

ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Τεχνικές Διαχωρισμού

Έρη Μπιζάνη, 2023

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ

- Επανάληψη Θεωρία Διαχωρισμού
- Υγροχρωματογραφία
- Ιοντική Χρωματογραφία
- Αεριοχρωματογραφία

ΘΕΩΡΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

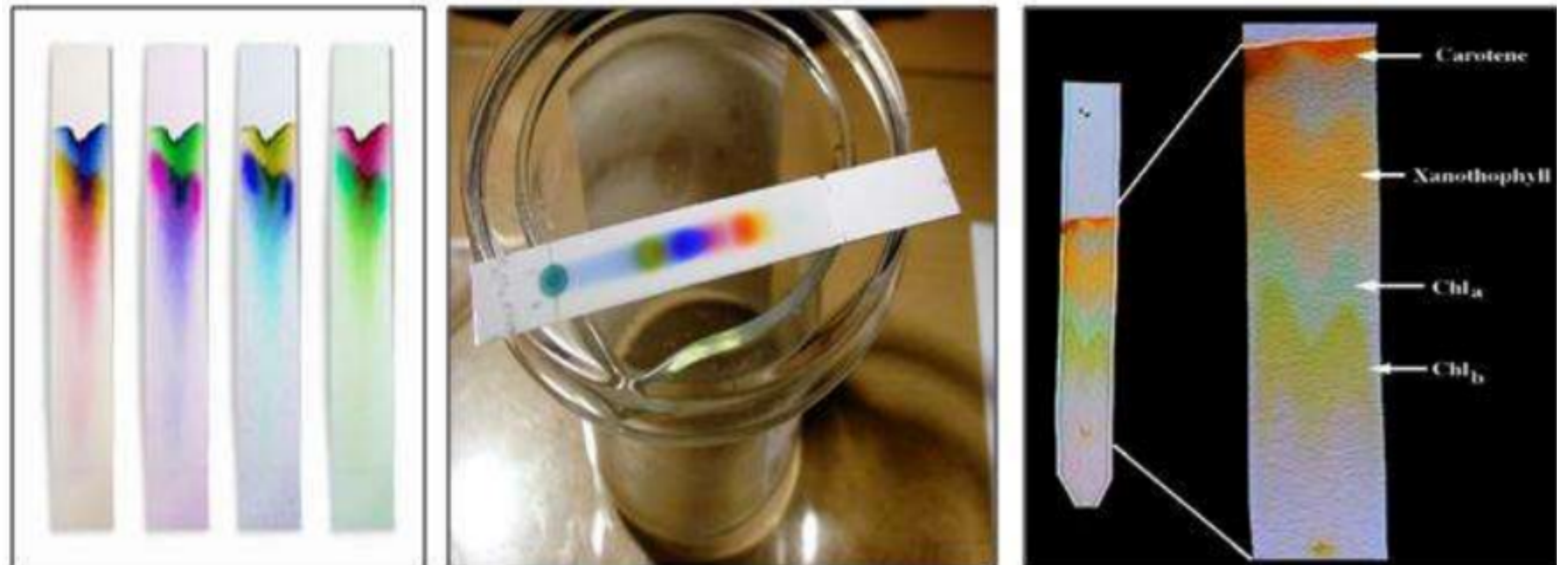
Επανάληψη

ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η ΑΡΧΗ

1906:

Ο Ρώσος Mikhail Tswett, χρησιμοποίησε τη χρωματογραφία (χάρτου) για να διαχωρίσει φυτικές χρωστικές, και από αυτό έλαβε το όνομα χρωματογραφία (χρώμα + γράφω)



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

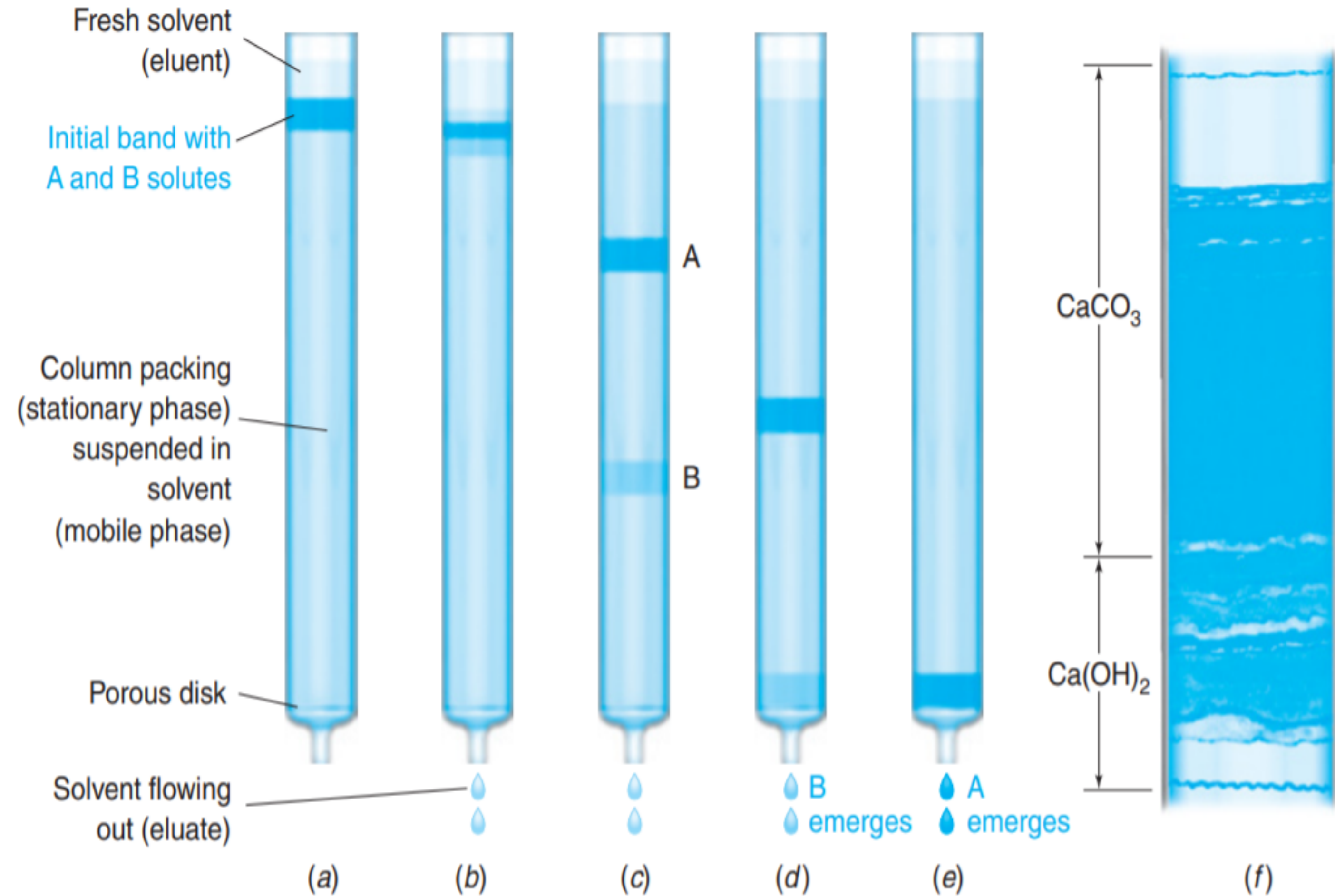
Η ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ

Ο όρος χρωματογραφία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση συστατικών ενός μίγματος.

Τα συστατικά αυτά κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, η μία είναι η στατική φάση (stationary phase), ενώ η άλλη είναι η κινητή φάση (mobile phase) που κινείται με συγκεκριμένη κατεύθυνση.

Η διεργασία της χρωματογραφίας λαμβάνει χώρα λόγω της διαφοράς στην σταθερά κατανομής των ανεξάρτητων συστατικών του δείγματος.

Τα μόρια τα οποία έχουν συγγένεια με την κινητή φάση εκκλούνται ταχύτερα ενώ αυτά που έχουν συγγένεια με την στατική εκκλούνται βραδύτερα.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είδη χρωματογραφίας ανάλογα με το είδος της κινητής φάσης

Υγροχρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC): υγρή κινητή φάση

Αεριοχρωματογραφία (Gas Chromatography, GC): Αέρια κινητή φάση

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: από το λεξικό χημικών όρων:

Liquid chromatography: υγροχρωματογραφία, χρωματογραφία υγρής φάσης. Γενικός όρος όλων των χρωματογραφικών τεχνικών στις οποίες η κινητή φάση είναι ένα υγρό. Η απόδοση «υγρή χρωματογραφία» όπως και τα παράγωγά της (π.χ. υγρός χρωματογράφος, υγρό χρωματογράφημα) θα πρέπει να αποφεύγονται. Ο όρος liquid chromatography (LC) είναι πλέον ο συνιστώμενος στη θέση του high performance liquid chromatography (HPLC).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είδη χρωματογραφίας ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, (Thin layer chromatography, TLC): Λεπτή στιβάδα που στηρίζεται σε πλάκες από γυαλί ή πλαστικό ή αλουμίνιο.

Χρωματογραφία Χάρτου (Paper Chromatography, PC): Η στατική φάση (υγρό) δεσμεύεται στο χαρτί (κυτταρίνη) που είναι το υλικό στήριξης.

Χρωματογραφία Στήλης (Column chromatography, CC): Η στατική φάση είναι μία στήλη που είναι πακεταρισμένη με το πληρωτικό υλικό που είναι η στατική φάση.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είδη χρωματογραφίας ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, (Thin layer chromatography, TLC): Λεπτή στιβάδα που στηρίζεται σε πλάκες από γυαλί ή πλαστικό ή αλουμίνιο.

Χρωματογραφία Χάρτου (Paper Chromatography, PC): Η στατική φάση (υγρό) δεσμεύεται στο χαρτί (κυτταρίνη) που είναι το υλικό στήριξης.

Χρωματογραφία Στήλης (Column chromatography, CC): Η στατική φάση είναι μία στήλη που είναι πακεταρισμένη με το πληρωτικό υλικό που είναι η στατική φάση.

ΘΕΩΡΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΩΝ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΩΝ

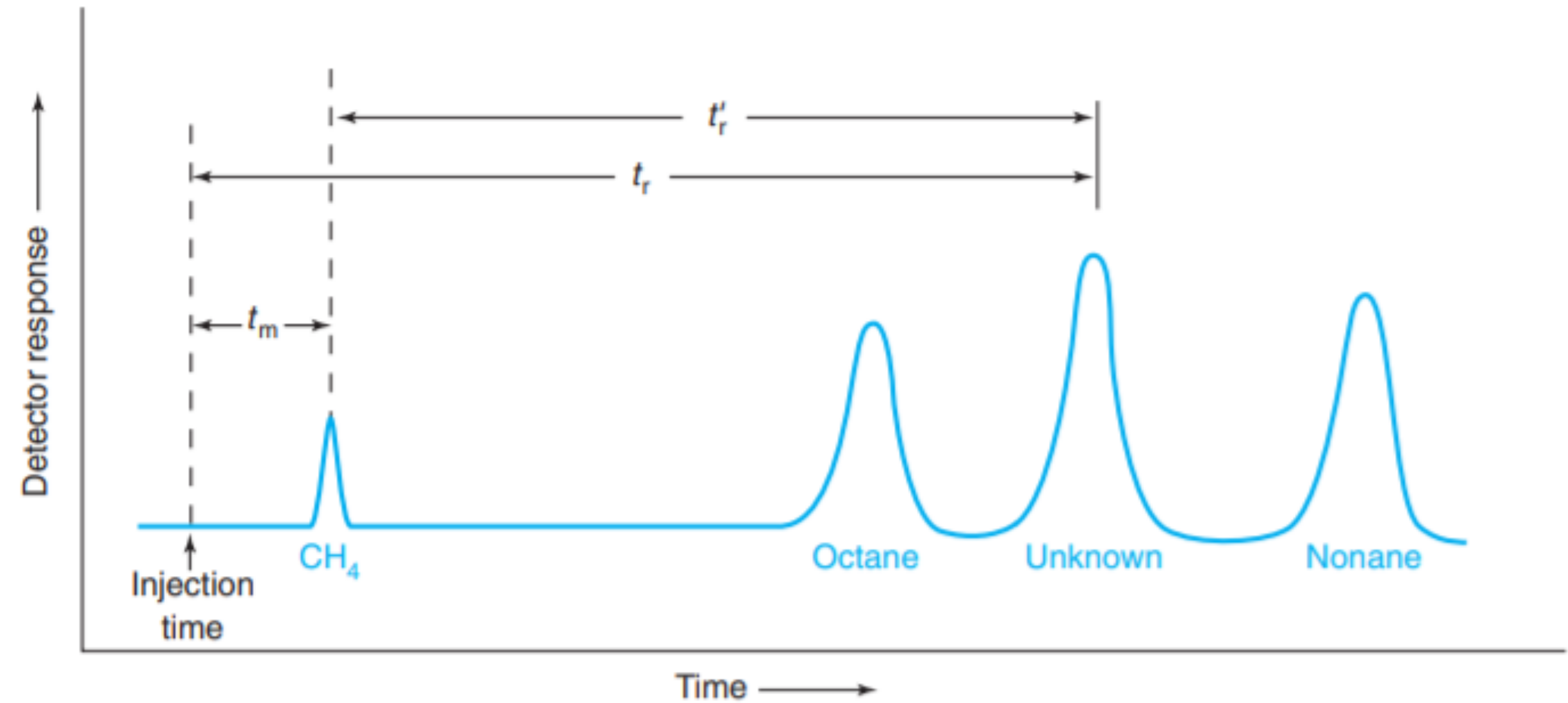
t_r =χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης, ο χρόνος που χρειάζεται μία ένωση από τη στιγμή που εισάγεται στο χρωματογράφο μέχρι να φτάσει στον ανιχνευτή

t_m =νεκρός χρόνος, ο χρόνος που χρειάζεται μία ένωση που **δεν κατακρατείται** να εξέλθει της στήλης.

$t_r' = t_r - t_m$, ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης, ο χρόνος που χρειάζεται να μετακινηθεί μία ένωση στη χρωματογραφική στήλη.

F: ταχύτητα ροής (mL/min)

Όγκος Ανάσχεσης $V_r = t_r \times F$



ΘΕΩΡΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΩΝ

ΑΠΟΔΟΣΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΩΝ

Θεωρία πλακών: Μία χρωματογραφική στήλη διαιρείται κατά μήκος σε διαχωριζόμενες ζώνες, κάθε ζώνη έχει τέτοιο μήκος ώστε εντός αυτής να υπάρχει ισορροπία μεταξύ στατικής και κινητής φάσης.

Ο όρος **πλάκα** προέκυψε από την θεωρία της απόσταξης

H: ύψος πλάκας

L: μήκος στήλης

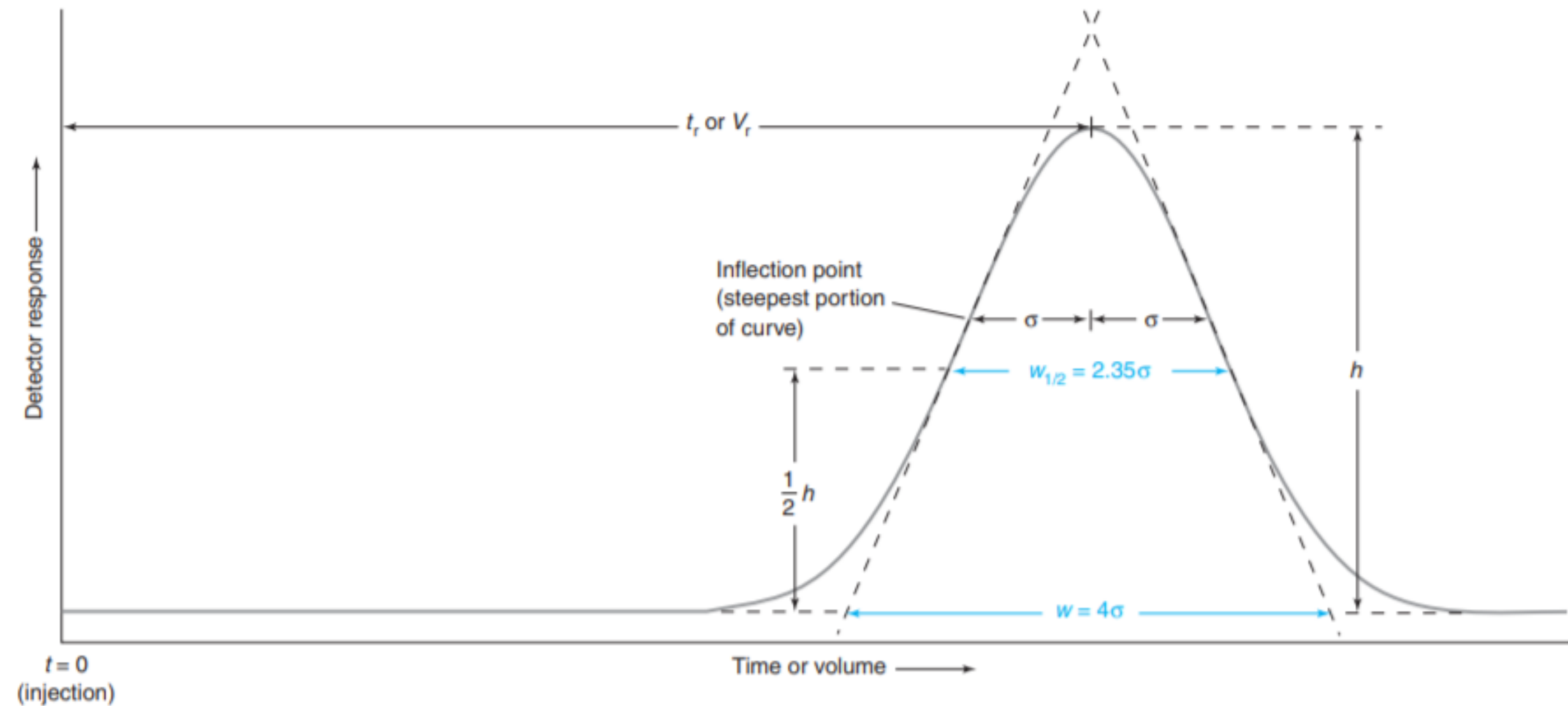
N: Αριθμός Πλακών σε μία στήλη

Με απλά λόγια: όσο πιο στενή είναι η κορυφή, τόσο μικρότερο το εύρος, τόσο μεγαλύτερος ο αριθμός θεωρητικών πλακών.

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

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

$$N = 5,55 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$



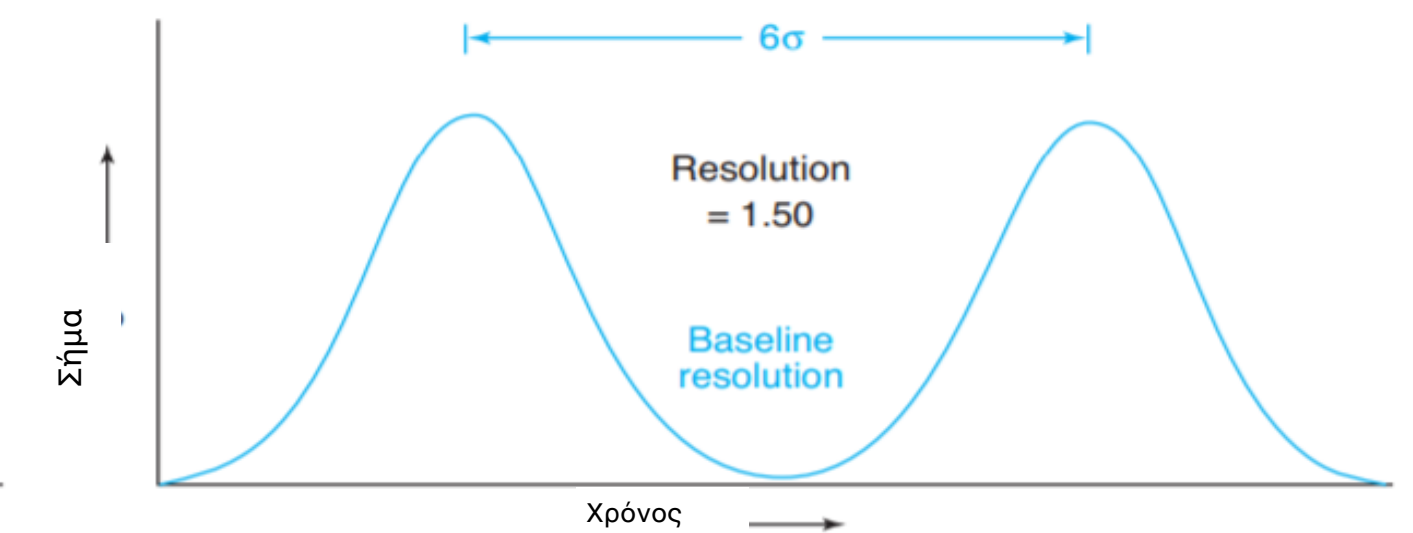
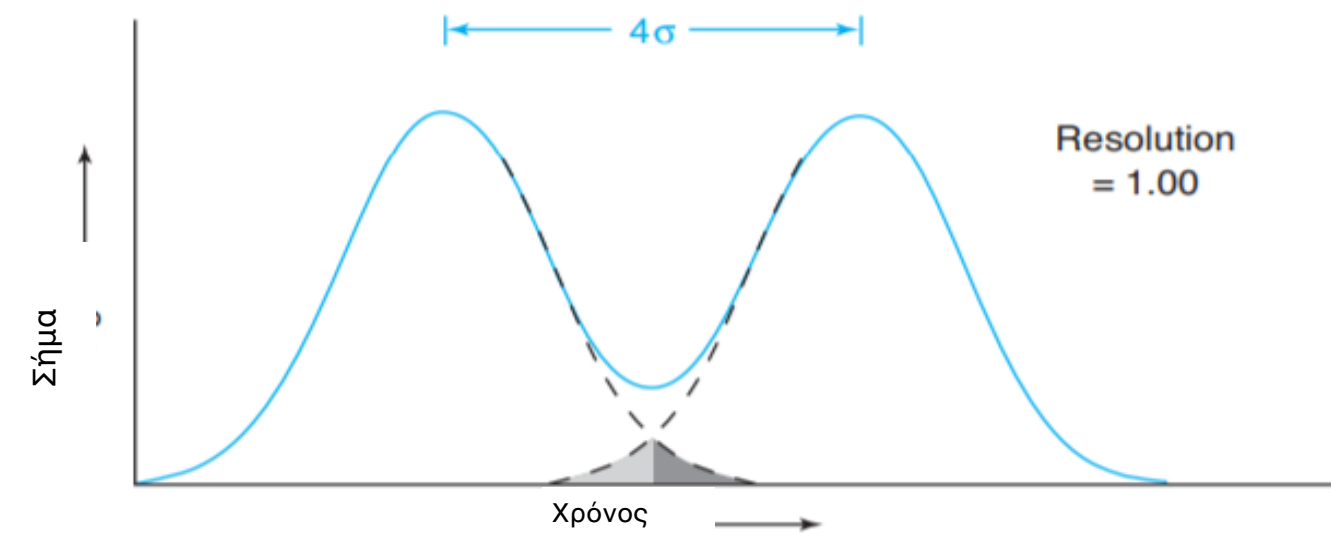
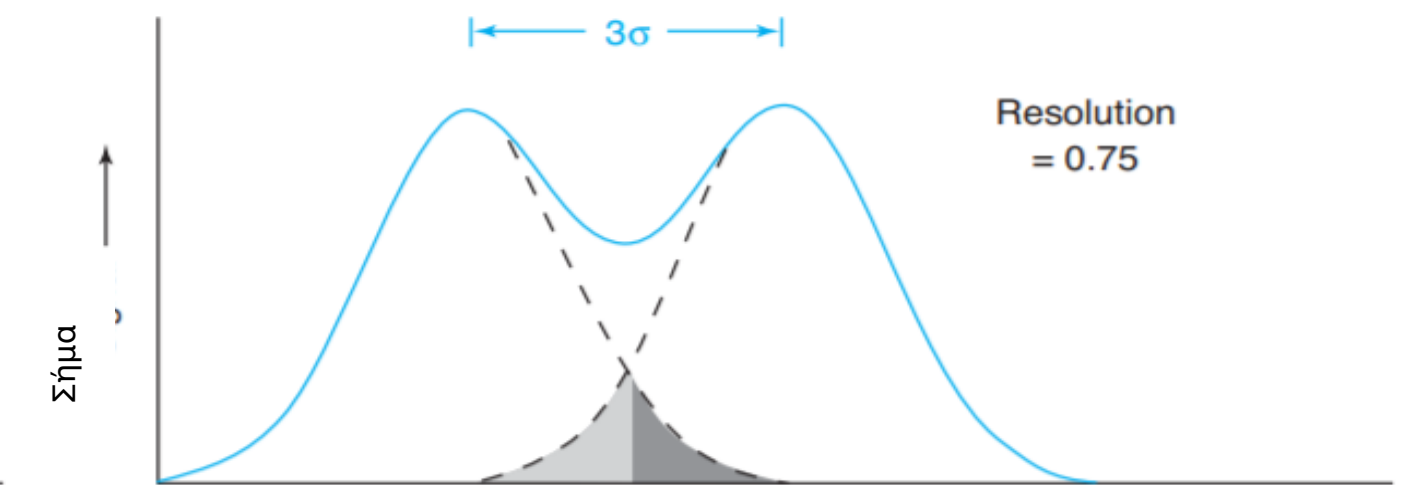
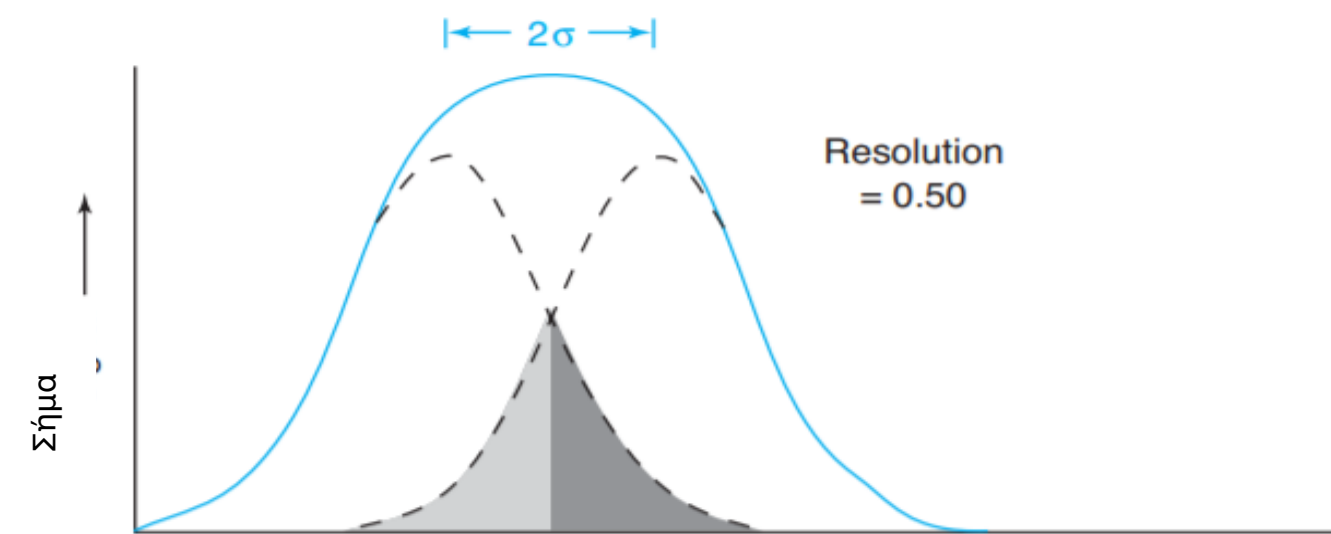
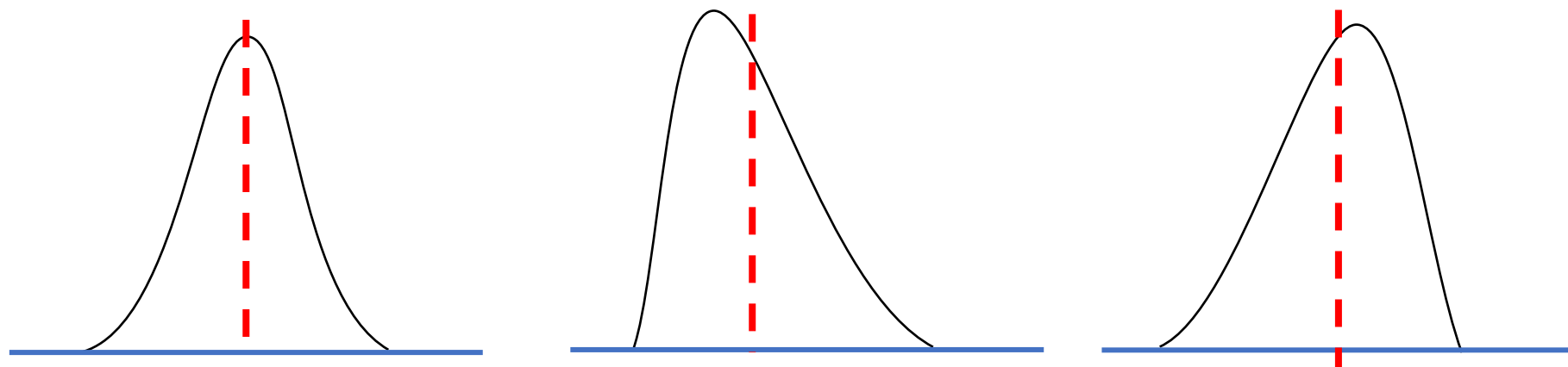
ΕΙΝΑΙ ΟΛΕΣ ΟΙ ΚΟΡΥΦΕΣ ΙΔΑΝΙΚΕΣ;

Φυσικά και όχι!

Καμία κορυφή δεν είναι ιδανική, οι κορυφές
διευρύνονται

Η συμμετρία της κορυφής πολύ σπάνια είναι η ιδανική
(κατανομή Gauss)

Ο λόγος είναι τα φυσικοχημικά φαινόμενα που
συμβαίνουν μέσα στη στήλη κατά τη διαδικασία
διαχωρισμού των ενώσεων.



Διαχωρισμός στην ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (1)

- Το μέτρο του πετυχημένου διαχωρισμού είναι η **διαχωριστικότητα R_s** , η οποία περιγράφει την ικανότητα της στήλης να διαχωρίζει τις κορυφές που μας ενδιαφέρουν
- Η διαχωριστικότητα εκφράζει το αν έχει επιτευχθεί ο διαχωρισμός από την γραμμή βάσης ή όχι (*base line separation*)

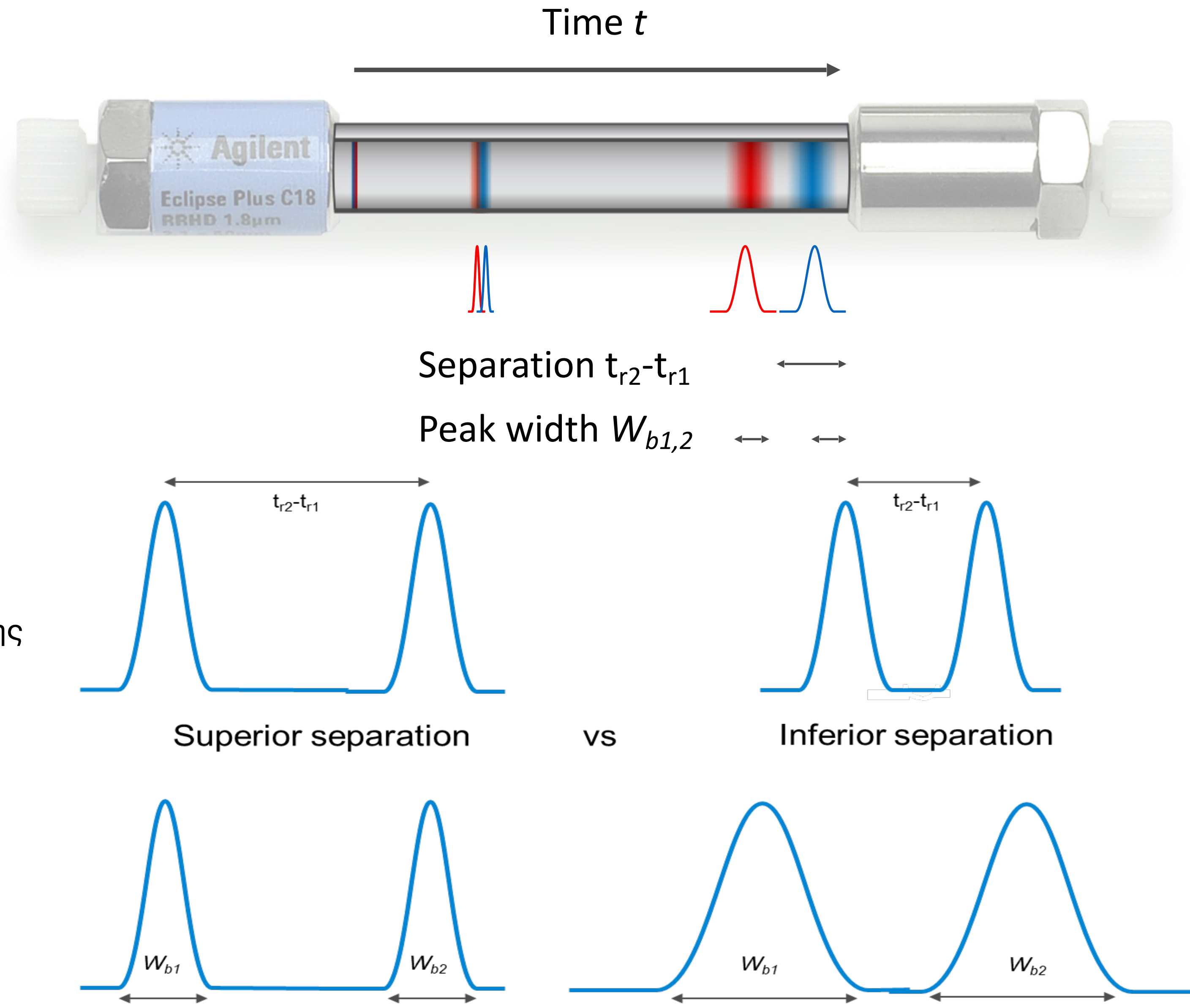
$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2 \cdot (W_{b2} + W_{b1})}$$

Κάποιες φορές είναι ευκολότερο να βρούμε το εύρος στο μέσο της χρωματογραφικής κορυφής,

Full width at half maximum (FWHM). Τότε η παραπάνω εξίσωση γίνεται:

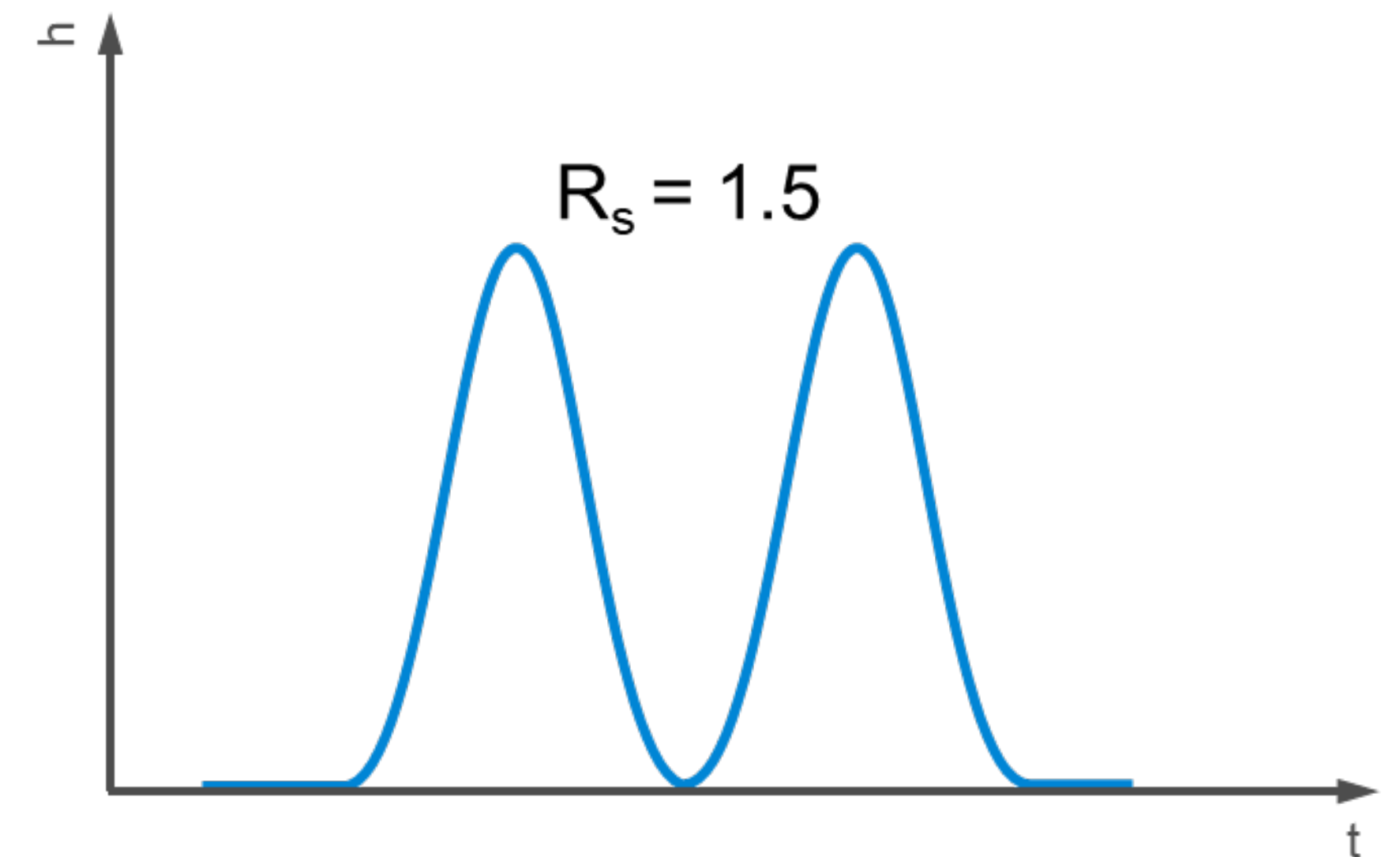
$$R_s = \frac{1,18(t_{RA} - t_{RB})}{(W_{0,5hA} + W_{0,5hB})}$$

Τα σύγχρονα χρωματογραφικά συστήματα υπολογίζουν τους και τους δύο και μπορεί ο χρήστης να επιλέξει ή έχουν ένα από τους δύο τύπους.



Διαχωρισμός στην ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (2)

- Η διαχωριστικότητα περιγράφει την ικανότητα της στήλης να διαχωρίζει της κορυφές που μας ενδιαφέρουν
- Τιμές διαχωριστικότητας
 - ✓ Τιμή **0,6** απαιτείται για τον σχηματισμό «κοιλιάδας» (valley) ανάμεσα σε δύο κορυφές
 - ✓ Τιμή **1** είναι η ελάχιστη τιμή για να έχουμε μετρήσιμο διαχωρισμό που να επιτρέπει την ποσοτικοποίηση (ανάμεσα σε κορυφές που είναι ισοσκελή τρίγωνα)
 - ✓ Τιμή πάνω **από 1,5** θεωρείται ότι αντιστοιχεί σε **επαρκή διαχωρισμό** (ανάμεσα σε κορυφές με κατανομές Gauss) και επιτρέπει ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό



ΘΕΩΡΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΩΝ

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Χρόνος ανάσχεσης: **Ταυτοποίηση**

Μια κορυφή ταυτοποιείται όταν ο χρόνος έκλουσης του προτύπου ταυτίζεται με το χρόνο έκλουσης στο δείγμα (δεν είναι όμως απόλυτο)

Εμβαδόν κορυφής ή ύψος κορυφής: **Ποσοτικοποίηση**

Η ποσότητα της ουσίας προσδιορίζεται σε σχέση με το εμβαδόν κορυφής του προτύπου με το δείγμα (είτε απλή σύγκριση είτε μέσω καμπύλης βαθμονόμησης)

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC)

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Εφαρμογή

Αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική

Χρησιμοποιείται:

Εργαστήρια Αναλύσεων
Φαρμακευτικές εταιρίες
Ερευνητικά κέντρα

Προσδιορισμός μεγάλου εύρους οργανικών ενώσεων

Δυνατότητα ταυτοποίησης της ένωσης ειδικά σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας.

Μεγάλη ανάπτυξη λόγω της σύνδεσης με φασματομετρία μάζας

High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Δόθηκε ως όνομα για να διαχωρίσει την «νέα» τότε τεχνολογία που επέτρεπε στην υγροχρωματογραφία να αντέχει σε υψηλές πιέσεις (35-400 bar) σε σχέση με την «παραδοσιακή» χρωματογραφία που βασιζόταν στη βαρύτητα.

Έχει καθιερωθεί ως όρος αν και πλέον όλα τα απλά συστήματα LC είναι HPLC.



ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΟΡΙΣΜΟΣ - ΤΜΗΜΑΤΑ ΟΡΓΑΝΟΥ

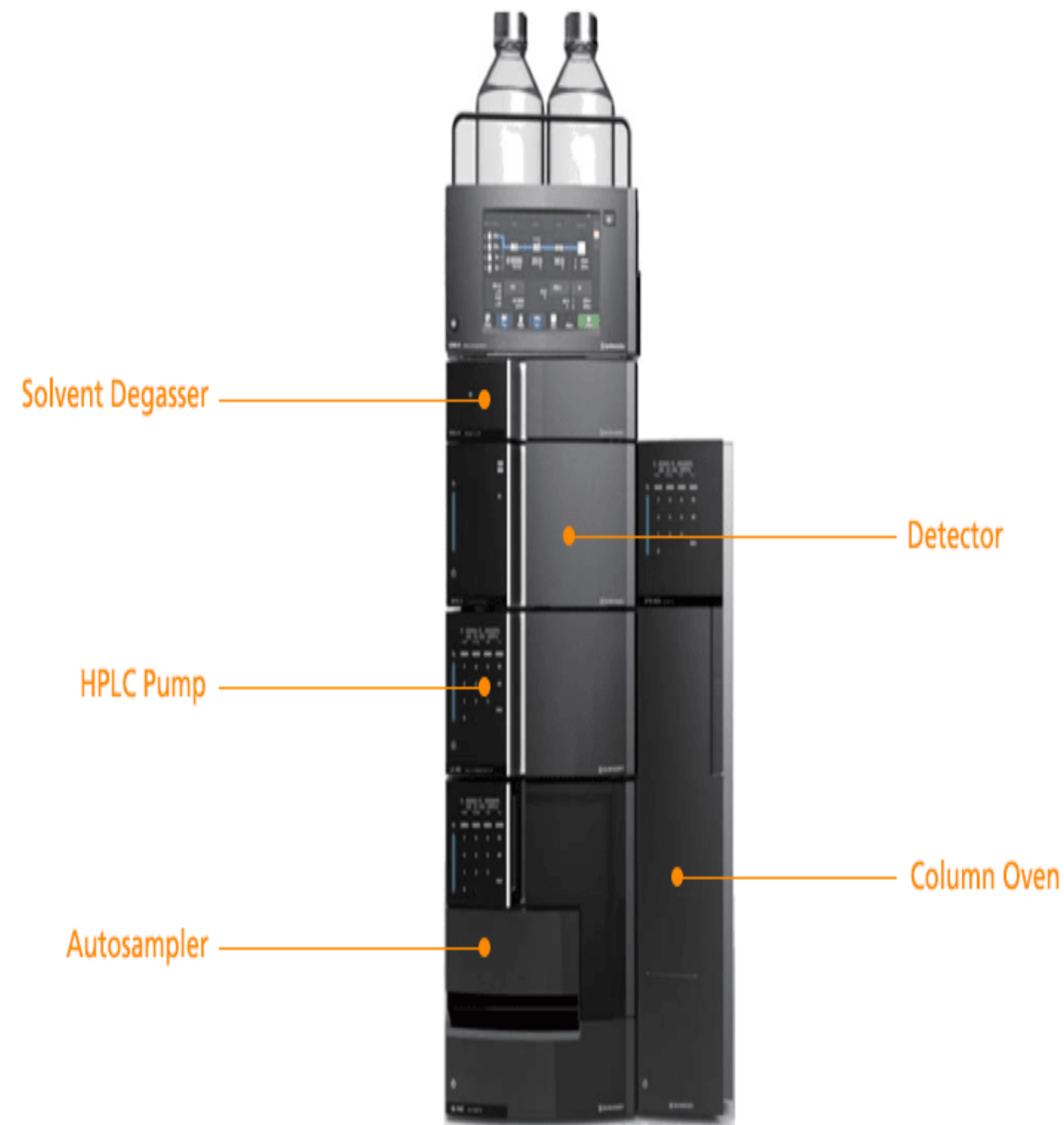
➤ **ΟΡΙΣΜΟΣ:** Υγροχρωματογραφία (LC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού που περιλαμβάνει την εισαγωγή μικρού όγκου υγρού δείγματος σε μια **στήλη πληρωμένη με πορώδη σωματίδια** (Στατική φάση). Κάθε αναλύτης διέρχεται από τη στήλη με τη βοήθεια **υγρού που κινείται με συγκεκριμένη διεύθυνση λόγω βαρύτητας (Κινητή φάση)**.

➤ Οι προσδιοριζόμενες ουσίες στο δείγμα διαχωρίζονται μεταξύ τους μέσω **διάφορων χημικών και φυσικών αλληλεπιδράσεων** ανάμεσα στα μόρια τους και τα σωματίδια της στατικής φάσης

➤ Οι διαχωριζόμενες ενώσεις εξέρχονται από τη στήλη και **ταυτοποιούνται** από μια άλλη εξωτερική τεχνική όπως η **φασματομετρία**, όπου αποκρίνεται στη διαφορετική χρωματική ένταση

✓ Ένα σύστημα **HPLC** αποτελείται από 4 τμήματα

- I. Αντλία
- II. Εισαγωγέας
- III. Στήλη
- IV. Ανιχνευτής



ΑΝΤΛΙΕΣ

- Ο ρόλος της αντλίας είναι η **εξαναγκασμένη κίνηση του υγρού** (κινητή φάση) στον χρωματογράφο με συγκεκριμένη ροή (mL/ min)
 - ✓ Οι συνήθεις ταχύτητες ροής στην HPLC κυμαίνονται από 1-2mL/min
 - ✓ Οι περισσότερες αντλίες LC φτάνουν πιέσεις μέχρι 400bar
 - ✓ **Οι αντλίες UHPLC (Ultra High Pressure LC)** είναι ικανές να δημιουργήσουν πιέσεις 600-1500bar
- Κατά τη διάρκεια ενός χρωματογραφικού προσδιορισμού με HPLC, η αντλία μπορεί να **μεταφέρει μια σταθερής σύστασης κινητή φάση** (Ισοκρατική έκλυση- *Isocratic*) ή μια **εναλλασσόμενης σύστασης κινητή φάση** (Βαθμιδωτή έκλυση – *Gradient*)



Κρίσιμοι παράμετροι αντλιών HPLC

- **Ταχύτητα ροής:** Ο όγκος που μεταφέρεται ως προς το χρόνο – Το εύρος της ταχύτητας ροής εξαρτάται από το είδος της αντλίας
- **Μέγιστη πίεση:** Για την αποφυγή βλαβών στο σύστημα της HPLC (π.χ. ευαίσθητη στήλη), μπορεί να καθοριστεί μια μέγιστη πίεση.
- **Σύσταση της βαθμιδωτής έκλυσης κάθε διαλύτη της κινητής φάσης:** Το ποσοστό κάθε διαλύτη σε συνάρτηση με το χρόνο (Διπλή αντλία- *binary pump*, τετραπλή αντλία- *quaternary pump*)

Ισοκρατική ή βαθμιδωτή έκλυση?

➤ **Ισοκρατική:** Η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει **σταθερή με το χρόνο**

✓ Προτείνεται για απλούς διαχωρισμούς

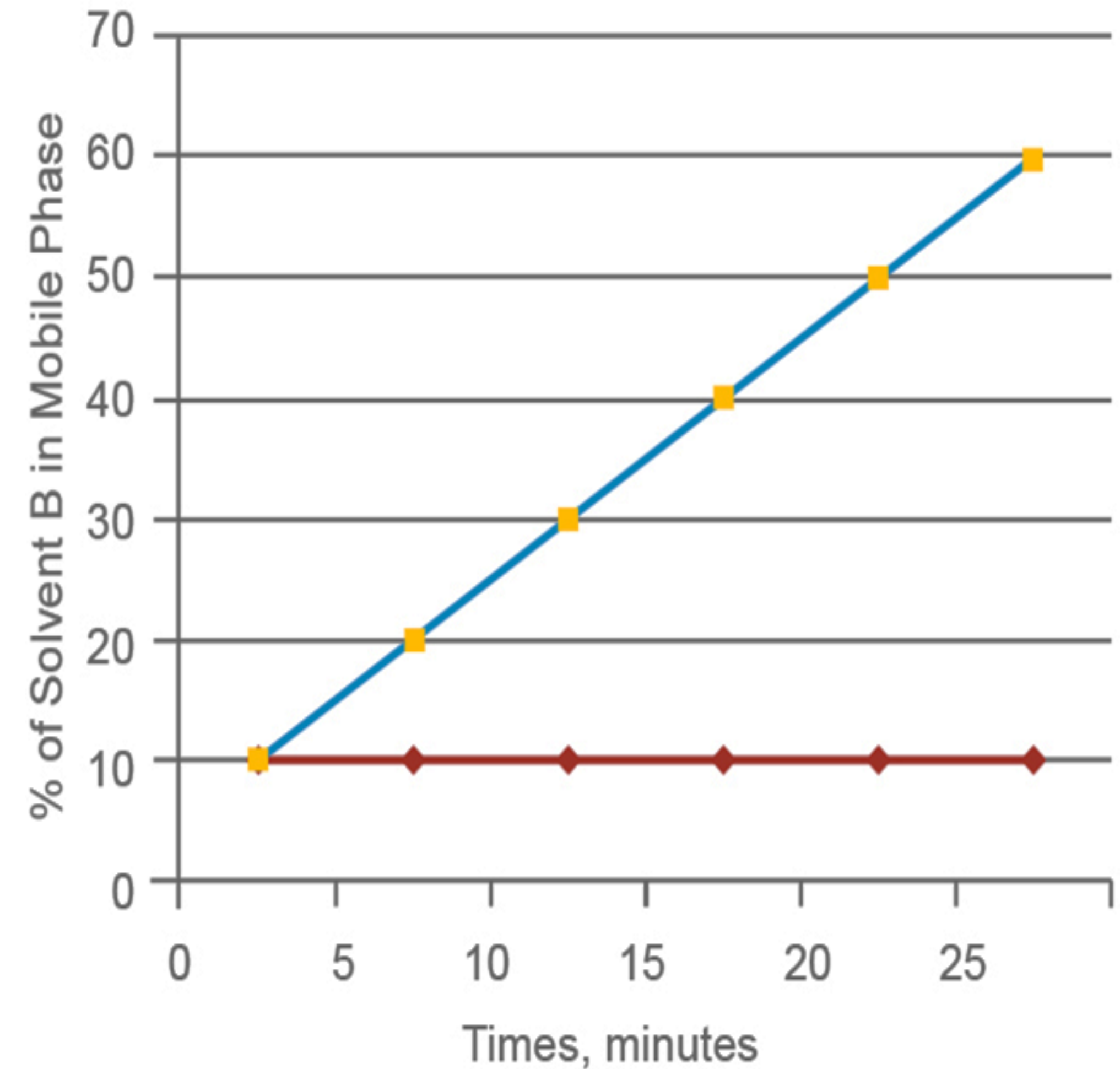
✓ Χρησιμοποιείται συχνά σε QC (quality control) εφαρμογές εάν το επιτρέπει το πρωτόκολλο

➤ **Βαθμιδωτή:** Η σύσταση της κινητής φάσης **αλλάζει με το χρόνο** – Αυξάνει το ποσοστό του ενός διαλύτη σε σχέση με τον άλλο με την πάροδο του χρόνου

✓ Προτείνεται για την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων

✓ Συχνά χρησιμοποιείται κατά την ανάπτυξη νέων μεθόδων

✓ Η γραμμική αύξηση του ποσοστού των διαλυτών είναι η πιο συνήθης βαθμιδωτή αλλαγή διαλύτη



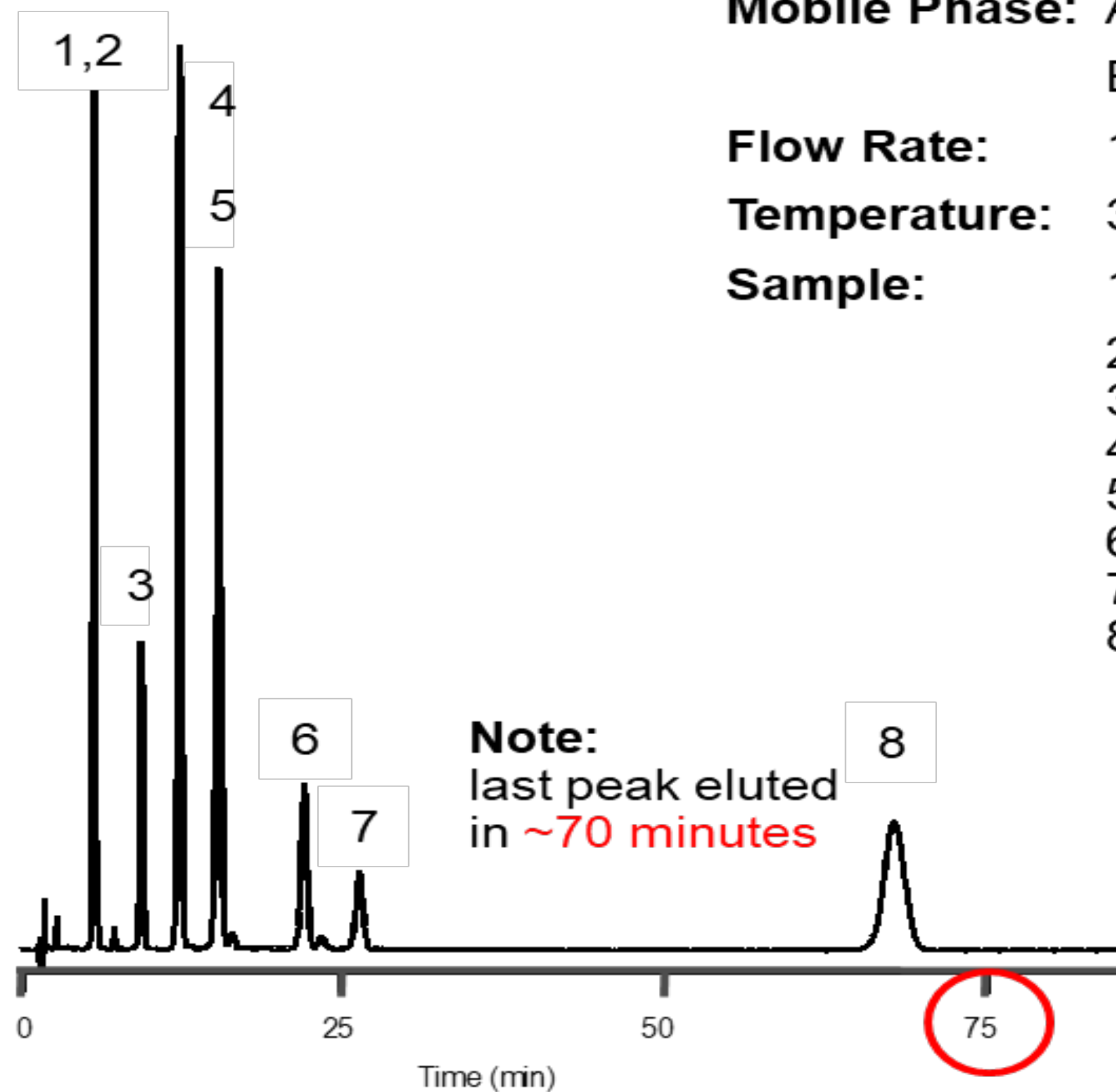
◆ Isocratic

■ Gradient

Παράδειγμα σύγκρισης ισοκρατικής και βαθμιδωτής έκλουσης

Separation of Herbicides on ZORBAX StableBond-C18

Isocratic Elution
70% water/30% Acetonitrile



Column: ZORBAX SB-C18
4.6 x 150 mm, 5 μ m

Mobile Phase: A: H₂O with 0.1% TFA, pH 2
B: Acetonitrile

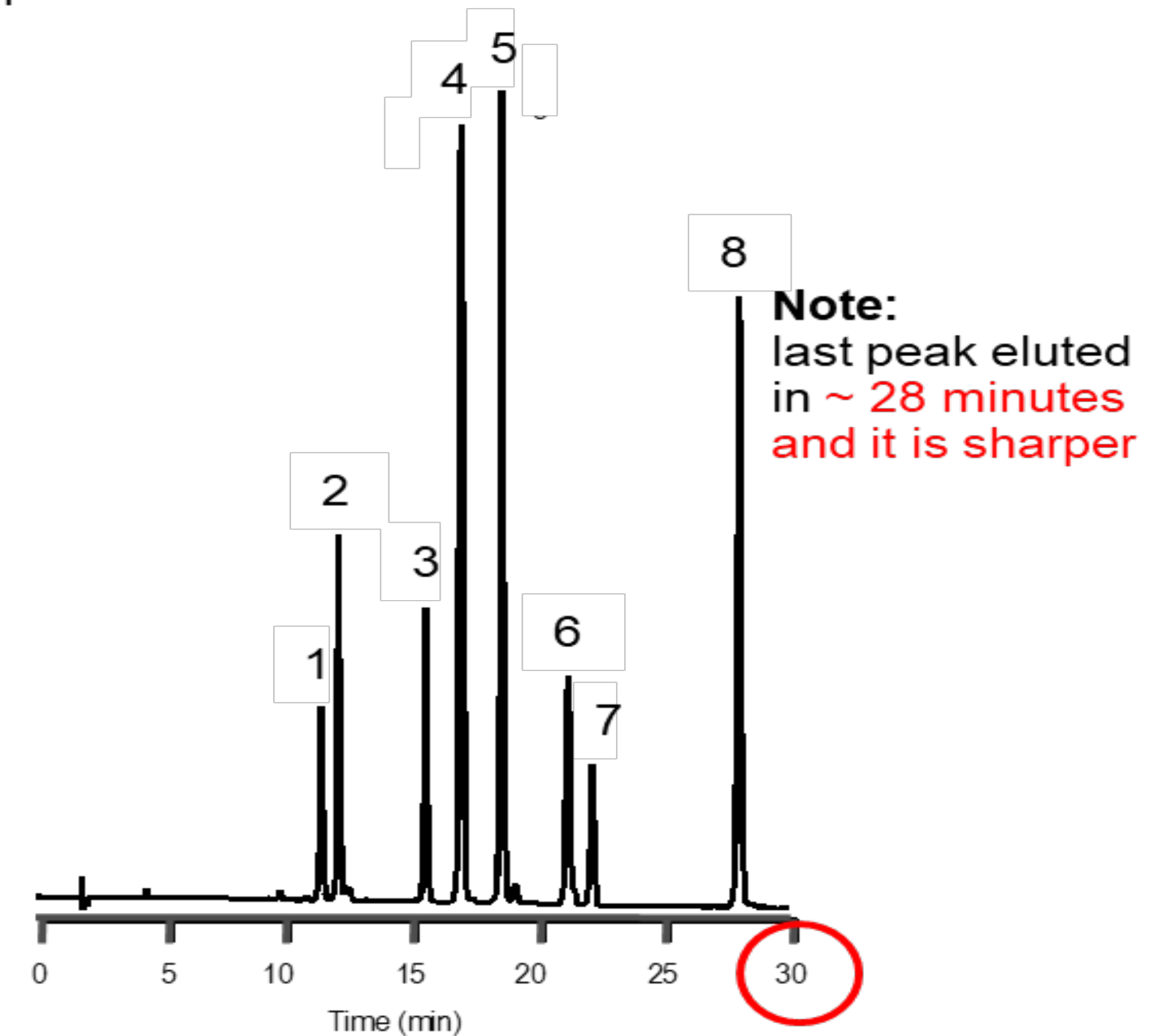
Flow Rate: 1.0 mL/min

Temperature: 35°C

Sample:

1. Tebuthiuron
2. Prometon
3. Prometryne
4. Atrazine
5. Bentazon
6. Propazine
7. Propanil
8. Metolachlor

Gradient Elution
20 – 60% Acetonitrile/water



ΕΙΣΑΓΩΓΕΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

➤ *Ο εισαγωγέας πρέπει να εξυπηρετεί την είσοδο του διαλυμένου δείγματος στο ρεύμα της κινητής φάσης*

✓ *Οι συνήθεις όγκοι εισαγωγής είναι από 0,1 – 20 μL*

✓ *Ο εισαγωγέας πρέπει να αντέχει τις υψηλές πιέσεις του συστήματος*

➤ *Η εισαγωγή μπορεί να γίνει:*

✓ *Με μη αυτόματο τρόπο (**manual injection**) με χρήση σύριγγας*

✓ *Με αυτόματο τρόπο με χρήση ειδικού δίσκου πολλαπλών θέσεων (**autosampler tray**)*



Κρίσιμοι παράμετροι εισαγωγή HPLC

- Εύρος όγκου εισαγωγής: Μπορεί να εισαχθούν από 0,1μL έως 100μL ανάλογα με τον βρόγχο εισαγωγής (Loop)
- Δοχεία εισαγωγής: Vials και δίσκος πολλαπλών θέσεων
- Carryover: Ενώσεις από προηγούμενη εισαγωγή. Για τον περιορισμό του καθαρίζεται η βελόνη της σύριγγας
- Η χωρητικότητα των δειγμάτων: Πόσα δείγματα χωρά ο δειγματολήπτης (tray)
- Cycle time: Μεσοδιάστημα μέχρι την επόμενη εισαγωγή δείγματος
- Πιστότητα (Precision): Επαναληψιμότητα σε κάθε εισαγωγή δείγματος
- Ακρίβεια (Accuracy): Ακριβής ποσότητα εισαγωγής σε κάθε ένεση
- Γραμμικότητα (Linearity): Ακρίβεια ενός συγκεκριμένου εύρους όγκων εισαγωγής

ΣΤΗΛΕΣ ΗΡΛC (1)

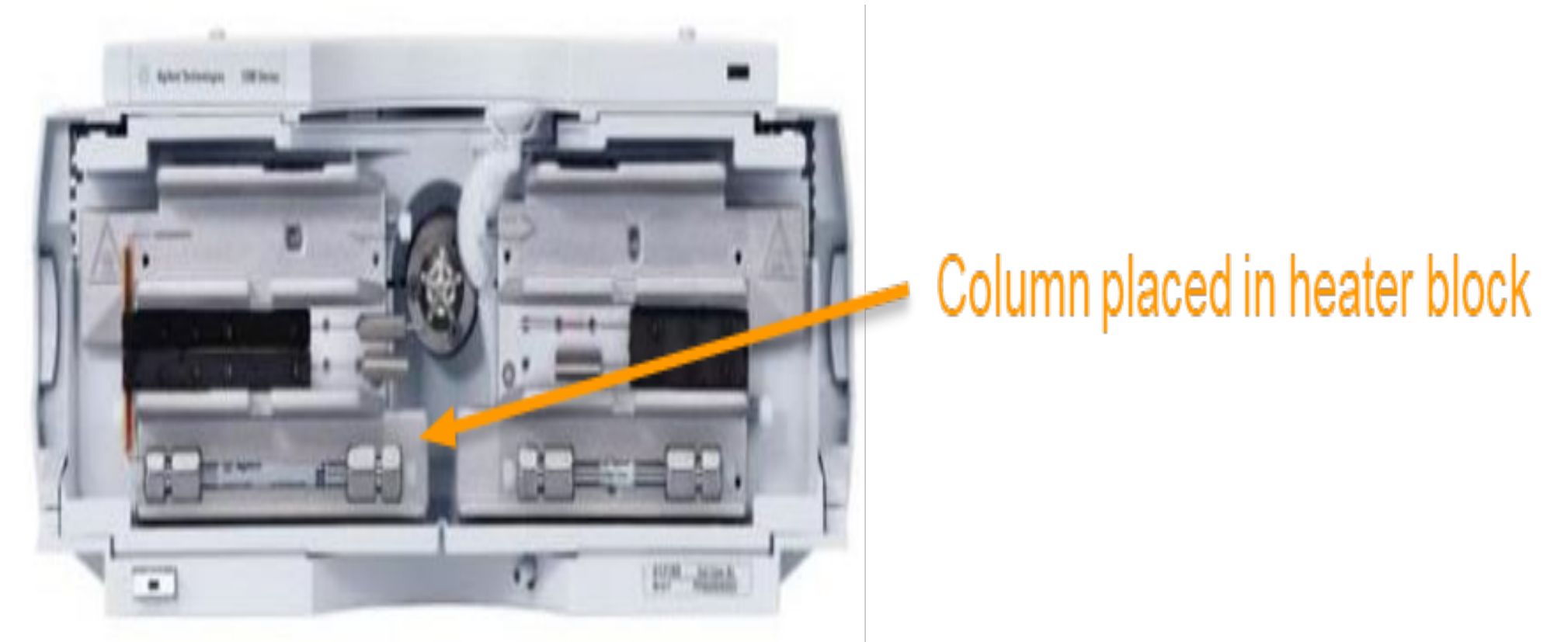
*Η στήλη βρίσκεται στο **θερμοστατούμενο** τμήμα του χρωματογράφου*

- *Η στήλη θεωρείται η «καρδιά» του χρωματογράφου*
- *Η στατική φάση της στήλης διαχωρίζει τα συστατικά του δείγματος σύμφωνα με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες*
- *Τα μικρά σωματίδια του πληρωτικού υλικού της στήλης είναι η αιτία της πτώσης της πίεσης μέσα στη στήλη σε κανονικές ταχύτητες ροής*
- *Η χρήση της αντλίας δημιουργεί υψηλές πιέσεις μέσα στο χρωματογράφο για να προωθήσει την κινητή φάση μέσα στη στήλη*



ΣΤΗΛΕΣ HPLC (2)

- Η επιλογή της κατάλληλης στήλης είναι κρίσιμη
 - ✓ Analytical: Με εσωτερική διάμετρο (i.d.) 1,0-4,6mm και μήκη από 15-250mm
 - ✓ Preparative: Με εσωτερική διάμετρο (i.d.) > 4,6mm και μήκη από 50-250mm
 - ✓ Capillary: Με εσωτερική διάμετρο (i.d.) 0,1-1,0mm και ποικιλία μηκών
 - ✓ Nano Με εσωτερική διάμετρο (i.d.) <0,1mm(100μm)
- Υλικά κατασκευής των εξωτερικών σωλήνων
 - ✓ Ανοξείδωτο ατσάλι (το πιο δημοφιλές, αντοχή σε υψηλές πιέσεις)
 - ✓ Γυαλί (Κυρίως για βιομόρια)
 - ✓ Πολυμερές ΡΕΕΚ(polyether ether ketone) - (Αδρανείς με τους πιο κοινούς διαλύτες)



ΤΥΠΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ στην HPLC

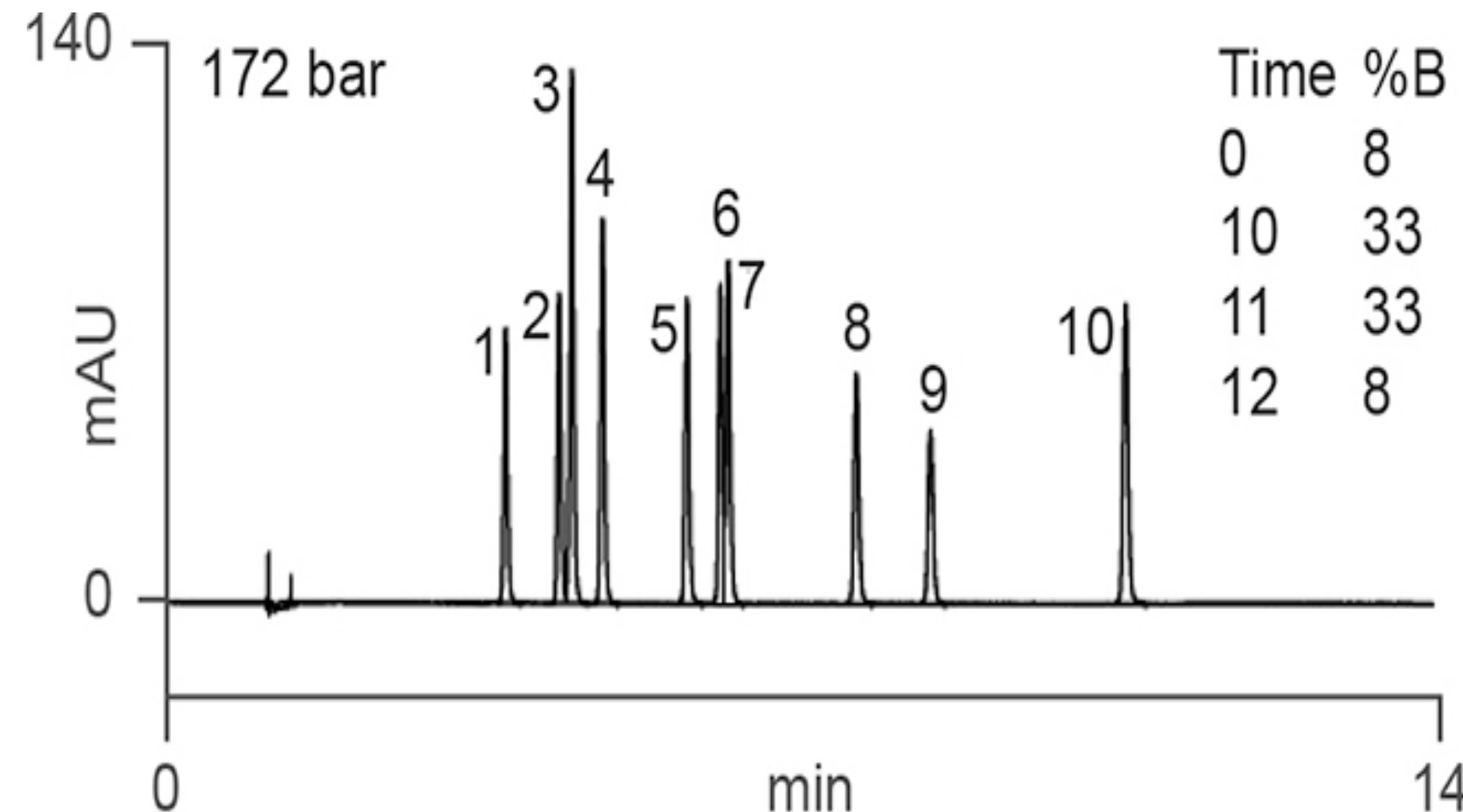
- Ανάλογα με το είδος της ανάλυσης που θέλουμε να πραγματοποιήσουμε πρέπει να γίνει
 - I. η κατάλληλη επιλογή διαλυτών της κινητής φάσης
 - II. η κατάλληλη επιλογή τύπου διαχωρισμού (*separation mode*)
- Οι δύο αυτές παράμετροι θα καθορίσουν **το είδος της στήλης** που θα χρησιμοποιηθεί
- Τα είδη διαχωρισμού στην HPLC είναι 4:
 - I. Κανονικής φάσης (*Normal Phase*)
 - II. **Αντίστροφης φάσης (*Reversed Phase*)**
 - III. Ιονανταλλαγής (*Ion exchange*)
 - IV. Αποκλεισμού μεγεθών (*Size exclusion*)
- Η σωστή επιλογή πληρωτικού υλικού της στήλης και της κινητής φάσης είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες για την επιτυχημένη λειτουργία της HPLC

HPLC Αντίστροφης φάσης (RP)

- Η HPLC αντίστροφης φάσης είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος διαχωρισμού σε ποσοστό πάνω από 90%
- Η στατική φάση της στήλης είναι άπολη (C18, C8, C3, φαίνυλο ομάδες) ενώ η κινητή φάση είναι πολική (νερό και νερό με κάποιον αναμίξιμο οργανικό διαλύτη, μεθανόλη-MeOH ή ακετονιτρίλιο-ACN)
- ✓ Είναι πολύ εύχρηστη και καλύπτει τον επιτυχή προσδιορισμό πολλών μη πολικών και πολικών μορίων, ιόντων ή μορίων που μπορούν να ιοντιστούν

✓ Η βαθμιδωτή έκλουση ξεκινά με κινητή φάση **μόνο νερό** και η προσθήκη οργανικού διαλύτη αυξάνει σε συνάρτηση με τον χρόνο

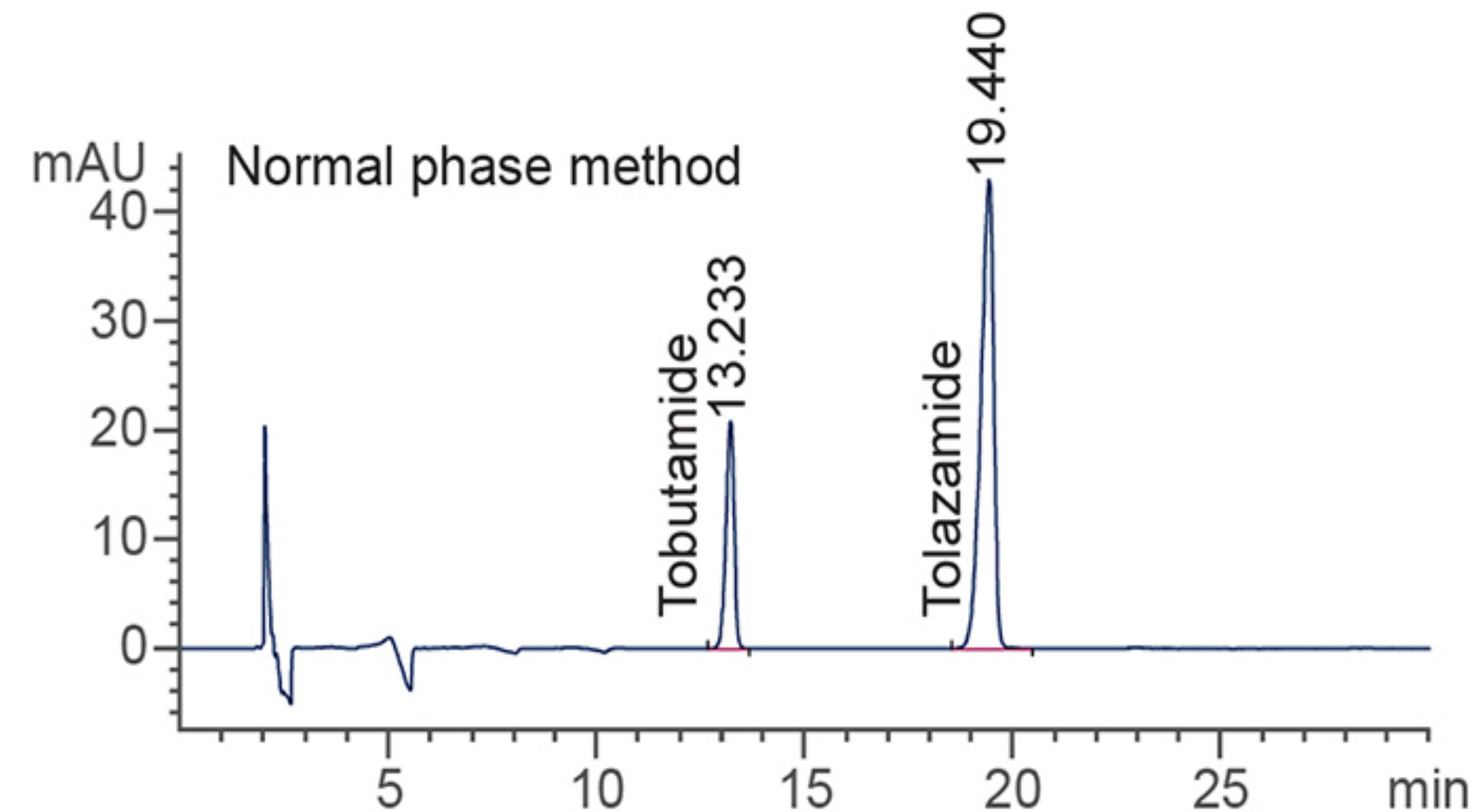
✓ Η **σταδιακή προσθήκη** του οργανικού διαλύτη αυξάνει την ισχύ της κινητής φάσης με συνέπεια να εκκλύονται σταδιακά και αναλύτες που κατακρατούνται ισχυρά στο πληρωτικό υλικό



10 sulfa drugs analyzed by reversed phase

HPLC Κανονικής φάσης (Προσρόφησης)

- Η HPLC κανονικής φάσης είναι λιγότερο διαδεδομένος τύπος διαχωρισμού σε ποσοστό κάτω από 10%
- Η στατική φάση της στήλης είναι πολική (silica gel, κυανοπροπυλ-bonded, amino-bonded) ενώ η κινητή φάση είναι μη πολική (εξάνιο, ισοοκτάνιο, οξικός αιθυλεστέρας)
- Χρησιμοποιείται για την ανάλυση
 - ✓ Υδατο-ευαίσθητων ενώσεων
 - ✓ Γεωμετρικά ισομερή
 - ✓ Cis-trans ισομερή
 - ✓ Χειρόμορφα ισομερή



Analysis of tolazamide

Κανονική vs Αντίστροφη Φάση

Κανονική Φάση

- Πολική στατική κυρίως πυριτία
- Μη πολική κινητή φάση, μη υδατικοί διαλύτες, κυρίως χλωροφόρμιο
- Διαχωρισμός πολικών αναλυτών
- Οι αναλύτες μπορούν να εκλουστούν ταχύτερα αυξάνοντας την πολικότητα
- Μικρός χρόνος ζωής της στήλης

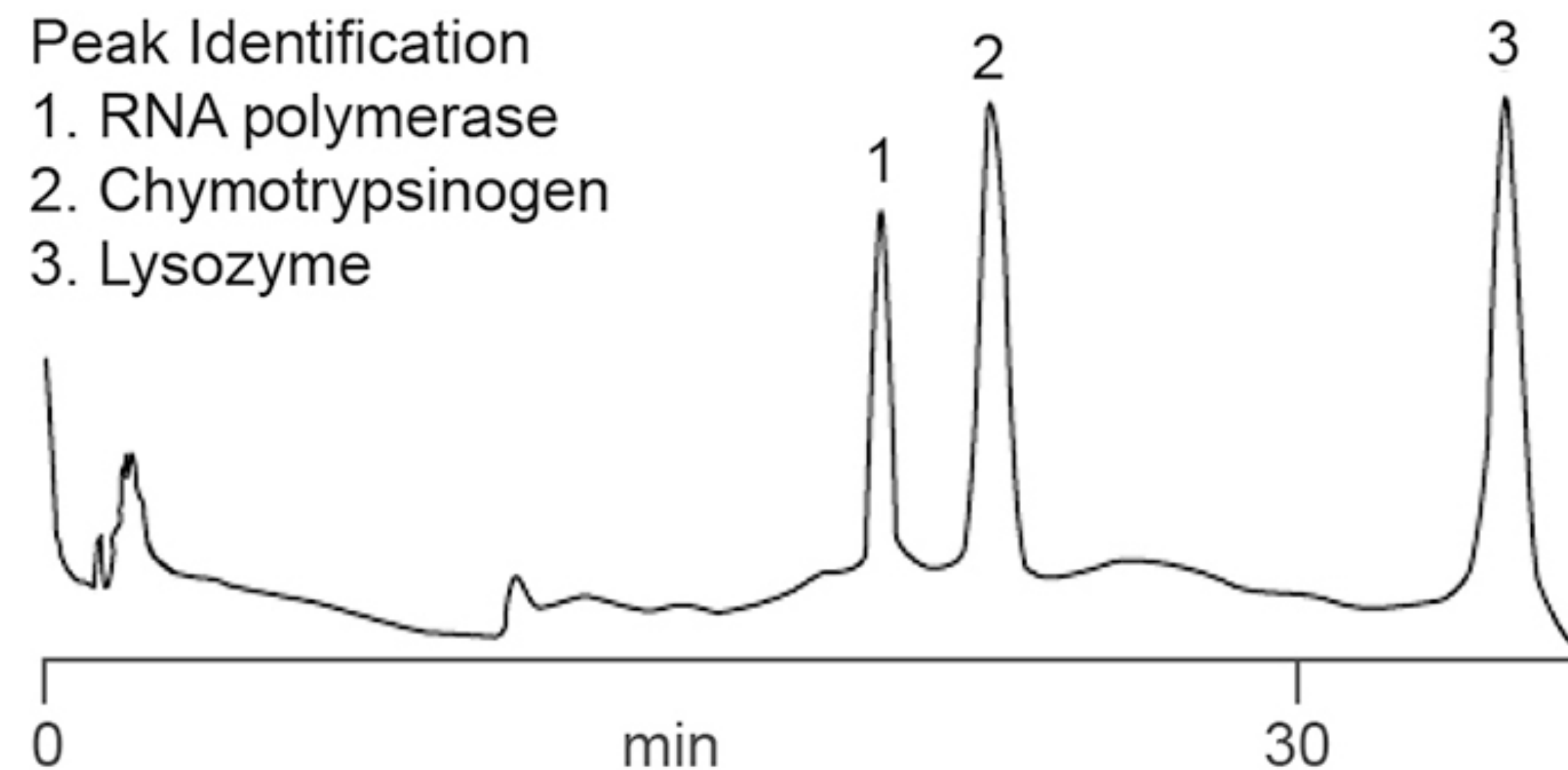
Αντίστροφη Φάση

- Μη πολική στατική φάση, τροποποιημένη πυριτία που έχει υποκατασταθεί με μακριές υδροφοβικές αλυσίδες.
- Πολική κινητή φάση, κυρίως νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο
- Διαχωρισμός λιγότερο πολικών αναλυτών.
- Οι αναλύτες μπορούν να εκλουστούν ταχύτερα μειώνοντας την πολικότητα
- Μεγάλος χρόνος ζωής της στήλης

HPLC Ιονανταλλαγής

- Η HPLC ιονανταλλαγής χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις διαχωρισμού ενώσεων με ιοντικές ομάδες.
- Η στατική φάση της στήλης περιέχει ιοντικές ομάδες (θειώδης-sulfonic, tetraalkyl-ammonium) ενώ η κινητή φάση αποτελείται από κάποιο υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate, formate)

- Χρησιμοποιείται για:
 - ✓ Τον διαχωρισμό ανόργανων και οργανικών ανιόντων και κατιόντων σε υδατικά διαλύματα
 - ✓ Τον διαχωρισμό ιοντικών χρωστικών, αμινοξέων και πρωτεϊνών τα οποία βρίσκονται με τη μορφή αλάτων σε αλμυρό νερό



Basic proteins on strong cation-exchange (-SO₃)

HPCL Αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography)

➤ Η HPCL αποκλεισμού μεγεθών χρησιμοποιείται κυρίως για το χαρακτηρισμό πρωτεϊνών και πολυμερών

❖ Υπάρχουν δύο τύποι SEC-HPCL

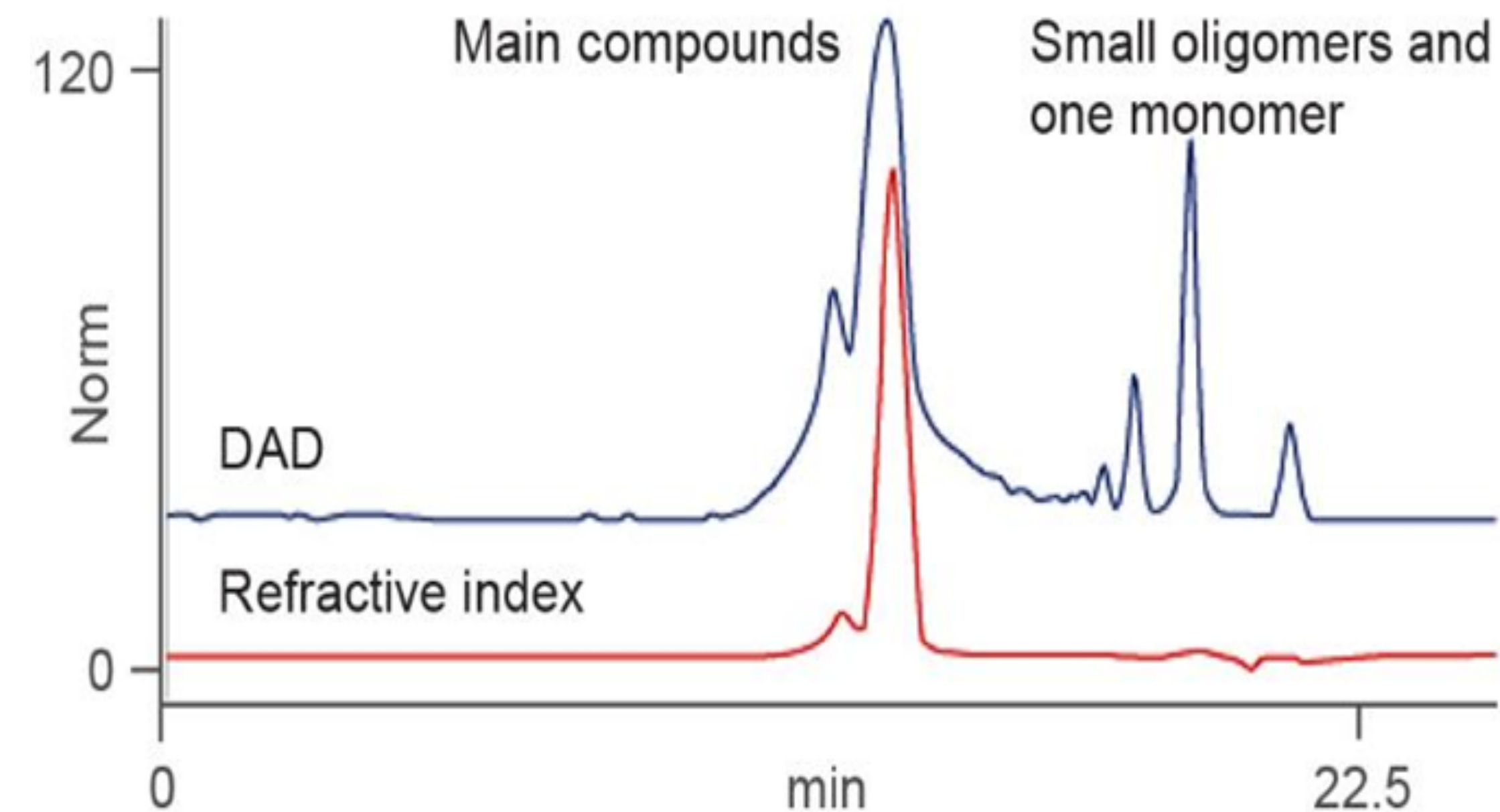
I. Μη-υδατικός (Gel permeation- Διάχυση)

II. Υδατικός (Gel filtration – Διήθηση)

➤ Και στους δύο τύπους **δεν πρέπει να υπάρχει αλληλεπίδραση** ανάμεσα στο δείγμα και το πληρωτικό υλικό της στήλης.

➤ Τα μόρια **διαχέονται ανάμεσα στα σωματίδια** του πληρωτικού υλικού

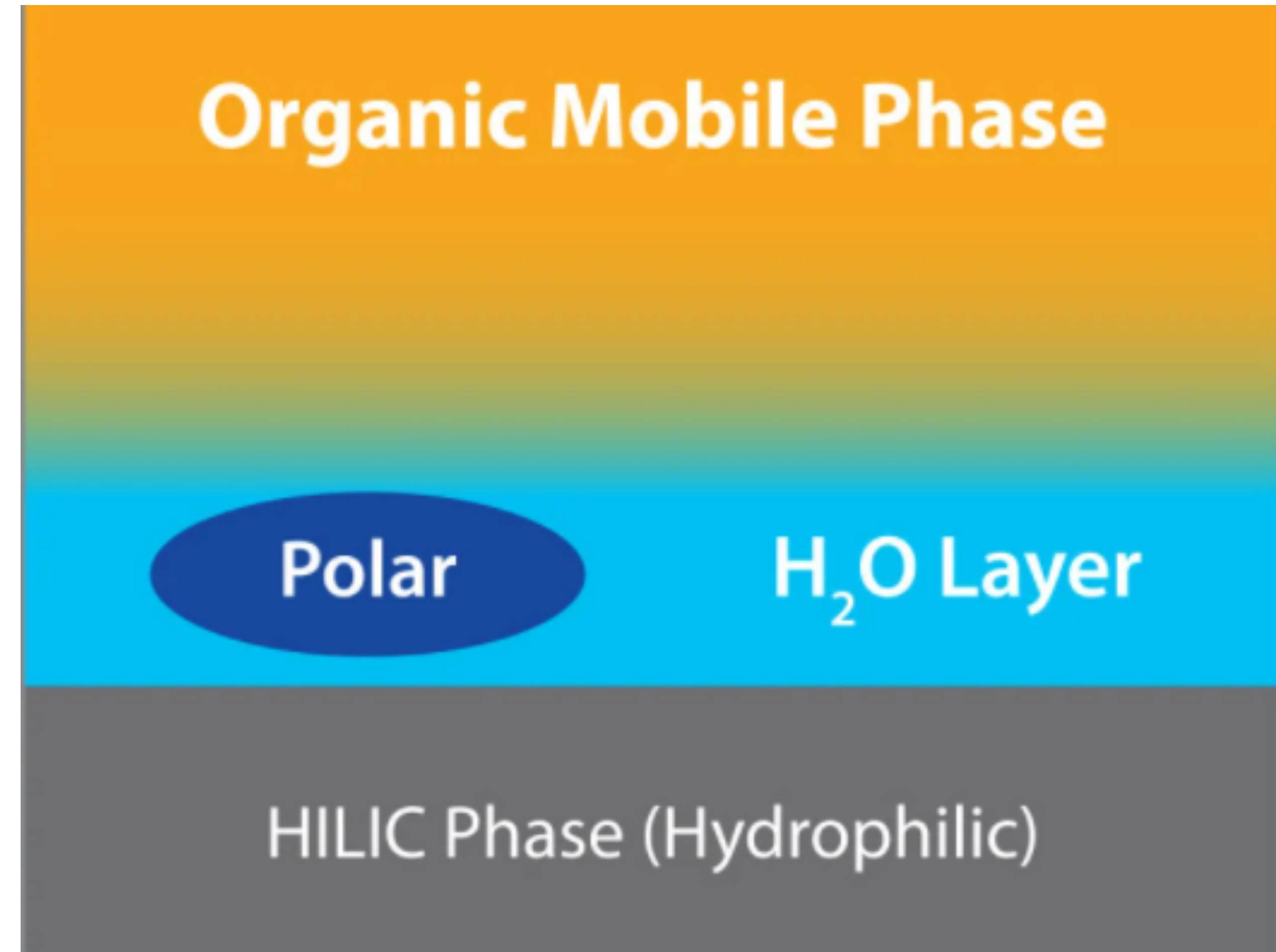
✓ Ο διαχωρισμός σχετίζεται **με το μέγεθος** των αναλυτών συγκριτικά με το μέγεθος των πόρων των σωματιδίων της στατικής φάσης



Gel Permeation chromatogram of polybutadiene polymer on non-aqueous SEC (GPC) column; The monomers elute after the polymer

HYDROPHILIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY (HILIC)

- Αν και αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια, πρώτη φορά αναφέρθηκε το 1990.
- Ιδιαίτερη εξέλιξη λόγω της ανάπτυξης της φασματομετρίας μαζών.
- Δυνατότητα έκλουσης πολικών διαλυτών με διαλύτες αντίστροφής φάσης.
- Δημιουργείται μια στιβάδα νερού που επιτρέπει τον διαχωρισμό των πολικών ενώσεων.
- Μεγαλύτερος χρόνος εξισορρόπησης
- Σημαντική η σύσταση του διαλύματος έγχυσης (κυρίως οργανικός διαλύτης)
- Σημαντική επίδραση από το pH και τη θερμοκρασία.



ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΗΡΛC

- Ο ανιχνευτής είναι η μονάδα της ΗΡΛC που ανιχνεύει («βλέπει») τα αυτόνομα μόρια που εκκλύονται από τη στήλη
- Ανάλογα με την ποσότητα κάθε αναλύτη λαμβάνεται **διαφορετικό «σήμα»** και η απεικόνιση αυτού το σήματος αποτελεί το χρωματογράφημα.
- Τα χρωματογραφήματα με τις κορυφές των συστατικών επεξεργάζονται με κατάλληλα λογισμικά στη συνέχεια
- Οι **πιο κοινοί ανιχνευτές** είναι:
 - ✓ Φωτομετρικοί ανιχνευτές (UV-Vis, IR)
 - ✓ Ανιχνευτές Δείκτη διάθλασης
 - ✓ Ανιχνευτές φθορισμού
 - ✓ Φασματοόμετρο μαζών

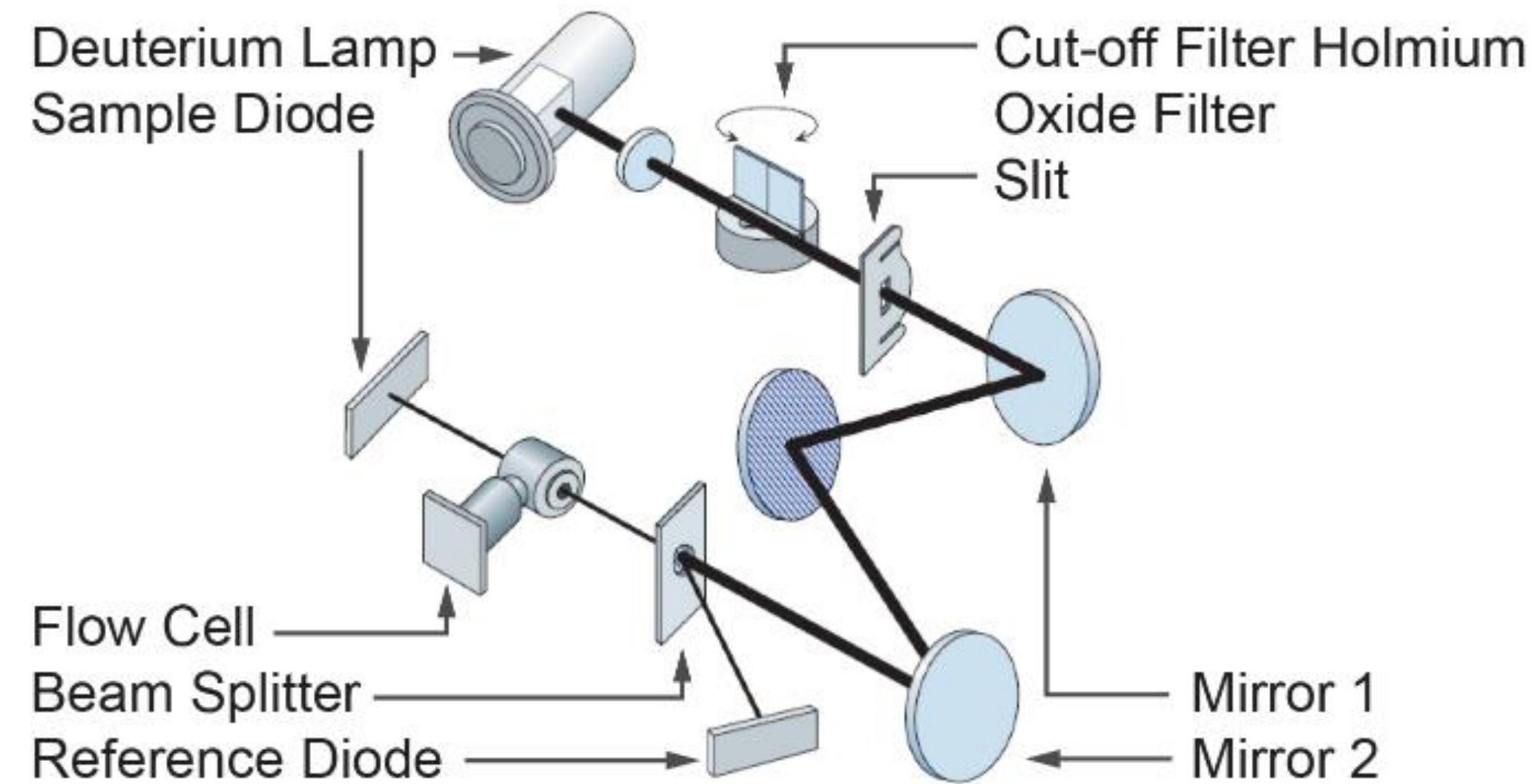


ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΗΡΛC - ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

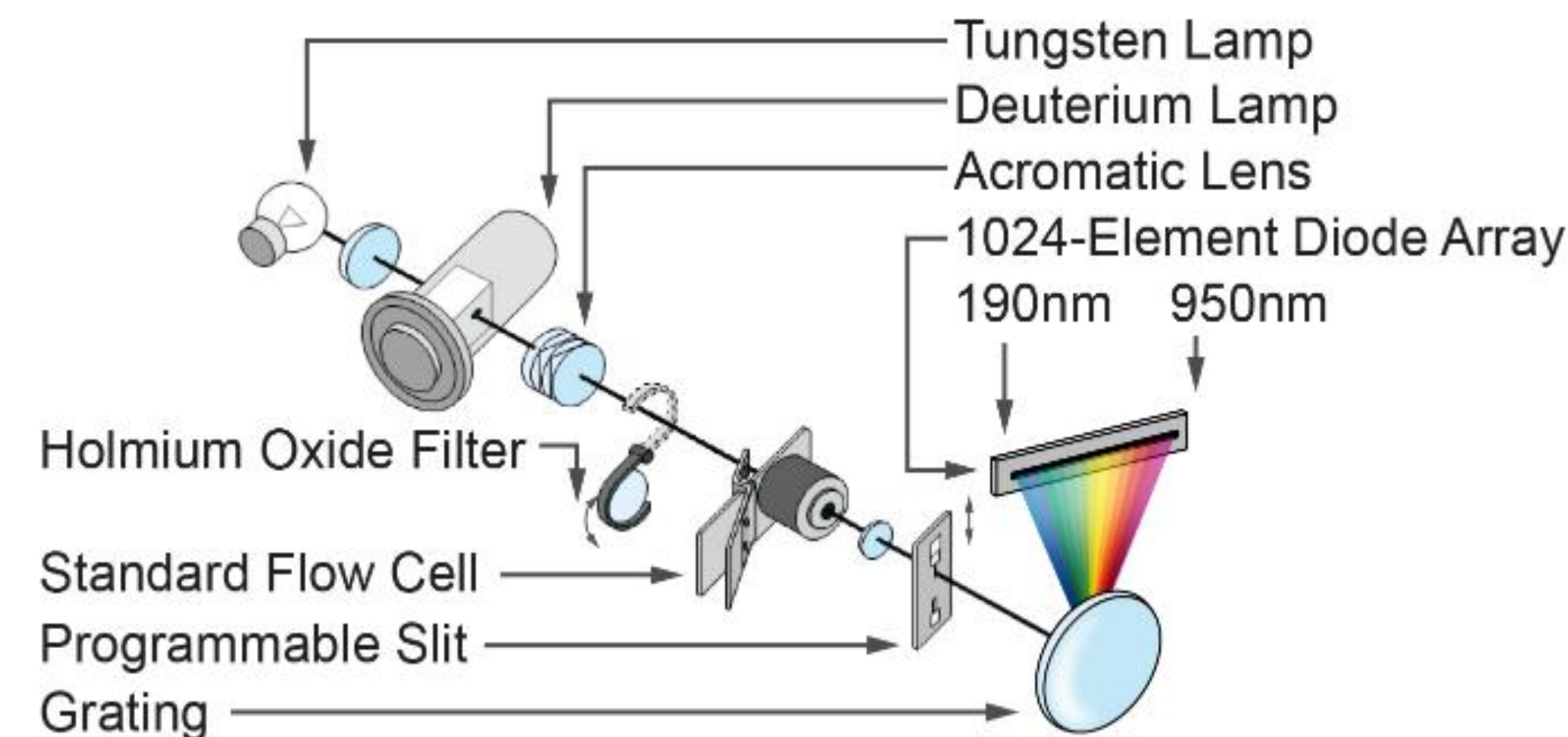
- ✓ Αποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μείγματος (γενικός ανιχνευτής) ή να έχει γνωστή **εκλεκτικότητα** αποκρίσεως (ειδικός ανιχνευτής)
- ✓ Επιτρέπει **χαμηλά όρια ανίχνευσης** (ng-μg)
- ✓ Να μην αποκρίνεται στην **κινητή φάση**
- ✓ Παρέχει **γραμμική απόκριση** στην περιοχή συγκεντρώσεων των διαχωριζόμενων συστατικών (χρήση στην ποσοτική ανάλυση)
- ✓ Να μην επηρεάζεται από μεταβολές **θερμοκρασίας και ταχύτητας ροής** κινητής φάσης
- ✓ Να έχει **αμελητέο νεκρό όγκο** και να μην συμμετέχει στη **διεύρυνση ζώνης** συστατικών του μίγματος

ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ UV-Vis

- Μια υπεριώδης ακτινοβολία οδηγείται μέσω μια **κυψελίδας ροής** και ένας αισθητήρας μετρά το φως που διέρχεται μέσα από αυτή
- Αν μια ουσία που εκλούεται από τη στήλη **απορροφά αυτή τη φωτεινή ενέργεια** αλλάζει το φως που θα πέσει στον αισθητήρα άρα και το σήμα
- Η **αλλαγή αυτή στον αισθητήρα** μετατρέπεται από τον ενισχυτή (amplifier) σε διαφορετικό ηλεκτρικό σήμα και έτσι στο χρωματογράφημα παρατηρούνται οι κορυφές
- Σε κάποιες περιπτώσεις παρέχεται ταυτόχρονα και **φάσμα UV** που οδηγεί στην ταυτοποίηση των αναλυτών



Schematic of variable wavelength detector (VWD)



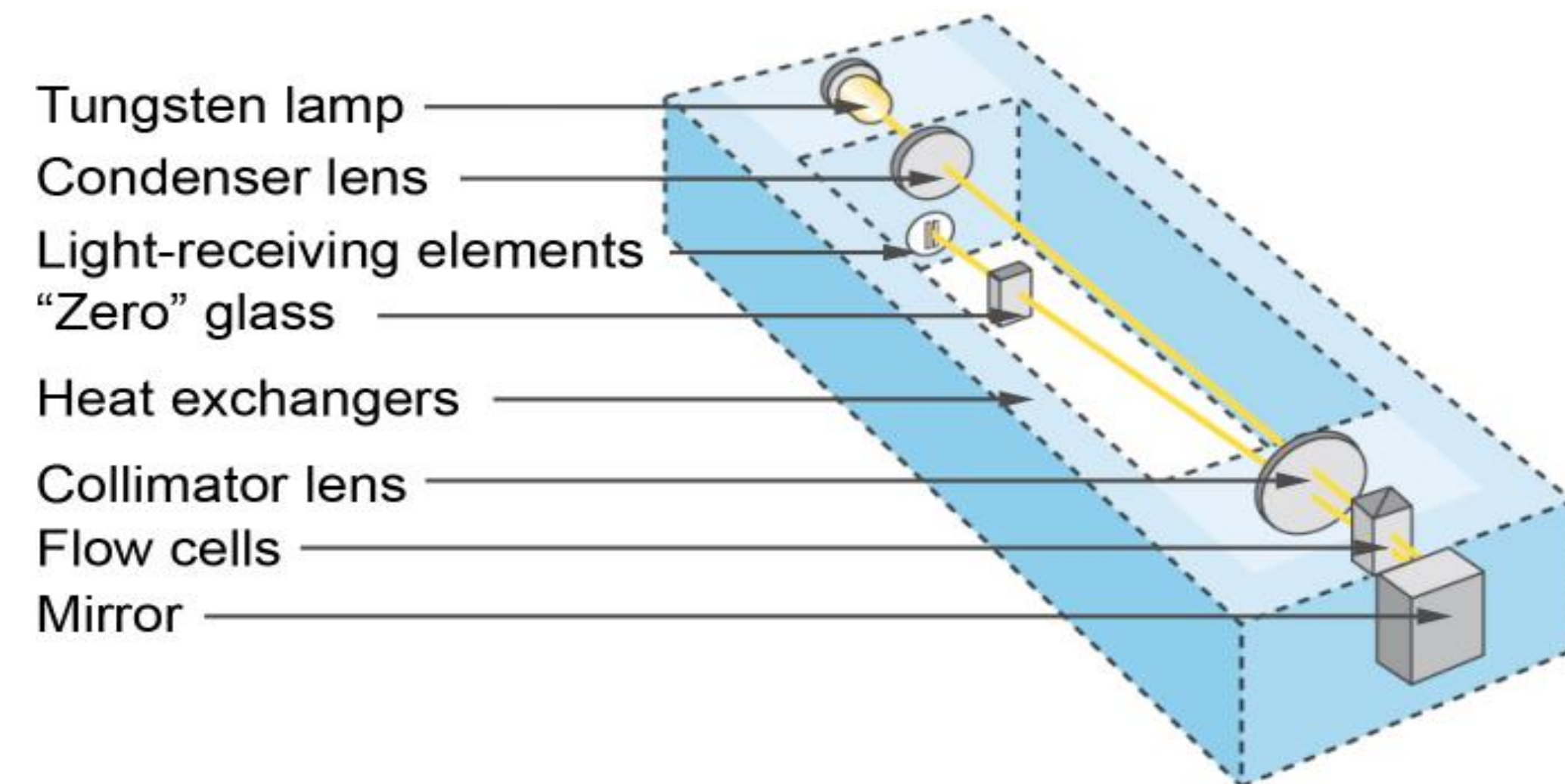
Schematic of diode array detector (DAD/PDA)

Χαρακτηριστικά ανιχνευτή UV-Vis

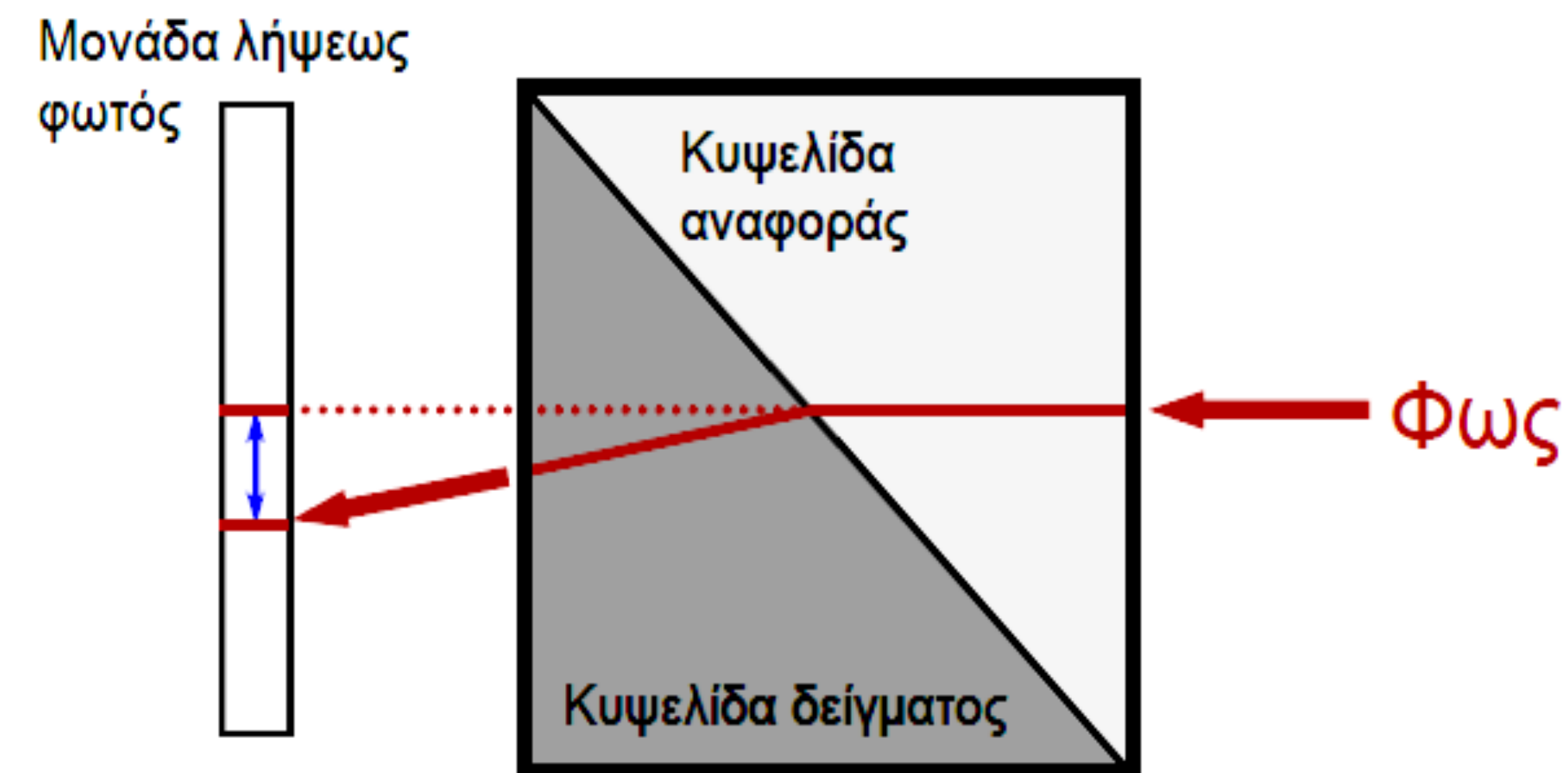
- ✓ Ευαισθησία ανιχνευτή UV-Vis εξαρτάται από μοριακή απορροφητικότητα συστατικών
- ✓ Συνήθως χρησιμοποιείται στην περιοχή 0,01 μg/mL
- ✓ Αδιάφορος σε μεταβολές θερμοκρασίας
- ✓ Σχετικά οικονομικός
- ✓ Μπορεί να εφαρμοσθεί και στη βαθμιδωτή έκλυση
- ✓ Αποκρίνεται σε μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων (περισσότερο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής, στο 80% των αναλύσεων HPLC)
- ✓ Με ανιχνευτή DAD, λαμβάνεται και το φάσμα κάθε εκλούμενου συστατικού
- ❖ Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με διαλύτες κινητής φάσης που απορροφούν ισχυρά στο UV
- ❖ Δεν μπορούν να χρησιμοποιηθεί σε διαχωρισμούς συστατικών που δεν απορροφούν στο UV, εκτός και εάν σχηματιστούν παράγωγα

Ανιχνευτές Δείκτη διάθλασης (Refractive Index detectors-RI)

- Η ικανότητα μιας ουσίας ή διαλύτη να διαθλά το φως παρέχει και έναν τρόπο ανίχνευσης της
- Ο Δείκτης Διάθλασης είναι ένα μέτρο της ικανότητας ενός μορίου να εκτρέπει το φως μέσα σε μια κυψελίδα ροής της κινητής φάσης σε σχέση με μια κυψελίδα αναφοράς στη στατική φάση
- Το ποσό της εκτροπής είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της ουσίας



Schematic of a Deflection Type of RI Detector



Χαρακτηριστικά ανιχνευτή RI

✓ Αποκρίνεται σε όλες σχεδόν τις ενώσεις (Γενικός ανιχνευτής)

❖ Σχετικά μικρή ευαισθησία (κατάλληλος για περιοχή 1- 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

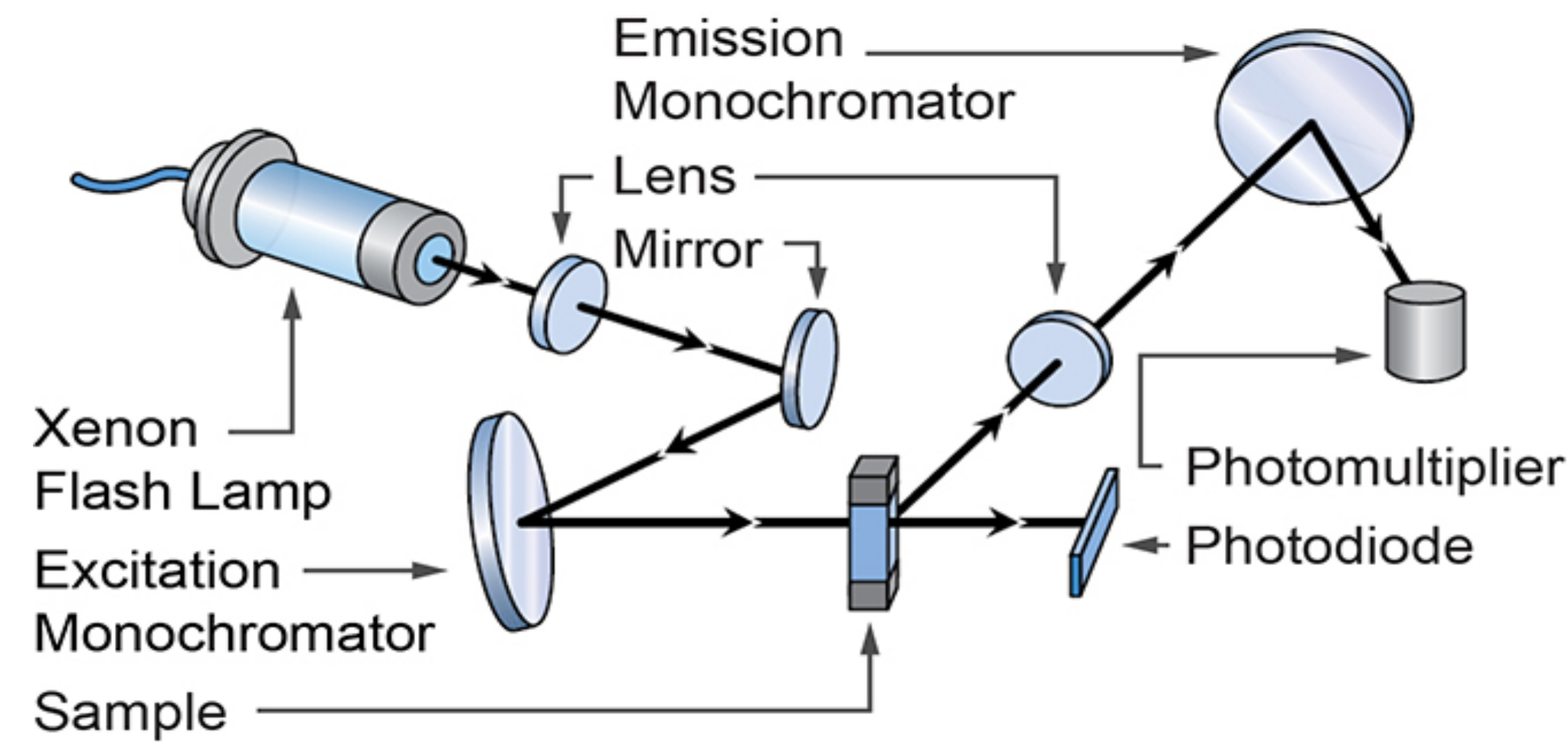
❖ Αδυναμία χρήσεως σε βαθμιδωτή έκλυση (χρησιμοποιείται μόνο στην ισοκρατική έκλυση γιατί στη βαθμιδωτή αλλάζει ο δείκτης διάθλασης κινητής φάσης)

❖ Ευαισθησία σε μεταβολές θερμοκρασίας

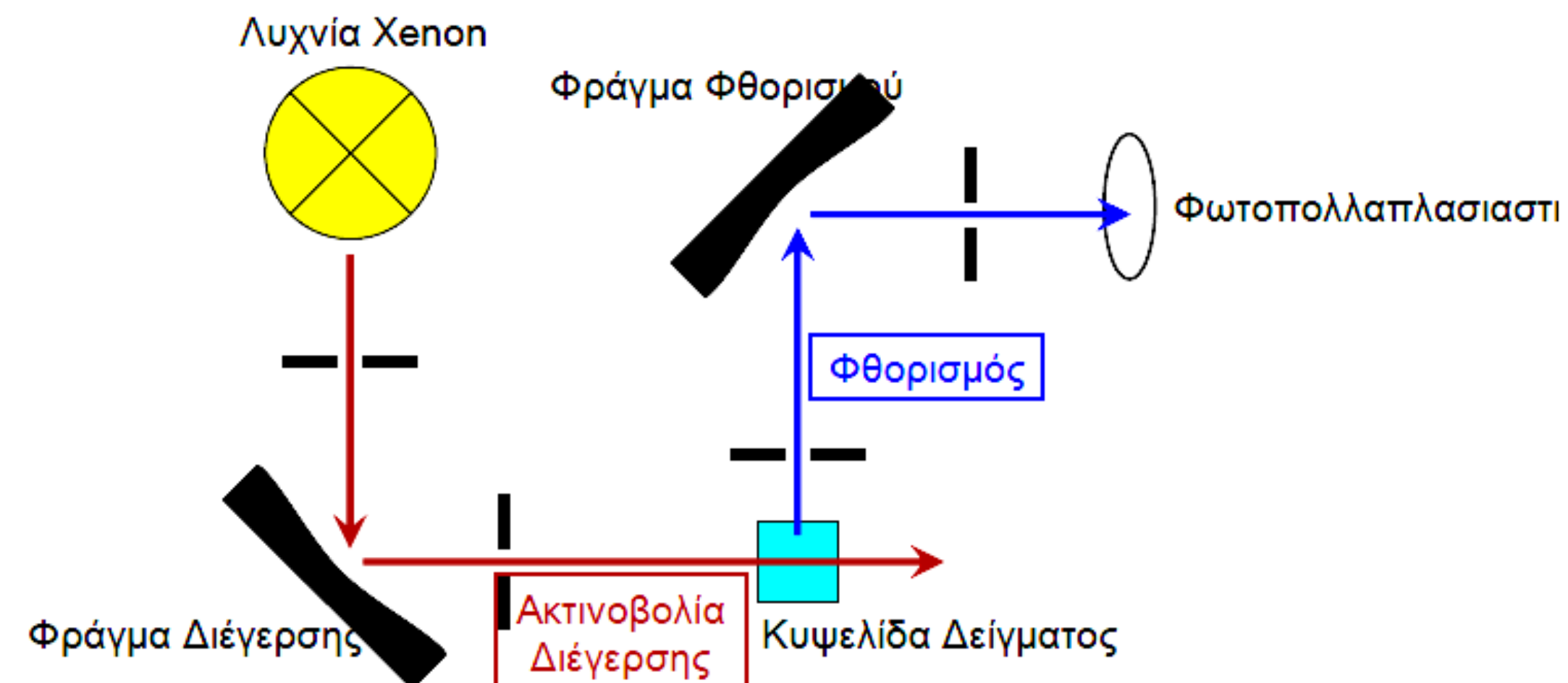
Ανιχνευτές Φθορισμού (Fluorescence Detector)

➤ Ο ανιχνευτής αυτός είναι **ανάλογος του UV-Vis** αλλά για ενώσεις που φθορίζουν (ειδικός ανιχνευτής)

✓ Προσφέρει **πολύ υψηλότερη ευαισθησία** επιτρέποντας την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φθορίζουσών ουσιών ακόμα και σε ίχνη (trace analysis)

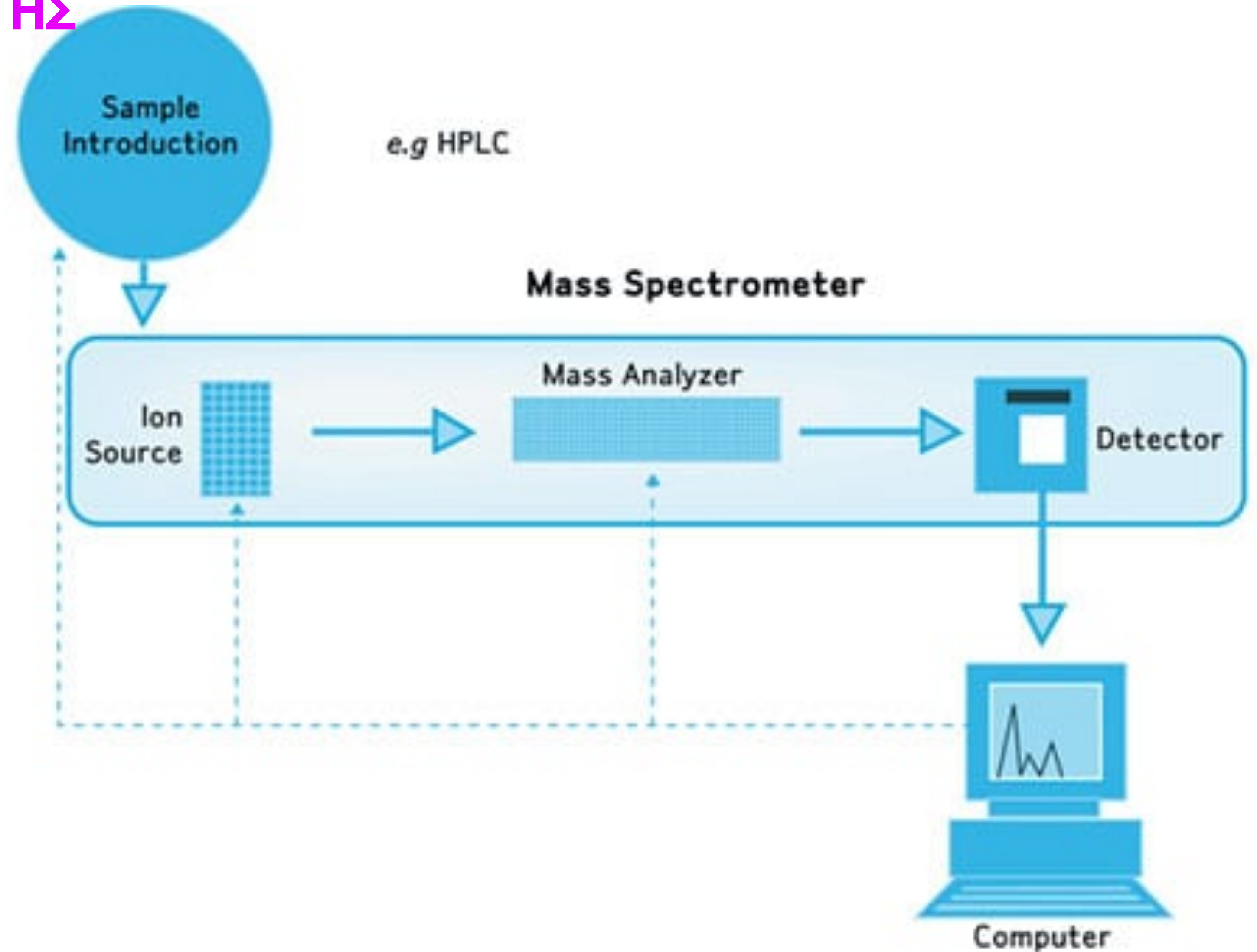


Σχεδιάγραμμα ενός ανιχνευτή Φθορισμού



ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

- Αμέσως μετά το UV-Vis, ο πιο πολύ χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής στην HPLC.
- Δίνει τη δυνατότητα με μία ανάλυση να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν μεγάλος αριθμός ενώσεων (>500 ενώσεις) => μικρός χρόνος ανάλυσης.
- Δυνατότητα πλήρους ταυτοποίησης.
- Μεγάλη επίδραση από την οργανολογική αστάθεια και την επίδραση μήτρας.
- Ανάλογα με την εφαρμογή υπάρχουν παραλλαγές σε σχέση με την επιλογή του τρόπου ανίχνευσης της μάζας.
- Καλή σύνδεση με RP και HILIC στήλες.



HPLC vs UPLC

Εξέλιξη της HPLC αποτελεί η ultra pressure liquid chromatography (UPLC)

Δεν αλλάζει κάτι στην οργανολογία, παρακάτω είναι 5 διαφορές της HPLC με την UPLC:

1. Χαμηλότερες ροές συνήθεις ροές HPLC 1-2 mL/min σε 0,2-0,7 mL/min στην UPLC
2. Υψηλότερες πιέσεις HPLC max 400 bar => UPLC max 1500 bar
3. Διαστάσεις Στατικής φάσης: Τυπικές διαστάσεις HPLC 4.6 x 250 mm => UPLC 2.1 x 100 mm
4. Μέγεθος σωματιδίων Στατικής φάσης: HPLC 3-5 μm => UPLC <2 μm
5. Στην UPLC οι κορυφές που παράγονται είναι στενότερες και υπάρχουν κάποιοι ανιχνευτές (π.χ. φασματομέτρα μάζας) που δουλεύουν ορθότερα σε χαμηλές ροές.

HPLC χρησιμοποιείται κυρίως σε ρουτίνα ενώ η UPLC σε ερευνητικές εφαρμογές

UPLC

Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα



Πλεονεκτήματα

Μικρότερες στήλες, καλύτεροι διαχωρισμοί σε μικρότερο χρόνο

Καλύτερος διαχωρισμός και στενές κορυφές λόγω του μικρότερου μεγέθους σωματιδίων

Χαμηλότερο κόστος χρήσης, λόγω μικρότερης κατανάλωσης διαλυτών



Μειονεκτήματα

Μεγαλύτερο κόστος αγοράς, έχει τμήματα που πρέπει να είναι από ειδικά υλικά ώστε να αντέχουν σε υψηλές πιέσεις.

Η μετατροπή δεν είναι πάντα φθηνή γιατί πρέπει να αλλάξουν οι στήλες.

Παράγοντες που επηρεάζουν τις γρήγορες τεχνικές HPLC

- Οι παράγοντες που επηρεάζουν μια ανάλυση με HPLC περιγράφονται συνοπτικά στον πίνακα που ακολουθεί
- Γενικά σε γρήγορη υγροχρωματογραφική ανάλυση οδηγούν
 - ✓ Οι μικρού μήκους στήλες
 - ✓ Η υψηλή θερμοκρασία
 - ✓ Οι μεγάλες ταχύτητες ροής

Παράμετροι	Μήκος στήλης (L)	Ταχύτητα ροής (F)	Διάμετρος σωματιδίων (d_p)	Θερμοκρασία στήλης (T)
Χρόνος ανάλυσης	$\propto L$	$\propto 1/F$	Έμμεσα συσχετίζονται	$\propto 1/T^x$
Πίεση στα άκρα της στήλης	$\propto L$	$\propto F$	$\propto 1/(d_p)^2$	$\propto 1/T$
Απόδοση στήλης	$\propto L$	Σύμφωνα με την εξίσωση van Deemter	$\propto 1/d_p$	$\propto T$

Στήλες μικρού μήκους

➤ Η χρήση μιας στήλης μικρού μήκους ελαττώνει το χρόνο διαχωρισμού. Ταυτόχρονα, η διαχωριστικότητα μειώνεται λόγω της μείωσης του αριθμού των θεωρητικών πλακών (N). Γενικά, το μήκος της στήλης είναι ανάλογο του χρόνου κατακράτησης του αναλύτη, της απόδοσης της στήλης και της πίεσης στα άκρα της.

✓ Μείωση του μήκους της στήλης είναι αποδεκτή μόνον εφ' όσον η απόδοση της στήλης παραμένει ικανοποιητική.

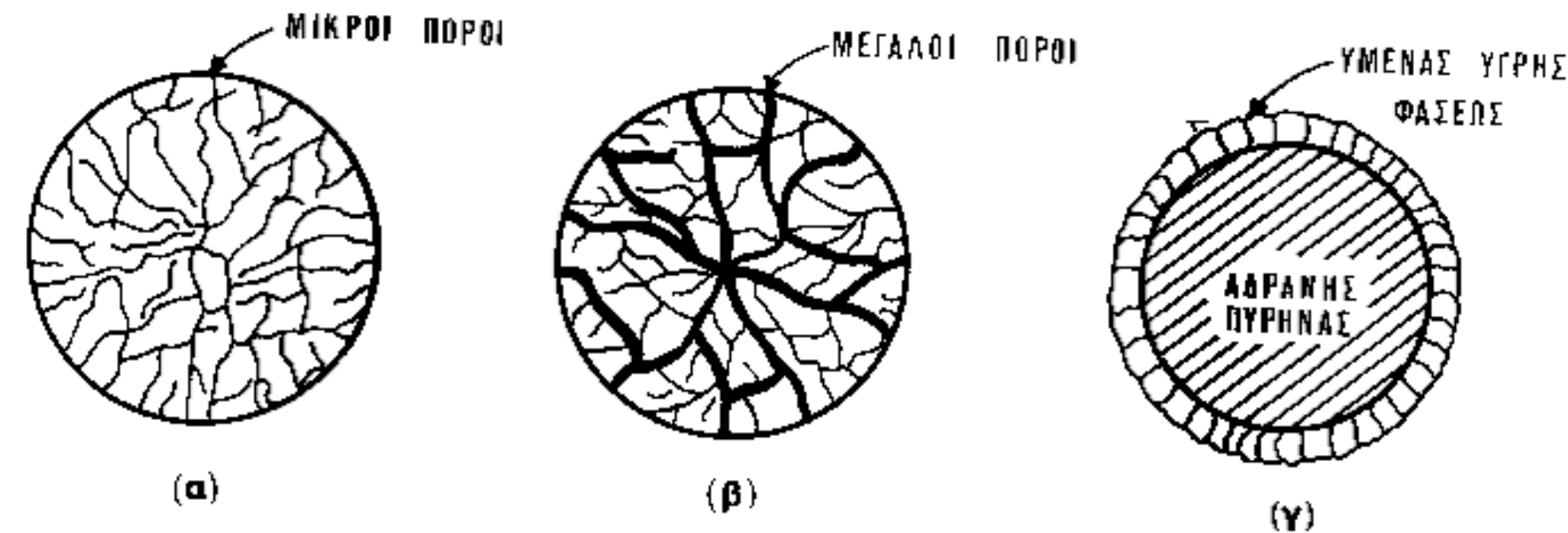
✓ Η χρήση μικροσωματιδίων πληρωτικού υλικού συνδυασμένη με μικρού μήκους στήλη εξουδετερώνει τη μείωση της απόδοσης της στήλης. Όμως, η αύξηση της πίεσης στα άκρα της στήλης περιορίζει την περαιτέρω μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού.

Αύξηση ταχύτητας ροής

- Η αύξηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης είναι ένας ακόμη τρόπος μείωσης του χρόνου έκλουσης.
- ✓ Μια βέλτιστη τιμή ταχύτητας ροής έχει καθιερωθεί για τις συνήθεις στήλες, που ουσιαστικά αντιστοιχεί στη μέγιστη απόδοση της στήλης, σύμφωνα με το διάγραμμα Van Deemter.
- Διπλασιάζοντας την ταχύτητα ροής, το κέρδος σε χρόνο ανάλυσης είναι τόσο όσο αν υποδιπλασιαζόταν το μήκος της στήλης. Αυξάνοντας την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, το αποτέλεσμα είναι μικρότερη μείωση του αριθμού των θεωρητικών πλακών από ότι εάν μειωθεί το μήκος της στήλης.
- ❖ Δυστυχώς, η ταχύτητα ροής είναι ανάλογη της πίεσης στα άκρα της στήλης. Οι περισσότερες γρήγορες αναλύσεις λαμβάνουν χώρα σε ταχύτητες ροής στη μέγιστη δυνατή τιμή που επιτρέπει η πίεση στα άκρα της στήλης και του συστήματος.

Σωματίδια πληρωτικού υλικού

- Μικροπορώδη σωματίδια (microporous particles) Διάμετρο $<10 \mu\text{m}$ και σχετικά μικρούς πόρους, επιτρέπουν δίοδο και αλληλεπίδραση με τη στατική φάση μόνο με μικρού μεγέθους συστατικά
- Μακροπορώδη σωματίδια (macroporous particles) Εκτός από μικρούς μοριακούς πόρους διαθέτουν και μεγάλους πόρους (διάμετρος $> 60 \mu\text{m}$), που επιτρέπουν τη δίοδο μικρών και μεγάλων συστατικών
- Υμενοειδή σωματίδια (pellicular particles) Διαμέτρου $35-45 \mu\text{m}$, διαθέτουν αδρανή πυρήνα καλυμμένο με υμένα υγρής στατικής φάσης



- Στήλες με **μικρό μέγεθος σωματιδίων** (π.χ. $2 \mu\text{m}$) οδηγούν σε γρήγορη ανάλυση λόγω της καλύτερης χρωματογραφικής τους απόδοσης.

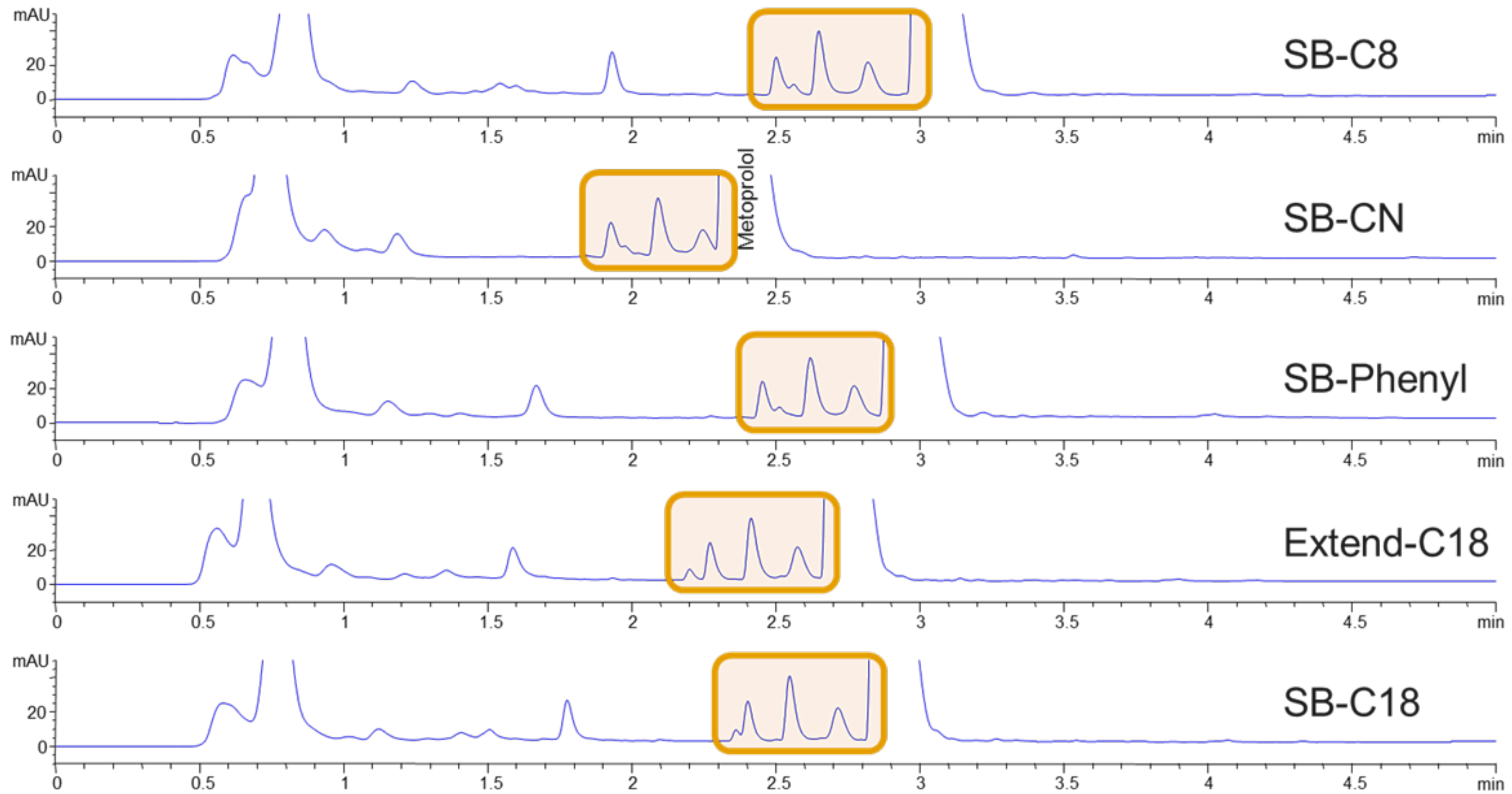
- ❖ Υψηλή πίεση στα άκρα των στηλών
- ❖ Πιθανότερη έμφραξη των στηλών

Επίδραση της θερμοκρασίας στον διαχωρισμό

- Η εύρεση της **βέλτιστης θερμοκρασίας** αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην ανάπτυξη μιας μεθόδου HPLC
- **Αύξηση της θερμοκρασίας**
 - ✓ Μειώνει το ιξώδες της κινητής φάσης και έτσι μειώνει την πίεση επιτρέποντας υψηλότερες ταχύτητες ροής, ταχύτερους διαχωρισμούς, καλύτερη αποδοτικότητα
 - ✓ Αυξάνει τη μεταφορά μάζας και άρα την αποδοτικότητα και τη διαχωριστικότητα
 - ✓ Μειώνει τον χρόνο ανάλυσης χωρίς να μειώνεται η διαχωριστικότητα
 - ✓ Μπορεί να αλλάξει την εκλεκτικότητα για βελτιστοποίηση της διαχωριστικότητας
- ❖ Η αύξηση της θερμοκρασίας **περιορίζεται** από
 - ✓ Πιθανή θερμική διάσπαση των αναλυτών
 - ✓ Πιθανή θερμική διάσπαση της στατικής φάσης
 - ✓ Το ΔT της κινητής φάσης

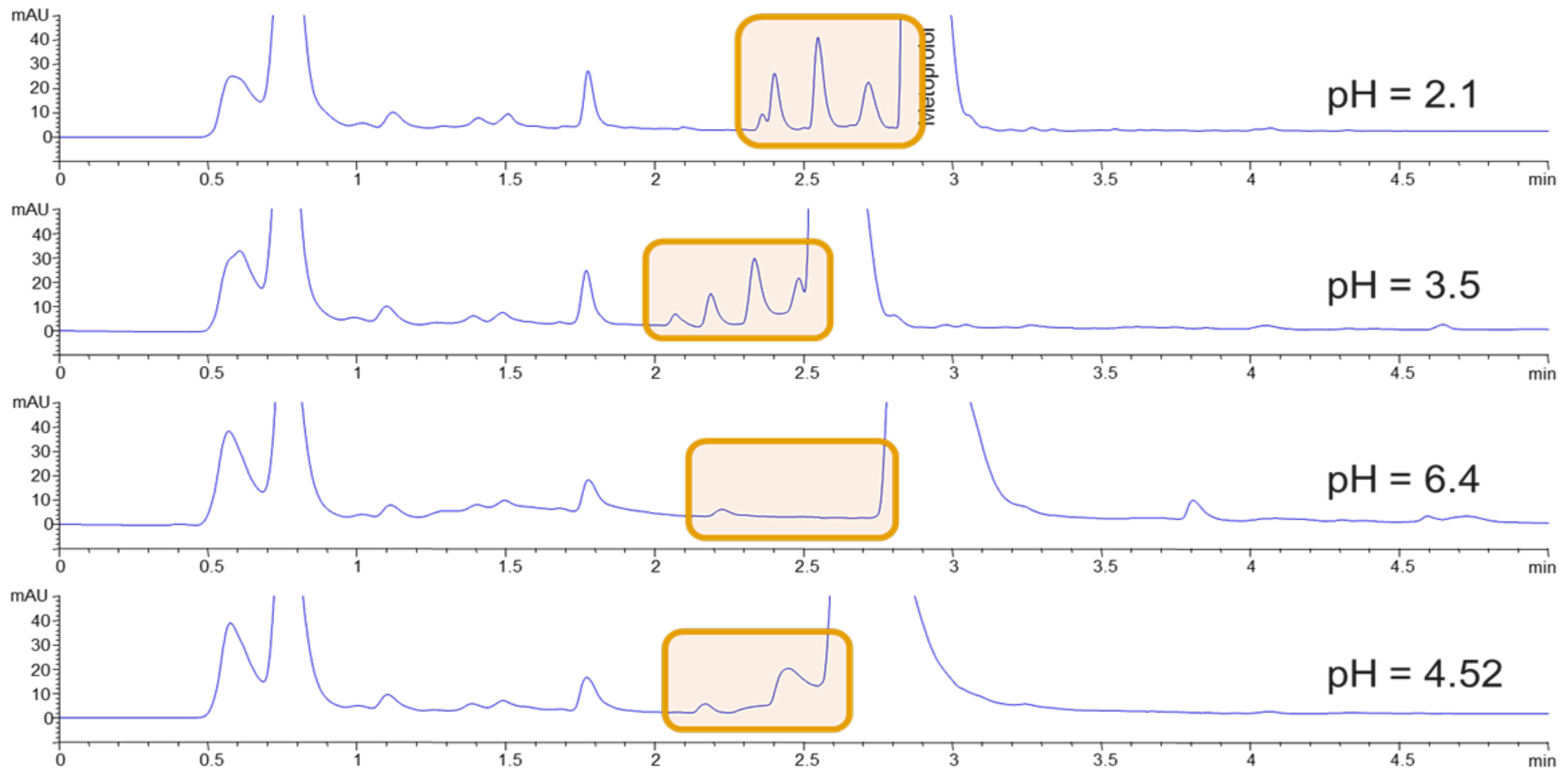
Παραδείγματα επίδρασης στον διαχωρισμό (1)

- Το ίδιο δείγμα έχει αναλυθεί με **διαφορετικές στατικές φάσεις** αλλά με την ίδια κινητή φάση και το ίδιο gradient αλλά και στην ίδια θερμοκρασία



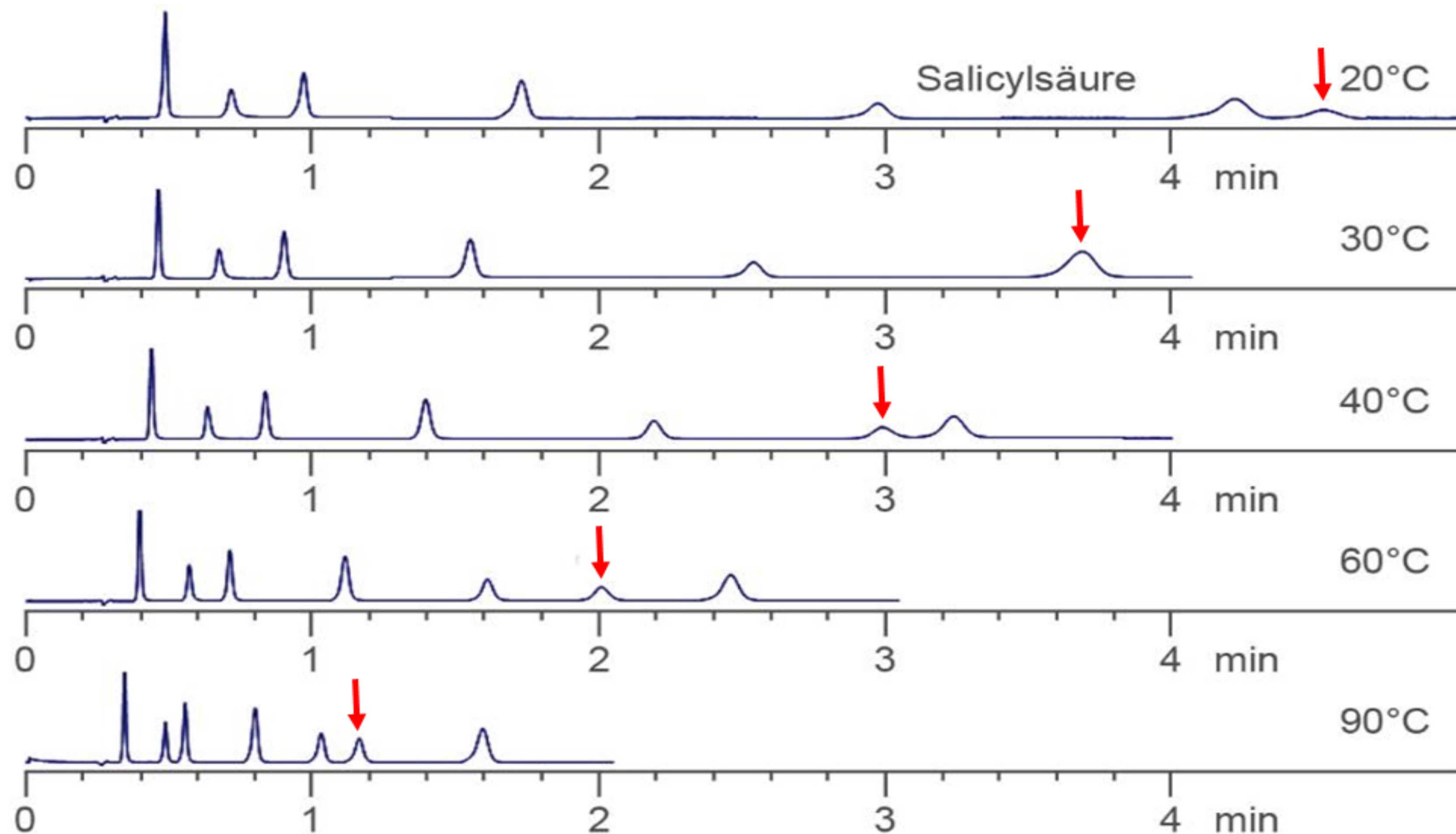
Παραδείγματα επίδρασης στον διαχωρισμό (2)

- Το ίδιο δείγμα έχει αναλυθεί με **διαφορετικές κινητές φάσεις** αλλά με το ίδιο gradient, την ίδια στατική φάση και την ίδια θερμοκρασία



Παραδείγματα επίδρασης στον διαχωρισμό (3)

- Το ίδιο δείγμα έχει αναλυθεί με την ίδια κινητή φάση, το ίδιο gradient, την ίδια στατική φάση αλλά **σε διαφορετικές θερμοκρασίες**



Θεμελιώδης εξίσωση της HPLC

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4} \sqrt{N}}_{\text{Efficiency}} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)}_{\text{Selectivity}} \cdot \underbrace{\left(\frac{k}{1+k}\right)}_{\text{Retention}}$$

Efficiency Selectivity Retention

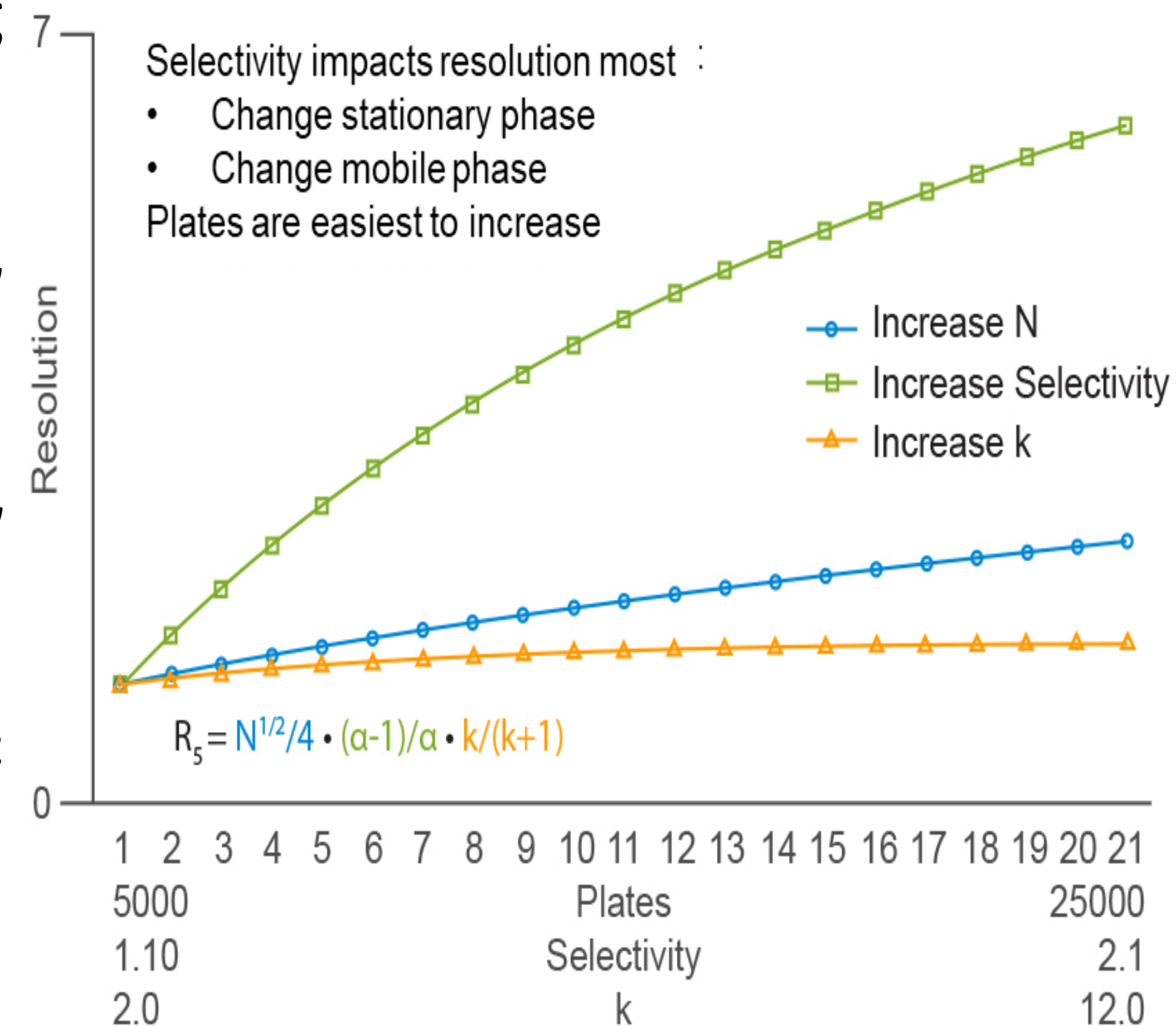
➤ Η διαχωριστικότητα είναι συνάρτηση της αποδοτικότητας (efficiency, **N**), της εκλεκτικότητας (selectivity, **a**) και του παράγοντα κατακράτησης **k** (retention)

➤ Ο διαχωρισμός μπορεί να βελτιωθεί με βελτίωση των 3 αυτών παραμέτρων

✓ Η εκλεκτικότητα έχει την μεγαλύτερη επιρροή στη διαχωριστικότητα. Μικρές αλλαγές στην εκλεκτικότητα και στον παράγοντα διαχωρισμού **a** οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στη διαχωριστικότητα

✓ Ο παράγοντας κατακράτησης έχει σημαντική συνεισφορά σε χαμηλές τιμές του **k**

✓ Η αποδοτικότητα εκφράζει την διαχωριστική ισχύ κάθε στήλης (**N**)



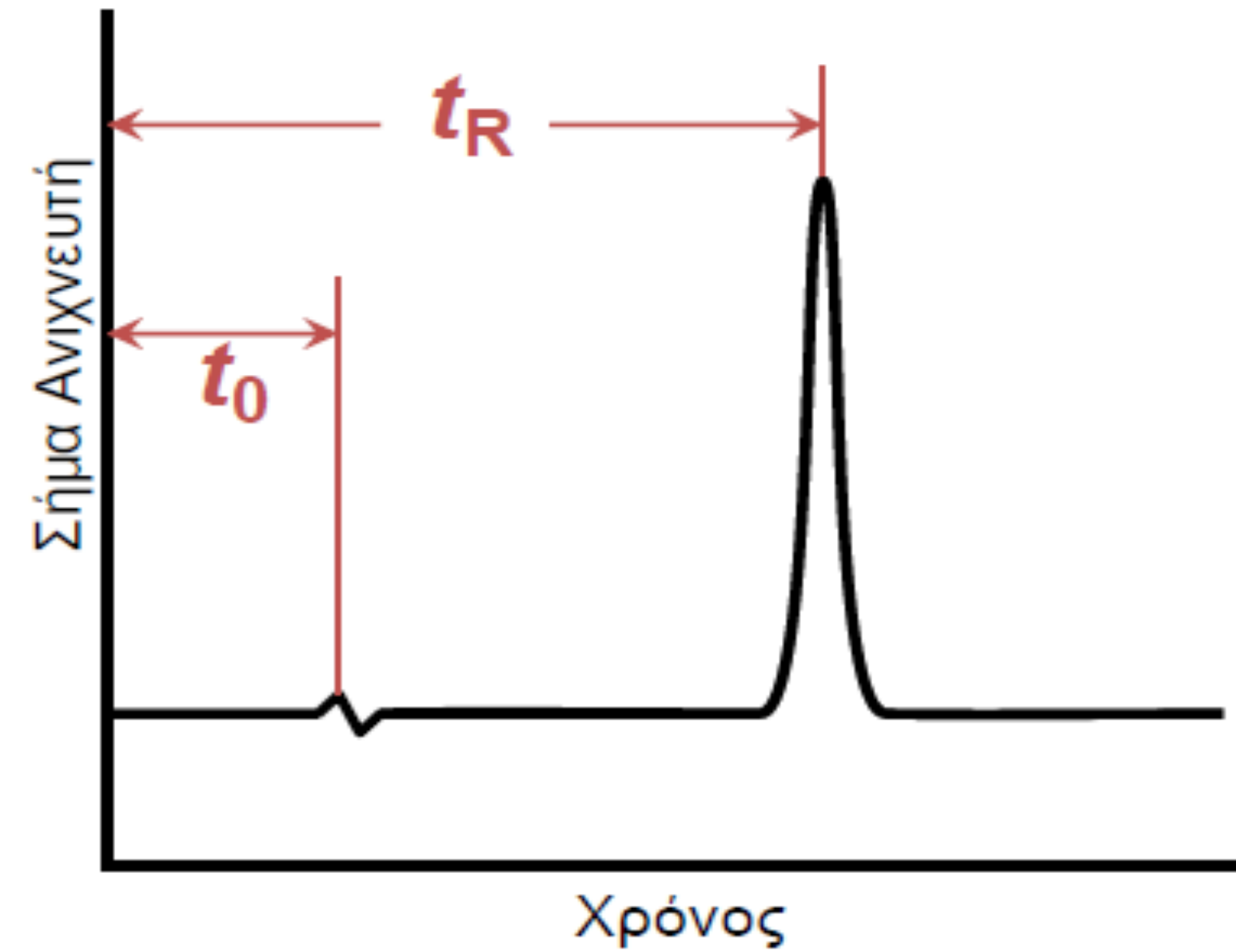
Αποδοτικότητα (Efficiency, N)

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2$$

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

- Η αποδοτικότητα της στήλης χρησιμοποιείται για να **συγκρίνουμε την απόδοση διαφορετικών στηλών** και εκφράζεται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών (N)
- **Στήλες με υψηλό N είναι πιο αποδοτικές.** Αυτό μεταφράζεται σε πιο οξείες κορυφές στο χρωματογράφημα συγκριτικά με άλλη στήλη με μικρότερο αριθμό N.
- Οι παράμετροι που επηρεάζουν τον αριθμό N άρα και την αποδοτικότητα είναι:
 - ✓ Το μήκος της στήλης (Αύξηση του μήκους σημαίνει αύξηση του N)
 - ✓ Διάμετρος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού (Μείωση διαμέτρου σημαίνει αύξηση του N)

Παράγοντας κατακράτησης k



$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Ο παράγοντας κατακράτησης αποτελεί τον χρόνο που ο αναλύτης παραμένει στη στατική φάση σε αντιστοιχία με τον χρόνο που παραμένει στην κινητή φάση.

Παράγοντες που επηρεάζουν τον παράγοντα κατακράτησης

✓

Η στατική φάση

✓

Η κινητή φάση

✓

Η επιλογή της βαθμιδωτής έκλουσης και του όγκου ανάμεσα στον αναμίκτη και τη στήλη

Παράγοντας κατακράτησης k (gradient)

$$k = \frac{t_G \cdot F}{S \cdot \Delta\Phi \cdot V_m}$$

- Η εξίσωση δείχνει πως ο παράγοντας κατακράτησης επηρεάζεται από την ταχύτητα ροής (F), τον χρόνο ολοκλήρωσης του gradient (t_g), την αλλαγή στον όγκο του διαλύτη B κατά την εφαρμογή του gradient ($\Delta\Phi$) και τον όγκο της κινητής φάσης στη στήλης (V_m)
- Το S είναι μια σταθερά που παίρνει τιμές 4-5 για μικρά μόρια και 10-1000 για πεπτίδια και πρωτεΐνες

Για να παραμείνει σταθερός ο παράγοντας k

- ✓ Μείωση του μήκους της στήλης αντισταθμίζεται με μείωση του t_g ή του F και αύξηση του $\Delta\Phi$
- ✓ Μείωση της διαμέτρου της στήλης αντισταθμίζεται με μείωση του t_g ή του F και αύξηση του $\Delta\Phi$
- ✓ Μείωση του $\Delta\Phi$ αντισταθμίζεται με μείωση του t_g ή του F

Εκλεκτικότητα (Selectivity)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

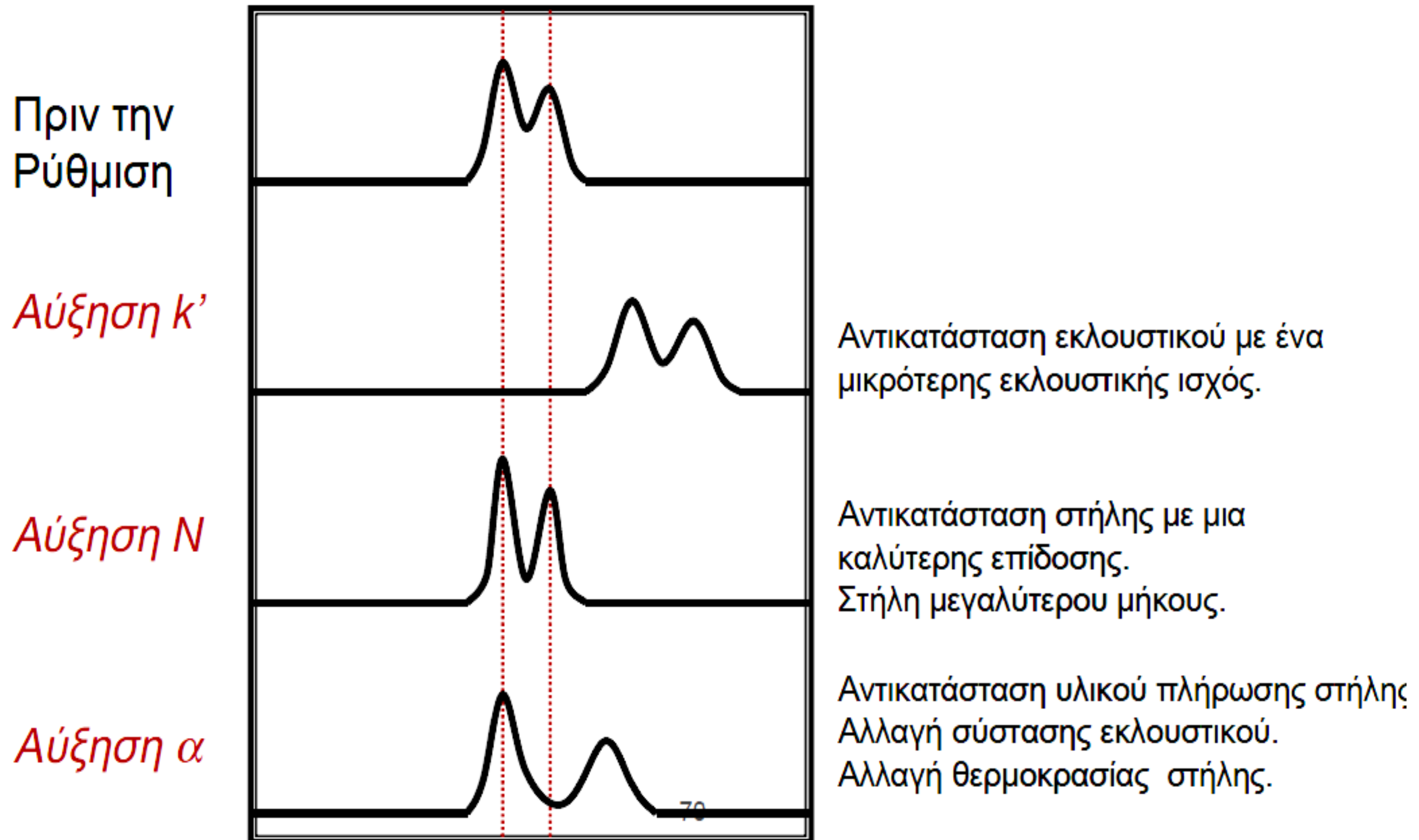
α Εκλεκτικότητα

k_1 Παράγοντας κατακράτησης 1^{ης} κορυφής

k_{2i} Παράγοντας κατακράτησης 2^{ης} κορυφής

- Η εκλεκτικότητα είναι το μέτρο του χρόνου ή της απόστασης ανάμεσα στα μέγιστα δύο κορυφών. **Αν $\alpha=1$** , οι δύο κορυφές έχουν τον ίδιο χρόνο ανάρτησης και **συνεκλούνται**. Πρέπει $\alpha>1$ για να είναι επιτυχημένος ο διαχωρισμός.
- Προσδιορίζεται ως ο λόγος των δύο παραγόντων κατακράτησης
- Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον παράγοντα κατακράτησης είναι:
 - ✓ Η στατική φάση
 - ✓ Η κινητή φάση
 - ✓ Η θερμοκρασία

Επίδραση των 3 παραμέτρων στην διαχωριστικότητα



Γιατί ασχολούμαστε κυρίως με το N και όχι με το a ?

- ❖ Η διαχωριστικότητα αυξάνει αναλογικά με το τετράγωνο του αριθμού N
- ❖ Η αύξηση του αριθμού θεωρητικών πλακών N περιορίζεται από τις συνθήκες της ανάλυσης (χρόνος ανάλυσης, πίεσης)

αλλά

Υψηλός αριθμός θεωρητικών πλακών (N) παρέχει:

- ✓ Οξείες και στενές κορυφές
- ✓ Καλύτερη ανίχνευση
- ✓ Καλύτερο διαχωρισμό πολύπλοκων δειγμάτων
- ✓ Η διαχωριστικότητα αυξάνει ευθέως με την αύξηση του a (εκλεκτικότητας)

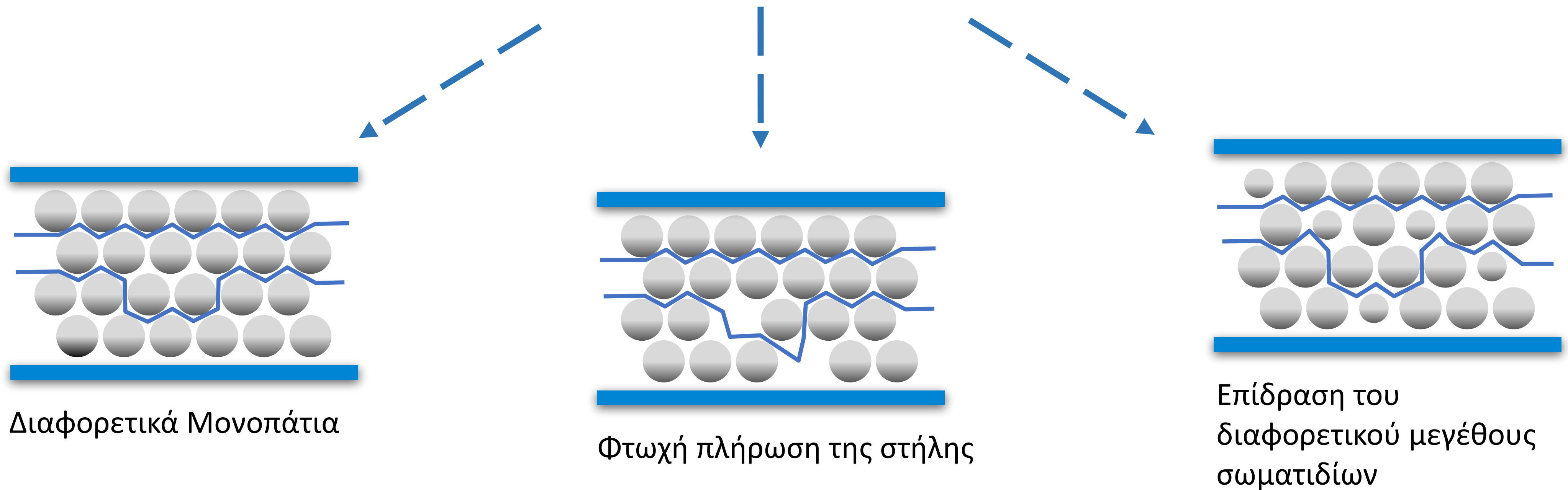
αλλά

- ❖ Είναι δύσκολο να το προβλέψεις κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου, απαιτεί εμπειρία

➤ **Έτσι κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου δίνεται έμφαση στην αύξηση του αριθμού των θεωρητικών πλακών N**

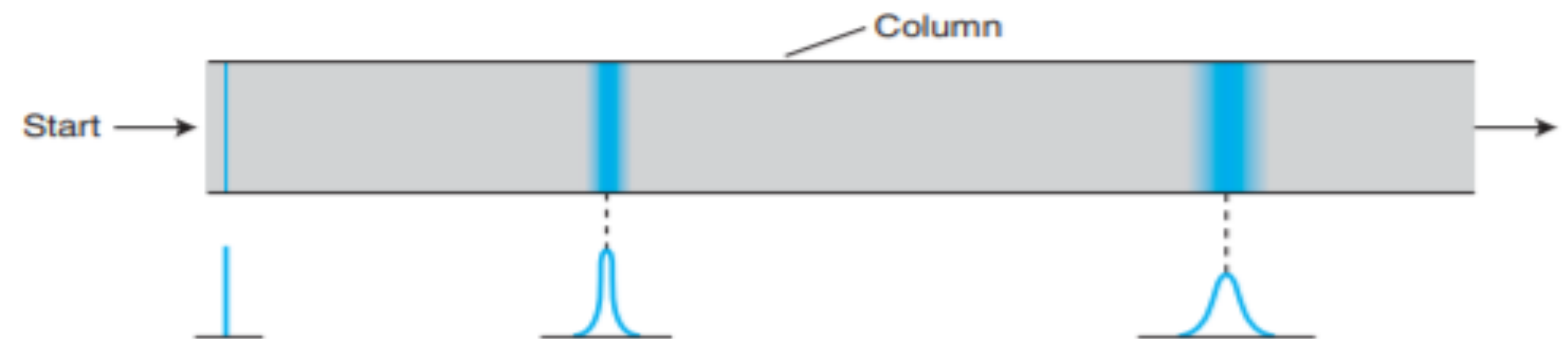
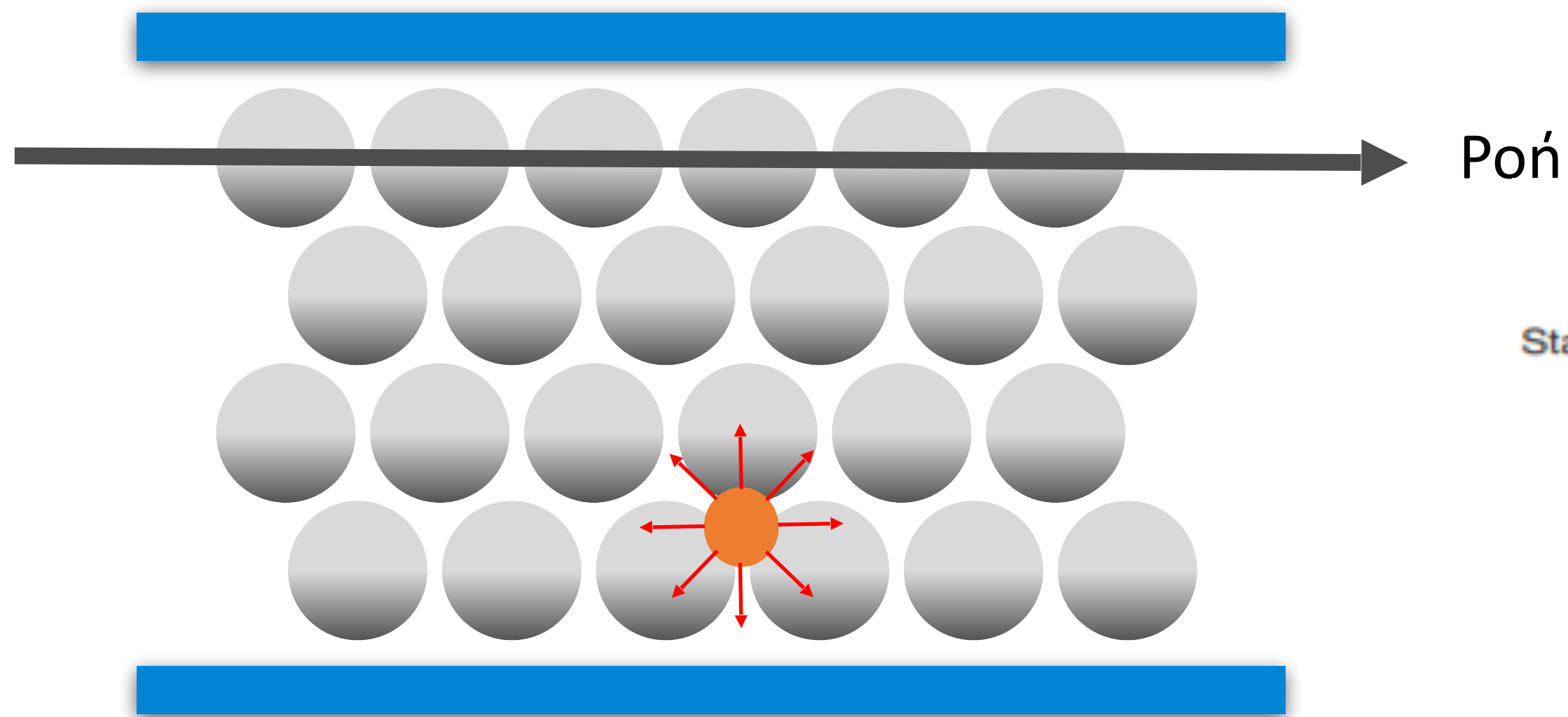
Στροβιλώδης Διάχυση Eddy (Eddy diffusion)

Παρατηρούνται διαφορές ως προς την διάχυση των ουσιών στο πληρωτικό υλικό της στήλης λόγω



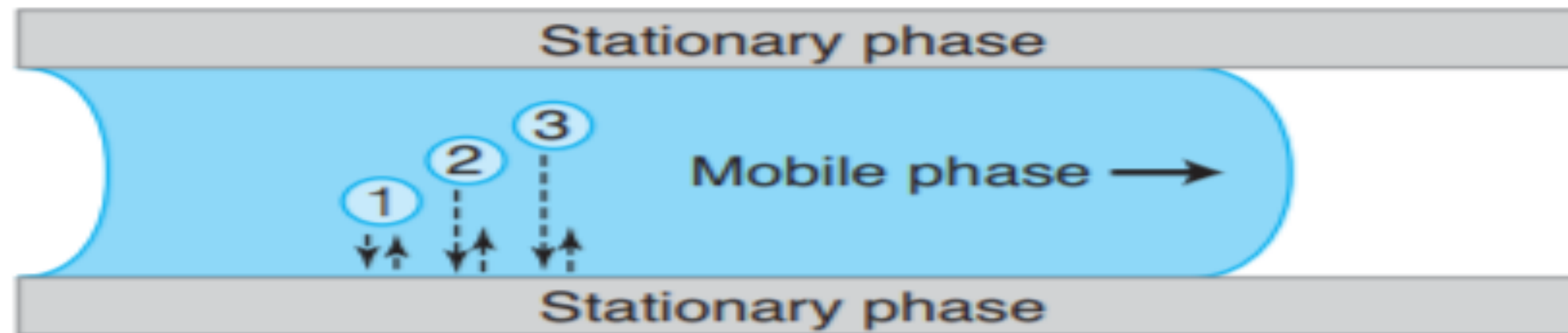
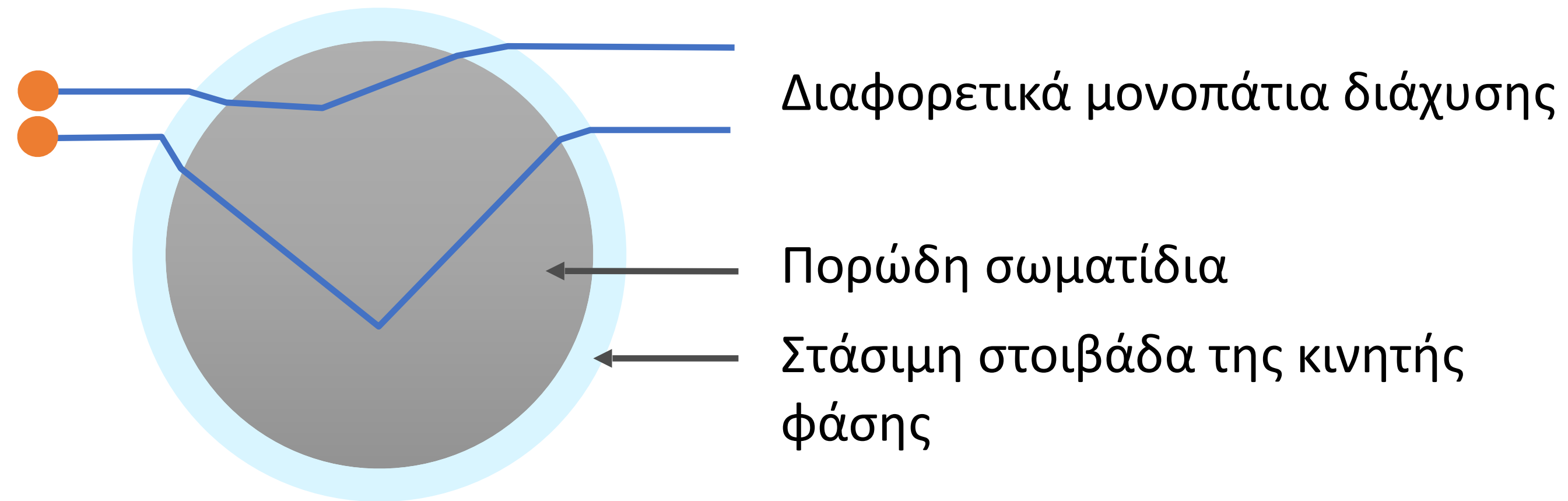
Αξονική και επιμήκης διάχυση (w_{ax})

- Αύξηση του εύρους της κορυφής λόγω αυτοδιάχυσης του αναλύτη
- Σε χαμηλές ταχύτητες ροής ο αναλύτης παραμένει στην κινητή φάση για μεγάλο χρονικό διάστημα
 - ❖ Αύξηση του εύρους της κορυφής
 - ❖ Αυξημένο ύψος της θεωρητικής πλάκας



Αντοχή στη μεταφορά μάζας

$$w_C \sim d_p^2$$



Εξίσωση Van Deemter

- Η εξίσωση Van Deemter συνδέει την αποδοτικότητα της στήλης μέσω του h (ύψους) ως συνάρτηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης λαμβάνοντας όμως υπόψιν και φυσικές, κινητικές και θερμοδυναμικές παραμέτρους του διαχωρισμού
- ✓ Όσο μικρότερο το ύψος h τόσο περισσότερες οι θεωρητικές πλάκες N και τόσο καλύτερος ο διαχωρισμός

$$h = f (w_{eddy} + w_{ax} + w_c)$$

- Στροβιλώδης διάχυση Eddy

- Αξονική και διαμήκης διάχυση

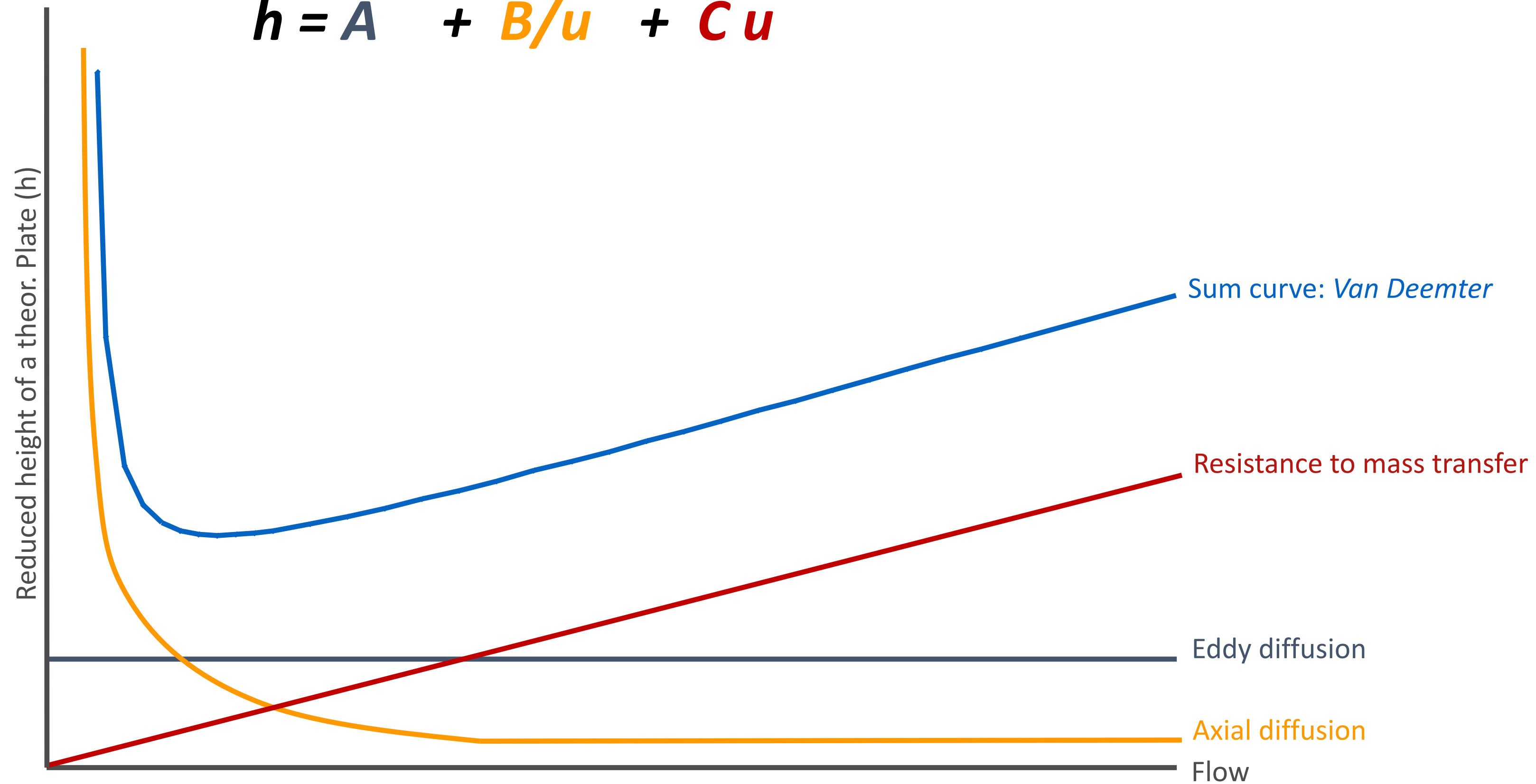
$$h = A + B/u + C u$$

- Αντοχή στη μεταφορά μάζας

- Μικρότερα σωματίδια της στατικής φάσης οδηγούν σε μικρότερες τιμές **A και C**. Έτσι, επιτρέπονται ταχύτεροι διαχωρισμοί με την ίδια διαχωριστική ικανότητα.

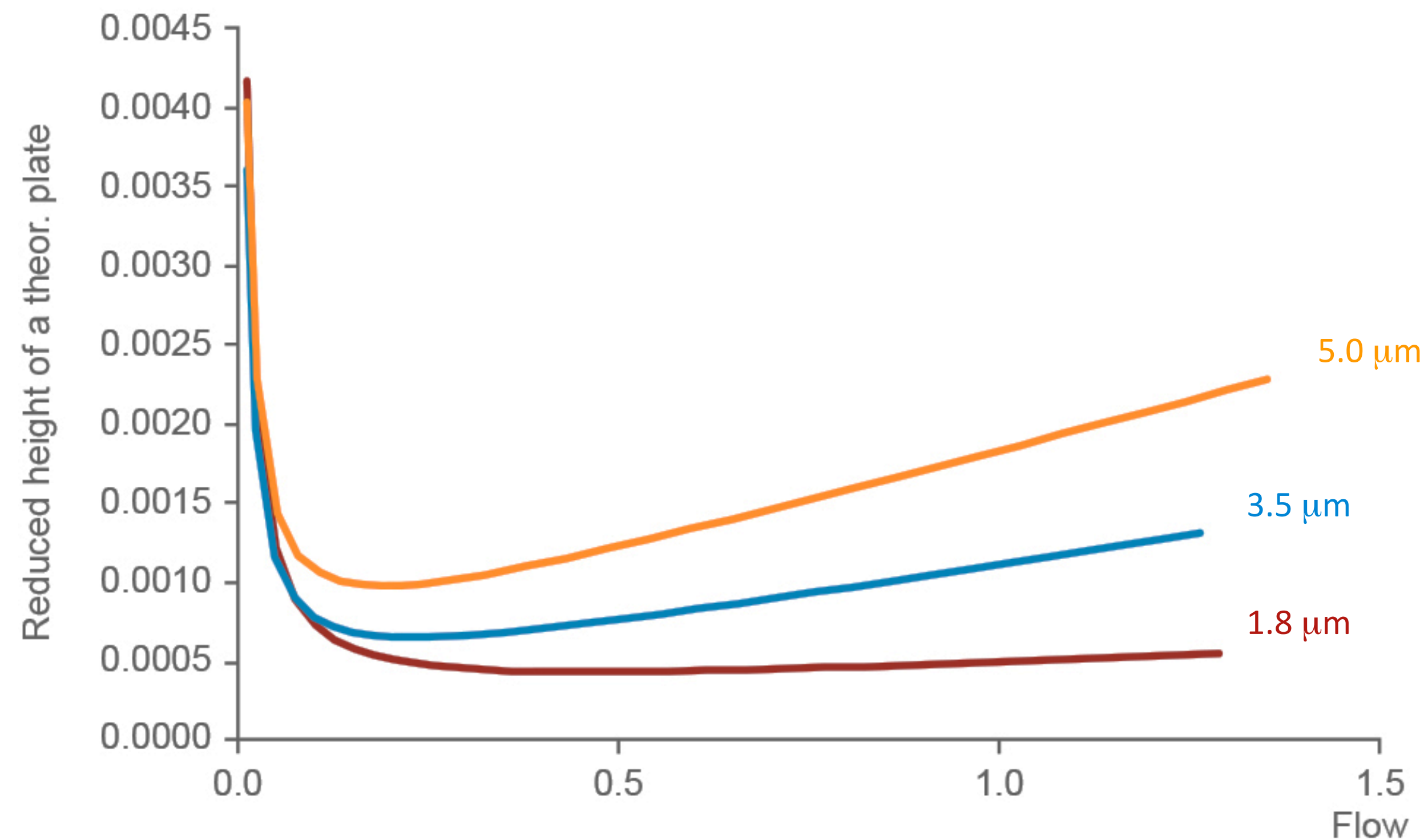
Διάγραμμα Van Deemter

$$h = A + B/u + Cu$$

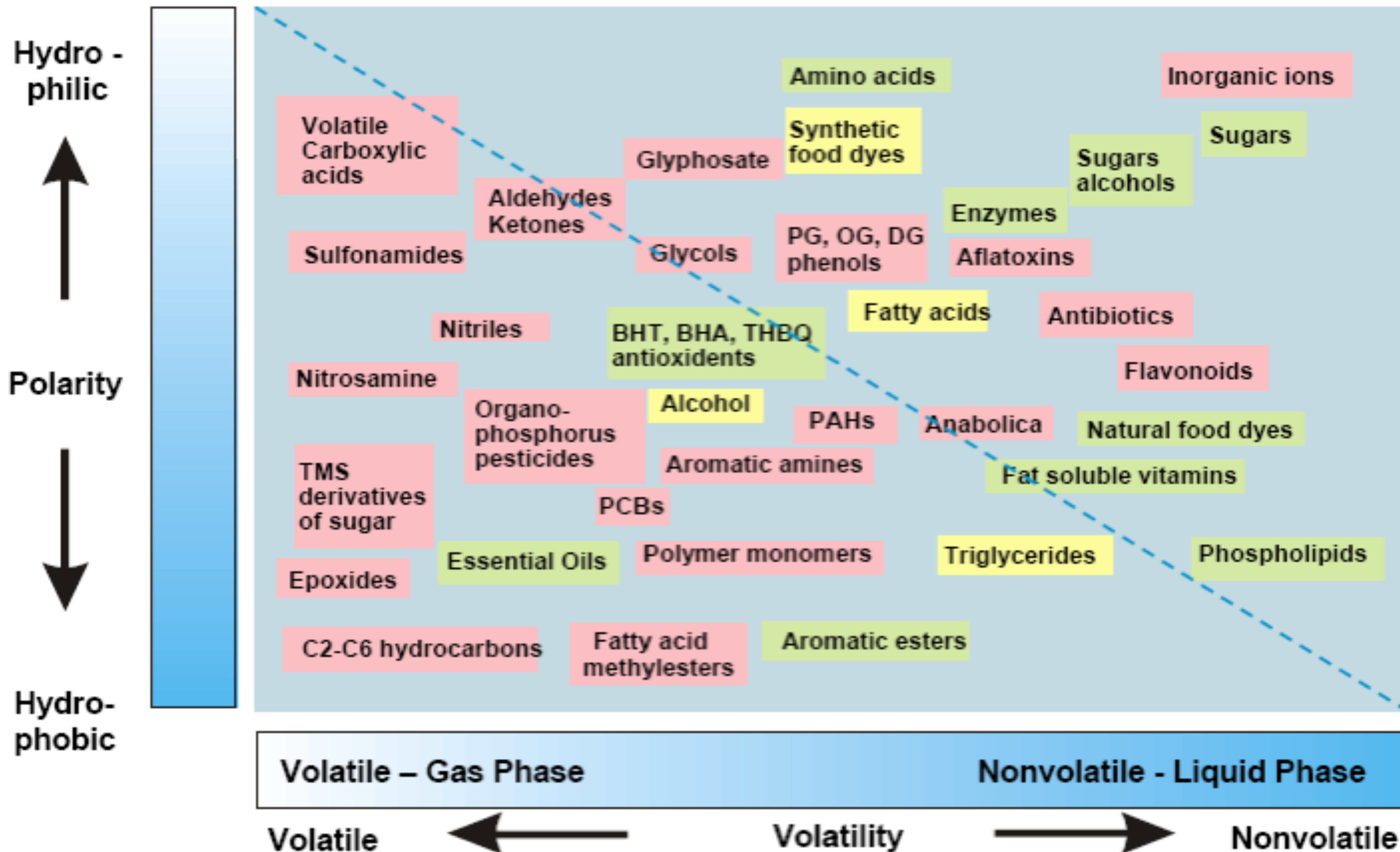


Εξίσωση Van Deemter (ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων της στατικής φάσης)

- Τα μικρότερα σωματίδια της στατικής φάσης οδηγούν σε χαμηλότερο ύψος θεωρητικών πλακών άρα σε καλύτερη διαχωριστικότητα
- Για τα μικρότερα σωματίδια η διαχωριστικότητα επηρεάζεται λιγότερο από την αύξηση της ταχύτητας ροής
- Η βέλτιστη ταχύτητα ροής εξαρτάται από τον κάθε αναλύτη



GC ή LC?



Σύγκριση GC- HPLC

	GC	HPLC
Θερμική αστάθεια	Κυρίως για θερμοσταθερές ενώσεις (Υψηλές θερμοκρασίες κατά την εισαγωγή)	Η ανάλυση γίνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες
M.B Αναλυτών	Τυπικά <500 amu	Δεν υπάρχει θεωρητικό άνω όριο, η διαλυτότητα είναι το όριο
Προκατεργασία δείγματος	Διαλύτης πτητικός, πτητικότερος από τους αναλύτες	Το δείγμα απαιτεί διήθηση και πρέπει να είναι στον ίδιο διαλύτη όπως η κινητή φάση
Μέγεθος δείγματος	Τυπικά 1-5 μL	Εξαρτάται από εσωτερική διάμετρο της στήλης
Μηχανισμός διαχωρισμού	Η κινητή φάση είναι ο μεταφορέας του δείγματος (Φέρον αέριο)	Και οι δύο φάσεις λαμβάνουν μέρος
Ανιχνευτές	FID ο πλέον κοινός για οργανικές ενώσεις	UV-Vis πλέον κοινός με μεγάλη ευαισθησία

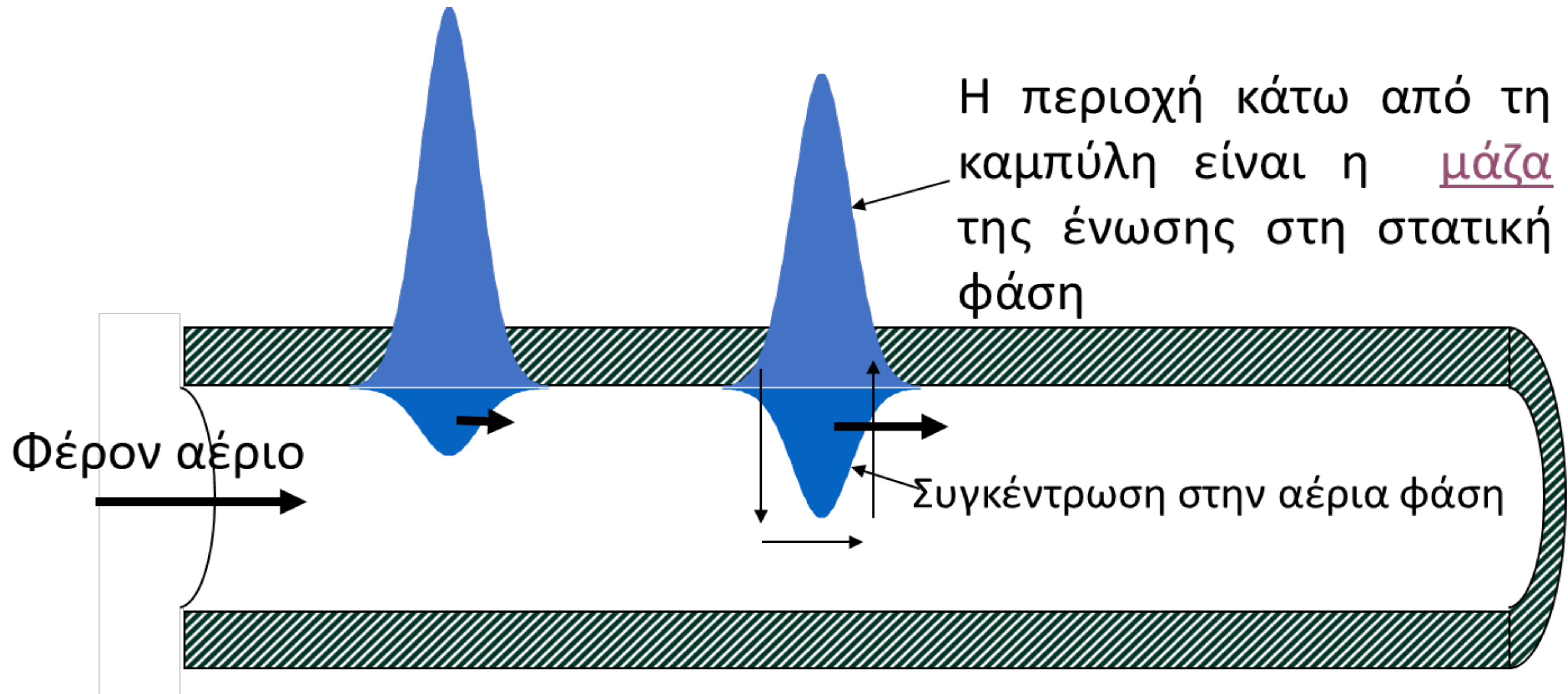
ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC)

Αεριοχρωματογραφία - Γενικά

- ✓ Η αεριοχρωματογραφία ανήκει στις μεθόδους διαχωρισμού και εφαρμόζεται κυρίως σε αναλυτική κλίμακα (ποσότητες δειγμάτων μικρότερες των $10^{-6}=1\mu\text{g}/\text{συστατικό}$)
- ✓ Οι ενώσεις πρέπει να είναι ή να καθίστανται **πτητικές** και θα πρέπει να μεταβαίνουν στην αέρια φάση χωρίς ταυτόχρονη διάσπαση
- ✓ Η αεριοχρωματογραφία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της **ταυτότητας** (ποιοτική ανάλυση) της **ποσότητας** (ποσοτική ανάλυση) των ενώσεων
- ✓ Η αεριοχρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως **μέθοδος απομόνωσης** ενός συστατικού ενός μίγματος στην καθαρή μορφή του (*Preparative Chromatography*)
- ☐ Αν η κινητή φάση είναι αέρια και η στατική υγρή- **GLC** (Χρωματογραφία Κατανομής)
- ☐ Αν η κινητή φάση είναι αέρια και η στατική στερεά – **GSC** (Χρωματογραφία προσρόφησης)

Αεριοχρωματογραφία – Αρχή Μεθόδου

- Η ταχύτητα της ένωσης μέσα στη στήλη εξαρτάται από τη «συγγένειά» της προς τη στατική φάση



Πλεονεκτήματα Αεριοχρωματογραφίας

- ✓ *Απαιτεί μικρού μεγέθους δείγματα τα οποία δεν απαιτούν εκτεταμένη προκατεργασία*
- ✓ *Αποτελεσματική στο διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων στα συστατικά τους ($N \sim 1,3 \cdot 10^6$)*
- ✓ *Τα αποτελέσματα λαμβάνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα*
- ✓ *Υψηλή ακρίβεια (1-5 % RSD)*
- ✓ *Υψηλή ευαισθησία για τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ppb, ppt)*
- ✓ *Η οργανολογία δεν είναι περίπλοκη*

Μειονεκτήματα της αεριοχρωματογραφίας

❖ Συχνά περιορίζεται από την **πτητικότητα των ενώσεων**

– η θερμοκρασία της στήλης περιορίζεται **~ 380 °C**

– η Ρατμ **~ 60 torr** σε αυτή τη θερμοκρασία στήλης

– οι ενώσεις θα πρέπει να έχουν **Σ.Ζ. < 500 °C**

❖ Ακατάλληλη για **θερμικά ασταθείς ενώσεις**

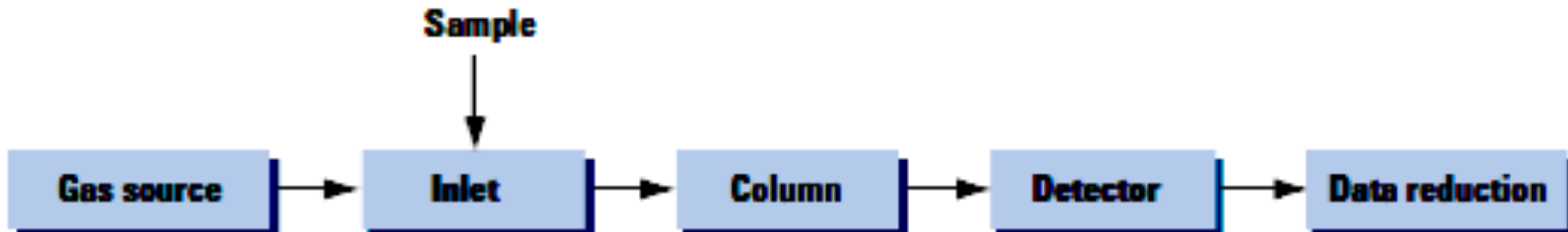
❖ Μερικά δείγματα απαιτούν **εκτεταμένη προκατεργασία**. Τα δείγματα θα πρέπει να είναι διαλυτά και να μην αντιδρούν με τη στήλη

❖ Συνήθως απαιτείται η **χρήση φασματοσκοπίας (συνήθως MS)** για τον προσδιορισμό της ταυτότητας των ενώσεων

Αεριοχρωματογράφος

Ένα αεριοχρωματογραφικό σύστημα **αποτελείται** από:

- ✓ Το **φέρων αέριο (κινητή φάση)** του οποίου η ροή και η καθαρότητα καθορίζονται κατάλληλα
- ✓ Ο **εισαγωγέας** που δρα σαν ατμοποιητής για τα υγρά δείγματα (υψηλές θερμοκρασίες)
- ✓ Η **στήλη (στατική φάση)** πάνω στην οποία συμβαίνει ο διαχωρισμός βάσει διαφορετικού χρόνου έκλυσης
- ✓ Ο **ανιχνευτής** που αποκρίνεται σε κάθε αναλύτη και παράγει ηλεκτρικό σήμα
- ✓ **Επεξεργασία** των χρωματογραφημάτων με κατάλληλο λογισμικό



Φέρον Αέριο - Καθαρότητα

Το φέρον αέριο πρέπει να είναι **υπερκάθαρο**

➤ Τυχόν προσμίξεις μπορεί να αντιδράσουν με το δείγμα ή με τη στήλη με αποτέλεσμα ψευδείς κορυφές, καταπόνηση του ανιχνευτή και αύξηση της γραμμής βάσης (*baseline*)

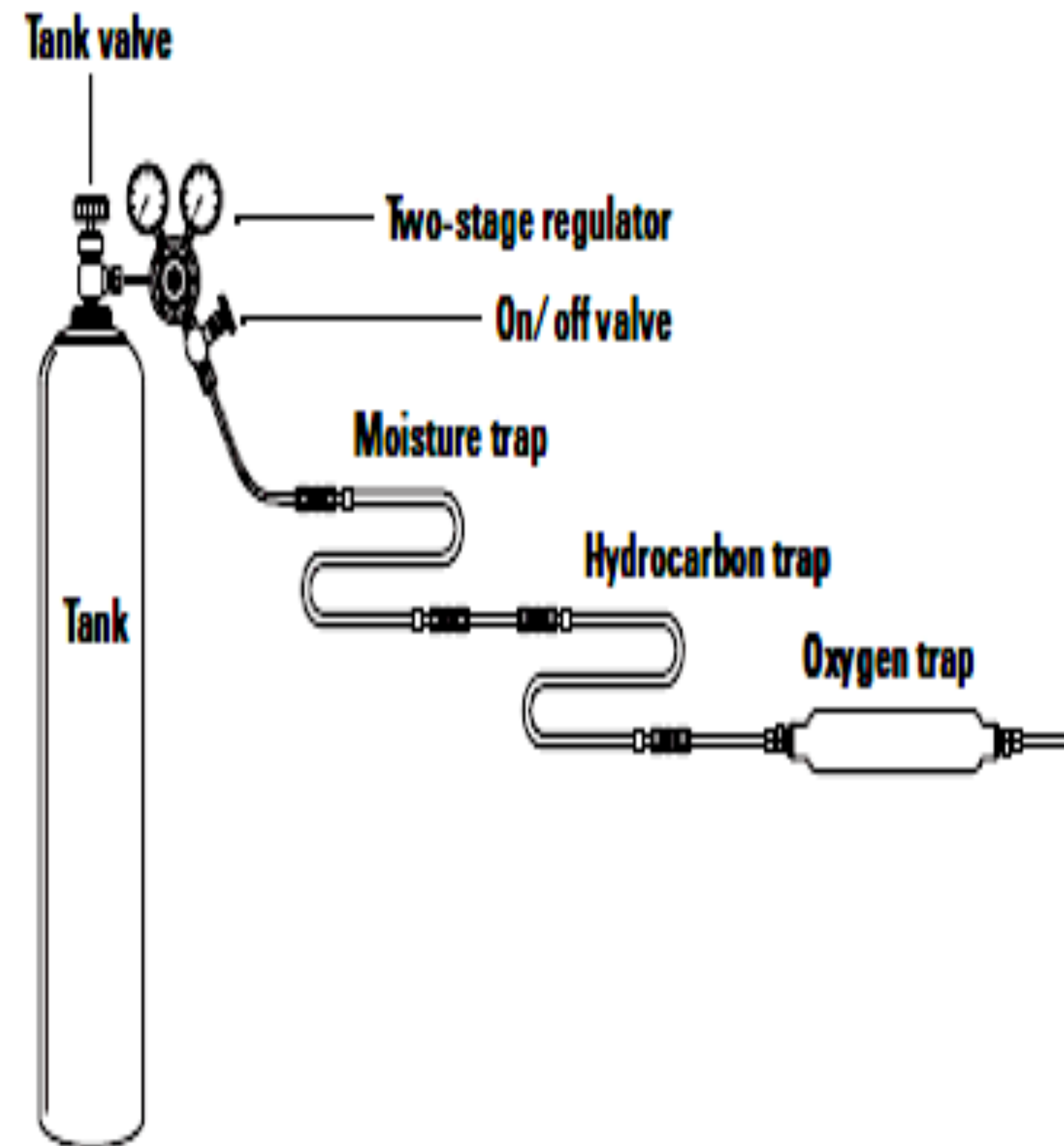
Πρέπει:

✓ Να χρησιμοποιούνται φιάλες αερίων **υψηλής καθαρότητας**

✓ Να χρησιμοποιούνται **παγίδες αερίων**

- Υγρασίας
- Οξυγόνου
- Υδρογονανθράκων

➤ Πρέπει να **αναγεννιούνται** με θέρμανση στους $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 4~8 hr με τη διαβίβαση ενός ρεύματος αερίου ή με τοποθέτησή τους σε φούρνο κενού (Κάθε 6 μήνες περίπου)



Φέρον Αέριο – Ρύθμιση Ροής (1)

➤ Η ροή πρέπει να παραμένει σταθερή γιατί μεταβολή κατά 1 % της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου προκαλεί μεταβολή κατά περίπου 1% του χρόνου κατακράτησης. Αυτό επιτυγχάνεται με:

- I. Έλεγχο της πίεσης εισόδου του αερίου
- II. Έλεγχο της ταχύτητας ροής του αερίου

➤ Τα αέρια φυλάσσονται σε φιάλες σε υψηλή πίεση **2500 psi** (150-160 atm)

➤ Οι ρυθμιστές πίεσης διαθέτουν **δύο διαφορετικά στάδια ρύθμισης:**

✓ υψηλή πίεση εισόδου

✓ χαμηλή πίεση εξόδου (40~100psi)

Είσοδος από φιάλη Έξοδος προς GC
υψηλής πίεσης χαμηλής πίεσης



Φέρον Αέριο – Ρύθμιση Ροής (2)

- Σε ισόθερμες συνθήκες ξεχωριστή ρύθμιση της πίεσης εισόδου στο GC και της ταχύτητας ροής δεν έχει έννοια αφού η ρύθμιση της σταθερότητας του ενός σημαίνει ταυτόχρονη ρύθμιση και του άλλου.
- Σε συνθήκες προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας απαιτείται ξεχωριστή ρύθμιση αφού *εάν παραμείνει σταθερή η πίεση εισόδου του φέροντος αερίου η ταχύτητα ροής αυτού θα μεταβάλλεται ανάλογα με τη θερμοκρασία.*
- ✓ Στην περίπτωση αυτή απαιτείται και ρύθμιση της ροής του φέροντος αερίου.

Προτεινόμενες ταχύτητες ροής αερίων

Προτεινόμενες ταχύτητες ροής αερίων

Ανιχνευτής	Αέριο	Περιοχή	Τριχοειδής στήλη	Πακεταρισμένη στήλη
FID	Φέρον αέριο		2 ml/min	40 ml/min
	H ₂	30~50 ml/min	35 ml/min	40 ml/min
	Αέρας	300~600 ml/min	350 ml/min	500 ml/min
	Make-up(N ₂)	10~60 ml/min	30 ml/min	-
NPD	H ₂	2~4 ml/min		
	Αέρας	40~80 ml/min		
	Make-up(N ₂ , He)	10~20 ml/min		
PID	Make-up	5~10 ml/min		
FPD	Φέρον αέριο		1~3 ml/min	30~50 ml/min
	H ₂		85~100 ml/min	100~120 ml/min
	Αέρας		100~120 ml/min	110~135 ml/min

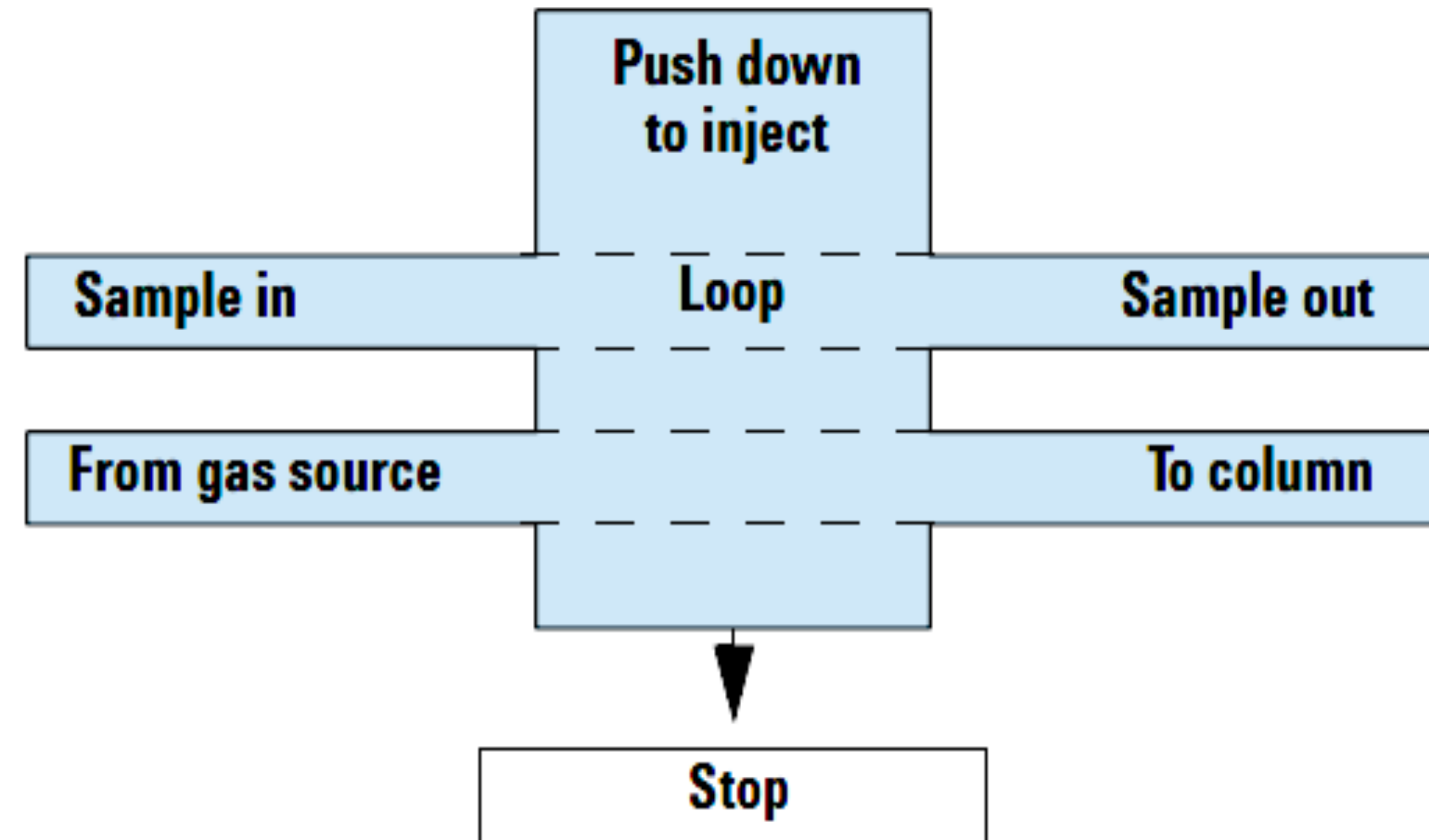
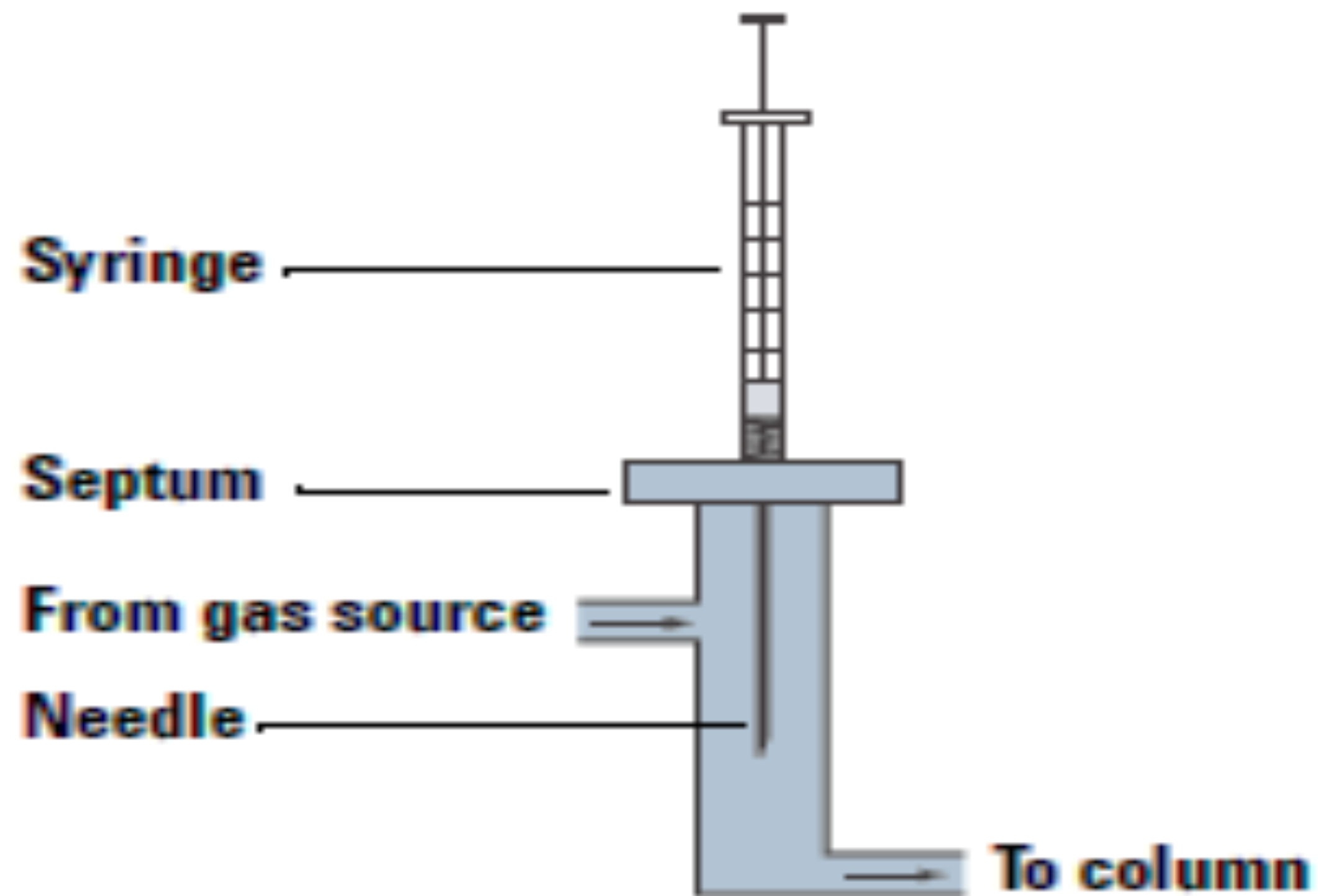
Εισαγωγή του δείγματος (1)

- Οι απαιτήσεις για το σύστημα εισαγωγής του δείγματος είναι να είναι **θερμοκρασιακά ελεγχόμενο, να είναι μικρού όγκου και να είναι κατασκευασμένο από αδρανή υλικά**
- ❖ **Αργή εισαγωγή, μεγάλου όγκου δείγματος οδηγεί στον εκφυλισμό των κορυφών και απώλεια της διαχωριστικής ικανότητας του συστήματος.**
- ✓ Ο εισαγωγέας πρέπει να διατηρείται σε **υψηλή θερμοκρασία** έτσι ώστε το δείγμα να ατμοποιείται ταχέως (50°C υψηλότερη από το Σ.Ζ του λιγότερο πτητικού συστατικού του δείγματος).
- ❖ Μερικές φορές όμως η **υπερθέρμανση του εισαγωγέα** πρέπει να αποφεύγεται γιατί μπορεί να εκλυθούν αέριες προσμίξεις από το ελαστικό διάφραγμα του εισαγωγέα στη στήλη
- ✓ Για τις **πακεταρισμένες στήλες** η ενιόμενη ποσότητα δείγματος ποικίλει από 0,1 έως 10 mL ενώ για τις **τριχοειδείς στήλες** αντίστοιχα από 1x10 μL.

Εισαγωγή του δείγματος (2)

➤ Ο πλέον χρησιμοποιούμενος τρόπος εισαγωγής του δείγματος είναι η χρήση **μικροσύριγγας και βαλβίδας**

➤ Το δείγμα ρέει μέσω ενός **βρόγχου (loop)** και το φέρον αέριο ρέει στη μια θέση απευθείας στη στήλη και στην άλλη θέση μέσω του βρόγχου παρασύροντας το δείγμα στη στήλη – Η χρήση **βαλβίδων ενδιάμεσα** αυξάνει την ποσοτική ανάλυση λόγω καλής **επαναληψιμότητας** του ενιόμενου δείγματος



Επίδραση του διαλύτη στην εισαγωγή του δείγματος

□ Χρόνος t_1

Αμέσως μετά την εισαγωγή ο διαλύτης και το δείγμα συγκεντρώνονται σε μία ευρεία ζώνη στην κορυφή της στήλης. Η θερμοκρασία της στήλης θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή για να παραμείνει συμπυκνωμένος ο διαλύτης.

□ Χρόνος t_2

Η θερμοκρασία της στήλης έχει αυξηθεί, το μεγαλύτερο ποσοστό του διαλύτη έχει ατμοποιηθεί και η επίδραση του διαλύτη έχει διατηρήσει τα μόρια του δείγματος συγκεντρωμένα σε μία μικρού εύρους ζώνη στην κορυφή της στήλης.

□ Καθώς η θερμοκρασία αυξάνει περαιτέρω ο διαλύτης ο οποίος έχει παραμείνει και το δείγμα ατμοποιούνται ταχέως με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένη ικανότητα της στήλης και οξείες χρωματογραφικές κορυφές

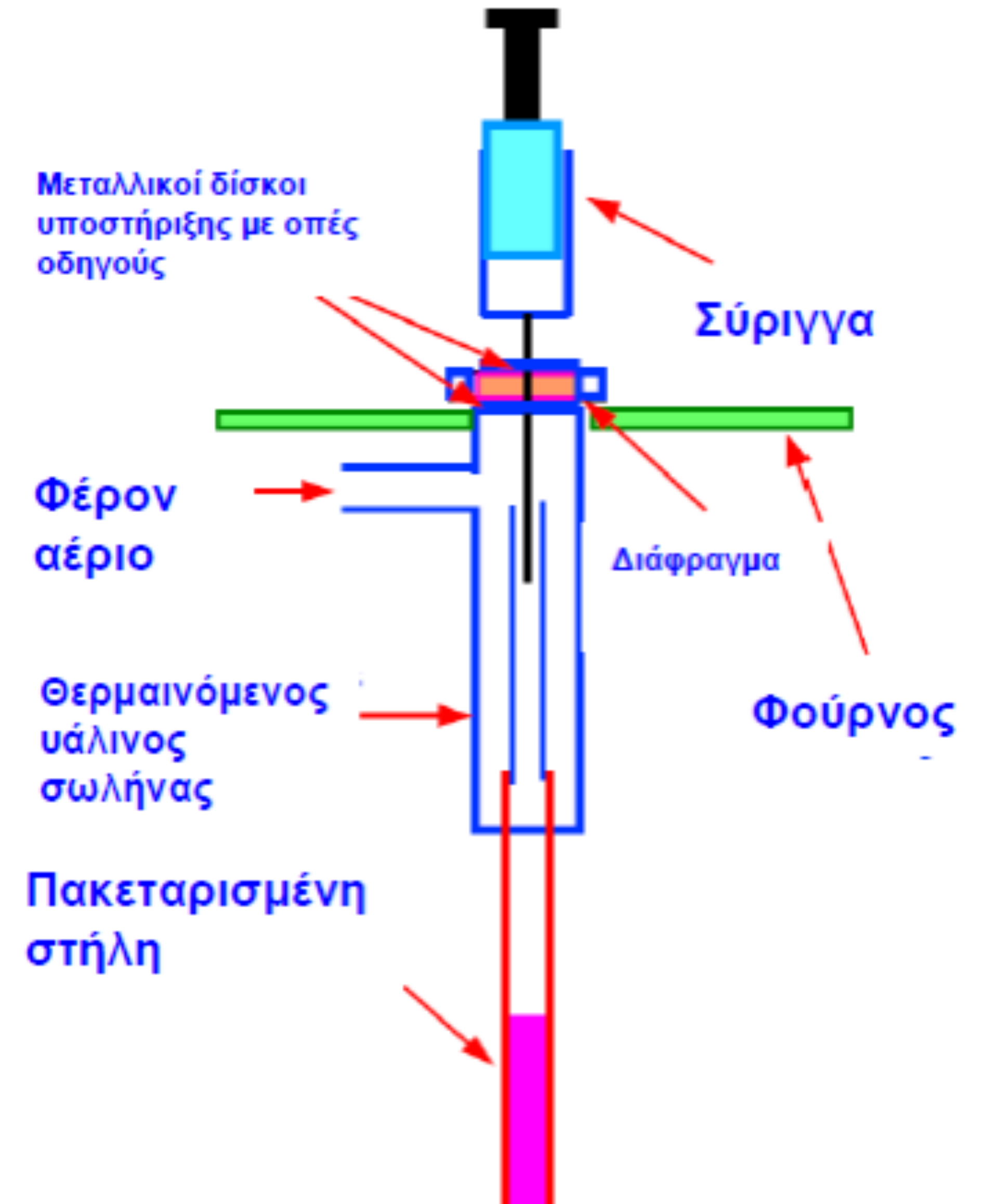
Εισαγωγή σε πακεταρισμένες στήλες

□ Ο όγκος του δείγματος κυμαίνεται από **0,5-10 ml** και συνήθως η συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων συστατικών κυμαίνεται από 5%w/v έως 10%w/v.

✓ Το δείγμα εισάγεται με **σύριγγα** μέσω του ελαστικού διαφράγματος απευθείας στη στατική φάση της στήλης. Μετά τη διάτρηση του διαφράγματος και αφού η βελόνη διαπεράσει όλο το μήκος του υάλινου σωλήνα το δείγμα **εισάγεται απευθείας στη στήλη**.

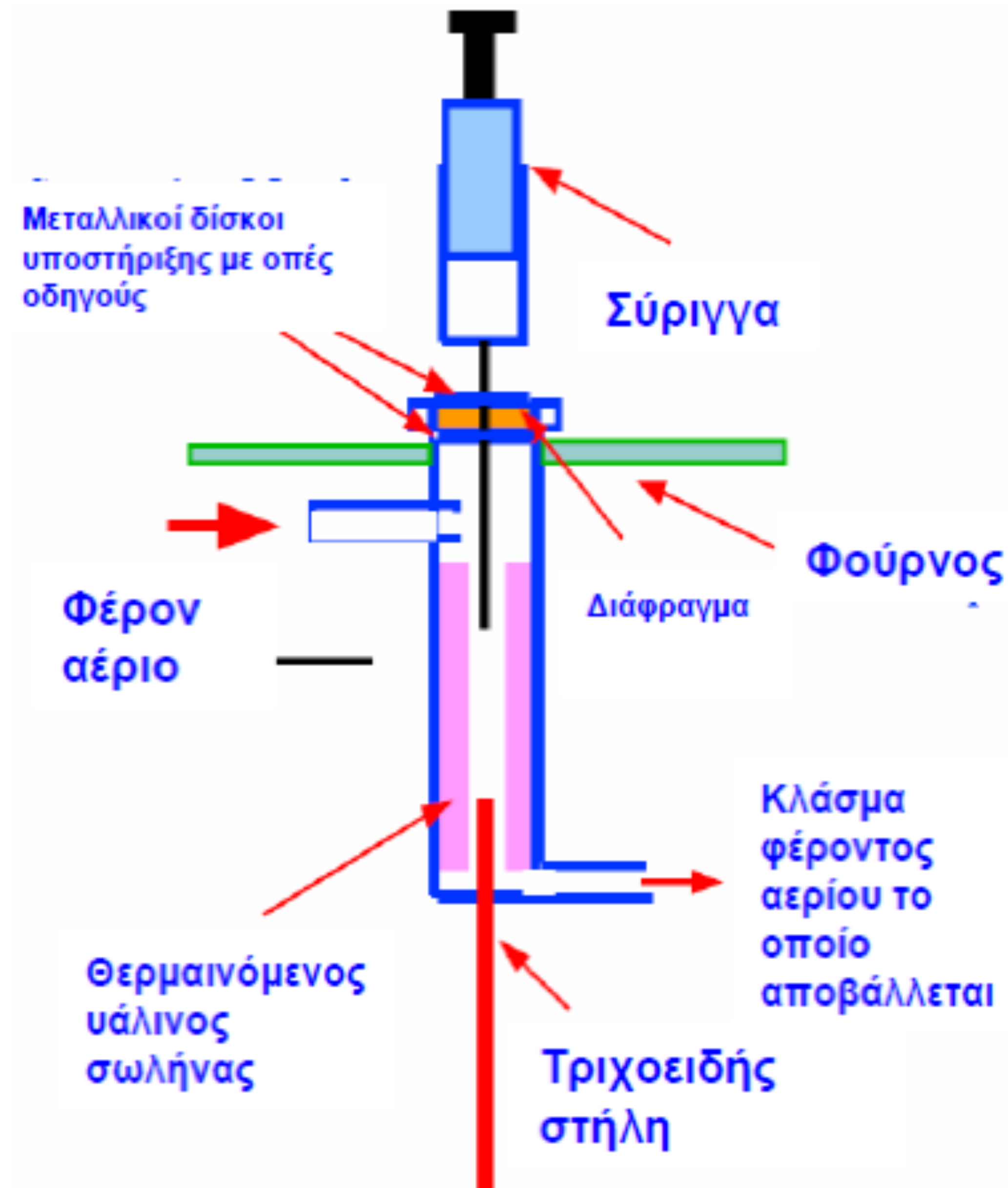
✓ Ο τρόπος αυτός εισαγωγής του δείγματος καλείται «εισαγωγή στην κορυφή της στήλης» (**on column injection**) και καθώς μειώνει τη διεύρυνση των κορυφών κατά την εισαγωγή αυξάνει την ικανότητα της στήλης.

✓ Το σύστημα αυτό είναι διαθέσιμο στους περισσότερους αεριοχρωματογράφους.



Εισαγωγή σε τριχοειδείς στήλες (split injection)

- ❑ Οι τριχοειδείς στήλες μπορούν να δεχτούν **μικρές ποσότητες δείγματος** και για αυτό απαιτείται ένα σύστημα εισαγωγής διαμοιρασμού (split injection)
- ✓ Η βασική διαφορά με τον προηγούμενο εισαγωγέα είναι ότι η τριχοειδής στήλη εισέρχεται στον υάλινο σωλήνα και ένα μέρος του φέροντος αερίου περνά από την κορυφή της στήλης και **αποβάλλεται χωρίς να εισέρχεται σε αυτήν (διαμοιρασμός)**.
- ✓ Καθώς το δείγμα περνά από την κορυφή της στήλης κλάσμα αυτού εισέρχεται σε αυτήν (split injector). Η αναλογία διαμοιρασμού ρυθμίζεται με **ρύθμιση του κλάσματος του φέροντος αερίου το οποίο αποβάλλεται**. Ο εισαγωγέας αυτός χρησιμοποιείται μόνο για μικρής διαμέτρου τριχοειδείς στήλες όπου το μέγεθος φόρτισης είναι κρίσιμο.
- ✓ Τυπική αναλογία διαμοιρασμού η οποία χρησιμοποιείται είναι η **1:100** με το 99% του δείγματος να αποβάλλεται στην ατμόσφαιρα.

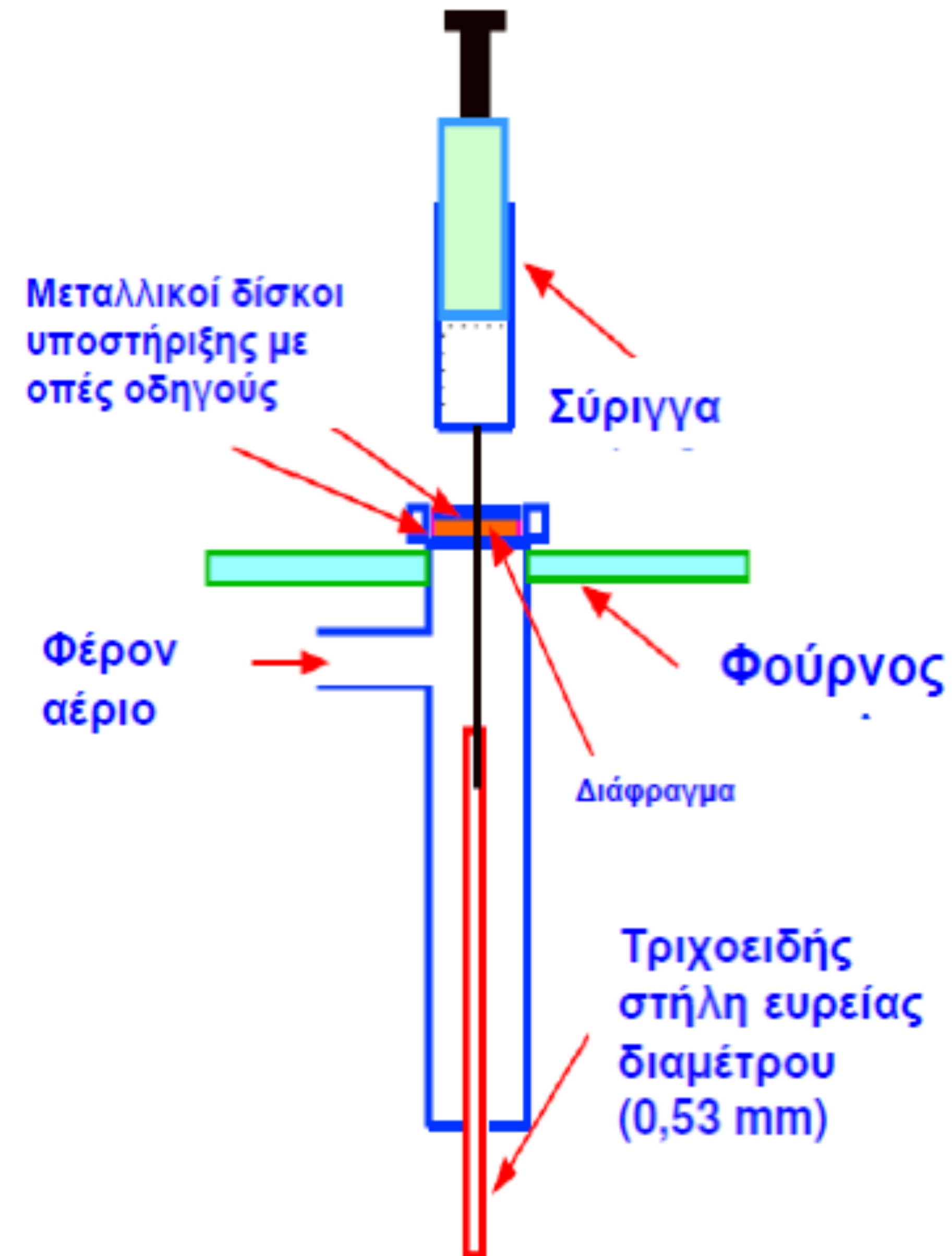


Εισαγωγή σε τριχοειδείς στήλες (splitless injection)

□ Για την αποφυγή προβλημάτων τα οποία προκύπτουν από τον εισαγωγέα διαμοιρασμού χρησιμοποιούνται **τριχοειδείς στήλες μεγαλύτερης διαμέτρου** (0,53 mm i.d.) στις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της εισαγωγής στην κορυφή της στήλης.

✓ Δεν πραγματοποιείται διαμοιρασμός του φέροντος αερίου και κατά επέκταση του δείγματος. Ο εισαγωγέας αυτός ονομάζεται εισαγωγέας μη διαμοιρασμού (splitless injector).

✓ Οι σύγχρονοι εισαγωγείς αποτελούν συνδυασμό των δύο προηγούμενων εισαγωγέων



Εισαγωγή σε τριχοειδείς στήλες

Εισαγωγέας διαμοιρασμού (split injector)

- ✓ Απλός
- ✓ Υψηλή ικανότητα της στήλης
- ✓ Προστασία της στήλης
- ❖ Απώλεια των μικρού M.B. ενώσεων σε σχέση με των υψηλού M.B.
- ❖ Περιορισμός πιστότητας και ορθότητας ανάλογα με τη φύση του δείγματος κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό

Εισαγωγέας μη διαμοιρασμού (splitless injector)

- ✓ Υψηλή ευαισθησία (95% του δείγματος εισάγεται στη στήλη)
- ✓ Η επίδραση του διαλύτη δημιουργεί μικρού εύρους ενιόμενες ζώνες δείγματος
- ❖ Αργή μεταφορά του δείγματος στη στήλη με αποτέλεσμα τη δημιουργία πεπλατυσμένων κορυφών
- ❖ Προηγείται αραίωση του δείγματος σε πτητικό διαλύτη
- ❖ Απαιτεί χρόνο: η στήλη πρέπει να διατηρηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία
- ❖ Αντενδείκνυται για θερμοσταθερές ενώσεις

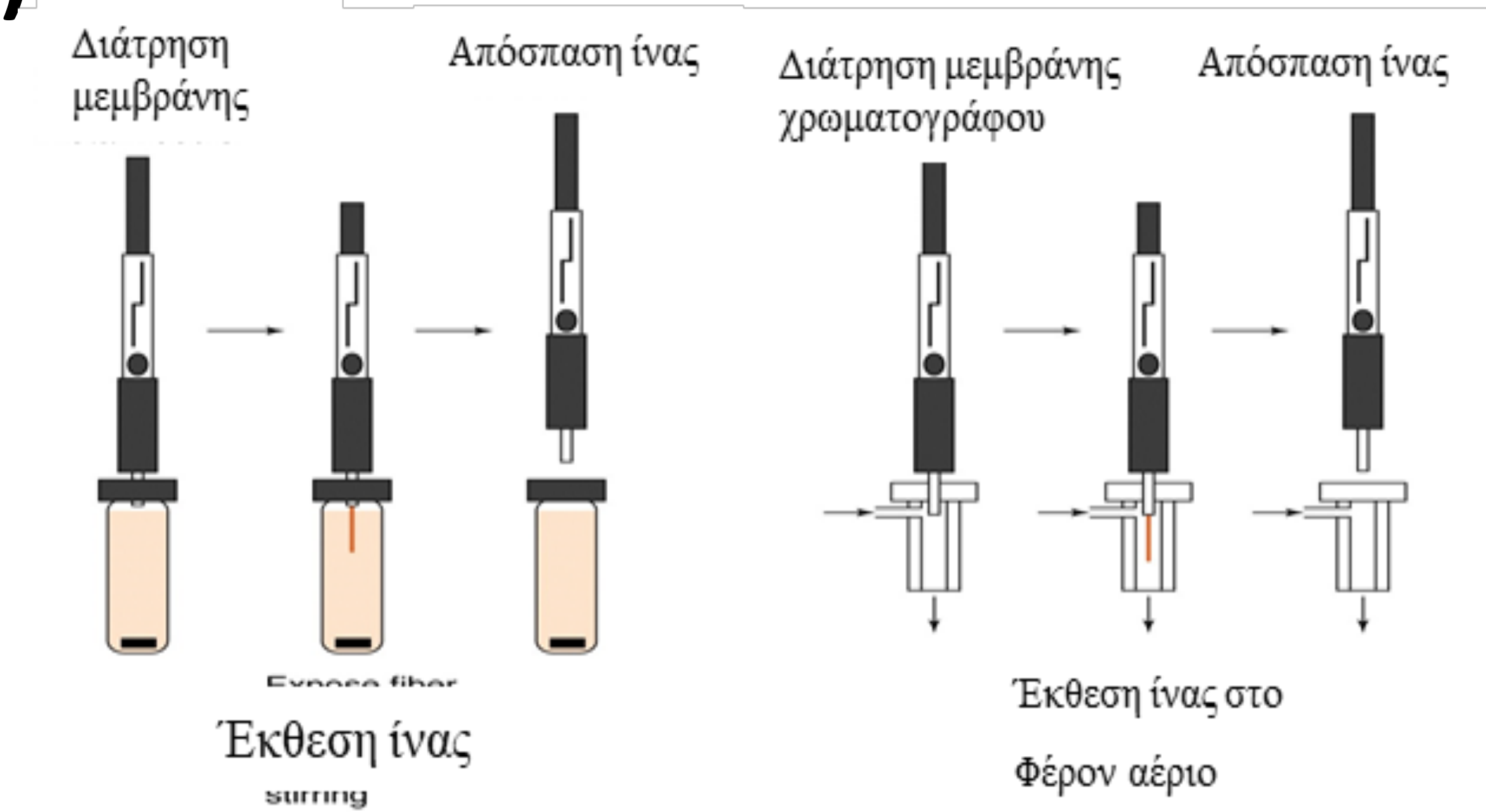
Εισαγωγέας στην κορυφή της στήλης (on column injector)

- ✓ Υψηλή πιστότητα
- ✓ Ενδείκνυται για θερμοσταθερές ενώσεις
- ✓ Χρησιμοποιείται για πακεταρισμένες και ευρείας διαμέτρου τριχοειδείς στήλες
- ❖ Μικρή ικανότητα στήλης

Εισαγωγή δείγματος (SPME)

□ Η εισαγωγή δείγματος με την τεχνική της SPME αποτελεί μία σχετικά νέα τεχνική με εφαρμογή σε αέρια, υγρά και στερεά δείγματα.

➤ Η σύριγγα SPME αποτελείται από το κύριο σώμα και από **μία ίνα**, εντός αυτού, στην οποία υπάρχει προσδεμένη υγρή στατική φάση.



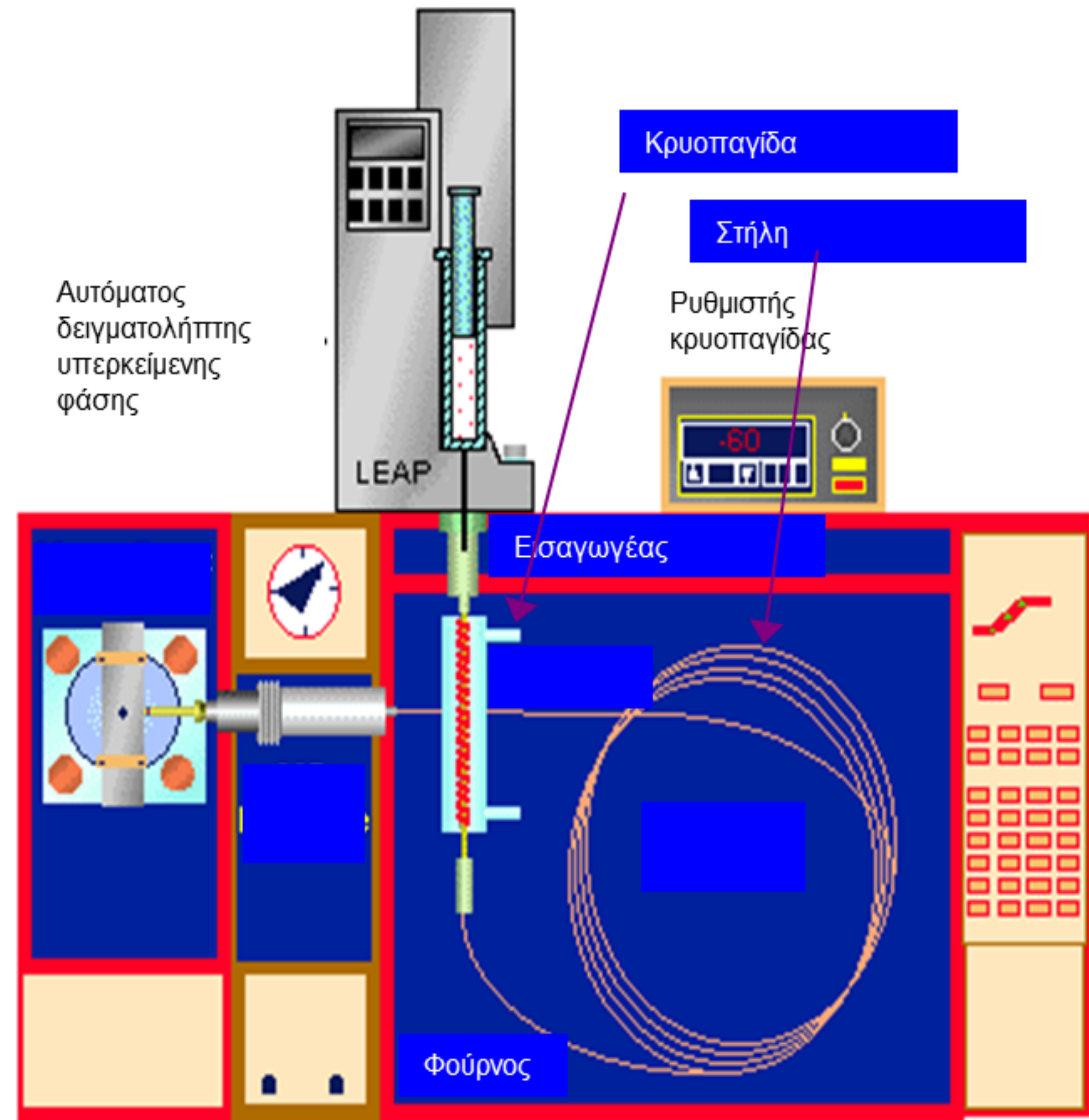
➤ Η παραλαβή των ενώσεων από την ίνα γίνεται είτε με **εμβάπτιση της ίνας** στο υγρό σώμα του δείγματος είτε με έκθεση αυτής στον **υπερκείμενο του υγρού** χώρο του φιαλιδίου για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (3-60 min). Οι ενώσεις προσροφούνται στην ίνα. Κατά την παραλαβή των ενώσεων από το δείγμα το δείγμα ταυτόχρονα θερμαίνεται και αναδεύεται.

➤ Μετά την παραλαβή των ενώσεων η σύριγγα SPME εισάγεται στον εισαγωγέα του αεριοχρωματογράφου και **η ίνα εκτίθεται** για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στο **φέρον αέριο**. Οι ενώσεις **εκροφούνται θερμικά** από την ίνα και οδηγούνται στη στήλη προς διαχωρισμό.

✓ **Κύριο πλεονέκτημα** της μεθόδου αποτελεί ο περιορισμός της χρήσης διαλυτών. Επίσης είναι απλή, ταχεία και μπορεί να επιτευχθεί αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου λόγω προσυγκέντρωσης.

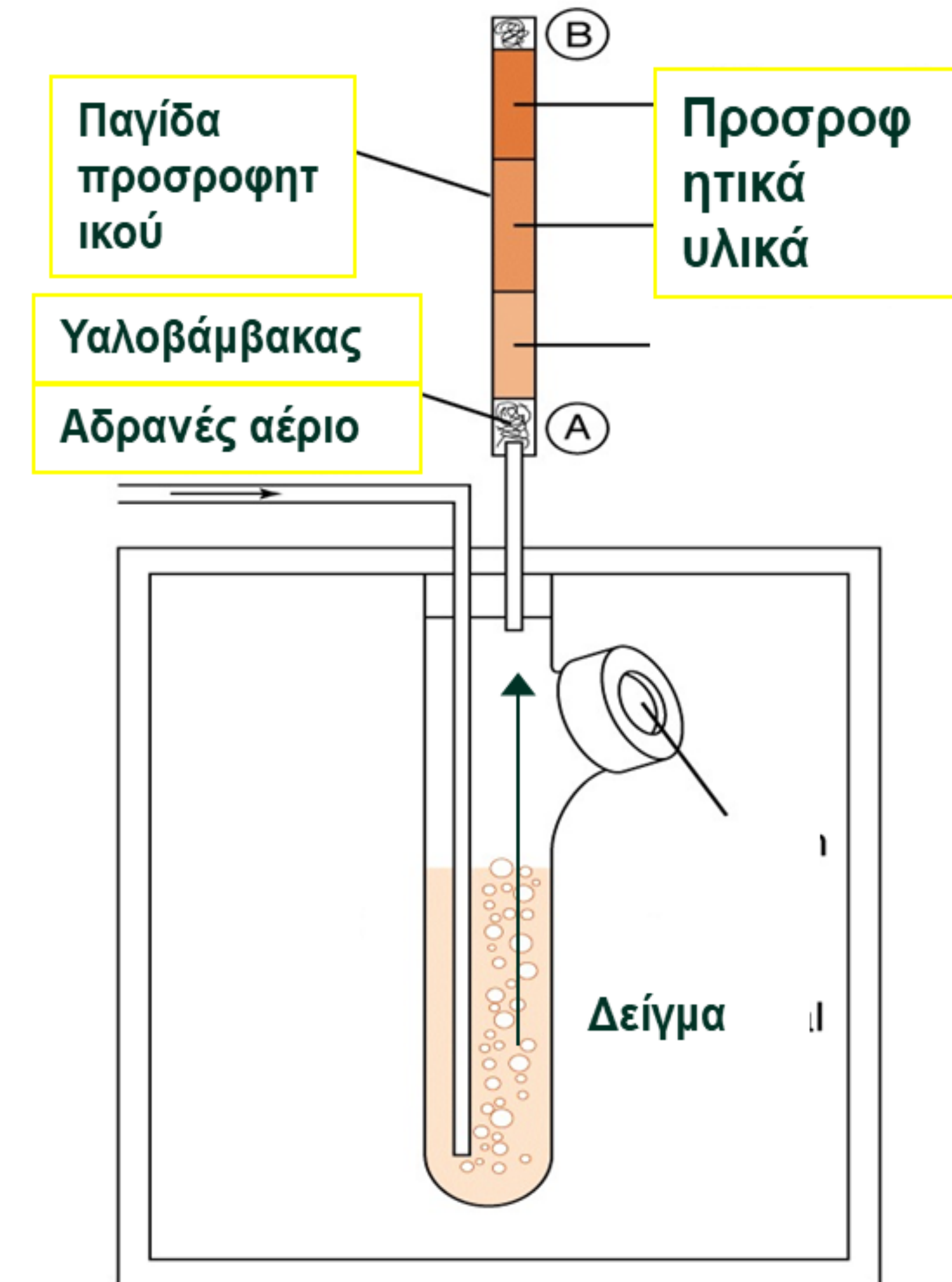
Εισαγωγή δείγματος (Ανάλυση Υπερκείμενης Φάσης - Head Space Analysis)

- ❑ Η τεχνική εισαγωγής της υπερκείμενης φάσης περιλαμβάνει τη λήψη με **μικροσύριγγα αερίων** (gas tight syringe) των **ατμών** των συστατικών του δείγματος οι οποίοι ευρίσκονται στην **υπερκείμενη φάση** σε ισορροπία με το υγρό ή στερεό δείγμα.
- Το δείγμα ευρισκόμενο σε φιαλίδιο **θερμαίνεται** για συγκεκριμένο διάστημα και αναδεύεται σε περίπτωση υγρού δείγματος. Τα συστατικά του δείγματος **μεταφέρονται στην αέρια φάση** όπου και δειγματοληπτούνται
- Ο όγκος της υπερκείμενης φάσης ο οποίος συλλέγεται ποικίλει από 1 έως 10 ml.
- Η εισαγωγή του δείγματος στον αεριοχρωματογράφο μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε **απευθείας** είτε μέσω ενός σταδίου προσυγκέντρωσης με τη χρήση **προσροφητικού υλικού** ή **κρυοπαγίδας**.
- ✓ Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό **πτητικών και ημιπτητικών ενώσεων**
- ✓ Το πλεονέκτημα είναι η απευθείας ανάλυση της αέριας φάσης άρα **αίξηση της ευαισθησίας 4 έως 5 τάξεις μεγέθους**



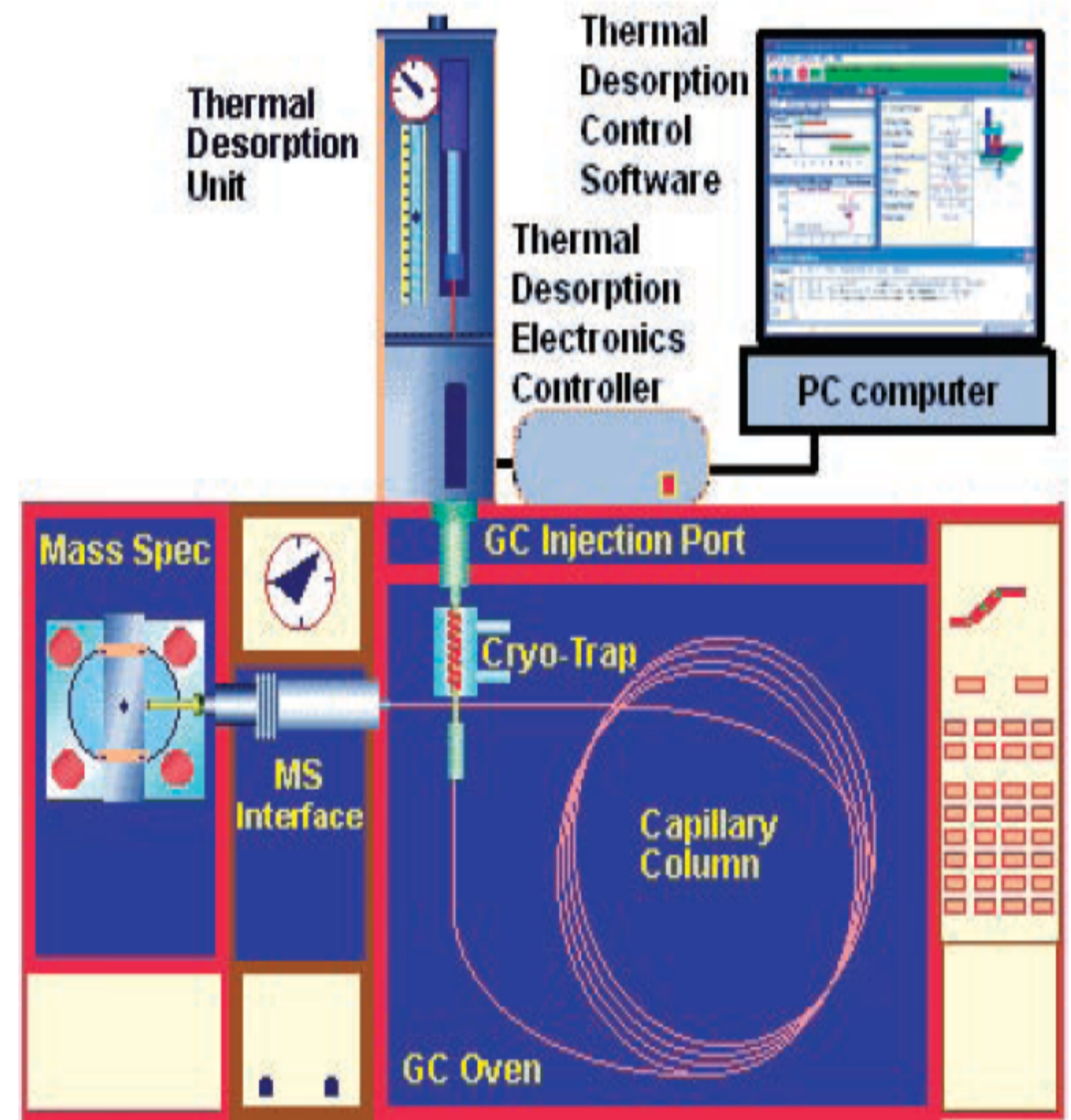
Εισαγωγή Δείγματος (Τεχνική Εκδίωξης και Παγίδευσης, Purge and Trap)

- ❑ Η τεχνική αυτή εισαγωγής αποτελεί εξέλιξη της τεχνικής υπερκείμενης φάσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πτητικές οργανικές ενώσεις με $\Sigma.Z. < 200 \text{ }^\circ\text{C}$ και οι οποίες είναι μη ή ελάχιστα διαλυτές στο ύδωρ.
- Σε αντίθεση με την τεχνική υπερκείμενης φάσης ένα **αδρανές αέριο διαβιβάζεται στο υγρό σώμα** του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου ή αυξημένη θερμοκρασία ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.
- Οι ενώσεις στην αέρια φάση παρασύρονται από το αδρανές αέριο **προς μία παγίδα** συνήθως προσροφητικού υλικού όπου και κατακρατούνται.
- Μετά την εκδίωξη των ενώσεων προς την παγίδα αυτή θερμαίνεται (**θερμική εκρόφιση**) και ταυτόχρονα με τη ροή αδρανούς αερίου μέσω αυτής τα συστατικά εκροφούνται και οδηγούνται στη στήλη προς ανάλυση.



Εισαγωγή Δείγματος (Θερμική Εκρόφηση – Thermal Desorption)

- Η τεχνική αυτή επιτρέπει της απευθείας θερμική ανάκτηση πτητικών και ημιπτητικών οργανικών ενώσεων από μικρού μεγέθους δείγματα (mg) χωρίς τη χρήση διαλυτών ή άλλου σταδίου προκατεργασίας του δείγματος.
- Το δείγμα μπορεί να βρίσκεται παγιδευμένο σε προσροφητικό υλικό ή να τίθεται σε αυτό.
- Ο σωλήνας με το προσροφητικό υλικό τοποθετείται σε σύστημα θερμικής εκρόφησης το οποίο συνδέεται με τον αεριοχρωματογράφο.
- Ο σωλήνας θερμαίνεται ταχέως και το φέρον αέριο, το οποίο ρέει μέσα από το σωλήνα, μεταφέρει τις εκροφούμενες ενώσεις στη στήλη προς ανάλυση.



Στήλες αεριοχρωματογραφίας (1)

- ❑ Τα χαρακτηριστικά με βάση τα οποία αξιολογείται μία στήλη για τη χρήση της στην αεριοχρωματογραφία είναι:
 - **Διαχωριστική ικανότητα** (αριθμός θεωρητικών πλακών) – μέτρο του διαχωρισμού ο οποίος μπορεί να επιτευχθεί
 - **Διαφυγή υποβάθρου** (Bleed) – μέτρο της σταθερότητας της στήλης
 - **Αδράνεια** – μέτρο της επίδρασης στην ανάκτηση των ενώσεων
 - Μέγιστη **θερμοκρασία** λειτουργίας
 - **Πολικότητα** στατικής φάσης
 - **Γεωμετρικά χαρακτηριστικά** της στήλης (μήκος, εσωτερική διάμετρος, πάχος στιβάδας στατικής φάσης)

Στήλες αεριοχρωματογραφίας (2)

Μία στήλη αποτελείται από

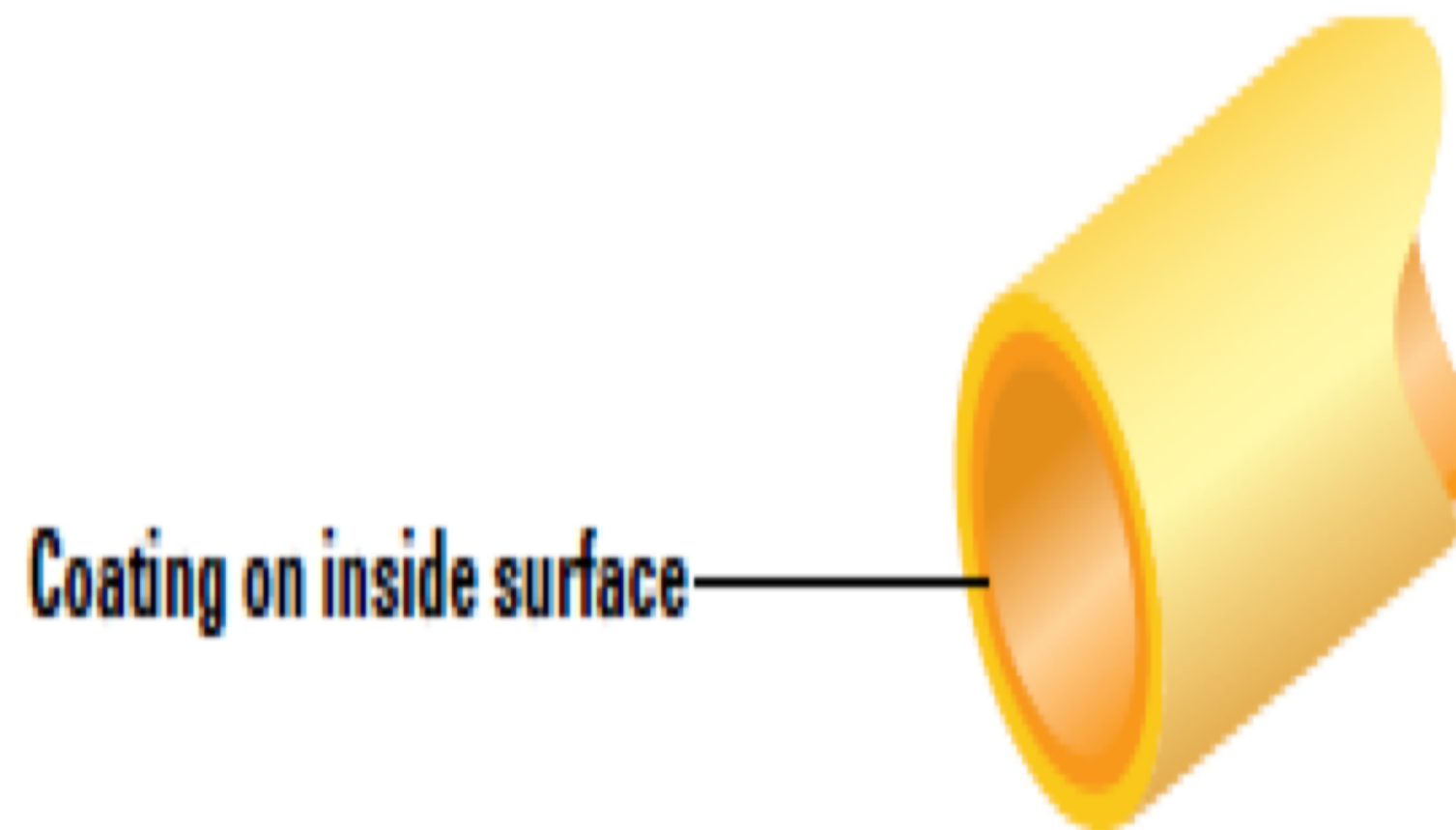
I. Υλικό σωλήνα (tubing material)

- ✓ ανοξείδωτο ατσάλι
- ✓ ύαλος (μπορεί να αδρανοποιηθεί, δύσκολη στο χειρισμό)
- ✓ τηγμένη πυριτία (αυξημένη ελαστικότητα, αδρανής, δυνατότητα κατασκευής στηλών με υψηλή διαχωριστικότητα)

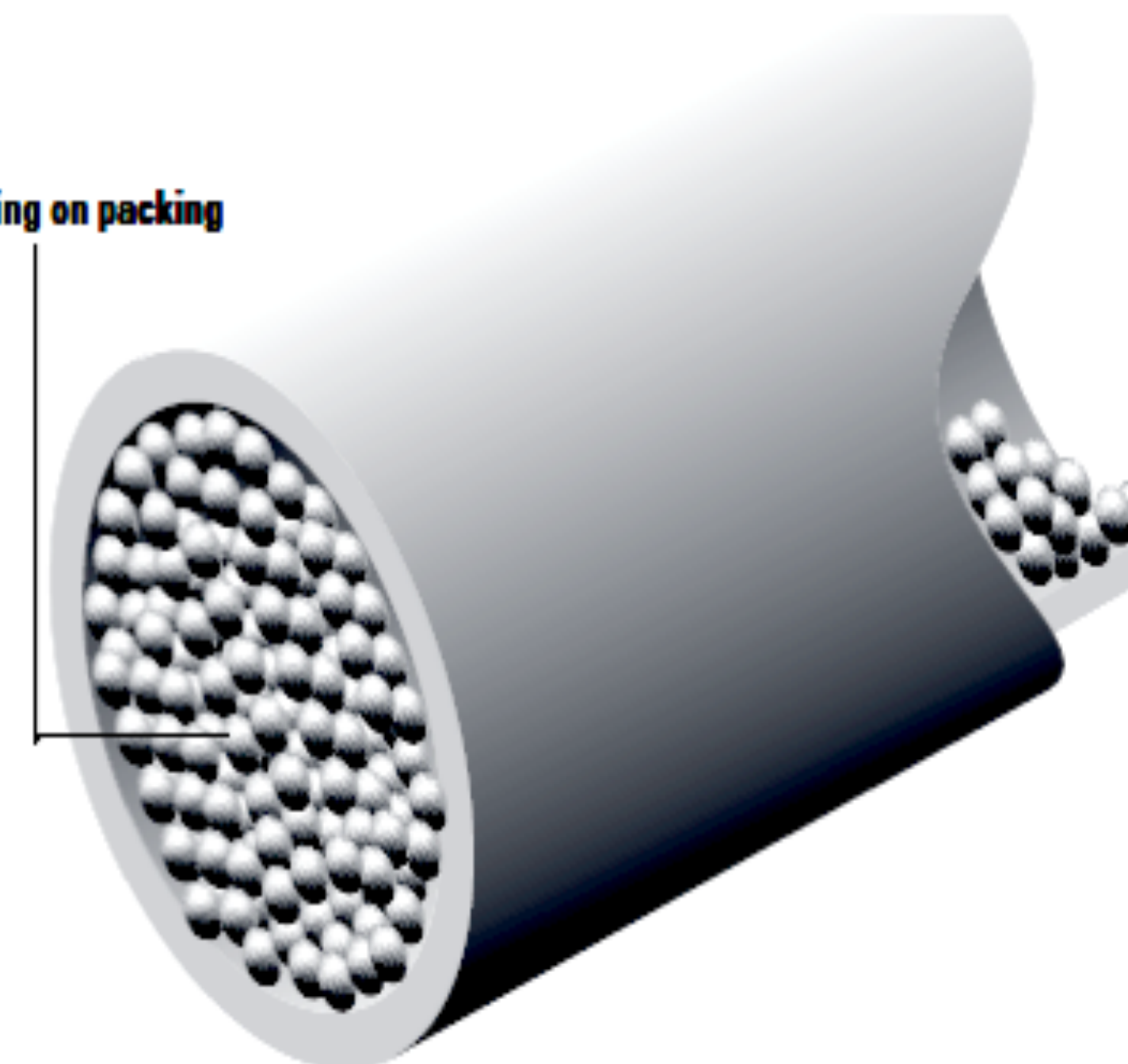


II. Στατική φάση

- ✓ Στερεό υπόστρωμα
- ✓ Υγρή φάση
- ✓ Πορώδη πολυμερή
- ✓ Προσροφητικά υλικά



Coating on packing



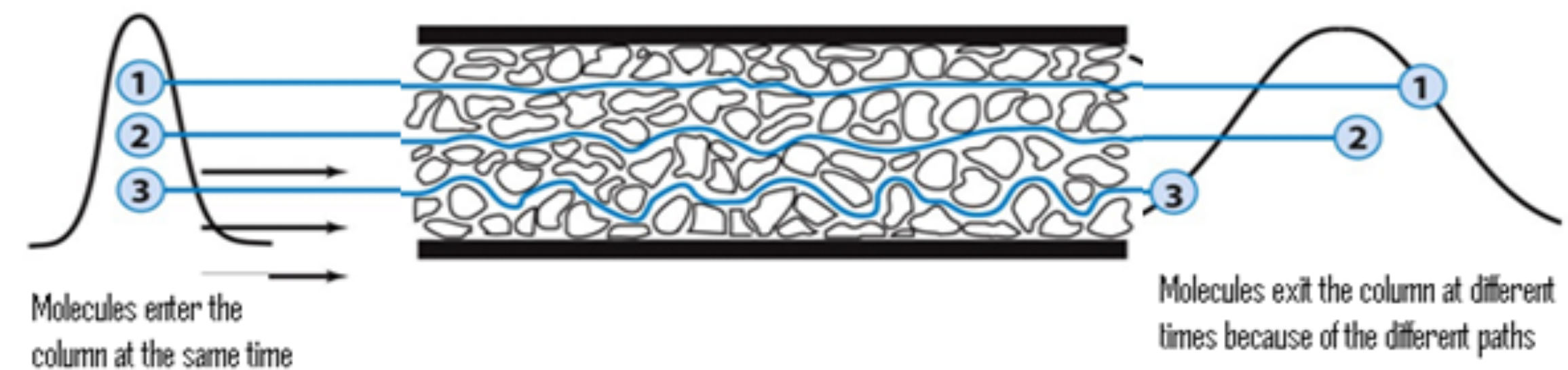
Στήλες αεριοχρωματογραφίας (3)

Πακεταρισμένες

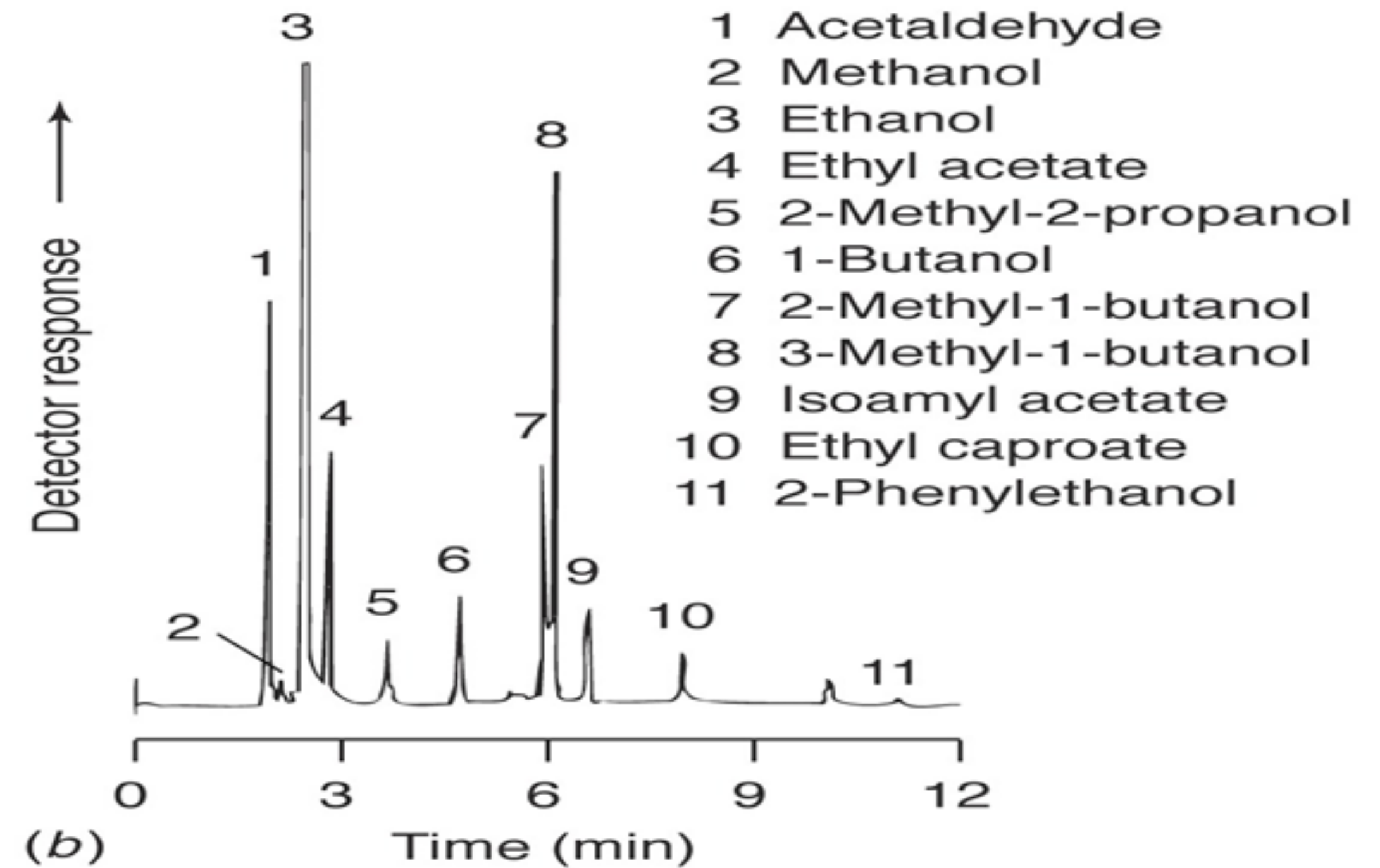
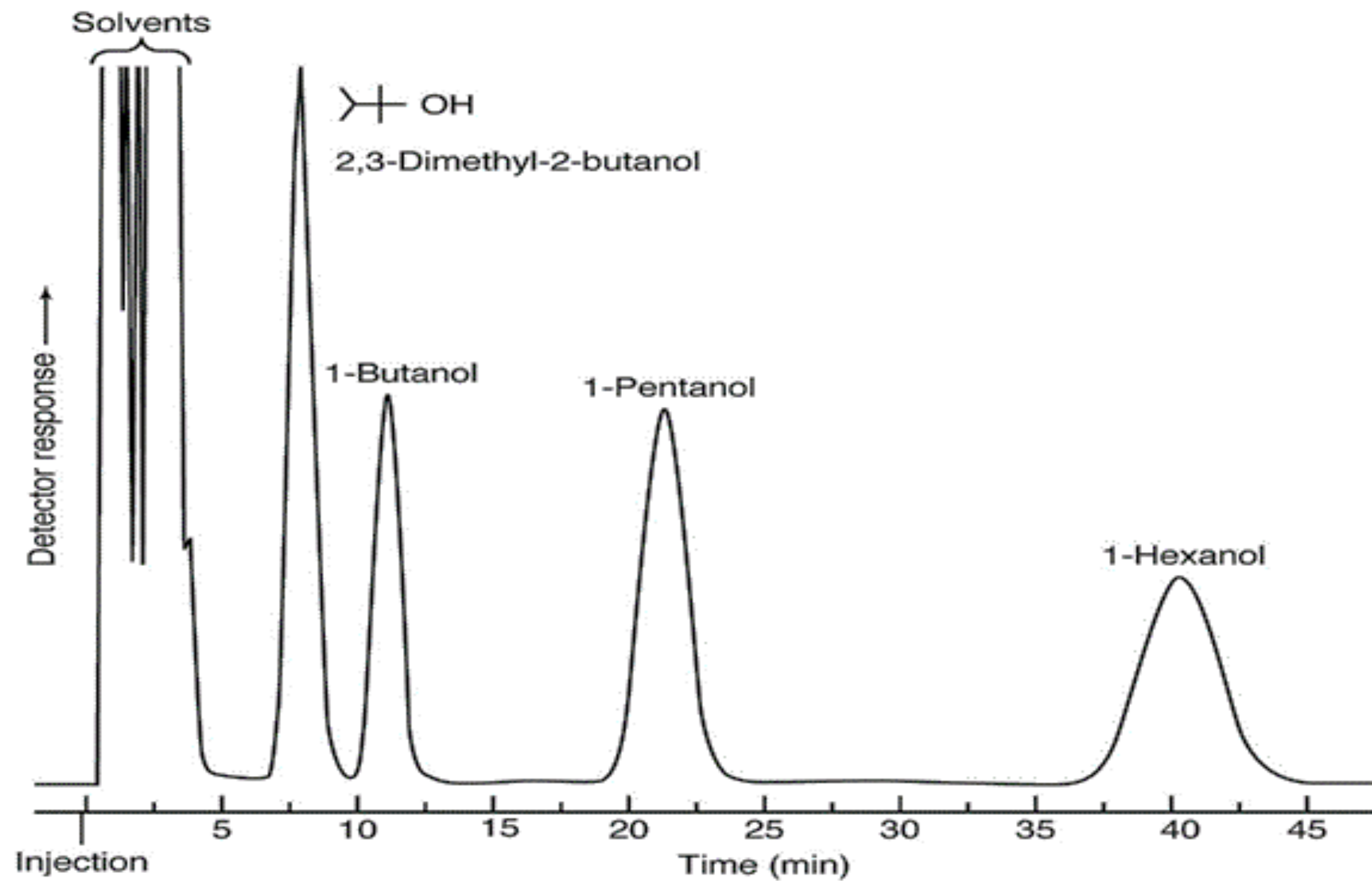
- Συνήθως κατασκευάζονται από ανοξείδωτο ατσάλι
- Εσωτερική διάμετρος **2 έως 4 mm I.D.** Και μήκος 1 έως 4 m.
- Πακεταρισμένες με κατάλληλο στερεό υπόστρωμα το οποίο επικαλύπτεται με τη στιβάδα της **υγρής στατικής φάσης** (περίπου 3-10% w/w) όταν η στατική φάση είναι υγρή και όχι στερεή.
- Δεν κατασκευάζονται σε μεγάλο μήκος. Περιοριστικός παράγοντας η πτώση πίεσης κατά μήκος της στήλης.
- ✓ Χρησιμοποιούνται κυρίως στην ανάλυση **αερίων.**
- ❖ Παρατηρείται **διεύρυνση του πλάτους των κορυφών** λόγω της διάχυσης **κατά ζώνη** (eddy diffusion)

Τριχοειδείς

- Εσωτερική διάμετρος **0,10 έως 0,53 mm I.D.** και μήκος 10 έως 100 m.
- Ο σωλήνας παραμένει ανοικτός με αποτέλεσμα να υπάρχει **μικρή πτώση πίεσης** και να επιτρέπεται η κατασκευή μεγάλου μήκους στηλών.
- Η στατική φάση τοποθετείται στα **εσωτερικά τοιχώματα** της στήλης υπό μορφή στιβάδας πάχους 0,2 mm έως 1 mm
- ✓ **Οξείες κορυφές** και όχι πεπλατυσμένες.
- ✓ **Πολύ καλοί διαχωρισμοί.**
- ✓ Οι πλέον χρησιμοποιούμενες.



Στήλες αεριοχρωματογραφίας (3)



Χρωματογράφημα αλκοολούχου δείγματος στους 40 °C με τη χρήση **πακεταρισμένης στήλης** (2mm I.D., 76 cm, 20 % Carbowax 20 M) και ανιχνευτή FID.

Χρωματογράφημα των ατμών υπερκείμενης φάσης μύρας με **τριχοειδή στήλη** 0,25 mm, 30 m, στατικής φάσης πορώδους άνθρακα και με θερμοκρασιακό πρόγραμμα 30 °C (2 min) έως 160 °C με ρυθμό ανόδου 20 °C/min.

Στήλες αεριοχρωματογραφίας (4)

Οι τριχοειδείς στήλες ανάλογα με την εσωτερική τους διάμετρο (i.d.) διακρίνονται σε

- μικροτριχοειδείς (narrow bore) με εσωτερική διάμετρο $< 100 \mu\text{m}$
- μέσης διαμέτρου τριχοειδείς (mid bore) με εσωτερική διάμετρο 250 και 320 μm
- ευρείας διαμέτρου τριχοειδείς (wide bore) με εσωτερική διάμετρο 530 μm . Αυτές συνδυάζουν τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες τόσο των τριχοειδών όσο και των πακεταρισμένων στηλών

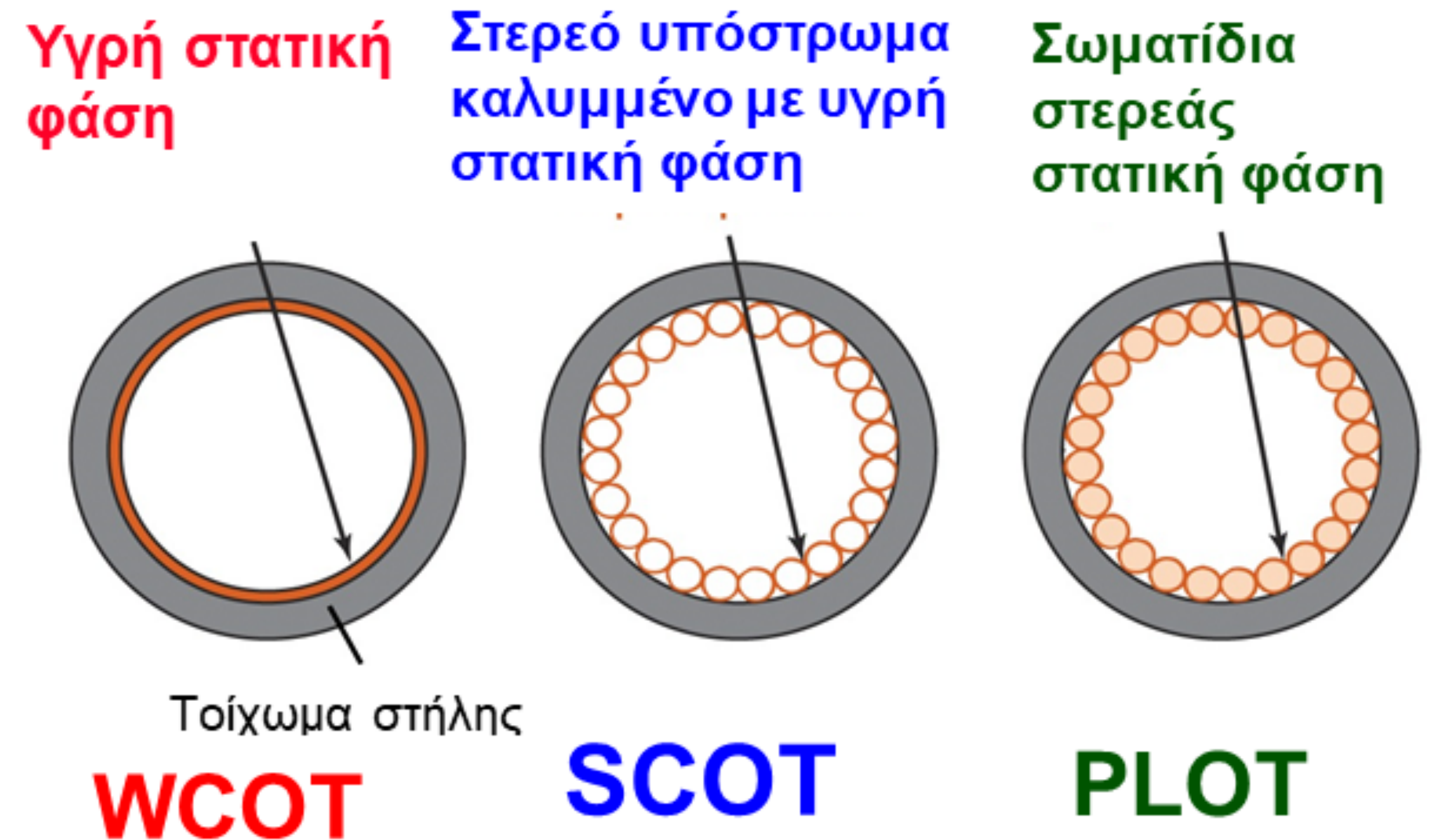
Η επιλογή της εσωτερικής διαμέτρου της στήλης αποτελεί σημαντική παράμετρο της ικανότητας αυτής

i.d. (μm)	Διαχωριστικότητα	Ταχύτητα	Χωρητικότητα
100	+++	+++	+
250, 320	++	++	++
530	+	++	+++

Στήλες αεριοχρωματογραφίας (5)

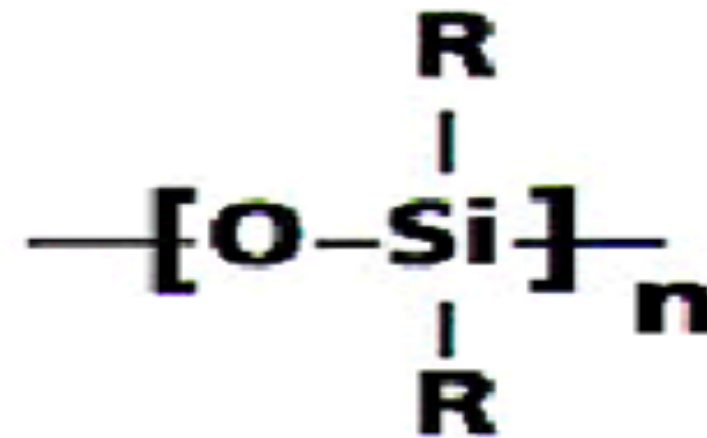
Οι τριχοειδείς στήλες ανάλογα με τον τρόπο τον οποίο τοποθετείται η στατική φάση στη στήλη διακρίνονται σε:

- αυτές τις οποίες η υγρή στατική προσδένεται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης (wall coated open tubular column, **WCOT**)
- αυτές στις οποίες η υγρή στατική φάση προσδένεται σε στερεό υπόστρωμα το οποίο καλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα της στήλης (support coated open tubular column, **SCOT**)
- αυτές τις οποίες τα σωματίδια της στερεάς στατικής φάσης προσδένονται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης (porous layer open tubular



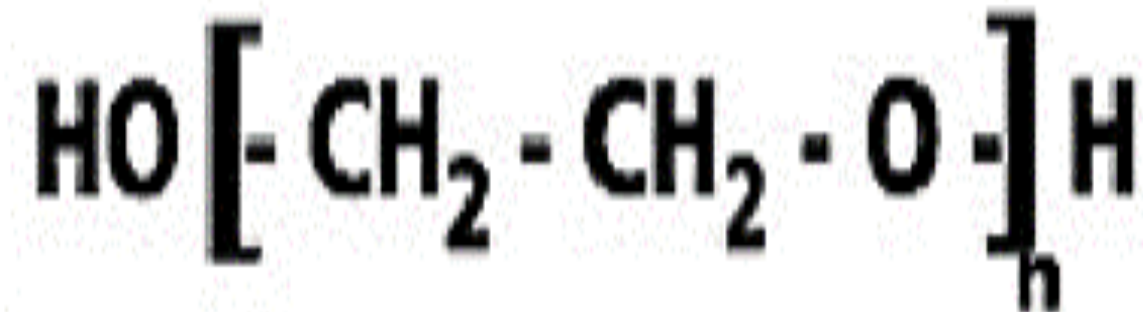
(c)

Στήλες αεριοχρωματογραφίας (6)



Πολυσιλοξάνιο

Το πολυσιλοξάνιο είναι η **πλέον συνηθισμένη** στατική φάση. Είναι **σταθερή, ανθεκτική και πολλαπλών κρίσεων**. Το πολυσιλοξάνιο χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα μονομερή (α). Κάθε άτομο συνδέεται με δύο δραστικές ομάδες (R) . Αυτές μπορεί να είναι μέθυλο-, κυανοπρόπυλο-, τριφθοροπρόπυλο- και φαίνυλο-ομάδες. Η παρουσία φαίνυλο-ομάδας στη στατική φάση πολυσιλοξανίου την σταθεροποιεί με αποτέλεσμα αυτή να διασπάται σε **υψηλότερες θερμοκρασίες**.

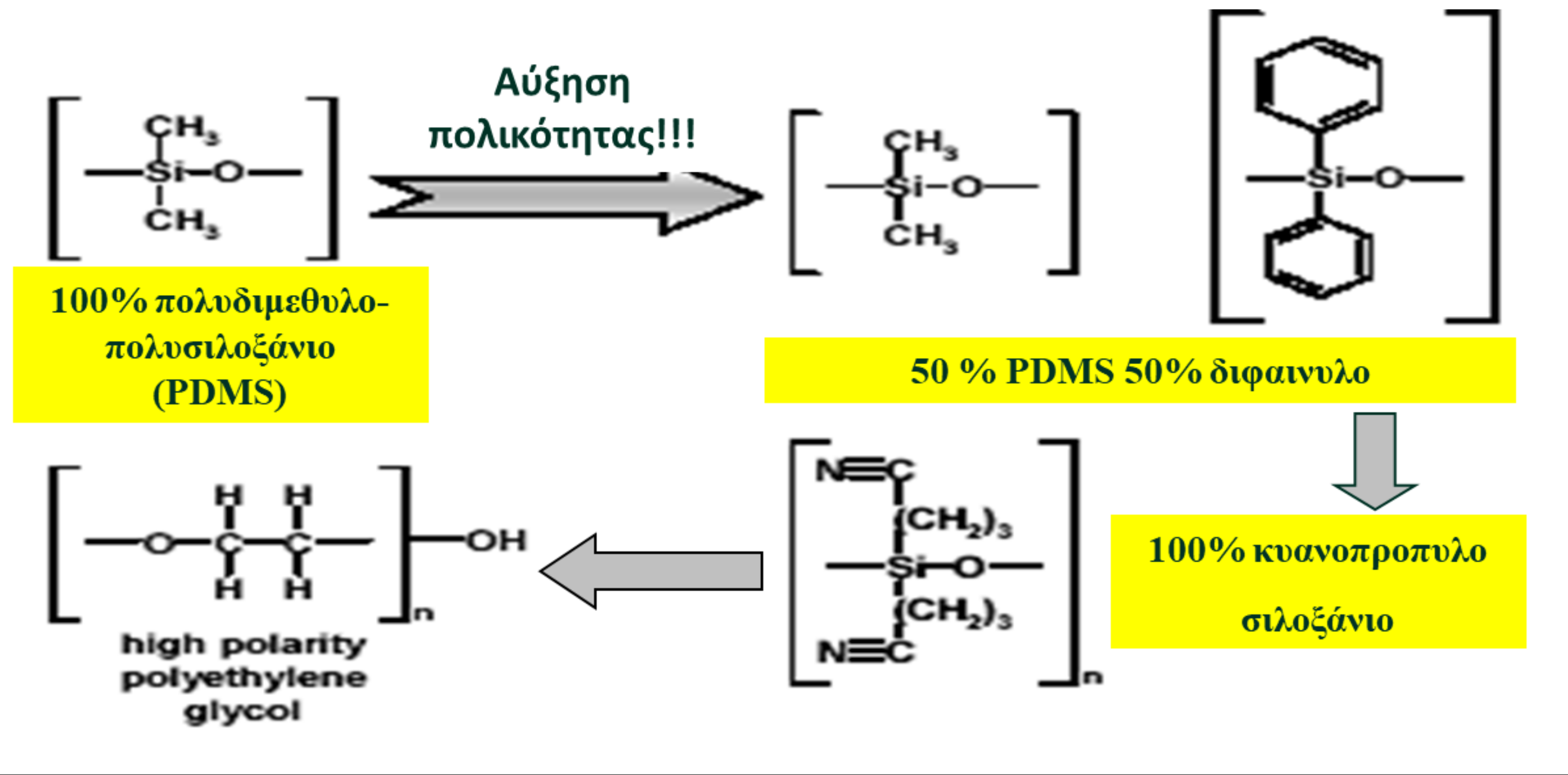


Πολυαιθυλενο-γλυκόλη

Επίσης **ευρέως χρησιμοποιούμενη** στατική φάση. Είναι λιγότερο ανθεκτική και με χαμηλότερο θερμοκρασιακό όριο από το πολυσιλοξάνιο αλλά η **καλή διαχωριστική ικανότητα** της την κάνει χρήσιμη. Πρέπει να είναι υγρή υπό τις συνήθεις θερμοκρασίες οι οποίες χρησιμοποιούνται στην αεριοχρωματογραφία. Δεικνύει καλύτερη **αναπαραγωγιμότητα και αδράνεια**

Στήλες Αεριοχρωματογραφίας (7)

Αύξηση πολικότητας της Στατικής φάσης ανάλογα με το πληρωτικό υλικό



Ανιχνευτές Αεριοχρωματογραφίας

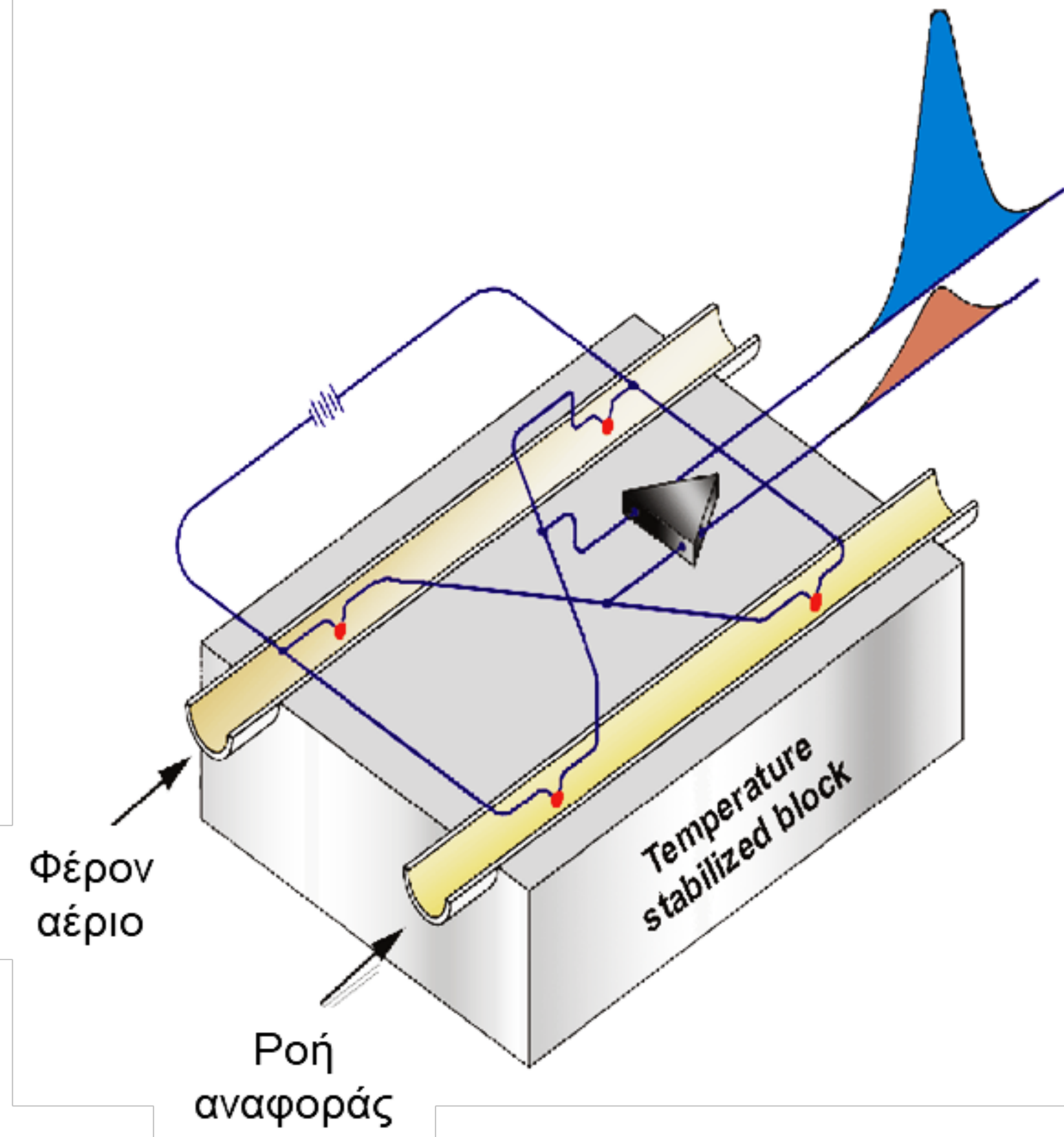
Τα χαρακτηριστικά ενός “ιδανικού” ανιχνευτή:

- ✓ Υψηλή σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα σε σχέση με το θόρυβο και το χρόνο
- ✓ Ευαισθησία ($\Delta \text{Response} / \Delta C$)
- ✓ Εκλεκτικότητα
- ✓ Γραμμική απόκριση στους αναλύτες η οποία να καλύπτει ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων
- ✓ Θερμοκρασία λειτουργίας έως **400 °C**
- ✓ Μικρός χρόνος απόκρισης ανεξάρτητος της ταχύτητα ροής
- ✓ Μη καταστρεπτικός
- ✓ Υψηλή αξιοπιστία και ευκολία χρήσης

Κανένας ανιχνευτής δεν συγκεντρώνει όλα αυτά τα χαρακτηριστικά

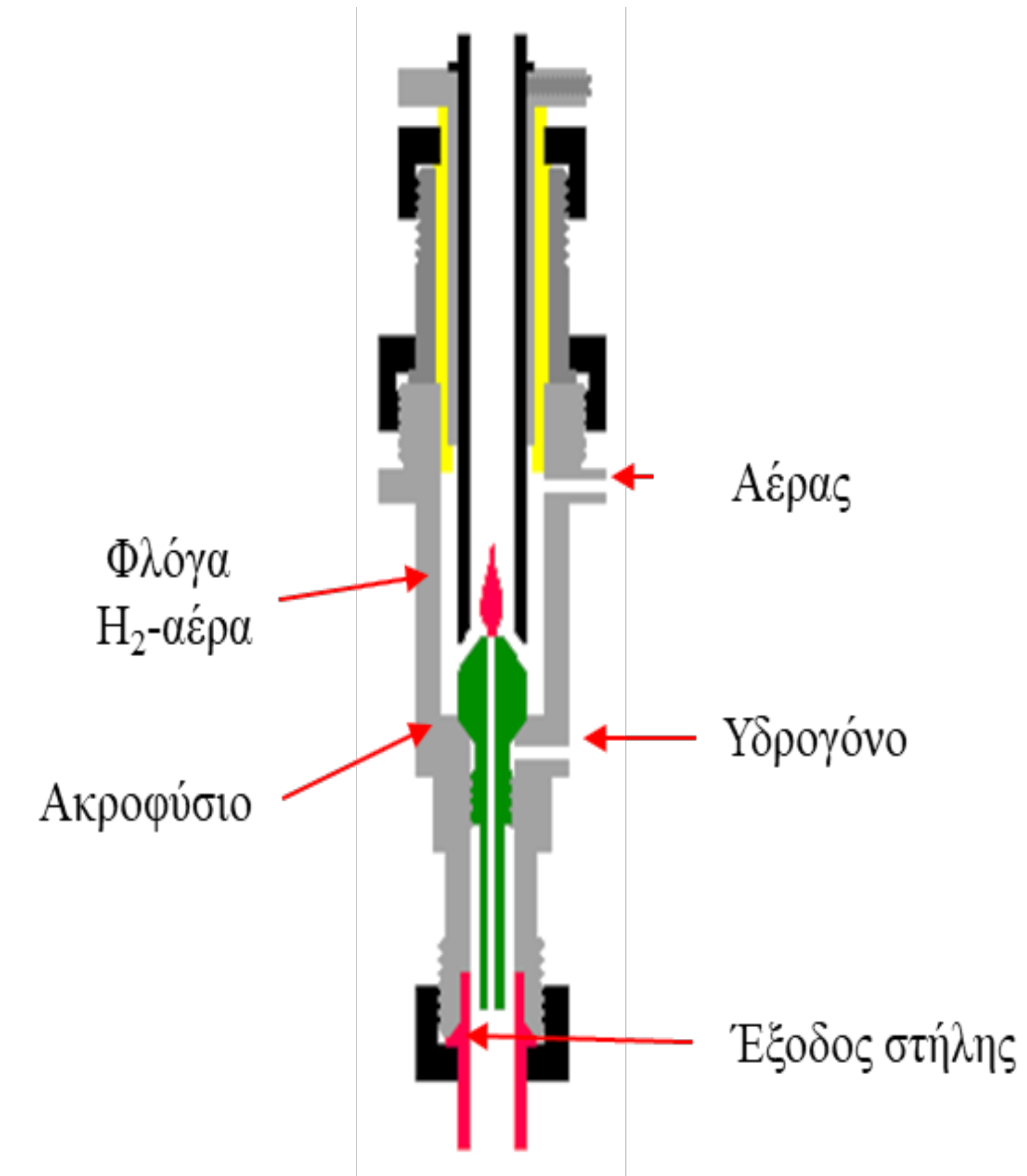
Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD)

- ❑ Βασίζεται στη μεταβολή της θερμικής αγωγιμότητας ενός ρεύματος αερίου η οποία οφείλεται στην παρουσία των μορίων της προσδιοριζόμενης ένωσης.
- Η θερμική αγωγιμότητα του φέροντος αερίου μειώνεται με την παρουσία της ένωσης σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις αυτής και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας στον ανιχνευτή.
- Οι τιμές θερμικής αγωγιμότητας των He και H₂ είναι ~ 6-10 φορές υψηλότερες από τις περισσότερες οργανικές ενώσεις και αυτό κάνει απαραίτητο τη χρήση των αερίων αυτών ως φέρον αέριο.
- ✓ Γραμμική περιοχή της τάξης του 10⁵ και είναι κατάλληλος για οργανικά και ανόργανα δείγματα.
- ✓ Μη καταστρεπτικός ανιχνευτής επιτρέποντας τη συλλογή του δείγματος μετά την ανίχνευση



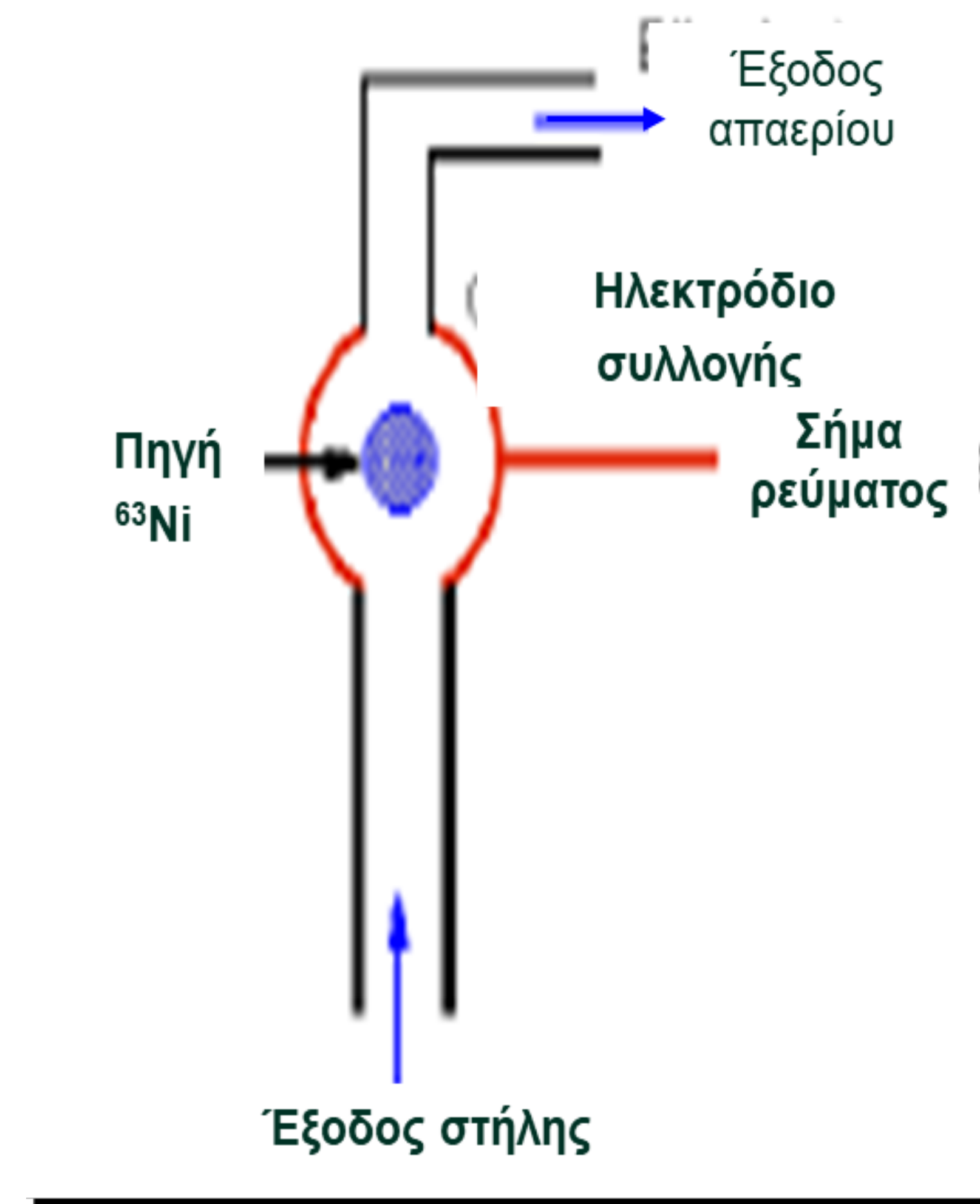
Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID)

- ❑ Οι περισσότερες **οργανικές ενώσεις** πυρολύονται σε **φλόγα H₂-αέρα** παράγοντας ιόντα και ηλεκτρόνια.
- Μεταξύ του ακροφυσίου καύσης και του ηλεκτροδίου συλλογής εφαρμόζεται δυναμικό μερικών εκατοντάδων volts.
- Το προκύπτον ρεύμα είναι ανάλογο του αριθμού **ατόμων άνθρακα** στη φλόγα.
- Αποκρίνεται σε **μάζα** και όχι σε συγκέντρωση.
- ✓ Ευρείας χρήσης ανιχνευτής.
- ✓ Μεγάλη γραμμική περιοχή απόκρισης ($\sim 10^7$) και χαμηλός θόρυβος. Πριν την ανάλυση απαιτείται σταθεροποίησή του για 24 hr.
- ✓ Υψηλή ευαισθησία $\sim 10^{-13}$ g/s του αναλύτη/sec
- ❖ **Δεν παρουσιάζει καλή ευαισθησία σε χαρακτηριστικές ομάδες** (π.χ. καρβονυλο- και αλογονο-ομάδες) καθώς επίσης και στα αδρανή αέρια H₂O CO₂ SO₂ NO_x.



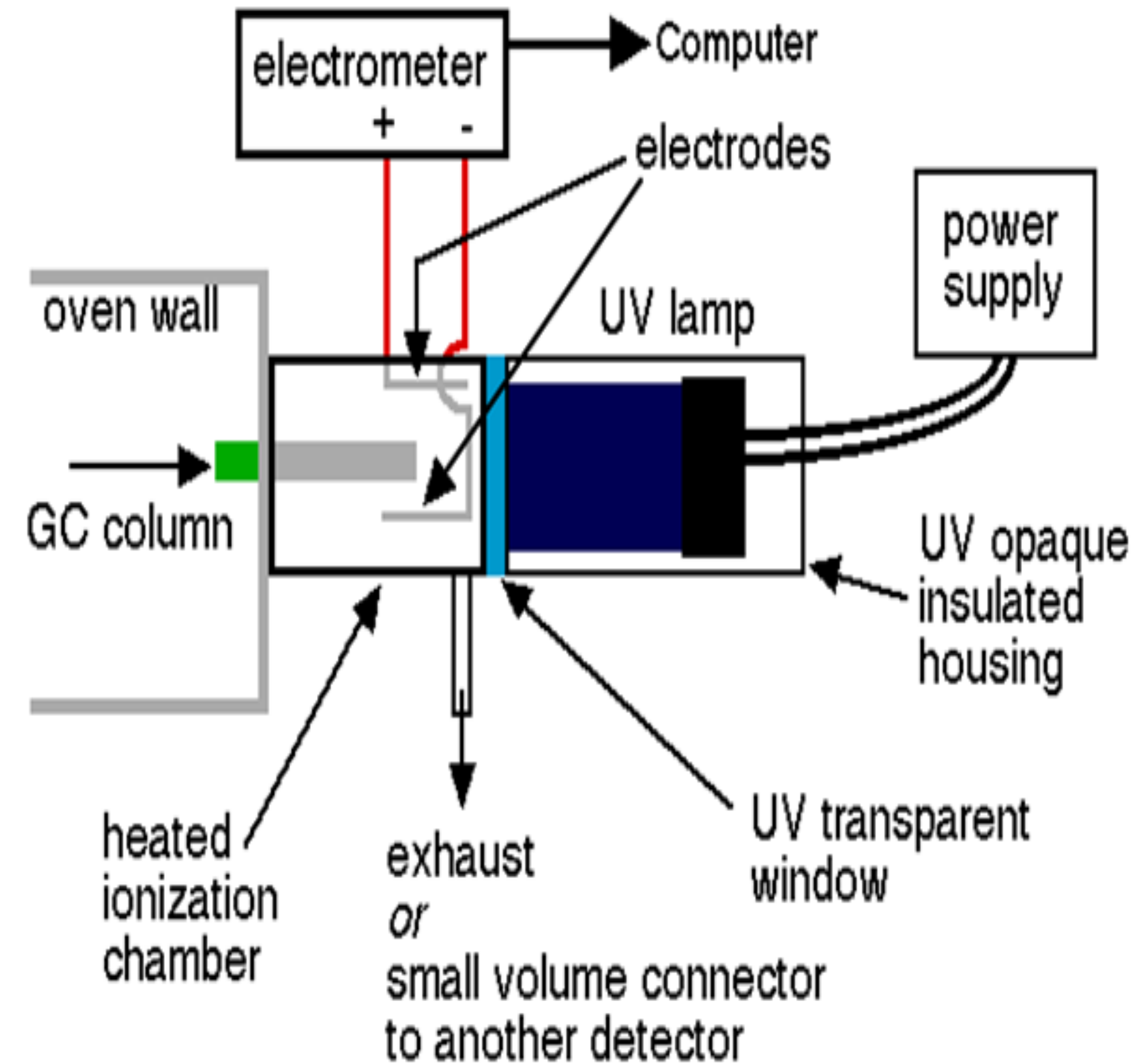
Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, ECD)

- ❑ Ανιχνευτής εκλεκτικός σε ενώσεις οι οποίες περιέχουν **αλογονο-ομάδες**
 - Πηγή β-σωματιδίων (ραδιενεργό Ni-63): τα εκπεμπόμενα e^- **ιονίζουν** το φέρον αέριο N_2 δημιουργώντας ρεύμα e^-
 - Ηλεκτραρνητικές ομάδες (αλογόνα, υπεροξειδία, κινόνες και η νίτρο-ομάδα) στο δείγμα **«συλλαμβάνουν»** τα e^- με αποτέλεσμα το ρεύμα να μειώνεται
- ✓ Υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία
- ✓ Μη καταστρεπτικός
- ✓ Υψηλή ευαισθησία $10^{-15}g/s$ για πολλές αλογονομένες ενώσεις (PCB, DDT κ.α.)
- ❖ Μικρή ευαισθησία σε αμίνες, αλκοόλες και υδρογονάνθρακες
- ❖ Μικρή γραμμική περιοχή (10^2)



Ανιχνευτής φωτοϊονισμού (Photoionization Detector, PID)

- ❑ Ο ανιχνευτής αυτός χρησιμοποιεί **ακτινοβολία UV** για τον ιονισμό των ενώσεων οι οποίες εκλύονται από τη στήλη
- Τα ιόντα τα οποία παράγονται **συλλέγονται από ηλεκτρόδια**. Το προκύπτον ρεύμα αποτελεί μέτρο της συγκέντρωσης των ενώσεων
- ✓ Υψηλή εκλεκτικότητα για τον προσδιορισμό ενώσεων οι οποίες περιέχουν **αρωματικό δακτύλιο**
- ❖ Γραμμική περιοχή $< 10^7$



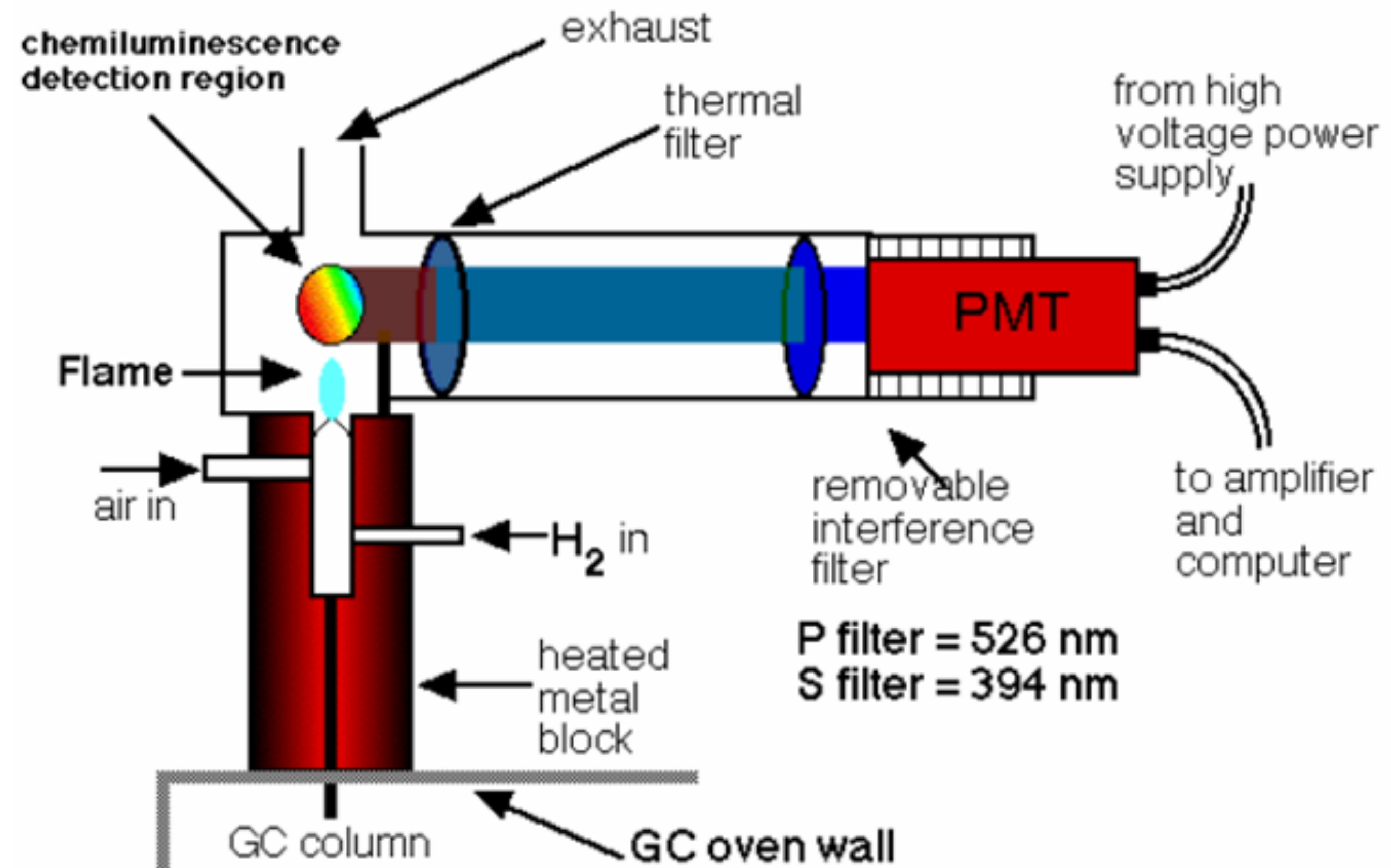
Φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (Flame Photometric Detector, FPD)

☐ Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ενώσεων οι οποίες περιέχουν **S** και **P**

➤ Η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στην μέτρηση της ακτινοβολίας η οποία **εκπέμπεται από διεγερμένα μόρια**: S(394 nm) και P(526 nm)

✓ Ευαισθησία: <1 pg/s (P), <10 pg/s (S)

❖ Γραμμική περιοχή: >10⁴ (P), >10³ (S)



Αντιδράσεις παραγωγοποίησης στην αεριοχρωματογραφία

✓ Η αεριοχρωματογραφία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πτητικών ενώσεων οι οποίες είναι θερμικά σταθερές.

❖ Δεν εφαρμόζεται όμως πάντοτε για ενώσεις υψηλού Μ.Β. ή ενώσεις οι οποίες περιέχουν πολικές ομάδες. Αυτές είναι δύσκολο να διαχωρισθούν με αεριοχρωματογραφία διότι δεν είναι αρκετά πτητικές, εκφυλίζονται σημαντικά, κατακρατούνται ισχυρά από τη στατική φάση, είναι θερμικά ασταθείς ή διασπώνται.

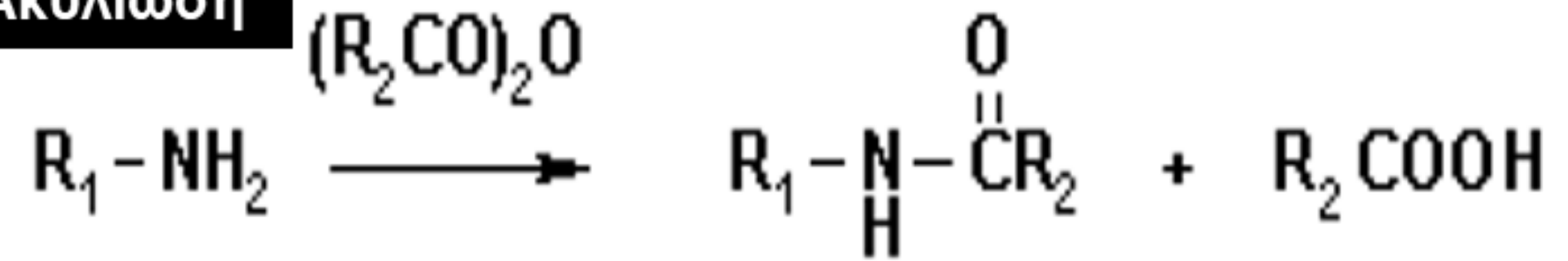
➤ Η χημική παραγωγοποίηση πριν την ανάλυση γενικά χρησιμοποιείται για :

- ✓ Αύξηση της πτητικότητας ή μείωση της πολικότητας της ένωσης
- ✓ Μείωση της θερμικής τους διάσπασης
- ✓ Αύξηση της απόκρισης του ανιχνευτή
- ✓ Αύξηση της διαχωριστικότητας και μείωση της διεύρυνσης των κορυφών

➤ Οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης ανάλογα με το αντιδραστήριο διακρίνονται σε

- ✓ Σιλανοποίησης
- ✓ Ακυλίωσης
- ✓ Αλκυλίωσης
- ✓ Εστεροποίησης

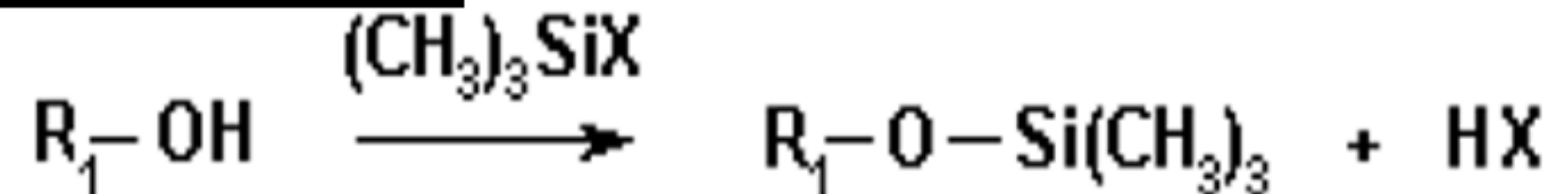
Ακυλίωση



Αλκυλίωση



Σιλανοποίησης



ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

ΠΡΟΦΙΛ VOCs ΣΕ ΚΡΑΣΙΑ ΜΕ PURGE & TRAP

Gas Chromatograph	Agilent 7890A
Column	Restek Rtx - VMS 30 meter, 0.25 mm ID, 1.4 μ m
Carrier Gas	Zero grade helium
Inlet Temperature	240 °C
Inlet Liner	Agilent Ultra Inert, 1 mm straight taper
Column Flow Rate	0.8 mL/min
Split Ratio	150:1
Oven Program	Hold at 40 °C for 1.5 min 16 °C/minute to 180 °C 40 °C/minute to 220 °C Hold at 220 °C for 4.25 min Total GC Run is 15.5 min

Figure 1. Standard

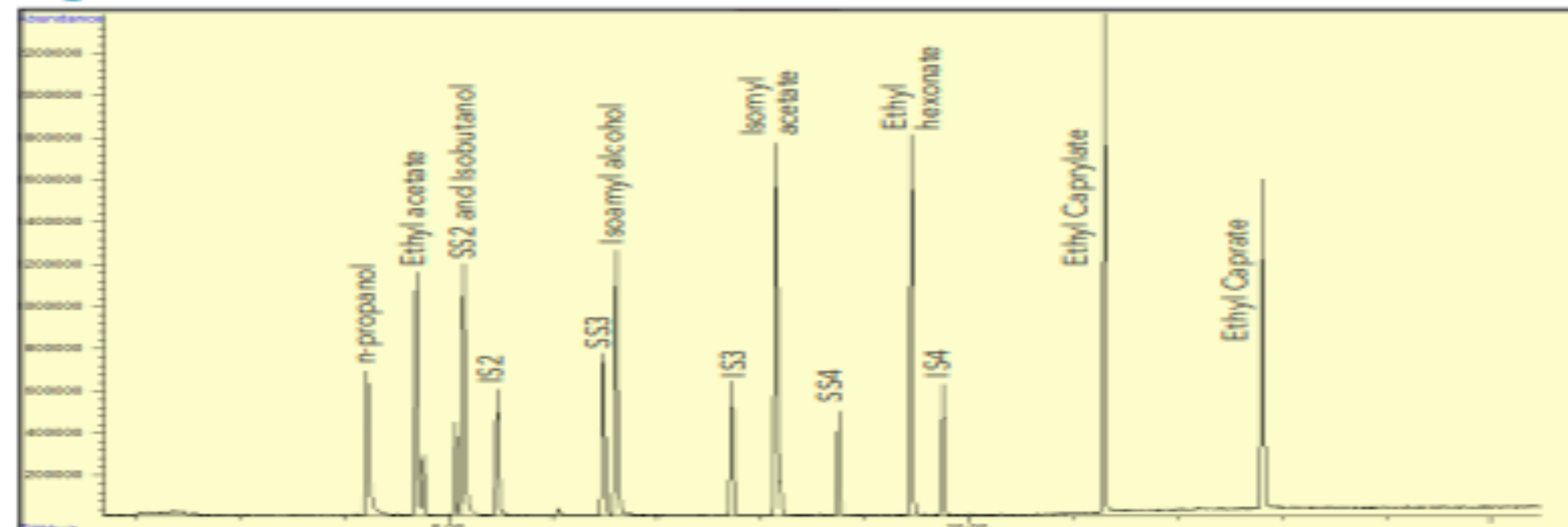


Figure 2. Chardonnay A

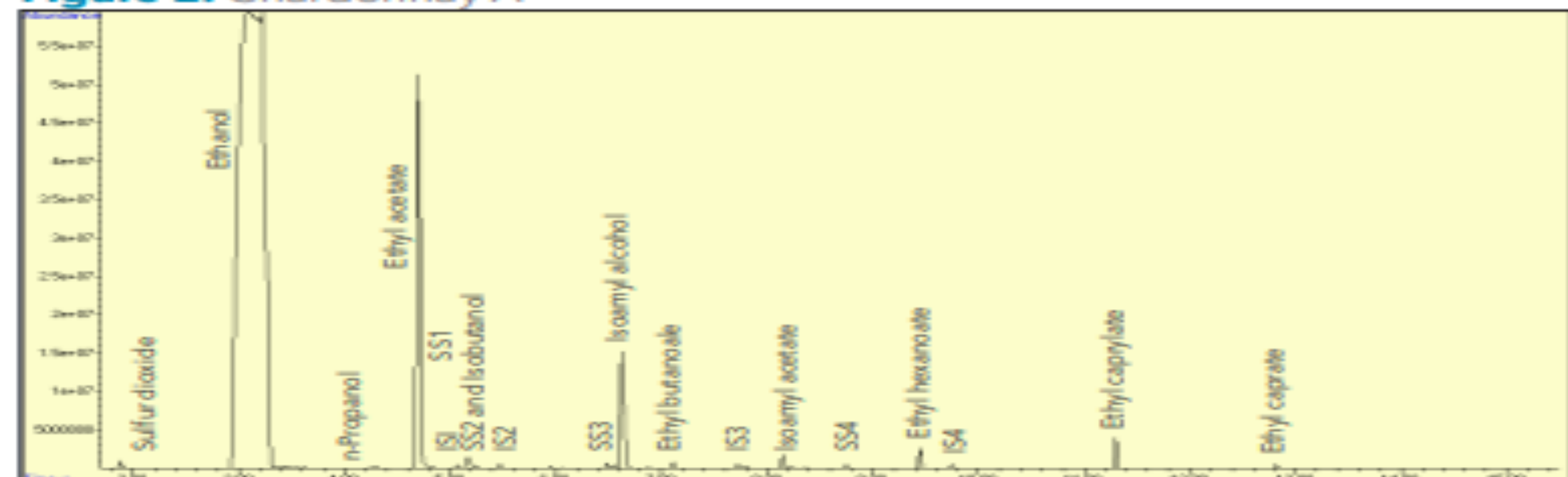
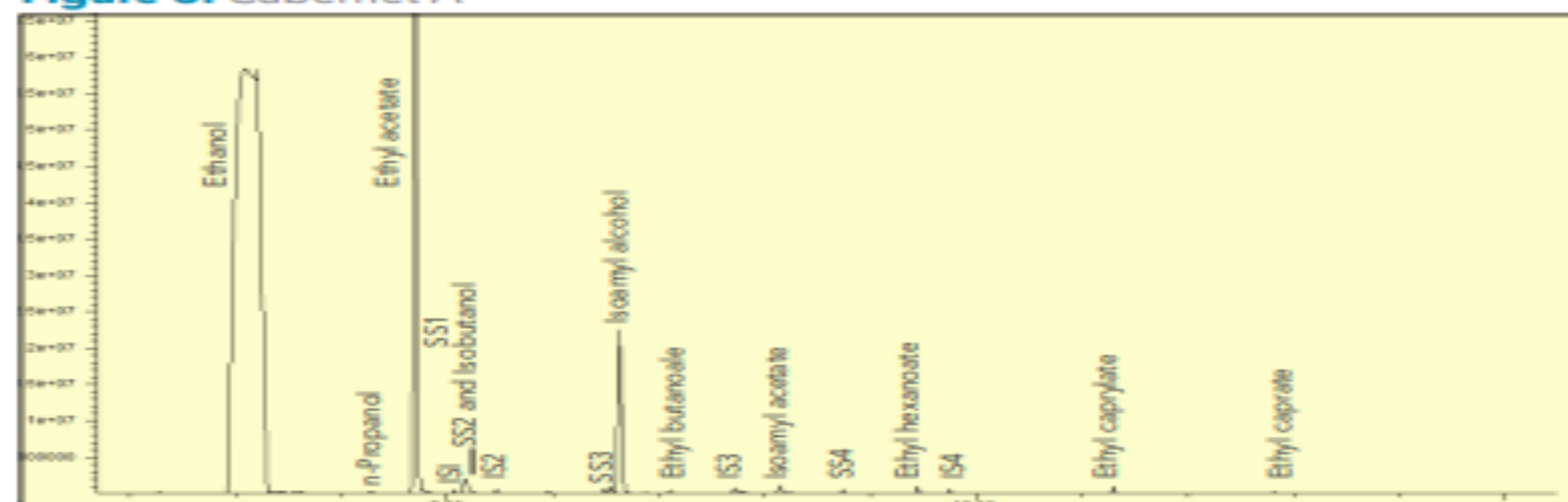


Figure 3. Cabernet A



ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (IC)

ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΞΕΛΙΞΗ (1)

- Η πρώτη αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία όπου συνδυάζεται η τεχνική της χρωματογραφίας με ιονανταλλακτικό μηχανισμό διαχωρισμού έγινε το 1937 από τους T. Taylor και H. Urey - χρήση ζεολίθων ως πληρωτικό υλικό, με σκοπό τον εμπλουτισμό δειγμάτων σε επιλεγμένα ισότοπα στοιχείων.
- Ο όρος “**ιοντική χρωματογραφία**” εισήχθη στη διεθνή βιβλιογραφία το 1975 από τον H. Small, με σκοπό την περιγραφή μίας τεχνικής **υγρής χρωματογραφίας διαχωρισμού ανόργανων ιόντων**

ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΞΕΛΙΞΗ (2)

- Η στατική φάση της στήλης διαχωρισμού ήταν **ιονανταλλακτική ρητίνη**, η κινητή φάση **υδατικό διάλυμα ηλεκτρολυτών** και ο ανιχνευτής **αγωγιμομετρικός**.
- Σε σειρά με τη στήλη διαχωρισμού ήταν απαραίτητη η τοποθέτηση μίας **δεύτερης στήλης ιονανταλλακτικής ρητίνης**, με δραστικές ομάδες **αντίθετου φορτίου** από τη στήλη διαχωρισμού, ώστε να επιτευχθεί
 - ✓ εξουδετέρωση της κινητής φάσης,
 - ✓ μείωση της αγωγιμότητας υποβάθρου
 - ✓ αύξηση του λόγου σήματος προς θόρυβο

*Τα αμέσως επόμενα χρόνια, υπήρξε **σημαντική ανάπτυξη** στην τεχνική της ιοντικής χρωματογραφίας*

ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΞΕΛΙΞΗ (3)

- Πλέον επιτυγχάνονται προσδιορισμοί, τόσο **οργανικών όσο και ανόργανων**, κατιόντων και ανιόντων, ακόμη και **πολύ ασθενώς ιονιζόμενων σωματιδίων**, σε ένα πλήθος φυσικών και βιομηχανικών δειγμάτων.
- Η τεχνική της **χημικής καταστολής** (δέσμευση των ιόντων της κινητής φάσης) δεν είναι πλέον μονόδρομος για την ιοντική χρωματογραφία, ενώ τα υγρά έκλουσης δεν είναι αναγκαστικά **υδατικά διαλύματα**.
- Εκτός από τον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή, έχει γίνει εφικτό να ενσωματωθούν στην ιοντική χρωματογραφία **όλα τα συστήματα ανίχνευσης** που είχαν αναπτυχθεί για HPLC και **οι αντλίες υψηλής απόδοσης** που αρχικά ήταν μη συμβατές εξαιτίας των διαβρώσεων που προκαλούσαν τα εκλουστικά υγρά της ιοντικής χρωματογραφίας.

ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΞΕΛΙΞΗ (4)

- Ο μηχανισμός διαχωρισμού ιόντων δεν περιορίζεται πλέον στον κλασικό **ιονανταλλακτικό** μηχανισμό, αλλά μπορούν να επιτευχθούν διαχωρισμοί με βάση μηχανισμό αποκλεισμού μεγεθών (ion exclusion chromatography), με μηχανισμό **ιοντικών αλληλεπιδράσεων** (ion interaction chromatography) ή με **συνδυασμό μηχανισμών** για ταυτόχρονο προσδιορισμό ανιόντων και κατιόντων (πολυδιάστατη ιοντική χρωματογραφία).
- Πολύ σημαντική είναι επίσης η εισαγωγή στην ιοντική χρωματογραφία της τεχνολογίας των **στηλών υψηλής απόδοσης**, που βασίζονται σε πληρωτικά υλικά μικρής χωρητικότητας και μικρού μεγέθους σωματιδίων.

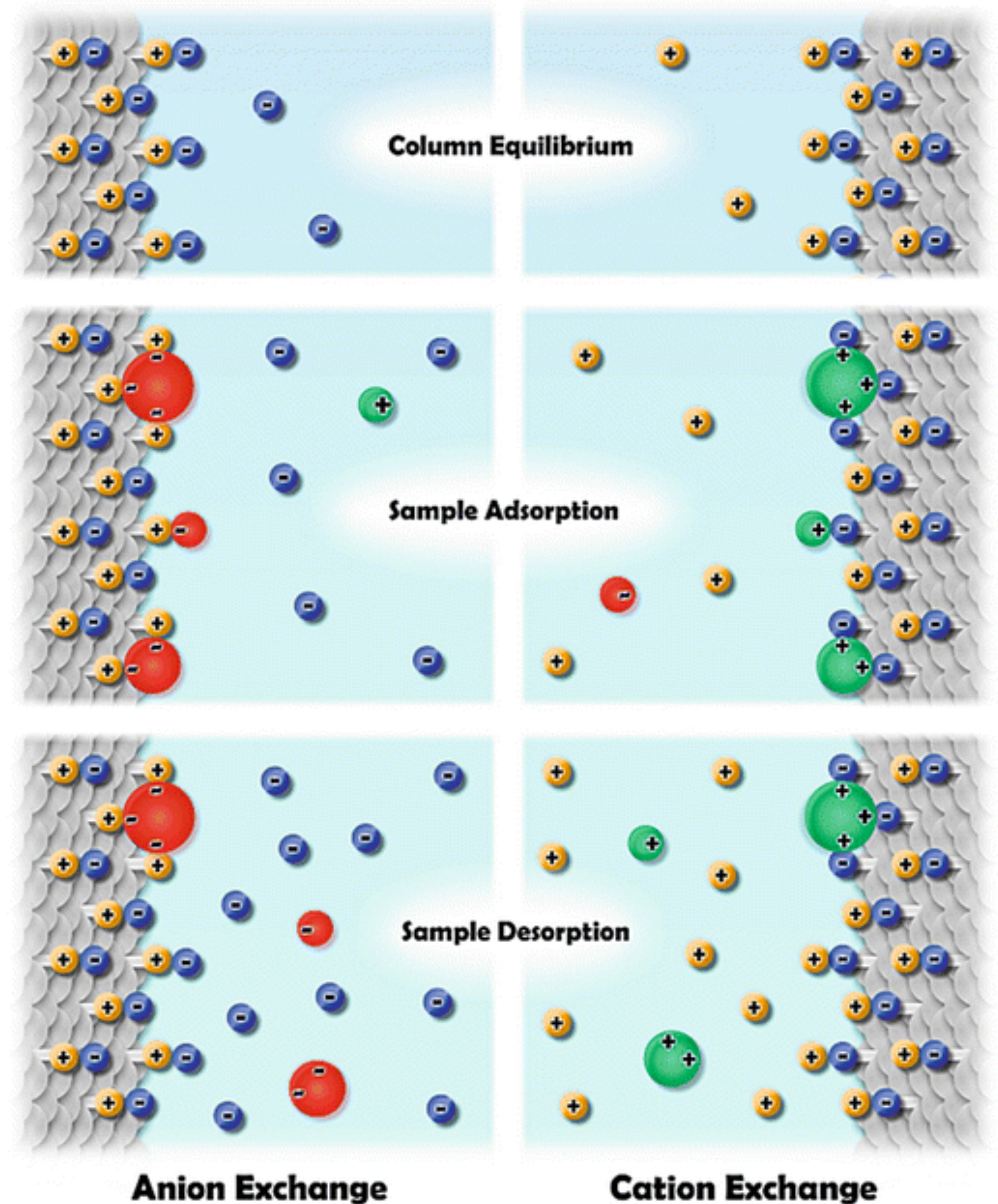
*Είναι εμφανές ότι ο όρος ιοντική χρωματογραφία, έπειτα από 45 και πλέον χρόνια ανάπτυξης, έχει διευρυνθεί, με αποτέλεσμα να συμπεριλαμβάνει **κάθε τεχνική χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που αφορά το διαχωρισμό και προσδιορισμό ιοντικών ενώσεων.***

ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗ (1)

➤ Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός με το μηχανισμό της ιονανταλλαγής στηρίζεται, όπως όλοι οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί, **στην κατανομή μίας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων** και στη **στιγμαία αποκατάσταση χημικής ισορροπίας**.

➤ Οι φάσεις που συμμετέχουν στον παραπάνω διαχωρισμό είναι:

- I. Ένα διάλυμα ιόντων, με διαλύτη συνήθως νερό, υπό ροή (**κινητή φάση** ή εκλουστικό υγρό)
- II. Ένα **στερεό πολυμερές**, με σχεδόν μηδενική διαλυτότητα στο διαλύτη της κινητής φάσης, που φέρει **ιονισμένες δραστικές ομάδες** (functional groups) χημικώς προσδεμένες στο πολυμερές υπόστρωμα (ιονανταλλάκτης).



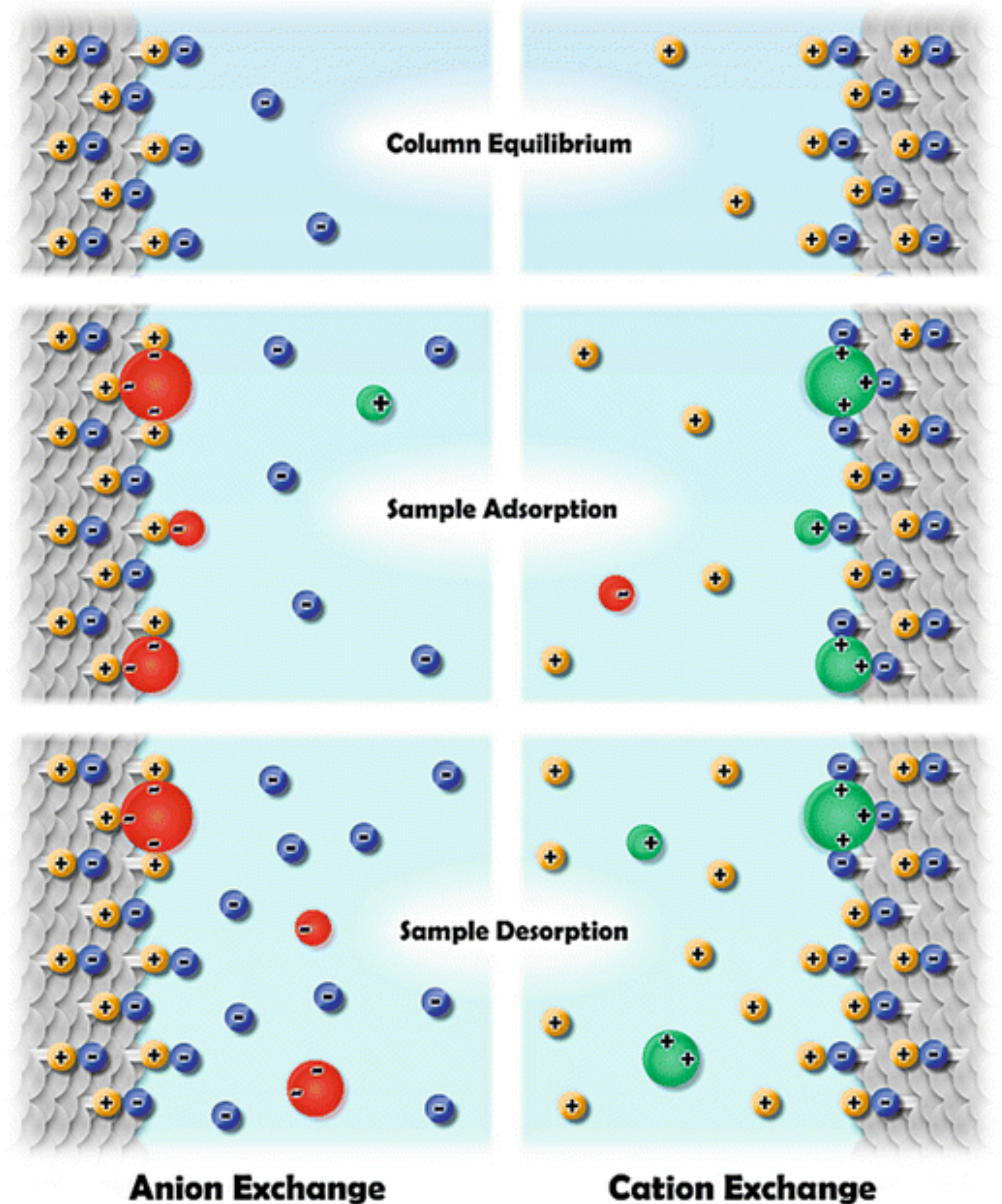
ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗ (2)

1^ο στάδιο: Εξισορρόπηση στήλης, τα αντισταθμιστικά ιόντα της κινητής φάσης καλύπτουν τις θέσεις της ρητίνης

2^ο στάδιο: Το δείγμα εισέρχεται στη στήλη και δεσμεύει θέσεις της ρητίνης απελευθερώνοντας τα αντισταθμιστικά ιόντα της κινητής φάσης

3^ο στάδιο: Οι αναλύτες απελευθερώνονται και οι θέσεις καλύπτονται από αντισταθμιστικά ιόντα της κινητής φάσης

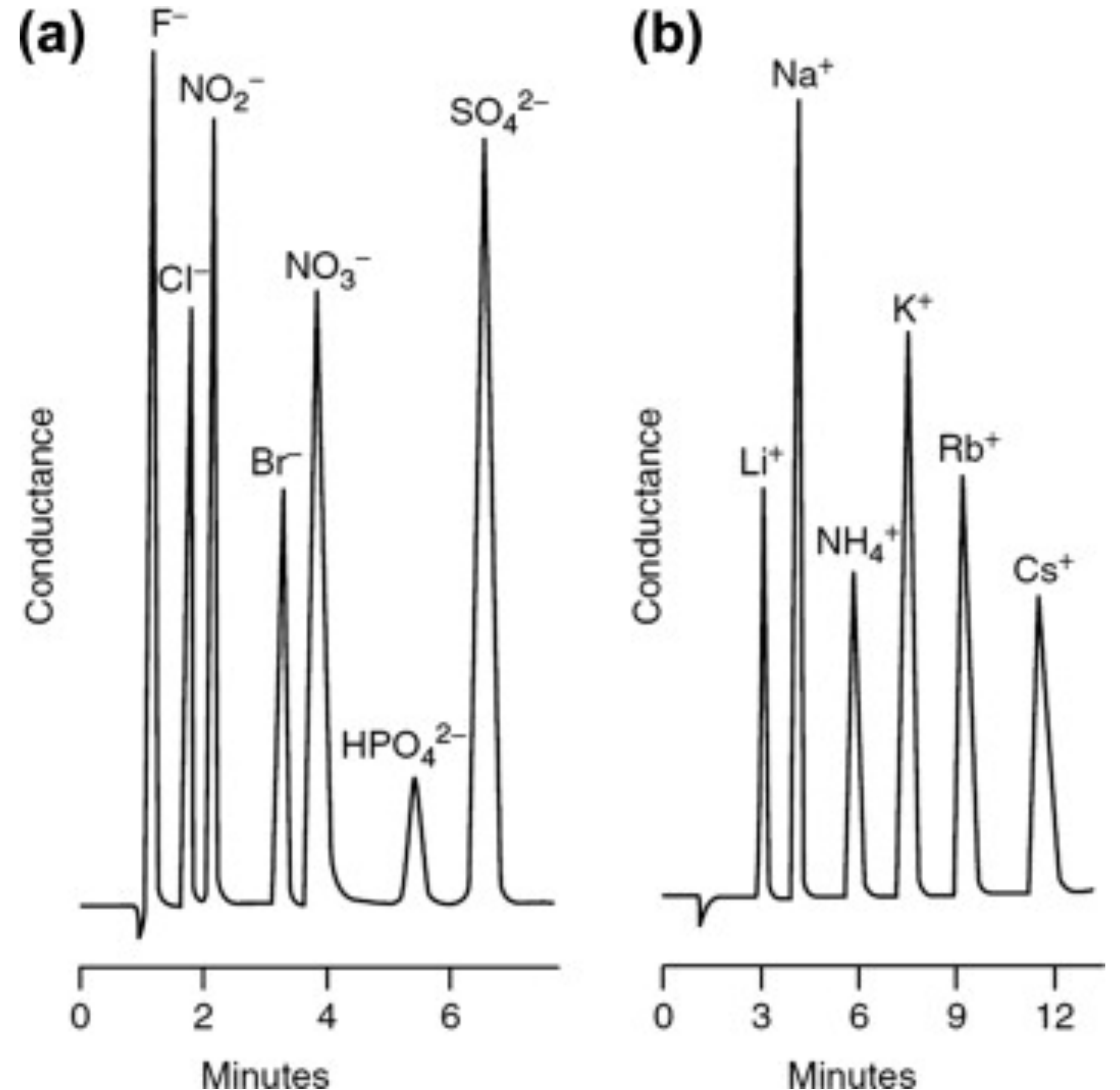
*Η ηλεκτρική ουδετερότητα του ιονανταλλάκτη επιτυγχάνεται με την ύπαρξη ίσου και αντίθετου φορτίου προς τις δραστικές ομάδες **αντισταθμιστικών ιόντων** (counter ions), τα οποία συγκρατούνται στη ρητίνη εξαιτίας ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις δραστικές ομάδες.*



ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗ (3)

Ο χρόνος κατακράτησης εξαρτάται:

1. Τις ιδιότητες της στατικής φάσης
2. Τις ιδιότητες της κινητής φάσης
3. Τον τύπο και την φύση των αναλυτών
4. Δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις και ισορροπίες, όπως επιδράσεις διαλυτών, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις οργανικών ιόντων, δεσμοί υδρογόνου, συμπλοκοποιήσεις.



ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗ (4)

Γενικοί κανόνες:

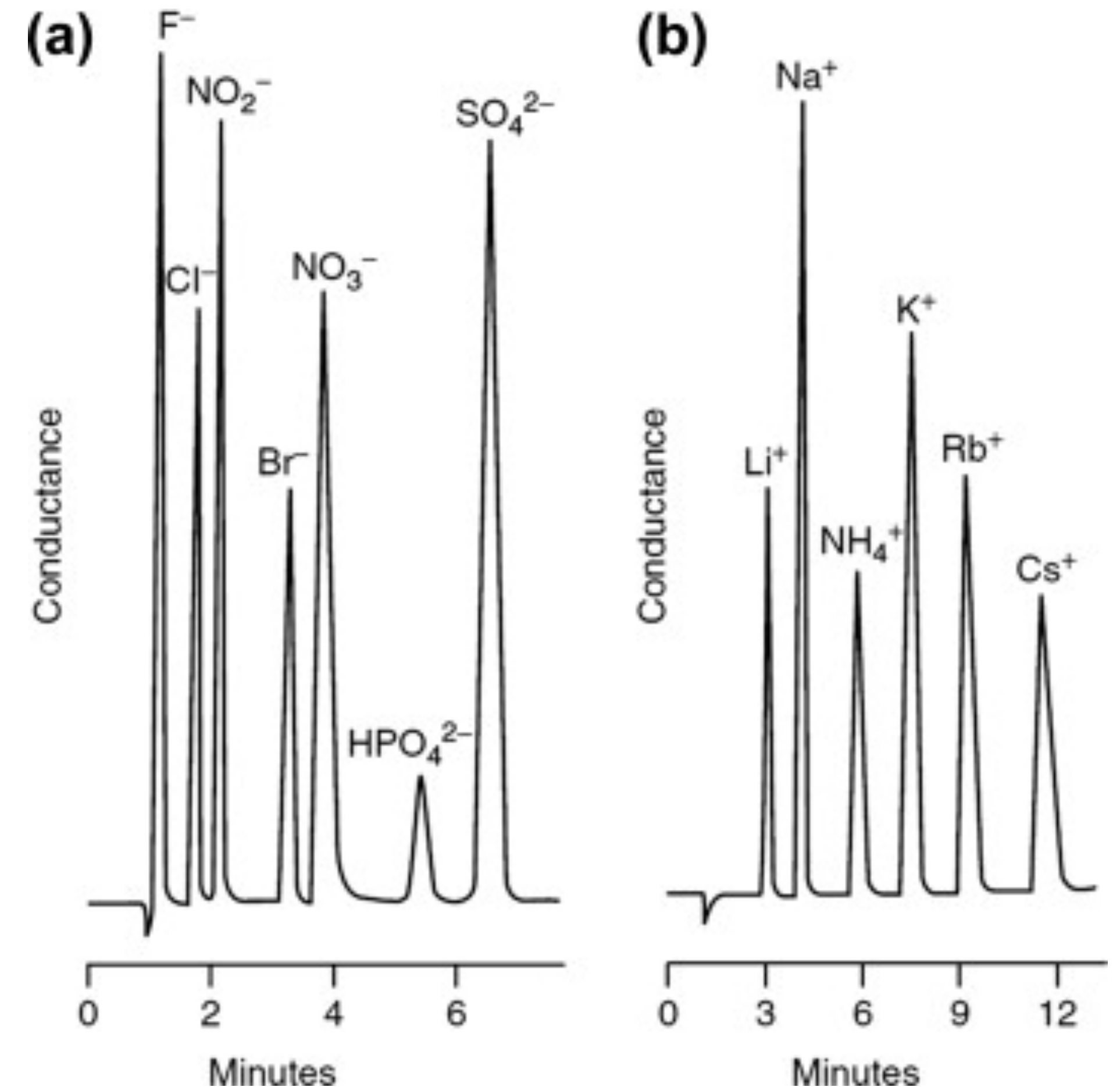
1. Αύξηση φορτίου συνεπάγεται αύξηση του χρόνου έκλουσης

Επομένως, η μεταβολή του pH για εκλουστικά ιόντα που υφίστανται πρωτονίωση, αναμένεται να έχει επίδραση στην εκλουστική τους ικανότητα. Με αυτόν τον τρόπο εξηγείται γιατί τα ανθρακικά ιόντα (CO_3^{2-}) έχουν μεγαλύτερη εκλουστική ικανότητα από τα όξινα ανθρακικά (HCO_3^-) και αντίστοιχα τα όξινα φωσφορικά (HPO_4^{2-}) από τα δισόξινα φωσφορικά (H_2PO_4^-). Έτσι εξηγείται και η παρατήρηση ότι οι αλκαλικές γαίες εμφανίζουν μεγαλύτερους χρόνους ανάσχεσης από τα αλκάλια.

2. Για ιόντα με το ίδιο φορτίο εμφανίζονται διαφορές που σχετίζονται με το μέγεθος του αφυδατωμένου ιόντος καθώς και με άλλες ιδιότητες. αυτό που κατακρατείται περισσότερο είναι το ιόν με το μικρότερο μέγεθος.

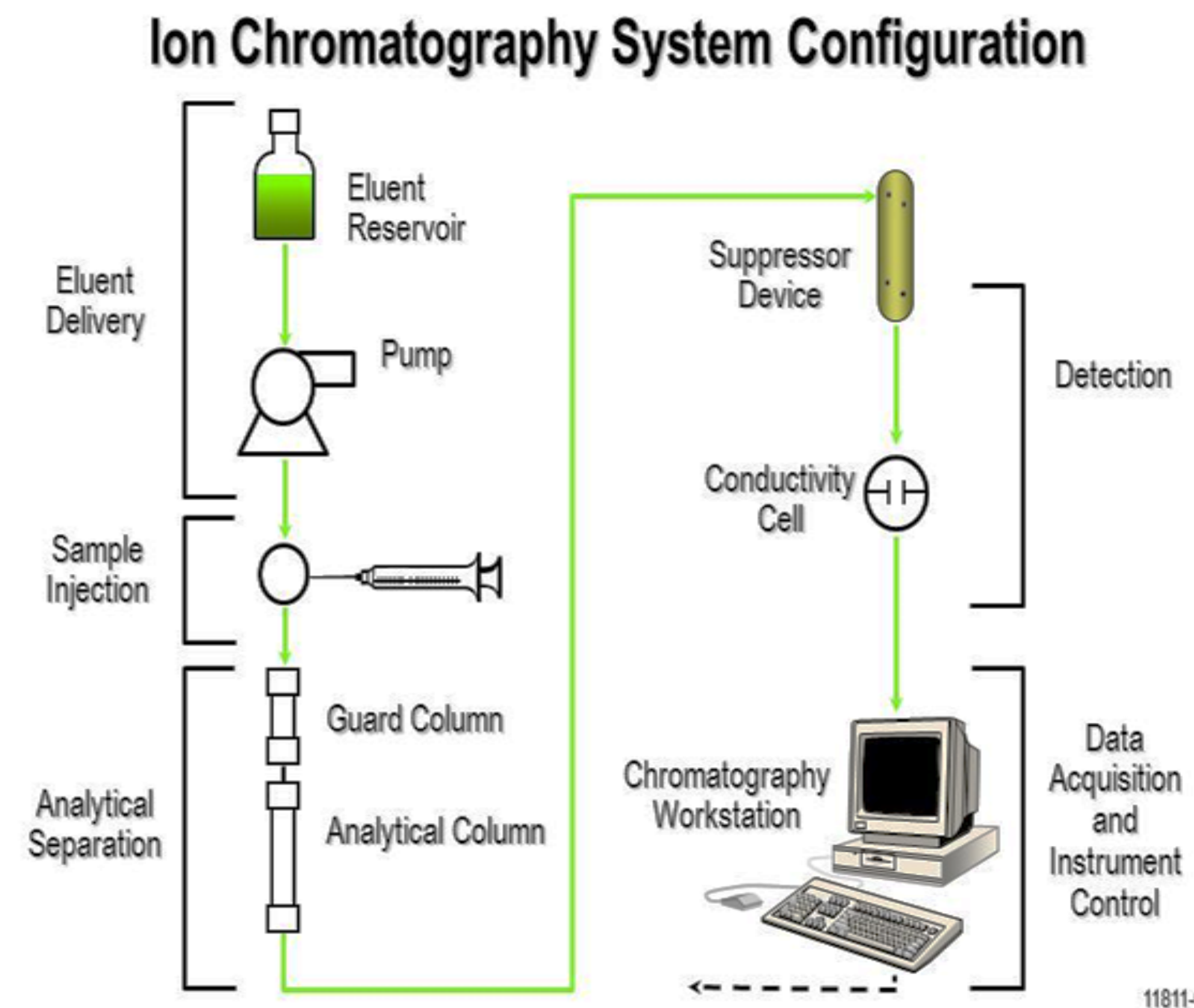
Η εκλεκτικότητα των ιονανταλλακτικών ρητινών για τα αλκάλια ακολουθεί τη σειρά $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+$ και για τα αλογόνα τη σειρά $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$.

3. Αύξηση της συγκέντρωσης του αντισταθμιστικού ιόντος στην κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του συντελεστή κατανομής του εκλουόμενου ιόντος και επομένως οδηγεί σε μείωση του χρόνου ανάσχεσης.



ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ (1)

- I. Τα δοχεία παροχής κινητής φάσης, η σύσταση της οποίας μπορεί να είναι σταθερή (ισοκρατική έκλυση) ή μεταβαλλόμενη (βαθμιδωτή έκλυση)
- II. Την αντλία, η οποία καθορίζει τη ροή της κινητής φάσης με την παλινδρομική κίνηση ενός ή δύο πιστονίων, τα οποία τοποθετούνται σε σειρά ή παράλληλα
- III. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος, το οποίο αποτελείται από βρόγχο (Loop) καθορισμένου όγκου και μπορεί να συνοδεύεται από σύστημα αυτόματης δειγματοληψίας.
- IV. Την αναλυτική στήλη, η οποία είναι υπεύθυνη για το χρωματογραφικό διαχωρισμό



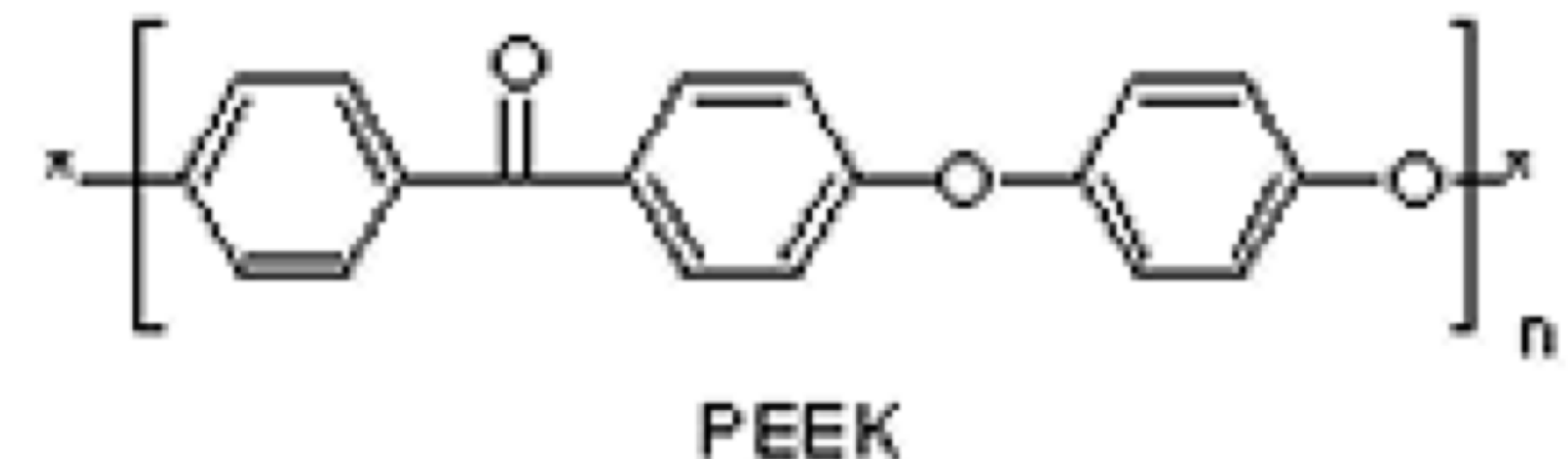
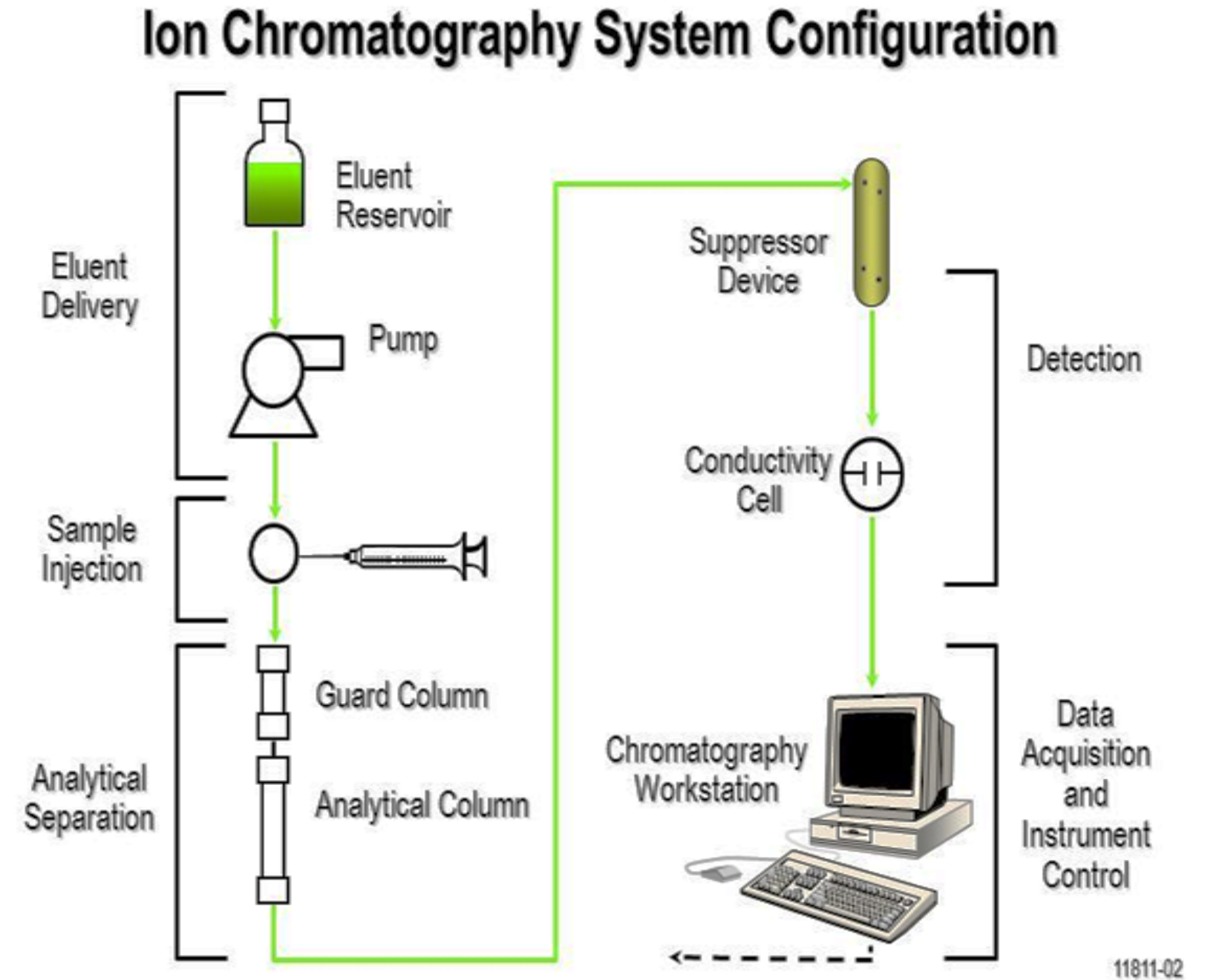
ΣΥΣΤΗΜΑ ΙΟΝΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ (2)

V. Το σύστημα καταστολής (suppressor), το οποίο μειώνει με χημικό, ηλεκτροχημικό ή ηλεκτρονικό τρόπο την αγωγιμότητα υποβάθρου και επομένως τοποθετείται, χωρίς να είναι πάντα απαραίτητο, μόνο στην περίπτωση που ο ανιχνευτής είναι αγωγιμομετρικός.

VI. Τον ανιχνευτή

VII. Το σύστημα ελέγχου, το λογισμικό επεξεργασίας και τη μονάδα αποθήκευσης των δεδομένων.

➤ Με εξαίρεση το θάλαμο της αντλίας, το υλικό κατασκευής των τμημάτων της ιοντικής χρωματογραφίας είναι το οργανικό πολυμερές PEEK (PolyEtherEtherKetone), το οποίο είναι ανθεκτικό σε όλη την περιοχή του pH



Διαχωρισμός με το μηχανισμό των ιοντικών αλληλεπιδράσεων

- Στη διεθνή βιβλιογραφία συναντάται ένα πλήθος διαφορετικών όρων γι' αυτό το είδος μηχανισμού, όπως: χρωματογραφία ζεύγους ιόντων (ion pair chromatography), χρωματογραφία ιοντικών αλληλεπιδράσεων (ion interaction chromatography), χρωματογραφία δυναμικής ιονανταλλαγής (dynamic ion exchange chromatography) και ιοντική χρωματογραφία κινητής φάσης (mobile-phase ion chromatography).
- Παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν **οι στήλες υψηλής απόδοσης της HPLC, κυρίως οι στήλες αντιστρόφου φάσεως C₁₈ και C₈**. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μακροπορώδη συμπολυμερή στυρενίου- διβινυλοβενζολίου.
- Η κινητή φάση περιέχει έναν ιοντικό τροποποιητή ή **ψευδοϊονανταλλάκτη** (pseudoexchanger), ο οποίος δρα ως μία **κινούμενη θέση ιονανταλλαγής** και παράλληλα έχει την ικανότητα να προσροφάται στη στατική φάση της στήλης μόνος του ή ως ζεύγος με κάποιο από τα προς διαχωρισμό ιόντα. Για διαχωρισμούς κατιόντων το οκτανοσουλφονικό οξύ είναι ένας συχνά χρησιμοποιούμενος ιοντικός τροποποιητής και για τους διαχωρισμούς ανιόντων το τετραβουτυλαμμώνιο.
- Για την ερμηνεία του μηχανισμού έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα, μία απλούστευση των οποίων είναι ότι **η κατακράτηση ενός ιόντος εξαρτάται αφενός μεν από την προσρόφηση του ζεύγους ιόντων στη στατική φάση, αφετέρου δε από μηχανισμό ιονανταλλαγής** στον οποίο η δραστική ομάδα είναι ο ιοντικός τροποποιητής προσροφημένος στη στατική φάση.
- ✓ Η χρωματογραφία ιοντικών αλληλεπιδράσεων στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζει **καλύτερους διαχωρισμούς** σε σχέση με τον κλασικό ιονανταλλακτικό μηχανισμό, τόσο επειδή χρησιμοποιεί **στήλες υψηλής απόδοσης** όσο και επειδή είναι εφικτή η ρύθμιση της **χωρητικότητας των θέσεων ιονανταλλαγής** και της **ισχύος των υφιστάμενων αλληλεπιδράσεων** με μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης.

Διαχωρισμός με το μηχανισμό αποκλεισμού ιόντων

- Στη χρωματογραφία αποκλεισμού ιόντων, λαμβάνει χώρα διαχωρισμός ιόντων ασθενών οξέων ή βάσεων σε χρωματογραφική στήλη, η **στατική φάση της οποίας έχει δραστικές ομάδες του ίδιου φορτίου με το φορτίο των ιόντων που διαχωρίζονται.**
- Σε αυτήν την περίπτωση τα ιόντα δεν μπορούν να κατακρατηθούν από τη στατική φάση, ωστόσο το κλάσμα των αδιάστατων μορίων μπορεί να προσροφηθεί στη στατική φάση και να λάβει χώρα **διαχωρισμός με βάση την προσρόφηση.**
- Η ανάσχεση ενός ιόντος ασθενούς οξέος ή ασθενούς βάσης εξαρτάται από δύο κυρίως παράγοντες: α) **από το κλάσμα των αδιάστατων μορίων**, δηλαδή από τη σταθερά διάστασης του οξέος ή της βάσης και β) **από την ισχύ των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αδιάστατων μορίων και της στατικής φάσης.**

Στήλες ιοντικής χρωματογραφίας

- Οι ρητίνες ιονανταλλαγής είναι εν γένει το υλικό επιλογής για την πλήρωση στηλών ιοντικής χρωματογραφίας.
- Μια ιονανταλλακτική ρητίνη αποτελείται **από τρία** κυρίως τμήματα:
 - I. Ένα μη διαλυτό οργανικό ή ανόργανο υπόστρωμα,
 - II. Δραστικές ιονανταλλακτικές ομάδες (functional groups)
 - III. Αντισταθμιστικά ιόντα αντιθέτου φορτίου προς τις ιονανταλλακτικές ομάδες (counter ions), έτσι ώστε να διατηρείται η ηλεκτρική ουδετερότητα.
- Οι ρητίνες ιονανταλλαγής πρέπει επίσης να διαθέτουν τα εξής **χαρακτηριστικά ποιότητας**
 - I. Ταχύτητα ανταλλαγής των ιόντων όσο το δυνατόν μεγαλύτερη
 - II. Χημική σταθερότητα σε ευρεία περιοχή pH,
 - III. Καλή μηχανική αντοχή και αντίσταση σε μεγάλες μεταβολές της οσμωτικής πίεσης
 - IV. Αντίσταση στην αποσύνθεση κατά την πλήρωση και τη ροή της κινητής φάσης
- Μια ποικιλία υλικών έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα ιονανταλλακτικών ρητινών. Το υλικό που κυριαρχεί πλέον στις σύγχρονες στήλες ιοντικής χρωματογραφίας είναι τα **οργανικά συμπολυμερή του στυρενίου**, ενώ χρησιμοποιείται και η **πηκτή διοξειδίου του πυριτίου**.
- ✓ Η **χημική σταθερότητα** είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα των οργανικών πολυμερών σε σχέση με την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου, που παρουσιάζει ευαισθησία σε αλκαλικό περιβάλλον.

Οργανικά πολυμερή για στήλες Ιοντικής χρωματογραφίας

➤ Υπάρχουν **δύο ειδών πολυμερή** τα οποία χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα στατικών φάσεων στηλών ιοντικής χρωματογραφίας:

I. Τα πολυμερή τύπου πηκτής ή μικροπορώδη

II. Τα μακροπορώδη πολυμερή

➤ Η διαφορά στη δομή μεταξύ των δύο υλικών έχει σημαντική επίδραση στην ταχύτητα ιονανταλλαγής

✓ Τα πολυμερή τύπου πηκτής σχηματίζονται με το συμπολυμερισμό στυρενίου και **διβινυλοβενζολίου** παρουσία καταλύτη βενζυλοϋπεροξειδίου. Η παρουσία του διβινυλοβενζολίου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό **σταυροδεσμών**, ο αριθμός των οποίων ελέγχεται με το ποσοστό της συγκέντρωσης του διβινυλοβενζολίου στο αρχικό μίγμα των μονομερών. Το ποσοστό διβινυλοβενζολίου πρέπει συνεπώς να καθορίζεται με ακρίβεια και μπορεί να κυμαίνεται από 4 έως 12 %. Μικρότερο ποσοστό από 4 % οδηγεί σε **ασταθείς ρητίνες** κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ μεγαλύτερο ποσοστό από 12 % δημιουργεί φαινόμενα **αποκλεισμού ιόντων**

✓ Τα μακροπορώδη πολυμερή σχηματίζονται επίσης με το συμπολυμερισμό στυρενίου και διβινυλοβενζολίου. Σε αυτήν την περίπτωση όμως, έχει προστεθεί στο αρχικό μίγμα των μονομερών **ένας διαλύτης μη αναμίξιμος με το νερό**, αναμίξιμος με τα μονομερή, αλλά φτωχός διαλύτης για το τελικό πολυμερές. Ο διαλύτης κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού **δημιουργεί σταγονίδια εντός του σχηματιζόμενου πολυμερούς με αποτέλεσμα τη δημιουργία πόρων μεγάλου μεγέθους** στο τελικό πολυμερές. Οι μακροπορώδεις ρητίνες χρησιμοποιούνται για κατασκευή στηλών μεγάλης χωρητικότητας ή για ιοντική χρωματογραφία **ζεύγους ιόντων**

Κατιοανταλλακτικές ρητίνες (1)

- Ο πλέον κοινός τρόπος παρασκευής ιονανταλλακτικής ρητίνης είναι η εισαγωγή των δραστικών ομάδων με **χημική τροποποίηση** του πολυμερούς υποστρώματος. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται μονομερή τα οποία φέρουν εξ αρχής τις δραστικές ομάδες, χωρίς όμως αυτός ο τρόπος να χρησιμοποιείται ευρέως στις στήλες ιοντικής χρωματογραφίας.
- Στις κατιοανταλλακτικές ρητίνες η συνήθως χρησιμοποιούμενη δραστική ομάδα είναι η **σουλφονική ομάδα $-\text{SO}_3^-$** , η οποία εισάγεται εκ των υστέρων στο πολυμερές υπόστρωμα με αντίδραση **αρωματικής υποκατάστασης**, που εμφανίζει μεγάλη απόδοση και λαμβάνει χώρα σχεδόν σε όλους τους αρωματικούς δακτυλίους
- Ο αριθμός των σουλφονικών ομάδων που θα εισαχθούν πρέπει να **είναι ελεγχόμενος**, διότι καθορίζει τη χωρητικότητα της ρητίνης.

Κατιοανταλλακτικές ρητίνες (2)

- Οι **υψηλής χωρητικότητας ρητίνες** (περίπου 5 meq $-\text{SO}_3^-/\text{g}$ ξηρής ρητίνης), ήταν αρχικά οι μόνες χρησιμοποιούμενες, διότι ήταν οι μόνες συμβατές με τους καταστολείς στήλης, ενώ μετά την εισαγωγή των καταστολέων μεμβράνης περιορίστηκαν στην ανάλυση δειγμάτων υψηλής συγκέντρωσης. Έχουν δύο σημαντικά μειονεκτήματα:
 - ❖ Έχουν **υψηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης**
 - ❖ Για να υπάρχει ικανοποιητική διάχυση των ιόντων στη ρητίνη πρέπει να κατασκευάζονται με μικρότερο μέγεθος σωματιδίων με αποτέλεσμα να έχουν **μικρότερη αντοχή στις υψηλές πιέσεις**
- Οι **χαμηλής χωρητικότητας ρητίνες** βρίσκουν μεγαλύτερη εφαρμογή για αναλυτικούς σκοπούς διότι δεν εμφανίζουν τα προαναφερόμενα μειονεκτήματα. Η πλέον χρήσιμη περιοχή χωρητικότητας είναι από 0,01 έως 0,05 meq $-\text{SO}_3^-/\text{g}$ ξηρής ρητίνης. Πρόκειται για ρητίνες μεμβράνης, στις οποίες η **σούλφωση έχει περιοριστεί αυστηρά σε μία λεπτή στιβάδα** στην επιφάνεια των σωματιδίων πλήρωσης, ενώ **το εσωτερικό** των σωματιδίων **δε συμμετέχει στο μηχανισμό** της ιονανταλλαγής και επομένως στο διαχωρισμό
- Εκτός από τη χρήση της σουλφονικής ομάδας, σημαντική εφαρμογή έχει και η **χρήση της καρβοξυλικής ομάδας** ($-\text{COO}^-$). Η διαφορά σε σχέση με τη σουλφονική ομάδα είναι ότι επειδή τα καρβοξυλικά οξέα είναι ασθενή οξέα, ο βαθμός διάστασης των καρβοξυλικών ομάδων **εξαρτάται από το pH**, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η ρύθμιση της χωρητικότητας της ρητίνης με ρύθμιση του pH της κινητής φάσης.

Ανιοανταλλακτικές ρητίνες (1)

- Η συνήθως χρησιμοποιούμενη ομάδα των ανιοανταλλακτικών ρητινών είναι το **τεταρτοταγές αμμώνιο $-N(R)_3^+$** , το οποίο εισάγεται στο υπόστρωμα πολυμερούς σε δύο στάδια:
 - I. Πραγματοποιείται χλωρομεθυλίωση, δηλαδή εισαγωγή της ομάδας $(-CH_2Cl)$ στον αρωματικό δακτύλιο και
 - II. Εισάγεται η τριτοταγής αμίνης $N(R)_3$ με αντίδραση υποκατάστασης του χλωρίου.
- Στις ανιοανταλλακτικές ρητίνες, οι στήλες χαμηλής χωρητικότητας πλεονεκτούν έναντι των στηλών υψηλής χωρητικότητας για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν στις κατιοανταλλακτικές στήλες
- Ως ασθενώς βασική ανιοανταλλακτική ομάδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τριτοταγής, η δευτεροταγής ή η πρωτοταγής **αμινομάδα**. Οι δυνατότητες που παρουσιάζονται είναι αντίστοιχες με τις δυνατότητες που αναφέρθηκαν στις κατιοανταλλακτικές ρητίνες με καρβοξυλική ομάδα.
- Η σημαντική διαφορά σε σχέση με τις κατιοανταλλακτικές στήλες είναι ότι **δεν υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου της χωρητικότητας** της ρητίνης με έλεγχο της απόδοσης των αντιδράσεων τροποποίησης του υποστρώματος.

Ανιοανταλλακτικές ρητίνες (2)

- Για την παρασκευή ρητινών χαμηλής χωρητικότητας ακολουθείται **η τεχνική της επιφανειακής συσσωμάτωσης** (surface agglomeration), η οποία γίνεται ως εξής:
 - I. Παρασκευάζεται μία χαμηλής χωρητικότητας κατιοανταλλακτική ρητίνη,
 - II. Παρασκευάζεται κολλοειδές αιώρημα ανιοανταλλακτικής ρητίνης και
 - III. Εξαιτίας ηλεκτροστατικών δυνάμεων αποτίθενται τα κολλοειδή ανιοανταλλακτικά σωματίδια στην κατιοανταλλακτική ρητίνη.
- **Τα πλεονεκτήματα** των ρητινών συσσωμάτωσης είναι ότι:
 - ✓ Μπορεί να γίνει εύκολα έλεγχος της χωρητικότητας της ρητίνης με επιλογή του μεγέθους των σωματιδίων του υποστρώματος και του κολλοειδούς αιωρήματος
 - ✓ Γίνεται ευκολότερα έλεγχος του ποσοστού σταυροδεσμών των κολλοειδών σωματιδίων σε σχέση με τα σωματίδια μεμβράνης
 - ✓ Είναι εύκολη η παραγωγή στηλών με επαναλήψιμα χαρακτηριστικά
 - ✓ Ο αριθμός των δραστικών ομάδων και ο βαθμός επιδιαλύτωσης είναι ομοιόμορφος σε όλη την επιφάνεια των σωματιδίων

Εναλλακτικές στήλες ιοντικής χρωματογραφίας

- Για την κατασκευή στηλών ιοντικής χρωματογραφίας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί **υπόστρωμα πηκτής διοξειδίου του πυριτίου**. Δραστικές κατιοανταλλακτικές ή ανιοανταλλακτικές ομάδες μπορούν να προσδεθούν με τις ομάδες υδροξειδίου του πυριτίου μέσω ολιγομερών που δρουν ως γέφυρες
- ✓ Οι στήλες αυτές αντέχουν σε **υψηλότερες πιέσεις** και παράλληλα έχουν **μεγαλύτερο αριθμό θεωρητικών πλακών**, διότι παρουσιάζουν μικρότερη αντίσταση μεταφοράς μάζας
- ❖ Σημαντικό μειονέκτημα αυτών των στηλών είναι η **χημική αστάθεια σε αλκαλικό περιβάλλον** και η περιορισμένη δυνατότητα κατασκευής στηλών με σημαντικές διαφοροποιήσεις στη **χωρητικότητα και την εκλεκτικότητα**. Για το λόγο αυτό οι εφαρμογές τους περιορίζονται στους προσδιορισμούς μικρών οργανικών και ανόργανων ιόντων
- Με περιορισμένη αλλά αυξανόμενη χρήση είναι οι στήλες που βασίζονται σε **υπόστρωμα ακρυλικού**. Οι στήλες αυτές είναι χημικώς περισσότερο σταθερές από τις στήλες πηκτής διοξειδίου του πυριτίου, αλλά λιγότερο σταθερές σε σχέση με τις ρητίνες πολυστυρενίου.
- ✓ Στις στήλες αυτές ότι το σχήμα της κορυφής και ο χρόνος έκλουσης επηρεάζονται λιγότερο από τις ποσότητες των ιόντων, είναι δηλαδή περισσότερο **ανεκτικές στο φαινόμενο της υπερφόρτωσης**.

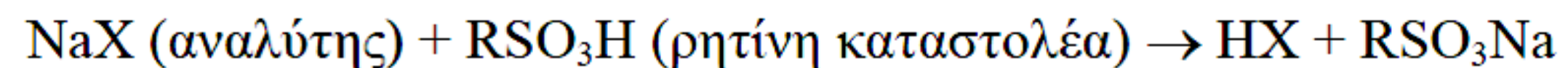
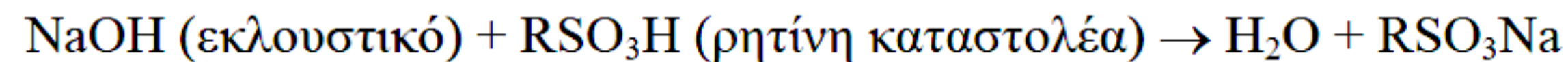
Καταστολείς Ιοντικής χρωματογραφίας (Suppressor)

- Με τον όρο “**καταστολή**” στην ιοντική χρωματογραφία ονομάζεται η μείωση του σήματος υποβάθρου, η οποία μπορεί να γίνει
 - I. Με ηλεκτρονικό τρόπο (electronic suppression)
 - II. Με χημικό τρόπο (chemical suppression)
- Στην περίπτωση της ηλεκτρονικής καταστολής το σήμα υποβάθρου ουσιαστικά δεν καταστέλλεται αλλά **αφαιρείται**, για αυτό η ηλεκτρονική καταστολή δε θεωρείται ότι ανήκει στην καταστέλλομενη ιοντική χρωματογραφία
- Η καταστολή στην περίπτωση του προσδιορισμού **ανιόντων** ισοδυναμεί με ανταλλαγή όλων των κατιόντων της κινητής φάσης με **κατιόντα υδρογόνου**, ενώ στην περίπτωση του προσδιορισμού **κατιόντων** ισοδυναμεί με ανταλλαγή όλων των ανιόντων της κινητής φάσης με **ανιόντα υδροξυλίου**

Καταστολείς- Εξέλιξη (1)

➤ Ο πρώτος τύπος καταστολέα, που κυκλοφόρησε με την εισαγωγή της τεχνικής το **1975**, ήταν μία **στήλη ιονανταλλακτικής ρητίνης**, η οποία ήταν συνδεδεμένη σε σειρά με τη στήλη διαχωρισμού.

✓ Στην περίπτωση του διαχωρισμού ανιόντων, η ρητίνη του καταστολέα ήταν **ισχυρά όξινη κατιοανταλλακτική ρητίνη** με αντισταθμιστικά ιόντα κατιόντα υδρογόνου, με σκοπό τη δέσμευση των κατιόντων της κινητής φάσης και την απελευθέρωση ίσου φορτίου κατιόντων υδρογόνου



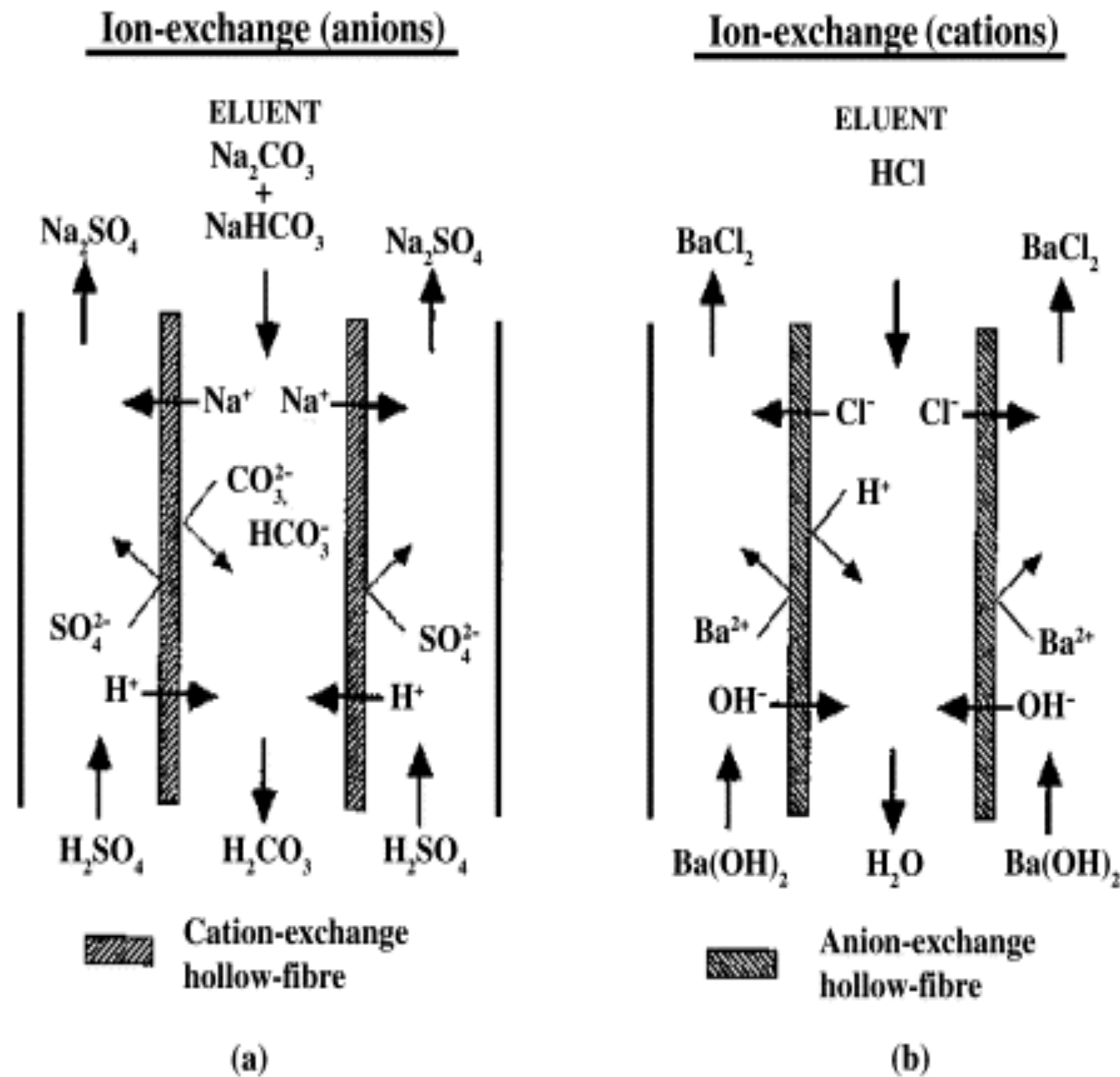
✓ Οι προσδιορισμοί κατιόντων χρησιμοποιούσαν αντίστοιχο σύστημα με τη μοναδική διαφορά ότι η ρητίνη ήταν **ισχυρά βασική ανιοανταλλακτική ρητίνη** με αντισταθμιστικά ιόντα ανιόντα υδροξυλίου.

❖ Τα μειονεκτήματα αυτού του αρχικού τύπου καταστολέων ήταν:

- I. Οι αναλυτικές στήλες ήταν **μεγάλης χωρητικότητας**, έπρεπε να χρησιμοποιείται υψηλής ιοντικής συγκέντρωσης κινητή φάση, με αποτέλεσμα, για να εξασφαλίζεται πλήρης καταστολή, να απαιτείται **μεγάλη ποσότητα ρητίνης καταστολής** και επομένως συστήματα μεγάλου νεκρού όγκου
- II. Έπειτα από κάποιες ώρες λειτουργίας απαιτείτο η **αναγέννηση της ρητίνης** και επομένως η διακοπή της λειτουργίας του χρωματογράφου
- III. Επηρέαζαν το χρόνο έκλουσης **οργανικών κυρίως ιόντων** με μηχανισμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Καταστολείς- Εξέλιξη (2)

- Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων των καταστολέων στήλης, αναπτύχθηκαν **οι καταστολείς μεμβράνης** το 1981.
 - Η κινητή φάση διέρχεται από το εσωτερικό μέρος της ινώδους μεμβράνης, ενώ κατάλληλο διάλυμα αναγέννησης της καταστολής (regenerating solution) διέρχεται από το εξωτερικό μέρος της μεμβράνης.
 - **Η ροή του διαλύματος αναγέννησης ήταν συνεχής** και δεν απαιτείτο διακοπή της λειτουργίας για την αναγέννηση των μεμβρανών.
- ✓ Εκτός από το πλεονέκτημα της συνεχούς λειτουργίας, οι καταστολείς μεμβράνης είχαν **μικρότερο νεκρό όγκο** (περίπου 300 μl) σε σχέση με τους καταστολείς στήλης και επομένως βελτίωσαν την απόδοση των διαχωρισμών.
- ❖ Μειονέκτημα σε σχέση με τους καταστολείς στήλης ήταν η **μικρότερη απόδοση καταστολής ιδιαίτερα σε σχετικά μεγάλες ταχύτητες ροής (>2 ml/min) και υψηλές συγκεντρώσεις εκλουστικών (> 0,005 M).**



Καταστολείς- Εξέλιξη (3)

- Η επόμενη εξέλιξη των καταστολέων μεμβράνης έγινε το **1985** με την εισαγωγή των καταστολέων **μικρομεμβράνης** με πάχος μικρότερο από 0,075 mm, οι οποίοι χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα.
- Οι καταστολείς μικρομεμβράνης είναι κατασκευασμένοι από **δύο ημιπερατές μεμβράνες** τοποθετημένες ανάμεσα σε **τρία δικτυωτά πλέγματα** με περιορισμένο ποσοστό σούλφωσης
- Η ροή της κινητής φάσης γίνεται ανάμεσα στις δύο μικρομεμβράνες, ενώ η ροή του **διαλύματος αναγέννησης** γίνεται από την **εξωτερική πλευρά** των μεμβρανών, αντίθετα από τη ροή της κινητής φάσης και με ταχύτητα 3 έως 10 φορές μεγαλύτερη.
- Τα δικτυωτά πλέγματα, που βρίσκονται σε επαφή με τις μεμβράνες, αφενός μεν **μειώνουν το νεκρό όγκο** στο χώρο της κινητής φάσης και αφετέρου δημιουργούν στροβιλώδη ροή του διαλύματος αναγέννησης με αποτέλεσμα την **καλύτερη μεταφορά ιόντων** στην επιφάνεια της μεμβράνης.
- Επίσης, εξαιτίας των **σουλφονικών ομάδων**, αυξάνουν τη **συγκέντρωση ιόντων καταστολής** στην επιφάνεια της μεμβράνης χωρίς να αυξάνουν ταυτόχρονα τη συγκέντρωση των αντισταθμιστικών ιόντων.
- Ως διάλυμα αναγέννησης της καταστολής χρησιμοποιείται στην περίπτωση του προσδιορισμού ανιόντων, **υδατικό διάλυμα σουλφονικού οξέος** και στην περίπτωση του προσδιορισμού κατιόντων, **υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του τετραβουτυλαμμωνίου**

Καταστολείς- Εξέλιξη (4)

➤ Τα πλεονεκτήματα των καταστολέων μικρομεμβράνης είναι:

✓ Έχουν **πολύ μικρό νεκρό όγκο**, περίπου 50 μl, δηλαδή σχεδόν το 1/6 του νεκρού όγκου των καταστολέων ινώδους μεμβράνης

✓ Έχουν **μεγαλύτερη χωρητικότητα καταστολής** (ισοδύναμα ιόντων που καταστέλλονται ανά μονάδα χρόνου), από 200 έως 300 μεq / min,

✓ Έγινε εφικτή η εφαρμογή **βαθμιδωτής έκλυσης**

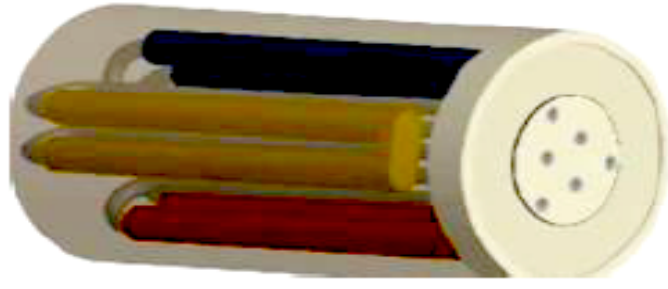
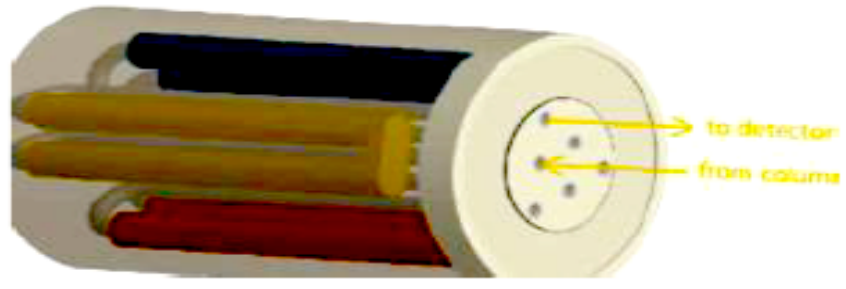
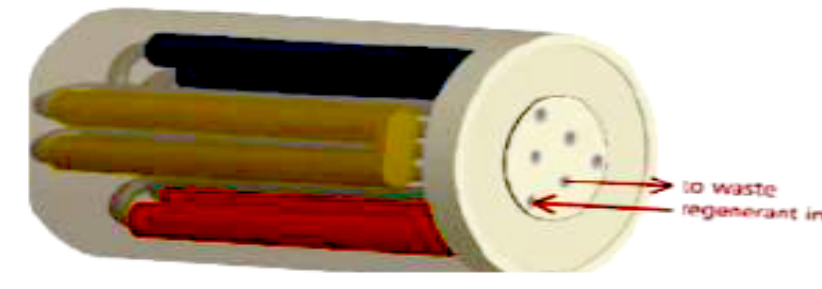
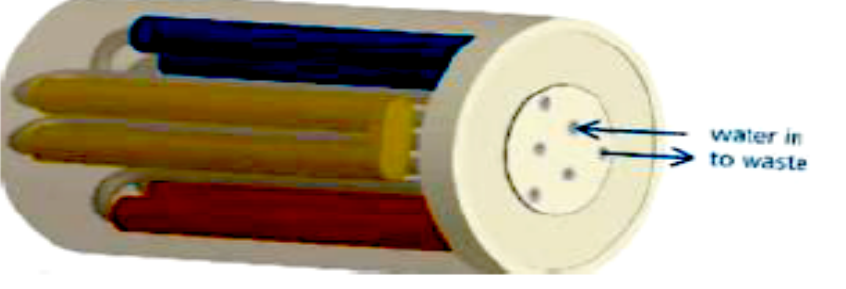
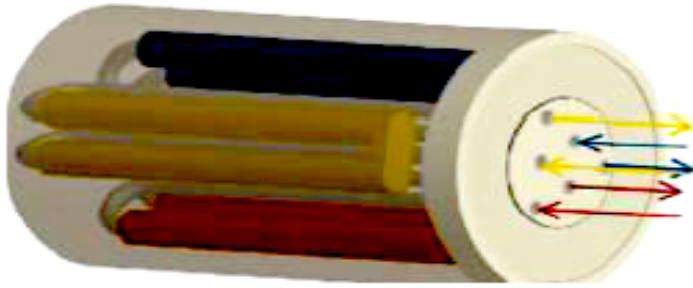
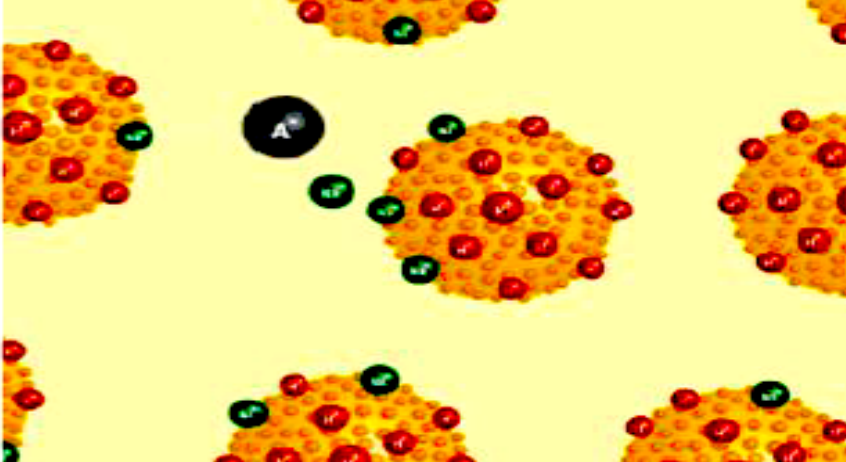
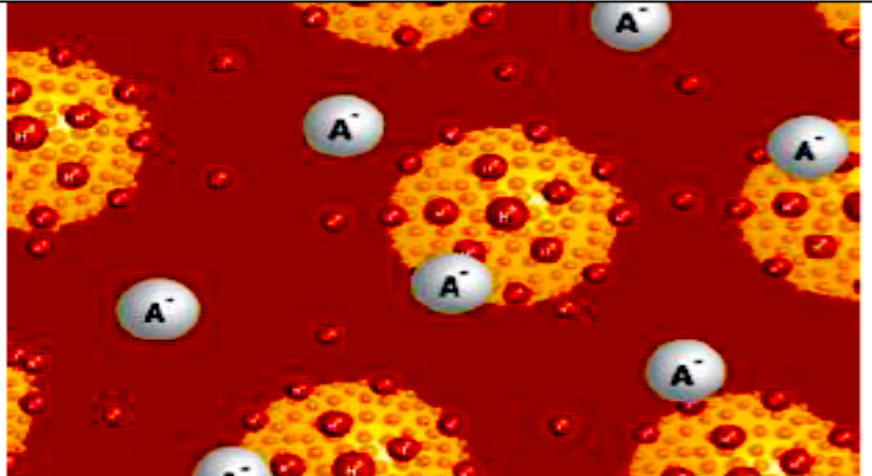
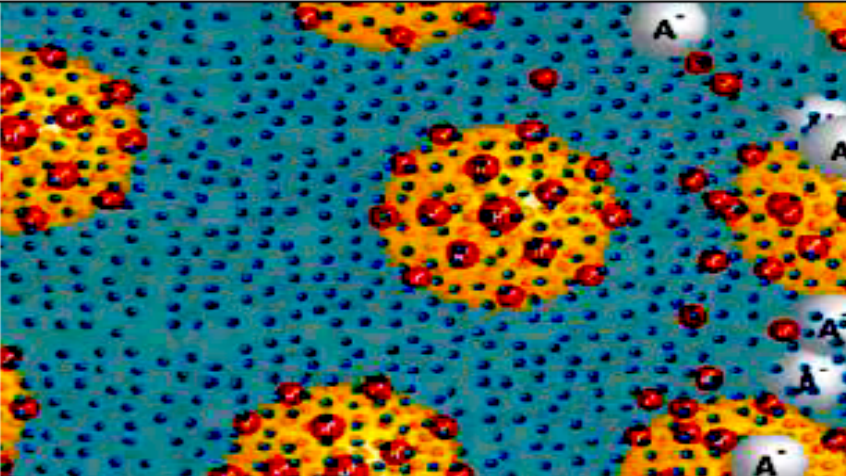
✓ Είναι συμβατοί με τη χρήση **οργανικών διαλυτών**

❖ Το σημαντικότερο μειονέκτημα αυτών των καταστολέων είναι ότι απαιτούν συνεχή και **σταθερή παροχή διαλύματος αναγέννησης**, με συνέπεια την κατανάλωση μεγάλης ποσότητας αντιδραστηρίων.

Καταστολείς- Εξέλιξη (5)

- Το **1991** παρουσιάστηκε μία τροποποίηση του καταστολέα μικρομεμβράνης, κατάλληλη για στήλες εσωτερικής διαμέτρου 2 mm.
- Η τροποποίηση που είχε γίνει αφορούσε τη **μείωση του όγκου του χώρου ροής** της κινητής φάσης δύο έως τρεις φορές, ώστε να διατηρηθεί η γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης σταθερή.
- ✓ Αυτού του είδους τα συστήματα ιοντικής χρωματογραφίας, εκτός από τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η τεχνολογία των στηλών εσωτερικής διαμέτρου 2 mm, έχουν το επιπλέον πλεονέκτημα της κατά **2 έως 3 φορές μεγαλύτερης χωρητικότητας καταστολής** και επομένως είναι εφικτή η χρήση πυκνότερων εκλουστικών υγρών.

Καταστολείς- Παράδειγμα καταστολέα ανιόντων

<p>3 πανομοιότυποι θάλαμοι 3 θέσεις</p> 	<p>Θέση 1: διέλευση κινητής φάσης</p> 
<p>Θέση 2: αναγέννηση θαλάμου</p> 	<p>Θέση 3: καθαρισμός θαλάμου</p> 
<p>Οι θάλαμοι εναλλάσσονται με περιστροφή. Πάντοτε ένας θάλαμος είναι έτοιμος για το δείγμα (κινητή φάση).</p> 	 <p>Διέλευση κινητής φάσης από το θάλαμο. Συγκράτηση Na^+ και ελευθέρωση H^+.</p>
 <p>Διέλευση διαλύματος αναγέννησης από το θάλαμο. Συγκράτηση H^+ και ελευθέρωση Na^+.</p>	 <p>Διέλευση υπερκάθαρου νερού από το θάλαμο. Απομάκρυνση λοιπών ιόντων A^-.</p>

Ανιχνευτές Ιοντικής χρωματογραφίας

- Ο αγωγιμομετρικός ανιχνευτής είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής στις εφαρμογές ιοντικής χρωματογραφίας, καθότι τα προσδιοριζόμενα σωματίδια είναι ιοντισμένα και επομένως εμφανίζουν ηλεκτρική αγωγιμότητα.
- Υπάρχει ένας αριθμός άλλων ανιχνευτών κυρίως **ηλεκτροχημικών και οπτικών**, που επεκτείνουν τις δυνατότητες της ιοντικής χρωματογραφίας σε ένα ευρύ πεδίο προσδιοριζόμενων σωματιδίων, που περιλαμβάνει από ισχυρώς μέχρι πολύ ασθενώς ιονιζόμενα οργανικά ή ανόργανα σωματίδια
- ✓ Τα χαρακτηριστικά ποιότητας των ανιχνευτών ιοντικής χρωματογραφίας είναι όμοια με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά ποιότητας που αναφέρονται για όλες τις χρωματογραφικές τεχνικές και περιλαμβάνουν κυρίως τη **γραμμική δυναμική περιοχή, την ευαισθησία και την ανιχνευσιμότητα**.

Αγωγιμομετρικός ανιχνευτής

- Η αγωγιμομετρική ανίχνευση βασίζεται στην εφαρμογή **εναλλασσόμενου δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτροδίων** εντός κατάλληλης κυψελίδας και στη μέτρηση της έντασης του ρεύματος.
- Στην περίπτωση της καταστέλλομενης χρωματογραφίας, αν υποθεθεί ότι έχουν απομακρυνθεί όλα τα ιόντα της κινητής φάσης, η μετρούμενη ένταση του ρεύματος είναι **ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του εκλουόμενου ιόντος**.
- Στη μη καταστέλλομενη χρωματογραφία είναι περισσότερο περίπλοκη, **διότι τα εκλουόμενα ιόντα συνυπάρχουν με τα ιόντα της κινητής φάσης**, όπου το άθροισμα των συγκεντρώσεων των εκλουόμενων ιόντων και των συγκεντρώσεων των ιόντων της κινητής φάσης είναι σταθερό σε κάθε σημείο της χρωματογραφικής στήλης.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ 1

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ -
ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ

Column: Dionex IonPac AG4A-SC, Dionex IonPac AS4A-SC

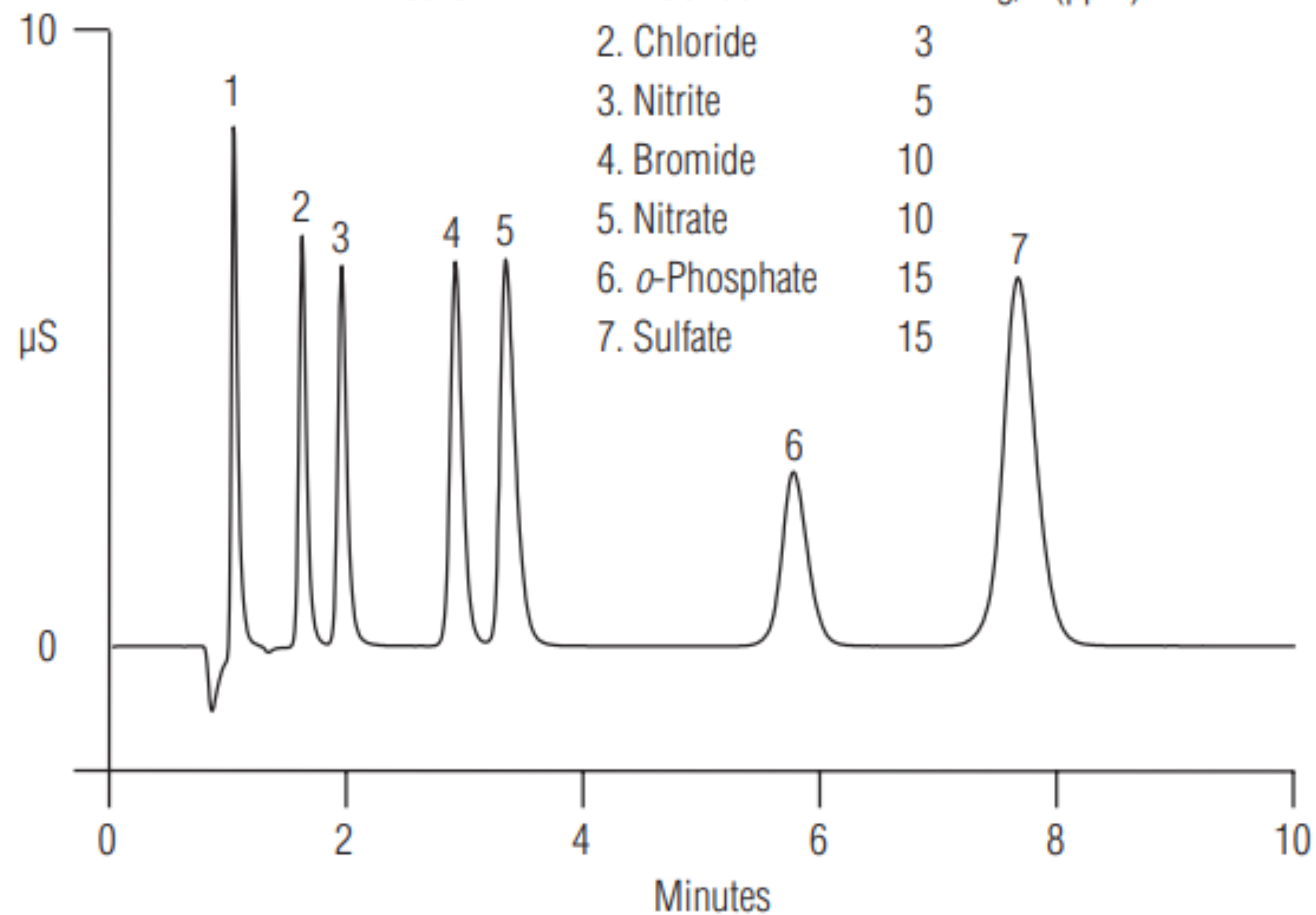
Eluent: 1.7 mM Sodium bicarbonate/
1.8 mM Sodium carbonate

Flow Rate: 2.0 mL/min

Injection: 50 μ L

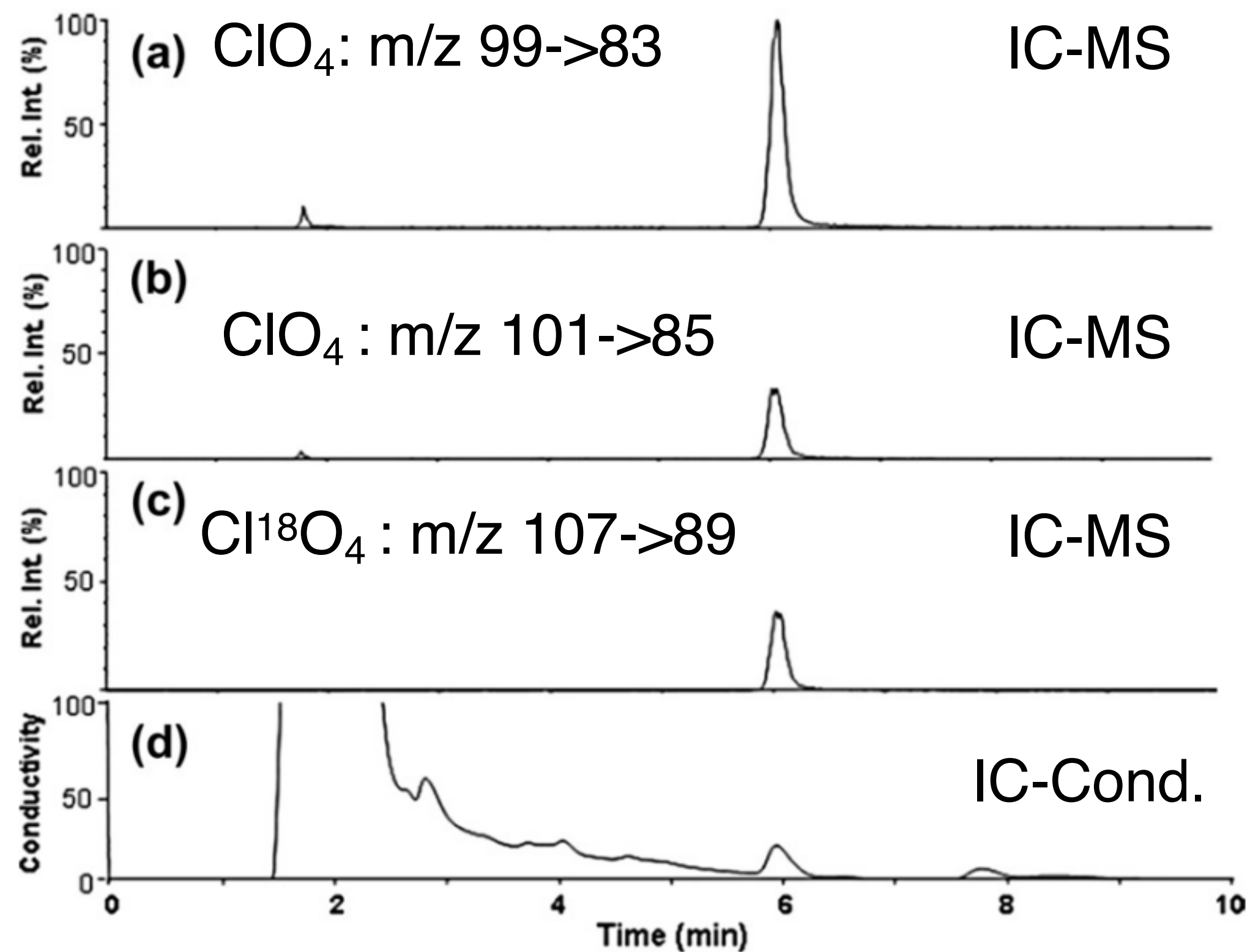
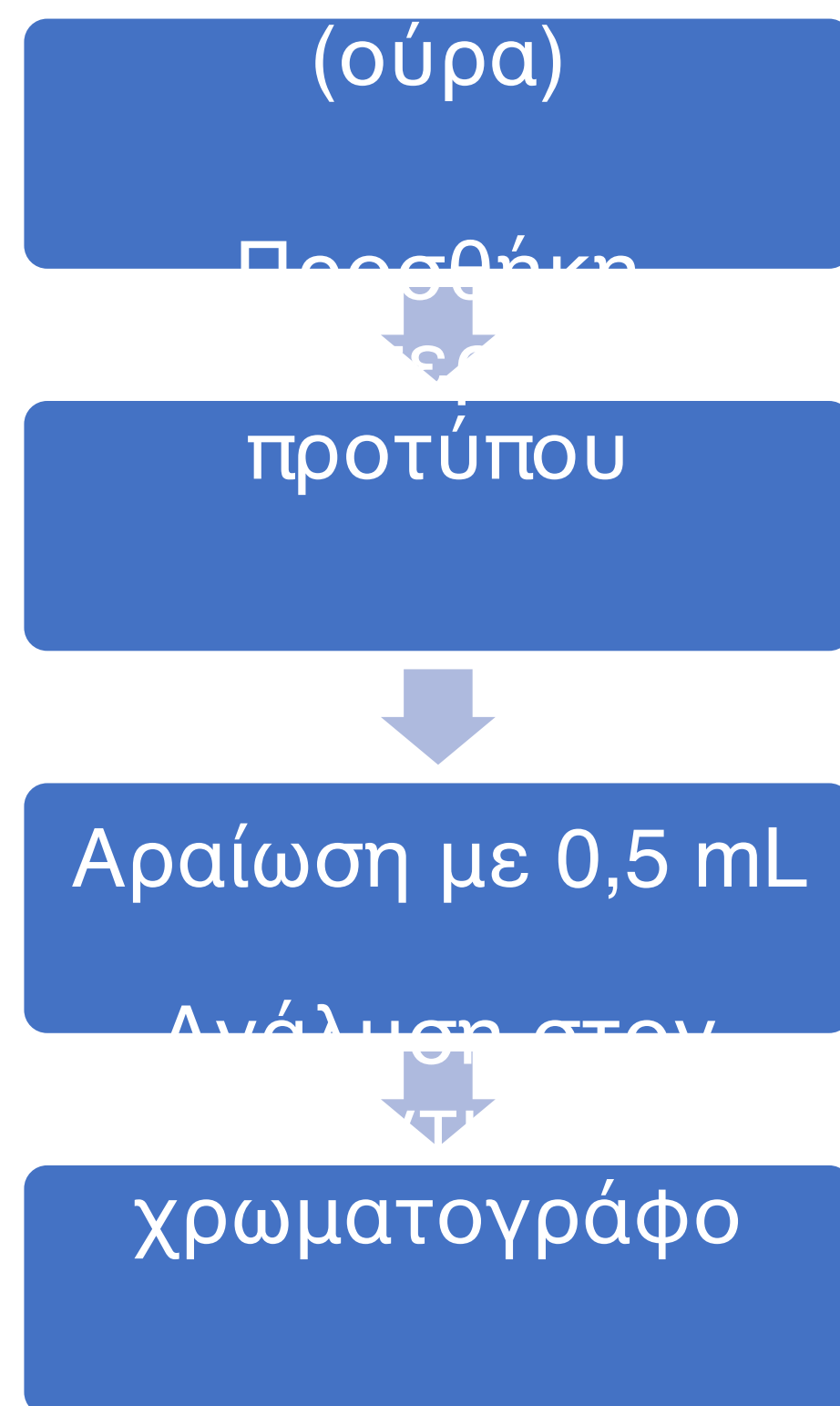
Detection: Suppressed conductivity
Dionex ASRS ULTRA suppressor, recycle mode

Peaks:	1. Fluoride	2 mg/L (ppm)
	2. Chloride	3
	3. Nitrite	5
	4. Bromide	10
	5. Nitrate	10
	6. <i>o</i> -Phosphate	15
	7. Sulfate	15



ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ 2

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΕΡΧΛΩΡΙΚΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ (ΟΥΡΑ) -
ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΚΑΙ
ΑΓΩΓΙΜΟΜΕΤΡΙΚΟ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ



ΣΧΕΤΙΚΑ ΒΙΝΤΕΟ

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

<https://www.youtube.com/watch?v=eCj0cRtJvJg>

ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

<https://www.youtube.com/watch?v=Pv4NYBUaUrQ>

ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

<https://www.youtube.com/watch?v=u--pOq43PMA>