

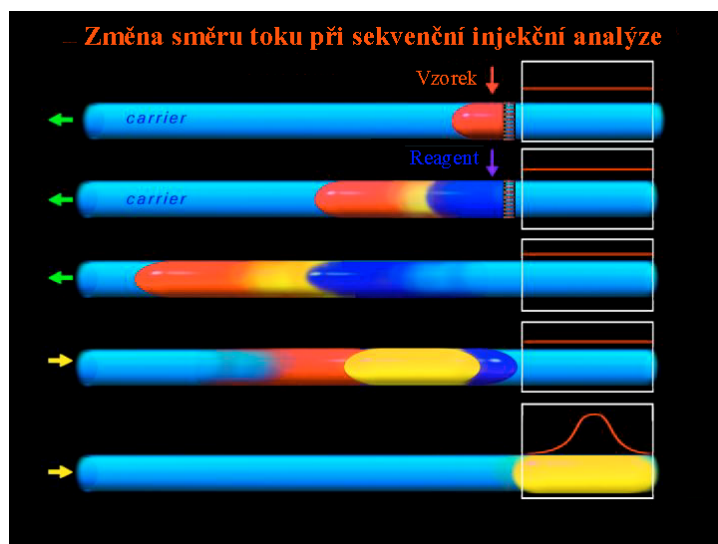
# Sekvenční injekční analýza

## (Stanovení obsahu dusitanů rivanolovou metodou)

### Teorie:

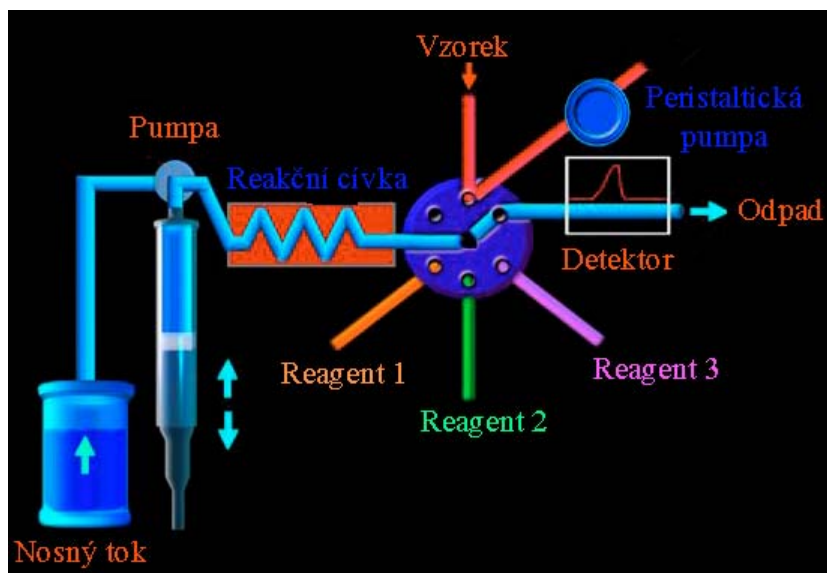
Sekvenční injekční analýza (SIA) je průtoková analytická metoda, řešící některé nedostatky průtokové injekční analýzy (FIA). Sekvenční injekční analýza také umožňuje snadnou automatizaci složitých postupů sériových analýz velkého počtu vzorků.

Významnými rozdíly techniky sekvenční injekční analýzy a FIA techniky je odlišnost v geometrii nosného toku, kdy FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco SIA využívá změnu přímého a zpětného toku (Obr. č. 1). Tím je dosaženo **vyššího stupně konverze analytu** na výsledný produkt.



Obr. č. 1: Princip sekvenční injekční analýzy

Systém SIA pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. Získání reprodukovatelného koncentračního gradientu produktu dosáhneme přesnou synchronizací a opakovatelností jednotlivých programových kroků. Z toho vyplývá, že součástí SIA systému musí být i počítač s řídicí kartou a příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data (Obr. č. 2).



**Obr. č. 2:** Schématické uspořádání sekvenční injekční analýzy

U SIA techniky je možné provést změny dávkovaného objemu vzorku od jednotek až po stovky  $\mu\text{l}$  programováním doby otevření kanálu selekčního ventilu a tím optimalizovat disperzi zóny vzorku a citlivost stanovení. Doba trvání jednoho měřicího cyklu se pohybuje okolo 30 s; průtokové rychlosti jsou u FIA a SIA techniky téměř shodné a pohybují se okolo  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Hlavní charakteristikou techniky SIA jsou oddělené měřicí cykly, kdy jsou nejprve zóny všech činidel a vzorku dávkovány postupně do jednokanálového systému s použitím vícecestného (nejčastěji 6, 8 či 10 cestného) selekčního ventilu a pístového (peristaltického) čerpadla. Pomocí selekčního ventilu jsou řazeny zóny činidel a vzorku v mísící cívce. Pohyb toku je dále pomocí čerpadla obrácen a tím dojde k dokonalému promísení zón za vzniku reakčního produktu, který je dále detekován. Někdy se využívá uzavření zóny vzorku mezi dvě činnidla, což zvyšuje výtěžek chemické reakce.

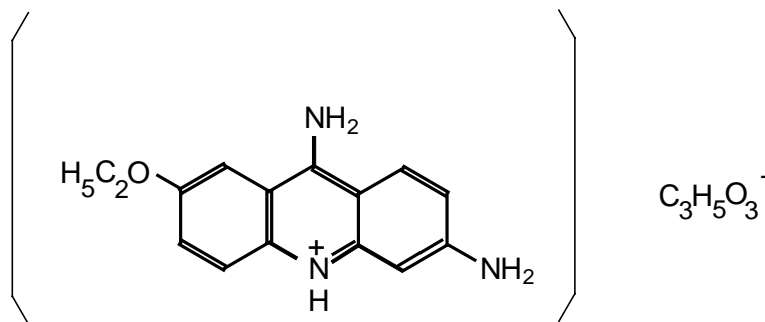
Jako detektory v SIA jsou používány spektrofotometry, fluorimetry, elektrochemické detektory atd. Získaný signál má opět tvar píku.

Výhodou SIA techniky oproti FIA je jednokanálové uspořádání s jedním ventilem. Při zastaveném toku je možno provádět i kinetická měření stejně jako u FIA. Protože SIA využívá zastavení a změnu směru toku, jsou **spotřeby vzorku a hlavně činidel podstatně nižší než u FIA**, kde je čerpání kontinuální. Velkou výhodou je i její **flexibilita**, daná snadnou změnou

parametrů měření pomocí klávesnice počítače beze změn konfigurace SIA systému. Nevýhodou SIA oproti FIA je **nižší frekvence** dávkování vzorku.

Dusitany a dusičnany jsou látky přítomné v přírodě, potravinách, průmyslových a fyziologických systémech. Stanovení dusitanů je nejčastěji prováděno přímo spektrofotometricky, elektrochemicky, chromatograficky či metodami průtokové analýzy. Dusičnany jsou ve většině případů redukovány a následně stanoveny jako dusitany.

Nejběžnější postup pro spektrofotometrickou detekci dusitanů je Griessova reakce, založená na diazotaci kyseliny sulfanilové dusitanem v kyselém prostředí a následné kopulaci vzniklé diazoniové soli s 1-naftylaminem za vzniku výrazně červeného azobarviva. Jinou možností stanovení dusitanů je jejich spektrofotometrické stanovení s rivanolem (Obr. č. 3) v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové. Toto stanovení, které je možno provádět za běžné laboratorní teploty, je založeno na tvorbě stabilního výrazně červeného produktu, který byl identifikován jako diazoniová sůl.



obr. č. 3: *Struktura rivanolu*

#### Použitá literatura:

1. Růžička J.: Flow-injection analysis (Principles tutorials and resources), Multimediální prezentace (1999)
2. Paseková H., Polášek M., Solich P.: Chemické Listy **93**, 354, (1999)
3. Hošková Š., Němcová I: Microchem. J. **41**, 296, (1990)

#### Úkol:

Stanovte obsah dusitanů ve vzorku metodou sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí. Pro stanovení použijte rivanolovou metodu.

## Přístroje a chemikálie:

Absorpční spektrometr Pye-Unicam PU 8800 (Philips-Unicam, Cambridge, Anglie) připojený k řídicímu počítači přes sériové rozhraní RS-232C (COM 1) a ovládaný vytvořeným software pro SIA aparaturu. Průtoková křemenná kyvety s vnitřním objemem 80  $\mu\text{l}$  s tloušťkou absorpční vrstvy 10,00 mm.

Programovatelná pístová pumpa s injekční stříkačkou o objemu 500  $\mu\text{l}$  (katalogové číslo 1-800-323-4390) firmy Cole-Parmer (USA) připojená k řídicímu počítači přes sériové rozhraní RS-232C (COM 2).

Programovatelná peristaltická pumpa s osmikanálovou čerpací hlavou Ismatec (Cole-Parmer, Vernon Hills, U.S.A.) připojená k řídicímu počítači přes sériové rozhraní RS-232C (COM 3).

8-cestný selekční ventil C25-3188 (Valco International, U.S.A.) řízený digitálními výstupy řídicí karty.

Řídicí karta PCI-6036E s konektorovým blokem BNC-2110 (National Instruments, U.S.A.).

Grafické programovací prostředí LabView FDS (7.1) (National Instruments, U.S.A.).

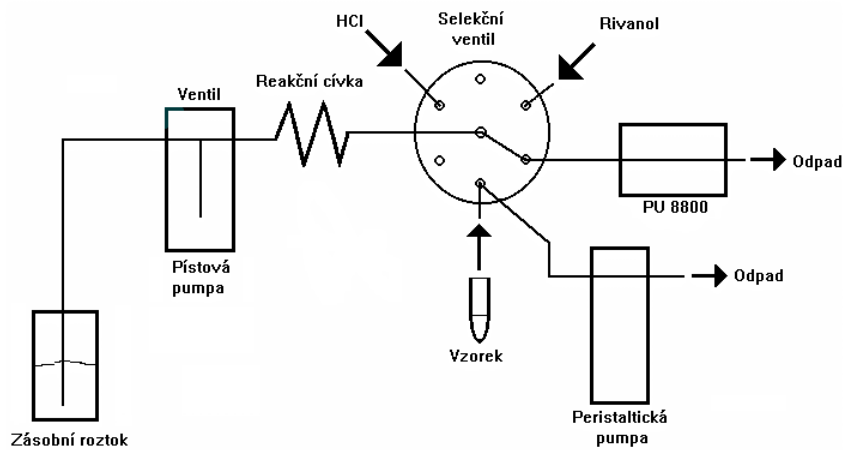
Čerpací hadička Tygon (Cole-Parmer), reakční cívka 600 mm (0,5 mm vnitřní průměr), spojovací teflonové hadičky (vnitřní průměr 0,5 mm) pro vedení všech roztoků.

Rivanol (mléčnan -2- ethoxy -6,9- diaminoakridinia), zásobní roztok o koncentraci  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ; roztok je nutno chránit před světlem. HCl o koncentraci  $1,0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Zásobní roztok  $\text{NO}_2^-$  o koncentraci  $1,000 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Odměrky, pipety.

## Pracovní postup a ovládání aparatury:

1. Ze zásobního roztoku  $\text{NO}_2^-$  o koncentraci  $1000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  připravíme sadu kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí 0 – 50  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .
2. Sestavíme aparaturu pro měření podle obrázku (Obr. č. 4) (pedagogický dozor praktika vám s propojením všech součástí aparatury a počítače poradí).
3. Zapneme spektrometr hlavním vypínačem a počkáme na proběhnutí testovacího programu; zapneme řídicí počítač a přihlásíme se do profilu „Praktika“. Provedeme inicializaci spojení spektrometru - na panelu spektrometru postupně zmáčkneme následující tlačítka: „\*“,

„MODIFY“, „ENTER“, „ENTER“ a otočíme klíčkem do polohy „LOCK/REMOTE“. Tímto je spektrometr přepnut do modu řízení počítačem.



Obr. č. 4: Zapojení SIA aparatury

- Zapneme pístové čerpadlo a peristaltickou pumpu; příslušné hadičky zasuneme do odpovídajících odměrek (zásobní roztok – destilovaná voda, vzorek, Rivanol, HCl) a do odpadní nádoby.
- Na řídicím počítači spustíme program „LabView“ a po jeho inicializaci otevřeme vlastní vytvořený řídicí software „SIA-praktika“ v adresáři „Praktika“.
- Na čelním panelu tohoto virtuálního přístroje musíme navolit následující parametry - PU 8800 (COM 1), pístové čerpadlo (COM 2), peristaltická pumpa (COM 3), vlnová délka stanovení (520) nm; dále navolíme parametry analýzy:

dávkovaný objem vzorku	<b>350</b> $\mu\text{l}$
dávkovaný objem HCl	<b>250</b> $\mu\text{l}$
dávkovaný objem rivanolu	<b>250</b> $\mu\text{l}$
průtoková rychlost vzorku	<b>3,0</b> $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
průtoková rychlost HCl	<b>2,0</b> $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
průtoková rychlost rivanolu	<b>1,0</b> $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
počet míchání	<b>2</b>

- Tím je aparatura připravena pro měření. Nejdříve proměříme jednotlivé body kalibrační závislosti včetně nulové hodnoty a potom neznámý vzorek. Všechna měření opakujeme 4 krát (nulovou hodnotu 10 krát).

Měření provádíme takto: Vstupní hadičku pro nasávání daného roztoku zasuneme do příslušného roztoku a na ovládacím panelu virtuálního přístroje pro SIA analýzu spustíme měření tlačítkem „Start“. Ovládací program nejdříve inicializuje ovládání spektrofotometru, nastaví jeho parametry měření (vlnová délka stanovení, spektrální interval, integrace); v průběhu analýzy pak před vlastním průchodem reakční směsi detektorem tento detektor vynuluje a ve vhodný časový okamžik spustí sběr absorbančních dat v čase.

Software dále inicializuje ovládání pístového čerpadla, peristaltické pumpy a selekčního ventilu a v průběhu analýzy nastavuje průtokové rychlosti i objemy čerpaných složek a ve vhodné okamžiky spouští čerpání.

Po propláchnutí celého systému je postupně do reakční cívky nasáta kyselina, vzorek a činidlo, reakční směs je dvakrát v reakční cívce promíchána a zreagovaná směs je vedena přes detektor do odpadu a celý systém je připraven na nový cyklus.

## **Vyhodnocení výsledků:**

1. Ze všech digitalizovaných časových závislostí absorbance diazoniové soli odečteme výšky SIA píků; statisticky je zhodnotíme; sestrojíme kalibrační závislost; zjistíme citlivost stanovení, mez detekce a mez stanovitelnosti. Nakonec odečteme obsah dusitanů v neznámém vzorku.
2. Z časových průběhů SIA píků odhadneme maximální frekvenci analýz za daných optimálních podmínek analýzy.

## **Poděkování:**

Děkujeme agentuře FRVŠ (projekt 275/2006) za poskytnutí finančních prostředků na zakoupení potřebné instrumentace pro provedení této úlohy (programovatelné pístové pumpy a programovatelného peristaltického čerpadla firmy Cole-Parmer s příslušenstvím, multifunkční karty a programovacího prostředí LabView firmy National Instruments pro řízení sekvenční injekční analýzy a selekčního ventilu s příslušenstvím firmy Valco).