

Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης

Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων – ΤΕΙ Αθήνας

Βασικές αρχές χρωματογραφίας (LC/GC)
&
Υγρής χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Διδάσκοντες

Βασιλεία Σινάνογλου
Παναγιώτης Ζουμπουλάκης
Σωτήρης Μπρατάκος

Πλάνο Παρουσίασης

- Βασικές αρχές χρωματογραφίας
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- Οργανολογία
- Ανιχνευτές
- Ενδεικτικά χρωματογραφήματα

Στόχοι μαθήματος

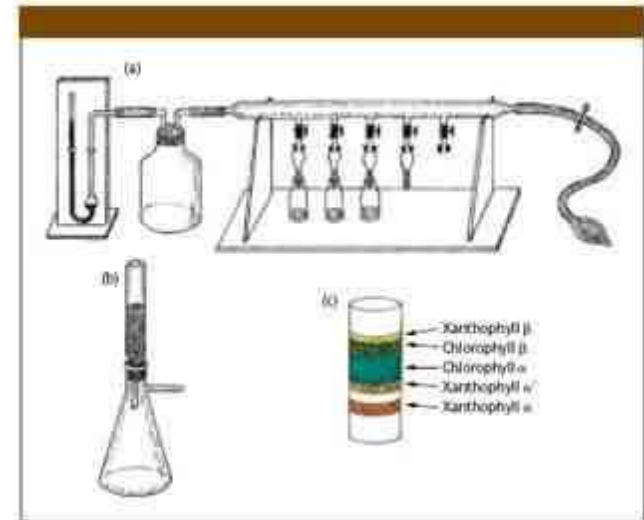
- Στο τέλος του μαθήματος θα πρέπει:
 - A) να γνωρίζετε τις βασικές αρχές της χρωματογραφίας
 - B) να κατανοείτε τις πληροφορίες που αντλούνται από τα χρωματογραφήματα
 - Γ) να γνωρίζετε βασικές εφαρμογές

Χρωματογραφία

- Αφορά τον διαχωρισμό συστατικών σε μίγματα με σκοπό τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους.
- Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση την **διαφορετική κατανομή των συστατικών ανάμεσα σε δύο φάσεις, μία κινητή και μία στατική.**
- Ο διαχωρισμός βασίζεται σε **διαφορές φυσικών ιδιοτήτων** των διαχωριζομένων συστατικών (σημείο ζέσεως, πολικότητα, ηλεκτρικό φορτίο, μέγεθος μορίων, κλπ.), οι οποίες διαφοροποιούν την φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις.
- Η κινητή φάση διερχόμενη μέσω της στατικής **μετατοπίζει τις διαφορετικές ουσίες με διαφορετικές ταχύτητες.**
- Τα συστατικά που **διαλύονται περισσότερο** στην κινητή φάση **διαπερνούν τη χρωματογραφική στήλη και εξέρχονται γρηγορότερα** από εκείνα που παραμένουν προσροφημένα περισσότερο χρόνο στη στατική φάση.

Ιστορική αναδρομή

- Ονομασία από τον Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett το 1906.



- Διαχωρισμός διαλυμάτων **φυτικών χρωστικών ουσιών**, τις οποίες διοχέτευσε σε **γυάλινους σωλήνες πληρωμένους με CaCO_3** . Καθώς το διάλυμα διέρχεται μέσα από τη στήλη του ανθρακικού ασβεστίου, τα συστατικά διαχωρίζονται δημιουργώντας **έγχρωμες ζώνες**. Έτσι προέκυψε ο όρος «χρωματογραφία».

Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών

1. Ως προς τη φύση της κινητής και της στατικής φάσης
2. Ως προς τη μορφή της στατικής φάσης
3. Ως προς τον μηχανισμό στον οποίο βασίζεται ο διαχωρισμός
4. Ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση και κινήσεως εντός αυτής.

Ταξινόμηση με βάση τη φύση της κινητής και της στατικής φάσης

- Υγρή χρωματογραφία (LC) αν η κινητή φάση είναι υγρή.
- Αέρια χρωματογραφία (GC) αν η κινητή φάση είναι αέρια.

Οι χρωματογραφίες LC και GC υποδιαιρούνται περαιτέρω ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης, η οποία μπορεί να είναι στερεή ή υγρή προσδεμένη σε στερεό αδρανές υπόστρωμα.

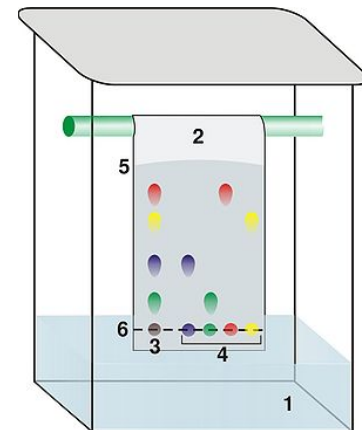
Έτσι διακρίνονται σε:

- Υγρή-στερεή χρωματογραφία (LSC)
- Υγρή-υγρή χρωματογραφία (LLC)
- Αέρια-στερεή χρωματογραφία (GSC)
- Αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC)

Ταξινόμηση με βάση τη φύση της στατικής φάσης

- **Χρωματογραφία στήλης** όπου η στατική φάση συγκρατείται σε μία στήλη μέσω της οποίας η κινητή φάση διαβιβάζεται με πίεση ή ρέει λόγω βαρύτητας. Υποδιαιρείται σε δύο κατηγορίες αναλόγως με τον τρόπο ακινητοποίησεως της στατικής φάσης:
 - **Χρωματογραφία πληρωμένων στηλών** όπου η στατική φάση αποτελείται από μικρά στερεά σωματίδια συχνά επικαλυμμένα από λεπτό υμένα υγρού.
 - **Χρωματογραφία τριχοειδών στηλών** όπου η υγρή στατική φάση διερχόμενη μέσα από τριχοειδή σωλήνα επικαλύπτει τα εσωτερικά του τοιχώματα ως λεπτός υμένας που συγκρατείται με τριχοειδείς δυνάμεις ή με χημικό δεσμό.

- **Επίπεδη χρωματογραφία.** Στην επίπεδη χρωματογραφία η κινητή φάση διέρχεται μέσω της στατικής με τη βοήθεια τριχοειδών δυνάμεων ή της βαρύτητας. Η χρωματογραφία αυτή αναλόγως με τη μορφή της στατικής φάσης υποδιαιρείται σε δύο κατηγορίες:
- **Χρωματογραφία χάρτου** όπου η στατική φάση είναι μια λωρίδα χάρτου από κυτταρίνη ειδικού μεγέθους πόρων.
 - **Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας** (Thin Layer Chromatography, TLC) όπου η στατική φάση είναι στιβάδα στερεού (συνήθως διοξείδιο του πυριτίου) επιστρωμένη σε γυάλινη ή αλουμινένια πλάκα.

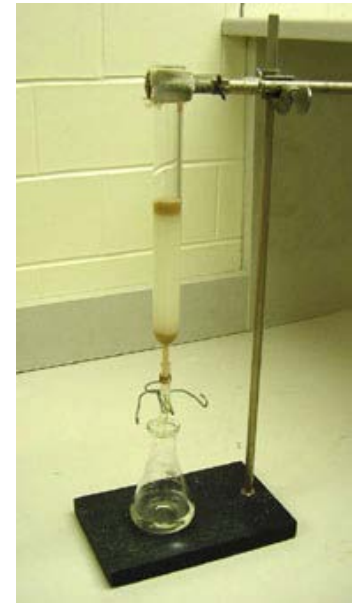


Χρωματογραφία υγρού – στερεού.

- Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν υλικά πλήρωσης είναι κυρίως οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3) και διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2), λόγω του μεγάλου λόγου εμβαδού επιφάνειας προς τον όγκο τους, και λόγω των χημικά ενεργών επιφανειών τους.

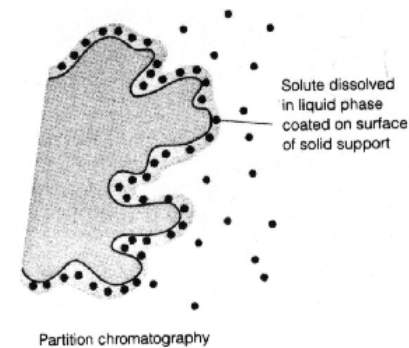
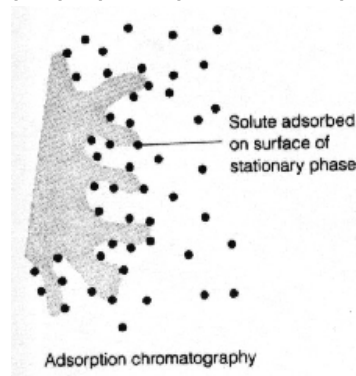
Υγρή χρωματογραφία ανοιχτής στήλης

- Η χρωματογραφία ανοιχτής στήλης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού όπου η στάσιμη φάση βρίσκεται σε γυάλινη στήλη. Το μίγμα εισάγεται εντός της πληρωμένης στήλης και κινείται κατά μήκος της διαλυμένο σε κατάλληλο διαλύτη που ονομάζεται κινητή φάση.



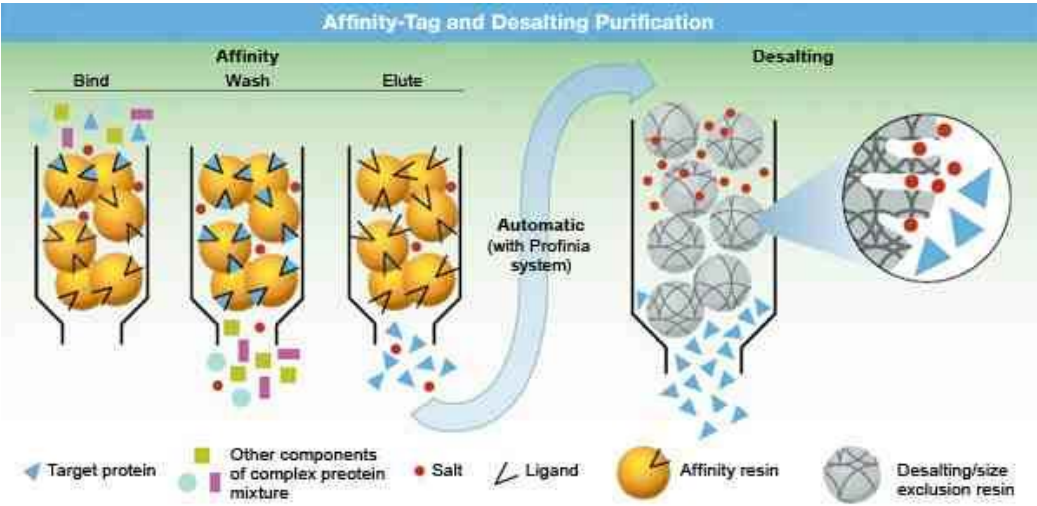
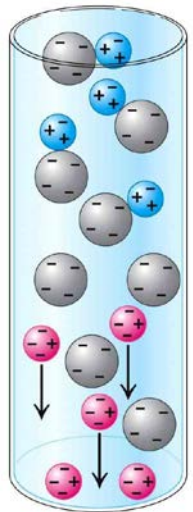
Ταξινόμηση με βάση τον μηχανισμό στον οποίο βασίζεται ο διαχωρισμός

- **Χρωματογραφία προσροφήσεως (Adsorption chromatography):** Τα προς διαχωρισμό συστατικά προσροφώνται στην επιφάνεια της στατικής φάσης (συνήθως στερεάς) με δυνάμεις μοριακής φύσης. Η ισορροπία που αποκαθίσταται μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων και των σωματιδίων που κατανέμονται στην υγρή ή αέρια κινητή φάση επιτυγχάνει το διαχωρισμό.



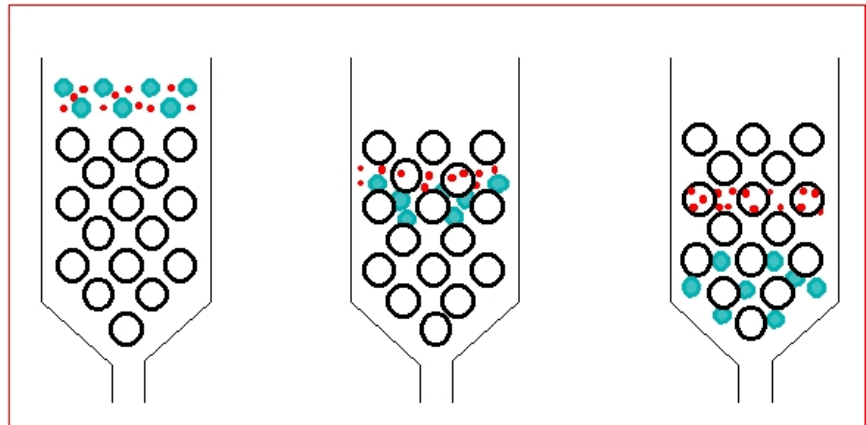
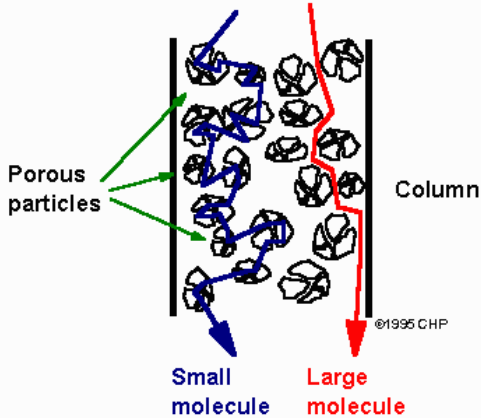
- **Χρωματογραφία κατανομής (Partition chromatography):** Τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται μέσω ισορροπίας μεταξύ λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσης που συγκρατείται στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος και μιας υγρής κινητής φάσης με βάση τη διαφορά στη διαλυτότητα. Αν η στατική φάση είναι πολικότερη της κινητής η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται **κανονικής φάσης ενώ στην αντίθετη περίπτωση αντιστρόφου φάσης**.

- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (ion-exchange chromatography):**
 Χρησιμοποιούνται ιονανταλλακτικές ρητίνες ή πηκτές ως στερεά στατική φάση. Τα ιοντισμένα συστατικά συγκρατούνται ηλεκτροστατικώς με δυνάμεις ιοντικής φύσεως, σε διαφορετικό βαθμό από τις αντιθέτου φορτίου ιοντικές ομάδες της στατικής φάσης.



- Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity chromatography):** Ο μηχανισμός βασίζεται στην εξαιρετικώς εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ενός μοριακού συστατικού του μίγματος με ένα μοριακό συστατικό το οποίο έχει χημικά δεσμευθεί στη στερεή στατική φάση.

- **Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (size exclusion chromatography):** Τα συστατικά διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους και **δεν** παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των προς διαχωρισμό συστατικών και της στατικής φάσης. Η υγρή ή αέρια κινητή φάση διέρχεται μέσα από πορώδη πηκτή, το μέγεθος των πόρων της οποίας είναι αρκετά μικρό ώστε να επιτρέπει την είσοδο από την πηκτή μόνο μορίων μικρού μεγέθους, αποκλείοντας τα μόρια μεγάλου μεγέθους. Τα μόρια μεγάλου μεγέθους διέρχονται ταχέως χωρίς να εισέρχονται στο δίκτυο της πηκτής ενώ τα μικρού μεγέθους μόρια εισαγόμενα στο δίκτυο της πηκτής καθυστερούν να εκλουσθούν απαιτώντας κατάλληλο όγκο κινητής φάσης. Άρα εκλούνται πρώτα τα μόρια μεγάλου μεγέθους.



Ταξινόμηση χρωματογραφίας με βάση τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση και κινήσεως εντός αυτής

Χρωματογραφία εκλουσεως: Τα συστατικά του μίγματος μεταφέρονται από την κινητή φάση με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στατικής οπότε εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους και διαχωρίζονται.

Χρωματογραφία εκτοπίσεως: Η κινητή φάση συγκρατείται ισχυρώς από τη στατική εκτοπίζοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό τα συστατικά του δείγματος.

Μηχανισμός Χρωματογραφίας εκλούσεως

Τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται με κάποιο μηχανισμό μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης.

Το κλάσμα κάθε συστατικού στη κινητή φάση μετακινείται από αυτή ερχόμενο σε επαφή με νέο τμήμα της στατικής φάσης οπότε συμβαίνει νέα κατανομή.

Παράλληλα το κλάσμα του συστατικού που παράμεινε στο αρχικό τμήμα της στατικής φάσης κατανέμεται σε νέα ποσότητα κινητής φάσης.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές με τη συνεχή διαβίβαση κινητής φάσης.

Τα συστατικά μετακινούνται μόνο όταν βρίσκονται στη κινητή φάση.

Ορισμοί χρωματογραφίας εκλούσεως

Υγρό ή αέριο εκλούσεως ονομάζεται η κινητή φάση

Έκλουσμα είναι το κάθε εξερχόμενο συστατικό από τη στήλη.

Έκλουση είναι η διαδικασία διαβίβασης της κινητής φάσης μέσω της στατικής, χαρακτηρίζεται δε ως γραμμική έκλουση αν γίνεται με σταθερή παροχή.

Χρόνος συγκρατήσεως ή ανασχέσεως (tR) ορίζεται ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος και της στιγμής που πρακτικά το συστατικό έχει εκλουσθεί στο μέγιστο της ποσότητάς του.

Όγκος συγκρατήσεως ή ανασχέσεως (VR) ορίζεται ο όγκος που απαιτείται να διέλθει για να εκλουσθεί ένα συστατικό στο μέγιστο της ποσότητάς του.

Ογκομετρική ταχύτητα ροής κινητής φάσης (F) είναι ο όγκος της κινητής φάσης που παρέχεται ανά μονάδα χρόνου.

Ισχύει $tR = VR / F$

Συντελεστής κατανομής K που εκφράζει τη φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού με τη στατική φάση. $K = C_{\text{στατική}} / C_{\text{κινητή}}$ όπου $C_{\text{στατική}}$ και $C_{\text{κινητή}}$ οι συγκεντρώσεις συστατικού σε στατική και κινητή φάση.

Κυριότερες παράμετροι στη χρωματογραφία

- **Συντελεστής συγκράτησης**

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

t_R : χρόνος συγκράτησης της ένωσης
 t_0 : νεκρός χρόνος

- **Συντελεστής εκλεκτικότητας**

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

- Παράγοντας ή συντελεστής επιβραδύνσεως (Rf) ορίζεται το **μέγεθος συγκρατήσεως συστατικού από τη στατική φάση**. Ισούται με το κλάσμα της μέσης ταχύτητας συστατικού στη χρωματογραφική στήλη ή πλάκα προς τη μέση ταχύτητα της κινητής φάσης. Δηλαδή ισχύει:

$$R_f = (L/t_R)/(L/t_M) = t_M/t_R = V_M/V_R \text{ όπου}$$

L το μήκος το χρωματογραφικής στήλης ή πλάκας

t_M χρόνος διευλεύσεως κινητής φάσης από στήλη ή πλάκα (νεκρός χρόνος) και

V_M όγκος κινητής φάσης στη στήλη

Θεωρία πλακών

- Η κίνηση κάθε συστατικού στη χρωματογραφική στήλη μπορεί να θεωρηθεί ως **μετακίνηση μέσω διαδοχικών θαλάμων εξισορροπήσεως** οι οποίοι λέγονται θεωρητικές πλάκες.
- Ως θεωρητική πλάκα ορίζεται ο **απαιτούμενος όγκος της στήλης ώστε εντός αυτού να αποκαθίσταται ισορροπία μεταξύ στατικής και κινητής φάσης.**
- Η ισορροπία αυτή περιγράφεται από τον **συντελεστή κατανομής K**, όπου

$$K = C_{\text{στατική}} / C_{\text{κινητή}}$$

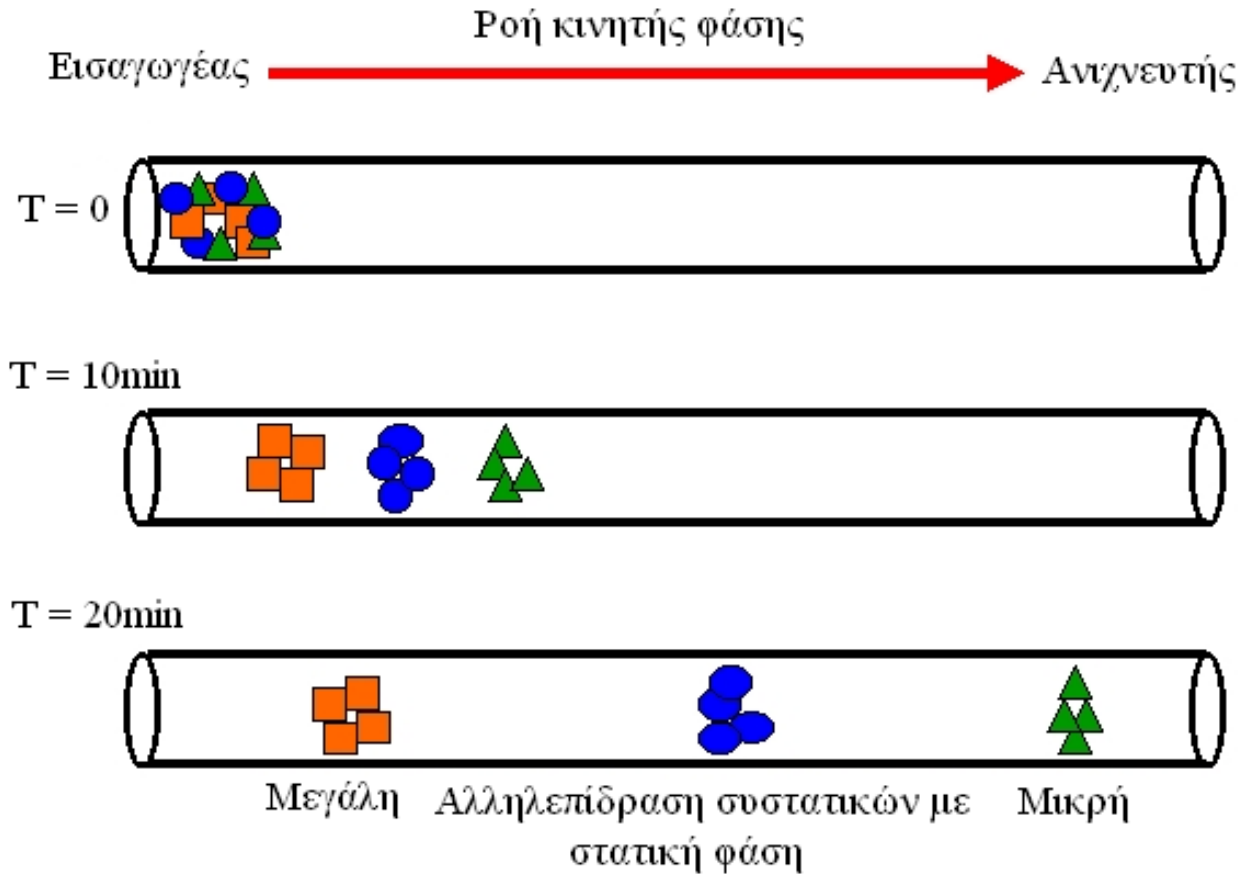
και εκφράζει τη φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού με τη στατική φάση.

- Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής **K** συστατικού τόσο **βραδύτερα κινείται** εντός της στήλης και τόσο **βραδύτερα εξέρχεται** από αυτήν με αύξηση του tR .
- Άρα όσο περισσότερο διαφέρουν οι συντελεστές κατανομής των συστατικών τόσο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται.
- Η αποτελεσματικότητα της στήλης εκφράζεται από την λεπτότητα της θεωρητικής πλάκας η οποία ορίζεται ως το **ισοδύναμο ύψος προς μία θεωρητική πλάκα** (ΥΙΘΠ), αντιστοιχεί δε σε ορισμένο μήκος της στήλης.

$$\text{ΥΙΘΠ} = h = L/n$$

όπου L το μήκος χρωματογραφικής στήλης και n ο αριθμός των θεωρητικών πλακών.

Δυνατότητα διαχωρισμού με βάση τον Κ



Θεωρητικές πλάκες

ΘΕΩΡΙΑ ΠΛΑΚΩΝ: Μια χρωματογραφική στήλη διαιρείται κατά μήκος αυτής σε διαχωριζόμενες ζώνες, κάθε δε ζώνη έχει τέτοιο μήκος ώστε εντός αυτής να υπάρχει ισορροπία (κατανομή) μεταξύ στατικής και κινητής φάσης.

Η ζώνη αυτή καλείται **ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ** και το μήκος αυτής **ΥΨΟΣ ΙΣΟΔΥΝΑΜΟ ΠΡΟΣ ΜΙΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ (ΥΙΘΠ)**

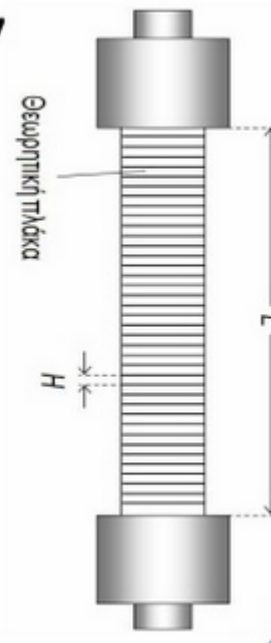
- Αριθμός θεωρητικών πλακών

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

W : εμβαδόν κορυφής (μονάδες χρόνου)

- Ύψος θεωρητικής πλάκας

$$H = \frac{L}{N}$$



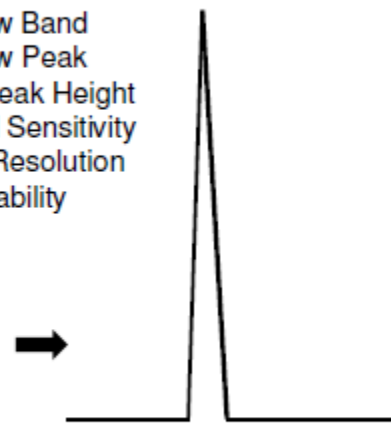
Less Plates

Broad Band – Broad Peak – Less Sensitivity
Less Resolution Capability



More Plates

Narrow Band
Narrow Peak
Greater Peak Height
Increased Sensitivity
More Resolution
Capability

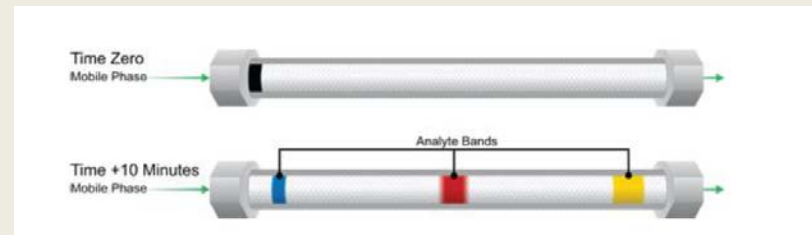


Same Peak Areas



Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

- Ο όρος HPLC εισήχθη από τον καθηγητή Csaba Horvath το 1970
- Αρχικά η μέθοδος αναφερόταν σαν Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης.
- Η υψηλή πίεση χρησιμοποιήθηκε για τη επίτευξη μεγαλύτερης ροής στις στήλες υγρής χρωματογραφίας με στόχο να μειωθεί ο χρόνος της διαδικασίας διαχωρισμού.
- Αρχικά 500 psi (35 bar). 1970 Νέα όργανα HPLC μπορούσαν να αναπτύξουν έως 6.000 psi (400 bar) πίεση.



HPLC

Από τα **πιο ισχυρά εργαλεία** στην αναλυτική χημεία με πολύ μεγάλο εύρος εφαρμογών.

Έχει τη δυνατότητα να **διαχωρίσει, να ανιχνεύσει και να προσδιορίσει ποσοτικά** το σύνολο των ενώσεων που υπάρχουν σε οποιοδήποτε δείγμα που μπορεί να διαλυθεί σε ένα υγρό.

Συγκεντρώσεις **μέχρι ppt**, μπορούν να προσδιοριστούν.

Η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποικίλα είδη δειγμάτων, όπως φαρμακευτικά προϊόντα, τρόφιμα, καλλυντικά, περιβαλλοντικά, ιατροδικαστικά δείγματα, βιομηχανικά χημικά προϊόντα και πετρελαϊκά μίγματα.

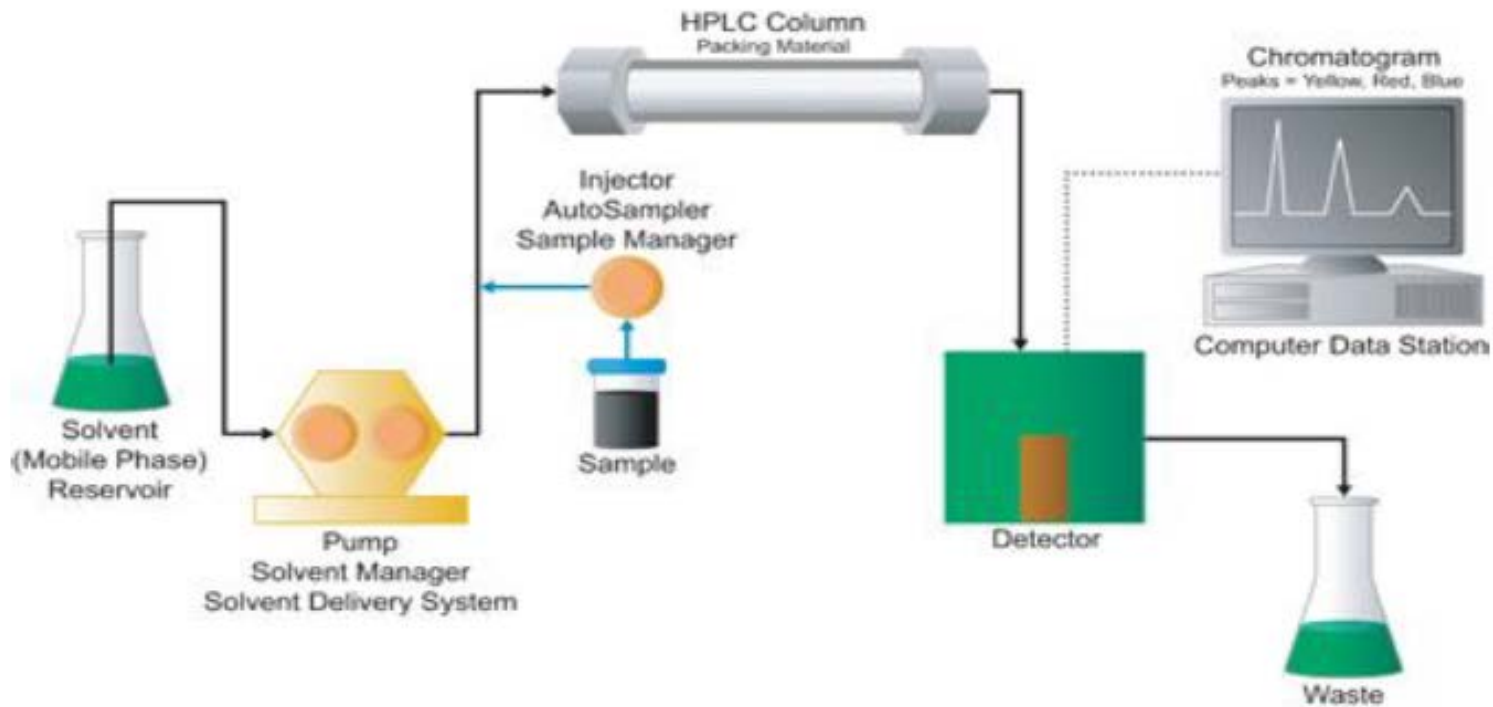
Αρχή Λειτουργίας HPLC

- Όμοια με αυτή της απλής χρωματογραφικής στήλης.
- Οι χρωματογραφικές στήλες για HPLC πληρώνονται με τόσο μικρά σωματίδια, που χρειάζονται μεγάλες πιέσεις για να δώσουν την επιθυμητή ταχύτητα ροής. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται αντλίες υψηλής πίεσης και βελτιωμένα συστήματα συνεχούς παροχής διαλύτη.
- Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με σύριγγα, και στη συνέχεια μεταφέρεται από το ρεύμα της κινητής φάσης μέσα στην στήλη.

Αρχή Λειτουργίας HPLC

- Ο εντοπισμός των διαχωρισμένων ενώσεων πλέον δεν μπορεί να γίνει με γυμνό μάτι, και για αυτό **χρησιμοποιούνται ανιχνευτές**. Ένας κατάλληλος ανιχνευτής έχει την ικανότητα να ανιχνεύει την παρουσία μιας ένωσης και να στείλει αντίστοιχο ηλεκτρικό σήμα σε ένα υπολογιστή.
- **Επιλογή μεταξύ πολλών διαφορετικών τύπων** ανιχνευτών, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά και τις συγκεντρώσεις των ενώσεων που πρέπει να διαχωριστούν και να αναλυθούν.
- Τελικά η **κινητή φάση εξέρχεται** από τον ανιχνευτή και μπορεί να αποσταλεί στα **απόβλητα**, ή να συλλεχθεί.

Διάγραμμα λειτουργίας HPLC



Είδη HPLC με βάση τον μηχανισμού διαχωρισμού

- **Χρωματογραφία Προσρόφησης**
 - Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης
 - Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης
- **Χρωματογραφία Κατανομής**
- **Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής**
- **Χρωματογραφία Συγγένειας**
- **Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους**

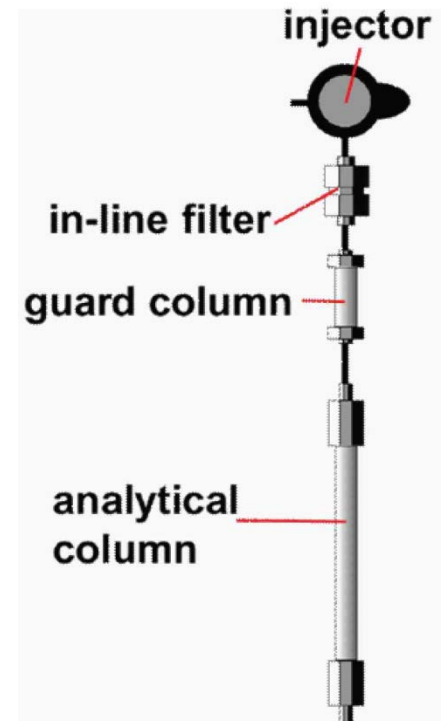
Τύποι στηλών και πληρωτικών

- **Τύποι στηλών:**

- αναλυτικές στήλες
- προστατευτικές στήλες

- **Τύποι σωματιδίων (πληρωτικών υλικών) :**

- Μικροπορώδη σωματίδια (διάμετρος πόρου 5-10 μ m)
- Μακροπορώδη σωματίδια (διαμέτρος πόρου >60 μ m)
- Υμενοειδή σωματίδια (διαμέτρου 35-45 μ m),
(αδρανείς πυρήνες καλυμμένοι με υμένα υγρής στατικής φάσης)



Στήλες στη βιομηχανία



Ανιχνευτές

- **Τύποι ανιχνευτών:**

- 1) Ορατού-υπεριώδους
- 2) Ηλεκτροχημικοί
- 3) Παράταξης φωτοδιόδων
- 4) Φθορισμομετρικοί
- 5) Αγωγιμομετρικοί
- 6) Ραδιενέργειας
- 7) Δείκτη διάθλασης
- 8) Σκεδασμού φωτός
- 9) Φασματογράφοι μάζας
- 10) Φλόγας

Ανιχνευτές υγρής χρωματογραφίας



UV-Vis



Light scattering



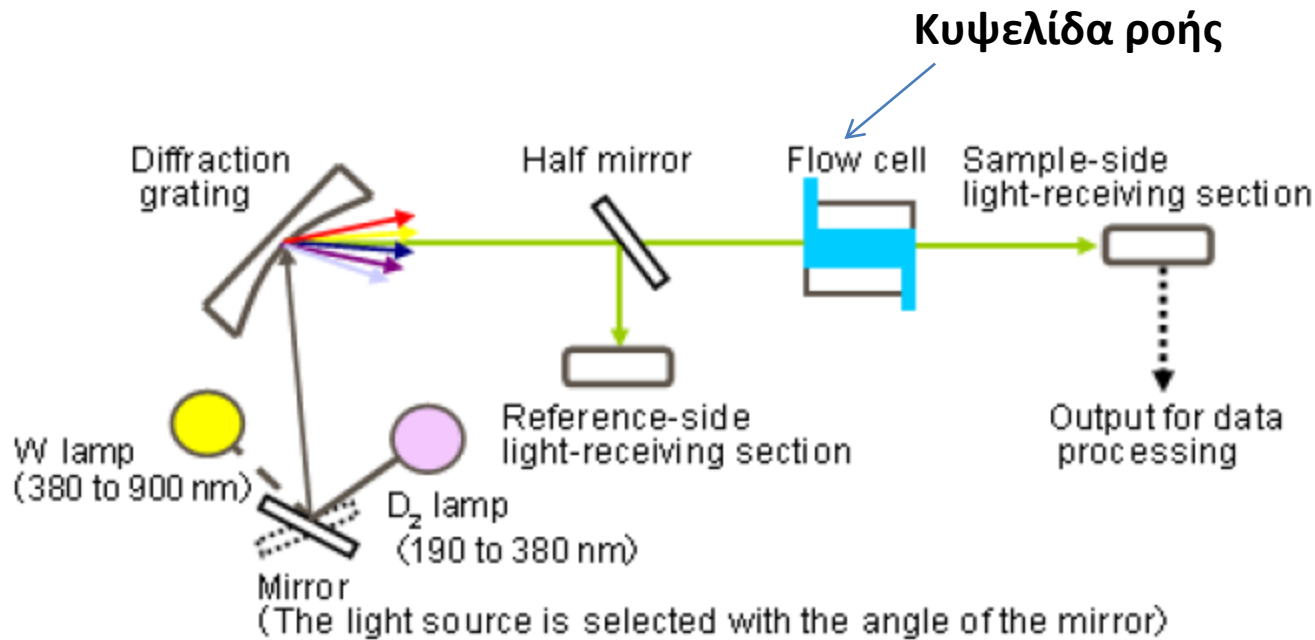
Diode array



RI

Ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV)

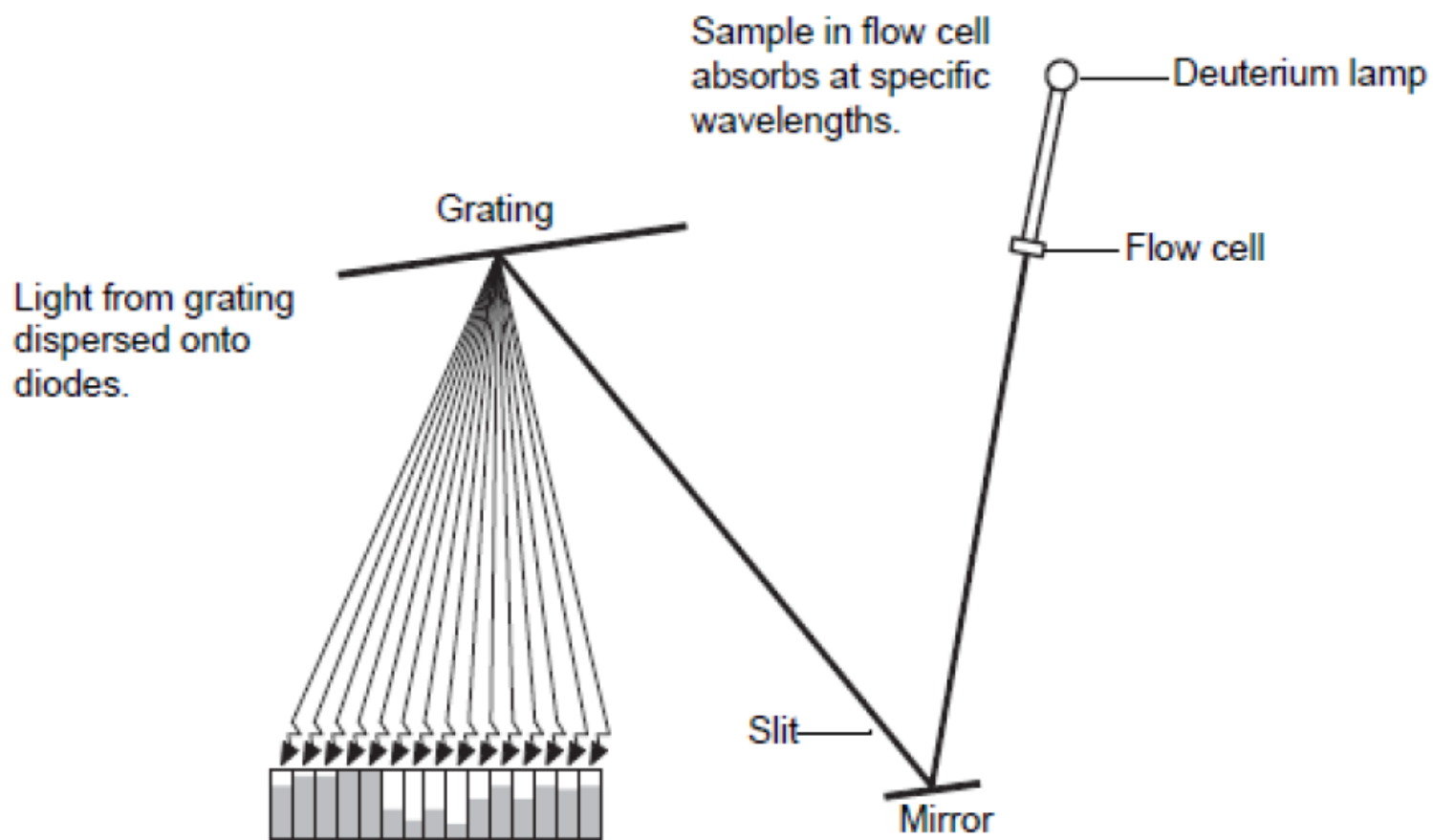
- Ανιχνευτής απορρόφησης. Πολύ συχνά χρησιμοποιημένος ανιχνευτής για την ανάλυση HPLC.
- Παρέχουν καλή ευαισθησία σε ενώσεις που απορροφούν το φως σε επίπεδο \sim pg.
- Είναι εύκολο να λειτουργήσουν και παρέχουν καλή σταθερότητα.
- Επιλέγεται ένα κατάλληλο μήκος κύματος με βάση τον τύπο του δείγματος μεταξύ 195 έως 370 nm. Αυτό που χρησιμοποιείται συνήθως είναι 254 nm γιατί είναι χαρακτηριστικό μήκος κύματος απορρόφησης των αρωματικών συστατικών.



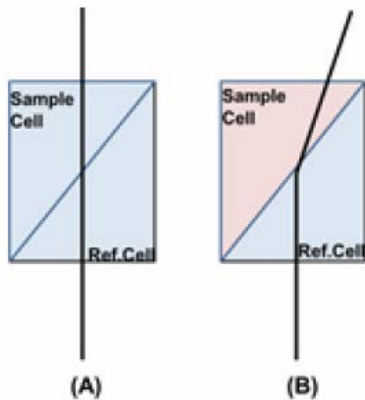
Κατά την ανάλυση, το δείγμα περνά μέσα από ένα καθαρό άχρωμο κελί από γυαλί, που ονομάζεται **κυψελίδα ροής**. Όταν υπεριώδες φως ακτινοβολείται διαμέσου της κυψελίδας ροής, το δείγμα απορροφά ένα μέρος του υπεριώδους φωτός. Έτσι, η ένταση του υπεριώδους φωτός για την κινητή φάση (χωρίς δείγμα) και στο έκλουσμα που περιέχει δείγμα διαφέρει. Με τη μέτρηση αυτής της διαφοράς, η συγκέντρωση της ένωσης στο δείγμα μπορεί να προσδιοριστεί.

Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode array- DAD)

- Εκτελεί φασματοσκοπικές σαρώσεις και ακριβείς αναγνώσεις απορρόφησης **σε μια σειρά από μήκη κύματος ταυτόχρονα.**
- Το φως προσπίπτει αρχικά σε ένα **φράγμα περίθλασης**, το οποίο χωρίζει και διαθλά το φως σε **δέσμες διαφόρων μήκων κύματος που ταξιδεύουν σε διαφορετικές κατευθύνσεις.** Η συστοιχία αποτελείται από 512 φωτοδιόδους, που η κάθε μία λειτουργεί σαν πυκνωτής και αρχικά περιέχει μια συγκεκριμένη ποσότητα ηλεκτρικού φορτίου. Το φως κάθε διαφορετικού μήκους κύματος προσπίπτει στις φωτοδιόδους και αποφορτίζει το ηλεκτρικό φορτίο τους.
- Το μέγεθος της αποφόρτισης είναι ανάλογο της ποσότητας του φωτός που προσπίπτει. Ο ανιχνευτής μετρά την ποσότητα ηλεκτρικού φορτίου που χρειάζεται για να ξαναφορτίσει την φωτοδίοδο, και υπολογίζεται η απορρόφηση του φωτός, σε όλα τα μήκη κύματος ταυτόχρονα.



Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (RI) 1



- Μετράει την **αλλαγή στο δείκτη διάθλασης** στο διάλυμα που περιέχει το δείγμα έναντι του καθαρού διαλύτη.
- Ένα γυάλινο κελί χωρίζεται σε δύο θαλάμους. Το εξερχόμενο ρευστό από τη ροή της στήλης περνά στο «**θάλαμο δείγματος**», ενώ ο «**θάλαμος αναφοράς**» είναι γεμάτος μόνο με κινητή φάση.

Όταν ο θάλαμος του δείγματος γεμίζει με την κινητή φάση και η δέσμη ακτινοβολίας προσπίπτει πάνω στα 2 κελιά η προσπίπτουσα δέσμη θα παραμείνει σε ευθεία. Όταν ο θάλαμος του δείγματος γεμίζει με διάλυμα που περιέχει και άλλα συστατικά εκτός από την κινητή φάση, η προσπίπτουσα δέσμη θα καμφθεί. Αυτό συμβαίνει λόγω της διαφοράς στο δείκτη διάθλασης μεταξύ των δύο διαλυμάτων των 2 κελιών. Με τη μέτρηση αυτής της αλλαγής, μπορούν να ταυτοποιηθούν τα συστατικά.

Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (RI) 2

- Βασικό πλεονέκτημα: σε σχέση με τον ανιχνευτή UV, είναι κατάλληλος για την ανίχνευση όλων των συστατικών.

Για παράδειγμα, τα δείγματα τα οποία δεν έχουν απορρόφηση UV, όπως η ζάχαρη, η αλκοόλη, οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες δεν μπορούν να εντοπισθούν με ένα UV ανιχνευτή.

Βήματα ανάλυσης HPLC

Επιλογή ανιχνευτή

Επιλογή στήλης

Επιλογή συστήματος διαλυτών (καθαρότητα LC-MS, έλεγχος φίλτρων διαλυτών)

Επιλογή προγράμματος έκλουσης

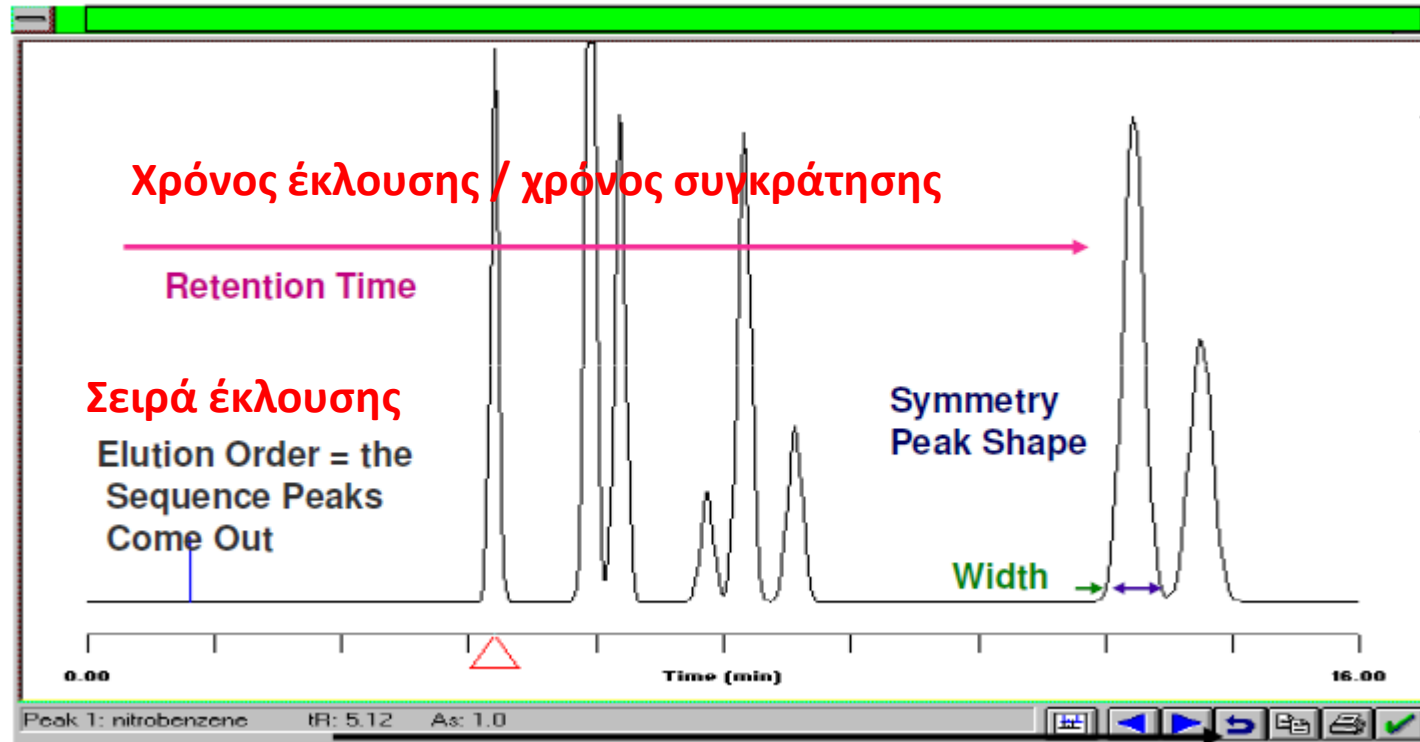
Σταθεροποίηση στήλης (conditioning, πίεση με συγκεκριμένη ροή, έλεγχος πιθανών διαρροών, κτλ)

Προεπεξεργασία δειγμάτων (διάλυση, φίλτρο καθαρισμού)

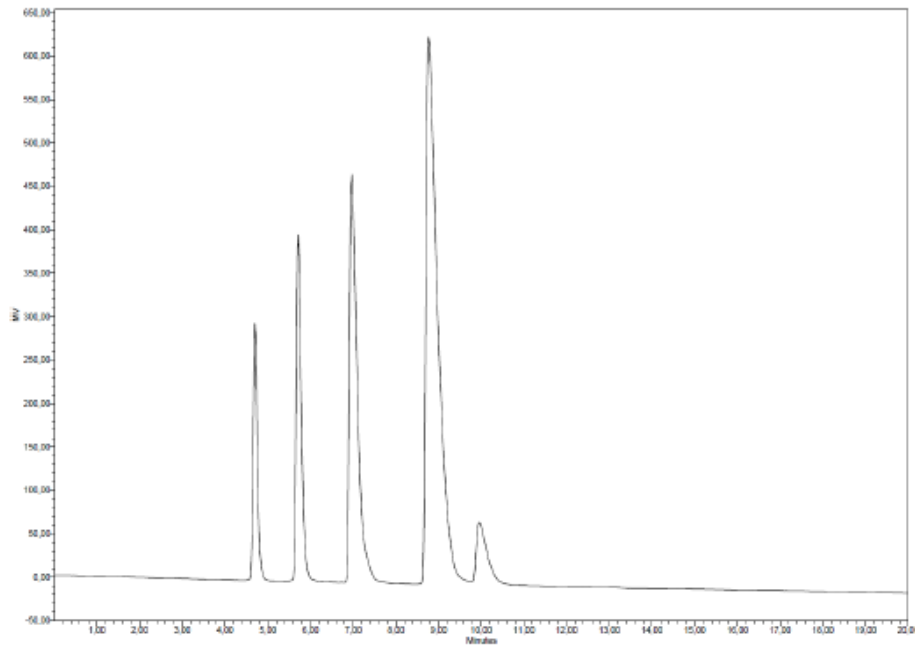
Επιλογή εισερχόμενου όγκου

Βελτιστοποίηση συνθηκών με βάση το χρωματογράφημα

Χρωματογράφημα



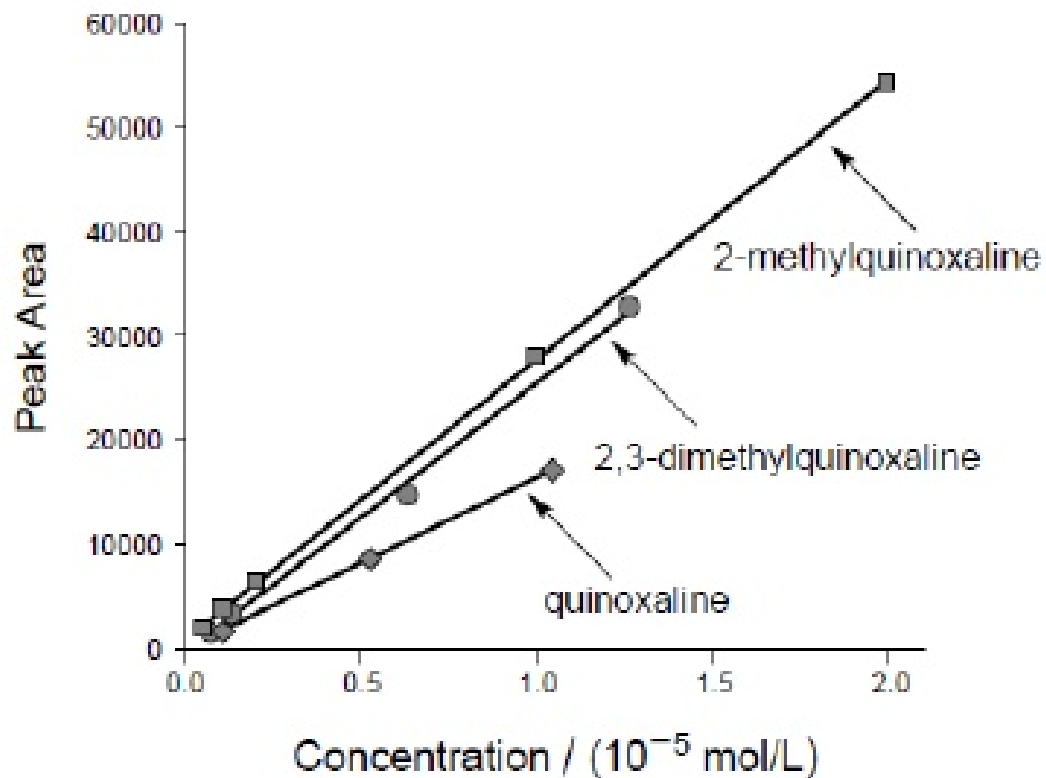
Χρωματογράφημα



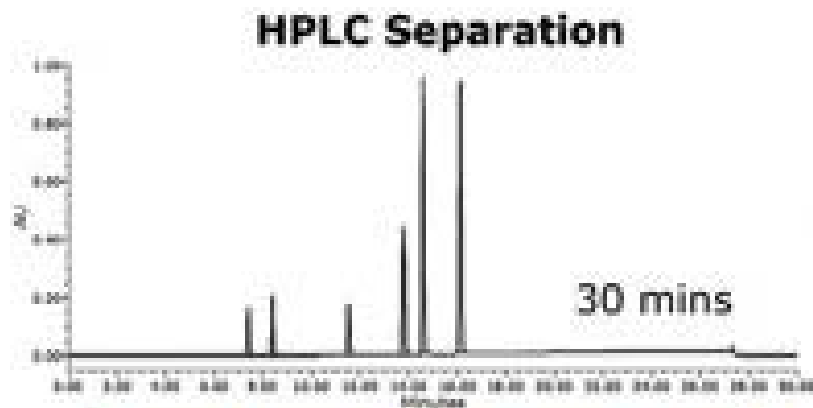
Εικόνα 16 Χρωματογράφημα καθαρών συστατικών σε ανιχνευτή RI

- 1: κυκλοεξάνιο, κορεσμένος υδρογονάνθρακας,
- 2: ορθοξυλόλιο, μονοαρωματικός υδρογονάνθρακας,
3. μεθυλναφθαλένιο, διαρωματικός υδρογονάνθρακας,
4. διβενζοθειοφένιο, χαρακτηριστική θειοένωση του πετρελαίου
5. φαινανθρένιο, τριαρωματικός υδρογονάνθρακας.

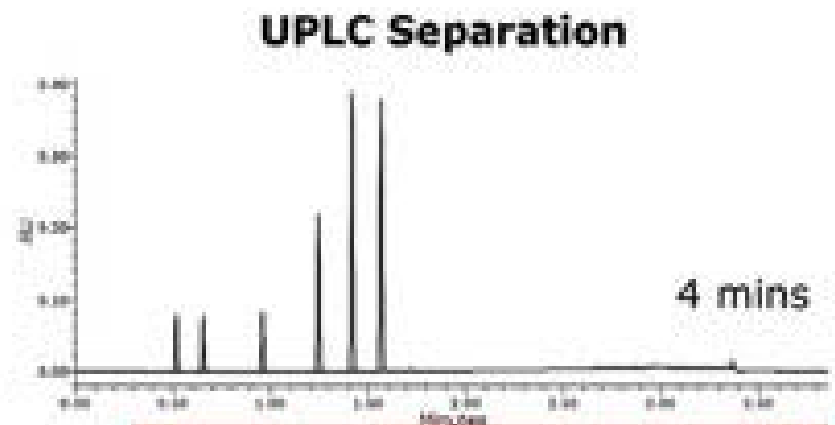
Πρότυπες καμπύλες αναφοράς



UPLC VS HPLC



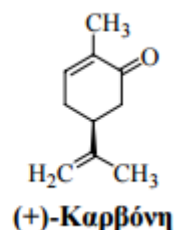
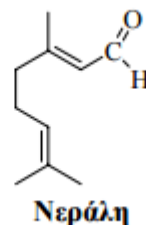
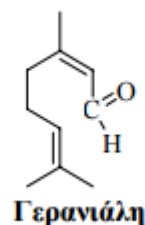
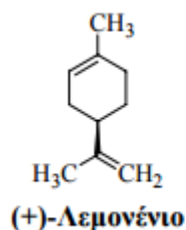
Typical Column Volume = 2.49 mL



Typical Column Volume = 0.17 mL

HPLC		UPLC Reduction	UPLC	
Run Time	30 min.	87%	Run Time	3.86 min.
Solvent Consumed	30 mL	83%	Solvent Consumed	4.97 mL
Sample Consumed	20 μ L	93%	Sample Consumed	1.0 μ L

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ & ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΙΘΕΡΙΩΝ ΕΛΑΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)



Πειραματική πορεία

Σε ογκομετρικές φιάλες των 10 ml ετοιμάζονται τα δείγματα **A, B, Γ, Δ, X & Ψ**. Το δείγμα **A** περιέχει 150 μl S(-)-Λεμονενίου σε 10 ml MeOH, το δείγμα **B** 150 μl R(+)-Λεμονενίου σε 10 ml MeOH, το δείγμα **Γ** 25 μl R(-) Καρβόνης σε 10 ml MeOH, το δείγμα **Δ** 20 μl Κιτράλης σε 10 ml MeOH, το δείγμα **X** αιθέριο έλαιο από περικάρπιο λεμονιού και το δείγμα **Ψ** αιθέριο έλαιο καρπού κάρου.

50 μl από κάθε διάλυμα εισάγεται στη στήλη του χρωματογράφου και χρωματογραφείται ακολουθώντας τις παρακάτω χρωματογραφικές συνθήκες:

Αναλυτική στήλη: C₁₈ Nucleosil, 150 x 4.6 mm, 5 μm

Σύστημα: έκλυσης: σύστημα διαλυτών μεταβαλλόμενης σύστασης CH₃CN/H₂O (από 25% CH₃CN έως 45% CH₃CN για 5 min, από 45% CH₃CN έως 100% CH₃CN για 25 min, από 100% CH₃CN έως 100% CH₃CN για 2 min και από 100% CH₃CN έως 25% CH₃CN για 5 min) σε 0,05% CF₃COOH/H₂O

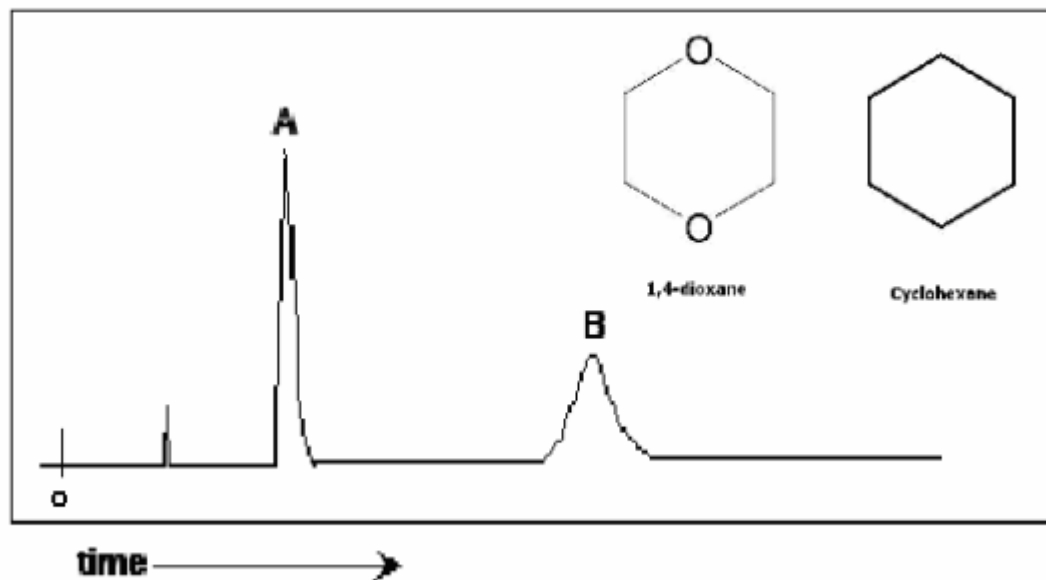
Ταχύτητα ροής: 1ml/min

Ανιχνευτής: UV/Vis (215 nm, 230 nm, 254 nm)

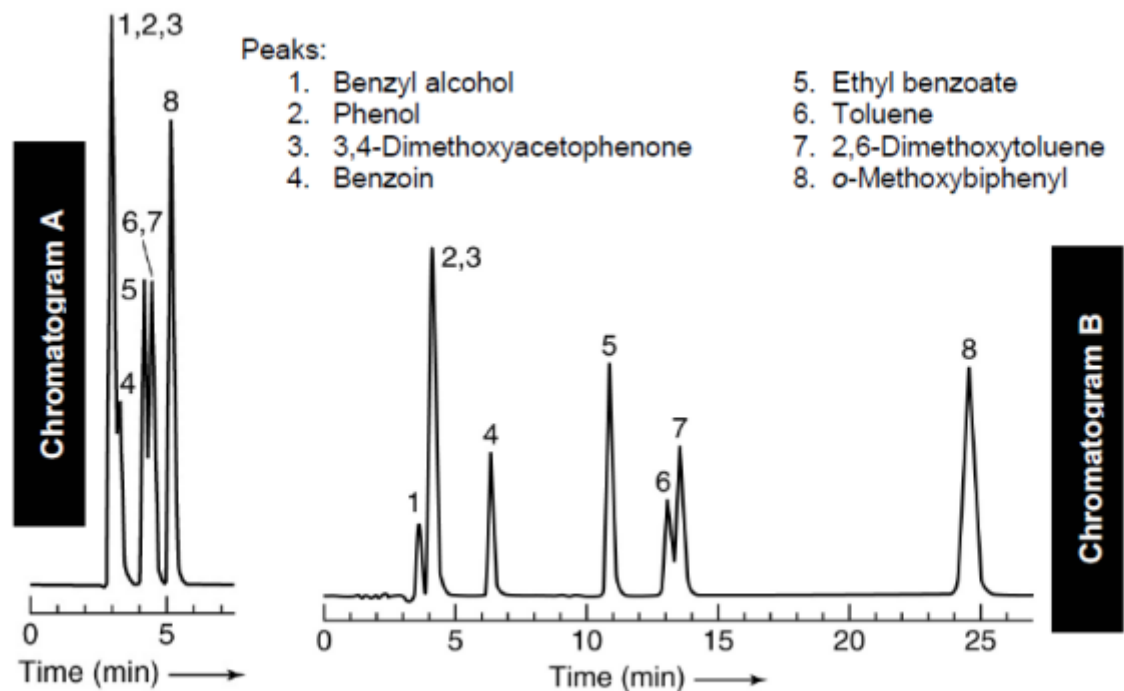
Οι χρόνοι συγκράτησης (t_R) για τις ενώσεις **A, B, Γ** και **Δ** για το παραπάνω χρωματογραφικό σύστημα είναι αντίστοιχα:

$t_{RA} = 27.20$ min, $t_{RB} = 27.12$ min, $t_{R\Gamma} = 15.93$ min, $t_{R\Delta} = 20.60$ min

1. Use the following gas chromatogram of a mixture of dioxane and cyclohexane eluted on a non-polar column to answer the following two questions.



- What is the identity of the substance labeled peak A? Explain how you deduced this.
- The area measured for peak A is 2 cm^2 and the area measured for peak B is 3 cm^2 . Assuming that the detector response is the same for both substances, calculate the mol% of A in the mixture.



These chromatograms were recorded using reverse phase HPLC.

- Give an example of a mobile phase that might be used for this type of separation (i.e. reverse phase).
- Give an example of a detector that might be used for these compounds.

Βιβλιογραφικές παραπομπές

- How Does High Performance Liquid Chromatography Work, Waters
- <http://www.sigmaaldrich.com/video/analytical/hplc-fundamentals-intro.html>
- [http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/Tips and Tricks HPLC Troubleshooting.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/Tips%20and%20Tricks%20HPLC%20Troubleshooting.pdf)