

Υγροχρωματογραφία - HPLC

Δρ. Μάριος Κωστάκης

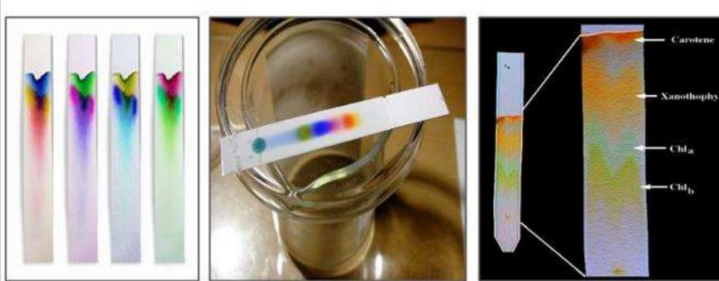
Χημικός

1

Εισαγωγή-Ιστορικά Στοιχεία

2

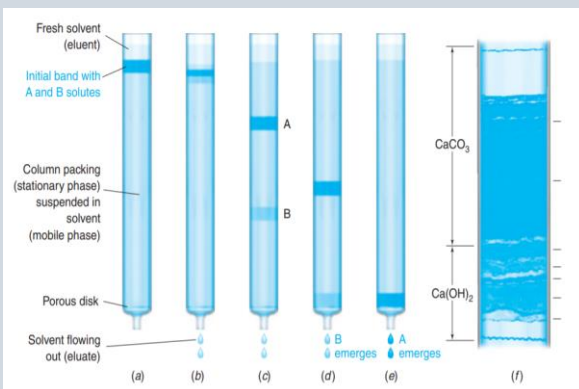
Ιστορικά Στοιχεία



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

3

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 εκλούνται ταχύτερα ενώ αυτά που έχουν συγγένεια με την στατική εκλούνται βραδύτερα.

4

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).

5

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.

6

Εισαγωγικά

Η χρωματογραφία διαχωρίζεται ανάλογα:

Με το είδος της διαχωρισμού:

Χρωματογραφία Προσρόφησης (Adsorption chromatography)

Χρωματογραφία Κατανομής (Partition chromatography)

Χρωματογραφία Ιονταλλαγής (Ion exchange chromatography)

Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού (Molecular exclusion Chromatography)

Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity chromatography)

7

Υγροχρωματογραφία

Αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική

Εφαρμογή

Εργαστήρια Αναλύσεων

Φαρμακευτικές εταιρίες

Ερευνητικά κέντρα

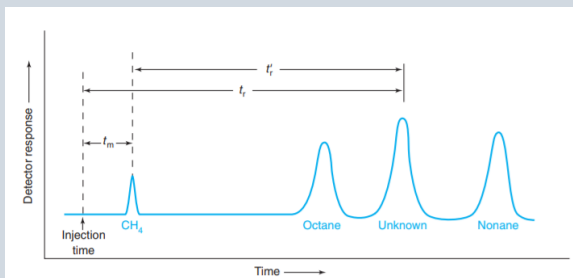
Προσδιορισμός μεγάλου εύρους οργανικών ενώσεων

Δυνατότητα ταυτοποίησης της ένωσης ειδικά σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας.

Μεγάλη ανάπτυξη λόγω της σύνδεσης με φασματομετρία μάζας

8

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.

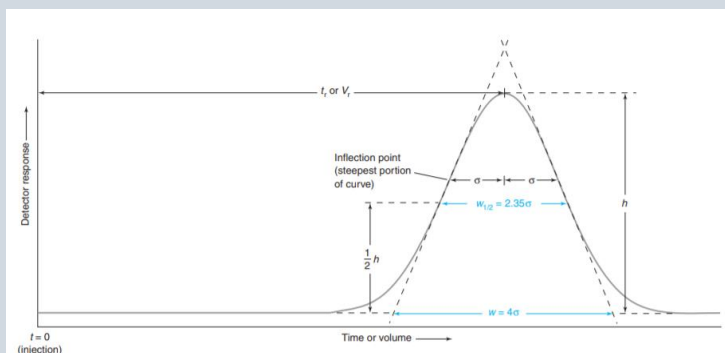
$t'_r = t_r - t_m$, ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης, ο χρόνος που χρειάζεται να μετακινηθεί μία ένωση στη χρωματογραφική στήλη.

F: ταχύτητα ροής (mL/min)

Όγκος Ανάσχεσης $V_r = t_r \times F$

9

Απόδοση διαχωρισμού



Θεωρία πλάκων: 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.

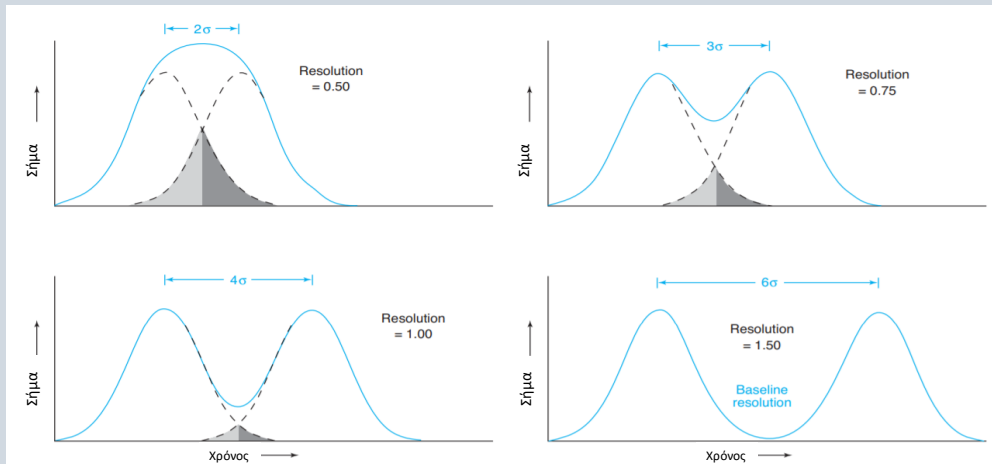
$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

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

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

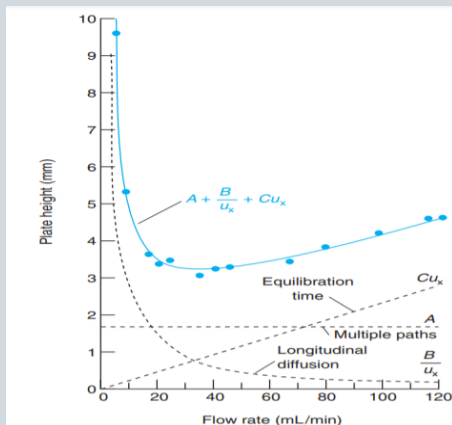
10

Διαχωριστικότητα, Resolution, Rs



11

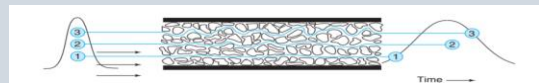
Γιατί διευρύνονται οι κορυφές;



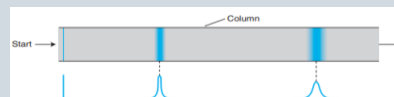
Εξίσωση Van Deemter:

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

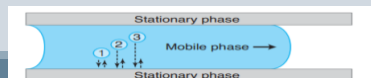
A: Πολλαπλότητας διαδρομών



B/u: Διαμήκους διάχυσης



Cu: μεταφοράς μάζας



12

Βασικά στοιχεία διαχωρισμού

Χρόνος ανάσχεσης: **Ταυτοποίηση**

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

Εμβαδόν κορυφής ή ύψος κορυφής: **Ποσοτικοποίηση**

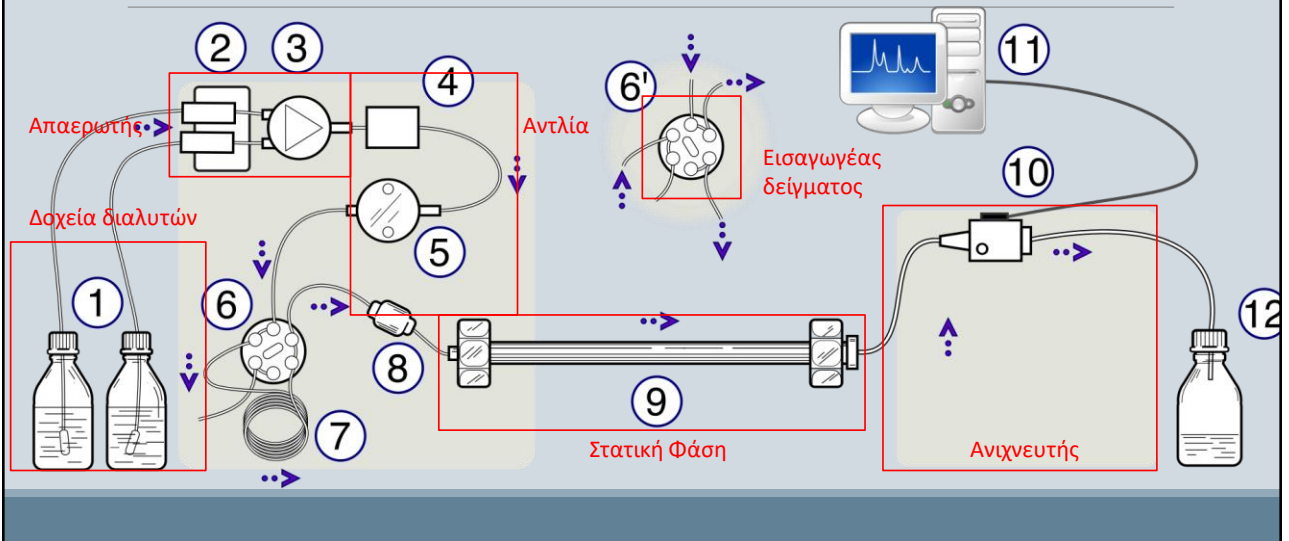
Η ποσότητα της ουσίας προσδιορίζεται σε σχέση με το εμβαδόν κορυφής του προτύπου με το δείγμα (είτε απλή σύγκριση είτε μέσω καμπύλης βαθμονόμησης)

13

Οργανολογία HPLC

14

Τμήματα Υγροχρωματογραφίας



15

Τμήματα Υγροχρωματογραφίας



16



Δοχεία Διαλυτών κινητής φάσης

Αποτελείται από 1 έως 4 δοχεία διαλυτών

Τα δοχεία είναι τύπου Duran, και με τη βοήθεια της αντλίας οι διαλύτες οδηγούνται στην στατική φάση.

Οι σωλήνες καταλήγουν σε ένα φίλτρο για να αποφευχθεί να περάσουν σωματίδια στο σύστημα.



Ανάλογα με την αντλία μπορεί να έχει τη δυνατότητα μίξης από 2 έως 4 διαλύτες ταυτόχρονα.

Προσοχή, κάποια συστήματα μπορούν να αναμειξουν μέχρι 2 (ανάλογα με το σύστημα)

Ανάμιξη διαλυτών: Ισοκρατική vs Βαθμιδωτή (gradient) έκλυση

17

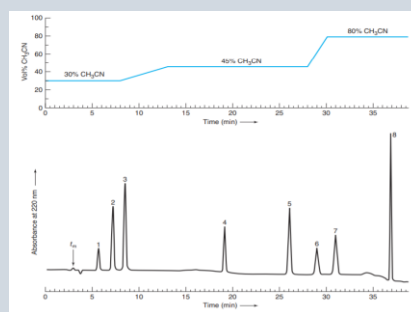
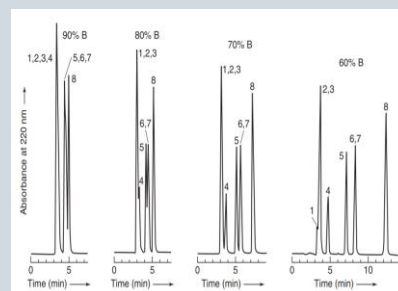


Ισοκρατική vs Βαθμιδωτή έκλυση

Ισοκρατική έκλυση: πραγματοποιείται με ένα διαλύτη ή ένα μίγμα διαλυτών.

Το πρόβλημα της έκλυσης: Στα σύνθετα μείγματα, υπάρχει ποικιλία ενώσεων με διαφορετική συγγένεια η οποία μπορεί να διαφέρει ή να είναι κοντινή, οπότε ένας διαλύτης ή ένα μίγμα διαλυτών μπορεί να μην είναι ικανοποιητικό να διαχωρίσει όλες τις ενώσεις και να υπάρχουν φαινόμενα συνέκλυσης.

Βαθμιδωτή έκλυση: κατά τη διάρκεια της ανάλυσης αλλάζει η σύσταση των διαλυτών.



18



Πως γράφω ένα πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

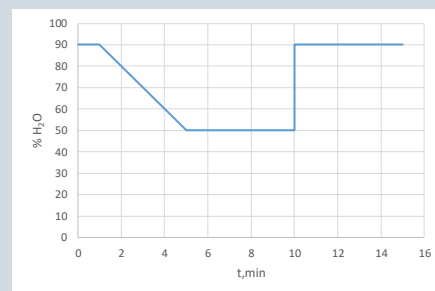
Η μέθοδος μου ορίζει:

Κινητή Φάση A: H₂O

Κινητή Φάση B: ACN

Το gradient της μεθόδου έχει ως εξής:

- ✓ Για 1 min ισοκρατικά 90 A: 10 B
- ✓ 4 min βαθμιδωτά από το 90 A: 10 B σε 50 A: 50 B
- ✓ 5 min σταθερά στο 50 A: 50 B
- ✓ Επαναφορά στις αρχικές συνθήκες για 5 min (επαναεξισορρόπηση)



time (min)	%A	%B
0 (ή 0,01)	90	10
1	90	10
5	50	50
10	50	50
10.1	90	10
15	90	10

19



Πρακτικά θέματα για τις κινητές φάσεις

Η καθαρότητα των διαλυτών είναι πολύ σημαντική για την επιτυχία της ανάλυσης.

Οι οργανικοί διαλύτες πρέπει να είναι καθαρότητας HPLC ή LC-MS (οι προμηθευτές πωλούν τέτοιας καθαρότητας)

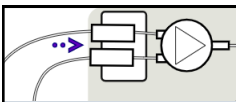
Το πρόβλημα που μπορεί να δημιουργηθεί από τις κινητές φάσεις είναι ο κίνδυνος σωματίδια να εισέλθουν στο σύστημα και να φράξουν το χρωματογράφο. Κινητές φάσεις που μπορούν να έχουν σωματίδια διηθούνται από φίλτρα με πόρους 0,22μm.

Π.χ. φωσφορικά άλατα (καλίου και νατρίου), οξικό αμμώνιο, φορμικό αμμώνιο κλπ

Το νερό πρέπει να είναι καθαρότητας κατάλληλης για HPLC (υπάρχουν στο εμπόριο ή από συσκευές παραγωγή υπερκάθαρου νερού π.χ. Millipore ή δισαπεσταγμενο)

Προσοχή στην αναμιξιμότητα των διαλυτών με τα άλατα (π.χ. φωσφορικά με ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη)

20



Απαερωτής - Degasser

Όλα τα σύγχρονα συστήματα υγροχρωματογραφίας μετά τους διαλύτες έχουν ένα σύστημα απομάκρυνσης μικροποσότητες αέρα (φουσαλίδες) από τους διαλύτες.

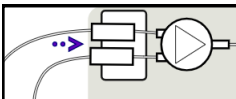
Οι μικροποσότητες αέρα προκαλούν διεύρυνση κορυφών και ανάλογα με τον ανιχνευτή εμποδίζουν τη σωστή λειτουργία του.

Τρόποι απαέρωσης:

- Μεμβράνες, online σύστημα συνδεδεμένο με όλο το υγροχρωματογραφικό σύστημα (αποκλειστική χρήση πλέον στα σύγχρονα συστήματα).
- Χρήση υπερήχων
- Διοχέτευση αδρανούς αερίου (ήλιο, άζωτο)

Προσοχή! Οι απαερωτές δεν μπορούν να διώξουν μεγάλες ποσότητες αέρα. Όταν αλλάζουν οι διαλύτες οι μεγάλες ποσότητες αέρα που μπορούν να πρέπει να απομακρυνθούν πριν ξεκινήσει η διαδικασία της ανάλυσης. Η διαδικασία ονομάζεται **purge**.

21



Απαερωτής – Degasser - Purge

Το purge γίνεται για δύο λόγους:

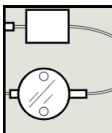
1. Απομάκρυνση μεγάλων ποσοτήτων αέρα που μπορεί να έχουν εισέλθει στις σωληνώσεις των κινητών φάσεων λόγω αλλαγής διαλυτών.
2. Τον καθαρισμό των σωληνώσεων από τους προηγούμενους διαλύτες και την εισαγωγή των νέων.

Στο purge εκτρέπεται η ροή από το σύστημα και πηγαίνει κατευθείαν στα απόβλητα.

Επειδή αποσυνδέεται η ροή από το σύστημα υπάρχει η δυνατότητα χρήσης υψηλών ροών (3-5 mL/min).

Το purge γίνεται πάντα στην αρχή πριν ξεκινήσει η ανάλυση

22



Αντλία

Η ποιότητα της αντλία για HPLC μετριέται από το πόσο σταθερή και αναπαραγώγιμη είναι η ροή που επιτυγχάνει

Όσο περισσότερες διακυμάνσεις έχει η ροή μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στον ανιχνευτή.

Μια κοινή HPLC μπορεί να φτάσει συνήθως μέχρι ροές 10 mL/min και μέγιστη πίεση 400 bar (40 MPa)

Η επαναληψιμότητα της ροής είναι κριτήριο για την κατάσταση του συστήματος την ανίχνευση διαρροών.

Ανάλογα και με την στατική φάση, υψηλή ποσότητα οργανικών διαλυτών μειώνει τη ροή ενώ υψηλή ποσότητα νερού ή αλάτων αυξάνει τη ροή.

23

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 υδροχρωματογραφία 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.

24

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. φασματόμετρα μάζας) που δουλεύουν ορθότερα σε χαμηλές ροές.

HPLC χρησιμοποιείται κυρίως σε ρουτίνα ενώ η UPLC σε ερευνητικές εφαρμογές

25

UPLC

Πλεονεκτήματα

Μικρότερες στήλες, καλύτεροι διαχωρισμοί σε μικρότερο χρόνο

Καλύτερος διαχωρισμός και στενές κορυφές λόγω του μικρότερου μεγέθους σωματιδίων

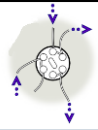
Χαμηλότερο κόστος χρήσης, λόγω μικρότερης κατανάλωσης διαλυτών

Μειονεκτήματα

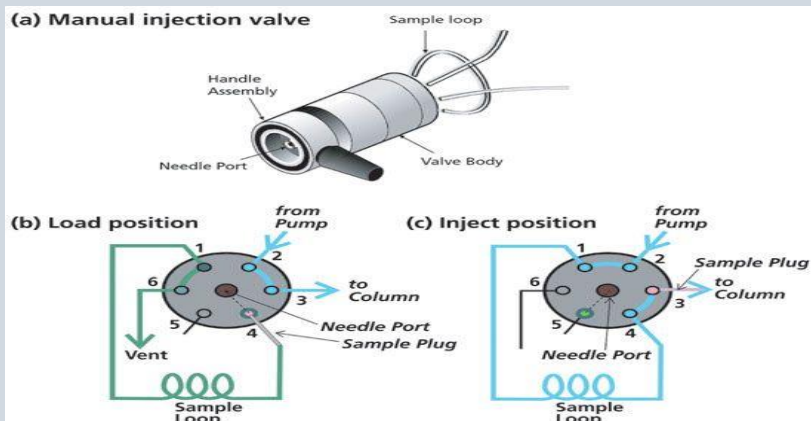
Μεγαλύτερο κόστος αγοράς, έχει τμήματα που πρέπει να είναι από ειδικά υλικά ώστε να αντέχουν σε υψηλές πιέσεις.

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

26

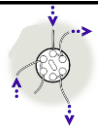


Εισαγωγέας Δείγματος- Injector



27

27



Εισαγωγέας Δείγματος- Injector

Στα **παλαιότερα** συστήματα το sample loop ήταν σταθερού όγκου, οπότε για να γίνει αλλαγή του όγκου έπρεπε να αλλάξει το loop

Συνήθεις όγκοι loop: 10, 20, 50 μL

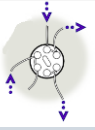
Στα **σύγχρονα** συστήματα η επιλογή του όγκου γίνεται από τον υπολογιστή που χειρίζεται το σύστημα

Εύρος όγκου από 1 μL – 100 μL



28

28



Αυτόματος δειγματολήπτης

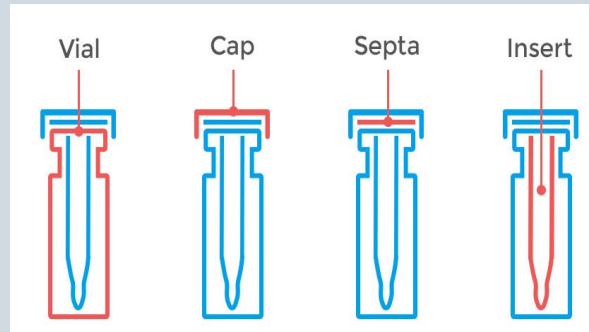
Τα περισσότερα συστήματα έρχονται με αυτόματο δειγματολήπτη, αν και οι περισσότεροι δειγματολήπτες έχουν δυνατότητα για σχεδόν όλους τους τύπους vials, θέλει προσοχή για να αποφευχθούν τεχνικά προβλήματα:

Vial: Μετανάστευση υλικού από το vial, η ποσότητα δείγματος δεν επαρκεί για να αναρροφήσει ο δειγματολήπτης.

Caps: Να μην είναι κατάλληλο για τον δειγματολήπτη οπότε να μην μπορεί να ευθυγραμιστεί.

Septa: Αρκετά σκληρό και δεν μπορεί να το τρυπήσει ο δειγματολήπτης ή αρκετά μαλακό, με αποτέλεσμα κομμάτια να αναρροφήσει η σύριγγα και να βουλώσει.

Insert: Να μην μπορεί να αναρροθήσει ο δειγματολήπτης, απώλεια ευθυγράμμισης.



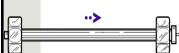
29

29

Χρωματογραφικές στήλες



30



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)

31



Κανονική vs Αντίστροφη Φάση

ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΦΑΣΗ

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

ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΦΑΣΗ

Μη πολική στατική φάση, τροποποιημένη πυριτία που έχει υποκατασταθεί με μακρίες 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

32



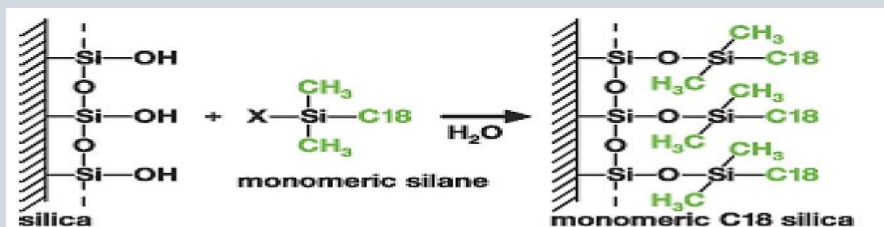
Στατικές Φάση Αντ. Φάση (RP)

Χρησιμοποιούνται στις περισσότερες αναλύσεις.

Μεγάλο εύρος εφαρμογών σε πολλούς τομείς.

Μεγάλο εύρος παραλλαγών.

Κύρια κατηγορία στατικών φάσεων RP είναι οι C18



33



Στατικές Φάση Αντ. Φάση (RP)

Μερικές εμπορικά διαθέσιμες στήλες:

Zorbax C18,

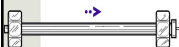
Waters Atlantis T3

Waters Spherisorb ODS

Phenomenex, Kinetex C18

Phenomenex, Luna C18

34



ODS vs BDS

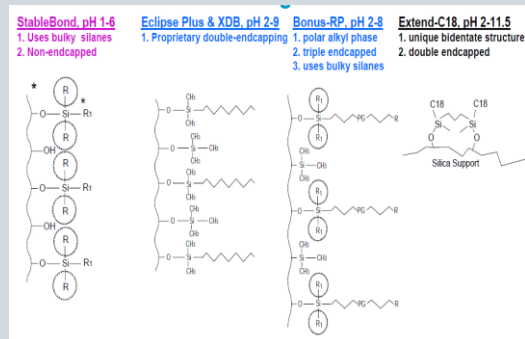
ODS – Octadecyl Silica: Αποτελεί την πρώτη εφαρμογή της C18 στην HPLC.

Παρόλο που η πυριτία είναι υποκατεστημένη με μία C18 αλυσίδα, υπάρχουν ελεύθερες ομάδες πυριτίας που δημιουργούν προβλήματα κατά το διαχωρισμό

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος καλύφθηκαν οι ελεύθερες ομάδες, με διάφορους υποκαταστάτες.

BDS – Base deactivated Silica: Έχουν απενεργοποιηθεί οι ελεύθερες ομάδες σιλανόλης, οπότε γίνεται καλύτερος διαχωρισμός ειδικότερα στις βασικές ενώσεις που επηρεάζονται από τις ελεύθερες ομάδες της πυριτίας.

Η διαδικασία αυτή ονομάζεται και endcap.



35



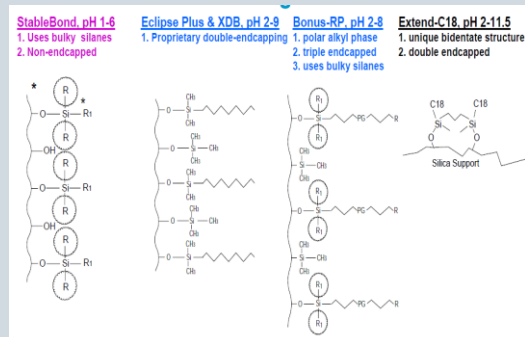
Carbon Load

Μέγεθος που δηλώνει το ποσοστό του άνθρακα που είναι συνδεδεμένος με την στατιστική φάση.

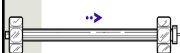
Γενικά, μία στήλη με υψηλό carbon load έχει πιο υδροφοβική επιφάνεια.

Επίσης είναι πιο ανθεκτική σε υψηλά pH

Υψηλό ποσοστό άνθρακα δεν σημαίνει απαραίτητα καλύτερο διαχωρισμός, εξαρτάται από τη φύση των ενώσεων.



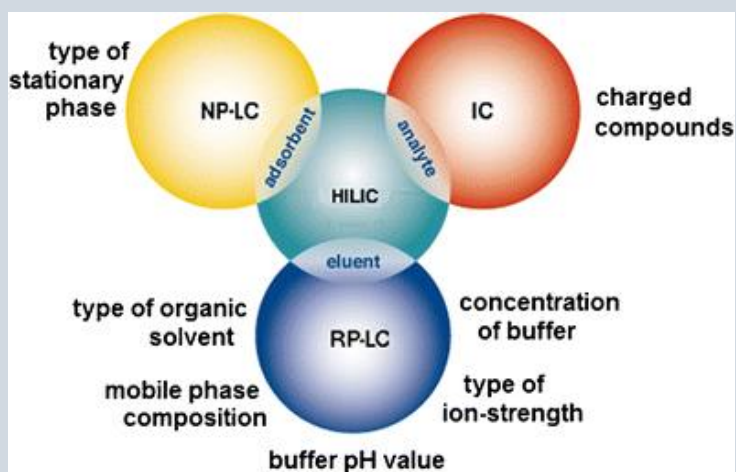
36



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 κατακράτηση, αλλαγές στην εκλεκτικότητα.
C3	Παρόμοια με τη Phenyl

37

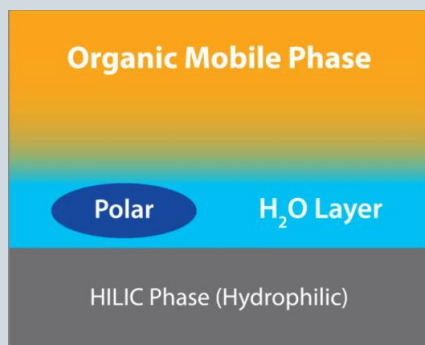


Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)

ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ ΤΗΣ ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.

38

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.

39

Πρακτικά θέματα σχετικά με τις στατικές φάσεις

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου:

Η φύση των αναλυτών (πολικοί, μη πολικοί)

Προσεκτική επιλογή συνθηκών κινητής φάσης.

Συνήθεις διαλύτες (ACN, MeOH, H₂O, υδατικά διαλύματα φωσφορικού οξέος, φορμικού ή οξικού οξέος, όπως και άλατα αυτών).

Προσοχή στο pH: Οι περισσότερες στήλες αντέχουν σε εύρος pH 2-8, πριν τη χρήση της στήλης ελέγξτε το εύρος που αντέχει. Ειδικές στήλες με πολυμερικά υλικά αντέχουν και μέχρι pH 12.

Προσοχή στην αναμιξιμότητα των διαλυτών, κάποιες φορές καταβυθίζονται άλατα και δημιουργούν προβλήματα στο σύστημα.

40

Πρακτικά θέματα σχετικά με τις στατικές φάσεις

Πριν την ανάλυση:

Όλες οι στήλες στην αρχή θέλουν χρόνο εξισορρόπησης ώστε να εξισορροπήσει το σύστημα στις αρχικές συνθήκες, διαφορετικά υπάρχει πιθανότητα, να επηρεαστεί το σχήμα των κορυφών καθώς και οι χρόνοι έκλουσης.

Συνήθως 30-45 λεπτά είναι ικανοποιητικά για εξισορρόπηση, με εξαίρεση τις HILIC που θέλουν τουλάχιστον 60 λεπτά.

Σε κάποιες περιπτώσεις για να εξισορροπήσει καλύτερα το σύστημα είναι καλύτερο να γίνουν μερικές ενέσεις στην αρχή του προτύπου. Έλεγχος αν υπάρχει απόκλιση στο χρόνο έκλουσης και το σχήμα των κορυφών.

Μετά το τέλος της ανάλυσης

Όλες οι στήλες πρέπει να φυλλάσσονται στο διαλύτη που αναφέρει η εταιρείας (συνήθως ACN ή ACN/H₂O

Μην αφήνεται τις στήλες με παρουσία αλατιού γιατί υπάρχει κίνδυνος να βουλώσει η στήλη και να μειωθεί ο χρόνος ζωής.

Καθαρίζεται τη στήλη μετά το τέλος της ανάλυσης.

Συνήθως:

Μεγάλη ποσότητα νερού ώστε να φύγει ποσότητα του άλατος

Αύξηση του ποσοστού του οργανικού μέχρι να φτάσει στο επίπεδο που αναφέρει ο κατασκευστής της στήλης.

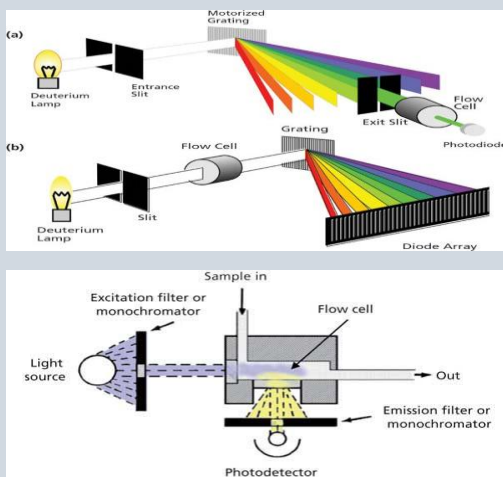
Όλες οι στήλες έχουν πώματα, μην παραλείπετε να κλείνετε τα πώματα, υπάρχει κίνδυνος η στήλη να ξεραθεί λόγω παρουσίας αέρα και να χαλάσει.

41

Ανιχνευτές

42

Φασματοφωτομετρικοί Ανιχνευτές



Οι πιο σημαντικοί ανιχνευτές στην HPLC.

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

Έχει μεγάλη γραμμική περιοχή

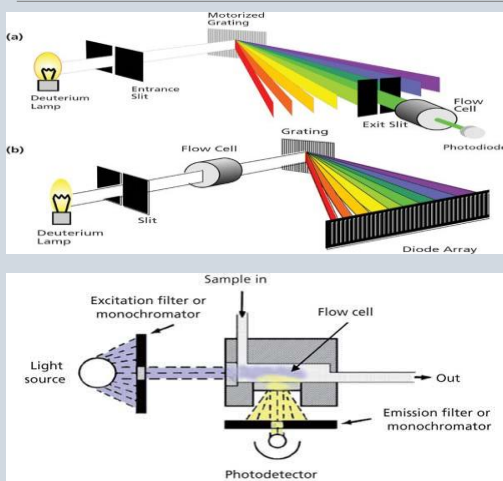
Δεν είναι ευαίσθητος σε μεταβολές της θερμοκρασίας και της σύστασης του διαλύτη

Σταθεροί σε οργανολογικές επιδράσεις.

Μόνο όσες ενώσεις έχουν ομάδες ικανές να απορροφήσουν

43

Φασματοφωτομετρικοί Ανιχνευτές



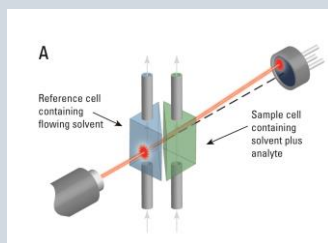
Εφαρμογές,

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)

44

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

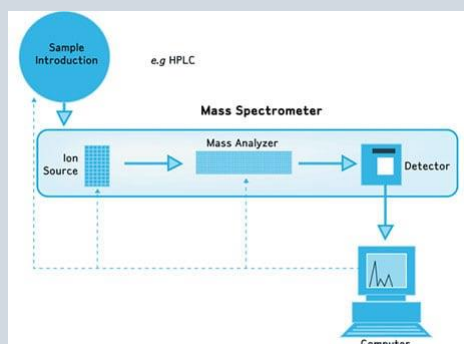
Επηρεάζεται από μεταβολές θερμοκρασίας και πίεση

Κύρια εφαρμογή για των προσδιορισμό σακχάρων σε τρόφιμα.

Δύσκολος στην εξισορρόπηση

45

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.

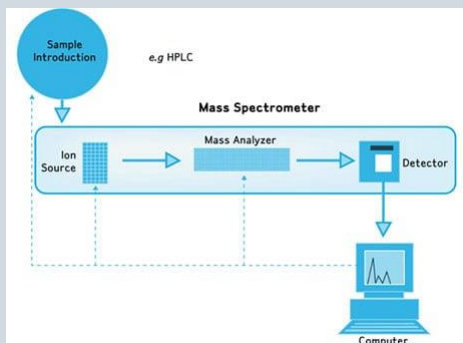
Μεγάλη επίδραση από την οργανολογική αστάθεια και την επίδραση μήτρας.

Ανάλογα με την εφαρμογή υπάρχουν παραλλαγές σε σχέση με την επιλογή του τρόπου ανίχνευσης της μάζας.

Καλή σύνδεση με RP και HILIC στήλες.

46

Φασματομετρία Μάζας



Υπολείματα φυτοφαρμάκων
Υπολείματα φαρμακευτικών ουσιών,
ναρκωτικές ουσίες,

απαγορευμένες,

Αμινοξέα,

σάκχαρα,

βιταμίνες

....

Απαιτεί μεγαλύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τους απλούς ανιχνευτές.

47

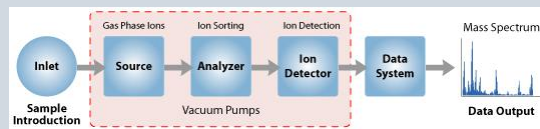
Γενικό διάγραμμα ροής στην Υγροχρωματογραφία

Απλά βήματα για την ανάλυση με HPLC



48

Φασματομετρία Μάζας



49

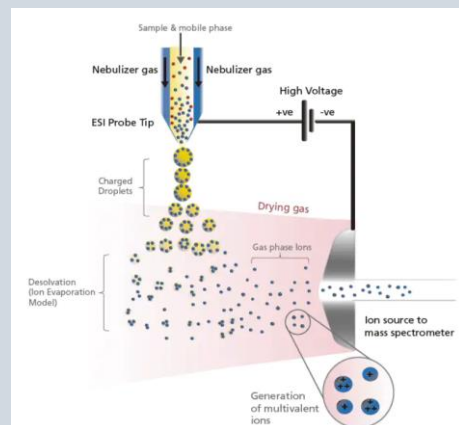
Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμός -ESI

Πλεονεκτήματα:

- Μαλακή πηγή ιοντισμού
- Κατάλληλος για θερμοασταθείς ενώσεις
- Κατάλληλος για μεγάλο εύρος αναλυτών
- Υψηλή αποδοτικότητα στην παραγωγή ιόντων

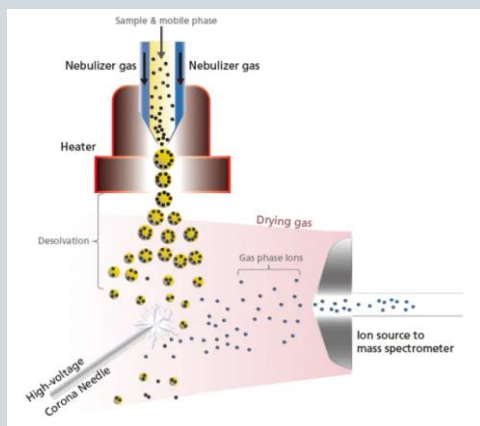
Μειονεκτήματα:

- Χαμηλές ροές
- Υψηλή καταστολή σήματος



50

APCI-Atmospheric pressure Chemical Ionization



Πλεονεκτήματα:

Σκληρή πηγή ιοντισμού σε σχέση με ESI

Μειωμένη καταστολή σήματος

Ικανότητα λειτουργίας σε υψηλές ροές κινητής φάσης

Μειονεκτήματα:

Ακατάλληλος για θερμοευαίσθητες ενώσεις

Απαιτήσεις για υψηλές θερμοκρασίες λειτουργίας

Θραυσματοποίηση μορίων που συνδέονται με ασθενείς δεσμούς.

51

Atmospheric Pressure

Πλεονεκτήματα:

Μειώνει την επίδραση μήτρας

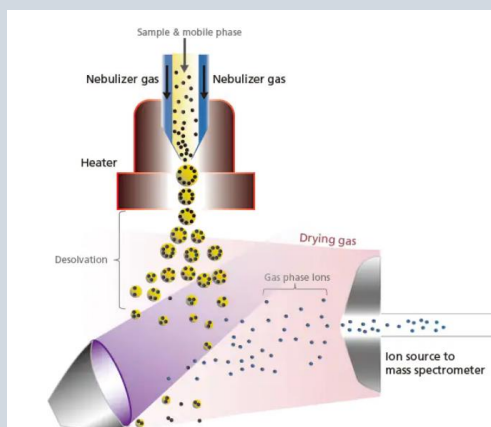
Μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής

Ιονισμός παράλληλα πολικών και μη πολικών ενώσεων.

Μειονεκτήματα:

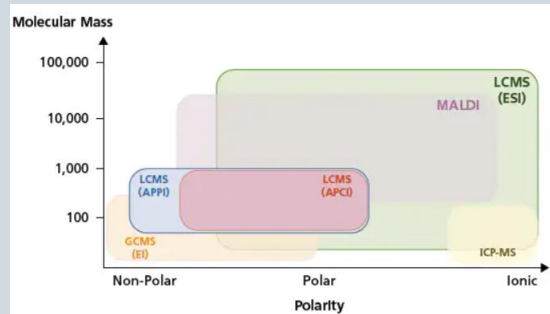
Ακατάλληλος για θερμοευαίσθητες ενώσεις

Μικρή παραγωγή ιόντων



52

Σύγκριση πηγών ιοντισμού



53

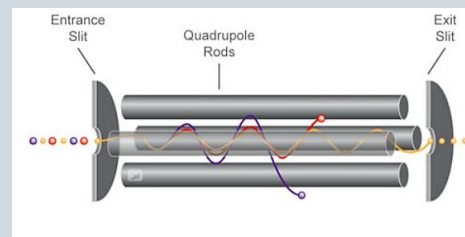
Τετράπολο - Quadrupole

Πλεονεκτήματα:

- Συμπαγής και απλός
- Σχετικά φθηνός
- Καλή εκλεκτικότητα (SIM λειτουργία)
- Μέτριες απαιτήσεις κενού

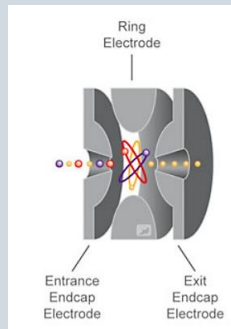
Μειονεκτήματα:

- Περιορισμένο εύρος μαζών (μέχρι 3000 m/z)
- Ευαίσθητο σε επίδραση μήτρας και παρεμποδίσεις
- Χαμηλής διακριτικής ικανότητας (FWHM: 0.5 u)



54

Ιοντική Παγίδα – Ion Trap



Πλεονεκτήματα:

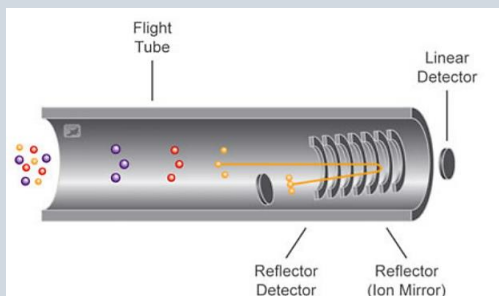
- Μικρό και σχετικά φθηνό
- Υψηλής ευαισθησία
- Καλή διακριτική ικανότητα
- Συμπαγές

Μειονεκτήματα:

- Περιορισμένο δυναμικό εύρος
- Περιορισμός στον αριθμό των ιόντων στην παγίδα
- Περιορισμένη διακριτική ικανότητα
- Απαιτεί παλμική λειτουργία

55

Χρόνου Πτήσης – Time of Flight (TOF)



Πλεονεκτήματα:

- Υψηλή ευαισθησία
- Υψηλή διακριτική ικανότητα
- Μεγάλο εύρος μαζών
- Μεγάλη ταχύτητα σκαναρίσματος

Μειονεκτήματα:

- Απαιτεί παλμική λειτουργία
- Μεγάλη ταχύτητα λήψης δεδομένων

56

Orbitrap

Πλεονεκτήματα:

Υψηλή διακριτική ικανότητα

Μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό μαζών

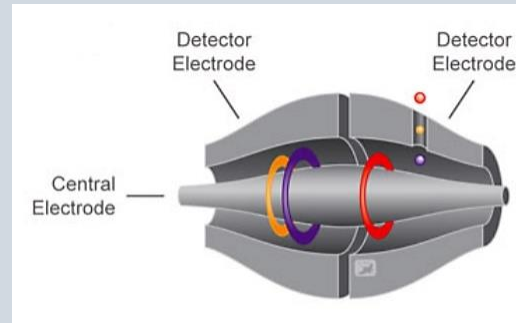
Μεγάλη χωρητικότητα

Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων

Μειονεκτήματα:

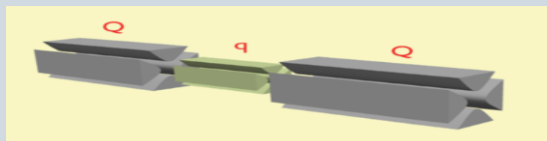
Ακριβό όργανο – Πολύπλοκη λειτουργία

Σχετικά αργή σάρωση



57

Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών – Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)



58

Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών

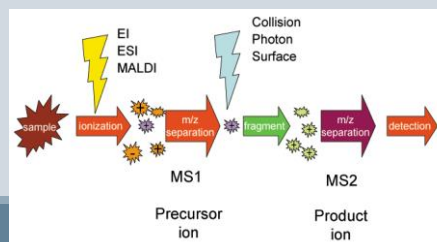
Βασική αρχή:

Συνδυάζονται πάνω από δύο αναλυτές μαζών. Ανάμεσά τους παρεμβάλεται μία **κυψελίδα συγκρούσεων** όπου παρουσία αδρανούς αερίου (συνήθως Ar). Τα ιόντα μετά την παραγωγή τους στην πηγή ιοντισμού οδηγούνται στον **1° Αναλυτή μαζών (συνήθως τετράπολο)**, εκεί γίνεται η επιλογή των ιόντων τα οποία θα οδηγηθούν στην **κυψελίδα συγκρούσεων**. Εκεί τα ιόντα επιτάχυνονται μέσα στην κυψελίδα και παρουσία του αερίου, τα ιόντα θραυσατοποιούνται σε μικρότερα ιόντα τα οποία στη συνέχεια οδηγούνται στον **2° αναλυτή μαζών** όπου και επιλέγονται συγκεκριμένα ιόντα που θα οδηγηθούν στον ανιχνευτή.

Δύο είναι οι πιο γνωστές διευθετήσεις Διαδοχικής Φασματομετρίας Μαζών:

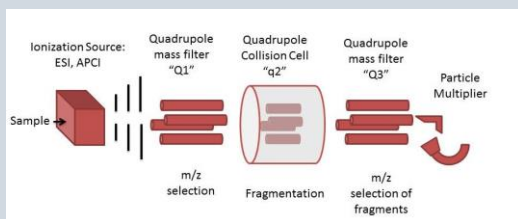
Τριπλό Τετράπολο (Triple quadrupole mass spectrometer)

qTOF (quadrupole time of flight mass spectrometer)



59

Τριπλό Τετράπολο



Πλεονεκτήματα:

Καλή εκλεκτικότητα σε λειτουργία SRM

Μεγάλη δυναμική περιοχή

Γρήγορη εναλλαγή αρνητικό/θετικό ιοντισμό

Πολλοί εναλλακτικοί τρόποι σάρωσης (neutral loss, product, precursor ion κλπ)

Μειονεκτήματα:

Περιορισμένο εύρος μαζών (μέχρι 3000 m/z)

Χαμηλής διακριτικής ικανότητας (FWHM:0.5 u)

60

Quadrupole time of flight (Q-TOF)

Πλεονεκτήματα:

Καλή ευαισθησία σε λειτουργία πλήρους σάρωσης

Υψηλή διακριτική ικανότητα

Καλή δυναμική περιοχή

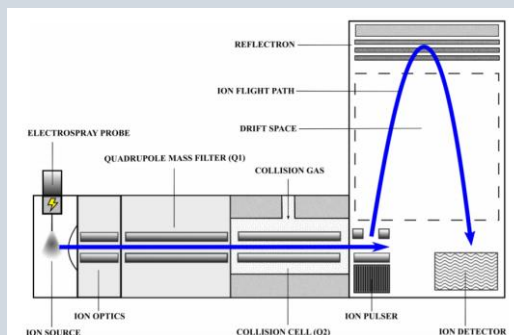
Μεγάλο εύρος μαζών

Δεν επηρεάζεται η διακριτική ικανότητα με αύξηση της ταχύτητας σάρωσης

Μειονεκτήματα:

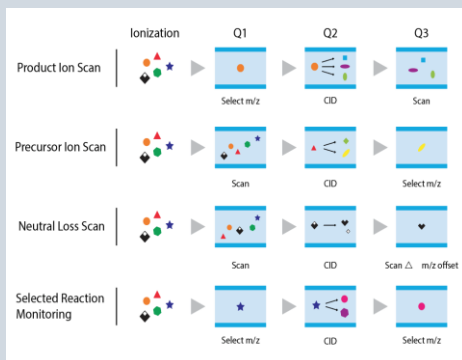
Γενικά χαμηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με το QqQ σε SRM λειτουργία

Η ευαισθησία μπορεί να επηρεαστεί από την αύξηση της ταχύτητας σάρωσης.



61

Επιλογές σάρωσης



Full scan – Πλήρους σάρωσης: Σάρωση στο 1^ο Τετράπολο, διέλευση από τα άλλα δύο.

Single Ion Monitoring (SIM): Επιλογή και παρακολούθηση στο 1^ο τετράπολο συγκεκριμένων m/z , διέλευση από τα άλλα δύο.

Product Ion Scan: Επιλογή και παρακολούθηση στο 1^ο τετράπολο συγκεκριμένων m/z , θραυσματοποίηση και σάρωση των ιόντων στο 3^ο τετράπολο

Precursor Ion Scan: Σάρωση στο 1^ο Τετράπολο, θραυσματοποίηση και επιλογή στο 3^ο τετράπολο

Neutral loss: Σάρωση στο 1^ο Τετράπολο, επιλεγμένη θραυσματοποίηση και σάρωση στο 3^ο τετράπολο

Selected reaction Monitoring (SRM): Επιλογή και παρακολούθηση στο 1^ο τετράπολο συγκεκριμένων m/z , επιλεγμένη θραυσματοποίηση στο 2^ο, επιλογή και παρακολούθηση στο 3^ο

62