ΚΕΦ. 20^{A}
ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ

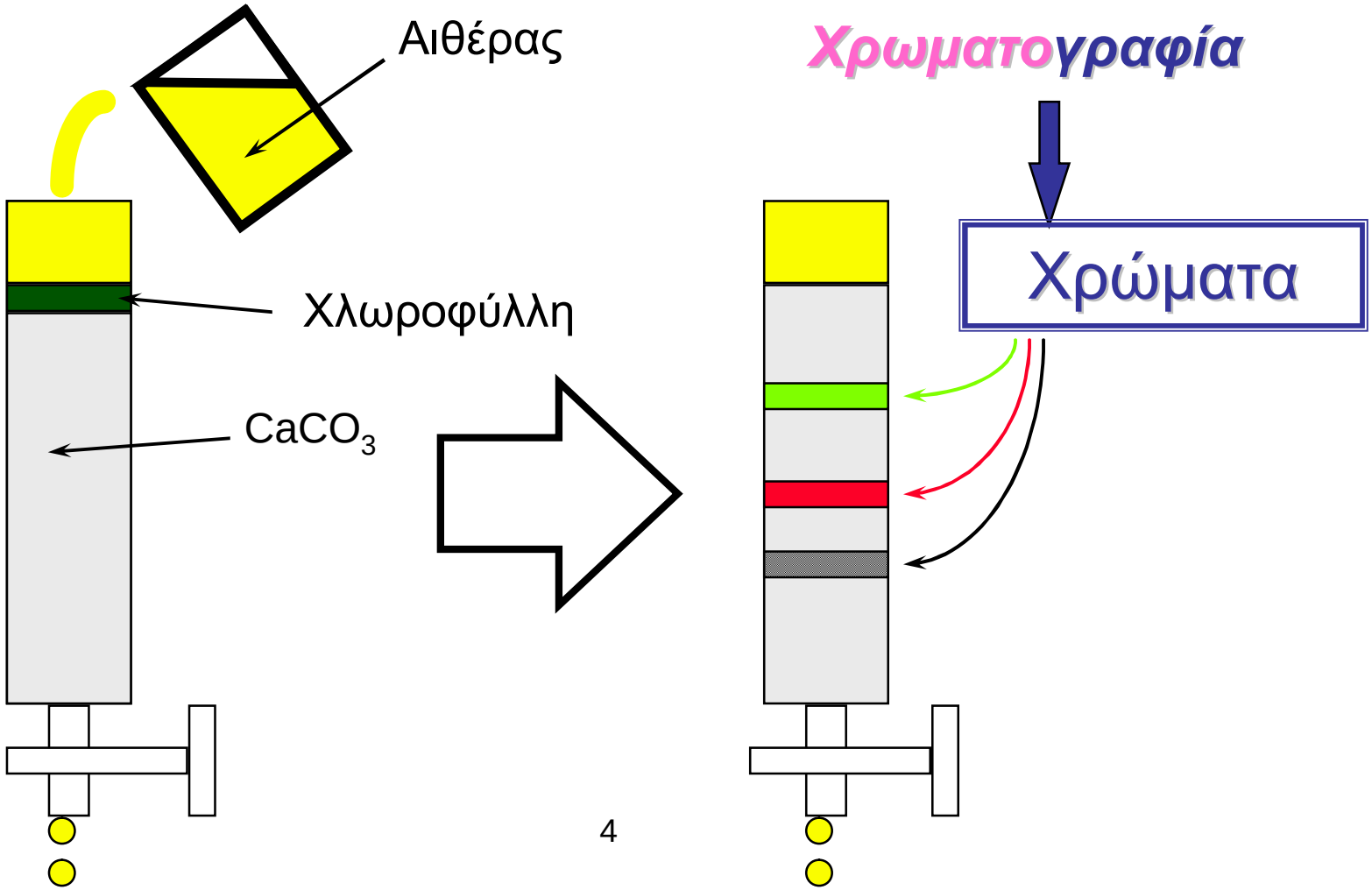
Εισαγωγή (1)

- Υγρή Χρωματογραφία στήλης ή απλώς Υγρή Χρωματογραφία (ορθότερα Υγροχρωματογραφία) Liquid Chromatography (LC)
  - Στατική φάση: στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, συσκευασμένο σε στήλη
  - Κινητή φάση: Υγρό

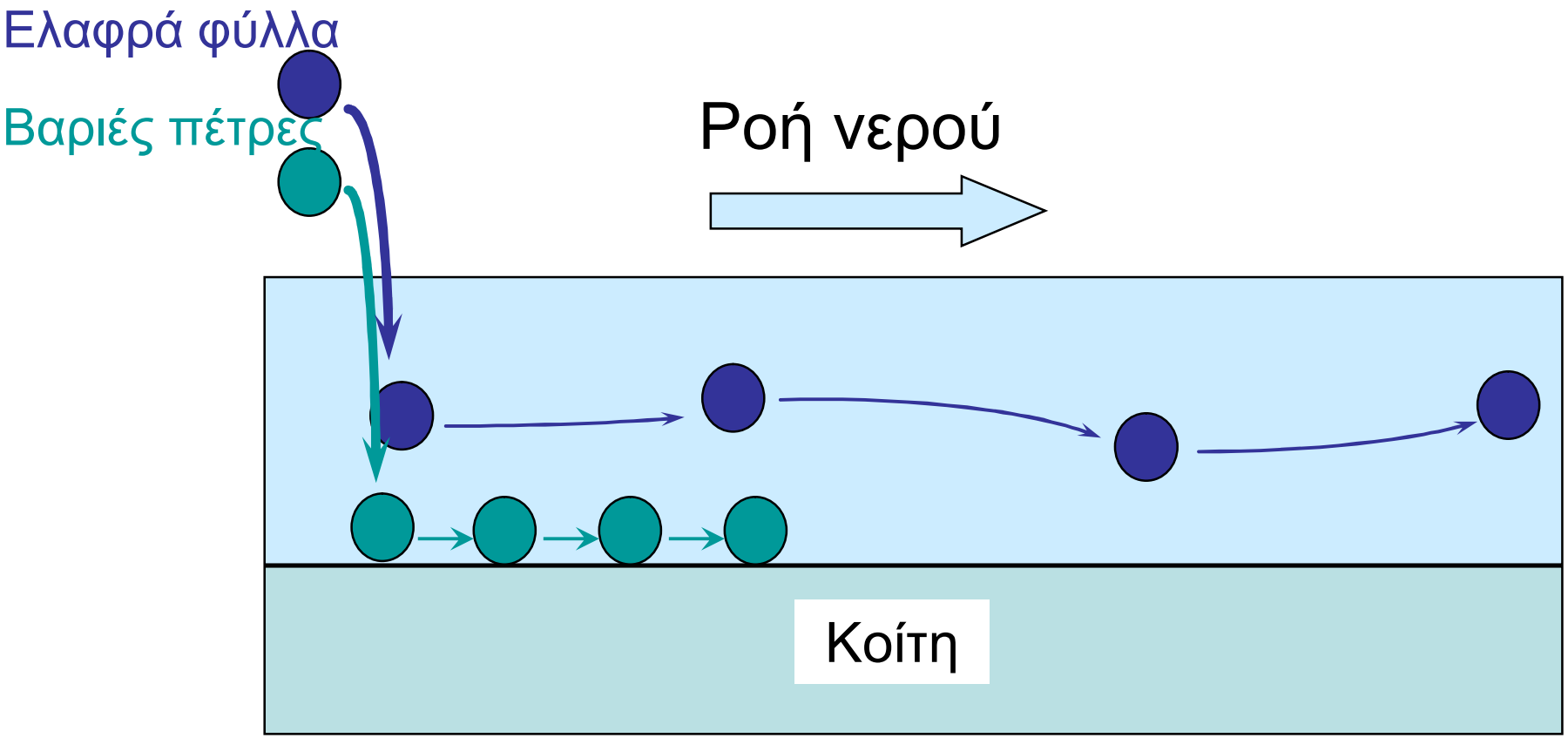
Εισαγωγή (2)

- Διαβίβαση υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική:
  - Λόγω βαρύτητας
  - Χρήση αντλιών χαμηλής πίεσης (όταν στατική φάση από σχετικώς μεγάλα σωματίδια με μικρή αντίσταση) (Κλασική Υγροχρωματογραφία στήλης)
  - Χρήση αντλιών υψηλής πίεσης (όταν στατική φάση από πολύ μικρής διαμέτρου σωματίδια με μεγάλη αντίσταση, αλλά υψηλή διαχωριστική απόδοση (Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

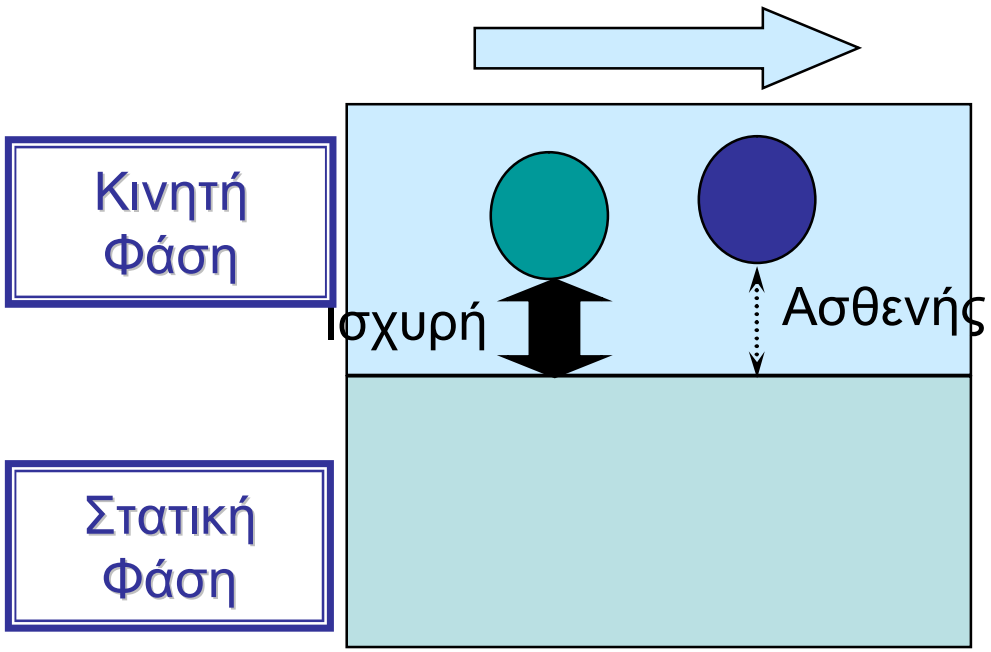
Ανακάλυψη Χρωματογραφίας από M. Tswett



Σύγκριση Χρωματογραφίας με Ροή Ποταμού...



Κινητή Φάση / Στατική Φάση



- Μια κινούμενη φάση (κινητή φάση) και μια ακίνητη φάση (στατική φάση) έρχονται σε επαφή μέσω μιας μεσεπιφάνειας
- Η συγγένεια των συστατικών με την κινητή και στατική φάση διαφέρει → προκύπτει διαχωρισμός λόγω διαφορών στην ταχύτητα κίνησης

Χρωματο-ορισμοί

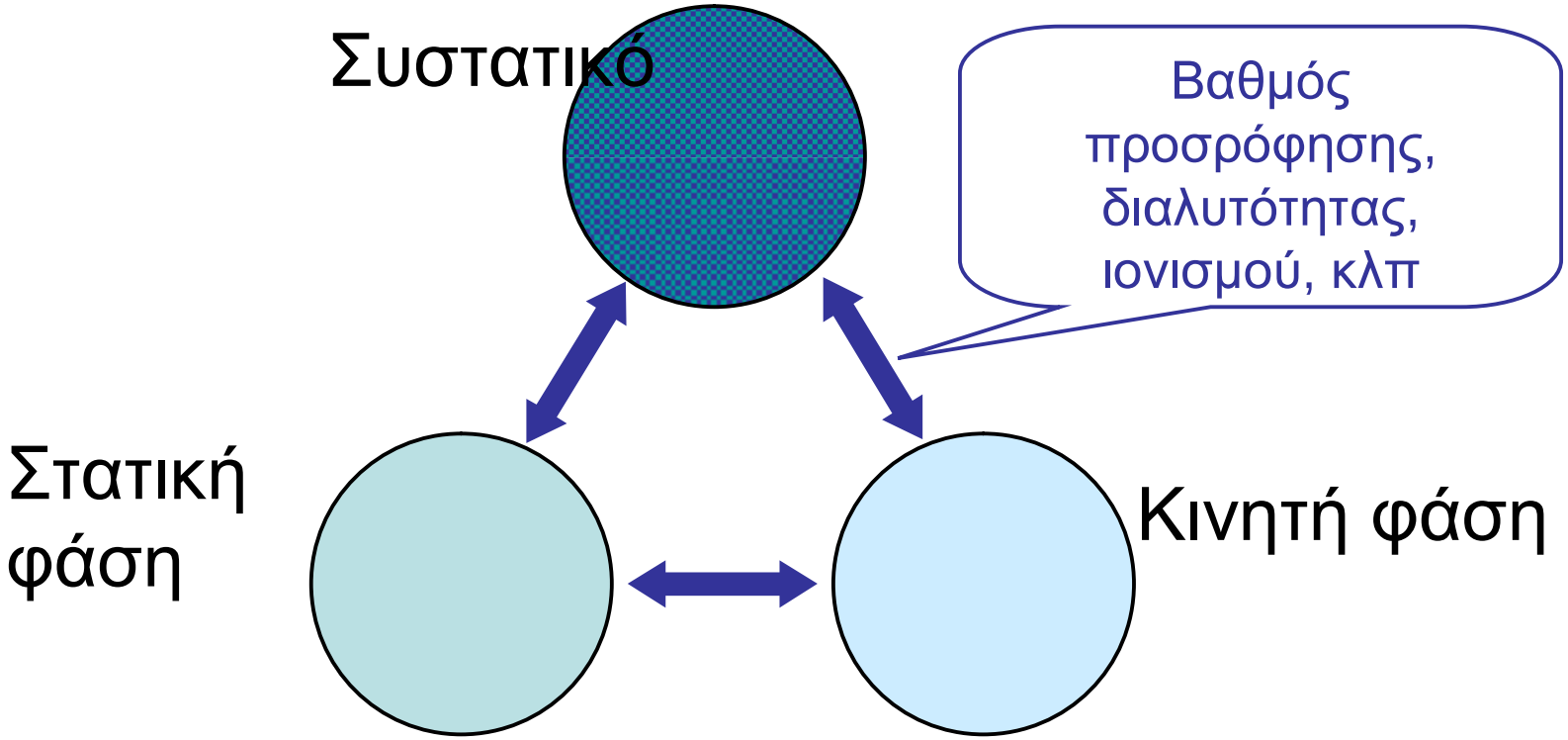
- Chromatography:
  - Χρωματογραφία Αναλυτική τεχνική
- Chromatograph:
  - Χρωματογράφος Όργανο
- Chromatogram:
  - Χρωματογράφημα Λαμβανόμενη «εικόνα»
- Chromatographer
  - Χρωματογραφιστής Αναλυτικός επιστήμων

Τρεις Καταστάσεις Ύλης και Τύποι Χρωματογραφίας

		Κινητή φάση		
		Αέρια	Υγρή	Στερεή
Στατική φάση	Αέρια			
	Υγρή	Αεριο-χρωματογραφία	Υγρο-χρωματογραφία	
	Στερεή			

Αλληλεπίδραση Μεταξύ Συστατικού, Στατικής Φάσης και Κινητής Φάσης

- Διαφορές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ συστατικών και στατικής και κινητής φάσης εξασφαλίζει διαχωρισμό.



Εισαγωγή (3)

- LC χρήσιμη για διαχωρισμό και ανάλυση μειγμάτων μοριακών ή ιοντικών ενώσεων:
  - με χαμηλές τάσεις ατμών
  - θερμικά ασταθών που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπασθούν
- Κλασική υγροχρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται:
  - κυρίως για διαχωρισμούς
  - σπανιότερα για ποσοτικούς προσδιορισμούς μικρής ακρίβειας
- HPLC: η περισσότερο χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική για ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων

Εισαγωγή (4)

- Χρωματογραφικοί μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα στην Υγροχρωματογραφία Στήλης:
  - Προσρόφηση
  - Κατανομή
  - Ιονανταλλαγή
  - Μοριακός αποκλεισμός
  - Συγγένεια
- Βάση ταξινόμησης ειδών υγροχρωματογραφίας

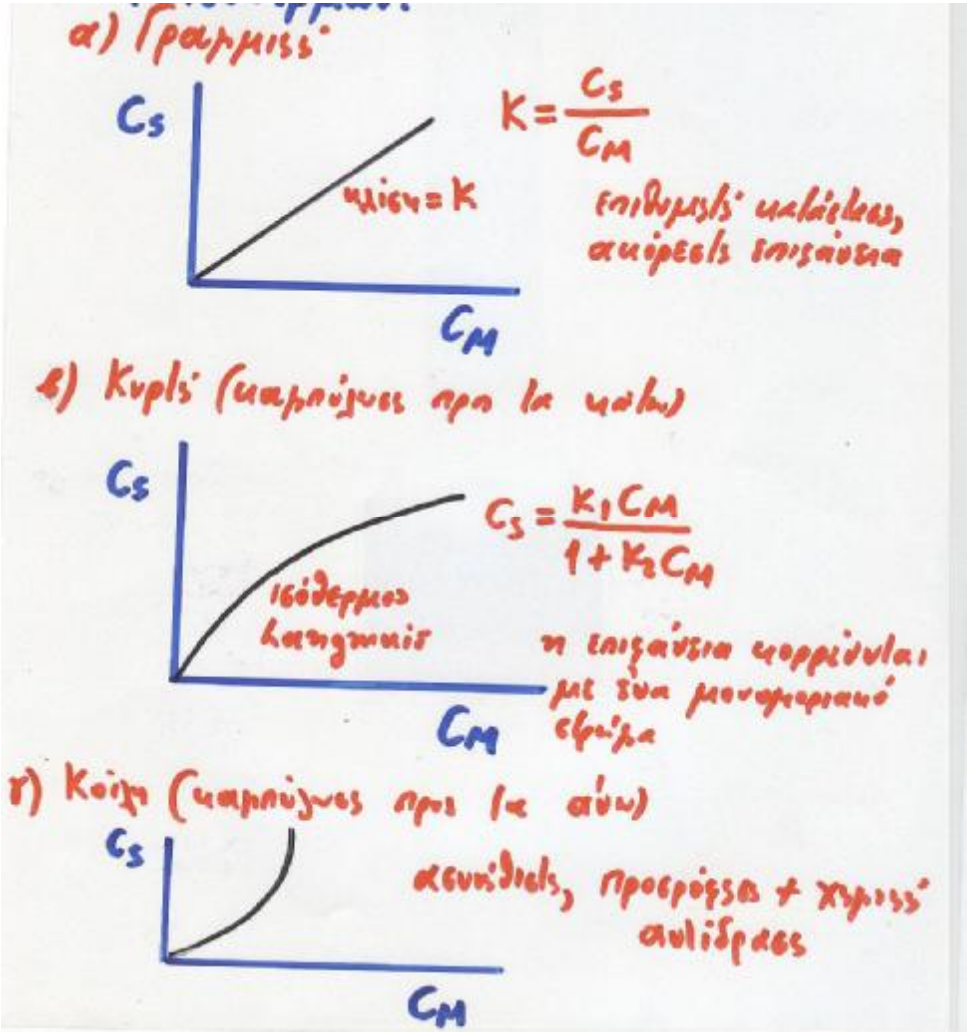
Υγρο-Στερεο Χρωματογραφία Προσρόφησης Στήλης (1)

- Τα προσροφητικά υλικά εμφανίζουν επιφανειακή ενεργότητα, λόγω απουσίας της προστατευτικής δομής που υπάρχει στο εσωτερικό τους.
- Δυνάμεις προσροφήσεως:
  - Ηλεκτροστατικές (ιοντικές)
  - Διπόλου – διπόλου
  - Διπόλου – επαγόμενου διπόλου
  - Δυνάμεις London
  - Συνδυασμός

Υγρο-Στερεο Χρωματογραφία Προσρόφησης Στήλης (2)

- Το προσροφητικό υλικό πρέπει να έχει:
  - Μεγάλο εμβαδό επιφάνειας
  - Μεγάλο αριθμό χημικώς ενεργών κέντρων
- Ισορροπία προσρόφησης
  - Παράσταση συγκέντρωσης προσροφημένου συστατικού (C_s) ως προς συγκέντρωσή του στην υγρή κινητή φάση C_M
  - Σε σταθερή θερμοκρασία, η παράσταση αυτή λέγεται Ισόθερμος Προσρόφησης

Είδη Ισοθέρμων



Υγρο-Στερεο Χρωματογραφία Προσρόφησης Στήλης (3)

- Ταχύτητα μετακίνησης ενός συστατικού στη στήλη είναι συνάρτηση του γραμμομοριακού κλάσματος στην κινητή φάση
- Η ζώνη του δείγματος διευρύνεται και δημιουργείται στο κέντρο της μια περιοχή μεγαλύτερης συγκέντρωσης απ’ ό,τι στα άκρα
  - Στην περίπτωση της κυρτής ισοθέρμου, αυτό οδηγεί σε κορυφή με απότομη άνοδο και βραδεία κάθοδο (κορυφή με ουρά, band tailing)

Υγρο-Στερεο Χρωματογραφία Προσρόφησης Στήλης (4)

- Η ασύμμετρη διεύρυνση είναι ανεπιθύμητη και αποφεύγεται με:
  - Μερική απενεργοποίηση της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού με κάλυψη των περισσότερων κέντρων με άλλη ουσία (τροποποιητής, modifier)
  - Ανύψωση της θερμοκρασίας
  - (κυρίως) με μείωση της ποσότητας του δείγματος (η ισόθερμη γίνεται γραμμική)

Προσροφητικά Υλικά (1)
Πηκτή Διοξειδίου Πυριτίου (Πυριτία)
(Silica gel, SiO_2 x H_2O)

- Περισσότερο χρησιμοποιούμενο υλικό
- Μέγεθος πόρων, ενεργή επιφάνεια και pH επιφάνειας εξαρτώνται από συνθήκες παρασκευής
  - Καταβύθιση με οξίνηση διαλυμάτων πυριτικών
- Ενεργά κέντρα προσρόφησης οι επιφανειακές ομάδες Si-O-H
- Ενεργοποιούνται με θέρμανση της πηκτής στους 200 ^{o}C
- Ασθενώς όξινη και αλληλεπιδρά με ισχυρά βασικά συστατικά

Προσροφητικά Υλικά (2)
Τριοξείδιο αργιλίου (alumina, Al_2O_3 x H_2O)

- Ενεργοποιείται με πύρωση στους 1100 ^oC
- Ολονύκτια πύρωση στους 400 ^oC στον αέρα παρέχει υψηλής ενεργότητας υλικό (βαθμός ενεργότητας I)
- Με εξισορρόπηση του υλικού αυτού με νερό λαμβάνονται τα υλικά:
  - Βαθμός ενεργότητας II 3% νερό
  - Βαθμός ενεργότητας III 6% νερό
  - Βαθμός ενεργότητας IV 10% νερό
  - Βαθμός ενεργότητας V 15% νερό

Προσροφητικά Υλικά (3)
Τριοξείδιο αργιλίου (alumina, Al_2O_3 x H_2O)

- Ενεργοποιημένη αλουμίνα είναι ασθενώς βασικό υλικό και συμπεριφέρεται σαν να έχει διαφορετικά κέντρα
  - Τα βασικά κέντρα προσροφούν ισχυρώς όξινα συστατικά
  - Τα ηλεκτρονιόφιλα κέντρα (Al^{3+}) προσροφούν ακόρεστες ενώσεις και οι αρωματικές ενώσεις αντιδρούν με φαινομενικό μηχανισμό μεταφοράς φορτίου (ηλεκτρονιοδότες)
  - Κάποια κέντρα αντιδρούν με εστέρες, ανυδρίτες, αλδεϋδες και κετόνες

Προσροφητικά Υλικά (4)
Σπανιότερα Υλικά Προσρόφησης

- Κυτταρίνη
  - Για υψηλής πολικότητας ουσίες που δεν μπορούν να εκλουσθούν από στατική φάση πηκτής διοξειδίου πυριτίου ή αλουμίνας
- Ενεργοποιημένος ξυλάθρακας
- Ένυδρο οξείδιο μαγνησίου (magnesia, $MgO \times H_2O$)
  - Χρήσιμο για ολεφίνες και αρωματικές ενώσεις
- Συγκαθίζημα SiO_2 + MgO (Florisil)

Διαλύτες (1)

- Η κινητή φάση (διαλύτης) ανταγωνίζεται τα συστατικά του μείγματος στην κατάληψη των θέσεων προσρόφησης της στατικής φάσης.
- Η έκλουση μιας ουσίας είναι αποτέλεσμα εκτόπισής της από προσροφητικό υλικό στατικής φάσης και όχι της κατανομής της μεταξύ των δύο φάσεων.
  - Η σχετική ικανότητα εκλούσεως ενός διαλύτη είναι ανεξάρτητη από την ουσία

Διαλύτες (2)

- Ισχύς εκλούσεως (eluent strength, ε^o) ενός διαλύτη εκφράζει την ενέργεια προσροφήσεως του διαλύτη ανά μονάδα επιφάνειας.
  - Μεγάλη ε^o → ισχυρότερος διαλύτης για εκτόπιση → μικρότερος παράγοντας χωρητικότητας k΄→ μικρότερος χρόνος (όγκος) συγκρατήσεως
- Για κάθε υλικό προσροφήσεως έχουν κατασκευασθεί κατάλογοι σχετικής ισχύος εκλούσεως (εκλουτροπική σειρά) με βάση το πεντάνιο (ε^o = 0,00)

Εκλουτροπική Σειρά Αλουμίνας

Πίνακας 20-Γ. Εκλουτροπική σειρά τριοξειδίου του αργιλλίου

Διαλύτης	ε°	Διαλύτης	ε°
Φθοριοαλκάνια	−0,25	Διχλωρομεθάνιο	0.42
κ-Πεντάνιο	0,00	Τετραϋδροφουράνιο	0,45
ισο-Οκτάνιο	0,01	1,2-Διχλωροαιθάνιο	0.49
κ-Επτάνιο	0,01	Βουτανόνη-2	0,51
κ-Δεκάνιο	0,04	Ακετόνη	0,56
Κυκλοεξάνιο	0,04	Διοξάνιο	0.56
Κυκλοπεντάνιο	0.05	Οξικός αιθυλεστέρας	0,58
Διθειάνθρακας	0,15	Οξικός μεθυλεστέρας	0,60
Τετραχλωράνθρακας	0,18	Πεντανόλη-1	0,61
1-Χλωροπεντάνιο	0,26	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	0,62
ισο-Προπυλαιθέρας	0,28	Ανιλίνη	0,62
ισο-Προπυλοχλωρίδιο	0,29	Νιτρομεθάνιο	0,64
Τολουόλιο	0,29	Ακετονιτρίλιο	0,65
1-Χλωροπροπάνιο	0,30	Πυριδίνη	0,71
Χλωροβενζόλιο	0,30	Προπανόλη-2	0,82
Βενζόλιο	0,32	Αιθανόλη	0,88
Βρωμοαιθάνιο	0,37	Μεθανόλη	0,95
Διαιθυλαιθέρας	0,38	Αιθανοδιόλη-1,2	1,11
Χλωροφόρμιο	0,40	Οξικό οξύ	πολύ μεγάλη

Διαλύτες (3)

- Στην πράξη χρησιμοποιείται Βαθμίδωση Ισχύος Εκλούσεως
  - Προσθήκη διαλύτη Α μικρής ισχύος εκλούσεως: έκλουση συστατικών ασθενούς προσρόφησης
  - Ανάμειξη διαλύτη Α με διαλύτη Β μεγαλύτερης ισχύος εκλούσεως
    - Είτε σε ξεχωριστά στάδια
    - Είτε συνεχώς
  - Σταδιακή έκλουση όλων των συστατικών

Διαλύτες (4)

- Ισχύς εκλούσεως όχι συνάρτηση σχετικής συστάσεως μεικτού διαλύτη
- Μικρός όγκος διαλύτη μεγάλης $ε^o$ αλλάζει σημαντικά την $ε^o$ ενός διαλύτη μικρής ισχύος εκλούσεως.

Υγρό – Υγρό Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης (1)

- Στατική φάση: λεπτή στιβάδα υγρού πολικού χαρακτήρα (ύδωρ, υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα) στηριγμένη σε στερεό υλικό στήριξης στη στήλη
- Κινητή φάση: Οργανικός διαλύτης χαμηλής πολικότητας (από αυτούς που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία προσροφήσεως).

Υγρό – Υγρό Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης (2)

- Οι δύο φάσεις πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία
- Ανάμειξη σε διαχωριστική χοάνη και άφεσή τους προς διαχωρισμό.
  - Υδατική στοιβάδα για διαβροχή υλικού πλήρωσης στήλης
  - Οργανική στοιβάδα ως κινητή φάση
- Εκλογή ζεύγους διαλυτών (μη αναμείξιμοι) γίνεται με βάση τη διαλυτότητα συστατικών προς διαχωρισμό σε αυτούς

Υγρό – Υγρό Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης (3)

- Στην ιδανική περίπτωση: γραμμομοριακό κλάσμα ουσιών στην κινητή φάση 0,05 – 0,5, διαφορετικά οι χρόνοι συγκρατήσεως είναι πολύ μεγάλοι ή πολύ μικροί, αντίστοιχα.

Υγρό – Υγρό Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης (4)

- Υλικά στηρίξεως:
  - Πηκτή SiO_2 (συγκρατεί σημαντική ποσότητα ύδατος διατηρώντας κοκκώδη μορφή)
  - Κυτταρίνη
- Χρωματογραφία κανονικής φάσης
  - Στατική φάση πολικότερη κινητής φάσης
- Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης
  - Υλικό στήριξης: γη διατόμων σιλανοποιημένη για να γίνει υδρόφοβη ή κονιοποιημένο ελαστικό καλυμμένο με βενζόλιο
  - Στατική φάση: Οργανικός διαλύτης
  - Κινητή φάση: Υδατικό διάλυμα

Υγρό – Υγρό Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης (5)

- Πλεονεκτήματα χρωματογραφίας κατανομής έναντι χρωματογραφίας προσροφήσεως:
  - Συντελεστής κατανομής σταθερός σε ευρύτερη περιοχή συγκεντρώσεων
  - Κορυφές οξύτερες και συμμετρικότερες
  - Πρόβλεψη αποτελεσμάτων διαχωρισμού από δεδομένα διαλυτότητας

Υγρό – Υγρό Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης (6)

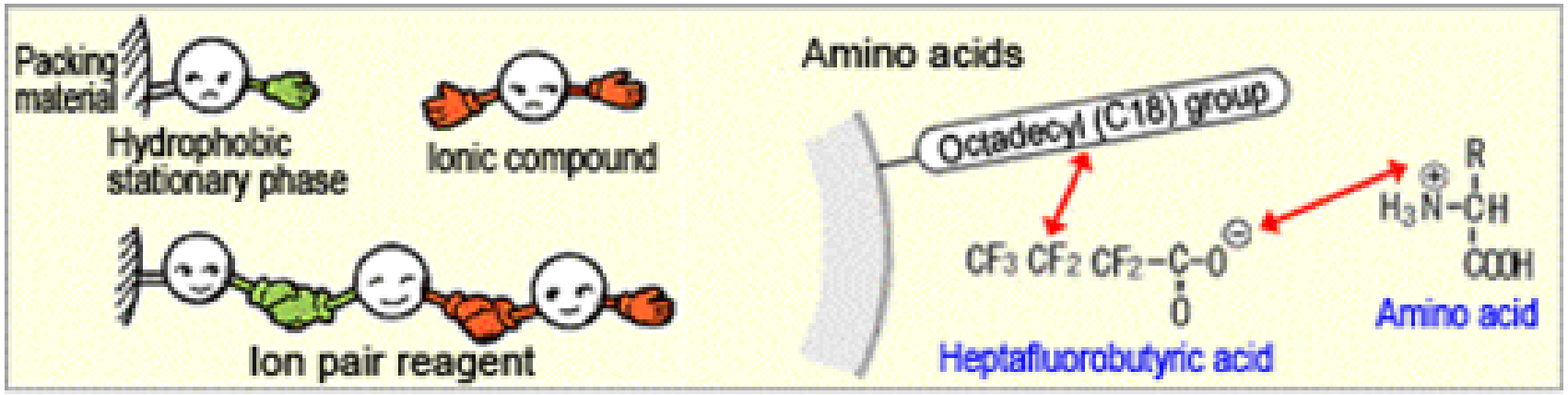
- Εξαναγκασμός συστατικών μείγματος να συμμετάσχουν σε μια δευτερεύουσα ισορροπία (πέραν της κύριας ισορροπίας κατανομής)
  - Αποτέλεσμα αποδοτικότερος διαχωρισμός
- Χρωματογραφία ζευγών ιόντων (ion-pair chromatography)

Υγρό – Υγρό Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης (7)

- Προσθήκη στην κινητή φάση ιονισμένης ενώσεως
- Δημιουργία με ιονισμένα συστατικά μείγματος, ζευγών ιόντων μικρής πολικότητας,
- Ικανά να διαλυθούν στην υγρή στατική φάση και να συγκρατηθούν ισχυρότερα από ό,τι τα αντίστοιχα συστατικά

- Τεχνική μοιάζει με τεχνική εκχυλίσεως ζευγών ιόντων
- Χρησιμοποείται ευρύτατα στη φαρμακευτική ανάλυση για διαχωρισμό και ανάλυση όξινων και βασικών ιονίσιμων φαρμακευτικών ουσιών

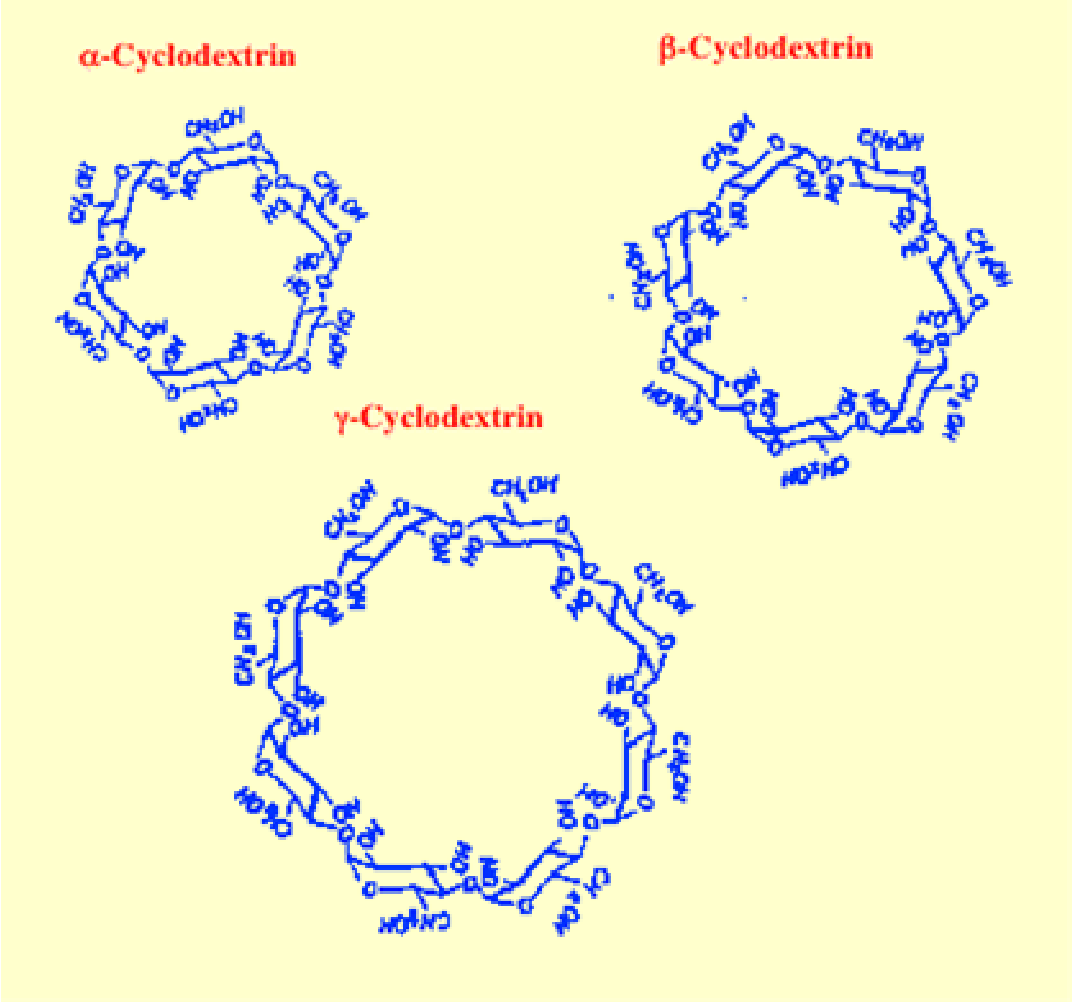
Αρχή Χρωματογραφίας Ζεύγους Ιόντων



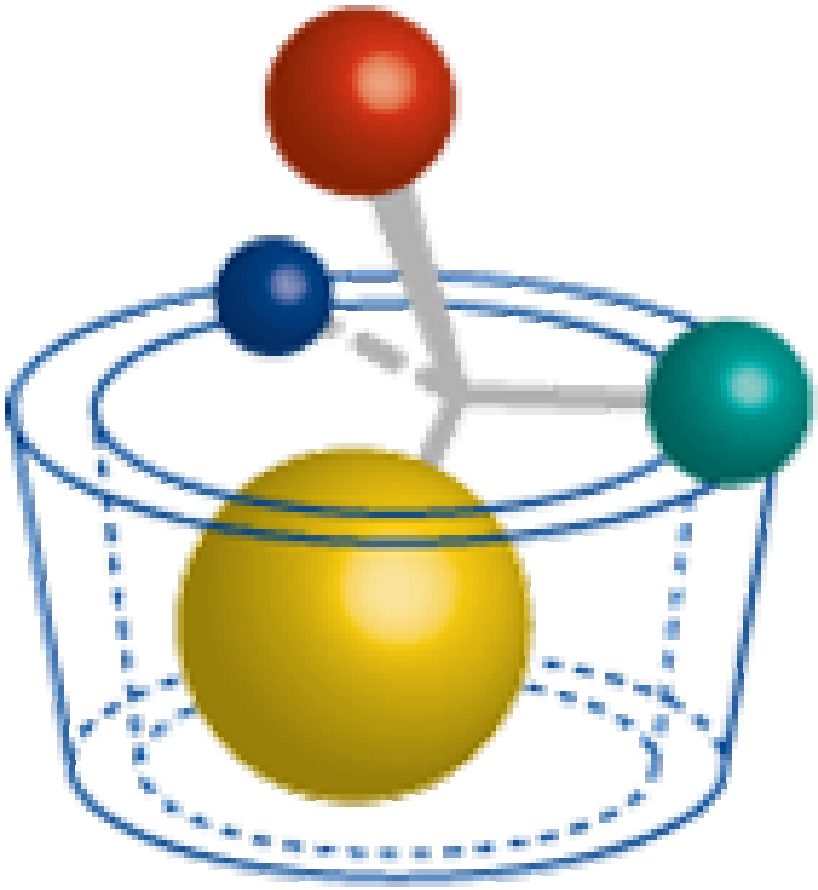
Υγρό – Υγρό Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης (8)

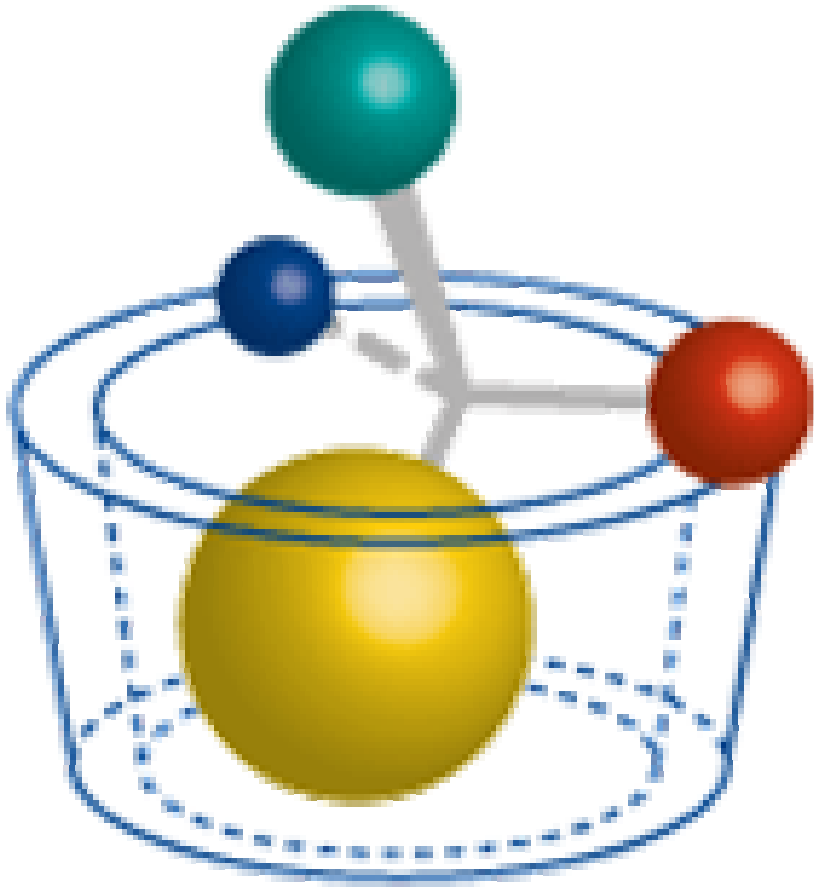
- Χρωματογραφία με στήλες κυκλοδεξτρινών
  - Ομοιοπολική πρόσδεση στη στατική φάση κυκλοδεξτρινών
  - Σχηματίζουν μοριακά σύμπλοκα με τα συστατικά του μείγματος διαφορετικής σταθερότητας
  - Διαφοροποιοπούν τη ταχύτητα μετακίνησης των συστατικών

Κυκλοδεξτρίνες



Σχηματισμός Συμπλόκων Εγκλεισμού Ουσιών με Κυκλοδεξτρίνες





Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής Στήλης (1)

- Χρήση ιονανταλλακτικών ρητινών
- Εφαρμόζεται βαθμιδωτή έκλουση με αλλαγή:
  - Ιοντικής ισχύος
  - pH

  χρησιμοποιώντας ειδικά συστήματα αναμείξεως κινητής φάσης
- Σύγχρονη παραλαγή της χρωματογραφίας ιονανταλλαγής στήλης με υψηλή απόδοση είναι η ιοντική χρωματογραφία

Υγροχρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (1)

- Διαχωρισμός (συνήθως) μεγαλομορίων κατά τη διαβίβαση υγρής κινητής φάσεως μέσα από το πορώδες δίκτυο στατικής φάσεως με βάση το μέγεθος των μορίων.
- Σε ιδανικές συνθήκες χωρίς άλλη αλληλεπίδραση
- Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους
- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
- Molecular exclusion chromatography

Υγροχρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (2)

- Πορώδη υλικά:
  - Ανόργανα: Φυσικοί και συνθετικοί ζεόλιθοι
  - Οργανικά: μη ιοντικά διακλαδούμενα πολυμερή
- Σχηματίζεται ένα δικτυωτό σύμπλεγμα μοριακών διαστάσεων (μοριακό κόσκινο) με μέγεθος πόρων εντός ορισμένης περιοχής τιμών

Υγροχρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (3)

- Ιόντα και μόρια με μέγεθος μικρότερο των πόρων του μοριακού κόσκινου εισέρχονται στους πόρους και περιπλανώμενα αργούν να εκλουσθούν.
- Ουσίες μεγαλύτερου μεγέθους αποκλείονται από το να εισέλθουν στο δίκτυο και παρασυρόμενες από την κινητή φάση εξέρχονται γρήγορα
- Οι υπόλοιπες ουσίες, ανάλογα με το μέγεθος τους περιπλανώνται λιγότερο ή περισσότερο στο πλέγμα και εκλούονται κατά αντίστροφη σειρά μεγέθους.

Υγροχρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (4)

- Στατικές φάσεις:
  - Υδρόφιλες πηκτές (γέλες, gels) από διακλαδούμενα πολυμερή
    - Δεξτράνης (Sephadex G)
    - Αγαρόζης (Sepharose B)
    - Πολυακρυλαμιδίου (Bio-Gel P)
  - Με κινητή φάση υδατική
  - Τεχνική διήθησης πηκτής (gel filtration)

Υγροχρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (5)

- Στατικές φάσεις:
  - Αλκυλιωμένα πολυμερή δεξτράνης, υδρόφοβες πηκτές με οργανικούς διαλύτες
    - Για το διαχωρισμό ουσιών μικρού μοριακού βάρους (εστέρες λιπαρών οξέων, χοληστερόλη, λιπαρά οξέα)
  - Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής (gel permeation

Υγροχρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (6)

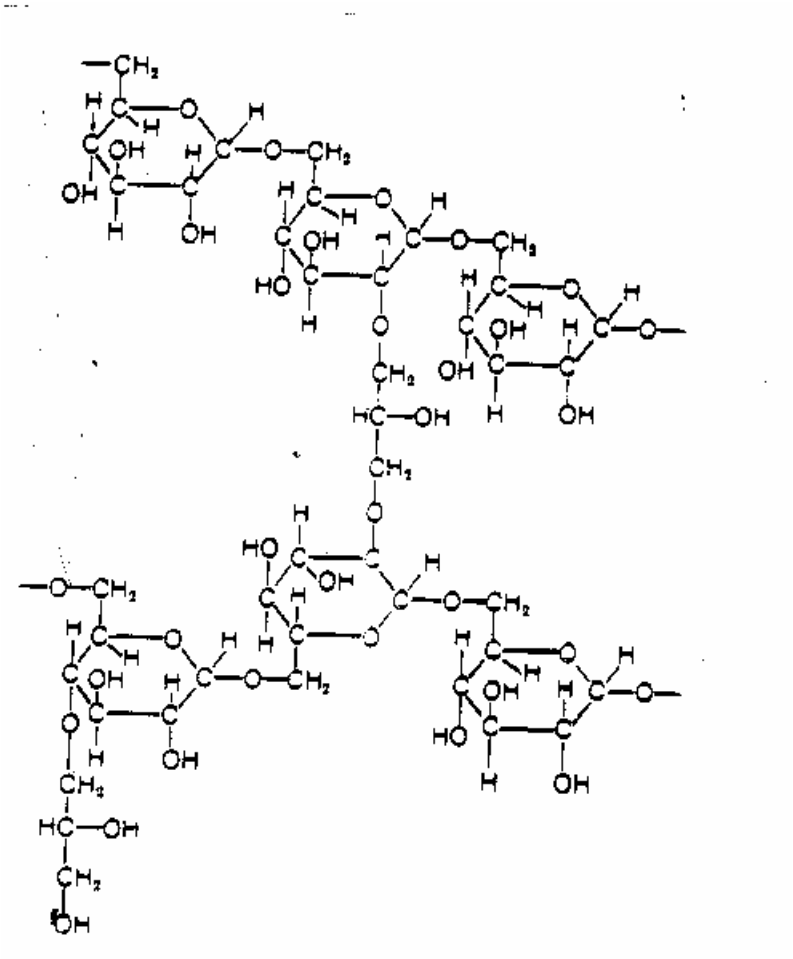
- Στο εμπόριο διατίθενται υλικά παρασκευής πηκτών με ποικιλία μεγέθους πόρων (ελέγχεται από αριθμό διακλαδώσεων)
  - Καθορίζεται η περιοχή κλασματώσεως (fractionation range)
- Παράδειγμα, πηκτή Sephadex G-25 με περιοχή κλασματώσεως 1000 – 5000
  - Κατακρατεί υπερβολικά ουσίες MB < 1000
  - Αποκλείει είσοδο στο πλέγμα και εκλούονται ταχύτατα ουσίες MB > 5000
  - Διαχωρίζει αποδοτικά (κλασματώνει) ουσίες MB 1000 - 5000

Ιδιότητες Μερικών Μέσων Διήθησης Πηκτής

Properties of some gel filtration media

Name	Fractionation range (M.W.) for globular proteins
Sephadex G-10	-700
Sephadex G-15	-1 500
Sephadex G-25	1 000-5 000
Sephadex G-50	1 500-30 000
Sephadex G-75	3 000-80 000
Sephadex G-100	4 000-150 000
Sephadex G-150	5 000-300 000
Sephadex G-200	5 000-600 000
Sephacryl S-200	5 000-250 000
Sephacryl S-300	10 000-1 500 000
Sepharose 2B	70 000-40 000 000
Sepharose 4B	60 000-20 000 000
Sepharose 6B	10 000-4 000 000
Bio-Gel P-2	100-1 800
Bio-Gel P-4	800-4 000
Bio-Gel P-6	1 000-6 000
Bio-Gel P-10	1 500-20 000
Bio-Gel P-30	2 500-40 000
Bio-Gel P-60	3 000-60 000
Bio-Gel P-100	5 000-100 000
Bio-Gel P-150	15 000-150 000
Bio-Gel P-200	30 000-200 000
Bio-Gel P-300	60 000-400 000
Bio-Gel A-0.5 m	< 10 000-500 000
Bio-Gel A-1.5 m	< 10 000-1 500 000
Bio-Gel A-5 m	10 000-5 000 000
Bio-Gel A-15 m	40 000-15 000 000
Bio-Gel A-50 m	100 000-50 000 000
Bio-Gel A-150 m	1 000 000-150 000 000

Δομή Sepharose
Διασταυρούμενη Δεξτράνη



Υγροχρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (7)

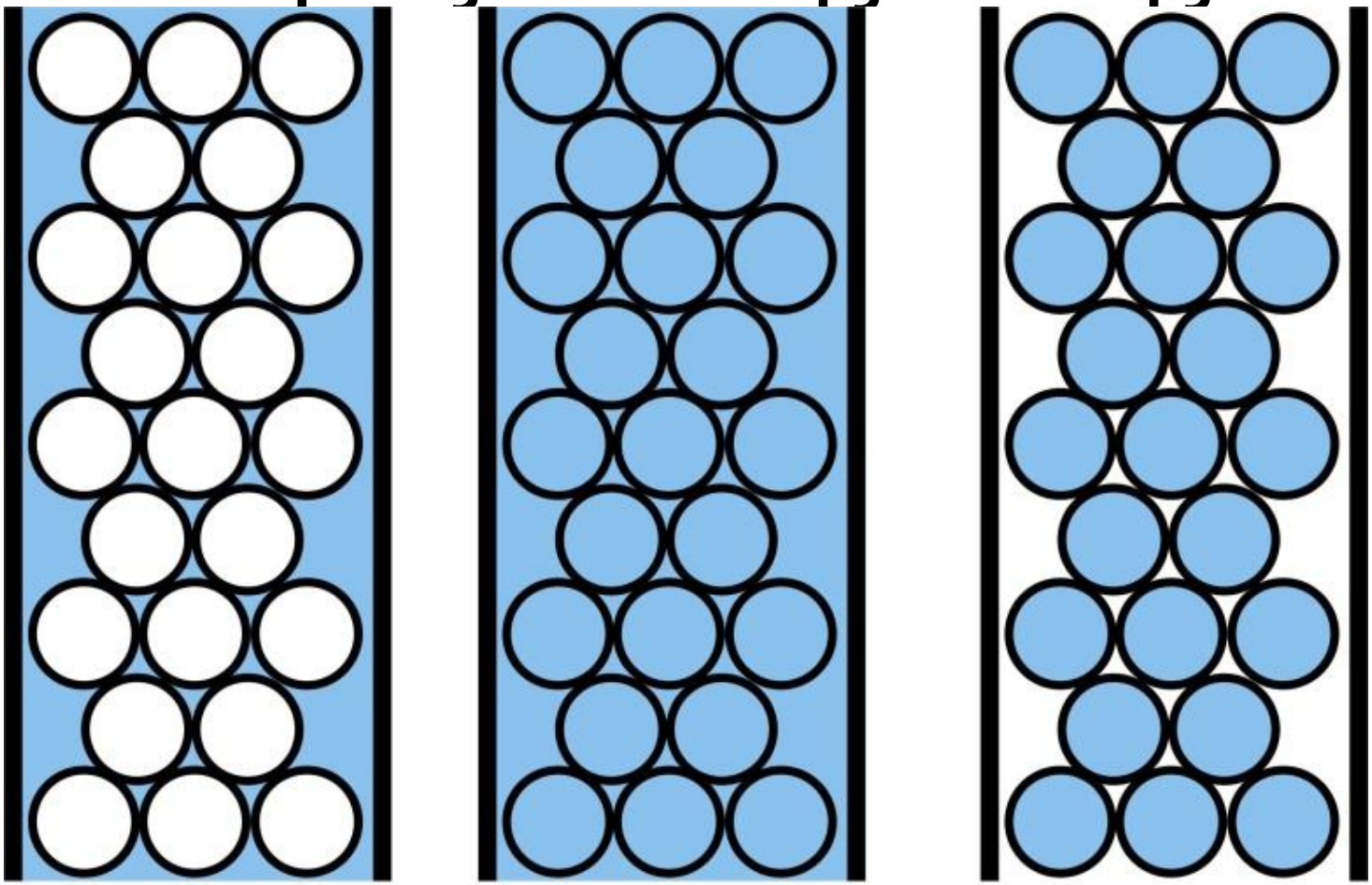
- Μοιάζει με τη χρωματογραφία κατανομής
  - Τα μεγάλα μόρια δαπανούν όλο το χρόνο τους στην κινητή φάση
  - Τα μικρά μόρια μόνο μικρό κλάσμα του χρόνου τους βρίσκονται στην κινητή φάση
- Όγκος κινητής φάσης (V_M) ονομάζεται κενός όγκος (void volume, V_o)
- Εάν V_t ο ολικός όγκος της στήλης, ο όγκος διαλύτη στη στατική φάση V_s είναι ένα μεγάλο κλάσμα του $V_t – V_o$
- V_R = όγκος συγκρατήσεως (ανασχέσεως) ουσίας

Μέσος Συντελεστής Κατανομής

$$K_{av} = \frac{V_R - V_o}{V_t - V_o}$$

- Για μεγάλα μόρια
  $V_R = V_o$ και $K_{av} = 0$
- Για ένα μικρό μόριο που διεισδύει ελεύθερα
  $V_R \approx V_t$ και $K_{av} \approx 1$
- Για μόρια ενδιάμεσου μεγέθους (καθορίζεται από περιοχή κλασμάτωσης πηκτής)
  $K_{av} = 0\text{-}1$

Νεκρός και Ολικός Όγκος Στήλης και Όγκος Στατικής Φάσης



Void volume V_0 Total volume V_t $V_t - V_0$

Προσδιορισμός κενού όγκου V_o και ολικού όγκου V_t

- Διαβίβαση χρωστικής, π.χ, «κυανό δεξτράνης» 2000, με MB = $2x10^6$
- Μέτρηση όγκου $V_R = V_o$
- Προσδιορισμός ολικού όγκου

$$V_t = \pi r^2 \text{ x μήκος στήλης}$$

Χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (1)

1) Για το διαχωρισμό μειγμάτων μεγαλομορίων:
   - Πρωτεΐνες
   - Πεπτίδια
   - Νουκλεϊκά οξέα
   - Πολυσαγχαρίτες
   - Ένζυμα
   - Ορμόνες
   - Πολυμερή

Χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (2)

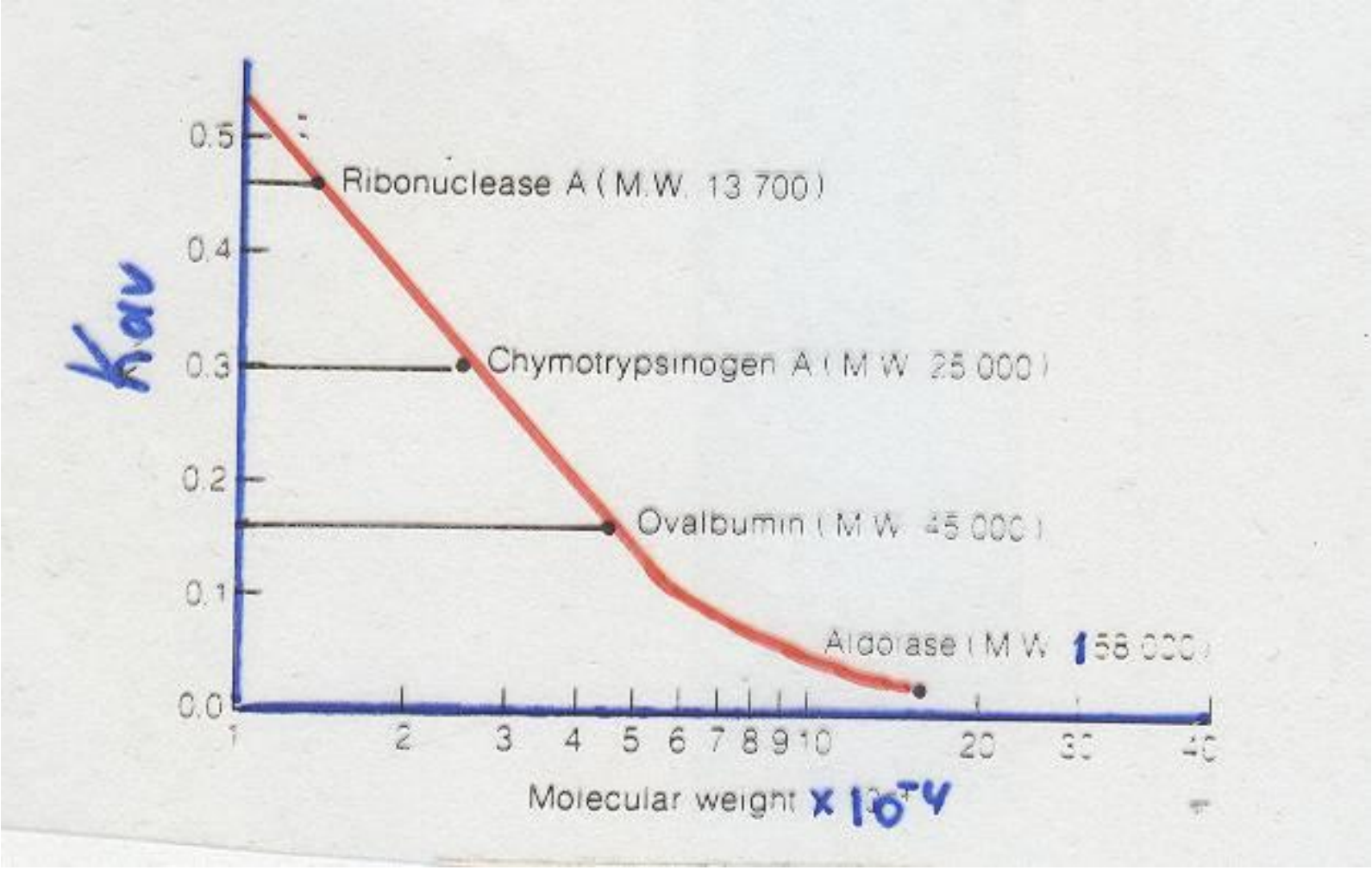
2) Προσδιορισμός ΜΒ

- Για κάθε πηκτή υπάρχει περιοχή ΜΒ για την οποία ισχύει:

$$K_{av} \text{ (ή } V_R) = f \log(MB)$$

- Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με χρήση γνωστών συγγενών ουσιών (παρόμοιου σχήματος)
- Για την έκλουση χρησιμοποιείται κινητή φάση μεγάλης σχετικά ιοντικής ισχύος (≥ 0,05 M) για να αποφεύγονται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με την πηκτή

Καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό ΜΒ



Χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (3)

3) Αφαλάτωση (desalting) διαλυμάτων μεγαλομορίων

- Κατακράτηση ουσιών μικρού ΜΒ (άλατα και διάφορα μικρομόρια αντιδραστηρίων και ρυθμιστικών διαλυμάτων) από διαλύματα μεγαλομορίων

- 4) Συμπύκνωση αραιών διαλυμάτων μεγαλομορίων
  - Με χρήση ξηρής πηκτής στη στήλη

Χρωματογραφία Συγγένειας (1)

- Εκτελείται κυρίως ως κλασική χρωματογραφία στήλης
- Βασίζεται στην εξειδικευμένη αλληλεπίδραση μιας ουσίας ακινητοποιημένης (με ομοιοπολική σύνδεση) σε στερεό φορέα και ενός μόνου συστατικού ενός πολύπλοκου μείγματος
- Το συστατικό που κατακρατείται εκλούεται με προσθήκη υγρού που αλλάζει τις συνθήκες και εξασθενεί τη σύνδεση του συστατικού στη στήλη

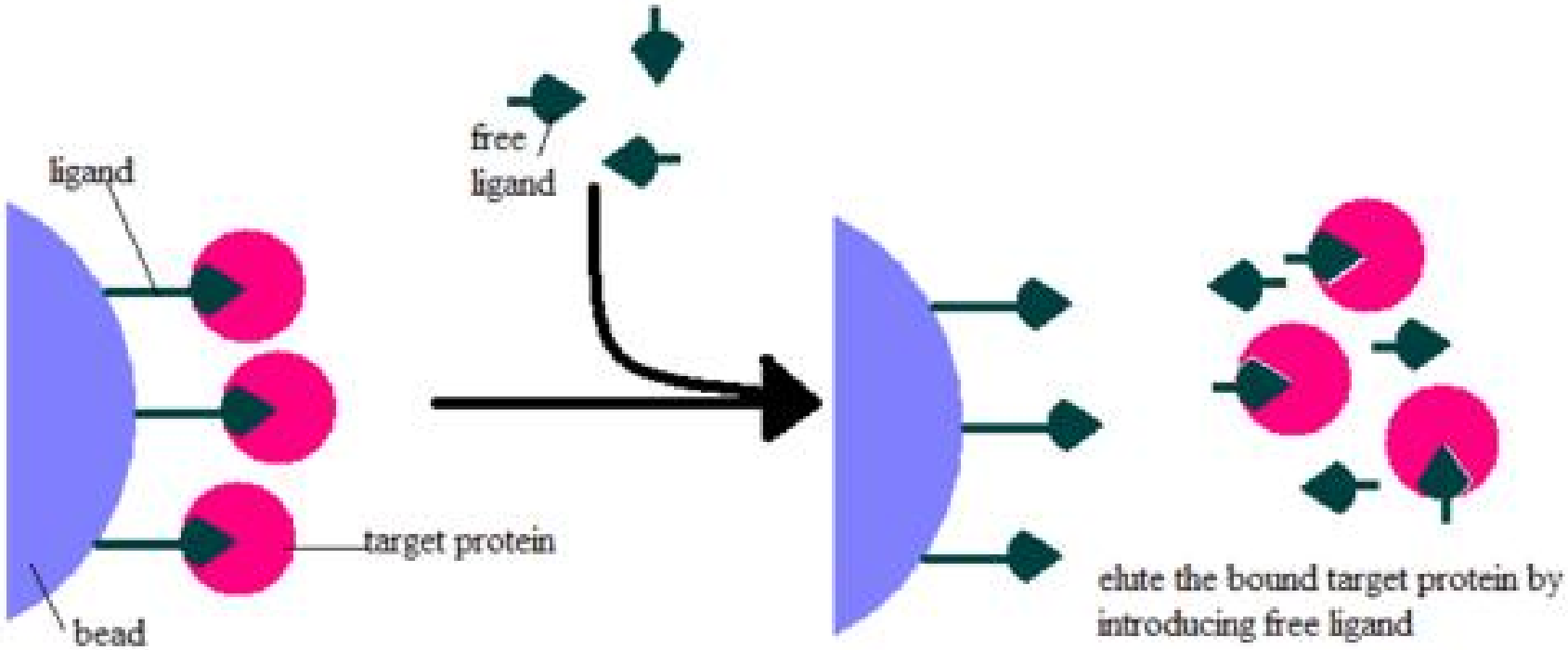
Χρωματογραφία Συγγένειας (2)

- Σχεδιασμός και κατασκευή στατικής φάσης από αναλυτή
- Υπάρχουν όμως και έτοιμες εμπορικές
- Εφαρμογή:
  - Διαχωρισμός (καθαρισμός) ουσιών βιοχημικού ενδιαφέροντος που συμμετέχουν σε εξειδικευμένες αντιδράσεις:
    - Ένζυμα – υποστρώματα (ή συνένζυμα)
    - Αντιγόνα – αντισώματα
    - Ορμόνες – υποδοχείς
    - Διαχωρισμός κυττάρων

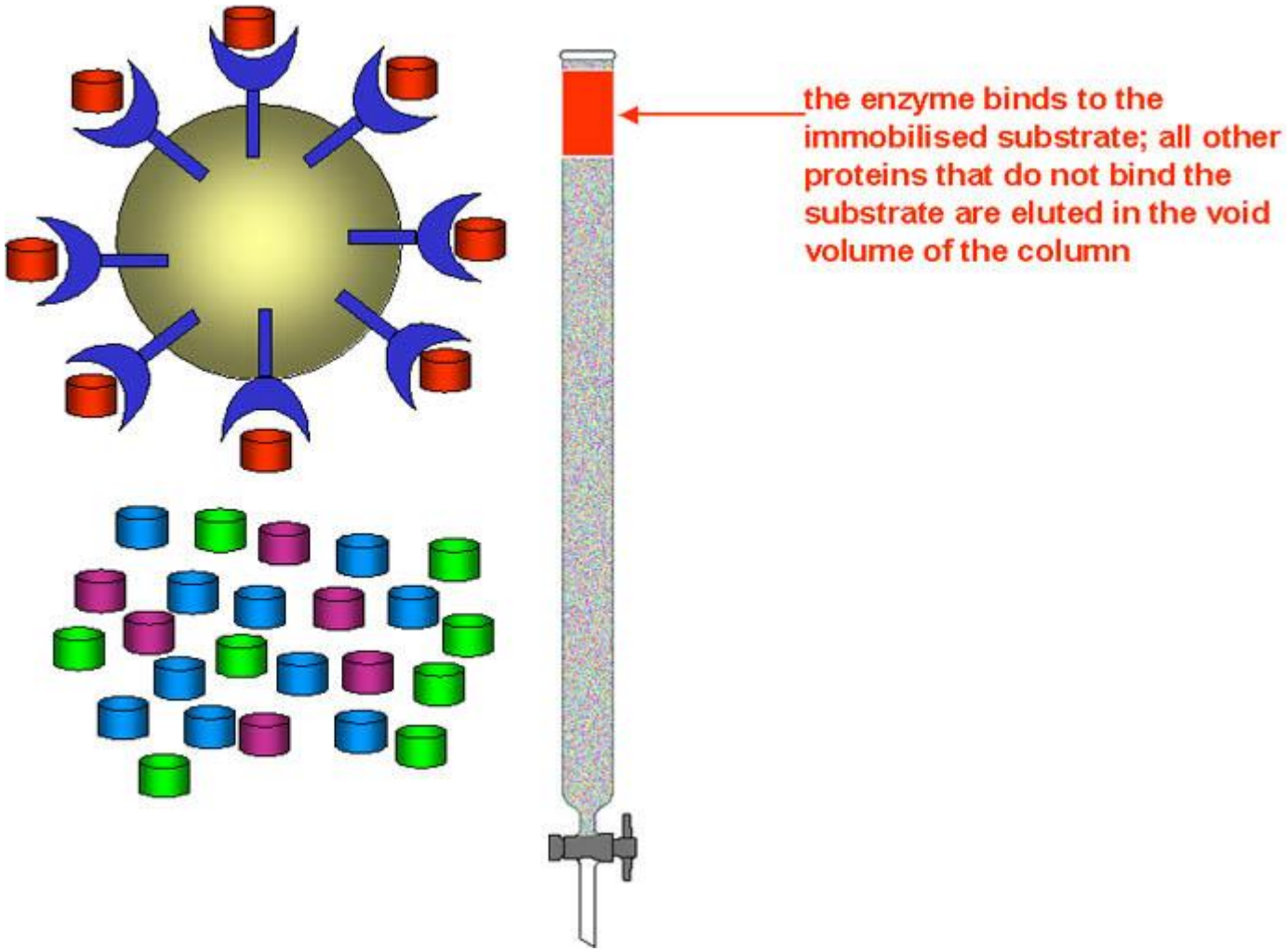
ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (1)

- Όργανα πολύ απλά και χαμηλού κόστους
  - Υάλινοι ή πλαστικοί σωλήνες
  - Προχοϊδες
  - Ειδικά κατασκευασμένοι σωλήνες χωρίς κενούς χώρους σύνδεσης και με δυνατότητα ελέγχου θερμοκρασίας (διπλότοιχος σωλήνας)

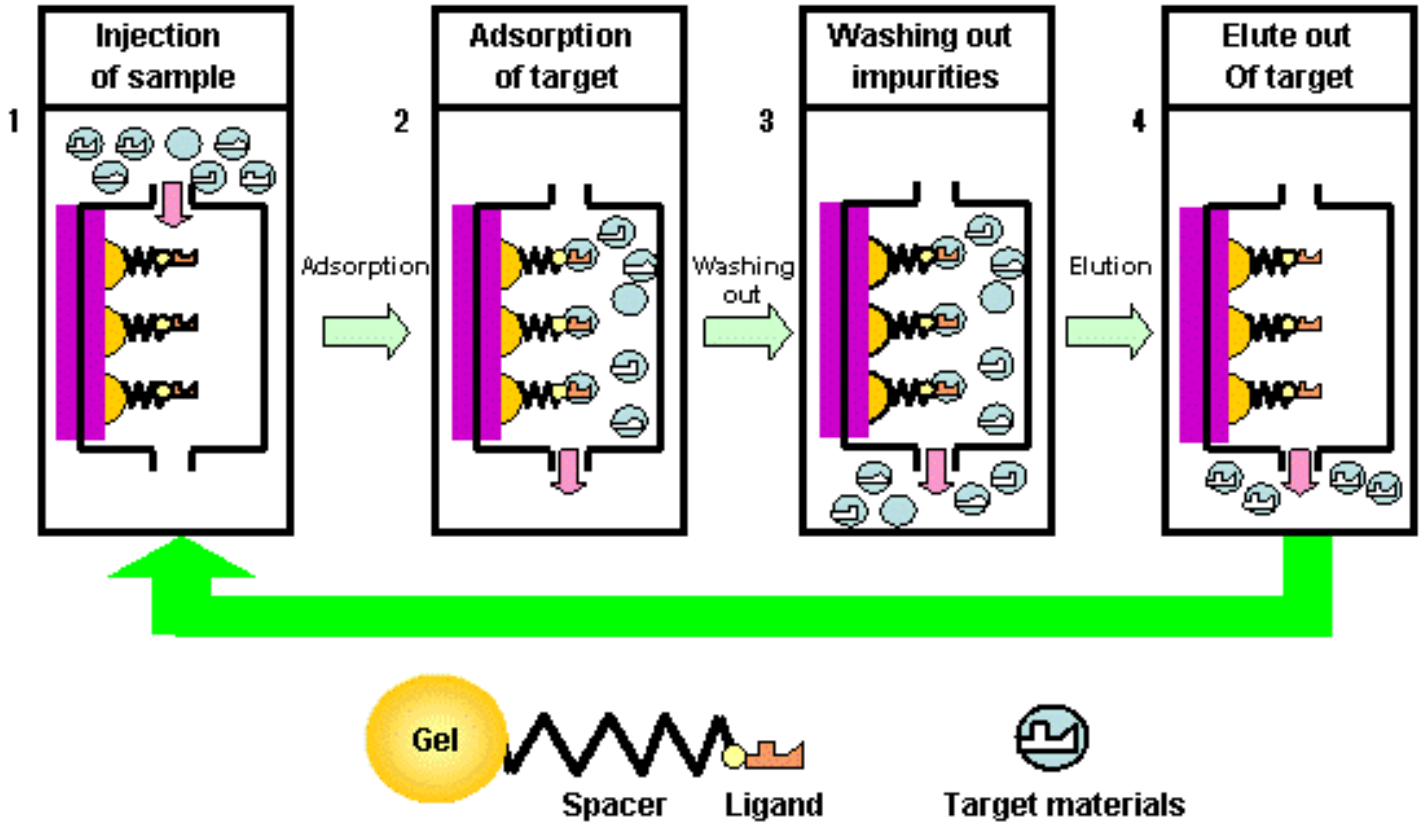
Αρχή Χρωματογραφίας Συγγενείας Χρήση ελεύθερου συνδέτη (ligand) ως εκλουστικού (1)



Αρχή Χρωματογραφίας Συγγενείας (2)



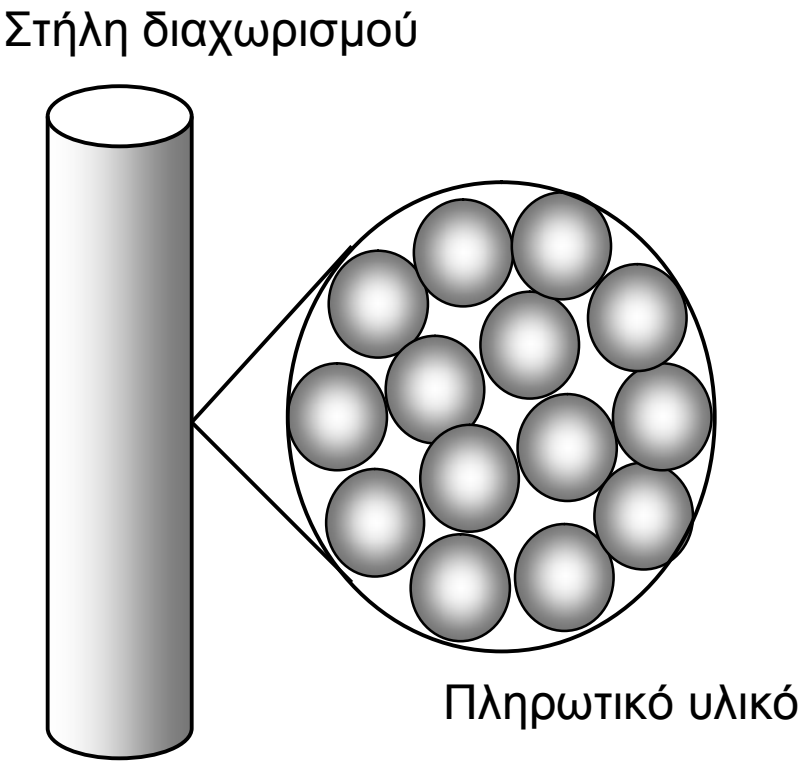
Αρχή Χρωματογραφίας Συγγενείας (3)



ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (2)

- Για δεδομένο βάρος πληρωτικού υλικού η απόδοση είναι μεγαλύτερη (μεγαλύτερος αριθμός θεωρητικών πλακών) με χρήση στήλης μικρής διαμέτρου
  - Η ταχύτητα όμως κινητής φάσης μειώνεται εάν το μήκος γίνει υπερβολικά μεγάλο

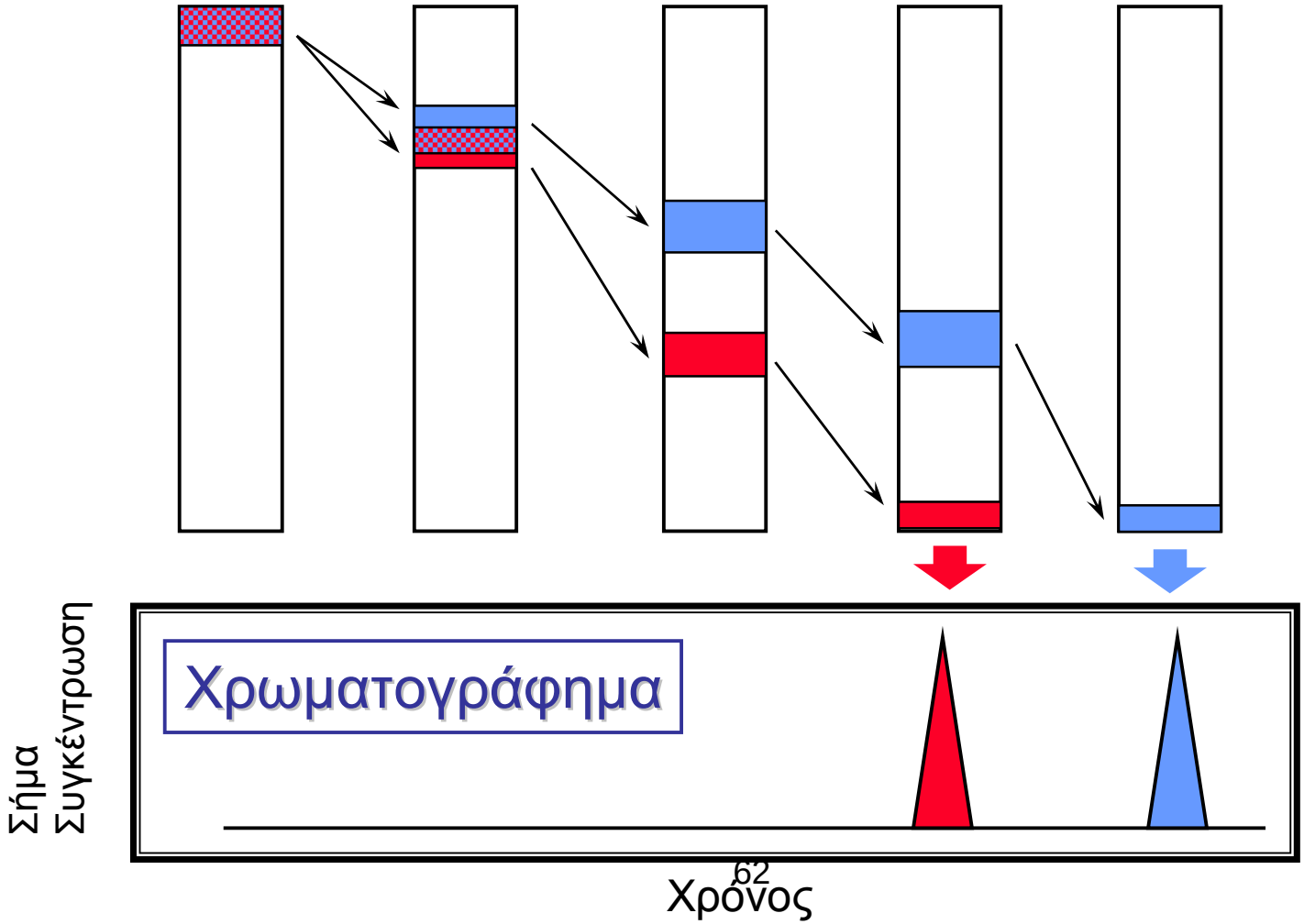
Χρωματογραφία Στήλης και Επίπεδη Χρωματογραφία



Χρωματογραφία Στήλης

Χρωματογραφία Χάρτη
Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC

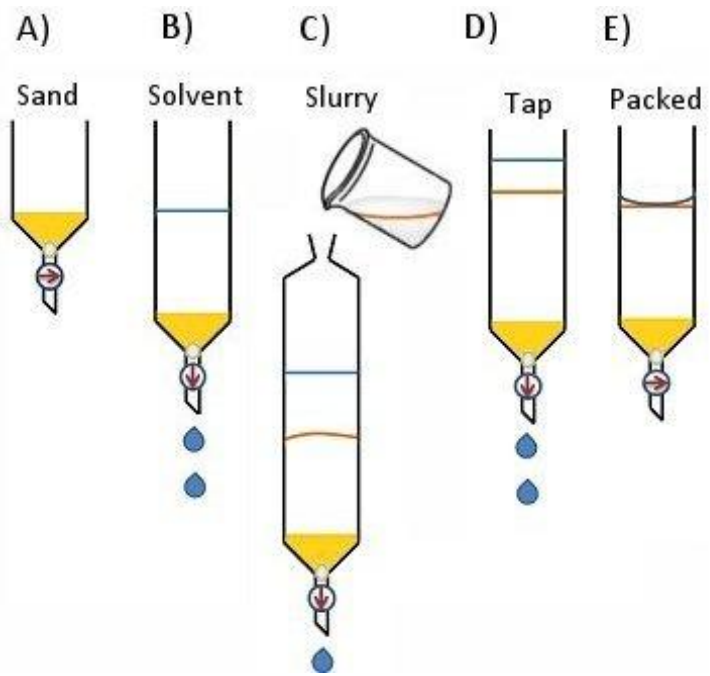
Διαδικασία Διαχωρισμού και Χρωματογράφημα για Χρωματογραφία Στήλης



ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (3)
Παρασκευή στατικής φάσης

- Τρόπος πληρώσεως και προετοιμασία ποικίλλει ανάλογα με εφαρμοζόμενο μηχανισμό
  - Παρασκευάστριες εταιρείες παρέχουν οδηγίες
- Κάτω άκρο σωλήνα φράσσεται με υαλοβάμβακα ή φρυγμένη ύαλο
  - Αποφυγή διαρροής πληρωτικού υλικού
- Πλήρωση με προσοχή
  - Αποφυγή κενών λιμναζόντων χώρων (μείωση όρου Α εξισώσεως van Deemter)

Παρασκευή Στατικής Φάσης



Top Tip: Use hand bellows to increase the pressure in the column and to force the silica to compact. Repeat several times, rinsing the sides of the column in between, to ensure complete packing.

ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (4)
Παρασκευή στατικής φάσης

- Χρωματογραφία προσροφήσεως
  - Πλήρωση στήλης με ξηρό υλικό ή με ρευστή ομογενή μάζα υλικού με κινητή φάση
  - Για βαθμιδωτή έκλουση, η ρευστή μάζα παρασκευάζεται (ή η ξηρή στήλη διαβρέχεται) με το λιγότερο πολικό διαλύτη

ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (5)
Παρασκευή στατικής φάσης

- Χρωματογραφία κατανομής
  - Υγρή στατική φάση εξαναγκάζεται να προσροφηθεί στην επιφάνεια των σωματιδίων υλικού στήριξης
  - Στη συνέχεια διασπείρεται στην κινητή φάση με δύο τρόπους
    - Ανατάραξη υγρής στατικής φάσης με στερεό στήριξης, δημιουργία ομογενούς διασποράς, ανατάραξη με κινητή φάση, δημιουργία λεπτόρρευστης μάζας και πλήρωση στήλης
    - Παρασκευή ρευστής μάζας υλικού στήριξης με κινητή φάση και προσθήκη υγρής στατικής φάσης και ανατάραξη

ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (6)
Παρασκευή στατικής φάσης

- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής και μοριακού αποκλεισμού με χρήση ρητινών ή πηκτών πολυμερών
  - Πλήρωση με απόχυση διαβρεγμένων υλικών με ύδωρ ή άλλο διαλύτη μέσα στο σωλήνα γεμάτο με ίδιο διαλύτη και αναμονή για κατακάθισμα σωματιδίων
  - Ουδέποτε γίνεται πλήρωση στήλης με ξηρό υλικό λόγω σημαντικής διόγκωσης κατά διαβροχή
  - Για την ανάμιξη χρήση υάλινης ράβδου και όχι μαγνητικής ανάδευσης (θραύση / καταστροφή σωματιδίων πηκτής)

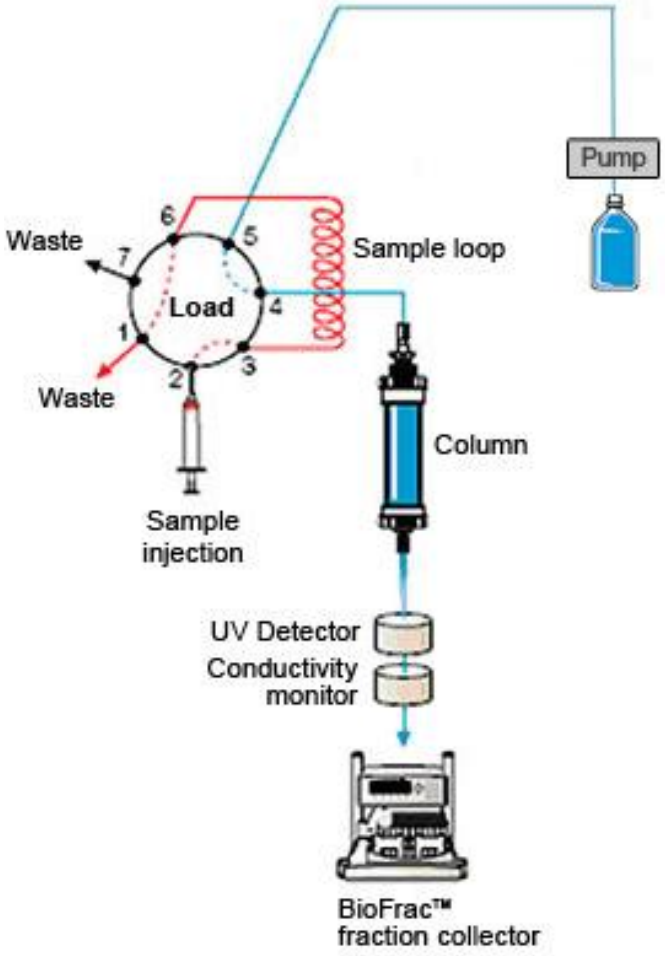
ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (7)
Εφαρμογή δείγματος στη στήλη

- Διαλυτοποίηση σε ένα από τους διαλύτες της κινητής φάσης και προσθήκη μέρους του διαλύματος με σιφώνιο στο άνω μέρος της στήλης
- Ανάμειξη διαλύματος δείγματος (κυρίως υδατικού) με στερεό προσροφητικό υλικό και τοποθέτηση μείγματος ως λεπτής ζώνης στην κορυφή στήλης.

ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (8)
Χρωματογράφηση

- Ροή κινητής φάσης μέσα από στήλη πετυχαίνεται με σιφωνισμό διαλύτη από δεξαμενή υψηλότερα από στήλη
- Ταχύτητα ροής εξαρτάται από διάμετρο στήλης και διαχωριστικότητα μεγιστοποιείται με πολύ μικρές ταχύτητες ροής
- Χρήση περισταλτικών αντλιών χαμηλής πίεσης για καλύτερο έλεγχο ροής
- Μόλυνση εξαιτίας πλαστικοποιητών των σωλήνων που χρησιμοποιούνται και διαλύονται από οργανικούς διαλύτες (χρήση Teflon, υάλου)

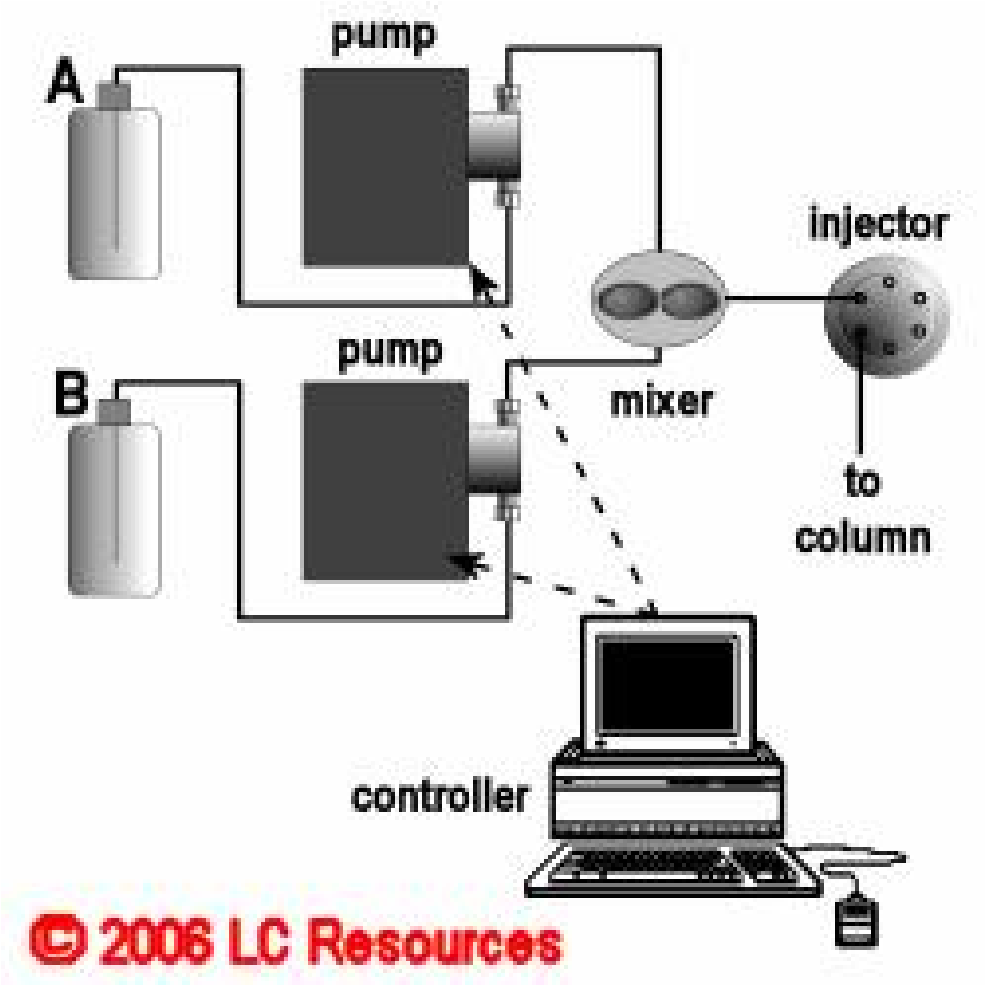
Χαμηλής πίεσης υγροχρωματογραφία



ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (9)
Χρωματογράφηση

- Για βαθμιδωτή έκλουση, συνήθως στη χρωματογραφία ιονανταλλαγής, χρήση συστημάτων ανάμειξης διαλυτών για αλλαγή σύστασης κινητής φάσης
  - Χρήση ειδικών συστημάτων με βαλβίδες ελέγχου ροής και χρονοδιακόπτες ή μικροϋπολογιστή για επίτευξη προγραμμάτων βαθμιδωτής έκλουσης

Σύστημα Βαθμιδωτής Έκλουσης



ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (10)
Χρωματογράφηση

- Συλλογή εκλούσματος σε κλασματοσυλλέκτη (fraction collector) με προγραμματισμό για συλλογή ορισμένου όγκου εκλούσματος σε κάθε σωλήνα
- Ανάλυση κλασμάτων με διάφορες τεχνικές
- Συχνά μετά την έξοδο του εκλούσματος από τη στήλη διέρχεται από κυψελίδα ροής φασματοφωτομέτρου και λαμβάνονται κορυφές απορρόφησης για κάθε κλάσμα (χρωματογράφημα)

Χρωματογραφία Στήλης και Κλασματοσυλλέκτης

ΚΛΑΣΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (11)
Εφαρμογές

- Όχι χρήση στην ποσοτική ανάλυση, λόγω ανάπτυξης της HPLC
- Ευρεία και αποτελεσματική χρήση
  - Προκατεργασία πολύπλοκων δειγμάτων (κυρίως βιολογικών) πριν τη μέτρηση με ενόργανη τεχνική
  - Συναγωνισμός με τεχνική εκχύλισης
  - Πλεονέκτημα η αυξημένη χωρητικότητα (εξαρτάται από γινόμενο KV_s
  - Για επιλογή κατάλληλου συνδυασμού στατικής – κινητής φάσης προκαταρκτική χρήση TLC ή μικροστηλών σε σταγονόμετρα για μείωση σπατάλης υλικών