

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΩΤΑΥΓΩΝ
ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΑΝΑΛΥΣΕΩΣ

Ευσταθίου Γ. Βασιλείου (Χημικού)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κ. Α. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΩΤΑΥΓΩΝ
ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΑΝΑΛΥΣΕΩΣ

Ευσταθίου Γ. Βασιλείου (Χημικού)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κ. Α. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΩΤΑΥΓΩΝ
ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΑΝΑΛΥΣΕΩΣ

Ευσταθίου Γ. Βασιλείου (Χημικού)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Κ. Α. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κωνσταντίνος Γεωργίου (Καθηγητής, Επιβλέπων Ερευνητής)
Σέρκο Χαρουτουιάν (Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής επιτροπής)
Πέτρος Ταραντίλης (Αναπληρωτής καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής
Επιτροπής)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κωνσταντίνος Γεωργίου (Καθηγητής, Επιβλέπων Ερευνητής)
Σέρκο Χαρουτουιάν (Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής επιτροπής)
Πέτρος Ταραντίλης (Αναπληρωτής καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής)
Κωνσταντίνος Γιαλούρης (Καθηγητής)
Δημήτριος Γεωργακόπουλος (Αναπληρωτής καθηγητής)
Μόσχος Πολυσίου (Καθηγητής)
Γιώργος Μούσδης (Ερευνητής Β', ΕΙΕ)

ΑΘΗΝΑ 2015

*Αφιερώνεται στη γυναίκα μου για την υπομονή της,
και στη μητέρα μου για την ενθάρρυνσή της...*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διδακτορική αυτή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του πρώην Γενικού Τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, το οποίο ενσωματώθηκε στο Τμήμα Τροφίμων του εν λόγω Πανεπιστημίου. Στο Τμήμα αυτό βρήκα όλα τα εφόδια που απαιτούνταν (υλικά και άυλα), για να πραγματοποιήσω αυτή μου τη διατριβή. Με αυτή τη βάση θα ήθελα να απευθύνω κάποιες ευχαριστίες προς άτομα υπαγόμενα ή εμπλεκόμενα στο εργαστήριο.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Α. Γεωργίου, ο οποίος όχι μόνο μου παρείχε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω την ερευνητική μου εργασία (με κάλυψη των υλικοτεχνικών μου αναγκών), αλλά ταυτόχρονα μου παρείχε και σωστές και πολύ χρήσιμες κατευθύνσεις σε περιπτώσεις που προέκυπταν δυσκολίες. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ψυχολογική στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια αυτής μου της προσπάθειας.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Πέτρο Ταραντίλη για την ενθάρρυνση που μου έδινε αρκετά απογεύματα που τον συναντούσα, οπότε και με παρέτρεπε ευγενικά να συνεχίσω με αυτό το ρυθμό την έρευνά μου.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Σέρκο Χαρουτουγιάν, ο οποίος δέχθηκε να διατελέσει μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής και να συμβάλλει και αυτός με τον τρόπο του στην πρόοδο της διατριβής μου.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Παρασκευαστές του εργαστηρίου που ήταν πάντα πρόθυμοι να μου προσφέρουν όλα τα αναγκαία (υλικοτεχνικά στοιχεία) για την πρόοδο της έρευνάς μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα ή συνδιαλέχθηκα (Ελένη Λαμπρινέα, Κωνσταντίνα Πούλη, Yaroslava Makaronska, Στράτο Κωμαΐτη και Lucyna Łekawska) για την αμέριστη συμπαράστασή τους και την κατανόησή τους στις επίπονες ώρες της εκπόνησης της συγκεκριμένης διατριβής. Οφείλω να ομολογήσω ότι το κλίμα συμπαράστασης ήταν διάχυτο από όλους και σε καμία περίπτωση δεν εισέπραξα διαφορετικά αισθήματα.

Αθήνα, Ιανουάριος 2015

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
SUMMARY	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	5
1. ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ	5
1.1. ΟΡΙΣΜΟΙ	5
1.2. ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟ.....	7
1.3. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ	9
1.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ.....	11
1.4.1. ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΔΙΑΚΡΙΤΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ	13
1.4.2. ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΡΟΗΣ	17
2. ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ (FIA: FLOW INJECTION ANALYSIS).....	21
2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ FIA	21
2.2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΠΟΥ ΔΙΕΠΟΥΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ FIA.....	22
2.3. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ FIA	25
2.3.1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΣΧΕΤΙΚΟ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	26
2.3.1.1. ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΙΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ	28
2.3.1.2. ΑΜΟΙΒΑΙΑ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΙ ΣΥΛΛΟΓΙΣΜΟΙ.....	31
2.3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA	34
2.3.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA	34
2.3.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΗΚΟΥΣ, ΤΗΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ ΔΙΑΥΛΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA.....	35
2.3.2.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΕΩΜΕΤΡΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA	37
2.3.2.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΛΛΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA ..	39
2.3.2.4.1. ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΩΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΘΑΛΑΜΩΝ (TANK IN SERIES MODEL).....	40
2.3.2.4.2. ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΗΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ.....	40
2.3.2.4.3. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ FIA	42

2.3.3.	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ FIA ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ	43
2.3.4.	ΤΕΧΝΙΚΕΣ FIA.....	47
2.3.4.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	47
2.3.4.2.	ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ FIA	47
2.3.4.3.	ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ FIA	49
2.4.	ΣΥΝΗΘΗΣ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΤΩΝ FIA	51
2.4.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	51
2.4.2.	ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΡΟΩΘΗΣΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ.....	51
2.4.3.	ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΡΟΗ.....	52
2.4.4.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ	53
2.4.5.	ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ	54
2.4.6.	ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΗΜΑΤΩΝ	55
2.4.7.	ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ FIA	56
2.5.	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ FIA ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ	56
2.6.	ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ FIA	57
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	59
3.	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΥΤΗ FIA ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ H ₂ O ₂ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ	59
3.1.	ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	59
3.2.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΥΛΙΚΟΥ.....	61
3.3.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΕ	74
3.3.1.	ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ.....	74
3.3.2.	ΓΛΩΣΣΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΥ LABVIEW	74
3.3.3.	ΔΟΜΗ ΕΝΟΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ LABVIEW	75
3.3.4.	ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ.....	78
3.4.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ-ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΣΧΕΔΙΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ H ₂ O ₂ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ	86
3.4.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	86
3.4.2.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	88
3.4.2.1.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	88
3.4.2.2.	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	89

3.4.2.3.	ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗΣ.....	89
3.4.2.4.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	91
3.4.3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	93
3.4.3.1.	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ	93
3.4.3.1.1.	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ CO (II)	94
3.4.3.1.2.	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΛΟΥΜΙΝΟΛΗΣ.....	95
3.4.3.1.3.	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΟΓΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	96
3.4.3.1.4.	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΑΧΥΤΗΤΟΣ ΡΟΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	97
3.4.3.2.	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	99
3.4.3.2.1.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΤΡΑΣ (MATRIX EFFECT)	99
3.4.3.2.2.	ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ	99
3.4.3.2.3.	ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ.....	100
3.4.3.2.4.	ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ.....	100
3.4.3.2.5.	ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ	100
3.4.4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	101
3.4.5.	ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	102
4.	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΥΤΗ FIA ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ	104
4.1.	ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	104
4.2.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΥΛΙΚΟΥ.....	106
4.3.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΕ	115
4.3.1.	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ.....	115
4.3.2.	ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΓΛΩΣΣΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΥ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ (LABVIEW)	115
4.3.3.	ΔΟΜΗ ΕΝΟΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ LABVIEW	115
4.3.4.	ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΥΡΙΟΥ ΑΥΤΟΣΧΕΔΙΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ.....	116
4.4.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ-ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΣΧΕΔΙΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ.....	117
5.	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΗ FIA ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΠΗΚΤΙΝΗΣ.....	117
5.1.	ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	117
5.2.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΥΛΙΚΟΥ.....	120

5.3.	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ	126
5.3.1.	ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΥΡΙΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΑΤΟΣ.....	126
5.4.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ-ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΣΧΕΔΙΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΗΚΤΙΝΗΣ	134
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	135
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	157

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ο ορισμός του αυτοματισμού εργαστηρίου κατά τον R. D. McDowall.	6
Σχήμα 2: Διακριτά στάδια μιας χημικής αναλύσεως.	7
Σχήμα 3: Απεικόνιση ενός σειριακού αναλυτή με φιαλίδια (BIOLIS 24i, PREMIUM) για κλινικές αναλύσεις	14
Σχήμα 4: Απεικόνιση του αναλυτή Automated Clinical Analyzer της εταιρείας Dupont.....	15
Σχήμα 5: Απεικόνιση ενός φυγοκεντρικού αναλυτή της εταιρείας COBAS	16
Σχήμα 6: Απεικόνιση ενός ρομποτικού διακριτού αναλυτή	17
Σχήμα 7: Απεικόνιση του ανιχνευτή Chem1 της εταιρείας Technicon	19
Σχήμα 8: Απεικόνιση εν παραλλήλω δύο αναλυτών (διακριτών αναλύσεων και ροής) σε σχέση με την εκτέλεση της ανάλυσης «δια χειρός» για σύγκριση	20
Σχήμα 9: Απεικόνιση της εκθετικής αύξησης δημοσιεύσεων που αναφέρουν την τεχνική FIA.	22
Σχήμα 10: Απεικόνιση ενός απλού συστήματος FIA (α) και ενός τυπικού καταγραφήματος (β).	23
Σχήμα 11: Μέτωπο ταχυτήτων στην τυρβώδη ροή (α) και στη στρωτή ροή (β).	27
Σχήμα 12: Σχετική κίνηση μορίων κατά την ακτινική διασπορά (α) και μέτωπο ταχυτήτων μετά από εκτεταμένη ακτινική διασπορά (β).....	27
Σχήμα 13: Απεικόνιση της βαθμίδωσης συγκεντρώσεων που δημιουργείται κατά την διασπορά ενός ιχνηθέτη μέσα σε ένα αδρανές υγρό	29
Σχήμα 14: Απεικόνιση της ζώνης δείγματος σε διάφορους χρόνους παραμονής μέσα στους διαύλους συστήματος FIA και συσχέτιση με τις καμπύλες που προκύπτουν.	30
Σχήμα 15: Απεικόνιση αμοιβαίας διασποράς δείγματος και αντιδραστηρίου σε σύστημα FIA μονού διαύλου.....	31
Σχήμα 16: Διπλή κορυφή σε ανεπάρκεια αντιδραστηρίου στο κέντρο της ζώνης του δείγματος, σε σύστημα FIA μονού διαύλου.	32
Σχήμα 17: Απεικόνιση συστήματος FIA δύο διαύλων (α) και της αμοιβαίας διασποράς δείγματος και αντιδραστηρίου (β).....	33
Σχήμα 18: Καμπύλες που δείχνουν την επίδραση του όγκου δείγματος σε απλό σύστημα FIA μονού διαύλου.....	35
Σχήμα 19: Επίδραση του μήκους του διαύλου στη διασπορά.	36
Σχήμα 20: Διάφοροι τύποι αντιδραστήρων που χρησιμοποιούνται στην FIA.....	37
Σχήμα 21: Κορυφές που ανιχνεύονται με χρήση των αντιδραστήρων του σχήματος 20.	38
Σχήμα 22: Σύστημα ολοκληρωμένων μικροσωληνώσεων της εταιρείας NaBis	39
Σχήμα 23: Καμπύλες συγκέντρωσης ιχνηθέτη συναρτήσει του χρόνου για διαφορετικούς αριθμούς διαδοχικών θεωρητικών θαλάμων.	40
Σχήμα 24: Σύστημα FIA μεγάλης διασποράς για ογκομετρήσεις	44
Σχήμα 25: Συγκέντρωση στην έξοδο του θαλάμου αναμείξεως ως συνάρτηση του χρόνου	46
Σχήμα 26: Συστήματα διαύλων που συναντά κανείς σε αναλύσεις.	48
Σχήμα 27: Σύστημα FIA, όπου απεικονίζεται η υλοποίηση της τεχνικής συγχωνευόμενων ζωνών.....	50
Σχήμα 28: Απεικόνιση ενός συστήματος εισαγωγής δείγματος με μέτρηση χρόνου.	53
Σχήμα 29: Σχηματική απεικόνιση του αυτοσχέδιου αναλυτή FIA, που αναπτύχθηκε για μέτρηση H ₂ O ₂ σε εκπνεόμενο αέρα.....	60
Σχήμα 30: Κάρτα διακοπών στερεάς κατάστασης PCL-725 της εταιρείας Advantech, στην κατασκευή του αναλυτή H ₂ O ₂	61

Σχήμα 31: Ανιχνευτής HC 135-01 της εταιρείας Hamamatsu, που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή του αναλυτή FIA, για ανάλυση H ₂ O ₂ .	63
Σχήμα 32: Κύκλωμα στο εσωτερικό του ανιχνευτή HC 135-01 της εταιρείας Hamamatsu.	63
Σχήμα 33: Αυτοσχέδια κυψελίδας ροής, που χρησιμοποιήθηκε στον αναλυτή για H ₂ O ₂ .	66
Σχήμα 34: Απεικόνιση σταδίων κατασκευής και συναρμογής της αυτοσχέδιας κυψελίδας ροής.	67
Σχήμα 35: Βάση αλουμινίου, η οποία χρησιμεύει για στήριξη και θερμοστάτηση της κυψελίδας ροής. Η οπή διέλευσης των διαύλων εισόδου εξόδου στην κυψελίδα φαίνεται με το μπλέ βέλος.	68
Σχήμα 36: Φορέας του ανιχνευτή FIA για προσδιορισμό H ₂ O ₂ .	69
Σχήμα 37: Στάδια προσαρμογής της λυχνίας φωτοπολλαπλασιαστή στον φορέα.	70
Σχήμα 38: Προσαρμογή του συστήματος «σύστημα ψύξης– κυψελίδα ροής» στον φορέα του ανιχνευτή FIA για ανίχνευση H ₂ O ₂ .	71
Σχήμα 39: Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή της εταιρείας VICI, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη του αναλυτή FIA για H ₂ O ₂ .	71
Σχήμα 40: Απεικόνιση των δύο θέσεων λειτουργίας της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος σε ροή.	72
Σχήμα 41: Περισταλτική αντλία της εταιρείας ISMATEC για τον αναλυτή FIA για H ₂ O ₂ .	73
Σχήμα 42: Υπορουτίνα ρύθμισης του χρονισμού λήψης των μετρήσεων από τον φωτοπολλαπλασιαστή (Εμπρόσθιο πλαίσιο)	77
Σχήμα 43: Υπορουτίνα ρύθμισης του χρονισμού λήψης των μετρήσεων από τον φωτοπολλαπλασιαστή (Κώδικας)	77
Σχήμα 44: Εμπρόσθιο πλαίσιο του προγράμματος της γλώσσας Labview στον αναλυτή FIA για μέτρηση H ₂ O ₂ .	78
Σχήμα 45: Κώδικας του προγράμματος για ανάλυση H ₂ O ₂ .	81
Σχήμα 46: Λογικό διάγραμμα του προγράμματος για ανάλυση H ₂ O ₂ .	82
Σχήμα 47: Εμπρόσθιο πλαίσιο της υπορουτίνας λήψης δεδομένων, που αναπτύχθηκε για την μέτρηση H ₂ O ₂ .	83
Σχήμα 48: Λογικό διάγραμμα της υπορουτίνας λήψης δεδομένων για ανάλυση H ₂ O ₂ .	84
Σχήμα 49: Κώδικας της υπορουτίνας λήψης δεδομένων για ανάλυση H ₂ O ₂ .	85
Σχήμα 50: Φορητό σύστημα συμπύκνωσης που αναπτύχθηκε για την μελέτη.	90
Σχήμα 51: Αναλυτής FIA που κατασκευάστηκε για προσδιορισμό H ₂ O ₂ .	91
Σχήμα 52: Κορυφές που λαμβάνονται κατά την ανάλυση H ₂ O ₂ , με πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων.	92
Σχήμα 53: Επίδραση του όγκου δείγματος στις καμπύλες του ανιχνευτή για ανίχνευση H ₂ O ₂ . Συγκέντρωση H ₂ O ₂ : 5,0 × 10 ⁻⁷ M, Ταχύτητα ροής αντιδραστηρίων: 1,5 mL/min.	97
Σχήμα 54: Επίδραση της ταχύτητας ροής αντιδραστηρίων στις καμπύλες του ανιχνευτή για ανίχνευση H ₂ O ₂ .	98
Σχήμα 55: Εμπρόσθιο πλαίσιο του ειδικού προγράμματος που αναπτύχθηκε για επεξεργασία των αρχείων με τις μετρήσεις.	103
Σχήμα 56: Αναλυτής FIA που αναπτύχθηκε για μέτρηση τοξικότητας.	106
Σχήμα 57: Κάρτα ηλεκτρομηχανικών διακοπών PCI-1760U της εταιρείας Advantech, του αναλυτή FIA για εκτίμηση τοξικότητας.	107
Σχήμα 58: Τερματικό ADAM 3937 της εταιρείας Advantech, που χρησιμοποιείται για διασύνδεση συσκευών στον αναλυτή FIA για ανάλυση τοξικότητας.	108
Σχήμα 59: Ανιχνευτής HC 9319-01 της εταιρείας Hamamatsu, που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή του αναλυτή FIA για ανάλυση τοξικότητας.	109

Σχήμα 60: Κυψελίδα ροής του αναλυτή FIA για ανάλυση τοξικότητας.....	111
Σχήμα 61: Αυτοσχέδιος φορέας του ανιχνευτή FIA για προσδιορισμό τοξικότητας σε δείγματα νερού. ...	112
Σχήμα 62: Περισταλτική αντλία Gilson Minipuls 3 του αναλυτή FIA για προσδιορισμό τοξικότητας σε δείγματα νερού.....	114
Σχήμα 63: Αναλυτής FIA που αναπτύχθηκε για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	119
Σχήμα 64: Ανιχνευτής USB 2000+ της εταιρείας Ocean Optics του αναλυτή FIA για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	120
Σχήμα 65: Κυψελίδα ροής της εταιρείας Hellma Analytics του αναλυτή FIA για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	122
Σχήμα 66: Βάση στήριξης της κυψελίδας ροής του αναλυτή FIA για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	124
Σχήμα 67: Εμπρόσθιο πλαίσιο του προγράμματος για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	126
Σχήμα 68: Κώδικας του αυτοσχέδιου προγράμματος για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	130
Σχήμα 69: Λογικό διάγραμμα του προγράμματος για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	131
Σχήμα 70: Εμπρόσθιο πλαίσιο της υπορουτίνας λήψης δεδομένων του αναλυτή για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	132
Σχήμα 71: Λογικό διάγραμμα της υπορουτίνας λήψης δεδομένων για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	133
Σχήμα 72: Κώδικας της υπορουτίνας λήψης δεδομένων για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.....	134

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ταξινόμηση αναλυτικών συστημάτων (αναλυτών) και κριτήρια ταξινόμησής τους	11
Πίνακας 2: Ενδεικτική αναφορά παραδειγμάτων ανιχνευτών σε αναλυτές ροής	18
Πίνακας 3: Ενδεικτική πορεία ενσωμάτωσης τεχνικών-ανιχνευτών σε αναλυτές ροής FIA	21
Πίνακας 4: Τεχνικές ανίχνευσης και συχνότητα εμφανίσεώς τους σε σύνολο 2200 περίπου άρθρων όπως φαίνονται στην βιβλιογραφία μέχρι το 1989 οπότε ενσωματώθηκαν σχεδόν όλες οι τεχνικές.	54
Πίνακας 5: Κατανομή των μέχρι το 1987 δημοσιεύσεων της FIA, ανά πεδίο εφαρμογής	56
Πίνακας 6: Χρήσιμα τεχνικά στοιχεία του ανιχνευτή PMT HC 135-01 της εταιρείας Hamamatsu	64
Πίνακας 7: Επίδραση της συγκέντρωσης Co (II) στα χαρακτηριστικά μεγέθη της καμπύλης αναφοράς υπεροξειδίου του υδρογόνου	95
Πίνακας 8: Επίδραση της συγκέντρωσης λουμινόλης στα χαρακτηριστικά μεγέθη της καμπύλης αναφοράς υπεροξειδίου του υδρογόνου.....	96
Πίνακας 9: Πειράματα ανάκτησης υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δείγμα EBC, που συλλέχθηκε από υγιές άτομο με μηδενική συγκέντρωση H ₂ O ₂	99
Πίνακας 10: Αποτελέσματα που ελήφθησαν από αναλύσεις EBC ασθενών.....	101
Πίνακας 11: Χρήσιμα τεχνικά χαρακτηριστικά του ανιχνευτή PMT HC 9319-01 της εταιρείας Hamamatsu .	109
Πίνακας 12: Χρήσιμα τεχνικά στοιχεία του ανιχνευτή USB 2000+ της εταιρείας Ocean Optics	121
Πίνακας 13: Τεχνικά στοιχεία της βάσης της κυψελίδας ροής, της εταιρείας Ocean Optics.....	125

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή περιγράφεται η ανάπτυξη αυτοματοποιημένων μεθόδων αναλύσεων, οι οποίες κάνουν χρήση της αναλυτικής τεχνικής FIA, μέσω της εφαρμογή της πάνω σε ιδιοκατασκευασμένους αναλυτές. Οι αναλυτές αυτοί κατασκευάστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε να διευκολύνουν την ανίχνευση των υπό διερεύνηση μορίων, να παρέχουν τρόπο αυτόματου χειρισμού των αντιδραστηρίων και να επιτρέπουν και την επεξεργασία, παρουσίαση και αποθήκευση των ληφθέντων δεδομένων ανίχνευσης (σήματα που μεταδίδονται προς τους ανιχνευτές). Η διενέργεια των προαναφερθέντων διαδικασιών, που ουσιαστικά συνοψίζονται με την αναφορά των δύο παρακάτω όρων: Flow control (Έλεγχος της ροής λειτουργίας των αναλυτών) και Data Acquisition-Manipulation-Presentation (Διαδικασία λήψης και διαχείρισης δεδομένων ανίχνευσης), πραγματοποιείται με την βοήθεια δύο αυτοσχέδιων προγραμμάτων, συντεταγμένων σε προγραμματιστική γλώσσα Labview.

Η κατασκευή αυτών των αναλυτών πραγματοποιήθηκε για να καλύψει επιστημονικά πεδία ευρέως φάσματος, όπως η ιατρική (1^{ος} αναλυτής, για ανίχνευση H₂O₂ σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα), το περιβάλλον (2^{ος} αναλυτής, για έλεγχο δειγμάτων νερού για τοξικότητα) και τα τρόφιμα (3^{ος} αναλυτής, για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης). Με αυτόν τον τρόπο επιδεικνύεται σαφέστατα η ευκολία με την οποία μπορεί κάποιος να χρησιμοποιήσει την τεχνική FIA, για να αυτοματοποιήσει μεθόδους ανάλυσης, που τον αφορούν, αλλά ταυτόχρονα να επιτύχει και στόχους για: μείωση όγκου αντιδραστηρίων, ευκολότερο χειρισμό αντιδραστηρίων, σαφέστατο χρονισμό πραγματοποίησης αντιδράσεων, καθώς και για παρακολούθηση ασταθών προϊόντων (μέσω χρήσης της τεχνικής stop flow analysis – 2^{ος} αναλυτής – κεφάλαιο 2).

Στην διατριβή αυτή (κεφάλαιο 1), αναφέρονται μερικά βασικά στοιχεία για τον αυτοματισμό στο αναλυτικό εργαστήριο και τονίζονται τα σημεία εκείνα, που οδήγησαν σε όλο και μεγαλύτερη ανάγκη της επιστημονικής κοινότητας, για ανάπτυξη όλο και πιο αυτόματων μεθόδων ανάλυσης, αλλά και όλο και πιο εξειδικευμένων μεθόδων (εφαρμοζόμενων ανά περίπτωση). Στο ίδιο κεφάλαιο αναλύονται μερικά βασικά στοιχεία για

τον αυτοματισμό συστημάτων ανάλυσης, όπως η κατηγοριοποίησή τους, καθώς και παραδείγματα σύγχρονων τάσεων στην αυτοματοποίηση των συστημάτων ανάλυσης.

Στο κεφάλαιο 2, αναφέρονται μερικά θεωρητικά στοιχεία που ενδιαφέρουν την εν λόγω τεχνική. Τέτοια στοιχεία αφορούν σε: μια θεωρητική προσέγγιση της μεθόδου αυτής (με αναφορά στις παραμέτρους που την επηρεάζουν), τις τεχνικές αυτοματοποίησης, που προσφέρει αυτή η μέθοδος, οργανολογία που εμπλέκει και προοπτικές που δημιουργεί.

Στα κεφάλαια 3-5, αναφέρονται αναλυτικά πληροφορίες για τον κάθε αναλυτή που κατασκευάστηκε. Πιο συγκεκριμένα, στο κεφάλαιο 3 αναπτύσσεται ο τρόπος κατασκευής ενός αυτοσχέδιου αναλυτή, για ανάλυση δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα για H_2O_2 , στο κεφάλαιο 4 αναπτύσσεται ο τρόπος κατασκευής ενός αυτοσχέδιου αναλυτή, για ανάλυση δειγμάτων νερού για τοξικότητα και στο κεφάλαιο 5 αναπτύσσεται ο τρόπος κατασκευής ενός αυτοσχέδιου αναλυτή, για προσδιορισμό μεθυλεστέρων σε δείγματα πηκτίνης. Για τον κάθε αναλυτή αναφέρονται χρήσιμα στοιχεία που περιγράφουν αναλυτικά την κατασκευή του και η παρουσίαση αυτών των στοιχείων γίνεται με τον ακόλουθο τρόπο: α) Παράθεση ενδεικτικού σχεδιαγράμματος του αναλυτή FIA και σύντομη περιγραφή λειτουργίας του, β) Αναλυτική περιγραφή του κάθε στοιχείου υλικού, με παράθεση περιγραφής του τρόπου λειτουργίας του και του τρόπου διασύνδεσής του με τα άλλα στοιχεία υλικού, που χρησιμοποιούνται, γ) Αναλυτική περιγραφή του αυτοσχέδιου προγράμματος που χρησιμοποιείται σε κάθε αναλυτή για την επιτέλεση των διαδικασιών της ροής του προγράμματος, ελέγχου και λήψης δεδομένων. Αυτό γίνεται με παράθεση καίριων κομματιών του κώδικα καθώς επίσης λογικών διαγραμμάτων ροής των προγραμμάτων, που περιγράφουν σαφέστατα τα βήματα, που ακολουθούνται για την αρμονική λειτουργία του αναλυτή. Αξιοσημείωτη είναι και η παράθεση πολλών σχεδιαγραμμάτων και εικόνων, σε κάθε σημείο του σταδίου αυτού, για καλύτερη οπτική απεικόνιση του κάθε στοιχείου υλικού που χρησιμοποιείται. Με τον τρόπο αυτό μπορεί κάποιος να κατανοήσει καλύτερα και τον τρόπο συνδυασμού των στοιχείων υλικού, προς την κατεύθυνση απόδοσης ενός αναλυτή.

Το κεφάλαια 3-5, παρουσιάζουν και τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν σε κάθε αναλυτή, για να πιστοποιηθεί η εύρυθμη λειτουργία, κατά τους προσδιορισμούς στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν. Από αυτές τις μεθόδους μας ενδιαφέρει η αναφορά της 1^{ης}

μεθόδου (που εφαρμόστηκε στον πρώτο αναλυτή), γιατί οι έτερες μέθοδοι (που εφαρμόστηκαν στους αναλυτές 2 & 3) αναπτύχθηκαν από έτερους υποψήφιους διδάκτορες που αναφέρονται στην εισαγωγή της διατριβής.

Η πρώτη μέθοδος στοχεύει στην ανίχνευση H_2O_2 σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα από ασθενείς, που πάσχουν από πνευμονολογικές παθήσεις. **Η ανάγκη μέτρησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου οφείλεται στο ότι αυτό είναι άριστος δείκτης, που παρέχει κλινικές πληροφορίες, σε σχέση με φλεγμονώδεις καταστάσεις στους πνεύμονες ασθενών. Και αυτό, γιατί μπορεί να συνδεθεί άμεσα με την ύπαρξη οξειδωτικού στρες στο ανθρώπινο σώμα.** Αυτό το γεγονός εξηγεί την ύπαρξη πολλών μεθόδων που υπάρχουν στην βιβλιογραφία για την ανίχνευση υπεροξειδίου του υδρογόνου σε τέτοια δείγματα. **Το πρόβλημα όμως των προϋπαρχόντων μεθόδων είναι ότι είναι μη αυτοματοποιημένες, χρονοβόρες και δύσκολες στην εκτέλεση. Επίσης συνήθως δεν διαθέτουν φορητές συσκευές για δειγματοληψία. Για να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω μειονεκτήματα αναπτύχθηκε η εν λόγω 1η μέθοδος, η οποία παρέχει φορητή συσκευή δειγματοληψίας δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα από ασθενείς και εκτέλεση προσδιορισμού H_2O_2 , μέσω μιας πλήρως αυτοματοποιημένης FIA-χημιοφωταυγούς μεθόδου ανίχνευσης.** Ο εν λόγω φορητός εξοπλισμός δειγματοληψίας παρέχει απόδοση συλλογής μεγαλύτερη από 86%, επιτρέποντας την συλλογή 2-3 mL δείγματος μέσα σε 20min. Η μέθοδος προσδιορισμού που αναπτύχθηκε, βασίζεται στην ανάμιξη ροής διαλύματος λουμινόλης (που χρησιμοποιείται σαν φορέας του δείγματος) με ροή διαλύματος κοβαλτίου (II), η οποία παράγει ένα χημιοφωταυγές παράγωγο, το οποίο δίνει φως, με ένταση ανάλογη της συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ο αναλυτής παρέχει όριο ανίχνευσης 10 nM και καλή γραμμικότητα ($R=0,997$). Η επαναληπτικότητα που αποδίδει είναι καλύτερη από 6,0% RSD και η ανάκτηση που εμφανίζει η μέθοδος είναι μεγαλύτερη από 64,9%. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτής της μεθόδου, με τα αποτελέσματα της πιο συχνά χρησιμοποιούμενης μεθόδου ανάλυσης H_2O_2 σε τέτοια δείγματα, έδωσε ισοδύναμα αποτελέσματα ($P>0,001$, συντελεστή συσχέτισης με $R=0,94$). Έτσι η μέθοδος που προτείνεται προσφέρει πλήρη αυτοματισμό στον χειρισμό αντιδραστηρίων, μεγάλο ρυθμό επεξεργασίας δειγμάτων (περίπου 180 δείγματα ανά ώρα), χαμηλό όριο ανίχνευσης και δυνατότητα για εξέλιξη του εξοπλισμού ανάλυσης σε φορητό (εγγενές πλεονέκτημα της μεθόδου FIA – Δες θεωρία).

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΩΤΑΥΓΩΝ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΣ

Επιστημονικό πεδίο: 1 Φυσικές Επιστήμες

1.4 Χημεία

Λέξεις- Κλειδιά: Αυτοματοποίηση, Ανάπτυξη αναλυτικών συστημάτων FIA, FIA, Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου Υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα, Υπεροξείδιο του Υδρογόνου, Εκπνεόμενος αέρας, Φωταύγεια.

SUMMARY

The current thesis describes three analyzers developed according to Flow Injection Analysis principles. These analyzers are built to accommodate: analyte detection, automated solution handling and appropriate editing, presentation and storage of data acquired. The carrying out of the aforementioned procedures, which can be described with the use of two words: *Flow control* (For checking of the analyzers' functionalities) and *Data Acquisition-Manipulation-Presentation*, can be realized through the assistance of two self-written computer programs, under the help of the Labview programming language.

The creation of these analyzers aimed in covering a broad band of scientific fields spanning from medicine, through to the environment and food. This thesis shows three convenient systems for automation of wet chemistry analysis achieving small sample and reagent consumption, automated timing of analytical steps and monitoring of short lived unstable products through the stopped flow technique described in chapter 2.

Introduction, in chapter 1, provides information concerning laboratory automation. The need and importance of laboratory automation are presented along basic terminology definitions, underlying the facts that led the scientific community to develop techniques for automated analysis and the reasons that made this effort so important. This chapter provides basic descriptions of automated analytical systems, schemes for their classification along with examples highlighting trends in automated methods of analysis.

Chapter 2 presents theoretical aspects of the technique. The influence of fluidic parameters is described on a theoretical basis while automation modes are highlighted and selected applications are briefly described along instrumentation used.

Experimental part presents information on the construction of three different analyzers. 1st analyzer for detection of H₂O₂ in Exhaled Breath Condensate is described in chapter 3, 2nd analyzer for water toxicity assessment is described in chapter 4 while chapter 5 highlights the development of the 3rd analyzer for pectin methylesters determination. For each analyzer construction steps are shown together with schematic

diagrams that offer information to the interested reader regarding their built up. To this end, there are detailed specifications of different components used in the three analyzers. **For each of the three analyzers developed a schematic diagram is presented providing an overview of the construction and layout, then a detailed description of components used, alongside with capabilities offered, alongside with details on connection of different parts and functionalities offered. Following each diagram there is a detailed description of the software that has been developed for each analyzer,** alongside with the functionalities offered concerning flow control, data acquisition and control, alongside with functions used for data extraction and utilization. Under this context, parts of programming code, together with logical flow diagrams, are given side by side, so as to clarify the steps that are followed, in order for the analyzer to function properly. Several sketches and pictures along these sections of the thesis are instrumental guiding to the reader to understand the systems proposed and providing details for implementation in his/her automation needs.

Chapters 3-5, describing the analyzers developed, also contain information about the chemical methods that have been developed, in order for each analyzer to be tested for functionality and proofing that it covers the need that led to its creation.

As far as these methods are concerned, a brief description is provided for just the first method (applied in the first analyzer), due to the fact that the other two methods (that have been tested in the other two analyzers) have been developed by other PhD students.

As far as the first method is concerned, it was developed to determine H_2O_2 in Exhaled Breath Condensate samples of patients that suffer from pulmonary diseases. The main reason that led to the need for the H_2O_2 determination is the fact that H_2O_2 is a perfect indicator of the existence of inflammation in the lungs. Hydrogen peroxide is created during any event of oxidative stress. This explains the existence of many chemical methods for determining H_2O_2 in analogous samples. The problem with these methods is that they are not automated, they are tedious and laborious. Moreover, most of them do not offer portable equipment for sampling. Due to these drawbacks, we aimed at developing a method to overcome these problems and that

SUMMARY

would offer, not only a portable device for collecting such samples, but also offer a fully automated FIA-chemiluminescence method of analysis. **The equipment that was constructed for collecting EBC offers a yield of more than 86%, allowing the acquisition of 2-3 mL of sample in just 20 min.** The developed assay is based upon the mixing of a flowing stream of a Luminol solution (that contains the EBC sample) with a flowing stream of a Co (II) solution, which gives a chemiluminescent derivative, whose light is proportional to the H₂O₂ concentration. **The analyzer offers a limit of detection of 10 nM and good linearity (R=0.997). The reproducibility of the method is better than 6.0% RSD and the recovery is better than 64.9%. The developed method compares well with the method commonly used in clinical chemistry: R=0.94, P>0.001.**

In summary, one can denote that the proposed method incorporates full automation, high speed of analysis (more than 180 samples per hour), low limit of detection and is a prototype that after further development, in collaboration with an instrument manufacturer, could lead to a fully functioning commercial product.

DEVELOPMENT OF AUTOMATIC LUMINESCENT METHODS OF ANALYSIS

Scientific Discipline: Natural Sciences

Chemistry

Keywords: Automation, Development of FIA analytical systems, FIA, Development and validation hydrogen peroxide in exhaled breath condensate, Hydrogen peroxide, Exhaled breath condensate, Luminescence.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το θέμα της παρούσης διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη νέων αυτοματοποιημένων μεθόδων αναλύσεως. Το αντικείμενο αυτό είναι πάντα στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος, καθώς η αυτοματοποίηση είναι μια έννοια, η οποία συνεισφέρει στην εκτέλεση των αναλύσεων κάτω από πιο ελεγχόμενες συνθήκες, υπό το πρίσμα όχι μόνον της αύξησης της ταχύτητας αλλά και της εξάλειψης των λαθών που εισάγει σε αυτές ο ανθρώπινος παράγοντας.

Η αυτοματοποίηση είναι μια διεργασία που στηρίζεται στη σαφή κατανόηση των διακριτών βημάτων που εμπλέκονται σε μια διαδικασία (π.χ. σε μια χημική ανάλυση) και στην τυποποίησή τους, ώστε να παράγεται επαναλήψιμο αποτέλεσμα¹. Στην περίπτωση μίας χημικής αναλύσεως, για παράδειγμα, η διεργασία της αυτοματοποίησης περιλαμβάνει: α) την επιλογή κατάλληλης αντίδρασης, στην οποία συμμετέχει η προς ανάλυση ουσία και παράγει κάποιο σήμα (π.χ. οπτικό, ηλεκτρικό κ.α.), β) την εκτέλεση της αντίδρασης ή των διαδοχικών αντιδράσεων όπου απαιτείται, ώστε να παραχθεί το σήμα (χωρίς την παρεμβολή του ανθρώπινου παράγοντα, αν είναι δυνατόν), γ) την ανίχνευση του σήματος, δ) την επεξεργασία του σήματος, ώστε να αποδίδεται χρήσιμη πληροφορία και ε) την επιλογή κατάλληλης διαδικασίας (π.χ. καμπύλη αναφοράς) που θα μεταφράζει την πληροφορία που φέρει το σήμα σε πληροφορία για την συγκέντρωση ή κάποια ιδιότητα της προς ανάλυση ουσίας.

Η διαδικασία αυτοματοποίησης των χημικών αναλύσεων (ρουτίνας) ξεκίνησε τη δεκαετία του 1960, συμβαδίζοντας με την ανάπτυξη των υπολογιστών². Έτσι εμφανίστηκαν οι γνωστές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης που συναντά κανείς σήμερα στα χημικά εργαστήρια (π.χ. αγωγιμομετρία, φασματοφωτομετρία, φασματοτομετρία μαζών, χρωματογραφία κ.α.)³. Σε αυτές τις τεχνικές, η συμμετοχή του ανθρώπινου παράγοντα έχει μειωθεί στο ελάχιστο.

Όμως η διεργασία αυτοματοποίησης δεν είναι στατική. Είναι μια διεργασία που διαρκώς προσπαθεί να πετύχει βελτιστοποίηση ανίχνευσης των χημικών ουσιών, στον ελάχιστο δυνατό χρόνο, με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια και με την ελάχιστη παρέμβαση του ανθρώπου. Στα πλαίσια αυτής της διαρκούς αναζήτησης καλύτερων τεχνικών αυτοματοποίησης δημιουργήθηκε η τεχνική εισαγωγής δείγματος σε ροή (FIA: Flow Injection Analysis, Εισαγωγή Δείγματος σε Ροή) το 1975⁴. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε για αυτοματοποίηση 3 μεθόδων/συστημάτων ανάλυσης.

Η τεχνική της εισαγωγής δείγματος σε ροή βασίζεται στην ανάμειξη αντιδραστηρίων υπό ροή και στη μέτρηση του σήματος που παράγεται από μία χημική αντίδραση (ή μία σειρά αντιδράσεων), χωρίς να έχει επέλθει φυσικοχημική ισορροπία στο σύστημα αντιδρώντων – προϊόντων. Η τεχνική αυτή οριοθέτησε μια νέα τάση στη χημική ανάλυση, αφού δεν ήταν πλέον απαιτούμενη η επίτευξη χημικής ισορροπίας για την έναρξη της μέτρησης και πέτυχε αποτελέσματα όπως: επίσπευση των χημικών αναλύσεων, δυνατότητα

λήψης πολλαπλών μετρήσεων με μεγαλύτερη συχνότητα, ευελιξία στον τρόπο επιλογής των αντιδράσεων και του τρόπου διεξαγωγής των (π.χ. ανάμειξη όλων των αντιδραστηρίων μαζί και αναμονή για επίτευξη των διαδοχικών αντιδράσεων ή επίτευξη κατά στάδια), μειωμένο κόστος και δυνατότητα απόλυτου ελέγχου του σήματος, μέσω ελέγχου της διασποράς του δείγματος στα αντιδραστήρια.

Από την εμφάνισή αυτής της τεχνικής μέχρι σήμερα, έχουν δημοσιευτεί πάνω από 42.000 επιστημονικά άρθρα⁵ που αναφέρουν τη χρήση της για ανίχνευση διάφορων χημικών ουσιών, με εφαρμογές που ενδιαφέρουν όλα τα επιστημονικά πεδία (από τη χημεία, μέχρι την ιατρική και τη βιολογία). Παράλληλα δεν πρέπει να παραληφθεί και η εμπορική της χρήση: στην αγορά κυκλοφορούν εμπορικοί αναλυτές που βασίζονται στην τεχνική FIA⁶ και οι οποίοι προσφέρουν αυτοματοποιημένη ανίχνευση διάφορων ουσιών χημικού και βιολογικού ενδιαφέροντος.

Στην παρούσα διατριβή περιγράφεται η **ανάπτυξη νέων αυτοματοποιημένων μεθόδων αναλύσεως, με εφαρμογή της κλασσικής τεχνικής FIA** (λήψη σήματος υπό συνεχή ροή αντιδραστηρίων) και με εφαρμογή της **μεθόδου αναχαιτιζόμενης ροής** (FIA-Stopped Flow/ FIA-SF: λήψη σήματος υπό κατάσταση αναχαίτισης της ροής των αντιδραστηρίων). Οι δύο αυτές τεχνικές ενσωματώθηκαν σε τρεις αυτοσχέδιους αναλυτές, οι οποίοι έφεραν: σύστημα υπολογιστή, για έλεγχο του συστήματος και για λήψη δεδομένων, περισταλτική αντλία, για την ροή των αντιδραστηρίων, βαλβίδα έκχυσης δείγματος, για έκχυση του δείγματος στα αντιδραστήρια ή του αντιδραστηρίου στην ροή του δείγματος και ανιχνευτές: α) φωτοπολλαπλασιαστή, με ενσωματωμένο μικροελεγκτή (microcontroller) ή β) φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή.

Η διατριβή αποτελείται από **θεωρητικό και πειραματικό τμήμα**. Τέλος παρατίθενται: κάποιες **προοπτικές που εμφανίζει η τεχνική, περίληψη της διατριβής και παραρτήματα με τμήματα του κώδικα που αναπτύχθηκε στην γλώσσα προγραμματισμού Labview για έλεγχο και λήψη δεδομένων**.

Στο **θεωρητικό μέρος** της διατριβής γίνεται μία εισαγωγή στον αυτοματισμό και πως αυτός επηρέασε το χημικό εργαστήριο του σήμερα. Εν συνεχεία περιγράφονται οι βασικές θεωρητικές αρχές της τεχνικής FIA και οι διάφορες υποτεχνικές που έχουν αναπτυχθεί. Έπειτα περιγράφονται μερικά διακριτά στοιχεία οργανολογίας ενός αναλυτή FIA και δίνονται μερικές πληροφορίες γι' αυτά. Και τέλος πραγματοποιείται μια αναφορά στις προοπτικές που ανοίγει αυτή η τεχνική.

Στο **πειραματικό μέρος** της διατριβής περιγράφονται οι τρεις αυτοσχέδιοι αναλυτές FIA που αναπτύχθηκαν, τόσο σε επίπεδο υλικού (*hardware*), όσο και σε επίπεδο λογισμικού (*software*). Πιο συγκεκριμένα αναπτύχθηκαν οι τρεις παρακάτω αναλυτές:

- 1) **Αναλυτής FIA για προσδιορισμό H_2O_2 σε συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα (Exhaled Breath Condensate: EBC).** Τα εν λόγω δείγματα λαμβάνονται από ασθενείς που πάσχουν από διάφορες πνευμονολογικές ασθένειες (π.χ. άσθμα) και φέρουν πτητικές ουσίες (βιολογικοί δείκτες) που μπορούν να συσχετιστούν με οξειδωτικές στρες στον οργανισμό των ασθενών. Έτσι η μέτρηση H_2O_2 (ενός εκ των δεικτών), με την ταχεία και αξιόπιστη μέθοδο που αναπτύχθηκε, αποδείχθηκε χρήσιμη για την έγκαιρη διάγνωση παρόμοιων πνευμονολογικών ασθενειών. Ο αναλυτής FIA που αναπτύχθηκε προσφέρει: δυνατότητα ανάλυσης “στην κλίνη” με χρήση φορητού συλλέκτη δειγμάτων που αναπτύχθηκε σε συνεργασία με την μονάδα εντατικής θεραπείας του Νοσοκομείου Σωτηρία. Η μέθοδος παρουσιάζει πολύ καλή συμφωνία με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται συνήθως για τις μετρήσεις αυτές. **Η κατασκευή του εν λόγω αναλυτή (τόσο του υλικού όσο και του λογισμικού), καθώς και οι μετρήσεις και η ανάπτυξη της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν από τον συντάκτη της διδακτορικής αυτής διατριβής.**
- 2) **Αναλυτής FIA για προσδιορισμό τοξικότητας ύδατος.** Η εκτίμηση της τοξικότητας του νερού αποτελεί ένα κρίσιμο ζήτημα που απασχολεί εντόνως και θα απασχολήσει στο μέλλον ακόμα πιο έντονα, καθώς ο υδροφόρος ορίζοντας των ανεπτυγμένων χωρών, μπορεί να φέρει επιμολυντές που υπερβαίνουν κατά πολύ τα επιτρεπόμενα όρια που έχουν τεθεί παγκοσμίως, λόγω αλόγιστης χρήσης υλικών στην γεωργία, αλλά και λόγω ανθρωπογενούς επιμόλυνσης. Έτσι μία ταχεία μέθοδος εκτίμησης τοξικότητας δειγμάτων νερού είναι πάντα ευπρόσδεκτη στην επιστημονική κοινότητα. Η πρωτοτυπία αυτής της μεθόδου είναι η χρήση ζωντανών βιοφωταυγών οργανισμών για την εκτίμηση της τοξικότητας, πράγμα που κάνει την εκτίμηση πιο εμπειριστατωμένη, γιατί η αντίδραση ζώντων οργανισμών σε επιμολυντές είναι ένας πιο άμεσος δείκτης τοξικότητας. Οι οργανισμοί αυτοί εκπέμπουν φως, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και το φως αυτό αναστέλλεται κάτω από την επίδραση επιμολυντών. **Για την ανάπτυξη του αναλυτή χρησιμοποιήθηκε η αναχαίτιση της ροής που έδωσε την δυνατότητα της εκτεταμένης επίδρασης των τοξικών ουσιών των δειγμάτων σε αιωρήματα καλλιιεργειών του βιοφωταυγούς βακτηρίου *V. Fischeri*.** Η κατασκευή του εν λόγω αναλυτή (τόσο του υλικού όσο και του λογισμικού), πραγματοποιήθηκε από τον συντάκτη της διδακτορικής αυτής διατριβής, ενώ οι μετρήσεις και η ανάπτυξη της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν από τον τότε υποψήφιο διδάκτορα κο Στράτο Κωμαΐτη.
- 3) **Αναλυτής FIA για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.** Με τη λέξη πηκτίνη ονοματίζουμε μία ομάδα πολυσακχαριτών που συναντάται στην φύση (κυρίως στα κитροειδή), η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία, λόγω της ιδιότητάς της να σχηματίζει ζελέ. Έτσι μπορεί κανείς να συναντήσει ευρύτατα ενώσεις πηκτίνης σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές. Η πιο συνήθης εφαρμογή της είναι

στη βιομηχανία σακχαρωδών προϊόντων, όπου χρησιμοποιείται για την παραγωγή ζελέδων (jellies). Μία παράμετρος που είναι σημαντική για τους πολυσακχαρίτες αυτούς, καθώς προδίδει τη φυσικοχημική συμπεριφορά τους κατά το σχηματισμό ζελέδων, είναι ο βαθμός εστεροποίησής τους, ο οποίος εκτιμάται με μέθοδο που αναπτύχθηκε, μέσω προσδιορισμού των μεθυλεστέρων που φέρει ένα δείγμα πηκτίνης. Η λειτουργία του αναλυτή αυτού βασίζεται στην τεχνική **FIA αναχαιτιζόμενης ροής (FIA-SF)**. Η κατασκευή του εν λόγω αναλυτή (τόσο του υλικού όσο και του λογισμικού), πραγματοποιήθηκε από τον συντάκτη της διδακτορικής αυτής διατριβής, ενώ οι μετρήσεις και η ανάπτυξη της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν από την τότε υποψήφια διδάκτορα κα *Lucyna Łekawska*.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

1.1. ΟΡΙΣΜΟΙ

Ξεκινώντας αυτή τη διατριβή πρέπει κάποιος να παραθέσει κάποιους ορισμούς σχετικούς με το θέμα της. **Ένας από τους βασικούς ορισμούς που πρέπει να παρατεθούν είναι ο ορισμός της αυτοματοποίησης (σε σχέση με τις μεθόδους ανάλυσης).**

Σύμφωνα με την Επιτροπή Αναλυτικής Ορολογίας της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC)⁷, **ως αυτοματοποίηση μπορεί κάποιος να χαρακτηρίσει την χρήση μηχανικών και ενόργανων συσκευών με σκοπό την αντικατάσταση, βελτίωση, επέκταση ή συμπλήρωση της ανθρώπινης προσπάθειας προς την επίτευξη μιας συγκεκριμένης διεργασίας, με την οποία επιτυγχάνεται (τουλάχιστον σε ένα κύριο στάδιό της) αντικατάσταση του ανθρώπινου παράγοντα με ένα σύστημα ανάδρασης.**

Ταυτόχρονα με αυτόν τον ορισμό, η εν λόγω επιτροπή παραθέτει και δύο άλλους: τον ορισμό της μηχανοποίησης και τον ορισμό της οργανολογίας ή οποία ενέχει μέσα της και τον ορισμό του οργάνου. Χωρίς αυτούς του επιπρόσθετους τρεις ορισμούς η έννοια της αυτοματοποίησης δεν αποσαφηνίζεται πλήρως. **Η έννοια της μηχανοποίησης χαρακτηρίζεται από τον ακόλουθο ορισμό: χρήση συσκευών (οι οποίες μπορούν να παράγουν κίνηση ή δράση) με σκοπό την αντικατάσταση, επέκταση ή υποβοήθηση της ανθρώπινης προσπάθειας. Η έννοια της οργανολογίας χαρακτηρίζεται από τον ακόλουθο ορισμό: παραγωγή και διάδοση πληροφορίας που ανακτάται μέσω ενός οργάνου. Η έννοια του οργάνου χαρακτηρίζεται από τον ακόλουθο ορισμό: συσκευή, η οποία χρησιμοποιείται για παρατήρηση, μέτρηση και διάδοση της ποιότητας του αναλυόμενου «στοιχείου».**

Με την απλή παράθεση αυτών των ορισμών μπορεί κάποιος εύκολα να μπερδέψει τους ορισμούς της αυτοματοποίησης και της μηχανοποίησης ή της οργανολογίας και του οργάνου. **Μια πιο σαφής ερμηνεία του αυτοματισμού προτείνεται από τον R. D. McDowall⁸,** ο οποίος ορίζει την αυτοματοποίηση ως εξής: *χρήση συσκευής, οργανολογίας και επικοινωνιακής ή πληροφοριακής εφαρμογής, η οποία έχει σχεδιαστεί για να μηχανοποιεί ή αυτοματοποιεί μέρος ή ολόκληρη την διαδικασία μιας αναλυτικής εφαρμογής, με σκοπό καταστήσει δυνατή την παροχή ποιοτικών πληροφοριών σε έναν οργανισμό από μέρους του εργαστηρίου που την χρησιμοποιεί.* Για μια πιο σαφή επεξήγηση του παραπάνω ορισμού παρατίθεται από τον προαναφερθέντα ερευνητή και το σχήμα 1, το οποίο αποσαφηνίζει με παραδείγματα σε δενδροειδή μορφή την έννοια του αυτοματισμού εργαστηρίου, ο οποίος συσχετίζεται με τις έννοιες του αυτοματισμού οργάνων (Instrument Automation), των επικοινωνιών

(Communications), της πληροφορικής (Data to information conversion) και του μάνατζμεντ της πληροφορίας (Information Management).



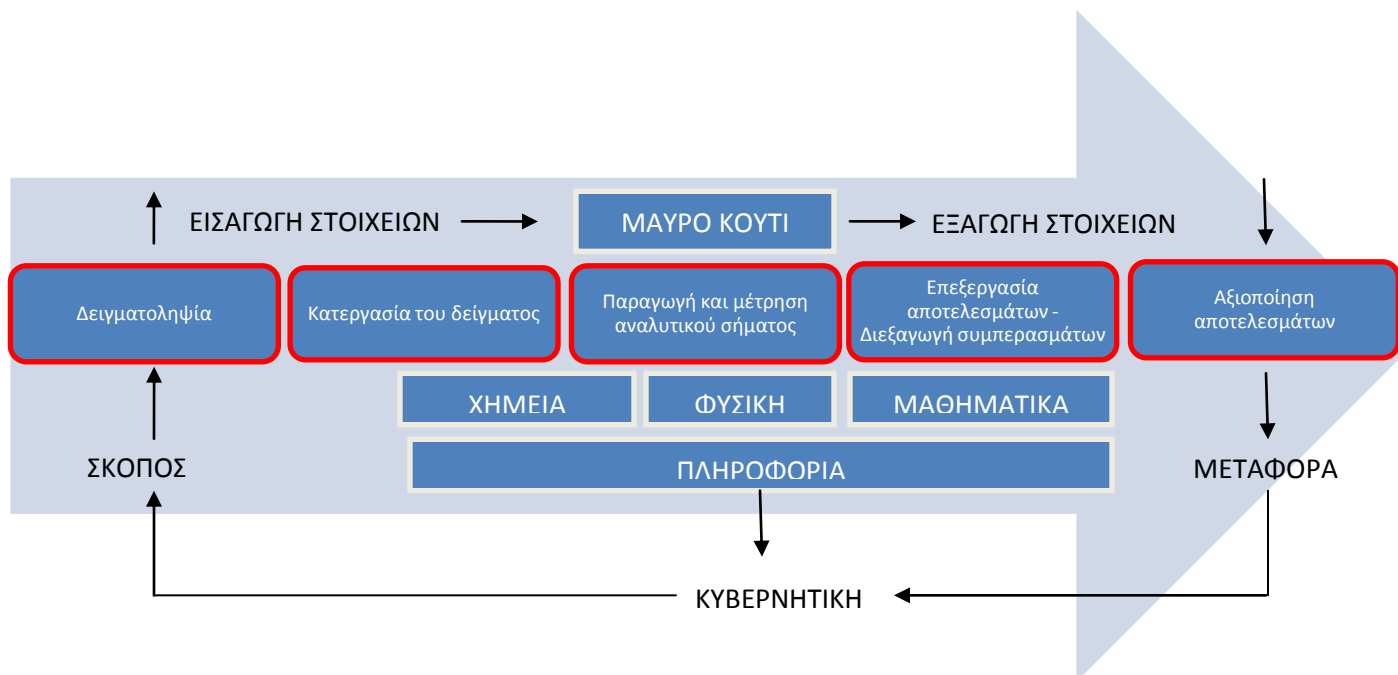
Σχήμα 1: Ο ορισμός του αυτοματισμού εργαστηρίου κατά τον R. D. McDowall.

Μετά την παράθεση της ερμηνείας της έννοιας του αυτοματισμού, ακολουθεί η παράθεση ερμηνείας για την έννοια της ανάλυσης στο χημικό εργαστήριο, καθώς και μια γρήγορη αναφορά στα στάδια που εμπλέκονται σε μια ανάλυση.

Ένας ορισμός που μπορεί να αποδοθεί στην χημική ανάλυση, με βάση τον ορισμό της αναλυτικής χημείας⁹ είναι ο ακόλουθος: η χημική ανάλυση είναι μια πορεία που απαρτίζεται από όλα τα στάδια εκείνα που ακολουθούνται, για να μπορέσει κάποιος να απομονώσει,

χαρκτηρίσει και ποσοτικοποιήσει ένα η περισσότερα χημικά συστατικά που περιέχονται σε φυσικά η τεχνητά υλικά.

Για να πραγματοποιηθεί μια χημική ανάλυση συνήθως ακολουθείται η πορεία που εμφανίζεται στο σχήμα 2. Η παρακάτω πορεία έχει χαρακτηριστεί ανά στάδια από την Hanns Malissa¹⁰, η οποία αποσαφηνίζει και τα όρια των διεργασιών που εμπλέκονται σε μια αυτοματοποιημένη ανάλυση, ενώ ταυτόχρονα ορίζει και την έννοια της «κυβερνητικής ανάλυσης».



Σχήμα 2: Διακριτά στάδια μιας χημικής αναλύσεως.

Αξιοσημείωτο είναι πως ο αυτοματισμός επικεντρώνεται συνήθως στα τελευταία τρία στάδια της πορείας του ανωτέρω σχήματος 2. Τα πρώτα δύο στάδια μπορούν να αυτοματοποιηθούν μόνο υπό προϋποθέσεις (π.χ. το στάδιο της δειγματοληψίας μπορεί να γίνεται με αυτόματο δειγματολήπτη αερίων, αν το υπό ανάλυση στοιχείο βρίσκεται στον χώρο ανάλυσης και είναι αέριο). Συνήθως όμως τα δύο πρώτα στάδια της αναλύσεως πραγματοποιούνται από εξειδικευμένο προσωπικό.

1.2. ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟ

Ο σύγχρονος τρόπος ζωής προσφέρει αρκετές ευκολίες στον άνθρωπο. Η ποιότητα ζωής του έχει ανέβει κατακόρυφα, εξαιτίας της διαδεδομένης χρήσης της τεχνολογίας. Η χρήση της τεχνολογίας του παρείχε την δυνατότητα να μπορεί να εκτελεί με ευκολία και

ταχύτητα πολλές εργασίες που στο παρελθόν τον δυσκόλευαν (π.χ. κατασκευή τεχνικών έργων με μηχανήματα, ταχύτερη και πιο φθηνή παραγωγή τροφίμων, καλύτερες παροχές υγείας, λόγω εξέλιξης των μηχανημάτων κ.α.). Αυτή η ποιότητα ζωής που απέκτησε όμως δεν ήλθε χωρίς κάποιο τίμημα. Η μαζικοποίηση της παραγωγής και η μηχανοποίηση των διαδικασιών έφεραν την ανάγκη για πιο αποτελεσματικό ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων ή των υπηρεσιών. Κι αυτό γιατί μια μαζικοποίηση παραγωγής οδηγεί σε συσσώρευση επιμολυντών στο περιβάλλον, ενώ παράλληλα η μηχανοποίηση οδηγεί σε ανάγκη για πιο στενό έλεγχο των διαδικασιών, για να διασφαλιστεί η ποιότητα, εφόσον η μηχανοποίηση οδηγεί και σε μεγάλες παραγωγές και άρα σε μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης σφαλμάτων. Ο αποτελεσματικότερος ποιοτικός έλεγχος μπορεί να γίνει πραγματικότητα με αύξηση των ποιοτικών ελέγχων στην παραγωγή (ή στην παροχή υπηρεσίας) και αυτό το γεγονός προκάλεσε μια ανάγκη για πιο γρήγορες αναλύσεις, οι οποίες όμως δεν θα έπρεπε να επιβαρύνουν κατά πολύ με το κόστος τους και τους οργανισμούς που τις παρέχουν.

Από την άλλη πλευρά η ανάγκη για αυτοματοποίηση των διαδικασιών ποιοτικού ελέγχου δημιουργήθηκε και από την ανάγκη για εκτέλεση των διαδικασιών που εμπλέκονται σε αυτόν με πιο μεγάλη ταχύτητα, με μεγαλύτερη ακρίβεια, με μεγαλύτερη αξιοπιστία και με την ελάχιστη συμμετοχή του ανθρώπινου παράγοντα, ο οποίος εισάγει σε μια ανάλυση από τη μια πλευρά σφάλματα και από την άλλη κόστος (σε χρόνο και χρήμα).

Από τα παραπάνω είναι φανερό πως σε κάθε περίπτωση, **οι στόχοι αυτοματοποίησης των διεργασιών ποιοτικού ελέγχου είναι η εξοικονόμηση κόστους και χρόνου από πλευράς του οργανισμού που την υιοθετεί.** Αυτό όμως δεν σημαίνει πως σε κάθε περίπτωση η αυτοματοποίηση είναι συμφέρουσα. Απαιτείται κοστολογική ανάλυση από τον οργανισμό που θέλει να την υιοθετήσει, για να αποτιμηθεί η χρησιμότητά της. Πιο συγκεκριμένα, για να είναι η αυτοματοποίηση μιας μεθόδου ποιοτικής ανάλυσης συμφέρουσα πρέπει να ικανοποιούνται μία η περισσότερες από τις παρακάτω προϋποθέσεις^{11,12}: α) να υπάρχει απαίτηση για ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, β) η μέθοδος να βασίζεται σε πολύπλοκη μεθοδολογία, γ) το κόστος της αυτοματοποιημένης ανάλυσης (αντιδραστήρια, αποσβέσεις εξοπλισμού, συντήρηση κτλ.) να είναι μικρότερο από αυτό της μη αυτοματοποιημένης, μετά από έναν χρονικό ορίζοντα, δ) να υπάρχει ανάγκη για γρήγορη διαχείριση της πληροφορίας (π.χ. κλινικά εργαστήρια, ιχνηλασιμότητα παρτίδων σε βιομηχανική μονάδα που διαθέτει προϊόντα στην παγκόσμια αγορά κτλ.) και ε) τα δείγματα να είναι πολύτιμα ή μικρών ποσοτήτων. Προς την κατεύθυνση της κοστολογικής ανάλυσης υπάρχουν σήμερα και υπηρεσίες συμβουλευτικής που αναλαμβάνουν την διεκπεραίωση μελετών για τους διάφορους οργανισμούς που επιθυμούν να προβούν σε αυτοματοποίηση του ποιοτικού τους ελέγχου.

1.3. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Αφού αναπτύχθηκαν παραπάνω κάποιοι ορισμοί σχετικά με τον αυτοματισμό και την ανάλυση στο χημικό εργαστήριο και μετά από αναφορά στους λόγους που οδήγησαν στην αυτοματοποίηση οργάνων ή διαδικασιών σε ένα χημικό εργαστήριο, **είναι σκόπιμο να γίνει μια αναφορά σε μερικές τάσεις που επικρατούν αυτήν την στιγμή στην επιστημονική κοινότητα, σε σχέση με τον αυτοματισμό συστημάτων χημικού εργαστηρίου.**

Μία ξεκάθαρη τάση που επικρατεί αυτήν την στιγμή και προκαλεί απαίτηση για αυτοματισμό μεθόδων είναι η ανάπτυξη της «Πράσινης Αναλυτικής Χημείας»¹³. Αυτή η τάση αγγίζει όλους τους κλάδους της αναλυτικής χημείας και στοχεύει στην ανάπτυξη μεθόδων πιο «πράσινων», πιο οικολογικών, πιο φιλικών προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο. Για την επίτευξη αυτού του στόχου δημιουργεί απαιτήσεις όπως ελάττωση χημικών αντιδραστηρίων, σμίκρυνση συσκευών, αυτοματοποίηση μεθόδων ανάλυσης, εξοικονόμηση ενέργειας και μεγαλύτερη προστασία των αναλυτών, ώστε να μειωθούν οι επιπτώσεις των χημικών αναλύσεων στο περιβάλλον και στον άνθρωπο. Παράλληλα με αυτές τις απαιτήσεις, αυτός ο κλάδος στοχεύει και σε βιωσιμότητα της αναλυτικής χημείας, μέσω on-line μεθόδων εξυγίανσης των αποβλήτων.

Μία άλλη ξεκάθαρη τάση στην αναλυτική χημεία που χρησιμοποιείται σε πολλές αυτοματοποιημένες μεθόδους είναι η χρήση αντιδράσεων «βιοφωταύγειας» για in vivo απεικόνιση αντιδράσεων, δομών ή κυτταρικών διεργασιών¹⁴. Η χρήση αντιδράσεων βιοφωταύγειας σαν βιοαναλυτικό εργαλείο έχει μεγάλη διάδοση τα τελευταία χρόνια. Παραδείγματα που μπορεί κάποιος πολύ εύκολα να συναντήσει στην επιστημονική κοινότητα, είναι τα ακόλουθα: ανάπτυξη βιοαισθητήρων για μελέτη αναπροσαρμοσμένων κυττάρων, ανοσολογικές αναλύσεις, αναλύσεις υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων, ανάπτυξη συστημάτων παρακολούθησης κυτταρικών διεργασιών (με σκοπό κλινικές, διαγνωστικές και φαρμακολογικές εφαρμογές) κ.α. Αυτή η μεγάλη διάδοση αυτών των μεθόδων έχει να κάνει με την ευκολία με την οποία οι τεχνικές βιοφωταυγούς ανίχνευσης ενσωματώνονται σε βιοαναλυτικές συσκευές μικρού μεγέθους, οι οποίες μπορούν να προσφέρουν δυνατότητα για μεγάλο αριθμό αναλύσεων γονιδίων ή πρωτεϊνών σε δείγματα μικρών όγκων.

Έτερη ξεκάθαρη τάση είναι η τάση που επικρατεί στην φαρμακευτική χημεία για ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων (μεγάλου αριθμού), λόγω υψηλής απόδοσης παράλληλων συνθετικών διεργασιών παραγωγής που συναντά κανείς σε αυτή τη βιομηχανία¹⁵. Αυτή η ανάγκη καλύπτεται πλέον με χρήση αυτοματοποιημένου εξοπλισμού που φέρει ανιχνευτές MS (MS:Mass Spectrometry), σε συνδυασμό με διάφορες μορφές διαχωρισμού και επεξεργασίας δειγμάτων π.χ. LC: Liquid Chromatography-MS ανάλυση, LC-UV: UltraViolet-ELSD: Evaporative

Light Scattering Detection-MS ανάλυση, FIA-MS ανάλυση, HPLC: High Pressure Liquid Chromatography-MS ανάλυση, LC: Liquid Chromatography-MS ανάλυση, LC-MS κ.α.

Ακόμα μία ξεκάθαρη τάση αυτοματοποίησης, σμίκρυνσης οργανολογίας και μείωσης χρήσης αντιδραστηρίων συναντά κανείς στην αναλυτική χημεία, στον τομέα ανάπτυξης microchip (παραδείγματα ανάπτυξης των οποίων υπάρχουν εδώ και χρόνια¹⁶⁻¹⁸), τα οποία βασίζονται στις αρχές μικρορροής ρευστών και συνδυάζονται με ανιχνευτές εν σειρά για ανίχνευση διάφορων ουσιών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η χρήση microchip συνδυασμένου με ανιχνευτή MS, μέσω χρήσης ενός ηλεκτρικού συστήματος που παράγει spray ιονισμού, για ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών ή για χρήση σε μελέτες δομών και λειτουργικότητας πρωτεϊνών¹⁹.

Ανάμεσα στις προαναφερθείσες τάσεις δεν μπορεί κανείς να παραλείψει την τάση για ανάπτυξη on-line συστημάτων ανάλυσης που θα εκτελούν αναλύσεις περιοδικά και θα δίνουν απαντήσεις μετρήσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα²⁰. Τέτοια παραδείγματα μπορεί κανείς να βρει σε κάθε αναλυτικό τομέα. Εδώ θα παραθέσουμε παραδείγματα από την φαρμακευτική ανάλυση, όπου έχουν αναπτυχθεί συστήματα FIA-Solid Phase Reactors, τα οποία φέρουν ακινητοποιημένα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για συνεχούς ροής ανίχνευση διάφορων ναρκωτικών και φαρμακευτικών ουσιών, όπως μεθαδόνη²¹, επινεφρίνη²², ρεσερπίνη²³, προμεθαζίνη²⁴, φλουφенаζίνη²⁵, εμετίνη²⁶ κ.α.

Τέλος δεν μπορεί να μην αναφερθεί η τάση που επικρατεί στην αναλυτική χημεία για ανάπτυξη αισθητήρων και βιοαισθητήρων που βρίσκουν εφαρμογή και χρήση σε όλους τους τομείς της. Οι αισθητήρες αυτοί είναι αυτόματες συσκευές μικρές σε μέγεθος, οι οποίες εμφανίζουν και χαμηλή κατανάλωση αντιδραστηρίων και εκλεκτικότητα για ανάλυση συγκεκριμένων ουσιών. Ενδεικτικά παραδείγματα τέτοιων συσκευών είναι τα παρακάτω:

- α) Ανάπτυξη φθορισμομετρικών αισθητήρων που βασίζονται σε νανοσωλήνια άνθρακα ειδικά κατασκευασμένα για ανίχνευση διάφορων κατηγοριών ουσιών ανάλογα με την κατασκευή των νανοσωληνίων²⁷ (π.χ. ανάπτυξη αισθητήρων με νανοσωλήνες, στους οποίους έχουν εγκλωβιστεί πρωτεΐνες για ανίχνευση γλυκόζης, ανάπτυξη αισθητήρων με συζευγμένες μορφές νανοσωληνίων - υποκαταστατών βαφής για ανίχνευση πρωτεϊνών κ.α.) με εφαρμογή **σε διάφορους τομείς.**
- β) Ανάπτυξη μικροαγωγιμυ ανοσοαισθητήρα για ανίχνευση αρνητικών κατά Gram βακτηρίων²⁸ με εφαρμογή στην **μικροβιολογία.**

- γ) Ανάπτυξη φθορισμομετρικού ανοσοαισθητήρα για την γρήγορη ανίχνευση μελαμίνης σε προϊόντα γάλακτος²⁹ με εφαρμογή στα **τρόφιμα**.
- δ) Ανάπτυξη βιοαισθητήρα πολυφαινολικών ενώσεων με τεχνολογία «τυπώματος» laser³⁰ με εφαρμογή στην **ανάλυση αντιοξειδωτικών**.
- ε) Ανάπτυξη ανοσοαισθητήρα βασισμένου σε σύνθετες νανοενώσεις γραφίτη για ηλεκτροχημική ανίχνευση βιοσημάτων καρκίνου³¹ με εφαρμογή στην **Ιατρική**.
- στ) Ανάπτυξη αμπερομετρικού βιοαισθητήρα για οργανοφωσφορικά και οργανοκαρβαμιδικά φυτοφάρμακα³² με εφαρμογή στην **ανάλυση φυτοφαρμάκων**.
- ζ) Ανάπτυξη διενζυμικού βιοαισθητήρα για ταυτόχρονη ανίχνευση νιτρικών και νιτρωδών³³ με εφαρμογή στην **ανάλυση υδάτων**.

1.4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ³⁴

Μία ταξινόμηση των αυτοματοποιημένων αναλυτικών συστημάτων (αναλυτών) δίνεται από τους M. Valcarcel και M. D. Luque de Castro, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα 1:

Πίνακας 1: Ταξινόμηση αναλυτικών συστημάτων (αναλυτών) και κριτήρια ταξινόμησής τους

Ανάλογα με το βαθμό αυτοματισμού	Αυτόματα	Κριτήριο: γενικευμένη παρέμβαση του ανθρώπινου παράγοντα σε κάποιο στάδιο ή όχι
	Ημιαυτόματα	
Ανάλογα με τον τρόπο μεταφοράς δειγμάτων	Διακριτά (Batch)	Κριτήριο: η ροή σε ένα σύστημα σωλήνων ή η στατικότητα των αντιδραστηρίων σε ένα δοχείο. Στα ρομποτικά ο χειρισμός του δοχείου γίνεται με ρομπότ
	Συνεχή	
	Κατά στάδια	
	Όχι κατά στάδια	
Ανάλογα με τον αριθμό ουσιών προς ανάλυση για κάθε δείγμα	Ρομποτικά	Κριτήριο: δυνατότητες μεθόδου ανίχνευσης
	Μονο-παραμετρικά	
	Πολύ-παραμετρικά	

Ανάλογα με την δυνατότητα χρήσης	Εξειδικευμένα Ευέλικτα	Κριτήριο: δυνατότητα χρήσης παρόμοιας διάταξης προς ανάλυση διαφορετικών ουσιών ή μη
Ανάλογα με τον κατασκευαστή	Εμπορικά Ιδιοκατασκευασμένα	Κριτήριο: κατασκευαστής
Ανάλογα με την φυσική κατάσταση του δείγματος	Αναλυτές αερίων Αναλυτές υγρών Αναλυτές στερεών	Κριτήριο: φυσική κατάσταση του δείγματος
Ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας τους	Βασισμένα σε φυσικές ιδιότητες Βασισμένα σε φυσικοχημικές ιδιότητες	Κριτήριο: τρόπος ανίχνευσης
Ανάλογα με τη συχνότητα δειγματοληψίας	Μονής δειγματοληψίας (One-off) Περιοδικής δειγματοληψίας Συνεχούς δειγματοληψίας	Κριτήριο: τρόπος δειγματοληψίας
Ανάλογα με τη δυνατότητα ή όχι εκτέλεσης πολλαπλών προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα³	Πολυδιαυλικά (multichannel) Τυχαίας προσπέλασης (Random access)	Κριτήριο: δυνατότητες ενσωμάτωσης πολλαπλών ανιχνευτών και ταυτόχρονης χρήσης τους ή χρήση ενός ανιχνευτή

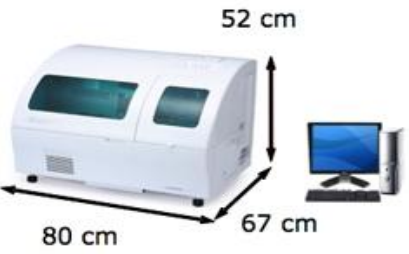

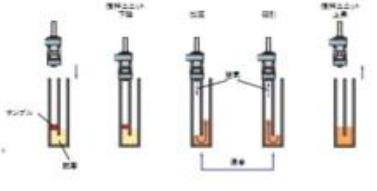

Από την παραπάνω ταξινόμηση, ο τρόπος ταξινόμησης που μας ενδιαφέρει για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής, είναι ο τρόπος ταξινόμησης με βάση τη μεταφορά των δειγμάτων (ώστε να καταλάβουμε τη διαφορά των αναλυτών που αναπτύχθηκαν – με την τεχνική FIA – σε σχέση με κλασσικούς αναλυτές διακριτών αναλύσεων). Με βάση τον τρόπο μεταφοράς του δείγματος οι αναλυτές μπορούν λοιπόν να ταξινομηθούν σε: α) αναλυτές διακριτών αναλύσεων (Batch ή Discrete analyzers), β) συνεχείς αναλυτές (ή αναλυτές ροής) και γ) σε ρομποτικούς αναλυτές (οι οποίοι θα μπορούσαν να καταταγούν στην κατηγορία αναλυτών διακριτών αναλύσεων, αλλά τους κατατάσσουμε ξεχωριστά, για να τονίσουμε τον αυτοματισμό που παρέχουν).

1.4.1. ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΔΙΑΚΡΙΤΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Αυτού του είδους οι αναλυτές χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι φέρουν το δείγμα σε ένα δοχείο (όπου διατηρείται ακέραιο), το οποίο μεταφέρεται με μηχανικό τρόπο στις διάφορες ζώνες του αναλυτή, όπου λαμβάνουν χώρα τα διάφορα στάδια μιας χημικής ανάλυσης (συγκέντρωση του δείγματος, αραίωση, έγχυση αντιδραστηρίων, ανάμειξη, θέρμανση ή παραμονή για αντίδραση, μέτρηση, εξαγωγή αποτελεσμάτων, χρήση και προώθηση της πληροφορίας). Για αποφυγή λαθών η χρήση τους συνδυάζεται συνήθως με σαρωτές γραμμικών κωδικών για αποκλειστική αναγνώριση και ταυτοποίηση του κάθε δείγματος ή του κάθε αντιδραστηρίου, μέσω των ειδικών γραμμικών κωδικών που υπάρχουν σε κάθε δοχείο και οι οποίοι αποτελούν χαρακτηριστικό διαχωρισμού των δειγμάτων-αντιδραστηρίων. Το πλεονέκτημα αυτών των αναλυτών είναι η δυνατότητα που προσφέρουν για διατήρηση της ακεραιότητας του δείγματος (ως προς τυχούσες εξωτερικές ακούσιες επιμολύνσεις), αφού διατηρούν το δείγμα συνεχώς εντός δοχείου, το οποίο δεν χειρίζεται ανθρώπινος παράγοντας. Το μειονέκτημά τους είναι το πολύπλοκο της κατασκευής τους και η τιμή τους (καθώς η αύξηση πολυπλοκότητας οδηγεί και σε αύξηση τιμής, γιατί γίνεται χρήση πιο πολλών μηχανικών μερών, για να βελτιστοποιηθεί ο χειρισμός σε ένα τέτοιο πολύπλοκο σύστημα).

Οι αναλυτές αυτοί μπορούν να καταταγούν σε τρεις κατηγορίες: α) σε **σειριακούς αναλυτές που κάνουν χρήση φιαλιδίων**, β) σε **σειριακούς αναλυτές που κάνουν χρήση προσυσκευασμένων ξηρών αντιδραστηρίων** και γ) σε **παράλληλους φυγοκεντρικούς αναλυτές**.

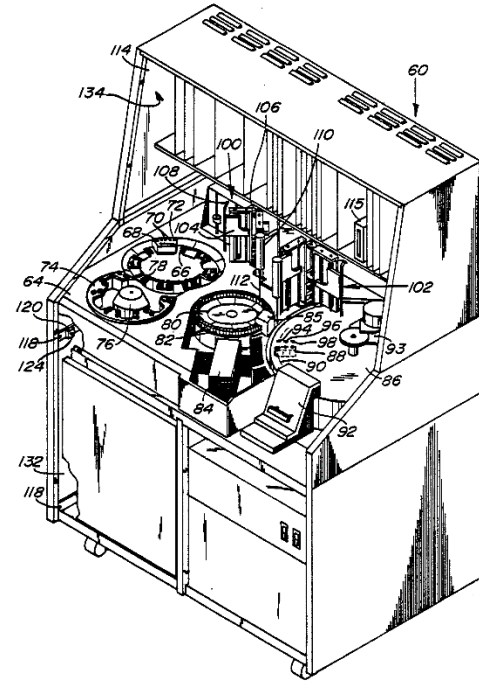
Οι **αναλυτές της πρώτης κατηγορίας** (σειριακοί αναλυτές που κάνουν χρήση φιαλιδίων) ονομάζονται έτσι γιατί φέρουν τα δείγματα σε φιαλίδια, τα οποία μεταφέρονται σειριακά σε διάφορες ζώνες-σταθμούς εργασίας, όπου πραγματοποιούνται διαδικασίες χειροκίνητες με μηχανικό τρόπο (π.χ. αραίωση, προσθήκη αντιδραστηρίου, ανάμειξη, θέρμανση, επώαση και μέτρηση). Τα πολυπλοκότερα παραδείγματα τέτοιων αναλυτών μπορούν να προβούν ακόμα και σε διαδικασίες κωνιοποίησης ή/και ογκομέτρησης. Ένα παράδειγμα τέτοιου αναλυτή είναι ο αναλυτής BIOLIS 24i PREMIUM, ο οποίος απεικονίζεται στο σχήμα 3 και ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλινικές και ανοσολογικές αναλύσεις.

<p>5. Συνεκτική κατασκευή, Σχεδιασμός για γραφεία</p>  <p>Μπορεί να τοποθετηθεί και να λειτουργήσει σε χώρο ισοδύναμο με μισό γραφείο. Δεν απαιτεί υδραυλικές ή ηλεκτρικές εγκαταστάσεις.</p>	<p>6. Ευκολόχρηστο λογισμικό</p>  <p>Κάθε μενού είναι προσβάσιμο με απλή επιλογή σε εικονίδια του λογισμικού. Η χρωματική απεικόνιση και οι φωνητικές οδηγίες βοηθούν στην κατανόηση της κατάστασης του οργάνου, κατά την ανάλυση.</p>
<p>7. Ανάμειξη με πίεση αέρα</p>  <p>Δεν επιτρέπει την επιμόλυνση δειγμάτων, καθώς η ανάμειξη αντιδραστηρίων γίνεται με αέρα και όχι με αναδευτήρα.</p>	<p>8. Πλήρης κατασκευή με συνεκτικό σχεδιασμό</p> 

Σχήμα 3: Απεικόνιση ενός σειριακού αναλυτή με φιαλίδια (BIOLIS 24i, PREMIUM) για κλινικές αναλύσεις

Οι αναλυτές της δεύτερης κατηγορίας (σειριακοί αναλυτές που κάνουν χρήση προσυσκευασμένων ξηρών αντιδραστηρίων) ονομάζονται έτσι, γιατί κατά την λειτουργία τους κάνουν χρήση προσυσκευασμένων αντιδραστηρίων σε ξηρά μορφή, τα οποία είναι συσκευασμένα σε διαφανή πλαστικά δοκίμια, που χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα ως φορείς αντιδραστηρίων, ως δοχεία αντίδρασης και ως κυψελίδες μέτρησης. Ο κυριότερος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι ο Automated Clinical Analyzer της εταιρείας Dupont. Σε αυτόν τον αναλυτή ο χειριστής τοποθετεί το δείγμα σε ειδικό υποδοχέα, ενώ ακολούθως εισάγει με την σειρά μέσα στον αναλυτή μια σειρά από δοκίμια (που φέρουν ξηρά αντιδραστήρια), με βάση τον αριθμό αναλύσεων που επιθυμεί να πραγματοποιήσει στο εν λόγω δείγμα. Ο αναλυτής αραιώνει το δείγμα και στην συνέχεια το προσθέτει σε κάθε δοκίμιο (κάθε δοκίμιο αντιπροσωπεύει μια ανάλυση), αφού πρώτα έχει κονιοποιήσει τα στερεά αντιδραστήρια του κάθε δοκιμίου, με κατάλληλο μηχανικό σύστημα που ενσωματώνει. Εν συνεχεία τα μείγματα που προκύπτουν (όσες και οι αναλύσεις) αναμιγνύονται, θερμοστατούνται και τέλος διαμορφώνονται με συμπίεση σε μορφή κυψελίδας, η οποία προωθείται για φασματοσκοπική ανάλυση. Ο αναλυτής αυτός είναι πολυδιαυλικός και τυχαίας

προσπέλασης. Μία εικόνα ενός τέτοιου αναλυτή φαίνεται στο σχήμα 4. Ο εν λόγω αναλυτής αποτελεί πολύ ενδιαφέρουσα περίπτωση αναλυτή, αφού απλουστεύει πολύ την διαδικασία αναλύσεων, αλλά έχει μεγάλο κόστος.

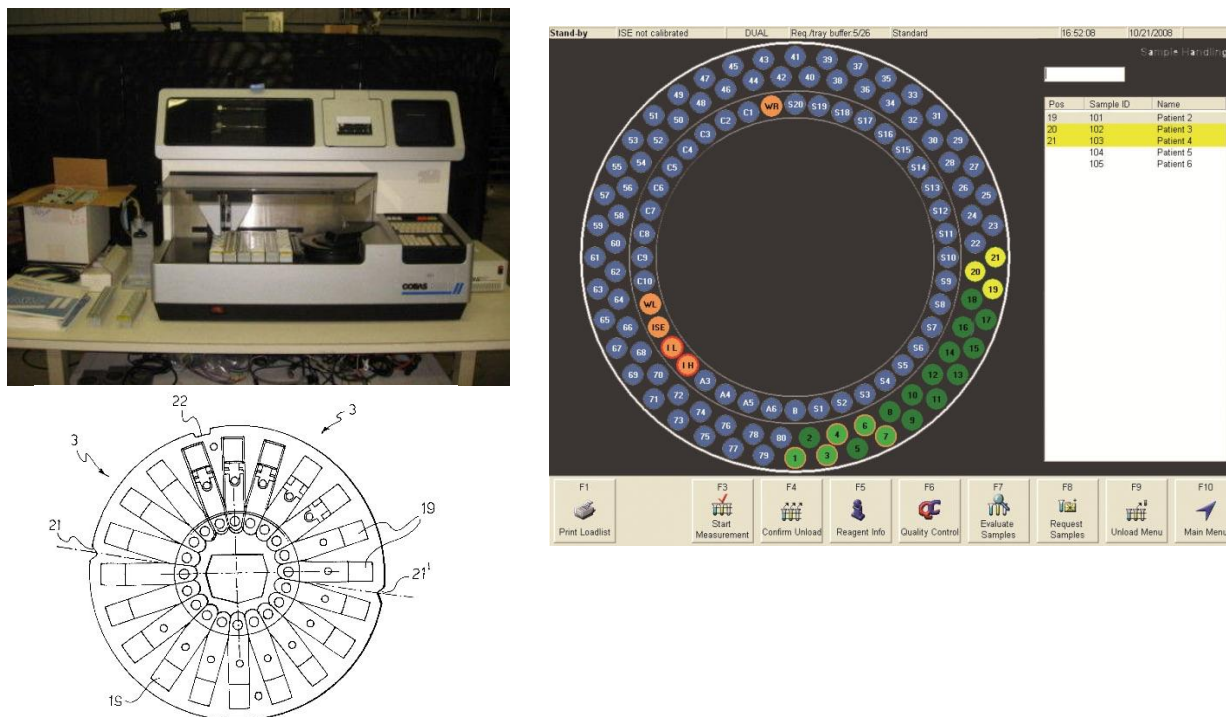


Σχήμα 4: Απεικόνιση του αναλυτή Automated Clinical Analyzer της εταιρείας Dupont.

Μια σύγχρονη μετεξέλιξη αυτής της τεχνικής είναι η εμφάνιση αναλυτών, οι οποίοι ενσωματώνουν αντιδραστήρια στερεής μορφής σε στερεά υποστρώματα (slide)³⁵ και μάλιστα με τέτοιο τρόπο, ώστε να υπάρχει στρατηγική διαστρωμάτωση αντιδραστηρίων σε διαδοχικές επιφάνειες, οι οποίες θα δίνουν διαδοχικές αντιδράσεις, μέχρι την τελική επιφάνεια που φέρει ένα στρώμα ανακλαστικό, που χρησιμοποιείται για μέτρηση ανάκλασης με ειδικά φασματοφωτόμετρα. Η χρήση τέτοιων αναλυτών περιορίζεται σε κλινικές εφαρμογές.

Οι **αναλυτές της τρίτης κατηγορίας** (παράλληλοι φυγοκεντρικοί αναλυτές) έχουν σχεδιαστεί για ταυτόχρονη διεξαγωγή πολλών προσδιορισμών. Αυτοί οι αναλυτές φέρουν έναν περιστρεφόμενο δίσκο που φέρει διαμορφωμένες κοιλότητες ακτινωτά σε σχέση με την επιφάνειά του, οι οποίες ενώνονται με χαραγμένα διάκενα κατά μήκος των ακτίνων αυτών (ώστε να διαμορφώνονται δίαυλοι ροής ανάμεσα στις χαραγμένες κοιλότητες). Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε κοιλότητα πλησίον του ρότορα, ενώ τα δείγματα σε κοιλότητα προς την εξωτερική πλευρά του δίσκου. Η αρχή λειτουργίας τους είναι απλή: ο δίσκος περιστρέφεται και τα αντιδραστήρια ρέουν προς την κοιλότητα του δείγματος (με την βοήθεια της φυγόκεντρου δύναμης). Εκεί αναμιγνύονται με το δείγμα και συνεχίζουν να ρέουν προς μια κυψελίδα (προς την εξωτερική πλευρά του δίσκου), στην οποία μετρείται η

απορρόφηση (με στατικό φωτόμετρο). Το φωτόμετρο δέχεται πολλαπλά σήματα, ανάλογα με τους προσδιορισμούς, τα οποία διαχωρίζει με την βοήθεια υπολογιστή και από τα οποία βγάζει τα αποτελέσματα των ταυτόχρονων αναλύσεων. Ένα παράδειγμα ενός τέτοιου αναλυτή μπορεί να συναντήσει κανείς σε άρθρο δημοσιευμένο για ανάλυση μαγνησίου σε δείγματα νερού³⁶, ενώ ταυτόχρονα μια εικόνα ενός τέτοιου αναλυτή αποδίδεται πιο κάτω, στο σχήμα 5, για πιο εμπειριστατωμένη απεικόνιση.



Σχήμα 5: Απεικόνιση ενός φυγοκεντρικού αναλυτή της εταιρείας COBAS

Στην κατηγορία αυτών των αναλυτών (Αναλυτών διακριτών αναλύσεων) μπορούν να ταξινομηθούν (όπως προαναφέρθηκε) και οι ρομποτικοί αναλυτές. Αυτοί οι αναλυτές είναι συστήματα που με την βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών, αισθητήρων και κινούμενων μηχανικών μερών, εκτελούν διαδικασίες που θα εκτελούσε χειροκίνητα ένας αναλυτικός χημικός (προσομοιάζοντας τις κινήσεις του)^{34,37,38}. Οι αναλυτές αυτοί έχουν συνήθως μηχανικό βραχίονα, ο οποίος είναι στερεωμένος σε εργαστηριακό πάγκο, όπου υπάρχουν τοποθετημένοι σταθμοί αντιδραστηρίων, συσκευών και σταθμοί μηχανικών μερών χρήσιμων για τον βραχίονα. Ο βραχίονας αυτός κινείται προς όλες τις κατευθύνσεις του πάγκου και προς τις τρεις διαστάσεις με την βοήθεια αισθητήριων θέσης και μπορεί να εκτελεί όλες τις κινήσεις που θα εκτελούσε ένας χημικός σε μια ανάλυση (π.χ. ανάμειξη αντιδραστηρίων, ομογενοποίηση, τοποθέτηση σε σταθμό θέρμανσης, μέτρηση σε κατάλληλο ανιχνευτή κτλ.), καθώς και κινήσεις επιδιόρθωσής του σε περίπτωση βλάβης (π.χ. αλλαγή βραχίονα). Μία εικόνα ενός τέτοιου ανιχνευτή φαίνεται στο σχήμα 6.



Σχήμα 6: Απεικόνιση ενός ρομποτικού διακριτού αναλυτή

1.4.2. ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΡΟΗΣ

Αυτού του είδους οι αναλυτές χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας παρατηρείται συνεχώς, καθώς το δείγμα περνά μπροστά από έναν ανιχνευτή, μεταφερόμενο με ένα ρεύμα υγρού ή αερίου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου καλά με τους αναλυτές διακριτών αναλύσεων, για να διεξάγουν διαδικασίες όπως προώθηση και μεταφορά δείγματος, αραιώση, θέρμανση, προσθήκη αντιδραστηρίων, ανάμειξη αντιδραστηρίων, αλλά ταυτόχρονα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για διαδικασίες όπως διάλυση αντιδραστηρίων ή δείγματος, απόσταξη, διύλιση διαλυτών και άλλους παρόμοιους διαχωρισμούς. Παράλληλα οι αναλυτές αυτοί έχουν την δυνατότητα να ενσωματώνουν μέσα τους μεγαλύτερη ποικιλία ανιχνευτών (σε σχέση για παράδειγμα με τους φυγοκεντρικούς αναλυτές) και να ενσωματώνουν και λιγότερα κινούμενα μέρη, πράγμα το οποίο, αφενός μεν ελαχιστοποιεί τα προβλήματα που προκύπτουν και την συντήρησή τους, αφετέρου δε ελαχιστοποιεί και το κόστος τους. Μερικές εφαρμογές αναφέρονται ενδεικτικά στον παρακάτω πίνακα 2, όπου φαίνονται διαφορετικοί τύποι ανιχνευτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτούς τους αναλυτές και διαφορετικά είδη προσδιορισμών που μπορούν να διεξαχθούν με αυτούς τους ανιχνευτές.

Πίνακας 2: Ενδεικτική αναφορά παραδειγμάτων ανιχνευτών σε αναλυτές ροής

<u>Αναφορά (Συγγραφείς)</u>	<u>Τύπος ανιχνευτή</u>	<u>Προσδιοριζόμενη ουσία – μέγεθος</u>	<u>Τομέας ανάλυσης</u>
M. A. Kouparis et al. ³⁹	Φασματοφωτόμετρο	Φαινοθιαζίνες	Φαρμακευτική
R. S. Vithanage et al. ⁴⁰	Diode array	Σταθερές ισορροπίας συμπλόκων	Οργανομεταλλική χημεία
E.G Sarantonis et al. ⁴¹	Φωτοπολλαπλασιαστής	Fe (II), Fe (III), Total Fe	Αναλυτική χημεία
F. Winquist et al. ⁴²	Ηλεκτροχημικός	Κρεατινίνη	Βιοχημεία
M. Trojanowicz et al. ⁴³	Αμπερομετρικός	Μολυβδαίνιο (VI)	Αναλυτική χημεία
N. Ishibashi et al. ⁴⁴	Ποτενσιομετρικός	Μεταλλικά ιόντα	Αναλυτική χημεία
P. C. A. Ooms et al. ⁴⁵	Ημιαγωγός (Ge(Li))	Ανάλυση ισοτόπων	Ραδιοχημεία

Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι η περιορισμένη δυνατότητα που προσφέρουν για ανάπτυξη συστημάτων τυχαίας προσπέλασης. Σε τέτοια συστήματα, όπου απαιτείται δυνατότητα τυχαίας επιλογής, ανάμεσα από σειρά συγκεκριμένων διαθέσιμων αυτοματοποιημένων αναλύσεων, η ανάπτυξη ενός αναλυτή θα οδηγούσε είτε σε συστήματα παράλληλων γραμμών ροής και επιπρόσθετα παράλληλων ταυτόχρονων πολλαπλών αναλύσεων είτε σε συστήματα πολυδιαυλικά (όπως ο ανιχνευτής Chem 1 της Technicon – Σχήμα 7) που χαρακτηρίζονται από δυνατότητα τυχαίας προσπέλασης μεν, αλλά ταυτόχρονα και από πολυπλοκότητα και υψηλή τιμή.

Οι αναλυτές αυτοί μπορούν να καταταγούν σε δύο κατηγορίες: α) σε **αναλυτές αναχαιτιζόμενης ροής** και β) σε **αναλυτές συνεχούς ροής**.

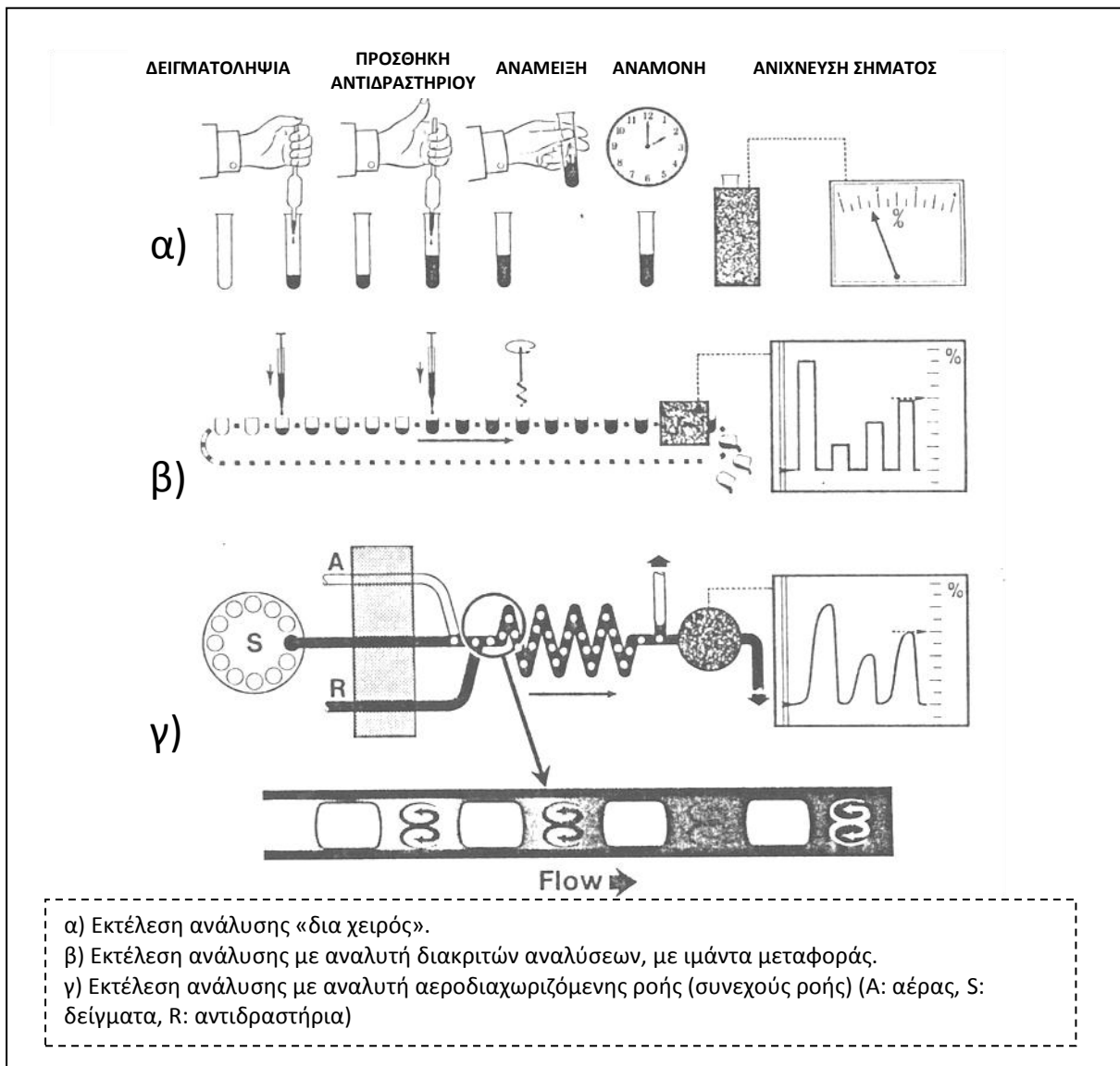
Στους **αναλυτές της πρώτης κατηγορίας** (αναλυτές αναχαιτιζόμενης ροής) το μείγμα δείγματος και αντιδραστηρίων οδηγείται με ένα σύστημα σωλήνων μπροστά από τον ανιχνευτή, οπότε και σταματά η ροή τους και η αντίδραση παρατηρείται μέσω του ανιχνευτή (συνήθως κινητικά, μέσω μέτρησης της μεταβολής του σήματος με τον χρόνο). Αυτοί οι αναλυτές παρέχουν μεν δυνατότητα για κινητικές μετρήσεις, αλλά δεν μπορούν να ενσωματώσουν εύκολα στάδιο κατεργασίας δείγματος ή κατά σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων.



Σχήμα 7: Απεικόνιση του ανιχνευτή Chem1 της εταιρείας Technicon

Στους **αναλυτές της δεύτερης κατηγορίας** (αναλυτές συνεχούς ροής) το μείγμα δείγματος και αντιδραστηρίων οδηγείται με ένα σύστημα σωλήνων μπροστά από τον ανιχνευτή και συνεχίζει την ροή του, διαμέσου μιας κυψελίδας ροής, συνεχώς προς τα απόβλητα, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται και η αντίδραση μέσω του ανιχνευτή. Η αντίδραση σε αυτήν την περίπτωση δεν παρατηρείται κινητικά, αλλά μόνο σε κάποιο χρονικό σημείο της. Το μειονέκτημα αυτών των ανιχνευτών είναι η επιμόλυνση που προκαλείται, λόγω της συνεχούς ροής μείγματος δείγματος-αντιδραστηρίων διαμέσου των σωληνώσεων. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε αρχικά από τον L. T. Skeggs, ο οποίος έφτιαξε το 1957 σύστημα με αεροδιαχωρισμό δείγματος⁴⁶, μέσω παρεμβολής φυσαλίδων πριν και μετά την προσθήκη δείγματος στην ροή αντιδραστηρίων (Σχήμα 8 (γ) - παρακάτω). Το σύστημα αυτό εισήγαγε μια νέα υποκατηγορία των αναλυτών συνεχούς ροής, τους **αναλυτές αεροδιαχωριζόμενης ροής**. Τελικά πάντως το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε αργότερα (μετά το 1975⁴⁷) με ευκολότερο τρόπο, όταν και παρατηρήθηκε πως ο αεροδιαχωρισμός δεν είναι απαραίτητος, εφόσον γίνει χρήση σωληνώσεων μικρής διαμέτρου για επίτευξη ροής του μείγματος δείγμα-αντιδραστήριο. **Με την ενσωμάτωση των σωλήνων μικρής διαμέτρου οριοθετήθηκε η γέννηση του αναλυτή εισαγωγής δείγματος σε ροή και της τεχνικής εισαγωγής δείγματος σε ροή**, η οποία και επεξηγήθηκε διεξοδικά και αναπτύχθηκε από τους J. Ruzicka και E. H. Hansen.

Σε αυτό το σημείο είναι σκόπιμη η παράθεση του σχήματος 8^{65,66}, όπου απεικονίζονται εν παραλλήλω δύο αναλυτές, ένας αναλυτής διακριτών αναλύσεων και ένας αναλυτής ροής (σε σχέση και με την ροή διεργασιών ανάλυσης δια χειρός ανθρώπινης παρουσίας), ώστε να καταλάβει κάποιος και σχηματικά την διαφορά των δύο κατηγοριών αναλυτών, πριν προχωρήσει σε μία σε βάθος ανάλυση της τεχνικής εισαγωγής δείγματος σε ροή, που λαμβάνει χώρα στο κεφάλαιο 2.



Σχήμα 8: Απεικόνιση εν παραλλήλω δύο αναλυτών (διακριτών αναλύσεων και ροής) σε σχέση με την εκτέλεση της ανάλυσης «δια χειρός» για σύγκριση

2. ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ (FIA: FLOW INJECTION ANALYSIS)

2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ FIA

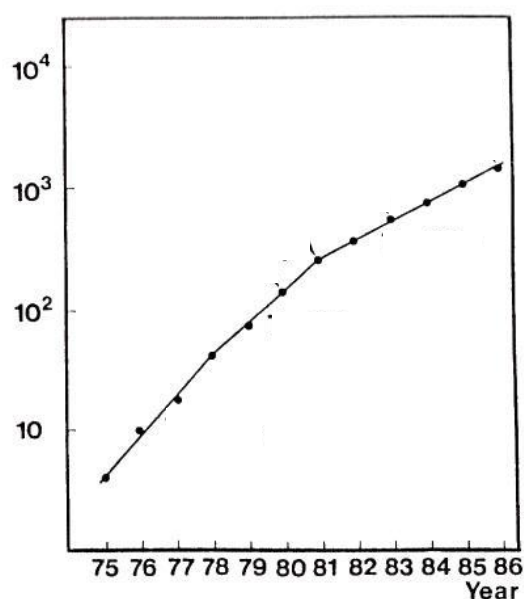
Η τεχνική εισαγωγής δείγματος σε ροή (FIA: Flow Injection Analysis) είναι μια τεχνική στην οποία κατέληξαν οι J. Ruzicka και E. H. Hansen το 1975⁴⁷, εξελίσσοντας αναλυτές ροής που προϋπήρχαν^{48,49} και επιλύοντας προβλήματα που είχαν αυτοί, όπως η επιμόλυνση μειγμάτων δείγματος-αντιδραστηρίων, ενώ παράλληλα οριοθέτησαν και τις πρώτες αρχές αυτής της τεχνικής σε σχέση με την ελεγχόμενη διασπορά δείγματος μέσα σε συνεχή ροή αντιδραστηρίων. Την πατρότητα της τεχνικής αυτής την διεκδικούν οι εν λόγω ερευνητές λόγω του γεγονότος ότι στο προαναφερθέν άρθρο που δημοσιεύτηκε το 1975 είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται το όνομα της εισαγωγής δείγματος σε ροή (Flow Injection Analysis, FIA). Βέβαια διάφορες απόψεις για την πατρότητα της τεχνικής έχουν παρουσιαστεί. Αυτό διότι υπήρξαν και άλλα άρθρα πριν από το 1975 που περιέγραφαν παρόμοιες τεχνικές και πειράματα. Τέτοιες τεχνικές αναφέρονται σε άρθρο του H. A. Mottola⁵⁰. Επίσης προς αυτήν την κατεύθυνση συνέτεινε και το γεγονός πως υπήρξαν και άλλες αξιολογικές ομάδες ερευνητών που ασχολήθηκαν με αναλυτές ροής και οι οποίες, αφενός μεν οδήγησαν με τις έρευνές τους στην ανακάλυψη αυτής της τεχνικής, αφετέρου δε από την εμφάνιση της τεχνικής αυτής και έπειτα, προσέφεραν πολλά στην ανάπτυξή της, όπως η ομάδα με επικεφαλής τον ερευνητή K. K. Stewart⁵¹. Μια ενδιαφέρουσα εικόνα εξελίξεων στους αναλυτές ροής που οδήγησαν στην FIA (όπως την ξέρουμε σήμερα) μπορεί να πάρει κάποιος από τον πίνακα 3 (ο οποίος εμφανίζεται σε άρθρο του K. K. Stewart⁵²).

Πίνακας 3: Ενδεικτική πορεία ενσωμάτωσης τεχνικών-ανιχνευτών σε αναλυτές ροής FIA

Ιδέα	Χρονιά	Συγγραφέας
Ένεση δειγμάτων με υποδερμικές σύριγγες σε συνεχείς ροές αντιδραστηρίων προς αντίδραση και ανίχνευση	1970	G. Navy et al. ⁴⁸
Χρήση ηλεκτροδίων στην FIA	1970	G. Navy et al. ⁴⁸
Χρήση περισταλτικής αντλίας στην FIA	1970	G. Navy et al. ⁴⁸
Χρήση αντλίας με πίεση αέρα στην FIA	1973	J. D. Frantz and P. E. Hare ⁵³
Χρήση αντλίας θετικής εκτόπισης στην FIA	1977	K. K. Stewart ⁵⁴
Χρήση χρωματομετρίας στην FIA	1972	Bergmeyer and Hagen ⁵⁵
	1972	White and Fitzgerald ⁵⁶
Ανάλυση ενζύμων με FIA	1972	Bergmeyer and Hagen ⁵⁵
Χρήση ανατροφοδοσίας αντιδραστηρίων στην FIA	1972	Bergmeyer and Hagen ⁵⁵
Χρήση αυτόματου δειγματολήπτη στην FIA	1974	K. K. Stewart et al. ⁵⁷
Μεταφορά δείγματος από διακριτά υγρά εν ροή σε συνεχόμενη (μη διαχωριζόμενη) ροή σύστημα για ανάλυση	1974	K. K. Stewart et al. ⁵⁷
Αναγέννηση αντιδραστηρίων στην FIA	1975	V. V. S. E. Dutt and H. A. Mottola ⁵⁸
Διαχωρισμός ρευμάτων στην FIA	1976	J. Ruzicka et al. ⁵⁹
Μέτρηση ιξώδους με FIA	1976	D. Betteridge and J. Ruzicka ⁶⁰

Χρήση της διάλυσης στην FIA	1976	E. H. Hansen and J. Ruzicka ⁶¹
Ανιχνευτές δύο σημείων στην FIA	1977	E. H. Hansen et al. ⁶²
Ογκομετρήσεις με FIA	1977	J. Ruzicka et al. ⁶³
Θολωσιμετρία με FIA	1977	F. J. Krug. et al. ⁶⁴

Ανεξάρτητα αυτών των σεναρίων πάντως, πρέπει να σημειωθεί πως η διαφωνία αυτή εμφανίστηκε και δημιουργήθηκε και από το γεγονός πως σύντομα από την εμφάνισή της, αυτή η τεχνική αναπτύχθηκε ραγδαία και πολλές ερευνητικές ομάδες άρχισαν να ασχολούνται με αυτήν. Για να πάρει κάποιος μια εικόνα της ανάπτυξης της τεχνικής, αρκεί να ρίξει μια ματιά στο σχήμα 9 (που φαίνεται σε βιβλίο των J. Ruzicka και E. H. Hansen⁶⁶), όπου φαίνεται η εκθετική αύξηση των δημοσιεύσεων σχετικών με την τεχνική αυτή στην δεκαετία 1975-1985.

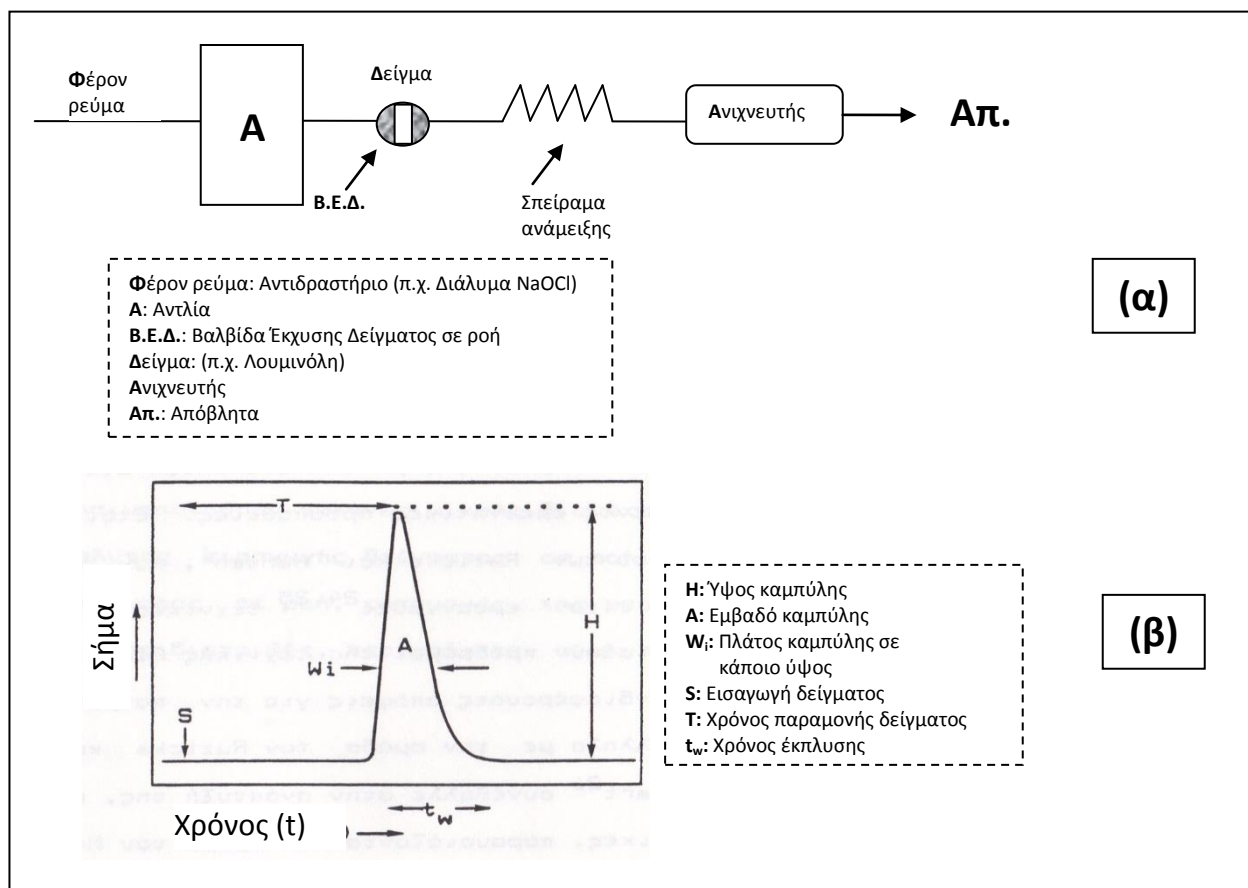


Σχήμα 9: Απεικόνιση της εκθετικής αύξησης δημοσιεύσεων που αναφέρουν την τεχνική FIA.

2.2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΠΟΥ ΔΙΕΠΟΥΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ FIA⁶⁵⁻⁶⁷

Η τεχνική FIA βασίζεται στην εισαγωγή ενός υγρού δείγματος σε κινούμενο, συνεχές και μη διαχωριζόμενο ρεύμα υγρού, το οποίο φέρει κατάλληλο μείγμα αντιδραστηρίων ώστε να πραγματοποιείται κάποια αντίδραση προς δημιουργία αναλυτικού σήματος (π.χ. δυναμικό, φθορισμός, απορρόφηση ακτινοβολίας κ.α.). Με την εισαγωγή αυτή, το δείγμα δημιουργεί μία ζώνη μέσα στο κινούμενο ρεύμα, η οποία διασπείρεται μέσα στα αντιδραστήρια και η οποία οδηγείται προς κατάλληλο ανιχνευτή, ο οποίος καταγράφει το σήμα που παράγεται. Στην συνέχεια, το σήμα αυτό υπόκειται επεξεργασία με κατάλληλα προγράμματα υπολογιστή (με βάση κάποια καμπύλη αναφοράς που μετρείται) και γίνεται συσχέτιση της συγκέντρωσης του δείγματος με το σήμα που δημιούργησε, μέσα στο σύστημα «μείγμα αντιδραστηρίων – δείγμα» (που βρίσκονται εν ροή).

Για να μπορέσει κάποιος να κατανοήσει καλύτερα αυτήν την τεχνική παρουσιάζεται πιο κάτω (σχήμα 10) ένα σχεδιάγραμμα του πιο απλού αναλυτή FIA που μπορεί να υπάρξει, σε συνδυασμό με μια τυπική καμπύλη που θα δώσει ένα τέτοιο σύστημα πραγματοποιώντας μια απλή αντίδραση (π.χ. Λουμινόλη + NaOCl → χημειοφωταύγεια).



Σχήμα 10: Απεικόνιση ενός απλού συστήματος FIA (α) και ενός τυπικού καταγραφήματος (β).

Το απλό σύστημα που φαίνεται στο Σχήμα 10 (α) αποτελείται από μια **περισταλτική αντλία**, η οποία χρησιμοποιείται, για να προωθεί με σταθερή ταχύτητα τα αντιδραστήρια μέσα από στενούς διαύλους, εσωτερικής διαμέτρου 0,5-1,5 mm, από **βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή**, η οποία χρησιμοποιείται για να εισάγει συγκεκριμένο όγκο του δείγματος στην ροή των αντιδραστηρίων, από ένα **σπείρωμα ανάμειξης** το οποίο χρησιμοποιείται, για να αναμειχθεί κατάλληλα η ζώνη του δείγματος με τα αντιδραστήρια, από **κατάλληλο ανιχνευτή** για ανίχνευση του σήματος της αντίδρασης και από **κατάλληλο δοχείο συλλογής αποβλήτων της αντίδρασης**.

Το γράφημα που απεικονίζεται στο Σχήμα 10 (β) είναι μία κορυφή, η οποία αποτελεί το σήμα του ανιχνευτή συναρτήσεως του χρόνου. Τα χαρακτηριστικά μεγέθη αυτής της κορυφής που είναι χρήσιμα για την ανάλυση και τα οποία συσχετίζονται με την συγκέντρωση της υπό ανάλυση ουσίας είναι τα ακόλουθα: το ύψος (H) της κορυφής, το εμβαδό (A) της καμπύλης και το πλάτος (W_i) της κορυφής σε συγκεκριμένο ύψος. Τα τρία αυτά χαρακτηριστικά της καμπύλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς, η οποία συσχετίζει την συγκέντρωση της υπό ανάλυση ουσίας σε συνάρτηση με τις προαναφερθείσες παραμέτρους. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε ανιχνευτή γραμμικής απόκρισης οι σχέσεις που συνδέουν τις πιο πάνω παραμέτρους με την συγκέντρωση, θα είναι των παρακάτω μορφών: $H=k_1C$, $A=k_2C$ και $W_i=k_3\log(C)+a$, όπου k_1, k_2 και k_3 είναι σταθερές αναλογίας. Εκτός από τις προαναφερθείσες παραμέτρους μπορεί κάποιος να μετρήσει και το σήμα σε κάποιο άλλο σημείο της καμπύλης (στο ανερχόμενο ή και στο κατερχόμενο τμήμα της, σε σχέση με την γραμμή βάσης), μία μέθοδος που χρησιμοποιείται στις τεχνικές βαθμίδωσης συγκέντρωσης.

Σε αυτό το σημείο είναι σκόπιμο να αναφέρουμε μερικά στοιχεία σχετικά με τις παραπάνω παραμέτρους, που είναι χρήσιμα:

- _ Το ύψος καμπύλης αποτελεί την πιο συνηθισμένη παράμετρο, η οποία συσχετίζεται με την συγκέντρωση της υπό ανάλυση ουσίας, γιατί προσδιορίζεται εύκολα.
- _ Το εμβαδό αποτελεί την δεύτερη πιο χρησιμοποιούμενη παράμετρο, καθώς μπορεί και αυτό να προσδιοριστεί σχετικά εύκολα με κατάλληλο λογισμικό και με αλγορίθμους ανίχνευσης καμπυλών σε σχέση με την γραμμή βάσης, αλλά παρουσιάζει δύο μειονεκτήματα: δεν μπορεί να εφαρμοσθεί σε τεχνικές βαθμίδωσης και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ανιχνευτές λογαριθμικής απόκρισης (π.χ. εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων), γιατί σε αυτούς η απόκριση σε περιοχή κοντά στην γραμμή βάσης σταθμίζεται πιο σημαντικά σε σχέση με την απόκριση σε άλλο μέρος της καμπύλης.
- _ Το πλάτος σε κάποιο τμήμα της καμπύλης είναι μια παράμετρος που χρησιμοποιείται τρίτη κατά σειρά, γιατί εμφανίζει λιγότερη ακρίβεια από το ύψος, αν και παρουσιάζει μεγαλύτερη δυναμική περιοχή μετρήσεων. Αποτελεί δε την βάση των ογκομετρήσεων FIA.

Στο παραπάνω σχήμα, εκτός από τα μεγέθη H , A και W_i που εξεξηγήθηκαν, απεικονίζονται και κάποια άλλα μεγέθη, τα οποία μαρτυρούν διάφορες χρήσιμες παραμέτρους που επηρεάζουν την ανίχνευση του σήματος. Αυτά είναι: α) ο χρόνος παραμονής T , κατά τον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση και β) ο χρόνος έκπλυσης t_w , ο οποίος είναι ο χρόνος από την εμφάνιση της καμπύλης (ανοδικό τμήμα), μέχρι και την επαναφορά του σήματος στην γραμμή βάσης (κατερχόμενο τμήμα).

Από τα παραπάνω μπορεί κάποιος να κατανοήσει ότι οι βασικές αρχές που διέπουν μία τυπική ανάλυση FIA είναι: α) η εισαγωγή δείγματος σε μια συνεχόμενη ροή αντιδραστηρίων που πρέπει να γίνεται με σταθερό και επαναλήψιμο τρόπο, β) η ελεγχόμενη διασπορά του δείγματος μέσα στα αντιδραστήρια που ρέουν, η οποία ελέγχεται από κινητικές και γεωμετρικές παραμέτρους του συστήματος FIA, όπως π.χ. η ταχύτητα ροής αντιδραστηρίων και γ) ο ελεγχόμενος χρονισμός στα διάφορα στάδια της ανάλυσης π.χ. σταθερός χρόνος για να φτάσει το δείγμα από το σημείο εισόδου στον ανιχνευτή).

Πρέπει να σημειωθεί πως λόγω της φύσης της (που εμπλέκει παραμέτρους όπως μικρούς διαύλους, μικρούς όγκους αντιδραστηρίων, μεγάλες ταχύτητες ροών και μικρούς χρόνους έκπλυσης), αυτή η τεχνική δίνει δυνατότητα μεγάλης συχνότητας μετρήσεων.

2.3. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ FIA

Η θεωρητική εξήγηση της FIA γίνεται μέσα από την κατανόηση των αρχών που διέπουν τα φαινόμενα που εμπλέκονται. Η έρευνα που έχει γίνει σχετικά με αυτήν την τεχνική έχει δείξει πως σε αυτήν εμπλέκονται δύο φαινόμενα που εξελίσσονται ταυτόχρονα: α) το φυσικό φαινόμενο της διασποράς (μη ομογενούς ανάμειξης) της ζώνης του δείγματος μέσα στο ρεύμα του φέροντος αντιδραστηρίου και β) το χημικό φαινόμενο χημικής αντίδρασης και κατά συνέπεια της δημιουργίας ενός νέου χημικού είδους που περιέχει ανιχνεύσιμη πληροφορία (π.χ. εκπέμπει φως, αλλάζει την αγωγιμότητα του διαλύματος, δημιουργεί ρεύμα κτλ.). Τα δύο αυτά φαινόμενα έχουν αναλυθεί διεξοδικά από την σκοπιά της μηχανικής χημικών διεργασιών⁶⁸ και από την εφαρμογή τους στην τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Είναι επίσης υπεύθυνα και για την μορφή της καμπύλης απόκρισης του ανιχνευτή.

Καθόσον αφορά τη χημική αντίδραση που εκτελείται, αυτή εξαρτάται από το είδος του χημικού συστήματος που εμπλέκει. Είναι αυτονόητο πως σε κάθε χημική αντίδραση ισχύουν οι γνωστοί νόμοι της χημείας περί μηχανισμού αντιδράσεων, περί κινητικής αντιδράσεων (πρώτης, δευτέρας, τρίτης τάξης κοκ.), καθώς και περί της χημικής ισορροπίας. Ανάλογα λοιπόν με την αντίδραση και τον μηχανισμό της, μπορεί κάποιος να κάνει χρήση των ανωτέρω θεωριών και να χρησιμοποιήσει εξισώσεις που περιγράφουν το εκάστοτε χημικό σύστημα (π.χ. για την αντίδραση $A + 2B \rightleftharpoons \Gamma$, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η εξίσωση: $C_T = K C_A C_B^2$), όπως και να υπολογίσει συγκεντρώσεις αντιδρώντων-προϊόντων, όταν επέλθει ισορροπία ή/και σε κάποιο σημείο της αντίδρασης, απλά μετρώντας την συγκέντρωση του προϊόντος, μέσω του σήματος που εκπέμπει με χρήση κατάλληλης καμπύλης αναφοράς.

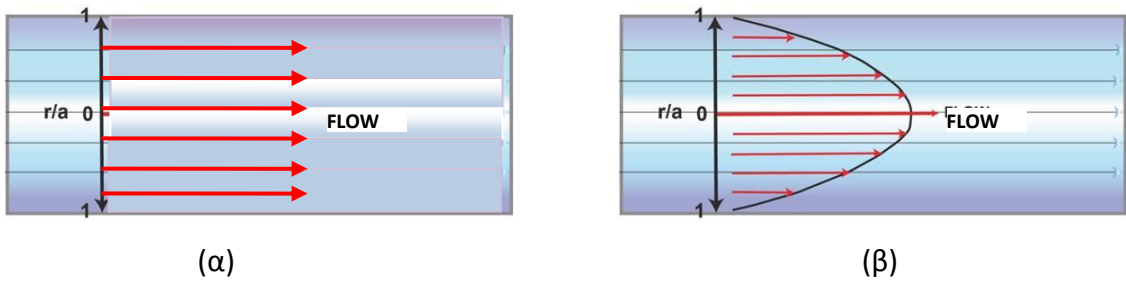
Η διασπορά του δείγματος έχει μελετηθεί σε απλά συστήματα, μονοδιαυλικά, όπως αυτό του παραπάνω σχήματος 10 (α) και πάντα υπό την προϋπόθεση ότι δεν πραγματοποιείται χημική αντίδραση μέσα στη ροή των χημικών οντοτήτων που εμπλέκει. Ένα τέτοιο σύστημα, που χρησιμοποιείται για ανάπτυξη θεωρητικών μοντέλων, συνήθως περιέχει

έναν έγχρωμο ιχνηθέτη, που εκχύεται στη ροή αδρανούς υγρού και καταλήγει στον ανιχνευτή (π.χ. φασματοφωτόμετρο). Με τέτοια συστήματα διασταυρώθηκαν οι θεωρίες περί διασποράς που ακολουθούν.

2.3.1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΣΧΕΤΙΚΟ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

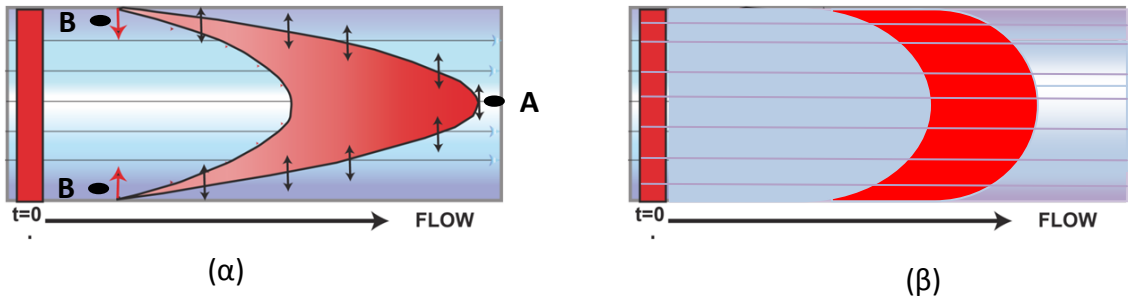
Η διασπορά ενός δείγματος σε ροή μέσα σε ένα ρεύμα αντιδραστηρίου πραγματοποιείται με βάση δύο μηχανισμούς: α) την αξονική διασπορά (κατά την διεύθυνση της ροής), η οποία εξαρτάται από το είδος ροής (στρωτή ή τυρβώδης) και β) την ακτινική διασπορά (κάθετη προς την διεύθυνση της ροής). Το πρώτο είδος διασποράς (αξονική) οφείλεται σε φαινόμενα μεταφοράς του δείγματος, ενώ το δεύτερο είδος διασποράς (ακτινική) οφείλεται στο φαινόμενο της διάχυσης.

Η αξονική διασπορά, φαίνεται στο σχήμα 11 (β)⁷³. Στις συνθήκες κάτω από τις οποίες εκτελείται ένα πείραμα FIA επικρατεί η στρωτή (Laminar) ροή και όχι η τυρβώδης (Turbulent) ροή (Συντελεστής Reynolds < 2000). Σε αυτό το είδος ροής οι δυνάμεις τριβής μεταξύ των στρωμάτων των υγρών δημιουργούν ένα παραβολικό προφίλ ταχυτήτων, όπου τα στρώματα δείγματος που βρίσκονται γειτνιάζοντα με τα τοιχώματα των σωλήνων είναι πρακτικά ακίνητα, ενώ τα στρώματα που βρίσκονται στο κέντρο των σωλήνων κινούνται με ταχύτητα διπλάσια από την μέση ταχύτητα του υγρού. Η ταχύτητα του κάθε μορίου περιγράφεται από τον τύπο $u = 2 \bar{u} [1 - (a/r)^2]$ (2.1) (όπου u : ταχύτητα του εκάστοτε μορίου, \bar{u} : μέση ταχύτητα των μορίων, a : ακτίνα σωλήνων και r : αξονική απόσταση από το κέντρο του σωλήνα). Με αυτό το προφίλ το δείγμα προχωράει προς τον ανιχνευτή ενώ ταυτόχρονα διασπείρεται αξονικά, μέσα στο αντιδραστήριο. **Παρόλα αυτά, η διασπορά δεν είναι μόνο αξονική.** Και αυτό, γιατί αν ήταν μόνο αξονική, τότε θα είχαμε ταχύτερη μετακίνηση μόνο των μορίων που βρίσκονταν στο κέντρο της ζώνης του δείγματος προς τον ανιχνευτή, με ταυτόχρονη παραμονή των μορίων που γειτνιάζαν στα τοιχώματα σε ακινησία (δίπλα στα τοιχώματα). Αυτό όμως δεν συμβαίνει και αυτό είναι και το γεγονός που επιτρέπει την εφαρμογή αυτής της τεχνικής ανάλυσης, η οποία ξεχωρίζει, γιατί μπορεί να πραγματοποιεί αναλύσεις υπό ελεγχόμενο συντελεστή διασποράς, ο οποίος μπορεί να αλλάζει κατά βούληση. Αυτό πετυχαίνεται με αλλαγή των κινητικών παραμέτρων του χημικού συστήματος ή και της γεωμετρίας του συστήματος FIA .



Σχήμα 11: Μέτωπο ταχυτήτων στην τυρβώδη ροή (α) και στη στρωτή ροή (β).

Η ακτινική διασπορά παρουσιάζεται στο σχήμα 12 (α)⁷³. Εκεί διακρίνονται δύο κατηγορίες μορίων ανάλογα με την θέση τους μέσα στην ζώνη του δείγματος: τα μόρια A και B, τα οποία εμφανίζουν και διαφορετικές τάσεις μετακίνησης, λόγω διάχυσης. Τα μεν μόρια A που βρίσκονται στο κέντρο της ζώνης του δείγματος τείνουν να διαχυθούν προς τα τοιχώματα των διαύλων γεγονός που μειώνει την ταχύτητα αξονικής τους κίνησης. Τα δε μόρια B που βρίσκονται κοντά στα τοιχώματα των διαύλων μετακινούνται λόγω διάχυσης προς το κέντρο του σωλήνα, όπου η ταχύτητα αξονικής τους κίνησης αυξάνεται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον συγκερασμό των δύο τάσεων και τελικά την εμφάνιση ενός προφίλ ταχυτήτων που προσομοιάζει αυτό του σχήματος 12 (β)⁷³.



Σχήμα 12: Σχετική κίνηση μορίων κατά την ακτινική διασπορά (α) και μέτωπο ταχυτήτων μετά από εκτεταμένη ακτινική διασπορά (β).

Σε αυτό το σημείο είναι σκόπιμο να σημειωθεί πως στην ακτινική διασπορά δεν συμβάλλει μόνο η διάχυση, αλλά και η εμφάνιση δευτερεύουσας ακτινικής ροής, λόγω φυγόκεντρων δυνάμεων που δημιουργούνται στην ροή των υγρών, λόγω της γεωμετρίας των σωλήνων που χρησιμοποιούνται στην τεχνική FIA. Η γεωμετρία αυτή μπορεί να περιλαμβάνει διατάξεις όπως περιελίξεις στους διαύλους⁶⁹, περιπλέξεις διαύλων⁷⁰, ακόμα και εισαγωγή στους σωλήνες σφαιριδίων αδρανούς υλικού με διάμετρο ελαφρώς μικρότερη από το άνοιγμά τους, τα οποία διατάσσονται σε σειρά⁷¹. Όλες αυτές οι διατάξεις επηρεάζουν την ροή και δημιουργούν δευτερεύουσα ακτινική ροή, γιατί διαταράσσουν το παραβολικό προφίλ ταχυτήτων. Και η δευτερεύουσα ακτινική ροή έχει μεγάλη σημασία στην τεχνική FIA, γιατί

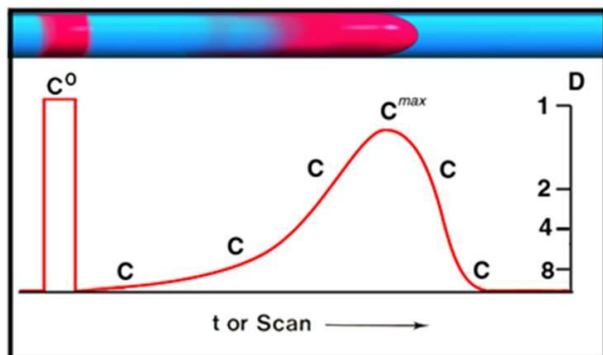
χρησιμοποιείται σαν εργαλείο μείωσης του πλάτους των καμπυλών που λαμβάνουμε από τους ανιχνευτές⁷². Η μείωση δε του πλάτους των καμπυλών είναι σημαντική, γιατί βοηθά στην πραγματοποίηση διαδοχικών αναλύσεων FIA μεγαλύτερης ταχύτητας λόγω των μικρότερων χρόνων έκπλυσης t_w , σχήμα 10 (β).

Μετά την αναφορά των θεωρητικών μοντέλων που επεξηγούν το προφίλ ταχυτήτων που εμφανίζει η ζώνη του δείγματος, λόγω διασποράς, είναι σκόπιμη η παράθεση ορισμένων εξισώσεων που περιγράφουν τη διασπορά του δείγματος στο ρεύμα των αντιδραστηρίων και η μελέτη κάποιων οριακών συστημάτων διασποράς, καθώς και η επίδρασή των στις καμπύλες απόκρισης. Η μελέτη των οριακών αυτών περιπτώσεων είναι πολύ χρήσιμη, γιατί βοηθά κάποιον που θα ήθελε να ασχοληθεί με το θέμα να γνωρίζει, με βάση την μορφή καμπύλης που λαμβάνει, σε ποια κατάσταση διασποράς βρίσκεται, ώστε να μπορεί να βελτιώσει τις καμπύλες που λαμβάνει και την αναλυτική πληροφορία που ανιχνεύει, μέσω κατάλληλων παρεμβάσεων στη γεωμετρία των σωλήνων του συστήματος FIA ή την κινητική των ροών.

2.3.1.1. ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΙΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

Για τον ορισμό του συντελεστή διασποράς χρησιμοποιείται το σύστημα που περιγράφηκε προηγουμένως, στο οποίο εισάγεται έγχρωμος ιχνηθέτης στην ροή αδρανούς άχρωμου υγρού και οδηγείται σε έναν ανιχνευτή για μέτρηση της συγκέντρωσης μέσω κατάλληλης καμπύλης αναφοράς. Σε αυτό το σύστημα αρχικής συγκέντρωσης C_0 , ρέει στην ροή του υγρού όπου και διασπείρεται σταδιακά, δημιουργώντας βαθμίδωση συγκεντρώσεων. Οι βαθμιδωμένες συγκεντρώσεις απεικονίζονται σαν μια συνέχεια διακριτών κομματιών διαφορετικής συγκέντρωσης όπως φαίνεται στο σχήμα 13⁷³. Καθώς προχωράει ο ιχνηθέτης στην ροή και φτάνει τον ανιχνευτή, ανιχνεύεται μια καμπύλη που φέρει σε κάθε σημείο της διαφορετική συγκέντρωση ιχνηθέτη και στην κορυφή την μέγιστη συγκέντρωση ιχνηθέτη (C_{max} , όπου $C_{max} \leq C_0$). Με βάση αυτήν την μέγιστη συγκέντρωση ιχνηθέτη και την αρχική του συγκέντρωση, μπορούμε να ορίσουμε τον συντελεστή ολικής διασποράς ως το πηλίκο της αρχικής συγκέντρωσης ιχνηθέτη, πριν την εισαγωγή στην ροή προς την μέγιστη συγκέντρωση του ιχνηθέτη που ανιχνεύτηκε, στην κορυφή της καμπύλης που ελήφθη από τον ανιχνευτή,

$$\text{δηλαδή: } D_S = \frac{C_0}{C_{max}} \quad (2.2).$$



Σχήμα 13: Απεικόνιση της βαθμίδωσης συγκεντρώσεων που δημιουργείται κατά την διασπορά ενός ιχνηθέτη μέσα σε ένα αδρανές υγρό

Για να καταλάβει κάποιος την ουσία αυτού του μεγέθους, δίνουμε ως παράδειγμα σύστημα με συντελεστή διασποράς 2: $D = C_0/C_{max} = 2$, τότε αυτό σημαίνει πως έχουμε μια αραιώση 1:1 μέσα στο φέρον ρεύμα, δηλαδή γενικά ισχύει ότι **η αραιώση δίνεται από τον τύπο: 1: (D-1)**.

Με βάση τις τιμές διασποράς που υπολογίζουμε για κάθε σύστημα FIA, μπορούμε να κατατάξουμε τα συστήματα αυτά σε τρεις κατηγορίες συστημάτων (ανάλογα με την διασπορά που τα συνοδεύει): σε **συστήματα περιορισμένης διασποράς** ($D=1-3$), σε **συστήματα μεσαίας διασποράς** ($D=3-10$) και σε **συστήματα μεγάλης διασποράς** ($D>10$).

Αφού εκφράσαμε τον συντελεστή διασποράς ενός συστήματος, διακρίνουμε τρεις περιπτώσεις διασποράς δείγματος και παρουσιάζουμε τις αντίστοιχες καμπύλες απόκρισης. Γενικά, *κάνοντας χρήση του προτύπου της διάχυσης που περιγράφεται σε επόμενο εδάφιο, (εδάφιο 2.3.2.4.2), κάνοντας την παραδοχή ότι δεν έχουμε δευτερεύουσα ροή και εκτελώντας κατάλληλους υπολογισμούς^{74,75} μπορούμε να διακρίνουμε τρεις περιπτώσεις, οι οποίες φαίνονται στο σχήμα 14.*

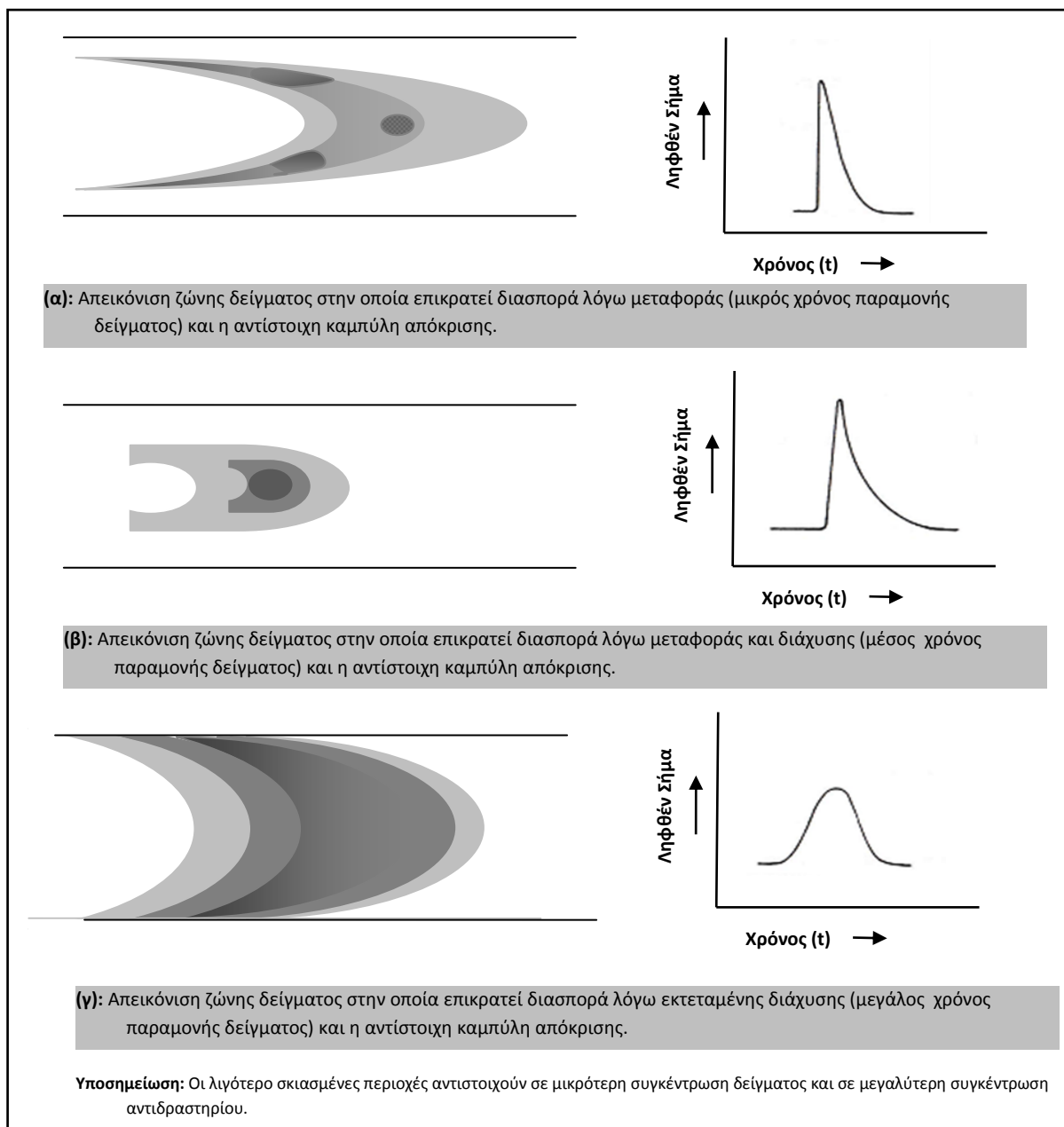
Η πρώτη περίπτωση αναφέρεται σε συστήματα με μικρούς χρόνους παραμονής δείγματος στους διαύλους (Σχήμα 14 (α)). Στην περίπτωση αυτή η διάχυση δεν έχει εξελιχθεί αρκετά, καθώς το δείγμα έχει μόλις εισαχθεί στην ροή των αντιδραστηρίων. Έτσι εκεί η διασπορά γίνεται μόνο με μεταφορά κατά τον άξονα του διαύλου.

Η δεύτερη περίπτωση αναφέρεται σε συστήματα με μέσους χρόνους παραμονής δείγματος στους διαύλους (Σχήμα 14 (β)). Στην περίπτωση αυτή η διάχυση έχει εξελιχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Στην περίπτωση αυτή η διασπορά βασίζεται τόσο στην μεταφορά, όσο και στη διάχυση. Αυτή η περίπτωση χαρακτηρίζει περισσότερα συστήματα FIA στην πράξη και είναι δύσκολο να περιγραφεί θεωρητικά λόγω πολλών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα.

Η τρίτη περίπτωση αναφέρεται σε συστήματα με μεγάλους χρόνους παραμονής δείγματος μέσα στους διαύλους (Σχήμα 14 (γ)). Στην περίπτωση αυτή η διάχυση είναι

εκτεταμένη, καθώς έχει περάσει πολύ ώρα από την εισαγωγή του δείγματος στην ροή. Έτσι εκεί η διασπορά βασίζεται κατά κύριο λόγο στη διάχυση.

Στο σχήμα 14 βλέπουμε τις τρεις περιπτώσεις διασποράς δείγματος και αντίστοιχα τις τρεις διαφορετικές καμπύλες που λαμβάνονται από τον ανιχνευτή.

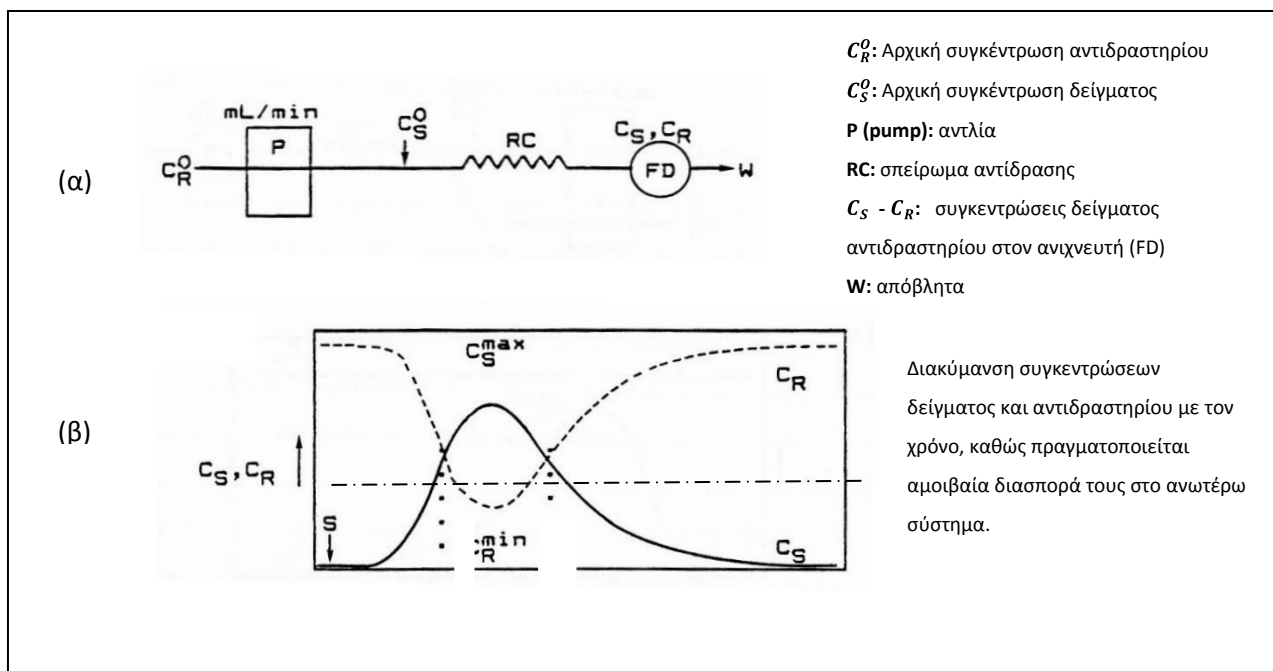


Σχήμα 14: Απεικόνιση της ζώνης δείγματος σε διάφορους χρόνους παραμονής μέσα στους διαύλους συστήματος FIA και συσχέτιση με τις καμπύλες που προκύπτουν.

Αφού ορίστηκε ο συντελεστής διασποράς ενός δείγματος, όταν εισάγεται στην ροή ενός αντιδραστήριου και απεικονίστηκαν οι διαφορετικές περιπτώσεις διασποράς του, σε σχέση με τους χρόνους παραμονής του στην ροή του αντιδραστήριου, είναι σκόπιμο να γίνει μια αναφορά και στην αμοιβαία διασπορά δείγματος και αντιδραστήριου σε ένα σύστημα σαν το προαναφερθέν.

2.3.1.2. ΑΜΟΙΒΑΙΑ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΙ ΣΥΛΛΟΓΙΣΜΟΙ

Σε ένα σύστημα σαν το προαναφερθέν, ενός διαλύου, όπου γίνεται έκχυση δείγματος στην ροή ενός αντιδραστήριου (σχήμα 15³) δεν έχουμε διασπορά μόνο του δείγματος στο αντιδραστήριο, αλλά και του αντιδραστήριου στο δείγμα. Έτσι **στην περίπτωση του αντιδραστήριου, η συγκέντρωση του κάθε στιγμή μεταβάλλεται, και μάλιστα αντιστρόφως ανάλογα με τη συγκέντρωση δείγματος**. Αυτό σημαίνει ότι αρχικά βαίνει μειούμενη από μία μέγιστη τιμή προς μία ελάχιστη τιμή, καθώς απομακρυνόμαστε από το κέντρο της ζώνης του δείγματος, και ακολούθως η συγκέντρωσή του επανέρχεται στη μέγιστη τιμή. Αυτό συμβαίνει ενώ η συγκέντρωση του δείγματος έχει φτάσει στην ελάχιστη τιμή της (μηδέν). Αυτή η αμοιβαία αυξομείωση συγκεντρώσεων προς αντίθετη κατεύθυνση σε κάθε χρονική στιγμή απεικονίζει ξεκάθαρα την αμοιβαιότητα της διασποράς στο προαναφερθέν σύστημα FIA.

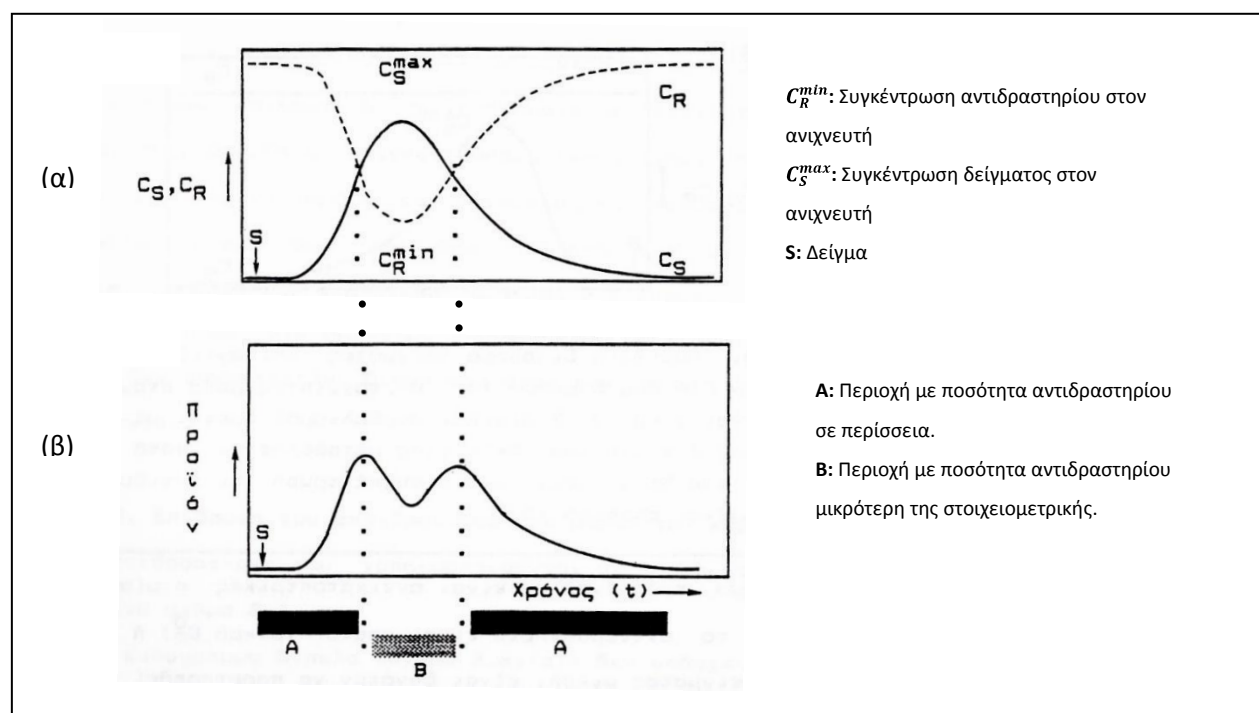


Σχήμα 15: Απεικόνιση αμοιβαίας διασποράς δείγματος και αντιδραστήριου σε σύστημα FIA μονού διαλύου.

Αν ήθελε κάποιος να ορίσει τον **συντελεστή διασποράς του αντιδραστηρίου (D_R)**, θα μπορούσε, κατά αναλογία με τον συντελεστή διασποράς του δείγματος (D_S) που αναφέρεται παραπάνω, να χρησιμοποιήσει την σχέση: $D_R = \frac{C_R^O}{C_R^{min}}$ (2.3), όπου C_R^O : η αρχική συγκέντρωση του αντιδραστηρίου και C_R^{min} : η ελάχιστη συγκέντρωσή του όταν περνά από τον ανιχνευτή το κέντρο της ζώνης του δείγματος. Έχει αποδειχθεί^{76,77} ότι **οι δύο αυτοί συντελεστές διασποράς σχετίζονται:**

$$1/D_S + 1/D_R = 1 \quad (2.4).$$

Σε αυτό το σημείο είναι σκόπιμο να μελετήσουμε μία περίπτωση που μπορεί να λάβει χώρα σε ένα τέτοιο σύστημα (Σύστημα FIA μονού διαύλου) και η οποία δημιουργεί προβλήματα στην ανίχνευση του δείγματός υπό ανάλυση. Αυτή είναι η περίπτωση, όπου η συγκέντρωση C_R^{min} είναι μικρότερη από την στοιχειομετρικά απαιτούμενη, για αντίδραση στο κέντρο της ζώνης του δείγματος. Σε αυτήν την περίπτωση καταγράφεται διπλή κορυφή όπως φαίνεται στο σχήμα 16. Στην περίπτωση αυτή το ύψος της καμπύλης C_S^{max} (σχήμα 16 (α)) δεν συνδέεται πια γραμμικά με το ύψος της ληφθείσας από τον ανιχνευτή καμπύλης (σχήμα 16 (β)).

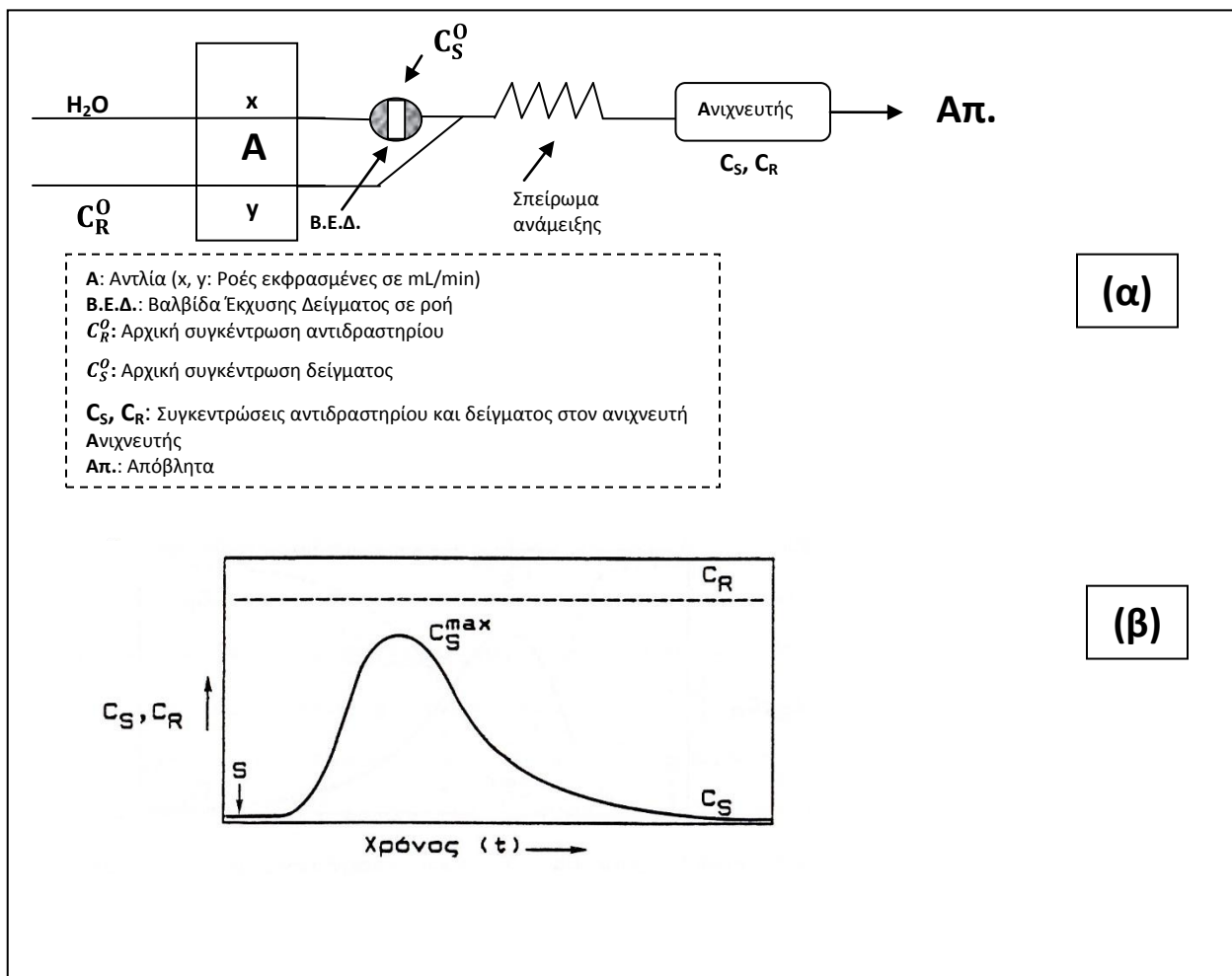


Σχήμα 16: Διπλή κορυφή σε ανεπάρκεια αντιδραστηρίου στο κέντρο της ζώνης του δείγματος, σε σύστημα FIA μονού διαύλου.

Για να επιλυθεί το πρόβλημα εμφάνισης διπλής κορυφής, υπάρχουν δύο τρόποι. Ο ένας τρόπος εμπλέκει υιοθέτηση τεχνασμάτων που βασίζονται σε κατάλληλη επεξεργασία των σημάτων ή κατάλληλη ρύθμιση του χημικού συστήματος. Παραδείγματα βρίσκουμε στην ερευνητική εργασία των A. Fernandez et al.⁷⁸, όπου προτείνεται μέθοδος ταυτόχρονου

διαφορικού κινητικού προσδιορισμού κοβαλτίου και νικελίου, που βασίζεται σε διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης της πρώτης και δεύτερης κορυφής και στην εργασία του J. F. Tyson⁷⁷, όπου προτείνονται μέθοδοι ογκομετρήσεων που βασίζονται στην μέτρηση του χρόνου που μεσολαβεί ανάμεσα σε δύο διαδοχικές κορυφές. **Ο άλλος τρόπος εμπλέκει διαδικασίες οι οποίες θα πρέπει να αυξάνουν την αρχική συγκέντρωση αντιδραστήριου C_R^0 ή την διασπορά του δείγματος, ώστε η C_R^{min} να επαρκεί για πλήρη αντίδραση στο κέντρο της ζώνης του δείγματος.** Ένα τέτοιο αποτέλεσμα πετυχαίνει κανείς χρησιμοποιώντας συστήματα δύο διαύλων, τα οποία αυξάνουν την διασπορά του δείγματος μέσα στο αντιδραστήριο και μάλιστα με τρόπο ελεγχόμενο.

Στο σχήμα 17(α) φαίνεται σύστημα δύο διαύλων και στο 17(β) το προφίλ των συγκεντρώσεων τόσο του δείγματος όσο και του αντιδραστήριου, όπου φαίνεται ότι υπάρχει περίσσεια σε όλη την ζώνη του δείγματος.



Σχήμα 17: Απεικόνιση συστήματος FIA δύο διαύλων (α) και της αμοιβαίας διασποράς δείγματος και αντιδραστήριου (β).

Στο Σχήμα 17 (α) βλέπουμε πως το δείγμα αρχικά εισάγεται στην ροή του διαλύτη με την βοήθεια βαλβίδας έγχυσης σε ροή και ακολούθως συναντά την ροή του αντιδραστηρίου, ενώ τελικά οδηγείται σε κατάλληλο σπείρωμα ανάμειξης/αντίδρασης και κατόπιν στον ανιχνευτή. **Φαίνεται καθαρά (Σχήμα 17 (β)), πως στο εν λόγω σύστημα (διπλού διαύλου), η συγκέντρωση του δείγματος μεταβάλλεται κατά μήκος της ζώνης του δείγματος, ενώ η συγκέντρωση αντιδραστηρίου παραμένει σταθερή. Η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου μπορεί να καθοριστεί με κατάλληλη ρύθμιση των ταχυτήτων ροής του διαλύτη (x) και του αντιδραστηρίου (y). Ισχύει δε η σχέση: $C_R = C_R^0 \left[\frac{y}{(x + y)} \right]$ (2.5).**

Με αυτόν τον τρόπο, αν υπάρχει πρόβλημα μη επάρκειας του αντιδραστηρίου για στοιχειομετρική αντίδραση με το δείγμα, μπορεί κάποιος αλλάζοντας τις ροές του διαλύτη και του αντιδραστηρίου, να ρυθμίσει (με βάση τον τύπο 2.5) τη συγκέντρωση του αντιδραστηρίου, ώστε να επαρκεί.

Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως ότι ισχύει για τα συστήματα δύο διαύλων, ισχύει και για τα συστήματα πολλαπλών διαύλων, όπου και εκεί μπορούν να ρυθμιστούν οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων (ώστε να είναι σταθερές σε όλη την ζώνη του δείγματος), με απλή ρύθμιση των ταχυτήτων ροής των ρευμάτων στους διάφορους διαύλους. Τότε ο

ανωτέρω τύπος θα μπορούσε να γραφτεί ως εξής: $C_{R1} = C_{R1}^0 \left[\frac{y1}{(x + y1 + \dots + yn)} \right]$ (2.6),

όπου R1: το ένα από τα πολλά αντιδραστήρια, y1: η ταχύτητα ροής του αντιδραστηρίου 1 και yn: η ταχύτητα ροής του αντιδραστηρίου n. Επίσης σε αυτήν την περίπτωση θα ίσχυε και ο τύπος: $1/D_S + 1/D_{R1} + \dots + 1/D_{Rn} = 1$ (2.7).

2.3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA

2.3.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA

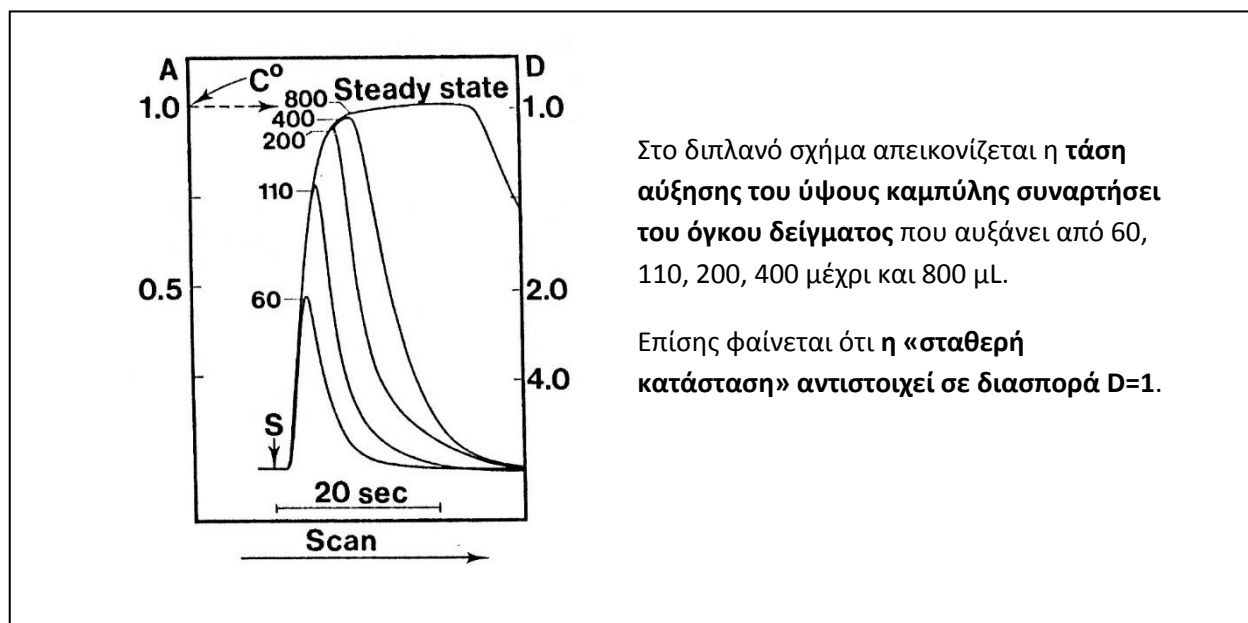
Αν κάποιος κάνει χρήση ενός συστήματος FIA, όπως αυτό του σχήματος 15 (α) και αντί του αντιδραστηρίου χρησιμοποιήσει νερό και αντί του δείγματος έγχρωμο ιχνηθέτη μπορεί να παρακολουθήσει την επίδραση όγκου δείγματος στη διασπορά. Έτσι θα προκύψουν οι καμπύλες που φαίνονται στο σχήμα 18^{65,66}. Φαίνεται σαφέστατα, ότι η αύξηση του όγκου δείγματος αυξάνει τα ύψη των κορυφών και κατά συνέπεια την ευαισθησία. Σε αυτές τις καμπύλες φαίνεται επίσης ότι, ενώ όλες οι καμπύλες (που αντιστοιχούν σε

διαφορετικούς όγκους δ/τος ιχνηθέτη) αρχίζουν από το ίδιο σημείο S (όπου γίνεται η έκχυση του ιχνηθέτη στο νερό), παρόλα αυτά έχουν διαφορετικό ύψος, ανάλογο του όγκου. Βέβαια παρατηρείται μέγιστο ύψος μετά από κάποια τιμή του όγκου. Περαιτέρω αύξηση του όγκου δεν αυξάνει το σήμα και κατά συνέπεια την ευαισθησία. Επίσης χαρακτηριστικό στοιχείο των καμπυλών είναι ότι σε κάθε περίπτωση το ανερχόμενο τμήμα της καμπύλης είναι κοινό (ανεξάρτητα του εγχυμένου όγκου).

Για τις προαναφερθείσες διασπορές ισχύουν οι παρακάτω τύποι^{65,66}:

$$1/D_{max} = C^{max}/C^0 = 1 - \exp(-kS_v) = 1 - \exp(-0.693n) = 1 - 2^{-n} \quad (2.8),$$

όπου $n = \frac{S_v}{S_{1/2}}$ και $S_{1/2}$: ο όγκος που απαιτείται για καμπύλη ίση με το 50% της «καμπύλης σταθερής κατάστασης». Η καμπύλη αυτή αντιστοιχεί σε $D=2$.



Σχήμα 18: Καμπύλες που δείχνουν την επίδραση του όγκου δείγματος σε απλό σύστημα FIA μονού διαύλου.

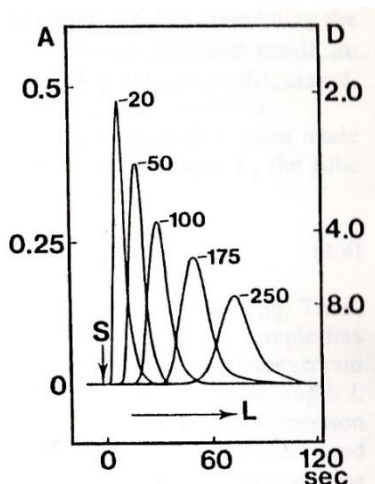
2.3.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΗΚΟΥΣ, ΤΗΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ ΔΙΑΥΛΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA

Η μελέτη του συστήματος που φαίνεται στο σχήμα 15 (α), έδειξε ότι⁷⁹ χρησιμοποιώντας διάυλο πολύ μικρής εσωτερικής διαμέτρου, το δείγμα καταλαμβάνει μεγαλύτερο μήκος σωλήνα (θ), εφόσον ισχύει ο τύπος $S_v = \pi(0.5 d)^2 \theta$ ^{65,66} (2.9), οπότε η επαφή

με το αντιδραστήριο θα είναι περιορισμένη και η διασπορά μικρότερη. Από τον πιο πάνω τύπο (2.9) φαίνεται, ότι μείωση της εσωτερικής διαμέτρου του διαύλου κατά το ήμισυ, προκαλεί μείωση της τιμής $S_{1/2}$ κατά 4 φορές. Αυτός είναι και ο λόγος που κατά την κατασκευή ενός συστήματος FIA ένας από τους κανόνες που χρησιμοποιούνται είναι ο ακόλουθος: **Αν υπάρχει απαίτηση για υλοποίηση συστήματος χαμηλής διασποράς, τότε πρέπει να δοθεί προσοχή ώστε ο όγκος του δείγματος να είναι μεγαλύτερος από την τιμή $S_{1/2}$ (τύπος 2.8).**

Πρακτικός κανόνας για την εσωτερική διάμετρο των διαύλων, είναι η χρήση διαύλων εσωτερικής διαμέτρου 0,3 mm για συστήματα χαμηλής διασποράς, 0,5mm για συστήματα μέσης και μεγαλύτερης των 0,75 mm για συστήματα υψηλής διασποράς.

Το μήκος του διαύλου είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την διασπορά. Η επίδραση του μήκους στις κορυφές FIA φαίνεται στο σχήμα 19^{65,66}. Στο σχήμα αυτό φαίνεται, ότι η αύξηση του μήκους έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ύψους της ανιχνευόμενης κορυφής. Με τον τρόπο αυτό παρατηρείται και σταδιακή μείωση της ευαισθησίας, λόγω εμφάνισης πεπλατυσμένων κορυφών.



Διασπορά σε σύστημα FIA μονού διαύλου ως συνάρτηση του μήκους του.

- _ Ο όγκος δείγματος είναι 60 μL .
- _ Το μήκος L εκφράζεται σε cm.
- _ Η εσωτερική διάμετρος είναι 0,5mm.
- _ Η ταχύτητα ροής των ρευστών είναι 1,5 mL/min.

Σχήμα 19: Επίδραση του μήκους του διαύλου στη διασπορά.

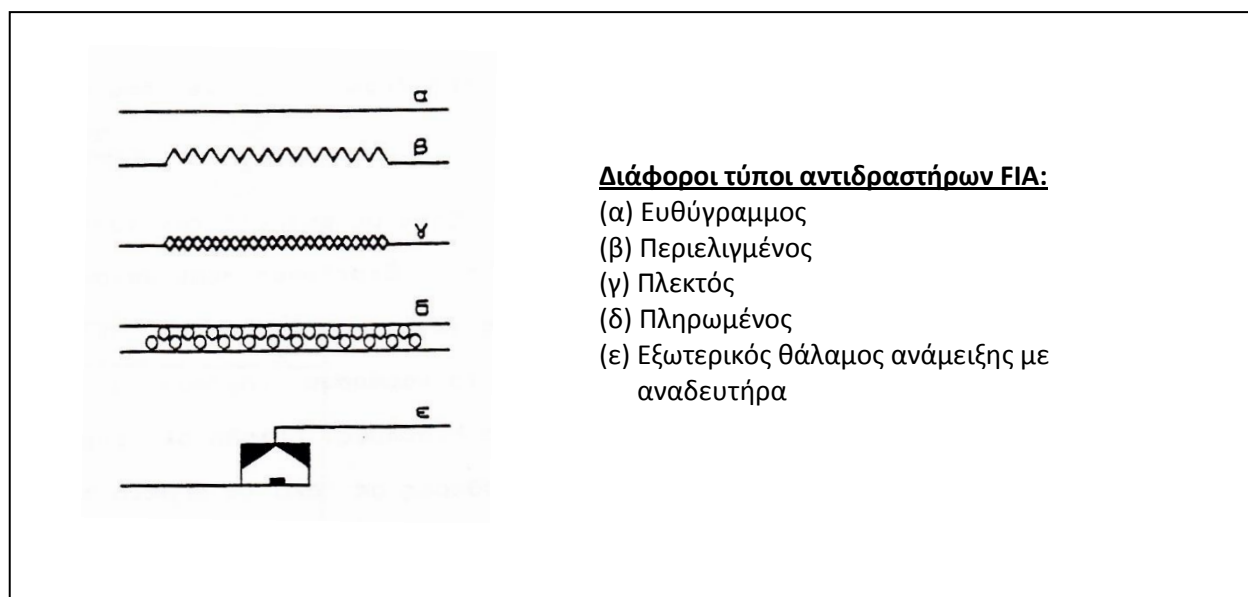
Πρέπει να αναφερθεί ότι ο χρόνος παραμονής του δείγματος και κατά συνέπεια ο χρόνος αντίδρασης εξαρτάται από το μήκος και την εσωτερική διάμετρο του διαύλου⁷⁹:

$$\bar{T} = \frac{\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 L}{Q} = \frac{L}{F} = V_r / Q \quad (2.10)$$
, όπου d : εσωτερική διάμετρος σωλήνα, L : μήκος σωλήνα, Q : ταχύτητα ροής, F : γραμμική ταχύτητα ροής και V_r : όγκος αντιδραστήρα. Πρέπει να σημειωθεί, πως ο χρόνος αυτός πλησιάζει τον χρόνο εμφάνισης του μεγίστου της κορυφής, όσο πιο

συμμετρική είναι η κορυφή. Συνδέεται με τη διάχυση με την ακόλουθη σχέση⁷⁹: $D^{max} = (2\pi^{3/2} R^2 D_f^{1/2} \bar{T}^{1/2}) / S_v$ (2.11), όπου R: η ακτίνα και D_f : η αξονική διασπορά. Από τους τύπους φαίνεται ότι η διάχυση είναι ευθέως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του μήκους και της ακτίνας του διαύλου, ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του όγκου του αντιδραστήρα και αντιστρόφως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας της ταχύτητας ροής.

2.3.2.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΕΩΜΕΤΡΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA

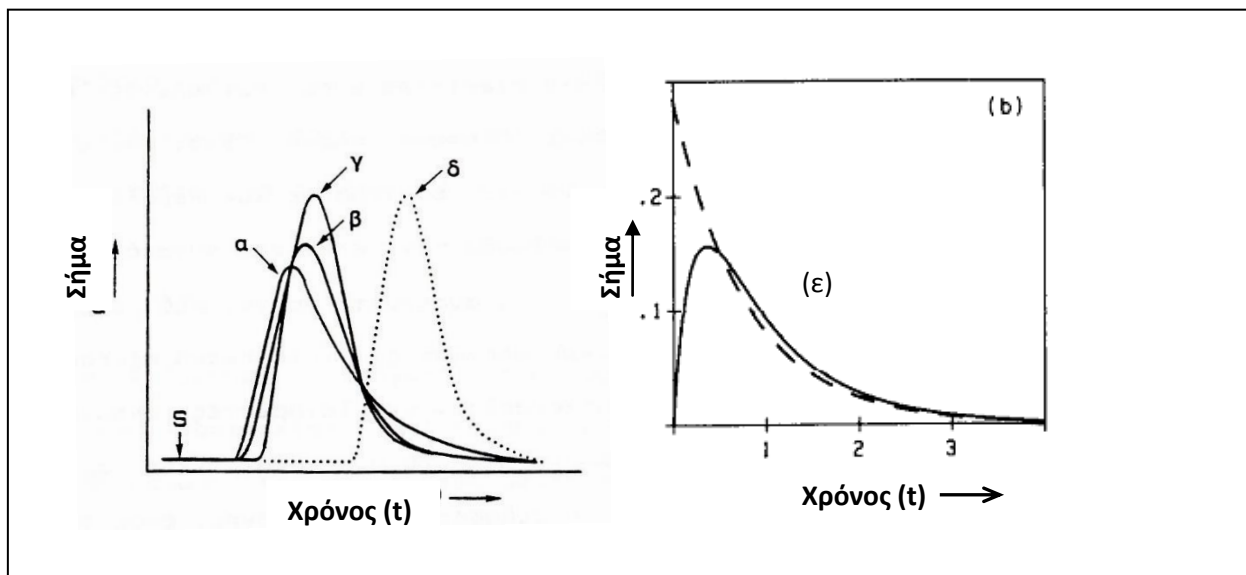
Οι διάφοροι τύποι διαύλων, που παρεμβάλλονται ανάμεσα στο σύστημα έκχυσης δείγματος στη ροή και στον ανιχνευτή και αποτελούν τον αντιδραστήρα του συστήματος FIA, φαίνονται στο σχήμα 20³.



Σχήμα 20: Διάφοροι τύποι αντιδραστήρων που χρησιμοποιούνται στην FIA.

Οι τύποι αυτοί διαφέρουν μεταξύ τους, κυρίως ως προς τη διάχυση που προκαλούν στο δείγμα και στο αντιδραστήριο. Η διαφορετική διάχυση είναι υπεύθυνη και για τις διαφορετικές μορφές καμπύλης που λαμβάνονται.

Στον αντιδραστήρα (α), Σχήμα 20, δεν υπάρχει δευτερεύουσα ροή. Έτσι σε αυτόν η ακτινική διασπορά οφείλεται μόνο σε διάχυση και είναι αμελητέα για τους συνήθεις χρόνους παραμονής στα συστήματα FIA. Οπότε η διασπορά που επικρατεί σε αυτόν είναι η αξονική και οι κορυφές που λαμβάνονται έχουν την μορφή του σχήματος 21 (α)³.



Σχήμα 21: Κορυφές που ανιχνεύονται με χρήση των αντιδραστήρων του σχήματος 20.

Στον αντιδραστήρα (β), Σχήμα 20, υπάρχει δευτερεύουσα ροή, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την λήψη κορυφής πιο συμμετρικής, πιο ψηλής και πιο στενής, σε σύγκριση με την κορυφή που θα λαμβανόταν από ευθύγραμμο αντιδραστήρα ίδιου μήκους. **Όσο πιο μικρή είναι η διάμετρος περιέλιξης, τόσο πιο έντονη η επίδραση στην ανιχνεύσιμη καμπύλη.** Η μορφή καμπυλών γι' αυτόν τον αντιδραστήρα φαίνεται στο 21 (β)³.

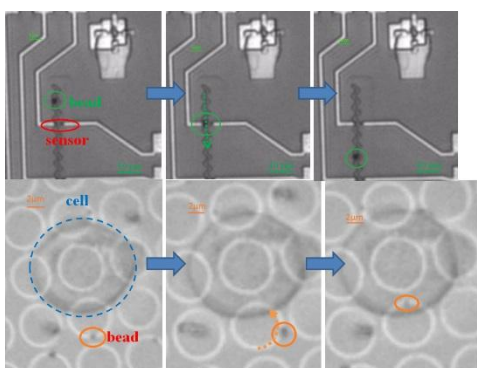
Αντίστοιχα, ο αντιδραστήρας (γ), Σχήμα 20, παράγει πιο εκτεταμένη δευτερεύουσα ροή και επομένως πιο συμμετρική και πιο στενή κορυφή, όπως αυτή στο σχήμα 21 (γ)³.

Στον αντιδραστήρα (δ), Σχήμα 20, ο οποίος είναι διαδεδομένος στις χρωματογραφικές τεχνικές λαμβάνονται κορυφές μικρότερου εύρους, όπως αυτή στο σχήμα 21 (δ)³. Αυτός ο αντιδραστήρας παρουσιάζει το πλεονέκτημα⁸⁰ ότι δίνει τη δυνατότητα για ταυτόχρονη παρουσία περισσότερων του ενός δείγματος στη ροή. Παρόλα αυτά, η χρήση τέτοιων αντιδραστήρων έχει και κάποια μειονεκτήματα, όπως η συμβολή στην ανάπτυξη υψηλών πιέσεων μέσα στους διαύλους, λόγω εμφάνισης μεγάλου λόγου επιφάνειας προς όγκο στη ροή τους. Βέβαια υπάρχουν περιπτώσεις εφαρμογών, όπου η χρήση τέτοιων αντιδραστήρων είναι μονόδρομος, όπως στην περίπτωση ανάγκης χρήσης ακινητοποιημένων ενζύμων⁸¹ ή στην περίπτωση ανάγκης χρήσης στερεών αντιδραστηρίων⁸².

Ο αντιδραστήρας (ε), Σχήμα 20, χρησιμοποιείται όταν απαιτούνται μεγάλοι συντελεστές διασποράς. Αυτός είναι και ο λόγος που χρησιμοποιείται σε ογκομετρήσεις FIA, σε εφαρμογές βαθμίδωσης συγκέντρωσης (gradient techniques) και σε εφαρμογές αραίωσης πυκνών διαλυμάτων⁷⁵. Με την χρήση αυτών των αντιδραστήρων λαμβάνονται ασύμμετρες κορυφές, με μεγάλο εύρος, οι οποίες παρουσιάζουν ένα αργά κατερχόμενο τμήμα (Σχήμα 21

(ϵ)⁸³). Σε αυτές οι μετρήσεις βασίζονται σε αξιοποίηση των σημάτων στο κατερχόμενο μέρος της καμπύλης^{83,84}.

Ο τελευταίος αντιδραστήρας που πρέπει να αναφερθεί και άρχισε να χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια, στα πλαίσια προσπαθειών βελτιστοποίησης και σμίκρυνσης των συστημάτων FIA, με στόχο την μείωση χρήσης αντιδραστηρίων, την μείωση των νεκρών όγκων και την σμίκρυνση του αναλυτή είναι ο επονομαζόμενος αντιδραστήρας ολοκληρωμένων μικροσωληνώσεων⁸⁵ (integrated microconduit reactor). Αυτός δημιουργείται με χάραξη ενός ημικυλινδρικού διαύλου πάνω σε κομμάτι plexiglass, το οποίο καλύπτεται με έτερη πλάκα plexiglass, η οποία την σφραγίζει. Οι αναλυτές αυτοί μπορούν να κατασκευαστούν στα μέτρα και σταθμά της εκάστοτε ανάλυσης και έχουν μέγεθος πιστωτικής κάρτας (σχήμα 22).



Σχήμα 22: Σύστημα ολοκληρωμένων μικροσωληνώσεων της εταιρείας NaBis

2.3.2.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΛΛΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΗ ΜΟΡΦΗ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ FIA

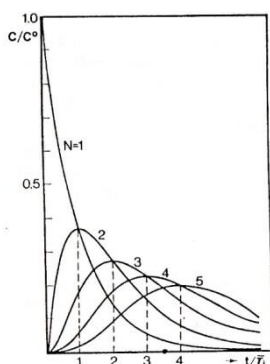
Μετά τη διεξοδική διερεύνηση της επίδρασης των πιο συνηθισμένων παραμέτρων του συστήματος FIA που επηρεάζουν τη διασπορά, πρέπει να αναφερθεί πως στη διασπορά συμμετέχουν όλα τα τμήματα που συναντά κανείς στην FIA, δηλαδή: **το τμήμα εισαγωγής δείγματος στην ροή, ο αντιδραστήρας και ο ανιχνευτής**. Στη διασπορά επιδρούν οι σύνδεσμοι μεταξύ των τμημάτων. Αυτοί συνεισφέρουν στην ολική διασπορά, μέσω των νεκρών όγκων που δημιουργούν. **Έτσι για να υπολογιστεί ο ολικός συντελεστής διασποράς θα πρέπει να υπολογιστεί η συνισταμένη όλων των διασπορών που δημιουργούνται στο σύστημα FIA**. Οι τρόποι που προτείνονται μέχρι σήμερα για το θεωρητικό υπολογισμό ενός ολικού συντελεστή διασποράς σε ένα σύστημα FIA αναφέρονται κατωτέρω, όπου περιγράφονται **το πρότυπο των διαδοχικών θαλάμων**⁶⁸ και **το πρότυπο της διάχυσης**⁸⁶.

2.3.2.4.1. ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΩΝ ΔΙΑΔΟΧΙΚΩΝ ΘΑΛΑΜΩΝ (TANK IN SERIES MODEL)

Το πρότυπο αυτό βασίζεται στην παραδοχή ότι το υγρό διαρρέει μια σειρά από ισομεγέθεις θαλάμους, οι οποίοι αναδεύονται ιδανικά ή διαρρέει ένα δίκτυο παράλληλων ισομεγεθών θαλάμων που αναδεύονται επίσης ιδανικά. Σε αυτήν την περίπτωση και αν συμβολίσουμε με N τον αριθμό των θαλάμων αυτών και με \bar{T}_i το μέσο χρόνο παραμονής του δείγματος σε κάθε θάλαμο, τότε η συγκέντρωσή του συναρτήσει του χρόνου θα δίνεται⁶⁸ από την στατιστική συνάρτηση Γάμμα, που είναι της μορφής: $c = \frac{1}{\bar{T}_i} \left(\frac{t}{\bar{T}_i}\right)^{N-1} \frac{1}{(N-1)!} e^{-t/\bar{T}_i}$ (2.12). Η σχέση αυτή, για μεγάλα N ($N \gg 10$) πλησιάζει την κατανομή Gauss, ενώ για μικρά N μεταβάλλεται ασύμμετρα (σχήμα 23^{65,66}). Ο συνολικός χρόνος παραμονής αποδίδεται μέσω της σχέσης $\bar{T} = N \bar{T}_i$, δηλαδή υπολογίζεται με το άθροισμα των μέσων χρόνων παραμονής σε κάθε θάλαμο ξεχωριστά.

Η ανωτέρω εξίσωση (2.12) για $N=1$ γίνεται $c = \frac{1}{\bar{T}_i} e^{-t/\bar{T}_i}$ (2.13), η οποία περιγράφει ικανοποιητικά τις ογκομετρήσεις FIA. Η σχέση αυτή εφαρμόζεται συνήθως σε αντιδραστήρες του τύπου του σχήματος 20 (ε), όπου θεωρείται ότι όλος ο όγκος του δείγματος συγκεντρώνεται στον θάλαμο αναμείξεως.

Γίνεται λοιπόν κατανοητό πως για πλήθος θεωρητικών θαλάμων που κυμαίνεται ανάμεσα στις προαναφερθείσες τιμές, η συμπεριφορά είναι κάπου ανάμεσα στις δύο ανωτέρω περιπτώσεις και μπορεί να προβλεφτεί με τις ανωτέρω εξισώσεις (2.12 και 2.13).



Σχήμα 23: Καμπύλες συγκέντρωσης ιχνηθέτη συναρτήσει του χρόνου για διαφορετικούς αριθμούς διαδοχικών θεωρητικών θαλάμων.

2.3.2.4.2. ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΗΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ

Το πρότυπο αυτό, που προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια τη φυσική κατάσταση που επικρατεί συνήθως στα συστήματα FIA και βασίζεται στην παραδοχή ότι η διασπορά οφείλεται αποκλειστικά σε φαινόμενα μεταφοράς μάζας και σε διάχυση και όχι σε

δευτερεύουσα ροή. Κάνοντας μια τέτοια παραδοχή η ροή περιγράφεται εφαρμόζοντας διαφορικές εξισώσεις που συνυπολογίζουν, τόσο την επίδραση της μεταφοράς μάζας, όσο και την επίδραση της διάχυσης⁸⁶. Μια τέτοια διαφορική εξίσωση έχει την παρακάτω μορφή⁸⁶:

$$D_m \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) = \frac{\partial C}{\partial t} + 2F \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right) \frac{\partial C}{\partial x} \quad (2.14),$$
 όπου: D_m : συντελεστής μοριακής διάχυσης, C : η συγκέντρωση του δείγματος, x : η απόσταση κατά μήκος του σωλήνα, r : η αξονική απόσταση, R : η ακτίνα του σωλήνα, t : ο χρόνος και F : η ταχύτητα ροής του υγρού. Για να αξιοποιήσει κανείς μια τέτοια εξίσωση πρέπει να κάνει παραδοχές και με αυτές να προβεί σε επίλυση.

Μία τέτοια αντιμετώπιση του θέματος προτάθηκε από τον Taylor⁸⁷, ο οποίος βρήκε λύσεις που επαληθεύουν την παραπάνω εξίσωση σε δύο οριακές περιπτώσεις: α) όταν η μεταφορά γίνεται τόσο γρήγορα, ώστε η επίδραση της διάχυσης να μπορεί να αγνοηθεί και β) όταν η μεταφορά είναι πολύ αργή και η επίδρασή της μπορεί να αγνοηθεί, σε σχέση με τη διάχυση. Η εξίσωση που εξήγαγε ήταν της παρακάτω μορφής: $C = M \frac{1}{\pi r^2} \left(\frac{1}{2(\pi \delta L^2)^{1/2}} e^{-\frac{(L-x)^2}{L^2 4\delta}} \right)$ Ο (2.15), όπου C : η συγκέντρωση, M : η μάζα που εισήχθη στην ροή, r : η ακτίνα του σωλήνα, L : το μήκος σωλήνα και $\delta = D t / L^2$, (D : συντελεστής διασποράς). Οι καταστάσεις αυτές όμως (για τις οποίες ο Taylor βρήκε λύσεις στην ανωτέρω διαφορική – 2.14) είναι ιδανικές για ένα σύστημα FIA, στο οποίο συνήθως επικρατούν και η μεταφορά μάζας και η διάχυση. Έτσι οι σχέσεις που εξήχθησαν από τον Taylor δεν έχουν μεγάλη εφαρμογή, καθώς η συμπεριφορά σε ένα σύστημα FIA βρίσκεται συνήθως ανάμεσα σε αυτές τις ακραίες περιπτώσεις. Αν απαιτείται λοιπόν η εξαγωγή σχέσεων που να περιγράφουν το εκάστοτε σύστημα, με βάση την μεθοδολογία του Taylor, αυτή γίνεται πειραματικά και με χρήση ψευδοεμπειρικών σχέσεων.

Ένας άλλος τρόπος επίλυσης της προαναφερθείσας διαφορικής προτάθηκε από τους Vanderslice et al.⁸⁸, οι οποίοι βρήκαν λύσεις που επαληθεύουν την παραπάνω εξίσωση σε συνθήκες πιο χαρακτηριστικές για τα συστήματα FIA (συνθήκες όπου επικρατεί στο σύστημα και η μεταφορά μάζας και η διάχυση). Υπό αυτές τις συνθήκες οι Vanderslice et al. βρήκαν τις παρακάτω εξισώσεις (2.16 και 2.17) που εκφράζουν τον χρόνο από την εισαγωγή δείγματος στην ροή έως και την αρχική εμφάνιση του δείγματος στον ανιχνευτή (t_a) και το εύρος της ανιχνεύσιμης κορυφής στο ύψος της γραμμής βάσης (Δt_b), αντίστοιχα:

$$t_a = \frac{109 R^2 D_m^{0.025}}{f} \left(\frac{L}{Q} \right)^{1.025} \quad (2.16) \quad \text{και} \quad \Delta t_b = \frac{35.4 R^2 f}{D_m^{0.36}} \left(\frac{L}{Q} \right)^{0.64} \quad (2.17),$$
 όπου: R : ακτίνα του διαύλου, L : μήκος του διαύλου, Q : ταχύτητα ροής των ρευστών, D_m : συντελεστής διάχυσης του ιχνηθέτη και f : σταθερά που παίρνει τιμές από 0.5 έως 1.0, ώστε να υπάρχει συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα (Ας σημειωθεί πως αυτή η τιμή υπολογίζεται πειραματικά για το εκάστοτε σύστημα). Οι εξισώσεις αυτές προκάλεσαν αμφισβήτηση σε μερικούς ερευνητές⁸⁹, ενώ έτυχαν αποδοχής από άλλους⁹⁰ (οι οποίοι τις επαληθεύσαν με τα αποτελέσματά τους). Σε

κάθε περίπτωση όμως η χρήση τους βοηθά πολύ στην εύρεση συντελεστών μοριακής διαχύσεως μορίων⁹¹.

Το πρότυπο αυτό αποτέλεσε μια βάση ερμηνείας των ροών μέσα σε ένα σύστημα FIA, αλλά πάντα μέσα σε καθορισμένο πλαίσιο ταχυτήτων ροής και μέσα σε ευθύγραμμους σωλήνες. **Η επέκταση του προτύπου σε περιελιγμένους σωλήνες και υπό διάφορες ταχύτητες ροής, όπου έχουμε ισχυρότερη επίδραση της δευτερεύουσας ροής, αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης. Οι πιο εμπειριστατωμένες εργασίες σε αυτόν τον τομέα ήταν αυτές του Tijssen⁷², του Lillig⁹² και του Sjøberg⁹³.** Η αναφορά των μελετών αυτών και των αποτελεσμάτων τους, που επικεντρώνονται πάνω στην θεωρητική μελέτη της ροής μέσα σε τέτοια συστήματα, ξεφεύγει από το σκοπό αυτής της διατριβής.

2.3.2.4.3. ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ FIA

Οι θεωρίες που προσπαθούν να περιγράψουν πλήρως τα φαινόμενα που επικρατούν σε ένα σύστημα FIA βρίσκονται σε εμβρυακό επίπεδο, παρόλο που έχουν παρέλθει πολλά χρόνια από την ανακάλυψη της τεχνικής FIA και παρόλο που οι τεχνικές FIA και οι εφαρμογές τους ολοένα και εξελίσσονται⁹⁴. Αυτό το γεγονός οφείλεται στο ότι μέσα σε ένα σύστημα FIA λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα πολλά φαινόμενα (π.χ. διασπορά δείγματος, διασπορά αντιδραστηρίων, χημική αντίδραση κτλ.), τα οποία καθιστούν την θεωρητική περιγραφή μέσω μαθηματικών τύπων αδύνατη.

Διάφορες προσπάθειες να προσεγγιστεί η πραγματική εικόνα ενός συστήματος FIA, έγιναν από διάφορους ερευνητές, που βασίστηκαν στο μοντέλο της διάχυσης. Μερικές σοβαρές προσπάθειες έγιναν από τους παρακάτω ερευνητές: J. Ruzicka and E. H. Hansen⁹⁵, S. D. Kolev and E. Pungor⁹⁶⁻⁹⁹, S. D. Kolev, G. Nagy and E. Pungor¹⁰⁰⁻¹⁰² και S. D. Kolev and W. E. van der Linden¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Άλλες προσπάθειες για προσέγγιση της εικόνας σε σύστημα FIA βασίστηκαν στο μοντέλο των διαδοχικών θαλάμων. Μερικές σοβαρές προσπάθειες έγιναν από τους παρακάτω ερευνητές: J. F. Tyson and A. B. Idris¹⁰⁶, J. F. Tyson, J. M. H. Appleton and A. B. Idris^{107,108}, J. F. Tyson^{109, 110}, J. M. H. Appleton and J. F. Tyson¹¹¹, M. Gisin, C. Thommen and K. F. Mansfield¹¹², J. M. Hungerford and G. D. Christian¹¹³, J. J. F. van Veen et al.¹¹⁴, H.C. Smit and P. J. H. Scheeren¹¹⁵, C. A. Lucy and F. F. Cantwell¹¹⁶ και F. E. Powell and A. G. Fogg¹¹⁷.

Οι προσπάθειες των παραπάνω ερευνητών αν και απέδωσαν μια προσέγγιση ως προς το θέμα της συμπεριφοράς συστήματος FIA κάτω από διάφορες συνθήκες, δεν ήταν δυνατό να το περιγράψουν με ακρίβεια, γιατί βασίζονται σε παραδοχές που δεν συμβαδίζουν με τις πραγματικές συνθήκες ενός συστήματος FIA. Έτσι αυτή η προσέγγιση της θεωρητικής

περιγραφής των συστημάτων FIA μέσω των προαναφερθέντων μοντέλων, αρχίζει να εγκαταλείπεται τα τελευταία χρόνια και να δίνει την θέση της στην χρήση μοντέλων τύπου «μαύρου κουτιού». Τα μοντέλα αυτά θεωρούν ότι το σύστημα FIA είναι ένα ενιαίο σύστημα, του οποίου η συμπεριφορά δεν επηρεάζεται από τα επί μέρους στοιχεία του και απλά εξετάζεται το σύνολο. Το γεγονός αυτό περιορίζει μεν την χρήση του κάθε μοντέλου σε έτερα παρόμοια συστήματα FIA, αλλά παρουσιάζει ευκολία στον χειρισμό και στην θεωρητική εξαγωγή χρήσιμων εξισώσεων. Και οι εξισώσεις που προκύπτουν από τέτοια θεωρητική αντιμετώπιση είναι συνήθως πολυωνυμικές ή εκθετικές εξισώσεις, οι οποίες συνδέουν μεταβλητές ανίχνευσης του συστήματος (π.χ. χαρακτηριστικά μεγέθη κορυφών FIA: ύψος, χρόνος παραμονής δείγματος, χρόνος από γραμμή βάσης σε γραμμή βάσης, χρόνος στο μέγιστο ύψος της καμπύλης κτλ.) με μεγέθη που μπορεί να οδηγήσουν σε πρόγνωση συμπεριφοράς του συστήματος (π.χ. γεωμετρικές ή λειτουργικές παραμέτρους του συστήματος: ταχύτητα ροής, όγκος δείγματος, μήκος και διάμετρος του σωλήνα, θερμοκρασία κτλ.). Μερικές σοβαρές προσπάθειες για χρήση τέτοιων μοντέλων, έγιναν από τους παρακάτω ερευνητές: J. Wang and H. D. Dewald¹¹⁸, M. A. Gómez-Nieto et al.¹¹⁹, J. Toei¹²⁰, P. L. Kempster¹²¹ και Y. Li and Y. Narusawa¹²².

2.3.3. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ FIA ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ

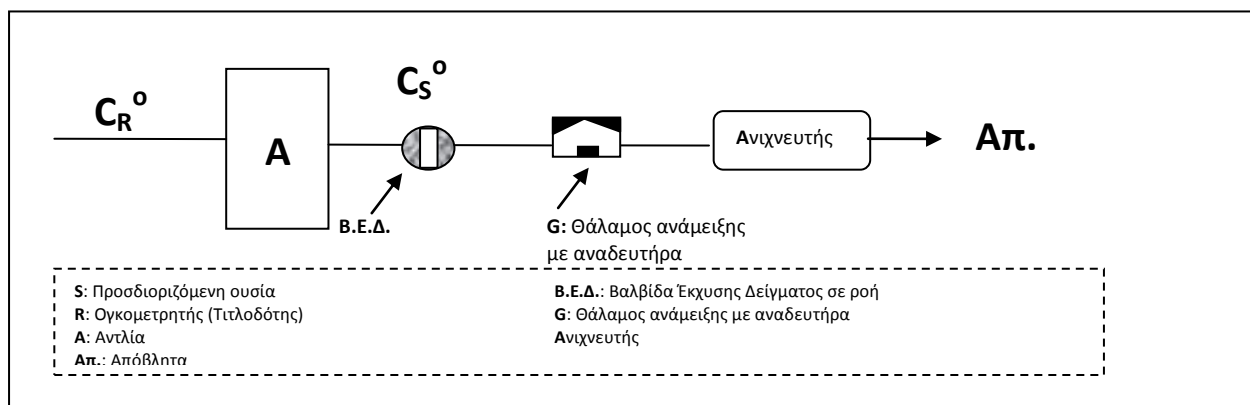
Αναφέρθηκε ότι τα διάφορα συστήματα FIA μπορούν να χωριστούν ανάλογα με το συντελεστή διασποράς που εμφανίζουν, σε συστήματα περιορισμένης, μεσαίας και υψηλής διασποράς. Είναι χρήσιμο να αναφερθούν οι ενδεικτικές περιπτώσεις στις οποίες γίνεται χρήση του κάθε συστήματος, για να μπορεί ένας επίδοξος χειριστής της τεχνικής FIA να κάνει επιλογή του κατάλληλου συστήματος, που απαιτεί η ανάλυση που επιθυμεί να διενεργήσει.

Καθόσον αφορά τα συστήματα περιορισμένης διασποράς ($D= 1-3$), αυτά χρησιμοποιούνται συνήθως σε περιπτώσεις, όπου το δείγμα χρησιμοποιείται αυτούσιο (χωρίς κάποια κατεργασία ή αντίδραση). Σε αυτές τις περιπτώσεις το δείγμα εισάγεται μέσω του συστήματος FIA σε ροή προς τον ανιχνευτή και μάλιστα πολλές φορές και χωρίς να έχει υποστεί αραίωση. Αυτό μπορεί να συμβεί σε συστήματα που λειτουργούν με μεγάλες ταχύτητες ροής και όπου συνήθως το δείγμα έχει σημαντικό όγκο σε σχέση με τον όγκο του αντιδραστήρα (λόγω π.χ. μικρής ακτίνας ή μήκους του αντιδραστήρα). Με την χρήση αυτών των συστημάτων «το δείγμα απλά μεταφέρεται στον ανιχνευτή με επαναλήψιμο τρόπο». Παράδειγμα τέτοιου συστήματος είναι ο προσδιορισμός pH με χρήση ηλεκτροδίου υάλου ροής ή ο προσδιορισμός μεταλλοϊόντων με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης.

Καθόσον αφορά τα συστήματα μεσαίας διασποράς ($D= 3-10$), αυτά είναι και τα πιο ενδιαφέροντα από αναλυτικής πλευράς. Σε αυτά τα συστήματα το «προς ανάλυση είδος»

αντιδρά με αντιδραστήρια, ώστε να δώσει ένα «νέο χημικό είδος» που ανιχνεύεται με κάποιον ανιχνευτή ροής (όπως φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή, φθορισμομετρικό ανιχνευτή, ηλεκτρικό ανιχνευτή κ.α.). Στην περίπτωση αυτών των συστημάτων το δείγμα εισάγεται με επαναλήψιμο τρόπο στη ροή ενός υγρού που φέρει τα αντιδραστήρια και τα μοναδικά σημεία του συστήματος που χρίζουν ελέγχου είναι η διασπορά του δείγματος και ο χρόνος μέχρι να φτάσει το ρεύμα των αντιδραστηρίων-δείγματος στον ανιχνευτή. Η διασπορά είναι μια παράμετρος που πρέπει να ελέγχεται, γιατί καθορίζει το πόσο καλά έρχονται σε επαφή τα αντιδραστήρια με το δείγμα, για να αντιδράσουν και ο χρόνος που προαναφέρεται είναι σημαντικός, ώστε να δοθεί χρονικό περιθώριο στην αντίδραση να λάβει χώρα και να δώσει και μετρήσιμο σήμα. Σε τέτοια συστήματα οι αντιδραστήρες έχουν αρκετά μεγαλύτερους όγκους από τον όγκο δείγματος και οι ταχύτητες ροής είναι αρκετά μικρότερες γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ταχύτητας μέτρησης. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα συστήματα αυτά δεν απαιτούν τη επίτευξη χημικής ισορροπίας πριν την μέτρηση και οι μετρήσεις είναι εγγενώς κινητικές.

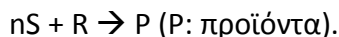
Τα συστήματα μεγάλης διασποράς ($D > 10$) περιλαμβάνουν συνήθως έναν εξωτερικό θάλαμο αναμείξεως, ο οποίος φέρει αναδευτήρα και ο οποίος έχει όγκο μεγαλύτερο από τον όγκο του συστήματος. Ένα τέτοιο σύστημα απεικονίζεται στο σχήμα 24⁶⁵⁻⁶⁶.



Σχήμα 24: Σύστημα FIA μεγάλης διασποράς για ογκομετρήσεις

Το παραπάνω σύστημα θεμελιώνει μια νέα χρήσιμη αναλυτική τεχνική, η οποία χαρακτηρίζεται ως ογκομέτρηση FIA και η οποία έχει θεμελιωθεί θεωρητικά από τους Ruzicka και Hansen^{65,66}. Η θεωρητικής περιγραφής της³ αναφέρεται ακολούθως.

Έστω ότι εκτελούμε μία ογκομέτρηση FIA, για προσδιορισμό της ουσίας S με τον τιτλοδότη R σύμφωνα με την αντίδραση:



Και έστω ότι C_S^0 και C_R^0 , οι αρχικές συγκεντρώσεις της προσδιοριζόμενης ουσίας και τιτλοδότη και V_S και V_R οι αντίστοιχοι όγκοι τους.

Εφαρμόζοντας την συνθήκη ισορροπίας ισχύει:

$e_{q_S} = e_{q_R} \Rightarrow N_S V_S = N_R V_R \Rightarrow (C_S^0/n) V_S = (C_R^0/1) V_R \Rightarrow C_S^0 V_S = C_R^0 V_R n$, η οποία σχέση, με αντικατάσταση των όγκων από τις ταχύτητες ροής (Q_S και Q_R , εφόσον $Q=f(V)$), γίνεται:

$C_S^0 Q_S = C_R^0 Q_R n$. Επειδή όμως για ένα σύστημα σαν αυτό του σχήματος 24 (μονού διαύλου) ισχύει ότι: $Q_S = Q_R = Q$, η συνθήκη ισορροπίας γίνεται: $C_S^0 = C_R^0 n$, **(2.18)**.

Σε ένα τέτοιο σύστημα μπορεί να γίνουν οι εξής παραδοχές:

- α) Ο όγκος του δείγματος (V_S) είναι μικρότερος από τον όγκο του θαλάμου αναμείξεως (V_M).
- β) Όλος ο όγκος του δείγματος που εισάγεται στον θάλαμο ανάμειξης (G) αναμιγνύεται ακαριαία με τον τιτλοδότη.
- γ) Η διασπορά οφείλεται μόνο στην ανάμειξη μέσα στον θάλαμο αναμείξεως και όχι σε μεταφορά του δείγματος μέσα από τα υπόλοιπα τμήματα του συστήματος FIA.

Με βάση αυτές τις παραδοχές, ισχύουν τα παρακάτω:

- A) Εφόσον η εισαγωγή και ανάμειξη δείγματος στον θάλαμο ανάμειξης είναι ακαριαία, τότε η συγκέντρωση του δείγματος μετά την ανάμειξη θα είναι:

$$C_S^G = C_S^0 (V_S/V_M), \text{ (2.19).}$$

- B) Η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας στην έξοδο του θαλάμου (C_S^E) θα δίνεται από την σχέση: $C_S^E = C_S^G e^{-t/\bar{T}}$, **(2.20)**.

- Γ) Η συνθήκη ισορροπίας στην έξοδο του θαλάμου, κατ' αναλογία με την σχέση 2.18, θα είναι: $C_S^E = C_R^0 n$, **(2.21)**.

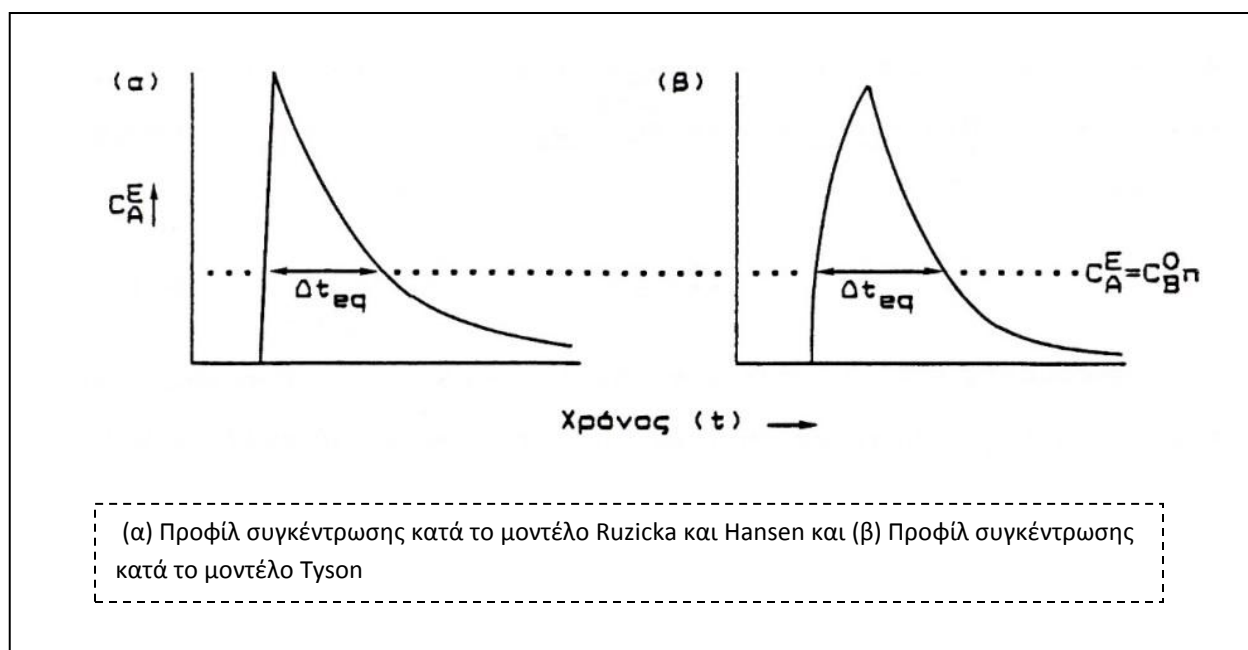
- Δ) Ο μέσος χρόνος παραμονής \bar{T} , με βάση τη σχέση 2.10, για $V_r = V_M$, θα δίνεται από τη σχέση: $\bar{T} = V_M/Q$, **(2.22)**.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω και λογαριθμίζοντας τη σχέση 2.20, με ταυτόχρονη αντικατάσταση των παραμέτρων C_S^G και \bar{T} (με βάση τις σχέσεις 2.19 και 2.22 αντίστοιχα) και με εφαρμογή της συνθήκης ισορροπίας που απεικονίζεται στη σχέση 2.21, λαμβάνεται η σχέση:

$$\Delta t_{eq} = \left(\frac{V_M}{Q} \right) \ln 10 \log C_S^0 - \left(\frac{V_M}{Q} \right) \ln 10 \log (n C_R^0 V_M / V_S), \text{ (2.23).}$$

Η σχέση αυτή είναι της μορφής: $\Delta t_{eq} = K_1 C_S^0 + K_2$, (2.24), όπου K_1, K_2 : σταθερές. Η σχέση αυτή δηλώνει πως ο χρόνος Δt_{eq} είναι γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας. Για να βρεθεί το θεωρητικό όριο ανίχνευσης, αρκεί να ισχύει ότι $\Delta t_{eq} = 0$, οπότε εξάγεται ως όριο ανίχνευσης $C_S^{D.L.}$ η παρακάτω σχέση: $C_S^{D.L.} = n C_R^0 (V_M/V_S)$, (2.24).

Η γραφική παράσταση της συνάρτησης $C_S^E = f(t)$ φαίνεται στο σχήμα 25 (α)³, το οποίο πλησιάζει την πραγματικότητα, αλλά δεν την απεικονίζει ικανοποιητικά. Κι' αυτό, γιατί στην πραγματικότητα το ανερχόμενο μέρος της καμπύλης δεν είναι κάθετο στον άξονα του χρόνου. Προς αυτήν την κατεύθυνση προτάθηκαν λύσεις από τους Tyson⁷⁷ και Pardue και Fields¹²³, οι οποίοι εξήγαγαν σχέσεις ανάλογες με την 2.23, οι οποίες όμως προσεγγίζουν καλύτερα την πραγματικότητα (σχήμα 25 (β)³). Η παράθεση των σχέσεων αυτών ξεφεύγει του σκοπού της παρούσας διατριβής. Πρέπει πάντως να σημειωθεί πως η σχέση 2.23 είναι επαρκής για περιγραφή μιας ογκομέτρησης FIA και κατασκευή καμπυλών αναφοράς, $\Delta t=f(\log C)$.



Σχήμα 25: Συγκέντρωση στην έξοδο του θαλάμου αναμείξεως ως συνάρτηση του χρόνου

2.3.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ FIA^{3, 65, 66}

2.3.4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

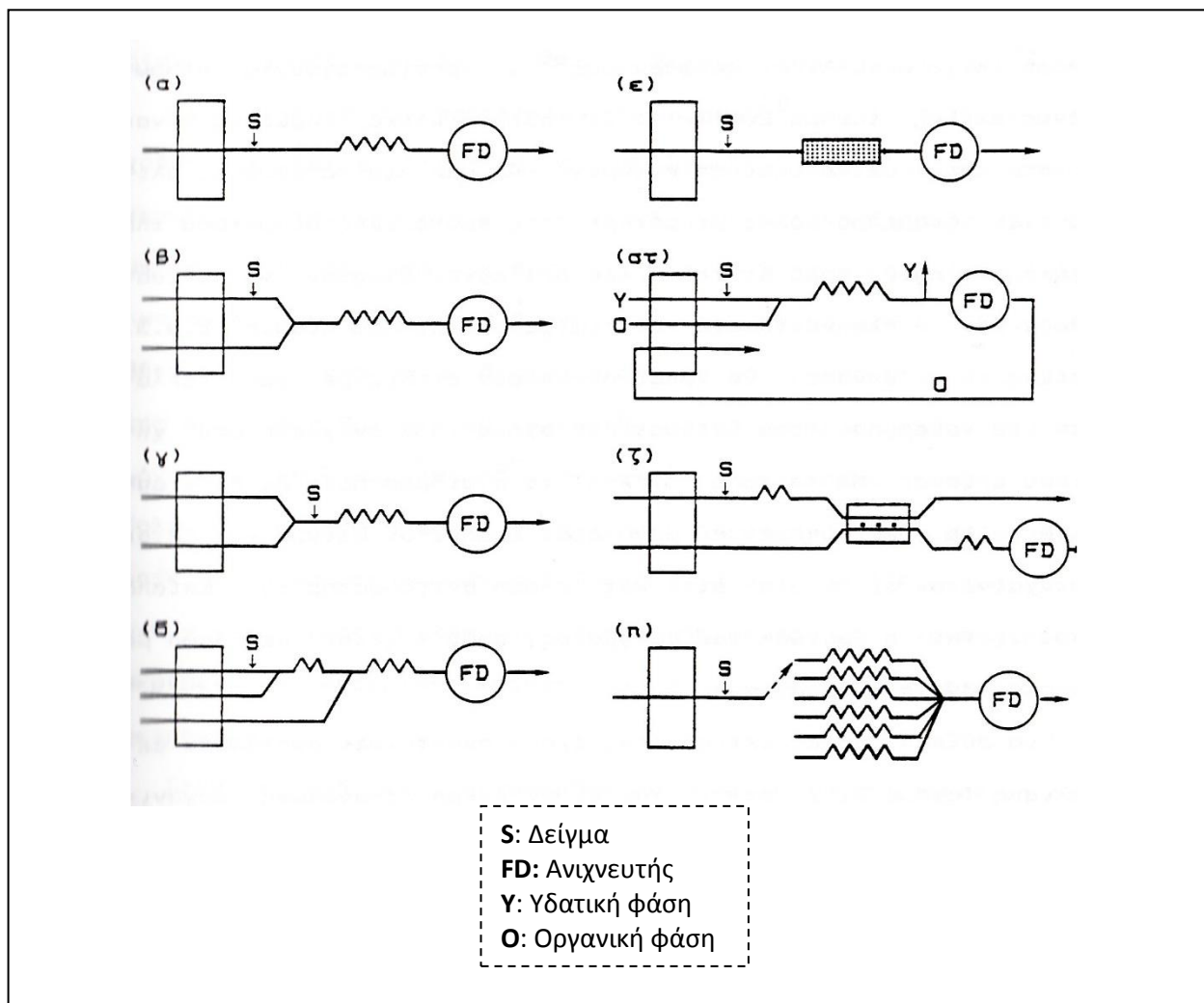
Με την αναφορά παραδειγμάτων συστημάτων FIA διαφαίνεται πως η τεχνική αυτή καλύπτει περιπτώσεις αναλυτικών προβλημάτων που κυμαίνονται από απλή μεταφορά ενός δείγματος στον ανιχνευτή, έως και χημικούς διαχωρισμούς με συστήματα δύο φάσεων. Για να κατανοηθεί ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η ποικιλομορφία αναλύσεων, είναι αναγκαία μια αναφορά στα συνηθέστερα συστήματα FIA που χρησιμοποιούνται (από πλευράς διάταξης διαύλων), καθώς και σε τεχνικές που εφαρμόζονται μέσα σε αυτά τα συστήματα, οι οποίες επεκτείνουν σε τέτοιο βαθμό την χρήση των συστημάτων FIA.

2.3.4.2. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ FIA

Τα συστήματα FIA μπορούν να καταταγούν, ανάλογα με τη διάταξη διαύλων που φέρουν, σε τρεις βασικές κατηγορίες: **τα συστήματα ενός διαύλου, τα συστήματα δύο διαύλων και τα πολυδιαυλικά συστήματα.**

Τα **συστήματα ενός διαύλου** (σχήμα 26 (α)³) έχουν αναφερθεί και αναλυθεί προηγουμένως (σχήμα 15). Τα συστήματα αυτά μπορούν να καλύψουν εφαρμογές που κυμαίνονται ανάμεσα σε συστήματα χαμηλής διασποράς και μέσης διασποράς, μετά από κατάλληλη προσαρμογή των εκάστοτε αντιδράσεων και πάντα με τις εξής προϋποθέσεις: α) να μην απαιτείται σταδιακή προσθήκη αντιδραστηρίων, β) η αντίδραση να πραγματοποιείται σε ένα στάδιο και γ) τα αντιδραστήρια να είναι συμβατά μεταξύ τους.

Τα **συστήματα δύο διαύλων** (σχήμα 26 (β)³) έχουν αναφερθεί και αναλυθεί επίσης προηγουμένως (σχήμα 17). Αυτά επιτρέπουν την ύπαρξη σταθερής περίσσειας αντιδραστηρίου σε όλη τη ζώνη του δείγματος, αλλά εμφανίζουν ευαισθησία μικρότερη από αυτή αντίστοιχων μη αυτοματοποιημένων μεθόδων, λόγω της μεγαλύτερης διασποράς. Οι εφαρμογές τους εμπλέκουν συστήματα κυρίως μεσαίας προς μεγάλη διασπορά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε περιπτώσεις στις οποίες υπάρχουν ασύμβατα αντιδραστήρια. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιούνται, μετά από προανάμειξη των αντιδραστηρίων και μετέπειτα προσθήκη του δείγματος στο μείγμα (σχήμα 26 (γ)³). Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται σε περιπτώσεις χρήσης ασταθών αντιδραστηρίων (π.χ. Br₂, Mn (III), Ag(II) κτλ.), τα οποία παράγονται in situ.



Σχήμα 26: Συστήματα διαύλων που συναντά κανείς σε αναλύσεις.

Τα συστήματα πολλαπλών διαύλων (σχήμα 26 (δ)³) χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις που πρέπει να πραγματοποιηθεί σταδιακή προσθήκη αντιδραστηρίων. Σε αυτό η προσδιοριζόμενη ουσία κινείται σύμφωνα με τις απαιτήσεις της αντίδρασης: Αρχικά διασπείρεται μέσα σε κάποιο αντιδραστήριο ή αδρανή φορέα. Έπειτα αντιδρά σε καθορισμένο και επαναλήψιμο χρόνο με το πρώτο αντιδραστήριο. Ακολούθως έρχεται σε επαφή με το δεύτερο αντιδραστήριο. Και τέλος οδηγείται στον ανιχνευτή, για να γίνει ανίχνευση του σήματος. Σε όλη αυτήν την πορεία διατηρείται σταθερός, απόλυτα καθορισμένος και επαναλήψιμος ο χρονισμός των σταδίων. Ας σημειωθεί επίσης, πως σε τέτοια συστήματα απαιτείται γωνία πρόσπτωσης των διαφορετικών ρευμάτων αντιδραστηρίων, τουλάχιστον 30°, ώστε να γίνεται αποτελεσματική ανάμειξη. Και τέλος πρέπει να σημειωθεί πως αυτά τα συστήματα, ανεξαρτήτως της πολυπλοκότητάς τους, αποτελούν συνδυασμό των δύο προαναφερθέντων συστημάτων (μονού και διπλού διαύλου) από τα οποία συντίθενται.

2.3.4.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΟΝΤΑΙ ΣΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ FIA^{3, 65, 66}

Μια αναφορά στις τεχνικές που συναντά κανείς στα συστήματα FIA, οι οποίες προέκυψαν από διάφορες εφαρμογές με ιδιαίτερες απαιτήσεις γίνεται ακολούθως.

Σε περιπτώσεις συστημάτων FIA με αντιδραστήρια σε μη διαλυτή μορφή (π.χ. μεταλλικός ψευδάργυρος¹²⁴), γίνεται χρήση συστημάτων που φέρουν στήλες (σχήμα 26 (ε)). Οι πληρωμένες στήλες αυτές μπορεί να περιέχουν αδρανή υλικά πληρώσεως (που ενδεχομένως φέρουν και ακινητοποιημένα ένζυμα) ή κάποιον ιονανταλλάκτη. Το υλικό πλήρωσης σε αυτές τις περιπτώσεις στοχεύει στο μετασχηματισμό του αναλύτη σε ανιχνεύσιμο χημικό είδος. Στην περίπτωση που το αδρανές υλικό έχει διάμετρο κατά τι μικρότερη από αυτή του διαύλου, μπορεί κάποιος να χαρακτηρίσει το σύστημα σαν σύστημα που φέρει «πληρωμένο αντιδραστήρα. Ένας τέτοιος αντιδραστήρας παρουσιάζει πλεονεκτήματα (όπως π.χ. οικονομία αντιδραστηρίων και μη αραίωση του δείγματος - αφού το δείγμα σε αυτές τις περιπτώσεις έρχεται σε επαφή μόνο με στερεά αντιδραστήρια), αλλά και κάποια μειονεκτήματα (όπως π.χ. η ανάπτυξη πίεσης μέσα στους διαύλους ροής).

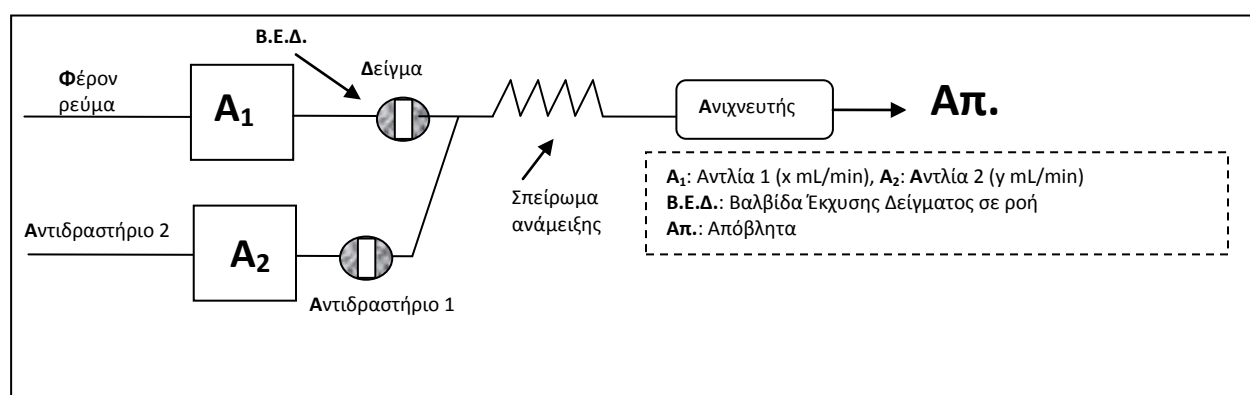
Σε περιπτώσεις όπου συναντώνται προβλήματα εκλεκτικότητας είναι δυνατή η χρήση συστημάτων εκχύλισης (σχήμα 26 (στ)). Τέτοια συστήματα επιτυγχάνουν εκχύλιση σε μικροκλίμακα, αφού σε αυτά τα συστήματα τα μόρια του δείγματος κατανέμονται υπό την μορφή σταγονιδίων, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται σταγόνες οργανικού διαλύτη. Αυτά τα συστήματα παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι επιτυγχάνουν εκχύλιση με ελάχιστη κατανάλωση οργανικών διαλυτών.

Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει ανάγκη να διαχωριστούν αέρια που βρίσκονται διαλυμένα στο δείγμα, γίνεται χρήση συστημάτων FIA που φέρουν το ρεύμα δείγματος (δότης), ένα ρεύμα διαλύτη που περιέχει το αντιδραστήριο (δέκτης) και μια εκλεκτική μεμβράνη διαπίδυσης (σχήμα 26 (ζ)). Με τέτοια συστήματα που φέρουν μεμβράνες διαπίδυσης, μπορούν να διαχωριστούν και προσδιοριστούν αέρια όπως: CO₂, NH₃, SO₂, HCN, HF και HCl, με καλή επαναληπτικότητα. Τα παραπάνω συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και σε περιπτώσεις διαχωρισμών ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους από ενώσεις μικρού μοριακού βάρους.

Σε περιπτώσεις όπου απαιτείται η χρήση αργών αντιδράσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σύστημα FIA με χρήση βαλβίδας επιλογής πολλαπλών διευθύνσεων και ανάλογων διαύλων αποθήκευσης (σχήμα 26 (η)). Ένα παράδειγμα τέτοιου συστήματος μπορεί κάποιος να συναντήσει στο άρθρο των B. F. Rocks et al.¹²⁵. Τα συστήματα αυτά

παρέχουν δυνατότητα αυτοματοποίησης μεθόδων που βασίζονται σε αργές αντιδράσεις, χωρίς μείωση της ταχύτητας δειγματοληψίας.

Σε περιπτώσεις όπου απαιτείται χρονισμός στον τρόπο με τον οποίο αντιδρά ένα δείγμα με περισσότερα του ενός αντιδραστήρια, χρησιμοποιείται η τεχνική των συγχωνευόμενων ζωνών. Σύμφωνα με αυτήν την τεχνική γίνεται ταυτόχρονη εισαγωγή δείγματος και αντιδραστηρίων σε έναν αντιδραστήρα, με δύο διαφορετικές ροές (και σε μερικές περιπτώσεις και μετά από κάποια καθυστέρηση) όπου τα δύο διαφορετικά ρεύματα συναντώνται κατά την πορεία τους προς τον ανιχνευτή (σχήμα 27). Με τέτοια συστήματα επιτυγχάνεται οικονομία αντιδραστηρίων και άρση παρεμποδιστικής δράσης συνυπαρχόντων ουσιών.



Σχήμα 27: Σύστημα FIA, όπου απεικονίζεται η υλοποίηση της τεχνικής συγχωνευόμενων ζωνών.

Μία τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται και δίνει τη δυνατότητα “δημιουργίας” πολλών/άπειρων διαλυμάτων σε ροή είναι η τεχνική βαθμίδωσης συγκέντρωσης^{83,95}. Σύμφωνα με αυτήν την τεχνική η χρήσιμη πληροφορία μπορεί να ληφθεί από οποιοδήποτε ανερχόμενο ή κατερχόμενο τμήμα της καμπύλης και όχι μόνο από την κορυφή που λαμβάνεται. Σε αυτήν την τεχνική υπάγονται και η τεχνική ογκομετρήσεων και η τεχνική ηλεκτρονικής βαθμονόμησης¹²⁶.

Εν τέλει πρέπει να αναφερθεί και η τεχνική αναχαιτιζόμενης ροής, η οποία καθιστά δυνατή την αυτοματοποίηση κινητικών μεθόδων ανάλυσης με λήψη πολλαπλών μετρήσεων και υπολογισμό των ταχυτήτων αντίδρασης. Αυτή η μέθοδος αντιδιαστέλλεται με τις συνηθισμένες μεθόδους FIA, οι οποίες στηρίζονται σε κινητική τεχνική ενός σημείου.

2.4. ΣΥΝΗΘΗΣ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΤΩΝ FIA^{3, 65, 66, 67}

2.4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αναλυτές FIA αποτελούνται κατά κύριο λόγο από τα παρακάτω διακριτά τμήματα: α) το σύστημα προώθησης του δείγματος και των αντιδραστηρίων, β) το σύστημα εισαγωγής δείγματος στην ροή των αντιδραστηρίων, γ) τον αντιδραστήρα, δ) τον ανιχνευτή και ε) τον καταγραφέα ή τον Η/Υ (Η/Υ: Ηλεκτρονικό υπολογιστή).

2.4.2. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΡΟΩΘΗΣΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Για την προώθηση των αντιδραστηρίων και του δείγματος μπορεί να γίνει χρήση αντλιών διάφορων τύπων. Παρόλα αυτά ο τύπος αντλίας που έχει επικρατήσει είναι η περισταλτική αντλία. Και αυτό στηρίζεται στα πολλαπλά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει αυτός ο τύπος αντλίας. Μερικά πλεονεκτήματά τους αναφέρονται ακολούθως: α) Οι περισταλτικές αντλίες παρέχουν δυνατότητα, τόσο για προώθηση αντιδραστηρίων, όσο και για αναρρόφηση (με μια απλή αλλαγή της φοράς περιστροφής τους), β) Μπορούν να υποστηρίξουν ταυτόχρονη προώθηση πολλαπλών αντιδραστηρίων (εφόσον μπορούν να προκαλούν παλμική κίνηση σε πολλαπλούς διαύλους ταυτόχρονα), γ) Μπορούν να προωθούν αντιδραστήρια ταυτόχρονα, με διαφορετικές ταχύτητες ροής (με απλή αλλαγή της διαμέτρου του διαύλου του κάθε αντιδραστηρίου), δ) Παρέχουν δυνατότητα εύκολης ρύθμισης ταχυτήτων (μέσω απλής ρύθμισης της ταχύτητας περιστροφής τους, σε συνάρτηση πάντα με τις διαμέτρους των διαύλων που φέρουν), ε) Οι καλές περισταλτικές αντλίες μπορούν και επιτυγχάνουν σταθερότητα ροής (μέσω κατάλληλου μηχανισμού ανάδρασης που υπάρχει στο τροφοδοτικό τους, ο οποίος τις καθιστά ικανές για αντιμετώπιση καταστάσεων αύξησης της αντίστασης κατά την ροή - γεγονός πολύ σημαντικό σε περιπτώσεις εφαρμογών τεχνικών βαθμίδωσης συγκέντρωσης ή/και ογκομετρήσεων FIA) και στ) Οι καλές περισταλτικές αντλίες μπορούν και επιτυγχάνουν γρήγορο σταμάτημα ροής (σημαντικό γεγονός κατά την υλοποίηση της τεχνικής FIA αναχαιτιζόμενης ροής).

Τα τρία πιο σημαντικά μειονεκτήματά τους είναι τα ακόλουθα: α) Οι περισταλτικές αντλίες δημιουργούν ροές, οι οποίες πολλές φορές ενέχουν παλμούς, β) Οι περισταλτικές αντλίες δημιουργούν ροές, οι οποίες πολλές φορές ενέχουν παλμούς στατικού ηλεκτρισμού (Οι παλμοί αυτοί επιβάλλουν την λήψη μέτρων, σε περιπτώσεις εφαρμογών που εμπλέκουν ως ανιχνευτές εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων) και γ) Οι περισταλτικές αντλίες συνδυάζονται με χρήση διαύλων, οι οποίοι δεν υποστηρίζουν όλο το φάσμα των οργανικών διαλυτών και μπορούν να υποστούν φθορές. Βέβαια πρέπει να προστεθεί εδώ πως αυτά τα μειονεκτήματά τους αντιμετωπίζονται εύκολα, είτε με κατασκευαστικούς τρόπους (καθόσον αφορά τα δύο

πρώτα), είτε με προληπτικούς τρόπους (όπως συχνή αντικατάσταση σωλήνων - καθόσον αφορά το τρίτο μειονέκτημά τους). Αυτός είναι και ο λόγος της ευχρηστίας τους.

Παρόλα αυτά οι καλές περισταλτικές αντλίες είναι και ακριβές. Και αυτός είναι και ο λόγος που κυκλοφορούν στην αγορά και κάποια άλλα είδη αντλιών που χρησιμοποιούνται αντί των περισταλτικών αντλιών. Αυτές οι αντλίες είναι οι ακόλουθες: α) συστήματα αντλιών με πίεση αερίων, β) συστήματα αντλιών που λειτουργούν με την βαρύτητα και γ) συστήματα αντλιών σύριγγας. Τα δύο πρώτα συστήματα είναι μεν φθηνά, αλλά εμφανίζουν δυσκολία στην ρύθμιση σταθερής ταχύτητας παροχής αντιδραστηρίων (Γι' αυτό και χρησιμοποιούνται συνήθως για εκπαιδευτικούς σκοπούς ή για αναλύσεις ρουτίνας). Το τρίτο σύστημα (αντλίες σύριγγας) είναι το σύστημα που εμφανίζει τα λιγότερα προβλήματα και την καλύτερη σταθερότητα, αλλά εμφανίζει το βασικό μειονέκτημα ότι απαιτεί περιοδική αναπλήρωση με αντιδραστήρια (διαθέτει περιορισμένη χωρητικότητα για τα αντιδραστήρια).

2.4.3. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΡΟΗ

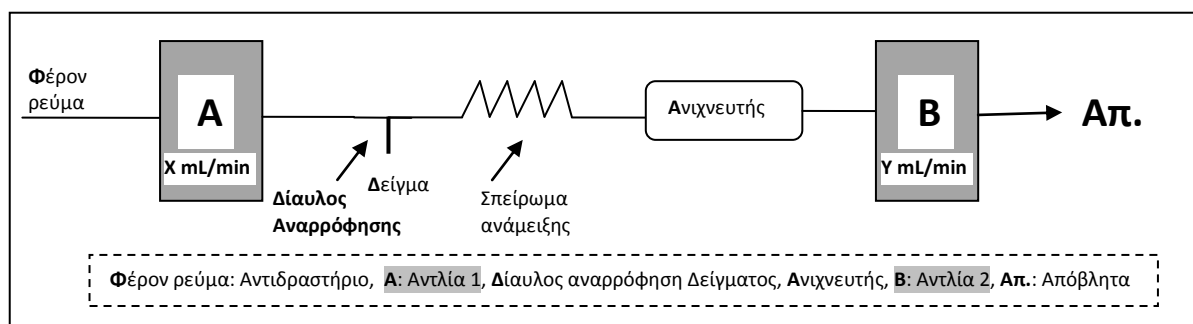
Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης της τεχνικής FIA⁴, το δείγμα ή το αντιδραστήριο (αν η εφαρμογή απαιτούσε εισαγωγή του αντιδραστηρίου μέσα στη ροή του δείγματος – τεχνική ανάστροφης FIA) εισαγόταν στη ροή, με τη βοήθεια σύριγγας και μέσω κατάλληλου διαφράγματος (septum), κατά αναλογία με τις αεριοχρωματογραφικές τεχνικές (χωρίς αυτόματο δειγματολήπτη). Ο τρόπος αυτός όπως είναι φυσικό δεν εξασφαλίζει καλή επαναληπτικότητα και σαφέστατα δεν επιδέχεται αυτοματοποίηση. Βέβαια τα αποτελέσματα που λαμβάνονταν στις πρώτες αυτές εφαρμογές ήταν αρκετά καλά, πράγμα που επιδεικνύει την σταθερότητα και την ευελιξία αυτής της τεχνικής.

Με την πάροδο του χρόνου και την πρόοδο της έρευνας σε αυτό το αναλυτικό πεδίο διαμορφώθηκαν βασικά δύο μέθοδοι εισαγωγής δείγματος σε ροή: 1) **Η εισαγωγή δείγματος με άμεση μέτρηση όγκου** και 2) **Η εισαγωγή δείγματος με μέτρηση και έλεγχο χρόνου.**

Καθόσον αφορά την πρώτη μέθοδο, αυτή φέρει ως χαρακτηριστικό της παράδειγμα τις βαλβίδες εισαγωγής δείγματος που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία². Στις βαλβίδες αυτές πληρούται (με τροφοδοσία από την περισταλτική αντλία) κατάλληλος βρόγχος, με συγκεκριμένο όγκο δείγματος (ίσο με τον όγκο του βρόγχου). Έτσι το δείγμα είναι έτοιμο να εισαχθεί στην ροή των αντιδραστηρίων. Όταν λοιπόν ο αναλυτής επιθυμεί την εισαγωγή του δείγματος στην ροή, ώστε να σχηματίσει ζώνη δείγματος που θα κινείται μέσα στα αντιδραστήρια, τότε μπορεί είτε χειροκίνητα είτε μηχανικά (όταν διαθέτει κατάλληλη αυτόματη βαλβίδα, με μηχανισμό περιστροφής) να την περιστρέψει κατά 60° και να παρεμβάλει τον βρόγχο αυτό στην ροή των αντιδραστηρίων, ώστε αυτά να παρασύρουν τη ζώνη του δείγματος και να προκαλέσουν διασπορά και αντίδραση. Πλέον τέτοιες βαλβίδες διατίθενται εμπορικά από πολλές εταιρείες και προσφέρουν ευκολία στην ενσωμάτωση στο

όλο σύστημα FIA. Είναι σαφές βέβαια πως για να φτάσει η αγορά στην παροχή έτοιμων λύσεων, υπήρξε εκτενής έρευνα στον τομέα των βαλβίδων, καθώς και ανάπτυξη πολλών ιδιοκατασκευών (από Teflon και PVC), οι οποίες έδιναν και την δυνατότητα για πολλές χρήσιμες εφαρμογές της τεχνικής FIA¹²⁷.

Η δεύτερη μέθοδος στηρίζεται σε αναρρόφηση δείγματος για αυστηρά καθορισμένο χρόνο. Αν η αναρρόφηση πραγματοποιείται υπό σταθερή ταχύτητα λαμβάνουμε όγκο, ο οποίος είναι γραμμική συνάρτηση του χρόνου. Για να κατανοήσει κανείς ένα τέτοιο σύστημα, αρκεί να δει το σχήμα 28.



Σχήμα 28: Απεικόνιση ενός συστήματος εισαγωγής δείγματος με μέτρηση χρόνου.

Στο σχήμα 28 απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας: Σε πρώτη φάση, η ταχύτητα ροής της αντλίας A είναι μεγαλύτερη από την ταχύτητα ροής της αντλίας B. Έτσι το δείγμα, όχι μόνο δεν αναρροφάται μέσα από τον δίαυλο αναρρόφησης, αλλά από τον δίαυλο αυτό απορρίπτεται και κάποια ποσότητα αντιδραστηρίου στα απόβλητα. Σε δεύτερη φάση όμως, η αντλία A σταματά να λειτουργεί, οπότε και αρχίζει η αναρρόφηση δείγματος από τον δίαυλο αναρρόφησης δείγματος, λόγω άντλησης από την αντλία B. Το δείγμα αναρροφάται και αντλείται προς το σπείρωμα ανάμειξης, οπότε και ξαναρχίζει η ροή της αντλίας A. Αυτό προκαλεί διασπορά και αντίδραση, η οποία θα δώσει σήμα στον ανιχνευτή. Είναι κατανοητό πως με ρύθμιση του χρόνου αναρρόφησης καθορίζεται και ο όγκος δείγματος που αναρροφάται.

Τα συστήματα που συναντά κανείς στην αγορά ή είναι ιδιοκατασκευές βασίζονται στις προαναφερθείσες αρχές λειτουργίας.

2.4.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

Οι διάφοροι τύποι αντιδραστήρων που χρησιμοποιούνται στην τεχνική FIA αναπτύσσονται στο εδάφιο 2.3.2.3, όπου αναλύεται και η επίδρασή τους στο σήμα του συστήματος FIA. Εδώ πρέπει απλώς να τονιστεί πως το υλικό κατασκευής των αντιδραστήρων είναι κάποιο αδρανές υλικό (συνήθως Teflon ή κάποιο άλλο κατάλληλο πολυμερές).

2.4.5. ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

Η τεχνική FIA είναι γνωστή για την δυνατότητά της να ενσωματώνει σχεδόν όλους τους ανιχνευτές. Αυτό έχει αναφερθεί στο εδάφιο 1.4.2, όπου περιγράφονται τα πλεονεκτήματα έναντι των αναλυτών διακριτών αναλύσεων. Στο εν λόγω κεφάλαιο, στον πίνακα 2 αναφέρονται παραδείγματα χρήσης ανιχνευτών ανά εφαρμογή, απ' όπου μπορεί κανείς να καταλάβει την ευχρηστία της τεχνικής FIA και το μεγάλο εύρος εφαρμογών. Στον πίνακα 4³ παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης διάφορων τεχνικών ανίχνευσης μέχρι το 1989.

Πίνακας 4: Τεχνικές ανίχνευσης και συχνότητα εμφανίσεώς τους σε σύνολο 2200 περίπου άρθρων όπως φαίνονται στην βιβλιογραφία μέχρι το 1989 οπότε ενσωματώθηκαν σχεδόν όλες οι τεχνικές.

1. Φασματοσκοπικές τεχνικές	
Φασματοφωτομετρία ορατού	42%
Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης	10%
Χημειοφωταύγεια και Βιοφωταύγεια	6%
Φθορισμομετρία	5%
Φασματοσκοπία I.C.P.	3%
Άλλες (Νεφελομετρία, Φασματοφωτομετρία ατομικής εκπομπής, Φασματοφωτομετρία μαζών, Φασματοφωτομετρία υπερύθρου, ΜΕСА, Φωσφοριμετρία, Διαθλασιμετρία, Φασματοφωτομετρία Raman)	5%
2. Ηλεκτροχημικές τεχνικές	
Αμπερομετρία	10%
Εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων	7%
Ποτενσιομετρία	4%
Βολταμετρία	4%
Λοιπές τεχνικές	3%
3. Άλλες τεχνικές	
Φασματοηλεκτροχημεία, Ενθαλπιομετρία, Φωτοακουστική φασματοσκοπία, Ραδιοχημική ανίχνευση.	<1%

Το σημαντικό όμως δεν είναι ο ανιχνευτής από μόνος του, αλλά και ο τρόπος ενσωμάτωσής του μέσα σε ένα σύστημα FIA. Καταρχάς **ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται στα συστήματα FIA πρέπει να είναι όσο το δυνατό πιο εκλεκτικός για την ανάλυση για την οποία προορίζεται**. Κατά δεύτερον, **ο ανιχνευτής πρέπει να συνδυάζεται με κατάλληλη κυψελίδα ροής, η οποία θα βελτιστοποιεί την ανίχνευση**. Υπό αυτό το πρίσμα, πρέπει να σημειωθεί, πως η εκάστοτε κυψελίδα ροής πρέπει να είναι κατασκευασμένη με την κατάλληλη «γεωμετρία» και τις κατάλληλες διαστάσεις, ώστε να παρέχει βελτιστοποιημένες κορυφές

ανίχνευσης. Προς αυτήν την κατεύθυνση πρέπει να έχει συνυπολογιστεί ο «νεκρός της όγκος», ώστε να μειώνεται το φαινόμενο διαπλάτυνσης των κορυφών στον ανιχνευτή. Ένας εμπειρικός κανόνας για την χρήση κατάλληλης κυψελίδας είναι η χρήση κυψελίδων όγκου μικρότερου των 20 μL και ελάχιστο «νεκρό όγκο».

Αν θέλει κάποιος να κατατάξει τους ανιχνευτές ανάλογα με την χρήση τους μπορεί να τους κατατάξει σε δύο κατηγορίες: **στους ανιχνευτές που ανιχνεύουν τη συγκέντρωση διαλύματος σε όλη τη μάζα του και στους ανιχνευτές που ανιχνεύουν τη συγκέντρωση σε μέρος διαλύματος (με το οποίο έρχονται σε επαφή)**. Αυτή η κατάταξη ενδιαφέρει την τεχνική FIA, γιατί σε αυτή δεν έχει επέλθει ισορροπία όταν αρχίζει η μέτρηση του σήματος στον ανιχνευτή. Στην πρώτη κατηγορία υπάγονται οι οπτικοί ανιχνευτές και στην δεύτερη οι ηλεκτροχημικοί. Εδώ είναι σαφές πως όταν πραγματοποιείται χρήση των ανιχνευτών της δεύτερης κατηγορίας, πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για επαφή του ανιχνευτή με όσο το δυνατόν μεγαλύτερο μέρος της ζώνης του δείγματος.

2.4.6. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΗΜΑΤΩΝ

Παλαιότερα τα συστήματα αυτά ενέπλεκαν απλώς έναν καταγραφέα ακίδας, ο οποίος απέδιδε το σήμα υπό τη μορφή μιας κορυφής σε χαρτί. Ακολούθως οι υπολογισμοί των βασικών παραμέτρων της κορυφής πραγματοποιούνταν γραφικά από τον ίδιο τον αναλυτή.

Η μετεξέλιξη αυτού του συστήματος καταγραφής ήταν η απόδοση και εκτύπωση και των βασικών παραμέτρων μαζί με την κορυφή. Αυτές υπολογίζονταν από κάποιον μικροεπεξεργαστή που ενσωματωνόταν στον ανιχνευτή και επιτελούσε επεξεργασία των σημάτων και εξαγωγή παραμέτρων.

Σήμερα όλα αυτά τα συστήματα έχουν εκλείψει. Όλοι οι ανιχνευτές περνούν τα σήματα (με την βοήθεια μικροεπεξεργαστών) ψηφιακά σε ένα προσωπικό υπολογιστή (μέσω κατάλληλων θυρών του υπολογιστή), ο οποίος είναι εφοδιασμένος με κατάλληλα προγράμματα, τα οποία σώζουν τα σήματα σε αρχεία και ταυτόχρονα επιτελούν επεξεργασία και εξαγωγή παραμέτρων, αυτόματες διορθώσεις σημάτων, ακόμα και αυτόματη εξαγωγή καμπυλών αναφοράς και εξισώσεων απόκρισης ανιχνευτή. Τα εν λόγω προγράμματα προσφέρουν επίσης δυνατότητα ρύθμισης παραμέτρων στον ανιχνευτή και απεικόνιση σημάτων σε πραγματικό χρόνο (real time).

2.4.7. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ FIA

Αφού αναφέρθηκαν τα βασικά στοιχεία εξοπλισμού που απαιτούνται για την υλοποίηση ενός ιδιοκατασκευασμένου συστήματος FIA, είναι ανάγκη να παρατεθούν παρακάτω και τα σημαντικότερα εμπορικά συστήματα που κυκλοφορούν στην αγορά, για να μπορεί κάποιος να έχει και την εναλλακτική επιλογή αγοράς ενός έτοιμου συστήματος. Τα σημαντικότερα εμπορικά συστήματα λοιπόν είναι τα ακόλουθα:

α) FIAstar της εταιρείας Tecator, β) QuickChem της εταιρείας Lachat Η.Π.Α., γ) Flow injection Unit K-1000 της εταιρείας Hitachi Ιαπωνίας, δ) HELI-FLOW της εταιρείας Walden Precision Apparatus Αγγλίας, ε) MULTIFLOW της εταιρείας Control Equipment Cooperation Η.Π.Α. στ) FIA Analysers της εταιρείας FIALab και στ) FIA-SIA-LOV Sequential Injection Analysis System της εταιρείας Ocean Optics.

2.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ FIA ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η τεχνική FIA δίνει τη δυνατότητα για αυτοματοποίηση αναλύσεων ρουτίνας, σε όλα τα πεδία εφαρμογής των φυσικοχημικών επιστημών και μάλιστα με εξειδικευμένες λύσεις ανά εφαρμογή. Αυτό φαίνεται στον πίνακα 5³ όπου παρουσιάζεται η κατανομή δημοσιεύσεων μέχρι το 1987, με βάση το πεδίο εφαρμογής. Ακόμα και σήμερα που η τεχνική είναι πολύ ώριμη εξακολουθεί να υπάρχει ενδιαφέρον σε αυτόν τον τομέα αναλύσεων και μάλιστα ομοίως, σε πολλαπλά επιστημονικά πεδία¹²⁸.

Πίνακας 5: Κατανομή των μέχρι το 1987 δημοσιεύσεων της FIA, ανά πεδίο εφαρμογής

Περιβαλλοντικές εφαρμογές	17%
Κλινικές εφαρμογές	15%
Γεωργικές εφαρμογές	7%
Βιομηχανικές εφαρμογές	6%
Φαρμακευτικές εφαρμογές	6%
Βιοχημικές εφαρμογές	5%
Εφαρμογές τροφίμων	4%
Ανασκοπήσεις, Βιβλία, Εκπαίδευση	10%
Γενικές (χωρίς πεδίο εφαρμογής)	30%

2.6. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ FIA

Όπως προαναφέρθηκε η τεχνική FIA είναι μία πολύ ώριμη τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη γκάμα φυσικοχημικών εφαρμογών, για να προσφέρει αυτοματοποίηση διαδικασιών, υψηλές ταχύτητες ανάλυσης, περιβαλλοντικά υπεύθυνη διαχείριση αντιδραστηρίων και ευκολία στην ανάλυση.

Το εκπληκτικό με την τεχνική FIA είναι πως ακόμα και σήμερα, μετά από 40 χρόνια από την ανακάλυψή της, εξακολουθεί να συμμετέχει σε πλήθος ερευνητικών εφαρμογών και να εξελίσσεται. Καθόσον αφορά την εμπλοκή σε επιστημονικές εφαρμογές, δεν είναι δύσκολο για κάποιον που θα ανατρέξει στην τωρινή βιβλιογραφία να δει, πως εμπλέκεται σε πάνω από 20.000 ερευνητικές εργασίες, που καλύπτουν μεγάλη γκάμα ερευνητικών θεμάτων¹²⁸. Καθόσον αφορά την εξέλιξή της, μπορεί κανείς εύκολα να διακρίνει σταθμούς εξέλιξης της εν λόγω τεχνικής, κατά την διάρκεια αυτών των 40 χρόνων έρευνας^{129,130}. Έτσι μπορεί κανείς να ονοματίσει σαν «πρώτη περίοδος» ανάπτυξης της FIA, την εποχή από το 1975 που πρωτοεμφανίστηκε μέχρι και το 1990 (όπου διερευνήθηκε αρκετά σαν τεχνική). Σαν «δεύτερη περίοδος» ανάπτυξης της FIA θεωρείται η εποχή από το 1990 έως το 2000, όπου πραγματοποιήθηκε η εξέλιξή της στην τεχνική SIA (Sequential Injection Analysis), η οποία έδωσε μεγάλη δυναμικότητα στην τεχνική FIA (σε σχέση με την ευκολία διαχείρισης πολλαπλών αντιδραστηρίων και με την διενέργεια αναλύσεων κατά στάδια). Σαν «τρίτη περίοδος» ανάπτυξης της FIA θεωρείται η εποχή από το 2000 έως το 2010, όπου πραγματοποιήθηκε η εξέλιξή της στην τεχνική LOV (Lab-On-Valve), η οποία εμπλέκει και την ιδέα της τεχνικής BI (Bead Injection). Και τέλος σαν «πιο πρόσφατη περίοδος» ανάπτυξης της FIA νοείται η περίοδος της τελευταίας τετραετίας, όπου εμφανίστηκε η τεχνική SI (Sequential Chromatography), η οποία επέτρεψε τον διαχωρισμό δειγμάτων υπό χαμηλή πίεση και την ανάλυση πολλαπλών συστατικών.

Αν αναλύσει κάποιος τις προαναφερθείσες περιόδους ανάπτυξης της FIA και μελετήσει την υπάρχουσα βιβλιογραφία¹²⁸, μπορεί να παρατηρήσει μια εξέλιξη από απλό χειρισμό αντιδραστηρίων (αρχικά), προς συστήματα που παρέχουν εντελώς αυτόματο χειρισμό αντιδραστηρίων (μικρών σε αριθμό αρχικά), αλλά σταδιακά αυξανόμενο, μέσω και της μετεξέλιξης της τεχνικής σε τεχνικές που μπορούν να διαχειριστούν πολλαπλά αντιδραστήρια ταυτόχρονα (και μάλιστα με σταδιακή χρήση τους στο αντιδρών σύστημα). Αυτό έφερε επέκταση των εφαρμογών της FIA, όπως η χρήση της τεχνικής αυτής σε εφαρμογές που εμπλέκουν ομογενείς αντιδράσεις μετατροπής¹³¹⁻¹³², σε συστήματα μελέτης υδριδίων¹³³, σε εφαρμογές που εμπλέκουν ετερογενείς αντιδράσεις μετατροπής¹³⁴⁻¹³⁵, σε εφαρμογές που εμπλέκουν χρήση ακινητοποιημένων ενζύμων¹³⁶, καθώς και η χρήση της σε συνδυασμό με άλλες εξαιρετικά ευαίσθητες τεχνικές όπως η χημειοφωταύγεια και η βιοφωταύγεια, στις οποίες έδωσε μεγάλη ώθηση. Σημειώνεται ότι η τεχνολογία FIA έχουν ενσωματωθεί σε πάρα πολλά συστήματα, στα οποία θεωρούνται αναπόσπαστο και φυσικό τμήμα. Σε αυτά μάλιστα δεν γίνεται καν αναφορά στην τεχνική FIA. Στο σημείο αυτό θα

μπορούσε να αναρωτηθεί κάποιος αν η ερευνητική ενασχόληση εξακολουθεί να παρουσιάζει ενδιαφέρον. Η απάντηση του συγγραφέως είναι ότι δεν έχουν ερευνηθεί επαρκώς θέματα που σχετίζονται με χρήση ζωντανών μικροοργανισμών ως αντιδραστηρίων ή συστημάτων ανίχνευσης σε ροή, ενώ η τεχνική πρόκειται να βρει νέες χρήσεις σε συνδυασμό με την φασματομετρία μαζών.

Αν κάποιος θέλει να ατενίσει το μέλλον αυτής της τεχνικής είναι σίγουρο πως μπορεί να την δει να διατηρείται στο προσκήνιο, καθώς η φαντασία των ερευνητών προκαλεί την διαρκή επέκταση των συνόρων εφαρμογής της. Το σίγουρο επίσης είναι ότι η χρήση της θα συνδυαστεί και με τάσεις σμίκρυνσης των διατάξεων που την χρησιμοποιούν, καθώς και με τάσεις μετεξέλιξής της σε αναλυτική τεχνική, που κάνει χρήση εξειδικευμένων chip, που πραγματοποιούν εξειδικευμένες αναλύσεις ουσιών, που βρίσκονται στο επίκεντρο ενδιαφέροντος της αναλυτικής κοινότητας. Το πόσο επιτυχημένη θα είναι αυτή η τεχνική ανοίγοντας πόρτες σε αυτές τις κατευθύνσεις θα το δείξει το μέλλον.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

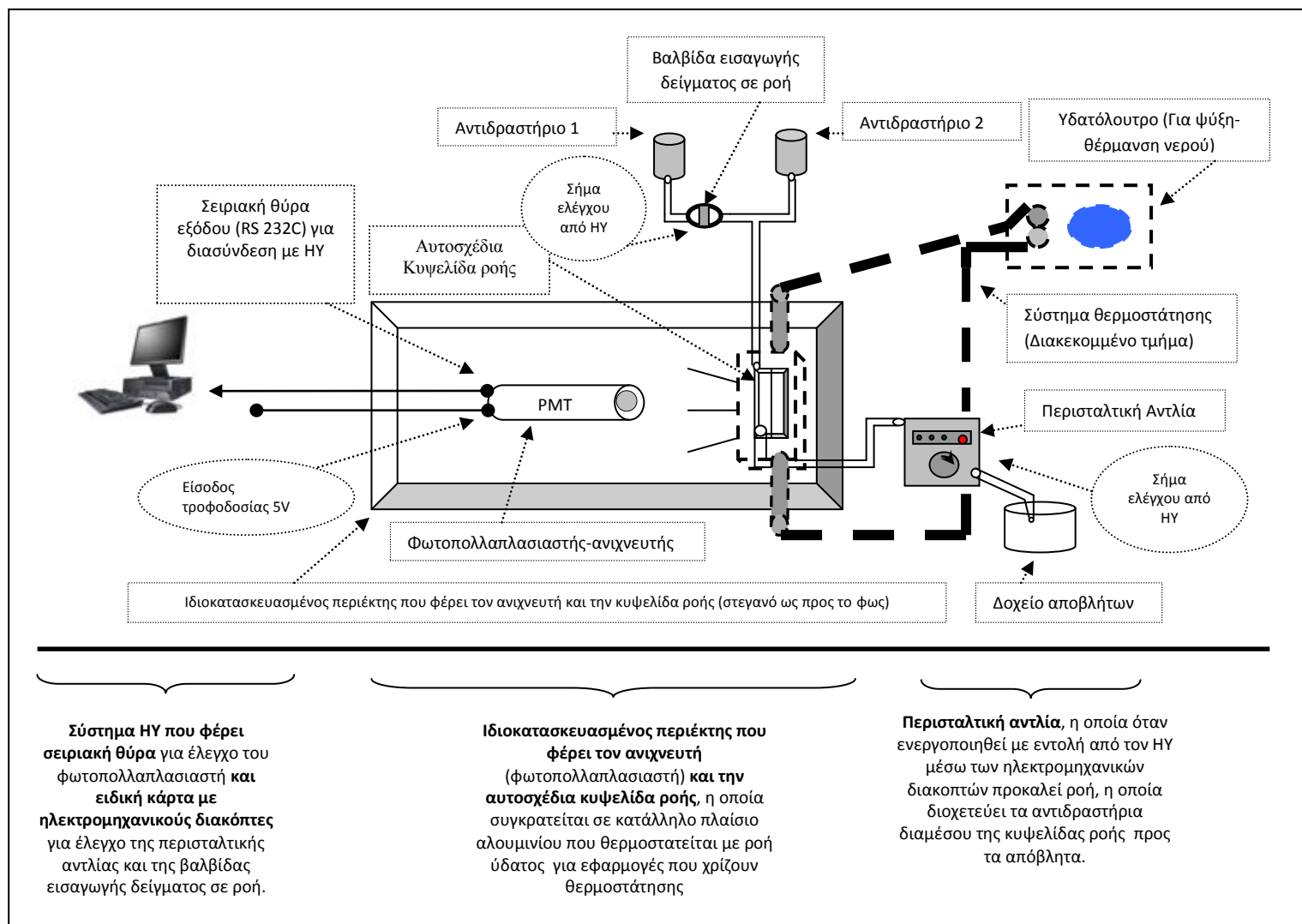
3. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΥΤΗ FIA ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ H_2O_2 ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

3.1. ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ο αναλυτής FIA που κατασκευάστηκε φαίνεται στο σχήμα 29 και αποτελείται από 4 τμήματα: α) έναν προσωπικό υπολογιστή, ο οποίος είναι εφοδιασμένος με κατάλληλη κάρτα με ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες (relays), που χρησιμοποιούνται για να δίνουν εντολή ανοίγματος και κλεισίματος στην περισταλτική αντλία του συστήματος που κατασκευάστηκε και εντολή περιστροφής στην βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή στην θέση φόρτωσης ή εισαγωγής στην ροή, β) έναν πλαστικό περιέκτη (στεγανό στο φως). Ο περιέκτης φέρει ως ανιχνευτή ένα σύστημα φωτοπολλαπλασιαστή με ενσωματωμένο μικροεπεξεργαστή και αναλογοψηφιακό μετατροπέα και αυτοσχέδια κυψελίδα ροής, γ) από τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή, η οποία με εντολή του μικροϋπολογιστή στην κάρτα των ηλεκτρομηχανικών διακοπών εισάγει το δείγμα στην ροή των αντιδραστηρίων, και έτσι δημιουργείται ζώνη του δείγματος για αντίδραση και δ) από την περισταλτική αντλία, η οποία χρησιμοποιείται για την δημιουργία κατάλληλης ροής που διέρχεται από την ιδιοκατασκευασμένη κυψελίδα ροής ευρισκόμενη έμπροσθεν του ανιχνευτή προς τα απόβλητα.

Κατά τη λειτουργία του αναλυτή FIA, πραγματοποιείται άντληση δείγματος συνεχώς μέσω του βρόγχου της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος, προς τα απόβλητα. Παράλληλα τα αντιδραστήρια οδηγούνται διαμέσου της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος, προς τον ανιχνευτή και ακολούθως ρέουν στα απόβλητα. Στην διαδρομή τους αυτή αντιδρούν με το δείγμα που έχουν παρασύρει από τον βρόγχο της βαλβίδας εισαγωγής. Στην κυψελίδα ροής το μείγμα αντιδραστήρια-δείγμα δίνει μια αντίδραση που παράγει φωτόνια που ανιχνεύονται από τον φωτοπολλαπλασιαστή. Το αυτοσχέδιο σύστημα μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και για κινητικές μετρήσεις, πραγματοποιώντας αντιδράσεις όπως περιγράφηκε παραπάνω με αναχαίτηση της ροής όταν το μίγμα της αντίδρασης βρεθεί στην κυψελίδα ροής έναντι του ανιχνευτή. Αμέσως μετά την αναχαίτηση της ροής ο αναλογοψηφιακός μετατροπέας παρακολουθεί το σήμα και ο ΗΥ το καταχωρεί συναρτήσει του χρόνου. Έτσι γίνεται δυνατή η μέτρηση της ταχύτητας της αντίδρασης και ακολούθως η συσχέτισή της με την συγκέντρωση στη οικεία καμπύλη αναφοράς.

Ο έλεγχος του ιδιοκατασκευασμένου αναλυτή πραγματοποιείται μέσω του προσωπικού υπολογιστή με τη βοήθεια λογισμικού που αναπτύχθηκε σε γλώσσα Labview. Το λογισμικό α) ελέγχει το σύστημα, μέσω εντολών στην κάρτα των ηλεκτρομηχανικών διακοπών. Οι διακόπτες ακολούθως ελέγχουν τη λειτουργία της περισταλτικής αντλίας (ταχύτητα και φορά ροής, σταμάτημα και ξεκίνημα) και της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος (θέση φόρτωσης και θέση εισαγωγής) και β) χρησιμοποιείται για λήψη δεδομένων από τον ανιχνευτή μέσω της σειριακής θύρας του υπολογιστή. Για να γίνει αυτό, ο ΗΥ διατηρεί κατά την λήψη δεδομένων αμφίπλευρη επικοινωνία με τον ανιχνευτή. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σε “πραγματικό χρόνο” (real time) ενώ ταυτόχρονα σώζονται και σε αρχείο για περαιτέρω επεξεργασία.



Σχήμα 29: Σχηματική απεικόνιση του αυτοσχέδιου αναλυτή FIA, που αναπτύχθηκε για μέτρηση H₂O₂ σε εκπνεόμενο αέρα.

3.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΥΛΙΚΟΥ

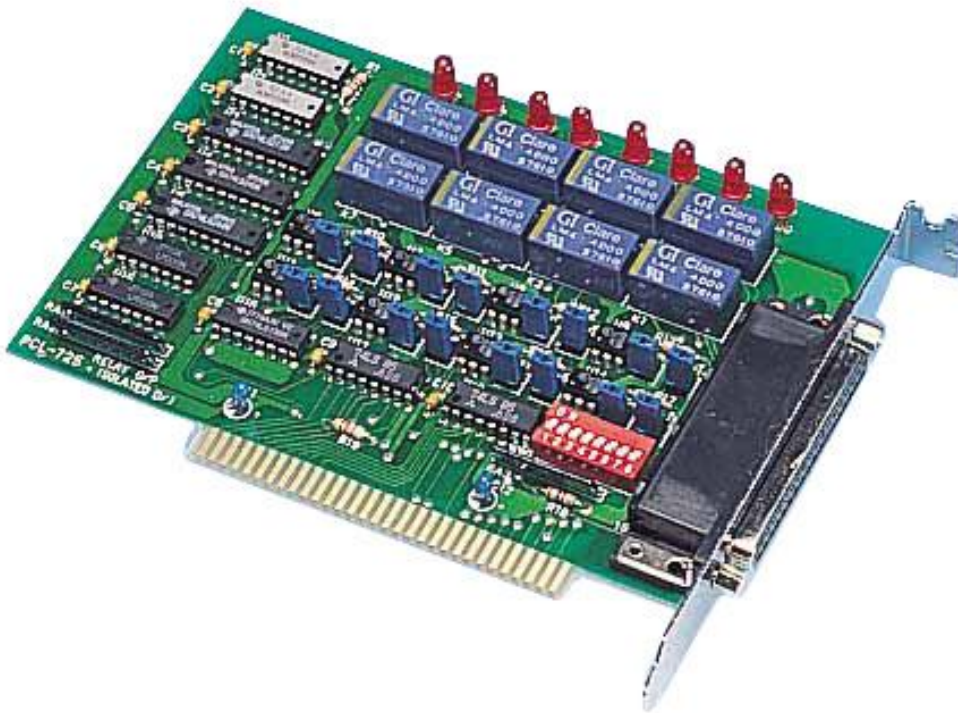
Τα χαρακτηριστικά των επιμέρους μονάδων του αυτοσχέδιου αναλυτή FIA αναφέρονται παρακάτω:

A) Προσωπικός υπολογιστής (Personal Computer):

Ο προσωπικός υπολογιστής που χρησιμοποιήθηκε είναι ένας Celeron υπολογιστής με 512 MB μνήμης, ο οποίος έφερε στη μητρική του κάρτα θύρες ISA για ενσωμάτωση της κάρτας με τους ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες, καθώς και σειριακές θύρες για διασύνδεση με τον φωτοπολλαπλασιαστή.

B) Κάρτα με ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες (Solid State Relays):

Η κάρτα ελέγχει τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή και την περισταλτική αντλία, μέσω διακοπών στερεάς κατάστασης. Είναι η κάρτα με μηχανισμό ενεργοποίησης διακοπών (Relay actuator) και με ανεξάρτητες ψηφιακές θύρες εισόδου (Digital Input) PCL-725 της εταιρείας Advantech Co. Ltd και φαίνεται στο σχήμα 30.



Σχήμα 30: Κάρτα διακοπών στερεάς κατάστασης PCL-725 της εταιρείας Advantech, στην κατασκευή του αναλυτή H₂O₂.

Οι διακόπτες στερεάς κατάστασης λειτουργούν υπακούοντας στην κατάσταση (0 ή 1) μιας ομάδας από bit που υπάρχει σε ζώνη θέσεων μνήμης. Η ζώνη θέσεων μνήμης επιλέγεται μέσω μιας ομάδας διακοπών (Δες σχήμα 30 πιο πάνω: κόκκινη διάταξη), η οποία επιλέγει θέσεις μνήμης που μπορεί να κυμανθούν στην δεκαεξαδική ζώνη διευθύνσεων: Hex 200 – Hex 3F8. Έτσι αν κάποιος επιλέξει μία συγκεκριμένη ζώνη θέσεων μνήμης για την εν λόγω κάρτα (π.χ. τη ζώνη θέσεων μνήμης Hex 200-201) και στείλει μετά μέσω κατάλληλης γλώσσας προγραμματισμού εντολές για άνοιγμα και κλείσιμο των διακοπών στερεάς κατάστασης, μέσω εντολών (0 ή 1) που γράφονται σε 8 θέσεις μνήμης της δεκαεξαδικής ζώνης διευθύνσεων που επελέγη, μπορεί να ανοιγοκλείσει συγκεκριμένους διακόπτες. Οι διακόπτες αυτοί με τη σειρά τους μπορεί να χρησιμοποιηθούν για αυτοματοποίηση διαδικασιών, όπως για παράδειγμα στην εφαρμογή μας, όπου χρησιμοποιούνται για να ελέγξουν το άνοιγμα και κλείσιμο της περισταλτικής αντλίας και την περιστροφή της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος σε ροή.

Η διασύνδεση της κάρτας αυτής με τις προαναφερθείσες συσκευές (περισταλτική αντλία και βαλβίδα) πραγματοποιείται μέσω ιδιοκατασκευασμένου καλωδίου με δύο κλώνους καθένας από τους οποίους συνδέει τις συσκευές που ελέγχονται. Η περισταλτική αντλία συνδέεται με την κάρτα των διακοπών στερεάς κατάστασης με την ενσωματωμένη αναλογική θύρα μέσω συνδέσμου 15 ακίδων. Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή συνδέεται με την κάρτα των διακοπών στερεάς κατάστασης μέσω αυτοσχέδιου συνδέσμου 5 ακίδων.

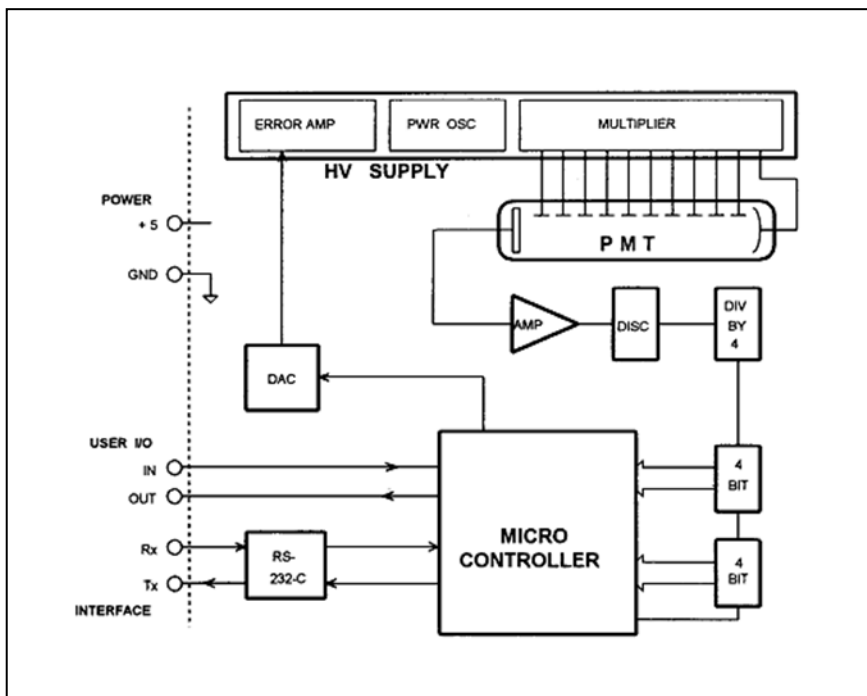
Γ) Φωτοπολλαπλασιαστής με ενσωματωμένο επεξεργαστή και αναλογοψηφιακό μετατροπέα (PhotoMultiplierTube module– PMT module):

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του αναλυτή FIA είναι ένας φωτοπολλαπλασιαστής, ο οποίος διαθέτει ενσωματωμένο μικροεπεξεργαστή και RS-232C interface για διασύνδεση με υπολογιστή (έτσι ώστε να μπορεί, τόσο να δέχεται εντολές από τον υπολογιστή, όσο και να στέλνει σε αυτόν τα δεδομένα που ανίχνευσε, προς παρουσίαση και αποθήκευση). Ο φωτοπολλαπλασιαστής που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Hamamatsu και πιο συγκεκριμένα πρόκειται για τον ανιχνευτή Hamamatsu HC 135-01, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση φωτός στην περιοχή UV έως το ορατό. Ο ανιχνευτής φαίνεται στο σχήμα 31.



Σχήμα 31: Ανιχνευτής HC 135-01 της εταιρείας Hamamatsu, που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή του αναλυτή FIA, για ανάλυση H_2O_2 .

Ο ανιχνευτής διαθέτει το κύκλωμα που φαίνεται στο σχήμα 32, το οποίο επιτρέπει τη μέτρηση φωτονίων που παράγονται από κατάλληλο χημικό σύστημα.



Σχήμα 32: Κύκλωμα στο εσωτερικό του ανιχνευτή HC 135-01 της εταιρείας Hamamatsu.

Η αρχή λειτουργίας του είναι η ακόλουθη: τα φωτόνια πέφτουν από το μπροστινό παράθυρο του ανιχνευτή σε μια φωτοκάθοδο, η οποία παράγει ηλεκτρόνια. Το κάθε φωτόνιο παράγει ένα ηλεκτρόνιο, το οποίο πέφτει σε κατάλληλες δυνόδους, όπου προκαλεί την παραγωγή δευτερευόντων ηλεκτρονίων, τα οποία με τη σειρά τους δημιουργούν έναν παλμό ρεύματος. Οι παλμοί ρεύματος αυτοί που δημιουργούνται από τα φωτόνια ενισχύονται και μετατρέπονται σε ψηφιακούς παλμούς με έναν ενισχυτή υψηλής ταχύτητας και διαλογέα. Από εκεί και έπειτα πραγματοποιείται καταμέτρηση των ψηφιακών αυτών παλμών, πράγμα που οδηγεί σε μία αναλογοψηφιακή μετατροπή πολύ μεγάλης ακρίβειας. Έτσι ανάλογα με τον ρυθμό λήψης δεδομένων, με τον οποίο έχει ρυθμιστεί ο ανιχνευτής, μπορεί να μετρά σε αυτή τη μονάδα χρόνου τον σχετικό αριθμό φωτονίων που δίνει μια χημική αντίδραση. **Ο αριθμός αυτός φωτονίων χαρακτηρίζεται σαν σχετικός, γιατί το ληφθέν σήμα έχει αναπροσαρμοστεί με πολλαπλασιασμό με έναν τελεστή ίσο με τέσσερα πριν την καταμέτρηση** (για τεχνητή επέκταση της δυναμικής περιοχής) **και γιατί μπορεί να πέσουν ταυτόχρονα δύο ηλεκτρόνια στην φωτοκάθοδο και το ρεύμα που θα ανιχνευτεί να έχει προσμετρηθεί σαν να προέρχεται από ένα φωτόνιο.** Μερικά χρήσιμα τεχνικά στοιχεία για τον εν λόγω ανιχνευτή παρατίθενται στον πίνακα 6 παρακάτω:

Πίνακας 6: Χρήσιμα τεχνικά στοιχεία του ανιχνευτή PMT HC 135-01 της εταιρείας Hamamatsu

<u>Παράμετρος</u>	<u>Τιμή (Μοντέλο HC 135-01)</u>	<u>Μονάδες μέτρησης</u>	Μέγιστες Τιμές
Τάση λειτουργίας	+6,0	Volts	
Θερμοκρασία λειτουργίας	+5 έως +50	°C	
Θερμοκρασία αποθήκευσης	-20 έως +50	°C	

Τάση λειτουργίας	+4.75 έως +5.25	Volts	Γενικές προδιαγραφές
Περιοχή φάσματος	300 έως 650	nm	
Μήκος κύματος κορυφής	400	nm	
Ενεργή περιοχή	21	mm	
Σειριακή θύρα	RS 232C		
Χρόνος προθέρμανσης	180	sec	
Κατανάλωση ρεύματος	35	mA	
Παράγοντας αναπροσαρμογής σήματος	4		
Διαστάσεις	4.75 με Φ 1,375	Inch	
Βάρος(περίπου – κεφαλής)	180	g	

Απόκριση	440,000	CPS/pW	Γενικές προδιαγραφές (Για το μήκος κύματος κορυφής και για μετρήσεις στους 25°C)
Θόρυβος	$3 \cdot 10^{-17}$	Watts	
Σταθερότητα γραμμής βάσης	11±0.1	%/°C	
Δυναμική περιοχή	$2 \cdot 10^6$		
Γραμμικότητα (0 έως $2 \cdot 10^7$ CPS)	±1	%	
Τυπική τιμή σκοτεινού ρεύματος (Σήμα από ανίχνευση θερμικών ηλεκτρονίων και διαφυγόντος φωτός)	100	Counts/sec	

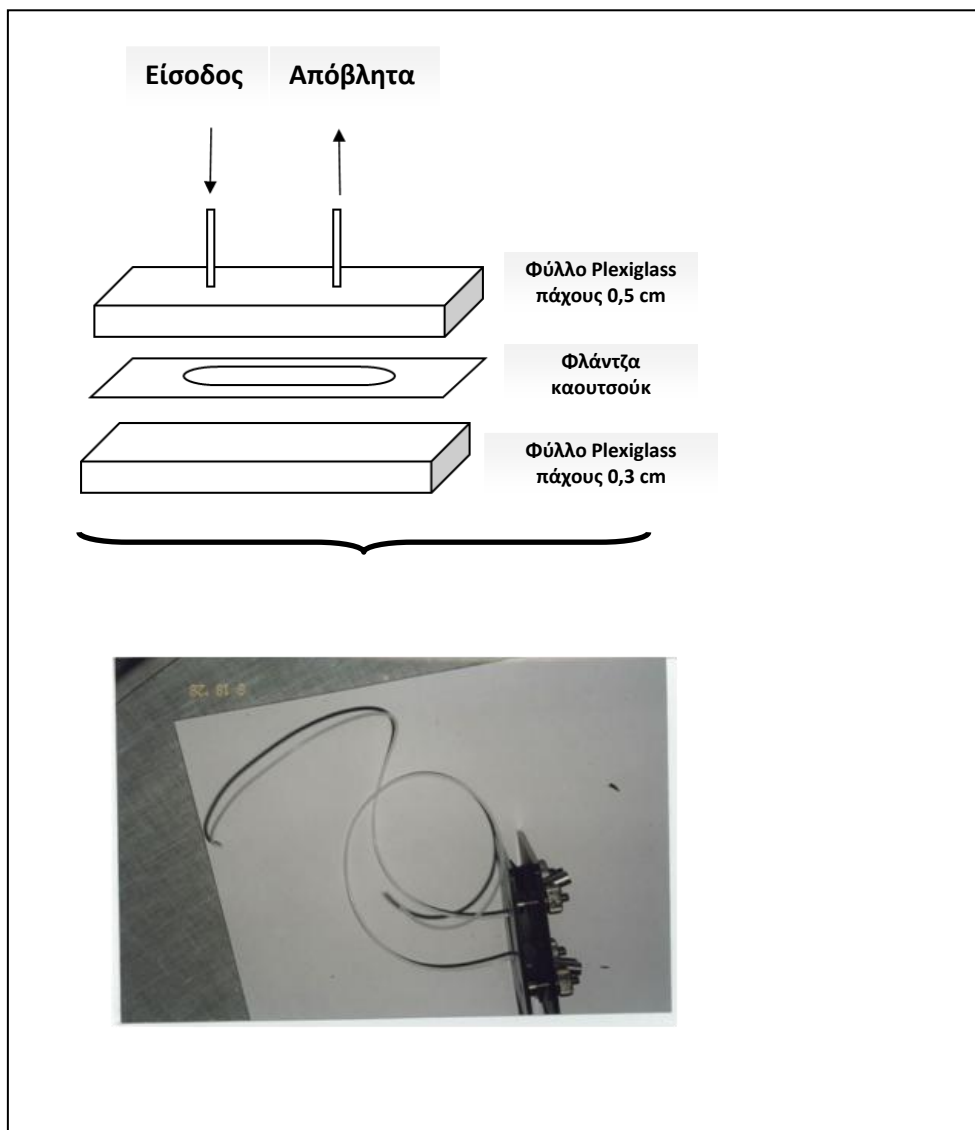
Η αναφορά σε αυτόν τον ανιχνευτή δεν πρέπει να τελειώσει χωρίς να αναφερθεί πως ο εν λόγω ανιχνευτής μπορεί να ελεγχθεί από έναν προσωπικό υπολογιστή με κατάλληλο πρόγραμμα και με απλές εντολές που πρέπει να στείλει ο χρήστης στον μικροεπεξεργαστή, μέσω της σειριακής θύρας RS 232C που διαθέτει. Οι εντολές αυτές αφορούν σε ρύθμιση της τάσης λειτουργίας στον ανιχνευτή, σε ρύθμιση του χρονισμού μετρήσεων, σε ρύθμιση της έναρξης μετρήσεων και σε ρύθμιση της παύσης μετρήσεων.

Δ) Αυτοσχέδια κυψελίδα ροής

Η κυψελίδα ροής που χρησιμοποιήθηκε είναι ιδιοκατασκευασμένη. Αποτελείται από δύο μεταλλικές πλάκες σχήματος ορθογωνίου παραλληλεπίπεδου (Διαστάσεις: Μήκος = 8 cm, Πλάτος = 5 cm, Πάχος = 0,3 cm) που έχουν μία οπή σχήματος ορθογωνίου παραλληλόγραμμου (Διαστάσεις: Μήκος = 2,2 cm, Πλάτος = 1 cm, Πάχος = 0,3 cm) στο κέντρο τους (σχήμα 33). Οι μεταλλικές πλάκες αυτές συγκρατούν όλη την κυψελίδα και μπορούν και προσαρμόζονται η μία πάνω στην άλλη και να αφήνουν διάκενο ανάμεσά τους, το οποίο οριοθετείται από τις βάσεις τεσσάρων οδηγών που υπάρχουν στη μία πλάκα. Αυτοί οι οδηγοί έχουν διαμορφωμένες βόλτες επάνω τους και έτσι επιτρέπουν τη σύσφιξη των δύο πλακών μεταξύ τους με τη βοήθεια ροδελών, όταν διέλθουν μέσα από τις οπές που υπάρχουν σε αντίστοιχα σημεία της αντικριστής πλάκας. Ανάμεσα σε αυτές τις πλάκες υπάρχουν τοποθετημένα δύο κομμάτια Plexiglass ρομβοειδούς σχήματος (Πάχους: 0,5 και 0,3 cm), τα οποία ορίζουν κυψελίδα με τη βοήθεια φλάντζας από καουτσούκ (σχήμα 33) ανάλογου

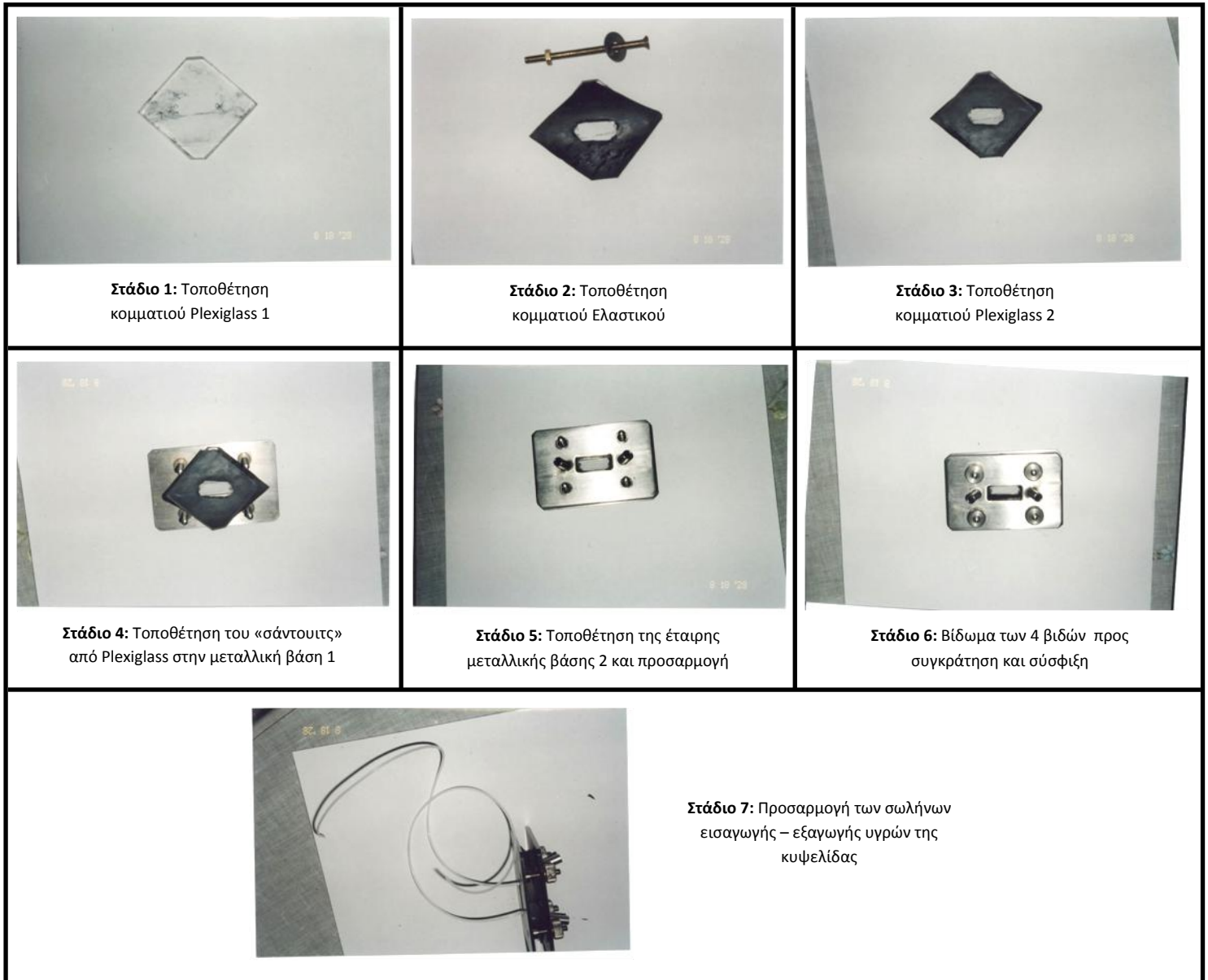
σχήματος και πάχους 0,2 cm, το οποίο φέρει ρομβοειδή οπή στο κέντρο του που έχει διάταξη παράλληλη με την οπή των δύο μεταλλικών πλακών.

Η ροή σε αυτό το αυτοσχέδιο σύστημα κυψελίδας ροής, πραγματοποιείται μέσω δύο σωλήνων μικρής διαμέτρου από Teflon, οι οποίοι είναι βυθισμένοι σε δύο τρύπες που έχουν γίνει σε συγκεκριμένα σημεία του πιο παχέως κομματιού Plexiglass. Έτσι από τον ένα σωλήνα Teflon έχουμε τροφοδοσία του συστήματος «αντιδρώντα-υπό ανάλυση ουσία» και από τον άλλο έχουμε έξοδο του εν λόγω χημικού συστήματος προς τα απόβλητα.



Σχήμα 33: Αυτοσχέδια κυψελίδας ροής, που χρησιμοποιήθηκε στον αναλυτή για H_2O_2 .

Τα στάδια της κατασκευής φαίνονται στο σχήμα 34.

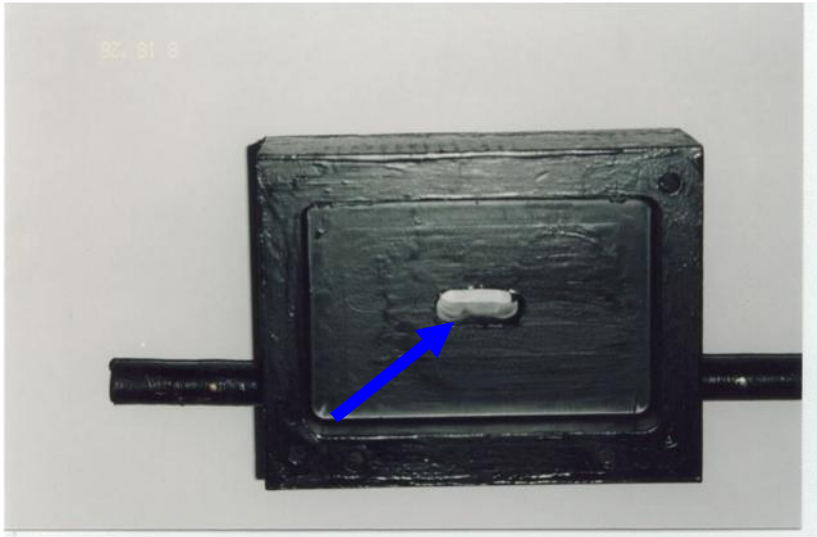


Σχήμα 34: Απεικόνιση σταδίων κατασκευής και συναρμογής της αυτοσχέδιας κυψελίδας ροής.

Ε) Ιδιοκατασκευασμένο σύστημα θερμοστάτησης:

Το βασικό δομικό στοιχείο του συστήματος θερμοστάτησης είναι βάση αλουμινίου, σχήματος ορθογωνίου παραλληλεπίπεδου (σχήμα 35), κατάλληλα διαμορφωμένη για υποδοχή της κυψελίδας ροής. Η μεταλλική βάση αυτή φέρει ειδική εγκοπή κατά μήκος της πλατιάς πλευράς της, για υποδοχή της κυψελίδας ροής, καθώς και ειδική οπή σε κατάλληλο σημείο της πλατιάς πλευράς της, κάθετη προς αυτή, για εξαγωγή των σωλήνων από teflon

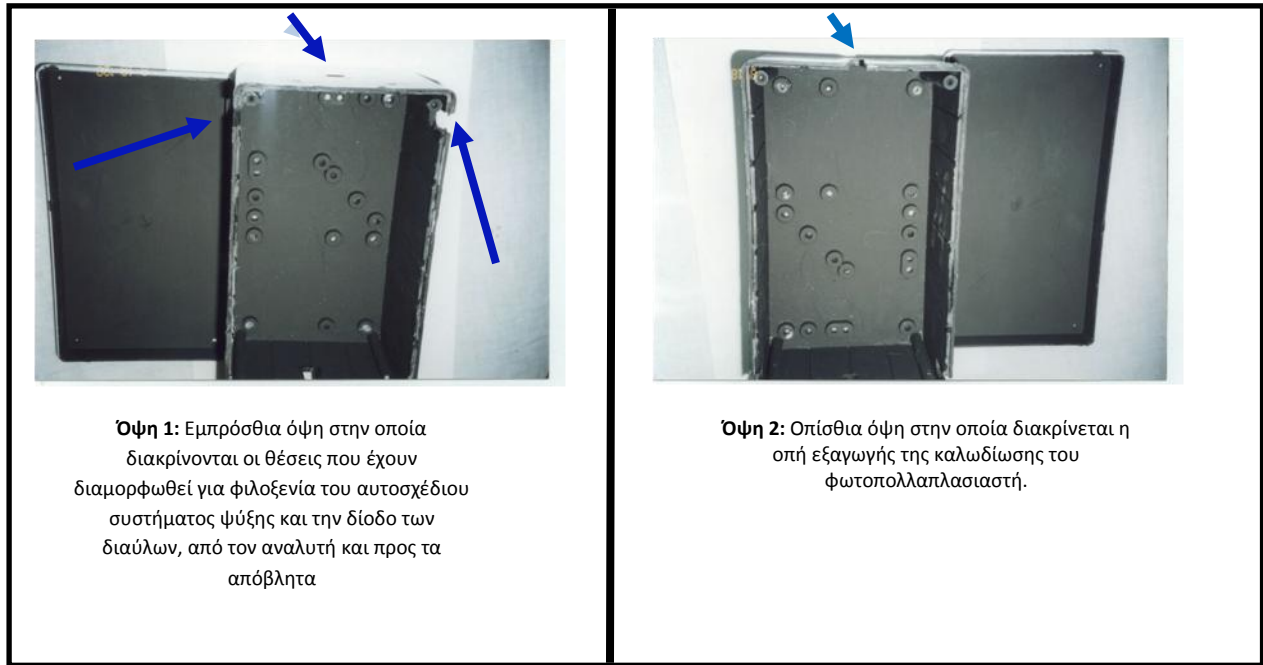
από το πίσω μέρος της βάσης (σχήμα 35). Η βάση αυτή φέρει επίσης και έναν **χάλκινο σωλήνα που διαπερνά την πλάκα του αλουμινίου**, ακριβώς πίσω από τη θέση της κυψελίδας, **για επίτευξη θερμοστάτησης με ψύξη-θέρμανση με εξωτερικό υδατόλουτρο**. Η συγκράτηση της κυψελίδας ροής πάνω στην μεταλλική βάση πραγματοποιείται με τη βοήθεια **κατάλληλων βιδών** διαμέτρου 3 mm και μήκους 6 cm. Για πλήρη σταθεροποίηση της κυψελίδας απαιτούνται 2 τέτοιες βίδες. Το σύστημα θερμοστάτησης φαίνεται στο σχήμα 35.



Σχήμα 35: Βάση αλουμινίου, η οποία χρησιμεύει για στήριξη και θερμοστάτησης της κυψελίδας ροής. Η σπή διέλευσης των διαύλων εισόδου εξόδου στην κυψελίδα φαίνεται με το μπλέ βέλος.

ΣΤ) Φορέας του αναλυτή:

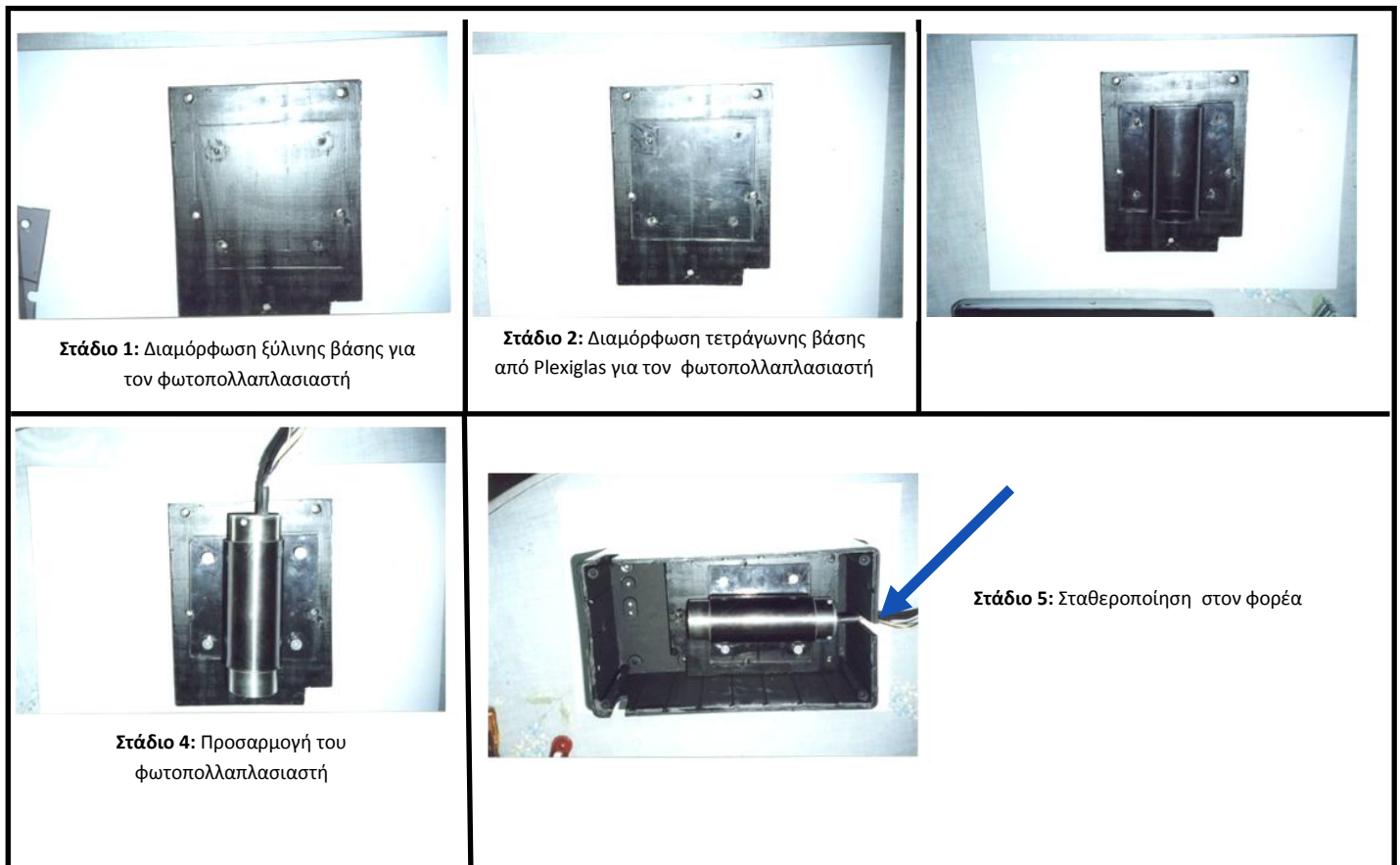
Ο ιδιοκατασκευασμένος φορέας του αναλυτή FIA αποτελείται από ένα πλαστικό κουτί σχήματος ορθογωνίου παραλληλόγραμμου [Μήκος = 22 cm, Πλάτος = 12,5 cm, Ύψος = 11 cm], του οποίου η εσωτερική επιφάνεια έχει βαφεί με μαύρο χρώμα, έτσι ώστε να απορροφάται φως, το οποίο προσπίπτει στα εσωτερικά του τοιχώματα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μείωση του θορύβου, ο οποίος οφείλεται σε διάχυτη ακτινοβολία (*stray light*). Το κουτί αυτό φέρει επίσης εσωτερικά αρκετές οπές για προσαρμογή διατάξεων σε αυτό, γεγονός που μεγαλώνει την ευχρηστιά του. Ο φορέας φαίνεται στο σχήμα 36.



Σχήμα 36: Φορέας του ανιχνευτή FIA για προσδιορισμό H_2O_2 .

Ο φορέας κατέστη απόλυτα στεγανός στο φώς με εσωτερικό μαύρο χρωματισμό και στεγάνωση των αρμών με μαύρο ελαστομερές υλικό.

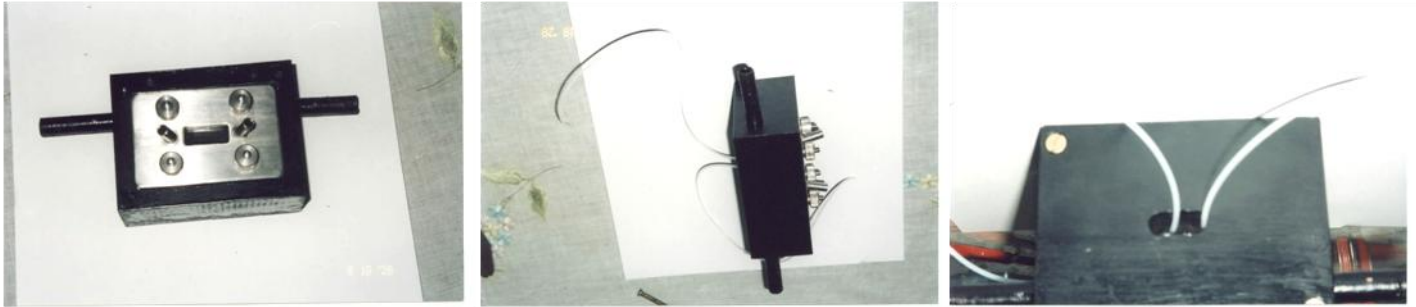
Καθόσον αφορά την λυχνία φωτοπολλαπλασιαστή, η οποία έχει κυλινδρικό σχήμα, **είναι επιβεβλημένη η χρήση κατάλληλης βάσεως** για σταθερότητα όπως φαίνεται στο σχήμα 37. Στο σχήμα αυτό διακρίνεται καταρχάς ξύλινη βάση. Η ξύλινη βάση αυτή έχει διαστάσεις μήκος = 14,9 cm, πλάτος = 11,4 cm και πάχος = 1,0 cm και φέρει τέσσερεις οπές 7 mm για προσαρμογή της στο εσωτερικό του φορέα.



Σχήμα 37: Στάδια προσαρμογής της λυχνίας φωτοπολλαπλασιαστή στον φορέα.

Η προσαρμογή του αυτοσχέδιου συστήματος ψύξης απέναντι από τον φωτοπολλαπλασιαστή φαίνεται στο σχήμα 38.

Η ολοκλήρωση του φορέα γίνεται με σφράγισμα με ειδικό ελαστομερές.



Στάδιο 1: Προσαρμογή της ιδιοκατασκευασμένης κυψελίδας ροής στο αυτοσχέδιο σύστημα θερμοστάτησης.



Στάδιο 2: Προσαρμογή του συστήματος θερμοστάτησης στον αυτοσχέδιο φορέα απέναντι από την λυχνία φωτοπολλαπλασιαστή.

Σχήμα 38: Προσαρμογή του συστήματος «σύστημα ψύξης- κυψελίδα ροής» στον φορέα του ανιχνευτή FIA για ανίχνευση H_2O_2 .

Z) Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή:

Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή που χρησιμοποιήθηκε είναι μια βαλβίδα της εταιρείας **VICI AG International**. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για το μοντέλο **VICI C22Z-3186E** το οποίο περιλαμβάνει σύστημα ηλεκτρικού ενεργοποιητή (*2 position Electric actuator*) της εν λόγω εταιρείας (σχήμα 39).

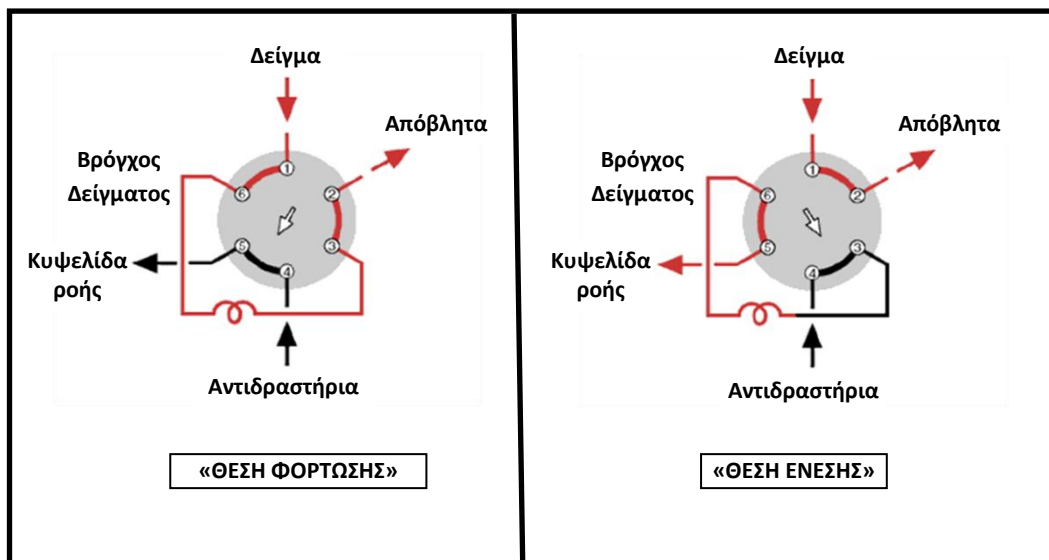


Σχήμα 39: Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή της εταιρείας VICI, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη του αναλυτή FIA για H_2O_2 .

Η εν λόγω βαλβίδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές που απαιτούν αυτόματη ένεση δειγμάτων (εισαγωγή δειγμάτων σε ροή αντιδραστηρίων). Η λειτουργία γίνεται με τη βοήθεια ενός στάτορα και ενός ρότορα. Ο ρότορας μπορεί και περιστρέφεται σε σχέση με τον στάτορα, με τέτοιο τρόπο, ώστε να αλλάζει η διαμόρφωση στις διαδρομές που υπάρχουν χαραγμένες ανάμεσά τους.

Το εν λόγω μοντέλο (C22Z-3186E) φέρει 6 θύρες, δηλαδή 6 διαθέσιμους διαύλους. Η εσωτερική σύνδεση των διαύλων και η περιστροφή του ρότορα ως προς τον στάτορα, καθορίζουν την ύπαρξη δύο θέσεων λειτουργίας της βαλβίδας (σχήμα 40). Η πρώτη θέση ονομάζεται «ΘΕΣΗ ΦΟΡΤΩΣΗΣ» και η δεύτερη θέση «ΘΕΣΗ ΕΝΕΣΗΣ». Στη «ΘΕΣΗ ΦΟΡΤΩΣΗΣ» έχουμε διοχέτευση των αντιδραστηρίων απευθείας στην κυψελίδα ροής, με παράλληλη διοχέτευση του δείγματος στα απόβλητα. Στη «ΘΕΣΗ ΕΝΕΣΗΣ» έχουμε διοχέτευση των αντιδραστηρίων διαμέσου του βρόγχου δείγματος στην κυψελίδα ροής, με παράλληλη διοχέτευση του δείγματος προς τα απόβλητα.

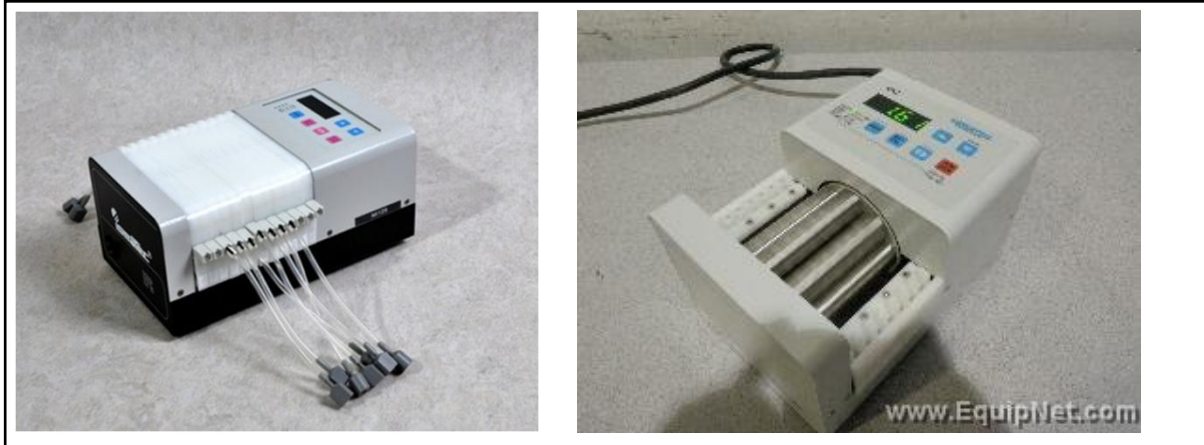
Η βαλβίδα φέρει δικό της τροφοδοτικό, ειδικό ενσύρματο χειριστήριο για εναλλαγή μεταξύ των δύο θέσεων και ειδικό καλώδιο διεπαφής για σύνδεση της, με την κάρτα των διακοπών στερεής κατάστασης, ώστε να αποστέλλονται από τον υπολογιστή αυτόματα (μέσα ειδικού λογισμικού) εντολές ελέγχου στην βαλβίδα.



Σχήμα 40: Απεικόνιση των δύο θέσεων λειτουργίας της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος σε ροή.

Η) Περισταλτική αντλία:

Η περισταλτική αντλία που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του αυτοσχέδιου αναλυτή FIA είναι μια αντλία της εταιρείας ISMATEC. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για το μοντέλο *Ismatec IPC-8 (peristaltic pump)* της εν λόγω εταιρείας (σχήμα 41).



Σχήμα 41: Περισταλτική αντλία της εταιρείας ISMATEC για τον αναλυτή FIA για H_2O_2 .

Η περισταλτική αντλία χρησιμοποιείται για την προώθηση ή την αναρρόφηση των αντιδραστηρίων του αναλυτή FIA. Με αλλαγή της φοράς περιστροφής της αντλίας ή της διάταξης των διαύλων είναι δυνατός ο έλεγχος της ροής.

Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στα ακόλουθα: Ένας ελαστικός σωλήνας διαμέτρου με ελάχιστες αποκλίσεις από την ονομαστική του τιμή, από κατάλληλο πλαστικό υλικό, τοποθετείται στο σώμα της αντλίας. Ο ελαστικός σωλήνας συμπιέζεται από την περιστροφική κίνηση των κυλίνδρων κύλισης αναρροφώντας με αυτό τον τρόπο το υγρό. **Η περισταλτική αντλία είναι μια αντλία θετικού εκτοπίσματος, ογκομετρική, με εξαιρετικά χαρακτηριστικά.**

Στην εν λόγω αντλία (ISMATEC IPC-8), η συγκράτηση των σωλήνων πάνω στους κυλίνδρους γίνεται με κατάλληλα διαμορφωμένες «πλαστικές φέτες» που φέρουν θέσεις για υποδοχή των σωλήνων. Αυτές τοποθετούνται πάνω από τους κυλίνδρους, στους οποίους εφάπτονται οριακά (σχήμα 41).

Ο έλεγχος της αντλίας πραγματοποιείται μέσω της αναλογικής διασύνδεσης και μέσω προγράμματος από τον υπολογιστή. Μέσω της διασύνδεσης αυτής μπορεί κανείς να καθορίσει αυτόματα μέσω του υπολογιστή, *την έναρξη-παύση λειτουργίας της αντλίας, την*

κατεύθυνση περιστροφής της, καθώς και την ταχύτητα περιστροφής της. Η αντλία διαθέτει επίσης και “δια χειρός” έλεγχο.

3.3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΕ

3.3.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Το λογισμικό υλοποιεί τέσσερις διαδικασίες: α) **Έλεγχο** (Control). Εδώ ρυθμίζονται οι συνθήκες λειτουργίας του αναλυτή με κατάλληλες εντολές του λογισμικού, β) **Λήψη δεδομένων** (Data Acquisition). Είναι η διαδικασία λήψης και αποκωδικοποίησης του σήματος, που λαμβάνει ο υπολογιστής, από τον ανιχνευτή του αναλυτή, γ) **Παρουσίαση του σήματος σε πραγματικό χρόνο** (real time) και δ) **Αποθήκευση του σήματος και των παραμέτρων λήψης του σε αρχείο υπολογιστή.**

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το Labview.

3.3.2. ΓΛΩΣΣΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΥ LABVIEW¹³⁷

Το LabView είναι γλώσσα προγραμματισμού για τη συλλογή & ανάλυση δεδομένων, προσομοίωση και έλεγχο οργάνων και μετρήσεων. Στηρίζεται στον γραφικό προγραμματισμό μέσω αντικειμένων, «αντικειμενοστραφή προγραμματισμό» (object oriented programming). Αυτός ο όρος χρησιμοποιείται στην πληροφορική σε αντιδιαστολή με τον λεγόμενο «προγραμματισμό διαδικασιών» (text based programming), όπου ο προγραμματιστής γράφει κώδικα εντολών που εκτελούνται με γραμμική διαδοχή. **Στο γραφικό περιβάλλον του LabView ο προγραμματιστής δεν χειρίζεται κώδικα, αλλά γραφικά αντικείμενα, όπως κουμπιά, συσκευές, οθόνες ή εικονίδια που παριστάνουν συναρτήσεις ή εκτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες με τη μορφή υπορουτίνων. Τα εικονίδια έχουν εισόδους και εξόδους και επιδέχονται προγραμματισμό των λειτουργιών τους.**

Το όνομα LabView είναι το ακρωνύμιο των λέξεων «Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench» και αναπτύχθηκε κατά το τέλος της δεκαετίας του 80 από την εταιρία

National Instruments (<http://www.ni.com>). Η εταιρία ειδικεύεται σε συστήματα συλλογής δεδομένων, σε αισθητήρες, αυτοματισμούς και λογισμικό μετρήσεων και ελέγχου.

Προγραμματίζοντας με τα αντικείμενα που μας δίνει το περιβάλλον LabView δημιουργούμε τα λεγόμενα «εικονικά όργανα» (Virtual Instruments ή απλώς VIs). Η γραφική γλώσσα που χρησιμοποιεί το LabView για τον προγραμματισμό και τη δημιουργία εικονικών οργάνων ονομάζεται γλώσσα G. Είναι πάντως δυνατό να χρησιμοποιήσει κανείς το LabView σε απλό επίπεδο, χρησιμοποιώντας έτοιμα εικονικά όργανα, χωρίς να μπαίνει σε λεπτομέρειες με τη γλώσσα G.

Το LabView διαθέτει έναν αριθμό από έτοιμα VIs και ορισμένα εικονίδια συναρτήσεων που επιτρέπουν την επικοινωνία με όλα τα γνωστά πρωτόκολλα μετάδοσης δεδομένων. Έτσι, υπάρχουν έτοιμες λειτουργίες που επιτρέπουν τη συλλογή και μετάδοση δεδομένων μέσω της σειριακής θύρας του υπολογιστή, καθώς και μέσω της παράλληλης θύρας. Επίσης, υπάρχουν λειτουργίες για την ανταλλαγή δεδομένων με την κάρτα ήχου, καθώς και με κάρτες επέκτασης που χρησιμοποιούν το πρωτόκολλο GPIB ή IEEE 488. Εξάλλου, όλες οι κάρτες συλλογής δεδομένων της εταιρίας National Instruments είναι συμβατές με το LabView με τη βοήθεια ειδικών οδηγών που ενσωματώνονται στο λογισμικό. Το ίδιο συμβαίνει και με σημαντικό αριθμό άλλων οργάνων για τα οποία κυκλοφορούν οδηγοί συμβατοί με το LabView.

Έτσι, μέσω των πρωτόκολλων επικοινωνίας (RS232, IEEE488 ή TCP/IP) οι διακόπτες που απεικονίζονται στην οθόνη του υπολογιστή συνδέονται με πραγματικά όργανα, μέσω του λογισμικού. Όταν πατούμε ένα εικονικό κουμπί στην οθόνη, ενεργοποιείται ένας πραγματικός διακόπτης σε ένα εργαστηριακό όργανο. Σ' αυτήν ακριβώς τη δυνατότητα, που επεκτείνει την απλή προσομοίωση ώστε να γίνεται εφικτός ο έλεγχος αληθινών οργάνων, βρίσκεται και η δύναμη του LabView ως λογισμικού μετρήσεων και ελέγχου.

3.3.3. ΔΟΜΗ ΕΝΟΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ LABVIEW¹³⁷

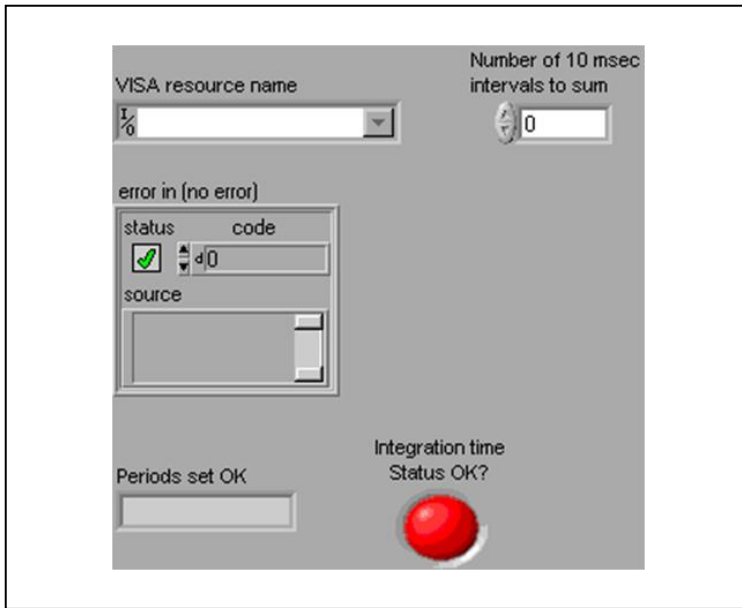
Όλες οι αντικειμενοστραφείς γλώσσες προγραμματισμού αποτελούνται από δύο τμήματα: *το τμήμα που περιέχει τον κώδικα του προγράμματος και το τμήμα διασύνδεσης με τον χρήστη (User Interface).* Αυτό συναντάται και στην γλώσσα Labview. **Αν θέλει λοιπόν**

κάποιος να παραθέσει μία υπορουτίνα της γλώσσας Labview, δηλαδή ένα τμήμα προγράμματος, το οποίο χρησιμοποιείται πολλές φορές σε τυποποιημένες διαδικασίες κατά τη ροή ενός κεντρικού προγράμματος, **θα πρέπει να παραθέσει δύο οθόνες, για να την απεικονίσει:** α) **Το εμπρόσθιο πλαίσιο** (front panel) και β) **το δομικό διάγραμμα** (block diagram).

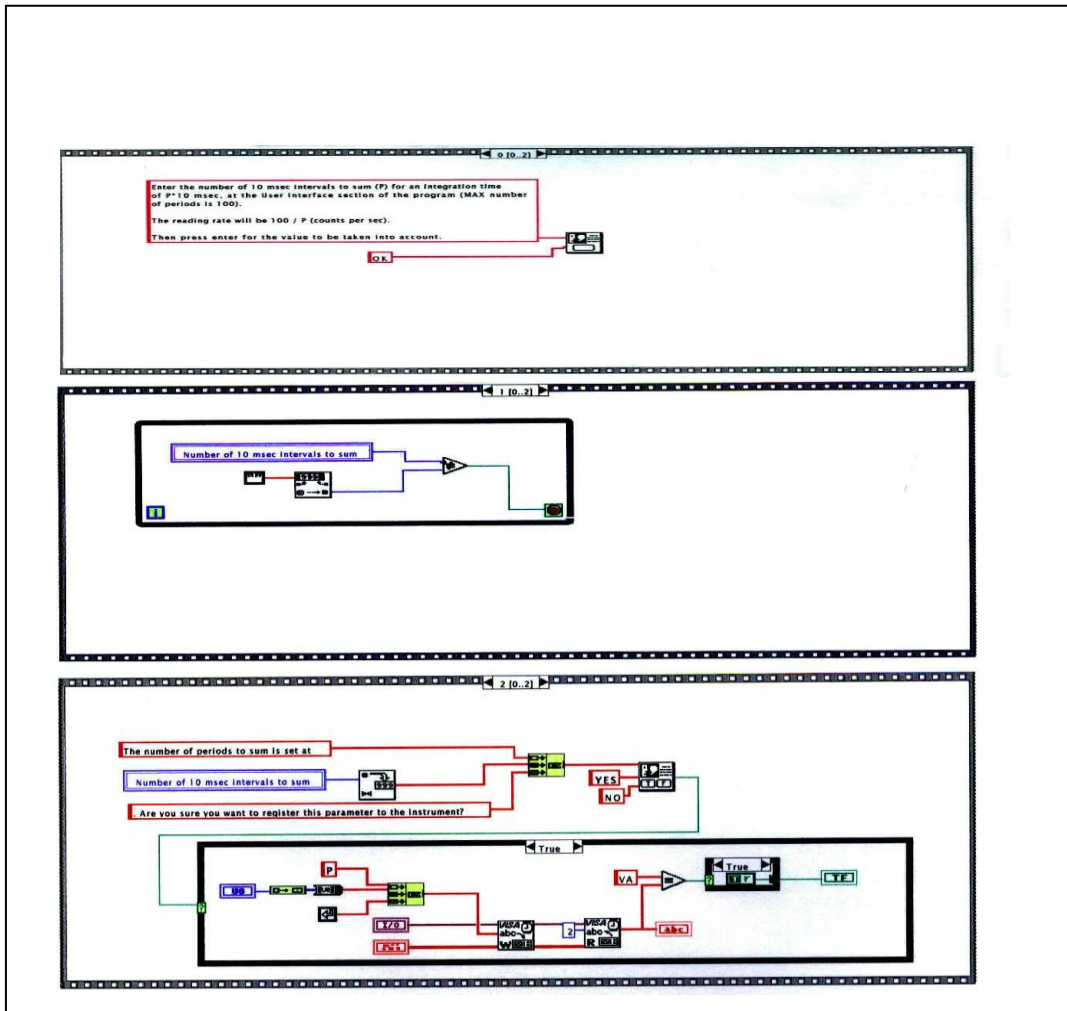
Το εμπρόσθιο πλαίσιο μοιάζει με την οθόνη ενός οργάνου. Μπορεί να περιέχει κουμπιά, διακόπτες, οθόνες γραφικών κ.ά. Τα στοιχεία του εμπρόσθιου πλαισίου παίρνουν τιμές με τη βοήθεια του ποντικιού ή του πληκτρολογίου. Για παράδειγμα, με το ποντίκι μπορούμε να πατήσουμε έναν διακόπτη και με το πληκτρολόγιο να ορίσουμε τιμή για μια τάση ή για μια θερμοκρασία. **Το εμπρόσθιο πλαίσιο είναι αυτό που κυρίως χειρίζεται ο χρήστης.** Είναι το πλαίσιο, στο οποίο ο χρήστης θα βάλει όλες τις παραμέτρους που απαιτούνται, για να ρυθμιστεί η εκτέλεση της μέτρησης, αλλά ταυτόχρονα είναι και το πλαίσιο εκείνο, στο οποίο θα απεικονίζεται σε πραγματικό χρόνο το σήμα, καθώς και το πλαίσιο στο οποίο ρυθμίζεται η διεύθυνση, στην οποία θα αποθηκεύονται τα δεδομένα που ελήφθησαν, μαζί με τις παραμέτρους λήψης τους.

Το δομικό διάγραμμα υπάρχει πάντα μαζί με το εμπρόσθιο πλαίσιο και ισοδυναμεί με τον κώδικα προγράμματος στη γραφική γλώσσα G. Κάθε στοιχείο του δομικού διαγράμματος παριστάνεται από ένα εικονίδιο. Ένα κουμπί μπορεί να είναι μια μεταβλητή που να παίρνει τιμές True/False ή μια μεταβλητή διπλής ακρίβειας για εισαγωγή δεδομένων. Κάθε συνάρτηση έχει το δικό της εικονίδιο, το ίδιο και κάθε ολοκληρωμένη λειτουργία. **Στο δομικό διάγραμμα απεικονίζεται ο τρόπος λειτουργιών του κάθε αντικειμένου που υπάρχει στο εμπρόσθιο πλαίσιο, καθώς και ο τρόπος διασύνδεσης των αντικειμένων ή διαδοχής λειτουργιών που συνδέουν αυτά τα αντικείμενα.**

Στα σχήματα 42 & 43 φαίνονται το εμπρόσθιο πλαίσιο και το δομικό διάγραμμα, αντίστοιχα, της υπορουτίνας που χρησιμοποιείται από το λογισμικό που αναπτύχθηκε για τον χρονοισμό λήψης μετρήσεων από τον φωτοπολλαπλασιαστή.



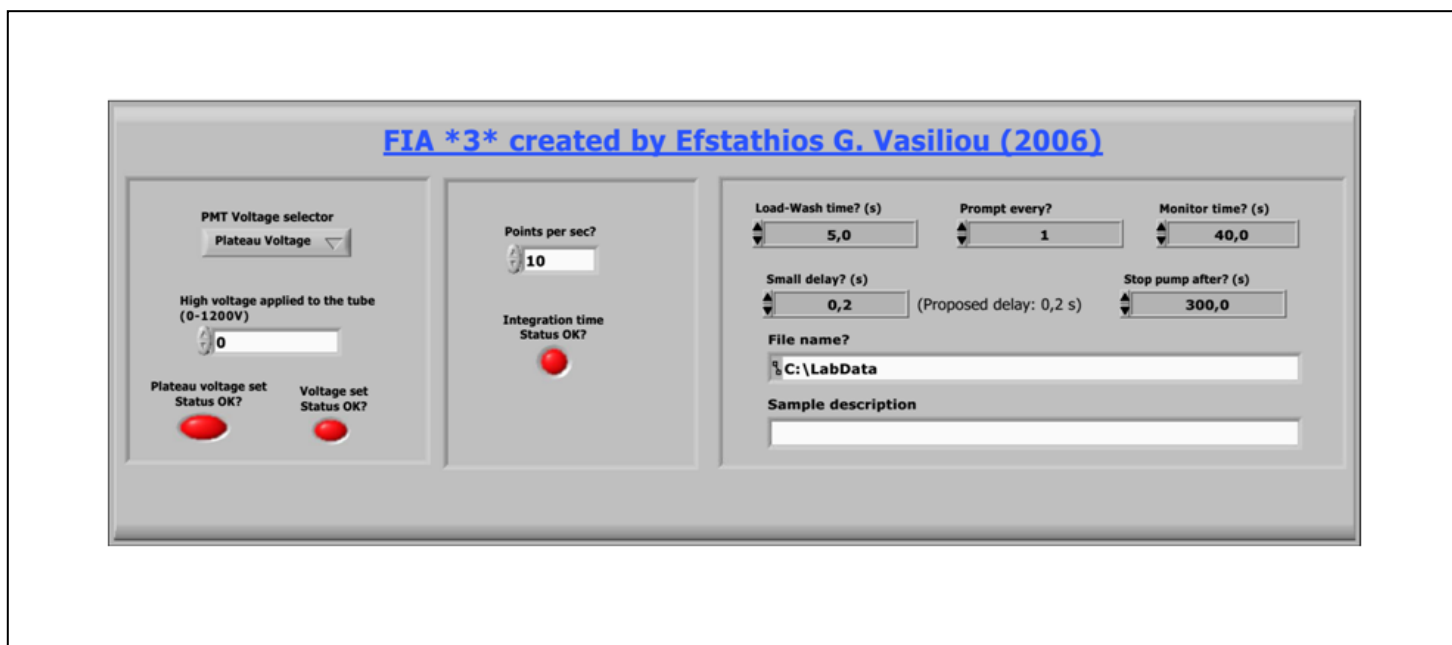
Σχήμα 42: Υπορουτίνα ρύθμισης του χρονισμού λήψης των μετρήσεων από τον φωτοπολλαπλασιαστή (Εμπρόσθιο πλαίσιο)



Σχήμα 43: Υπορουτίνα ρύθμισης του χρονισμού λήψης των μετρήσεων από τον φωτοπολλαπλασιαστή (Κώδικας)

3.3.4. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

Το εμπρόσθιο πλαίσιο του προγράμματος που αναπτύχθηκε φαίνεται στο σχήμα 44. Εκεί βλέπουμε ότι ο χρήστης οριοθετεί τις παραμέτρους, που είναι κρίσιμες να ρυθμιστούν κατά την εκτέλεση της κάθε μέτρησης. Στο εν λόγω εμπρόσθιο πλαίσιο εμφανίζονται τρία διακριτά τμήματα ρυθμίσεων.



Σχήμα 44: Εμπρόσθιο πλαίσιο του προγράμματος της γλώσσας Labview στον αναλυτή FIA για μέτρηση H₂O₂.

Το πρώτο τμήμα (αριστερά) είναι το τμήμα, όπου ο χρήστης επιλέγει την τάση λειτουργίας του φωτοπολλαπλασιαστή. Εκεί απεικονίζεται ένας επιλογέας πολλαπλών κουτιών (Dropbox), όπου φαίνεται σαν προεπιλογή, η επιλογή Plateau Voltage. Αυτή είναι η επιλογή, που έχει ο χρήστης να λειτουργεί με τη μέγιστη τάση λειτουργίας του φωτοπολλαπλασιαστή, όπου ενισχύονται ακόμα και ασθενή ρεύματα φωτός (λίγων φωτονίων). Εκτός από την τάση αυτή, στον επιλογέα υπάρχει η επιλογή μικρότερης τάσης (0-1200 V), οπότε ο χρήστης πρέπει να θέσει και την επιθυμητή τάση στον αντίστοιχο ρυθμιστή της τάσης. Τα λαμπάκια κάτω από τους επιλογείς επιβεβαιώνουν την επιτυχή λήψη της εντολής από τον φωτοπολλαπλασιαστή με αλλαγή χρωματισμού σε πράσινο.

Στο δεύτερο τμήμα (κεντρικό) ο χρήστης ρυθμίζει τον χρονισμό λήψης μετρήσεων από τον φωτοπολλαπλασιαστή (κάθε πόσο χρόνο γίνεται ανάγνωση του σήματος του φωτοπολλαπλασιαστή). Εκεί υπάρχει επιλογέας του χρονισμού μετρήσεων και το σχετικό

λαμπάκι επιβεβαίωσης της ορθής μεταβίβασης της εντολής στον ανιχνευτή. Ο επιλογέας αυτός δίνει εντολή στην υπορουτίνα για ρύθμιση του χρονισμού.

Στο τρίτο τμήμα (δεξιά) ο χρήστης ρυθμίζει παραμέτρους που είναι χρήσιμες κατά την ίδια τη μέτρηση και κατά την λειτουργία του ίδιου του αναλυτή. Οι παράμετροι αυτές είναι:

α) **Load-Wash time (s)**: ρυθμίζει πόσο χρόνο να περιμένει το σύστημα, μέχρι να αρχίσει την αλληλουχία βημάτων. Ο χρόνος αυτός είναι αναγκαίος, για να ξεπλυθούν οι δίαυλοι με τα αντιδραστήρια και να πληρωθεί ο βρόγχος δειγματοληψίας με το δείγμα.

β) **Prompt every**: ρυθμίζει πόσοι διαδοχικοί κύκλοι του προγράμματος θα εκτελεστούν χωρίς διακοπή. Η παράμετρος αυτή ρυθμίζει πόσες επαναλήψεις της ανάλυσης θα γίνουν (Replicates).

γ) **Monitor time (s)**: ρυθμίζει πόσο χρόνο διαρκεί κάθε ανάλυση.

δ) **Small Delay (s)**: ρυθμίζει πόσο χρόνο θα καθυστερεί κάθε εντολή προς τους ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες από την αμέσως επόμενη της. Ο χρόνος αυτός είναι ο χρόνος που απαιτούν οι ηλεκτρομηχανικοί διακόπτες προκειμένου να εκτελέσουν μια εντολή αλλαγής της θέσης τους. Ελλείψει χρόνου καθυστέρησης το πρόγραμμα θα συνέχιζε την λειτουργία του με την ταχύτητα του υπολογιστή, την οποία δεν μπορεί να ακολουθήσει ο υπόλοιπος εξοπλισμός. Ο χρόνος αυτός ρυθμίζεται παραμετρικά ώστε το πρόγραμμα να μπορεί να συνεργασθεί με διαφορετικά τμήματα του εξοπλισμού. Στον αναλυτή για προσδιορισμό H_2O_2 ο χρόνος αυτός έχει υπολογιστεί σε 0,2 s.

ε) **Stop pump after (s)**: ρυθμίζει το αν θα έχουμε σταμάτημα της αντλίας σε κάποιο σημείο της μέτρησης ή όχι. Η παράμετρος αυτή αγνοείται, αν είναι μεγαλύτερη από την παράμετρο Monitor time. Αν όχι, ενεργοποιείται και δίνει εντολή στην κάρτα με τους διακόπτες να σταματήσει την αντλία. Αυτή η επιλογή ενσωματώθηκε ώστε να δοθεί η δυνατότητα κινητικών μετρήσεων πολλαπλών σημείων. Η δυνατότητα αυτή,

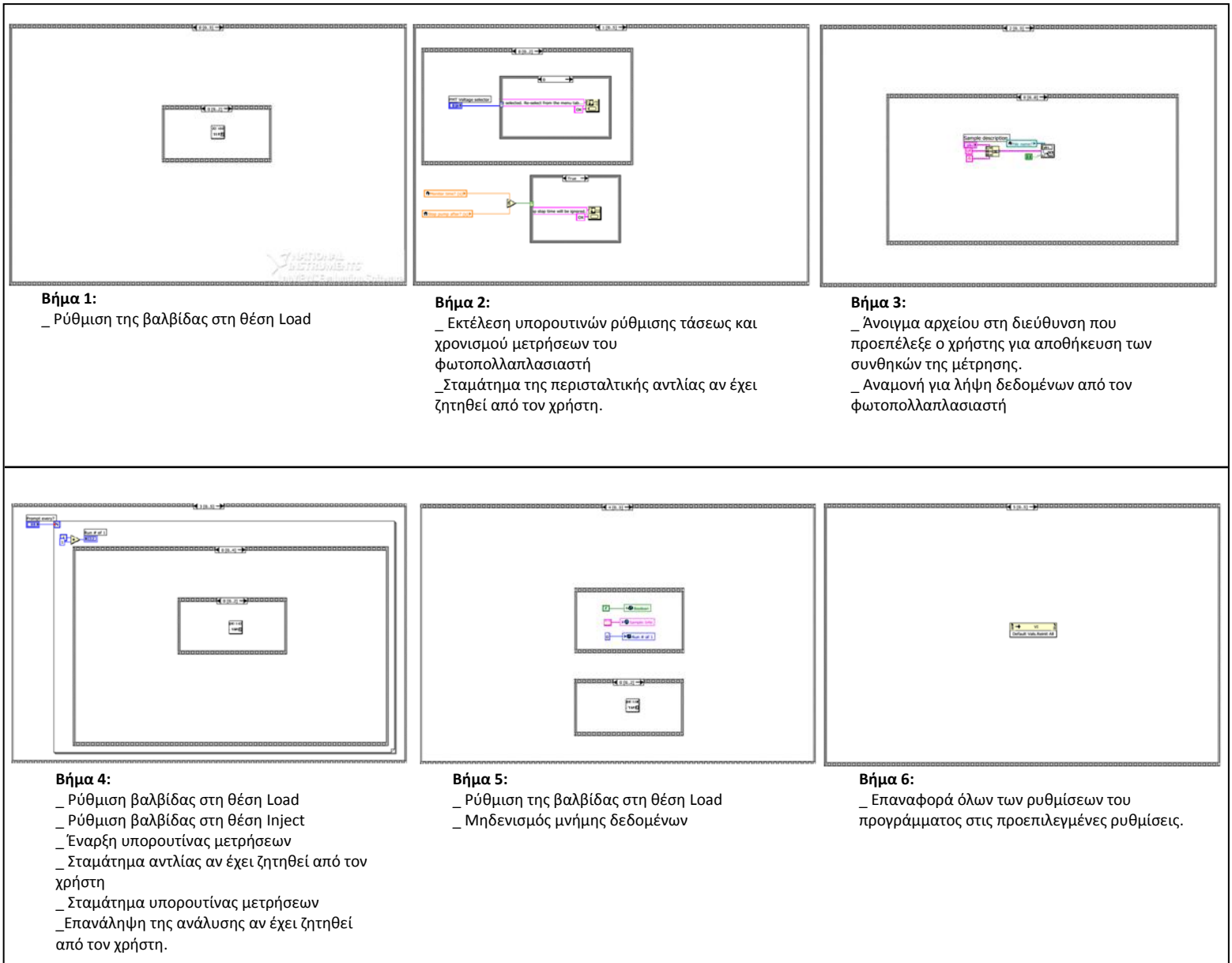
παρόλο που δεν χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη εφαρμογή, είναι πολύ χρήσιμη για μελλοντική χρήση, ιδιαίτερα κατά την πιθανή μελλοντική εμπορική αξιοποίηση.

στ) **File name:** όνομα και θέση στον σκληρό δίσκο όπου θα σωθεί το αρχείο των μετρήσεων.

ζ) **Sample Description:** πληροφοριακή παράμετρος, που γράφεται στο αρχείο, σαν πρόσθετη πληροφορία για το δείγμα.

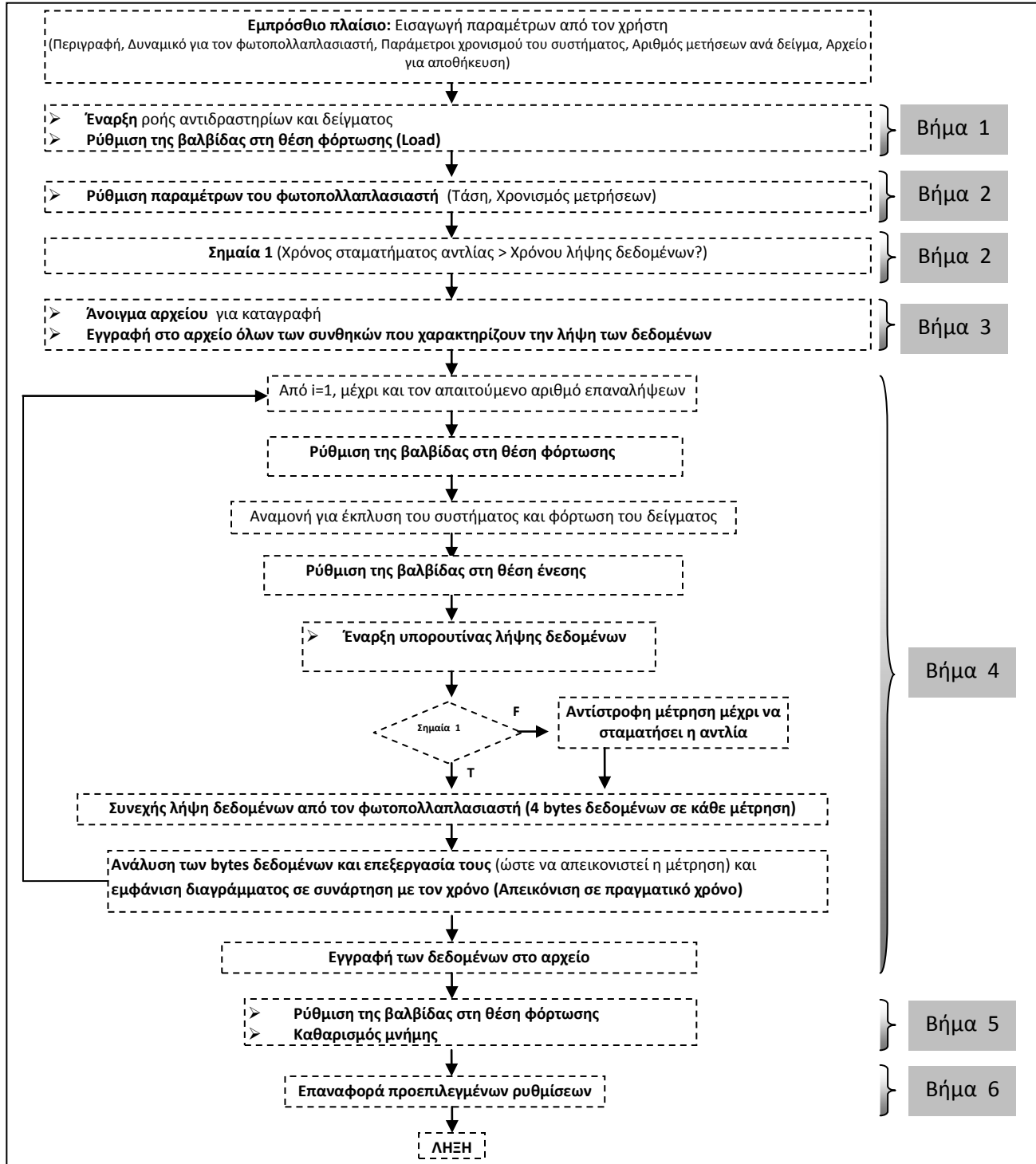
Οι παραπάνω παράμετροι που ρυθμίζονται στο εμπρόσθιο πλαίσιο από τον χειριστή, μεταφράζονται σε εντολές και στέλνονται στις αντίστοιχες υπορουτίνες που τρέχουν στο πρόγραμμα, οι οποίες με τη σειρά τους περνούν εντολές, είτε μέσω της σειριακής θύρας στον φωτοπολλαπλασιαστή, είτε μέσω της κάρτας με τους διακόπτες στην βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή και την περισταλτική αντλία. Εκτός από αυτές τις εντολές, υπάρχουν και εντολές χρονισμού που ρυθμίζουν χρονικά τις εργασίες που επιτελούνται στον αναλυτή.

Μετά την παράθεση του εμπρόσθιου πλαισίου του προγράμματος, είναι επιβεβλημένη η περιγραφή της ροής του κώδικα. Με την περιγραφή αυτή γίνεται φανερός το τρόπος που ενσωματώνονται στο πρόγραμμα οι διαδικασίες της λήψης δεδομένων, της παρουσίασης σε πραγματικό χρόνο και της αποθήκευσης των μετρήσεων σε αρχείο, για μελλοντική επισκόπηση. Η διαδικασία ελέγχου δεν αναφέρεται, γιατί ο τρόπος λειτουργίας της εξηγήθηκε παραπάνω. Ο κώδικας του προγράμματος φαίνεται στο σχήμα 45.



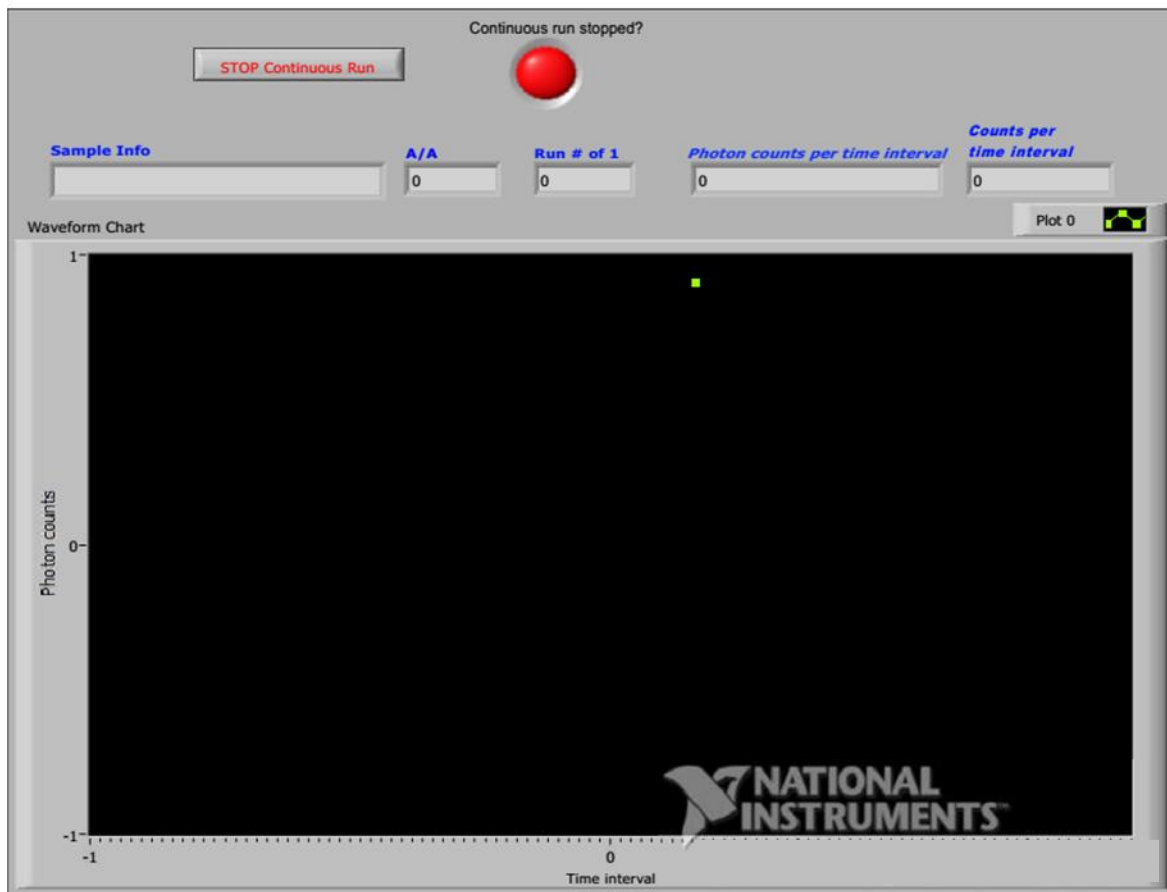
Σχήμα 45: Κώδικας του προγράμματος για ανάλυση H₂O₂.

Το λογικό διάγραμμα του προγράμματος φαίνεται στο σχήμα 46.



Σχήμα 46: Λογικό διάγραμμα του προγράμματος για ανάλυση H₂O₂.

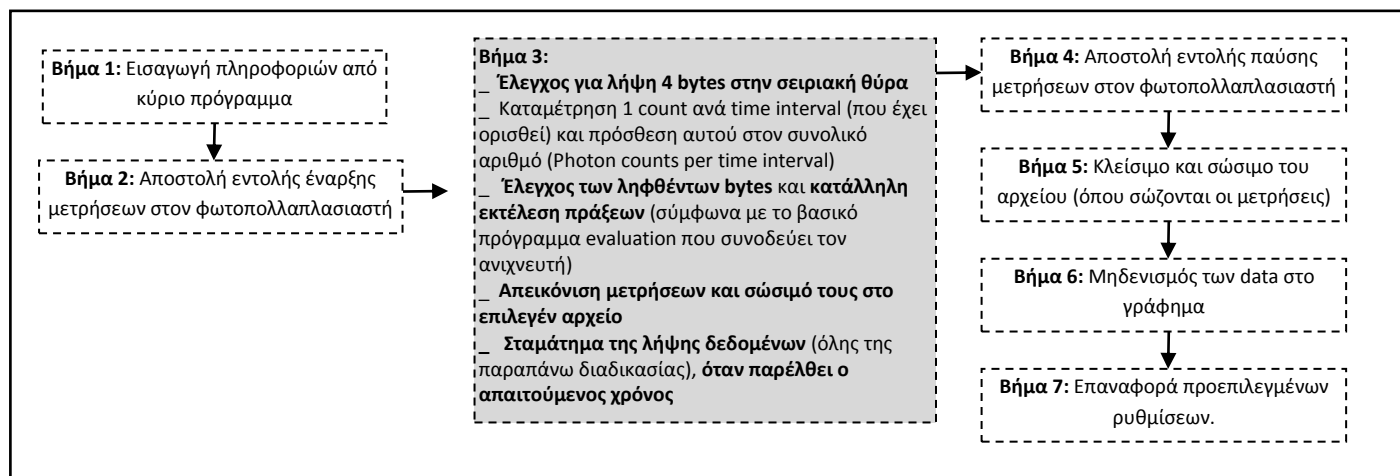
Είναι σκόπιμο να γίνει μια αναφορά στην υπορουτίνα λήψης δεδομένων, καθώς αυτή επιτελεί τις περισσότερες προαναφερθείσες διαδικασίες (λήψη δεδομένων, παρουσίαση σε πραγματικό χρόνο και αποθήκευση των μετρήσεων σε αρχείο, για μελλοντική επισκόπηση). Το εμπρόσθιο πλαίσιο της υπορουτίνας, φαίνεται στο σχήμα 47.



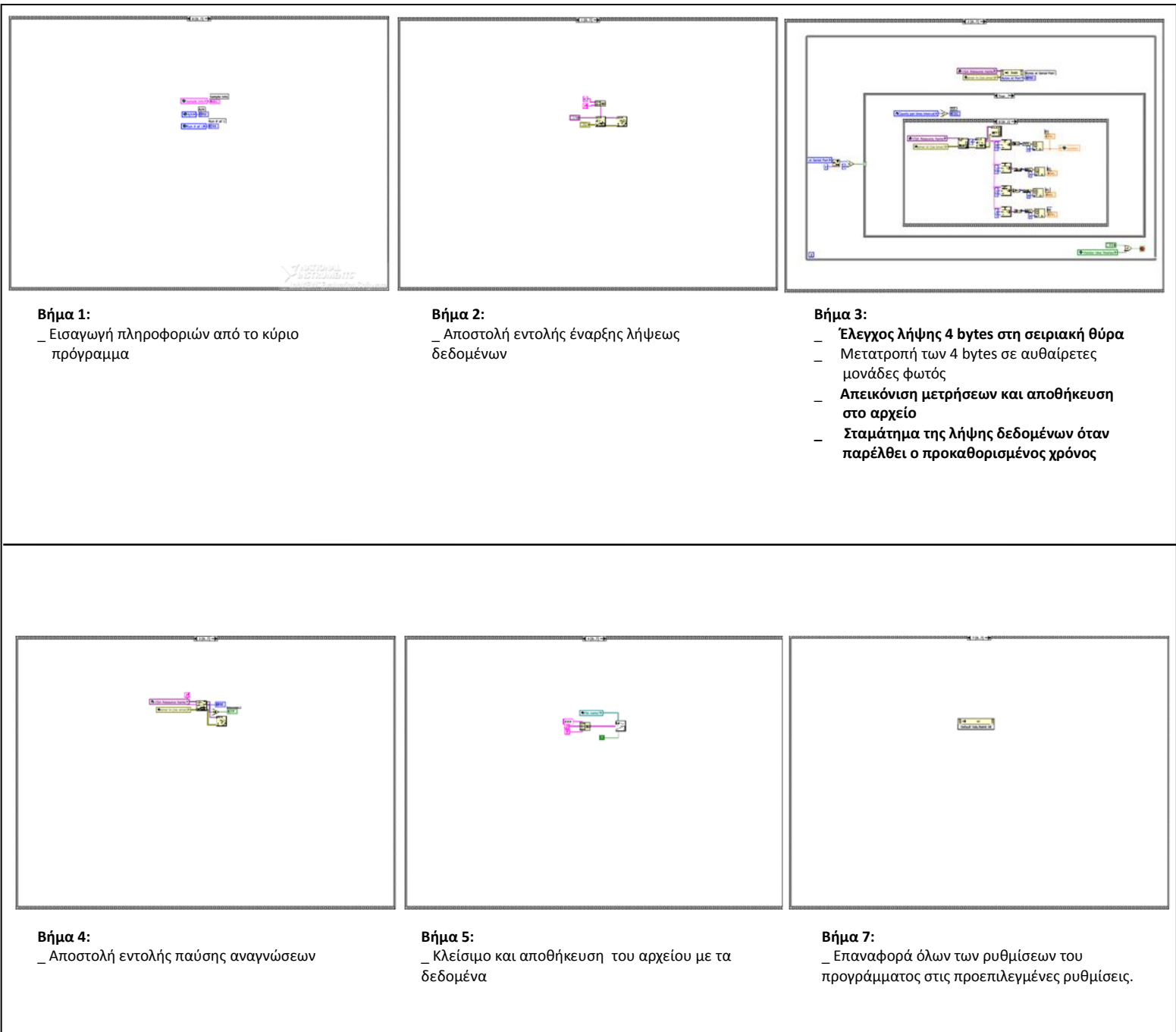
Σχήμα 47: Εμπρόσθιο πλαίσιο της υπορουτίνας λήψης δεδομένων, που αναπτύχθηκε για την μέτρηση H_2O_2 .

Στο εμπρόσθιο πλαίσιο αυτής της υπορουτίνας εμφανίζεται γράφημα, που δείχνει τις μετρήσεις που λαμβάνονται από τον φωτοπολλαπλασιαστή σε μονάδες σχετικού αριθμού φωτονίων συναρτήσει του χρόνου. Επίσης εμφανίζονται σε αυτό διάφοροι δείκτες που μας πληροφορούν για χρήσιμες πληροφορίες που έχουν ρυθμιστεί στο κύριο πρόγραμμα, όπως: α) πληροφορίες που αφορούν το δείγμα (*Sample Info*), β) τον αύξοντα αριθμό δείγματος (*A/A*), γ) τον αύξοντα αριθμό επανάληψης μέτρησης του ίδιου δείγματος (*Run # of n*), δ) τον σχετικό αριθμό φωτονίων, που μετρήθηκε σε κάθε χρονικό διάστημα (*Photon counts per time interval*) και ε) πλήθος αναγνώσεων σε κάθε χρονικό διάστημα (*Counts per time interval*). Τέλος στο εμπρόσθιο πλαίσιο υπάρχει και διακόπτης παύσης λειτουργίας της υπορουτίνας, όπως και φωτεινός δείκτης, που δείχνει πότε σταματά η λήψη μετρήσεων από τον φωτοπολλαπλασιαστή. Αυτό συμβαίνει όταν πατηθεί το κουμπί σταματήματος ή όταν παρέλθει ο ρυθμισμένος χρόνος μέτρησης, που έχει τεθεί στο κύριο πρόγραμμα.

Το λογικό διάγραμμα της υπορουτίνας αυτής απεικονίζεται στο σχήμα 48. Παράλληλα με αυτό παρατίθεται στο σχήμα 49 και ο κώδικας του προγράμματος για καλύτερη επεξήγηση.



Σχήμα 48: Λογικό διάγραμμα της υπορουτίνας λήψης δεδομένων για ανάλυση H_2O_2 .



Σχήμα 49: Κώδικας της υπορουτίνας λήψης δεδομένων για ανάλυση H₂O₂.

3.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ-ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΣΧΕΔΙΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ H₂O₂ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ

3.4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τελευταία δεκαετία εμφανίζει αυξανόμενο ενδιαφέρον στη χρήση Συμπυκνώματος Εκπνεόμενου Αέρα (Exhaled Breath Condensate, EBC), ως μέσο για εξαγωγή χρήσιμων κλινικών πληροφοριών, οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε διάγνωση και θεραπεία των ασθενειών του πνεύμονα^{138,139}. Αυτό βέβαια είναι ένα γεγονός που εξηγείται, αν αναλογιστεί κάποιος τη σύσταση του EBC. Αν και αποτελείται κατά κύριο λόγο από νερό, το EBC περιέχει διαλυμένες μη πτητικές ουσίες, ανάμεσα στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και οι ακόλουθες: κυτοσίνες, λιπίδια, επιφανειοδραστικές ουσίες, ιόντα, προϊόντα οξειδωσης, αδενοσίνη, ισταμίνη, ακετυλοχολίνη και σεροτονίνη. Επίσης το EBC περιέχει και ενώσεις εν δυνάμει πτητικές, όπως: αμμωνία, υπεροξείδιο του υδρογόνου και αιθανόλη, καθώς και πτητικές οργανικές ενώσεις¹³⁹. Τέτοιες ενώσεις είναι προϊόντα ή παραπροϊόντα πρωτεϊνών, DNA και προϊόντα ή παραπροϊόντα οξειδωσης λιπιδίων, τα οποία συντίθενται μέσω αντιδράσεων που παράγονται από Ενεργά Οξυγονούχα Είδη (Reactive Oxygen Species, ROS), ενώ παράλληλα η παρουσία τους υποδηλώνει συσσώρευση οξειδωτικού στρες στον οργανισμό¹⁴⁰.

Έχουν μετρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις ROS στο EBC, που συλλέγεται από ασθενείς με διάφορες πνευμονικές ασθένειες, όπως: άσθμα, σύνδρομο αναπνευστικής ανεπάρκειας, ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, πνευμονία, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), κυστική ίνωση, βρογχεόσταση, καρκίνο των πνευμόνων και συστημακή φλεγμονή¹³⁸⁻¹⁴⁴. Τα προφίλ συγκέντρωσης των ανιχνευμένων ουσιών επιδεικνύουν διακυμάνσεις, οι οποίες αντικατοπτρίζουν την σοβαρότητα του οξειδωτικού στρες και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν κλινικά για διαγνωστικούς σκοπούς.

Με την ίδια φιλοσοφία, οι μέθοδοι που βασίζονται στο EBC, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ένας μη επεμβατικός τρόπος γρήγορης, ασφαλούς και οικονομικά αποτελεσματικής ιατρικής διάγνωσης, όπως και σαν ένα εργαλείο έρευνας, ως προς την αναγνώριση ωφελειών που θα μπορούσαν να έχουν οι ασθενείς από τη λήψη μιας αντιοξειδωτικής ουσίας ή εφαρμογή μιας αντιφλεγμονώδους θεραπείας¹⁴⁵. Μία περαιτέρω χρήση περιλαμβάνει τον έλεγχο ανταπόκρισης σε θεραπείες¹⁴⁶ και την αποδοτικότητα νέων φαρμάκων, μέσω μέτρησης της πτώσης συγκέντρωσης κάποιας ουσίας δείκτη μετά την παρακολούθηση μιας θεραπευτικής αγωγής.

Το γεγονός πως το EBC αποτελεί έναν τομέα με μεγάλο ενδιαφέρον, οδηγεί σε μία συνεχή έρευνα για νέα βιομόρια, τα οποία θα έχουν κλινική αξία. Ο κύριος στόχος εύρεσης τέτοιων μορίων είναι η συσχέτιση της ύπαρξής τους με υπάρχουσες και διαγνωσθείσες

ασθένειες¹⁴⁷. Ένα καλό παράδειγμα ενός τέτοιου βιομορίου είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο μπορεί να αποτελέσει έναν σπουδαίο δείκτη της ύπαρξης οξειδωτικού στρες στους πνεύμονες. Βέβαια, είναι φυσικό να καταλάβει κανείς, πως το εύρος των κλινικών εφαρμογών με έναν τέτοιο δείκτη είναι μεγάλο, καθώς το οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται σε πολλές διαφορετικές ασθένειες. Ανεβασμένα επίπεδα υπεροξειδίου μπορεί κάποιος να βρει σε EBC από ασθενείς με: βρογχέοσταση¹⁴⁸, οξύ σύνδρομο αναπνευστικής ανεπάρκειας¹⁴⁹, κοινό κρυολόγημα¹⁵⁰, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια¹⁵¹, άσθμα¹⁵², συστηματική σκλήρυνση¹⁵³, ουραιμία¹⁵⁴ και μη νοσοκομιακής προέλευσης πνευμονίες¹⁵⁵. Τα επίπεδα σε αυτούς τους ασθενείς κυμαίνονται από 10 nmol/L έως 10 μmol/L.

Τα προαναφερθέντα όρια συγκεντρώσεων υπεροξειδίου είναι πολύ χαμηλά και η ανίχνευση σε τέτοια όρια πραγματοποιείται συνήθως μέσω φθορισμού ή χημειοφωταύγειας. Οι περισσότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία για ανίχνευση υπεροξειδίου του υδρογόνου σε EBC ασθενών ή υγρών υποκειμένων, βασίζονται σε ανίχνευση μέσω φθορισμού¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στην καταλυτική, με υπεροξειδάση, αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με κατάλληλα υποστρώματα, ώστε να αποδοθεί ένα φθορίζον διμερές. Καθόσον αφορά την χημειοφωταύγεια, μόνο μια μέθοδος έχει αναπτυχθεί για ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε EBC¹⁵⁹. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην καταλυτική αντίδραση της λουμινόλης με υπεροξειδίο του υδρογόνου, παρουσία υπεροξειδάσης. Εκτός από τις προαναφερθείσες μεθόδους, πρέπει να προστεθεί στον κατάλογο και μια φασματοφωτομετρική μέθοδος που υπάρχει, η οποία έχει αναπτυχθεί πλήρως, αν και δεν χρησιμοποιείται πολύ¹⁶⁰. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου με 3, 3', 5, 5'-τετραμεθυλοβενζινιδίνη, με την καταλυόμενη δράση της υπεροξειδάσης, ώστε να παραχθεί έγχρωμο προϊόν.

Όλες οι προαναφερθείσες μέθοδοι είναι χρονοβόρες, ενώ ταυτόχρονα κάποιες απαιτούν και μακροσκελή στάδια προετοιμασίας αντιδραστηρίων. Αυτά τα μειονεκτήματα θα μπορούσαν να αποφευχθούν με την χρήση τεχνικών αυτοματοποίησης. Αυτό το γεγονός αναγνωρίστηκε και έτσι οδηγηθήκαμε στην ανάπτυξη μιας μεθόδου εισαγωγής δείγματος σε ροή με ανίχνευση φθορισμού¹⁶¹. Σε αυτή τη μέθοδο ο αυτοματισμός χρησιμοποιήθηκε μόνο σαν για την μεταφορά των αντιδραστηρίων στον ανιχνευτή. Η χημική παραγωγοποίηση για δημιουργία φθορίζοντος παραγώγου προς μέτρηση γινόταν χειροκίνητα.

Βασιζόμενοι στις προόδους που προαναφέραμε στοχεύσαμε στην ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα αυτοματοποιούσε την παραγωγοποίηση, σε συνδυασμό με χημειοφωταυγή ανίχνευση ώστε να πετύχουμε πλήρη αυτοματοποίηση και υψηλές ταχύτητες ανάλυσης. Επιπρόσθετα αναπτύχθηκε κινητή συσκευή συμπυκνώσεως για συλλογή EBC, για χρήση από νοσοκομειακό προσωπικό, σαν εναλλακτική πρόταση ανάμεσα στις υπάρχουσες μεθόδους, έτσι ώστε να παρέχουμε ολοκληρωμένο σύστημα συλλογής και ανάλυσης με απλή και φθηνή κατασκευή.

3.4.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

3.4.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εφαρμογή του αυτοσχέδιου αναλυτή για μέτρηση H_2O_2 σε EBC είναι τα ακόλουθα:

- **Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)**, 30% σε υδατικό διάλυμα, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, από την εταιρεία Merck.
- **Λουμινόλη (Luminol)**, 97%, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, από την εταιρεία Sigma-Aldrich.
- **Ομοβανιλλικό οξύ (Homovanillic acid)**, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, από την εταιρεία Sigma-Aldrich.
- **Γλυκίνη (Glycine)**, 99%, για ανάλυση TLC, από την εταιρεία Sigma-Aldrich.
- **Αιθυλενοδιάμινο-τετρα-οξικό οξύ (EDTA)**, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, από την εταιρεία Serva.
- **Υπεροξειδάση (horseradish peroxidase, HRP)**, από την εταιρεία Serva.
- **Εξαϋδρικό νιτρικό κοβάτιο (II) ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)**, 98%, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, από την εταιρεία Fluka.
- **Το νερό που χρησιμοποιήθηκε** ήταν υπερκάθαρο νερό αντίστροφης όσμωσης, από το σύστημα καθαρισμού νερού Milli-Q της Millipore.
- Όλα τα άλλα αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων (και αναφέρονται παρακάτω), ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας:
 - **Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3)**, 0,1 mol/L, pH=10,3.
 - **Διάλυμα παρακαταθήκης λουμινόλης** 10 mmol/L ρυθμιστικού ανθρακικού νατρίου pH=9,0.
 - **Διάλυμα παρακαταθήκης κοβαλτίου Co (II)** 1,0 mmol/L.
 - **Διάλυμα παρακαταθήκης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)** 2,5 mol/L.
- Όλα τα παραπάνω διαλύματα διατηρούνταν στους $+4^\circ\text{C}$, μέχρι την χρήση.
- Τα διαλύματα εργασίας (λουμινόλης σε ρυθμιστικό και κοβαλτίου σε νερό), καθώς και τα πρότυπα διαλύματα υπεροξειδίου σε νερό προετοιμάζονταν ημερησίως.

3.4.2.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

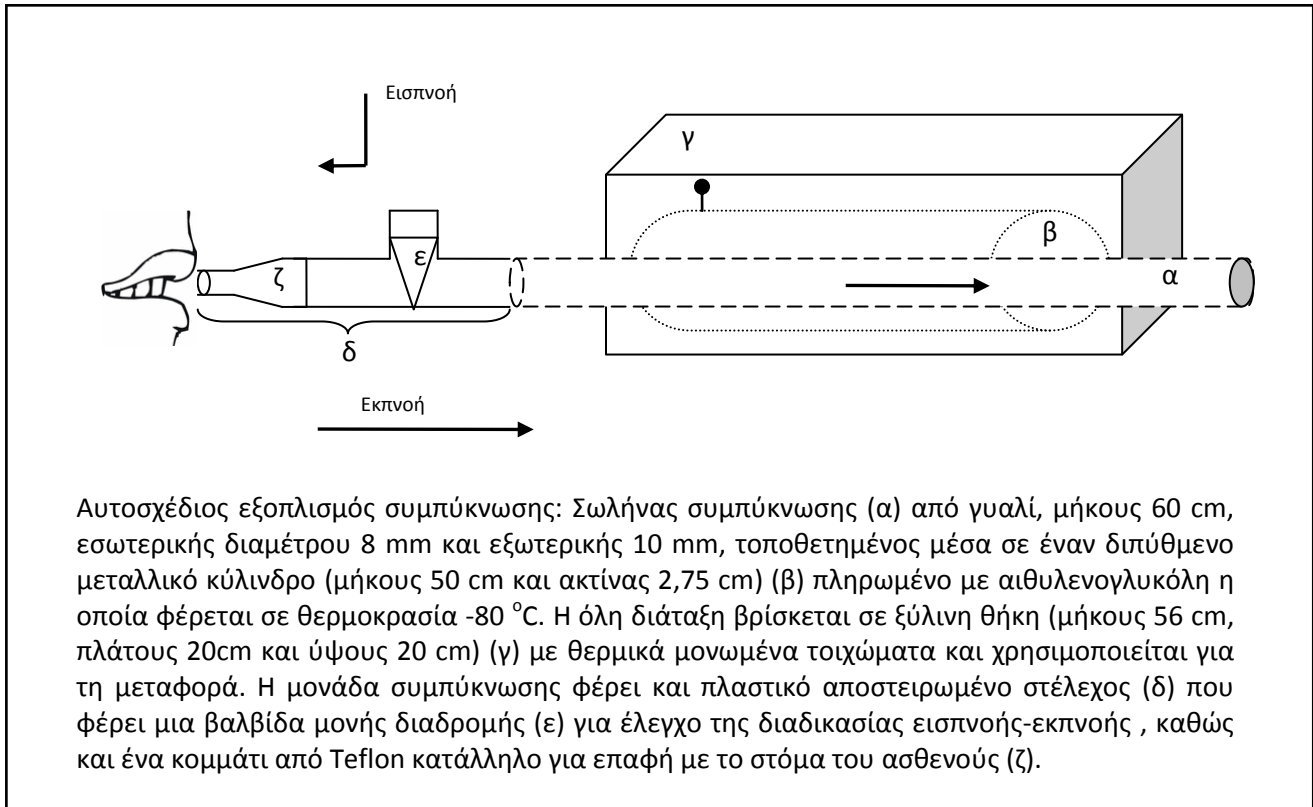
Δείγματα EBC ελήφθησαν από ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (n=4), με βρογχικό άσθμα (n=1) και με πνευμονία σε συνδυασμό με έμφραγμα του μυοκαρδίου (n=1). Οι ασθενείς νοσηλεύονταν στο Πνευμονολογικό Τμήμα (n=2), όπως και στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (n=4) του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Σωτηρία». Οι συμμετέχοντες ή οι συγγενείς τους έδωσαν τη συναίνεσή τους για συμμετοχή στην έρευνα, μετά από σχετική ενημέρωση, σχετικά με τις διαδικασίες που θα ακολουθούσαν και σχετικά με τον σκοπό της έρευνας.

3.4.2.3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗΣ

Ο εξοπλισμός συμπύκνωσης του EBC φαίνεται στο σχήμα 50. Ο εξοπλισμός είναι τοποθετημένος σε μία ξύλινη θήκη, η οποία είναι μονωμένη με fiberglass. Ο μεταλλικός κύλινδρος, ο οποίος είναι διπύθμενος και παραγεμισμένος με προπυλενογλυκόλη όγκου ~1 L και διατηρείται στους -80°C. Ο σωλήνας συμπύκνωσης, που είναι φτιαγμένος από γυαλί, τοποθετείται διαμέσου του διπύθμενου μεταλλικού κυλίνδρου, αφήνοντας τα δυο του άκρα να εξέχουν κατά 5 cm σε κάθε πλευρά της θήκης. Σωλήνας Teflon κατάλληλα διαμορφωμένος για επαφή με το στόμα συνδέεται μέσω βαλβίδας μονής διαδρομής με την μια πλευρά του σωλήνα συμπύκνωσης.

Ο κύριος στόχος μιας τέτοιας κατασκευής είναι να επιτρέπει ομαλή αναπνοή και ταυτόχρονα να κατευθύνει τον εκπνεόμενο αέρα στον σωλήνα συμπύκνωσης. Τα πλαστικά τμήματα είναι μιας χρήσης και αποστειρωμένα. Για αποφυγή επιμολύνσεων, είναι επιβεβλημένη η έκπλυση του σωλήνα συμπύκνωσης με αντιβακτηριδιακό διάλυμα και αποστειρωμένο νερό μετά την χρήση, καθώς και η αποστείρωσή του πριν την δειγματοληψία.

Οι ασθενείς ενημερώνονται πριν από κάθε δειγματοληψία, ότι πρέπει να αναπνέουν κανονικά διαμέσου του κομματιού Teflon. Η διαδικασία εισπνοής-εκπνοής διαρκεί περίπου 20 λεπτά, κατά την διάρκεια των οποίων η μύτη των ασθενών φέρει τσιμπιδάκι μύτης, το οποίο εμποδίζει την αναπνοή διαμέσου της ρινικής οδού. Κατά την διαδικασία αναπνοής, ο μεταλλικός κύλινδρος παγώνει τον γυάλινο σωλήνα και προκαλεί συμπύκνωση και πάγωμα του εκπνεόμενου αέρα. Έτσι το EBC παγιδεύεται μέσα στον γυάλινο σωλήνα σαν πάγος. Η διαδικασία συλλογής τελειώνει με την αφαίρεση του σωλήνα, ο οποίος σφραγίζεται (με parafilm) και φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την ανάλυση. Αμέσως πριν την ανάλυση, πραγματοποιείται απόψυξη των δειγμάτων που βρίσκονται μέσα στους σωλήνες (σε θερμοκρασία δωματίου) και συλλογή του EBC σε ένα στείρο γυάλινο δοχείο (vial).



Σχήμα 50: Φορητό σύστημα συμπύκνωσης που αναπτύχθηκε για την μελέτη.

Η αποδοτικότητα της συλλογής EBC εξετάστηκε με σύνδεση του εξοπλισμού συμπύκνωσης με έναν νοσοκομειακό νεφελοποιητή υπερήχων, ο οποίος περιείχε 30 mL φυσιολογικού ορού για προσομοίωση της αναπνοής. Η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε με ζύγισμα του νεφελοποιητή (δοχείο + διάλυμα φυσιολογικού ορού) καθώς επίσης και του υάλινου σωλήνα του εξοπλισμού συμπύκνωσης πριν και μετά την συλλογή EBC, έτσι ώστε να συγκριθεί η διαφορά βάρους με το βάρος του συλλεχθέντος EBC. **Η αποδοτικότητα της συλλογής με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκε στο 86%.** Το μήκος του πλαστικού και αποστειρωμένου τμήματος (τμήμα δ, σχήμα 50) ήταν 15 cm.

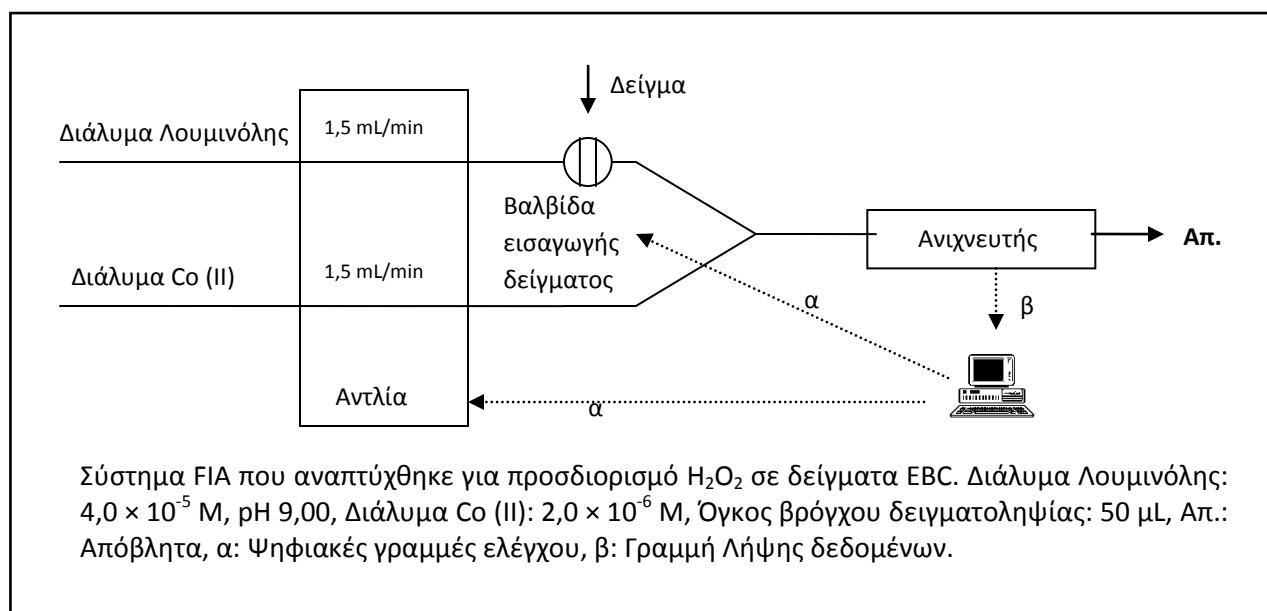
Το συλλεχθέν EBC από πλευράς όγκου πλησιάζει τα 2-3mL, για κάθε 20 λεπτά εισπνοής-εκπνοής του ασθενούς. Η συγκέντρωση τέτοιων όγκων, σε αναλογία με τον όγκο του σωλήνα συλλογής (που πλησιάζει τα 100 mL), βεβαιώνει την ελεύθερη διέλευση αερίων, χωρίς να μπλοκάρεται ο σωλήνας συλλογής από τα παγωμένα δείγματα EBC.

Ο εξοπλισμός συλλογής που αποθηκεύεται στους -80°C πριν την χρήση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μία ώρα για λήψη EBC, εφόσον βγει από την κατάψυξη. Σε αυτό το διάστημα, η θερμοκρασία στο εσωτερικό του ξύλινου περιέκτη διατηρείται κάτω από -5°C. Πάνω από αυτή τη θερμοκρασία η συμπύκνωση δεν είναι ικανοποιητική και απαιτείται επανακατάψυξη για 1-2 ώρες πριν την επαναχρησιμοποίηση.

Τα κύρια πλεονεκτήματα του αυτοσχέδιου εξοπλισμού είναι η απλότητα κατασκευής, η καλή απόδοση συλλογής που πετυχαίνεται (86%), η φορητότητα και ο μεγάλος σχετικά χρόνος χρησιμοποίησης μετά την απομάκρυνση από την κατάψυξη (1 h, που επιτρέπει συλλογή τριών δειγμάτων).

3.4.2.4. ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε βασίζεται στον αναλυτή FIA που παρουσιάστηκε διεξοδικά στα εδάφια 3.1-3.3 και φαίνεται στο σχήμα 51.



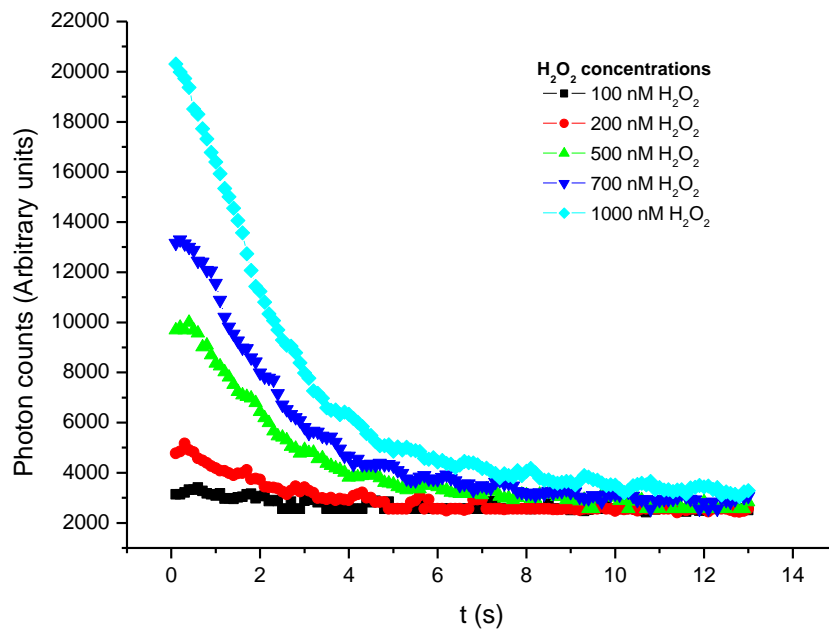
Σχήμα 51: Αναλυτής FIA που κατασκευάστηκε για προσδιορισμό H_2O_2 .

Ο αναλυτής FIA ενσωματώνει: **περισταλτική αντλία της εταιρείας Ismatech (IPC-8) για προώθηση των αντιδραστηρίων, βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή της εταιρείας Vici AG International (C22Z-3186E) για εισαγωγή των δειγμάτων EBC στην ροή των αντιδραστηρίων, ανιχνευτή της εταιρείας Hamamatsu (HC-135 01) και αυτοσχέδια κυψελίδα ροής (σχήμα 33) για προώθηση του μίγματος της αντίδρασης και μέτρηση της ακτινοβολίας χημειοφωταύγειας, που παράγει το χημικό σύστημα αντιδραστηρίων-δείγματος.** Οι παράμετροι του συστήματος είναι :

- Διάλυτοι: **PTFE, εξωτερικής διαμέτρου 1,6 mm και εσωτερικής 0,5 mm.**
- Όγκος βρόγχου δειγματοληψίας: **50 μ L**
- Ταχύτητα ροής αντιδραστηρίων: **1,5 mL/min.**

- Μήκος σπειράματος αντίδρασης (μεταξύ του σημείου που τα δύο ρεύματα συναντούνται και του του ανιχνευτή): **7 cm**. Το μήκος αυτό ήταν το ελάχιστο δυνατό μήκος, το οποίο επέτρεπε ανίχνευση στον αυτοσχέδιο αναλυτή FIA.
- Έλεγχος και λήψη δεδομένων: **μέσω αυτοσχέδιου προγράμματος της γλώσσας Labview** (εδάφιο 3.3.4).

Τα δείγματα EBC εισάγονται σε ρεύμα λουμινόλης το οποίο ακολούθως συναντά ρεύμα Co (II). Το Co (II) είναι καταλύτης στην χημειοφωταυγή αντίδραση της λουμινόλης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου που περιέχεται στα δείγματα EBC ασθενών. Η εν λόγω αντίδραση λαμβάνει χώρα μέσω μηχανισμού που εμπλέκει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών και τη διέγερση του προϊόντος αντίδρασης¹⁶². Το διεγερμένο προϊόν επιστρέφει στην βασική ενεργειακή κατάσταση εκπέμποντας φωτόνια, τα οποία μετρώνται από τον ανιχνευτή και καταγράφονται με το πρόγραμμα Labview, οπότε λαμβάνουμε θετικές κορυφές απαρίθμησης φωτονίων. Τέτοιες κορυφές απεικονίζονται στο σχήμα 52. Η αναλυτική πληροφορία είναι το ύψος κορυφής και η γραμμή βάσης υπολογίζεται από το τυφλό δείγμα που λαμβάνεται με εισαγωγή στην ροή υπερκάθαρου ύδατος.



Σχήμα 52: Κορυφές που λαμβάνονται κατά την ανάλυση H₂O₂, με πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Η μορφή των καμπυλών που λαμβάνονται οφείλεται στην μεγάλη ταχύτητα της αντίδρασης που επιτρέπει την καταγραφή μόνο του κατερχόμενου τμήματος. Είναι προφανές ότι στην δια χειρός ανάλυση δεν θα ήταν δυνατή η μέτρηση σήματος αφού αυτό θα είχε εξαφανιστεί αμέσως μετά την ανάμειξη του δείγματος με τα αντιδραστήρια.

Η νέα αυτοματοποιημένη μέθοδος που αναπτύχθηκε συγκρίνεται με την αρκετά χρησιμοποιούμενη μέθοδο των Ruch et al.¹⁶³ για ανάλυση H₂O₂ σε δείγματα EBC, όπως αυτή τροποποιήθηκε από τους Nowak et al.¹⁵¹. Για να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός με την προαναφερθείσα συγκριτική μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε το φθορισμοφασματοφωτόμετρο Jobin Yvon fluorolog-3. Αυτό ενσωματώνει διπλό μονοχρωμάτωρα. Για τις μετρήσεις με αυτό το όργανο χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ρυθμίσεις:

- Πλάτος σχισμής μονοχρωμάτωρα για διέγερση: **2nm**.
- Πλάτος σχισμής μονοχρωμάτωρα για εκπομπή: **2nm**.
- Βήμα λήψης δεδομένων: **1 nm**.
- Χρονισμός λήψης μετρήσεων: **0,3 sec**.
- Κυψελίδα: **Υαλου quartz 1,4 mL**.

3.4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.4.3.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

Η παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης H₂O₂ στα δείγματα EBC ήταν το ύψος των κορυφών. Το ύψος των κορυφών είναι συνάρτηση της διασποράς του δείγματος μέσα στα αντιδραστήρια και εξαρτάται από τη γεωμετρία της ροής, από τον όγκο δείγματος και από την ταχύτητα ροής των αντιδραστηρίων (εδάφιο 2.3.2). Το ύψος συνδέεται επίσης με την κινητική της αντίδρασης⁶⁶, η οποία επηρεάζεται από παραμέτρους όπως η συγκέντρωση, το pH και η ιονική ισχύς των ρευμάτων με τα αντιδραστήρια.

Υπό αυτό το πρίσμα, η βελτιστοποίηση επικεντρώθηκε στον έλεγχο δύο βασικών παραμέτρων που επηρεάζουν την διασπορά: τον όγκο δείγματος μέσω αλλαγής του βρόγχου δείγματος και την ταχύτητα ροής των αντιδραστηρίων με σταθερή γεωμετρία του συστήματος.

Παράλληλα η βελτιστοποίηση επικεντρώθηκε και στον έλεγχο δύο βασικών παραμέτρων που επηρεάζουν την κινητική: τη συγκέντρωση λουμινόλης και τη συγκέντρωση του καταλύτη Co (II) με σταθερό το pH και την ιονική ισχύ και στα δύο ρεύματα. Για καλύτερη και επαναλήψιμη ανάμειξη χρησιμοποιήθηκε αναλογία ροής 1:1 σε όλες τις μετρήσεις.

3.4.3.1.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ Co (II)

Η διαδικασία βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης Co (II) περιελάμβανε μετρήσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου διάφορων συγκεντρώσεων, προς λήψη καμπυλών αναφοράς, με χρήση διαλυμάτων Co (II) διαφορετικών συγκεντρώσεων. Αυτή η βελτιστοποίηση είναι μονοπαραγοντική και πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες ρυθμίσεις:

- Σταθερός όγκος δείγματος βρόγχου: **50μL**.
- Σταθερή συγκέντρωση λουμινόλης: **$7,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$** .
- Σταθερές ταχύτητες ροής αντιδραστηρίων: **1,5 mL/min**.

Η επίδραση της συγκέντρωσης Co (II) στα χαρακτηριστικά μεγέθη της καμπύλης αναφοράς, που λαμβάνεται από δείγματα υπεροξειδίου του υδρογόνου, φαίνεται στον πίνακα 7. Αν και η μέγιστη ευαισθησία παρατηρείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης Co (II) στα $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, επιλέγουμε ως βέλτιστη συγκέντρωση τα $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, καθώς αυτή η συγκέντρωση παρέχει μεγαλύτερη περιοχή γραμμικότητας, ιδίως σε περιοχές με χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτή δε η παράμετρος είναι πολύ σημαντική να ληφθεί υπ' όψιν, γιατί τα δείγματα που θα αναλυθούν (EBC ασθενών) περιέχουν υπεροξείδιο του υδρογόνου, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται πολύ κοντά στο όριο ανίχνευσης που βρίσκεται στο κάτω μέρος της γραμμικής περιοχής.

Πίνακας 7: Επίδραση της συγκέντρωσης Co (II) στα χαρακτηριστικά μεγέθη της καμπύλης αναφοράς υπεροξειδίου του υδρογόνου

Συγκέντρωση Co (II) (μM)	Κλίση $\pm\text{SD}$ (counts/nM)	r	Όριο ανίχνευσης ^α (nM)
40,0 ^β	68 \pm 4	0,996	30
8,0 ^β	102 \pm 9	0,999	20
5,0 ^β	36 \pm 2	0,996	20
2,0 ^γ	17,8 \pm 0,8	0,997	20

^α Υπολογισμένο σαν τρεις φορές την τυπική απόκλιση του σημείου τομής της καμπύλης, διαιρεμένη με την κλίση της καμπύλης αναφοράς. Γραμμική περιοχή της καμπύλης αναφοράς: ^β 0,5 – 20 μM & ^γ 0,2 – 20 μM .

3.4.3.1.2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΛΟΥΜΙΝΟΛΗΣ

Η διαδικασία βελτιστοποίησης της συγκέντρωσης λουμινόλης περιελάμβανε λήψη καμπυλών αναφοράς με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων λουμινόλης. Αυτή η βελτιστοποίηση είναι επίσης μονοπαραγοντική και πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες ρυθμίσεις:

- Σταθερός όγκος δείγματος βρόγχου: **50 μL** .
- Σταθερή συγκέντρωση Co (II): **2,0 $\times 10^{-6}$ mol/L**.
- Σταθερές ταχύτητες ροής αντιδραστηρίων: **1,5 mL/min**.

Η επίδραση της συγκέντρωσης λουμινόλης στα χαρακτηριστικά μεγέθη της καμπύλης αναφοράς φαίνεται στον πίνακα 8. Εκεί βλέπουμε πως η μέγιστη ευαισθησία, καθώς και το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης παρατηρείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης λουμινόλης στο σύστημα στα **4,0 $\times 10^{-5}$ mol/L**.

Πίνακας 8: Επίδραση της συγκέντρωσης λουμινόλης στα χαρακτηριστικά μεγέθη της καμπύλης αναφοράς υπεροξειδίου του υδρογόνου

Συγκέντρωση λουμινόλης (μM)	Κλίση ±SD (counts/nM)	r	Όριο ανίχνευσης ^α (nM)
70,0 ^β	17,8±0,8	0,997	30
40,0 ^γ	26±1	0,997	30
10,0 ^β	20±1	0,995	40
7,0 ^β	14±1	0,995	60

^α Υπολογισμένο σαν τρεις φορές την τυπική απόκλιση του σημείου τομής της καμπύλης, διαιρεμένη με την κλίση της καμπύλης αναφοράς. Γραμμική περιοχή της καμπύλης αναφοράς: ^β 0,2 – 20 μM & ^γ 0,1 – 20 μM.

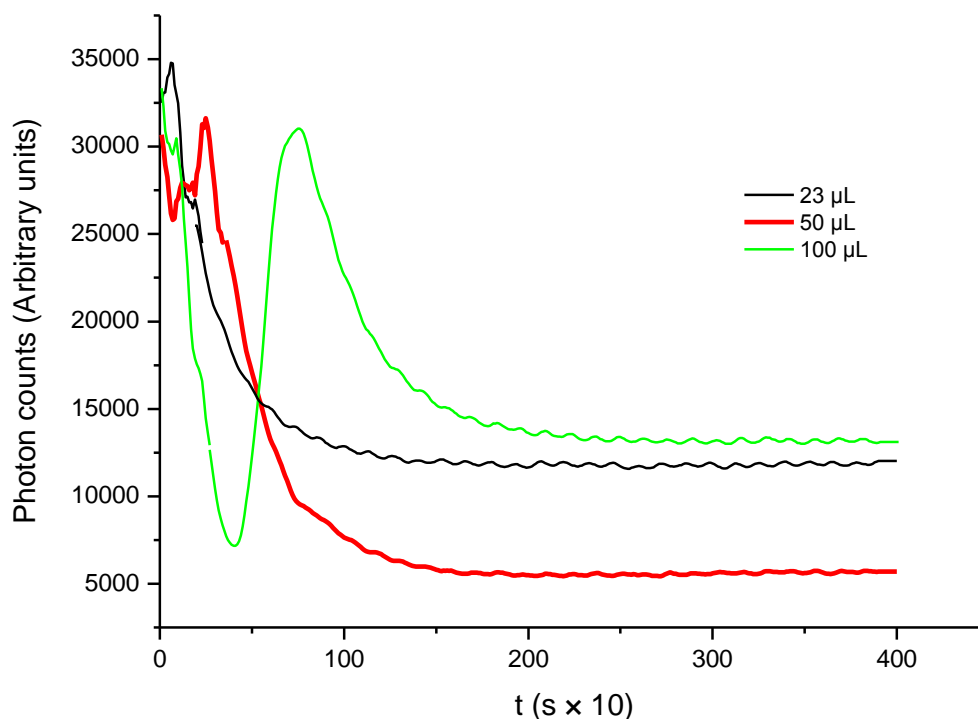
3.4.3.1.3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΟΓΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η διαδικασία βελτιστοποίησης του βρόγχου δείγματος, έγινε με λήψη καμπυλών αναφοράς με χρήση διαφορετικών βρόγχων δειγματοληψίας ενώ οι ταχύτητες ροής των αντιδραστηρίων και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων ήταν σταθερές. Αυτή η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες ρυθμίσεις:

- Συγκέντρωση H₂O₂: $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$.
- Συγκέντρωση Co (II): $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$.
- Συγκέντρωση λουμινόλης: $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.
- Ταχύτητες ροής αντιδραστηρίων: $0,9 \text{ mL/min}$.

Οι όγκοι δείγματος που ελέγχθηκαν ήταν της τάξεως των 23, 50 και 100 μL. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 53. Εκεί βλέπουμε πως ο βέλτιστος όγκος δείγματος είναι τα 50 μL, καθώς αυτός παρέχει το υψηλότερο καθαρό σήμα (καθαρό σήμα = ύψος κορυφής – σήμα βάσης). Στο σχήμα απεικονίζονται επίσης και διπλές κορυφές. Αυτές δημιουργούνται λόγω ανεπαρκούς ανάμειξης δείγματος και αντιδραστηρίων, πράγμα που δημιουργεί η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιδραστηρίων στο κέντρο της ζώνης δείγματος, σε σχέση με την στοιχειομετρικά απαιτούμενη για πλήρη αντίδραση (εδάφιο 2.3.1.2). Αυτό είναι

εμφανέστερο όταν χρησιμοποιείται δείγμα όγκου 100μL. Αντιμετωπίζεται με χρήση σπειράματος ανάμειξης 30 cm, το οποίο τοποθετείται μεταξύ του σημείου που συναντούνται τα δύο ρεύματα και του ανιχνευτή. Σε αυτήν την περίπτωση εξαφανίζονται οι διπλές κορυφές, αλλά έχουμε και ελάττωση ευαισθησίας, καθώς περισσότερο από το 80% της αντίδρασης έχει τελειώσει, μέχρι η ζώνη του δείγματος να φτάσει στην κυψελίδα ροής για ανίχνευση.



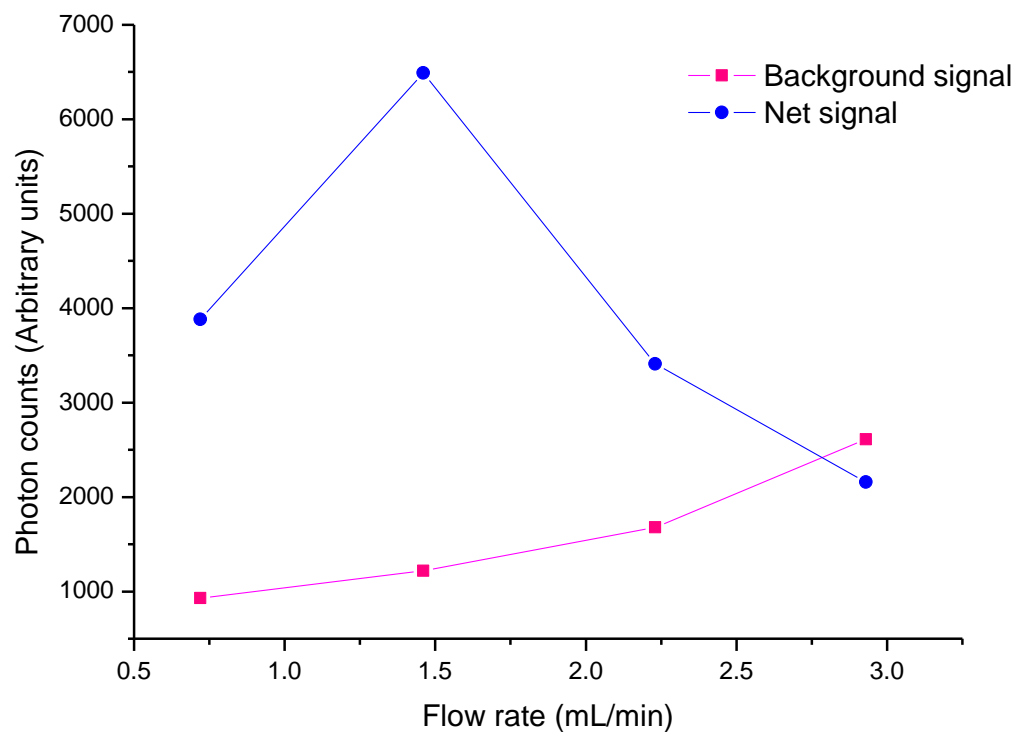
Σχήμα 53: Επίδραση του όγκου δείγματος στις καμπύλες του ανιχνευτή για ανίχνευση H_2O_2 . Συγκέντρωση H_2O_2 : $5,0 \times 10^{-7}$ M, Ταχύτητα ροής αντιδραστηρίων: 1,5 mL/min.

3.4.3.1.4. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΑΧΥΤΗΤΟΣ ΡΟΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Η διαδικασία βελτιστοποίησης της ταχύτητας ροής των αντιδραστηρίων, έγινε με λήψη καμπυλών αναφοράς με χρήση σταθερού όγκου δείγματος και με ροές αντιδραστηρίων 0,75, 1,50, 2,25 και 3,00 mL/min. Αυτή η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες ρυθμίσεις:

- Συγκέντρωση H_2O_2 : $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$.
- Συγκέντρωση Co (II) : $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$.
- Συγκέντρωση λουμινόλης: $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.
- Όγκος βρόγχου δειγματοληψίας: $50 \mu\text{L}$.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 54. Εκεί φαίνεται ότι η βέλτιστη ταχύτητα ροής αντιδραστηρίων είναι τα $1,5 \text{ mL/min}$, καθώς αυτή η ταχύτητα παρέχει το υψηλότερο καθαρό σήμα, σε συνδυασμό με ένα πολύ χαμηλό σήμα υποβάθρου.



Σχήμα 54: Επίδραση της ταχύτητας ροής αντιδραστηρίων στις καμπύλες του ανιχνευτή για ανίχνευση H_2O_2 .

3.4.3.2. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.4.3.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΗΤΡΑΣ (MATRIX EFFECT)

Η επίδραση μήτρας ελέγχθηκε μέσω πειράματος ανάκτησης. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε με χρήση δείγματος EBC, το οποίο δημιουργήθηκε συγκεντρωτικά από τη λήψη EBC από δέκα ασθενείς. Από το δείγμα αυτό παρασκευάστηκαν δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 με προσθήκη διαφορετικών όγκων πρότυπου δ/τος. Αρχικό δείγμα είχε συγκέντρωση (πριν την ενίσχυση με H_2O_2 από εμάς) κάτω από το όριο ανίχνευσης, τόσο με την προταθείσα μέθοδο, όσο και με τη μέθοδο της βιβλιογραφίας^{151,163}. Τα αποτελέσματα από το πείραμα ανάκτησης φαίνονται στον πίνακα 9, όπου φαίνεται ότι η ανάκτηση (%) κυμαίνεται σε ποσοστό $70,1 \pm 6,2$, $n=4$.

Πίνακας 9: Πειράματα ανάκτησης υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δείγμα EBC, που συλέλχθηκε από υγιές άτομο με μηδενική συγκέντρωση H_2O_2 .

Επίπεδο ενίσχυσης	Συγκέντρωση H_2O_2 , μM		Ανάκτηση (%)
	Προστέθηκε	Ανακτήθηκε	
1 ⁿ	0,4	0,3	79,0
2 ⁿ	0,8	0,5	64,9
3 ⁿ	1,4	0,9	68,4
4 ⁿ	1,9	1,3	67,9

3.4.3.2.2. ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Η γραμμικότητα της αναπτυχθείσας μεθόδου εξετάστηκε με εκτέλεση τριπλών επαναληπτικών αναλύσεων σε 7 πρότυπα δείγματα υπεροξειδίου του υδρογόνου και με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν στην περιοχή 200 nmol/L έως 2000 nmol/L. Η καμπύλη αναφοράς που λήφθηκε ήταν γραμμική ($r=0,997$) σε όλη την περιοχή συγκεντρώσεων που μελετήθηκε, ενώ η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς που λήφθηκε ήταν:

$$\text{Σήμα} = (33,1 \pm 1,3)C + (1,9 \pm 1,3) \times 10^2 \text{ (Σχετικές μετρήσεις φωτονίων/nmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2\text{)}.$$

3.4.3.2.3. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε, υπολογίστηκε ως τρεις φορές η τυπική απόκλιση του σήματος του τυφλού, όπως αυτό μετρήθηκε με δέκα μετρήσεις προτύπου διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 200 nmol/L, διαιρεμένη με την κλίση της καμπύλης αναφοράς. Σημειώνεται ότι το τυφλό υπολογίζεται ταυτόχρονα με την μέτρηση κάθε δείγματος από το οριζόντιο τμήμα της καμπύλης, αυτό που καταγράφεται κατά την έκπλυση του δείγματος από τον αναλυτή. **Το όριο ανίχνευσης βρέθηκε ότι είναι τα 10 nmol/L.** Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου υπολογίστηκε ως δέκα φορές η τυπική απόκλιση του σήματος του τυφλού, όπως αυτό μετρήθηκε με δέκα μετρήσεις προτύπου διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου συγκέντρωσης 200 nmol/L, διαιρεμένη με την κλίση της καμπύλης αναφοράς. **Το όριο ποσοτικοποίησης βρέθηκε ότι είναι τα 35 nmol/L.**

3.4.3.2.4. ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η επαναληπτικότητα εκτιμήθηκε με δέκα μετρήσεις καθενός από τα ακόλουθα πρότυπα διαλύματα: 200 nmol/L, 700 nmol/L και 2000 nmol/L και βρέθηκε 5,2, 6,0 και 3,3 % RSD, αντίστοιχα.

3.4.3.2.5. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η ακρίβεια της μεθόδου που αναπτύχθηκε, καθορίστηκε με σύγκριση με τη μέθοδο των Ruch et al.¹⁶³, όπως αυτή τροποποιήθηκε από τους Nowak et al.¹⁵¹. Αυτή η μέθοδος επιλέχθηκε, ως η πλέον χρησιμοποιούμενη στη βιβλιογραφία, για προσδιορισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δείγματα EBC. Τα αποτελέσματα αναλύσεων σε δείγματα EBC φαίνονται στον πίνακα 10, όπου επιδεικνύεται καλή συμφωνία των δύο μεθόδων μεταξύ τους. Η δοκιμασία t κατά ζεύγη (paired t-Test) ανάμεσα στις δύο μεθόδους δείχνει ότι δίνουν ισοδύναμα αποτελέσματα ($P > 0,001$). Περαιτέρω οι μέθοδοι σχετίζονται γραμμικά με κλίση $0,76 \pm 0,16$, $r = 0,94$.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα που ελήφθησαν από αναλύσεις EBC ασθενών

Ασθενής #	Συγκέντρωση H ₂ O ₂ , μM		% Σχετική Διαφορά
	Μέθοδος FIA που αναπτύχθηκε	Φθορισμομετρική μέθοδος των Nowak et al. ¹⁵¹	
1 ^α	1,52	1,28	19
2 ^β	1,13	1,09	4
3 ^β	1,26	1,07	18
4 ^β	1,56	1,41	11
5 ^γ	1,56	1,39	12
6 ^β	- ^δ	0,025	- ^δ

Ασθενείς πάσχοντες από: ^α βρογχικό άσθμα, ^β χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Χ.Α.Π.), ^γ πνευμονία σε συνδυασμό με έμφραγμα του μυοκαρδίου.

^δ Κάτω από το όριο ανίχνευσης.

3.4.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο φορητός εξοπλισμός που αναπτύχθηκε, παρέχει τη δυνατότητα για έλεγχο της κατάστασης υγείας ασθενών δίπλα στο κρεβάτι νοσηλείας τους. Ταυτόχρονα, ο συνδυασμός της τεχνικής FIA με χημειοφωταυγή μέθοδο ανίχνευσης έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού υπεροξειδίου του υδρογόνου κατάλληλης για αυτόματη μέτρηση των χαμηλών επιπέδων H₂O₂ που αναμένονται σε δείγματα EBC. Η αναπτυχθείσα μέθοδος

παρουσιάζει καλή συμφωνία με την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για αυτό το δείγμα και χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά χαμηλό όριο ανίχνευσης των 10 nmol/L.

Αν κάποιος αναλογιστεί τα πιο πάνω πλεονεκτήματα, σε συνδυασμό και με τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της αναπτυχθείσας μεθόδου (Γραμμικότητα, $r=0,997$ και επαναληπτικότητα καλύτερη από 6,0% RSD), είναι φανερό πως μπορεί πολύ εύκολα να συμπεράνει, πως μια τέτοια μέθοδος θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των κλινικών ιατρών.

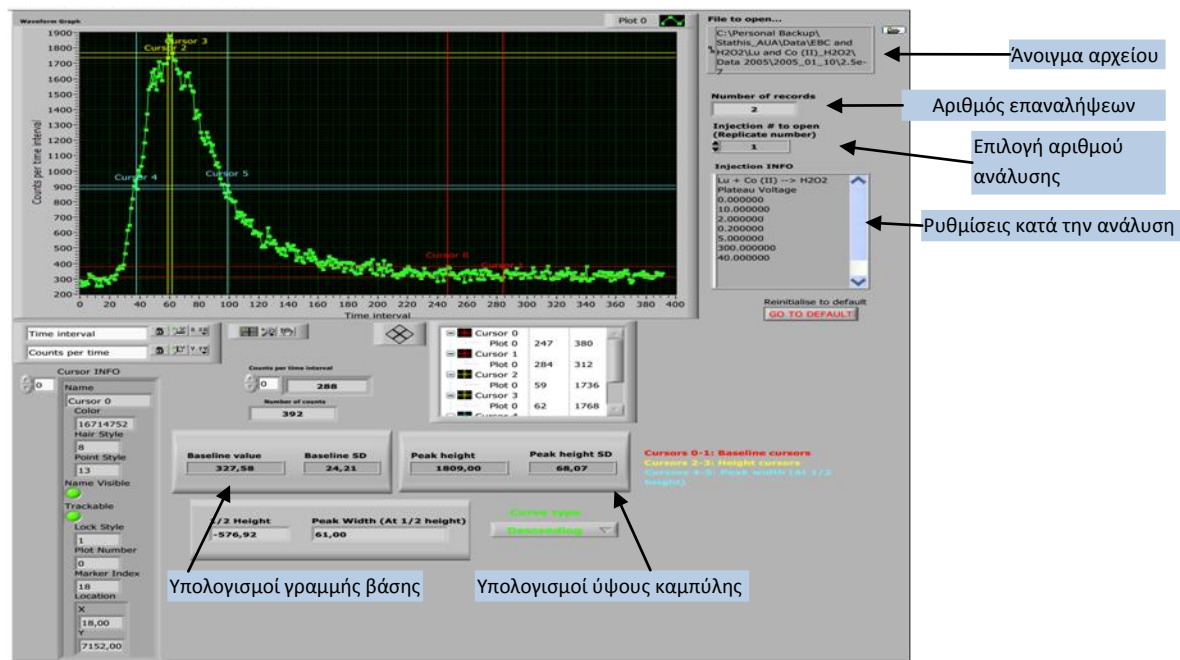
Κάποια σημεία της μεθόδου που χρίζουν ειδικής αναφοράς είναι τα ακόλουθα: α) η μέθοδος που αναπτύχθηκε επιτρέπει ταχύτητα ανάλυσης 180 δειγμάτων την ώρα, β) η μέθοδος είναι πλήρως αυτοματοποιημένη και ξεπερνά τα προβλήματα που παρουσιάζει η διαχειρός εκτελούμενη αναλυτική μέθοδος, τα οποία αφορούν τη δημιουργία μη ανιχνεύσιμων παραπροϊόντων με επακόλουθη μείωση του αναλυτικού σήματος. Τα παραπροϊόντα σχηματίζονται κατά την αντίδραση σχηματισμού ανιχνεύσιμου παραγώγου και οφείλονται σε ανεπαρκή έλεγχο των συνθηκών αντίδρασης, που παρουσιάζει μέθοδος που δημοσιεύθηκε στο ίδιο χρονικό πλαίσιο με την παρούσα μέθοδο¹⁶¹. **Το γεγονός αυτό ανοίγει τον δρόμο και για on-line μέτρηση EBC και μάλιστα σε πραγματικό χρόνο.** Μια τέτοια εξέλιξη θα απαιτούσε και κατάλληλη σύνδεση του αναλυτή με την διάταξη συμπύκνωσης, πράγμα που απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Η σμίκρυνση των αναλυτικών διατάξεων είναι σημαντικό προαπαιτούμενο για μέτρηση στη κλίνη του ασθενούς. Αυτό το απαιτούμενο μπορεί εύκολα να καλύψει η τεχνολογία που αναπτύχθηκε με χρήση μικροκυκλωμάτων ροής⁶⁶, τα οποία καταλαμβάνουν όγκο μεγέθους πιστωτικής κάρτας.

3.4.5. ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Για εξαγωγή χρήσιμων δεδομένων από τα αρχεία στα οποία αποθηκεύονται οι μετρήσεις, δημιουργήθηκε και πρόγραμμα, του οποίου ο κώδικας φαίνεται στο παράρτημα I.

Το πρόγραμμα που αναπτύχθηκε είναι φιλικό προς τον χρήστη και επιτρέπει την άμεση και γρήγορη εξαγωγή των παραμέτρων που είναι χρήσιμες και περιέχονται στα

καταγραφόμενα που λαμβάνονται κατά την ανάλυση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, οι παράμετροι που μας ενδιαφέρουν σε κάθε καμπύλη, είναι το ύψος της καμπύλης και η τιμή για την γραμμή βάσης. Οι παράμετροι αυτές μας αποδίδουν την καθαρή πληροφορία του ύψους της καμπύλης, αφού αφαιρεθούν η μία από την άλλη. Μία άποψη του εμπρόσθιου πλαισίου του προγράμματος αυτού απεικονίζεται στο σχήμα 55.



Σχήμα 55: Εμπρόσθιο πλαίσιο του ειδικού προγράμματος που αναπτύχθηκε για επεξεργασία των αρχείων με τις μετρήσεις.

Τα βήματα που ακολουθεί ένας χρήστης κατά τον χειρισμό αυτού του προγράμματος, είναι τα ακόλουθα:

- **Επιλογή του αρχείου από το οποίο θα εξαχθεί η χρήσιμη πληροφορία (σχήμα 55, ταμπέλα: άνοιγμα αρχείου).**
- **Έναρξη του προγράμματος.**
- **Επιλογή αριθμού ανάλυσης που μας ενδιαφέρει. (σχήμα 55, ταμπέλα: επιλογή αριθμού ανάλυσης).**

- Επιλογή του επιθυμητού τμήματος της καμπύλης με τη βοήθεια των γραφικών δεικτών 0 και 1, ώστε να υπολογιστεί η τιμή «Σήμα γραμμής βάσης» και η τυπική της απόκλιση (σχήμα 55, ταμπέλα: Υπολογισμοί γραμμής βάσης).
- Επιλογή του επιθυμητού τμήματος της καμπύλης με τη βοήθεια των γραφικών δεικτών 2 και 3, ώστε να υπολογιστεί η τιμή «Ύψος καμπύλης» και η τυπική της απόκλιση (σχήμα 55, ταμπέλα: Υπολογισμοί ύψους καμπύλης).
- Χρήση των τιμών σήμα γραμμής βάσης και ύψος καμπύλης για υπολογισμό του καθαρού ύψους, μετά από αφαίρεσή τους.

Είναι φανερό, πως το πρόγραμμα κάνει εύκολα έναν υπολογισμό, ο οποίος θα απαιτούσε πολύπλοκους χειρισμούς σειρών δεδομένων, κάνοντας χρήση μιας απλής γραφικής μεθόδου. Και με αυτήν την γραφική μέθοδο καταφέρνει να ξεχωρίσει μόνο τις χρήσιμες πληροφορίες της καμπύλης, δηλαδή μόνο εκείνα τα κομμάτια της που συντελούν (κατά την κρίση του αναλυτή) στην αποτύπωση του ύψους της καμπύλης και του σήματος βάσης της.

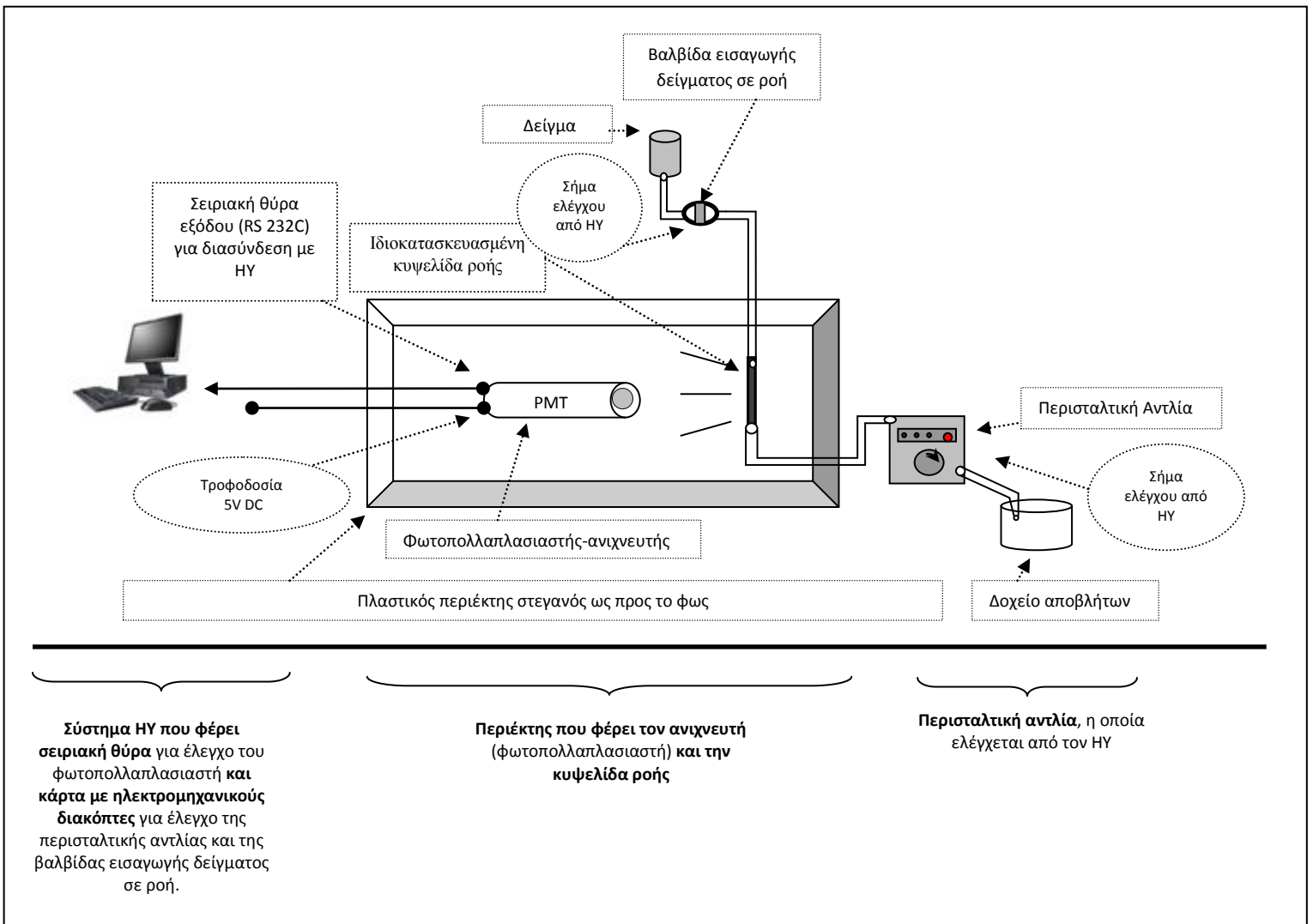
4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΥΤΗ FIA ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ

4.1. ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ο αναλυτής FIA που κατασκευάστηκε φαίνεται στο σχήμα 56 και αποτελείται από 4 τμήματα: α) έναν προσωπικό υπολογιστή, ο οποίος είναι εφοδιασμένος με κατάλληλη κάρτα με ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες (relays). Οι διακόπτες αυτοί χρησιμοποιούνται για να ελέγχουν την περισταλτική αντλία και την βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή που χρησιμοποιούνται στο σύστημα που κατασκευάστηκε. β) έναν πλαστικό περιέκτη, ο οποίος είναι εντελώς στεγανός ως προς το φως, ο οποίος φέρει τον ανιχνευτή και την αυτοσχέδια κυψελίδα ροής, γ) τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή και δ) την περισταλτική αντλία.

Κατά τη λειτουργία του αναλυτή FIA, πραγματοποιείται άντληση κατάλληλα διαμορφωμένου εναιωρήματος καλλιέργειας μικροοργανισμού *Vibrio fischeri* διαμέσου του βρόγχου δειγματοληψίας προς τα απόβλητα. Παράλληλα πραγματοποιείται και άντληση του δείγματος (**διαλύματος του οποίου η τοξικότητα διερευνάται**), το οποίο ρέει επίσης προς τα απόβλητα. Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή εισάγει το αντιδραστήριο (**καλλιέργεια μικροοργανισμών *Vibrio fischeri***) στη ροή του δείγματος (**τεχνητό θαλασσινό νερό, αν πρόκειται για το τυφλό και διάλυμα τοξικού παράγοντα σε τεχνητό θαλασσινό νερό, αν πρόκειται για το δείγμα**), μέσω κατάλληλης περιστροφής της, η οποία προκαλεί αλλαγή στη διάταξη της ροής, οπότε το αντιδραστήριο παρασύρεται από το δείγμα και διαμέσου της κυψελίδας ροής οδεύει προς τα απόβλητα. Περνώντας από την κυψελίδα ροής, το μείγμα αντιδραστήριο-δείγμα ακινητοποιείται μπροστά από τον ανιχνευτή (μέσω κατάλληλης εντολής του λογισμικού ελέγχου του αναλυτή που αναπτύχθηκε), οπότε παρακολουθείται από το σύστημα η πτώση του σήματος που προκαλείται από τον τοξικό παράγοντα, στη φυσική αντίδραση βιοφωταύγειας που παράγει ο εν λόγω μικροοργανισμός. Η μείωση του σήματος ανιχνεύεται από τον φωτοπολλαπλασιαστή και χρησιμοποιείται για εκτίμηση της τοξικότητας του δείγματος. Μεγαλύτερη μείωση μεταφράζεται σε μεγαλύτερη τοξικότητα, η οποία εκτιμάται με καμπύλες απόκρισης στη συγκέντρωση του τοξικού παράγοντα (dose response curves).

Ο έλεγχος του αναλυτή που αναπτύχθηκε γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού που αναπτύχθηκε στην γλώσσα Labview. Το λογισμικό επιτελεί τη διαδικασία ελέγχου του συστήματος, μέσω εντολών προς τη σειριακή θύρα του υπολογιστή και προς τις θύρες PCI της μητρικής κάρτας του υπολογιστή (για έλεγχο της κάρτας με τους διακόπτες). Το λογισμικό επίσης αναλαμβάνει την λήψη δεδομένων, τα οποία παρουσιάζονται σε πραγματικό χρόνο στην οθόνη του υπολογιστή, αλλά ταυτόχρονα σώζονται και σε αρχείο για περαιτέρω επεξεργασία.



Σχήμα 56: Αναλυτής FIA που αναπτύχθηκε για μέτρηση τοξικότητας.

4.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΥΛΙΚΟΥ

Τα χαρακτηριστικά των επιμέρους μονάδων του αναλυτή FIA αναφέρονται παρακάτω:

A) Προσωπικός υπολογιστής:

Ο προσωπικός υπολογιστής που χρησιμοποιήθηκε είναι ένας Pentium 4 υπολογιστής με 1.5 GB μνήμης, ο οποίος έφερε στη μητρική του κάρτα θύρες PCI για ενσωμάτωση της κάρτας με τους ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες, καθώς και σειριακές θύρες για διασύνδεση με τον φωτοπολλαπλασιαστή.

B) Κάρτα με ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες (Solid State Relays):

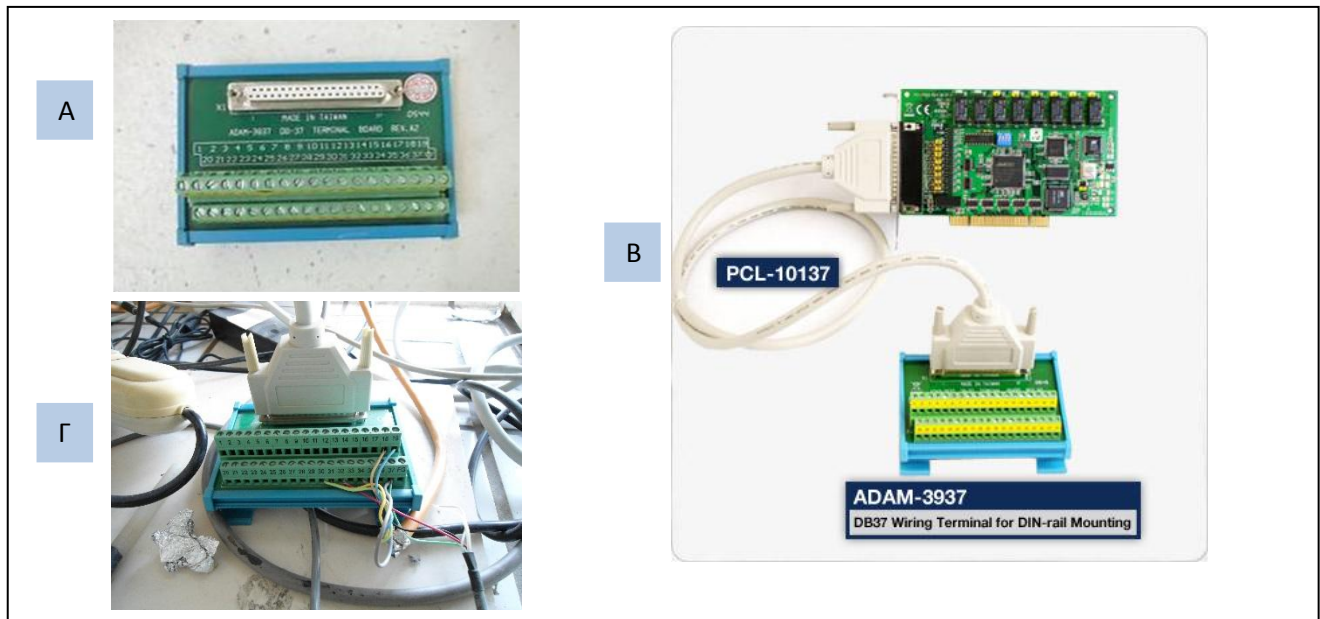
Η κάρτα ελέγχει τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή και την περισταλτική αντλία. Είναι η κάρτα με μηχανισμό ενεργοποίησης διακοπών (Relay actuator) και με ανεξάρτητες ψηφιακές θύρες εισόδου (Digital Input) PCI-1760U της εταιρείας Advantech Co. Ltd και φαίνεται στο σχήμα 57.



Σχήμα 57: Κάρτα ηλεκτρομηχανικών διακοπών PCI-1760U της εταιρείας Advantech, του αναλυτή FIA για εκτίμηση τοξικότητας.

Η εν λόγω κάρτα παρουσιάζει παρόμοια δομή, καθώς και παρόμοια λειτουργία με την κάρτα PCL-725 που περιγράφηκε στον αναλυτή για ανάλυση H_2O_2 (σχήμα 30), αλλά έχει διαφορετική διαμόρφωση στο κομμάτι διασύνδεσής της με τον υπολογιστή, ώστε να ταιριάζει με τις θύρες PCI που εφοδιάζουν την μητρική του κάρτα. Αυτό ήταν αναγκαίο, γιατί στους αντίστοιχους υπολογιστές, οι θύρες ISA αντικαταστάθηκαν από τις θύρες PCI. Η λειτουργία της είναι πανομοιότυπη με την κάρτα PCL-725 και αναφέρεται στο εδάφιο 3.2.B.

Η διασύνδεση της κάρτας αυτής με τις προαναφερθείσες συσκευές (περισταλτική αντλία και βαλβίδα) πραγματοποιείται μέσω κατάλληλου τερματικού της εταιρείας Advantech. Το εν λόγω τερματικό είναι το ADAM 3937 (Σχήμα 58A) και ο τρόπος διασύνδεσής του με την κάρτα PCI-1760U γίνεται μέσω κατάλληλου καλωδίου 37 θέσεων (Σχήμα 58B). Η διασύνδεση του ADAM 3937 με τις προαναφερθείσες συσκευές πραγματοποιείται μέσω των θυρών που φέρει (Σχήμα 58Γ), πάνω στις οποίες προσαρτώνται κατάλληλα καλώδια που φεύγουν από τις συσκευές αυτές.



Σχήμα 58: Τερματικό ADAM 3937 της εταιρείας Advantech, που χρησιμοποιείται για διασύνδεση συσκευών στον αναλυτή FIA για ανάλυση τοξικότητας.

Γ) Φωτοπολλαπλασιαστής με ενσωματωμένο επεξεργαστή και αναλογοψηφιακό μετατροπέα (PhotoMultiplierTube module- PMT module):

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του αναλυτή FIA είναι ένας φωτοπολλαπλασιαστής, ο οποίος διαθέτει ενσωματωμένο μικροεπεξεργαστή και σειριακή θύρα διασύνδεσης RS-232C. Ο φωτοπολλαπλασιαστής που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Hamamatsu και πιο συγκεκριμένα πρόκειται για το μοντέλο HC 9319-01, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση φωτός στην περιοχή UV έως το ορατό. Ο ανιχνευτής φαίνεται στο σχήμα 59.



Σχήμα 59: Ανιχνευτής HC 9319-01 της εταιρείας Hamamatsu, που χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή του αναλυτή FIA για ανάλυση τοξικότητας.

Ο πιο πάνω ανιχνευτής διαθέτει ένα κύκλωμα όπως αυτό που φαίνεται στο σχήμα 32, το οποίο του επιτρέπει να μετρά φωτόνια, που παράγονται από κατάλληλο χημικό σύστημα (κατά αναλογία με τον ανιχνευτή HC 135-01, εδάφιο 3.2.Γ). Μερικά χρήσιμα τεχνικά χαρακτηριστικά του ανιχνευτή παρατίθενται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Χρήσιμα τεχνικά χαρακτηριστικά του ανιχνευτή PMT HC 9319-01 της εταιρείας Hamamatsu

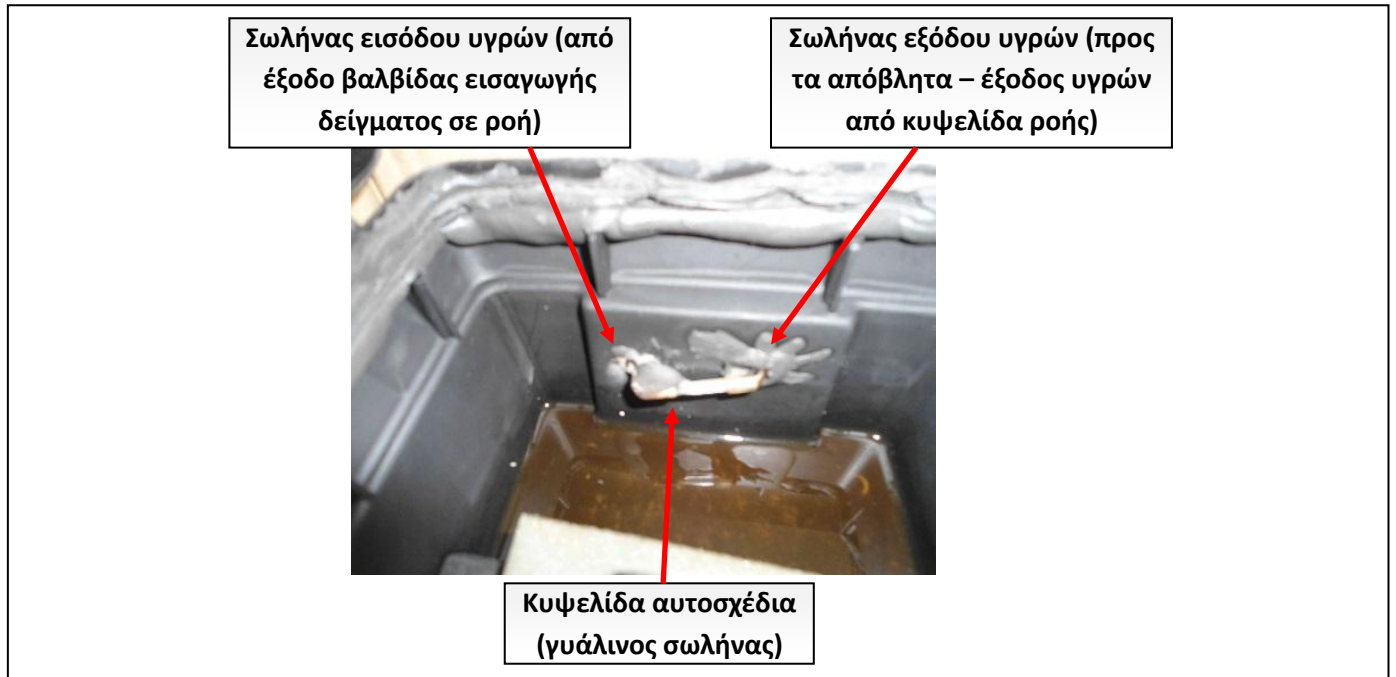
<u>Παράμετρος</u>	<u>Τιμή</u> <u>(Μοντέλο HC 9319-01)</u>	<u>Μονάδες</u> <u>μέτρησης</u>	
Τάση λειτουργίας	+6,0	Volts	Max. Τιμές
Θερμοκρασία λειτουργίας	+5 έως +50	°C	
Θερμοκρασία αποθήκευσης	-20 έως +50	°C	
Τάση λειτουργίας	+4.75 έως +5.25	Volts	Γενικές προδιαγραφές
Περιοχή φάσματος	300 έως 650	nm	
Ενεργή περιοχή	22	mm Dia	
Σειριακή διεπαφή	RS 232C		
Χρόνος προθέρμανσης	180	sec	
Παράγοντας αναπροσαρμογής σήματος	4		
Διαστάσεις	35 dia × 120	mm	
Βάρος(περίπου – κεφαλής)	180	g	

Σταθερότητα γραμμής βάσης	11±0.1	%/°C	Γενικές προδιαγραφές (Για το μήκος κύματος κορυφής και για μετρήσεις στους 25°C)
Δυναμική περιοχή	2*10 ⁶		
Γραμμικότητα (0 έως 2*10 ⁷ CPS)	±1	%	
Τυπική τιμή σκοτεινού ρεύματος (Σήμα από ανίχνευση θερμικών ηλεκτρονίων και διαφυγόντος φωτός)	150	Counts/sec	

Ο ανιχνευτής αυτός, όπως και ο ανιχνευτής HC 135-01 που περιγράφεται στο εδάφιο 3.2.Γ, ελέγχεται από προσωπικό υπολογιστή με κατάλληλο πρόγραμμα. Το πρόγραμμα αυτό επίσης αναλαμβάνει τη λήψη δεδομένων και τους περαιτέρω χειρισμούς τους.

Δ) Αυτοσχέδια κυψελίδα ροής

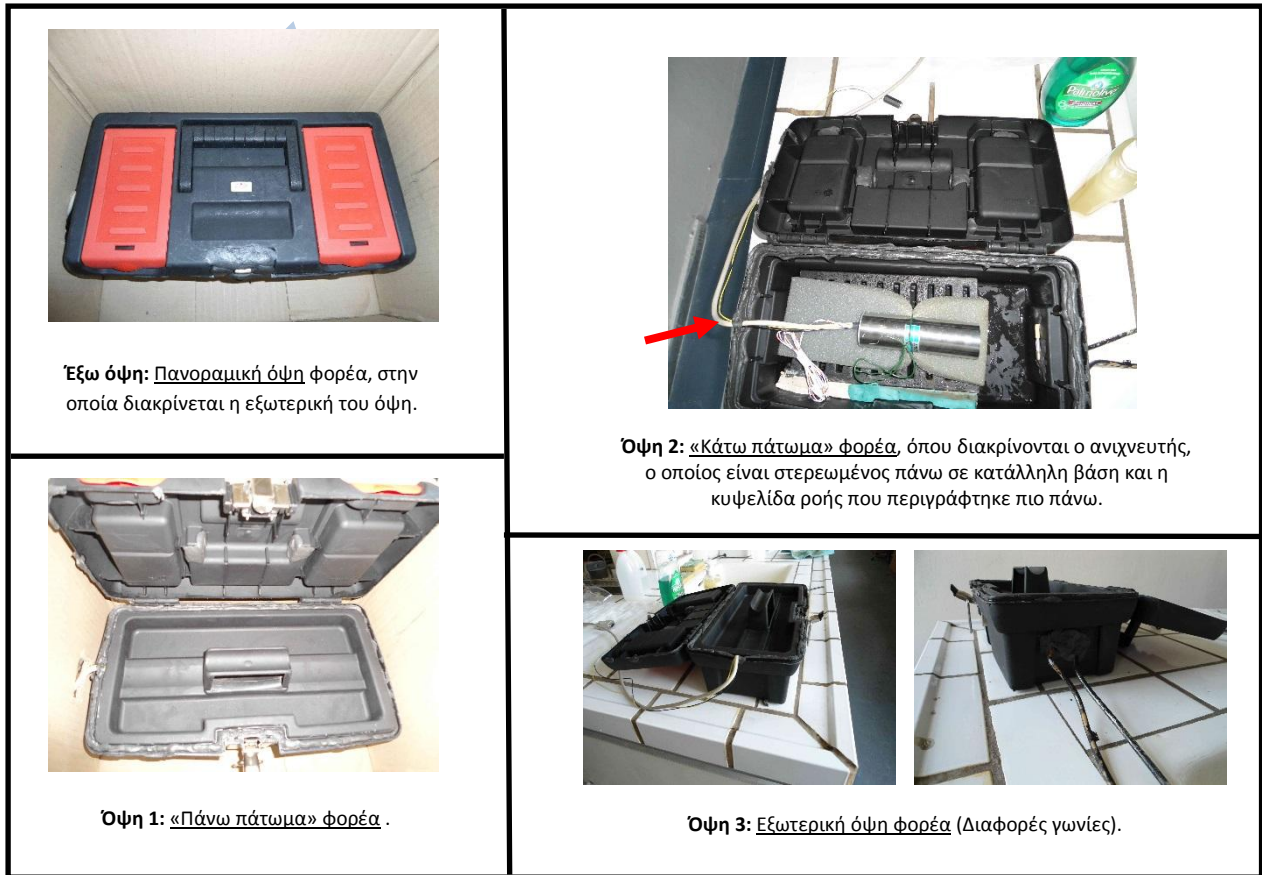
Η κυψελίδα ροής που χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε αυτόν τον αναλυτή ήταν η αυτοσχέδια κυψελίδα που είχε κατασκευαστεί στον αναλυτή για ανίχνευση H₂O₂ σε δείγματα EBC (εδάφιο 3.2.Δ). Αυτή η κυψελίδα όμως αντικαταστάθηκε διότι κατακρατούσε το αιώρημα των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα χρόνους έκπλυσης μεγαλύτερους των 5 λεπτών μειώνοντας την ταχύτητα ανάλυσης στα 10-12 δείγματα/ώρα. Η κυψελίδα που κατασκευάσθηκε ήταν απλούστερη και δεν υποστηριζόταν από μηχανισμό θερμοστάτησης. Αυτό δεν δημιούργησε πρόβλημα στην εν λόγω εφαρμογή, γιατί η χρήση των μικροοργανισμών απαιτούσε γρήγορη χρήση τους μετά την ανασύσταση, που γινόταν λίγο πριν την μέτρηση. Η θερμοκρασία περιβάλλοντος, στην οποία πραγματοποιούταν η μέτρηση, έδινε επαναλήψιμα αποτελέσματα ανίχνευσης φωτός, από την αντίδραση βιοφωταύγειας των εν λόγω μικροοργανισμών. Μια εικόνα της κυψελίδας φαίνεται στο σχήμα 60. Εκεί διακρίνεται πως πρόκειται για έναν γυάλινο σωλήνα μικρών διαστάσεων (Διαμέτρου: 1.5mm και Μήκους: 2 cm), στην μία είσοδο του οποίου κατέληγε το ρεύμα που παρασύρει το δείγμα από την βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή και η έξοδος οδηγείται στα απόβλητα. Η κυψελίδα τοποθετείται μπροστά από τον φωτοπολλαπλασιαστή.



Σχήμα 60: Κυψελίδα ροής του αναλυτή FIA για ανάλυση τοξικότητας.

Ε) Αυτοσχέδιος φορέας του αναλυτή:

Ο φορέας του αναλυτή FIA που αναπτύχθηκε είναι ιδιοκατασκευασμένος και αποτελείται από ένα κουτί-εργαλειοθήκη σχήματος ορθογωνίου παραλληλόγραμμου [Διαστάσεις: Μήκος = 355 mm, Πλάτος = 154 mm, Ύψος = 182 mm], του οποίου η εσωτερική επιφάνεια έχει μαύρο χρώμα, έτσι ώστε να απορροφάται η παράσιτη ακτινοβολία (stray light). Σε αυτό συντελεί και το δεύτερο (πάνω) πάτωμα που υπάρχει σε κάθε εργαλειοθήκη, καθώς δυσκολεύει το φως να φτάσει στο κάτω πάτωμα, όπου βρίσκεται ο ανιχνευτής, στερεωμένος πάνω σε κατάλληλη βάση. Το αυτοσχέδιο κουτί φαίνεται στο σχήμα 61.



Σχήμα 61: Αυτοσχέδιο φορέας του ανιχνευτή FIA για προσδιορισμό τοξικότητας σε δείγματα νερού.

Το κουτί αυτό έχει σκοπό να φέρει, τόσο τον ανιχνευτή, όσο και την κυψελίδα ροής και να προσφέρει την μεγαλύτερη δυνατή στεγανότητα ως προς το φως.

Ο ανιχνευτής έχει κυλινδρικό σχήμα και έτσι **επιβάλλει την προσαρμογή του στο κουτί μέσω κατάλληλης βάσεως** που θα τον συγκρατεί σταθερά. Αυτή η βάση στον παρόντα ανιχνευτή FIA είναι μία πλαστική σχάρα από κανάλι αποστράγγισης (κατάλληλα κομμένη), πάνω στην οποία φέρεται κομμάτι πλαστικού αφρολέξ και πάνω στο οποίο στερεώνεται **δεμένος με σύρμα** (με πλαστική επικάλυψη) **ο ανιχνευτής**. Η όλη διάταξη της σχάρας σταθεροποιείται στο κουτί με πλαστική μαστίχα, που τοποθετείται στα διάκενα που αφήνονται ανάμεσα στη σχάρα και τα τοιχώματα του κουτιού. Η ύπαρξη καλωδίων στο πίσω μέρος του ανιχνευτή κάνει επιβεβλημένη την **ύπαρξη οπής στο πίσω μέρος του φορέα**, η οποία θα χρησιμεύει για το «πέρασμα» των καλωδίων έξω από αυτόν (κόκκινο βελάκι στο σχήμα 61). Η οπή αυτή, εν συνεχεία, μονώνεται από το φως με χρήση κατάλληλου

ελαστομερούς μαύρου χρώματος, το οποίο χρησιμοποιείται και για την οπτική στεγάνωση όλης της κατασκευής.

ΣΤ) Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή:

Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του αυτοσχέδιου αναλυτή FIA είναι μια βαλβίδα της εταιρείας VICI AG International. Είναι η βαλβίδα VICI C22Z-3186E (2 position Electric actuator) της εν λόγω εταιρείας, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στον προηγούμενο αναλυτή.

Η εν λόγω βαλβίδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές που απαιτούν αυτόματη ένεση δειγμάτων (εισαγωγή δειγμάτων σε ροή αντιδραστηρίων). Η λειτουργία της αναφέρεται ενδελεχώς στο κεφάλαιο 3.2.Z.

Η εν λόγω βαλβίδα φέρει δική της τροφοδοσία, ειδικό ενσύρματο χειριστήριο για εναλλαγή μεταξύ των δύο προαναφερθέντων θέσεων της βαλβίδας και ειδικό καλώδιο διεπαφής για σύνδεση της με την κάρτα με τους διακόπτες στερεάς κατάστασης, ώστε να αποστέλλονται από τον υπολογιστή αυτόματα εντολές ελέγχου στην βαλβίδα. Η διασύνδεσή της με την κάρτα με τους διακόπτες υλοποιήθηκε μέσω του τερματικού ADAM 3937 (κεφάλαιο 4.2.B).

Ζ) Περισταλτική αντλία:

Η περισταλτική αντλία που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή αυτού του αυτοσχέδιου αναλυτή FIA, είναι μια αντλία της εταιρείας Gilson. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για το μοντέλο *Gilson Minipuls 3 (peristaltic pump)* της εν λόγω εταιρείας. Η συγκεκριμένη αντλία φαίνεται στο σχήμα 62.

Η περισταλτική αντλία είναι υπεύθυνη για την προώθηση ή την αναρρόφηση των αντιδραστηρίων του αναλυτή FIA. Το αν θα συμβεί προώθηση ή αναρρόφηση εξαρτάται, τόσο από την κατεύθυνση περιστροφής της, όσο και από την διάταξη των σωλήνων.

Η αρχή λειτουργίας της ελκύει με την απλότητα και τα πλεονεκτήματά της. Μια περιγραφή της παρατίθεται στο εδάφιο 3.2.H.



Σχήμα 62: Περισταλτική αντλία Gilson Minipuls 3 του αναλυτή FIA για προσδιορισμό τοξικότητας σε δείγματα νερού.

Ο έλεγχος της εν λόγω αντλίας πραγματοποιείται μέσω κατάλληλης ηλεκτρικής διεπαφής που διαθέτει και μέσω ειδικού λογισμικού. Μέσω της διεπαφής αυτής μπορεί κανείς να καθορίσει αυτόματα μέσω του υπολογιστή, *την έναρξη-παύση λειτουργίας της αντλίας, την κατεύθυνση περιστροφής της, καθώς και την ταχύτητα περιστροφής της (μέσω αναλογικού σήματος)*. Η αντλία διαθέτει και κουμπιά χειροκίνητου χειρισμού για άμεσο έλεγχο.

Σε αυτόν τον αναλυτή χρησιμοποιήθηκε αυτή η διεπαφή, για να συνδεθεί η περισταλτική αντλία με την κάρτα των ηλεκτρομηχανικών διακοπών, μέσω του προαναφερθέντος τερματικού ADAM 3937. Έτσι έγινε δυνατός ο έλεγχος τόσο της κατεύθυνσης περιστροφής της, όσο και της έναρξης-παύσης λειτουργίας της. Σε αυτήν την περίπτωση η ταχύτητα περιστροφής οριζόταν χειροκίνητα, από τα ειδικά κουμπιά που διαθέτει η αντλία στο σώμα της.

4.3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΕ

4.3.1. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ

Η επιτήρηση και αυτού του αναλυτή FIA μέσω του υπολογιστή, εμπλέκει τέσσερις διαδικασίες: α) την **διαδικασία ελέγχου** (Control), β) την **διαδικασία λήψης δεδομένων** (Data Acquisition), η οποία είναι η διαδικασία λήψης του σήματος, που λαμβάνει ο υπολογιστής, από τον ανιχνευτή του αναλυτή που αναπτύχθηκε, γ) την **διαδικασία απεικόνισης του σήματος σε πραγματικό χρόνο** (real time) και δ) την **διαδικασία αποθήκευσης του σήματος και των παραμέτρων λήψης σε ένα αρχείο του υπολογιστή** για μελλοντική αναφορά.

Όλες οι προαναφερθείσες διαδικασίες επιτελούνται και σε αυτόν τον αναλυτή FIA που αναπτύχθηκε, με τη βοήθεια λογισμικού συντεταγμένου σε γλώσσα προγραμματισμού Labview.

4.3.2. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΓΛΩΣΣΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΥ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ (LABVIEW)¹³⁷

Μια περιγραφή κάποιων γενικών πληροφοριών σχετικών με την προγραμματιστική γλώσσα Labview παρατίθεται στο εδάφιο 3.3.2.

4.3.3. ΔΟΜΗ ΕΝΟΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ LABVIEW¹³⁷

Μια περιγραφή της βασικής δομής, με την οποία παρουσιάζεται ένα πρόγραμμα, συντεταγμένο σε προγραμματιστική γλώσσα Labview, παρατίθεται στο εδάφιο 3.3.3.

4.3.4. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΥΡΙΟΥ ΑΥΤΟΣΧΕΔΙΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο όλων των διαδικασιών του εδαφίου 4.3.1, είναι ίδιο με το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε και στον προηγούμενο αναλυτή FIA.

Διαθέτει ίδιο εμπρόσθιο πλαίσιο, όπου εισάγονται οι παράμετροι της μέτρησης (εδάφιο 3.3.4) και ο χειριστής ακολουθεί την ίδια λογική χρήσης με το προηγούμενο πρόγραμμα. Ακόμα και η ροή του προγράμματος είναι η ίδια, ενώ ίδιες είναι και όλες οι υπορουτίνες.

Αυτό που άλλαξε είναι η έκδοση της προγραμματιστικής βάσης Labview. Ενώ η βάση Labview, στην οποία συντάχθηκε το όλο πρόγραμμα ήταν έκδοσης 6.1, στον νέο αναλυτή FIA χρησιμοποιήθηκε βάση Labview έκδοσης 7.1. Και αυτό ήταν απολύτως απαραίτητο, λόγω αλλαγής λειτουργικού προγράμματος (από Windows 2000 σε Windows XP) στον νέο υπολογιστή του εν λόγω αναλυτή. Στο νέο λειτουργικό πρόγραμμα (Windows XP) του υπολογιστή ενσωματώνεται η λειτουργία protected mode¹⁶⁴, που είναι μια λειτουργία του λειτουργικού, που ενεργοποιείται για να επιτρέπει εκμετάλλευση θέσεων μνήμης μεγαλύτερων από 1MB. Για να το πετύχει αυτό όμως, αλλάζει το σύστημα θέσεων μνήμης, μετασχηματίζοντάς τις μέσω κάποιου πίνακα. Έτσι δεν επιτρέπεται πλέον άμεση εγγραφή δεδομένων στις θέσεις μνήμης του συστήματος. Αυτό γινόταν μέχρι το λειτουργικό Windows 2000. Από την έκδοση των Windows XP και μετά, πρέπει η εγγραφή να γίνεται μέσω εύρεσης της θέσης μνήμης από τον σχετικό πίνακα αντιστοιχίας, ώστε η εντολή να φτάσει στον προορισμό της. Αυτός ο πίνακας ενσωματώθηκε στη νέα προγραμματιστική βάση Labview 7.1. Έτσι ανοίγοντας το παλαιό πρόγραμμα με αυτήν την έκδοση της βάσης η εντολή πηγαίνει εκεί που πρέπει. Με χρήση της παλιάς βάσης, το πρόγραμμα δεν λειτουργεί, στο κομμάτι ελέγχου της κάρτας με τους διακόπτες και κατ' επέκταση δεν λειτουργούν και οι έλεγχοι της αντλίας και της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος σε ροή.

4.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ-ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΣΧΕΔΙΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ

Ο εν λόγω αναλυτής χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη μεθόδου μέτρησης τοξικότητας σε δείγματα νερού. Η ανάπτυξη της μεθόδου πραγματοποιήθηκε από τον τότε υποψήφιο διδάκτορα κο Στράτο Κωμαΐτη. Η σχετική βιβλιογραφία για την μέθοδο αναφέρεται στο τέλος αυτής της διατριβής (Πηγές: 165-180).

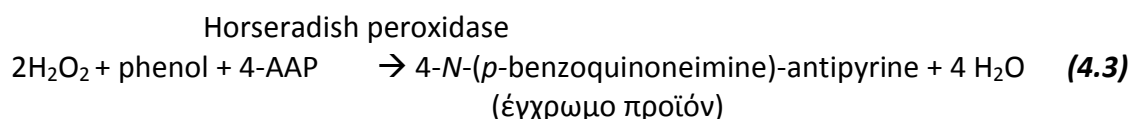
5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΗ FIA ΓΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΠΗΚΤΙΝΗΣ

5.1. ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ο αναλυτής FIA που κατασκευάστηκε απεικονίζεται στο σχήμα 63 και αποτελείται από 5 τμήματα: α) έναν προσωπικό υπολογιστή, ο οποίος είναι εφοδιασμένος με κατάλληλη κάρτα με ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες (relays). Η κάρτα αυτή χρησιμοποιείται για έλεγχο της περισταλτικής αντλίας και της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος σε ροή του συστήματος FIA που αναπτύχθηκε. β) μία κυψελίδα ροής, που ενσωματώνεται σε κατάλληλη βάση, διαμορφωμένη ώστε να μπορεί να συνδέεται και με οπτικές ίνες, που καταλήγουν σε ένα φασματοφωτόμετρο. γ) ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis-NIR, για τη λειτουργία του οποίου γίνεται χρήση και αυτοσχέδιας πηγής φωτός. δ) μία βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή, η οποία με εντολή από την κάρτα με τους διακόπτες εισάγει το δείγμα στη ροή των αντιδραστηρίων. ε) μία περισταλτική αντλία, η οποία καθιστά δυνατή τη ροή των αντιδραστηρίων προς τα απόβλητα.

Κατά τη λειτουργία του αναλυτή FIA, πραγματοποιείται άντληση κατάλληλα διαμορφωμένου διαλύματος αντιδραστηρίων που περιέχει οξειδάση της αλκοόλης [alcohol oxidase – AOX], υπεροξειδάση [horseradish peroxidase – HRP], φαινόλη και 4-αμινοαντιπυρίνη. Το διάλυμα αυτό ρέει συνεχώς μέσα από κατάλληλο βρόγχο που φέρει η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή, προς τα απόβλητα. Παράλληλα πραγματοποιείται και άντληση του δείγματος, πηκτίνη, καθώς και διαλύματος εστεράσης της πηκτίνης σε διαφορετικό ρεύμα. Τα ρεύματα αυτά συναντώνται και ακολούθως στο ρεύμα που προκύπτει

εισάγεται όγκος του διαλύματος των αντιδραστηρίων, ώστε να ξεκινήσουν οι διαδοχικές αντιδράσεις που περιγράφονται πιο κάτω. Το μίγμα παρασύρεται στην κυψελίδα ροής για μέτρηση και ακολούθως οδηγείται στα απόβλητα. Περνώντας από την κυψελίδα ροής, το μείγμα αντιδραστήρια-δείγμα ακινητοποιείται μπροστά από τον ανιχνευτή μέσω κατάλληλης εντολής του προγράμματος ελέγχου του αναλυτή, προς την περισταλτική αντλία. Τότε παρακολουθείται από το σύστημα, μέσω καταγραφής από το φασματοφωτόμετρο, το φάσμα απορρόφησης ακτινοβολίας που δίνει το έγχρωμο προϊόν της σειράς αντιδράσεων, που λαμβάνουν χώρα στο περιγραφέν χημικό σύστημα. Μία σύντομη περιγραφή των σχετικών αντιδράσεων, που λαμβάνουν χώρα, δίνεται με τις παρακάτω χημικές εξισώσεις (4.1-4.3):



5.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΥΛΙΚΟΥ

Τα χαρακτηριστικά των επιμέρους μονάδων του αναλυτή FIA που αναπτύχθηκε αναφέρονται παρακάτω:

A) Προσωπικός υπολογιστής:

Ο προσωπικός υπολογιστής που χρησιμοποιήθηκε είναι ένας διπύρηνος υπολογιστής με 4.0 GB μνήμης, ο οποίος έφερε και στη μητρική του κάρτα θύρες PCI για διασύνδεση με την κάρτα με τους ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες, καθώς και σειριακές θύρες USB για διασύνδεση με το φασματοφωτόμετρο.

B) Κάρτα με Ηλεκτρομηχανικούς Διακόπτες (Solid State Relays):

Η κάρτα που χρησιμοποιήθηκε για να ελέγξει, τόσο τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή, όσο και την περισταλτική αντλία, μέσω των ηλεκτρομηχανικών διακοπών που έχει είναι η κάρτα PCI-1760U της εταιρείας Advantech Co. Ltd. Η κάρτα αυτή φαίνεται στο σχήμα 57 και παρουσιάστηκε στο εδάφιο 4.2.B.

Η διασύνδεση με την περισταλτική αντλία και την βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή πραγματοποιείται μέσω του τερματικού ADAM 3937 της εταιρείας Advantech (Σχήμα 58) μέσω κατάλληλου καλωδίου 37 θέσων.

Γ) Φορητό φασματοφωτόμετρο UV-Vis-NIR:

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα φορητό φασματοφωτόμετρο, που καλύπτει την περιοχή UV-Vis-NIR (200-1100 nm), το οποίο διαθέτει ενσωματωμένο μικροεπεξεργαστή και USB interface για διασύνδεση με υπολογιστή. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Ocean Optics και είναι το φασματοφωτόμετρο Ocean Optics USB 2000+, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση φωτός στην περιοχή UV έως το NIR. Ο ανιχνευτής αυτός φαίνεται στο σχήμα 64.



Σχήμα 64: Ανιχνευτής USB 2000+ της εταιρείας Ocean Optics του αναλυτή FIA για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτικής.

Το φασματοφωτόμετρο βασίζεται σε συστοιχία CCD 2048 στοιχείων, περιέχει μικροεπεξεργαστή με τις απαραίτητες θύρες και αποτελεί μικρό και ευέλικτο σύστημα, που δεν φέρει κινούμενα μέρη και δίνει την δυνατότητα ενσωμάτωσης OEM (Other Equipment Manufacturer), σε συστήματα που μπορεί να φέρουν υπολογιστές, PLCs ή ενσωματωμένους controllers, με σύνδεση μέσω USB 2.0 ή RS-232. Η τροφοδοσία του γίνεται μέσω της USB θύρας, που φέρει για επικοινωνία με υπολογιστές (+5VDC). Και από την ίδια θύρα μπορούν να ρυθμιστούν σε αυτό και όλες οι παράμετροι λειτουργίας, μέσω του λογισμικού που αναπτύχθηκε. Αξιοπρόσεχτο είναι και το ηλεκτρονικό του σύστημα, το οποίο του επιτρέπει (παρά το μέγεθός του) να λαμβάνει μέχρι και 1000 πλήρη φάσματα ανά δευτερόλεπτο. Μερικά χρήσιμα τεχνικά στοιχεία για τον εν λόγω ανιχνευτή παρατίθενται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12: Χρήσιμα τεχνικά στοιχεία του ανιχνευτή USB 2000+ της εταιρείας Ocean Optics

Μηχανολογικές προδιαγραφές	Φασματοφωτόμετρο: USB 2000+
Φυσικές προδιαγραφές	
Διαστάσεις	89.1 mm x 63.3 mm x 34.4 mm
Βάρος	190 g
Προδιαγραφές Ανιχνευτή	
Ανιχνευτής	Sony ILX511B (2048-element linear silicon CCD array)
Εύρος ανίχνευσης	200-1100 nm
Μέγεθος pixel	14 μm x 200 μm
Φορτίο κορεσμού pixel	~62,500 ηλεκτρόνια
Φασματοσκοπικές προδιαγραφές	
Οπτική ανάλυση	~0.3-10.0 nm FWHM
Αναλογία Signal/Noise	250:1
Ανάλυση A/D	16 bit
Dark counts	50 RMS counts
Δυναμική περιοχή	8.5×10^7
Χρόνος ολοκλήρωσης	1 ms – 65 seconds
Παράσιτη ακτινοβολία	<0.05% at 600 nm; <0.10% at 435 nm
Ηλεκτρονικές προδιαγραφές	
Κατανάλωση ρεύματος	250 mA @ 5 VDC
Είσοδοι/έξοδοι	Προγραμματιζόμενοι GPIOs στην μητρική κάρτα
Λειτουργίες Trigger	4 modes
Λειτουργία Strobe	NAI
Συνδεσμολογία	Σύνδεσμος 22 ακίδων

Οι εντολές του προγράμματος που αναπτύχθηκε περιλαμβάνουν ρύθμιση παραμέτρων όπως: η συχνότητα του εσωτερικού ρολογιού του επεξεργαστή του φασματοφωτομέτρου, ο χρόνος ολοκλήρωσης, ο διάυλος μέτρησης, η λειτουργία strobe (αν

απαιτείται), η λειτουργία trigger (αν απαιτείται), καθώς και η αποστολή εντολών για έναρξη και λήξη της διαδικασίας λήψης φασμάτων.

Δ) Κυψελίδα ροής

Η κυψελίδα ροής που χρησιμοποιήθηκε σε αυτόν τον αναλυτή FIA, ήταν μία εμπορικά διαθέσιμη κυψελίδα ροής από Quartz της Hellma Analytics. Η κυψελίδα αυτή είναι όγκου 120 μL και έχει μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm. Οι διαστάσεις της ήταν: *Ύψος: 35 mm, Πλάτος: 12,5 mm και Βάθος: 12,5mm*. Μια εικόνα της κυψελίδας φαίνεται στο σχήμα 65. Εκεί φαίνεται πως πρόκειται για κυψελίδα σχήματος ορθογωνίου παραλληλεπίπεδου, η οποία διαθέτει δύο οπτικά παράθυρα σε δύο αντιδιαμετρικά αντίθετες μακρόστενες πλευρές, καθώς και δύο σχηματισμένους σωλήνες στην μία επάνω μικρή της βάση. Οι σχηματισμένοι σωλήνες χρησιμεύουν σαν είσοδος και έξοδος διαύλων, οι οποίοι προσαρμόζονται με την βοήθεια κατάλληλων πλαστικών σφικτήρων, που φέρουν «βόλτες», για να βιδώνουν στο γυαλί. Ο ένας διάυλος εισέρχεται στην κυψελίδα προερχόμενος από την βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή και ο άλλος αποτελεί την έξοδο των ρευστών προς τα απόβλητα. Η τοποθέτηση αυτής της κυψελίδας σε όρθια θέση απαιτούσε ειδική βάση, που θα επέτρεπε αφενός τη συγκράτησή της σε κατακόρυφη θέση και αφετέρου την διασύνδεση του φασματοφωτομέτρου με το οπτικό παράθυρό της (μέσω οπτικών ινών).



Σχήμα 65: Κυψελίδα ροής της εταιρείας Hellma Analytics του αναλυτή FIA για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.

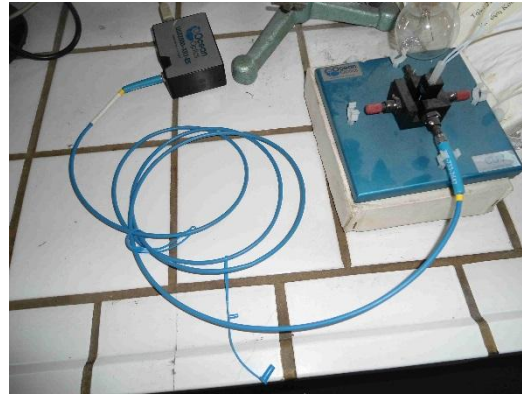
E) Βάση στήριξης της κυψελίδας ροής:

Η βάση στήριξης της κυψελίδας ροής, που χρησιμοποιήθηκε σε αυτόν τον αναλυτή FIA, ήταν εμπορικά διαθέσιμη, της εταιρίας Ocean Optics, κατάλληλα διαμορφωμένη για να συγκρατεί κυψελίδες που διαθέτουν μέγιστο μήκος οπτικής διαδρομής 10 mm.

Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για το μοντέλο CUV-ALL-UV Cuvette holder, το οποίο διαθέτει κατάλληλες υποδοχές για οπτικές ίνες σε τέσσερις πιθανούς προσανατολισμούς, από τους οποίους μπορεί να εισάγεται φως ή να διοχετεύεται φως σε ανιχνευτή για ανίχνευση. Οι κατάλληλες υποδοχές αυτές διατάσσονται σε σχήμα σταυρού, για να διευκολύνουν την εισαγωγή ή ανίχνευση φωτός, υπό όποια διάταξη βολεύει. Η αυτοσχέδια βάση φαίνεται στο σχήμα 66 (Όψη Α). Εκεί φαίνεται επίσης ο τρόπος εισαγωγής της κυψελίδας ροής μέσα στη βάση (όψη Γ) και ο τρόπος σύνδεσης της βάσης με τον ανιχνευτή (φασματοφωτόμετρο), μέσω οπτικής ίνας (όψη Β). Επίσης διακρίνεται και η πηγή φωτός (κοινή λάμπα βολφραμίου), που τοποθετείται στο αντιδιαμετρικά αντίθετο παράθυρο, από αυτό στο οποίο συνδέεται η οπτική ίνα, που καταλήγει στον ανιχνευτή φωτός (όψη Δ).



Όψη Α: Πανοραμική όψη κενής βάσης



Όψη Β: Διασύνδεση της βάσης με το φασματοφωτόμετρο, μέσω οπτικής ίνας για μέτρηση φάσματος απορρόφησης



Όψη Γ: Τοποθέτηση της κυψελίδας ροής στη βάση για σταθεροποίηση



Όψη Δ: Τοποθέτηση της πηγής φωτός μπροστά από το παράθυρο της κυψελίδας ροής

Σχήμα 66: Βάση στήριξης της κυψελίδας ροής του αναλυτή FIA για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.

Πρέπει να σημειωθεί επίσης πως η πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε σε αντικατάσταση της εμπορικά διαθέσιμης λυχνίας βολφραμίου-αλογόνου LS-1 Tungsten-Halogen light source της εταιρείας Ocean Optics που διαθέταμε, γιατί δεν απέδιδε τόσο ισχυρό φως, όσο χρειαζόμασταν για να «διαβάσουμε» το φάσμα απορρόφησης του έγχρωμου προϊόντος της αντίδρασής μας. Μερικά χρήσιμα τεχνικά στοιχεία για την εν λόγω βάση παρατίθενται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13: Τεχνικά στοιχεία της βάσης της κυψελίδας ροής, της εταιρείας Ocean Optics

Διαστάσεις	147 mm x 147 mm x 40 mm
Βάρος	540 g
Μήκος οπτικού παραθύρου	10 mm
Z-Διάσταση	15 mm
Μέγεθος φίλτρου	Πάχος έως 6.35 mm (1/4")
Κατευθυντήριοι φακοί προς τις οπτικές ίνες	Τέσσερεις φακοί (200-2000 nm)
Θύρα προσαρμογής ύδατος θερμοστάτησης	Δίαυλος 3.175 mm (1/8")
Σφράγιση οπτικής ίνας	SMA 905
Αναβάθμιση για φθορισμό	Προσθήκη δύο καθρέπτων ενσωματωμένων σε κοχλίες

ΣΤ) Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή:

Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.Z και φαίνεται στο σχήμα 39.

Ζ) Περισταλτική αντλία:

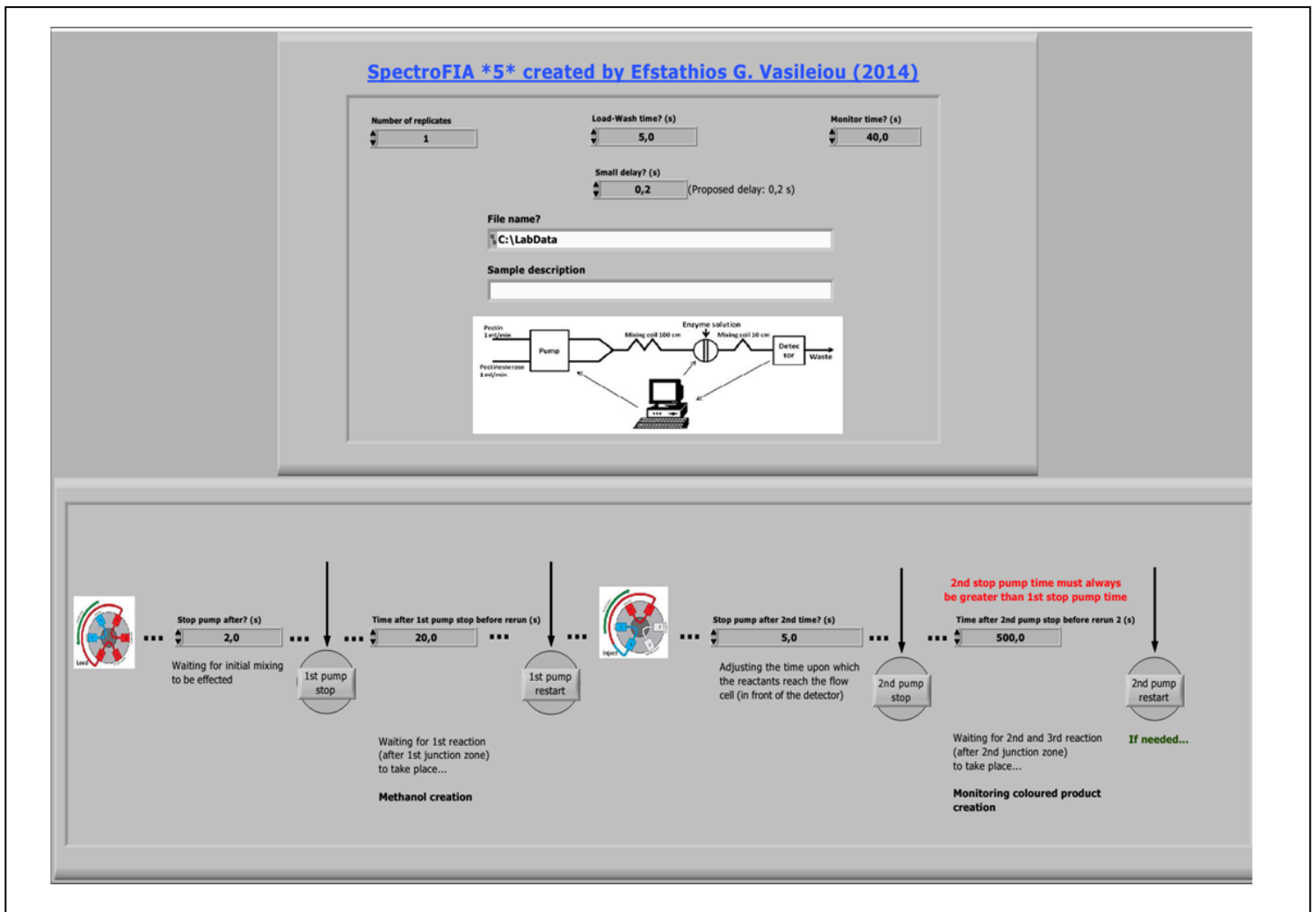
Η περισταλτική αντλία που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή αυτού του αυτοσχέδιου αναλυτή FIA, είναι η αντλία *Gilson Minipuls 3* που φαίνεται στο σχήμα 62 και περιγράφεται στο εδάφιο 3.2.H

Ο τρόπος διασύνδεσής της με τους διαύλους του συστήματος FIA αναφέρεται στο εδάφιο 4.2.H, όπου περιγράφεται και ο τρόπος διασύνδεσής της με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

5.3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ

5.3.1. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΥΡΙΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΑΤΟΣ

Για κατανόηση της λειτουργίας παρατίθεται εικόνα από το εμπρόσθιο πλαίσιο του προγράμματος (σχήμα 67), όπου ο χρήστης οριοθετεί τις παραμέτρους, που είναι κρίσιμες να ρυθμιστούν κατά την εκτέλεση της κάθε μέτρησης. Στο εν λόγω εμπρόσθιο πλαίσιο εμφανίζονται δύο διακριτά τμήματα ρυθμίσεων.



Σχήμα 67: Εμπρόσθιο πλαίσιο του προγράμματος για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.

Το πρώτο τμήμα (επάνω μέρος στο σχήμα 67) είναι το τμήμα, όπου ο χρήστης ρυθμίζει στο σύστημα παραμέτρους που είναι χρήσιμες κατά την ίδια τη μέτρηση και κατά την λειτουργία του ίδιου του αναλυτή. Εκεί εμφανίζεται το διάγραμμα του αναλυτή. Οι παράμετροι που ρυθμίζονται αναλύονται παρακάτω:

α) **Load-Wash time (s)**: είναι η παράμετρος, που ρυθμίζει πόσο χρόνο να περιμένει το σύστημα, μέχρι να αρχίσει την αλληλουχία βημάτων του κυρίου προγράμματος προς τη μέτρηση. Ο χρόνος αυτός είναι αναγκαίος, για να ξεπλυθούν οι διάλυτοι με τα αντιδραστήρια και με το δείγμα.

β) **Number of replicates**: είναι η παράμετρος, που ρυθμίζει πόσες επαναλήψεις κάθε μέτρησης θα γίνουν.

γ) **Monitor time (s)**: είναι η παράμετρος, που ρυθμίζει πόσο χρόνο διαρκεί κάθε μέτρηση. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μέτρηση αρχίζει αμέσως μετά τη ρύθμιση της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος σε ροή στην θέση εισαγωγής (inject).

δ) **Small Delay (s)**: είναι η παράμετρος, που ρυθμίζει πόσο χρόνο θα καθυστερεί η μία εντολή προς τους ηλεκτρομηχανικούς διακόπτες από την αμέσως επόμενη της. Ο χρόνος αυτός συγχρονίζει την ταχύτητα εκτέλεσης των εντολών του προγράμματος που είναι πολύ μεγάλη, με τον χρόνο απόκρισης των ηλεκτρομηχανικών διακοπών που είναι τουλάχιστων 0,2 sec. Όταν ο χρόνος αυτός είναι μικρότερος, οι διακόπτες δεν προλαβαίνουν να μεταβάλουν την θέση τους με αποτέλεσμα, παρόλο που το πρόγραμμα εκτελείται κωνονικά, να μην καταφέρνει να ακολουθήσει το υλικό (hardware). Εδώ φαίνεται και ο περιορισμός του συστήματος που αναπτύχθηκε για κινητικές μετρήσεις αντιδράσεων των οποίων ο χρόνος ημιζωής είναι μικρότερος από 0,2 sec. Σε περίπτωση κινητικών μετρήσεων εξαιρετικά γρήγορων αντιδράσεων θα πρέπει να γίνει κατάλληλη τροποποίηση του υλικού (hardware): θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σωληνοειδείς αντλίες με χρόνους απόκρισης στην περιοχή των msec καθώς επίσης και διακόπτες ηλεκτρονικοί σε αντικατάσταση των ηλεκτρομηχανικών.

ε) **File name:** είναι η παράμετρος που καθορίζει, που θα αποθηκευτεί το αρχείο των μετρήσεων, που παράγεται κατά την εκτέλεση του προγράμματος.

ζ) **Sample Description:** είναι μια πληροφοριακή παράμετρος, που γράφεται στο αρχείο που σώζεται, σαν πρόσθετη πληροφορία για το δείγμα.

Το δεύτερο τμήμα (κάτω μέρος στο σχήμα 67) είναι το τμήμα, όπου ο χρήστης ρυθμίζει τον χρονισμό του αναλυτή. Σε αυτό το τμήμα ρυθμίζεται ουσιαστικά, ο τρόπος με τον οποίο θα σταματά και θα ξεκινά η αντλία, με βάση την πορεία των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα – Δες εξισώσεις 4.1-4.3. Αρχικά η αντλία σταματά και το μίγμα της αντίδρασης 4.1 αφήνεται σε σπείραμα που βρίσκεται πριν την βαλβίδα εισαγωγής δείγματος. Αφού δημιουργηθεί επαρκής ποσότητα προϊόντος ο υπολογιστής ενεργοποιεί την ροή και ταυτόχρονα δίνει εντολή για εισαγωγή των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στην ροή. Το όλο μίγμα οδηγείται μπροστά από τον ανιχνευτή, οπότε και ο υπολογιστής σταματά την ροή, για να προχωρήσουν οι αντιδράσεις 4.2-4.3, ενώ ταυτόχρονα αρχίζει και η λήψη δεδομένων. Στο πρόγραμμα υπάρχει επιλογή για επανενεργοποίηση της ροής μετά από επιλογή. Οι παράμετροι χρονισμού που ρυθμίζει ο χρήστης είναι οι ακόλουθοι:

α) **Stop pump after (s):** είναι ο χρόνος αναμονής πριν την αρχική αναχαίτηση της ροής. Ο χρόνος αυτός ξεκινά αμέσως μετά τη ρύθμιση της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος σε ροή στη θέση *Load*. Ο χρόνος αυτός απαιτείται για επαρκή ανάμειξη του δείγματος και της μεθυλεστεράσης της πηκτίνης σύμφωνα με την αντίδραση 4.1. Μετά από την παρέλευση αυτού του χρόνου σταματά η αντλία, ώστε να αφηθεί ικανοποιητικός χρόνος, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση που απεικονίζεται.

β) **Time after 1st pump stop before rerun (s):** είναι χρόνος αναμονής ώστε να αντιδράσει επαρκώς το χημικό σύστημα της εξίσωσης 4.1. Με την παρέλευση αυτού του χρόνου επανενεργοποιείται η ροή.

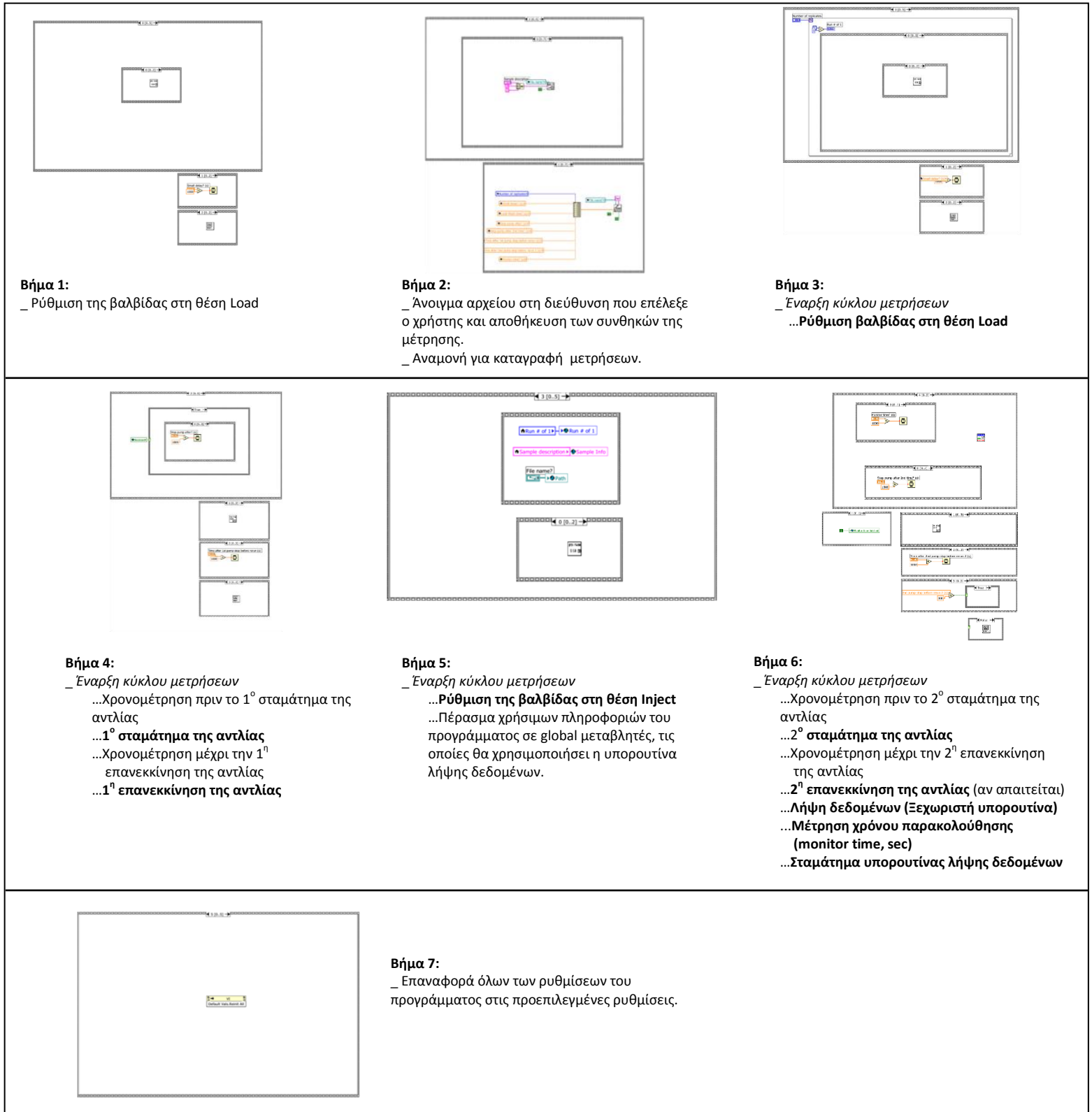
γ) **Stop pump after 2nd time (s):** είναι ο χρόνος αναμονής πριν τη δεύτερη αναχαίτηση της ροής. Ο χρόνος αυτός αρχίζει να μετράει αμέσως μετά τη ρύθμιση της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος σε ροή στη θέση *Inject*. Ο χρόνος αυτός απαιτείται για επαρκή ανάμειξη των προϊόντων της αντίδρασης 4.1 και των έτερων αντιδραστηρίων που απεικονίζονται στις

εξισώσεις 4.2 και 4.3, ώστε να πραγματοποιηθούν αυτές οι αντιδράσεις. Μετά από την παρέλευση αυτού του χρόνου σταματά η αντλία, ενώ ταυτόχρονα αρχίζει να παρακολουθείται το σήμα της αντίδρασης.

δ) Time after 2nd pump stop before rerun (s): είναι χρόνος αναμονής για παρακολούθηση της αντίδρασης. Με την παρέλευση αυτού του χρόνου επανενεργοποιείται η ροή μέσα στον αναλυτή, μετά από κατάλληλη επιλογή.

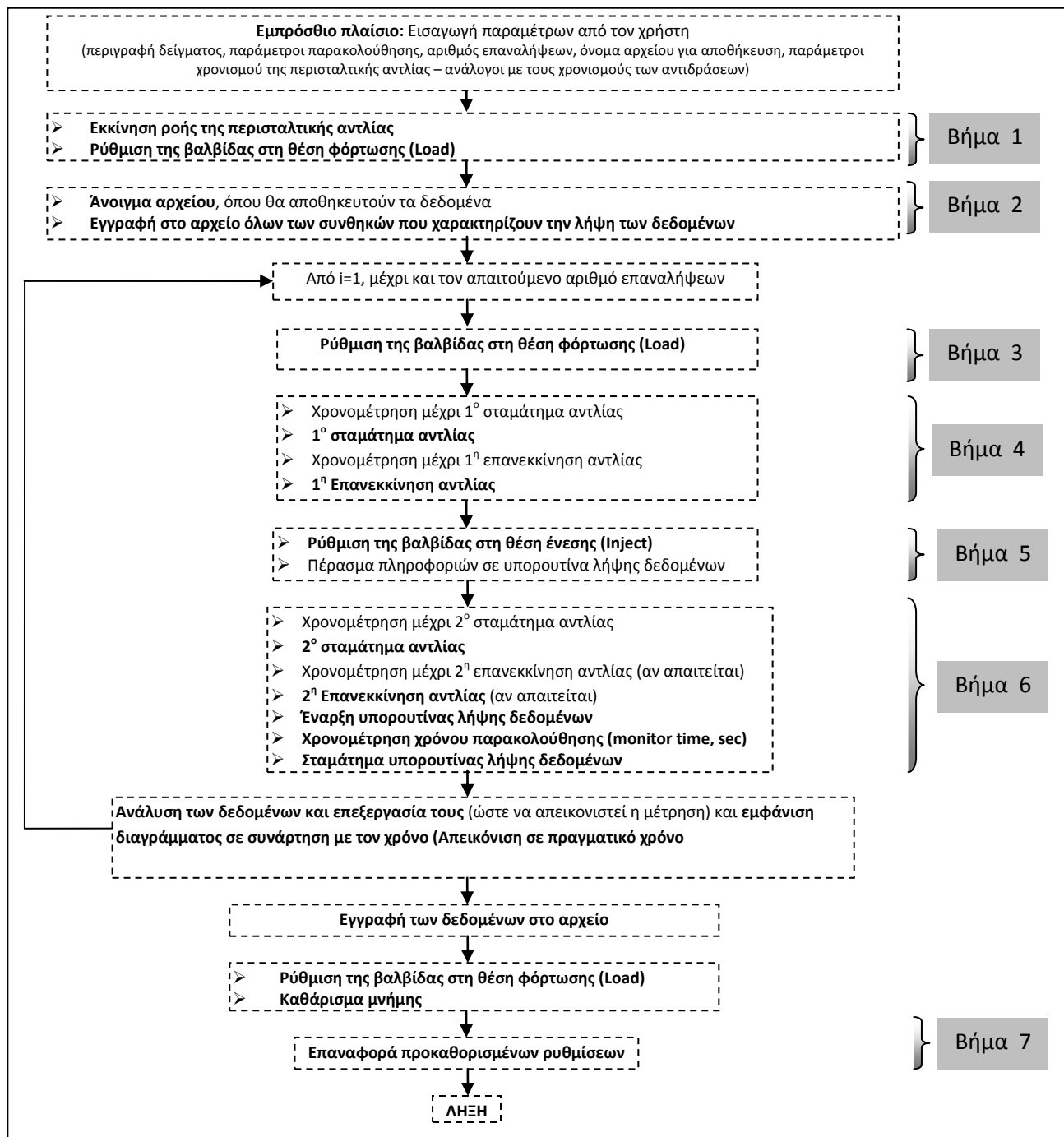
Οι παραπάνω παράμετροι που τέθηκαν στο εμπρόσθιο πλαίσιο από τον χειριστή, μεταφράζονται σε εντολές και στέλνονται στις αντίστοιχες υπορουτίνες που τρέχουν μέσα στο κύριο πρόγραμμα, οι οποίες με τη σειρά τους περνούν εντολές, είτε μέσω της θύρας USB στο φορητό φασματοφωτόμετρο, είτε μέσω της κάρτας με τους διακόπτες στην βαλβίδα εισαγωγής δείγματος σε ροή και στην περισταλτική αντλία, ώστε να λειτουργήσει αρμονικά ο αναλυτής. Εκτός από αυτές τις εντολές, υπάρχουν και εντολές χρονισμού (του κάτω τμήματος), οι οποίες εμπεριέχονται στον ίδιο τον γραφικό κώδικα του αυτοσχέδιου προγράμματος και οι οποίες ρυθμίζουν χρονικά τις εργασίες που επιτελούνται στον αναλυτή.

Μετά την παράθεση μιας εικόνας του εμπρόσθιου πλαισίου του αυτοσχέδιου προγράμματος, είναι επιβεβλημένη μία περιγραφή και μία απεικόνιση της ροής του προγράμματος, για να μπορέσει κάποιος να καταλάβει πως λειτουργεί ο αναλυτής. Με την περιγραφή αυτή, μπορεί κάποιος να καταλάβει και πως ενσωματώνονται στο πρόγραμμα αυτό και οι τρεις άλλες διαδικασίες τις οποίες διεκπεραιώνει και οι οποίες έχουν προαναφερθεί (διαδικασία λήψης δεδομένων, διαδικασία παρουσίασης σε πραγματικό χρόνο και διαδικασία αποθήκευσης των μετρήσεων σε αρχείο, για μελλοντική επισκόπηση). Στο σχήμα 68 απεικονίζεται σε στάδια, η ροή του προγράμματος, όπως αυτή έχει συνταχθεί στο δομικό του διάγραμμα.



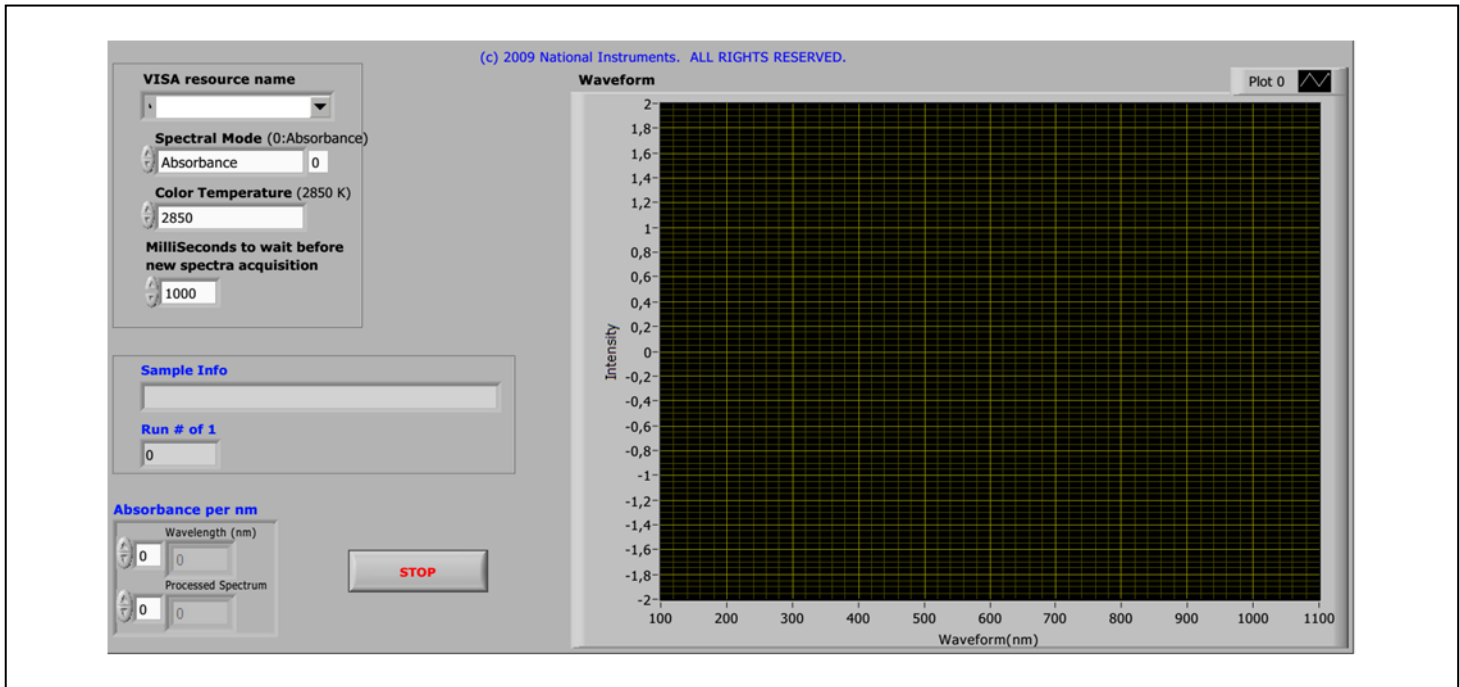
Σχήμα 68: Κώδικας του αυτοσχέδιου προγράμματος για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.

Στο σχήμα 69 φαίνεται το δομικό διάγραμμα του προγράμματος που αναπτύχθηκε.



Σχήμα 69: Λογικό διάγραμμα του προγράμματος για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.

Σε αυτό το σημείο είναι σκόπιμο να κάνουμε μια αναφορά και στην υπορουτίνα λήψης δεδομένων, καθώς αυτή επιτελεί τις περισσότερες διαδικασίες (λήψη δεδομένων, παρουσίαση σε πραγματικό χρόνο και αποθήκευση των μετρήσεων σε αρχείο, για μελλοντική επισκόπηση). Η εικόνα του εμπρόσθιου πλαισίου της υπορουτίνας αυτής φαίνεται στο σχήμα 70.



Σχήμα 70: Εμπρόσθιο πλαίσιο της υπορουτίνας λήψης δεδομένων του αναλυτή για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.

Στο εμπρόσθιο πλαίσιο αυτής της υπορουτίνας απεικονίζεται γράφημα, το οποίο είναι το φάσμα απορρόφησης του δείγματός μας και εμφανίζει τις μετρήσεις (% Διαπερατότητα ή Απορρόφηση), που λαμβάνονται από το φασματοφωτόμετρο για το εκάστοτε δείγμα ανά nm (από τα 200 nm έως και τα 1100 nm). Οι μετρήσεις αυτές παρουσιάζονται μετά από διόρθωση για την επίδραση του τυφλού και του τυφλού ρεύματος. Μπορούν να παρουσιαστούν με δύο τρόπους, ως απορρόφηση ή % διαπερατότητα, ανάλογα με τη ρύθμιση του επιλογέα **Spectral Mode** στο σχήμα 70. Το αποτέλεσμα της μέτρησης υπολογίζεται από τον τύπο:

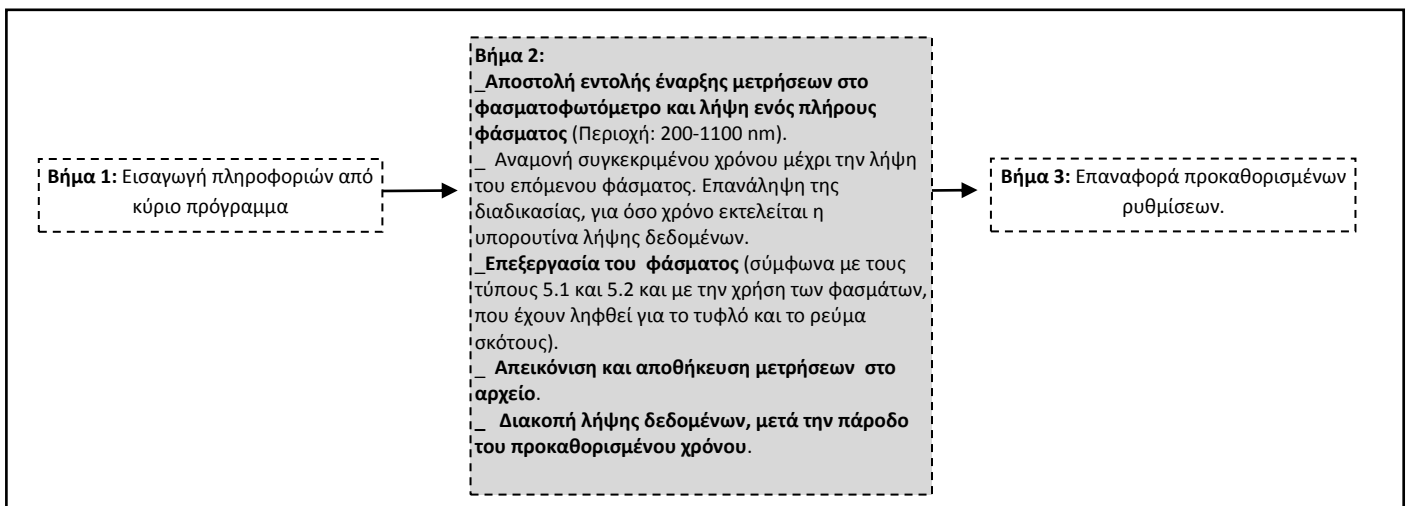
$$\% \text{ Transmittance} = \left(\frac{S_\lambda - D_\lambda}{R_\lambda - D_\lambda} \right) \times 100 \quad (5.1), \text{ όπου: } S_\lambda: \text{ η ένταση ακτινοβολίας του}$$

δείγματος σε μήκος κύματος λ , D_λ : η ένταση της ακτινοβολίας του ρεύματος σκότους σε μήκος κύματος λ και R_λ : η ένταση ακτινοβολίας του τυφλού δείγματος σε μήκος κύματος λ και από τον τύπο $A = -\log T$ (5.2).

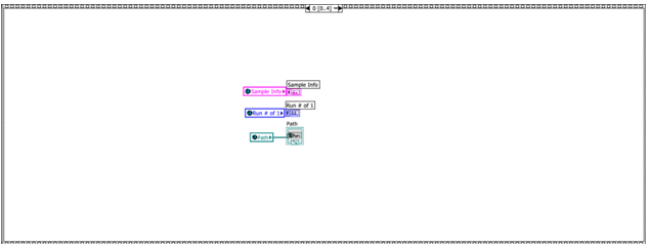
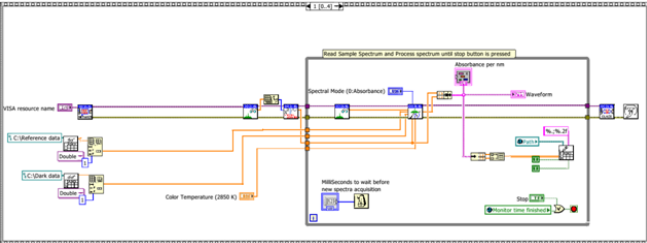
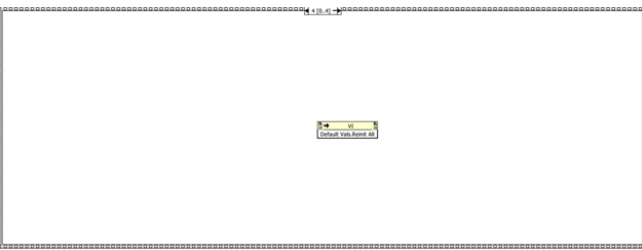
Επίσης στο εμπρόσθιο πλαίσιο εμφανίζονται και διάφοροι άλλοι ενδείκτες με πληροφορίες για: α) ειδικές πληροφορίες που αφορούν το δείγμα (*Sample Info*), β) τον αύξοντα αριθμό επανάληψης μέτρησης του ίδιου δείγματος (*Run # of 1*) και γ) την τιμή της απορρόφησης για κάθε nm.

Επίσης στο εμπρόσθιο πλαίσιο υπάρχει και διακόπτης παύσης λειτουργίας της υπορουτίνας, για να υπάρχει η δυνατότητα σταματήματος, πριν παρέλθει ο ρυθμισμένος χρόνος μέτρησης, που έχει τεθεί στο κύριο πρόγραμμα, σε περίπτωση που δημιουργηθεί κάποιο πρόβλημα.

Στο σχήμα 71 φαίνεται το λογικό διάγραμμα της υπορουτίνας λήψης δεδομένων που εξηγεί τον κώδικα της υπορουτίνας του σχήματος 72.



Σχήμα 71: Λογικό διάγραμμα της υπορουτίνας λήψης δεδομένων για προσδιορισμό μεθυλεστέρωσ πηκτίνης.

	<p>Βήμα 1: _ Εισαγωγή πληροφοριών από το κύριο πρόγραμμα</p>
	<p>Βήμα 2: _ Αποστολή εντολής έναρξης μετρήσεων στο φασματοφωτόμετρο και λήψη φάσματος (Περιοχή: 200-1100 nm). _ Αναμονή συγκεκριμένου χρόνου μέχρι την λήψη του επόμενου φάσματος. Επανάληψη της πιο πάνω διαδικασίας, για όσο χρόνο εκτελείται η υπορουτίνα λήψης δεδομένων. _ Επεξεργασία κάθε φάσματος (σύμφωνα με τους τύπους 5.1 και 5.2 παραπάνω και με την χρήση των φασμάτων, που έχουν ληφθεί για το τυφλό και το ρεύμα σκότους). _ Απεικόνιση μετρήσεων και αποθήκευση στο αρχείο. _ Διακοπή λήψης δεδομένων μετά την παρέλευση του απαιτούμενου χρόνου.</p>
	<p>Βήμα 3: _ Επαναφορά όλων των ρυθμίσεων του προγράμματος στις προκαθορισμένες ρυθμίσεις.</p>

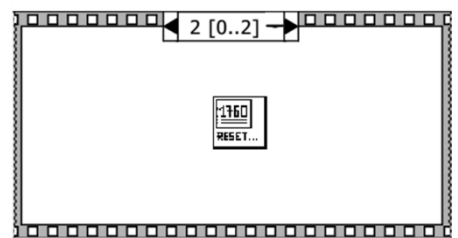
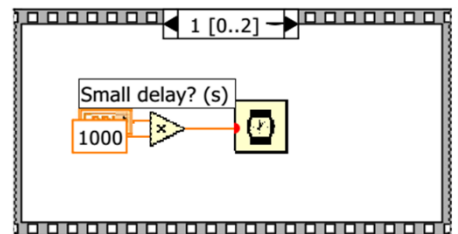
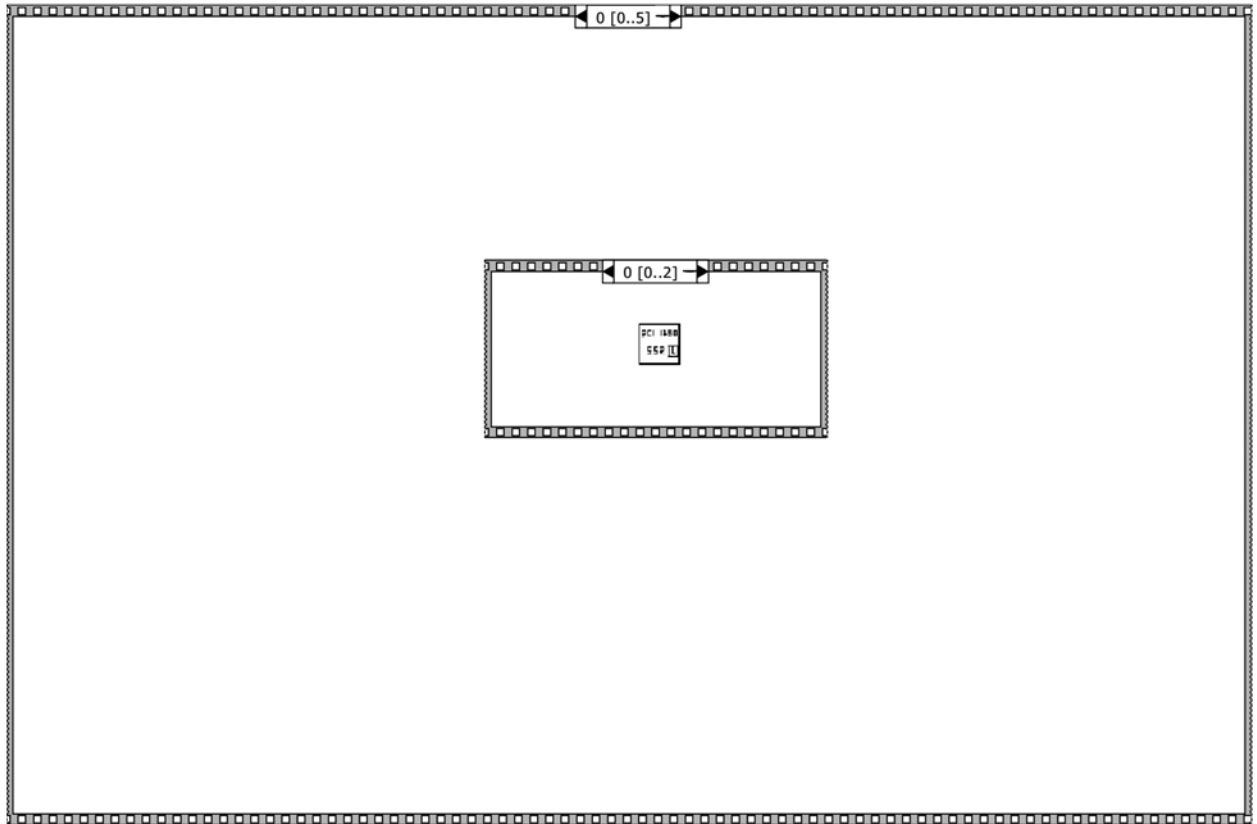
Σχήμα 72: Κώδικας της υπορουτίνας λήψης δεδομένων για προσδιορισμό μεθυλεστέρων πηκτίνης.

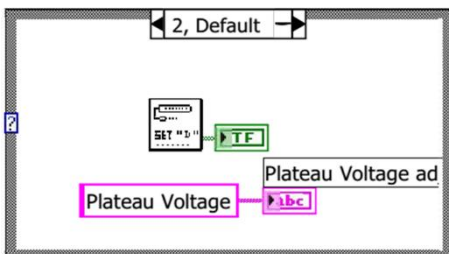
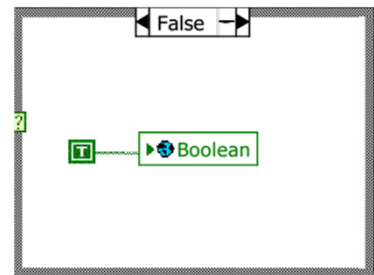
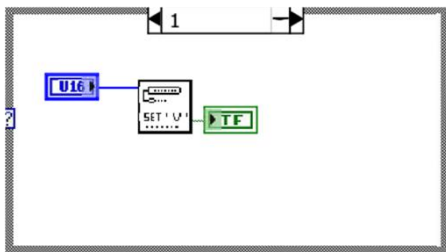
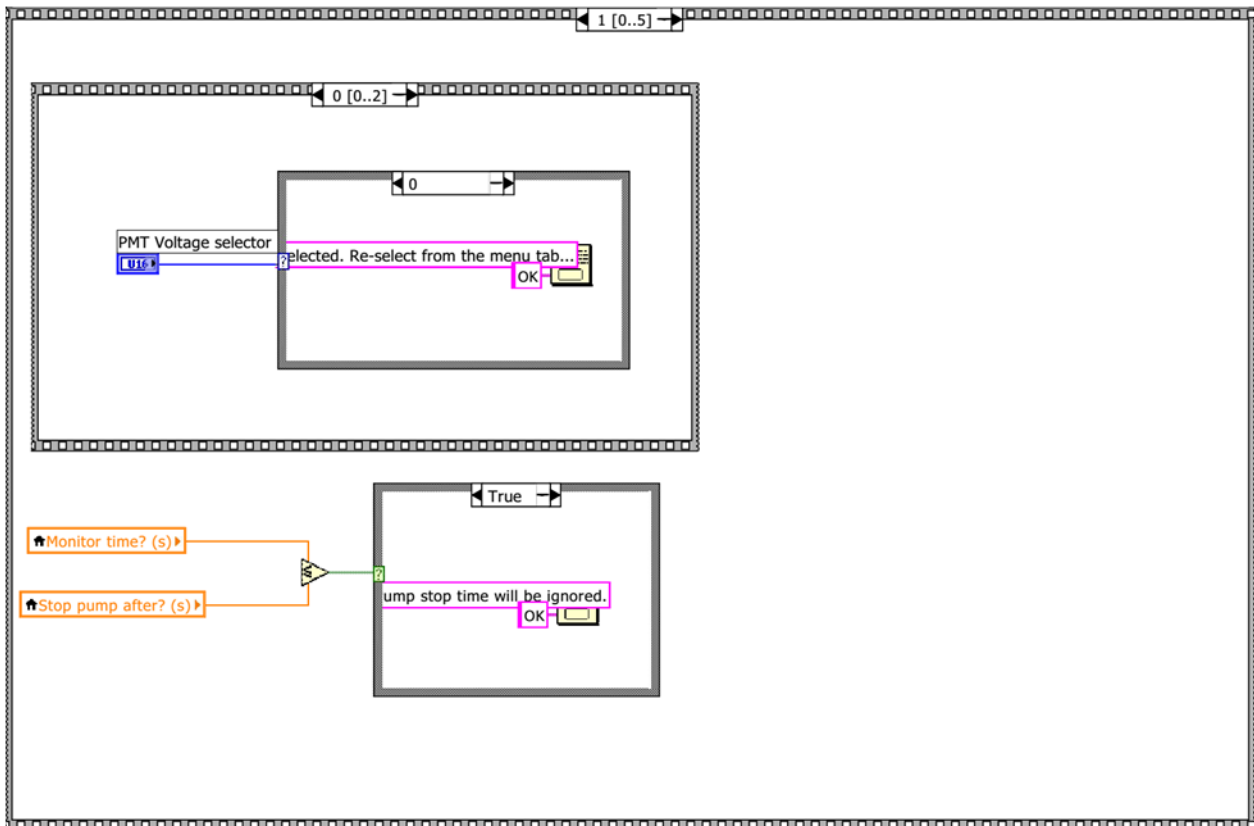
5.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ-ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΑΥΤΟΣΧΕΔΙΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΓΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΗΚΤΙΝΗΣ

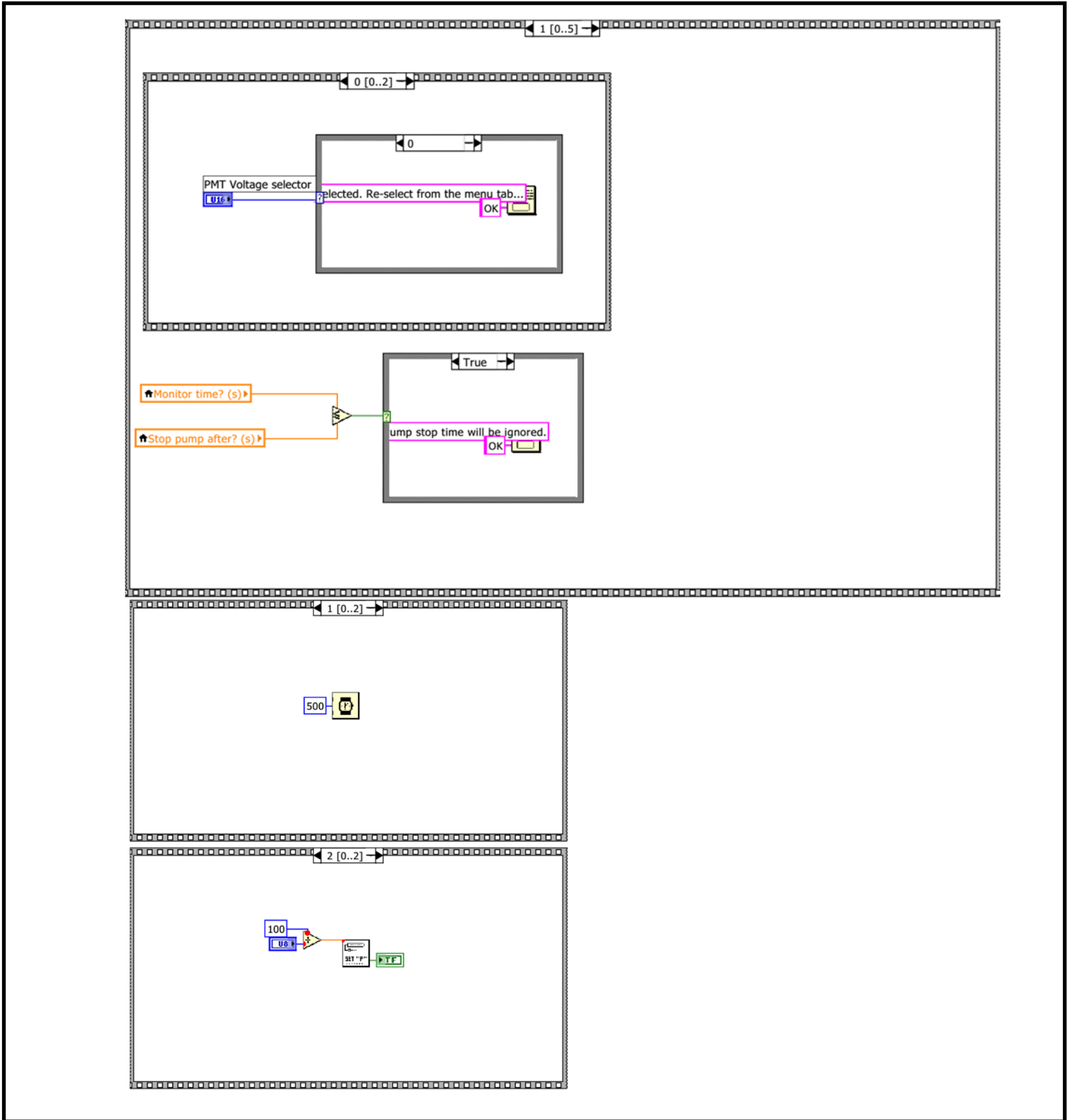
Ο εν λόγω αναλυτής χρησιμοποιήθηκε για ανάπτυξη μεθόδου μέτρησης μεθυλεστέρων σε δείγματα πηκτίνης. **Η ανάπτυξη της μεθόδου πραγματοποιήθηκε από την τότε υποψήφια διδάκτορα κα Lucyna Łękawska.** Η σχετική βιβλιογραφία για την μέθοδο αναφέρεται στο τέλος αυτής της διατριβής (Πηγές: 181-204).

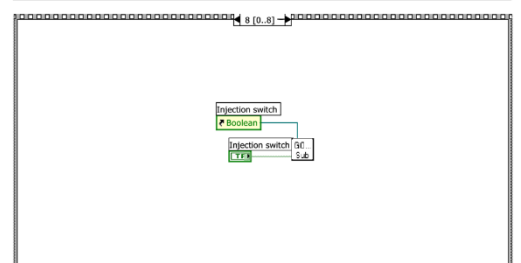
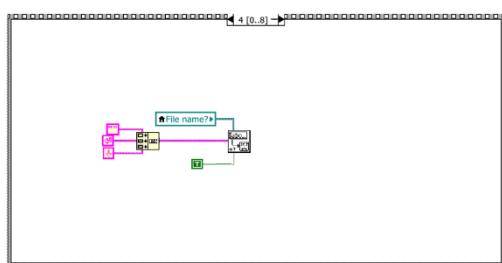
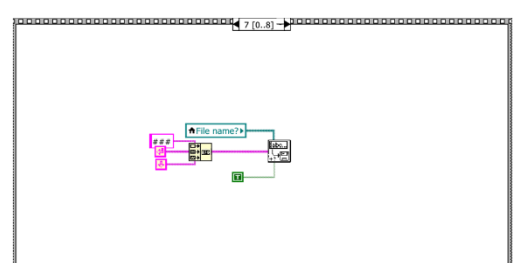
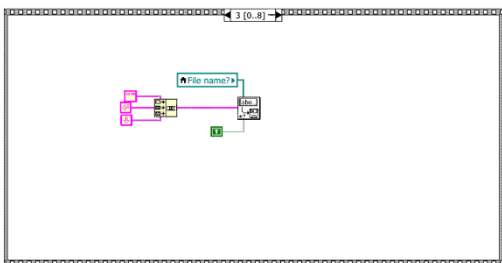
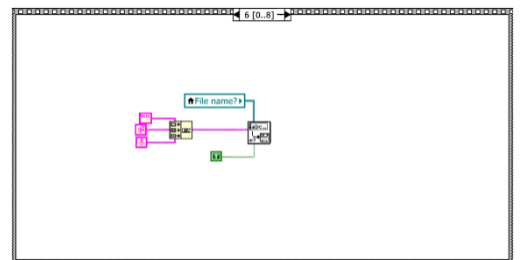
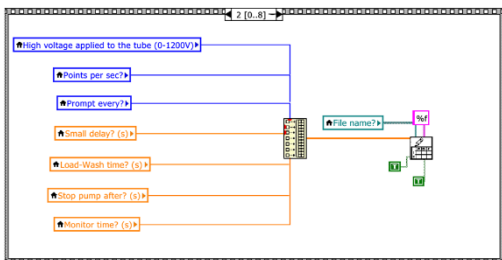
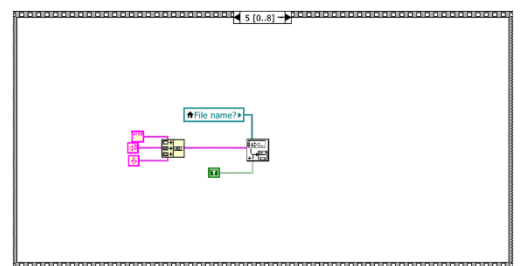
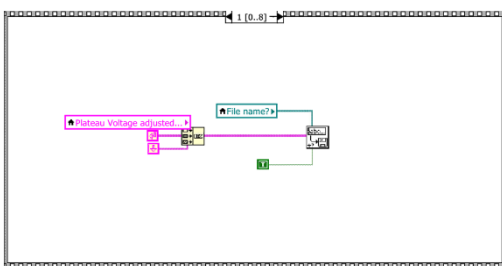
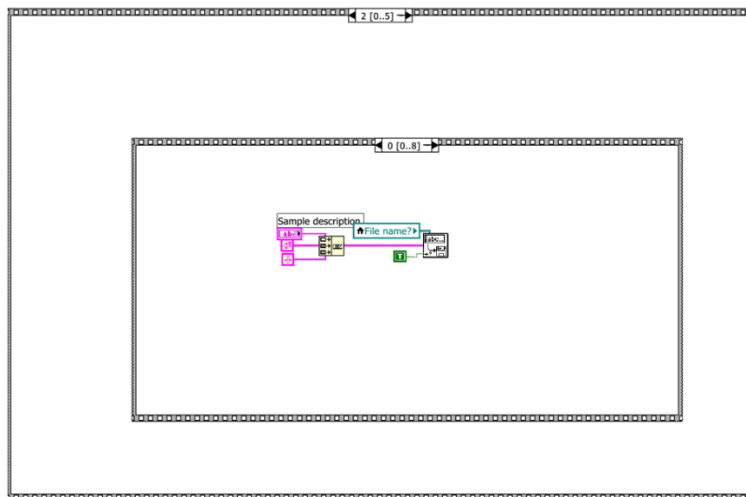
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

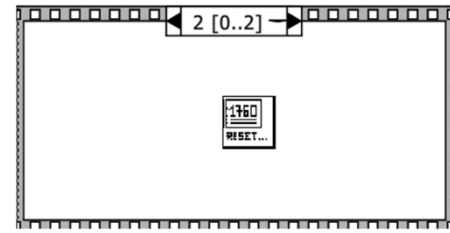
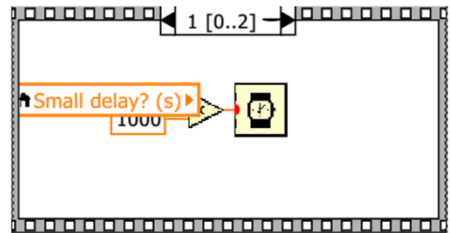
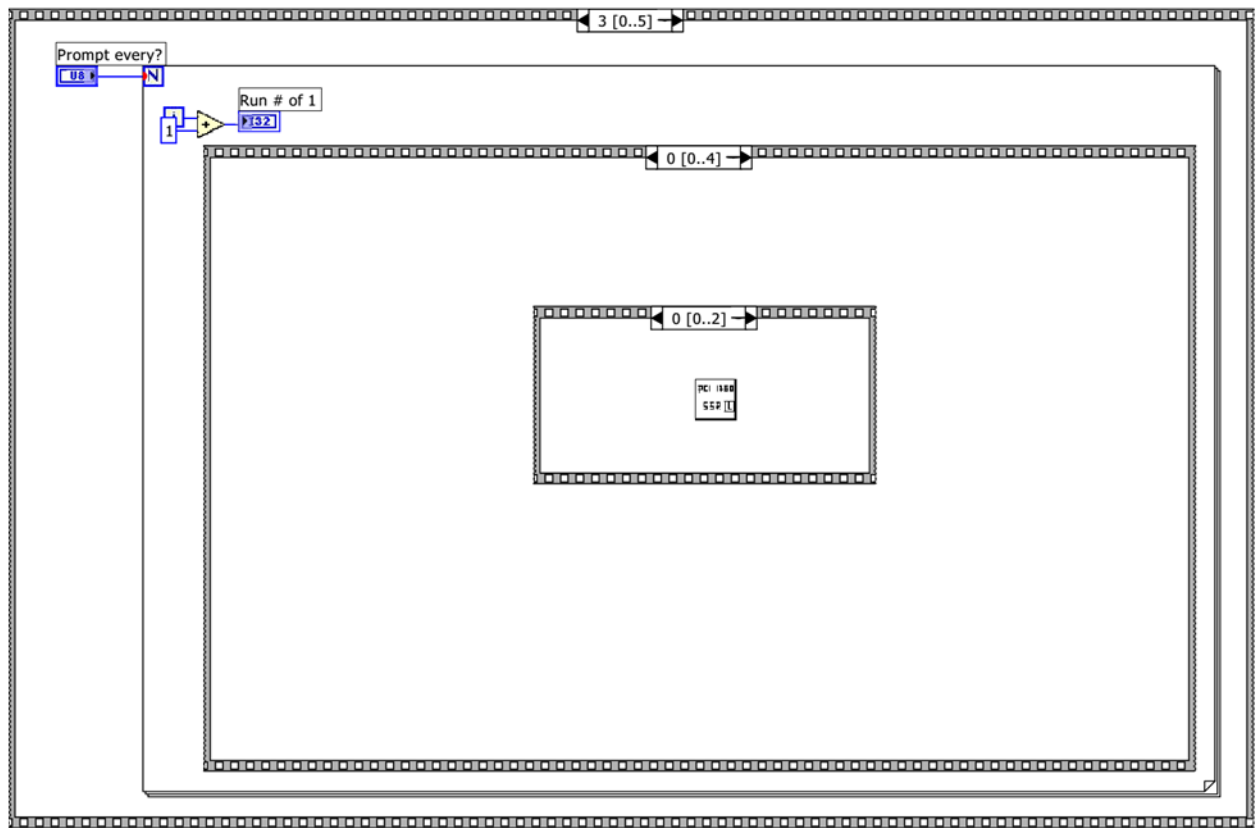
1. ΡΟΗ ΚΩΔΙΚΑ ΚΥΡΙΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΤΗ 1 & 2:

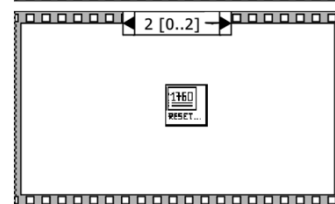
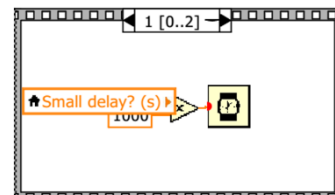
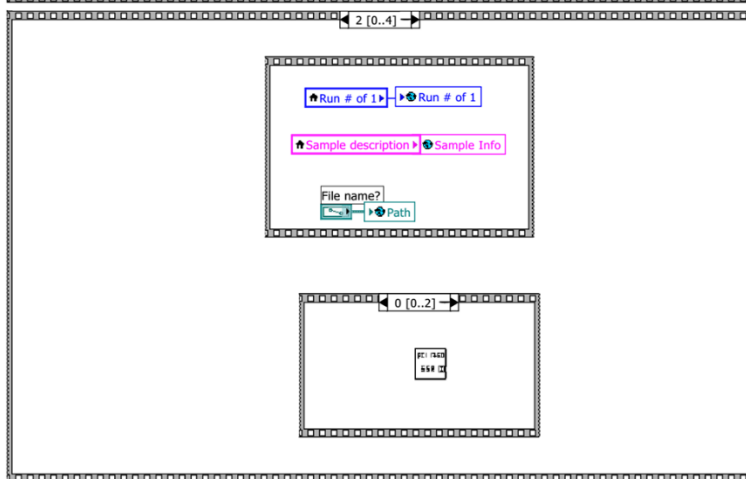
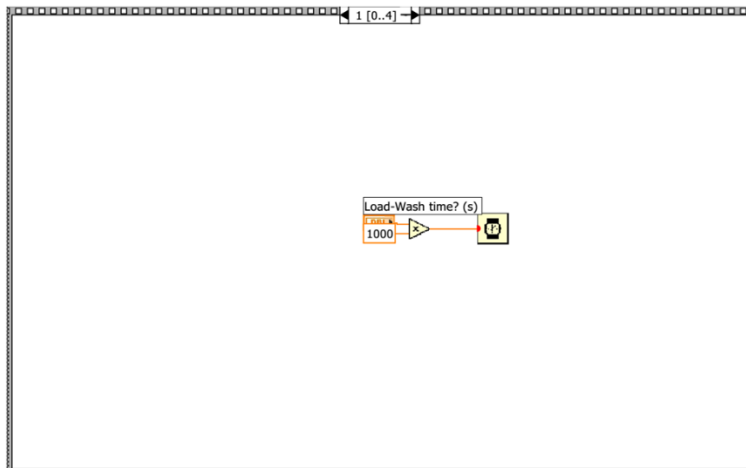
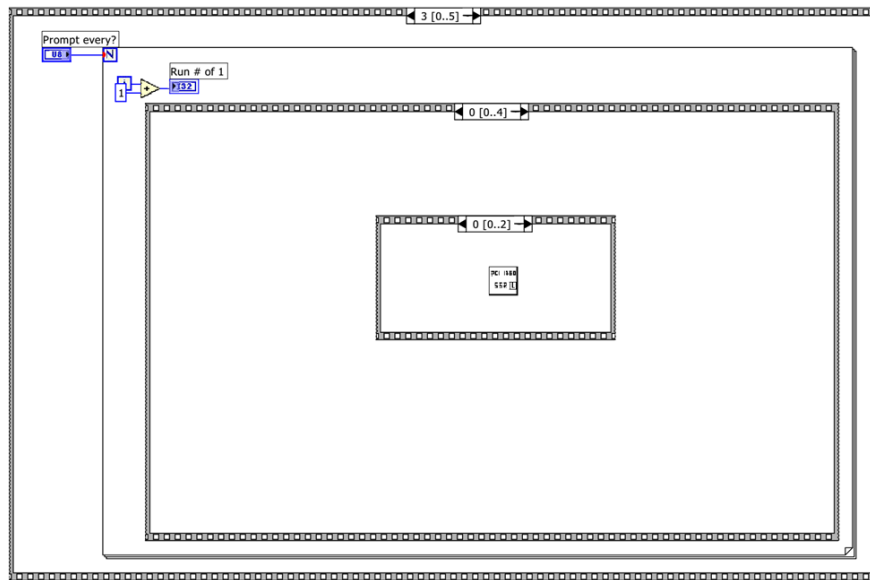


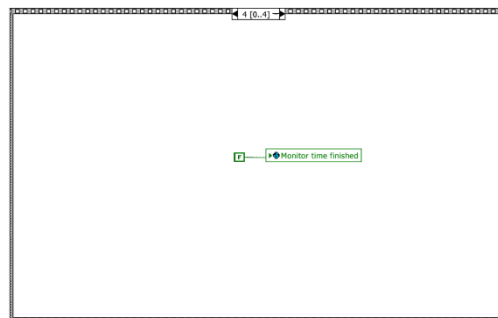
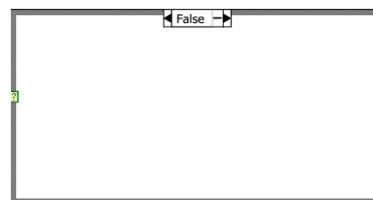
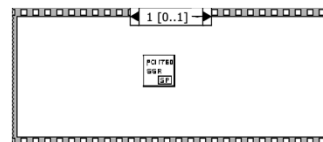
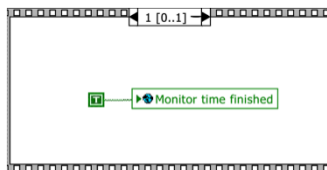
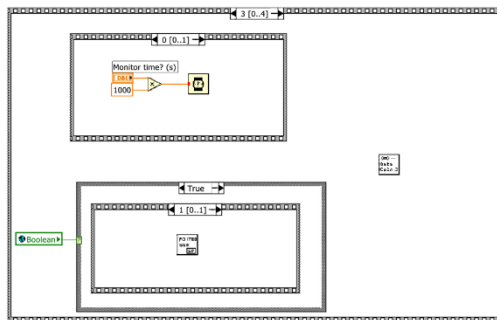
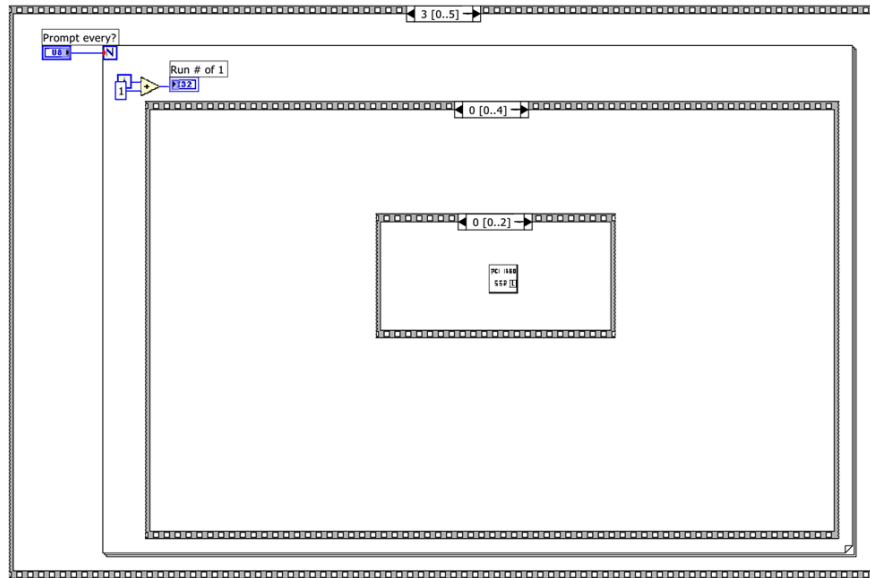


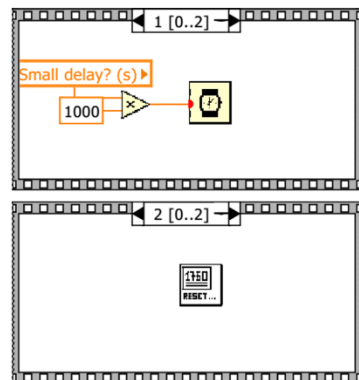
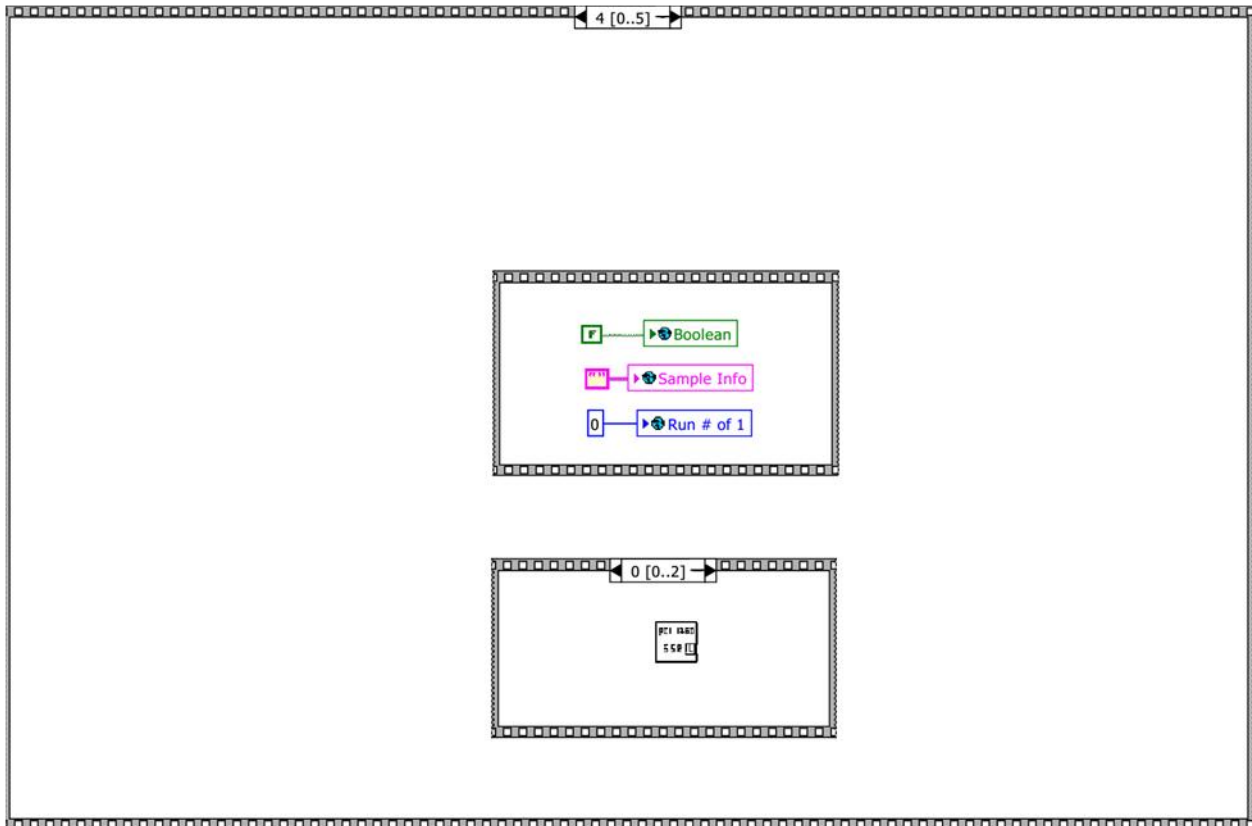


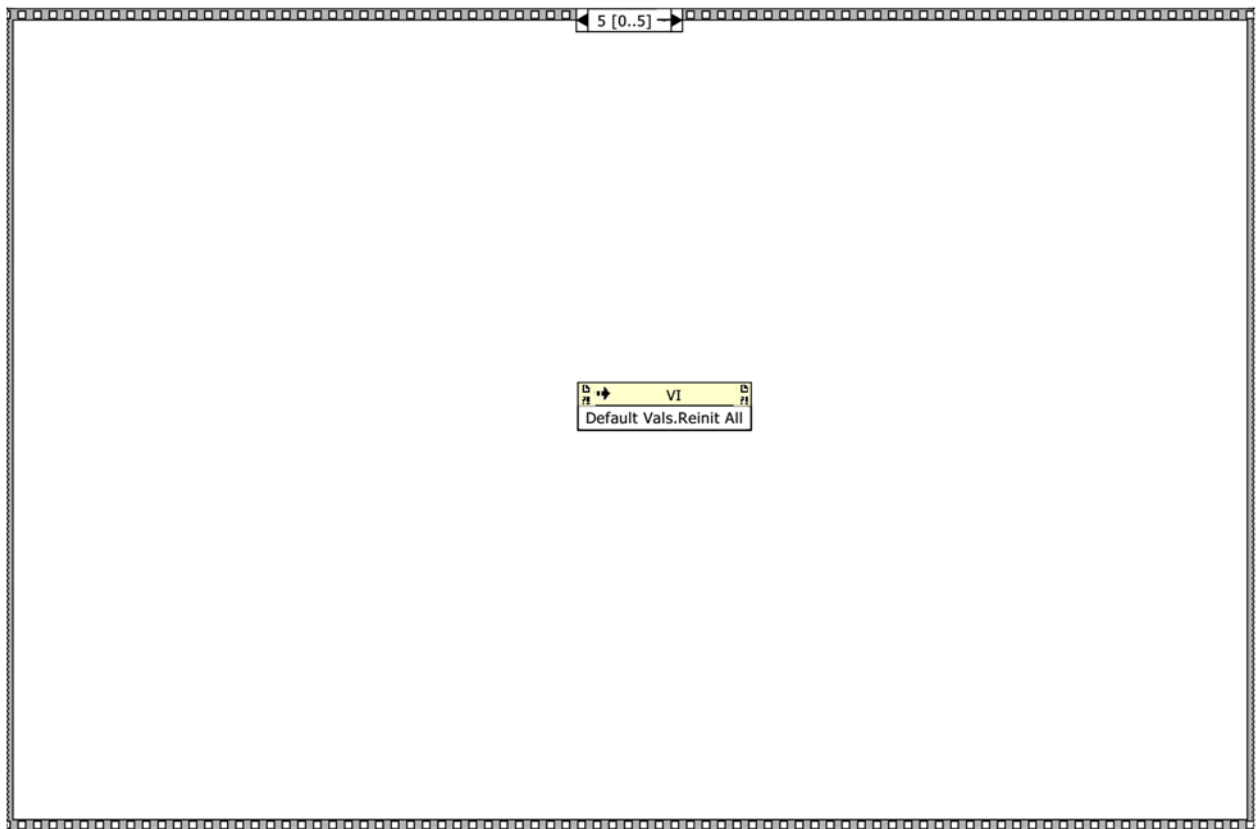




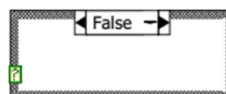
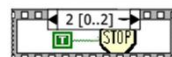
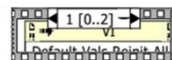
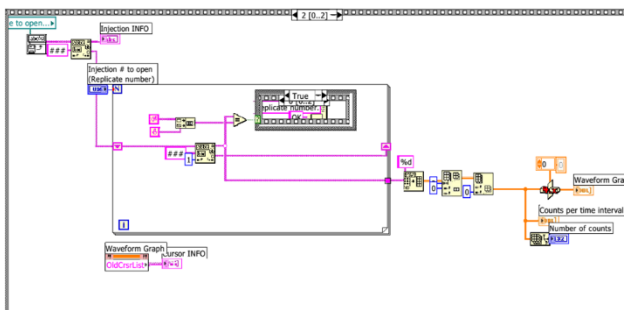
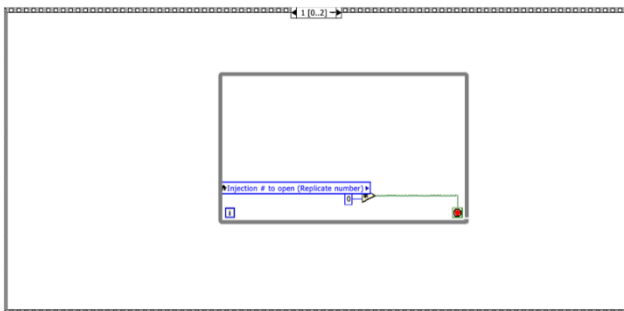
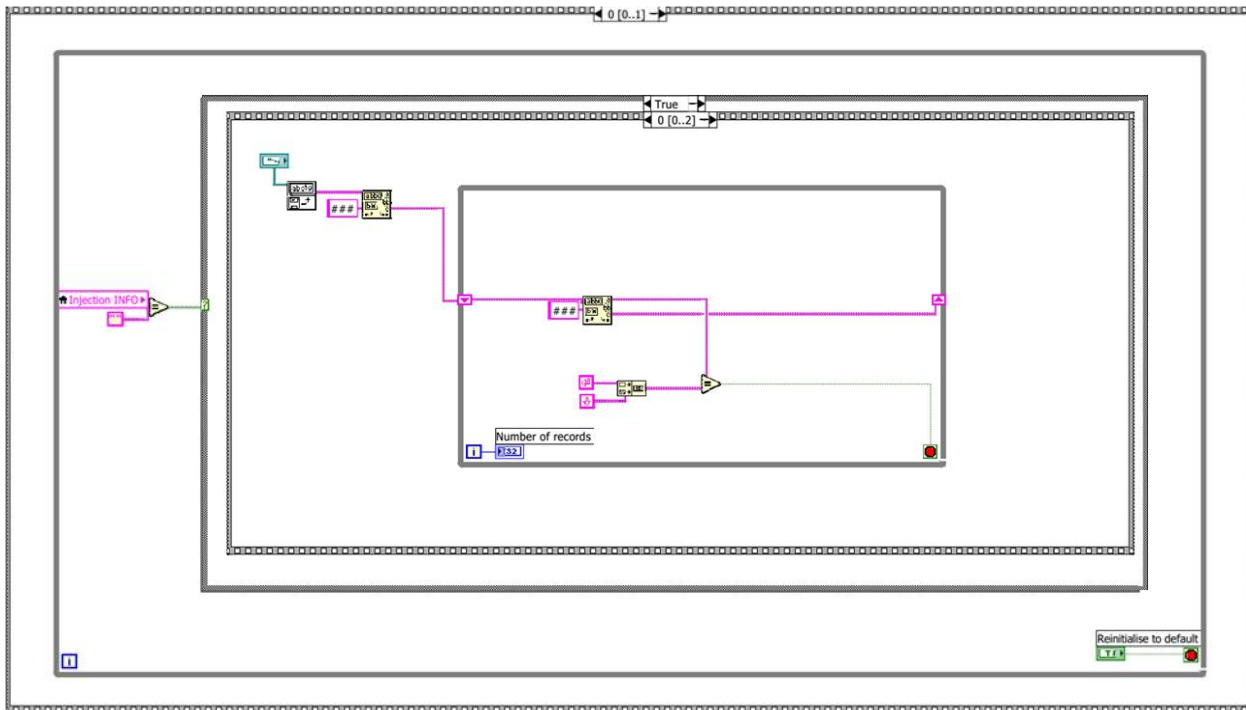


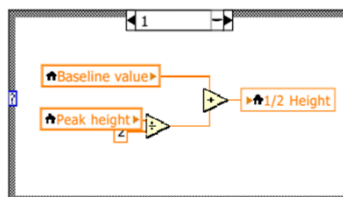
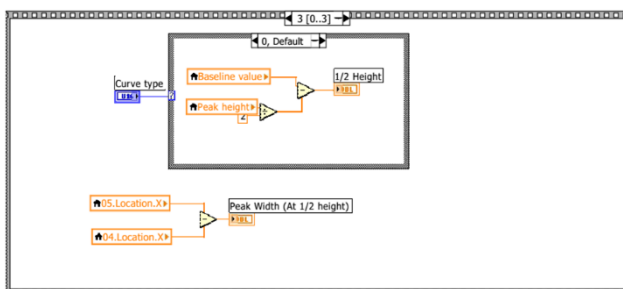
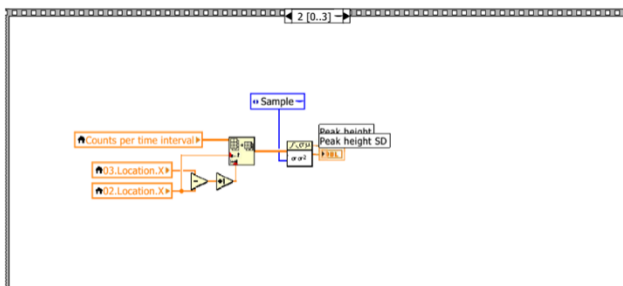
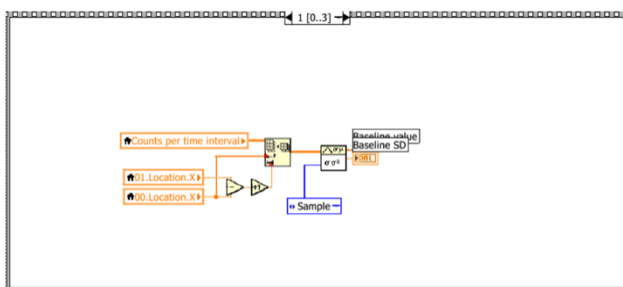
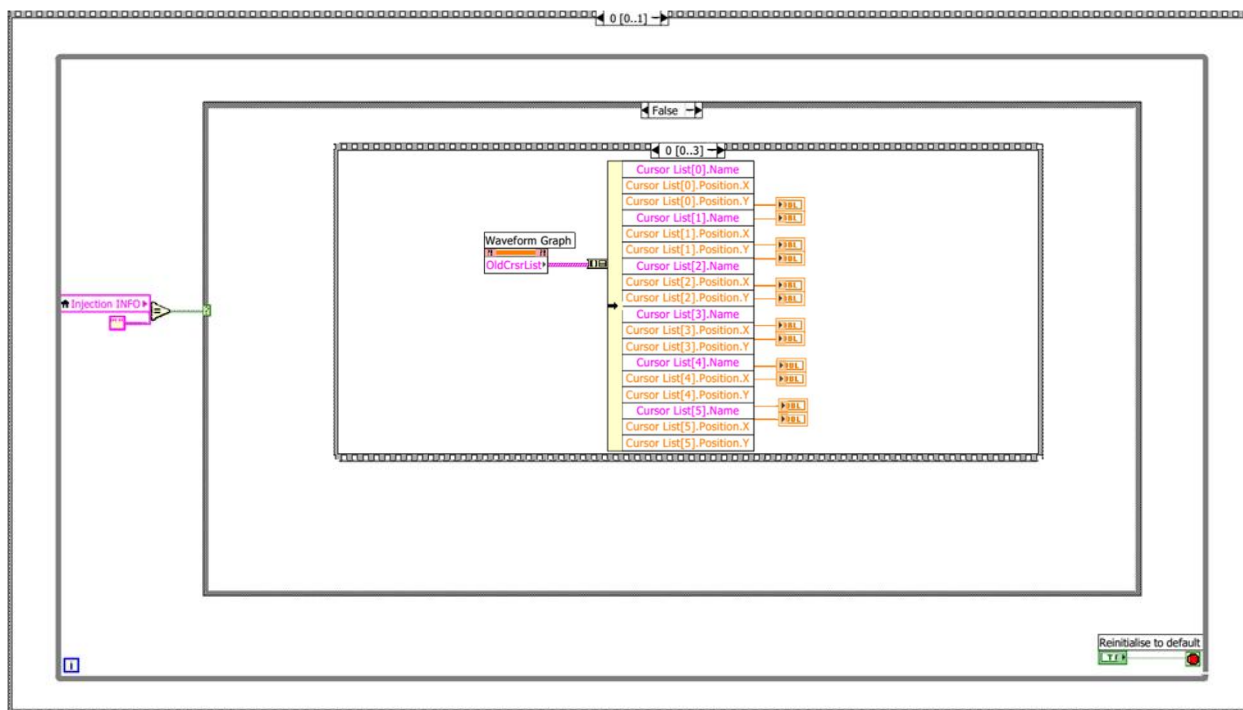


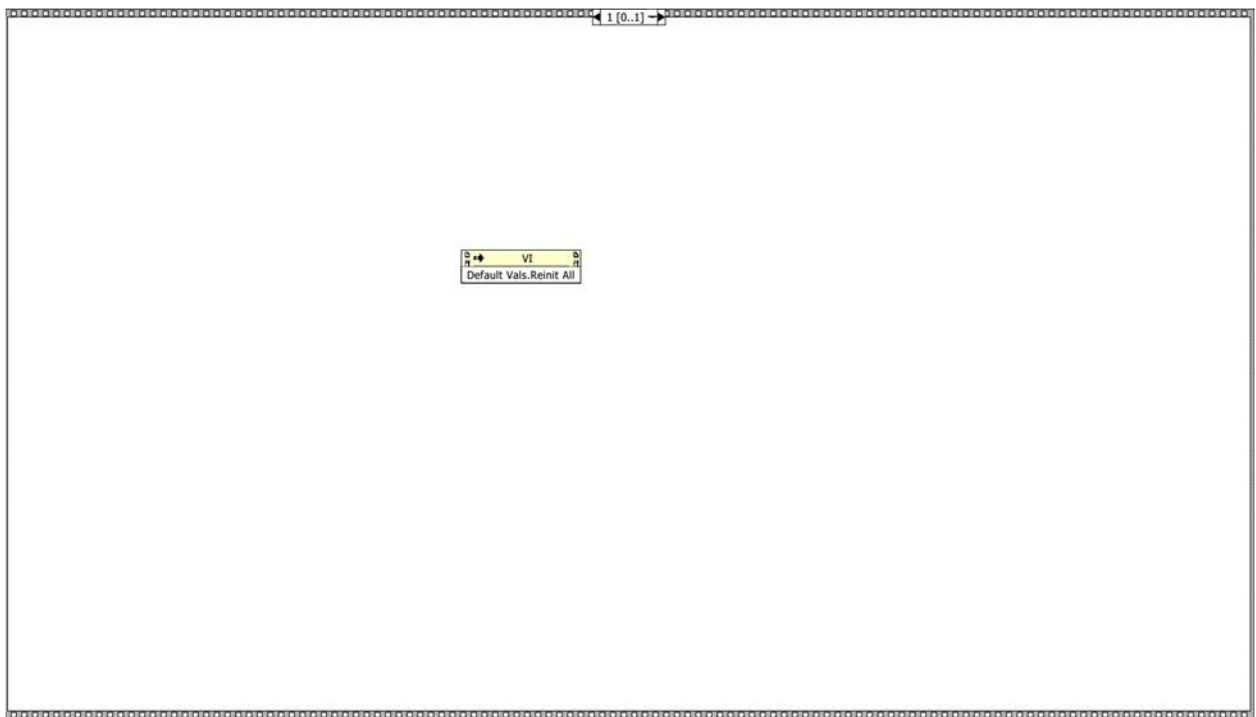




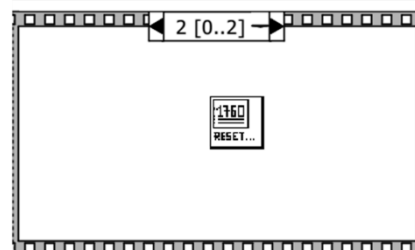
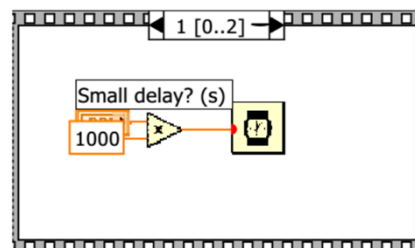
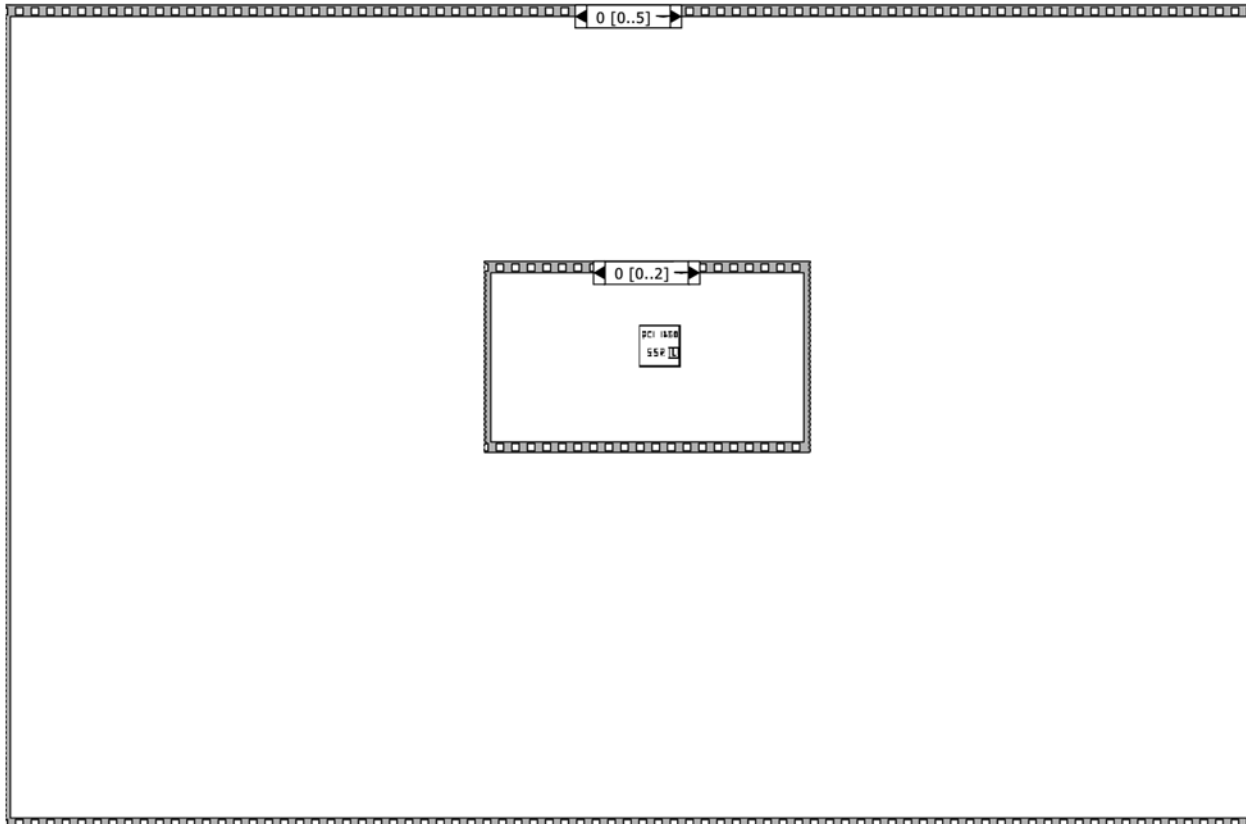
2. ΡΟΗ ΚΩΔΙΚΑ ΕΠΙΠΡΟΣΘΕΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ, ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ ΧΡΗΣΙΜΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ, ΑΠΟ ΑΠΟΘΗΚΕΥΜΕΝΑ ΑΡΧΕΙΑ ΣΤΟΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ:

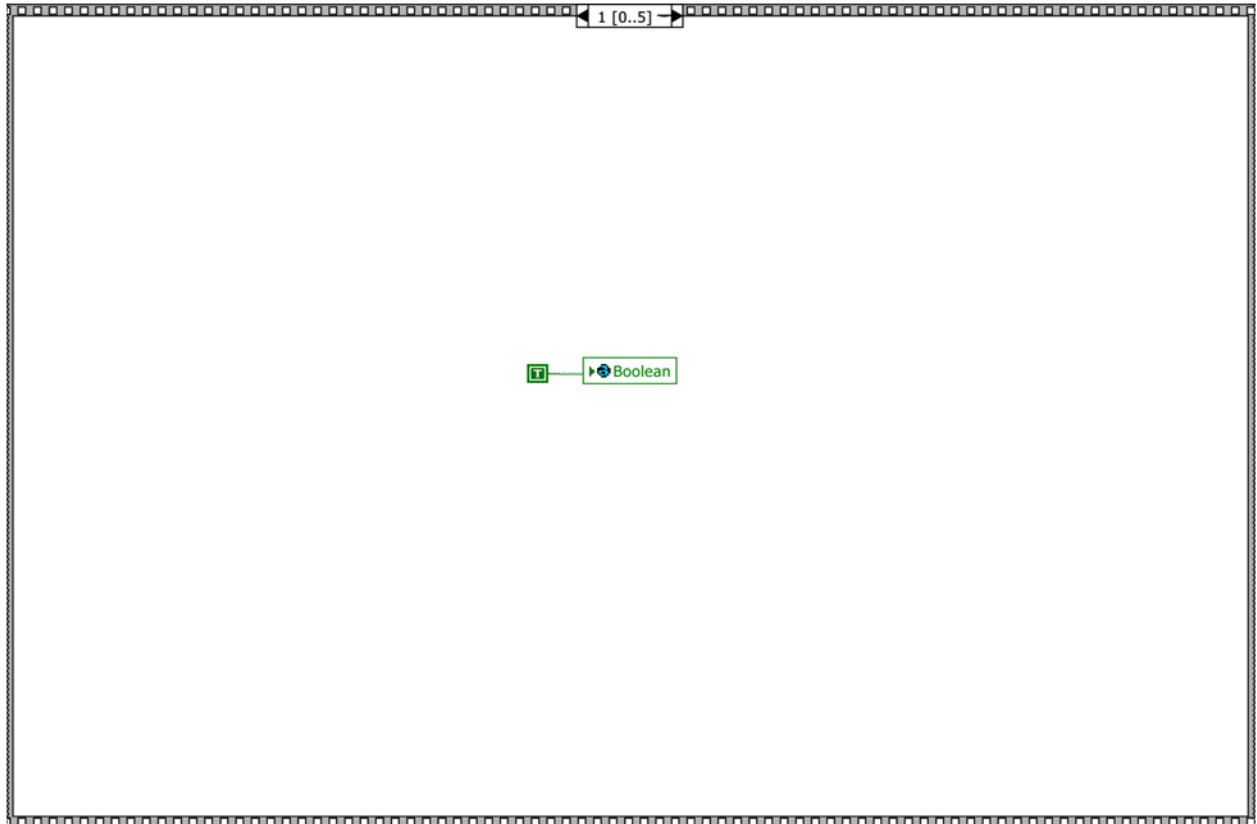


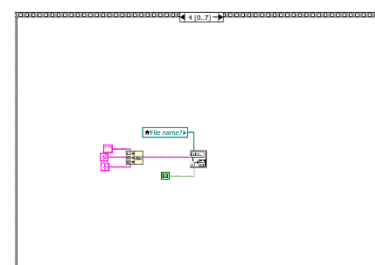
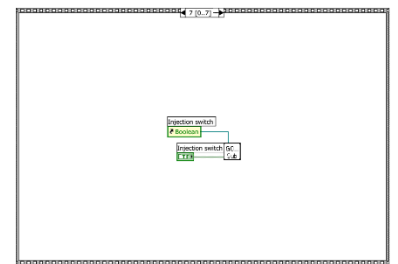
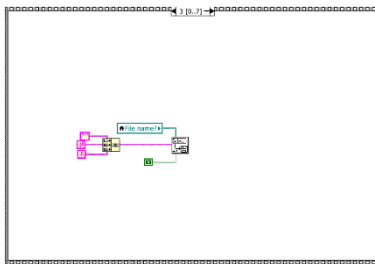
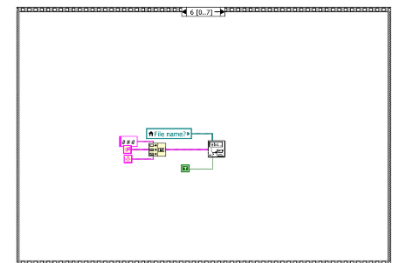
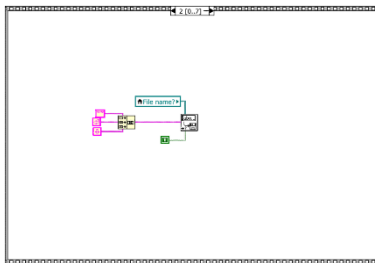
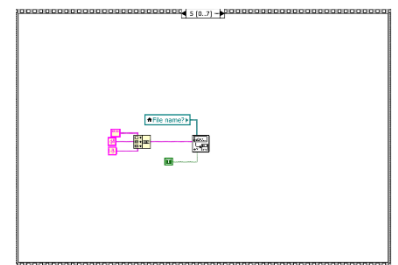
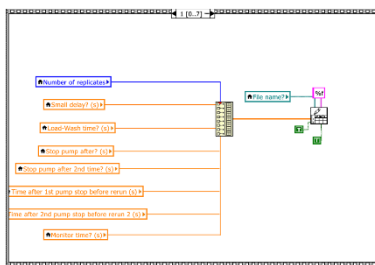
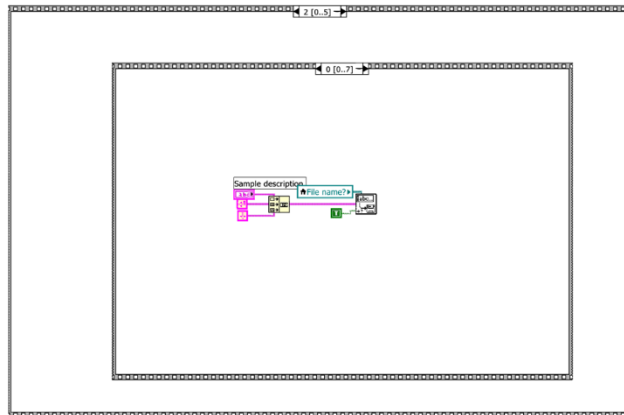


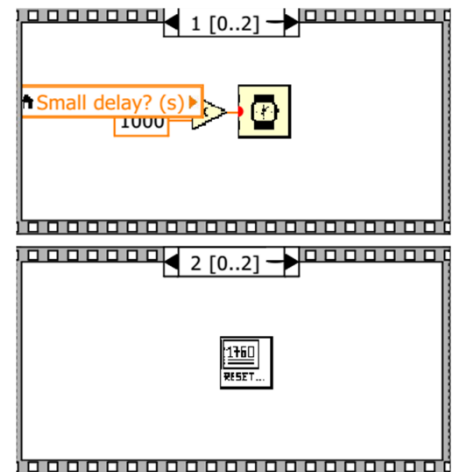
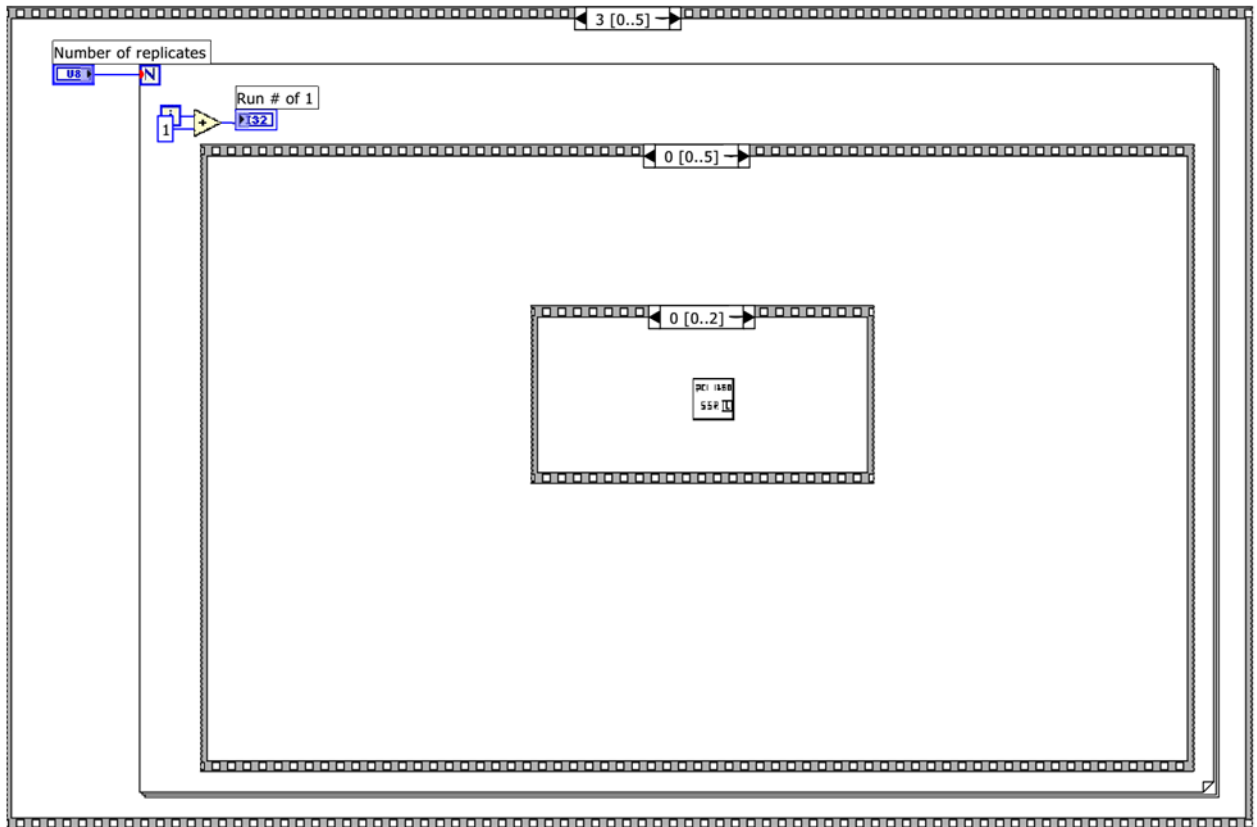


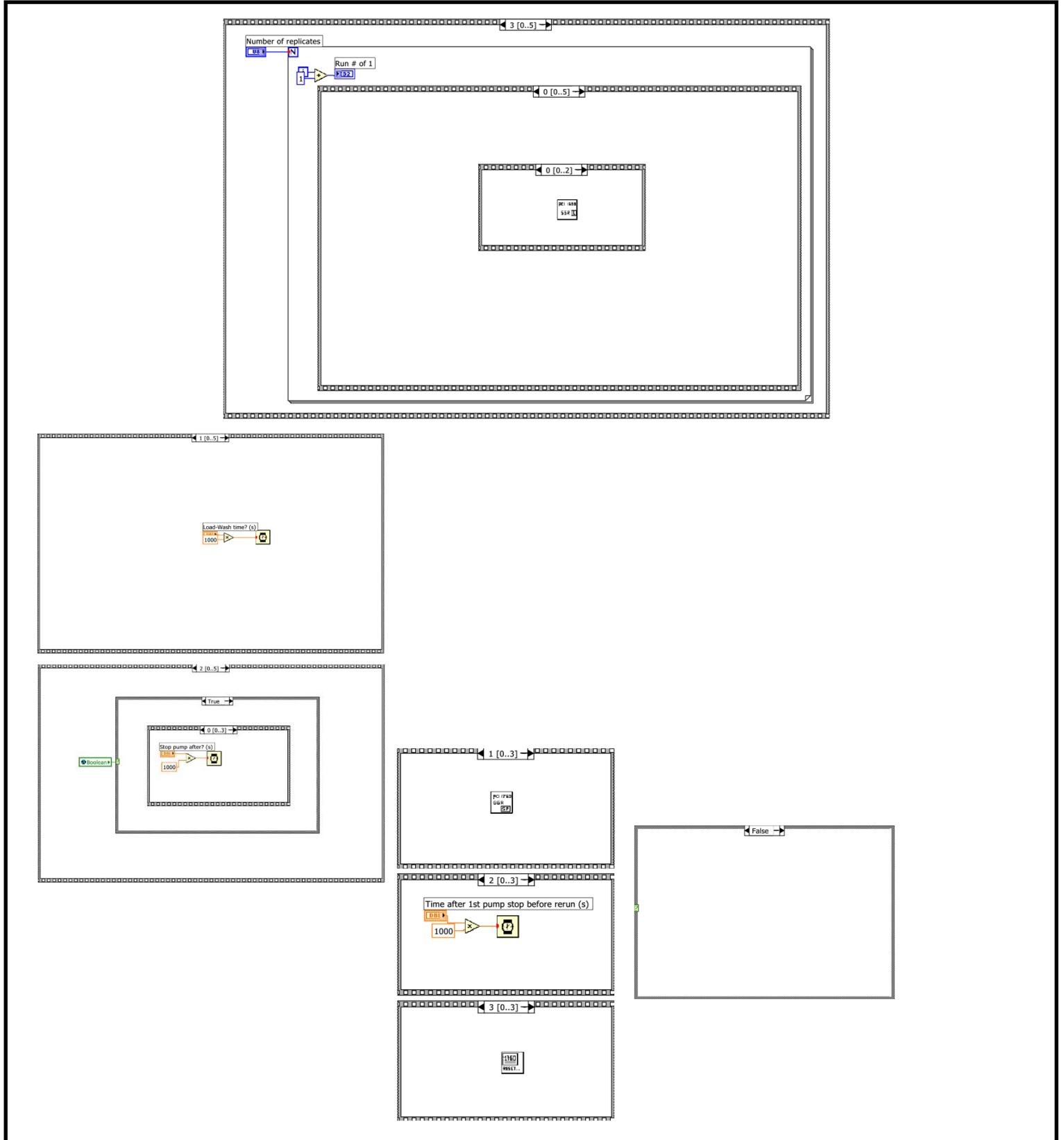
3. ΡΟΗ ΚΩΔΙΚΑ ΚΥΡΙΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗ 3:

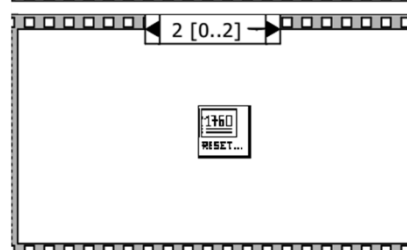
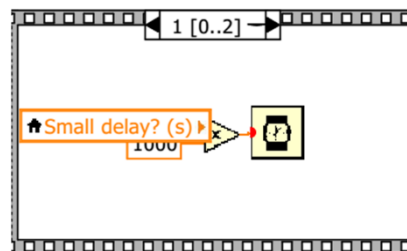
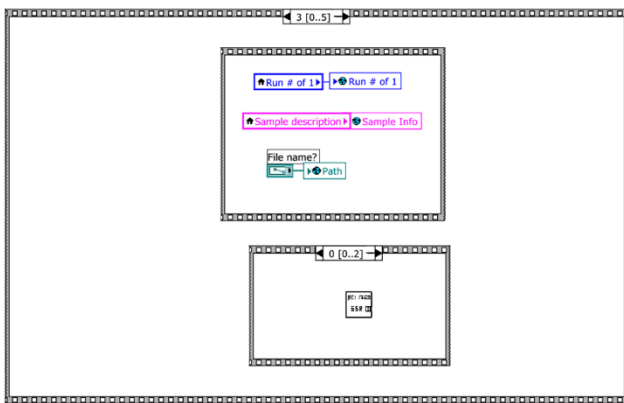
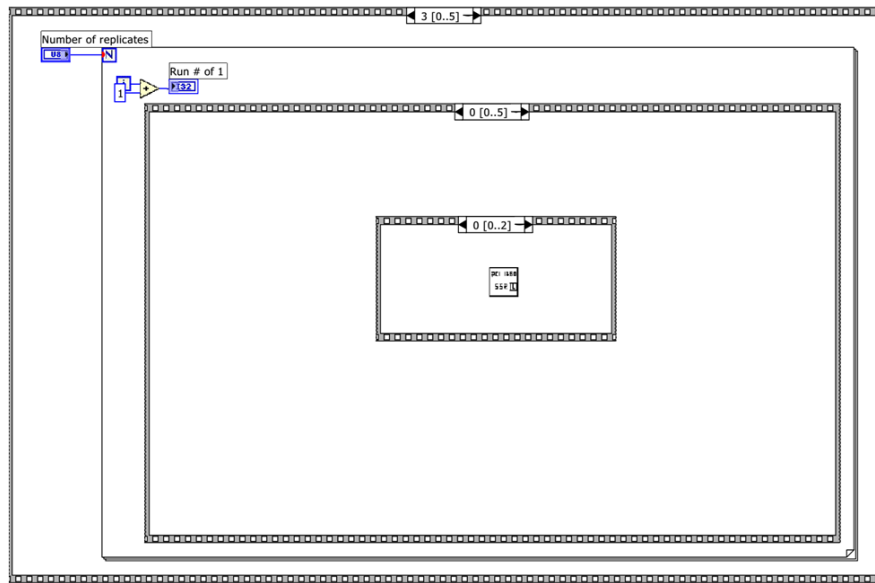


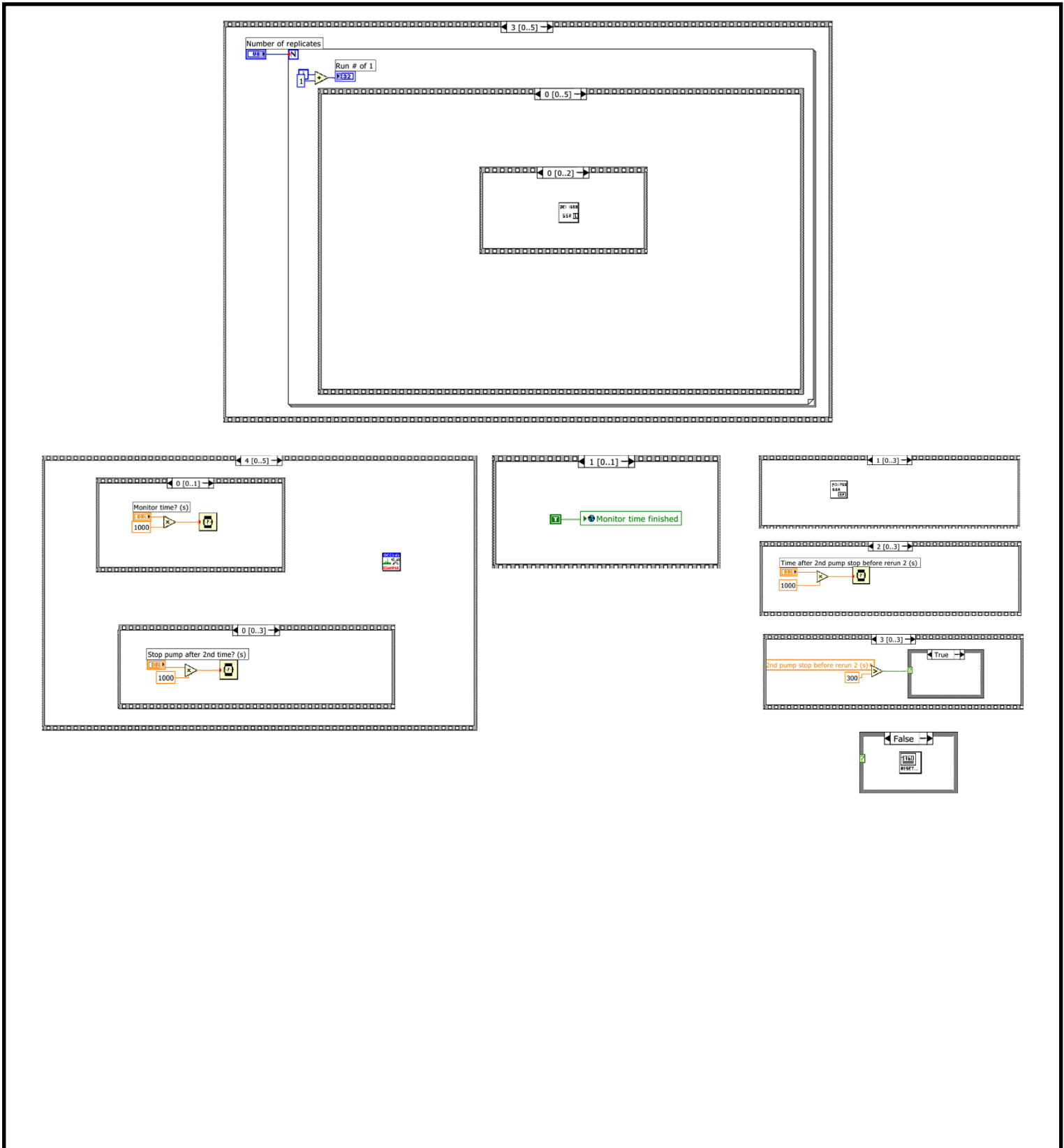


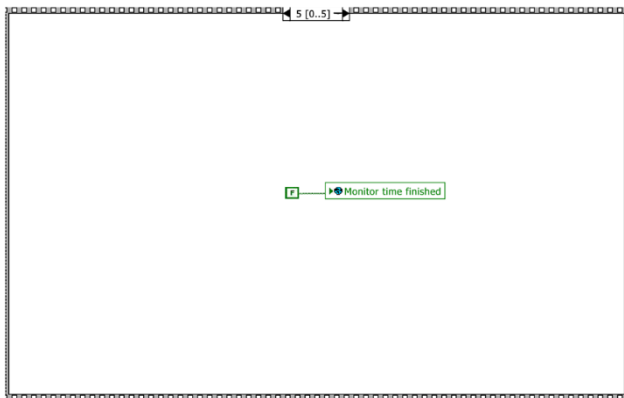
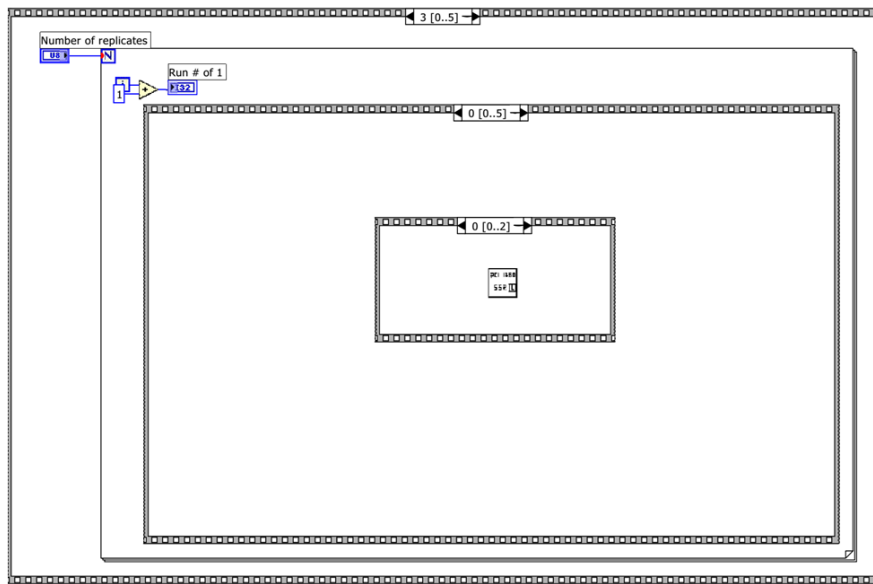


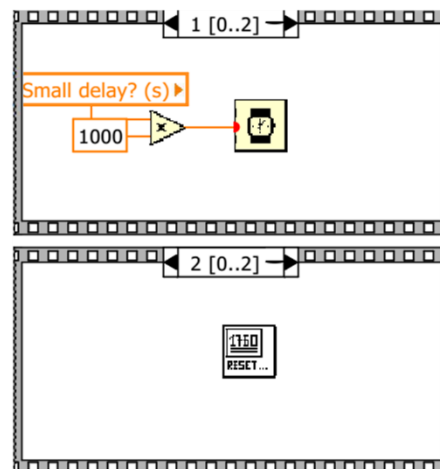
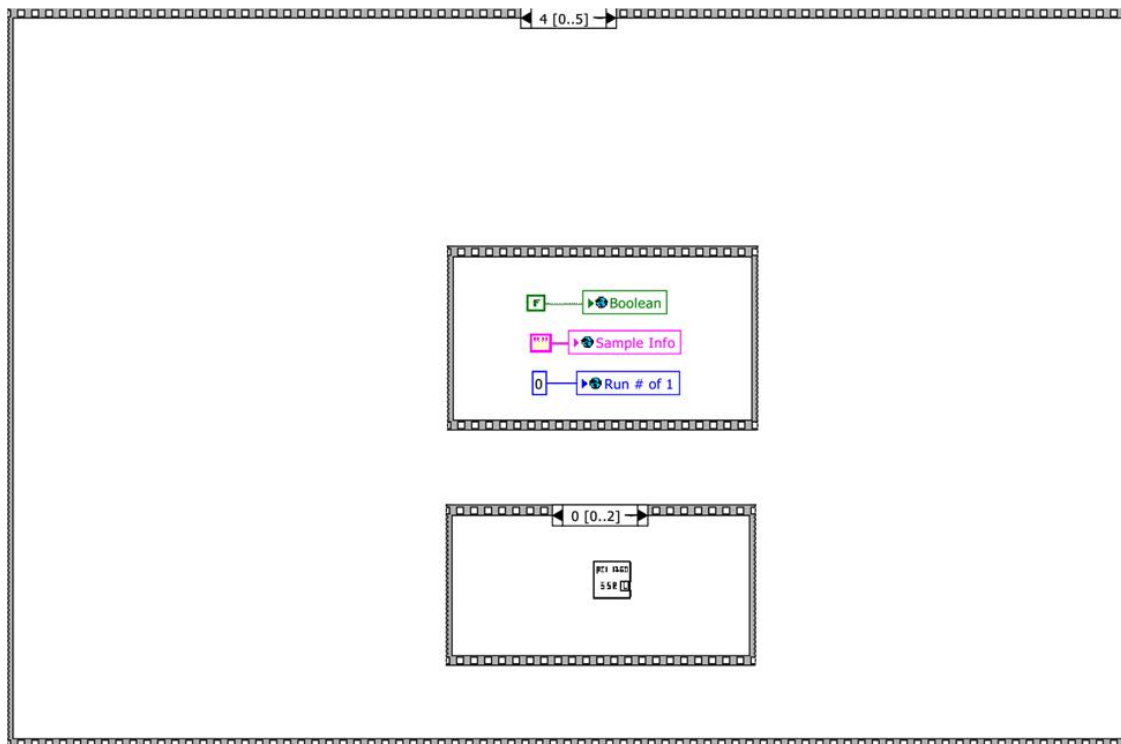


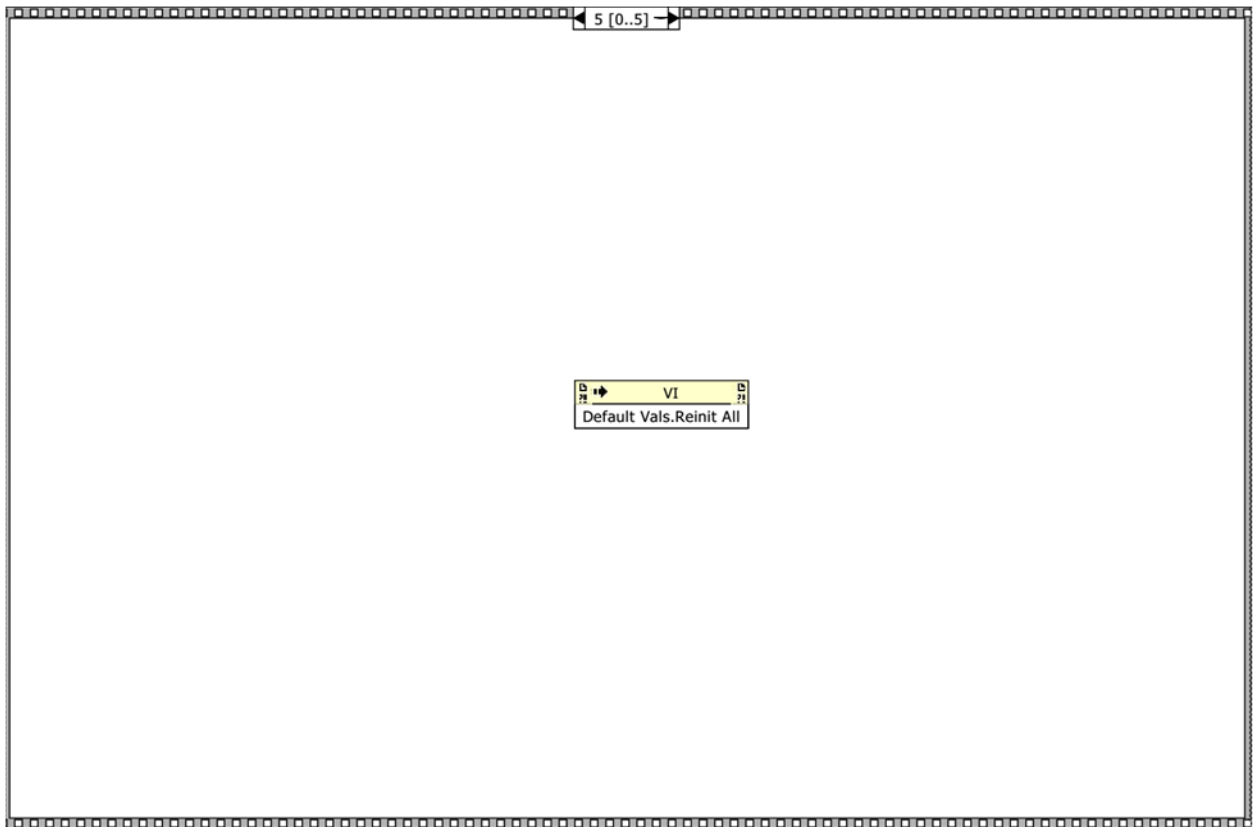












ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Wikipedia*, Θέμα: αυτοματισμός, <http://el.wikipedia.org/wiki/αυτοματισμός>, Πρόσβαση: **01/2014**.
2. Κ. Α. Γεωργίου, *Διδακτορική Διατριβή*, Αθήνα, **1990**.
3. Θ. Π. Χατζηϊωάννου, *ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑΙ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ*, Αθήνα, **1992**.
4. J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145, **1975**.
5. *Scopus*, Θέμα: FIA, <http://www.scopus.com/home.url>, Πρόσβαση: **01/2014**.
6. *Google*, Θέμα: commercial FIA analysers, <https://www.google.gr/>, Πρόσβαση: **01/2014**.
7. IUPAC, *Compendium of Analytical Nomenclature*, Pergamon Press, New York, **1997**.
8. R. D. McDowall, *Laboratory Automation & Information Management*, **17**, 265, **1992**.
9. *Wikipedia*, Θέμα: Analytical chemistry, http://en.wikipedia.org/wiki/Analytical_chemistry, Πρόσβαση: **01/2014**.
10. *IUPAC*, Θέμα: Analytical chemistry and automation, <http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/1969/pdf/1801x0017.pdf>, Πρόσβαση: **01/2014**.
11. J. K. Foreman and P. B. Stockwell, *Automatic Methods of Analysis*, Elsevier, New York, **1975**.
12. W. A. Coakley, *Handbook of Automated Analysis*, Marcel Dekker Inc., New York, **1981**.
13. S. Armenta, S. Garrigues and M. de la Guardia, *Trends in Analytical Chemistry*, **27** (Issue 6), 497, **2008**.
14. Aldo Roda et al., *Trends in Analytical Chemistry*, **28** (Issue 3), 307, **2009**.
15. James N. Kyranos (Editor), *Trends in Analytical Chemistry*, **24** (Issue 8), 793, **2005**.
16. D.J. Harrison and E. van den Berg, *Micro Total Analysis Systems '98, Proceedings of the WTAS '98 Workshop*, Kluwer, Dordrecht, **1998**.
17. C.S. Effenhauser, G.J.M. Bruin and A. Paulus, *Electrophoresis*, **18**, 2203, **1997**.
18. C.L. Coyler, T. Tang, N. Chiem and D.J. Harrison, *Electrophoresis*, **18**, 1733, **1997**.
19. Richard D. Oleschuk and D. Jed Harrison, *Trends in Analytical Chemistry*, **19** (Issue 6), 379, **2000**.
20. J. Martinez Calatayud and J.V. Garcia Mateo, *Trends in Analytical Chemistry*, **12** (Issue 10), 428, **1993**.
21. R. Montero, M. Gallego and M. Valcarcel, *Analytica Chimica Acta*, **234**, 433, **1990**.
22. A. Kojlo and J. Martinez Calatayud, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **8**, 663, **1990**.
23. H. Mottola, and J. Martinez Calatayud, *Analytica Chimica Acta*, **233**, 235, **1990**.
24. J. Martinez Calatayud and J.V. Garcia Mateo, *Analytica Chimica Acta*, **264**, 283, **1992**.
25. S. Laredo Ortiz and J. Martinez Calatayud, *Analytica Chimica Acta*, **276**, 281, **1993**.

26. S. Laredo Oriz and J. Martinez Calatayud, *4th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Baltimore, MD, April 18-21, MPCL, **1993**.
27. Chun Li and Gaoquan Shi, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **19**, 20, **2014**.
28. Sarra El Ichi et al., *Biosensors and Bioelectronics*, **54**, 378, **2014**.
29. Hongli Guo et al., *Sensors and Actuators B: Chemical*, **194**, 114, **2014**.
30. Eleftherios Touloupakis et al., *Sensors and Actuators B: Chemical*, **193**, 301, **2014**.
31. Xinle Jia, Zhimin Liu, Na Liu and Zhanfang Ma, *Biosensors and Bioelectronics*, **53**, 160, **2014**.
32. Rekha Rani Dutta and Panchanan Puzari, *Biosensors and Bioelectronics*, **52**, 166, **2014**.
33. Thangamuthu Madasamy et al., *Biosensors and Bioelectronics*, **52**, 209, **2014**.
34. M. Valcarcel and M. D. Luque de Castro, *Automatic Methods of Analysis*, Elsevier, New York, **1988**.
35. A. Zipp and W. E. Hornby, *Talanta*, **31**, 863, **1984**.
36. T. P. Hadjiioannou et al., *Analytica Chimica Acta*, **89**, 231, **1977**.
37. Hassan G. Fouda and Richard P. Schneider, *Trends in Analytical Chemistry*, **6** (Issue 6), 139, **1987**.
38. J. Hawkins and A. Lloyd, *Proceedings of the Fourteenth Biennial Conference of the International Association on Water Pollution Research and Control*, Brighton, 937, **1988**.
39. M. A. Koupparis and A. Barcuchová, *Analyst*, **111**, 313, **1986**.
40. R. S. Vithanage and P. K. Dasgupta, *Analytical Chemistry*, **58**, 326, **1986**.
41. E.G Sarantonis and Alan Townshend, *Analytica Chimica Acta*, **184**, 311, **1986**.
42. F. Winquist and I. Lundström, *Analytical Chemistry*, **58**, 145, **1986**.
43. M. Trojanowicz et al., *Analytica Chimica Acta*, **188**, 165, **1986**.
44. N. Ishibashi et al., *Analytica Chimica Acta*, **190**, 185, **1986**.
45. P. C. A. Ooms et al., *Journal of Radioanalytical Chemistry*, **67** (Issue 1), 5, **1981**.
46. L. T. Skeggs, *Analytical Chemistry*, **38** (Issue 6), 31A, **1966**.
47. J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, **78**, 145, **1975**.
48. G. Navy et al., *Analytica Chimica Acta*, **52**, 47, **1970**.
49. J. J. T. Gerding et al., *Journal of Chromatography*, **66**, 145, **1972**.
50. H. A. Mottola, *Analytical Chemistry*, **53** (Issue 12), 1312A, **1981**.
51. K. K. Stewart et al., *Analytical Biochemistry*, **70**, 167, **1976**.
52. K. K. Stewart, *Talanta*, **28**, 789, **1981**.
53. J. D. Frantz and P. E. Hare, *Annual Report of the Director of Geophysical Lab.*, **1630**, 704, **1973**.
54. K. K. Stewart, *Analytical Chemistry*, **49** (Issue 13), 2125, **1977**.
55. H. U. Bermeyer and A. Hagan, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **261**, 333, **1972**.
56. V. R. White and J. M. Fitzgerald, *Analytical chemistry*, **44** (Issue 7), 1267, **1972**.
57. K. K. Stewart et al., *Federation Proceedings Journal*, **33**, 1439, **1974**.

58. V. V. S. E. Dutt and H. A. Mottola, *Analytical chemistry*, **47** (Issue 2), 357, **1975**.
59. J. Ruzicka et al., *ibid.*, **81**, 387, **1976**.
60. D. Betteridge and J. Ruzicka, *Talanta*, **23**, 409, **1976**.
61. E. H. Hansen and J. Ruzicka, *ibid.*, **87**, 353, **1976**.
62. E. H. Hansen et al., *ibid.*, **89**, 241, **1977**.
63. J. Ruzicka et al., *ibid.*, **92**, 235, **1977**.
64. F. J. Krug. et al., *Analyst*, **102**, 503, **1977**.
65. J. Ruzicka and E. H. Hansen, FLOW INJECTION ANALYSIS, John Wiley & Sons, New York, **1981**.
66. J. Ruzicka and E. H. Hansen, FLOW INJECTION ANALYSIS, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York, **1988**.
67. M. Valcarcel and M.D. Luque de Castro, FLOW INJECTION ANALYSIS – PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Ellis Horwood, Chichester, **1987**.
68. O. Levenspiel, CHEMICAL REACTION ENGINEERING, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York, **1998**.
69. M. D. Luaces et al., *Microchemical Journal*, **110**, 458, **2013**.
70. A. C. Galvis-Sánchez et al., *Food Control*, **22**, 277, **2011**.
71. N. V. Panini et al., *Food Chemistry*, **125**, 791, **2011**.
72. R. Tijssen, *Analytica Chimica Acta*, **114**, 71, **1980**.
73. J. Ruzicka and E.H. Hansen, **CD περί Flow Injection Analysis**, 4th Edition, Copyright **2009**.
74. J. T. Vanderslice et al., *Analytica Chimica Acta*, **179**, 119, **1986**.
75. K. K. Stewart, *Analytical Chemistry*, **55** (Issue 9), 931A, **1983**.
76. F. Zhaolun et al., *Analytical Chemistry*, **57** (Issue 7), 1457, **1985**.
77. J. F. Tyson, *Analytica Chimica Acta*, **179**, 131, **1986**.
78. A. Fernandez et al., *Analytica Chimica Acta*, **193**, 107, **1987**.
79. J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, **99**, 37, **1978**.
80. J. M. Reijn et al., *Analytica Chimica Acta*, **123**, 229, **1981**.
81. P. Solich et al., *Analytica Chimica Acta*, **218**, 151, **1989**.
82. J. F. van Staden, *Analytica Chimica Acta*, **138**, 403, **1982**.
83. A) M. E. Georgiou, C. A. Georgiou and M. A. Koupparis, *Analytical Chemistry*, **67** (Issue 1), 114, **1995**.
 B) M. E. Georgiou, C. A. Georgiou and M. A. Koupparis, *Analytical Chemistry*, **71** (Issue 13), 2541, **1999**.
 C) M. Gisin et al., *Analytica Chimica Acta*, **179**, 149, **1986**.
84. J. N. Miller et al., *Analytica Chimica Acta*, **179**, 81, **1986**.
85. J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, **161**, 1, **1984**.
86. G. Horvai, E. Pungor and A Mottola, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **17** (Issue 3), 231, **1987**.
87. G. Taylor, *Proceedings of the Royal Society Series A*, **219**, 186, **1953**.

88. J. T. Vanderslice et al., *Talanta*, **28**, 11, **1981**.
89. M. A. Gomez-Nieto et al., *Talanta*, **32**, 319, **1985**
90. H. Wada et al., *Analytica Chimica Acta*, **179**, 181, **1986**.
91. G. Gerhardt and R. N. Adams, *Analytical Chemistry*, **54** (Issue 14), 2618, **1982**.
92. B. Lillig, *Theorie und Praxis in der Modern Flüssigkeitchromatographie*, **Thesis**, Univ. des Saarlandes, **1984**.
93. H. Sjøeberg, *Chemical Engineering Science*, **43**, 855, **1988**.
94. S. D. Kolev, *Comprehensive Analytical Chemistry*, **54**, 47, **2008**.
95. J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, **145**, 1, **1983**.
96. S. D. Kolev and E. Pungor, *Analytica Chimica Acta*, **185**, 315, **1986**.
97. S. D. Kolev and E. Pungor, *Talanta*, **34**, 1009, **1987**.
98. S. D. Kolev and E. Pungor, *Analytica Chimica Acta*, **208**, 117, **1988**.
99. S. D. Kolev and E. Pungor, *Analytica Chimica Acta*, **208**, 133, **1988**.
100. S. D. Kolev, G. Nagy and E. Pungor, *Analytica Chimica Acta*, **241**, 43, **1990**.
101. S. D. Kolev, G. Nagy and E. Pungor, *Analytica Chimica Acta*, **241**, 55, **1990**.
102. S. D. Kolev, G. Nagy and E. Pungor, *Analytica Chimica Acta*, **254**, 167, **1991**.
103. S. D. Kolev and W. E. van der Linden, *Analytica Chimica Acta*, **256**, 301, **1992**.
104. S. D. Kolev and W. E. van der Linden, *Analytica Chimica Acta*, **268**, 7, **1992**.
105. S. D. Kolev and W. E. van der Linden, *International Journal of Heat Mass Transfer*, **36**, 135, **1993**.
106. J. F. Tyson and A. B. Idris, *Analyst*, **106**, 1125, **1981**.
107. J. F. Tyson, J. M. H. Appleton and A. B. Idris, *Analyst*, **108**, 153, **1983**.
108. J. F. Tyson, J. M. H. Appleton and A. B. Idris, *Analytica Chimica Acta*, **145**, 159, **1983**.
109. J. F. Tyson, *Analyst*, **109**, 319, **1984**.
110. J. F. Tyson, *Analytica Chimica Acta*, **179**, 131, **1986**.
111. J. M. H. Appleton and J. F. Tyson, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1**, 63, **1986**.
112. M. Gisin, C. Thommen and K. F. Mansfield, *Analytica Chimica Acta*, **179**, 149, **1986**.
113. J. M. Hungerford and G. D. Christian, *Analytica Chimica Acta*, **200**, 1, **1987**.
114. J. J. F. van Veen, M. A. J. van Opstal, J. M. Reijn, W. P. van Bennekom and A. Bult, *Analytica Chimica Acta*, **204**, 29, **1988**.
115. H.C. Smit and P. J. H. Scheeren, *Analytica Chimica Acta*, **215**, 143, **1988**.
116. C. A. Lucy and F. F. Cantwell, *Analytical Chemistry*, **61** (Issue 2), 107, **1989**.
117. F. E. Powell and A. G. Fogg, *Analyst*, **114**, 799, **1989**.
118. J. Wang and H. D. Dewald, *Analytica Chimica Acta*, **162**, 189, **1984**.
119. M. A. Gómez-Nieto, M.D. Luque de Castro, A. Martin and M. Valcárcel, *Talanta*, **32**, 319, **1985**.
120. J. Toei, *Talanta*, **35**, 425, **1988**.
121. P. L. Kempster, H. R. van Vliet and J. F. van Staden, *Talanta*, **36**, 969, **1989**.

122. Y. Li and Y. Narusawa, *Analytica Chimica Acta*, **289**, 355, **1994**.
123. H. L. Pardue and B. Fields, *Analytica Chimica Acta*, **124**, 39 and 65, **1981**.
124. K. H. Al-Sowdani and A. Townshend, *Analytica Chimica Acta*, **201**, 339, **1987**.
125. P. G. Nouros, C. A. Georgiou and M. G. Polissiou, *Analytica Chimica Acta*, **389**, 239, **1999**.
126. S. Olsen, J. Ruzicka and E. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, **136**, 101, **1982**.
127. B. C. Erickson et al., *Analytical Chemistry*, **59** (Issue 8), 1246, **1987**.
128. *Flow injection.com*, Θέμα: FIA lab Database. <http://www.flowinjection.com/tutorials/database>, Πρόσβαση: **02/2014**.
129. E. H. Hansen and M. Miro, *Trends in Analytical Chemistry*, **26** (Issue 1), 18, **2007**.
130. J. Ruzicka and E. H. Hansen, *Trends in Analytical Chemistry*, **27** (Issue 5), 390, **2008**.
131. H. Matschiner et al., German (East) Pat. No. 216543, **1984**.
132. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER: **Determination of P and Si**, Washington DC, USA, 20th Edition, **Ch. 4**, **1998**.
133. O. Åström, *Analytical Chemistry*, **54** (Issue 2), 190, **1982**.
134. E.H. Hansen and J.H. Wang, *Analytical Letters*, **37**, 345, **2004**.
135. J.H. Wang and E.H. Hansen, *Trends in Analytical Chemistry*, **24** (Issue 1), 1, **2005**.
136. J. Ruzicka, A.D. Carroll and I. Lahdesmaki, *Analyst* (Cambridge, UK), **131**, 799, **2006**.
137. Ψηφιακή βιβλιοθήκη-Επιχειρησιακό πρόγραμμα «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», Θέμα: Εκπαίδευση στο λογισμικό Labview, <http://repository.edulll.gr/edulll/retrieve/4971/1410.pdf>, Πρόσβαση: **10/2015**.
138. Hunt J., *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **110**, 28, **2002**.
139. Kharitonov S. and Barnes P., *Biomarkers*, **7**, 1, **2002**.
140. Rahman I. and Kelly F., *Free Radical Research*, **37**, 1253, **2003**.
141. Risby T. and Sehnert S., *Free Radical Biology & Medicine*, **27**, 1182, **1999**.
142. Montuschi P., *Clinical Chimica Acta*, **356**, 22, **2005**.
143. Yu H., Xu L. and Wang P., *Journal of Chromatography B*, **826**, 69, **2005**.
144. Göen T. et al., *Journal of Chromatography B*, **826**, 261, **2005**.
145. Biernacki W. et al., *Chest*, **128**, 1958, **2005**.
146. Mercken E. et al., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **172**, 994, **2005**.
147. Horvath I., Hunt J. and Barnes P.J., *European Respiratory Journal*, **26**, 523, **2005**.
148. Loukides S. et al., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **158**, 991, **1998**.
149. Heard S. et al., *Anesthesia & Analgesia*, **89**, 353, **1999**.
150. Jöbsis R. et al., *Mediators of Inflammation*, **10**, 351, **2001**.
151. Nowak D. et al., *Respiratory Medicine*, **93**, 389, **1999**.
152. Antczak A. et al., *European Respiratory Journal*, **10**, 1235, **1997**.
153. Łuczynska M. et al., *European Journal of Clinical Investigation*, **33**, 274, **2003**.

154. Rysz, J. et al., *Nephrology Dialysis Transplantation*, **19**, 158, **2004**.
155. Majewska E. et al., *Respiratory Medicine*, **98**, 669, **2004**.
156. Rota C., Chignell C. and Mason R., *Free Radical Biology & Medicine*, **27**, 873, **1999**.
157. Van Beurden W. et al., *Respiratory Medicine*, **96**, 197, **2002**.
158. Nowak D. et al., *Free Radical Biology & Medicine*, **30**, 178, **2001**.
159. Zappacosta B. et al., *Clinica Chimica Acta*, **310**, 187, **2001**.
160. Emelyanov A. et al., *Chest*, **120**, 1136, **2001**.
161. Svensson S. et al., *Journal of Chromatography B*, **809**, 199, **2004**.
162. Yamashiro N. et al., *Journal of Nuclear Science and Technology*, **41**, 890, **2004**.
163. Ruch W. et al., *Journal of Immunological Methods*, **63**, 347, **1983**.
164. *Geek.com*, Θέμα: Protected mode, <http://www.geek.com/chips/difference-between-real-mode-and-protected-mode-574665/>, Πρόσβαση: **10/2015**.
165. Dewhurst R. E. et al., *Chemosphere*, **47**, 547, **2002**.
166. Forget G. et al., *Toxicology*, **15**, 362, **2000**.
167. Deryabin D. G. and Karimov I. F., *Bulletin of Experimental Biology and Medicine-English*, **147**, 349, **2009**.
168. Farre M. and Barcelo D., *Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 299, **2003**.
169. El-Alawi Y. S. et al., *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 2225, **2002**.
170. D' Souza S. F., *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 337, **2001**.
171. Divritsioti M. H. et al., *Analytical Letters*, **36**, 1939, **2003**.
172. Liu X. M. et al., *Sensors*, **10**, 1377, **2010**.
173. Beyersdorf-Radeck B. et al., *Microbiological Research*, **153**, 239, **1998**.
174. Petanen T. and Romantschuk M., *Analytica Chimica Acta*, **456**, 55, **2002**.
175. Liu Q. et al., *Sensors Journal*, **7**, 1625, **2007**.
176. Peters M. et al., *Assay and Drug Development Technology*, **8**, 219, **2010**.
177. Baeumner A. J., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **377**, 434, **2003**.
178. Melidis P., Vaiopoulou E. and Aivasidis A., *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **31**, 277, **2008**.
179. Minioti K. S. and Georgiou C. A., *Grasas Aceites*, **61**, 45, **2010**.
180. Mimendia A. et al., *Sensors and Actuators B-Chemistry*, 420, **2010**.
181. BeMiller J. N., CARBONATE CHEMISTRY FOR FOOD SCIENTISTS, AACC International Inc., St. Paul, 303, **2007**.
182. Thilbault J. F. and Ralet M. C., PECTINS - THEIR ORIGIN, STRUCTURE AND FUNCTIONS IN ADVANCED DIETARY FIBRE TECHNOLOGY, ed. By McCleary B. V. and Prosky L., Blackwell Science Ltd, Oxford, 369, **2001**.
183. Liu L. S., Fishman M. L. and Hicks K. B., *Cellulose*, **14**, 15, **2007**.
184. Morris G. A. et al., *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **27**, 254, **2010**.
185. Sungthongjeen S. et al., *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, **5** (Issue 1), 50, **2004**.

186. Bartolome L. G. and Hoff E., *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **20** (Issue 2), 262, **1972**.
187. Savary B. J. and Nuñez A., *Journal of Chromatography A*, **1017**, 151, **2003**.
188. Vorangen A. G. J, Schols H. A. and Pilnik W., *Food Hydrocolloids*, **1** (Issue 1), 65, **1986**.
189. Klavons J. A. and Bennett R. D., *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **34**, 597, **1986**.
190. Anthon G. E. and Barrett D. M *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **53**, 3749, **2004**.
191. Mangos T. J. and Haas M. J., *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **44** (Issue 10), 2977, **1996**.
192. Hernández-Martínez R. and Navarro-Blasco I., *Food Control*, **30** (Issue 2), 423, **2013**.
193. Wabaidur S. M. et al., *Spectrochimica Acta A*, **105**, 412, **2013**.
194. Burfeind J. et al., *Analytica Chimica Acta*, **322**, 131, **1996**.
195. Forster E. et al., *Analytica Chimica Acta*, **274**, 109, **1993**.
196. Garcia de Maria C. et al., *Analytica Chimica Acta*, **309**, 241, **1995**.
197. Sekine Y. et al., *Analytica Chimica Acta*, **280**, 179, **1993**.
198. Almuzara C. et al., *Biotechnology Letters*, **24**, 413, **2002**.
199. Yue X. F. and Zhang Z. Q., *Journal of Analytical Chemistry*, **62** (Issue 10), 992, **2007**.
200. Delgado-Reyes F. et al., *Analytical Letters*, **34** (Issue 13), 2277, **2001**.
201. Couderc R. and Baratti J., *Agricultural & Biological Chemistry*, **44**, 2279, **1980**.
202. Schomberg D., Salzmann M. and Stephan D., *ENZYME HANDBOOK 7, EC 1.11.1.7, 1*, **1993**.
203. Vasilariou A. G. and Georgiou C. A., *Journal of Chemical Education*, **77** (Issue 10), **2000**.
204. Vasiliou E. G. et al., *Journal of Brazilian Chemical Society*, **18** (Issue 5), 1040, **2007**.