

Σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές

Εμμανουήλ (Χ.) Σεμιδαλάς

emmanous@chem.uoa.gr

2^η Διάλεξη

Τεχνικές διαχωρισμού
(αεριοχρωματογραφία, υγροχρωματογραφία,
ιοντική χρωματογραφία)

Agenda

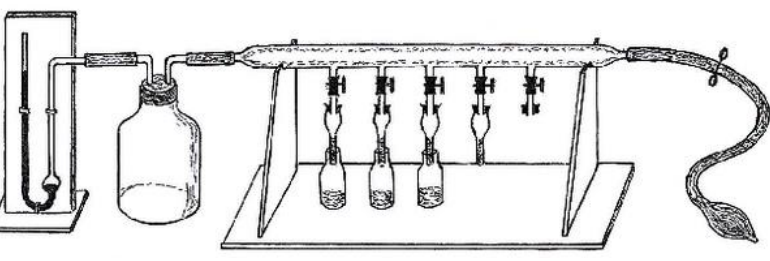
- Ιστορικά στοιχεία χρωματογραφίας
- Τεχνική αέριας χρωματογραφίας
- Τεχνική υγρής χρωματογραφίας
- Τεχνική χρωματογραφίας ιονανταλλαγής

Σύντομη ιστορία της χρωματογραφίας

- **1900**: Εφεύρεση της χρωματογραφίας (M. Tswett) για διαχωρισμό φυτικών χρωστικών

Χρωματογραφία → "έγχρωμη γραφή"
διότι οι διαχωρισμένες ενώσεις φαίνονται ως χρωματιστές ζώνες στη στήλη

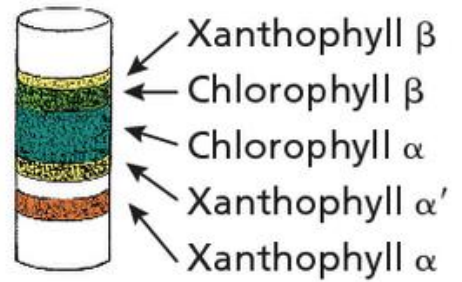
"In so far as a scientific statement speaks about reality, it must be falsifiable: and in so far as it is not falsifiable, it does not speak about reality."
— Karl R. Popper, The Logic of Scientific Discovery



(α) Συσκευή για ταυτόχρονη χρήση έως και πέντε στηλών. Το κάτω μέρος των μικρών γυάλινων δοχείων σε σχήμα χωνιού (εσωτερική διάμετρος 2–3 mm και μήκος 20–30 mm) λειτουργούσε ως στήλη πλήρωσης.



(β) Συσκευή για μεγαλύτερα δείγματα (εσωτερική διάμετρος 1–3 cm, μήκος πλήρωσης: 5–9 cm).

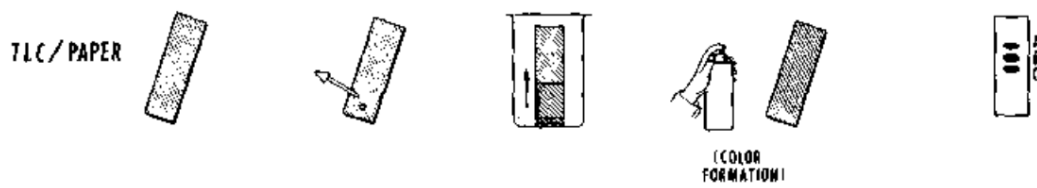


(γ) Χρωματογραφικός διαχωρισμός φυτικών χρωστικών όπως σχεδιάστηκε από τον Tswett. Στατική φάση: CaCO_3
Εκλουστικό διάλυμα: CS_2

Εικόνες από το άρθρο του Tswett το 1906:

Σύντομη ιστορία της χρωματογραφίας

- **Δεκαετία '40:** Χρωματογραφία κατανομής & χρωματογραφία χαρτιού



(Martin & Synge)
The Nobel Prize in
Chemistry 1952



- **Δεκαετία '50:** Χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής· αναλυτής αμινοξέων

- **Τέλη '50:** Εφεύρεση της χρωματογραφίας διήθησης μέσω πηκτής (gel permeation, GPC)
Ανάπτυξη της αέριας χρωματογραφίας (GC)

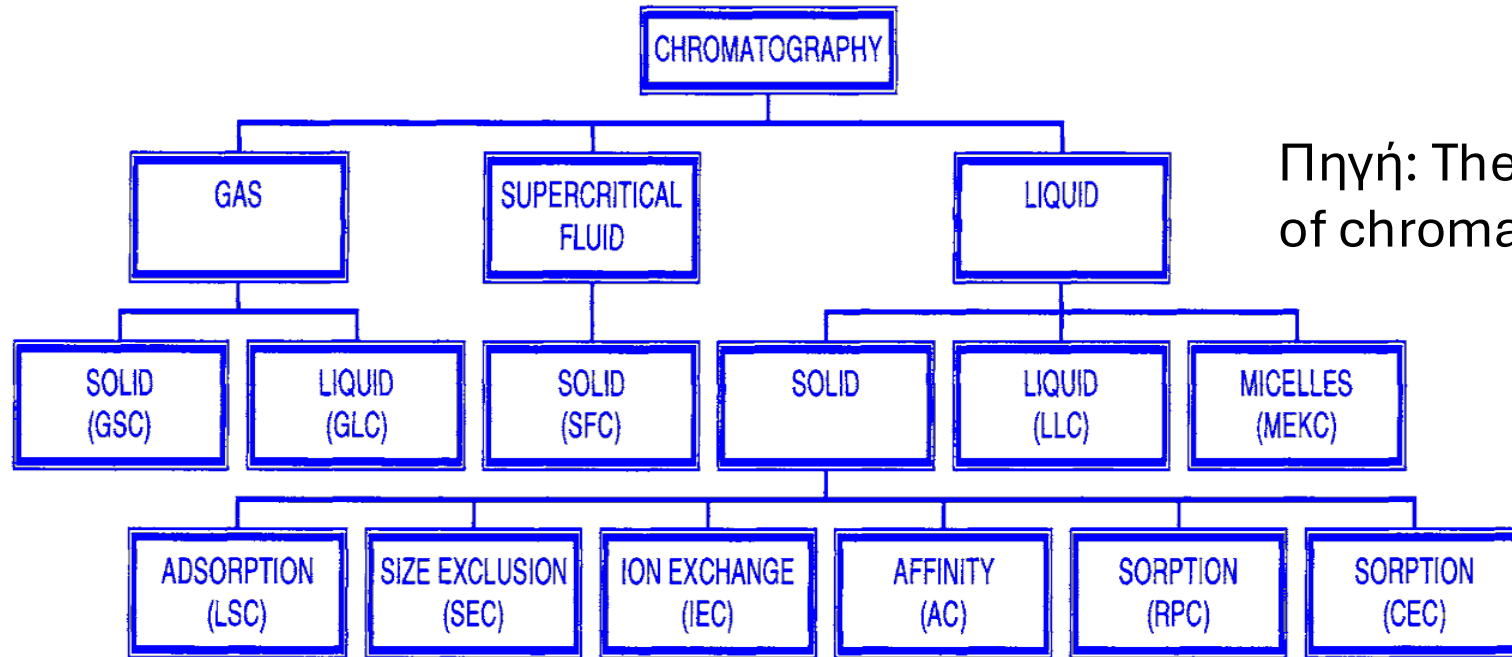
- **Μέσα '60:** Γέννηση της HPLC (Horváth, Huber, Kirkland)

- **Δεκαετία '70+:** Ραγδαία πρόοδος σε στήλες, στατικές φάσεις, εξοπλισμό & ανιχνευτές

- Αντίστροφη φάση, ζεύγος ιόντων, HILIC
- Βελτιστοποίηση μέσω υπολογιστή, συστήματα UHPLC
- Ανιχνευτές UV, RI, φθορισμού, ηλεκτροχημικοί, LC-MS ανιχνευτές

- Σήμερα: Ευρεία χρήση της χρωματογραφίας στην έρευνα και τη βιομηχανία

Κατηγορίες χρωματογραφίας ανάλογα με τη φάση και μηχανισμό διαχωρισμού



Πηγή: The essence of chromatography

Γενεαλογικό δέντρο μεθόδων χρωματογραφίας στήλης.

GSC = χρωματογραφία αερίου-στερεού· GLC = χρωματογραφία αερίου-υγρού·

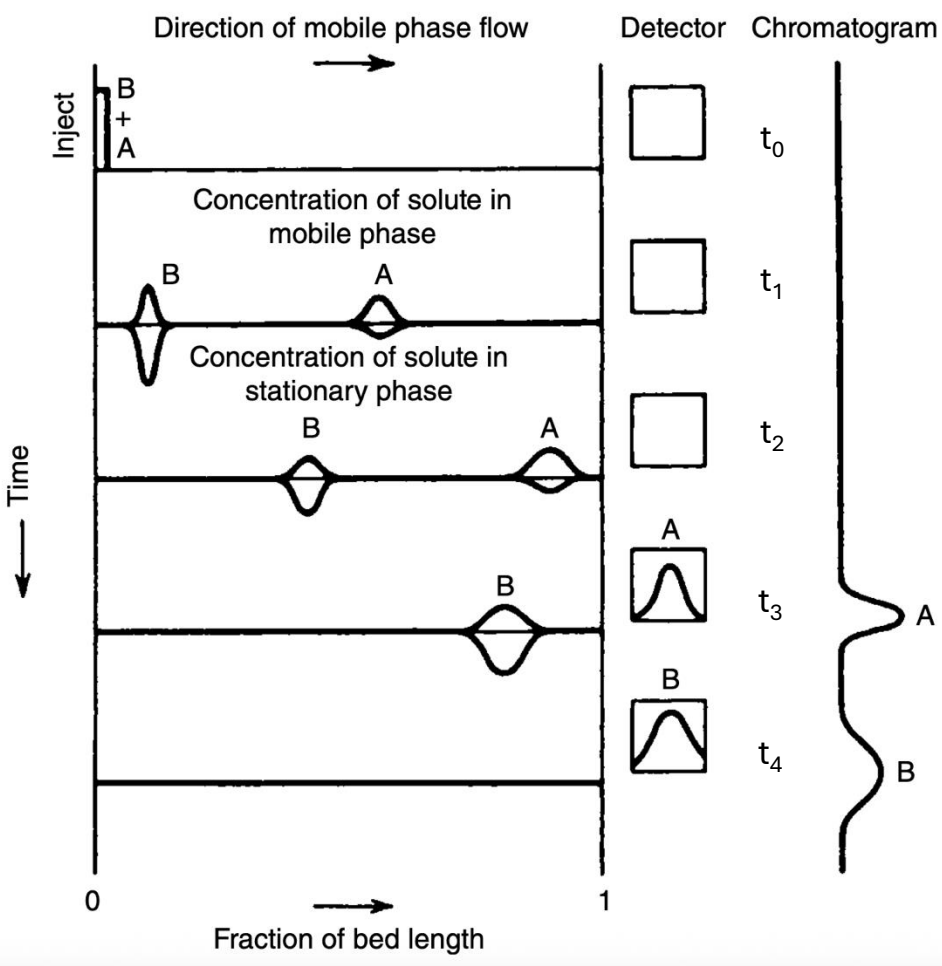
SFC = χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού· LLC = χρωματογραφία υγρού-υγρού·

MEKC = μικυλλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία· LSC = χρωματογραφία υγρού-στερεού·

SEC = χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους· IEC = χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων·

AC: συγγένειας· RPC = χρωματογραφία αντίστροφης φάσης· CEC = τριχοειδής ηλεκτροχρωματογρ.

Βασική αρχή χρωματογραφίας



Μηχανισμός Διαχωρισμού:

- Το δείγμα (A + B) εισάγεται ως στενή ζώνη
- Κατανομή μεταξύ κινητής & στατικής φάσης
- **Συστατικό A:** Μεγαλύτερη συγγένεια για την κινητή φάση → μεταναστεύει ταχύτερα
- **Συστατικό B:** Μεγαλύτερη συγγένεια για τη στατική φάση → μεταναστεύει βραδύτερα

Οι θερμοδυναμικές διαφορές στις σταθερές κατανομής (K_c) οδηγούν σε διαχωρισμό

$$[A_s] \rightleftharpoons [A_m], \quad K_c = \frac{[A_s]}{[A_m]}$$

Διεύρυνση κορυφής:

Προκύπτει από κινητικές διεονασίες κατά τη διέλευση

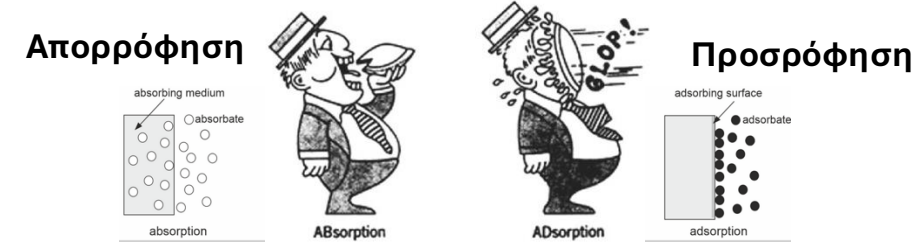
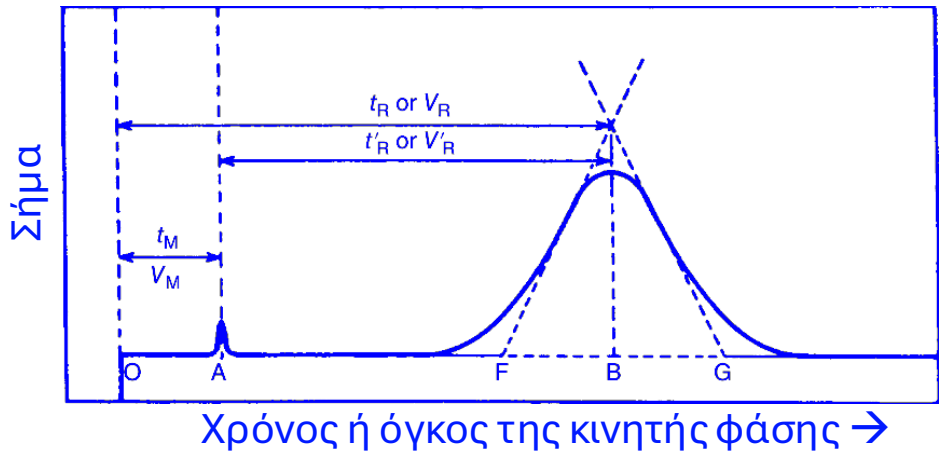


Figure 1.4. Comical illustration of the difference between absorption (partition) and adsorption. Source: From Miller [10, p. 45]. Reproduced courtesy of John Wiley & Sons, Inc.

Βασικές έννοιες χρωματογραφίας: Κατακράτηση



Εμβαδόν ή ύψος κορυφής
Πληροφορίες για ποσο-
τικοποίηση ουσιών

- Χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης (t_R): Ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει το διαλυμένο συστατικό από την είσοδο της στήλης στον ανιχνευτή.
- Νεκρός χρόνος (t_M): Χρόνος για ένωση που δεν κατακρατείται να εξέλθει από την στήλη
- Χρόνος ανάσχεσης ($t'_R = t_R - t_M$): Χρόνος για μετακίνηση ουσίας εντός στήλης
- Συντελεστής κατακράτησης (k): Δείχνει πόσο χρόνο παραμένει το συστατικό στη στατική φάση σε σχέση με τη κινητή φάση.
 - $k = t'_R / t_M = (t_R - t_M) / t_M$ (Υψηλότερο k = ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση)

Βασικές έννοιες χρωματογραφίας: Γιατί διευρύνονται οι κορυφές;

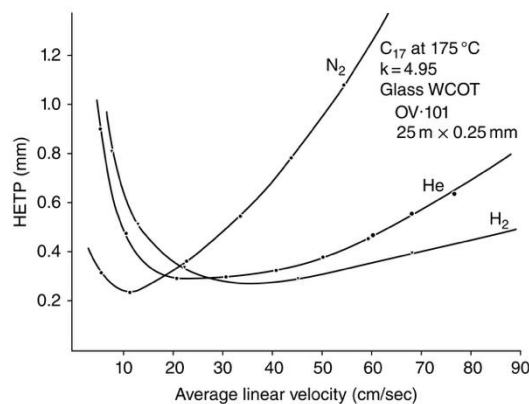
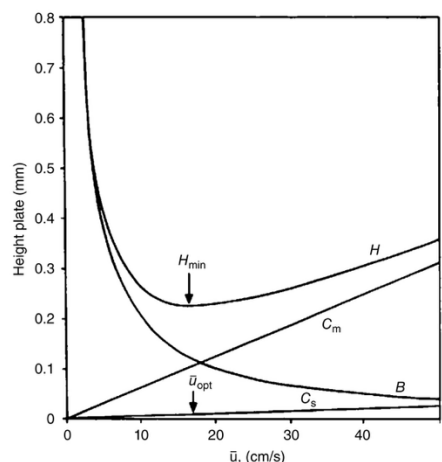
Πρακτικά, οι κορυφές διευρύνονται. Για GC/LC σε χαμηλή ταχύτητα, η διεύρυνση παρέχεται προσεγγιστικά από την εξίσωση van Deemter:



$H = A + B/u + Cu = A + B/u + (C_s + C_M)u$

H = Ύψος ισοδύναμο με θεωρητική πλάκα (HETP), μέτρο απόδοσης στήλης (χαμηλότερο H = καλύτερος διαχωρισμός)
u = Γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης (πόσο γρήγορα κινείται το διαλύτη)

- A, B, C** = Σταθερές που αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πηγές διεύρυνσης της ζώνης
- Όρος A:** Στροβιλώδης διάχυση → πολλαπλές διαδρομές μέσω της πλήρωσης της στήλης
- Όρος B:** Διαμήκης διάχυση → διάχυση από υψηλή σε χαμηλή συγκέντρωση κατά μήκος της στήλης
- Όρος C:** Χρόνος που απαιτείται για μεταφορά μάζας μεταξύ κινητής και στατικής φάσης

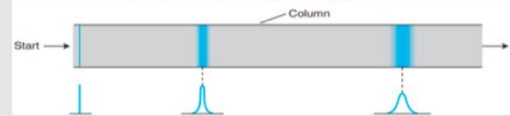


Τυπικό διάγραμμα van Deemter και εξάρτηση από φέρον αέριο

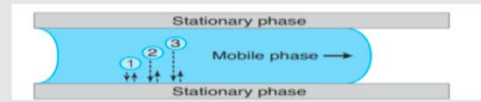
A: Πολλαπλότητας διαδρομών



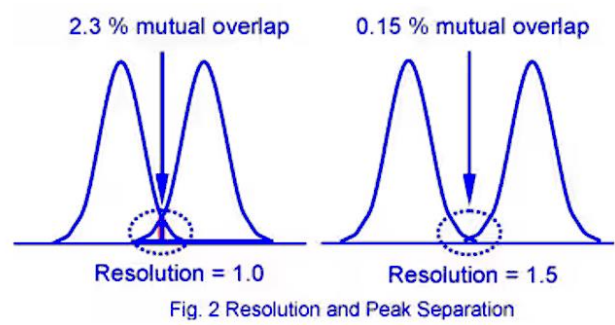
B/u: Διαμήκους διάχυσης



Cu: μεταφοράς μάζας

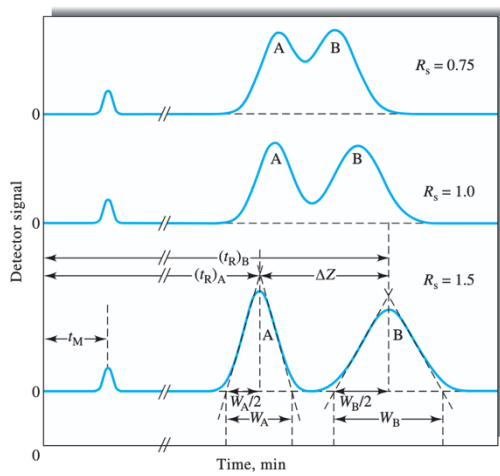


Βασικές έννοιες χρωματογραφίας: Διαχωριστικότητα



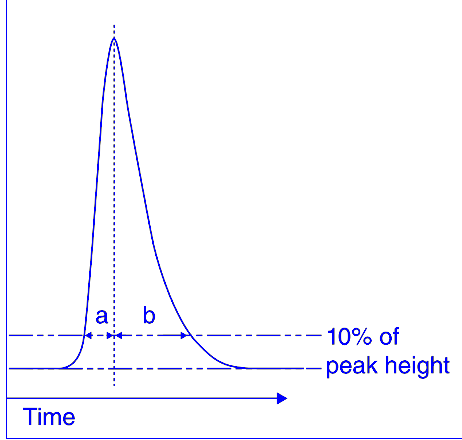
$$R_s = \frac{\Delta Z}{\frac{W_A}{2} + \frac{W_B}{2}} = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B}$$

$$= \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$



Διαχωριστικότητα (Rs): Ορίζεται ως η πληρότητα του διαχωρισμού από έναν αναλυτή σε άλλους. Αναπαρίσταται από μια αριθμητική τιμή, 0.6, 0.9, 1.0 ή 3.

Ασυμμετρία κορυφών



$$USP \text{ Tailing Factor } (T) = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

- **T ≤ 2.0** είναι γενικά αποδεκτό για τις περισσότερες εφαρμογές
- **T = 1.0** αντιπροσωπεύει μια απόλυτα συμμετρική κορυφή

Αεριοχρωματογραφία

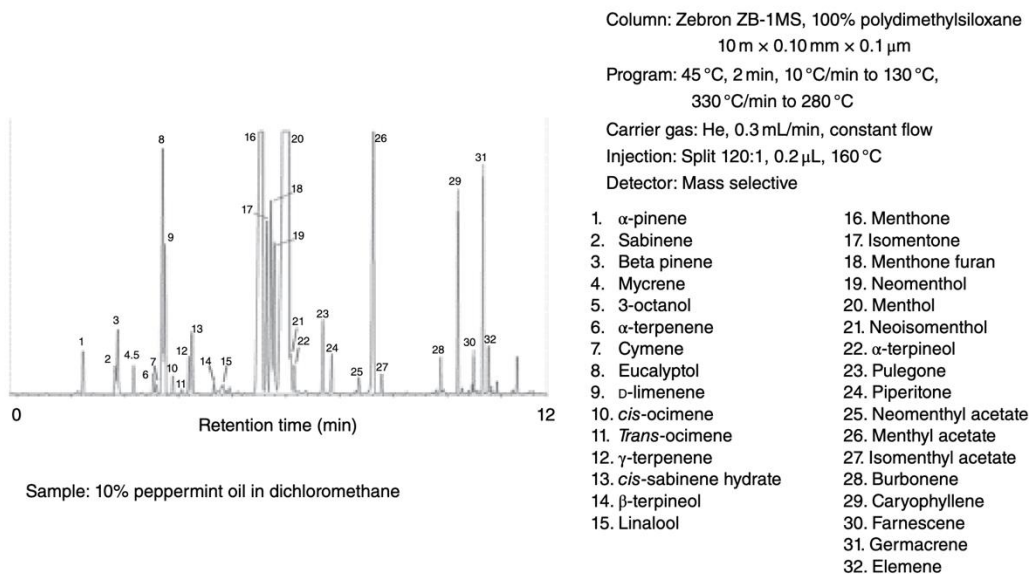


Figure 1.1. Typical gas chromatographic separation showing the high efficiency of this method. *Source:* Courtesy of Phenomenex, Inc.

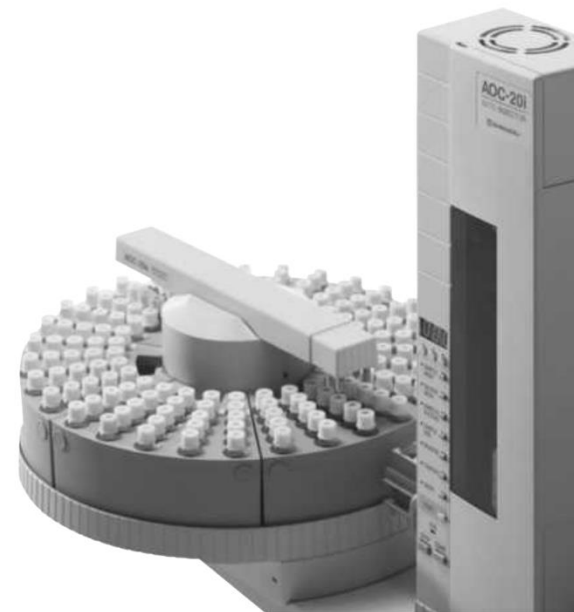


FIGURE 27-5 An autoinjection system with autosampler for gas chromatography. (Shimadzu Corp.)

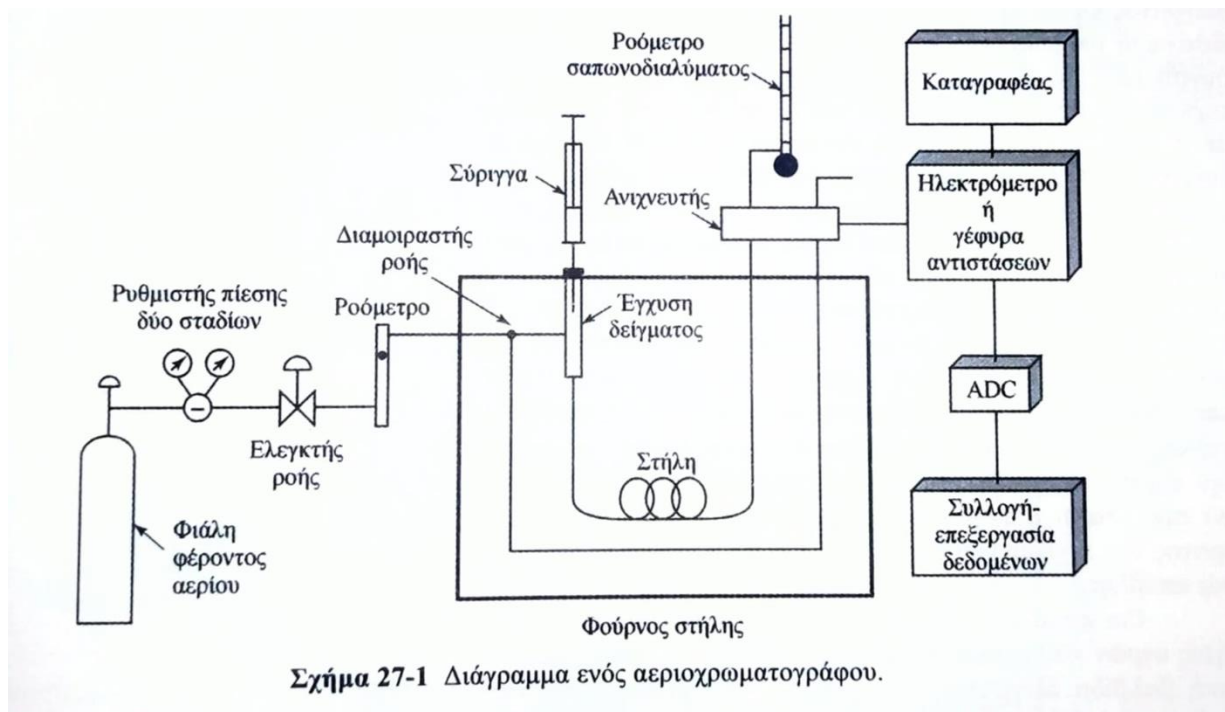
Βασικές αρχές αεριοχρωματογραφίας (GC)

Στη αεριοχρωματογραφία (GC), το δείγμα εξατμίζεται και μεταφέρεται από την κινητή αέρια φάση (το φέρον αέριο) μέσω της στήλης. Στις περισσότερες αναλύσεις, τα δείγματα κατανέμονται (ισορροπούν) μέσα και έξω από τη στατική υγρή φάση, με βάση τις διαλυτότητές τους στη στατική φάση στη δεδομένη θερμοκρασία. Οι αναλύτες διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση τις σχετικές τάσεις ατμών τους και τις συγγενειές τους για τη στατική φάση.

Πλεονεκτήματα της αεριοχρωματογραφίας

- Γρήγορη ανάλυση, συνήθως σε λίγα λεπτά.
- Αποδοτική, με υψηλή διακριτική ικανότητα.
- Υψηλή ευαισθησία, ανιχνεύει εύκολα ppm και συχνά ppb.
- Μη καταστρεπτική, επιτρέπει on-line σύζευξη, π.χ. με φασματογράφο μάζας.
- Πολύ ακριβής ποσοτική ανάλυση, τυπικά RSD 1–5%.
- Απαιτεί μικρά δείγματα, συνήθως σε μL .
- Αξιόπιστη και σχετικά απλή.
- Οικονομική.

Διάταξη αεριοχρωματογράφου (GC)



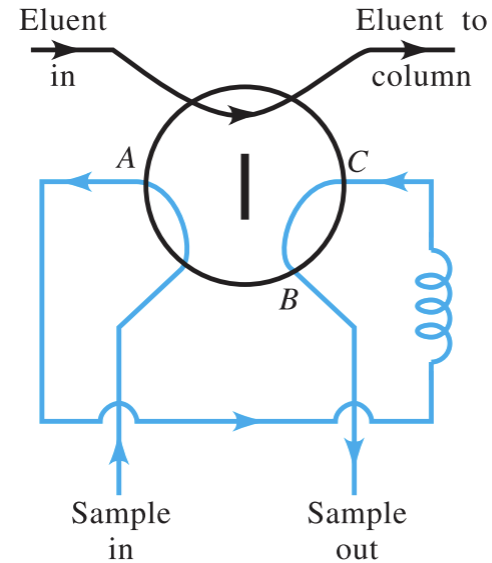
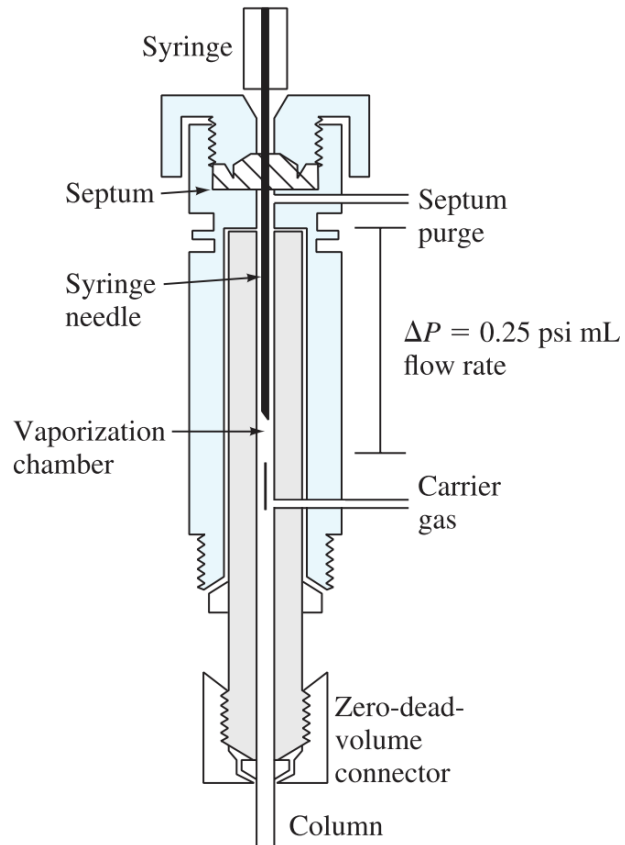
Φέρον αέριο:

He (συμβατό με περισσότερους ανιχνευτές)

H₂ (γρήγοροι διαχωρισμοί)

N₂ (φθηνό αλλά διαχωρισμοί λιγότερο ικανοποιητικοί)

Συστήματα έγχυσης στην αεριοχρωματογραφία



Πηγή: Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, 7^η έκδοση, Skoog, Hooler, Nieman

Εισαγωγή δείγματος στην αεριοχρωματογραφία

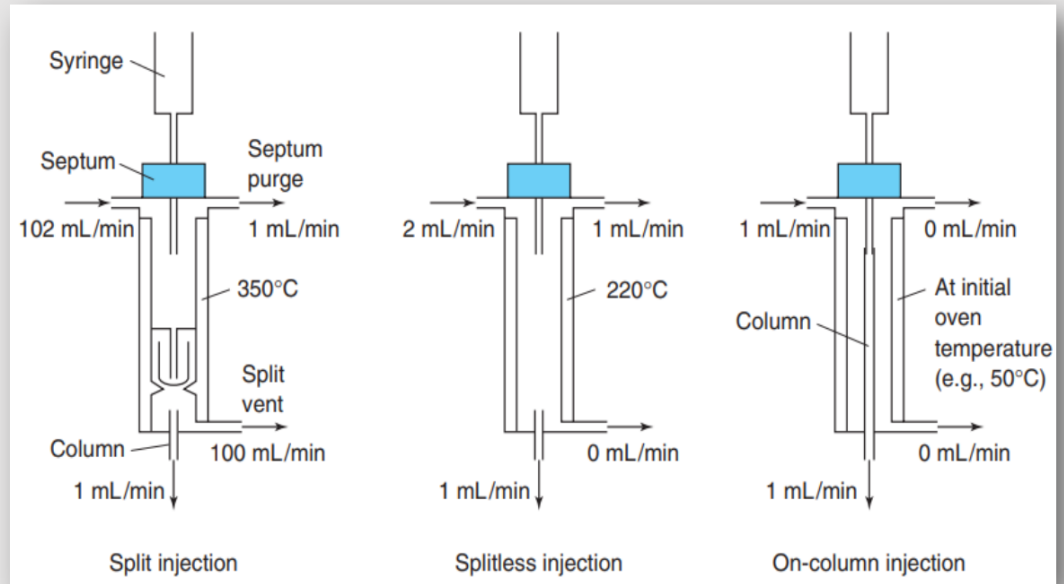
Διαμοιρασμός δείγματος

Split Injection: Εισαγωγή μικρών ποσοτήτων δείγματος, κυρίως σε ρουτίνα

Splitless Injection: ιδανικό για προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων

On Column Injection: κυρίως για θερμικά ασταθείς ενώσεις.

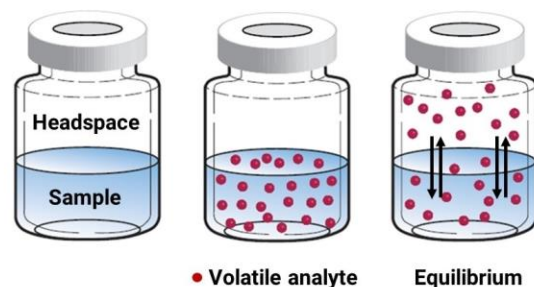
Πως υπολογίζεται η τελική ροή του φέροντος αερίου;



Διαφάνεια: Μάριου Κωστάκη

Εισαγωγή δείγματος στην αεριοχρωματογραφία: Headspace

Configuration for Single Drop Headspace Microextraction



Ο υπερκείμενος χώρος (headspace) είναι ο ατμός πάνω από υγρά/στερεά.

Στατικός υπερκείμενος χώρος: ένα σφραγισμένο, θερμοστατημένο φιαλίδιο σε ισορροπία.

Λαμβάνονται δείγματα πτητικών ουσιών, καθιστώντας τον υπερκείμενο χώρο ιδανικό για βρώμικες ή στερεές μήτρες, παρεμποδιστές υψηλού σημείου ζέσεως, δείγματα υψηλής περιεκτικότητας σε νερό ή δύσκολα στη χρήση υλικά.

Τα μη πτητικά παραμένουν πίσω.

Βαθμονόμηση: διαλύστε τους αναλυτές σε έναν πτητικό διαλύτη και εγχύστε έναν μικρό γνωστό όγκο στο σφραγισμένο φιαλίδιο για πλήρη εξάτμιση.

Διάγραμμα εργασίας headspace:

- τοποθετήστε το δείγμα σε ένα φιαλίδιο με σφραγισμένο διάφραγμα,
- ρυθμίστε τον θερμοστάτη σε ισορροπία και, στη συνέχεια, εγχύστε μέσω σύριγγας ή αυτόματου δειγματολήπτη.
- οι αυτόματοι δειγματολήπτες ισορροπημένης πίεσης αντιστοιχίζουν το φιαλίδιο με την πίεση εισόδου της στήλης για καλύτερη ποσοτικοποίηση και σταθερές γραμμές βάσης

Στατιστικές φάσεις - Στήλες

Πακεταρισμένες Στήλες:

Συνήθως από ανοξείδωτο ατσάλι

Εσωτερική διάμετρο **2-4 mm** ID και μήκος **1-4 m**

Όχι μεγάλο μήκος λόγω πτώσεις πίεσης κατά μήκος στήλης

Κυρίως για ανάλυση αερίων

Διεύρυνση κορυφών

Τριχοειδείς Στήλες:

Εσωτερική διάμετρος **0,10-0,53 mm** ID και μήκος **10-100 m**.

Ανοικτός σωλήνας με επικάλυψη των εσωτερικών τοιχωμάτων της στήλης

Πολύ καλοί διαχωρισμοί

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στήλες



Διαφάνεια: Μάριου Κωστάκη

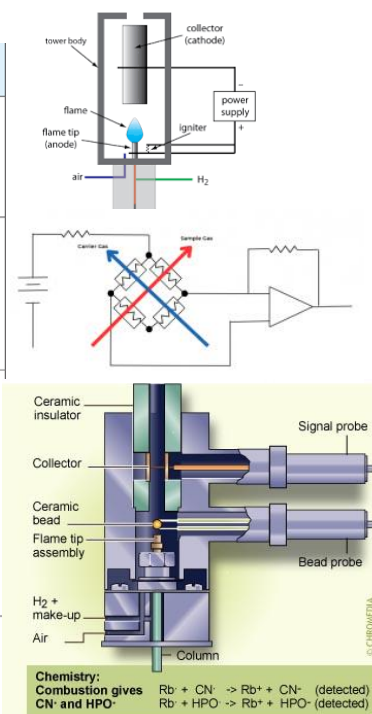
TABLE 27-3 Some Common Liquid Stationary Phases for Gas-Liquid Chromatography

Stationary Phase	Common Trade Name	Maximum Temperature, °C	Common Applications
Polydimethyl siloxane	OV-1, SE-30	350	General-purpose nonpolar phase, hydrocarbons, polynuclear aromatics, steroids, PCBs
5% Phenyl-polydimethyl siloxane	OV-3, SE-52	350	Fatty acid methyl esters, alkaloids, drugs, halogenated compounds
50% Phenyl-polydimethyl siloxane	OV-17	250	Drugs, steroids, pesticides, glycols
50% Trifluoropropyl-polydimethyl siloxane	OV-210	200	Chlorinated aromatics, nitroaromatics, alkyl-substituted benzenes
Polyethylene glycol	Carbowax 20M	250	Free acids, alcohols, ethers, essential oils, glycols
50% Cyanopropyl-polydimethyl siloxane	OV-275	240	Polyunsaturated fatty acids, rosin acids, free acids, alcohols

Πηγή: Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης,
7^η έκδοση, Skoog, Hooler, Nieman

Ανιχνευτές αεριοχρωματογραφίας

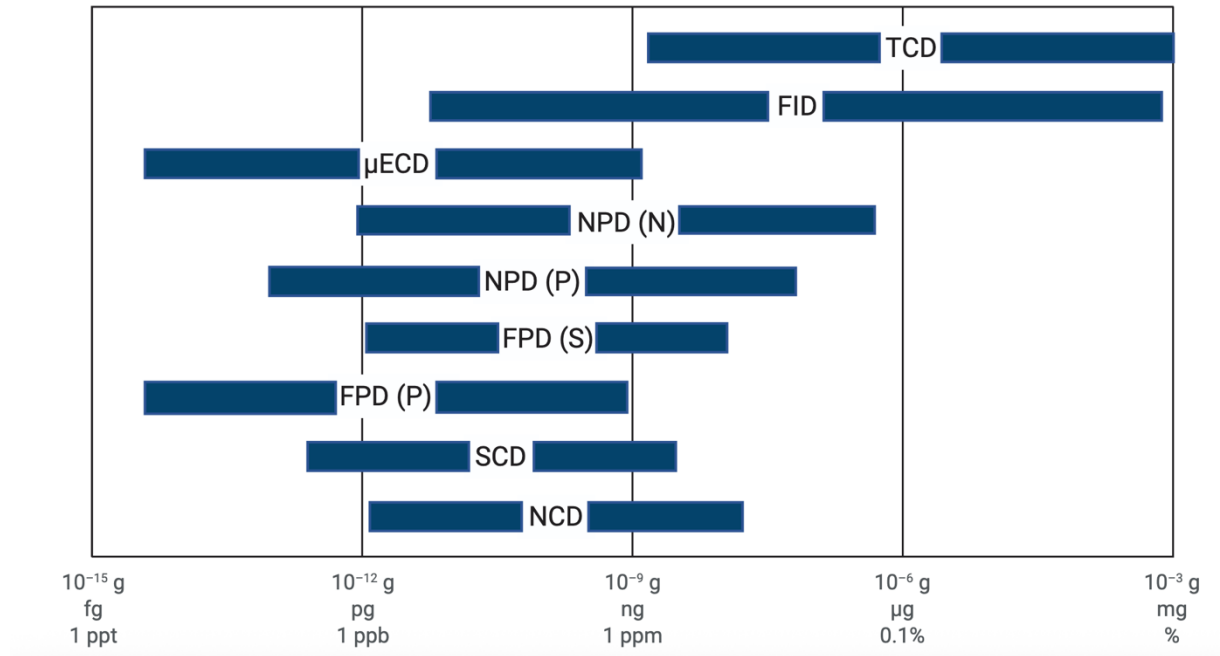
Detector	Description	Linear Dynamic Range	Destructive	Analytes
 FID	Flame Ionization Detector The FID is the most commonly used general-purpose GC detector. As the sample exits the column, it is burned in a hydrogen/air flame and ionized particles are measured as an electrical current.	$>10^7$ ($\pm 10\%$)	Yes	Most organic compounds
 TCD	Thermal Conductivity Detector A TCD is considered a universal detector that can measure any GC sample component having a thermal conductivity different than the carrier gas. It uses a single filament in a constant current DC power supply. It requires only one gas type to operate (the carrier), which can be helium, argon, nitrogen, or hydrogen.	$>10^5$ ($\pm 5\%$) 10^5 ($\pm 10\%$) for 8860 GC	No	Permanent gases, light hydrocarbon gases, fatty acids, flavors, and fragrances
 NPD	Nitrogen-Phosphorus Detector The Agilent 8890/8860 NPD uses a Blos bead (glass). The bead is electrically heated in the presence of hydrogen and air, which forms a plasma around the bead. A collector uses a positive DC voltage to collect the electrons formed when compounds with N-C or P-C bonds contact the hot bead. For nitrogen-containing compounds, selectivity is 25,000:1 for 8890 and 8860 GCs. For phosphorus-containing compounds, selectivity versus hydrocarbons is 200,000:1 for the 8890 and 75,000:1 for 8860.	$>10^5$ N, $>10^5$ P $>10^4$ N, $>10^4$ P for 8860 GC	Yes	Phosphorous-containing compounds (e.g., pesticides) Nitrogen-containing compounds (e.g., drugs)
 ECD	Micro-Electron Capture Detector The micro-ECD is very sensitive and selective for halogenated compounds. It uses a low-level radioactive beta emitter in a carrier/makeup gas stream of nitrogen or argon-methane. The electrons emitted from the radioactive source collide with molecules of the makeup gas resulting in many more free electrons, which are then accelerated towards an anode that is polarized with a variable frequency, constant-current voltage. As the sample is carried into the detector by the carrier gas, electron-absorbing analyte molecules capture electrons and the anode voltage frequency is increased to keep the current constant. The analyte concentration is proportional to the degree of electron capture.	$>5 \times 10^4$ $>10^4$ for 8860 GC	No	Halogenated organic compounds, aromatic compounds, other analytes with high electron affinity (e.g., organometallics, nitriles, or nitro compounds)



Πηγή: <https://www.agilent.com/cs/library/quickreference/public/quick-reference-gc-detectors-5994-4919en-agilent.pdf>

Ανιχνευτές αεριοχρωματογραφίας

Relative sensitivity of GC detectors*



Πηγή: <https://www.agilent.com/cs/library/quickreference/public/quick-reference-gc-detectors-5994-4919en-agilent.pdf>

Άσκηση (27-21, Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, 5η έκδοση, Skoog, Hooler, Nieman)

Μια στήλη GC λειτούργησε υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

στήλη: 1,10 m x 2,0 mm, πακεταρισμένη με Chromosorb P· Βάρος προστεθέντος στατικού υγρού 1,40 g· πυκνότητα υγρού, 1,02 g/mL. Δίνεται ακόμη $P_{\text{H}_2\text{O}} = 18.88$ torr.

πίεσεις: εισόδου, 134,94 torr μεγαλύτερη από την πίεση δωματίου· πίεση δωματίου 748 torr

Μετρηθείσα ταχύτητα ροής εξόδου: 24,3 mL/min

θερμοκρασία: δωματίου, 21,2°C· στήλη, 102,0°C

Χρόνοι κατακράτησης: αέρας 18,0 s· οξικός μεθυλεστέρας 1,98 λεπτά·

προπιονικός μεθυλεστέρας, 4,16 λεπτά· n-βουτυρικός μεθυλεστέρας, 7,93 λεπτά

Υπολογίσατε

(α) την μέση ταχύτητα ροής στη στήλη.

(β) τους διορθωμένους όγκους κατακράτησης για τον αέρα και τους τρεις εστέρες

Ταχύτητα ροής στη GC:
$$F = F_m \times \frac{T_c}{T} \times \frac{(P - P_{\text{H}_2\text{O}})}{P}$$

$$V_R^0 = j t_R F \quad \text{and} \quad V_M^0 = j t_M F \quad (27-4)$$

where j can be calculated from the relationship

$$j = \frac{3[(P_i/P)^2 - 1]}{2[(P_i/P)^3 - 1]} \quad (27-5)$$

The specific retention volume V_g is then defined as

$$V_g = \frac{V_R^0 - V_M^0}{m_s} \times \frac{273}{T_c} = \frac{jF(t_R - t_M)}{m_s} \times \frac{273}{T_c} \quad (27-6)$$

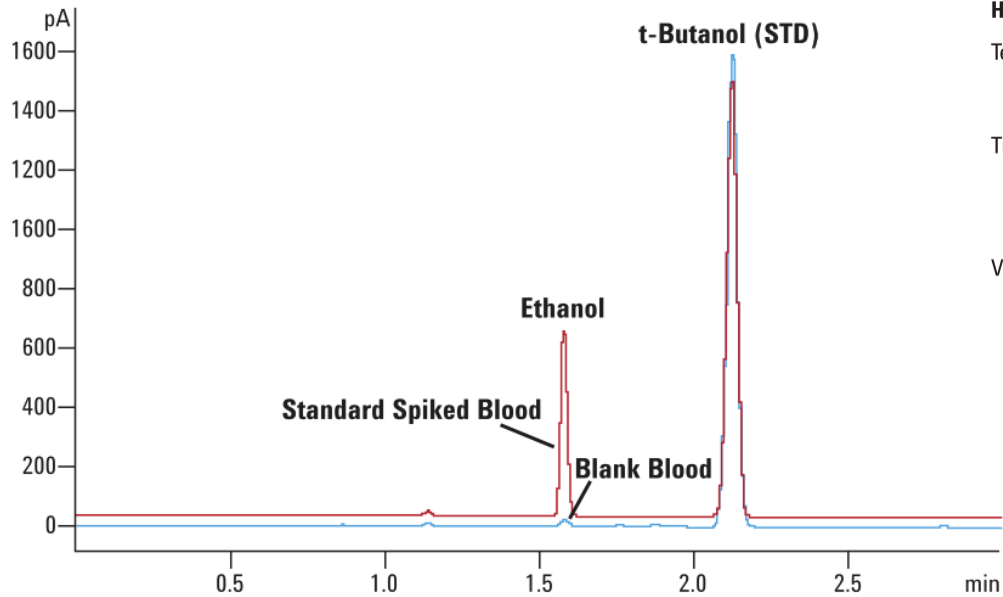
Εφαρμογή GC: Ανάλυση αίματος με headspace

GC Conditions:

Inlet settings: 200 °C, split ratio: 10:1
Column: DB-ALC2 0.32 mm x 30 m,
1.2 μ m (P/N 123-9234)
Column flow (N_2): 12 mL/min, constant flow
Oven temp program: 40 °C (7 min)
Temperature: 250 °C
FID setting: H_2 flow: 40 mL/min
Air flow: 400 mL/min
Makeup (N_2): 45 mL/min
Data acquisition rate: 20 Hz

Headspace Conditions:

Temperatures: Oven: 85 °C
Loop: 85 °C
Transfer line: 100 °C
Times: GC cycle time: 15 min
Press equilb time: 0.1 min
Vial equilb time: 15 min
Inject time: 0.5 min
Vial: Fill mode: Flow-limited press
Ramp rate: 20 psi/min
Fill pressure: 15 psi
Final pressure: 10 psi
Fill flow: 50.00 mL/min
Final hold: 0.05 min
Fill mode: Advanced
Vent after extraction: No



Παράδειγμα: Αλκοόλη στο Αίμα (EtOH)

Φιαλίδιο 20 mL, αυτόματος δειγματολήπτης, εσωτερικό πρότυπο: t-βουτανόλη

Βαθμονόμηση 5 επιπέδων: 10–160 mg/100 mL

Απόδοση: RT %RSD $\approx$ 0,03· area %RSD $\approx$ 4

Νομικά όρια συχνά $\geq$ 50-80 mg/100 mL

Εφαρμογή GC: Ανάλυση του πορτοκαλελαίου

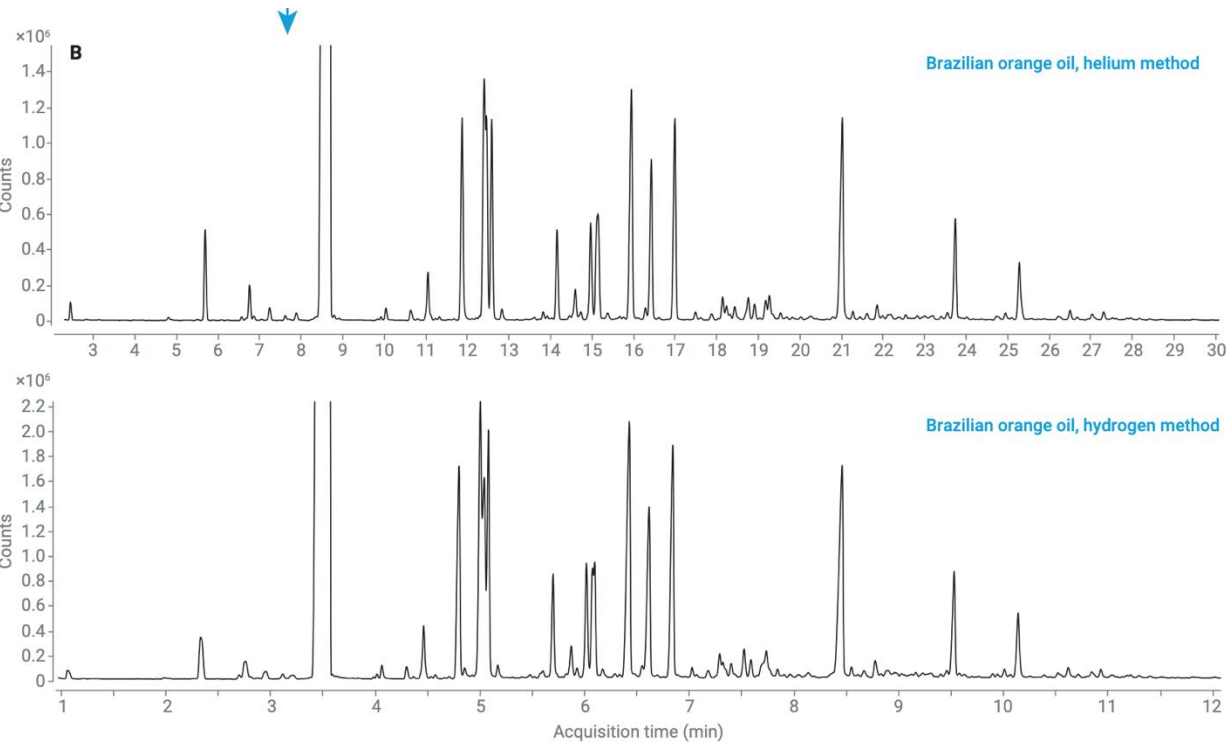


Figure 5. (A) Brazilian orange oil with helium and hydrogen methods showing full range of compound elution. (B) Expanded view of earlier elution time region.

The NIST 23 Mass Spectral Library
& Search Software (NIST 2023/2020/2017/EPA/NIH)

Home ▶ Heaters/Source ▶ Agilent Heaters and Sensors ▶ Software ▶ Wiley Specialty Libraries ▶ NIST 23 (This Page)

Πηγή: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/an-hydroinert-source-essential-oils-5994-7058en-agilent.pdf>

Εφαρμογή GC: Ανάλυση ηλεκτρολύτη μπαταριών Li-ion με GC-FID



Ρόλος των Ηλεκτρολυτών

Λειτουργία: Φορέας ιόντων μεταξύ καθόδου ↔ ανόδου

Κρίσιμοι παράγοντες: Σύσταση, αναλογία, καθαρότητα

Επίδραση: Χωρητικότητα μπαταρίας, κύκλος ζωής, σταθερότητα, ασφάλεια

Ανθρακικοί Εστέρες

- Dimethyl carbonate (DMC)
- Ethyl methyl carbonate (EMC)

Parameter	Value
ALS	Agilent 7650A
Injection Volume	1.0 µL
Inlet Type	Split-splitless injector
Inlet Temperature	250 °C

Πρόβλημα

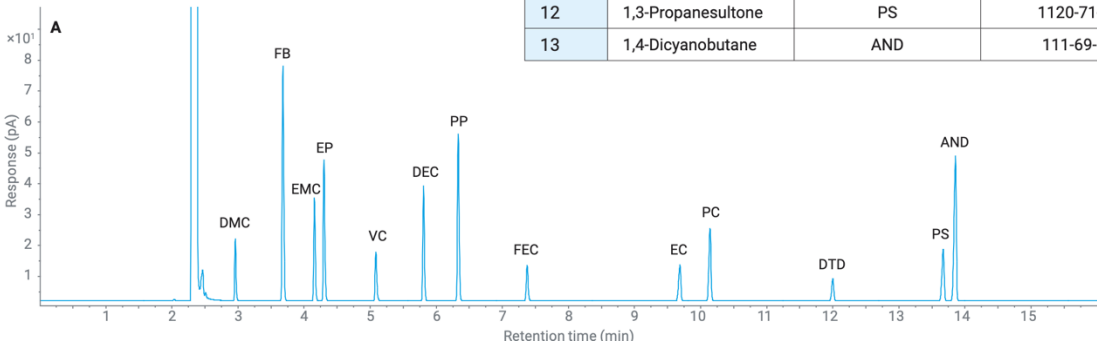
Αποσύνθεση σε χαμηλά δυναμικά
Πρόσθετα (**Performance Enhancers**)

- Fluoroethylene carbonate (FEC)
- Vinylene carbonate (VC)

•Στόχος: Βελτίωση απόδοσης μπαταρίας και προσδιορισμός των ενώσεων

Table 1. Thirteen target carbonate esters and additives.

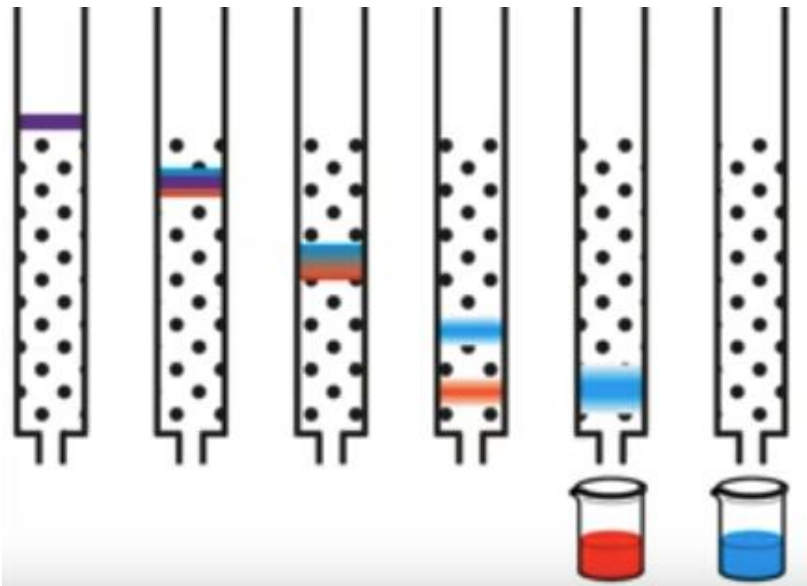
No.	Target Compounds	Abbreviation	CAS Number
1	Dimethyl carbonate	DMC	616-38-6
2	Fluorobenzene	FB	462-06-6
3	Ethyl propanoate	EP	105-37-3
4	Ethyl methyl carbonate	EMC	623-53-0
5	Diethyl carbonate	DEC	105-58-8
6	<i>n</i> -Propyl propionate	PP	106-36-5
7	Vinylene carbonate	VC	872-36-6
8	Fluoroethylene carbonate	FEC	114435-02-8
9	Ethylene carbonate	EC	96-49-1
10	Propylene carbonate	PC	108-32-7
11	Ethylene sulfate	DTD	1072-53-3
12	1,3-Propanesultone	PS	1120-71-4
13	1,4-Dicyanobutane	AND	111-69-3



Αεριοχρωματογράφημα

Πηγή: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/an-battery-electrolyte-8860-gc-5994-5888en-agilent.pdf>

Υγρή χρωματογραφία (LC)



LC: A separation technique in which the mobile phase is a liquid. Liquid chromatography can be carried out either in a column or on a plane. Present-day LC generally utilizing very small particles and a relatively high inlet pressure is often characterized by the term high-performance (or high-pressure) liquid chromatography, and the acronym HPLC. *IUPAC Recommendations 1993)*

- Κινητή φάση
- Στατική φάση
- Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται λόγω διαφορών στη συγγένεια μεταξύ κινητής/στατικής φάσης

Υγρή Χρωματογραφία vs. Αέρια Χρωματογραφία

Υγρή Χρωματογραφία (LC)

- Κινητή φάση: υγρή
- Κατάλληλη για μη πτητικές, θερμικά ευαίσθητες ενώσεις
- Αναλύει μεγάλα μόρια (π.χ. πρωτεΐνες, πολυμερή)
- Λειτουργεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Ευρύ φάσμα ανιχνευτών (UV, φθορισμός, MS)
- Συνήθης σε φαρμακευτική, βιοϊατρική και περιβαλλοντική ανάλυση

Αέρια Χρωματογραφία (GC)

- Κινητή φάση: αέρια
- Κατάλληλη για πτητικές, θερμικά σταθερές ενώσεις
- Αναλύει μικρά μόρια (π.χ. διαλύτες, αέρια)
- Απαιτεί αυξημένες θερμοκρασίες
- Ανιχνευτές: FID, TCD, MS
- Συνήθης σε κλάδους πετροχημικών, περιβάλλοντος και εγκληματολογικής ανάλυσης

Κλασικές και σύγχρονες τεχνικές LC

Κλασική ανοιχτή στήλη LC



TLC (thin layer chromatography)



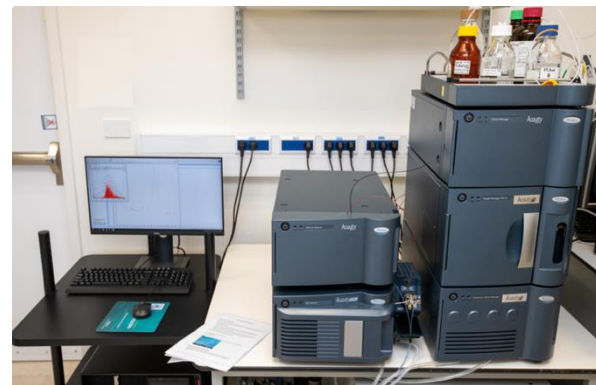
HPLC (high pressure/performance liquid chromatography)



Στην HPLC οι στήλες και τα πληρωτικά υλικά είναι υψηλής ποιότητας και αντέχουν σε υψηλές πιέσεις 35-400 bar. Η διαχωριστική ισχύς είναι υψηλή.

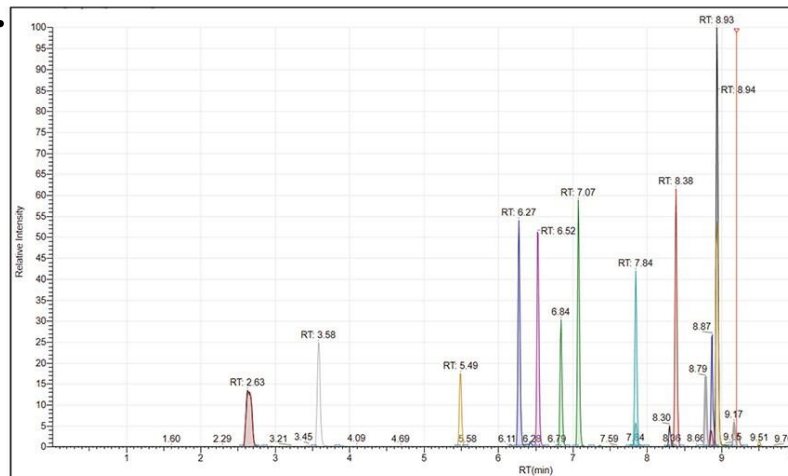
Τα υλικά είναι επαναχρησιμοποιήσιμα.

UHPLC (ultra-high pressure liquid chromatography)



HPLC 101

1. Η κινητή φάση μεταφέρει το υγρό δείγμα μέσω της στήλης προς τον ανιχνευτή, και οι ενώσεις ή αναλύτες διαχωρίζονται λόγω διαφορετικού βαθμού αλληλεπίδρασης με τη στατική φάση.
2. Ο ανιχνευτής μετρά τους αναλύτες μετά την εκλούωση από τη στήλη, και ένα σύστημα συλλογής δεδομένων χρωματογραφίας μεταφράζει το ανιχνευμένο σήμα.
3. Το μεταφρασμένο αποτέλεσμα μιας ανάλυσης HPLC ονομάζεται χρωματογράφημα, όπου ο άξονας x αντιστοιχεί στον χρόνο και ο άξονας y αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο σήμα που παράγεται από τον ανιχνευτή.



Το σύστημα HPLC I

Οφέλη της HPLC

- Υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια
- Εξαιρετική αποδοτικότητα διαχωρισμού
- Κατάλληλη για σύνθετα μίγματα
- Γρήγορη ανάλυση με αναπαραγόμενα αποτελέσματα
- Ευρεία γκάμα τύπων δειγμάτων (υγρά, στερεά, βιολογικά)
- Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση
- Αυτοματοποιημένη και δυνατότητα υψηλής διαπερατότητας

Χρήσεις της HPLC

- Φαρμακευτική ανάλυση (καθαρότητα φαρμάκων, δοσολογία)
- Περιβαλλοντική παρακολούθηση (ρύποι, φυτοφάρμακα)
- Έλεγχος τροφίμων & ποτών (πρόσθετα, προσμείξεις)
- Κλινική & βιοϊατρική έρευνα (βιοδείκτες, μεταβολίτες)
- Χημική & βιομηχανία πολυμερών (σύσταση, ποιοτικός έλεγχος)
- Εγκληματολογία (ναρκωτικά, τοξίνες, ανάλυση ιχνών)
- Ανάλυση πρωτεϊνών & πεπτιδίων (βιοτεχνολογία)

Το σύστημα HPLC II

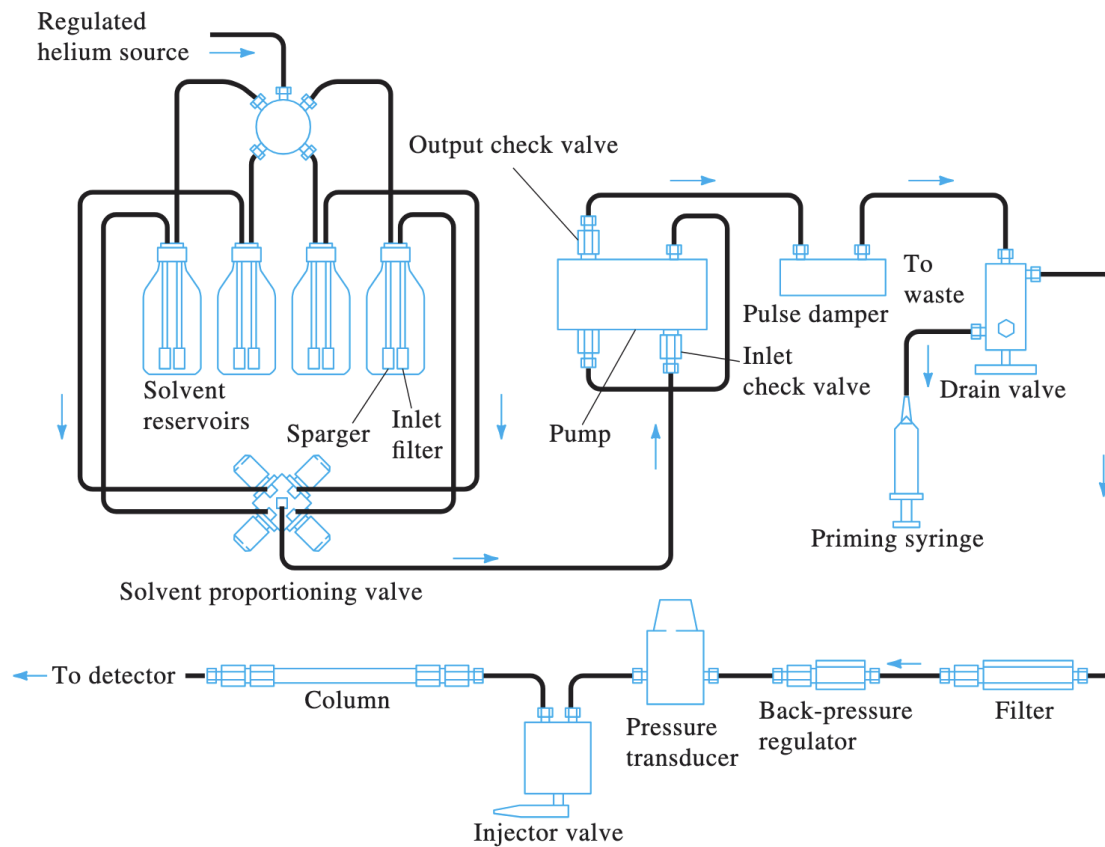


FIGURE 28-3 Block diagram showing components of a typical apparatus for HPLC. (Courtesy of PerkinElmer Corp., Norwalk, CT).

Πηγή: Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, 7^η έκδοση, Skoog, Hooler, Nieman

Το σύστημα HPLC III: Interactive session



<https://www.youtube.com/watch?v=5s8UP7Po-zc>

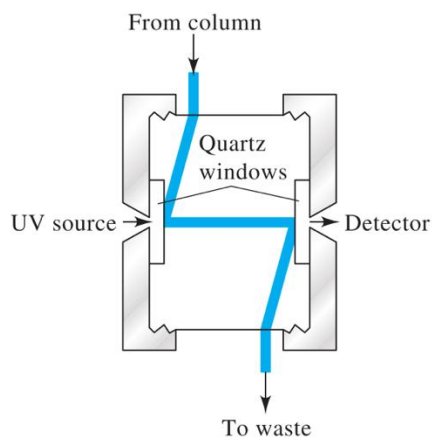
<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/virtual/vanquish-core-hplc-3d-tour.html>

Ανιχνευτές υγρής χρωματογραφίας (LC)

Μέθοδος Ανίχνευσης	Απαιτήσεις Αναλύτη	Όριο Ανίχνευσης	Καταστροφικός Ανιχνευτής;
UV-Vis (UVD)	Απορροφά UV-Vis φως μεταξύ 190 – 800 nm	Νανογραμμάρια	Όχι
Φθορισμός (FLD)	Έχει φθοριοφόρο ή είναι σεσημασμένος με φθορίζουσα ετικέτα	Φεμτογραμμάρια	Όχι
Δείκτης Διάθλασης (RID)	Χωρίς περιορισμούς αναλύτη	Μικρογραμμάρια	Όχι
Σκέδαση Φωτός με Εξάτμιση (ELSD)	Μη πτητικοί και ημι- πτητικοί αναλύτες	Νανογραμμάρια	Ναι
Ηλεκτροχημικός (ECD)	Υφίσταται αντίδραση οξειδοαναγωγής παρουσία ηλεκτρικού δυναμικού	Φεμτογραμμάρια	Ναι
Φορτισμένο Αερόλυμα (CAD)	Μη πτητικοί και ημι- πτητικοί αναλύτες	Πικογραμμάρια	Ναι
Φασματομετρία Μάζας (MS)	Πτητικοί και ημι-πτητικοί ιονιζόμενοι αναλύτες	Πικογραμμάρια	Ναι

Πηγή: Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, 7^η έκδοση, Skoog, Hooler, Nieman

Ανιχνευτές υγρής χρωματογραφίας (LC)



Κυψελίδα ανιχνευτού
υπεριώδους για HPLC

Φασματοφωτομετρικοί Ανιχνευτές

Οι πιο σημαντικοί ανιχνευτές στην HPLC.

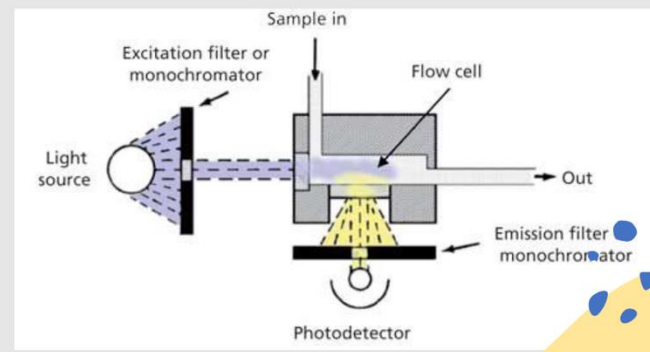
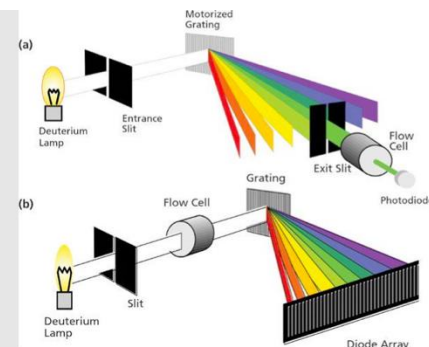
Είναι ευαίσθητοι σε χαμηλές συγκεντρώσεις
<1 ppm.

Έχει μεγάλη γραμμική περιοχή

Δεν είναι ευαίσθητος σε μεταβολές της
θερμοκρασίας και της σύστασης του διαλύτη

Σταθεροί σε οργανολογικές επιδράσεις.

Μόνο όσες ενώσεις έχουν ομάδες ικανές να
απορροφήσουν



Διαφάνεια Μ. Κωστάκη

Ανιχνευτές υγρής χρωματογραφίας (LC)

Φασματομετρία Μάζας

Αμέσως μετά το UV-Vis, ο πιο πολύ χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής στην HPLC.

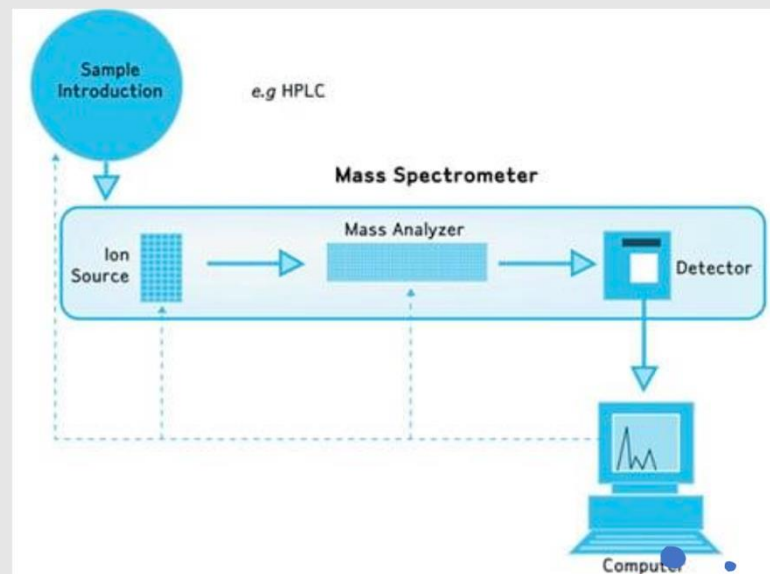
Δίνει τη δυνατότητα με μία ανάλυση να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν μεγάλος αριθμός ενώσεων (>500 ενώσεις) => μικρός χρόνος ανάλυσης.

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.



Διαφάνεια Μ. Κωστάκη

Στήλες υγρής χρωματογραφίας (LC)

Κανονική φάση LC:

- Πολική στατική φάση: silica (πυριτία), άμινο, ή κύανο ομάδες
- Μη πολική κινητή φάση: Εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας

Αντίστροφη φάση LC:

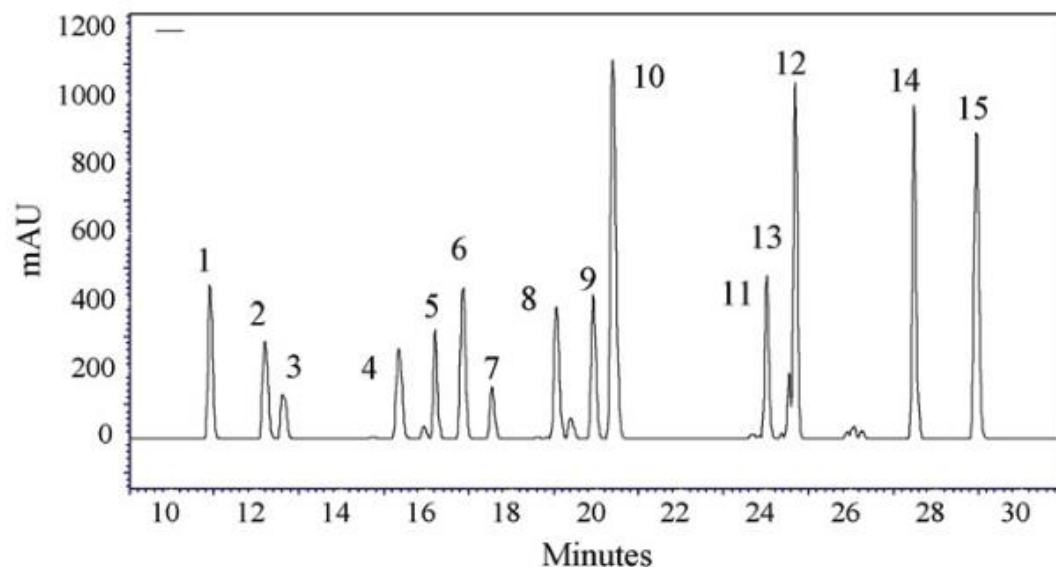
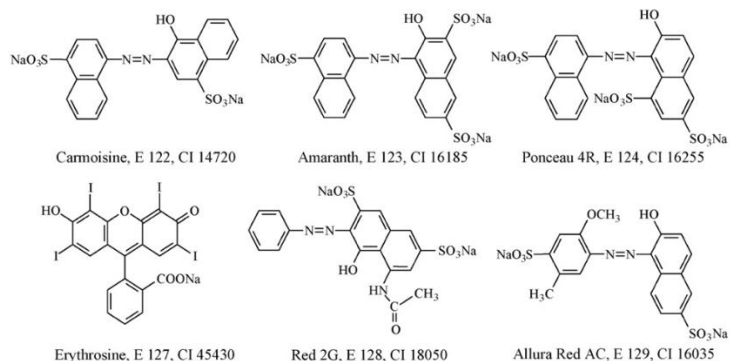
Μη πολική στατική φάση: C8, C18

Πολική κινητή φάση: Νερό, ACN, μεθανόλη

Παράμετρος	Κανονική Φάση	Αντίστροφη φάση
Πολικότητα υλικού πλήρωσης	→ , ↑	↓ , →
Πολικότητα διαλύτη	↓ , →	→ , ↑
Σειρά έκλουσης	↓ πολικότητα πρώτη	↑ πολικότητα πρώτη
Αύξηση πολικότητας διαλύτη	Γρήγορη έκλουση	Αργή έκλουση

Σύνηθες μήκος στήλης 5-25 cm, διάμετρος: 3-5 mm, μέγεθος σωματιδίων: 3 ή 5 μm, μέγεθος πόρων: 100 – 120 Å, επιφάνεια: 300 – 350 m²/g

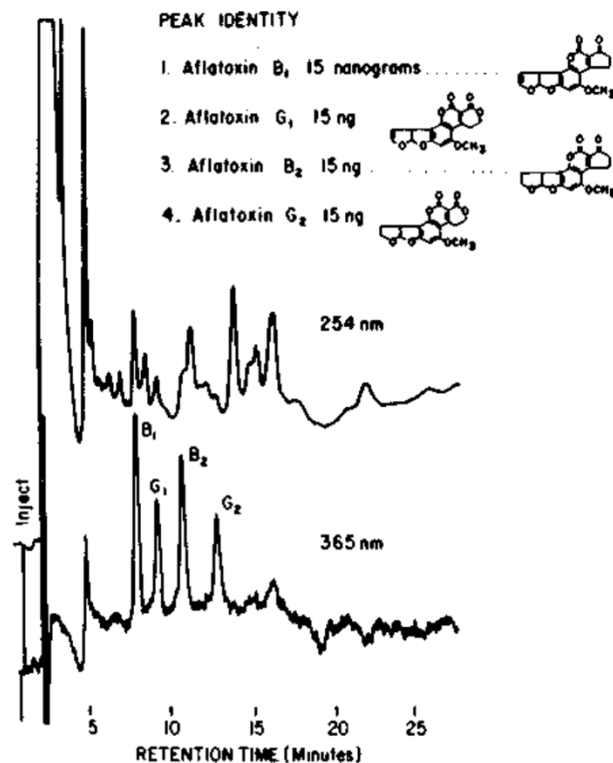
Εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας (LC): Προσδιορισμός χρωστικών σε τρόφιμα



Εικ. 2. Χρωματογράφημα τυπικού διαλύματος μίγματος χρησιμοποιώντας το βελτιστοποιημένο πρόγραμμα κλίσης του Πίνακα 2. Οι συγκεντρώσεις όλων των χρωστικών ήταν 10 mg L^{-1} . Η ταυτοποίηση των κορυφών και οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησής τους (tR) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Minioti, Sakellariou, Thomaidis, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 103-110

Εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας (LC): Προσδιορισμός αφλατοξινών



Ανίχνευση αφλατοξινών σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος. Στήλη, Zorbax-SIL, 25 × 0,21 cm· κινητή φάση, 60% CH₂Cl₂/40% CHCl₃ (και τα δύο 50% κορεσμένα με H₂O)/0,1% μεθανόλη· πίεση, 1500 psi· ροή, 0,7 cc/min· θερμοκρασία περιβάλλοντος· ανιχνευτής, φωτόμετρο UV, 254 nm, 0,02 AUFS· 365 nm, 0,01 AUFS. Λήψη από την Du Pont Instrument Products Division.

Εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας (LC): Διαχωρισμός πεπτιδίων

Αντίστροφη φάση LC:

Μη πολική στατική φάση: C8, C18



**Hypersil GOLD™ στήλη HPLC
για διαχωρισμό πεπτιδίων**

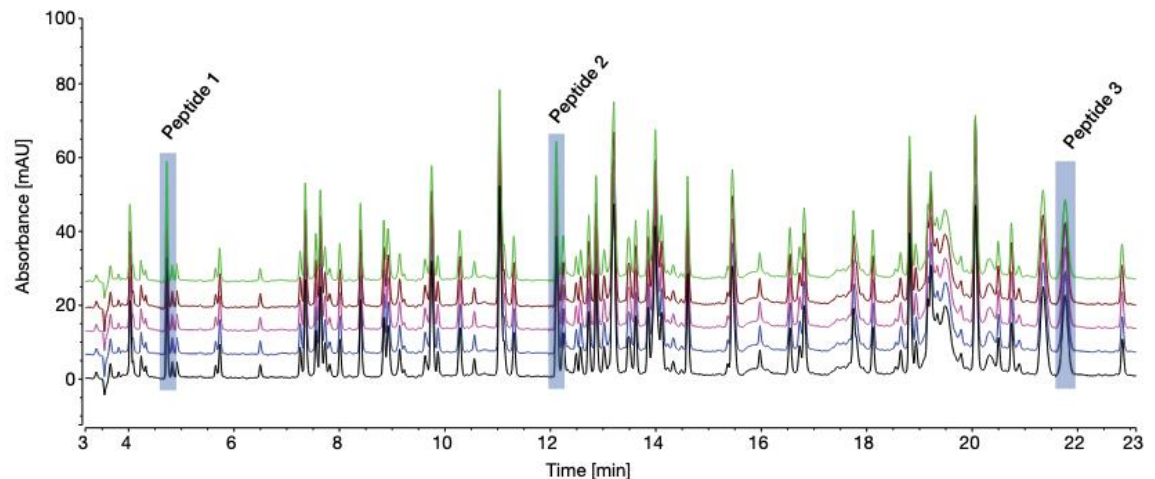


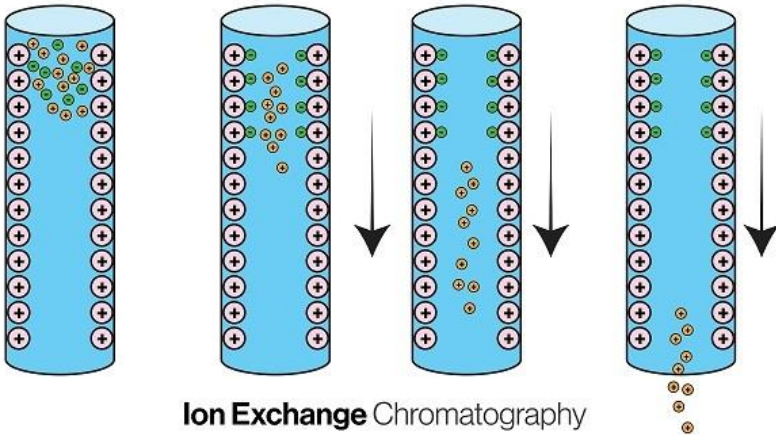
Figure 1. UV chromatograms of five consecutive injections of adalimumab tryptic digest sample with detection wavelength of 214 nm

<https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-002776-ccs-hypersil-gold-biopharma-peptide-an002776-na-en.pdf>

Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Η τεχνική αναπτύχθηκε σημαντικά στο
Manhattan Project για ανίχνευση
σπάνιων γαιών

Sample Mixture



Ion Exchange Chromatography

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων είναι μια διαδικασία για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών και άλλων μορίων σε ένα διάλυμα με βάση τις διαφορές στο φορτίο. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια συνδέονται με θετικά φορτισμένα στερεά υποστρώματα και τα θετικά φορτισμένα μόρια συνδέονται με αρνητικά φορτισμένα υποστρώματα.

Chromatography in which separation is based mainly on differences in the ion-exchange affinities of the sample components. Present day ion-exchange chromatography on small particle high efficiency columns, and usually utilizing conductometric or spectroscopic detectors, is often referred to as ion chromatography (IC).

Source: IUPAC Recommendations 1993))

- Κινητή φάση: Διάλυμα ιόντων
- Στατική φάση: Στερεό πολυμερές με μηδενική διαλυτότητα με ιονισμένες δραστικές ομάδες χημικώς προσδεμένες στο πολυμερές. Στο πολυμερές υπάρχουν αντισταθμιστικά ιόντα για την εξασφάλιση της χημικής ουδετερότητας.

Διάταξη χρωματογραφίας ιονανταλλαγής

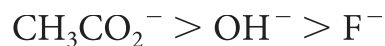
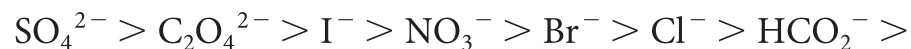
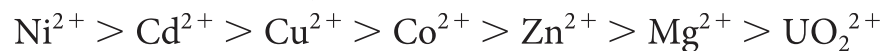


Όταν $[\text{RSO}_3^- \text{H}^+]_s \gg [\text{RSO}_3^- \text{B}^+]_s$ και $[\text{H}^+]_{aq} \gg [\text{B}^+]_{aq}$, τότε $[\text{RSO}_3^- \text{H}^+]$, $[\text{H}^+]_{aq}/[\text{RSO}_3^- \text{H}^+]$ οπότε θεωρείται σταθερό

$$K_{\text{ex}} = \frac{[\text{RSO}_3^- \text{B}^+]_s [\text{H}^+]_{aq}}{[\text{RSO}_3^- \text{H}^+]_s [\text{B}^+]_{aq}}$$

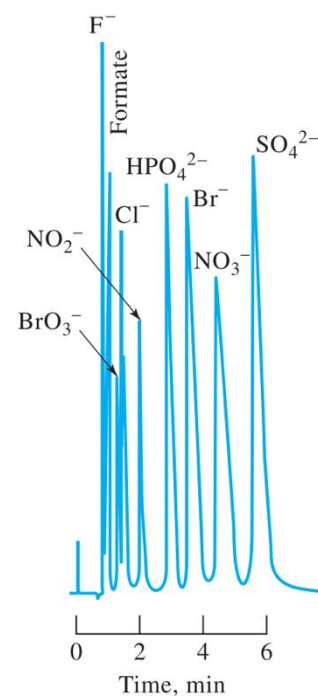
$$\frac{[\text{RSO}_3^- \text{B}^+]_s}{[\text{B}^+]_{aq}} = K = \frac{c_s}{c_M}$$

Σειρά αύξησης της K_{ex}

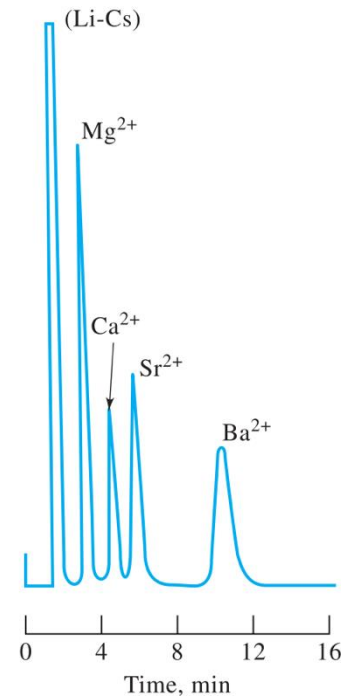


Concentrations, ppm	
F^-	3
Formate	8
BrO_3^-	10
Cl^-	4
NO_2^-	10
HPO_4^{2-}	30
Br^-	30
NO_3^-	30
SO_4^{2-}	25

Concentrations, ppm	
Ca^{2+}	3
Mg^{2+}	3
Sr^{2+}	10
Ba^{2+}	25

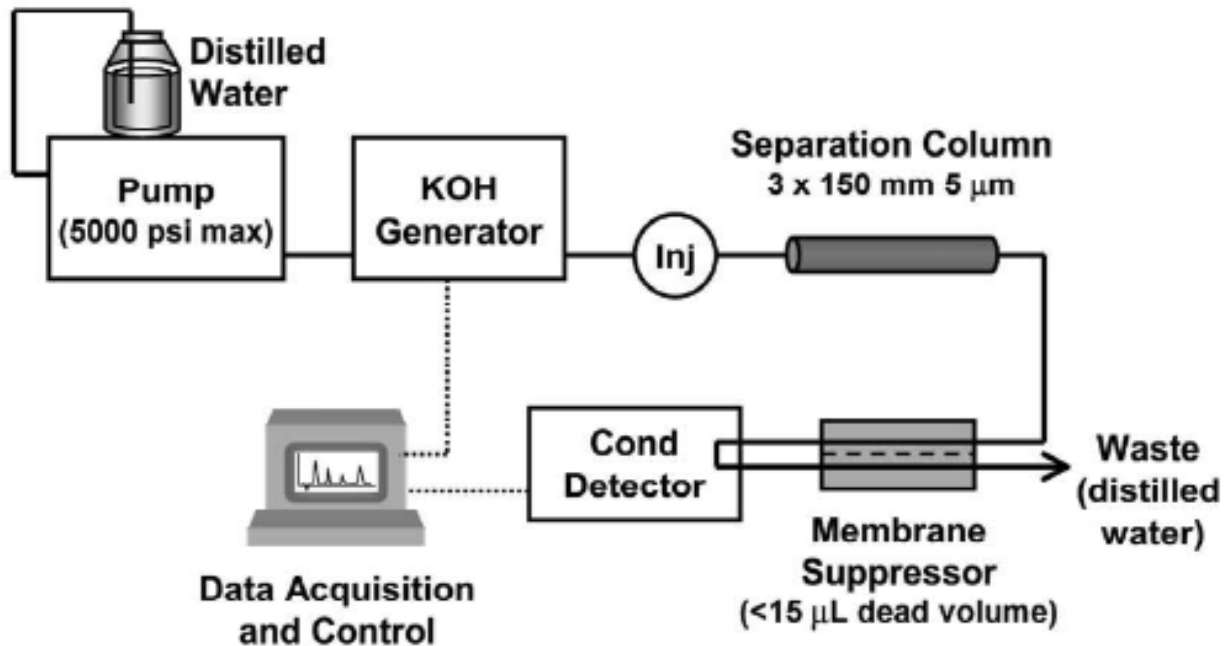


(a)



(b)

Διάταξη χρωματογραφίας ιονανταλλαγής



C. A. Lucy, Evolution of ion-exchange: from Moses to the Manhattan Project to Modern Times, Journal of Chromatography A, 2003

Στήλες χρωματογραφίας ιονανταλλαγής



Hydroxide-selective anion-exchange IC columns

Use these high-capacity, high-resolution columns for inorganic anions, oxyhalides, organic acids, haloacetic acids and multivalent anions in complex matrices.



Carbonate eluent anion-exchange IC columns

Perform well-characterized, isocratic separations, including regulated methods for drinking water and wastewater.



Cation-exchange IC columns

Obtain high-resolution separations of inorganic cations, ammonium and amines, including alkylamines, alkanolamines, and biogenic amines.



Specialty IC columns

These columns are used for a variety of specialty applications, including transition metals, polyvalent anions, hexavalent chromium, sulfide, and cyanide.



Ion-exclusion IC columns

For separating aliphatic organic acids and alcohols in complex samples and for monitoring trace levels of borate in high-purity water.



Carbohydrate IC columns

Carbohydrate columns are optimized for high-resolution separation of sugars and sugar alcohols.



Amino acid IC columns

Amino acid columns separate free amino acids without derivatization.



Reversed-phase IC columns

For ionizable compounds or traditional reversed-phase applications. Mixed-mode columns are available for hydrophobic, neutral and ionic

Τύπος Στήλης	Μηχανισμός	Κύριες Εφαρμογές
Hydroxide-selective anion-exchange	Ανιονοανταλλαγή (OH^-)	Ανόργανα ανιόντα, οργανικά οξέα, HAAs
Carbonate eluent anion-exchange	Ανιονοανταλλαγή (CO_3^{2-})	Γενική ανάλυση ανιόντων, πόσιμο νερό
Cation-exchange	Κατιονοανταλλαγή	Κατιόντα, NH_4^+ , αμίνες
Specialty	Διάφοροι	Μέταλλα, Cr^{6+} , CN^- , S^{2-}
Ion-exclusion	Αποκλεισμός ιόντων	Οργανικά οξέα, F^- (υψηλής καθαρότητας)
Carbohydrate	Ανιονοανταλλαγή (υψηλό pH)	Ζάχαρες, σάκχαρα
Amino acid	Κατιονοανταλλαγή	Αμινοξέα (χωρίς derivatization)
Reversed-phase	Υδρόφοβες + ιονικές	Ιονίσιμες οργανικές, mixed-mode

Πηγή:
<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/industrial/chromatography/ion-chromatography-ic/ion-chromatography-columns/categories.html>

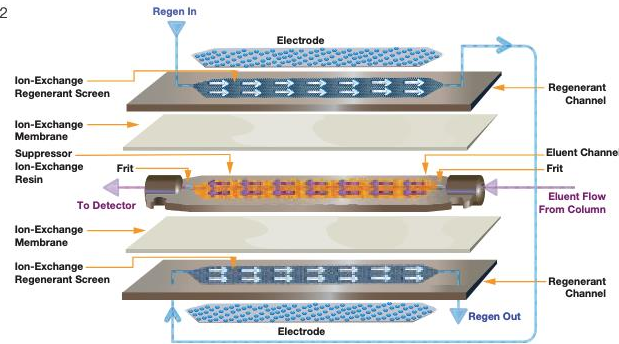
Ανιχνευτές χρωματογραφίας ιονανταλλαγής

- **Αγωγιμοτερικός:** ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος, απλός και γενικός ανιχνευτής, επηρεάζεται από την αγωγιμότητα της κινητή φάσης. Χρήση μέσω καταστολέα.



Thermo Scientific Dionex eluent suppressors for ion chromatography

Figure 2



- **Αμπερομετρικός:** Ανίχνευση ηλεκτρονεργών ουσιών. Οι ουσίες διέρχονται από τον ανιχνευτή, που αποτελείται από ένα ηλεκτρόδιο εργασίας και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς και ανάγονται ή οξειδώνονται και καταγράφεται το ρεύμα. Απαιτεί καλή ρύθμιση συνθηκών.
- **Ορατού-υπεριώδους:** Περιορισμένη χρήση γιατί τα περισσότερα ιόντα δεν έχουν χρωματοφόρο ομάδα, απαιτείται παραγωγοποίηση, που πραγματοποιείται μετά τη στήλη.
- **Φασματομετρία Μαζών:** Βρίσκει εφαρμογή τα τελευταία χρόνια, για τον προσδιορισμό ιόντων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Μεγάλη εκλεκτικότητα, αλλά απαιτεί εξειδικευμένο χρήστη και έχει μεγαλύτερο κόστος.

Παραλλαγή διαφάνειας Μ. Κωστάκη

Φαρμακευτική εφαρμογή της ιοντικής χρωματογραφίας

Table II B. Pharmaceutical Applications of Ion Chromatography, Active Ingredients

Analyte	Column	Eluent	Detection	Other
Copper, manganese, and zinc	Dionex HPICE-CS5	0.05 M oxalic acid (pH 5.24) at 1 mL/min	UV-vis at 520 nm after post-column reaction with PAR	Used to characterize multivitamin supplements.
Chloride, bromide	Dionex IonPac AS4A	0.75 mmol/dm ³ sodium bicarbonate, 2.2 mmol/dm ³ sodium carbonate at 1 mL/min	Suppressed conductivity with 25 mmol/dm ³ sulfuric acid as regenerant	Used to assess batch to batch variation in an ion exchange bile acid sequestrant

Table IV B. Pharmaceutical Applications of Ion Chromatography, Degradation Products and Impurities

Analyte	Column	Eluent	Detection	Other
Oxalic acid, oxamic acid, and oxamide	Dionex IonPac ICE-AS1 (250 × 9 mm, 7.5 µm particles)	5:95 acetonitrile–0.1% sulfuric acid at 0.8 mL/min	UV at 205 nm	Impurity products in synthetic processes, some validation data provided.
Sulfate and sulfamate	Dionex IonPac AS5A-5m (150 × 4 mm)	Gradient with mobile phase A being water and mobile phase B being 50 mM NaOH at 1 mL/min	Suppressed conductivity	Assay used to measure these analytes as degradation products of Topiramate. Extensive validation information provided.
Trifluoroacetate	Dionex IonPac AS18, 250 × 4 mm, with AG18 guard	KOH gradient at 1 mL/min: 0–6 min, 22 mM; 6–12 min, 28 mM, 12–15 min, 50 mM, 15–20, 22 mM	Suppressed conductivity	Assay is used to measure residual TFA in injection solutions and peptides. Method optimization and evaluation data provided.

D. Jenke, Application of Ion Chromatography in Pharmaceutical and Drug Analysis, J. Chrom. Sci., 2011

Επίδειξη χρωματογραφίας ιονανταλλαγής

- <https://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/infinitylab-lc-workflow-solutions/infinitylab-bio-inert-lc-solutions/1260-infinity-bio-inert-quaternary-lc-system/ion-chromatography>

Πίνακας Απόφασης - Ποια Τεχνική να Επιλέξω;

Χαρακτηριστικό Αναλύτη	Επιλογή
Πτητικός (<500 Da)	GC ★
Μη πτητικός	HPLC ★
Θερμοευαίσθητος	HPLC ★
Θερμοσταθερός (<400°C)	GC ή HPLC
Πολικός	HPLC ★ (ή GC μετά derivatization)
Μη πολικός	GC ή HPLC (RP)
Μοριακό βάρος >1000 Da	HPLC ★
Trace analysis (<ppb)	GC-MS (ECD, NPD) ★ ή HPLC-MS/MS
Ταχύτητα κρίσιμη	GC (με H ₂) ⚡
Χαμηλό κόστος	GC 💰
Ιόντα	IC (HPLC-based) ★
Πρωτεΐνες/πεπτίδια	HPLC (LC-MS) ★