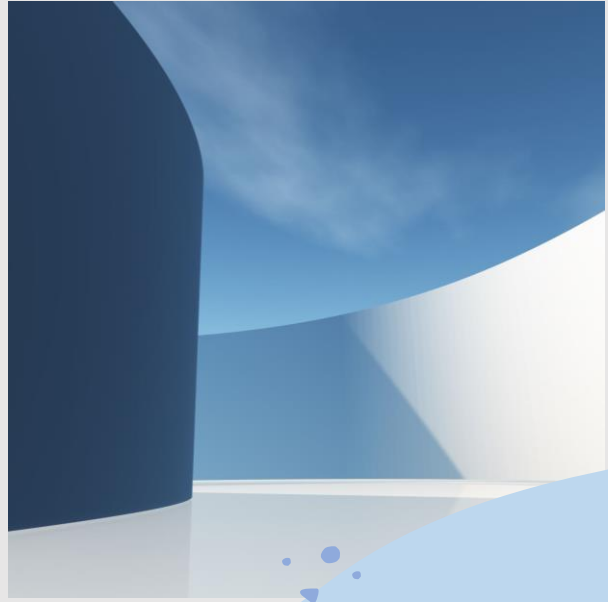


# *Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές*

Τεχνικές Διαχωρισμού  
Δρ. Μάριος Κωστάκης



1

## *Δομής Μαθήματος*

- Επανάληψη Θεωρία Διαχωρισμού
- Υγροχρωματογραφία
- Ιοντική Χρωματογραφία
- Αεριοχρωματογραφία



2

# *Θεωρία Διαχωρισμού*

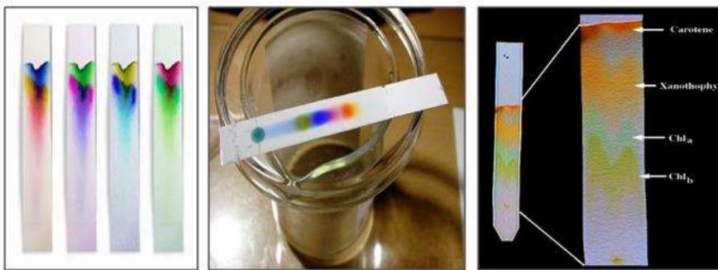
Επανάληψη

3

# *Εισαγωγή-Ιστορικά Στοιχεία*

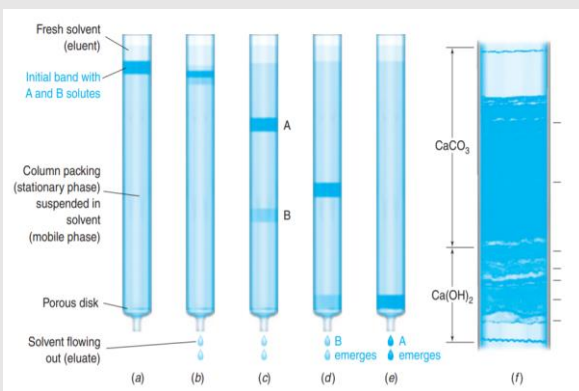
4

## Ιστορικά Στοιχεία



1906, ο Ρώσος Mikkhail Tswett, χρησιμοποίησε τη χρωματογραφία (χάρτου) για να διαχωρίσει φυτικές χρωστικές, και από αυτό έλαβε το όνομα χρωματογραφία (χρώμα + γράφω)

5



## Εισαγωγικά

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.

6

## Εισαγωγικά

Η χρωματογραφία διαχωρίζεται 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).*

7

## Εισαγωγικά

Η χρωματογραφία διαχωρίζεται ανάλογα:

**Με το είδος της στατιστικής 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.

8

## *Εισαγωγικά*

---

Η χρωματογραφία διαχωρίζεται ανάλογα:

### **Με το είδος της διαχωρισμού:**

**Χρωματογραφία Προσρόφησης** (Adsorption chromatography)

**Χρωματογραφία Κατανομής** (Partition chromatography)

**Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής** (Ion exchange chromatography)

**Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού** (Molecular exclusion Chromatography)

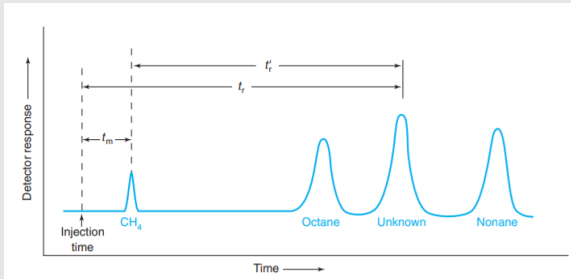
**Χρωματογραφία Συγγένειας** (Affinity chromatography)

9

## *Στοιχεία θεωρίας των διαχωρισμών*

---

10



## Στοιχεία Διαχωρισμών

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

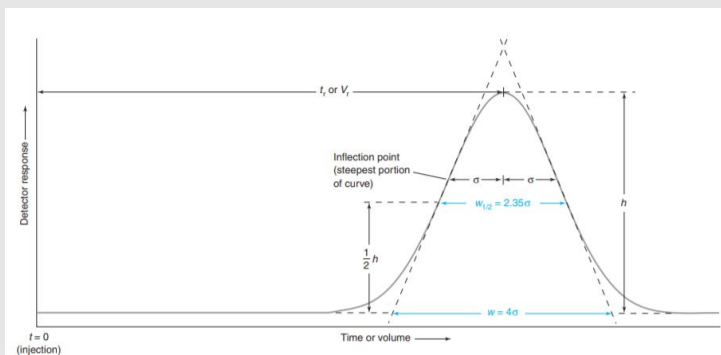
$t_m$  = νεκρός χρόνος, ο χρόνος που χρειάζεται μία ένωση που **δεν κατακρατείται** να εξέλθει της στήλης.

$t'_r = t_r - t_m$ , ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης, ο χρόνος που χρειάζεται να μετακινηθεί μία ένωση στη χρωματογραφική στήλη.

**F**: ταχύτητα ροής (mL/min)

Όγκος Ανάσχεσης  $V_r = t_r \times F$

11



## Απόδοση διαχωρισμού

**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.

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

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

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

12

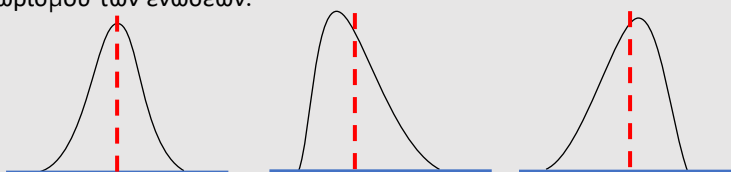
## Είναι όλες οι κορυφές ιδανικές;

Φυσικά και όχι!

Καμία κορυφή δεν είναι ιδανική, οι κορυφές διευρύνονται

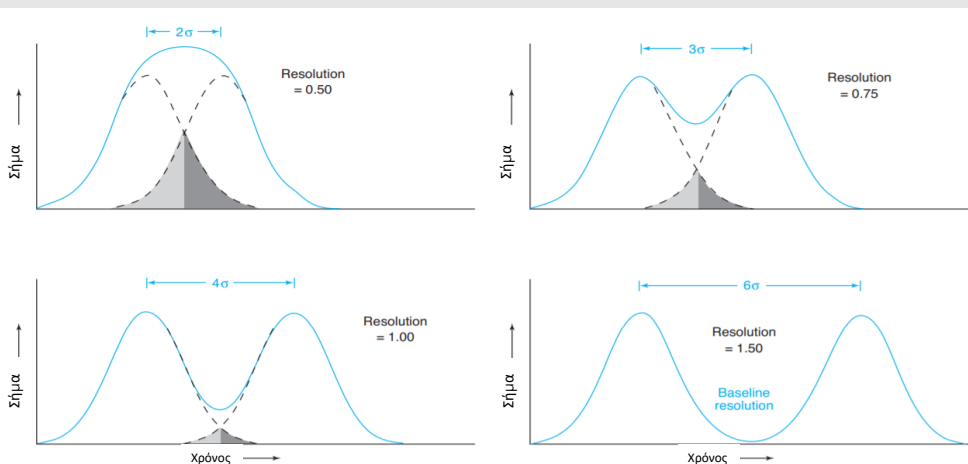
Η συμμετρία της κορυφής πολύ σπάνια είναι η ιδανική (κατανομή Gauss)

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



13

## Διαχωριστικότητα, Resolution, $R_s$



14

## Διαχωριστικότητα, Resolution, $R_s$

$$R_s = \frac{\Delta Z}{\left(\frac{W_A}{2} + \frac{W_B}{2}\right)} = \frac{2\Delta Z}{(W_A + W_B)} = \frac{2(t_{R_A} - t_{R_B})}{(W_A + W_B)}$$

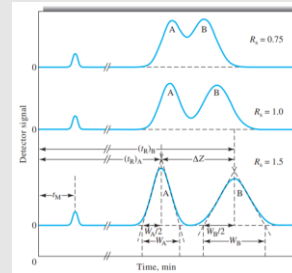
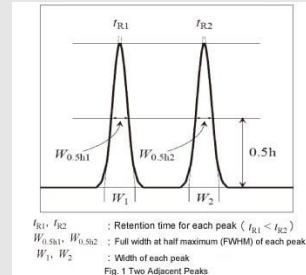
Πλήρης διαχωρισμός:  $R_s > 1,5$

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

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

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

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



15

## Ασυμμετρία Κορυφής

Δύο παράγοντες:

Ασυμμετρία Κορυφής:

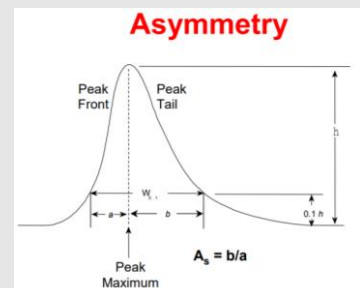
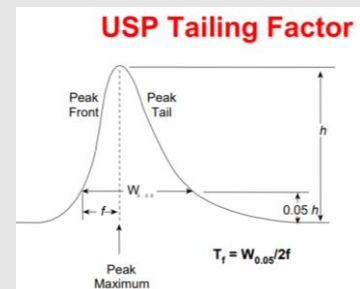
$A_s = \frac{b}{a}$ , στο 10% του ύψους.

Ιδανικά 1,0,  $A_s > 1$  tailing,  $A_s < 1$  fronting

USP Tailing Factor

$T_f = \frac{(a+b)}{2a} = \frac{W_{0.05}}{2f}$ , στο 5% του ύψους

Τα όρια είναι ίδια με την ασυμμετρία.



16



## Γιατί διευρύνονται οι κορυφές;

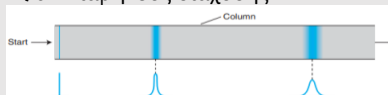
Εξίσωση **Van Deemter**:

$$H = A + \frac{B}{u_x} + C u_x$$

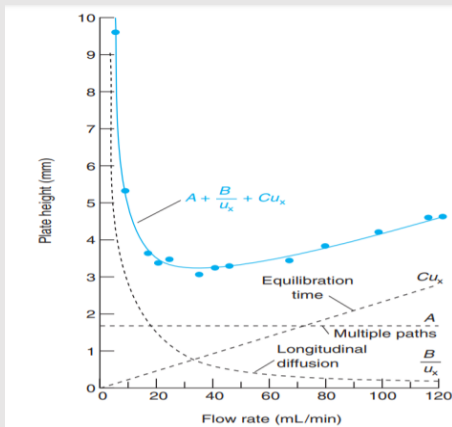
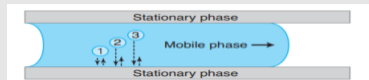
**A:** Πολλαπλότητας διαδρομών



**B/u:** Διαμήκους διάχυσης



**Cu:** μεταφοράς μάζας



17

## Βασικά στοιχεία διαχωρισμού

Χρόνος ανάσχεσης: **Ταυτοποίηση**

Μια κορυφή ταυτοποιείται όταν ο χρόνος έκλυσης του προτύπου ταυτίζεται με το χρόνο έκλυσης 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)

18

# Υγροχρωματογραφία

19

# Υγροχρωματογραφία

Αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική

Εφαρμογή

Εργαστήρια Αναλύσεων

Φαρμακευτικές εταιρίες

Ερευνητικά κέντρα

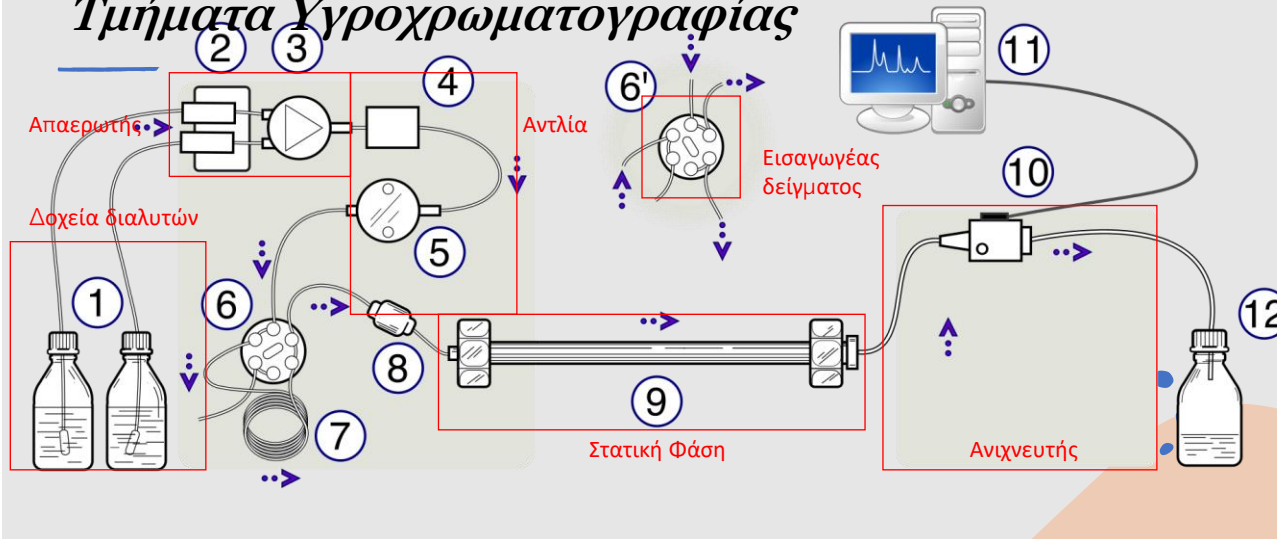
Προσδιορισμός μεγάλου εύρους οργανικών ενώσεων

Δυνατότητα ταυτοποίησης της ένωσης ειδικά σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας.

Μεγάλη ανάπτυξη λόγω της σύνδεσης με φασματομετρία μάζας

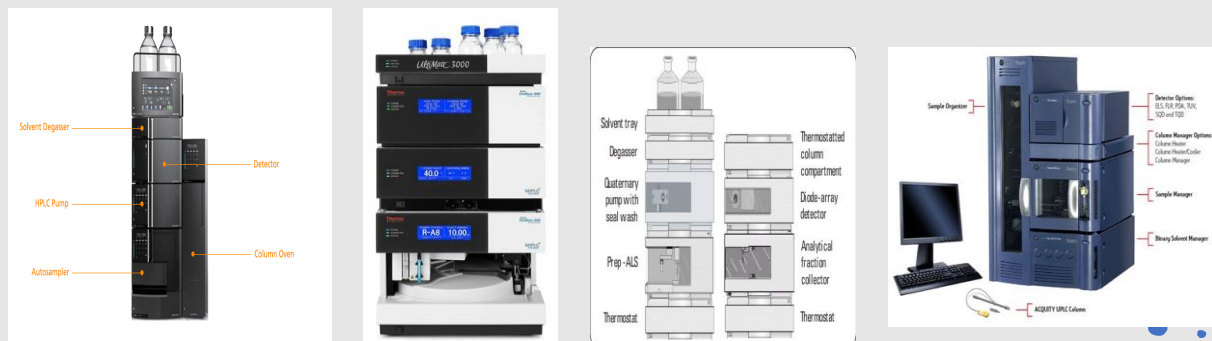
20

## Τμήματα Υγροχρωματογραφίας



21

## Τμήματα Υγροχρωματογραφίας



22

## *Γιατί HPLC;*

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.

23

## *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

24

## *UPLC*

### **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.

25

## *Χρωματογραφικές στήλες*



26



## Στατική Φάση – Χρ. Στήλες

Αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα της HPLC

Καθορίζει την επιτυχία της ανάλυσης

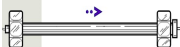
Η επιλογή της στατικής φάσης θέλει και την κατάλληλη κινητή φάση ώστε να γίνει επιτυχημένη η υδροχρωματογραφία.

Δύο βασικές κατηγορίες με βάση την πολικότητα:

1. **Κανονικής φάσης** (πολική στατική φάση, μη πολική κινητή φάση)
2. **Αντίστροφης φάσης** (μη πολική στατική φάση, πολική κινητή φάση)

Η ονομασία δόθηκε λόγω της σειράς που αναπτύχθηκαν οι στήλες (πρώτα η κανονικής και μετά η αντίστροφης)

27



## 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 μακρές 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

28

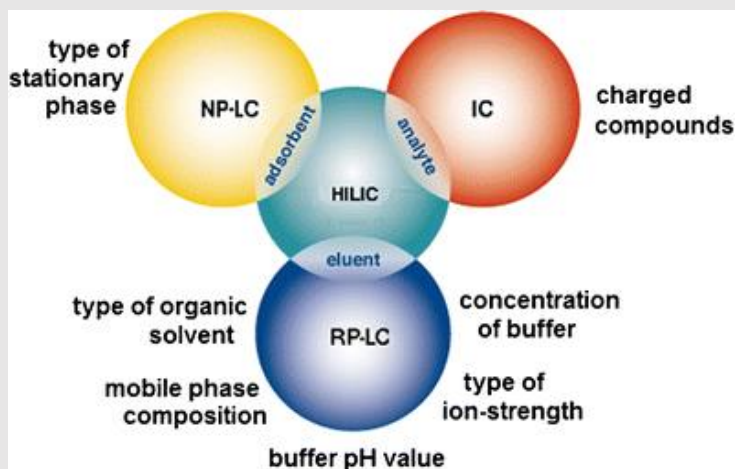


## Άλλες Στήλες Αντίστροφης Φάσης

C8	Μικρότερη δυνατότητα κατακράτησης από τη C18, ωστόσο παρόμοια εκλεκτικότητα.
Phenyl	Μικρότερη δυνατότητα κατακράτησης μη πολικών ενώσεων, αλλά καλύτερη κατακράτηση πολικών ενώσεων, μείωση του χρόνου ανάλυσης για μίγμα παρουσία πολικών/μη πολικών ενώσεων
CN	Μικρή δυνατότητα κατακράτησης, αλλαγές στην εκλεκτικότητα.
C3	Παρόμοια με τη Phenyl

29

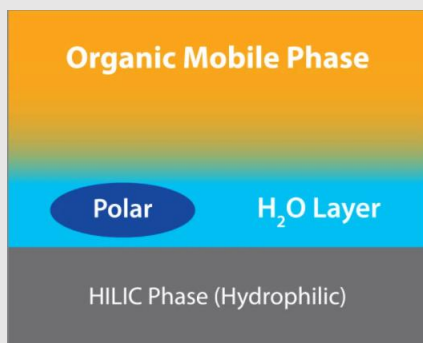
## Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)



Παραλλαγή της κανονική φάσης Υγροχρωματογραφία.

30

## *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

Σημαντική επίδραση από το pH και τη θερμοκρασία.

31

## *Ανιχνευτές*

32



## Φασματοφωτομετρικοί Ανιχνευτές

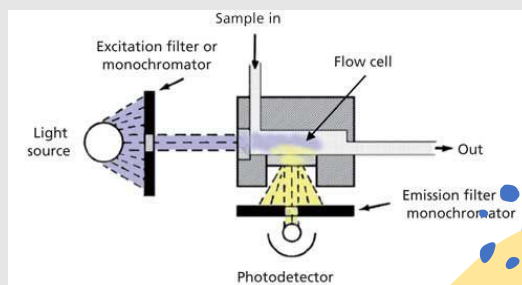
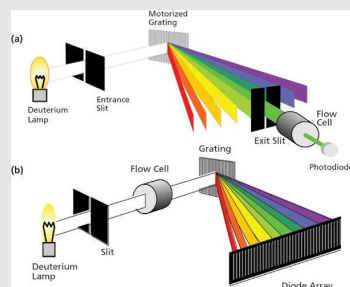
Οι πιο σημαντικοί ανιχνευτές στην HPLC.

Είναι ευαίσθητοι σε χαμηλές συγκεντρώσεις <math><1 \text{ ppm}</math>.

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



33

## Ορατού Υπεριώδου

Δύο παραλλαγές:

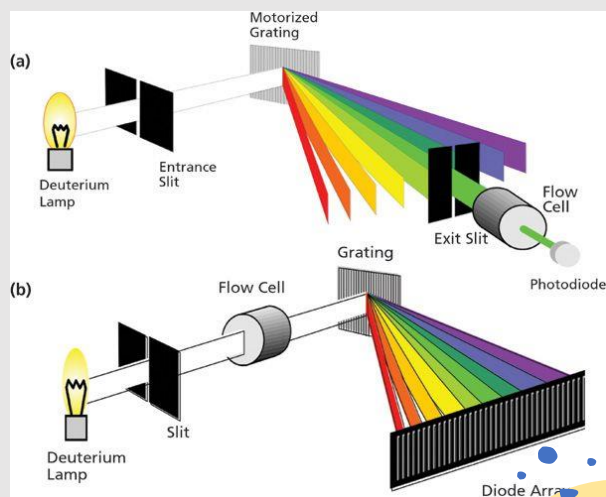
**Ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού:**

Μέτρηση ενός μήκους κύματος τη φορά,

Αν οι ενώσεις απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος, πρέπει να υπάρχει ένα χρονικό κενό ώστε να προλάβει να αλλάξει μήκος κύματος.

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής.

Δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση των ενώσεων πέρα του χρόνου έκλουσης.



34

## Ορατού Υπεριώδου

Δύο παραλλαγές:

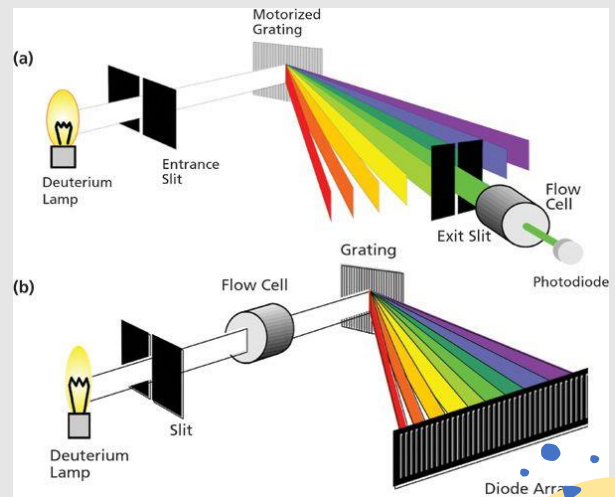
### Συστοιχία φωτοδιόδων

Λήψη φάσματος καθ' όλη τη διάρκεια του χρωματογραφήματος

Δυνατότητα επιλογής συγκεκριμένου μήκους κύματος αλλά και ταυτοποίηση της ένωσης μέσω του φάσματος απορρόφησης.

Μόνο όσες ενώσεις απορροφούν στο ορατό υπεριώδες

Διαφορετικά, απαιτείται παραγωγοποίηση => αύξηση του χρόνου ανάλυσης.



35

## Φθορισμομετρικός Ανιχνευτής (FLD)

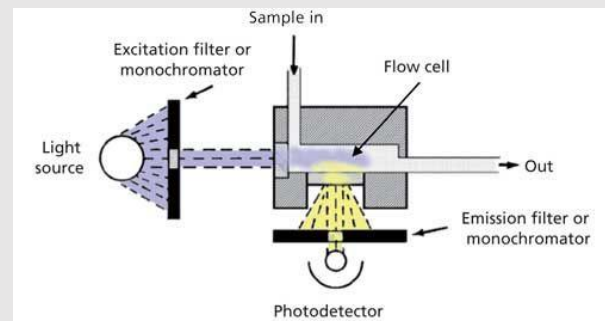
Εκλεκτικός

Χαμηλά όρια ανίχνευσης μπορούν να φτάσουν στα όρια του ppb.

Πρέπει οι ενώσεις με ομάδες που να φθορίζουν.

Διαφορετικά χρειάζεται παραγωγοποίηση

=> αύξηση του χρόνου ανάλυσης



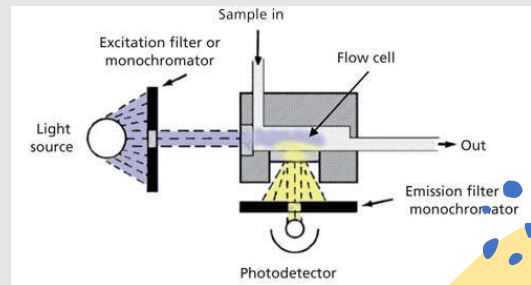
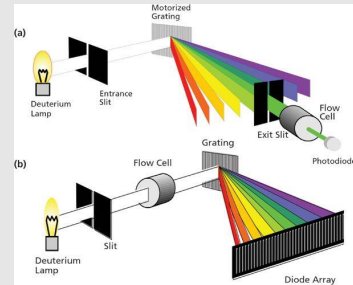
36

## Φασματοφωτομετρικοί Ανιχνευτές

### Εφαρμογές

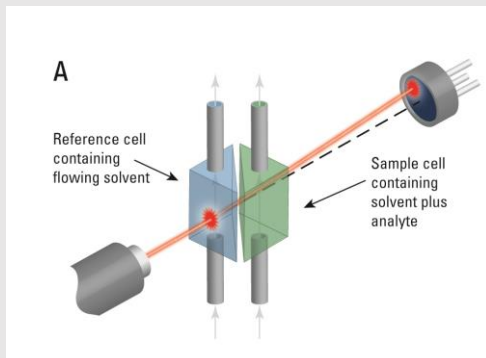
**UV/Vis:** Προσδιορισμός αντιβιοτικών, φαρμακευτικών σκευασμάτων, άλλων υπολειμάτων σε τρόφιμα, λιποδιαλυτές βιταμίνες, χρωστικές, αμινοξέα (μετά από παραγωγοποίηση), γενικότερα όποια οργανική ένωση έχει χρωματοφόρα ομάδα κλπ.

Προσδιορισμός μυκοτοξινών (**FLD**), βιογενείς αμίνες (**FLD**, μετά από παραγωγοποίηση)



37

## Ανιχνευτής Δείκτη Διάθλασης (RI)



Αποκρίνεται σχεδόν σε όλες τις ουσίες, αλλά έχει υψηλά όρια ανίχνευσης.

Μικρή γραμμική περιοχή

Δεν είναι εύκολο να έχει βαθμιδωτή έκλυση

Επηρεάζεται από μεταβολές θερμοκρασίας και πίεση

Κύρια εφαρμογή για των προσδιορισμό σακχάρων σε τρόφιμα.

Δύσκολος στην εξισορρόπηση

38

## Φασματομετρία Μάζας

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

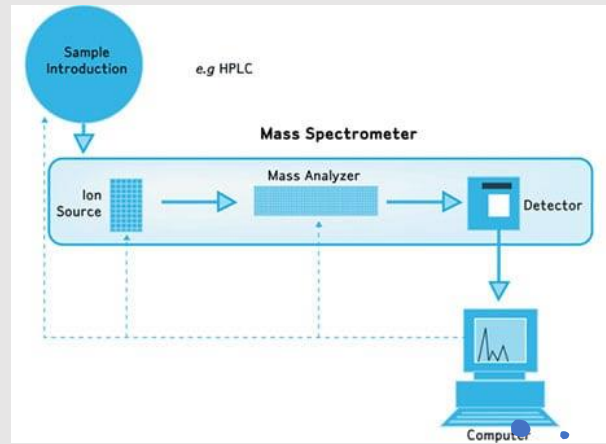
Δίνει τη δυνατότητα με μία ανάλυση να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν μεγάλοι αριθμός ενώσεων (>500 ενώσεις) => μικρός χρόνος ανάλυσης.

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.



39

## Φασματομετρία Μάζας

Υπολείματα φυτοφαρμάκων

Υπολείματα φαρμακευτικών ουσιών,  
ναρκωτικές ουσίες,

απαγορευμένες,

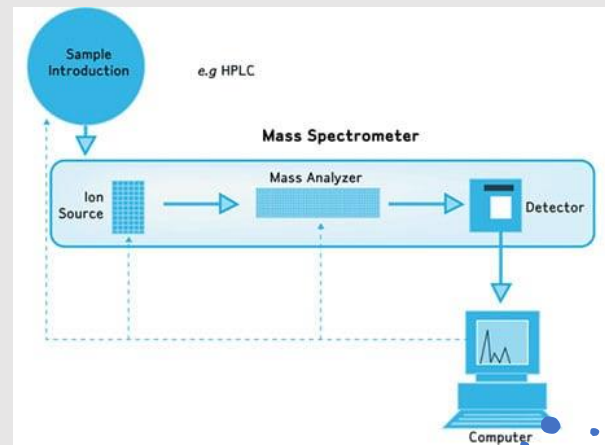
Αμινοξέα,

σάκχαρα,

βιταμίνες

....

Απαιτεί μεγαλύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τους απλούς ανιχνευτές.



40

# *Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής*

Ιοντική Χρωματογραφία

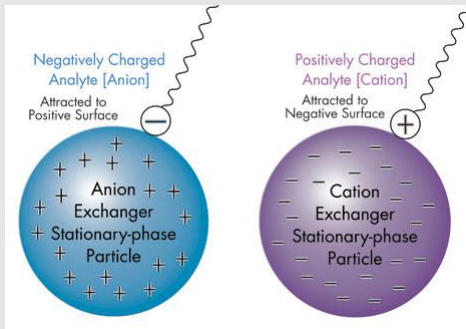
41

# *Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής*

- Εισήχθη το 1975 με σκοπό να περιγράψει την τεχνική της υγροχρωματογραφίας διαχωρισμού ανόργανων ιόντων, όπου η στατική φάση ήταν ιονανταλλακτική ρητίνη και το υγρό έκλουσης υδατικό διάλυμα ηλεκτρολυτών.
- Αποτελεί επιτυχή συνδυασμό της υγροχρωματογραφίας και της ιονανταλλαγής
- Πλέον δεν περιορίζεται μόνο στον ιονανταλλακτικό μηχανισμό αλλά και σε μηχανισμό αποκλεισμού ιόντων και ιοντικών αλληλεπιδράσεων

42

## Ιονανταλλαγή



**Κινητή φάση:** Διάλυμα ιόντων (συνήθως σε διαλύτη νερό)

**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



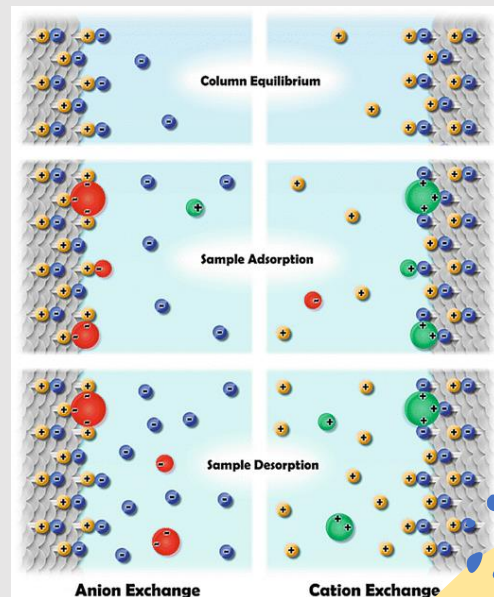
43

## Ιονανταλλαγή

**1<sup>ο</sup> στάδιο:** Εξισορρόπηση στήλης, τα αντισταθμιστικά ιόντα της κινητής φάσης καλύπτουν τις θέσεις της ρητίνης

**2<sup>ο</sup> στάδιο:** Το δείγμα εισέρχεται στη στήλη και δεσμεύει θέσεις της ρητίνης απελευθερώνοντας τα αντισταθμιστικά ιόντα της κινητής φάσης

**3<sup>ο</sup> στάδιο:** Οι αναλύτες απελευθερώνονται και οι θέσεις καλύπτονται από αντισταθμιστικά ιόντα της κινητής φάσης

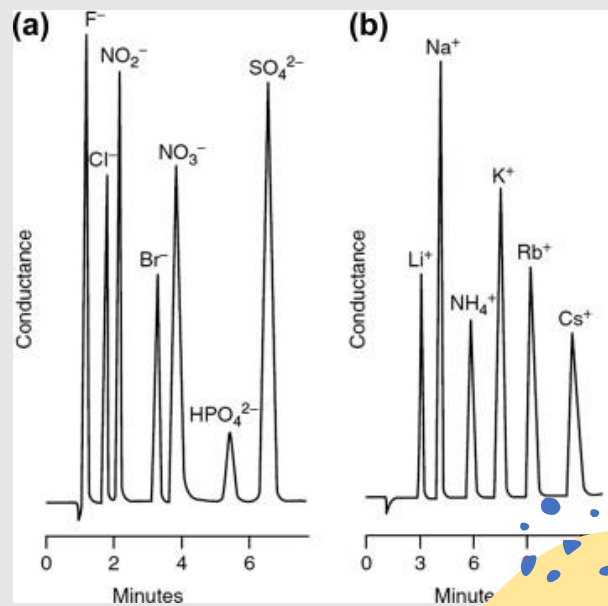


44

## Ιονανταλλαγή

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.

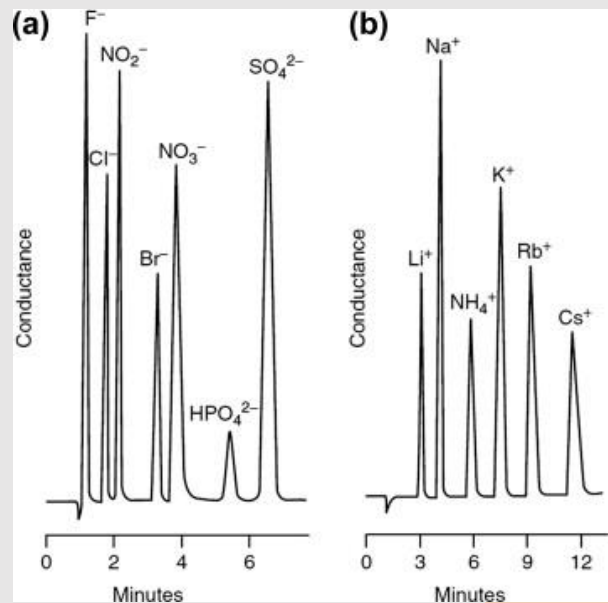


45

## Ιονανταλλαγή

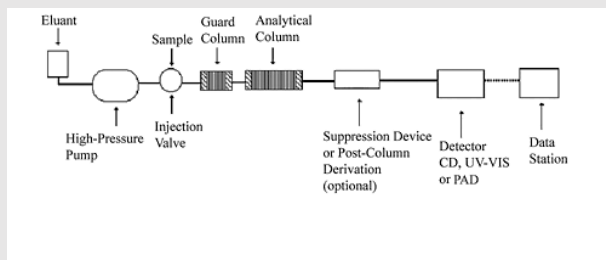
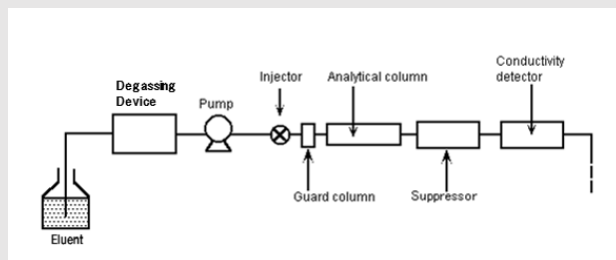
Γενικοί κανόνες:

1. Αύξηση φορτίου συνεπάγεται **αύξηση** του χρόνου έκλουσης
2. Απουσία δευτερεύουσων αλληλεπιδράσεων ισχύει ότι ιόντα με το ίδιο φορτίο, αυτό που κατακρατείται **περισσότερο** είναι το ιόν με το μικρότερο μέγεθος.
3. Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη και η σφαίρα ενυδάτωσης.
4. Σύνδεση ιόντος-ρητίνης => εισαγωγή τάσεων στο ελαστικό δίκτυο της ρητίνης και αποδιάταξη της σφαίρας ενυδάτωσης.



46

## Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής - Οργανολογία



Ποιες διαφορές παρατηρείτε με την απλή HPLC;

47

## Χρωματογραφικές Στήλες Ιοντικής χρωματογραφίας



Column type	Column	Functional group	pH range
Strong anion exchanger (SAX)	Quaternary ammonium salts (Q)	$(\text{CH}_3)_3 \text{N}^+ \text{CH}_2\text{O}^-$	0-14
Weak anion exchanger (WAX)	Diethylamino ethyl (DEAE)	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}^-$	2-9
Strong cation exchanger (SCX)	Sulfopropyl (SP)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	0-14
Weak cation exchanger (WCX)	Carboxymethyl (CM)	$-\text{OCH}_2\text{COO}^-$	2-9

- Ανιοανταλλακτική ρητίνη
- Ρητίνη με δραστική ομάδα τεταρτοταγούς αμίνης ( $-\text{N}(\text{R})_3^+$ ).
- Ρητίνη με δραστική ομάδα τριτοταγή ή δευτεροταγής αμίνης
- Κατιοανταλλακτική ρητίνη
- Ρητίνη με δραστική σουλφονική ομάδα ( $-\text{SO}_3^-$ ) τροποποιημένη με οργανικό πολυμερές
- Ρητίνη με δραστική καρβοξυλική ομάδα ( $-\text{COO}^-$ )

48

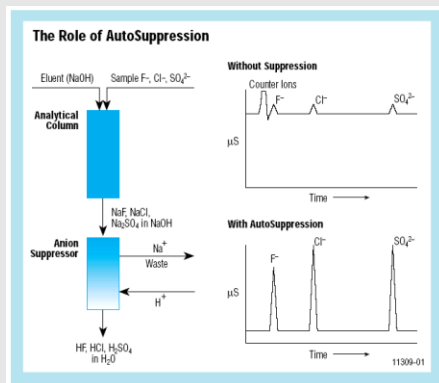


## Ανιχνευτές

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

49

## Καστολή σήματος



Αναφέρετε κυρίως στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται αγωγιμομετρικός ανιχνευτής

Αύξηση του λόγου S/N (σήμα/θόρυβο)

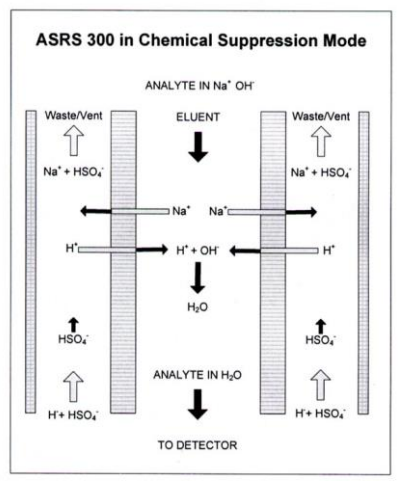
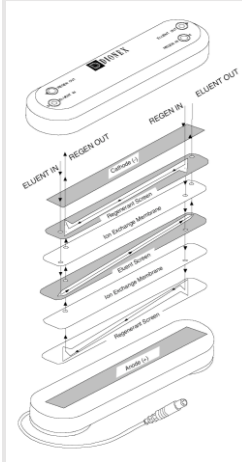
Καταστολή: μείωση του σήματος υποβάθρου.

A) με ηλεκτρονικό τρόπο (electronic suppression), μέσω μεμβράνης ιονανταλλαγής

B) με Χημικό τρόπο (chemical suppression) μέσω χρήσης δεύτερης στήλης

50

# Καταστολέας με ηλεκτρονική μεμβράνη



Χρήση με μορφή σωλήνων ή μικροσυστημάτων διαπίδυσης

Το υγρό εκλούσεως διέρχεται μέσα από το σωλήνα/μικροσύστημα της ιονανταλλακτικής μεμβράνης, ενώ εξωτερικά διαβιβάζεται διάλυμα ενός λουτρού

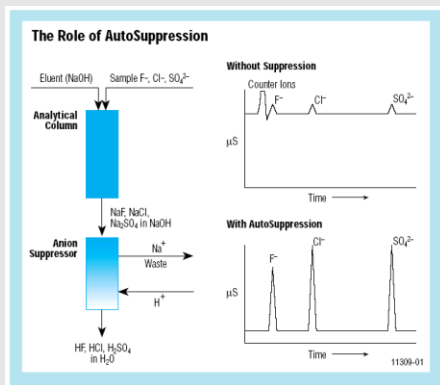
Ανταλλάσσονται τα ιόντα της κινητής φάσης με τα ιόντα του λουτρού

Ανάλογα με τον προσδιορισμό απαιτείται ανιοανταλλακτική ή κατιοανταλλακτική μεμβράνη



51

# Καστολή σήματος με χημικό τρόπο



Ο παλαιότερος τρόπος καταστολής

Χρήση δύο στηλών: Μία για το διαχωρισμό και μία για την καταστολή του σήματος.

Τεχνικές δυσκολίες λόγω της ύπαρξης δύο στηλών.

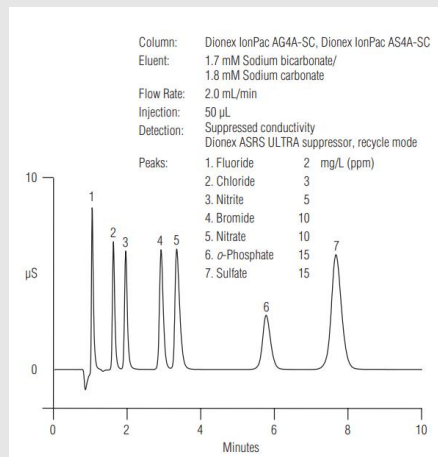
Συχνή αναγέννηση της στήλης καταστολής του σήματος.

Δεν χρησιμοποιείτε συχνά.

52

## Παράδειγμα Εφαρμογής 1

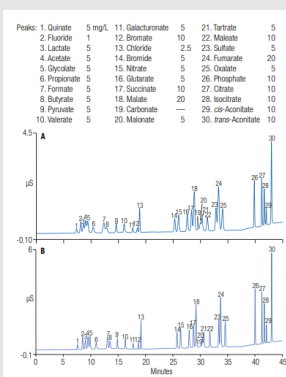
Προδιορισμός ανιόντων σε πόσιμο νερό με ιοντική χρωματογραφία με αγωγιμομετρικό ανιχνευτή.



53

## Παράδειγμα Εφαρμογής 2

Προδιορισμός οργανικών οξέων σε χυμούς με ιοντική χρωματογραφία με αγωγιμομετρικό ανιχνευτή.



Πρότυπο διάλυμα

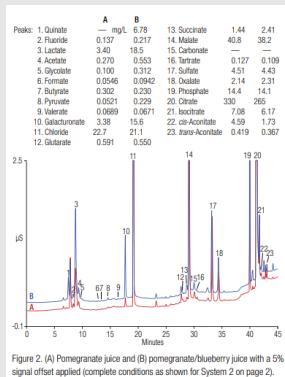


Figure 2. (A) Pomegranate juice and (B) pomegranate/blueberry juice with a 5% signal offset applied (complete conditions as shown for System 2 on page 2).

Χυμός ροδιού

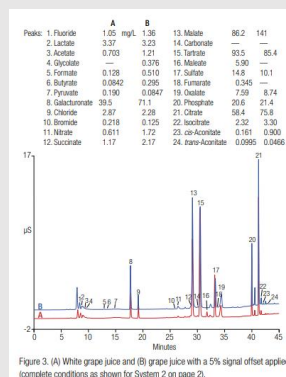


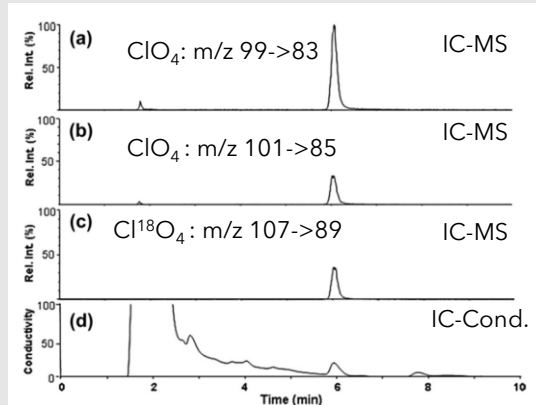
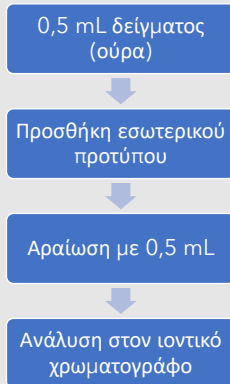
Figure 3. (A) White grape juice and (B) grape juice with a 5% signal offset applied (complete conditions as shown for System 2 on page 2).

Χυμός σταφυλιού

54

## Παράδειγμα Εφαρμογής 3

Προσδιορισμός υπερχλωρικών σε βιολογικά υγρά (ούρα) με ιοντική χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας και αγωγιμομετρικό ανιχνευτή



55

## Αεριοχρωματογραφία

Ποιες οι διαφορές σε σχέση με την υγροχρωματογραφία;

56

## Αεριοχρωματογραφία

**Στατική Φάση:** Στερεή ή Υγρή

**Κινητή Φάση:** Αέρια (συνήθως He, αλλά και H<sub>2</sub> ή πιο σπάνια N<sub>2</sub>)

Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πτητικών ενώσεων

**Εφαρμογές:**

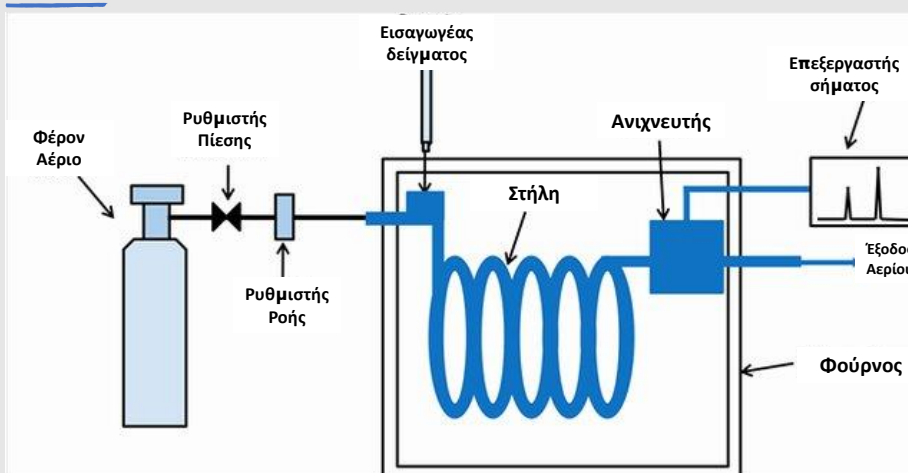
Μεγάλη εφαρμογή στον προσδιορισμό ρύπων (PCBs, PAHs, VOCs κλπ)

Εφαρμογή στον προσδιορισμό λιπαρών οξέων

Προσδιορισμός Διοξινών

57

## Τμήματα Αεριοχρωματογραφίας



58

## Τμήματα Αεριοχρωματογραφίας



59

## Αεριοχρωματογραφία

**Στατική Φάση:** Στερεή ή Υγρή

**Κινητή Φάση:** Αέρια (συνήθως He)

Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πτητικών ενώσεων

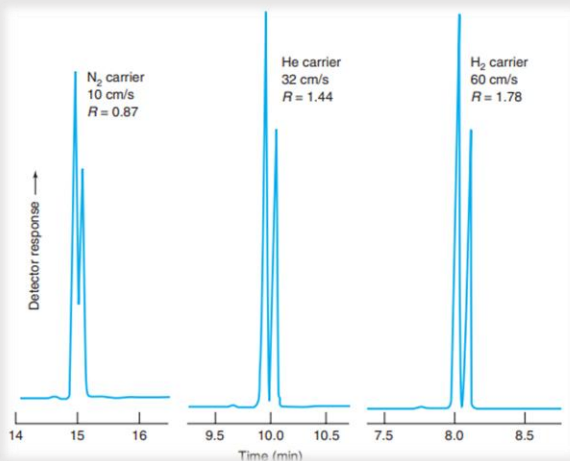
**Εφαρμογές:**

Μεγάλη εφαρμογή στον προσδιορισμό ρύπων (PCBs, PAHs, VOCs κλπ)

Εφαρμογή στον προσδιορισμό λιπαρών οξέων

60

## Κινητή Φάση – Φέρον Αέριο (Carrier Gas)



- Τα πιο κοινά φέροντα αερία είναι το **N<sub>2</sub>**, **He**, **H<sub>2</sub>**.
- Το **Ήλιο (He)** είναι το πιο κοινό φέρον αέριο και συμβατό με τους περισσότερους ανιχνευτές.
- Το **Υδρογόνο (H<sub>2</sub>)** παρέχει ταχύτερους διαχωρισμούς αλλά έχει τον κίνδυνο της έκρηξης
- Το **Άζωτο (N<sub>2</sub>)** είναι φθινό και άμεσα διαθέσιμο αλλά οι διαχωρισμοί είναι λιγότερο ικανοποιητικοί.

61

## Εισαγωγέας Δείγματος



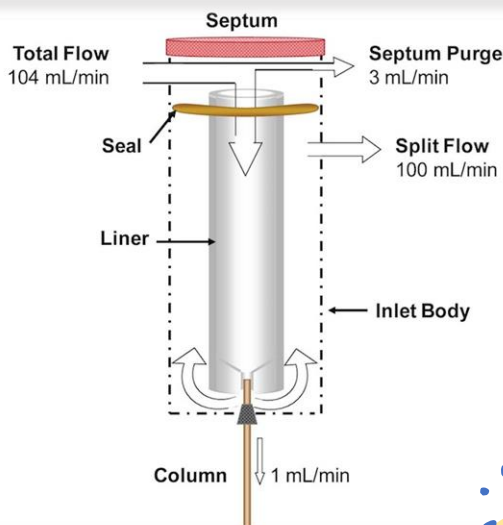
Το δείγμα εισάγεται με σε ένα θερμαινόμενο μεταλλικό μπλοκ που πωματίζεται με ένα ελαστικό διάφραγμα (**septum**).

Το δείγμα εισάγεται και λόγω θέρμανσης εξατμίζεται και με τη βοήθεια του φέροντος αερίου εισάγεται στη στήλη.

Μετά την εισαγωγή στη στήλη το διάλυμα υγροποιείται λόγω διαφοράς της θερμοκρασίας

Ο εισαγωγέας πρέπει να είναι τουλάχιστον 50°C πάνω από την σημείο ζέσης της λιγότερο πτητικής ένωσης.

Το **septum** λόγω υψηλής θερμοκρασίας μπορεί να εκλύσει ενώσεις που να εισέλθουν στην στήλη δίνοντας «ghost» κορυφές, γι' αυτό μικρή ροή αερίου (~3 mL/min) διέρχεται κάτω από το septum (septum purge).



62

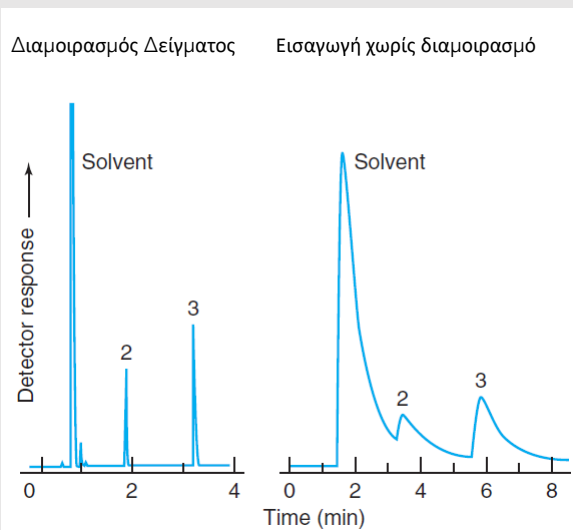
## Τεχνικές Εισαγωγής Δείγματος

Το δείγμα πρέπει να έχει το κατάλληλο μέγεθος και να εισάγεται άμεσα ως ατμός.

Αργή έγχυση και μεγάλες ποσότητες δείγματος δημιουργούν διεύρυνση κορυφών και χαμηλή διαχωριστικότητα.

Είναι απαραίτητος ο διαμορισμός του δείγματος ώστε να βελτιωθεί ο διαχωρισμός και να αποφευχθούν φαινόμενα υπερφόρτωσης της στήλης.

Σημαντικός ο διαχωρισμός ιδιαίτερα σε τριχοειδείς στήλες.



63

## Τεχνικές Εισαγωγής Δείγματος

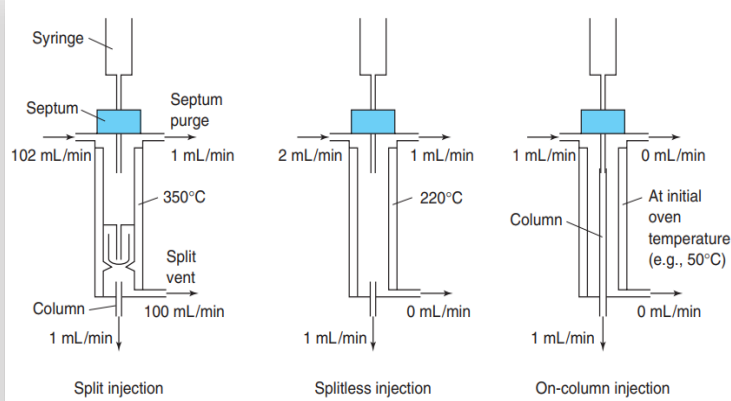
### Διαμορισμός δείγματος

**Split Injection:** Εισαγωγή μικρών ποσοτήτων δείγματος, κυρίως σε ρουτίνα

**Splitless Injection:** ιδανικό για προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων

**On Column Injection:** κυρίως για θερμικά ασταθείς ενώσεις.

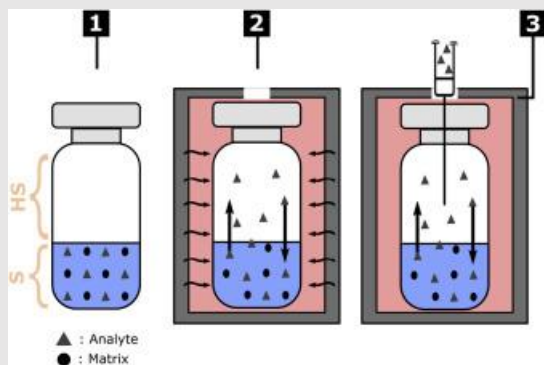
Πως υπολογίζεται η τελική ροή του φέροντος αερίου;



64



## Εναλλακτικοί Τρόποι - Headspace



**VOC (Volatile Compounds):** κάθε ένωση με σημείο ζέσης μικρότερο των 180°C.

Headspace: Τεχνική εισαγωγής της υπερκείμενης φάσης.

Το δείγμα λαμβάνεται από την αέρια υπερκείμενη φάση με ειδική μικροσύριγγα αερίων.

**1.** Το δείγμα εισάγεται σε ειδικά φιαλίδια με ειδικό πώμα για να μην διαφεύγουν τα αέρια.

**2.** Το φιαλίδιο θερμαίνεται και αναδεύεται ώστε τα συστατικά του να μεταφερθούν στην αέρια φάση.

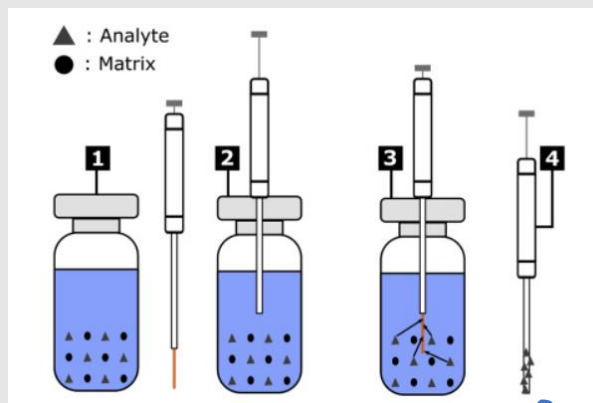
**3.** Το δείγμα λαμβάνεται με την μικροσύριγγα από την αέρια φάση.

65

## Εναλλακτικοί Τρόποι - SPME

Αποτελεί μια παραλλαγή της SPE σε μικροκλίμακα.

1. Ειδική σύριγγα με μία ίνα εμβαπτίζεται στο δείγμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.
2. Οι ενώσεις προσροφούνται στην ίνα.
3. Η σύριγγα εισάγεται στον αεριοχρωματογράφο και οι ενώσεις εκροφούνται θερμικά από την ίνα και οδηγούνται στη στήλη.

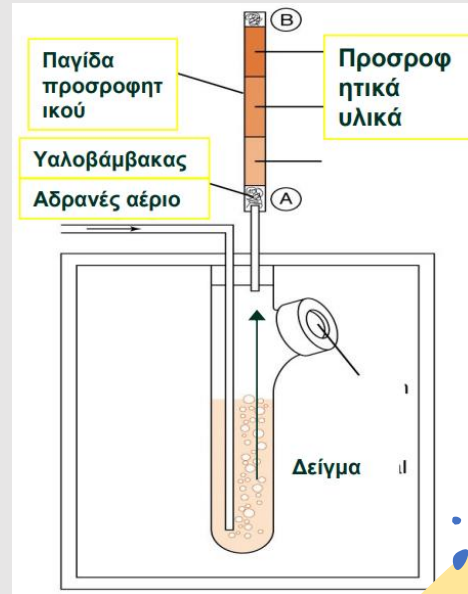


66

## Εναλλακτικοί Τρόποι - Purge and Trap

Παραλλαγή του headspace με την διαφορά ότι στο φιαλίδιο εισάγεται αδρανές αέριο, εξαναγκάζοντας τις ενώσεις να μεταφερθούν στην αέρια και σε μια παγίδα με προσροφητικό υλικό όπου κατακρατούνται.

Η παγίδα θερμαίνεται και οι ενώσεις εκροφούνται και οδηγούνται στη στήλη.



67

## Στατιστικές φάσεις - Στήλες

### Πακεταρισμένες Στήλες:

Συνήθως από ανοξείδωτο αστάλι

Εσωτερική διάμετρος **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



68

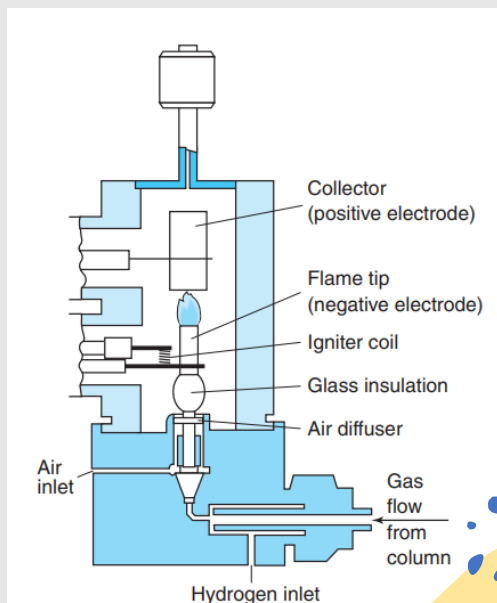
## Ανιχνευτές

- Υψηλή σταθερότητα και ανααγωγισιμότητα σε σχέση με το θόρυβο και το χρόνο
- Ευαισθησία ( $\Delta\text{Response}/\Delta C$ )
- Εκλεκτικότητα
- Γραμμική Απόκριση
- Θερμοκρασία λειτουργίας έως  $400^{\circ}\text{C}$
- Χρόνος απόκρισης σε σχέση με την ταχύτητα ροής
- Μη καταστρεπτικός
- Αξιοπιστία και ευκολία χρήσης

69

## Ανιχνευτές – Ιοντισμού Φλόγας (FID)

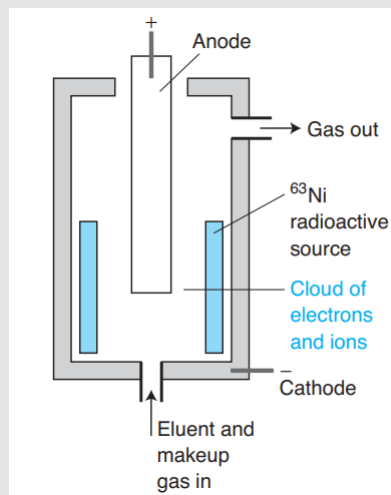
- Το έκλουσμα καίγεται σε φλόγα υδρογόνου – αέρα. Τα άτομα άνθρακα παράγουν ρίζες CH. Καταγράφεται το ρεύμα που παράγεται από ένα ηλεκτρόδιο και είναι ανάλογο των ατόμων άνθρακα στο έκλουσμα.
- Μεγάλη γραμμική περιοχή
- Το  $\text{N}_2$  δίνει καλύτερα όρια ανίχνευσης, για το λόγω αυτό χρησιμοποιείται και ως makeup gas πριν τον ανιχνευτή
- Μεγάλο εύρος γραμμικότητας ( $10^7$ )
- Ευρείας χρήσης
- Πόσα αέρια χρειάζεται ένας GC-FID χρωματογράφος;



70

## Ανιχνευτές – Σύλληψης Ηλεκτρονίων (ECD)

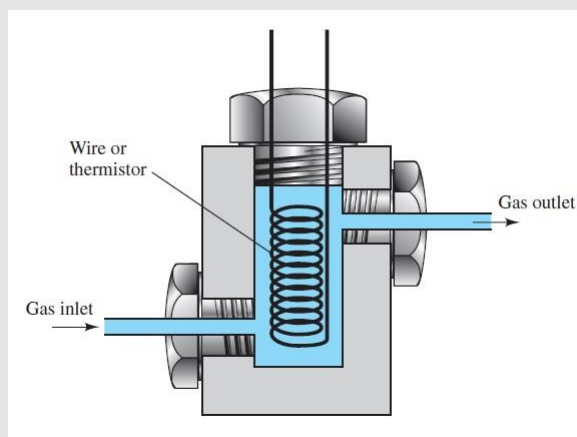
- Το έκλουσμα διέρχεται από μία ρεύμα ηλεκτρονίων που παράγεται από μία πηγή με ραδιενεργό  $^{63}\text{Ni}$ . Οι ενώσεις που περιέχουν ηλεκτραρνητικές ομάδες, προσλαμβάνουν τα ηλεκτρόνια μειώνοντα το ρεύμα. Καταγράφονται οι αυξομειώσεις του σήματος ένα ηλεκτρόδιο. Χρησιμοποιείται κυρίως για αλογονωμένες ενώσεις.
- Μικρή γραμμική περιοχή ( $10^2$ )
- Ευαίσθητος σε επιμολύνσεις και υγρασία.
- Μεγάλη ευαισθησία σε αλογονωμένες ενώσεις με όρια ανίχνευσης που συγκρίνονται με την φασματομετρία μάζας!
- Μικρότερη ευαισθησία σε αμίνες, αλκοόλες και υδρογονάνθρακες).



71

## Ανιχνευτές – Θερμικής Αγωγιμότητας (TCD)

- Βασίζεται στην μεταβολή της θερμικής αγωγιμότητας του ρεύματος αερίου που οφείλεται στις ενώσεις που εκλύονται.
- Μεγάλη γραμμική περιοχή ( $10^5$ )
- $\text{H}_2$  και  $\text{He}$  δίνουν βελτιωμένα όρια ανίχνευσης.



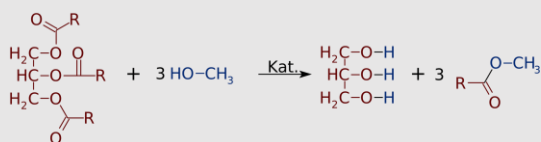
72

## Άλλοι Ανιχνευτές

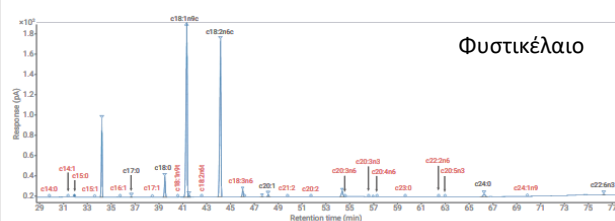
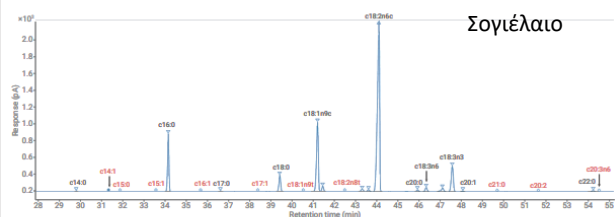
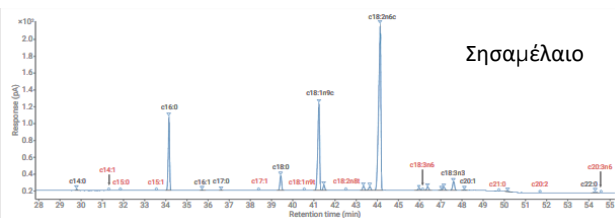
- **Ανιχνευτής με Φωτοϊονισμό (PID):** αποκρίνεται κυρίως σε ενώσεις που έχουν αρωματικό δακτύλιο, με χρήση μίας λάμπας UV.
- **Φωτομετρικός Ανιχνευτής Φλόγας (FPD):** Μέτρησης ακτινοβολίας που παράγεται από την καύση ενώσεων S και P.
- **Φασματόμετρο Μάζας (MS):** Ο πλέον χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής. Αφορά τις επόμενες ενότητες. Χρήση ως συζευγμένες τεχνικές (**hyphenated techniques**).

73

## Παράδειγμα 1 – Προσδιορισμός Λιπαρών Οξέων



GC system	8890A GC
S/SL Inlet	250 °C, split ratio 100:1,
Liner	Split, Ultra inert, glass wool, low pressure drop (p/n 5190-2295)
Oven ramp program	100 °C (13 minutes), 10 °C/min to 180 °C (6 minutes), 1 °C/min to 200 °C (20 minutes), 4 °C/min to 230 °C (7 minutes)
Carrier gas	Nitrogen, 40 psi, constant pressure mode
Column	Agilent HP-88, 100 m × 0.25 mm, 0.20 μm (p/n 112-88A7)
Detector	280 °C, H <sub>2</sub> : 40 mL/min Air: 400 mL/min Make up gas: 25 mL/min



74

## Παράδειγμα 2 – Προφίλ VOCs σε κρασιά με purge and trap

Gas Chromatograph	Agilent 7890A
Column	Restek Rtx - VMS 30 meter, 0.25 mm ID, 1.4 $\mu$ 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

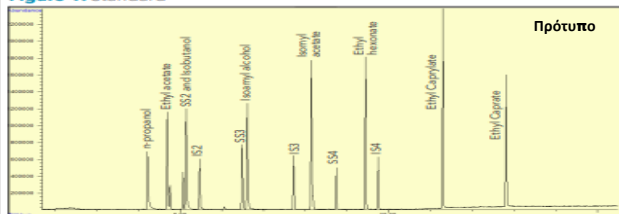


Figure 2. Chardonnay A

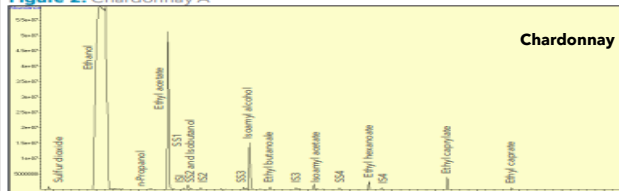


Figure 3. Cabernet A

