

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jana Horáková

STANOVENÍ KYSELINY BARBITUROVÉ POMOCÍ
TECHNIKY SIA SE SPEKTROFOTOMETRICKOU DETEKČÍ

Determination of barbituric acid using SIA technique with
spectrophotometric detection

Diplomová práce

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

Praha 2014

Prohlášení

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

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

V Praze dne 15.5.2014

Ráda bych poděkovala RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat všem členům katedry analytické chemie za příjemné prostředí, které mi poskytli během mé práce v laboratoři. Děkuji také svým rodičům a přátelům, jenž mi umožnili studovat vysokou školu a děkuji za jejich podporu během studia.

Abstrakt:

Předložená diplomová práce se zabývá stanovením kyseliny barbiturové pomocí průtokové injekční analýzy a sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí. Pro stanovení kyseliny barbiturové byly vybrány dva postupy, ve kterých byly zjištěny optimální podmínky pro její stanovení. U průtokové injekční analýzy byly zjišťovány optimální koncentrace reagensů, optimální průtoková rychlost, optimální objem dávkovaného vzorku a optimální objem reakční cívky. V případě sekvenční injekční analýzy byly zjišťovány stejné parametry s výjimkou optimálního objemu reakční cívky, který byl nahrazen optimální dobou setrvání v mísící cívce. Při stanovení kyseliny barbiturové pomocí reakce s *o*-nitroanilinovou směsí bylo za optimálních podmínek dosaženo lineární závislosti v rozmezí $2,0 \cdot 10^{-6}$ až $1,2 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ při použití FIA metody a $3,9 \cdot 10^{-6}$ až $6,2 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ v případě použití SIA metody. Při stanovení kyseliny barbiturové pomocí inhibice rozkladu methylované vznikajícími halogeny bylo dosaženo za optimálních podmínek lineární závislosti v rozmezí $5 \cdot 10^{-6}$ až $3 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ při použití FIA metody a $2 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ při použití SIA metody.

Klíčová slova:

Průtoková injekční analýza

Sekvenční injekční analýza

Kyselina barbiturová

Spektrofotometrická detekce

Optimalizace

Abstract:

This thesis is focused on the determination of barbituric acid using two methods of flow analysis: flow injection analysis and sequential injection analysis, with spectrophotometric detection. Two reactions were selected for the determination of barbituric acid and different experimental conditions were optimized conditions for its determination. In the case of flow injection analysis, the concentration and flow rates of many reagents, the sample volume and the volume of the reaction coil were optimized. In the case of sequential injection analysis the same parameters except the optimum volume of the reaction coil were optimized. The optimal volume of the reaction coil was replaced by the optimum retention time in the mixing coil. Determination of barbituric acid by reaction with a nitroaniline mixture achieved a calibration range from $2,0 \cdot 10^{-6}$ to $1,2 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ and from $3,9 \cdot 10^{-6}$ to $6,2 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ using using FIA and SIA method, respectively, under the optimal conditions. Determination of barbituric acid by inhibition effect on the reaction between hydrochloric acid and bromate ions served a calibration range from $5 \cdot 10^{-6}$ to $3 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ using FIA method and $2 \cdot 10^{-5}$ to $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ using methods SIA under optimal conditions.

Key Words:

Flow injection analysis

Sequential injection analysis

Barbituric acid

Spectrophotometric detection

Optimization

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Cíle práce.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	Historie průtokových metod	9
2.2	FIA	11
2.3	SIA.....	12
2.4	Využití FIA a SIA	13
2.5	Kyselina barbiturová.....	15
2.6	Možnosti stanovení kyseliny barbiturové	15
2.7	Princip stanovení kyseliny barbiturové	17
2.7.1	Reakce s diazotační nitroanilinovou směsí.....	17
2.7.2	Inhibice rozkladu methyloranže s využitím bromičnanu	18
3	Experimentální část	19
3.1	Seznam použitých látek a přístrojů.....	19
3.1.1	Použité chemikálie.....	19
3.1.2	Použité přístroje a zařízení	20
4	Výsledky	22
4.1	Reakce kyseliny barbiturové s nitroanilinovou směsí	22
4.1.1	Předběžná měření	22
4.1.2	Absorpční spektra a vliv pH	22
4.1.3	FIA stanovení	25
4.1.4	SIA stanovení	30
4.2	Inhibice rozkladu methyloranže kyselinou barbiturovou	36
4.2.1	Předběžná měření	36
4.2.2	FIA stanovení	40
4.2.3	SIA stanovení	47
4.2.4	Shrnutí	54
4.3	Stanovení kyseliny barbiturové v biologickém materiálu	56
5	Závěr	59
6	Použitá literatura	61

Seznam zkratek a symbolů:

SFA – segmentovaná průtoková analýza

FIA – průtoková injekční analýza

SIA – sekvenční injekční analýza

PC – osobní počítač

KB – kyselina barbiturová

DS – nitroanilinová diazotační směs

p-DS – *para*-nitroanilinová diazotační směs

o-DS – *ortho*-nitroanilinová diazotační směs

MO – methyloranž

DNA – kyselina deoxyribonukleová

RSD – relativní směrodatná odchylka

A – absorbance

λ_{o-DS} – vlnová délka absorpčního maxima *o*-DS

λ_{p-DS} – vlnová délka absorpčního maxima *p*-DS

$\lambda_{MO \text{ v HCl}}$ – vlnová délka absorpčního maxima MO v HCl

$\lambda_{MO \text{ v}}$ – vlnová délka absorpčního maxima MO

v – rychlost průtoku detektorem (SIA)

$v(\text{H}_2\text{O i DS})$ – průtoková rychlost vody a diazotační směsi

$v(\text{H}_2\text{O, MO, KBrO}_3)$ – průtoková rychlost vody, methyloranže a bromičnanu draselného

$V_{\text{cívky}}$ – objem reakční cívky (FIA)

$V(\text{KBrO}_3)$ – dávkovaný objem bromičnanu draselného

V_{KB} – dávkovaný objem kyseliny barbiturové

V_{MO} – dávkovaný objem methyloranže

$c(\text{KBrO}_3)$ – koncentrace bromičnanu draselného

c_{MO} – koncentrace methyloranže

c_{KB} – koncentrace kyseliny barbiturové

t – čas

t_r – čas setrvání v mísící cívce

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

1 Úvod

Průtoková injekční analýza (FIA) a sekvenční injekční analýza (SIA) jsou jednoduché, rychlé a univerzální metody s širokým uplatněním především pro kvantitativní analýzu. Uplatnění našly nejen v hutnickém průmyslu, geologii, zemědělství, potravinářství, farmaceutickém průmyslu a studiích zabývajících se vědeckým výzkumem.

1.1 Cíle práce

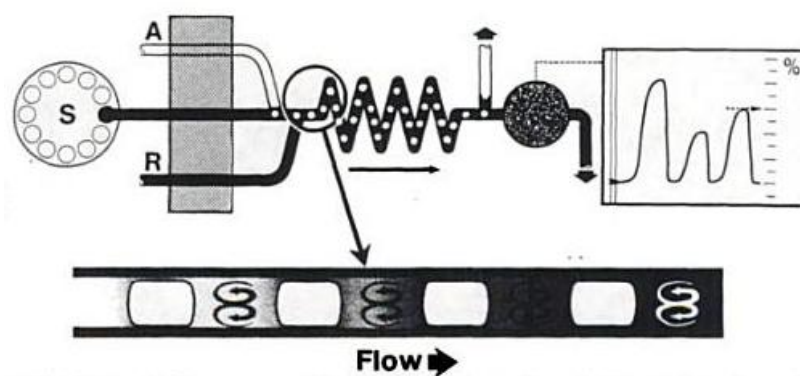
Hlavním cílem této diplomové práce bylo najít vhodné analytické reakce pro stanovení kyseliny barbiturové a převést tyto reakce, v literatuře popsány ve statickém uspořádání, do režimu průtokové injekční analýzy a sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí. V souvislosti s tímto úkolem bylo dále zapotřebí nalézt optimální podmínky těchto stanovení, a to pro oba typy průtokových metod. Dále bylo nutné za optimálních podmínek zjistit a porovnat základní charakteristiky stanovení kyseliny barbiturové testovanými metodami. Posledním cílem práce bylo zjištění vlivu biologické matrice na stanovení kyseliny barbiturové.

2 Teoretická část

V moderní době je zvykem vše urychlovat a automatizovat. Z tohoto důvodu začaly vznikat průtokové analytické metody. Jsou jednoduché, rychlé, flexibilní, snadno automatizovatelné, umožňující sériovou analýzu. Navíc s miniaturizací aparatur je spojena nižší finanční náročnost.

2.1 Historie průtokových metod

První průtoková metoda široce využívaná nejprve v oceánografických a klinických laboratořích byla SFA (segmentovaná průtoková analýza) známá spíše pod obchodním názvem Autoanalyser. Tato metoda byla popsána již v roce 1957 Skeggsem. Její schéma je znázorněno na obr. 2.1. Princip metody spočívá v dávkování vzorku do nosného media. Vzorek lze zavést ponořením trubičky přímo do vzorku nebo pomocí automatického dávkovače[1]. Jednotlivé vzorky jsou odděleny vzduchovými bublinami, které jsou posléze odstraněny. Trubičky jsou značně široké průměr okolo 2 mm [2]. Dávkované množství vzorku odpovídá 0,2–2 ml a je zapotřebí poměrně dlouhá doba analýzy 2–30 min. Vzhledem k možné frekvenci dávkování vzorku je možné stanovit 80 vzorků za hodinu[3].

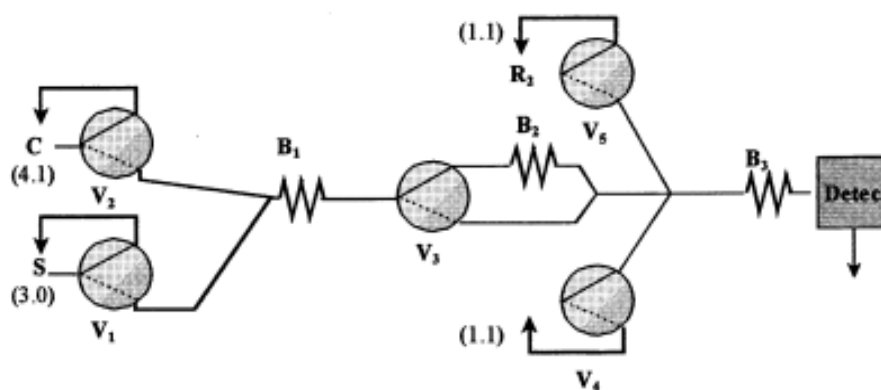


Obr. 2.1 segmentovaný systém proudění [4]

Řadu let probíhaly drobné úpravy a vylepšení této metody a v roce 1975 byla popsána metoda FIA (průtoková injekční analýza) J. Růžičkou[2]. Princip FIA metody je popsán v následující kapitole. Nicméně mezi hlavní rozdíly patří nepřítomnost bublin,

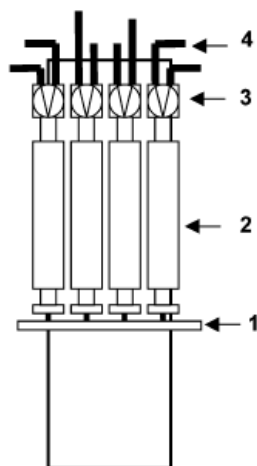
užší trubičky, a možná vyšší frekvence dávkování vzorku. O dalších 15 let později byla popsána J. Růžičkou i metoda s názvem SIA (sekvenční injekční analýza), jejíž princip je rovněž popsán v následující kapitole. Metoda SIA vznikla na základě odstraňování nedostatků průtokové injekční analýzy.

Tím se vývoj nezastavil a následovala metoda, která je dnes v literatuře označována jako „multicommutation flow analysis“ (MCFA)[5],[6]. Jedná se o metodu, kde složitější systém proudění obsahuje sadu elektromagnetických ventilů, které jsou sestaveny tak, aby umožnily efektivní manipulaci vzorků a reagentů. Na obr. 2.2 je znázorněn diagram této metody pro automatické jednostupňové ředění.[3]



Obr. 2.2 Diagram více komutačního systému pro automatické jednostupňové ředění[3]

Další metodou je metoda označovaná v literatuře jako „multisyringe flow injection analysis“ (MSFIA). Tato metoda se od klasické metody FIA a SIA liší především v dávkovacím ventilu. Zatímco FIA používá rotační dávkovací ventil s dávkovací smyčkou a SIA vícecestný selekční ventil, MSFIA používá více injekční byretu znázorněnou na obr. 2.3, která je napojena na automatickou dávkovací pumpu umožňující pohyb více stříkaček [7].



Obr. 2.3 Dávkovací zařízení pro MSFIA[7]

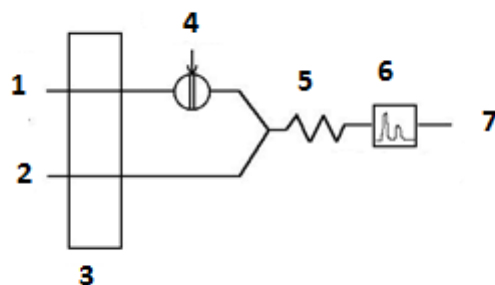
*1- řídicí jednotka, 2- stříkačka, 3- elektromagnetický komutační ventil,
4- konektory a hadičky*

2.2 FIA

Průtoková injekční analýza je metoda založená na zavádění kapalného vzorku do nosného proudu vhodné kapaliny. Vzorek je dále unášen přes reakční cívku k detektoru, který průběžně zaznamenává veličinu závislou na přítomnosti vzorku v průtokové cele. Takovouto veličinou může být absorpance, fluorescence, elektrodový potenciál nebo jiný fyzikální parametr.

Nejjednodušší průtokový injekční analyzátor se skládá z pumpy, která pohání nosný proud úzkými trubičkami aparatury. Analyzátor dále obsahuje dávkovací smyčku, díky které je zaváděn přesně definovaný a reprodukovatelný objem vzorku do aparatury. Dále obsahuje reakční cívku, ve které dochází k definované disperzi a reakci mezi jednotlivými komponenty nosného proudu. Poslední částí je detektor, který průběžně zaznamenává zvolenou veličinu. Disperze vzorku je základní charakteristikou metody.[4] Zařízení pro průtokovou injekční analýzu je znázorněno na obr. 2.4.

Tato metoda je rychlejší než její předchůdce SFA. Vzorky mohou být dávkovány po méně jak 30 sekundách, takže je možné stanovit okolo 120 vzorků za hodinu. Dávkový objem vzorku je mnohem nižší. Obvykle mezi 1 – 200 μl [4]. Trubičky jsou užší jejich průměr je 0,5 až 0,7 mm.[3]



Obr 2.4 Zařízení pro průtokovou injekční analýzu

1- nosný proud, 2- reakční činidlo, 3- pumpa, 4- vzorek, 5- reakční cívka, 6-detektor, 7-odpad

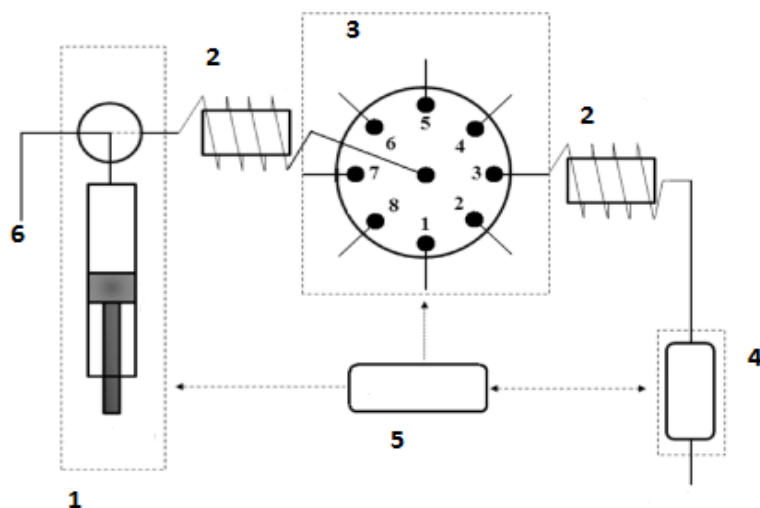
2.3 SIA

Sekvenční injekční analýza je další historicky objevenou průtokovou metodou. Ovšem nevyužívá přímého konstantního toku jako FIA, ale kombinuje přímý a zpětný tok. Nejprve jsou postupně nasáty zóny nosného media, vzorku a činidla do mísící cívky. Posléze je proud toku obrácen, dojde k promísení jednotlivých složek a dopravení vzniklých produktů k příslušnému detektoru.

Jednoduchý sekvenční injekční analyzátor se skládá z jednobokového dvousměrného pístového čerpadla, které pohání a určuje směr toku. Další důležitou součástí je selekční vícecestný ventil, který zajišťuje nasátí všech požadovaných roztoků ve správném pořadí. Následuje mísící cívka umístěná mezi čerpadlem a selekčním ventilem, která navíc zabraňuje vniknutí reagentů do čerpadla. V případě déle trvajících reakcí je možno zapojit další mísící cívku mezi selekční ventil a detektor. Dále je zapotřebí vhodný detektor a spojovací materiál (většinou teflonové a tygonové trubičky). Pro tuto metodu je podstatné správné naprogramování pohybů pístového čerpadla synchronně s přepínáním pozic selekčního vícecestného ventilu. Nezbytnou součástí je tudíž mikroprocesor (PC) s příslušným programem. Schématické zapojení sekvenční injekční analýzy je znázorněno na obr. 2.5.

Průtoková rychlost používaná pro sekvenční injekční analýzu je srovnatelná s průtokovou rychlostí pro průtokovou injekční analýzu a pohybuje se okolo 1 ml min^{-1} .

Tygonové hadičky mají vnitřní průměr okolo 0,7 až 0,8 mm, což je srovnatelné s hadičkami pro FIA. Ovšem výhodou této metody oproti FIA je variabilita dávkovaného objemu v jednotlivých cyklech. Zatímco u FIA je dávkovaný objem dán objemem dávkovací smyčky, u SIA ho lze měnit v rozmezí jednotek až stovek μl díky možnosti otevření selekčního ventilu na delší dobu.



Obr. 2.5 Schéma zapojení sekvenční injekční analýzy

1- dvousměrné pístové čerpadlo, 2- mísící cívka, 3- selekční vícecestný ventil,
4- detektor, 5- řídicí počítač

2.4 Využití FIA a SIA

Vzhledem ke zvyšujícím se nárokům na kontrolu kvality léčiv, potravin a životního prostředí se zvyšuje i využití průtokových metod, splňujících požadavky na rychlost, spolehlivost a přesnost stanovení.

Ve farmacii je možné uplatnění průtokových metod pro stanovení mnoha různých látek. Množství látek, které lze stanovit je nepřeborné. Důležité je zvolit vhodný způsob detekce pro dané stanovení. Ve farmacii se nejčastěji používá FIA s různými způsoby detekce, SIA se spektrofotometrickou detekcí, fluorimetrickou detekcí, chemiluminiscenční detekcí a elektrochemickou detekcí[8]. Spektrofotometricky lze stanovit například některá antibiotika norfloxacin, ciprofloxacin[9], cefradin, ceftazidim[10] a některá další cefalosporinová antibiotika[11], látky používané jako

běžná analgetika jako je ibuprofen[12], paracetamol[13] i látky ovlivňující centrální nervovou soustavu jako je diazepam[14] a mnohé další. Chemiluminiscenčně lze stanovit alkaloidy jako je morfin[15], heroin[16], reserpin[17], sympatomimetikum oxymethazolin hydrochlorid[18] (Nasivin), nesteroidní protizánětlivý acemetacin[19], antibiotikum gentamicin[20], penicilin[21] nebo analgetika jako je ibuprofen[22]. Pro stanovení ibuprofenu lze použít nejen spektrofotometrickou a chemiluminiscenční detekci, ale i fluorimetrickou detekci[23]. Fluorimetricky lze dále stanovit deriváty fenothiazinu[24] používané jako antipsychotika a antihistaminika, antituberkulotikum isoniazid a dříve používané antidepresivum iproniazid[25] nebo antipyretikum paracetamol[26]. Elektrochemickou detekci je možné využít pro stanovení opioidů jako je kodein[27], dihydrokodein[28] a meptazinol[29], alopurinol[30] (léčba DNY), kyselina salicylová[31], kyselina askorbová[32], serotonin[33], vitamín B2[34] a další. Kromě kontroly kvality léčiv jsou průtokové metody vhodné ke zjištění stejnoměrnosti obsahu účinné látky v přípravcích a jejich rychlosti uvolňování z lékové formy.

V potravinářském průmyslu mají tyto metody velký význam a využití při kontrole kvality a obsahu složek v potravinách. Velké uplatnění mají průtokové metody pro stanovení obsahu látek v nápojích, zelenině, mléce, mléčných výrobcích a mase[8]. Lze stanovit například množství vápníku v mléce[35]. Kromě vápníku lze v mléce stanovit i obsah laktózy[36], močoviny[37], kadmia, olova[38], mědi, železa[39], chloridových iontů, fosfátů[40], peroxidu vodíku, dichromanu, formaldehydu, bikarbonátu[41], dusitanů a dusičnanů[42], vitamínu E[43] a dalších. Dále je možné průtokové metody využít pro stanovení různých toxinů v potravinách např. aflatoxinu[44].

Co se týká monitorování životního prostředí, tak jsou nejčastěji analyzovány atmosférické plyny, voda, sedimenty a soli. Po zvolení vhodného způsobu detekce jsou možnosti stanovení látek velmi rozmanité[8]. Spektrofotometricky lze stanovit například anorganické kationty: dusitany[45], fosfáty[46], thiokyanáty[47]. Z aniontů lze stanovit např. hliník[48], měď[49], vápník[50], hořčík[51], amoniak[52] a další. Lze stanovit i organické sloučeniny například halogenové organické sloučeniny a fenolický index[53]. Další možností je elektrochemická detekce. Amperometricky lze stanovit například azidy[54]. Kovy jako je měď, olovo, kadmium a zinek lze stanovit pomocí anodické rozpouštěcí voltametrie[55].

Dále je možné využít tuto techniku pro extrakci látek nebo jejich prekoncentraci[8]. Další možnosti využití těchto technik se nachází na vědeckých pracovištích zabývajících se studiem DNA, proteinů, aminokyselin, enzymů nebo imunologickými testy.[8]

2.5 Kyselina barbiturová

Kyselina barbiturová je organická sloučenina obsahující heterocyklickou pyrimidinovou kostru. Její základní fyzikální vlastnosti jsou v tab. 2.1. Byla objevena německým chemikem Adolfem von Baeyerem 4.prosince 1864. Kyselina barbiturová vzniká kondenzací močoviny a kyseliny malonové. Pomocí Knoevenagelovy kondenzační reakce ji lze převést na širokou škálu barbiturátů, které se dříve hojně využívali ve farmacii jako léky se sedativními a hypnotickými účinky na centrální nervovou soustavu. Kyselina barbiturová však nemá depresivní účinky na centrální nervovou soustavu.

Kyselina barbiturová se používá při výrobě plastů, farmaceutických přípravků (riboflavinu[56]), indikátorů (stanovení nikotinový derivátů v moči[57]), textilií a polymerů (teplotní stabilizace PVC[58]). Kyselina barbiturová je také prekurzorem pro látky s antimikrobiální a protinádorovou aktivitou.[59]

Tab. 2.1 Základní vlastnosti kyseliny barbiturové

Molekulový vzorec	$C_4H_4N_2O_3$
Molární hmotnost	128,086 g mol ⁻¹
Teplota tání	245°C
Teplota varu	260°C
Rozpustnost ve vodě	142 g l ⁻¹ (20°C)

2.6 Možnosti stanovení kyseliny barbiturové

Stanovení kyseliny barbiturové lze provést mnoha způsoby např. pomocí chromatografie ať již plynové[60] nebo kapalinové[61], dále pomocí kapilární elektroforézy[62], elektrochemicky[63], chemiluminiscenčně[64] nebo spektrofotometricky[59], [65]–[69].

V případě použití kapilární elektroforézy byl lineární rozsah 0,13 – 130 $\mu\text{g ml}^{-1}$ limit detekce 0,070 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a RSD činila 3,4%[62]. V případě coulometrického stanovení byl lineární rozsah 0 – 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ limit detekce 0,50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a RSD činila 1,9%[63]. V případě použití voltametrického stanovení s molekulárním potiskovým polymerem byl lineární rozsah 5 – 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ limit detekce 1,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a RSD činila 1,25%[70]. V případě chemiluminiscenčního stanovení za použití $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ -Ce(IV) systému byl lineární rozsah 0,005 – 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ limit detekce 0,0007 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a RSD činila 3,2%[64].

Co se týče spektrofotometrického stanovení, je zde velké množství látek, se kterými tvoří kyselina barbiturová barevné produkty. V případě spektrofotometrického stanovení založeného na reakci kyseliny barbiturové s 2,2,2-trichloroethan-1,1-diolem byla vyvinuta metoda stanovení s lineárním rozsahem 1 – 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kde RSD činila 1,1%[71]. V případě stanovení založeného na reakci kyseliny barbiturové s 1,4-naphtoquinonem byla vyvinuta metoda s lineárním rozsahem 3,2 – 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kde RSD činí 1%[72]. Jelikož tvorba barevného komplexu kyseliny barbiturové s 1,4-naphtoquinonem je poměrně časově náročná (cca 1 hod při 50°C) je možné použít i jiné quinony jako např. *p*-benzoquinon nebo *p*-chloranil. V případě použití *p*-benzoquinonu trvá vznik barevného komplexu cca 5 min[69]. Další možností je reakce kyseliny barbiturové s dusitanem sodným v prostředí kyseliny octové. Toto stanovení poskytuje lineární rozsah v rozmezí 18,75 – 2250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [59]. Další možností je použití reakce kyseliny barbiturové s *p*-dimethylaminobenzaldehydem. V tomto případě bylo díky použití disperzní kapalina–kapalina mikroextrakce kyseliny barbiturové ze vzorku před vlastním spektrofotometrickým stanovením dosaženo lineárního rozsahu 0,005 – 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ limitu detekce 0,002 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a RSD činila 1,65%[65]. Další možností je reakce kyseliny barbiturové s diazotační nitroanilinovou směsí. Pro stanovení byly použity *o*-, *m*- i *p*- nitro anilinová směs a bylo dosaženo lineárního rozsahu v rozmezí 0,2 – 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Poloha nitroskupiny je rozhodující jak pro reakční čas potřebný k tvorbě výsledného barevné azokomplexu, tak pro vlnovou délku absorpčního maxima [68].

Další možností spektrofotometrického stanovení kyseliny barbiturové je pomocí inhibice odbarvení methylované. Metoda je založena na odbarvení methylované

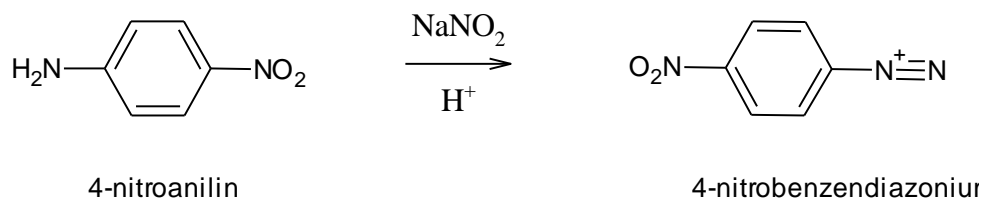
pomocí halogenů vzniklých reakcí $10\text{Cl}^- + 2\text{BrO}_3^- + 12\text{H}^+ \rightarrow 5\text{Cl}_2 + \text{Br}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$. Kyselina barbiturová inhibuje tuto reakci, a tudíž nedochází ke vzniku halogenů schopných odbarvit methylovanž. Tato technika poskytuje lineární rozsah pro $1 \cdot 10^{-6} - 6 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ limit detekce je $7,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ a RSD činní 1,8% [66].

2.7 Princip stanovení kyseliny barbiturové

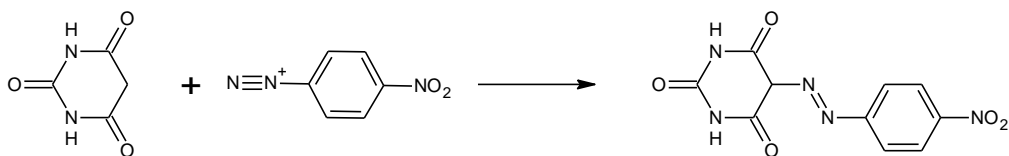
Spektrofotometricky lze stanovit kyselinu barbiturovou mnoha způsoby viz. kapitola 2.6 Možnosti stanovení kyseliny barbiturové. Většina těchto reakcí probíhá relativně dlouho, a proto je nutné zvolit metodu stanovení kyseliny barbiturové, která bude vhodná i pro použití v průtoku. Z předpokládané doby reakce byly zvoleny dvě metody, a to stanovení pomocí reakce s diazotační nitroanilinovou směsí[68] a pomocí inhibiční reakce rozkladu methylovanže s využitím bromičnanu[66].

2.7.1 Reakce s diazotační nitroanilinovou směsí

Stanovení kyseliny barbiturové pomocí diazotační nitroanilinové směsi je založeno na dvoukrokové reakci. Prvním krokem je tzv. diazotace, přesněji reakce nitroanilinu s dusitanem v kyselém prostředí.



Tím vzniká benzendiazoniová sůl, která je slabým elektrofilem. V druhém kroku dochází ke kopulační reakci, kde reaguje benzendiazoniová sůl s aktivovaným jádrem kyseliny barbiturové za vzniku příslušné azosloučeniny. Tato azosloučenina absorbuje elektromagnetické záření ve viditelné oblasti světla, díky rozsáhlému konjugovanému π -elektronovému systému[73]. Konkrétní vlnová délka absorpčního maxima vzniklého azobarviva je závislá na poloze nitroskupiny v diazotační směsi. Reakce kyseliny barbiturové s nitroanilinovou diazoniovou solí probíhá podle reakce:

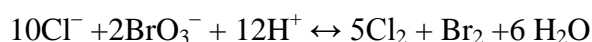


2,4,6-trihydroxy pyrimidin 4-nitrobenzediazonium

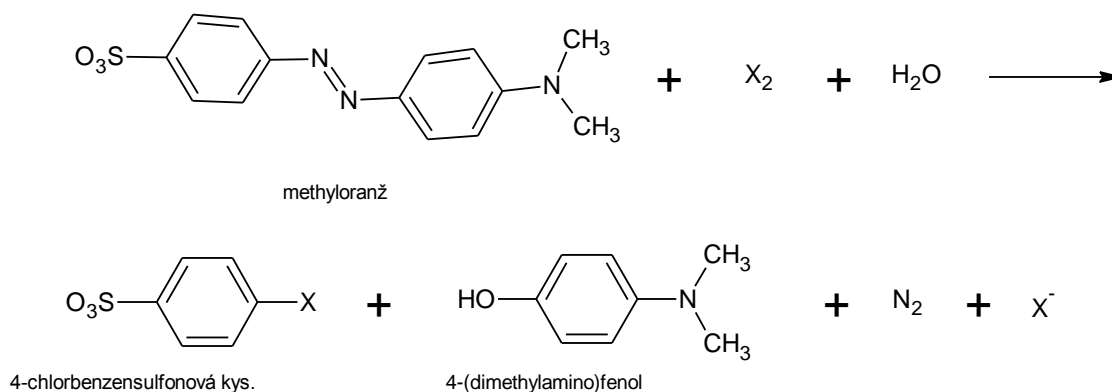
5-[(4-nitrofenyl)diazenyl]-2,4,6-trihydroxypyrimid

2.7.2 Inhibice rozkladu methylozanže s využitím bromičnanu

Bromičnan reaguje s kyselinou chlorovodíkovou za vzniku chloru a bromu podle rovnice:



Vzniklý brom a chlor jsou látky schopné rozložit methylozanž na 4-chlorbenzensulfonovou kyselinu, 4-(dimethylamino)fenol a atomární dusík podle následující rovnice[74].



Methylozanž obsahuje rozsáhlý konjugovaný π -elektronový systém, díky kterému absorbuje záření ve viditelné oblasti stejně jako azobarvivo z předchozího stanovení. V tomto případě však nedochází k jejímu vzniku, ale zániku vlivem halogenů (Cl_2 a Br_2). Kyselina barbiturová inhibuje rozklad methylozanže.

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitých látek a přístrojů

3.1.1 Použité chemikálie

Kyselina barbiturová p.a. (LachNer, ČR)

2–Nitroanilin $\geq 98\%$ (pro HPLC) (Fluka, USA)

4–Nitroanilin $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, USA)

4–(dimethylamino)benzaldehyd 98% (Sigma Aldrich, USA)

Bromičnan draselný p.a. (Lachema, ČR)

Methyloranž p.a. (Lachema, ČR)

Hydroxid sodný 98% (Lachema, ČR)

Kyselina chlorovodíková ACS reagent 37% (Sigma Aldrich, Německo)

Dusitan sodný p.a. (Lachema, ČR)

Acetonitril $\geq 99,9\%$ (HPLC) (Sigma Aldrich, USA)

Trifluoroctová kyselina $\geq 99,9\%$ (Romil LTP, Anglie)

Krevní sérum lidské (Sigma Aldrich, USA)

Hydroxid sodný p.a. (Lachema, ČR)

Hydroxid draselný p.a. (Lachema, ČR)

Octan sodný p.a. (Lachema, ČR)

3.1.1.1 Diazotační nitroanilinová směs

Bylo naváženo 0,0700 g příslušného nitroanilinu a částečně rozpuštěno v malém množství H_2O . Poté bylo přidáno 1,6 ml 5 mol dm^{-3} kyseliny chlorovodíkové a dorozpuštěno za vyšší teploty ve vodní lázni. Poté byla směs opatrně zředěna na objem cca 50 ml H_2O a ochlazena na 0 až 5°C. Následně bylo přidáno 3,5 ml 1% NaNO_2 a směs byla míchána po dobu 5 min. Poté byla směs doplněna na objem 100 ml a uchována v tmavé zásobní láhvi.

3.1.1.2 Příprava biologického materiálu

Vzorky krevního séra pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí kopulační reakce s nitroanilinovou směsí byly nejprve vysráženy acetonitrem. Do 700 μl

lidského séra bylo přidáno 200 μl acetonitrilu a vzorek byl centrifugován po dobu 10 min při 7000 otáčkách za min. Poté byl oddělen supernatant od vysrážených bílkovin. K supernatantu bylo případně přidáno další množství acetonitrilu. Mezi jednotlivými přídávky byl vzorek vždy centrifugován stejným způsobem, 10 min při 7000 otáčkách za min.

Vzorky krevního séra pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí inhibice rozkladu methyloranže byly vysráženy kyselinou trifluoroctovou. K 1,5 ml séra bylo přidáno 50 μl trifluoroctové kyseliny a směs byla centrifugována po dobu 10 min při 7000 otáčkách za minutu. Poté byl supernatant oddělen od vysrážených bílkovin. K supernatantu bylo přidáno další 20 μl trifluoroctové kyseliny a centrifugováno po dobu 10 min při 7000 otáčkách za minutu.

3.1.1.3 Příprava biologického materiálu s kyselinou barbiturovou

Do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 1,0 ml lidského séra po vysrážení a doplněno vodou po rysku. Poté bylo sérum injikováno do optimalizované aparatury pro stanovení kyseliny barbiturové v průtoku a byla změřena jeho absorbance při vhodné vlnové délce.

Následně bylo k vzorku přidáno 10, 10, 20 a 40 μl kyseliny barbiturové o koncentraci $7.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí reakce s benzendiazoniovou solí za využití FIA techniky a 4x po 10 μl pro SIA techniku. Absorbance byla měřena při 408 nm.

Pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí inhibice rozkladu methyloranže byla k vzorku pipetována 4x kyselina barbiturová o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ po 10 μl .

3.1.2 Použité přístroje a zařízení

Automatické pipety (Thermo Scientific, USA)

Analytické váhy Sartorius RC 210D (Sartorius, USA)

pH metr Adwa AD1000 (Adwa, Maďarsko)

Sonifikátor Elmasonic E 30 H (Elma, Německo)

Spektrofotometr Agilent 8953 (Agilent technologies, USA)

Mikrocentrifuga 7200g (Denver Instrument Company, USA)

Zařízení pro deonizaci vody Milli Q_{PLUS} (Millipore, USA)

3.1.2.1 Zařízení pro průtokovou injekční analýzu

Peristaltická pumpa Masterflax L/S (Cole-Parmer, USA)

Dávkovací ventil 6-Port Medium Pressure Injection Valves Bulkhead Version model V-451 (ViciValco, USA)

Zdroj záření Mikropack DT mini-2-GS (Ocean Optics, USA)

Detektor Ocean Optics QE65000 (Ocean Optics, USA)

Detekční průtoková Z cela (Ocean Optics, USA)

Optické kabely CPATCH 3180652 (Ocean Optics, USA)

Čerpací a spojovací hadičky Tygon (Cole-Parmer, USA)

3.1.2.2 Zařízení pro sekvenční injekční analýzu

FIALab 3500 (FIALab, USA)

Zdroj záření Mikropack DT miny -2-GS (Ocean Optics, USA)

Detektor Ocean Optics QE65000 (Ocean Optics, USA)

Optické kabely QP600-2-SR (Ocean Optics, USA)

Čerpací a spojovací hadičky Tygon (Cole-Parmer, USA)

4 Výsledky

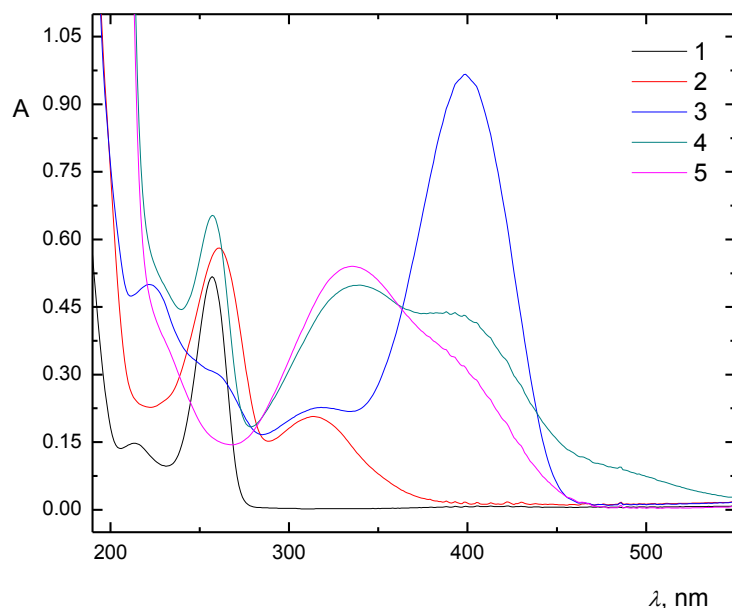
4.1 Reakce kyseliny barbiturové s nitroanilinovou směsí

4.1.1 Předběžná měření

Nejprve bylo zapotřebí zjistit absorpční spektra jednotlivých složek reakce a reakčních produktů. Dále byl zjištěn vliv pH prostředí na absorbanci a nakonec byl sledován i časový průběh vzniku produktů.

4.1.2 Absorpční spektra a vliv pH

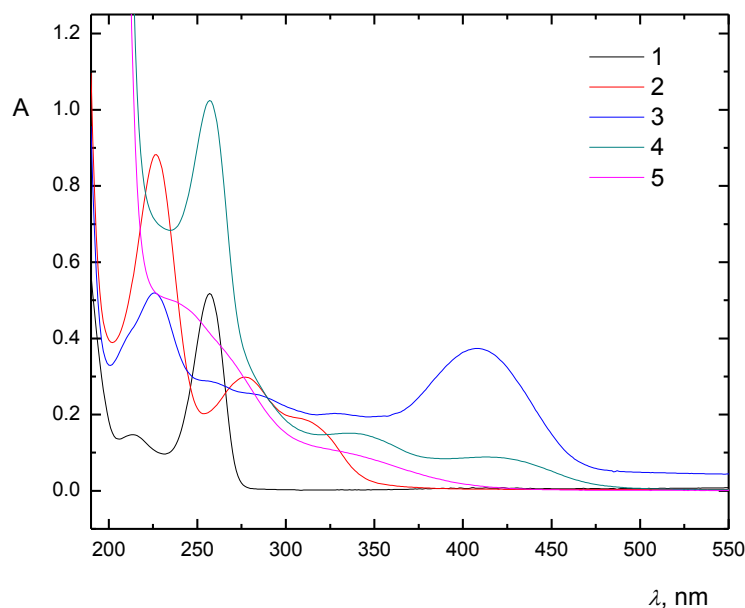
Bylo zjištěno, že samotná *p*-nitroanilinová diazotační směs (*p*-DS) má absorpční maximum při 260 nm. Kyselina barbiturová (KB) má absorpční maximum při 257 nm. Barevný komplex vzniklý reakcí KB s *p*-DS bez ovlivnění pH (pH rovno 2,5) má absorpční maximum při 399 nm. Při stejné reakci v alkalickém prostředí od pH 10 je absorpční maximum při 330 nm. Tento barevný komplex však není tvořen komplexem *p*-DS s KB, ale samotnou *p*-DS v alkalickém prostředí. V přítomnosti KB dochází k úbytku množství volné *p*-DS, a tím i zeslabení signálu při 330 nm (snížení hodnoty absorbance). Jako optimální byla zvolena hodnota pH okolo 2,5, kdy není zapotřebí úpravy pH. Absorpční spektra jsou znázorněna na obr. 4.1.



Obr. 4.1 Absorpční spektra s *p*-nitroanilinovou diazotační směsí

1- *KB*, 2- *p-DS*, 3- *KB a p-DS (pH 2,5)*, 4- *KB a p-DS (pH 12,9)*, 5- *p-DS (pH 12,9)*,
 $c_{KB} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{p-DS} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

Diazotační směs s *o*-nitroanilinem má dvě absorpční maxima, jedno při 220 nm a druhé při 275 nm znázorněné na obr 4.2. Komplex s *o*-DS vykazoval oproti *p*-DS odlišnou závislost na pH. Při snížení na pH 2 absorbance silně poklesla oproti hodnotě měřené bez úpravy pH (pH = 2,5). Při zvýšení pH na 4, hodnota absorbance ještě o něco málo poklesla oproti hodnotě měřené při pH 2. Tato lehce klesající tendence se projevila i u pH 6. Pro pH 8 byla hodnota absorbance již stejná jako pro pH 6. Při pH 10 byla hodnota absorbance nejvyšší, ovšem následné navýšení pH způsobilo lehký pokles absorbance na hodnotu srovnatelnou pro měření při pH 2,5 ovšem absorpční maximum se při obou těchto dvou měření začalo posouvat doprava na 414 nm pro pH 10 a 417 nm pro pH 12,9. Jako optimální byla tudíž zvolena hodnota pH 2,5.



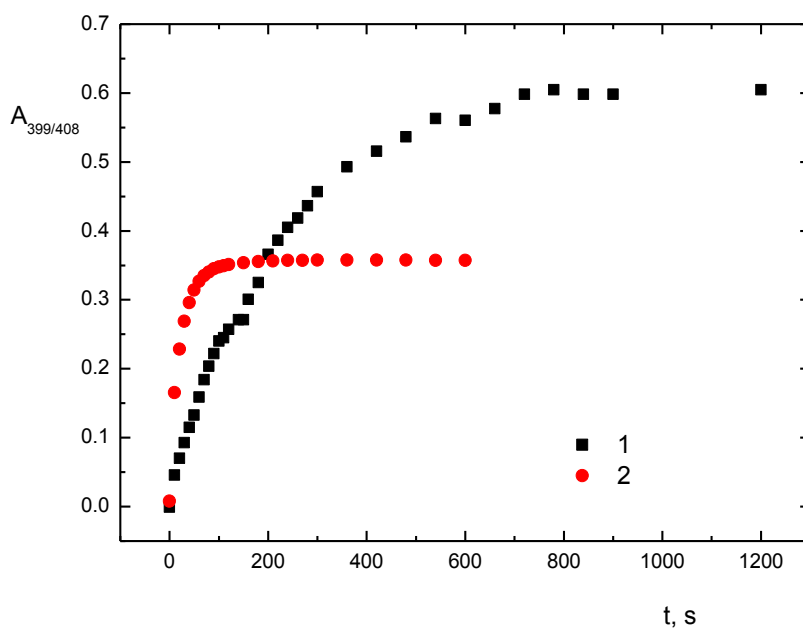
Obr. 4.2 Absorpční spektra s *o*-nitroanilinovou diazotační směsí

1- KB, 2- *o*-DS, 3- KB a *o*-DS (pH 2,5), 4- KB a *o*-DS (pH 12,9), 5- *o*-DS (pH 12,9)

$$c_{KB} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}, c_{o\text{-DS}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$$

4.1.2.1 Kinetika vzniku azobarviva

Dalším zjišťovaným faktorem byla doba vzniku azobarviva. Z obr. 4.3 je patrné, že ke kvantitativnímu zreagování KB s *p*-DS dochází až po cca 10 minutách. Z tohoto důvodu je tato reakce nevyhovující pro použití v průtokových metodách FIA i SIA. V případě použití *o*-DS, dochází ke kvantitativnímu zreagování KB s *o*-DS již po 90 s, a proto ji bylo možné použít pro měření pomocí průtokových metod FIA a SIA. Měření rychlosti vzniku azobarviva probíhalo ve statickém uspořádání a byla použita KB o koncentraci $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a *o*-DS i *p*-DS o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Absorbance azobarviva s *o*-DS byla měřena při vlnové délce 408 nm a absorbance azobarviva s *p*-DS byla měřena při 399 nm. Jelikož je dále pracováno pouze s *o*-DS, je pro zjednodušení označena pouze symbolem DS.



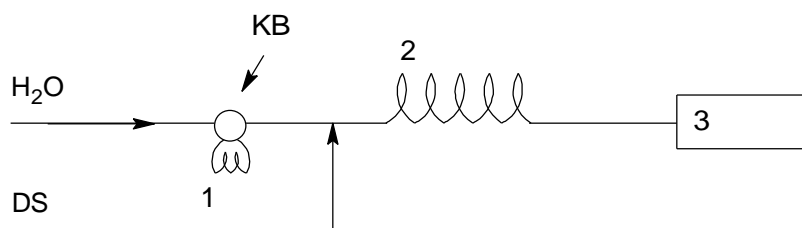
Obr. 4.3 Rychlost vzniku azobarviva

1- *p*-DS, 2- *o*-DS

$$c_{KB} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}; c_{o\text{-}DS} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}; c_{p\text{-}DS} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}; \lambda_{p\text{-}DS} = 399 \text{ nm}; \lambda_{o\text{-}DS} = 408 \text{ nm}$$

4.1.3 FIA stanovení

Pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí reakce s nitroanilinovou směsí byla sestavena FIA aparatura s jednočinnidlovým systémem skládající se ze dvou toků. Tok diazotační směsi (tou bude nadále pouze směs připravená z *o*-nitroanilinu) a tok vody, do kterého byla pomocí dávkovacího ventilu se smyčkou dávkována kyselina barbiturová. Po smíšení toků směs putovala do reakční cívky, kde došlo k promíchání jednotlivých složek, a následně do spektrofotometrického detektoru. Schéma zapojení FIA metody je znázorněno na obr. 4.4.



Obr. 4.4 Schéma zapojení FIA

1-dávkovácí smyčka 2-reakční cívka 3- detektor

4.1.3.1 Optimalizace průtokové rychlosti

Optimalizace průtokové rychlosti byla prvním kritériem optimalizace pro stanovení kyseliny barbiturové průtokovou injekční analýzou. Při měření byla měněna průtoková rychlost nosného toku (H_2O) a vybarvovacího činidla (DS), ostatní parametry byly konstantní. Z tab. 4.1 je patrné, že čím nižší průtoková rychlost, tím vyšší hodnota absorbance. Dále bylo zjištěno, že průtoková rychlost vybarvovacího činidla hodnotu absorbance ovlivňuje výrazněji, než průtoková rychlost toku obsahující vzorek. Při nízké průtokové rychlosti ($0,5 \text{ ml min}^{-1}$) vody a vysoké průtokové rychlosti ($2,5 \text{ ml min}^{-1}$) vybarvovacího činidla byla hodnota absorbance víc jak 4,5x nižší, než při opačném provedení ($v(\text{H}_2\text{O}) = 2,5 \text{ ml min}^{-1}$ a $v_{\text{DS}} = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$). Jako optimální byla zvolena průtoková rychlost $v = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$, jak pro analyt, tak pro vybarvovací činidlo. Měření probíhalo za těchto podmínek: koncentrace KB $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace DS $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, dávkovaný objem KB $250 \mu\text{l}$, objem použité cívky $100 \mu\text{l}$.

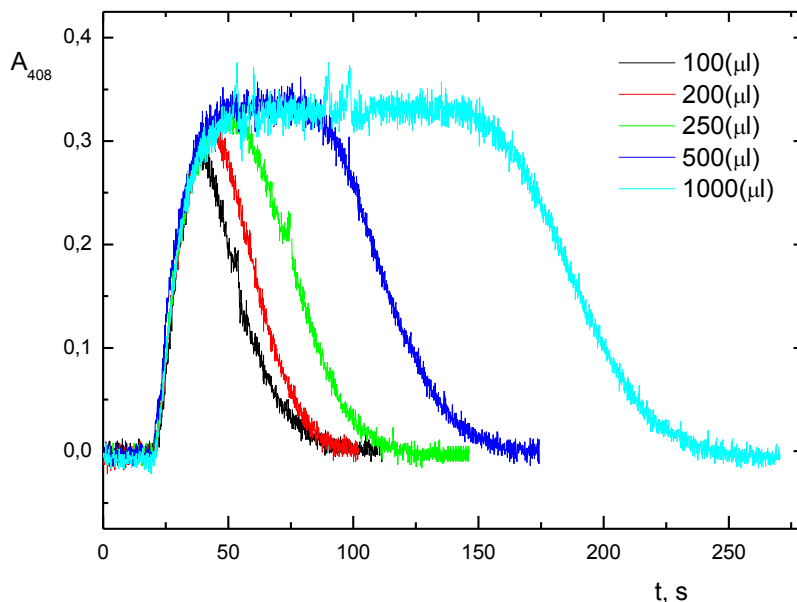
Tab. 4.1 Optimalizace průtokové rychlosti

$c_{\text{KB}} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{\text{DS}} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $V_{\text{KB}} = 250 \mu\text{l}$; $V_{\text{cívky}} = 100 \mu\text{l}$

A_{408}	$v_{(\text{H}_2\text{O})} / \text{ml min}^{-1}$					
	0,5	1	1,5	2	2,5	
$v_{\text{DS}} / \text{ml min}^{-1}$	0,5	0,305	0,292	0,287	0,264	0,217
	1	0,152	0,177	0,187	0,188	0,175
	1,5	0,089	0,120	0,136	0,141	0,142
	2	0,06	0,092	0,101	0,107	0,114
	2,5	0,046	0,082	0,078	0,084	x

4.1.3.2 Optimalizace dávkovaného objemu

Dalším zjišťovaným parametrem byl dávkovaný objem analytu. Ostatní parametry byly během měření konstantní. Koncentrace KB $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace DS $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, objem použité cívky $100 \mu\text{l}$. Pro měření byla použita zjištěná optimální průtoková rychlost z předchozích měření $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ jak pro mobilní fázi, tak pro vybarvovací činidlo. Z grafu na obr. 4.5 je patrné, že při větším dávkovacím objemu dochází vždy k rozšíření absorpčního píku. Při nižších dávkovacích objemech ($100 \mu\text{l}$ a $200 \mu\text{l}$) hodnota absorpčního maxima vzrůstala se vzrůstajícím množstvím dávkované KB. Od objemu $250 \mu\text{l}$ se hodnota absorbance téměř neměnila, docházelo již pouze k rozšiřování píku vlivem rozšíření zóny s kyselinou barbiturovou. Proto byl jako optimální dávkovaný objem zvolen objem $250 \mu\text{l}$.



Obr. 4.5 Optimalizace dávkovaného objemu

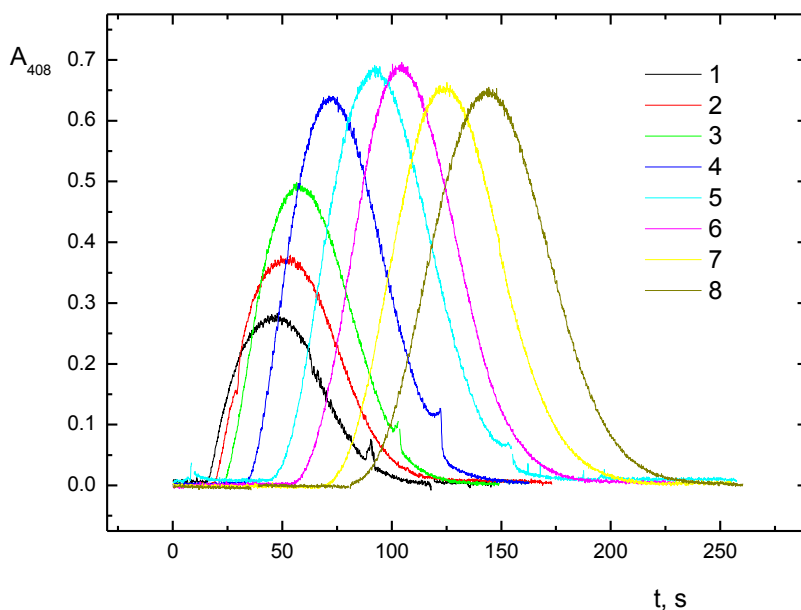
1- $100 \mu\text{l}$, 2- $200 \mu\text{l}$, 3- $250 \mu\text{l}$, 4- $500 \mu\text{l}$, 5- $1000 \mu\text{l}$

$v(\text{H}_2\text{O i DS}) = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$; $c_{\text{DS}} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $V_{\text{cívky}} = 100 \mu\text{l}$;

$c_{\text{KB}} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

4.1.3.3 Optimalizace objemu reakční cívky

Dalším sledovaným parametrem byl objem reakční cívky. Optimální průtoková rychlost mobilní fáze i vybarvovacího činidla byly použity z předchozích měření $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, stejně jako optimální dávkovaný objem $250 \text{ } \mu\text{l}$. Pro měření byla použita KB o koncentraci $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a DS o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Jelikož ke kvantitativnímu vzniku barevného komplexu dochází až po cca 90 s, je zapotřebí taková reakční cívka, která zabezpečí komplexu dostatek času na kvantitativní zreagování, ale zároveň nesmí docházet k přílišnému rozmývání reakční zóny a tím i tvaru píku. Z grafu na obr. 4.6 je patrné, že při objemech reakční cívky do $750 \text{ } \mu\text{l}$ s narůstajícím objemem narůstala i hodnota absorbance barevného komplexu nebo-li s přirůstajícím časem stráveným v reakční cívce vznikne větší množství sledovaného komplexu. Při objemu 750 a $1000 \text{ } \mu\text{l}$ byla absorbance barevného komplexu nejvyšší, $750 \text{ } \mu\text{l}$ bylo zvoleno jako optimální. Při vyšších objemech $1250 \text{ } \mu\text{l}$ a $1500 \text{ } \mu\text{l}$ byla absorbance nižší v důsledku rozmývání zóny.



Obr. 4.6 Optimalizace objemu reakční cívky

1- $100 \text{ } \mu\text{l}$, 2- $200 \text{ } \mu\text{l}$, 3- $250 \text{ } \mu\text{l}$, 4- $500 \text{ } \mu\text{l}$, 5- $750 \text{ } \mu\text{l}$, 6- $1000 \text{ } \mu\text{l}$, 7- $1250 \text{ } \mu\text{l}$, 8- $1500 \text{ } \mu\text{l}$

$v(\text{H}_2\text{O i DS}) = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$; $c_{\text{DS}} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $V_d = 250 \text{ } \mu\text{l}$;

$c_{\text{KB}} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

4.1.3.4 Optimalizace koncentrace diazotační směsi

Posledním sledovaným parametrem byla koncentrace diazotační směsi. Jako optimální koncentrace DS byla zvolena koncentrace $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Při nižší koncentraci DS $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ byla absorbance nižší a nedocházelo ke kvantitativnímu zreagování veškeré KB. Při koncentraci DS od $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ byla hodnota absorbance takřka stejná. Lišila se nepatrně o pozůstatek píku nezreagované DS. Výsledky měření jsou zaznamenány v tab. 4.2. Pro měření byla použita KB o koncentraci $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, průtoková rychlost mobilní fáze i vybarvovacího činidla $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, dávkovaný objem KB byl $250 \mu\text{l}$ a byla použita reakční cívka o objemu $750 \mu\text{l}$.

Tab. 4.2 Optimalizace koncentrace diazotační směsi

$$v(\text{H}_2\text{O i DS}) = 0,5 \text{ ml min}^{-1}; V_{KB} = 250 \mu\text{l}; c_{KB} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3};$$

$$V_{cívky} = 750 \mu\text{l}$$

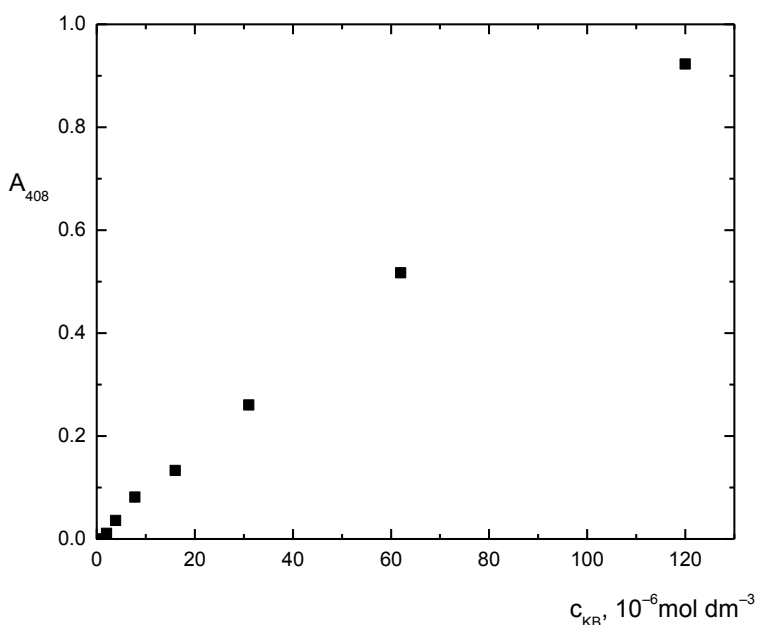
$c_{DS}, (\text{mol dm}^{-3})$	A_{408}
5×10^{-3}	0,681
$2,5 \times 10^{-3}$	0,680
1×10^{-3}	0,685
5×10^{-4}	0,675
1×10^{-4}	0,660
5×10^{-5}	0,610

4.1.3.5 Kalibrační závislost

Po zjištění optimálních experimentálních podmínek této reakce ve FIA uspořádání byla proměřena kalibrační závislost a zjištěny základní charakteristiky stanovení kyseliny barbiturové pomocí diazotační směsi s použitím průtokové injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí.

Byly proměřeny koncentrace KB v rozmezí $7,8 \cdot 10^{-7}$ až $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Lineární závislost však byla zjištěna pouze pro hodnoty $2,0 \cdot 10^{-6}$ až $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ (obr. 4.7). Při vyšších hodnotách koncentrace KB docházelo již k výraznému zakřivování kalibrační závislosti. Hodnoty absorbance byly měřeny při průtoku $0,5$

ml min⁻¹ DS i H₂O, koncentraci DS byla 2.10⁻⁴ mol dm⁻³, objemu reakční cívky 750 μl a dávkovaném objemu kyseliny barbiturové 250 μl.



Obr. 4.7 Kalibrační závislost stanovení koncentrace kyseliny barbiturové

$v(\text{H}_2\text{O i DS}) = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$; $c_{DS} = 2.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V_{KB} = 250 \mu\text{l}$; $V_{cívky} = 750 \mu\text{l}$

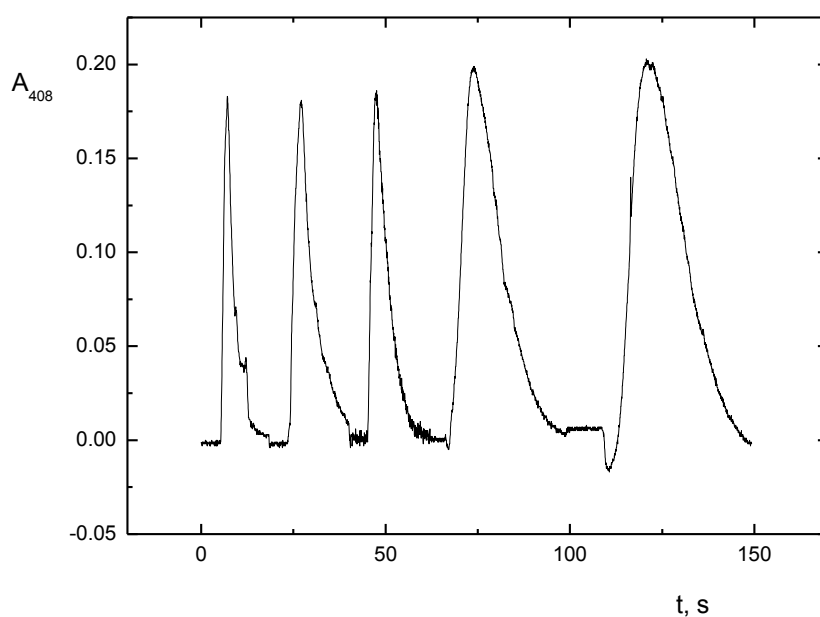
Následně byly zjišťovány další charakteristiky stanovení KB touto metodou. Mezi uvedené charakteristiky byla zahrnuta mez detekce a stanovitelnosti, opakovatelnost, citlivost a korelační koeficient. Tyto hodnoty jsou pro názornost uvedeny spolu s charakteristikami pro SIA uspořádání v tab. 4.4 (na str. 36).

4.1.4 SIA stanovení

4.1.4.1 Optimalizace dávkovaného objemu

Optimalizace dávkovaného objemu KB i DS byla prvním kritériem optimalizace pro stanovení kyseliny barbiturové sekvenční injekční analýzou. Při měření byly měněny dávkovací objemy obou složek a ostatní parametry zůstaly konstantní. Na obr. 4.8 první pík odpovídá dávkovanému objemu 50 μl obou složek. Druhý pík odpovídá dávkovanému objemu 100 μl, třetí 150 μl, čtvrtý 200 μl a poslední 300 μl vždy obou složek. Z grafu na obr. 4.8 je patrné, že při zvyšování objemů dávkovaných složek se

hodnota absorbance zvyšuje pouze nepatrně. Při dávkovacím objemu 10 μl DS i KB nebyl pík zaznamenán. Při dávkovacím objemu 50 μl , 100 μl a 150 μl DS i KB byl získán špičatý pík na konci lehce rozmytý. Při dávkovacích objemech 200 μl a 300 μl opět u obou činidel docházelo k mírnému navyšování absorbance základní linie a prudkému sestupu absorbance pod základní linii těsně před vznikem píku. Tyto píky měly sice o něco vyšší hodnotu absorbance, ale byly již značně ze zadní části rozmyté. V případě zachování dávkovaného objemu KB a navýšení dávkovaného objemu DS docházelo k snížení hodnoty absorbance (viz tab. 4.3). Naopak při zachování dávkovaného objemu DS se se zvýšením dávkovaného objemu KB absorbance zvýšila. Z těchto důvodů byl jako optimální dávkovaný objem obou složek zvolen 150 μl . Měření probíhalo při průtoku $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ a byla použita DS o koncentraci $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ a KB o koncentraci $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, čas setrvání v mísící cívce byl 10 s.



Obr. 4.8 Optimalizace dávkovaného objemu

$$v = 0,5 \text{ ml min}^{-1}; c_{DS} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}; c_{KB} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}; t_r = 10s$$

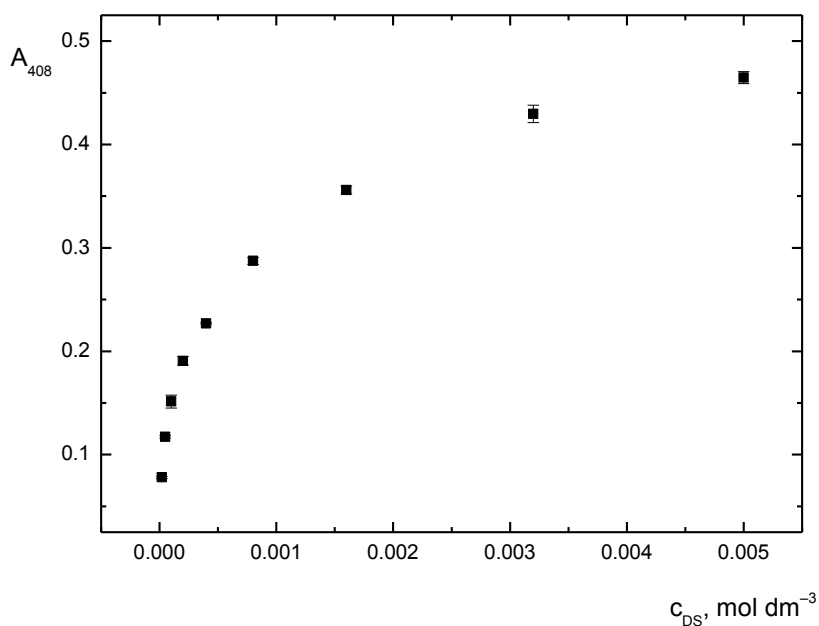
Tab. 4.3 Optimalizace dávkovaného objemu

$$v = 0,5 \text{ ml min}^{-1}; c_{DS} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}; c_{KB} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}; t_r = 10 \text{ s}$$

	$V_{KB} (\mu\text{l})$				
	50	100	150	200	300
50	0,18	0,204	–	–	–
100	0,16	0,182	–	0,21	0,25
$V_{DS} (\mu\text{l})$ 150	–	–	0,182	–	–
200	–	0,158	–	0,185	–
300	–	0,155	–	–	0,216

4.1.4.2 Optimalizace koncentrace diazotační směsi

Dalším sledovaným parametrem byla koncentrace diazotační směsi. Při měření byly použity optimální dávkovací objemy z předešlého měření, tedy 150 μl . Ostatní parametry zůstaly konstantní. Průtoková rychlost 0,5 ml min^{-1} , koncentrace KB 3,1 $\cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, čas setrvání v mísící cívce byl 10 s.

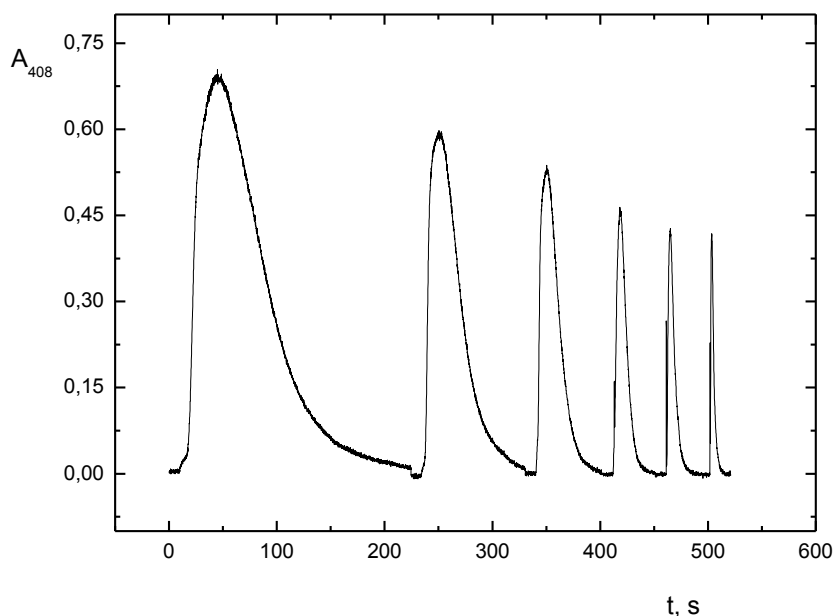
**Obr. 4.9 Optimalizace koncentrace diazotační směsi**

$$v = 0,5 \text{ ml min}^{-1}; V_{KB} = 150 \mu\text{l}; V_{DS} = 150 \mu\text{l}; c_{KB} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}; t_r = 10 \text{ s}$$

Z grafu na obr. 4.9 je patrné, že při koncentracích DS do $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ docházelo s velkým zvýšením koncentrace DS k velkému zvýšení hodnoty absorbance. Při koncentracích nad $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ již nebyl rozdíl tak výrazný. Jako optimální koncentrace DS byla stanovena koncentrace $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ z důvodu další úspory reakčních činidel.

4.1.4.3 Optimalizace rychlosti průtoku

Dalším sledovaným parametrem byla průtoková rychlost reakční směsi detektorem. Na obr. 4.10 první pík odpovídá rychlosti průtoku $0,125 \text{ ml min}^{-1}$, druhý $0,25 \text{ ml min}^{-1}$, třetí $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, čtvrtý $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, pátý $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ a poslední $3,0 \text{ ml min}^{-1}$. Z grafu je patrné, že se zvyšující se průtokovou rychlostí se mírně snižuje hodnota absorbance, a pík se zužuje. Při nízkých průtokových rychlostech $0,125$ až $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ navíc dochází k výraznému rozmývání sestupné části píku. Proto byla jako optimální rychlost průtoku zvolena hodnota $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. Pík je dostatečně úzký a nedochází k příliš výraznému rozmývání. Hodnota absorbance je sice nižší, ale to je způsobeno krátkým reakčním časem, který byl následně prodloužen délkou setrvání v mísící cívce.



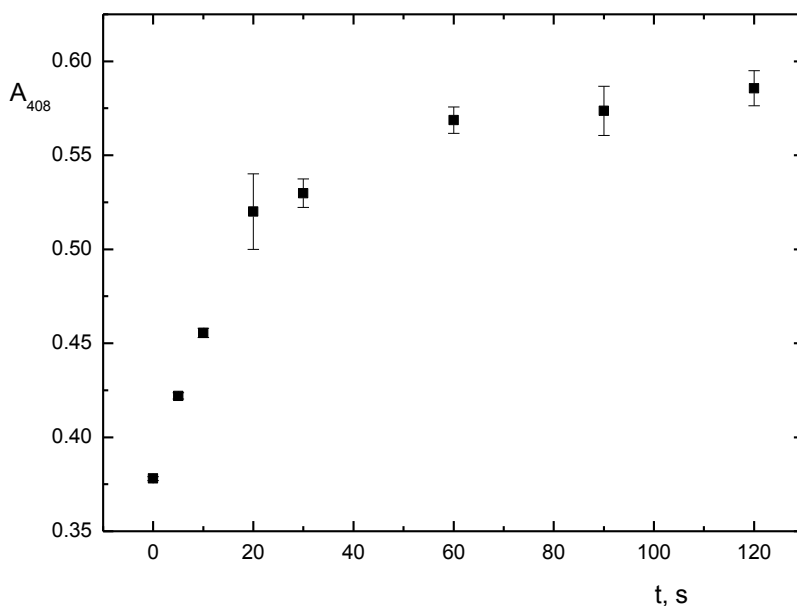
Obr. 4.10 Optimalizace rychlosti průtoku

$V_{KB} = 150 \mu\text{l}$; $c_{KB} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V_{DS} = 150 \mu\text{l}$; $c_{DS} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $t_r = 10 \text{ s}$

Při vyšších průtokových rychlostech byly píky již velmi úzké. Pro měření bylo použito 150 μl DS o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a 150 μl KB o koncentraci $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, čas setrvání v mísící cívce byl 10 s.

4.1.4.4 Optimalizace času setrvání v mísící cívce

Posledním sledovaným parametrem byla doba setrvání komponent v mísící cívce (t_r). Z grafu na obr. 4.11 je patrné, že při čase pod 20 s, tedy s relativně malým časovým intervalem setrvání reakční směsi v cívce docházelo k velké změně absorbance při malé změně času. Naopak při čase nad 30 s docházelo při velké změně času k relativně malému nárůstu absorbance. Rozmytí konce píku nemělo na čas setrvání komponent v mísící cívce příliš vliv. Jako optimální doba byla zvolena hodnota 25 s. Pro měření bylo použito 150 μl DS o koncentraci $3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a 150 μl KB o koncentraci $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, rychlost průtoku činila $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.



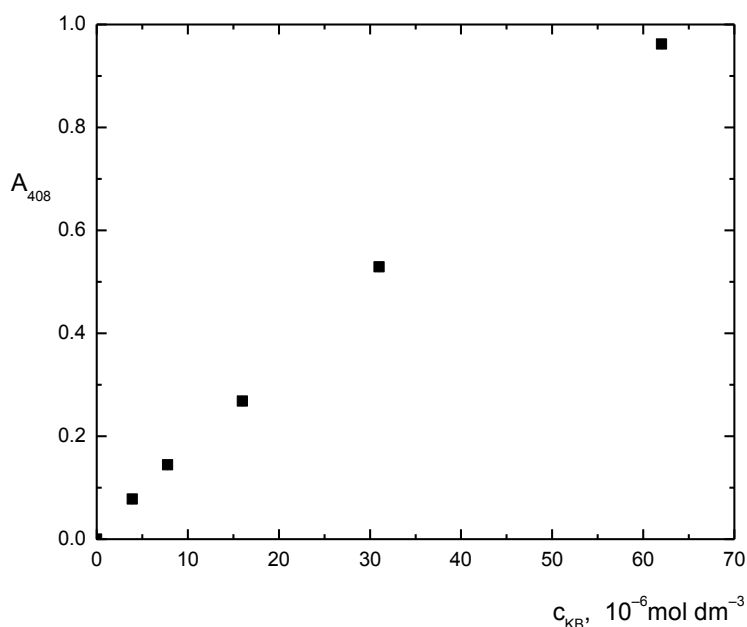
Obr. 4.11 Optimalizace času setrvání v mísící cívce

$$v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}; V_{KB} = 150 \mu\text{l}; c_{KB} = 3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}; V_{DS} = 150 \mu\text{l};$$
$$c_{DS} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

4.1.4.5 Kalibrační závislost

Po zjištění optimálních experimentálních podmínek byla proměřena kalibrační závislost a zjištěny základní charakteristiky stanovení kyseliny barbiturové pomocí diazotační směsi s použitím sekvenční injekční analýzy.

Byly proměřeny koncentrace v rozmezí $7,8 \cdot 10^{-7}$ až $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} . Lineární závislost však byla zjištěna pouze pro hodnoty $3,9 \cdot 10^{-6}$ až $6,2 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} znázorněné na obr. 4.12. Při vyšších hodnotách koncentrace KB docházelo již k výraznému zakřivování kalibrační závislosti. Hodnoty absorbance byly měřeny při průtoku $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, koncentrace DS byla $3 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} , čas strávený v mísící cívce byl 25 s a dávkovaný objem kyseliny barbiturové i diazotačního činidla činil $150 \mu\text{l}$.



Obr. 4.12 Kalibrační závislost stanovení koncentrace kyseliny barbiturové

$$v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}; V_{KB} = 150 \mu\text{l}; V_{DS} = 150 \mu\text{l}; c_{DS} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$$

4.1.4.6 Porovnání charakteristik FIA a SIA stanovení

Citlivost stanovení byla zjištěna ze směrnice kalibrační přímky stanovení kyseliny barbiturové pomocí obou metod. Hodnota LOD byla spočítána jako trojnásobek šumu podělený směrnici kalibrační přímky procházející počátkem. Hodnota LOQ byla vypočtena jako desetinásobek šumu podělený směrnici kalibrační přímky

procházející počátkem. Korelační koeficient byl spočítán pomocí funkce CORREL v programu Microsoft Excel 2010. Procentuální opakovatelnost byla spočítána jako poměr směrodatné odchylky 10-ti měření k jejich průměru.

Z tab. 4.4 je patrné, že pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí reakce s nitroanilinovou směsí je vhodnější využití FIA metody. FIA metoda má sice nižší citlivost, ale mez detekce FIA metody je nižší a pohybuje se okolo $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Nejnižší koncentrace analytu, kterou lze stanovit s přijatelným stupněm správnosti a přesnosti je $3,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, což je nižší hodnota v porovnání se SIA metodou. Opakovatelnost a korelační koeficient je také lepší při použití FIA metody.

Tab. 4.4 Přehled dosažené citlivosti, LOD, LOQ, korelačního koeficientu a opakovatelnosti

Charakteristika	FIA	SIA
Citlivost ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)	$1,6 \cdot 10^4$	$7,7 \cdot 10^4$
LOD (mol dm^{-3})	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$4,9 \cdot 10^{-7}$
LOQ (mol dm^{-3})	$3,3 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$
Korelační koeficient	0,9989	0,9988
Opakovatelnost (%)	1,30	3,10

4.2 Inhibice rozkladu methylovaného kyseliny barbiturovou

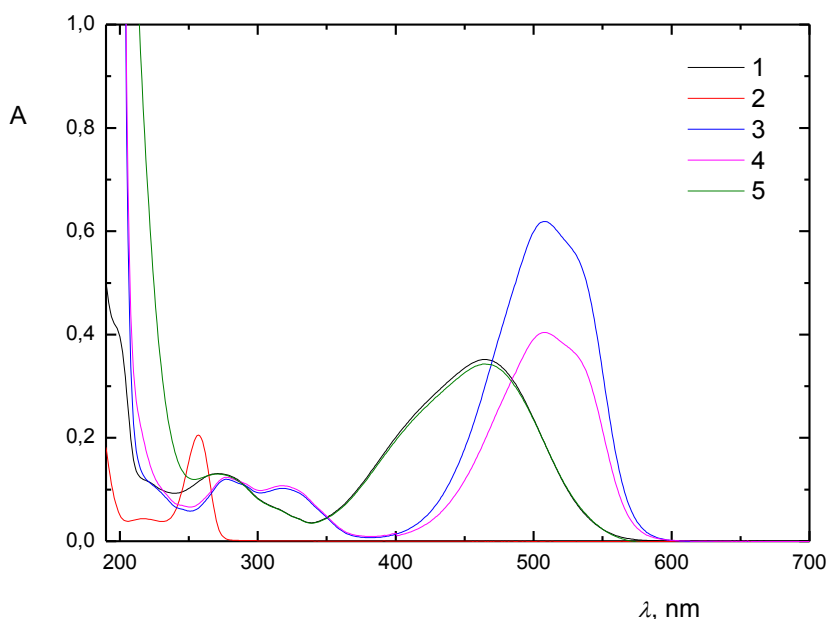
4.2.1 Předběžná měření

Nejprve bylo zapotřebí zjistit absorpční spektra jednotlivých složek, jejich stabilitu a časový průběh vzniku produktů. Na základě těchto spekter bylo rozhodnuto o způsobu využití této metody pro analytické účely.

4.2.1.1 Absorpční spektra

Z měření bylo zjištěno, že kyselina barbiturová má absorpční maximum při 257 nm viz obr. 4.13. Samotná methylovaná (MO) vykazuje absorpční maximum při 466 nm. V kyselém prostředí $0,35 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$ se její absorpční maximum posouvá na

508 nm. Přítomnost bromičnanu neovlivňuje absorpční maximum MO. Z uvedeného tedy vyplývá princip stanovení KB.



Obr. 4.13 Absorpční spektra

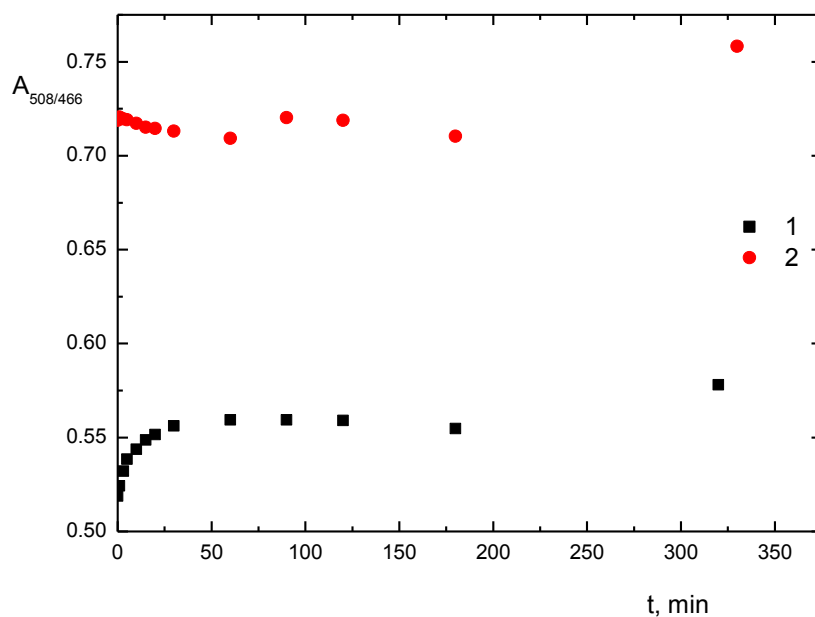
1- MO, 2- KB, 3- MO+HCl, 4- MO+HCl+KBrO₃, 5- MO+KBrO₃

$c_{KB}=1.10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{MO} = 10 \text{ mg l}^{-1}$, $c_{HCl} = 0,35 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(KBrO_3) = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$

MO poskytuje v přítomnosti HCl absorpční signál, který je odlišný od signálu ve vodném prostředí o pH přibližně 7. Po přidavku bromičnanu dochází k rozkladu MO (v přítomnosti HCl), což se projeví výrazným poklesem absorpčního signálu při vlnové délce 508 nm v důsledku jejího rozkladu. Při současné přítomnosti KB dochází ke zpomalení rozkladu MO, což lze využít pro analytické účely, kdy jako základní stav (blank) je považováno maximální rozložení MO a tedy velmi nízký signál při 508 nm. S rostoucím přidavkem KB dochází pak ke zpomalení rozkladu MO, což se projeví v přesně daném časovém okamžiku nárůstem signálu oproti blanku.

4.2.1.2 Stabilita zásobního roztoku MO

Dalším zjišťovaným faktorem byla stabilita zásobního roztoku MO v neutrálním a v kyselém prostředí.

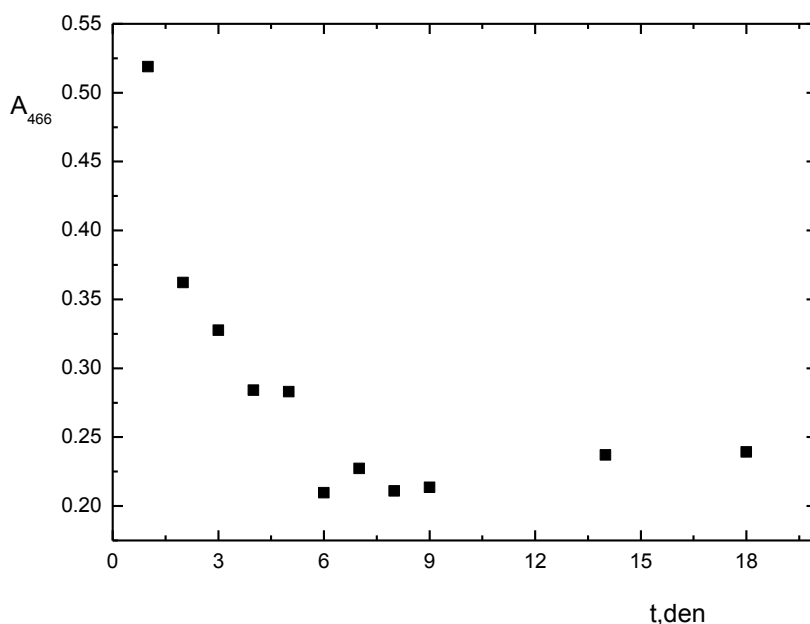


Obr.4.14 Stabilita MO a MO v kyselém prostředí

1- $c_{MO} = 10 \text{ mg l}^{-1}$, $\lambda_{MO} = 466 \text{ nm}$, 2- $c_{MO} = 10 \text{ mg l}^{-1}$ v $0,35 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$,

$$\lambda_{MO \text{ v HCl}} = 508 \text{ nm}$$

Z grafu na obr. 4.14 je patrné, že první hodinu po přípravě zásobního roztoku MO dochází k lehkému zvyšování absorbance, poté se hodnota ustálí, ovšem z grafu na obr. 4.15 je vidět, že s delším časovým odstupem hodnota absorbance MO značně klesá. Po šesti dnech se hodnota ustálí na méně než poloviční hodnotě původní absorbance. V kyselém prostředí je MO stabilnější a dochází pouze k malým výkyvům hodnoty absorbance. Z těchto důvodů byl pro měření optimální koncentrace MO, KBrO_3 a kalibrační křivku použit vždy čerstvý roztok MO, který byl následně okyselen $3,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$. Při ostatních měřeních byl použit starší roztok MO s vyšší koncentrací.

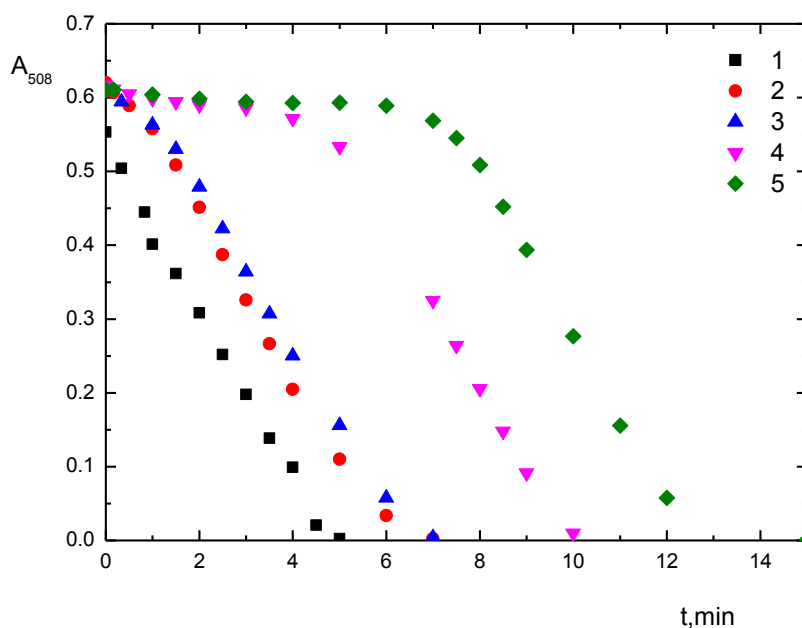


Obr.4.15 Stabilita methylovanže

$(c_{MO}=10 \text{ mg l}^{-1}; \lambda_{MO}= 466 \text{ nm})$

4.2.1.3 Rychlost rozpadu MO

Posledním sledovaným parametrem bylo ovlivnění rychlosti rozpadu MO přítomností kyseliny barbiturové. Z grafu na obr. 4.16 je patrné, že okyselená MO se v přítomnosti KBrO_3 rozpadá kinetikou 0-tého řádu. V přítomnosti KB lze křivku rozdělit na dvě části. Absorbance se v první části křivky snižuje velice pomalu. Délka a strmost této křivky je závislá na koncentraci KB. V případě nízké koncentrace KB ($1,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) je křivka velice krátká a strmá. V případě vyšších koncentrací KB ($1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) je tato část delší a méně strmá. V druhé části všech křivek dochází k rozkladu MO srovnatelnou rychlostí jako v nepřítomnosti KB, což je v rozporu se zjištěnými výsledky v článku A. A. Ensafi a H. Movahedinia (2003) [66], kde se rychlost rozpadu liší i ve druhé části křivky. A to tak, že při vyšších koncentracích KB je druhá část křivky strmější, než v nepřítomnosti KB.



Obr. 4.16 Rychlost reakce MO a bromičnanu v přítomnosti různých koncentrací KB

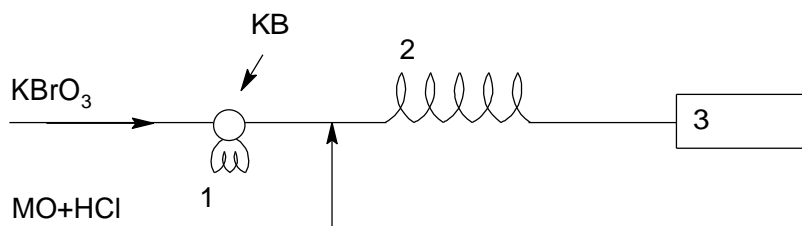
1- $c_{KB}=0 \text{ mol dm}^{-3}$, 2- $c_{KB}=1,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, 3- $c_{KB}=2,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, 4-
 $c_{KB}=7,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, 5- $c_{KB}=1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$
 $c_{MO} = 10 \text{ mg l}^{-1}$ ($v \text{ } 0,35 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$); $c(\text{KBrO}_3) = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$

4.2.2 FIA stanovení

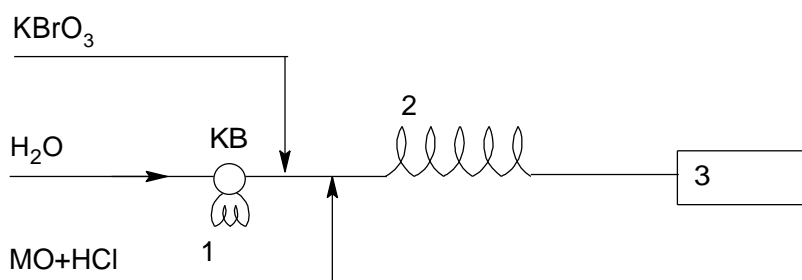
4.2.2.1 Uspořádání metody FIA

Nejprve bylo zapotřebí sestavit aparaturu pro FIA měření. Jako první bylo vyzkoušeno zapojení se dvěma mobilními fázemi, viz obr. 4.17a. Jednu fázi zde tvořila již okyselená MO a druhou tvořil KBrO_3 . Vzorek KB se dávkoval přímo do fáze KBrO_3 . Při tomto zapojení však nedocházelo k dostatečnému promísení všech komponent. Při nadávkování vzorku se dostavila odezva nezávisle na tom, zda byla dávkována KB nebo H_2O . Nosný tok složený z okyselené MO byl sloučen s dávkovanou látkou, ale k reakci s bromičnanem v daném úseku nedošlo, a byla získána falešně pozitivní odezva. Poté bylo schéma zapojení změněno podle obr. 4.17b. Zde se vzorek zavádí do vodné fáze, ke které se postupně přidá fáze s KBrO_3 a posléze fáze s MO. Zde již dochází k optimálnímu smíšení jednotlivých složek.

a) dvouproudová sestava FIA



b) tříproudová sestava FIA



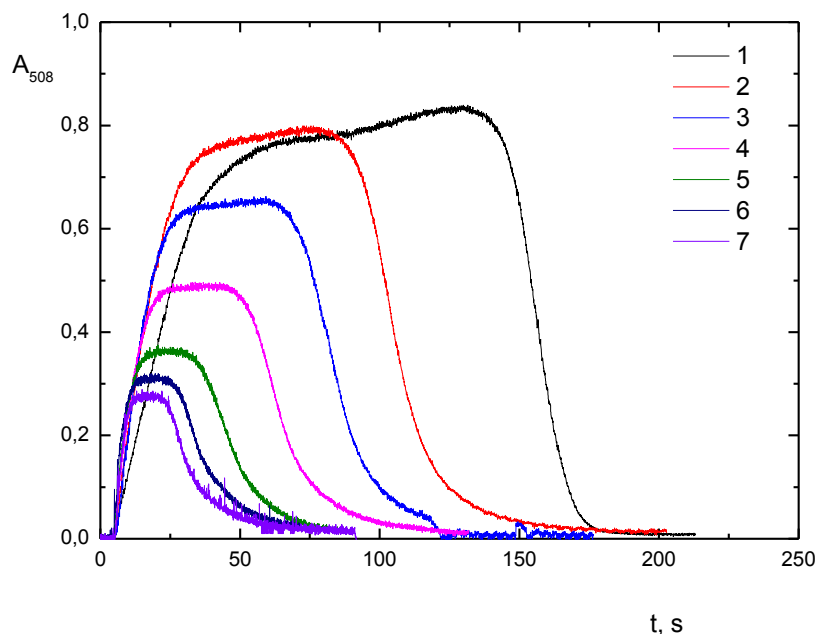
Obr.4.17 Schéma zapojení metody FIA

1-dávkovací smyčka 2-reakční cívka 3- detektor

4.2.2.2 Optimalizace průtokové rychlosti

Optimalizace průtokové rychlosti byla opět prvním kritériem pro stanovení kyseliny barbiturové průtokovou injekční analýzou. Pro měření byla použita pouze jedna pumpa, proto nebylo možné měnit průtoky jednotlivých komponent libovolně. Při měření docházelo ke změně průtokové rychlosti mobilní fáze složené z H_2O , MO a roztoku bromičnanu draselného. Ostatní parametry zůstaly zachovány. Jako základní linie je použit nosný tok složený ze všech tří složek (MO, H_2O a KBrO_3) po smíšení. Z grafu na obr 4.18 je patrné, že se zvyšující se průtokovou rychlostí se snižuje hodnota absorpance směsi. Tato skutečnost je ovlivněna dvěma faktory a to jednak nedostatečně dlouhou časovou reakcí mezi methyloranží a bromičnanem (v případě použití H_2O jako základní linie s rostoucí průtokovou rychlostí roste hodnota absorpance základní linie tvořené mobilní fází). Tak i kratší dobou reakce KB a bromičnanu draselného. Při nízkých průtokových rychlostech $0,3$ a $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ vzniká nejednotný pík. Z těchto důvodů byla jako optimální průtoková rychlost zvolena rychlost $0,7 \text{ ml min}^{-1}$. Umožňuje dostatečně dlouhou dobu reakce mezi MO, bromičnanem a kyselinou

barbiturovou. Měření probíhalo za těchto podmínek: koncentrace MO 40 mg l^{-1} , objem dávkovací smyčky $250 \text{ } \mu\text{l}$, objem reakční cívky $1000 \text{ } \mu\text{l}$, koncentrace KB $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace KBrO_3 $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$.



Obr. 4.18 Optimalizace průtokové rychlosti

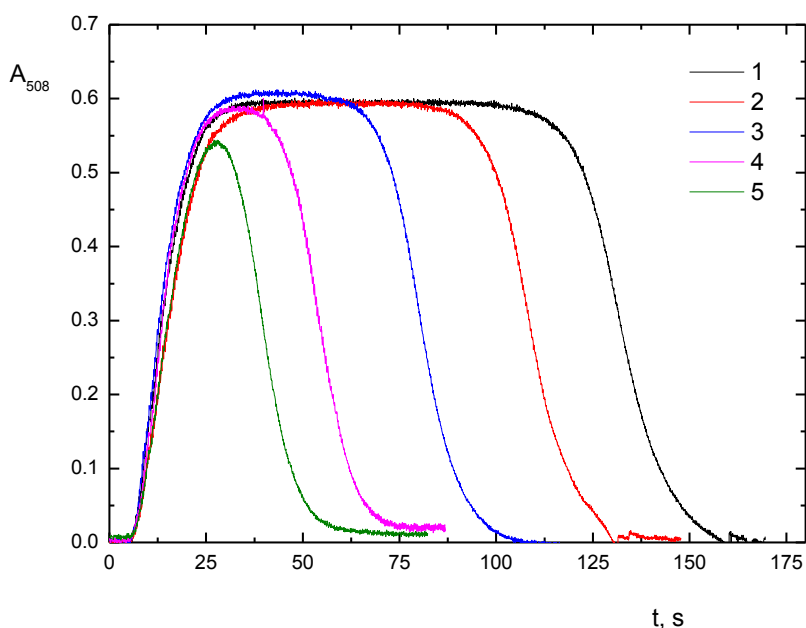
1- $0,3 \text{ ml min}^{-1}$, 2- $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, 3- $0,7 \text{ ml min}^{-1}$, 4- $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, 5- $1,5 \text{ ml min}^{-1}$,
6- $2,0 \text{ ml min}^{-1}$, 7- $2,5 \text{ ml min}^{-1}$

$c_{\text{MO}} = 40 \text{ mg l}^{-1}$; $V_{\text{KB}} = 250 \text{ } \mu\text{l}$; $V_{\text{cívky}} = 1000 \text{ } \mu\text{l}$; $c_{\text{KB}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$;
 $c(\text{KBrO}_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$

4.2.2.3 Optimalizace dávkovaného objemu

Dalším zjišťovaným parametrem byl dávkovaný objem analytu. Ostatní parametry zůstaly během měření konstantní. Koncentrace KB $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace MO 40 mg l^{-1} , koncentrace KBrO_3 $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, objem reakční cívky $1,0 \text{ ml}$. Pro měření byla použita zjištěná optimální průtoková rychlost z předchozího měření $0,7 \text{ ml min}^{-1}$ pro všechny tři komponenty. Základní linii tvoří odezva na nosný tok složený ze všech tří složek (MO, H_2O a KBrO_3). Z grafu na obr 4.19 je patrné, že u dávkovaného objemu 100 a $250 \text{ } \mu\text{l}$ se hodnota absorbance zvyšuje. Od dávkovaného

objemu 250 μl se se zvýšením objemu již hodnota absorpance nemění a dochází pouze k rozšiřování píku. Proto byl jako optimální dávkovaný objem zvolen objem 250 μl .



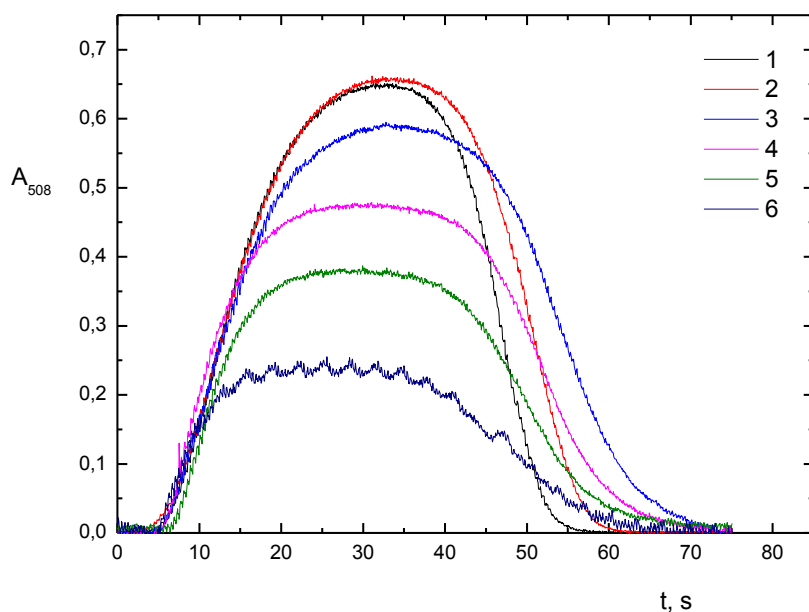
Obr.4.19 Optimalizace dávkovaného objemu.

1- 1000 μl , 2- 700 μl , 3- 500 μl , 4- 250 μl , 5- 100 μl

$$v(\text{H}_2\text{O}, \text{MO}, \text{KBrO}_3) = 0,7 \text{ ml min}^{-1}; c_{\text{MO}} = 40 \text{ mg l}^{-1}; V_{\text{cívky}} = 1000 \mu\text{l}; c_{\text{KB}} = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}; c(\text{KBrO}_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$$

4.2.2.4 Optimalizace objemu reakční cívky

Dalším sledovaným parametrem byl objem reakční cívky. Ostatní parametry zůstaly konstantní. Koncentrace KB $1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace MO 40 mg l^{-1} , koncentrace KBrO_3 $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Pro měření byl použit zjištěný optimální objem dávkovací smyčky 250 μl a průtoková rychlost z předchozího měření $0,7 \text{ ml min}^{-1}$ pro všechny tři komponenty. Základní linii tvoří odezva na nosný tok složený ze všech tří složek (MO, H_2O a KBrO_3). Z grafu na obr 4.20 je patrné, že až do objemu 1500 μl s narůstajícím objemem reakční cívky narůstá i hodnota absorpance. Zvýšení objemu reakční cívky nad 1500 μl již nemá na hodnotu absorpance vliv. Při objemu 250 μl je navíc patrné nedostatečné promíšení všech komponent a drobné kolísání absorpance. Jako optimální objem reakční cívky byl zvolen objem 1500 μl .



Obr. 4.20 Optimalizace objemu reakční cívky.

1- 1750 μl , 2- 1500 μl , 3- 1000 μl , 4- 750 μl , 5- 500 μl , 6- 250 μl
 $v(\text{H}_2\text{O}, \text{MO}, \text{KBrO}_3) = 0,7 \text{ ml min}^{-1}$; $c_{\text{MO}} = 40 \text{ mg l}^{-1}$; $V_{\text{KB}} = 250 \mu\text{l}$;
 $c_{\text{KB}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{KBrO}_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$

4.2.2.5 Optimalizace koncentrace MO a KBrO_3

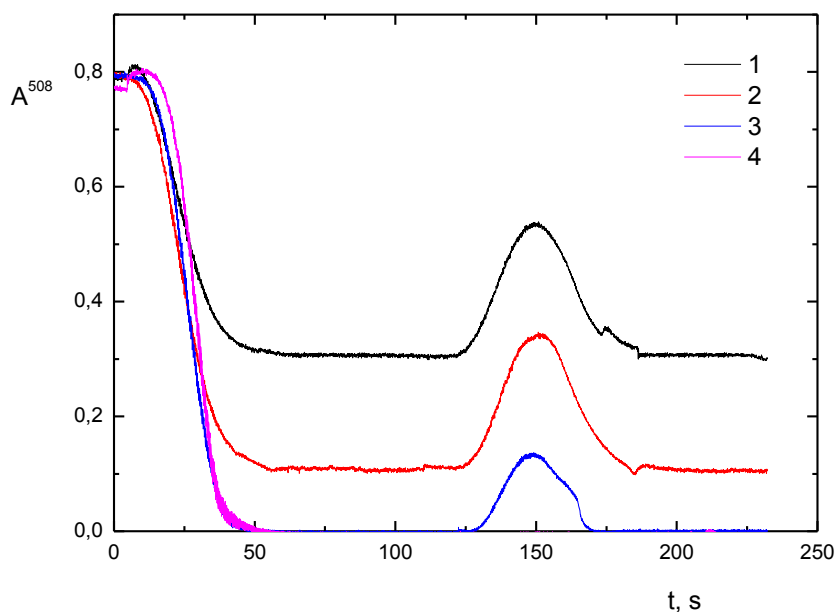
Dalším sledovaným parametrem byla koncentrace MO. Jelikož sledovaný pík se nachází mezi hodnotou absorbance samotné MO a hodnotou absorbance MO po reakci s KBrO_3 je zapotřebí aby tento rozptýl byl co největší. Z tab. 4.5 je patrné, že se zvyšující se koncentrací MO se zvyšuje i hodnota absorbance. Z hlediska přesnosti měření je však nevhodné, aby absorbance přesahovala hodnotu jedna. Proto byla jako optimální stanovena koncentrace MO 25 mg l^{-1} . Při měření nebyl dávkován žádný vzorek ani nedocházelo ke smíšení s bromičnanem. Zásobní roztok bromičnanu byl nahrazen destilovanou vodou.

Tab. 4.5 Optimalizace koncentrace MO

$$v(H_2O, MO) = 0,7 \text{ ml min}^{-1}$$

$c_{MO}(\text{mg l}^{-1})$	A_{508}
10	0,332
25	0,797
50	1,27
75	1,53

Poté byla sledována optimální koncentrace bromičnanu. Zde bylo zapotřebí, aby sledovaná absorbance klesla těsně nad nulu, aby byl rozsah co největší. Z grafu na obr 4.21 vyplývá, že je při dané průtokové rychlosti dostačující KBrO_3 o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Při vyšší koncentraci bromičnanu dochází ke snížení píku. Měření probíhalo za těchto podmínek: základní linii tvoří odezva na H_2O , průtoková rychlost nosného toku (MO , H_2O a KBrO_3) $0,7 \text{ ml min}^{-1}$, koncentrace MO 25 mg l^{-1} , objem dávkovací smyčky $250 \text{ }\mu\text{l}$, objem reakční cívky $1500 \text{ }\mu\text{l}$, koncentrace KB $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

**Obr.4.21 Optimalizace koncentrace KBrO_3**

1- $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, 2- $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, 3- $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$, 4- $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$

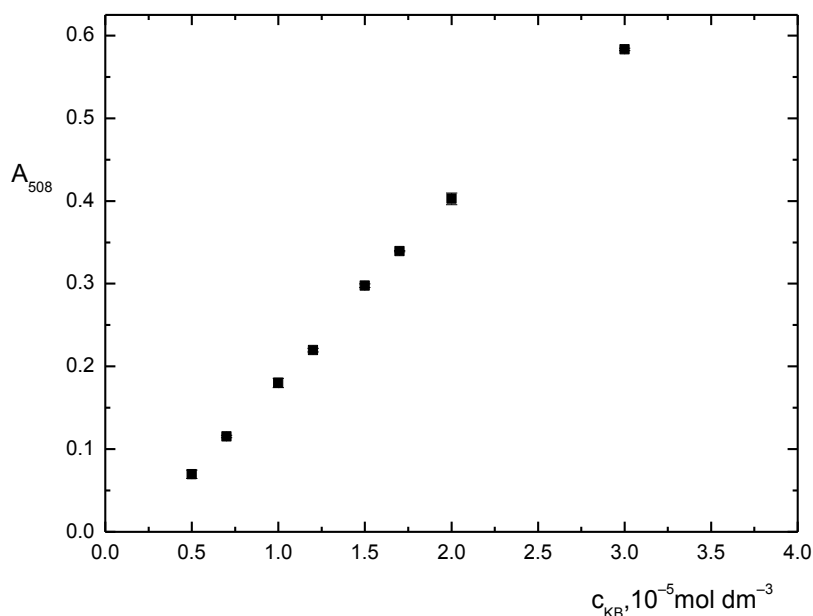
$v(H_2O, MO, KBrO_3) = 0,7 \text{ ml min}^{-1}$; $c_{MO} = 25 \text{ mg l}^{-1}$; $V_{KB} = 250 \text{ }\mu\text{l}$;

$c_{KB} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V_{cívky} = 1500 \text{ }\mu\text{l}$

4.2.2.6 Kalibrační závislost

Po zjištění optimálních experimentálních podmínek byla proměřena kalibrační závislost a zjištěny základní charakteristiky stanovení kyseliny barbiturové pomocí inhibiční reakce v přítomnosti bromičnanu a methylovanže s použitím průtokové injekční analýzy.

Byly proměřeny koncentrace v rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $5 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} . Lineární závislost však byla zjištěna pouze pro hodnoty od $5 \cdot 10^{-6}$ až $3 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} znázorněné na obr 4.22. Při vyšších hodnotách koncentrace KB docházelo již k výraznému zakřivování kalibrační závislosti. Hodnoty absorbance byly měřeny při průtoku nosného toku (MO, H_2O a KBrO_3) $0,7 \text{ ml min}^{-1}$, koncentraci MO 25 mg l^{-1} , objemu dávkovací smyčky $250 \text{ }\mu\text{l}$, objemu reakční cívky $1500 \text{ }\mu\text{l}$, koncentraci KBrO_3 $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$.



Obr. 4.22 Kalibrační závislost stanovení koncentrace kyseliny barbiturové

$$v(\text{H}_2\text{O}, \text{MO}, \text{KBrO}_3) = 0,7 \text{ ml min}^{-1}; c_{\text{MO}} = 25 \text{ mg l}^{-1}; V_{\text{KB}} = 250 \text{ }\mu\text{l};$$

$$V_{\text{cívky}} = 1500 \text{ }\mu\text{l}; c(\text{KBrO}_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$$

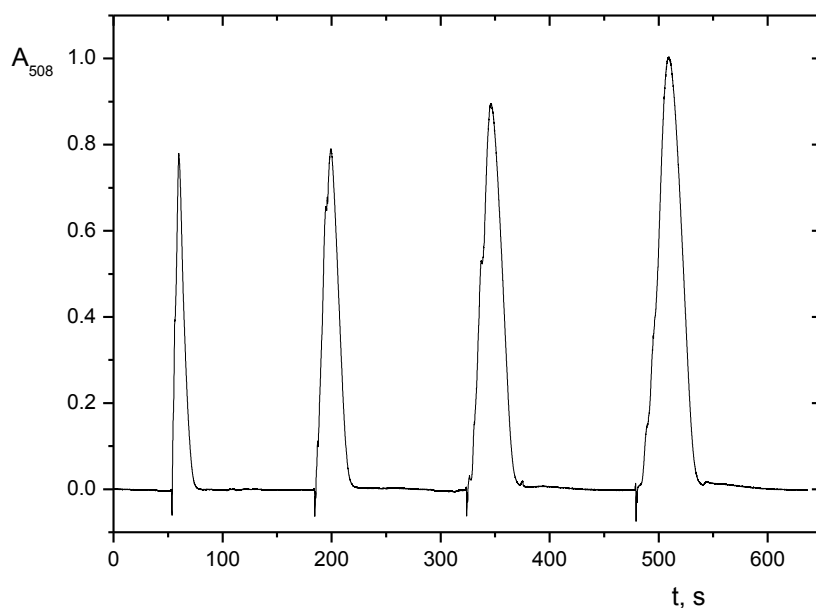
Následně byly zjišťovány další charakteristiky stanovení KB touto metodou. Mezi uvedené charakteristiky byla zahrnuta mez detekce a stanovitelnosti,

opakovatelnost, citlivost a korelační koeficient. Tyto hodnoty jsou pro názornost uvedeny spolu s charakteristikami pro SIA uspořádání v tab. 4.9 (na str.54).

4.2.3 SIA stanovení

4.2.3.1 Optimalizace dávkovaného objemu

Optimalizace dávkovaného objemu KB, MO i KBrO_3 byla prvním kritériem optimalizace pro stanovení kyseliny barbiturové sekvenční injekční analýzou. Při měření byly měněny dávkovací objemy všech tří složek, ostatní parametry zůstaly konstantní. Na obr. 4.23 první pík odpovídá dávkovanému objemu 50 μl všech tří složek. Druhý pík odpovídá dávkovanému objemu 100 μl , třetí 150 μl a čtvrtý 200 μl vždy všech složek. Z grafu je patrné, že při zvyšování objemů dávkovaných složek se hodnota absorbance zvyšuje u prvních dvou (50 a 100 μl) pouze nepatrně. Při dalším navýšení dávkovaných objemů (150 a 200 μl) je rozdíl větší.



Obr. 4.23 Optimalizace dávkovaného objemu

$$c_{MO} = 25 \text{ mg l}^{-1}, c_{KB} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}, c(\text{KBrO}_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}, t_r = 0 \text{ s}, \\ v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$$

Při zachování objemů reakčních činidel (MO a KBrO_3) a současném zvýšení objemu vzorku docházelo ke snížení hodnoty absorbance vlivem naředění komponent. Z tohoto důvodu byl zvolen co nejmenší objem jako optimální objem dávkovaného vzorku a to 50 μl . V případě zachování dávkovaného objemu KB a navýšení dávkovaného objemu KBrO_3 docházelo k snížení hodnoty absorbance (viz tab. 4.6). Velikost snížení byla závislá na dávkovaném objemu MO. Z těchto důvodů byl jako optimální dávkovaný objem zvolen objem 150 μl jak pro MO tak pro KBrO_3 . Měření probíhalo při průtoku 1,0 ml min^{-1} a byla použita MO o koncentraci 25 mg l^{-1} , KBrO_3 o koncentraci 0,2 mol dm^{-3} a KB o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, čas setrvání v mísicí cílce byl 0 s.

Tab. 4.6 Optimalizace dávkovaného objemu

$$c_{MO} = 25 \text{ mg l}^{-1}, c_{KB} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}, c(\text{KBrO}_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}, t_r = 0 \text{ s},$$

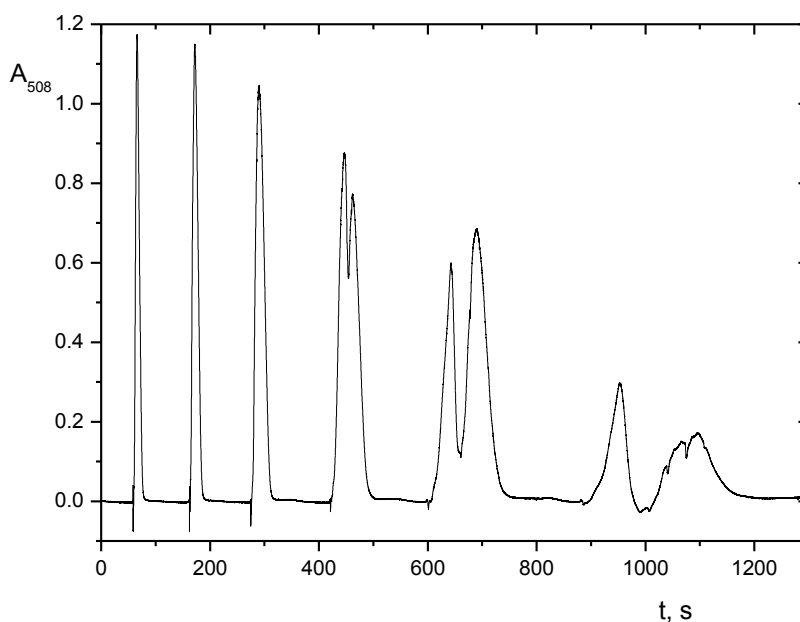
$$v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$$

Pro $V_{KB} 50 \mu\text{l}$				Pro $V_{KB} 100 \mu\text{l}$					
$V_{MO}, (\mu\text{l})$	$V(\text{KBrO}_3), (\mu\text{l})$				$V_{MO}, (\mu\text{l})$	$V(\text{KBrO}_3), (\mu\text{l})$			
	50	100	150	200		50	100	150	200
50	0,778				50	0,484	0,485	0,476	
100	0,963				100	0,985	0,789		
150	1,341	1,003			150	1,174	1,077	0,984	
200					200				
Pro $V_{KB} 150 \mu\text{l}$				Pro $V_{KB} 200 \mu\text{l}$					
$V_{MO}, (\mu\text{l})$	$V(\text{KBrO}_3), (\mu\text{l})$				$V_{MO}, (\mu\text{l})$	$V(\text{KBrO}_3), (\mu\text{l})$			
	50	100	150	200		50	100	150	200
50					50				
100	0,694				100				
150	0,893				150				
200					200	1,003			

4.2.3.2 Optimalizace rychlosti průtoku

Dalším sledovaným parametrem byla rychlost průtoku. Na obr 4.24 první pík odpovídá rychlosti průtoku 0,125 ml min^{-1} , druhý 0,25 ml min^{-1} , třetí 0,5 ml min^{-1} , čtvrtý 1,0 ml min^{-1} , pátý 1,5 ml min^{-1} , a poslední 2,0 ml min^{-1} . Z grafu na obr 4.24 je patrné, že se zvyšující se průtokovou rychlostí se snižuje hodnota absorbance, a pík se zužuje. Při nízkých průtokových rychlostech 0,125 až 0,5 ml min^{-1} navíc dochází

k výraznému rozdělení píku. Proto byla jako optimální rychlost průtoku zvolena hodnota $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. Pík je dostatečně úzký a nedochází k příliš výraznému rozmývání. Při vyšších průtokových rychlostech byly píky již velmi úzké. Pro měření bylo použito $150 \text{ } \mu\text{l}$ KBrO_3 o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, $150 \text{ } \mu\text{l}$ MO o koncentraci 25 mg l^{-1} a $50 \text{ } \mu\text{l}$ KB o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, čas setrvání v mísící cívce byl 0 s .



Obr. 4.24 Optimalizace rychlosti průtoku

$$V(\text{KBrO}_3) = 150 \text{ } \mu\text{l}, c(\text{KBrO}_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}, V_{\text{MO}} = 150 \text{ } \mu\text{l}, c_{\text{MO}} = 25 \text{ mg l}^{-1},$$

$$V_{\text{KB}} = 50 \text{ } \mu\text{l}, c_{\text{KB}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}, t_r = 0 \text{ s}$$

4.2.3.3 Optimalizace koncentrace MO a KBrO_3

Dalším sledovaným parametrem byla koncentrace MO. Při měření byly použity optimální dávkované objemy z předešlého měření tedy $150 \text{ } \mu\text{l}$ KBrO_3 , $150 \text{ } \mu\text{l}$ MO a $50 \text{ } \mu\text{l}$ KB. Ovšem tyto složky dávkované nebyly, byla dávkována pouze MO o různé koncentraci a místo KBrO_3 a KB byla použita voda. Průtoková rychlost byla $1,0 \text{ ml min}^{-1}$. Z tab. 4.7 je patrné, že se zvyšující se koncentrací se zvyšuje i hodnota absorbance MO. Jelikož při reakci s bromičnanem dochází k rozkladu MO byla zvolena

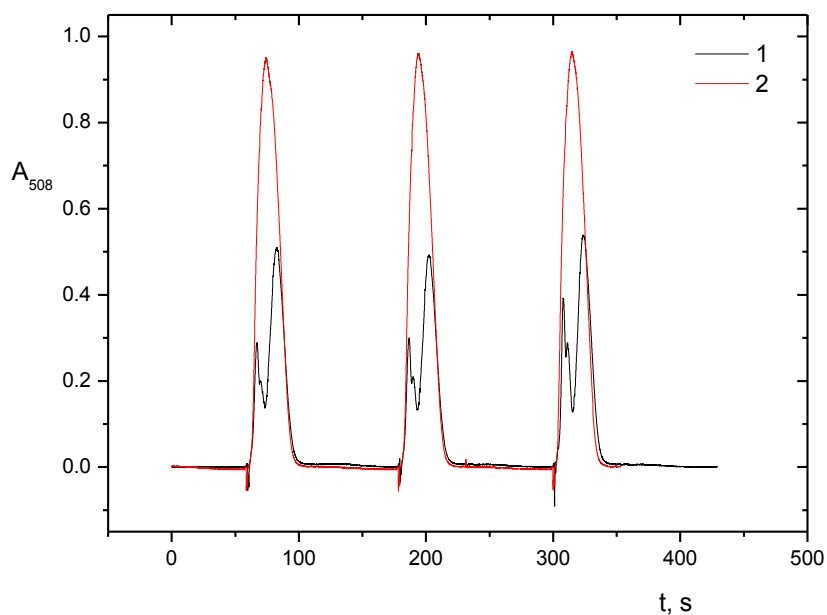
koncentrace s vysokou hodnotou absorbance, která nepředstavuje příliš velkou chybu měření a to okolo 1,2. Této absorbanci nejlépe odpovídala koncentrace MO 25 mg l⁻¹.

Tab. 4.7 Optimalizace koncentrace MO

$$V(H_2O)=200 \mu\text{l}, V_{MO} = 150 \mu\text{l}, t_r = 0 \text{ s}, v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$$

$c_{MO}, \text{ mg l}^{-1}$	A_{508}
10	0,509
20	0,982
25	1,204
30	1,423
40	1,742
50	1,931

Poté byla stanovena optimální koncentrace KBrO₃. Měření bylo prováděno vždy dvakrát. Jednou v přítomnosti KB a jednou bez přítomnosti KB za stejných podmínek. Pro měření byly použity optimální dávkované objemy 150 μl KBrO₃ o různé koncentraci, 150 μl MO o koncentraci 25 mg l⁻¹ a 50 μl KB o koncentraci 1,0·10⁻⁴ mol dm⁻³, čas setrvání v mísící cívce byl 0 s a průtoková rychlost činila 1,0 ml min⁻¹. V přítomnosti KB byly získány symetrické Gaussovské píky lišící se nepatrně hodnotou absorbance v závislosti na koncentraci KBrO₃. Se stoupající koncentrací KBrO₃ mírně klesá hodnota absorbance směsi. V případě nepřítomnosti KB docházelo s rostoucí koncentrací KBrO₃ ke změně výšky i tvaru píku. Při koncentracích 0,1 až 0,2 mol dm⁻³ KBrO₃ docházelo k rozdělení píku na dvě části. První část měla lehce nižší hodnotu maximální absorbance, druhá část ji měla vyšší, přesto pík působil celistvý. Při koncentracích 0,25 a 0,30 mol dm⁻³ KBrO₃ docházelo k výraznému rozdělení píku na dvě části viz. obr. 4.25. Jako optimální koncentrace KBrO₃ byla zvolena koncentrace s největším rozdílem výšek píků, a to 0,2 mol dm⁻³. Největší rozdíl ploch píků byl sice dosažen při koncentraci 0,3 mol dm⁻³ viz tab. 4.8, ovšem pouze v případě použití KB o vyšších koncentracích 1,0·10⁻⁴ mol dm⁻³, v případě použití nižší koncentrace se rozdíl ploch píku snižoval.



Obr. 4.25 Optimalizace koncentrace KBrO_3

1- v přítomnosti KB, 2- bez KB

$V(\text{KBrO}_3) = 150 \mu\text{l}$, $V_{\text{MO}} = 150 \mu\text{l}$, $c_{\text{MO}} = 25 \text{ mg l}^{-1}$, $V_{\text{KB}} = 50 \mu\text{l}$, $c_{\text{KB}} = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$,
 $t_r = 0 \text{ s}$, $v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$

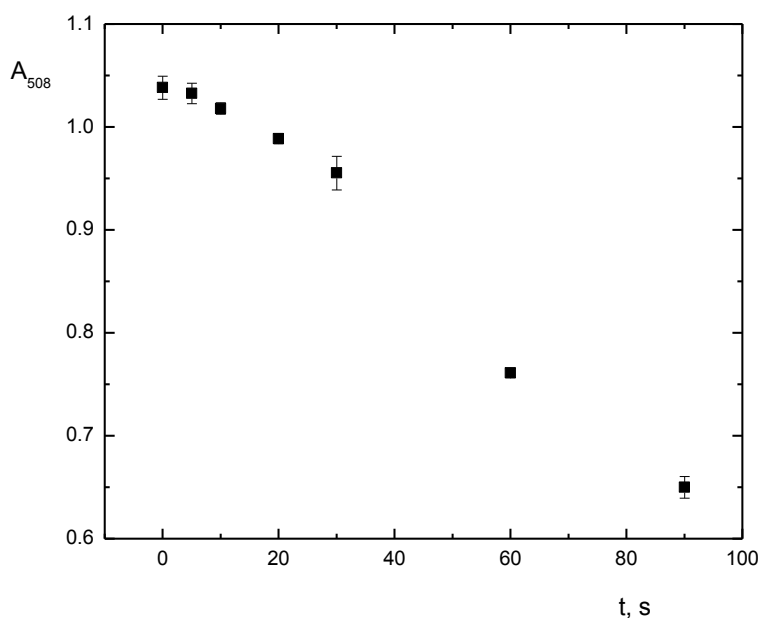
Tab. 4.8 Optimalizace koncentrace KBrO_3

$V(\text{KBrO}_3) = 150 \mu\text{l}$, $V_{\text{MO}} = 150 \mu\text{l}$, $c_{\text{MO}} = 25 \text{ mg l}^{-1}$, $V_{\text{KB}} = 50 \mu\text{l}$, $c_{\text{KB}} = 1.10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$,
 $t_r = 0 \text{ s}$, $v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$

$c(\text{KBrO}_3)$, mol dm^{-3}	A_{508} (s KB)	rozdíl výšek píků	rozdíl ploch píků
0,1	1,107	0,357	3,972
0,15	1,088	0,456	7,195
0,2	1,035	0,478	8,800
0,25	1,023	0,459	8,868
0,3	0,953	0,446	9,054

4.2.3.4 Optimalizace času setrvání v mísící cívce

Posledním sledovaným parametrem byla doba setrvání komponent v mísící cívce (t_r). Z grafu na obr. 4.26 je patrné, že při čase pod 10 s, s prodloužením času došlo k nepatrnému nárůstu absorbance. Naopak při čase nad 10 s, s nárůstem času došlo k relativně velkému snížení absorbance. Reakce viditelně probíhá již po 10 s strávených v mísící cívce, a proto byl tento čas zvolen jako optimální. Rozmytí píku nemělo na čas setrvání komponent v mísící cívce vliv. Pro měření bylo použito 150 μl KBrO_3 o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ a 50 μl KB o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, 150 μl MO o koncentraci 25 mg l^{-1} , rychlost průtoku činila $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.



Obr.4.26 Optimalizace času setrvání v mísící cívce

$$v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}, V(\text{KBrO}_3) = 150 \mu\text{l}, c(\text{KBrO}_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}, V_{\text{MO}} = 150 \mu\text{l},$$

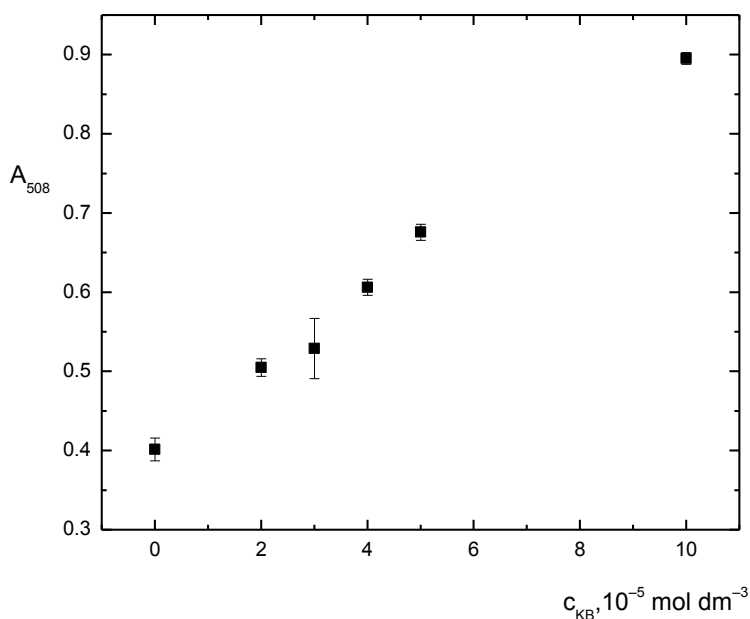
$$c_{\text{MO}} = 25 \text{ mg l}^{-1}, V_{\text{KB}} = 50 \mu\text{l}, c_{\text{KB}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$$

4.2.3.5 Kalibrační závislost

Po zjištění optimálních experimentálních podmínek byla proměřena kalibrační závislost a zjištěny základní charakteristiky stanovení kyseliny barbiturové pomocí

inhibice rozkladu methyloranže pomocí bromičnanu s použitím sekvenční injekční analýzy.

Byly proměřeny koncentrace v rozmezí $3 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} . Lineární závislost však byla zjištěna pouze pro hodnoty od $2 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} znázorněné na obr 4.27. Při vyšších hodnotách koncentrace KB docházelo již k výraznému zakřivování kalibrační závislosti. Hodnoty absorbance byly měřeny při průtoku 1,0 ml min^{-1} , koncentraci MO 25 mg l^{-1} , koncentraci KBrO_3 0,2 mol dm^{-3} , dávkovaných objemech 150 μl KBrO_3 , 150 μl MO a 50 μl , čas setrvání v mísící cívce byl 10 s.



Obr. 4.27 Kalibrační závislost stanovení koncentrace kyseliny barbiturové

$v = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$, $V(\text{KBrO}_3) = 150 \mu\text{l}$, $c(\text{KBrO}_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, $V_{\text{MO}} = 150 \mu\text{l}$,

$c_{\text{MO}} = 25 \text{ mg l}^{-1}$, $V_{\text{KB}} = 50 \mu\text{l}$, $t_r = 10 \text{ s}$

4.2.3.6 Porovnání FIA a SIA

Základní charakteristiky, jako jsou citlivost, LOD, LOQ, korelační koeficient a opakovatelnost, byly spočítány stejným způsobem jako v předchozím stanovení.

Z tab. 4.9 je patrné, že pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí inhibice rozkladu methyloranže je opět vhodnější využití FIA metody. FIA metoda má o řád vyšší citlivost. Mez detekce FIA metody se pohybuje okolo $3,8 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3} , nejnižší

koncentrace analytu, kterou lze stanovit s přijatelným stupněm správnosti a přesnosti je $1,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, což jsou hodnoty srovnatelné s hodnotami pro SIA metodu. Lepší opakovatelnost i korelační koeficient vykazuje FIA metoda z důvodu nejednotnosti píku získaných při SIA metodě.

Tab. 4.9 Přehled dosažené citlivosti, LOD, LOQ, korelačního koeficientu a opakovatelnosti

Charakteristika	FIA	SIA
Citlivost ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)	$2,8 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^3$
LOD (mol dm^{-3})	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$3,1 \cdot 10^{-7}$
LOQ (mol dm^{-3})	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$
Korelační koeficient	0,9981	0,9955
Opakovatelnost (%)	2,04%	6,40%

4.2.4 Shrnutí

4.2.4.1 Přehled optimálních podmínek pro jednotlivá stanovení

V tab. 4.10 jsou shrnuty optimální podmínky pro stanovení KB pomocí metody FIA s využitím reakce KB s DS (Reakce 1) a inhibice rozkladu MO v přítomnosti KB (Reakce 2).

Tab. 4.10 Přehled optimálních podmínek pro stanovení KB pomocí FIA

reakce 1- reakce KB s DS, c_1 - DS,

reakce 2-inhibice rozkladu MO pomocí KB, c_1 - KBrO_3 , c_2 - MO

Parametry	Reakce 1	Reakce 2
V_{pr} (ml min^{-1})	0,5	0,7
c_1 (mol dm^{-3})	$5 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-1}$
c_2 (mg l^{-1})	X	25
V_{KB} (μl)	250	250
$V_{\text{cívky}}$ (μl)	750	1500

V tab. 4.11 jsou znázorněny optimální podmínky pro stanovení KB pomocí metody SIA s využitím reakce KB s DS (reakce 1) a inhibice rozkladu MO v přítomnosti KB (reakce 2).

Tab. 4.11 Přehled optimálních podmínek pro stanovení KB pomocí SIA*reakce 1- reakce KB s DS, c_1, V_1 - DS,**reakce 2- inhibice rozkladu MO pomocí KB, V_1, c_1 - $KBrO_3$, V_2, c_2 - MO*

Parametry	Reakce 1	Reakce 2
V_{pr} (ml min ⁻¹)	1,0	1,0
c_1 (mol dm ⁻³)	$3 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-1}$
c_2 (mg l ⁻¹)	X	25
V_{KB} (μl)	150	50
V_1 (μl)	150	150
V_2 (μl)	X	150
t_r (s)	25	10

4.2.4.2 Přehled dosažených charakteristik metod

Jak je patrné z tab. 4.12 největší citlivosti bylo dosaženo při stanovení kyseliny barbiturové pomocí reakce s nitroanilinovou diazotační směsí za použití SIA metody. Nejnižší hodnota meze detekce byla získána při stanovení kyseliny barbiturové pomocí reakce s nitroanilinovou diazotační směsí za použití FIA metody. Nejnižší hodnota meze stanovitelnosti byla získána taktéž při stanovení kyseliny barbiturové pomocí reakce s nitroanilinovou diazotační směsí za použití FIA metody. Z toho důvodu byla tato metoda zvolena za nejvhodnější pro stanovení kyseliny barbiturové. Navíc vykazovala nejlepší opakovatelnost a nejvyšší korelační koeficient.

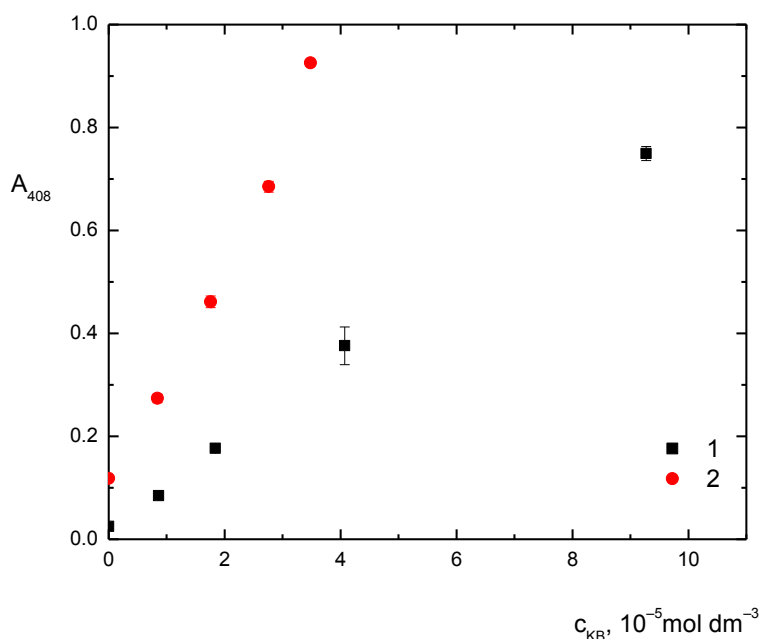
Tab. 4.12 Přehled dosažené citlivosti, LOD, LOQ, korelačního koeficientu a opakovatelnosti*reakce 1- reakce KB s DS, reakce 2- Inhibice rozkladu MO*

Charakteristiky	Reakce 1		Reakce 2	
	FIA	SIA	FIA	SIA
Citlivost (dm ³ mol ⁻¹)	$1,6 \cdot 10^4$	$7,7 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^3$
LOD (mol dm ⁻³)	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$4,9 \cdot 10^{-7}$	$3,8 \cdot 10^{-7}$	$3,1 \cdot 10^{-7}$
LOQ (mol dm ⁻³)	$3,3 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$
Korelační koeficient	0,9989	0,9988	0,9981	0,9955
Opakovatelnost (%)	1,30%	3,10%	2,04%	6,40%

Nejhorších výsledků stanovení kyseliny barbiturové bylo dosaženo pomocí inhibice rozkladu methyloranže SIA metodou. Při tomto provedení bylo dosaženo o řád nižší citlivosti než u ostatních metod. Hodnota korelačního koeficientu byla nejnižší a opakovatelnost vykazovala také nejhorší výsledek. Z toho důvodu nebyla stanovována koncentrace kyseliny barbiturové pomocí inhibice rozkladu methyloranže SIA metodou v biologickém materiálu.

4.3 Stanovení kyseliny barbiturové v biologickém materiálu

Po optimalizaci podmínek a získání kalibračních závislostí pro jednotlivé metody byla stanovena koncentrace KB v krevním séru. Koncentrace KB se nedala stanovit z neupraveného séra díky přítomnosti bílkovin, které rušily spektrofotometrickou detekci. Ve všech měřeních (oba typy reakce, obě metody) byly získány vysoké hodnoty absorbance nezávislé na koncentraci KB. Bílkoviny ze séra byly sráženy pomocí kyseliny trifluoroctové a acetonitrilu.



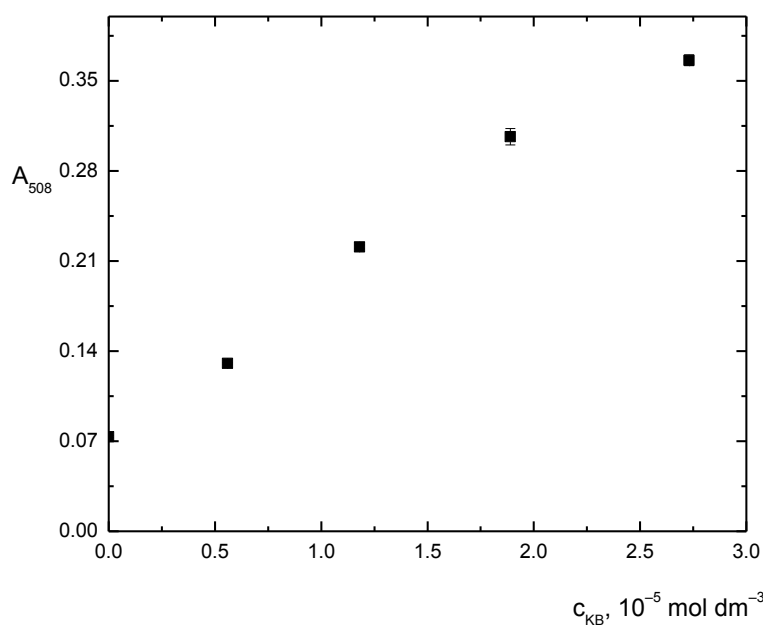
Obr. 4.28 Stanovení KB v séru pomocí reakce s benzendiazoniou solí

1-FIA $v(H_2O \text{ i } DS) = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$; $c_{DS} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$; $V_{vz} = 250 \mu\text{l}$; $V_{civky} = 750 \mu\text{l}$

2- SIA, $v = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 150 \mu\text{l}$; $V_{DS} = 150 \mu\text{l}$; $c_{DS} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

Kyselina trifluoroctová rušila stanovení KB pomocí reakce s *o*-nitroanilinovou směsí. Hodnoty absorbance získané po reakci KB s *o*-nitroanilinovou směsí v přítomnosti trifluoroctové kyseliny byly velice nízké a nezávislé na koncentraci KB. Hodnoty absorbance získané po reakci KB s *o*-nitroanilinovou směsí v séru vysráženém acetonitrem byly lineárně závislé na koncentraci KB. Lineární závislost hodnot absorbance na koncentraci KB v séru vysráženém acetonitrem je znázorněna na obr. 4.28, jak při využití metody FIA a tak pro metodu SIA.

Stanovení KB pomocí inhibice rozkladu methyloranže bylo možné provést v přítomnosti kys. trifluoroctové i acetonitrilu. Ovšem sérum vysrážené acetonitrem vykazovalo hodnoty srovnatelně vysoké, jako nevysrážené sérum. Navíc nebyla prokázána závislost hodnot absorbance séra vysráženého acetonitrem na koncentraci KB. Z tohoto důvodu bylo pro stanovení KB pomocí inhibice rozkladu methyloranže sérum sráženo pomocí trifluoroctové kys.



Obr.4.29 Stanovení KB v séru pomocí inhibice rozkladu MO

$$v(H_2O, MO, KBrO_3) = 0,7 \text{ ml min}^{-1}; c_{MO} = 25 \text{ mg l}^{-1}; V_{KB} = 250 \text{ } \mu\text{l}; V_{cívky.} = 1500 \text{ } \mu\text{l};$$

$$c(KBrO_3) = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$$

Lineární závislost hodnot absorbance na koncentraci KB v séru vysráženém trifluoroctovou kyselinou je znázorněna na obr. 4.29 při využití metody FIA. Vzhledem k nepřesnosti a nespolehlivosti metody SIA pro toto stanovení nebyly biologické vzorky touto metodou stanovovány.

Z výše uvedeného vyplývá, že při spektrofotometrickém stanovení KB oběma metodami má biologická matrice (krevní sérum) významný vliv na získaný signál. V těchto případech je tedy nutné pracovat metodou standardního přídavku nebo metodou spikování vzorku.

5 Závěr

Cílem této práce bylo nalezení a porovnání optimálních podmínek pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí dvou různých chemických reakcí v režimu průtokové injekční analýzy a sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí. Dále byla pozornost věnována zjištění možnosti stanovení kyseliny barbiturové v biologickém materiálu (krevním séru).

Pro měření byly využity dva typy reakcí. První z těchto reakcí byla kopulační reakce mezi kyselinou barbiturovou a nitroanilinovou směsí, při které vzniká barevný produkt, který lze detegovat spektrofotometricky při vlnové délce 408 nm. Druhým typem reakce byla inhibice rozkladu barevné sloučeniny. Konkrétně inhibice rozkladu methylovanže pomocí halogenů. Koncentraci methylovanže lze detegovat spektrofotometricky při vlnové délce 508 nm.

Optimální hodnoty pro jednotlivá stanovení jsou shrnuty v tab. 4.10 a 4.11. Dosažené charakteristiky jsou shrnuty v tab. 4.12, ze které je patrné, že nejvhodnější způsob stanovení koncentrace KB je založený na metodě využívající reakci s *o*-nitroanilinovou směsí za využití FIA metody. Tato metoda vykazovala lineární rozsah v rozmezí $2,0 \cdot 10^{-6}$ až $1,2 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ kyseliny barbiturové. Citlivost metody byla $1,6 \cdot 10^4$ dm³ mol⁻¹, LOD byl $1,0 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³, LOQ byl $3,3 \cdot 10^{-7}$ mol dm⁻³, korelační koeficient byl 0,9989, opakovatelnost 1,30 %. Naopak jako nejméně vhodné se jevílo stanovení kyseliny barbiturové pomocí inhibice rozkladu methylovanže metodou SIA. V tomto případě bylo dosaženo lineární závislosti v rozmezí $2 \cdot 10^{-5}$ až $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ kyseliny barbiturové. Při stanovení kyseliny barbiturové pomocí reakce s *o*-nitroanilinovou směsí bylo za optimálních podmínek dosaženo lineární závislosti v rozmezí $3,9 \cdot 10^{-6}$ až $6,2 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ v případě použití SIA metody. Při stanovení kyseliny barbiturové pomocí inhibice rozkladu methylovanže halogeny bylo dosaženo za optimálních podmínek lineární závislosti v rozmezí $5 \cdot 10^{-6}$ až $3 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³ při použití FIA metody.

Porovnáním výsledků měření koncentrace kyseliny barbiturové pomocí reakce s nitroanilinovou směsí průtokovými metodami FIA a SIA s výsledky získanými (B. B. Ibraheem, 2011) bylo zjištěno, že průtokové metody mají lineární rozsah při koncentraci kyseliny barbiturové o tři řády níž, než publikoval (B. B. Ibraheem, 2011).

Porovnáním výsledků měření koncentrace kyseliny barbiturové pomocí inhibice rozkladu methyloranže průtokovými metodami FIA a SIA s výsledky získanými (A. A. Ensafi a H. Movahedinia, 2003) bylo zjištěno, že průtokovou metodou bylo dosaženo více jak polovičního limitu detekce. Lineární rozsah byl u průtokových metod nepatrně zúžen z obou stran.

Dále byla potvrzena lineární závislost hodnoty absorbance na koncentraci kyseliny barbiturové v modelovém biologickém materiálu (krevním séru) pro 3 metody stanovení. Konkrétně pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí reakce s *o*-nitroanilinovou směsí metodou FIA i SIA a dále pro stanovení kyseliny barbiturové pomocí inhibice rozkladu methyloranže metodou FIA.

6 Použitá literatura

- [1] E. H. Hansen a J. Růžička, „Flow injection analysis : Part VI. The determination of phosphate and chloride in blood serum by dialysis and sample dilution", *Anal. Chim. Acta*, roč. 87, č. 2, s. 353–363, pro. 1976.
- [2] J. Růžička a E. H. Hansen, „Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis", *Anal. Chim. Acta*, roč. 78, č. 1, s. 145–157, srp. 1975.
- [3] V. Cerdà, J. M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, a P. Sitjar, „Flow techniques in water analysis", *Talanta*, roč. 50, č. 4, s. 695–705, lis. 1999.
- [4] J. Růžička, *Flow Injection Analysis*. John Wiley & Sons, 1988.
- [5] B. F. R. Fábio R. P Rocha, „Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends", *Anal. Chim. Acta*, č. 1, s. 119–131, 2002.
- [6] P. R. F. Mário A Feres, „Multi-commutation in flow analysis: recent developments and applications.", *Anal. Chim. Acta*, roč. 618, č. 1, s. 1–17, 2008.
- [7] M. Miró, V. Cerdà, a J. M. Estela, „Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications", *TrAC Trends Anal. Chem.*, roč. 21, č. 3, s. 199–210, bře. 2002.
- [8] S. D. Kolev a I. D. McKelvie, *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*. Elsevier, 2008.
- [9] J. L. Rufino, H. R. Pezza, L. Pezza, P. C. A. G. Pinto, M. L. M. F. S. Saraiva, a J. L. F. C. Lima, „Sequential injection analysis system with spectrophotometric detection for determination of norfloxacin and ciprofloxacin in pharmaceutical formulations", *Quím. Nova*, roč. 34, č. 2, s. 256–261, led. 2011.
- [10] V. Ródenas, M. S. García, C. Sánchez-Pedreño, a M. I. Albero, „Spectrophotometric methods for the determination of cephradine or ceftazidime in human urine using batch and flow-injection procedures", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, roč. 15, č. 11, s. 1687–1693, ervenec 1997.
- [11] G. Decristoforo a F. Knauseder, „Rapid determination of cephalosporins with an immobilized enzyme reactor and sequential subtractive spectrophotometric detection in an automated flow-injection system", *Anal. Chim. Acta*, roč. 163, s. 73–84, 1984.

- [12] A. Afkhami, T. Madrakian, a L. Khalafi, „Flow Injection and Batch Spectrophotometric Determination of Ibuprofen Based on its Competitive Complexation Reaction with Phenolphthalein- β -Cyclodextrin Inclusion Complex", *Anal. Lett.*, roč. 40, č. 12, s. 2317–2328, 2007.
- [13] M. Knochen, J. Giglio, a B. F. Reis, „Flow-injection spectrophotometric determination of paracetamol in tablets and oral solutions", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, roč. 33, č. 2, s. 191–197, zář. 2003.
- [14] S. Liawruangrath, J. Makchit, a B. Liawruangrath, „A simple flow injection spectrophotometric procedure for the determination of diazepam in pharmaceutical formulation", *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.*, roč. 22, č. 1, s. 127–130, led. 2006.
- [15] R. W. Abbott, A. Townshend, a R. Gill, „Determination of morphine by flow injection analysis with chemiluminescence detection", *Analyst*, roč. 111, č. 6, s. 635–640, led. 1986.
- [16] K. M. Agg, A. F. Craddock, R. Bos, P. S. Francis, S. W. Lewis, a N. W. Barnett, „A rapid test for heroin (3,6-diacetylmorphine) based on two chemiluminescence reactions", *J. Forensic Sci.*, roč. 51, č. 5, s. 1080–1084, zář. 2006.
- [17] S. Zheng-Hua a Z. Ni, „Flow-injection Chemiluminescence Determination of Reserpine in Medicine and Biological Fluids with Controlled-Reagent-Release Technology", *Chin. J. Chem.*, roč. 21, č. 2, s. 175–180, nor 2003.
- [18] A. M. García-Campaña, J. M. Bosque Sendra, M. Pilar Bueno Vargas, W. R. G. Baeyens, a X. Zhang, „Flow injection analysis of oxymetazoline hydrochloride with inhibited chemiluminescent detection", *Anal. Chim. Acta*, roč. 516, č. 1–2, s. 245–249, ervenec 2004.
- [19] Z. Zj, Z. Yf, a J. Hx, „Flow injection chemiluminescent detection of acemetacin in KMnO₄ - Na₂ SO₃ system.", *Yao Xue Xue Bao*, roč. 39, č. 11, s. 925–928, lis. 2004.
- [20] J. M. Fernández-Ramos, A. M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, a J. M. Bosque-Sendra, „Determination of gentamicin in pharmaceutical formulations using peroxyoxalate chemiluminescent detection in flow-injection analysis", *Talanta*, roč. 69, č. 3, s. 763–768, kvě. 2006.

- [21] R. W. Min, J. Nielsen, a J. Villadsen, „On-line monitoring of glucose and penicillin by sequential injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, roč. 320, č. 2–3, s. 199–205, nor 1996.
- [22] Y. Li a J. Lu, „Direct chemiluminescence determination of ibuprofen by the enhancement of the KMnO₄–sulphite reaction", *Luminescence*, roč. 22, č. 4, s. 326–330, ervenec 2007.
- [23] A. G. Lista, M. E. Palomeque, a B. S. F. Band, „A fast fluorimetric flow injection method to determine ibuprofen", *J. Braz. Chem. Soc.*, roč. 17, č. 7, s. 1428–1431, pro. 2006.
- [24] B. Laassis, J.-J. Aaron, a M. C. Mahedero, „Fluorimetric determination of phenothiazine derivatives by photooxidation in a flow-injection system", *Talanta*, roč. 41, č. 11, s. 1985–1989, lis. 1994.
- [25] J. A. García Bautista, J. V. García Mateo, a J. M. Calatayud, „Spectrofluorimetric Determination of Iproniazid and Isoniazid in a FIA System Provided with a Solid-Phase Reactor", *Anal. Lett.*, roč. 31, č. 7, s. 1209–1218, 1998.
- [26] C. G. B. J. Martinez Calatayud, „Flow-injection spectrofluorimetric determination of paracetamol", *Anal. Chim. Acta - ANAL CHIM ACTA*, roč. 231, s. 259–264, 1990.
- [27] J. M. P. J. Garrido, C. Delerue-Matos, F. Borges, T. R. A. Macedo, a A. M. Oliveira-Brett, „Electroanalytical Determination of Codeine in Pharmaceutical Preparations", *Anal. Lett.*, roč. 35, č. 15, s. 2487–2498, 2002.
- [28] J. M. P. J. Garrido, C. Delerue-Matos, F. Borges, T. R. A. Macedo, a A. M. Oliveira-Brett, „Electrochemical Determination of Dihydrocodeine in Pharmaceuticals", *Anal. Lett.*, roč. 36, č. 3, s. 577–590, 2003.
- [29] H. K. Chan a A. G. Fogg, „Flow-injection determination of meptazinol with electrochemical detection", *Anal. Chim. Acta*, roč. 111, s. 281–285, pro. 1979.
- [30] G. B. Martin a G. A. Rechnitz, „Electrochemical determination of allopurinol based on its interaction with xanthine oxidase", *Anal. Chim. Acta*, roč. 237, s. 91–98, 1990.
- [31] M. Neumayr, O. Friedrich, G. Sontag, a F. Pittner, „Flow-injection analysis with electrochemical detection for determination of salicylic acid in pharmaceutical preparations", *Anal. Chim. Acta*, roč. 273, č. 1–2, s. 469–475, nor 1993.

- [32] A. B. Florou, M. I. Prodromidis, M. I. Karayannis, a S. M. Tzouwara-Karayanni, „Flow electrochemical determination of ascorbic acid in real samples using a glassy carbon electrode modified with a cellulose acetate film bearing 2,6-dichlorophenolindophenol", *Anal. Chim. Acta*, roč. 409, č. 1–2, s. 113–121, bře. 2000.
- [33] T. N. R. Bulusu V. Sarada, „Electrochemical Detection of Serotonin Using Conductive Diamond Electrodes", *Chem. Lett. - CHEM LETT*, č. 11, s. 1213–1214, 1999.
- [34] K. S. Kwok-Keung Shiu, „Selective Determination of Vitamin B2 at Electrochemically Activated Glassy Carbon Electrode", *Electroanalysis*, roč. 12, č. 2, s. 134 – 139, 2000.
- [35] W. D. Basson a J. F. van Staden, „Direct determination of calcium in milk on a non-segmented continuous-flow system", *Analyst*, roč. 104, č. 1238, s. 419–424, led. 1979.
- [36] T. Yao, R. Akasaka, a T. Wasa, „Amperometric determination of lactose in human and cow's milk using a flow-injection system with some immobilized enzyme reactors", *Electroanalysis*, roč. 1, č. 5, s. 413–416, zář. 1989.
- [37] M. Baumgartner, M. Flöck, P. Winter, a et al., „Evaluation of flow injection analysis for determination of urea in sheep's and cow's milk", *Acta Vet. Hung.*, roč. 50, č. 3, s. 263–271, čvc. 2002.
- [38] L. Alamestrand, D. Jagner, a L. Renman, „Determination of cadmium, lead and copper in milk and milk powder by means of flow potentiometric stripping analysis", *Talanta*, roč. 33, č. 12, s. 991–995, pro. 1986.
- [39] J. F. C. Lima, C. Delerue-Matos, a M. C. V. F. Vaz, „Automation of iron and copper determination in milks using FIA systems and colourimetric detection", *Food Chem.*, roč. 62, č. 1, s. 117–121, kvě. 1998.
- [40] M. A. Herrero, J. Atienza, A. Maquieira, a R. Puchades, „Flow injection spectrophotometric determination of calcium, phosphate and chloride ions in milk", *The Analyst*, roč. 117, č. 6, s. 1019–1024, čer. 1992.
- [41] J. F. Cerdán, M. Peris-Tortajada, R. Puchades, a A. Maquieira, „Automation of the determination of hydrogen peroxide, dichromate, formaldehyde and bicarbonate in

- milk by flow injection analysis", *Fresenius J. Anal. Chem.*, roč. 344, č. 3, s. 123–127, bře. 1992.
- [42] M. Pistón, A. Mollo, M. Knochen, a s, „A Simple Automated Method for the Determination of Nitrate and Nitrite in Infant Formula and Milk Powder Using Sequential Injection Analysis", *J. Anal. Methods Chem.*, roč. 2011, zář. 2011.
- [43] S. Jadoon, A. Waseem, M. Yaqoob, a A. Nabi, „Flow injection spectrophotometric determination of vitamin E in pharmaceuticals, milk powder and blood serum using potassium ferricyanide–Fe(III) detection system", *Chin. Chem. Lett.*, roč. 21, č. 6, s. 712–715, erven 2010.
- [44] J. Gilbert a E. A. Vargas, „Advances in Sampling and Analysis for Aflatoxins in Food and Animal Feed", *Toxin Rev.*, roč. 22, č. 2–3, s. 381–422, led. 2003.
- [45] J. F. van Staden a T. A. van der Merwe, „On-line monitoring of nitrite in fertilizer process streams, natural and waste water effluents with sequential injection analysis", *Microchim. Acta*, roč. 129, č. 1–2, s. 33–39, bře. 1998.
- [46] J. F. van Staden a R. E. Taljaard, „On-line monitoring of phosphate in natural water and effluent streams using sequential injection analysis", *Microchim. Acta*, roč. 128, č. 3–4, s. 223–228, zář. 1998.
- [47] J. F. van Staden a A. Botha, „Spectrophotometric determination of thiocyanate by sequential injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, roč. 403, č. 1–2, s. 279–286, led. 2000.
- [48] C. Wyganowski, S. Motomizu, a K. Tōei, „Spectrophotometric determination of aluminium with bromopyrogallol red and a quaternary ammonium salt: Determination of aluminium in river water", *Microchim. Acta*, roč. 79, č. 1–2, s. 55–64, led. 1983.
- [49] J. F. van Staden a A. Botha, „Spectrophotometric determination of Cu(II) with sequential injection analysis", *Talanta*, roč. 49, č. 5, s. 1099–1108, srp. 1999.
- [50] J. F. van Staden a R. E. Taljaard, „Determination of calcium in water, urine and pharmaceutical samples by sequential injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, roč. 323, č. 1–3, s. 75–85, dub. 1996.
- [51] G. de Armas, A. Cladera, E. Becerra, J. M. Estela, a V. Cerdà, „Fluorimetric sequential injection determination of magnesium using 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid in a micellar medium", *Talanta*, roč. 52, č. 1, s. 77–82, kvě. 2000.

- [52] J. F. van Staden a R. E. Taljaard, „Determination of ammonia in water and industrial effluent streams with the indophenol blue method using sequential injection analysis", *Anal. Chim. Acta*, roč. 344, č. 3, s. 281–289, erven 1997.
- [53] F. Maya, J. M. Estela, a V. Cerdà, „Flow analysis techniques as effective tools for the improved environmental analysis of organic compounds expressed as total indices", *Talanta*, roč. 81, č. 1–2, s. 1–8, dub. 2010.
- [54] R. T. Echols, R. R. James, a J. H. Aldstadt, „Determination of Primary Explosive Azides in Environmental Samples by Sequential Injection Amperometry", *Analyst*, roč. 122, č. 4, s. 315–319, led. 1997.
- [55] C. L. da Silva a J. C. Masini, „Determination of Cu, Pb, Cd, and Zn in river sediment extracts by sequential injection anodic stripping voltammetry with thin mercury film electrode", *Fresenius J. Anal. Chem.*, roč. 367, č. 3, s. 284–290, čer. 2000.
- [56] R. Wolf, F. Reiff, R. Wittmann, a J. Butzke, „Process for the preparation of riboflavin", 435515819-řij-1982.
- [57] R. D. Barlow, R. B. Stone, N. J. Wald, a E. V. J. Puhakainen, „The direct barbituric acid assay for nicotine metabolites in urine: A simple colorimetric test for the routine assessment of smoking status and cigarette smoke intake", *Clin. Chim. Acta*, roč. 165, č. 1, s. 45–52, kvě. 1987.
- [58] N. A. Mohamed, A. A. Yassin, K. D. Khalil, a M. W. Sabaa, „Organic thermal stabilizers for rigid poly(vinyl chloride) I. Barbituric and thiobarbituric acids", *Polym. Degrad. Stab.*, roč. 70, č. 1, s. 5–10, 2000.
- [59] R. Bartzatt, „Determination of barbituric acid, utilizing a rapid and simple colorimetric assay", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, roč. 29, č. 5, s. 909–915, ervenec 2002.
- [60] R. F. Skinner, E. G. Gallaher, a D. B. Predmore, „Rapid determination of barbiturates by gas chromatography-mass spectrometry", *Anal. Chem.*, roč. 45, č. 3, s. 574–576, bře. 1973.
- [61] P. Fernández García-Borregón, M. Lores, a R. Cela, „Analysis of barbiturates by micro-high-performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization", *J. Chromatogr. A*, roč. 870, č. 1–2, s. 39–44, nor 2000.

- [62] T. You, X. Yang*, a E. Wang, „Determination of barbituric acid and 2-thiobarbituric acid with end-column electrochemical detection by capillary electrophoresis", *Talanta*, roč. 51, č. 6, s. 1213–1218, kvě. 2000.
- [63] D. Nematollahi a M. Hesari, „Electrochemical study of iodide in the presence of barbituric acid. Application to coulometric titration of barbituric acid", *Microchem. J.*, roč. 70, č. 1, s. 7–11, zář. 2001.
- [64] J. Xi, X. Ai, a Z. He, „Chemiluminescence determination of barbituric acid using Ru(phen)₃²⁺–Ce(IV) system", *Talanta*, roč. 59, č. 5, s. 1045–1051, dub. 2003.
- [65] A. R. Zarei a F. Gholamian, „Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for spectrophotometric determination of barbituric acid in pharmaceutical formulation and biological samples", *Anal. Biochem.*, roč. 412, č. 2, s. 224–228, kvě. 2011.
- [66] A. A. Ensafi a H. Movahedinia, „Spectrophotometric reaction rate method for determination of barbituric acid by inhibition of the hydrochloric acid–bromate reaction", *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, roč. 59, č. 13, s. 3159–3164, lis. 2003.
- [67] R. Iqbal a S. M. Yousaf, „Spectrophotometric Determination of Barbituric Acid with Sodium Nitrite", *J.-Chem. Soc. Pak.*, roč. 14, s. 187–187, 1992.
- [68] B. B. Ibraheem, „Spectrophotometric Determination of Barbituric Acid by Coupling with Diazotized Nitroanilines", *Raf J Sci*, roč. 22, č. 1, s. 56–71, 2011.
- [69] H. A. A. Medien, „New method for spectrophotometric determination of quinones and barbituric acid through their reaction. A kinetic study", *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, roč. 52, č. 12, s. 1679–1684, lis. 1996.
- [70] A. K. Patel, P. S. Sharma, a B. B. Prasad, „Voltammetric sensor for barbituric acid based on a sol–gel derivated molecularly imprinted polymer brush grafted to graphite electrode", *Int. J. Pharm.*, roč. 371, č. 1–2, s. 47–55, dub. 2009.
- [71] T. Aman, I.-U. Khan, a Z. Parveen, „Spectrophotometric Determination of Barbituric Acid", *Anal. Lett.*, roč. 30, č. 15, s. 2765–2777, 1997.
- [72] H. A. A. Medien a A. A. Zahran, „Spectrophotometric kinetic and determination of quinones and barbiturates", *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, roč. 57, č. 12, s. 2505–2511, jen 2001.
- [73] J. McMurry „Organická chemie" Brno, VUTIUM 2007

[74] D. F. BOLTZ, „Colorimetric determination of nonmetals.", s. 372 pp., 1958.