

Protočno injekcijske metode

FIA metode

Ljubiša Ignjatović



Automatizacija fotometrijskih i spektrofotometrijskih metoda

1957. god prvi automatizovani instrument za hemijsku analizu (Technicon Auto Analyzer)

- Veliki broj kliničkih uzoraka**
- Rutinsko određivanje vrsta**
- Smanjenje cena analiza**

Primena automatskih analizatora proširila se iz kliničkih laboratorija u industrijske.

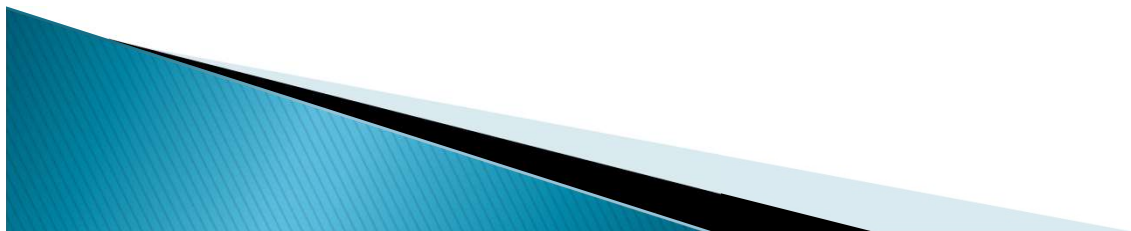
Počelo je rutinsko određivanje vrsta u uzorcima vazduha, vode, zemlje i u farmaceutskim preparatima i poljoprivrednim proizvodima.

Većina primera se završava sa fotometrijskim merenjima



Dva tipa automatskih sastava

- **Diskretni**
- **Kontinualni**
- **Ili njihove kombinacije**



Kod diskretnih instrumenata pojedinačni uzorci se čuvaju odvojeno, autosampleri.

Odvojeni za vreme svake operacije kao što je: uzorkovanje, razblaživanje, dodatak reagensa, mešanje i prenos do mernog instrumenta.

U kontinuiranim uređajima uzorak postaje deo kontinuiranog protoka (protočne struje)

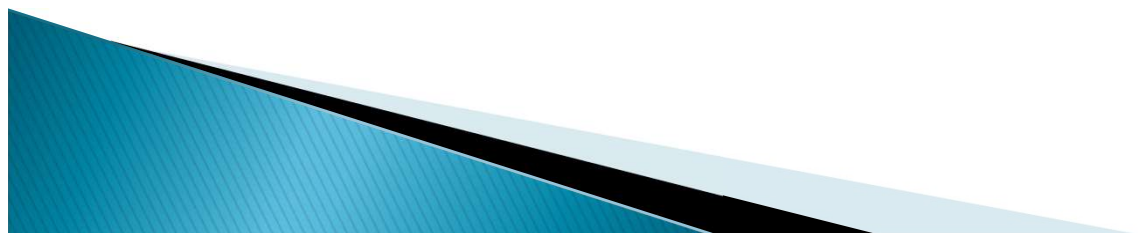


Postoje dva tipa kontinuiranih procesa:

Segmentirane protočne metode (analitička struja se deli u pojedinačne segmente periodičnim ubrizgavanjem vazduha)

i

Nesegmentirane protočne metode (protočne injekcione metode) sa neprekidnom analitičkom strujom



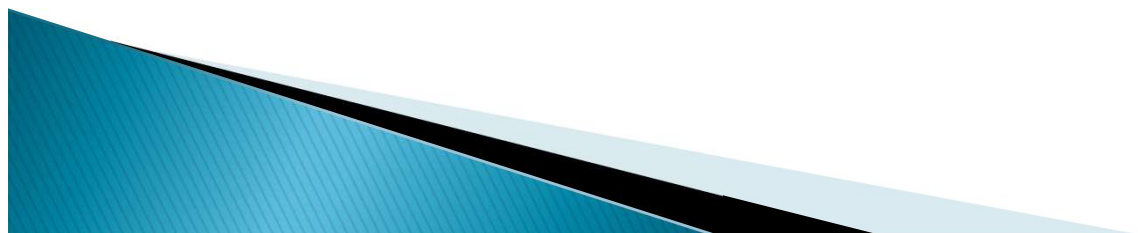
Peristaltičke pumpe

- **Uređaji u kojima se tečnost ili gas potiskuje kroz plastične cevi pomoću valjaka pričvršćenih na osovinu**
- **Ploča pritiska cevi prema valjcima i na taj način obezbeđuje stalni protok**
- **Zapremina je određena unutrašnjim prečnikom cevčica i vremenom trajanja.**
- **Različita veličina cevi omogućava brzine protoka od 0,015 ml/min do 4 ml/min.**

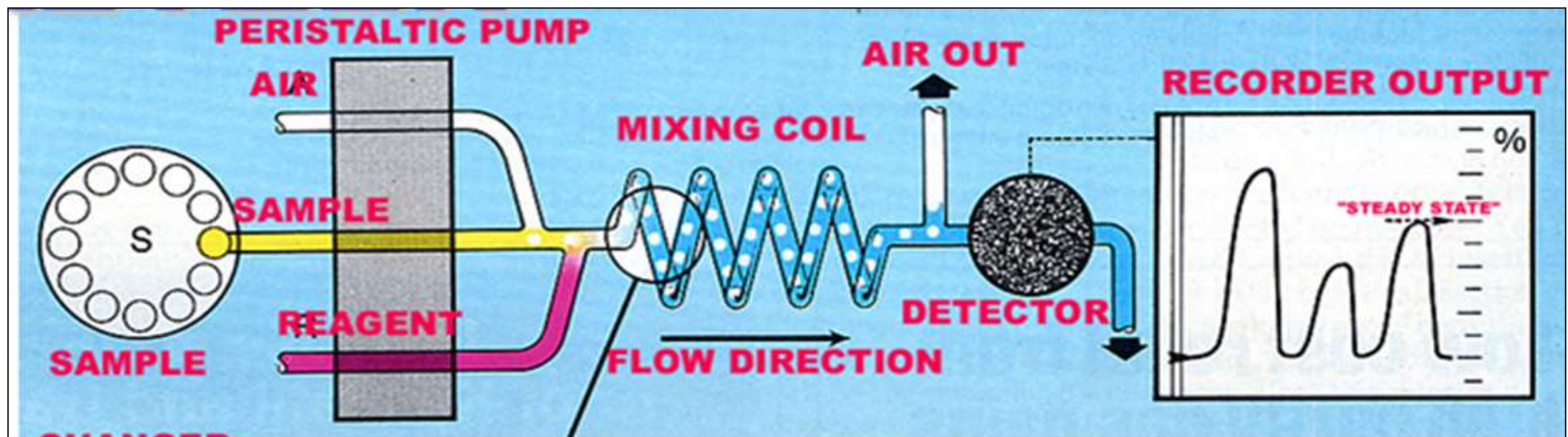


Segmentiranje

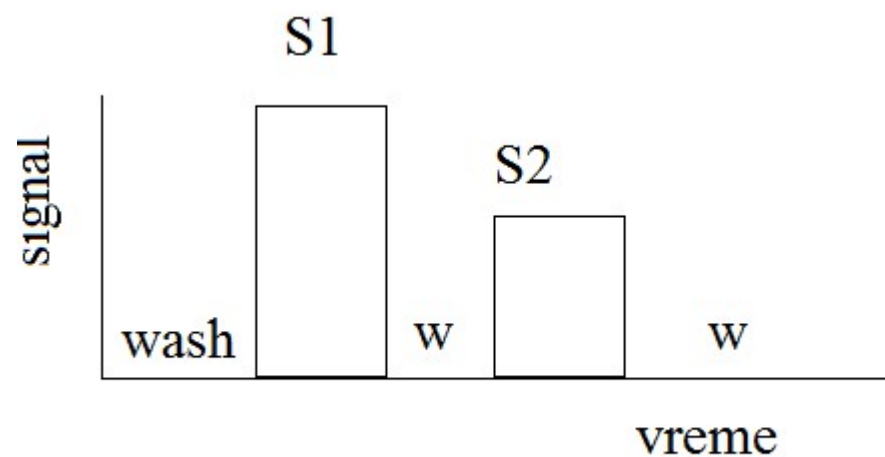
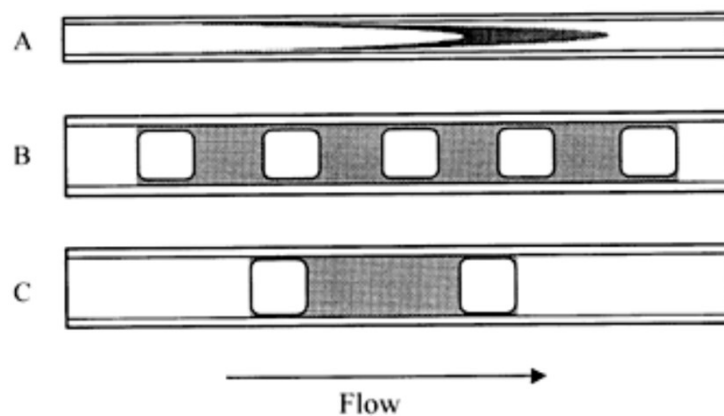
- **Važan deo instrumenta je onaj koji omogućava pumpanje mehurića vazduha u svaku struju.**
- **Razmak između mehurića je takav da se svaki uzorak prenosi u nekoliko protočnih delova.**
- **Pre konačnog merenja struje prolazi uređajem koji uklanja mehuriće i ponovo spaja protoke.**
- **U odsustvu mehurića moguće je zaostajanje repa prethodnog uzorka duž zidova cevi što povećava onečišćenje idućeg uzorka.**
- **Druga svrha mehurića je poboljšanje mešanja uzorka i reagensa.**



SEGMENTIRANE PROTOČNE METODE



Razvijanje boje



Idealni izgled signala detektora iz segmentiranog kontinualnog protočnog analizatora.....

Primena analizatora sa segmentiranim tokom

- **U kliničkim laboratorijama, najprikladniji su za rutinska ispitivanja**
- **U farmaceutskim analizama**
- **Prehrambenim**
- **Poljoprivrednim analizama**



Protočne injekcije metode (*flow injection analysis*) FIA metode

- Ružička i Hansen, 1975 god.-principe protočno-injekcije analize**

- Istovremeno objavljeni patenti Ružičke i Hansena u Danskoj i Stjuarta u SAD-u označili su početak nove tehnologije koja je veoma brzo bila prihvaćena u svetu.**

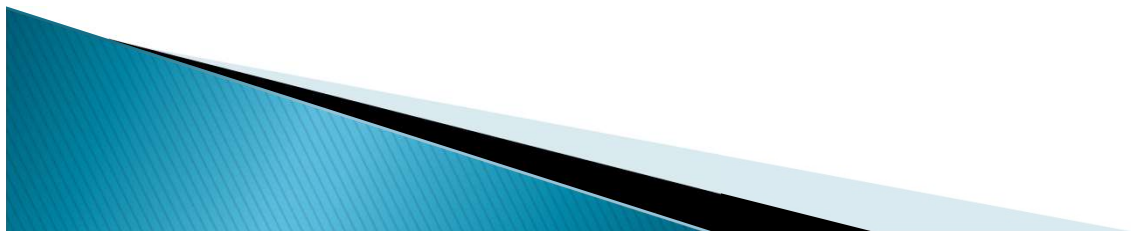
“Flow injection analysis se ne objašnjava već demonstrira!”

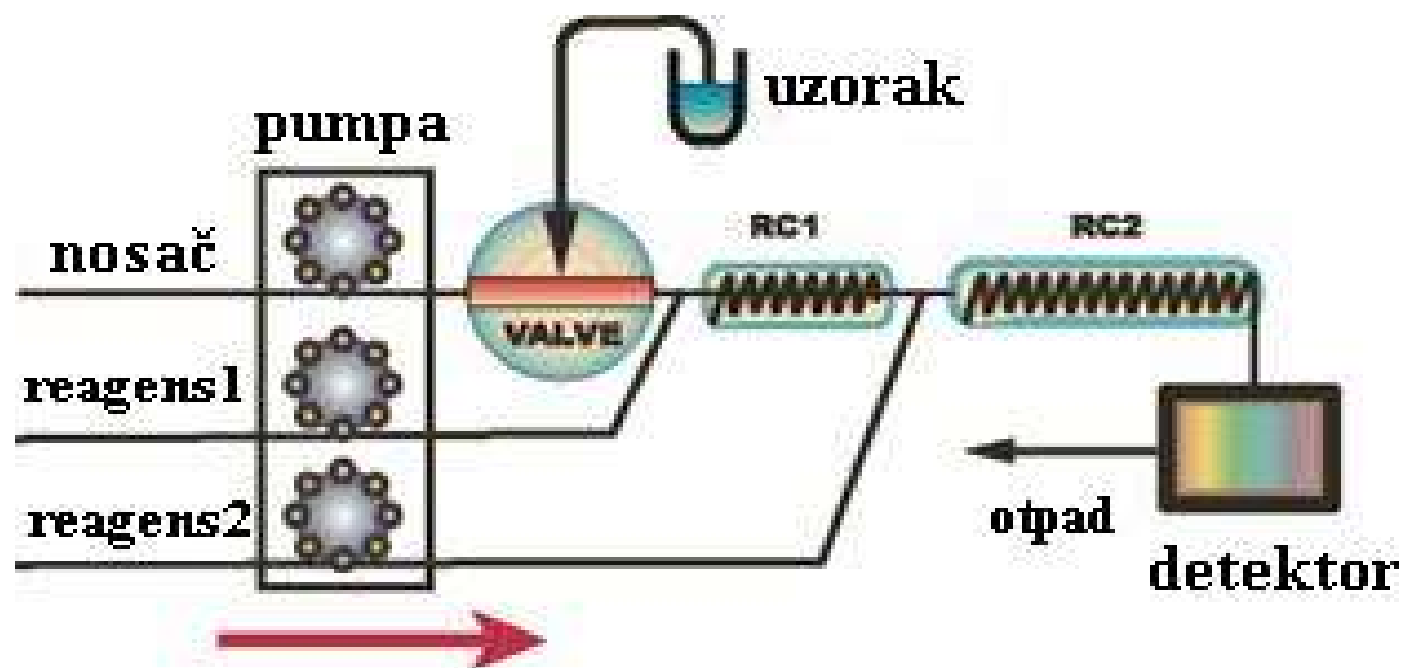


Najnovija metoda kontinuiranog protoka koja omogućava uvođenje vrlo tačnih zapremina uzorka u nesegmentiranu struju nosača.

Može se primeniti na skoro svaku analitičku reakciju čiji se proizvod može detektovati analitičkim senzorom.

merenja ne vrše u ravnotežnim uslovima pa se štedi vreme potrebno za mešanje





RC1, RC2, petlje za mešanje, vrlo efikasan način mešanja uzorka sa nosačem ili reagensima uz min. razblaživanje

- ▶ **Prva faza u FIA procesima je uzorkovanje.**

Uzorak je odmeren i injektovan u struju nosača, jednostavnim injekcionim ventilom.

- ▶ **Druga faza je transformacija uzorka u vrstu koja će biti detektabilna i**
- ▶ **treća faza je kada analizirana supstanca ili njegov derivat daje signal koji se koristi za kvantifikaciju.**
- ▶ **Prva i treća faza su konvencionalne tehnike a druga faza srce FIA tehnike.**

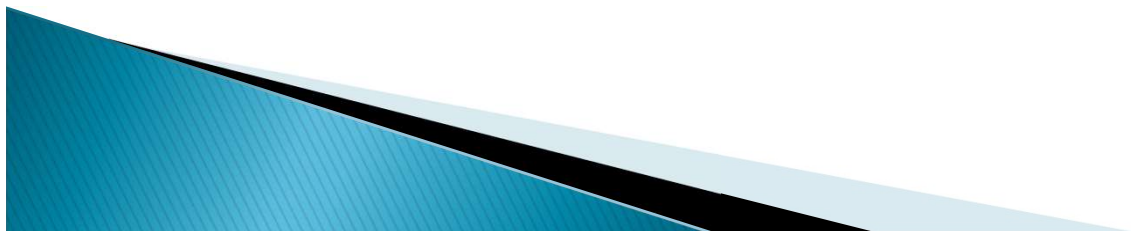


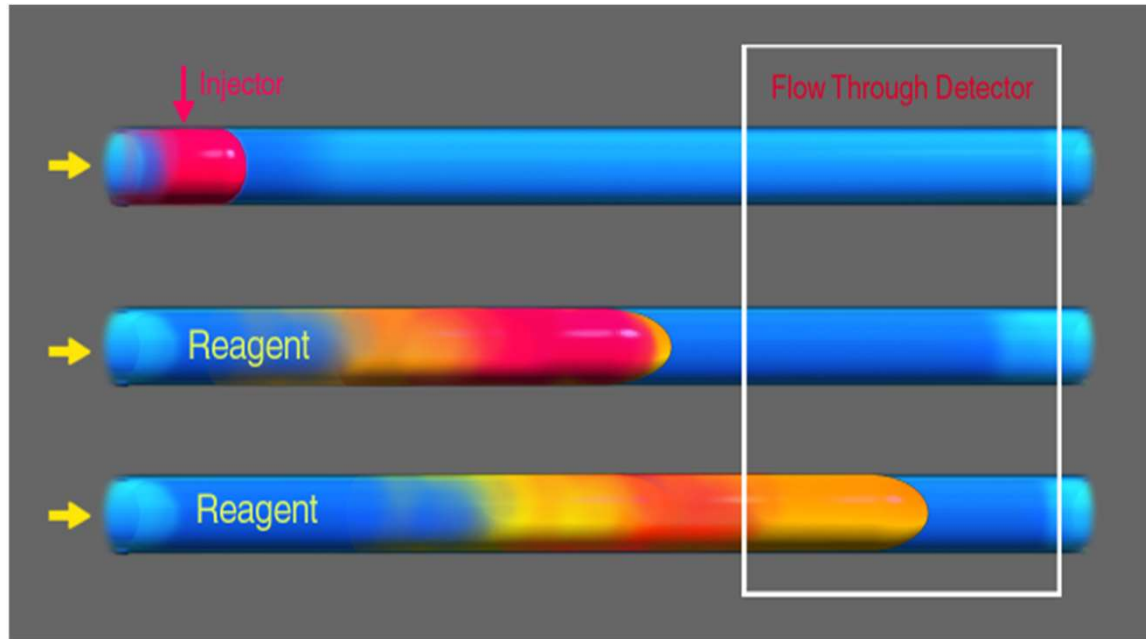
•FIA kriva je rezultat dva procesa:

fizički proces disperzije zone uzorka unutar struje nosača i hemijski proces formiranja reakcionih proizvoda.

- razblaživanje uzorka prouzrokovano kretanjem injektovane zone uzorka (disperzija u struji nosača) i**
- povećanje koncentracije reakcionih proizvoda tokom transporta od injektora do detektora.**

Oba procesa se dešavaju simultano i doprinose, zajedno sa dinamičkim karakteristikama detektora, izgledu FIA krive.





1- tačna V analita unosi se u tok reagensa

2- uzorak se kreće, meša sa reagensom i formira proizvod

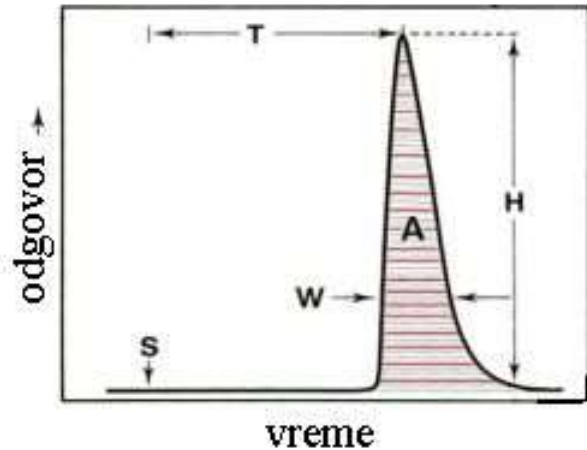
Obim mešanja i dužina trajanja se kontroliše protokom, obimom i geometrijom kanala.

vremenski interval između injektiranja uzorka i detekcije analita je reproduktivno. uzorci su obrađeni na isti način, omogućavajući poređenje sa standardima

Princip metode

- **Odmah nakon injektiranja uzorka zona uzorka ima pravougaoni koncentracijski profil.**
- **Prolaskom uzorka kroz cevi dolazi do širenja trake i disperzije (raspršivanja) pa profil poprima oblik pikova**





Visina i oblik FIA signala zavise od: V_{uzorka} , dužine i geometrije cevčica, brzine tokova, disperzije zone uzorka i reagensa i učestalosti ubrizgivanja uzoraka

- Parametri kao što su brzina tokova, tip reaktora, dužine cevi, se slučajno odabiraju, a zatim prilagođavaju u toku rada.**



DISPERZIJA

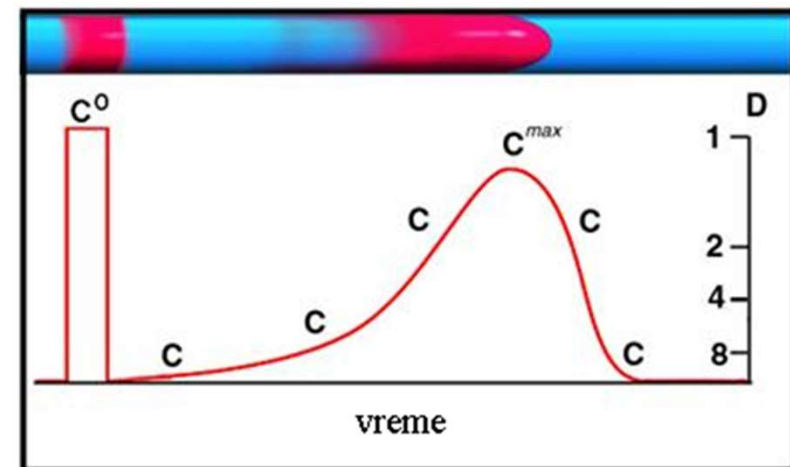
Disperzija $D = C_0/C$

D = koeficijent disperzije predstavlja odnos koncentracije u momentu ubrizgavanja (C_0) i koncentracije koja se dobija kao analitički odgovor detektora (C) posle disperzije

Granična disperzija $D = 1-2$

Srednja disperzija $D = 2-10$

Visoka disperzija $D = 10-10000$



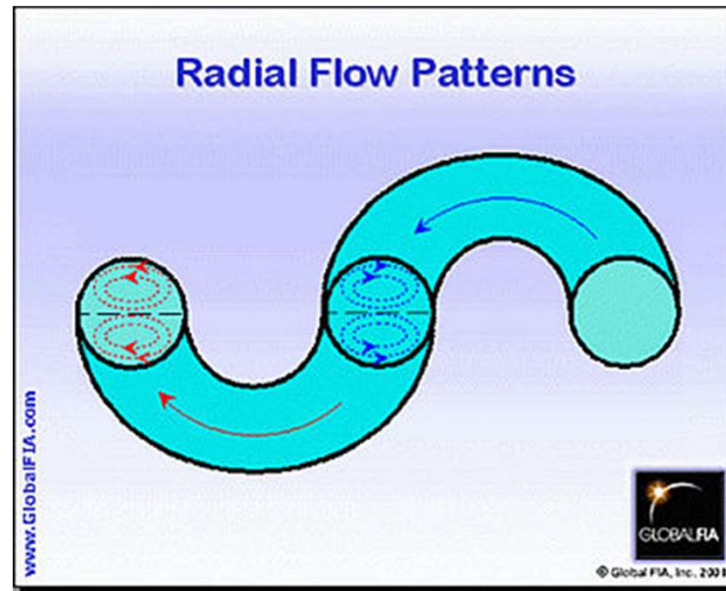
Postoje dve vrste disperzije u FIA sistemima:

- **aksijalna i**
- **radijalna**

Aksijalna disperzija se javlja u pravcu toka toka i izaziva veća razblaženja i širenje pika od radijalne disperzije. preovlađuje u ravnoj cevi.

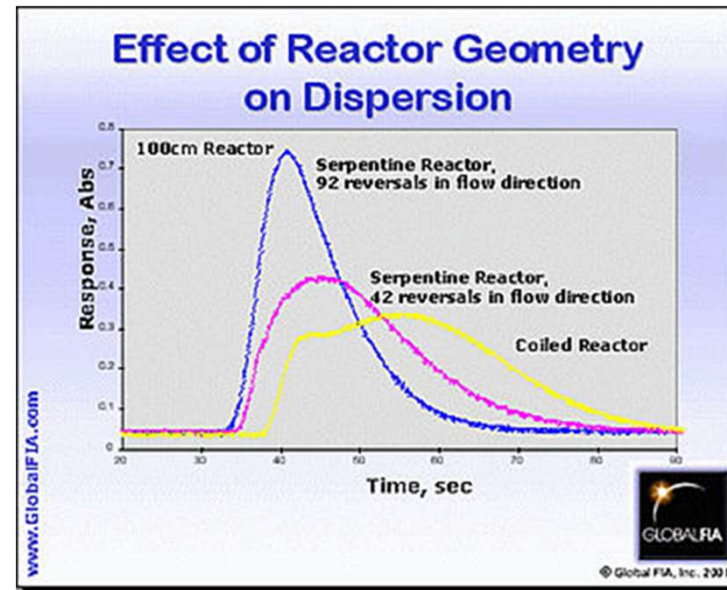
Radijalna disperzija je uzrokovana tokovima koji cirkulišu normalno na pravac toka, i na taj način izazvaju mešanje sa minimalnim razblaživanjem i širenjem pika.





Promene na putu protoka, na primer u petljama za mešanje, a posebno gde su česte i oštre promene u pravcu okreta unapredjuju radijalnu disperziju. Petlje za mešanje dovode do veće osetljivosti i užih vrhova.





Preokret u radijalnom protoku sa svakim preokretom u smeru protoka nosača je veoma efikasan za mešanje uzorka sa nosačem (reagensom) sa minimalnim razblaživanjem.

Efekat na formu pika je ogroman

Ako se porede pikovi dobijeni sa istom dužinom cevi reaktora za normalno namotani reaktor, serpentinski reaktor sa 42 okreta i serpentinski reaktor sa 92 namotaja.

Ako je sistem dizajniran da se dobije mala (tzv. Granična) disperzija onda uzorak stiže do detektora u nerazblaženom obliku.

Takvi sistemi se koriste za:

- **pH ili konduktometrijska određivanja;**
- **automatsko injektiranje uzoraka u AAS ili ICP instrumente;**
- **kinetička određivanja ili funkcionalna određivanja u živim ćelijama.**



Sistemi sa srednjom dispezijom daju "tipičan" FIA signal, gde je C_{max} od 50% do 10% od koncentracije uzorka koja je injektovana.

Sistemi sa velikom disperzijom se koriste kada su koncentracije uzoraka velike za radni opseg primenjenog detektora.



Tipičan FIA sistem radi:

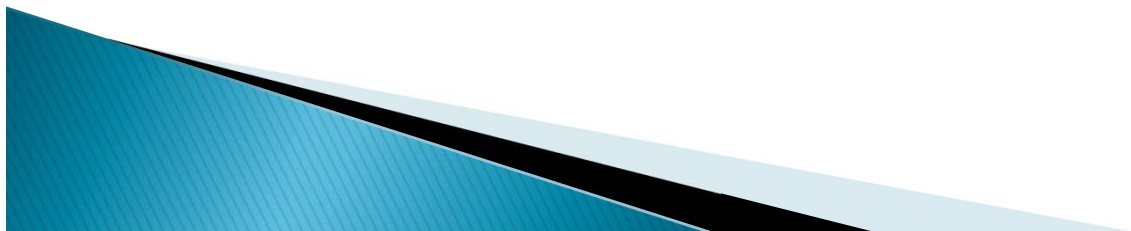
Brzina protoka: 1 -2 ml/min po kanalu

Injektovana zapremina: 50-300 μ L

Prečnik cevi: 0,5 mm

Dužina cevi: do 2 m

Brzina uzorkovanja: 1-2 uzorka/min



Injektori

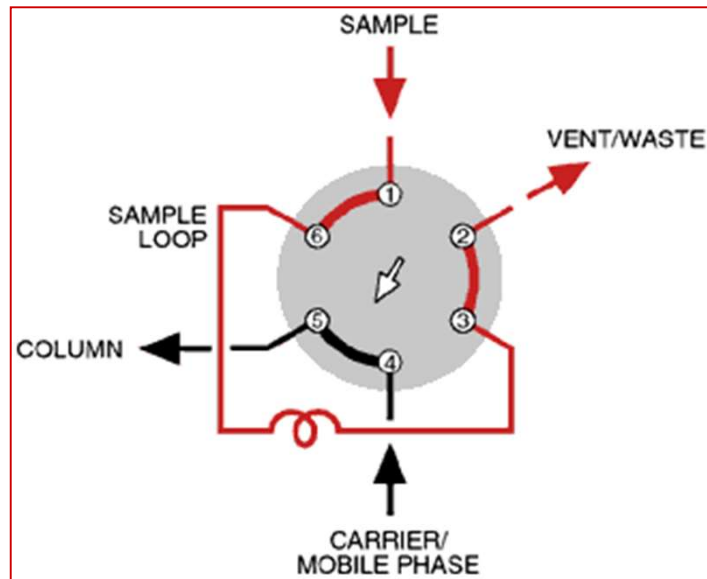
- **Zapremine uzoraka koje se injektiraju u protok kreću se u opsegu od 5 do 500 μl , pri čemu je tipična zapremina 10 do 30 μl .**
- **Bitno je da se uzorak injektira brzo**
- **Ne sme da remeti protok nosača (tu su zahtevi mnogo stroži nego u segmentiranim metodama)**
- **danas su to petlje za uzorkovanje slične onima koje se primenjuju u (HPLC) hromatografiji.**



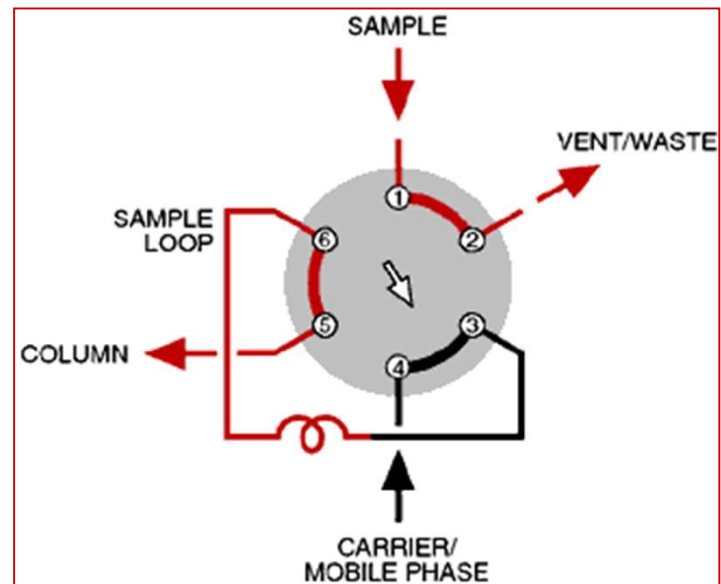
Valves:



Load sample loop:



Flow through:



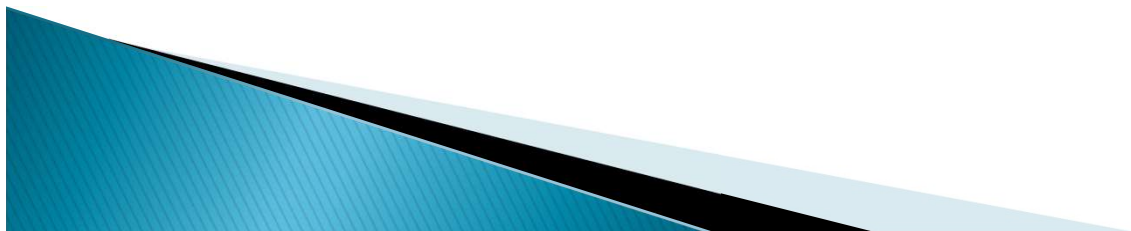
Poređenje HPLC sa FIA

- **Cilj hromatografije je da odvoji i detektuje nekoliko komponenti uzorka**
- **HPLC zahteva visok pritisak**
- **Nema tu kontrolu disperzije uzorka ni reproduktivnost**
- **Injektiranje je i kod jedne i kod druge**
- **FIA koristi detektujući signal samo jedne komponente uzorka**
- **Nizak pritisak , 7 psi**
- **Nekada koristi male kolone ali ne može da razdvaja tom rezolucijom**



Poređenje segmentirane tehnike sa FIA

- **Osnovna razlika je segmentiranje**
- **Ono dozvoljava identitet svakog uzorka**
- **Ali segmentirani kontinualni sistem radi pod ravnotežnim (*steady state*) uslovima. To znači da podešavanje sistema zahteva podešavanje vremena**
- **U FIA postizanje steady state nije neophodno jer nema reproduktivnog vremena i kontrolisane disperzije uzorka**
- **Za većinu detektora vazduh mora da se ukloni**
- **Veličinu mehura je teško kontrolisati**

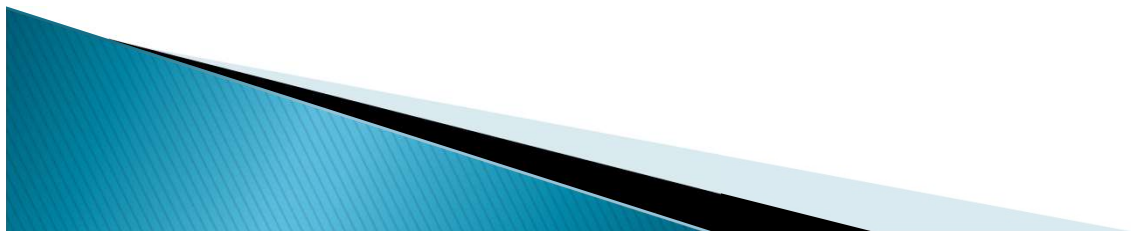


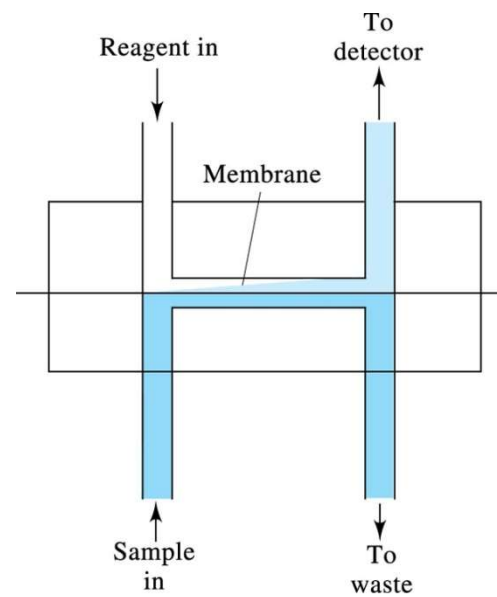
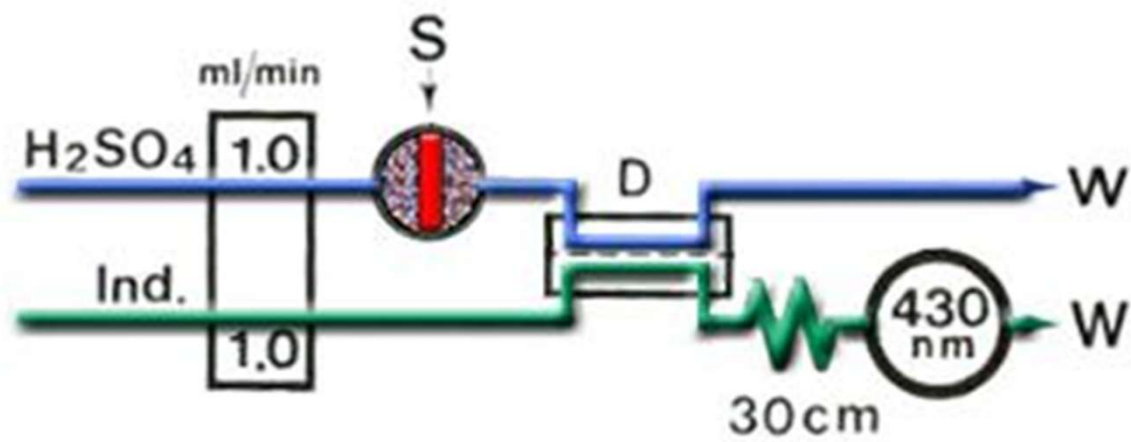
Prednosti FIA metoda

- FIA metode su brze, 100-300 uzoraka/sat što zavisi od brzine odgovora upotrebljenog detektora i brzine hemijske reakcije**
- Poboljšano vreme odgovora (manje od min)**
- Velika ušteda reagenasa (mL) i uzorka (20 μ L)**
- Granice detekcije su vrlo niske (reda 1 μ g/L), reproduktivnost bolja od 1%**
- Jednostavno sastavljanje aparature od jeftinih i komercijalnih delova**
- Ušteda vremena**
- Izabrati parametre koji daju min disperziju i max vreme zadržavanja (ne mora se povećavati dužina cevčica, već se može smanjiti brzina struje nosača)**

Membrane sampling devices (MSD) je tehnika koja se koristi za razblaživanje ali i za druge operacije uzorka kao što je matriks modifikacija ili eliminacija, uzorkovanje u struji gasa, solvent ekstrakcija ili koncentrovanje uzorka.

MSD se opisuje kanalima dva protoka odvojenih membranom. Jedan od tokova je donorski, koji može biti bilo tečnost ili gas, koji sadrži analit koji je ili ubrizgan injektiranjem ili je sam u toku. Druga je prihvatna ili akceptorska struja.





Membrane mogu biti:

- ▶ **porozne (Teflonske)**
- ▶ **nepropusne (Silikon, guma) ili**
- ▶ **jonske (Nafion)**

Sa mikroporoznim membranama, maseni transport se dešava difuzijom analita kroz pore.

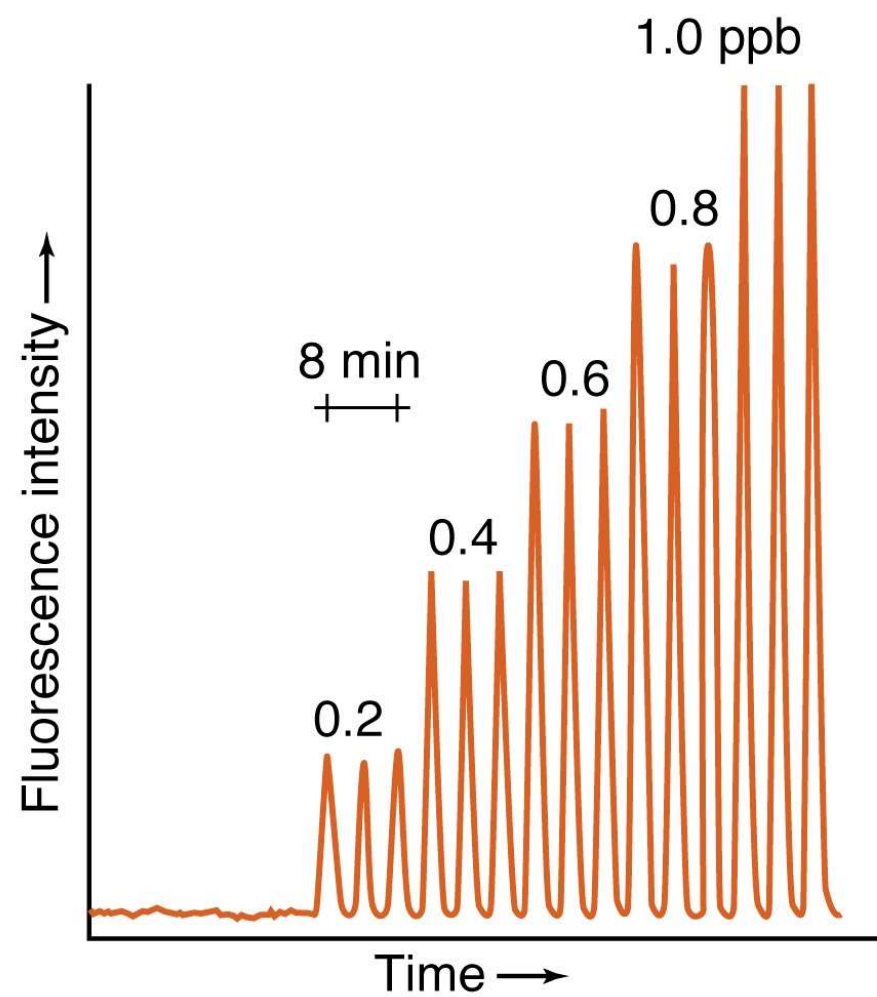
Te membrane se koriste za volatizaciju analite kao što su rastvoreni CO₂, NH₃, H₂S, HCN.



Detekcija

- ▶ **Detekcija je najčešće fotometrijska (UV/VIS i IR).
Zavisno od supstanci različite luminiscentne tehnike
su sve popularnije.**
- ▶ **Elektrohemijske tehnike kao amperometrijska i
potenciometrijska daju nove mogućnosti FIA
metodama.**
- ▶ **U novije vreme kupuju se FIA aparature čak sa
AAS, ICP-MS, ICP-AES, GC.**





FIA of ppb levels of H_2O_2 in air.