

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

ON-LINE EXTRAKCE NA TUHÉ FÁZI POMOCÍ SEKVENČNÍ
INJEKČNÍ ANALÝZY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

Bc. Zuzana Hadysová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

.....

Ráda bych poděkovala školiteli PharmDr. Petru Chocholoušovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a připomínky k mé diplomové práci a také za ochotu a výbornou spolupráci.

Rovněž bych chtěla poděkovat své rodině, která mi studium umožnila a po celou dobu jeho trvání mě podporovala.

ABSTRAKT

Katedra: Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Zuzana Hadysová

Školitel: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Název diplomové práce: On-line extrakce na tuhé fázi pomocí sekvenční injekční analýzy

Tato diplomová práce je zaměřena na porovnání tří sorbentů (Iontosorb OXIN 50, Iontosorb OXIN 100 a TOYOpearl AF-chelate-650M) s cílem najít ten nejvhodnější pro analýzu Zn^{2+} při použití on-line extrakce na tuhou fázi s využitím sekvenční injekční analýzy.

Při práci byly používány roztoky síranu zinečnatého o koncentracích 25 nmol/l, 50 nmol/l, 100 nmol/l, 200 nmol/l, 500 nmol/l, 1000 nmol/l, 1500 nmol/l a 2000 nmol/l. Při analýze byl dále využíván pufr o pH 6, eluční činidlo HCl o pH 1 a činidlo 4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR). Snahou bylo extrahovat Zn^{2+} v co nejnižších koncentracích.

Testovány byly kalibrační rozsahy a opakovatelnost metody. Nejlepším sorbentem z porovnávaných byl Iontosorb OXIN 100.

ABSTRACT

Department: Department of Analytical chemistry

Candidate: Bc. Zuzana Hadysová

Supervisor: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title of the diploma thesis: On-line solid phase extraction using sequential injection analysis

This diploma thesis is focused on the comparison of three sorbents (Iontosorb OXIN 50, Iontosorb Oxin 100 and TOYOpearl AF-chelate-650M) with the aim to find the most suitable one for analysis of Zn^{2+} using on-line solid phase extraction based on sequential injection analysis.

Zinc sulphate solutions at concentrations of 25 nmol/l, 50 nmol/l, 100 nmol/l, 200 nmol/l, 500 nmol/l, 1000 nmol/l, 1500 nmol/l and 2000 nmol/l were used in this work. During the analysis was used the buffer at pH 6, the elution solution HCl at pH 1 and the reagent 4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR). The effort was to extract Zn^{2+} at the lowest possible concentrations.

Tested parameters were calibration range and repeatability. The best sorbent in comparison was Iontosorb OXIN 100.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
OBSAH	6
SEZNAM ZKRATEK.....	8
SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK	11
1. ÚVOD.....	12
2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE.....	13
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1 Extrakce na tuhou fázi (SPE).....	14
3.1.1 Sorbenty.....	16
3.2 Průtokové metody.....	17
3.2.1 Průtoková injekční analýza (FIA).....	18
3.2.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1 Příklad a pomůcky	22
4.2 Chemikálie.....	22
4.3 Příprava roztoků.....	23
4.3.1 Zásobní roztok síranu zinečnatého 1 mmol/l	23
4.3.2 Pracovní roztoky síranu zinečnatého.....	23
4.3.3 Zásobní roztok pufru.....	23
4.3.4 Pracovní roztok pufru	23
4.3.5 Eluční činidlo	24
4.3.6 Zásobní roztok činidla PAR.....	24

4.3.7	Pracovní roztok činidla PAR	24
4.4	Použité sorbenty	24
4.4.1	Iontosorb Oxin 50 a Oxin 100	25
4.4.2	TOYOpearl AF-chelate-650M	26
4.5	Podmínky měření	26
4.5.1	Popis a nastavení přístroje.....	26
4.5.2	Programy.....	28
4.5.3	Optimalizace jednotlivých kroků analýzy.....	31
5.	VÝSLEDKY.....	35
6.	ZÁVĚR	44
7.	SEZNAM LITERATURY	45

SEZNAM ZKRATEK

A	Absorbance
FIA	Průtoková injekční analýza
IDA	Iminodioctová kyselina
PAR	4-(2-Pyridylazo)resorcinol
PEEK	Polyetereterketon
R ²	Koeficient determinace
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SIA	Sekvenční injekční analýza
SP	Hlavní pístová pumpa
SP1	Doplňková pístová pumpa

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Princip metody SPE. Kondicionace – příprava sorbentu, jeho zvlhčení a aktivace funkčních skupin. Aplikace vzorku – interakce vzorku se sorbentem. Promytí – odstranění nepotřebných látek ze sorbentu. Eluce – uvolnění zachycených analytů z tuhé fáze a jejich vymytí z kolony. Převzato a upraveno z: [6].</i>	15
<i>Obrázek 2: Typy provedení SPE. A – kazetové provedení v injekční stříkačce, B – disk, C – pipetovací špička, D – jamková destička. Převzato a upraveno z: [3].</i>	15
<i>Obrázek 3: Schéma přístroje FIA. Pumpa čerpá a pohání nosný proud, do něhož je rozptýlen roztok vzorku, jehož objem je do systému vpouštěn vstřikovacím ventilem. Disperze probíhající v mísící cívce se může projevit např. změnou barvy, která je zaznamenána detektorem. Převzato a upraveno z: [14].</i>	18
<i>Obrázek 4: Princip metody SIA. A – nasátí vzorku do systému. B – nasátí roztoku činidla do systému a počátek tvorby produktu. C – tvorba většího množství produktu a jeho promíchání. D – změna směru toku, lepší promíchání reakční směsi. E – vytlačení reakční směsi do detektoru. Převzato a upraveno z: [20].</i>	19
<i>Obrázek 5: Schéma zapojení systému SIA. Pístová pumpa nasaje nosný proud, vzorek a činidlo do mísící cívky, zde dochází k promíchání a vzniká reakční směs putující (po změně směru toku) do detektoru a poté do odpadu. Převzato a upraveno z: [22].</i>	20
<i>Obrázek 6: Ukázka funkční skupiny chelatačního sorbentu OXIN. Převzato z: [25].</i>	25
<i>Obrázek 7: Kapacita sorbentu OXIN v závislosti na pH pro vybrané kovy. Převzato z: [4].</i>	25
<i>Obrázek 8: Zobrazení chelatačního ligandu kyseliny iminodioxetové (IDA) sorbentu TOYOpearl. Převzato z: [28].</i>	26
<i>Obrázek 9: Schéma zapojení systému SIA.</i>	27
<i>Obrázek 10: Objem nástřiku vzorků 500 µl pro vzorky o koncentracích 1 – 20 µmol/l a slepý vzorek za použití sorbentu OXIN 100. Výška píku byla odečítána v čase 156 s, výška základní linie v čase 164 s.</i>	32
<i>Obrázek 11: Objem nástřiku vzorků 2 ml pro vzorky o koncentracích 200 – 5000 nmol/l a slepý vzorek za použití sorbentu OXIN 100. Výška píku byla odečítána v čase 156 s, výška základní linie v čase 168 s.</i>	33

<i>Obrázek 12: Objem nástřiku vzorků 4 ml pro vzorky o koncentracích 25 – 1000 nmol/l a slepého vzorku za použití sorbentu OXIN 100. Výška píku byla odečítána v čase 155 s, výška základní linie v čase 158 s.</i>	<i>34</i>
<i>Obrázek 13: Záchyt Zn²⁺ o koncentracích 25 – 1000 nmol/l včetně slepého vzorku na sorbentu OXIN 100. Výška píku byla odečítána v čase 155 s, výška základní linie v čase 158 s.</i>	<i>36</i>
<i>Obrázek 14: Kalibrační křivka pro sorbent OXIN 100. Rozsah koncentrace vzorků 25 – 1000 nmol/l, znázorněna absorbance získaná po odečtu slepého vzorku.</i>	<i>37</i>
<i>Obrázek 15: Obrázek 16: Záchyt Zn²⁺ o koncentracích 25 – 2000 nmol/l včetně slepého vzorku na sorbentu OXIN 50. Výška píku byla odečítána v čase 155 s, výška základní linie v čase 170 s.</i>	<i>38</i>
<i>Obrázek 16: Kalibrační křivka pro sorbent OXIN 50. Rozsah koncentrace vzorků 100 – 2000 nmol/l, koncentrace 25 nmol/l a 50 nmol/l odstraněny z důvodu špatné detekce. Znázorněna absorbance získaná po odečtu slepého vzorku.</i>	<i>39</i>
<i>Obrázek 17: Záchyt Zn²⁺ o koncentracích 25 – 2000 nmol/l včetně slepého vzorku na sorbentu TOYOpearl. Výška píku byla odečítána v čase 155 s, výška základní linie v čase 170 s.</i>	<i>41</i>
<i>Obrázek 18: Kalibrační křivka pro sorbent TOYOpearl. Rozsah koncentrace vzorků 50 – 2000 nmol/l, koncentrace 25 nmol/l odstraněna z důvodu špatné detekce. Znázorněna absorbance získaná po odečtu slepého vzorku.</i>	<i>42</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Příprava pracovních roztoků síranu zinečnatého. Množství odebraného zásobního roztoku ZnSO₄, které bylo doplněno 0,1 mol/l puřrem o pH 6 do 15 ml zkumavky.</i>	<i>23</i>
<i>Tabulka 2: Program č. 1 - měření vzorku pro kalibraci a opakovatelnost.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabulka 3: Program č. 2 - promytí kolony nosným proudem (puřrem).</i>	<i>29</i>
<i>Tabulka 4: Program č. 3 - promytí systému elučním roztokem.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabulka 5: Program č. 4 - promytí SP 1.</i>	<i>30</i>
<i>Tabulka 6: Program č. 5 - promytí SIC pumpy.</i>	<i>30</i>
<i>Tabulka 7: Program č. 6 - promytí vzorku.</i>	<i>31</i>
<i>Tabulka 8: Hodnoty absorbance pro nástřik vzorku o objemu 500 μl. Koncentrace vzorků 1 μmol/l – 20 μmol/l včetně slepého vzorku při použití sorbentu OXIN 100.</i>	<i>32</i>
<i>Tabulka 9: Hodnoty absorbance pro nástřik vzorku o objemu 2 ml. Koncentrace vzorků 200 nmol/l – 5000 nmol/l včetně slepého vzorku při použití sorbentu OXIN 100.</i>	<i>33</i>
<i>Tabulka 10: Hodnoty absorbance pro nástřik vzorku o objemu 4 ml. Koncentrace vzorků 25 nmol/l – 1000 nmol/l včetně slepého vzorku při použití sorbentu OXIN 100.</i>	<i>34</i>
<i>Tabulka 11: Hodnoty absorbance pro kalibrační přímku pro OXIN 100.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabulka 12: Opakovatelnost pro sorbent OXIN 100.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabulka 13: Hodnoty absorbance pro kalibrační přímku pro OXIN 50.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabulka 14: Opakovatelnost pro sorbent OXIN 50.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabulka 15: Hodnoty absorbance pro kalibrační přímku pro TOYOpearl.</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 16: Opakovatelnost pro sorbent TOYOpearl.</i>	<i>42</i>

1. ÚVOD

Stanovení koncentrace stopových prvků, konkrétně kovových iontů, je důležité, jedná se o esenciální prvky, ale zároveň mohou mít vysoké hladiny některých kovových iontů negativní vliv na zdraví člověka.

V současnosti je kladen nárok na metody pokud možno co nejrychlejší, finančně dostupné, jednoduché na provedení, bezpečné a dostatečně citlivé. Jednou takovou metodou je sekvenční injekční analýza, která umožňuje analýzu série vzorků. Pro samotné měření je potřeba malých objemů, tudíž je nízká spotřeba činidel, vzorku i tvorba vzniklého odpadu. Výhodou této metody je automatizace a možnost jejího propojení s dalšími metodami jako je např. extrakce na tuhou fázi.

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem práce bylo porovnat sorbenty Iontosorb OXIN 100, Iontosorb OXIN 50 a TOYOpearl AF-chelate-650M a zjistit, který z nich by byl nejvhodnější pro analýzu Zn^{2+} při použití on-line extrakce na tuhou fázi s využitím sekvenční injekční analýzy. Snahou bylo analyzovat Zn^{2+} v co nejnižších koncentracích.

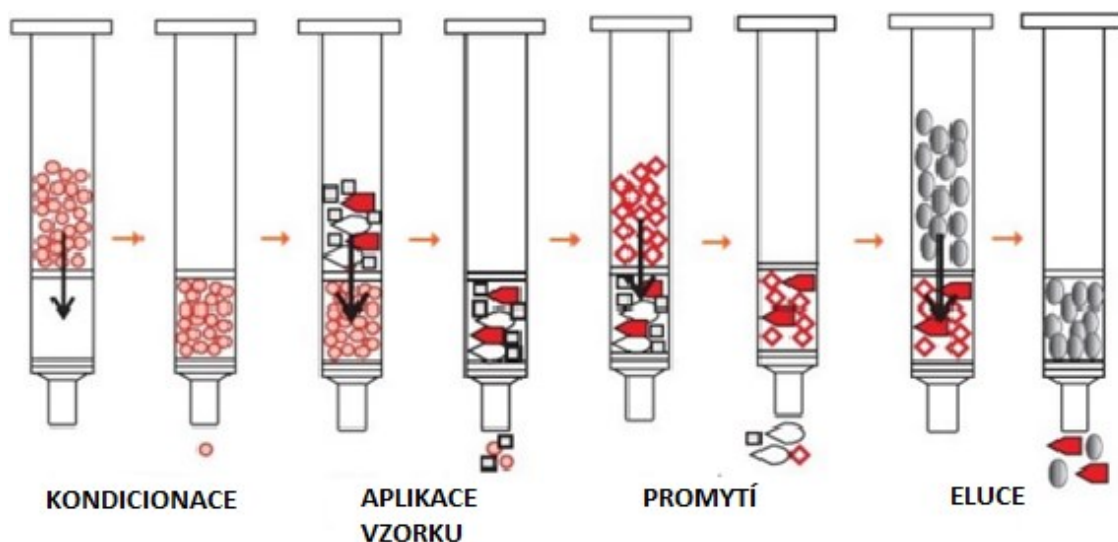
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Extrakce na tuhou fázi (SPE)*

Extrakce na tuhou fázi (Solid phase extraction, SPE) je jedna z nejpoužívanějších technik v analytické chemii pro přípravu vzorků s cílem odstranit interference vzorku a pro zakoncentrování analytu před samotnou analýzou [1].

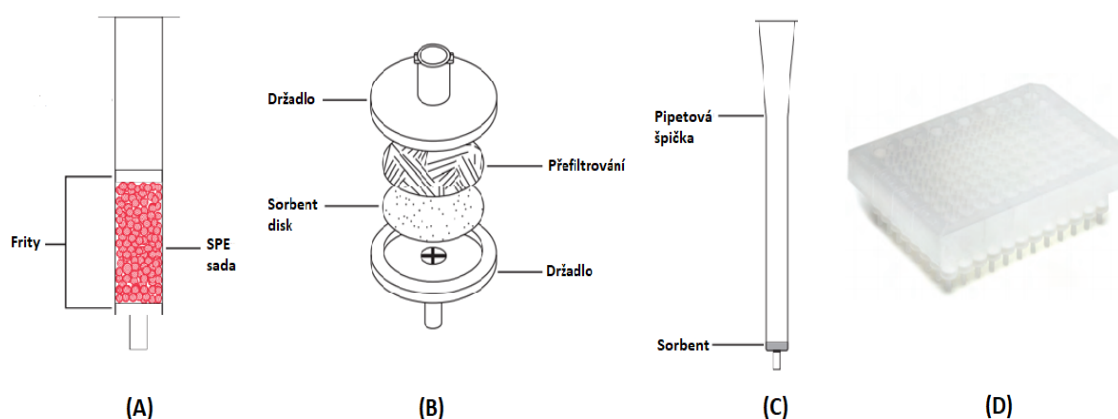
Je to metoda, která je založena na rovnovážné distribuci analytu mezi dvě fáze (kapalnou a tuhou), přičemž rovnováha je posunuta ve prospěch jedné z nich (tuhé fáze). Pokud je tuhá fáze neboli sorbent tvořen nemodifikovaným silikagelem nebo iontomeniči, hovoříme o polárních stacionárních fázích. V případě modifikovaných silikagelů s uhlíkovými řetězci – C18 hovoříme o nepolárních stacionárních fázích [2].

Provedení SPE se skládá z pěti kroků, které jsou zobrazené na obr. č. 1. První krok je nazýván kondicionace. Kolonka musí být připravena na interakci složek obsažených ve vzorku se sorbentem. Druhý krok aplikace vzorku zahrnuje nanesení vzorku na sorbent, který zachytí analyty po průchodu kolonkou. Třetím krokem je promytí, přičemž dochází k eliminaci nežádoucích látek, žádoucí analyty jsou zachovány na sorbentu. Dalším krokem je sušení, při kterém je využíván vzduch či inertní plyn. Při posledním kroku dochází k uvolnění adsorbovaného analytu ze sorbentu. Tento krok je nazýván eluce [2].



Obrázek 1: Princip metody SPE. Kondicionace – příprava sorbentu, jeho zvlhčení a aktivace funkčních skupin. Aplikace vzorku – interakce vzorku se sorbentem. Promytí – odstranění nepotřebných látek ze sorbentu. Eluce – uvolnění zachycených analytů z tuhé fáze a jejich vymytí z kolony. Převzato a upraveno z: [6].

Jak je patrné z obr. č. 2, SPE může být vyhotovena v podobě kazet, disků, pipetových špiček, jako deska s 96 jamkami nebo v podobě potažených vláken, která se využívají při mikroextrakci [3].



Obrázek 2: Typy provedení SPE. A – kazetové provedení v injekční stříkačce, B – disk, C – pipetovací špička, D – jamková destička. Převzato a upraveno z: [3].

SPE je často využívána pro čištění látek. Látky obsahují mnoho nečistot, jejichž zdrojem je průmysl, spalování fosilních paliv, zemědělská činnost a další. Nečistotami

jsou např. toxické železnaté ionty a škodlivé organické sloučeniny, které je potřeba odstranit. Příkladem může být využití SPE pro získání přečištěné vody pro lidskou konzumaci nebo metalurgie pro získání čistých kovů, které jsou používány v elektronickém průmyslu, atd. Při SPE lze extrahovat organické i anorganické sloučeniny. Právě při analýze stopových prvků je SPE nejčastěji používanou metodou pro zakoncentrování analytu [4, 5].

Oproti jiným extrakčním technikám má SPE nižší spotřebu rozpouštědel, vysokou účinnost, krátkou dobu extrakce, nízkou ekonomickou náročnost na likvidaci nebo minimální ztráty při izolaci analytů v průběhu evaporace. Ve spojení se SIA, ale i s jinými metodami, lze SPE zautomatizovat [5].

3.1.1 Sorbenty

3.1.1.1 Sorbenty s reverzní fází

Použití reverzní fáze je v případě, že hledaný analyt je středně polární až nepolární sloučenina, která je na sorbentu zadržována pomocí hydrofobních interakcí, a to van der Waalových sil či disperzních sil. Stacionární fáze je nepolární (silikagel s navázanými funkčními skupinami) a mobilní fáze je polární (nejčastěji směs acetonitrilu nebo metanolu s vodou nebo jiným vhodným pufrům) [6].

3.1.1.2 Sorbenty s normální fází

V případě, že je hledaný analyt polární látka, využívají se sorbenty s normální fází. Analyt je na sorbentu zadržován pomocí hydrofilních interakcí, a to vodíkovými vazbami, π - π interakcemi, vazbou dipól-dipól a interakcí dipól-indukovaný dipól. Stacionární fáze je polární, mobilní fáze je středně polární až nepolární (např. aceton nebo chlorovaná rozpouštědla) [6].

3.1.1.3 Sorbenty s iontoměničovou fází

Jedná se o sorbenty, které jsou schopny iontové výměny s analytem pomocí elektrostatických sil. Principem je použití roztoku o takovém pH, aby došlo k neutralizaci

funkční skupiny analytu nebo sorbentu, výsledkem je eluce hledaného analytu. Řadíme sem aniontově výměnné sorbenty (anexy) a kationtově výměnné sorbenty (katexy). Jak anexy, tak katexy dále dělíme na slabé či silné.

Silné anexy se používají pro izolaci silných nebo slabých aniontů, stejně tak slabé anexy. Silné i slabé katexy slouží pro izolaci silných i slabých kationtů. Při použití silných iontoměničů pro silné anionty/kationty není možná jejich eluce. V tomto případě je lepší použití slabých iontoměničů [6].

3.1.1.4 Chelatační sorbenty

Chelatační sorbent se skládá ze dvou složek – polymerního nosiče a na něm navázaného chelátového ligandu tvořícího funkční skupinu. Vlastnosti těchto dvou složek určují funkci a použití tohoto sorbentu. Chelátový ligand tvoří stabilní komplexy s dvojmocnými a trojmocnými kationty kovů [7, 8].

Nejpoužívanějším polymerním nosičem je agarosa. Nejčastěji používaným ligandem je iminodioctová kyselina (IDA). Ta je však postupně nahrazována ligandy vytvářejícími stabilnější komplexy. Příkladem jsou tris(karboxymetyl)etylendiamin (TED), N-(2-pyridylmetyl)glycin nebo karboxymetylaspartát (CM-ASP). Dalšími ligandy jsou dietyltriain (DETA), dietyltriaintetraoctová kyselina (DTTA), etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) nebo dietyltriainpentaoctová kyselina (DTPA) [9, 10].

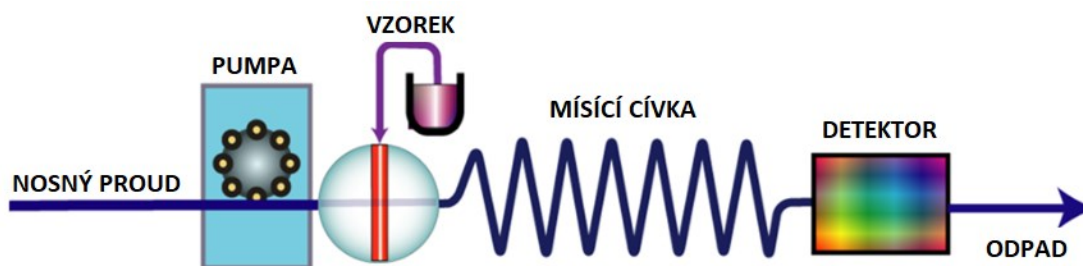
3.2 Průtokové metody

Jedná se o metody založené na průtoku kapaliny systémem, řadíme sem např. průtokovou injekční analýzu (FIA) a sekvenční injekční analýzu (SIA). Obě metody využívají vstřikování kapalného vzorku do proudu nosiče vhodné kapaliny. Metody mohou být poloautomatické i plně automatické a mohou zahrnovat i extrakci kapalina - kapalina nebo extrakci kapalina - tuhá látka [11].

3.2.1 Průtoková injekční analýza (FIA)

FIA je založena na vstřikování kapalného vzorku do pohybujícího se přímého konstantního proudu nosiče vhodné kapaliny. Vstřikovaný vzorek je proudem unášen a rozptýlen do nosiče vhodné kapaliny. Vzniká tak zóna produktu, která se může projevit např. změnou barvy a která je zaznamenávána detektorem v podobě absorbance nebo jiných fyzikálních parametrů [12, 13].

Základem nejjednoduššího systému FIA je pumpa, sloužící k čerpání a pohánění nosného proudu jedním směrem; vstřikovací ventil, který určuje objem roztoku vzorku; mísící cívka, v níž probíhá disperze vzorku do nosného proudu; a detektor. Schéma systému přístroje je zobrazeno na obrázku č. 3 [13, 14].



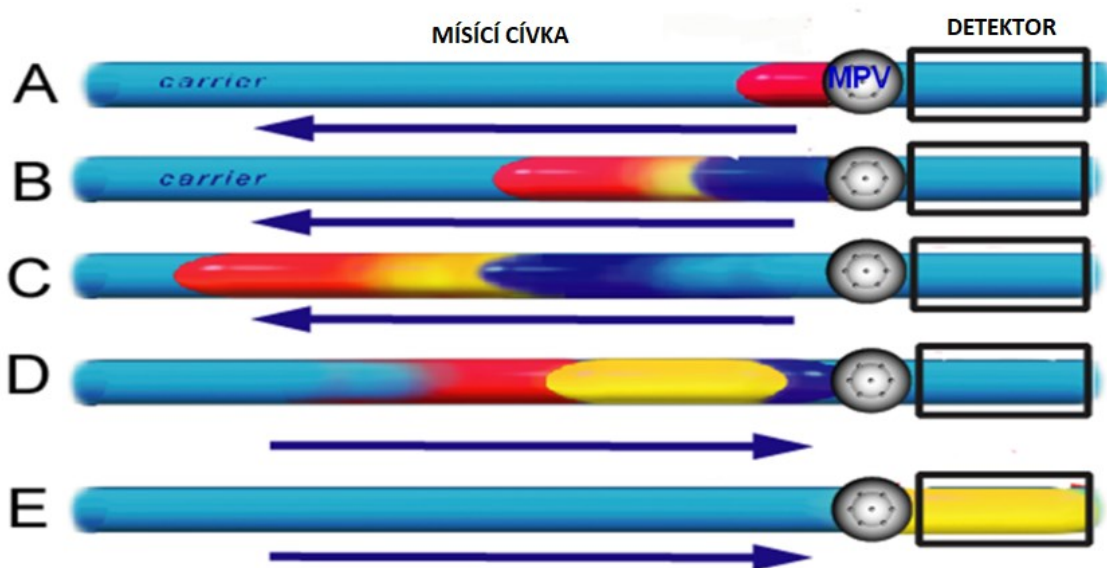
Obrázek 3: Schéma přístroje FIA. Pumpa čerpá a pohání nosný proud, do něhož je rozptýlen roztok vzorku, jehož objem je do systému vpouštěn vstřikovacím ventilem. Disperze probíhající v mísící cívce se může projevit např. změnou barvy, která je zaznamenána detektorem. Převzato a upraveno z: [14].

FIA má uplatnění v mnoha laboratořích v oblasti životního prostředí, pro klinické a farmaceutické analýzy, analýzy potravin, vody nebo půdy. Nejvíce je však využívána pro kontrolu a monitorování procesu v laboratořích [15, 16].

3.2.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)

Technické nedostatky FIA byly postupně odstraňovány a vznikla tak nová, dokonalejší metoda SIA, která umožňuje stanovit analýzu série vzorků a je plně automatizovaná. Má nižší spotřebu objemu roztoků a vede k urychlení celého procesu [17, 18].

Jedná se o jednorázový systém, jehož hlavní podstatou je přítomnost vícecestného selekčního ventilu, umožňujícího přesně nastavit naplnění systému roztoky; a pístové pumpy, využívající přímý i zpětný tok. Pomocí pumpy je nosný proud spolu se vzorkem a činidlem nasáván přes vícecestný selekční ventil do mísící cívky. Následně je změněn směr toku, dochází k lepšímu promíchání reakční směsi, která je transportována do detektoru. Výsledný produkt je zaznamenán jako analytický signál ve formě píku. Níže na obrázku č. 4 je znázorněn princip této metody [18, 19, 20].

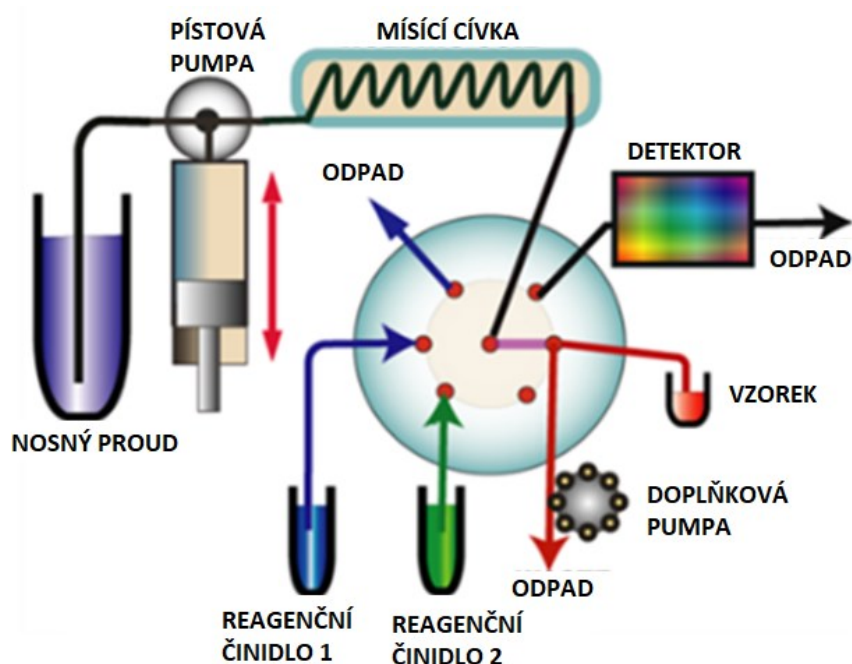


Obrázek 4: Princip metody SIA. **A** – nasátí vzorku do systému. **B** – nasátí roztoku činidla do systému a počátek tvorby produktu. **C** – tvorba většího množství produktu a jeho promíchání. **D** – změna směru toku, lepší promíchání reakční směsi. **E** - vytlačení reakční směsi do detektoru. Převzato a upraveno z: [20].

Celý systém je řízen přes počítač a programován pomocí softwaru. Zvýšení citlivosti této metody se dá dosáhnout různým naprogramováním systému, např. zvýšením doby inkubace reagujících složek, a to tak, že je zastaven průtok a reagující složky jsou zachyceny v mísící cívce. Zachycení vzorku je detektorem zobrazováno ve formě píku, jehož výška je přímo úměrná koncentraci analytu [21].

Díky variabilitě a programovatelnosti systému je SIA všestrannou metodou, která může být propojena s dalšími metodami. Vhodným nastavením systému dochází k minimální spotřebě reagensů, a tudíž i nízké produkci odpadu. Důsledkem je zrychlení a zlevnění analýzy [22].

Systém SIA je tvořen jednokanálovou dvousměrnou pístovou pumpou, případně i pumpou doplňkovou. Dále je tvořen vícecestným selekčním ventilem, sloužícím ke vstřikování roztoků do nosného proudu, nejběžnějším je šesticestný ventil. Mísící cívka plní funkci míchání reakční směsi a slouží jako zábrana proti vniknutí vzorku a činidel do pumpy. Všechny tyto komponenty jsou propojeny systémem hadiček, které bývají nejčastěji teflonové nebo PEEK (polyetereterketon) o vnitřním průměru 0,5 – 0,8 mm. Nezbytnou součástí systému je detektor, nejčastěji spektrofotometrický. Celý systém je propojen s počítačem a je naprogramovaný příslušným softwarem, který řídí jednotlivé kroky procesu a zároveň data sbírá, uchovává a vyhodnocuje. Schéma systému SIA je zobrazeno níže na obrázku č. 5 [1, 17, 18].



Obrázek 5: Schéma zapojení systému SIA. Pístová pumpa nasaje nosný proud, vzorek a činidlo do mísící cívky, zde dochází k promíchání a vzniká reakční směs putující (po změně směru toku) do detektoru a poté do odpadu. Převzato a upraveno z: [22].

Využití SIA, stejně jako FIA, je mnoho, např. kontrola kvality životního prostředí (stanovení vybraných anorganických iontů ve vodě, obsah dusitanů a dusičnanů v půdě, stanovení herbicidů, atd.), potravin a léčiv (kontrola jejich kvality a účinnosti). Metoda má značný potenciál a do budoucna se očekává její další rozvoj a proniknutí i do dalších oblastí, např. imunoanalýzy [18].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Přístroj a pomůcky*

Průtokový systém SIA

Analytické váhy Sartorius Analytic A200S

Digitální pH metr Hanna instruments pH212

Ultrazvuková lázeň Sonorex Bandelin RK-100

Automatické pipety 10 – 100 μ l, 100 – 1000 μ l, 1 – 10 ml

Skleněné lahve s uzávěrem 250 ml

Plastové centrifugační zkumavky s uzávěrem 15 ml a 50 ml

Odměrný válec

Sorbenty pro extrakci na tuhou fázi

Cartridge pro tvorbu extrakčních kolon

4.2 *Chemikálie*

Síran zinečnatý (ZnSO_4), Sigma-Aldrich

Amoniak (NH_4) 24%, Sigma-Aldrich

Kyselina octová (CH_3COOH) 99%, Sigma-Aldrich

Kyselina chlorovodíková (HCl) 36%, Sigma-Aldrich

4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR), Sigma-Aldrich

Ultračistá voda – MilliQ (Millipore-Merck)

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Zásobní roztok síranu zinečnatého 1 mmol/l

Tento zásobní roztok nebyl připravován, byl již k dispozici v laboratoři.

4.3.2 Pracovní roztoky síranu zinečnatého

Pro měření bylo nutné připravit si vzorky síranu zinečnatého o různých koncentracích. Těchto koncentrací bylo dosaženo naředěním zásobního roztoku 1 mmol/l síranu zinečnatého, jež byl k dispozici v laboratoři. Vzorky byly naředěny pufrům o pH 6 do 15 ml odměrné nádoby. Pro vyšší přesnost u nižších koncentrací byl pro přípravu použit 1 $\mu\text{mol/l}$ roztok síranu zinečnatého. Návod na přípravu vzorků je podrobně popsán v následující tabulce (Tab. 1). Slepým vzorkem byl samotný pufr o pH 6.

Tabulka 1: Příprava pracovních roztoků síranu zinečnatého. Množství odebraného zásobního roztoku ZnSO_4 , které bylo doplněno 0,1 mol/l pufrům o pH 6 do 15 ml zkumavky.

c (nmol/l)	25	50	100	200	500	1000	1500	2000
1 mmol/l	-	-	-	-	-	15 μl	22,5 μl	30 μl
1 μmol	375 μl	750 μl	1,5 ml	3 ml	7,5 ml	-	-	-

4.3.3 Zásobní roztok pufru

Pro přípravu zásobního roztoku být nejdříve připraven 4 mol/l roztok octanu amonného ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) o pH 6. Tento roztok byl získán smícháním 68,8 ml amoniaku a 57,4 ml kyseliny octové a doplněním vodou na 250 ml.

4.3.4 Pracovní roztok pufru

Pro práci byl používán 0,1 mol/l pufr získaný smícháním 6,25 ml 4 mol/l octanu amonného a doplněním vody do 250 ml.

4.3.5 Eluční činidlo

Ultračistá voda byla smíchána s HCl v množství potřebném pro pH 1 – připraveno s pomocí pH metru.

4.3.6 Zásobní roztok činidla PAR

Koncentrace zásobního roztoku činidla PAR v 25 ml lahvi byla 1,86 mmol/l, což odpovídá 0,4 g/l. Činidlo bylo získáno rozpuštěním 0,01 g pevného PAR ve vodě doplněné po rysku odměrné baňky.

4.3.7 Pracovní roztok činidla PAR

Pro měření bylo používáno méně koncentrovaného činidla PAR – 10 $\mu\text{mol/l}$. Této koncentrace bylo dosaženo smícháním 268 μl PAR (1,86 mmol/l) s 15 ml octanu amonného (4 mol/l) a doplněno vodou do 50 ml odměrné nádoby.

4.4 Použité sorbenty

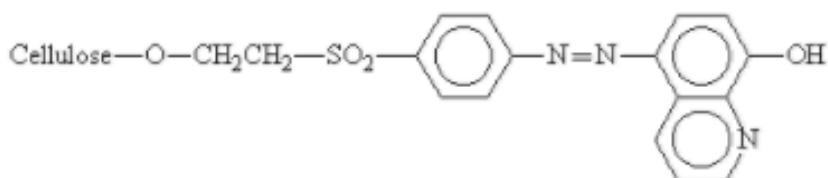
Základním nosičem všech sorbentů Iontosorb jsou makroporézní částice celulózy. Tyto částice jsou vyráběné podle originální metody, která byla vyvinuta v Ústavu makromolekulární chemie – Akademie věd České republiky sídlící v Praze.

Makromolekulární částice celulózy jsou hydrofilní částice kulovitěho tvaru. Spolu s dalšími vlastnostmi jako jsou vysoká pórovitost, velký vnitřní prostor a funkční skupiny mají za následek urychlení reakční rychlosti a rychlé stanovení zachycených analytů sorbenty [23].

Tyto částice jsou vyráběny v několika typech porozity. Označují se jako MT 50, MT 100, MT 200 a MT 500 a liší se svou velikostí. Jejich polymerní struktura je stabilizována pouze vodíkovými můstky. Hlavními rysy jsou výborná mechanická stabilita, vysoká chemická odolnost a kompatibilita s většinou běžně používaných rozpouštědel a pufrů, dále vysoká tepelná stabilita, selektivnost a snadná příprava [24].

4.4.1 Iontosorb Oxin 50 a Oxin 100

Jedná se o chelatační sorbent, který obsahuje funkční skupinu 8-hydroxychinolin. Tato funkční skupina je vázána azo skupinou k vedlejším řetězcům modifikované celulózy (Obr. 6) [25].

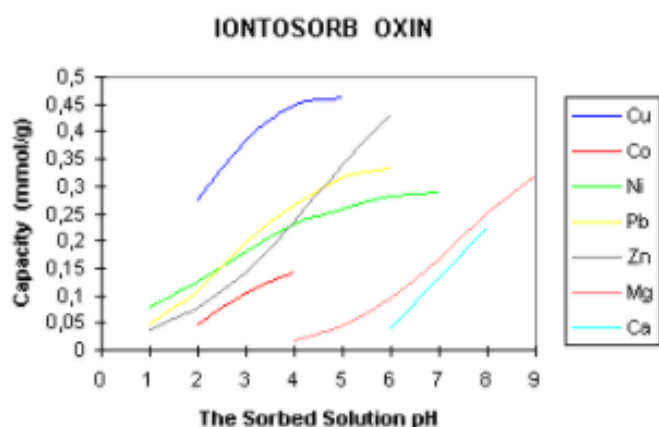


Obrázek 6: Ukázka funkční skupiny chelatačního sorbentu OXIN. Převzato z: [25].

Iontosorb Oxin neobsahuje pouze chelatační skupiny, ale také neutrální hydroxyskupiny celulózy. Přesto je chelatační selektivita dána pouze reaktivitou 8-hydroxychinolinu.

Tento sorbent je využíván pro chromatografickou separaci těžkých kovů a dalších neželeznatých kovů. Díky vysoké selektivitě je tento sorbent využíván pro analýzu a čištění chelátujících látek jako jsou aminokyseliny a nukleové kyseliny.

Na následujícím obrázku je možné vidět kapacitu sorbentu v závislosti na pH pro některé kovy (Obr. 7) [25].



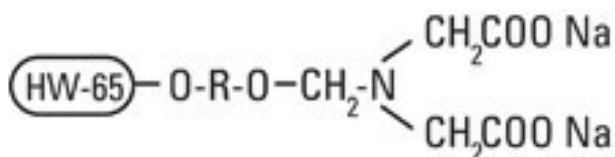
Obrázek 7: Kapacita sorbentu OXIN v závislosti na pH pro vybrané kovy. Převzato z: [4].

Při měření byly použity dva sorbenty OXIN, které se lišily porozitou, a to OXIN 50 a OXIN 100, velikost částic byla vždy 50 - 80 μm .

4.4.2 TOYOpearl AF-chelate-650M

Sorbent TOYOpearl je vyrobený z polymerní pryskyřice. Je hydrofilní a makroporézní. Díky vynikajícím vlastnostem (tlak a průtok) je vhodný pro používání v kapalinové chromatografii. Je stabilní v rozmezí pH 2-13 [26]. Velikost částic 65 μm.

TOYOpearl AF-chelát-650M obsahuje chelatační ligand iminodioctovou kyselinu (IDA) (Obr. 8). Tato kyselina může tvořit stabilní chelátové komplexy s některými kovy, např. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} a Co^{2+} . Výsledná pryskyřice může být dále použita v imobilizované kovové afinitní chromatografii, pro chromatografii proteinů a pro aktivované/funkcionalizované matrice [27, 28].

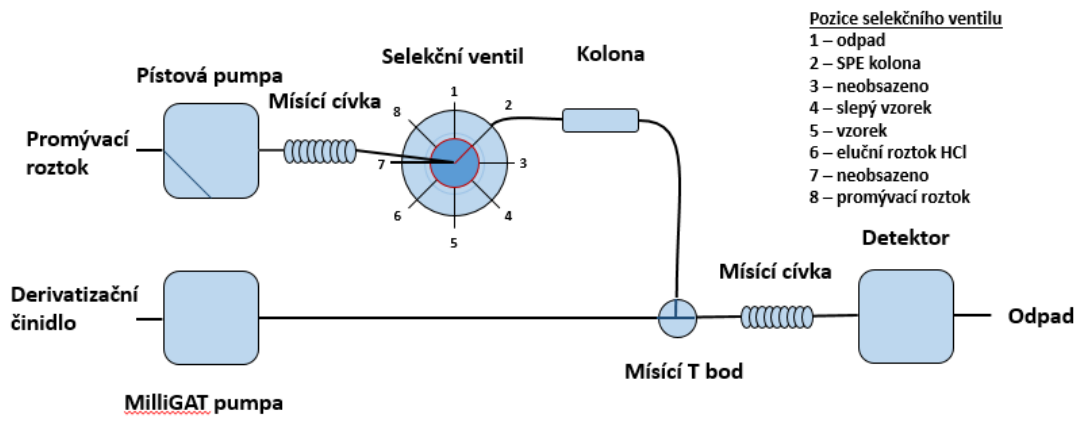


Obrázek 8: Zobrazení chelatačního ligandu kyseliny iminodioctové (IDA) sorbentu TOYOpearl. Převzato z: [28].

4.5 Podmínky měření

4.5.1 Popis a nastavení přístroje

Průtokový systém SIA se skládal z několika částí. Součástí přístroje byly dvě pístové pumpy – hlavní pumpa (SP) a doplňková pumpa (SP1). SP1 sloužila pro nasátí a vysátí čidla PAR a byla opatřena dvoucestným ventilem a mísící cívkou vedoucí k osmicestnému selekčnímu ventilu. Další částí přístroje byla kolona naplněná různými sorbenty (OXIN 50 a 100, TOYOpearl). Během měření byly použity rozměry kolony 10 mm x 1,5 mm, 5 mm x 2,5 mm a 20 mm x 1,5 mm. Dalšími částmi byla halogenová lampa Ocean Optics LS-1 (vis spektrum), spektrofotometrický detektor Ocean Optics USB4000, mísící bod T spolu s druhou mísící cívkou a systém teflonových hadiček různé délky. Celý přístroj byl ovládán přes příslušný software s počítačem, který také zpracovával data z detektoru. Na následujícím obrázku (Obr. 9) je zobrazeno zapojení celého přístroje.



Obrázek 9: Schéma zapojení systému SIA.

4.5.2 Programy

Tabulka 2: Program č. 1 - měření vzorku pro kalibraci a opakovatelnost

Pogram č. 1 – Měření vzorku pro kalibraci a opakovatelnost		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
1	Hardware	Nastavení vlnové délky 430, 490 a 630 nm
		Začátek smyčky 1
2	SP 1	Zapnout
	SP 1	Průtok 50 µl/s
	SP 1	Nasát 1000 µl
	SP 1	Počkat do konce
3	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
	SP	Průtok 70 µl/s
	SP	Nasát 500 µl
	SP	Počkat do konce
		Začátek smyčky 2 – opakování 8x
4	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
	SP	Průtok 70 µl/s
	SP	Nasát 300 µl
	SP	Počkat do konce
5	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 5
	SP	Průtok 50 µl/s
	SP	Nasát 500 µl
	SP	Počkat do konce
6	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
	SP	průtok 15 µl/s
	SP	Vypustit 800 µl
	SP	Počkat do konce
		Konec smyčky 2
7	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 6
	SP	Průtok 50 µl/s
	SP	Nasát 500 µl
	SP	Počkat do konce
8	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 2
	SP 1	Vypnout
	SP 1	Průtok 15 µl/s
	SP 1	Vypustit 1000 µl
		Počkat do 10 s
9	SP	Průtok 15 µl/s
	P	Vypustit 1000 µl
10	Spektrometr	Měření absorbance a referenčního spektra
		Počkat 60 s
11	SP 1	Počkat do konce
	SP	Počkat do konce
12	Spektrometr	Konec měření
		Konec smyčky 1

Pro měření slepého vzorku byl použit program č. 1 s výjimkou kroku č. 5, kdy byl vícecestný ventil přepnut do polohy 4 (vialka se slepým vzorkem), nikoliv 5 (vialka se vzorkem).

Tabulka 3: Program č. 2 - promytí kolony nosným proudem (pufrem).

Program č. 2 – Promytí kolony nosným proudem (pufrem)		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
		Začátek smyčky – opakování 3x
1	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
	SP	Průtok 70 µl
	SP	Nasát 150 µl
	SP	Počkat do konce
2	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 4
	SP	Průtok 30 µl/s
	SP	Nasát 150 µl
	SP	Počkat do konce
3	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 1
	SP	Průtok 50 µl/s
	SP	Nasát 300 µl
	SP	Počkat do konce
		Konec smyčky

Tabulka 4: Program č. 3 - promytí systému elučním roztokem.

Program č. 3 – Promytí systému elučním roztokem		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
		Začátek smyčky – opakování 3x
1	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
	SP	Průtok 70 µl
	SP	Nasát 150 µl
	SP	Počkat do konce
2	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 6
	SP	Průtok 30 µl/s
	SP	Nasát 150 µl
	SP	Počkat do konce
3	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 1
	SP	Průtok 50 µl/s
	SP	Nasát 300 µl
	SP	Počkat do konce
		Konec smyčky

Tabulka 5: Program č. 4 - promytí SP 1.

Program č. 4 – Promytí SP 1		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
		Začátek smyčky – opakování 3x
1	SP 1	Zapnout
	SP 1	Průtok 50 µl/s
	SP 1	Nasát 2000 µl
2	SP 1	Vypnout
	SP 1	Průtok 50 µl/s
3	SP 1	Vyprázdnit
	SP 1	Počkat do konce
		Konec smyčky

Tabulka 6: Program č. 5 - promytí SIC pumpy.

Program č. 5 – Promytí SIC pumpy		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
		Začátek smyčky – opakování 3x
1	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
	SP	Průtok 70 µl/s
	SP	Nasát 3500 µl
	SP	Počkat do konce
2	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 1
	SP	Průtok 50 µl/s
	SP	Vypustit 3500 µl
	SP	Počkat do konce
		Konec smyčky

Tabulka 7: Program č. 6 - promytí vzorku.

Program č. 6 – Promytí vzorku		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
		Začátek smyčky – opakování 3x
1	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 8
	SP	Průtok 70 µl
	SP	Nasát 150 µl
	SP	Počkat do konce
2	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 5
	SP	Průtok 30 µl/s
	SP	Nasát 150 µl
	SP	Počkat do konce
3	Vícecestný ventil	Přepnout do polohy 1
	SP	Průtok 50 µl/s
	SP	Nasát 300 µl
	SP	Počkat do konce
		Konec smyčky

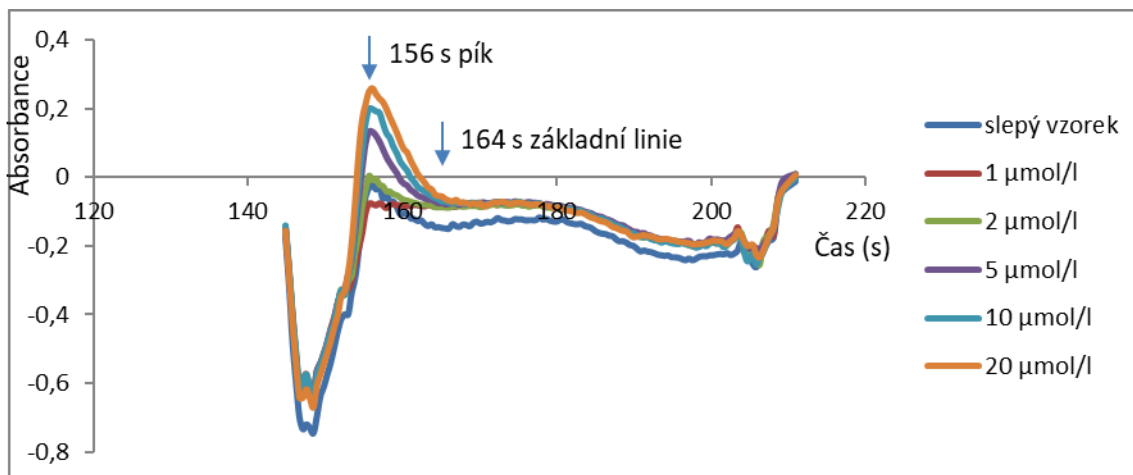
Pro promytí slepého vzorku byl použit program č. 6 s výjimkou kroku č. 2, kdy vícecestný ventil byl přepnut do polohy 4, nikoliv 5.

4.5.3 Optimalizace jednotlivých kroků analýzy

Aby bylo měření správné, bylo k tomu potřeba zajistit správné podmínky měření. Ty byly získány metodou postupného vývoje (pokusů a omylů). Mezi prvními pokusy byla změna objemu elučního činidla HCl. Optimální byl objem 500 µl. Při vyšším objemu eluce byly píky zachyceného zinku na koloně špatně detekovatelné. Dalším pokusem byla změna rychlosti průtoku kolonou. Byly zkoušeny rychlosti 10, 15, 20 a 25 µl/s. Optimální se jevila rychlost 15 µl/s. U ostatních rychlostí byl zachycený Zn²⁺ nedetekovatelný. Dále byla měněna koncentrace PAR. Nejlepší výsledky měření byly se vzorky s koncentrací 10 µmol/l Zn²⁺. Měření bylo prováděno na koloně o rozměru 10x1,5 mm. Během prvních testů byly odzkoušeny i kolony o rozměrech 5x2,5 mm a 20x1,5 mm. Ty se ale neosvědčily díky nízké opakovatelnosti a výrazně vyššímu šumu základní linie.

Během prvních pokusů (optimalizace metody) byly používány koncentrace vzorků 1, 2, 5, 10 a 20 µmol/l, při čemž jejich nástřik na kolonu byl 500 µl (*Obr. 10*). Jednalo se však o celkem vysoké koncentrace. Záchytu nižších koncentrací (v řádu nmol/l) bylo dosaženo zvýšením objemu nástřiku vzorku (*Obr. 11*). Testováním se nejlépe jevil nástřik

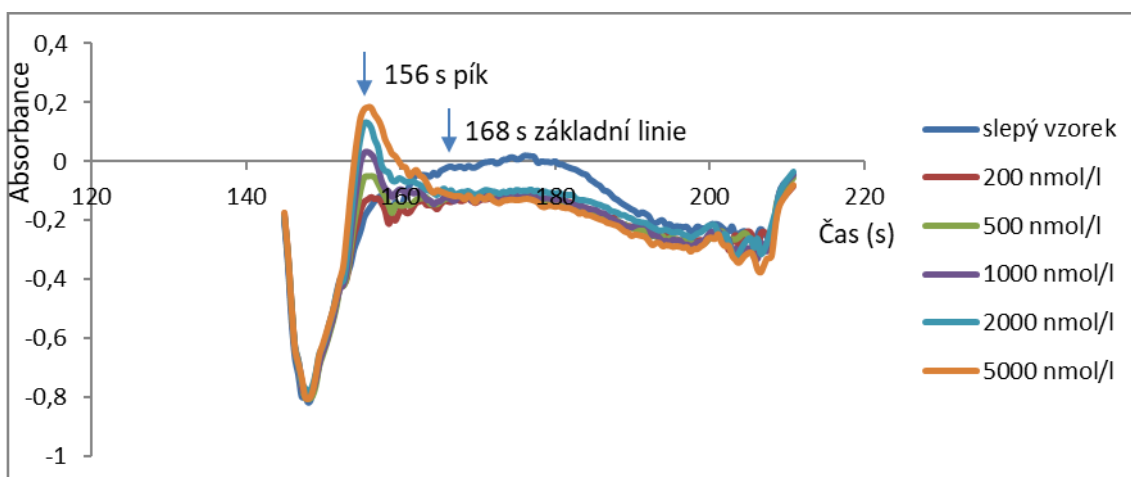
vzorku o objemu 4 ml, kdy jedna analýza trvala 13 min (Obr. 12). Hodnoty absorbance pro sestavení jednotlivých grafů jsou uvedeny níže (Tab. 8, Tab. 9, Tab. 10).



Obrázek 10: Objem nástřiku vzorků 500 µl pro vzorky o koncentracích 1 – 20 µmol/l a slepý vzorek za použití sorbentu OXIN 100. Výška píku byla odečítána v čase 156 s, výška základní linie v čase 164 s.

Tabulka 8: Hodnoty absorbance pro nástřik vzorku o objemu 500 µl. Koncentrace vzorků 1 – 20 µmol/l včetně slepého vzorku při použití sorbentu OXIN 100.

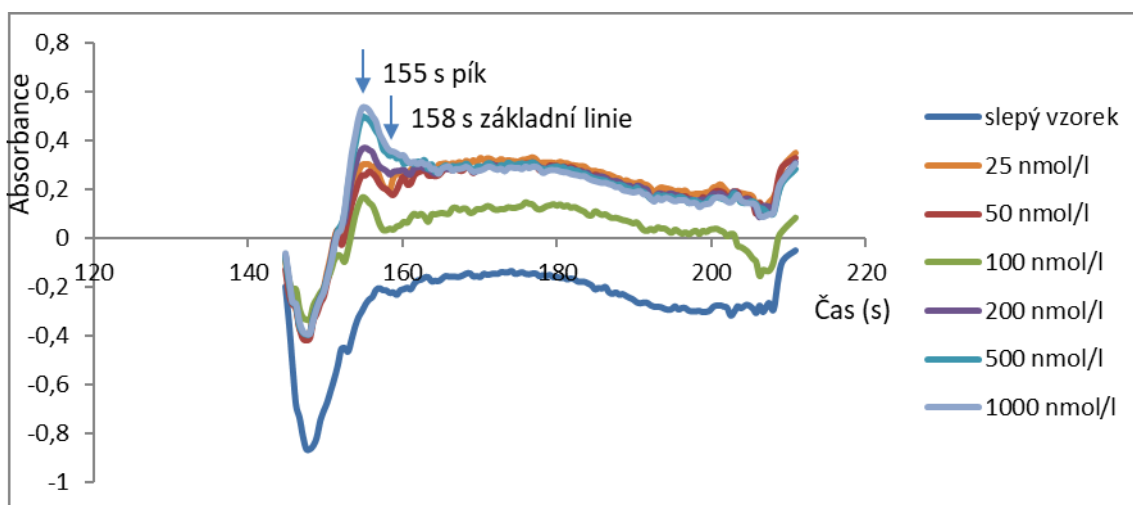
c (µmol/l)	A – 156 s	A – 164 s	A – výška píku
0	-0,023	-0,136	0,112
1	-0,079	-0,083	0,004
2	0,003	-0,088	0,091
5	0,131	-0,075	0,206
10	0,199	-0,076	0,276
20	0,259	-0,075	0,335
$y = 0,0145x + 0,0790; R^2 = 0,8883$			



Obrázek 11: Objem nástřiku vzorků 2 ml pro vzorky o koncentracích 200 – 5000 nmol/l a slepý vzorek za použití sorbentu OXIN 100. Výška píku byla odečítána v čase 156 s, výška základní linie v čase 168 s.

Tabulka 9: Hodnoty absorbance pro nástřik vzorku o objemu 2 ml. Koncentrace vzorků 200 – 5000 nmol/l včetně slepého vzorku při použití sorbentu OXIN 100.

c (nmol/l)	A – 156 s	A – 168 s	A – výška píku
0	-0,117	-0,013	-0,103
200	-0,119	-0,124	0,005
500	-0,049	-0,118	0,070
1000	0,033	-0,118	0,151
2000	0,132	-0,099	0,231
5000	0,185	-0,113	0,298
$y = -0,0000675x + 0,0107; R^2 = 0,8574$			



Obrázek 12: Objem nástřiku vzorků 4 ml pro vzorky o koncentracích 25 – 1000 nmol/l a slepého vzorku za použití sorbentu OXIN 100. Výška píku byla odečítána v čase 155 s, výška základní linie v čase 158 s.

Tabulka 10: Hodnoty absorbance pro nástřik vzorku o objemu 4 ml. Koncentrace vzorků 25 – 1000 nmol/l včetně slepého vzorku při použití sorbentu OXIN 100.

c (nmol/l)	A – 155 s	A – 158 s	A – výška píku
0	-0,206	-0,222	0,016
25	0,302	0,198	0,105
50	0,275	0,179	0,096
100	0,165	0,032	0,133
200	0,372	0,263	0,109
500	0,497	0,327	0,170
1000	0,535	0,308	0,227
$y = 0,000156x + 0,0804; R^2 = 0,8709$			

Za těchto podmínek probíhala měření, z nichž byly udělány kalibrace a opakovatelnost pro každý měřený sorbent.

5. VÝSLEDKY

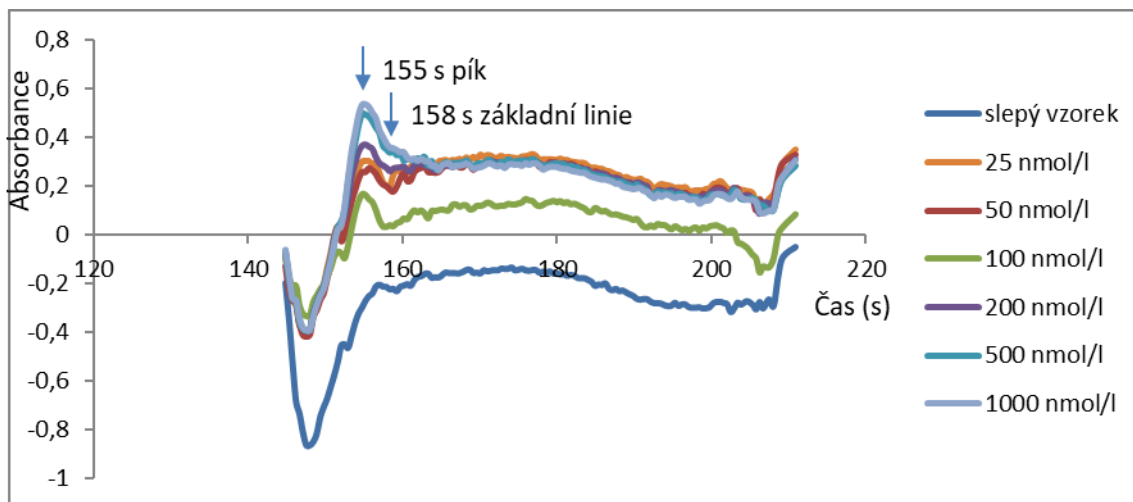
Použité sorbenty byly testovány pro extrakci Zn^{2+} z roztoků síranu zinečnatého o různých koncentracích s využitím průtokových metod. Podmínky při měření byly stejné, tzn. stejné eluční činidlo HCl (pH 1), nosný proud pufr octan amonný 0,1 mol/l (pH 6) – používaný také jako slepý vzorek, derivatizační činidlo PAR 10 $\mu\text{mol/l}$ a pro SPE byla používána kolona o délce 10 mm x 1,5 mm.

Pro každý sorbent byla provedena kalibrace, z níž byl patrný záchyt Zn^{2+} na koloně o určité koncentraci. Naměřené hodnoty absorbance jednotlivých koncentrací byly zaneseny do tabulky, byl sestaven graf kalibrační křivky a vypočtena směrnice pro konkrétní sorbent. Směrnice odkazuje na výtěžnost extrakce zinku. Zde se uplatňuje přímá úměra, tedy čím vyšší je směrnice, tím vyšší je výtěžnost. Z grafu kalibrační přímky byl rovněž zjištěn koeficient determinace, který v závěru posloužil pro srovnání jednotlivých sorbentů a umožnil tak eliminaci chyb měření a procesu extrakce.

Pro zjištění přesnosti měření byla provedena opakovatelnost v rámci jedné analytické série pro každý sorbent jednotlivě (*Tab. 12, Tab. 14, Tab. 16*). Měření je prováděno jednou osobou za stejných analytických podmínek s použitím stejného vybavení a reagensů v co nejkratším časovém rozmezí [29].

OXIN 100

Kalibrace pro sorbent OXIN 100 byla provedena z 6 vzorků o koncentracích od 25 nmol/l do 1000 nmol/l a slepého vzorku, kterým byl pufr o pH 6 (Obr. 13).



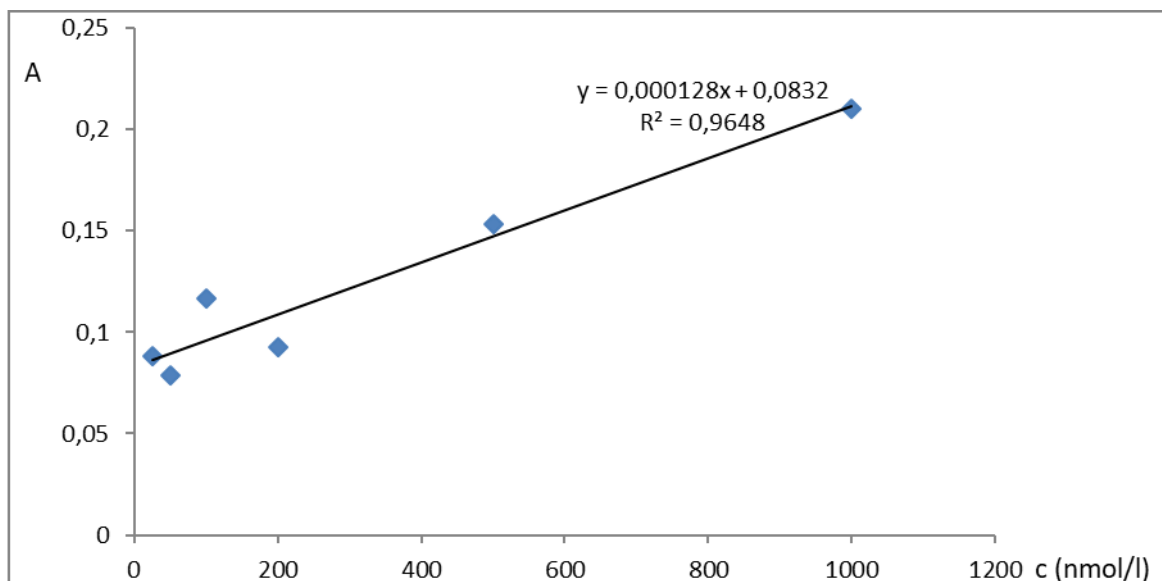
Obrázek 13: Záchyt Zn^{2+} o koncentracích 25 – 1000 nmol/l včetně slepého vzorku na sorbentu OXIN 100. Výška píku byla odečítána v čase 155 s, výška základní linie v čase 158 s.

Z naměřených hodnot absorbance (Tab. 11) byla sestrojena kalibrační křivka (Obr. 14) a vypočítána hodnota R^2 .

Tabulka 11: Hodnoty absorbance pro kalibrační přímku pro OXIN 100.

c (nmol/l)	A	Rozdíl A – slepý vzorek
0	0,016	0,000
25	0,105	0,088
50	0,096	0,079
100	0,133	0,117
200	0,109	0,092
500	0,170	0,153
1000	0,227	0,210

$y = 0,000128x + 0,0832; R^2 = 0,9648$



Obrázek 14: Kalibrační křivka pro sorbent OXIN 100. Rozsah koncentrace vzorků 25 – 1000 nmol/l, znázorněna absorpance získaná po odečtu slepého vzorku.

Z obrázku č. 13 můžeme usoudit, že záchyt Zn^{2+} byl patrný jak při vyšších koncentracích (např. 1000 nmol/l), tak i při nižších koncentracích (např. 25 nmol/l). Pro sestavení kalibrační přímky byla použita absorpance získaná odečtem slepého vzorku od nejvyššího bodu píku. Pro lepší znázornění byl bod nula, který představuje slepý vzorek, v grafu vynechán.

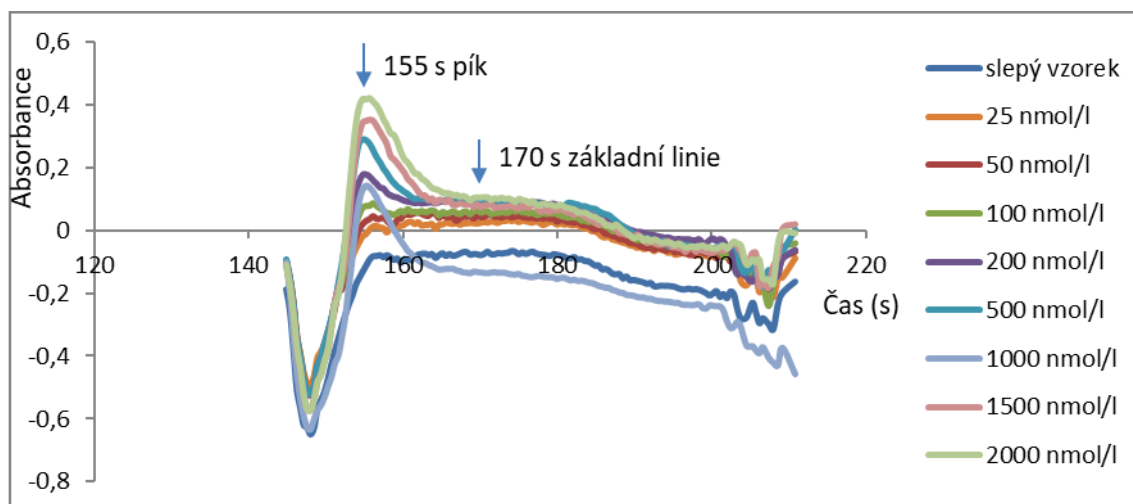
V tabulce č. 12 je zobrazena opakovatelnost pro sorbent OXIN 100. Z poměrně vysokých hodnot relativní směrodatné odchylky (RSD) tohoto sorbentu lze vyčíst, že metoda není příliš opakovatelná. Korelace RSD opakovatelnosti a koncentrace Zn^{2+} nelze určit.

Tabulka 12: Opakovatelnost pro sorbent OXIN 100.

	1000 nmol/l	200 nmol/l	100 nmol/l	slepý vzorek
Nástřik 1	0,094	0,086	0,007	-0,091
Nástřik 2	0,172	0,089	0,009	-0,099
Nástřik 3	0,201	0,081	0,013	-0,098
Nástřik 4	0,248	0,079	0,019	-0,109
Nástřik 5	0,264	0,091	0,019	-0,101
Nástřik 6	0,261	0,103	0,018	-0,106
Průměr	0,207	0,088	0,014	-0,101
SD	0,060	0,008	0,005	0,006
RSD	29,20%	8,66%	33,90%	5,75%

OXIN 50

Dalším zkoušeným sorbentem byl OXIN 50. Pro tento sorbent byla provedena kalibrace z 8 vzorků v rozsahu koncentrace 25 nmol/l – 2000 nmol/l a slepého vzorku (Obr. 15), jímž byl opět pufr o pH 6. Z obrázku č. 15 je patrné, že záchyt Zn^{2+} při koncentraci vzorku 25 nmol/l a 50 nmol/l byl již špatně detekovatelný – nebyla významná odchylka od slepého vzorku.

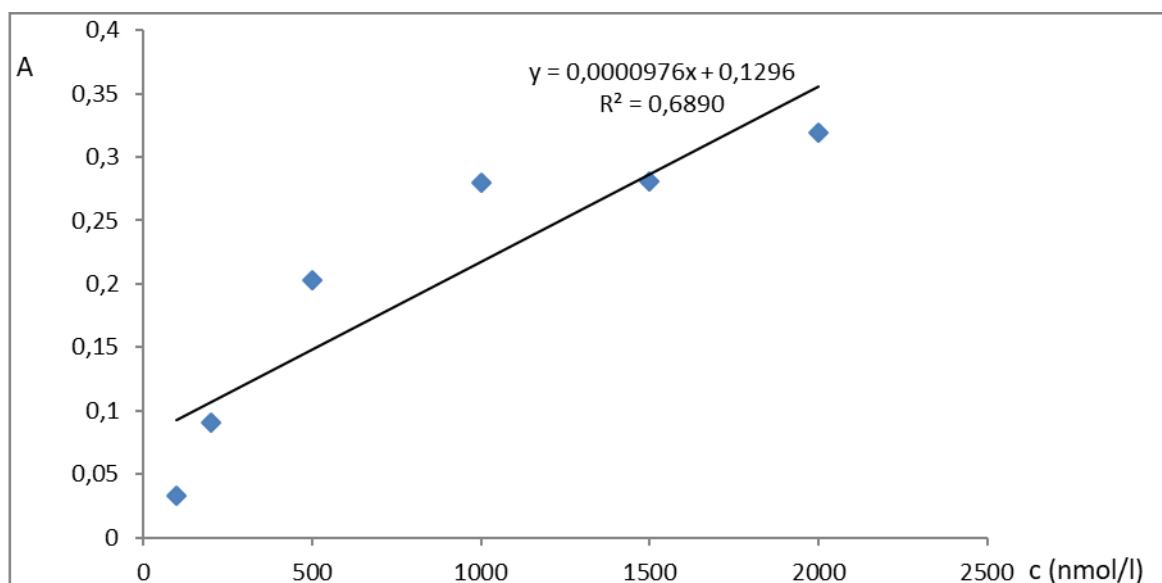


Obrázek 15: Obrázek 16: Záchyt Zn^{2+} o koncentracích 25 – 2000 nmol/l včetně slepého vzorku na sorbentu OXIN 50. Výška píku byla odečítána v čase 155 s, výška základní linie v čase 170 s.

Následně byla opět pomocí absorbance jednotlivých roztoků (Tab. 13) sestavena kalibrační křivka a vypočítána hodnota R^2 (Obr. 16).

Tabulka 13: Hodnoty absorbance pro kalibrační přímku pro OXIN 50.

c (nmol/l)	A	A – slepý vzorek
0	-0,003	0,000
25	-0,021	-0,018
50	-0,006	-0,003
100	0,030	0,033
200	0,088	0,091
500	0,200	0,203
1000	0,277	0,280
1500	0,278	0,281
2000	0,316	0,319
$y = 0,0000976x + 0,1296; R^2 = 0,6890$		



Obrázek 16: Kalibrační křivka pro sorbent OXIN 50. Rozsah koncentrace vzorků 100 – 2000 nmol/l, koncentrace 25 nmol/l a 50 nmol/l odstraněny z důvodu špatné detekce. Znárodněna absorbance získaná po odečtu slepého vzorku.

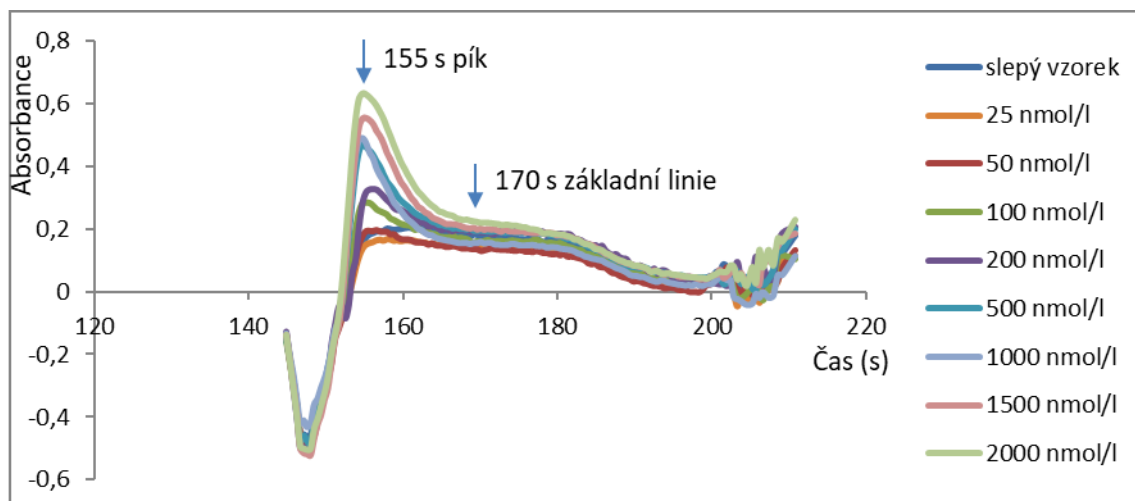
V tabulce č. 14 je zobrazena opakovatelnost pro sorbent OXIN 50. Hodnoty RSD jsou mnohem nižší než u předchozího měření, a tedy lze vyčíst, že čím byla analyzována nižší koncentrace vzorku, tím se RSD zvyšovala a měření se tak stávalo méně přesným.

Tabulka 14: Opakovatelnost pro sorbent OXIN 50.

	2000 nmol/l	500 nmol/l	200 nmol/l	slepý vzorek
Nástřík 1	0,275	0,168	0,091	-0,030
Nástřík 2	0,263	0,169	0,082	-0,044
Nástřík 3	0,272	0,193	0,076	-0,039
Nástřík 4	0,271	0,164	0,083	-0,050
Nástřík 5	0,297	0,183	0,097	-0,048
Nástřík 6	0,280	0,186	0,102	-0,050
Průměr	0,276	0,177	0,088	-0,043
SD	0,010	0,011	0,009	0,007
RSD	3,77%	6,08%	10,08%	16,64%

TOYOpearl

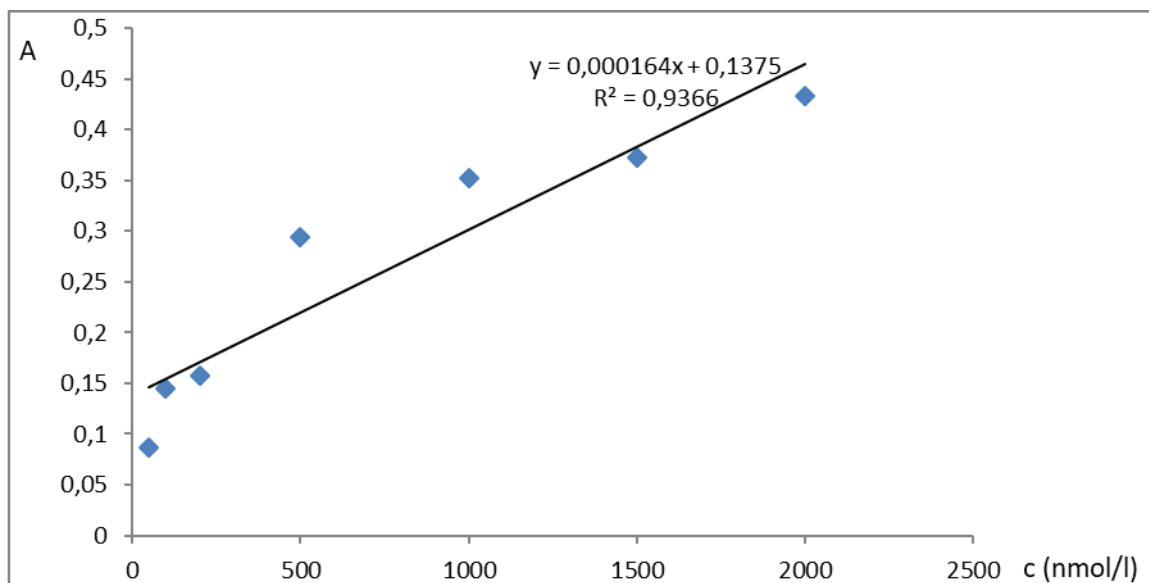
Posledním zkoušeným sorbentem byl TOYOpearl. Kalibrace byla provedena z osmi vzorků v rozsahu koncentrace 25 – 2000 nmol/l (Obr. 17). Z obrázku č. 17 lze vyčíst, že při koncentraci vzorku 25 nmol/l byl záchyt Zn^{2+} již špatně detekovatelný. Pro tento sorbent byla také provedena kalibrační křivka a hodnota R^2 (Tab. 15, Obr., 18).



Obrázek 17: Záchyt Zn^{2+} o koncentracích 25 – 2000 nmol/l včetně slepého vzorku na sorbentu TOYOpearl. Výška píku byla odečítána v čase 155 s, výška základní linie v čase 170 s.

Tabulka 15: Hodnoty absorbance pro kalibrační přímku pro TOYOpearl.

C (nmol/l)	A	A – slepý vzorek
0	-0,020	0,000
25	-0,005	0,015
50	0,067	0,087
100	0,124	0,144
200	0,137	0,157
500	0,274	0,294
1000	0,332	0,352
1500	0,352	0,372
2000	0,413	0,433
$y = 0,000164x + 0,1375; R^2 = 0,9366$		



Obrázek 18: Kalibrační křivka pro sorbent TOYOpearl. Rozsah koncentrace vzorků 50 – 2000 nmol/l, koncentrace 25 nmol/l odstraněna z důvodu špatné detekce. Znáznorněna absorbance získaná po odečtu slepého vzorku.

Pro zjištění přesnosti měření byla provedena opakovatelnost na tomto sorbentu. Z následující tabulky (Tab. 16) je patrné, že RSD má celkem nízké hodnoty (<10%), opakovatelnost metody s tímto sorbentem je vysoká pro všechny testované koncentrace.

Tabulka 16: Opakovatelnost pro sorbent TOYOpearl.

	1000 nmol/l	200 nmol/l	100 nmol/l	slepý vzorek
Nástřík 1	0,271	0,139	0,075	-0,055
Nástřík 2	0,297	0,150	0,100	-0,067
Nástřík 3	0,295	0,156	0,089	-0,067
Nástřík 4	0,301	0,156	0,096	-0,060
Nástřík 5	0,319	0,147	0,088	-0,066
Nástřík 6	0,318	0,156	0,096	-0,062
Průměr	0,300	0,151	0,091	-0,063
SD	0,016	0,006	0,008	0,004
RSD	5,31%	4,13%	9,14%	6,85%

Souhrn výsledků

Při analýze Zn^{2+} Iontosorb OXIN 100 dosáhl nejvyšší citlivosti (absorbance se dala odečíst i u koncentrace 25 nmol/l), jak můžeme vidět na obrázku č. 13. Ale opakovatelnost nebyla příliš vysoká. U Iontosorbu OXIN 50 a TOYOpearl AF-chelate-650M nebyla hodnotitelná analýza Zn^{2+} při koncentracích 25 nmol/l a 50 nmol/l. Porovnání směnic všech tří sorbentů však poukazuje na lepší výtěžnost Iontosorbu OXIN 50 a TOYOpearl AF-chelate-650M. Kapacita byla nejvyšší u sorbentu TOYOpearl AF-chelate-650M, který se jeví vhodný pro měření vzorků s vyššími koncentracemi. Kolony se sorbenty Iontosorb OXIN 100 a TOYOpearl AF-chelate-650M umožnily dobrou opakovatelnost metody (RSD <15%).

6. ZÁVĚR

V této práci byly porovnávány tři sorbenty, a to Iontosorb OXIN 100, Iontosorb OXIN 50 a TOYOpearl AF-chelate-650M. Cílem práce bylo porovnat tyto sorbenty a zjistit, který z nich by se jevil nejvhodněji pro analýzu Zn^{2+} za použití on-line extrakce na tuhou fázi s využitím sekvenční injekční analýzy.

Vzorky $ZnSO_4$ o koncentracích 25 nmol/l, 50 nmol/l, 100 nmol/l, 200 nmol/l, 500 nmol/l, 1000 nmol/l, 1500 nmol/l a 2000 nmol/l byly extrahovány na sorbentu a následně vytvořily spolu s činidlem PAR barevné komplexy, které byly zaznamenány detektorem.

Pro každý sorbent byla zhotovena kalibrace z šesti až osmi vzorků o různé koncentraci. Z výsledných hodnot byla zhotovena kalibrační přímka, byla vypočítána směrnice přímky a koeficient determinace. Opakovatelnost byla provedena z šesti nástřiků vzorků o stejné koncentraci. Výsledná RSD poukázala na přesnost měření.

Nejlepší výtěžností se prokázal TOYOpearl AF-chelate-650M, avšak nižší koncentrace vzorků byly špatně detekovatelné. Nejcitlivější ale zároveň nejméně přesný a s nejmenší výtěžností byl Iontosorb OXIN 100, který zachytil Zn^{2+} i při nejnižší zkoušené koncentraci vzorku. Iontosorb OXIN 50 byl citlivostí i výtěžností podobný sorbentu TOYOpearl.

7. SEZNAM LITERATURY

- [1] Horstkotte, B., Chocholouš, P. a Solich, P. *Large volume preconcentration and determination of nanomolar concentrations of iron in seawater using a renewable cellulose 8-hydroquinoline sorbent microcolumn and universal approach of post-column eluate utilization in a Lab-on-Valve systém.* Talanta. 2016, (150), 213-223.
- [2] Borkovcová, I. a Kostrhounová, R. *Extrakční metody* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivity/zs-2013-2014/h3cp1/index/h3cp1---extrakcni-metody---studijni-material-zs-13-14.pdf>
- [3] Agilent Technologies. *Sample preparation fundamentals for chromatography* [online]. 2013 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf
- [4] Šatínský, D., Serralheiro, H. S., Solich, P., Araújo, A. N., Montenegro, M. C. B. S. M. *On-line coupling of sequential injection extraction with restricted-access materials and post-column derivatization for sample clean-up and determination of propranolol in human plasma.* Analytica Chimica Acta. 2007, (600), 122-128.
- [5] Türker, A. R. *Separation, Preconcentration and Speciation of Metal Ions by Solid Phase Extraction.* Separation & Purification Reviews. 2012, (41:3), 169-206.
- [6] Sigma-Aldrich. *Guide to Solid Phase Extraction.* Bulletin 910. 1998.
- [7] Bilba, D., Bejan, D. a Tofan, L. *Chelating Sorbents in Inorganic Chemical Analysis.* Croatica Chemica Acta. 1998, (71), 155-178.
- [8] Halko, R. a Hutta, M. *Využitie afinitnej chromatografie na imobilizovaných iónoch kovu na analýzu vzoriek životného prostredia.* Chem. Listy. 2012, (106), 357-364.
- [9] <https://www.iontosorb.cz/pages/imac/chelat.htm>
- [10] Janiczek, O. *Využití chelatační afinitní chromatografie (IMAC) při studiu a purifikaci biomolekul* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://orion.sci.muni.cz/virtuallab/index.php?page=imac>

- [11] Sakai, T. a Teshima, N. *Advancement of Flow-based Analysis with Alternative Chemical Reaction and New Devices for Enviromental and Biological Samples*. Analytical Sciences. 2008, (24), 855-864.
- [12] Ruzicka, J. *Flow injection analysis* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.1.1.%20Introduction%20-%20Continuous%20and%20Programmed%20Flow%20Injection.html>
- [13] Ruzicka, J. a Hansen, E. *Flow Injection Analysis*. John Wiley & Sons, 1988, 498 s.
- [14] Ruzicka, J. *Flow injection analysis* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.1.4.%20Flow%20Injection%20System.html>
- [15] Ruzicka, J. *Flow injection analysis* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%201.1.2.%20Why%20Flow%20Injection.html>
- [16] Hansen, E. H. *The impact of flow injection on modern chemical analysis: has it fulfilled our expectations? And where are we going?* Talanta. 2004, (64), 1076-1083.
- [17] Hartwell, S. K. *Flow Injection/Sequential Injection Analysis Systems: Potential Use as Tools for Liver Diseases Biomarker Study*. International Journal of Hepatology. 2012, (2012), 8 s.
- [18] Paseková, H., Polášek, M., Solich, P. *Sekvenční injekční analýza*. Chem. Listy. 1999, (93), 354-359.
- [19] Chocholouš, P., Solich, P. a Šatínský, D. *An overview of sequential injection chromatography*. Analytica Chimica Acta. 2007, (600), 123-135
- [20] Ruzicka, J. *Flow injection analysis* [online]. [cit. 2018- 04-24]. Dostupné z: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.2.%20Flow%20Programming.html>
- [21] Ruzicka, J. *Flow injection analysis* [online]. [cit. 2018- 04-24]. Dostupné z: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.3.%20Selecting%20Assay%20Protocol.html>

- [22] Ruzicka, J. *Flow injection analysis* [online]. [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.4.%20Configurations%20of%20SIA%20Systems.html>
- [23] IONTOSORB. *About our products: General informations* [online]. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://www.iontosorb.cz/index.html>
- [24] IONTOSORB. *Macroporous Bead Cellulose MT* [online]. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://www.iontosorb.cz/pages/bead.htm>
- [25] IONTOSORB. *Iontosorb OXIN: Chelating sorbent* [online]. [cit. 2018.04.16]. Dostupné z: <https://www.iontosorb.cz/pages/imac/iontos05.htm>
- [26] TOSOH BIOSCIENCE. *TOYOPEARL* [online]. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://www.toyopearl.com/>
- [27] SIGMA-ALDRICH. *TOYOPEARL AF-Chelate-650M Bulk Media: phase iminodiacetic acid, bottle of 25 mL, 65 µm particle size* [online]. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/814475?lang=en®ion=CZ>
- [28] TOSOH BIOSCIENCE. *TOYOPEARL AF-Chelate-650M* [online]. [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/solutions/process-media-products/by-mode/affinity/toyopearl-af-chelate-650m>
- [29] EURACHEM/CITAT Guide. *Quantifyinf Uncertainty in Analytical Measurement*. Vydání 3. 2012. 133 str. 978-0-948926-30-3 Dostupné v anglickém jazyce z: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/quam#translations>