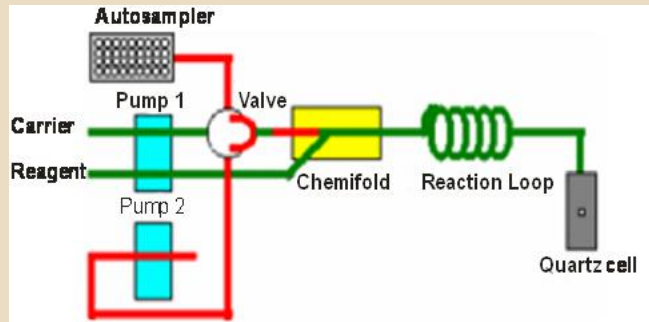


# Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

Αυτοματοποιημένες Μέθοδοι  
Ανάλυσης

Δρ. Μάριος Κωστάκης -

Καθ. Α. Οικονόμου



1

## Κλασική ανάλυση vs αυτόματη ανάλυση

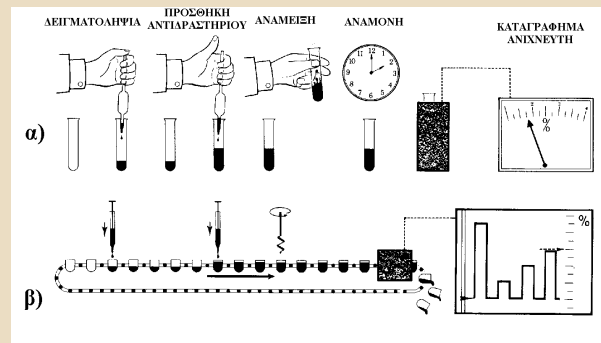
Κλασική Ανάλυση



Ασυνεχής αυτόματη ανάλυση



Ανάλυση συνεχούς ροής



2

## Τα πλεονεκτήματα των αυτόματων μεθόδων ανάλυσης

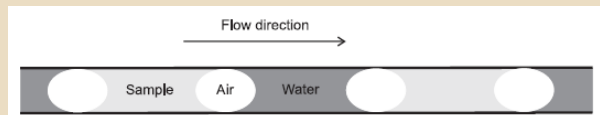
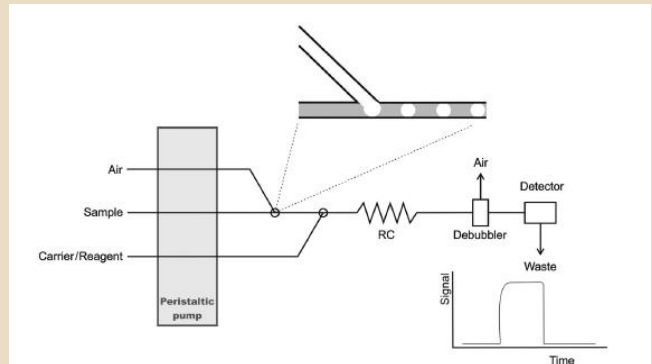
- Αυτοματισμός
- Ταχύτητα
- Κόστος
- Μείωση κατανάλωσης αντιδραστηρίων
- Βελτίωση ακρίβειας και επαναληψιμότητας
- Ελαχιστοποίηση επιμολύνσεων

3

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

#### Μειονεκτήματα

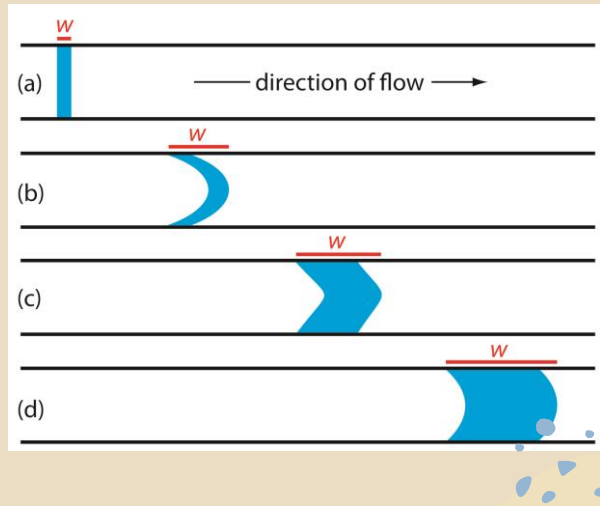
- πιθανότητα επιμόλυνσης διαδοχικών δειγμάτων
- πολυπλοκότητα του απαερωτή



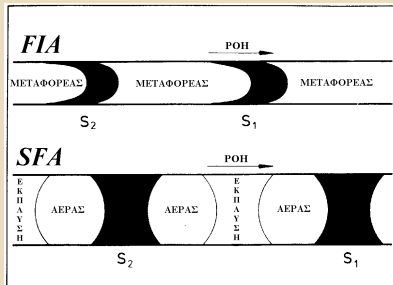
4

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

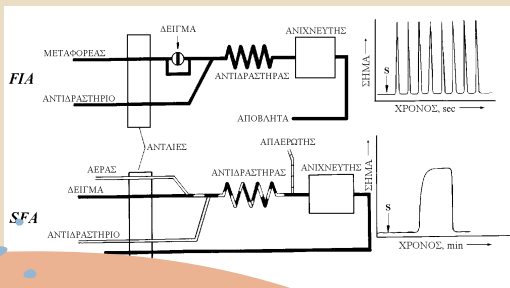
- Η ανάλυση με έγχυση του δείγματος σε συνεχή ροή (flow injection analysis, FIA) βασίζεται στην έγχυση ενός υγρού δείγματος μέσα σε κινούμενο ρεύμα υγρού μεταφορέα (carrier).
- Η ζώνη του δείγματος μεταφέρεται από το ρεύμα του μεταφορέα σε ένα ανιχνευτή που καταγράφει τη μεταβολή κάποιας φυσικής ή χημικής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



5



### Αλλαγές στην FIA σε σχέση με τη SFA



Κατάργηση ρεύματος αέρα και απαερωτή

Εισαγωγή δείγματος με βαλβίδα έγχυσης σε ρεύμα μεταφορέα

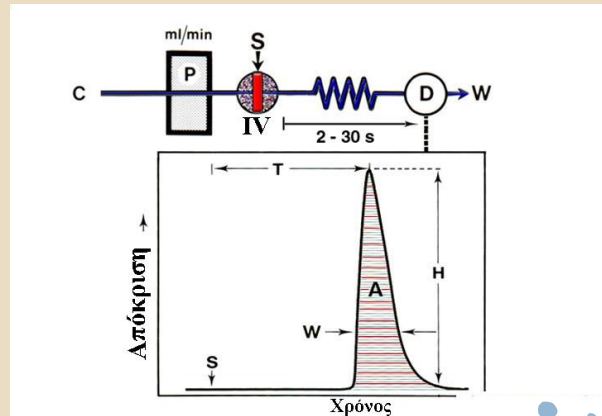
6

## 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.

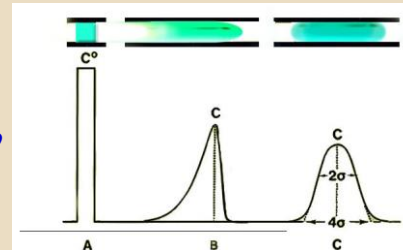
Το Ύψος της **κορυφής (H)** είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλυτή στο δείγμα



7

## Τι είναι η διασπορά (dispersion)?

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



### Συντελεστής διασποράς (Dispersion coefficient)

$$D = C_0 / C$$

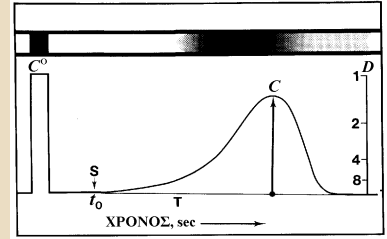
Χαμηλός ( $D=1-2$ )

Μέσος ( $D=2-10$ )

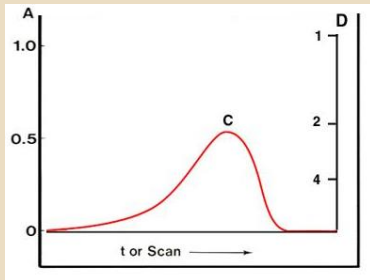
Υψηλός ( $D=10-10000$ )

8

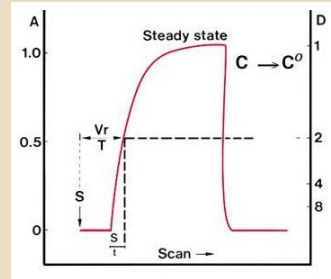
## Περισσότερα για τη διασπορά



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



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

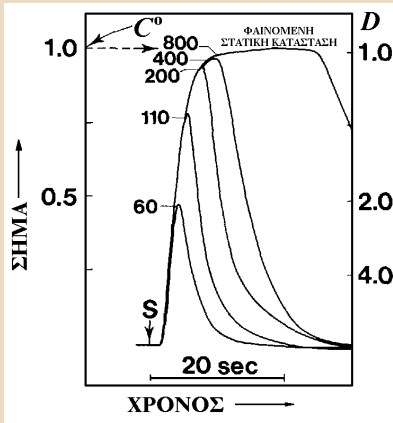


9

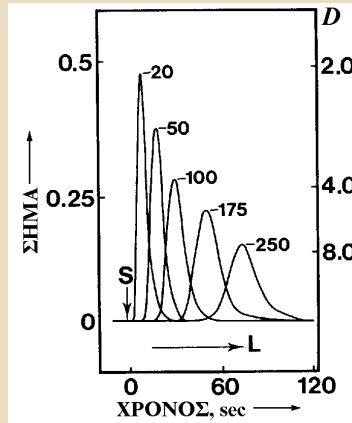
## Περισσότερα για τη διασπορά

Η διασπορά εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές:

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



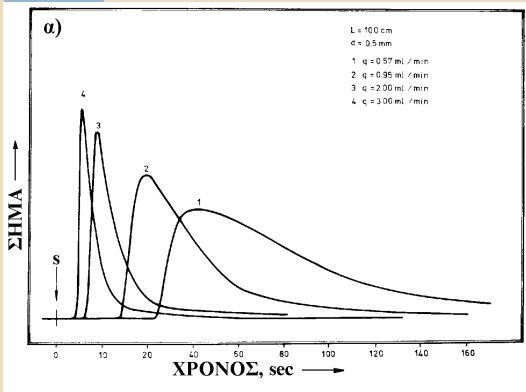
Διασπορά με διαφορετικούς όγκους δείγματος (60-800 μl)



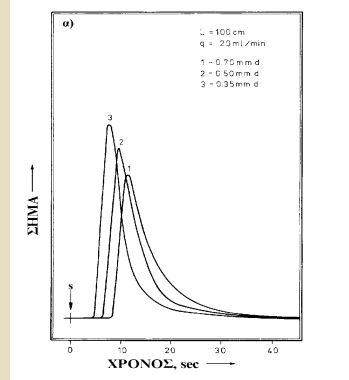
Διασπορά με διαφορετικά μήκη σπειράματος (20-250 cm)

10

## Περισσότερα για τη διασπορά

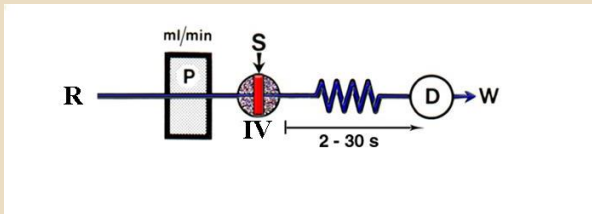


Διασπορά με διαφορετικούς ταχύτητες ροής (0.57-3 ml min<sup>-1</sup>)



Διασπορά με διαφορετικής διαμέτρου σπείραμα (0.7-0.35 mm i.d.)

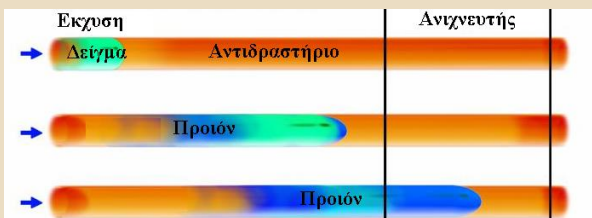
11



## 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 αναλυτή και μεταφορέα-αντιδραστήριου (που προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος της αντίδρασης καθώς το δείγμα κινείται προς τον ανιχνευτή).

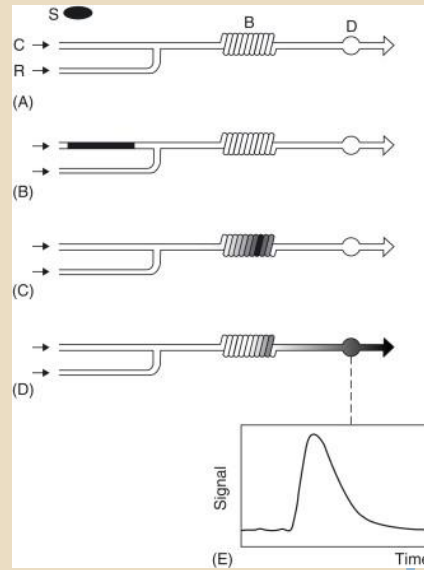


12

## Πολυκάναλα συστήματα FIA

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

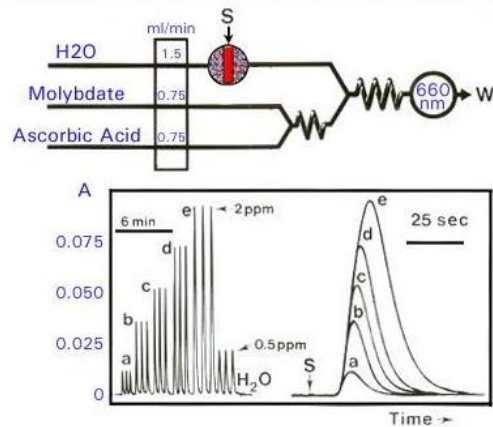
Όταν απαιτείται η χρήση πολλαπλών αντιδραστηρίων προτιμάται η χρήση πολυκάναλων συστημάτων με σημεία ανάμιξης (confluence points)



13

## 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»

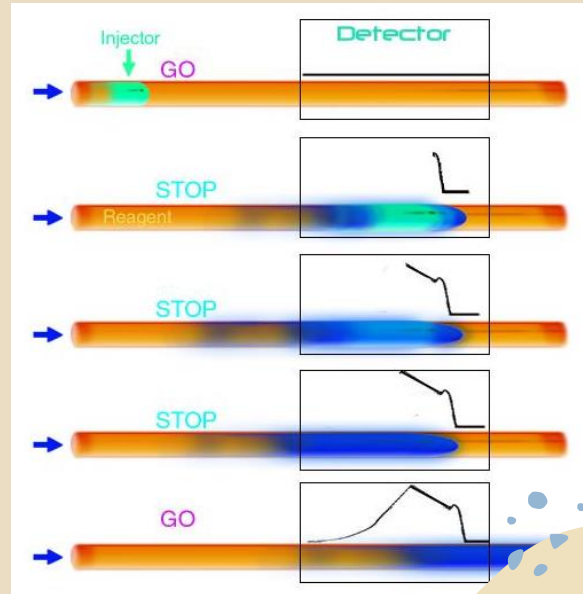


14

## *FIA αναχαιτιζόμενης 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-αντιδραστήριου με το δείγμα.



15

## *Βελτιστοποίηση των παραμέτρων στη FIA*

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

16



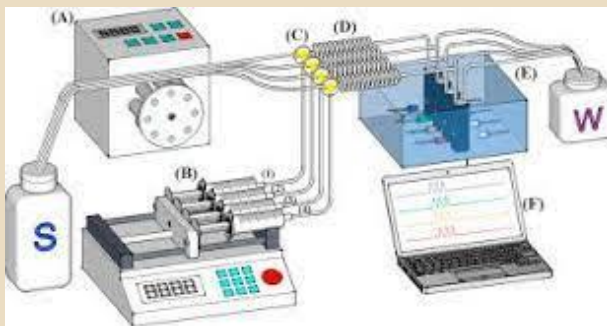
## *Τα πλεονεκτήματα της FIA*

- 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

17

## *Αυτοματοποίηση στη FIA*

Σύστημα FIA ελεγχόμενο από υπολογιστή



18

## *FIA και μικροκατασκευασμένα συστήματα (microfluidics)*

Προσδιορισμός σακχάρων με χρήση ενζυμικής αντίδρασης και ανιχνευτή χημειοφωταύγειας

19

## *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

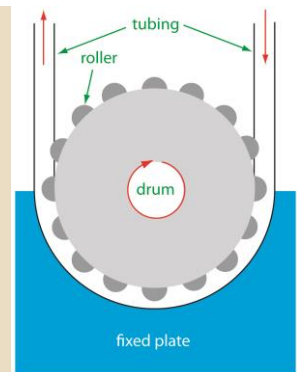
### **Αντλίες σύριγγας**

#### **Πλεονεκτήματα:**

Συνεχής ροή χωρίς παλμούς  
Σταθερή ροή

#### **Μειονεκτήματα:**

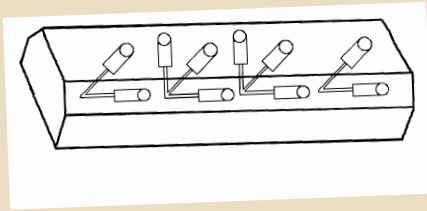
Χρειάζονται συχνή πλήρωση



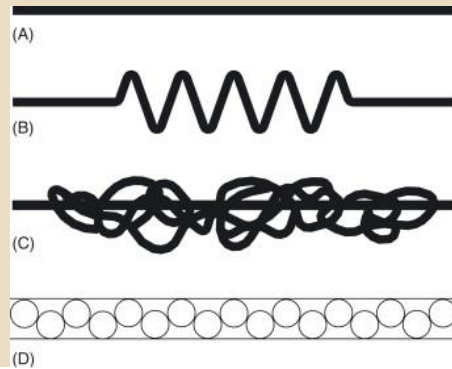
20

## Μίκτες και σπειράματα αντίδρασης στη FIA

Στα πολυκαναλικά συστήματα  
χρειάζονται διατάξεις ανάμιξης



Το σπείραμα αντίδρασης μπορεί να έχει  
διάφορες μορφές



21

## Ανιχνευτές FIA

### Ηλεκτροχημικοί

Βολταμμετρικοί  
Ποτενσιομετρικοί  
Πεχαμετρικοί

### Άλλοι

Φασματομετρίας υπερύθρου  
Φασματομετρίας Raman  
Φασματομετρία Μαζών

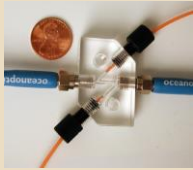
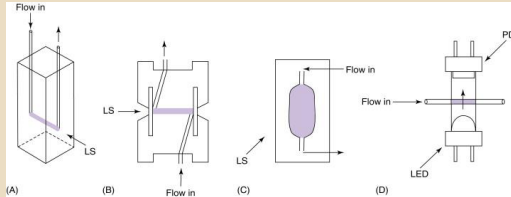
### Οπτικοί

Μοριακής απορρόφησης  
Χημειοφωταύγειας  
Μοριακής εκπομπής-φθορισμοί  
Ατομικής εκπομπής  
Ατομική απορρόφησης

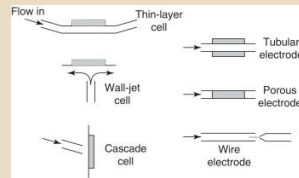
22

# Ανιχνευτές στη FIA

## Φωτομετρικοί



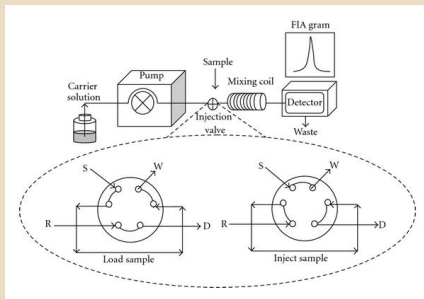
## Ηλεκτροχημικοί



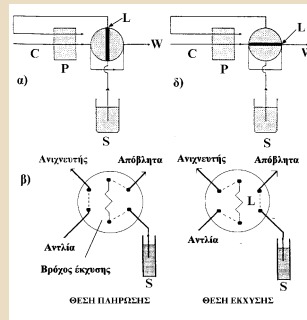
23

# Βαλβίδες δειγματοληψίας στη FIA

## Πολλαπλών Θέσεων



## Απλές vs πολλαπλών θέσεων



24

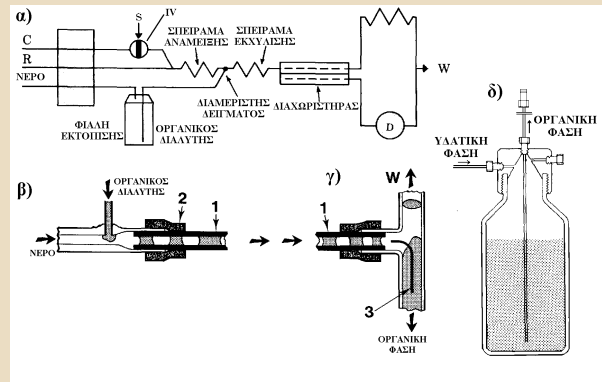
## Εκχύλιση υγρό-υγρό με FIA

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

Πλεονεκτήματα:

Μικρή κατανάλωση οργανικού διαλύτη

Μεγάλη προσυγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού

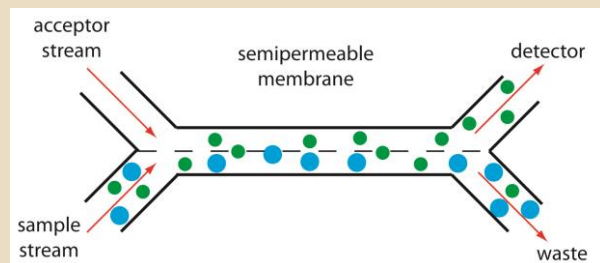


25

## 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  $\text{CO}_3^{2-}$



26

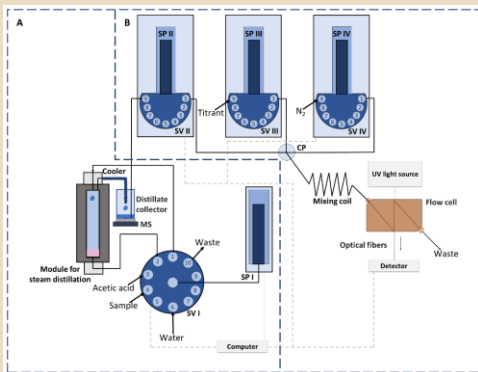
## Πληρωμένοι αντιδραστήρες στη FIA

Ως πληρωμένοι αντιδραστήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

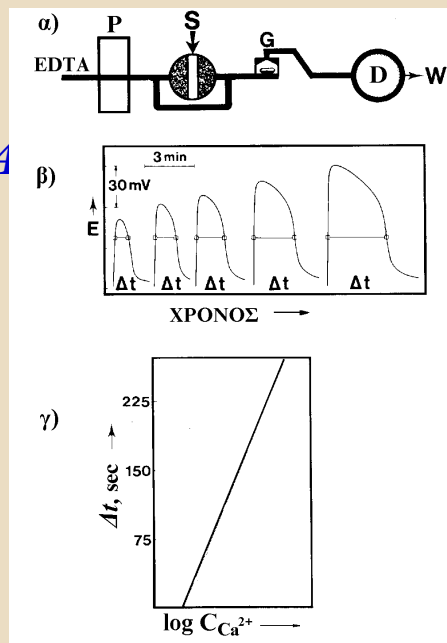
1. Στήλες ιονανταλλαγής (για την προσυγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού, την απομάκρυνση των ουσιών που παρεμποδίζουν ή τη μετατροπή του προσδιοριζόμενου συστατικού σε μετρήσιμο προϊόν).
2. Στήλες ενζύμων με ακινητοποιημένα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την εκλεκτική αποικοδόμηση υποστρωμάτων 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

27

## Ογκομετρήσεις με FIA



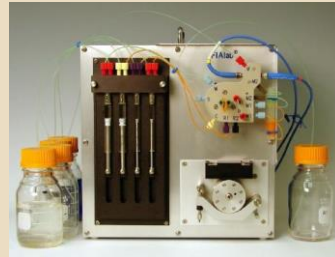
Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας σε κρασί



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

28

## *Τυπικά συστήματα FLA*



29

## *Πεδία Εφαρμογής FLA*

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

30