

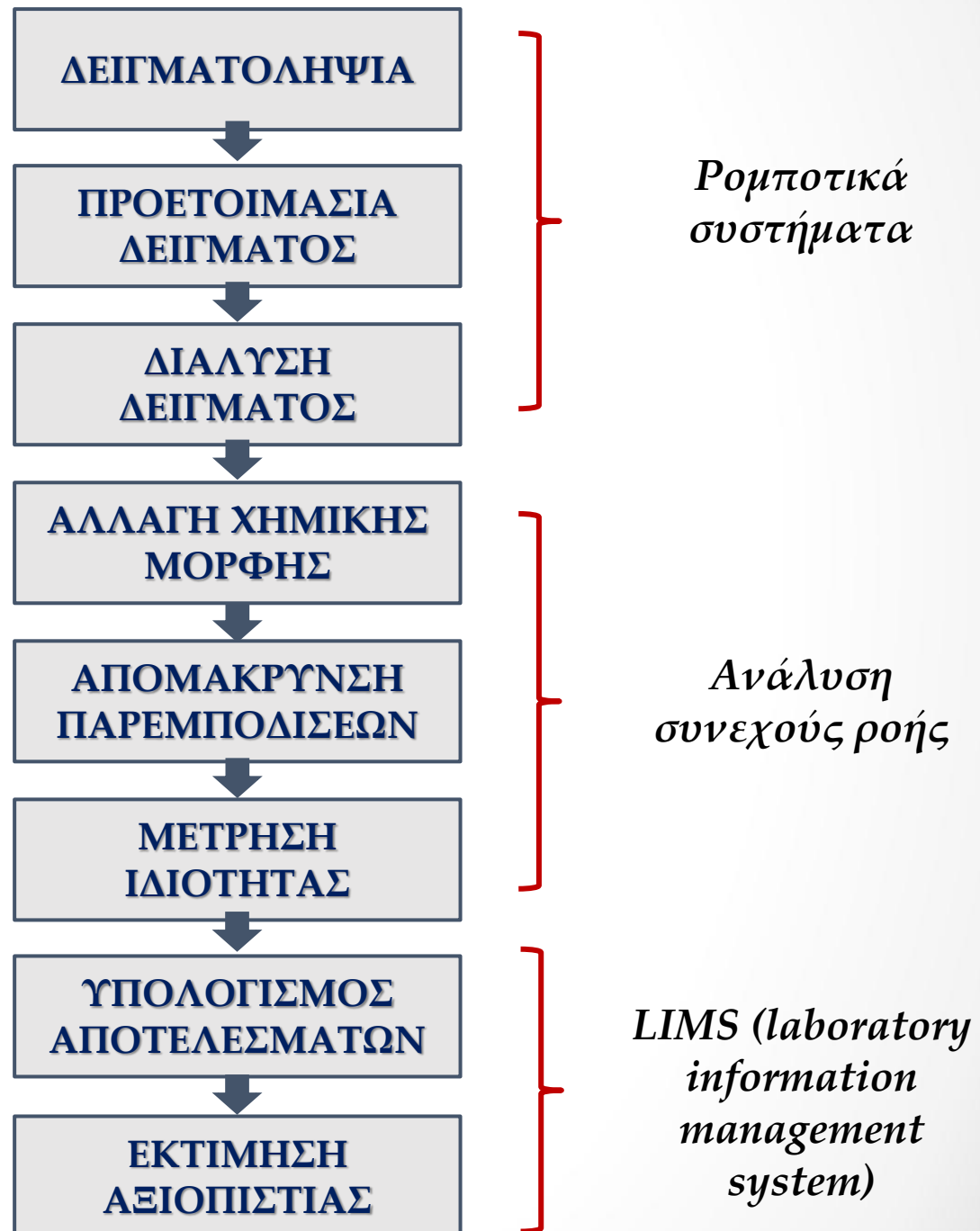
Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

Διάλεξη 8

-ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αλίκη Ντζιφά, PhD
2024

ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΥΤΟΜΑΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- ✓ Μείωση κόστους εργασίας
- ✓ Σε εργαστήρια αναλύσεων ρουτίνας (π.χ. κλινικά εργαστήρια)-δυνατότητα πολλαπλών αναλύσεων ταυτόχρονα
- ✓ Μείωση χρόνου ανάλυσης
- ✓ Μεγάλος αριθμός αναλύσεων/ημέρα
- ✓ Επαναλήψιμα αποτελέσματα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα
- ✓ Μεγαλύτερη ακρίβεια
- ✓ Υψηλή αναπαραγωγιμότητα της χρονικής αλληλουχίας των διεργασιών
- ✓ Επεξεργασία επικίνδυνων δειγμάτων για τον άνθρωπο
- ✓ Ελαχιστοποίηση υπολογιστικών σφαλμάτων
- ✓ Άμεση καταγραφή αποτελεσμάτων σε βάσεις δεδομένων
- ✓ Ελαχιστοποίηση επιμολύνσεων

➤ **Ο ρόλος του αναλυτικού χημικού;**

ΤΥΠΟΙ ΑΥΤΟΜΑΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

□ Διακριτοί (discrete analyzers)

- Τα δείγματα φυλάσσονται σε ξεχωριστά δοχεία και αναλύονται διαδοχικά περνώντας από κάθε στάδιο ανάλυσης

□ Συνεχούς ροής (continuous-flow analyzers)

- Το δείγμα γίνεται μέρος ενός ρέοντος ρεύματος, περνώντας από τα διάφορα στάδια (π.χ προκατεργασίας) έως ότου μεταφερθεί στο σημείο εισαγωγής του δείγματος → μονάδα μέτρησης → απόβλητα

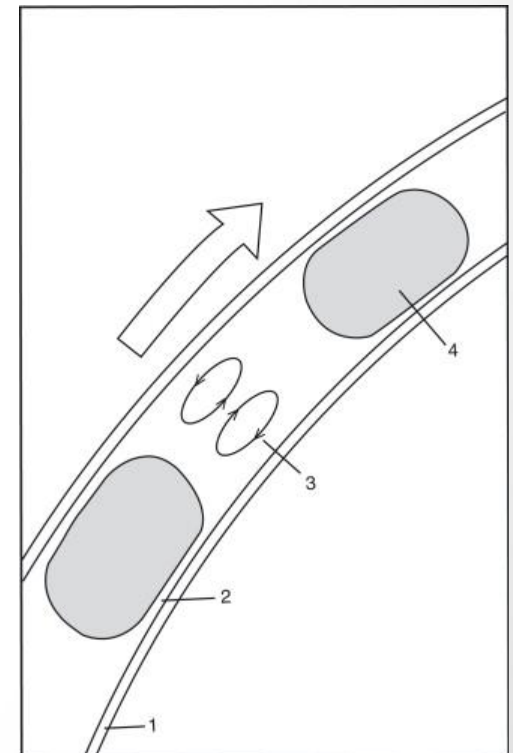
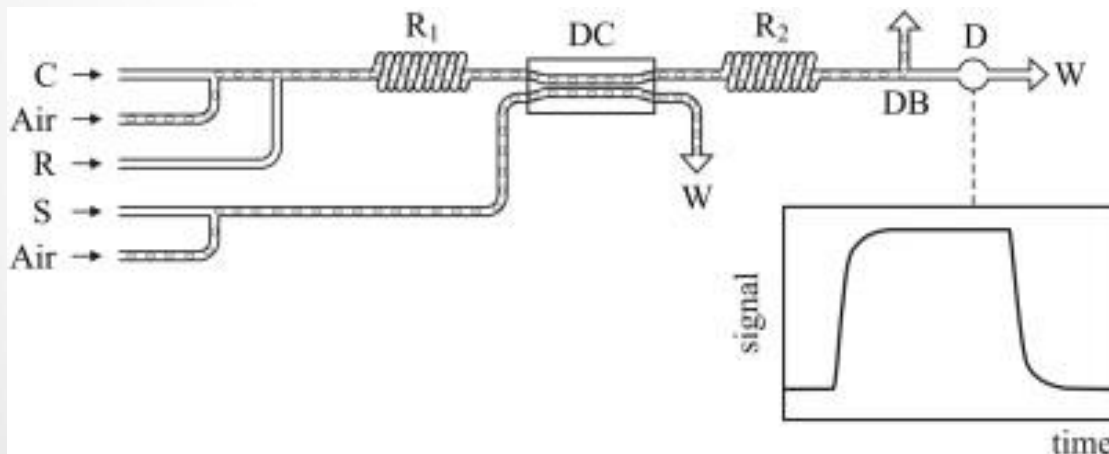


□ Συνδυασμός των παραπάνω

ΤΜΗΜΑΤΙΚΗ ή ΑΕΡΙΟΔΙΑΧΩΡΙΖΟΜΕΝΗ ΡΟΗ

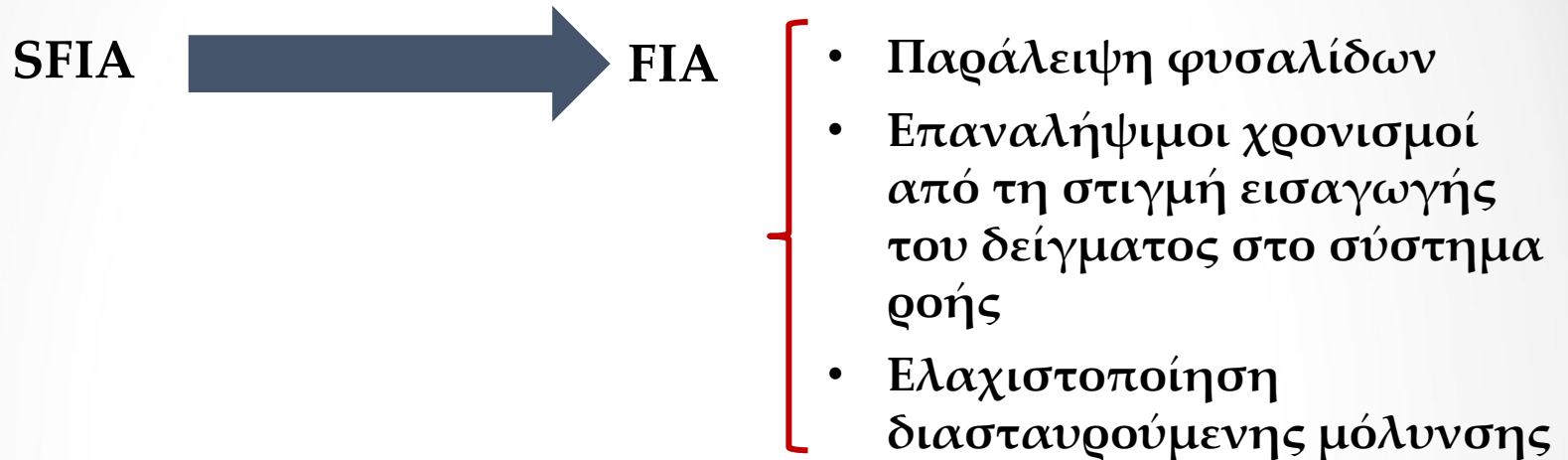
Segmented-flow analysis, SFIA

- Μεταφορά δειγμάτων μέσω του συστήματος προς τον ανιχνευτή με ένα διάλυμα σε ροή
- Σε πολλά τμήματα με παρεμβολή φυσαλίδων αέρα
 - Αποφυγή διασποράς δείγματος
 - Ενίσχυση τυρβώδους ανάμιξης δειγμάτων και αντιδραστηρίων
 - Αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης
- Αποφυσαλιδωτής για αφαίρεση φυσαλίδων



ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΕΓΧΥΣΗ ΣΕ ΡΟΗ

Flow-injection analysis, FIA



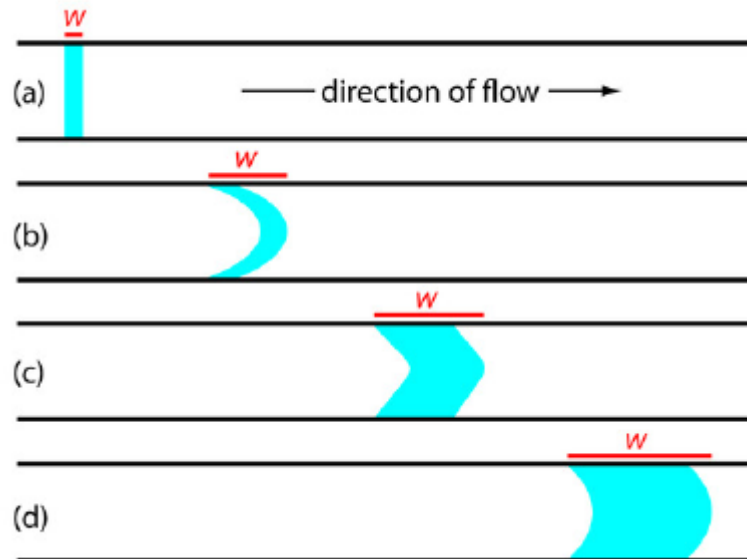
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

1. Υψηλοί ρυθμοί ανάλυσης (100-300 δείγματα/ ώρα)
2. Βελτιωμένοι χρόνοι απόκρισης (<1min)
3. Μικρότεροι χρόνοι έναρξης & κλεισίματος συστήματος
4. Απλούστερη κατασκευή
5. Εφαρμογή και σε περιορισμένο αριθμό δειγμάτων
6. **Ελεγχόμενη διασπορά** → βαθμίδες δείγματος ή αντιδραστηρίων → αναπαραγώγιμη ανάμιξη → ελάχιστη κατανάλωση αντιδραστηρίων

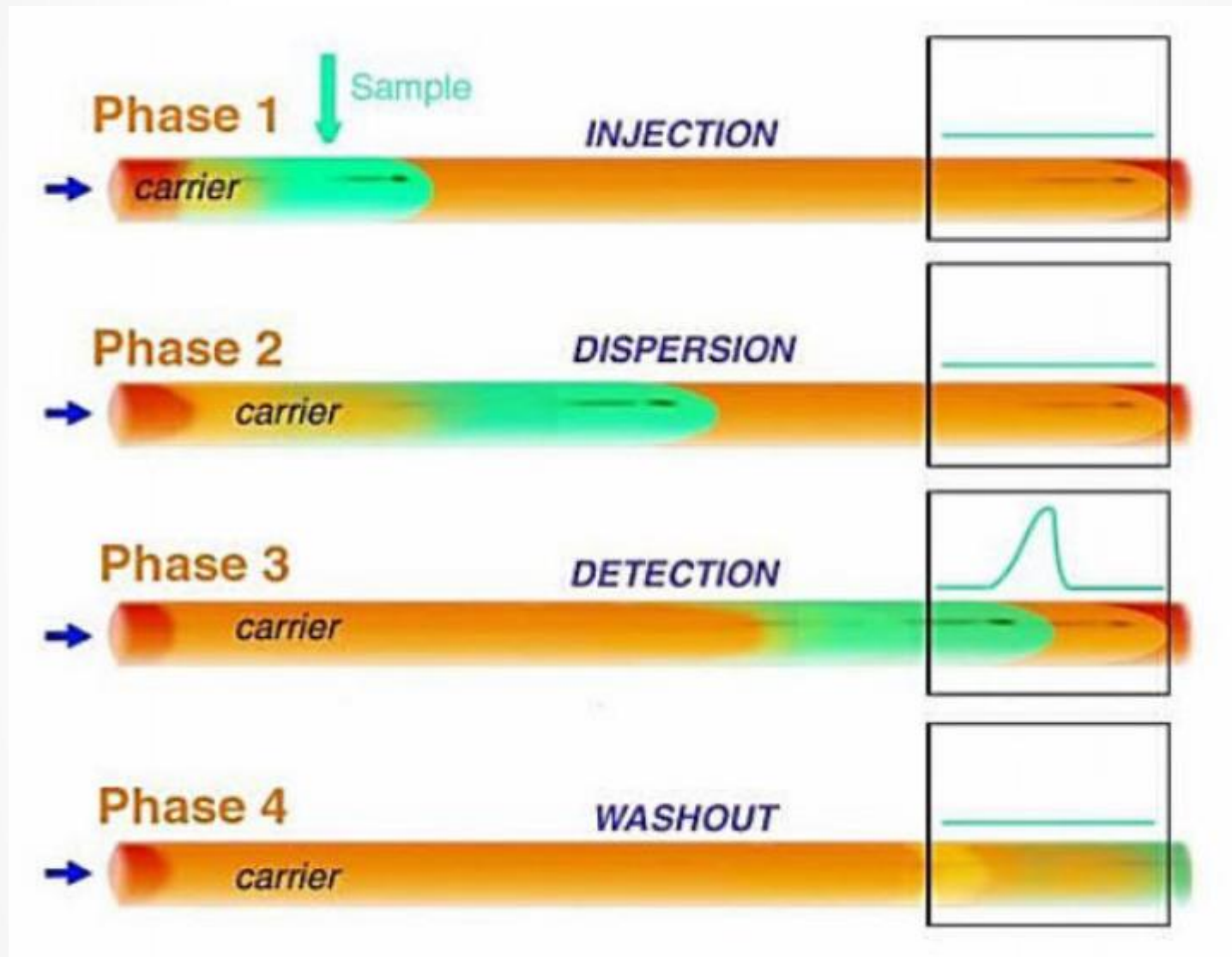
ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΕΓΧΥΣΗ ΣΕ ΡΟΗ

Flow-injection analysis, FIA

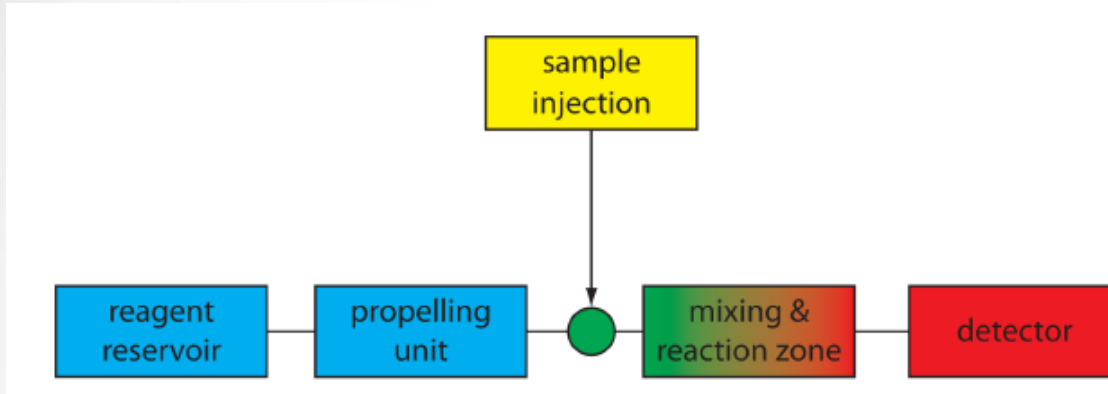
- Η ανάλυση με έγχυση του δείγματος σε συνεχή ροή (flow injection analysis, FIA) βασίζεται στην έκχυση ενός υγρού δείγματος μέσα σε ένα κινούμενο ρεύμα υγρού μεταφορέα (carrier).
- Η ζώνη του δείγματος μεταφέρεται από το ρεύμα του μεταφορέα σε έναν ανιχνευτή που καταγράφει τη μεταβολή κάποιας φυσικής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



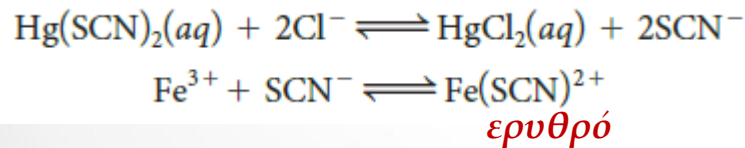
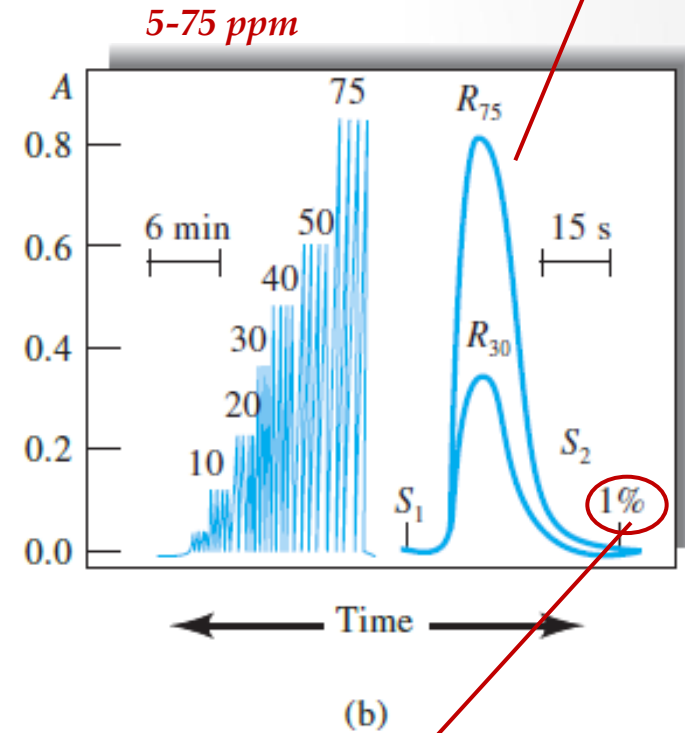
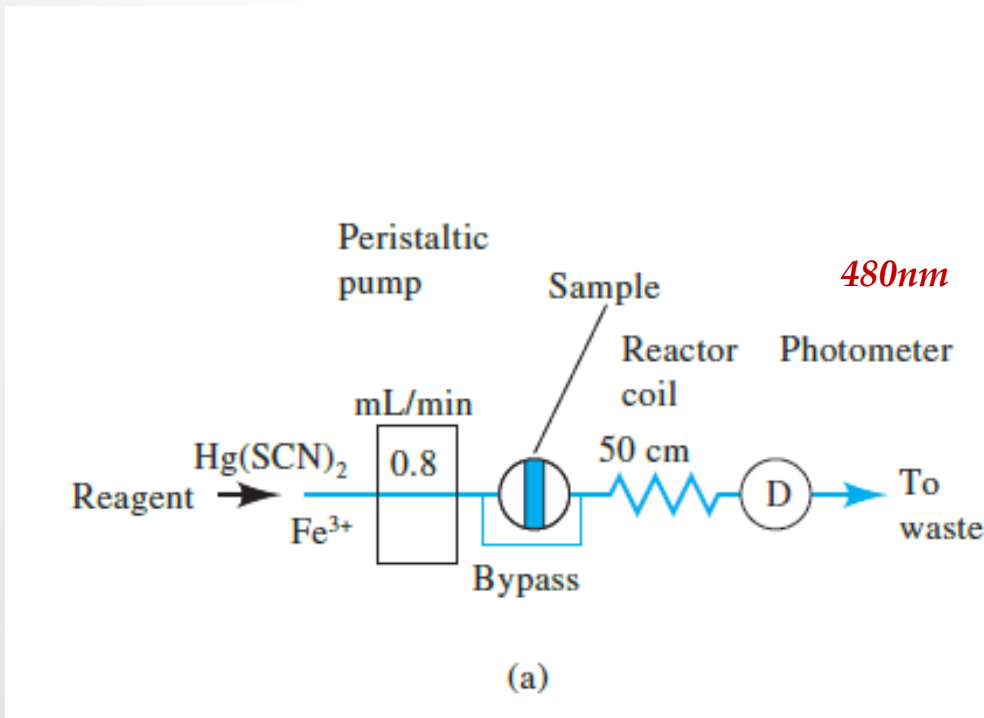
ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΕΓΧΥΣΗ ΣΕ ΡΟΗ Flow-injection analysis, FIA



FIA-Οργανολογία



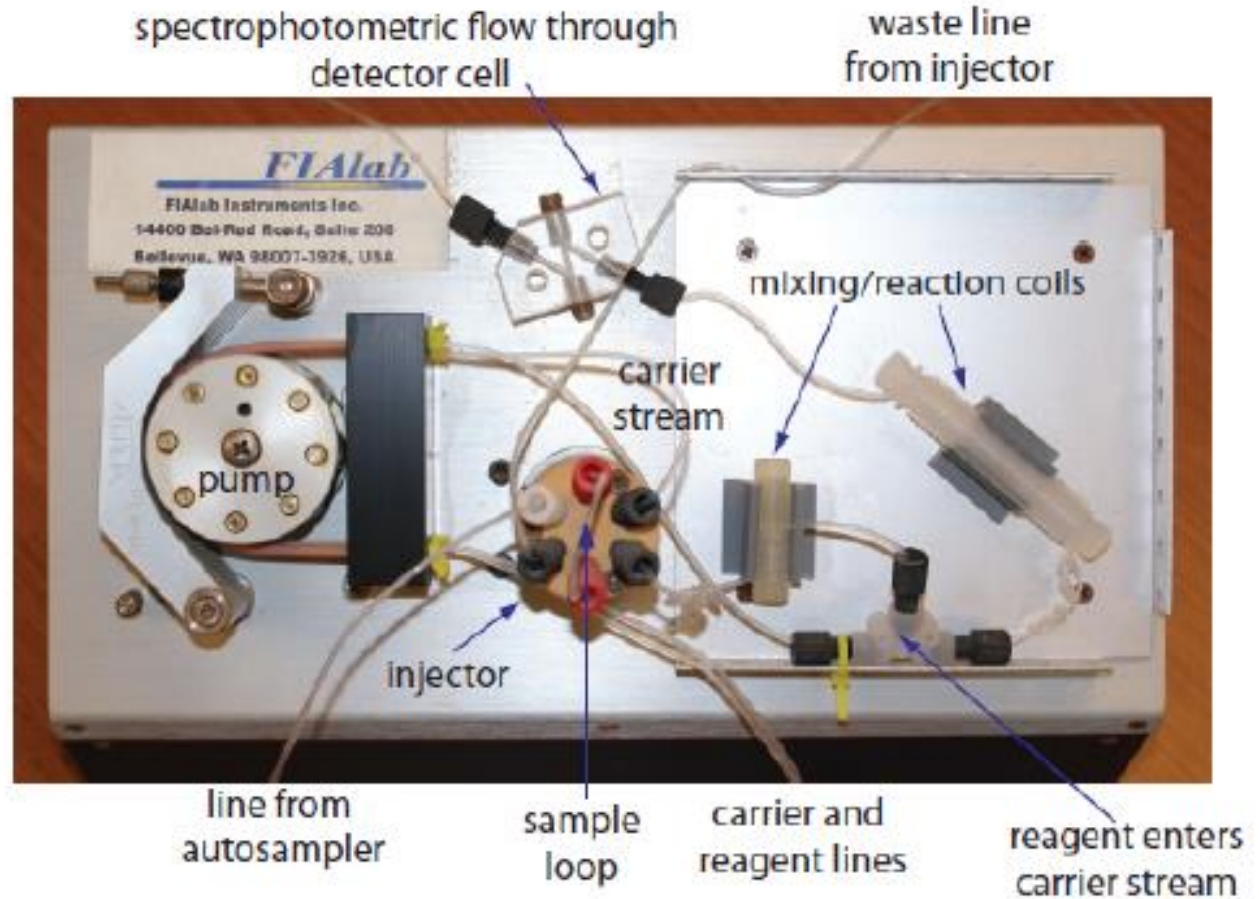
Το ύψος της κορυφής (H) είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα



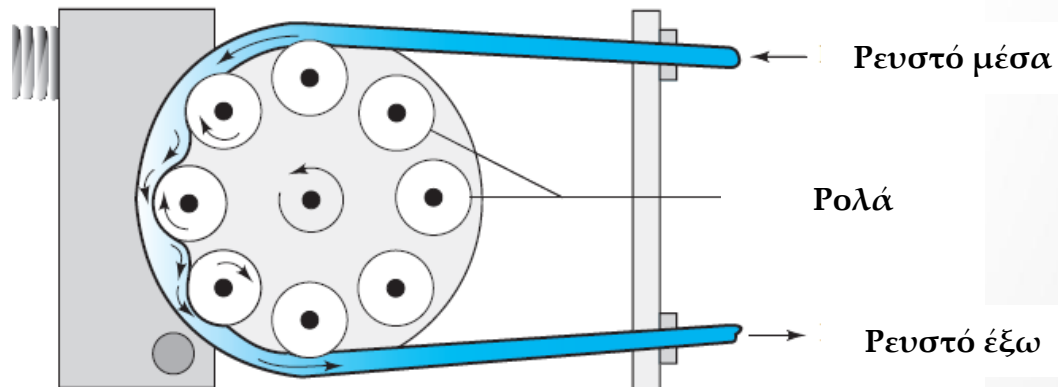
<1% του πρώτου αναλύτη βρίσκεται στην κυψελίδα ροής-τη στιγμή της επόμενης έγχυσης

ΦΙΑ-Οργανολογία

- Σύστημα μεταφοράς δείγματος & αντιδραστηρίων



Ελατήριο πίεσης περιβλήματος



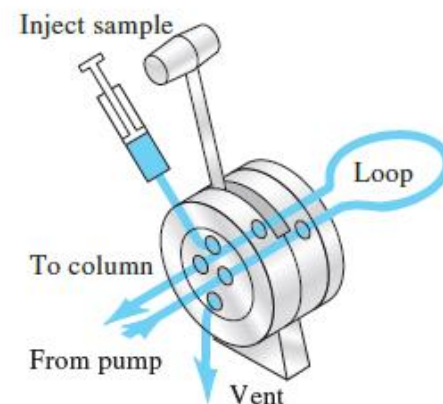
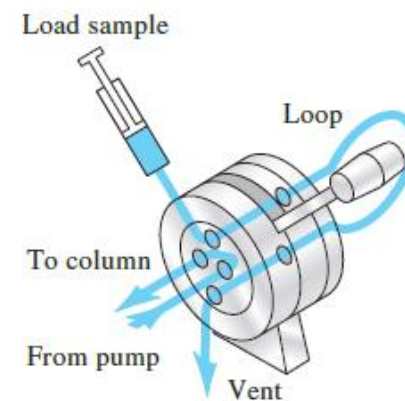
FIA-Οργανολογία

➤ Εγχυτές δειγμάτων

- Ή εισαγωγείς δειγμάτων
- Παρόμοιοι με αυτούς που χρησιμοποιούνται στην HPLC
- Μέγεθος δείγματος 1-200μL
- Το διάλυμα να εγχέεται ταχύτατα ώστε να δημιουργεί παλμό στο φέρον ρεύμα
- Βρόχοι δειγματοληψίας (sampling loops)

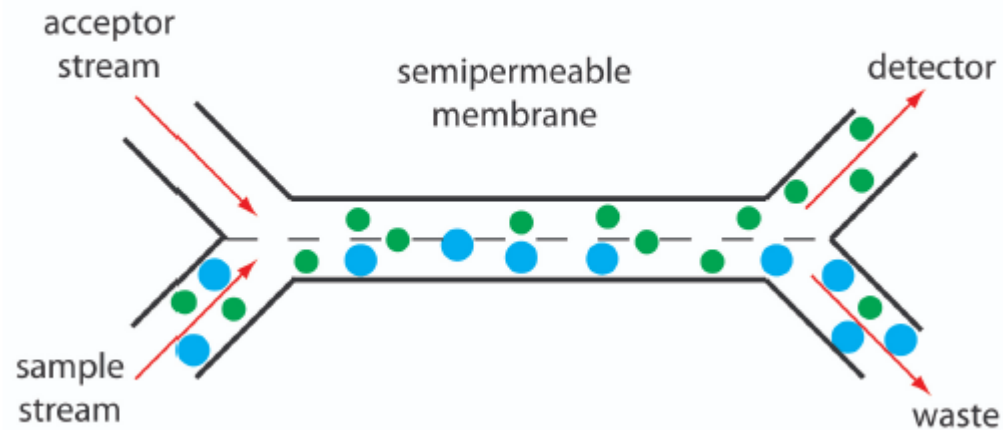
➤ Ανιχνευτές FIA

- Φασματοφωτόμετρα
- Φωτόμετρα
- Φθορισμόμετρα
- Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές
- Χημειοφωταύγειας
- Ατομικής εκπομπής & απορρόφησης



Διαχωρισμοί με FIA

- Διαπίδυση & διάχυση αερίου



□ Διαπίδυση

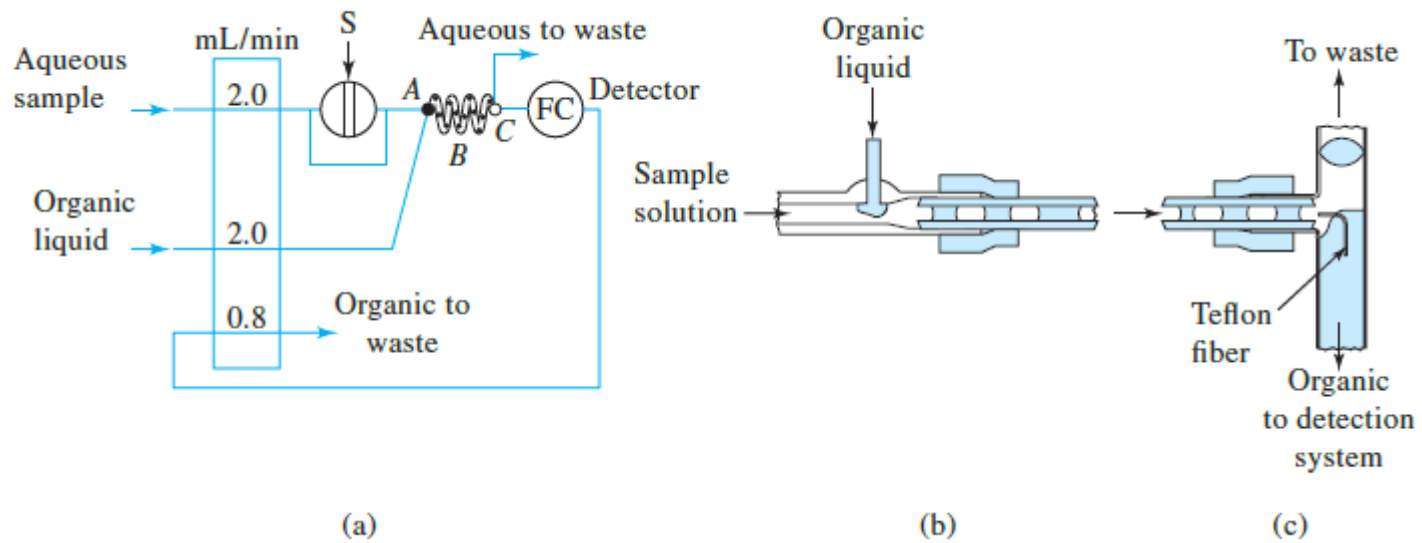
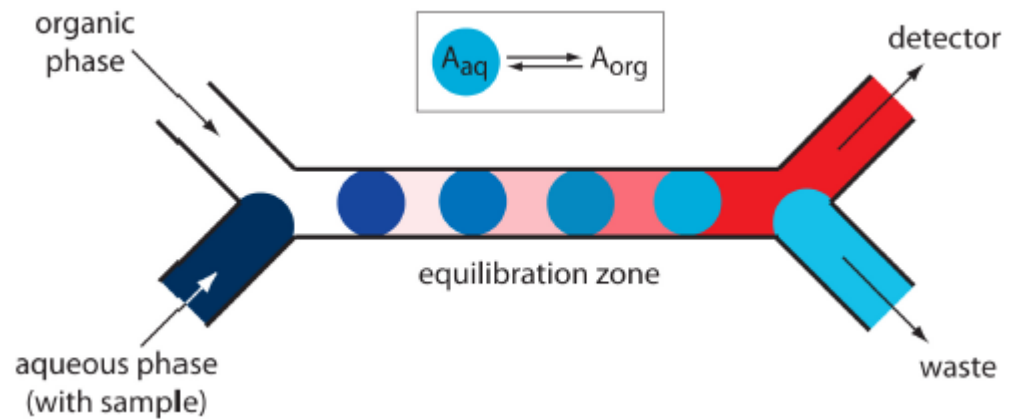
- Μικρά ιόντα ή μόρια διαχέονται από το διάλυμα του δείγματος
- Υδρόφιλες μεμβράνες οξικής ή νιτρικής κυτταρίνης
- Το διάλυμα με το αντιδραστήριο → έγχρωμη ουσία με τον αναλύτη
- Μέτρηση στο φωτόμετρο
- Μεγάλα μόρια παραμένουν στο αρχικό ρεύμα και οδηγούνται στα απόβλητα

□ Διάχυση αερίου

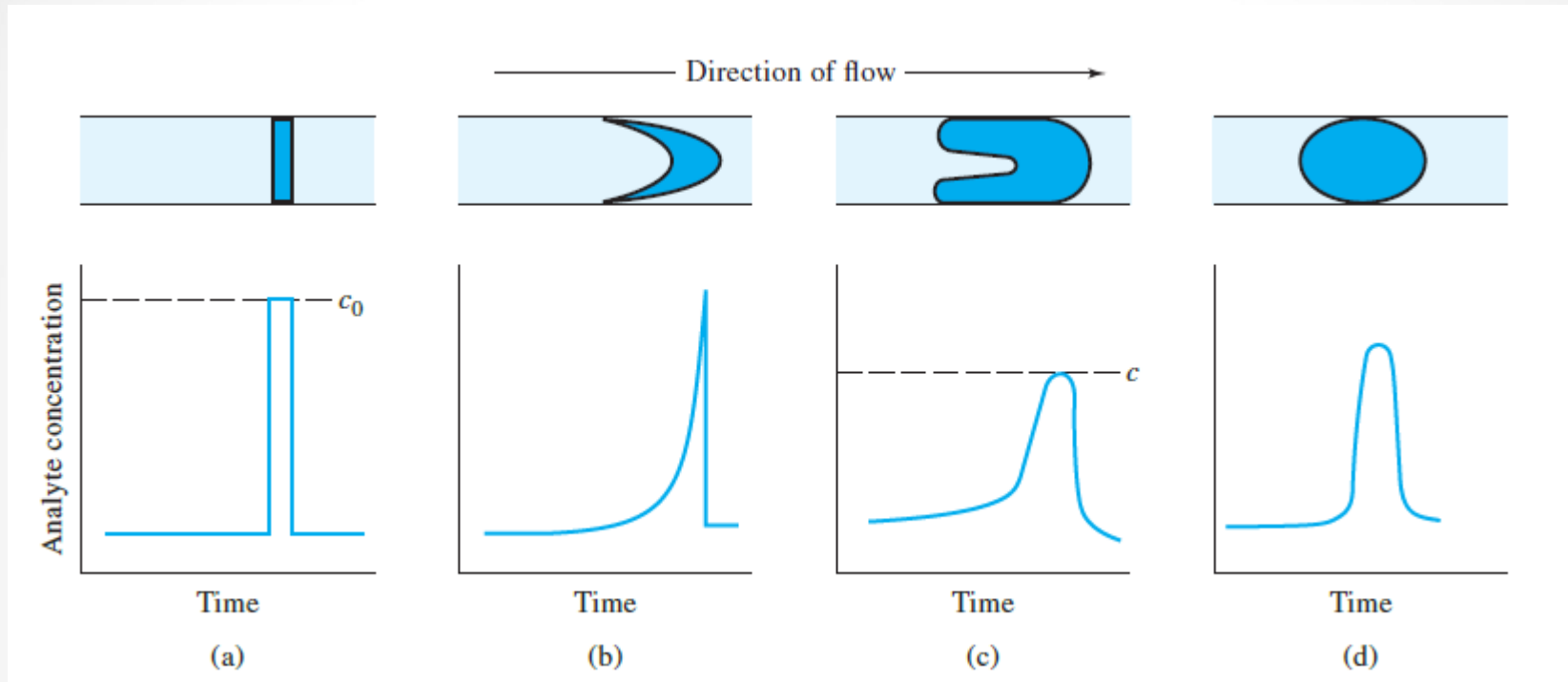
- Από ένα ρεύμα-δότη που περιέχει τον **αέριο αναλύτη** προς ένα ρεύμα-δέκτη που περιέχει το αντιδραστήριο
- Μεμβράνη από υδρόφοβο μικροπορώδες υλικό, π.χ. Teflon ή ισοτακτικό προπυλένιο
- Παράδειγμα: προσδιορισμός ολικών ανθρακικών σε υδατικά διαλύματα → φέρον ρεύμα αραιού θεικού οξέος → Ελεύθερο CO₂ στο ρεύμα λήπτη με πρωτολυτικό δείκτη

Διαχωρισμοί με FIA

- Εκχύλιση με διαλύτη



Αρχές της FIA



Καμία
διασπορά

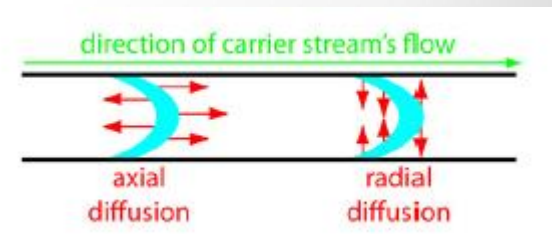
Διασπορά λόγω
εξαναγκασμένης
μεταφοράς

Διασπορά λόγω
εξαναγκασμένης
μεταφοράς &
ακτινωτής διάχυσης

Διασπορά
λόγω
διάχυσης

➤ Διεύρυνση ή
διασπορά

1. Εξαναγκασμένη μεταφορά ή μεταγωγή
2. Διάχυση
 - Ακτινωτή ή κάθετη προς τη ροή
 - Διαμήκη/παράλληλη προς τη ροή



Διασπορά στη FIA

- Διασπορά είναι η αραίωση του δείγματος που προκαλείται κατά την κίνηση του προς τον ανιχνευτή

$$D = c_0/c$$

c_0 : συγκέντρωση αναλύτη στο εγχεόμενο δείγμα

c : συγκέντρωση κορυφής στον ανιχνευτή

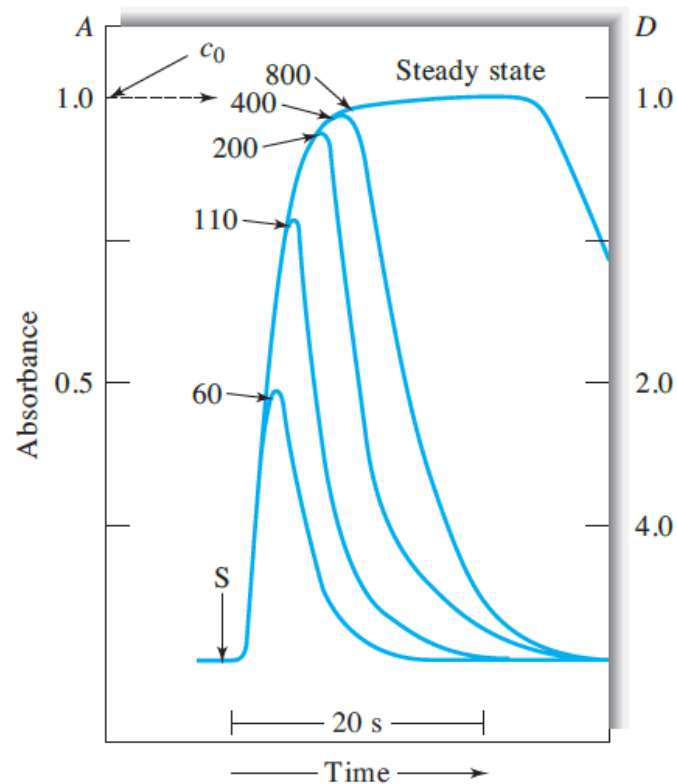
D : *dispersion*

➤ N.Beer

Επηρεάζεται από:

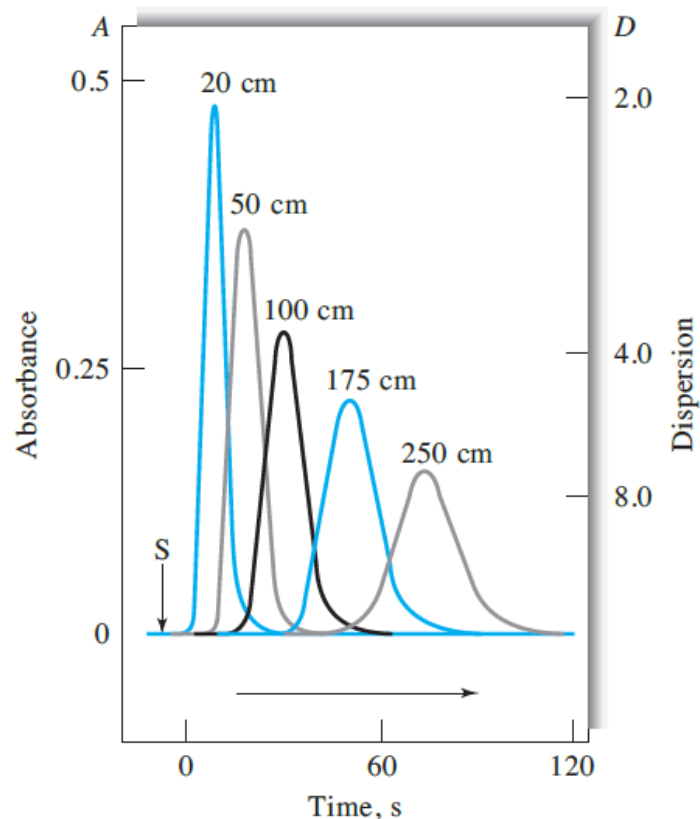
1. Όγκο δείγματος
2. Μήκος σωλήνα
3. Ταχύτητα ροής

Διασπορά στη FIA



(a)

- Επίδραση του όγκου δείγματος



(b)

- Επίδραση του μήκους σωλήνα

Διάγραμμα FIA

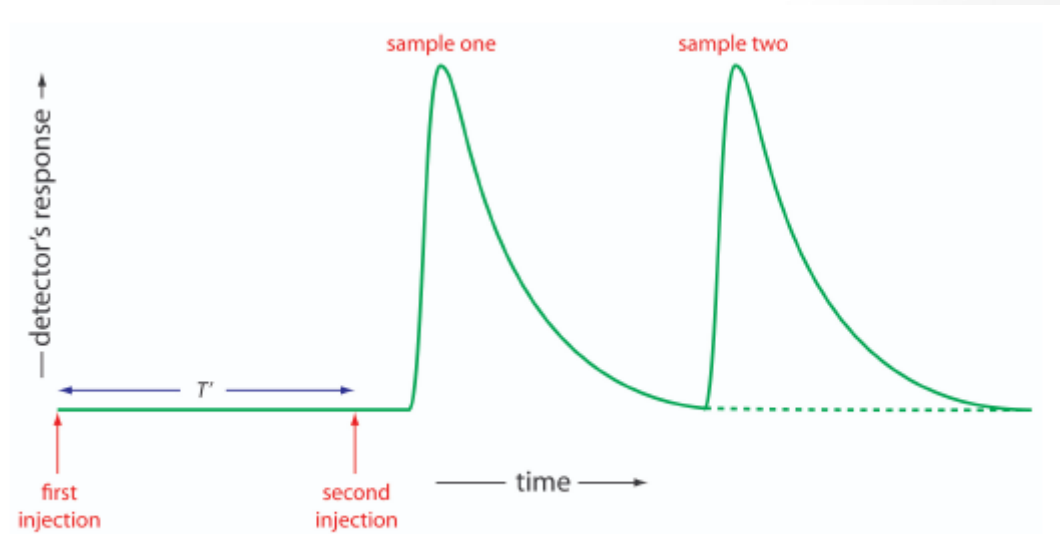
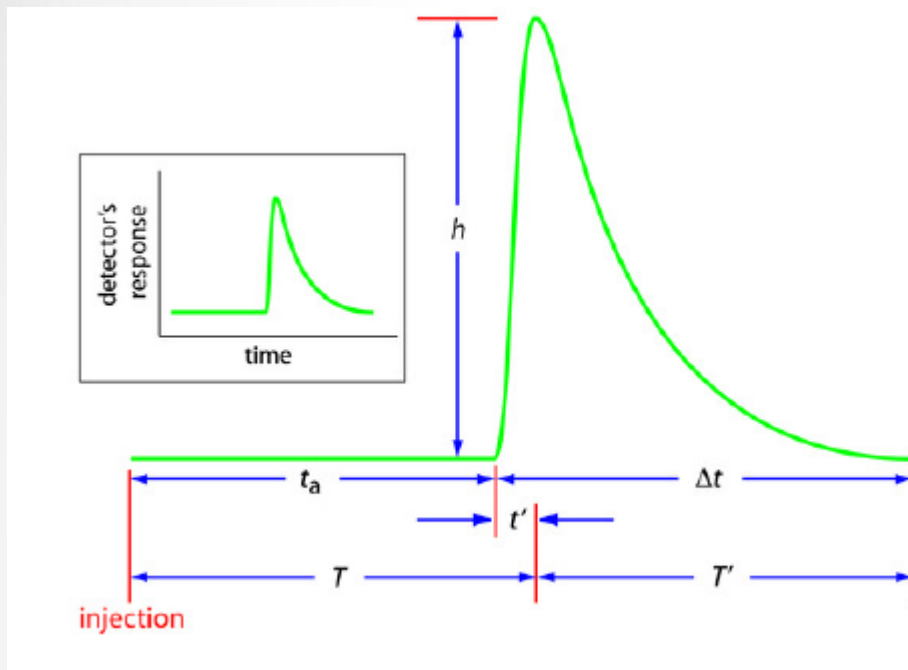


Figure 13.22 Effect of return time, T' , on sampling frequency.

Εφαρμογές της FIA

1. Χαμηλής διασποράς

- Τιμές $D = 1-3$
- Σε συστήματα ταχείας εισαγωγής δείγματος
- Ανιχνευτές εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, ατομικής απορρόφησης φλόγας & εκλεκτικών ηλεκτροδίων
- Ο μικρός όγκος δείγματος & ο μικρός χρόνος μέτρησης ιδανικά για μετρήσεις pH με συστήματα FIA (π.χ. pH ορού αίματος-
- 240 δείγματα/ώρα & $\pm 0,002$ pH επαναληψιμότητα

2. Μέσης διασποράς

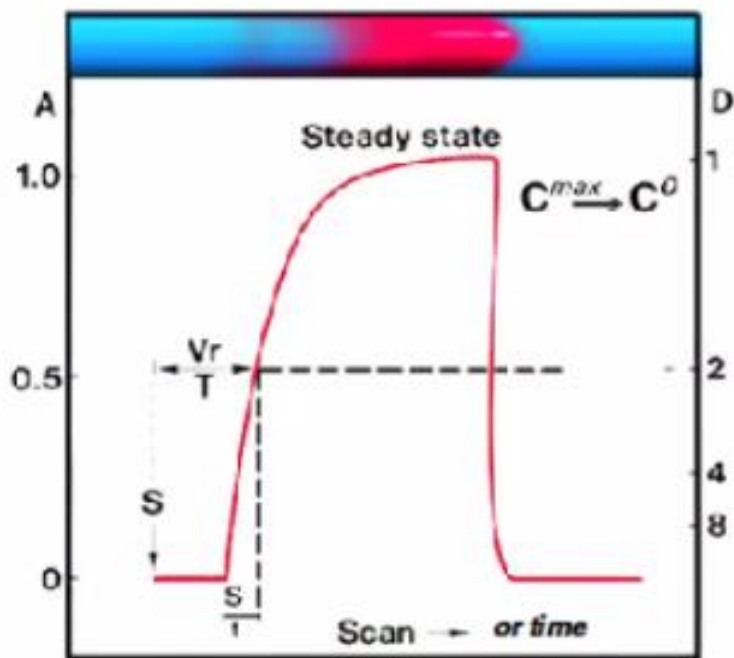
- Τιμές $D = 3-10$
- Π.χ προσδιορισμός ασβεστίου στον ορό του αίματος

3. Υψηλής διασποράς

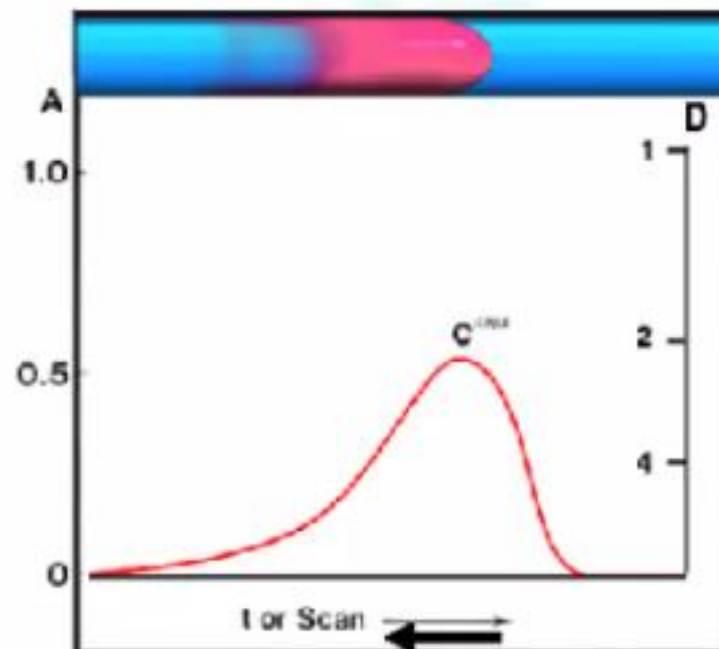
- Τιμές $D = 10-10.000$

➤ Περιορισμένη διάχυση επιτυγχάνεται με:

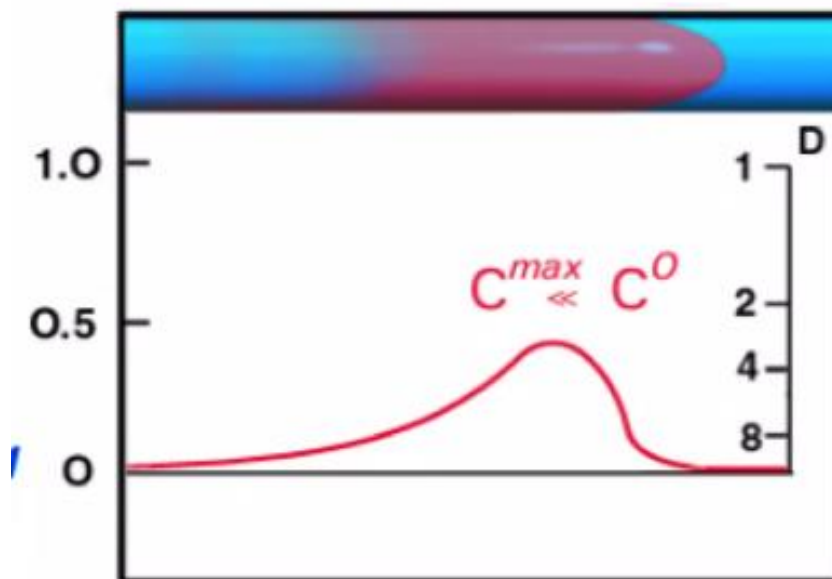
- ✓ Μείωση απόστασης μεταξύ συστήματος έγχυσης κ ανιχνευτή
- ✓ Μείωση της ταχύτητας της αντλίας
- ✓ Αύξηση του όγκου του δείγματος



1. Χαμηλής διασποράς



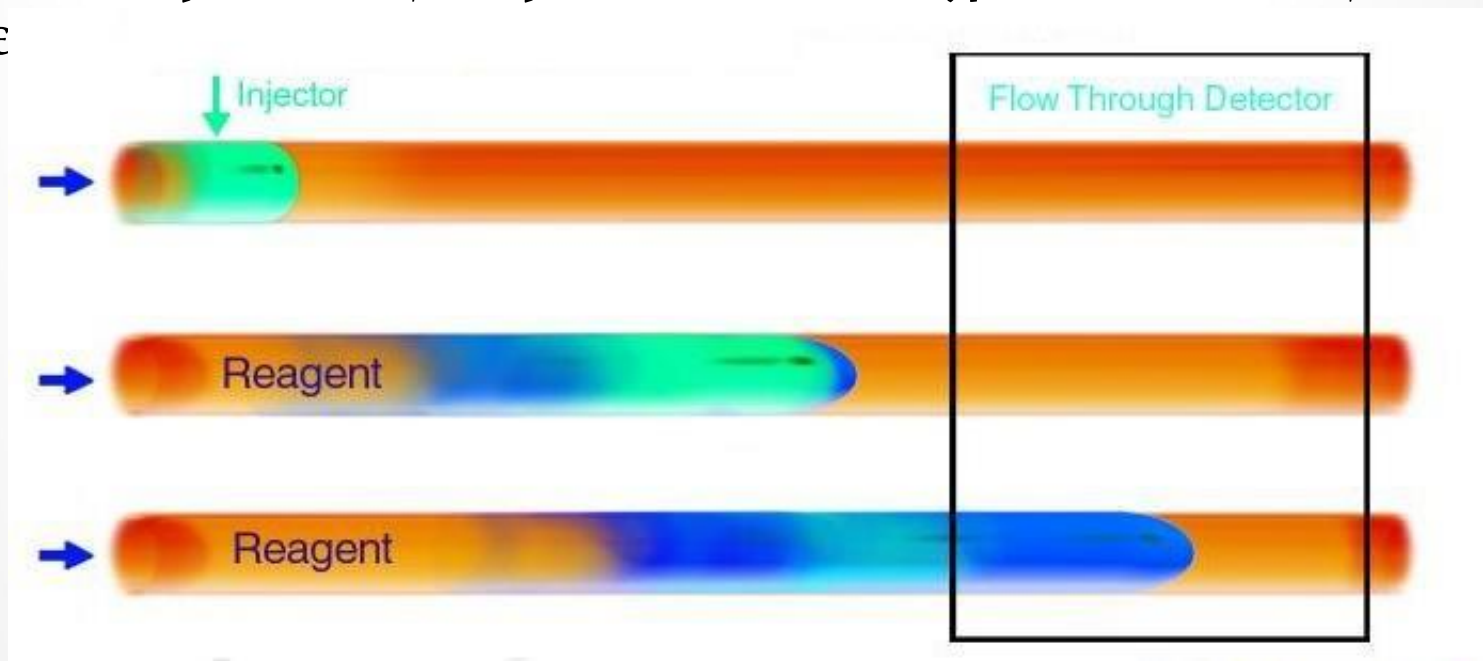
2. Μέσης διασποράς



3. Υψηλής διασποράς

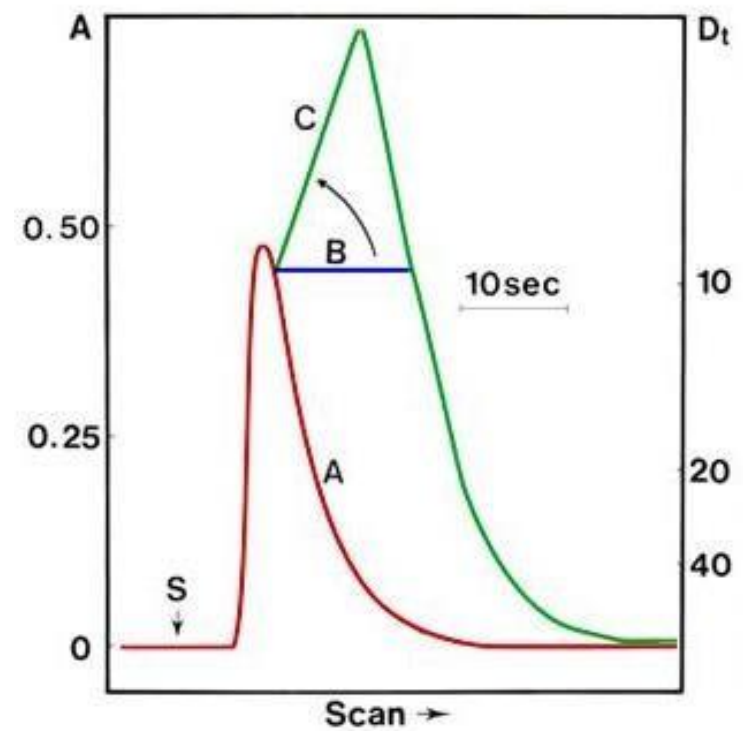
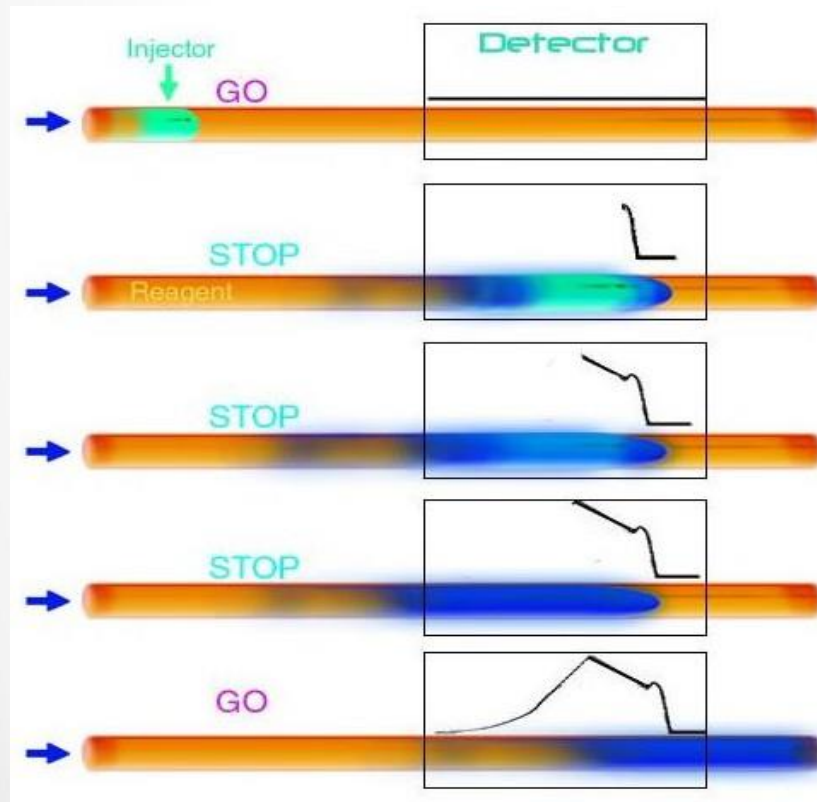
Χημικές αντιδράσεις στη FIA

- Αν ο αδρανής μεταφορέας αντικατασταθεί από ένα αντιδραστήριο που αντιδρά με τον αναλύτη, λαμβάνει χώρα μια χημική αντίδραση
- 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)

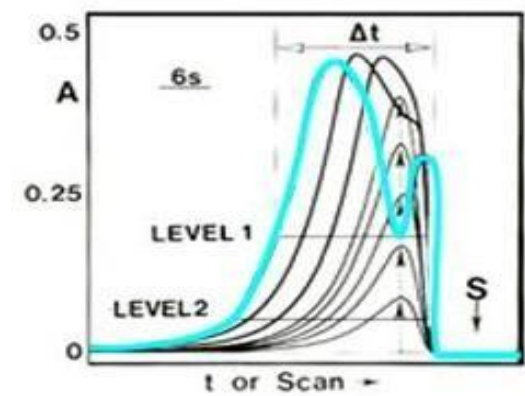
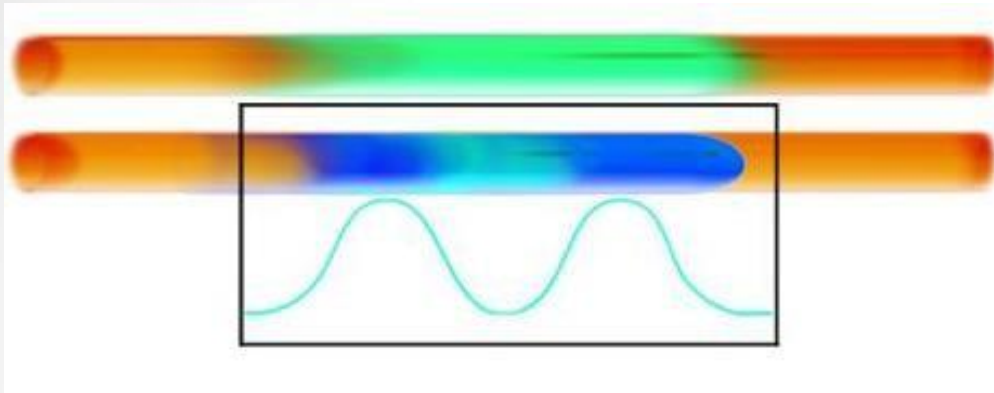


FIA αναχαιτιζόμενης ροής (stopped-flow FIA)

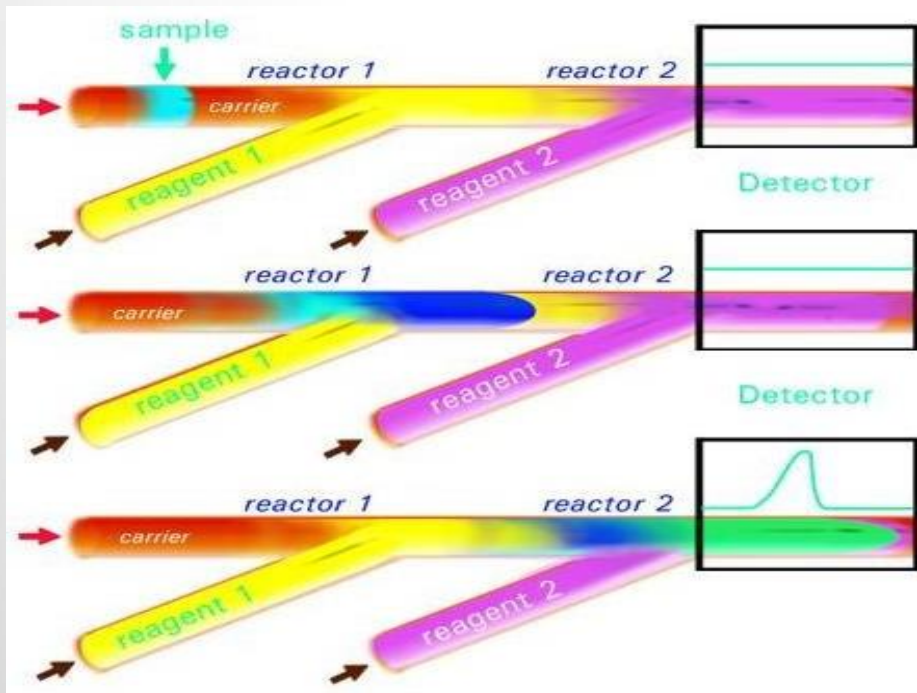
- Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος αναπτύχθηκε η μέθοδος της αναχαιτιζόμενης ροής
- Όταν το δείγμα φτάσει στον ανιχνευτή, διακόπτεται η ροή για κάποιο χρονικό διάστημα. Έτσι, μειώνεται η διασπορά του δείγματος και ταυτόχρονα βελτιώνεται η μίξη του μεταφορέα-αντιδραστηρίου με το δείγμα



Πολυκάνανα συστήματα FIA



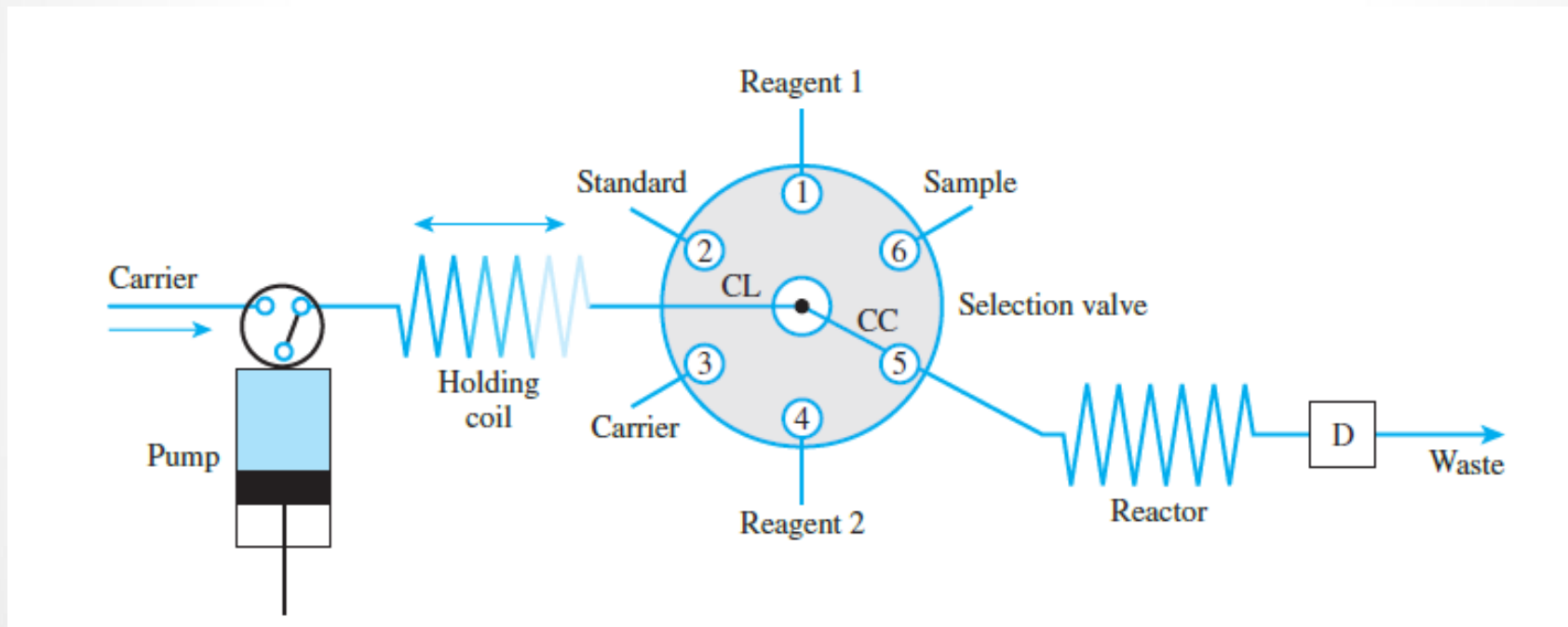
- Τα μονοκάνανα συστήματα FIA δεν επιτυγχάνουν πάντα καλή ανάμιξη δείγματος-αντιδραστηρίου (δημιουργούνται διπλές κορυφές)



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

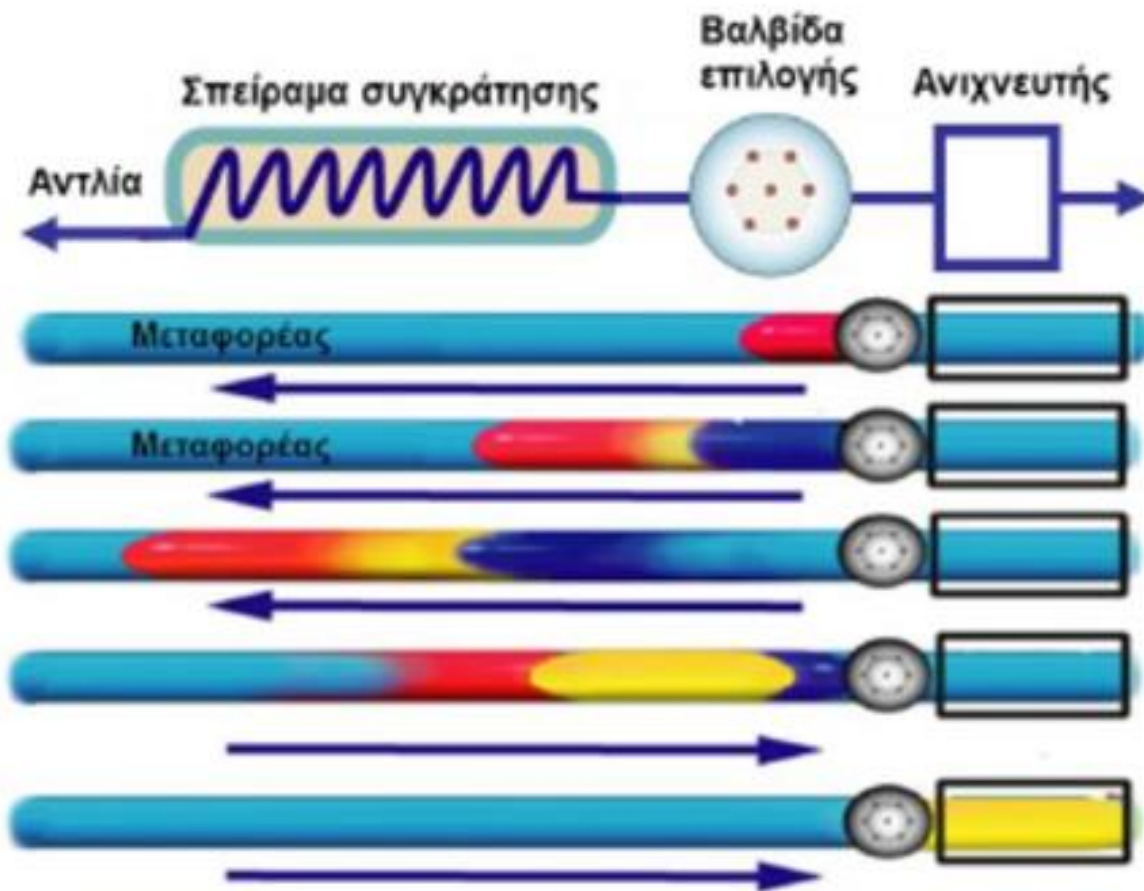
Ανάλυση με διαδοχικές εγχύσεις Sequential injection analysis-SIA

- Παραλλαγή της FIA (συνεχής, μονοκατευθυνόμενη ροή)
- Λύνει το πρόβλημα σπατάλης αντιδραστηρίων
- Ασυνεχής, δικατευθυνόμενη ροή



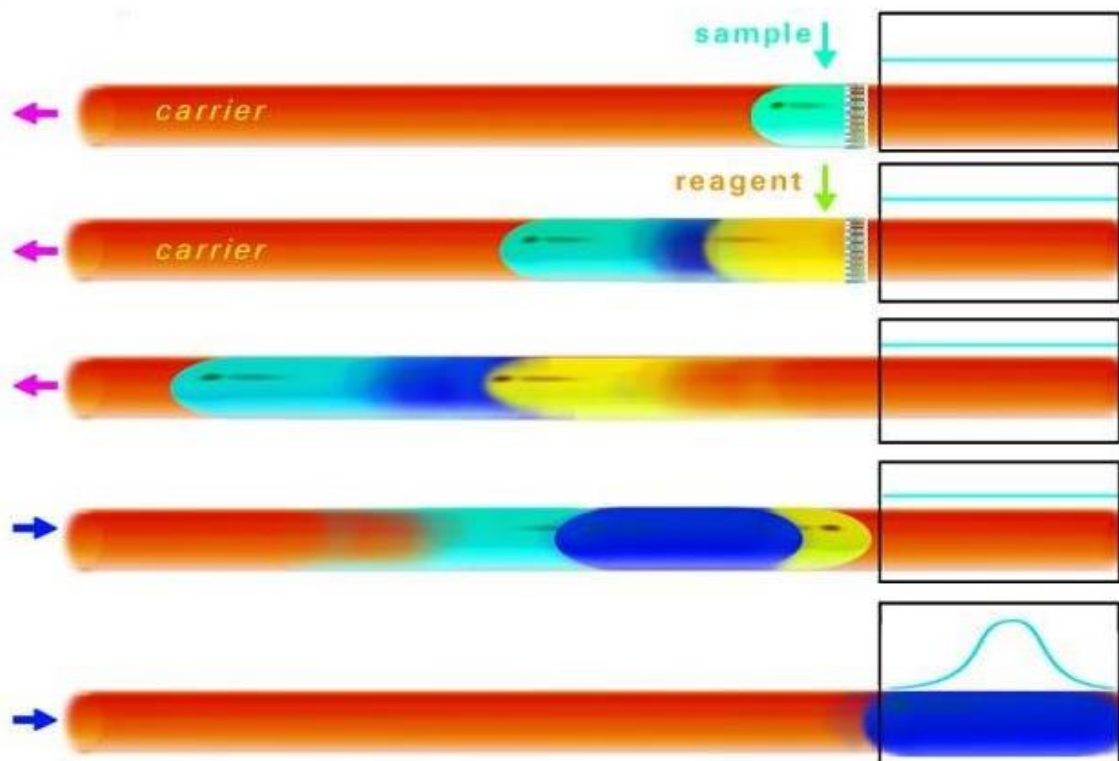
1. διασπορά,
2. μερική ανάμιξη και
3. χημική αντίδραση

Ανάλυση με διαδοχικές εγχύσεις Sequential injection analysis-SIA



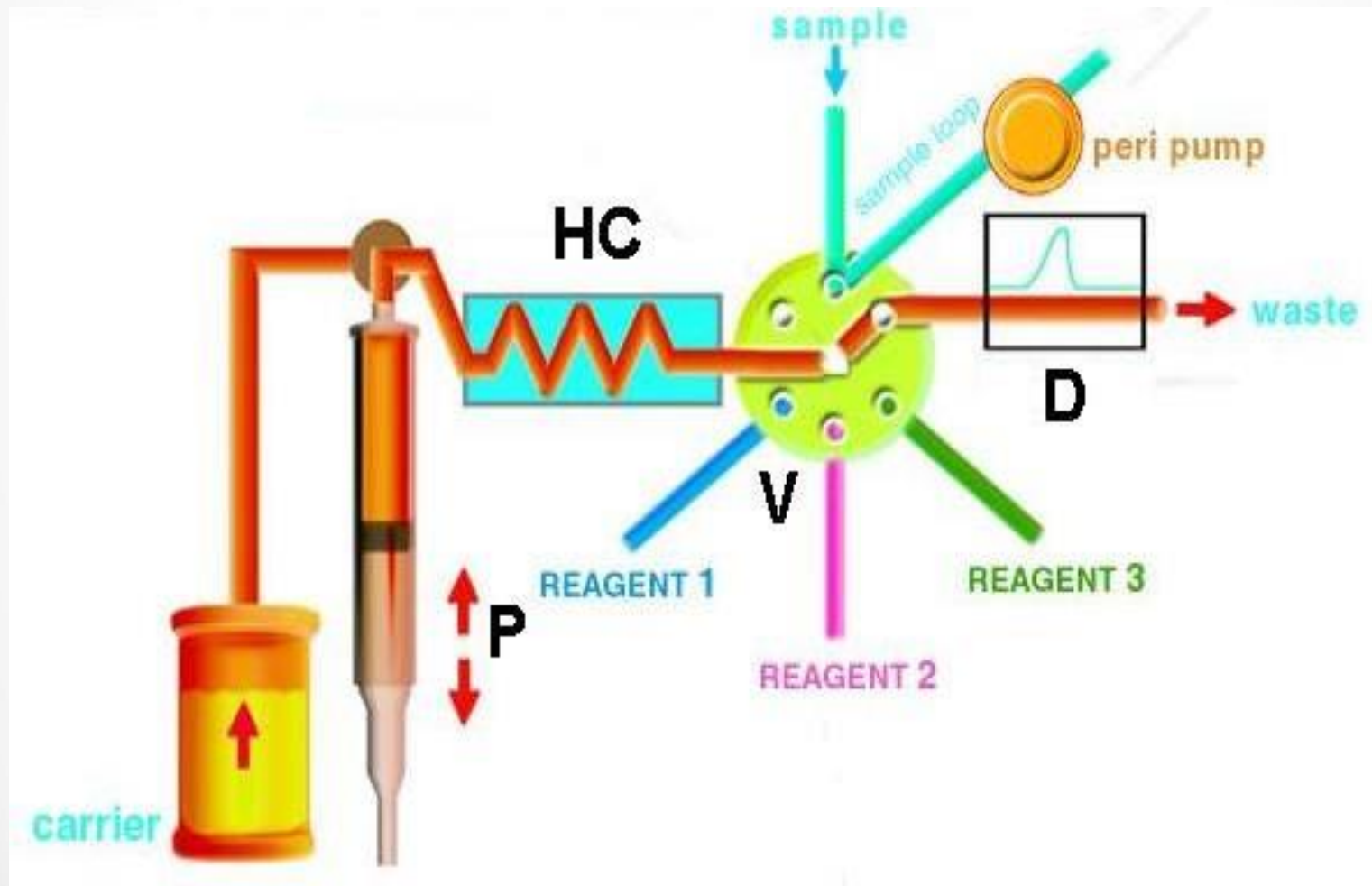
Ανάλυση με διαδοχικές εγχύσεις Sequential injection analysis-SIA

- 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

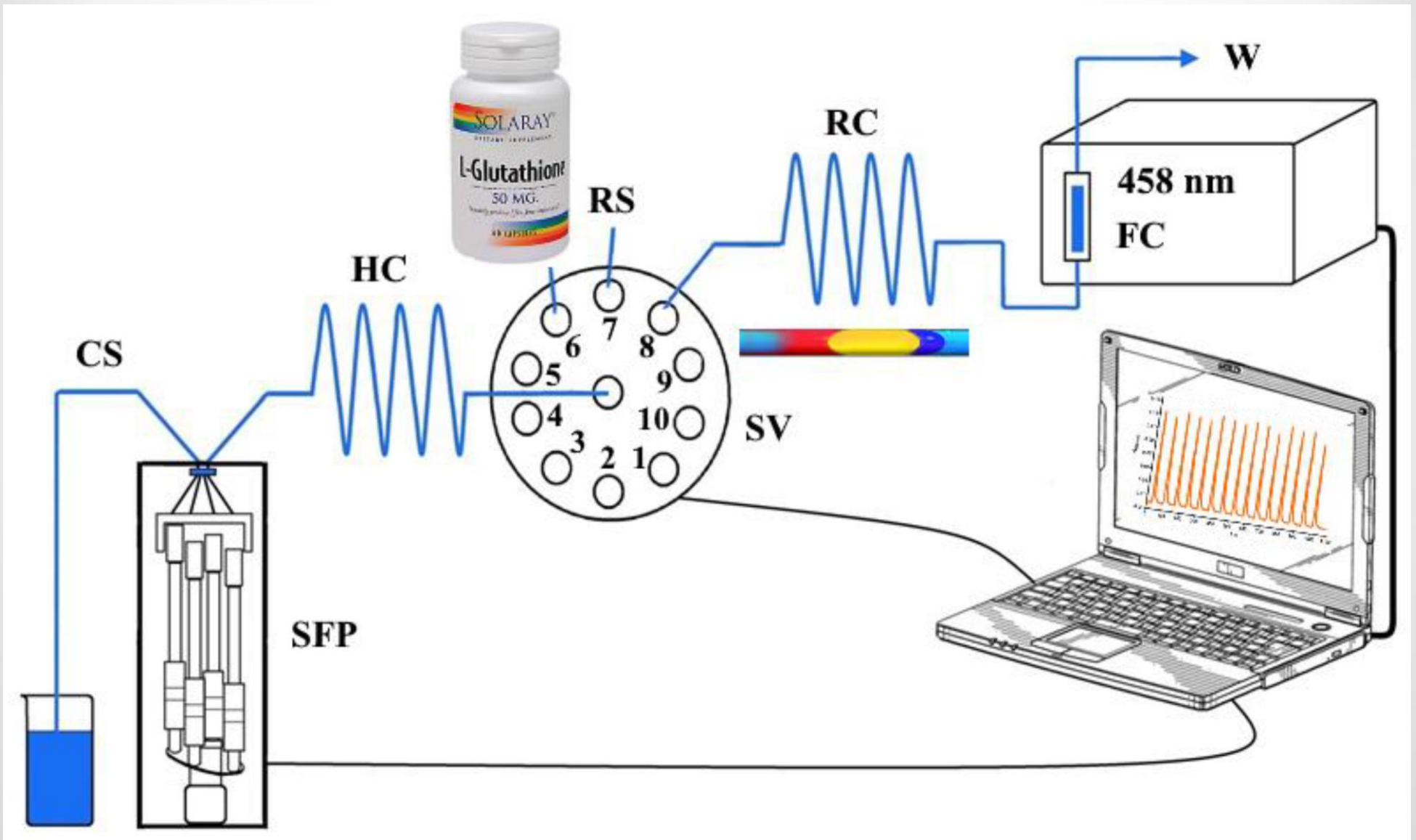


Σύστημα SIA

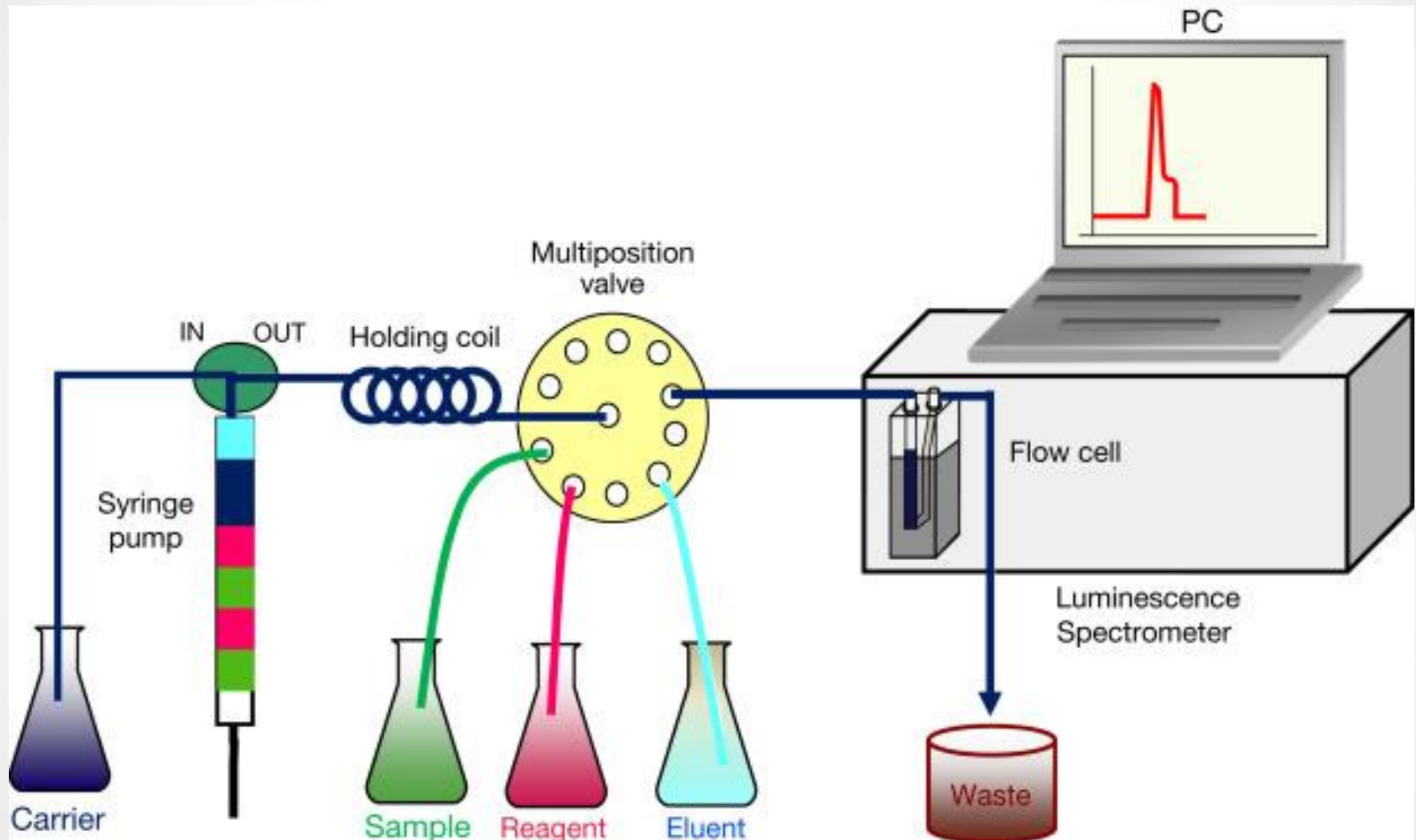
- Μία τυπική συνδεσμολογία SIA αποτελείται από μία αντλία (pump, P), μία βαλβίδα πολλαπλών θέσεων (multi-port valve, V), ένα σπείραμα συγκράτησης (holding coil, HC) και έναν ανιχνευτή (detector, D)



Ανάλυση με διαδοχικές εγχύσεις Sequential injection analysis-SIA

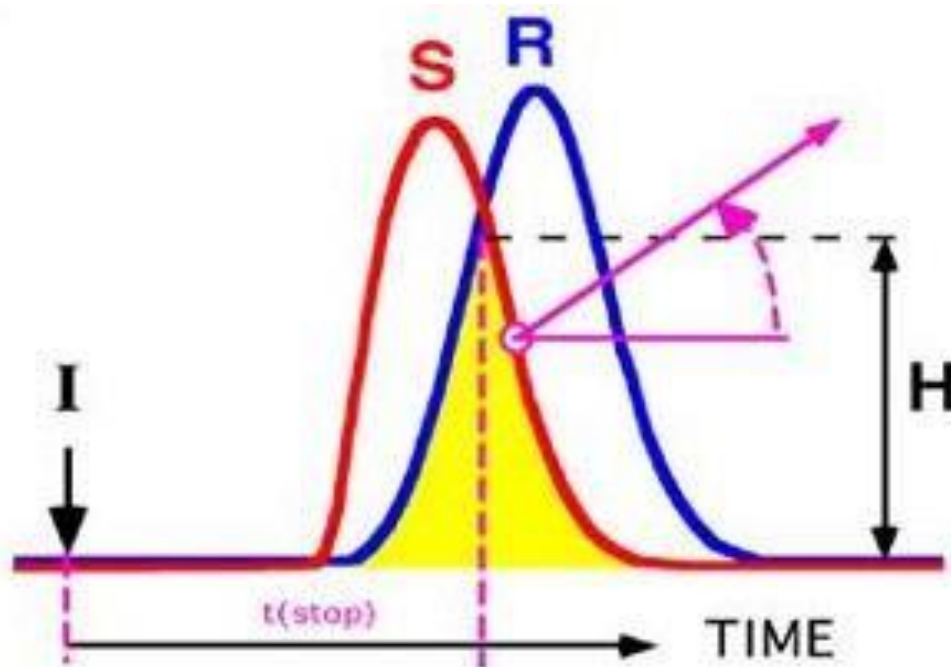


Ανάλυση με διαδοχικές εγχύσεις Sequential injection analysis-SIA



Ανάμιξη των ζωνών στη SIA

- Στη SIA, η αντίδραση ξεκινά καθώς οι ζώνες αναρροφώνται 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

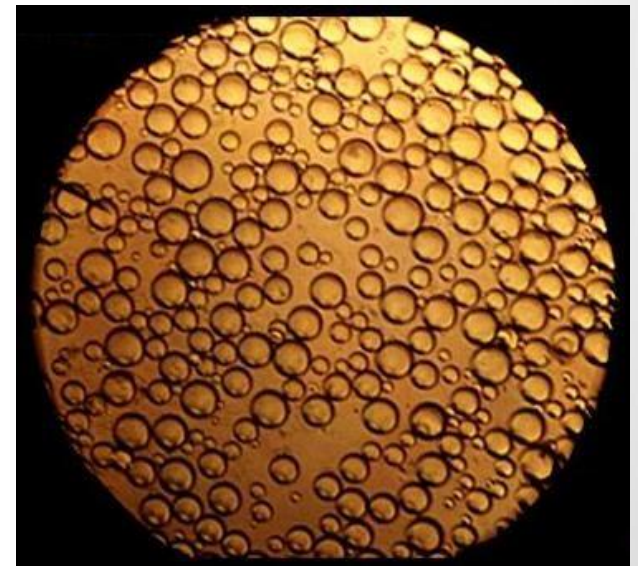
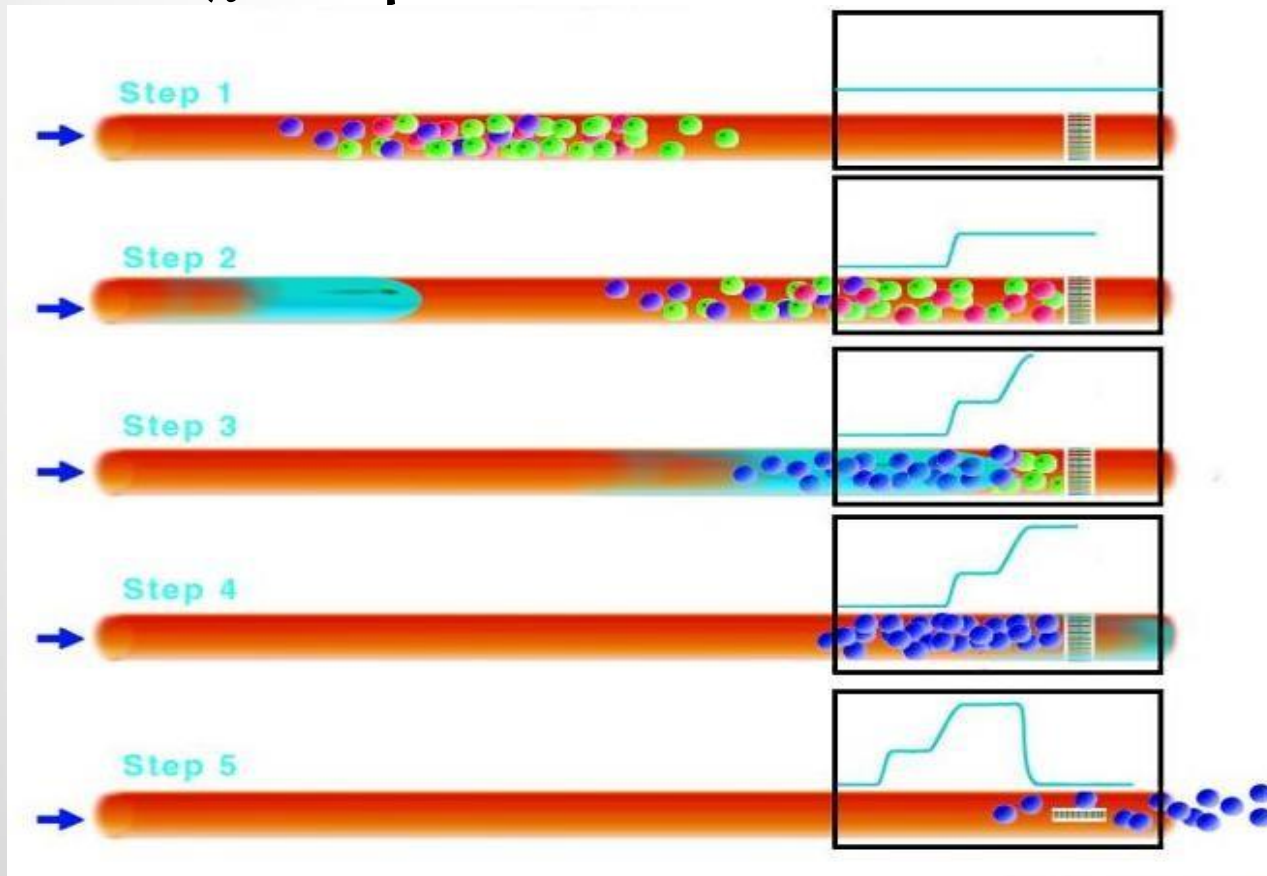


Πλεονεκτήματα της SIA

- Χρησιμοποιεί απλούστερη, πιο ανθεκτική μονοκαναλική οδό ενώ στη FIA απαιτούνται επιπλέον κανάλια ροής
- Αντικαθίστανται οι πολυκαναλικές περισταλτικές αντλίες της FIA από ακριβείς και ανθεκτικές αντλίες σύριγγας
- Μικρή κατανάλωση αντιδραστηρίων και δείγματος
- Η βαλβίδα επιλογής παρέχει ένα μέσο για την πραγματοποίηση εύκολης και αυτόματης βαθμονόμησης
- Αυτοματισμός
- Μεγάλες δυνατότητες προκατεργασίας του δείγματος

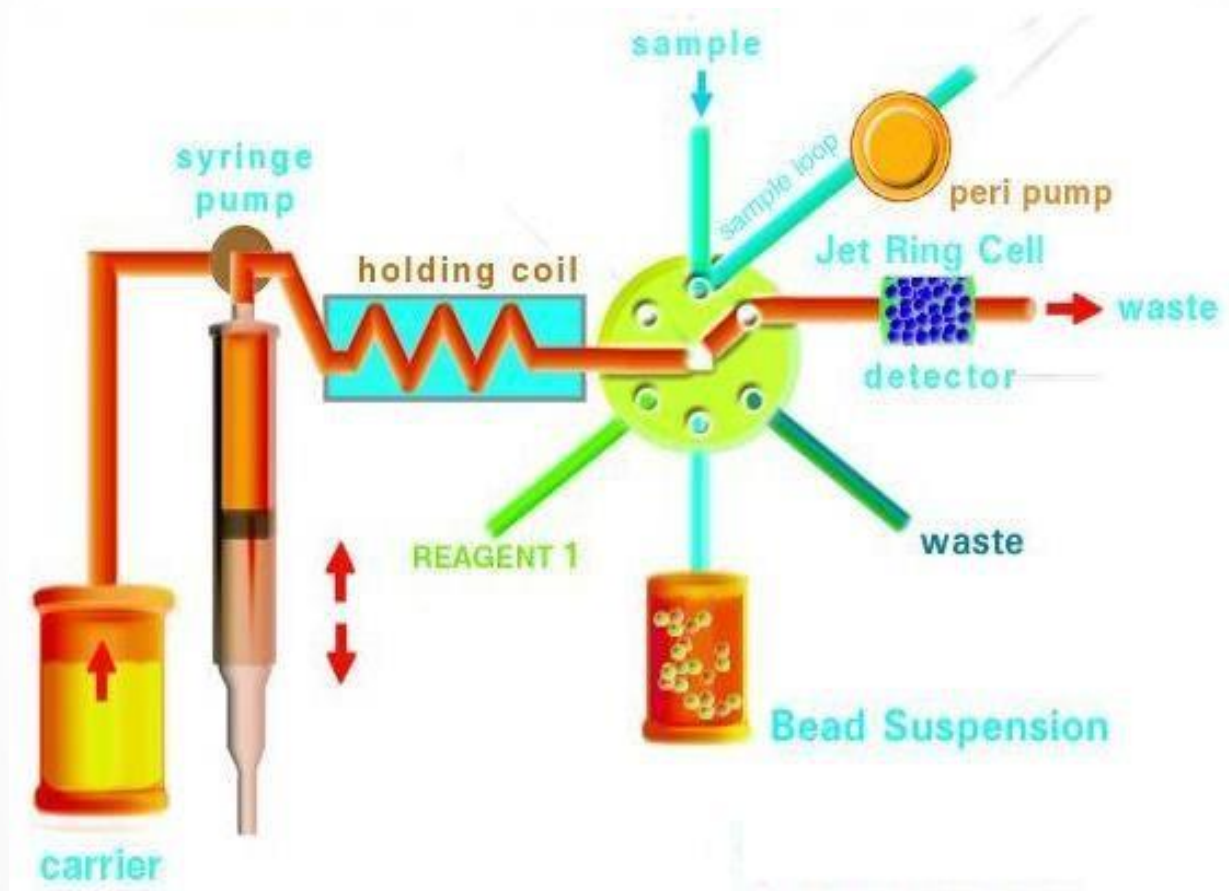
Ανάλυση με έγχυση με σφαιρίδια Bead injection analysis-BIA

- 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



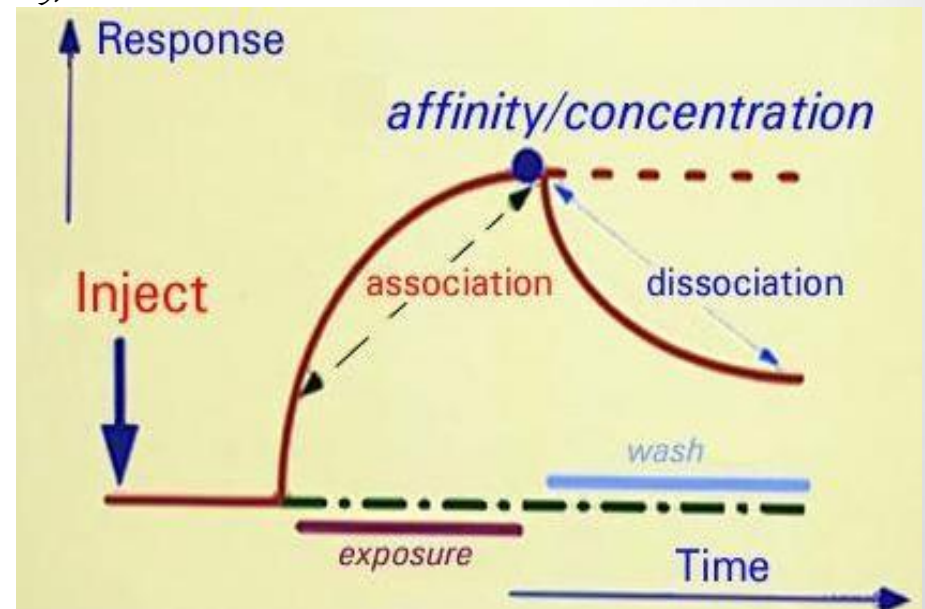
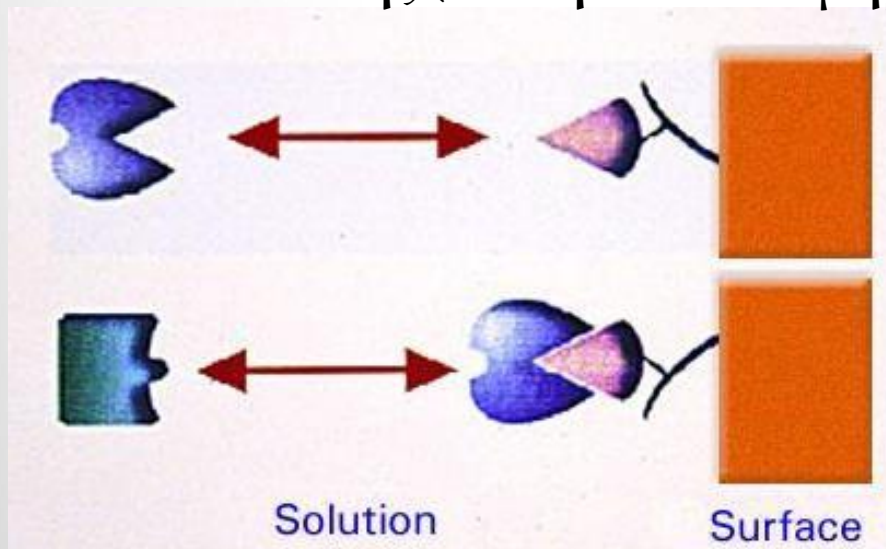
Σύστημα ΒΙΑ

- παρόμοια με μια αντίστοιχη SIA.
- Ένα από τα αντιδραστήρια αντικαθίσταται από ένα εναιώρημα με σφαιρίδια και η ειδική κυψελίδα συγκράτησης τοποθετείται πριν ή μέσα στον ανιχνευτή



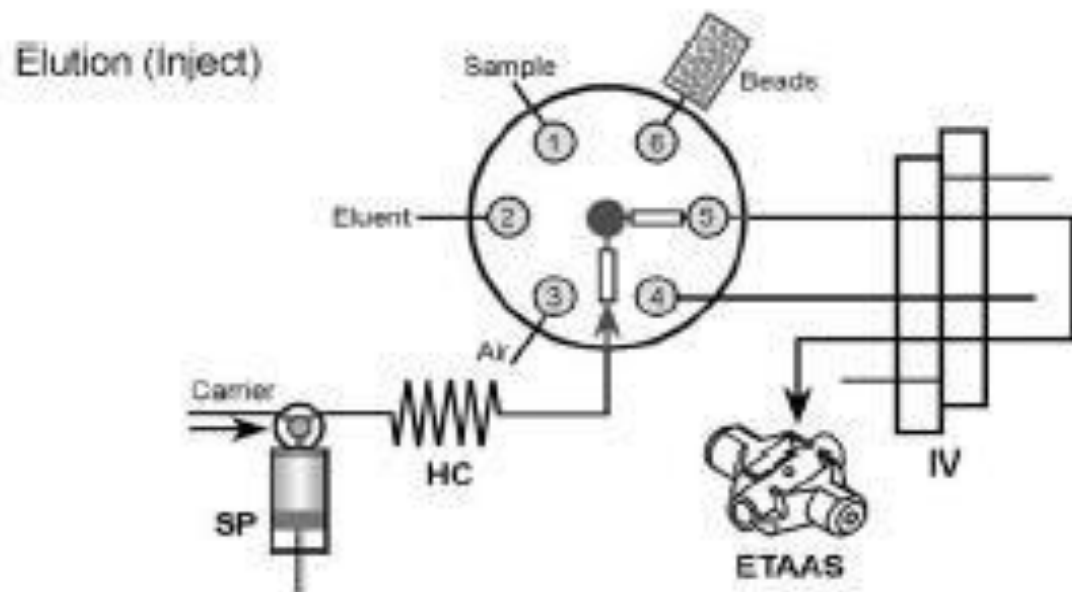
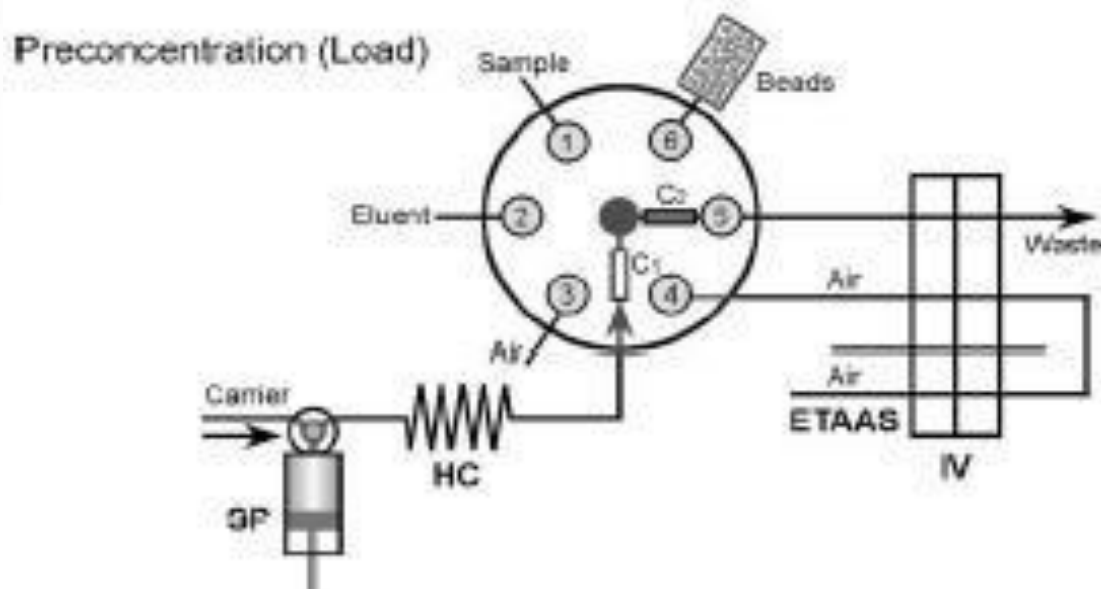
Μετρήσεις βιοειδικών δράσεων (bioligand interaction assays) με ΒΙΑ

- Στη περίπτωση αυτή ένα εκλεκτικό αντιδραστήριο (μωβ) προς ένα βιολογικό μόριο (σκούρο μπλε) ακινητοποιείται στην επιφάνεια του σφαιριδίου (πορτοκαλί)
- 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)



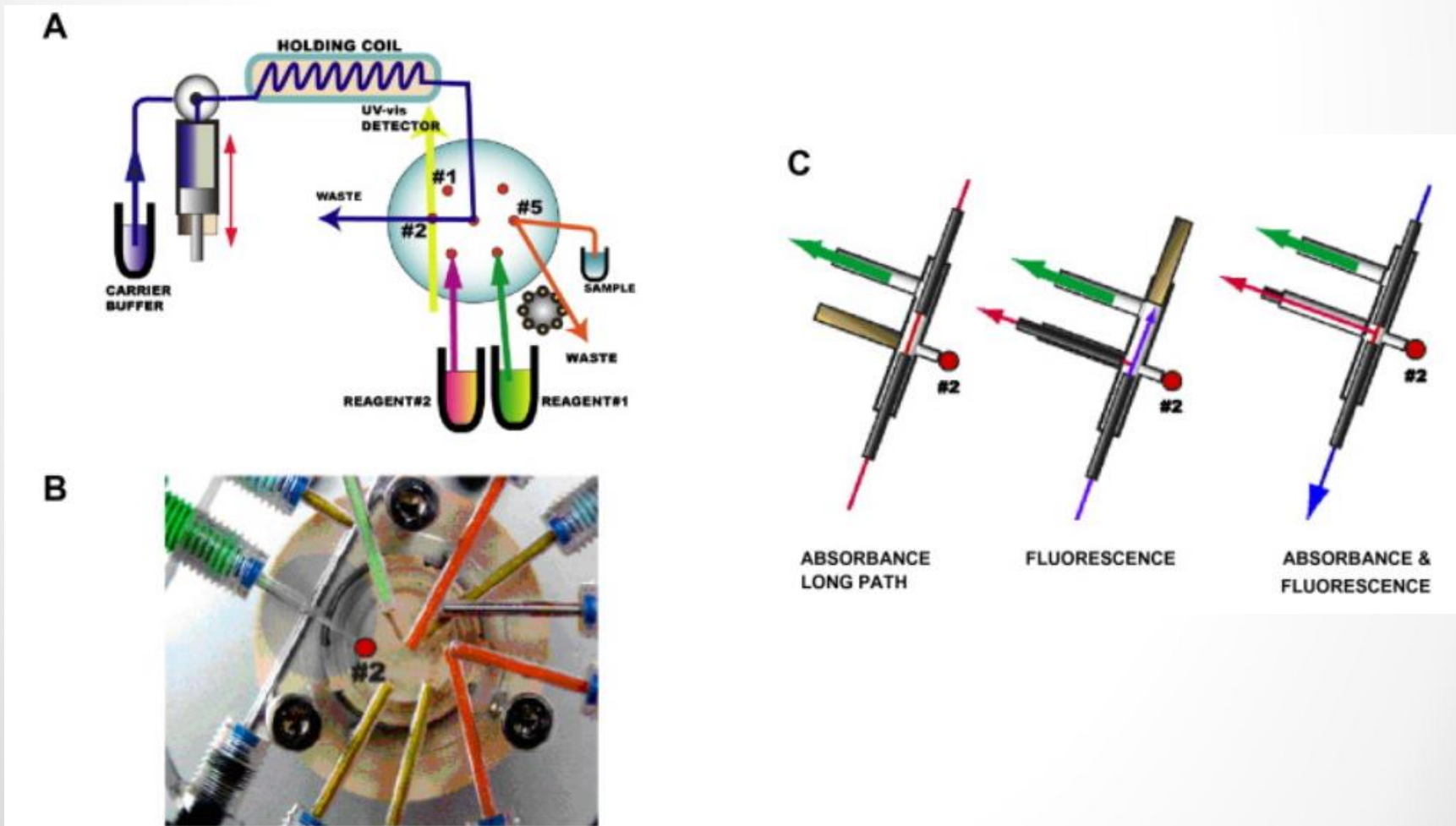
ΒΙΑ συνδυασμένη με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης

- Προσδιορισμός ιχνών μεταλλοίωντων

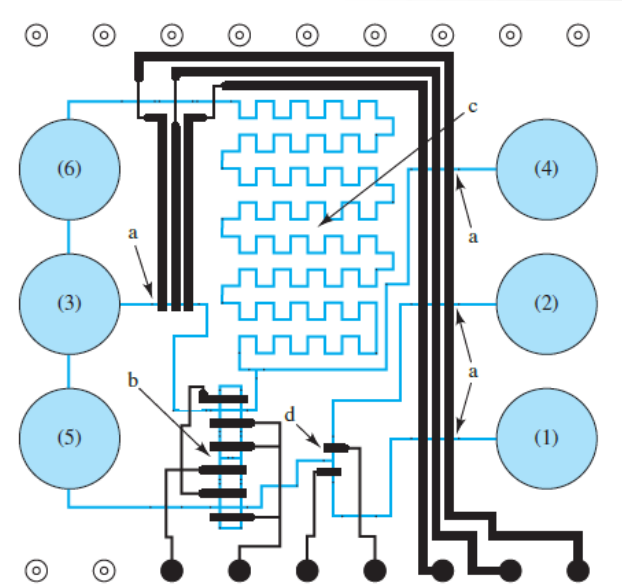
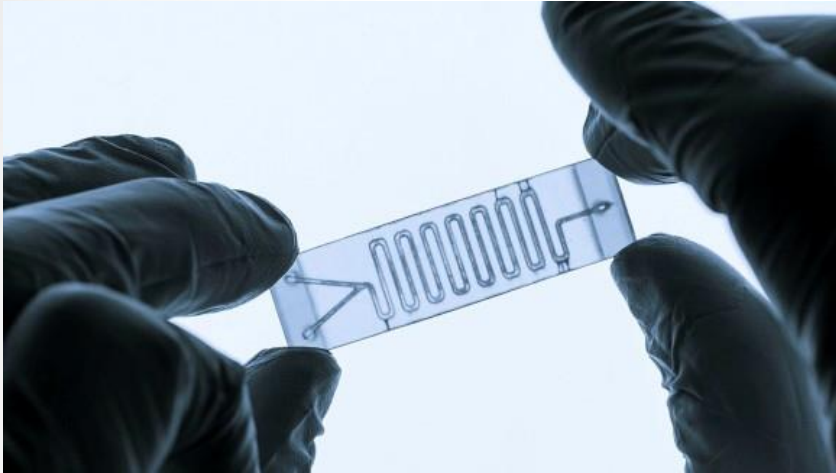


Lab-on-a-valve

- 3^{ης} γενιάς FIA
- Τύπου SIA σε μικροκλίμακα
- Αντικατάσταση της συνεχούς ροής από ελεγχόμενη ροή-
'ψηφιακή» κίνηση αντιδραστηρίων και δειγμάτων → κυκλική
αναχαιτίση-αναστροφή-επιτάχυνση ροών
- Περιορισμένη κατανάλωση δειγμάτων & αντιδραστηρίων (10–
20-μl) κ παραγωγή αποβλήτων (0.1–0.2 ml per assay)
- Ιδανικά για BIA

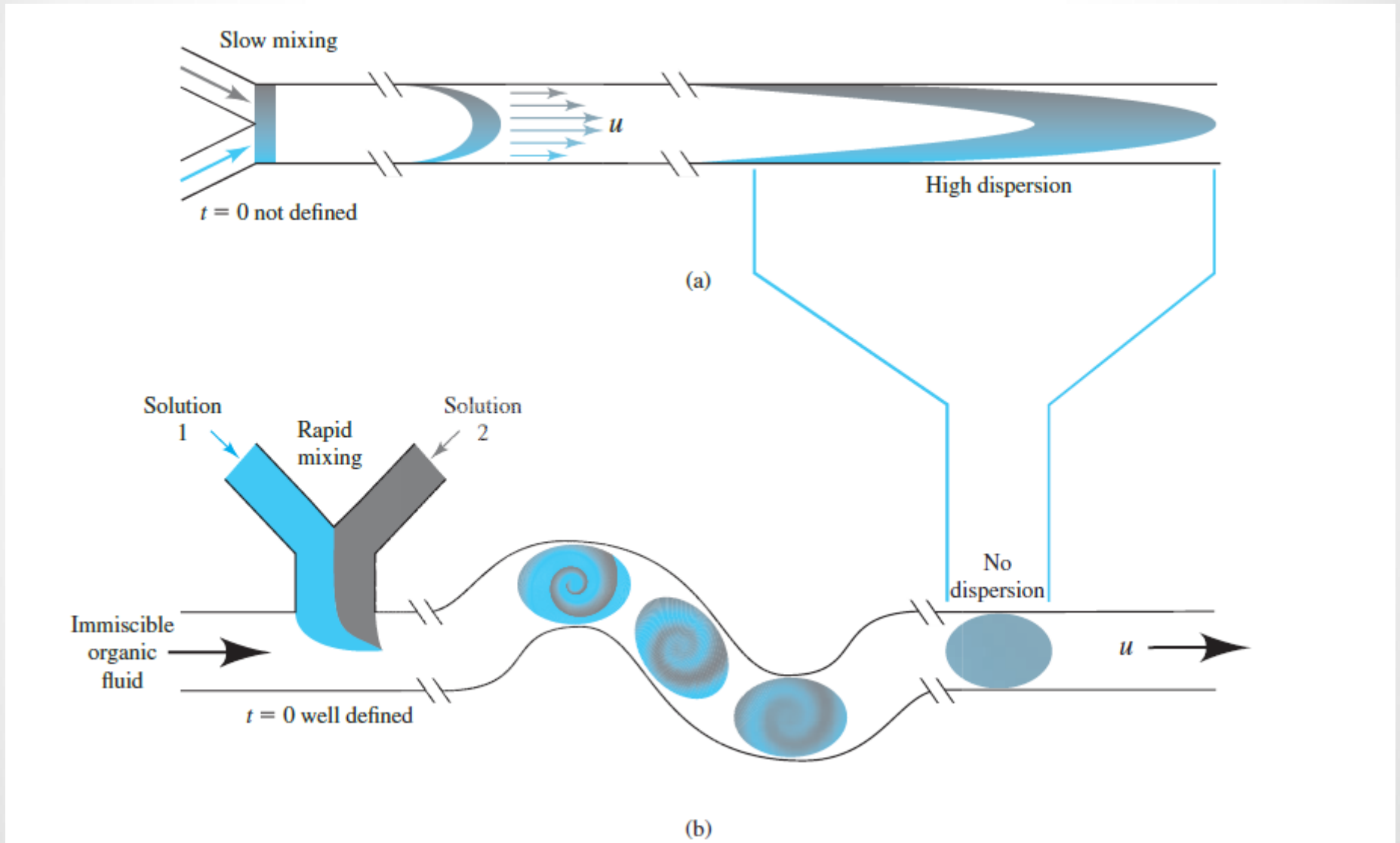


Μικρορρευστονική-Microfluidics Lab-on-a-chip

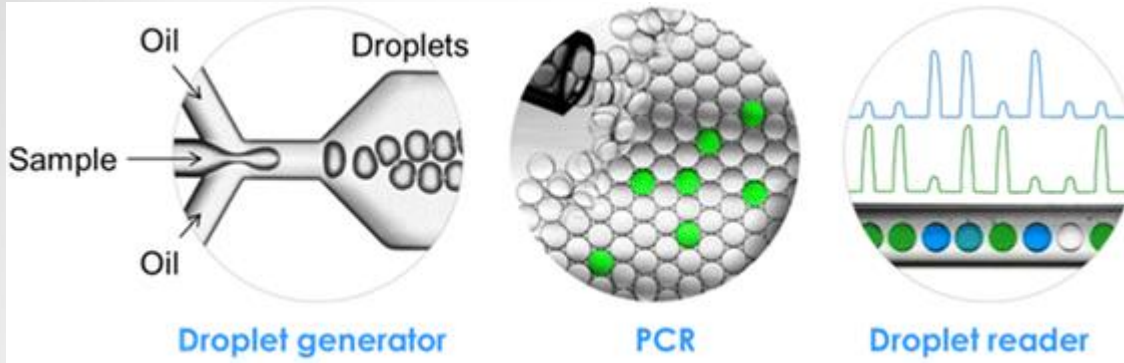


- Χρήση φωτολιθογραφικής τεχνολογίας όπως αυτή που χρησιμοποιείται στα ηλεκτρονικά κυκλώματα
- Συστήματα προώθησης, αναμίκτης, δίαυλοι ροής και βαλβίδες σε μια ενιαία δομή
 - Ηλεκτροώσμωση
 - Μικροκατασκευασμένες μηχανικές αντλίες
 - Υδροπηκτές
- Μονολιθικά ομάδα από δύο μόνιμα συγκολλημένες επιφάνειες PDMS
- 2,0 X 2,0cm
- Υάλινο κάλυμμα για εμφάνιση διαύλων με φθορισμό

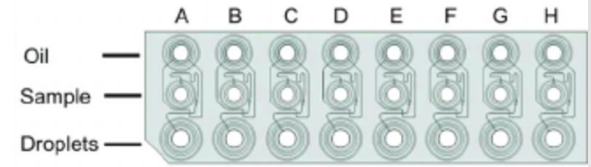
Μικρορρευστονική-Microfluidics Lab-on-a-chip



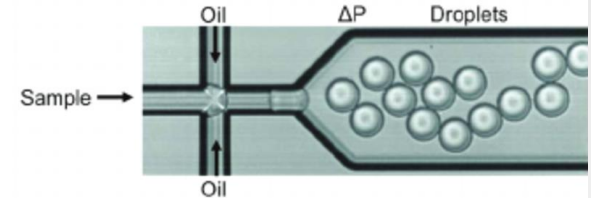
droplet digital PCR-Biorad



a Load samples and oil into disposable droplet generator cartridge



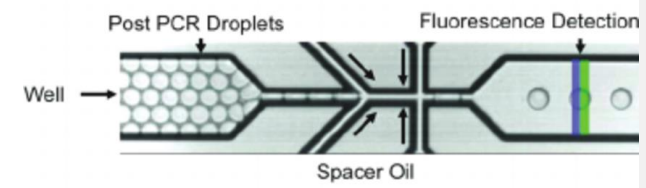
b Generate droplets



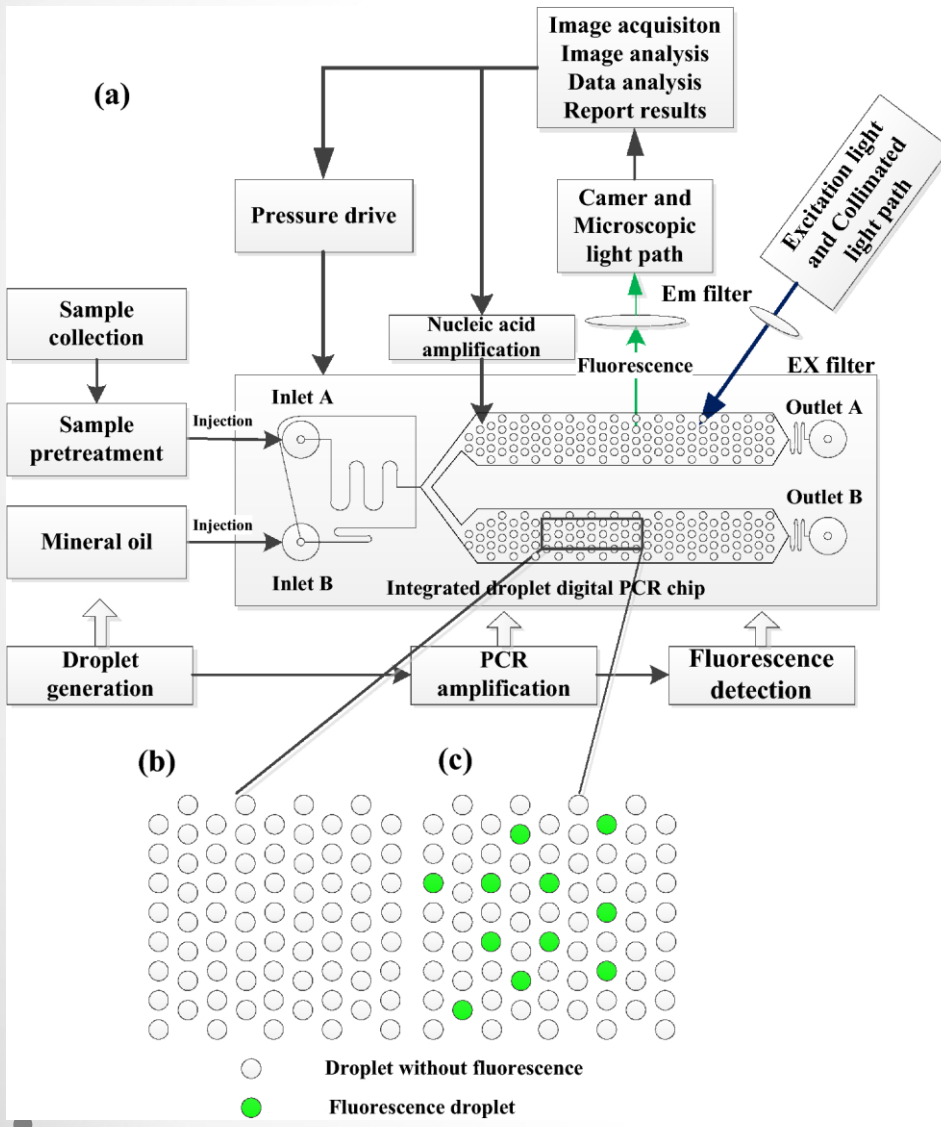
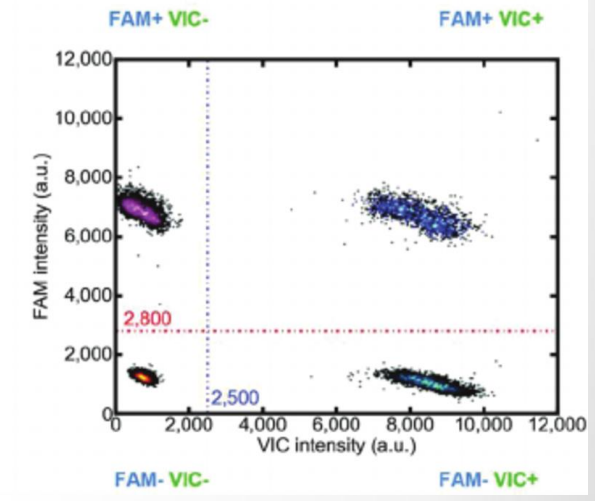
c Transfer droplets to 96-well PCR plate

d Thermal cycle to end-point

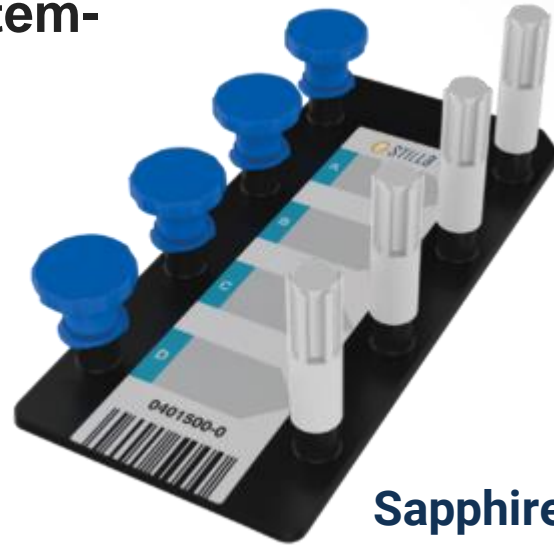
e Read droplet fluorescence



f Apply amplitude thresholds and calculate concentrations



Crystal digital PCR-Naica system-



Sapphire Chip



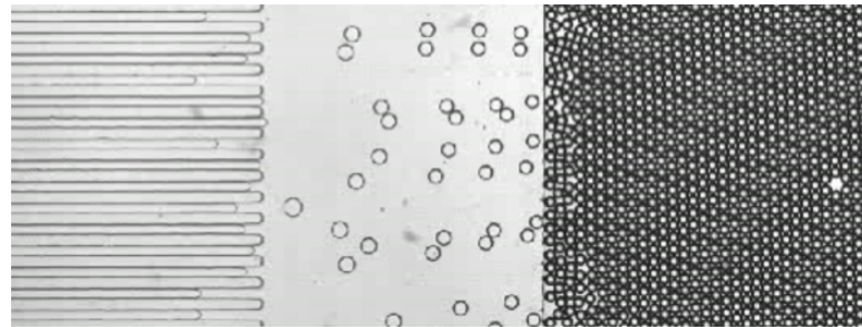
Step 2 – Partition & Amplify – 2h10

Step 2.1 – Partition

Transfer chips to the Geode

- 1-3 chips and 1-12 samples / run
- ~30,000 partitions / sample

Contactless fluid injection



The droplet crystals spontaneously forms inside the chip

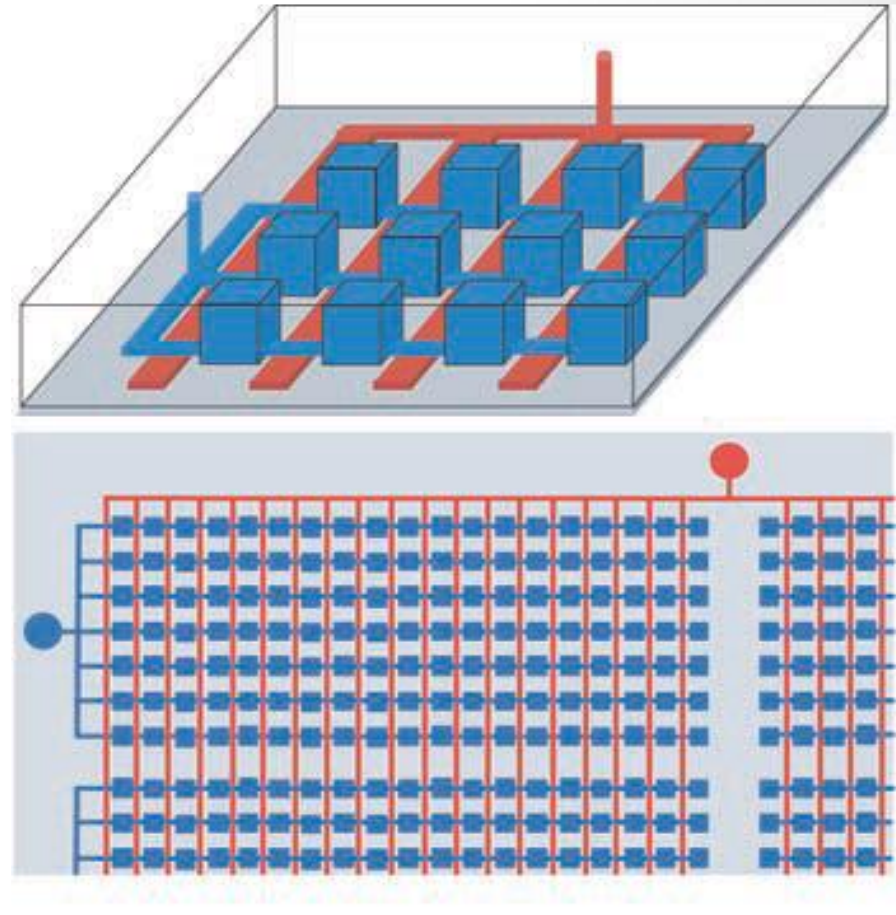
Step 2.2 – Amplify

Unique features for fast PCR amplification

- Fast thermal diffusion
- High ramp rates
- Fast PCR

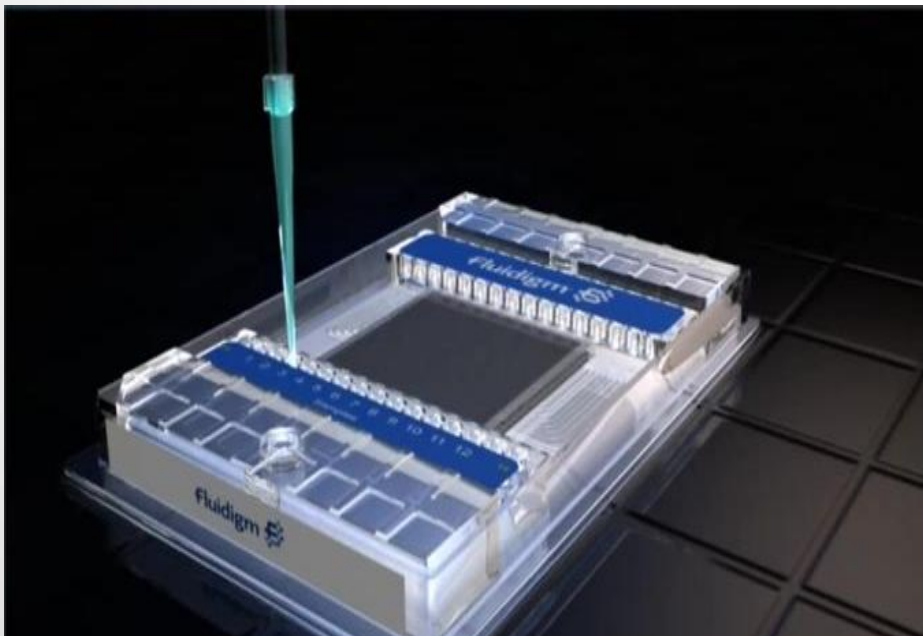
<https://www.stillatechnologies.com/multiplex-pcr/digital-pcr/#iLightbox%5B047ad03378fa269cf94%5D/0>

- Τσιπ με παράλληλα φρεάτια επικοινωνούν
- Βαλβίδες και αντλίες απομονώνουν τα φρεάτια χωρίζοντας το δείγμα
- Ξεχωριστοί θάλαμοι αντίδρασης



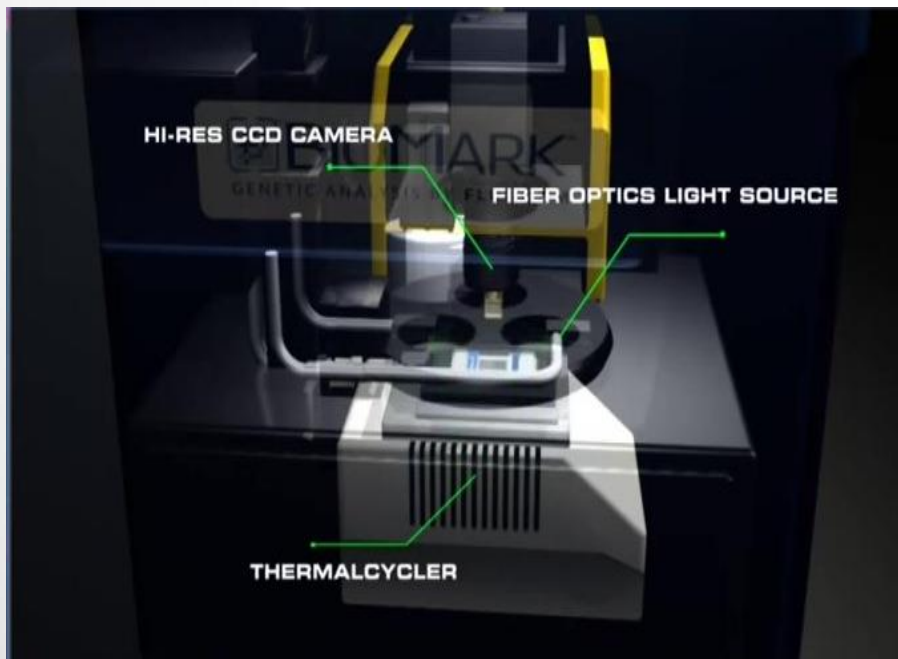
Fluidigm -BioMark™ HD system

- Τσιπ 12 ή 48 θέσεων για δείγματα – 765 ή 770 φρεάτια αντίστοιχα
- Τοποθετείται στο IFC Controller για διαχωρισμό κάθε δείγματος

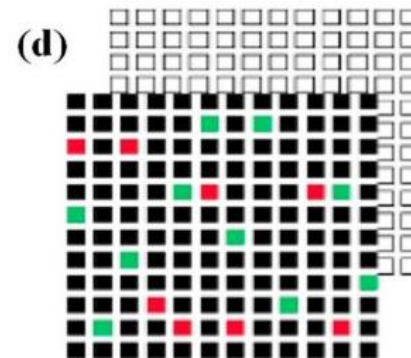
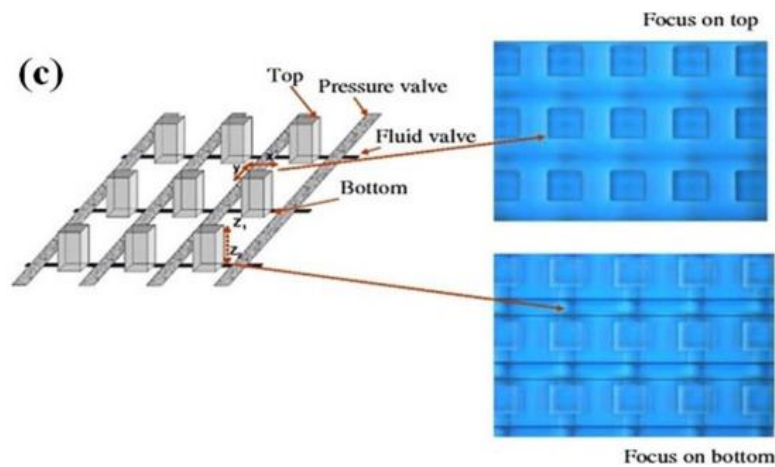
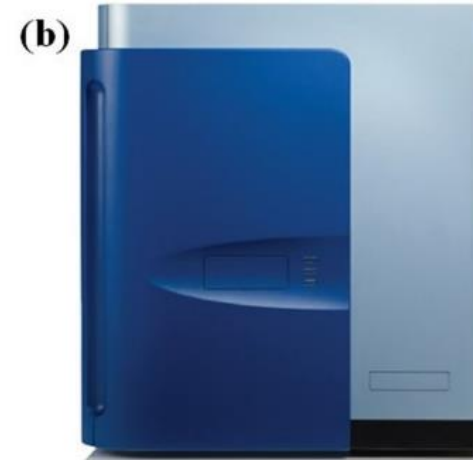
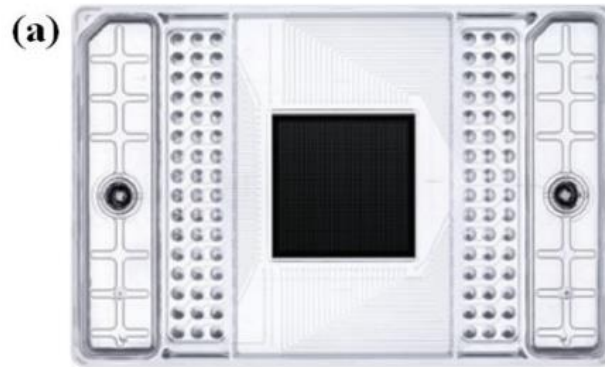


Fluidigm -BioMark™ HD system

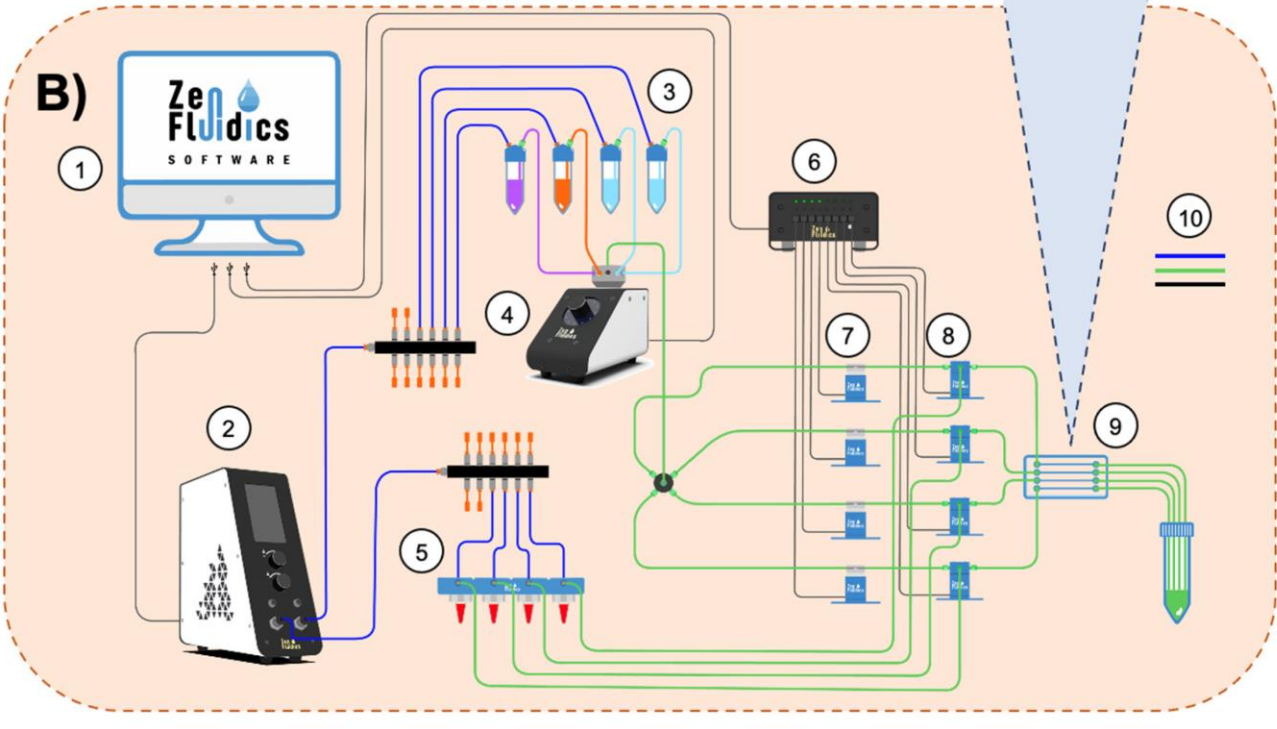
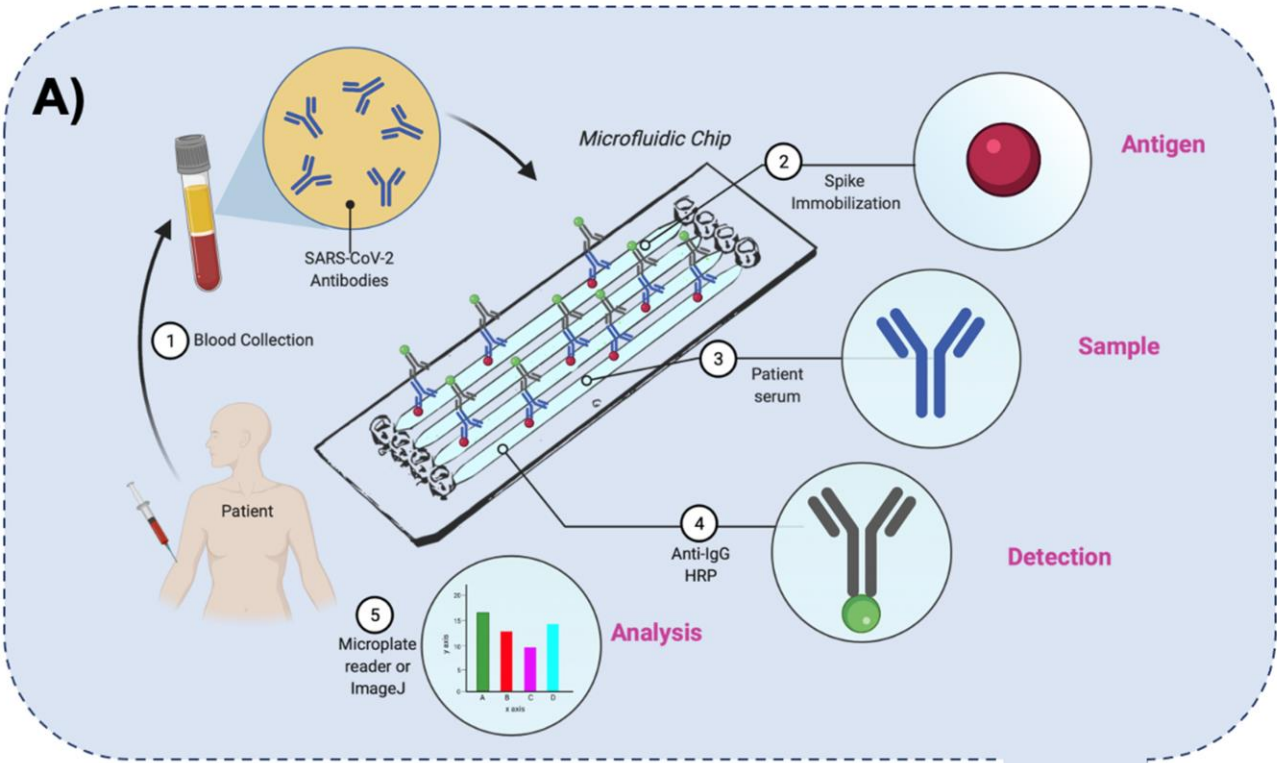
- Το ίδιο τσιπ στο BioMark HD για κλασική PCR και ανάγνωση σημάτων φθορισμού



Fluidigm -BioMark™ HD system

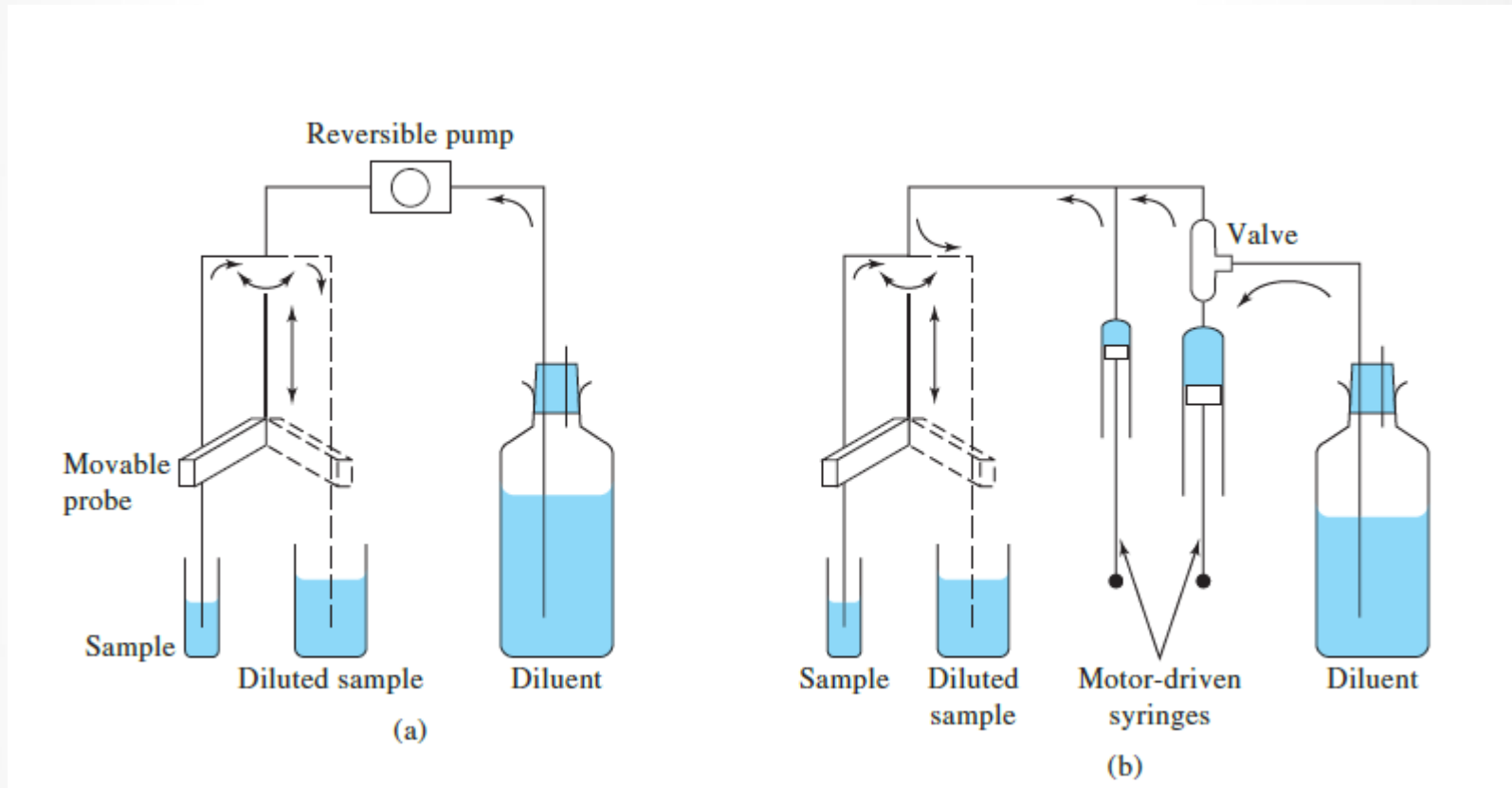


ELISA on-chip



Διακριτά αυτόματα συστήματα

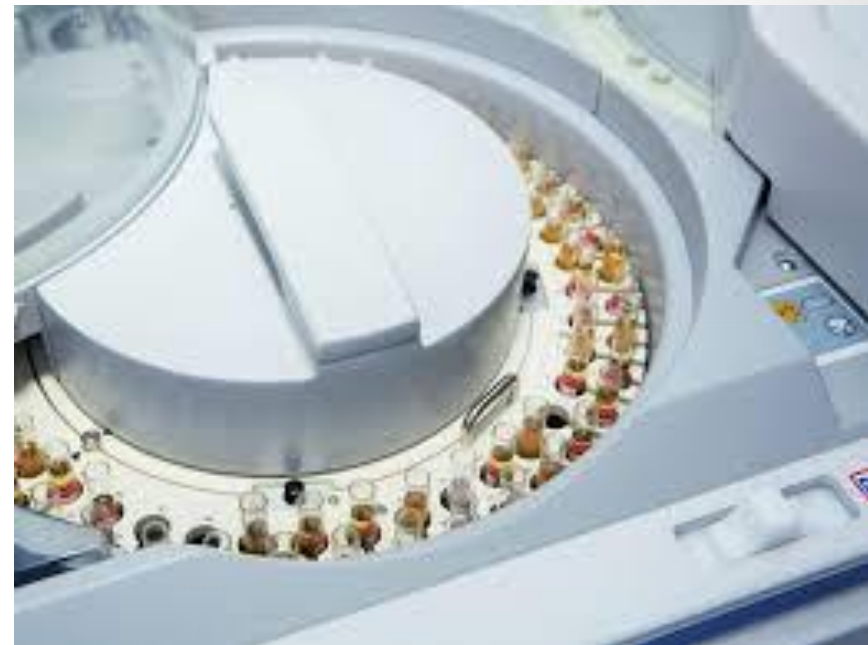
Δειγματολήπτες τύπου:



- Αντιστρεπτής αντλίας

- Σύριγγας

- Βασικά μέρη βιοχημικού αναλυτή



- Παραδείγματα βιοχημικών αναλυτών



CLINITEK Novus® Automated Urine Chemistry Analyzer



ARCHITECT i1000SR immunoassay analyzer



Siemens Clinitek Status+ Point of Care Urinalysis



Axon On-Call Vibid
Συσκευή μέτρησης γλυκόζης
POCT-Point-of-Care Testing

- Σύγχρονα συστήματα βιοχημικών αναλυτών



Atellica® Solution-Siemens

<https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=CbvQQ2r8578>

- Σύγχρονα συστήματα βιοχημικών αναλυτών



- Σύγχρονα συστήματα βιοχημικών αναλυτών



- *Mid-to-high volume throughput of up to 4,400 tests/hour*

cobas® pro integrated solutions



- *High-volume throughput of up to 8,100 tests/hour*

cobas® 8000 modular analyzer series

- Αυτόματο προ-αναλυτικό σύστημα



It includes modules for registration and decapping of sample tubes, liquid level detection, and sample quality assessment (optional), recapping of sample tubes (optional), barcode printing, as well as aliquoting of primary and secondary tubes.

cobas p 612 pre-analytical system

- **Αυτόματο μετα-αναλυτικό σύστημα**



cobas® p 701 post-analytical unit

The cobas® p 501 / p 701 post-analytical unit stores primary and secondary sample tubes. The tubes are stored in a controlled, refrigerated sample store. Automatic retrieval for add-on testing is possible at any time. Expired samples are disposed of automatically when their storage time has elapsed.

- Σύγχρονο εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας



<https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=CbvQQ2r8578>

https://www.youtube.com/watch?v=6P-jaC3_d3o

<https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=pP2s8kPaH30>

PCR SET-UP

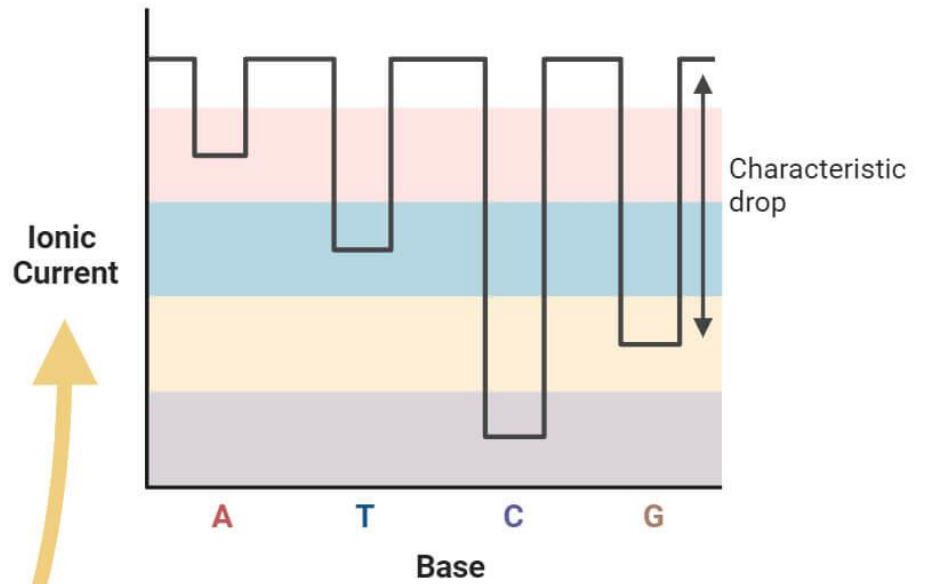
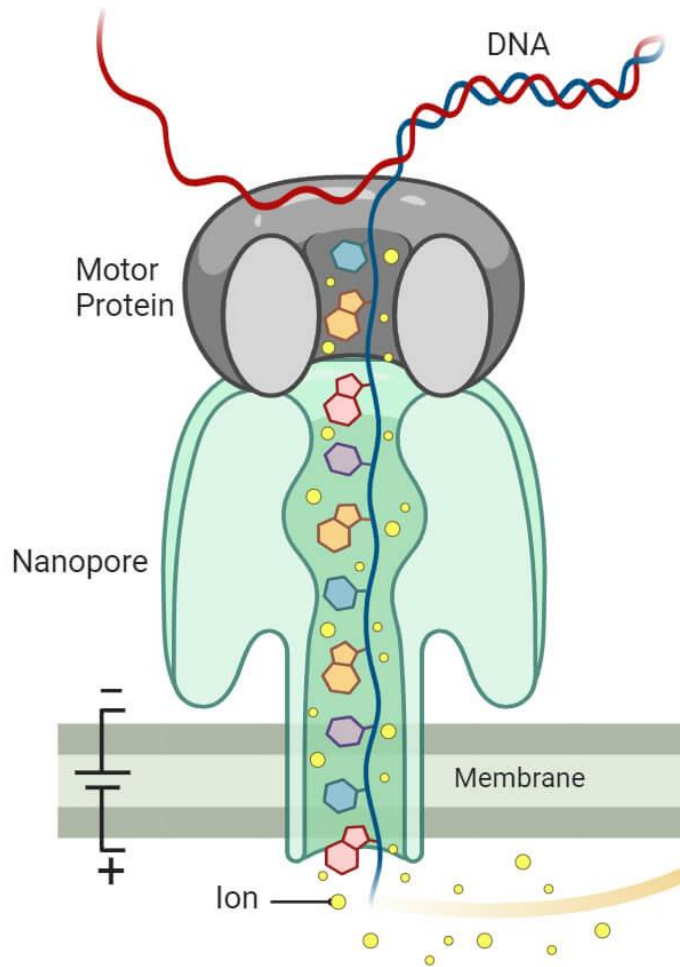


Liquid Handling
System | Myra by Bio
Molecular Systems

<https://biomolecularsystems.com/myra-liquid-handling-system/>

Nanopore Sequencing Principle

- 1 DNA is unwound by the motor protein and one strand is translocated through the pore to the +ve side of membrane



- 2 Each base gives a characteristic reduction in the ionic current, allowing the DNA to be sequenced