

Organska elementarna analiza.
Metode molekulske spektroskopije.
Automatizovane metode analize.

Organska elementarna analiza

C, H, N, O, S



Fritz Pregl
1869 –1930

Nobelova nagrada 1923 za hemiju za kvantitativnu organsku mikroanalizu

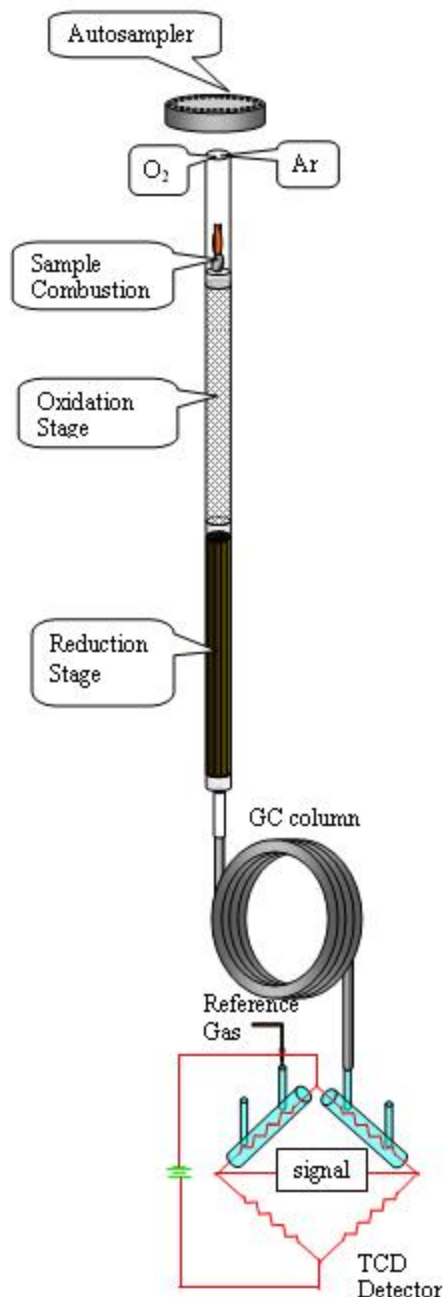
Organska elementna analiza se koristi za određivanje C, H, N i S u organskim i neorganskim materijalima u čvrstom, tečnom ili gasovitom stanju.

Visoko efikasni analizatori sa sagorevanjem za brzu CHNOS analizu u organskim mikro i makro uzorcima

Primena: u farmaceutskoj industriji, organskoj/neorganskoj hemiji (polimeri, tekstil, plastika, deterdženti, eksplozivi), analizi životne sredine (vode, zemljišta, ...), analizi ljudskih i životinjskih uzoraka (analiza krvi, kose, seruma, urina, noktiju, ...), poljoprivredi, petrohemiji, za analizu izotopa



Određivanje C, H, N, S i O



Analiza počinje odmeravanjem određene količine uzorka (od par mg do nekoliko stotina mg) u čamčić za sagorevanje, koji se unosi u atmosferu čistog kiseonika, a sagorevanje se vrši najčešće na temperaturi do 1100°C.

Uzorak sagoreva oslobađajući ugljenik u obliku CO₂ gasa, sumpor se oksiduje i oslobađa u obliku SO₂ gasa, azot u obliku gasova azota.

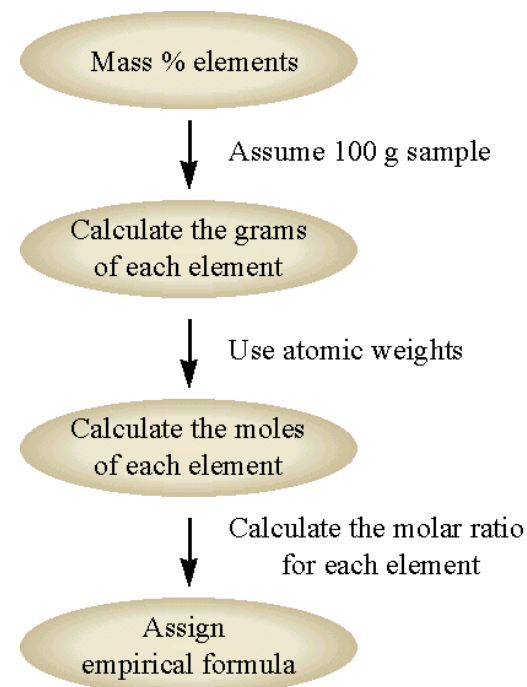
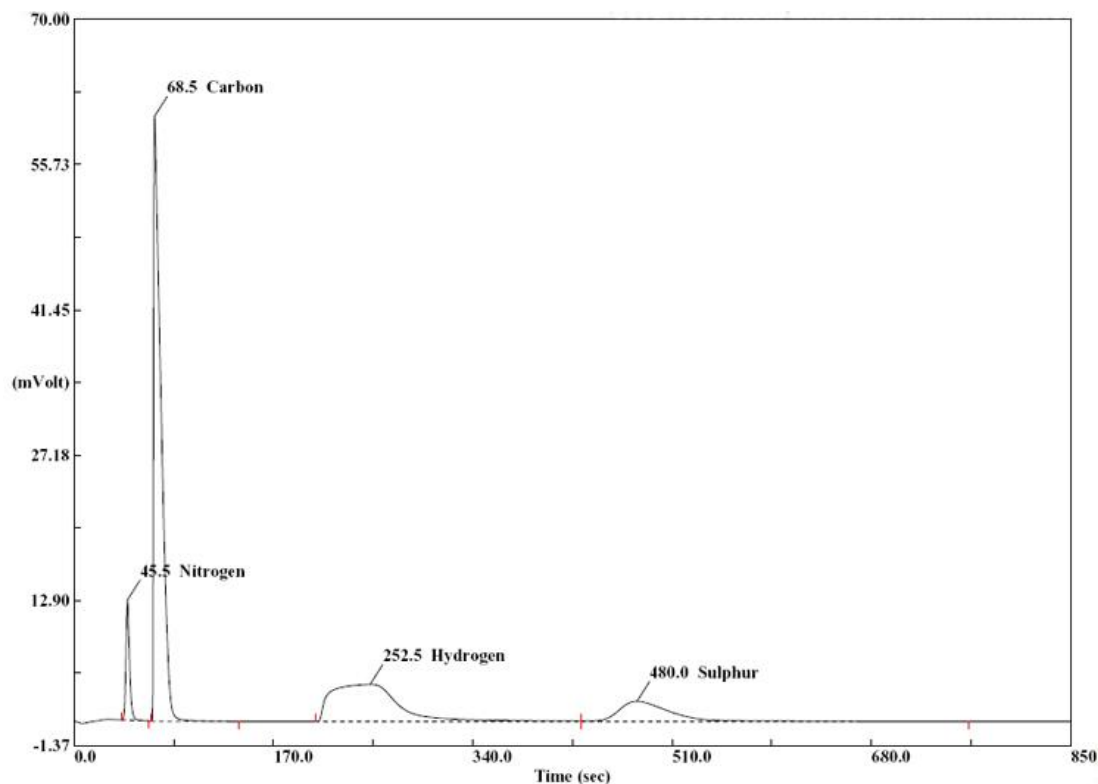
Oslobodeni gasovi se pumpaju kroz odgovarajuće detektore za precizno merenje svakog elementa.

Koncentracija nepoznatih uzoraka se određuje u odnosu na kalibracione standarde.

Kalibracija

Čiste organske supstance se koriste za kalibraciju i poželjno je da budu što sličnije analiziranom uzorku.

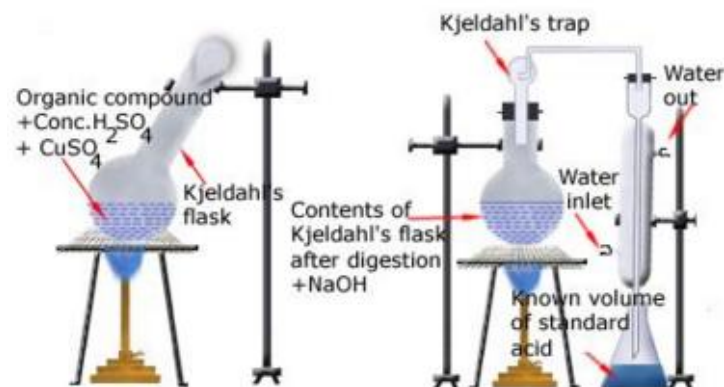
$C_{27}H_{27}N_3O_6S$	requires % C 62.18	H 5.22	N 8.06
M = 521.5 g/mol	found % C 62.02	H 5.29	N 8.15



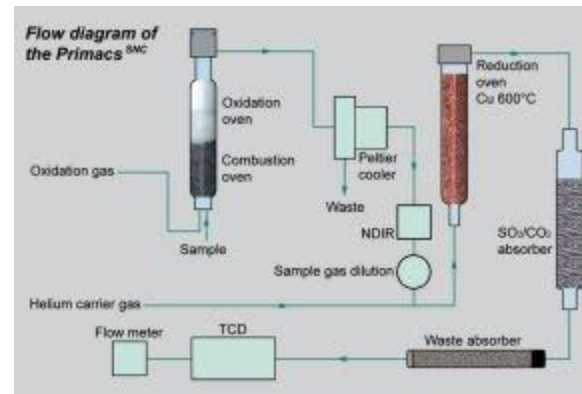
Određivanje ukupnog sadržaja azota (Total nitrogen analysis)

Ukupni azot (TN) je suma azota iz nitrata, (NO_3^-), nitrita (NO_2^-), amonijaka (NH_3) i organsko vezanog azota.

Kjeldahl-ova metoda se koristi za kvantitativno određivanje azota u organskim supstancama i azota iz neorganskih u obliku amonijaka i amonijum jona ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$). Međutim, ne može se odrediti azot iz nitrata i nitrita.



Detektori: termalno provodljivi detektor (**TCD**), elektrohemijski detektori, hemiluminiscentni detektor



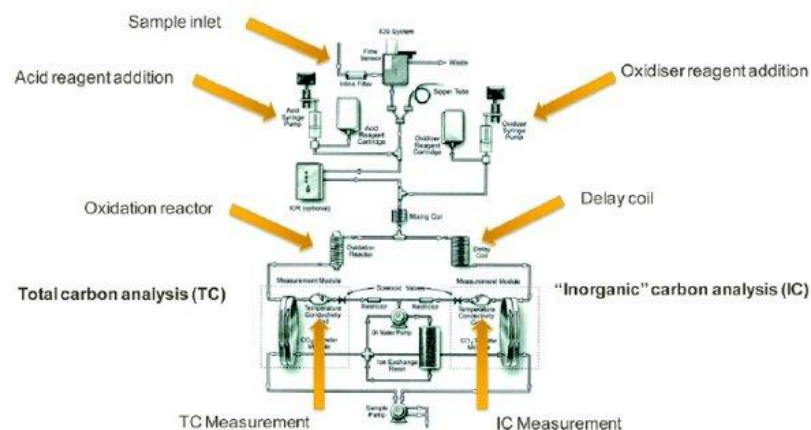
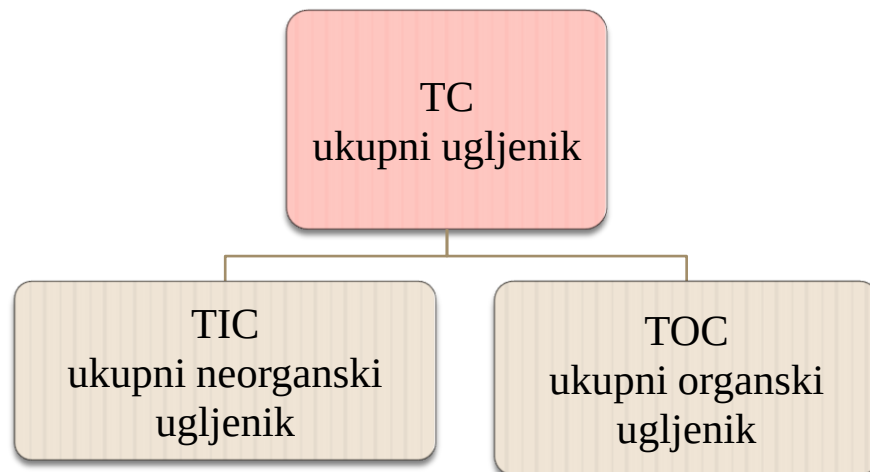
Određivanje ukupnog organskog ugljenika

Total carbon analyses (TC, TIC and TOC)

Ukupni neorganski ugljenik TIC – ugljenik koji potiče od prisutnog ugljenika u neorganskim jedinjenjima koji su rastvoreni u rastvoru (ugljen dioksid, karbonska kiselina, hidrogenkarbonatni anjon i karbonatni anion)

Ukupni organski ugljenik TOC – ukupni ugljenik koji se nalazi u organskim molekulima

Ukupni ugljenik TC – ukupni sadržaj ugljenika u uzorku



$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$$

Analyser schematic reproduced from Sievers 900 Portable Operation and Maintenance Manual

Analyser schematic reproduced from Sievers 900 Portable Operation and Maintenance Manual

METODE MOLEKULSKE SPEKTROSKOPIJE

(za kvalitativnu i kvantitativnu analizu)

Metode molekulske spektroskopije za kvalitativnu i kvantitativnu analizu hemijskog sastava: određivanje prisutnih jedinjenja tj. molekula (molekulski joni i radikali takođe).

Pored metoda molekulske spektroskopije, za određivanje prisutnih jedinjenja koriste se i elektrohemijske metode (obično se određuju molekulski joni)

Metode molekulske spektroskopije mogu se podeliti u dve grupe:

- masena spektrometrija molekula (detaljno se uči iz predmeta Fizičko-hemijske metode analize).
- metode spektroskopije elektromagnetnog zračenja molekula

Metode molekulske spektroskopije elektromagnetnog zračenja

- ✓ Ekscitacija elektrona (**molekulska UV-VIS spektrofotometrija**)
- ✓ Vibracioni prelazi (**infracrvena spektrometrija, ramanska spektrometrija**)
- ✓ Rotacioni prelazi (mikrotalasna oblast, delom daleka infracrvena, malo se koristi u analitici)
- ✓ Prelazi u vezi spina (radiotalasna oblast - nuklearna i mikrotalasna oblast - elektronska magnetna rezonancija **NMR i EPR**)

Type of transfer	molecular rotation				molecular oscillation		electron excitation							
Spectroscopic methods	microwave absorption				infrared spectroscopy				UV-VIS spectroscopy					
Spectral region	radio waves		microwaves		infrared (IR)				Vis		UV		X-rays	
					F		M		N					
wavelength [m]	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰		
$\lambda = \frac{c}{\nu}$														
λ				1cm				1μm					1nm	1Å
Frequency [Hz]	10 ⁻⁷		10 ⁻⁹		10 ⁻¹¹		10 ⁻¹³		10 ⁻¹⁵		10 ⁻¹⁷			
$\nu = \frac{c}{\lambda} = c \cdot \tilde{\nu}$														
Wavenumber $\tilde{\nu}$			10 ⁻³		10 ⁻¹		10		10 ³		10 ⁵		10 ⁷	
$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$ [cm ⁻¹]														

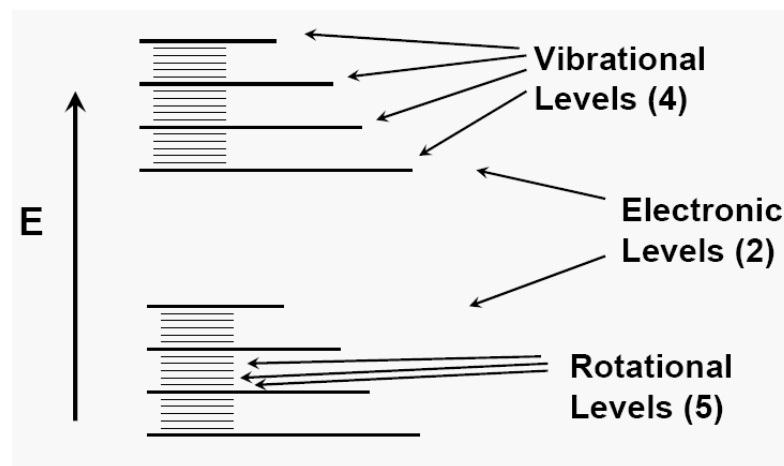
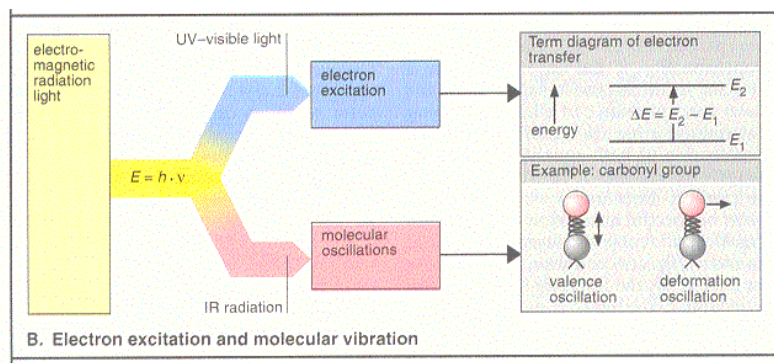
A. Electromagnetic spectrum

U molekularnoj spektroskopiji se ne upotrebljava termičko pobuđivanje, pogotovo ne u UV-VIS oblasti, jer bi se molekuli disosovali.

Emisioni spektri samo za male molekule koji su dovoljno stabilni da se ne disosuju na temperaturi potrebnoj za ekscitaciju: analitička primena samo u astrofizici

Metode su ili apsorpcione ili se primenjuje fotonsko pobuđivanje (molekulska fluorescencija)

Neke metode više pogodne za kvalitativnu neke više za kvantitativnu analizu



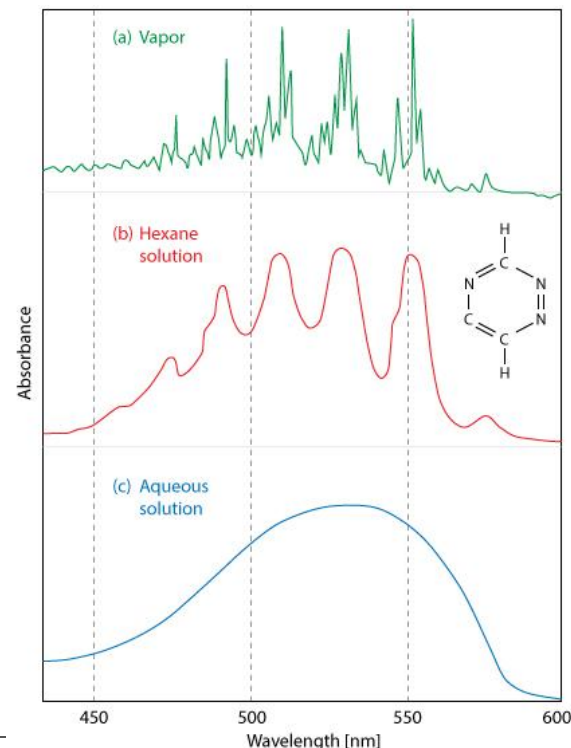
Molekulska UV-VIS apsorpciona spektrofotometrija

Praktični (instrumentalni) razlozi ograničavaju primenu molekulske UV-VIS spektrofotometrije na oblast 200-1000 nm, tj. na optičku oblast.

UV-VIS spektri molekula potiču od prelaza valentnih elektrona.

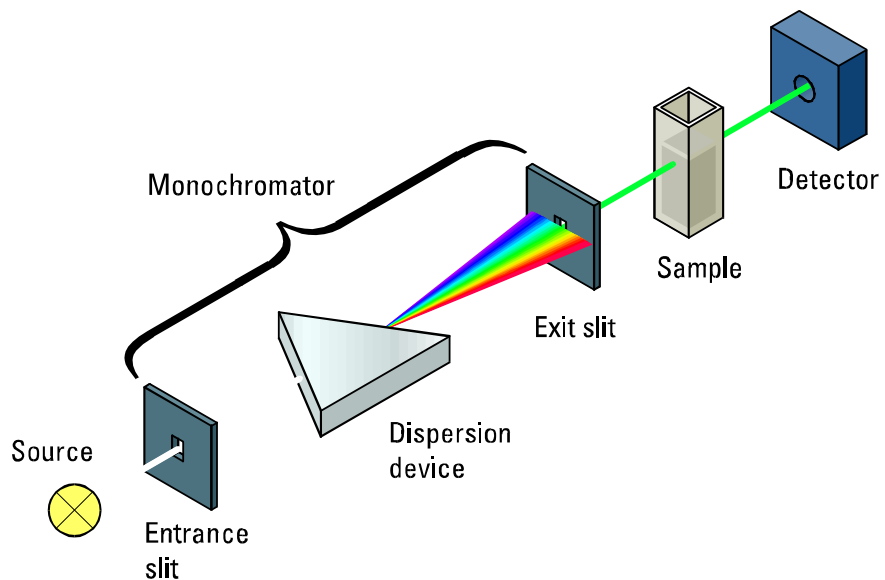
Prelazu valentnog elektrona kod atoma odgovara jedna linija, kod molekula sistem traka: kombinaciji vibracionih nivoa odgovara traka a rotacionih nivoa jedna linija.

Rotaciona i vibraciona struktura elektronskog prelaza kod molekula se mogu videti obično samo u parnom stanju. U kondenzovanim stanjima interakcija susednih molekula je velika i struktura se gubi: u vodenim rastvorima ostaje široka apsorpciona traka.

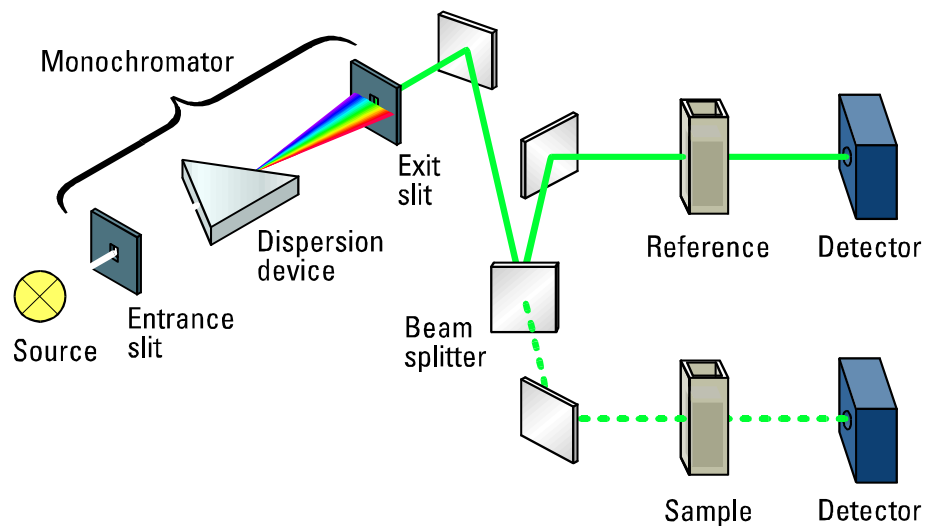


Šema spektrofotometra

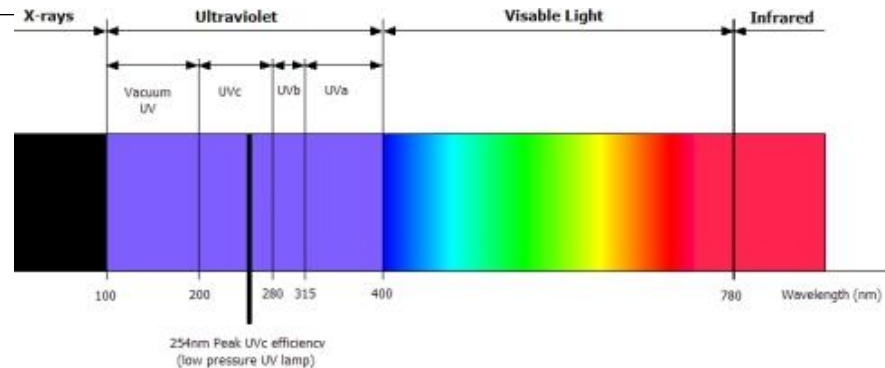
Jednozračni spektrometri



Dvozáčni spektrometri



UV-VIS spektralna oblast



Ovaj deo spektra elektromagnetnog zračenja podeljenje na 3 pod oblasti: bliski UV (185-400 nm), vidljivi (400-700 nm) i bliski IR (700-1100 nm).

Većina komercijalnih spektrofotometara pokriva oblast 185–900 nm.

Donja granica instrumenta zavisi od prirode optičkih komponenti koje se koriste u opremi; kao i od toga da li je na putu svetlosti (na optičkom putu) prisutan vazduh ili ne. Kiseonik i voda apsorbuju intenzivno u oblasti ispod 190 nm.

Neki instrumenti, koji su konstruisani tako da se u njima (u odeljku u koji se smešta uzorak) može izvršiti evakuacija, rade sa gasnim uzorcima do granice od 150 nm. Ovo je domen daleke ili vakuumske UV oblasti.

Gornja granica detekcije je određena osobinama detektora spektrofotometra. Postoje komercijalni UV-VIS spektrofotometri kod kojih je granica detekcije u bliskoj infracrvenoj oblasti pomerena do 3300 nm.

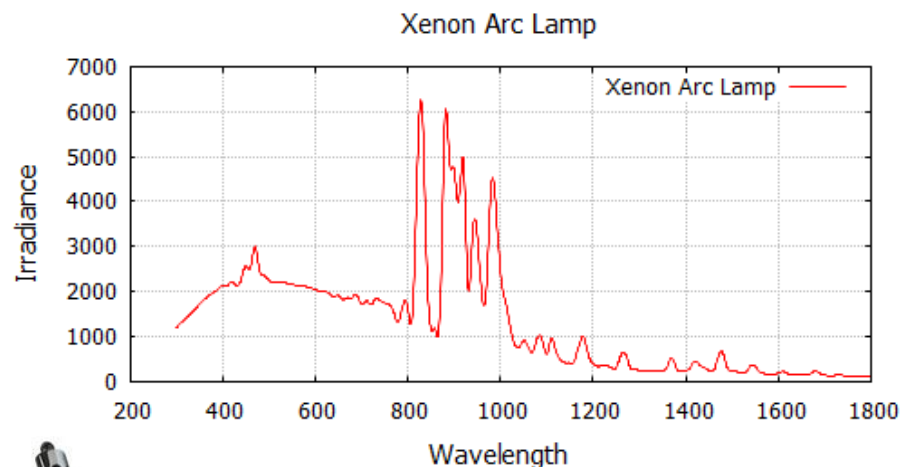
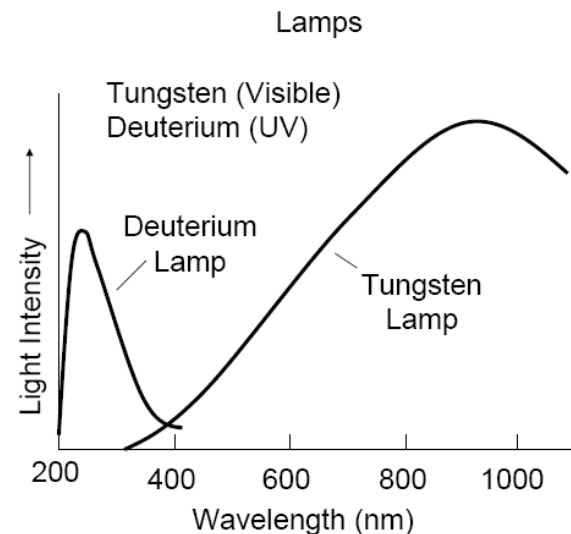
Izvori primarnog zračenja:

kontinualno zračenje

Vodonična (H_2) ili deuterijumska (D_2) lampa (160 – 375 nm) za UV oblast

Volframska (W) lampa (300 – 2500 nm) za vidljivu oblast

Ksenonska (Xe) lampa (150 – 800 nm) za UV i vidljivu oblast



D₂ lamp



H₂ lamp



W lamps



Xe arc lamp

Kivete

Kivete, mikrokiveta, termostatirana kiveta.

Postoje mnogi različiti materijali od kojih se kivete mogu praviti. Četiri najpopularnija materijala za kivete su:

- ✓ Optičko staklo ili Pyrex staklo
- ✓ UV kvarc
- ✓ IR kvarc
- ✓ Safir

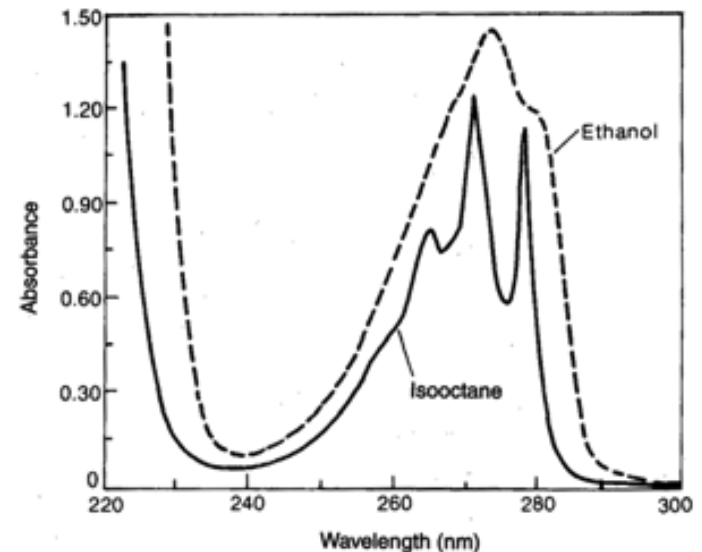
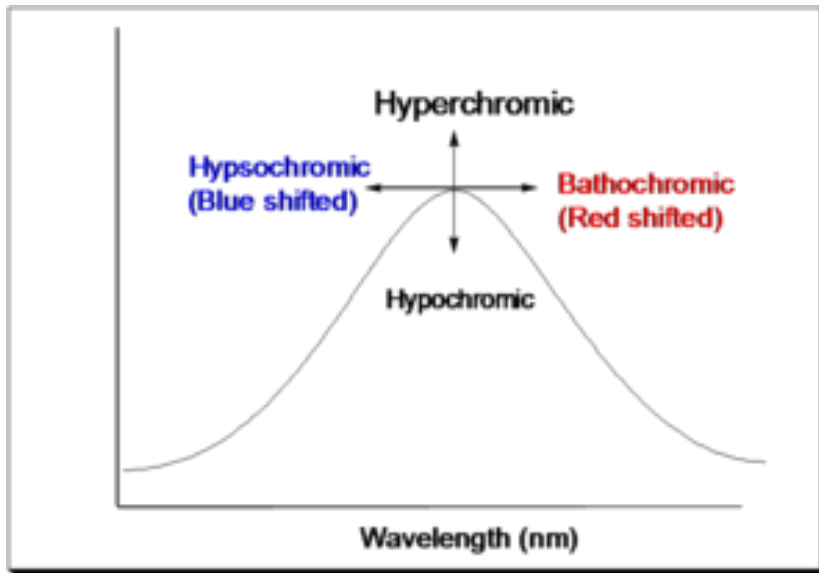
Materijal	Domet
Optičko staklo	340 - 2,500 nm
UV kvarc	190 - 2,500 nm
IR kvarc	220 - 3,500 nm
Safir	250 - 5,000 nm



Uticaj rastvarača

Kako svaki rastvarač ima svoju karakterističnu polarnost, i kako se zna da elektronski prelazi menjaju raspored naelektrisanja jedinjenja u rastvoru, očigledno je da će pozicija i intenzitet apsorpcionih traka varirati u izvesnoj meri zavisno od prirode rastvarača koji je primenjen. Uticaj na položaj maksimuma apsorpcije koji se ostvaruje kada se promeni rastvarač je vrlo važna indikacija za tip elektronskog prelaza koji postoji u uzorku. Postoje dva različita slučaja:

Hipsohromni efekat (plavi pomeraj) i **batohromni efekat (crveni pomeraj)**:



Trake posebno “bezoblične” sa polarnim rastvaračima, sa nepolarnim rastvaračima se vidi i vibraciona struktura traka.

Priroda (polarnost) rastvarača utiče na položaj apsorpcionog makimuma. Kod prikazivanje spektra nekog jedinjenja potrebno je naglasiti koji je rastvarač korišćen.

Kao rastvarači u apsorpcionoj spektrometriji koriste se jedinjenja koja ne apsorbuju UV-VIS zračenje. Za očuvanje fine strukture koriste se nepolarni rastvarači.

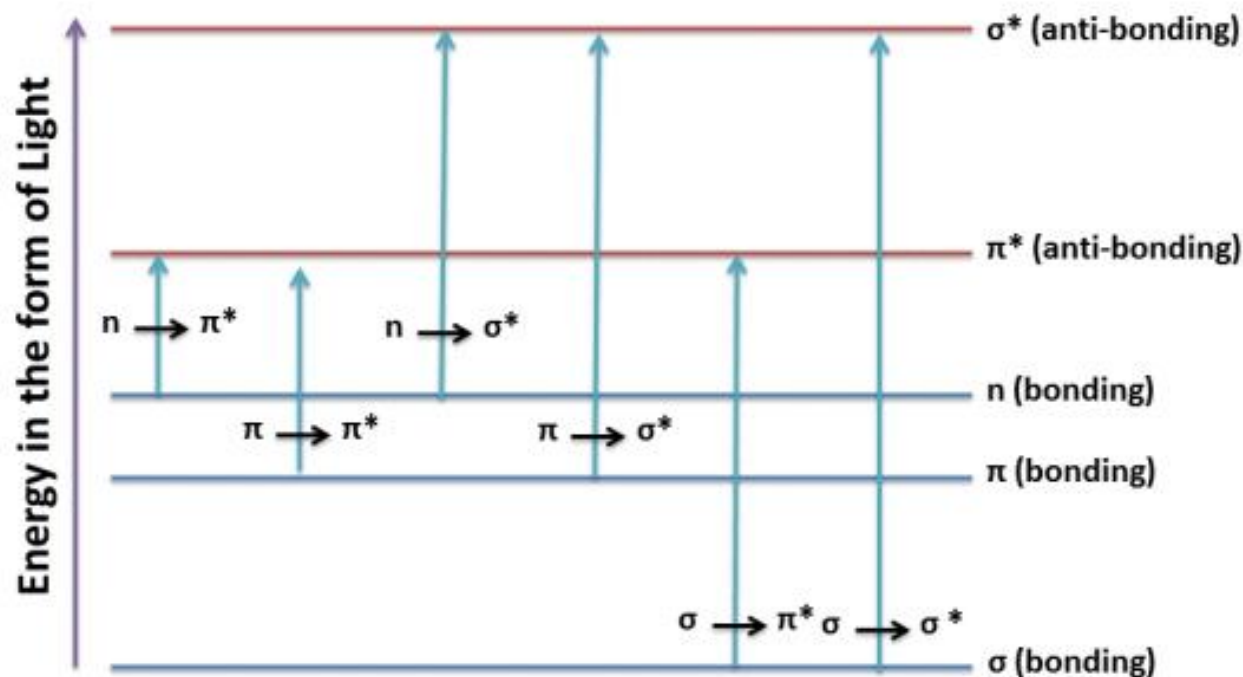
rastvarač	λ (nm)
Voda	190
Etanol	210
N-heksan	195
Cikloheksan	210
Benzen	280
Dietil-etar	210
aceton	330

Razlika elektronskih spektara valentnih elektrona i molekula: jednom prelazu između dva elektronska stanja kod atoma odgovara jedna linija, kod molekula sistem traka.

Razlika elektronskih spektara valentnih elektrona i molekula: kod najvećeg broja elemenata rezonantne linije odnosno spektar leže u optičkoj oblasti, tek nemetali i plemeniti gasovi ne daju upotrebljive linije u optičkoj oblasti već u vakuumskoj. Kod molekula to nije tako. Stvaranjem hemijskih veza energije pobuđivanja postaju znatno veće tako da tek manji broj molekula daje spektre u optičkoj oblasti.

Funkcionalne grupe u molekulima koje daju apsorpciju u optičkoj oblasti: hromofore.

Kod organskih jedinjenja za apsorpciju u optičkoj oblasti potrebno je postojanje π veza (dvogube i trogube veze) i nevezivnih elektronskih parova kod većih atoma kao što su O, N, S... Spektri u optičkoj oblasti vezani za prelaze $n \rightarrow \pi^*$ i $\pi \rightarrow \pi^*$



$\sigma \rightarrow \sigma^*$ and $\sigma \rightarrow \pi^*$ ($\lambda_{\max} < 150 \text{ nm}$)

$n \rightarrow \sigma^*$ and $\pi \rightarrow \sigma^*$ ($\lambda_{\max}$) in the 150-250 nm region

$n \rightarrow \pi^*$ and $\pi \rightarrow \pi^*$ $\lambda_{\max} = 200-600 \text{ nm}$.

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ i $n \rightarrow \sigma^*$ prelazi imaju preveliku energiju i leže u vakuumskoj UV. Izuzetak daje prisustvo velikih elektronegativnih atoma kao što su S, I, Br... tako sa samo neki supstituisani alkani mogu dati UV-VIS spektre preko $n \rightarrow \sigma^*$ prelaza.

Zasićeni ugljovodonici, koji poseduju samo veza $\sigma \rightarrow \sigma^*$, transparentni su u oblasti bliskog UV (hexane (gas): $\lambda_{\max}=135$ nm).

Zasićeni ugljovodonici mogu biti rastvarači za supstance koje apsorbuju u bliskoj UV oblasti. $n \rightarrow \sigma^*$ imaju sledeći rastvarači metanol $\lambda_{\max}=183$ nm; etar: $\lambda_{\max}=190$ nm; etilamin: $\lambda_{\max}=210$ nm; 1-hlorobutan: $\lambda_{\max}=179$ nm.

$n \rightarrow \pi^*$ prelazi se javljaju kod jedinjenja koja sadrže elektronegativni atom koji ima i nevezivne orbitale i gradi dvogube veze (O, N)... Ovi prelazi imaju manju energiju od $\pi \rightarrow \pi^*$ ali su slabiji, zbog malog preklapanja ovih orbitala.

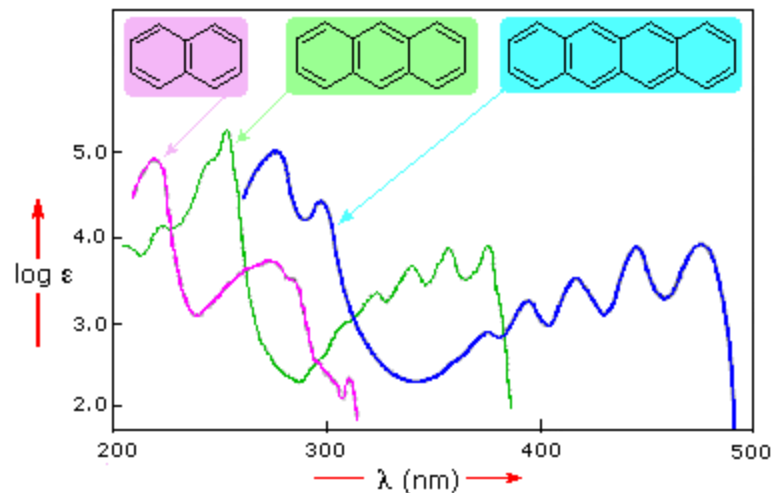
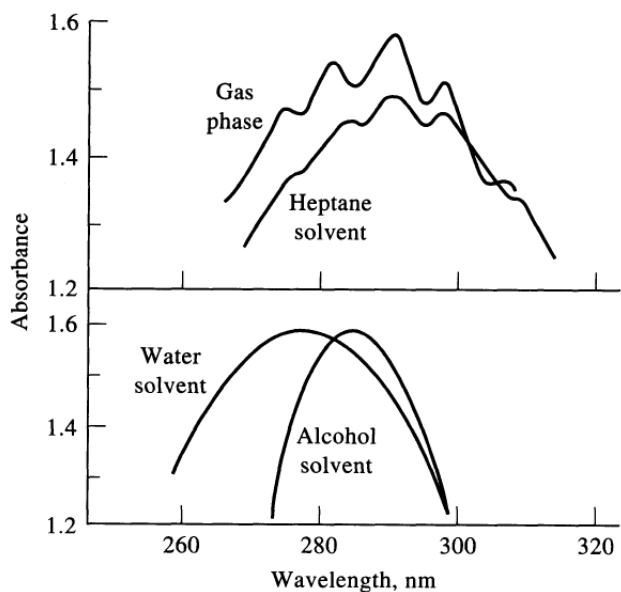
$\pi \rightarrow \pi^*$ prelazi imaju veću energiju od $n \rightarrow \pi^*$ prelaza ali su mnogo intenzivniji. Trake koje potiču od ovih prelaza pomeraju se prema većim talasnim dužinama i postaju intenzivnije što je delokalizacija elektrona veća.

Kvalitativna analiza

Zbog širina traka (nedovoljna specifičnost spektra) nije direktno moguća, ipak, UV-VIS spektrofotometrija može da posluži kao **pomoćna metoda** u identifikaciji jedinjenja.

Bilo koji snimljeni spektar dobijen je od uzorka koji sadrži ogroman broj molekula koji nisu svi na istom energetsom stanju.

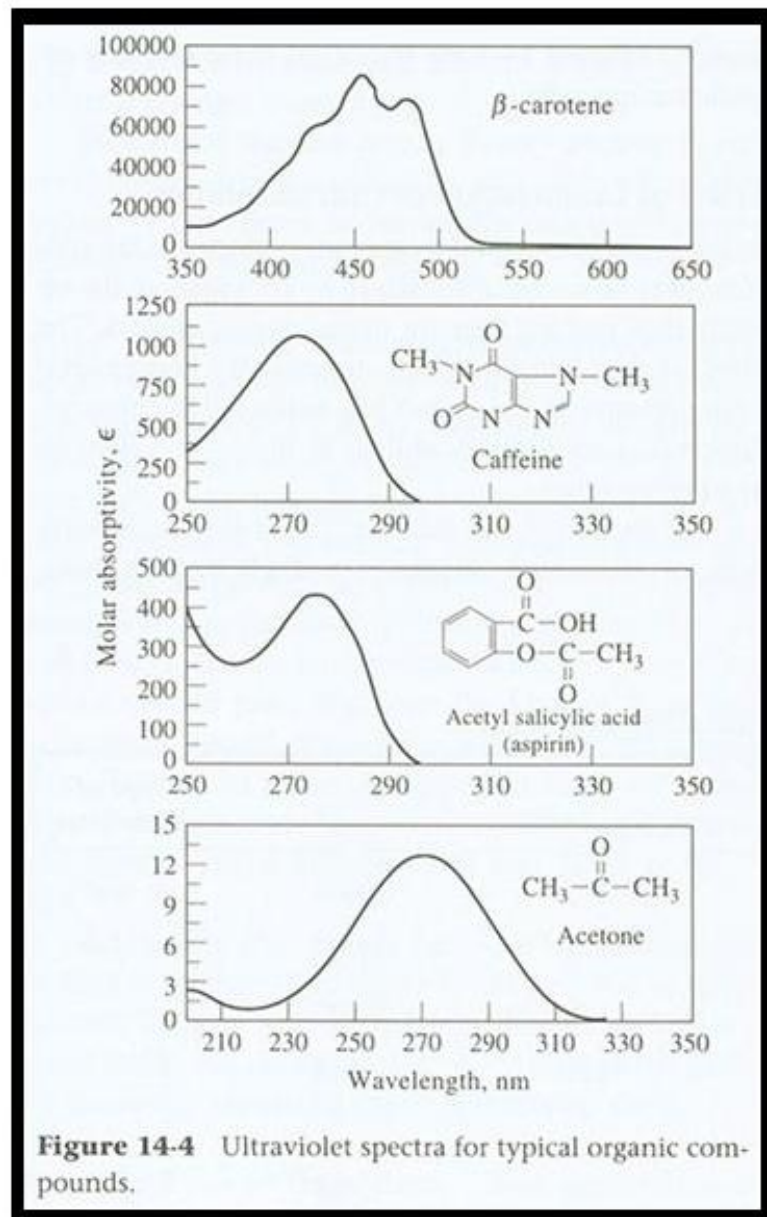
Zbog toga, iako je elektronski skok kvantiran i odredjen, dobijeni grafički prikaz spektra je u obliku trake a ne linije, pa ta traka „pokriva” linije nastale od elektronskih, vibracionih ili rotacionih prelaza individualnih molekula



Uticaj dužine hromofore

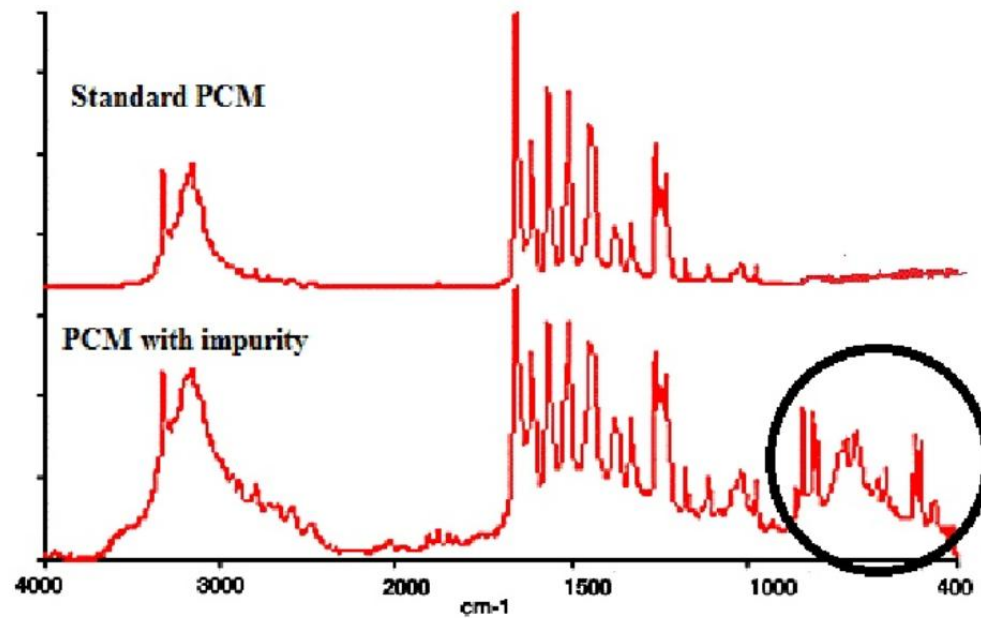
Molekulski elektronski spektri daju široke trake nekarakterističnog oblika, zato je ova metoda generalno neprimenljiva za kvalitativnu analizu.

U nekim situacijama može da pomogne u identifikaciji nekih jedinjenja poređenje sa bazom podataka



Prisustvo nečistoća

U.V. SPECTRA OF PARACETAMOL (PCM)



Kvantitativna hemijska analiza

Primena UV-VIS spektrofotometrije za **kvantitativnu hemijsku analizu jedinjenja** vrlo široko zastupljena.

Uobičajena osetljivost je reda 10^{-4} do 10^{-5} M ili čak niže za 1-2 reda veličine.

Umerena selektivnost, potrebna priprema uzorka, preciznost dobra, jeftina metoda.

Spektrofotometrija vrlo zastupljena u laboratorijama, pogotovu joj je polje primene bilo široko ranije, sa razvojem i dostupnošću osetljivijih i selektivnijih tehnika u nekim oblastima primene izgubila na značaju.

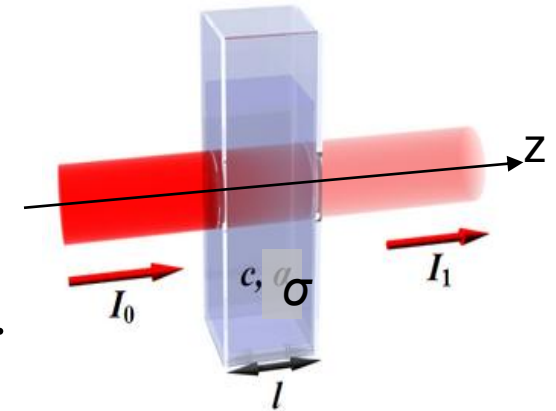
Za većinu elemenata postoji razrađena spektrofotometrijska metoda određivanja u vodama, hrani... Dati element se prevodi u jedan jonski oblik koji se onda kompleksira u pogodan kompleks čija se apsorbancija meri.

apsorpcija elektromagnetnog zračenja:

Berov zakon

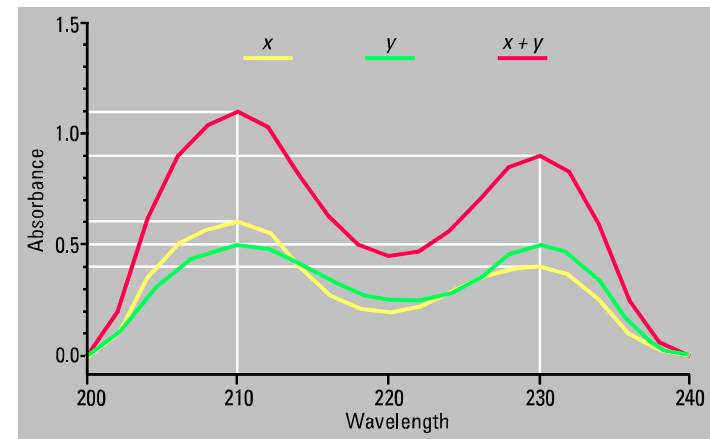
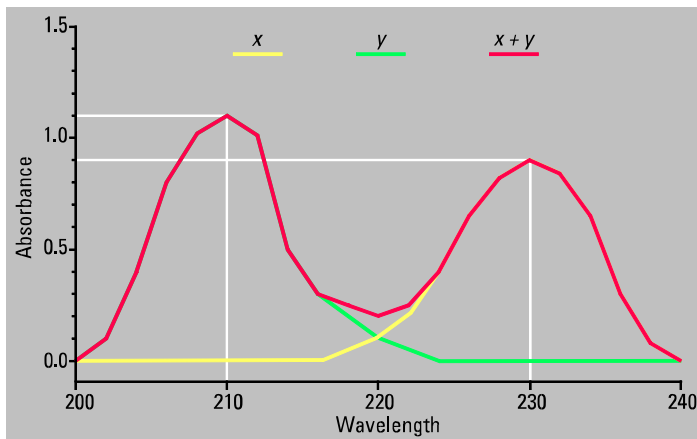
$$A = -\log T = \log(I_0/I) = abc$$

ili umesto **a** molarna apsorptivnost se obeležava i sa ϵ .



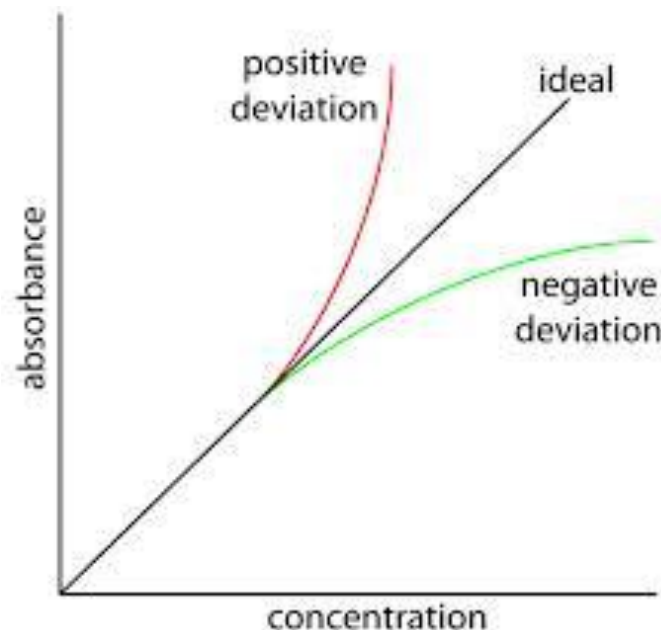
Apsorbancija zavisi od osobina molekula, talasne dužine i temperature (preko molarne apsorptivnosti) kao i od dužine apsorpcionog puta i koncentracije

Berov zakon je aditivan, doprinosi ukupnoj apsorbanciji na datoj λ od različitih komponenti se sabiraju



Odstupanje od linearnosti pri visokim koncentracijam analita:

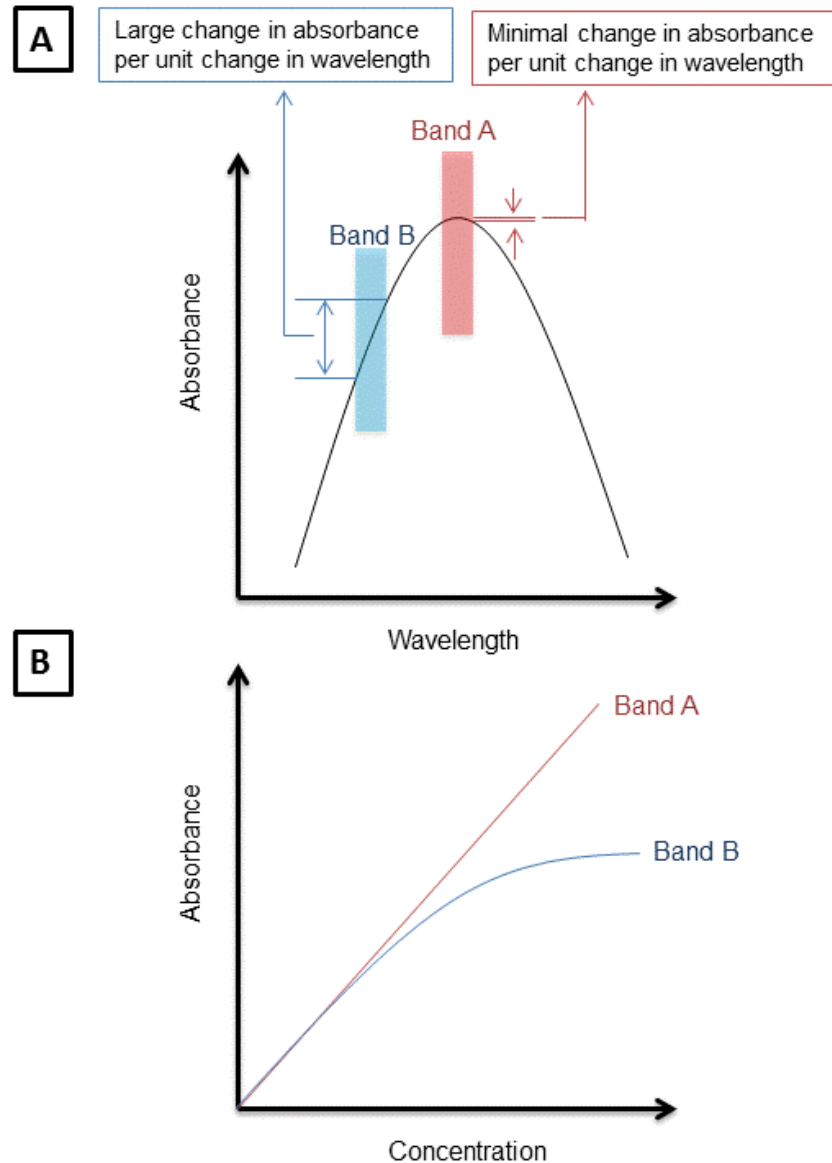
- ✓ Usled velike koncentracije apsorbujuće vrste mogu međusobno da reaguju
- ✓ Analit disosije/asosuje ili reaguje sa rastvaračem.
- ✓ Na smanjenje apsorpcije utiče i ukupna koncentracija drugih supstanci, pogotovu elektrolita
- ✓ $a = f(\lambda)$; većina izvora su polihromatski, a ne isključivo monohromatski



Berov zakon važi samo za monohromatsko zračenje, što praktično nije izvodljivo, uvek radimo sa intervalom zračenja. Ipak, sa polihromatskim upadnim zračenjem linearnost mala

Problem ako se apsorptivnosti razlikuju, to je još jedan razlog zašto je bolje raditi na maksimumu trake, pored toga što je tu apsorptivnost najveća pa je i osetljivost najveća

Kompromis: zbog širine apsorpcionih traka nije neophodno da spektralna širina upadnog zračenja bude previše mala



I ako mnoga jedinjenja pokazuju UV-VIS apsorpciju, generalno je princip kvantitativne analize **kompleksiranje** datog analita u kompleks koji daje intenzivnu apsorpciju

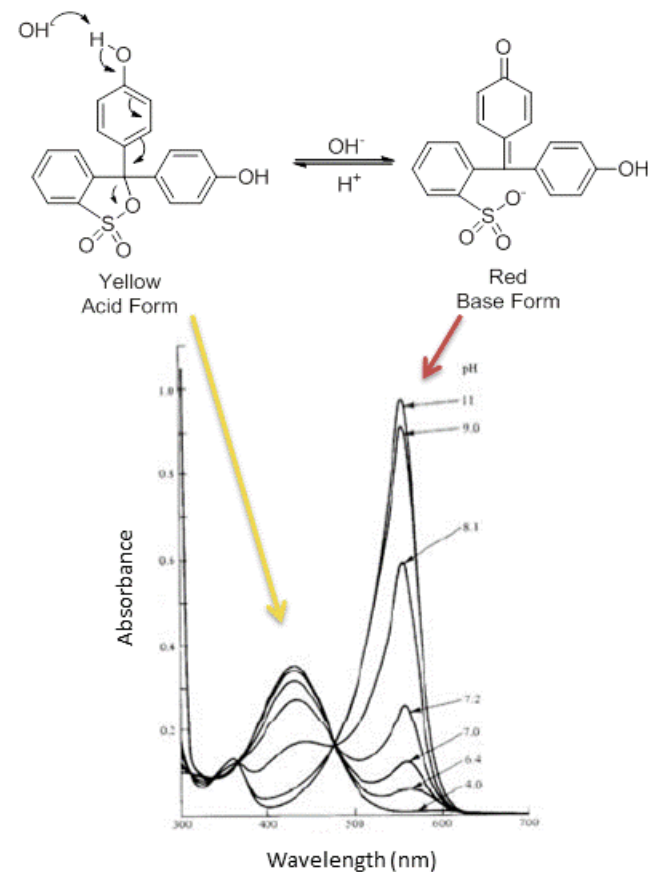
Rezultat osetljiv na prirodu rastvarača, pH, T, jonsku jačinu

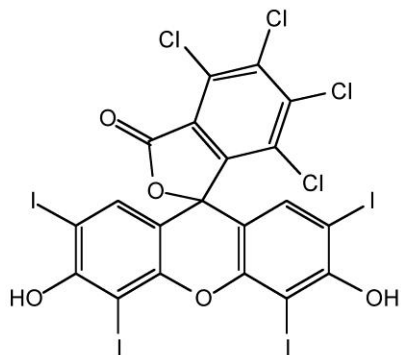
Mogućnost hemijskih interferencije je značajan i njihova eliminacija odvajanjem ili maskiranjem je često neophodna.

Zbog hemijskih interferencija i potrebe formiranja kompleksa ova metoda je sporija i manje selektivna u odnosu na metode atomske spektrohemijske

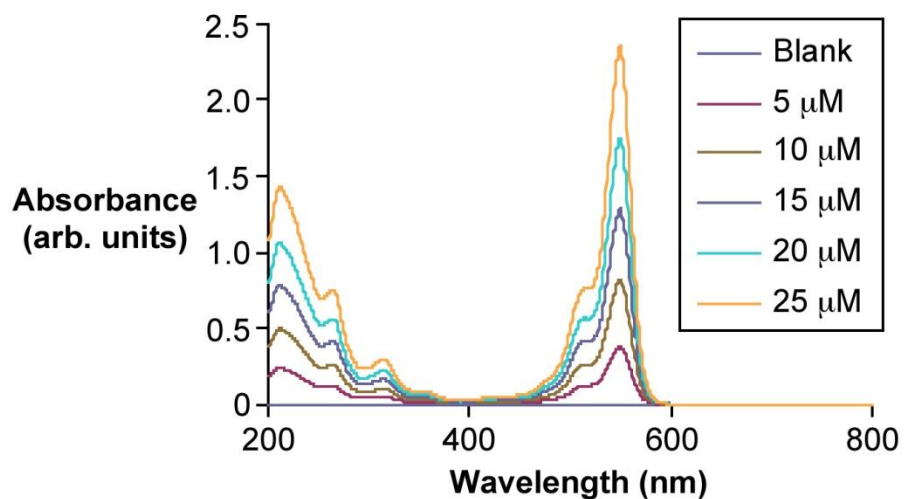
Mnoge biohemijske analize se obavljaju upravo spektrofotometrijski. U našim bolnicama se velika većina hemijskih analiza obavlja upravo spektrofotometrijski

Dobra osetljivost, umerena selektivnost, loše za kvalitativnu

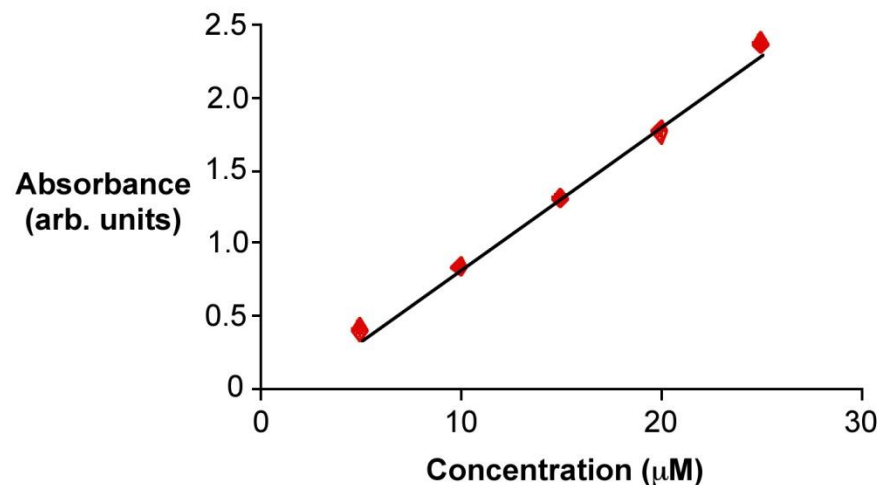




The molecular structure of Rose Bengal
(4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-
tetraiodofluorescein).



UV-vis spectra of different concentrations of
Rose Bengal



Calibration curve of Rose Bengal.
Equation of line: $y = 0.0977x - 0.1492$
($R^2 = 0.996$)

Žaštita životne sredine

analit	metoda	λ (nm)
Al	bojena reakcija građenja kompleksa sa eriohrom cijanidom na pH=6 (pink kompleks)	535
As	redukcija do AsH_3 pomoću Zn apotom reakcija sa dietilditiokarbamatom (crveni kompleks)	535
Cr	oksidacija do Cr (IV) i reakcija sa difenilkarbazidom u kiseloj sredini (crvmo-ljubičasti proizvod)	540
Cd	ekstrakcija CHCl_3 koji sadrži ditizon (crveni kompleks)	518
Hg	ekstrakcija CHCl_3 koji sadrži ditizon (narandžasti kompleks)	492
NH_3	reakcija sa amonijakom, hipohloritom i fenolom daje plavi indofenol	630
CN-	pretvara se u CNCI reakcijom sa hloraminom T, i u reakciji sa piridin-TBA daje crveno-plavi kompleks	578
fenol	reakcija sa 4-aminoantipirinom i $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ antipirinsku boju	460
deterdž.	anjonski detedžent daje plavi proizvod u reakciji sa katjonskom bojom, metilenskim plavim	652

Klinička ispitivanja

analit	metoda	λ (nm)
ukupan sadržaj proteina u serumu	reakcija proteina sa NaOH i Cu^{2+} jonima (plavo-ljubičasti kompleks)	540
ukupan sadržaj holesterola u serumu	reakcija sa Fe^{3+} jonima u prisustvu izopropanola, sirćetne kiseline i H_2SO_4 (plavo-ljubičasti kompleks)	540
mokraćna kiselina	reakcija sa fosfovolframovom kiselinom (daje tzv. Wf plavo)	710
barbiturati u serumu	ekstrakcija barbiturata u CHCl_3 a potom u 0.45 M NaOH	260
glukoza	reakcija sa o-toludinom na 1000C (plavo-zeleni kompleks)	630
jod vezan za proteine	razlaganjem proteina oslobađa se jodid koji se određuje pomoću sopstvenog katalitičkog delovanja redoks reakciju između Ce^{4+} i As^{3+}	420

Analiza industrijskih uzoraka

- farmaceutski proizvodi (mnogi imaju hromofore koje apsorbuju u ULJ i VID oblasti)
- vitamini
- antibiotici
- hormoni
- analgetici
- hrana
- boje i lakovi
- staklo i metali

Primer:

- određivanje čistoće tableta aspirina (acetilsalicilna kiselina)
- salicilna kiselina koja nastaje oksidacijom acetilsalicilne kiseline čini nečistoću u tabletama aspirina (ne bi smelo da je ima više od 0,01% w/w)
- njena koncentracija se prati preko intenziteta apsorpcione trake na 280 nm

Forenzika

- analiza droga i drugih narkotika
- određivanje sadržaja alkohola, test izdisaja

AUTOMATIZOVANE METODE ANALIZE

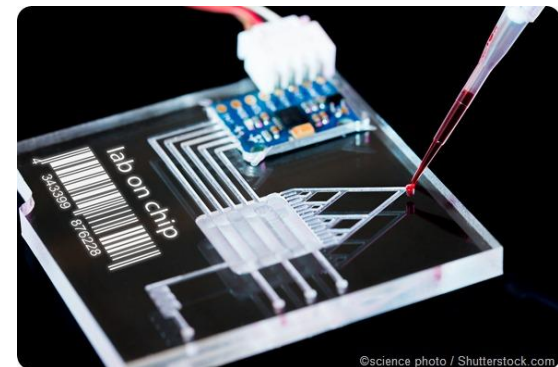
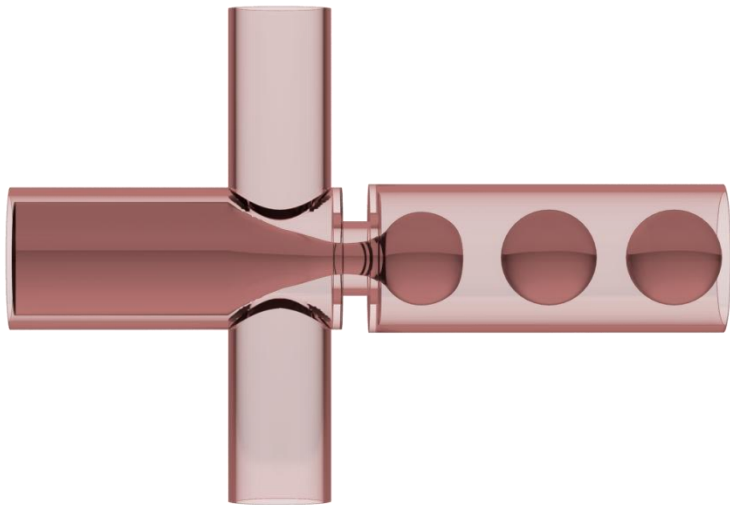
Analiza injektiranjem u protok (Flow-Injection Analysis) FIA je najjednostavnija i najzastupljenija metoda automatizovane analize.

FIA metode analize podrazumevaju reakciju između jednog ili više reaktanata sa analitom pri čemu nastaje produkt koji se može pogodno detektovati.

Analiza injektiranjem u protok (flow injection analysis, FIA) prva je moderna mikrofluidna metoda razvijena od strane Ružičke i Hansena 70-ih godina prošlog veka.

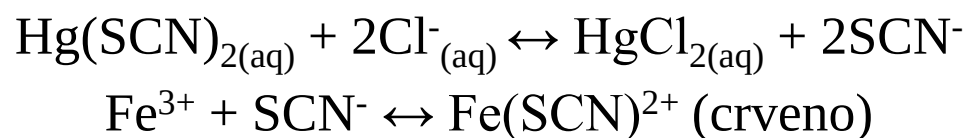
FIA je analitička metoda za automatsku analizu tečnih uzoraka koja se zasniva na disperziji zone uzorka nastale injektiranjem uzorka u tok.

Mikrofluidika obuhvata poznavanje i tehnologiju sistema kod kojih se cevi vrlo malih dimenzija koriste za rukovanje malim količinama rastvora (10^{-9} do 10^{-18} L). Zbog mnogih prednosti, mikrofluidika svoju osnovnu primenu nalazi u hemijskoj analizi. Glavne prednosti su korišćenje vrlo male količine uzorka ili reagensa, separacija i detekcija visoke rezolucije i osetljivosti, nizak trošak i kratko vreme analize. Kompleksnije tehnike mogu se koristiti za sintezu i istovremenu analizu sintetiziranih uzoraka.

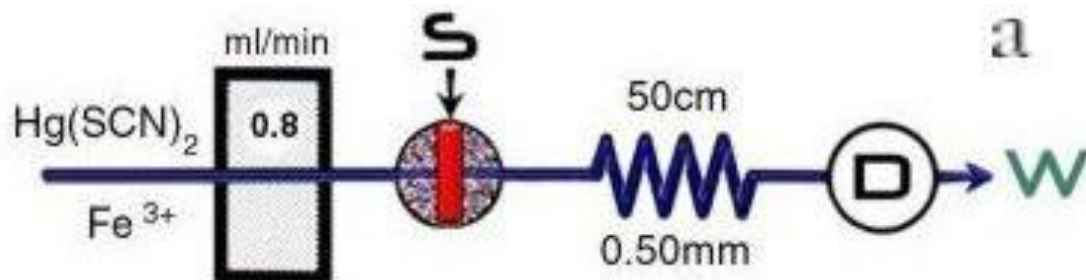


FIA (Analiza injektiranjem u protok sistema) sa jednim reagensom: primer **kolorimetrijski reagens za Cl^- $\text{Hg}(\text{SCN})_2$** koji se kontinuiranim protokom dobijenim peristaltičkom pumpom propušta kroz sistem. U slavini za uzorkovanje se u taj protok reagensa dodaje uzorak i onda zajedno idu u reakcioni kalem.

Reakcioni kalem, obično dug 50-tak cm, dužina mu je usklađena sa brzinom toka fluida, obezbeđuje mešanje reaktanta i analita i time njihovu potpunu hemijsku reakciju. U našem primeru reakcija je:



Dobijeni produkt se onda detektuje kolorimetrijskim detektorom. Reaktant kontinuirano prolazi kroz sistem, povremeno se u protok reaktanta ubacuje uzorak koji sa reaktantom gradi produkt koji se pogodno (jednostavno, jeftino, selektivno, osetljivo) detektuje



FIA metode analize se koristi za određivanje hlorida u pitkoj vodi, površinskoj vodi, telesnih tečnosti, industrijskog otpada



Za razliku od hromatografskih metoda, kod FIA nema separacione kolone već imamo hemijsku reakciju kojom se analit hemijski pretvara u pogodniji oblik za detekciju.

Detektori: može se nalaziti jedan ili više detektora koji se koriste za opažanje promena u apsorpciji, fluorescenciji, atomskoj emisiji ili apsorpciji, infracrvenoj apsorpciji, pH vrednosti, elektrodnom potencijalu, električnoj provodljivosti, masi i ostalim svojstvima.

Injektor uzorka radi na sličnom principu kao kod HPLC, ubacivanje uzorka se dodatno može automatizovati autosemplerom koji pored automatizacije doprinosi preciznosti cele analize (ujednačavanjem ispuštanja uzorka).

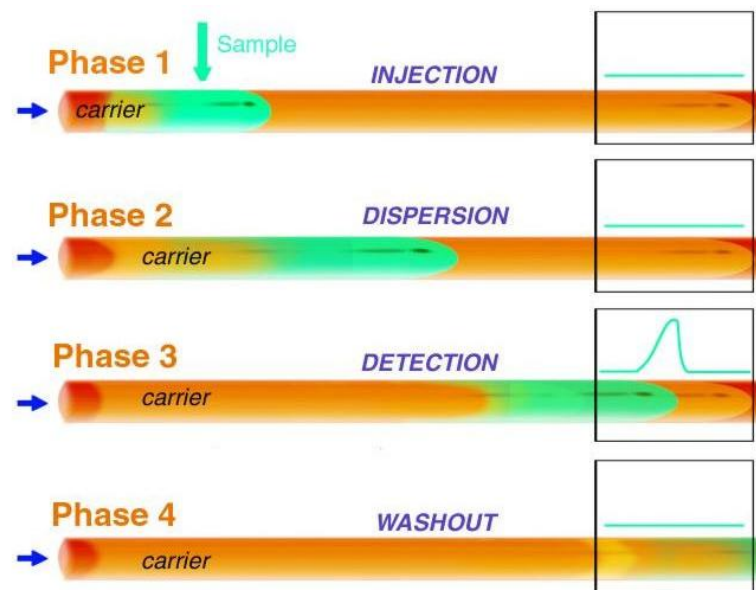
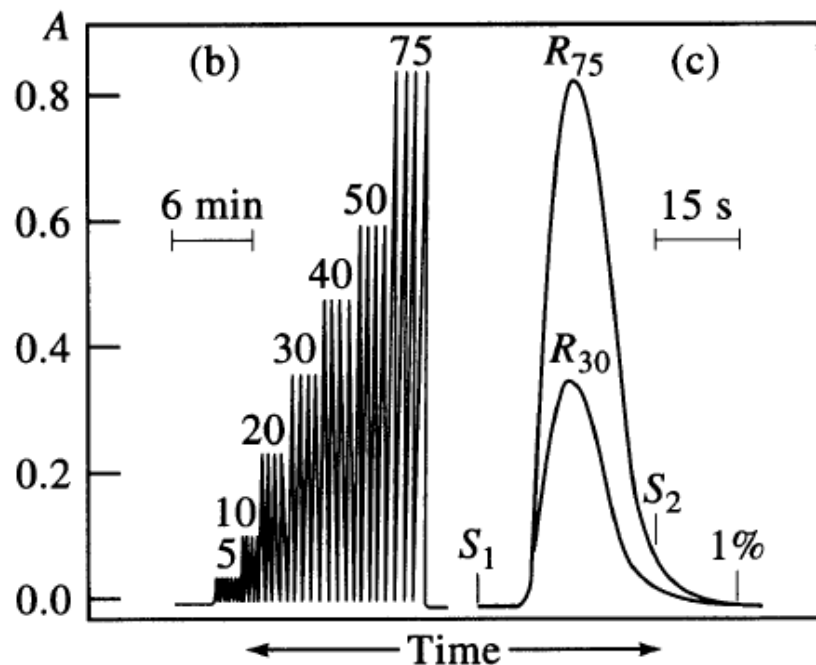
Peristaltička pumpa formira protok fluida sa minimumom pulsacija koje su prisutne zbog njenog principa rada: protok se reguliše prečnikom creva i brzinom motora. Jedna peristaltička pumpa može da “tera” nekoliko paralelnih protoka, protoci su obično od 0.0005 do 50 ml/min.

Na slici dole, levi deo, vide se pikovi standarda različitih koncentracija (od 5 do 75 ppm), svaki standard je meren 4 puta. Na slici desno vide se pojedinačni pikovi standarda 75 i 30 ppm na drugoj vremenskoj skali. Iz datih slika se možemo orijentisati u pogledu tipičnih vremena trajanja FIA analize.

Oblik pika koji se dobija na detektoru zavisi od više faktora, poželjno je da bude što uži. U teoriji FIA, širenje pikova analita zove se disperzija.

Disperzija D kod FIA, se definiše i kao odnos signala kad ne bi bilo disperzije i signala na maksimumu realnog pika. Što je širina pika veća disperzija je veća.

Difuzija pika zavisi od širine cevi, brzine toka fluida i zapremine uzorka.



Slika levo daje uticaj veličine uzorka na visinu i oblik pika. Velike zapremine uzorka otežavaju mešanje sa reagensom i nisu poželjne. Zbog potrebe mešanja uzorka i reagensa D je obično veće od 2.

Slika desno pokazuje uticaj dužine kolone (date u cm) na oblik pika.

Veće d tj. veća širina pika povećava vreme po uzorku potrebno za analizu a zbog manje visine pika smanjuje donekle i osetljivost.

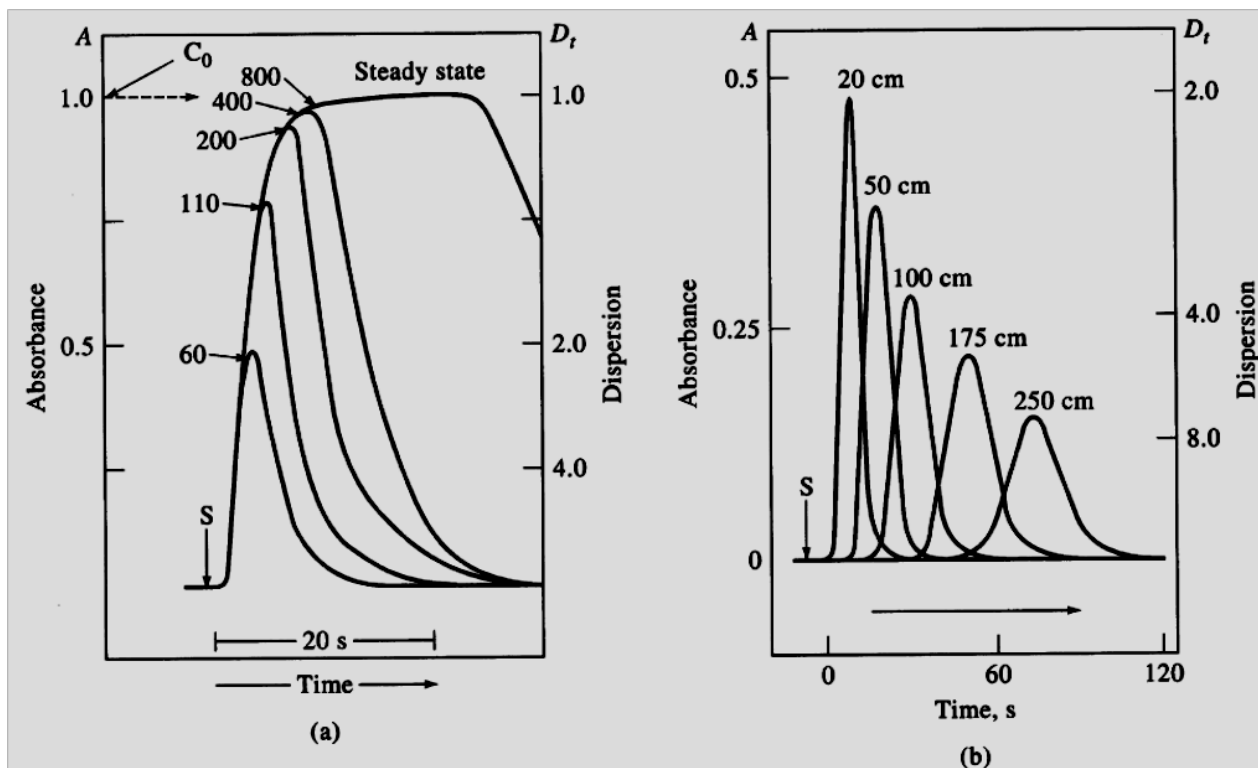
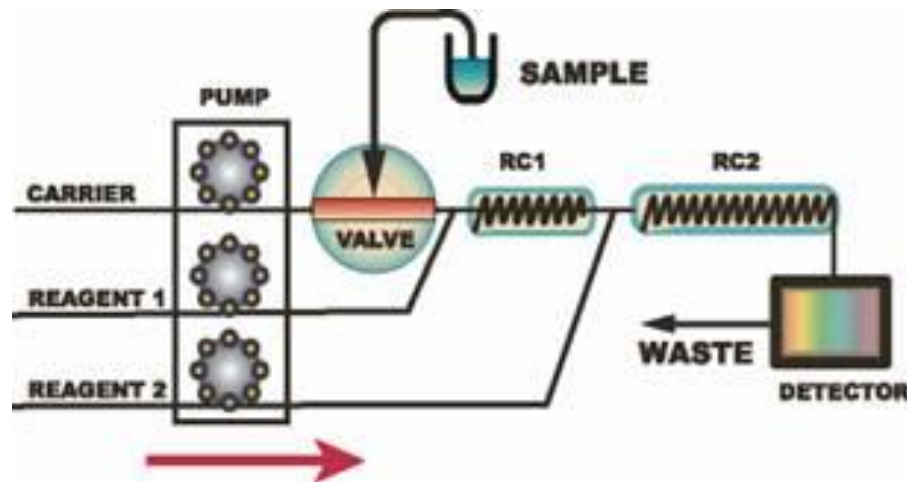


Table 1. Features of the automatic FIA extraction methods.

Analyte	Chemical foundation	Organic phase	Separating system	Detection system
Mo Pb, Cd	CF	Isoamyl alcohol Carbon tetrachloride	Gradient chamber DOH connector- paper phase	Photometric
Cd PO ₄ ³⁻ U		Chloroform Isobuthyl acetate Tributyl phosphate/ heptane	Paper phase Membrane Modified T-piece	
K	IPF	1,2-dichloro-ethane	No	Fluorimetric
Ga Cu, Ni, Zn, Pb Zn	CF	Isoamyl alcohol 4-methyl-2-pentanone	Membrane Membrane	AAS
Zn ClO ₄ ⁻ NO ₃ ⁻ -NO ₂ ⁻ NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	IPF		Membrane Glass-Teflon T-piece	
Caffeine Codeine	NCR IPF	Chloroform	Teflon T-piece	Photometric
Anionic surfactans Anionic surfactans Cationic surfactans		Toluene chloroform	gradient chamber Y-connector	
Procyclidine Diphenyldramamine 8-chlorotheofilline	NCR	Cyclohexane	Membrane Paper phase-teflon membranes	
Vitamin B ₁ Steroids	RR IPF	Chloroform 1,2-dichloro-ethane	Teflon T-piece	Fluorimetric Chemiluminescence



FIA sistemi mogu biti i komplikovaniji, na slici levo vidimo sistem sa dva uzastopna reagensa i dve kolone za mešanje.

Daljnim razvojem ove metode nastaje sekvencijska injekcijska analiza (sequential injection analysis, SIA). Glavna razlika između te dve metode je način disperzije uzorka i reagensa. SIA je mikrofluidička metoda čija je glavna karakteristika dvosmerni neprekinuti tok uzorka i reagensa.

