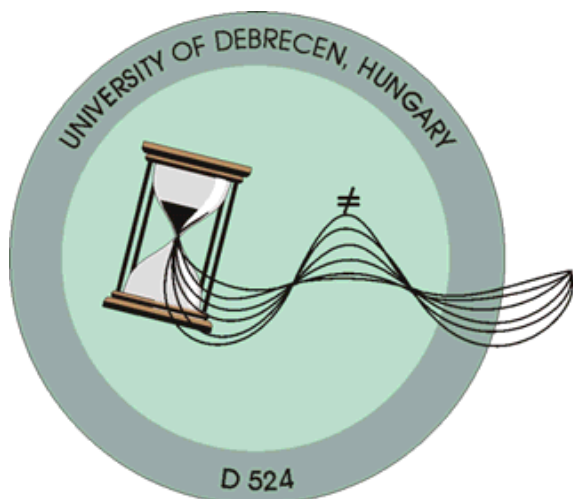




Stopped-flow készülék kalibrációjának fejlesztése

Tudományos Diákköri dolgozat

Ditrói Tamás

II. éves vegyész MSc hallgató

Témavezető: Dr. Lente Gábor egyetemi docens
Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
2012.

Tartalom

1.	Bevezetés	2
2.	A stopped-flow technika	5
3.	Irodalmi előzmények	8
4.	Kísérleti előzmények	12
5.	Célkitűzés	15
6.	Kísérleti körülmények	16
7.	Eredmények és értékelésük	17
7.1.	DTNB és tioglicerin reakciója	17
7.2.	Ferrocianid-ion reakciója aszkorbinsavval	20
7.3.	Diffúziós kísérletek	24
8.	Összefoglalás	27
9.	Felhasznált irodalom	29
10.	Köszönetnyilvánítás	30

1. Bevezetés

A nagy sebességű reakciók vizsgálata kényes kérdés a kémián belül. Általában azon reakciókat sorolják nagy sebességű reakciók közé, amelyek felezési ideje 1 másodperc alatt van.¹ A reakciók vizsgálatához, lefolytatásukhoz a reakciópartnerek kapcsolatba hozására van szükség, azaz a legtöbbször oldatfázisú reagenseket össze kell keverni. A kézzel történő keverés legalább 1 másodpercet igényel, és még ehhez hozzáadódik a készülékbe helyezés időtartama. Így a reakció kezdetétől a detektálás kezdetéig eltelt idő már többszöröse a felezési időnek, ami egyáltalán nem kedvez a detektálásnak, hiszen előfordulhat, hogy a készülékbe helyezéskor már az egész reakció le is zajlott.

Ezt elkerülendő, először 1923-ban alkottak a keverés és detektálás megoldására technikát, ez volt az első folyamatos áramlású készülék, amellyel Hartridge és Roughton mérte meg a hemoglobin reakcióját oxigénnel és szén-monoxiddal.¹ A módszer lényege az oldatok homogenizálásának gyorsasága volt, turbulens keverővel 0,001 s körüli keverési időt értek el, majd a nagyjából 10 m/s sebességgel áramló, még reagáló keveréket a keverőtől különböző távolságokra vizsgálták. Ezzel megkapták a reaktánsok koncentrációjának változását a távolság függvényében, ami persze egyenesen arányos az idővel, és ismert áramlási sebesség mellett könnyen átszámolható. Így megfelelő kinetikai görbét tudtak felvenni, amiből aztán a sebességi állandókat kiszámolhatták. A módszer előnyös abból a szempontból, hogy időigényes detektálást is lehet végezni, így konduktometriás követésre alkalmas, valamint a jel/zaj arány is egyszerűen növelhető hosszabb integrálási idővel. Hátránya azonban, hogy nagyon nagy az anyagfogyasztása, a modern kémiában ennél lényegesen gazdaságosabb eszközre volt szükség.

Ezt a problémát 1940-ben sikerült enyhíteni egy nagy előrelépéssel, amely során kidolgozták a stopped-flow (megállított áramlásos) technikának elnevezett módszert.¹ A keverésig az elv ugyanaz volt, ám az áramlást adott pillanatban megállítva kezdődik a detektálás. Itt a korlátot csak a detektálás távolsága és a keverés sebessége befolyásolja, a tipikus keverési idő pedig 1 milliszekundum. A nagy sebességgel turbulensen keveredő reaktánsok egy megállítófecskendőbe kerülnek, aminek feltöltődésekor az egy kapcsolót zár, a betáplálás megszűnik, és eközben a detektálás már megkezdődik a cellában. Mindennek nagyon nagy előnye, hogy az oldatokból néhány cm³ térfogatokat használunk egy-egy

méréshez, ezáltal meglehetősen drága, vagy csak nehezen előállítható anyagokat, például enzimeket is vizsgálhatunk a módszerrel.

Stopped-flow készülékünk esetében kb. 1000 s^{-1} elsőrendű sebességi állandójú reakciót tudunk legfeljebb pontosan meghatározni, az ennél gyorsabb folyamatokat már zavarja a keverés „lassúsága”.² Nemcsak ez, de még egy másik paraméter is befolyásolja a mérési korlátainkat, ez pedig a holtidő (t_d). Ez azon időtartamot jelenti, ami alatt az összekeveredni kezdő oldatok eljutnak a reakciócellában a detektálás pontjáig, azaz a reakciókat sosem a valódi kiindulásuk pillanatában kezdjük detektálni, hanem annyival később, míg az oldatok a keverési ponttól elvándorolnak a detektálási pontig. Ez az időtartam körülbelül 1,2-1,3 ms, de mégis korlátozza a mérési lehetőségeinket.

A következő lépést a villanófény-fotolízis megalkotása jelentette, melyet 1949-ben Norrish és Porter dolgozott ki gyors kinetikájú rendszerek mérési módszereként.¹ A technika elve, hogy a vizsgálandó rendszerre nagy erősségű fotonáramot bocsátunk rövid idő alatt, amit a reakcióelegy abszorbeál. Ekkor az elnyelő részecskék gerjesztett állapotba kerülnek, innen pedig valamilyen reakción keresztül (fluoreszcens sugárzás, gyökképződés, kémiai kölcsönhatás) leadják felesleges energiájukat. Az egyik detektálási technika, ha az inicializáló villanás ('flash') után újabb rövid megvilágítás történik, és így rögzítenek spektrumot. Ha különböző időkülönbségekkel történik a két felvillanás, feltérképezhetővé válik a reakció lefolyása, de emellett persze lehetőség van csak egy hullámhosszon való detektálásra is. Az inicializáló felvillanásnak nagyon rövidnek kell lennie, ám megfelelően erősnek is, hogy gerjesztett állapotban hozza a rendszert. A legegyszerűbb esetekben a fényforrás egy egyszerű „plasma flash light”, ami 10 J-os nagyságrendű, mikroszekundum hosszúságú fényimpulzust generál. A lézertechnika fejlődésével ez jelentősen megváltozott, először nanoszekundumos, majd később külön technikával pikoszekundumos időtartamú, de nagy energiájú lézerfelvillanásokat sikerült generálni. Ezeknek a fényforrásoknak azonban egy nagy hátránya, mégpedig az, hogy az általuk kibocsátott fény monokromatikus, ennek hullámhossza nem szabályozható. Ez azért gond, mert nem feltétlenül a lézer hullámhosszán tudjuk gerjeszteni a rendszert, erre vagy más hullámhosszú lézer vagy lézerek beszerelése a megoldás, vagy megfelelő „frekvencia-duplázó” beszerelése küszöbölheti ki a problémát. A technika előnye, hogy nagy időtartományban alkalmas mérésekre. Kémiai teljesítőképessége az áramlásos módszerekhez képes mégis messze elmarad, mivel csakis gerjesztett állapotú

anyagok reakciójának vizsgálatára képes, alapállapotú reakciók (például fémkomplexek képződése) követésére alkalmatlan.

Speciális területet képviselnek a relaxációs, vagy „jump” technikák, melyek gyors egyensúlyi folyamatok tanulmányozására alkalmasak.¹ Ezek lényege az egyensúly nagyon rövid időbeli, ugrásszerű eltolása, majd az egyensúly visszaállásának detektálása. Itt is a minél gyorsabb inicializálás a fontos, legyen szó bármely paraméterről. A hőmérsékletváltozást okozó „temperature jump” módszer általában nagy áramerősséggel való felfűtést takar, nyomásugrást pedig egy nagy nyomású cellában átszakadó fólia segítségével valósítanak meg, ami 100 atmoszféráról 1-re való nyomáscsökkenést okoz kb. 50 mikroszekundum alatt. Ezeknél speciálisabb módszerek az ultrahangos és elektromos térugrásos megoldások, az utóbbi gyenge elektrolitok esetén nagy elektromos térerősségváltozást használnak.

2. A stopped-flow módszer

A stopped-flow technika reakciók kinetikájának követésére megalkotott módszer, melynek működése a reaktánsoldatok nagy sebességű összekeverésén majd az áramlás megállításán és a reakció előrehaladásának detektálásán alapul. Az általunk használt ilyen készülék az Applied Photophysics által gyártott SX.18MV spektrofotométeres stopped-flow, amelyet 1994-óta használ a csoport.

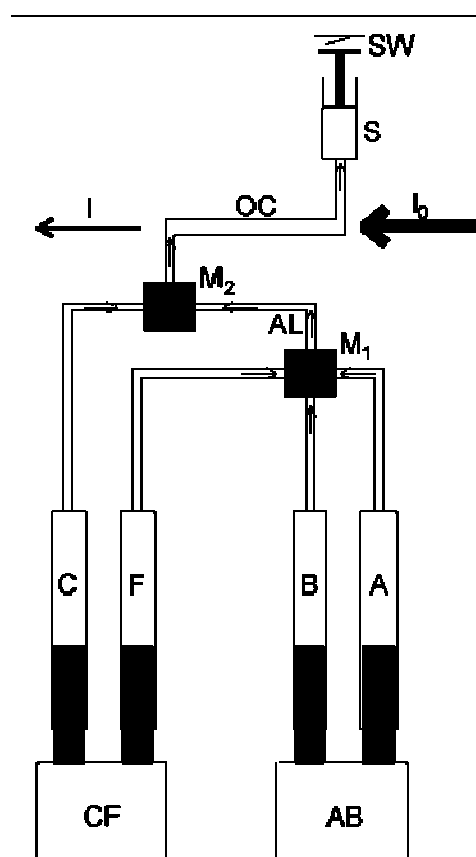
A készülék több nagyobb egységre bontható, maga a mintakezelő egység, a detektor és tartozékai, a vezérlő hardver és szoftver, fényforrás és monokromátor.



1. ábra - Applied Photophysics SX18.MV

A fényforrás szerepét egy 150 wattos xenonizzó látja el, az átfolyó áram és ezzel a fényerősség időbeli állandóságát pedig a forrás elé kötött stabilizált tápegység biztosítja, és ez szolgáltatja az indítóáramot is a lámpa számára. A fény innen közvetlenül a monokromátoregységbe kerül, amelynek bemeneti résszélessége állítható, ezzel pedig a fényerősség változtatható a minta fényérzékenységének függvényében. Az egységben a fény

felbontását egy holografikus rács végzi. Ezt gyárilag He-Ne lézerrel kalibrálták, így felbontása 200 nm-től 700 nm hullámhossztartományig megbízható.



2. ábra – stopped-flow áramlási sémája²

A mintakezelő egység (2. ábra) az egész készülék központi része, ebben helyezkedik el a reakciócella. A reakciócella egy termosztáló köpennyel körbevett 10×2×1 mm-es, kvarcüvegéből készülő optikai cella (OC), amelyben a detektálás lehetséges úthossza 2 és 10 mm. Ezen folyik át reagáló oldat, itt történik a detektálás, ami spektrofotometriás vagy fluoreszcenciás elven is működhet.

A mintakezelő mind két reagenst tartalmazó hagyományos, mind három reaktánst használó, szekvenciális mérésekhez alkalmazható. Az előbbihez elég a két reagenstartó fecskendő (C, F), amelyek közvetlenül tölthetők majd csappal zárhatóak. Ezekben a teflondugattyúkat egy nagyobb fémdugattyú (CF) pneumatikusan mozgatja, amit egy szeleprendszeren keresztül vezérel az automatika, az összekeverésnél felhasznált mennyiség pedig igényeknek megfelelően szabályozható. A nyomást egy reduktorral ellátott nitrogénpalack biztosítja, az általunk

használt nyomás tipikusan 6 bar. Két reaktáns esetében így csak az egyik nagy dugattyú (CF) mozog, ez az oldatokat nagy sebességgel egy csőrendszeren keresztül egyesíti, egy turbulens keverőben (M_2) keveri, és a reakciócellába továbbnyomja (ilyenkor azonban csak azonos térfogatú reaktánsok keverésére van lehetőség). A szekvenciális módszer révén két reagensből előállított köztitermék reakcióját lehet vizsgálni egy harmadik oldattal. Ehhez mindkét nagy dugattyúra szükség van, ezek egymástól függetlenül szabályozhatók. A második nagy dugattyú (AB) segítségével a két reagens egy „aging loop”-nak nevezett 115 mikroliter térfogatú csőszakaszba (AL) kerül, amelyben képződik a köztitermék, majd ez a másik ággal találkozáva keveredik és megkezdődik a reakció. Az oldat ezután a cellán továbbfolyva egy megállító fecskendőbe (S) kerül, amit feltölt, a dugattyú pedig teljes töltött állapotában egy nyomáskapcsolót (SW) zár, ami keverési fázis végét jelenti, ekkor a nyomás megszűnik, ezzel pedig az áramlás is. A keverésnél felhasznált oldatmennyiség a megállító fecskendőben lévő

üres térfogatot jelenti, amelyet töltött fecskendőből meghatározott mennyiségű folyadék pneumatikus kipréselésével állít be a rendszer minden egyes lövés előtt, nagy pontossággal.

A detektálás mindig a reakciócellában történik. Ennek lehetőségét a fémház oldalán egymásra merőlegesen 2-2 áttellenes és egy merőleges nyílás biztosítja, ezeken vezetjük be a fényt és detektáljuk az áttellenes oldalon az abszorbanciaváltozást, vagy a merőleges nyíláson a fluoreszcenciát. Így a detektorunk igény szerint lehet hagyományos, diódasoros vagy fluorimetriás spektrofotométer, ezeket pedig az optikai kábelek megfelelő átszerelésével változtathatjuk. Fontos még, hogy az átvilágítás iránya úthossztól is függ, ugyanis 2 mm-es úthossznál az átvilágítás merőleges az áramlás irányára, 10 mm-es esetben azonban az átvilágítás az áramlással párhuzamos, ezért elviekben mindig a kialakult abszorbanciagradiens irányában átlagabszorbanciát fogunk mérni ilyen esetekben.

A hardveres vezérlést a rendszer 2011 januárjában elvégzett fejlesztése óta egy IBM-kompatibilis személyi számítógép látja el, amin Windows operációs rendszeren fut az Applied Photophysics saját stopped-flow és spektrofotométer-kezelő programja. A felújítás nemcsak a vezérlő számítógépre terjedt ki, hanem egyes elektronikai és mechanikai elemekre is, többek közt a vezérlő-digitalizáló hardverre.

Laborunkban ezen kívül azonban van még egy stopped-flow készülék, amely viszont csupán kiegészítő része egy másik, szintén az Applied Photophysics által épített LKS.60 villanófény-fotolízis készüléknek. Ellentétben az előzőleg leírt kiépítéssel, ez csupán két reagens közti reakciót tud követni, a másik két fecskendő, a hozzájuk tartozó dugattyú és a megfelelő csövezés („aging loop”) hiányzik belőle. A digitalizáló hardvert kivéve azonban más tulajdonságaiban lényegében megegyezik a másikkal.

3. Irodalmi előzmények

Az első, stopped-flow keverési problémát megoldani kívánó cikket Chin-tung Lin és D. B. Rorabacher publikálta 1974-ben, munkájukban⁴ pedig arra keresték a választ, hogy a reakciócella inhomogenitását figyelembe véve hogyan tudják méréseiket másodrendű reakciókban pontosabbá tenni, ha elérték a készülékük teljesítményének határát. Ezt két faktor határozza meg: az egyik a tökéletes keveréshez szükséges időtartam, a másik pedig a cella reakcióeleggyel való feltöltéséhez szükséges idő. A matematikai modellhez ezt a két dolgot vették figyelembe, a holtidőt és a küvettafeltöltési időt, feltételezve, hogy a reakciócella tartalma nem homogén, benne a detektált anyag koncentrációgradienssel oszlik el, így a cellát elméletben kis méretű, homogén, különböző reakciókoordinátájú szeletekként is tekinthetik. Próbareakcióként réz(II)-hidroxokomplexek és 2,3,2-TET (2,3,2-tetraazaundekán) közötti folyamatokat vizsgálták erősen lúgos közegben, majd kidolgozott modelljüket alkalmazták, amivel sikeresen redukálták a nagy reakciósebességből adódó jelentős eltéréseket a névleges értékektől. Ezzel olyan mérésekre is sikerült értelmezhető értékeket mérniük, ahol a rendszer számított felezési ideje mindössze egyötöde a készülék holtidejének.

Az általunk is használt kalibrációs reakció bő 30 éve alkalmazott módszer, lefolyásáról 1978-ban írtak cikket⁵ a kyotoi egyetem kutatói, akik teljesítménykalibrációs célra kerestek reakciót, és tapasztalataikat publikálták. Felállították a megfelelő követelményeket a reakció számára, majd ezek szerint válogatva 2,6-diklórfenol-indofenol, valamint kálium-ferricianid redukcióját választották aszkorbinsavval tesztfolyamatként. Mindkét reakcióra teljesül, hogy egyszerű kinetikájú, abszorbanciaváltozása jól követhető (524 nm-en az előbbi eltűnése, 420 nm-en az utóbbié), a reakciósebesség könnyen szabályozható, 1 ms alatti felezési idő is egyszerűen elérhető, valamint maguk a reaktánsok is könnyen kezelhetőek és beszerezhetőek. A reakciók során, hogy fenntartsák a pszeudo-elsőrendű körülményeket, a színezékek koncentrációit mindig a redukálószer koncentrációjának 5%-a alatt tartották, 0,2 M-os NaCl-ot adtak a rendszerhez az ionerősség állandó értéken tartásához, és 25 °C-on termosztálták a készüléket. Kísérletesen összehasonlították a két reakciót, pH és más paraméterek szerint külön vizsgálva, végül a DCIP redukálási reakció bizonyult jobb teljesítményűnek, pH = 2 értéken, 524 nm-en detektálva, legfeljebb 5% DCIP tartalommal viszonyítva az aszkorbinsavhoz. A cikkben ajánlott kísérleti körülmények annyira megbízhatónak bizonyultak, hogy majdnem ugyanezeket a körülményeket ajánlja a gyártó is 30 évvel később.³

Két évvel későbbi cikkben⁶ a Bázeli Egyetem kutatói szintén egy stopped-flow kalibrációs módszert mutattak be. Ebben egy kétlépéses reakciót vizsgáltak, így a kiértékelés nehézkesebbé vált bizonyos szempontból, noha a szerzők néhány előnyre is rámutattak. A választott reakciójuk az Elmann-reagens (5,5'-ditiobisz-(nitrobenzoesav), DTNB) és tioglicerin közti folyamat, mely során első lépésben a két reagensből egy közttermék, majd ebből és egy újabb tioglicerinből alakul ki a végső termék, a 2-nitro-merkaptobenzoesav (TNB). A reakciót úgy alakították, hogy végül a kapott görbe megfeleljen két pszeudo-elsőrendű exponenciális összegének, fotometriásan a TNB változását követték 440 nm-en. Ezt azért találták előnyösnek, mivel a két lépést könnyen el tudták egymástól választani, az amplitúdók aránya jól jellemzi a sebességi együtthatók arányát, a rendszer megfelelően érzéketlen a hőmérséklet és a pH változására, valamint fluoreszcenciásan is követhető megfelelő festék alkalmazásával. A tesztreakciót ezen felül nem csak az időeltolás meghatározására, de a készülék linearitásának vizsgálatára is ajánlják a szerzők.

Később, 1986-os cikkben⁷ foglalkozott Peter N. Dickson és Dale W. Margerum hasonló problémákkal. Megpróbálták kiterjeszteni a mérési tartományukat nagyobb sebességi együtthatójú reakciókra azáltal, hogy a keverés okozta változásokat megfelelő matematikai eljárással figyelembe veszik, valamint holtidő meghatározására is pontosabb módszert kerestek. Választott tesztfolyamatuk a monoklóramin és jodidion reakciója volt, amit a trijodidion hullámhosszán követtek. Kinetikai görbéjük leírásához egy olyan sebességi állandót (k_{obs}) rendeltek, melyben a reakció tényleges pszeudo-elsőrendű sebességi állandója (k_r), valamint a keverés elsőrendű sebességi állandója (k_{mix}) is szerepel:

$$1/k_{\text{obs}} = 1/k_r + 1/k_{\text{mix}} \quad (1)$$

Ebből az egyenletből (1), valamint a k_{mix} áramlási sebességtől való függésének ismeretében sikerült meghatározniuk már szélsőségesen nagy sebességű reakció sebességi állandóját viszonylag csekély hibával. Kitértek a holtidő-meghatározás problémáira is, miszerint a holtidő közvetlenül függ az áramlás végsebességétől, azaz az áramlást bármilyen módon befolyásoló paraméter befolyásolja a holtidőt is. Ez lehet a gázyomás ingadozása, reagens viszkozitása, vagy a készülékben valamilyen mozgó alkatrészek közti megnövekedett súrlódást okozó tényező. Munkájuk eredményeként publikálták az általuk kidolgozott monoklóraminos holtidőmeghatározási módszert, másfelől modelljükkel 2000 s^{-1} nagyságrendű reakcióra tudtak helyes sebességi együtthatót meghatározni.

Egy későbbi cikkben⁸ aztán Nancy E. Meagher és David B. Rorabacher szintén megpróbálta matematikai módszerekkel leírni a stopped-flow reakciócellában zajló összetett folyamatokat koncentrációgradienst mutató rendszert feltételezve, ehhez integrálták a küvetta hosszában a koncentrációgradienst és felhasználták a kísérletesen meghatározott küvettafeltöltési időt, valamint feltételezték, hogy a küvettaiba jutás pillanatában a keverés már teljes. Ez azonban nagyon sokszor nem teljesül, ami gyenge pontja a modellnek. Munkájukban olyan megfordítható másodrendű reakcióval foglalkoztak, melynek felezési ideje a keverési időtartamnál kisebb. Megállapították, hogy elsőrendű reakciókban a korrekcióhoz elégséges a keverés bevonása a sebességi egyenletben egy elsőrendű folyamat formájában, azonban ugyanez más sokkal komplexebb és bonyolultabb matematikai kezelésmódot követel meg másodrendű megfordítható folyamatoknál, ráadásul itt a koncentráció inhomogenitása még tovább bonyolítja a rendszert.

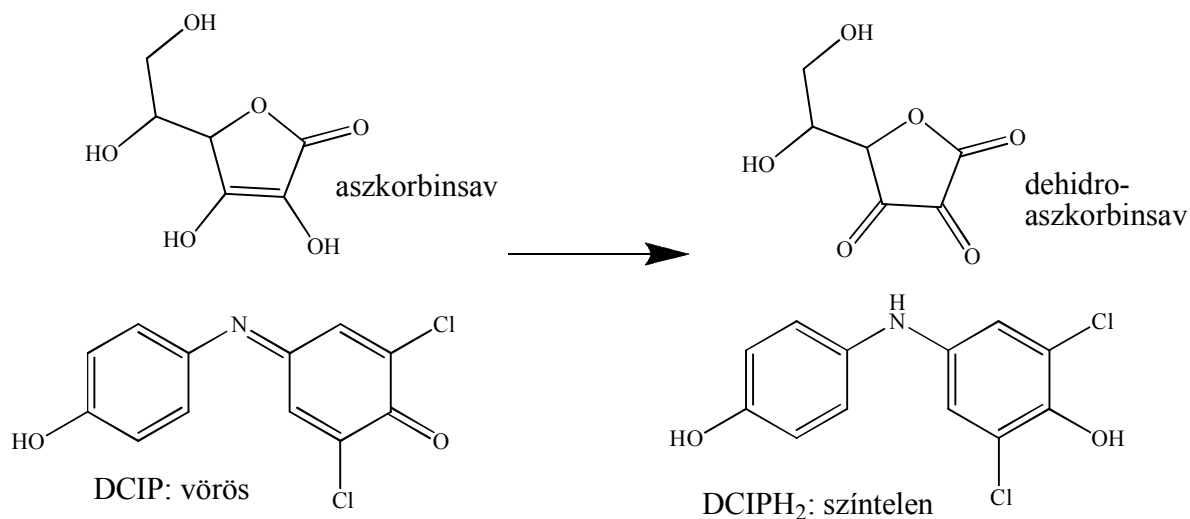
Ugyanezen szerzők pár évvel később már koncentrációgradienst kiküszöbölő modellt publikáltak⁹ ismét másodrendű megfordítható reakcióra, amit összehasonlítottak másfajta korrekciós megoldással. Mérési határérték körüli sebességi együtthatójú elektrontranszfer folyamatokat választottak, ezek sebességi együtthatóját pedig számolással meghatározták. Ezeket a választott fémkomplexes reakciókat vizsgálták és mérték meg, majd alkalmazták modelljüket. Egyik megoldásuk nem vezetett jelentős eredményre, azonban egy másik megközelítésükkel olyan tartományban is jó eredményt kaptak, ahol a felezési idő kevesebb, mint fele a készülék holtidejének. Megállapították ezen felül, hogy ahogy a felezési idő közelít a holtidőhöz, egyre inkább javasoltá válik az adatok steady-state megközelítése.

2000-ben magyar kutatók jelentettek meg cikket¹⁰ fejlesztett stopped-flow kalibrációs eljárásról, ahol többek közt két új paramétert is felhasználtak a kalibrációhoz, az egyik a küvettafeltöltési idő, a másik az elméleti kezdeti idő, ami a keverési ponttól az optikai cella végéig való eljutásához szükséges ideje az oldatoknak. Felvetették azonban, hogy míg a küvettafeltöltési idő csak a stopped-flow rendszertől és a viszkozitástól függ, addig a holtidőt még maga a reakció sebessége is befolyásolja. Ezek mellett a görbék egyéni kiértékelése helyett szimultán analízist javasolnak, valamint bemutatták a paraméterek alkalmazhatóságát másodrendű reakciókra is, amivel elveszti jelentőségét a kalibrációs folyamatok pszeudoelsőrendű követelménye, ilyen módon a magasabb rendű esetekben is könnyen kiértékelhetőek a mérési eredmények. Ezzel a kitéttel nagymértékben bővítették a lehetséges reakciók körét, mivel az elérhető szimultán illesztéssel az egyszerű kinetikai görbék már nem jelentenek kritériumot a stopped-flow vizsgálatoknál. Az elméletek kipróbálására a már

említett DCIP-aszkorbinsav reakció mellett elvégezték a méréseket $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ és NaSCN segítségével is, az FeSCN^{2+} keletkezését detektálva. Igazolták, hogy másodrendű folyamatként is kiértékelhető a reakció minden egyszerűsítő törekvés (pszeudo-elsőrendűvé tétel) nélkül, az általuk használt modellen keresztül.

4. Kísérleti előzmények

Egy korábbi, 2010-es TDK munkámban¹¹ „Stopped-flow készülék kalibrációja” címmel már foglalkoztam ezzel a témával, amelyben főképp a kalibráció kiértékelésének fejlesztésével foglalkoztam. Felhasználva a gyártó által ajánlott aszkorbinsav és DCIP közötti reakciót (3. ábra) kalibrációs kísérleteket végeztem, melyek eredményeiből a készülék kézikönyvében leírtak szerint meghatároztam a holtidőt, azaz elvégeztem a készülék kalibrációját. A meghatározás során 2,6-diklorofenol-indofenol 500 μM -os oldatát reagáltattam 2-es pH alá HCl segítségével állított 2 mM és 120 mM koncentrációk közötti aszkorbinsav oldatokkal. Az aszkorbinsav többszörös mennyisége biztosította a pszeudo-elsőrendű körülményeket, míg a savas kémhatás a reakció gyors lezajlását. A detektálást 524 nm-en végeztem, ahol a DCIP protonált formája rendelkezik elnyelési maximummal, ez alapján pedig követhettem a reaktáns fogyását.



3. ábra – aszkorbinsav és DCIP reakciója

A gyártó által is közölt kiértékeléshez a kapott elsőrendű görbéket illesztettem a készülék saját szoftverével, a számolt kezdeti abszorbanciákat és a pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat felhasználva a következő linearizált egyenlet (2) segítségével határoztam meg a holtidőt:

$$\ln(A_{obs}) = \ln(A_{tot}) - k_{obs} \cdot t_d \quad (2)$$

Az A_{obs} a kezdeti észlelt abszorbanciát, az A_{tot} az illesztett kezdeti abszorbanciát, k_{obs} az illesztett sebességi állandót, t_d pedig a holtidőt jelenti. Használt készülékünkre így első próbálkozásra $1,51 \pm 0,03$ ms értékű holtidőt mértem.

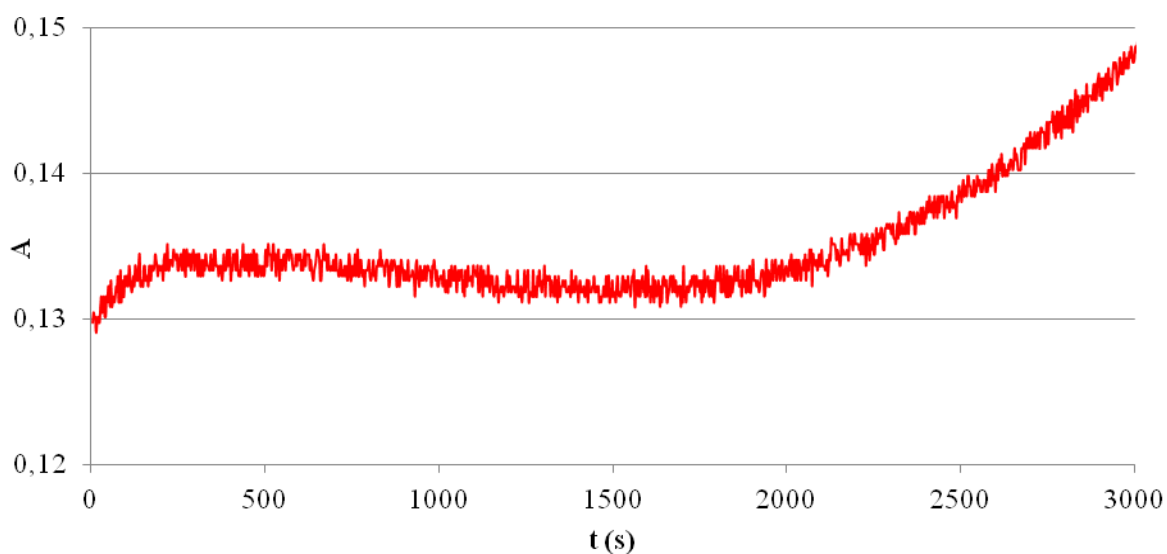
A rutinművelet adataiból ezután azonban megpróbálkoztam egy fejlesztett módszer alkalmazásával is, amely figyelembe vette a küvetta belüli történéseket is, pontosabban az optikai úthossz mentén kialakuló koncentrációgradienst. Mivel az eredetileg mozgó oldatkeverék hirtelen megállásával kezdődik a detektálás, ezért attól függően, hogy milyen távolságot tesz meg az oldat a keverési ponttól, a reakció lefolyt ideje is változik. A keverési ponttól távolabbi oldatrészletek kora, ezzel pedig bennük a termék koncentrációja nagyobb. Ha ezt vizsgáljuk a küvetta hosszában végig, a detektált jel a küvettabeli különböző koncentrációk átlagának adódik. Ezt a jelenséget figyelembe véve a kiértékelés során, azaz a különböző korú, cellában lévő oldatokra integrálva, egy küvettafeltöltési időt is tartalmazó kifejezést (3) kapunk, amely a következőképpen néz ki:

$$A_{\text{obs}} = \int_0^l \frac{A_{\text{tot}}}{l} e^{-k_{\text{obs}}(t_d + x/l \cdot t_f)} dx = \frac{A_{\text{tot}}}{l} e^{-k_{\text{obs}} t_d} \int_0^l e^{-k_{\text{obs}}(x/l \cdot t_f)} dx = \frac{A_{\text{tot}}}{k_{\text{obs}} t_f} e^{-k_{\text{obs}} t_d} (1 - e^{-k_{\text{obs}} t_f}) \quad (3)$$

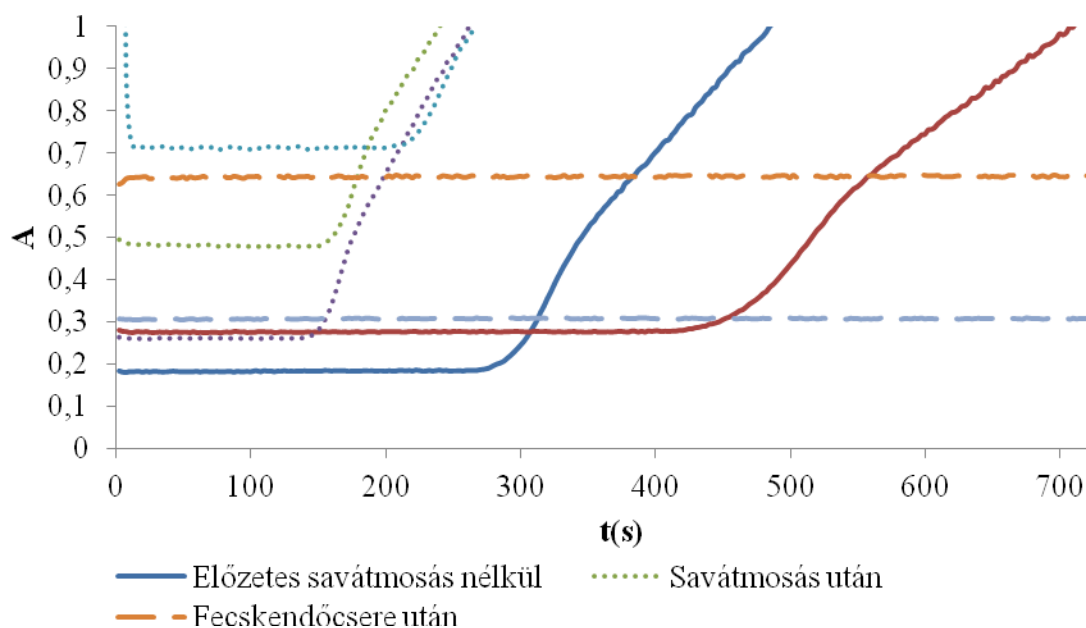
Ennek segítségével sikerült pontosabb értéket kapnom a holtidőre és a küvettafeltöltési időre is, amely esetben az eredmények helyességét a csőrendszer ismert méretei is alátámasztották. Az előbbi értéke $1,12 \pm 0,13$ ms, az utóbbié $0,95 \pm 0,30$ ms. Helyességüket az támasztja alá, hogy a küvetta és a csőrendszer térfogata közel megegyező, így a bennük töltött időnek is hasonlóknak kell lenniük.

A kalibráció elvégzése mellett diffúziós kísérleteket is végeztem, melynek célja az esetleg a jelenség miatt fellépő zavaró hatás kimérése volt. A kísérletekhez a rendszert átmostam, miközben egy látható elnyeléssel rendelkező reagenst töltöttem az egyik fecskendőbe, mérést indítottam injektálás nélkül, és követtem az abszorbanciában bekövetkező változásokat, amelynek egyetlen forrása a diffúzió lehetett. KMnO_4 -tal végzett kísérletek esetén 2000 másodperc után észleltünk abszorbancianövekedést (4. ábra), indikátort használva azonban akár már 150 másodperc alatt megjelent a fecskendőben lévő sav diffúziója okozta jel (5. ábra). Ez viszont csak az egyik fecskendő esetén volt igaz. Ha felcseréltük őket, 2000 másodperc után sem láttuk a diffúzió jelét. Ebből adódóan kb. 150 másodpercig biztosak lehetünk abban, hogy a rendszerbeli diffúzió nem zavarja a mérésünket,

ha pedig megfelelően párosítjuk a reagenseket a fecskendőkkel, úgy ezt az időt jelentősen kitolhatjuk.



4. ábra: diffúziós görbe a rendszerben 0,02 M KMnO_4 esetén, 520 nm hullámhosszon



5. ábra: sav diffúziója metilvörös indikátor jelenlétében különböző körülmények közt, 0,9 M HClO_4 oldat esetén 520 nm hullámhosszon

5. Célkitűzés

Munkám közvetlen célja a stopped-flow készülékek holtidő-meghatározásának fejlesztése volt. A kiértékelési módszer pontosítása után a kísérleti módszer vizsgálatát tűztem ki célul, olyan reakciókat kipróbálva, amelyek segítségével pontosabban, megbízhatóbban, vagy éppen egyszerűbben lehetséges a holtidő vagy más teljesítménytényező meghatározása. Ezen kívül célom volt a mérés során előforduló más jelenségek feltárása is, így például a rendszerben fellépő diffúzió mélyebb vizsgálata.

6. Kísérleti körülmények

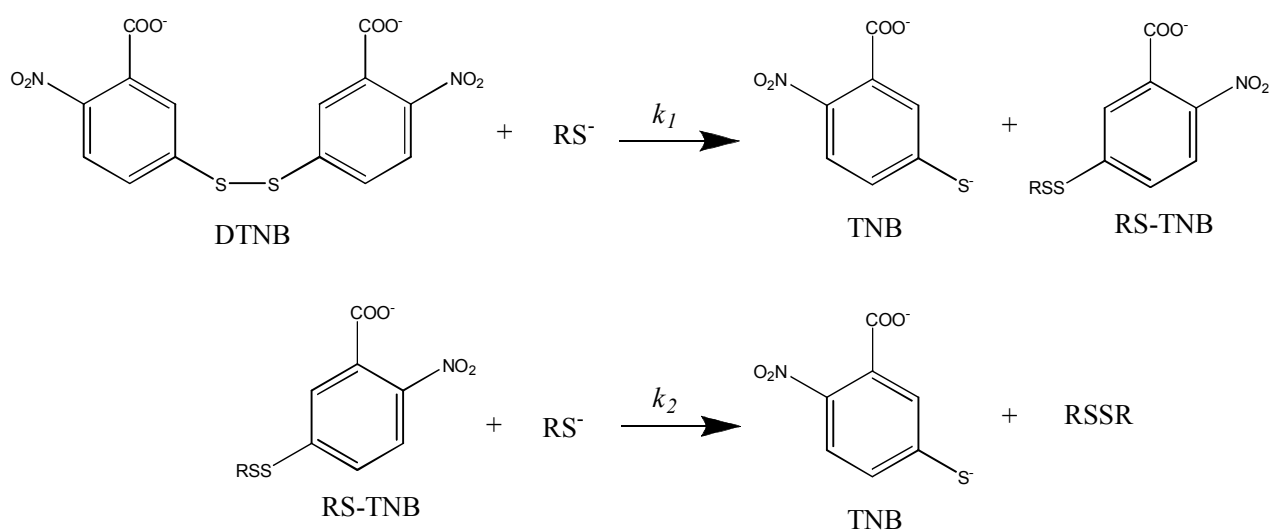
A mérésekhez különböző tisztaságú anyagokat használtunk, a kalibrációs mérésekhez aszkorbinsav (Reanal, a. lt.), DCIP (puriss, 97%) és DTNB (Aldrich, 99%) szilárd vegyszerekből és tioglicerinből (Sigma, 97%) háromszor ioncserélt (MILLI-Q) segítségével készítettünk oldatokat, a savasságot tömény HCl oldat (Reagent grade) hígításával, az állandó ionerősséget NaCl-dal (Reanal, puriss) biztosítottuk. Diffúziós méréseknél reagensekként KMnO_4 -ot (Reanal, a. lt.), metilvörös indikátort (Reanal), perklórsavat (a. lt.) és sósavat (Reagent grade) használtunk.

A felhasznált készülék és annak sajátságainak részletes leírása megtalálható a 2. fejezetben.

7. Kísérletek és értékelésük

7.1. DTNB és tioglicerin reakciója

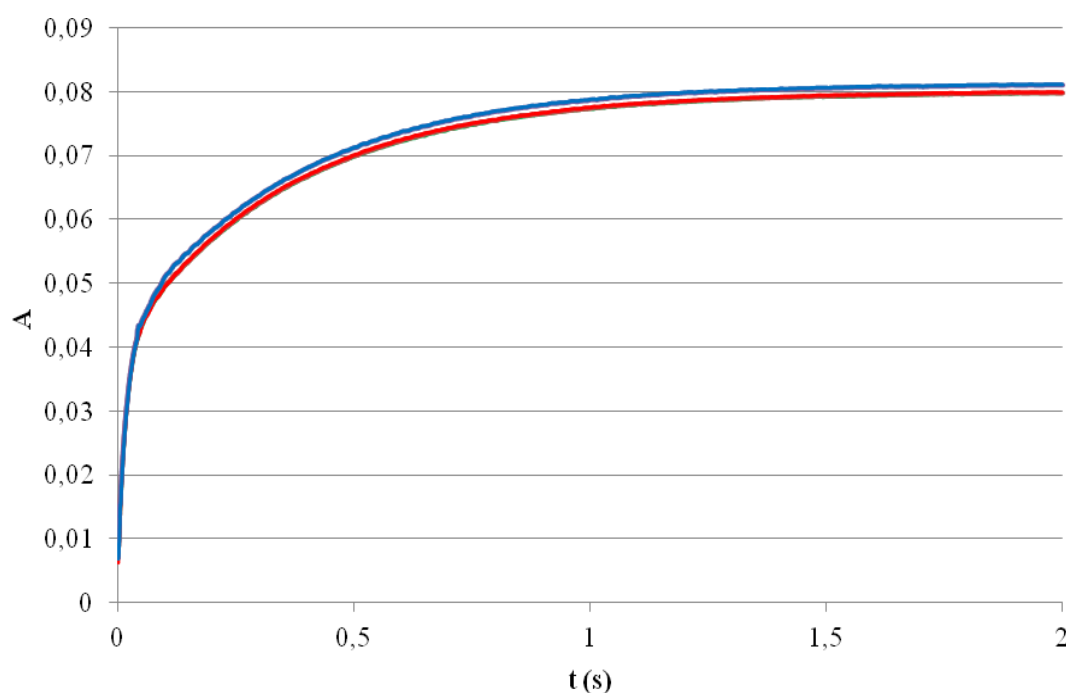
A klasszikus aszkorbinsavas módszer után az irodalomban 1980-ban megjelent cikket⁶ követve DTNB (5,5'-ditiobisz-nitrobenzoesav, Elmann-reagens) reakcióját próbáltuk ki kalibrációs módszerként. Az irodalomban előnyeként említik, hogy a reakció egyszerűen kivitelezhető, reprodukálható, pontos, a meghatározáshoz elég egyetlen kísérlet, valamint a reagensoldatok is stabilak, összehasonlítva például az aszkorbinsav-oldattal. A reakció maga kétlépéses (6. ábra), amely során első lépésben egy DTNB és TG (tioglicerin) reaktánsokból egy TG-TNB köztitermék és egy TNB (2-merkaptobenzoesav) molekula képződik. Második lépésben ez a köztitermék újabb TG molekulával diszulfidhíd képzése mellett további egy TNB anion keletkezésével jár.



6. ábra – DTNB és TG reakciója

Az egyes lépések tehát 1-1 TNB keletkezésével járnak, amelynek abszorpciós maximuma 410 nm-en található, a detektálást azonban 440 nm hullámhosszon végeztük, itt a többi termék kevesebb, mint 1%-ban járul hozzá az abszorbanciához. A két reagens mérésünk során DTNB 10 μ M oldata volt 0,1 M koncentrációjú, 6,5-ös pH kálium-foszfát pufferben, míg a tioglicerint 25 mM koncentrációban, 8,5-ös pH-jú, 0,1 M koncentrációjú kálium-foszfátban készítettük. Ezekkel a koncentrációviszonyokkal értük el a pszeudo-elsőrendű körülményeket az egyes lépésekben, így a reakció lefutását két exponenciális görbe

összegeként detektáljuk. (7. ábra) Itt is a görbék paramétereire van szükségünk, melyek A_1 , A_2 , λ_1 , λ_2 valamint egy konstans, ez azonban nem lényeges a kiértékelés szempontjából. Ehhez a cikk több egyszerűsítést is ír, hiszen 1979-ben, megalkotásakor még nem állt rendelkezésre a szoftveres kiértékelés lehetősége, s emiatt a cikk ezen része elavultnak tekinthető. A szerzők megállapították, hogy valójában 3 paraméteres illesztésre van csak szükség, mivel a λ_1 és λ_2 paraméterek nem függetlenek egymástól, sőt a hőmérséklet is csak kevésbé befolyásolja, valamint pH 7,5 és 9,5 közt is konstansnak tekinthető hányadosuk, mely $R = \lambda_1/\lambda_2$ értéke 22,5, ha a hőmérséklet 25 °C. Mi azonban már itt minden mérésünk esetén ettől eltérő értéket kaptunk, az átlagérték $20,6 \pm 1,1$ volt. Ez az eredmény már megkérdőjelezi a mérés megbízhatóságát, ám mivel mi ezt a tulajdonságát a reakciónak nem használjuk a szoftveres kiértékelés lehetősége miatt, ettől eltekintve is elvégezhetjük a kalibrálást.



7. ábra: kalibrációs görbék 5 μ M DTNB, 5 és 25mM TG koncentrációknál, 440 nm hullámhosszon

Emellett azonban fennállt egy másik probléma is, a DTNB oldatban jól mérhető bomlást tapasztaltunk már egy órás állás után is, valamint szennyezésre és nem megfelelő pH-ra is érzékenynek bizonyult, ami még inkább kétségesé teszi a reakció megbízhatóságát, a reaktánsok stabilitását. Ezekről a tapasztalatokról eltekintve azonban a kapott görbékre a készülék szoftverével két-exponenciálist illesztettük, független λ_1 és λ_2 értékekkel, majd megpróbáltuk alkalmazni rá a holtidő meghatározására használt eredeti egyenletet, melyet a

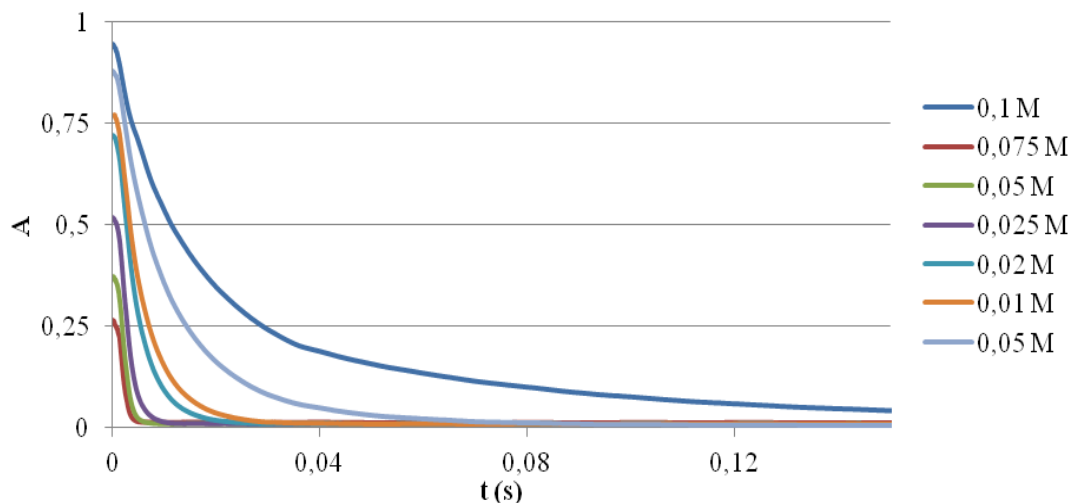
DCIP-aszkorbinsav reakciónál is használtunk, azzal a feltételezéssel élve, hogy a reakció kezdeti szakaszában elhanyagolható mértékben folyik a reakció második lépése. Ez tehát azt jelenti, hogy az A_{obs} értékét nem befolyásolja jelentősen a második reakciólépés. A módszerrel azonban látványosan helytelen, 8,4 ms-os értéket kaptunk a holtidőre. Ez többszöröse az általunk vártnak, tehát a kalibrációs módszer ilyen formájában nem alkalmas ennek a reakciónak a helyes kiértékelésére, vélhetőleg azonban megfelelő változtatásokkal és egyes más paraméterek bevonásával a módszer átdolgozható holtidő megadására alkalmas kalibrációs eljárássá. Végül soron mi ezt a lehetőség elvetettük, egyfelől a DTNB oldatbeli gyenge stabilitása miatt, másfelől azért, mert a reakció több lépése feleslegesen bonyolítja a kiértékelést. A görbeillesztés szempontjából ez a mai informatikai környezetben nem jelentős akadály, azonban a matematikai értelmezést jelentősen bonyolítja a két reakció összefüggése olyan egyszerű rendszerekkel való összevetésben, mint amilyen a DCIP-aszkorbinsav reakció. Ezen tapasztalatokat és problémákat figyelembe véve tehát a reakció mellőzése mellett döntöttünk, a közeljövőben nem tervezzük ennek a módszernek a továbbfejlesztését vagy használatát.

7.2. Ferricianid-ion reakciója aszkorbinsavval

A következő általunk vizsgálni kívánt reakció a ferricianid-aszkorbinsav reakció volt, melyet a kyotoi egyetem kutatói az 1978-as publikációjukban⁵ állítottak szemben a DCIP és aszkorbinsav reakcióval. A cikkben a két reakció közül a ferricianidos maradt alul, ennek oka az volt, hogy az eredmények nehezen reprodukálhatóvá váltak nagyobb pH-kon, 8,5-9-es pH körül pedig jelentősen eltértek a várttól. A másik probléma a pH-függéssel volt, a DCIP rendszer sokkal kevésbé reagált a változásra, míg a ferricianid rendszerben 1-8-as pH között ezerszeres különbséget mértek a sebességi állandókban. Emellett azonban az is negatívum, hogy a reakció a pH növelésével eredményez nagyobb, a kalibrációs céloknak megfelelő, vagyis a készülék teljesítőképességhez közeli sebességi állandót. Vagyis a kalibrációs tartomány egyúttal kevésbé megbízható tartományt is jelent.

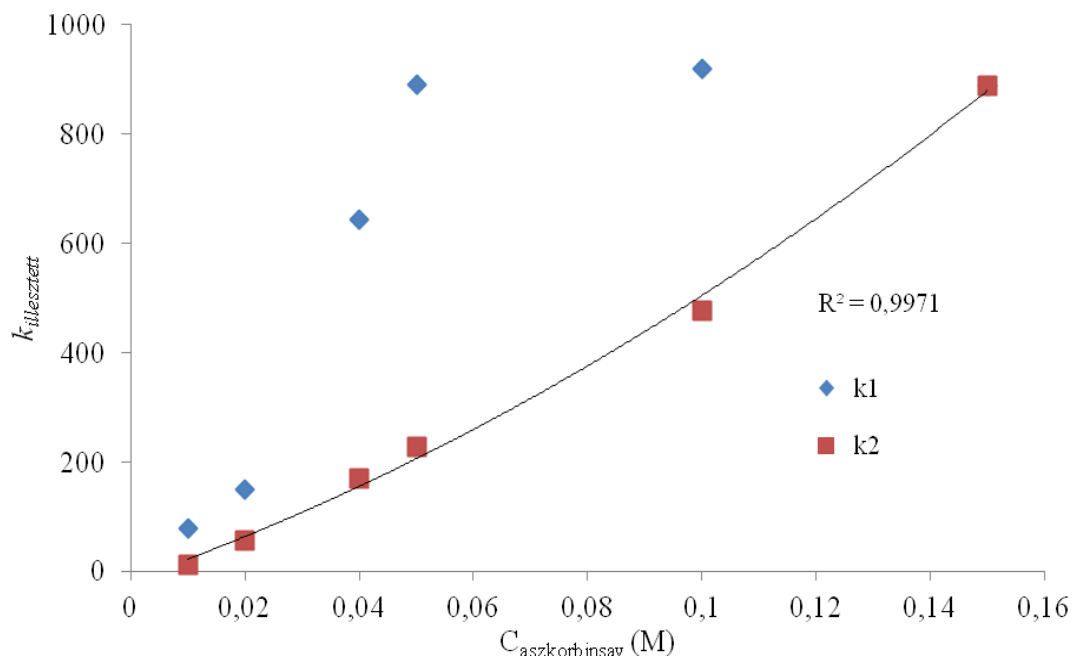
A kísérletekéhez a cikkben leírtakat vettük alapul, és ismerve a készülék már meghatározott holtidejét, meghatároztuk a méréshez szükséges paramétereket. A ferricianid-ion mennyiségét az aszkorbinsav mennyiségének 5%-a alatt tartottuk a pszeudo-elsőrendű körülmények biztosításához, az ionerősséget minden esetben 0,2 M NaCl segítségével állítottuk be. A kezdeti méréseket 6-os pH-ra beállítva végeztük, ehhez foszfátpuffert alkalmaztunk, 0,8 mM koncentrációjú $K_3Fe(CN)_6$ oldatot, valamint 20 és 100 mM koncentrációjú puffereelt aszkorbinsavat készítettünk. A kapott görbék azonban nem bizonyultak megfelelőnek, túlságosan kicsi sebességi állandókat kaptunk, amelyek nem közelítik meg a készülék mérési tartományának határait. A sebesség növeléséhez nagyobb aszkorbinsav-koncentrációt alkalmaztunk, valamint a pH-t is növeltük. Az aszkorbinsavat nátriumsójaként oldottuk, a pufferelest pedig bórax segítségével végeztük, 8-10 körüli értékre állítva az oldatok pH-ját. A kapott görbék alapján így végül a 8-as pH mellett döntöttünk, az aszkorbinsav-oldatok koncentrációját pedig 0,2-0,01 M közöttire állítottuk. Így végeztük el a kalibrációs reakciókat, 2 mM-os $K_3Fe(CN)_6$ oldattal, 0,2 M NaCl koncentrációt használva az ionerősség stabilizálására. A mérések során a 8. ábrán látható görbéket kaptuk, amelyekre elsőrendű illesztést végeztünk.

Az első illesztések szerint a várt pszeudo-elsőrendű görbék helyett két-exponenciálissal illeszthető görbéket kaptunk. Ez az irodalmi előzmények ismeretében kimondottan meglepő volt, azonban így is elvégeztük az görbék kiértékeléseit. Minden egyes kinetikai görbére így 2 sebességi állandót, 2 számított kezdeti abszorbanciát és egy leolvasott kezdeti abszorbanciát kaptunk, melyek közt korrelációt próbáltunk megállapítani.



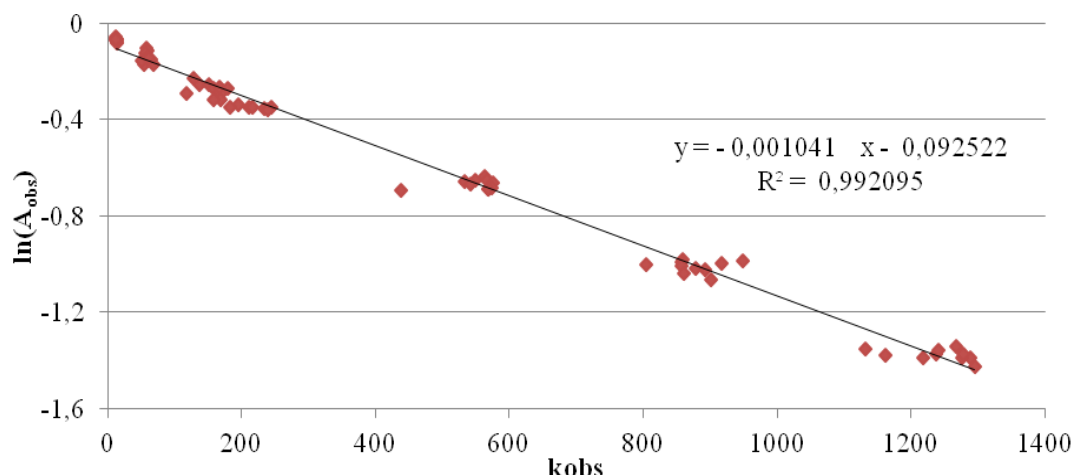
8. ábra: kapott kalibrációs görbék 1 mM ferricianid koncentrációnál, 420 nm hullámhosszon

Ábrázolva a kapott sebességi állandókat az aszkorbinsav koncentráció függvényében (9. ábra) megállapíthattuk, hogy az egyik sorozatra (k_2) rossz közelítéssel, de illeszthető egyenes. Irodalomból és korábbi mérésekből azonban már tudjuk, hogy az általunk használt sebességi tartományban már nem igaz a lineáris illeszkedés, ezért polinomiális függvénnyel közelítettük a sorozatot, amely jó illesztést mutatott.



9. ábra: sebességi állandók koncentrációfüggése a 8. ábra görbéi alapján

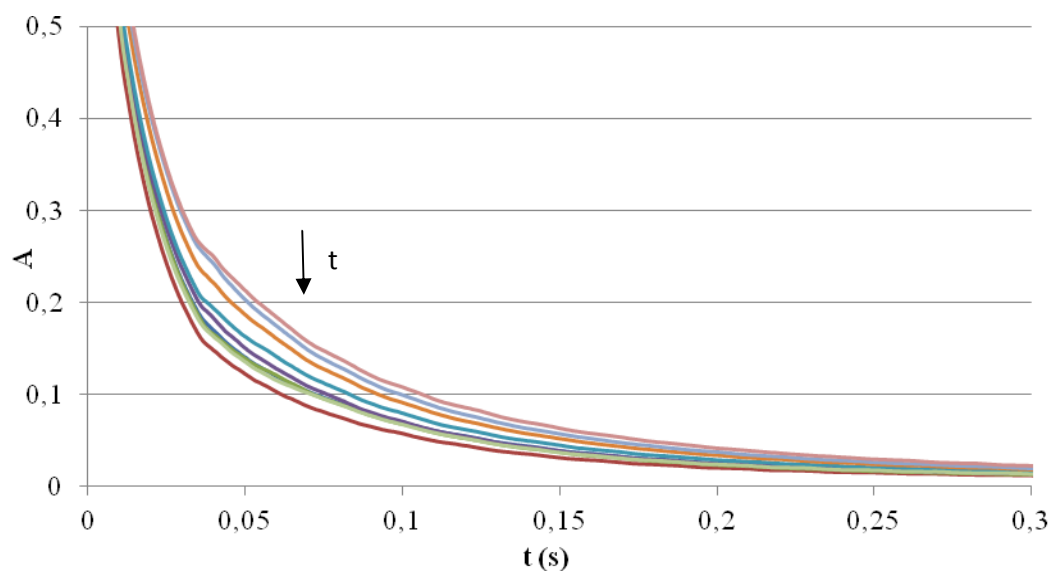
Emiatt az egyik sebességi állandót (k_2) felhasználhattuk a kiértékeléshez, melyet először az eredeti $\ln(A_{obs}) = \ln(A_{tot}) - k_{obs} \cdot t_d$ egyenlet szerint illesztettünk (10. ábra) felhasználva a leolvasott kezdeti abszorbanciát, ezzel a módszerrel 1,04 ms-os holtidőt mértünk, ami jól közelít a DCIP reakció alapján fejlesztett módszerrel kapott $1,12 \pm 0,13$ ms-hoz.



10. ábra: holtidő meghatározása ferricianid-redukciós módszerrel, hagyományos kiértékeléssel, 8. ábra mérései alapján

Bár az illeszkedés nem kiváló, valamint a pszeudo-elsőrendtől való eltérés magyarázatát sem találtuk meg az irodalomban, maga a holtidő értéke a vártnak megfelelő, így érdemesnek tartottuk tovább vizsgálatok tervezését. A választott pontokra a korábban leírt, fejlesztett módszer nem bizonyult alkalmazhatónak. Ennek hátterében minden bizonnyal az a tény van, hogy nem pszeudo-elsőrendűek a görbék.

Az egymás után közvetlenül mért görbéken még egy jellemző dolgot észlelhettünk, az illesztett sebességi állandók változtak, ami jól látszott a felvett görbék egymás melletti ábrázolásánál (11. ábra) is. Olyan esetekben, amikor egy adott koncentráción gyors egymásutánban összelőttük a reaktánsokat, a görbék folyamatosan meredekebbé váltak, ami az illesztett sebességi állandók növekedésében követhető volt. A jelenség oka még nem ismert, a reakció gyorsulását okozhatja azonban a pH növekedése, ami következhet például az aszkorbinsav bomlásából. Mivel eleve 8 körüli pH-n dolgoztunk, ezért elég valószínű, hogy ilyen körülmények közt kevésbé stabil a reagensünk, így a továbbiakban érdemes foglalkozni a bomlás fékezésének lehetőségével is a rendszerben.



11. ábra: kalibrációs görbék változása mérés alatt, 1mM ferricianid és 5mM aszkorbinsav koncentrációknál, 420 nm hullámhosszon

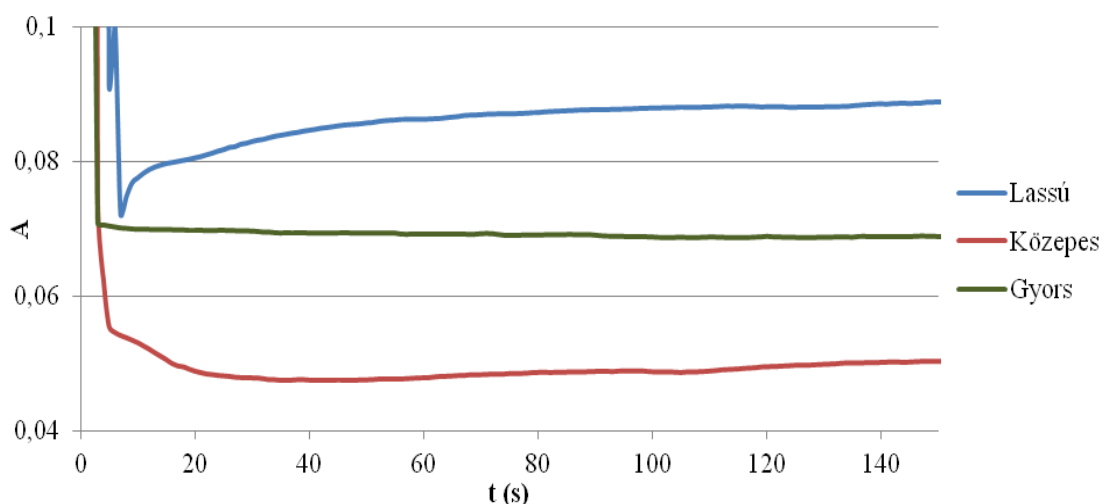
Összefoglalva a módszer tapasztalatait, biztató eredményt sikerült kapnunk a kalibrációs adatokból annak ellenére, hogy több problémával is szembesülnünk kellett. A mai korszerű kiértékelési, illesztési lehetőségeket is figyelembe véve érdemes újraértékelni a reakció létjogosultságát a sok éve megszokott DCIP-módszerrel szemben.

7.3. Diffúziós kísérletek

Már előző TDK-munkám során is végeztem kísérleteket a készüléken, melynek célja a diffúzió hatásának vizsgálata volt, és ezt a témát több kísérleten keresztül folytattam is. Megpróbáltam a lehetséges további befolyásoló tényezőket változtatva felderíteni, azok vajon játszanak-e szerepet a diffúziós folyamatokban. A vizsgálatokat minden esetben úgy végeztem, hogy választottam egy diffundáló reagenst és egy olyan közeget, amelyben fotometriásan jól követhető, abszorbanciaváltozással jól érzékelhető a diffúzió okozta koncentrációváltozás. A két választott összeállításom egyike a káliumpermanganát és víz páros volt, a másik a metilvörös és a híg sósav. Mindkét jelenséget 520 nm hullámhosszon detektáltam, a kiértékeléshez pedig azt az időtartamot használtam, mely idő után abszorbancinövekedést tapasztaltam, tehát a diffundáló reagens elérte a detektálási cellát. Az egyes mérések előtt a diffundáló komponenssel átmostam és feltöltöttem az optika cellát, ezután pedig kézzel, csak az egyik fecskendőt mozgatva a megállítófecskendő segítségével beállított térfogatú, nem diffundáló komponenst juttattam a rendszerbe, miközben detektálást indítottam. Emiatt a görbék első 1-4 másodperce a nem diffundáló reagens áramlásának folyamatát tükrözi.

Egyfelől, mivel kézi fecskendőmozgatást használtam, kérdéses volt, befolyásolja-e annak sebessége a méréseket. Ehhez összeállítottam a mérést a fentebb leírtak szerint, majd különböző gyorsasággal végezve a kézi áramoltatást (mérve ennek idejét), figyeltem a görbéket és az azokon jelentkező töréspontokat. Lassú áramoltatást kb. 5 másodperc alatt, közepes sebességűt 2-3 másodperc alatt, a gyors áramoltatást pedig kevesebb, mint 1 másodperc alatt végeztem el. Várakozásunknak megfelelően valóban volt szerepe ennek a tényezőnek, ugyanis nagyon lassú keverés esetén a kezdeti várt lineáris szakasz helyett a 12. ábrán látható görbét kaptam. Gyorsítva azonban a mozgatást, állandó, lineáris kezdeti szakaszokat kaptam, amelyeken nagyon jól érzékelhető volt a keresett töréspont. Az eltérés nagy valószínűséggel az áramlási hatásokon és részben a diffúziós hatásokon alapul, a lassú áramoltatás során mindig friss felületek érintkeztek a keverőben, ami jelentősen növelte a diffúzió lehetőségét az álló ágból a mozgó felé. Más tényező lehet még a mérés előtti állapot, hiszen a rendszerben már az átmosás pillanatától megkezdődik a diffúzió, emiatt nem mindegy, az átmosás után mikor kezdjük a mérést. Megjegyzendő azonban, hogy rutinméréseknél ez a kezdeti diffúzió elhanyagolható hatású, mivel az álló oldatrészletek mindössze áthaladnak a detektálási ponton, az áramlás megállításakor már friss oldat kerül a

cellába. Ennek megállapítására kidolgozottabb módszerre és a keverés mechanikájának ismeretére lenne szükség.

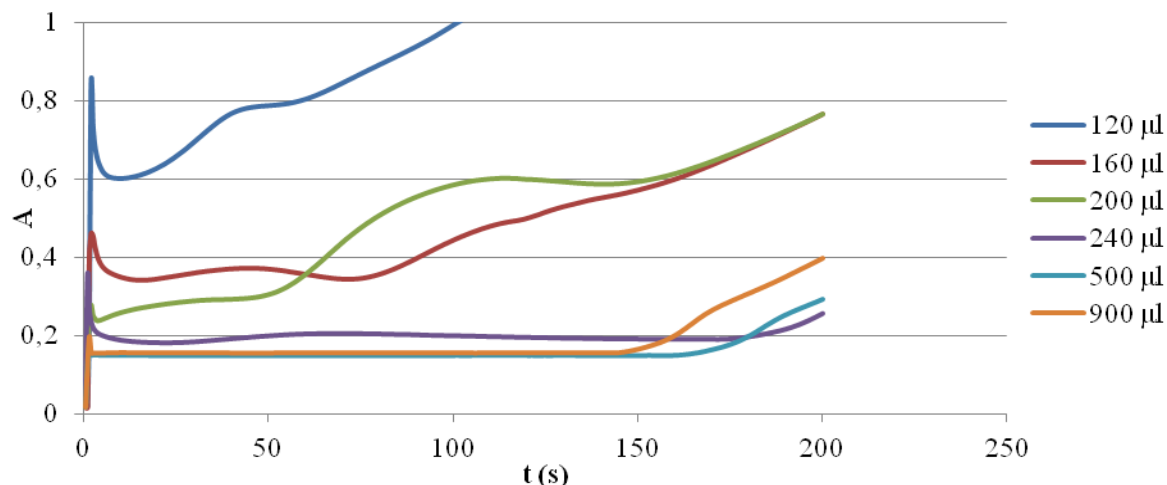


12. ábra: Injektálás sebességének hatása a görbékre, 0,02M KMnO_4 oldattal, 525 nm hullámhosszon

Ezután visszatértünk a készülékbeli diffúzió vizsgálatára, és megpróbáltuk megvizsgálni a rendszerből visszafele, tehát a megállítófecskendő irányából történő diffúzió hatását. Ehhez különböző, egyre növekvő mértékűre állítottuk be a megállítófecskendőben kísérletkor létrehozott üres térfogatot, a rendszert átmostuk 0,1 M koncentrációjú sósavoldattal az egyik fecskendőből, a másikba pedig metilvörös indikátort töltöttünk. Még az indikátor kézi áramoltatása előtt elindítottuk a detektálást 520 nm-en, így a kezdeti (áramlás közbeni) jelenségeket is követni tudtuk. A végtérfogatot 120 μl -tól kezdve 40 μl -es lépésekben növeltük egészen 240 μl -ig, majd a fél- valamint a teljes megállítófecskendő-térfogattal is elvégeztük a mérést. Ezután megcseréltük a két fecskendőben lévő oldatokat és szintén megismételtük a méréseket. Az előző munkámban már megmutattam, hogy a fecskendők cseréjével jelentősen kitolható a diffúzió megjelenésénke időtartama, és ezt most ismét tapasztalhattuk, így a kísérleteket a mérési idő csökkentése szempontjából kedvezőbb összeállításban végeztük.

A kapott görbék jól láthatóan, jelentősen különböztek egymástól, egyértelműen a nagyobb térfogatok eredményeztek jobban értelmezhető és reprodukálhatóbb görbéket (13. ábra). A legkisebb térfogat esetén már kezdetben is jelentős volt az abszorbancianövekedés, 40 és 100 s körül pedig egy lokális maximumot ér el az abszorbancia (utóbbi az ábrán nem látszik). A növekvő kezdeti térfogatokkal csökken a görbék kezdeti „meredeksége”, vagyis a diffúzió ekkor már kevésbé jelentős. Emellett azonban még mindig jól kivehetőek a lokális

maximumok, szintén 40 és 100 másodpercnél. 240 μl teljes kísérleti térfogat esetén már nagyon jól értelmezhető görbét kapunk, amelyen jól látható a töréspont 170 s körül. Az 500 és 900 μl -es méréseknél (fél és teljes fecskendő) pedig nincs látható különbség a kezdeti szakaszok közt.



13. ábra: diffúziós görbék függése az injektálási térfogattól, 1M HCl oldattal, kb. 0,05M metilvörös indikátor jelenlétében, 520 nm hullámhosszon

A változás alapján egyértelműen van lehetőség a megállítófecskendő irányából történő diffúzióra, amely a végtérfogat csökkenésével egyre zavaróbbá válik. Ezen mérések összességében mindenképpen megerősítik azt a nézetet, hogy 2 percnél hosszab ideig végzett stopped-flow mérések esetében a lineáris diffúzió zavaró hatásának lehetőségét már nem lehet egyértelműen kizárni. Ennek megfelelően két percnél hosszabb reakciókat már nem érdemes ezzel a technikával mérni, hanem a hagyományos, egy küvettában teljesen zárt rendszert létrehozó kézi keverés használata ajánlott.

8. Összefoglalás

Munkám során kalibrációs és diffúziós méréseket végeztem a laborban található Applied Photophysics SX.18 MV stopped-flow spektrofotométeres eszközön, az egyes kalibrációs módszereket kiértékeltem, a diffúziós jelenségeket pedig megvizsgáltam különböző körülmények közt.

Megvizsgáltam egy korábbi, az irodalomban megjelent reakciót a DTNB és tioglicerinnel között a cikkben leírtaknak megfelelően. A kiértékeléshez már két exponenciálissal való illesztésre volt szükség, amely kicsit bonyolultabbá tette a módszert az elterjedtebb, egyszerűbb, elsőrendű reakciót alkalmazó DCIP-redukciós módszernél. Emellett azonban további problémát jelentett a reaktáns törzsoldatbeli változása, jól mérhető eltérést tapasztaltunk már akkor is, ha a törzsoldatok kora között 1 óra különbség volt. Emellett a holtidőt sem tudtuk pontosan meghatározni, hiszen a várt 1-1,5 ms helyett a publikált eljárás 8,4 ms-os értéket adott. Ezek alapján a reakciót nem találtuk érdemesnek a további vizsgálatokra kalibrációs reakcióként.

Megvizsgáltam egy másik, irodalomban a DCIP-aszkorbinsav reakcióval együtt vizsgált módszert, mely ferricianid-ion aszkorbinsavas redukcióján alapul. A cikknek megfelelően próbáltuk ki a módszert, majd az általunk optimálisnak vélt körülményeket beállítva végeztem el a kalibrációt. Szintén problémákba ütköztünk: az irodalom alapján várt pseudo-elsőrendű folyamat helyett kétexponenciálissal illeszthető kinetikai görbéket kaptunk. Ez kissé bonyolultabbá tette a kiértékelést, azonban az előző reakcióhoz hasonlóan reprodukálási gondokat is tapasztaltunk. Ennek a jelenségnek az oka vélhetőleg az egyik reagens szabályozatlan reakciója a törzsoldatban. A kalibrációt mindezek ellenére el tudtuk végezni, a kapott 1,04 ms-os eredmény pedig nagyon jó egyezést mutatott a már jól bevált módszerrel kapott holtidővel. Emiatt a reakciót megfelelőnek ítéltük további kutatás és fejlesztés szempontjából, a jövőben folytatni kívánjuk a módszer vizsgálatát, mindenek előtt a reprodukálhatósági problémák okainak feltárását.

Tovább folytattam még az előző munkámban már megkezdett diffúziós kísérleteket is, amely során először a kézi keverési eljárásból adódó egyik problémát, az áramlás sebességét hatását vizsgáltam. Igazoltam, hogy a lassabb oldatáramlás zavarja a mérésünket, ezért ilyen jellegű kísérleteknél feltétlenül szükség van a dugattyú gyors mozgására.

Megvizsgáltam még a megállítófecskendő által beállított végtérfogot, vagyis a teljes keverési térfogat hatását a diffúziós görbékre. A kisebb térfogatok esetén jelentősebb

diffúziós jelenségeket figyeltünk meg, amelyek azonban eltűntek akkor, ha a keverési térfogat 240-500 μl -re növekedett. Ilyen esetekben már a reagensfecskendők felőli diffúzió mutatkozott jelentősebbnek.

9. Felhasznált Irodalom

1. Hans Strehlow: *Rapid Reactions in Solutions*, VCH Publishers, Weinheim, **1992**.
2. Lente Gábor: *Komplexbépződés a vas(III)-szulfid reakció kezdeti szakaszában*, diplomamunka, Kossuth Lajos Tudományegyetem, Debrecen, **1997**.
3. *SX.18MV Stopped-Flow Reaction Analyzer User Handbook*, Applied Photophysics, folyamatos frissítésekkel.
4. Chin-tung Lin, David B. Rorabacher: *The Journal of Physical Chemistry*, **1974**, 78, 305.
5. Been'ichiro Tonomura, Hiroshi Nakatani, Masatake Ohnishi, Junko Yamaguchi-Ito, Keitaro Hiromi: *Analytical Biochemistry*, **1978**, 84, 370.
6. Carlton Paul, Kasper Kirschner, Gernot Haenisch: *Analytical Biochemistry*, **1980**, 101, 442.
7. Peter N. Dickson, Dale W. Margerum: *Analytical Chemistry* **1986**, 58, 3153.
8. Nancy E. Meagher, David B. Rorabacher: *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, 98, 12590.
9. Brian C. Dunn, Nancy E. Meagher, David B. Rorabacher: *The Journal of Physical Chemistry*, **1996**, 100, 16925.
10. Gábor Peintler, Andrea Nagy, Attila K. Horváth, Tamás Körtvélyesi, István Nagypál: *Physical Chemical Chemical Physics*, **2000**, 2, 2575.
11. Ditrói Tamás: *Stopped-flow készülék kalibrációja*, szakdolgozat, Debreceni Egyetem, **2011**

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Lente Gábor egyetemi docensnek, témavezetőmnek, hogy munkámban segített és a kutatás menetében is segítségemre volt. Szintén köszönet jár Ana Budimir horvát vendégkutatónak is, akivel munkám egy részét együtt végeztem, valamint Kalmár József phd hallgatónak, aki a készülékkel adódó problémáknál volt segítségemre.

Az OTDK-ra való nevezés feltételeit a Debreceni Egyetem a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 pályázat segítségével biztosította.