



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

Τμήμα Αειφορικής
Γεωργίας, Γεωπονική Σχολή

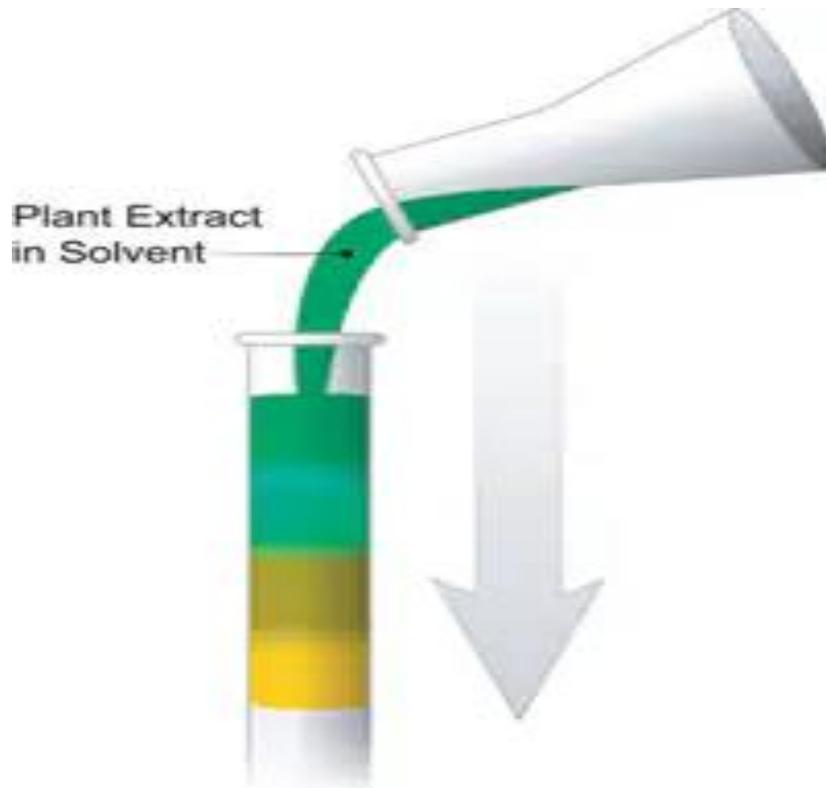
Αναλυτική & Οργανική Χημεία

13^η Ενότητα

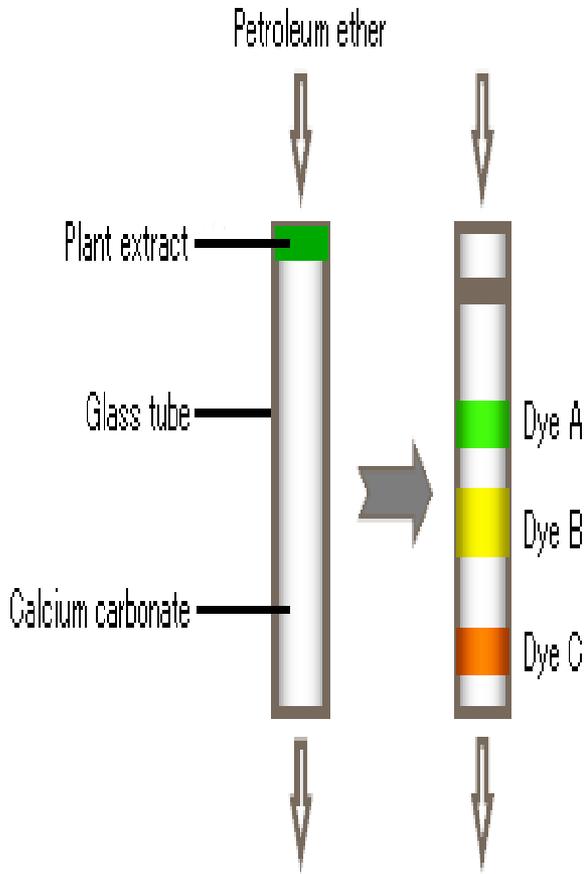
Χρωματογραφία

Γαλάνη Απ. Αγγελική, Χημικός PhD
Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό, (Ε.ΔΙ.Π.)

Ανακάλυψη Χρωματογραφίας από M. Tswett 1906 (Ρώσος Βοτανολόγος Πείραμα διαχωρισμού χλωροφύλλων)



Πείραμα Tswett



• Γέμισε μια γυάλινη στήλη με σκόνη κιμωλίας (δηλ με CaCO_3) και μετά τοποθέτησε υγρό μίγμα από χρωστικές που είχε παρασκευάσει (ανθοκυανίνες και χλωροφύλλες).

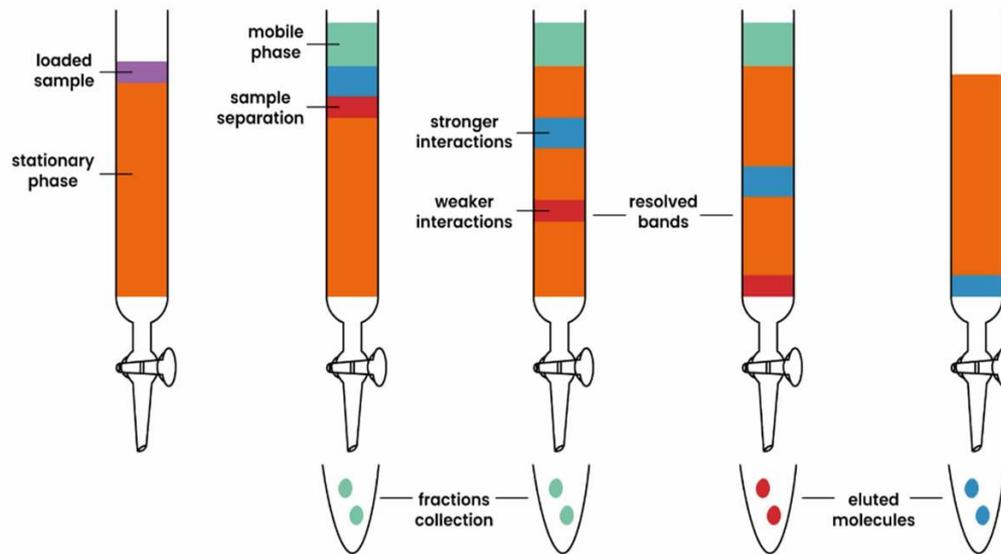
- Αρχικά τα διαλυμένα στον πετρελαϊκό αιθέρα συστατικά προσροφήθηκαν στην κορυφή της στήλης και ακολούθως με συνεχόμενες προσθήκες ίσων ποσοτήτων ίδιου διαλύτη, αυτά προχωρούσαν κατά μήκος της στήλης, με διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης το καθένα.
- Οι διαφορετικές ζώνες που σχηματίστηκαν οφείλονταν στις διαφορετικές χρωστικές και ήταν έγχρωμες. Έτσι η όλη διαδικασία ονομάστηκε χρωματογραφία.
- Οι διαφορετικές ζώνες συνεχίζοντας την προσθήκη διαλύτη μπορούσαν να διαχωριστούν και κάθε συστατικό να παραληφθεί σε ξεχωριστό δοχείο.

- Το πείραμα του Tswett θεωρείται ιστορικής σημασίας διότι για πρώτη φορά περιγράφηκαν τα βασικά χαρακτηριστικά μιας χρωματογραφικής διαδικασίας.
- Η στατική φάση (η ακίνητη) στο πείραμα ήταν η κιμωλία
- Η κινητή φάση, εκείνη η οποία μετακινείται στο πείραμα ήταν ο πετρελαϊκός αιώνας.

Σήμερα η χρωματογραφία θεωρείται η πιο κατάλληλη τεχνική για τον διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων καθώς και για την απομόνωση ευαίσθητων ουσιών. Βρίσκει εφαρμογή στη Χημεία, τη Βιολογία, την Ιατρική καθώς και πλήθος άλλων επιστημονικών πεδίων.

Η χρωματογραφία είναι μια αναλυτική τεχνική κατά την οποία δείγμα κάποιου υπό εξέταση μίγματος διαχωρίζεται στα συστατικά του, με βάση τη διαφορετική συγγένεια την οποία αυτά έχουν με τη στατική και την κινητή φάση.

Το κάθε συστατικό κινείται με διαφορετική ταχύτητα στην στατική φάση και άρα εξέρχεται από την στήλη σε διαφορετικούς χρόνους (χρωματογραφία στήλης), ή διανύει διαφορετική απόσταση στον ίδιο χρόνο στην στατική φάση (επίπεδη χρωματογραφία).



Εάν κατά την έξοδο υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και μέτρησης της ποσότητας του κάθε συστατικού, γίνεται και ποσοτικός προσδιορισμός.

Κατάταξη Χρωματογραφίας

βάση της φυσικής κατάστασης της κινητής και της στατικής φάσης

Αέρια
Χρωματογραφία
Gas
Chromatography
GC Κινητή φάση
αέριο

Αέρια
Στερεή
GSC

Αέρια-
Υγρή
GLC

Υγρή
Χρωματογραφία
Liquid
Chromatography LC
Κινητή φάση υγρό

Υγρή-
Στερεή
LSC

Υγρή-
Υγρή
LLC

Χρωματογραφία
Υπερκρίσιμου
ρευστού
Supercritical
Fluid
Chromatography
SFC

Κινητή φάση
υπερκρίσιμο
ρευστό

Κατάταξη με βάση την
αλληλεπίδραση με τις δυο
φάσεις

Προσρόφησης
Adsorption
Chromatography

Κατανομής
Partition chromatography

Ιονοανταλλαγής
Ion-Exchange
Chromatography

Συγγένειας
Affinity Chromatography

Μοριακού αποκλεισμού
Molecular Exclusion
Chromatography

Χρωματογραφία Προσρόφησης

Είναι η πιο παλιά χρωματογραφική τεχνική.

- Τα συστατικά μείγματος προσροφώνται σε κάποιο πολικό προσροφητικό υλικό όπως η síλικά (SiO_2) ή η αλούμινα (Al_2O_3). Οι πολικές ενώσεις συγκρατούνται ισχυρά.
- Με την ισορροπία μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων και των σωματιδίων στην κινητή φάση (υγρή ή αέρια), επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός.

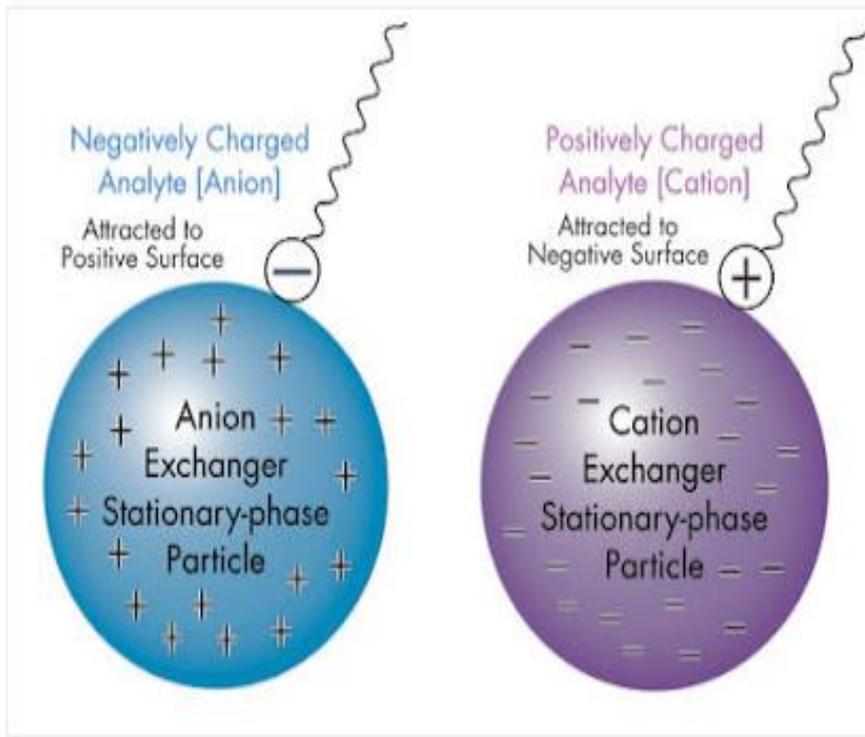


Χρωματογραφία Κατανομής

- Τα συστατικά του προς ανάλυση μείγματος κατανέμονται μεταξύ μιας λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσης η οποία σχηματίζεται στην επιφάνεια στερεού αδρανούς υποστρώματος και μιας υγρής κινητής φάσης.
- Διαχωρίζεται σε:
 - ✓ Χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase), όταν η υγρή στατική φάση είναι πολικότερη της κινητής φάσης.
 - ✓ Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed phase), όταν η κινητή φάση είναι πολικότερη της υγρής στατικής φάσης.

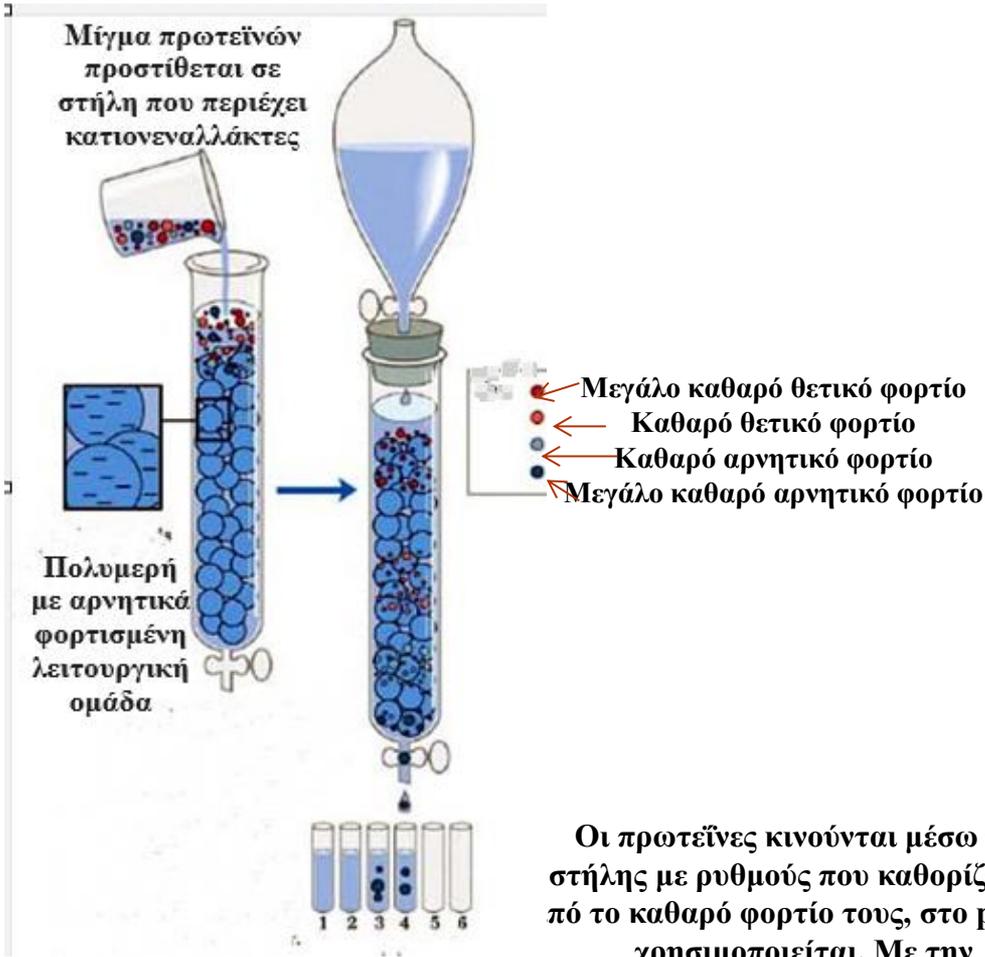


Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής

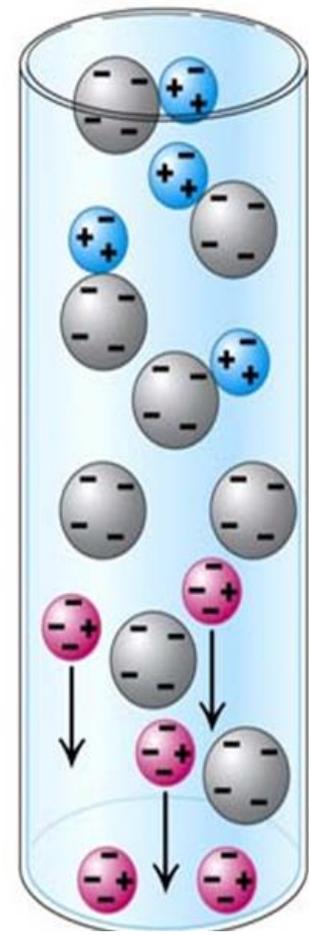


[Bio-Resource: Ion Exchange Chromatography Principle \(technologyinscience.blogspot.com\)](http://technologyinscience.blogspot.com)

- Βασίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις φορτισμένης επιφάνειας.
- Οι τύποι είναι δύο:
 - Κατιονανταλλαγής
 - Ανιονανταλλαγής



Οι πρωτεΐνες κινούνται μέσω της στήλης με ρυθμούς που καθορίζονται από το καθαρό φορτίο τους, στο pH που χρησιμοποιείται. Με την κατιοναλλαγή, οι πρωτεΐνες με πιο αρνητικό καθαρό φορτίο κινούνται πιο γρήγορα και εκκλύονται νωρίτερα.

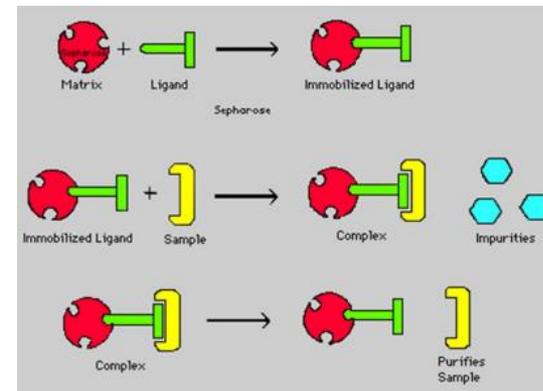
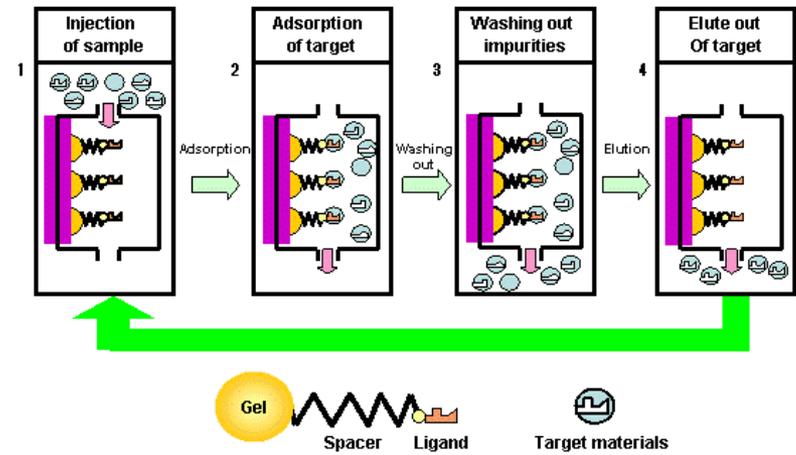


Θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες, ενώνονται με τα αρνητικά φορτισμένα σφαιρίδια του πολυμερούς

Αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες, διέρχονται μέσω της στήλης προς τα κάτω

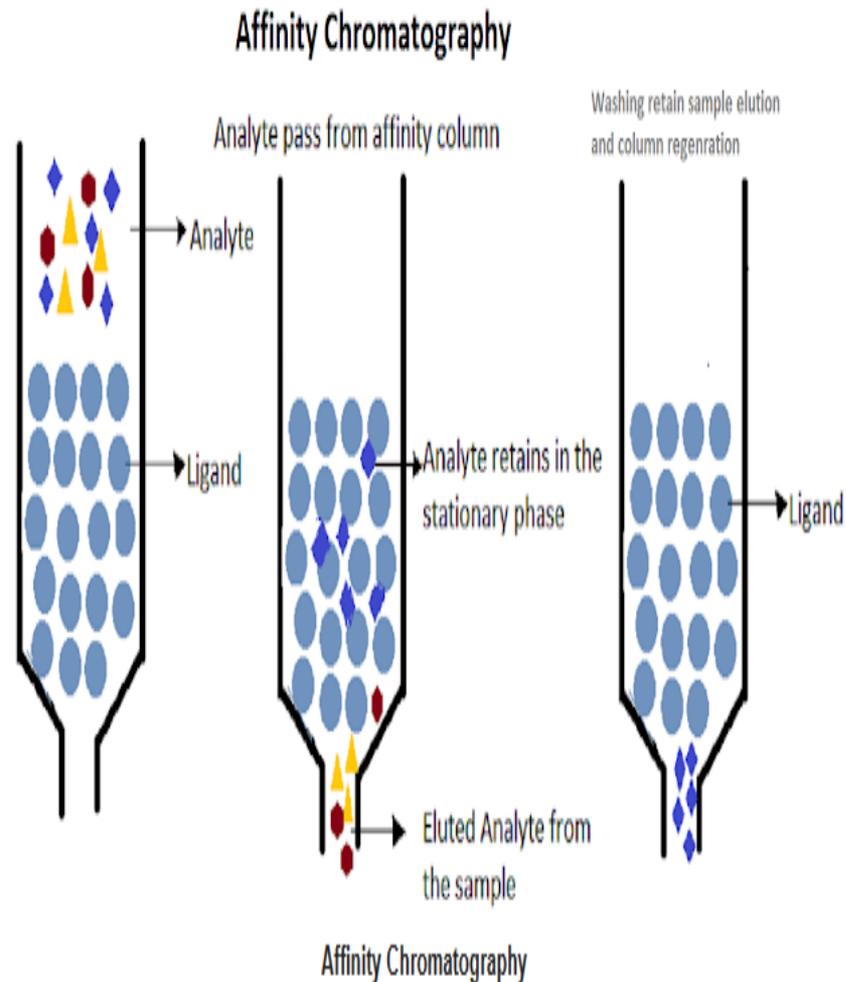
Χρωματογραφία συγγένειας

Βασίζεται στην εξαιρετικά εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ενός μορίου του μείγματος (αντίσωμα, συνένζυμο, μέταλλο) με ένα μόριο (Ligand), χημικά δεσμευμένο (ακινητοποιημένο), στη στερεή στατική φάση. Αφορά μόνο την υγροχρωματογραφία.



[Principle of affinity chromatography - Αναζήτηση Εικόνες \(bing.com\)](#)

- Η χρωματογραφία συγγένειας είναι τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό βιοχημικών μειγμάτων.
- Η χρωματογραφία στήλης συγγένειας είναι μια πολύ συγκεκριμένη τεχνική που εξαρτάται από την ειδική συγγένεια μεταξύ της στατικής φάσης και της αναλυόμενης ουσίας (Ligand).
- Είναι μια αναστρέψιμη βιοχημική αντίδραση.



Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

- Κινητή φάση (είτε υγρή είτε αέρια), διέρχεται μέσω πορώδους πηκτής που έχει μέγεθος πόρων τέτοιο που να επιτρέπει την είσοδο μόνο μικρών μορίων και να αποκλείει τα μεγάλα.
- Τα μεγάλα μεγέθους μόρια διέρχονται γρήγορα χωρίς να εισέλθουν εντός της πηκτής, ενώ τα μόρια μικρού μεγέθους, όταν εισέρχονται στην πηκτή αργούν να εξέλθουν από τη στήλη. Χρειάζονται μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης και τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους. Τα μόρια μεγάλου μεγέθους εξέρχονται πρώτα.



Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
(Molecular exclusion Chromatography)

Κατάταξη
χρωματογραφία
βάση στατικής
φάση

Χρωματογραφία
Στήλης

Επίπεδη
Χρωματογραφία

Χρωματο-
γραφία
πληρωμένων
στηλών

Χρωματογραφία
ανοικτών
τριχοειδών
στηλών

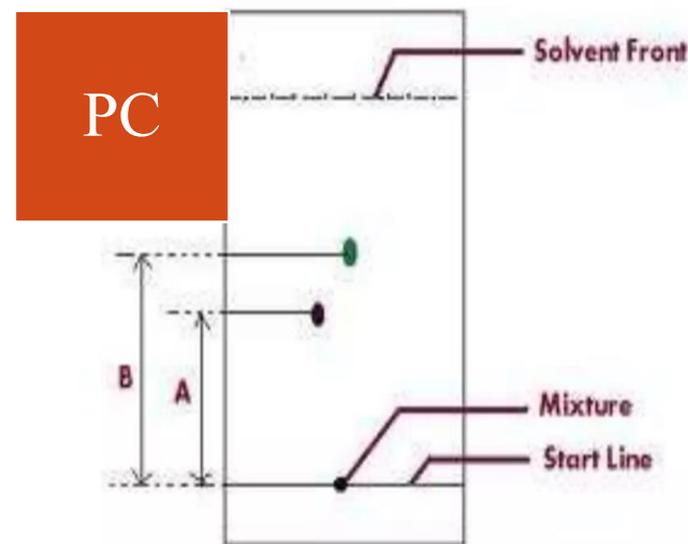
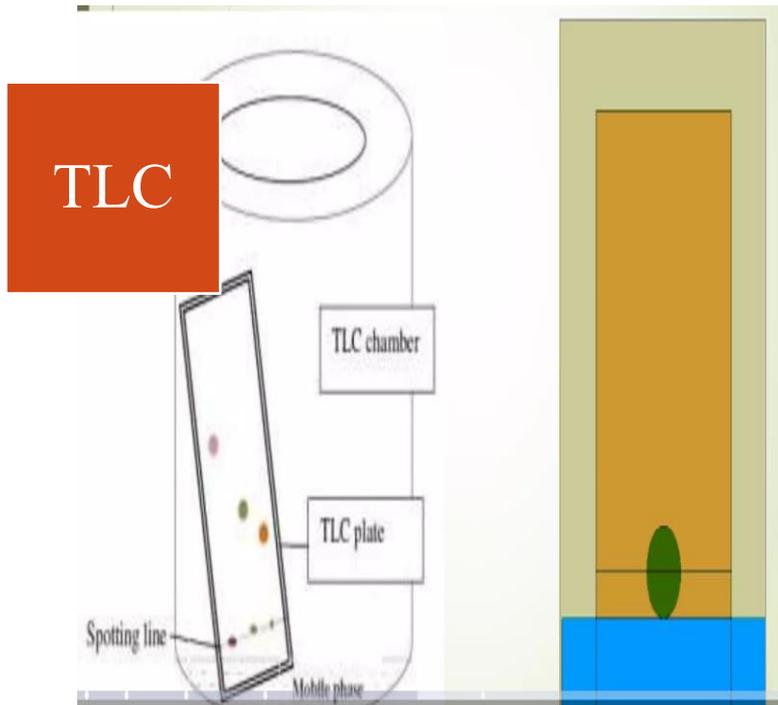
Χρωματογραφία
χάρτου (PC)

Χρωματογραφία
λεπτής στιβάδας
(TLC)

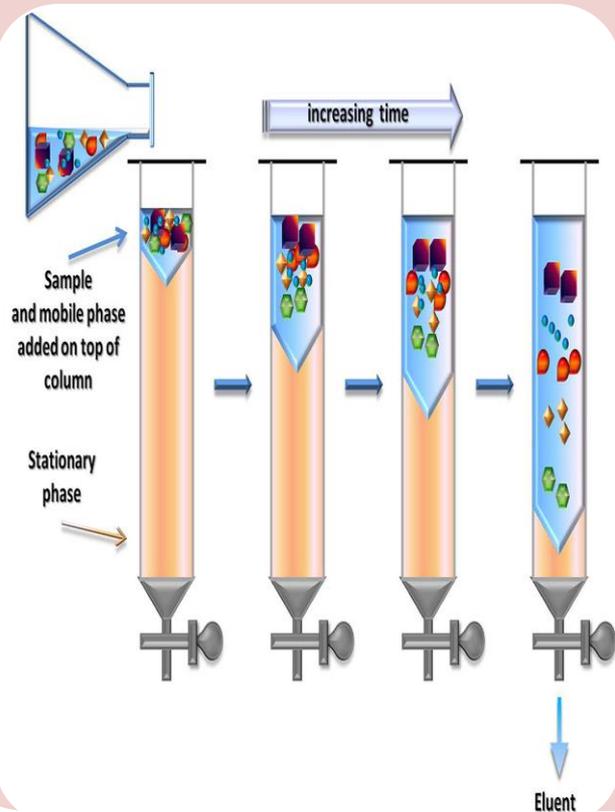
Επίπεδη χρωματογραφία

Η στατική φάση είναι επίπεδη, είτε λωρίδα χάρτη (PC), είτε λεπτή στιβάδα στερεού επιστρωμένη σε γυάλινη ή άλλου υλικού πλάκα (TLC).

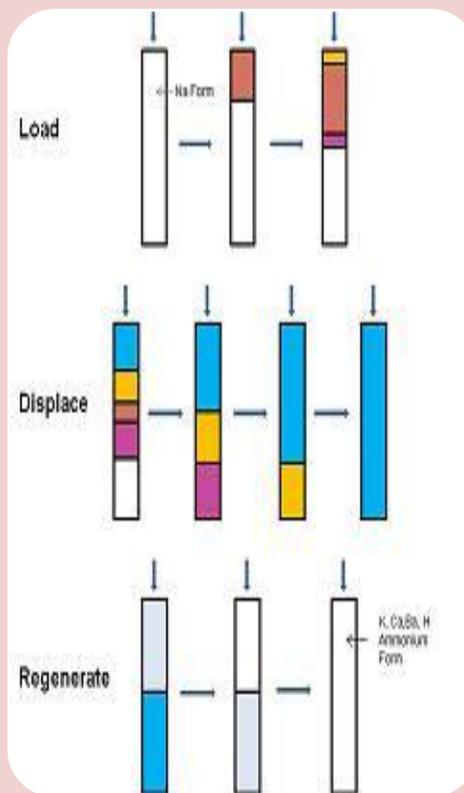
Η υγρή κινητή φάση διέρχεται μέσω της στατικής με τη βοήθεια τριχοειδών δυνάμεων ή της βαρύτητας.



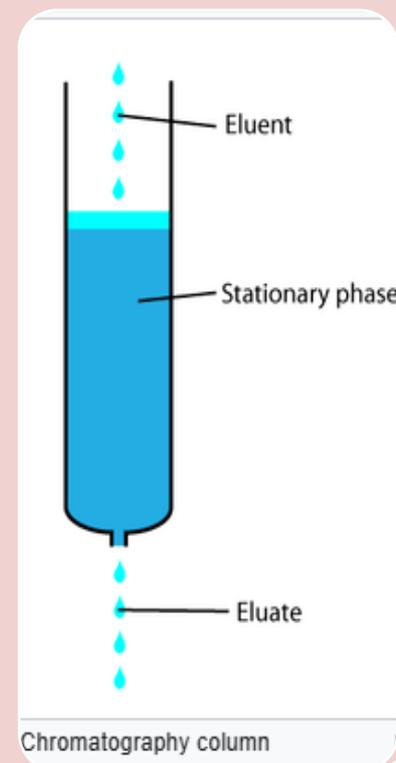
Κατάταξη με βάση τον τρόπο εισαγωγής και κινήσεως του δείγματος



Μετωπική
χρωματογραφία

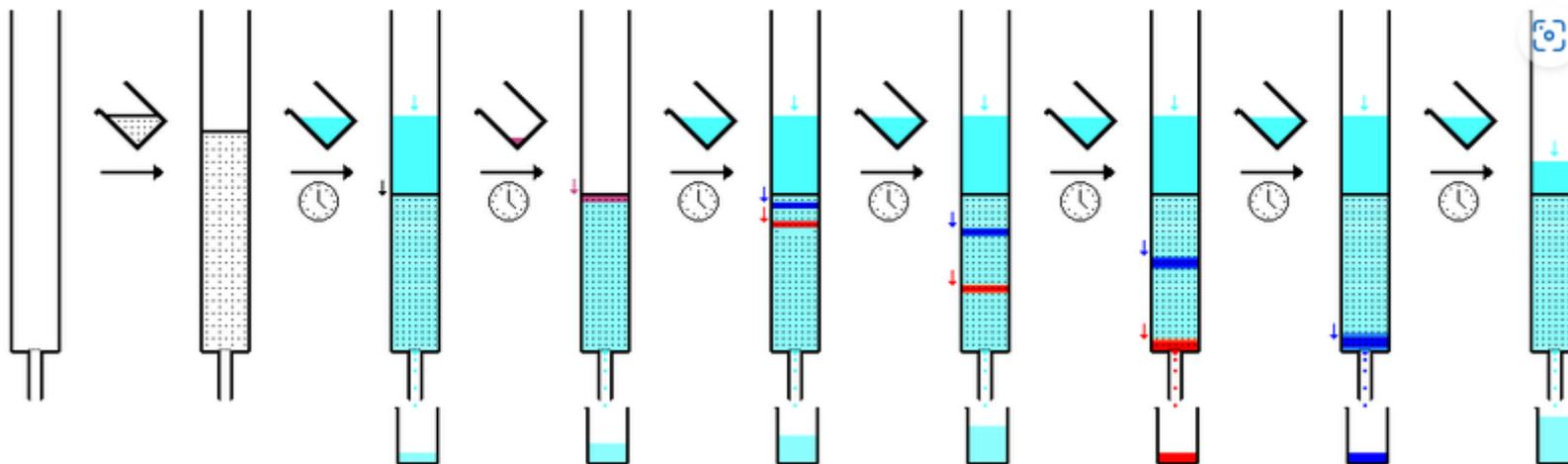


Χρωματογραφία
εκτοπίσεως)

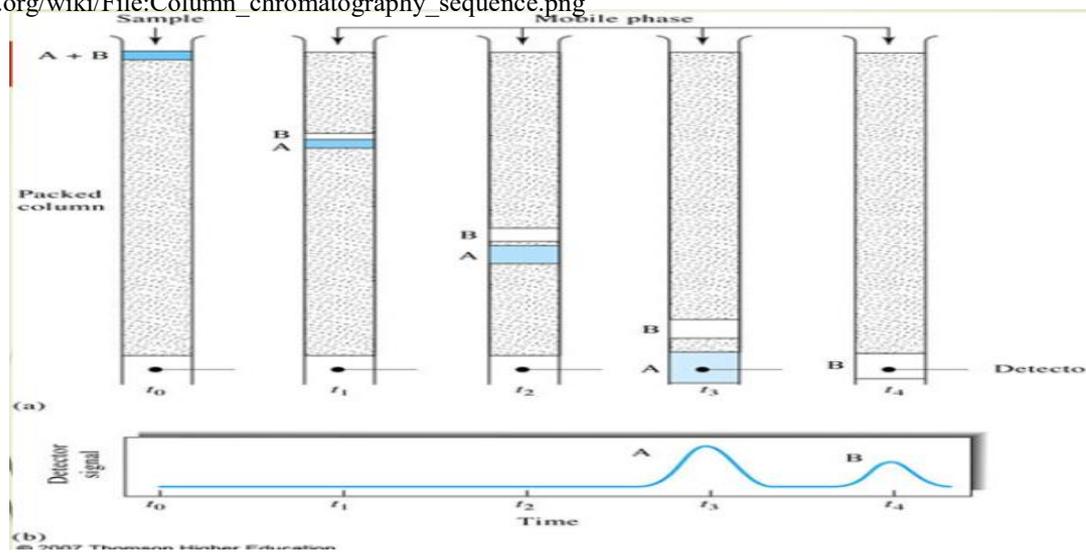


Χρωματογραφία
εκλούσεως

Χρωματογραφία έκλουσης η πιο σημαντική



https://en.wikipedia.org/wiki/File:Column_chromatography_sequence.png



Βασικά στάδια-βήματα χρωματογραφίας έκλουσης

- Συγκεκριμένη ποσότητα κάποιου δείγματος προστίθεται στην κινητή φάση στην κορυφή στήλης
- Στη συνέχεια το δείγμα μετακινείται στη στήλη με τη βοήθεια κινητής φάσης που προστίθεται σε αυτή
- Τα συστατικά κατανέμονται με κάποιο συγκεκριμένο μηχανισμό μεταξύ στατικής και κινητής φάσης
- Το κλάσμα του συστατικού που βρίσκεται στην κινητή φάση μετακινείται καθώς έρχεται σε επαφή με νέο τμήμα κινητής φάσης, κι έτσι κατανέμεται και πάλι
- Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές καθώς διαβιβάζεται συνεχώς και με σταθερή συνήθως ταχύτητα καινούργια ποσότητα κινητής φάσης στη στήλη.
- Μετακινούνται μόνο τα συστατικά τα οποία βρίσκονται στην κινητή φάση, με ταχύτητα μετακίνησης που εξαρτάται από το κλάσμα χρόνου παραμονής στην κινητή φάση και το κλάσμα χρόνου παραμονής συνάρτηση του συντελεστή κατανομής (μερισμού) στις δύο φάσεις

Γενική κατάταξη χρωματογραφικών τεχνικών

Type of Chromatography	Mobile Phase	Stationary Phase	Stationary Phase Support	Technique	Acronym
Adsorption chromatography	Gas	Solid	Column	Gas-solid chromatography	GC/GSC
	Liquid	Solid	Column	Liquid column chromatography	LC
				High performance liquid chromatography	HPLC
		Solid	Planar layer	Thin layer chromatography	TLC
Partition chromatography	Gas	Liquid	Column	Gas-liquid chromatography	GC/GLC
	Liquid	Liquid	Column	Liquid-liquid chromatography	LC
				High performance liquid chromatography	HPLC
		Liquid	Planar layer	Paper chromatography	PC
Ion exchange chromatography	Liquid	Exchange resin	Column	Ion exchange chromatography	IEX
Permeation chromatography	Liquid	Polymer matrix	Column	Size exclusion chromatography	SEC/GPC

Chromatography techniques - Labster

Χρήσιμοι όροι

Κινητή Φάση
(Φέρουσα) Mobile
phase

- Μπορεί να είναι αέριο, υγρό ή υπερκρίσιμο ρευστό

Στατική Φάση
Stationary Phase

- Είναι καθηλωμένη σε μια στήλη ή σε μια στερεή επιφάνεια

Αναλύτης

- Μείγμα του οποίου τα συστατικά θέλουμε να διαχωρίσουμε και να αναλύσουμε

Eluent

- Υγρό που εισέρχεται στη στήλη

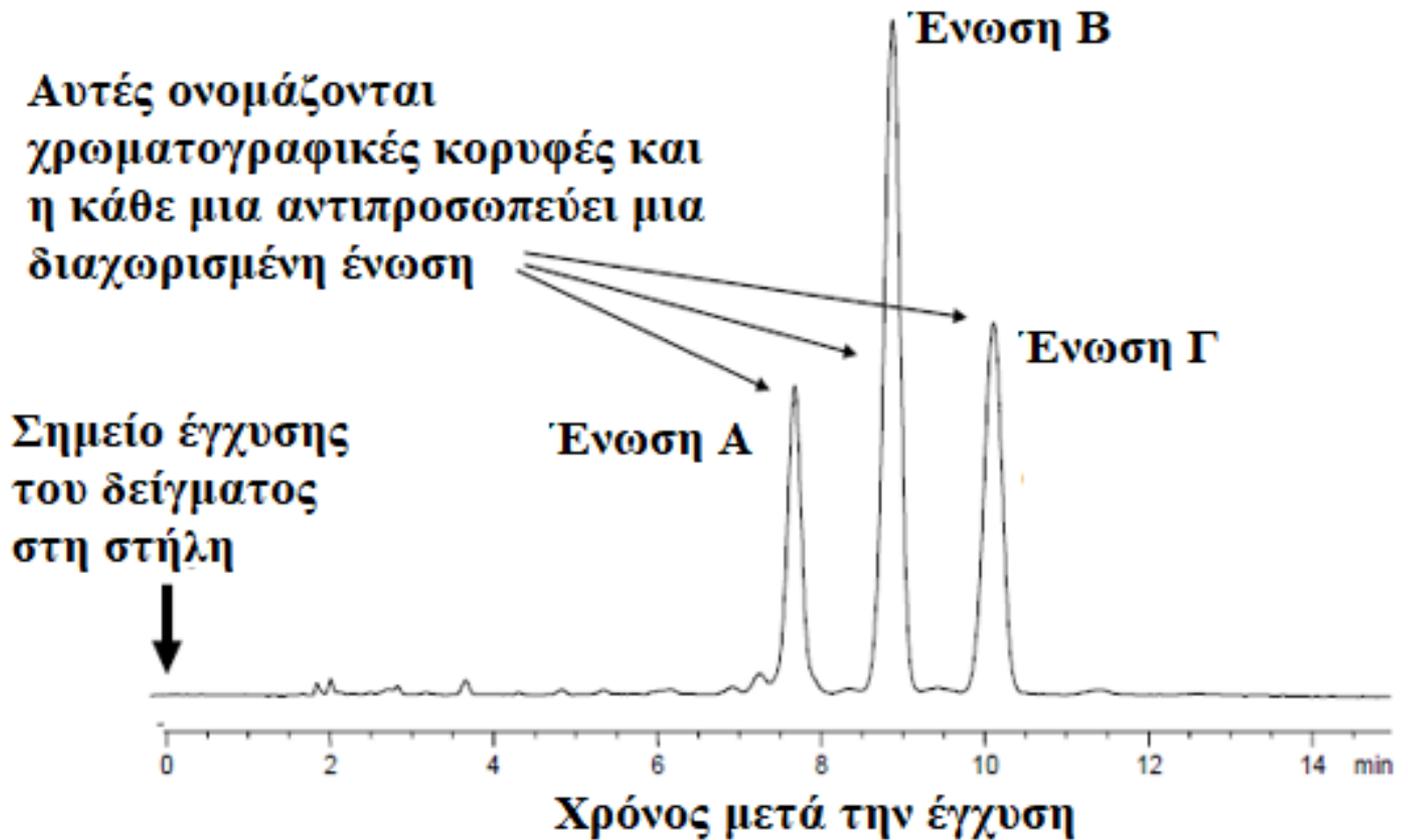
Eluate

- Υγρό που εξέρχεται από τη στήλη το οποίο συλλέγεται σε φιάλες.

Έκλουση Elution

- Διαδικασία έκπλυσης μιας ένωσης μέσω στήλης χρησιμοποιώντας κατάλληλο διαλύτη. Γραμμική έκλουση: Χρησιμοποιείται σταθερή παροχή κινητής φάσης

Χρωματογράφημα: Διάγραμμα του σήματος του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου.



Χρωματογραφική
κορυφή

- Το σήμα το οποίο παράγεται από τον ανιχνευτή, κάθε φορά που κάποιο συστατικό εκλύεται.

Χρόνος έκλυσης
συστατικού

- Χαρακτηριστικός για κάθε συστατικό

Ύψος ή
ολοκληρωμένη
επιφάνεια
χρωματογραφικής
κορυφής σήματος.

- Έχει σχέση με τη συγκέντρωση του συστατικού.

Η κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ κινητής και στατικής φάσης είναι μια ισορροπία που περιγράφεται από τη σχέση:

$$K = C_s / C_M$$

όπου:

K: ο συντελεστής κατανομής ή μερισμού

C_s : συγκέντρωση συστατικού στη στατική φάση (S)

C_m: συγκέντρωση συστατικού στην κινητή φάση (M)

Ο λόγος κατανομής K' , καλείται παράγοντας χωρητικότητας, εκφράζει ποσότητες ουσίας στην στατική και στην κινητή φάση και δίνεται από τη σχέση:

$$K' = K(V_S / V_M)$$

ή την

$$K' = (C_S / C_M) \times (V_S / V_M)$$

όπου V_S και V_M είναι οι όγκοι στη στατική και στην κινητή φάση

Εάν β το κλάσμα των δύο φάσεων, ισχύει ότι $\beta = V_S / V_M$ και ότι

$$K' = K / \beta$$

- Το κλάσμα του χρόνου που μια ουσία είναι στη στατική φάση δίνεται από τη σχέση: $k' / (1 + k')$
- Το κλάσμα του χρόνου που μια ουσία είναι στην κινητή φάση δίνεται από τη σχέση: $1 / (1 + k')$



- t_0 είναι ο χρόνος που απαιτεί μια μη κατακρατημένη ουσία για να φτάσει στον ανιχνευτή, δηλαδή ο χρόνος που χρειάζεται η κινητή φάση για να φθάσει στον ανιχνευτή.
- t_R (Retention time) είναι ο χρόνος συγκράτησης ή ανάσχεσης, δηλαδή ο χρόνος που η ουσία παραμένει στη χρωματογραφική στήλη.

$$t_R = L / \bar{u} (1 + k') \text{ όπου } L \text{ το μήκος της στήλης και } \bar{u} \text{ η μέση ταχύτητα της κινητής φάσης}$$

- V_R (Retention Volume), Όγκος συγκράτησης ή ανάσχεσης: Είναι ο όγκος κινητής φάσης που χρειάζεται να περάσει από τη στήλη για να εκλουσθεί μια ουσία στο μέγιστο της συγκέντρωσής της.

ισχύει ότι $t_R = V_R / F$ όπου F η ογκομετρική ταχύτητα ροής κινητής φάσης (μονάδες όγκου / μονάδα χρόνου)

- t_R' : Ορίζεται ως η διαφορά $t_R - t_0$ και ονομάζεται ανηγμένος χρόνος συγκράτησης. Ανάλογα ορίζεται ο V_R'
- V_M είναι ο όγκος της κινητής φάσης στη στήλη

$$V_M = t_M \cdot F_C$$

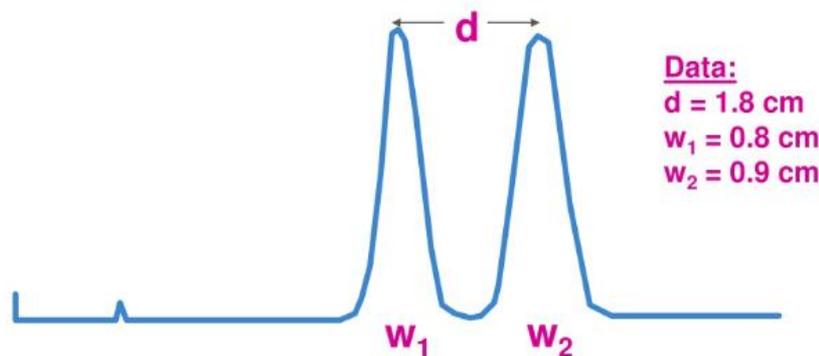
- Η σχετική συγκράτηση $\alpha = t_R' / t_R'^* = K / K^*$ Το * δηλώνει πρότυπη ουσία.

- Σε ένα χρωματογράφημα οι κορυφές έκλουσης μοιάζουν με καμπύλες Gauss.
- Σε ουσίες με παραπλήσιες τιμές K οι κορυφές έκλουσης αλληλεπικαλύπτονται και δεν διαχωρίζονται πλήρως. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν δυο θεωρίες:
 - Η θεωρία των πλακών: Γίνεται η υπόθεση πως η χρωματογραφική στήλη αποτελείται από μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών. Ύψος ισοδύναμο προς μια θεωρητική πλάκα (H), καλείται το μήκος της στήλης που αντιστοιχεί σε μια θεωρητική πλάκα και ισούται με το πηλίκο του μήκους της στήλης (L), προς τον αριθμό των θεωρητικών πλακών (n). Ισχύει πως όσο μικρότερη τιμή έχει το H, τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός.
 - Η θεωρία της ταχύτητας: Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, στην αποδοτικότητα της στήλης (H, N)
Εξίσωση Van Deemter, Διαγράμματα Van Deemter

- Η διαχωριστικότητα (Resolution) R_s εκφράζει ποσοτικά το μέτρο του διαχωρισμού δύο συστατικών. Θα πρέπει να ισχύει $R_s > 1.5$, δηλαδή επικάλυψη κορυφών $< 1\%$

$R = 2(t_B - t_A) / (W_A + W_B)$: η διαχωριστική ικανότητα για δύο κορυφές με χρόνο συγκράτησης t_A και t_B και εύρος κορυφών έκλυσης W_A και W_B

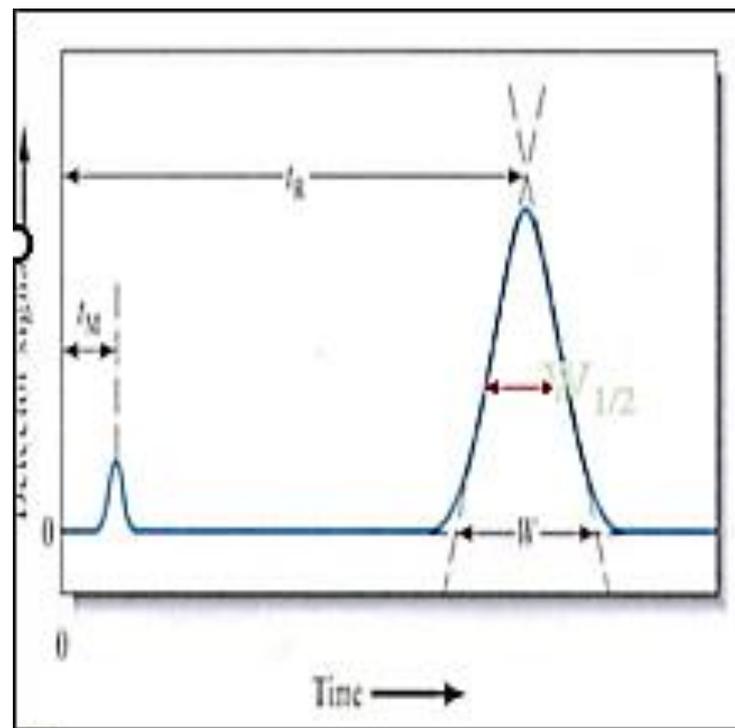
Resolution



$$R_s = 2 \frac{d}{(w_1 + w_2)} = \frac{3.6 \text{ cm}}{1.7 \text{ cm}} = 2.1$$

<https://www.slideserve.com/robinmurphy/chromatography-powerpoint-ppt-presentation>

Αγγελική Απ. Γαλάνη



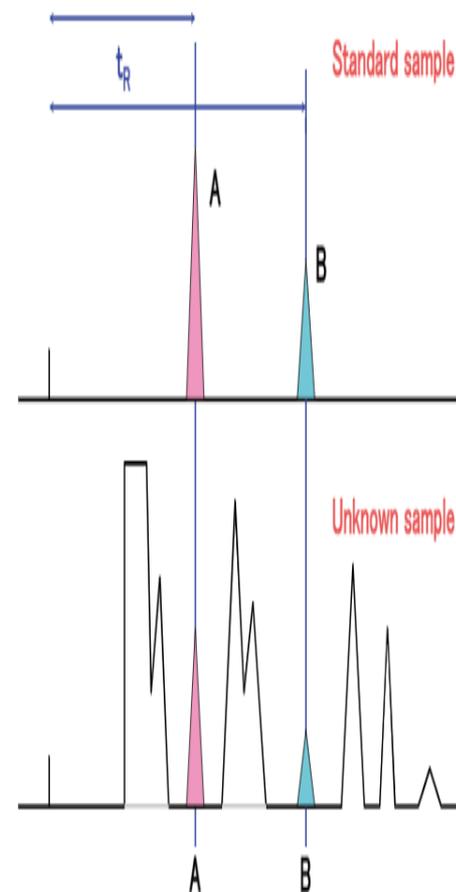
ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Χρόνος
ανάσχεσης t_R

Χρήση
φασματοσκοπικών
τεχνικών (MS,
FTIR, UV-VIS...)

Χρήση 2^{ης}
χρωματογραφικής
μεθόδου

- Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αναγνώριση ενός συστατικού δείγματος πραγματοποιείται συγκρίνοντας τον χρόνο συγκράτησης του με αυτόν σε ένα τυπικό δείγμα.
- Εάν ληφθεί ένα σύνθετο χρωματογράφημα με πολλές κορυφές ή εάν ο χρόνος κατακράτησης του συστατικού στόχου διαφέρει μεταξύ του προτύπου και του πραγματικού δείγματος, το συστατικό στόχο αναγνωρίζεται προσθέτοντας το πρότυπο δείγμα στο άγνωστο δείγμα
- Η ανάλυση των συστατικών που συλλέγονται με HPLC με IR ή φασματοσκοπία μάζας επιτρέπει αξιόπιστη ποιοτική ανάλυση



ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μεταξύ του σήματος μιας χρωματογραφικής κορυφής και της συγκέντρωσης της ουσίας στην οποία αυτό αντιστοιχεί, υπάρχει γραμμική σχέση

Ύψος κορυφής

Αυτό επηρεάζεται από τη μεταβολή του εύρους, τη θερμοκρασία, τη ροή την ταχύτητα έγχυσης

Εμβαδό κορυφής

Η ποσοτική ανάλυση μας λέει πόση αναλυόμενη ουσία βρίσκεται σε ένα μείγμα.

Σε μια ιδανική ανάλυση, το ύψος της κορυφής και η περιοχή κάτω από την κορυφή είναι ανάλογα με την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας που εγχέεται στη στήλη.

Το εμβαδόν μιας κορυφής καθορίζεται από την ολοκλήρωση, η οποία συνήθως υπολογίζεται από τον υπολογιστή του οργάνου.

Ποσοτική Ανάλυση – Καμπύλη Βαθμονόμησης

Δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης που να συσχετίζει την απόκριση του ανιχνευτή με τη συγκέντρωση αναλυόμενης ουσίας.

- Χρήση εξωτερικών προτύπων

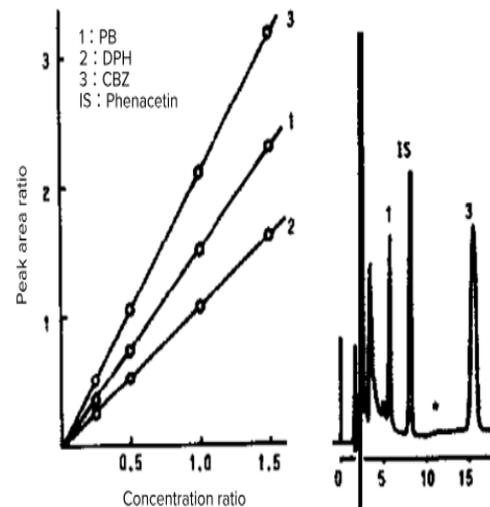
Εάν ο όγκος έγχυσης είναι πανομοιότυπος για κάθε πρότυπο και δείγμα, τότε μια εξωτερική τυποποίηση παρέχει ακριβή αποτελέσματα. Η μέθοδος εξωτερικού προτύπου δημιουργεί μια καμπύλη βαθμονόμησης για ένα τυπικό δείγμα και τα άγνωστα δείγματα ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας τη βαθμονόμηση. Δυστυχώς, ακόμη και υπό τις καλύτερες συνθήκες, η σχετική ακρίβεια για επαναλαμβανόμενες ενέσεις μπορεί να διαφέρει κατά 5% ή και παραπάνω. Για ποσοτικές εργασίες που απαιτούν υψηλή ακρίβεια και ακρίβεια, συνιστάται η χρήση εσωτερικών προτύπων

• Χρήση εσωτερικών προτύπων

Εάν οι όγκοι έγχυσης ποικίλλουν ή εάν η συγκέντρωση μπορεί να αλλάξει εύκολα επειδή ο διαλύτης είναι πτητικός, μπορούμε να δημιουργήσουμε μια βαθμονόμηση χρησιμοποιώντας ένα εσωτερικό πρότυπο ως αναφορά.

Το εσωτερικό πρότυπο είναι μια ένωση που προστίθεται σε κάθε διάλυμα που χρησιμοποιείται ως αναφορά για σύγκριση με το σήμα της αναλυόμενης ουσίας.

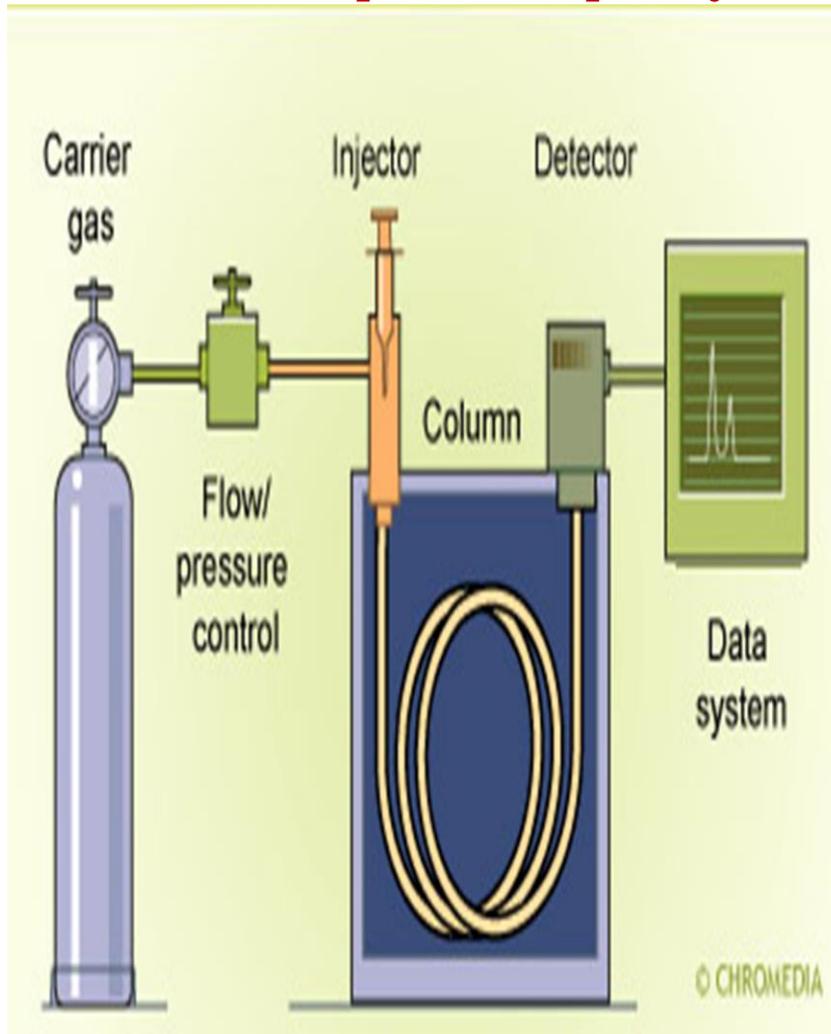
Το είδος, το οποίο ονομάζουμε εσωτερικό πρότυπο, πρέπει να είναι διαφορετικό από την αναλυόμενη ουσία.



Ποσοτικοποίηση με μέθοδο εσωτερικού προτύπου, καμπύλη βαθμονόμησης (αριστερά) και χρωματογράφημα (δεξιά)

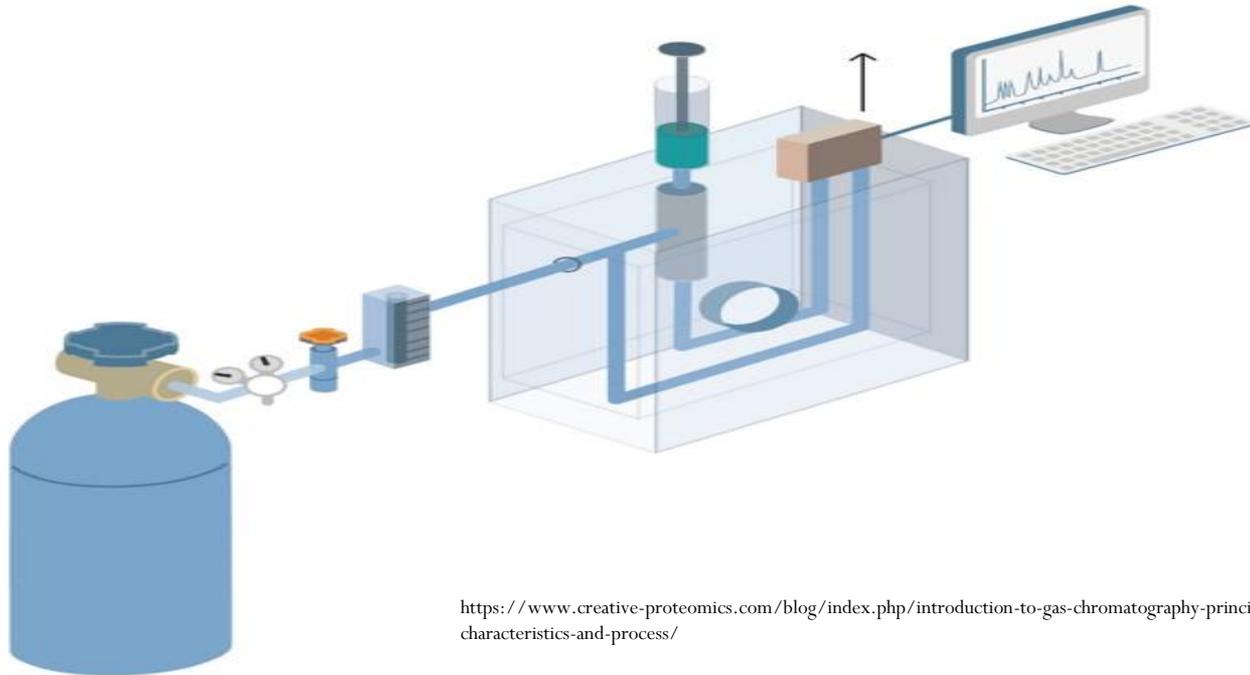
<https://www.jasco-global.com/principle/principles-of-hplc-5-qualitative-and-quantitative-analysis/>

Αέρια Χρωματογραφία GC



- Φέρον Αέριο(Carrier gas): Μέσα σε κυλίνδρους με μεγάλη πίεση
- Ρυθμιστές Πίεσης(Flow pressure control): Παρέχουν το φέρον αέριο ρυθμίζοντας την ταχύτητα ροής του.
- Εισαγωγέας δείγματος (Injector): Ο Θερμαινόμενος θάλαμος στον οποίο εισάγεται το δείγμα. Βρίσκεται στην αρχή της στήλης και το δείγμα εισάγεται μέσω σύριγγας ή μέσω ειδικής βαλβίδας εισαγωγής.

- Στήλη (Column): Σε αυτή εισέρχονται με το φέρον αέριο τα συστατικά του δείγματος και σε αυτή διαχωρίζονται.
- Ανιχνευτής (Detector): Σε αυτόν εισέρχονται μετά τη στήλη ξεχωριστά τα συστατικά του δείγματος.
- Καταγραφέας (Data System): Για κάθε ένωση που ανιχνεύει ο ανιχνευτής στέλνει σήμα στον καταγραφέα.



<https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/introduction-to-gas-chromatography-principles-characteristics-and-process/>

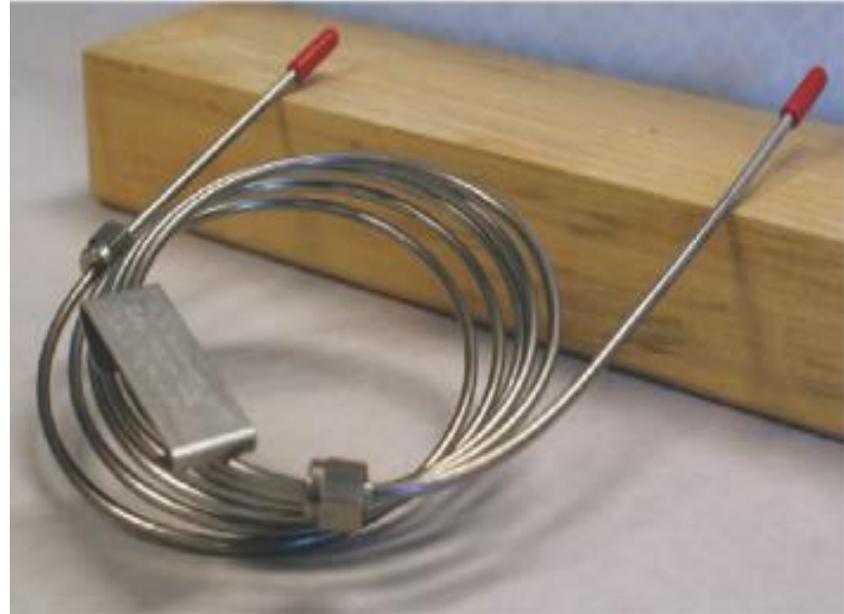
Φέρον Αέριο – Κινητή φάση για αέρια Χρωματογραφία

- Ανάλογα με το είδος του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται και τις απαιτήσεις του επιλέγεται το κατάλληλο φέρον αέριο.
- Συχνά χρησιμοποιούμενα είναι το ήλιο (He), το άζωτο (N₂), το υδρογόνο (H₂), και το αργό (Ar). Το ήλιο και το άζωτο χρησιμοποιούνται συχνότερα . Το ήλιο είναι κατάλληλο για τριχοειδείς στήλες

Είδη στηλών στην αέρια χρωματογραφία

Πληρωμένων στηλών (packed columns)

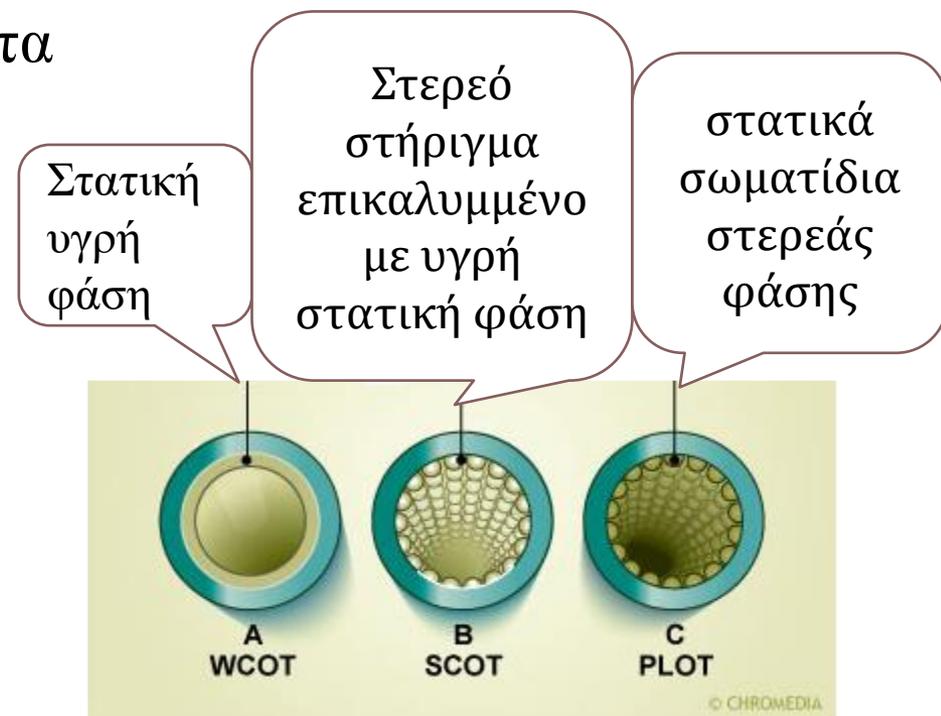
- Περιέχουν λεπτά σωματίδια στερεού υλικού επικαλυμμένα με μια μη πτητική υγρή στατική φάση. Το ίδιο το στερεό είναι δυνατόν να αποτελεί τη στατική φάση.



Είδη στηλών στην αέρια χρωματογραφία

Ανοικτές σωληνοειδείς στήλες Capillary Columns ή *open tubular column*

- Σε σχέση με τις πληρωμένες στήλες έχουν
 - Υψηλή διαχωριστική ικανότητα
 - Μικρότερο χρόνο ανάλυσης
 - Μεγαλύτερη ευαισθησία
 - Μικρότερη χωρητικότητα δείγματος
- Διακρίνονται στις:
 - ✓ WCOT
 - ✓ SCOT
 - ✓ PLOT



Όσο πιο ισχυρές είναι οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων των ενώσεων του προς ανάλυση δείγματος και της στατικής φάσης, τόσο μεγαλύτερος ο χρόνος κατακράτησης των ενώσεων αυτών στη στήλη

Παραδείγματα

- Δυνάμεις διπόλου-διπόλου
- Δεσμοί Υδρογόνου
- Επαγωγικές δυνάμεις
- Δυνάμεις διασποράς

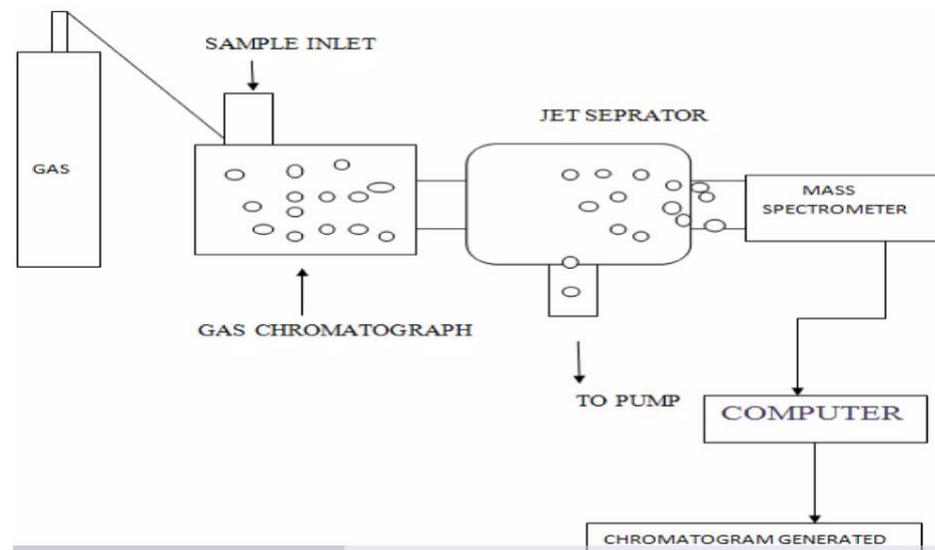
Ανιχνευτές

- Ο ανιχνευτής, βρίσκεται στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των συστατικών του δείγματος τα οποία εκλύονται από αυτή
- Οι ανιχνευτές **διακρίνονται** σε μη εκλεκτικούς, εκλεκτικούς και ειδικούς Ένας μη εκλεκτικός ανιχνευτής ανταποκρίνεται σε όλες τις ενώσεις εκτός από τον φέρον αέριο, ένας εκλεκτικός ανιχνευτής αποκρίνεται σε μια σειρά ενώσεων με κοινή φυσική ή χημική ιδιότητα και οι ειδικοί ανιχνευτές αποκρίνονται σε μία μόνο χημική ένωση.
- Οι ανιχνευτές **διακρίνονται επίσης** σε εκείνους που αποκρίνονται στη συγκέντρωση, (σήμα από στιγμιαία συγκέντρωση της κάθε ένωσης που φτάνει στο στον ανιχνευτή) και σε εκείνους που αποκρίνονται στη μάζα (σήμα ανάλογο με ταχύτητα ροής μάζας που ανιχνεύεται).

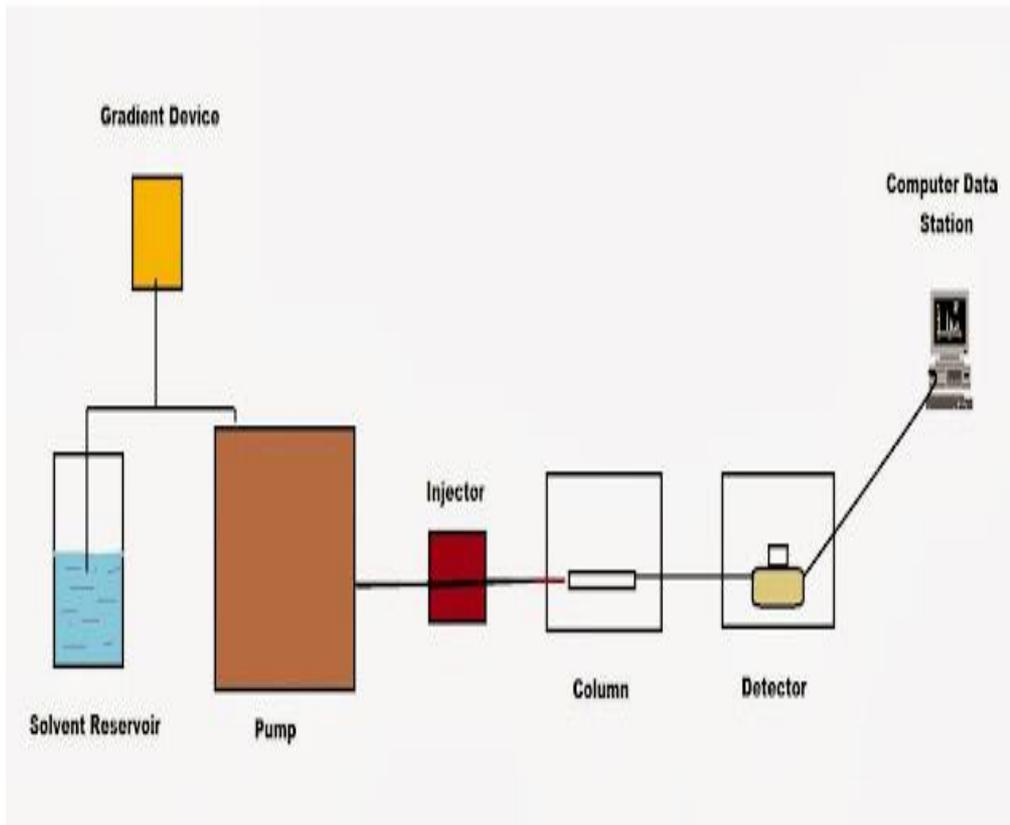
Τα πιο κοινά είδη Ανιχνευτών στην Αέρια Χρωματογραφία

- Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD)
- Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID)
- Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)
- Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας αλκαλίων (AFID)
- φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (FPD)
- ανιχνευτής φωτοϊονισμού (PID)
- ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας (MS)

- Μια από τις πιο αποτελεσματικές τεχνικές για την ανίχνευση και για την ταυτοποίηση συστατικών πολύπλοκων οργανικών δειγμάτων με εφαρμογές σε περιβαλλοντική ανάλυση, προκύπτει από το συνδυασμό αέριας χρωματογραφίας και φασματοφωτομετρίας μάζας (GC-MS)



Υγρή Χρωματογραφία



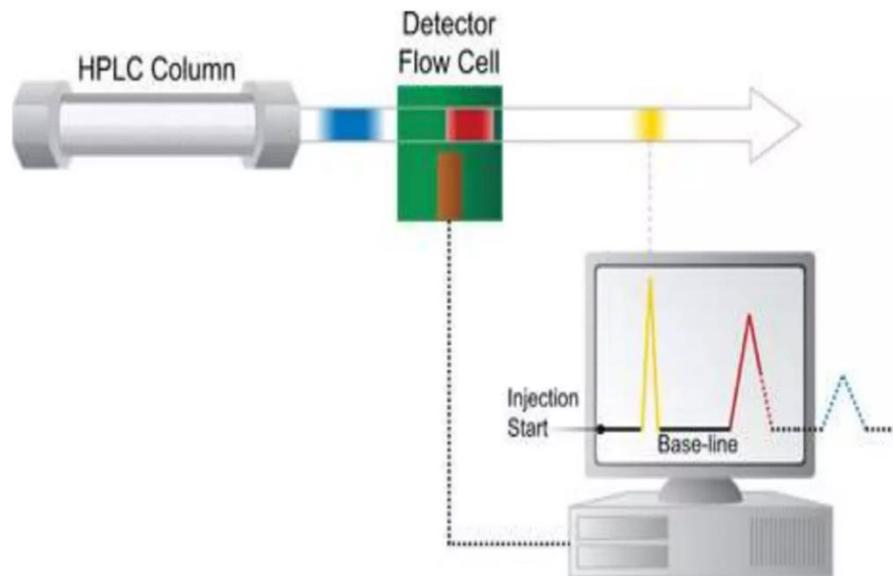
What is Liquid Chromatography? What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography) | Chemistry Net
(chem-net.blogspot.com)

- Δεξαμενή για κινητή φάση (υγρή)
- Αντλία
- Θύρα έγχυσης (στόμιο εισόδου δείγματος)
- Στήλη / στήλη HPLC
- Ανιχνευτής (ανιχνευτής χρωματογραφίας)
- Σταθμός δεδομένων υπολογιστή
- Δοχείο απορριμμάτων

- Η υγρή χρωματογραφία ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα με μεγάλα μόρια ή με ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών καθώς και για ασταθείς ενώσεις οι οποίες δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν.
- Ανάλογα με τις πολικότητες κινητής και στατικής φάσης η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε:
 - Χρωματογραφία κανονικής φάσης: Πολική στατική φάση και κινητή φάση μη πολική ή ενδιάμεσης πολικότητας
 - Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης: Πολική στατική φάση και πολική κινητή φάση

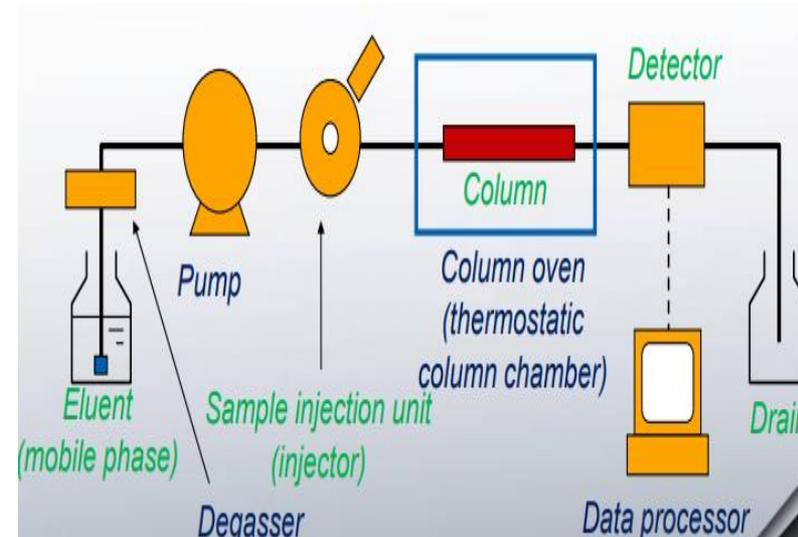
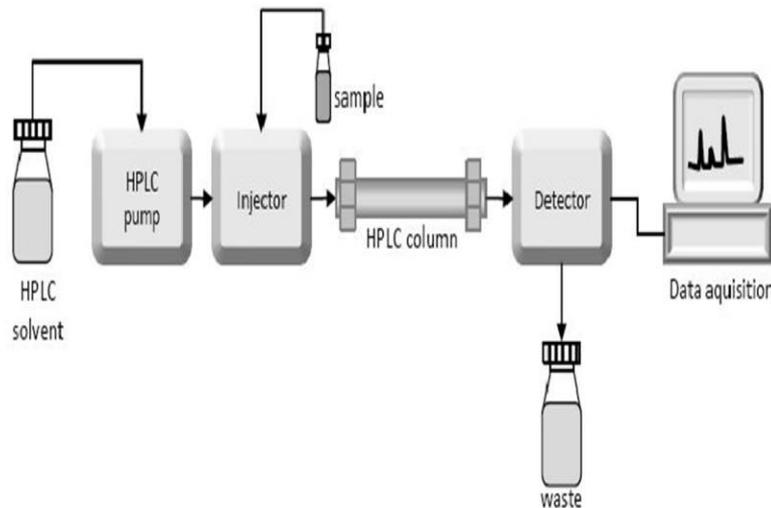
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC

- Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), είναι μια χρωματογραφική τεχνική μεγάλης ευελιξίας και αναλυτικής ισχύος που βρίσκει πολλές εφαρμογές.
- Διαχωρίζει ή προσδιορίζει μείγματα ουσιών στα συστατικά τους με βάση τη μοριακή δομή και τη σύστασή τους.



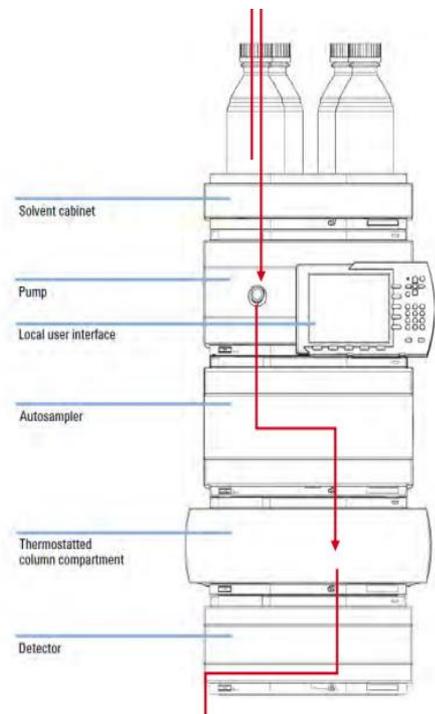
[Introduction to chromatography and its applications 2 | PPT \(slideshare.net\)](#)

- HPLC: Μορφή υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενώσεων που βρίσκονται σε διάλυμα.
- Τα όργανα HPLC αποτελούνται από μια δεξαμενή κινητής φάσης, μια αντλία, έναν εγχυτήρα, στήλη διαχωρισμού, ανιχνευτής και επεξεργαστής δεδομένων.

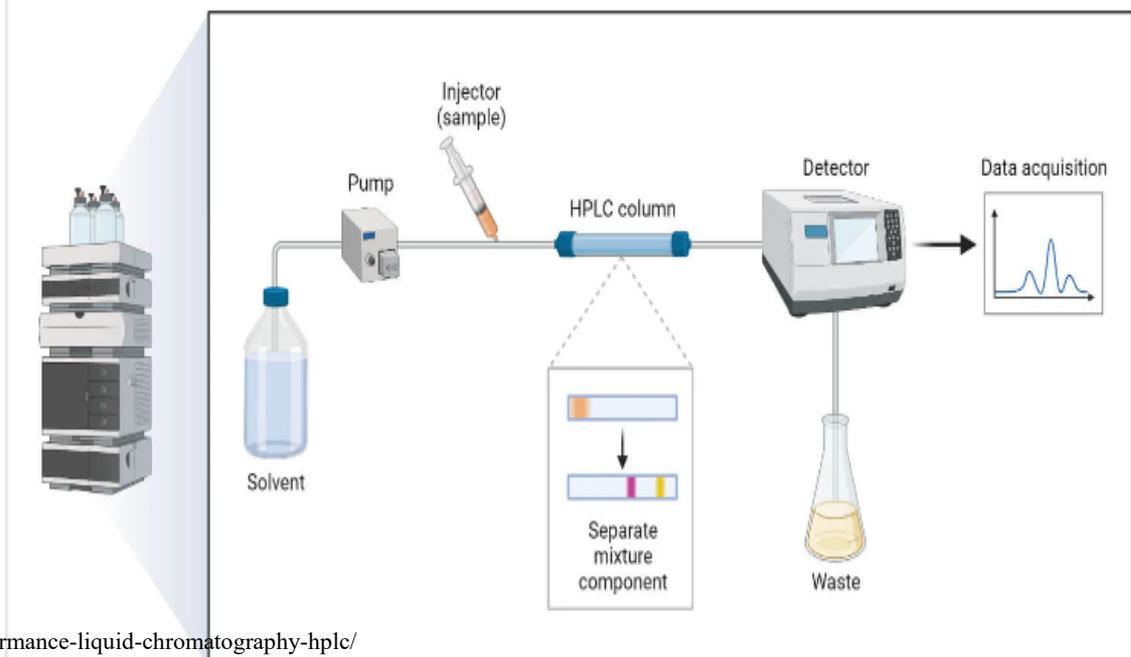


<https://laboratoryinfo.com/hplc/>

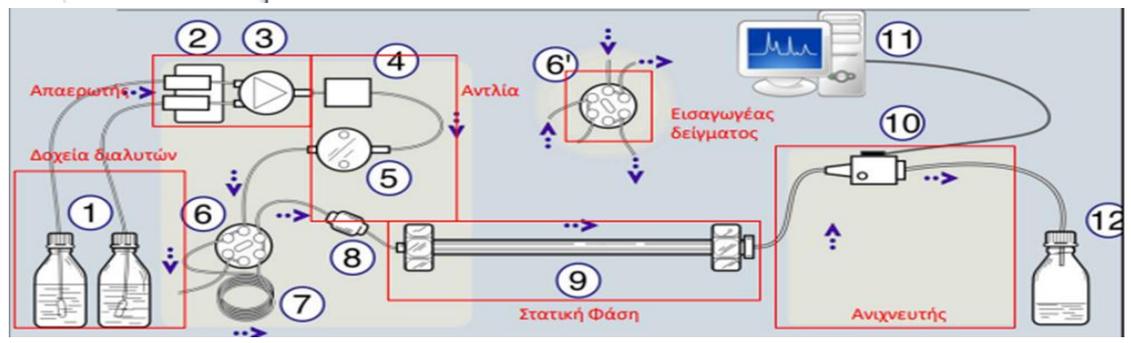
file:///C:/Users/User/Desktop/Ivanova-Petropulos-Presentation-Ohrid%202016%20(1).pdf



High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

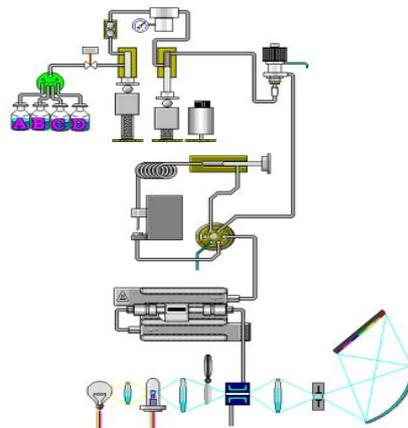


<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>

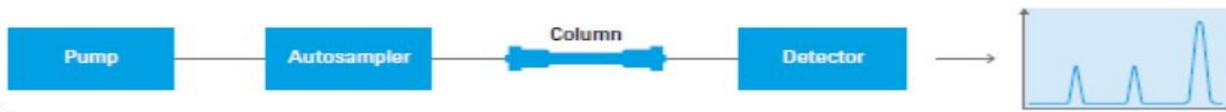


HPLC - LCMS μέρος 1ο_master.pdf

Detector
Column
Compartment
Autosampler
Pump &
Vacuum
Degasser



<https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/An-Introduction-to-HPLC-Instrumentation-05112020.pdf>



- Στην HPLC, μια στήλη συγκρατεί τη στάσιμη φάση, μια αντλία μετακινεί τις κινητές φάσεις μέσω της στήλης, ένας ανιχνευτής δείχνει τους χρόνους κατακράτησης των μορίων.
- Ο χρόνος κατακράτησης είναι μεταβλητός και εξαρτάται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της στατικής φάσης, των μορίων που αναλύονται και του χρησιμοποιούμενου διαλύτη.
- Ένας μικρός όγκος δείγματος προς ανάλυση εισάγεται στο ρεύμα κινητής φάσης και επιβραδύνεται από συγκεκριμένες χημικές ή φυσικές αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση. Η ποσότητα της επιβράδυνσης εξαρτάται κυρίως από τη φύση της αναλύομενης ουσίας και τη σύνθεση τόσο της στατικής όσο και της κινητής φάσης.
- Οι πιο συνηθισμένοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο.

Δοχεία Διαλυτών (κινητή φάση)

- Τύπου Duran και μέσω αντλίας οι διαλύτες οδηγούνται στη στατική φάση. Οι σωλήνες καταλήγουν σε φίλτρο με σκοπό την αποφυγή ροής σωματιδίων στο σύστημα. Ανάλογα με το είδος τους οι αντλίες έχουν δυνατότητα ανάμιξης από 2 έως 4 διαλυτών ταυτόχρονα.

Ανάμιξη Διαλυτών: Ισοκρατική ή Βαθμιδωτή Έκλυση

- Ισοκρατική έκλυση: Με ένα διαλύτη ή μίγμα διαλυτών με σταθερή σύσταση
- Βαθμιδωτή έκλυση: Μεταβάλλεται συνεχώς η σύσταση του μίγματος διαλυτών που χρησιμοποιείται έτσι ώστε να αυξάνει η ισχύς έκλυσης. Γίνεται ανάμιξη ενός ισχυρού με έναν ασθενή διαλύτη σε ποσοστά που μεταβάλλονται με το χρόνο και με την ποσότητα του ισχυρού διαλύτη να αυξάνεται συνεχώς. Έτσι διαχωρίζονται αρχικά όσες έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης και με την αύξηση της ισχύος του διαλύτη διαχωρίζονται κι όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο.

Κάθε διαλύτης χαρακτηρίζεται από ισχύ έκλυσης ανάλογα με την ικανότητα που έχει να εκτοπίζει ουσίες από την στατική φάση. Εξαρτάται από την πολικότητα της στατικής φάσης

Στήλες HPLC

- Είναι είτε ατσάλινες είτε πλαστικές και πληρώνονται με τη στατική φάση. Είναι σύνηθες να προηγείται της στήλης μια προστήλη, της οποίας ο ρόλος είναι προστατευτικός.
- Είναι πολύ σημαντικές διότι σε αυτές επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος
- Διατίθενται στο εμπόριο σε διάφορα μήκη, μεγέθη πόρων και υλικά συσκευασίας



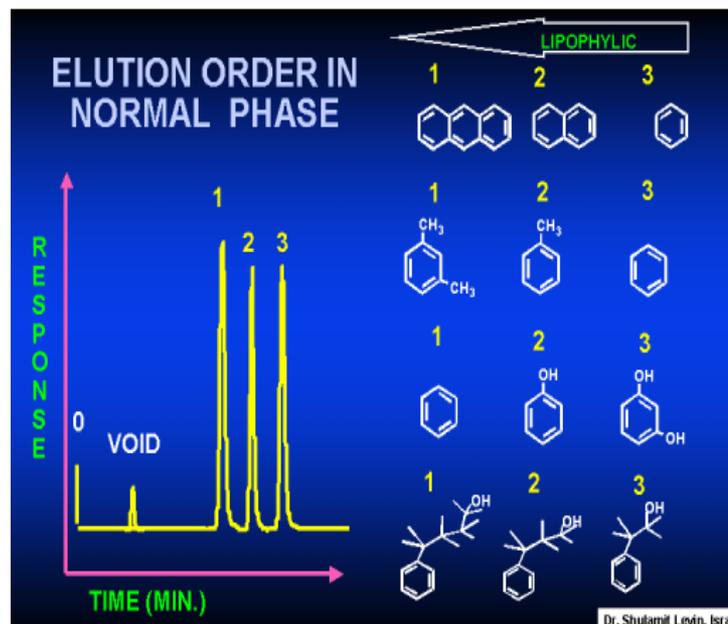
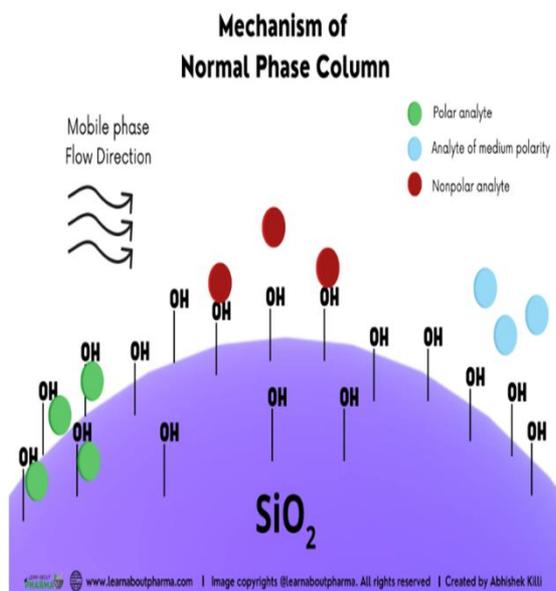
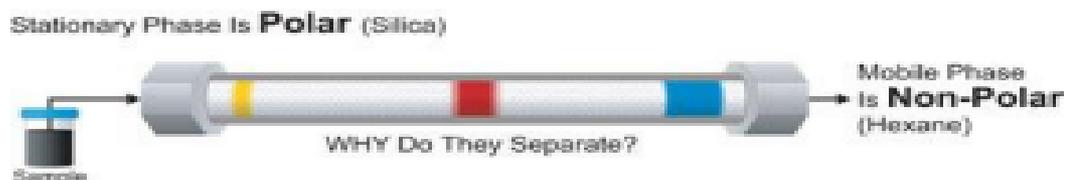
- Το υλικό συσκευασίας σε μια στήλη HPLC είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματικότητα και την επιλεκτικότητα του διαχωρισμού. Πρέπει να έχει μεγάλη επιφάνεια, ομοιόμορφο μέγεθος πόρων και καλή μηχανική σταθερότητα.
- Το πιο διαδεδομένο υλικό συσκευασίας είναι η Πηκτή Διοξειδίου Πυριτίου (Πυριτία) (Silica gel, $\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$) η οποία έχει ως ενεργά κέντρα προσρόφησης τις επιφανειακές ομάδες **Si-O-H** που ενεργοποιούνται με θέρμανση της πηκτής στους **200 °C**. Είναι ασθενώς όξινη και αλληλεπιδρά με ισχυρά βασικά συστατικά. Έχει μεγάλη πολικότητα και αποτελεί τη βάση της χρωματογραφίας. Μείωση της πολικότητας επιτυγχάνεται με σύνδεση με αλκύλια που έχουν αμινο-, κυανο- ή αλκυλο- ομάδες

Η Πηκτή Διοξειδίου Πυριτίου (Πυριτία)

(Silica gel, $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) η οποία έχει ως ενεργά κέντρα προσρόφησης τις επιφανειακές ομάδες Si-O-H που ενεργοποιούνται με θέρμανση της πηκτής στους $200\text{ }^\circ\text{C}$. Είναι ασθενώς όξινη και αλληλεπιδρά με ισχυρά βασικά συστατικά

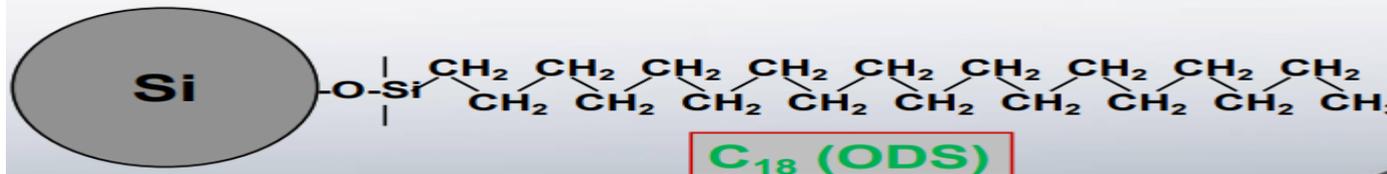
Κανονικής φάσης HPLC

- Όταν η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή
- Στατική φάση: Silica ή οργανικά τμήματα με κυανό και αμινο λειτουργικές ομάδες
- Κινητή φάση χαμηλής πολικότητας, (εξάνιο ή επτάνιο)

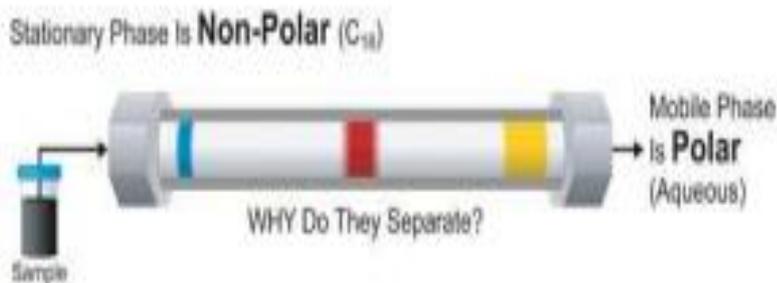


Αντίστροφης φάσης HPLC

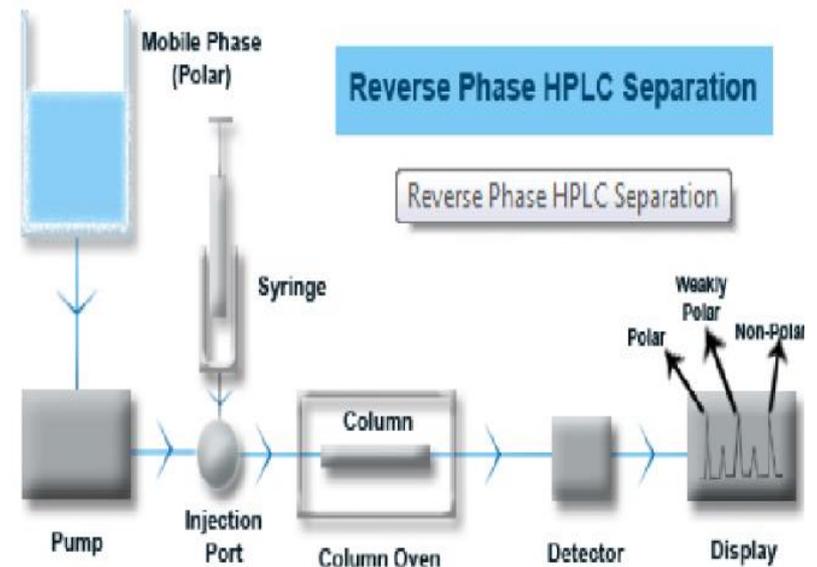
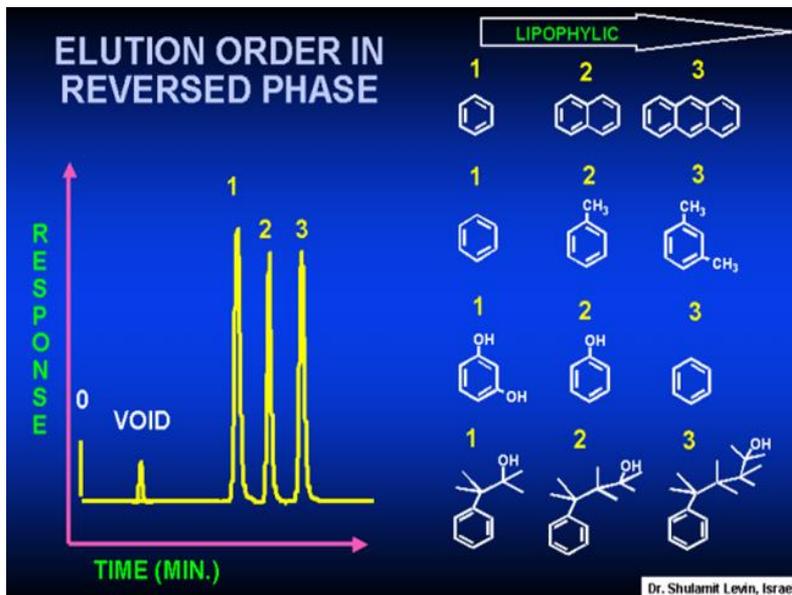
- Όταν η κινητή φάση είναι πιο πολική από τη στατική
- Στατική φάση Octadecyl group-bonded silical gel (ODS)



- Κινητή φάση: Υψηλής πολικότητας, όπως νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο. Κάποιες φορές προστίθενται και άλατα ή οξέα



Ανίστροφης φάσης



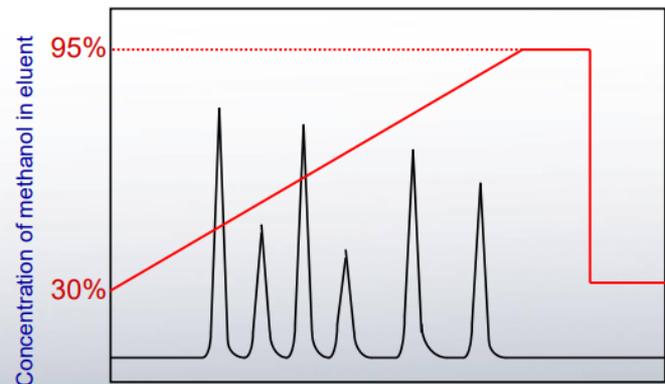
https://www.researchgate.net/figure/Set-up-of-a-reverse-phase-HPLC-system-showing-the-pump-injection-port-column-detector_fig8_264431139

▪ In isocratic mode



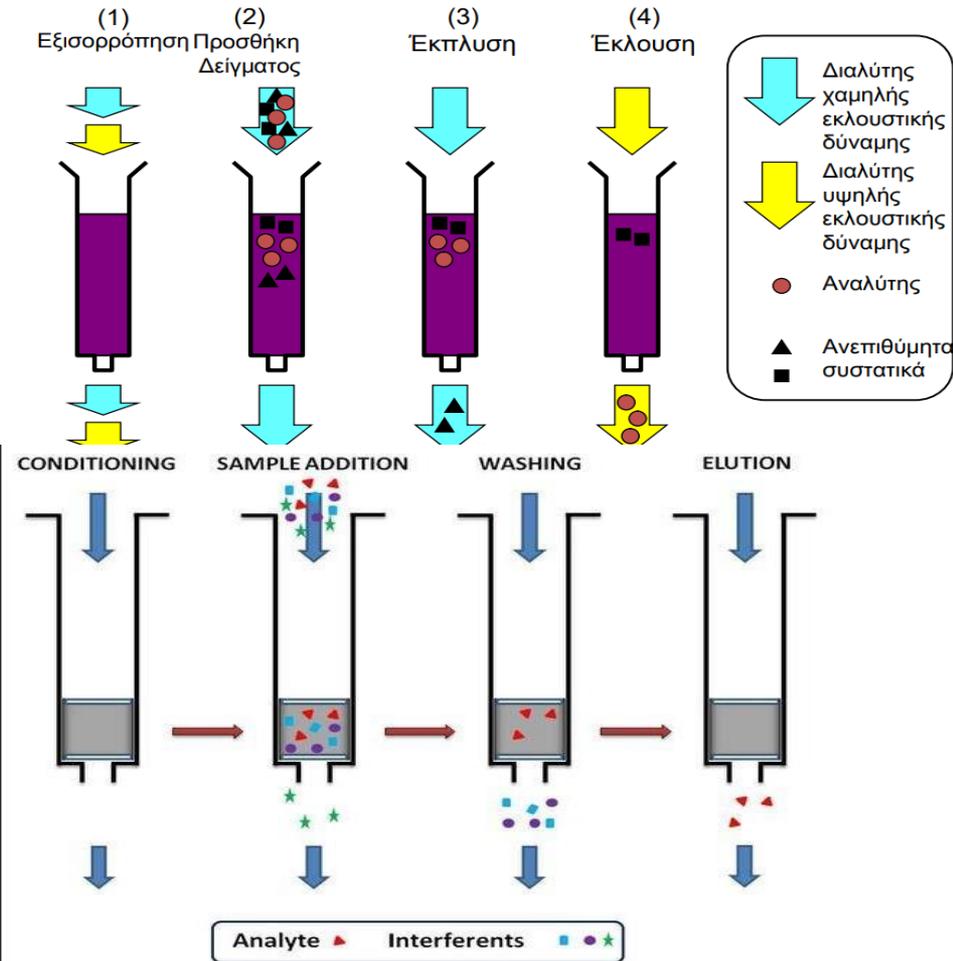
(Column: ODS type)

▪ In gradient mode



Τύποι Ανιχνευτών

Καθαρισμός ή προσυγκέντρωση δείγματος



Εφαρμογές HPLC

Φαρμακευτική

- Για τον έλεγχο της σταθερότητας των φαρμάκων.
- Μελέτη διάλυσης δισκίου φαρμακευτικής μορφής δοσολογίας.
- Φαρμακευτικό ποιοτικό έλεγχο

Περιβάλλον

- Ανίχνευση φαινολικών ενώσεων στο πόσιμο νερό.
- Βιοπαρακολούθηση ρύπων

Ιατροδικαστική - Ιατρική

- Ποσοτικοποίηση φαρμάκων σε βιολογικά δείγματα.
- Αναγνώριση στεροειδών σε αίμα, ούρα...
- Προσδιορισμός κοκαΐνης και άλλων ναρκωτικών σε αίμα, ούρα κ.λπ..
- κλπ

Τρόφιμα

- Εκτίμηση Ποιότητας αναψυκτικών και νερού.
- Ανάλυση σακχάρου σε χυμούς φρούτων.
- Ανάλυση πολυκυκλικών ενώσεων στα λαχανικά.
- Ανάλυση συντηρητικών

Na do

- [Microsoft PowerPoint - HPLC Separation Fundamentals - 121107.ppt \(agilent.com\)](#)
- [Principles of Chromatography \(wsfcs.k12.nc.us\)](#)
- [Chromatography.pdf \(cutm.ac.in\)](#)
- [https://chem.libretexts.org/Courses/Duke_University/CHEM_401L%3A_Analytical_Chemistry_Lab_Manual/05%3A_Determination_of_cocaine_on_bills_using_Gas_Chromatography_Mass_Spectrometry_\(GC-MS\)/5.03%3A_Quantitative_and_Qualitative_GC_and_GC-MS](https://chem.libretexts.org/Courses/Duke_University/CHEM_401L%3A_Analytical_Chemistry_Lab_Manual/05%3A_Determination_of_cocaine_on_bills_using_Gas_Chromatography_Mass_Spectrometry_(GC-MS)/5.03%3A_Quantitative_and_Qualitative_GC_and_GC-MS)
- [Slide 1 \(agilent.com\)](#)



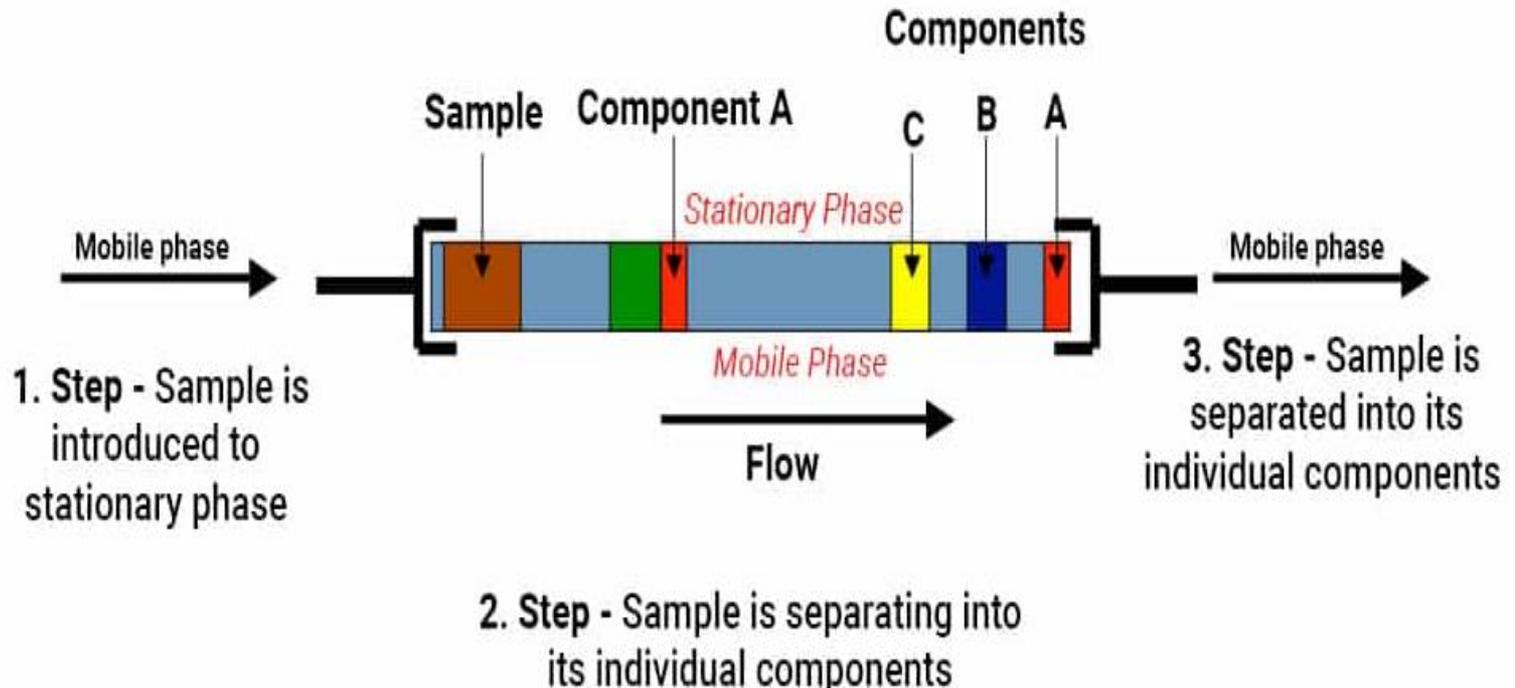
Βιβλιογραφία

- **Οργανική Χημεία John McMurry, Μετάφραση Επιστημονική επιμέλεια Αναστάσιος Βάρβογλης, Μιχάλης Ορφανόπουλος, Ιουλία Σμόνου, Μανώλης Στρατάκης, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.**
- **<https://www.nature.com/subjects/asymmetric-catalysis>**
- **<http://www.pnas.org/content/101/15/5347>**
- **<http://www.msc.chembiol.chem.upatras.gr/el/>**
- **<https://brilliant.org/wiki/molecular-orbital-theory/#molecular-orbitals>**
- **<http://www.chemistryexplained.com/Ma-Na/Molecular-Orbital-Theory.html>**
- **<http://ecourses.dbnet.ntua.gr/fsr/9585/ANKEF9.ppt>**
- **[http://www.klouras.chem.upatras.gr/attachments/article/16/05_Chemical-Bond\(II\)_Quantum_Mechanics.pdf](http://www.klouras.chem.upatras.gr/attachments/article/16/05_Chemical-Bond(II)_Quantum_Mechanics.pdf)**

Αρχές HPLC

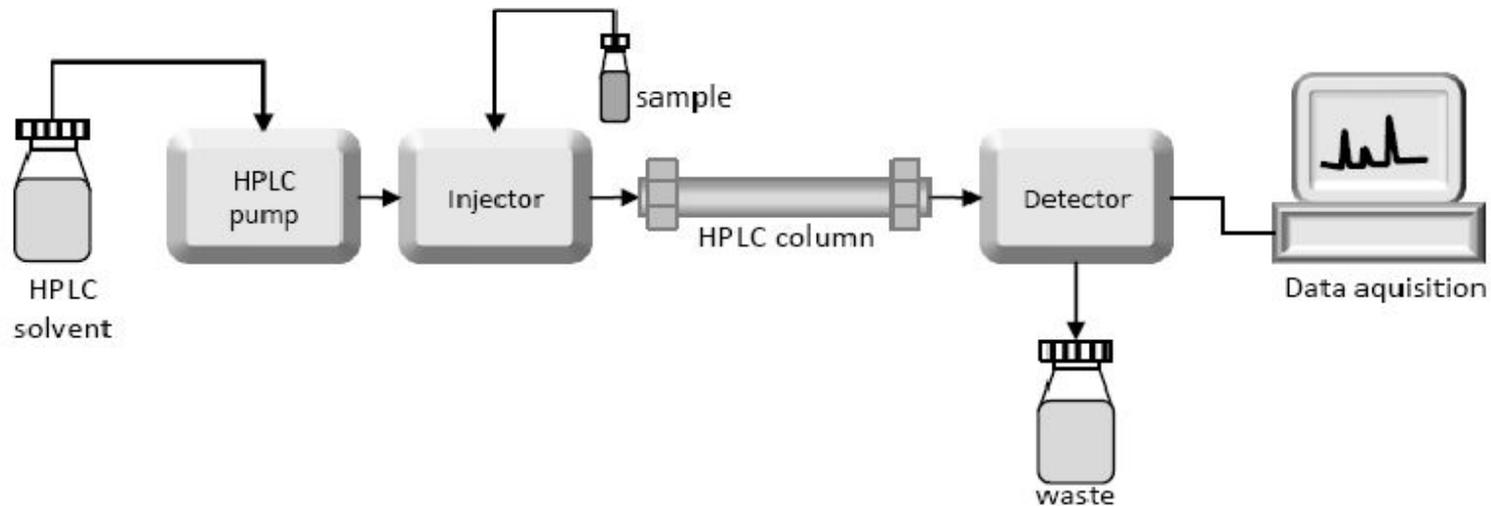
- Στατική φάση: Κοκκώδες υλικό με πολύ μικρά πορώδη σωματίδια που συγκρατείται μέσα σε μια στήλη διαχωρισμού.
- Κινητή φάση: Διαλύτης ή μίγμα διαλυτών που ωθείται με αντλία υψηλής πίεσης μέσω της στήλης διαχωρισμού.
- Μέσω μιας βαλβίδας με έναν συνδεδεμένο βρόχο δείγματος, (δηλαδή ενός μικρού σωλήνα ή ενός τριχοειδούς από ανοξείδωτο χάλυβα), το δείγμα εγχέεται στη ροή κινητής φάσης από την αντλία στη στήλη διαχωρισμού χρησιμοποιώντας μια σύριγγα.

- Στη συνέχεια, τα επιμέρους συστατικά του δείγματος μεταναστεύουν μέσω της στήλης με διαφορετικούς ρυθμούς, επειδή διατηρούνται σε διαφορετικό βαθμό από αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση.
- Μετά την έξοδο από τη στήλη, οι μεμονωμένες ουσίες ανιχνεύονται από έναν κατάλληλο ανιχνευτή και μεταβιβάζονται ως σήμα στο λογισμικό HPLC στον υπολογιστή.
- Στο τέλος αυτής της λειτουργίας, λαμβάνεται ένα χρωματογράφημα στο λογισμικό HPLC στον υπολογιστή. Το χρωματογράφημα επιτρέπει την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των διαφόρων ουσιών.



<https://laboratoryinfo.com/hplc/>

Βασική Οργανολογία HPLC



High Performance (pressure) Liquid Chromatography (HPLC)

- HPLC involves a liquid sample being passed over a solid adsorbent material packed into a column using a flow of liquid solvent under pressure.

Normal Phase HPLC

- A non-polar, non-aqueous mobile phase (e.g. Chloroform), the analyte associates with and is retained by the polar stationary phase. Adsorption strengths increase with increased analyte polarity.

Reversed Phase HPLC

- A non-polar stationary phase and an aqueous, moderately polar mobile phase. With such stationary phases, retention time is longer for molecules which are less polar, while polar molecules elute more readily (early in the analysis).

[Introduction to chromatography and its applications](#)

[2 | PPT \(slideshare.net\)](#)

Αγγελική Απ. Γαλάνη

Χρωματογραφία Στήλης

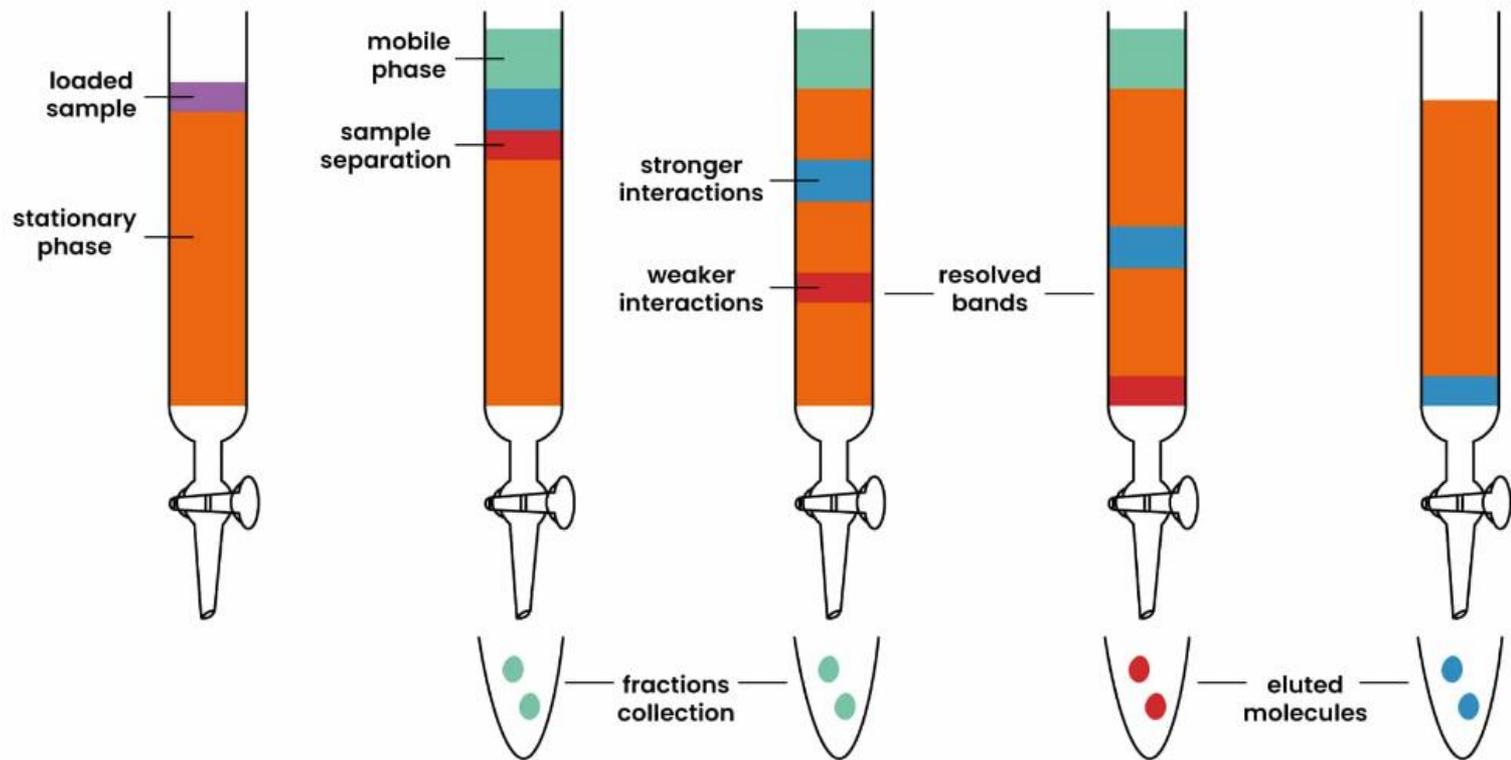
Η **στατική φάση** βρίσκεται συγκρατημένη μέσα σε μια στήλη και η **κινητή φάση** είτε διοχετεύεται με πίεση, είτε ρέει αργά με βάση τη βαρύτητα

Χρωματογραφία πληρωμένων στηλών (packed columns chromatography)

Η στατική φάση είναι μικρά στερεά σωματίδια (κάποτε επικαλυμμένα με λεπτό υμένα υγρού) και βρίσκεται σε ανοικτό σωλήνα

Χρωματογραφία ανοικτών τριχοειδών στηλών

Η υγρή στατική φάση εξαναγκάζεται να περάσει σε τριχοειδή σωλήνα του οποίου επικαλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα με λεπτό υμένα. Τέλος συγκρατείται από τριχοειδείς σωλήνες ή από χημικό δεσμό



[Column Chromatography Made Simple: An Easy to Follow Guide \(bitesizebio.com\)](https://www.bitesizebio.com)

ΤΥΠΟΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

Αέρια Στερεή
Χρωματογραφία
(GSC)

ΛΕΠΤΗΣ
ΣΤΙΒΑΔΑΣ
(TLC)

Χρωματογραφία
διείσδυσης γέλης
(Gel Permeation
Chromatography)

ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Χρωματογραφία
στήλης (Column
Chromatography)

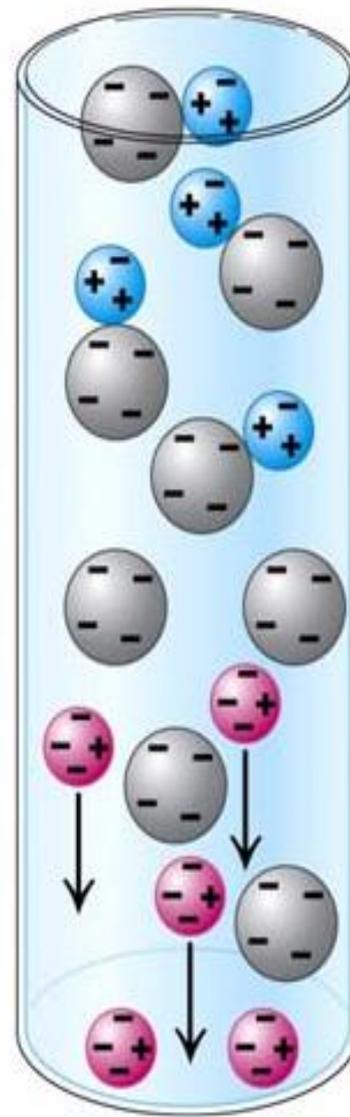
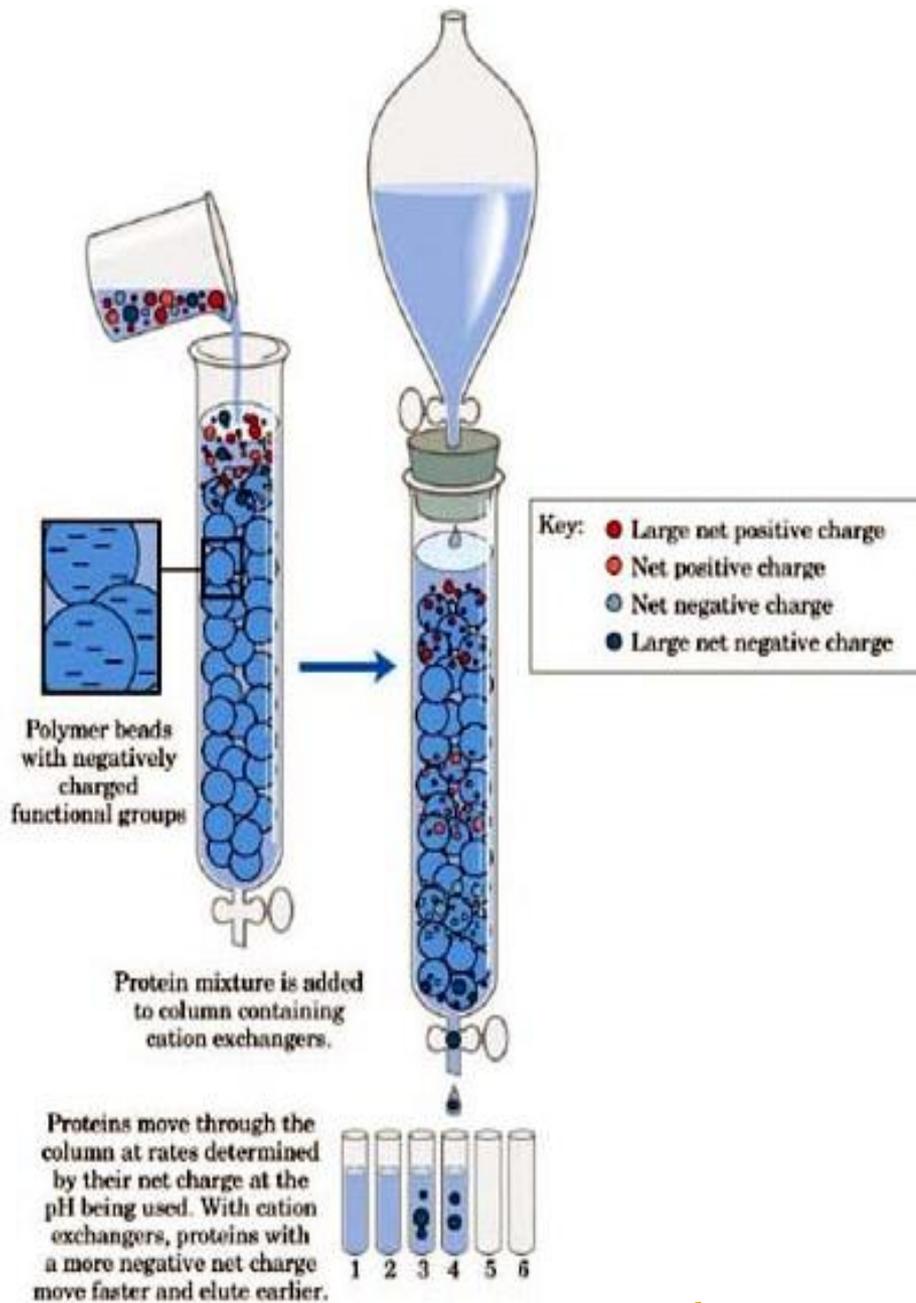
Υγρή
Χρωματογραφία
Υψηλής Απόδοσης
(HPLC)

Ιονανταλλαγής

Χρωματογραφία κατανομής

Χρωματογραφία Χάρτου
(Paper Chromatography
PC)

Αέρια Υγρή Χρωματογραφία
(Gas liquid Chromatography, GLC)



Positively charged protein binds to negatively charged bead

Negatively charged protein flows through

Ταξινόμηση ανιχνευτών

Detector	Response	Optimal detection limit	Linear range	Classification
TCD	Organic and inorganic solutes	$10^{-9} \text{ g ml}^{-1}$	10^4	Concentration; nondestructive
FID	All organic solutes except formic acid and formaldehyde	$10^{-12} \text{ g ml}^{-1}$	10^7	Mass flow-rate; destructive
ECD	Halogenated and nitro compounds	$10^{-16} \text{ mol ml}^{-1}$	10^3 – 10^4 (pulsed)	Concentration; nondestructive
AFID	P- or N-containing solutes	N: $10^{-14} \text{ g s}^{-1}$ P: $10^{-13} \text{ g s}^{-1}$	10^3 – 10^5	Mass flow-rate; destructive
FPD	P- or S-containing solutes	S: $10^{-10} \text{ g s}^{-1}$ P: $10^{-12} \text{ g s}^{-1}$	S: 10^3 P: 10^5	Mass flow-rate; destructive

<https://chemistry.unt.edu/~tgolden/courses/Lecture%2015%20GC3%202020.pdf>

Βιβλιογραφία

- <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM233/%CE%9A%CE%95%CE%A6%2017A%20%CE%95%CE%99%CE%A3%CE%91%CE%93%CE%A9%CE%93%CE%97%20%CE%A7%CE%A1%CE%A9%CE%9C%CE%91%CE%A4%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91%CE%A3.pdf>
- <https://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHiemBpdmBIIecCzB&subNav=tlpbfDsHiemBpdmBIIecCzBsB>
- <https://www.chromatographyonline.com/view/glossary-hplclc-separation-terms>



Βιβλιογραφία

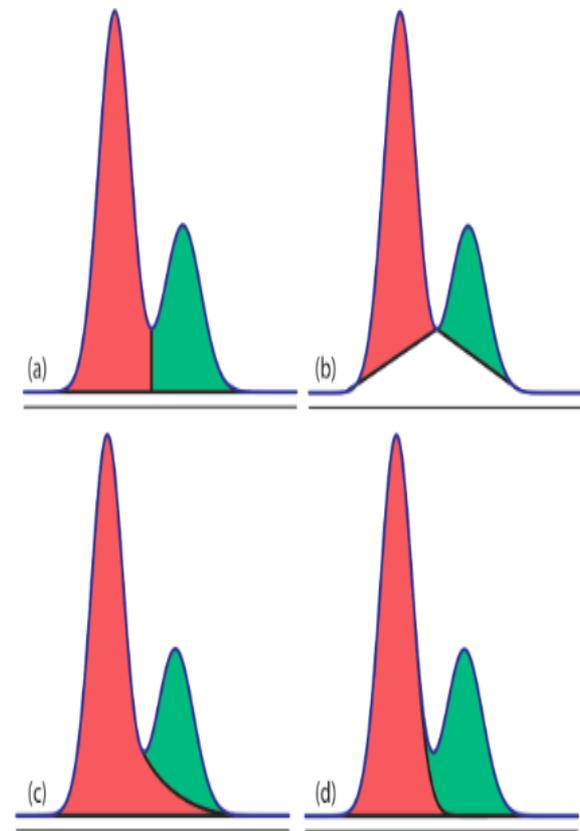
- **Οργανική Χημεία John McMurry, Μετάφραση Επιστημονική επιμέλεια Αναστάσιος Βάρβογλης, Μιχάλης Ορφανόπουλος, Ιουλία Σμόνου, Μανώλης Στρατάκης, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.**
- **<https://www.nature.com/subjects/asymmetric-catalysis>**
- **<http://www.pnas.org/content/101/15/5347>**
- **<http://www.msc.chembiol.chem.upatras.gr/el/>**
- **<https://brilliant.org/wiki/molecular-orbital-theory/#molecular-orbitals>**
- **<http://www.chemistryexplained.com/Ma-Na/Molecular-Orbital-Theory.html>**
- **<http://ecourses.dbnet.ntua.gr/fsr/9585/ANKEF9.ppt>**
- **[http://www.klouras.chem.upatras.gr/attachments/article/16/05_Chemical-Bond\(II\)_Quantum_Mechanics.pdf](http://www.klouras.chem.upatras.gr/attachments/article/16/05_Chemical-Bond(II)_Quantum_Mechanics.pdf)**

Ποσοτική Ανάλυση

- Η ποσοτική ανάλυση μας λέει πόση αναλυόμενη ουσία βρίσκεται σε ένα μείγμα.
- Σε μια ιδανική ανάλυση GC ή GC-MS, το ύψος της κορυφής και η περιοχή κάτω από την κορυφή είναι ανάλογα με την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας που εγχέεται στη στήλη.
- Το εμβαδόν μιας κορυφής καθορίζεται από την ολοκλήρωση, η οποία συνήθως υπολογίζεται από τον υπολογιστή του οργάνου.

- Εάν δύο κορυφές διαχωριστούν πλήρως, ο προσδιορισμός των αντίστοιχων περιοχών τους είναι απλός. Οι επικαλυπτόμενες κορυφές, ωστόσο, απαιτούν μια επιλογή μεταξύ μιας από τις πολλές επιλογές για τη διαίρεση της περιοχής που μοιράζονται (Εικόνα 5.3.15). Ποια μέθοδο χρησιμοποιούμε εξαρτάται από το σχετικό μέγεθος των δύο κορυφών και την ανάλυσή τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η χρήση των υψών κορυφής παρέχει πιο ακριβή αποτελέσματα [(a) Bicking, M. K. L. Chromatography Online, Απρίλιος 2006; (β) Bicking, M. K. L. Chromatography Online, Ιούνιος 2006].

- μμμ



Μέθοδοι για τον προσδιορισμό των περιοχών κάτω από δύο επικαλυπτόμενες χρωματογραφικές κορυφές

- Για ποσοτικό προσδιορισμό πρέπει να δημιουργήσουμε καμπύλη βαθμονόμησης που να συσχετίζει την απόκριση του ανιχνευτή με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας.
- Εάν ο όγκος έγχυσης είναι πανομοιότυπος για κάθε πρότυπο και δείγμα, τότε μια εξωτερική τυποποίηση παρέχει ακριβή αποτελέσματα. Δυστυχώς, ακόμη και υπό τις καλύτερες συνθήκες, η σχετική ακρίβεια για επαναλαμβανόμενες ενέσεις μπορεί να διαφέρει κατά 5% ή και παραπάνω. Για ποσοτικές εργασίες που απαιτούν υψηλή ακρίβεια και ακρίβεια, συνιστάται η χρήση εσωτερικών προτύπων

- Επίσης σημαντική παράμετρος είναι η διακύμανση της ευαισθησίας του ανιχνευτή για διαφορετικές ουσίες που μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή ποσοτικά αποτελέσματα. Για την επίλυση πρέπει να καθοριστεί ένας παράγοντας απόκρισης για την ουσία που μας ενδιαφέρει σε σχέση με το εσωτερικό πρότυπο. Ο μοριακός παράγοντας απόκρισης (r) για ένα συστατικό C_n ορίζεται ως:

$$r_{C_n} = \frac{\text{peak area}}{\text{moles of } C_n \text{ injected}} \quad (1)$$

- Οι συντελεστές γραμμομοριακής απόκρισης πρέπει να προσδιορίζονται από μια καμπύλη βαθμονόμησης. Χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα, γνωστές ποσότητες της αναλυόμενης ουσίας (s) εγχέονται στο όργανο και προσδιορίζονται το ύψος και η περιοχή κορυφής. Προσθέτοντας γνωστή ποσότητα εσωτερικού προτύπου σε κάθε πρότυπο και στο δείγμα, μετρώντας τα εμβαδά αιχμής και ενσωματώνοντας παράγοντες απόκρισης, μπορεί να προσδιοριστεί η ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας.

Εσωτερικά πρότυπα στην ποσοτική ανάλυση με GC

- Εάν οι όγκοι έγχυσης ποικίλλουν ή εάν η συγκέντρωση μπορεί να αλλάξει εύκολα επειδή ο διαλύτης είναι πτητικός, μπορούμε να δημιουργήσουμε μια βαθμονόμηση χρησιμοποιώντας ένα εσωτερικό πρότυπο ως αναφορά.
- Το εσωτερικό πρότυπο είναι μια ένωση που προστίθεται σε κάθε διάλυμα που χρησιμοποιείται ως αναφορά για σύγκριση με το σήμα της αναλυόμενης ουσίας.
- Το είδος, το οποίο ονομάζουμε εσωτερικό πρότυπο, πρέπει να είναι διαφορετικό από την αναλυόμενη ουσία.

- Επειδή η αναλυόμενη ουσία και το εσωτερικό πρότυπο λαμβάνουν την ίδια επεξεργασία, η αναλογία των σημάτων τους δεν επηρεάζεται από τυχόν έλλειψη επαναληψιμότητας στη διαδικασία έγχυσης ή αλλαγές στη συγκέντρωση λόγω εξάτμισης.
- Εάν ένα διάλυμα περιέχει μια αναλυόμενη ουσία συγκέντρωσης C_A και ένα εσωτερικό πρότυπο συγκέντρωσης C_{IS} , τότε τα σήματα που οφείλονται στην αναλυόμενη ουσία, S_A , και στο εσωτερικό πρότυπο, S_{IS} , είναι:

$$S_A = k_A C_A$$

$$S_{IS} = k_{SI} C_{IS}$$
- όπου k_A και k_{IS} είναι οι ευαισθησίες (**γνωστοί και ως παράγοντες απόκρισης**) για την αναλυόμενη ουσία και το εσωτερικό πρότυπο, αντίστοιχα. Λαμβάνοντας την αναλογία των δύο σημάτων δίνεται η θεμελιώδης εξίσωση για μια εσωτερική τυποποίηση.

$$\frac{S_A}{S_{IS}} = \frac{k_A C_A}{k_{IS} C_{IS}} = K \times \frac{C_A}{C_{IS}} \quad (2)$$

- Λαμβάνοντας την αναλογία των δύο σημάτων δίνεται η θεμελιώδης εξίσωση για μια εσωτερική τυποποίηση.

$$\frac{S_A}{S_{IS}} = \frac{k_A C_A}{k_{IS} C_{IS}} = K \times \frac{C_A}{C_{IS}} \quad (2)$$

- K είναι η σχετική ευαισθησία (**σχετικός συντελεστής απόκρισης**) για την αναλύμενη ουσία σε σύγκριση με το εσωτερικό πρότυπο. Επειδή K είναι μια αναλογία της ευαισθησίας της αναλύμενης ουσίας και της ευαισθησίας του εσωτερικού προτύπου, δεν είναι απαραίτητο να καθοριστούν ανεξάρτητα τιμές για κανένα από τα δύο k_A ή k_{IS}

Ενιαίο Εσωτερικό Πρότυπο

- Σε μια εσωτερική τυποποίηση ενός σημείου, προετοιμάζουμε ένα ενιαίο πρότυπο που περιέχει την αναλυόμενη ουσία και το εσωτερικό πρότυπο και το χρησιμοποιούμε για να προσδιορίσουμε την τιμή του K στην εξίσωση:

$$K = \left(\frac{C_{IS}}{C_A} \right)_{std} \times \left(\frac{S_A}{S_{IS}} \right)_{std} \quad (3)$$

- Έχοντας τυποποιήσει τη μέθοδο, η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας δίνεται από τον τύπο: $C_A = \frac{C_{IS}}{K} \times \left(\frac{S_A}{S_{IS}} \right)_{samp}$

Παράδειγμα: Μια φασματοφωτομετρική μέθοδος για ποσοτική ανάλυση Pb^{2+} σε αίμα χρησιμοποιεί Cu^{2+} ως εσωτερικό πρότυπο. Πρότυπο 1,75 ppb Pb^{2+} και 2,25 ppb Cu^{2+} αποδίδει αναλογία $(S_A/S_{IS})_{std}$ 2,37. Δείγμα αίματος με ίδια συγκέντρωση Cu^{2+} δίνει αναλογία σήματος, $(S_A/S_{IS})_{samp}$, 1,80. Ποια είναι η συγκέντρωση Pb^{2+} στο δείγμα αίματος;

$$K = \left(\frac{C_{IS}}{C_A} \right)_{std} \times \left(\frac{S_A}{S_{IS}} \right)_{std} = \frac{2.25 \text{ ppb } Cu^{2+}}{1.75 \text{ ppb } Pb^{2+}} \times 2.37 = 3.05 \frac{\text{ppb } Cu^{2+}}{\text{ppb } Pb^{2+}}$$

$$C_A = \frac{C_{IS}}{K} \times \left(\frac{S_A}{S_{IS}} \right)_{samp} = \frac{2.25 \text{ ppb } Cu^{2+}}{3.05 \frac{\text{ppb } Cu^{2+}}{\text{ppb } Pb^{2+}}} \times 1.80 = 1.33 \text{ ppb } Pb^{2+}$$

Πολλαπλά εσωτερικά πρότυπα

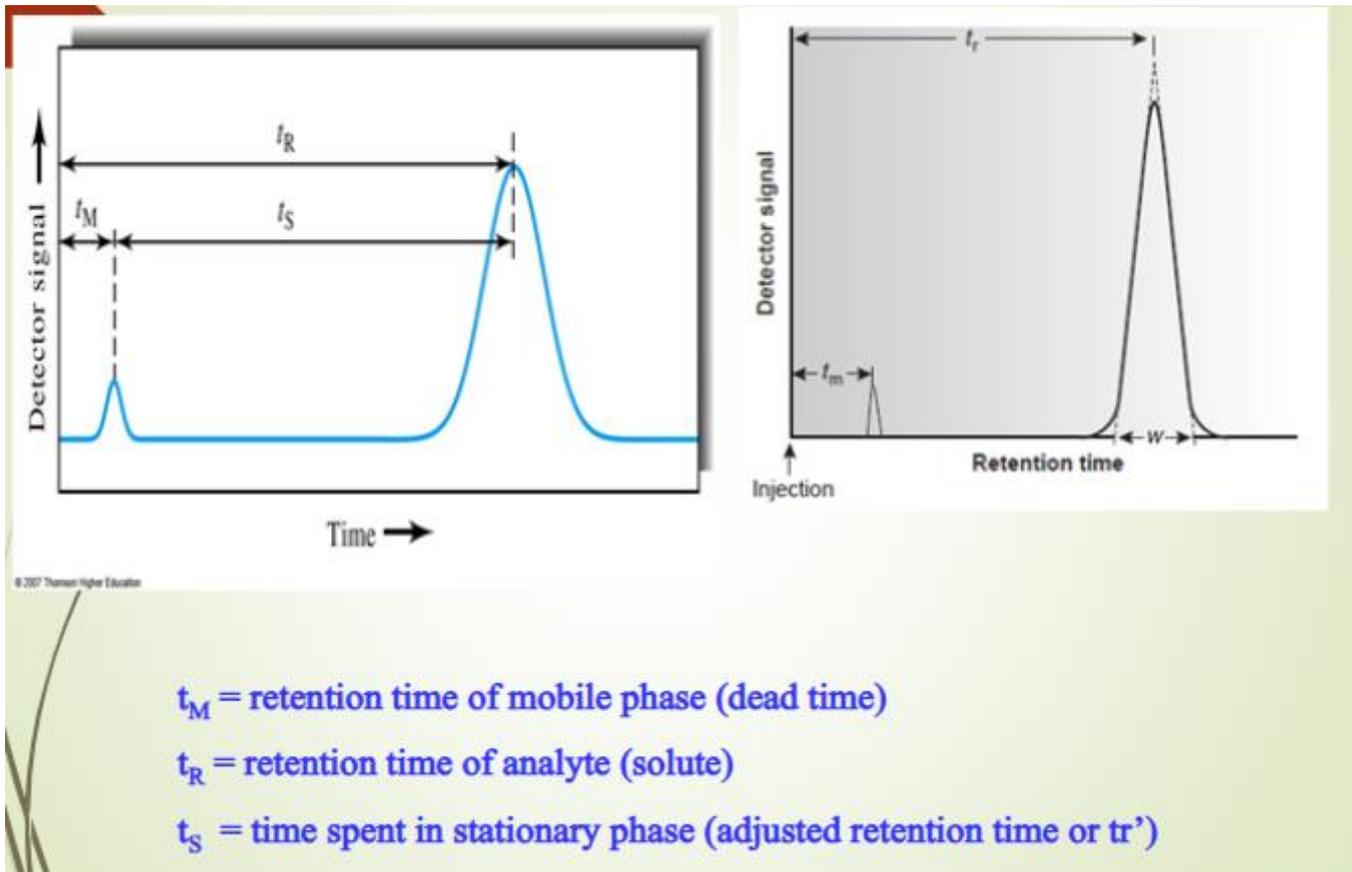
- Για να κατασκευάσουμε μια καμπύλη βαθμονόμησης εσωτερικών προτύπων, ετοιμάζουμε μια σειρά προτύπων, καθένα από τα οποία περιέχει την ίδια συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου και διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλυόμενης ουσίας. Υπό αυτές τις συνθήκες, μια καμπύλη βαθμονόμησης $(S_A/S_{IS})_{std}$ συναρτήσει C_A είναι γραμμική με κλίση K/C_{IS} . Αν και η συνήθης πρακτική είναι να προετοιμάζονται τα πρότυπα έτσι ώστε το καθένα να περιέχει την ίδια ποσότητα του εσωτερικού προτύπου, αυτό δεν αποτελεί απαίτηση.

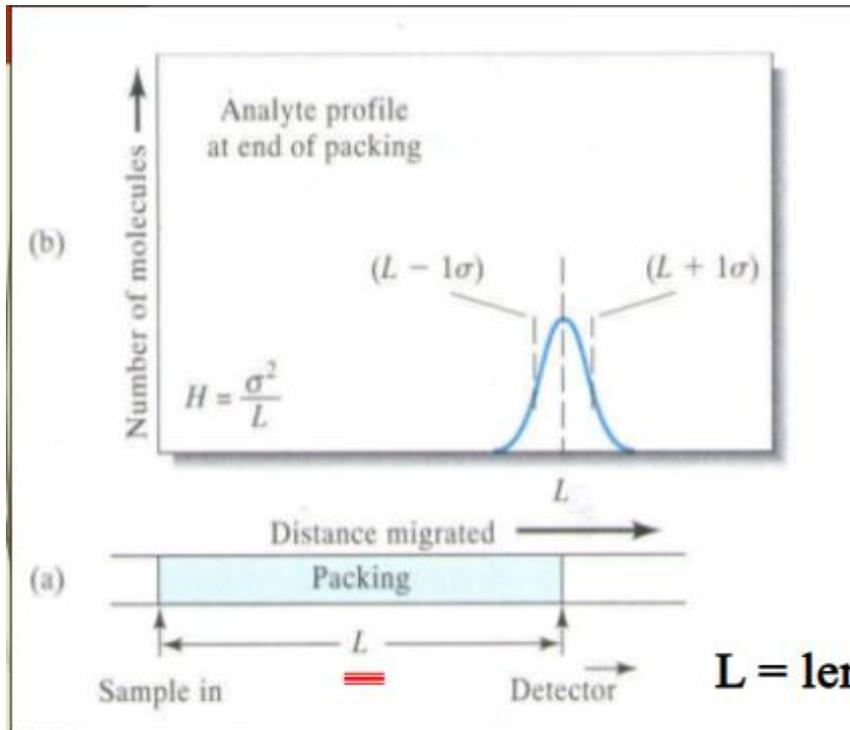
Μια φασματοφωτομετρική μέθοδος για την ποσοτική ανάλυση του Pb^{2+} στο αίμα δίνει μια γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης εσωτερικών προτύπων για τα οποία

$$\left(\frac{S_A}{S_{IS}}\right)_{std} = (2.11 \text{ ppb}^{-1} \times C_A) - 0.006$$

- Ποια η συγκέντρωση σε ppb Pb^{2+} σε ένα δείγμα αίματος εάν $(S_A/S_{IS})_{\text{sample}} = 2,80$

$$C_A = \frac{\left(\frac{S_A}{S_{IS}}\right)_{\text{samp}} + 0.006}{2.11 \text{ ppb}^{-1}} = \frac{2.80 + 0.006}{2.11 \text{ ppb}^{-1}} = 1.33 \text{ ppb Pb}^{2+}$$





H = plate height

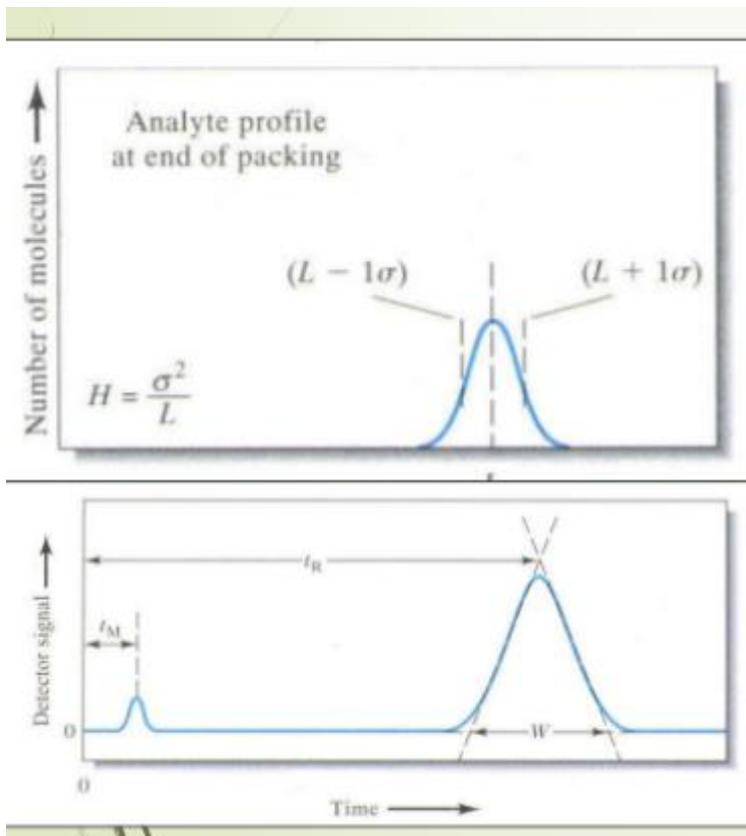
N = number of plates

$$N = \frac{L}{H}$$

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

L = length of column packing

$\sigma \rightarrow$ standard deviation $\sigma^2/L \rightarrow$ variance per unit length



L = column length (distance)

σ = standard deviation in distance

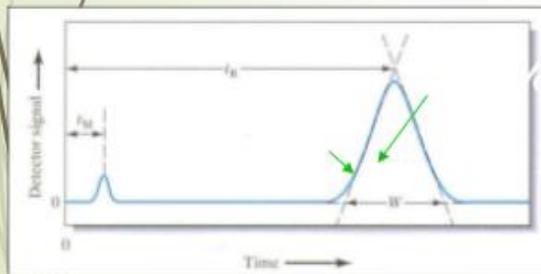
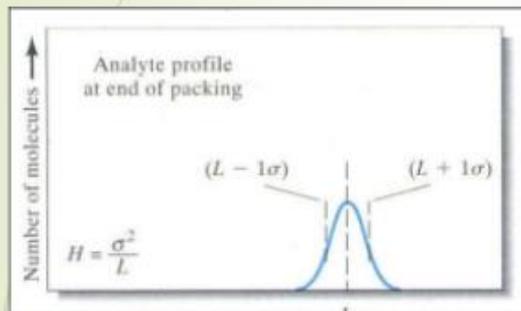
t_R = retention time

τ = standard deviation in time

$$\frac{\sigma}{L} = \frac{\tau}{t_R}$$

$$\tau = \frac{\sigma}{L/t_R}$$

Relation between column distance and retention times



$$\frac{\sigma}{L} = \frac{\tau}{t_R}$$

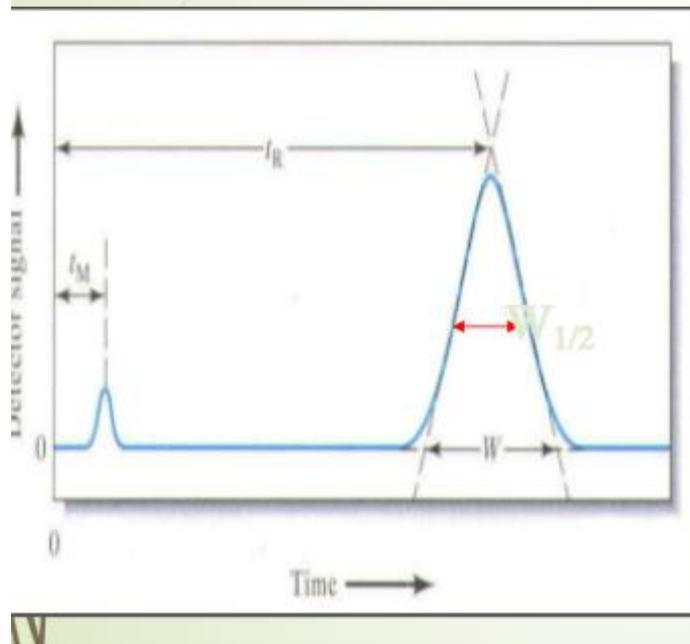
$$\sigma = \frac{\tau L}{t_R}$$

$$W = 4\tau$$

$$\sigma = \frac{W L}{4 t_R}$$

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{W^2 L}{16 t_R^2}$$

Determining the Number of Theoretical Plates



N = number of plates

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$