

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Eliška Nováková

KONSTRUKCE PRŮTOKOVÉ DETEKČNÍ CELY PRO NEFELOMETRICKÁ
STANOVENÍ A JEJÍ APLIKACE PRO STANOVENÍ SÍRANŮ A PROMETHAZINU

Design and Construction of Flow-through Detection Cell for Nephelometric
Determinations and Its Application for Determination of Sulphate and Promethazine

Diplomová práce

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

Praha 2013

Prohlášení

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

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

V Praze dne 15. srpna 2013.

.....

Podpis

Poděkování

Tímto děkuji svému školiteli RNDr. Jakubovi Hraníčkoví, Ph.D. za cenné kritické připomínky a odborné rady. Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za odbornou pomoc s konstrukcí detekční cely, výběrem elektronických součástí a tvorbou ovládání detektoru.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu a trpělivost, jimiž mi usnadnili vznik této práce.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývala konstrukcí a testováním průtokové nefelometrické detekční cely založené na fotodiodě jako sensoru a laserovém zdroji záření.

Funkčnost zkonstruovaného zařízení byla prokázána na stanovení síranů srážením s chloridem barnatým průtokovou injekční analýzou a bylo dosaženo výsledků srovnatelných se spektrometrickou detekcí. Dále bylo zařízení úspěšně aplikováno pro stanovení promethazinu na základě tvorby jeho špatně rozpustného iontového asociátu s bromofenolovou modří.

Klíčová slova:

Nefelometrické stanovení, průtoková injekční analýza, laserový zdroj záření, optický sensor, sírany, promethazin

Abstract

The aim of this thesis has been design, construction and application of a flow-through nephelometric detection cell based on photodiode as a sensor and a laser source.

The developed device has been tested and its function has been proven on the determination of sulphate by flow injection analysis with nephelometric detection after precipitation by barium chloride. The results achieved were comparable with those obtained by spectrometric detection. Furthermore, the device has been successfully applied to the determination of promethazine based on formation of its insoluble ion associate with bromophenol blue.

Keywords:

Nephelometric determination, flow injection analysis, laser source, optical sensor, sulphate, promethazine

Obsah

1	Úvod	11
1.1	Cíl práce.....	11
2	Teoretická část	12
2.1	Průtokové metody analýzy.....	12
2.1.1	Kontinuální průtoková analýza.....	12
2.1.2	Průtoková injekční analýza.....	13
2.1.3	Sekvenční injekční analýza	14
2.1.4	Odvozené průtokové metody	15
2.2	Metody detekce založené na rozptylu záření	16
2.2.1	Principy rozptylu záření.....	16
2.2.2	Nefelometrie a turbidimetrie	17
2.2.3	Analytické využití nefelometrie a turbidimetrie	18
2.2.4	Vliv parametrů stanovení na rozptyl záření	19
2.3	Stanovení síranů.....	20
2.3.1	Výskyt a význam	20
2.3.2	Metody stanovení	20
2.4	Stanovení promethazinu	21
2.4.1	Význam	21
2.4.2	Metody stanovení	21
2.5	Statistické vyhodnocení	22
2.5.1	Měření.....	22
2.5.2	Odhad střední hodnoty	22
2.5.3	Kalibrace.....	23
2.5.4	Šum.....	24
2.5.5	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	24
2.5.6	Opakovatelnost	24
3	Experimentální část.....	25
3.1	Použité chemikálie	25
3.2	Reálné vzorky	25

3.3	Použitá zařízení	26
3.4	Aparatura FIA	26
3.5	Průtoková cela detektoru.....	27
3.6	Zdroje záření	28
3.7	Snímač záření	29
3.8	Schéma napájení laserových diod.....	30
3.9	Mechanismus sběru dat a ovládání detektoru	31
3.10	Použitý software.....	32
4	Výsledky a diskuze.....	33
4.1	Optimalizace průtokové detekční cely.....	33
4.1.1	Stabilita použitých zdrojů záření	33
4.1.2	Závislost odezvy na vzdálenosti zdroje a snímače záření.....	35
4.1.3	Závislost odezvy na vzdálenosti sensoru od křemenné kapiláry.....	36
4.1.4	Volba vlnové délky	37
4.2	Optimalizace stanovení SO_4^{2-} srážením Ba^{2+} v módu FIA	38
4.2.1	Optimalizace koncentrace srážecího činidla	38
4.2.2	Optimalizace koncentrace stabilizátoru (PVA).....	40
4.2.3	Optimalizace délky reakční cívky.....	42
4.2.4	Optimalizace dávkovaného objemu vzorku a průtokové rychlosti činidla.....	43
4.2.5	Vliv vlnové délky zdroje záření na citlivost detekce.....	43
4.2.5.1	Kalibrace a základní charakteristiky stanovení SO_4^{2-} , $\lambda = 653 \text{ nm}$	43
4.2.5.2	Optimalizace koncentrace PVA pro $\lambda = 783 \text{ nm}$	45
4.2.5.3	Kalibrace a základní charakteristiky stanovení SO_4^{2-} , $\lambda = 783 \text{ nm}$	45
4.2.5.4	Optimalizace koncentrace PVA pro $\lambda = 531 \text{ nm}$	46
4.2.5.5	Kalibrace a základní charakteristiky stanovení SO_4^{2-} , $\lambda = 531 \text{ nm}$	47
4.2.5.6	Optimalizace koncentrace PVA pro $\lambda = 403 \text{ nm}$	48
4.2.5.7	Kalibrace a základní charakteristiky stanovení SO_4^{2-} , $\lambda = 403 \text{ nm}$	49
4.3	Srovnání dosažených výsledků s literaturou	51
4.4	Stanovení SO_4^{2-} v reálných vzorcích metodou FIA s nefelometrickou detekcí.....	52
4.5	Stanovení promethazinu metodou FIA s nefelometrickou detekcí	53
4.5.1	Optimalizace pH a vlnové délky	54
4.5.2	Optimalizace koncentrace chloridu draselného.....	55
4.5.3	Optimalizace koncentrace bromfenolové modři	56
4.5.4	Optimalizace koncentrace polyvinylalkoholu	57

4.5.5	Optimalizace délky reakční cívky.....	58
4.5.6	Optimalizace dávkovaného objemu vzorku a průtokové rychlosti čidla.....	59
4.5.7	Kalibrace a základní charakteristiky stanovení promethazinu	60
4.6	Stanovení reálných vzorků lékových forem promethazinu metodou FIA s nefelometrickou detekcí.....	62
4.6.1	Stanovení promethazinu metodou UV-spektrometrie	62
4.6.2	Stanovení promethazinu v reálných vzorcích metodou FIA s nefelometrickou detekcí	63
5	Závěr.....	65
6	Literatura.....	66

Seznam zkratek a symbolů

BI	bead injection
BPB	bromfenolová modř
c	koncentrace
c_A	koncentrace analytu
c_{Ba}	koncentrace barnatých iontů v roztoku činidla
c_{BPB}	koncentrace bromfenolové modři v roztoku činidla
c_{KCl}	koncentrace chloridu sodného v roztoku činidla
c_{PVA}	koncentrace polyvinylalkoholu v roztoku činidla
CFA	kontinuální průtoková analýza
d	vzdálenost
DAQ	digitálně analogový převodník
DR	dynamický rozsah metody
d_{RC}	délka reakční cívky
E_e	zářivý tok, při kterém výrobce testoval parametry sensoru
F	průtoková rychlost činidla
FIA	průtoková injekční analýza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I	intenzita záření po průchodu prostředím
I_0	intenzita záření před průchodem prostředím
ID	vnitřní průměr
k_n	tabelovaný koeficient pro výpočet směrodatné odchylky z rozpětí
LDR	lineární dynamický rozsah metody
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovení
λ	vlnová délka
λ_{max}	vlnová délka maxima
λ_p	vlnová délka, při které výrobce testoval parametry sensoru
μ -TAS	mikrofluidní systém
n	počet měření
N	počet kvant záření v daném časovém intervalu (spektrometr Ocean Optics HR 4000)

OD	vnější průměr
PCI	typ sběrnice pro připojení periférií k základní desce počítače
PVA	polyvinylalkohol
R	koeficient korelace
R	rozpětí
R_L	odpor mezi výstupem a uzemněním sensoru
S	signál
s	směrodatná odchylka měření
SIA	sekvenční injekční analýza
s_r	relativní směrodatná odchylka měření
σ^2	rozptyl měření
T	transmitance
T_A	pracovní teplota sensoru
U	napětí
UV	ultrafialová oblast vlnových délek záření
V	dávkovaný objem vzorku
V_{DD}	napájecí napětí sensoru
V_O	napětí na výstupu ze sensoru
\bar{x}	aritmetický průměr naměřených hodnot
\tilde{x}	medián naměřených hodnot

1 Úvod

1.1 Cíl práce

Podstatnou výzvou analytických laboratoří jsou finanční investice spojené s pořízováním a provozem instrumentace. Jedním z možných přístupů je doplňkové používání zařízení sestavených z elektronických součástek přímo v laboratoři. Jednoduchý turbidimetrický nebo nefelometrický detektor založený na laserovém modulu a fotodiodě může, například, nahradit spektrometrický detektor, který je pro měření rozptylu záření používán nejčastěji.

Cílem této diplomové práce bylo zkonstruovat miniaturizovaný průtokový detekční systém pro nefelometrická měření založený na laserovém zdroji záření a aplikovat ho pro stanovení síranů a léčiva promethazinu průtokovou injekční analýzou. Záměrem bylo získat zařízení, které by poskytovalo výsledky srovnatelné s použitím komerčního zdroje záření a spektrometru při mnohem nižších nákladech.

Stanovení síranů bylo jako modelový systém pro ověření funkce zařízení vybráno z několika důvodů. Jedná se o běžný, zároveň ale významný analyt nacházející se, mimo jiné, ve vodných vzorcích. Jeho stanovení různými analytickými metodami již bylo mnohokrát publikováno, takže existuje řada literárních odkazů pro porovnání výsledků získaných v této práci.

Jako druhý analyt byla zvolena organická látka promethazin, léčivo ze skupiny fenothiazinů. Jedná se o H_1 antihistaminikum s výraznými tlumivými účinky na centrální nervový systém. Toto léčivo lze mimo jiné stanovit turbidimetricky prostřednictvím tvorby špatně rozpustného iontového asociátu s některými acidobazickými indikátory. [1]

2 Teoretická část

2.1 Průtokové metody analýzy

Průtokové metody analýzy jsou jednou z moderních instrumentálních technik umožňujících rychlé automatizované analýzy velkého množství vzorků. Z tohoto důvodu se uplatňují např. ve farmaceutickém průmyslu. [2]

Vzorek je při nich dávkován do proudu kapaliny, která ho transportuje z místa nastříku do detektoru a následně do odpadu. Nosným tokem může být činidlo, do kterého je analyt nastříknut, nebo může sestávat ze zón činidel a analytů. V každém případě dochází k reakci mezi analytem a činidlem za vzniku detegovatelného produktu. Protože všechny vzorky se nacházejí v jednom analytickém systému, musí být zajištěno, aby nedocházelo k jejich vzájemné kontaminaci. Význam tohoto požadavku vzrůstá s rostoucí frekvencí zpracovávaných vzorků za jednotku času.

Automatizované analytické techniky poskytují mnoho výhod. Mimo jiné šetří při analýzách velkých množství vzorků čas a náklady. Zároveň automatický analyzátor produkuje reprodukovatelnější výsledky než analytik provádějící manuální analýzu. Uzavřený systém navíc rozšířil možnosti analýzy o používání nestabilních činidel; jako příklad lze uvést on-line generování bromu z bromidu v kyselém prostředí reakčního média. Dále je minimalizován kontakt analytika s případnými zdraví škodlivými činidly, jejichž spotřeba, a tudíž i množství produkovaného odpadu, je oproti manuálním analýzám nižší. Tím jsou automatizované metody také šetrnější vůči životnímu prostředí. [3]

2.1.1 Kontinuální průtoková analýza

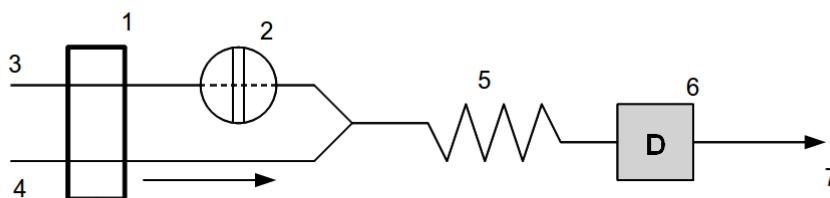
První metodou průtokové analýzy byla kontinuální průtoková analýza (CFA), poprvé publikovaná v roce 1957, někdy označovaná také jako segmentová průtoková analýza (SFA). Kontinuální průtoková analýza se ve své době prosadila v klinických a oceánografických laboratořích zpracovávajících velké objemy vzorků, ovšem později bylo od jejího užívání upuštěno. Princip CFA spočívá v nasávání vzorků oddělených bublinami plynu do proudu reakčního činidla. Bubliny zajišťují míchání reakční směsi a zabraňují kontaminaci vzorků mezi sebou. Nicméně musí být po proběhnutí reakce

mezi analytem a činidlem před vstupem do detektoru odstraněny. Nevýhodou této techniky je pulzování toku způsobené stlačitelností plynu. Od následujících průtokových technik se zásadně odlišuje tím, že stanovení (odečet velikosti signálu) probíhá až po dosažení rovnovážného stavu. [4–6]

2.1.2 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (FIA) byla poprvé navržena Růžičkou a Hansenem roku 1975 ve spojení s fotometrickou a elektrochemickou detekcí. [7] Zavedení časově odstupňovaného dávkování vzorku do nosného proudu bez použití vzduchových bublin významně zjednodušilo rutinní analýzy, aniž by přitom došlo k vzájemné kontaminaci vzorků.

V principu je FIA založena na nastříknutí definovaného objemu vzorku do pohybujícího se neděleného toku reakčního činidla. [8] Nejjednodušší FIA uspořádání tak sestává z peristaltické pumpy pohánějící nosný tok, dávkovací ventilu, reakční smyčky a vhodného průtokového detektoru, jak zobrazuje schéma na obr. 2.1. Analyt lze dávkovat buď přímo do proudu činidla anebo do proudu nosného toku, ke kterému je činidlo přimícháváno. Druhý postup umožňuje lepší promíchání zóny činidla a analytu, ale může vyžadovat vyšší koncentraci činidla.



Obr. 2.1: Schéma uspořádání FIA aparatury s činidlem přimíchávaným k nosnému toku
1 – pumpa, 2 – dávkovací ventil, 3 – nosný tok, 4 – činidlo, 5 – reakční cívka, 6 –
detektor, 7 - odpad

Se zavedením FIA byla poprvé uplatněna myšlenka provádění analýz

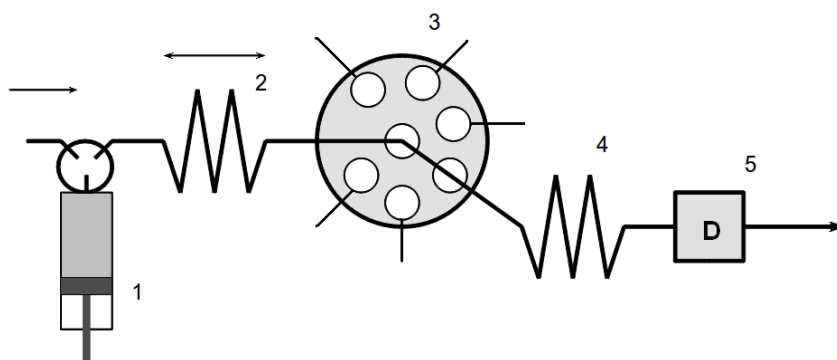
před dosažením rovnovážného stavu, což si vyžádalo používání transportního vedení o průměrech, které umožňují laminární tok všech kapalin v systému, a zajištění opakovatelných experimentálních podmínek stanovení pro všechny vzorky i standardy. Po nadávkování vzorku do činidla dojde k částečnému promísení zón vlivem difúze a následně k chemické reakci. Získaný záznam signálu má tvar píku, jehož výška v maximu je úměrná koncentraci vzorku a je využívána jako analytická odezva. Výsledný tvar zóny je kombinací axiální a radiální difúze; velikost difúze je podmíněna objemem vzorku, průtokovou rychlostí a délkou transportního vedení. [3,9,10] Výhodným důsledkem detekce reakčních produktů před dosažením rovnováhy je možnost využití souhry termodynamiky a kinetiky reakce. Kinetickou diskriminaci lze využít například pro omezení interferencí nebo pro speciální analýzu. [11] Měření signálu před dosažením rovnovážného stavu reakce umožnilo i detekci bio- a chemiluminiscence, která v předchozím průtokovém uspořádání nebyla možná. [12]

2.1.3 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (SIA) byla vyvinuta během odstraňování nedokonalostí průtokové injekční analýzy, přičemž u jejího zrodu stál opět J. Růžička. První článek popisující koncepci této techniky byl publikován v roce 1990. [13] Její zavedení umožnilo další snížení spotřeby činidel při menších nárocích na údržbu systému, a tudíž se SIA více prosadila v komerční sféře. Ovšem jejím hlavním přínosem byla snadná změna parametrů stanovení bez nutnosti manuálně přestavovat aparaturu.

Klíčovým prvkem SIA uspořádání je obrácení směru nosného toku. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně nasáty do jednokanálového systému pomocí selekčního ventilu, a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k efektivnějšímu promísení vzorku a činidla, a vzniklý produkt je následně dopraven do detektoru. [14] Nahrazení peristaltické pumpy pístovou pumpou snížilo pulzování toku, ovšem vyžádalo si používání odplyněných roztoků. [15] Vniknutí činidel a vzorků do čerpadla brání zařazení reakční (zadržovací) cívky mezi selekční ventil a čerpadlo. Podmínkou úspěšné analýzy v SIA uspořádání je přesná synchronizace naprogramovaných pohybů pístového čerpadla a přepínání selekčního ventilu. Zjednodušení aparatury je tedy provázáno většími nároky na řízení celého systému

počítačovou technikou. [14,16,17] Schematicky je uspořádání SIA znázorněno na obr. 2.2.



Obr. 2.2: Schéma uspořádání aparatury pro SIA

1 – pístová pumpa, 2 – reakční (zadržovací) cívka, 3 – selekční ventil, 4 – druhá reakční cívka (používaná u pomalu probíhajících reakcí), 5 - detektor

2.1.4 Odvozené průtokové metody

Současnou tendencí v oblasti průtokových analýz je snaha o integraci všech operací se vzorkem včetně prekoncentračních kroků do uzavřeného analytického systému. Zde se průtokové techniky inspirovaly chromatografií. [18] V módu FIA je možné přímo zařazení kolony se sorbentem, v módu SIA se rozvinul tzv. „bead injection“ (BI) protokol. [19] BI-SIA využívá suspenze pevných částic, které mohou sloužit jako sorbent pro zakoncentrování analytu nebo jako nosiče reaktantů. Toto uspořádání je obzvláště vhodné pro vysoce citlivá imunochemická stanovení. [20,21]

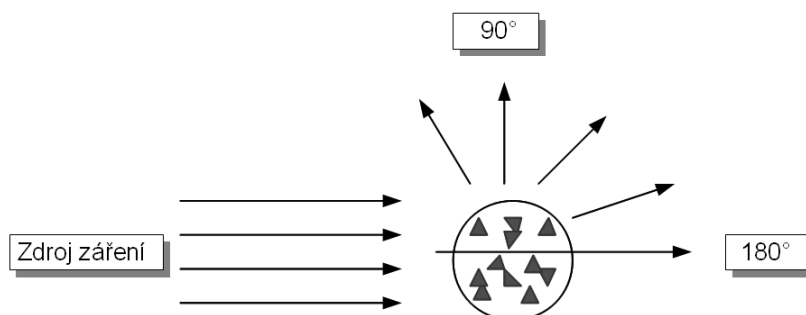
Miniaturizace se projevila v oblasti průtokových technik jako tzv. mikrofluidní systémy (μ -TAS; z anglického pojmenování Micro Total Analysis System) někdy označované jako Lab-on-a-chip, které spočívají ve zmenšení objemu průtokového systému. Tyto systémy se vyvíjejí především pro analýzy z oblasti životního prostředí jako automatická monitorovací zařízení. Jejich výhodou je snadná přenosnost; pokud nevyžadují údržbu, pak je ovládání a sběr dat v současnosti možné přes internet. Naopak slabinou je zatím velmi obtížná integrace preanalytických kroků

např. zakoncentrování analytu a dále komplikace vyplývající z práce s komplexní maticí obsahující např. i pevné látky. V takovém případě reálně hrozí i ucpání průtokových obvodů, které jsou dimenzované na objemy nl či dokonce pl. [11,22,23]

2.2 Metody detekce založené na rozptylu záření

2.2.1 Principy rozptylu záření

Nefelometrie a turbidimetrie jsou příbuzné analytické techniky založené na rozptylu záření v tekutině (tj. kapalině nebo plynu) obsahující rozptýlené částičky pevné hmoty. Při průchodu záření průsvitným prostředím s pevnými částicemi je část záření rozptýlena ve všech směrech a pouze část projde skrz prostředí. Schematicky je tento děj znázorněn na obr. 2.3.



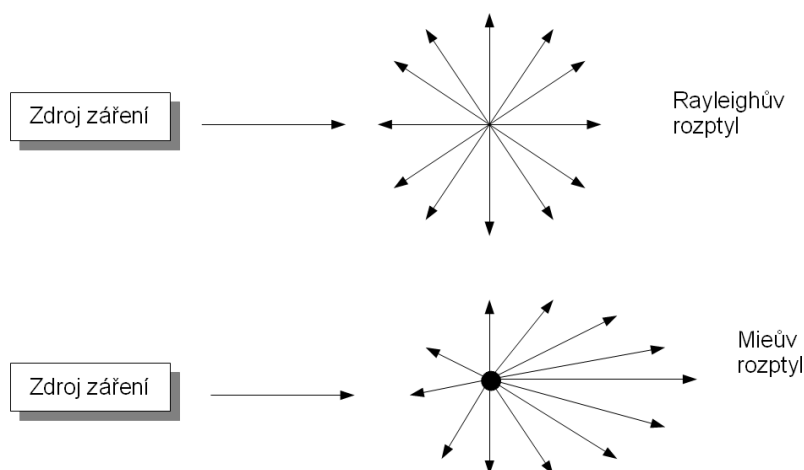
Obr. 2.3: Rozptyl záření na pevných částicích

Převažující směr rozptylu závisí především na poměru mezi velikostí a tvarem rozptylujících částic a vlnovou délkou záření. Pro monochromatický paprsek o vlnové délce λ platí, že k rozptylu bude docházet na částicích, jejichž největší rozměr nepřesáhne $3/2 \lambda$. Naopak u větších částic se uplatňuje především odraz a ohyb. Pro měření intenzity zákalu v ultrafialové a viditelné oblasti by se velikost suspendovaných částic měla pohybovat v oblasti 0,1-1 μm .

Elastický rozptyl se dělí do dvou kategorií. Tzv. Rayleighův rozptyl nastává

u částic, jejichž největší rozměr nepřesahuje 5% vlnové délky rozptylovaného záření. V takovém případě je záření rozptylováno rovnoměrně ve všech směrech a pro jeho intenzitu platí, že je závislá na čtvrté mocnině frekvence ($I \sim \nu^4$). Záření o kratších vlnových délkách je tedy rozptylováno výrazně intenzivněji. Se vzrůstajícím poměrem velikosti částice a vlnové délky začne převažovat tzv. Mieův rozptyl s charakteristickým směrem rozptylu vpřed. Při elastickém rozptylu nedochází k výměně energie mezi zářením a hmotou. Záření je vyzářeno na stejné vlnové délce, jako byla vlnová délka záření absorbovaného; dochází tedy pouze ke změně směru jeho pohybu v prostoru. [24]

Schéma znázorňující převažující směr rozptylu záření pro dvě různé velikosti částic zobrazuje obr. 2.4.



Obr. 2.4: Závislost převažujícího směru rozptylu záření na velikosti částic

Upraveno dle [25]

2.2.2 Nefelometrie a turbidimetrie

Principiálně se tyto dvě techniky liší svým geometrickým uspořádáním. Základem turbidimetrických měření je pokles intenzity prošlého záření a detektor je tedy zařazen ve směru průchodu paprsku (tedy v optické ose zdroje záření) za rozptylujícím prostředím obdobně jako při absorpční spektrometrii. V nefelometrii je detektor umístěn mimo dráhu paprsku, nejčastěji v úhlu 90° , protože tato technika

je založena na měření intenzity rozptýleného záření. Je tedy možná ji přirovnat k měření fluorescence. Volba mezi nefelometrickým a turbidimetrickým uspořádáním závisí nejčastěji na koncentraci rozptylujících částic. Při velkém rozptylu způsobeném přítomností velkého množství částic poskytuje lepší výsledky turbidimetrie, naopak nefelometrie je preferována při nízkých koncentracích, protože je snazší měřit nízký rozptyl proti černému pozadí než malý pokles intenzity prošlého záření. [26,27]

2.2.3 Analytické využití nefelometrie a turbidimetrie

Jako metoda určování koncentrace je měření zákalu turbidimetricky i nefelometricky rutinně aplikováno v praxi pro imunochemická stanovení proteinů v klinických laboratořích. [28–30] V mikrobiologických laboratořích jsou nefelometrie a turbidimetrie využívány pro stanovení bakteriální biomasy. [31,32] V analytické chemii převládají aplikace pro stanovení anorganických iontů; jmenovitě chloridů [33,34] a síranů [35], dále fosforečnanů, draslíku a dusíku. Ovšem metody založené na rozptylu záření byly aplikovány i pro stanovení organických látek např. některých léčiv. [26]

Kromě stanovování koncentrace lze tyto techniky využít i v mnoha dalších oblastech. Navržena byla například metoda studia bobtnání polymerů v prostředí hydrogelové membrány prostřednictvím turbidimetrie. [36] Dále jsou využívány při různých studiích kinetiky rozpouštění málo rozpustných sloučenin; jako příklad lze uvést studium kinetiky rozpouštění některých anorganických hydroxidů (Cr^{III} a Ni^{II}). [37] Ve farmaceutických laboratořích lze využít metody založené na rozptylu záření pro sledování rozpustnosti při screeningu potenciálně účinných látek během vývoje nových léčiv. [38]

Při kombinaci turbidimetrických a nefelometrických technik s průtokovými metodami analýzy nastává problém s omezením usazování sraženiny na vnitřním povrchu aparatury. To vede kromě carry-over efektu (kontaminace z předchozí analýzy) ke změnám průtokové rychlosti a případně i vzniku turbulentního toku, které výrazně zhoršují reprodukovatelnost výsledků. V extrémním případě může dojít k ucpání vedení. Řešením je používání stabilizujících látek pokrývajících povrch sraženiny (například polyvinylalkoholu, polyethylenglykolu, želatiny anebo jejich kombinací) a zařazení

promývacích kroků. Udává se, že pokrytí sraženiny stabilizátorem zabraňuje koagulaci částic sraženiny ve větší částice, a tedy zajišťuje jejich reprodukovatelnější rozměry, a dále brání jejich usazování na vnitřním povrchu aparatury.

2.2.4 Vliv parametrů stanovení na rozptyl záření

Intenzita záření rozptýleného pod libovolným úhlem závisí mimo jiné na koncentraci částic, které stojí paprsku v cestě, jejich velikosti a tvaru a na zvolené vlnové délce a intenzitě záření. [26]

Turbidimetrie je svým uspořádáním analogií měření absorpce záření. Závislost intenzity prošlého záření na intenzitě záření vstupujícího je nelineární; vyjádřená jako transmitance nabývá tvaru:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad , \quad (1)$$

kde T je transmitance, I intenzita prošlého a I_0 intenzita vstupního záření. Z uvedeného vztahu vyplývá, že zvýšení intenzity vstupního záření nijak neovlivní citlivost analýzy, protože poměr intenzit zůstane konstantní.

V praxi se používá logaritmovaný vztah vyjádřený jako závislost na koncentraci:

$$-\log T = k \cdot b \cdot c \quad , \quad (2)$$

kde b je délka optického prostředí, c koncentrace a k konstanta závislá na více faktorech, mimo jiné na vlnové délce záření, koncentraci částic a jejich velikosti a tvaru.

U nefelometrických měření byla závislost intenzity rozptýleného záření na intenzitě záření vstupního určena jako přímoúměrná:

$$I = k \cdot I_0 \cdot c \quad , \quad (3)$$

kde k je empirická konstanta systému za daných podmínek, I_0 intenzita vstupního záření a c koncentrace rozptylujících částic. V praxi to znamená, že vyšší intenzita záření zdroje bude poskytovat vyšší signál a umožní vyšší citlivost měření. [24,27]

Dále je nezbytné při volbě vlnové délky zohlednit možnou absorpci a luminiscenci matrice. Při turbidimetrickém uspořádání je nutné se vyvarovat použití vlnové délky, při které by matrice absorbovala. [24] Pokud absorbuje záření analyt, lze tuto vlastnost někdy využít pro zvýšení citlivosti. [39] U nefelometrie je naopak nežádoucí luminiscence matrice na detegované vlnové délce.

2.3 Stanovení síranů

2.3.1 Výskyt a význam

Sírany se vyskytují přirozeně v přírodě rozpustné i nerozpustné; ve druhém případě nejčastěji jako složky hornin a minerálů. Z hlediska lidské činnosti má význam především používání rozpustných síranů jako průmyslových hnojiv. Obsah síranů ve vodách se stanovuje především v pitné vodě [40] a odpadních vodách z průmyslových zařízení [41].

V současné době vzrůstá také produkce bioethanolu přidávaného do automobilového benzínu, jehož součástí mohou být množství zbytková množství síranů z výroby schopná deaktivovat katalyzátor. [42]

Další cestou vstupu síranů do životního prostředí je oxidace a hydrolyza oxidu siřičitého vznikajícího spalováním fosilních paliv. [43] Při spalovacích procesech dochází k rychlé konverzi SO_2 na SO_4^{2-} obzvláště v přítomnosti přechodných kovů (Fe, Mn, V), atmosférická oxidace může probíhat také fotochemicky. Oxid siřičitý i aerosol kyseliny sírové při vdechnutí vyvolávají bronchokonstrikci, jejíž intenzita je závislá na jejich koncentraci. [44]

2.3.2 Metody stanovení

Dříve využívanou standardní metodou pro stanovení síranů byla gravimetrická analýza po vysrážení síranových aniontů barnatými kationty, ovšem její provedení bylo zdlouhavé. [45] Mezi další dříve používané metody patří nepřímé stanovení SO_4^{2-} titrací olovnatými kationty za použití olovené iontově selektivní elektrody [46] nebo průtokové stanovení se stejnou detekcí [47]. Relativní novinkou je vývoj iontově selektivních elektrod pro síranový anion. [48] Dále je možné stanovit sírany pomocí atomové emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou. [49] V současnosti

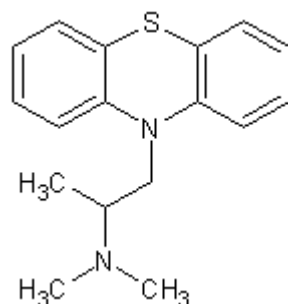
je nejrozšířenější stanovení síranů průtokovými metodami se spektrofotometrickou [42,50], spektrofluorimetrickou [43] nebo turbidimetrickou či nefelometrickou detekcí [5,41,45,51–56]. Ve směsi s dalšími ionty jsou nejběžnějšími separace a stanovení elektromigračními metodami [40] nebo iontovou chromatografií [57].

Při stanovení síranů srážením barnatými ionty v průtokovém uspořádání je k eliminaci usazování sraženiny v aparatuře doporučováno používání promývacího roztoku ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) v bazickém roztoku. [41,55,58,59]

2.4 Stanovení promethazinu

2.4.1 Význam

Promethazin (10-[2-(dimethylamin)propyl]fenothiazin) je léčivo ze skupiny fenothiazinů; jedná se o H_1 – antihistaminikum první generace s výrazným antiemetickým a sedativním účinkem. Uplatňuje se v prevenci nauzey a zvracení u kinetóz a vestibulárních poruch (např. Ménièreův syndrom). Indikován je také u migrény provázené stavu nauzey. [60] V omezené míře je stále ještě využíván i jako antialergikum. Dále může potencovat např. analgetické a sedativní účinky jiných léků. [61] Struktura promethazinu (racemátu) je uvedena na obr. 2.5.



Obr. 2.5: Chemická struktura promethazinu

2.4.2 Metody stanovení

Ve vzorcích lidského séra byl promethazin stanovován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) buď s UV [62] nebo elektrochemickou detekcí [63]. V lékových formách byl promethazin stanovován různými voltametrickými metodami a to buď samostatně [64] nebo v lékových směsích např. s chlorpromazinem [65]. Dále byl v léčivých přípravcích stanovován spektrofotometricky po reakci

s disíranem draselným [66] nebo na základě fluorescence jeho intenzivně červeně vyzařujícího komplexu s Au^{III} [67].

2.5 Statistické vyhodnocení

2.5.1 Měření

Proces měření je definován jako soubor činností, jejichž cílem je stanovit kvantitativně, tj. číselnou formou a v určitých jednotkách, hodnotu veličiny. Naměřená hodnota buď sama představuje požadovanou informaci, nebo – což je častější případ – musí být na požadovanou informaci převedena např. výpočtem z výsledků měření. [68,69]

2.5.2 Odhad střední hodnoty

Soubor výsledků (x_1, \dots, x_n) získaných n -krát provedeným měřením, lze zpravidla pokládat za náhodný výběr ze základního souboru s normálním rozdělením. Ten lze charakterizovat mírou polohy a mírou variability měřené veličiny. Mírou polohy náhodné veličiny je střední hodnota; jistá průměrná hodnota, kolem níž náhodná veličina kolísá. Mírou kolísání náhodné veličiny kolem střední hodnoty je rozptyl σ^2 , v praxi je využívána i jeho odmocnina – směrodatná odchylka. [70] Střední hodnota může být zastoupena buď aritmetickým průměrem \bar{x} nebo mediánem \tilde{x} .

Aritmetický průměr je nestranným odhadem střední hodnoty ale může být znehodnocen při existenci odlehlých pozorování v datech. [71]

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (4)$$

Medián je definován jako střední hodnota výsledků seřazených od nejnižší po nejvyšší hodnotu. V případě sudého počtu měření je mediánem aritmetický průměr dvou prostředních hodnot. Medián je vydatnějším odhadem střední hodnoty pro malý počet měření, protože eliminuje vliv odlehlého pozorování na střední hodnotu.

Odhad směrodatné odchylky s charakterizuje šířku intervalu, v němž se mohou

vyskytnout výsledky opakovaných měření v mezích náhodné chyby. Při vyhodnocování s ve velké sérii měření, z níž mohou být vyloučené odlehlé hodnoty, je nejčastěji používána výběrová směrodatná odchylka.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (5)$$

V kombinaci s mediánem se častěji používá výpočet směrodatné odchylky z rozpětí pomocí tabelovaného koeficientu k_n .

$$s = k_n \cdot R \quad (6)$$

$$R = x_{max} - x_{min} \quad (7)$$

Relativní směrodatná odchylka charakterizuje relativní hodnotu náhodné chyby vztaženou ke střední hodnotě naměřených výsledků.

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \quad (8)$$

V této práci byl pro vyhodnocení výsledků používán medián a směrodatná odchylka vypočtená z rozpětí. Každá hodnota byla změřena nejméně třikrát. Jako analytický signál byla vyhodnocována výška píku, tak jak je v technice FIA obvyklé.

2.5.3 Kalibrace

Kalibrace je empirický postup zjištění závislosti mezi měřenou veličinou a požadovanou informací. Uplatňuje se při instrumentálních analýzách, kdy je z intenzity signálu přístroje (závislá proměnná y) odečítán obsah analyzované složky (nezávisle proměnná x). [69]

Kalibrační závislost se zjišťuje proměřením odezev přístroje na standardní vzorky se známým obsahem analytu a výpočtem kalibrační rovnice vhodnou regresní analýzou. Kalibrační závislost $y = f(x)$ resp. $S = f(c)$ může mít obecný průběh, ideální je ovšem závislost lineární. V tom případě je citlivost stanovení nezávislá na koncentraci analytu a nabývá hodnoty směrnice kalibrační přímky. [72] Úplně

obecně je citlivost definována poměrem dS/dx .

V popisu lineární kalibrační závislosti se uplatňuje i pojem lineární dynamický rozsah představující rozsah koncentrací analytu, pro které platí lineární regrese. Horní mez lineárního dynamického rozsahu bývá dána měřicím systémem, spodní mezí je pak mez stanovitelnosti.

2.5.4 Šum

Šum je významným parametrem ovlivňujícím limity detekce popřípadě správnost měření. Při měření je možné se setkat s více typy šumu. Pro bílý šum platí, že součet negativních a pozitivních výchylek je v dostatečně dlouhém časovém intervalu roven nule. Šum, jehož suma je ve výsledku nenulová, je označován jako tzv. náhodný šum. Posledním typem šumu je tzv. drift, při kterém výchylky základní linie vykazují časovou závislost.

2.5.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a stanovitelnosti udávají jaká množství analytu ve vzorku je metoda schopná prokazatelně určit respektive stanovit. Dle IUPAC odpovídá mez detekce koncentraci poskytující odezvu rovnou trojnásobku směrodatné odchylky ($3s$) nulového vzorku. Je to nejmenší koncentrace analytu, kterou můžeme danou analytickou metodou s jistotou detekovat.

Mez stanovitelnosti analogicky odpovídá desetinásobku ($10s$) směrodatné odchylky nulového vzorku. Představuje nejnižší koncentraci analytu, kterou můžeme danou analytickou metodou stanovit ve vzorku s přijatelnou přesností.

V této práci byly LOD a LOQ určovány na základě směrodatné odchylky stanovení deseti těsně za sebou provedených měření nízké koncentrace vzorku.

2.5.6 Opakovatelnost

Opakovatelnost je mírou preciznosti měření a v této práci byla vyjadřována jako relativní směrodatná odchylka výsledků deseti těsně po sobě následujících měření. Preciznost za podmínek opakovatelnosti odpovídá výsledkům naměřeným v krátkém časovém úseku, na jednom přístroji a jedním analytikem.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Všechny používané chemikálie byly čistoty p.a. (kde není specifikováno) nebo vyšší. Roztoky byly ředěny deionizovanou vodou (18,2 M Ω ·cm) připravovanou zařízením MilliQ_{PLUS} (Millipore, USA).

Zásobní roztok síranu pro optimalizace byl připravován z bezvodého síranu sodného (Lachema, ČR). Pro kalibrace a stanovení reálných vzorků byl používán standardní roztok síranu 1000 mg·l⁻¹(CertiPUR, Merck, Německo)

Činidlo pro stanovení síranů bylo připravováno navážením příslušné hmotnosti PVA (Merck, Německo) a rozpuštěním v deionizované vodě za varu v cca dvou třetinách výsledného objemu. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byla přidána odpovídající navážka dihydrátu chloridu barnatého (Merck, Německo), roztok byl doplněn na požadovaný objem a přefiltrován. Koncentrace Ba²⁺ a PVA je udávána v procentech (*m/v*).

Jako standard promethazinu byl používán promethazin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA). Činidlo pro stanovení promethazinu - roztok bromfenolové modři - bylo připravováno vždy čerstvé navážením příslušné hmotnosti jeho sodné soli (Sigma-Aldrich, USA), rozpuštěním v deionizované vodě v ultrazvukové lázni a přidáním potřebného objemu zásobního roztoku KCl. Následně bylo činidlo doplněno na přesný objem, přefiltrováno a jeho pH bylo upraveno přidávkem HCl (37 %, ACS Reagent, Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci 6,0 mol·dm⁻³ po kapkách.

Zásobní roztok KCl o koncentraci 1,0·10⁻² mol·dm⁻³ byl připraven ze soli (Lachema, ČR).

3.2 Reálné vzorky

Pro stanovení síranů ve vzorcích pitné vody byly použity následující reálné vzorky: studniční voda (obec Košík, okres Nymburk), Aquila; první voda (Karlovarské minerální vody a.s.), Korunní neperlivá; příchut' meruňka (Karlovarská Korunní s.r.o.), Poděbradka přírodní; jemně perlivá (Poděbradka a.s.). Všechny vzorky balené vody byly zakoupeny v běžné obchodní síti.

Pro stanovení promethazinu byly jako vzorky použity oba léčivé přípravky schválené v České republice v humánní medicíně: Prothazin 25 mg, potahovaná tableta (UCB Pharma SA, Belgie) a Coldrex Noční léčba, sirup (GlaxoSmithKline, UK).

Postup přípravy reálných vzorků je uveden vždy u konkrétní metody stanovení.

3.3 Použitá zařízení

Pro úpravu pH roztoků byl používán pH metr Adwa AD 1000 (Adwa, Maďarsko) vybavený skleněnou kombinovanou elektrodou.

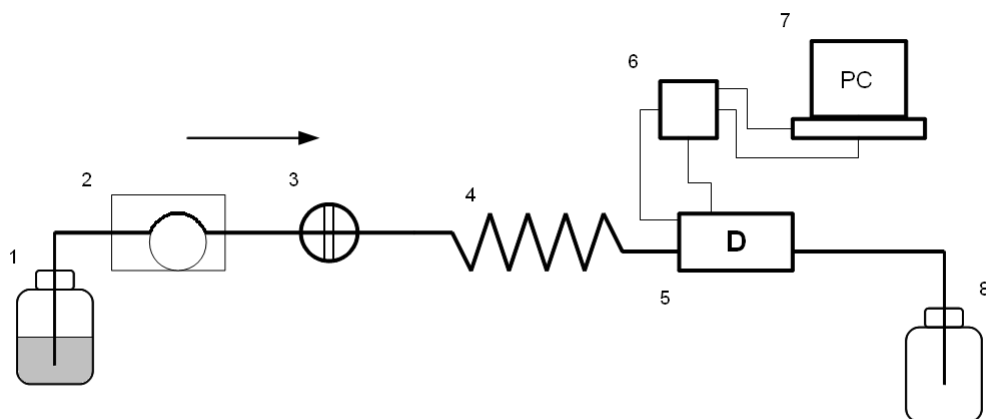
K čerpání roztoků sloužila peristaltická pumpa Masterflex L/S (Cole-Parmer, USA).

Ke změření stabilit a maxim vlnových délek laserových zdrojů záření byl použit přenosný spektrometr HR 4000 s optickým vláknem (OceanOptics, USA).

Referenční stanovení promethazinu v UV spektru byla provedena na diode-array UV-Vis spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA).

3.4 Aparatura FIA

Aparatura pro nefelometrické stanovení síranů a promethazinu technikou FIA (obr. 3.1) byla jednoduchého uspořádání s dávkováním vzorku přímo do nosného toku činidla. Sestávala z peristaltické pumpy, šesticestného dávkovacího ventilu, teflonových dávkovacích a reakčních smyček a Tygonových hadiček. Reakční cívky měly vnitřní průměr 0,5 mm.

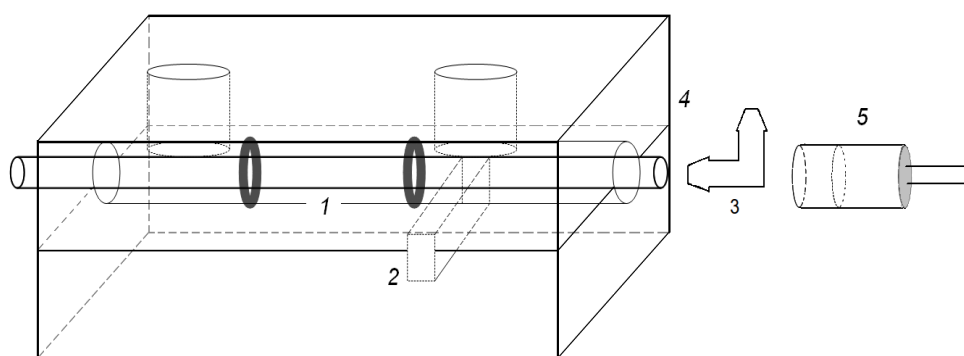


Obr. 3.1: Schéma aparatury

1 – zásobník činidla, 2 – peristaltická pumpa, 3 – dávkovací ventil, 4 – reakční cívka, 5 – průtokový detektor, 6 – elektronické obvody zajišťující napájení a ovládání zdroje záření a sensoru, 7 – počítač zajišťující sběr a vyhodnocení dat, 8 – odpad

3.5 Průtoková cela detektoru

Detekční cela (viz obr. 3.2) byla vyfrézována z plexiskla a sestávala z křemenné kapiláry (ID = 2,0 mm, OD = 4,0 mm) představující optické prostředí a vyfrézovaných otvorů pro umístění optických součástí. V použitém experimentálním uspořádání byl uvnitř cely kromě křemenné trubičky upevněn pouze sensor. S laserovou diodou byla cela spojena prostřednictvím optického okénka vytvořeného z obroušeného spojovacího „tělčka“ z polypropylenu, v němž byl vzniklý otvor zalepen průhledným chemicky odolným epoxidovým lepidlem. Rozměry cely byly 72 mm na šířku, 22 mm na výšku a 40 mm na hloubku. Cela byla pevně spojena třemi šrouby a uzavřena v neprůsvitném černém plastovém pouzdře. Samotný vnitřní objem detektoru byl určen vzdáleností sensoru od laserového zdroje a vnitřním průměrem křemenné kapiláry. Při zanedbání vnitřního objemu spojky s okénkem byl objem detekční oblasti při optimální vzdálenosti sensoru od zdroje záření řádově 150 μ l. Směr průchodu zón detekční celou byl zleva doprava; spojka s optickým okénkem byla zároveň využita jako výstup do odpadu.



Obr. 3.2: Schéma průtokové detekční cely

1 – křemenná trubička upevněná plastovými těsněními, 2 – vstup pro fotodiodu, 3 – spojka s optickým okénkem, 4 – cela průtokového detektoru, 5 - laserová dioda v pouzdře nebo laserový modul

3.6 Zdroje záření

Zdroj záření byl použit laserový (dioda nebo modul, tj dioda s řídicí elektronikou), poskytující intenzivní monochromatické záření. Výčet použitých zdrojů se nalézá v tab. 3.1.

Tab. 3.1: Použité zdroje záření

Zdroj	Výkon	λ deklarovaná výrobcem	λ_{\max} změřená ^a
laserová dioda infračervená	10 mW	775 – 800 nm	783 nm
laserová dioda červená	5 mW	650 – 660 nm	653 nm
laserový modul zelený	20 mW ^b	-----	531 nm 805 – 810 nm ^c
laserový modul fialový	20 mW	405 nm	403 nm

^a Vlnové délky byly změřeny na spektrometru Ocean Optics HR 4000.

^b Po omezení napájecího proudu vřazením odporu neodpovídá výkon deklarované hodnotě (viz níže)

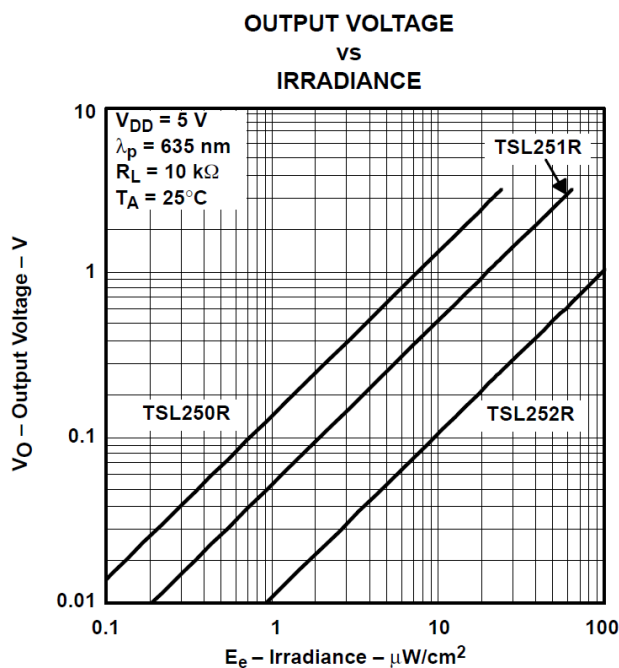
^c Laserový modul produkoval kromě záření ve viditelné oblasti i intenzivní pás vlnových délek v oblasti infračervené způsobovaný zahříváním modulu při provozu. Tento jev byl významně potlačen omezením napájecího proudu předřazením odporu 2,2

Ω před výstup napájení laserového modulu.

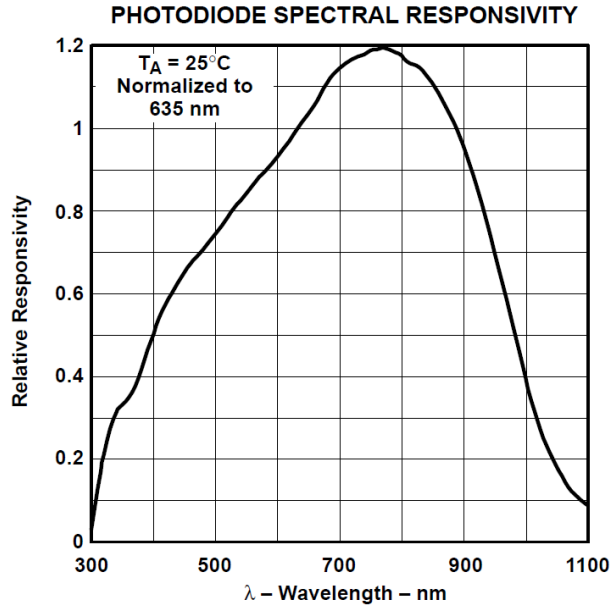
3.7 Snímač záření

Pro detekci rozptýleného záření byl použit optický sensor TSL250R (Light-to-Voltage Optical Sensor, výrobce Texas Advanced Optoelectronic Solutions, USA) obsahující ve svém pouzdře fotodiodu, operační zesilovač a zpětnovazebné součástky. Tento sensor byl používán ve standardním zapojení doporučeném výrobcem – napájecí napětí $V_{DD} = 5\text{ V}$, odpor mezi výstupem a zemí $R_L = 10\text{ k}\Omega$.

Na následujících obrázcích jsou uvedeny základní charakteristiky optického sensoru převzaté z firemní literatury [73]. Dle obr. 3.3 je odezva sensoru (tj. napětí na výstupu) přímo úměrná dopadajícímu zářivému toku monochromatického záření, obr. 3.4 zobrazuje závislost odezvy sensoru na vlnové délce dopadajícího záření.



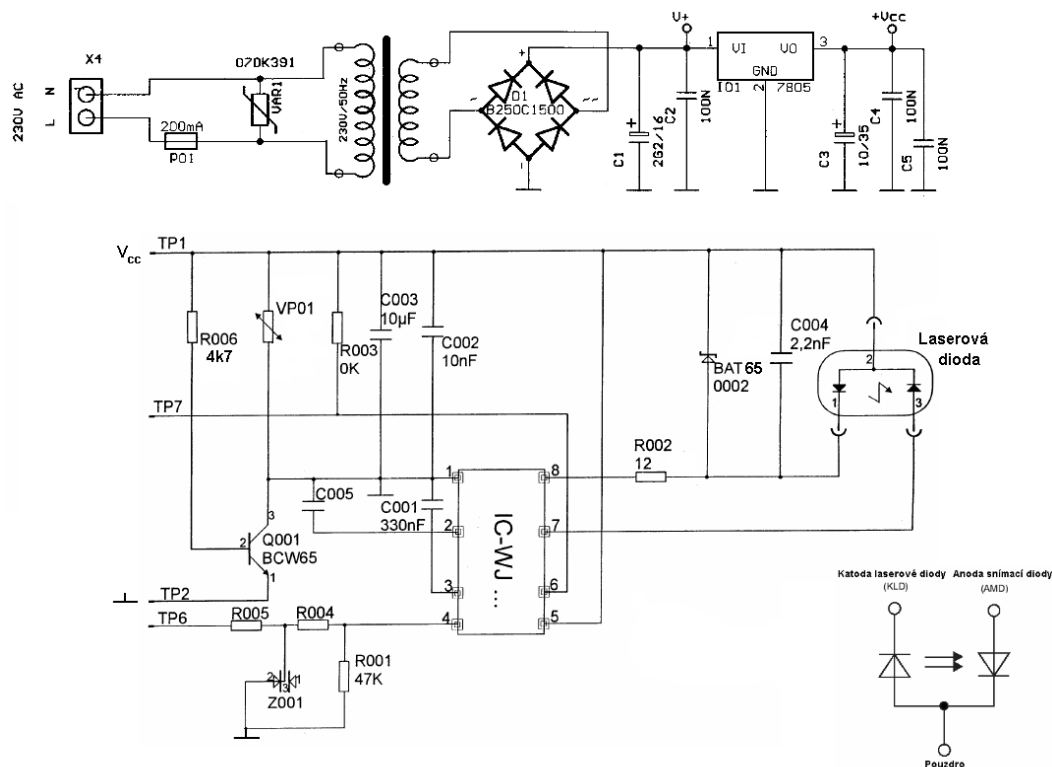
Obr. 3.3: Závislost napětí na výstupu ze sensoru na zářivém toku pro sensor TSL250R



Obr. 3.4: Závislost odezvy sensoru TSL250R na vlnové délce dopadajícího záření

3.8 Schéma napájení laserových diod

Pro napájení řídicí elektroniky laserových diod bylo použito jednoduché napájení uvedené v horní části obrázku 3.5. U zeleného a fialového modulu byl pro napájení řídicí elektroniky používán laboratorní napájecí zdroj LPS 303 (American Reliance, Taiwan) z důvodu lepší dlouhodobé stability napájecího napětí. Na výše zmíněném obrázku je ve spodní části zároveň zobrazeno schéma zapojení modulu řídicí elektroniky laserové diody obsahující řídicí integrovaný obvod řady IC-WJ (iC-Haus GmbH, Německo).

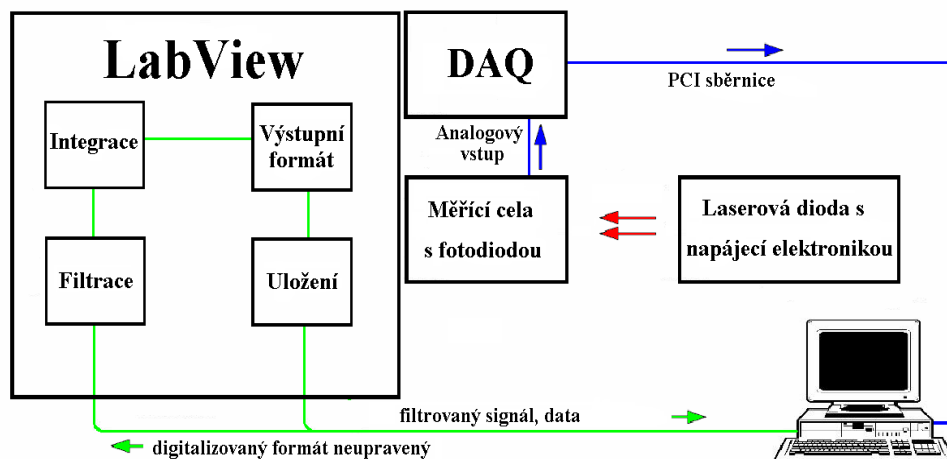


Obr. 3.5: Napájení laserových diod

3.9 Mechanismus sběru dat a ovládání detektoru

Získaný analogový signál z optického senzoru byl dále přiveden do analogově-digitální převodníkové karty NI 6036E pomocí propojovacího modulu BNC-2120 (obojí National Instruments, USA).

Signál byl nejprve v analogově digitálním převodníku digitalizován (frekvence digitalizace 0,1 s), následně byl filtrován a integrován a po převedení do výsledného formátu byl uložen v počítači. Blokové schéma činnosti programu vytvořeného pro sběr a zpracování výstupního signálu je uvedeno na obr. 3.6.



Obr 3.6: Schéma sběru dat a ovládání detektoru

3.10 Použitý software

Zpracování digitalizovaného signálu probíhalo v grafickém programovacím prostředí LabView 7.1 (National Instruments, USA). Pro zpracování naměřených výsledků byl používán software Microcal Origin (Microcal Software Inc., USA). Dále byl během práce využíván textový editor Microsoft Word 2003 a tabulkový procesor Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA), editor chemických struktur ChemSketch (ACD/Labs) a grafický editor Draw kancelářského balíčku Open Office (Oracle Corp.).

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace průtokové detekční cely

Na výslednou citlivost analytického stanovení mají vliv i parametry konstrukce detekční cely. Vzhledem k tomu, že stanovení byla prováděna s v laboratoři sestavenou průtokovou nefelometrickou celou, bylo nutné provést řadu optimalizačních kroků. Cílem optimalizace detekční cely a měřicí aparatury bylo dosažení vysoké citlivosti a opakovatelnosti stanovení vybraných analytů.

V použitém experimentálním uspořádání dochází na vstupu do detektoru k náhlému výraznému zvětšení vnitřního průměru průtokového systému (postupný přechod z 0,5 až na 2,0 mm ID). Je známo, že tento jev vede v průtokových metodách k větší disperzi nadávkované zóny a tedy ke snížení citlivosti odezvy, protože v rozšířeném místě dochází ke změně proudění z laminárního na turbulentní a tedy k promíchání nadávkované zóny. [74] Tento jev byl jedním z faktorů limitujících citlivost stanovení.

Rozptyl záření v místě vstupu do systému nebylo možné výrazněji ovlivnit, a proto byla spojka, která vstup záření zajišťovala, fixována, aby se její poloha vůči laserovému paprsku nemohla měnit.

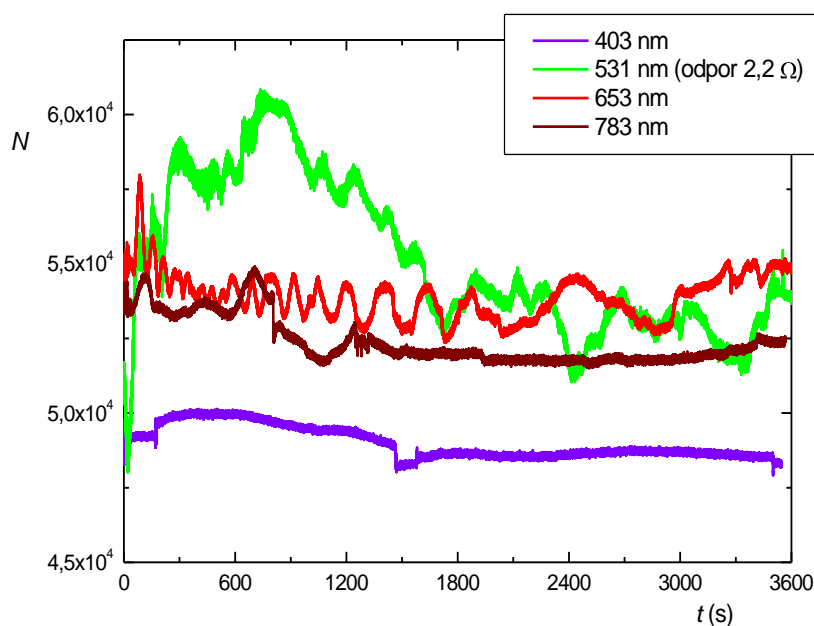
Jako významné konstrukční faktory měřicí aparatury byly vyhodnoceny a testovány: vzájemná vzdálenost zdroje a snímače záření a vzdálenost snímače záření od křemenné kapiláry představující průtokovou část detektoru a tedy optické prostředí. Kromě těchto parametrů byla sledována také stabilita zářivého toku jednotlivých laserových diod.

4.1.1 Stabilita použitých zdrojů záření

V rámci optimalizace měřicí aparatury byly sledovány stability jednotlivých zdrojů záření. Laserová dioda společně s chladičem byla uchycena v externím kyvetovém držáku (Ocean Optics) v jednom ze vstupů pro optické vlákno a k protilehlému výstupu bylo připojeno optické vlákno, které přivádělo záření z laserové diody do spektrometru. Mezi vstup a výstup byl vložen gradientový neutrální šedý filtr (Ocean Optics). Jeho nastavením byla vždy intenzita vstupního záření jednotlivých diod

zeslabena tak, aby detektor spektrometru nebyl přehlčen.

Stabilita jednotlivých zdrojů byla měřena po dobu minimálně 60 minut a intenzita vstupního signálu měřená spektrometrem byla zaznamenávána a uložena. Na obr. 4.1 jsou pro ilustraci znázorněny časové průběhy výstupního záření po dobu 60 minut.



Obr. 4.1: Stabilita laserových zdrojů

Stability signálu jednotlivých zdrojů záření byly měřeny spektrometrem, do kterého bylo záření přiváděno vláknovou optikou. Odezva spektrometru odpovídala počtu zaznamenaných kvant záření o dané vlnové délce během zadaného integračního času. Integrační časy a neutrální šedý filtr byly nastaveny tak, aby bylo dosaženo podobných intenzit odezev laserových zdrojů. Signál zeleného laserového modulu zobrazuje stav po omezení napájecího proudu odporem 2,2 Ω.

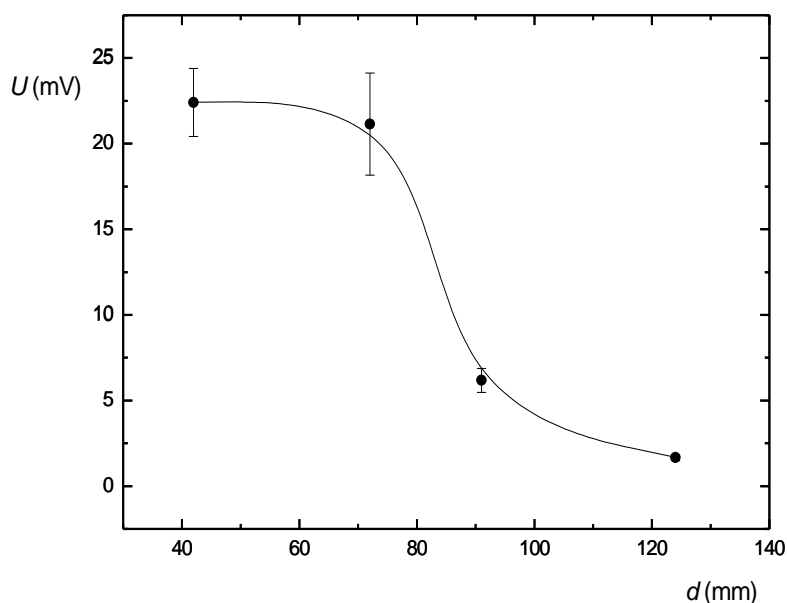
Signál zelené diody byl i po zařazení odporu do napájecího obvodu za účelem snížení napájecího proudu dostatečně stabilní až po jisté době provozu. Tento jev bylo možno v menší míře pozorovat i u obou laserových diod. Z těchto grafických závislostí jednoznačně vyplynulo, že pro provoz laserového zdroje v kontinuálním režimu je nutné daný zdroj stabilizovat minimálně 20 minut. Po tomto intervalu bylo možné všechny laserové zdroje považovat za stabilní.

4.1.2 Závislost odezvy na vzdálenosti zdroje a snímače záření

Délka optického prostředí, pokud daná vlnová délka není absorbována, nemá teoreticky vliv na intenzitu procházejícího záření. V případě průtokového detektoru vzdálenost sensoru od zdroje záření určuje vnitřní objem detektoru. Intenzita záření je tedy výskytem zóny rozptylující záření mezi senzorem a zdrojem záření v optické dráze zeslabena a klesá měřený signál.

Vliv vzdálenosti sensoru od čočky laserové diody byl optimalizován v rozsahu 42 – 124 mm, tedy v maximálním rozsahu, který zatemněné pouzdro cely umožňovalo. Cílem experimentů bylo zjistit, v jaké vzdálenosti mezi zdrojem záření a detektorem by bylo nejvhodnější sensor umístit. Cela v principu umožňovala volbu mezi dvěma možnostmi upevnění, a to ve vzdálenosti 55 nebo 108 mm od čočky laserové diody.

Podmínky měření byly následující: fotodioda přitisknuta na podložce ke křemenné kapiláře, průtoková rychlost reakčního činidla $4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, koncentrace činidla 5,0 % Ba^{2+} v 0,1% PVA, délka reakční smyčky 80 cm, koncentrace síranů $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, vlnová délka 653 nm.



Obr. 4.2: Závislost signálu na vzdálenosti mezi zdrojem a snímačem záření

$c_{\text{Ba}} = 5,0 \text{ \%}$ v 0,1% PVA, $c_{\text{A}} = 200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $V = 250 \text{ }\mu\text{l}$, $F = 4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$,
 $\lambda = 653 \text{ nm}$

Závislost uvedená na obr 4.2 vykazovala nelineární pokles, který bylo možno proložit sigmoidní křivkou. Vyplynulo z ní, že nevhodnější by bylo fotodiodu umístit hned za vstup kapiláry do zatemněné části průtokového detektoru.

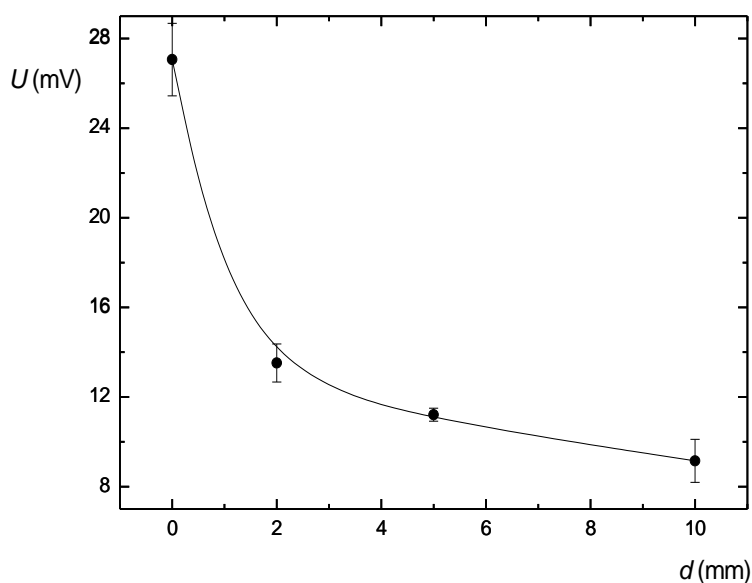
V tomto místě by ovšem mohlo do detektoru také vstupovat spojité viditelné světlo z vnějšího prostředí, které by mohlo zvyšovat signál detektoru. Rozptyl polychromatického záření na sraženině by byl nežádoucí z důvodu potenciálně nelineární odezvy. Dále by rozptyl laserového paprsku do okolí v místě vstupu záření do optického prostředí mohl vést k ohrožení zraku analytika. Omezení obou těchto rizik bylo zajištěno překrytím místa spojení černým krytem půlkruhového tvaru.

Na základě naměřených závislostí byla zvolena vzdálenost mezi zdrojem a snímačem záření 55 mm, která by měla zajišťovat vysokou citlivost měření. Při této délce optického prostředí byl vnitřní objem detekční cely přibližně 150 μl .

4.1.3 Závislost odezvy na vzdálenosti sensoru od křemenné kapiláry

Množství rozptýleného záření zachyceného senzorem je určeno úhlem, který je schopna pokrýt fotodioda. Tento úhel klesá se vzdáleností sensoru od křemenné kapiláry. Dále může být úhel rozptylu paprsků ovlivněn i rozptylem v materiálu křemenné kapiláry. Existuje tudíž důvod předpokládat, že signál bude s rostoucí vzdáleností od rozptylujícího prostředí klesat. V případě zkoumané průtokové detekční cely byl do vzdálenosti 4 mm od křemenné kapiláry kolmo na ni vyvrtán kruhový otvor, takže paprsek byl ve svém šíření omezen stěnami cely až za touto vzdáleností. Hloubka vyfrézované drážky pro fotodiodu, ve které s ní bylo možné bezpečně manipulovat, odpovídala 0 – 10 mm od křemenné kapiláry a v tomto rozmezí také byla závislost optimalizována.

Závislost byla měřena při vzájemné vzdálenosti zdroje a snímače záření 55 mm; ostatní podmínky byly stejné jako v předchozím měření.



Obr. 4.3: Závislost signálu na vzdálenosti snímače záření od průtokové trubičky
 $c_{\text{Ba}} = 5,0\% \text{ v } 0,1\% \text{ PVA}$, $c_{\text{A}} = 200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $V = 250 \text{ }\mu\text{l}$, $F = 4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$,
 $\lambda = 653 \text{ nm}$

Z naměřené závislosti je patrné, že s rostoucí vzdáleností fotodiody od rozptylujícího prostředí výrazně klesalo množství zachyceného rozptýleného záření. Pro další měření byla fotodioda upevněna těsně k průtokové kapiláře, která zároveň odebírala případné teplo vyprodukované senzorem.

4.1.4 Volba vlnové délky

Pro měření bylo pořízeno více laserových diod resp. laserových modulů pokrývajících celý rozsah vlnových délek viditelného a blízkého infračerveného záření, které odpovídalo spektrální citlivosti fotodiody. Vzhledem k rozdílným výkonům jednotlivých zdrojů záření bylo ztíženo jejich vzájemné porovnání, protože kromě vlnové délky má na intenzitu rozptylu vliv i vstupní intenzita záření.

Srovnání výsledků stanovení s jednotlivými zdroji záření je součástí kapitoly stanovení síranů. Použité zdroje záření jsou shrnuty v tab. 3.1 na straně 28.

4.2 Optimalizace stanovení SO_4^{2-} srážením Ba^{2+} v módu FIA

Po optimalizaci konstrukce detektoru byly optimalizovány parametry ovlivňující srážení síranů barnatými ionty. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, v průtokovém uspořádání je v publikacích zdůrazňována nutnost používat stabilizátor a vymývací činidlo bez nichž nelze dosáhnout reprodukovatelných výsledků.

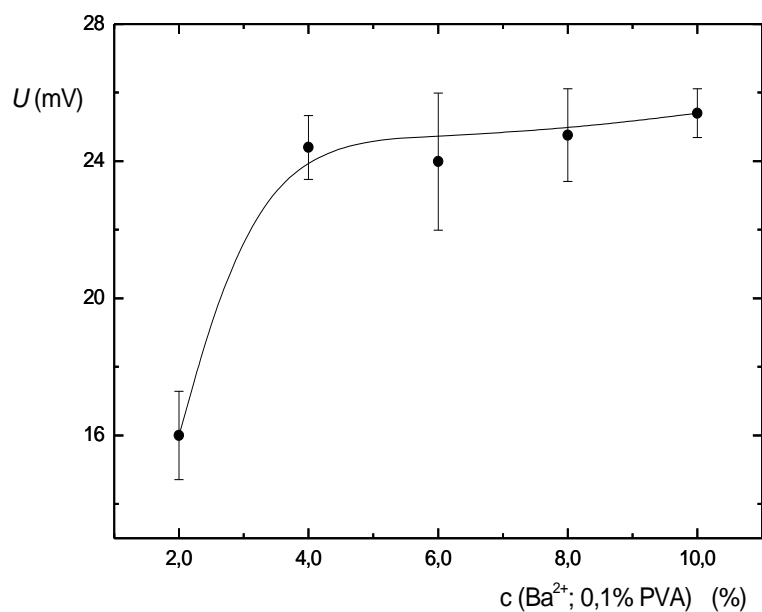
Během měření bylo zjištěno, že dostatečně dlouhé časové intervaly mezi dávkováními a případné proplachování aparatury deionizovanou vodou zajišťovaly návrat signálu na základní linii. Používání EDTA jako vymývací fáze se neosvědčilo, protože její průchod detektorem způsoboval intenzivní signál, který je v odborné literatuře označován jako „schlieren efekt“ (rozptyl a lom záření na rozhraní prostředí o různých indexech lomu, nejčastěji způsobený koncentračním nebo teplotním gradientem). [75] Nadále byl roztok EDTA používán pouze pro vyčištění aparatury po sérii měření nebo na konci pracovního dne.

Alkalické prostředí, které dle literatury zvyšuje rozpustnost síranu barnatého, nebylo možné použít z důvodu možného narušení vnitřního povrchu křemenné kapiláry.

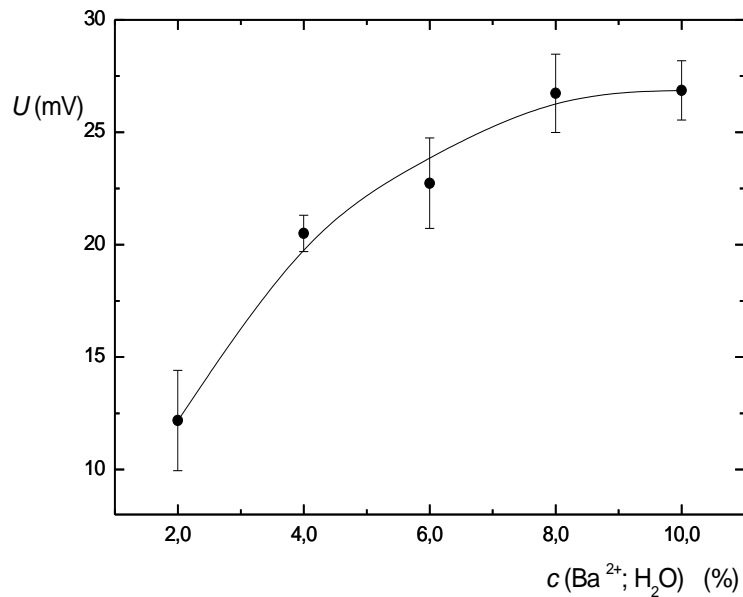
Optimální reakční podmínky byly měřeny za použití laserové diody o vlnové délce 653 nm.

4.2.1 Optimalizace koncentrace srážecího činidla

Prvním optimalizovaným parametrem byla koncentrace barnatých iontů. Měření mělo dva cíle. Kromě zjištění vhodné koncentrace barnatých iontů bylo druhým záměrem zjistit, jak ovlivňuje přítomnost stabilizátoru velikost a reprodukovatelnost signálu. Optimalizace byla provedena v rozmezí 2,0 – 10,0 % Ba^{2+} rozpuštěného jak v 0,1% PVA (obr. 4.4) tak pouze v deionizované vodě (obr. 4.5).



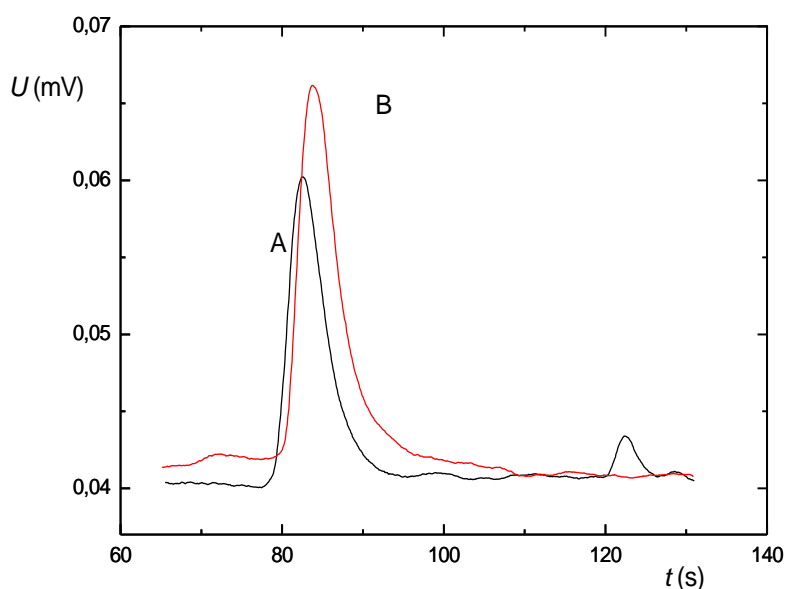
Obr. 4.4: Vliv koncentrace barnatých iontů na signál za použití stabilizátoru
 $c_{\text{PVA}} = 0,1\%$, $c_{\text{A}} = 200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $V = 250 \mu\text{l}$, $F = 4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$, $\lambda = 653 \text{ nm}$



Obr.4.5: Vliv koncentrace barnatých iontů na signál bez použití stabilizátoru
 $c_{\text{A}} = 200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $V = 250 \mu\text{l}$, $F = 4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$, $\lambda = 653 \text{ nm}$

Z výše uvedených závislostí vyplynulo, že používání vyšších koncentrací barnatých iontů než 10,0 % nemělo smysl, protože už dále nedošlo ke zvýšení citlivosti. Při 0,1% koncentraci PVA v roztoku vykazovala závislost na koncentraci srážecího činidla strmější nárůst než při použití barnatých iontů rozpuštěných pouze v deionizované vodě. Dosažené maximální hodnoty závislosti byly podobné, přičemž při používání stabilizátoru postačovala poloviční koncentrace barnatých iontů.

Rozdíl v opakovatelnosti není z naměřených hodnot patrný, ale bez stabilizátoru docházelo k usazování sraženiny v aparatuře (nejspíše v dávkovacím ventilu) a k jejímu opožděnému vymytí jako dalšího menšího píku („ghost píku“). Tvar signálů při a bez používání PVA je lépe patrný z obr. 4.6. Používání PVA bylo tedy vyhodnoceno jako nezbytné.



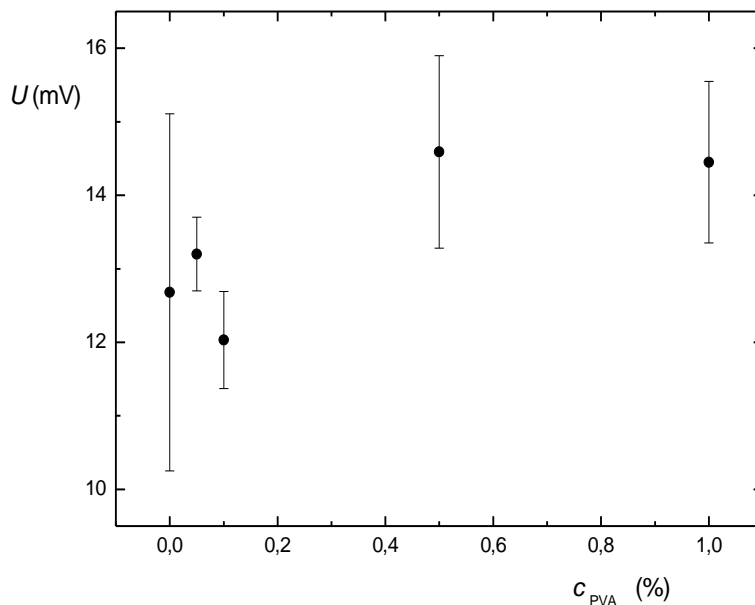
Obr. 4.6: Porovnání tvaru signálu při srážení $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$ pomocí $4,0\% \text{ Ba}^{2+}$
 křivka A – Ba^{2+} v deionizované vodě, křivka B – Ba^{2+} v $0,1\% \text{ PVA}$
 $c_{\text{Ba}} = 4,0 \%$, $c_{\text{A}} = 200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $V = 250 \mu\text{l}$, $F = 4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$, $\lambda = 653 \text{ nm}$

4.2.2 Optimalizace koncentrace stabilizátoru (PVA)

Z předcházejících optimalizací vyplynula potřeba přidávat do činidla

polyvinylalkohol (PVA) jako stabilizátor, protože jeho přítomnost ve vhodné koncentraci měla pozitivní vliv na reprodukovatelnost signálu.

Koncentrace stabilizátoru byla optimalizována v rozsahu 0 – 1,0 % a naměřená závislost je uvedena na obr. 4.7. Koncentrace 1,0 % se ukázala být hraniční, protože při ní již bylo obtížné polyvinylalkohol rozpustit, aniž by zároveň došlo k jeho degradaci zvýšenou teplotou.



Obr.4.7: Vliv koncentrace stabilizátoru na signál

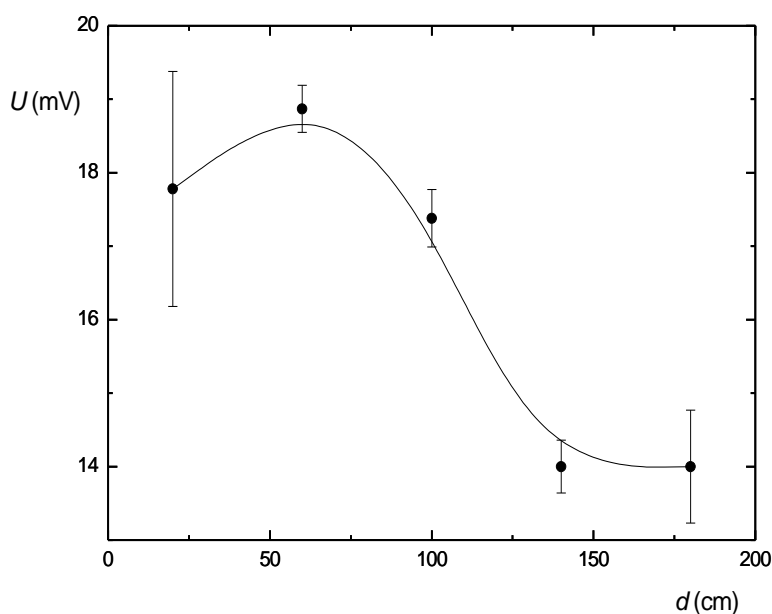
$c_{\text{Ba}} = 5,0 \%$, $c_{\text{A}} = 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $V = 250 \mu\text{l}$, $F = 4,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$, $\lambda = 653 \text{ nm}$

Literatura uvádí mírnou lineární závislost velikosti signálu na koncentraci PVA při stanovení síranů. [51] Tato závislost však v této práci pozorována nebyla.

Naměřená závislost má obtížně čitelný průběh, ale vyplývá z ní, že jak absence tak i používání vysokých koncentrací PVA měly negativní vliv na reprodukovatelnost měření. Při nulové koncentraci koloidu se píky vyznačovaly velmi pomalým návratem na základní linii („tailing“ píku). Při zvyšování koncentrace PVA rostl signál, ale spolu s ním rostla i směrodatná odchylka měření. Jako kompromis mezi citlivostí a směrodatnou odchylkou měření byla zvolena koncentrace PVA 0,05 %.

4.2.3 Optimalizace délky reakční cívky

Významným parametrem ovlivňujícím velikost signálu u průtokové injekční analýzy je délka reakční cívky. Při průchodu zóny analytu cívkou dochází k promísení analytu a činidla vlivem difúze a k proběhnutí reakce. Délka reakční cívky tedy přímo ovlivňuje rozmytí píku i úroveň konverze analytu na produkt. Obecně platí, že příliš krátké a příliš dlouhé reakční cívky zhoršují tvar signálu a reprodukovatelnost měření. Délka reakční cívky byla optimalizována v rozmezí 20 – 180 cm, které odpovídalo rozmezí objemů 39 – 353 μl .



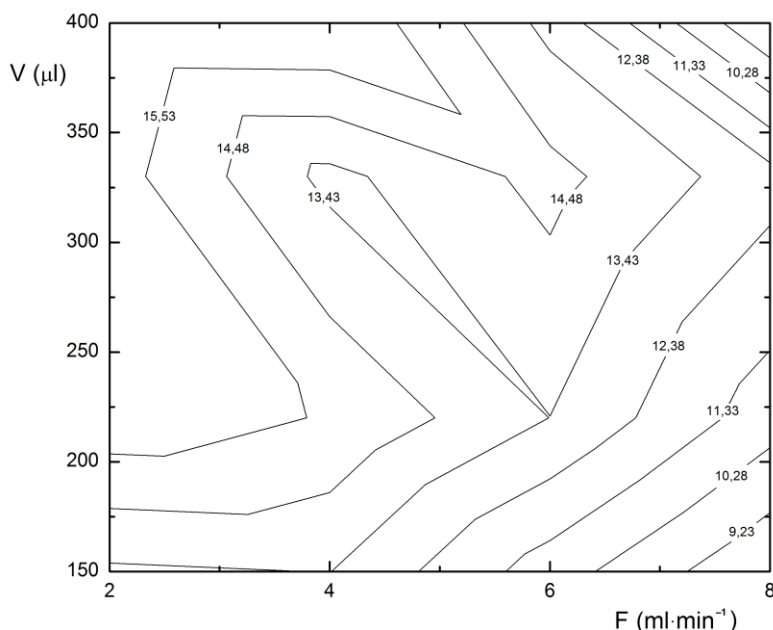
Obr. 4.8: Závislost velikosti signálu na délce reakční cívky

$c_{\text{Ba}} = 5,0 \%$, $c_{\text{PVA}} = 0,05 \%$, $c_{\text{A}} = 100 \text{ mg.l}^{-1}$, $V = 250 \mu\text{l}$, $F = 4,0 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 653 \text{ nm}$

Maximum signálu bylo nalezeno pro délku cívky 60 cm, ale z následně provedených experimentů vyplynulo, že reakční smyčka této délky nezajišťovala dostatečnou konverzi analytu a vzniklé píky byly rozštěpené nebo různě deformované. Tyto jevy byly odstraněny použitím reakční cívky o délce 80 cm (která odpovídá objemu 157 μl) a další měření byla prováděna s touto reakční cívkou.

4.2.4 Optimalizace dávkovaného objemu vzorku a průtokové rychlosti činidla

Vlivy objemu vzorku a průtokové rychlosti činidla byly změřeny zároveň a to v rozsahu dávkovaného objemu vzorku 150 – 400 μl a objemové průtokové rychlosti činidla 2,0 – 8,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Výsledky jsou zpracovány na obr. 4.9.



Obr. 4.9: Závislost signálu na průtokové rychlosti činidla a dávkovaném objemu vzorku
 $c_{\text{Ba}} = 5,0 \%$, $c_{\text{PVA}} = 0,05 \%$, $c_{\text{A}} = 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$, $\lambda = 653 \text{ nm}$

Z naměřené závislosti vyplynulo, že nejvyšší signály odpovídaly kombinaci velkých objemů vzorku a nízkých průtokových rychlostí. Použití velmi nízké průtokové rychlosti by zpomalovalo analýzu a poskytovalo prostor pro rozmytí píku difúzí; vyšší průtokové rychlosti vedly k poklesu signálu nejspíše díky pomalé kinetice tvorby sraženiny BaSO_4 . Zvolena byla průtoková rychlost $3,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a dávkovaný objem $250 \mu\text{l}$.

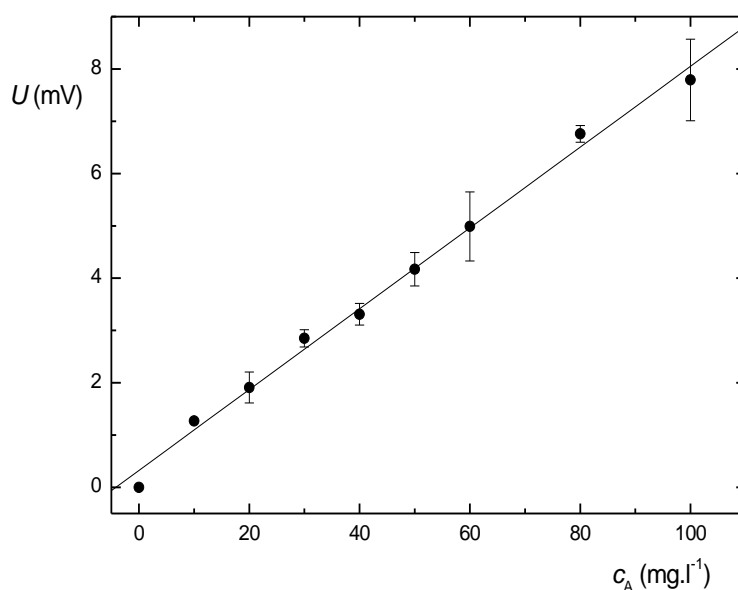
4.2.5 Vliv vlnové délky zdroje záření na citlivost detekce

4.2.5.1 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení SO_4^{2-} , $\lambda = 653 \text{ nm}$

Při optimálních podmínkách a vlnové délce zdroje záření 653 nm (červená

laserová dioda) byla naměřena kalibrační závislost a určeny základní charakteristiky stanovení pro tuto vlnovou délku. Pro získání lineární kalibrační závislosti bylo nezbytné důkladně filtrovat reakční činidlo; případné pevné částice se chovaly jako kondenzační jádra a jejich výskyt v roztoku činidla vedl ke skoku na kalibrační závislosti připomínajícímu inflex na titrační křivce. Kalibrační přímka při vlnové délce 653 nm se nachází na obr. 4.9 a základní charakteristiky stanovení v tab. 4.1.

Filtrace činidla vedla k významnému poklesu velikosti signálu oproti optimalizacím.



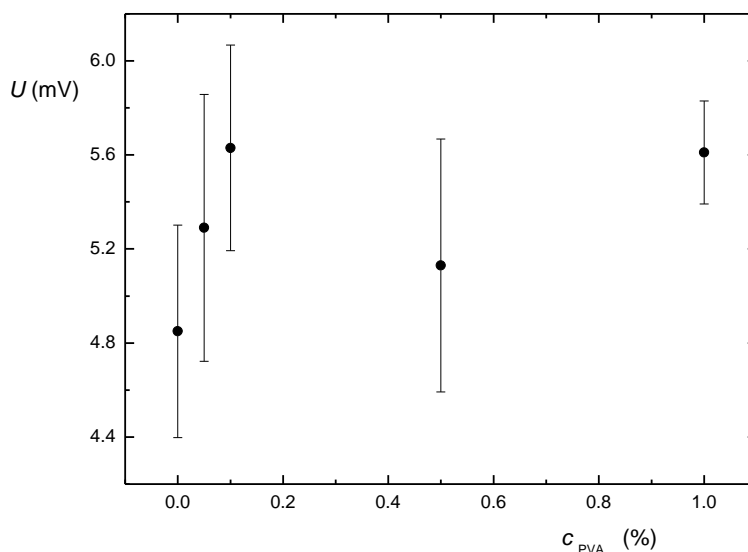
Obr. 4.9: Kalibrační závislost stanovení síranového aniontu při vlnové délce 653 nm.
 $c_{Ba} = 5,0 \%$, $c_{PVA} = 0,05 \%$, $V = 250 \mu\text{l}$, $F = 3,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{RC} = 80 \text{ cm}$, $\lambda = 653 \text{ nm}$

Tab. 4.1: Základní charakteristiky stanovení při $\lambda = 653 \text{ nm}$

	h (mV)
Citlivost [$\text{l}\cdot\text{mg}^{-1}$]	0,0773
Opakovatelnost ($50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) [%]	11,68
LOD [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	6,7
LOQ [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	22
R	0,99257
LDR do [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	100

4.2.5.2 Optimalizace koncentrace PVA pro $\lambda = 783$ nm

Nelze vyloučit, že koncentrace PVA může ovlivňovat velikost částic sraženiny a tudíž parametry detekce při konkrétní vlnové délce. Pro konstrukci kalibrační křivky při 783 nm byla znovu optimalizována koncentrace PVA v rozsahu 0 – 1,0 %. Získaná závislost je uvedena na obr. 4.10. Ostatní parametry byly ponechány na optimálních hodnotách.



Obr. 4.10: Závislost signálu na koncentraci PVA při vlnové délce 783 nm

$$c_{\text{Ba}} = 5,0 \%, c_{\text{A}} = 100 \text{ mg} \cdot \Gamma^{-1}, V = 250 \mu\text{l}, F = 3,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}, \\ \lambda = 783 \text{ nm}$$

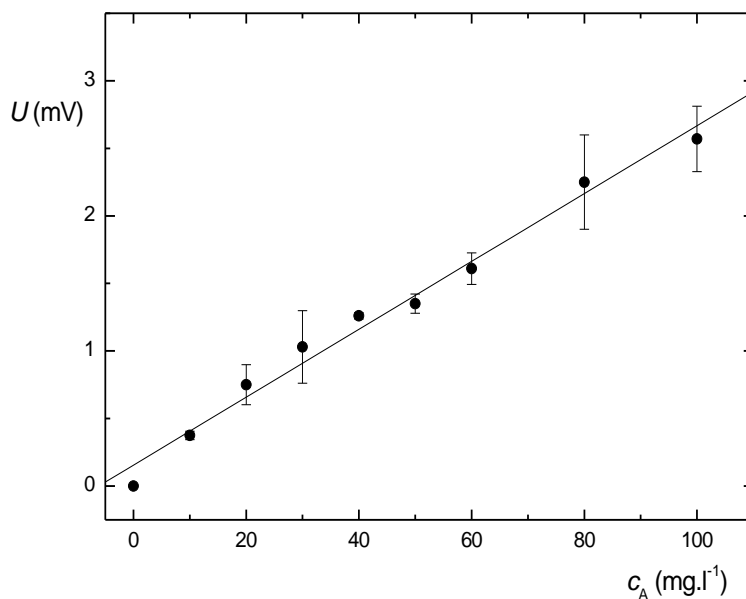
Výsledná závislost byla opět obtížně čitelná, s rostoucí tendencí při nižších hodnotách koncentrace PVA. Oproti vlnové délce 653 nm došlo k výraznému zhoršení opakovatelnosti a poklesu velikosti signálu.

Protože bylo možno v infračervené části spektra předpokládat nižší citlivost v důsledku slabšího rozptylu, byla pro měření zvolena koncentrace 0,1 % poskytující nejvyšší signál.

4.2.5.3 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení SO_4^{2-} , $\lambda = 783$ nm

Při optimálních podmínkách byla naměřena kalibrace uvedená na následujícím

obrázku 4.11. Základní charakteristiky stanovení získané při vlnové délce 783 nm jsou uvedeny v tabulce 4.2.



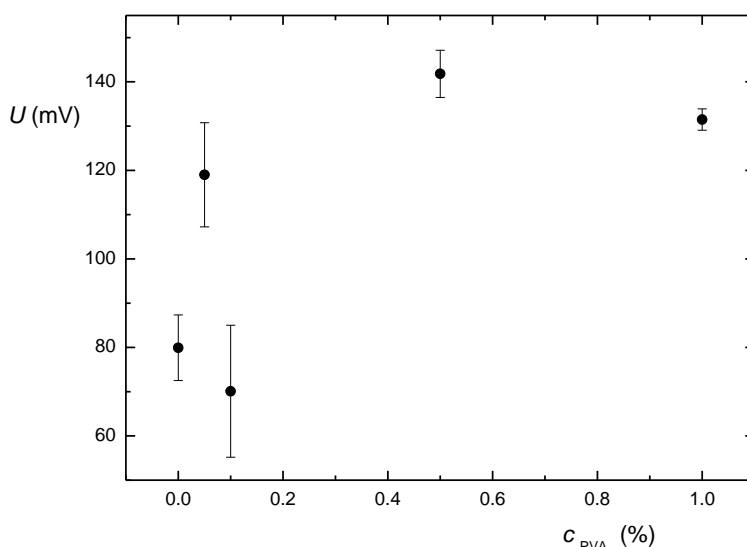
Obr. 4.11: Kalibrační závislost stanovení síranového aniontu při vlnové délce 783 nm
 $c_{\text{Ba}} = 5,0 \%$, $c_{\text{PVA}} = 0,1 \%$, $V = 250 \mu\text{l}$, $F = 3,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$, $\lambda = 783 \text{ nm}$

Tab.4.2: Základní charakteristiky stanovení při $\lambda = 783 \text{ nm}$

	h (mV)
Citlivost [$\text{l}\cdot\text{mg}^{-1}$]	0,0251
Opakovatelnost ($60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) [%]	15,18
LOD [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	8,6
LOQ [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	29
R	0,99257
LDR do [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	100

4.2.5.4 Optimalizace koncentrace PVA pro $\lambda = 531 \text{ nm}$

Přesto, že pravděpodobně budou mít závislosti velikosti signálu na koncentraci stabilizátoru pro různé vlnové délky obdobný průběh, byla tato závislost naměřena i při vlnové délce 531 nm. Získaná závislost se nachází na obr. 4.12. Měření bylo provedeno při optimálních podmínkách.



Obr. 4.12: Závislost odezvy na koncentraci PVA při vlnové délce 531 nm
 $c_{\text{Ba}} = 5,0 \%$, $c_{\text{PVA}} = 0,5 \%$, $c_{\text{A}} = 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $V = 250 \mu\text{l}$, $F = 3,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80$
 cm, $\lambda = 531 \text{ nm}$

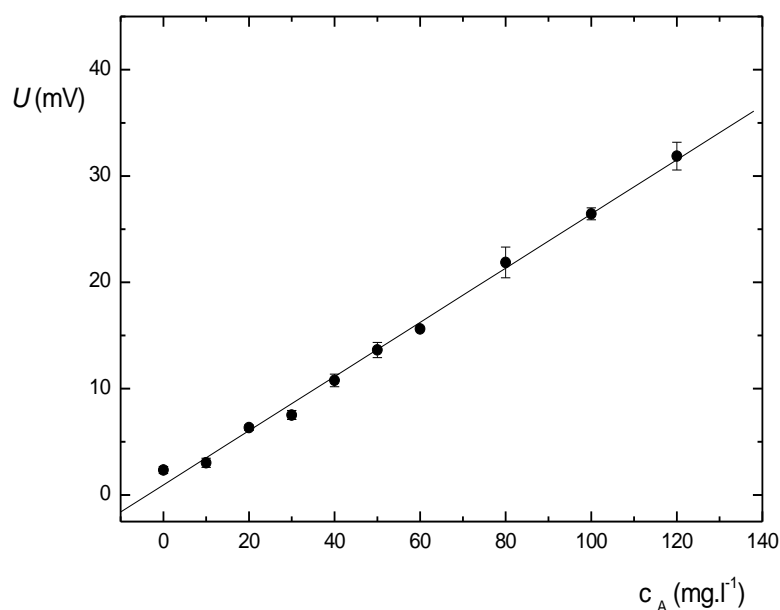
Průběh závislosti obsahuje nezvyklý pokles signálu u hodnoty 0,1 %; zvolena byla vyšší koncentrace PVA 0,5 %, protože při této vlnové délce vykazovalo měření čistější základní linii.

Získaná závislost sice vykazovala vysoké signály, ale při dávkovaném objemu 250 μl byl pík následován poklesem signálu (negativním píkem).

Vzhledem k intenzitě zdroje a výše zmíněné asymetrii píku při optimalizaci koncentrace stabilizátoru se jevílo nevhodné používat velký dávkovaný objem vzorku. Tento parametr byl opět optimalizován (v rozsahu 100 – 250 μl) a jako kompromis mezi výškou a tvarem píku byla zvolena hodnota 150 μl poskytující úzké, symetrické píky s relativně menší směrodatnou odchylkou měření. Tento dávkovaný objem byl nadále používán při stanovení síranů u zdrojů s vlnovou délkou 403 a 531 nm.

4.2.5.5 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení SO_4^{2-} , $\lambda = 531 \text{ nm}$

Při vlnové délce zdroje záření 531 nm byla naměřena kalibrační závislost uvedená na obr. 4.13. Základní charakteristiky stanovení jsou uvedeny v tab. 4.3.



Obr 4.13: Kalibrační závislost stanovení síranového aniontu při vlnové délce 531 nm
 $c_{\text{Ba}} = 5,0 \%$, $c_{\text{PVA}} = 0,5 \%$, $V = 150 \mu\text{l}$, $F = 3,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$, $\lambda = 531 \text{ nm}$

Tab.4.3: Základní charakteristiky stanovení při $\lambda = 531 \text{ nm}$

	h (mV)
Citlivost [$\text{l}\cdot\text{mg}^{-1}$]	0,2548
Opakovatelnost ($60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) [%]	3,21
LOD [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	7,4
LOQ [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	25
R	0,9976
LDR do [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	120

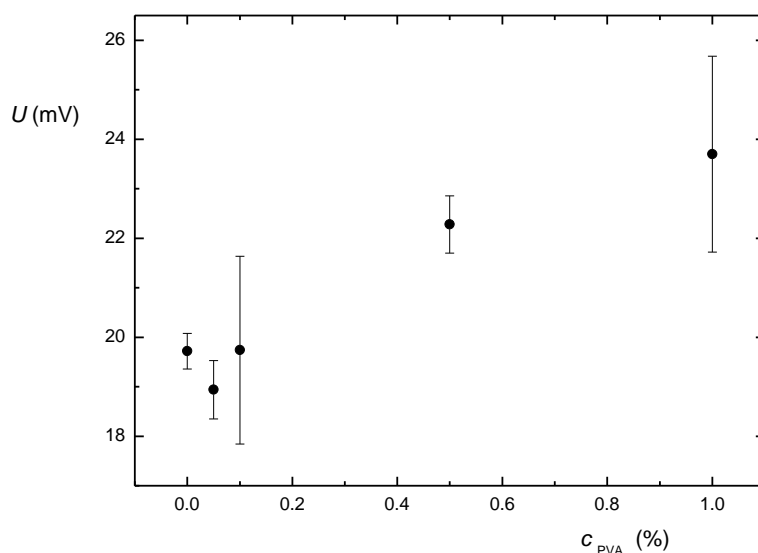
Při vlnové délce 531 nm bylo dosaženo o jeden řád vyšší citlivosti oproti laserovým diodám o vlnových délkách 653 a 783 nm. Dosaženo bylo také opakovatelnosti výsledků menší než 5 %.

4.2.5.6 Optimalizace koncentrace PVA pro $\lambda = 403 \text{ nm}$

Posledním testovaným zdrojem byl laserový modul o vlnové délce 403 nm. Tato vlnová délka záření sice poskytovala intenzivní rozptyl, její snímání ovšem bylo

omezeno klesající odezvou fotodiody na nižší vlnové délky. Z firemních materiálů (viz str. 30 tab. 3.4) výrobce sensoru vyplynulo, že při vlnové délce 403 nm je odezva sensoru nižší než 50 %.

Při jinak optimálních parametrech a vlnové délce 403 nm byla naměřena závislost velikosti signálu na koncentraci stabilizátoru.



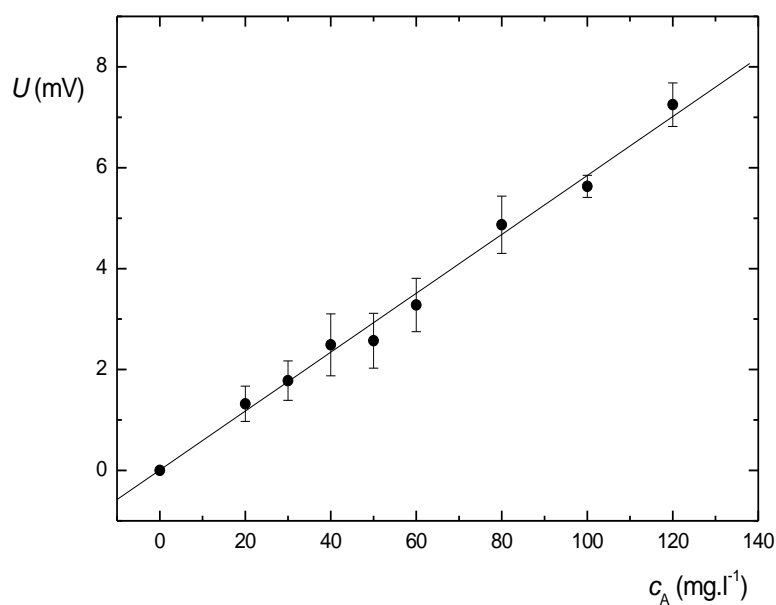
Obr. 4.14: Optimalizace koncentrace PVA při vlnové délce 403 nm

$c_{\text{Ba}} = 5,0 \%$, $c_{\text{PVA}} = 0,5 \%$, $c_{\text{A}} = 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $V = 150 \mu\text{l}$, $F = 3,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$,
 $\lambda = 403 \text{ nm}$

Jako koncentrace PVA poskytující rozumný poměr mezi velikostí signálu a směrodatnou odchylkou byla opět zvolena hodnota 0,5 %.

4.2.5.7 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení SO_4^{2-} , $\lambda = 403 \text{ nm}$

Při optimálních parametrech stanovení byla naměřena kalibrace a zjištěny základní charakteristiky stanovení při vlnové délce 403 nm. Výsledky jsou uvedeny na obr. 4.15 a v tab. 4.4.



Obr. 4.15: Kalibrační závislost stanovení síranového aniontu při 403 nm

$c_{Ba} = 5,0 \%$, $c_{PVA} = 0,5 \%$, $V = 150 \mu\text{l}$, $F = 3,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $d_{RC} = 80 \text{ cm}$, $\lambda = 403 \text{ nm}$

Na rozdíl od delších vlnových délek bylo možné při 403 nm pozorovat asymetrii píku ve vzrůstající i klesající fázi; vrchol píku byl oblý, jakoby uříznutý. Příčinou byla nejspíše nízká odezva fotodiody na danou vlnovou délku. Naměřené hodnoty v kalibraci byly sníženy o intenzivní signál nulového vzorku, nejspíše způsobený odlišným indexem lomu pro danou vlnovou délku v čisté deionizované vodě a reakčním činidle.

Tab.4.4: Základní charakteristiky stanovení při $\lambda = 403 \text{ nm}$

	h (mV)
Citlivost [l·mg ⁻¹]	0,0584
Opakovatelnost (60 mg·l ⁻¹) [%]	6,02
LOD [mg·l ⁻¹]	12,5
LOQ [mg·l ⁻¹]	42
R	0,99613
LDR do [mg·l ⁻¹]	120

4.3 Srovnání dosažených výsledků s literaturou

Experimentální výsledky naznačily, že lineární dynamický rozsah by mohl souviset s volbou vlnové délky a intenzity záření. Vliv ovšem mohla mít i vyšší koncentrace stabilizátoru používaná s vlnovými délkami 403 a 531 nm nebo odlišný způsob napájení zdroje záření.

Z hlediska základních charakteristik stanovení byl jako optimální pro stanovení bezbarvé sráženiny vyhodnocen zelený laserový modul, a jeho parametry při stanovení síranů srážením barnatými ionty byly porovnány s dostupnými literárními zdroji. Základní charakteristiky zeleného laserového modulu jsou pro přehlednost uvedeny v prvním řádku tab. 4.5 shrnující výsledky literární rešerše.

Tab. 4.5: Srovnání dosažených výsledků s literárními zdroji

Metoda	DR [mg.l ⁻¹]	LOD [mg.l ⁻¹]	Charakter kalibrační závislosti	RSD [%]	Detekce	Pozn.	Citace
FIA	25 - 120	7,4	lineární	3,21	nefelometrická, $\lambda = 531$ nm	V této práci	
FIA	40 - 140	-----	lineární	0,85	turbidimetrická, $\lambda = 480$ nm	-----	[76]
FIA	5 - 200	-----	lineární	< 1	turbidimetrická, $\lambda = 410$ nm	analýza rostlinných vzorků	[52]
SIA	10 - 100	10	rovnice druhého řádu	< 3,3	turbidimetrická, $\lambda = 420$ nm	vodné vzorky mimo odpadní vody	[55]
SIA	10 - 200	-----	lineární	< 3,9	turbidimetrická, $\lambda = 540$ nm	-----	[41]
SIA	40 - 200	33	lineární	3,2	turbidimetrická, $\lambda = 410$ nm	^a	[58]
FIA	40 - 200	29	lineární	2,7	turbidimetrická, $\lambda = 410$ nm	^a	[58]
FIA	2 - 20	0,3	lineární	< 3,0	turbidimetrická, $\lambda = 410$ nm	srážení Pb ²⁺ , EtOH-voda (1:1, v/v)	[45]
FIA	10 - 80	-----	rovnice čtvrtého řádu	10,0	nefelometrická, $\lambda = 680$ nm	v laboratoři sestrojený detektor	[56]

^a autoři neuvedli, jakým způsobem určili limit detekce; neodpovídá konvenci IUPAC

Porovnáním s výsledky publikovanými v literatuře bylo prokázáno, že zkonstruovaná detekční cela nevykazuje při stanovení síranů horší charakteristiky než

spektrometr. Ze srovnání vyplývá, že nebylo dosaženo nižšího detekčního limitu než poskytovala turbidimetrická stanovení, přesto že nefelometrické stanovení bývají citlivější. Na rozdíl od publikovaných výsledků bylo v této práci použito nejjednoduššího možného experimentálního uspořádání. Snížení limitu detekce by bylo možné dosáhnout snížením pH reakčního činidla nebo přidavkem organického modifikátoru. Účinnost tohoto postupu je ilustrována výsledky dosaženými srážením síranů olovnatými kationty v prostředí 50% ethanolu.

Stanovení síranů srážením barnatými kationty metodou FIA s nefelometrickou detekcí prostřednictvím jednoduché cely bylo limitováno chemickou reakcí nikoliv instrumentací.

4.4 Stanovení SO_4^{2-} v reálných vzorcích metodou FIA s nefelometrickou detekcí

Výše popsaná a optimalizovaná metoda byla při vlnové délce 531 nm aplikována pro stanovení obsahu síranů ve vzorcích pitné a minerální vody metodou kalibrační přímky a metodou standardního přídávku. Možná interference hydrogenuhličitanového aniontu byla omezena okyselením 50 ml vzorku 20 μl 2M HCl a převařením po dobu 10 minut na vodní lázni. Stejným způsobem jako vzorky byly okyseleny i kalibrační standardy.

Vzorky bez okyselení byly před ředěním 20 minut sonikovány na ultrazvuku za účelem odstranění rozpuštěného oxidu uhličitého. Vzorky okyselené a převařené za účelem převedení rozpuštěných hydrogenuhličitanů na oxid uhličitý a jeho odstranění ze vzorku už následně sonikovány nebyly. Výsledky stanovení jsou uvedeny v tab. 4.6.

Tab. 4.6: Výsledky stanovení síranů ve vzorcích pitné a minerální vody

Identifikace vzorku	Deklarovaný obsah [mg.l ⁻¹]	Stanovení metodou kalibrační přímky [mg.l ⁻¹]	Stanovení metodou kalibrační přímky po okyselení [mg.l ⁻¹]	Stanovení metodou standardního přídávku [mg.l ⁻¹]
studniční voda	-----	192 ± 10,0	180 ± 0,6	150 ± 6,5
Aquila, první voda	32,60	38,3 ± 0,7	36,0 ± 1,1	34,6 ± 2,6
Korunní neperlivá, meruňka	57,6	-----	23,6 ± 3,2	-----
Poděbradka jemně perlivá	73,10	111 ± 3,2	77,6 ± 2,8	75,0 ± 4,2

Metoda kalibrační přímky byla zatížena významnou pozitivní chybou způsobenou maticí, naopak metoda standardního přídavku poskytla výsledky srovnatelné s deklarovanými hodnotami. Výrobci neuvádí úplné složení minerálních vod, ale dle předpokladu by maticové efekty měly být způsobeny především hydrogenuhličitanovým aniontem. Modifikovaný postup přípravy vzorků a kalibračních roztoků omezující vliv rozpuštěných hydrogenuhličitanových aniontů měl pozitivní vliv, ale nevedl k úplnému odstranění pozitivní chyby stanovení, což naznačuje existenci dalších interferentů ve vzorku.

Ve vzorku ochucené minerální vody Korunní nebylo možno stanovit obsah síranů. V neutrálním pH neposkytl vzorek žádnou analytickou odezvu ani po přídavku standardu. Po okyselení bylo možno stanovit obsah síranového aniontu odpovídající jen 41 % deklarované koncentrace. Došlo tedy pouze k částečnému potlačení vlivu matrice. Lze předpokládat, že matrice vzorku obsahovala látky bránící vzniku sraženiny. Aditivy ve vzorku uvedenými na etiketě byly jmenovitě v pořadí dle obsahu: invertovaný cukr, kyselina citronová, aroma, sorbát draselný, benzoát sodný, přičemž např. sacharidy jsou známy kosmotropními účinky (stabilizujícími povrchové napětí vody).

4.5 Stanovení promethazinu metodou FIA s nefelometrickou detekcí

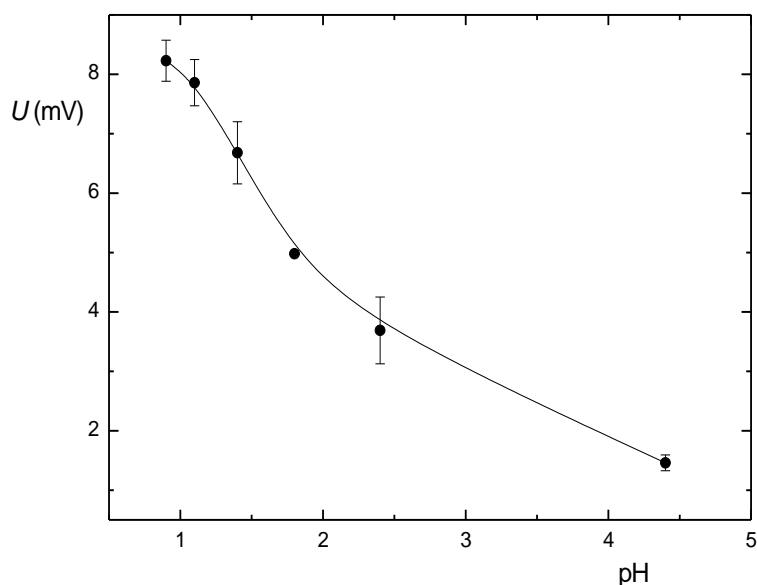
Za účelem aplikace v laboratoři sestaveného nefelometrického detektoru pro stanovení farmakologicky aktivních látek bylo vybráno stanovení promethazinu založené na tvorbě jeho nerozpustného iontového asociátu s bromfenolovou modří. [1] Aplikaci metody pro průtokové uspořádání předcházelo ověření její použitelnosti. Bylo zjištěno, že srážení je podporováno nízkým pH a probíhá pouze za zvýšené iontové síly. V okyseleném roztoku bromfenolové modří bez přídavku soli silné kyseliny a zásady ke vzniku sraženiny nedošlo. Zkoumány byly dvě možnosti úpravy iontové síly a pH činidla. Buď přídavkem roztoku chloridu sodného a okyselení kyselinou chlorovodíkovou nebo přídavkem roztoku síranu sodného a okyselení kyselinou sírovou. V obou případech došlo ke stejné změně barevného přechodu při poklesu pH (z bordó při pH 4-5 do oranžové při pH nižším než 2; bez přídavku soli nebo po naředění vedl přechod ke žluté barvě) a ke vzniku viditelné sraženiny. Na základě

faktu, že analytem byl promethazin hydrochlorid, byla zvolena kombinace kyselina chlorovodíková a chlorid draselný.

4.5.1 Optimalizace pH a vlnové délky

Vzhledem k barevnému přechodu při úpravě pH roztoku byla zkoumána odezva na pH při dvou vlnových délkách 531 a 653 nm. Kromě rozptylu záření na barevné sraženině mohla mít na intenzitu odezvy vliv i absorpce dané vlnové délky v barevném roztoku činidla.

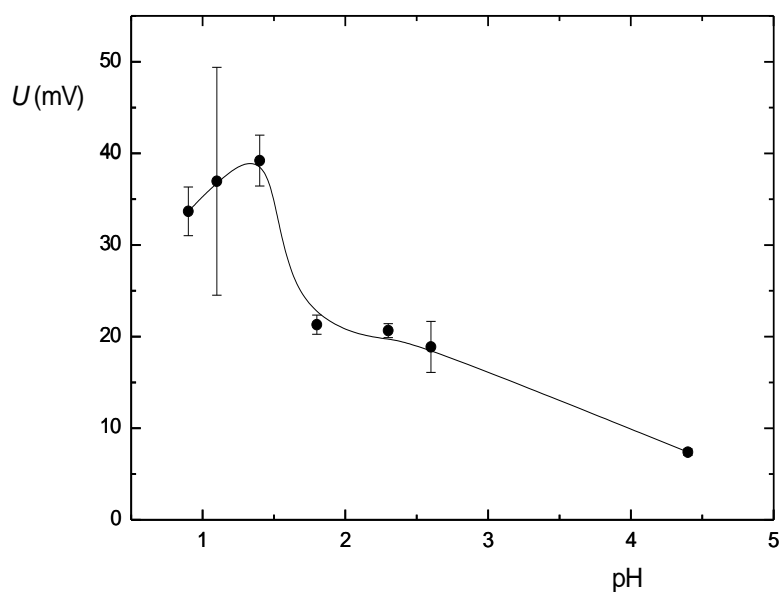
Bromfenolová modř je slabou kyselinou, horní mez závislosti intenzity srážení na pH byla omezena její vlastní disociací v deionizované vodě. Dolní mez byla zvolena s ohledem na kyselou chybu pH metru, která u používaného zařízení nebyla přesně známa. Závislosti tedy byly optimalizovány v rozmezí pH 0,9 - 4,4 a hodnoty naměřené při nízkých pH byly hodnoceny s rezervou. Závislosti pro dvě vlnové délky 531 a 653 nm byly změřeny za jinak stejných podmínek, kterými byly: koncentrace činidla $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bromfenolové modři obsahující $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl, dávkovaný objem 150 μl , průtok činidla $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a délka reakční cívky 80 cm (157 μl).



Obr. 4.16: Závislost signálu na pH při vlnové délce 653 nm

$$c_{\text{BPB}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c_{\text{KCL}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c_{\text{A}} = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}, V = 150 \mu\text{l},$$

$$F = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$$



Obr. 4.17: Závislost signálu na pH při vlnové délce 531 nm
 $c_{\text{BPB}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c_{\text{KCL}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c_{\text{A}} = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $V = 150 \text{ } \mu\text{l}$,
 $F = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$

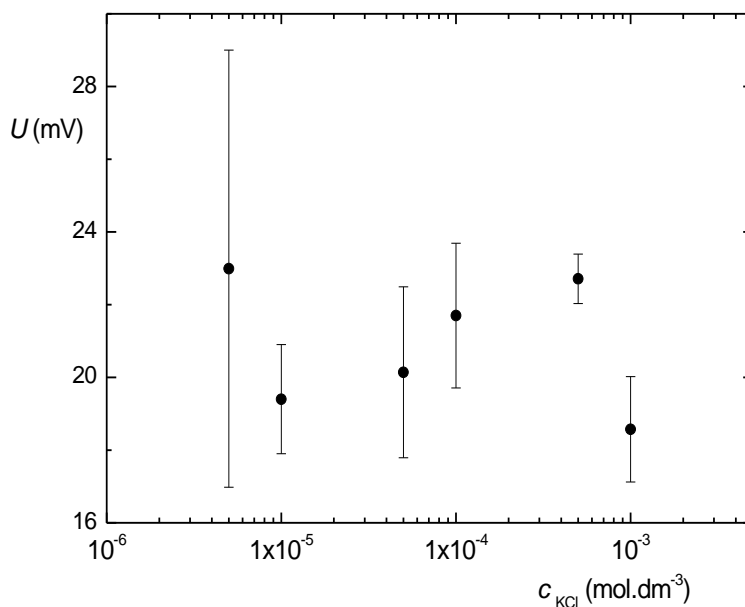
Z naměřených závislostí vyplynulo, že při použití laserového modulu o vlnové délce 531 nm byly získané hodnoty přibližně o půl řádu vyšší než při použití diody o vlnové délce 653 nm. Při obou vlnových délkách bylo možné pozorovat zřetelný pokles rozptylu záření s rostoucí hodnotou pH. Průběh křivky při vlnové délce 653 nm odpovídal kombinaci větší tvorby sraženiny při nižších pH a větší absorpce záření při vyšším pH, kdy bylo srážecí činidlo červené. Závislost naměřená při 531 nm obsahovala maximum okolo hodnoty pH 1,4 naznačující, že ve velmi kyselém prostředí by mohlo docházet k dějům negativně ovlivňujícím stanovení.

Jako optimální zdroj byl zvolen laserový modul o vlnové délce 531 nm a hodnota pH 1,4 odpovídající maximální citlivosti v daném intervalu pH.

4.5.2 Optimalizace koncentrace chloridu draselného

Jak bylo výše zmíněno, vyšší iontová síla roztoku činidla je podmínkou

proběhnutí srážecí reakce. Proto byla optimalizována koncentrace chloridu draselného v činidle v rozmezí $5,0 \cdot 10^{-6} - 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ za účelem zjištění jejího vlivu na velikost a reprodukovatelnost signálu.



Obr. 4.18: Závislost signálu na koncentraci chloridu draselného

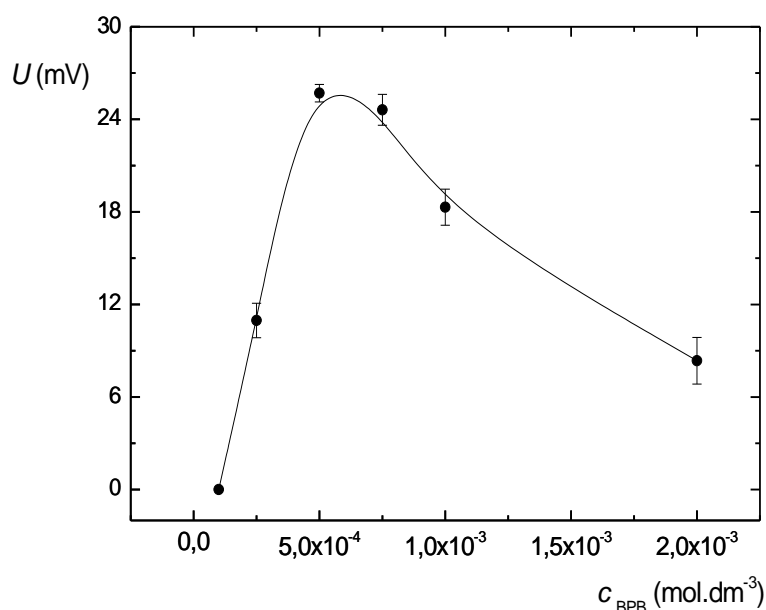
$c_{\text{BPB}} = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c_{\text{A}} = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $V = 150 \text{ } \mu\text{l}$, $F = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}$,
 $\lambda = 531 \text{ nm}$, $\text{pH} = 1,4$

Ukázalo se, že koncentrace chloridu draselného neměla žádný vliv na citlivost stanovení. Všechny naměřené hodnoty oscilovaly v rámci směrodatných odchylek okolo hodnoty blížící se 21 mV. V následujících měřeních byla používána koncentrace KCl $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ zajišťující dostatečnou iontovou sílu roztoku potřebnou pro srážení promethazinu bromfenolovou modří.

4.5.3 Optimalizace koncentrace bromfenolové modří

Dle předpokladu by koncentrace bromfenolové modří v činidle měla být nejdůležitějším parametrem pro dosažení vysoké citlivosti stanovení. S rostoucí koncentrací indikátoru by mělo docházet k hyperbolickému vzrůstu odezvy v důsledku vzniku většího množství sraženiny až do konstantní hodnoty. Tento acidobazický

indikátor je ovšem natolik intenzivně zbarvený, že by mohl při vyšších koncentracích absorbovat většinu záření ze zdroje před jeho interakcí se sraženinou.



Obr. 4.19: Závislost signálu na koncentraci bromfenolové modři

$c_{KCL} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c_A = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $V = 150 \text{ } \mu\text{l}$, $F = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $d_{RC} = 80 \text{ cm}$,
 $\lambda = 531 \text{ nm}$, $\text{pH} = 1,4$

V souladu s výše uvedenými předpoklady měla naměřená závislost maximum následované prudkým poklesem signálu. Ten byl způsoben nejspíše částečnou absorpcí a především intenzivním nespécifickým rozptylem záření v koncentrovaném činidle. Při hodnotách v maximu křivky bylo činidlo mírně zakalené resp. opalizující, ale stále ještě průhledné pro zvolenou vlnovou délku. Jako optimální hodnota byla zvolena koncentrace bromfenolové modři v činidle $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

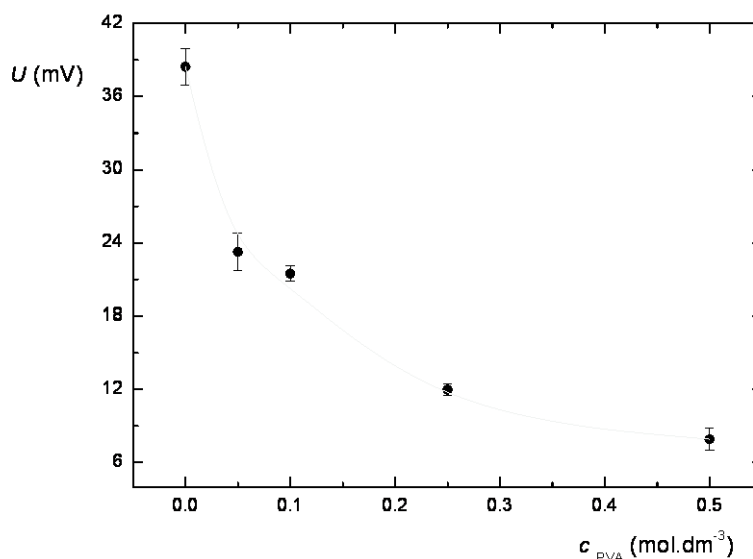
4.5.4 Optimalizace koncentrace polyvinylalkoholu

Píky byly ve většině případů deformované, byl tedy učiněn pokus o vylepšení reprodukovatelnosti signálu použitím stabilizačního činidla. Při stanovení síranů se pozitivně projevila přítomnost polyvinylalkoholu v koncentracích desetin procenta v činidle. Jeho vliv na signál byl zkoumán i při stanovení promethazinu.

Připraveny byly roztoky o koncentracích 0 - 1,0 % PVA a koncentraci BPB

$5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Roztoky bromfenolové modři v PVA se barevně lišily od roztoku BPB v deionizované vodě naznačující interakci mezi oběma organickými sloučeninami.

Závislost, jejíž průběh je zobrazen na obr. 4.20, byla změřena v rozmezí koncentrací PVA v roztoku činidla pouze do 0,5 %, protože při koncentraci 1,0 % PVA nedošlo k ustálení základní linie.



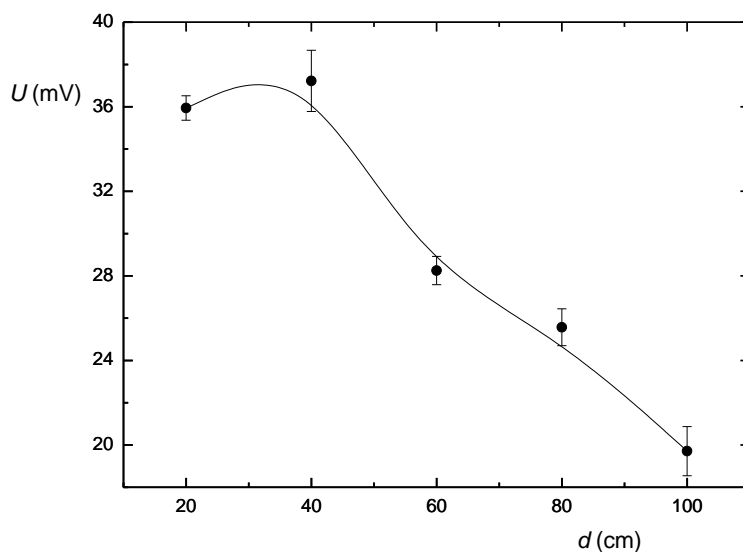
Obr. 4.20: Vliv koncentrace PVA na signál při stanovení promethazinu

$$c_{\text{BPB}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c_{\text{KCL}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c_{\text{A}} = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}, V = 150 \text{ } \mu\text{l}, \\ F = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, d_{\text{RC}} = 80 \text{ cm}, \lambda = 531 \text{ nm}, \text{pH} = 1,4$$

Ze závislosti vyplynulo, že přítomnost polyvinylakoholu rušila stanovení a jeho přídavek nevedl k vylepšení tvaru signálu. Příčina poklesu signálu tkvěla v neznámém ději, který se projevil změnou barvy činidla při přípravě roztoků. Konkrétní příčina této barevné změny nebyla zřejmá a nebyla zkoumána.

4.5.5 Optimalizace délky reakční cívky

Dalším optimalizovaným parametrem stanovení byla délka reakční cívky. Vliv její délky byl zkoumán v rozsahu 20 – 100 cm, což při přepočtu na objem odpovídalo 39 – 196 μl . Průběh této závislosti je zobrazen na obr. 4.21.



Obr. 4.21: Závislost velikosti signálu na délce reakční cívky

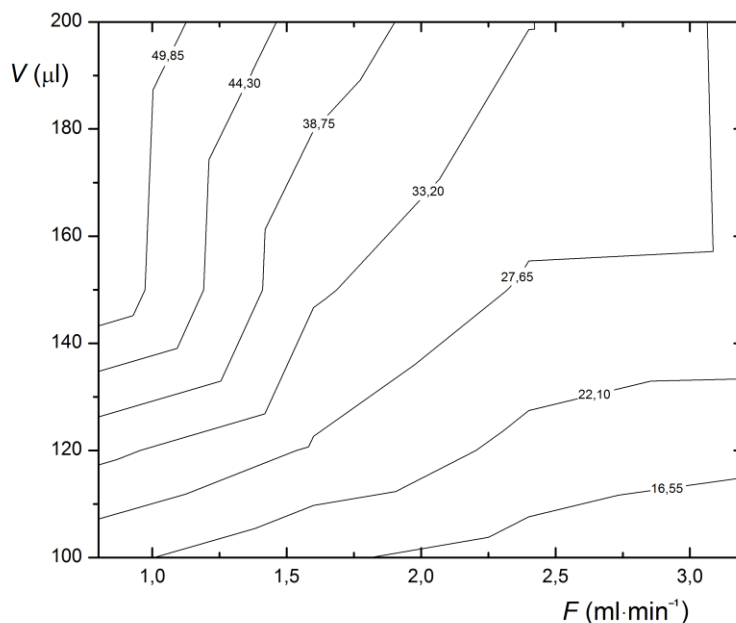
$c_{\text{BPB}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c_{\text{KCL}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c_{\text{A}} = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, $V = 150 \text{ } \mu\text{l}$,
 $F = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 531 \text{ nm}$, $\text{pH} = 1,4$

Výsledná závislost obsahovala maximum odpovídající délce reakční smyčky 40 cm a ukázala, že asociace promethazinu s činidlem a jejich vysrážení probíhá rychle. Prodlužování reakční smyčky vedlo pouze k vyšší disperzi zóny. Pro další měření byla zvolena reakční cívka délky 40 cm přibližně odpovídající vnitřnímu objemu cívky 79 μl .

4.5.6 Optimalizace dávkovaného objemu vzorku a průtokové rychlosti činidla

Posledním optimalizovaným parametrem byla vzájemná závislost dávkovaného objemu a průtokové rychlosti činidla. Z dosavadních zkušeností bylo možno vyvodit, že optimální pro stanovení by měla být spíše nízká průtoková rychlost do $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a dávkovaný objem vzorku menší než $250 \text{ } \mu\text{l}$.

Průtoková rychlost byla optimalizována v rozmezí $0,8 - 3,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a dávkovaný objem vzorku v rozmezí $100 - 200 \text{ } \mu\text{l}$.



Obr. 4.22: Závislost výšky píku na průtokové rychlosti čididla a dávkovaném objemu vzorku

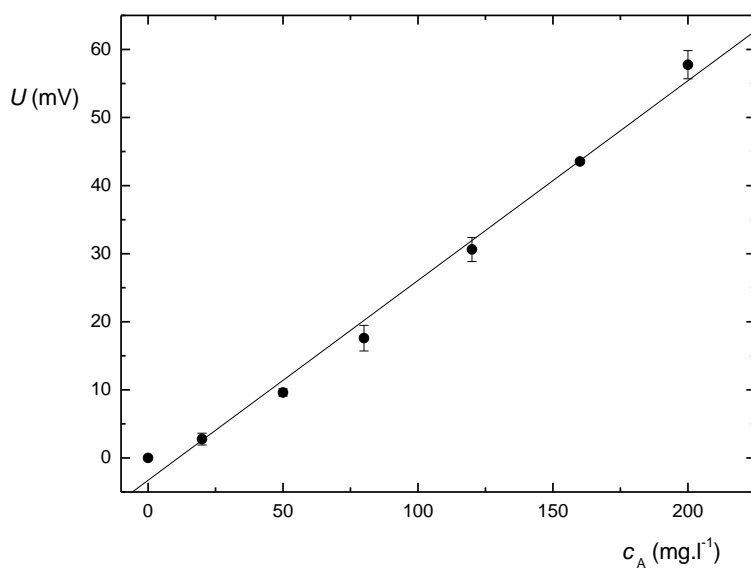
$$c_{\text{BPB}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c_{\text{KCL}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, c_{\text{A}} = 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}, d_{\text{RC}} = 40 \text{ cm}, \\ \lambda = 531 \text{ nm}, \text{pH} = 1,4$$

Z grafu je patrné, že nejvyšší odezvy poskytovala kombinace velkých dávkovaných objemů vzorku a nízkých průtokových rychlostí.

Jako kompromisní byla zvolena kombinace průtokové rychlosti čididla $1,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a dávkovaný objem vzorku $150 \mu\text{l}$, protože dávkování objemu $200 \mu\text{l}$ bylo při nízkých průtokových rychlostech provázáno větším rozptylem naměřených hodnot. Tento aspekt není z konturového grafu možné vyčíst.

4.5.7 Kalibrace a základní charakteristiky stanovení promethazinu

Při optimálních hodnotách podmínek stanovení byla naměřena kalibrační závislost a určeny základní charakteristiky stanovení promethazinu skrze tvorbu jeho špatně rozpustného asociátu s bromfenolovou modří. Kalibrační závislost je zobrazena na obr. 4.23 a základní charakteristiky stanovení jsou uvedeny v tab. 4.7.



Obr. 4.23: Kalibrační závislost nefelometrického stanovení promethazinu s bromfenolovou modří

$c_{\text{BPB}} = 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c_{\text{KCL}} = 5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $V = 150 \text{ } \mu\text{l}$, $F = 1,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$,
 $d_{\text{RC}} = 40 \text{ cm}$, $\lambda = 531 \text{ nm}$, $\text{pH} = 1,4$

Tab. 4.7: Základní charakteristiky nefelometrického stanovení promethazinu s BPB

	h (mV)
Citlivost [$\text{l} \cdot \text{mg}^{-1}$]	0,2935
Opakovatelnost ($120 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) [%]	2,64
LOD [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	15,9
LOQ [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	53,0
R	0,99505
LDR do [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	200

Z výše uvedených základních charakteristik vyplynulo, že lineární dynamický rozsah a opakovatelnost metody jsou dostačující pro stanovení promethazinu v jeho lékových formách.

Omezené množství literárních zdrojů týkajících se stanovení promethazinu na základě rozptylu záření jeho iontového asociátu s bromfenolovou modří [1]

neumožnilo porovnání výsledků získaných s průtokovou detekční celou s výsledky získanými na spektrofotometru. Autoři zmíněného článku publikovali lineární pracovní rozsah $25 - 195 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ promethazinu, ovšem bez udání limitu detekce. Na základě této neúplné informace nebylo možné vytvářet závěry o vlivu použité detekční cely na parametry stanovení.

4.6 Stanovení reálných vzorků lékových forem promethazinu metodou FIA s nefelometrickou detekcí

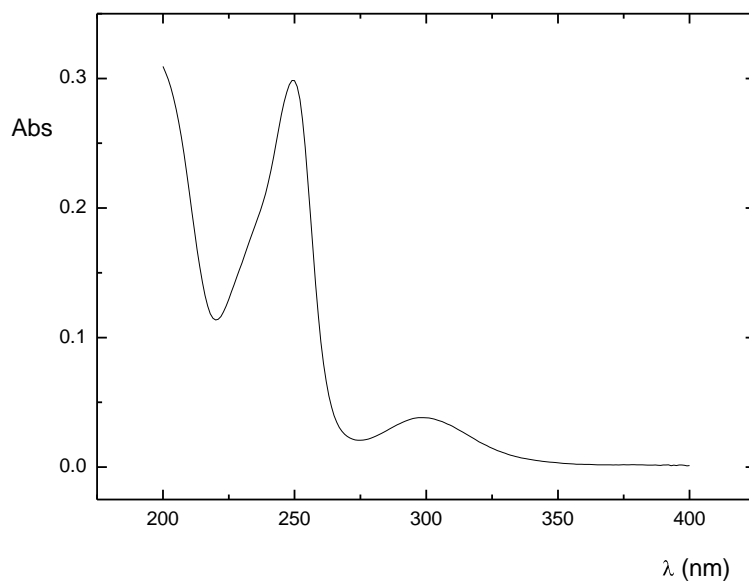
Vzorky ve formě sirupu byly pro obě metody stanovení připravovány naředěním na příslušné koncentrace.

Vzorky ve formě tablety byly vždy zváženy, rozdrceny a z rozdrcené tablety byl odebrán definovaný podíl, který byl následně rozpuštěn. Rozpuštěné podíly byly dále sonikovány v ultrazvuku 20 minut za účelem dosažení úplného převedení účinné látky do roztoku a přefiltrovány přes vatou do odměrné baňky, kde byly roztoky doplněny po rysku. Pro stanovení metodou UV spektrometrie byly takto připravené roztoky ještě dále ředěny.

4.6.1 Stanovení promethazinu metodou UV-spektrometrie

Metoda absorpční spektrometrie v UV oblasti byla zvolena jako referenční metoda stanovení obsahu promethazin hydrochloridu v jeho lékových formách. Spektrum standardu promethazinu o koncentraci $1\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (v deionizované vodě) bylo změřeno v rozsahu vlnových délek 200 – 400 nm a je zobrazeno na obr. 4.24. Byly nalezeny dva absorpční pásy s maximy při vlnových délkách 249 a 300 nm. Při vlnové délce 249 nm byl následně metodou kalibrační přímky stanoven obsah promethazinu ve vzorcích léčiv.

Deklarované hodnoty obsahu promethazinu v lékových formách a hodnoty stanovené metodou UV spektrometrie jsou uvedeny v tab. 4.8.



Obr. 4.24: Absorpční spektrum promethazinu v UV oblasti

Tab. 4.8: Stanovení promethazinu v reálných vzorcích metodou UV spektrometrie při $\lambda = 249$ nm

Vzorek	Deklarovaný obsah	Stanovení UV spektrometricky (249 nm)
Prothazin (tbl.)	25 mg v tabletě	$22,8 \pm 0,8$ mg v tabletě
Coldrex, noční léčba (sirup)	20 mg ve 20 ml ($1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	$830 \pm 4,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Referenční metodou UV spektrometrie byl v lékových formách stanoven menší obsah promethazin hydrochloridu než bylo deklarováno výrobcem.

4.6.2 Stanovení promethazinu v reálných vzorcích metodou FIA s nefelometrickou detekcí

Pro stanovení obsahu promethazin hydrochloridu v léčivých přípravcích metodou FIA s nefelometrickou detekcí po srážení bromefenolovou modří byla použita metoda kalibrační přímky. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.9.

Tab. 4.9: Stanovení promethazinu v reálných vzorcích metodou FIA s nefelometrickou detekcí

Vzorek	Stanovení FIA s nefelometrickou detekcí
Prothazin (tbl.)	25,6 ± 1,6 mg v tabletě
Coldrex, noční léčba (sirup)	1480 ± 120 mg·l ⁻¹

Z porovnání výsledků s referenční metodou a hodnotami deklarovanými výrobcem vyplynulo, že stanovení promethazinu metodou FIA s nefelometrickou detekcí bylo zatíženo pozitivní chybou, která se obzvláště významně projevila u léčiva ve formě sirupu. Naopak referenční metodou byl v této matrici nalezen menší obsah analytu, než výrobce udával. Chyby byly pravděpodobně způsobeny efektem matrice vzorku, která měla na každou metodu stanovení odlišný vliv.

V laboratoři sestavený nefelometrický detektor se osvědčil i při stanovení organického analytu, přestože aplikovaná metoda není vhodná pro všechny typy matrice.

5 Závěr

V této práci byla zkonstruována průtoková nefelometrická detekční cela a aplikována pro stanovení dvou analytů: síranového aniontu a léčiva promethazinu. Významnou výhodou tohoto jednoúčelového zařízení byla jeho finanční nenáročnost, protože bylo sestaveno ze snadno dostupných součástí. Navíc bylo toto zařízení přenosné.

Prvním krokem této práce byl návrh, sestavení nefelometrické cely a optimalizace jejích konstrukčních parametrů. Druhým krokem pak byla optimalizace reakčních podmínek stanovení SO_4^{2-} srážením chloridem barnatým a volba nejvhodnějšího laserového zdroje záření za účelem dosažení vysoké citlivosti a opakovatelnosti stanovení průtokovou injekční analýzou. V souladu s předpoklady bylo zjištěno, že bylo optimální pracovat s laserovým modulem o relativně vysokém výkonu a vlnové délce poskytující jak intenzivní rozptyl tak i vysokou odezvu sensoru, i když si toto uspořádání vynutilo stabilizaci laserového zdroje omezením napájecího proudu. Porovnáním dosažených výsledků stanovení vybraných analytů s literárními zdroji bylo zjištěno, že v laboratoři sestavený detektor nebyl limitujícím parametrem stanovení a bylo s ním dosaženo výsledků srovnatelných s výsledky stanovení za použití komerčních spektrometrických přístrojů. Metoda byla aplikována pro stanovení síranů ve vzorcích pitné a minerální vody s výbornými výsledky.

Dále byla detekční cela úspěšně aplikována ve stejném experimentálním uspořádání i pro stanovení organického analytu - léčiva promethazinu na základě tvorby jeho špatně rozpustného iontového asociátu s bromfenolovou modří. V případě tohoto stanovení nebylo možné výsledky porovnat s literárními zdroji. Základní charakteristiky stanovení ovšem byly plně postačující pro analýzu reálných vzorků – lékových forem obsahujících promethazin a porovnání dosažených výsledků s referenční metodou UV spektrometrie. V tomto případě byly dosažené výsledky sporné – významně se projevil interference matrice. Ovšem opět nebyla limitujícím faktorem instrumentace, ale probíhající chemická reakce.

Experimenty popsané v této diplomové práci probíhaly intenzivně po dobu pěti měsíců a po celou dobu byl používán jeden sensor, u kterého, během této doby, nebyla pozorována žádná degradace odezvy. Zařízení tak je schopno dlouhodobého provozu.

Všechny cíle vytčené v této práci byly splněny.

6 Literatura

- [1] Calatayud, J. M.; Sarrion, S. N.; Sampedro, A. S.; Benito, C. G.: Determination of promethazine hydrochloride with bromophenol blue by a turbidimetric method and flow injection analysis. *Microchemical Journal* **45**:2, 129–136 (1992).
- [2] Tzanavaras, P. D.; Themelis, D. G.: Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis. *Analytica Chimica Acta* **588**:1, 1–9 (2007).
- [3] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.: *Principles of Instrumental Analysis*. Brooks/Cole, 6th edn.2006.
- [4] Segundo, M. A.; Rangel, A. O. S. S.: Flow Analysis: a Critical View of its Evolution and Perspectives. *Journal of Flow Injection Analysis* **19**, 3–8 (2002).
- [5] Vieira, J.; Jr, I. R.; Reis, B.: Sampling strategies in sequential injection analysis: Exploiting the monosegmented-flow approach. *Analytica Chimica Acta* **366**, 257–262 (1998).
- [6] Cerdà, V.; Estela, J. M.; Forteza, R.; et al.: Flow techniques in water analysis. *Talanta* **50**:4, 695–705 (1999).
- [7] Ruzicka, J.; Hansen, E. H.: Flow injection analyses. *Analytica Chimica Acta* **78**:1, 145–157 (1975).
- [8] Ruzicka, J.; Hansen, E. H.: *Flow Injection Analysis*. 1988.
- [9] Ruzicka, J.: From Test Tube to Integrated Microconduits. *Analytical Chemistry* **55**:11, 1043A–1053A (1983).
- [10] Betteridge, D.: Flow Injection. *Analytical Chemistry* **50**:9, 832A – 846A (1978).
- [11] Miró, M.; Hansen, E. H.: Miniaturization of environmental chemical assays in flowing systems: the lab-on-a-valve approach vis-à-vis lab-on-a-chip microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta* **600**:1-2, 46–57 (2007).
- [12] Hansen, E. H.: The impact of flow injection on modern chemical analysis: has it fulfilled our expectations? And where are we going? *Talanta* **64**:5, 1076–83 (2004).
- [13] Ruzicka, J.; Marshall, G. D.: Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* **237**, 329–343 (1990).
- [14] Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P.: Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy* **93**, 354–359 (1999).
- [15] Lima, J. L. F. C.; Santos, J. L. M.; Dias, A. C. B.; et al.: Multi-pumping flow systems: an automation tool. *Talanta* **64**:5, 1091–8 (2004).

- [16] Gubeli, T.; Christian, G. D.; Ruzicka, J.: Fundamentals of Sinusoidal Flow Sequential Injection Spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, 2407–2413 (1991).
- [17] Ruzicka, J.; Gubeli, T.: Principles of Stopped-Flow Sequential Injection Analysis and Its Application to the Kinetic Determination **63**, 1680–1685 (1991).
- [18] Ruzicka, J.; Hansen, E. H.: Flow injection analysis – Where are we heading? *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **17**:2, 69–73 (1998).
- [19] Wang, J.; Hansen, E. H.: Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**:4, 225–231 (2003).
- [20] Grudpan, K.: Some recent developments on cost-effective flow-based analysis. *Talanta* **64**:5, 1084–90 (2004).
- [21] Ruzicka, J.: Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *The Analyst* **125**, 1053–1060 (2000).
- [22] Sequeira, M.; Bowden, M.; Minogue, E.; Diamond, D.: Towards autonomous environmental monitoring systems. *Talanta* **56**:2, 355–63 (2002).
- [23] Wang, J.: Lab-on-valve mesofluidic analytical system and its perspectives as a “world-to-chip” front-end. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**:4, 809–11 (2005).
- [24] Harvey, D.: *Modern Analytical Chemistry*. Boston: McGraw-Hill, 2000.
- [25] Rayleigh and Mie Scattering: Dostupné z URL: <<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/atmos/blusky.html#c3>> [cit. 1.7.2013].
- [26] Morais, I. P. A.; Tóth, I. V.; Rangel, A. O. S. S.: Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications. *Spectroscopy Letters* **39**:6, 547–579 (2006).
- [27] Vagner, B. dos S.; Thiago, B. G.; Suarez, W. T.; et al.: Evaluation of Turbidimetric and Nephelometric Techniques for Analytical Determination of N-Acetylcysteine and Thiamine in Pharmaceutical Formulations Employing a Lab-Made Portable Microcontrolled Turbidimeter and Nephelometer. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **22**:10, 1968–1978 (2011).
- [28] Sohrabian, A.; Noraddin, F. H.; Flodin, M.; et al.: Particle enhanced turbidimetric immunoassay for the determination of urine cystatin C on Cobas c501. *Clinical Biochemistry* **45**, 339–344 (2012).
- [29] Christiansen, M. S.; Blirup-Jensen, S.; Foged, L.; et al.: A particle-enhanced turbidimetric immunoassay for quantitative determination of orosomucoid in urine: development, validation and reference values. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **42**:10, 1168–1177 (2004).

- [30] Montagne, P. M.; Trégoat, V. S.; Cuillière, M. L.; et al.: Measurement of Nine Human Milk Proteins by Nephelometric Immunoassays: Application to the Determination of Mature Milk Protein Profile. *Clinical Biochemistry* **33**:3, 181–186 (2000).
- [31] Begot, C.; Desnier, I.; Daudin, J. D.; et al.: Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements, 225–232 (1996).
- [32] Augustin, J.-C.; Rosso, L.; Carrier, V.: Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* **38**, 137–146 (1999).
- [33] Taylor, R. H.; Grate, J. W.: A Flow Injection Analysis Technique for the Determination of Chloride Using reflectance Detection. *Talanta* **42**:2, 257–261 (1995).
- [34] Oliveira, C. C.; Sartini, R. P.; Zagatto, E. A. G.; da Costa Lima, J. L. F.: Flow analysis with accuracy assessment. *Analytica Chimica Acta* **350**, 31–36 (1997).
- [35] Van Staden, J. F.: Flow-injection analysis of substances in water. Part I. Anions. A critical review. *Water SA* **13**, 197–208 (1987).
- [36] Lavine, B. K.; Oxenford, L.; Kim, M.; et al.: Novel turbidimetric method to study polymer swelling. *Microchemical Journal* **103**, 97–104 (2012).
- [37] Avena, M.; Giacomelli, C.; García, C.; Pauli, C. De: : Dissolution of chromium hydroxides monitored by turbidimetry. *Langmuir* **12**, 6659–6664 (1996).
- [38] Dehring, K. a; Workman, H. L.; Miller, K. D.; et al.: Automated robotic liquid handling/laser-based nephelometry system for high throughput measurement of kinetic aqueous solubility. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **36**:3, 447–56 (2004).
- [39] Kubáň, V.: Continuous precipitation techniques in flow injection analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **346**, 837–881 (1993).
- [40] Masár, M.; Bomastyk, B.; Bodor, R.; et al.: Determination of chloride, sulfate and nitrate in drinking water by microchip electrophoresis. *Microchimica Acta* **117**, 309–316 (2012).
- [41] Van Staden, J. F.; Taljaard, R. E.: Determination of sulphate in natural waters and industrial effluents by sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta* **331**:3, 271–280 (1996).
- [42] De Oliveira, F. S.; Korn, M.: Spectrophotometric determination of sulphate in automotive fuel ethanol by sequential injection analysis using dimethylsulphonazo(III) reaction. *Talanta* **68**:3, 992–9 (2006).
- [43] Chimpalee, N.; Cimpalee, D.; Suparuknari, S.; et al.: Flow-injection spectrofluorimetric determination of sulphate using calcein and zirconium. *Analytica Chimica Acta* **298**, 401–404 (1994).

- [44] Klaassen, C. D.: *Casarett and Doull's toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York: McGraw-Hill, 2001.
- [45] Santelli, R.; Lopes, P.: Turbidimetric determination of sulphate in waters employing flow injection and lead sulphate formation. *Analytica Chimica Acta* **300**, 149–153 (1995).
- [46] Hulanicki, A.; Lewandowski, R.; Lewenstam, A.: Elimination of ionic interferences in the determination of sulfates in water using the lead-sensitive ion-selective electrode. *The Analyst* **101**, 939–942 (1976).
- [47] Hirokazu, H.; Horvai, G.; Pungor, E.: Continuous Flow Determination of Sulphate With a Lead-selective Electrode. *The Analyst* **113**, 1870–1820 (1988).
- [48] Firouzabadi, S.; Razavipanah, I.; Zhiani, R.; Ghanei-Motlagh, M.: Sulfate-selective electrode based on a bis-thiourea ionophore. *Monatshefte für Chemie* **144**:2, 113–120 (2013).
- [49] Miles, D. L.; Cook, J. M.: The determination of sulphate in natural waters by inductively coupled plasma emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1982**, 207–212 (261AD).
- [50] Lapa, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Pinto, I. V. O. S.: Sequential Injection Analysis Determination of Sulphate in Wastewaters by Ultraviolet-Spectrophotometry. *Journal of Brazilian Chemical Society* **11**:2, 170–174 (2000).
- [51] Krug, F. J.; Filho, B. H.; Zagatto, E. A. G.; Jorgensen, S. S.: Rapid Determination of Sulphate in Natural Waters and Plant Digests by Continuous Flow Injection Turbidimetry. *Analyst* **102**, 503 – 508 (1977).
- [52] Krug, F. J.; Zagatto, E. A. G.; Reis, B. F.; et al.: Turbidimetric determination of sulphate in plant digests and natural waters by flow injection analysis with alternating streams. *Analytica Chimica Acta* **145**, 179–187 (1983).
- [53] Baban, S.; Beetlestone, D.; Betteridge, D.; Sweet, P.: The Determination of Sulphate by Flow-injection Analysis with Exploitation of pH Gradients and EDTA. *Analytica Chimica Acta* **114**, 319–323 (1980).
- [54] Liu, H.; Dasgupta, P. K.: A liquid drop: A windowless optical cell and a reactor without walls for flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta* **326**:1-3, 13–22 (1996).
- [55] Morais, I. P. a; Souto, M. R. S.; Lopes, T. I. M. S.; Rangel, A. O. S. S.: Use of a single air segment to minimise dispersion and improve mixing in sequential injection: turbidimetric determination of sulphate in waters. *Water research* **37**:17, 4243–9 (2003).
- [56] Jakmunee, J.; Udnan, Y.; Morrison, R.; et al.: A low-cost light-scattering detector for the flow-injection nephelometric determination of sulfate. *Analytical sciences: the International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* **19**:11, 1495–8 (2003).

- [57] Singh, R. P.; Pambid, E. R.; Abbas, N. M.: Determination of Sulfate in Deep Subsurface Waters by Suppressed Ion Chromatography. *Analytical Chemistry* **63**:6, 1897–1901 (1991).
- [58] Vieira, J. a; Raimundo, I. M.; Reis, B. F.: Turbidimetric determination of sulphate employing gravity flow-based systems. *Analytica Chimica Acta* **438**:1-2, 75–81 (2001).
- [59] Vieira, J.; Reis, B.; Kronka, E.: Multicommutation in flow analysis. Part 6. Binary sampling for wide concentration range turbidimetric determination of sulphate in plant digests. *Analytica Chimica Acta* **366**, 251–255 (1998).
- [60] Lincová, D.; Farghali, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2007.
- [61] Daniel, D.; Gutz, I. G. R.: Flow injection spectroelectroanalytical method for the determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical preparations. *Analytica Chimica Acta* **494**:1-2, 215–224 (2003).
- [62] Wallace, J. E.; Shimek, E. L.; Harris, S. C.; Stavchansky, S.: Determination of promethazine in serum by liquid chromatography. *Clinical Chemistry* **27**:2, 253–5 (1981).
- [63] Wallace, J. E.; Shimek, E. L.; Stavchansky, S.; Harris, S. C.: Determination of promethazine and other phenothiazine compounds by liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytical chemistry* **53**:7, 960–2 (1981).
- [64] Ribeiro, F. W. P.; Cardoso, A. S.; Portela, R. R.; et al.: Electroanalytical Determination of Promethazine Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations on Highly Boron-Doped Diamond Electrodes Using Square-Wave Adsorptive Voltammetry. *Electroanalysis* **20**:18, 2031–2039 (2008).
- [65] Ni, Y.; Wang, L.; Kokot, S.: Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta* **439**:1, 159–168 (2001).
- [66] Saif, M. J.; Anwar, J.: A new spectrophotometric method for the determination of promethazine-HCl from pure and pharmaceutical preparations. *Talanta* **67**:5, 869–72 (2005).
- [67] Hornyak, I.; Kozma, L.; Lapat, A.; Tovari, I.: Spectrofluoric Determination of Diethazine and Promethazine in Pharmaceutical Preparations. *Biomedical Chromatography* **11**, 99–101 (1997).
- [68] Terminologická komise.: Nomenklatura a terminologie. *Chemické listy* **444**, 439–444 (2000).
- [69] Eckschlager, K.: *Chemometrie*. Praha: Karolinum, 1991.
- [70] Pavlík, J.: *Aplikovaná statistika*. Praha: VŠCHT, 2005.

- [71] Zichová, J.: *Plánování experimentů a predikční vícerozměrná analýza*. Praha: Karolinum, 2007.
- [72] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, 2007.
- [73] Technický list k TSL250/Light-to-voltage sensor Dostupné z URL: <<http://www.ams.com/eng/Products/Light-Sensors/Light-to-Voltage/TSL250>> [cit. 8.8.2013].
- [74] Ružička, J.: *Flow injection analysis*. New York: J. Wiley, 2nd ed.1988.
- [75] Dias, A. C. B.; Borges, E. P.; Zagatto, E. a G.; Worsfold, P. J.: A critical examination of the components of the Schlieren effect in flow analysis. *Talanta* **68**:4, 1076–82 (2006).
- [76] Filha, M. M. S.; Krug, J.: Sulphate preconcentration by anion exchange resin in flow injection and its turbidimetric determination in water. *Talanta* **40**:10, 1529–1534 (1993).