

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΑΥΤΟΜΑΤΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

*Απο την ανάλυση με έγχυση του
δείγματος σε συνεχή ροή
(Flow Injection Analysis, FIA)
στην ανάλυση με διαδοχικές
εγχύσεις του δείγματος
(Sequential Injection Analysis, SIA)*

Η αναγκαιότητα των αυτόματων μεθόδων ανάλυσης

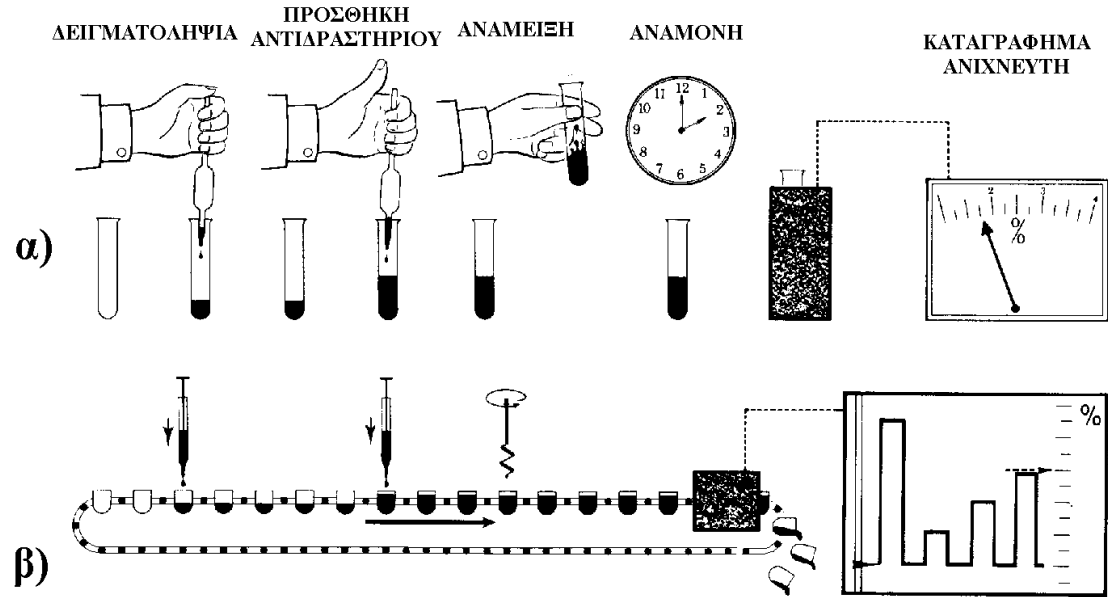
- Κλασική ανάλυση



- Συνεχής αυτόματη ανάλυση



- Ανάλυση συνεχούς ροής



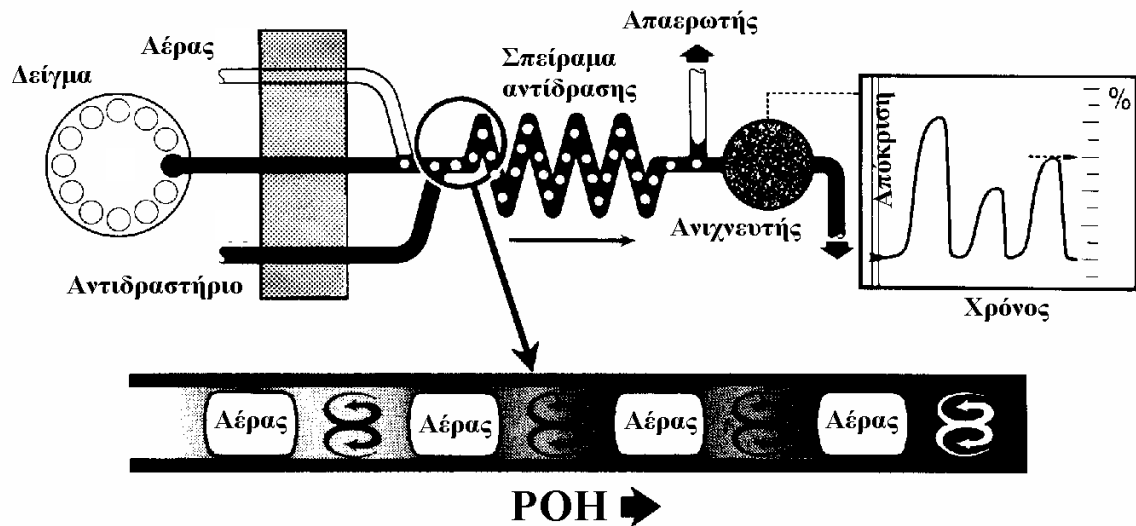
Τα πλεονεκτήματα των αυτόματων μεθόδων ανάλυσης

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

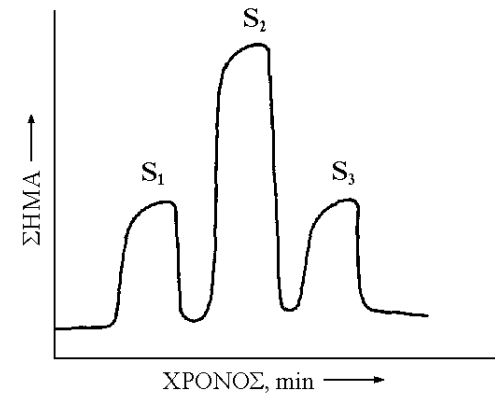
Αυτόματη αεριοδιαχωριζόμενη ανάλυση συνεχούς ροής (segmented flow analysis, SFA)

- Μειονεκτήματα:

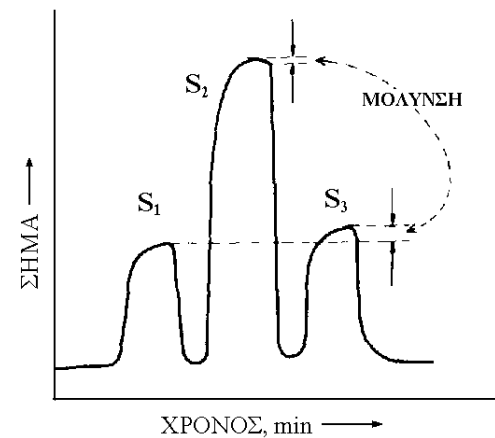
- α) η πιθανότητα αλληλοεπιμόλυνσης διαδοχικών δειγμάτων
- β) η πολυπλοκότητα του απαερωτή



α)

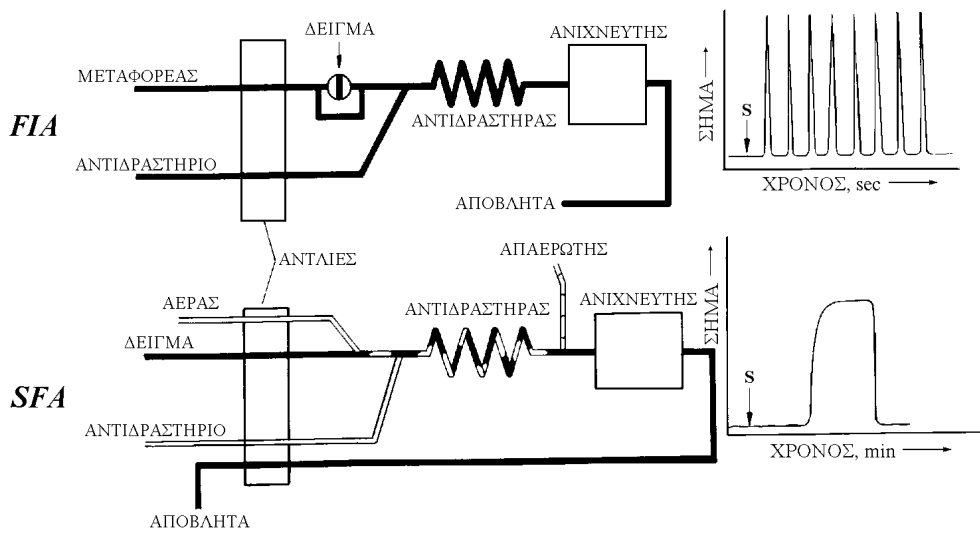
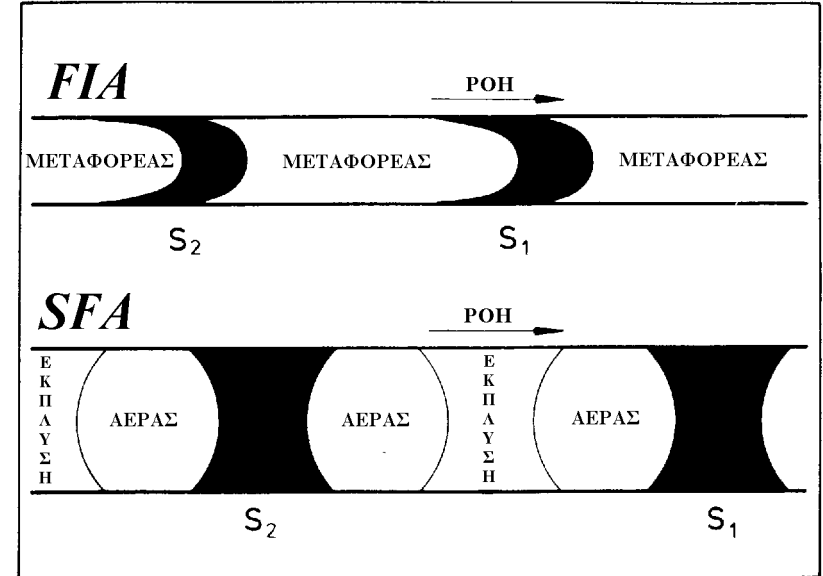


β)



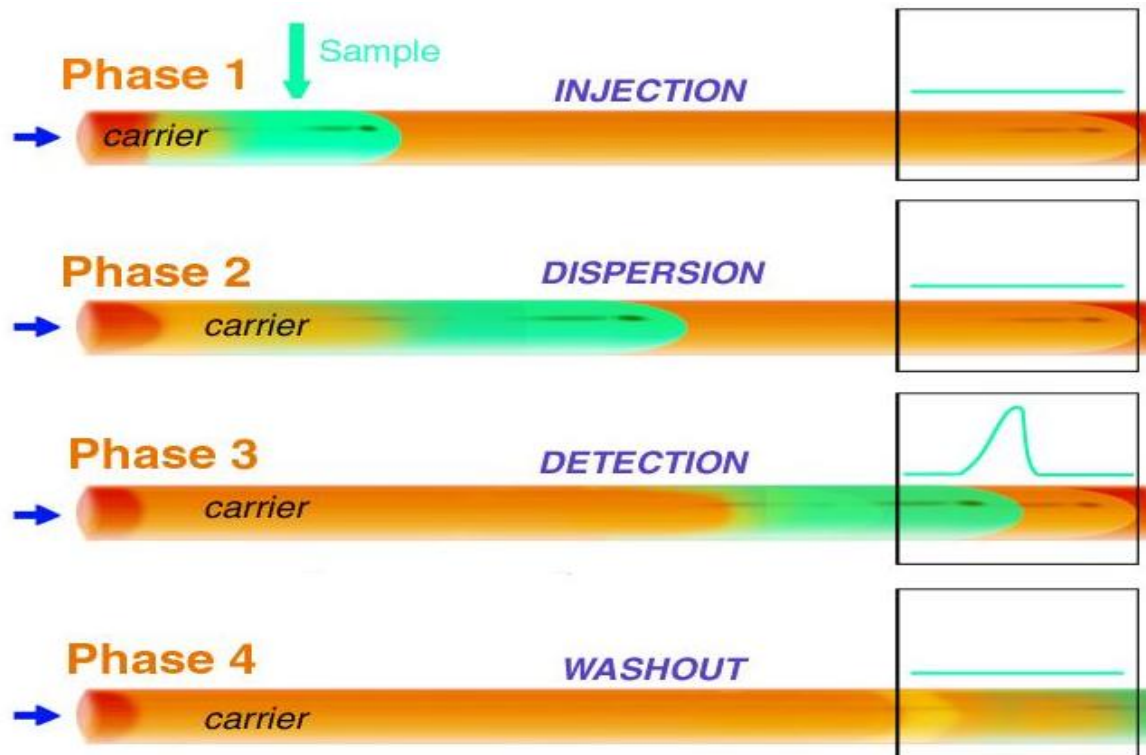
Αλλαγές στην SFA

- Κατάργηση ρεύματος αέρα και απαερωτή
- Εισαγωγή δείγματος με βαλβίδα έγχυσης σε ρεύμα μεταφοράς



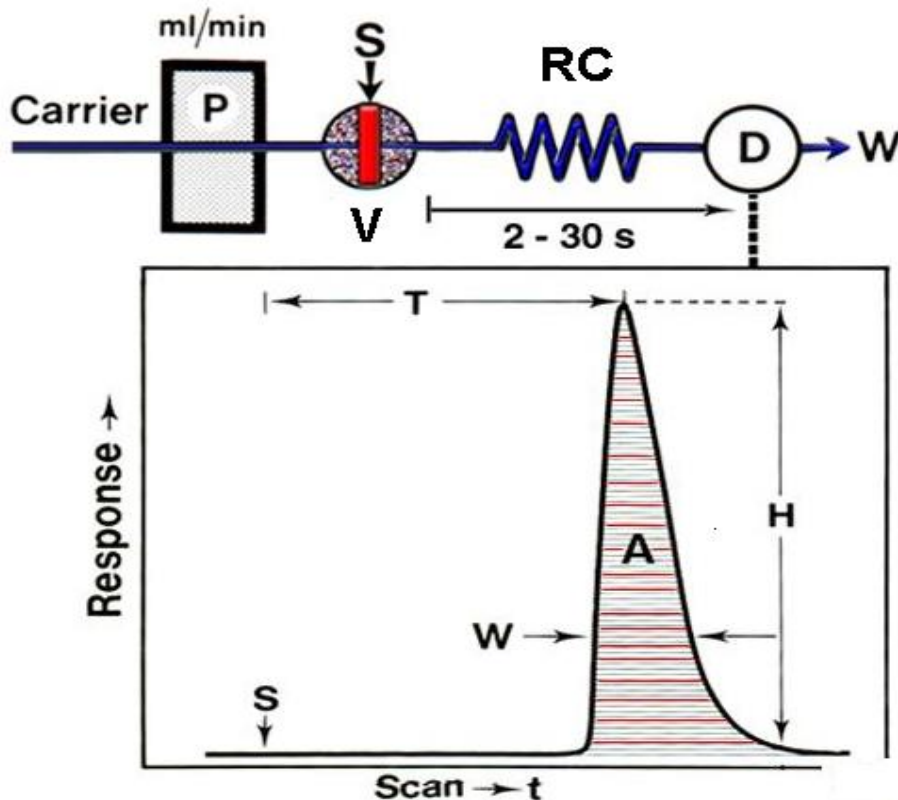
Ανάλυση με έγχυση του δείγματος σε συνεχή ροή (Flow Injection Analysis, FIA)

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



Ένα απλό σύστημα FIA

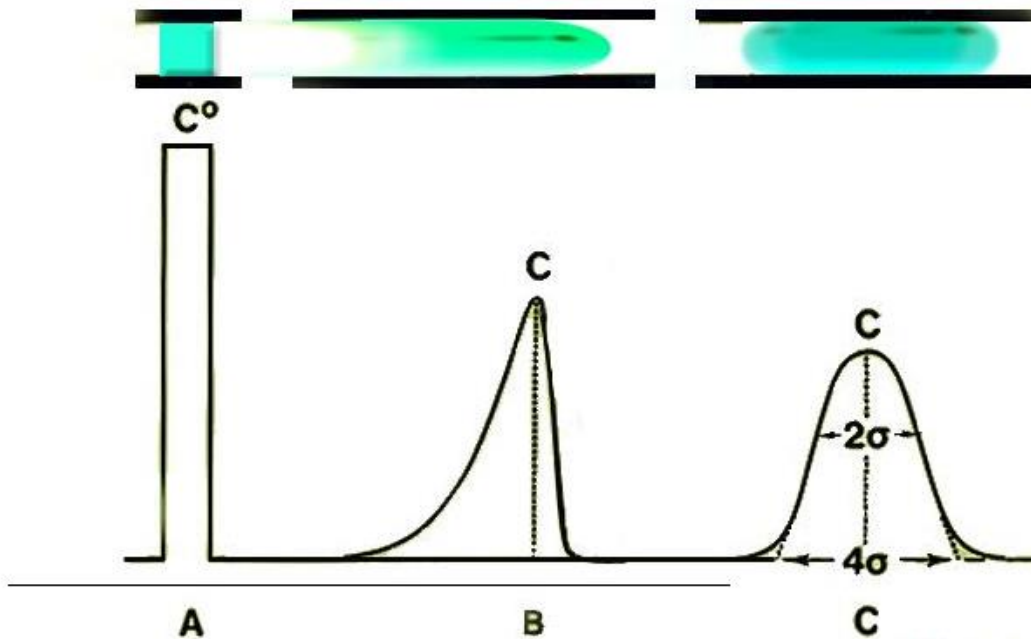
- Ένα απλό σύστημα FIA αποτελείται από μια αντλία (pump, P), μια βαλβίδα έγχυσης (injection valve, V), ένα σπείραμα αντίδρασης (reaction coil, RC) και έναν ανιχνευτή (detector, D)
- Η απόκριση του ανιχνευτή έχει τη μορφή κορυφής



Το ύψος της κορυφής (H) είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα

Τι είναι διασπορά (dispersion)?

- Διασπορά είναι η αραίωση του δείγματος που προκαλείται κατά την κίνηση του προς τον ανιχνευτή
- Αμέσως μόλις το δείγμα εγχύεται, η συγκέντρωσή 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 ($D=2-10$)

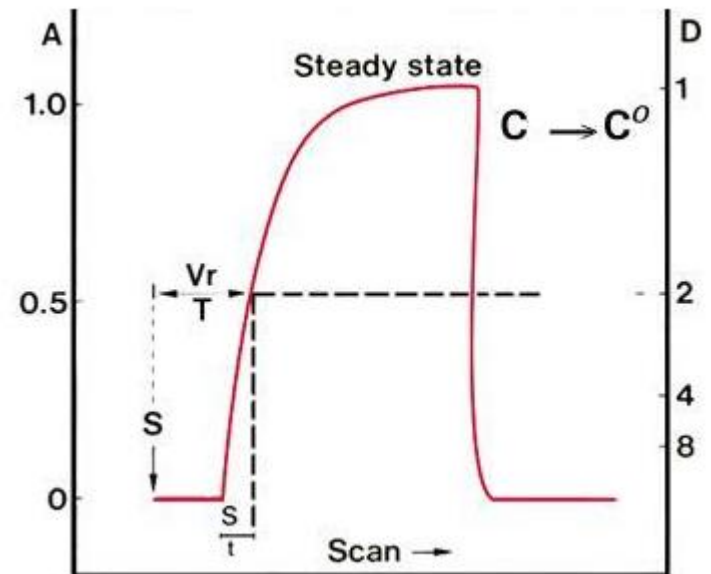
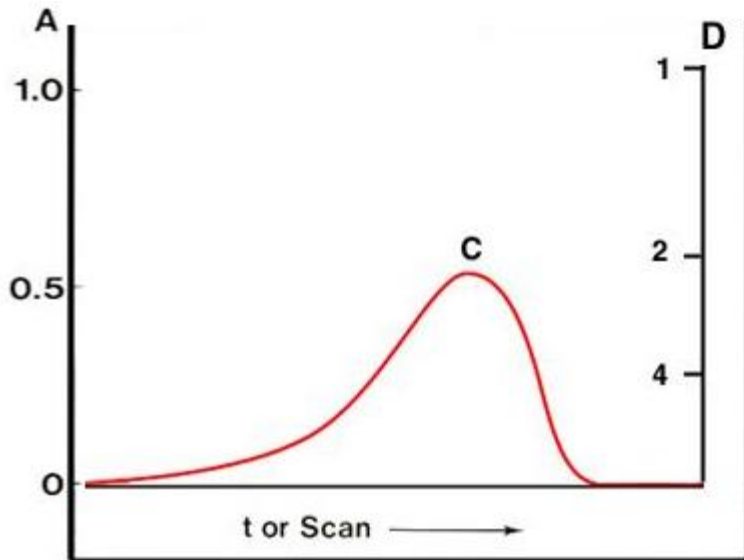
Υψηλός ($D=10-10000$)

Περισσότερα για τη διασπορά

- Η διασπορά εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές (π.χ. το μήκος του σπειράματος αντίδρασης, τον όγκο του δείγματος, τη γεωμετρία των σωληνώσεων ροής και τη ταχύτητα ροής του μεταφορέα

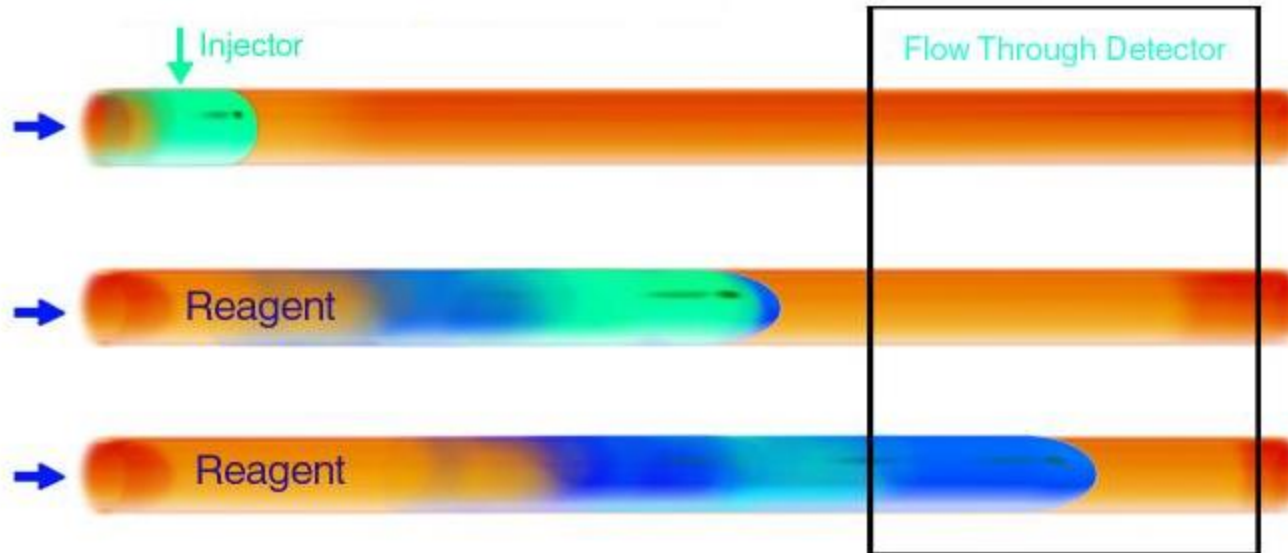
Συνήθως απαιτείται μέση διασπορά

Σε κάποιες περιπτώσεις επιζητούμε χαμηλή διασπορά



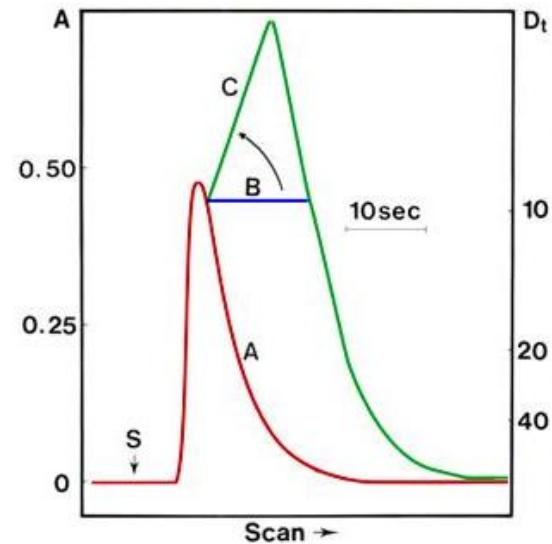
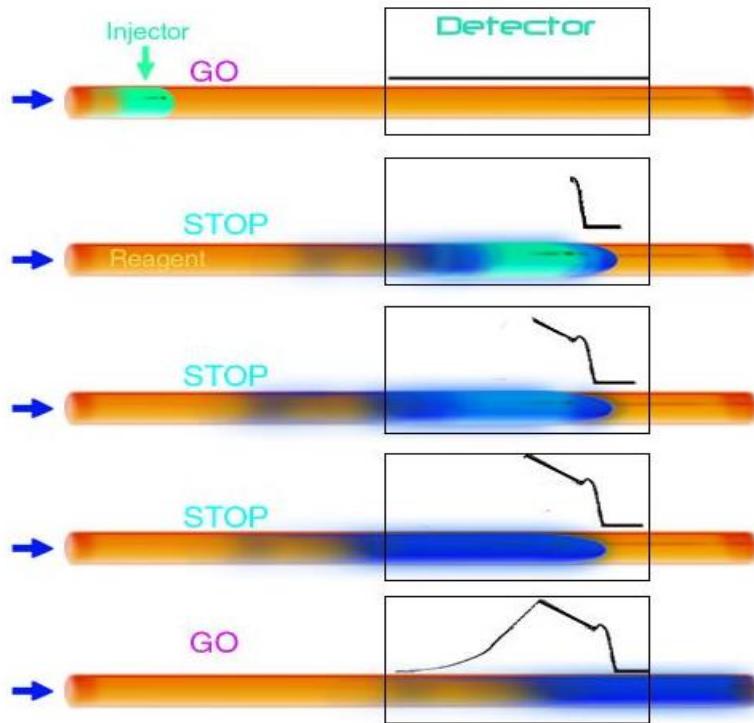
Χημικές αντιδράσεις στη FIA

- Αν ο αδρανής μεταφορέας αντικατασταθεί από ένα αντιδραστήριο που αντιδρά με τον αναλύτη, 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-αντιδραστήριου (που προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος της αντίδρασης καθώς το δείγμα κινείται προς τον ανιχνευτή)

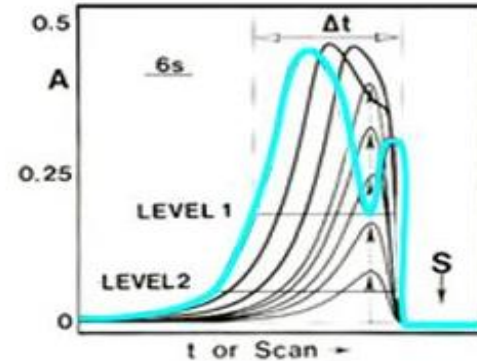
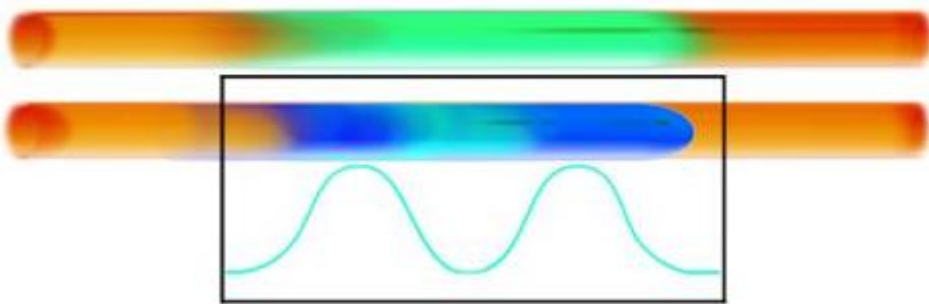


FIA αναχαιτιζόμενης ροής (stopped-flow FIA)

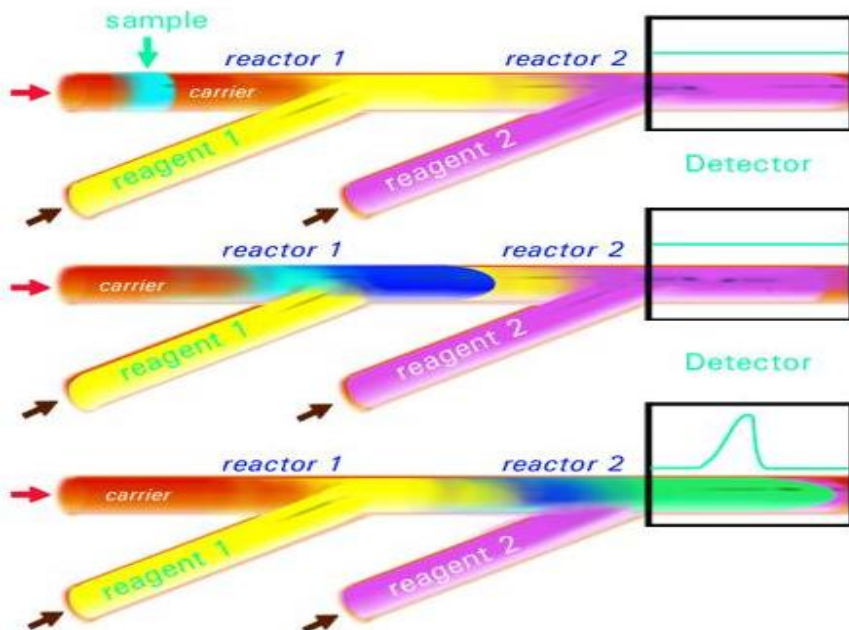
- Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος αναπτύχθηκε η μέθοδος της αναχαιτιζόμενης ροής (stopped-flow FIA).
- Στη τεχνική αυτή, όταν το δείγμα φτάσει στον ανιχνευτή, διακόπτεται η ροή για κάποιο χρονικό διάστημα. Έτσι, μειώνεται η διασπορά του δείγματος και ταυτόχρονα βελτιώνεται η μίξη του μεταφορέα-αντιδραστηρίου με το δείγμα



Πολυκάναλα συστήματα FIA



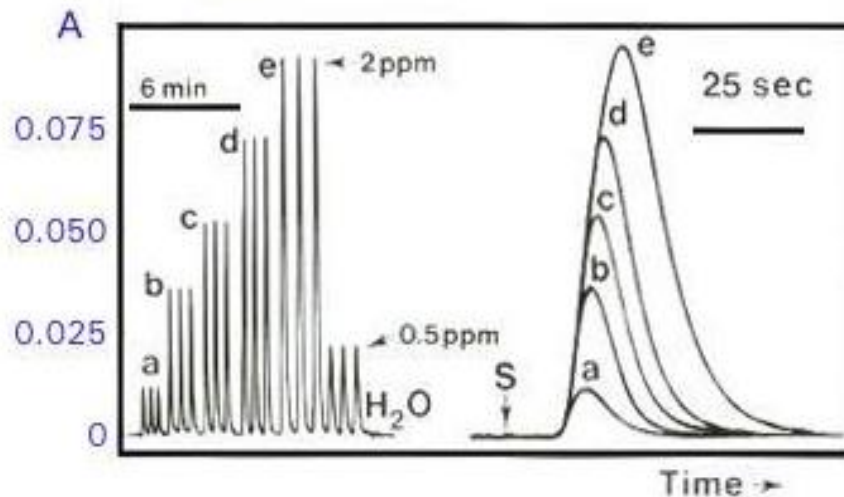
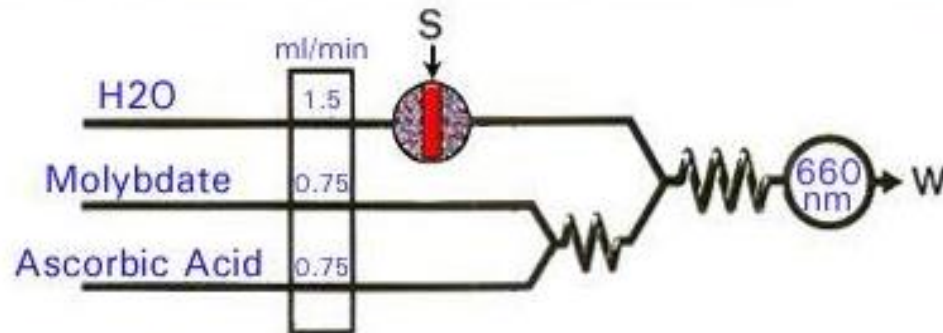
- Τα μονοκάναλα συστήματα FIA δεν επιτυγχάνουν πάντα καλή ανάμιξη δείγματος-αντιδραστηρίου (δημιουργούνται διπλές κορυφές)



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

Μία τυπική εφαρμογή FIA

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



Βελτιστοποίηση των παραμέτρων στη FIA

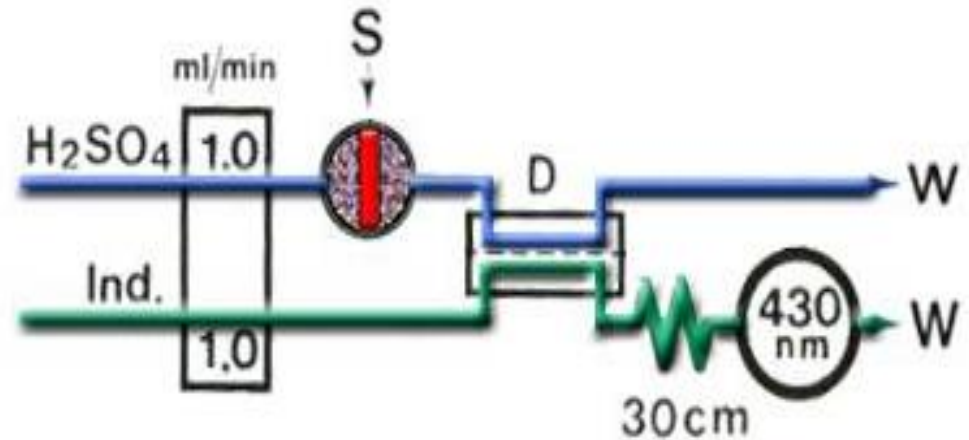
- Συγκέντρωση των αντιδραστηρίων
- pH
- Παροχές των υγρών
- Μήκος σπειραμάτων αντίδρασης
- Όγκος δείγματος
- Γεωμετρικές παράμετροι του συστήματος

Τα πλεονεκτήματα της FIA

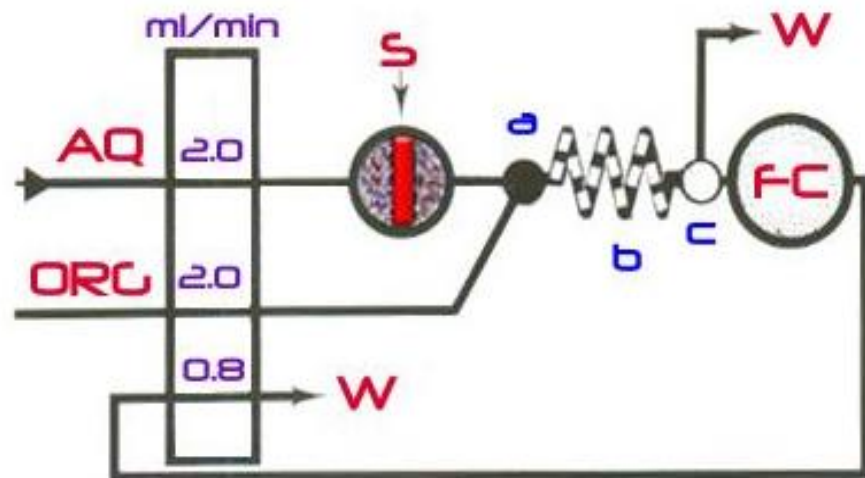
- Αυτοματισμός
- Μεγάλη συχνότητα μετρήσεων
- Ακρίβεια και επαναληψιμότητα
- Ευελιξία στη διαχείριση του δείγματος (μέσω ελέγχου της διασποράς)
- Ευρεία εφαρμοσιμότητα
- Μικρή κατανάλωση δείγματος και αντιδραστηρίων
- Ελαχιστοποίηση επιμόλυνσης

Εξελιγμένες τεχνικές FIA

- Ανταλλαγής αερίων (π.χ. προσδιορισμός CO_2)

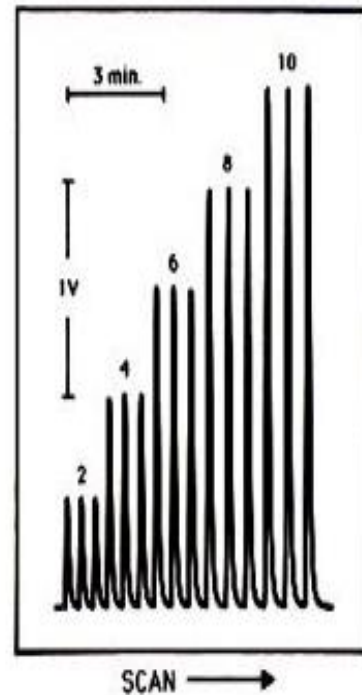
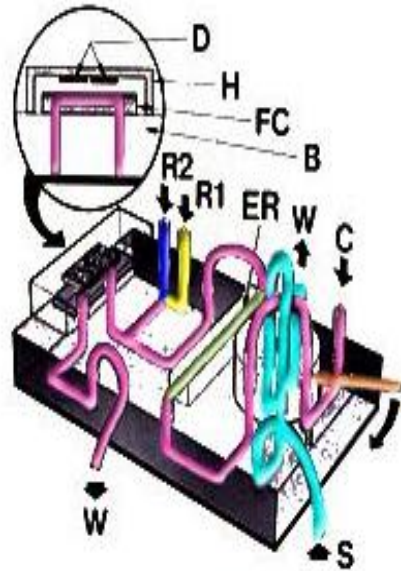
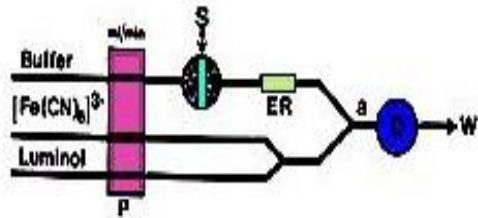


- Εκχύλιση (κατανομή μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης)



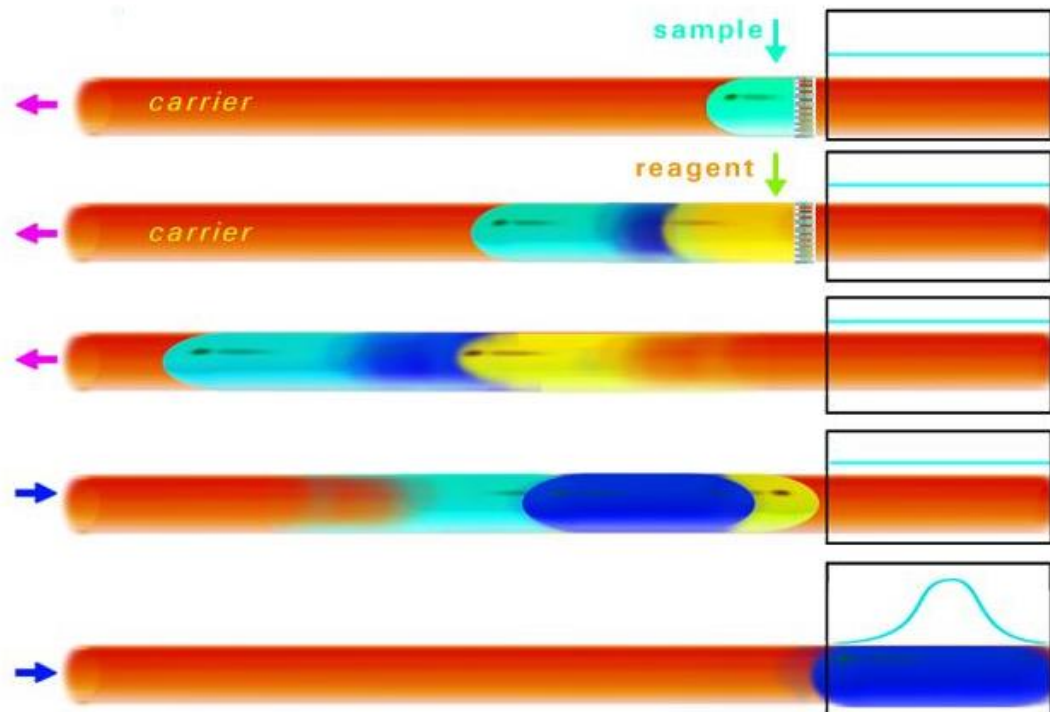
ΦΙΑ σε μικροκατασκευασμένα συστήματα (microfluidics)

- Προσδιορισμός σακχάρων με τη χρήση ενζυμικής αντίδρασης-χημειοφωταύγειας



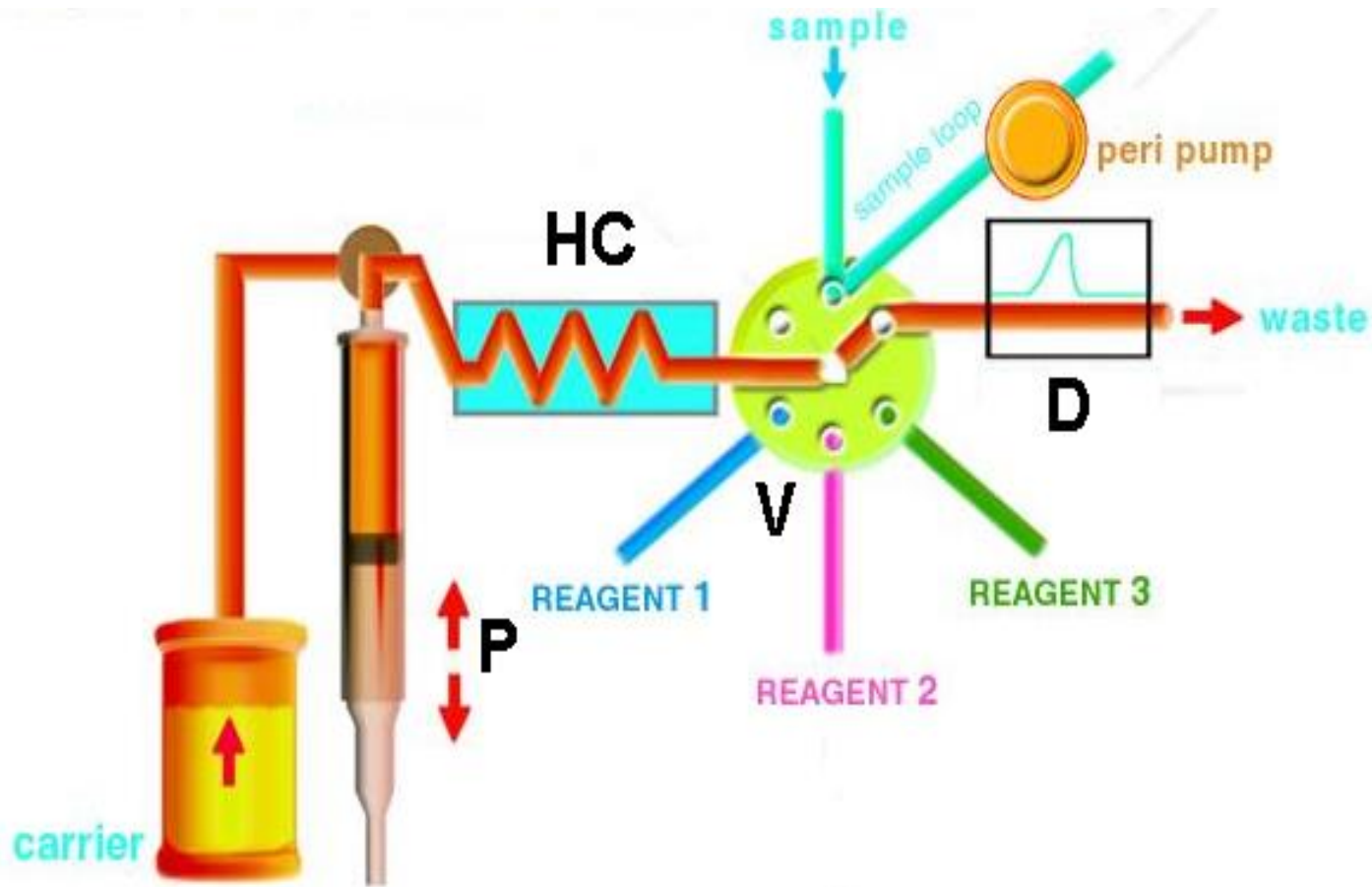
Ανάλυση με διαδοχικές εκχύσεις του δείγματος (*Sequential Injection Analysis, SIA*)

- Η SIA βασίζεται στη διαδοχική αναρρόφηση ζωνών δείγματος και αντιδραστηρίων σε ένα σπείραμα συγκράτησης (*holding coil*)
- Στη συνέχεια, η ροή αντιστρέφεται και οι ζώνες προωθούνται προς έναν ανιχνευτή
- Κατά τα στάδια της αναρρόφησης και κυρίως της προώθησης, οι ζώνες διασπείρονται και αναμιγνύονται με αποτέλεσμα τη χημική αντίδραση και την παραγωγή κάποιου μετρήσιμου προϊόντος



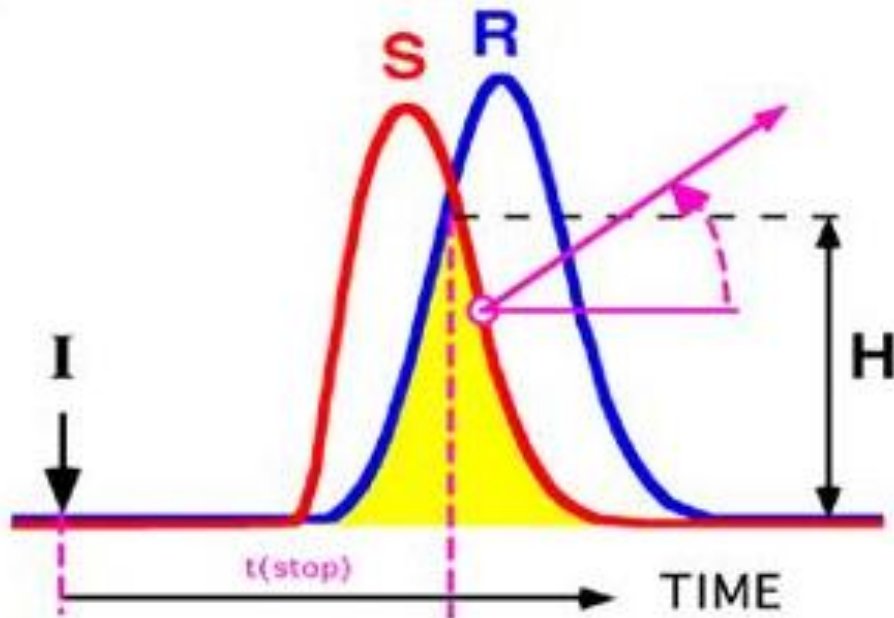
Ένα τυπικό σύστημα SIA

- Μία τυπική συνδεσμολογία SIA αποτελείται από μία αντλία (pump, P), μία βαλβίδα πολλαπλών θέσεων (multi-port valve, V), ένα σπείραμα συγκράτησης (holding coil, HC) και έναν ανιχνευτή (detector, D)



Ανάμιξη των ζωνών στη SIA

- Στη SIA, η αντίδραση ξεκινά καθώς οι ζώνες αναρροφώνονται και προχωρά κατά την προώθηση προς τον ανιχνευτή
- Οι ζώνες του δείγματος (S) και του αντιδραστηρίου (R) διασπείρονται ανεξάρτητα όπως στη FIA
- Το προϊόν παράγεται στην περιοχή όπου οι ζώνες αλληλεπικαλύπτονται (κίτρινη περιοχή)
- Είναι επιθυμητή η μέγιστη αλληλεπικάλυψη των ζωνών



Βελτιστοποίηση των παραμέτρων στη SIA

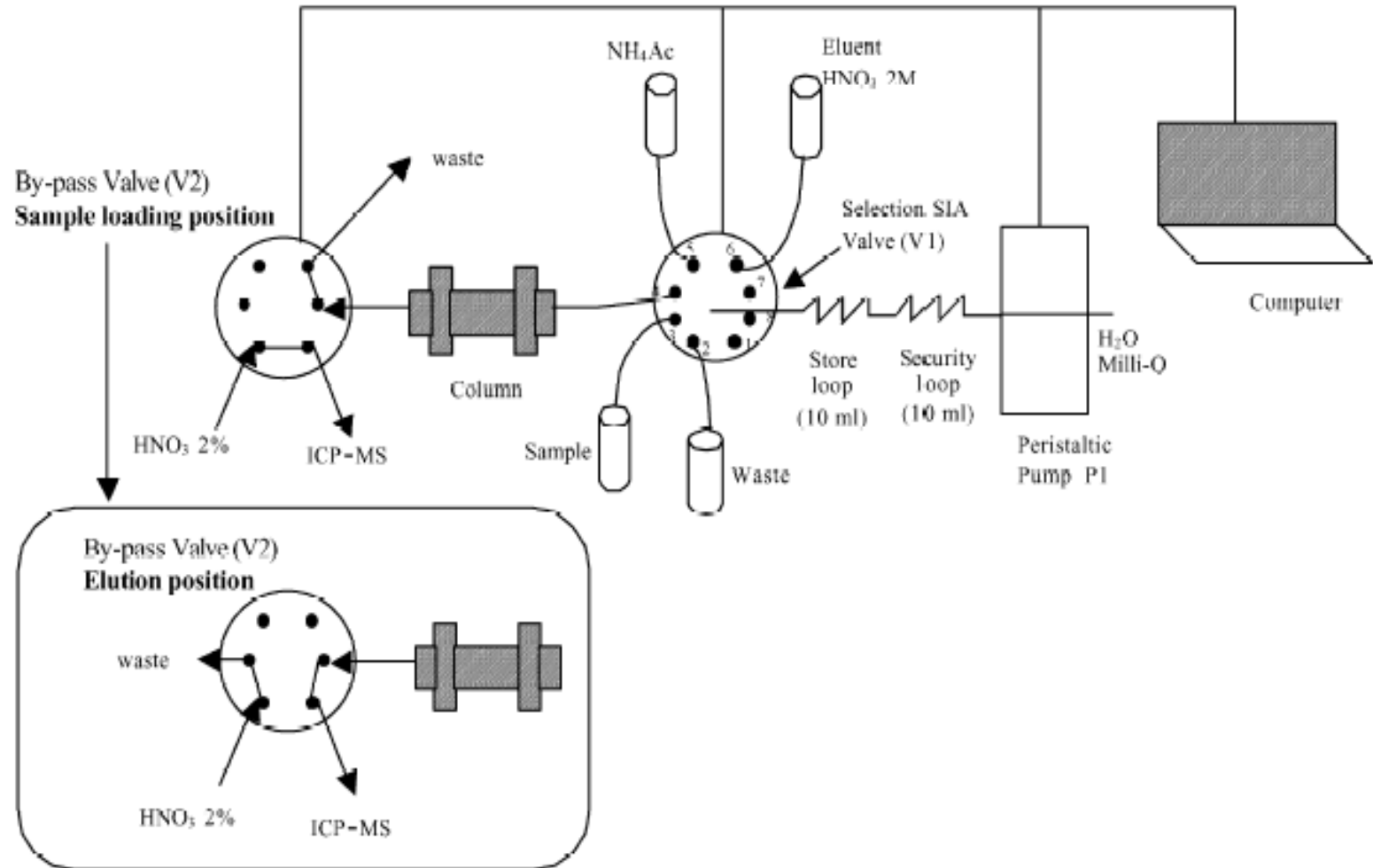
- Όγκος της ζώνης του δείγματος
- Όγκοι των ζωνών των αντιδραστηρίων
- Συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων
- pH
- Παροχή προς τον ανιχνευτή

Πλεονεκτήματα της SIA

- Μικρή κατανάλωση αντιδραστηρίων και δείγματος
- Απλότητα (μονοκάναλη διάταξη)
- Ευελιξία
- Αυτοματισμός
- Μεγάλες δυνατότητες προκατεργασίας του δείγματος

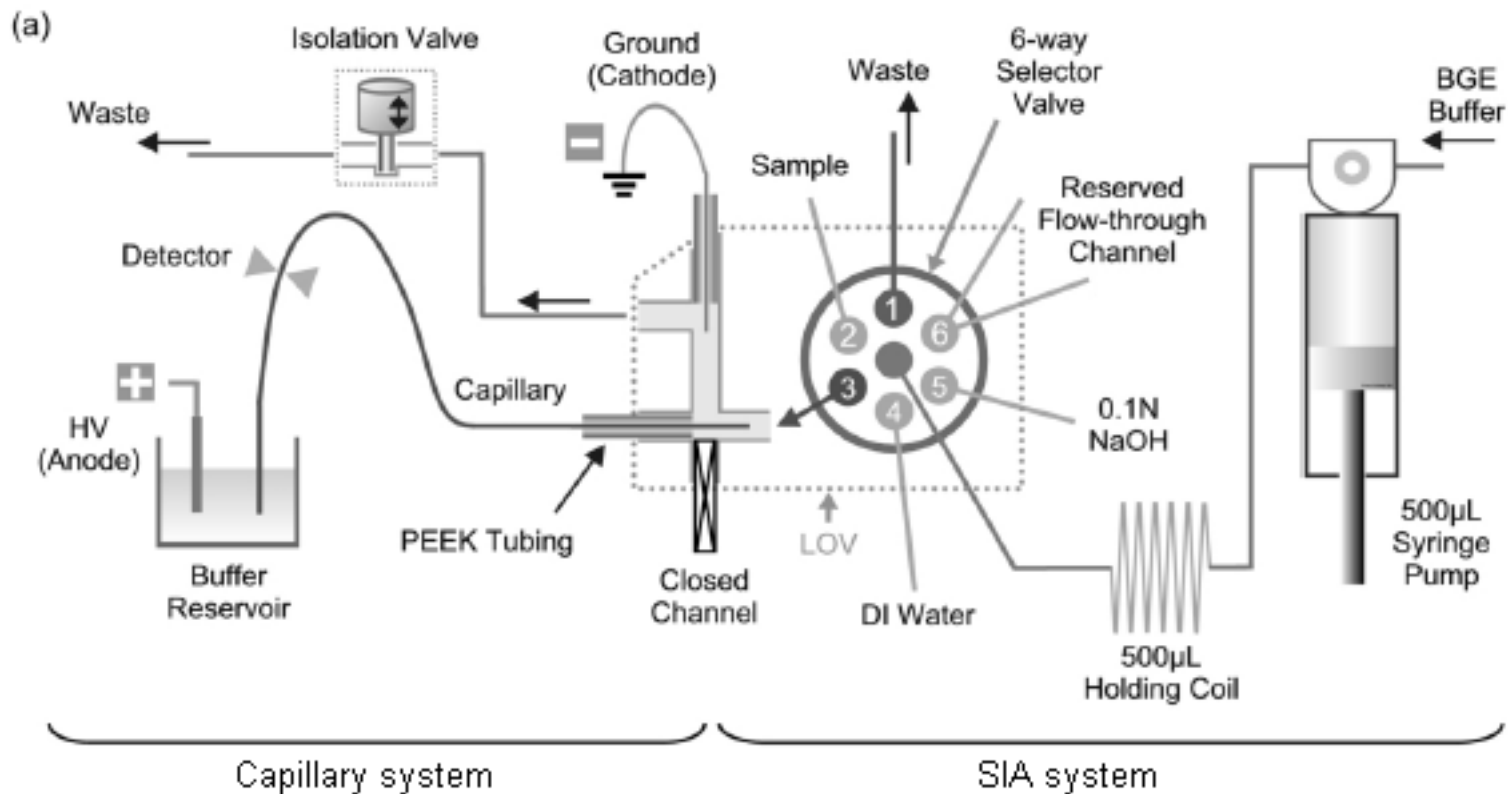
SIA συνδυασμένη με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα-φασματομετρία μάζας

- Προσδιορισμός ιχνών μεταλλοϊόντων



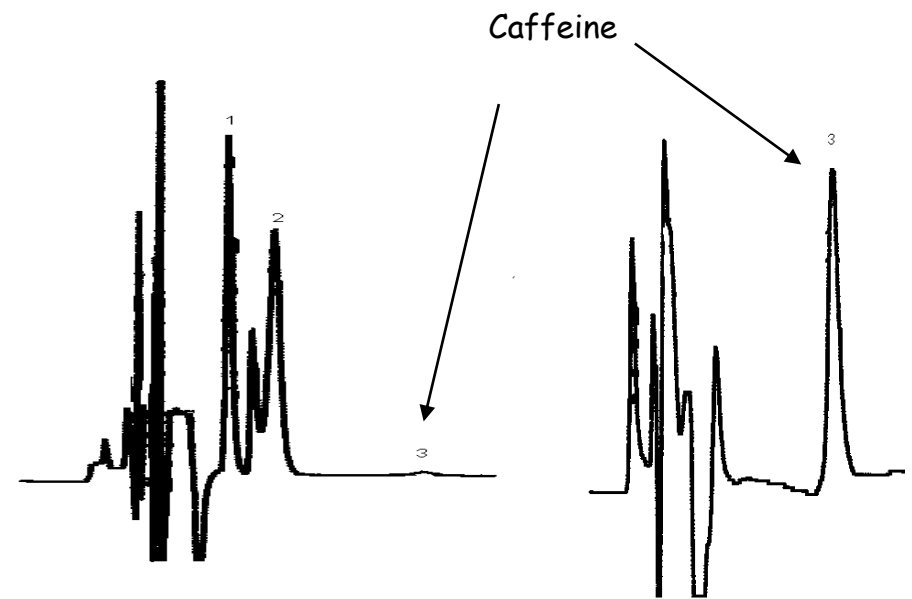
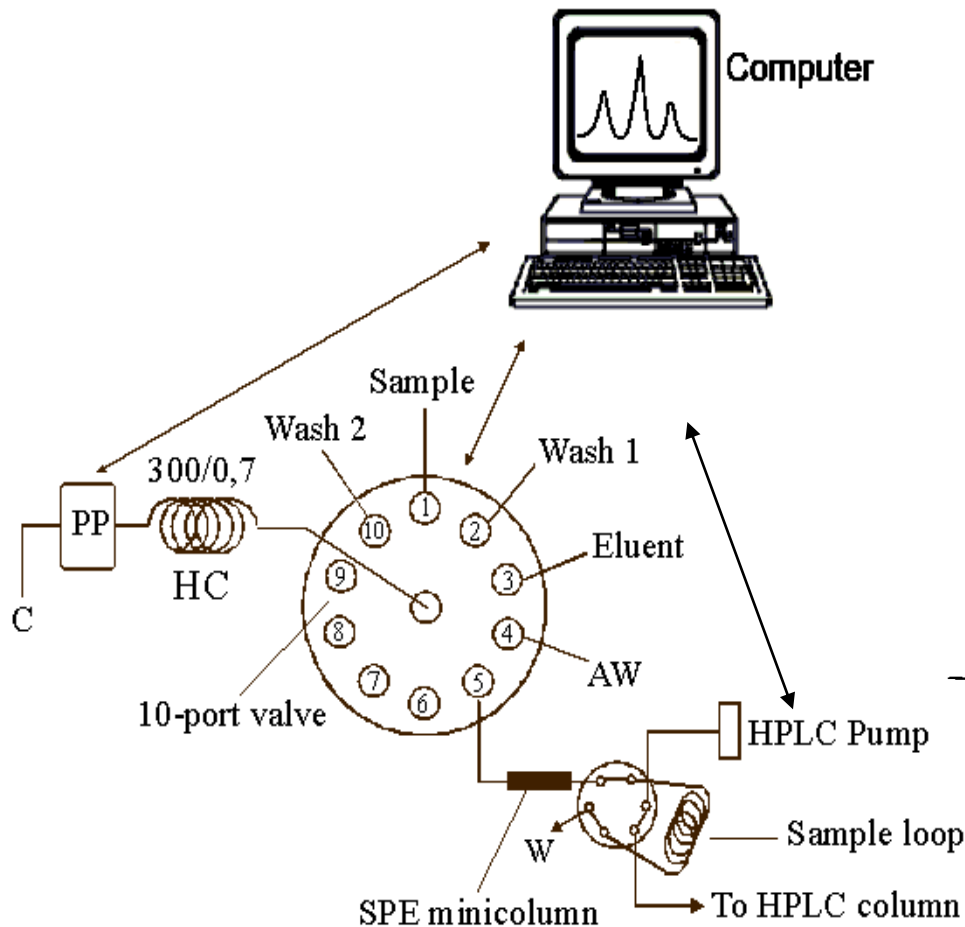
SIA συνδυασμένη με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση

• Προσδιορισμός φαρμακευτικών ουσιών



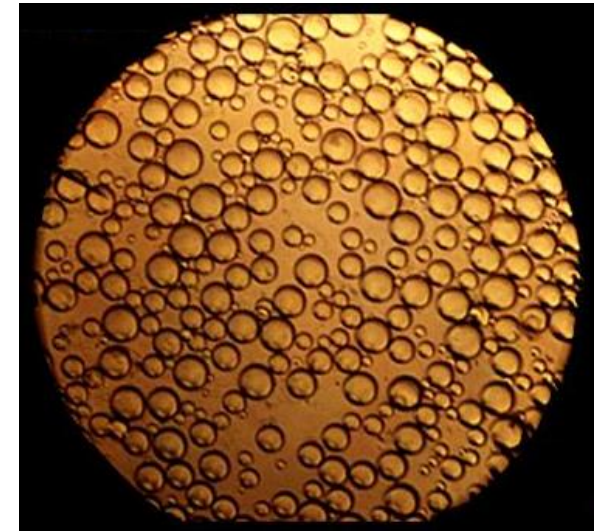
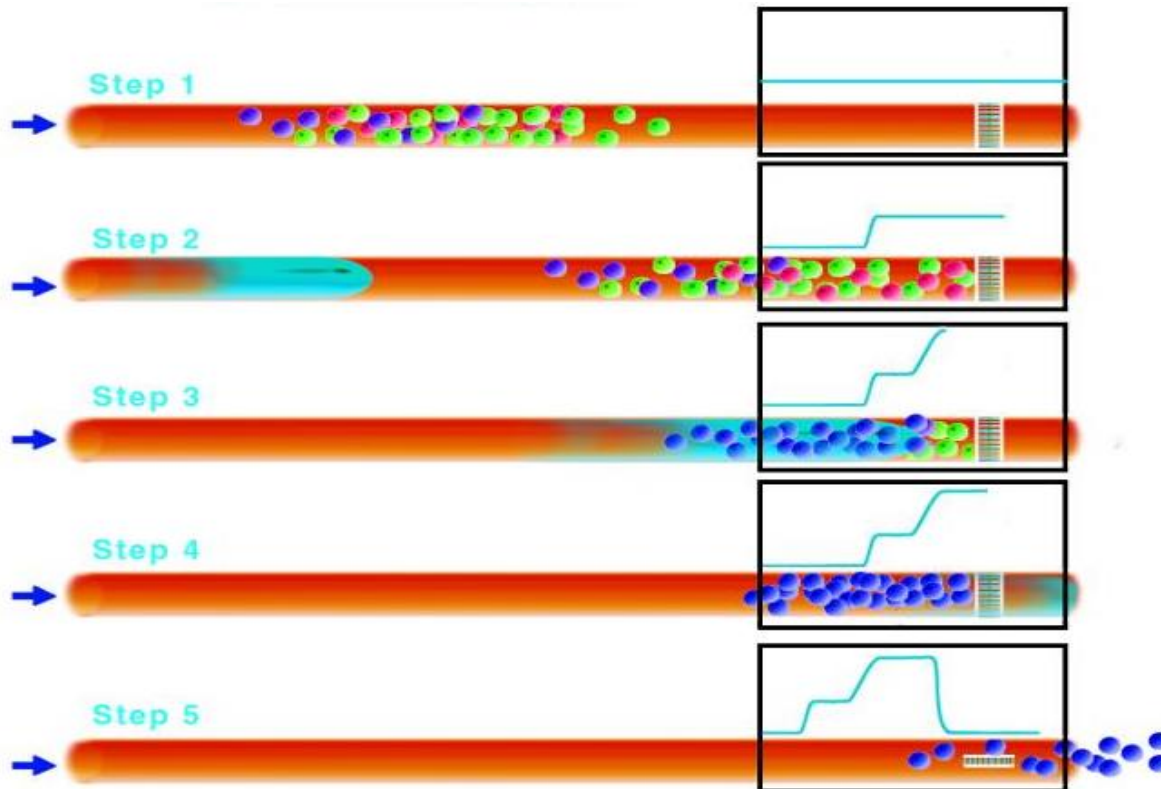
SIA συνδυασμένη με εκχύλιση στερεής φάσης - υδροχρωματογραφία

• Προσδιορισμός οργανικών ουσιών



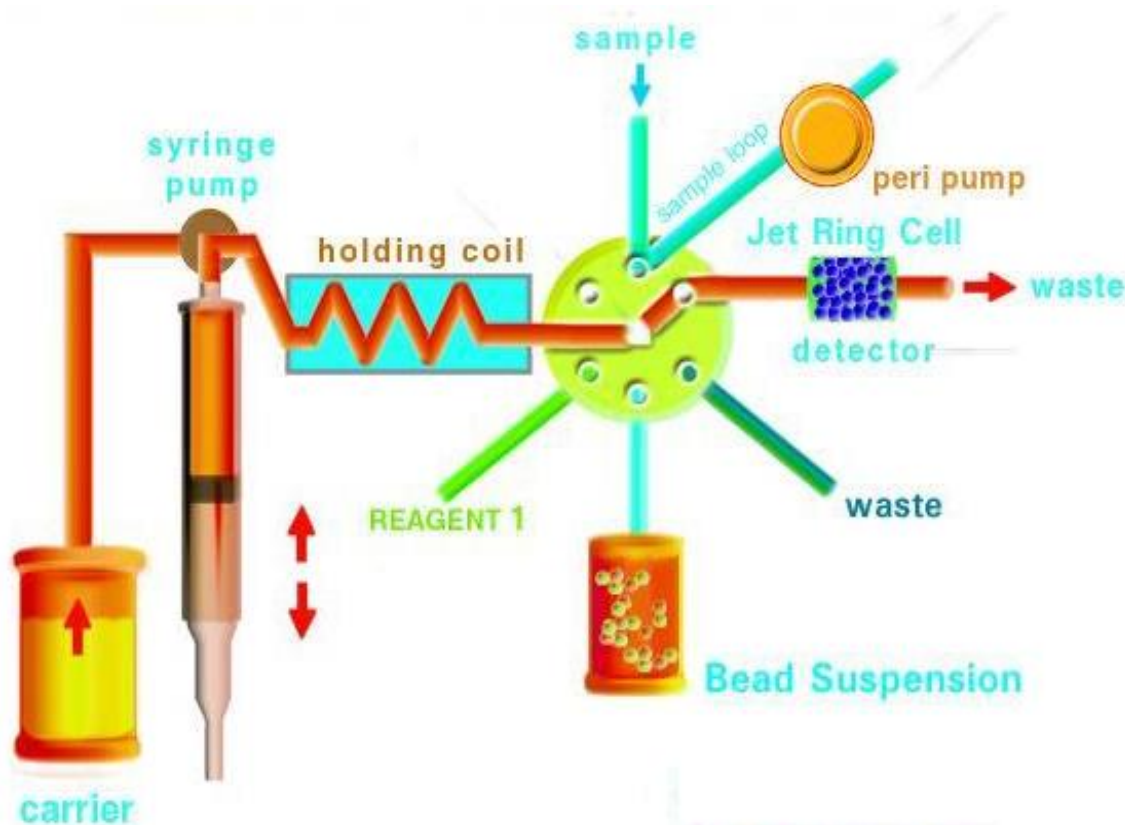
Ανάλυση με έγχυση με χάντρες (BIA)

- Η BIA είναι μια παραλλαγή της SIA που χρησιμοποιεί σφαιρίδια (από σεφαρόζη ή sephadex ακτίνας 30-150 μm) ως φορείς αντιδραστηρίων
- Τα σφαιρίδια εγχύονται και κατακρατούνται σε μια ειδική κυψελίδα ροής. Κατόπιν, το δείγμα εγχύεται, αντιδρά με το αντιδραστήριο στα σφαιρίδια και το προϊόν που παράγεται μετράται από έναν ανιχνευτή



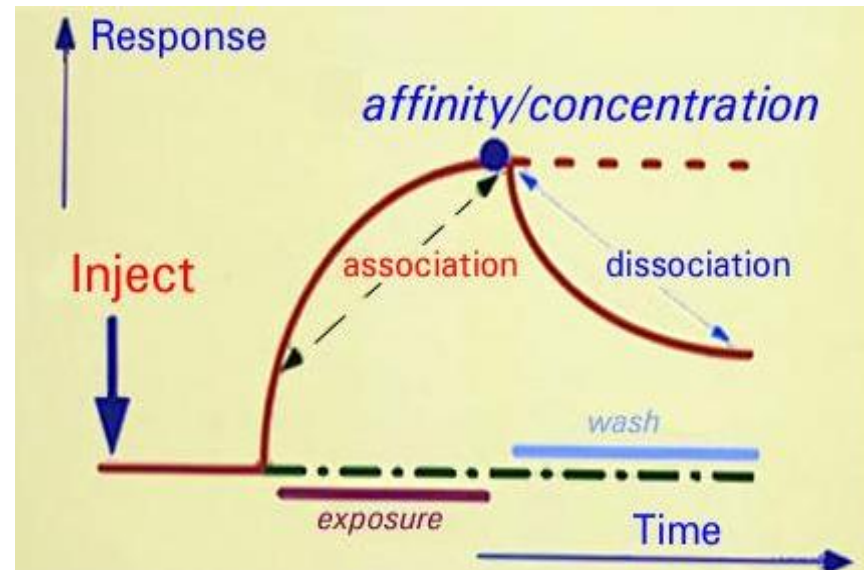
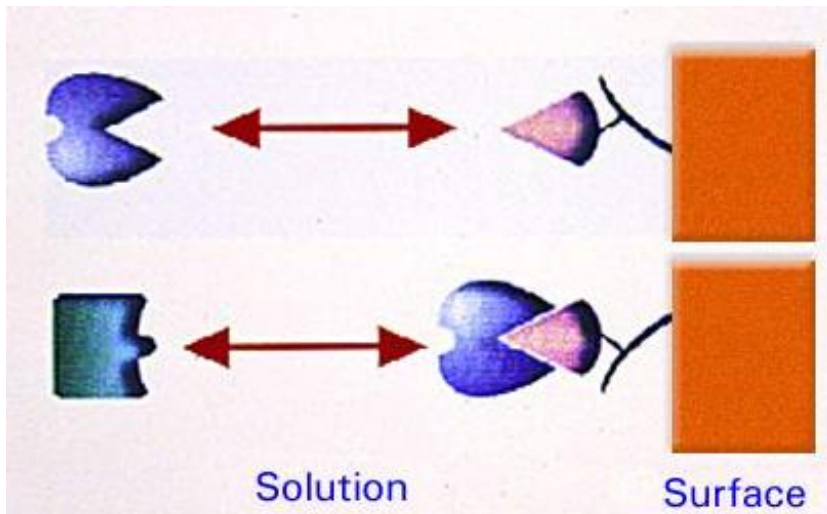
Μια τυπική συνδεσμολογία ΒΙΑ

Μια συνδεσμολογία ΒΙΑ είναι παρόμοια με μια αντίστοιχη ΣΙΑ. Ένα από τα αντιδραστήρια αντικαθίσταται από ένα εναιώρημα με σφαιρίδια και η ειδική κυψελίδα συγκράτησης τοποθετείται πριν η μέσα στον ανιχνευτή



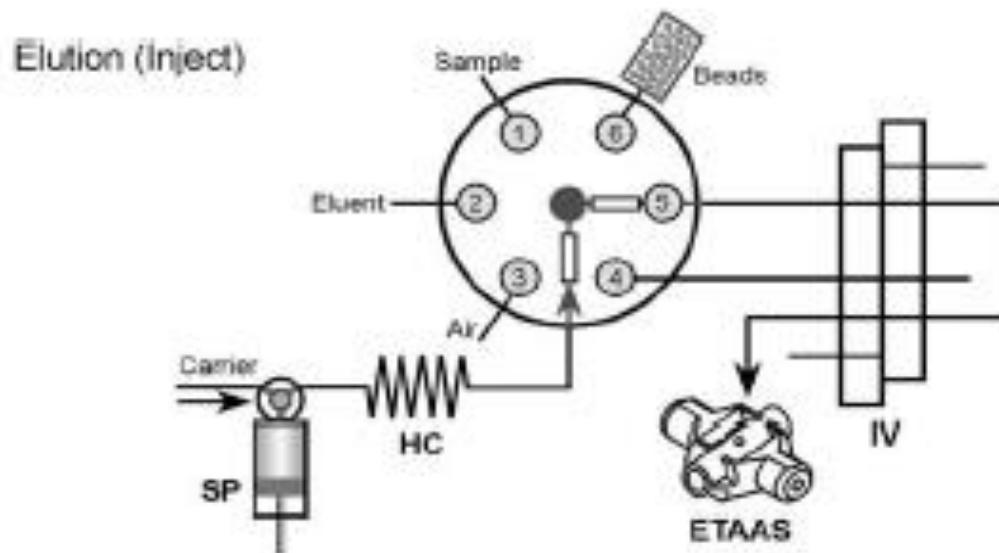
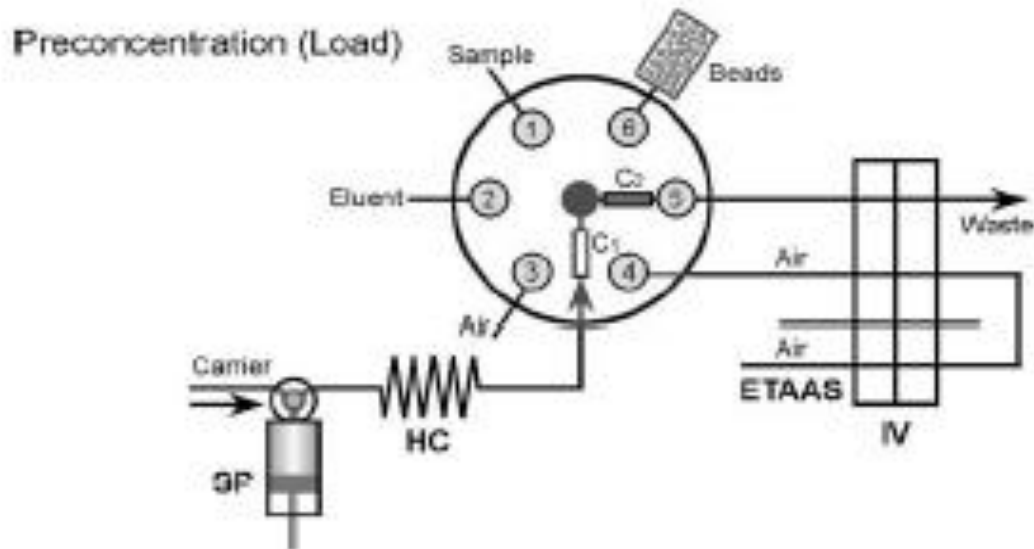
Μετρήσεις βιοειδικών δράσεων (bioligand interaction assays) με ΒΙΑ

- Στη περίπτωση αυτή ένα εκλεκτικό αντιδραστήριο (μωβ) προς ένα βιολογικό μόριο (σκούρο μπλε) ακινητοποιείται στην επιφάνεια του σφαιριδίου (πορτοκαλί) (πορτοκαλί)
- Όταν το δείγμα εισαχθεί στον αναλυτή, το βιολογικό μόριο συγκρατείται εκλεκτικά από το ακινητοποιημένο αντιδραστήριο και μπορεί να προσδιορισθεί άμεσα (μετρώντας κάποια ιδιότητά του) ή έμμεσα χρησιμοποιώντας κάποιο δείκτη που αλληλεπιδρά εκλεκτικά με το βιολογικό μόριο (ανοικτό μπλε)
- Η καμπύλη απόκρισης δίνει πληροφορίες για: α) την ποσότητα του βιολογικού μορίου που έχει συγκρατηθεί (ύψος), β) την ταχύτητα συγκράτησης (κλίση του αρχικού τμήματος), γ) την ταχύτητα διάσπασης (κλίση τελικού τμήματος)



ΒΙΑ συνδυασμένη με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης

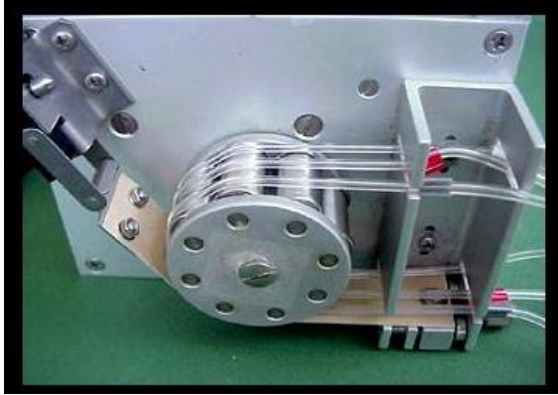
- Προσδιορισμός ιχνών μεταλλοίωντων



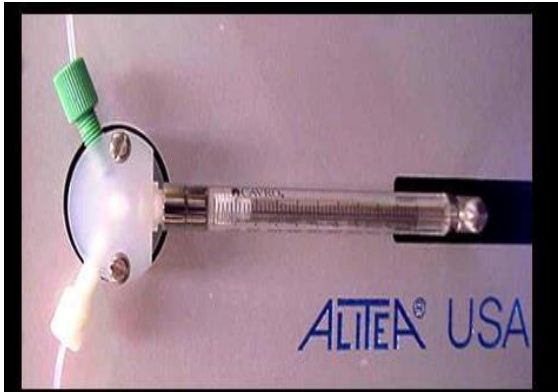
Οργανολογία FIA και SIA

- Αντλίες

α) περισταλτικές



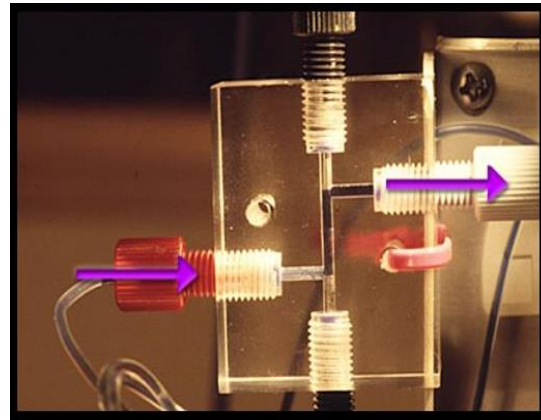
(β) σύριγγας



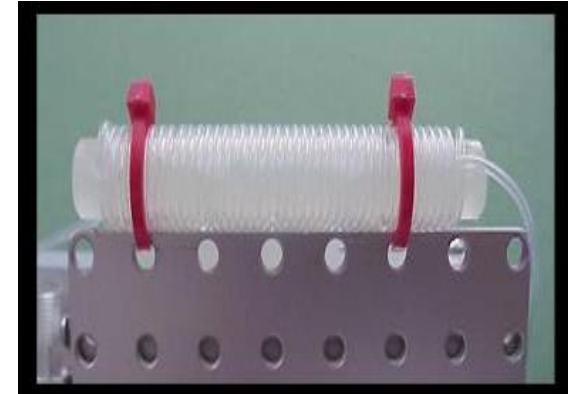
- Βαλβίδες



- Κυψελίδες ροής



- Σπειράματα



- Άλλα (σωλήνες, ενώσεις κ.λπ.)

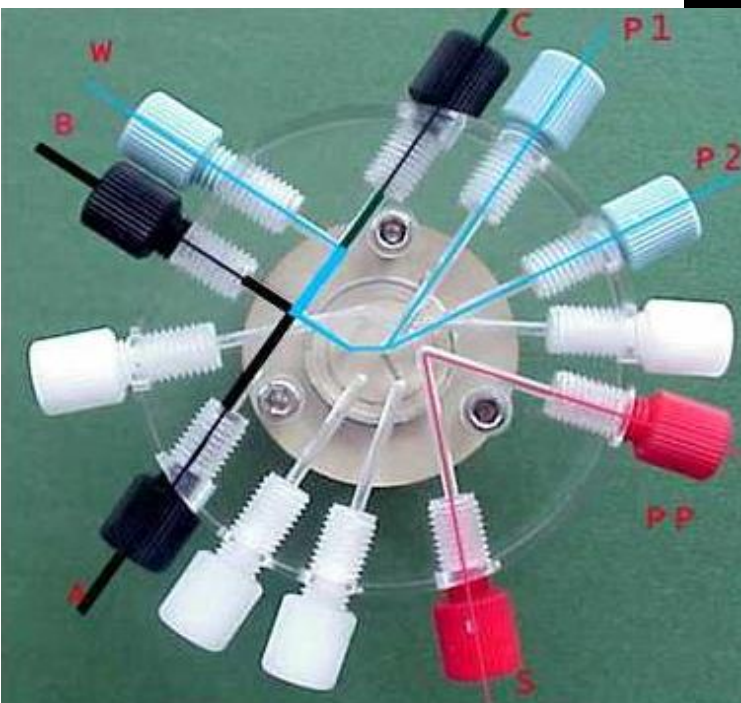
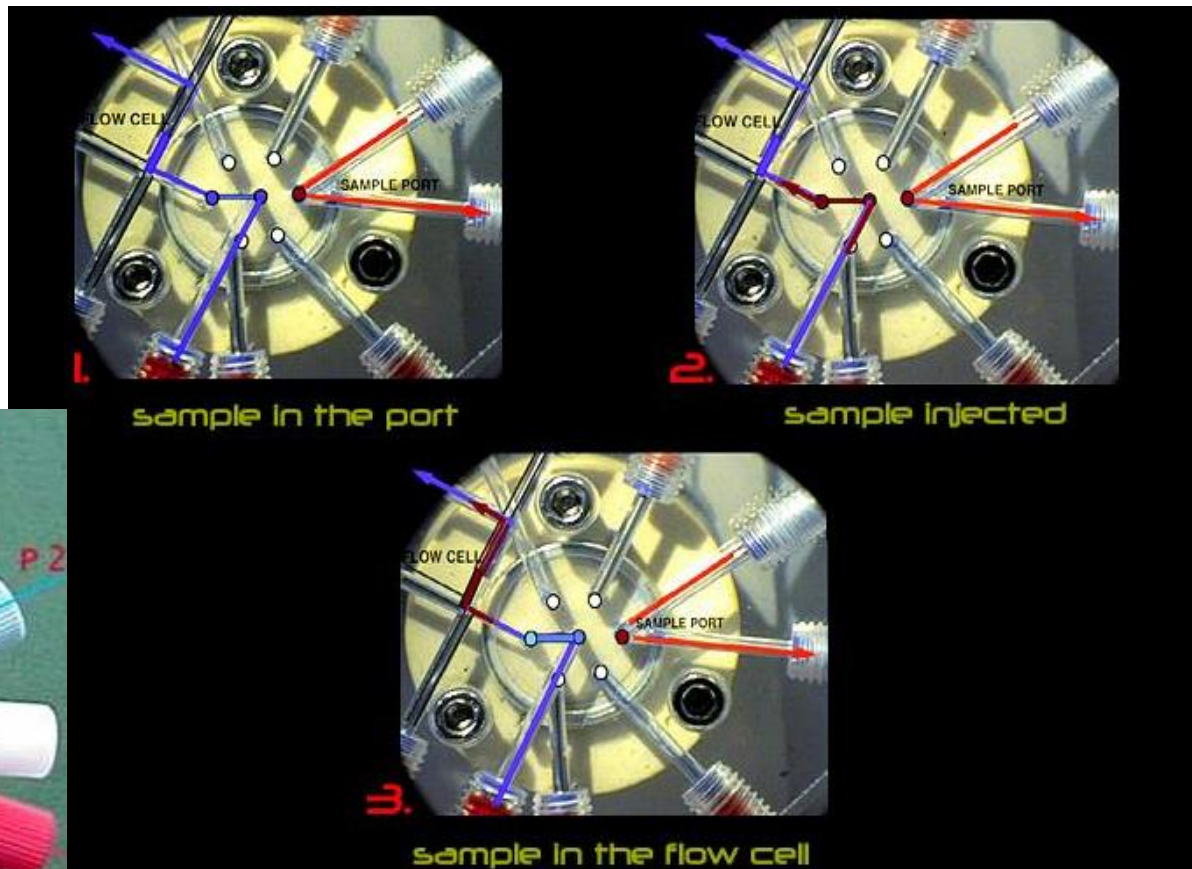


Ανιχνευτές FIA και SIA

- Ηλεκτροχημικοί
 - α) βολταμετρικοί
 - β) ποτενσιομετρικοί
 - γ) πεχαμετρικοί
- Οπτικοί
 - α) μοριακής απορρόφησης
 - β) χημειοφωταύγειας
 - γ) μοριακής εκπομπής-φθορισμού
 - δ) ατομικής εκπομπής
 - ε) ατομικής απορρόφησης
- Άλλοι
 - α) φασματομετρίας υπερύθρου
 - β) φασματομετρίας Raman
 - γ) φασματομετρίας μάζας

Η 4η γενιά των αυτομάτων συστημάτων (Lab-on-a-valve)

Συνδυασμός δειγματοληψίας και ανίχνευσης σε ολοκληρωμένο μικροκατασκευασμένο σύστημα



Τυπικά συστήματα FIA και SIA

- FIA



- SIA



Εφαρμογές FIA και SIA

- Περιβάλλον
- Κλινική ανάλυση
- Βιοανάλυση
- Βιοτεχνολογία
- Ανοσολογική ανάλυση
- Φαρμακευτική ανάλυση
- Τρόφιμα
- Βιομηχανική ανάλυση

<i>Assay</i>	<i>Typical Throughput</i>	<i>Concentration Range</i>	<i>Notes</i>
Nitrate (Mid to High)	180 samples/hour	0.03 to 200 mg (N)/L	Nitrites react with sulfanilamide to form azo dyes that will then couple with N- (1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride to form magenta colored solution. A copperized cadmium column converts nitrate to nitrite. Dynamic Range extended using selected choices of wavelengths.
Nitrite (Mid to High)	220 samples/hour	0.005 to 100 mg (N)/L	
Nitrate (Low)	60 samples/hour	0.003 to .9 mg (N)/L	Identical chemistry as above, however utilizes a 10 cm long optical path flow cell.
Nitrite (Low)	80 samples/hour	0.0005 to .18 mg (N)/L	
Ammonia (Mid to High)	120 samples/hour	0.5 to 200 mg (N)/L NH ₃	Ammonia in water can be determined using the standard Salicylate method. This method requires a heated reaction coil.
Ammonia (Low)	80 samples/hour	0.05 to 10 mg (N)/L NH ₃	Identical chemistry as above, however utilizes a 10 cm long optical path flow cell.
Ammonia (Ultra Low)	30 samples/hour	0.001 to 0.5 mg (N)/L NH ₃	Fluorometric ammonium (OPA) analysis. Required hardware includes PMT-FL and either the FIAlab-2500 or FIAlab-2700. Also requires a flowthrough heater.
Phosphate (Mid to High) <i>Method compatible with Bray and Olsen Bicarb soil extraction samples. Similar method is compatible with total phosphate assays.</i>	120 samples/hour	0.1 to 25 mg (Phosphate)	Orthophosphates react directly with molybdate anions to form a yellow-colored phosphomolybdate complex. This complex is then reduced by ascorbic acid to create a molybdenum blue species that has a broad absorbance range from 700nm to 900nm.
Phosphate (Low)	60 samples/hour	0.01 to 2.5 mg (Phosphorous)	Identical chemistry as above, however requires heated reaction coil and a 10+ cm flowcell.
Chloride	120 samples/hour	1 to 50 mg Cl-/L	The chloride assay is based on the liberation of the thiocyanate ion (SCN) from mercuric thiocyanate, through sequestration of mercury by the chloride ion, to form un-ionized, but soluble mercuric chloride. The liberated SCN then reacts with the ferric ion to form highly colored ferric thiocyanate.
Chloride	60 samples/hour	0.1 to 5 mg Cl-/L	Identical chemistry as above, however utilizes a 10 cm long optical path length flowcell.
Iron	140 samples/hour	0.1 to 100 ppm	1,10-phenanthroline chelation chemistry to Fe ²⁺ . This Fe-complex has an absorbance maximum around 510nm.

Βιβλιογραφία

Μονογραφίες (στα αγγλικά)

W. Frenzel, Flow Injection Analysis. Principles, Techniques and Applications. Technical Univ. Berlin Berlin, Germany, 1993.

B. Karlberg and G. E. Pacey, Flow Injection Analysis. A Practical Guide. Elsevier Sci. Publ. Co. Inc., The Netherlands, 1989 (ISBN 0-444-88014-3).

M. Valcarcel and M. D. Luque de Castro, Flow-Injection Analysis. Principles and Applications. (Translation of Ref. 665. Translated by A. Losada). Ellis Horwood Ltd., England, (1987). (ISBN 0-85312-904-5).

Z. L. Fang, Flow-Injection Separation and Preconcentration. Publ.: VCH Verlags- gesellschaft mbh, Weinheim, Germany, 1993.

Ruzicka and E. H. Hansen, Flow Injection Analysis. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA, 1988 (ISBN 0-471-81355-9)."

J. Ruzicka and E. H. Hansen, Flow Injection Analysis. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, (1981). (ISBN 0 471-08192-2).

Μονογραφία (στα ελληνικά)

Δ.Γ. Θεμελή, Αυτόματες Μέθοδοι Χημικής Ανάλυσης, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, 1998

Ιστοσελίδα

www.flowinjection.com