

SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA

HANA PASEKOVÁ, MIROSLAV POLÁŠEK
a PETR SOLICH

Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: pasekova@faf.cuni.cz

Došlo dne 23.VII.1998

Klíčová slova: sekvenční injekční analýza, přehled

Obsah

1. Úvod
2. Princip a vlastnosti metody SIA; srovnání s průtokovou injekční analýzou (FIA)
3. Uplatnění SIA v praxi
 - 3.1. Analýza složek životního prostředí
 - 3.2. Bioanalytické a farmaceutické aplikace
 - 3.3. Současné trendy v SIA

1. Úvod

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) patří do skupiny průtokových analytických technik, které umožňují racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatným způsobem zvyšovat produktivitu zejména rutinních stanovení. SIA byla vyvinuta během odstraňování nevýhod a nedokonalostí techniky průtokové injekční analýzy^{1,2} (FIA); u jejího zrodu stál kolektiv analytiků z University of Washington, vedený jedním z otců FIA, J. Růžičkou. První článek, definující koncepci SIA, byl uveřejněn³ v roce 1990; od té doby bylo publikováno asi 100 prací, zabývajících se tematikou SIA. Předložený přehled si klade za cíl seznámit čtenáře s principy a možnostmi uplatnění této relativně nové a velmi progresivně se rozvíjející techniky v rozmanitých odvětvích analytické praxe.

2. Princip a vlastnosti metody SIA; srovnání s technikou FIA

Obecný princip metody SIA včetně základních teoretických podkladů byl podrobně diskutován v uvedených pracích^{3,5}.

Při vysvětlení principu SIA vycházejme z jednoduchého analytického zadání, kdy analyt, obsažený v roztoku vzorku, potřebujeme převést na detegovatelný (např. barevný) produkt reakcí s činidlem a změřit (kvantifikovat) vhodnou analytickou vlastnost tohoto produktu (např. absorpenci při určité

vlnové délce). Konvenční FIA^{1,2} řeší tento problém tím způsobem, že je zóna vzorku injikována dávkovacím kohoutem do kontinuálního nosného proudu a mísí se s činidlem za vzniku produktu reakce při plynulém průtoku jednotlivých zón vícekanálovým systémem směrem k průtokovému detektoru (obr. 1a). Technika SIA používá odlišný princip, jehož charakteristickým rysem jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně (jednorázově) aspirovány do jednocanálového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla (obr. 1b) a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt (obr. 1c) je dopraven do detektoru; tím je jeden cyklus ukončen. V tomto jednoduchém případě je získán výsledný analytický signál ve formě píku podobně jako je tomu u FIA; v podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem. Rozdíly se projevují v geometrii nosného proudu. FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco základem SIA jsou změny přímého a zpětného toku.

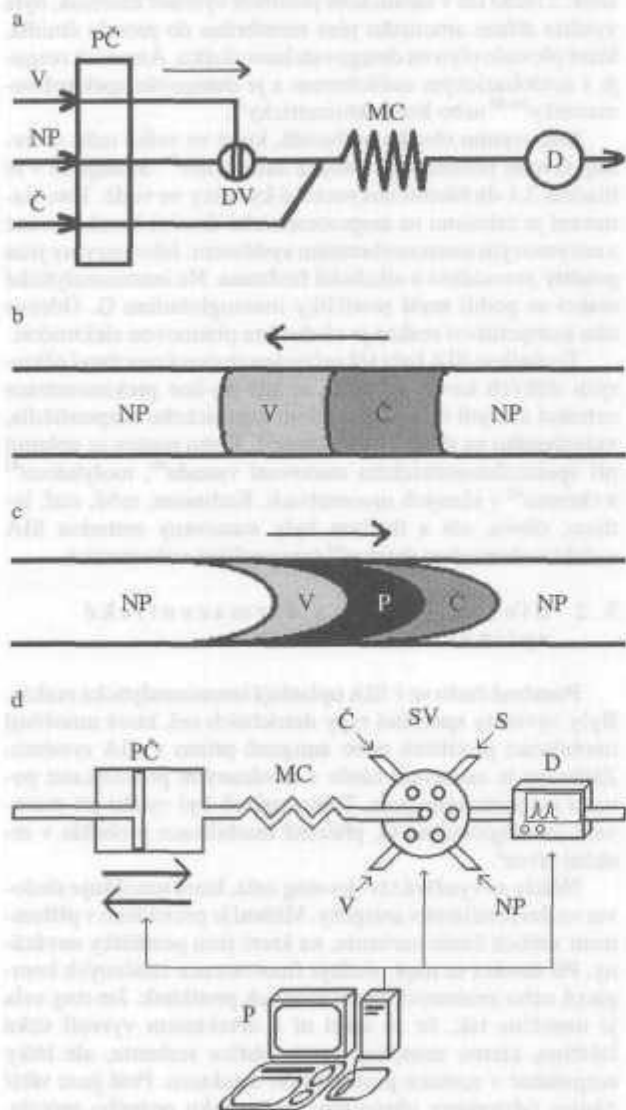
Typická základní konfigurace příslušného SIA systému je schematicky znázorněna na obr. 1d. Systém je tvořen jednocanálovým dvousměrným pístovým čerpadlem, vícecestným selekčním ventilem, vhodným detektorem, mísící cívkou, která slouží zároveň jako pojistka proti vniknutí vzorku a činidel do čerpadla, a spojovacím materiálem (obvykle plastické hadičky s vnitřním průměrem 0,7-0,8 mm). V podstatě se dá říci, že SIA systém pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. Přesná synchronizace a opakovatelnost těchto kroků je nutnou podmínkou k dosažení reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému a tím i k získání reprodukovatelného koncentračního gradientu reakčního produktu, resp. odpovědi detektoru. Z uvedených skutečností vyplývá, že nezbytnou součástí SIA systému musí být i vhodný mikroprocesor (nejlépe PC) s příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data.

Průtokové rychlosti v SIA se prakticky neliší od FIA a pohybují se obvykle okolo 1 ml.min⁻¹ a doba trvání jednoho měřicího cyklu v SIA většinou nepřesahuje 30 s, což je v mnoha případech srovnatelné s frekvencí dávkování vzorku ve FIA. Zatímco ve FIA je v rámci jedné série měření dávkovaný objem vzorku fixní, což je dáno konstantní délkou dávkovací smyčky, u SIA je možno v jednotlivých cyklech objem vzorku cíleně měnit v rozsahu jednotek až stovek μ l programováním doby otevření příslušného kanálu selekčního ventilu; tímto postupem lze jednak optimalizovat disperzi zóny vzorku (a tedy citlivost stanovení) podle koncentrace analytu a také pohodlně provádět kalibraci, pokud jeden z kanálů selekčního ventilu propojíme s roztokem standardu.

Giibeli s Christianem a Růžičkou si v prvních pracích všimají překrývání zón a disperze v jedno a dvou-činidlových systémech. Překrytí zón a jeho kontrola jsou důležitým parametrem SIA. V systému s jedním činidlem potvrzují dostatečné promísení při jedné změně směru toku. (Vícenásobná změna směru je opodstatněná při mísení zón s odlišnou viskozí-

tu.) Při uplatnění dvou činidel se využívá uzavření zóny vzorku mezi tato činidla. Uzavření zóny vzorku mezi dvě zóny stejného činidla obvykle zvyšuje výtěžek reakčního produktu a tím i citlivost stanovení⁴.

Nevýhody SIA oproti FIA vidí autoři⁴ zejména v poněkud snížené frekvenci dávkování vzorku a v nutnosti používat poměrně složitou počítačovou techniku. Na druhé straně má SIA proti FIA nesporné výhody: i když se pracuje s několika roztoky, které je nutno definovaným způsobem vnést do systému, probíhá analýza v jednokanálovém uspořádání s jedním ventilem a jedním čerpadlem. Objemy roztoků jsou dány časově, délkou pohybu pístu čerpadla. Při zastaveném toku je možné provádět kinetická měření, např. určovat řád reakci,



Obr. 1. a) FIA systém (V - vzorek, NP - nosný proud, Č - činidlo, PČ - peristaltické čerpadlo, DV - dávkovací ventil, MC - míšící cívka, D - detektor); b), c) zóny vzorku, činidla a produktu reakce v SIA systému před a po obrácení směru toku nosného proudu (P - produkt reakce); d) SIA systém (PČ - pístové čerpadlo, SV - selekční ventil, S - standard, Č - činidlo, NP - nosný proud, V - vzorek, MC - míšící cívka, D - detektor, P - počítač)

stejně jako ve FIA. Tyto postupy vedou k optimalizaci reakčního času, úspoře činidel, eliminaci interferujících signálů pozadí⁵. Protože SIA pracuje s malými diskrétními objemy vzorků a činidel a využívá zastavení a změnu směru toku, spotřeby činidel a vzorků i objem odpadu jsou podstatně nižší než u FIA, kde jsou jednotlivé roztoky čerpány kontinuálně. Velkou výhodou SIA je její flexibilita, daná snadnou změnou parametrů měření prostřednictvím klávesnice počítače, aniž je třeba měnit konfiguraci SIA systému.

Vstupní jednotkou SIA systému je čerpadlo, které generuje definovaný tok nosného proudu. V raném stádiu vývoje metody SIA používal Růžička prototyp pumpy s pístem, jehož pohyb je řízen mechanickou vačkou. Geometrie poskytovaného toku je sinusová. K aspiraci určitého roztoku přes selekční ventil docházelo v oblastech s nulovou rychlostí toku, aby se zabránilo nežádoucímu nedefinovanému promísení jednotlivých zón³.

Novější typy čerpadel nejsou ovládány vačkou, ale pohyb pístu je řízen krokovým elektromotorem. Délka pohybu pístu je definována počtem jednotlivých kroků, rychlost pohybu lze libovolně měnit. Další alternativou je použití peristaltických čerpadel. Při úpravách omezujících pulzaci toku představují řešení s nižší pořizovací cenou a širokou dostupností i v průměrně vybavených laboratořích; vzhledem k jejich snadnějšímu mechanickému opotřebování jsou však v SIA systémech peristaltická čerpadla používána spíše jako pomocná zařízení vedle hlavní pístové pumpy.

V sériově vyráběném SIA systému typu FIALab 3500 je zařazeno pístové čerpadlo poháněné vysoce přesným krokovým motorem. Čerpadla užívaná v SIA systémech jsou dodávána převážně firmami Alitea a Cavro. V některých případech byly použity také automatické byrety Crison nebo upravené automatické titrátoři Allela.

Další součástí systému je vícecestný selekční ventil. Nejčastěji se jedná o 6, 8 a 10-cestné ventily firmy Valco. Jako doplněk někdy slouží jednodušší ventily Rheodyne. Selekční ventil představuje jednotku, která řídí seřazení jednotlivých zón v míšící cívce, zajišťuje připojení všech požadovaných roztoků k systému, jejich aspiraci a po obrácení toku i transport zón do detektoru. Časování poloh selektoru a jejich synchronizaci s pohybem čerpadla řídí a kontroluje počítač.

Reakční (míšící) cívky v SIA systémech jsou jednodušší a kratší než u FIA zařízení; obvykle mají přímkovou geometrii. Buď slouží pouze k promíchání zón, nebo mohou obsahovat reaktivní náplň, např. pevné nosiče s imobilizovanými enzymy nebo magnetické polymerní částice s aktivním povrchem⁶. Způsob umístění míšící cívky v SIA systému není zcela ustálen. Často bývá jediná reakční cívka zařazena mezi čerpadlo a selekční ventil. Druhá cívka může být eventuelně umístěna před detektorem, ale u rychle probíhajících reakcí se nepoužívá.

Detektory v SIA nejsou systémově omezeny, jejich volba závisí na druhu použité analytické reakce. Využívají se zejména spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické detektory s příslušnými průtokovými celami. U spektrofotometrických detektorů se nejčastěji vyskytuje Z-cela s optickou délkou 10 mm a vnitřním průměrem 1,5 mm, můžeme se však setkat i s univerzální membránovou celou sandwichového typu, která umožňuje provádět on-line separaci analytů selektivním průchodem přes dialyzační membránu.

Pro realizaci jednoduchých spektrofotometrických SIA analyzátorů navrhl Růžička koncepci chemických senzorů

s obnovitelným citlivým povrchem, který bývá tvořen činidlem navázaným na submilimetrové částice inertního nosiče polymerního charakteru nebo samotným nosičem, na kterém se příslušný analyt selektivně zachytí. Není zde nutná pevná kovalentní vazba nosič-činidlo, protože vhodným uspořádáním pokusu lze citlivý povrch před každým měřením obnovit³. V této souvislosti byla v poslední době pro SIA systémy vyvinuta tzv. jet-ring cela, jejímž prostřednictvím lze jak optický tak i elektrochemický senzor s obnovitelným povrchem poměrně snadno vytvořit.

Christian používá univerzální sandwichovou membránovou celu vhodnou pro průtokové měření absorbance a chemiluminiscence a také mikroobjemovou celu určenou pro komplikovanější SIA analýzy, ve kterých je analyt stanovován po reakci s několika činidly najednou. Tzv. fontánová cela byla aplikována při perfuzních studiích živých buněk⁷. V rámci elektrochemické detekce se vedle běžných amperometrických průtokových cel často uplatňují v SIA iontově selektivní a enzymové elektrody.

Mechanické součásti SIA systému (čerpadlo, selekční ventil) a detektor jsou propojeny prostřednictvím příslušných převodníků a digitálních vstupů a výstupů těchto jednotek s počítačem, který řídí celý proces automatické analýzy včetně sběru, zpracování a ukládání dat. Klíčový význam zde má kvalitní obslužný program SIA systému, bez něhož nelze automatická SIA měření provádět; příslušný software musí též „umět“ zpracovat a vhodným způsobem prezentovat výsledky měření. Běžný je automatický výpočet výšky, plochy a dalších parametrů píku (čas dosažení jeho maxima, šířka píku v určité výšce), kalibračních parametrů a koncentrace vzorku^{8,9}. Tyto programy, jako např. Flowtek^{8,10,11}, Fialab¹²⁻¹⁴, Labpro³⁴, Labdata⁵ a Mat-lab^{6,15-17} většinou poskytují také funkci automatické kalibrace a tvorbu grafů pro přehledné znázornění výsledků analýzy.

Stejně jako je tomu u zařízení FIA, i do SIA systému je možno zařadit různé doplňkové moduly. Jsou to zejména jednotky pro kapalinovou extrakci, dialýzu a difuzi plynů přes membránu. Konvenční uspořádání hlavních jednotek, tvořících SIA systém, je znázorněno na obr 1d; vyskytuje se ve velké většině dosud publikovaných prací.

3. Uplatnění SIA v praxi

Od roku 1990 bylo publikováno téměř sto prací, týkajících se automatického stanovení většiny běžných anorganických iontů a četných organických látek včetně léčiv technikou SIA. Se vzrůstajícími potřebami kontroly kvality životního prostředí, potravin a léčiv, s požadavky na rychlost a spolehlivost diagnostických metod v medicíně a biologickém výzkumu, a na racionalizaci řízení technologických procesů se jeví SIA jako jedna z nadějných alternativ, umožňujících provádět analýzy velkých sérií vzorků s vysokou produktivitou a dostatečnou spolehlivostí.

3.1. Analýza složek životního prostředí

SIA se uplatnila při stanovení některých anorganických iontů ve vodě různého původu (povrchové, pitné, odpadní) za účelem kontroly její kvality. Výhodné je současné stanovení několika druhů iontů bez nutnosti separace nebo opakovaného

měření s různými činidly. Takto byly např. stanoveny ve vodě vápenaté ionty^{10,18} nebo Ca^{2+} souběžně s Mg^{2+} s využitím tvorby barevných komplexů a spektrofotometrickou detekcí¹⁹⁻²³. Podobně byly stanoveny ionty železité^{24,25}.

Z aniontů se stanovují současně chloridy a fluoridy^{26,27}, k jejich detekci se zde využívají iontově selektivní elektrody. Důležité je rychlé a přesné stanovení. Obsah dusitanů a dusičnanů ve vodě byl stanoven SIA se spektrofotometrickou detekcí²⁸. Sírany se stanovují pomocí srážecí reakce s barvitými ionty^{11,29,30}. Fosfáty, jako důležité pollutanty podporující růst mikroorganismů ve vodě, byly určovány samostatně^{31,32} nebo současně s křemičitany³³.

Při stanovení amoniakových solí a některých organických látek, z nichž lze v alkalickém prostředí vytěsnit amoniak, byla využita difuze amoniaku přes membránu do proudu činidla, které převede plyn na detegovatelnou složku. Amoniak reaguje s acidobazickým indikátorem a je detegován spektrofotometricky³⁴⁻³⁶ nebo konduktometricky³⁷.

Stanovením obsahu herbicidů, které ve velké míře ovlivňují životní prostředí, se zabývá další práce³⁸. Sleduje se v ní hladina 2,4-dichlorofenoxyoctové kyseliny ve vodě. Toto stanovení je založeno na amperometrické detekci kombinované s enzymovým imunisorbentním systémem. Jako enzymy jsou použity peroxidasa a alkalická fosfatasa. Na imunoanalytické reakci se podílí myší protilátka imunoglobulinu G. Odezva této kompetitivní reakce je sledována platinovou elektrodou.

Technikou SIA byla též určována stopová množství některých těžkých kovů; uplatnila se zde on-line prekoncentrace extrakcí analytů do tenkého filmu organického rozpouštědla, vytvořeného na stěně SIA systému³⁹. Tento postup se uplatnil při spektrofotometrickém stanovení vanadu⁴⁰, molybdenu⁴¹ a chromu⁴² v různých mocnostech. Kadmium, měď, rtuť, indium, olovo, cín a thalium byly stanoveny metodou SIA s elektrochemickou detekcí⁴³ (rozpuštěcí voltametrie).

3.2. Bioanalytické a farmaceutické aplikace

Poměrně často se v SIA uplatňují imunoanalytické reakce. Byly vyvinuty speciální typy detekčních cel, které umožňují imobilizaci protilátek nebo antigenů přímo v SIA systému. Zajímavé je zakotvení částic s navázanými protilátkami pomocí magnetického pole. Tento způsob byl využit při stanovení imunoglobulinu G, přičemž imobilizace proběhla v reakční cívice⁶.

Někdy se využívá tzv. jet-ring cela, která umožňuje sledovat vazbu protilátek s antigeny. Měření je prováděno v přítomnosti větších částic sorbentu, na které jsou protilátky navázány. Při detekci se např. sleduje fluorescence značených komplexů nebo značených nenavázaných protilátek. Jet-ring cela je umístěna tak, že se mezi ní a detektorem vytvoří úzká štěrbina, kterou nemohou projít částice sorbentu, ale látky rozpuštěné v roztoku postupují do detektoru. Poté jsou větší částice odstraněny obrácením směru toku nosného proudu. Toto uspořádání bylo využito u stanovení sodíku a lithia⁴⁴, chromu⁴⁵, imunoglobulinu G⁴⁶, glukosy⁴⁷, ale také při analýze buněk ledvinové tkáně¹⁵.

V upravené podobě se tato cela objevuje s pohyblivým tělem, které nasedá na okénko detektoru. Po změření fluorescence nebo absorbance sorbentu se štěrbina automaticky rozšíří a pevné částice jsou nosným proudem vyplaveny do od-

padu. Takto byl stanovován ethanol a glukosa ve víně a pivu⁴⁸ s využitím enzymových elektrod a amperometrické detekce. V další práci byla určována koncentrace lidského sérového albuminu, různých typů inzulinů, theofylinu a aminotheofylinu reakcí s monoklonálními protilátkami⁴⁹. Detekci zajišťoval fluorescenční mikroskop.

Podobnou funkci má i fontánová cela. Sledují se v ní nejčastěji jednotlivé buňky určité kultury. Detekce se provádí videokamerou přes fluorescenční mikroskop. Popis fontánové cely se objevuje ve dvou teoretických pracích^{7,50}, praktická aplikace se týká perfuzních studií živých buněk^{51,52} a stanovení hladiny glukosy a peroxidu vodíku reakcí s luminolem⁵³.

Analyticky využitelné enzymy jako látky bílkovinné povahy jsou citlivé na změny teploty a složení okolního prostředí a jejich výroba je poměrně drahá. Zakotvení těchto látek v reakční cívce SIA systému vede ke snížení jejich spotřeby a umožňuje také opakovanou aktivaci uvnitř systému. Tato technika se uplatňuje při stanovení glukosy s pomocí imobilizované glukosa-oxidasy a následné reakce peroxidu vodíku s luminolem⁵⁴⁻⁵⁶. V těchto pracích se kombinuje stanovení glukosy s dalšími látkami, laktátem a penicilinem. Při analýze samotného laktátu se využívá reakce enzymového systému dependentního na NAD⁺ a vzniklý NADH se deteguje spektrofotometricky⁵⁷⁻⁵⁹. Podobně probíhá i SIA stanovení ethanolu, produkovaného buněčnou kulturou; imobilizovaným enzymem je zde alkohol-dehydrogenasa⁶⁰. Při SIA stanovení glukosy⁶¹ a souběžném stanovení glukosy a ethanolu⁶⁰ byly využity amperometrické enzymové elektrody s imobilizovanou glukosa-oxidasou a alkohol-dehydrogenasou.

Z farmaceuticky významných analýz byla SIA technikou provedena dříve zmiňovaná stanovení penicilinu^{55,56}, trimeprazinu a perfenazinu tvořících barevné komplexy s paladiem⁶², bromazepamu poskytujícího komplex s železnatými kationty⁶³, morfinu oxidovaného manganistanem na fluoreskující produkt⁶⁴, ciprofloxacinu a norfloxacinu vytvářejících barevný komplex s ionty železitými⁶⁵. Při stanovení barbiturátů a serotoninových inhibitorů byla SIA využita k extrakci a následná analýza proběhla pomocí HPLC⁶⁶. Imunoanalytické stanovení inzulinů, theofylinu a aminotheofylinu bylo uvedeno výše⁴⁹. Dále bylo publikováno spektrofotometrické stanovení promethazinu komplexotvornou reakcí s paladiem⁶⁷.

Z anorganických iontů vyskytujících se v potravinových doplncích a léčivých přípravcích byly stanoveny železité ionty^{68,69}, v obou případech se spektrofotometrickou detekcí. V kinetické studii byl sledován proces oxidace vitamínu C (cit.⁷⁰). Další možnosti přináší práce popisující disoluční stanovení ibuprofenu v tabletách, obalených tabletách a kapslích⁷¹. Chemometrické metody byly použity pro optimalizaci stanovení oxprenololu ve farmaceutických přípravcích⁷². Dále byl stanovován morfin v nevodném nosném proudu pomocí chemiluminiscenční detekce⁷³ a warfarin byl určován díky fluorescenci vykazované v přítomnosti cyklodextrinu⁷⁴.

3.3. Současné trendy v SIA

Rychlost, jednoduchost, flexibilita a plná automatizace předurčují techniku SIA jako velmi vhodný prostředek všude tam, kde je nutno analyzovat velké série vzorků (např. rutinní analýzy vod, potravin, krve, moči), sledovat změny koncentrace důležitých analytů v průběhu různých procesů (řízení a optimalizace biotechnologických výrob, monitorování hla-

din léčiv nebo jejich metabolitů v tělních tekutinách pacientů) nebo studovat odpověď buněk, membrán či orgánů na různé vnější podněty^{51,75} (např. ve farmaceutickém výzkumu). Lze očekávat, že v brzké době SIA silně ovlivní oblast imunoanalýzy, kdy využitím komerčních imunisorbentů a jet-ring cely bude možno podstatně zrychlit a zlevnit tyto velmi selektivní a citlivé analytické postupy.

Možnost uplatnění SIA ve farmacii se vztahuje nejen na kontrolu kvality a účinnosti léčiv, ale také na hodnocení délky trvajících stabilitních studií. Ve výrobní technologii pomáhá tato metoda zjistit stejnoměrnost obsahu účinné látky v různých farmaceutických přípravcích a rychlost jejího uvolňování z dané lékové formy (disoluční testy). Významná je také možnost využití SIA při studiu vazby léčiv či toxických látek na krevní bílkoviny.

Z uvedených skutečností vyplývá, že potenciál využití SIA v analytické praxi je značný a bude se zřejmě dále rozšiřovat s pronikáním komerčních SIA analyzátorů do analytických laboratoří. Aktuální informace o vývoji SIA poskytuje internetová stránka firmy Alitea, která zatím jediná vyrábí kompletní komerčně dostupný SIA systém (viz <http://www.flowinjection.com/>).

Autoři děkují Fondu rozvoje vysokých škol za finanční podporu této práce (projekt č. 1268/99).

LITERATURA

1. Růžička J., Hansen E. H.: *Flow Injection Analysis*. J. Wiley, New York 1988.
2. Calatayud J. M.: *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals*. Taylor and Francis, London 1996.
3. Růžička J., Marshall G. D.: *Anal. Chim. Acta* 237, 329 (1990).
4. Gübeli T., Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Chem.* 63, 2407 (1991).
5. Růžička J., Gübeli T.: *Anal. Chem.* 63, 1680 (1991).
6. Pollema C. H., Růžička J., Christian G. D., Lemmark A.: *Anal. Chem.* 64, 1356 (1992).
7. Christian G. D.: *J. Flow Inj. Anal.* 11, 2 (1994).
8. Marshall G. D., Staden J. F.: *Process Control Qual.* 3, 251 (1992).
9. Marshall G. D., Staden J. F.: *Anal. Instrum.* 20, 79 (1992).
10. Staden J. F., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta* 323, 75 (1996).
11. Staden J. F., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta* 331, 271 (1996).
12. Ivaska A., Růžička J.: *Analyst* 118, 885 (1993).
13. Lukkari I., Růžička J., Christian G. D.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 346, 813 (1993).
14. Baxter P. J., Christian G. D., Růžička J.: *Analyst* 119, 1807 (1994).
15. Růžička J., Pollema C. H., Scudder K. M.: *Anal. Chem.* 65, 3566 (1993).
16. Chung S., Christian G. D., Růžička J.: *Process Control Qual.* 3, 115 (1992).
17. Guzman M., Pollema C. H., Růžička J., Christian G. D.: *Talanta* 40, 81 (1993).
18. Nyman J., Ivaska A.: *Anal. Chim. Acta* 308, 286 (1995).

19. Rius A., Callao M. P., Rius F. X.: *Anal. Chim. Acta* 316, 27 (1995).
20. Gomez E., Tomas C, Cladera A., Estela J. M., Cerda V.: *Analyst* 720, 1181 (1995).
21. Rius A., Callao M. P., Ferré J., Rius F. X.: *Anal. Chim. Acta* 337, 287 (1997).
22. Ruisanchez I., Lozano J., Larrechi M. S., Rius F. X., Zupan J.: *Anal. Chim. Acta* 348, 113 (1997).
23. Araújo A. N., Costa R. C, Lima J. L., Reis B. F.: *Anal. Chim. Acta* 358, 111(1998).
24. Rubí E., Jiménez M. S., Mirabó F. B., Forteza R., Cerda V.: *Talanta* 44, 553 (1997).
25. Gracia J., Saraiva M., Araújo A., Lima J., Valle M., Poch M.: *Anal. Chim. Acta* 348, 143 (1997).
26. Alpizar J., Crespi A., Cladera A., Forteza R., Cerda V.: *Electroanalysis* 8, 1051 (1996).
27. Alpizar J., Crespi A., Cladera A., Forteza R., Cerda V.: *Lab. Rob. Autom.* 8, 165 (1996).
28. Oms M. T., Cerda A., Cerda V.: *Anal. Chim. Acta* 315, 321 (1995).
29. Staden J.F., Taljaard R.E.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 357, 577 (1997).
30. Rius A., Callao M. P., Rius F. X.: *Analyst* 122, 131 (1997).
31. Munoz A., Torres F. M., Estela J. M., Cerda V.: *Anal. Chim. Acta* 350, 21 (1997).
32. Staden J. F., Taljaard R. E.: *Mikrochim. Acta* 128, 223 (1998).
33. Torres F. M., Estela J. M., Cerda V.: *Analyst* 122, 1033 (1997).
34. Luo Y., Al-Othman R., Christian G. D., Růžička J.: *Talanta* 42, 1545(1995).
35. Oms M. T., Cerda A., Cladera A., Cerda V., Forteza R.: *Anal. Chim. Acta* 318, 251 (1996).
36. Staden J. F., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta* 344, 281 (1997).
37. Oms M. T., Cerda A., Cerda V.: *Electroanalysis* 8, 387 (1996).
38. Wilmer M., Trau D., Renneberg R., Spener F.: *Anal. Lett.* 30, 515 (1997).
39. Luo Y., Al-Othman R., Růžička J., Christian G. D.: *Analyst* 121, 601 (1996).
40. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *J. Flow Inj. Anal.* 13, 148 (1996).
41. Nakano S., Luo Y., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *Microchem. J.* 55, 392 (1997).
42. Luo Y., Nakano S., Holman D., Růžička J., Christian G. D.: *Talanta* 44, 1563 (1997).
43. Ivaska A., Kubiak W. W.: *Talanta* 44, 713 (1997).
44. Christian G. D.: *Analyst* 119, 2309 (1994).
45. Egorov O., Růžička J.: *Analyst* 120, 1959 (1995).
46. Pollema C. H., Růžička J.: *Anal. Chem.* 66, 1825 (1994).
47. Lindfors T., Lähdesmäki I., Ivaska A.: *Anal. Lett.* 29, 2257 (1996).
48. Mayer M., Růžička J.: *Anal. Chem.* 68, 3808 (1996).
49. Willumsen B., Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Chem.* 69, 3482 (1997).
50. Růžička J.: *Analyst* 119, 1925 (1994).
51. Pollema C. H., Růžička J.: *Analyst* 118, 1235 (1993).
52. Baxter P. J., Hallgren L., Pollema C. H., Trnka M., Růžička J.: *Anal. Chem.* 67, 1486 (1995).
53. Tucker D. J., Toivola B., Pollema C. H., Růžička J., Christian G. D.: *Analyst* 119, 975 (1994).
54. Liu X., Hansen E. H.: *Anal. Chim. Acta* 326, 1 (1996).
55. Min R. W., Nielsen J., Villadsen J.: *Anal. Chim. Acta* 320, 199 (1996).
56. Min R. W., Nielsen J., Villadsen J.: *Anal. Chim. Acta* 312, 149 (1995).
57. Shu H., Hakanson H., Mattiasson B.: *Anal. Chim. Acta* 283, 727 (1993).
58. Shu H., Hakanson H., Mattiasson B.: *Anal. Chim. Acta* 300, 277 (1995).
59. Araújo A. N., Lima J. L., Saraiva M. L., Zagatto E. A.: *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 428 (1997).
60. Hedenfalk M., Mattiasson B.: *Anal. Lett.* 29, 1109 (1996).
61. Baron A., Guzman M., Růžička J., Christian G. D.: *Analyst* 777, 1839(1992).
62. Sultan S. M., Suliman F. E. O., Saad B.: *Analyst* 120, 561 (1995).
63. Sultan S. M., Suliman F. E. O.: *Analyst* 727, 617 (1996).
64. Barnett N. W., Lewis S. W., Tucker D. J.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 355, 591 (1996).
65. Suliman F. E. O., Sultan S. M.: *Talanta* 43, 559 (1996).
66. Peterson K., Logan B., Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Chim. Acta* 337, 99 (1997).
67. Sultan S. M., Desai N.: *Analyst* 722, 911 (1997).
68. Araújo A. N., Gracia J., Lima J., Poch M., Lucia M., Saraiva M.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 357, 1153 (1997).
69. Staden J. F., Plessis H., Taljaard R. E.: *Anal. Chim. Acta* 357, 141 (1997).
70. Sultan S. M., Desai N. I.: *Talanta* 45, 1061 (1998).
71. Liu X., Fang Z.: *Anal. Chim. Acta* 358, 103 (1998).
72. Suliman F. E., Sultan S. M.: *Microchem. J.* 57, 320 (1997).
73. Barnett N. W., Lenehan C. E., Lewis S. W., Tucker D. J., Essery K. M.: *Analyst* 123, 601 (1998).
74. Tang L. X., Rowell F. J.: *Anal. Lett.* 31, 891 (1998).
75. Růžička J., Lindberg W.: *Anal. Chem.* 64, 537 (1992).
76. Pollema C. H., Růžička J., Lemmark A., Christian G. D.: *Microchem. J.* 45, 121 (1992).
77. Růžička J.: *Anal. Chim. Acta* 261, 3 (1992).
78. Christian G. D.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10, 769 (1992).
79. Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Chim. Acta* 267, 11 (1992).
80. Liu S., Dasgupta P. K.: *Talanta* 41, 1903 (1994).
81. Baxter P. J., Christian G. D., Růžička J.: *Chem. Anal.* 40, 455 (1995).
82. Cladera A., Tomas C, Gomez E., Estela J. M., Cerda V.: *Anal. Chim. Acta* 302, 297 (1995).
83. Masini J. C, Baxter P J., Detwiler K. R., Christian G. D.: *Analyst* 720, 1583 (1995).
84. Crespi A., Forteza R. Cerda V.: *Lab. Rob. Autom.* 7, 245 (1995).
85. Grate J. W., Strebin R. Janata J., Egorov O., Růžička J.: *Anal. Chem.* 68, 333 (1996).
86. Cladera A., Gomez E., Estela J. M., Cerda V.: *Talanta* 43, 1667 (1996).
87. Staden J. F., Malan D.: *Anal. Commun.* 33, 339 (1996).
88. Rubí E., Forteza R., Cerda V.: *Lab. Rob. Autom.* 8, 149 (1996).
89. Estela J. M., Cladera A., Munoz A., Cerda V.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 64, 205 (1996).
90. Grate J. W., Taylor R. H.: *Field Anal. Chem. Technol.* 7, 39 (1996).

91. Holman D., Christian G. D., Růžička J.: *Anal. Chem.* **69**, 1763 (1997).
 92. Staden J. F., Plessis H.: *Anal. Commun.* **34**, 147 (1997).
 93. Echols R. T., James R. R., Aldstadt J. H.: *Analyst* **122**, 315 (1997).
 94. Staden J. F., Plessis H., Linsky S., Taljaard R. E., Kremer B.: *Anal. Chim. Acta* **354**, 59 (1997).
 95. Mirabo F. M., Thomas A. C., Rubí E., Forteza R., Cerda V.: *Anal. Chim. Acta* **355**, 203 (1997).
 96. Marshall G. D., Staden J. F.: *Instrum. Sci. Technol.* **25**, 307 (1997).
 97. Thomas O., Theraulaz F., Cerda V., Constant D., Quevauviller P.: *Trends Anal. Chem.* **16**, 419 (1997).
 98. Sales F., Callao M. P., Rius F. X.: *Chem. Int. Lab. Syst.* **38**, 63 (1997).

99. Parab S., Van Wie B. J., Byrnes I., Robles E. J., Weyrauch B., Tiffany T. O.: *Anal. Chim. Acta* **359**, 157 (1998).
 100. Růžička J., Hansen E. H.: *Trends Anal. Chem.* **17**, 69 (1998).
 101. Schindler R., Watkins M., Vonach R., Lendl B., Kellner R., Sara R.: *Anal. Chem.* **70**, 226 (1998).

H. Paseková, M. Polášek, and P. Solich (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové*): **Sequential Injection Analysis**

The review deals with the principles and practical applications of the SIA (sequential injection analysis) techniques. The article in vol ves 101 references covering the period from 1990 to 1998.