

2. Szekvenciális injektálásos módszer (SIA, Sequential Injection Analysis)



A szekvenciális injektálásos módszer (SIA) az áramlásos injektálásos módszer (FIA) továbbfejlesztett változatának tekinthető. Lényege:

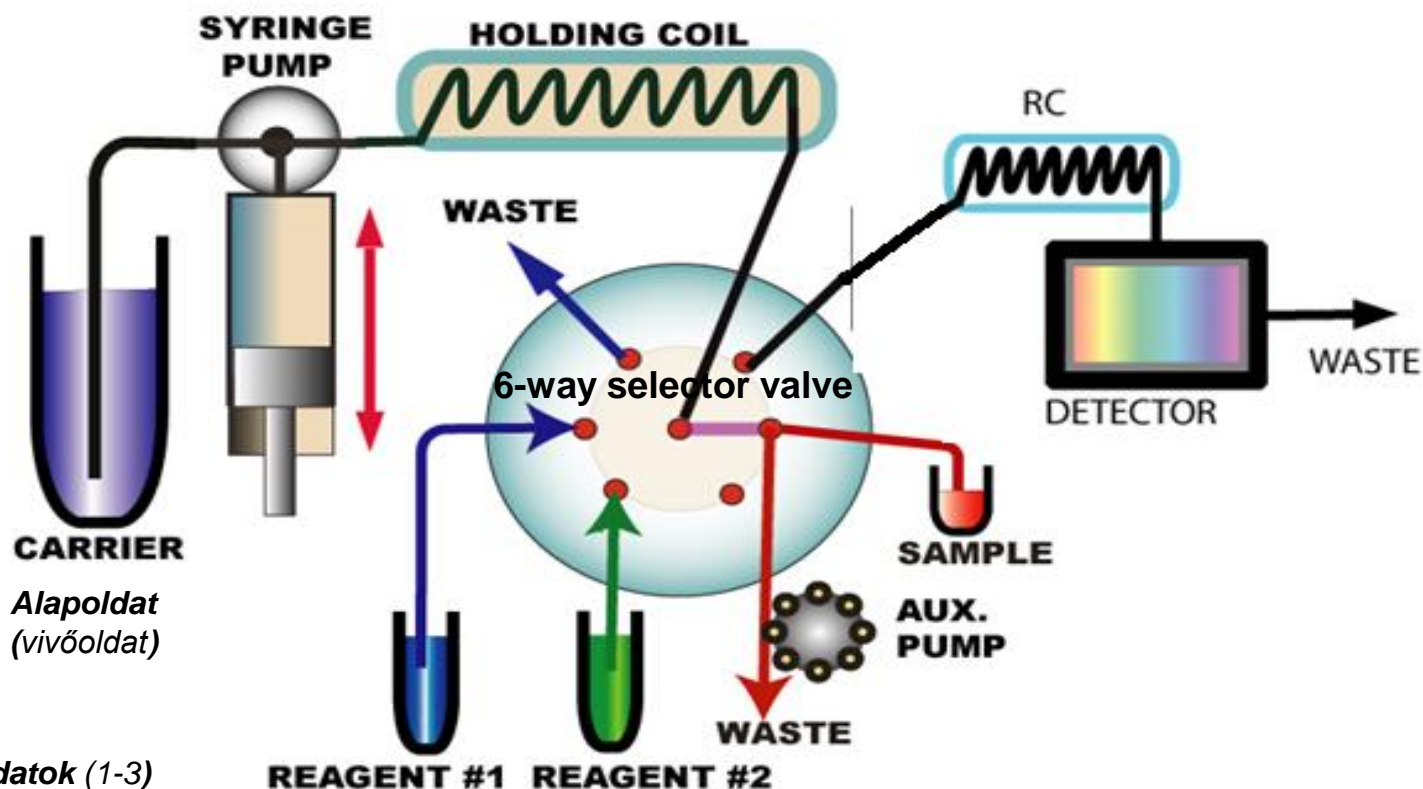
A mintát és a reagenseket egymás után sorban (szekvenciálisan) injektáljuk be az alapoldatba (folymatos áramoltatás nincs!**).**

A minta és a reagensek közötti kémiai reakció intenzifikálása érdekében az áramlás irányát megfordítjuk és áramlási sebességeket az egyes lépésekben jelentősen megváltoztatjuk.

A berendezés központi egysége a multifunkciós szelep, amelynek középső portja (csatlakozója) egy rendkívül precíz működésű dugattyús szivattyúhoz (syringe pump) van kötve.

A rendszer nagyon precíz, csak számítógépes programmal irányítható, amely vezérli a multifunkciós szelep és a szivattyú működését, gyűjti a detektor által szolgáltatott adatokat.

2.1.1 A SIA rendszer általános felépítése



Reagens oldatok (1-3)

Dugattyús pumpa (syringe pump):

Gyűjtő (töltő) csőszakasz (holding coil):

Reaktorcső (RC, reactor coil):

Multifunkciós szelep (6-way selector valve):

Detektor):

Segéd perisztaltikus pumpa (auxiliary pump):

nagy precizitású léptetőmotorral (24000 lépés) hajtva, lökettérfogat: 2,5 ml,

egy lépésre eső lökettérfogat: 2500 μ l/ 24000 \sim 0,1 μ l

120 cm x 0,5 mm, térfogat: \sim 500 μ l

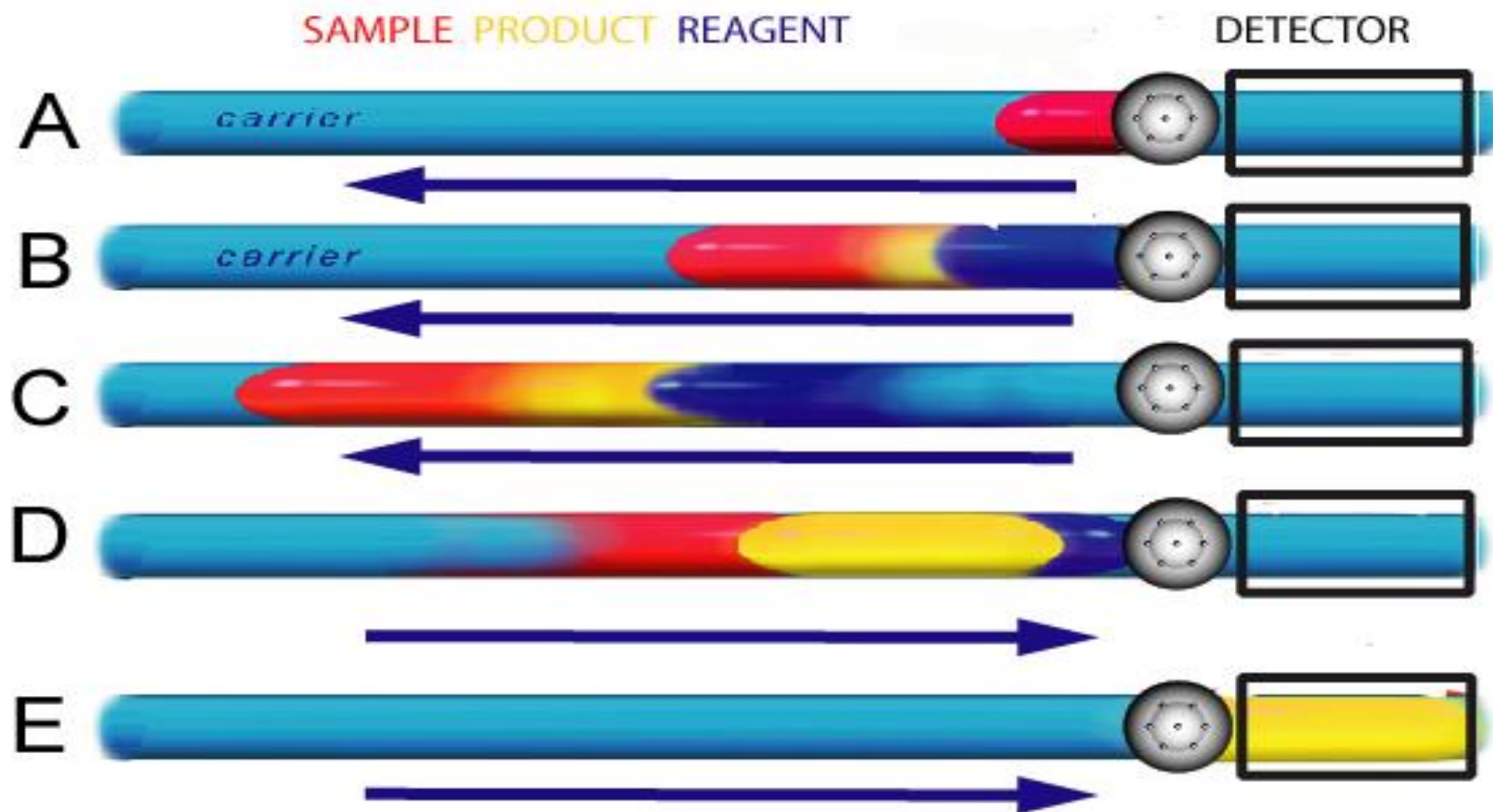
50 cm x 0,5 mm, térfogat: \sim 100 μ l

összekapcsolja a 6 külső portot a központi porttal, biztosítva a komponensek betöltését, áramoltatását a reakciózónán, ill. detektoron keresztül.

ált. spektrofotométer átfolyó cellával (küvetával), cellatérfogat: \sim 250 μ l

a mintaoldatot a szállító csőszakasz ürítésére

2.2 A termék kialakulásának lépései a SIA módszerénél



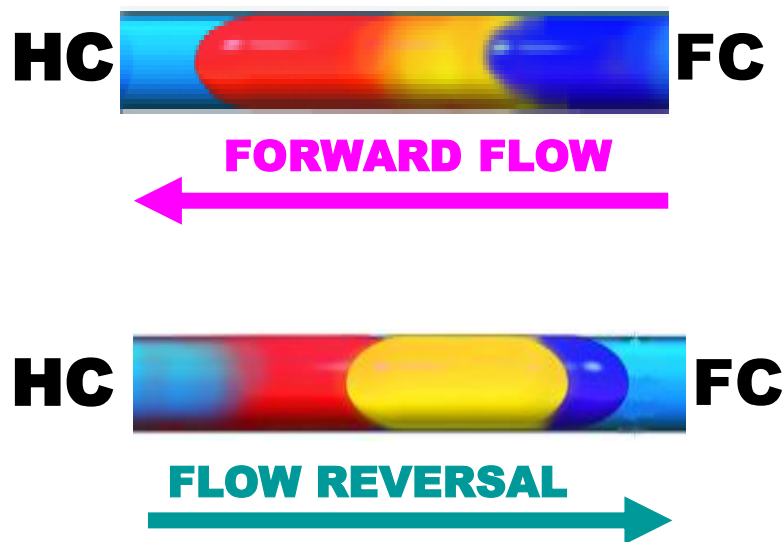
- A:** a mintaoldat felszívása (beinjektálása) a gyűjtőcsőbe (alapoldatba)
- B:** a reagensoldat(ok) felszívása (beinjektálása) a gyűjtőcsőbe
- C:** a spacer (általában ez is alapoldat) felszívása (beinjektálása) a gyűjtőcsőbe, miközben a kémia reakció az átlapoló folyadékfelületeken megkezdődik
- D:** az áramlási irány megfordítása, ezáltal az átlapoló felületek növelése, a kémia reakció intenzifikálása (adott esetben, ha van, ez a reaktorcsőben folytatódik)
- E:** a keletkező színes termék bevitele a detektorcellába (az abszorbancia mérése)

2.3 A keveredés intenzifikálásának módjai, eszközei a SIA rendszerben

1. Az egymás után injektált zónák (az ábrán sárga: termék, piros: minta , sötétkék: reagens, világos kék: alapoldat) a parabolikus lamináris áramlási profil miatt egymásba tolódnak, mivel a zóna közepén kétszer olyan nagy az áramlási sebesség, mint az átlag. Ez elősegíti az axiális irányú keveredést, ugyanakkor a szomszédos zónák határfelületén (a kialakuló kúppalást mentén) meginduló diffúzió következtében megindul a radiális keveredés is.

2. Amikor az áramlási irány megfordul a zónák átlapolása a másik irányból is megtörténik, így a keveredés hatékonysága tovább nő.

3. A zónák átlapolását (egymásba tolását) az áramlási sebességek változtatása (pl. a visszaáramlás meggyorsítása) tovább fokozza.



HC: Holding coil (gyűjtő cső)
FC: Flow cell (átfolyó detektorcella)

2.4 Az egyes paraméterek (áramlási sebesség, injektált térfogat) értékeinek változása SIA protokoll egyes lépéseiben

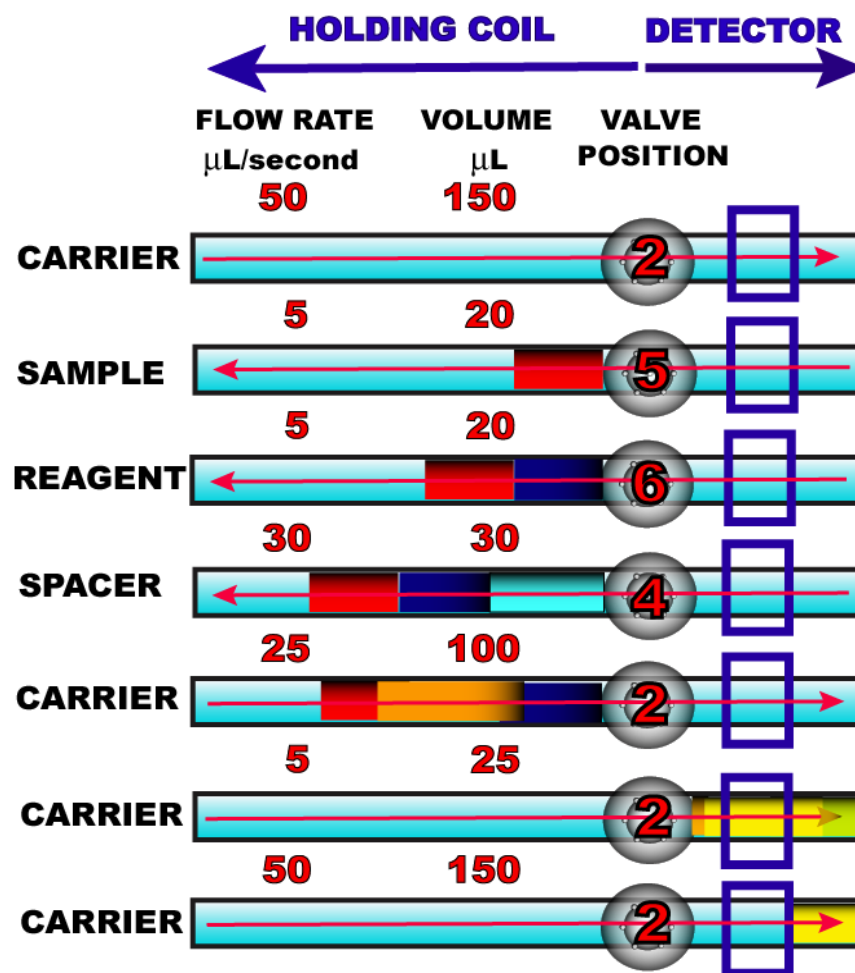
• **Gyors:** az alapoldat felszívása (max.200 $\mu\text{L}/\text{sec}$, itt 50 $\mu\text{L}/\text{sec}$), a detektorcella ürítése a mérés után (50 $\mu\text{L}/\text{sec}$)

• **Közepes:** spacer felszívása (30 $\mu\text{L}/\text{sec}$),

• **Lassú:** a minta és a reagensek felszívása (5 $\mu\text{L}/\text{sec}$), a termék bejuttatása a detektorba, a mérési adatok gyűjtése (5 $\mu\text{L}/\text{sec}$).

• **A spacer (betét) szerepe:** elősegíti a az egymás után beinjektált zónák keveredését. Ha több reagenst használunk, a nagyobb térfogatban adagolt reagens is betöltheti be a spacer szerepét.

Lassú kémiai reakciók esetén itt is előnyösen alkalmazható a **STOP FLOW** technika.



2.5 Miért jobb a SIA módszer a FIA-nál

1. **Programozott minta- és reagens adagolás, továbbá a programozott (és nem folyamatos) áramoltatás:** a FIA módszerhez képest jóval rövidebb úthosszak és az intenzív érintkeztetés következtében **kisebb a minta diszperziója** ($D = C^0/C^{max}$ értéke kisebb lesz), ill. kémia reakció esetén **nagyobb a konverzió**.

2. **Sokkal kisebb vegyszerfelhasználás:** ellentétben a FIA módszerrel itt nincs folyamatos áramoltatása (flow) az oldatoknak (csak akkor adagoljuk a rendszerbe a reagens oldatokat, amikor a mintaoldatot) így jóval kevesebb kell belőlük és kevesebb a regdo mennyisége is.



3. **Minden folyamatot a számítógép irányít:** multifunkciós szelep működtetése, térfogatok bemérése, áramlási sebességek beállítása, ill. változtatása, adatgyűjtés. Ez **rendkívül nagy precizitást** biztosít.

4. **A rendszer könnyen bővíthető** (lásd a köv. oldalon):

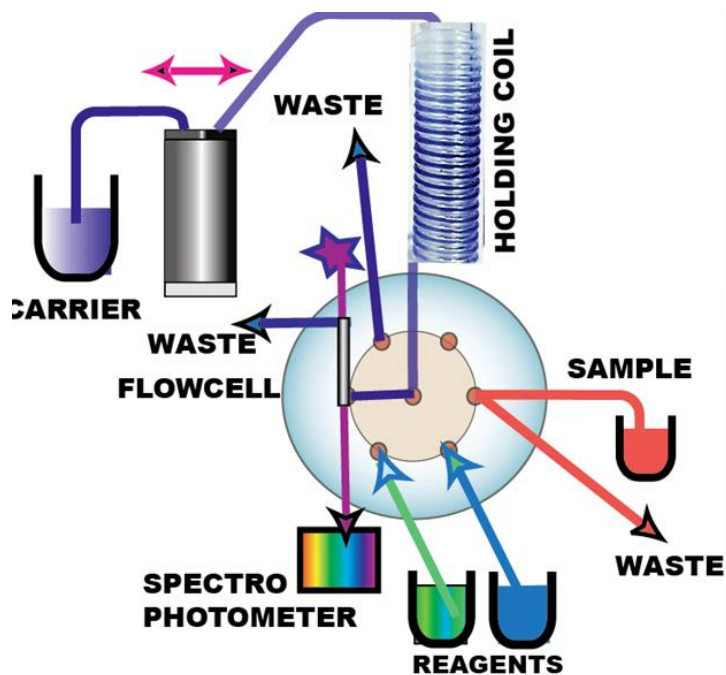
- mivel minden műveletet a multifunkciós szelepen keresztül a számítógép vezérel, az **alap SI rendszerhez könnyen kapcsolhatunk további külső egységeket** (pl. gáz-folyadék szeparátor, folyadék-folyadék extraktor, mikro HPLC kolonna, mikroreaktor, további adagoló-szivattyú, ill. multifunkciós szelep).
- Különböző, más analitikai mérés technikákhoz is könnyen illeszthető. Pl. AS mérésekhez (ICP-OES, ICP-MS, ETA-AAS), kromatográfhoz, kapilláris elektroforézis rendszerhez. Ezeknél előny, hogy precíz mintaelőkészítés és adagolás valósítható meg a SIA rendszerrel.

2.6. Mikro SIA rendszer

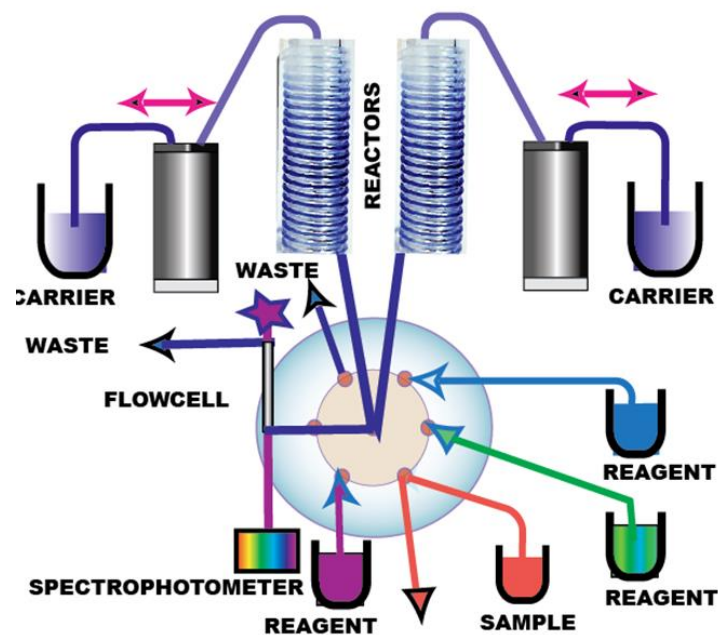
Ebben az elrendezésben az átfolyó detektorcellát ráépítik a multifunkciós szelepre, ezáltal lerövidül az út, amelyen a gyűjtő cellában (holding coil) összemért (egymás után felszívott) komponensekből képződő termék a detektorcellába ér. Így a termék képződése a viszonylag hosszú gyűjtőcellában játszódik le, ahol a reakció jól szabályozható és intenzifikálható a beinjektált térfogatok, az injektálási és áramlási sebességek optimalizálásával (lásd 2.3 pont).

Ezzel a megoldással egy jóval kisebb méretű, hordozható berendezést kapunk (lásd a köv. oldalon) és tovább csökkenthető a vegyszerfelhasználás, ill. a regdo mennyisége.

A rendszer könnyen bővíthető:

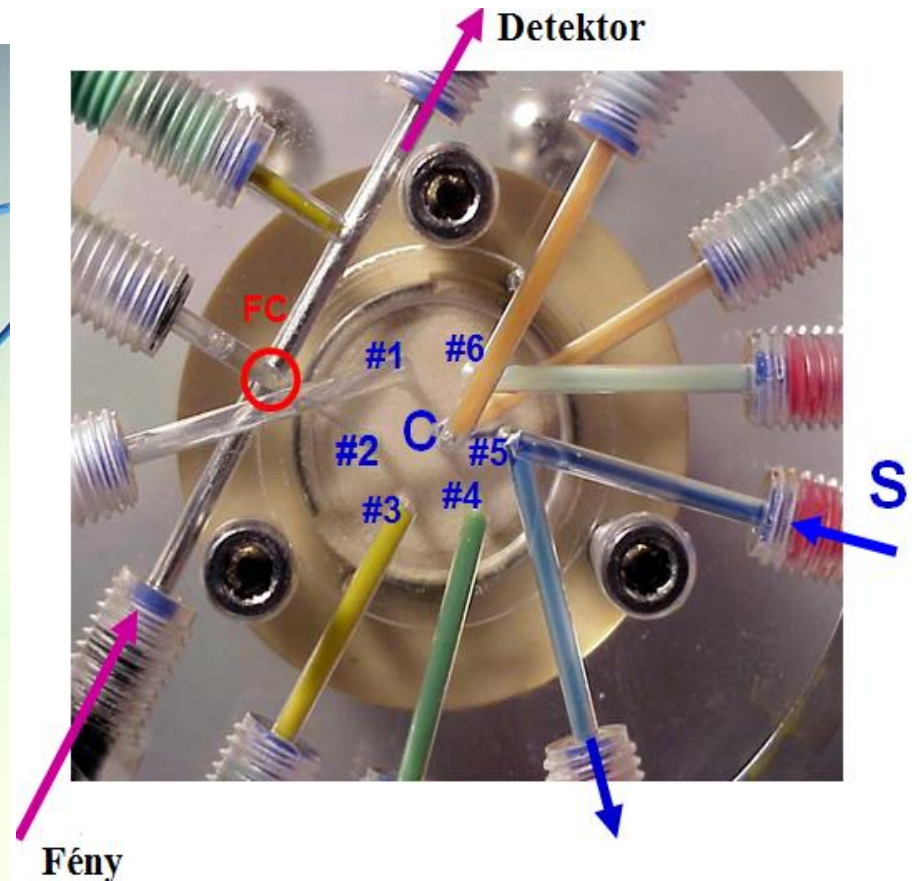
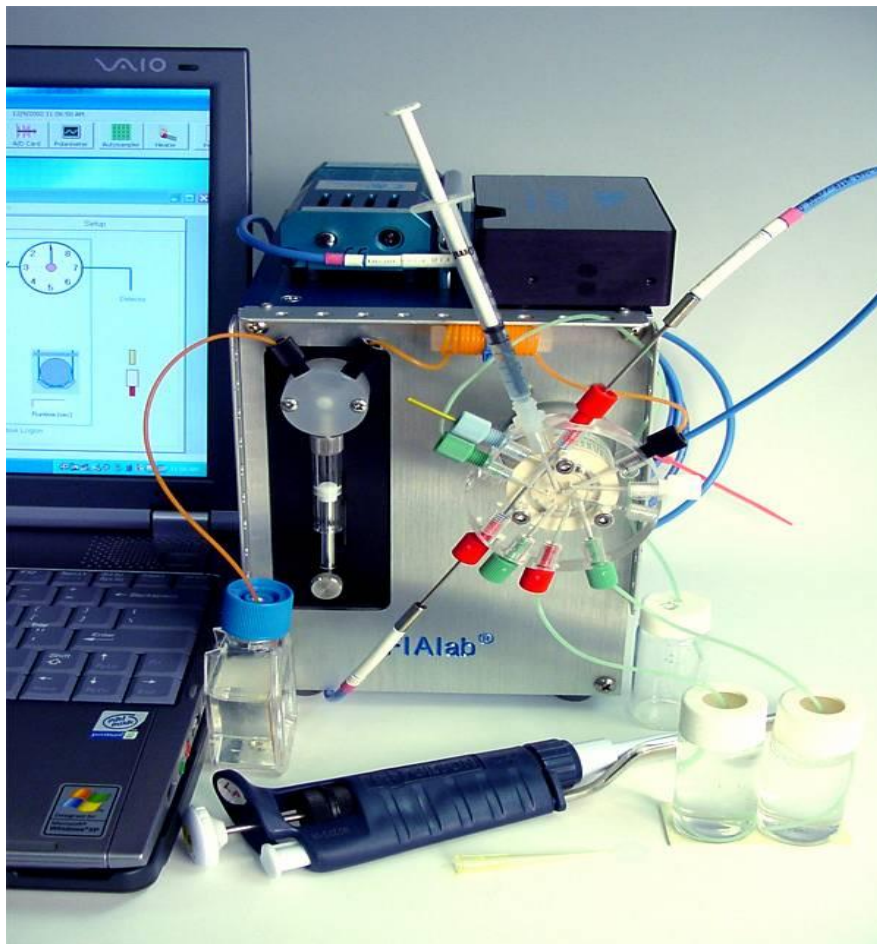


Egyutas μ -SIA rendszer (egy pumpa, egy holding coil)



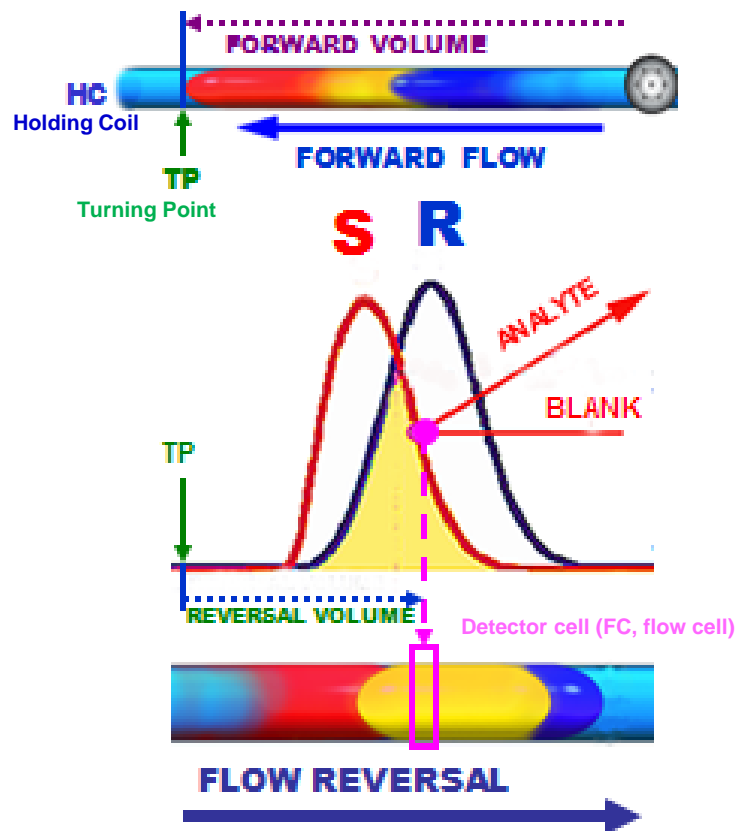
Kétutas μ -SIA rendszer (két pumpa, két holding coil)

2.6. 1. Laboratóriumi hordozható mikro SIA berendezés (micro SIA Lab-on Valve system)



A μ -SIA berendezés multifunciós szelepe, összeépítve az átfolyó cellával (FC)

2.7. Stop flow módszer alkalmazása a SIA rendszerben



A komponensek felszívásának sorrendje a gyűjtőcsőbe (holding coil): **minta**, **reagens 1**, (**reagens 2**, ha van), **spacer** (itt a vivőanyag).

A komponensek optimális térfogataránya:

minta: **reagens 1**: **reagens 2** = 1 : 2 : 3

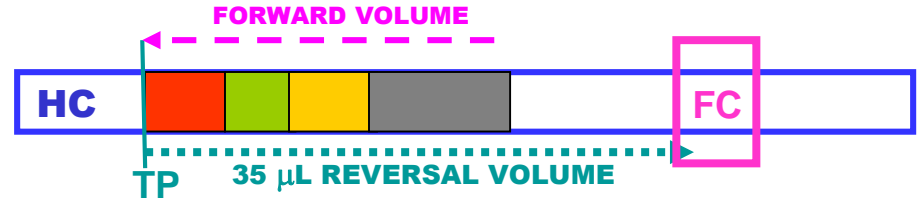
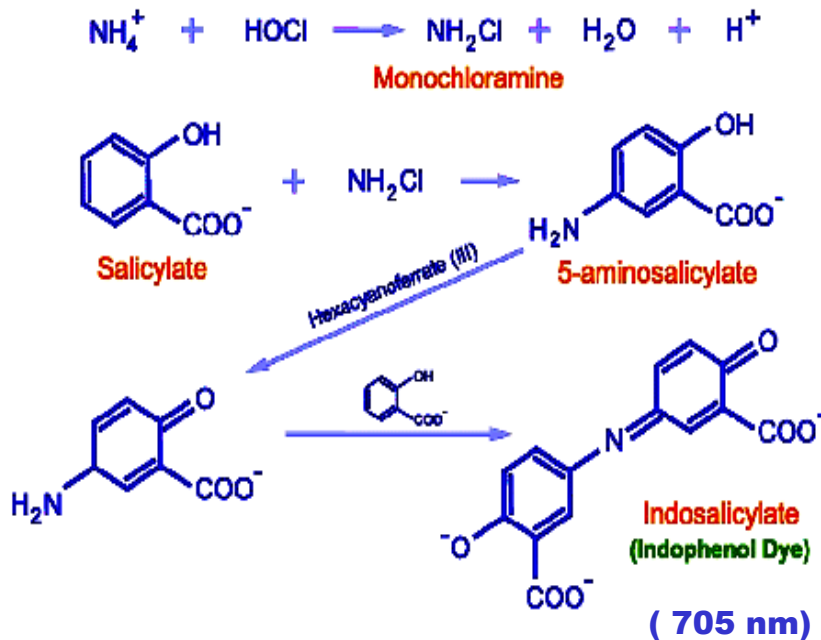
A stop flow módszer előnyei a SIA rendszerben:

A szekvenciális injektálásos módszer előnyei (lásd 2.3-2.5 pontokat) lehetővé teszik, hogy már a gyűjtőcsőben jó konverziót lehet elérni viszonylag egyszerűen és gyorsan (**HC protokoll**), miközben a diszperzió nem nő.

A stop flow módszer (**FC protokoll**) alkalmazása azonban további előnyökkel jár:

- **hosszú reakció esetén tovább növelhető a konverzió** → **nő a mérés érzékenysége**,
- **ha a detektorcellában állítjuk meg az áramlást a minta és a reagens esetleges elnyelése (háttér abszorbancia) nem zavarja a mérést, stabil alapvonalat (blank) kapunk** → **nő a szelektivitás**.

2.8 Példa: Ammónia meghatározása indofenolkék formájában, SIA-stop flow módszerrel



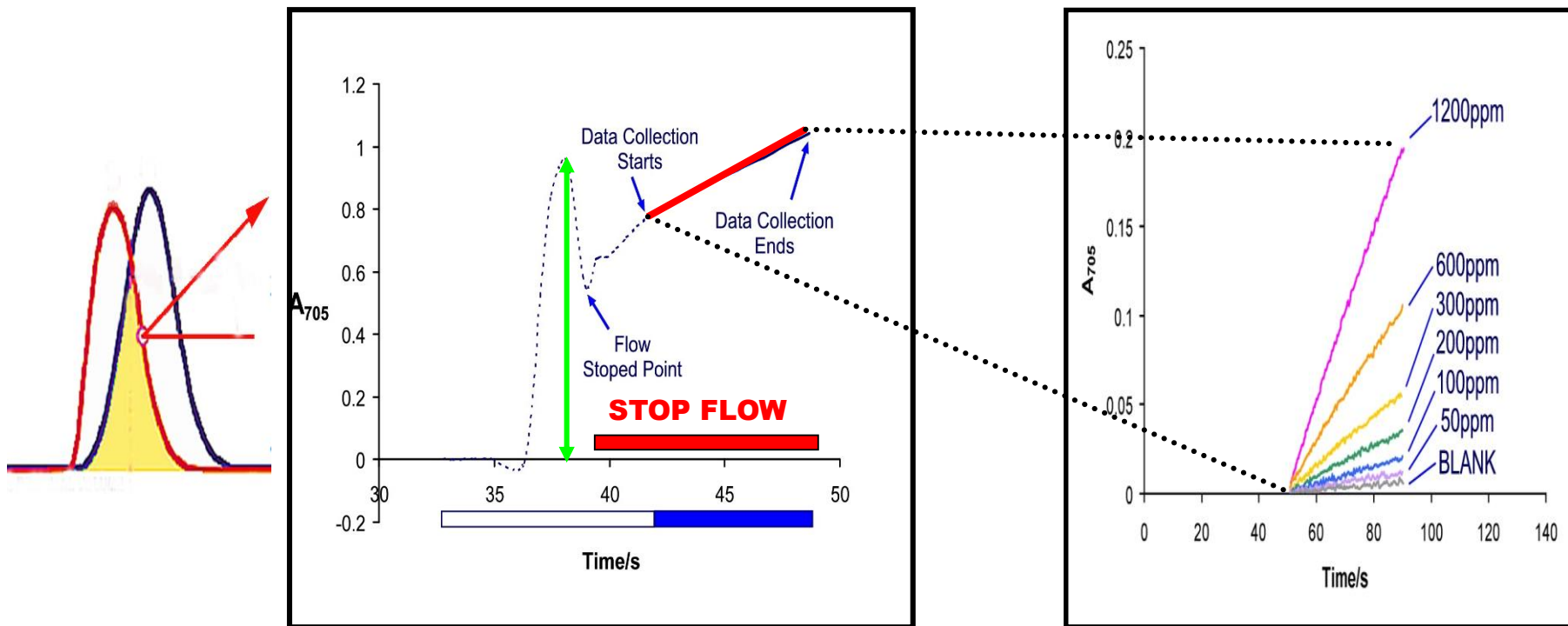
A meghatározás lépései:

A **mintát** (20 μL), a **hipokloritot** (20 μL), a **szalicilátot** (30 μL) és a keveredést fokozó **spacert** (50 μL) sorrendben felszívjuk az **analíziscsatornába** (holding coil), majd megfordítjuk az áramlás irányát (TP: turning point) és plusz **35 μL alapoldattal** (spacer) az átfolyó detektorcellába toljuk a zónákat.

A detektorcellában megállítjuk az áramlást és 40 s ideig mérjük a keletkező indofenol festék koncentrációját, majd gyorsan kimossuk a rendszert.

A teljes elemzési ciklus időtartama: 90 s.
(Chao-Hsiang Wu 2001)

2.8.1. A detektorjel kialakulása az ammónia SLA-stop flow analízise során



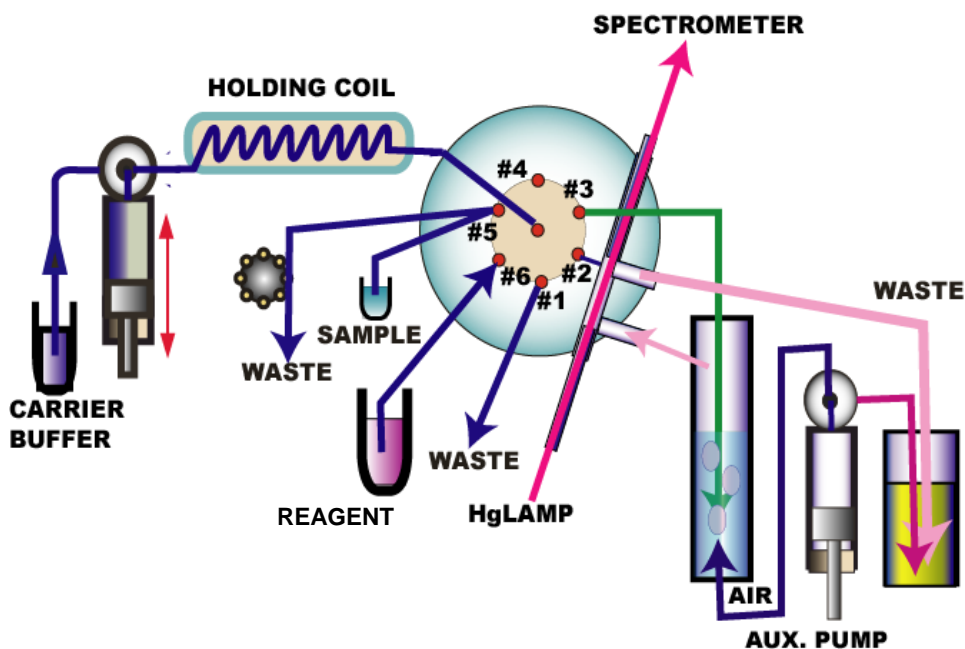
Miután a termék beérkezett a detektorcellába megállítjuk az áramoltatást (piros vonal eleje), majd pontosan beállított ideig (40 s) mérjük (kék vonal) az egyre nagyobb koncentrációban keletkező termék abszorbanciáját (A_{705}).

A lineáris egyenesek kezdőpontja (tk. a vak minta jele) a mérés indulásakor mérhető abszorbancia. Alapvető a precíz időmérés, mert csak akkor hasonlíthatók össze a különböző koncentrációknál mért adatok.

A mérési idő lejártát követően gyorsan kitoljuk a mintát az átfolyó detektorcellából.

2.9. A SIA rendszer bővítése külső egységekkel, alkalmazási példák

2.9.1.: Higany meghatározása CV-atomabszorpciós módszerrel



1. A gyűjtőcellába (holding coil) sorban felszívjuk az alapoldatot (savos puffer), a Hg-t tartalmazó mintát (szerves, vagy szervetlen Hg^{2+} -vegyület), a reagensoldatot (SnCl_2 savas oldata) és a spacert (szintén alapoldat).

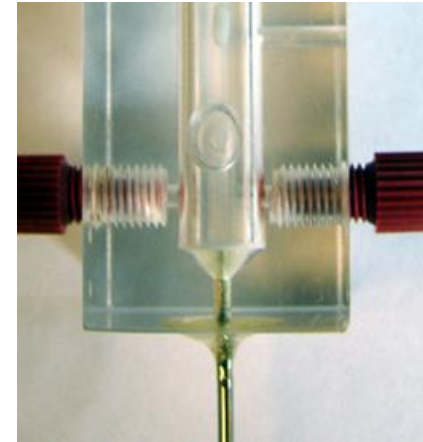
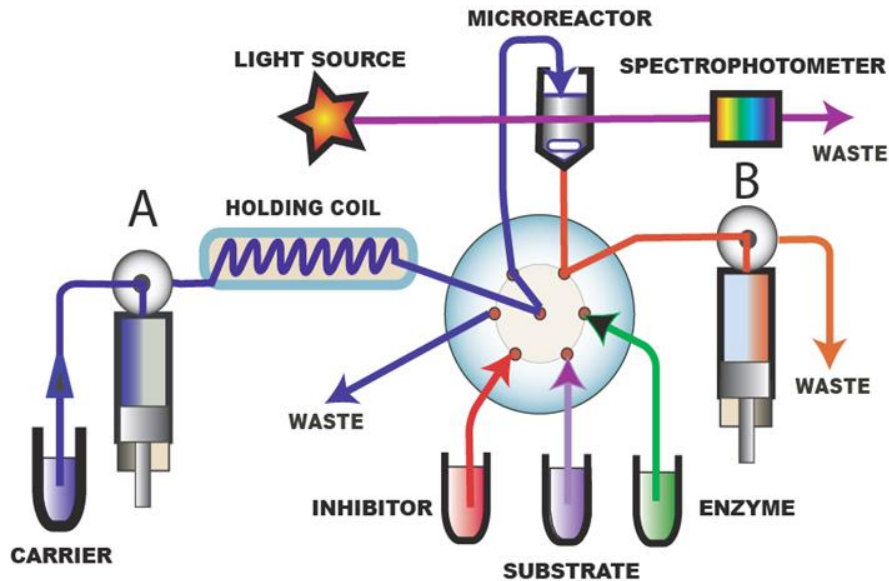
2. Az áramlási irányt megfordítva kitoljuk a gyűjtőcella tartalmát a **gáz-folyadék szeparátorba**. Közben az intenzív érintkeztetés következtében beindul a kémiai reakció (redukció), melynek során fém Hg gőz keletkezik.

3. A keletkező Hg-gőzt levegővel kihajtjuk az oldatból az átfolyó detektorcellába.
4. A detektorcellát Hg vájtkatódú lámpával megvilágítva 254 nm-en mérjük az abszorbanciát.

LOD= 0.3 $\mu\text{g/l}$ (ppb)
Lineáris tart.: 2-50 ppb
teljesítmény.: 30 minta/óra

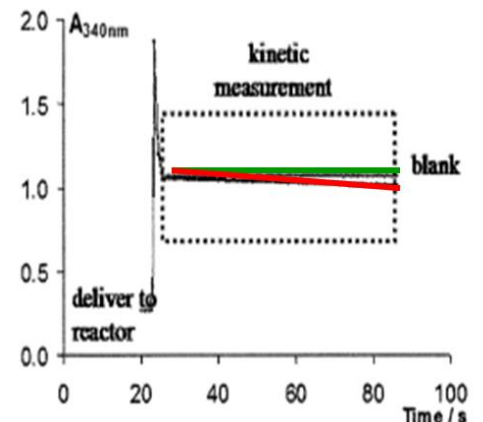
2.9.2.: Mikroreaktor csatlakoztatása a SIA rendszerhez

Enzimkinetika tanulmányozása: acetilkolin észteráz enzim működésének követése inhibitor jelenlétében (A) ill. anélkül (B) spektrofotometriás módszerrel

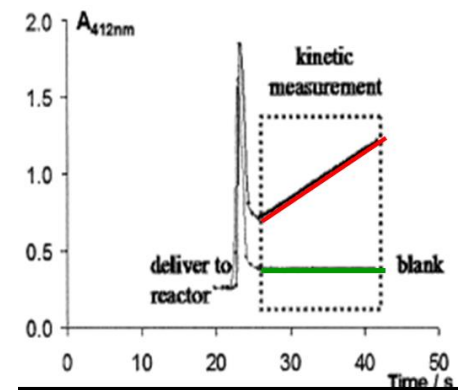


Mikroreaktor, két oldalt az optikai kábelek

A gyűjtőcsőbe (holding coil) sorban felszívjuk az *enzimet*, a *szubsztrátot* és az *inhibitor* (A), majd az összemért oldatot átnyomjuk a mikroreaktorba és kevertetés közben folyamatosan mérjük a szubsztrátból keletkező színes termék abszorbanciáját.



A: inhibitor jelenlétében



B: inhibitor nélkül