

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



Rigorózní práce

**Vývoj automatizovaného SIA systému pro
paralelní stanovení vybraných aniontů**

Mgr. Aneta Dundová

Konzultant: PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že rigorózní práci jsem vypracovala samostatně s použitím pramenů uvedených v seznamu literatury.

V Hradci Králové dne

Poděkování

Děkuji své konzultantce PharmDr. Haně Sklenářové, Ph. D za její cenné rady a odborné konzultace při sepisování rigorózní práce, dále chci vyjádřit své poděkování všem pracovníkům katedry analytické chemie za jejich přátelský přístup a vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

Abstrakt

Tato rigorózní práce je rozdělena do dvou částí, které spolu úzce souvisí. První část se zabývá optimalizací podmínek pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou sekvenční injekční analýzy upravenou podle platné ISO normy pro metodu FIA, ve druhé, hlavní části práce se pojednává o vývoji automatizovaného SIA systému pro paralelní stanovení vybraných aniontů v komerčním SIA systému.

Česká technická norma ČSN EN ISO 16 264 popisující metodu FIA pro stanovení rozpuštěných křemičitanů se spektrofotometrickou detekcí je založena na reakci vzorku obsahujícího rozpuštěné křemičitany s roztokem činidla (kyselý roztok heptamolybdenanu), který reaguje s křemičitany a fosforečnany za vzniku kyseliny molybdátokřemičité a molybdátofosforečné, která je následně rozložena roztokem kyseliny šťavelové. Kyselina molybdátokřemičitá se redukuje roztokem chloridu cínatého na výsledný produkt reakce - molybdenovou modř - měřený při vlnové délce 710 nm.

V experimentální části práce bylo provedeno převedení uvedeného FIA stanovení do systému sekvenční injekční analýzy při dodržení kalibračních rozsahů uvedených v normě. Kalibrační křivky vykazovaly linearitu v rozmezí $c = 0,2 - 2,0 \text{ mg/l}$ a $c = 2,0 - 20,0 \text{ mg/l}$ s korelačními koeficienty $R^2 = 0,9982$ a $R^2 = 0,9968$.

Při vývoji automatizovaného SIA systému pro paralelní stanovení vybraných iontů byly použity poznatky získané v rámci předchozí diplomové práce (téma: SIA stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů podle platných ISO norem) společně se stanovením rozpuštěných křemičitanů pro metodu SIA zpracované v této rigorózní práci.

V rámci experimentu byl vytvořen kalibrační program pro paralelní stanovení vybraných iontů v komerčním SIA systému, bylo provedeno praktické testování paralelního stanovení vybraných iontů včetně proměření vybraných kalibračních rozsahů a měření opakovatelnosti.

Dosažené výsledky potvrzují možnost použití metody SIA pro stanovení rozpuštěných křemičitanů v rámci rutinní analýzy při dodržení požadavků platné ISO normy. Na základě vytvořeného programu pro paralelní stanovení vybraných iontů (dusitanů, dusičnanů, chloridů a křemičitanů) metodou sekvenční injekční analýzy bylo

provedeno testování systému na modelových směsných vzorcích a při jeho praktické aplikaci lze očekávat uplatnění automatického měření s poměrně vysokou frekvencí dávkování vzorků.

Abstract

This rigorous thesis is divided into two parts, which are closely related. The first part deals with optimization of conditions for the determination of dissolved silicates using sequential injection analysis adjusted in accordance with applicable ISO standards for the FIA method, the second, main part of work deals with the development of the automated SIA system for the parallel determination of selected anions in the commercial SIA system. CSN EN ISO 16 264 describing FIA methodology suitable for determination of dissolved silicates with spectrophotometric detection was based on the reaction of a sample containing dissolved silicates with the reagent (acid solution of heptamolybdate), which reacts with the silicates and phosphates to form acid molybdate - silicate and molybdatophosphate, which is then decomposed by oxalic acid. Molybdatosilicate acid is reduced by acidic solution of stannous chloride to the resulting product of the reaction - molybdenum blue – that was measured at 710nm. In the experimental work transfer of the FIA method to the determination in the sequential injection system in compliance with the calibration ranges listed in the ISO standard was carried out. Calibration curves showed linearity in the range $c = 0.2$ to 2.0 mg /l and $c = 2.0$ to 20.0 mg /l with a correlation coefficients $R^2 = 0.9982$ and $R^2 = 0.9968$, respectively.

In development of the automated SIA system for the parallel determination of selected ions knowledge gained in the previous diploma work (topic: SIA determination of nitrite, nitrate, chloride according to the applicable ISO standards) was used together with the experience with determination of dissolved silicate processed at this rigorous thesis. The experiment result was a calibration program for the parallel determination of selected ions in the commercial SIA system with practical tests of parallel determination of selected ions, including measurement of the selected range calibrations and measurement repeatability. The achieved results confirm the possibility of using the SIA method for the determination of dissolved silicates in the routine analysis with compliance to the applicable requirements of ISO norms. Performance of the program for parallel determination of selected ions (nitrites, nitrates, chlorides and silicates) using sequential injection analysis has been carried out using the model composite samples. Practical application of the developed method can be expected in the automated measurements with a relatively high sample throughput.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 ÚVOD.....	10
1.1 CÍL PRÁCE	12
2 PRŮTOKOVÉ ANALYTICKÉ METODY A JEJICH APLIKACE	13
2.1 SEGMENTOVANÁ PRŮTOKOVÁ ANALÝZA (SFA).....	15
2.2 PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA (FIA).....	16
2.3 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA (SIA)	17
2.4 MULTICOMMUTATED FLOW ANALYSIS(MCFIA).....	20
2.5 MULTISYRINGE FLOW INJECTION ANALYSIS(MSFIA)	21
2.6 MULTIPUMPING FLOW SYSTEM (MPFS)	25
2.7 KOMBINOVANÉ PRŮTOKOVÉ TECHNIKY	26
2.8 APLIKACE METOD PRŮTOKOVÉ ANALÝZY	27
3 ZPŮSOBY VYHODNOCENÍ STANOVENÍ	31
3.1 STANOVENÍ NA ZÁKLADĚ KALIBRAČNÍ KŘIVKY	31
3.1.1 Kalibrační závislost na základě výšky píku.....	31
3.1.2 Kalibrační závislost na základě šířky píku.....	31
3.1.3 Kalibrační závislost na základě plochy píku.....	32
3.2 STOPPED-FLOW PRŮTOKOVÉ TECHNIKY	32
3.2.1 Aplikace stopped-flow metod do metod kinetických	33
3.2.2 Aplikace stopped-flow metod na snímací techniky.....	33
4 STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ PRŮTOKOVOU ANALÝZOU (FIA A CFA).....	34
4.1 PRINCIP ZKOUŠKY PŘI PRÁCI S METODOU FIA.....	34
4.2 ROZSAH A UŽITÍ KALIBRACE	34
4.3 RUŠIVÉ VLIVY	34
4.4 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ČINIDLA.....	35
4.5 OSTATNÍ STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ.....	36
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
5.1 PRINCIP POUŽITÉHO STANOVENÍ KŘEMIČITANŮ METODOU SIA.....	39
5.2 APARATURA.....	39
5.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	39
5.4 OPTIMALIZACE PODMÍNEK PRO STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ METODOU SIA	41
5.5 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST A KALIBRAČNÍ PROGRAM	42
5.6 OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ.....	45
6 VÝVOJ OVLÁDACÍHO PROGRAMU PRO PARALELNÍ STANOVENÍ DUSITANŮ, DUSIČNANŮ, CHLORIDŮ A ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ METODOU SIA.....	46
6.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE PRO PARALELNÍ ANALÝZU DUSITANŮ, DUSIČNANŮ, CHLORIDŮ A ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ METODOU SIA	48
6.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ PRO PARALELNÍ ANALÝZU DUSITANŮ, DUSIČNANŮ, CHLORIDŮ A ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ METODOU SIA.....	50
6.2.1 Příprava zásobních roztoků	50
6.2.2 Příprava kalibračních roztoků.....	50
6.3 PŘÍPRAVA SMĚSNÝCH ROZTOKŮ:	51
6.4 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST A KALIBRAČNÍ PROGRAM PRO PARALELNÍ STANOVENÍ DUSITANŮ, DUSIČNANŮ, CHLORIDŮ A ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ METODOU SIA	52

6.5	OPAKOVATELNOST	58
7	VÝSLEDKY A DISKUSE	59
7.1	STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ PODLE ISO NOREM.....	59
7.1.1	<i>Optimalizace podmínek pro stanovení křemičitanů</i>	<i>59</i>
7.1.2	<i>Kalibrační závislost</i>	<i>67</i>
7.1.3	<i>Opakovatelnost</i>	<i>70</i>
7.2	KALIBRAČNÍ ZÁVISLOSTI JEDNOTLIVÝM IONTŮ PŘI JEJICH PARALELNÍM STANOVENÍ.....	72
7.3	KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST IONTŮ V PARALELNÍM STANOVENÍ V KOMERČNÍM SYSTÉMU SIA.....	74
7.4	OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ PARALELNÍHO STANOVENÍ IONTŮ METODOU SIA	79
8	SOUHRN	82
9	ZÁVĚR.....	85
	POUŽITÁ LITERATURA.....	86

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CFA	kontinuální průtoková analýza
SFA	segmentovaná průtoková analýza
FIA	průtoková injekční analýza
SIA	sekvenční injekční analýza
UV	ultrafialová oblast záření
VIS	viditelná oblast záření
CVAAS	atomová absorpční spektrometrie chlazených výparů
CCD	detektor založený na měření vodivosti
RSD	relativní směrodatná odchylka, hodnota udávaná v %
SIC	sekvenční injekční chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LLE	liquid - liquid extrakce (extrakce mezi dvě nemísitelné kapaliny)
AAS	atomová absorpční spektrometrie
MCFIA	„multicommutated flow“ injekční analýza
MSFIA	„multisyringe flow“ injekční analýza
MPFS	„multipumping“ průtokový systém
RX	označení činidla, X = pořadové číslo
ISE	iontově selektivní elektroda
HLB	kolona s hydrofilně-lipofilní rovnováhou
SD	směrodatná odchylka

1 ÚVOD

Metody průtokové analýzy nacházejí uplatnění v řadě oborů, flexibilita, snadná automatizace, vysoká frekvence zpracování vzorků umožňuje jejich rutinní použití v laboratořích různého zaměření. Tyto metody se mimo jiné využívají při stanovení farmaceuticky významných látek a pro monitorování životního prostředí. Tato práce se zabývá optimalizací podmínek pro stanovení rozpuštěných křemičitanů ve vodě metodou sekvenční injekční analýzy a dále vývojem automatizovaného SIA systému pro paralelní stanovení vybraných iontů. Vybrané ionty (dusitany, dusičnany, chloridy a křemičitany) se ve vodě běžně stanovují, pro jejich obsah jsou dány určité povolené limity, které při překročení představují riziko s vlivem na zdraví člověka.

Dusík patří mezi nejdůležitější biogenní prvky ve vodách. Sloučeniny dusíku se uplatňují při všech biologických procesech probíhajících v povrchových, podzemních i odpadních vodách. Koncentrace amoniakálního dusíku v podzemních vodách a v čisté povrchové vodě je obvykle do $c = 0,1$ mg/l. Dusitany jako velmi nestálé ionty, jsou snadno oxidovány nebo redukovány. Jsou indikátorem fekálního znečištění podzemních vod. Podle Vyhlášky č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody je přípustný limit pro pitnou vodu pro dospělé 50 mg/l. Způsobují methemoglobinemii, v trávicím traktu mohou být biotransformovány v karcinogenní nitrosoaminy. Dusitany se vážou na hemoglobin za vzniku methemoglobinu (nepřenáší kyslík). Nebezpečná dávka pro dospělého člověka je přibližně 500 mg NO_2^- , pro kojence již 1 až 10 mg NO_2^- . U kojenců do 3 měsíců věku obsahuje krev fetální hemoglobin (hemoglobin F), který je snáze oxidovatelný než hemoglobin A obsažený v krvi starších dětí a dospělých. Enzymový oxido-redukční systém katalyzující zpětnou redukci methemoglobinu není u kojenců ještě dokonale vyvinut^[1,2] a proto u nich vyšší obsah dusitanů ve vodě způsobuje závažnější problémy (také limit obsahu amoniakálního dusíku je v pitné kojenecké vodě rozdílný).

Koncentrace dusičnanů se v čistých podzemních a povrchových vodách pohybuje obvykle v jednotkách mg/l, znečištěné podzemní a povrchové vody i desítky mg/l. Za aerobních podmínek jsou stabilní, ve vodách s nedostatkem kyslíku podléhají redukci na dusitany. Samy o sobě nejsou dusičnany nijak škodlivé, škodí však nepřímo tím, že jsou v trávicím traktu redukovány na dusitany. Limit pro obsah dusičnanů

v kojenecké pitné vodě je 15 mg/l. Vysoký obsah dusičnanů může způsobit změnu barvy masa (jsou proto používány v konzervárnách a jejich obsah v konečných výrobcích určených ke spotřebě je také limitován). V povrchových vodách souvisí obsah dusičnanů se stupněm eutrofizace a patří mezi ukazatele používané ke klasifikaci vod dle čistoty. Při vypouštění odpadních vod patří dusičnany mezi závazné ukazatele^[1,2,3].

Chloridy jsou spolu s hydrogenuhličitanů a sírany hlavními anionty povrchových vod, běžně jsou obsaženy jednotky až desítky mg/l Cl⁻. Ve vodách jsou chemicky i biochemicky poměrně stabilní, při infiltraci vody se v půdách prakticky nezadržují. Ve vodách s vyšší mineralizací díky dobré rozpustnosti chloridových solí můžeme najít i desítky g/l Cl⁻. V mořské vodě je průměrně 19 g/l Cl⁻ (Mrtvé moře 88-127 g/l Cl⁻). Přípustné max. zatížení vodárenských toků je 150 mg/l Cl⁻, ostatní povrchové vody 350 mg/l Cl⁻^[3].

Křemík získáváme z potravy ve formě křemičitanů (solí křemíku). Ty se nacházejí především v minerálních vodách, v pivu, kuřecí kůži, celozrnných potravinách a kořenové zelenině. Pokud delší dobu máme snížený příjem křemíku v potravě, můžeme pozorovat zvýšenou lomivost nehtů a vlasů. Naopak příliš zvýšený příjem křemíku může zapříčinit vznik močových kamenů. Právě tento zvýšený příjem křemíku, který překračuje denní příjem ze stravy, je nebezpečný. Silikáty (což jsou soli křemíku a syntetické formy křemíku) přidávané do potravin jsou naproti tomu relativně neškodné látky a všeobecně označované za nezávadné. Alkalické křemičitany jsou ve vodě rozpustné, vodný roztok alkalických křemičitanů – vodní sklo - se používá k impregnaci, lepení, přísada do tmelů, konzervování vajec). Ostatní křemičitany jsou nerozpustné^[4,5].

1.1 Cíl práce

Cílem práce bylo sestavení automatizovaného SIA systému pro paralelní stanovení vybraných iontů (dusitanů, dusičnanů, chloridů, křemičitanů) na bázi sekvenční injekční analýzy, jeho optimalizace pro měření a testování systému na modelových směsných vzorcích vybraných iontů v oblasti monitorování životního prostředí. Součástí práce, bez které by nebyl realizován cíl práce, bylo zpracování základních informací o stanovení rozpuštěných křemičitanů uvedených v platné normě^[6] pro použití v systému průtokové injekční analýzy a převedení tohoto stanovení do systému sekvenční injekční analýzy. V případě ostatních iontů byl převod jejich individuálních stanovení do SIA systému vyřešen v rámci předchozí diplomové práce^[7].

Experimentální část je jednak zaměřena na podrobnou optimalizaci stanovení rozpuštěných křemičitanů společně s proměřením kalibračních závislostí a měření opakovatelnosti a dále na popis sestavení automatizovaného SIA systému pro paralelní stanovení vybraných iontů na bázi sekvenční injekční analýzy, jeho optimalizaci pro měření a testování na modelových směsných vzorcích.

2 PRŮTOKOVÉ ANALYTICKÉ METODY A JEJICH APLIKACE

Metody průtokové analýzy slouží především k automatizaci chemických analýz. Umožňují zpracování velkého množství vzorků, k jejichž analýze používají jen malé objemy vzorků (10 – 100 μ l). Při zpracování roztoků vzorků a činidel odpadá fáze odměřování jejich objemu, pipetování a eliminuje se tak kontakt pracovníka s toxickými látkami, jedy a rozpouštědly, a především se zvyšuje opakovatelnost výsledků. Minimalizuje se spotřeba činidel a výsledky analýzy jsou získávány v krátkém čase. Metody jsou rovněž velice flexibilní, umožňují provádět manipulaci se vzorky přímo v průtokovém systému. Vyšší rychlost analytického procesu, možnost automatizace, sériové analýzy, miniaturizace aparatury a tím hospodárnost analytického stanovení jsou dalšími charakteristikami těchto metod. Potřeba důležitosti vyvinout automatické metody analýzy vznikla po r. 1950, kdy začaly být čím dál více používány klinické testy pro diagnostické účely v medicíně. Jako řešením byla vyvinuta metoda segmentované průtokové analýzy sloužící jako základ pro další metody průtokových analýz.

Z hlediska ovládnání průtokového systému můžeme průtokové metody rozdělit do dvou generací. Dříve byl průtokový systém obsluhován ručně (metody SFA, FIA), dnes díky pokročilé počítačové technice pomohl vývoji a možnostem využití automatických technik jako jsou sekvenční injekční analýza, multicommutated průtokové metody nebo multisyringe průtokové metody.

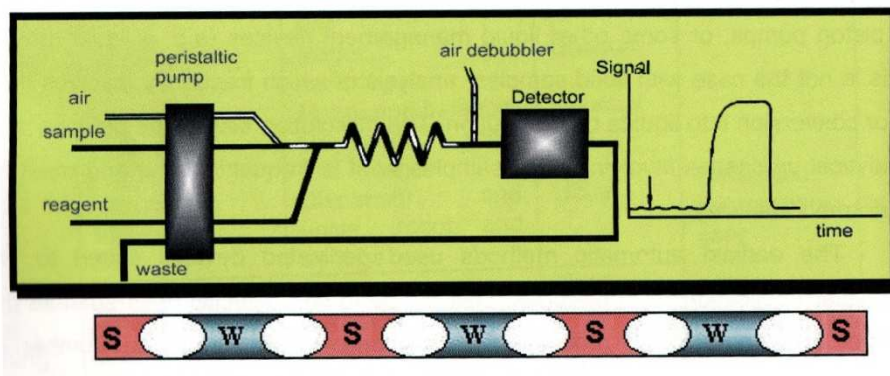
Tab. 1 Vývoj průtokových neseparačních analytických metod^[8,9,10]

Průtoková technika	Základní princip	Výhody/nevýhody
Kontinuální průtoková analýza – CFA	Nástřik vzorku do kontinuálního nosného proudu, dosažení rovnovážného stavu reakce	Pulzování toku roztoků, dlouhý čas analýzy
Segmentovaná průtoková analýza SFA	Oddělení aspirovaných vzorků vzduchovými bublinami, dosažení rovnovážného stavu reakce	Omezení kontaminace analyzovaného vzorku předchozími vzorky, eliminace překryvu signálů po sobě následujících vzorků
Průtoková injekční analýza – FIA	Nástřik vzorku do kontinuálního nosného proudu, dosažení rovnovážného stavu reakce, kontrolovaná disperze	Jednosměrný tok nosného proudu, vyšší frekvence dávkování vzorku

Sekvenční injekční analýza – SIA	Aspirace do diskontinuálního nosného proudu, kontrolovaná parciální disperze, koncentrační gradient	Rychlejší konverze analytu na výsledný produkt díky změnám přímého a zpětného toku, nižší spotřeba objemu činidel a vzorku
Sekvenční injekční chromatografie – SIC	Zapojení krátké monolitické chromatografické kolony do komerčně vyráběného SIA systému	Automatizace, miniaturizace, programovatelnost toku uvnitř systému, rychlost analýzy, nízká spotřeba vzorku, činidel, mobilní fáze a menší finanční náročnost na instrumentaci v porovnání s HPLC

2.1 Segmentovaná průtoková analýza (SFA)

Segmentovaná průtoková analýza (SFA) je zdokonalenou technikou kontinuální průtokové analýzy (CFA) s jednoduchou instrumentací, která obvykle zahrnuje peristaltickou pumpu pro kontinuální aspiraci vzorku nebo činidel, soubor spojujících hadiček určených k proudění nosného toku spojujícího systém s detektorem. Po aspiraci vzorku je vzorek následně rozdělen pomocí vzduchových bublin v nosném proudu a transportován směrem k detektoru (Obr. 1). Použití vzduchových bublin má několik nevýhod – pulzování toku roztoků, jejich vstříknutí do systému a pohyb komplikuje provedení operace a jejich přítomnost redukuje výkonnost separačních technik (dialýza, LLE), představuje překážky v provedení stopped-flow metody a znemožňuje miniaturizaci z mnoha důvodů. Výsledný záznam z detektoru jsou píky, jejichž výška je úměrná koncentraci zkoumaného analytu. Nyní metoda SFA poskytuje efektivní řešení pro laboratoře, pracující s velkým počtem vzorků opakujících stanovení v rutinní analýze. Nicméně cena tohoto vybavení brání jeho rozšíření do běžných laboratoří^[11].



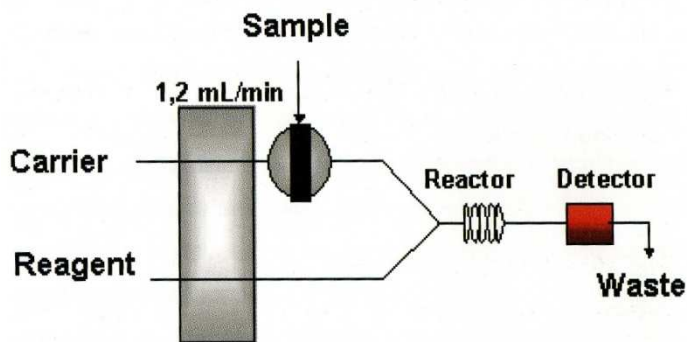
Obr. 1 Schéma segmentované průtokové analýzy^[11]

2.2 Průtoková injekční analýza (FIA)

Průtoková injekční analýza (FIA) spojena se jménem J. Růžička a E. H. Hansen byla vyvinuta v roce 1975 v Danemarku. Základní komponenty FIA jsou ve skutečnosti stejné jako u SFA, zahrnují peristaltickou pumpu jako hnací sílu k pohybu vzorku a činidel, soubor plastových hadiček nesoucích jednotlivé zóny k detektoru. Oproti SFA není vzorek dávkován kontinuální aspirací, ale je vložen do proudu nosného roztoku cestou injekčního ventilu sloužícího pro spojení s tokem činidla, s nímž daný analyt reaguje. Zatímco SFA operuje v turbulentním průtokovém režimu, metoda FIA používá laminární průtok, který snižuje pravděpodobnost mísení po sobě jdoucích vzorků. Protože FIA používá systém úzkých hadiček s nízkou průtokovou rychlostí vzorku a činidel, je spotřeba těchto roztoků mnohem šetrnější než u SFA. Kromě toho je průtoková injekční analýza mnohem flexibilnější metodou, dovoluje provádět možné úpravy této analytické metodiky. Jedna z větších výhod FIA je její jednoduché vybavení. Celý systém je sestaven z nenákladných součástí komerčně snadno dostupných (kromě detekční části systému: spektrometr, potenciometr, AAS vybavení). Důsledkem toho je značný rozvoj této metody v řadě průzkumných laboratoří a vede k využití velkého počtu praktických aplikací v současných technikách^[11].

Tab. 2 Charakteristiky průtokové injekční analýzy^[11]

Aspirovaný objem vzorku	50 – 150 μ l
Reakční čas	3 – 60 s
Průměr hadiček	0,5 mm
Podmínky detekce	Není potřeba dosáhnout rovnovážného stavu reakce
Počet vzorků/h	100
Přesnost	1 – 2 %
Spotřeba činidel	Nízká
Kinetické metody	Proveditelné
Titrace	Proveditelné
Nosný proud	Není nutný
Typ odezvy	Pík
Parametr	Výška, plocha píku

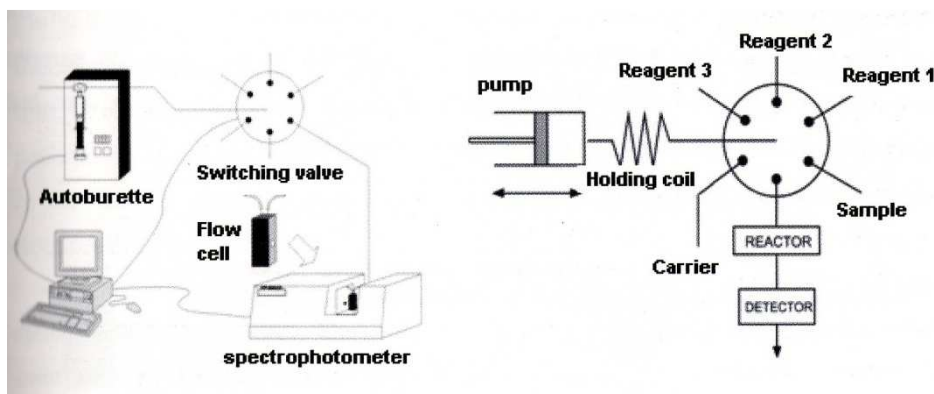


Obr. 2 Schéma metody průtokové injekční analýzy^[11]

2.3 Sekvenční injekční analýza (SIA)

Sekvenční injekční analýza (SIA) jako alternativní metoda k FIA je znázorněna na Obr. 3. Centrální port ventilu je spojen s dvoucestnou pístovou pumpou, jednotlivé pozice portů vzorku a činidel jsou ovládány pomocí selekčního ventilu. Pozice portů

mohou být použity i pro jiné účely, jako jsou vyprázdnění do odpadu nebo připojení dalších zařízení (mikrovlnná trouba, systém fotooxidace nebo mísící komora). Jedna z hlavních charakteristik je řízená kontrola počítačem. Počítač vybírá pozici selekčního ventilu, propojení centrálního portu s jednotlivými obvodovými porty, zapíná, vypíná pístovou pumpu, řídí pohyb ve smyslu aspirace nebo dispenze, vybírá jejich objem a upravuje průtokovou rychlost. Jeho nedílnou prací je také shromažďovat data z měření a vyhodnocovat je. V systému SIA je ústřední port selekčního ventilu připojen ke kanálu vzorku a čerpadlo je nastaveno na odsávání předem naprogramovaného objemu vzorku při poměrně nízké průtokové rychlosti, aby se zabránilo tvorbě bublin. Potom je ústřední port připojen k příslušnému kanálu za účelem aspirace předem daného objemu činidla. Dále se systém nastaví tak, aby se spojil s kanálem vedoucím k detektoru. Tyto děje probíhají v režimu laminárního proudění, který usnadňuje disperzi vzorku a činidla. Výsledkem je záznam detektoru ve formě píků stejně tak jako u metody FIA. Disperze v systému SIA vede k tomu, že se zóny vzorku a činidla mohou překrývat. Typický SIA systém obsahuje dva typy cívky, a sice: cívky vložené do kanálu spojovacího pístové čerpadlo s ústředním portem selekčního ventilu a cívky použité pro spojení s detektorem, která je určena k dostatečnému promísení vzorku a činidla, aby signál reakčního produktu byl vyhodnotitelný. Na rozdíl od FIA, může být SIA upravena na systém víceparametrových analýz a to pomocí selekčního ventilu s příslušným počtem kanálů s nabídkou různých analytických činidel, která budou přesně naprogramována počítačem. Ve FIA systému se k tomuto účelu používají další kanály systému, který bývá velmi komplikovaný. V tomto ohledu je SIA mnohem blíže k metodě SFA než FIA, která umožnila stanovení až dvaceti parametrů u jednoho vzorku - kromě toho, že SIA působí mnohem jednoduše a především hospodárně.



Obr. 3 Schematické znázornění systému sekvenční injekční analýzy^[11]

Tab. 3 znázorňuje vlastnosti SIA, které jsou zdánlivě velmi podobné vlastnostem metody FIA (Tab. 2) s nepatrnými rozdíly mezi těmito dvěma metodami. Jedním z nich je výrazné snížení spotřeby vzorku a činidel v SIA, to však není v důsledku používání menších objemů pomocí injekční aspirace, nýbrž v souvislosti s principem SIA metody. V provozu FIA, vzorek a spotřeba činidla jsou prakticky nezávislé, peristaltické čerpadlo neustále pohání vzorek a činidla při konstantním průtoku v celém procesu. V SIA pístové čerpadlo pracuje pouze po dobu nezbytně nutnou k dávkování objemu vzorku a činidla potřebného pro dané stanovení. Vzhledem k tomu, že metoda sekvenční injekční analýzy používá pístová čerpadla, je robustnější než techniky využívající peristaltická čerpadla. Ve skutečnosti, peristaltická čerpadla používají hadičky z materiálů, které jsou relativně snadno poškoditelné mechanicky i některými chemikáliemi (kyseliny, zásady, a zejména rozpouštědla), naopak pístová čerpadla používají pouze skleněné rezervoáry pístu pístové pumpy nebo teflonové hadičky jako spojovací materiál, který je vysoce inertní a zaručuje dlouhou životnost.

Tab. 3 *Charakteristiky sekvenční injekční analýzy^[11]*

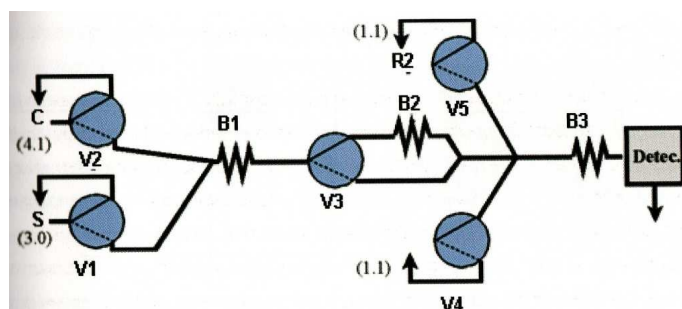
Aspirovaný objem vzorku	50 - 150 μ l
Reakční čas	3 – 60 s
Průměr hadiček	0,8 mm
Podmínky detekce	Není potřeba dosáhnout rovnovážného stavu reakce
Počet vzorků/h	70
Přesnost	1 – 2 %
Spotřeba činidel	Velmi nízká
Kinetické metody	Proveditelné
Titrace	Proveditelné
Nosný proud	Není nutný
Typ odezvy	Pík
Parametr	Výška, plocha píku

Jednou z největších překážek původního vývoje SIA byla nutnost počítače k řízení systému, která na rozdíl od FIA, vyústila ve vývoji v sotva pár desítek metod během prvního roku její existence. Nedostatek komerčně dostupného softwaru a nedostatek zkušeností v propojení počítačů do analytické aplikace se začal rozvíjet velmi pomalu, navzdory své osvědčené výhodě. Jen během desetiletí, s počátkem použití komerčního softwaru, SIA získala svou pevnou pozici mezi průtokovými metodami.

2.4 Multicommutated flow analysis(MCFIA)

Technika MCFIA, jejichž autory B. F. Reis a spol. využívá rychlé přepínání mezi třícestnými solenoidními ventily. Dřívější MCFIA systémy využívaly jednonábový pohonný systém k aspiraci kapalin dávkovaných přes jednotlivé ventily. Jelikož aspirační zařízení vedlo ke vložení vzduchových bublin, nebo odplynění kapaliny v systému, bylo vhodnější použít taková pohonná zařízení, jako jsou peristaltická nebo pístová čerpadla.

Systém MCFIA znázorněn na Obr. 4 lze použít pro řadu účelů pomocí rychlého přepínání ventilů. Používá se peristaltické čerpadlo a solenoidní ventily V1, V2, V4 a V5, které jsou uspořádány tak, že proudící kapalina se vrací do zásobníku činidla, jehož ventil je vypnutý, je dávkována do systému, zatímco solenoidní ventily jsou zapnuté. Střídavým přepínáním V1 a V2 ON dochází k ředění vzorku nosným proudem. Vzhledem k tomu, že solenoidní ventily mohou být zapnuty velmi rychle, lze střídavě vkládat variabilně dlouhé zóny nosného proudu a vzorku, které budou pronikat cestou přes smyčku B1. Ventil V3 umožňuje průtok přes měřnatokadmiovou kolonu s cílem redukce dusičnanů na dusitany. Ventily V5 a V6 mohou být použity k dávkování předem daných objemů při jejich zapnutí po vhodný interval. Smyčka B3 má usnadnit homogenizaci zředěného neznámého vzorku s činidly přidávanými v posledním kroku^[11].



Obr. 4 Schéma systému multicommutated flow analýzy^[11]

Jedním z hlavních nedostatků solenoidních ventilů je fakt, že se ventily po dlouhou dobu v provozu zahřívají. Výsledný nárůst teploty může deformovat teflon vnitřní membrány ventilů a činí je tak nepoužitelnými. Přehřátí lze předejít použitím účinného elektronického ochranného systému. Tab. 4 zahrnuje charakteristické vlastnosti MCFIA. Jak je patrné, sdílí některé výhody s FIA jako zvýšená rychlost analýzy (vyšší než u SIA) a snížená spotřeba činidel jako důsledek nepoužitých vzorků a činidel, které se vrací do svých nádrží. Nicméně, MCFIA také sdílí jednu nevýhodu s metodou průtokové injekční analýzy, především zranitelnost peristaltického čerpadla při působení agresivních činidel (zejména rozpouštědla).

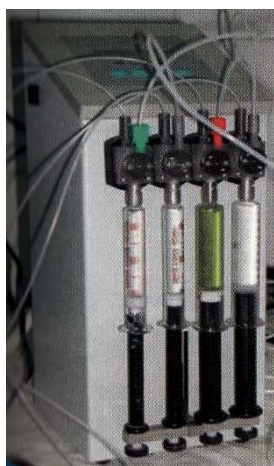
Tab. 4 Charakteristiky metody multicommutated flow analýzy^[11]

Aspirovaný objem vzorku	50 – 150 µl
Reakční čas	3 – 60 s
Průměr hadiček	0,8 mm
Podmínky detekce	Není potřeba dosáhnout rovnovážného stavu reakce
Počet vzorků/h	100
Přesnost	1 – 2 %
Spotřeba činidel	Velmi nízká
Kinetické metody	Proveditelné
Titrace	Proveditelné
Nosný proud	Není nutný
Typ odezvy	Pík
Parametr	Výška, plocha píku

2.5 Multisyringe flow injection analysis(MSFIA)

Tato varianta průtokové injekční analýzy byla vyvinuta v roce 1999 ve spolupráci s firmou Crison (Alella, Barcelona, Španělsko). Cílem bylo spojit výhody předchozích postupů při proudění a předcházet tak jejich nevýhodám. Obr. 5 ukazuje typický multisyringe byretový systém pro použití v MSFIA. Zařízení se skládá z konvenční automatické titrační byrety upravené tak, že motor může současně pohybovat čtyřmi

písty, aby se zabránilo potřebě mít čtyři samostatné byrety fungující paralelně. Toho je dosaženo pomocí kovové tyče, která pohybuje krokovým motorem byrety, tyč přizpůsobuje polohy čtyř pístů a každá hlava obsahuje rychlé přepínání elektromagnetického ventilu. Je zřejmé, že motor se pohybuje mezi čtyřmi písty najednou, což je ekvivalentní s použitím vícekanalového peristaltického čerpadla u FIA, ale vyhýbá se nevýhodě a to nízké mechanické a chemické odolnosti hadiček. Poměr průtokových rychlostí mezi kanály lze změnit pomocí pístu s vhodným průměrem podobně jako průměry hadiček ve FIA.



Obr. 5 Multisyringe byreta používaná v multisyringe průtokové metodě^[11]

Vstříknutí požadovaného objemu vzorku vyžaduje použití modulu včetně typického FIA rotačního injekčního ventilu, který umožňuje aspirovaný objem upravit pomocí rozměrů jeho smyčky. V prvním kroku byly písty sníženy, aby začalo odsávání vzorku a činidla. Zatímco elektromagnetický ventil pístu 1, který aspiroval vzorek, byl zapnutý (left), jiné byly v poloze OFF (vpravo). Vzhledem k tomu, že injekční ventil byl v pozici dávkování, došlo k aspiraci vzorku definovaného objemu přes smyčku. Současně, jiné písty aspirovaly jak nosný proud, tak činidla.

Jakmile byly vzorek a činidla naaspirovány – to vše v druhém kroku, bylo zahájeno obrácení směru pohybu pístů. Nejdříve byl injekční ventil přepnut do pozice dávkování, poté byl ventil pístu 1 zapnut a začal řídit vypuštění do odpadu a ventil pístu 2 byl zapnut tak, že nosný proud vzorku proudil ve smyčce. Ventily pístů 3 a 4 byly vypnuty, aby se vrátila činidla R1 a R2 do jejich zásobníků. Bezprostředně před smísením vzorku s činidlem R1, byl ventil pístu 3 zapnut, za účelem smísení obou kapalin. Tento postup se opakuje pro činidlo R2.

MSFIA systémy kombinují některé z výhod výše popsaných průtokových technik, a to:

A] Vysokou rychlost analýzy FIA, což je výsledkem paralelního dávkování vzorku a činidla, což vede ke zlepšení účinnosti mísení ve vztahu k SIA.

B] Robustnost SIA. Ve skutečnosti mohou tekutiny přijít do kontaktu pouze se skleněnými stěnami rezervoárů pístů a teflonovými hadičkami, neboť se zde nepoužívá žádné peristaltické čerpadlo.

C] Vzorek a nízká spotřeba činidla v SIA na základě reakce složek se používá v množství nezbytně nutném pro chemickou reakci. Činidla jsou aspirována pouze tehdy, prochází – li vzorek jejich směsným bodem.

D] Vysoká flexibilita SIA systému. Doba analýzy není stanovena rozměrem hadiček, ale spíše programem vytvořeným počítačem, kterým se řídí celý systém, který určuje čas a průtokovou rychlost.

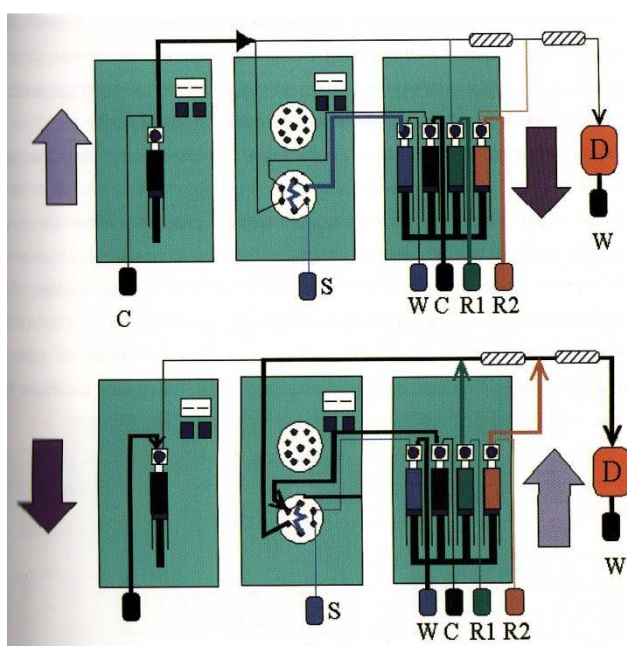
E] Schopnost používat solenoidní ventily jako metoda MCFIA, které lze ovládat, aniž by se museli zastavit pohyby pístů. Přepínání mezi ventily je tak rychlé, že v systému nevzniká žádný přetlak.

Na rozdíl od FIA, MSFIA vyžaduje použití počítače k ovládní systému. To však nepředstavuje žádný zvláštní problém, protože dostupné softwary pro provádění všech průtokových technik jsou nyní k dispozici. Původní MSFIA prototyp byl později upraven pro ekonomické využití a jednoduchost ve spolupráci s firmou Crison, a to včetně úprav v začlenění dvou rychle přepínaných ventilů nezávislých pístových pump, ale ovládaných stejnou byretou. Nové ventily jsou umístěny na horní platformě multisyringe byrety.

Písty jsou vyplněny spínacími solenoidními ventily V5 a V6, píst 2 aspiruje daný objem vzorku, a písty 1, 3 a 4 nasávají nosný proud a činidla. Měření se provádějí pomocí obráceného směru proudění, které je dosaženo přepínacími ventily V5 a V6 ve vypnuté poloze. Jakmile je píst 1 v poloze zapnuté, pohání objem vzorku ve smyčce. Zároveň je ventil byrety 2 ve vypnutém stavu. Vzhledem k tomu, že ventily V5 a V6 fungují synchronně během aspirace, mohou být nahrazeny zdvojeným ventilem ovládaným přes jeden solenoid. To umožňuje ovládat byrety s dvojitým ventilem pro vstřikování a uvolní jiný ventil pro jiný účel. Třetí generace multisyringe byret v současné době již zahrnuje nezávislé ventily, které nahrazují čtyřcestné ventily se spojujícím proužkem s

cílem usnadnit řízení jednotlivých, dvoulůžkových a třílůžkových solenoidních ventilů pomocí samostatné byrety.

Nejdříve je multisyringe na pravé horní polovině Obr. 6 snížena pro naplnění vzorku do smyčky a činidla do stříkačky, a současně byreta vlevo pohání nosný proud k detektoru. Ve druhém kroku se byreta vpravo pohybuje nahoru pro injekci vzorku i činidla, mezitím byreta vlevo jsou naplněny nosným proudem. Alternativní využití dvou byret umožňuje zrychlit analýzu až na dvojnásobek (až 200 vzorků za hodinu, což lze jen stěží dosáhnout jinou průtokovou technikou). Tab. 5 shrnuje charakteristické vlastnosti MSFIA.



Obr. 6 Schéma zrychlené multisyringe flow techniky^[11]

Tab. 5 Charakteristika multisyringe průtokové analýzy^[11]

Aspirovaný objem vzorku	50 – 150 μ l
Reakční čas	3 – 60 s
Průměr hadiček potrubí motoru, pro aspiraci vzorku	0,8 mm
Průměr hadiček pro aspiraci činidel	1,5 mm
Podmínky detekce	Není potřeba dosáhnout rovnovážného stavu reakce
Počet vzorků/h	100/200 při použití přídavné byrety
Přesnost	1 – 2 %
Spotřeba činidel	Velmi nízká
Kinetické metody	Proveditelné
Titrace	Proveditelné
Nosný proud	Není nutný
Typ odezvy	Pík
Parametr	Výška, plocha píku

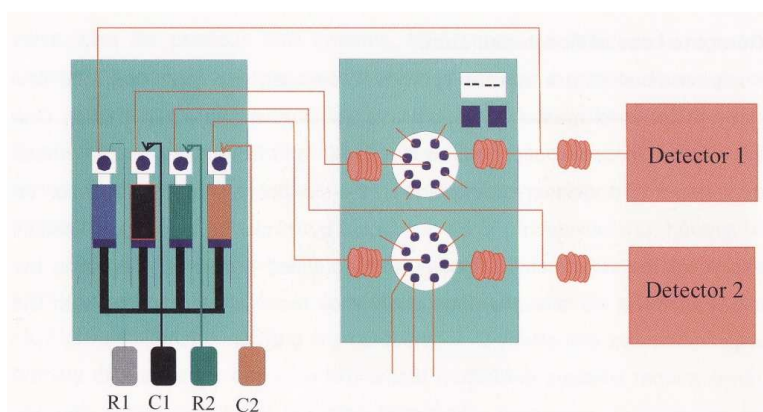
2.6 Multipumping flow system (MPFS)

Multipumping flow systém, který byl vyvinut v roce 2002 na Farmaceutické fakultě University of Porto (Portugalsko) a Piracicaba CENA (Brazílie) je založen na využití solenoidních pístových čerpadel, kde každý zdvih pohání nastavené objemy kapalin ($V = 3, 8, 20, 25, 50 \mu\text{l}$) danou průtokovou rychlostí, udávající určitou frekvenci. Mezi hlavní výhody těchto systémů patří jejich vysoká flexibilita, snadná konfigurace, odolnost a nízká cena. Stejně jako předchozí systémy, MPFS používá vzorky a činidla velmi střídmě. Obvykle se používá kombinace solenoidních čerpadel a ventilů. Píky analytů poskytnuté multipumping průtokovým systémem jsou vyšší, než ty získané jinými technikami průtokových analýz. To může být připsáno tahům pístových pump způsobujícím turbulence, které usnadňují smísení vzorku a činidla. Typický

multipumping systém je podobný systému MCFIA. Ve skutečnosti, dříve mohl být použit k provedení MCFIA, protože nabízí libovolnou kombinaci ovládání ventilů a solenoidních čerpadel. Hlavní rozdíl mezi nimi je, že multipumping systémy vyžadují nejen kontrolu přepínání ventilů, ale také kontrolu frekvence, s cílem zajistit reprodukovatelnou průtokovou rychlost. Jednoduchost a hospodárnost MPFS by měla usnadnit rozvoj přenosných zařízení na principu této metody pro měření v terénu^[11].

2.7 Kombinované průtokové techniky

Je zřejmé, že při vývoji konkrétní aplikace lze použít více než jednu z různých průtokových technik s cílem maximalizovat výhody každého individuálního výběru. Jedním z potenciálně účinných kombinací může být spojení metody SIA a MSFIA (Obr. 7). Ve skutečnosti, tato kombinace umožňuje, aby všechny předchozí operace se vzorkem (např. zakoncentrování na pevnou matici, fotooxidace), byly provedeny napodobením práce manuálních systémů, zatímco další systém může přispět pro zvýšenou přesnost aspirace činidla paralelně přes multisyringe, a tedy účinnějším promísením se vzorkem. Další atraktivní kombinace je MSFIA s modulem, který obsahuje dva přepínací ventily, což umožňuje každému ventilu regulovat dvě pístové pumpy a umožňuje současně provádět dva procesy bez výrazně zvýšených nákladů. V současné době se experimentuje s touto kombinací s cílem monitorovat kombinovanou výrobu vodní energie z tepelných elektráren (viz Obr. 7). Kombinace metod MSFIA a MPFS jsou také neméně zajímavé.

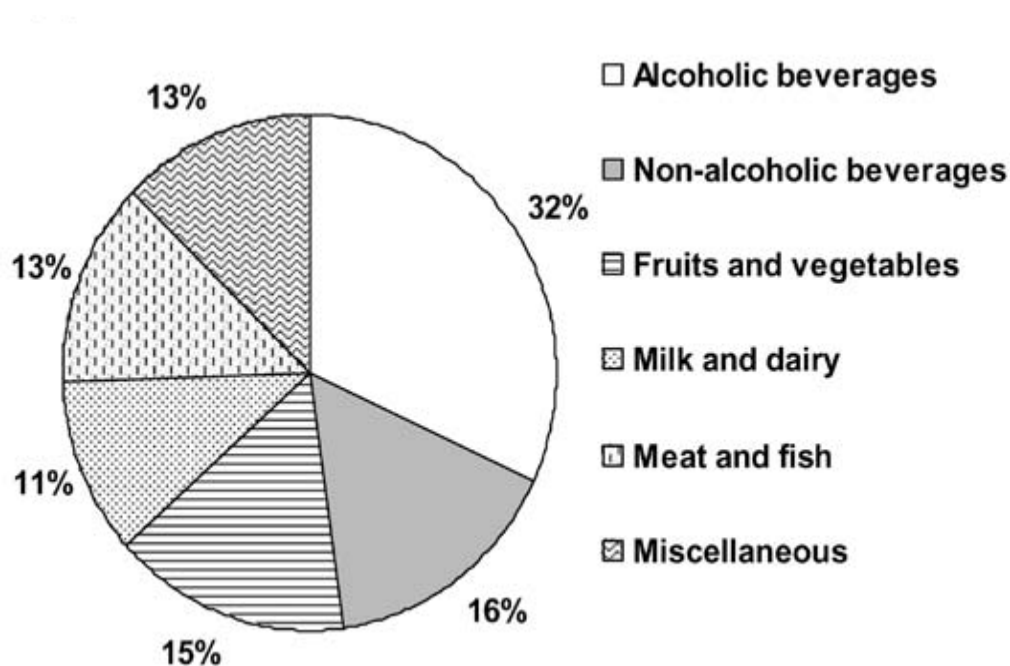


Obr. 7 Schematické znázornění kombinace metod multisyringe flow analýzy a sekvenční injekční analýzy^[11]

2.8 Aplikace metod průtokové analýzy

Metody průtokové analýzy patří mezi techniky, které umožňují analýzu mnoha vzorků v krátkém čase, proto tyto metody (jak je patrné z Obr. 8) mají široké uplatnění nejen v chemickém průmyslu, ale i v zemědělství, využívají se k analýze zemědělských produktů, v potravinářství k analýze jídel a nápojů alkoholických ale i nealkoholických aj. Grafické znázornění procentuálního zastoupení SIA metody odpovídají výsledkům publikovaných do roku 2008. Jelikož jsou tyto metody řízeny pomocí počítače, nekladou velké požadavky na obsluhu, která systém ovládá pomocí řídicího programu sestaveného z jednotlivých měřících cyklů^[12].

Při analýze vzorků s různým obsahem není nutné měnit a přestavovat celý systém, pouze stačí zvolit příslušný program vytvořený obsluhou či případně zaměnit použitá činidla.



Obr. 8: Procentuální zastoupení SIA metody v analýze potravin^[12]

Díky tomu, že vzorek je většinou ve vodném roztoku, je aplikace do průtokového systému jednoduchá a bez větších problémů s předchozí úpravou vzorku. Analýza vzorku probíhá automaticky a celý analytický proces je velmi jednoduchý.

Díky flexibilitě s možností měnit parametry stanovení, které se rychle naprogramují v ovládacím programu, je umožněna rychlá a citlivá optimalizace. Navíc je SIA schopna velmi přesně dávkovat i malé objemy roztoků, čímž se snižuje množství vznikajícího odpadu, což je jedna z velkých výhod této metody. V následujících tabulkách je uveden přehled vybraných biotechnologických aplikací metody SIA^[12].

Tab. 6: SIA stanovení vybraných parametrů v biotechnologických aplikacích (nealkoholické nápoje)

Analyt	Matrice	Detekce	Kalibr. rozsah	Citace
Ethanol	Pivo	Amperometrie	0,15 - 30 mg/l	13
Ethanol	Víno	UV – VIS	0,03 - 0,30 mg/l	14
Glycerol	Víno, pivo	UV – VIS	0,3- 3,0 mM	15
L- (-) malonová kyselina	Víno	UV – VIS	0,01 - 0,15 mg/l	16
Glukóza	Pivo	Amperometrie	5 - 750 mg/l	13
Oxid siřičitý	Víno	UV – VIS	25 - 250 mg/l	17
Vápník	Kokos. mléko	UV – VIS	15 - 150 g/l	18
Hořčík	Kokos. mléko	UV – VIS	5 - 50 g/l	18

Tab. 7: SIA stanovení vybraných parametrů v biotechnologických aplikacích (zelenina, ovoce)

Analyt	Matrice	Detekce	Kalibr. rozsah	Limit detekce	Citace
Dimethoát	Zelenina	UV – VIS	0,03 - 0,5 µg/g	0,01 µg/g	19
Aflatoxin B ₁	Ovoce	UV – VIS	Neuvedeno	0,2 ng/ml	20
Dusičnany	Zelenina	UV – VIS	1,35 - 50,0 mg/l	Neuvedeno	21

Tab. 8: SIA stanovení vybraných parametrů v biotechnologických aplikacích (mléko, mléčné výrobky)

Analyt	Matrice	Detekce	Kalibr. rozsah	Limit detekce	Citace
Chloridy	Mléko	Potenciometrie	0,01 - 0,25 M	Neuvedeno	22
Fosfor	Mléko	UV – VIS	Neuvedeno	2,0 mg/l	23
Močovina	Mléko	Konduktometrie	Neuvedeno	$2,6 \cdot 10^{-4}$ M	24
Močovina	Mléko	UV – VIS	Neuvedeno	$2,8 \cdot 10^{-5}$ M	25

Tab. 9: SIA stanovení vybraných parametrů v biotechnologických aplikacích (maso, rybí produkty)

Analyt	Matrice	Detekce	Kalibr. rozsah	Limit detekce	Citace
Dusitany, dusičnany	Maso	UV – VIS	Neuvedeno	9,0 µg/l	25
Měď	Ryby	CVAAS	Neuvedeno	0,46 µg/l	26

Tab. 10: SIA stanovení vybraných parametrů v biotechnologických aplikacích (analýza jídel, potravinářské výrobky)

Analyt	Matrice	Detekce	Kalibr. rozsah	Limit detekce	Citace
Glukóza	Med	Chemiluminiscence	$1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ M	$1,0 \cdot 10^{-6}$ M	27
Glukóza	Med	Chemiluminiscence	0,01 - 1,0 mM	4 µM	28

Železo	Olej	UV – VIS		0,31 mg	29
--------	------	----------	--	---------	----

Z výše uvedených tabulek je zřejmé, že metoda sekvenční injekční analýzy je značně využitelnou metodou nejenom v biotechnologických aplikacích, ale i v analýze potravin. Různé druhy matrice, ve kterých je daný analyt stanovován, především nápoje (alkoholické, nealkoholické), ale i v pevné vzorky (zelenina, ovoce, maso aj.), možnosti různých detekčních systémů (chemiluminiscence, UV- VIS, potenciometrie aj.), vybrané kalibrační rozsahy některých látek a nízké detekční limity vybraných analytů činí tuto metodu vhodnou pro stanovení těchto látek v různých odvětvích.

3 ZPŮSOBY VYHODNOCENÍ STANOVENÍ

Většina prací využívá průtokové techniky zahrnující kvantitativní stanovení daných cílových analytů. Některé aplikace se však týkají předúpravy vzorků - zvláště v souvislosti s pomalým průběhem operace, jako jsou radiochemické metody. Užitečnost průtokových technik v této souvislosti spočívá ve schopnosti minimalizovat objem vzorku a spotřebu činidla, a také zvýšení bezpečnosti a to snížením intervence analytika do analytického procesu. Dále jsou popsány různé způsoby využití průtokových technik pro kvantitativní účely. Některé mohou být užitečné i pro kvalitativní účely, neboť umožňují stanovit přítomnost či nepřítomnost daného analytu, jako je tomu například u stopped-flow techniky, která umožňuje provádět spektrální scany.

3.1 Stanovení na základě kalibrační křivky

Stanovení na základě kalibrační křivky je nejčastěji využívanou metodou pro stanovení neznámého analytu ve vzorku. Kalibrační křivka je obecně znázorněna graficky jako závislost absorbance (signál) na koncentraci vzorku. V následujících kapitolách jsou uvedeny možnosti kalibračních závislostí.

3.1.1 Kalibrační závislost na základě výšky píku

Nejčastější analytická metoda; kalibrační křivka je vytvořena vynesáním závislosti výšek píků na koncentraci - nebo logaritmické koncentraci v potenciometrickém stanovení. Zvyšující se dostupnost elektronického zpracování dat a softwaru usnadnily využití ploch píků místo výšek, které poskytují přesnější výsledky, v některých případech. Jaký parametr bude vhodnější pro kalibraci, je volbou v každé situaci a měl by být stanoven na základě analýzy.

3.1.2 Kalibrační závislost na základě šířky píku

Šířky píků pro stanovení kalibrační závislosti jsou také používány, i když mnohem méně často než výška píku. Za tímto účelem je šířka píku v dané výšce měřena

a vynesena, obvykle ve formě logaritmické $W = a + b \log C$, tato metoda je obzvláště užitečná při vytvoření dvojitéch píků.

3.1.3 Kalibrační závislost na základě plochy píku

Digitalizace dat usnadnila jejich zpracování do té míry, že výpočet kalibrační křivky z oblasti pod píkem je nyní stejně náročný, jako kalibrace vytvořené z výšky píků. Některé softwarové balíky (např. AUTOANALYSIS) mají možnost výběru v parametrech píku (výška a plocha), které mají být použity pro kalibrační závislost. Uživatel má možnost vybrat lepší volbu z hlediska linearit na základě předchozích zkušeností.

3.2 Stopped-flow průtokové techniky

Obecně řečeno, stopped-flow techniky jsou techniky takové, kde v určitém čase procesu je tok zastaven pro konkrétní účel. Nejčastěji je zastaven tok v určité době po průchodu vrcholu píku. To může být použito pro různé účely, nejdůležitější z nich jsou popsány níže. Ačkoli stopped-flow techniky vznikly v době rozvoje metody FIA, získala tato metoda větší význam než jiné, novější alternativy. To bylo částečně výsledkem přístupnosti FIA pro ruční ovládání, aniž by bylo nutné použít počítač. V každém případě po rozmachu počítavé techniky bylo umožněno využití stopped-flow techniky a to proto, že poskytuje přesné a reprodukovatelné zastavení toku v bezobslužném způsobu. Jedno z prvních použití stopped-flow techniky bylo zastavení disperze roztoku. Při pomalých reakcích se používá dostatečně dlouhá hadička k zajištění odpovídající reakce a zároveň k odhalování slabého signálu. To však má dvojitý efekt, protože se zvyšuje signál díky prodlouženému reakčnímu času, ale také vyvolává rozptyl díky dlouhé cestě k detektoru a nakonec redukuje signál analytu. Z tohoto důvodu může být účinnější zvýšení reakční doby jednoduše tím, že je provedeno zastavení toku během přiměřeného času, a poté se vzorek transportuje k detektoru co nejkratší hadičkou, aby nedošlo ke zvýšení rozptylu (disperze).

Ve FIA toto řešení vždy snižuje rychlost analýzy, zatímco v SIA mohou být ztráty minimalizovány zastavením průtoku v reakční cívce, která se nachází za selekčním ventilem, a mezitím začíná zpracování dalšího vzorku. Když druhý vzorek dosáhne reakční cívky, bude pohánět vzorek první, který v té době reagoval v dostatečné míře,

směrem k detektoru. Reakční dobu lze dále zvýšit pomocí několika kanálů pro reakční cívky.

3.2.1 Aplikace stopped–flow metod do metod kinetických

Průtokové techniky jsou metody pracující na základě časově fixované techniky, ve skutečnosti není dosaženo rovnovážného stavu reakce, protože se předpokládá vytvoření dostatečně vysokého signálu s vysokou opakovatelností na základě vysoké přesnosti provádění jednotlivých kroků měření. S ohledem na vliv průtokové techniky na reakční kinetiku, je tu další možnost použití stopped flow režimu. Stopped–flow režim patří mezi nejpoužívanější kinetické metodiky. Ve skutečnosti, pokud je tok zastaven, zatímco se tvoří vrchol píku, výsledný signál se bude lišit v závislosti na konkrétní situaci. Jestliže reakce je již v rovnováze, bude signál stále stejně vysoký jako vzorek, zastavený v detektoru, a nebude se již dále zvyšovat. Na druhé straně, jestliže se vzorek zastavil, než byla reakce dokončena, bude se signál dále vyvíjet, pokud další podmínky přispívají ke vzniku reakčního produktu, pak se signál bude s časem zvyšovat.

3.2.2 Aplikace stopped–flow metod na snímací techniky

Jedním z dalších zajímavých použití stopped–flow technik je skenování procesů používaných k rozšíření dostupných analytických informací. Tím, že při zastavení toku je signál nejvyšší, lze získat UV-VIS spektra pro účely, jako je spektrální identifikace, čistota hodnocení nebo vícerozměrné analýzy. Se současnými CCD detektory nebo s UV-VIS spektrofotometry s diodovým polem, které umožňují snímat spektra v každém bodě podél profilu, může být snímání dosaženo i bez zastavení toku. Přesto je tato stopped-flow metoda užitečná pro ostatní z testovacích technik (např. fluorimetrie, polarografie, voltametrie).

4 STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ PRŮTOKOVOU ANALÝZOU (FIA a CFA)

Stanovení rozpuštěných křemičitanů průtokovou analýzou (FIA a CFA) se spektrofotometrickou detekcí podle ČSN EN ISO 16 264

4.1 Princip zkoušky při práci s metodou FIA

Při metodě FIA se vzorek vstříkují do kontinuálně protékajícího nosného proudu (vody). Ke vzorku se přidá kyselý roztok heptamolybdenanu, který reaguje s křemičitany a fosforečnany za vzniku kyseliny molybdátokřemičité a molybdátofosforečné, která je rozložena kyselinou šťavelovou. Kyselina molybdátokřemičitá se redukuje roztokem chloridu cínatého na výsledný produkt-molybdenovou modř měřený při vlnové délce 710 nm^[6].

4.2 Rozsah a užití kalibrace

Dle normy ČSN EN ISO 16 264 pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou FIA byly určeny dva kalibrační rozsahy. Kalibrační rozsah I ($c = 0,2 - 2,0$ mg/l) a kalibrační rozsah II ($c = 2,0 - 20,0$ mg/l)^[6].

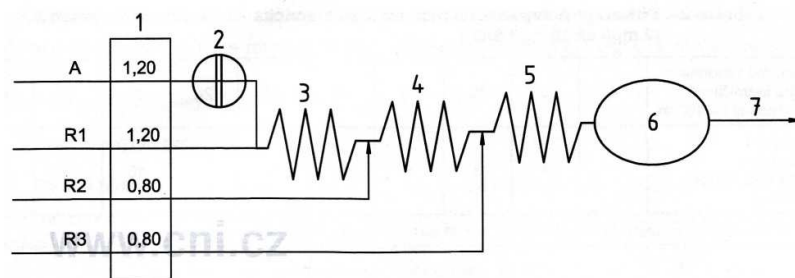
4.3 Rušivé vlivy

- tanin, vysoké koncentrace železa, sulfidů a fosforečnanů (úpravou kyselinou šťavelovou se snižuje rušivý vliv těchto látek)
- hlinité ionty jako příměs ve vzorku- snižují účinnost přídavku kyseliny šťavelové při odstraňování rušivého vlivu fosforečnanů
- fluoridy v koncentracích vyšších než 150 mg/l jako příměs vzorku- úprava pomocí kyseliny borité
- vysoké koncentrace oxidačních činidel^[6]

4.4 Použité chemikálie a činidla

Všechny požadované chemikálie musí být zaručené analytické jakosti

- roztok molybdenanu (R1) - připraven z vodného roztoku tetrahydrátu heptamolybdenanu hexaamonného $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a kyseliny sírové
- roztok kyseliny šťavelové (R2) - vodný roztok dihydrátu kyseliny šťavelové
- roztok chloridu cínatého (R3) – v roztoku zředěné kyseliny sírové se rozpustí dihydrát chloridu cínatého a hydrazin- sulfát
- alkalický roztok křemičitanů-připraven z vodného roztoku hydroxidu sodného a chloridu cínitého SnCl_4
- zásobní roztok křemičitanů- vodný roztok alkalického roztoku křemičitanů
- kalibrační roztoky- připraveny zředěním zásobního roztoku křemičitanů, doporučuje se příprava nejméně pěti kalibračních roztoků pro jeden kalibrační rozsah
- roztok k čištění průtokové sestavy - připraven z vodného roztoku hydroxidu sodného, do kterého se přidá dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové $(\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})^{[6]}$



- A - nosný roztok
R1 - roztok činidla R1
R2- roztok činidla R2
R3 - roztok činidla R3
1- čerpadlo
2- injekční ventil
3 - reakční spirála
4 - detektor
5 - odpad

Obr. 9 Průtoková injekční sestava pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou FIA ^[6]

4.5 Ostatní stanovení rozpuštěných křemičitanů

Tab. 11 *Ostatní stanovení rozpuštěných křemičitanů*

Vzorek	Použitá činidla	Detekce/ spektrofotometr	Detekční limit	Pracovní rozsah	RSD	Počet vz/h	Citace
Čerstvá voda – SiO ₄	Molybdenan amonný, NaOH	Využito	0.18 mg/l	0.47 - 117 mg/l	1,80 %	24	30
Pevný odpad ze spal. zařízení – NH ₄ , SiO ₂	Heteropoly molybdát, askorbová kyselina	Využito -multi- syringe systém	0,13 mg/l (NH ₄), 0,03 mg/l (SiO ₂)	Neuvedeno	do 2,5 %	Neuvedeno	31
Odpadní voda – SiO ₄ , PO ₄	Heteropoly- molybdát	Využito - stopped flow technika	1,424 mmol (Si), 0,162 mmol (P)	0,125-2,848 mmol (Si), 0,026-0,485 mmol (P)	2,1 % (PO ₄) 1,1 % (SiO ₄)	30	32
Odpadní voda – SiO ₂ , PO ₄	Produkt – molybdo - silikát	SIA	0.2 mg/l (P), 0,9 mg/l (Si)	do 12 mg/l (P), 30 mg/l (Si)	1.4 % (P), < 4 % (Si)	23	33

Tab. 12 Ostatní stanovení rozpuštěných křemičitanů

Vzorek	Použitá činidla	Detekce/ spektrofotometr	Detekční limit	Pracovní rozsah	RSD	Počet vz/h	Citace
Vzorky vody - NO, NO ₃ , Cl, PO ₄	Chromogenní činidla ke stanovení daných iontů	CCD	6 mg/l (N-NO ₂ ⁻), 40 mg/l (N-NO ₃ ⁻), 400 mg/l (Cl ⁻), 30 mg/l (P-PO ₄ ³⁻)	30-300 mg/l (N- NO ₂ ⁻), 0,1-1,0 mg/l (N-NO ₃ ⁻), 1,0-10 mg/l (Cl ⁻) , 0,05-2,5 mg/l (P-PO ₄ ³⁻)	1,6 % (NO ₂), 2,2 % (NO ₃), 2,3 % (Cl ⁻), 1,5 % (PO ₄ ³⁻)	50	34
Amonium, NO ₂ , NO ₃	Anorganické kyseliny	UV - VIS	Neuvedeno	0,03-10 mg/l (amoniak. dusík), 0,05-5 mg/l (NO ₂), 0,1- 10 mg/l (NO ₃)	Neuvedeno	15	35
NO ₃ , Cl ⁻	ISE elektrody	Potenciometrie	Neuvedeno	pro nízké koncentrace NO ₃	do 2,8%	Neuvedeno	36

Rešerše stanovení rozpuštěných křemičitanů ukázala, že stanovení byla prováděna ve většině případů společně se stanovením fosforečnanů, výjimkou bylo stanovení rozpuštěných křemičitanů samostatně s použitím HLB kolony, na kterou se naváže molybdenová modř jako produkt reakce, který je později vymyt roztokem hydroxidu sodného a následně změřen spektrofotometricky. Při stanovení rozpuštěných křemičitanů společně s fosforečnany byly využity dvě metody – stopped flow metoda a metoda sekvenční injekční analýzy, ve kterých jsou použita stejná činidla ke stanovení křemičitanů a to heteromolybdát, který s nimi reaguje za vzniku molybdátokřemičitanů. Pracovní rozsah optimalizace se u jednotlivých stanovení liší, příčinou jsou různé typy vzorků. Jako nejčastější používanou technikou detekce byla uvedena spektrofotometrie. Součástí rešerše je také stanovení vybraných iontů v rámci jedné analýzy a to konkrétně stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů. V dostupné literatuře bylo nalezeno několik stanovení uvedených v Tab. 12, kdy nejčastější z nich bylo společné stanovení dusitanů, dusičnanů a chloridů. V dostupné literatuře nebylo dosud nalezeno stanovení všech čtyř aniontů (dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů) najednou v rámci jedné analýzy.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Princip použitého stanovení křemičitanů metodou SIA

Při stanovení křemičitanů metodou SIA byla použita reakce uvedená v normě ČSN EN ISO 16 264, založená na reakci rozpuštěných křemičitanů s roztokem heptamolybdenanu hexaamonného. Poté vzniklý meziprodukt reaguje s roztokem kyseliny šťavelové a roztokem chloridu cínatého za vzniku konečného produktu reakce-molybdenová modř, měřitelného při vlnové délce 710 nm^[6].

5.2 Aparatura

SIA systém (FIALab 3000, FIALab[®] Instruments, USA), který byl použit pro experimentální část této práce byl sestaven z následujících částí. Pístová pumpa se skleněným rezervoárem a kovovým pístem krytým teflonovým zakončením je schopna měnit objem aspirace reagentů v rozmezí od $V = 5 \mu\text{l}$ po maximální objem pumpy $V = 5 \text{ ml}$. Další součástí systému jsou selekční ventil s osmi porty, teflonová mísící cívka spirálovitě natočená na válečku z plexiskla, jejíž délka byla určena na základě hodnot objemů použitých roztoků, aby došlo k optimálnímu promísení jednotlivých složek, dále „Z“ průtoková optická 20 mm cela, USB 2000 UV-VIS CCD detektor pracující s optickými vlákny (OceanOptics, USA), solarizací rezistentní optická vlákna (Avantes, USA), VIS světelný zdroj LS-1 (Ocean Optics, Inc., USA). Spojovacím materiálem mezi všemi jednotkami systému byly teflonové hadičky s vnitřním průměrem 0,50 mm. Řídící jednotkou těchto všech složek je počítač se softwarem FIALab for Windows 5.0.

5.3 Použité chemikálie

Všechny roztoky byly připraveny z chemikálií jakosti vhodné pro stanovení daných iontů a demineralizované vody.

Chemikálie pro stanovení křemičitanů jsou uvedeny v Tab. 13. Standardy křemičitanů, roztoky činidel, alkalický roztok křemičitanů a roztok k čištění průtokové sestavy byly připraveny podle normy ČSN EN ISO 16 264. Připravené roztoky je

možno uchovávat při laboratorní teplotě po dobu šesti měsíců, výjimku tvoří roztok činidla R3, jehož stálost je jeden měsíc, pokud je uchováván v chladničce při teplotě 2-4°C.

Tab. 13: *Přehled chemikálií pro stanovení křemičitanů*

Chemikálie	Dodavatel
Kyselina sírová, p. a. 96%	Lachema, Neratovice
Tetrahydrát heptamolybdenanu hexaamonného (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	Balex, Pardubice
Kyselina šťavelová, p. a.	Lach - Ner, s. r. o., Neratovice
Dihydrát chloridu cínatého, SnCl ₂ · 2H ₂ O	Lach - Ner, s. r. o., Neratovice
Hydroxid sodný, NaOH	Penta, Praha
Chlorid cíničitý, SnCl ₄ , (99%)	Aldrich, Steinheim, Německo
Kyselina ethylendiamintetraoctová, C ₁₀ H ₁₂ O ₈ N ₂ Na ₂ · 2H ₂ O	Lachema, Neratovice
Hydrazínium sulfát, p. a.	Lach - Ner, s. r. o., Neratovice

5.4 Optimalizace podmínek pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou SIA

Princip stanovení křemičitanů je shodný s výše uvedenou normou a spočívá v barevné reakci, kdy křemičitany reagují s roztoky činidel za vzniku barevného produktu měřitelného při vlnové délce 710 nm.

Cílem optimalizace pro stanovení rozpuštěných křemičitanů bylo nalézt vhodné podmínky ke stanovení těchto iontů, a to s co největší odezvou detektoru při co nejnižší hodnotě slepého pokusu, metodou sekvenční injekční analýzy pomocí spektrofotometrické detekce za plně automatizované analýzy. Každý parametr byl změřen pětkrát ($n = 5$), hodnota RSD, uváděná v procentech, by se měla pohybovat v rozmezí 0 – 5 %.

V experimentální části bylo optimalizováno celkem šest parametrů - objem vzorku, objem činidla R1, objem činidla R2, objem činidla R3, sekvence a počet mísení vzorku s činidly. Každá změna parametru byla proměřena pětkrát ($n = 5$). Parametr průtokové rychlosti pro aspiraci jednotlivých zón, na které je analýza vzorku nezávislá, byla optimalizována v rámci experimentální části diplomové práce^[7] společně s parametrem průtokové rychlosti transportu měřeného produktu do detektoru. Výsledná hodnota průtokové rychlosti pro aspiraci jednotlivých zón byla $v = 60 \mu\text{l/s}$ a průtoková rychlost průtoku detektorem $v = 40 \mu\text{l/s}$.

Signál je vyhodnocován ve formě píků, výška píku je automaticky vyhodnocena pomocí softwaru FIAlab for Windows 5.0 a odpovídá absorbanci příslušného produktu. Optimální hodnoty uvedených parametrů byly použity pro proměření kalibrace a měření opakovatelnosti.

5.5 Kalibrační závislost a kalibrační program

Dle normy ČSN EN ISO 16 264 byly stanoveny dva pracovní rozsahy pro stanovení rozpuštěných křemičitanů, a to $c = 0,2 - 2,0$ mg/l a $c = 2,0 - 20,0$ mg/l. Kalibrační roztoky byly připraveny zředěním zásobního roztoku křemičitanů $\rho(\text{Si}) = 50$ mg/l. Každý vzorek byl změřen třikrát, hodnota RSD (%) byla vyhodnocena programem FIAlab. Pro kalibraci byly použity průměrné hodnoty absorbance.

Tab. 14 Kalibrační program pro stanovení rozpuštěných křemičitanů

Příkaz	Parametr	Akce
Syringe Pump Command (?)	KOR	Základní nastavení pístové pumpy
Hardware Settings Scan Rate (Hz) 20	20	Nastavení scanovací frekvence
Loop Start (#)	3	Celý cyklus bude třikrát opakován po příkaz „Loop End“
Syringe Pump Valve In		Nastavení ventilu na pozici aspirace nosného proudu (pozice Valve In)
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	150	nastavení průtokové rychlosti aspirace pístové pumpy
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	1000	Aspirace nosného proudu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Valve Out		Nastavení ventilu na pozici aspirace dalších zón (pozice Valve Out)
Analyte New Sample		Označení nového vzorku
Analyte Name	silicate 2,0 mg/l	Nastavení názvu zkoumaného analytu
Analyte Quantity	2	Nastavení koncentrace zkoumaného analytu
Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci standardu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	50	Nastavení průtokové rychlosti aspirace standardu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	60	Aspirace standardu

Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	2	Nastavení pozice portu pro aspiraci čidla R1
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	50	Nastavení průtokové rychlosti aspirace čidla R1
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	30	Aspirace čidla R1
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	3	Nastavení pozice portu pro aspiraci čidla R2
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	10	Nastavení průtokové rychlosti aspirace čidla R2
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	5	Aspirace čidla R2
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	4	Nastavení pozice portu pro aspiraci čidla R3
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	40	Nastavení průtokové rychlosti aspirace čidla R3
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	25	Aspirace čidla R3
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Loop Start (#)	2	Nastavení dvojnásobného mísení aspirovaných zón
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	40	Nastavení průtokové rychlosti mísení
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	25	Aspirace objemu pro mísení zón
Syringe Pump Dispense (microliter)	25	Dispenze objemu pro mísení zón
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Loop End		Konec opakované akce
Valve port	5	Nastavení pozice portu pro aspiraci spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	50	Nastavení průtokové rychlosti aspirace vzorku použitého jako spacer
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	150	Aspirace spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Hardware Settings Wavelength 1 (nm)	710	Nastavení vlnové délky
Valve port	6	Nastavení pozice portu průchodu zón přes detektor
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	40	Nastavení průtokové rychlosti přes detektor
Syringe Pump Empty		Průchod všech aspirovaných zón přes detektor při vypuštění celého objemu pístu
Spectrometer Reference Scan		Nastavení spektrometru
Spectrometer Absorbance Scanning		Nastavení snímání absorbance
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Spectrometer Stop Scanning		Zastavení snímání absorbance
Syringe Pump Valve In		Nastavení ventilu na pozici aspirace nosného proudu (pozice Valve In)
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	150	Nastavení průtokové rychlosti aspirace pístové pumpy
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	2000	Aspirace nosného proudu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Valve Out		Nastavení ventilu na pozici aspirace dalších zón (pozice Valve Out)
Valve port	6	Nastavení pozice portu pro detektor
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	80	Nastavení průtokové rychlosti detektorem
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Empty		Průchod všech aspirovaných zón přes detektor při vypuštění celého objemu pístu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Loop End		Konec opakujícího se cyklu

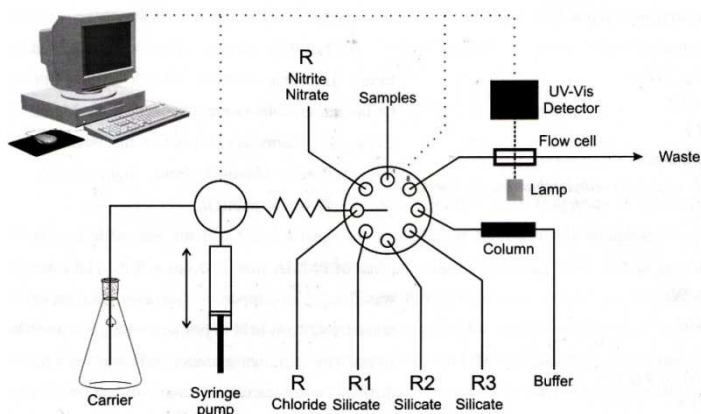
5.6 Opakovatelnost měření rozpuštěných křemičitanů

Pro měření opakovatelnosti měření byly použity koncentrace rozpuštěných křemičitanů $c = 1,0 \text{ mg/l}$ a $c = 10,0 \text{ mg/l}$, tj. koncentrace ze středu kalibračních rozsahů I, II, a následně proměřeny desetkrát za stejných optimálních podmínek. Tyto série byly opakovány třikrát. Hodnoty absorbancí s hodnotou RSD (%) jsou uvedené v Tab. 27, 28.

6 VÝVOJ OVLÁDACÍHO PROGRAMU PRO PARALELNÍ STANOVENÍ DUSITANŮ, DUSIČNANŮ, CHLORIDŮ A ROZPUŠTĚNÝCH KŘEMIČITANŮ METODOU SIA

Před vlastním vypracováním ovládacího programu pro paralelní stanovení uvedených iontů v komerčním systému SIA, byly nejdříve provedeny optimalizace stanovení každého iontu zvlášť pro metodu sekvenční injekční analýzy a to podle platných ISO norem pro metodu FIA. Tyto optimalizace stanovení jsou sepsány v rámci mé diplomové práce ^[7].

Na základě proměřených optimalizací, jsem postupovala v experimentální části vývoje ovládacího programu následovně. Před vlastním měřením byla nezbytnou součástí důkladná příprava všech roztoků jak standardů, činidel, promývacích roztoků atd. (viz kap. 6.2. Příprava roztoků pro paralelní analýzu dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů metodou SIA). Pro měření kalibračních závislostí iontů dle normy byly v diplomové práci sestaveny kalibrační programy pro kalibrační závislosti jednotlivých iontů, tyto programy byly postupně sestaveny dohromady. Koncentrace standardního roztoku obsahujícího roztok dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů, se kterým bylo vyzkoušeno paralelní stanovení a optimalizováno pořadí aspirace jednotlivých zón do systému, byly vybrány ze středu kalibračních rozsahů pro jednotlivé ionty určené podle ISO norem. Na následujícím obrázku je znázorněno schéma zapojení systému SIA pro paralelní stanovení uvedených iontů.



Obr. 10 Průtoková injekční sestava pro paralelní stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů a křemičitanů metodou SIA ^[37].

Do průtokového systému byly postupně aspirovány jednotlivé složky pro analýzu a měřicí cykly byly prováděny na základě programu vytvořeného spojením původních programů pro individuální stanovení uvedených iontů. Jak se zanedlouho ukázalo, takto sestavený program byl nevyhovující a musela být provedena další optimalizace, po které byly na výsledném záznamu absorbance viditelné ostře ohraničené píky odpovídající jednotlivým stanovovaným iontům.

Nejdříve byla vyzkoušena změna pořadí iontů, ve kterém byly aspirovány do systému. Tato možnost byla nevyhovující díky tomu, že se začaly píky iontů navzájem překrývat. U stanovení dusičnanů v paralelním stanovení s ostatními ionty byla provedena změna objemu činidla, jelikož pík zobrazující sumu dusičnany-dusitanů se překrýval s následujícím píkem odpovídající samotným dusitanům. Objem činidla pro paralelní stanovení dusičnanů byl $V = 50 \mu\text{l}$, oproti hodnotě objemu při optimalizaci podmínek ke stanovení dusičnanů samostatně, kde objem činidla činil $V = 15 \mu\text{l}$. Při paralelním stanovení dusitanů nebyla měněna žádná podmínka stanovení, byly shodné s podmínkami optimalizace pro stanovení dusitanů metodou SIA uvedené v diplomové práci. U chloridových iontů bylo provedeno několik změn – změna objemu činidla R na $V = 15 \mu\text{l}$, dále jedno mísení objemu $V = 80 \mu\text{l}$ z původních dvakrát, které bylo použito při optimalizaci podmínek pro samostatné stanovení chloridových iontů. Byly provedeny určité úpravy u stanovení křemičitanových iontů, které se týkaly zvýšení objemu činidla R1 z původních podmínek optimalizace na $V = 40 \mu\text{l}$, zároveň byl zvýšen i objem činidla R3 na objem $V = 60 \mu\text{l}$. Počet mísení směsi $\text{SiO}_4 + \text{R1} + \text{R2} + \text{R3}$ o objemu $V = 60 \mu\text{l}$ byl upraven na dvojnásobné z původního čtyřnásobného. Dále bylo provedeno ještě několik drobných změn - v průtokové rychlosti jednotlivých zón, snížení rychlosti aspirace spaceru na $v = 30 \mu\text{l/s}$, měření bez mísení mezi aspirací chloridů a křemičitanů. Zvýšení objemu spaceru na $V = 250 \mu\text{l}$ a použití mísení všech zón až na konci celého měřicího cyklu byly posledními úpravami, které vedly ke konečnému programu, který byl použit jako kalibrační program k paralelnímu stanovení daných iontů.

Finální verze aspirace jednotlivých zón do průtokového systému byla následující: aspirace vzorku do redukční kolony, po dobu redukce následuje aspirace činidla pro NO_2^- a NO_3^- dále vzorku z redukční kolony (redukované dusičnany), spacer, zóny vzorku a činidel R1 + R2 + R3 pro stanovení křemičitanů, spacer. Následuje zóna činidla pro stanovení NO_2^- , zóna vzorku a činidla pro stanovení chloridů a poté

transport všech zón do detektoru průtokovou rychlostí $v = 45 \mu\text{l/s}$ (podrobně Tab. 18 Kalibrační program pro paralelní stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů, křemičitanů pro metodu sekvenční injekční analýzy). Jako spacer byl použit směsný vzorek dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů příslušných koncentrací. Jeho objem pro aspiraci mezi jednotlivými zónami, byl určen v rámci vývoje programu pro paralelní stanovení daných iontů (viz. výše), tak aby výsledné píky, zobrazující absorpenci stanovovaného iontu byly dostatečně daleko od sebe oddělené.

6.1 Použité chemikálie pro paralelní analýzu dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů metodou SIA

Všechny roztoky byly připraveny z chemikálií jakosti vhodné pro stanovení daných iontů a demineralizované vody.

- **Dusitany a dusičnany**

Chemikálie pro stanovení dusitanů a dusičnanů jsou uvedeny v Tab. 15. Standardy dusitanů, dusičnanů, roztok činidla a pufr (pH = 7,5) byly připraveny podle normy EN ISO 13395:1996. Připravené roztoky je nutné chránit proti světlu, proto byly uchovávány v temnu v chladničce při teplotě 2 - 4 °C.

Tab. 15 Přehled chemikálií pro stanovení NO_2^- , NO_3^- ^[37]

Chemikálie	Výrobce
Sulfanilamid	Léčiva a. s., Praha
N- (1- naphtyl)- ethylendiamin dichlorid	Loba Feinchemie, Německo
Kyselina fosforečná 85%, p. a.	Lach-Ner, s.r.o., Neratovice
Hydroxid sodný	Penta, Praha
Kyselina chlorovodíková, 35%, $c(\text{HCl}) = 1\text{M}$	Penta, Praha
Síran měďnatý, $c(\text{Cu SO}_4) = 20\text{g/l}$	Balex, Pardubice

- **Chloridy**

Přehled použitých chemikálií pro stanovení chloridů je uvedený v Tab. 16. Roztoky k analýze nevyžadují zvláštní uchovávání, pouze vzorek činidla má delší dobu stálosti, je-li uchováván ve tmě. Zásobní roztok chloridů $\rho(\text{Cl}^-) = 100 \text{ mg/l}$ je stálý tři měsíce, roztok $\rho(\text{Cl}^-) = 10\,000 \text{ mg/l}$ jeden rok.

Tab. 16 Přehled chemikálií pro stanovení Cl^- ^[38]

Chemikálie	Výrobce
Thiokyanatan rtuťnatý	Aldrich, Německo
Methanol p.a.	Penta, Praha
Kyselina dusičná 65%, p. a.	Lach-Ner, s.r.o., Neratovice
Nonahydrát dusičnanu železitého	Lachema, Brno
Promývací roztok kyselina sírová, 96%, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,5\text{M}$	Lachema, Neratovice

- **Křemičitany**

Chemikálie pro stanovení křemičitanů jsou uvedeny v Tab. 17. Standardy křemičitanů, roztoky činidel, alkalický roztok křemičitanů a roztok k čištění průtokové sestavy byly připraveny podle normy ČSN EN ISO 16 264. Připravené roztoky je možno uchovávat při laboratorní teplotě po dobu šesti měsíců, výjimku tvoří roztok činidla R3, jehož stálost je jeden měsíc, pokud je uchováván v chladničce při teplotě 2-4°C.

Tab. 17: Přehled chemikálií pro stanovení křemičitanů^[6]

Chemikálie	Výrobce
Kyselina sírová, p. a. 96%	Lachema, Neratovice
Tetrahydrát heptamolybdenanu amonného (NH_4) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	Balex, Pardubice
Kyselina šťavelová, p. a.	Lach-Ner, s. r. o., Neratovice

Dihydrát chloridu cínatého, $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Lach-Ner, s. r. o., Neratovice
Hydroxid sodný, NaOH	Penta, Praha
Chlorid cíničitý, SnCl_4 , (99%)	Aldrich, Steinheim, Německo
Kyselina ethylendiamintetraoctová $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Lachema, Neratovice
Hydrazín sulfát, p. a.	Lach - Ner, s. r. o., Neratovice
Kyselina sírová, p. a., (96%)	Lachema, Neratovice

6.2 Příprava roztoků pro paralelní analýzu dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů metodou SIA

6.2.1 Příprava zásobních roztoků

- zásobní roztok NaNO_2 o $\rho = 100 \text{ mg/l}$
- zásobní roztok NaNO_3 o $\rho = 100 \text{ mg/l}$
- zásobní roztok I NaCl o $\rho = 100 \text{ mg/l}$
- zásobní roztok II NaCl o $\rho = 1000 \text{ mg/l}$
- zásobní roztok SiO_4^{4-} o $\rho = 0,5 \text{ g/l SiO}_2$ - vodný roztok alkalického roztoku křemičitanů - připraven z vodného roztoku hydroxidu sodného a chloridu cíničitého SnCl_4

6.2.2 Příprava kalibračních roztoků

- dusitany - kalibrační rozsah $c = 0,25 - 0,80 \text{ mg/l}$
- dusičnany – kalibrační rozsah $c = 3,0 - 15,0 \text{ mg/l}$
- chloridy – kalibrační rozsah $c = 25,0 - 125 \text{ mg/l}$
- křemičity – kalibrační rozsah $c = 1,0 - 12,0 \text{ mg/l}$

6.3 Příprava směsných roztoků:

V rámci měření bylo testováno několik směsných roztoků, z nichž u některých analýza paralelního stanovení nebyla možná, protože píky daných iontů se začaly překrývat a nebylo jednoznačně možné určit, o jaký typ iontu se jedná. Týkalo se to např. směsného roztoku, ve kterém byly současně vyšší koncentrace dusitanů a dusičnanů. Nejvyšší koncentrace chloridů, kterou bylo možno změřit v paralelním stanovení, byla $c = 125 \text{ mg/l}$, což není zdaleka nejvyšší koncentrace chloridů měřitelná v kalibrační závislosti při optimalizaci individuálního stanovení chloridů, koncentrace chloridů nad $c = 125 \text{ mg/l}$ měla rušivý efekt na stanovení dalších iontů v paralelním stanovení.

Proto při přípravě směsných roztoků bylo využito těchto poznatků, na základě kterých bylo připraveno celkem pět směsných roztoků příslušných koncentrací a proměřeny kalibrační závislosti při paralelním stanovení, včetně měření opakovatelnosti pro jeden směsný roztok.

- směsný roztok I – vodný roztok dusitanů o $c = 0,5 \text{ mg/l}$, dusičnanů o $c = 3,0 \text{ mg/l}$, chloridů o $c = 50,0 \text{ mg/l}$ a rozpuštěných křemičitanů o $c = 1,0 \text{ mg/l}$
- směsný roztok II – vodný roztok dusitanů o $c = 0,8 \text{ mg/l}$, dusičnanů o $c = 10,0 \text{ mg/l}$, chloridů o $c = 100,0 \text{ mg/l}$ a rozpuštěných křemičitanů o $c = 5,0 \text{ mg/l}$
- směsný roztok III – vodný roztok dusitanů o $c = 0,25 \text{ mg/l}$, dusičnanů o $c = 5,0 \text{ mg/l}$, chloridů o $c = 125,0 \text{ mg/l}$ a rozpuštěných křemičitanů o $c = 10,0 \text{ mg/l}$
- směsný roztok IV – vodný roztok dusitanů o $c = 0,4 \text{ mg/l}$, dusičnanů o $c = 15,0 \text{ mg/l}$, chloridů o $c = 25,0 \text{ mg/l}$ a rozpuštěných křemičitanů o $c = 8,0 \text{ mg/l}$
- směsný roztok V – vodný roztok dusitanů o $c = 0,65 \text{ mg/l}$, dusičnanů o $c = 12,0 \text{ mg/l}$, chloridů o $c = 75,0 \text{ mg/l}$ a rozpuštěných křemičitanů o $c = 12,0 \text{ mg/l}$

6.4 Kalibrační závislost a kalibrační program pro paralelní stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů metodou SIA

Dle normy ČSN EN ISO 11732 pro stanovení amoniakálního dusíku, ČSN EN ISO 15682 pro stanovení chloridů a ČSN EN ISO 16264 pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou FIA byla stanovena kalibrační rozmezí, ve kterých by měli absorbance konečných produktů reakce při stanovení uvedených iontů vykazovat linearitu. Pro vlastní měření paralelního stanovení iontů byly tyto kalibrační rozsahy nepatrně upraveny s tím, že se přesto nacházely v původních kalibračních rozsazích určených dle ISO norem. Každý směsný roztok byl měřen třikrát, hodnota RSD (%) byla vyhodnocena programem FIAlab. Pro kalibraci byly použity průměrné hodnoty absorbance.

Tab. 18 Kalibrační program pro stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů v komerčním SIA systému

Příkaz	Parametr	Akce
Syringe Pump Command (?)	KOR	Základní nastavení pístové pumpy
Hardware Settings Scan Rate (Hz)	20	Nastavení scanovací frekvence
Loop Start (#)	3	Celý cyklus bude třikrát opakován po příkaz „Loop End“
Syringe Pump Valve In		Nastavení ventilu na pozici aspirace nosného proudu (pozice Valve In)
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	150	Nastavení průtokové rychlosti aspirace pístové pumpy
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	2000	Aspirace nosného proudu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Valve Out		Nastavení ventilu na pozici aspirace dalších zón (pozice Valve Out)
Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci standardu (dusičnany)

Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	30	Nastavení průtokové rychlosti aspirace standardu
Syringe Pump Aspirate (microliter)	50	Aspirace standardu (dusičnany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	7	Nastavení pozice portu pro redukční kolonu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti toku do redukční kolony
Syringe Pump Dispense (microliter)	70	Dispenze vzorku do redukční kolony
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Delay (sec)	5	Doba pobytu vzorku v redukční koloně
Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	20	Nastavení průtokové rychlosti aspirace spaceru
Syringe Pump Aspirate (microliter)	250	Aspirace spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	7	Nastavení pozice portu pro aspiraci přes redukční kolonu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	20	Nastavení průtokové rychlosti aspirace z redukční kolony
Syringe Pump Aspirate (microliter)	50	Aspirace vzorku (dusitany) z redukční kolony
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port nitrate reagent	2	Nastavení pozice portu pro aspiraci činidla (dusitany, dusičnany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti aspirace činidla
Syringe Pump Aspirate (microliter)	20	Aspirace činidla
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce

Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	10	Nastavení průtokové rychlosti aspirace spaceru
Syringe Pump Aspirate (microliter)	250	Aspirace spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci standardu (křemičitany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	10	Nastavení průtokové rychlosti aspirace standardu
Syringe Pump Aspirate (microliter)	60	Aspirace standardu (křemičitany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	4	Nastavení pozice portu pro aspiraci činidla R1 (křemičitany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti aspirace činidla R1
Syringe Pump Aspirate (microliter)	40	Aspirace činidla R1
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	5	Nastavení pozice portu pro aspiraci činidla R2 (křemičitany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti aspirace činidla R2
Syringe Pump Aspirate (microliter)	5	Aspirace činidla R2
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	6	Nastavení pozice portu pro aspiraci činidla R3 (křemičitany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti aspirace činidla R3
Syringe Pump Aspirate (microliter)	60	Aspirace činidla R3
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	8	Nastavení pozice portu průchodu zón přes detektor
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce

Loop Start (#)	2	Nastavení dvojnásobného mísení aspirovaných zón
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti mísení
Syringe Pump Dispense (microliter)	60	Nastavení dispendovaného objemu pro mísení zón
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Aspirate (microliter)	60	Nastavení aspirovaného objemu pro mísení zón
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Loop End		Konec opakované akce
Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti aspirace spaceru
Syringe Pump Aspirate (microliter)	250	Aspirace spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	2	Nastavení pozice portu pro aspiraci čínidla (dusitany, dusičnany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti aspirace čínidla
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30	30	Aspirace čínidla
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci standardu (dusitany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	20	Nastavení průtokové rychlosti aspirace standardu
Syringe Pump Aspirate (microliter)	50	Aspirace standardu (dusitany)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti aspirace spaceru
Syringe Pump Aspirate (microliter)	250	Aspirace spaceru

Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci standardu (chloridy)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	15	Nastavení průtokové rychlosti aspirace standardu
Syringe Pump Aspirate (microliter)	50	Aspirace standardu (chloridy)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	3	Nastavení pozice portu pro aspiraci činidla (chloridy)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	20	Nastavení průtokové rychlosti aspirace činidla
Syringe Pump Aspirate (microliter)	25	Aspirace činidla
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	1	Nastavení pozice portu pro aspiraci spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	10	Nastavení průtokové rychlosti aspirace spaceru
Syringe Pump Aspirate (microliter)	250	Aspirace spaceru
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Hardware Settings Wavelength 1 (nm)	710	Nastavení vlnové délky
Hardware Settings Wavelength 2 (nm)	465	Nastavení vlnové délky
Hardware Settings Wavelength 3 (nm)	540	Nastavení vlnové délky
Analyte New Sample		Označení vzorku (chloridy + dusitany)
Analyte Name		Nastavení názvu zkoumaného analytu
Valve port	8	Nastavení pozice portu průchodu zón přes detektor
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	45	Nastavení průtokové rychlosti detektorem
Syringe Pump Dispense (microliter)	750	Dispenze (chloridy + dusitany) přes detektor
Spectrometer Absorbance Scanning		Nastavení snímání absorbance

Analyte New Sample		Označení vzorku (křemičitany + suma dusitany - dusičnany)
Analyte Name silicate+suma		Nastavení názvu zkoumaného analytu
Valve port 8		Nastavení pozice portu průchodu zón přes detektor
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Empty		Průchod všech zón v systému přes detektor při vypuštění celého objemu pístu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Spectrometer Stop Scanning		Zastavení snímání absorbance
Valve port	7	Nastavení pozice portu pro aspiraci přes redukční kolonu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	20	Nastavení průtokové rychlosti aspirace přes redukční kolonu
Syringe Pump Aspirate (microliter)	600	Aspirace vzorku (pufr) do redukční kolony
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Valve port	8	Nastavení pozice portu průchodu zón přes detektor
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	70	Nastavení průtokové rychlosti detektorem
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Empty		Průchod všech zón v systému přes detektor při vyštění celého objemu pístu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Valve In		Nastavení ventilu na pozici aspirace nosného proudu (pozice Valve In)
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec)	150	Nastavení průtokové rychlosti aspirace pístové pumpy
Syringe Pump Aspirate (microliter)	1000	Aspirace nosného proudu
Syringe Pump Delay Until Done		Dokončení předchozí akce

Syringe Pump Valve Out	Nastavení ventilu na pozici aspirace dalších zón (pozice Valve Out)
Valve port 8	Nastavení pozice portu průchodu přes detektor
Syringe Pump Delay Until Done	Dokončení předchozí akce
Syringe Pump Empty	Průchod přes detektor při vypuštění celého objemu pístu
Syringe Pump Delay Until Done	Dokončení předchozí akce
Loop End	Konec opakujícího se cyklu

6.5 Opakovatelnost

Pro měření opakovatelnosti byl vybrán jeden z pěti směsných roztoků - směsný roztok III ($c(\text{NO}_2) = 0,25 \text{ mg/l}$, $c(\text{NO}_3) = 5 \text{ mg/l}$, $c(\text{Cl}^-) = 125,0 \text{ mg/l}$ a $c(\text{SiO}_4^{4-}) = 10,0 \text{ mg/l}$), který byl následně změřen desetkrát za optimálních podmínek. Měření bylo provedeno v jedné sérii desetkrát, hodnoty absorbancí společně s hodnotou RSD(%) jsou uvedeny v Tab. 38.

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Stanovení rozpuštěných křemičitanů podle ISO norem

Stanovení rozpuštěných křemičitanů bylo provedeno podle platné normy ČSN EN ISO 16 264 metodou sekvenční injekční analýzy (SIA) se spektrofotometrickou detekcí.

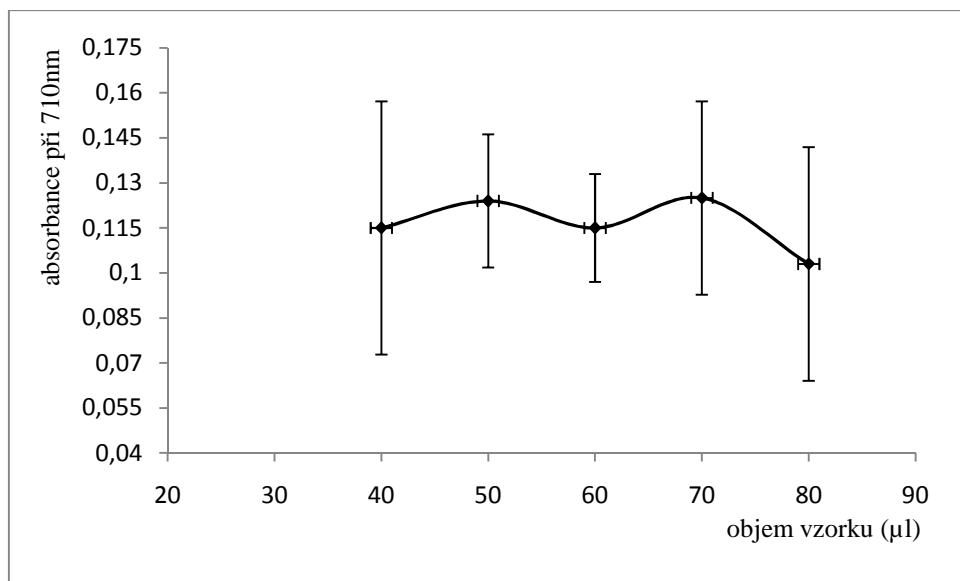
7.1.1 Optimalizace podmínek pro stanovení křemičitanů

7.1.1.1 Optimalizace objemu vzorku

Při optimalizaci byly proměřeny objemy vzorku v rozmezí $V = 40 - 80 \mu\text{l}$, jejichž odpovídající hodnoty absorbancí jsou uvedeny v Tab. 19. Objemy činidel R1, R2 a R3 pro optimalizaci této podmínky byly stejné, jako při stanovení tohoto iontu v předchozí práci ^[7]. Jako optimální objem byl zvolen $V = 60 \mu\text{l}$, hodnoty absorbancí se při změně objemu vzorku neměnily, byl brán zřetel především na hodnotu RSD. Chybové úsečky zobrazené v grafu optimalizace objemu vzorku znázorňují hodnotu směrodatné odchylky (SD), v následující tabulce jsou uvedeny hodnoty relativní směrodatné odchylky (RSD).

Tab. 19 Optimalizace objemu vzorku

Vzorek (μl)	Absorbance při 710 nm					Průměr	RSD (%)
	1.	2.	3.	4.	5.		
40	0,111	0,115	0,113	0,124	0,114	0,115	4,22
50	0,125	0,125	0,128	0,120	0,124	0,124	2,22
60	0,116	0,118	0,115	0,112	0,115	0,115	1,80
70	0,124	0,127	0,124	0,130	0,118	0,125	3,22
80	0,090	0,100	0,111	0,100	0,112	0,103	3,89



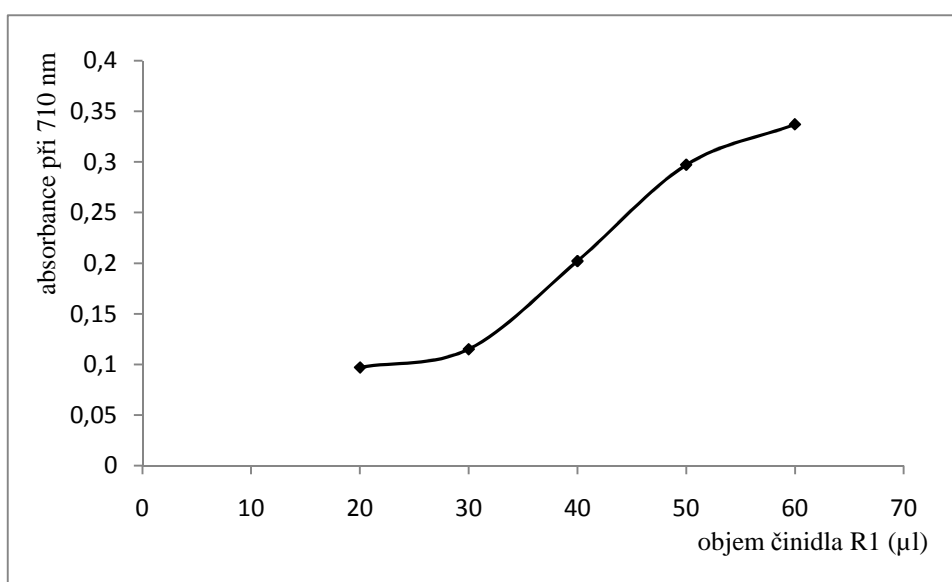
Obr. 11 Optimalizace objemu vzorku pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou SIA, $\lambda = 710 \text{ nm}$

7.1.1.2 Optimalizace objemu činidla R1

Při optimalizaci této podmínky byl měněn objem činidla R1 (roztok tetrahydrátu heptamolybdenanu hexaamonného) v rozmezí $V = 20 - 60 \mu\text{l}$. Při objemu $V = 20 \mu\text{l}$ byl signál finálního produktu velmi malý s velkou chybou měření, jestliže se objem činidla zvyšoval, rostla zároveň hodnota absorbance a chyba měření se snižovala v závislosti na změně objemu činidla. Jako optimální objem činidla R1 byl zvolen $V = 30 \mu\text{l}$, u něhož je hodnota chyby měření nejnižší i s vhodnou hodnotou absorbance konečného produktu.

Tab. 20 Optimalizace objemu činidla R1

R1 (μl)	Absorbance při 710 nm					Průměr	RSD (%)
	1.	2.	3.	4.	5.		
20	0,102	0,097	0,097	0,099	0,089	0,097	4,05
30	0,115	0,118	0,122	0,104	0,115	0,115	2,24
40	0,199	0,195	0,209	0,204	0,204	0,202	2,64
50	0,285	0,299	0,300	0,292	0,308	0,297	2,96
60	0,348	0,332	0,342	0,331	0,333	0,337	3,02



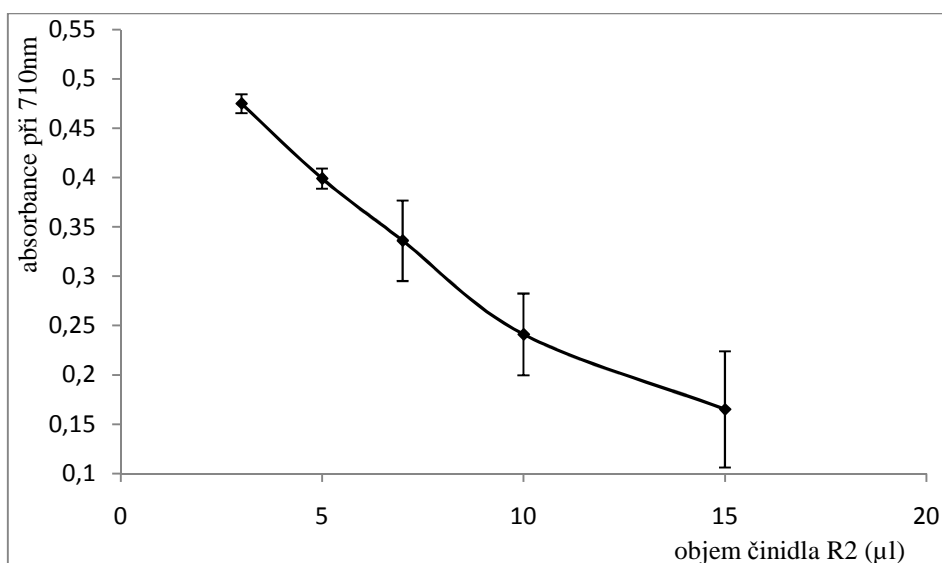
Obr. 12 Optimalizace objemu činidla R1 pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou SIA, $\lambda = 710 \text{ nm}$

7.1.1.3 Optimalizace objemu činidla R2

Při optimalizaci byly proměřeny změny objemu činidla R2 (roztok kyseliny šťavelové) a hodnoty absorbancí konečného produktu jsou zaznamenány v Tab. 21. Jak je patrné z následující tabulky, hodnota absorpance v závislosti na zvyšujícím se objemu činidla klesá, naopak hodnota RSD s rostoucím objemem činidla roste. Jako optimální objem činidla R2 byl zvolen $V = 5 \mu\text{l}$, na základě tvaru píků i hodnoty RSD. Chybové úsečky zobrazené v grafu optimalizace objemu činidla R2 znázorňují hodnotu směrodatné odchylky (SD), v následující tabulce jsou uvedeny hodnoty relativní směrodatné odchylky (RSD).

Tab. 21 Optimalizace objemu činidla R2

R2 (μl)	Absorbance při 710 nm					Průměr	RSD (%)
	1.	2.	3.	4.	5.		
3	0,477	0,464	0,477	0,477	0,482	0,475	0,96
5	0,397	0,403	0,399	0,396	0,398	0,399	1,02
7	0,330	0,335	0,358	0,339	0,317	0,336	4,08
10	0,234	0,259	0,238	0,237	0,237	0,241	4,15
15	0,175	0,180	0,157	0,159	0,156	0,165	5,89



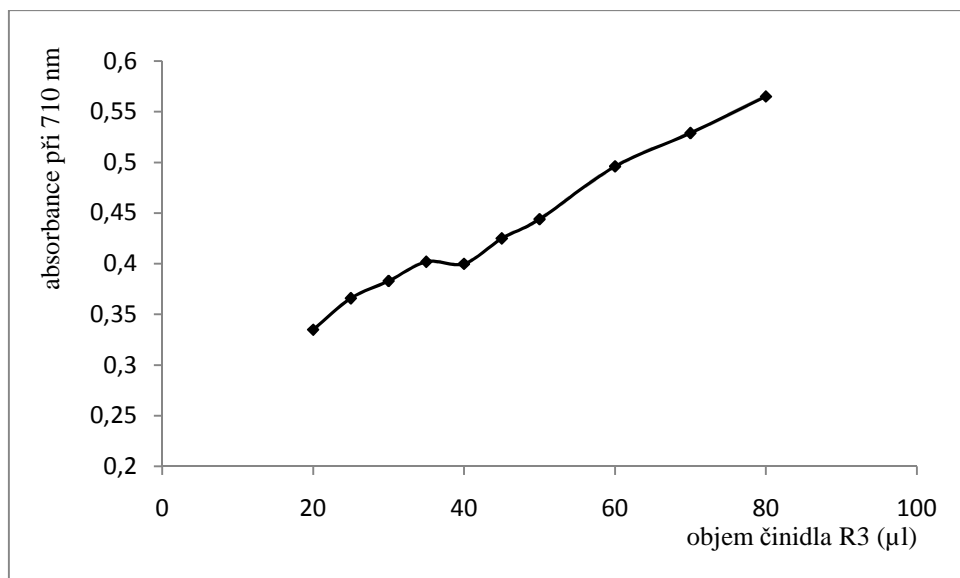
Obr. 13 Optimalizace objemu činidla R2 pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou SIA, $\lambda = 710 \text{ nm}$

7.1.1.4 Optimalizace objemu činidla R3

Byla provedena optimalizace podmínky objemu činidla R3 (roztok chloridu cínatého) a proměřeny objemy v rozmezí $V = 20 - 80 \mu\text{l}$. Hodnoty absorbancí konečných produktů společně s hodnotou RSD jsou zaznamenány v Tab. 22. Jak je patrné, hodnota absorbance je přímo závislá na objemu činidla, se stoupající hodnotou lineárně stoupá absorbance. Byly zvoleny dva objemy vhodné pro stanovení křemičitanů metodou SIA. Optimální objem pro stanovení křemičitanů v kalibračním rozsahu $c = 0,2 - 2,0 \text{ mg/l}$ byl $V = 25 \mu\text{l}$, byla také zároveň změněna podmínka objemu činidla R1 ($V = 30 \mu\text{l}$). Objem činidla R1 použitý pro toto stanovení byl $V = 25 \mu\text{l}$. Při měření druhého kalibračního rozsahu $c = 2,0 - 20 \text{ mg/l}$ byl jako optimální zvolen $V(\text{R3}) = 45 \mu\text{l}$.

Tab. 22 Optimalizace objemu činidla R3

R3 (μl)	Absorbance při 710 nm					Průměr	RSD (%)
	1.	2.	3.	4.	5.		
20	0,344	0,351	0,323	0,327	0,330	0,335	3,25
25	0,380	0,368	0,351	0,365	0,367	0,366	2,57
30	0,370	0,366	0,390	0,397	0,391	0,383	3,62
35	0,395	0,399	0,406	0,417	0,394	0,402	2,16
40	0,399	0,395	0,400	0,407	0,399	0,400	1,01
45	0,428	0,413	0,428	0,424	0,433	0,425	1,61
50	0,442	0,463	0,447	0,425	0,444	0,444	2,32
60	0,494	0,479	0,483	0,512	0,511	0,496	2,07
70	0,547	0,525	0,531	0,539	0,505	0,529	2,86
80	0,565	0,570	0,589	0,549	0,550	0,565	2,43



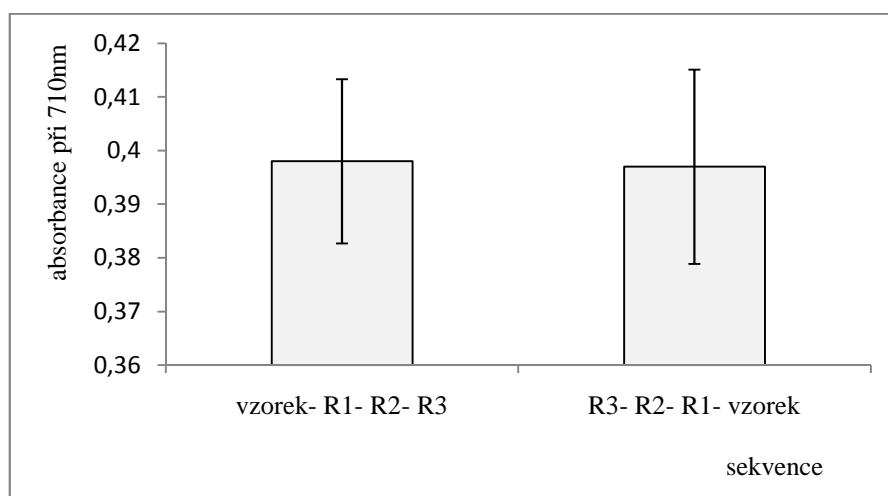
Obr. 14 Optimalizace objemu činidla R3 pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou SIA, $\lambda = 710\text{nm}$

7.1.1.5 Optimalizace sekvence

Byly proměřeny změny pořadí aspirace jednotlivých zón do systému v rámci optimalizace této podmínky. V následující tabulce jsou uvedeny pouze dvě změny pořadí aspirace jednotlivých zón do systému, které byly vyhovující, jelikož ty ostatní nebyly vhodné z hlediska tvarů píků a odlišných hodnot absorbance v rámci jednoho měření. Výsledné pořadí bylo určeno na základě tvaru píků a hodnoty RSD. Pro správnou analýzu byl vhodnější tvar píků v pořadí aspirace vzorek – R1 - R2 - R3, proto byl vybrán jako optimální. Při pořadí aspirace R3 - R2 - R1 - vzorek se začal objevovat trojitý pík. Chybové úsečky zobrazené v grafu optimalizace sekvence aspirace jednotlivých zón znázorňují hodnotu směrodatné odchylky (SD), v následující tabulce jsou uvedeny hodnoty relativní směrodatné odchylky(RSD).

Tab. 23 Optimalizace sekvence

Sekvence	Absorbance při 710 nm					Průměr	RSD (%)
	1.	2.	3.	4.	5.		
vzorek- R1- R2- R3	0,388	0,397	0,399	0,412	0,392	0,398	1,53
R3- R2- R1- vzorek	0,390	0,408	0,398	0,401	0,389	0,397	1,81



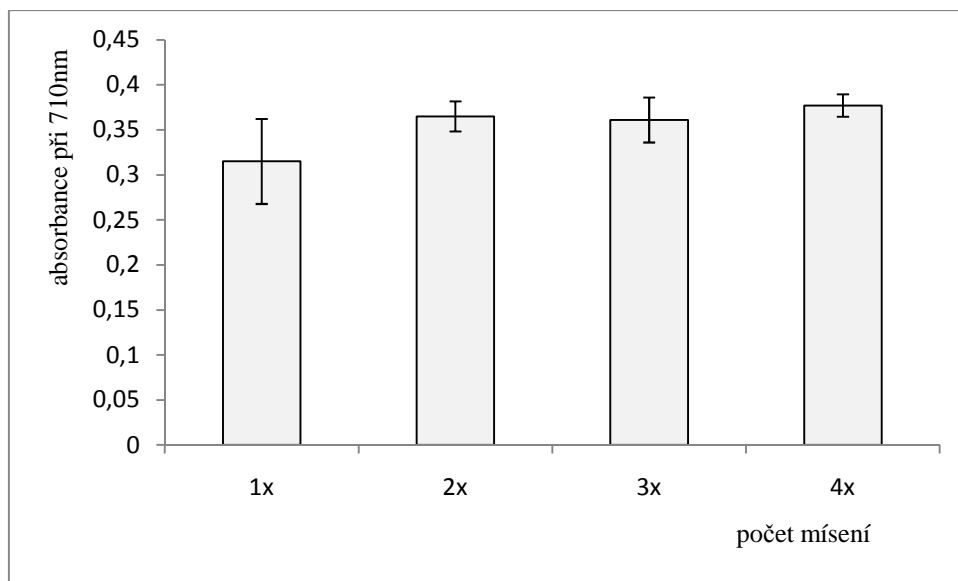
Obr. 15 Optimalizace sekvence aspirace jednotlivých zón pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou SIA, $\lambda = 710 \text{ nm}$

7.1.1.6 Optimalizace počtu mísení vzorek – činidlo

Při této optimalizaci byl měněn směr toku vzorku s činidly R1, R2 a R3, tj. počet mísení jednotlivých zón. Jak je patrné z následující tabulky, v případě, že dochází pouze k promísení vzorku s činidly, a následně k průchodu produktu detektorem, nedochází k dokonalému promísení jednotlivých zón a výsledek je zatížen velkou chybou měření. Při vyšším počtu mísení se signál téměř nemění, dochází pouze ke změně hodnoty RSD. Byly stanoveny dvě hodnoty optimalizace, a to pro každý kalibrační rozsah zvlášť. U kalibračního rozsahu $c = 0,2 - 2,0$ mg/l bylo jako optimální zvoleno čtyřnásobné mísení, kdežto u kalibračního rozsahu $c = 2,0 - 20,0$ mg/l byl optimální počet mísení jednotlivých zón dvakrát. Současně při měření kalibrace u vyššího kalibračního rozsahu bylo použito stínítko, aby rozsah měřeného signálu byl lineární a aby i nejvyšší bod kalibrační křivky ležel v lineárním rozsahu detektoru. Chybové úsečky zobrazené v grafu optimalizace počtu mísení vzorek – činidlo znázorňují hodnotu směrodatné odchylky (SD), v následující tabulce jsou uvedeny hodnoty relativní směrodatné odchylky (RSD).

Tab. 24 Optimalizace počtu mísení vzorek – činidlo

Mísení (x)	Absorbance při 710 nm					Průměr	RSD (%)
	1.	2.	3.	4.	5.		
1	0,289	0,313	0,314	0,330	0,328	0,315	4,72
2	0,356	0,366	0,369	0,361	0,374	0,365	1,66
3	0,347	0,363	0,360	0,359	0,375	0,361	2,50
4	0,368	0,381	0,377	0,382	0,379	0,377	1,25



Obr. 16 Optimalizace počtu mísení vzorek – činidlo pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou SIA, $\lambda = 710 \text{ nm}$

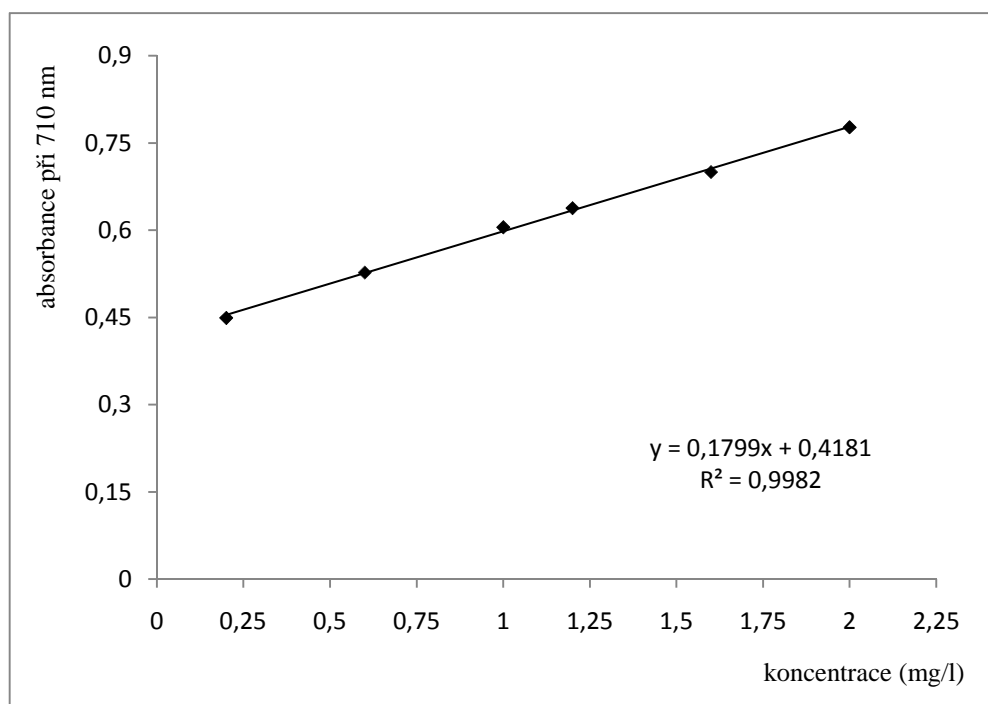
7.1.2 Kalibrační závislost

Podle normy ČSN EN ISO 16 624 pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou FIA se spektrofotometrickou detekcí byly stanoveny dva kalibrační rozsahy pro stanovení rozpuštěných křemičitanů metodou průtokové injekční analýzy. Kalibrační program při optimalizaci podmínek stanovení křemičitanů byl vyvinut obdobně jako při optimalizaci podmínek stanovení ostatních iontů metodou SIA podle platných ISO norem v rámci mé diplomové práce^[7]. Pouze při měření druhého kalibračního rozsahu byla změněna podmínka optimalizace, a to počet mísení zón ze čtyřikrát na dvakrát, lampa detektoru byla zastíněna stínítkem, aby se nejvyšší hodnoty absorbance u vyšších koncentrací křemičitanů vešly do lineárního rozsahu detektoru. Kalibrační rozsah I se pohyboval v rozmezí $c = 0,2 - 2,0 \text{ mg/l}$ a kalibrační rozsah II v rozmezí $c = 2,0 - 20,0 \text{ mg/l}$. Jednotlivé body kalibrace byly měřeny třikrát, v následujících tabulkách jsou uvedeny průměrné hodnoty absorbancí a hodnota RSD (%). Délka jedné analýzy v rámci jedné série při třech opakováních trvala $t = 512,67 \text{ s}$.

- a) kalibrační rozsah I ($c = 0,2 - 2,0 \text{ mg/l}$)
- jak už bylo uvedeno v předchozí kapitole, při měření této kalibrační závislosti daného kalibračního rozsahu byly změněny dvě podmínky měření: objem činidla R1 a počet mísení.

Tab. 25 Kalibrační závislost ($c = 0,2 - 2,0 \text{ mg/l}$)

Koncentrace vzorku (mg/l)	Absorbance	RSD (%)
0,2	0,449	1,99
0,6	0,527	2,25
1,0	0,605	1,91
1,2	0,638	1,09
1,6	0,700	2,15
2,0	0,777	1,09



Obr. 17 Kalibrační závislost rozpuštěných křemičitanů ($c = 0,2 - 2,0 \text{ mg/l}$) pro metodu SIA, $\lambda = 710 \text{ nm}$

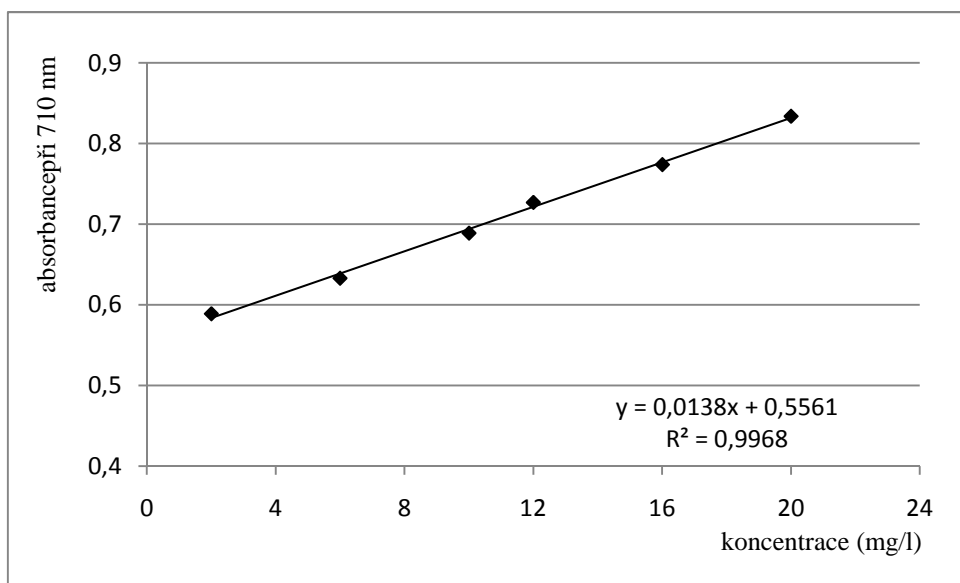
Kalibrační závislost rozpuštěných křemičitanů v koncentračním rozmezí dle normy $c = 0,2 - 2,0 \text{ mg/l}$ vykazovala linearitu v celém rozsahu s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9982$.

b) Kalibrační rozsah II ($c = 2,0 - 20,0 \text{ mg/l}$)

- při měření této kalibrační závislosti byl změněn pouze jeden parametr měření, konkrétně počet mísení na dvojnásobné. Ostatní podmínky měření zůstaly stejné. U vyšších koncentrací křemičitanů bylo použito stínítko a průtokový systém byl propláchnut promývacím roztokem na čištění soustavy.

Tab. 26 Kalibrační závislost ($c = 2,0 - 20,0 \text{ mg/l}$)

Koncentrace vzorku (mg/l)	Absorbance	RSD (%)
2	0,589	1,63
6	0,633	0,65
10	0,689	1,04
12	0,727	0,80
16	0,774	1,38
20	0,834	0,50



Obr. 18 Kalibrační závislost rozpuštěných křemičitanů ($c = 2,0 - 20,0 \text{ mg/l}$) pro metodu SIA, $\lambda = 710 \text{ nm}$

Z výše uvedeného grafu je patrné, že kalibrační závislost rozpuštěných křemičitanů v druhém kalibračním rozmezí $c = 2,0 - 20 \text{ mg/l}$ určené normou je lineární v celém svém rozsahu a to s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9968$.

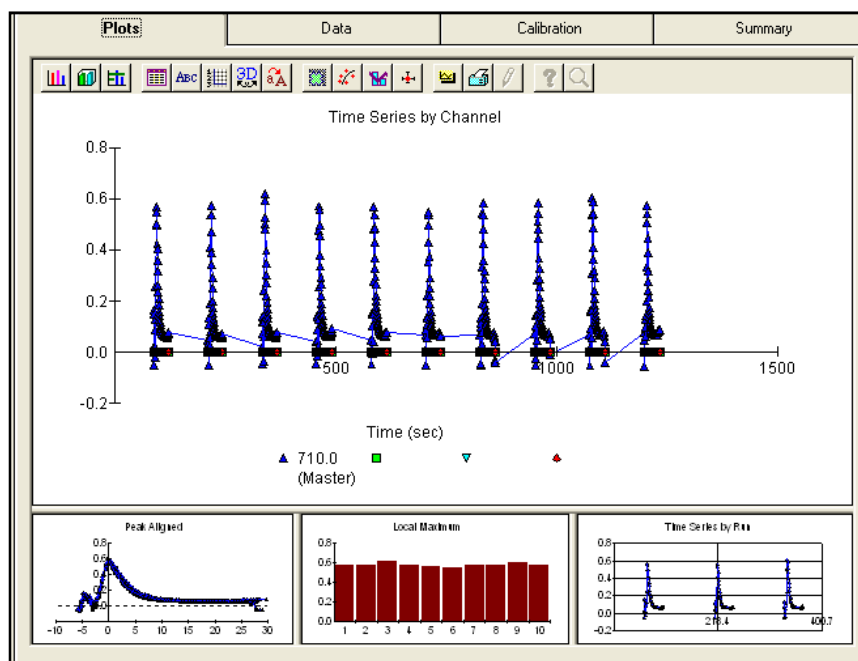
7.1.3 Opakovatelnost

Pro měření opakovatelnosti byly použity koncentrace rozpuštěných křemičitanů $c = 1,0 \text{ mg/l}$ a $c = 10,0 \text{ mg/l}$, tj. koncentrace ze středu kalibračních rozsahů I, II a následně proměřeny desetkrát za stejných optimálních podmínek. Tyto série měření byly opakovány třikrát. V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty absorbancí a RSD u jednotlivých měření s výsledným průměrem absorbance a chybou měření.

a) $c = 1,0 \text{ mg/l}$

Tab. 27 *Opakovatelnost měření křemičitanů*

Měření	Absorbance při 710 nm		
1.	0,547	0,531	0,547
2.	0,557	0,539	0,541
3.	0,561	0,541	0,568
4.	0,555	0,520	0,568
5.	0,553	0,557	0,544
6.	0,545	0,538	0,546
7.	0,551	0,511	0,548
8.	0,556	0,515	0,550
9.	0,572	0,525	0,544
10.	0,562	0,541	0,533
RSD (%)	1,79	3,11	2,18
Průměr		0,546	
Průměr RSD (%)		2,36	

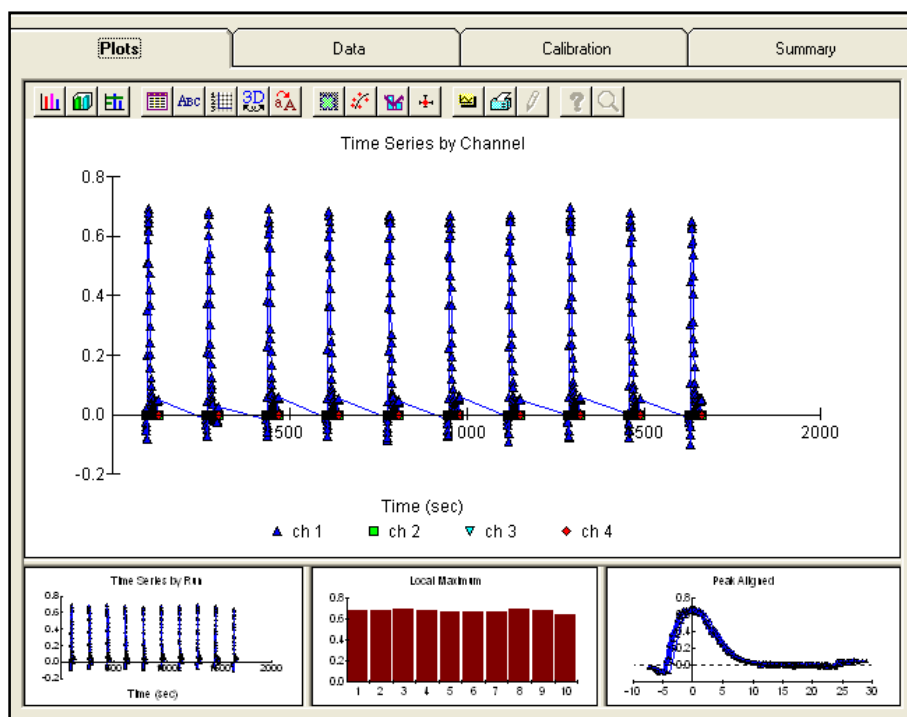


Obr. 19 Záznam měření opakovatelnosti stanovení rozpuštěných křemičitanů ($c = 1,0 \text{ mg/l}$) pro metodu SIA, $\lambda = 710 \text{ nm}$

b) $c = 10 \text{ mg/l}$

Tab. 28 Opakovatelnost měření křemičitanů

Měření	Absorbance při 710 nm		
1.	0,692	0,643	0,648
2.	0,686	0,659	0,643
3.	0,695	0,644	0,696
4.	0,683	0,650	0,664
5.	0,668	0,638	0,706
6.	0,671	0,649	0,642
7.	0,672	0,642	0,671
8.	0,697	0,623	0,642
9.	0,680	0,638	0,687
10.	0,650	0,637	0,664
RSD (%)	1,70	1,41	3,33
Průměr		0,663	
Průměr RSD (%)		2,15	



Obr. 20 Záznam měření opakovatelnosti stanovení rozpuštěných křemičitanů ($c = 10,0 \text{ mg/l}$) pro metodu SIA, $\lambda = 710 \text{ nm}$

7.2 Kalibrační závislosti jednotlivým iontům při jejich paralelním stanovení

Při měření kalibračních závislostí jednotlivých iontů při jejich paralelním stanovení bylo postupně proměřeno pět směsných roztoků, každý bod kalibrace byl měřen třikrát, pro výslednou kalibraci daného iontu byly použity průměrné hodnoty absorbance. Kalibrační rozmezí pro dusitaný v paralelním stanovení s ostatními ionty bylo $c = 0,25 - 0,8 \text{ mg/l}$, pro dusičnaný $c = 3,0 - 15,0 \text{ mg/l}$, pro chloridy $c = 25,0 - 125,0 \text{ mg/l}$ a pro rozpuštěné křemičitaný $c = 1,0 - 12,0 \text{ mg/l}$. V těchto rozmezích vykazovaly dané ionty v paralelním stanovení v komerčním SIA systému dostatečnou linearitu kalibrací. Výsledná absorbance konečných produktů byla měřena ve dvou blocích (viz. Kalibrační program pro paralelní stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů), v prvním bloku byly měřeny chloridy společně s dusitaný při vlnových délkách $\lambda = 465 \text{ nm}$ a $\lambda = 540 \text{ nm}$, ve druhém křemičitaný a suma dusitaný+dusičnaný při vlnových délkách $\lambda = 710 \text{ nm}$ a $\lambda = 540 \text{ nm}$.

a) Směsný roztok I

Tab. 29 Kalibrační závislost směsného roztoku I

<i>c</i> (mg/l)	Absorbance				
	1.	2.	3.	Průměr	RSD (%)
<i>c</i> (NO ₂) 0,5	0,573	0,577	0,572	0,574	0,67
<i>c</i> (NO ₃) 3	0,571	0,567	0,571	0,570	0,29
<i>c</i> (Cl ⁻) 50	0,505	0,501	0,503	0,503	0,50
<i>c</i> (SiO ₄ ⁴⁻) 1	0,647	0,649	0,658	0,651	0,72

b) Směsný roztok II

Tab. 30 Kalibrační závislost směsného roztoku II

<i>c</i> (mg/l)	Absorbance				
	1.	2.	3.	Průměr	RSD (%)
<i>c</i> (NO ₂) 0,8	0,662	0,667	0,666	0,665	0,31
<i>c</i> (NO ₃) 10	1,246	1,227	1,236	1,236	0,97
<i>c</i> (Cl ⁻) 100	0,970	0,964	0,973	0,969	1,95
<i>c</i> (SiO ₄ ⁴⁻) 5	0,795	0,800	0,815	0,803	2,12

c) Směsný roztok III

Tab. 31 Kalibrační závislost směsného roztoku III

<i>c</i> (mg/l)	Absorbance				
	1.	2.	3.	Průměr	RSD (%)
<i>c</i> (NO ₂) 0,25	0,477	0,480	0,474	0,477	1,38
<i>c</i> (NO ₃) 5	0,740	0,751	0,757	0,749	0,95
<i>c</i> (Cl ⁻) 125	1,213	1,278	1,238	1,243	2,81
<i>c</i> (SiO ₄ ⁴⁻) 10	1,021	1,042	1,028	1,030	1,03

d) Směsný roztok IV

Tab. 32 Kalibrační závislost směsného roztoku IV

<i>c</i> (mg/l)	Absorbance				
	1.	2.	3.	Průměr	RSD (%)
<i>c</i> (NO ₂) 0,4	0,522	0,542	0,531	0,532	0,53
<i>c</i> (NO ₃) 15	1,762	1,768	1,755	1,762	1,02
<i>c</i> (Cl ⁻) 25	0,310	0,320	0,330	0,320	0,53
<i>c</i> (SiO ₄ ⁴⁻) 8	0,935	0,946	0,943	0,941	1,77

e) Směsný roztok V

Tab. 33 Kalibrační závislost směsného roztoku V

<i>c</i> (mg/l)	Absorbance				
	1.	2.	3.	Průměr	RSD (%)
<i>c</i> (NO ₂) 0,65	0,620	0,606	0,633	0,620	1,22
<i>c</i> (NO ₃) 12	1,510	1,497	1,523	1,510	4,24
<i>c</i> (Cl ⁻) 75	0,758	0,772	0,764	0,765	0,69
<i>c</i> (SiO ₄ ⁴⁻) 12	1,097	1,078	1,082	1,086	0,82

7.3 Kalibrační závislost iontů v paralelním stanovení v komerčním systému SIA

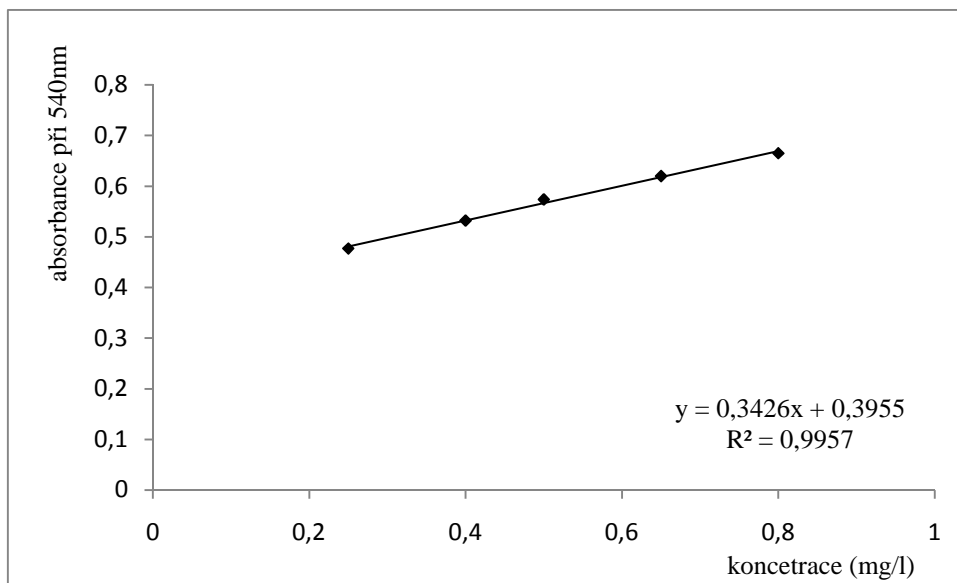
V předchozí kapitole byly proměřeny kalibrační závislosti směsných roztoků, v této kapitole budou uvedeny kalibrační závislosti každého iontu samostatně. Dusitany vykazovaly linearitu v kalibračním rozsahu $c = 0,25 - 0,8$ mg/l s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9957$, dusičnany v kalibračním rozsahu $c = 3,0 - 15,0$ mg/l s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9970$, chloridy v rozmezí kalibrace $c = 25,0 - 125,0$

mg/l s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9961$ a rozpuštěné křemičitany v kalibračním rozmezí $c = 1,0 - 12,0$ mg/l s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9963$.

Dusitany ($c = 0,25 - 0,8$ mg/l)

Tab. 34 Kalibrační závislost dusitanů

Koncentrace (mg/l)	Absorbance ($\lambda = 540$ nm)
0,25	0,477
0,40	0,532
0,50	0,574
0,65	0,620
0,80	0,665

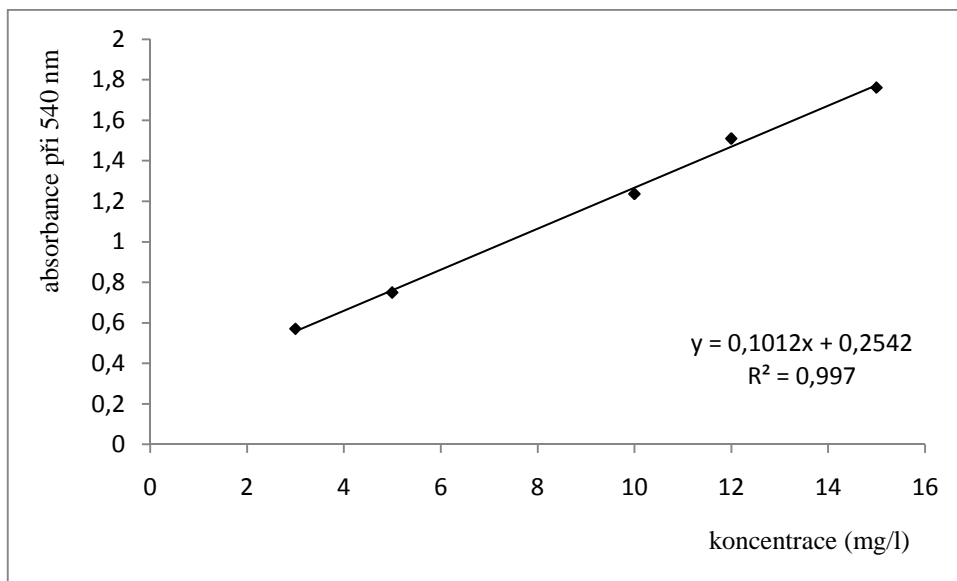


Obr. 21 Kalibrační závislost dusitanů ($c = 0,25 - 0,8$ mg/l), $\lambda = 540$ nm

Dusičnany ($c = 3,0 - 15,0$ mg/l)

Tab. 35 Kalibrační závislost dusičnanů

Koncentrace (mg/l)	Absorbance ($\lambda = 540$ nm)
3	0,570
5	0,749
10	1,236
12	1,510
15	1,762

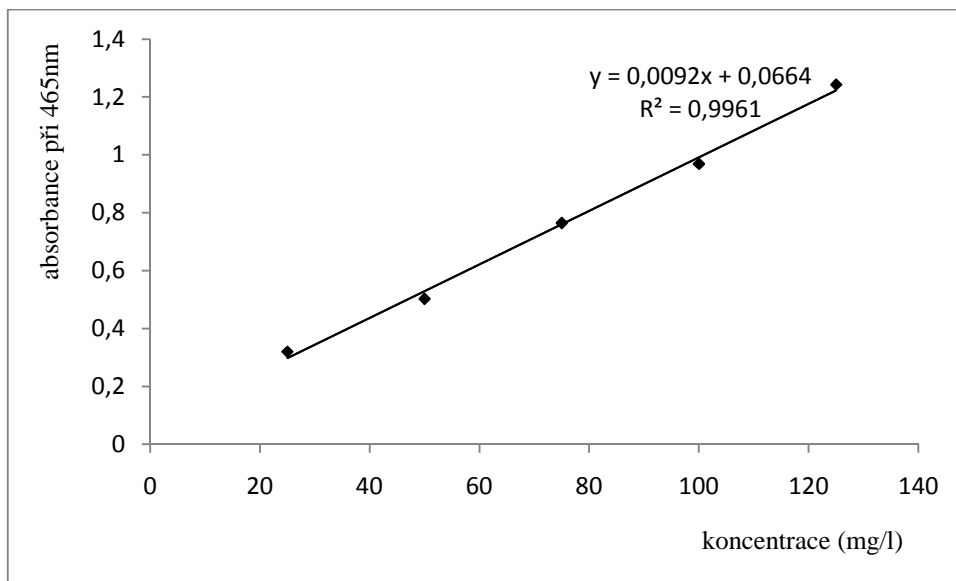


Obr. 22 Kalibrační závislost dusičnanů ($c = 3,0 - 15,0$ mg/l), $\lambda = 540$ nm

Chloridy ($c = 25,0 - 125,0$ mg/l)

Tab. 36 Kalibrační závislost chloridů

Koncentrace (mg/l)	Absorbance ($\lambda = 465$ nm)
25	0,320
50	0,503
75	0,765
100	0,969
125	1,243

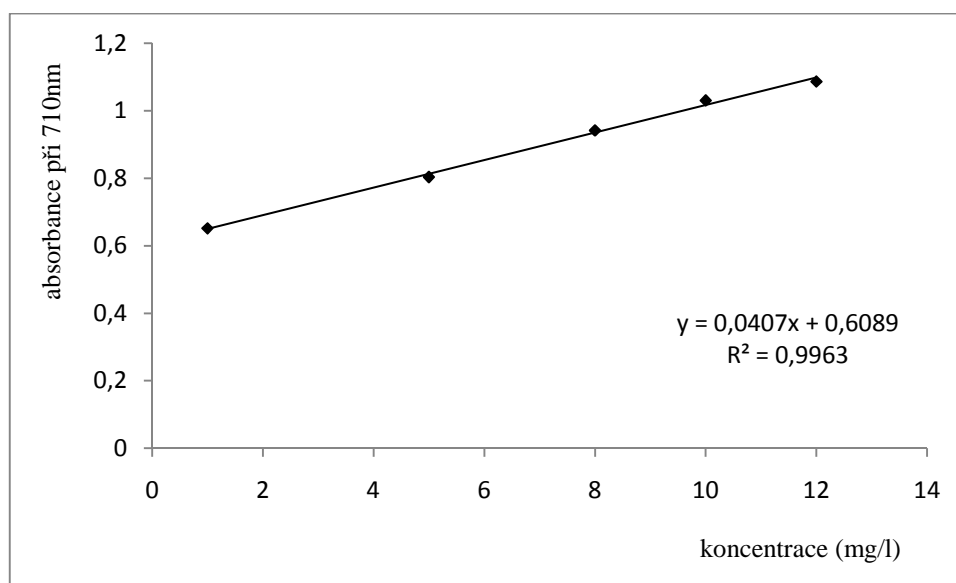


Obr. 23 Kalibrační závislost chloridů ($c = 25 - 125$ mg/l), $\lambda = 465$ nm

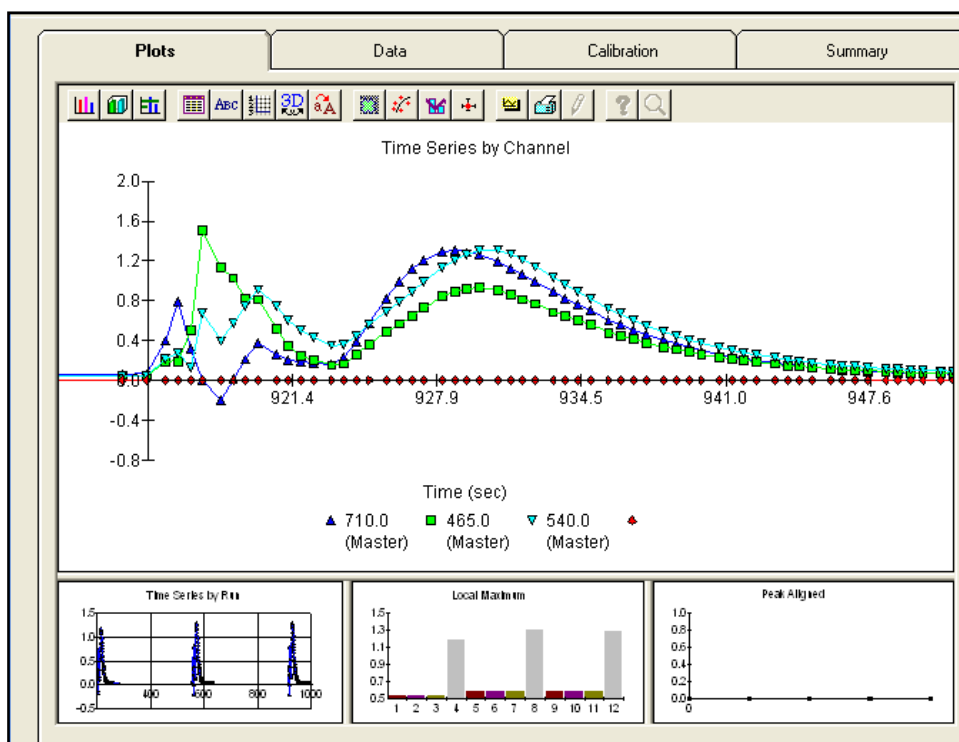
Křemičitany ($c = 1,0 - 12,0$ mg/l)

Tab. 37 Kalibrační závislost křemičitanů

Koncentrace (mg/l)	Absorbance ($\lambda = 710$ nm)
1	0,651
5	0,803
8	0,941
10	1,030
12	1,086



Obr. 24 Kalibrační závislost křemičitanů ($c = 1,0 - 12,0$ mg/l), $\lambda = 710$ nm



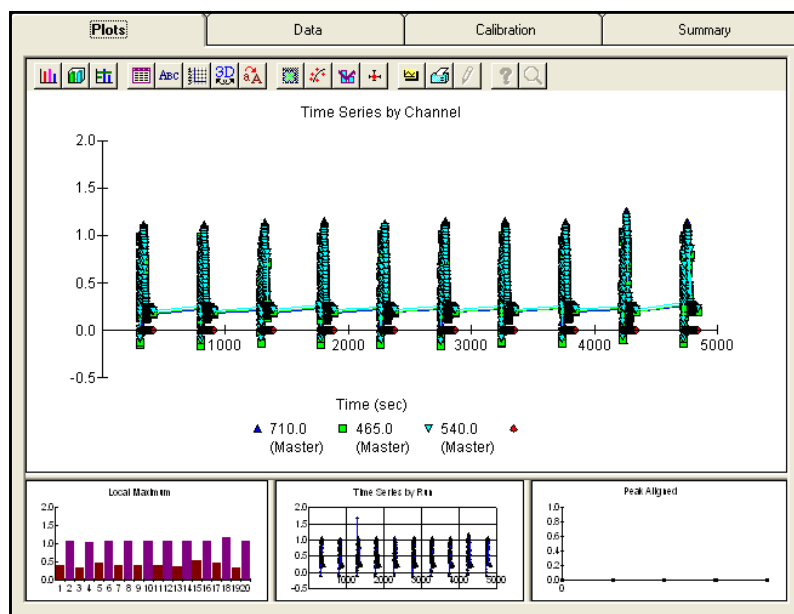
Obr. 25 Záznam měření při paralelním stanovení dusitanů ($\lambda = 540 \text{ nm}$), dusičnanů ($\lambda = 540 \text{ nm}$), chloridů ($\lambda = 465 \text{ nm}$) a křemičitanů ($\lambda = 710 \text{ nm}$) v systému SIA

7.4 Opakovatelnost měření paralelního stanovení iontů metodou SIA

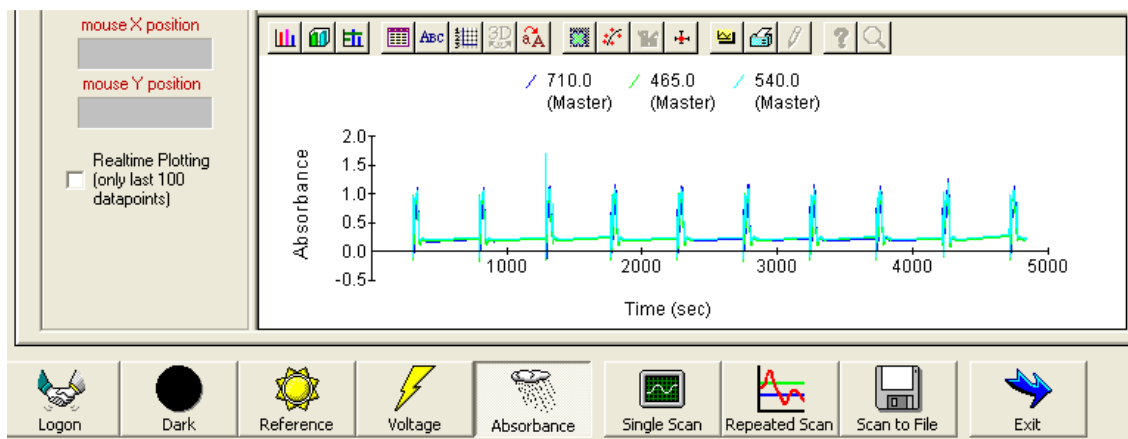
Pro měření opakovatelnosti byl vybrán jeden z pěti směsných roztoků - směsný roztok III ($c(\text{NO}_2) = 0,25 \text{ mg/l}$, $c(\text{NO}_3) = 5,0 \text{ mg/l}$, $c(\text{Cl}^-) = 125,0 \text{ mg/l}$ a $c(\text{SiO}_4^{4-}) = 10,0 \text{ mg/l}$) a následně přeměřen desetkrát za stejných podmínek měření. Měření bylo provedeno v jedné sérii 10 měření, hodnoty absorbancí společně s hodnotou RSD (%) jsou uvedeny v Tab. 38.

Tab. 38 Opakovatelnost měření ($c(\text{NO}_2) = 0,25 \text{ mg/l}$, $c(\text{NO}_3) = 5,0 \text{ mg/l}$, $c(\text{Cl}^-) = 125,0 \text{ mg/l}$ a $c(\text{SiO}_4^{4-}) = 10,0 \text{ mg/l}$)

Měření	Absorbance ($\lambda = 540 \text{ nm}, 465 \text{ nm}, 710 \text{ nm}$)			
	NO ₂	NO ₃	Cl ⁻	SiO ₄ ⁴⁻
1.	0,417	0,721	1,198	1,119
2.	0,419	0,709	1,179	1,111
3.	0,427	0,722	1,319	1,508
4.	0,407	0,737	1,251	1,148
5.	0,400	0,735	1,237	1,130
6.	0,402	0,747	1,245	1,152
7.	0,441	0,736	1,225	1,152
8.	0,490	0,725	1,242	1,138
9.	0,407	0,846	1,240	1,273
10.	0,454	0,722	1,301	1,144
Průměr	0,426	0,740	1,244	1,188
RSD (%)	2,86	3,88	4,17	4,56



Obr. 26 Záznam měření opakovatelnosti stanovení dusitanů ($\lambda = 540 \text{ nm}$), dusičnanů ($\lambda = 540 \text{ nm}$), chloridů ($\lambda = 465 \text{ nm}$) křemičitanů ($\lambda = 710 \text{ nm}$) v SIA systému – Analýza dat



Obr. 27 Záznam měření opakovatelnosti stanovení dusitanů ($\lambda = 540 \text{ nm}$), dusičnanů ($\lambda = 540 \text{ nm}$), chloridů ($\lambda = 465 \text{ nm}$), křemičitanů ($\lambda = 710 \text{ nm}$) v SIA systému - záznam z detektoru

8 SOUHRN

Tato práce se zabývá tématem průtokových analytických metod, popisuje optimalizaci stanovení rozpuštěných křemičitanů podle platné ISO normy. Součástí práce je sestavení automatizovaného systému pro paralelní stanovení vybraných iontů v komerčním SIA systému.

Experimentální část zahrnuje podrobnou optimalizaci podmínek pro stanovení rozpuštěných křemičitanů pro metodu SIA. V Tab. 39 jsou uvedeny přehledně podmínky optimalizace pro toto stanovení. Každý vzorek je měřen třikrát a tyto 3 měřicí cykly jsou do rychlosti analýzy jednoho vzorku započítány. Celkový čas měřicího cyklu rozpuštěných křemičitanů byl 512,67 s, což teoreticky odpovídá 7 h^{-1} jako hodnotě rychlosti stanovení udávající počet vzorků analyzovaných za hodinu. V Tab. 40 je popsán přehled optimálních podmínek pro paralelní stanovení vybraných iontů metodou sekvenční injekční analýzy, konkrétně pro stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů. V tabulce č. 41 je uvedena spotřeba roztoků činidel spotřebovaných pro analýzu jednoho vzorku.

Rigorózní práce obsahuje výsledky měření optimalizací všech testovaných parametrů včetně proměření kalibračních závislostí, opakovatelnost měření s grafy, doplněné o obrázky z programu FIALab. Součástí práce jsou také praktické ukázky grafů proměřených vybraných kalibračních rozsahů směsných roztoků společně s měřením opakovatelnosti jednoho směsného roztoku.

Význam práce spočívá na jedné straně v ověření možnosti stanovení rozpuštěných křemičitanů podle normy vztahující se k metodě FIA ve formě převedené na stanovení pomocí SIA metody s dodržáním požadovaných kalibračních rozsahů a v možnosti využít vytvořený automatizovaný SIA systém pro paralelní stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů a křemičitanů na základě proměřených kalibračních rozsahů na straně druhé.

Tab. 39 Přehled optimálních podmínek pro stanovení rozpuštěných křemičitanů

Parametr	Rozmezí optimalizace	Výsledek optimalizace
Objem vzorku	$V = 40 - 80\mu\text{l}$	$V = 60\mu\text{l}$
Objem činidla R1	$V = 20 - 60\mu\text{l}$	$V = 30\mu\text{l}$
Objem činidla R2	$V = 3 - 15\mu\text{l}$	$V = 5\mu\text{l}$
Objem činidla R3	$V = 20 - 110\mu\text{l}$	$V = 25\mu\text{l}, V = 45\mu\text{l}$
Sekvence	Kombinace S - R ₁ - R ₂ - R ₃ , R ₃ - R ₂ - R ₁ - S	S - R ₁ - R ₂ - R ₃
Počet míchaní	1x - 4x	2x, 4x
kalibrační rozsah	rovnice regrese	korelační koeficient R
$c = 0,2 - 2,0 \text{ mg/l}$	$y = 0,1808x + 0,4156$	$R^2 = 0,9977$
$c = 2,0 - 20,0 \text{ mg/l}$	$y = 0,0138x + 0,556$	$R^2 = 0,9970$
Opakovatelnost	RSD (%)	
$c = 1,0 \text{ mg/l}$	2,89	
$c = 10,0 \text{ mg/l}$	2,26	

Tab. 40 Přehled optimálních podmínek pro paralelní stanovení vybraných iontů metodou sekvenční injekční analýzy

	Objem vzorku	Objem činidla	Kalibrační rozsah	Korelační koeficient
NO₂⁻	$V = 50\mu\text{l}$	$V = 30\mu\text{l}$	$c = 0,25 - 0,8\text{mg/l}$	$R^2 = 0,9957$
NO₃⁻	$V = 50\mu\text{l}$	$V = 20\mu\text{l}$	$c = 3,0 - 15,0\text{mg/l}$	$R^2 = 0,9970$
Cl⁻	$V = 50\mu\text{l}$	$V = 25\mu\text{l}$	$c = 25,0 - 125,0\text{mg/l}$	$R^2 = 0,9961$
SiO₄⁴⁻	$V = 60\mu\text{l}$	$V(\text{R1}) = 40\mu\text{l}$ $V(\text{R2}) = 5\mu\text{l}$ $V(\text{R3}) = 60\mu\text{l}$	$c = 1,0 - 12,0\text{mg/l}$	$R^2 = 0,9963$

Tab. 41 *Spotřeba roztoků činidel spotřebovaných pro analýzu daného iontu při paralelním stanovení vybraných iontů*

Spotřeba roztoků činidel (μl)	
NO_2^-	$V = 90 \mu\text{l}$
NO_3^-	$V = 60 \mu\text{l}$
Cl^-	$V = 75 \mu\text{l}$
SiO_4^{4-}	$V(\text{R1}) = 120 \mu\text{l}$ $V(\text{R2}) = 15 \mu\text{l}$ $V(\text{R3}) = 180 \mu\text{l}$

9 ZÁVĚR

Sekvenční injekční analýza představuje moderní typ průtokové metody, vyznačující se jednoduchým průtokovým systémem, vysokou variabilitou chemických reakcí probíhajících přímo v systému, širokou nabídkou detekčních technik pro stanovení produktů těchto reakcí, dostatečně vysokou frekvencí dávkování vzorků a snadnou automatizovatelností. Všechny tyto vlastnosti z ní činí techniku vhodnou pro rutinní analýzy vysokého počtu vzorků a využitelnou v řadě nejen chemických oborů.

Tato rigorózní práce popisuje stanovení rozpuštěných křemičitanů vyskytujících se běžně v pitné vodě pomocí metody sekvenční injekční analýzy na základě FIA stanovení podle platné ISO normy ^[6] a jeho podrobnou optimalizaci v rámci parametrů stanovení v průtokovém systému. Na základě úspěšně vytvořených podmínek v rámci optimalizace měření a proměření kalibračních závislostí podle kalibračních rozsahů určených dle normy včetně měření opakovatelnosti lze říci, že tato metoda je vhodná ke stanovení těchto iontů v rámci rutinních měření.

Aplikace průtokových metod v monitorování kvality životního prostředí, přesněji kvality vod, je další možností, jak využít metodu sekvenční injekční analýzy a to na základě vytvoření automatizovaného SIA systému pro paralelní stanovení dusitanů, dusičnanů, chloridů a rozpuštěných křemičitanů, jehož testování na modelových směsných vzorcích úspěšně proběhlo v rámci druhé části této práce.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] http://web2.mendelu.cz/af_224_rybari/dok%20rybari/anionty.pdf (1/2010).
- [2] http://www.chos.cz/chemie_vody.htm (1/2010).
- [3] <http://www.vegetarian.cz/ostatni/voda/voda6.html> (2/2010).
- [4] <http://www.celostnimedicina.cz/kremik.htm> (2/2010).
- [5] http://chemie.gfxs.cz/index.php?pg=prvek&prvek_id=14(1/2010).
- [6] ČSN EN ISO 16 624, Jakost vod - Stanovení rozpuštěných křemičitanů průtokovou analýzou (CFA a FIA) a fotometrickou detekcí, Český normalizační institut (2004).
- [7] Dundová A., Diplomová práce: SIA stanovení dusitanů, dusičanů, chloridů podle platných ISO norem, (2009)
- [8] http://tomcat.prf.jcu.cz/home/sima/vybrane_kapitoly/prutok_anal.htm (1/2010).
- [9] <http://www.natur.cuni.cz/~analchem/pprakt/sia.pdf> (1/2010).
- [10] Bartl T., Kombian B. S., Miláčková I., Žádníková P., Jiříková R., Stašková P., Beneš L., Chem. Listy 102 (2008), 179- 264.
- [11] Cerda A., Cerda V.: An introduction to flow analysis, SCIWARE, S. L., Palma de Malorca, 2009
- [12] Barcelo D.: Comprehensive analytical chemistry, volume 54, Wilson's & Wilson's, Elsevier (2008).
- [13] Lapa R. A. S., Lima J. L. F. C., Pinto I., Food Chem., 81 (2003) 141–146.
- [14] Segundo M. A., Rangel A. O. S. S., Anal. Chim. Acta, 458 (2002) 131–138.
- [15] Oliveira H. M., Segundo M. A., Lima J. L. F. C., Grassi V., Zagatto E. A. G., J. Agric. Food Chem., 54 (2006) 4136–4140.
- [16] Segundo M. A., Rangel A. O. S. S., Anal. Chim. Acta, 499 (2003) 99–106.

- [17] Segundo M. A, Rangel A. O. S. S., *Anal. Chim. Acta*, 27 (2001) 279–286.
- [18] Oliveira C. C., Sartini R. P., Zagatto E. A. G., *Anal. Chim. Acta*, 413 (2000) 41–48.
- [19] Qian L. L., He Z. Y., Hu Y. Y., *Spectrosc. Lett.*, 39 (2006) 581–592.
- [20] Garden S. R., Strachan N. J. C., *Anal. Chim. Acta*, 444 (2001) 187–191.
- [21] Oliveira S. M., Lopes T. I. M. S., Rangel A. O. S. S., *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 38 (2007) 533–544.
- [22] Lima M. J. R., Fernandes S. M. V., Rangel A. O. S. S., *Food Control*, 15 (2004) 609–613.
- [23] Lima M. J. R., Fernandes S. M. V., Rangel A. O. S. S., *J. Food Sci.*, 67 (2002) 3280–3283.
- [24] Lima M. J. R., Fernandes S. M. V., Rangel A. O. S. S., *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 6887–6890.
- [25] Oliveira S. M., Lopes T. I. M. S., Rangel A. O. S. S., *J. Food Sci.*, 69 (2004) C690–C695.
- [26] Doering W. E., James R. R., Echols R. T., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368 (2000) 475–479.
- [27] Economou A., Panoutsou P., Themelis D. G., *Anal. Chim. Acta*, 572 (2006) 140–147.
- [28] Panoutsou P., Economou A., *Talanta*, 67 (2005) 603–609.
- [29] Pinto P. C. A. G., Saraiva M. L. M. F. S., Lima J. L. F. C., *Anal. Chim. Acta*, 555 (2006) 377–383.
- [30] Peng Y. Z., Zhang M., Ma J., Yuan D. X., *Chinese J. Anal. Chem.*, 37 (2009) 1258 – 1262(abstrakt).
- [31] Bauza de Mirabo F. M., Forteza R., Cerda V., *Talanta*, 79 (2009) 1011 – 1020.

- [32] Mas-Torres F., Munoz A., Estela J. M. Cerda V., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 77 (2000) 185-202.
- [33] Mas-Torres F., Munoz A., Estela J. M., Cerda V., *Analyst*, 122 (1997) 1033-1038.
- [34] Rocha F. R. P., Martelli P. B., Reis B. F., *Anal. Chim. Acta*, 438 (2001) 11 – 19.
- [35] Lane R., McLeod S., Mulcahy D. E., Chow CK W. k., Davey D. E., *Desalination*, 1 (2009) 223 – 231.
- [36] Santos E., Montenegro M. C. B. S. M., Couto C., Araujo A. N., Pimentel M. F., da Silva V. L., *Talanta*, 63 (2004) 721 – 727.
- [37] Coelho P. M. R.: Sócrates/ERASMUS Program 2005, Water analysis using Sequential Injection Analysis system.
- [38] ČSN EN ISO 15 682, Jakost vod- Stanovení chloridů průtokovou analýzou (FIA a CFA) se spektrofotometrickou nebo potenciometrickou detekcí, Český normalizační institut (2002).