	0,3
Koncentrace luminolu [mmol L ⁻¹]	8,47
Objemová průtoková rychlost peroxidu vodíku [mL min ⁻¹]	1,5
Objemová průtoková rychlost luminolu [mL min ⁻¹]	1,5
Objemová průtoková rychlost analytu [mL min ⁻¹]	2,5
Dávkovaný objem analytu [μL]	100
pH luminolu	8,8

4.3 Kalibrační závislost stanovení kobaltnatých iontů (FIA)

Po dokončení optimalizace experimentálních parametrů se přešlo na měření kalibrační závislosti. Optimální podmínky, při nichž bylo toto měření provedeno, jsou shrnuty v Tab. 4.1. Byly proměřeny kalibrační roztoky o koncentracích 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 250 a 500 mg L⁻¹. U koncentrací nižších jak 0,5 mg L⁻¹ nebyla intenzita signálu rozeznána od šumu základní linie. Ze získaných hodnot intenzit záření byl sestrojen graf závislosti chemiluminiscenčního záření na koncentraci kobaltnatých iontů, který je zobrazen na Obr. 4.8. Do grafu byly vyneseny hodnoty do koncentrace 10 mg L⁻¹, které tvořily lineární závislost.



Obr. 4.8: Kalibrační závislost pro kobaltnaté ionty

$V (Co^{2+}) = 100 \mu L$; $c (luminol) = 8,47 mmol L^{-1}$; $0,3\% H_2O_2$, $pH = 8,8$;

$v (luminol) = 1,5 mL min^{-1}$; $v (H_2O_2) = 1,5 mL min^{-1}$; $v (H_2O) = v (Co^{2+}) = 2,5 mL min^{-1}$

4.4 Zjištění základních charakteristik (FIA)

Po optimalizaci experimentálních parametrů a sestrojení kalibrační závislosti pro kobaltnaté ionty, byly zjištěny základní charakteristiky stanovení. Tyto charakteristiky jsou uvedeny v Tab. 4.2.

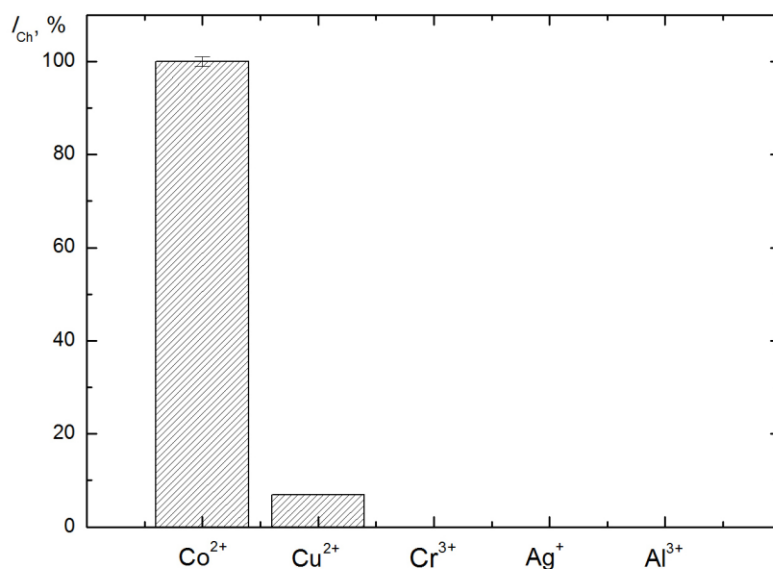
Byl zvolen kalibrační roztok kobaltnatých iontů o koncentraci $10 mg L^{-1}$, který byl desetkrát proměřen. Ze získaných hodnot byla vypočtena mez detekce, mez stanovitelnosti a opakovatelnost. Na základě kalibrační závislosti, která byla vynesena do grafu, byl stanoven lineární dynamický rozsah, pracovní rozsah, citlivost a korelační koeficient.

Tab. 4.2: Základní charakteristiky stanovení kobaltnatých iontů

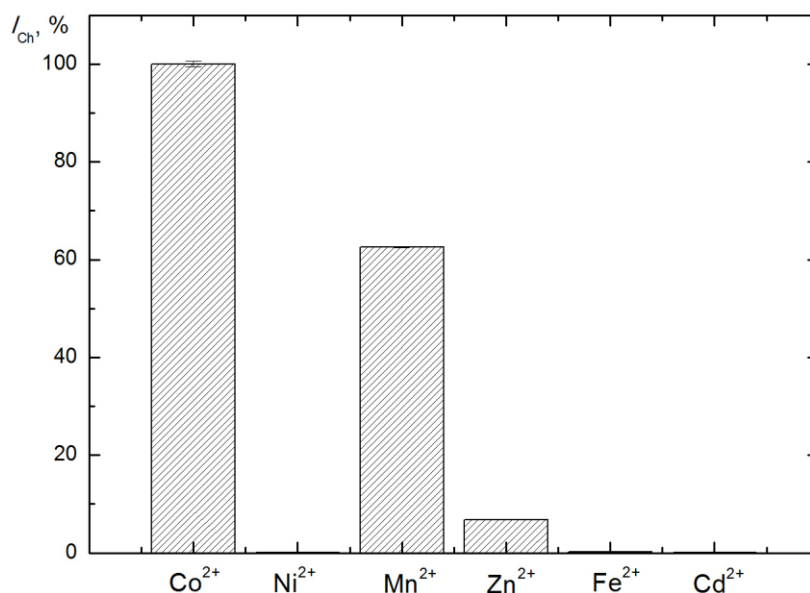
Charakteristika	Hodnota
LOD [mg L^{-1}]	0,11
LOQ [mg L^{-1}]	0,38
Citlivost [L mg^{-1}]	0,0083
Opakovatelnost [%]	9,52
Lineární dynamický rozsah do [mg L^{-1}]	10,0
Korelační koeficient	0,9962
Pracovní rozsah do [mg L^{-1}]	500,0

4.5 Katalytická schopnost ostatních iontů

V této části práce byla pozornost věnována iontům, které by mohly mít podobný katalytický účinek jako ionty kobaltu a přispívat tak ke zvýšení intenzity chemiluminiscenční reakce. Byla vyzkoušena katalytická schopnost nikelnatých, železnatých, manganatých, zinečnatých, kademnatých, chromitých, stříbrných, měďnatých a hlinitých iontů. Byly připraveny roztoky těchto iontů o koncentraci 500 mg L^{-1} a proměřeny. Výsledky měření uvedené na Obr. 4.9 a 4.10 byly vždy porovnány s výsledky pro kobaltnaté ionty, u kterých byla intenzita záření brána jako 100%. Experimentální parametry během měření katalytické schopnosti výše zmíněných iontů byly následující: dávkovaný objem roztoku iontů o koncentraci 500 mg L^{-1} byl $100 \mu\text{L}$, objemová průtoková rychlost roztoku luminolu o koncentraci $8,47 \text{ mmol L}^{-1}$ a optimálním $\text{pH} = 8,8$ byla $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. K oxidaci luminolu byl používán 0,3% roztok peroxidu vodíku, jehož objemová průtoková rychlost byla $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.



Obr. 4.9: Procentuální vyjádření intenzity chemiluminiscenčního záření roztoků iontů
 $V (Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Ag^+, Al^{3+}) = 100 \mu L$; $c (Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Ag^+, Al^{3+}) = 500 mg L^{-1}$;
 $c (luminol) = 8,47 mmol L^{-1}$; $0,3\% H_2O_2$; $pH = 8,8$; $v (luminol) = 1,5 mL min^{-1}$;
 $v (H_2O_2) = 1,5 mL min^{-1}$; $v (H_2O) = v (Co^{2+}) = 2,5 mL min^{-1}$



Obr. 4.10: Procentuální vyjádření intenzity chemiluminiscenčního záření roztoků iontů
 $V (Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cd^{2+}) = 100 \mu L$; $c (Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cd^{2+}) =$
 $500 mg L^{-1}$; $c (luminol) = 8,47 mmol L^{-1}$; $0,3\% H_2O_2$; $pH = 8,8$;
 $v (luminol) = 1,5 mL min^{-1}$; $v (H_2O_2) = 1,5 mL min^{-1}$; $v (H_2O) = v (Co^{2+}) = 2,5 mL min^{-1}$

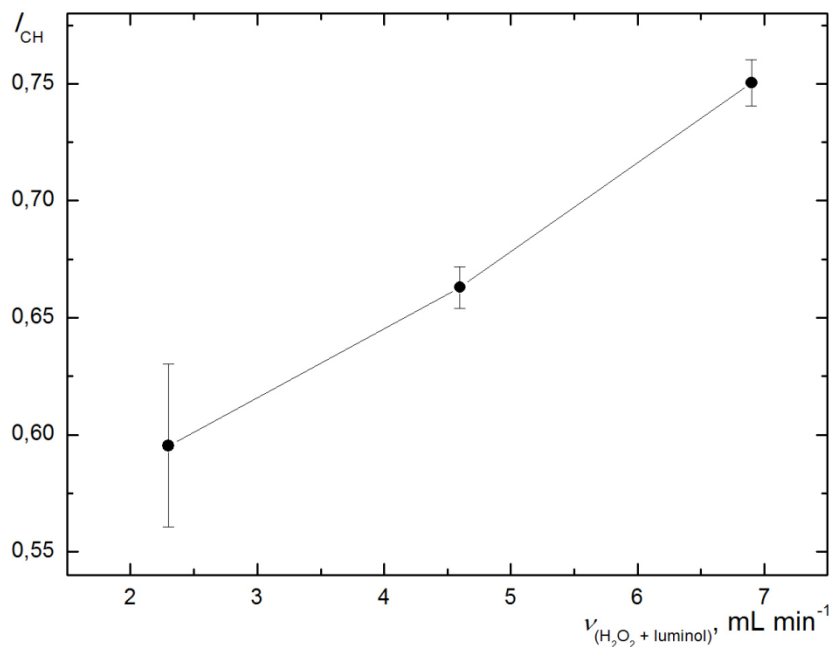
Z následujících grafů je patrné, že nejvyšší katalytický účinek vykazovaly manganaté ionty. Katalytickou schopnost vykazovaly i měďnaté a zinečnaté ionty, avšak oproti kobaltnatým iontům to byly zanedbatelné hodnoty. Ionty niklu, železa a kadmia neměly žádný významný vliv na intenzitu chemiluminiscenčního záření. U iontů hliníku, stříbra a chromu nedošlo k chemiluminiscenční reakci, jelikož tyto ionty nevykazovaly katalytickou schopnost.

4.6 Optimalizace experimentálních parametrů (SIA)

Při FIA uspořádání byly optimalizovány experimentální parametry pro stanovení kobaltnatých iontů, přičemž některé z těchto parametrů (hmotnostní procento roztoku peroxidu vodíku, koncentrace roztoku luminolu, pH roztoku luminolu) byly využity u SIA techniky a nebylo potřebné je již optimalizovat. Parametry byly optimalizovány na základě změn uspořádání SIA aparatury (viz Kapitola 3.6). Při prvním uspořádání byl optimalizován dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů, objemová průtoková rychlost čerpadla a objemová průtoková rychlost roztoku kobaltnatých iontů. Při druhém uspořádání byly optimalizovány dávkované objemy reakčních činidel a při třetím uspořádání objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku.

4.6.1 Objemová průtoková rychlost čerpadla

V tomto uspořádání byl přes peristaltické čerpadlo kontinuálně čerpán roztok peroxidu vodíku a luminolu, jehož objemová průtoková rychlost byla regulována procentuálně. Bylo zjištěno, že 100% objemová průtoková rychlost odpovídá hodnotě 4,6 mL min⁻¹. Výsledky měření jsou uvedeny na Obr. 4.11 v jednotkách mL min⁻¹.



Obr. 4.11: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na objemové průtokové rychlosti čerpadla

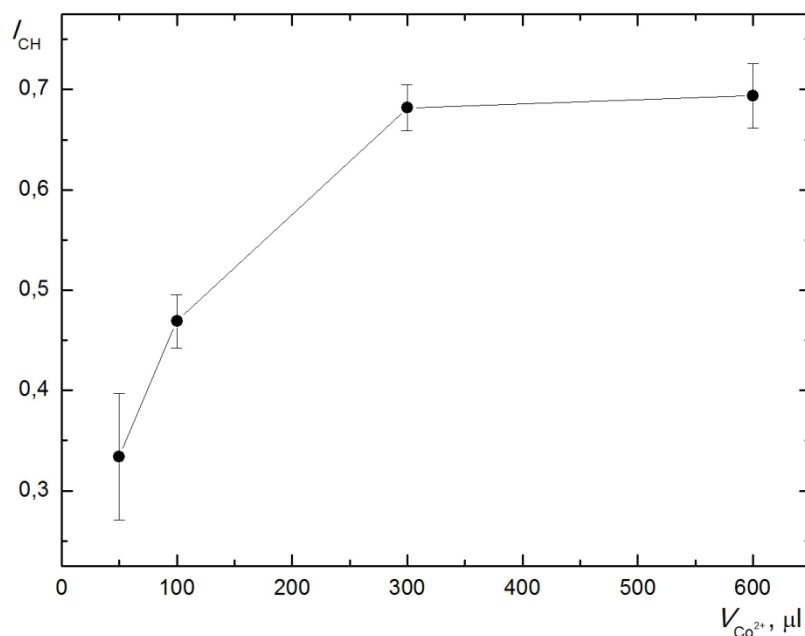
$$c(\text{Co}^{2+}) = 50 \text{ mg L}^{-1}; c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}; \text{pH} = 8,8; 0,3\% \text{ H}_2\text{O}_2;$$

$$V(\text{Co}^{2+}) = 300 \text{ } \mu\text{L}; v(\text{H}_2\text{O}) = v(\text{Co}^{2+}) = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$$

Z grafu je patrné, že se zvyšující se objemovou průtokovou rychlostí roztoku peroxidu vodíku a luminolu roste intenzita chemiluminiscenčního záření. K dalšímu měření byla zvolena hodnota 4,6 mL min⁻¹ vzhledem k nižší hodnotě směrodatné odchylky.

4.6.2 Dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů

Dalším experimentálním parametrem, který byl optimalizován, byl dávkovaný objem analytu. Byly proměřeny čtyři objemy a to 50; 100; 300 a 600 μL . Výsledky měření jsou zobrazeny na Obr. 4.12.



Obr. 4.12: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na dávkovaném objemu roztoku kobaltnatých iontů

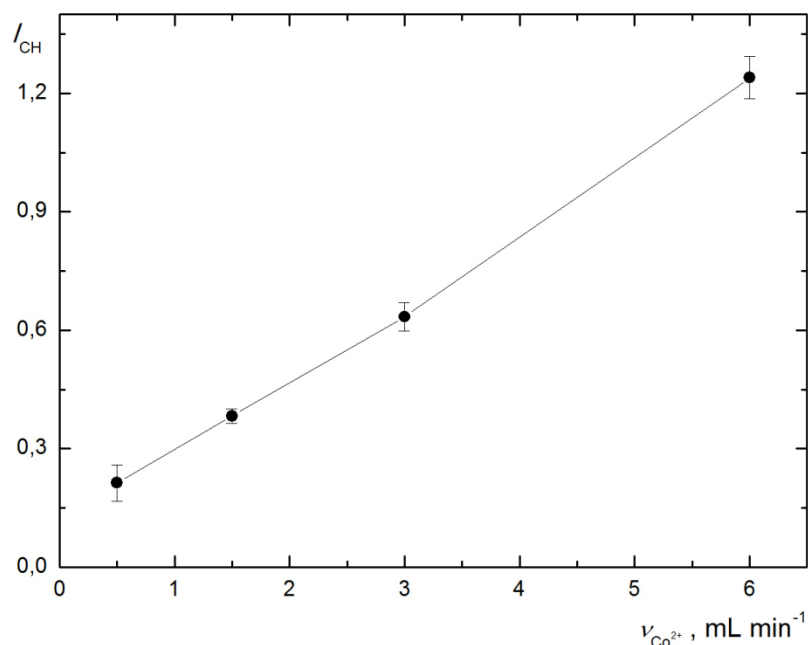
$$c(\text{Co}^{2+}) = 50 \text{ mg L}^{-1}; c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}; \text{pH} = 8,8; 0,3\% \text{ H}_2\text{O}_2;$$

$$v(\text{luminol}) = v(\text{H}_2\text{O}_2) = 4,6 \text{ mL min}^{-1}; v(\text{H}_2\text{O}) = v(\text{Co}^{2+}) = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$$

Z grafu je patrné, že intenzita signálu roste do hodnoty 300 μL . Nadávkováním většího objemu se již intenzita výrazně neměnila. Vzhledem k větší stabilitě signálu byl k vlastnímu měření zvolen objem 300 μL .

4.6.3 Objemová průtoková rychlost roztoku kobaltnatých iontů

Pomocí pístového čerpadla byl nasán příslušný objem roztoku kobaltnatých iontů do mísící cívky a následně transportován k detektoru určitou objemovou průtokovou rychlostí. Objemové průtokové rychlosti byly měněny v rozmezí 0,5 – 6,0 mL min^{-1} . Výsledné hodnoty intenzity záření jsou uvedeny na Obr. 4.13.



Obr. 4.13: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na objemové průtokové rychlosti roztoku kobaltnatých iontů

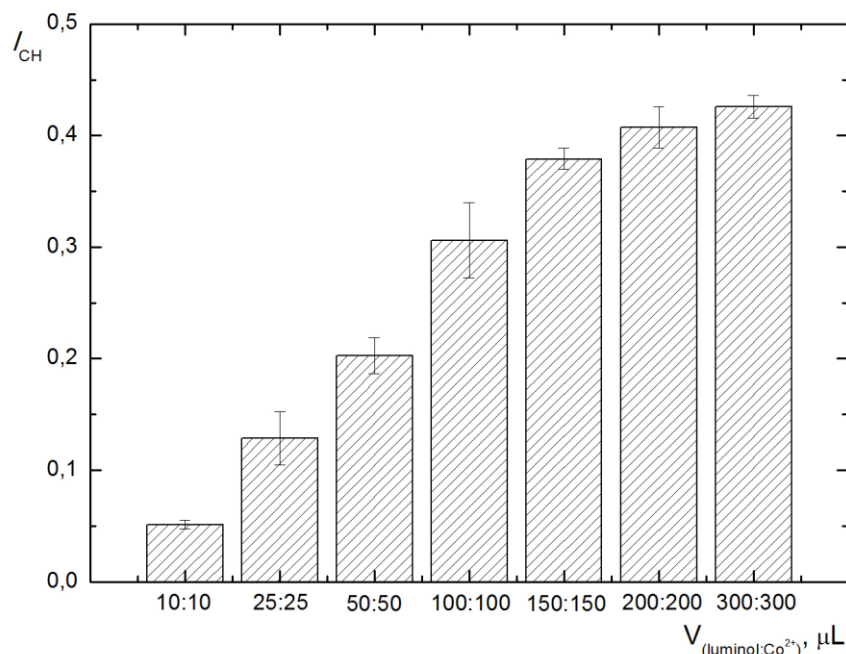
$c(\text{Co}^{2+}) = 50 \text{ mg L}^{-1}$; $c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{pH} = 8,8$; $0,3\% \text{ H}_2\text{O}_2$;

$V(\text{Co}^{2+}) = 300 \text{ }\mu\text{L}$; $v(\text{luminol}) = v(\text{H}_2\text{O}_2) = 4,6 \text{ mL min}^{-1}$

Z grafu je patrné, že se zvyšující se objemovou průtokovou rychlostí, intenzita záření roste. Pro vlastní měření byla zvolena hodnota $3,0 \text{ mL min}^{-1}$, vzhledem k větší opakovatelnosti oproti získanému výsledku při průtoku $6,0 \text{ mL min}^{-1}$.

4.6.4 Dávkované objemy reakčních činidel

V tomto kroku, který je nedílnou součástí optimalizací v SIA uspořádání, bylo nutné nalézt optimální dávkované objemy reakčních činidel mísících se v zadržovací cívce. Optimalizován byl objem roztoku luminolu a roztoku kobaltnatých iontů, a to v poměru 1:1 (10:10; 25:25; 50:50; 100:100; 150:150; 250:250 a 300:300 μL). Výsledné hodnoty intenzity záření v závislosti na poměru objemů reakčních činidel jsou uvedeny na Obr. 4.14.



Obr. 4.14: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na dávkovaných poměrech objemů reakčních činidel

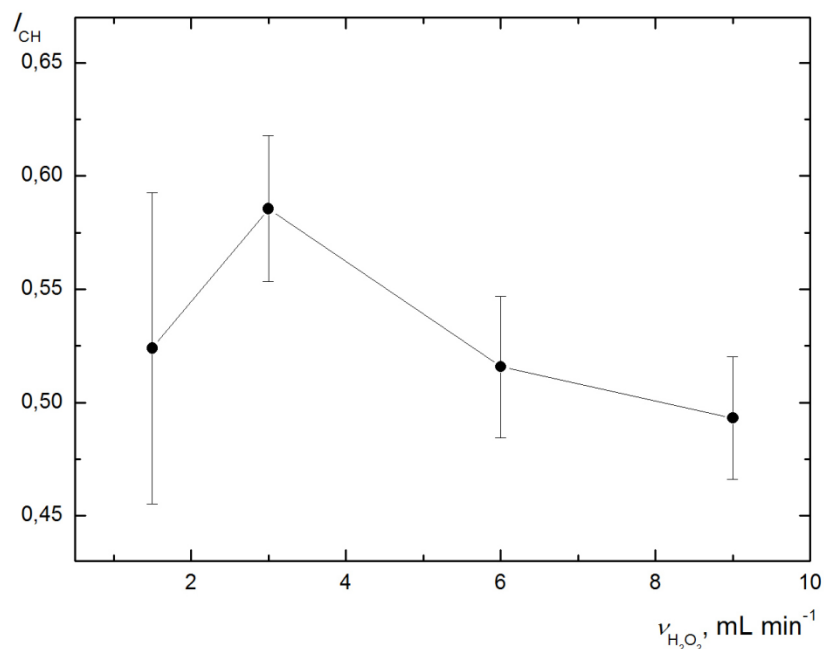
$$c(\text{Co}^{2+}) = 50 \text{ mg L}^{-1}; c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}; \text{pH} = 8,8; 0,3\% \text{ H}_2\text{O}_2;$$

$$v(\text{H}_2\text{O}) = v(\text{luminol}) = v(\text{Co}^{2+}) = 3,0 \text{ mL min}^{-1}; v(\text{H}_2\text{O}_2) = 4,6 \text{ mL min}^{-1}$$

Z grafu je patrné, že se zvyšujícím se objemem roztoku luminolu a roztoku kobaltnatých iontů roste intenzita chemiluminiscenčního záření. Je tedy patrné, že množství kobaltnatých iontů v roztoku koreluje s množstvím luminolu. K dosažení vysoké intenzity záření je tedy zapotřebí, aby směs obsahovala dostatečné množství luminolu (substrát) a příslušné množství kobaltnatých iontů (katalyzátor). Při dalších měřeních byl dávkován objem 300:300 μL .

4.6.5 Objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku

Roztok peroxidu vodíku byl v tomto uspořádání dávkován pomocí druhého pístového čerpadla v okamžiku, kdy dochází k obrácení pohybu prvního pístového čerpadla a transportu směsi roztoku luminolu a kobaltnatých iontů. Objemové průtokové rychlosti byly měněny pomocí programu v rozmezí 1,5 – 9,0 mL min^{-1} . Výsledné hodnoty intenzity záření jsou uvedeny na Obr. 4.15.



Obr. 4.15: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na objemové průtokové rychlosti roztoku peroxidu vodíku

$c(Co^{2+}) = 50 \text{ mg } L^{-1}$; $c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol } L^{-1}$; $pH = 8,8$; $0,3\% H_2O_2$;
 $v(H_2O) = v(\text{luminol}) = v(Co^{2+}) = 3,0 \text{ mL } min^{-1}$; $V(\text{luminol}) = V(Co^{2+}) = 300 \mu L$

Z grafu je patrné, že nejvyšší intenzity chemiluminiscenčního záření bylo dosaženo při objemové průtokové rychlosti $3,0 \text{ mL } min^{-1}$. Důvodem dosažení maximální intenzity záření při nižší objemové průtokové rychlosti mohlo být delší setrvání reakční směsi v optické dráze.

4.7 Souhrn optimalizovaných parametrů (SIA)

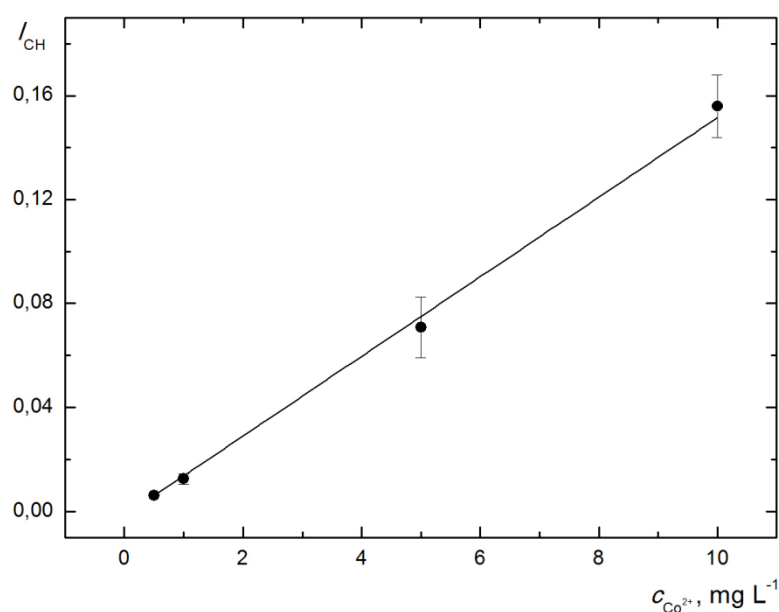
V Tab. 4.3 jsou uvedené experimentální parametry, které byly získané z výše uvedených optimalizací v SIA uspořádání. Tyto parametry byly při dalších experimentech dodržovány z důvodů zajištění maximální citlivosti stanovení.

Tab. 4.3: Výsledky optimalizací experimentálních parametrů

Optimalizovaný parametr	Hodnota
Objemová průtoková rychlost čerpadla [mL min ⁻¹]	4,6
Dávkovaný objem analytu [μL]	300
Objemová průtoková rychlost analytu [mL min ⁻¹]	3,0
Dávkované objemy reakčních činidel [μL]	300 : 300
Objemová průtoková rychlost peroxidu vodíku [mL min ⁻¹]	3,0

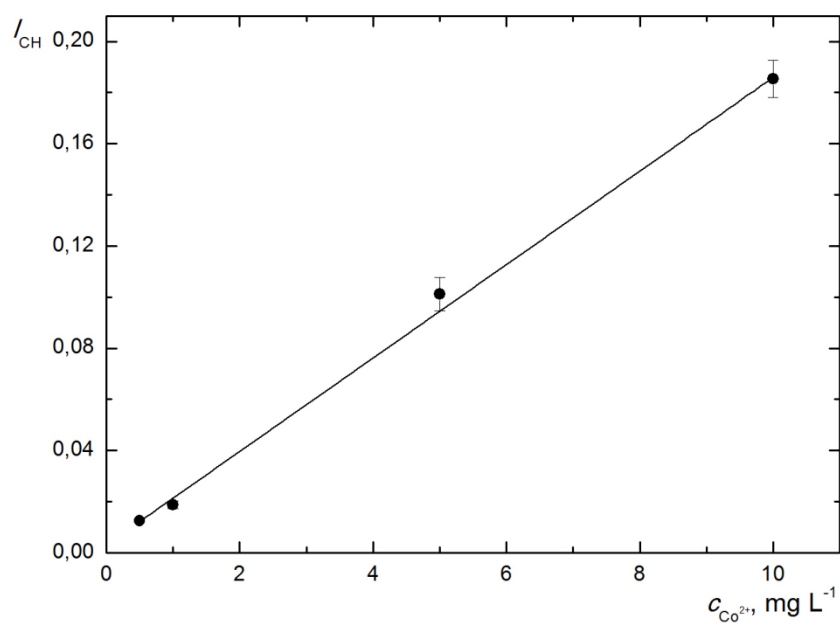
4.8 Kalibrační závislost stanovení kobaltnatých iontů (SIA)

Po dokončení optimalizace experimentálních parametrů se přešlo na měření kalibrační závislosti technikou SIA. Kalibrační závislost byla proměřena pro všechna uspořádání (viz Kapitola 3.6). Optimální podmínky, při nichž bylo toto měření provedeno, jsou shrnuty v Tab. 4.3. Byly proměřeny kalibrační roztoky o koncentracích 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 a 250 mg L⁻¹. Ze získaných hodnot intenzit záření byly sestrojeny grafy závislosti chemiluminiscenčního záření na koncentraci kobaltnatých iontů, které jsou zobrazeny na Obr. 4.14, 4.15 a 4.16. Do grafů byly vyneseny hodnoty tvořící lineární závislost.



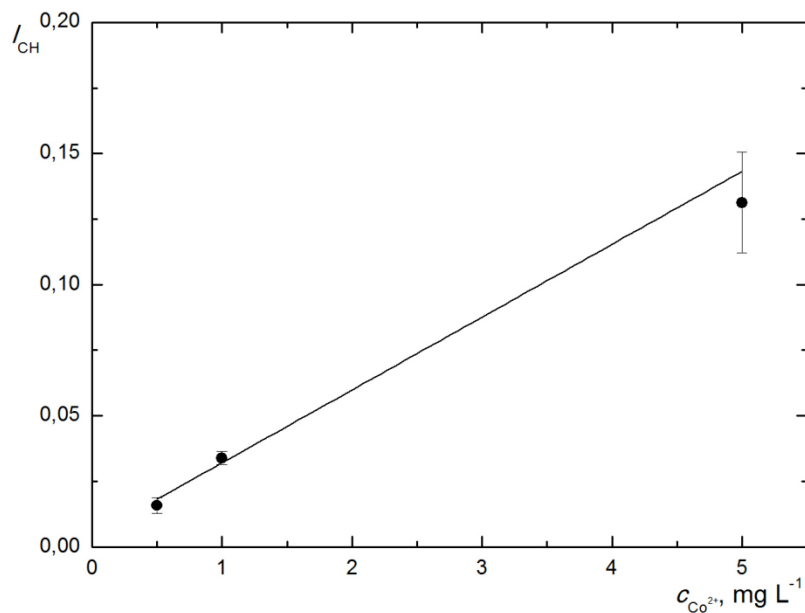
Obr. 4.14: Kalibrační závislost pro kobaltnaté ionty (uspořádání 1)

$V(Co^{2+}) = 300 \mu L$; $c(luminol) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}$; 0,3% H_2O_2 ; $pH = 8,8$;
 $v(luminol) = v(H_2O_2) = 4,6 \text{ mL min}^{-1}$; $v(H_2O) = v(Co^{2+}) = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$



Obr. 4.15: Kalibrační závislost pro kobaltnaté ionty (uspořádání 2)

$V(\text{Co}^{2+}) = V(\text{luminol}) = 300 \mu\text{L}$; $c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{pH} = 8,8$; $0,3\% \text{ H}_2\text{O}_2$;
 $v(\text{H}_2\text{O}) = v(\text{luminol}) = v(\text{Co}^{2+}) = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $v(\text{H}_2\text{O}_2) = 4,6 \text{ mL min}^{-1}$



Obr. 4.16: Kalibrační závislost pro kobaltnaté ionty (uspořádání 3)

$V(\text{Co}^{2+}) = V(\text{luminol}) = 300 \mu\text{L}$; $c(\text{luminol}) = 8,47 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{pH} = 8,8$; $0,3\% \text{ H}_2\text{O}_2$;
 $v(\text{H}_2\text{O}) = v(\text{luminol}) = v(\text{Co}^{2+}) = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$; $v(\text{H}_2\text{O}_2) = 3,0 \text{ mL min}^{-1}$

4.9 Zjištění základních charakteristik (SIA)

Po optimalizaci experimentálních parametrů a sestavení kalibrační závislosti pro kobaltnaté ionty, byly zjištěny základní charakteristiky stanovení pro techniku SIA. V Tab. 4.4 jsou porovnány výsledky při různém uspořádání SIA aparatury (viz Kapitola 3.6).

U všech uspořádání byl zvolen kalibrační roztok kobaltnatých iontů o koncentraci 10 mg L^{-1} , který byl desetkrát proměřen. Ze získaných hodnot byla vypočtena mez detekce, mez stanovitelnosti a opakovatelnost. Na základě kalibrační závislosti, která byla vynesena do grafu, byl stanoven lineární dynamický rozsah, pracovní rozsah, citlivost a korelační koeficient.

Tab. 4.4: Základní charakteristiky stanovení kobaltnatých iontů

Charakteristika	Uspořádání 1	Uspořádání 2	Uspořádání 3
LOD [mg L^{-1}]	0,33	0,07	0,05
LOQ [mg L^{-1}]	1,09	0,24	0,17
Citlivost [L mg^{-1}]	0,0153	0,0189	0,0266
Opakovatelnost [%]	3,86	1,95	2,12
Lineární dynamický rozsah do [mg L^{-1}]	10,0	10,0	5,0
Korelační koeficient	0,9965	0,9966	0,9919
Pracovní rozsah do [mg L^{-1}]	250,0	250,0	250,0

Z výše uvedené tabulky je patrné, že nejnižší meze detekce a nejvyšší citlivosti bylo dosaženo u třetího uspořádání. Toto uspořádání, kdy bylo k čerpání roztoku peroxidu vodíku využito pístové čerpadlo a roztok luminolu a analytu byl přiváděn přes osmicestný selekční ventil, je nejvhodnější pro stanovení. V obou předchozích uspořádáních byl roztok čerpán peristaltickým čerpadlem.

4.10 Porovnání základních charakteristik

V Tab. 4.5 jsou porovnány výsledky základních charakteristik stanovení kobaltnatých iontů ve FIA a SIA uspořádání.

Tab. 4.5: Porovnání základních charakteristik stanovení

Charakteristika	FIA	SIA (uspořádání 3)
LOD [mg L^{-1}]	0,11	0,05
LOQ [mg L^{-1}]	0,38	0,17
Citlivost [L mg^{-1}]	0,0083	0,0266
Opakovatelnost [%]	9,52	2,12
Lineární dynamický rozsah do [mg L^{-1}]	10,0	5,0
Korelační koeficient	0,9962	0,9919
Pracovní rozsah do [mg L^{-1}]	500,0	250,0

Z výsledných hodnot je patrné, že pomocí techniky SIA s vhodným uspořádáním lze dosáhnout nižších mezí detekce a vyšší citlivosti pro stanovení kobaltnatých iontů. Citlivost stanovení je přibližně trojnásobná, což představuje výrazné zlepšení u SIA oproti FIA uspořádání.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo nalezení optimálního experimentálního uspořádání pro chemiluminiscenční stanovení kobaltnatých iontů technikami FIA a SIA a porovnání dosažených výsledků stanovení.

Bylo nalezeno vhodné uspořádání pro detekci záření. K vlastnímu měření byla zvolena skleněná spirálovitá trubice s dostatečně úzkým prostorem pro dokonalé promíchání roztoků. Oproti ostatním provedeným experimentům probíhala chemiluminiscenční reakce v optické dráze detektoru a zároveň byl poskytnut dostatečně stabilní signál.

Podářilo se sestavit aparaturu FIA a zvolit vhodné uspořádání SIA aparatury. Metody FIA a SIA byly následně optimalizovány. Pro metodu FIA byl zvolen jako optimální 0,3% roztok peroxidu vodíku o objemové průtokové rychlosti 1,5 mL min⁻¹, dále byl zvolen jako optimální 8,47 mmol L⁻¹ roztok luminolu (pH = 8,8) o objemové průtokové rychlosti 1,5 mL min⁻¹. Optimální dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů byl 100 μL. U metody SIA byly ponechány některé optimalizované parametry z výše zmíněných, jako 0,3% roztok peroxidu vodíku a 8,47 mmol L⁻¹ roztok luminolu (pH = 8,8). Ostatní parametry byly optimalizovány na základě změn uspořádání SIA aparatury. Optimální objemová průtoková rychlost čerpadla byla 4,6 mL min⁻¹, objemová průtoková rychlost roztoku peroxidu vodíku a roztoku kobaltnatých iontů byla 3,0 mL min⁻¹. Optimální dávkovaný objem roztoku kobaltnatých iontů byl 300 μL a optimální objemy reakčních činidel (luminol a kobaltnaté ionty) byly 300:300 μL.

Za výše zmíněných experimentálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti a určeny základní charakteristiky stanovení. Vzhledem k tomu, že byl proveden experiment, kde bylo měněno uspořádání u SIA aparatury, byly nejprve porovnány výsledky charakteristik u metody SIA. Nejnižší LOD a nejvyšší citlivosti bylo dosaženo u třetího uspořádání, které bylo následně porovnáno s výsledky metody FIA. U metody FIA činila LOD 0,11 mg L⁻¹ a citlivost byla 0,0083 L mg⁻¹. U metody SIA (uspořádání 3) činila LOD 0,05 mg L⁻¹ a citlivost byla 0,0266 L mg⁻¹. Na základě porovnání lze říci, že stanovení pomocí techniky SIA je citlivější pro detekci kobaltnatých iontů v roztoku.

Při studiu katalytické schopnosti ostatních iontů na intenzitu chemiluminiscenční reakce bylo zjištěno, že nejvyšší katalytický účinek vykazovaly manganaté ionty. Katalytický účinek byl také zaznamenán u měďnatých a zinečnatých iontů, avšak oproti kobaltnatým iontům se jednalo o zanedbatelné hodnoty. Dále bylo zjištěno, že u iontů

hliníku, stříbra a chromu nedošlo k chemiluminiscenční reakci, jelikož tyto ionty nevykazovaly katalytickou schopnost.

Z výše uvedeného vyplývá, že i přes určité komplikace, byly cíle diplomové práce splněny.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Beinrohr, E.: *Prietokové elektroanalytické metódy v praxi*, Český Těšín, 2 THETA, 2013, ISBN 978-80-86380-69-8
- [2] Pinto, P. C. A. G.; Lúcia, M.; Saraiva, M. F. S.; Lima, J. L. F. C.: Sequential Injection Analysis Hyphenated with Other Flow Techniques: A Review, *Analytical Letters* **44**, 374-397 (2011)
- [3] Christian, G. D.: Flow analysis and its role and importance in the analytical science, *Analytica Chimica Acta* **499**, 5-8 (2003)
- [4] Cerdà, V.; Ferrer, L.; Avivar, J.; Cerdà, A.: *Flow analysis – A practical guide (1st edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2014, ISBN 978-0-444-59596-6
- [5] Melchert, W. R.; Reis, B. F.; Rocha, F. R. P.: Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review, *Analytica Chimica Acta* **714**, 8-19 (2012)
- [6] Barceló, D.: *Comprehensive analytical chemistry*, Amsterdam, Wilson & Wilson's, 2003, ISBN 0-444-51037-0
- [7] Worsfold, P.; Poole, C.; Townshend, A.; Miró, M.: *Encyclopedia of analytical science (third edition)*, Amsterdam, Elsevier, 2019, ISBN 978-0-08-101983-2
- [8] Cerdà, V.; Avivar, J.; Cerdà, A.: Laboratory automation based on flow techniques, *Pure Appl. Chem.* **84**, 1983-1998 (2012)
- [9] Wang, J.; Hansen, E. H.: Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis, *Trends in Analytical Chemistry* **22**, 225-231 (2003)
- [10] Pharik, A.; Patel, K.; Patel, C.; Patel, BN.: Flow injection: A new approach in analysis, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2**, 118-125 (2010)
- [11] Růžička, J.; Hansen, E. H.: *Flow Injection Analysis (second edition)*, New York, John Wiley & Sons, 1988, ISBN 0-471-81355-9
- [12] Růžička, J.: From continuous flow analysis to programmable Flow injection techniques. A history and tutorial of emerging methodologies, *Talanta* **158**, 299-305 (2016)
- [13] Keay, P. J.; Wang, Y.: Applications of flow injection analysis to analytical biotechnology, *Trends in Biotechnology* **15**, 76-81 (1997)

-
- [14] Barnett, N. W.; Lenehan, C. E.; Lewis, S. W.: Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry, *Trends in Analytical Chemistry* **18**, 346-353 (1999)
- [15] Cladera, A.; Tomàs, C.; Gómez, E.; Estela, J. M.; Cerdà, V.: A new instrumental implementation of sequential injection analysis, *Analytica Chimica Acta* **302**, 297-308 (1995)
- [16] Mesquita, R. B. R.; Rangel, A. O. S. S.: A review on sequential injection methods for water analysis, *Analytica Chimica Acta* **648**, 7-22 (2009)
- [17] Aldstadt, J. H.; Olson, D. C.; Wolcott, D. K.; Marshall, G. D.; Stieg, S. W.: Flow and Sequential Injection Analysis Techniques in Process Analysis, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 2006
- [18] Paseková, H.; Polášek, M.; Solich P.: Sekvenční injekční analýza, *Chem. listy* **93**, 354-359 (1999)
- [19] McKelvie, I. D.: Principles of Flow Injection Analysis, *Comprehensive Analytical Chemistry* **54**, 81-109 (2008)
- [20] Economou, A.: Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment, *Trends in Analytical Chemistry* **24**, 416-425 (2005)
- [21] Miró, M.; Hansen, E. H.: Solid reactors in sequential injection analysis: recent trends in the environmental field, *Trends in Analytical Chemistry* **25**, 267-281 (2006)
- [22] FIALab: *Sequential Injection Analysis*, Dostupné z URL:
<http://www.flowinjection.com/images/Sequential_Injection.pdf>
- [23] 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, *J. Flow Injection Anal.* **24**, 103-108 (2007)
- [24] Van Staden, J. F.; Taljaard, R. E.: On-line monitoring of phosphate in natural water and effluent streams using sequential injection analysis, *Microchimica Acta* **128**, 223-228 (1998)
- [25] Van Staden, J. F.; Taljaard, R. E.: Determination of ammonia in water and industrial effluent streams with the indophenol blue method using sequential injection analysis, *Analytica Chimica Acta* **344**, 281-289 (1997)

-
- [26] Pimenta, A. M.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Araújo, A. N.; Calatayud, J. M.: Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**, 16-34 (2006)
- [27] Harvey, E. N.: *A history of luminescence from the earliest times until 1900*, Philadelphia, The American Philosophical Society, 1957
- [28] Pelant, I.; Valenta, J.: *Luminiscence doma, v přírodě a v laboratoři*, Praha, Academia, 2014, ISBN 978-80-200-2394-0
- [29] Šimsa, D.; Skopal, J.: Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií, *Chem. listy* **102**, 1017-1019 (2008)
- [30] Pátek, K.: *Luminiscence (fyzikální poznatky a technické aplikace)*, Praha, Státní nakladatelství technické literatury, 1962
- [31] Pospíšil, J.: *Základy fotonové optiky II. – Emise a absorpce fotonů*, Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, 1999, ISBN 80-7067-955-7
- [32] Pelant, I.; Valenta, J.: *Luminiscenční spektroskopie – I. Objemové krystalické polovodiče*, Praha, Academia, 2006, ISBN 80-200-1447-0
- [33] Meng L.; Zi-Yue W.; Chun-Yang Z.: Recent Advance in Chemiluminescence Assay and Its Biochemical Applications, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **44**, 1934-1941 (2016)
- [34] Jimenez, A. M.; Navas, A. J.: Chemiluminescence Methods (Present and future), *Grasas y Aceites* **53**, 64-75 (2002)
- [35] Christodouleas, D.; Fotakis, C.; Economou, A.; Papadopoulos, K.; Timotheou-Potamia, M.; Calokerinos, A.: Flow-Based Methods with Chemiluminescence Detection for Food and Environmental Analysis: A Review, *Analytical Letters* **44**, 176-215 (2011)
- [36] Campbell, A. K.: *Chemiluminescence: Principles and applications in biology and medicine*, England, Ellis Horwood Ltd., 1988, ISBN 0-89573-501-6
- [37] Zhanga, Z.; Lai, L.; Wu, K.; Huang, X.; Guo, S.; Zhang, L.; Liu, L.: Peroxidase-catalyzed chemiluminescence system and its application in Immunoassay, *Talanta* **180**, 260-270 (2018)

-
- [38] Skripnikova, T. A.; Lysova, S. S.; Zevatskii, Y. E.; Myznikov, L. V.; Vorona, S. V.; Artamonova, T. V.: Physico-chemical properties of isomeric forms of luminol in aqueous solutions, *Journal of Molecular Structure* **1154**, 59-63 (2018)
- [39] Mervartová, K.; Polášek, M.; Calatayud J. M.: Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **45**, 367-381 (2007)
- [40] Giussani, A.; Farahani, P.; Martínéz-Munoz, D.; Lundberg, M.; Lindh, R.; Roca-Sanjuán, D.: Molecular Basis of the Chemiluminescence Mechanism of Luminol, *Chemistry European Journal* **25**, 5202-5213 (2019)
- [41] Ocaña-González, J. A.; Ramos-Payán, M.; Fernández-Torres, R.; Villar Navarro, M.; Bello-López, M. Á.: Application of the Chemiluminescence to the analysis of wastewaters – A review, *Talanta* **122**, 214-222 (2014)
- [42] Kolev, S. D.; McKelvie, I. D.: *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, Amsterdam, Elsevier, 2008, ISBN 978-0-444-53094-3
- [43] Dodeigne, C.; Thunus, L.; Lejeune, R.: Chemiluminescence as diagnostic tool. A review, *Talanta* **51**, 415-439 (2000)
- [44] Roswell, D. F.; White, E. H.: The chemiluminescence of luminol and related hydrazides, *Methods in Enzymology* **57**, 409-423 (1978)
- [45] Šimůnek, O.: *Chemiluminiscence*. Dostupné z URL:
<http://chemiluminiscence.xf.cz/chemiluminiscence_II_final.pdf>
- [46] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie (2. vydání)*, Praha, Karolinum, 2010
- [47] Armbruster, D.; Pry, T.: Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation, *The Clinical Biochemist Reviews* **29**, 49-52 (2008)
- [48] Barek, J.; Jánoš, P.; Koruna, P.; Meloun, M.; Plzák, Z.; Skácel, F.; Suchánek, M.; Tichý, J.; Vilímeč, J.; Vláčil, F.; Zima, T.: Metrologická terminologie v chemii, *Chem. listy* **94**, 439-444 (2000)