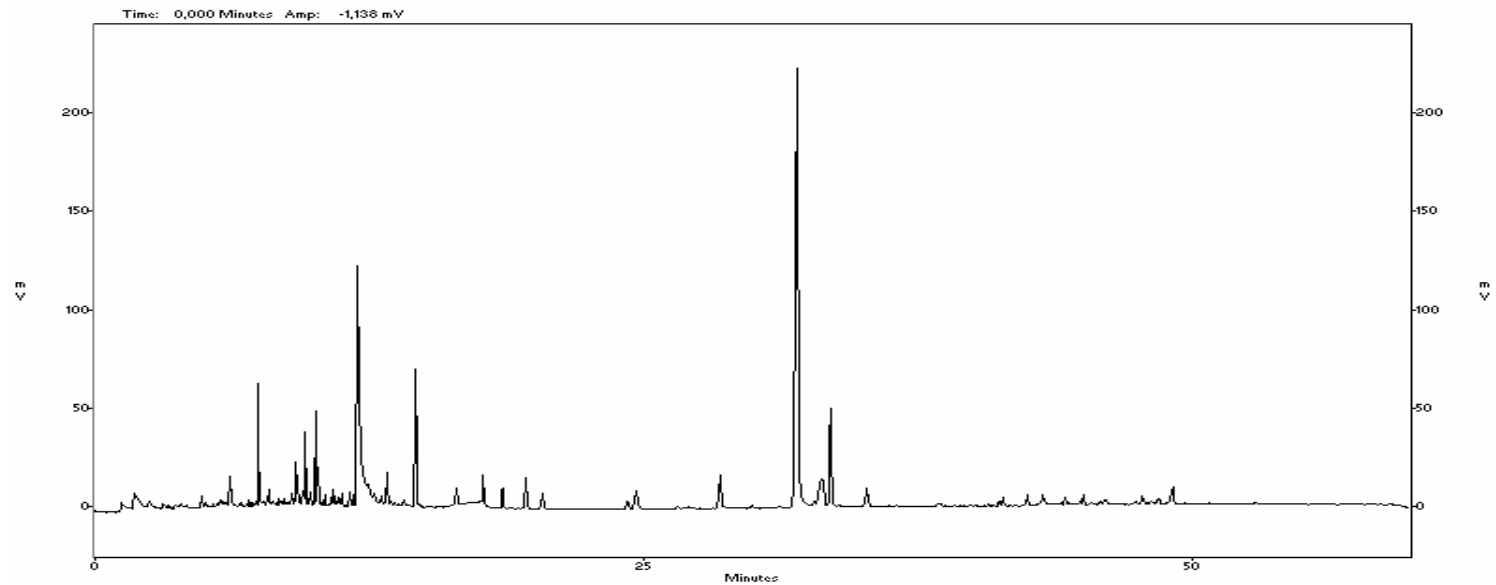


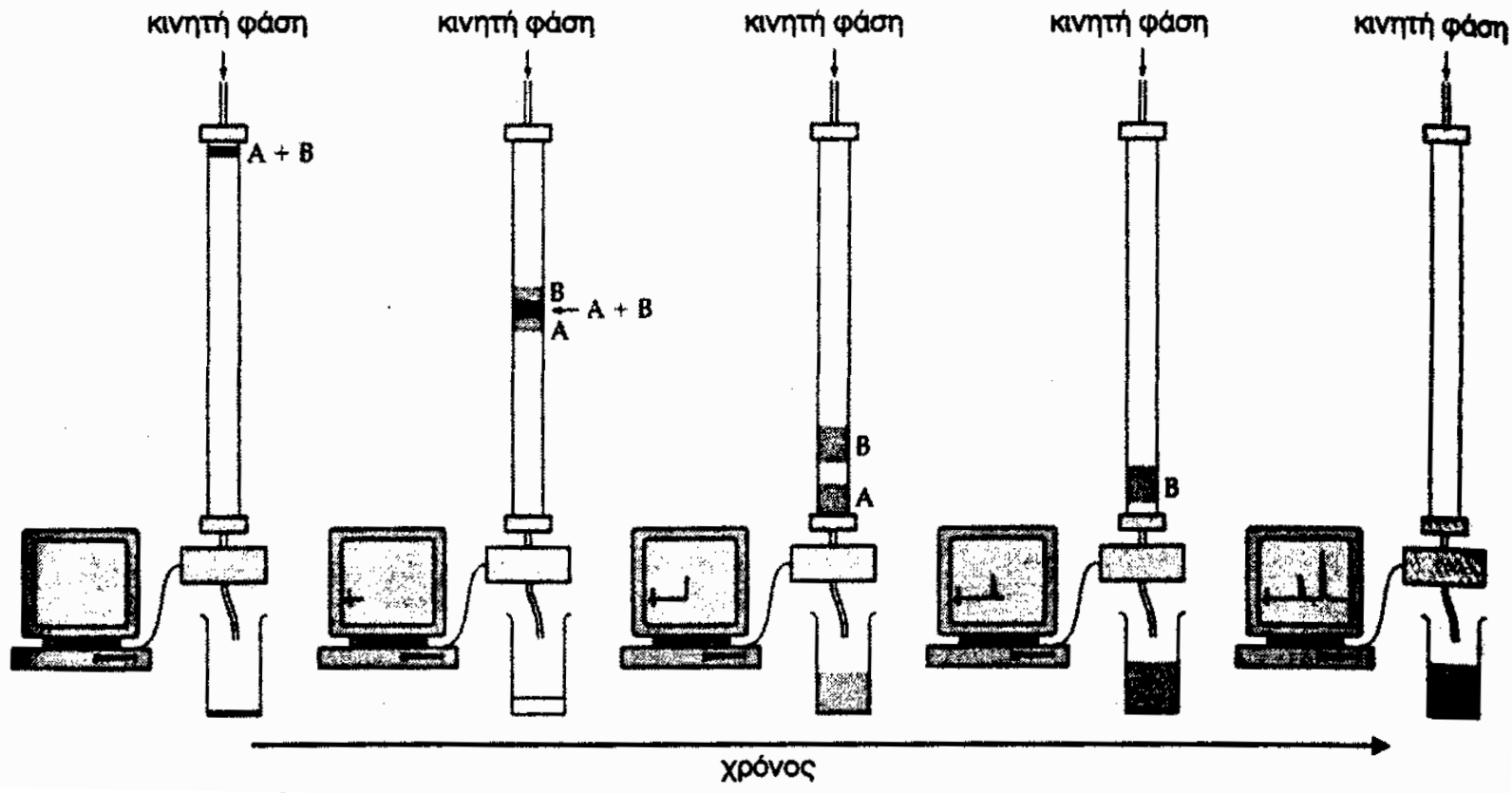
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ



**Με τον όρο χρωματογραφία
εννοούμε ένα πλήθος τεχνικών
διαχωρισμού που βασίζονται στη
διαφορετική κατανομή των
συστατικών ενός μίγματος μεταξύ
μια κινητής και μιας στατικής φάσης**

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- Μέθοδοι **Διαχωρισμού**
- Καλύπτουν την ανάγκη **ανάλυσης μιγμάτων**
- Στηρίζονται στη **διαφορετική κατανομή** των συστατικών του μίγματος σε ένα σύστημα κινητής και ακίνητης φάσης. Αποτέλεσμα αυτού είναι άλλα συστατικά να κατακρατούνται περισσότερο και άλλα λιγότερο χρόνο.



- Κινητή φάση **αέρια** → αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)
- Κινητή φάση **υγρή** → υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)
- Κινητή φάση αέρια σε υπερκρίσιμη κατάσταση (CO_2 στους 50° και πίεση μεγαλύτερη 15mPa) → υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία (superficial fluid chromatography, SFC).

- Η στατική φάση μπορεί να είναι:
- **Στερεή** → αέρια στερεή χρωματογραφία (GSC) και υγρή στερεή χρωματογραφία (LSC).
- **Υγρή** μηχανικά ή χημικά συνδεδεμένη σε στερεό υπόστρωμα → αέρια υγρή χρωματογραφία (GLC) και υγρή, υγρή χρωματογραφία (LLC).

- Όλες οι χρωματογραφικές μέθοδοι συνδυάζονται με συστήματα ανίχνευσης των συστατικών που εκλύονται (φασματοφωτόμετρα, MS, ECD, NPD, FPD κ.α.) για την ολοκλήρωσή τους ως τεχνικές ανάλυσης.

Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού

- 1. Χρωματογραφία Προσρόφησης** (adsorption), όταν ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική προσρόφηση των συστατικών του δείγματος στην επιφάνεια της ακίνητης φάσης που είναι συνήθως το διοξείδιο του πυριτίου (σίλικα). Η ισορροπία που αποκαθίσταται μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων και των σωματιδίων στη κινητή φάση, πετυχαίνει τον διαχωρισμό.

Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού

2. **Χρωματογραφία Κατανομής** (partition ή absorption), τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται μεταξύ λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσεως, που σχηματίζεται στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος και της υγρής κινητής φάσεως. Εάν η υγρή στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή φάση, πρόκειται για χρωματογραφία **κανονικής φάσεως**, ενώ στην αντίθετη περίπτωση έχουμε χρωματογραφία **αντίστροφης φάσεως** (**reversed phase chromatography**).

Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού

- 3. Χρωματογραφία ιόντων** (ion chromatography), όπου τα ιόντα του δείγματος εναλλάσσονται με τα ιόντα της στατικής φάσης.
- 4. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού** (molecular exclusion chromatography), όπου τα μόρια του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους, με τα μεγάλα μόρια να εξέρχονται πρώτα. Αντίθετα, τα μικρά μόρια 'περιπλανώνται' στους πόρους του πληρωτικού υλικού και συγκρατούνται περισσότερο.
- 5. Χρωματογραφία συγγένειας** (affinity chromatography), βασίζεται στην εξαιρετικά εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ενός μορίου του μείγματος με ένα μόριο που έχει χημικά δεσμευτεί στην στατική φάση.

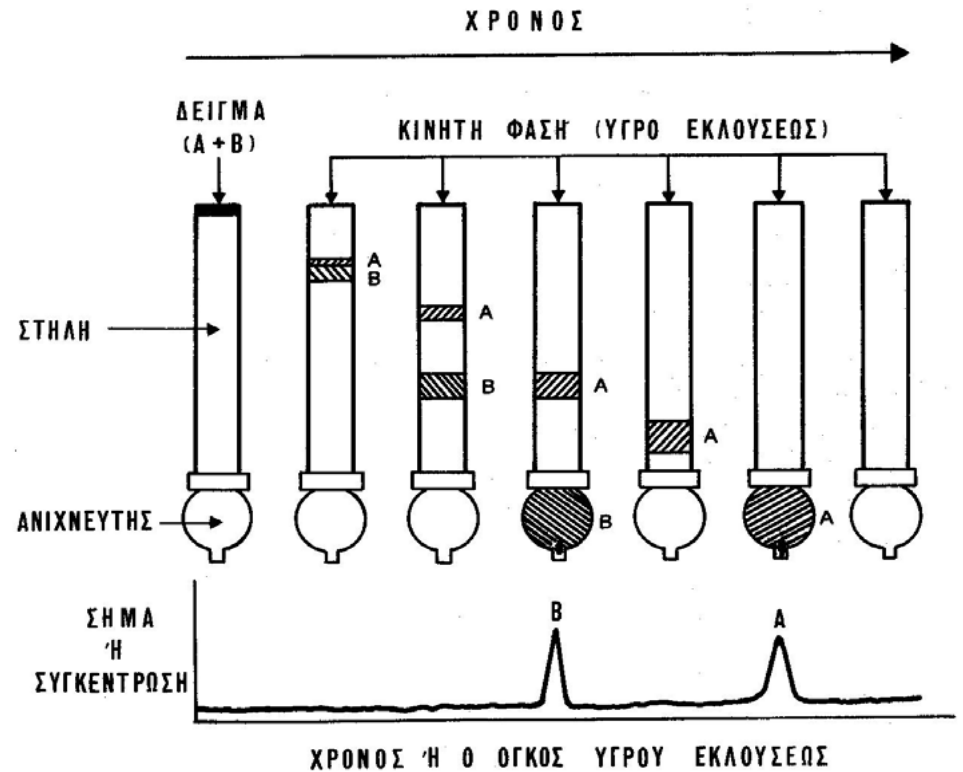
- Με βάση τη διάταξη της ακίνητης φάσης, η χρωματογραφία διακρίνεται σε:
 - **Χρωματογραφία στήλης** όπου η ακίνητη φάση συγκρατείται σε κυλινδρική στήλη μέσα από την οποία η κινητή φάση διαβιβάζεται με πίεση ή ρέει λόγω βαρύτητας.
 - **Επίπεδη Χρωματογραφία**, όπου η ακίνητη φάση είναι σε επίπεδο (χρωματογραφία χάρτου PC και λεπτής στιβάδος TLC)
- Διαχωρισμοί με **αέρια** χρωματογραφία, μπορούν να πραγματοποιηθούν **μόνο σε στήλη**, ενώ με **υγρή**, σε **στήλη, χαρτί ή λεπτή στιβάδα**.

Με βάση τον τρόπο εισαγωγής και κίνησης του δείγματος η χρωματογραφία διακρίνεται σε:

- **Μετωπική**, όπου το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στη στήλη συνεχώς και ο διαλύτης δρα και ως κινητή φάση.
- **Εκτοπίσεως**, όπου χρησιμοποιείται κινητή φάση η οποία συγκρατείται ισχυρώς από τη στατική φάση, εκτοπίζοντας έτσι σε διάφορο βαθμό τα συστατικά του δείγματος μέσα από τη στήλη.
- **Εκλούσεως** (elution chromatography), όπου τα συστατικά του δείγματος μεταφέρονται από την κινητή φάση με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στατικής φάσης, οπότε εξέρχονται σε διαφορετικούς χρόνους.

Βασική αρχή και ορολογία Χρωματογραφίας εκλούσεως

- Προσθήκη δείγματος
- Κατανομή συστατικών μεταξύ στατικής και κινητής φάσης.
- Το κλάσμα κάθε συστατικού που βρίσκεται στην κινητή φάση μετακινείται στη στήλη, έρχεται σε επαφή με νέο τμήμα της στατικής φάσης οπότε και έχουμε νέα κατανομή.
- Το κλάσμα που βρισκόταν στη στατική φάση, έρχεται σε επαφή με την κινητή φάση οπότε και έχουμε νέα κατανομή.
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται καθώς διαβιβάζεται νέα κινητή φάση



Σχηματική παράσταση διαχωρισμού με χρωματογραφία εκλούσεως

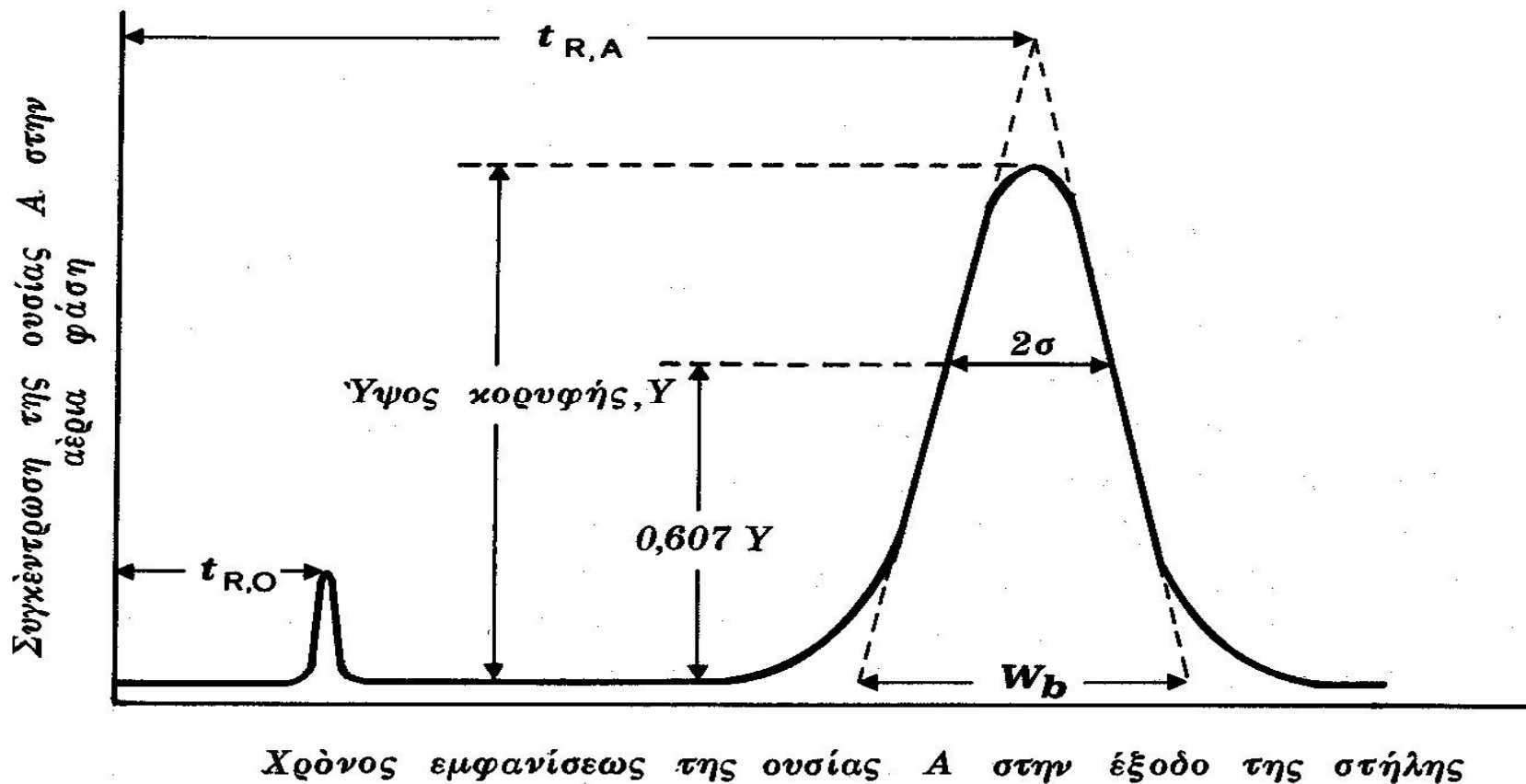
Τα συστατικά μετακινούνται μόνο όταν βρίσκονται στην κινητή φάση με ταχύτητα η οποία εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής του σε αυτή, αυτό είναι συνάρτηση του συντελεστή κατανομής τους στις δυο φάσεις.

- Η βάση της χρωματογραφίας εκλούσεως είναι η κατανομή των συστατικών του μείγματος μεταξύ κινητής και στατικής φάσης που περιγράφεται με τον **συντελεστή κατανομής K**

$$K = \frac{C_s}{C_M}$$

- Η κινητή φάση (υγρό ή αέριο) ονομάζεται **εκλουστικό**
- Το διάλυμα που εξέρχεται από τη στήλη **έκλουσμα**
- Η διαδικασία ονομάζεται έκλουση και αν η παροχή κινητής φάσης γίνεται με σταθερή ταχύτητα γραμμική έκλουση.
- Στο τέλος της στήλης τοποθετείται ανιχνευτής που παρακολουθεί μια αναλυτική ιδιότητα και παράγει σήμα κάθε φορά που εκλούεται ένα συστατικό (**χρωματογραφική κορυφή**)
- Το διάγραμμα του σήματος συναρτήσει του όγκου ή του χρόνου ονομάζεται **χρωματογράφημα**.
- Τα χρωματογραφήματα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ



- Ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για να εκλουσθεί μια ουσία στο μέγιστο της συγκεντρώσεως της ονομάζεται **όγκος συγκρατήσεως ή ανασχέσεως V_R**
- Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ εισαγωγής του δείγματος και εμφάνισης του μεγίστου της κορυφής του ονομάζεται **χρόνος συγκρατήσεως ή ανασχέσεως t_R**
- **F** = ογκομετρική ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (μονάδα όγκου /μονάδα χρόνου)

$$t_R = \frac{V_R}{F}$$

- Το μέγεθος της συγκρατήσεως μιας ουσίας εκφράζεται από τον **λόγο συγκρατήσεως ή επιβραδύνσεως R_F** (retention ratio)

$$R_F = \frac{\text{μέση ταχύτητα ουσίας στη στήλη}}{\text{μέση ταχύτητα υγρού εκλούσεως}}$$

Οι όγκοι και χρόνοι που απαιτούνται για να διέλθουν το υγρό έκλουσης και η ουσία από τη στήλη είναι αντιστρόφως ανάλογοι των μέσων ταχυτήτων τους.

$$R_F = \frac{L / t_R}{L / t_M} = \frac{t_M}{t_R} = \frac{V_M}{V_R}$$

L = μήκος της στήλης, t_M = χρόνος διελεύσεως της στατικής φάσης (νεκρός χρόνος)
 V_M = όγκος της κινητής φάσης στη στήλη (νεκρός όγκος)

- Επειδή όμως η ουσία μετακινείται μόνο όταν βρίσκεται στη κινητή φάση, ο λόγος των ταχυτήτων R_F ισούται με το κλάσμα του χρόνου που η ουσία βρίσκεται στην κινητή φάση, το οποίο ισούται με το μοριακό κλάσμα της ουσίας στην ίδια φάση.

$$R_F = \frac{\text{ποσότητα ουσίας στη κινητή φάση}}{\text{ολική ποσότητα ουσίας}} = \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S}$$

V_S = όγκος στατικής φάσης

Διαιρώντας με C_M και λαμβάνοντας υπόψη την εξίσωση: $R_F = \frac{V_M}{V_R}$

$$R_F = \frac{V_M}{V_M + K V_S} = \frac{V_M}{V_S} \quad V_R = V_M + K V_S$$

Για στήλη με δεδομένες τιμές V_M και V_S ο βαθμός διαχωρισμού εξαρτάται από τις τιμές του K .

Παράδειγμα

- Να υπολογισθεί η διαφορά στους όγκους συγκρατήσεως δύο ουσιών, εάν η στήλη περιέχει 2,5 ml στατικής φάσης και έχει νεκρό όγκο 4,2 ml. Οι συντελεστές κατανομής για τις ουσίες είναι 14,7 και 8,32 αντίστοιχα.

$$V_R = V_M + KV_S$$

$$V_{R,A} = 4,2 + (14,7)(2,5) = 40,95 \text{ ml}$$

$$V_{R,B} = 4,2 + (8,32)(2,5) = 25 \text{ ml}$$

$$\Delta V_R = 40,95 - 25 = 15,95 \text{ ml}$$

ΘΕΩΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΛΗΣ-ΘΕΩΡΙΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

Κατά τη έκλουση συμβαίνουν 2 ενδιαφέρουσες διαδικασίες:

- Τα συστατικά του μείγματος μετακινούνται στη στήλη με διαφορετική ταχύτητα
- Τα μόρια κάθε συστατικού διασπείρονται από μια λεπτή ζώνη σε μια πιο ευρύτερη
- Η πρώτη προκαλεί τον διαχωρισμό, η δεύτερη τείνει να τα κρατήσει αναμειγμένα.
- Για να επιτευχθεί διαχωρισμός πρέπει τα συστατικά να μετακινούνται χωριστά ταχύτερα απ' ότι διαπλάτυνονται.
- **Μια χρωματογραφική στήλη είναι τόσο αποτελεσματικότερη, όσο μικρότερη διαπλάτυνση προκαλεί για δεδομένο όγκο συγκρατήσεως.**

- Μια θεωρία που συνδυάζει τη διεύρυνση με τη μετακίνηση είναι η **θεωρία των πλακών** όπου η κίνηση μιας ουσίας θεωρείται σαν μετακίνηση μέσω διαδοχικών θαλάμων (ζωνών) εξισορροπήσεως που ονομάζονται **Θεωρητικές πλάκες**.
- Η **θεωρητική πλάκα** είναι μια φανταστική έννοια και **ισοδυναμεί** με τον **απαιτούμενο όγκο της στήλης**, ώστε μέσα σ' αυτόν να αποκαθίσταται **ισορροπία μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης**.
- Η αποτελεσματικότητα της στήλης χαρακτηρίζεται από την λεπτότητα μιας θεωρητικής πλάκας ή το **ύψος ισοδύναμο με μια θεωρητική πλάκα (ΥΙΘΠ)**.

$$ΥΙΘΠ = h = L / n$$

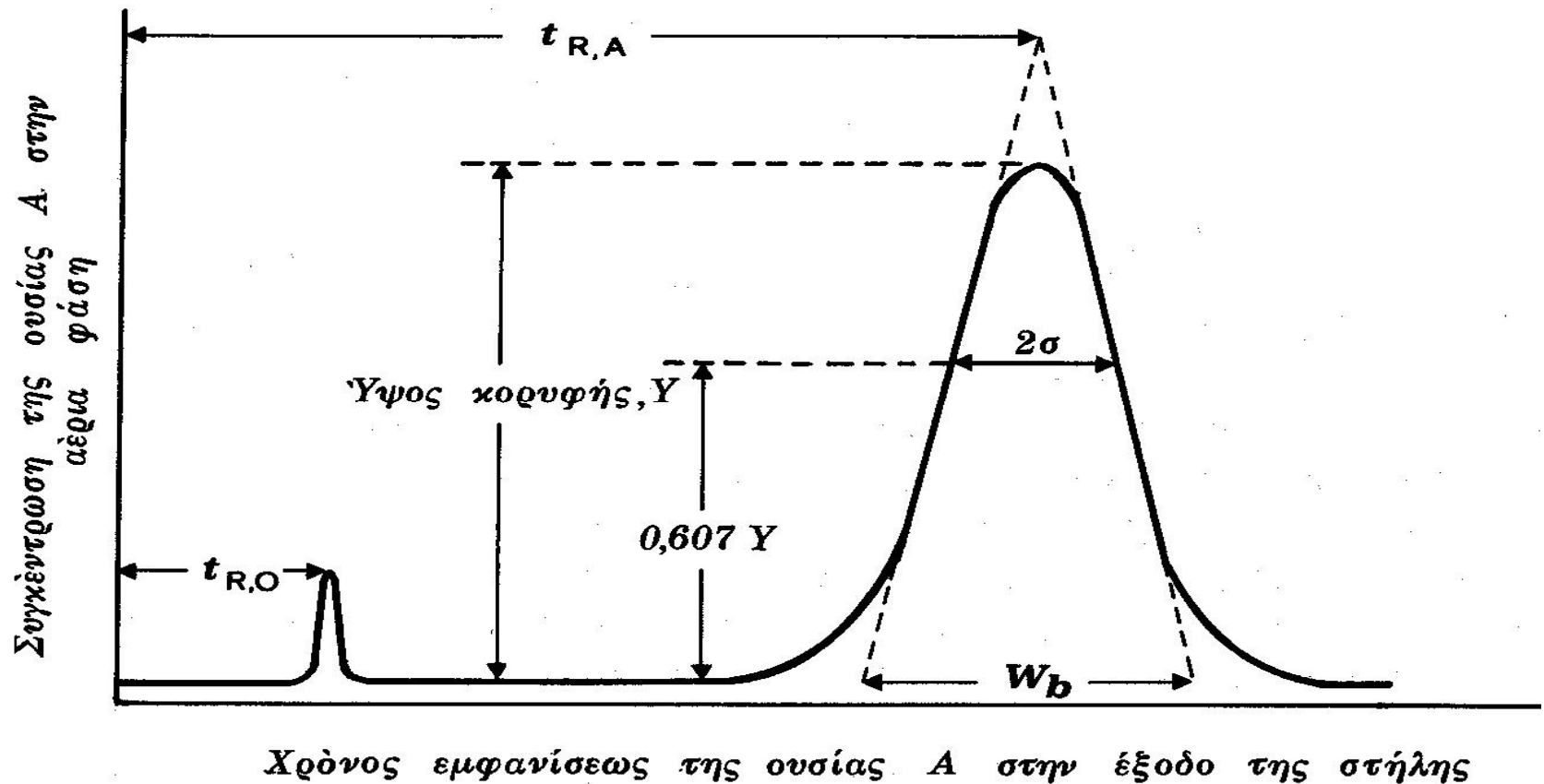
n = αριθμός θεωρητικών πλακών

Στη θεωρία πλακών

Ο συντελεστής **K** είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση

Η ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων αποκαθίσταται ταχύτατα

Έτσι η συγκέντρωση της ουσίας στη κινητή φάση ακολουθεί κατανομή κατά Gauss



$$n = 16(t_{R,A} / w_b)^2 = 16(V_{R,A} / w_b)^2$$

- Όσο μεγαλύτερος είναι ο n τόσο στενότερες είναι οι κορυφές και τόσο αποτελεσματικότερη είναι η στήλη.
- Ο αριθμός θεωρητικών πλακών είναι καθαρός αριθμός, το ΥΙΘΠ έχει μονάδες μήκους και οι όροι $t_{R,A}$, $V_{R,A}$, και w_b μετρούνται στις ίδιες μονάδες.
- Συνήθως οι στήλες συμπεριφέρονται σαν να έχουν διαφορετικό αριθμό πλακών για διαφορετικά συστατικά του μείγματος.

Διεύρυνση Κορυφών – Θεωρία Ταχύτητας.

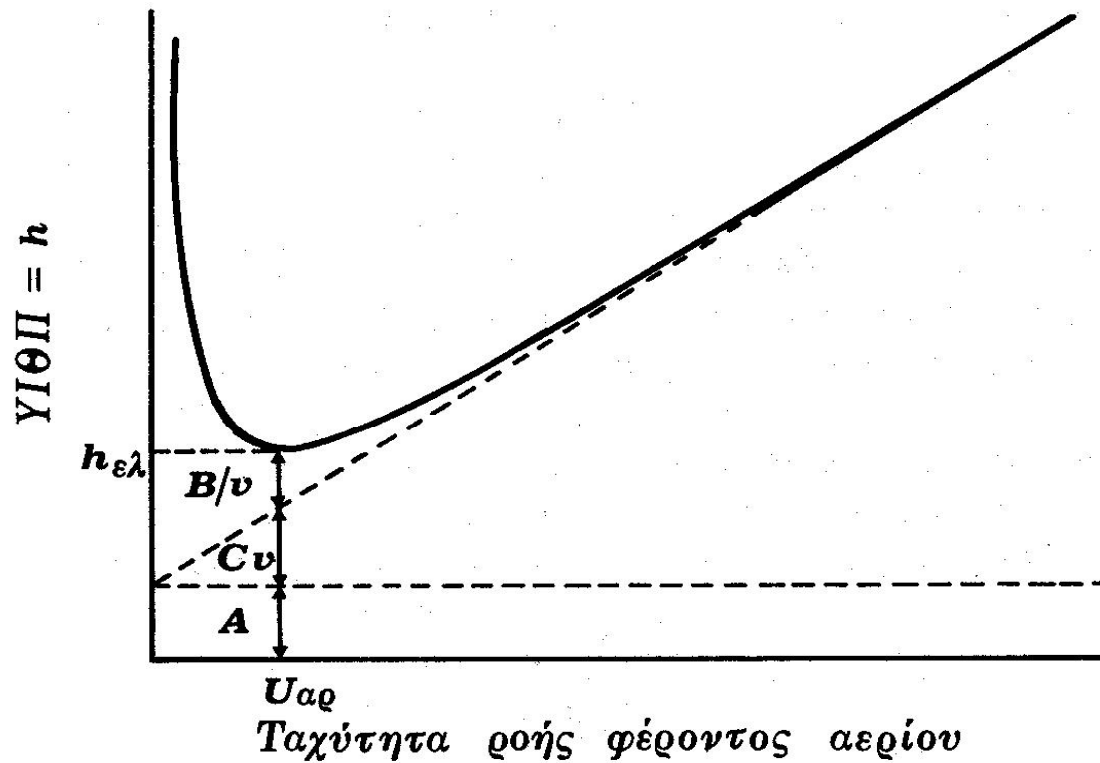
- Η θεωρία πλακών δεν επεξηγεί την επίδρασή της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης και διαφόρων χαρακτηριστικών της στήλης στο εύρος της κορυφής και επομένως στις παραμέτρους **n** και **h**.
- Η επίδραση της ταχύτητας της κινητής φάσης **u** στις παραμέτρους **n** και **h** περιγράφεται από την εξίσωση **van Deemter**

$$h = A + \frac{B}{u} + Cu$$

A, **B** και **C** = σταθερές μιας ορισμένης στήλης και εξαρτώνται από το υλικό πληρώσεως και από τη φύση της στατικής και κινητής φάσης της στήλης.

$$h = A + \frac{B}{u} + Cu$$

- **A** αντιπροσωπεύει τη **στροβιλώδη διάχυση** και είναι ανεξάρτητος της ταχύτητας. Αποτελεί μέτρο της διεύρυνσης μια κορυφής. Τα μόρια μιας ουσίας δεν διατρέχουν την ίδια απόσταση λόγω της ανομοιομορφίας του πληρωτικού υλικού. Όσο μικρότερη είναι η διάμετρος των σωματιδίων τόσο μικρότεροι είναι οι όροι **A** και **h**.
- **B/u** αντιπροσωπεύει τη **διαμήκη διάχυση** και εξαρτάται από τον συντελεστή διαχύσεως (ιξώδες, θερμοκρασία). Η **διαμήκη διάχυση** αυξάνεται με τον χρόνο και επομένως η **διεύρυνση κορυφής αυξάνεται με τη μείωση της ταχύτητας**.
- **Cu** σχετίζεται α) με την **αντίσταση μεταφοράς μάζας** στη στήλη η οποία εμποδίζει την ακαριαία αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων β) με την **εγκάρσια διάχυση** μέσα στην κινητή φάση από τον ένα θάλαμο στον άλλο. Η διεύρυνση της κορυφής μειώνεται, άρα η αποτελεσματικότητα αυξάνεται, με οτιδήποτε αυξάνει την ταχύτητα αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων (θερμοκρασία ιξώδες κλπ).



Γραφική παράσταση της εξισώσεως van Deemter (17-14) για την αέρια χρωματογραφία, που δείχνει τη συμβολή καθενός όρου, ως συνάρτηση της ταχύτητας του φέροντος αερίου.

- Υπάρχει μια άριστη τιμή ταχύτητας: $u_{\alpha\rho} = \sqrt{B/C}$

στην οποία αντιστοιχεί μια ελάχιστη τιμή του $h_{\epsilon\lambda} = A + 2\sqrt{BC}$

Οι τιμές των A, B και C, προσδιορίζονται είτε γραφικώς, είτε

- Λαμβάνεται μια κορυφή σε 3 διαφορετικές ταχύτητες ροής
- Υπολογίζεται η τιμή n από τον τύπο:

$$n = 5,54(t_{R,A} / w_{1/2})^2 = 5,54(V_{R,A} / w_{1/2})^2$$

-Η τιμή h από $h = L / n$

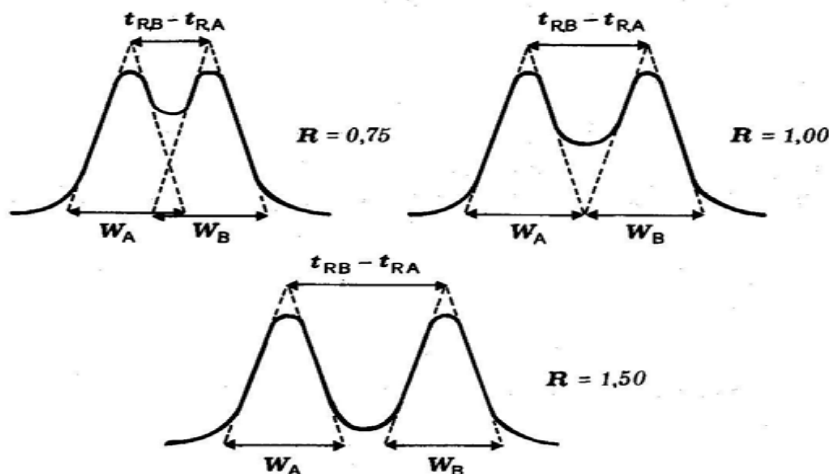
Αντικαθιστούμε τις τιμές u και h στην εξίσωση $h = A + \frac{B}{u} + Cu$

-Λύνουμε το σύστημα

Διαχωριστικότητα ή Διαχωριστική Ικανότητα

- Ο βαθμός διαχωρισμού 2 ουσιών φαίνεται από τον βαθμό αλληλοεπικάλυψης των κορυφών τους. Η διαχωριστική ικανότητα **R** ορίζεται από τη σχέση:

$$R = \frac{\Delta t_R}{4\sigma} = \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{0,5(w_A + w_B)} = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{w_A + w_B}$$



Δύο ισοϋψείς κορυφές για τρεις τιμές της διαχωριστικότητας **R**. Οι διακεκομμένες γραμμές είναι οι τριγωνικές προσεγγίσεις των χωριστών κορυφών.

Ο διαχωρισμός είναι πλήρης για $R \geq 1,5$

- Η ανωτέρω σχέση ορίζει τη διαχωριστικότητα με βάση πειραματικά δεδομένα. Αποδεικνύεται ότι εξαρτάται από τον αριθμό θεωρητικών πλακών.

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \left(\frac{a-1}{a}\right) \left(\frac{k'_B}{1+k'_B}\right)$$

$\alpha = K_B/K_A$ (K = συντελεστής κατανομής)

N = αποτελεσματικός αριθμός πλακών (στην πραγματικότητα $N = (N_A + N_B)/2$).

k'_B = παράγοντας χωρητικότητας ή λόγος κατανομής μάζας της ουσίας B (γραμμομόρια στη στατική φάση προς γραμμομόρια στη κινητή)

$$K' = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M}$$

- Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών μπορεί να αυξηθεί:
 - Αύξηση του μήκους της στήλης
 - Ρύθμιση ταχύτητας ροής πλησίον $u_{αρ}$
 - Αλλαγή των παραμέτρων της στήλης για τη μείωση των A, B και C

Οι όροι α και κ , είναι θερμοδυναμικές ιδιότητες και αλλάζουν με τη χρήση διαφορετικών στατικών και κινητών φάσεων και με τη θερμοκρασία.

Υπάρχουν και άλλες σχέσεις για την επίλυση προβλημάτων των χρωματογραφικών τεχνικών

$$t_R = t_M (1 + k')$$

- t_m = νεκρός χρόνος (για ουσία που δεν επιδρά με την κινητή φάση $k'=0$)
- με αφαίρεση του νεκρού χρόνου λαμβάνεται ο προσαρμοσμένος ή ανηγμένος χρόνος

$$t'_R = t_R - t_M \quad \underline{\text{ομοίως}} \quad V'_R = V_R - V_M$$

Υπάρχουν και άλλες σχέσεις για την επίλυση προβλημάτων των χρωματογραφικών τεχνικών

- Σχετική ανάσχεση ή παράγοντας διαχωριστικότητας α ή $r_{B/A}$ είναι ο λόγος των ανηγμένων χρόνων ή όγκων συγκρατήσεως της ουσίας **A** και μιας ουσίας αναφοράς **B**

$$a=r_{B/A}=(t'_{R,B}/t'_{R,A})=(V_{R,B}/V_{R,A})=K_B/K_A$$

εάν στις σχέσεις $n = 16(t'_{R,A} / w_b)^2 = 16(V_{R,A} / w_b)^2$

χρησιμοποιηθεί ο ανηγμένος χρόνος ή όγκος υπολογίζεται με αυτές ο **αποτελεσματικός αριθμός πλακών N**

Η σχέση μεταξύ n και **N**

$$N = n \left(\frac{k'}{1 + k'} \right)^2$$

Παράδειγμα 1

- Οι χρόνοι συγκρατήσεως δυο ουσιών A και B είναι $t_{R,A} = 14,80$ και $t_{R,B} = 16,14$ min. Το μήκος της στήλης $L = 40$ cm. Τα εύρη $w_A = 1,28$ και $w_B = 1,40$ cm. Να υπολογισθούν α) Μέσος αριθμός θεωρητικών πλακών β) Η διαχωριστικότητα γ) το ύψος ισοδύναμο με μια Θεωρητική πλάκα δ) Το μήκος της στήλης ώστε η διαχωριστικότητα να είναι 1,50

Παράδειγμα 2

- Ποια χρωματογραφική στήλη είναι η αποτελεσματικότερη και γιατί:
 - α) Αυτή που έχει $h = 0.3\text{mm}$ ή αυτή που έχει $h=0.2\text{mm}$
 - β) Αυτή που έχει $n = 20000$ ή αυτή που έχει $n = 10000$
 - γ) αυτή που έχει $H = 0.5$ ή $H = 0.2$
 - δ) αυτή που έχει $N = 30.000$ ή $N = 15.000$

Παράδειγμα 3

- Τα παρακάτω στοιχεία αφορούν την ανάλυση του αιθέριου ελαίου του λεμονιού με αέρια χρωματογραφία(GC).

Ουσία	t_R (min)	w (min)
Λεμονένιο	8,36	0,96
γ-τερπένιο	9,54	0,64

Να υπολογιστεί η διαχωριστικότητα R των κορυφών λεμονενίου και γ-τερπενίου.