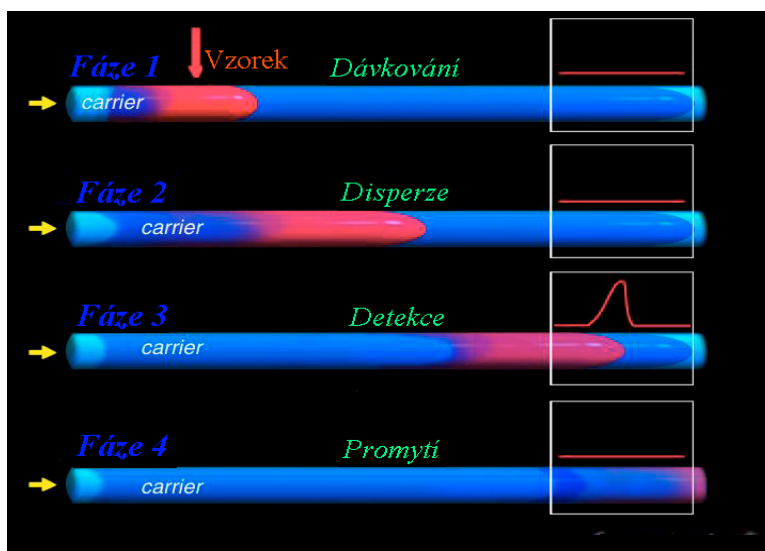


Průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí

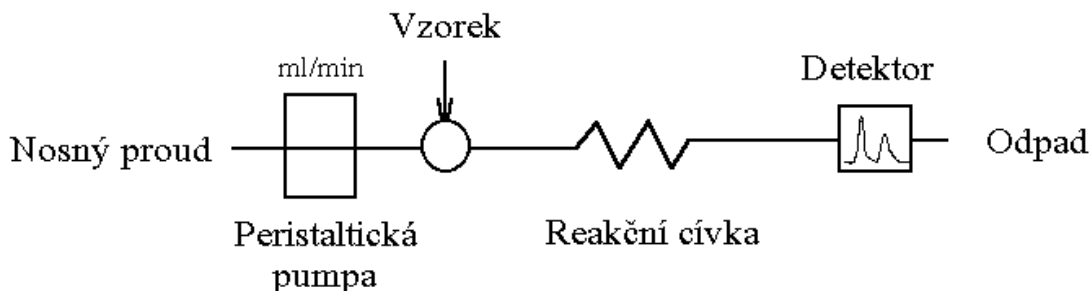
Teorie:

Průtoková injekční analýza (FIA) je analytická metoda s plynulým tokem všech roztoků, založená na vstříkovaní vzorku do proudu reagentů (Obr. č. 1).



Obr. č. 1: Princip průtokové injekční analýzy

Základní schéma FIA (Obr. č. 2) systému se skládá ze čtyř částí: **1.** zdroj proudu kapaliny - peristaltická pumpa (průtokové rychlosti asi $0,5 - 5,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$), **2.** injekční systém – dávkovací nízkotlaký šesticestný ventil se smyčkou daného objemu, **3.** reakční zóna - cívka, **4.** detektor.

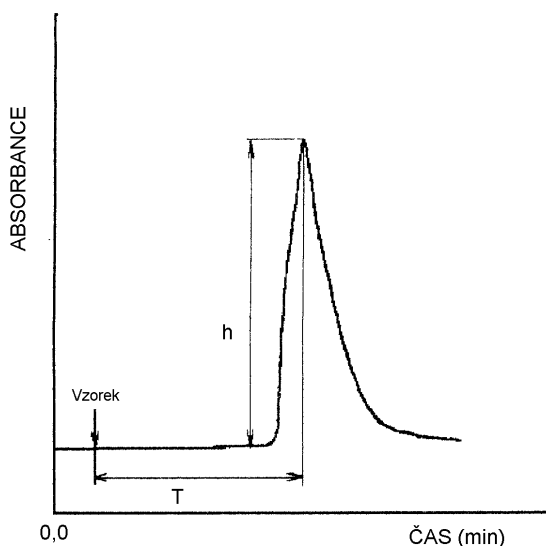


Obr. č. 2: Schéma základního zapojení průtokové injekční analýzy

Vlastní pohyb vzorku a činidel, jejich míchání a chemická reakce probíhá v teflonových nebo polyethylenových trubicích o vnitřním průměru 0,5 - 1 mm.

Výsledkem analýzy jsou za sebou jdoucí píky závislosti signálu (např. absorbance) na čase, jejich výška h je mírou analytické koncentrace (Obr. č. 3).

Vzorek je při průchodu vedením rozmýván v nosném proudu činidel a vytváří se koncentrační gradient. **Kontrolovaná disperze** je základní charakteristikou metody FIA. K disperzi vzorku může dojít přímo v rozpouštědle, kdy nedochází k chemické reakci, a nebo i při chemické reakci v proudu reagentů.



Obr. č. 3: Záznam FIA piku a důležité charakteristiky: h – Výška FIA piku, T – čas dosažení maxima analytického signálu od nástřiku vzorku

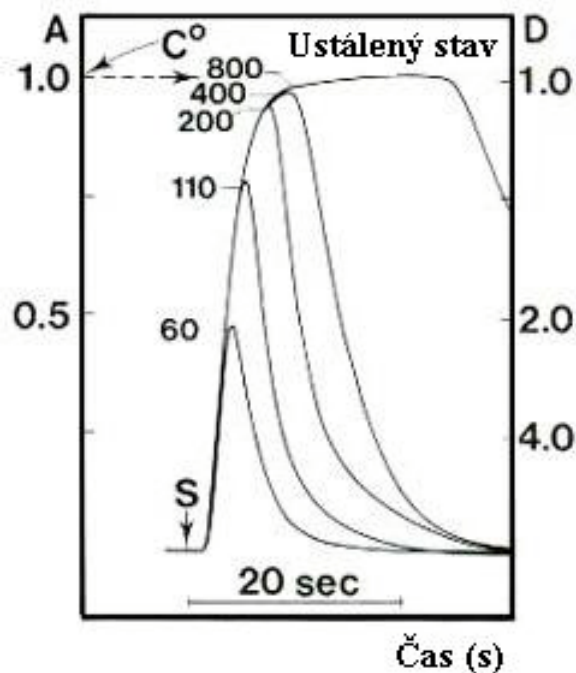
K popisu koncentračního gradientu se užívá disperzní koeficient D , který je dán poměrem počáteční koncentrace a aktuální koncentrace v daném bodě (čase):

$$D = \frac{c_0}{c} \quad (1)$$

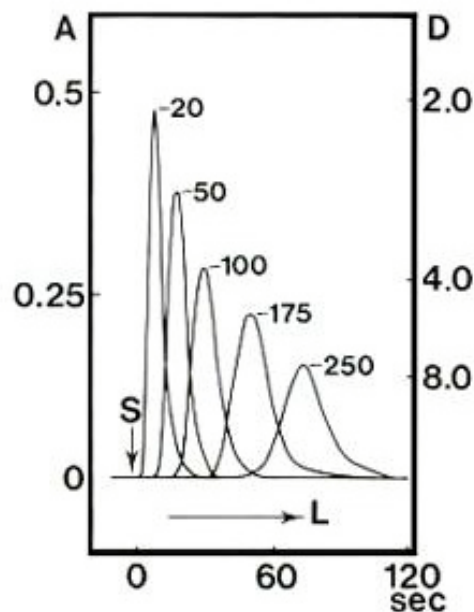
kde c_0 je počáteční koncentrace a c je aktuální koncentrace. Hodnota D je vždy větší než jedna a nejčastěji se odečítá v bodě maximální koncentrace (c_{max}), které pak odpovídá hodnota D_{max} .

Podle velikosti disperzního koeficientu rozlišujeme tři druhy disperze: omezená ($D = 1 - 3$), střední ($D = 3 - 10$) a velká ($D = 10$).

Velikost rozptýlení zóny, a tedy i tvar a výška zaznamenaného signálu, závisí na objemu vzorku (Obr. č. 4), délce reakčních cívek (délce celého vedení) (Obr. č. 5)



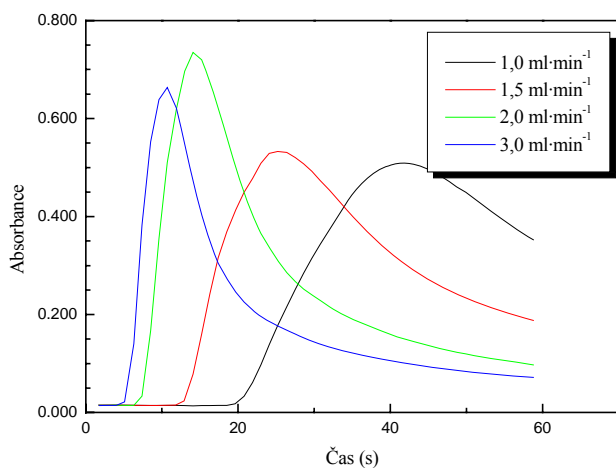
Obr. č. 4: Vliv dávkovaného objemu (μl)



Obr. č. 5: Vliv délky vedení

a na parametrech průtokového zařízení:

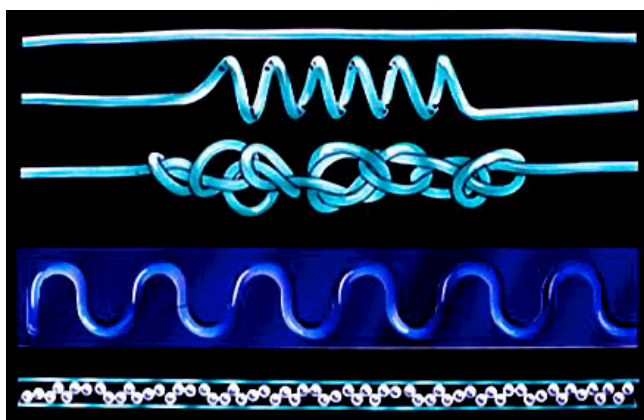
1. S objemem vzorku roste výška a šířka píku při dané hodnotě koncentrace.
2. S rostoucí délkou trubic se pík rozšiřuje a jeho výška klesá.
3. Mezi parametry ovlivňující signál patří: vnitřní průměr vedení - d , délka trubičky - L , lineární rychlost proudění kapaliny - F (čím je větší, tím je disperze menší), objemová rychlost čerpání - Q (Obr. č. 6), vnitřní objem detekční cely, geometrie systému...



Obr. č. 6: Vliv objemové průtokové rychlosti

Pro kvalitní záznam signálu v metodě FIA musí být na jedné straně dosaženo malé disperze vzorku $D = f(V_i, d, L, Q)$ a zároveň musí být poskytnut dostatečný čas T pro proběhnutí reakce $T = f(L, F, Q)$. Oba tyto požadavky jsou však protichůdné, proto je velmi důležité nalézt optimální podmínky pro provedení dané analýzy. Aby bylo dosaženo malé disperze, musí být injektováno minimálně $S_{1/2}$ objemu vzorku. Trubice mezi dávkovacím ventilem a detektorem musí být krátká a úzká. Naproti tomu pro průběh chemické reakce, je třeba velké délky trubice a menší průtokové rychlosti. Velikost disperze a symetrie signálu je také ovlivněna reaktorem, ve kterém dochází k míchání vzorku s činidly.

Reaktor může být realizován různými způsoby (Obr. č. 7):



1. přímá trubice
2. reakční cívka (nejběžněji používaná),
3. uzlový reaktor (nepravidelně zohýbaná a stočená trubice).
4. mísící komůrka
5. korálkový reaktor

Při volbě reaktoru je důležité, aby došlo k co nejrychlejšímu smísení a aby byla zvýšena intenzita radiálního míšení (vzorek při průchodu reaktorem naráží na stěny trubice, mění směr toku, ale stále platí předpoklad laminárního proudění). Naopak rychlost v axiálním směru by měla být co nejnižší. Vhodný je takový reaktor, který má konstantní průměr reakční cívky a dochází v něm k prudkým změnám toku.

Další charakteristikou sloužící k popisu koncentračního gradientu je vedle disperzního koeficientu disperzní faktor $b_{1/2}$:

$$b_{1/2} = \frac{t_{1/2}}{T} = \frac{S_{1/2}}{V_r}$$

kde V_r je celkový objem reaktoru, $t_{1/2}$ je čas k dosažení 50% ustáleného stavu a T je čas proběhnutí chemické reakce.

Pro sériové analýzy je maximální frekvence dávkování vzorku S_{\max} dána vztahem:

$$S_{max} = \frac{60}{t_b} = \frac{15Q}{S_{1/2}}$$

kde t_b je šířka píku při základně.

Ve FIA metodě je obecně nutné zajistit bezpulsní tok všech chemikálií a přísně reprodukovatelný vnesený objem vzorku. Pro detekci ve FIA systému je možné použít jakýkoliv detektor vhodný pro daný reakční produkt v kombinaci s průtokovou kvyetou (vnitřní objem několik desítek μl).

Mezi detektory využívající optické vlastnosti látek patří: fotometrické, citlivější fluorimetrické, detektory využívající chemiluminiscenci, detektory refraktometrické, AAS, ICP, plamenná fotometrie. Z elektrochemických detektorů lze použít iontově selektivní elektrody a vodivostní nebo coulometrické detektory.

Použitá literatura:

1. Růžička J., Hansen E.H.: Flow-injection analysis, 2nd Ed. Wiley, New York (1988)
2. Valcárcel M., Luque de Castro M.D.: Flow injection analysis, Ellis Horwood Chichester (1987)
3. Růžička J.: Flow-injection analysis (Principles tutorials and resources), Multimediální prezentace (1999)

Úkol:

Zjistěte vliv následujících parametrů na disperzi vzorku v metodě průtokové injekční analýzy: objemová průtoková rychlost nosného proudu, délka reaktoru, dávkovaný objem.

Chemikálie a přístroje:

Methylenová modř, destilovaná voda, odměrné baňky, pipety, kádinky.
Programovatelná peristaltická pumpa s osmikanálovou čerpací hlavou Ismatec (Cole-Parmer, Vernon Hills, U.S.A.), teflonový nízkotlaký dávkovací ventil s různými dávkovacími smyčkami (100 μl , 250 μl , 500 μl , 1000 μl) (Rheodyne, U.S.A.), čerpací hadičky Tygon (Cole-Parmer), reakční cívky různých délek (200, 400, 600, 800, 1000 mm), spojovací teflonové hadičky (vnitřní průměr 0,5 mm).

Diode-array spektrofotometr HP 8453 (Hewlett Packard, U.S.A.) s řídicím počítačem a ovládacím softwarem UV-VIS ChemStation; průtoková kyveta vnitřního objemu 80 μl s tloušťkou absorpční vrstvy 10,00 ml (Hellma).

Pracovní postup:

1. Sestavíme aparaturu podle obr. č. 2, připravíme roztok methylenové modři o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (50 ml). Při všech měřeních bude nosným proudem destilovaná voda. Ovládání diode-array spektrometru je uvedeno níže. Všechna měření budou prováděna při vlnové délce 650 nm.
2. Nejprve určíme hodnotu absorbance samotného roztoku methylenové modři o dané koncentraci (ustálený stav – proměříme spektrum roztoku v kyvetě s tloušťkou absorpční vrstvy 10,00 mm). Tuto hodnotu použijete pro výpočet příslušných disperzních koeficientů D_{max} .
3. Při proměřování vlivu dávkovaného objemu na signál dávkujeme vzorek v těchto objemech: 30 μl (spojení nakrátko), 100 μl , 250 μl , 500 μl , 1000 μl , 1500 μl , 2000 μl (průtoková rychlost 2,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, délka reakční cívky 1000 mm).
4. Při proměřování vlivu průtokové rychlosti Q ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) na disperzi vzorku proměřte rozmezí průtokových rychlostí: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. (délka reakční cívky je 1000 mm, dávkovaný objem 250 μl).
5. Při proměřování vlivu délky reaktoru na disperzi vzorku proměřte délky reakční cívky: 0; 200; 400; 600; 800; 1000 mm. (průtoková rychlost 2,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dávkovaný objem 250 μl).

Ovládání spektrofotometru a řídicího software:

K záznamu signálu nadávkovaného vzorku methylenové modři použijeme spektrofotometr s diodovým polem 8453 firmy Hewlett-Packard. Tento spektrometr lze snadno aplikovat pro měření absorbance v čase. Přístroj je řízen počítačem přes řídicí software UV-VIS ChemStation.

Postup ovládání přístroje je následující: nejdříve zapneme spektrometr hlavním vypínačem a počkáme na proběhnutí testovacího programu; ukončení se projeví zeleným zabarvením kontrolní LED diody. Zapneme řídicí počítač a přihlásíme se do profilu „Praktika“; na ploše spustíme ovládací software ikonou „UV-VIS on-line“. Při inicializaci programu se musíme přihlásit jako uživatel „Praktika“ (bez hesla). Po skončení inicializace musíme nastavit

parametry měření; tyto podmínky jsou již v paměti počítače uloženy v adresáři „D:\Pokročilá praktika\praktika.m“. Spektrofotometr se nastaví na měření při jedné vlnové délce (650 nm), absorbance je odečítána každou 0,5 s po dobu 60 s. V případě potřeby je možné měření prodloužit (např. na 120 s; v podokně „Setup“). Spektrometr vynulujeme tlačítkem „Blank“. Vlastní měření provádíme tlačítkem „Time measurement“; musíme zadat název souboru do kterého se uloží naměřená data a vlastní analýzu spustíme tlačítkem „Start“. Po uplynutí nastavené doby se měření ukončí, data se zapíše na harddisk počítače a výsledný FIA záznam se objeví v grafu na obrazovce. Pro další zpracování závislostí je potřeba exportovat změřená data do formátu vhodného pro zpracování v tabulkovém procesoru: pravým tlačítkem myši klikneme na křivku získaného záznamu (tím označíme křivku) a z nabídky „File“, „Export selected data“ vybereme možnost „Export .csv“; křivku opět pomocí pravého tlačítka myši odznačíme a můžeme proměřovat další vzorek. **Při proměřování všech vzorků vždy současně dávkujeme vzorek do nosného proudu se stlačením tlačítka „Start“ na obrazovce software spektrofotometru.**

Vyhodnocení výsledků:

1. Z uložených závislostí absorbance na čase pro jednotlivá měření vyneseme do grafu výsledné časové průběhy signálu v závislosti na daném sledovaném parametru (celkem 3 grafy), spočteme jednotlivé hodnoty D_{max} , a do dalších 3 závislostí vyneseme vliv daného parametru (dávkovaný objem, objemová průtoková rychlost, délka reakční cívky) na hodnotu D_{max} .
2. Z výsledných závislostí D_{max} / parametr navrhnete optimální hodnotu parametru pro stanovení methylenové modři.
3. Z vámi získaných hodnot určete parametry v závislostech $D_{max} = f(V_i^x; L^y; Q^z)$.
4. Zjistěte maximální frekvenci analýz S_{max} .

Poděkování:

Děkujeme agentuře FRVŠ (projekt 275/2006) za poskytnutí finančních prostředků na zakoupení programovatelného peristaltického čerpadla Cole-Parmer.