

Univerzita Karlova

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**



**Vývoj a optimalizace metody pro stanovení jódu  
v různých matricích**

Diplomová práce

Školitel: PharmDr. Ivana Šrámková, PhD.

Konzultant: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, PhD.

Hradec Králové, 2017

Patrik Kušnír



## **Pod'akovanie**

Ďakujem mojej školiteľke PharmDr. Ivane Šrámkovej PhD. za jej odborné vedenie, pomoc pri experimentoch, priateľský prístup a cenné rady, ktoré mi poskytla pri vypracovávaní tejto diplomovej práce.

## **Prehlásenie o pôvodnosti**

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojim pôvodným autorským dielom a všetky myšlienky, dáta a ich zdroje, z ktorých som pre spracovanie čerpal, riadne citujem v zozname použitej literatúry.

Práca nebola využitá pre získanie iného alebo rovnakého kvalifikačného titulu.

Dátum

Podpis

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Cieľ a popis zadania práce .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická časť .....</b>	<b>11</b>
3.1	Význam jódu v organizme .....	11
3.2	Analytické metódy na stanovenie jódu .....	12
3.3	Prietokové techniky .....	14
3.3.1	Prietoková injekčná analýza (FIA) .....	14
3.3.2	Sekvenčná injekčná analýza (SIA) .....	15
3.3.3	Lab-On-Valve analýza .....	16
3.3.4	Lab-In-Syringe .....	18
<b>4</b>	<b>Experimentálna časť .....</b>	<b>19</b>
4.1	Použitá analytická reakcia .....	19
4.2	Prístrojové vybavenie .....	20
4.3	Zoznam použitých látok .....	22
4.4	Príprava roztokov .....	23
4.5	Optimalizácia výberu oxidačného činidla .....	25
4.6	Optimalizácia výberu činidla na vytvorenie kyslého prostredia .....	27
4.7	Optimalizácia pH tlmivého roztoku .....	29
4.8	Optimalizácia objemu tlmivého roztoku .....	31
4.9	Optimalizácia koncentrácie oxidačného činidla .....	32
4.10	Optimalizácia objemu použitého indikátoru .....	34
4.11	Optimalizácia objemu extrakčného činidla .....	35
4.12	Optimalizácia času oxidácie jodidu na jód .....	36
4.13	Optimalizácia času oxidácie genciánovej violete .....	37
4.14	Optimalizácia času extrakcie do chloroformu .....	38

4.15	Overenie citlivosti metódy .....	39
4.16	Kalibračná krivka a analytické parametre metódy .....	40
4.17	Reálne vzorky .....	43
<b>5</b>	<b>Záver .....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>Zoznam použitej literatúry .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Príloha: Program použitý na meranie kalibračnej krivky .....</b>	<b>50</b>

## Abstrakt

Katedra: Katedra analytické chemie  
Kandidát: Patrik Kušnir  
Školiteľ: PharmDr. Ivana Šrámková, Ph.D.  
Konzultant: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Vývoj a optimalizace metody pro stanovení jódu v různých matricích

Jód patří medzi dôležité stopové prvky v strave. Vo svete trpí nedostatkom jódu v príjme potravy približne 2 miliardy ľudí. Nedostatok jódu vedie k nedostatku tvorby hormónov štítnej žľazy, ktorý súvisí s ochoreniami ako napr. struma. Z tohto dôvodu sa jód pridáva do bežných potravín (jódovaná kuchynská soľ) a dôležité sú aj iné zdroje tohto prvku, napríklad minerálne vody.

Z tohto pohľadu je sledovanie množstva jódu dôležitou úlohou pre včasné odhalenie rizika chorôb spojených so štítnou žľazou a ich diagnostikou.

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť jednoduchú metódu s využitím jednoduchého prístrojového vybavenia na stanovenie jódu v rôznych vzorkách. Súčasťou vývoja našej metódy bola optimalizácia podmienok pre analýzu jódu v stopovom množstve a stanovenie obsahu jódu vo vybraných vzorkách.

Ako technika bola využitá prietoková technika *Lab-In syringe*.

Po optimalizácii táto metóda bola využitá na analýzu stopového množstva jódu vo vzorke nosných kvapiek a v doplnku stravy s obsahom jódu.

## Abstract

Department: Department of Analytical Chemistry

Candidate: Patrik Kušnír

Supervisor: PharmDr. Ivana Šrámková, Ph.D.

Tutor: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Development and optimization of a method for the determination of iodine in various matrices

Iodine is an important trace element in our nutrition. Approximately two billions people in the world has insufficient iodine intake in nutrition. Deficiency in iodine causes insufficient production of thyroidal hormones, which is connected with various diseases such as goitre. That is why iodine is added to basic foodstuffs as table salt and other sources are important too, for example mineral water.

It is important to monitor content of iodine to early discovery of disease risk connected with thyroidal gland and its diagnostics.

The goal of this diploma thesis was to develop simple method with using of simple instrumental equipment to determine iodine in different samples. One part of development of our method was optimalization of conditions for iodine analysis in trace quantity and determination of iodine in selected samples.

In-Syringe analysis, one of flow techniques, was used as a technique for accomplishing the task.

This method was optimized for determination of iodine in sample. After optimalization this method was used for analysis of trace quantity of iodine in nose drops and food supplement with iodine.



# 1 Úvod

Jód patrí medzi dôležité stopové prvky v potrave. Je dôležitý pre správnu funkciu štítnej žľazy a tvorbu hormónov tejto žľazy. Pre dôležitosť tohto prvku z hľadiska potreby monitorovania hladiny jódu v tele bolo potrebné vyvinúť metódu s jednoduchým prístrojovým vybavením.

Keďže jód sa nachádza v tele len v stopovom množstve, cieľom bolo vyvinúť metódu, aby bola použiteľná pre stopové množstvo jódu vo vzorke.

Ako metóda bola použitá *Lab-In-syringe* analýza. Táto metóda patrí medzi prietokové techniky. Na rozdiel od ostatných prietokových techník, základným princípom tejto metódy je postupné nasávanie jednotlivých zložiek podľa naprogramovaného poradia pomocou pumpy do striekačky. Následne v striekačke prebehne chemická reakcia a výsledný produkt reakcie sa pumpou vytlačí do detekčnej cely, kde sa zmeria absorbanca roztoku.

## 2 Cieľ a popis zadania práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo:

- vybrať vhodnú reakciu, ktorá s analytom poskytne farebný produkt
- optimalizovať podmienky reakcie
- zmerať kalibračnú krivku s optimalizovanými podmienkami a určiť analytické parametre metódy
- určiť možné interferencie ostatných balastných látok
- aplikovať metódu s vhodne optimalizovanými podmienkami na reálne vzorky

## 3 Teoretická časť

### 3.1 Význam jódu v organizme

Jód je esenciálna zložka hormónov produkovaných štítnou žľazou, ktoré sú zodpovedné za reguláciu rôznych enzýmov a metabolických procesov. Doporučený denný príjem jódu pre dospelého človeka je 150 µg [2].

Po prijatí jódu z potravy sa v tenkom čreve redukuje na jodid a podlieha takmer úplnej absorpcii [3]. Po absorpcii sa jód vylučuje hlavne obličkami a takisto jód vychytáva z krvi štítna žľaza pomocou prenášača, ktorý prenáša jód proti koncentračnému gradientu [2].

Odhaduje sa, že viac než dva milióny ľudí má nedostatočný príjem jódu a u týchto ľudí je riziko rozvoja chorôb, ktoré sú spojené s nedostatkom jódu [4]. Medzi tieto choroby patrí mentálna retardácia, znížená funkcia štítnej žľazy, struma, kreténizmus a poruchy rastu a vývoja. Je to spôsobené nedostatočnou tvorbou hormónov štítnej žľazy pre chýbajúci jód v strave [2].

Naopak nadmerný prísun jódu v potrave vedie k zvýšenej funkcii štítnej žľazy a autoimunitným chorobám štítnej žľazy [6].

V potrave sa nachádza najviac jódu v morských rybách a rastlinách pre vyšší obsah jódu v morskej vode. Organicky viazaný jód býva vo vysokých koncentráciách v určitých druhoch morských rias [4]. U nás sa k zvýšeniu príjmu jódu pridáva jód do kuchynskej soli.

Zdrojom jódu môžu byť aj voľne dostupné doplnky stravy s obsahom jódu. Podľa štúdie Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) u dospelých účastníkov štúdie, ktorí užívali doplnky stravy s obsahom jódu bol priemerný denný príjem jódu 140 µg [2].

Jód vylúčený močom sa považuje za epidemiologický indikátor k zisteniu príjmu jódu v populácii [5]. Podľa hladiny jódu v moči sa určuje závažnosť nedostatku jódu v strave [6]. Tieto údaje sú zhrnuté v tabuľke č. 1.

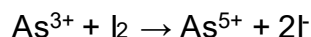
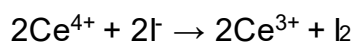
**Tabuľka č. 1:** Závažnosť nedostatku alebo nadbytku jódu v organizme podľa hladiny jódu v krvi

Závažnosť	Hladina jódu
veľmi závažný nedostatok	menej než 20 µg/l
stredne závažný nedostatok	20-40 µg/l
mierny nedostatok	50-99 µg/l
postačujúci príjem	100-199 µg/l
príjem prevyšujúci požiadavky organizmu	200-299 µg/l
nadmerný príjem	nad 300 µg/l

### 3.2 Analytické metódy na stanovenie jódu

Na to, aby bolo možné správne stanoviť množstvo jódu, je potrebné použiť metódy, ktoré presne stanovia obsah jódu za prijateľnú cenu. V dnešnej dobe kvantitatívna analýza v biologických vzorkách je vykonávaná výlučne pomocou jednej z týchto dvoch metód [6].

Prvou z nich je spektrofotometrická kinetická analýza založená na tzv. Sandell-Kolthoffovej reakcii.



Dochádza k redukcii ceričitých iónov, ktorých roztok je žltej farby, na bezfarebný roztok ceritých iónov. Táto reakcia je veľmi pomalá, no je možné použiť katalyzátor pomocou stopového množstva jodidu, ktorý vznikne z jódu redukciou pomocou arsenitých katiónov [7].

Táto reakcia sa nedá použiť na stanovenie organicky viazaného jódu bez kompletnej mineralizácie vzorky organického pôvodu. Na mineralizáciu sa použije kyselina chloristá, čo zvyšuje riziko výbuchu [7].

Túto reakciu je možné využiť aj pri prietokovej injekčnej analýze. Metóda funguje na rovnakom princípe ako vyššie popísaná reakcia. Rozdiel je v pridaní brucínu na ukončenie reakcie a umožnenie merania absorbančie pri vlnovej dĺžke 480 nm [8].

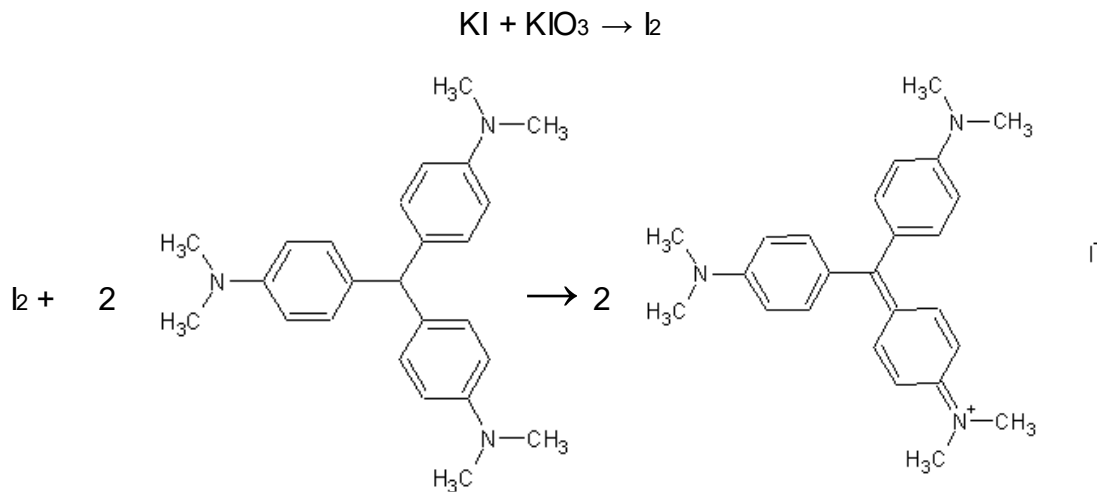
Pri tejto metóde je možné využiť reakciu elementárneho jódu so škrobom za vzniku modrého komplexu amylozy popr. amylopektínu so škrobom. Reakcia je katalyzovaná prítomnosťou jodidu. Metóda je vhodná pre relatívne veľké objemy vzoriek v porovnaní k metódam používaným v praxi [6].

Namiesto škrobu ako polymér k tvorbe komplexu s jódom je možné použiť aj polyvinylalkohol. U plne hydrolyzovaného polyméru spolu s jódom vzniká komplex modrej farby [9].

Pri použití sekvenčnej injekčnej analýzy je možné využiť reakciu 4,4'-metylénbis(N,N-dimethyl)anilínu s chloramínom T za vzniku modrého produktu a následne je možné zmerať absorbančiu pri 600 nm. Jodid má v tejto reakcii výraznú funkciu katalyzátora. Na začiatku sa aspiruje roztok vzorky, následne 4,4'-metylénbis(N,N-dimethyl)anilín a chloramín T do cievky a následne sa po reakcii odvádza produkt do detekčnej cely [10].

Jód patrí medzi oxidačné činidlá. Existuje veľa substrátov, ktoré jód dokáže oxidovať za vzniku intenzívne farebných produktov [6].

V tejto práci bola použitá metóda založená na tejto vlastnosti jódu ako oxidačného činidla. Ako štandardná látka bol využitý jodid draselný, ktorý pomocou jodičnanu draselného sa oxiduje na jód. Vzniknutý jód oxiduje genciánovú violet z jej redukovanej formy na oxidovanú formu v kyslom prostredí a vzniká farebný modrofialový produkt, u ktorého následne bola zmeraná absorbanca.



Druhou využívanou metódou v praxi je hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS). Táto metóda je vysoko citlivá a je možné analyzovať vzorku priamo po nariadení [7], nevýhodou je však vysoká cena prístroja.

### 3.3 Prietokové techniky

#### 3.3.1 Prietoková injekčná analýza (FIA)

V prietokovej injekčnej analýze je vodná vzorka vedená do toku nosného prúdu. Následne sa vzorka vytlačí do cievky. V tomto nosnom prúde dochádza k tzv. kontinuálnej disperzii vzorky. Behom disperzie vzorky dochádza k reakcii s ostatnými činidlami, popr. je možné využiť separáciu časti vzorky alebo zakoncentrovanie priamo v miesiacej cievke. Následne sa vzorka odvádza z cievky do detektoru. V detektore vzorka vyvoláva prechodný signál vo forme píku, ktorý je úmerný ku koncentrácii analytu [11]. Tento proces je znázornený na obrázku č. 1.

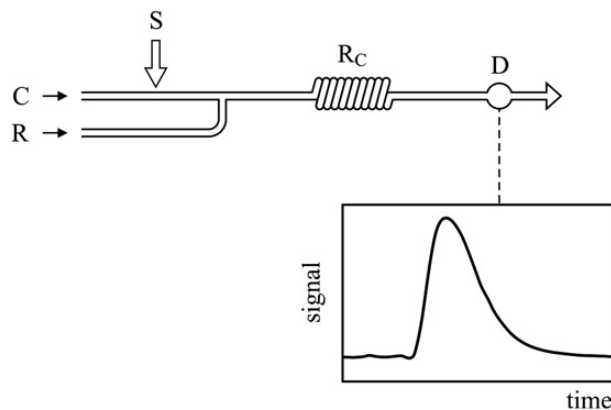
Na detekciu vzorky je najčastejšie využívaný spektrofotometrický detektor.

Používajú sa objemy vzoriek v rozmedzí 5-500  $\mu\text{l}$ , takže sa môžu použiť činidlá v malom objeme a tým sa znižuje aj produkcia odpadu a nároky na špeciálne laboratórne vybavenie [11][12].

Použitie malých objemov vzoriek sa využíva hlavne u analýzy biologických vzoriek ako napr. analýza biologických tekutín, tkanivových kultúr a séra.

Vzhľadom na to, že vzorka je v uzavretom systéme, nedochádza k vplyvu okolitého prostredia a znečisteniu vzorky [12].

Prietokové metódy majú ďalšie svoje výhody ako jednoduchosť obsluhy systému, obmedzené používanie laboratórneho skla a možnosť automatizácie procesu analýzy [11].



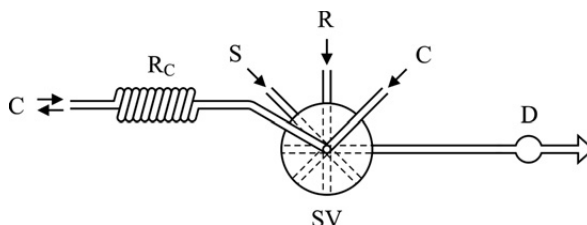
**Obrázok č. 1:** Schéma spracovania vzorky vo FIA analýze. (Prevzaté z [11])  
(S – vzorka, C – nosný prúd, Rc -cievka, D – detektor, R – činidlo)

### 3.3.2 Sekvenčná injekčná analýza (SIA)

Hlavnou súčasťou systému je viaccestný ventil. Viaccestný ventil je zložený z 6-10 periférnych portov a jedného centrálného portu. Centrálny port je spojený s cievkou a periférne porty sú spojené s číničlami v skúmavkách, z ktorých sa postupne aspirujú jednotlivé číničlá. Celý systém je ovládaný počítačovým programom [11].

V typickom systéme SIA analýzy pomocou viaccestného ventilu je zvolená vzorka, číničlá a nosný prúd, ktoré sú podľa poradia nasávané do cievky [13-15]. Následne sa smer prietoku obráti a viaccestný ventil sa prepne tak, aby roztok v cievke sa vytlačil do detektoru [11].

Ďalšou súčasťou systému je detektor, cez ktorý pokiaľ prechádza vzorka, detektor zachytí signál vo forme píku. Jeho výška je úmerná koncentrácii analytu vo vzorke. Tvar píku takisto môže ukazovať možné interakcie medzi vzorkou a číničlom [11]. Schéma systému na SIA analýzu je zobrazená na obrázku č. 2.



**Obrázok č. 2:** Schéma jednoduchého SIA analyzátoru. (Prevzaté z [11]).  
C - nosný prúd, Rc - cievka, S -vzorka, SV- viaccestný ventil, D-detektor

Tento systém SIA analýzy je veľmi univerzálny, pretože je možné meniť podmienky reakcie pomocou počítačového programu pri vývoji novej metódy. Pomocou programu je možné nastaviť poradie požadovaných roztokov, ich objemy a čas potrebný na reakciu resp. na extrakciu [11].

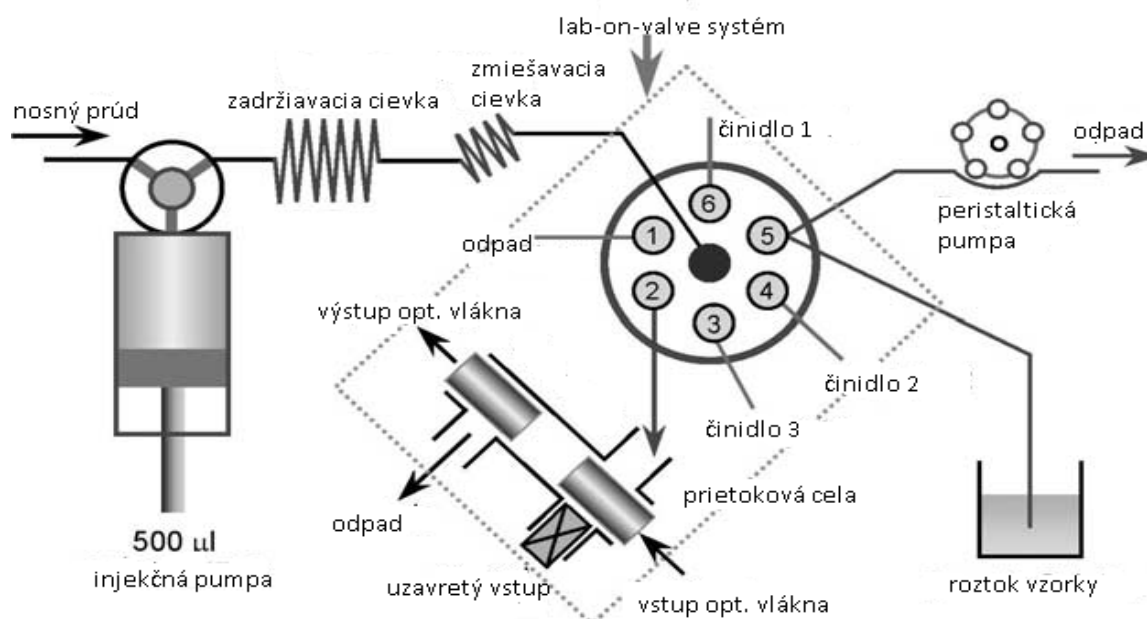
### 3.3.3 Lab-On-Valve analýza

Táto modifikácia SIA analýzy bola vyvinutá v roku 2000 s cieľom minimalizácie objemu činidiel a vzoriek, zmenšenie a integrácie viaccestných ventilov, púmp popr. zásobníkov činidiel do jedného miesta [13].

To je dôležité hlavne pri analytických metódach, kde je k dispozícii obmedzené množstvo činidiel alebo sa zaobchádza s vysoko nebezpečnými látkami pre ľudský organizmus popr. cieľom je znížiť produkciu odpadu z analýzy [16].

V tejto modifikácii sú všetky zložky systému integrované do jednej jednotky viazané na viaccestný ventil s 6-10 periférnymi portmi a jedným centrálnym portom. Priestor detektoru je zmenšený a umiestnený blízko prívodu vzorky do detektoru [11]. Dôležitým znakom je veľmi krátke spojenie medzi detektorom a portmi na selekčnom ventile. Z tohto dôvodu je možné využiť bioanalytické metódy alebo vzorky vo forme suspenzie [19]. Tým sa aj znížia požiadavky na objem vzorky, činidiel a premývacieho roztoku, čo je hlavným cieľom modifikácie SIA metódy. Pomocou tejto metódy je možné analyzovať vzorky v objeme rádovo v mikrolitroch [11]. Schématické zobrazenie možnej konfigurácie systému je na obrázku č. 3.





**Obrázok č. 3:** Schématické zobrazenie SIA lab-on-valve systému  
(Prevzaté a upravené z [17] )

Na obrázku môžeme vidieť viaccestný selekčný ventil, na ktorom sa nachádza 6 periférnych portov a 1 centrálny port, ktorý je spojený s cievkou a injekčnou pumpou. Port č. 5 je spojený s roztokom vzorky a z portu č. 1 sa odvádza odpad z analýzy. Ostatné porty sú určené pre prívod činidiel. Pomocná peristaltická pumpa napojená na port č. 5 slúži na rýchlu výmenu roztoku vzorky v systéme. Na port č. 2 je pripojená prietoková cela, v ktorej je možné nariadenie vzorky ako aj umožnenie priebehu chemickej reakcie, či pridanie ďalšieho činidla k reakcii priamo v prietokovej cele. Táto cela je opatrená optickými vláknami, ktoré sú spojené s externým zdrojom svetla a detektorom, ktorý umožňuje sledovať reakciu v reálnom čase [18,19].

Pokiaľ sa využije reakcia, ktorá má pomalý priebeh, na zvýšenie citlivosti reakcie je možné využiť zastavenie priebehu analýzy pomocou zastavenia prietoku. Tento postup sa využil na stanovenie fosforečnanov, enzýmu [18] a na monitorovanie amoniaku, glycerolu, glukózy a elementárneho železa vo fermentačnej kultúre [18].

### 3.3.4 Lab-In-Syringe

V tejto modifikácii SIA metódy jednotlivé roztoky sú priamo nasávané do striekačky piestovej pumpy.

Bola vyvinutá v r. 2012 [27] a ďalej rozvinutá v r. 2013 pridaním magnetického miešadla, ktoré umožnilo dokonalé premiešanie aspirovaných roztokov a zlepšilo účinnosť prípadnej extrakcie [26]. Nedochádza tak k disperzii, ako je tomu v prípade techník FIA a SIA, ale k homogénnemu miešaniu.

Výhodou tejto techniky je vzdialenosť, cez ktorú prúdia roztoky zo zásobníkov do piestovej pumpy, znížená na čo najkratšiu možnú [20]. Z tohto dôvodu sa s výhodou používa 9-cestný selekčný ventil, ktorý môže byť umiestnený priamo nad striekačkou [21].

Technika sa využíva predovšetkým na automatizáciu mikroextrakčných techník [20]. Mikroextrakčné techniky sa používajú s cieľom obmedziť používanie veľkých objemov organických rozpúšťadiel, ktoré sú škodlivé pre organizmus. Mikroextrakčná technika dovoľuje vykonať extrakciu analytu a odstrániť maticu v jednom kroku s použitím malého objemu organického rozpúšťadla [22]. Medzi mikroextrakčné techniky patrí mikroextrakcia do jednej kvapky (single-drop microextraction, SDME) [23], extrakcia pomocou dutého vlákna (hollow fiber liquid phase microextraction HF-LPME) [24] a disperzná mikroextrakcia kvapaliny do kvapaliny (dispersive liquid–liquid microextraction, DLLME) [25].

Výhodou využitia striekačky piestovej pumpy ako miesta pre reakciu je niekoľko. Jednou z nich je možnosť úpravy objemu použitej vzorky, ak je cieľom zvýšenie objemu použitej vzorky k dosiahnutiu vyššej citlivosti analýzy. Ďalšou výhodou je kompaktnosť systému, kde je možné vynechať použitie cievok [20].

Nevýhodou môže byť dodatočné premývanie striekačky pred meraním každej vzorky, kým v SIA metóde sa systém premýva pomocou nosného roztoku [20].

## 4 Experimentálna časť

### 4.1 Použitá analytická reakcia

Na stanovenie jódu bola vybraná reakcia podľa [28]. Jód, prítomný vo vzorke ako jodid, bol najprv oxidovaný pomocou brómovej vody na jodičnan. V prostredí kyseliny octovej sa pomocou jodidu draselného uvoľní elementárny jód. Jód selektívne oxiduje bezfarebnú formu genciánovej violete (*leucocrystal violet*) na farebnú formu (*crystal violet*) s vysokým molárnym absorpčným koeficientom. Následne sa táto oxidovaná forma genciánovej violete extrahovala do chloroformu. Po extrakcii sa chloroformová vrstva oddelila a kvantitatívne preniesla do skúmavky a doplnil sa objem na 10 ml. Následne bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 588 nm oproti slepému vzorku [28].

Cieľom tejto práce bolo overenie možnosti použitia tejto metódy, jej zjednodušenie (predovšetkým oxidácia jodidu na jód), miniaturizácia a automatizácia pomocou prietokovej techniky.

Na prevedenie jodidu na jód ako oxidačné činidlo sa použil jodičnan draselný. Táto reakcia je možná v kyslom prostredí, na vytvorenie kyslého prostredia sa použila kyselina chlorovodíková. Elementárny jód následne oxiduje genciánovú violet z jej bezfarebnej formy na farebnú formu a táto oxidovaná forma genciánovej violete bola následne extrahovaná do kvapky chloroformu priamo v striekačke piestovej pumpy. Chloroformový extrakt bol odvedený do detektoru na meranie absorbancie.

## 4.2 Prístrojové vybavenie

Piestová pumpa typ Cavro XL, Tecan (San Jose, CA, USA), s 5 ml sklenenou striekačkou a magnetickým miešadlom

9-cestný selekčný ventil, FIAlab Instruments, Inc., Seattle, USA

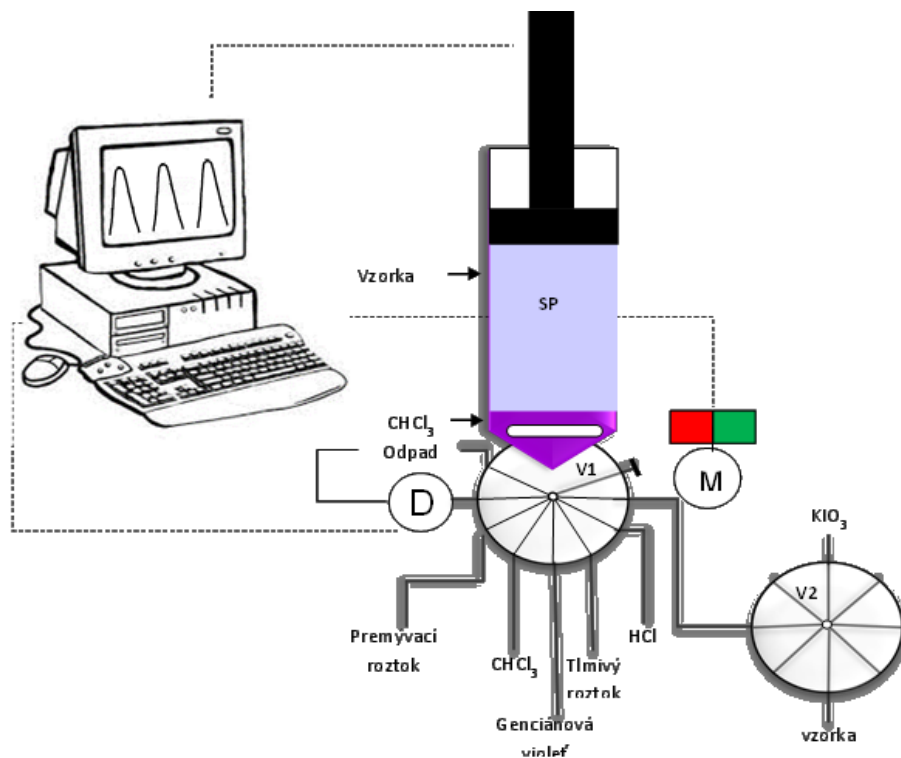
Halogenová lampa Ocean Optics Inc., (Dunedin, FL, USA)

Detektor USB 2000 Ocean Optics Inc., (Dunedin, FL, USA) s optickými vláknami

Teflonová detekčná cela s dĺžkou optickej dráhy 2 cm

Software FIAlab for Windows 5.0

Motor s pripevnenými magnetmi k indukcii rotácie magnetického miešadla vo vnútornom priestore sklenenej striekačky



**Obrázok č. 4:** Schéma použitého systému v tejto práci.  
*D-detektor, SP-piestová pumpa, M-motor s pripojenými magnetmi,  
 V1 - 9-miestny ventil, V2 - 8 miestny ventil*

Jednotlivé roztoky boli nasávané postupne podľa naprogramovaného poradia. Na začiatku sa aspirovala vzorka z portu č. 3 selekčného ventilu, ktorí slúžil ako autosampler a bol pripojený k 9-cestnému ventilu do portu č. 2. Súčasne sa spustilo miešanie pomocou aktivácie motoru s pripojenými magnetmi. Následne sa nasávala kyselina na vytvorenie kyslého prostredia z portu č. 3. Potom sa nasávalo oxidačné činidlo z portu č. 1 selekčného ventilu. Z portu č. 4 sa nasal tlmivý roztok a z portu č. 5 indikátor. Po 60 s sa z portu č. 6 nasal chloroform ako extrakčné činidlo a po 50 s sa ukončila extrakcia oxidovanej formy genciánovej violete. Extrakcia bola podporená miešaním pomocou magnetického miešadla vnútri striekačky. Chloroformový extrakt cez port č. 8 bol posunutý do detekčnej cely na meranie absorbancie. V tomto kroku bola rotácia motoru vypnutá. Vodná fáza vzorky bola vypustená do odpadu. Pred každým meraním bol vnútorný priestor striekačky vypláchnutý premývacím roztokom (voda:izopropanol 50:50). Na začiatku merania bol premytý celý systém vrátane hadičiek a detekčnej cely. Použitý program je uvedený v prílohe v kapitole 7.

### 4.3 Zoznam použitých látok

Jodičnan draselný p.a. Lachema n.p Brno

Jodid draselný p.a. PENTA, Chrudim, Česká republika

Destilovaná voda Millipore®, pripravená na Katedre analytickej chémie

Chloroform p.a., Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Izopropanol, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Genciánová violet', Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Kyselina chlorovodíková 35%, p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika

Kyselina fosforečná > 85%, Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Hydroxid sodný, PENTA, Chrudim, Česká republika

Kyselina citrónová, monohdrát,  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

Dusitan sodný p.a., PENTA, Chrudim, Česká republika

Kyselina sírová, 98%, p.a. Sigma Aldrich, Praha, Česká republika

## 4.4 Príprava roztokov

### **Príprava roztoku jodičnanu draselného 100 mmol/l**

Navážilo sa 2,14 g jodičnanu draselného a rozpustilo sa vo vode. Následne sa roztok doplnil vodou po značku v 100 ml odmernej banke.

### **Príprava roztoku jodičnanu draselného 5 mmol/l**

Prípravil sa roztok jodičnanu draselného p.a s koncentráciou 100 mmol/l a z neho bolo odobrané 1,25 ml roztoku a doplnené vodou po značku v 25 ml odmernej banke.

### **Príprava roztoku jodičnanu draselného 1 mmol/l**

Prípravil sa roztok jodičnanu draselného p.a s koncentráciou 100 mmol/l a z neho bolo odobrané 250 µl roztoku a doplnené vodou po značku v 25 ml odmernej banke.

### **Príprava roztoku jodidu draselného 2000 µg/ml**

Navážilo sa odpovedajúce množstvo jodidu draselného, aby vznikol roztok s koncentráciou 2000 µg/ml, navážený jodid draselný sa rozpustil za postupného miešania vo vode a doplnilo sa vodou po značku v 100 ml odmernej banke. Tento roztok sa použil ako zásobný a nariadením sa získal pracovný roztok.

### **Príprava roztoku genciánovej violete 250 mg/l**

Navážilo sa 12,5 mg genciánovej violete a dané množstvo sa vpravilo kvantitatívne do odmernej banky. Pridalo sa 150 µl kyseliny fosforečnej 85 % a za postupného miešania sa genciánová violeta rozpustila v destilovanej vode. Následne sa v 50 ml odmernej banke roztok doplnil vodou po značku. Tento roztok sa použil ďalej na analýzu.

### **Príprava roztoku kyseliny chlorovodíkovej 0,8 mol/l**

Zo zásobného roztoku kyseliny chlorovodíkovej s koncentráciou 5 mol/l bolo odobrané 4 ml a doplnené po značku v 25 ml odmernej banke.

### **Príprava roztoku 0,4 mol/l kyseliny sírovej**

Zo zásobného roztoku kyseliny sírovej s koncentráciou 5 mol/l bolo odobrané 2 ml a doplnené po značku v 25 ml odmernej banke.

### **Príprava roztoku 50 mmol/l dusitanu sodného**

Navážilo sa 86,3 mg dusitanu sodného a dané množstvo sa vpravilo kvantitatívne do 25 ml odmernej banky. Za postupného miešania sa dusitan sodný rozpustil v destilovanej vode.

### **Príprava tlmivého roztoku 0,3 mol/l o pH 4,5**

Navážilo sa 2,88 g kyseliny citrónovej a toto množstvo sa vpravilo kvantitatívne do 50 ml odmernej banky. Pridalo sa malé množstvo destilovanej vody na rozpustenie kyseliny citrónovej. Následne sa pridával roztok hydroxidu sodného na dosiahnutie pH hodnoty 4,5.



## 4.5 Optimalizácia výberu oxidačného činidla

V tomto experimente sa testovalo vhodné oxidačné činidlo na oxidáciu jodidu na jód. Ako oxidačné činidlo sa testoval dusitan draselný  $\text{NaNO}_2$  s koncentráciou 50 mmol/l v objeme 100  $\mu\text{l}$  a jodičnan draselný  $\text{KIO}_3$  s koncentraciami 1 mmol/l a 5 mmol/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako štandard sa použil jodid draselný KI s koncentraciami 2,5 ppm a 5 ppm. Pre vytvorenie kyslého prostredia sa použila kyselina chlorovodíková HCl s koncentráciou 0,8 mol/l. Ako tlmivý roztok sa použil citrátový tlmivý roztok s koncentráciou kyseliny citrónovej 0,3 mol/l. Pri použití 400  $\mu\text{l}$  tohoto pufru bolo výsledné pH roztoku 5,1. Ako indikátor sa použila genciánová violeť s koncentráciou 250 mg/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako extračné činidlo sa použil chloroform v objeme 200  $\mu\text{l}$ .

Merala sa absorbancia roztoku, merania boli zopakované štyrikrát a porovnávalo sa meranie spolu so slepou vzorkou. Výsledky sú uvedené v tabuľke č. 2 a v grafe č. 1 je znázornené porovnanie použitých oxidačných činidiel, kde sú použité hodnoty rozdielu absorbancie štandardu a slepej vzorky.

Zistilo sa, že ako oxidačné činidlo pre analýzu je vhodnejšie použiť jodičnan draselný  $\text{KIO}_3$  s koncentráciou 5 mmol/l, pretože u tohto oxidačného činidla sa namerala najväčšia absorbancia a dosiahla najlepšia opakovateľnosť (najnižšie RSD – *relative standard deviation*). Pre ďalšie experimenty sa použil jodičnan draselný  $\text{KIO}_3$  s koncentráciou 5 mmol/l.

**Tabuľka č. 2:** Meranie absorbancie s použitím dusitanu sodného s koncentráciou 50 mmol/l ako oxidačného činidla

Číslo merania	Absorbancia		
	sl. vzorka	KI 2,5 ppm	KI 5,0 ppm
1.	0,215	0,118	0,187
2.	0,157	0,156	0,166
3.	0,203	0,227	0,215
4.	0,137		
priemer	0,178	0,167	0,189
sm.odchýlka	0,037	0,055	0,024
RSD*(%)	20,80	33,00	12,70
rozdiel( $A_{\text{st}} - A_{\text{bl}}$ )*		-0,011	0,011

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

( $A_{\text{st}} - A_{\text{bl}}$ )\* = Absorbancia štandardu – absorbancia slepej vzorky

**Tabuľka č. 3:** Meranie absorbcie s použitím jodičnanu draselného s koncentráciou 1 mmol/l ako oxidačného činidla

Číslo merania	Absorbancia		
	sl. vzorka	KI 2,5 ppm	KI 5,0 ppm
1.	0,089	0,084	0,101
2.	0,050	0,121	0,145
3.		0,082	0,136
<b>priemer</b>	<b>0,070</b>	<b>0,096</b>	<b>0,127</b>
sm.odchýlka	0,028	0,022	0,023
RSD* (%)	40,0	23,00	18,30
rozdiel( $A_{st} - A_{bl}$ )*	-	0,026	0,058

Pozn. Prázdne miesto v bunke je pre odľahlý bod

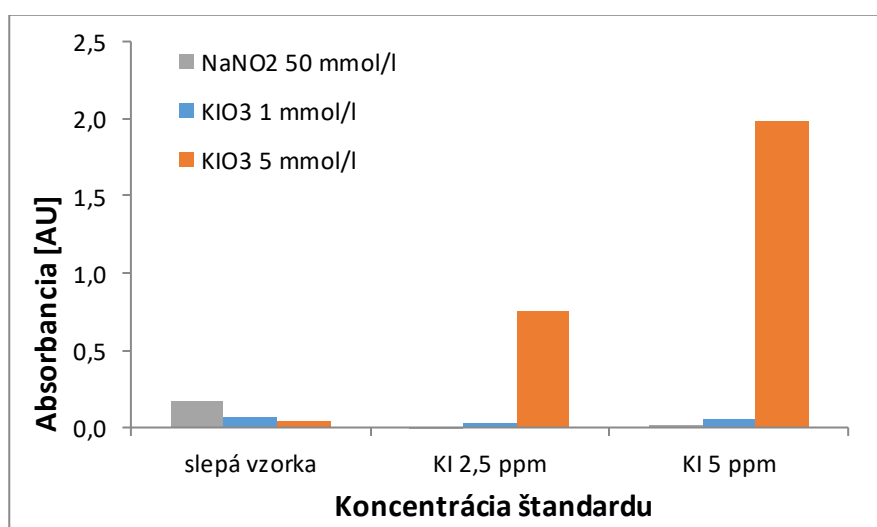
\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

\*( $A_{st} - A_{bl}$ ) = Absorbancia štandardu – absorbancia slepej vzorky

**Tabuľka č. 4:** Meranie absorbcie s použitím jodičnanu draselného s koncentráciou 5 mmol/l ako oxidačného činidla

Číslo merania	Absorbancia		
	sl.	KI 2,5 ppm	KI 5 ppm
1.	0,061	0,817	2,038
2.	0,045	0,785	2,216
3.	0,047		1,723
4.	0,031		2,142
<b>priemer</b>	<b>0,046</b>	<b>0,801</b>	<b>2,030</b>
sm. odchýlka	0,012	0,023	0,217
RSD (%)	26,4	2,9	10,7
rozdiel( $A_{st} - A_{bl}$ )	-	0,755	1,984

Pozn. Prázdne miesto v bunke je pre odľahlý bod



**Graf č. 1:** Závislosť absorbcie na použítom oxidačnom činidle

## 4.6 Optimalizácia výberu činidla na vytvorenie kyslého prostredia

V tomto experimente sa porovnávala vhodnosť použitej kyseliny. Oxidácia jodidu draselného na jód prebieha v kyslom prostredí, preto bolo nutné použiť kyselinu vhodnú na vytvorenie kyslého prostredia.

Porovnávalo sa použitie kyseliny chlorovodíkovej s koncentráciou 0,8 mol/l a kyseliny sírovej s koncentráciou 0,4 mol/l.

Ako štandard sa použil jodid draselný KI s koncentraciami 1,25 ppm a 2,5 ppm. Ako tlivý roztok sa použil citrónan sodný s koncentráciou 0,3 mol/l, ktorý mal hodnotu pH 5,1 v objeme 800  $\mu$ l. Ako indikátor sa použila genciánová violet s koncentráciou 250 mg/l v objeme 100  $\mu$ l. Oxidačné činidlo sa použil jodičan draselný  $KIO_3$  s koncentráciou 5 mmol/l a objeme 100  $\mu$ l. Ako extračné činidlo sa použil chloroform v objeme 200  $\mu$ l.

Bola zmeraná absorbanca roztoku, merania boli zopakované trikrát a porovnávali sa hodnoty spolu so slepou vzorkou. Výsledky sú uvedené v tabuľke č. 5 a v grafe je znázornené porovnanie rozdielov absorbancie štandardu a slepej vzorky pri použití uvedených kyselín.

Z grafu č. 2 vyplýva, že je vhodnejšie pre ďalšie merania použiť kyselinu chlorovodíkovú HCl s koncentráciou 0,8 mol/l pretože pri použití tejto kyseliny sa namerali väčšie hodnoty absorbancie.

**Tabuľka č. 5** Meranie absorbancie za použitia kyseliny chlorovodíkovej HCl s koncentráciou 0,8 mol/l

Číslo merania	Absorbancia		
	sl.vzorka	KI 1,25 ppm	KI 2,5 ppm
1.	0,060	0,153	0,584
2.	0,021	0,097	0,645
3.	0,031	0,103	0,806
priemer	0,037	0,117	0,679
sm. odchýlka	0,020	0,031	0,115
RSD* (%)	54,4	26,1	16,9
rozdiel ( $A_{st} - A_{bl}$ )*		0,080	0,641

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

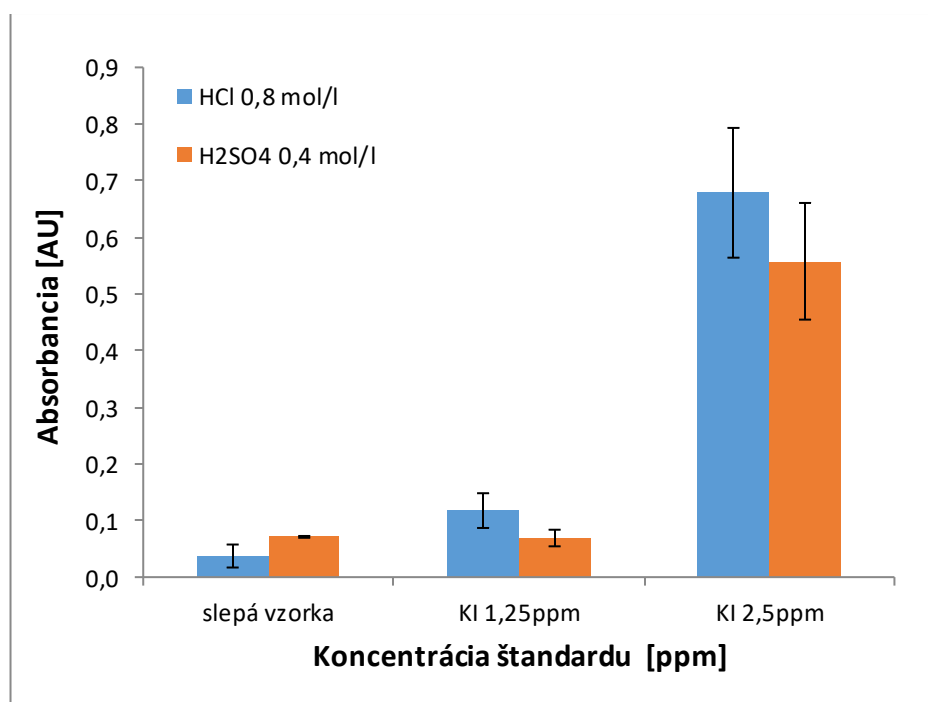
\*( $A_{st} - A_{bl}$ ) = Absorbancia štandardu – absorbancia slepej vzorky

**Tabuľka č. 6:** Meranie absorpcie za použitia kyseliny sírovej  $H_2SO_4$  s koncentráciou 0,4 mol/l

Číslo merania	Absorbancia		
	slepá vzorka	KI 1,25 ppm	KI 2,5 ppm
1.	0,073	0,054	0,496
2.	0,070	0,084	0,500
3.	0,070	0,069	0,677
priemer	0,071	0,069	0,558
sm. odchýlka	0,002	0,015	0,103
RSD* (%)	2,3	21,2	18,5
rozdiel ( $A_{st} - A_{bl}$ )*		-0,002	0,487

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

\*( $A_{st} - A_{bl}$ ) = Absorbancia štandardu – absorbancia slepej vzorky



**Graf č. 2:** Závislosť absorpcie na použitej kyseline

## 4.7 Optimalizácia pH tlmivého roztoku

Oxidácia genciánovej violete na jej oxidovanú formu prebieha v určitom rozmedzí pH, preto bolo dôležité nastaviť správne pH pre túto reakciu. V predchádzajúcom kroku (oxidácia KI na I<sub>2</sub>) je kyslé pH, preto bolo potrebné použiť tlmivý roztok s vhodným pH.

Ako štandard sa použil roztok KI s koncentráciou 2,5 ppm. Ako oxidačné činidlo sa použil roztok KIO<sub>3</sub> s koncentráciou 5 mmol/l. Na vytvorenie kyslého prostredia sa použila HCl s koncentráciou 0,8 mol/l nariedením zo zásobného roztoku HCl s koncentráciou 5 mol/l. Ako indikátor sa použil okyslený roztok genciánovej violete s koncentráciou 250 mg/l v objeme 150 µl. Ako tlmivý roztok sa použil citrónan sodný. Pripravilo sa 6 rôznych tlmivých roztokov s hodnotami pH uvedenými v tabuľke č. 7, zmerala sa absorbancia a výsledky sa porovnali so slepou vzorkou.

Pre kontrolu pH hodnoty vodnej vzorky sa zbierala vodná časť vzorky pri meracom kroku „Empty“ a následne sa zmeralo pH. Výsledné pH vzorky je uvedené v tabuľke č. 7.

Z tabuľky č. 7 je zrejmé, že pufrovacia kapacita použitého pufru bola dostatočná, nakoľko hodnoty pH sa líšili o maximálne 0,03 jednotky.

Z grafu č. 3 je zrejmé, že optimálne pH oxidácie genciánovej violete je 4,56, kde rozdiel medzi absorbanciou štandardu a absorbanciou slepej vzorky je najväčší.

**Tabuľka č. 7:** Meranie výslednej hodnoty pH vodnej vzorky

Hodnota pH pufru	Výsledná hodnota pH vodnej vzorky
4,05	4,02
4,56	4,53
4,75	4,72
5,03	5,06
5,25	5,31
5,51	5,55

**Tabuľka č. 8: Optimalizácia pH tlmivého roztoku u slepej vzorky**

pH tlmivého roztoku	Absorbancia					
	1.meranie	2.meranie	3.meranie	priemer	sm. odchýlka	RSD* (%)
4,05	0,015	0,036	0,027	0,026	0,010	39,4
4,56	0,053	0,041	0,041	0,045	0,007	14,9
4,75	0,031	0,016		0,024	0,011	45,0
5,03	0,024	0,024		0,024	0,000	0,3
5,25	0,143	0,006	0,092	0,080	0,069	86,3
5,51	0,056	0,092		0,074	0,025	34,2

Pozn. Prázdne miesta v bunkách sú pre odľahlé body, u merania pH 4,75 a 5,25 došlo k chybe merania pri 2. meraní

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

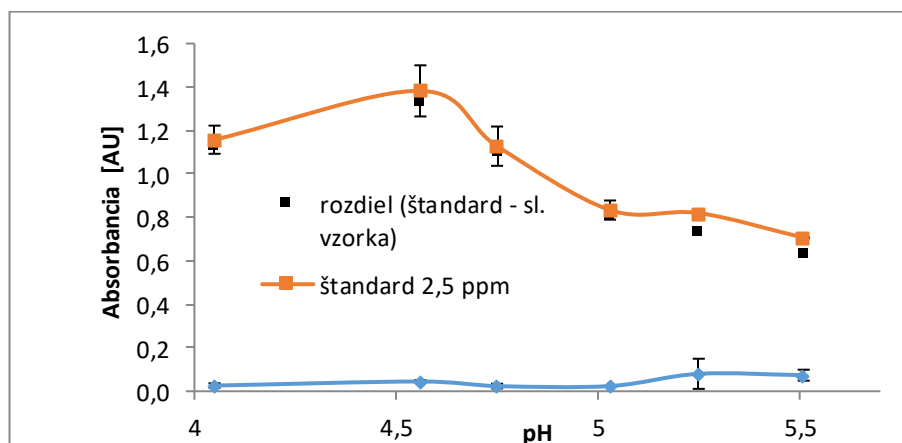
**Tabuľka č. 9: Meranie absorbancie pri rôznych hodnotách pH tlmivého roztoku u štandardu KI s koncentráciou 2,5 ppm a porovnanie hodnôt so slepou vzorkou**

pH	Absorbancia				sm. odchýlka	RSD* (%)	rozdiel ( $A_{st} - A_{bl}$ )*
	1.meranie	2.meranie	3.meranie	priemer			
4,05	1,203	1,112		1,158	0,065	5,6	1,131
4,56	1,508	1,275	1,364	1,382	0,118	8,5	1,337
4,75	1,101	1,054	1,229	1,128	0,090	8,0	1,104
5,03	0,803	0,865		0,834	0,044	5,3	0,810
5,25	0,823	0,817		0,820	0,004	0,5	0,740
5,51	0,705	0,708		0,706	0,002	0,3	0,632

Pozn. Prázdne miesta v bunkách sú pre odľahlé body

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

\*( $A_{st} - A_{bl}$ ) = Absorbancia štandardu – absorbancia slepej vzorky



**Graf č. 3: Závislosť absorbancie na pH tlmivého roztoku**

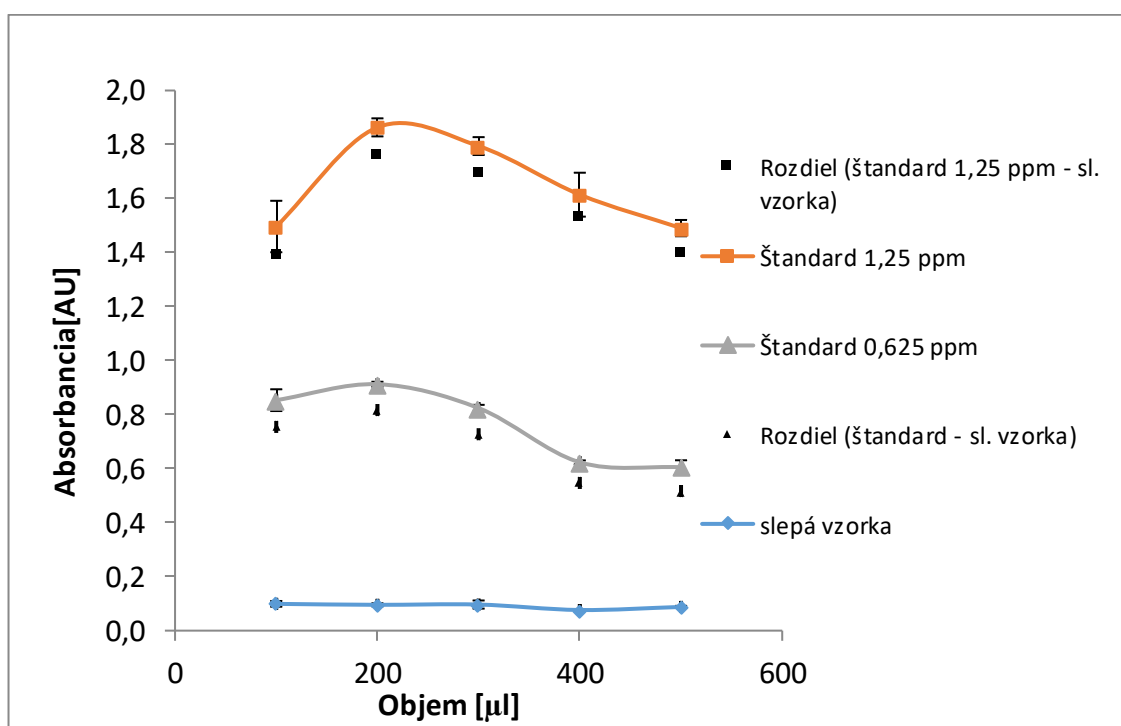
## 4.8 Optimalizácia objemu tlmivého roztoku

V tomto experimente bolo potrebné zistiť vhodný objem tlmivého roztoku. Cieľom bolo znížiť objem tlmivého roztoku a zároveň zvýšiť objem vzorky, čím sa dosiahne väčšia citlivosť analýzy. Znížením objemu tlmivého roztoku sa skrátí čas analýzy a spotrebuje sa menšie množstvo činidiel resp. vytvorí sa menej odpadu.

Ako štandardný roztok sa použil jodid draselný s koncentráciou 2,5 ppm v objeme 1000  $\mu\text{l}$ . Na vytvorenie kyslého prostredia sa použila kyselina chlorovodíková s koncentráciou 0,8 mol/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ .

Ako oxidačné činidlo sa použil jodičnan draselný s koncentráciou 5 mmol/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako indikátor sa použila genciánová violet s koncentráciou 250 mg/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Na extrakciu sa použil chloroform v objeme 200  $\mu\text{l}$ . Ako tlmivý roztok sa použil citrónan sodný s optimalizovaným pH v hodnote 4,5. Zisťoval sa vhodný objem tlmivého roztoku, ktorý bol následne použitý na analýzu reálnej vzorky. Objem bol testovaný v rozmedzí od 100  $\mu\text{l}$  do 500  $\mu\text{l}$  použitého tlmivého roztoku, bola zmeraná absorbanca roztoku a porovnávala sa so slepou vzorkou. Ako vyplýva z grafu, najvyšší signál pri oboch koncentráciách štandardu bol dosiahnutý s objemom pufru 200  $\mu\text{l}$ , preto sa tento objem zvolil pre ďalšie experimenty.

Výsledky optimalizácie sú znázornené v grafe č. 4.



**Graf č. 4:** Závislosť absorbancie na objeme použitého tlmivého roztoku

## 4.9 Optimalizácia koncentrácie oxidačného činidla

V tomto experimente sa testovali rôzne koncentrácie oxidačného činidla, bola zmeraná absorbanca a výsledky absorbancie boli porovnávané so slepou vzorkou. Ako oxidačné činidlo sa použil jodičnan draselný  $\text{KIO}_3$ , ktorého testované koncentrácie sú uvedené v tabuľke č. 10.

Ako štandard sa použil roztok jodidu draselného KI s koncentráciou 0,625 ppm. Na vytvorenie kyslého prostredia sa použila kyselina chlorovodíková s koncentráciou 0,8 mol/l, ktorá bola optimálne zvolená v predošlom experimente. Ako tlmový roztok sa použil citrónan sodný s koncentráciou 0,3 mol/l v objeme 200  $\mu\text{l}$ , ktorého objem bol optimalizovaný v predošlom kroku. Ako indikátor sa použila genciánová violeť s koncentráciou 250 mg/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako extrakčné činidlo sa použil chloroform v objeme 200  $\mu\text{l}$ .

Bolo zistené, že optimálna koncentrácia  $\text{KIO}_3$  je 5 mmol/l, u ktorej bola nameraná najväčšia absorbanca v porovnaní so slepou vzorkou.

Výsledky sú uvedené v tabuľke č. 10 pre slepú vzorku a v tabuľke č. 11 pre štandard KI s koncentráciou 0,625 ppm a v grafe sú prehľadne zhrnuté výsledky experimentu. Na základe výsledkov v grafe možno usúdiť, že pri koncentrácii 5 mmol/l jodičnanu draselného je najvyšší rozdiel absorbancie štandardu a slepej vzorky, preto v ďalších experimentoch sa použil ako oxidačné činidlo jodičnan draselný s koncentráciou 5 mmol/l.

**Tabuľka č. 10:** Optimalizácia koncentrácie oxidačného činidla pri slepej vzorke

Koncentrácia oxidačného činidla [mmol/l]	0,5	1	2,5	5	7,5	10
1. meranie	0,095	0,102	0,126	0,111	0,104	0,123
2. meranie	0,110	0,079	0,102	0,118	0,122	0,131
3. meranie	0,109	0,114	0,112	0,115	0,108	0,118
priemer	0,105	0,098	0,114	0,115	0,111	0,124
sm. odchýlka	0,008	0,018	0,012	0,003	0,009	0,007
RSD* (%)	7,8	18,2	10,9	3,0	8,3	5,4

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

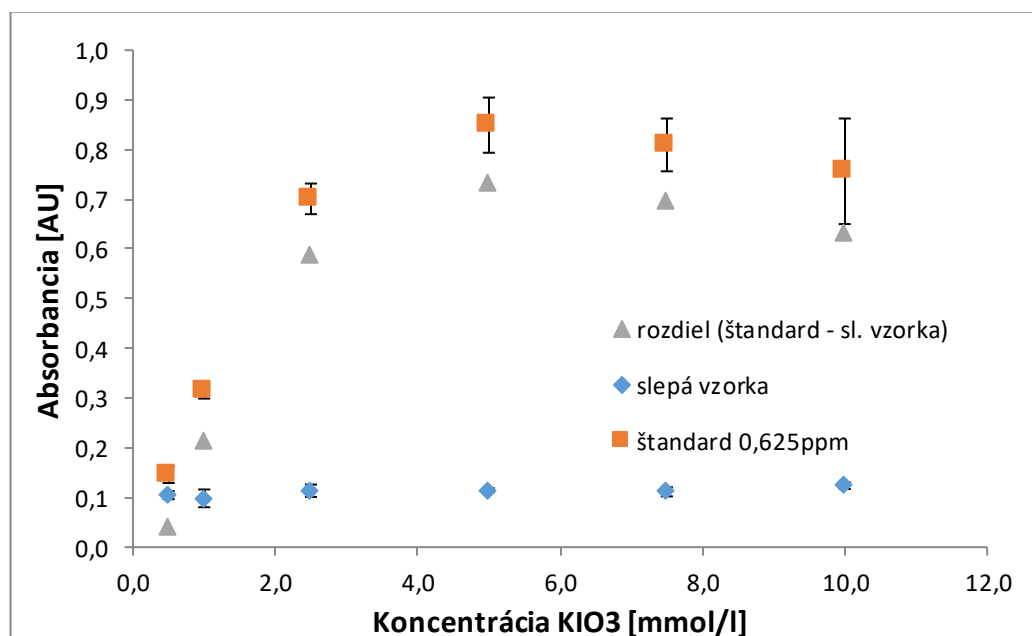


**Tabuľka č. 11:** Meranie absorpcie pri rôznych koncentráciach oxidačného činidla so štandardom KI s koncentráciou 0,625 ppm

Koncentrácia oxidačného činidla [mmol/l]	0,5	1	2,5	5	7,5	10
1. meranie			0,686	0,945	0,820	0,658
2. meranie	0,134	0,303	0,680	0,843	0,752	0,742
3. meranie	0,158	0,323	0,736	0,855	0,856	0,869
priemer	0,146	0,313	0,701	0,849	0,809	0,756
sm. odchýlka	0,017	0,014	0,031	0,056	0,053	0,106
RSD* (%)	11,5	4,6	4,4	6,5	6,6	14,0
rozdiel( $A_{st} - A_{bl}$ )*	0,041	0,215	0,587	0,734	0,698	0,633

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

\*( $A_{st} - A_{bl}$ ) = Absorbancia štandardu – absorbancia slepej vzorky



**Graf č. 5:** Závislosť absorpcie na koncentrácii oxidačného činidla

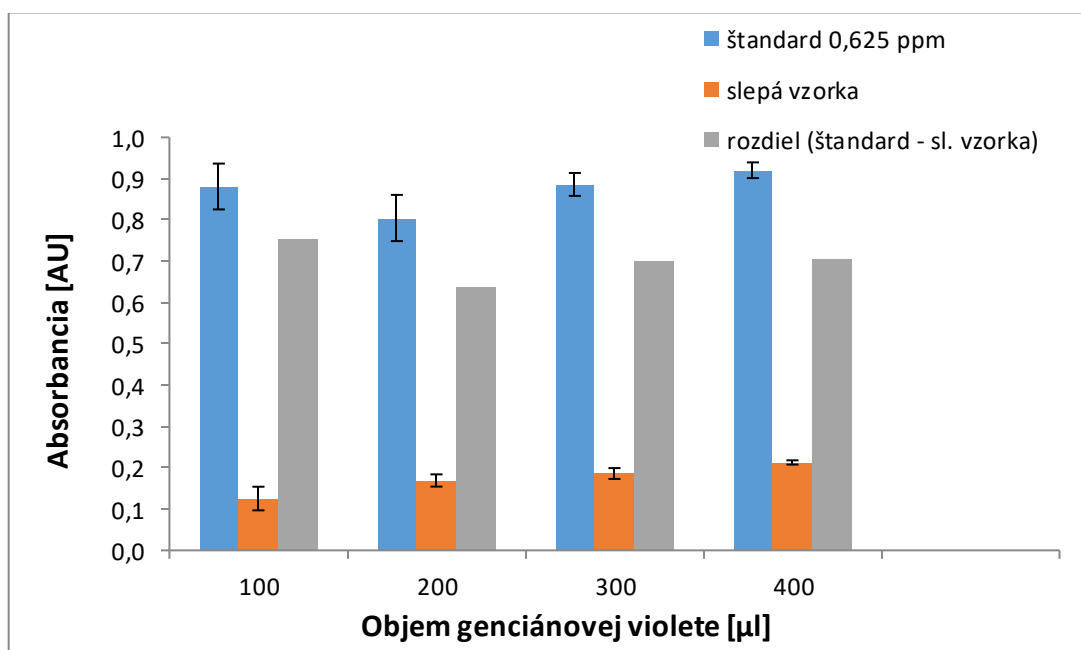
## 4.10 Optimalizácia objemu použitého indikátoru

Cieľom experimentu bolo zistiť vhodnosť zvoleného objemu použitého indikátoru.

Ako štandard sa použil jodid draselný KI s koncentráciou 0,625 ppm v objeme 1000  $\mu\text{l}$ . Ako kyselina sa použila kyselina chlorovodíková v koncentrácii 0,8 mol/l a v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Na oxidáciu sa použil jodičnan draselný v optimalizovanej koncentrácii 5 mmol/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako tlmový roztok sa použil citrónan sodný s koncentráciou 0,3 mol/l v objeme 200  $\mu\text{l}$ . Ako extrakčné činidlo sa použil chloroform v objeme 200  $\mu\text{l}$ .

Merala sa absorbancia pri rôznych objemoch genciánovej violete s rovnakou koncentráciou, prevzatou z práce [28] a hodnoty absorbancie sa porovnávali so slepou vzorkou.

Výsledky sú zhrnuté v grafe č. 6, z ktorého vyplýva, že hodnoty sa pri stúpajúcom objeme indikátora od seba signifikantne nelíšia a pri objeme 100  $\mu\text{l}$  hodnoty rozdielov absorbancie štandardu a slepej vzorky boli najvyššie, preto v ďalších experimentoch sa použil objem indikátora 100  $\mu\text{l}$ .



**Graf č. 6:** Závislosť absorbancie na použitom objeme genciánovej violete

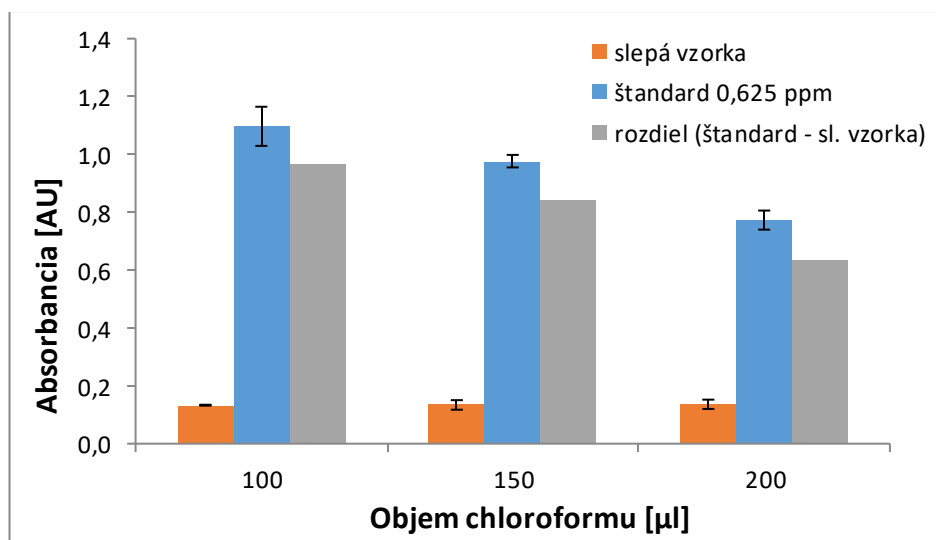
#### 4.11 Optimalizácia objemu extrakčného činidla

Pri tomto experimente bol zisťovaný objem extrakčného činidla a ako extrakčné činidlo bol použitý chloroform v objemoch 100  $\mu\text{l}$ , 150  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$ . Cieľom je použiť čo najnižší objem rozpúšťadla tak, aby sa:

- dosiahla čo najvyššia citlivosť (extrakcia oxidovanej formy genciánovej violete do malého objemu chloroformu),
- znižila spotreba organického činidla,
- zachovala dostatočnú opakovateľnosť pri nasávaní malého objemu chloroformu do detekčnej cely

Ako štandard bol použitý roztok jodidu draselného KI s koncentráciou 0,625 ppm a v objeme 1000  $\mu\text{l}$ . Na vytvorenie kyslého prostredia bola použitá kyselina chlorovodíková s koncentráciou 0,8 mol/l a v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako oxidačné činidlo bol použitý jodičnan draselný s koncentráciou 5 mmol/l a v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako tlmivý roztok bol použitý citrónan sodný s koncentráciou 0,3 mol/l a v objeme 200  $\mu\text{l}$ . pH tlmivého roztoku bolo 4,5. Ako indikátor bola použitá genciánová violet s koncentráciou 250 mg/l objeme 100  $\mu\text{l}$ . Merala sa absorbancia chloroformového extraktu pri objemoch chloroformu uvedených vyššie a výsledná hodnota bola porovnávaná so slepou vzorkou.

Výsledok experimentu je prehľadne zhrnutý v grafe č. 7. Z grafu vyplýva, že absorbancia nameraná pri objeme 100  $\mu\text{l}$  chloroformu bola najvyššia, no pre nižšiu smerodajnú odchylku (tj. lepšiu opakovateľnosť) pri objeme 150  $\mu\text{l}$  pre ďalšie experimenty bol zvolený objem chloroformu 150  $\mu\text{l}$ .



**Graf č. 7:** Závislosť absorbancie na použitom objeme chloroformu

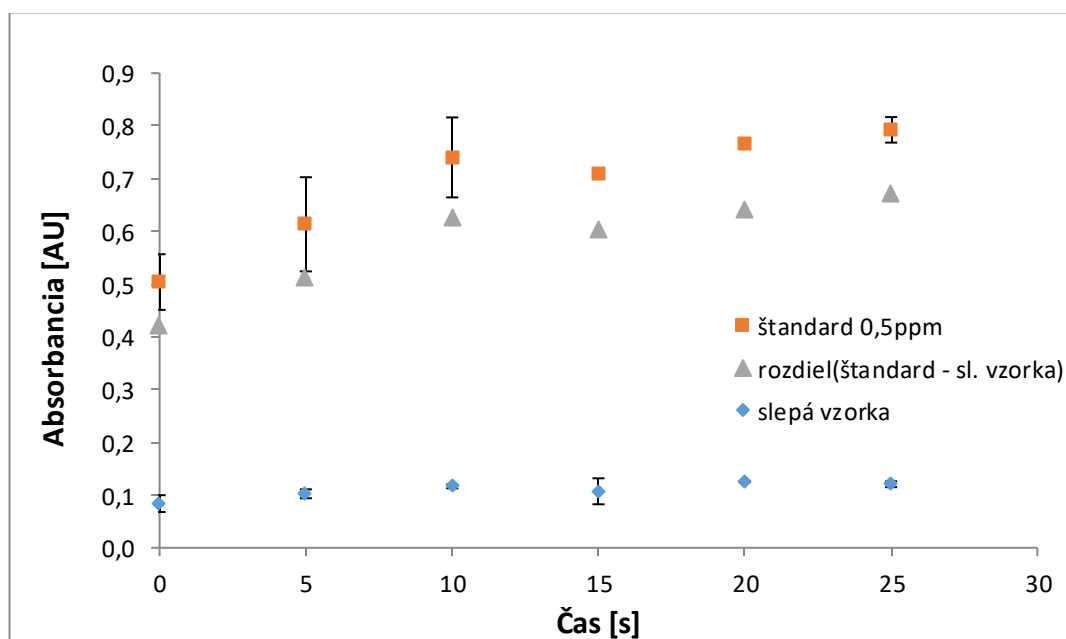
## 4.12 Optimalizácia času oxidácie jodidu na jód

Na oxidáciu jodidu na jód je potrebný určitý čas, aby oxidácia prebehla úplne. Preto bolo potrebné optimalizovať čas potrebný na reakciu, aby sa zistilo koľko času je potrebné ponechať na reakciu resp. či je možné skrátiť čas a tým aj skrátiť celkový čas analýzy.

Ako štandard sa použil jodid draselný s koncentráciou 0,5 ppm v objeme 1000  $\mu\text{l}$ . Na vytvorenie kyslého prostredia sa použila kyselina chlorovodíková s koncentráciou 0,8 mol/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako oxidačné činidlo sa použil jodičnan draselný s koncentráciou 5 mmol/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako tlmivý roztok sa použil citrónan sodný s koncentráciou 0,3 mol/l, ktorého pH bolo 4,5. Ako indikátor sa použila genciánová violet s koncentráciou 250 mg/l a objemom 100  $\mu\text{l}$ . Na extrakciu sa použil chloroform v objeme 150  $\mu\text{l}$ .

Bola meraná absorbanca pri rôznych časoch potrebných na oxidáciu jodidu na jód a výsledky merania sú zobrazené v grafe č. 8.

Z grafu je zrejmé, že po 10 sekundách sa už signál výrazne nezvyšuje, preto pre ďalšie kroky optimalizácie bol zvolený čas potrebný na oxidáciu jodidu na jód 10 sekúnd ako kompromis medzi citlivosťou a celkovým časom analýzy.



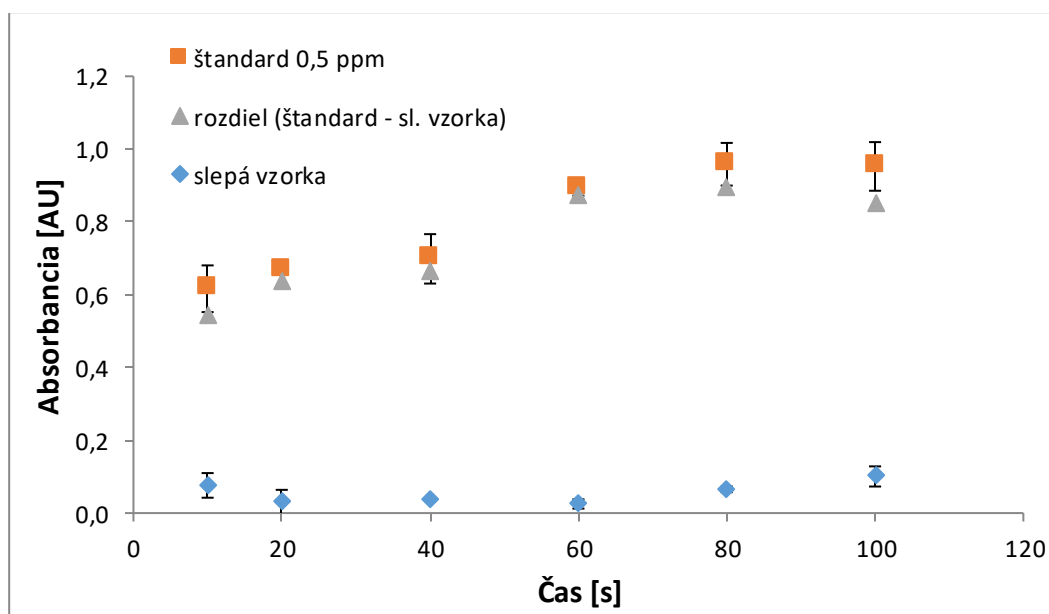
**Graf č. 8:** Závislosť absorbancie na čase oxidácie jodidu na jód

### 4.13 Optimalizácia času oxidácie genciánovej violete

V tejto časti bola meraná absorbanca pri rôznych časoch potrebných na oxidáciu genciánovej violete a porovnaná so slepou vzorkou.

Ako štandard sa použil jodid draselný KI s koncentráciou 0,5 ppm v objeme 1000  $\mu\text{l}$ . Na vytvorenie kyslého prostredia sa použila HCl s koncentráciou 0,8 mol/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Ako oxidačné činidlo sa použil jodičnan draselný  $\text{KIO}_3$  s koncentráciou 5 mmol/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Čas potrebný na oxidáciu jodidu bol zvolený na 10 s. Ako tlmivý roztok sa použil citrónan sodný v koncentrácii 0,3 mol/l, ktorého pH bolo 4,5. Ako indikátor sa použila genciánová violet v koncentrácii 250 mg/l v objeme 100  $\mu\text{l}$ . Na extrakciu sa použil chloroform v objeme 150  $\mu\text{l}$ .

Výsledky tohto experimentu sú zobrazené v grafe č. 9. Bolo zistené, že pri čase oxidácie 60 s je rozdiel absorbancie štandardu a slepej vzorky najvyšší a s ďalším postupným zvyšovaním času potrebného na oxidáciu sa rozdiel absorbancií nezvyšoval.



**Graf č. 9:** Závislosť absorbancie na čase oxidácie genciánovej violete z redukovanej formy na oxidovanú formu

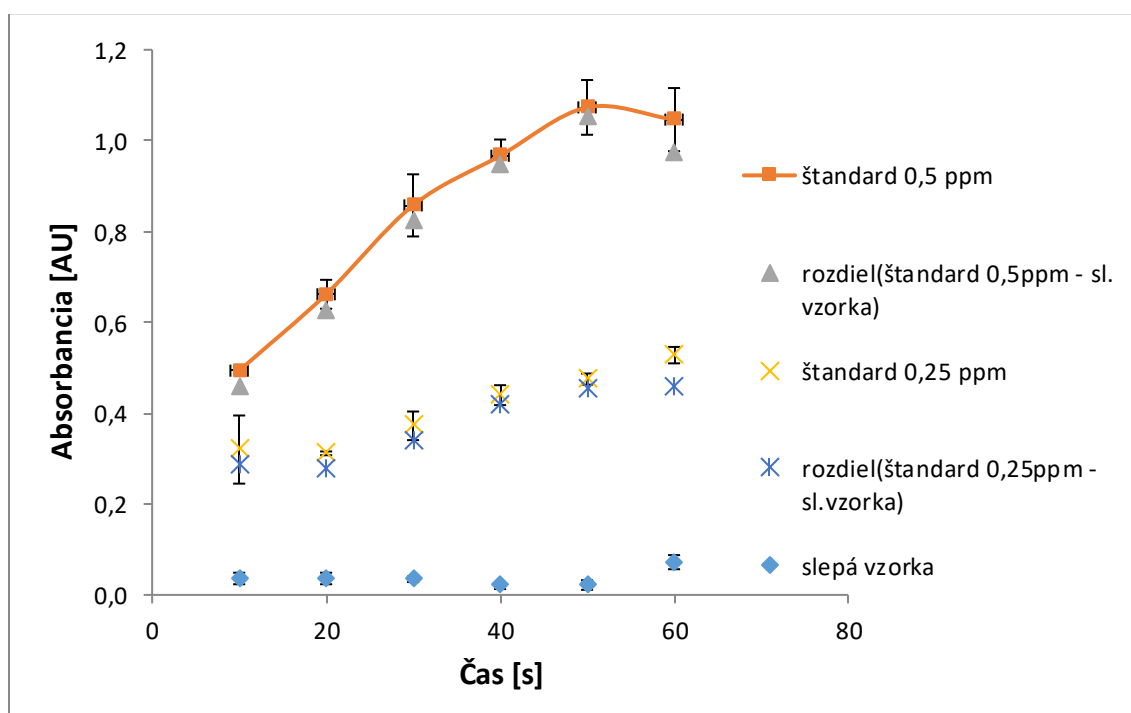
#### 4.14 Optimalizácia času extrakcie do chloroformu

V tejto časti bol optimalizovaný čas extrakcie vzniknutého produktu reakcie do chloroformu.

Boli použité rovnaké podmienky analýzy ako v predošlých experimentoch.

Bola zmeraná absorbancia pri rôznych časoch potrebných na extrakciu a porovnaná so slepou vzorkou.

Výsledky sú znázornené v grafe č. 10. Bolo zistené, že s rastúcim časom extrakcie absorbancia stúpa približne lineárne až do času 50 s. Po tomto bode už s rastúcim časom signál nestúpá. Preto bola pre ďalšie experimenty zvolená doba extrakcie 50 s.



**Graf č. 10:** Závislosť absorbancie na čase extrakcie do chloroformu

#### 4.15 Overenie citlivosti metódy

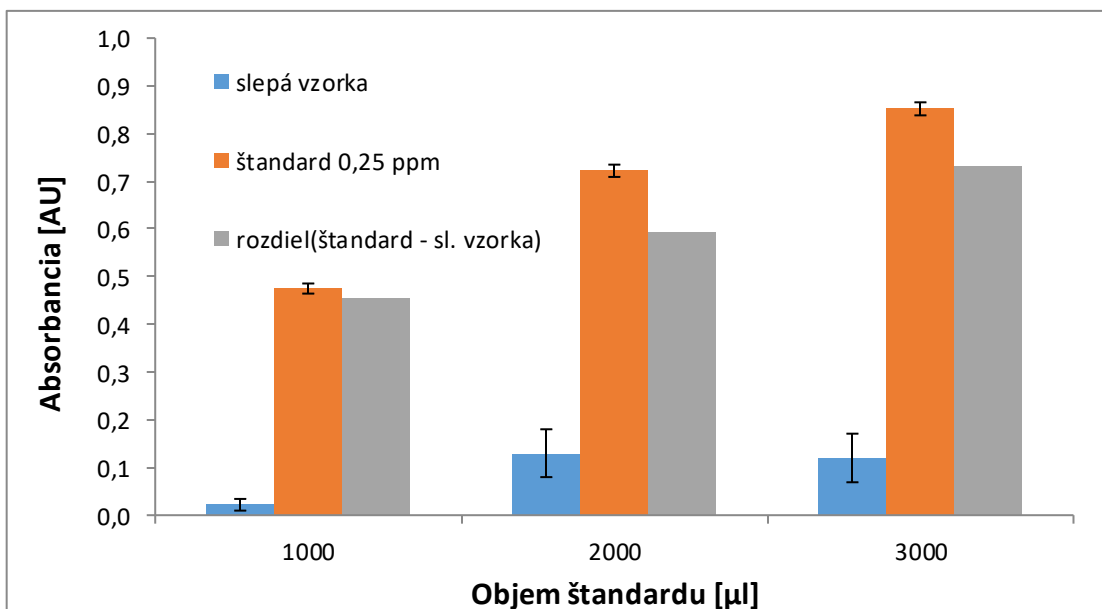
V tejto časti bolo zisťované, či je možné zvýšiť citlivosť metódy, ak sa zvýši objem štandardu.

Použili sa objemy štandardu 1000  $\mu\text{l}$ , 2000  $\mu\text{l}$  a 3000  $\mu\text{l}$  s koncentráciou 0,25 ppm. Podmienky analýzy sú v tomto prípade zhrnuté v tabuľke č. 12.

Bola zmeraná absorbanca chloroformového extraktu u troch rôznych objemov štandardu a porovnaná so slepou vzorkou. Výsledky sú zhrnuté v grafe č. 11. Na rozdiel od predpokladu dvojnásobného, prípadne trojnásobného zvýšenia signálu, pri použití dvojnásobného množstva objemov vzorky a činidiel došlo k nárastu absorbancie o 30,6 % a pri trojnásobnom zvýšení objemov došlo o 61,5% oproti meraniu s objemom vzorky 1000  $\mu\text{l}$ .

**Tabuľka č. 12:** Podmienky pri optimalizácii vhodného objemu štandardu

Použité činidlo	Objem činidiel [ $\mu\text{l}$ ]		
jodid draselný	1000	2000	3000
kyselina chlorovodíková 0,8 mol/l	100	200	300
jodičnan draselný 5 mmol/l	100	200	300
citrónan sodný 0,3 mol/l	200	400	600
genciánová violeť 250 mg/l	100	100	100
chloroform	150	150	150



**Graf č. 11:** Závislosť absorbancie na použítom objeme štandardu

#### 4.16 Kalibračná krivka a analytické parametre metódy

Optimalizované hodnoty všetkých premenných boli použité na zistenie linearity metódy. Kalibračná krivka bola zmeraná so šiestimi štandardmi s koncentraciami 0,05 – 0,6 ppm v objeme 1000  $\mu$ l. Optimalizované podmienky sú uvedené v tabuľke č. 13.

**Tabuľka č. 13:** Optimalizované podmienky použité pri meraní kalibračnej krivky

Použité činidlo	Koncentrácia	Objem [ $\mu$ l]	
jodid draselný	0,05 – 0,6 ppm	3000	1000
kyselina chlorovodíková	0,8 mol/l	300	100
jodičnan draselný	5 mmol/l	300	100
citrónan sodný	0,3 mol/l	600	200
genciánová violet	250 mg/l	100	100
chloroform		150	150

Ako čas potrebný na oxidáciu jodidu draselného sa použil 10 s. Čas potrebný na oxidáciu genciánovej violete sa použil 60 s a čas potrebný na extrakciu analytu do chloroformu sa použil 50 s.

Nameraná absorbanca sa porovnala so slepou vzorkou. Kalibračná závislosť bola zistená v rozmedzí 0,1 ppm – 0,6 ppm. Absorbanca najnižšieho bodu kalibračnej krivky (0,05 ppm) bola zhodná s absorbanciou slepej vzorky. Preto bola overená možnosť zvýšenia citlivosti metódy zvýšením objemu aspirovanej vzorky z 1000 na 3000  $\mu$ l (objem použitej striekačky to dovoľoval). Úmerne boli zvýšené objemy aspirovaných činidiel s výnimkou genciánovej violete a extrakčného činidla, ktorých objemy ostali zachované. Po premeraní kalibračných štandardov s vyšším objemom vzorky bolo zistené, že citlivosť sa zvýšila asi 1,6 -násobne (smernica 2,0637 vs. 3,3002) oproti meraniu s 1000  $\mu$ l roztoku štandardu.

Zistené hodnoty analytických parametrov sú zosumarizované v tabuľke č. 16 a 17.

Bola zmeraná absorbanca chloroformového extraktu a výsledky boli porovnávané so slepou vzorkou. Výsledky sú uvedené v tabuľke č. 14 a 15. Kalibračné krivky oboch metód (s nižším a vyšším objemom štandardu) sú zobrazené v grafe č. 12.



**Tabuľka č. 14: Meranie kalibračnej krivky pri použití štandardu v objeme 3000  $\mu$ l**

Koncentrácia štandardu (ppm)	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
1.meranie		0,092	0,246	0,536	0,906	0,958	1,646	1,803
2.meranie	0,131	0,088	0,278	0,615	0,934		1,880	1,875
3.meranie	0,090	0,098	0,251	0,579	0,984	1,182		
priemer	0,109	0,093	0,258	0,577	0,941	1,070	1,763	1,839
sm. odchýlka	0,089	0,005	0,017	0,039	0,040	0,158	0,166	0,051
RSD (%)	81,7	5,6	6,7	6,8	4,2	14,8	9,4	2,8
rozdiel( $A_{st} - A_{bl}$ )		0,149	0,468	0,833	0,961	1,655	1,730	0,149

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

\*( $A_{st} - A_{bl}$ )= Absorbancia štandardu – absorbancia slepej vzorky**Tabuľka č. 15: Meranie kalibračnej krivky pri použití štandardu v objeme 1000  $\mu$ l**

Koncentrácia štandardu (ppm)	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
1.meranie		0,102	0,166	0,268	0,590	0,715	0,970	1,247
2.meranie	0,111	0,086	0,179		0,610		0,951	1,299
3.meranie	0,118	0,102	0,171	0,383	0,607	0,758	0,980	1,257
priemer	0,114	0,097	0,172	0,260	0,602	0,736	0,967	1,268
sm. odchýlka	0,005	0,009	0,007	0,089	0,011	0,031	0,015	0,028
RSD* (%)	4,6	9,5	3,8	34,0	1,8	4,2	1,5	2,2
rozdiel( $A_{st} - A_{bl}$ )*		0,018	0,058	0,146	0,488	0,622	0,853	1,153

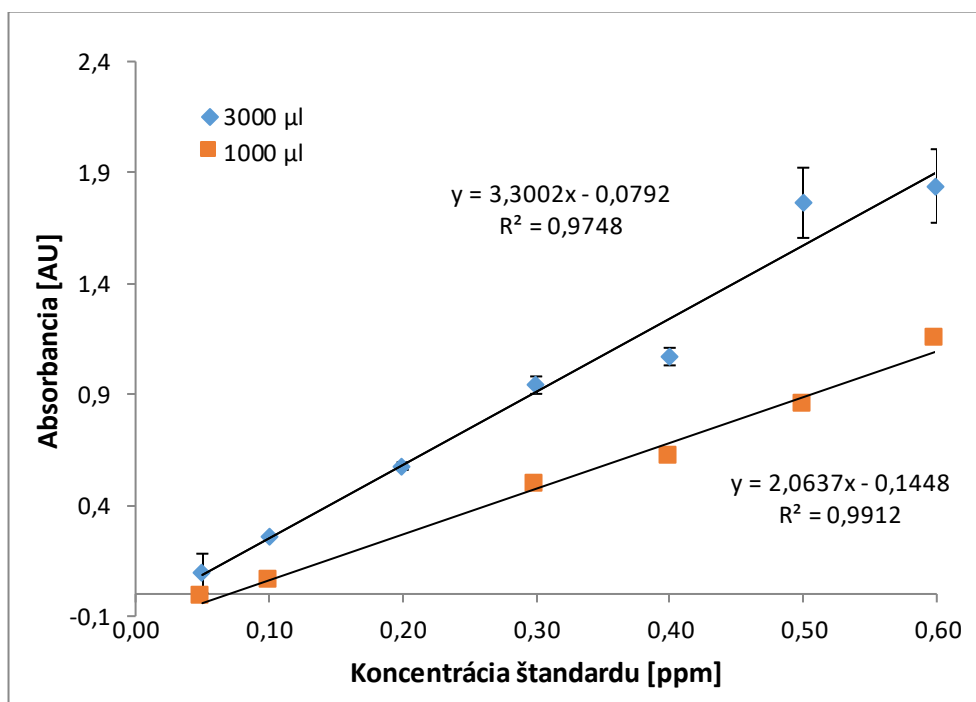
\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

\*( $A_{st} - A_{bl}$ )\*= Absorbancia štandardu – absorbancia slepej vzorky**Tabuľka č. 16: Hodnoty analytických parametrov pri použití štandardu v objeme 3000  $\mu$ l**

Analytický parameter	Hodnota
Limit detekcie (ppm)	0,081
Limit kvantifikácie (ppm)	0,242
Opakovateľnosť (% RSD)	7,2
Počet vzoriek/h	10

**Tabuľka č. 17:** Hodnoty analytických parametrov pri použití štandardu v objeme 1000  $\mu$ l

Analytický parameter	Hodnota
Limit detekcie (ppm)	0,049
Limit kvantifikácie (ppm)	0,145
Opakovateľnosť (% RSD)	8,1
Počet vzoriek/h	12



**Graf č. 12:** Kalibračné krivky

#### 4.17 Reálne vzorky

Po zoptimalizovaní všetkých podmienok na analýzu bola táto metóda aplikovaná na reálne vzorky s použitím kalibračnej krivky zmeranej ešte raz v rámci tohto experimentu. Použité podmienky sú uvedené v tabuľke č. 13 a sú identické s podmienkami použitými pri meraní kalibračnej krivky.

Boli zmerané dve kalibračné krivky s objemami štandardov 3000 µl a 1000 µl a následne bola zmeraná absorbancia reálnej vzorky a zmesi reálnej vzorky a jodidu draselného s koncentráciou 0,2 ppm. Ako reálne vzorky sa použili nosné kvapky Vincentka a doplnok stravy s obsahom jódu Kelp.

Nosné kvapky Vincentka boli 20-krát nariadené a použité na analýzu. V prípade doplnku stravy Kelp sa použila jedna tableta, ktorá bola rozdrvená, jej obsah sa rozpustil vo vode a prefiltraval sa cez membránový filter s veľkosťou pórov 0,45 µm. Filtrát sa použil na analýzu.

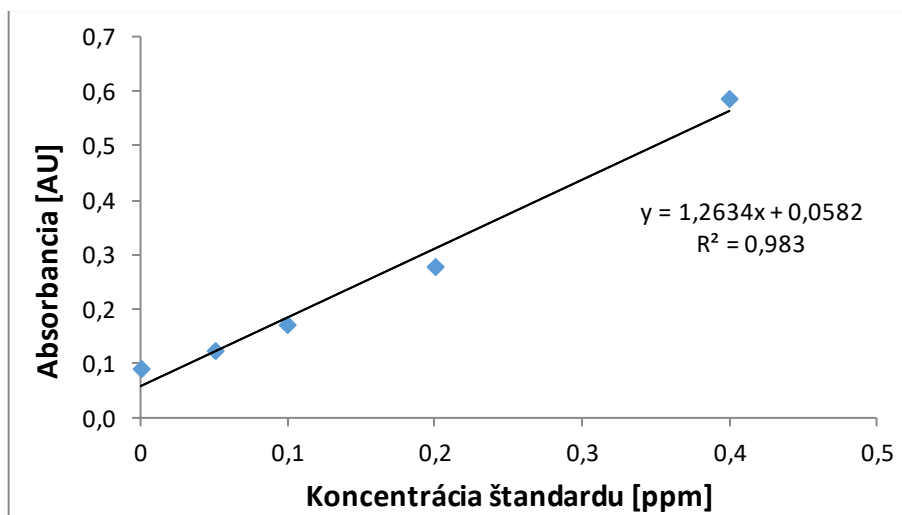
Výsledky kalibračnej krivky a analýzy nosných kvapiek Vincentka sú uvedené v tabuľke č. 18.

**Tabuľka č. 18:** Meranie kalibračnej krivky s objemom štandardu 1000 µl a stanovenie obsahu jódu v nosných kvapkách Vincentka

Koncentrácia štandardu(ppm)	0	0,05	0,1	0,2	0,4	Vincentka 20x zriedená	Vincentka + 0,2ppm štandard
1.meranie	0,097	0,123	0,166	0,267		0,366	0,543
2.meranie	0,091	0,117	0,173			0,315	0,504
3.meranie	0,075	0,124	0,166	0,286	0,585	0,356	
priemer	0,087	0,122	0,168	0,277	0,585	0,346	0,523
sm. odchýlka	0,011	0,004	0,004	0,013		0,027	0,027
RSD* (%)	13,0	3,4	2,5	4,7		7,7	5,2

Pozn. Prázdne bunky sú pre odľahlé body

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka



**Graf č. 13:** Kalibračná krivka pri objeme štandardu 1000 µl

Z rovnice kalibračnej krivky bol vypočítaný obsah jodidu v nosných kvapkách Vincentka. Podľa údajov výrobcu obsahuje Vincentka 6,88 mg jodidu na 1 liter. Z nášho merania vyplýva, že obsah jodidu vo Vincentke je 4,54 mg jodidu na 1 liter.

Výťažnosť bola vypočítaná podľa vzorca:

$$\frac{c(\text{vz.} + \text{prid. štandard}) - c(\text{vz.})}{c(\text{prid. štandard})} \cdot 100$$

Výsledná hodnota bola 94,1 %.

Pri stanovení jódu v doplnku stravy Kelp sa použila kalibračná krivka z predošlého stanovenia jódu v nosných kvapkách Vincentka. Bola zmeraná trikrát absorbanca chloroformového extraktu z filtrátu doplnku stravy Kelp a výsledky sa porovnávali so slepou vzorkou. Takisto bola zmeraná absorbanca štandardu s koncentráciou 0,2 ppm a absorbanca zmesi filtrátu reálnej vzorky a prídavku štandardu s koncentráciou 0,2 ppm.

Výsledky sú uvedené v tabuľke č. 19.

**Tabuľka č. 19:** Výsledky stanovenia jódu v doplnku stravy Kelp

	slepá vzorka	0,2 ppm KI	Kelp	Kelp + 0,2 ppm KI
1. meranie		0,270	0,143	0,349
2. meranie	0,083	0,254	0,150	0,341
3. meranie	0,077	0,292	0,103	0,310
priemer	0,080	0,272	0,132	0,333
sm. odchýlka	0,005	0,019	0,026	0,021
RSD*(%)	5,8	7,0	19,5	6,2

\*RSD = relatívna smerodajná odchýlka

Podľa výpočtu z rovnice kalibračnej krivky bol stanovený obsah jodidu v doplnku stravy Kelp v množstve 0,085 mg/l.

Výtťažnosť bola vypočítaná podľa vzorca:

$$\frac{c(vz.+prid.štandard)-c(vz.)}{c(prid.štandard)} \cdot 100$$

Výsledná hodnota výtťažnosti bola 104,7 %.

## 5 Záver

V tejto práci bola vyvinutá metóda na stanovenie jódu v nosných kvapkách Vincentka a v doplnku stravy s obsahom jódu. Bola zvolená vhodná reakcia využívajúca schopnosť jódu oxidovať genciánovú violet z jej bezfarebnej formy na oxidovanú, farebnú formu. Citlivosť metódy sa zvýšila využitím extrakcie farebnej formy indikátoru do malého objemu chloroformu. Ako technika na automatizovanie celej reakcie sa využila prietoková technika *Lab-In-Syringe*.

Boli optimalizované parametre metódy, ako koncentrácia a druh činidiel, čas oxidácie jodidu na jód, čas oxidácie farebného indikátora a čas extrakcie. Následne po optimalizácii bola zmeraná kalibračná krivka a určené analytické parametre vyvinutej metódy.

Túto metódu je možné využiť na stanovenie stopového množstva jódu v jednoduchých matriciach, ako sú napr. nosné kvapky. Stanovenie obsahu jódu bolo testované aj na doplnku stravy s obsahom jódu Kelp v tablete.

Zoptimalizované podmienky budú slúžiť ako podklad pre ďalšiu optimalizáciu a validáciu metódy.

Pre úplnú validáciu bude potrebné overiť citlivosť metódy, tj. overiť možné interferencie látok prítomných v skúmaných vzorkách, a ďalej zmerať väčší počet vzoriek. V prípade merania organicky viazaného jódu (prípravok Kelp) bude nutné overiť správnosť stanovenia porovnaním s metódou využívajúcou mineralizáciu vzorky.

Využitie *Lab-In-Syringe* techniky prinieslo urýchlenie a zjednodušenie celej analýzy.

## 6 Zoznam použitej literatúry

- [1] *Flow injection analysis, Tutorial & News on flow based micro analytical techniques* :<http://flowinjectiontutorial.com/Introduction%20I.4.%20Flow%20Programming.html> [cit. 2017-05-05]
- [2] *DRI: dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc : a report of the Panel on Micronutrients and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine* . 2001, 258-259, 261.
- [3] NATH, S.K., MOINIER B., THUILLIER F., RONGIER M. a DESIEUX J.F.. Urinary excretion of iodide and fluoride from supplemented food grade salt. *International journal for vitamin and nutrition research* . 1992, **62**(1), 66-72
- [4] Iodine Deficiency. *Endocrine Reviews* . 2009, **30**(4), 376-408
- [5] *Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination: a guide for programme managers* . 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2007, s. 4
- [6] SHELOR, C. P. a DASGUPTA P.K. Review of analytical methods for the quantification of iodine in complex matrices. *Analytica Chimica Acta* . 2011, **702**(1), 16-36
- [7] SANDELL, E. B. a KOLTHOFF I. M. Micro determination of iodine by a catalytic method. *Mikrochimica Acta* . 1937, **1**(1), 9-25
- [8] YAPING, Z., DONGXING Y., JIXIANG,C.,TIANSIUI, L. a HUIGIN, C. Spectrophotometric determination of urinary iodine by flow-injection analysis with on-line catalytic digestion. *Clinical Chemistry* . 1996, **42**(12), 2021-2027

- [9] KUZNETSOV, V. V., ERMOLENKO, Yu. V. a SEFFAR, L. Flow-Injection Determination of Elemental Iodine by Polyvinyl Alcohol. *Journal of Analytical Chemistry* . 2004, **59**(7), 688-693
- [10] TESHALDET, Z. Sequential injection spectrophotometric determination of trace amounts of iodide by its catalytic effect on the 4,4-methylenebis(N,N-dimethylaniline)-chloramine-T reaction. *Talanta* . 2004, **64**(5), 1213-1219
- [11] *Flow analysis with spectrophotometric and luminometric detection* . Waltham, Mass.: Elsevier, 2012, 2,3-5,22,24-26, 174-180, 186. ISBN 0123859247.
- [12] DE LA GUARDIA, M. a RUZICKA J. Guest editorial. Towards environmentally conscientious analytical chemistry through miniaturization, containment and reagent replacement. *The Analyst* . 1995, **120**(2), 17N
- [13] RUZICKA, J. a MARSHALL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors. process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* . 1990, **237**, 329-343
- [14] LENEHAN, C. E., BARNETT, N. W. a LEWIS, S. W. Sequential injection analysis. *The Analyst* . **127**(8), 997-1020
- [15] MESQUITA, R.B.R. a RANGEL, A.O.S.S. A review on sequential injection methods for water analysis. *Analytica Chimica Acta* . 2009, **648**(1), 7-22
- [16] RUZICKA, J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *The Analyst* . **125**(6), 1053-1060
- [17] WANG, J. a HANSEN, E. H. Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* . 2003, **22**(4), 225-231
- [18] WU, Ch., SCAMPAVIA L., RUZICKA J. a ZAMOST B. Micro sequential injection: fermentation monitoring of ammonia, glycerol, glucose, and free iron using the novel lab-on-valve system. *The Analyst* . **126**(3), 291-297
- [19] RUZICKA, J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *The Analyst* . **125**(6), 1053-1060
- [20] ŠRÁMKOVÁ, I. *Application of non-separation flow methods in pharmaceutical analysis* . Hradec Králové, 2015
- [21] *FIALab Instruments Inc., Syringe Pumps*,  
<http://www.flowinjection.com/index.php/products?sid=86&pid=54> [cit. 2017-05-05]



- [22] HORSTKOTTE, B., ALEXOVIČ M., MAYA F., DUARTE C. M., ANDRUCH V. a CERDÀ V. Automatic determination of copper by in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction of its bathocuproine-complex using long path-length spectrophotometric detection. *Talanta* . 2012, **99**, 349-356
- [23] JEANNOT, M. A. a CANTWELL, F. F.. Solvent Microextraction into a Single Drop. *Analytical Chemistry* . 1996, **68**(13), 2236-2240
- [24] RASMUSSEN, K. E. a PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* . 2004, **23**(1), 1-10
- [25] REZAEI, M., ASSADI, Y., MILANI HOSSEINI, M., AGHAEI, E., AHMADI, F. a BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* . 2006, **1116**(1-2), 1-9
- [26] SUÁREZ, R., HORSTKOTTE, B. a CERDÀ, V. In-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for automation and downscaling of methylene blue active substances assay. *Talanta* . 2014, **130**, 555-560
- [27] MAYA, F., HORSTKOTTE, B., ESTELA, J. M. a CERDÀ V. Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid–liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* . 2012, **404**(3), 909-917
- [28] AGRAWAL, O. A sensitive colorimetric method for the micro determination of iodine in marine water. *Talanta* . 1999, **49**(4), 923-928

## 7 Príloha: Program použitý na meranie kalibračnej krivky

Hardware Settings Wavelength 1 (nm) 580  
Hardware Settings Wavelength 2 (nm) 500  
Hardware Settings Wavelength 3 (nm) 540  
Hardware Settings Wavelength 4 (nm) 650  
Hardware Settings Use Wavelength 4 as Reference

Hardware Settings Integration Time (msec) 10  
Hardware Settings Samples to Average 9  
Hardware Settings Detectors to Average 5  
Hardware Settings Scan Rate (Hz) 5

ExternalPump Command (?) K0R

Variable define New SamplePort  
SamplePort = 2

ExternalPump Command (?) J0R  
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 200  
ExternalPump Valve Out  
ExternalPump Empty  
ExternalPump Delay Until Done

ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 25  
ExternalPump Command (?) O5R  
ExternalPump Delay Until Done  
ExternalPump Aspirate (microliter) 50  
ExternalPump Delay Until Done

'Vypustenie do odpadu

ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 200  
ExternalPump Valve Out  
ExternalPump Empty  
ExternalPump Delay Until Done

**Loop Start (#) 6**

**Loop Start (#) 3**

'Nasávanie vzorky alebo slepej vzorky

Multiposition Valve port 3  
ExternalPump Command (?) O2R  
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 200  
ExternalPump Aspirate (microliter) 3000  
ExternalPump Delay Until Done  
ExternalPump Command (?) J7R  
Delay (sec) 2

#### 'Nasávanie kyseliny

ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 50  
ExternalPump Command (?) O3R  
ExternalPump Aspirate (microliter) 300  
ExternalPump Delay Until Done  
Delay (sec) 2

#### 'Nasávanie oxidačného činidla

ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 300  
Multiposition Valve port 1  
ExternalPump Command (?) O2R  
ExternalPump Delay Until Done  
ExternalPump Aspirate (microliter) 100  
ExternalPump Delay Until Done

#### 'Nasávanie vzduchu

Multiposition Valve port 0  
ExternalPump Delay Until Done  
ExternalPump Aspirate (microliter) 150  
ExternalPump Delay Until Done  
ExternalPump Command (?) J7R  
Delay (sec) 2  
Delay (sec) 10

#### 'Nasávanie tlmivého roztoku

ExternalPump Command (?) O4R  
ExternalPump Delay Until Done  
ExternalPump Aspirate (microliter) 600  
ExternalPump Delay Until Done  
Delay (sec) 2

#### 'Nasávanie indikátora

ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 25  
ExternalPump Command (?) O5R  
ExternalPump Delay Until Done  
ExternalPump Aspirate (microliter) 100  
ExternalPump Delay Until Done  
ExternalPump Command (?) O1R  
Delay (sec) 60  
ExternalPump Command (?) J0R  
Delay (sec) 1

#### 'Nasávanie chloroformu

ExternalPump Command (?) O6R  
ExternalPump Aspirate (microliter) 150  
ExternalPump Delay Until Done  
Delay (sec) 1

'Prepnutie na uzatvorený port

ExternalPump Command (?) O1R  
ExternalPump Delay Until Done  
ExternalPump Command (?) J7R  
Delay (sec) 50  
ExternalPump Command (?) J0R

'Uvoľnenie tlaku

ExternalPump Command (?) J0R  
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 100  
ExternalPump Aspirate (microliter) 150  
ExternalPump Delay Until Done  
Delay (sec) 2

'Meranie

ExternalPump Command (?) O8R  
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 20  
Analyte New Sample  
Spectrometer Absorbance Scanning  
ExternalPump Empty  
Delay (sec) 20  
Spectrometer Stop Scanning  
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 100  
ExternalPump Delay Until Done

**Loop End**

SamplePort = SamplePort + 1

**Loop End**