

VAN RENSBURG A

DIE GEBRUIK VAN DIALISE IN VLOEI-INSPUITANALISE

MSc (Chemie)

UP

1989

DIE GEBRUIK VAN DIALISE IN VLOEI-INSPUITANALISE

Mei 1989

Voorgelê vir die graad MSc (Chemie)

Âncel van Rensburg

Departement Chemie

Fakulteit Wis- en Natuurkunde

Universiteit van Pretoria

Pretoria

Bedankings:

Hiermee betuig die skrywer haar dank teenoor:

professor J.F. van Staden, haar studieleier, vir sy hulp en entoesiasme met die projek,

haar vader, mnr. Roelf van Rensburg vir die redaksionele versorging van die verhandeling,

vriende by die Universiteit van Pretoria vir hulp en aanmoediging met die projek.

Die gebruik van dialise in vloeï-inspuitanalise

deur

Ancel van Rensburg

Leier: Professor Jacobus F. van Staden

Departement Chemie, Universiteit van Pretoria

Graad: Magister Scientiae

SAMEVATTING

Die groot groei in analitiese chemie en veral analitiese biochemie, in die afgelope dekade het die noodnag vir outomatiese analitiese sisteme sterk na vore gebring. Die oorgrote meerderheid van outomatiese sisteme is vloeï-inspuitanalitiese sisteme (FIA-sisteme). Hierdie FIA-sisteme werk volgens 'n proses waardeur die konsentrasie van 'n analiet in 'n ononderbroke stroom vloeistof bepaal word. In hierdie sisteme word 'n groot aantal monsters langs dieselfde pad gevoer ('n bepaalde lengte buis) deur die analiseerder, terwyl reagentiese langs die pad op strategiese punte bygevoeg word. Vermenging, inkubasie en reaksies vind plaas terwyl die monster onderweg is na 'n deurvloeï-deteksiesisteme waar die konsentrasie van die gevormde produk kontinu bepaal en geregistreer word. Met hierdie metode kan 'n groot aantal monsters in 'n kort tydjie met baie hoë akkuraatheid geanaliseer word. Nog voordele van hierdie sisteme is dat 'n baie klein monstervolume (mikroliters) nodig is vir die bepaling, minimale hoeveelhede reagentiese word benodig en soos

daar in hierdie navorsing aangetoon word, kan daar selfs 3 verskillende bepalinge gelyktydig op een monster gedoen word.

Die FIA-sisteme is geskik vir 'n wye verskeidenheid monsters. Biologiese monsters is ook reeds met groot sukses deur FIA geanaliseer. Daar is baie steurings wat die analise van biologiese monsters kan bemoeilik. Om hierdie steurings te verwyder, kan in baie gevalle tydrowend en duur wees. Die steurings word in hierdie metode gelyktydig met die bepaling deur dialise verwyder. Die dialiseproses neem dus geen ekstra tyd in beslag nie en dien terselfdertyd as 'n verdunningsstap en skei ook die vry en gebonde ione wat bepaal moet word.

Dialise, gepaard met vloeï-inspuitanalise, is nog nie deur baie navorsers gebruik of ondersoek nie. In hierdie navorsingsprojek is daar gepoog om veranderlikes wat dialise beïnvloed te ondersoek. Daar is ook na verskillende tipes en lengtes membrane gekyk en daar is ook aangetoon dat dialise nie slegs in teorie 'n nuttige toevoeging tot 'n FIA-sisteme is nie, maar ook groot moontlikhede in die praktyk skep. Die dialisesisteme is gebruik om eerstens totale en vry kalsium in melk gelyktydig te bepaal, deur atoomabsorpsie-spektroskopie (AAS) en spektrofotometrie onderskeidelik. In 'n tweede opstelling is totale en vry kalsium sowel as chloried in melk gelyktydig bepaal. Die kalsium is deur dieselfde metodes as in die eerste geval bepaal, terwyl die chloried met behulp van 'n deurvloei-chloriedselektiewe elektrode bepaal is. In 'n derde bepaling is sulfaat bepaal deur die indirekte bepaling van barium.

Uit hierdie studie is dit duidelik dat dialise in vloeï-inspuitanalitiese sisteme 'n nuttige metode is wat verskeie

elemente in biologiese monsters, sonder enige addisionele
behandeling, kan bepaal.

The use of dialysis in flow-injection analysis

by

Ancel van Rensburg

Supervisor: Professor Jacobus F. van Staden

Department of Chemistry, University of Pretoria

Degree: Master of Science

SYNOPSIS

The growth in analytical chemistry and in particular analytical biochemistry during the last decade, highlighted the necessity for automatic analytical systems. The majority of automated systems are flow-injection analytical systems. These systems operate according to a process in which the concentration of the analyte is measured continuously in a stream of liquid. In this context, successive samples pass through the same path (length of tubing) in the analyser while reagents are being added at strategic points. The mixing and incubation of the sample and reagents takes place while the sample solution is on its way towards a flow-through cuvette, where the signal is continuously monitored and recorded. With the use of this method it is possible to analyse a large number of samples with high accuracy, in a very brief space of time. Some of the advantages of this system is the use of small sample volumes (microlitres), small amounts of reagents are used and as demonstrated by this research is also possible

to determine three different elements simultaneously in one sample.

This method can be used on a wide variety of samples. Biological samples can also be analysed with success, however a large number of interferences can complicate the analysis of biological samples. The removal of these interferences can be time consuming and expensive. By this method, on the other hand, interferences are removed simultaneously with the determination by means of dialysis. The dialysis process also acts as diluter and separator of total and free ions to be determined.

Dialysis in conjunction with flow-injection analysis has not been investigated by many researchers. In this project we took a closer look at the parameters affecting dialysis. Different types of membranes and different lengths were also investigated. Through this investigation it became clear that dialysis is not only theoretically a useful addition to flow-injection analytical systems, but it also creates great opportunities for analysis in practise.

In the first instance the dialysis system was used for the simultaneous determination of total and free calcium in milk by atomic absorption spectroscopy (AAS) and spectrophotometry respectively. Secondly the total and free calcium as well as chloride in milk were determined simultaneously. The calcium was determined in the same way as in the first approach, while the chloride was determined by a flow-through chloride selective electrode. In the third instance the dialysis system was used for the indirect determination of sulphate, making use of an indirect barium determination. Through this study it became clear that dialysis as part of a flow-injection analytical system can be utilized in the

analysis of biological samples, without any additional treatment of samples.

INHOUDSOPGAWE

HOOFSUK 1	1
Inleiding en doelstellings	1
HOOFSUK 2	3
Die beginsels van vloei-inspuitanalise	3
2.1 Inleiding	3
2.2 Historiese oorsig	3
2.3 Noodsaaklike eienskappe van FIA	4
2.4 Vergelykings met ander metodes	6
2.4.1 FIA en handmetodes	6
2.4.2 FIA en SFA (kontinue vloei-analise)	6
2.4.3 FIA en chromatografie	9
2.5 Dispersie as 'n komponent van FIA	11
2.6 Die basiese komponente van FIA	15
2.7 Deteksiesisteme	19
2.7.1 Elektrochemiese detektore	19
2.7.2 Optiese detektore	21
2.8 Tweefase-FIA-metodes	23
HOOFSUK 3	25
Membraanskeidings in vloei-inspuitanalise	25
3.1 Inleiding	25
3.2 Teoretiese agtergrond	27
3.3 Eksperimenteel	36
3.3.1 kalsiumbepaling	36
3.3.1 a) Reagense	36
3.3.1 b) Apparaat	37
3.3.2 Chloriedbepaling	37

3.3.2 a) Reagense	37
3.3.2 b) Apparaat	38
3.4 Resultate en bespreking	39
3.4 a) Inleiding	39
3.4 b) Vloeitempo van skenker- en ontvangerstroom	39
3.4 c) Rigting van vloei in skenker- en ontvangerstrome	40
3.4 d) Samestelling van skenker- en ontvangerströme	41
3.4 e) Konsentrasie analiet in die skenkerstroom	42
3.4 f) Volume monster ingespuut	43
3.4 g) Membraantipes	43
 HOOFSTUK 4	 52
Tweekomponent-analise met behulp van dialiseerders; gelyktydige bepaling van totale en vry kalsium in melk	52
4.1 Inleiding	52
4.1.1 Bepaling van kalsium deur atoomabsorpsie- spektroskopie	52
4.1.2 Bepaling van kalsium deur kolorimetriese metodes	53
4.1.3 Bepaling van kalsium deur vloei-inspuitanalise	55
4.2 Eksperimeteel	56
4.2.a) Reagense	56
4.2.b) Apparaat	57
4.3 Resultate en bespreking	60
 HOOFSTUK 5	 65
Driekomponent-analise met behulp van dialiseerders; Die gelyktydige bepaling van totale en vry kalsium, en chloried in melk.	65
Inleiding	65
5.1.1 Gelyktydige bepaling met verskillende detektore	66
5.1.1.1 Die gebruik van seriedetektors	66
5.1.1.2 Die gebruik van paralleldetektors	67

5.1.2 Gelyktydige bepaling met 'n enkele detektor	70
5.1.2.1 Bepaling met opeenvolgende inspuitings	70
5.1.2.2 Bepaling met 'n enkele inspuiting	70
5.2 Eksperimenteel	72
5.2.1 Kalsiumbepaling	72
5.2.1 a) Reagense	72
5.2.2 Chloriedbepaling	73
5.2.2 a) Reagense	73
5.2.2 b) Apparaat	73
5.2.2 c) Konstruksie van die bedekte buisvormige elektrode	74
5.3 Resultate en bespreking	76
HOOFSUK 6	81
Sulfaatbepaling met behulp van die indirekte bariumbepaling	81
6.1 Inleiding	81
6.2 Eksperimenteel	84
6.2 a) Reagense	84
6.2 b) Apparaat	85
6.3 Resultate en bespreking	87
HOOFSUK 7	90
Gevolgtrekking en Algemene bespreking	90
VERWYSINGS	93

HOOFSTUK 1

INLEIDING EN DOELSTELLINGS

Die behoefte aan vereenvoudiging en outomatisering is nie 'n nuwigheid wat in die afgelope dekade of twee ontstaan het nie, maar duur reeds eeue lank. 'n Advertensie van Kodak het reeds in 1888 gesê: " You press the button and we'll do the rest¹." Hierdie beginsel kan maklik op vloeï-inspuitanalise toegepas word. Met slegs die druk van 'n knoppie kan 'n groot aantal monsters teen 'n baie hoër tempo en akkurrater geanaliseer word as wat die persoon wat die knoppie druk dit self sou kon doen. Die substitusie van die gemeganiseerde prosesse vir metodes wat oorspronklik met die hand gedoen is soos pipettering, vermenging, skeiding, meting en weggooi van die afval, maak dit ook moontlik om die volumes van reagense en monsters aansienlik te verminder sonder die verlies van akkuraatheid of herhaalbaarheid. Dus word materiaal sowel as tyd gespaar. FIA is werklik 'n mikrochemiese tegniek. dus sal 'n goed ontwerpte FIA-instrument maklik op 'n tafelblad pas en sal sekerlik met verdere ontwikkeling nog kleiner word.

Die enigste beperkings in die ontwikkeling van FIA-sisteme is beperkings in tyd en geld om navorsing oor die onderwerp te doen. Daar is reeds 'n magdom metodes beskikbaar wat vir FIA-sisteme aangepas is en feitlik enige monster kan met hierdie metodes geanaliseer word. Biologiese materiaal is een van die weinige oorblywende tipe monsters waarmee daar nog probleme ondervind word. Die spesifieke aard van die biologiese monsters

- byvoorbeeld kleur en tekstuur - kan soms probleme skep, veral by spektrofotometriese bepalings. Die samestelling van so 'n monster kan ook analyses beïnvloed, byvoorbeeld proteïene of vette wat aan buiswande of meetapparaat vasheg. Selwande of heelselle in byvoorbeeld bloed kan betekenisvolle verskille in analitiese waardes veroorsaak, om aan die verstopping van die buissisteme nie eers te dink nie. Uit bogenoemde probleme is dit duidelik dat biologiese monsters, of enige ander monster wat groot hoeveelhede onsuiverhede bevat, op die een of ander wyse eers gesuiwer moet word om dit toeganklik te maak vir 'n FIA-sisteem. Die ideaal is ook om 'n suiweringsproses by die FIA-sisteem in te sluit om vooraf behandeling van monsters tot 'n minimum te beperk.

Die gebruik van dialise in die FIA-sisteem is in hierdie projek ondersoek. Dit is 'n goedkoop proses, komponente is maklik verkrygbaar en kan sonder moeite in 'n FIA-sisteem ingeskakel word. Deur die vloeitempo's van reagentse of lengte van die dialisemembraan te varieer, kan die hoeveelheid stof wat bepaal gaan word maklik beheer word en is dit dus maklik om met konsentrasies te werk wat presies in die bepalingsgebied van die spesifieke metode val, sonder enige addisionele verdunning. In hierdie projek is daar gepoog om meer oor die membrane, die dialiseproses sowel as die wye toepassingsgebied van dialise in FIA te wete te kom.

HOOFSTUK 2

DIE BEGINSELS VAN VLOEI-INSPUITANALISE

2.1 INLEIDING

Gesegmenteerde kontinue analise (SFA) is vir die eerste keer in die laat 1950's deur Skegg bekend gestel². Hierdie beginsel was een van die eerstes waarvolgens bepalinge wat voorheen met die hand gedoen moes word, outomaties gedoen kon word. Die toepassing van hierdie beginsel het nie slegs gelei tot 'n verhoging in die bepalingstempo van monsters nie, maar het ook tot 'n verhoging in akkuraatheid, reproduseerbaarheid en betroubaarheid van roetinewerk gelei. In die jongste tyd het die belangstelling in vloei-analise egter baie toegeneem. Die rede hiervoor is die groeiende belangrikheid van vloei-analise. Aangesien daar daaglik 'n verhoging in die aantal monsters is wat bepaal moet word is daar 'n verhoogde vraag na in-tydse beheer van nywerheidsprosesse. Vloei-inspuitanalise (FIA) het die bevrediging van hierdie vereistes moontlik gemaak.

2.2 HISTORIESE OORSIG

Die ontstaan en ontwikkeling van vloei-inspuitanalise is 'n baie kontroversiële onderwerp, en dis nie altyd maklik om die ware feite te onderskei nie.

K.K. Stewart, hoof van die eerste Amerikaanse navorsingspan wat in 1974 resultate oor FIA gepubliseer het³, het in 'n baie bekende publikasie gesê⁴ dat wanneer 'n nuwe tegniek aan die analitiese chemie-gemeenskap bekend gestel word, dit normaalweg die geval is dat die proses die somtotaal is van verskeie individuele beginsels wat deur verskillende navorsers daargestel is. Hy vermoed dat die eerste bydrae tot FIA die monster was wat direk in die vloeiende stroom ingespuit is, in die gaschromatografiese tegniek wat deur die Nobelprysweners James en Martin in 1957 ontwikkel is. Dit was egter Ruzicka se span in Denemarke wat die beskrywing "vloei-inspuitanalise" voorgestel het⁵. Hulle het gesê dat FIA drie unieke eienskappe het, naamlik monster-inspuiting, gekontroleerde dispersie en reproduseerbare tydsberekening⁶. Die basiese teoretiese agtergrond van hierdie tegniek is in fyn besonderhede beskryf deur Ruzicka en Hansen^{7,8}, Reijn et al.⁹, Vanderslice et al.¹⁰, en Paiton en Mottola¹¹. Die voordele van hierdie tegniek is in fyn besonderhede bespreek deur Ruzicka en Hansen^{7,8}, Betteridge¹², Ranger¹³, en Van Staden¹⁴. Volgens kenners op die gebied van FIA is die mees objektiewe beskouing oor geskiedkundige aspekte van FIA gegee deur Mottola in 1981¹⁵. Hierdie publikasie begin met die Bybelse aanhaling: "Gee die keiser wat hom toekom en gee aan God wat Hom toekom." Hy het dus gepoog om so ver dit moontlik was by die geskiedkundige feite te bly sonder om enige van die ware voorlopers te na te kom.

2.3 NOODSAAKLIKE EIENSKAPPE VAN FIA

Indien daar opsommend na 'n FIA-sisteem gekyk word, kan so 'n sisteem in 'n paar noodsaaklike komponente opgedeel word, naamlik:

1. Die vloeï word nie gesegmenteer deur lugborrels nie, wat 'n fundamentele verskil tussen FIA en die klassieke kontinue vloeï-metodes is:
2. Die monster word direk in die stroom ingespuï, in plaas daarvan dat die monster daarin geaspireer word.
3. Die ingespuïte prop word met die sisteem langs vervoer. 'n Proses soos 'n chemiese reaksie, dialise, vloeïstof-vloeïstof-ekstraksie, ens., mag ook plaasvind.
4. Die gedeeltelike dispersie of verdunning van die analiet deur die transportsisteem kan gemanipuleer word deur beheer van die geometriese en hidrodinamiese karaktereïenskappe van die sisteem.
5. 'n Kontinue waarnemingsisteem gee 'n kontinue sein wat toepaslik geregistreer word.
6. Wanneer die sein gelees word, is daar nog nie fisiese ewewig (die homogenisasie van 'n gedeelte van die vloeï) of chemiese ewewig (volledigheid van die reaksie) bereik nie. Die FIA-metodes is dus hoogs afhanklik van die tyd van die bepaling.
7. Die tydsberekering moet dus hoogs reproduseerbaar wees aangesien lesings geneem word voor die reaksies voltooi is, en 'n klein variasie in tyd mag groot verskille in die resultate tot gevolg hê.

2.4 VERGELYKINGS MET ANDER METODEDES

Een van die beste maniere om enige nuwe analitiese tegniek te beskryf, is deur dit te vergelyk met die metodes wat deur die nuwe tegniek vervang word.

2.4.1 FIA EN HANDMETODES

Die hoofdoel van FIA is om tyd, reagentse en glasware wat met die handmetodes gepaard gaan, te bespaar. Dis ook baie handig wanneer daar met giftige stowwe gewerk word, aangesien die analis nie direk met die giftige stowwe in aanraking hoef te kom nie.

2.4.2 FIA EN SFA (KONTINUE VLOEI-ANALISE)

Fig. 2.1 toon 'n diagram van FIA en die klassieke SFA-tegniek (gesegmenteerde vloei-analise) wat deur Skeggs² ontwikkel is.

Lugsegmentasie, wat die belangrikste verskil tussen die twee metodes is, kom slegs by SFA voor en het die volgende voordele.

1. Voorkom kruiskontaminasie tussen monsters.
2. Verlaag die verdunning en dispersie van die monster wat ingespuut is.
3. Veroorsaak 'n turbulente vloei deur die borrels saam te pers, waardeur beide fisiese (homogenisasie van die sone tussen twee borrels) en chemiese ewewig (deeglike vermenging van reagentse en monster) verkry kan word.

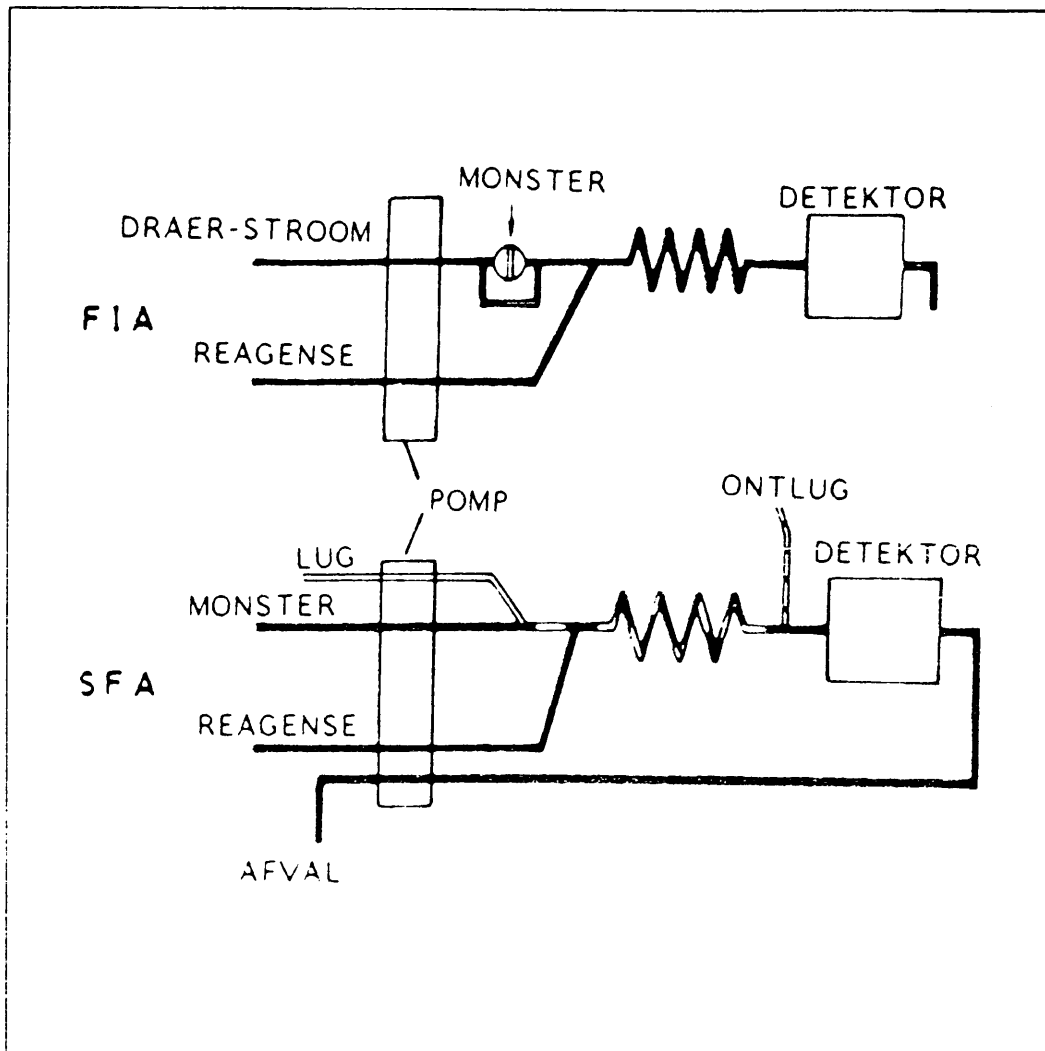


Fig. 2.1 - Skematiese vergelyking tussen FIA en SFA. Tipiese ranskikkings.

Ten spyte van die voordeel van segmentasie, is daar 'n paar groot nadele aan SFA-sisteme verbonde:

1. Die tegniese kompleksiteit van die sisteme maak dit uiters moeilik om aan te pas op 'n mikroskaal.
2. Die saamdrukbaarheid van die borrels veroorsaak 'n pulsering in die sisteem, wat resultate kan beïnvloed.

3. Die sisteem benodig sekere meganismes wat herhaalbare vorming en verwydering van lugborrels verseker.
4. Die lae kontaktyd verlaag die effektiwiteit van kontinue skeidingstegnieke (dialise, vloeistof-vloeistof-ekstraksie).
5. Statiese elektrisiteit mag vorm, wat die respons van elektrochemiese detektors sal steur.
6. Die tydsberekening vir die stop en die begin van die pomp, in die ontwikkeling van stopvloeikinetiese metodes, is nie herhaalbaar nie.
7. Die vloeitempo is moeilik beheerbaar in die teenwoordigheid van lugborrels as gevolg van verskeie interaksies tussen die lug en materiale wat in die SFA-sisteem voorkom.

Die afwesigheid van lugborrels in die FIA-sisteem is die rede dat FIA 'n belangrike analitiese tegniek is, aangesien:

- meer herhaalbare vloeitempo's verkry word;
- die apparaat wat benodig word eenvoudig en dus relatief goedkoop is;
- die sisteem maklik aangepas kan word om op mikroskaal te werk;
- die metingstempo baie hoog is;
- en die analitiese potensiaal en toepassingsmoontlikhede baie wyd is.

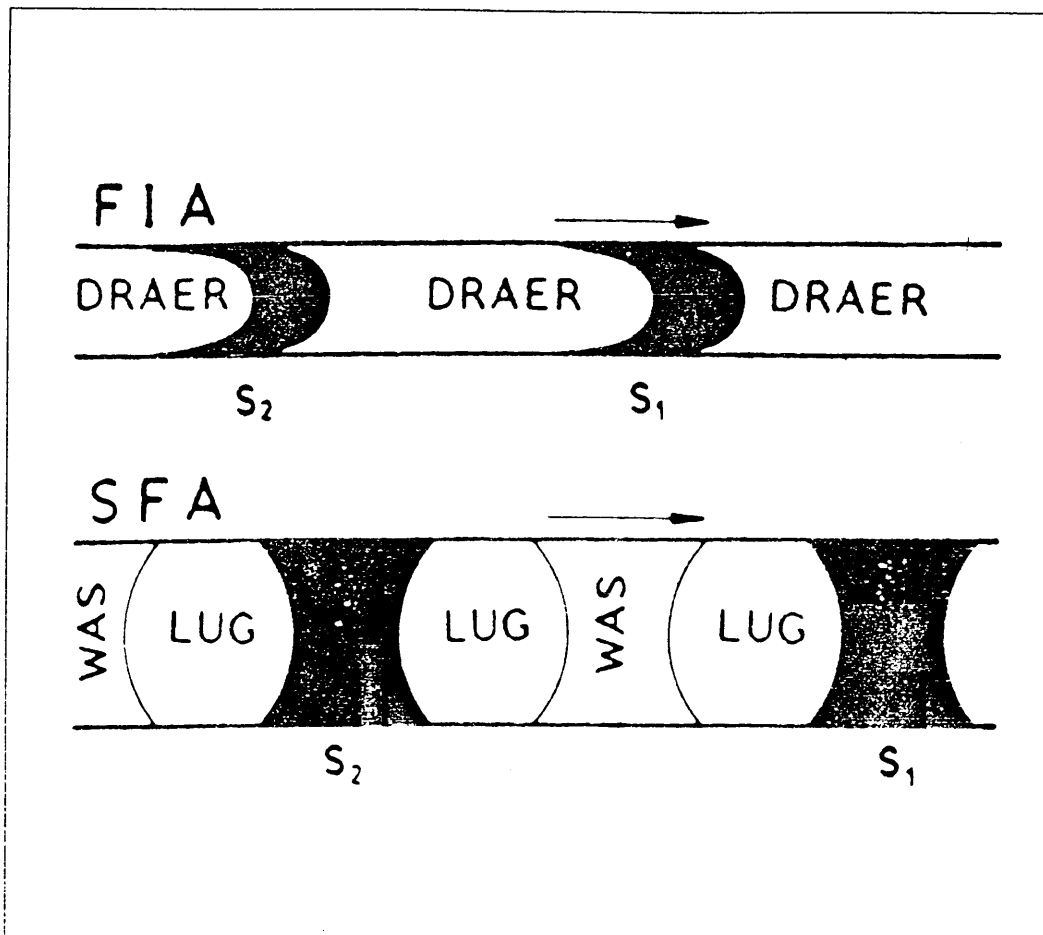


Fig. 2.2 - Skematiese diagram van die vloei in FIA- en SFA-sisteme na inspuiting of aspirasie van twee opeenvolgende monsters S_1 en S_2 .

2.4.3 FIA EN CHROMATOGRAFIE

By nadere inspeksie is dit duidelik dat FIA in 'n baie groter mate met chromatografie ooreenstem as wat die geval was met die klassieke gesegmenteerde kontinue vloei-metodes. Volgens Ranger¹³ is FIA 'n hibried van SFA en hoëdruk-vloeistofchromatografie. Die verskille tussen hoëdruk-vloeistofchromatografie en FIA word in tabel 2.1 aangedui.

Tabel 2.1 Vergelyking tussen FIA en hoëdruk-vloeistofchromatografie (HPLC)

EIENSKAP	HPLC	FIA
STEURINGS	altyd	soms
KOLOM	essensiëel	moontlik
DRUK	hoog	laag
DATA GEPRODUSEER	piekhoogte, area, wydte, piek na piek- afstand	piekhoogte, area
KOSTE	hoog	laag
TOEPASLIKHEID	beperk	groot
HOOF ANALITIESE DOEL	verskeie komponente in 'n enkele monster	beperkte aantal komponente in baie monsters

Die volgende ooreenkomste tussen FIA en HPLC moet egter beklemtoon word: verkleiningskapasiteit, inspuit van die monster, ongesegmenteerde vloei, klein monstervolume, seinprofiel en 'n veranderbare vloeitempo. Nieteenstaande al die

ooreenkomste is daar belangrike verskille waarvan die belangrikste sekerlik die basiese beginsel is, aangesien daar altyd steurings by HPLC voorkom wat die skeiding van 'n mengsel stowwe wat deur die kolom beweeg, belemmer, terwyl dit nie algemeen by FIA voorkom nie. Ten spyte daarvan dat sekere FIA-metodes ontwikkel is met die hulp van HPLC-komponente, is tipiese FIA-sisteme baie eenvoudiger, aangesien hulle nie aan hoë druk onderwerp hoef te word nie. As gevolg hiervan is HPLC-instrumente wat baie minder data verskaf, soveel duurder.

Die toepassingsmoontlikhede van die twee tegnieke verskil aansienlik. Die basiese doel van 'n HPLC-instrument is om 'n komplekse mengsel van stowwe te skei en te analiseer, terwyl FIA hoofsaaklik poog om 'n beperkte aantal analiete vinnig en akkuraat in 'n groot aantal monsters te bepaal.

2.5 DISPERSIE AS 'N KOMPONENT VAN FIA

Die eksperimentele toestande wat voorkom by FIA veroorsaak normaalweg 'n onvolledige vermenging van die monster wat ingespuit is in die draerstream met twee belangrike gevolge:

1. Vermenging is tyd-afhanklik en kom dus tot verskillende mates voor by verskillende punte in die vloeistroom.
2. Die herhaalbaarheid van die vermenging is hoogs reproduceerbaar van monster tot monster.

Die fisiese grondslag van FIA is verbind aan dispersie, wat gedefinieer word as die verdunning wat ondergaan is deur 'n monstervolume wat in die vloeistroom ingespuit is. Die dispersie word gekarakteriseer deur die konsentrasieprofiel wat aangeneem

word deur 'n sone of prop wat op 'n bepaalde plek in die sisteem ingevoeg is, sonder om die vloei te stop.

Wanneer daar na die teoretiese beginsels van FIA gekyk word, moet daar altyd in aanmerking geneem word dat daar nie slegs chemiese faktore betrokke is nie, maar ook fisiese faktore wat dispersie beïnvloed. Alhoewel vroeë werkers aangeneem het dat turbulente vloei nodig is om kruiskontaminasie uit te skakel⁵, is daar later gevind dat die vervoer¹⁶ van materie in die pypies hoofsaaklik volgens laminêre vloei geskied.

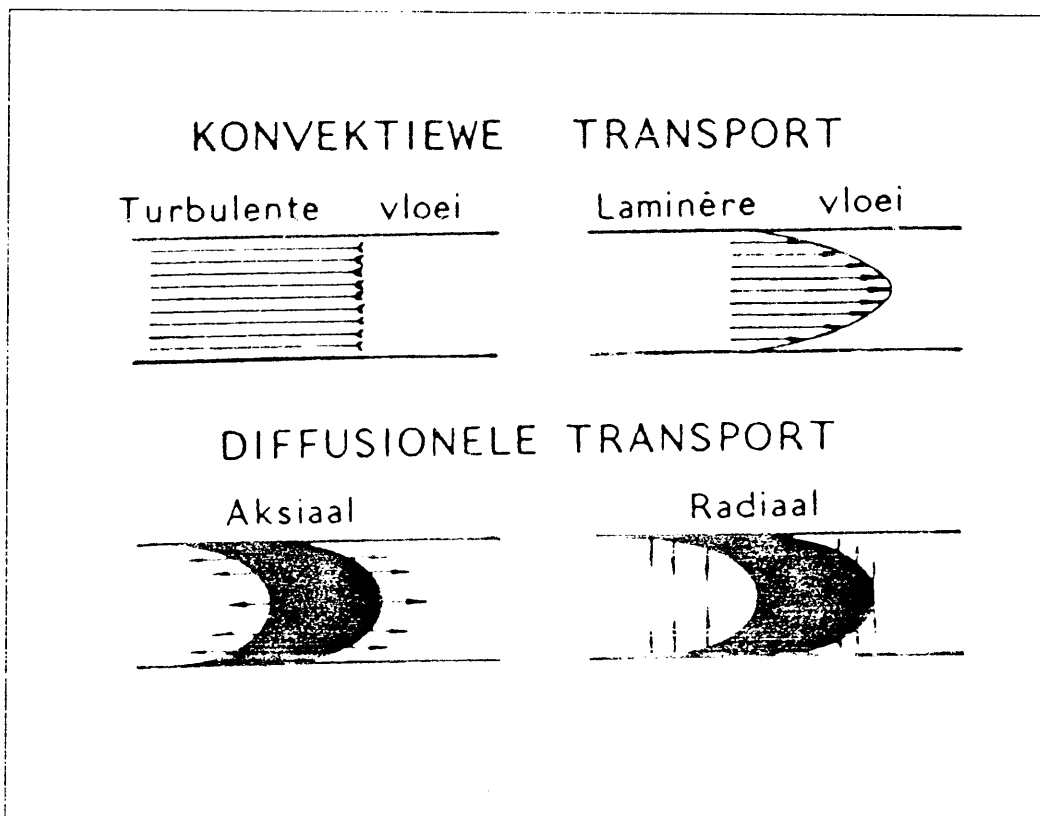


Fig 2.3 - Algemene tipes transport in geslote buise.

Daar is gevind dat twee meganismes dispersie veroorsaak, naamlik:

1. Konvektiewe transport wat plaasvind onder laminêre vloei-toestande. Dit vorm 'n paraboliese snelheidsprofiel met

monstermolekules wat by die wande van die buis voorkom met zero liniêre snelheid en by die middel van die buis met twee keer die gemiddelde snelheid.

2. Diffusionele transport as gevolg van konsentrasieverskille veroorsaak aksiale en radiale diffusie (Fig. 2.3). Aksiale diffusie ontstaan as gevolg van horisontale konsentrasiegradiënte by die begin- en eindpunte van die monstersone. Hierdie diffusie dra 'n baie klein deeltjie by tot die totale dispersie, terwyl die radiale diffusie, wat ontstaan as gevolg van konsentrasieverskille loodreg tot die rigting van beweging, 'n belangrike bydrae lewer tot die totale dispersie.

Die vloeistroom kan voorgestel word as 'n groot aantal vloeistofsilinders wat konvektief beweeg teen verskillende snelhede. Die radiale diffusie poog om die konsentrasies te balanseer op so 'n manier dat die molekules wat teen die buiswand voorkom na die middel beweeg, terwyl die molekules in die middel buitentoe beweeg. Hierdie proses veroorsaak nie net dat elke monster sy integriteit behou nie, maar dit verlaag ook die konvektiewe transport. Deur die konvektiewe transport te verlaag, word verdunning van die sone in die draerstrom verhoed. Daar kan gesê word dat radiale diffusie ongeveer dieselfde rol speel as die lugborrel in gesegmenteerde vloeianalise (SFA).

Daar is verskeie modelle ontwikkel vir laminêre vloeikondisies om die teoretiese beginsels van FIA te definieer en om wiskundige vergelykings van die vorm $C = f(t)$ af te lei, met inagneming van die fisiese gedrag van 'n ingespuite prop. Die algemene model

wat beide konvektiewe en diffusionele transport in ag neem en daarom die beste beskrywing gee vir die fisiese dispersie, is

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \left[\frac{\delta^2 C}{\delta l^2} + \frac{\delta^2 C}{\delta r^2} + \frac{1}{r} \frac{\delta C}{\delta r} \right] - u_{\max} \left[1 - \frac{r^2}{R^2} \frac{\delta C}{\delta l} \right]$$

Waar:

C = konsentrasie by die punt (l, r, t)

D = molekulêre diffusiekoeffisiënt

l = afstand vanaf 'n sekere punt in die buisas

r = radiale afstand vanaf die middelpunt van die buis

t = tyd vanaf 'n sekere beginpunt

R = buisradius

u_{\max} = maksimum liniêre vloeitempo by die middelpunt van die buis

Die gedeelte van die vergelyking aan die linkerkant van die minusteken stel die diffusionele transport voor. Die eerste term in die hakies maak voorsiening vir aksiale diffusie en die ander twee vir radiale diffusie. Die eerste term aan die regterkant van die minusteken hou verband met die hidrae van die konvektiewe transport waarvoor die snelheidsprofiel 'n paraboliese vorm het en gegee word deur:

$$u = u_{\max} (1 - (r^2/R^2))$$

Die molekules by die wande van die buis ($r = R$) het geen snelheid nie ($u = 0$), terwyl die molekules in die middel van die buis ($r = 0$) 'n maksimum snelheid het ($u = u_0$).

Die sleutel tot 'n suksesvolle, effektiewe FIA-sisteem lê in die vermoë om die dispersie van die monsterprop te manipuleer sodat die beste resultate verkry word. Deur bogenoemde parameters

te varieer, kan 'n groot mate van beheer verkry word oor dispersie en kan 'n sisteem maklik geoptimiseer word.

Volgens Ruzicka en Hansen¹⁷ word totale dispersie gegee deur:

$$D_t = D_i D_m D_d$$

waar

D_i = dispersie as gevolg van die inspuut van die monster

D_m = dispersie as gevolg van die buissisteem

D_d = dispersie in die deteksiesisteem

Van Staden^{18,19} het bygevoeg dat dispersie ook ontstaan as gevolg van koppelstukke, en het dus totale dispersie geherdefinieer as:

$$D_t = D_i D_m D_c D_d$$

waar

D_c = dispersie as gevolg van koppelstukke

Omdat die analitiese waarde by FIA-sisteme verkry word uit piekhoogte kan die dispersie soos volg gedefinieer word:

$$D_t = C_o / C_{\max}$$

waar

C_o = oorspronklike analietkonsentrasie

C_{\max} = analietkonsentrasie by piek-maksimum

Bogenoemde vier dispersies definieer slegs die fisiese dispersie. Die totale dispersie is 'n funksie van beide fisiese en chemiese dispersie:

$$D_t = D_{\text{fis}} + D_{\text{chem}}$$

Die fisiese dispersie ontstaan gedeeltelik deur longitudinale vloei wat 'n paraboliese kop en stert veroorsaak en gedeeltelik deur radiale diffusie, soos aangetoon in Fig.2.3. Die chemiese dispersie D_{chem} word gedefinieer deur die chemiese kinetika van elke individuele analitiese prosedure.

2.6 DIE BASIESE KOMPONENTE VAN FIA

Ruzicka⁶ het in 'n publikasie, wat FI-Astar bekend gestel het, gesê dat 'n vloei-inspuitanaliseerder aan die volgende vereistes moet voldoen:

- Die draerstream moet op 'n pulsvrye wyse deur 'n nou buisie met eenvormige deursnee vloei, wat die inspuit- en deteksie-eenhede insluit.
- Die volume van die monster (μl) moet as 'n prop in die draerstream ingespuit word sonder om die vloei te verander. Die monstervolume moet binne perke veranderbaar wees.
- Die vloei-pad moet in so 'n mate veranderbaar wees dat dit vir 'n wye verskeidenheid bepalingse gebruik kan word. Die sistrome moet ook op 'n maklike en reproduseerbare wyse aan die draerstream gekoppel kan word.

- Die vloedetektor moet dadelik 'n reproduseerbare sein, in ooreenstemming met die analietinhoud, gee.

'n Elementêre FIA-sisteem word saamgestel uit 'n reeks noodsaaklike komponente wat hieronder in meer besonderhede bespreek word.

1. 'n Sisteem wat die draerstream deur die verskillende eenhede neem met 'n perfekte herhaalbare pulsvrye en konstante stroom. Die konstante pulsvrye stroom word veroorsaak deur 'n multikanaal-peristaltiese pomp. Die verskillende vloeitempo's word moontlik gemaak deur pompbuis met gespesifiseerde deursnee vir spesifieke vloeitempo's.
2. 'n Inspuitsisteem wat die monster op akkurate en herhaalbare wyse in die stroom invoeg. Die inspuitvolume moet ook veranderbaar wees. Die klep wat daarvoor verantwoordelik is om spesifieke volumes van die monster in die draerstream in te spuit sonder om die stroom te onderbreek, het soos volg daaruit gesien:
3. 'n Transportsisteem om die verskillende elemente te koppel en die verlangde mate van vermenging en dispersie te veroorsaak.
4. 'n Deteksiesisteem vir die kontinue waarneming van die draerstream om kwalitatiewe sowel as kwantitatiewe inligting te voorsien. Die wye verskeidenheid deteksie-sisteme wat met welslae gebruik kan word, word in die volgende afdeling in meer besonderhede bespreek.

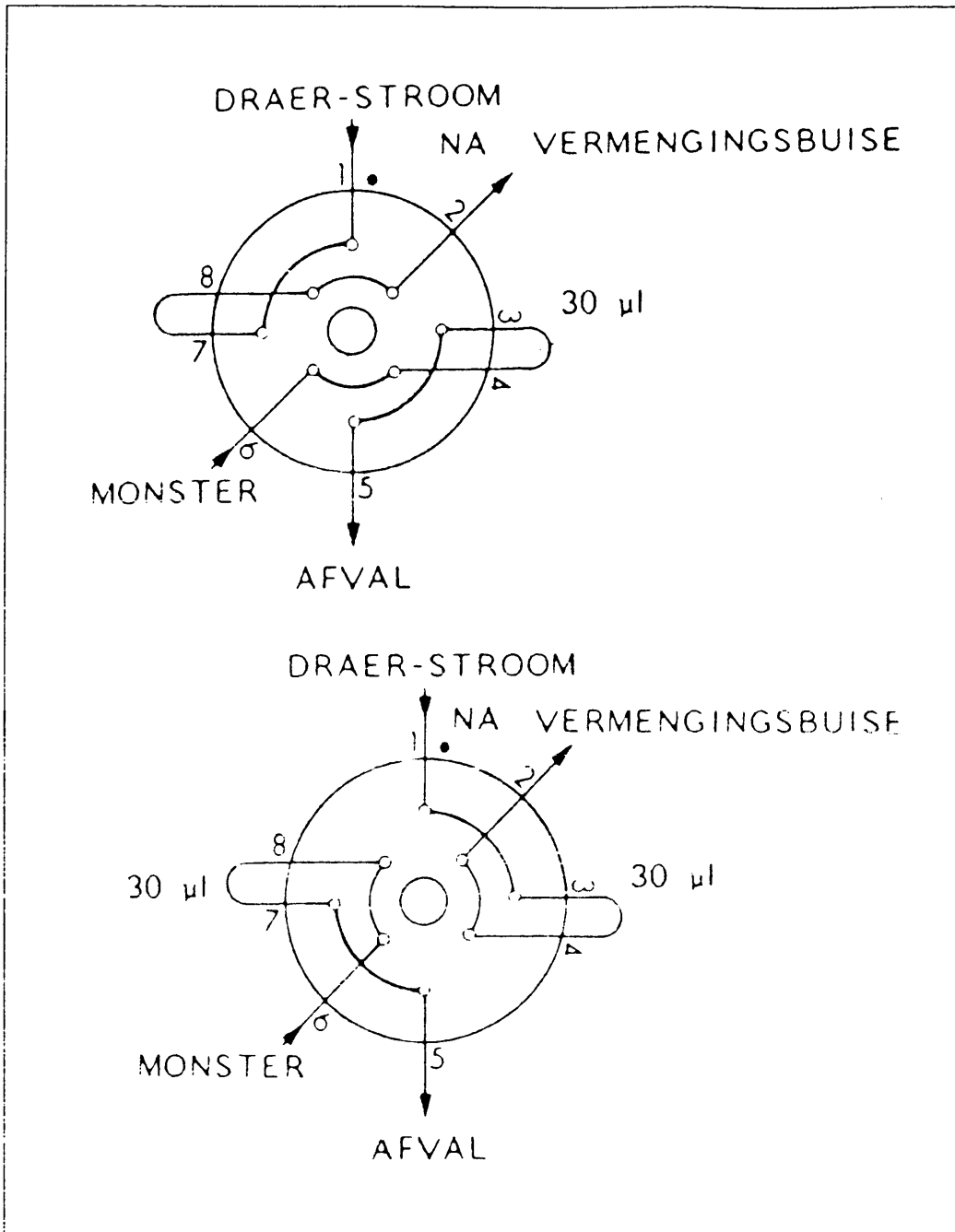


Fig. 2.4 - Skematiese voorstelling van die dubbeliusklep. Die twee posisies wat moontlik is word aangetoon.

2.7 DETEKSIESISTEME

2.7.1 ELEKTROCHEMIESE DETEKTORE

Hierdie tipe sensors is baie nuttig in hidrodinamiese sisteme as gevolg van vinnige respons en lineariteit oor 'n wye konsentrasiegebied²⁰. Die waardes wat verkry word is ook baie herhaalbaar, het 'n lae inherente elektriese geraas en is baie sensitief²¹. Die gebruik van ionselektiewe elektrodes (ISE) in FIA het nog addisionele voordele soos byvoorbeeld die lae koste wat aan die instrumentasie verbonde is, baie min of geen vooraf behandeling van die monster nie²² en geen steurings as gevolg van die kleur of troebelheid van die monster nie^{23,24}.

Aangesien elektrochemiese prosesse oor die algemeen op 'n oppervlak in plaas van in 'n oplossing as geheel voorkom, maak dit hierdie prosesse besonder aantreklik vir die gebruik op miniatuurskaal. Alhoewel die vervaardiging van kleinvolume selle vir elektrochemiese deteksie nie baie moeilik is nie, word daar tog probleme ondervind met soliede, statiese elektrodes. 'n Verlaging in sein word verkry as gevolg van oppervlakadsorpsie. Die keuse van 'n elektrodemateriaal en die metingstegniek sal bepaal word deur die aard van die verbinding wat geanaliseer moet word, sowel as die analitiese toestande wat vereis word.

'n Elektrochemiese detektor is sensitief vir 'n sekere eienskap van òf die oplossing òf die opgeloste stof. Detektors wat sensitief is vir die elektrochemiese eienskappe van die oplossing is nie-destruktief in karakter en universeel toepaslik (nie-selektief). Die detektore wat gebaseer is op elektrochemiese eienskappe van die opgeloste stof is oor die algemeen baie sensitief en selektief. 'n Eienskap van hierdie tipe detektor is dat die uittreesein bepaal

word deur die aktiwiteit of konsentrasie van die verbinding in die omgewing van die elektrode-oppervlak. Die elektrode maak dus 'n gelokaliseerde meting en nie 'n meting wat gemiddelde konsentrasies in die vloeikanaal meet nie. Dit is dus baie belangrik dat daar 'n onveranderbare verhouding moet wees tussen die gemiddelde konsentrasie in die dwarsdeursnee van die sel en by die werksoppervlak van die elektrode.

In hierdie projek is 'n ioonselektiewe elektrode as elektrochemiese detektor gebruik. Die ioonselektiewe elektrode was 'n chloried-selektiewe elektrode in samewerking met 'n kalomel-verwysingselektrode. Ruzicka en Hansen²⁵ het die ioonselektiewe elektrode ontwikkel wat 'n kaskade-vorm het en deel uitmaak van die vloesisteam, met die verwysingselektrode op 'n ander posisie in die sisteem. Een van die groot probleme van ioonselektiewe elektrodes is dat die potensiaalverskil grootliks afhanklik is van die posisie van die elektrode in die vloesisteam. Indien die sensor te naby aan die wand van die buis is, is dit nie baie sensitief vir konsentrasieveranderinge nie, as gevolg van die paraboliese profiel van die monsterprop. Wanneer die sensor in die middel van die buis voorkom, word die vloei vertraag en swak herhaalbare resultate word verkry. In hierdie projek is 'n ioonselektiewe elektrode gebruik wat deel uitmaak van die buissisteam terwyl die verwysingselektrode vertikaal in 'n bekertjie aan die einde van die buissisteam voorkom (Fig. 5.1). Die konstruksie van hierdie elektrode word in hoofstuk 5 bespreek.

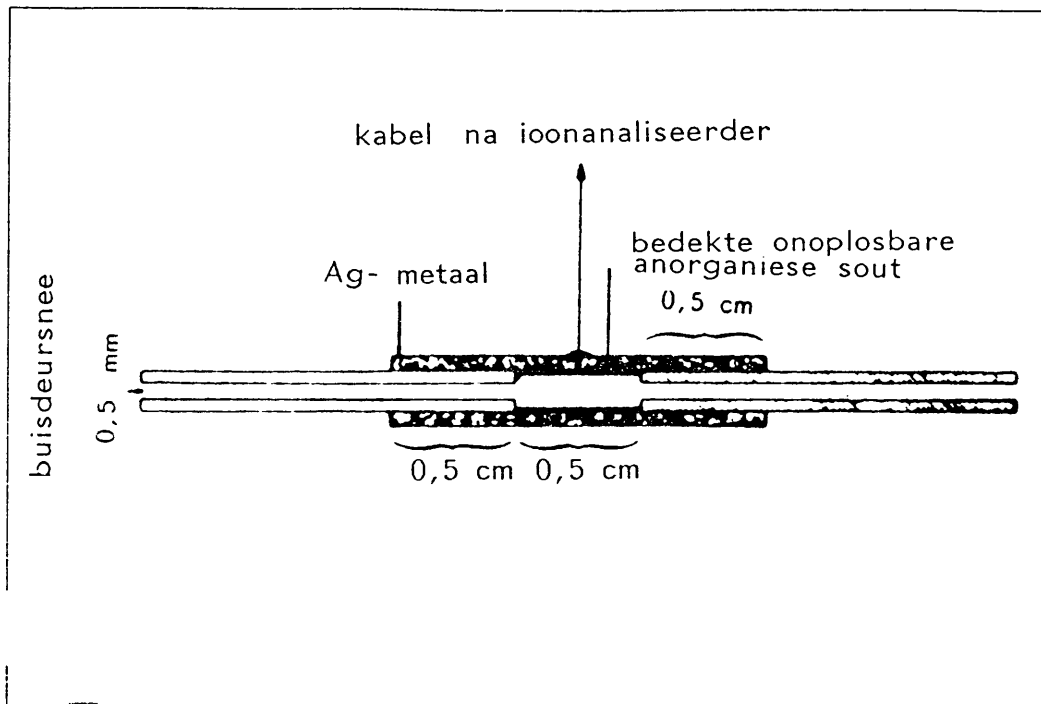


Fig.2.5 - Skematiese voorstelling van die chloriedselektiewe elektrode.

2.7.2 OPTIESE DETEKTORE

Hierdie is beslis die detektore wat die meeste gebruik word in samewerking met FIA, terwyl spektrofotometrie die optiese metode is wat die meeste gebruik word. Die ontwerp van fotometriese selle kry nie veel aandag van navorsers nie, aangesien daar goeie resultate met kommersieel-beskikbare selle verkry word. Fig 2.6 toon die U-vormige sel wat vervaardig word uit silika of spesiale optiese glas. Hierdie is ook die tipe sel wat deur ons gebruik is vir die spektrofotometriese bepaling van kalsium.

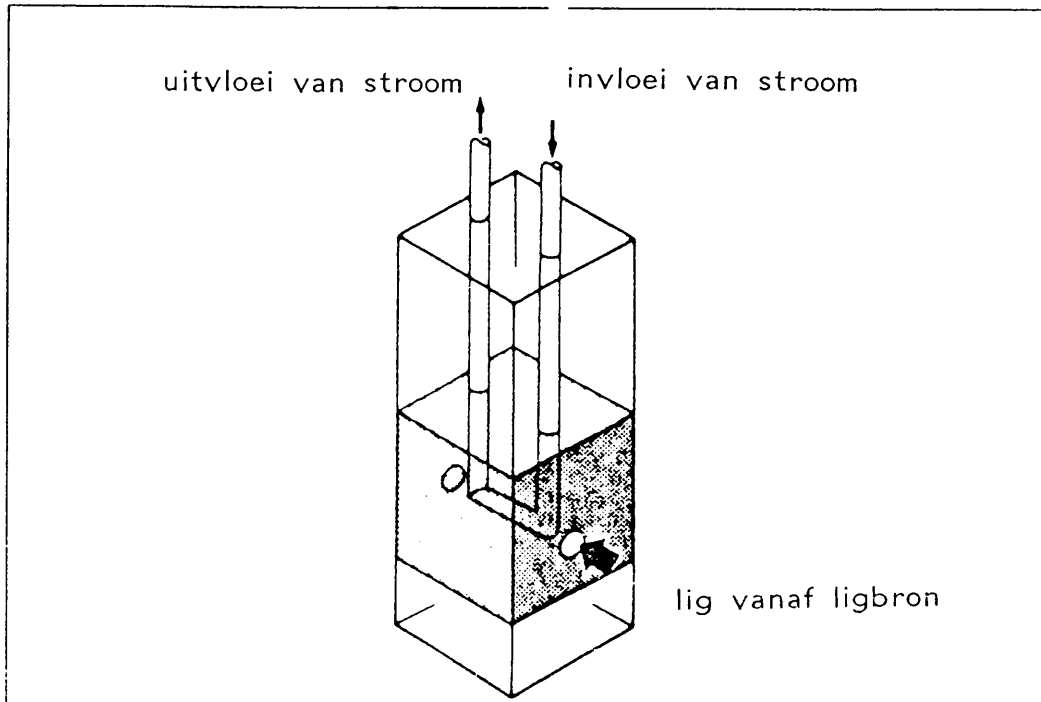


Fig. 2.6 - Voorbeeld van 'n deurvloeiëls vir spektrofotometriese bepalinge.

Die onlangse bekendstelling van laseropwekkingsbronne het die gebruik van fluorometriese tegnieke opnuut onder die aandag van die FIA-gebruiker gebring. Voordele soos goeie selektiwiteit, lae detekselimiëte, verkleiningskapasiteit en relatiewe lae koste is verantwoordelik vir die uitgebreide gebruik van hierdie tegniek. Een van die enigste nadele van hierdie tegniek is die skaarshêid van verbindings met fluorimetriese eienskappe.

Nog 'n handige tegniek wat in samewerking met FIA gebruik kan word, is atoomspektrometriese tegnieke. Hierdie tegnieke gebruik normaalweg 'n monstervolume van 0,5- tot 2 cm³ oplossing vir die bepaling van 'n gegewe element deur kontinue aspirasie. Veel kleiner monstervolumes kan gebruik word deur FIA saam met hierdie tegniek te gebruik. In teenstelling met ander detektore wat saam met FIA gebruik word, benodig atoomabsorpsie-spektrometers, vlamfotometers en IGP-eenhede nie 'n vloeiëls nie.

Die skema vir so 'n sisteem is uiters eenvoudig. Die draer wat kontinuu gepomp word, word in die verstuiwer geaspireer. Een van die belangrikste voordele van die gesamentlike gebruik van FIA en AAS (atoomabsorpsie-spektroskopie) is die lae gebruik van maskeringsreagense (reagense wat steurings verwyder). Die gebruik van lantaan kan byvoorbeeld so min soos 1% van die normale hoeveelheid wees²⁶.

2.8 TWEEFASE-FIA-METODES

'n Bewys van die veelsydigheid van FIA is die wye verskeidenheid toepassings wat ontstaan as gevolg van die invoeging van kontinue skeidingsisteme in 'n normale FIA-sisteem. Alhoewel sekere twee-fase-sisteme (dialise, vloeistof-vloeistof-ekstraksie, ensiemreaktors) lank reeds geassosieer is met klassieke outomatiese gesegmenteerde metodes, bied hulle invoeging in FIA veel groter voordele as gevolg van die afwesigheid van lugborrels. Lugborrels kompliseer sonder twyfel die kontinue werking van 'n skeidingsisteem en verlaag ook die effektiwiteit, aangesien die tyd wat die fases in kontak is, aansienlik verlaag word.

Die faseskeidingstegnieke wat hoofsaaklik in FIA gebruik word, is:

1. Gas-vloeistofskeidings, bv. distillasie.
2. Vastestof-vloeistofskeidings, bv. ionuitruiling.
3. Vloeistof-vloeistofskeidings, bv. vloeistof-vloeistofekstraksie en dialise.

Dialise is baie nuttig by die bepaling van stowwe in biologiese monsters, byvoorbeeld urien, bloed en melk. Die analise van biologiese monsters deur FIA-dialisesisteme oorkom grootliks die probleme wat algemeen voorkom by analise van die monsters, naamlik:

1. Die hoeveelheid monster wat beskikbaar is, is normaalweg beperk.
2. Die monsters verskil normaalweg van die standaard wat gebruik word vir kalibrasie wat 'n analitiese fout in die sisteem inbring.
3. 'n Dialise of verdunningsproses word normaalweg benodig om steurings van proteïene en ander groot molekules te verwyder of om 'n sein in die bepalinggebied te verkry.
4. Proteïene en vette toon die neiging om aan die wande van buise en vloeiselle saam te pak.

Dit is dus duidelik dat dialise 'n baie nuttige en in sommige gevalle onmisbare tegniek is in die analise van biologiese monsters.

HOOFSTUK 3

MEMBRAANSKEIDINGS IN VLOEI-INSPUITANALISE

3.1 INLEIDING

Die beginsel van massadrag in kontinue vloesisteme word lank reeds gebruik. Die oordrag geskied oor gasdiffusie en dialisemembrane wat veral in kliniese roetinelaboratoriums gebruik word. Die gebruik van dialisesisteme in FIA is besonder handig vir die bepaling van analiete in biologiese sisteme byvoorbeeld melk of bloedserum. Tot op hede is dialise in FIA nog nie tot sy volle potensiaal ontwikkel nie, hoofsaaklik as gevolg van die mening wat verskeie wetenskaplikes het dat dialise 'n stadige en nie 'n goed gedefinieerde proses is nie, soos ondervind word by die ontsouting van biologiese monsters. Dialise in 'n vloesisteam is egter presies voorspelbaar en aangesien die dialiseerder deel uitmaak van die bepalingstelsel word geen ekstra tyd hierdeur in beslag geneem nie. Sekere van die huidige toepassings in vloei-inspuitsisteme toon aan dat 45 - 70 monsters per uur geprosesseer kan word met steeds hoogs reproduceerbare resultate ^{27, 28}.

Dialise kan beskou word as 'n proses waar klein molekules of ione vanuit een oplossing deur 'n dialisemembraan na 'n ander oplossing beweeg. Die oplossing waaruit die molekules beweeg in die FIA-sisteam staan bekend as die skenkerstroom en die

oplossing waarna die molekules beweeg staan bekend as die ontvangerstroom. Die membraan is nie selektiefdeurlaatbaar nie maar laat alle molekules deur vanaf 'n hoër na 'n laer konsentrasie van die spesifieke molekule. Die enigste onderskeid wat tussen molekules getref kan word is op grond van molekulêre grootte, deurdat die porieë in die membraan 'n vaste grootte het en slegs molekules sal deurlaat wat kleiner as die porie is. Ander molekules in die skenker of ontvangerstroom kan egter 'n invloed hê op die dialise van 'n sekere molekule, wat dit dus noodsaaklik maak dat die ontvanger en skenkerstroom so identies moontlik moet wees.

Die tempo waarteen stowwe oorgedra word vanaf die skenkerstroom na die ontvangerstroom is afhanklik van die eienskappe van die membraan, die vloeitempo en dus die vertikale massa-oordrag van stowwe in die oplossing na die membraanoppervlak. Die oorgrote meerderheid van dialiseerders word in 'n sisteem ingebou en daarna getoets om optimum kondisies vir dialise te bepaal. Alhoewel hierdie tipe optimisasie wel met sukses toegepas wêrd, kan 'n groter begrip vir die dialiseproses in die vloeisisteem beter en vinniger optimisasie verseker. Aangesien die teoretiese vergelykings nie voorsiening maak vir die individuele karaktereenskappe van verskillende membrane nie, kan die effekte van dialiseerder-geometrie en membraaneienskappe maklik geskei word.

Die dialiseerder maak deel uit van 'n vloeï-inspuitanalitiese sisteem. In hierdie dialiseerder word 'n skenkerstroom (monsterstroom) deur 'n dun buisie gepomp, wat langs die een kant van 'n membraan verby loop, terwyl skoon water aan die ander kant van die membraan verby gepomp word (Fig. 3.1). Hierdie sisteem word hoofsaaklik gebruik vir bepalinge in

biologiese monsters, aangesien ione of klein molekules wat bepaal moet word maklik deur die membraan beweeg, in die ontvangerstroom in, om daarna na die detektor te gaan. Alle selle en makromolekules wat moontlik in die bepaling kan steur of verstoppings veroorsaak, bly in die skenkerstroom (monsterstroom) agter en word weggevoer as afval.

3.2 TEORETIESE AGTERGROND

Die sein wat deur die FIA-sisteem, met 'n dialiseerder in die sisteem, gelees word, word gekontroleer deur twee komponente:

1. die bydrae van die gedeeltelike dispersie wat ontstaan voor, as deel van en na dialise. Hierdie dispersie veroorsaak 'n konsentrasie-tyd-profiel wat ontstaan as gevolg van konveksie en diffusietransport,
2. die bydrae van die dialiseproses self.

Daar word egter aangeneem dat die dialiseproses nie die vorm van die monsterprop verander nie. Die dialiseproses behoort 'n identiese, proteïënvrye monster te vorm aan die anderkant van die dialisemembraan, wat voort beweeg in die ontvangerstroom. Die fraksie van die analiet vanaf die skenkerstroom na die ontvangerstroom is afhanklik van 'n aantal faktore naamlik:

1. membraanoppervlak,
2. membraanlynlengte,
3. membraanporeusiteit,

4. die konsentrasie van analiet in die ontvangerstroom,
5. die gebruik van ontvanger en skenkerstrome wat in dieselfde rigting vloei of wat in die teenoorgestelde rigting vloei,
6. vloeitempo's van die skenker en ontvangerstrome,
7. en temperatuur.

Verskeie artikels is reeds gepubliseer oor massaoordrag in dialiseerders vir kunsmatige niere of vir industriële dialiseerders, maar die aantal teoretiese vloeimodelle vir analitiese dialiseerders is baie beperk.

Agren en Garret³⁸ was die eerste persone wat wiskundige modelle ontwikkel het vir vloeidialise. Uit hierdie vergelykings kan die relatiewe konsentrasies van die gedialiseerde spesies in die skenker- en ontvangerstrome bereken word. Hierdie konsentrasies word bereken as funksies van vloeitempo's en sellengtes vir gevalle waar die strome in dieselfde en in teenoorgestelde rigtings vloei. Hierdie vergelykings stel die analitiese chemikus in staat om te bereken wat die padlengte van 'n dialiseerder moet wees om 'n spesifieke herwinning moontlik te maak. Daar kan met hierdie vergelykings aangetoon word dat, in sommige gevalle, 'n groter %-dialise verkry sal word indien beide strome in dieselfde rigting vloei, maar dat dit in ander gevalle meer effektief sal wees indien die strome in teenoorgestelde rigtings vloei, aangesien daar by laasgenoemde geval 100% dialise mag plaasvind indien 'n sel lank genoeg is, en indien die vloeitempoverhouding (donor/akseptor) minder of gelyk aan 1 is. Een van die nadele verbonde aan berekeninge met hierdie vergelykings is dat sekere konstantes in die vergelykings

bekend moet wees, byvoorbeeld die diffusiekoëffisiënt vir die dialiseerbare spesie en 'n "konstante wat gedefinieer word deur die eienskappe van die membraan". Geen eksperimentele tegnieke word gegee om hierdie waardes te bepaal nie.

Van der Linden²⁸ het 'n model afgelei vir gasdiffusie in 'n analitiese parallelplaat-dialiseerder. Hierdie afgeleide vergelykings is eksperimenteel getoets en die waardes, het ooreengestem met die wat bereken is uit die vergelykings. Hierdie vergelykings is afgelei deur gebruik te maak van 'n tenk-in-serie-model. Elke tenk word gemeng en ruil materiaal uit met die tenk aan die ander kant van die membraan, in 'n tyd-afhanklike oordragstap. Cooney et al²⁹ het vergelykings afgelei wat massa-oordrag oor membrane beskryf vir 'n parallelplaat-dialiseerder met semi-oneindige breedte. 'n Unieke eienskap van die oplossing was twee stelde diffusievergelykings wat die bloed aan die dialisaatkant van die membraan verteenwoordig, wat gekoppel word deur die membraan-oordragsvergelykings. Die teorie is ontwikkel vir die kunsmatige nierdialiseerders waarin 'n bloedkanaal omring word deur 'n membraan en 'n dialisaat of waterkanaal aan elke kant. Daar is dus 'n simmetrie rondom die bloedkanaal wat geen ooreenstemming toon met die monsterkanaal van die analitiese dialiseerder nie. Daar bestaan verskeie publikasies wat handel oor massa-oordrag in dialiseerders vir kunsmatige niere¹⁶, terwyl teorie wat direk van toepassing is op analitiese dialiseerders baie skaars is.

Die benadering wat deur Cooney gebruik is, is aantreklik aangesien daar slegs van fundamentele konstantes gebruik gemaak word. Bernhardsson³¹ het twee numeriese vergelykings afgelei om konsentrasies in ontvangerstrome te bereken. Die eerste model is afgelei vir propvloei en die tweede vir paraboliese vloei in

beide kanale. Die vergelyking is afgelei vir saamstromige vloeï, aangesien dit normaalweg tot 'n kleiner differensiële drukverskil oor die membraan lei. Nog 'n rede is dat dispersie kleiner is wanneer beide strome in dieselfde rigting vloeï, as wat die geval sou wees indien beide strome in teenoorgestelde rigtings vloeï. Bernhardsson³¹ het waardes vir die konsentrasieverhoudings van C_d/C_s bereken vir verskillende vloeitempo's in die skenker en ontvangerstroom. Hierdie berekening is uitgevoer vir die gemengde koppie-model, die propvloeï-model en die laminêre vloeï-model. Hierdie waardes is op 'n grafiek gestip en vergeelyk met eksperimentele waardes wat verkry is vir Zn(II)-bepalings (Fig. 3.2). Die model is ook vergelyk met die teorie soos afgelei deur Van der Linden²⁸. Dieselfde grafiese voorstellings word in hierdie hoofstuk gemaak uit resultate wat deur ons verkry is. Die profiele van 8 membrane word met mekaar op hierdie wyse vergelyk. Daar is van ook drie verskillende grootte dialiseerders gebruik gemaak om sodoende ook die invloed van membraanoppervlakte op %-dialise te ondersoek.

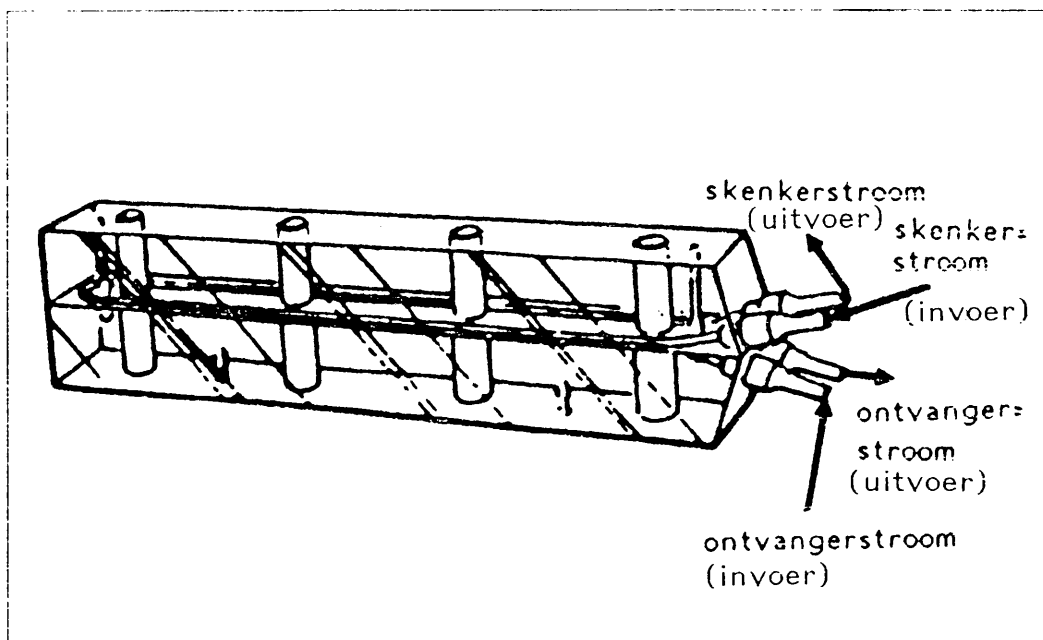


Fig. 3.1 - Skematiese voorstelling van 'n deurvloeidialiseerder.

Beide die modelle van Bernhardsson et al³¹ en Van der Linden²⁸ stel 'n sisteem voor met twee parallelle kanale met oneindige breedte, wat geskei word deur 'n dialisemembraan (Fig. 3.1). Die analitiese monster kom die sisteem aan die regterkant van die skets binne en die analiet word oorgedra vanaf die boonste kanaal na die detektorkanaal, deur die membraan. Vervoer in 'n horisontale rigting (y-rigting), dit wil sê in die rigting waarin die stroom vloei vind plaas slegs deur vloeistofvloei en vervoer in 'n vertikale rigting (x-rigting), dit wil sê loodreg met die membraan, vind plaas deur molekulêre diffusie. Aangesien die breedte van die kanaal teoreties oneindig is, sal daar geen beweging in die rigting van die wande van die buis (z-rigting) wees nie. Die konsentrasie by $y = 0$ word geneem as C_s^0 en C_d^0 respektiewelik, met C_s^0 die beginkonsentrasie in die skenkerstroom en C_d^0 die beginkonsentrasie in die ontvangerstroom. Die onderskrif i word egter gebruik waar die vergelyking dieselfde waarde het vir beide strome. Die diffusievergelyking vir dialise is dus:

$$v_i(x) \left[\frac{\delta C_i}{\delta y} \right] = D_i \left[\frac{\delta^2 C_i}{\delta x^2} \right]$$

waar $v(x)$ die liniêre vloeitempo is, D die diffusiekoëffisiënt in die oplossing en C die konsentrasie by 'n spesifieke punt in die kanaal. Die grenstoestand is $C_i = C_i^0$ by $y = 0$ en $\delta C_i / \delta x = 0$ by $x = -a_i/2$. Die punt $x = -a_i/2$ is op die wand van die dialiseerder en stel dus dat die wand ondeurdringbaar is. Daar word aangeneem dat die permeasie direk eweredig is aan die konsentrasieverskil tussen die twee sye van die membraan.

$$\pm(\delta C_i/\delta x)(a_i/2; y) = P((C_s/2; y) - C_d(a_d/2; y))$$

waar P die permeabiliteit in $m.s^{-1}$ is. Vir die geval waar daar aangeneem word dat propvloeï deur die dialiseerder plaasvind, sal $v_i(x) = v_i$, dit wil sê die liniêre snelheid is konstant regdeur die kanaal. Vergelykings is hieruit afgelei wat 'n sekere konsentrasie in die skenker- en ontvangerstrome bereken by 'n posisie y , dus $C_s(y)$ en $C_d(y)$. Die vloeitempo vir die geval van laminêre vloeï word aangegee as:

$$v_i(x) = v_{i,max} \left(1 - \frac{2x_i^2}{a_i^2}\right)$$

Hiervolgens kan die konsentrasies in die kanale bereken word deur eike kanaal in 'n aantal kleiner volumes te deel. Die beginkonsentrasie in al die volumes is C_i^0 maar verander met tyd namate ewewig bereik word in die afsonderlike volumes. Bernharson et al³¹ het al die bekende waardes ook eksperimenteel getoets deur die %-dialise van sinkione te bepaal deur 'n Etkay-selluloseasetaat-dialisemembraan

Soos wat verwag sou word, gee die vermengings-model (mixed cup model) die hoogste %-dialise aangesien daar aangeneem word dat perfekte vertikale massa-oordrag plaasvind in elke kanaal. Die tweede hoogste %-dialise word verkry vanaf die propvloeï-model, alhoewel daar slegs 'n klein verskil is tussen hierdie en die laminêre vloeï-model, veral by lae vloeitempo's. Die ontvangerstroom wat teen die membraanoppervlak geleë is, beweeg vinniger in die y -rigting in die propvloeï-model en meer van die ontvangerstroom is dus beskikbaar vir oordrag vanuit

die skenkerstroom. Al drie die modelle voorspel dat ewewig bereik sal word wanneer 'n vloeitempo laer as $0,1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ gebruik word. Uit die resultate het dit ook geblyk dat die verskille tussen die laminêre- en propvloei-model weglaatbaar klein is.

Daar is verder gevind dat die eksperimentele gedrag van 'n deurvloeidialiseerder slegs ooreenstem met die teoretiese massaordrag indien sekere voorsorgmaatreëls getref word. Eerstens moet die hidrostatische druk dieselfde wees in beide kanale en dit vereis dat die vloeitempo's sowel as die in- en uitvoerdruk gelyk moet wees.

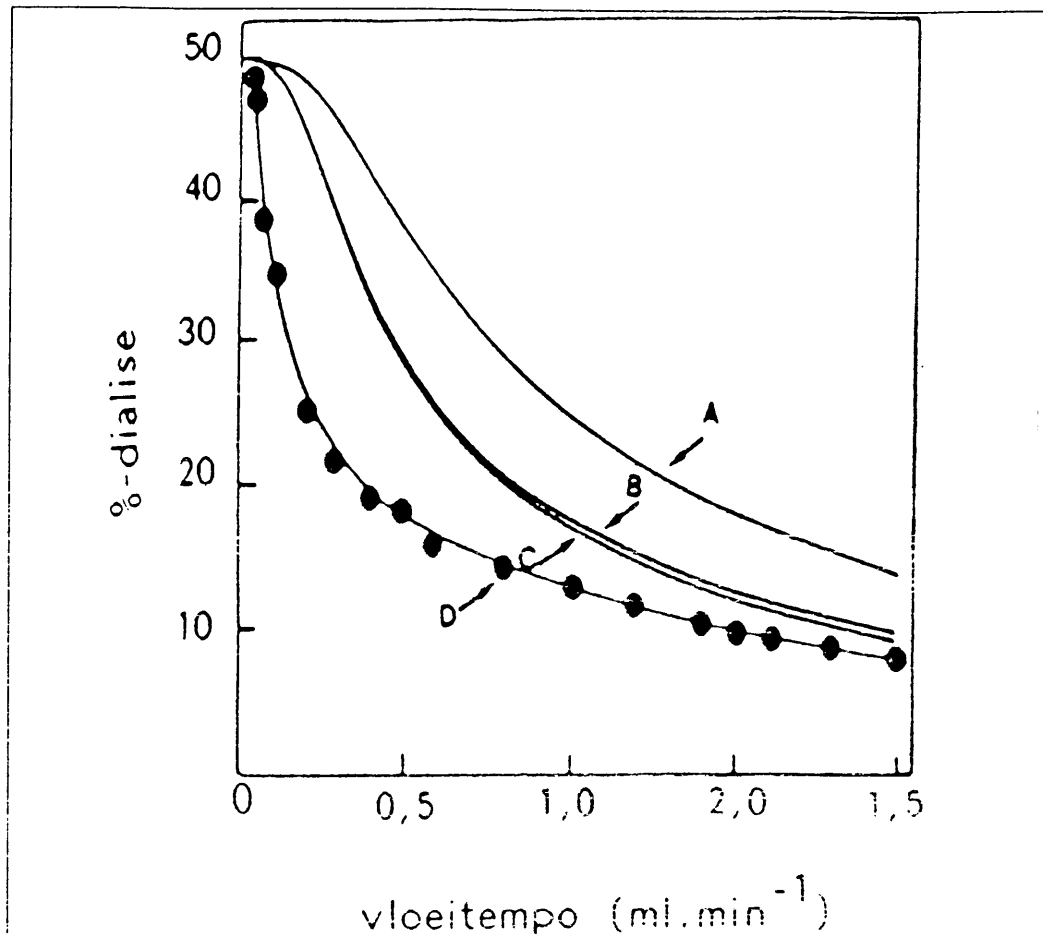


Fig. 3.2 - Teoretiese en eksperimentele vloei-afhanklikheid van die %-dialise van 'n parallelplaat-dialiseerder met gelyke vloeitempo's in beide kanale: (A) gemengde koppie-model (B) propvloei-model (C) laminêre vloei-model (D) eksperimentele waardes vir Zn(II) ione. Dimensies van die dialiseerder : 500 mm lank, $a_s = a_d = 0,091$ mm, 1,5 mm kanaalbreedte, $P = 7,74 \times 10^{-6}$ m.s⁻¹, $D = 7,4 \times 10^{-10}$ m².s⁻¹.

Tweedens moet enige aksie vermy word wat kan veroorsaak dat die membraan uitsit. Derdens moet die vloeitempo hoog genoeg wees sodat die afgeplatte gedeelte van die vloei-afhanklikheidskurwe (Fig. 3.2) bereik is. Daar mag op die meeste 25% van die dialiseerbare stof oorgedra word. Die rede hiervoor is dat die konsentrasieverhouding minder varieer met

veranderinge in vloeitempo en dit verlaag die kans op membraanuitsetting.

Om die effektiwiteit van dialise aan te toon vir verskillende dialiseerderdimensies en verskillende membraantipes het ons die volgende veranderlikes geëvalueer in die eksperimentele gedeelte:

1. Vloei-inspuitanalise en kontinue vloei.
2. Die gebruik van skenker en ontvangerstroom wat in dieselfde rigting vloei en gevalle waar die strome in teenoorgestelde rigtings vloei.
3. Die konsentrasie van analiet in die donorstroom.
4. Membraanlynlengte (dialise-area).
5. Membraanporeusiteit.
6. Membraandikte.
7. Vloeitempo afhanklikheid van dialise (dieselfde vloeitempo's in skenker en ontvangerstrome).

3.3 EKSPERIMENTEEL

3.3.1 KALSIUMBEPALING

3.3.1 a) Reagense

Alle reagense is voorberei uit analitiese graad chemikalieë, tensy dit anders gespesifiseer word. Dubbel gedistilleerde water is deurentyd gebruik. Die reagense is soos volg berei:

KRESOLFTALEIENKOMPLEKSOON: Die oplossing is voorberei deur 0,100 g kresolftaleïenkompleksoon (verkry vanaf BDH CHEMIKALIEE BPK.) af te weeg en in 40 cm^3 , $5,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ soutsuur op te los. Daarna is 2 g kinolien-8-ol bygevoeg terwyl die fles versigtig geswaai is. Die oplossing is kwantitatief verdun na 2 dm^3 met gedistilleerde water.

BASISOPLOSSING: Die oplossing is voorberei deur 70 g, 2-amino-2-metielpropan-1-ol (AMP) af te weeg en op te los in 500 cm^3 gedistilleerde water.

STANDAARDKALSIUMOPLOSSING: 'n Kalsiumoplossing is voorberei deur 24,9800 g analitiese graad kalsiumkarbonaat versigtig op te los in ongeveer $0,50 \text{ mol.dm}^{-3}$ soutsuur, wat drupsgewys bygevoeg is, totdat al die kalsiumkarbonaat net opgelos is. Die oplossing is 'n paar minute lank gekook om al die koolstofdioksied te verwyder. Die kalsiumoplossing is daarna geneutraliseer met ongeveer $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ kaliumhidroksied. Die pH is aangepas tot 'n pH van ongeveer 6, waarna die standaard verdun is tot 1 dm^3 met gedistilleerde water, wat 'n standaard oplossing van $10\,000 \text{ mg.dm}^{-3}$ kalsium gegee het. 'n Reeks standarde wat konsentrasies tussen 100 en $1\,500 \text{ mg.dm}^{-3}$ het,

is berei deur verdunnings van die $10\ 000\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ -oplossing te maak. Nog 'n reeks standarde is berei met konsentrasies van $6\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $10\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $15\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $30\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ en $50\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ vir die direkte bepaling van kalsiumkonsentrasies in die berekening van die %-dialise.

KALIUMOPLOSSING: Vir die verwydering van ioniese steurings is $6,4650\ \text{g}$ kaliumnitraat (KNO_3) afgeweg en verdun tot $1\ \text{dm}^3$ om 'n oplossing te gee wat $2\ 500\ \mu\text{g}\ \text{K}^+/\text{cm}^3$ te bevat.

3.3.1 b) Apparaat

'n Carle-mikrovolumeklep is gebruik. Die klep het 2 identiese lusse wat elk 'n volume van $30\ \mu\text{l}$ het. Die outomatiese monsternemingseenheid is deur Cenco gemaak en is in samewerking met 'n Cenco-peristaltiese pomp, wat teen 'n tempo van 10 revolusies per minuut werk, gebruik. Die optimumtempo waarteen die monsters geneem is, was 60 per uur. 'n Philips Pye Unicam SP6-550 spektrofotometer is gebruik by 'n golflengte van $580\ \text{nm}$ en 'n Varian AA-175-atoomabsorpsie-spektrofotometer (AAS) is by 'n golflengte van $422,7\ \text{nm}$ gebruik. Die AAS-lampstroom was $10,5\ \text{mA}$ en die spleetwydte was $1\ \text{nm}$. In die vloeisistiem is transmissiebuis met 'n binnedeursnee van $0,76\ \text{mm}$ gebruik. 'n Technicon-tipe C-12" dialisemembraan met 'n padlengte van $300\ \text{mm}$ is gebruik.

3.3.2 CHLORIEDBEPALING

3.3.2 a) Reagense

Alle reagense is voorberei vanaf analitiese graad reagense, tensy

dit anders gespesifiseer word. Dubbel gedistilleerde water is deurgaans gebruik. Die reagense is soos volg berei:

KALIUMNITRAATOPLOSSING: 'n Kaliumnitraatoplossing met konsentrasie 1 mol.dm^{-1} is voorberei deur 101 g KNO_3 op te los en kwantitatief te verdun tot 2 dm^3

CHLORIEDOPLOSSING: 'n Chloriedoplossing is voorberei deur 32,9680 g droeë natriumchloried op te los in gedistilleerde water en te verdun tot 2 dm^3 . Standaardwerksoplossings is berei deur die nodige verdunnings te maak wat strek van 250 tot 5 000 $\text{mg.dm}^{-3} \text{ Cl}^-$. Nog 'n reeks standarde is berei met konsentrasies van 10, 15, 30, 50 en 100 mg.dm^{-3} chloried vir die direkte bepaling van chloriedkonsentrasies in die berekening van die %-dialise. Alle oplossings is ontgas voordat lesings geneem is.

3.3.2 b) Apparaat

'n Carle-mikrovolumeklep, met twee identiese monsterlusse, elk $30 \mu\text{l}$ volume, is gebruik. 'n Reeks monsters word aan die klep verskaf deur 'n Cenco monsternemingseenheid. Die monsters is teen 'n tempo van een monster per minuut ingespuit. Tygon transmissiebuis met 'n binnedeursnee van 0,76 mm is gebruik om die verdelingsisteam saam te stel. Vermengingspirale is saamgestel deur die korrekte lengtes transmissiebuis rondom glasbuis met deursnee 15 mm te draai. Die relatiewe millivolts is by kamertemperatuur gemeet met 'n Orion Research (model 901) rekenaarbeheerde ionaanaliseerder. Die deurvloei-chloriedselektiewe elektrode is berei soos beskryf deur Van Staden²¹ en saam met 'n kalomelverwysingselektrode gebruik.

3.4 RESULTATE EN BESPREKING

3.4 A) INLEIDING

Die effektiwiteit van die dialiseerder is 'n funksie van drie veranderlikes, naamlik die oppervlakte waaroor dialise voorkom, die temperatuur en die vloeitempo van skenker- en ontvangerstrome^{32, 33}. Daar word egter by bogenoemde drie veranderlikes aannames gemaak byvoorbeeld dat dieselfde membraan deurentyd gebruik word. In hierdie ondersoek is daar in meer besonderhede na nog 'n paar veranderlikes gekyk naamlik vloeitempo's van die skenker en die ontvangerstrome, die rigting waarin die strome vloei ten opsigte van mekaar, die samestelling van die twee strome en die invloed wat verskille in samestelling mag oplewer, die invloed van die konsentrasie van die analiet in die ontvangerstroom, die volume monster wat ingespuut word sowel as die verskillende tipes membrane wat gebruik word.

3.4 B) VLOEITEMPO VAN SKENKER- EN ONTVANGERSTROOM

Clarke en Nicklas³⁴ het daarop gewys dat 'n verhoging in die herwinning van gedialiseerde stowwe verkry kan word deur vloeitempo's te halveer en dus die dialisetyd te verdubbel. Alhoewel die effek van temperatuur op die %-dialise nie ondersoek is nie, is daar deurentyd gepoog om by 'n konstante temperatuur te werk. Grady en Lamar³⁵ het glukose bepaal en het gevind dat die persentasie glukose wat dialiseer, verhoog wanneer die temperatuur verhoog word. Scobett et al³⁶ het ook 'n dialiseerder gebruik in 'n geoutomatiseerde metode vir die analise van glukose en het gevind dat die resultate varieer met 0,26% wanneer daar 'n verandering van 0,1°C in die dialisemodule is. Hierdie veranderings kan maklik verklaar word indien daar in aanmerking

geneem word dat meeste van die dialisemembrane in 'n jelvorm bestaan en die fisiese toestand hoogs afhanklik is van temperatuur.

Verskillende vloeitempo's is gebruik waarby die konsentrasies in die detektorkanaal bepaal is. Die waardes van konsentrasie in die detektorstroom is gedeel deur die waardes van die konsentrasie in die skenkerstroom en is aangedui as die %-dialise. Die Cl^- - en Ca^{2+} -konsentrasies in die detektorstroom is bepaal wanneer vloeitempo's in die skenker- en detektorstroom dieselfde is. 'n Duidelike verhoging in die %-dialise is verkry wanneer die vloeitempo verlaag is van $3,9 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ tot $1,0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Die lae vloeitempo's wat vir hierdie gedeelte gebruik is, is glad nie 'n goeie keuse vir 'n normale vloei-inspuitanalitiese sisteem nie. Daar moet gepoog word om by 'n meer afgeplatte gedeelte van die kurwe te werk (Fig. 3.3-3.8). Die rede hiervoor is dat die konsentrasieverhouding (dus ook %-dialise) minder varieer by hoër vloeitempo's. Daar is ook gevind dat die groewe van die dialiseerder 'n klein hoogte tot wydte verhouding moet hê om sekondêre vloei te voorkom⁴². Elke membraan is ondersoek vir 'n anioon (Cl^-) en 'n kation (Ca^{2+}). Die invloed van membraanlengte is ook ondersoek deur dieselfde prosedure soos hierbo beskryf word met verskillende lengtes van dieselfde membraantipe uit te voer. In tabelle 3.3 tot 3.8 kan gesien word dat die %-dialise toeneem met 'n toename in die lengte van die dialisepad.

3.4 C) RIGTING VAN VLOEI IN SKENKER- EN ONTVANGERSTROME

Die effek van skenker- en ontvangerstrome wat in dieselfde rigting vloei of in teenoorgestelde rigting vloei, word deur verskeie outeurs bespreek. Skeggs² het gevind dat minder

materiaal oorgedra word wanneer die skenker- en ontvangerstrome in dieselfde rigting deur 'n dialiseerder vloei, as wat die geval sou wees indien die strome in teenoorgestelde rigtings vloei. Die tyd wat dit neem om ewewig te bereik, is korter in die geval waar die vloeirigtings dieselfde is, en hierdie geval is dus gekies vir algemene gebruik. Lundgren³⁷ het die resultate bevestig en het aanbeveel dat ooreenstemmende vloeirigtings in dialiseerders gebruik moet word. Hy het ook gevind dat teenoorgestelde vloeirigtings in 'n dialiseerder kan lei tot kruiskontaminasie tussen monsters, selfs wanneer so min as 4 monsters per uur geanaliseer word. Hierdie veranderlike is deur ons ondersoek, maar aangesien ons by relatiewe hoë vloeitempo's gewerk het ($3,9 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, $2,9 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, $2,0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ en $1,0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$), kon geen definitiewe verskil met 'n verandering in vloeirigting waargeneem word nie. Die herhaalbaarheid van die resultate het egter aansienlik verlaag wanneer die vloeirigtings nie dieselfde is nie, daarom is daar vir verdere eksperimentele werk gehou by vloeirigtings wat dieselde is.

3.4 D) SAMESTELLING VAN SKENKER- EN ONTVANGERSTROME

Vreemde stowwe wat saam met die analiet voorkom, kan 'n merkbare invloed op dialise hê. Baum³⁹ het sukrose geanaliseer in water wat ander opgeloste soute bevat. Hy het die osmotiese druk in die dialiseerder gebalanseer deur natriumchloried in die ontvangerstroom te voeg. Dit het die dialise van sukrose verhoog. Fusari et al⁴⁰ het die dialiseerder gebruik om verskeie geneesmiddels in tablet- of kapsulevorm te bepaal. Hy het vir al sy bepalinge 'n plasebo ('n mengsel van al die bestanddele behalwe die bestanddeel wat bepaal word) in die ontvangerstroom geplaas om te kompenseer vir osmotiese druk. Vir die bepaling

van kalsium sowel as chloried is die skenker en ontvangerstrome deurentyd dieselfde gehou met gedistilleerde water in beide kanale. Wanneer daar 'n ander stof in een van die kanale voorkom kan dit duidelike verskille in dialise veroorsaak. Wanneer die monster in 'n reagensstroom (CPC) as ontvangerstroom gedialiseer word, verhoog die %-dialise aansienlik. Dit kan moontlik wees as gevolg van die kalsium wat dadelik aan die CPC in die ontvangerstroom bind en sodoende die ewewig van dialise versteur.

3.4 E) KONSENTRASIE ANALIET IN DIE SKENKERSTROOM

Om die %-dialise te bereken soos aangedui word in Fig. 3.3-3.8 is 'n aantal standarde van verskillende konsentrasies gebruik. Die %-dialise vir elke standaard is afsonderlik bepaal waarna die gemiddeld bereken word en aangeteken is as vloeitempo teenoor %-dialise. Die waardes vir die verskillende konsentrasies het baie min verskil. Indien 'n grafiek getrek sou word wat konsentrasie teenoor %-dialise aantoon is dit egter duidelik dat die grafiek nie parallel loop nie, maar dat daar tog 'n helling is wat 'n hoër %-dialise voorspel vir monsters met laer konsentrasies. Dit is egter nie moontlik om dit eksperimenteel vas te stel nie aangesien sulke lae konsentrasies na dialise te klein sal wees om te bepaal. Aangesien dit gevaarlik is om afleidings te maak uit resultate wat statisties en nie eksperimenteel verkry is nie, sal hierdie bevinding eers eksperimenteel bevestig moet voor moontlike verklaring daarvoor gesoek kan word. Daar moet egter duidelik daarop gewys word dat die kurwe afplat vir hoër konsentrasies en dat dit dus heeltemal aanvaarbaar is om die gemiddeld van 5 verskillende standarde te neem vir die toets van 'n sekere membraan.

3.4 F) VOLUME MONSTER INGESPUIT

Daar is ook vasgestel dat die volume van die monster geen invloed op die %-dialise het nie. Verskillende volume monsters is in die FIA-sisteem gespuut en het geen verskil getoon nie. Die volumes is progressief verhoog totdat 'n kontinue stroom van die monster in die skenkerstroom gevloei het. Die ontvangerstroom is in 'n aparte bekertjie opgevang waarna die konsentrasie daarvan met die vloeisisteem (sonder 'n dialisemembraan) bepaal is. Uit die konsentrasie is die %-dialise bereken en het ooreengestem met die waardes wat verkry is vir die voorgestelde FIA-sisteem.

3.4 G) MEMBRAANTIPES

Die membraan wat die meeste in vloeï-inspuitanalise gebruik word, is die Technicon tipe C- membraan. Hierdie membraan is gemonteer op karton en daarom baie gerieflik om te gebruik. Die meeste van die dialisemembrane is selluloseasetaat-membrane. Die presiese samestelling word egter nie in alle gevalle bekend gemaak nie as gevolg van patentregte. Daar is ook ander maatskappye behalwe Technicon wat gemonteerde membrane vir vloeï-inspuitanalitiese sisteme vervaardig. Van die gemonteerde membrane wat in hierdie ondersoek gebruik is, is Elkay tipe C, Elkay tipe H en die Gradko tipe C. Daar word aangeneem dat die samestelling van hierdie membrane tot 'n groot mate ooreenstem en dat die verskil in %-dialise ontstaan as gevolg van die mate waartoe kruisbindings in die membrane voorkom.

'n Ander tipe dialisemembraan waarna daar gekyk is, is die algemeen gebruikte dialisebuis, byvoorbeeld Spectrapor 1, 2 en 3 en Visking tubing. Op die verpakking van die membrane word gesê dat die Spectrapor-membrane vervaardig word uit

geregenereerde sellulose. Hierdie tipe membraan (sellulose) is die beste vir laboratoriumgebruik, aangesien dit geen vaste lading bevat of adsorpsie van stowwe veroorsaak nie. Alhoewel hierdie membrane in werklikheid uit 'n jel bestaan, reageer hulle asof hulle porieë met vaste grootte het. As gevolg hiervan behoort enige stremming op die membraan verhoed te word om te verseker dat die poreusiteit konstant bly. Die membraanmatriks bestaan waarskynlik uit 'n deurmekaar massa kettings wat gevorm word deur glukose eenhede wat gekoppel is van C_1 na C_4 van die glukosemolekule. Hierdie membrane werk dus op 'n poriemeganisme wat beteken dat dit die eienskap van 'n eenvoudige sif het wat verskeie stowwe sal deurlaat op grond van molekulêre grootte. Die Spectrapor-membrane kom voor in 'n verskeidenheid van poriegroottes met molekulêre afsnynpunte vanaf 1 000 tot 50 000 molekulêre massa. Die molekulêre afsnynpunte van Visking tubing en die gemonteerde membrane word nie gespesifiseer nie, maar die ander membrane het 'n standaard-poriegrootte vir elke tipe membraan. Die gemonteerde membrane word verskaf in die vorm van 'n "nat"-membraan wat reeds uitgeswel is tot 'n standaard-porie-grootte, terwyl die buisvormige membrane droog aan die verbruiker verskaf word. Nadat die benodigde lengte van die dialisebuis afgeony is, word die membrane 'n paar uur in warm water geweek om die gliserol te verwyder en die membraanjel te vorm wat verantwoordelik is vir die skeiding. Die membrane word met gliserol behandel om te voorkom dat die membrane in hul droeë toestand bros word en skeur. Nadat hierdie membrane eers nat gemaak is, mag dit nie weer uitdroog nie, ander kan die poreusiteit verander of skeure mag daarin voorkom. Die membraan wat die beste %-dialise getoon het was die Technicon Tipe C membraan met 'n %-dialise van 7,0% vir 'n 300 mm membraan, 4,3% vir 'n 150 mm membraan en 2,1% vir 'n 70 mm membraan, al die resultate is verkry vir

'n vloeitempo van $1,0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min.}^{-1}$ Hierdie goeie diffusie kan waarskynlik toegeskryf word aan die lae dikte van $0,015 \text{ mm}$ en die relatief groot porieë van $40\text{-}60 \text{ \AA}$. Die verlaging in %-dialise vanaf Technicon tipe C na Elkay tipe C na Gradko tipe C kan toegeskryf word aan die toename in membraandikte en daarom die laer diffusietempo. Poriegrootte en membraaneienskappe is waarskynlik die rede vir die laer %-dialise wat verkry is vir die Spectra/por en Visking-membrane. Daar moet egter in aanmerking geneem word dat hierdie membrane nie ontwerp is vir vloei-sisteme nie maar vir dialise waar monsters oornag in die membrane gelaat word om te ontsout. In hierdie geval gaan dit nie oor dit wat dialiseer nie maar eerder oor dit wat agterbly, vandaar die klein poriegroottes. Die groter poriegrootte ($25\text{-}40 \text{ \AA}$) gee Spectra/por 2 'n hoër %-dialise as Spectra/por 1 met $12\text{-}25 \text{ \AA}$, en Spectra/por 3 met 'n poriegrootte van minder as 15 \AA . Daar is ook gevind dat die %-dialise vir membrane met korter padlengtes baie dieselfde is vir Visking en Spectra/por membrane en dat die verskil eers merkbaar word vir langer padlengtes.

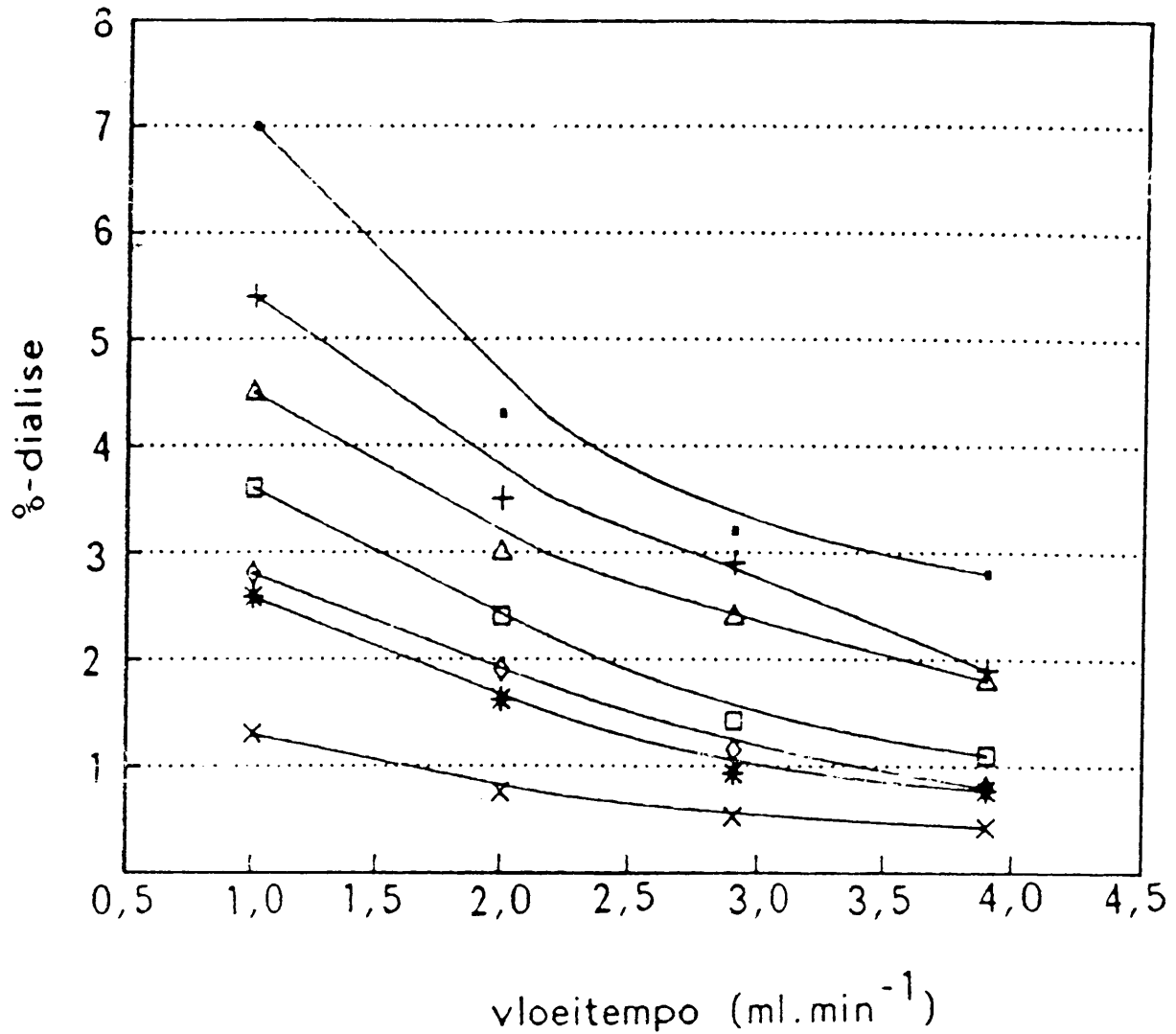


Fig. 3.3 - Eksperimentele vloei-afhanklikheid van dialise deur 'n 300 mm membraan soos verkry met die kalsiumbepaling.

(●) Technicon tipe C, (+) Elkay tipe C, (△) Gradko tipe C,
(*) Spectrapor 1, (⊞) Spectrapor 2, (×) Spectrapor 3,
(◊) Visking tubing.

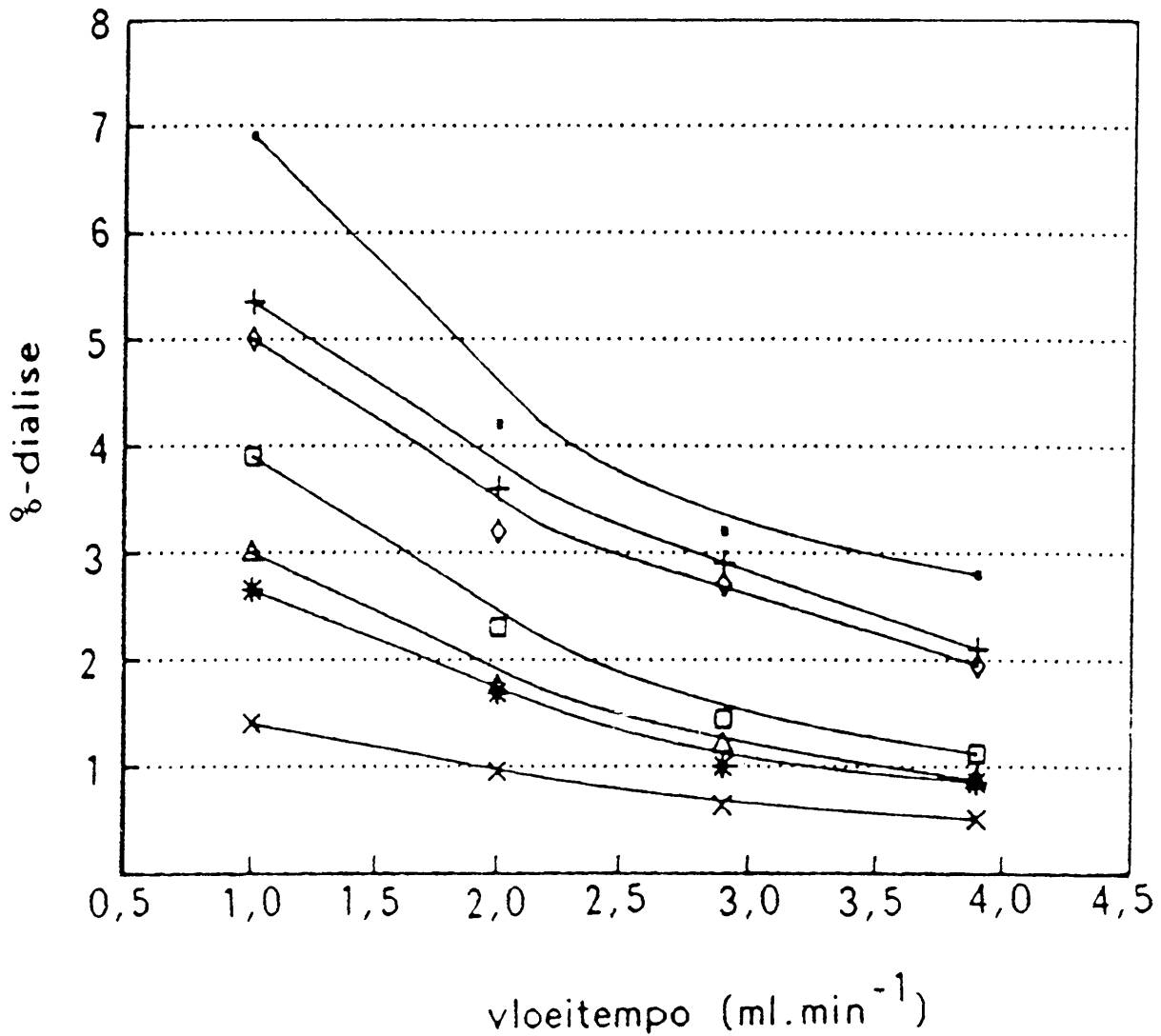


Fig. 3.4 - Eksperimentele vloei-afhanklikheid van dialise deur 'n 300 mm membraan soos verkry met die chloriedbepaling.

(●) Technicon tipe C, (+) Elkay tipe C, (◊) Gradko tipe C,
 (*) Spectrapor 1, (◻) Spectrapor 2, (x) Spectrapor 3,
 (△) Visking tubing.

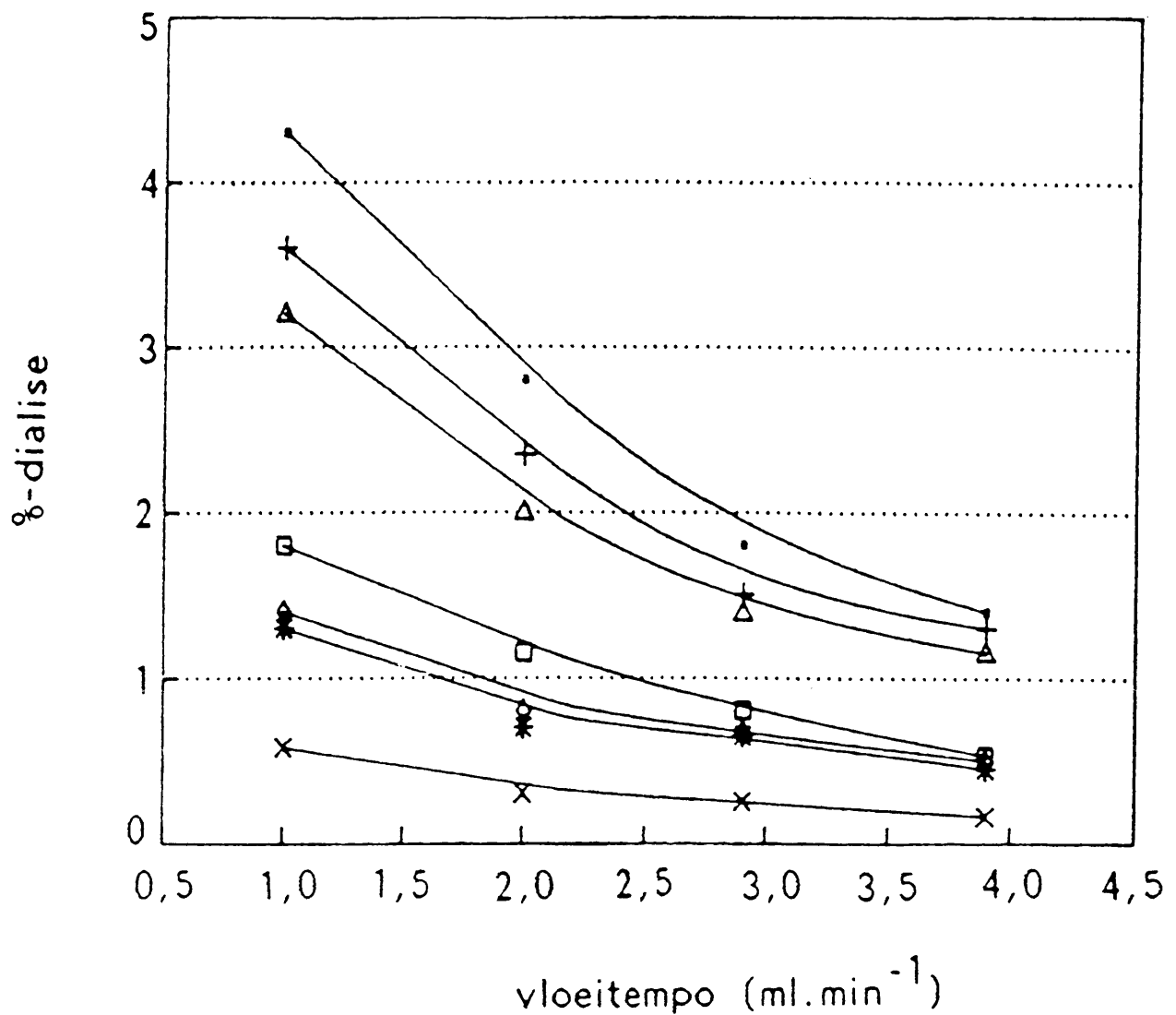


Fig. 3.5 - Eksperimentele vloeï-afhanklikheid van dialise deur 'n 170 mm membraan soos verkry met die kalsiumbepaling.

(●) Technicon tipe C, (+) Elkay tipe C, (▲) Gradko tipe C,
 (*) Spectrapor 1, (□) Spectrapor 2, (×) Spectrapor 3,
 (—) Visking tubing.

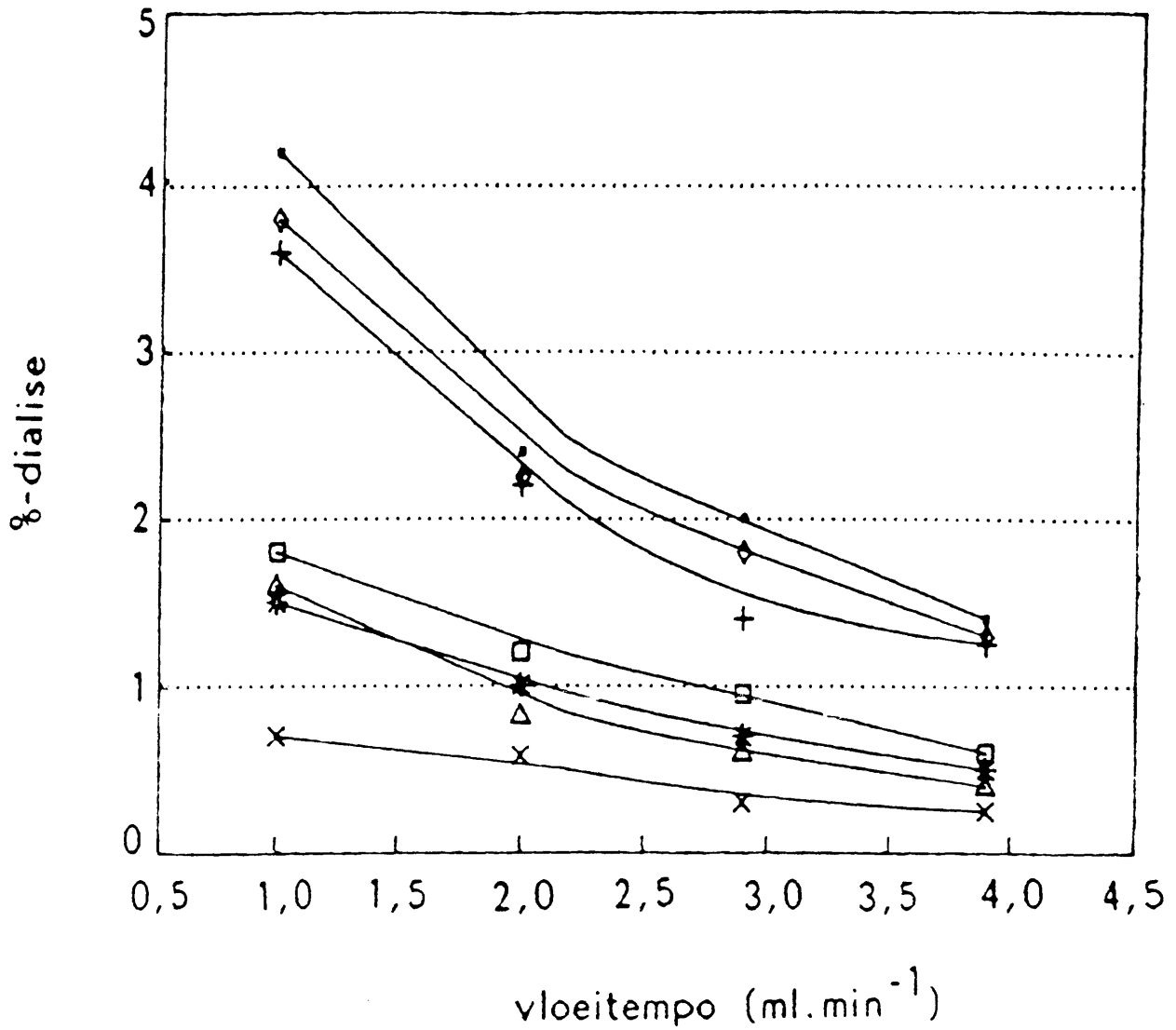


Fig. 3.6 - Eksperimentele vloei-afhanklikheid van dialise deur 'n 170 mm membraan soos verkry met die chloriedbepaling.

- (●) Technicon tipe C, (+) Eikav tipe C, (◊) Gradko tipe C,
 (*) Spectrapor 1, (◻) Spectrapor 2, (×) Spectrapor 3,
 (△) Visking tubing.

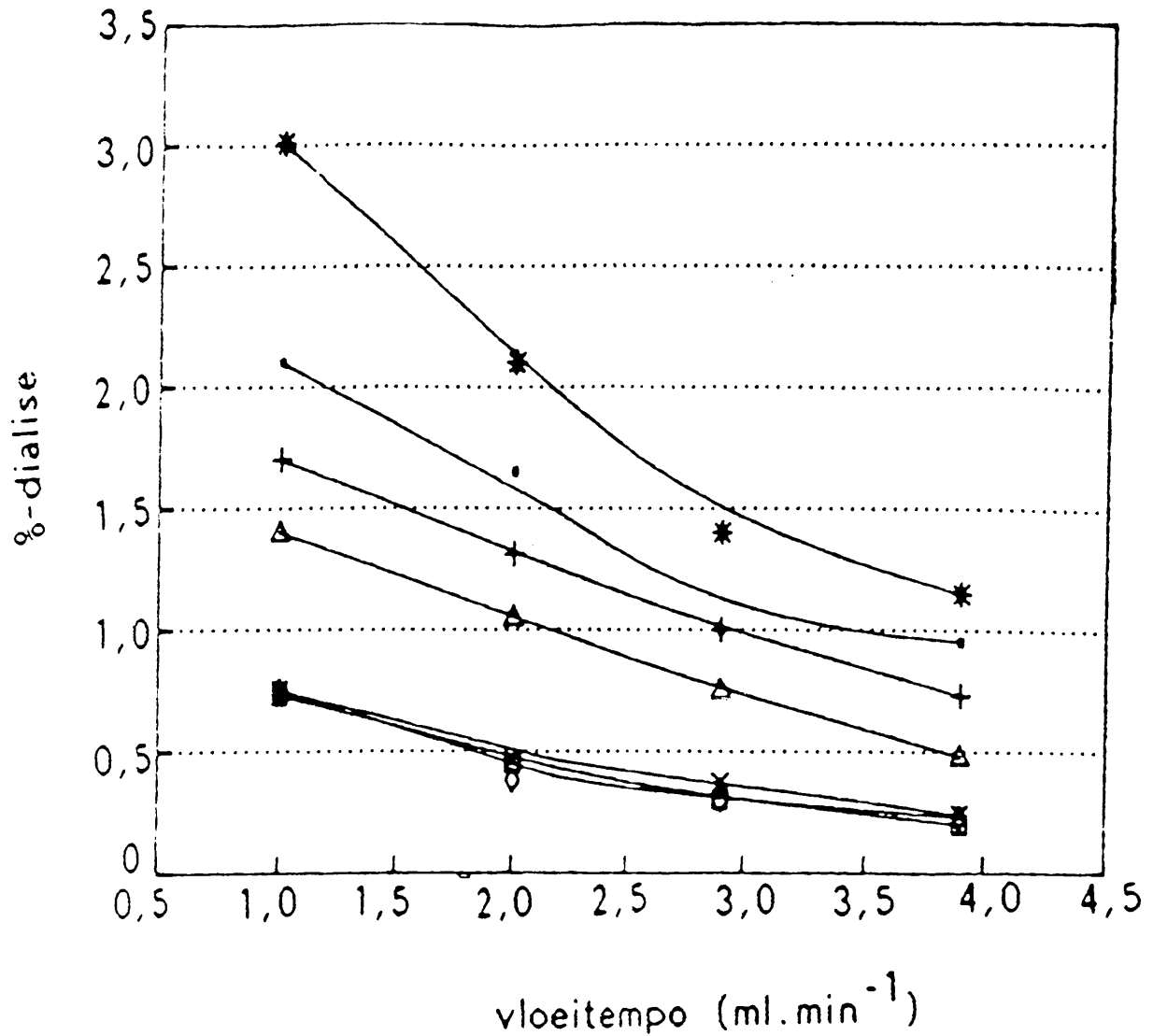


Fig. 3.7 - Eksperimentele vloei-afhanklikheid van dialise deur 'n 70 mm membraan soos verkry met die kalsiumbepaling.

(●) Technicon tipe C, (+) Elkay tipe C, (△) Gradko tipe C,
 (⊞) Spectrapor 1, (×) Spectrapor 2, (*) Elkay tipe H,
 (◇) Visking tubing.

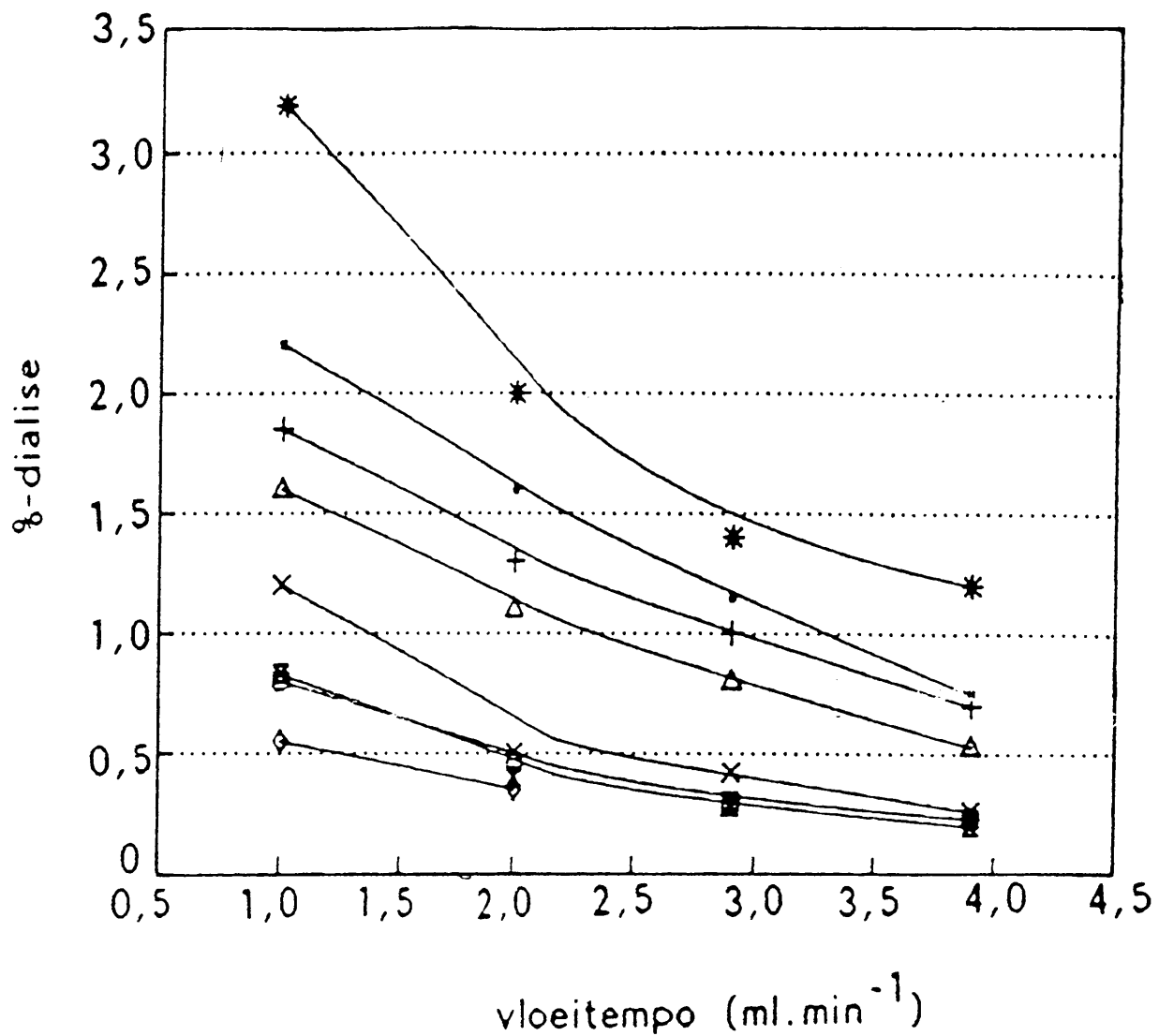


Fig. 3.8 - Eksperimentele vloei-afhanklikheid van dialise deur 'n 70 mm membraan soos verkry met die chloriedbepaling.

(●) Technicon tipe C, (+) Elkay tipe C, (△) Gradko tipe C,
 (■) Spectrapor 1, (×) Spectrapor 2, (*) Spectrapor 3,
 (⊗) Visking tubing, (◊) Elkay tipe H.

HOOFSTUK 4

TWEEKOMPONENT-ANALISE MET BEHULP VAN DIALISEERDERS; GELYKTYDIGE BEPALING VAN TOTALE EN VRY KALSIUM IN MELK

4.1 INLEIDING

Die hoë biologiese waarde van kalsium in melk is baie bekend. Kalsium vorm 'n onmisbare deel van die daaglikse dieët en is een van die komponente wat noodsaaklik is vir die vorming van been, veral vir kinders en babas.

Twee derdes van die kalsium in melk is gebind aan proteïene, terwyl die oorblywende derde in die vorm van vry ione voorkom. Die monovalente ione soos Na^+ , K^+ , en Cl^- kom hoofsaaklik voor as vry ione, terwyl die multivalente ione soos Ca^{2+} en Mg^{2+} komplekse vorm ⁴².

4.1.1 BEPALING VAN KALSIUM DEUR ATOOMABSORPSIE-SPEKTROSKOPIE

Die twee metodes wat in die meeste gevalle gebruik word vir die bepaling van kalsium in melk, is atoomabsorpsie-spektroskopie (AAS) en spektrofotometrie (kolorimetriese metodes). Kalsium word deur AAS bepaal aangesien dit 'n baie akkurate en vinnige metode is. Normale melkmonsters word by 239,9 nm bepaal wat die optimum lesing gee vir monsters wat tussen 200 en 800 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ Ca^{2+} bevat. Die FIA-sisteem veroorsaak egter 'n

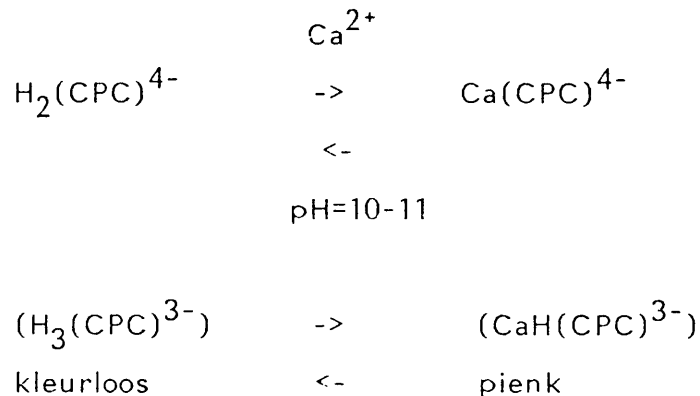
verduunning van die monster wat dit dan nodig maak om die Ca^{2+} by 422,7 nm te bepaal wat die optimum absorpsie gee vir monsters wat $1-4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Ca}^{2+}$ bevat. AAS is besonder nuttig vir die bepaling van totale kalsium, aangesien proteïensteuring deur die warm di-stikstofoksied-asetileenvlam uitgeskakel word, terwyl kolorimetrie met dialise gebruik kan word om die vry kalsium-inhoud te bepaal. Dit is moontlik om beide totale en vry kalsium te bepaal deur 'n dialiseerder in 'n vloeï-inspuitanalitiese sisteem in te voeg. Tydens die bepaling van totale kalsium deur AAS word die di-stikstofoksied-asetileenvlam gebruik om die invloed wat fosfate in melk op die bepaling het, uit te skakel. Hierdie vlam verhoog egter die gedeeltelike ionisasie van kalsium, wat onderdruk word deur die byvoeging van 'n makliker ioniseerbare element soos kalium (in die vorm van KNO_3).

4.1.2 BEPALING VAN KALSIUM DEUR KOLORIMETRIESE METODES

Die kolorimetriese metode vir die bepaling van vry kalsium is gebaseer op die reaksie tussen 'n metaalindikator en kalsium, deur gebruik te maak van die korrekte toestande, bv. pH. Kalmagiet⁴³ en kresolftaleïenkompleksoon (CPC)^{44, 45} is twee metaal-komplekseringsreagense wat gebruik kan word vir die kolorimetriese bepaling van kalsium. Die gebruik van CPC word verkies bo kalmagiet as gevolg van sekere nadele verbonde aan kalmagiet. Kalmagiet vorm 'n meer stabiele kompleks met magnesium as met kalsium⁴⁶. Fosfaat, koper, yster en aluminium steur^{47, 48} in die analitiese prosedure en die vry indikator gee 'n agtergrondabsorpsie by pH 10 in die kolorimetriese metode. CPC vorm $\text{Ca}(\text{CPC})^{4-}$, $\text{CaH}(\text{CPC})^{3-}$ en $\text{Ca}_2(\text{CPC})^{2-}$ komplekse met Ca- (of Mg-) ione³⁰. Die konsentrasie van hierdie spesies is 'n funksie van pH, metaalioonkonsentrasie en die ioniese omgewing. Die kleur wat gevorm word deur die CPC-kompleks is

die gevolg van 'n laktoonringvorming in die ftaleïenmolekule. Die kleurvorming word verhoog deur bivalente metale en 'n verhoging in pH.

Die reaksie tussen CPC en kalsium by pH 10-11 kan soos volg geskryf word:



Verskeie variasies van die handmetode word gebruik. Die meerderheid van hierdie metodes is egter te tydrowend vir laboratoriums waarin 'n hoë monsteruitvoer vereis word. Die meeste vloeï-inspuitanalitiese prosedures maak gebruik van 'n soortgelyke metode as die van Kessler en Wolfman⁴⁸ vir die bepaling van kalsium met kresolftaleïenkompleks en di-etielamien-natriumasetaat as 'n basis. Die absorpsie van die kalsium-kresolftaleïenkompleks word bepaal by 580 nm en pH 12. Magnesium veroorsaak die minste steurings by hierdie pH en golflengte. Gitelman⁴⁹ het hierdie metode verbeter deur die kinolien-8-ol by te voeg om die steuring wat deur magnesium veroorsaak word te verwyder en die kompleks se absorpsie by 570 nm te meet. Roach⁵⁰ het hierdie metode toegepas teen 'n tempo van 60 monsters per uur vir die bepaling van kalsium in veevoer. Die absorpsie van die kompleks is by 580 nm en pH 10,7 bepaal. Moorehead en Biggs⁵¹ het hierdie metode verander deur die giftige, vlugtige di-etielamien (pK_a 11,0) te vervang met die meer stabiele 2-amino-2-metielpropaan-1-ol (pK_a 9,6) as 'n basis. Die kresolftaleïenkompleks is feitlik kleurloos by 'n

pH 10, maar is hoogs gekleurd by pH 12. Die blanko was daardeur gereduseer en die sensitiwiteit is verhoog. Aangesien die magnesiumsteurings verwyder is deur die gebruik van kinolien-8-ol, was dit onnodig om by 'n hoër pH te werk. Basson en Van Staden⁵² het gevind dat die 2-amino-2-metielpropan-1-ol wat gebruik word as basis 'n meer stabiele oplossing vir vloeï-inspuitanalise gee vir die bepaling van kalsium in veevoer, wat die gebruik van die giftige kalsiumsianied as stabiliseerder onnodig maak.

4.1.3 BEPALING VAN KALSIUM DEUR VLOEI-INSPUITANALISE

Proteïene in melk steur in die kresolftaleïen-kalsiumbepaling, en moet daarom geëlimineer word. Dit kan gedoen word deur nat vertering, deproteïenering met natriumtungstaat, swaesisuur of dialise. Een van die nadele van deproteïenering en nat vertering is dat dit 'n verlaging in analisetempo tot gevolg het, terwyl dialise nie net die proteïensteurings elimineer nie, maar ook die bepaling van vry kalsium moontlik maak. Joe et al⁵³ het 'n kontinue vloeimetode beskryf vir die bepaling van kalsium in melk teen 'n tempo van 20 monsters per uur. Hierdie metode maak gebruik van nat vertering van monsters voor analise. 'n Outomatiese gesegmenteerde kontinue vloeisisteam met 'n dialiseerder is ook beskryf vir die bepaling van kalsium in bloed⁵⁴. Deurvloedialiseerders is uiters nuttige komponente in analitiese vloeisisteme, veral in vloeï-inspuitanalise (FIA). Aangesien die effektiwiteit van dialise in 'n kontinue bewegende stroom slegs omtrent 0,5-4% is, dien die dialiseerder nie slegs as 'n skeidingsapparaat tussen stowwe wat bepaal word en steurende komponente nie, maar ook as 'n effektiewe verdunner van stowwe.

Die bepaling van totale en vry kalsium in melk bly nog steeds 'n probleem. Dit was duidelik dat die beste manier om hierdie probleem op te los, die insluiting van 'n dialiseerder in die vloeï-inspuitsisteen is. Basson en Van Staden⁵⁵ het 'n vloeï-inspuitanalitiese sisteen beskryf vir die bepaling van kalsium in melk, waar die absorpsie van die gedialiseerde kalsium as 'n kalsium-kresolftaleïenkompleks by 580 nm gemeet is. Hierdie metode het egter groot nadele, aangesien dit slegs bruikbaar is vir die bepaling van totale kalsium. Proteïenvertering is gebruik om totale dialiseerbare kalsium te produseer. Hierdie voorafbehandeling van monsters is tydrowend en duur en mag ook 'n verlaging in presisie tot gevolg hê. Deur die kombinasie van 'n vloeï-inspuïtdialitiese sisteen met toepaslike detektors, was dit moontlik om te onderskei tussen totale en vry kalsium. Deur van hierdie moontlikheid gebruik te maak, is 'n FIA-metode ontwerp vir die gelyktydige bepaling van hierdie twee kalsiumkomponente in melk. Hierdie hoofstuk doen verslag oor werk wat gedoen is deur gebruikmaking van bogenoemde metode.

4.2 EKSPERIMENTEEL

4.2.A) REAGENSE

Alle reagentiese is voorberei uit analitiese graad chemikalieë, tensy dit anders gespesifiseer word. Dubbel gedistilleerde water is deurentyd gebruik. Die reagentiese is soos volg berei:

KRESOLFTALEIENKOMPLESOON: Die oplossing is voorberei deur 0,10 g kresolftaleïenkompleks (verkry vanaf BDH CHEMIKALIEE BPK.) af te weeg en in 40 cm³, 5 mol.dm⁻³ soutsuur op te los. Daarna is 2 g kinolien-8-ol bygevoeg terwyl

die fles versigtig geswaai is. Die oplossing is kwantitatief verdun tot 2 dm^3 met gedistilleerde water.

BASISOPLOSSING: Die oplossing is voorberei deur 70 g , 2-amino-2-metielpropaan-1-ol (AMP) af te weeg en op te los in 500 cm^3 gedistilleerde water.

STANDAARDKALSIUMOPLOSSING: 'n Kalsiumoplossing is voorberei deur $24,9800 \text{ g}$ analitiese graad kalsiumkarbonaat versigtig op te los in ongeveer $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ soutsuur, wat drupsgewys bygevoeg is totdat al die kalsiumkarbonaat net opgelos is. Die oplossing is vir 'n paar minute gekook om al die koolstofdioksied te verwyder. Die kalsiumoplossing is daarna geneutraliseer met ongeveer $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ kaliumhidroksied. Die pH is aangepas tot 'n pH van ongeveer 6, waarna die standaard verdun is tot 1 dm^3 met gedistilleerde water, wat 'n standaard oplossing van $10\ 000 \text{ mg.dm}^{-3}$ kalsium gegee het. 'n Reeks standarde wat konsentrasies tussen 100 en $1\ 500 \text{ mg.dm}^{-3}$ het is berei deur verdunnings van die $10\ 000 \text{ mg.dm}^{-3}$ -oplossing te maak. Hierdie standaardreeks is gebruik vir die bepaling van totale sowel as vry kalsium in die voorgestelde FIA-sisteem. Die registreerderattenuasie van die dubbelpenregistreerder is so ingestel dat daar duidelik onderskeid getref kon word tussen die twee bepalingsmetodes op die registreerderpapier.

KALIUMOPLOSSING: Vir die verwydering van ioniese steurings is $6,4650 \text{ g}$ kaliumnitraat (KNO_3) afgeweg en verdun tot 1 dm^3 om 'n oplossing te gee wat $2\ 500 \mu\text{g K}^+/\text{cm}^3$ te bevat.

4.2.B) APPARAAT

'n Carle-mikrovolumeklep is gebruik. Die klep het 2 identiese

lusse wat elk 'n volume van 30 μ l het. Die outomatiese monsternemingseenheid is deur Cenco gemaak en is in samewerking met 'n Cenco-peristalriese pomp, wat teen 'n tempo van 10 revolusies per minuut werk, gebruik. Die optimum tempo waarteen die monsters geneem is, was 60 per uur. 'n Philips Pye Unicam SP6-550 spektrofotometer is gebruik by 'n golflengte van 580 nm vir die bepaling van die vry kalsium en 'n Varian AA-175-atoomabsorpsie-spektrofotometer (AAS) is by 'n golflengte van 422,7 nm gebruik vir die bepaling van die totale kalsium. Die AAS-lampstroom was 10,5 mA en die spleetwydte was 1 nm. In die vloeisistiem is transmissiebuis met 'n binnedeursnee van 0,76 mm gebruik. 'n Technicon-tipe C-12" dialisemembraan met 'n padlengte van 300 mm is gebruik.

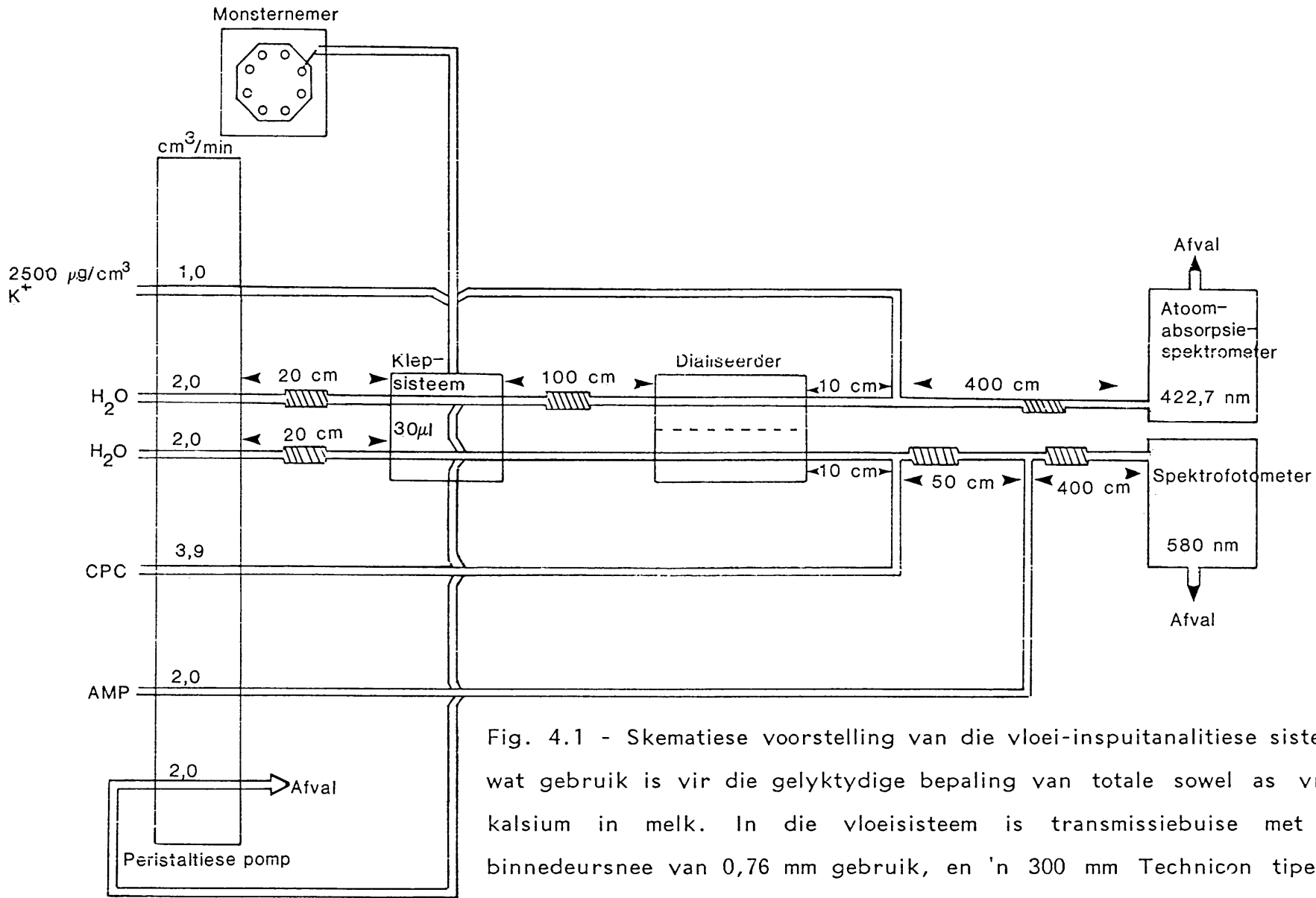


Fig. 4.1 - Skematiese voorstelling van die vloeï-inspuitanalitiese sisteem wat gebruik is vir die gelyktydige bepaling van totale sowel as vrye kalsium in melk. In die vloeisisteem is transmissiebuis met 'n binnedeursnee van 0,76 mm gebruik, en 'n 300 mm Technicon tipe C dialisemembraan.

4.3 RESULTATE EN BESPREKING

Die vloediagram vir die gelyktydige bepaling van totale en vry kalsium word in Fig. 4.1 aangetoon. Die verdelingsbuis bestaan uit Tygon-buis (met binnedeursnee van 0.76 mm) wat in die nodige lengtes gesny en rondom glasbuis met lengte 10 cm en breedte 1 cm gedraai is.

Die effektiwiteit van hierdie kontinue dialise is afhanklik van 'n verskeidenheid faktore, onder andere die vloeitempo's van die pompbuis in die draer- en ontvangerstrome. In hierdie sisteem is daar besluit op 'n saamstromige vloeï in plaas van 'n teenstromige vloeï, aangesien dispersie in 'n lang dialiseerder kleiner is met saamstromige vloeï. Daar kon ook duidelik uit die resultate afgelei word dat 'n optimum presiese massa-oordrag verkry kan word deur dieselfde vloeitempo's in die draer- en ontvangerstroom te gebruik. Dit het verseker dat die dialiseproses nie die vorm van die monsterprop wat ingespuif is verander het nie, maar dat die dialisaat 'n identiese verdunde proteïenvrye monster aan die ontvangerkant van die membraan verkry. Resultate wat verkry is, het ook getoon dat die gebruik van aangesuurde CPC in die ontvangerstroom die dinamiese momentele ewewig van die dialiseproses verander. Die CPC-reagens is daarom op 'n latere posisie in die opstelling bygevoeg nadat die dialise voltooi is (Fig 4.1). Dit is opgevolg deur 'n geoptimeerde hoeveelheid AMP-oplossing, soos oorspronklik beskryf deur Gitelman⁴⁹ en Basson en Van Staden⁵⁵. Vir 'n optimum reaksie is water as draerstroom gebruik. Die $2\ 500\ \mu\text{g}\ \text{K}^+ \cdot \text{cm}^{-3}$ kaliumnitraatoplossing is later in die stroom bygevoeg (Fig. 4.1) net voor deteksie van totale kalsium deur die AAS. Die byvoeging van kalium onderdruk kalsiumionisasie, wat die optimum akkurate bepaling van kalsium

verseker. Die byvoeging van 'n dialiseerder in die netwerk van die FIA-sisteem skep ook die moontlikheid vir die gebruik van 'n enkele reeks standaarde vir die gelyktydige bepaling van beide totale en vry kalsium. Die kalsiumstandaarde wat gebruik word vir die bepaling van totale kalsium word direk na die AAS gekanaliseer via die draerstream. Die kalsiumstandaarde vir die bepaling van vry kalsium word gelyktydig gedialiseer. Die dialisaat word as 'n produk na reaksie met CPC na die spektrofotometer gestuur.

Tabel 4.1. Bepaling van totale en vry kalsium deur atoomabsorpsiespektroskopie asook met die voorgestelde metode (Fig. 4.1) Alle konsentrasies is gemeet in mg.dm^{-3} .

No.	Vrye kalsium			Totale kalsium		
	AAS	FIA	%Rsd	AAS	FIA	%Rsd
1	155	160	0.58	1310	1350	1.05
2	150	158	0.78	1300	1340	1.03
3	132	150	0.65	1308	1342	1.23
4	148	155	0.85	1300	1337	0.99
5	160	165	0.76	1450	1500	1.30

AAS = direkte atoomabsorpsie-bepaling van kalsium.

FIA = voorgestelde metode van bepaling deur vloei-inspuitanalise.

%RSD= gemiddelde relatiewe standaardafwyking van 15 toetse in elke geval.

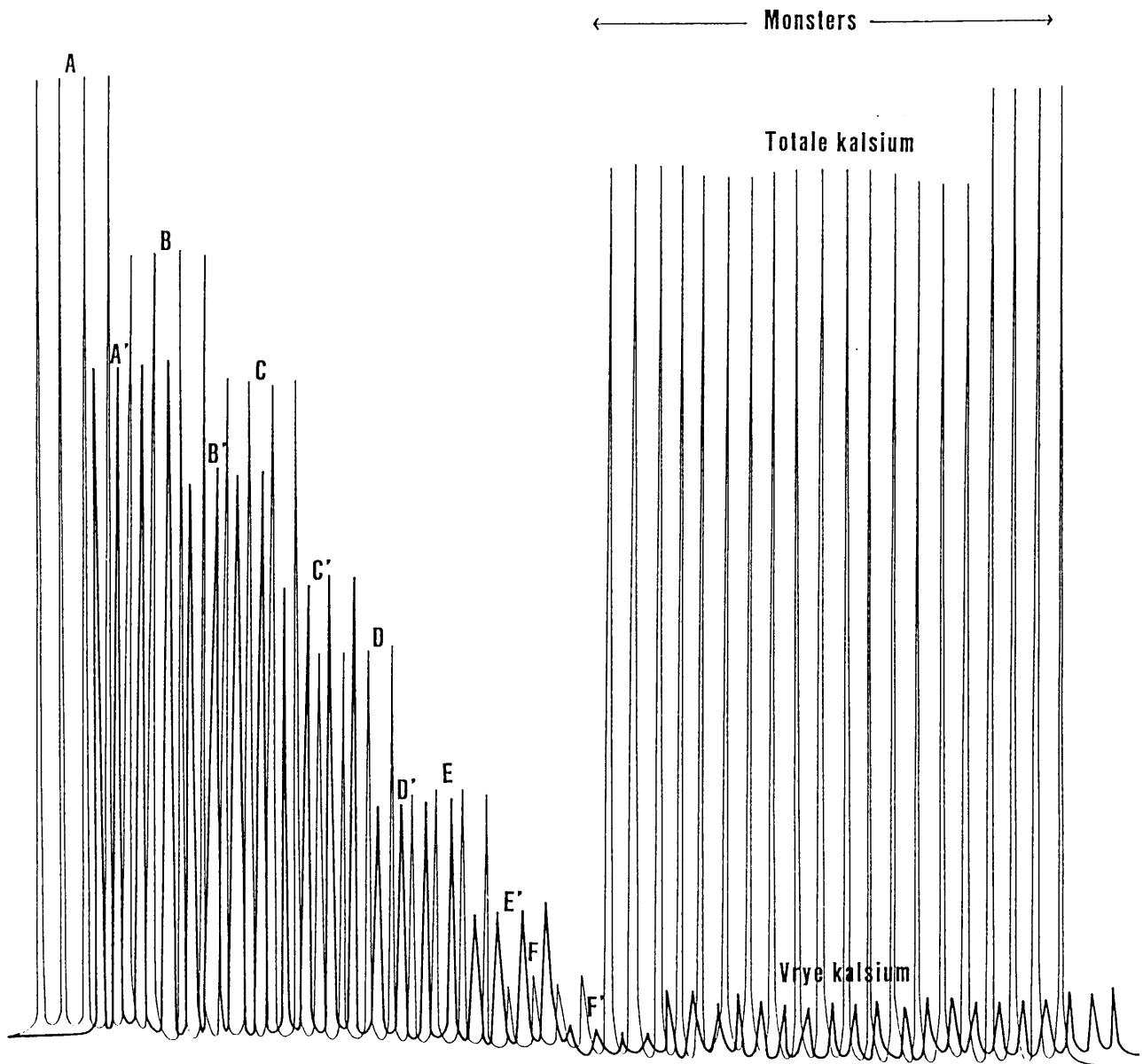


Fig. 4.2 - Registreerdervoorstelling van 'n verteenwoordigende lopie teen bepalingstempo van 60 melkmonsters per uur vir die bepaling van totale en vry kalsium. Elke standaard en monster is 4 keer ingepuit. Van links na regs is kalsiumstandaarde met konsentrasies $1\,500\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $1\,000\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $800\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $600\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $400\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, en $200\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, waarna 5 melkmonsters geanaliseer is.

Die resultate wat verkry is met die metode word aangetoon in tabel 4.1. Die waardes wat verkry is vir die bepaling van totale kalsium deur die voorgestelde metode is ook vergelyk met waardes verkry vir dieselfede melkmonsters wat direk bepaal is deur AAS. Melkmonsters is ook gedialiseer deur 'n kontinue dialisesisteen en die dialisaat is opgevang. Resultate wat verkry is vir die bepaling van vry kalsium deur die voorgestelde FIA-metode is vergelyk met die waardes verkry vir die melkdialisaat wat bepaal is deur 'n direkte AAS-metode en 'n direkte standaard-FIA-metode vir die bepaling van kalsium. Dit is duidelik uit tabel 4.1 dat ooreenstemmende resultate verkry is tussen die voorgesteide FIA-metode en die standaardmetodes. 'n Statistiese ondersoek toon ook aan dat verskille tussen die metodes weglaatbaar klein is. Die relatiewe standaardafwyking vir melkmonsters met verskillende konsentrasies totale en vry kalsium was beter as 1,30 en 0,85 %, respektiewelik vir 15 toetse van elke monster.

HOOFSUK 5

DRIEKOMPONENT-ANALISE MET BEHULP VAN DIALISEERDERS; DIE GELYKTYDIGE BEPALING VAN TOTALE EN VRY KALSIUM, EN CHLORIED IN MELK.

INLEIDING

Die meeste FIA-metodes is gebaseer op 'n enkele bepaling. Dit is egter moontlik om meer as een bepaling op een monster uit te voer. In hierdie hoofstuk word die gelyktydige bepaling van totale kalsium, vry kalsium en vry chloried bespreek. 'n Gelyktydige bepaling kan beskou word as 'n bepaling waar twee of meer spesies in dieselfde monster bepaal word met 'n enkele FIA-sisteen. Indien daar meer aandag aan verdere ontwikkeling geskenk word, kan een van die groot nadele van FIA-sisteme, naamlik dat slegs 'n baie beperkte aantal elemente bepaal kan word, maklik geëlimineer word. Gelyktydige bepalings kan op verskeie maniere uitgevoer word. Om 'n verskeidenheid elemente te bepaal kan meer as een detektor gebruik word, van dieselfde tipe of verskillende tipes of 'n enkele detektor kan gebruik word en die monster word deur die klep beheer sodat twee spesies opeenvolgens bepaal word. Dit is ook moontlik om 'n enkele inspuiting van 'n enkele monsterprop te gebruik waar die monster na inspuiting geskei word en deur verskillende vloeiselle in dieselfde detektor beweeg.

Gelyktydige bepalings kan geklassifiseer word op grond van die verhouding tussen die aantal spesies wat bepaal word en die aantal detektors wat gebruik word. Dus kan 'n enkele detektor gebruik word

om verskeie spesies te bepaal of die FIA-sisteem kan een detektor hê vir elke spesie wat bepaal moet word. In laasgenoemde geval kan daar weer onderskeid getref word tussen die geval waar die detektore in parallel of in serie gerangskik moet word. Waar paralleldetektors gebruik word is dit nie nodig om die draerstream te verdeel om sodoende twee monsterproppe te verkry wat na die onderskeie detektore gaan nie. Skeiding van die monsterprop kan geskied deur multikanaalkleppe, verdeling van die draerstream of dialise. Waar detektore in serie gerangskik is, beweeg die monsterprop deur al die detektors agtereenvolgens en hoef die monster nie onderverdeel te word nie. 'n Verdere klassifikasie vir die geval waar 'n enkele detektor gebruik word, is gekoppel aan die tipe inspuitsisteem wat gebruik word. In die meeste gevalle word 'n enkele inspuiting van die monster gebruik terwyl ander groepe gebaseer is op multi-inspuiting (gelyktydig of opeenvolgend).

5.1.1 GELYKTYDIGE BEPALING MET VERSKILLENDE DETEKTORE

Die relatiewe posisies van detektore in gelyktydige FIA-sisteme gee aanleiding tot klassifikasie wat gebaseer is op die rangskikking van die detektors in serie of in parallel.

5.1.1.1 Die gebruik van seriedetektors

Hierdie tipe detektore word oor die algemeen gebruik in samewerking met potensiometriese tegnieke. Die gebruik van ionselektiewe elektrodes wat agtereenvolgens in 'n FIA-sisteem voorkom maak die gelyktydige bepaling van verskillende spesies moontlik. Ander tipes detektore kan ook in serie gebruik word, byvoorbeeld spektrofotometers. 'n Vereiste vir die gebruik van detektore in serie is dat die vorm en geometrie van die monstersone, behalwe vir dispersie, nie weselik verander nie. Die deurvloei-sel behoort dus buisvormig te wees met dimensies wat aansluit by die gewone vermengingssisteem. 'n Voorbeeld hiervan is die sisteme

wat deur Jensen en medewerkers voorgestel is vir die bepaling van elementpare magnesium en strontium en magnesium en kalsium⁵⁶⁻⁵⁹ op grond van die verskillende verplasingstempo's van hulle komplekse met verskillende ligande. Die absorpsie van hierdie sisteme word gemonitor deur twee opeenvolgende spektrofotometers wat so geplaas is dat slegs een van die metale verplaas is wanneer die monster deur die eerste detektor gaan, terwyl albei metale verplaas is wanneer hulle die tweede detektor bereik. 'n Tipiese voorbeeld van gelyktydige seriepotensiometriese analise is deur Virtanen⁶⁰ ontwikkel vir die bepaling van natrium-, kalium-, kalsium- en chloriedione deur die gebruik van ioonselektiewe elektrodes.

Nie-differensiële FIA maak van optiese detektore in serie gebruik in studies op yster⁶¹ en chroom⁶² waarin 'n spektrofotometer gebruik word om een van die oksidasietoestande van die element onder bespreking te bepaal. Die detektore word in serie geplaas met 'n atoomabsorpsiespektrometer ook in serie, aan die einde, om die totale hoeveelheid van die element te bepaal.

5.1.1.2 Die gebruik van parallel-detektors

Hierdie tipe sisteme kan nog verder onderverdeel word na aankom van hoe die monster verdeel word deur verdeling van die draerstroombaan voor dit by die detektore aankom. Oor die algemeen word die monster gelyk verdeel, waarna elke subprop na 'n aparte detektor geneem word. Basson en Van Staden⁶³ het 'n sisteem met twee spektrofotometers ontwerp, waarvan een gestel is om atoomabsorpsie te bepaal en die ander atoomemissie. Hierdie opstelling word gebruik vir die gelyktydige bepaling van tot vier elemente (natrium, kalium, magnesium en kalsium). Hierdie sisteem is vir die bepaling van die elemente in oppervlak, grond en huishoudelike water gebruik.

Verskeie elemente kan ook gelyktydig bepaal word deur multi-inspuiting. Hierdie metode is deur Slanina et al⁶⁴ gebruik vir die bepaling van drie spesies deur gebruik te maak van 'n multikanaalspektrofotometer. Chloried-, ammonium- en nitraatione is bepaal deur gebruik te maak van 'n sisteem met drie inspuitskleppe, waarvan al drie gelyktydig gevul word met 'n enkele monster. Die multikanaal-drielaagklep is ontwerp deur die Brasiliaanse navorsingsgroep⁶⁵ onder leiding van Bergamin en is gebruik vir die opeenvolgende bepaling van nitriet en nitraat in dieselfde monster⁶⁶ sowel as die opeenvolgende bepaling van stikstof en fosfor in plantmateriaal⁶⁷. 'n Minder eenvoudige drielaaginspuite stroomwisselaar^{68,69} is ook gebruik vir die bepaling van spoorhoeveelhede swaarmetale. Twee parallelle monsterlusse, twee eluantlusse en twee ionuitruilingskolomme is op dieselfde rotor gerangskik. Indien die rotor met die hand geroteer word, met gereelde intervalle, word die monsterneming, ionuitruiling en eluasieprosesse opeenvolgend uitgevoer. Die drie prosesse het alternatief op die twee kolomme plaasgevind. Jorgensen et al⁷⁰ het 'n veesydige dubbellaag-draaiklep beskryf wat met lugdruk werk. Hierdie klep is gebruik om analitiese strome in FIA te verdeel. Die konfigurasies van die klep word aangetoon deur Jorgensen⁷⁰. Die monstervolumes wat aangetoon word, word beheer deur tyd, met die lusvolumes in een of twee lusse of met ionuitruilpiekkonsentrasieprosedures. Opeenvolgende monsterneming deur gebruik te maak van twee-lus-konfigurasie word ook aangetoon⁷⁰. Die blokdiagram van 'n multikanaalmonsterlus-inspuiting, vir gelyktydige analyses, word aangetoon in Fig.5.1⁷¹. In posisie 1 word slegs 'n monster van die draaitafel van 'n outomatiese monsternemer geneem. Die monster word gekanaliseer deur die valslus 1 en lusse 3, 5, 7, 9 en 11, terwyl 5 individuele draerstrome, wat 5 verskillende spesies analiseer, gekanaliseer word via lusse 2, 4, 6, 8 en 10 na vyf verskillende vermengingsbuis-sisteme. Lus 12 is 'n valslus. In posisie 2 spuit die vyf monsterge vulde lusse, wat hierbo genoem word, die monsterproppe in vyf verskillende analitiese kanale via lusse 3, 5, 7, 9 en 11, terwyl

lusse 2, 4, 6, 8, en 10 en die valslus 12 terselfdertyd gevul word met die volgende monster. Lus een is nou 'n valslus. In posisie 2 word die binneste staaf in die buiteste kamer gestoot, sodat die openinge presies ooreenkom soos aangetoon. Die staaf is in posisie een uitgetrek met dieselfde voorsorgmaatreëls wat getref word. Indien die klepsisteem goed vervaardig is en versigtig ingestel is, is geen opbou van druk waarneembaar nie. Die klep word vinnig omgeskakel deur saamgepersde lug vanaf 'n gassilinder sonder 'n lekasie. Alhoewel daar reeds verskeie detektore met sukses gebruik is vir gelyktydige bepalinge met FIA, lyk die gebruik van 'n enkele veeldoelige detektor soos 'n IGP-eenheid (induktiefgekoppelde plasma) na 'n besondere goeie detektor. Die toepassings moontlikhede van so 'n spektrometer in samewerking met FIA is beklemtoon in 'n interessante artikel deur Greenfield⁷².

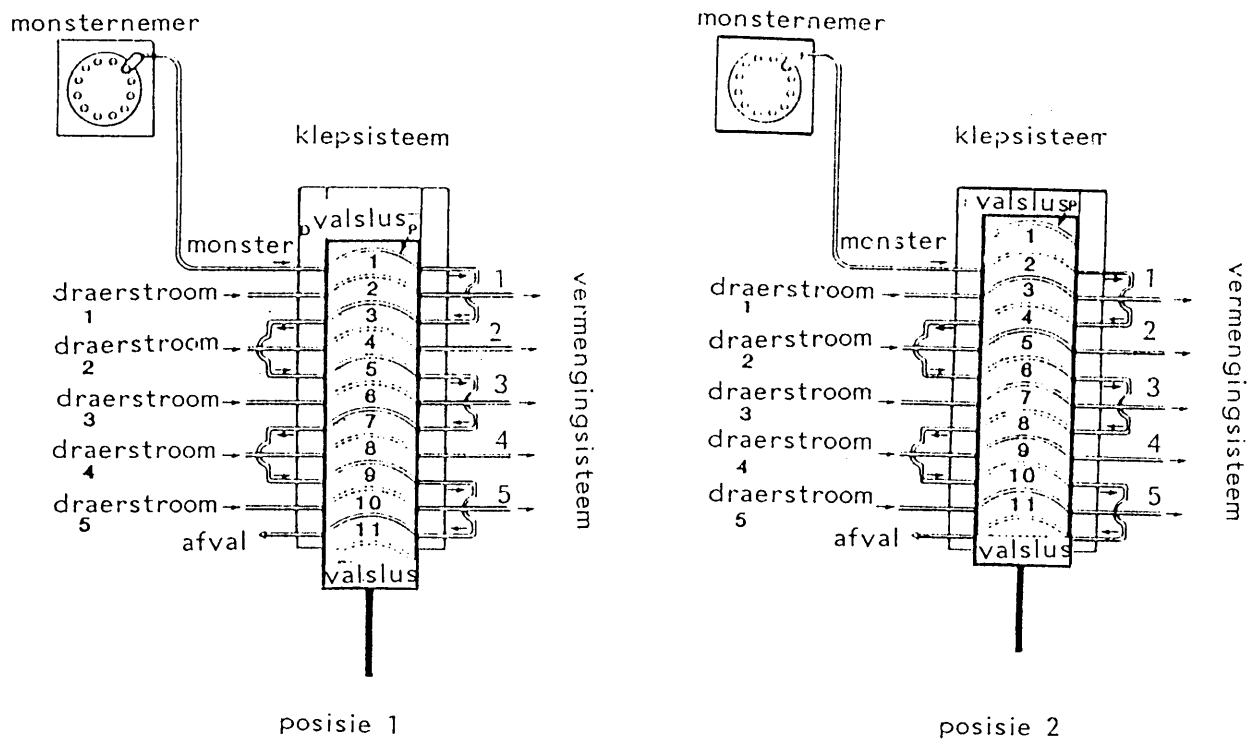


Fig. 5.1 - 'n Skematiese voorstelling van die multikanaalklep.

Die metode wat in hierdie gedeelte voorgestel word kan ook as parallelle bepaling geklassifiseer word. In plaas daarvan dat die monster in drie verdeel word deur 'n verdeling van die stroom word die monster verdeel deur dialise wat 'n meer presiese metode is. Daar word gebruik gemaak van 'n enkelkanaalklep en ook 'n enkele monster. Die monster beweeg in die draerstream verby die eerste dialiseerder wat die monster skei, die gedialiseerde gedeelte gaan na 'n spektrofotometer wat vry kalsium bepaal. Die ongedialiseerde gedeelte gaan na 'n tweede dialiseerder wat weer die monster skei en in hierdie geval gaan die gedialiseerde gedeelte na 'n ISE wat totale chloried bepaal. Die oorspronklike monsterprop word nie deur die dialiseproses verander nie en gaan dan na 'n AAS vir bepaling van die totale kalsium. Die verdunning van die oorspronklike monster het geen invloed op die uiteindelijke resultate nie aangesien die standaard dieselfde reaksies ondergaan.

5.1.2 GELYKTYDIGE BEPALINGS MET 'N ENKELE DETEKTOR

5.1.2.1 Bepalings met opeenvolgende inspuittings

Die Brasiliaanse span onder leiding van Bergamini het 'n metode ontwikkel vir die gelyktydige bepaling van nitriet en nitraat. Vir hierdie bepaling is die inspuitsklep so gestel dat een van die drie lusse die reagent in die draerstream inspuit, terwyl die ander twee lusse, waarvan een 'n ingeboude kadmiumreduksiekolom bevat, alternatief gebruik word⁷³. Die monsterprop vanaf die lus met die reduksiekolom maak die bepaling van die som van die twee spesies moontlik, terwyl die ander kolom slegs nitriet bepaal. 'n Meer gesofistikeerde drievoudinspuit is deur dieselfde outeurs gebruik vir die opeenvolgende bepaling van stikstof en fosfor in plante⁷⁴.

5.1.2.2 Bepalings met 'n enkele inspuiting

Die eerste sisteem wat volgens hierdie beginsel werk, is deur Ruzicka beskryf⁷⁵ vir die analise van fosfor en stikstof deur die vorming van fosfomolibdeensuur en indofenolblou respektiewelik. Die apparaat bestaan uit 'n hoofkanaal wat 'n suurdraerstroom bevat, waarin die monster ingespuut word. Nadat die monster ingespuut is, word die stroom in twee verdeel waarna elk vermeng word met 'n toepaslike reagens vir die spesifieke bepaling. Elk van die kanale lei 'n reagerende subprop na 'n vloeisel, met beide vloeiselle agter mekaar in die pad van die enkele detektor. Elke inspuiting gee dus twee pieke.

Daar moet egter sterk daarop gewys word dat die verdeling van 'n enkele monster deur verdeling van die draerstroom nie baie akkuraat of herhaalbaar geskied nie, en waar moontlik moet hierdie metodes vermy word en met 'n beter metode vervang word. In die metode wat in hierdie gedeelte voorgestel word, word drie verskillende elemente bepaal met drie verskillende detektors. Hierdie bepaling geskied sonder die skeiding van die monsterprop. Die bepaling word moontlik gemaak deur die gebruik van 'n dialisemembraan. Die membraan skei nie net totale en vry kalsium nie maar veroorsaak ook 'n verdunning van die vry kalsium wat die konsentrasie van vry kalsium binne die bepalinggebied van die kleurreegens (CPC) bring. Die dialiseproses in teenstelling met die skeiding van die monster deur die verdeling van die draerstroom, is 'n baie akkurate en herhaalbare proses. Vir die bepaling van chloried word 'n chloriedselektiewe elektrode gebruik wat chloried bepaal nadat dit van die draerstroom geskei is deur 'n tweede dialisemembraan. Die draerstroom met die monsterprop word nie deur die dialiseproses versteur nie en word dan net so na die AAS vervoer vir die bepaling van die totale kalsium.

5.2 EKSPERIMENTEEL

5.2.1 KALSIUMBEPALING

5.2.1 a) Reagense

Alle reagense is voorberei uit analitiese graad chemikalieë, tensy dit anders gespesifiseer word. Dubbel gedistilleerde water is deurentyd gebruik. Die reagense is soos volg berei:

KRESOLFTALEIENKOMPLESOON: Die oplossing is voorberei deur 0,100 g kresolftaleienkompleksoon (verkry vanaf BDH CHEMIKALIEE BPK.) af te weeg en in 40 cm³, 5,0 mol.dm⁻³ soutsuur op te los. Daarna is 2,00 g kinolien-8-ol bygevoeg terwyl die fles versigtig geswaai is. Die oplossing is kwantitatief verdun tot 2 dm³ met gedistilleerde water.

BASISOPLOSSING: Die oplossing is voorberei deur 70,00 g 2-amino-2-metielpropan-1-ol (AMP) af te weeg en op te los in 500 cm³ gedistilleerde water.

STANDAARDKALSIUMOPLOSSING: 'n Kalsiumoplossing is voorberei deur 24,9800 g analitiese graad kalsiumkarbonaat versigtig op te los in ongeveer 0,5 mol.dm⁻³ soutsuur, wat drupsgewys bygevoeg is totdat al die kalsiumkarbonaat net opgelos is. Die oplossing is vir 'n paar minute gekook om al die koolstofdiksied te verwyder. Die kalsiumoplossing is daarna geneutraliseer met ongeveer 0,1 mol.dm⁻³ kaliumhidroksied. Die pH is aangepas tot 'n pH van ongeveer 6, waarna die standaard verdun is tot 1 dm³ met gedistilleerde water, wat 'n standaard oplossing van presies 10 000 mg.dm⁻³ kalsium gegee het. 'n Reeks standarde (konsentrasies tussen 100 en 1 500 mg.dm⁻³) is berei deur verdunnings van die 10 000 mg.dm⁻³-oplossing te maak. Hierdie standaardreeks is gebruik vir die bepaling van totale sowel as vry kalsium in die

voorgestelde FIA-sisteen. Die registreerderattenuasie van die drievoudige penregistreerder is so ingestel dat daar duidelik onderskeid getref kon word tussen die twee bepalmingsmetodes op die registreerderpapier.

KALIUMOPLOSSING: Vir die verwydering van ioniese steurings is 6,4650 g kaliumnitraat (KNO_3) afgeweeg en verdun tot 1 dm^3 om 'n oplossing te gee wat $2\,500 \mu\text{g K}^+ \cdot \text{cm}^{-3}$ te bevat.

5.2.2 CHLORIEDBEPALING

5.2.2 a) Reagense

Alle reagense is voorberei vanaf analitiese graad reagense, tensy dit gespesifiseer word. Dubbel gedistilleerde water is deurgaans gebruik. Die reagense is soos volg berei:

KALIUMNITRAATOPLOSSING: 'n Kaliumnitraatoplossing met konsentrasie $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ is voorberei deur 202,22 g KNO_3 op te los en kwantitatief te verdun tot 2 dm^3 .

CHLORIEDOPLOSSING: 'n Chloriedoplossing is voorberei deur 32,9680 g droë natriumchloried op te los in gedistilleerde water en te verdun tot 2 dm^3 . Standaardwerksoplossings is berei deur die nodige verdunnings te maak wat strek van 250 tot $5\,000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Cl}$. Alle oplossings is ontgas voordat lesings geneem is.

5.2.2 b) Apparaat

'n Carle-mikrovolumeklep is gebruik. Die klep het 2 identiese lusse wat elk 'n volume van $30 \mu\text{l}$ het. Die outomatiese monsternemingseenheid is deur Cenco gemaak en is in samewerking met 'n Cenco-peristaltiese pomp, wat teen 'n tempo van 10 revolusies per minuut werk, gebruik.

Die optimum tempo waarteen die monsters geneem is, was 60 per uur. 'n Philips Pye Unicam SP6-550 spektrofotometer is gebruik by 'n golflengte van 580 nm saam met 'n 10 mm Hellma-tipe vloeisel; volume 80 μl . 'n Varian AA-175-atoomabsorpsie-spektrofotometer (AAS) is by 'n golflengte van 422,7 nm gebruik. Die AAS-lampstroom was 10,5 mA en die spleetwydte was 1 nm. In die vloeisisteam is transmissiebuis met 'n binnedeursnee van 0,76 mm gebruik. Die dialise membraan wat gebruik is was 'n 300 mm Technicon tipe C (12") dialisemembraan gebruik. Die vloei-inspuitsisteam wat gebruik is, word in figuur 5.2 skematies aangetoon. 'n Orion Research (model 901) mikroprosesseerder-ioonanaliseerder is in samewerking met die ionselektiewe elektrode gebruik vir die bepaling van chloried. 'n Kalomelverwysingselektrode is gebruik.

5.2.2 c) Konstruksie van die bedekte buisvormige elektrode

Die finale konfigurasie van die chloriedselektiewe elektrode word in Fig. 2.5 aangetoon. Silwerfoelie met 'n dikte van 0,25 mm is om twee tygon-buise gedraai by die sykante van die buise. Elektriese kontak tussen die ionanaliseerder-instrument en die elektrode is gemaak deur die binnedraad van 'n beskermde kabel rondom die silwermetaalsilinder te draai. Die hele elektrodesisteam is geïsoleer met Araldite-epoksiegom. Daarna is 20 cm^3 huishoudelike bleikmiddel (wat 3,5% natriumhipochloriet bevat) aangesuur met 5 druppels 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ soutsuur en teen 1,6 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ 120 lank minute deur die metaalsilinder gepomp. Gedurende die proses, word silwermetaal geoksideer na silwerione en terselfdertyd op die binnewand van die silinder neergelê. Daar ontstaan dus 'n fyn membraansilwerchloried op die oppervlak van die metaal⁴¹. Die hele sisteam is na elke dag se eksperimentele werk uitgespoel met gedistilleerde water en oornag in die water laat staan.

5.3 RESULTATE EN BESPREKING

Die vloedigram wat vir hierdie bepaling gebruik word, word in figuur 5.2 aangetoon. Die vloeitempo van die draerstream is op $3,9 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ gelaat aangesien dit die tempo van die bepaling versnel en die korrekte hoeveelhede kalsium en chloried deurlaat vir bepaling met die CPC-reagens sowel as die chloriedselektiewe elektrode. Indien laer vloeitempo's gebruik word is daar gevind dat die standaardkurwe vir die bepaling van die vry kalsium afplat vir die hoër konsentrasies.

Die konsentrasies van die totale kalsium was ook effens te hoog en het net buite die liniêre gebied van die kurwe gelê. Volgens teoretiese berekeninge sou die monster in die korrekte konsentrasiegebied val, maar aangesien daar vir die berekeninge aangeneem word dat die monster volkome vermeng met die draerstream en reagent, wat nie heeltemal die geval is nie val die piek van die monster net buite die gebied. Om hierdie probleem op te los is die vermengingsbuis net voor die AAS verleng tot 400 cm. Die probleem is in 'n groot mate opgelos deur die verlenging van die buise. Die buise kon egter nie onbepaald verleng word nie, aangesien dit 'n verhoogde druk in die sisteem veroorsaak wat op sy beurt weer druk plaas op lasplekke tussen pompbuis en vermengingsbuis. Indien hierdie druk te hoog word, word lasplekke uitmekaar geforseer. Om die hoë sein wat die AAS lees te verlaag is die asetileen-distikstofoksiedvlamkop met 30° gedraai. Die padlengte waardeur die ligstraal beweeg is dus heelwat korter en die sein word dienooreenkomstig kleiner. Om kalsiumionisasie te voorkom is $2\,500 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \text{ K}^+$ by die stroom gevoeg. Vir 'n direkte bepaling word $5\,000 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \text{ K}^+$ aanbeveel maar waar die stroom konstant deur die vlam beweeg, veroorsaak so 'n hoë konsentrasie verstopping van die vlamkop. Deur die KNO_3 konsentrasie te halveer en die stroom teen $1,0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ te pomp, word ionisasie nog steeds voorkom sonder dat die vlam verstop.

Vir die bepaling van vry kalsium is daar ook 'n 400 cm vermengingsbuis voor die spektrofotometer aangelas om vermenging van die reagense te verbeter. Aangesien die reaksie nog nie volledig plaasgevind het wanneer die monster by die detektor aankom nie, is dit belangrik om die vermenging so goed moontlik te doen om presiese te verbeter. Om optimum werking van 'n ISE te verkry moet die monster in 'n draerstream van $1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ ingespuut word. Waar dialise betrokke is, is dit egter belangrik om die draerstream en die ontvangerstream presies dieselfde te hou. Dit was dus onmoontlik om KNO_3 in die ontvangerstream te voeg wat na die ISE gaan. Die KNO_3 in die ontvangerstream het nie net die dialiseproses belemmer nie maar het ook die bepaling van die totale kalsium beïnvloed deur die vlamkop van die AAS te verstop. Daar is dus besluit om die KNO_3 na die dialiseerder by te voeg en dan ook die konsentrasie te verdubbel sodat daar nog steeds $1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ by die ioonselektiewe elektrode verby vloei. Om te verseker dat die KNO_3 en die water goed meng voor dit die ioonselektiewe elektrode bereik is 'n vermengingspiraal van 400 cm net voor die ISE ingevoeg.

Die optimum monstervolume was $30 \mu\text{l}$. Groter volumes het die bepaling van die chloried verbeter maar was totaal ongeskik vir die bepaling van totale kalsium, terwyl kleiner volumes beter resultate gelewer het vir die totale kalsium bepaling was dit weer ongeskik vir die chloried-bepaling.

Tabel 5.1 Die gelyktydige bepaling van totale en vry kalsium deur atoomabsorpsie-spektroskopie en die voorgestelde FIA-metode, sowel as die bepaling van totale chloried deur middel van 'n direkte bepaling met die chloried-selektiewe elektrode en die voorgestelde FIA-metode. Alle waardes is gemeet in $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Totale Kalsium			
No.	AAS	FIA	%RSD
1	1030	1060	0,81
2	1145	1150	0,98
3	1200	1230	1,00
4	1190	1200	0,95
5	1210	1220	1,01
Vrye kalsium			
No.	AAS	FIA	%RSD
1	115	120	0,35
2	148	150	0,37
3	165	170	0,26
4	120	127	0,29
5	116	120	0,34
Totale chloried			
No.	ISE	FIA	%RSD
1	1120	1122	0,20
2	1560	1584	0,25
3	1780	1778	0,19
4	1320	1323	0,23
5	1200	1189	0,20

AAS = direkte atoomabsorpsie bepaling van kalsium.

FIA = voorgestelde metode van bepaling deur vloei-inspuitanalise.

ISE = direkte bepaling met ionselektiewe elektrode.

%RSD = gemiddelde resultate van 15 toetse in elke geval, met relatiewe standaardafwyking vir die voorgestelde FIA-metode.

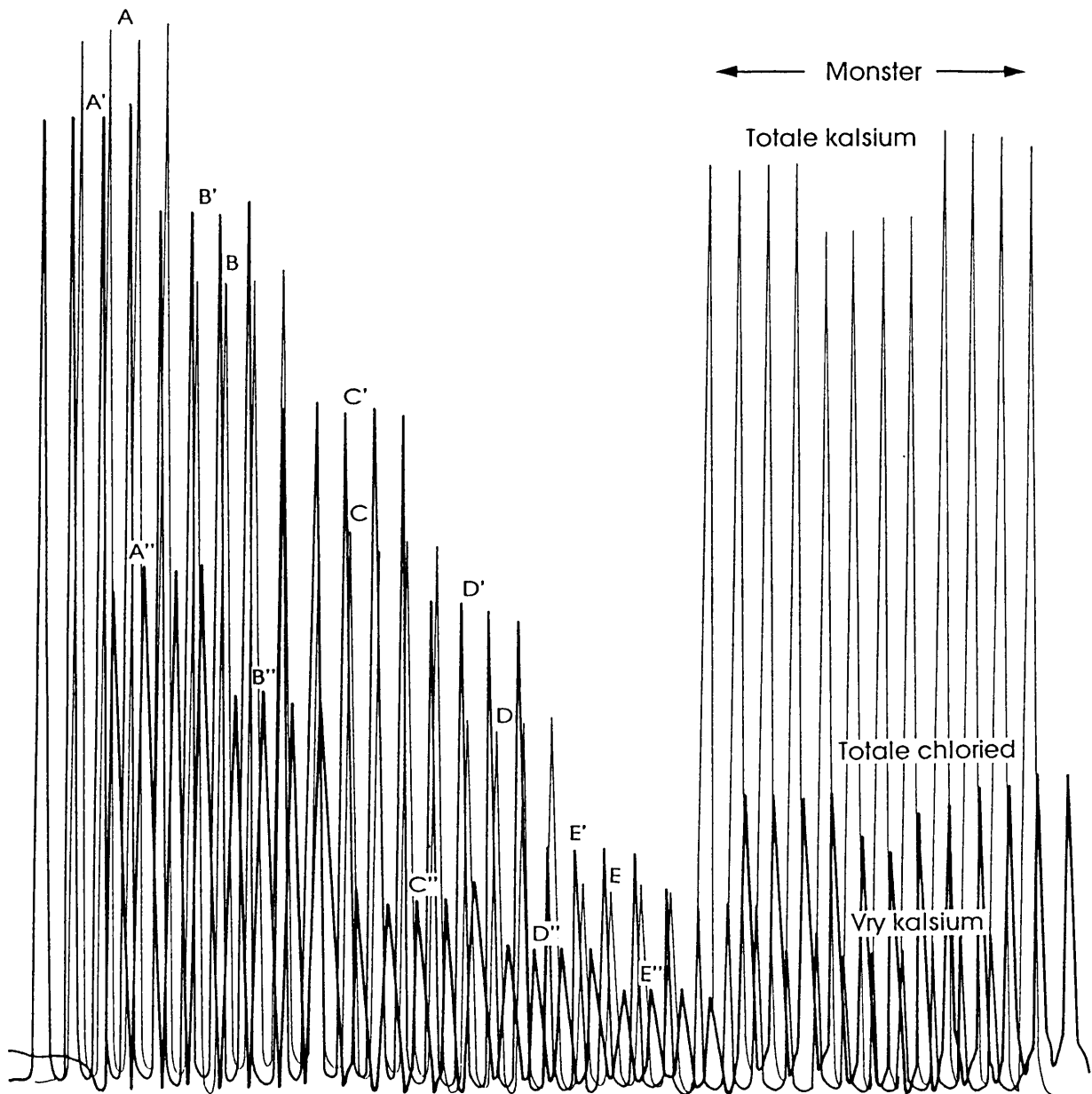


Fig. 5.3 - Registreerdervoorstelling van 'n verteenwoordigende lopie teen 'n bepalingstempo van 60 melkmonsters per uur vir die bepaling van totale en vry kalsium en totale chloried. Elke monster en standaard is vier keer ingespuut. Die registreerderspoed was 30 cm per uur en daar is in die 10 mV gebied gewerk vir totale kalsium, 2 mV vir vry kalsium en 5 mV vir totale chloried. Van links na regs is kalsiumstandaarde (A) vir totale kalsium en (A') vir vry kalsium met konsntrasies $1\ 500\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $600\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $400\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ en $200\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, asook chloriedstandaarde (A'') met konsentrasies $5\ 000\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $3\ 000\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, $500\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ en $250\ \text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, waarna drie melkmonsters geanaliseer is.

Deur optimisering van hierdie sisteem was dit moontlik om 'n metode daar te stel wat geskik is om totale en vry kalsium sowel as chloried in melk te bepaal. Relatiewe standaardafwykings is ook vir hierdie metode bepaal met behulp van standarde. Vir totale kalsium bepaling met standarde met konsentrasies tussen 1 000 en 1 500 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ is 'n %RSD van < 0,9% verkry, vir vry kalsium met standarde met konsentrasies tussen 100 en 200 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ is 'n %RSD van < 0,5% verkry en vir chloried met standarde met konsentrasies tussen 1 000 en 3 000 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ is 'n %RSD van < 0,28% verkry.

Om te verseker dat die waardes wat vir die spesifieke monsters verkry is korrek is, is die waardes met bestaande metodes vergelyk vir 5 verskillende monsters. Uit tabel 5.1 kan daar gesien word dat die waardes wat vir die totale kalsium verkry is effens hoër is as die waardes wat met die direkte AAS-bepaling verkry is. 'n Moontlike rede hiervoor kan die verlaagde hoeveelheid KNO_3 wees wat deur die FIA-sisteem gebruik word. Dit is ook moontlik dat die tempo waarteen monsters ingespuut word 'n effek kan hê asook die feit dat die monster by die FIA-sisteem nie 'n 100% homogeen vermeng is nie. Die waardes wat vir die vry kalsium verkry is, is ook effens hoër as die waardes wat met die direkte AAS-bepaling verkry is. Die verskil kan dieselfde oorsake hê as wat vir die totale kalsium bespreek is. Daar moet eeter ook in aanmerking geneem word die vry kalsium in die voorgestelde metode deur 'n spektrofotometer bepaal is, terwyl dit direk met 'n AAS getoets is. In hierdie sisteem wil dit voorkom asof die chloriedbepaling die akkuraatste van die drie is. Die %RSD is die kleinste en die waardes tussen die FIA-metode en die ISE verskil baie min. Dit is dus duidelik uit die resultate dat hierdie metode nie net baie vinnig is nie, maar ook baie akkuraat.

HOOFSTUK 6

SULFAATBEPALING MET BEHULP VAN DIE INDIREKTE BARIUMBEPALING

6.1 INLEIDING

Die voorkoms van sulfaat is wyd versprei in die natuur. Sulfaat kom voor in natuurlike water in konsentrasies wat strek van slegs 'n paar tot verskeie duisende milligramme per dm^3 . Afvalwater van myne bevat normaalweg groot hoeveelhede sulfaat wat normaalweg moeilik bepaalbaar is as gevolg van groot hoeveelhede onsuiverhede wat in die water voorkom. Biologiese monsters is ook groot bronne van sulfaat wat oor die algemeen dieselfde probleme met bepaling het as wat betrokke is by afval water.

Die bepaling van sulfaat in waterige oplossings kan op 'n verskeidenheid van maniere gedoen word. Hierdie metodes sluit gravimetriese bepalinge, spektrofotometriese bepalinge en elektroanalitiese bepalinge in. Die bepaling met die gravimetriese metode word as volg gedoen. Die sulfaat word gepresipiteer in 'n soutsuuroplossing as bariumsulfaat deur die addisie van bariumchloried. Die presipitasie vind plaas naby die kookpunt van die oplossing. Na voldoende presipitasie plaasgevind het word die presipitaat gefiltreer en gewas totdat dit vry is van chloriede. Die presipitaat word dan gedroog en geweeg as bariumsulfaat. As gevolg van die tydsaamheid van die ander metodes byvoorbeeld die gravimetriese metode is verskeie spektrofotometriese metodes voorgestel:

1. Die bepaling van die turbiditeit van 'n bariumsulfaat-suspensie⁷⁶. In hierdie metode word die sulfaatioon gepresipiteer in 'n soutsuuroplossing met bariumchloried om bariumsulfaat te vorm. Die bariumsulfaatkristalle is kristalle van eenvormige grootte. Die ligabsorbansie van die bariumsulfaatsuspensie word gemeet met 'n spektrofotometer by 420 nm en die konsentrasie word bereken deur die waardes wat verkry is te vergelyk met standarde.
2. Die substitusie van 'n gekleurde chlooranilaat-anioon vanaf 'n onoplosbare barium-chlooranilaat deur sulfaat, in 'n gedeeltelik-nie-waterige oplossing.
3. Indirekte bepaling deur 'n kompeterende reaksie van sulfaat en metieltimolblou (MTB) met barium in oplossing⁷⁷. In hierdie reaksie word bariumsulfaat gevorm deur die reaksie van die sulfaatioon met bariumchloried by 'n lae pH. By 'n hoë pH reageer 'n oormaat barium met metieltimolblou om 'n blou chelaat te vorm. Die ongekomplekseerde, grys metieltimolblou gee dus 'n aanduiding van die konsentrasie van die sulfaatioon.
4. Die koppeling van bensidien van gepresipiteerde bensidiniumsulfaat om 'n asokleurstof te vorm.

Die drie metodes wat feitlik universeel gebruik word, is die barium-chlooranilaat-metode, die metieltimolblou-metode en die bariumsulfaat-metode. Vir die geoutomatiseerde roetiene-bepaling van sulfaat is die "autoanalyzer"-metode baie handig en is die metode herhaaldelik geëvalueer en getoets sedert dit deur Lazarus et.al.⁷⁸ ontwerp is. Outomatisering met gesegmenteerde, kontinue vloei-metodes (SFA-metodes) maak dit moontlik om gemiddeld 30 monsters per uur te analiseer. 'n Paar spektrofotometriese metodes is reeds aangepas vir vloei-inspuitanalise. Hierdie metodes sluit die metieltimolblou-metode, die

gekataliseerde sirkonium-metieltimolblou-metode, die dimetielsulfonazo-III-metode en die bariumsulfaat-turbiditeitsmetode^{79,80} in. Die bariumsulfaat-turbiditeitsmetode is deur verskeie persone by FIA aangepas. Die grootste probleem is dat die metode nie geskik is vir monsters wat self troebel is nie bv. sekere mynwatermonsters, urien en melk. Die gebruik van die sirkonium-metieltimolbloumetode word beskryf deur Hems⁸³ as 'n metode wat maklik en effektief in samewerking met FIA gebruik kan word. Sekere anione bv. sulfaat vorm labiele komplekse met sirkonium wat dan teen 'n baie hoër tempo met die metieltimolblou reageer.⁸¹ 'n Aanpassing van die metieltimolbloumetode vir die bepaling van sulfaat is geëvalueer deur gebruik te maak van FIA en toegepas vir die bepaling van sulfaat in reënwater-monsters wat 0,6 - 8,8 mg.dm⁻³ sulfaat bevat⁸². Hierdie sisteem is egter nie beperk tot monsters wat in hierdie konsentrasiegebied val nie. Deur 'n dialisemembraan in 'n sisteem in te voeg kan nie net die konsentrasie van die monsters verlaag word nie, maar kan die analiet geskei word van enige steurende effekte van onsiuwerhede wat in die monster kan voorkom. Dit is reeds bekend uit vorige hoofstukke dat elke dialisemembraan 'n spesifieke %-dialise het by 'n vasgestelde vloeitempo. Indien die monster dus buite die bepalinggebied vir die spesifieke element val kan daar van verskillende vloeitempo's, membraanlengtes en membraantipes gebruik gemaak word om die benodigde konsentrasiegebied te kry. Aangesien die dialisemembraan onsiuwerhede verwyder mag dit ook die gebruik van sekere metodes moontlik maak wat andersins weens die aard van die monster nie moontlik sou wees nie. Een so 'n voorbeeld is die turbiditeitsmetode wat nie geskik is vir troebelmonsters nie.

Die sulfaatkonsentrasies in urienmonsters wat ongeveer 300 mg.dm⁻³ is, val duidelik buite bereik van die metode, indien die monsters egter gedialiseer word, word konsentrasies van ongeveer 9 mg.dm⁻³ verkry wat maklik bepaal kan word. Proteïene, epiteelselle en ander makromolekules wat moontlik in die bepaling kan steur word dan ook

geëlimineer. Die opstelling wat gebruik is word skematies in Fig. 6.1 aangetoon.

6.2 EKSPERIMENTEEL

6.2 A) REAGENSE

Alle reagentiese is berei uit analitiese graad chemikalieë, tensy dit anders gespesifiseer word. Dubbel gedistilleerde water is deurentyd gebruik. Die reagentiese is as volg berei:

METIELTIMOLBLOU: (3,3-bis N,N-bis(karbonsiemiel)aminometiel - timolsulfoonftaleien, natriumsout) verkry van Aldrich chemikalieë. 0,116 g metieltimolblou-monster (MTB) (molmassa $844,76 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) is afgeweg en opgelos in 'n oplossing wat $6,0 \text{ cm}^3$ water bevat. Die finale oplossing is verdun tot 1 dm^3 . Vars MTB-reagentiese is daaglik berei.

BaCl₂-OPLOSSING: 'n Draerstroem wat $600 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ barium bevat, is berei deur $1,067 \text{ g BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ af te weeg en verdun na 1 dm^3 .

NaOH-OPLOSSING: 'n $3,6 \times 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ NaOH-oplossing is berei deur $1,44 \text{ g NaOH}$ af te weeg en op te los in 1 dm^3 water.

SULFAATOPLOSSING: 'n Sulfaat-oplossing is berei deur $14,786 \text{ g NaSO}_4$ af te weeg en te verdun na 1 dm^3 om 'n oplossing met konsentrasie $10000 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ SO}_4^{2-}$ te gee. 'n Reeks standarde met konsentrasies tussen 100 en $1000 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ is berei deur verdunnings van die $10000 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ -oplossing te maak.

6.2 B) APPARAAT

'n Carle mikro-volume-klep is gebruik. Die klep het twee identiese lusse wat elk 'n volume van 100 μl het. Die outomatiese monsternemingseenheid is vervaardig deur Cenco en is in samewerking met 'n Cenco peristaltiese pomp, wat teen 'n tempo van 10 revolusies per minuut werk, gebruik. Die tempo waarteen die monsters geneem is, was 60 per uur. 'n Philips Pye Unicam SP6-550 spektrofotometer is gebruik by 'n golflengte van 608 nm. Die transmissie-buise wat in die vloei-sisteem gebruik is, het 'n binnedeursnee van 0,76 mm. Die dialisemembraan wat gebruik is, was 'n 300 mm Technicon tipe C (12") dialise-membraan. Die opstelling van die vloei-inspuit-sisteem word in Fig. 6.1 aangetoon.

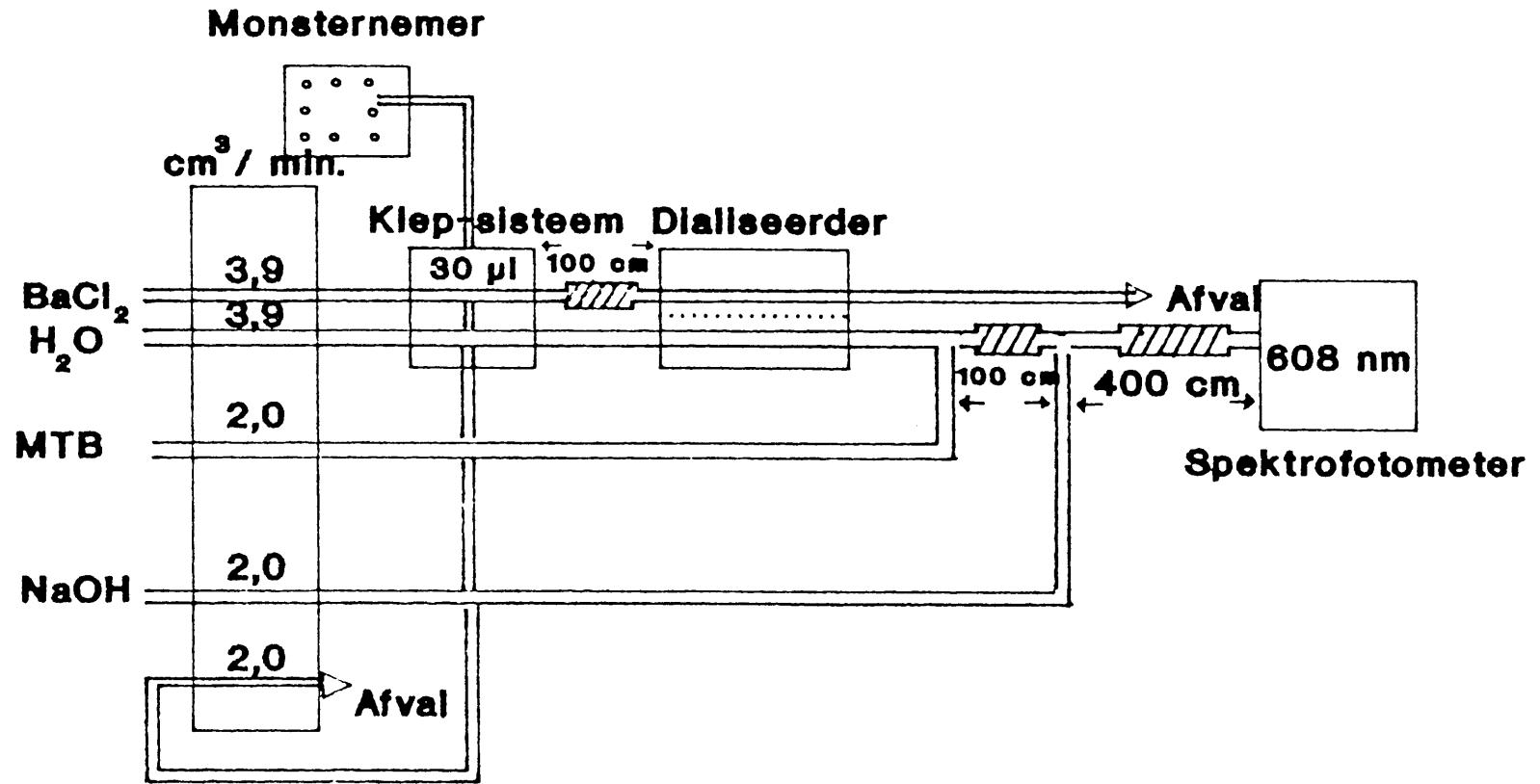


Fig. 6.1 - Skematiese voorstelling van die vloeï-inspuitanalitiese sisteem wat gebruik is vir die indirekte bepaling van sulfaat in urienmonsters. Vervoerbuis met binnedeursnee van 0,76 mm is gebruik, en 'n 300 mm Technicon tipe C dialisemembraan.

6.3 RESULTATE EN BESPREKING

Die indirekte bepaling van sulfaat, gebaseer op die kompeterende reaksie van sulfaat en MTB met barium in oplossing kan gedoen word deur absorbansiemetings van of die ongekomplekseerde MTB of die MTB-barium-kompleks. Absorbansie by 460 nm as gevolg van die ongekomplekseerde MTB sal toeneem terwyl absorbansie as gevolg van die MTB-barium-kompleks sal afneem wanneer die sulfaatkonsentrasie verhoog word⁸³. Die verlaging in absorbansie by 608 nm as gevolg van die MTB-barium-kompleks was ongeveer 3 keer groter as die ooreenstemmende verhoging in absorbansie by 460 nm as gevolg van die ongekomplekseerde MTB⁸². Meting van die absorbansieverlaging by 608 nm is daarom gekies vir verdere ondersoek. Daar is reeds gevind dat monsters wat in 'n waterdraerstroom ingespuut word in plaas van 'n reagensstroom die blankowaardes verlaag en help om basislynverskuiwings, as gevolg van tydelike veranderings in reagensvermenging, te stabiliseer^{84,16}. Hierdie probleem is in 'n groot mate oorkom deur in hierdie bepaling beide reagense na die dialise-eenheid by te voeg. Die monster word in 'n waterige bariumoplossing ingespuut.

Aangesien die barium-MTB-reaksie tydfafhanklik is, is die aantal monsters wat per uur geanaliseer word redelik beperk en kon daar nie meer as 60 monsters per uur geanaliseer word nie. Die vlocitempo van die reagense is dus ook nie hoër as $2,0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ gestel nie. Madsen⁸² het ook gevind dat die sensitiwiteit van die metode aansienlik verbeter met 'n verhoging in die reagense se metanolinhoud. In hierdie metode is daar deurentyd in waterige oplossings gewerk sonder enige verlies aan sensitiwiteit.

Uit die standaardkurwe vir die bepaling kan daar duidelik gesien word dat die kurwe liniêr is vir die konsentrasiegebied tussen 100 en 1 000

mg.dm^{-3} sulfaat. Met verandering in bariumkonsentrasie bly die kurwe nog steeds liniër. Daar is egter gevind dat die beste kurwe met 600 mg.dm^{-3} barium verkry word. Die kurwes wat met verskillende bariumkonsentrasies verkry is, word ook aangetoon in Fig. 6.2. Die standaardkurwe is verkry deur elke standaard-oplossing 4 keer in te spuit en die gemiddelde waarde bereken. Die persentasie relatiewe standaard-afwyking is vir elke standaard bepaal deur elke standaard 15 keer in te spuit. Die waardes wat verkry is, was vir $1\ 000 \text{ mg.dm}^{-3}$ 1,40%, vir 750 mg.dm^{-3} 1,25%, vir 500 mg.dm^{-3} 1,00%, vir 300 mg.dm^{-3} 1,19% en vir 100 mg.dm^{-3} 1,02%.

Die opstelling is gebruik om die sulfaat-konsentrasie van 3 urienmonsters te bepaal. Tabel 6.1 gee die resultate wat verkry is. Die persentasie relatiewe standaardafwyking is bereken soos hierbo beskryf. Die verkrygte waardes is getoets deur standaardaddisie van die urienmonsters. Waardes van 100%, 98,8% en 99,0% is verkry. Daar kan dus met redelike sekerheid gesê word dat die waardes wat met hierdie metode verkry is, wel akkuraat is.

Tabel 6.1 - Sulfaatwaardes van 3 urienmonsters soos verkry deur die voorgestelde metode.

No	Sulfaat (mg.dm^{-3})	%RSD
1	290	1,00
2	301	1,19
3	295	1,25

%RSD = % relatiewe standaard afwyking.

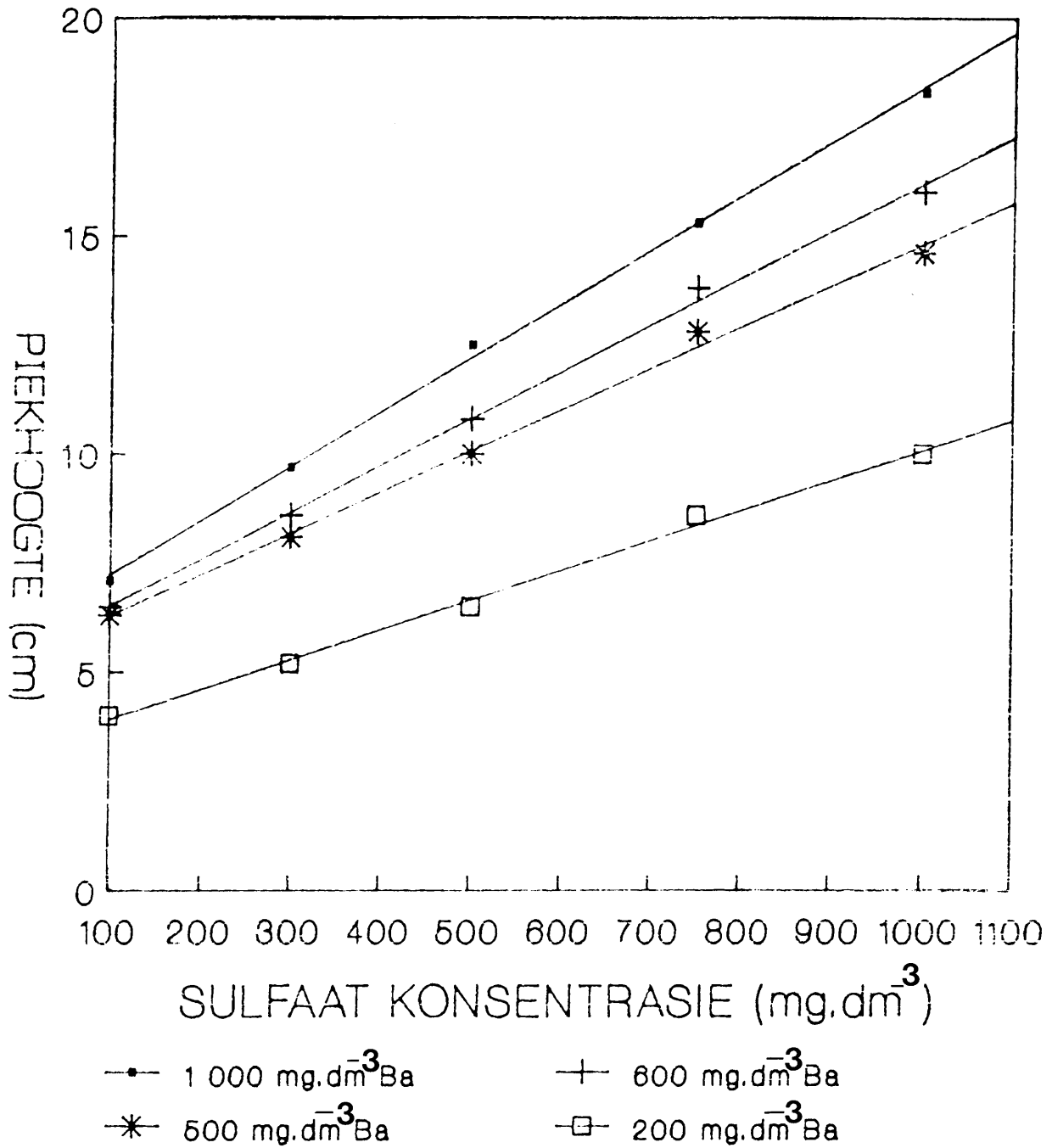


Fig 6.2 - Standaarkurwes vir die indirekte bepaling van sulfaat.

HOOFSTUK 7

GEVOLGTREKKING EN ALGEMENE BESPREKING

Aangesien ons tyd in die moderne samelewing as geld beskou, het dit vir ons noodsaaklik geword om analises nie net akkuraat uit te voer nie maar ook so vinnig moontlik. Die groot uitbreiding in analitiese chemie in die afgelope dekade het dit nog verder beklemtoon dat die bestaande outomatiese, analitiese sisteme optimum ontwikkel moet word. Die oorgrote meerderheid outomatiese sisteme is FIA-sisteme. Hierdie sisteme het hulself al bewys as vinnige en akkurate sisteme en is dus die ideale sisteme om te ontwikkel vir bepaling met dialisemembrane.

Die invoeging van dialisemembrane in FIA-sisteme maak 'n magdom van analises moontlik wat in die verlede onmoontlik was om uit te voer sonder vooraf behandeling van die monster. Aangesien die gebruik van dialisemembrane in FIA nog baie beperk is, was dit vir ons nodig om 'n verskeidenheid membrane te ondersoek en die invloed van verskillende eienskappe op %-dialise te ondersoek. Die eienskappe wat ondersoek is, is membraanoppervlak, membraanporeusiteit, konsentrasie van analiet in die ontvangerstroom, die vloeitempo's van die ontvanger en skenkerstroom sowel as die temperatuur. Dit is dus maklik om bogenoemde parameters so te verander dat 'n spesifieke hoeveelheid analiet na die ontvangerstroom gaan. Dit is ook moontlik om die hoeveelheid analiet wat oorgedra word wiskundig te bereken, maar aangesien die noodsaaklike parameters moeilik bekombaar is, bly eksperimentele optimisering steeds die beste metode.

Deur die dialisemembraan in 'n analitiese sisteem in te voeg kan 'n wye verskeidenheid monsters geanaliseer word. Die membraan verwyder enige groot molekule byvoorbeeld proteïene en vette in biologiese monsters. Dit is ook moontlik om ander onsuiverhede te verwyder in byvoorbeeld troebel afvalwater of melk. In die sisteme wat hier voorgestel word dien die membraan nie net as 'n suiwingstap nie maar skei ook die totale van die vry kalsium, aangesien sommige van die kalsium aan groot molekules gebind is en dus nie gedialiseer kan word nie. Die membraan maak dus die bepaling van twee komponente moontlik. Deur nog 'n membraan in die sisteem in te voeg is dit moontlik om nog 'n komponent te bepaal. So 'n sisteem waar totale en vry kalsium en totale chloried bepaal is, is deur ons voorgestel. Die byvoeging van 'n ekstra membraan het dus nie die bepalingstempo of die akkuraatheid beïnvloed nie. Uit die resultate blyk dit dat die bepaling van chloried selfs nog akkurater was as die bepaling van totale en vry kalsium. Daar kan dus met redelike sekerheid gesê word dat die bepaling van selfs nog meer komponente moontlik kan wees deur die invoeging van nog dialisemembrane.

'n Verskeidenheid monsters kan met die metodes geanaliseer word. Die bepaling van sulfaat in urien is ook uitgevoer. Die dialisemembraan verwyder dus enige molekules of troebelheid wat die bepaling kan beïnvloed. Dit is dus duidelik dat die membrane die vinnige en presiese skeiding en suiwing van 'n wye verskeidenheid monsters moontlik maak. Die membrane is maklik bekombaar, goedkoop en kan sonder veel moeite in die sisteem ingevoeg word.

Aangesien slegs 'n klein gedeelte van die moontlikhede ondersoek is, is daar waarskynlik nog vele ander toepassings van dialisemembrane in FIA-sisteme. Deur die gebruik van lang hoogsdeurlaatbare membrane kan monsters moontlik ontsout word vir proteïenbepalings waar soute 'n groot invloed op die bepaling het. Daar kan moontlik ook geëksperimenteer word met membrane wat positiewe of negatiewe ladings op die membraan

het. Dit sal waarskynlik ook moontlik wees om organiese groepe aan die membraan te koppel wat binding van spesifieke ione tot gevolg sal hê. Hieruit kan daar gesien word dat die moontlikhede vir die gebruik van dialisemembrane in FIA-sisteme slegs beperk word deur die inisiatief van die navorsers en die tyd wat aan die navorsing oor die onderwerp geskenk gaan word.

VERWYSINGS

1. Ruzicka, J., Hansen, H.E., in "*Flow Injection Analysis*"., John Wiley and Sons, New York, 1981, Hoofstuk 1.
2. Skeggs, L.T., *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1957, 28, 311.
3. Stewart, K.K., Beecher, G.R., en Hare, P.E., *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Biochem.*, 1974, 33, 1429.
4. Stewart, K.K., *Talanta*, 1981, 28, 789.
5. Ruzicka, J., en Hansen, E.H., *Anal. Chim. Acta.*, 1975, 78, 145.
6. Ruzicka, J., Hansen, E.H., Ramsing, A.U., *Anal. Chim. Acta.*, 1982, 134, 55.
7. Ruzicka, J., en Hansen, E.H., *Anal. Chim. Acta.*, 1980, 114, 19.
8. Ruzicka, J., en Hansen, E.H., *Flow Injection Analysis*, 1981, Wiley, New York, NY.
9. Reijn, J.M., Van der Linden, W.E., en Poppe, H., *Anal. Chim. Acta*, 1980, 114, 105.
10. Vanderslice, J.T., Stewart, K.K., Rosenfeld, A.G., en Higgs, D.J., *Talanta*, 1981, 28, 11.
11. Painton, C.C., en Mottola, H.A., *Anal. Chem.*, 1981, 53, 1715.

12. Betteridge, D., *Anal. Chem.*, 1978, 50, 832A.
13. Ranger, C.B., *Anal. Chem.*, 1981, 53, 20A.
14. Van Staden, J.F., 1981, 182ste ACS Nasionale Vergadering, New York, NY, Augustus uitgawe, nommer 23.
15. Mottola, H.A., *Anal. Chem.*, 1981, 53, 1312A.
16. Ruzicka, J., Hansen, E.H., en Zagatto, E.A., *Anal. Chim. Acta*, 1977, 88, 1.
17. Ruzicka, J., en Hansen, E.H., *Anal. Chim. Acta*, 1978, 99, 37.
18. Van Staden, J.F., Konferensie; *Ion-ex '87. an international conference and industrial exhibition on ion exchange processes. Royal Society of Chemistry. Analytical Division. Wrexham. Wales. Great Britain.*, 1987, p1-25.
19. Van Staden, J.F., *29ste Konvensie (Jubilee Konvensie, 75ste verjaardag) SA Chemiese Instituut*, Durban, 1978, p1-11.
20. Brunt, K., in *Trace Analysis*, J. Lawrence (ed), Academic Press, New York, 1981.
21. Van Staden, J.F., *Anal. Chim. Acta.*, 1986, 179, 407.
22. Meyerhoff, M.E., en Kovach, P.M., *J. Chem. Educ.*, 1983, 60, 766.
23. Meyerhoff, M.E., en Fraticelli, Y.M., *Anal. Lett.*, 1981, 14, 415.

24. Pungor, E., Feher, Z., Nagy, G., Toth, K., Horvai, G., en Gratzl, M., *Anal. Chim. Acta.*, 1979, 109, 1.
25. Valcarcel, M., Luque de Castro, M.D., in "*Flow-injection analysis - principles and applications*", Ellis Horwood LMT., West Sussex, 1987, 142.
26. Zagatto, E.A.G., Krug, F.J., Bergamin, H., Jørgensen, S.S., Reis, B.F., *Anal. Chim. Acta.*, 1979, 104, 279.
27. Gorton, L., en Ogren, L., *Anal. Chim. Acta.*, 1981, 130, 45.
28. Van der Linden, W.E., *Anal. Chim. Acta*, 1983, 151, 358.
29. Cooney, D.O., Kim, S.S. en Davis, E.J., *Chem.Eng.Sci.*, 1974, 29, 1731.
30. Kooijman, J.M., *Chem. Eng. Sci.*, 1973, 28, 1149.
31. Bernhardsson, B., Martins, E., en Johansson, G., *Anal. Chim. Acta*, 1985, 167, 111.
32. Kessler, G., in "*Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*", 6th ed., Vol 1, C.V. Mosby Co., St. Louis, 1963, pp 301-313.
33. Kessler, G., in "*Gradwolhs's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*", 7th ed., Vol I, C.V. Mosby Co., St. Louis, 1970, pp 323-372.
34. Clarke, D.D., en Nicklas, R., in "*Automation in Analytical Chemistry*", Technicon Symposia 1966, Vol I, Mediad Inc., White Plains, N.Y., 1967, pp183-186.

35. Grady, H.J., en Lamar, M.A., *Clin. Chem.*, 1959, 5 , 542.
36. Scobell, H.D., Tai, H., en Hill, J.B., in "*Advances in Automated Analysis*", Technicon International Congress 1969, Vol II, Mediad Inc., White Plains, N.Y., 1970, pp79-82.
37. Lundgren, D.P., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960, 87, 904.
38. Agren, A., en Garret, E.R., *Acta. Pharm. Seucica.*, 1967, 4, 1.
39. Baum, E.H., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960, 87, 894.
40. Fusari, S.A., Dittmar, D., en Perrizo, C.H., in "*Advances in Automated Analysis*", Technicon International Congress 1970, Vol II, Turman Associates, Miami, 1971, pp241-245.
41. van Staden, J.F., *Anal. Chim. Acta.*, 1986, 179, 407.
42. Webb, B.H., Johnson, A.H., en Alford, J.H., in "*Fundamentals of diary Chemistry*", AVI publishing company, 1974, 469.
43. Trijssen, R., Thesis. Delft Universiteit, 1979.
44. Anderegg, G., Fiaschka, H., Sallman, R., en Schwarzenbach, G., *Helv. Chem. Acta.*, 1954, 37, 113.
45. Schwarzenbach, G., *Analyst*, 1955, 80, 713.
46. Vogel, A.I., *A Text-book of Quantitative Inorganic Analysis*, Longmans, London, 1961, Hoofstuk 4.

47. Mc Cullough, R.L., MacKay, J.K., en Padmanabhan, G.R., in "*Automation in Analytical Chemistry*", Technicon Symposia, 1967, Volume 1, Mediad Inc., New York, 1968, pp.233-238.
48. Kessler, G., and Wolfman, M., *Clin. Chem.*, 1964, *10*, 686.
49. Gitelman, H.J., *Anal. Biochem.*, 1967, *18*, 521.
50. Roach, A.G., in "*Automation in Analytical Chemistry*", Technicon Symposia, 1965, Mediad Inc., New York, 1966, pp.137-141.
51. Moorehead, W.R., en Biggs, H.G., *Clin. Chem.*, 1974, *20*, 1458.
52. Basson, W.D., en van Staden, J.F., *Analyst*, 1978, *103*, 296.
53. Joe, M.M., Sakai, D., en Moffit, R.A., in "*Automation in Analytical Chemistry*", Technicon Symposia, 1966, Volume 1, Mediad Inc., New York, 1967, pp595-597.
54. Ratliff, C.R., Casey, A.E.; en Trasher, G.S., in "*Automation in Analytical Chemistry*", Technicon Symposia, 1966, Volume 1. Mediad Inc., New York, 1967, pp321-325.
55. Basson, W.D., en van Staden, J.F., *Analyst*, 1979, *104*, 419.
56. Espersen, D. en Jensen, A., *Anal. Chim. Acta.*, 1979, *108*, 241.
57. Dahl, J.H., Espersen, D. en Jensen, A., *Anal. Chim. Acta.*, 1979, *105*, 327.
58. Kagenow, H. en Jensen, A., *Anal. Chim. Acta.*, 1980, *114*, 227.

59. Kagenow, H. en Jensen, A., *Anal. Chim. Acta.*, 1983, *145*, 125.
60. Virtanen, R., in "*Ion-Selective Electrodes 3*", E.Pungor (ed.), p375, Akademiai Kiado, Budapest, Elsevier, Amsterdam, 1981.
61. Burguera, J.L., en Burguera, M., *Anal. Chim. Acta.*, 1984, *161*, 375.
62. Lynch, T.P., Kernoghan, N.J. en Wilson, J.L., *Analyst*, 1984, *109*, 839.
63. Basson, W.D. en van Staden, J.F., *Z. Anal. Chem.*, 1980, *302.*, 370.
64. Slanina, J., Bakker, F., Bruyn-Hen, A. en Mols, J.J., *Anal. Chim. Acta.*, 1980, *113*, 331.
65. Bergamin, H., Zagatto, E.A.G., Krug, F.J., en Reis, B.F., *Anai. Chim. Acta.*, 1978, *101*, 17.
66. Gine, M.F., Zagatto, E.A.G., Reis, B.F., en Bergamin, H., *Anal. Chim. Acta.*, 1980, *114*, 191.
67. Reis, B.F., Zagatto, E.A.G., Jacintho, A.O., Krug, F.J., en Bergamin, H., *Anal. Chim. Acta.*, 1980, *119*, 305.
68. Fang, Z., Ruzicka, J., en Hansen, E.H., *Anal. Chim. Acta.*, 1984, *164*, 23.
69. Fang, Z., Xu, S., en Zhang, S., *Anal. Chim. Acta.*, 1984, *164*, 41.
70. Jorgensen, S.S., Petersen, K.M., en Hansen, L.A., *Anal. Chim. Acta.*, 1985, *169*, 51.

71. Ramsey, M.H., en Thompson, M., *Analyst*, 1982, 107, 232.
72. Greenfield, S., *Ind. Res. Dev.*, 1981, 23, No.8, 140.
73. Gine, M.F., Bergamin, H., Zagatto, E.A.G. en Reis, B.R., *Anal. Chim. Acta.*, 1980, 114, 191.
74. Reis, B.R., Zagatto, E.A.G., Krug, A.O.F.J. en Bergamin, H., *Anal. Chim. Acta.*, 1980, 119, 305.
75. Stewart, J.W.B. en Ruzicka, J., *Anal. Chim. Acta.*, 1976, 82, 137.
76. Baban, S., Beetlestone, D., Betteridge, D., Sweet, P., *Anal. Chim. Acta.*, 1980, 114, 319.
77. Krug, F.J., Bergamin Filho, H., Zagatto, E.A.G., Storgaard Jorgensen, S., *Analyst(London)*, 1977, 102, 503.
78. Lindstrom, F., *Anal. Chem.*, 1960, 32 , 1123.
79. Lazarus, A.L., Hill, K.C., Lodge, J.P., "*Automation in Analytical Chemistry- Technicon Symposia 1965*". Mediad: White Plains, N.Y., 1966, 291.
80. Seifter, E., Kambrosos, D., en Chanas, A., in *Advances in Automated Analysis*", Technicon International Congress 1969, Vol 1, Mediad inc., White Plains, N.Y., 1970, pp121-125.
81. Wanninen, E., in "*Indicators*"(Ed. E. Bishop), Pergamon Press Ltd., Oxford, 1972, pp252, 340.

82. Cooney, D.O., Davis, E.J., en Kim, S-S., *Chem.Eng.J.*, 1974, 8, 213.
83. Hems, R.V., Kirkbright, G.F., en West, T.S., *Talanta*, 1969, 16, 789.
84. Mc Swann, M.R., Watrous, R.J., Douglass, J.E., *Anal. Chem.* 1974, 46, 1329.
85. Tabatabal, M.A., *Environ. Lett.*, 1974, 7, 237.
86. Colovos, G., Panesar, M.R., Parry, E.P., *Anal. Chem.*, 1976, 48, 157.