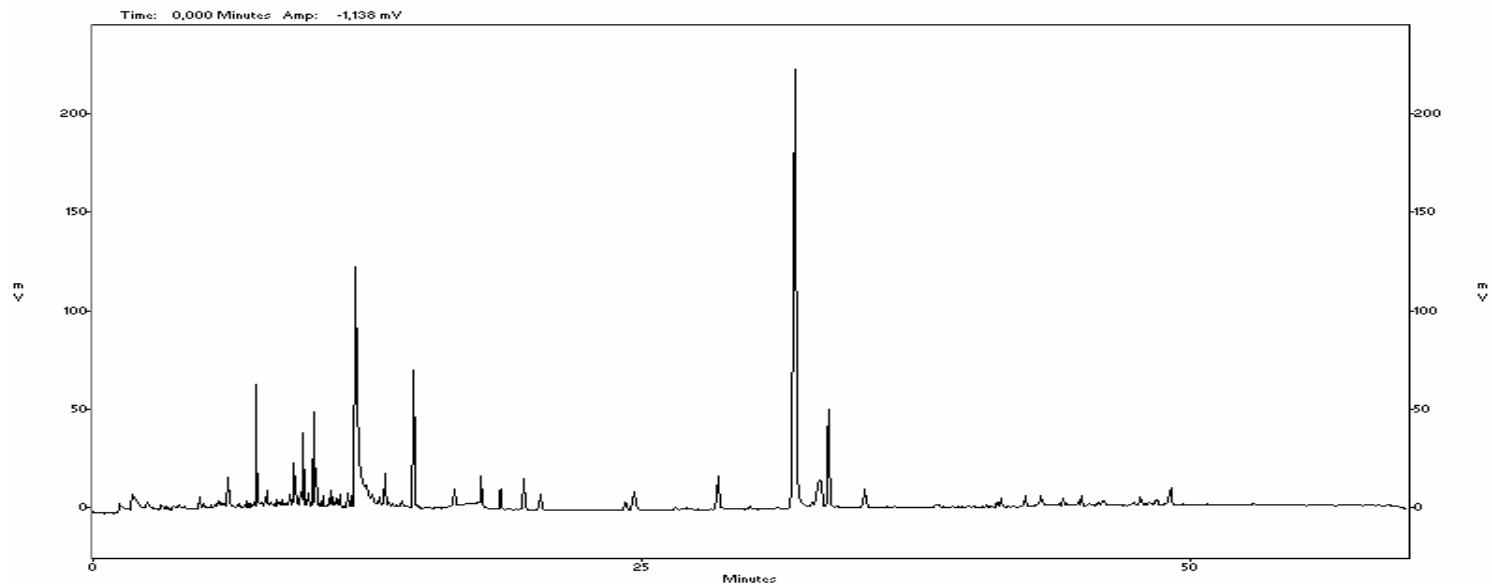
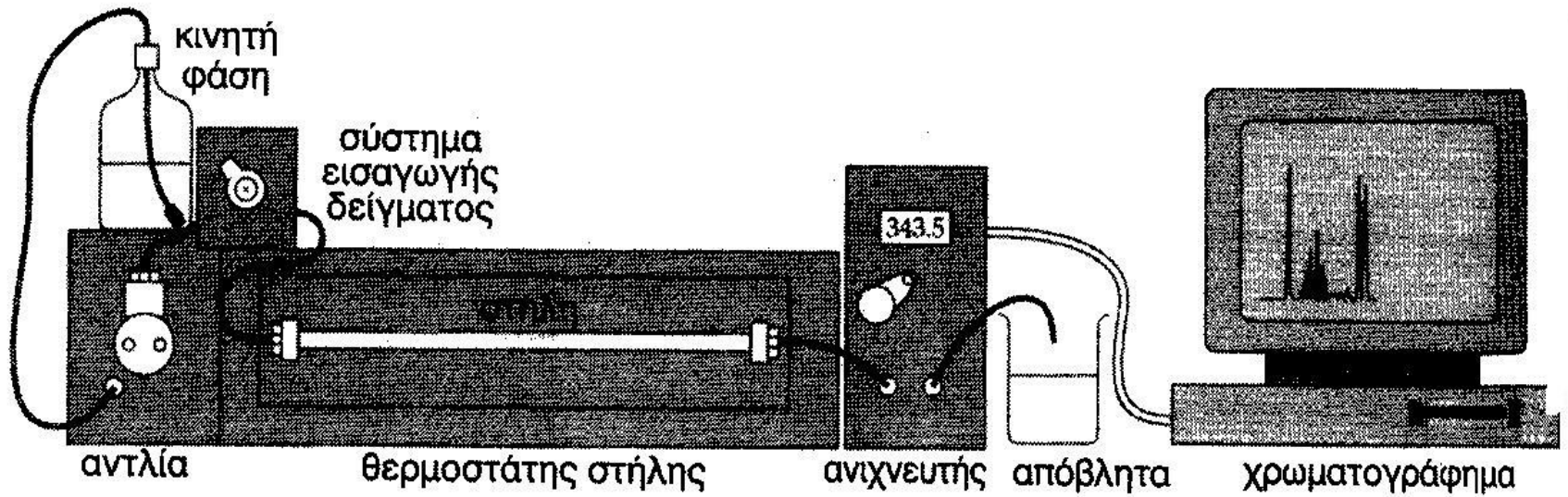


# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

## HPLC



# ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

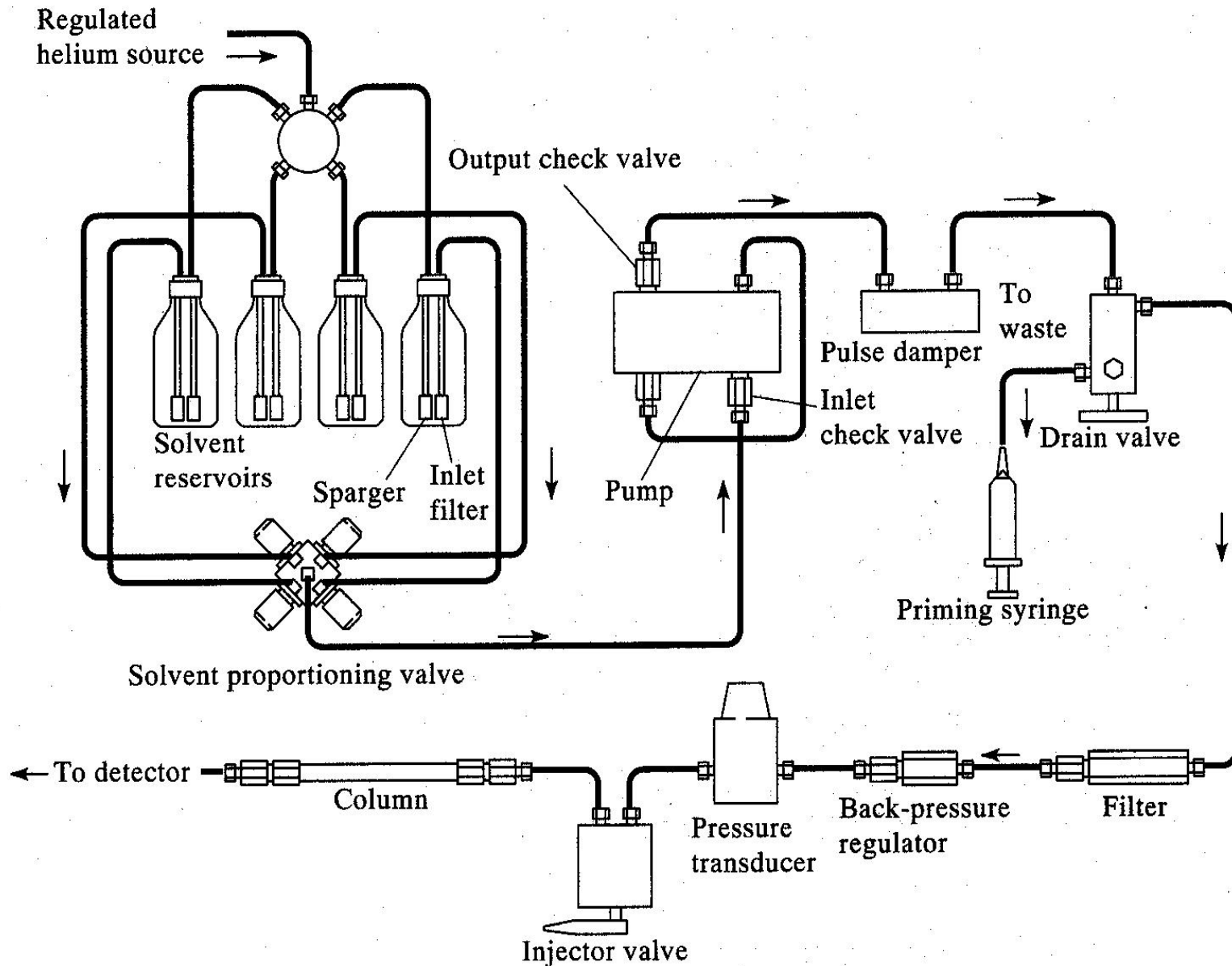


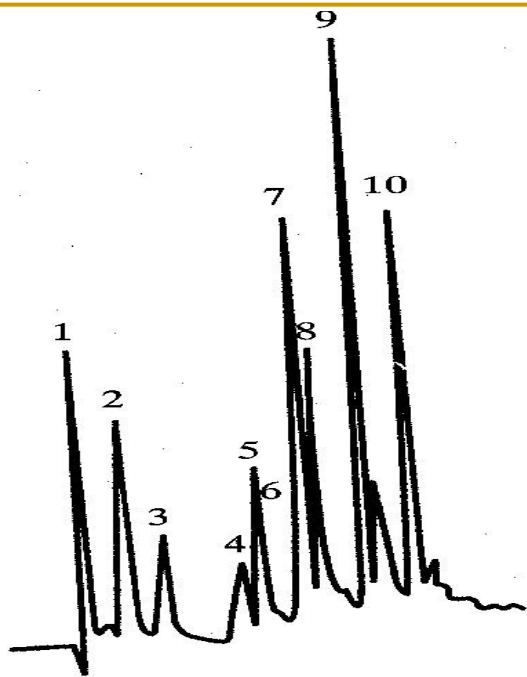
# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΤΗΛΗ / ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ

- Επίπεδη, μήκους 3-25 cm και διαμέτρου 0,5-5 mm.
- Μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (Silicagel), διαμέτρου 2-10μm. Παρουσιάζει υψηλή πολικότητα και αποτελεί τη βάση της υγρής χρωματογραφίας.
- Μείωση της πολικότητας επιτυγχάνεται με σύνδεση με αλκύλια που φέρουν άμινο-, κύανο-, ή φαινύλο ομάδες.
- Αν η στατική φάση είναι πιο πολική από τη κινητή, τότε η HPLC χαρακτηρίζεται ως κανονικής φάσης.
- Αν η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από τη κινητή, τότε η HPLC χαρακτηρίζεται ως αντίστροφης φάσης.

# ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ

- Η κινητή φάση διέρχεται διαμέσου της χρωματογραφικής στήλης μέσω αντλίας.
- Η σύσταση της κινητής φάσης είτε διατηρείται σταθερή (**ισοθερμική έκλυση**), είτε μεταβάλλεται με καθορισμένο πρόγραμμα με τη χρήση δύο ή περισσότερων διαλυτών (**βαθμιδωτή έκλυση**)
- Η θερμοκρασία της στήλης είτε διατηρείται σταθερή (**Ισόθερμη έκλυση**), είτε μεταβάλλεται με καθορισμένο πρόγραμμα (**θερμο-προγραμματιζόμενη έκλυση**)

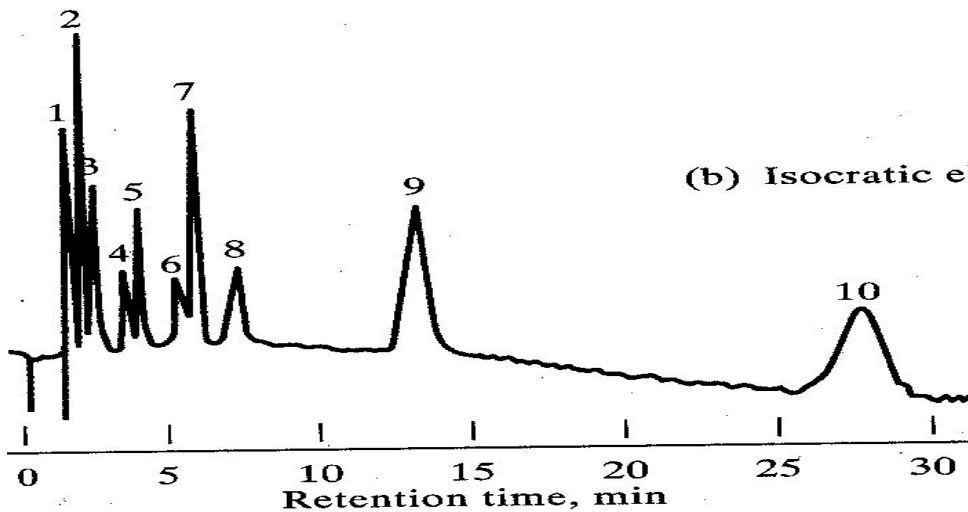




(a) Gradient elution

Peak identity

1. Benzene
2. Monochlorobenzene
3. Orthodichlorobenzene
4. 1,2,3-trichlorobenzene
5. 1,3,5-trichlorobenzene
6. 1,2,4-trichlorobenzene
7. 1,2,3,4-tetrachlorobenzene
8. 1,2,4,5-tetrachlorobenzene
9. Pentachlorobenzene
10. Hexachlorobenzene

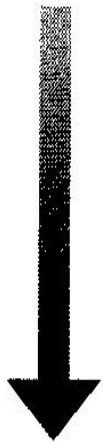


(b) Isocratic elution

# Χρησιμοποιούμενοι διαλύτες σύμφωνα με τη σχετική τιμή έκλυσης:

## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ

ασθενής



ισχυρός

## ΔΙΑΛΥΤΗΣ

εξάνιο  
τολουόλιο  
τριχλωρομεθάνιο  
διχλωρομεθάνιο  
αιθέρας  
οξικός αιθυλεστέρας  
ακετονιτρίλιο  
μεθανόλη  
νερό

## ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ

ισχυρός



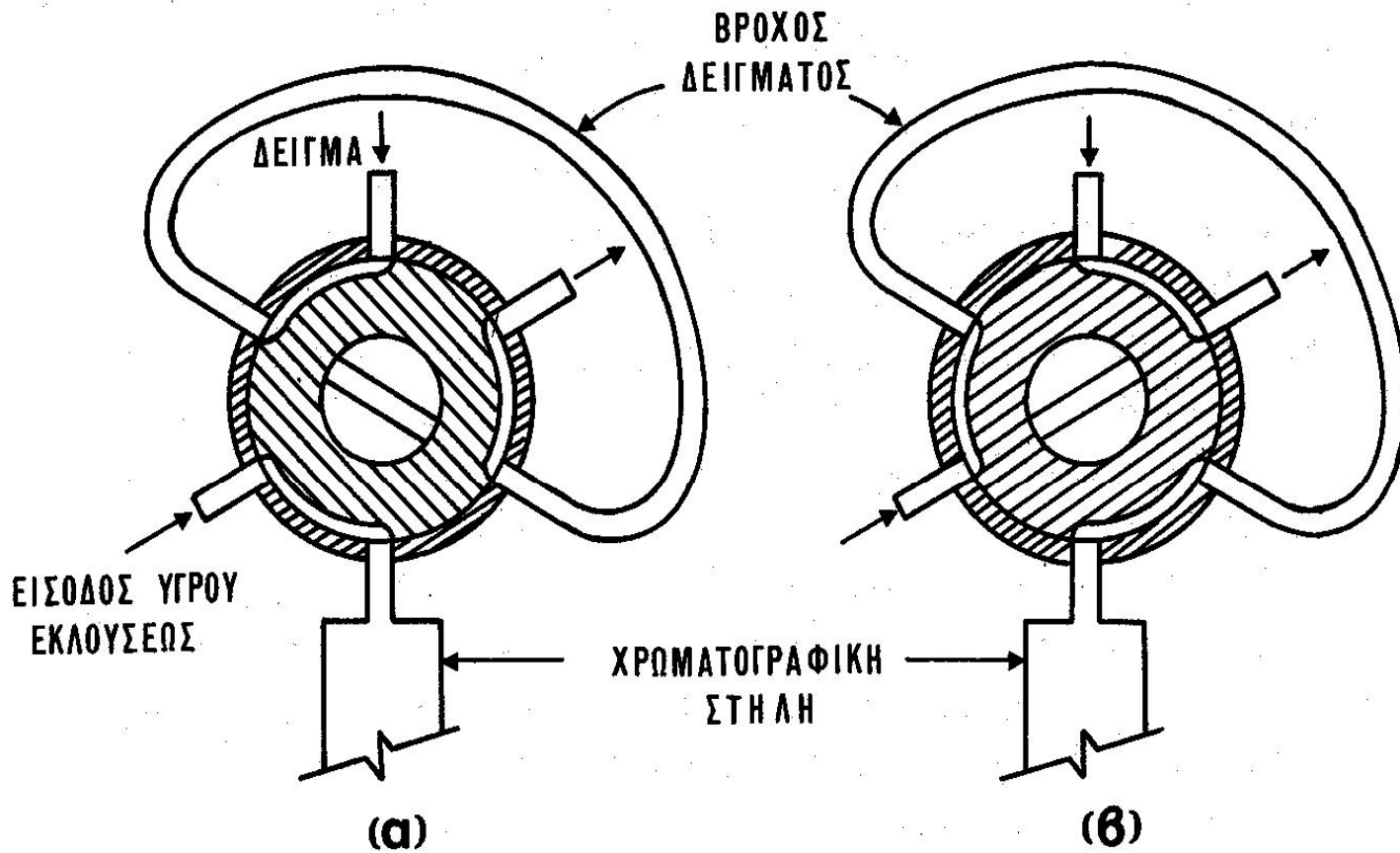
ασθενής

---

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Διαμέσου βρόχου,
- Είτε με σύριγγα,
- Είτε με αυτόματο δειγματολήπτη.



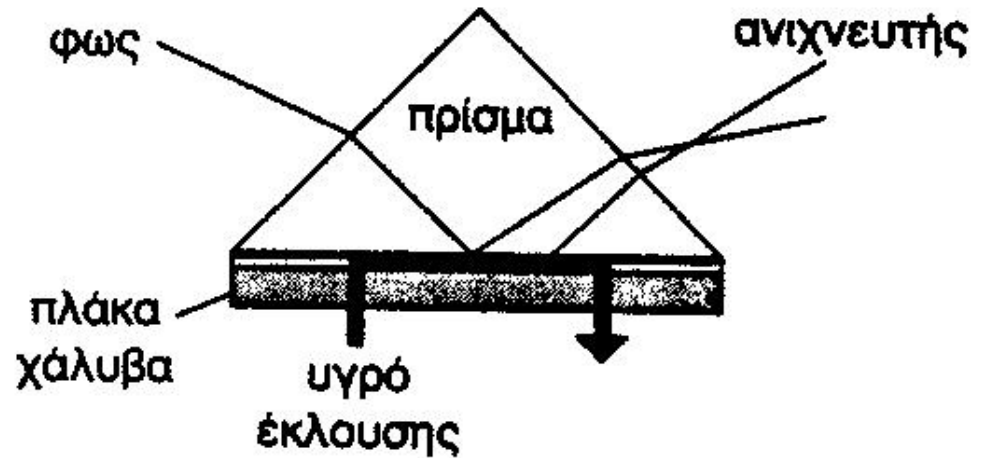


Σύστημα εισαγωγής δείγματος. α) Θέση "φορτώσεως", β) θέση εισαγωγής.

# ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

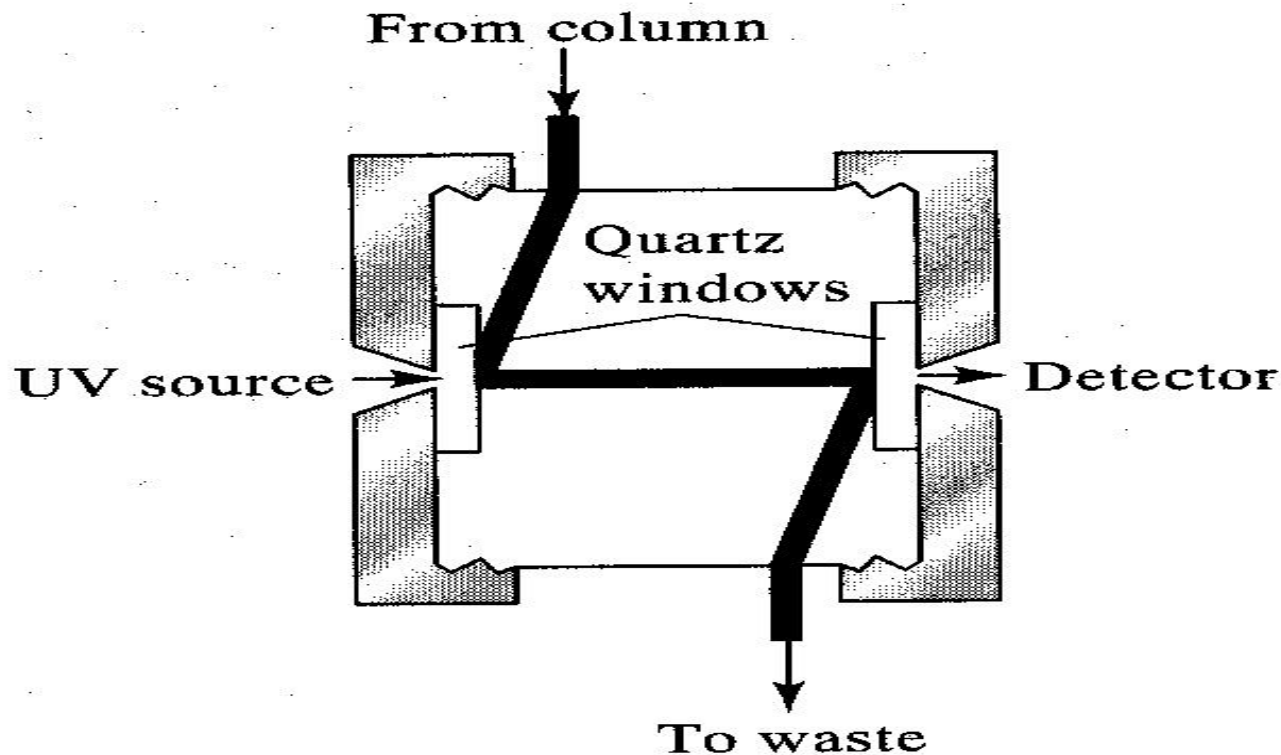
- **Ανιχνευτής δείκτη διαθλάσεως (RI):**  
Ανιχνευτής γενικής χρήσεως ο οποίος βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς του δείκτη διάθλασης, μεταξύ της καθαρής κινητής φάσης και αυτής που περιέχει την ουσία.

Έχει μεγάλη ευαισθησία στη θερμοκρασία και θερμοστατείται ( $\pm 0,001^\circ\text{C}$ ).



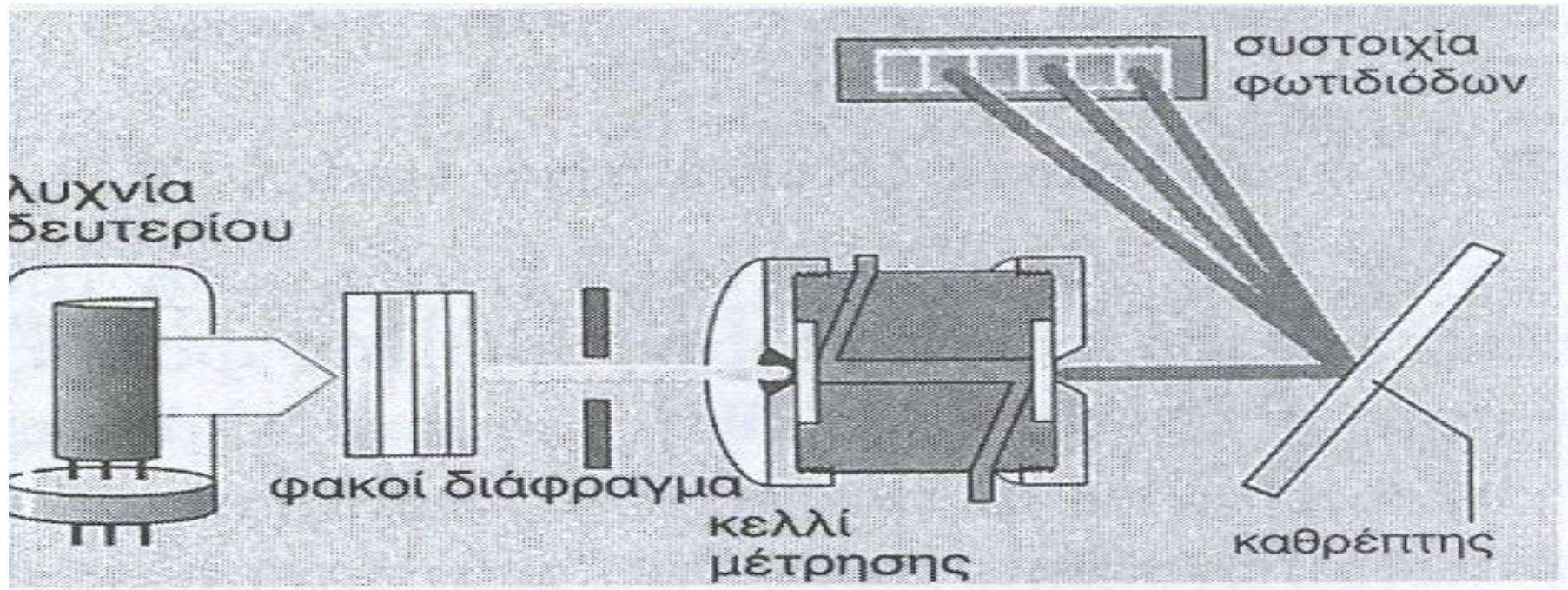
# Ανιχνευτές υπεριώδους ορατού (UV-VIS)

- Σταθερού μήκους κύματος
- Μεταβαλλόμενου μήκους κύματος



# Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode Array, PDA)

- Μετρά ταυτόχρονα σε διαφορετικά μήκη κύματος με τη βοήθεια μιας συστοιχίας φωτοδιόδων.
- Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται στο μέγιστο της απορρόφησης της κάθε ουσίας.



---

# ΆΛΛΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

- **Ηλεκτροχημικοί**
- **Αμπερομετρικοί**
- **Βολταμμετρικοί**
- **Αγωγιμομετρικοί**
  - **Φθορισμού**
  - **Φασματομέτρα μάζας**



Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συχνά στην HPLC με τα βασικά χαρακτηριστικά τους.

Ανιχνευτής	Ουσίες που ανιχνεύονται	Προσεγγιστικό Όριο Ανίχνευσης	Προσεγγιστική Γραμμική Περιοχή
UV - VIS	Ουσίες που απορροφούν στην περιοχή αυτή	$10^{-11}$ g	$10^4$
RI	Γενικής χρήσεως	$10^{-9}$ g	$10^3$
Ηλεκτροχημικοί/ αγωγιμότητας	Ιόντα	$10^{-8}$ g mL <sup>-1</sup>	$10^5$
Φθορισμού	Ειδικός ανιχνευτής	$10^{-14}$ g	$10^5$
MS	Γενικής χρήσεως	$10^{-7}$ - $10^{-9}$ g	$10^5$

# ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

- Με βάση το διορθωμένο χρόνο ή όγκο ανάσχεσης σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές πρότυπων ουσιών
- Με τη μέθοδο του εμβολιασμού (spiking)
- Με προσδιορισμό του δείκτη Kovàts (retention indices), I (Μόνο στην αέρια χρωματογραφία)

$$I = 100 z + 100 (\lg t'_{Rx} - \lg t'_z) / (\lg t'_{Rz+1} - \lg t'_{Rz})$$

- Με βάση την εκλεκτικότητα του ανιχνευτή

---

# ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

**Οι ποσοτικές αναλύσεις βασίζονται στο συσχετισμό του εμβαδού της κορυφής με την ποσότητα ή τη συγκέντρωση της ουσίας**



# ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ποσοτική ανάλυση γίνεται συνήθως με μια από τις παρακάτω μεθόδους:

- 1. Με βάση το % εμβαδόν (percentage of total)  
(το κλάσμα του ολικού εμβαδού μιας κορυφής είναι το ίδιο με την % αναλογία του συστατικού στο δείγμα)
- 2. Με εξωτερικά πρότυπα (external standard analysis)

---

# ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

- 3. Με εσωτερικά πρότυπα (internal standard analysis)
- 4. Με την μέθοδο της προσθήκης γνωστής ποσότητας (standard addition)
- 5. Με την μέθοδο εσωτερικής κανονικοποίησης

# Εσωτερικά πρότυπα

Η πρότυπη ουσία θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Να διαχωρίζεται πλήρως από τα συστατικά του μίγματος που αναλύουμε, αλλά και να εκλούεται σε παραπλήσιους χρόνους με αυτά.
- Το ύψος και το πλάτος της κορυφής της πρότυπης ουσίας να είναι παραπλήσιο της ουσίας που προσδιορίζουμε.
- Πρότυπο και αναλυόμενο δείγμα να είναι της ίδιας χημικής φύσης, χωρίς όμως το δείγμα να περιέχει την πρότυπη ουσία.

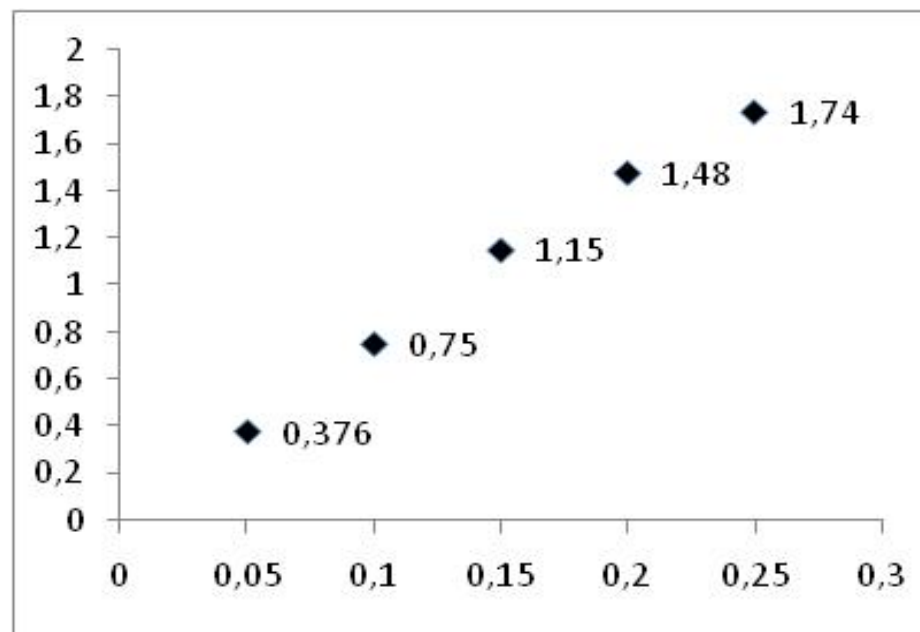
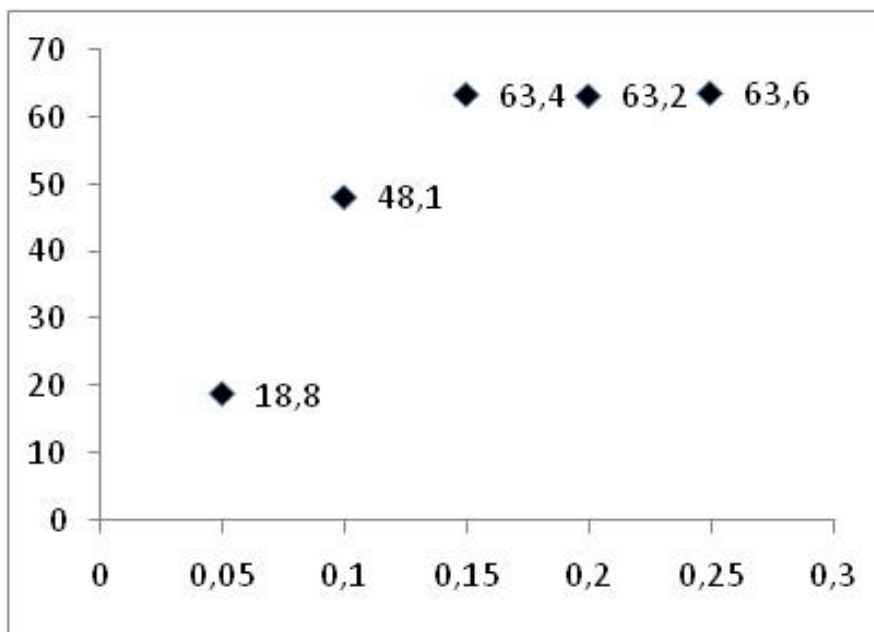
- Ο προσδιορισμός της αιθανόλης στον ορό του αίματος μπορεί να γίνει με αέριο χρωματογράφο χρησιμοποιώντας προπανόλη ως εσωτερικό πρότυπο. Το άγνωστο διάλυμα καθώς και τα πρότυπα διαλύματα περιέχουν 0,1%(w/v) προπανόλη. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδωσαν:

% w/v αιθανόλης	Ύψος της κορυφής αιθανόλης	Ύψος της κορυφής προπανόλης
0,050	18,8	50,0
0,100	48,1	64,1
0,150	63,4	55,1
0,200	63,2	42,7
0,250	93,6	53,8
Άγνωστο διάλυμα	58,9	49,4

- Να υπολογισθεί η εκατοστιαία περιεκτικότητα δείγματος σε μεθανόλη.

**% w/v EtOH      Ύψος κορυφής MeOH      Ύψος κορυφής EtOH**

■ 0.050	18.8	50.0	0.376
■ 0.100	48.1	64.1	0.750
■ 0.150	63.4	55.1	1.150
■ 0.200	63.2	42.7	1.480
■ 0.250	93.6	53.8	1.740
■ Άγνωστο X	58.9	49.4	1.190

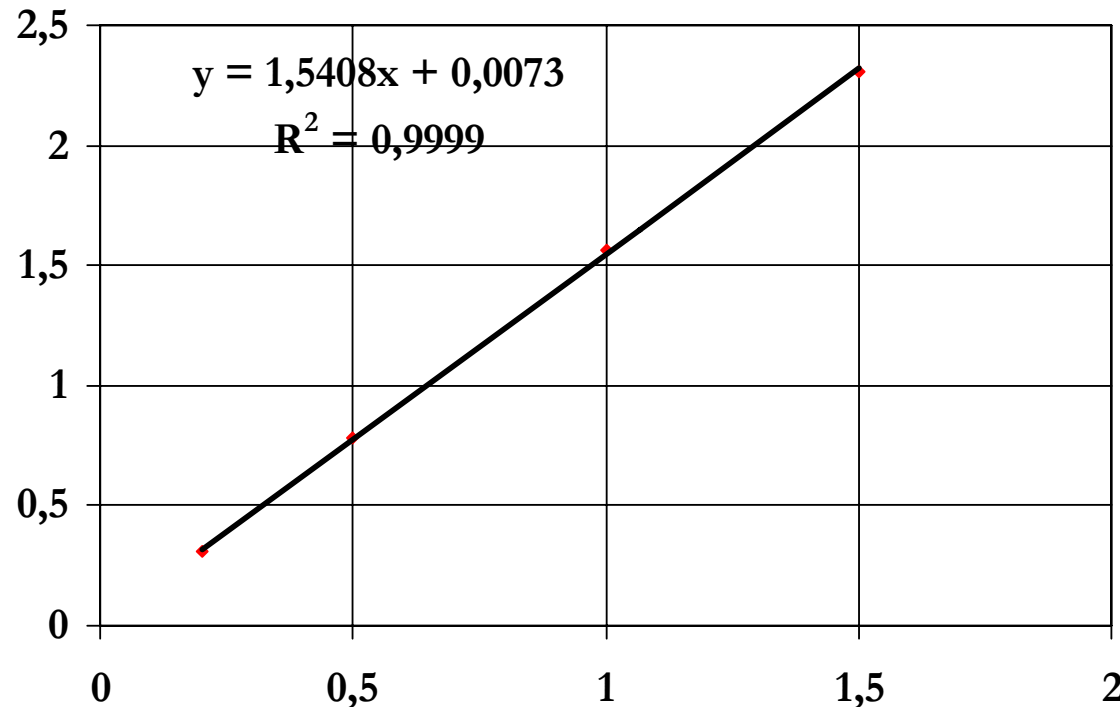


- Για τον αέριο χρωματογραφικό προσδιορισμό της αιθανόλης σε αλκοολούχα σκευάσματα με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου, παρασκευάζεται σειρά προτύπων διαλυμάτων που περιέχουν την ίδια ποσότητα προπυλικής αλκοόλης (1,00 mg/mL) και μετρούνται τα ύψη των κορυφών για τις δύο αλκοόλες στο αέριο χρωματογράφημα. 1,230g αλκοολούχου σκευάσματος διαλύονται σε ύδωρ, αραιώνονται έως τα 100mL και αναμειγνύεται με διάλυμα προπυλικής αλκοόλης 2% w/v, σε αναλογία 1/1 (διάλυμα Α). Με βάση τα παρακάτω αποτελέσματα να υπολογισθεί η εκατοστιαία περιεκτικότητα (w/w) του σκευάσματος σε αιθανόλη.

Συγκέντρωση	Ύψος κορυφής, cm	
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, mg/mL	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH
0.200	3.15	10.14
0.500	7.55	9.70
1.00	16.00	10.25
1.50	21.95	9.50
Άγνωστο	9.25	10.85

Συγκέντρωση	Ύψος κορυφής, cm	
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, mg/mL	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH
0.200	3.15	10.14
0.500	7.55	9.70
1.00	16.00	10.25
1.50	21.95	9.50
Άγνωστο	9.25	10.85

C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH/C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH
0.310
0.778
1.562
2.310
A-0.85



- Σε έναν αναλυτικό προσδιορισμό DDT σε βιολογικά υγρά με GC-ECD χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό του στα θετικά άγνωστα δείγματα. Προσθέτοντας γνωστές ποσότητες DDT στο άγνωστο δείγμα και αναλύοντας το δείγμα, λήφθηκε η εξίσωση της ευθείας με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων:  $y = 6,004 \cdot 10^{-7} x + 1,016 \cdot 10^2$  ( $r = 0,9999$ ). Να βρεθεί η συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος σε DDT.