

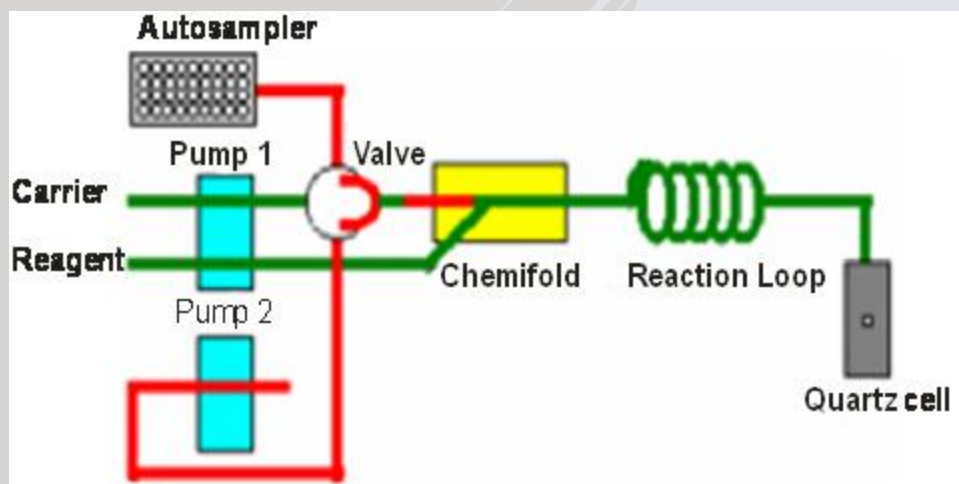
Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Δρ. Μάριος Κωστάκης -

Καθ. Α. Οικονόμου

Μανώλης Σεμιδαλάς



Κλασική ανάλυση vs αυτόματη ανάλυση

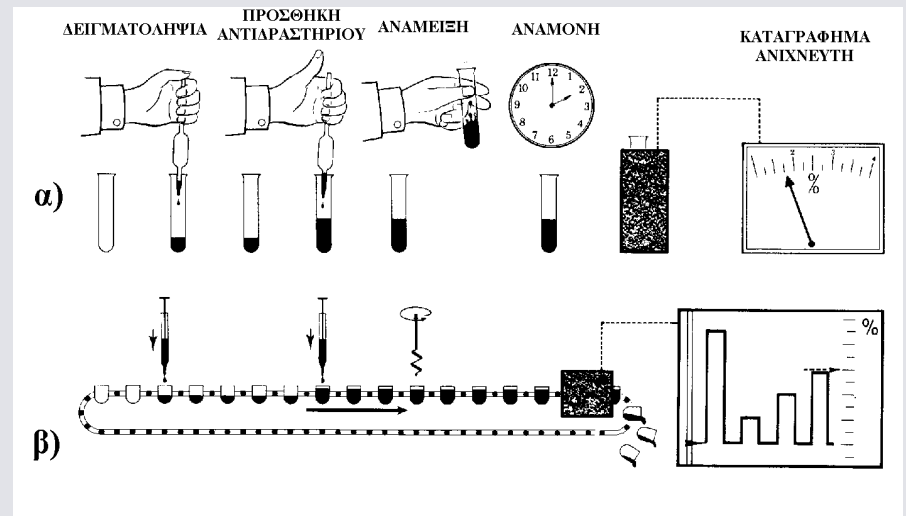
- Κλασσική Ανάλυση



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.



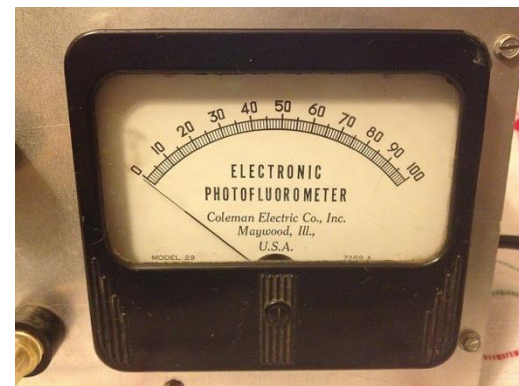
Ask for New Bulletin B-245.

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



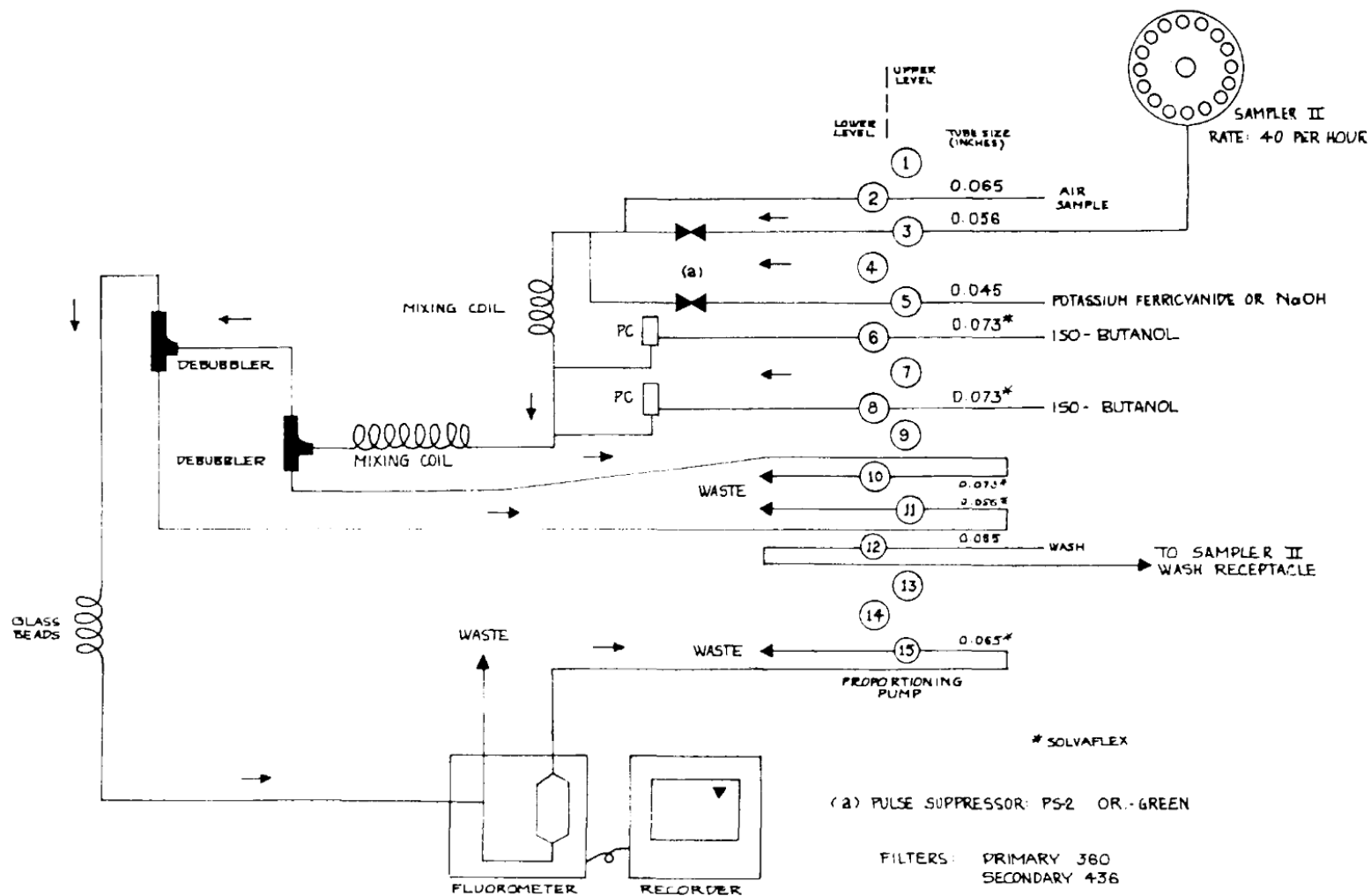


FIG. 1—Diagram of flow-through system for the automated determination of thiamine .

Omer Pelletier, René Brasard,
 Vitamins and Other Nutrients,
 Journal of the AOAC, 54, 5, 1971, 1164-1167

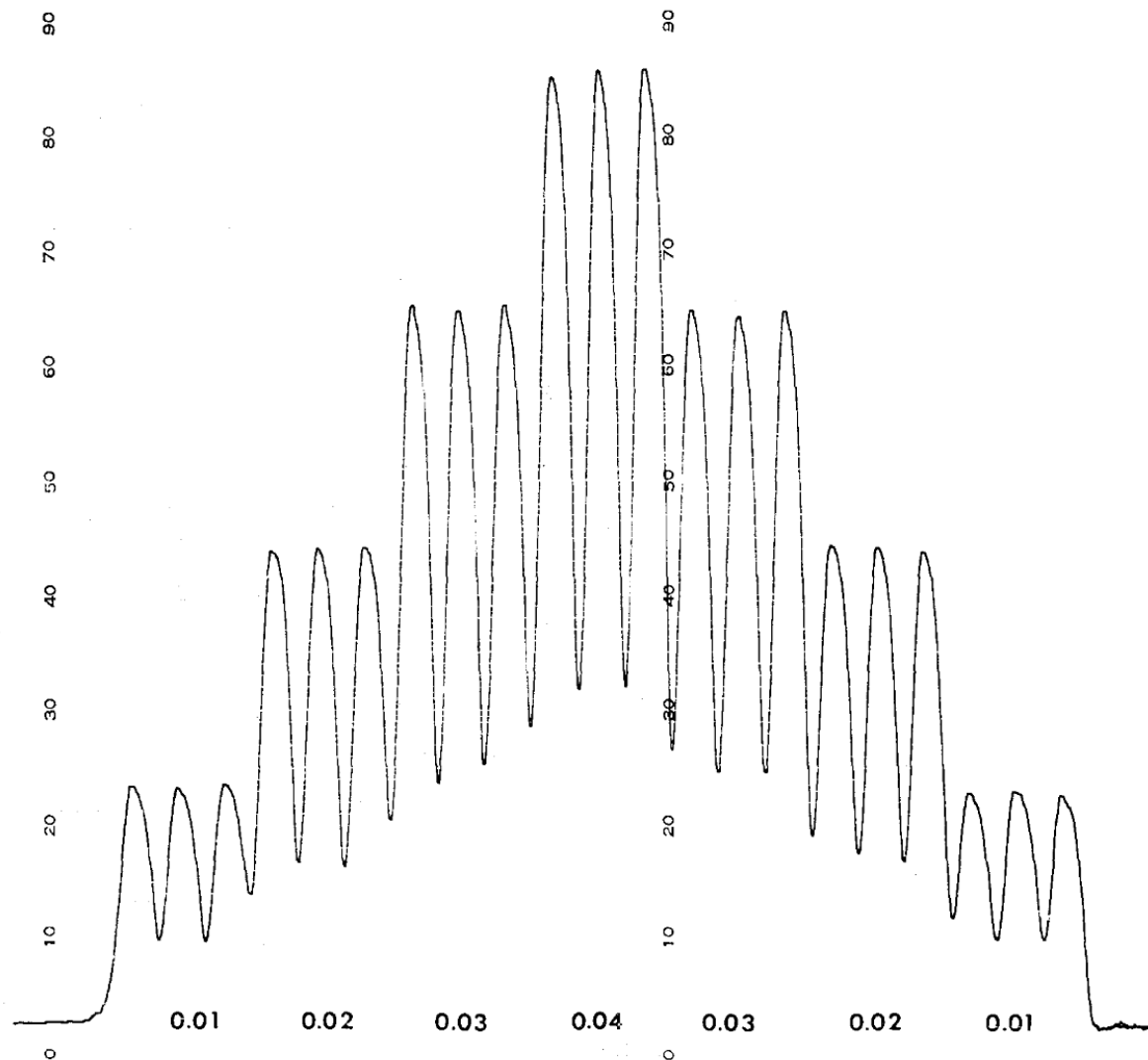
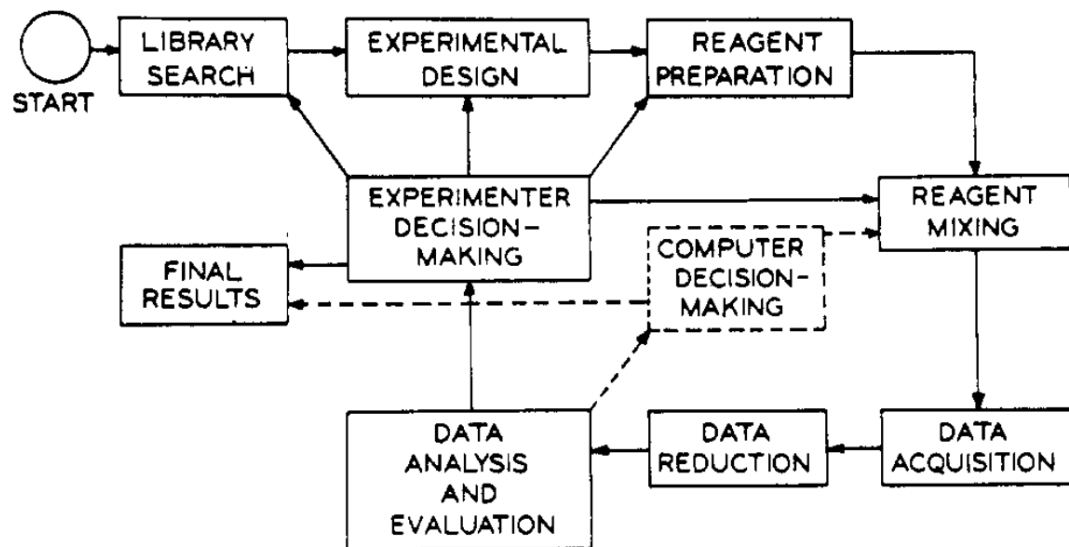


FIG. 2—Typical recording of fluorescence response at various concentrations (μg) of thiamine.

Omer Pelletier, René Brasard,
Vitamins and Other Nutrients,
Journal of the AOAC, 54, 5, 1971, 1164-1167



Σημερινοί υπολογιστές έχουν τουλάχιστον 5 εκατομ. περισσό μνήμη

Figure 1. The steps involved in an analytical experiment

Application of an on-line computer to the automation of analytical experiments, Analytical Chemistry, 1970, 42, 7, 729-737

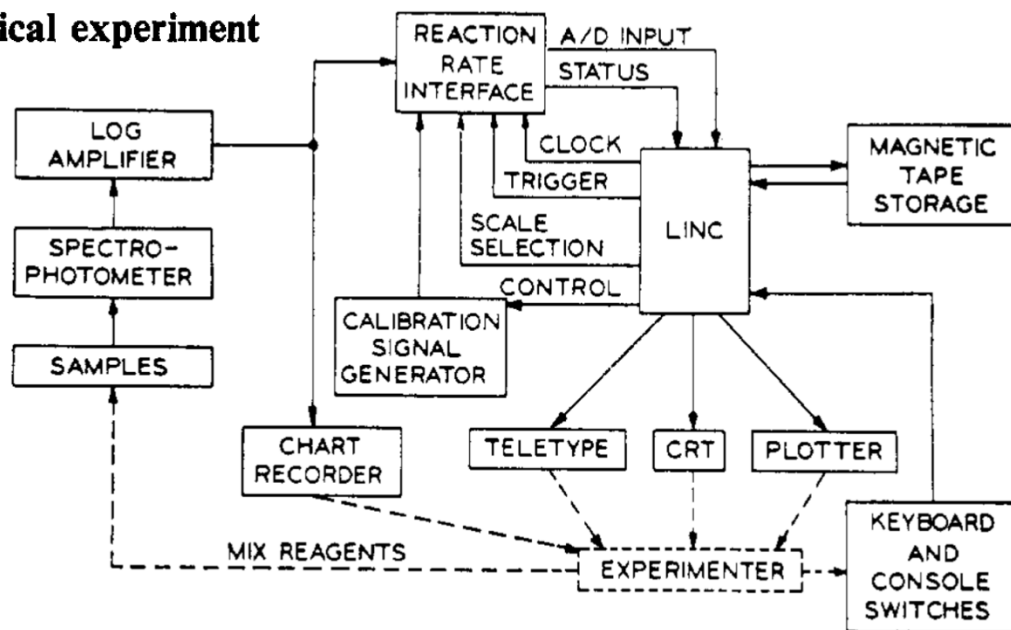


Figure 2. Block diagram showing hardware and functional relationships. Arrows indicate the flow of information and control

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



Διακριτοί αναλύτες

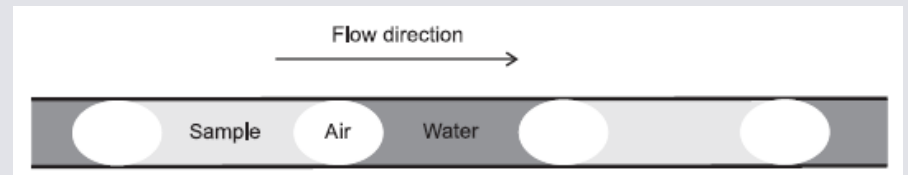
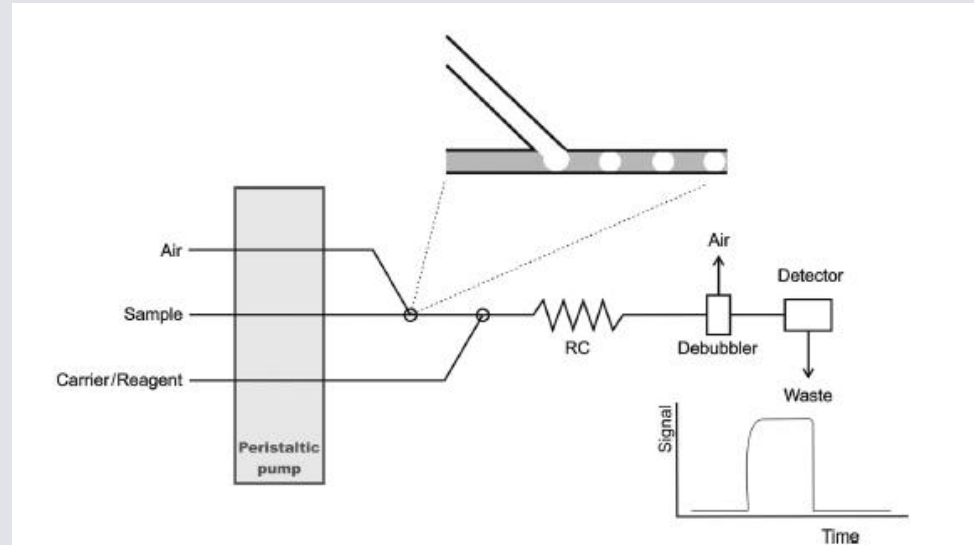


<https://www.youtube.com/watch?v=b4CHI9D6euQ>

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

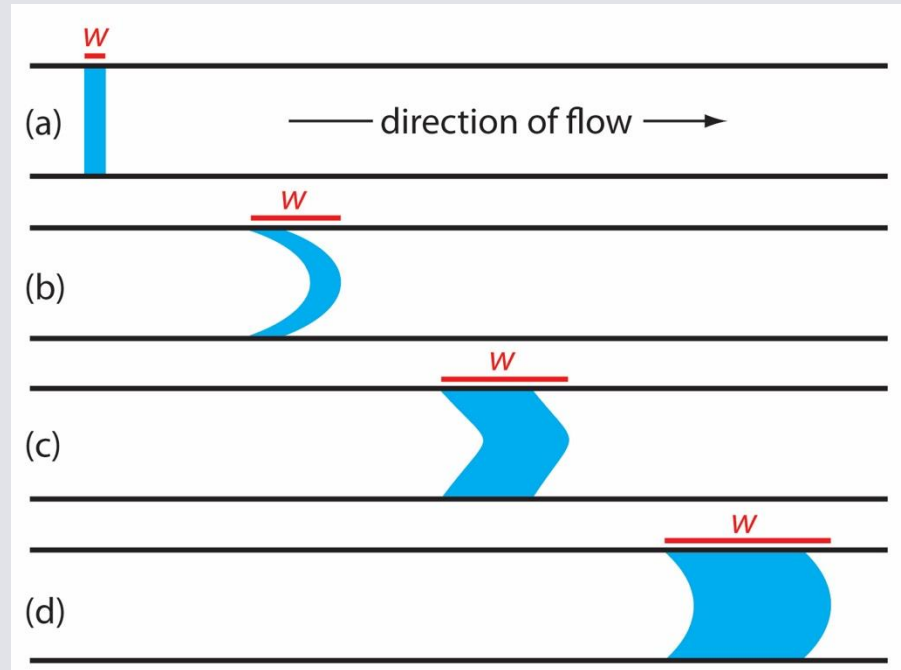
- **Μειονεκτήματα**

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



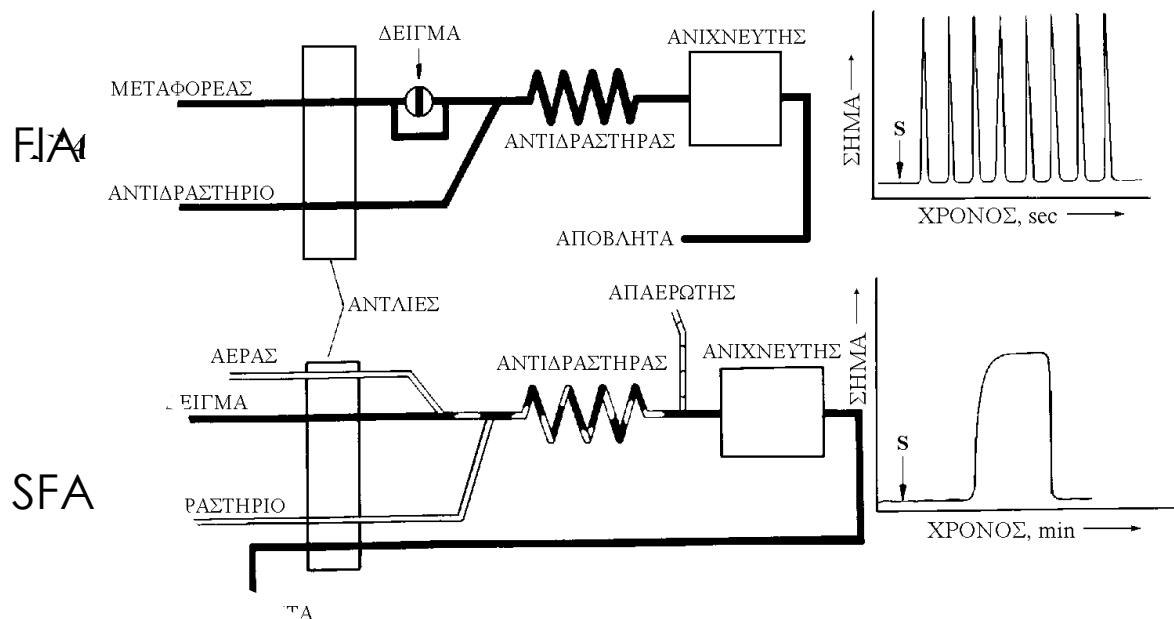
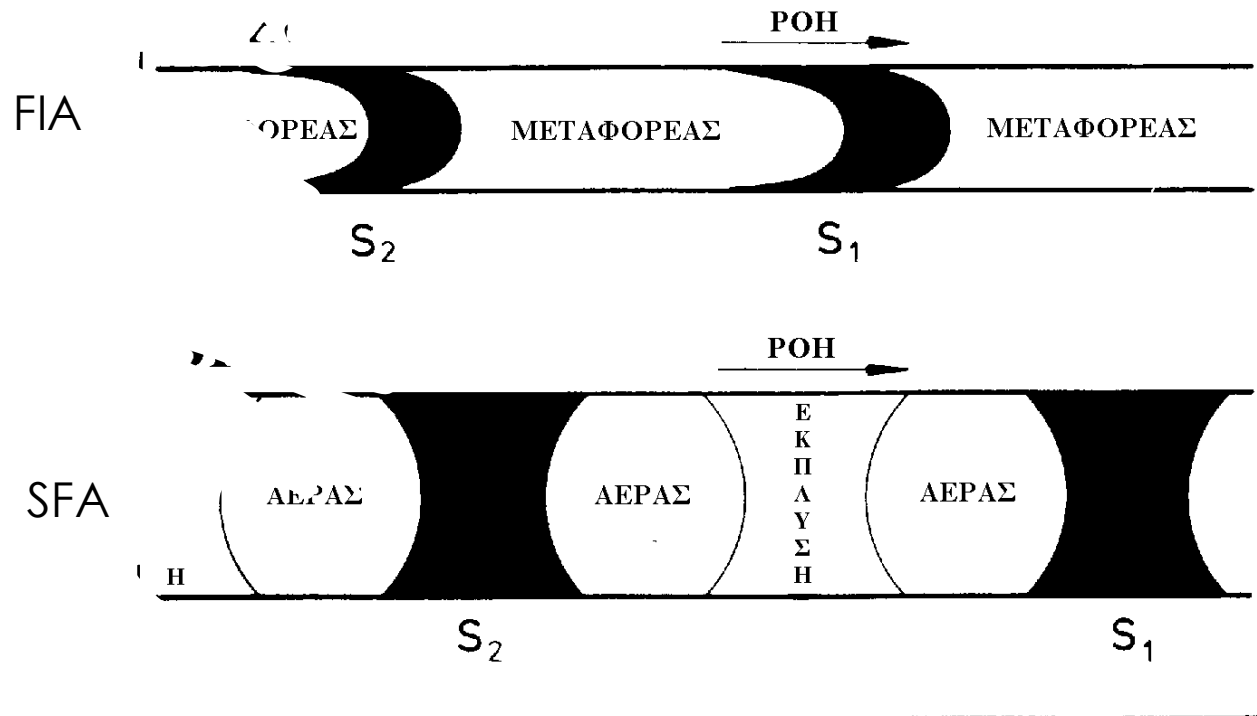
Ανάλυση με έγχυση του δείγματος σε συνεχή ροή (Flow Injection Analysis, FIA)

- 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.



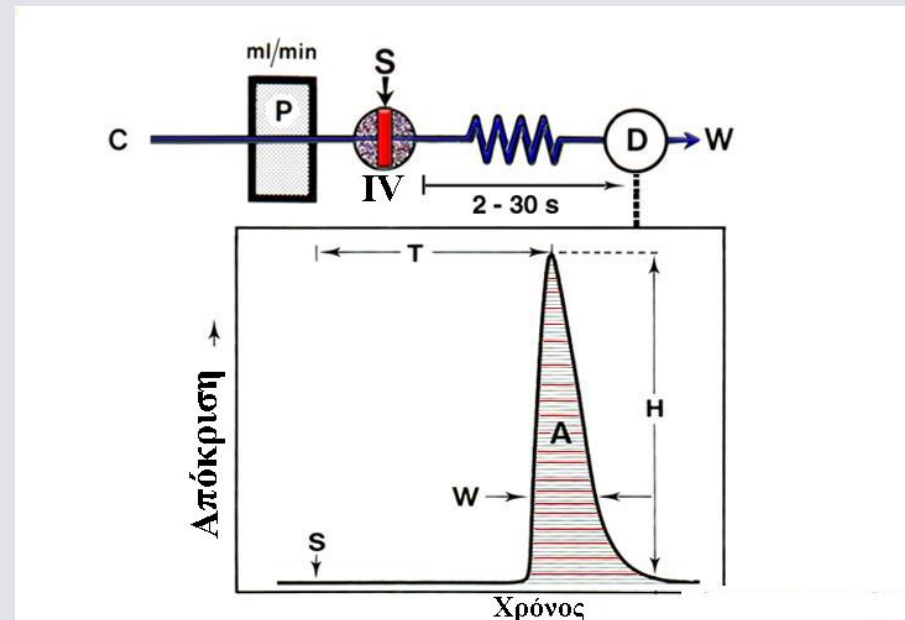
Αλλαγές στην FIA σε σχέση με τη SFA

- 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

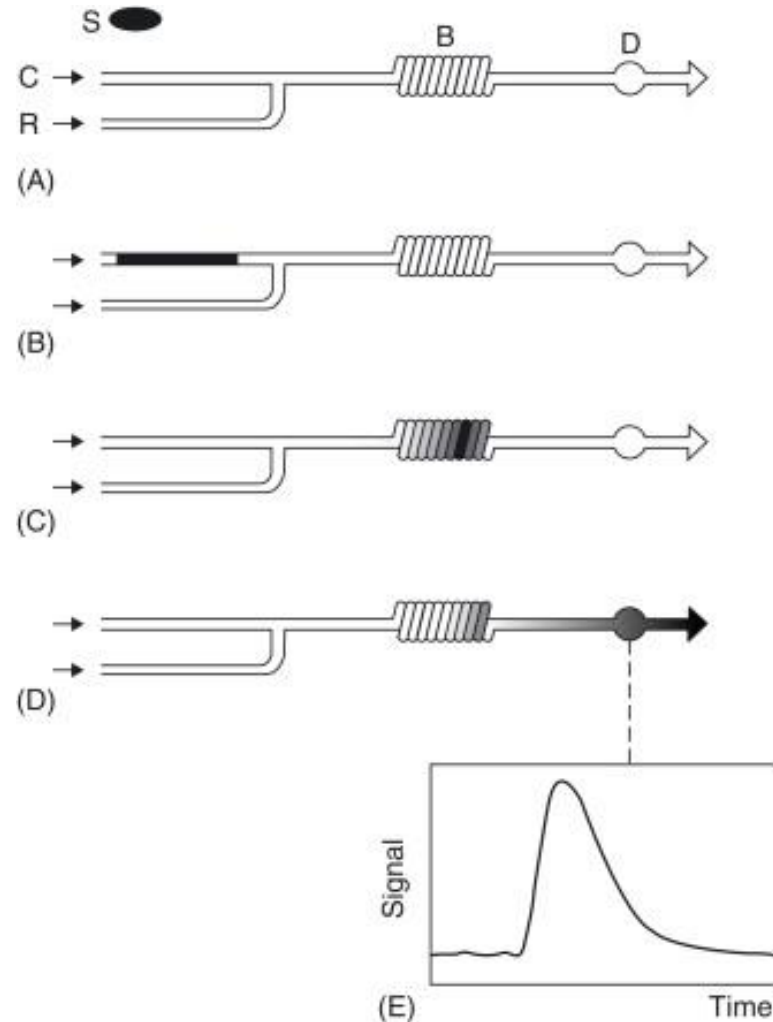




<https://www.youtube.com/watch?v=foUNnKrRoql&t=387s>

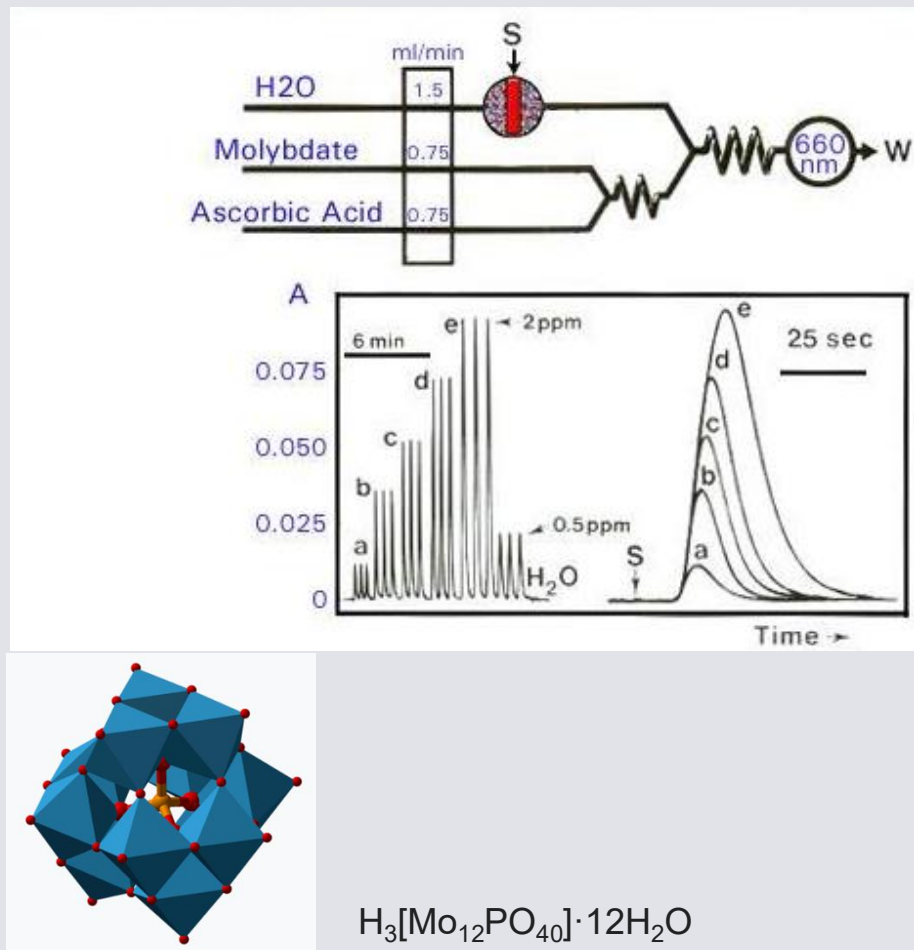
Πολυκάνανα συστήματα FIA

- 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)



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»



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 μL .
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. Δίνεται ότι στα 10 mg/L η απορρόφηση είναι 0.850 AU.
4. Γιατί στο σύστημα το σήμα εμφανίζεται ως πλατώ και όχι ως κορυφή όπως στο FIA.

Είδη ροής

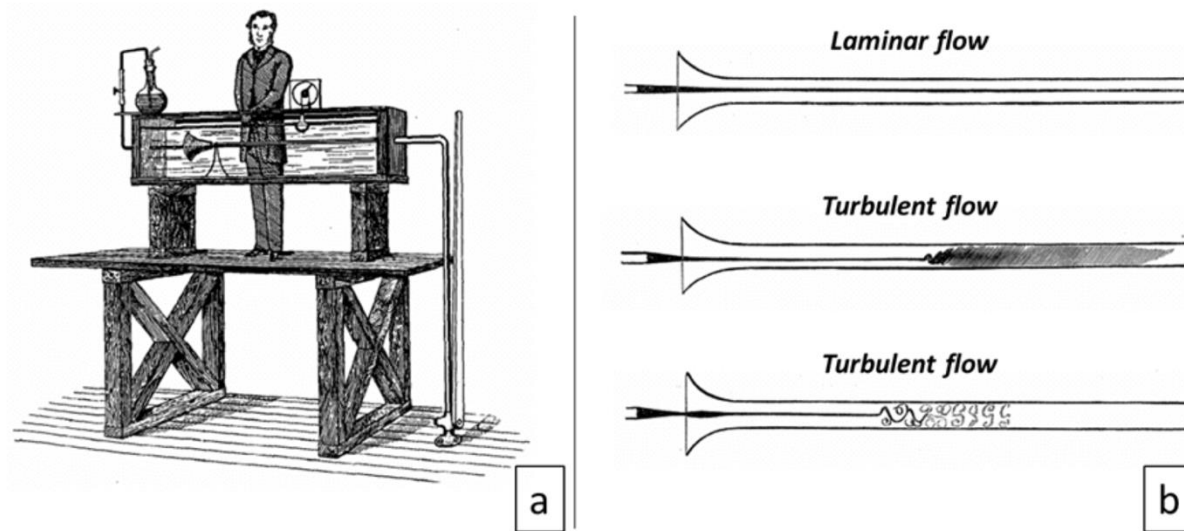
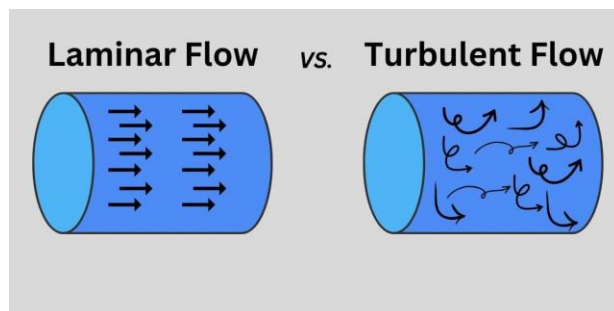


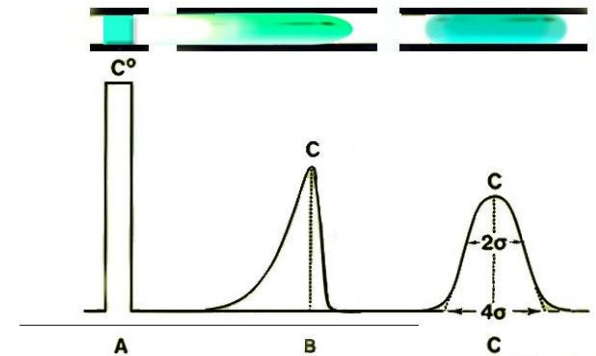
Figure 2: a) Experimental setup established by Osborne Reynolds; b) Experimental visualization of laminar and turbulent flow



$$Re = \frac{\text{inertial forces}}{\text{viscous forces}} = \frac{v \cdot d}{\nu} = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\mu}$$

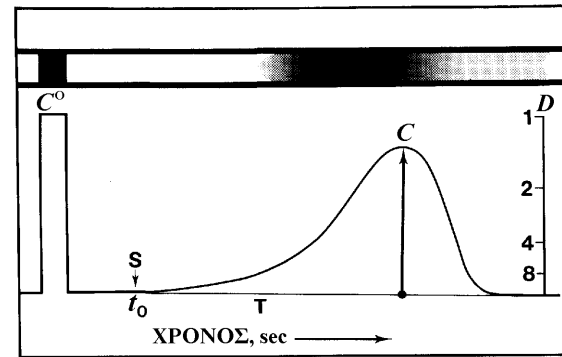
Τι είναι η διασπορά (dispersion)?

- 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)**

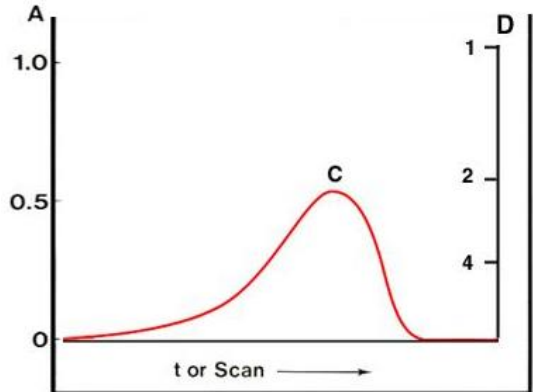


- **Συντελεστής διασποράς**
- **(Dispersion coefficient)**
- $D = C_0 / C$
- Χαμηλός ($D=1-2$)
- Μέσος ($D=2-10$)
- Υψηλός ($D=10-10000$)

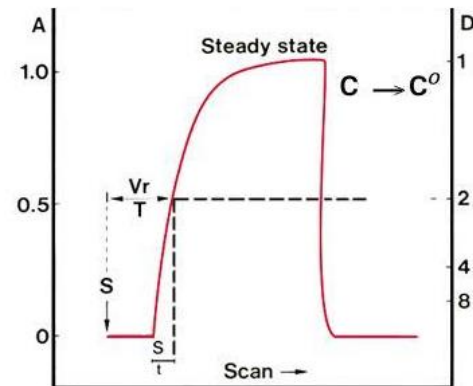
Περισσότερα για τη διασπορά



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



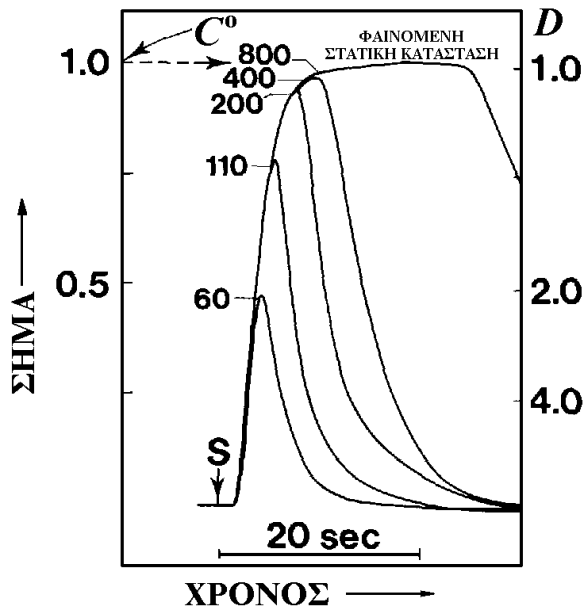
Σε κάποιες περιπτώσεις
επιζητούμε χαμηλή διασπορά
($D=1-2$)



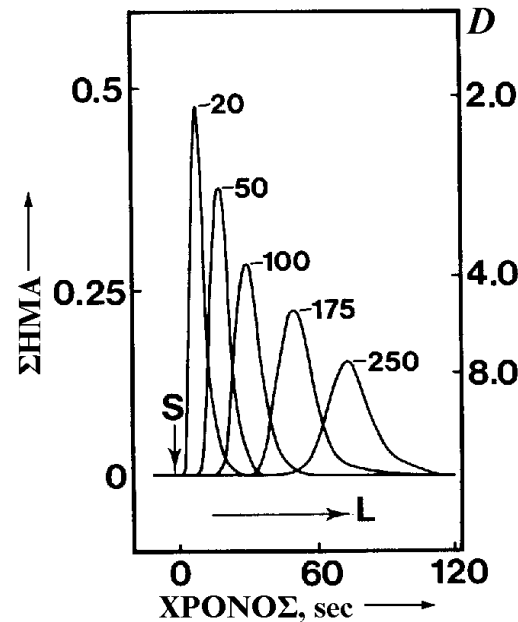
- Η διασπορά εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές:

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

Λίγα ακόμη για τη διασπορά



Διασπορά με διαφορετικούς όγκους δείγματος (60-800 μl)

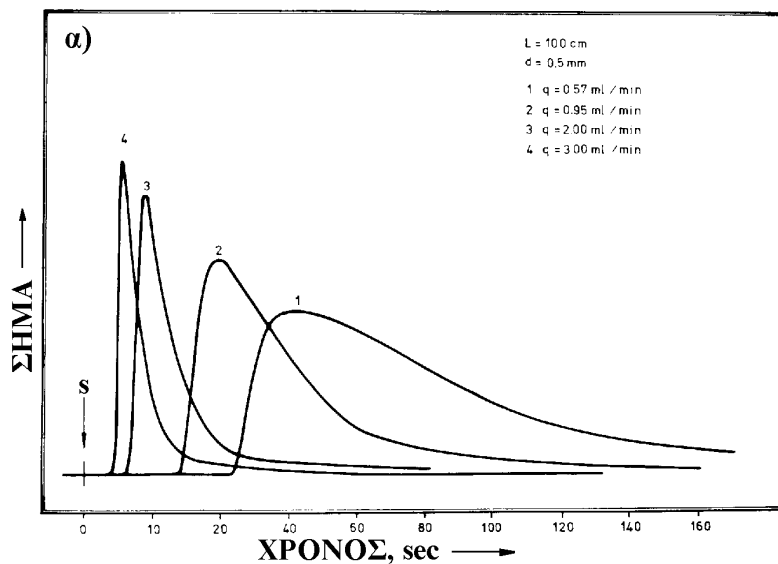


Διασπορά με διαφορετικά μήκη σπειράματος (20-250 cm)

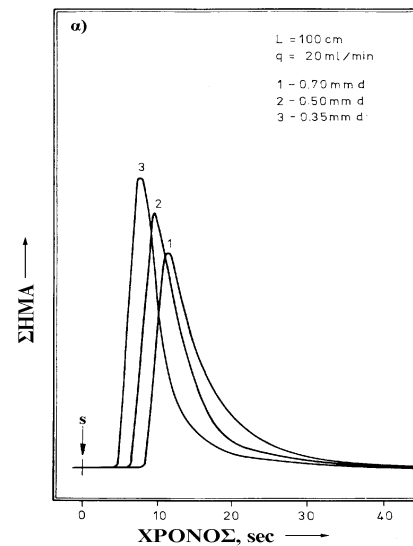
Διασπορά και ταχύτητες ροής/ διάμετρος σπειράμματος

- Η διασπορά εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές:

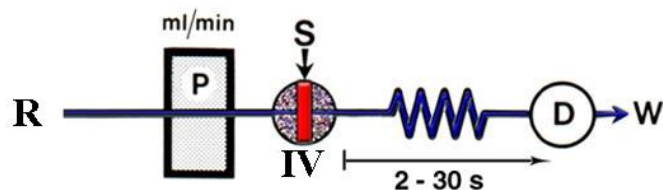
3. Τη ταχύτητα ροής του μεταφορέα
4. Τη γεωμετρία των σωληνώσεων ροής



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

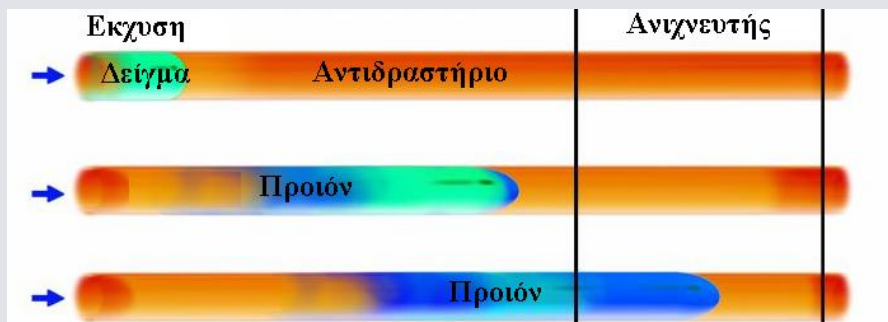


Διασπορά με διαφορετικής διαμέτρου σπείραμα ($0.7\text{-}0.35 \text{ mm i.d.}$)



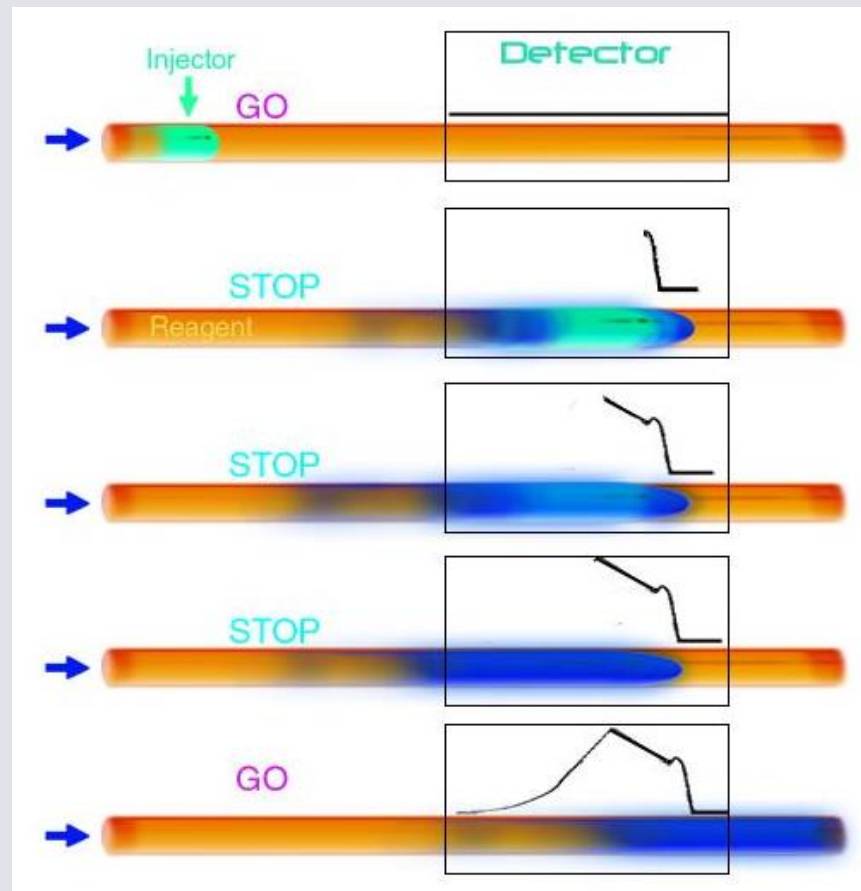
Χημικές αντιδράσεις στη FIA

- 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 αντανakλά 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).



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.



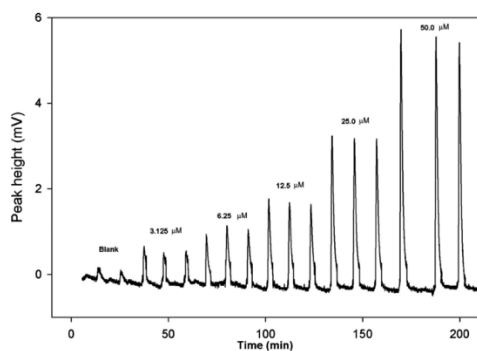
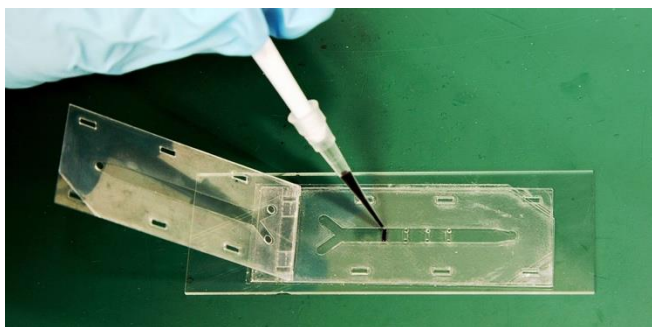
Βελτιστοποίηση των παραμέτρων στη FIA

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

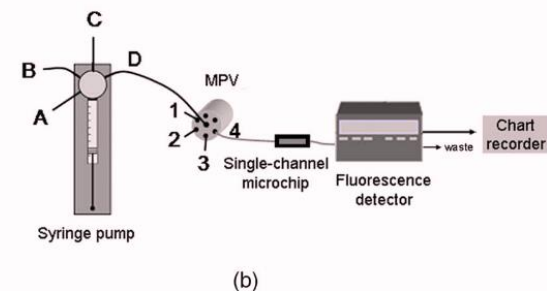
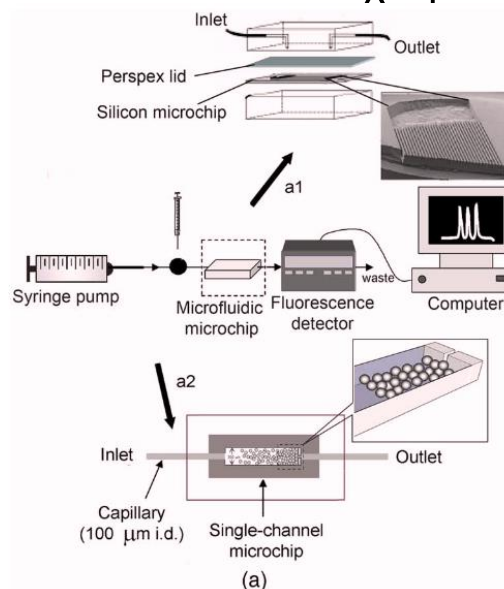
Τα πλεονεκτήματα της FIA

- 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

FLA και μικροκατασκευασμένα συστήματα (microfluidics)



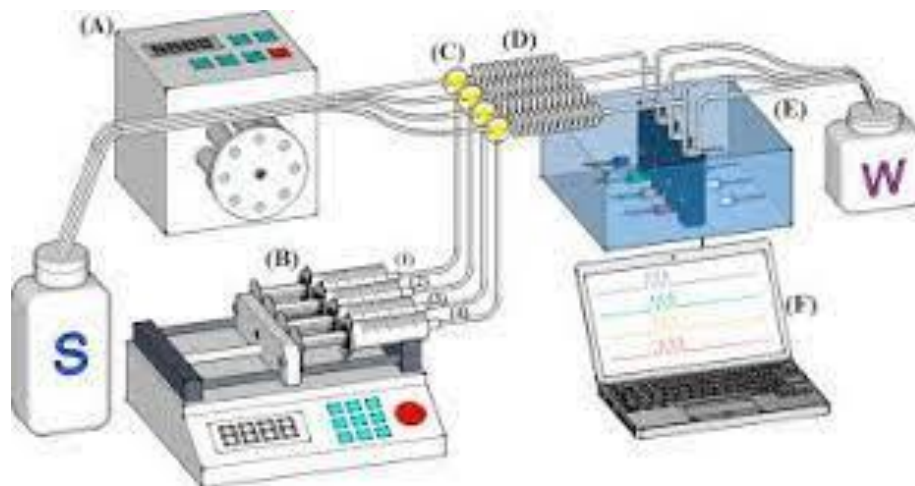
- Προσδιορισμός σακχάρων με χρήση



<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

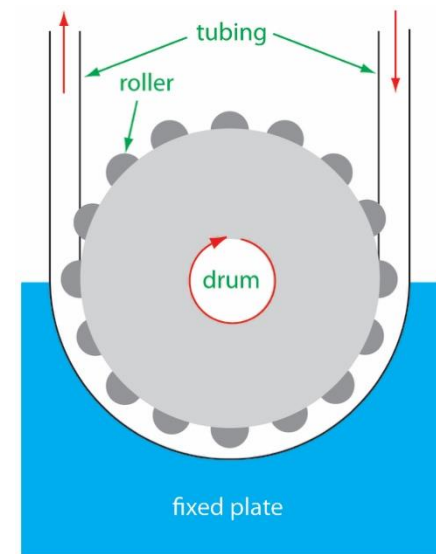
Αντλίες σύριγγας

- **Πλεονεκτήματα:**

- Συνεχής ροή χωρίς παλμούς
- Σταθερή ροή

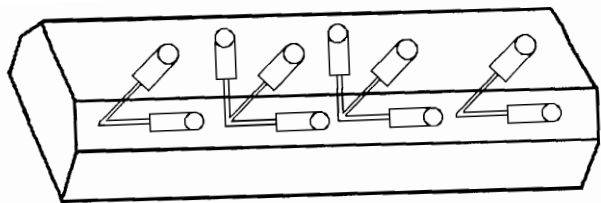
- **Μειονεκτήματα:**

- Χρειάζονται συχνή πλήρωση

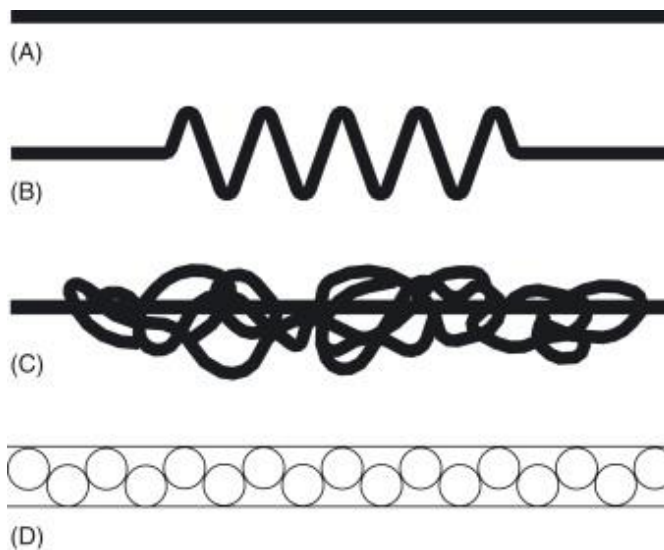


Μίκτες και σπειράματα αντίδρασης στη FIA

Στα πολυκαναλικά συστήματα
χρειάζονται διατάξεις ανάμιξης



Το σπείραμα αντίδρασης
μπορεί να έχει διάφορες
μορφές



Ανιχνευτές FIA

- **Ηλεκτροχημικοί**

- Βολταμμετρικοί
- Ποτενσιομετρικοί
- Πεχαμετρικοί

- **Άλλοι**

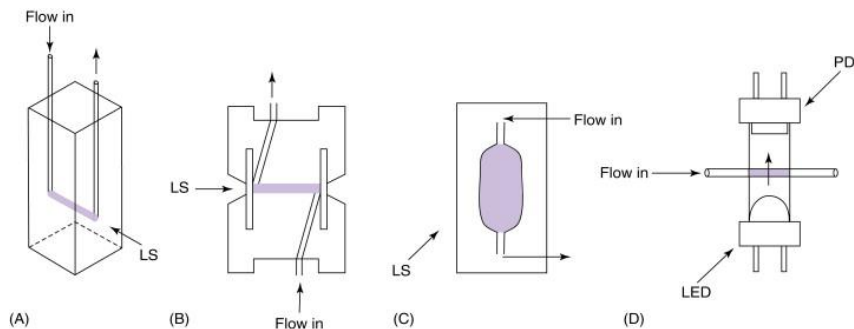
- Φασματομετρίας υπερύθρου
- Φασματομετρίας Raman
- Φασματομετρία Μαζών

- **Οπτικοί**

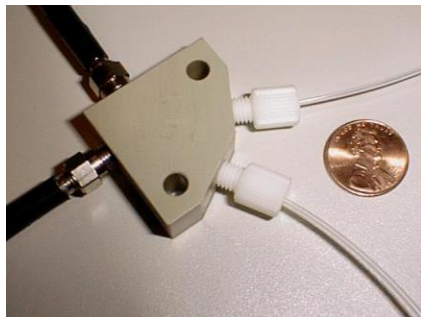
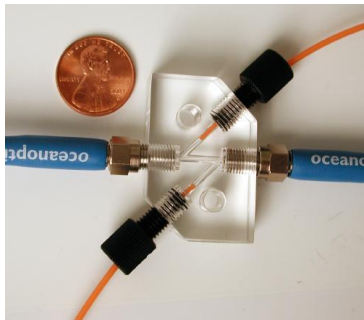
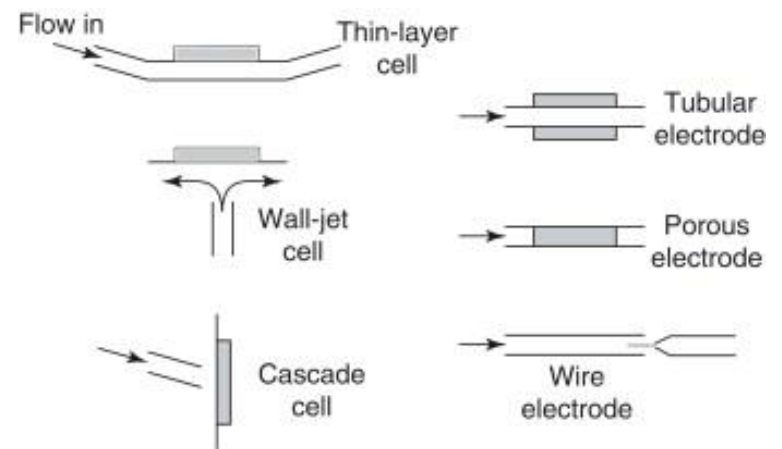
- Μοριακής απορρόφησης
- Χημειοφωταύγειας
- Μοριακής εκπομπής-φθορισμοί
- Ατομικής εκπομπής
- Ατομική απορρόφησης

Ανιχνευτές στη FIA

Φωτομετρικοί

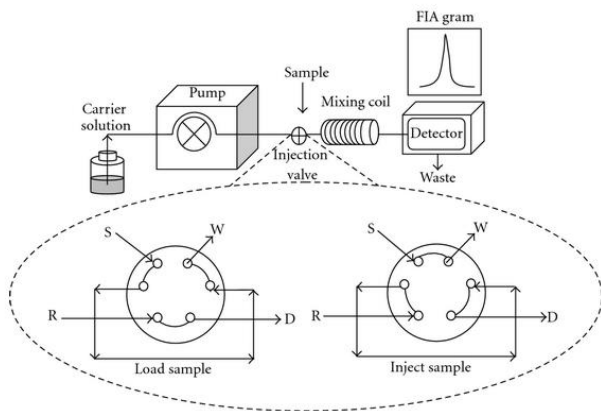


Ηλεκτροχημικοί

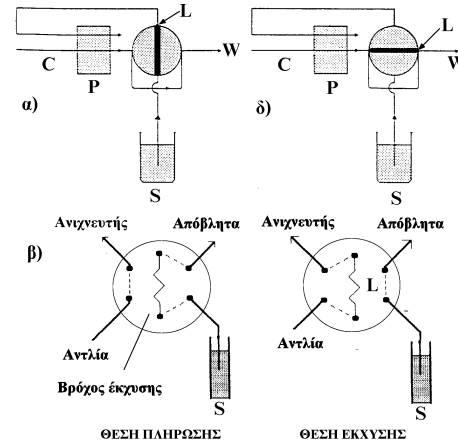


Βαλβίδες δειγματοληψίας στη FIA

Πολλαπλών Θέσεων

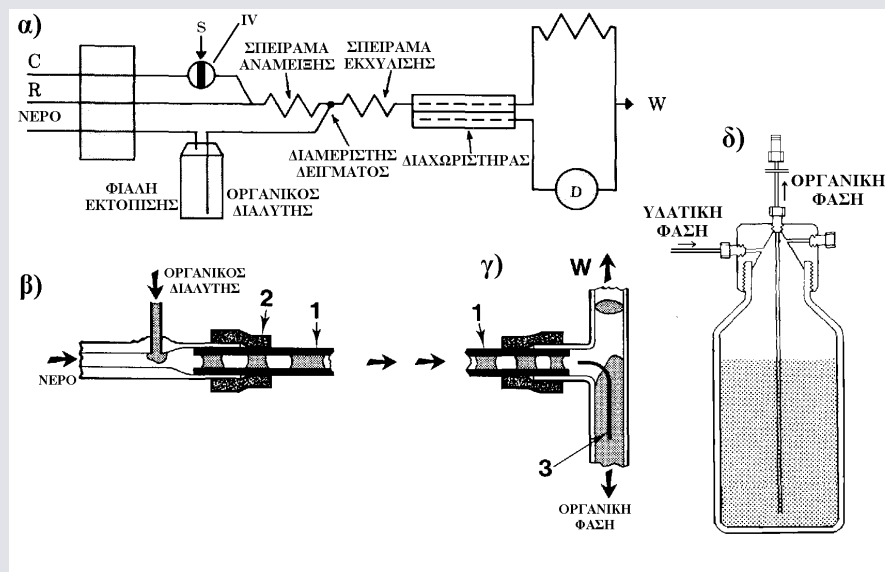


Απλές vs πολλαπλών Θέσεων



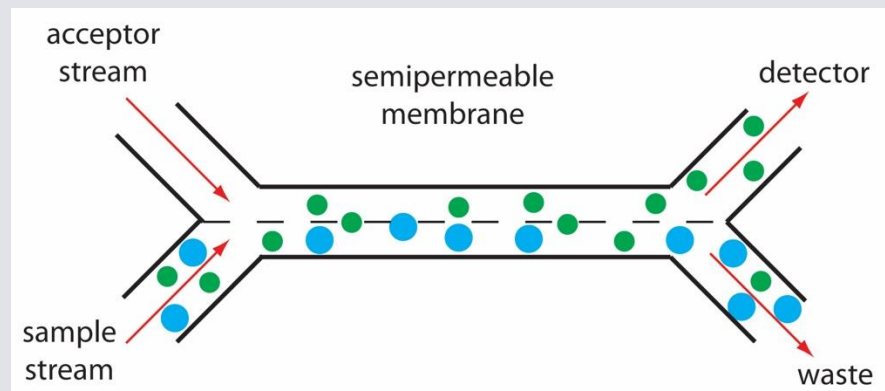
Εκχύλιση υγρό-υγρό με FIA

- 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

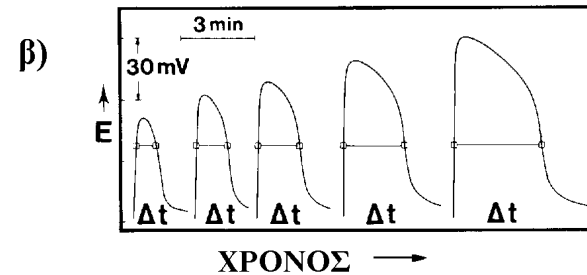
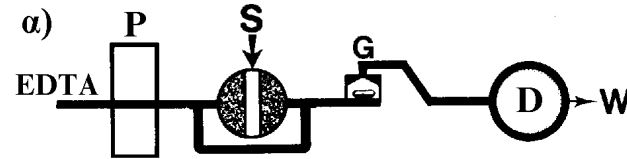
- Στην τεχνική διάχυσης αερίων, το αέριο διαχέεται από ρεύμα του δείγματος (δότης) στο ρεύμα του αντιδραστήριου (δέκτης). Γίνεται διαμέσου μια υδρόφοβης πορώδους και διαπερατής μεμβράνης από Teflon. Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι αυξάνεται σημαντικά η εκλεκτικότητα του προσδιορισμού
- Παράδειγμα προσδιορισμό CO_3^{2-}



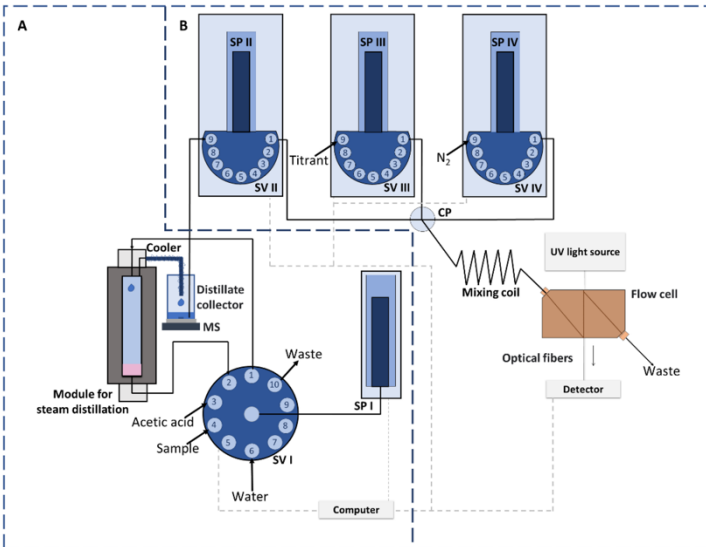
Πληρωμένοι αντιδραστήρες στη FIA

- 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

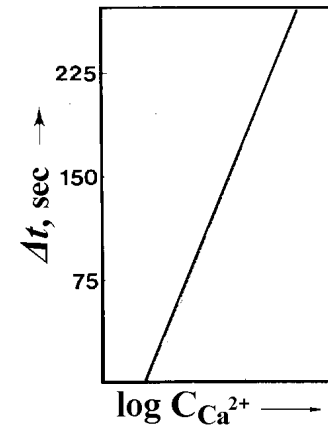
Ογκομετρήσεις με FIA



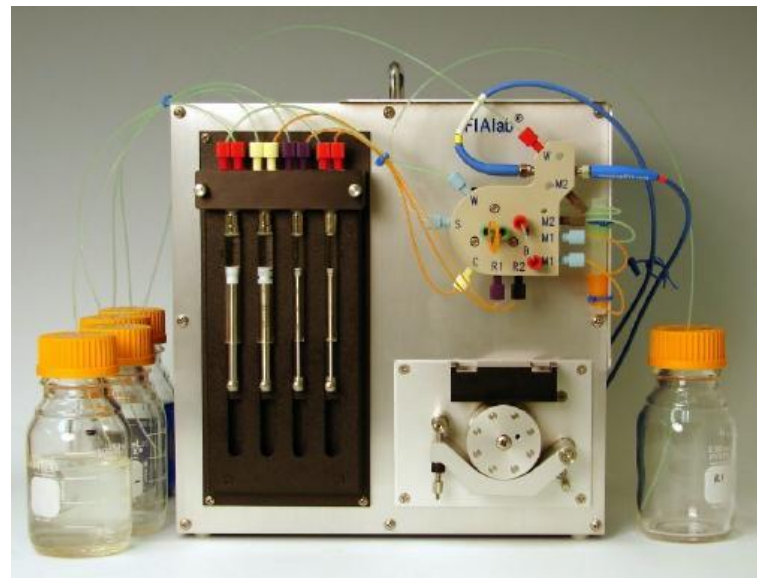
Ποτενσιομετρική ογκομέτρηση διαλυμάτων ιόντων Ca^{2+} με πρότυπο διάλυμα EDTA: το δείγμα S (ιόντα Ca^{2+}) εγχύεται στο ρεύμα του μεταφορέα (EDTA)



Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας σε κρασί



Τυπικά συστήματα FIA



Πεδία Εφαρμογής FIA

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