

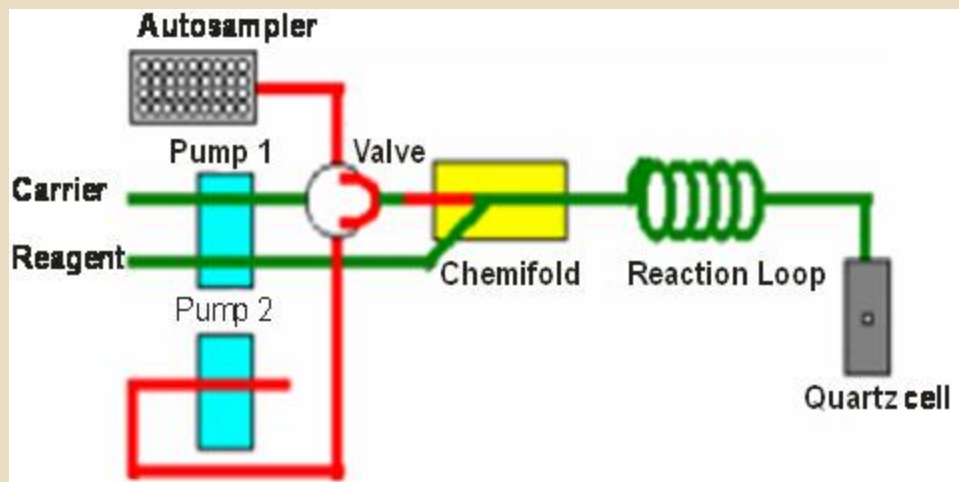
Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

**Αυτοματοποιημένες Μέθοδοι
Ανάλυσης**

Δρ. Μάριος Κωστάκης -

Καθ. Α. Οικονόμου

Εμμανουήλ Χ. Σεμιδαλάς



Κλασική ανάλυση vs αυτόματη ανάλυση

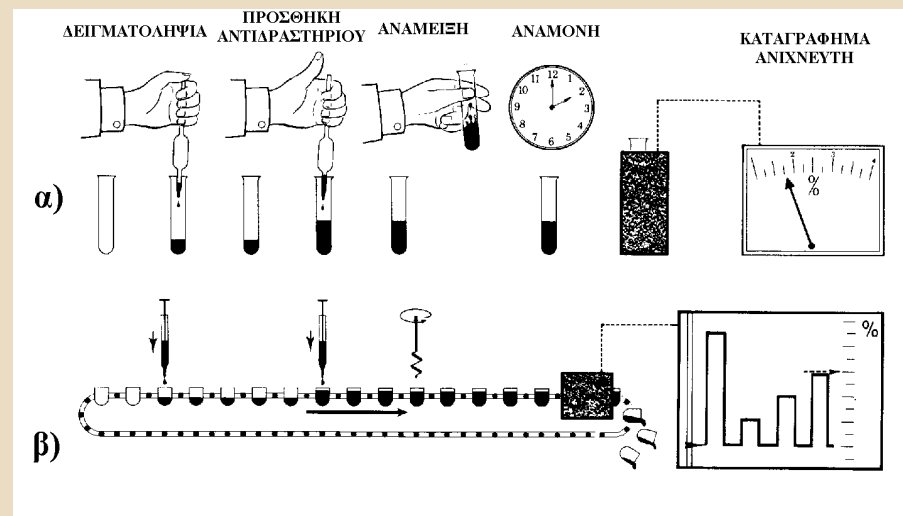
Κλασσική Ανάλυση



Ασυνεχής αυτόματη ανάλυση



Ανάλυση συνεχούς ροής



Are You
Interested
in
Vitamins
too?



If *you* are interested in vitamins, you'll like the Coleman Photofluorometer. It offers the fastest and easiest way to find and measure Thiamine and Riboflavin in foods, beverages, cereals, pharmaceuticals, animal feeds, plant and animal tissues as well as for metal complexes, and a number of other fluorophors of special interest to medical science.

The Coleman Electronic Photofluorometer (Model 12C) is direct-reading, AC line operated, stable and reproducible with a *sensitivity range capable of encompassing both trace quantities and concentrates of fluorescing constituents*. It is a typical COLEMAN instrument—sound in science—eminently practical in use and low in cost.



Ask for New Bulletin B-245.

COLEMAN PHOTOFLUOROMETER

COLEMAN INSTRUMENTS, INC., DEPT. A, MAYWOOD, ILLINOIS

For further information, circle number 29 A on Readers' Service Card, page 97 A

VOL. 30, NO. 12, DECEMBER 1958 • 29 A



Τα πλεονεκτήματα των αυτόματων μεθόδων ανάλυσης

- Αυτοματισμός
- Ταχύτητα
- Κόστος
- Μείωση κατανάλωσης αντιδραστηρίων
- Βελτίωση ακρίβειας και επαναληψιμότητας
- Ελαχιστοποίηση επιμολύνσεων

Διακριτοί αναλύτες

- Τα δείγματα είναι ξεχωριστές οντότητες σε χωριστά δοχεία
- Δεν υπάρχει διασταυρούμενη μόλυνση

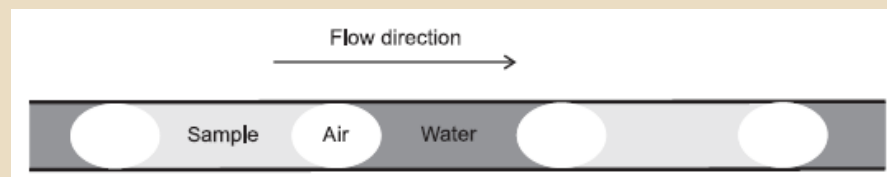
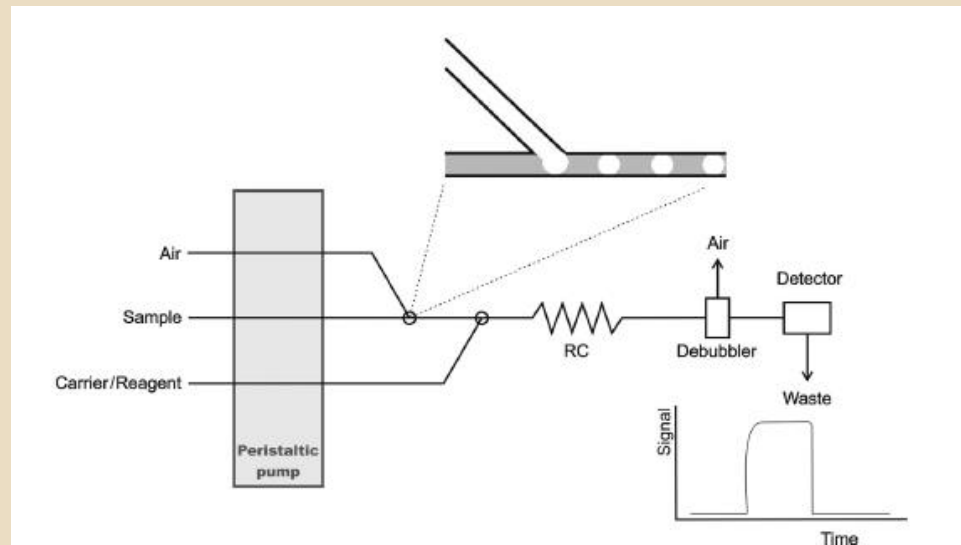


<https://www.youtube.com/watch?v=b4CHI9D6euQ>

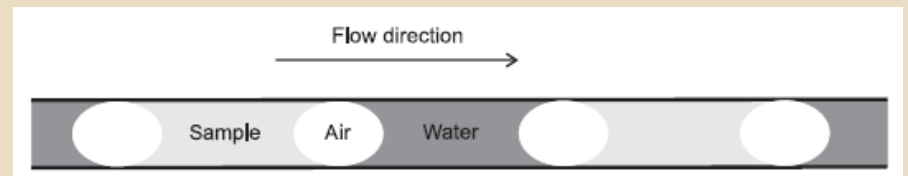
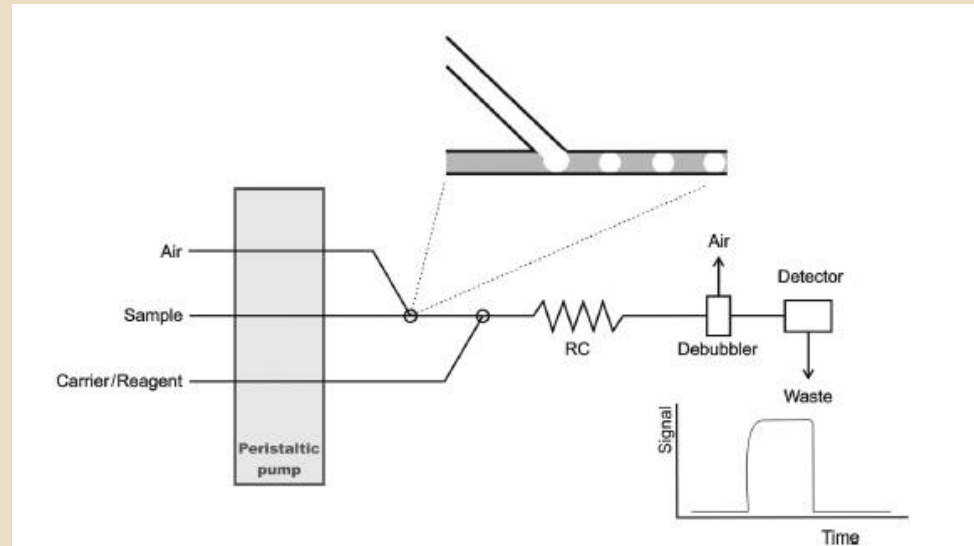
Αυτόματη αεριοδιαχωριζόμενη ανάλυση συνεχούς ροής (segmented flow analysis, SFA)

Μειονεκτήματα

- A) πιθανότητα επιμόλυνσης διαδοχικών δειγμάτων
- B) πολυπλοκότητα του απαερωτή

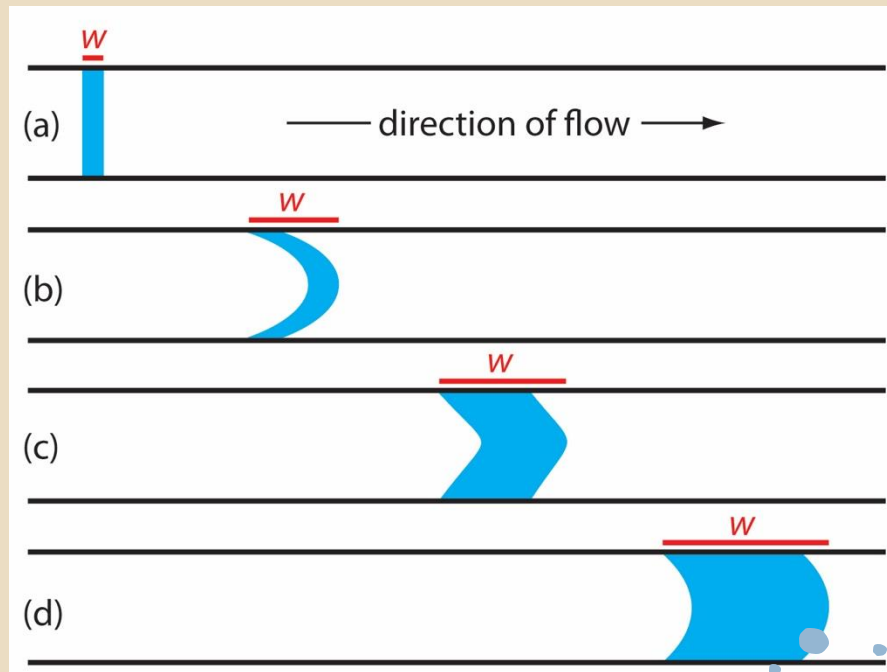


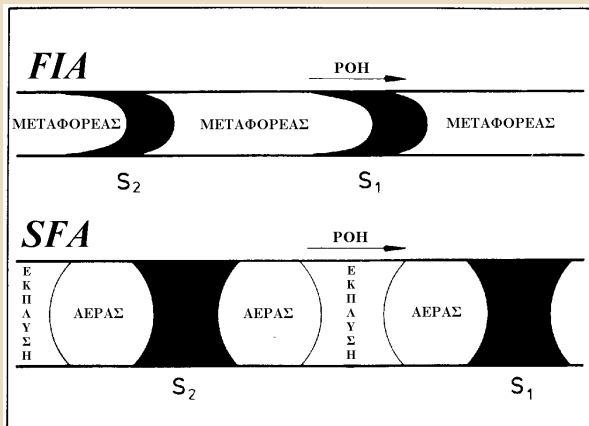
https://www.youtube.com/watch?v=48lmNc_vjf0



Ανάλυση με έγχυση του δείγματος σε συνεχή ροή (Flow Injection Analysis, FIA)

- Η ανάλυση με έγχυση του δείγματος σε συνεχή ροή (flow injection analysis, FIA) βασίζεται στην έγχυση ενός υγρού δείγματος μέσα σε κινούμενο ρεύμα υγρού μεταφορέα (carrier).
- Η ζώνη του δείγματος μεταφέρεται από το ρεύμα του μεταφορέα σε ένα ανιχνευτή που καταγράφει τη μεταβολή κάποιας φυσικής ή χημικής παραμέτρου.

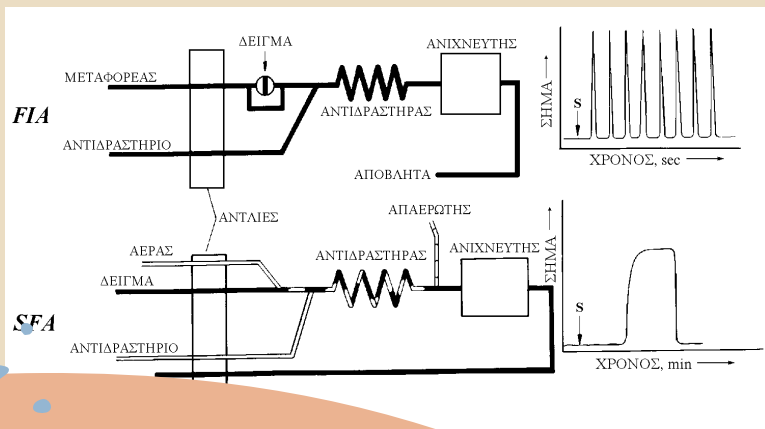




Αλλαγές στην FIA σε σχέση με τη SFA

Κατάργηση ρεύματος αέρα και
απαερωτή

Εισαγωγή δείγματος με βαλβίδα
έγχυσης σε ρεύμα μεταφορέα

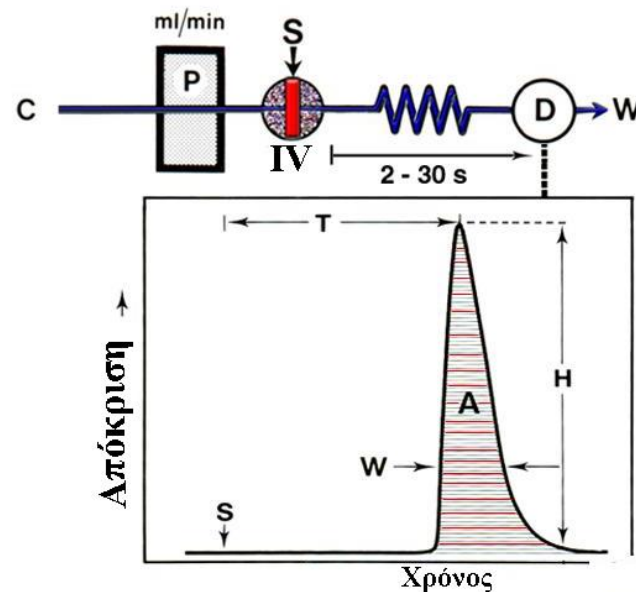


FIA - Οργανολογία

Ένα απλό σύστημα FIA αποτελείται από μια αντλία (**Pump, P**) που προωθεί το μεταφορέα (**Carrier, C**), μια βαλβίδα έγχυσης (**injection valve, IV**), ένα σπείραμα αντίδρασης (**reaction coil, RC**) και έναν ανιχνευτή (**detector, D**)

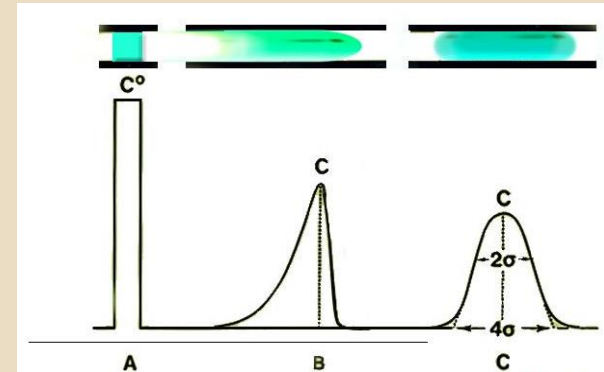
Η απόκριση του ανιχνευτή έχει τη μορφή κορυφής.

Το Ύψος της **κορυφής (H)** είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλυτή στο δείγμα



Τι είναι η διασπορά (dispersion)?

- Διασπορά είναι η αραίωση του δείγματος που προκαλείται κατά την κίνηση του προς τον ανιχνευτή.
- Αμέσως μόλις το δείγμα εγχύεται, η συγκέντρωση του έχει τη μορφή **ζώνης (A)**. Καθώς το δείγμα αρχίζει να κινείται προς τον ανιχνευτή περνά από μια διαδοχική σειρά σταδίων αραίωσης και η μορφή του μετατρέπεται από **ασύμμετρη (B)** σε συμμετρική κατά **Gauss (C)**



Συντελεστής διασποράς (Dispersion coefficient)

$$D = C_0 / C$$

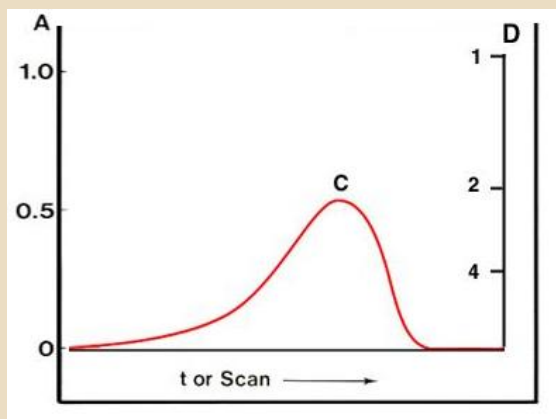
Χαμηλός ($D = 1-2$)

Μέσος ($D = 2-10$)

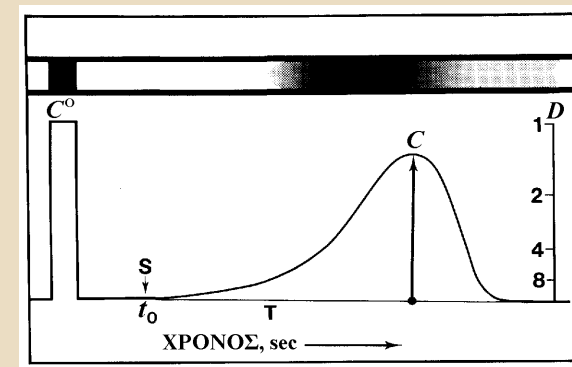
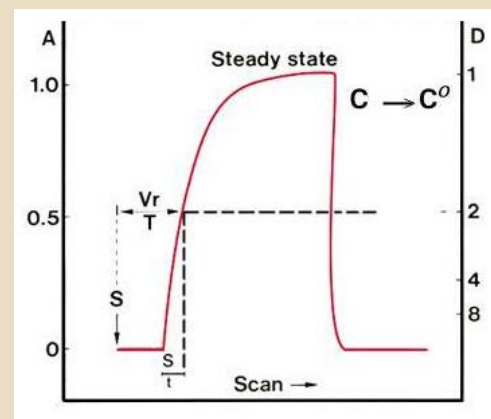
Υψηλός ($D = 10-10000$)

Περισσότερα για τη διασπορά

Συνήθως απαιτείται μέση διασπορά
($D=2-10$)



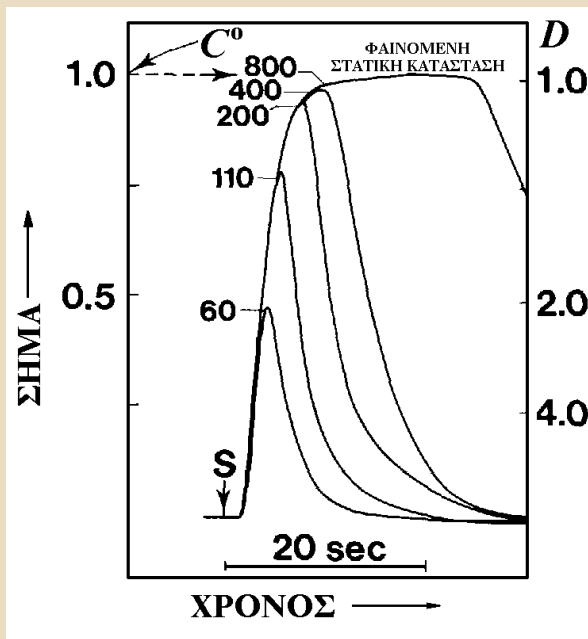
Σε κάποιες περιπτώσεις επιζητούμε
χαμηλή διασπορά ($D=1-2$)



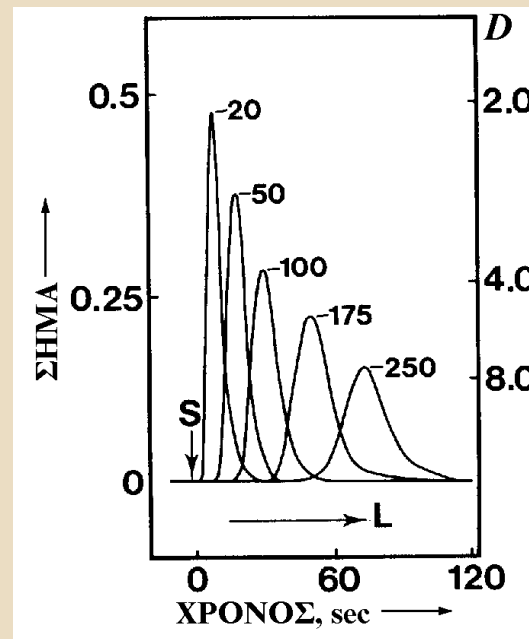
Περισσότερα για τη διασπορά

Η διασπορά εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές:

1. Το μήκος του σπειράματος αντίδρασης
2. Τον όγκο του δείγματος



Διασπορά με διαφορετικούς όγκους δείγματος (60-800 μl)

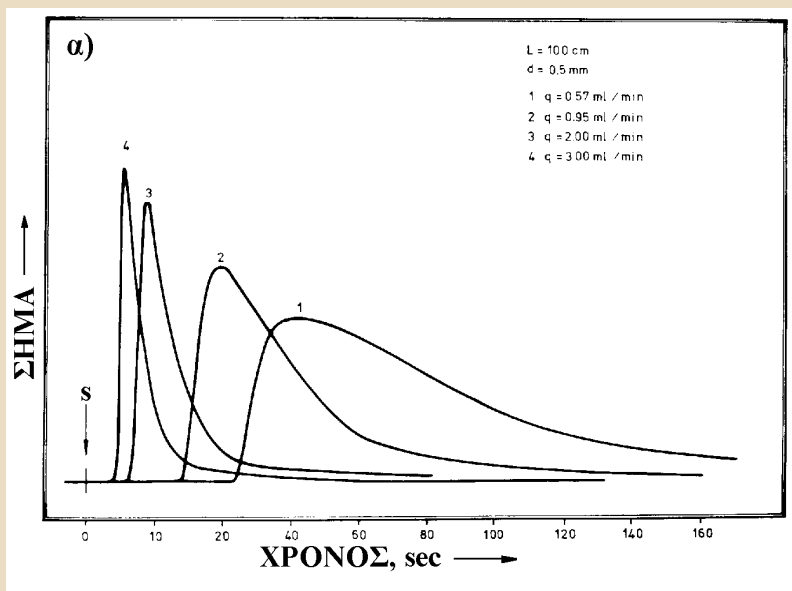


Διασπορά με διαφορετικά μήκη σπειράματος (20-250 cm)

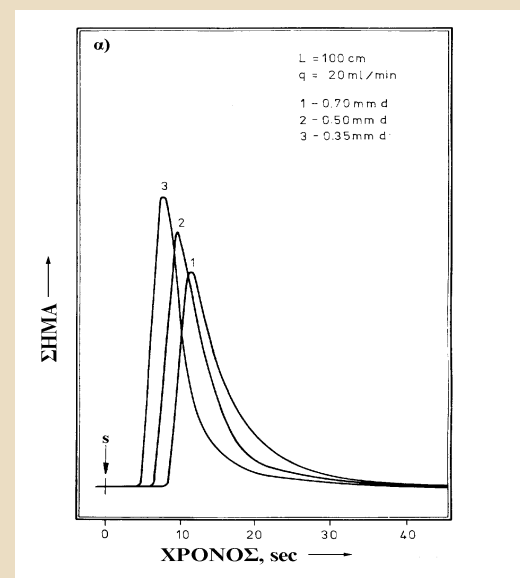
Περισσότερα για τη διασπορά

Η διασπορά εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές:

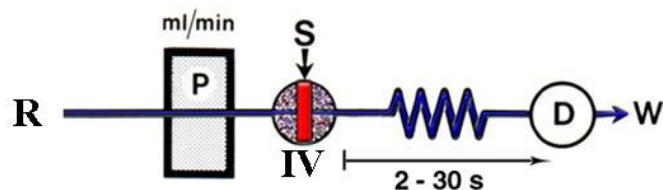
3. Τη ταχύτητα ροής του μεταφορέα
4. Τη γεωμετρία των σωληνώσεων ροής



Διασπορά με διαφορετικούς ταχύτητες ροής ($0.57\text{-}3 \text{ ml min}^{-1}$)



Διασπορά με διαφορετικής διαμέτρου σπείραμα ($0.7\text{-}0.35 \text{ mm i.d.}$)

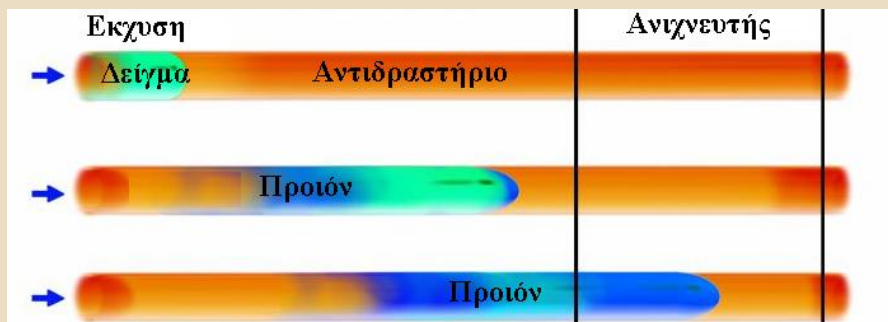


Χημικές αντιδράσεις στη FIA

Αν ο αδρανής μεταφορέας (C) αντικατασταθεί από ένα αντιδραστήριο (R), που αντιδρά με τον αναλυτή, λαμβάνει χώρα μια χημική αντίδραση σε ροή

Το σήμα του ανιχνευτή θα αντανακλά το συνδυασμό δύο αντίθετων φαινομένων:

α) τη φυσική διασπορά του δείγματος μέσα στο μεταφορέα-αντιδραστήριο (που προκαλεί αραίωση του δείγματος και αυξάνεται καθώς το δείγμα κινείται προς τον ανιχνευτή),
β) τη χημική αντίδραση μεταξύ αναλύτη και μεταφορέα-αντιδραστηρίου (που προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος της αντίδρασης καθώς το δείγμα κινείται προς τον ανιχνευτή).



Άσκηση

Ένα αυτοματοποιημένο σύστημα SFA (Segmented Flow Analysis) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό φωσφορικών ιόντων (PO_4^{3-}) σε δείγματα νερού με τη μέθοδο του μπλε του μολυβδαίνιου.

Το σύστημα έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Ροή δείγματος: 0,80 mL/min
- Ροή αντιδραστηρίων (συνολικά): 1,60 mL/min
- Εισαγωγή φυσαλίδων αέρα κάθε 15 δευτερόλεπτα

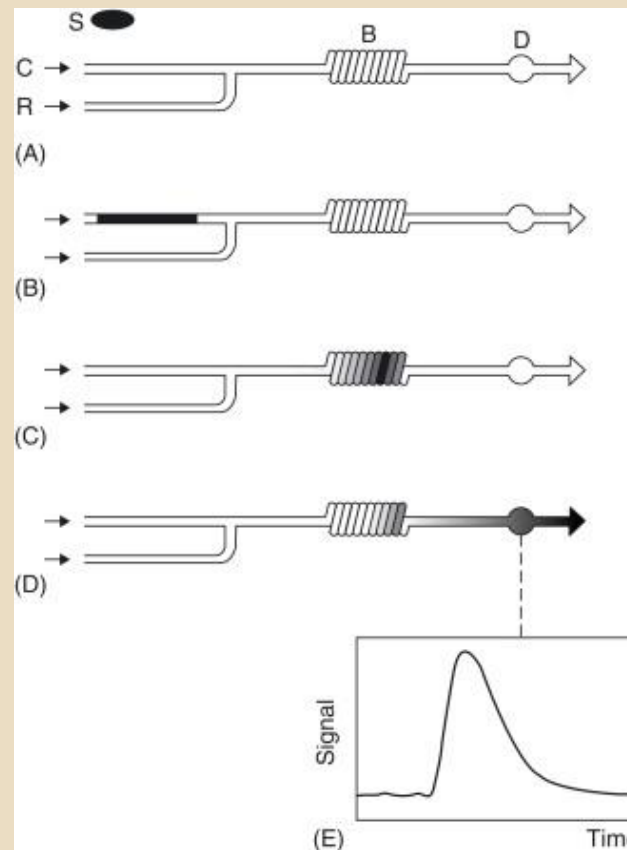
Ερωτήματα:

1. Υπολογίσατε τον συνολικό ρυθμό ροής (total flow rate) του υγρού στο σύστημα σε mL/min και τον μέσο όγκο κάθε τμήματος δείγματος (segment volume) σε mL.
2. Ποιος είναι ο ρόλος των φυσαλίδων αέρα στο SFA και γιατί το συγκεκριμένο σύστημα θεωρείται ανώτερο από το FIA (flow injection analysis) ως προς το carry-over και την ανάμιξη;
3. Σε ένα δείγμα φωσφόρου αγνώστης συγκέντρωσης, η καταγεγραμμένη κορυφή έχει ύψος 0,512 AU.
Υπολογίσατε τη συγκέντρωση του δείγματος σε mg/L P, θεωρώντας γραμμική βαθμονόμηση από 0 έως 10 mg/L.
4. Γιατί στο σύστημα το σήμα εμφανίζεται ως πλατώ και όχι ως κορυφή όπως στο FIA.

Πολυκάναλα συστήματα FIA

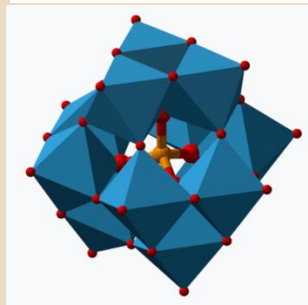
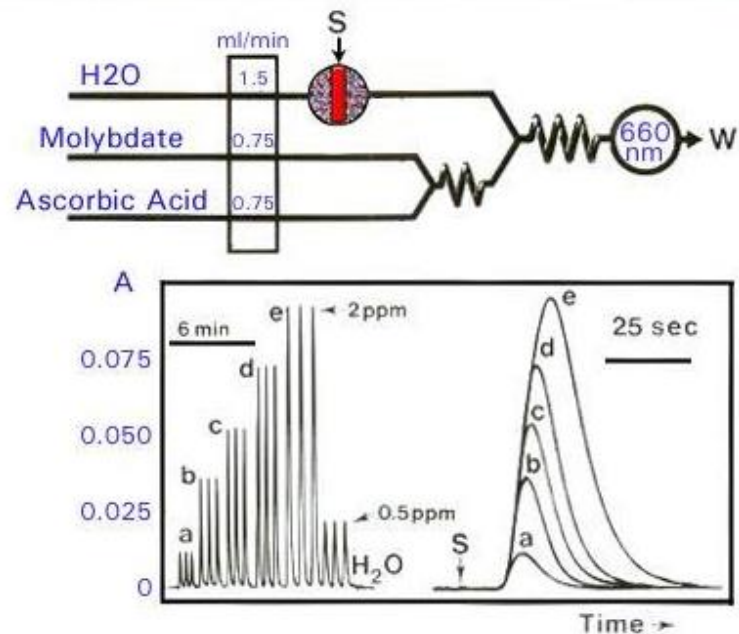
Τα μονοκάναλα συστήματα FIA δεν επιτυγχάνουν πάντα καλή ανάμιξη δείγματος-αντιδραστηρίου (δημιουργούνται διπλές κορυφές)

Όταν απαιτείται η χρήση πολλαπλών αντιδραστηρίων προτιμάται η χρήση πολυκάναλων συστημάτων με σημεία ανάμιξης (confluence points)



Παράδειγμα εφαρμογής πολυκάναλου συστήματος

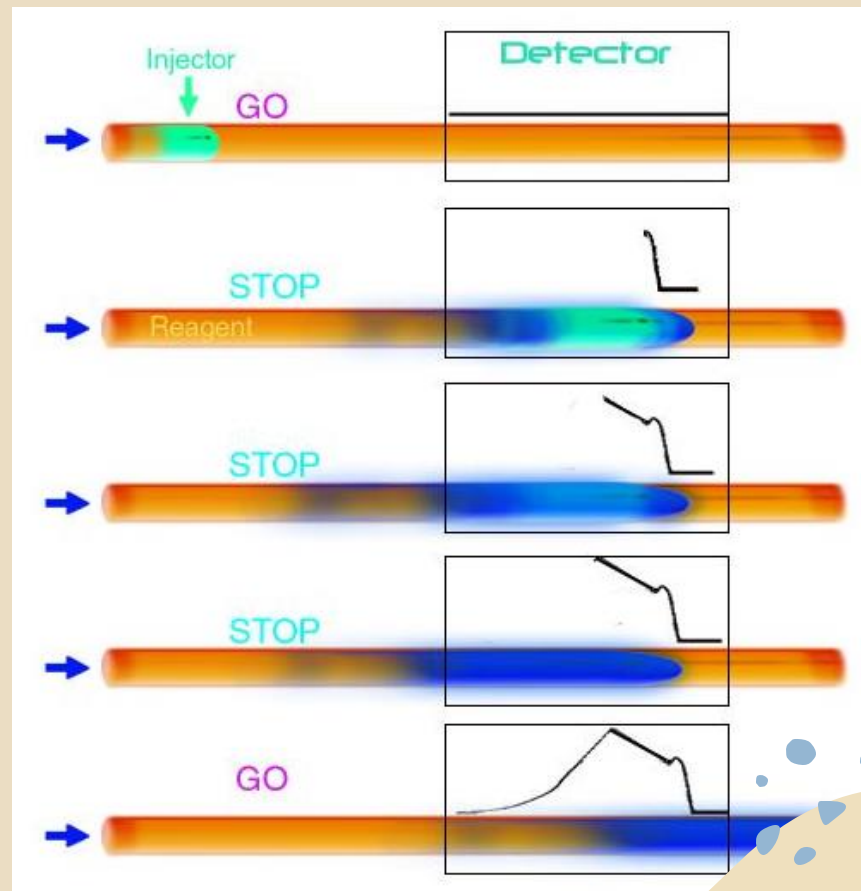
Ο προσδιορισμός φωσφορικών ιόντων βασίζεται στην αντίδραση τους με μολυβδαινικά ιόντα για την παραγωγή μολυβδαινοφωσφορικού οξέος το οποίο στη συνέχεια ανάγεται με ασκορβικό οξύ προς «κυανό του μολυβδαινίου»



FIA αναχαιριζόμενης ροής (stopped-flow FIA)

Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος αναπτύχθηκε η μέθοδος της αναχαιτιζόμενης ροής (stopped-flow, FIA)

Στην τεχνική αυτή, όταν το δείγμα φτάνει στην ανιχνευτή, διακόπτεται η ροή για κάποιο χρονικό διάστημα. Έτσι, μειώνεται η διασπορά του δείγματος και ταυτόχρονα βελτιώνεται η μίξη μεταφορέα-αντιδραστηρίου με το δείγμα.



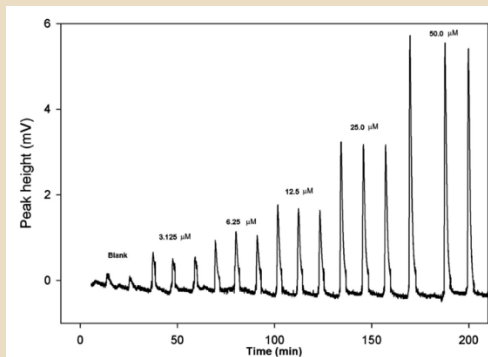
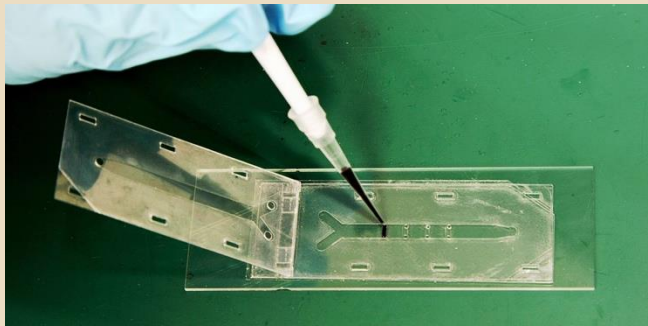
Βελτιστοποίηση των παραμέτρων στη FIA

- Συγκέντρωση των αντιδραστηρίων
- pH
- Παροχές των υγρών
- Μήκος σπειραμάτων αντίδρασης
- Όγκος δείγματος
- Γεωμετρικές παράμετροι του συστήματος

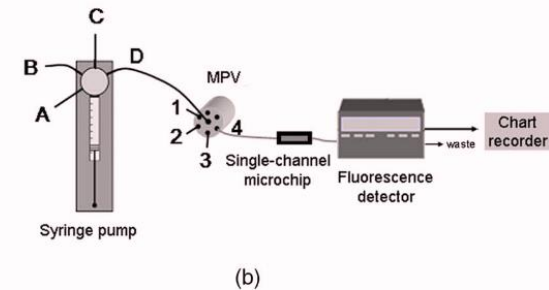
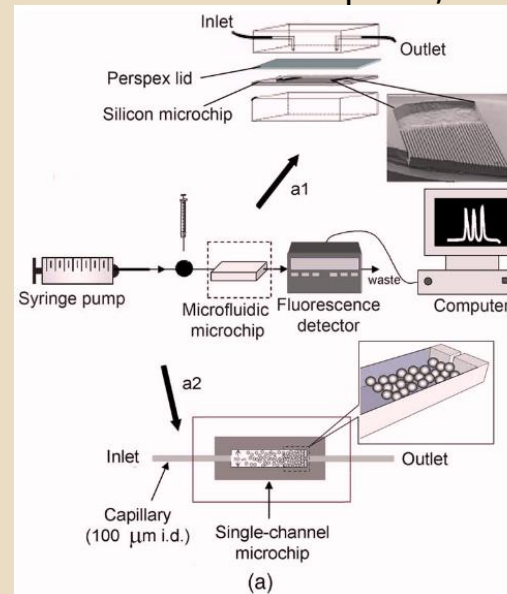
Τα πλεονεκτήματα της FIA

- Αυτοματισμός
- Μέγαλη συχνότητα μετρήσεων
- Ακρίβεια και επαναληψιμότητα
- Ευελιξία στην διαχείριση του δείγματος (μέσω ελέγχου της διασποράς)
- Ευρεία εφαρμοσιμότητα
- Μικρή κατανάλωση δείγματος και αντιδραστηρίων
- Ελαχιστοποίηση επιμόλυνσης

FIA και μικροκατασκευασμένα συστήματα (microfluidics)



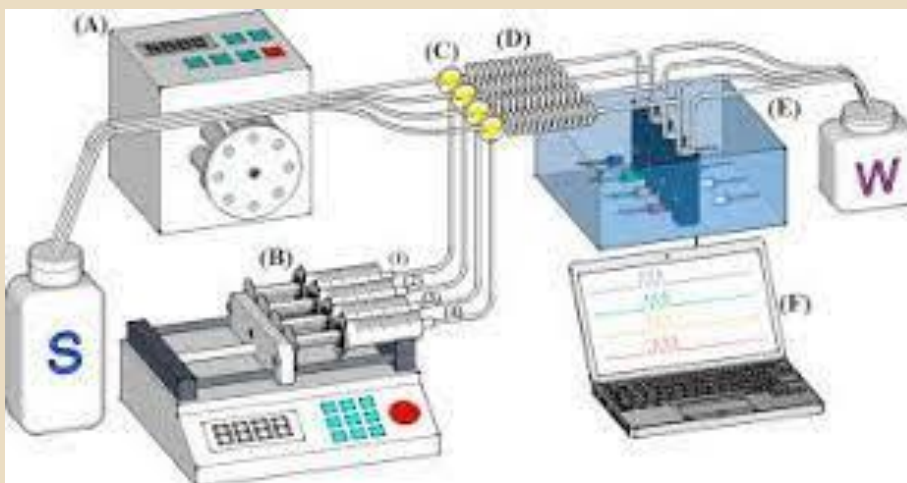
Προσδιορισμός σακχάρων με χρήση ενζυμικής αντίδρασης και ανιχνευτή



<https://doi.org/10.1063/1.3098319>

Αυτοματοποίηση στη FIA

Σύστημα FIA ελεγχόμενο από υπολογιστή



Αντλίες στη FIA

Οι **περισταλτικές αντλίες** είναι οι ευρύτερα διαδεδομένες αντλίες στη FIA.

Πλεονεκτήματα:

Απλές και φθηνές

Δεν χρειάζονται πλήρωση

Μειονεκτήματα:

Ροή όχι συνεχής (παλμοί)

Μικρή σταθερότητα ροής

Αντλίες σύριγγας

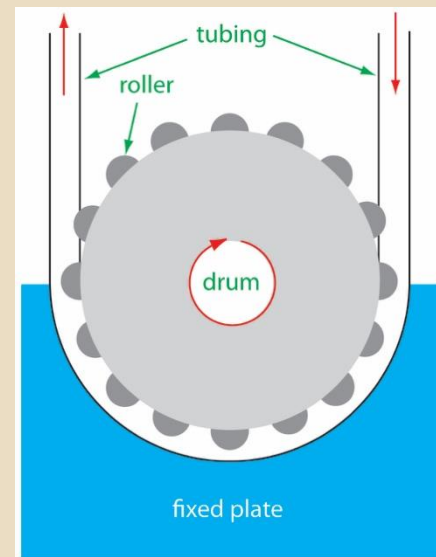
Πλεονεκτήματα:

Συνεχής ροή χωρίς παλμούς

Σταθερή ροή

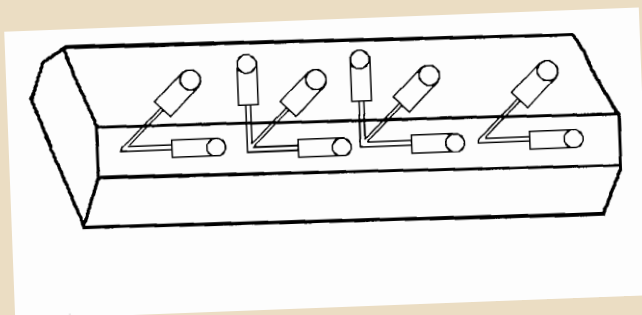
Μειονεκτήματα:

Χρειάζονται συχνή πλήρωση

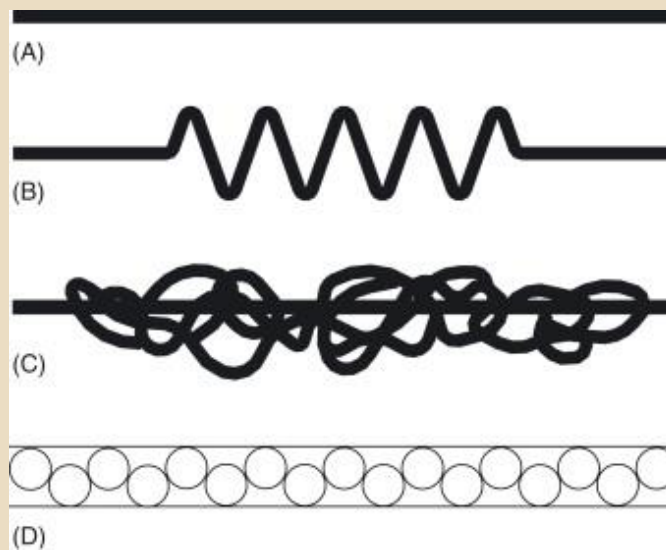


Μίκτες και σπειράματα αντίδρασης στη FIA

Στα πολυκαναλικά συστήματα
χρειάζονται διατάξεις ανάμιξης



Το σπείραμα αντίδρασης μπορεί να έχει
διάφορες μορφές



Ανιχνευτές FIA

Ηλεκτροχημικοί

Βολταμμετρικοί

Ποτενσιομετρικοί

Πεχαμετρικοί

Άλλοι

Φασματομετρίας υπερύθρου

Φασματομετρίας Raman

Φασματομετρία Μαζών

Οπτικοί

Μοριακής απορρόφησης

Χημειοφωταύγειας

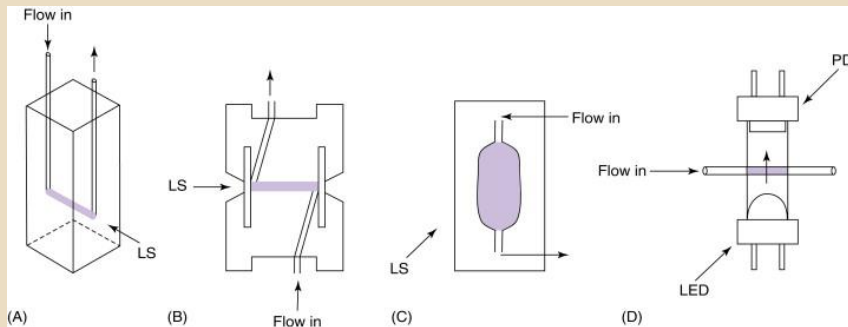
Μοριακής εκπομπής-φθορισμοί

Ατομικής εκπομπής

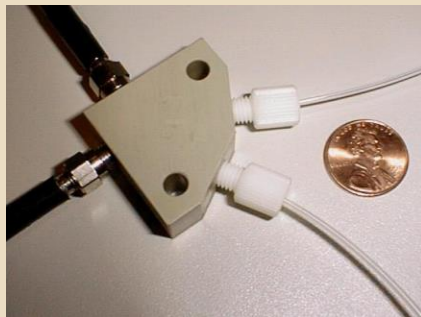
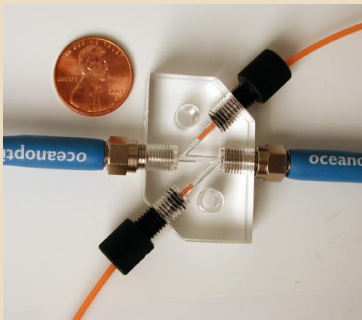
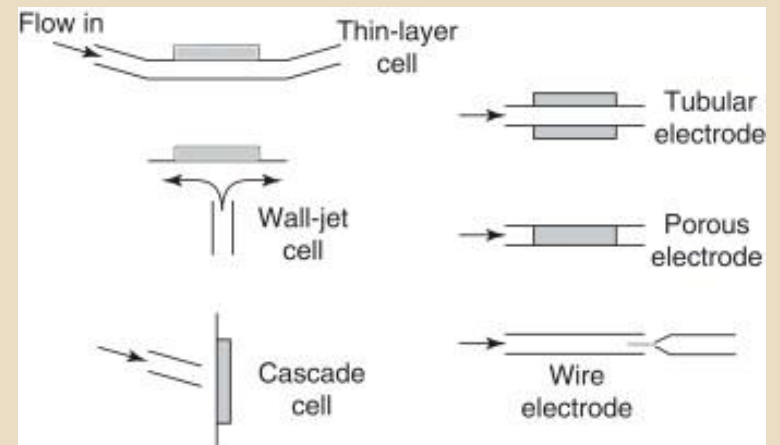
Ατομική απορρόφησης

Ανιχνευτές στη FIA

Φωτομετρικοί

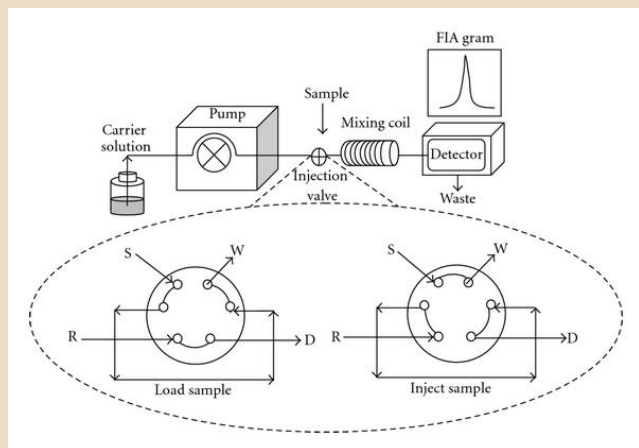


Ηλεκτροχημικοί

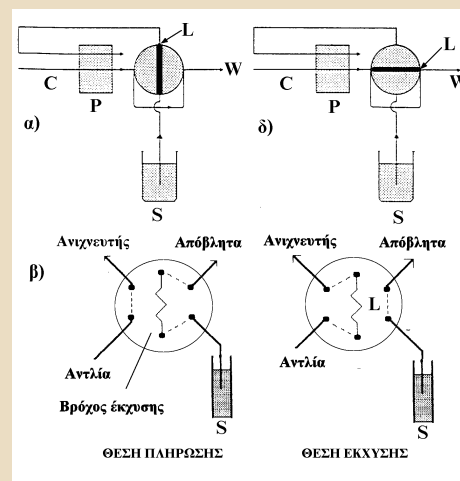


Βαλβίδες δειγματοληψίας στη FIA

Πολλαπλών Θέσεων



Απλές vs πολλαπλών θέσεων



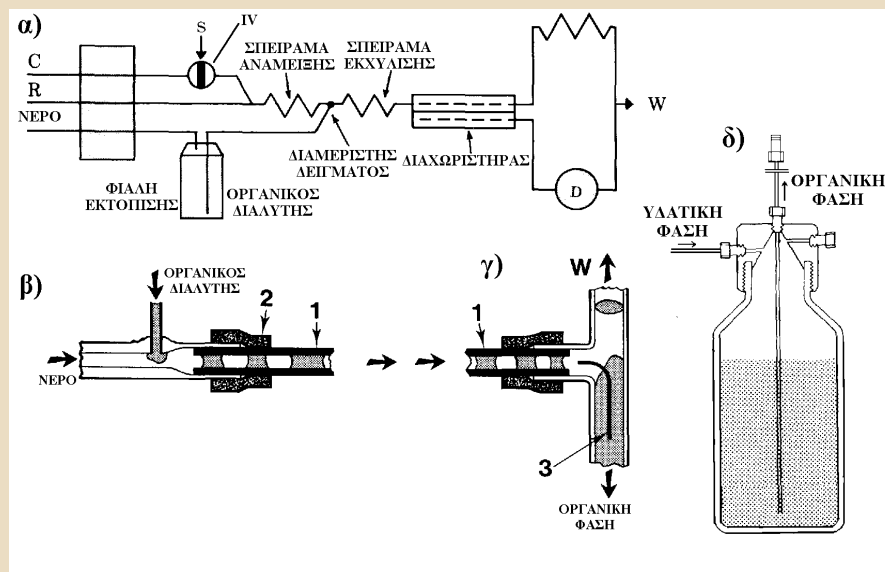
Εκχύλιση υγρό-υγρό με FIA

Μία τυπική συνεδσμολογία περιλαμβάνει, επιπλέον των άλλων, μια αντλία εκτόπισης, ένα διαμεριστή δείγματος, ένα διαχωριστήρα και μια φιάλη εκτόπισης.

Πλεονεκτήματα:

Μικρή κατανάλωση οργανικού διαλύτη

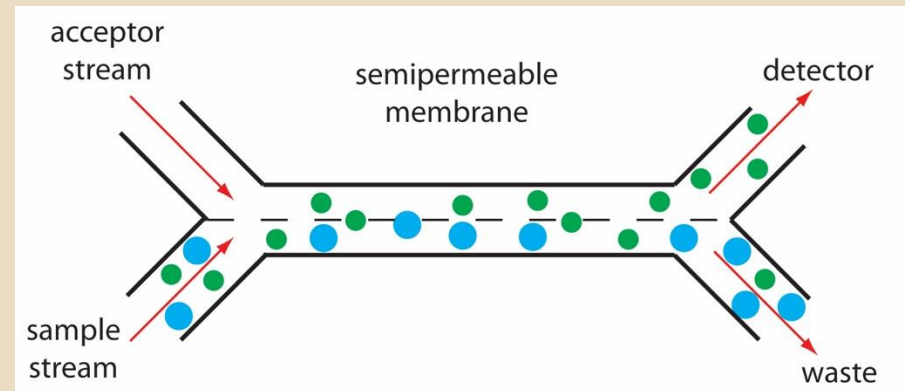
Μεγάλη προσυγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού



Διάχυση αερίων με *FIA*

Στην τεχνική διάχυσης αερίων, το αέριο διαχέεται από ρεύμα του δείγματος (δότης) στο ρεύμα του αντιδραστηρίου (δέκτης). Γίνεται διαμέσου μια υδρόφοβης πορώδους και διαπερατής μεμβράνης από Teflon. Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι αυξάνεται σημαντικά η εκλεκτικότητα του προσδιορισμού

Παράδειγμα προσδιορισμό CO_3^{2-}

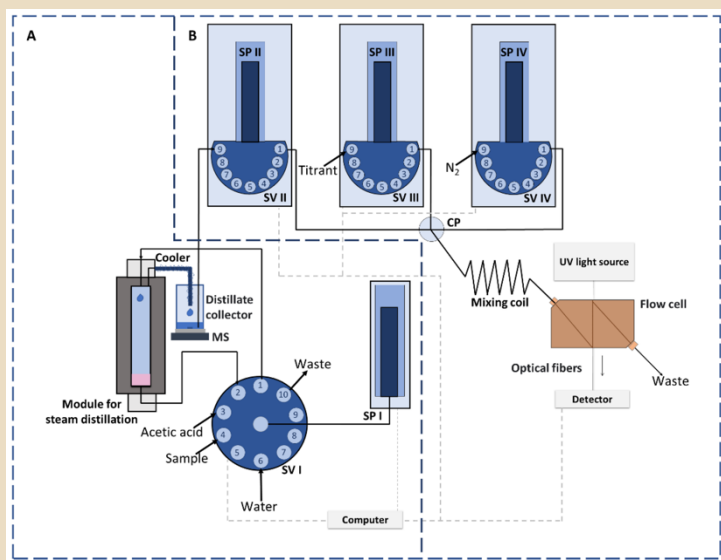


Πληρωμένοι αντιδραστήρες στη FIA

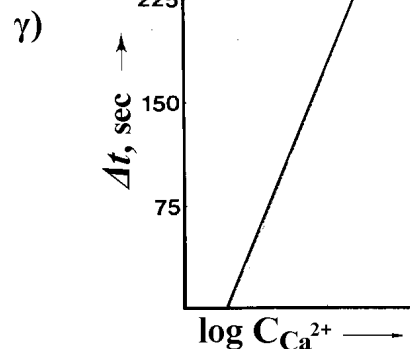
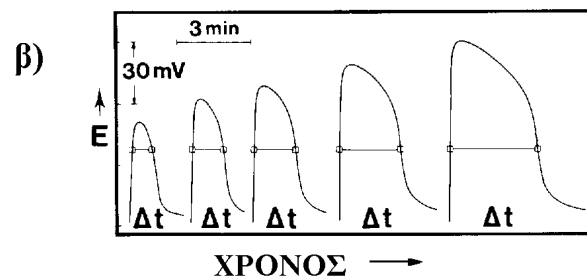
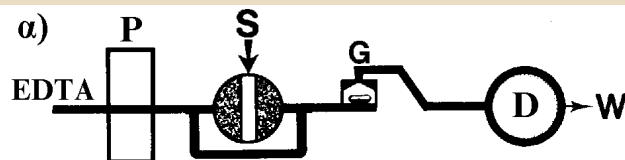
Ως πληρωμένοι αντιδραστήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

1. Στήλες ιονανταλλαγής (για την προσυγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού, την απομάκρυνση των ουσιών που παρεμποδίζουν ή τη μετατροπή του προσδιοριζόμενου συστατικού σε μετρήσιμο προϊόν.
2. Στήλες ενζύμων με ακινητοποιημένα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την εκλεκτική αποικοδόμηση υποστρωμάτων σε μετρήσιμα προϊόντα.
3. Οξειδοαναγωγικές στήλες που είναι πληρωμένες με οξειδωτικά ή αναγωγικά σώματα, και οι οποίες χρησιμοποιούνται για την επιτόπια παραγωγή αντιδραστηρίων
4. Χρωματογραφικές στήλες διαχωρισμού ή στήλες εκχύλισης στερεής φάσης

Ογκομετρήσεις με FIA

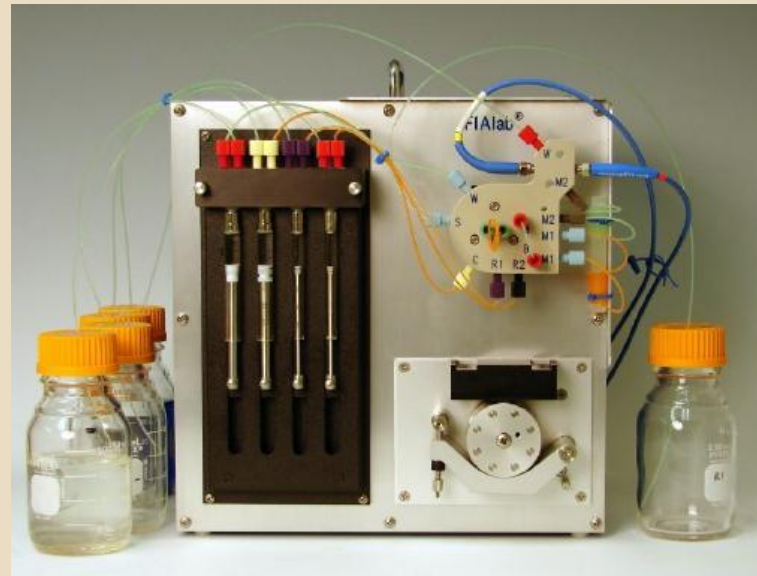


Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας σε κρασί



Ποτενσιομετρική ογκομέτρηση διαλυμάτων ιόντων Ca^{2+} με πρότυπο διάλυμα EDTA: το δείγμα S (ιόντα Ca^{2+}) εγχύεται στο ρεύμα του μεταφορέα (EDTA)

Τυπικά συστήματα FIA



Πεδία Εφαρμογής FIA

Περιβάλλον

Κλινική ανάλυση

Βιοανάλυση

Βιοτεχνολογία

Ανοσολογική ανάλυση

Φαρμακευτική ανάλυση

Τρόφιμα

Βιομηχανική ανάλυση