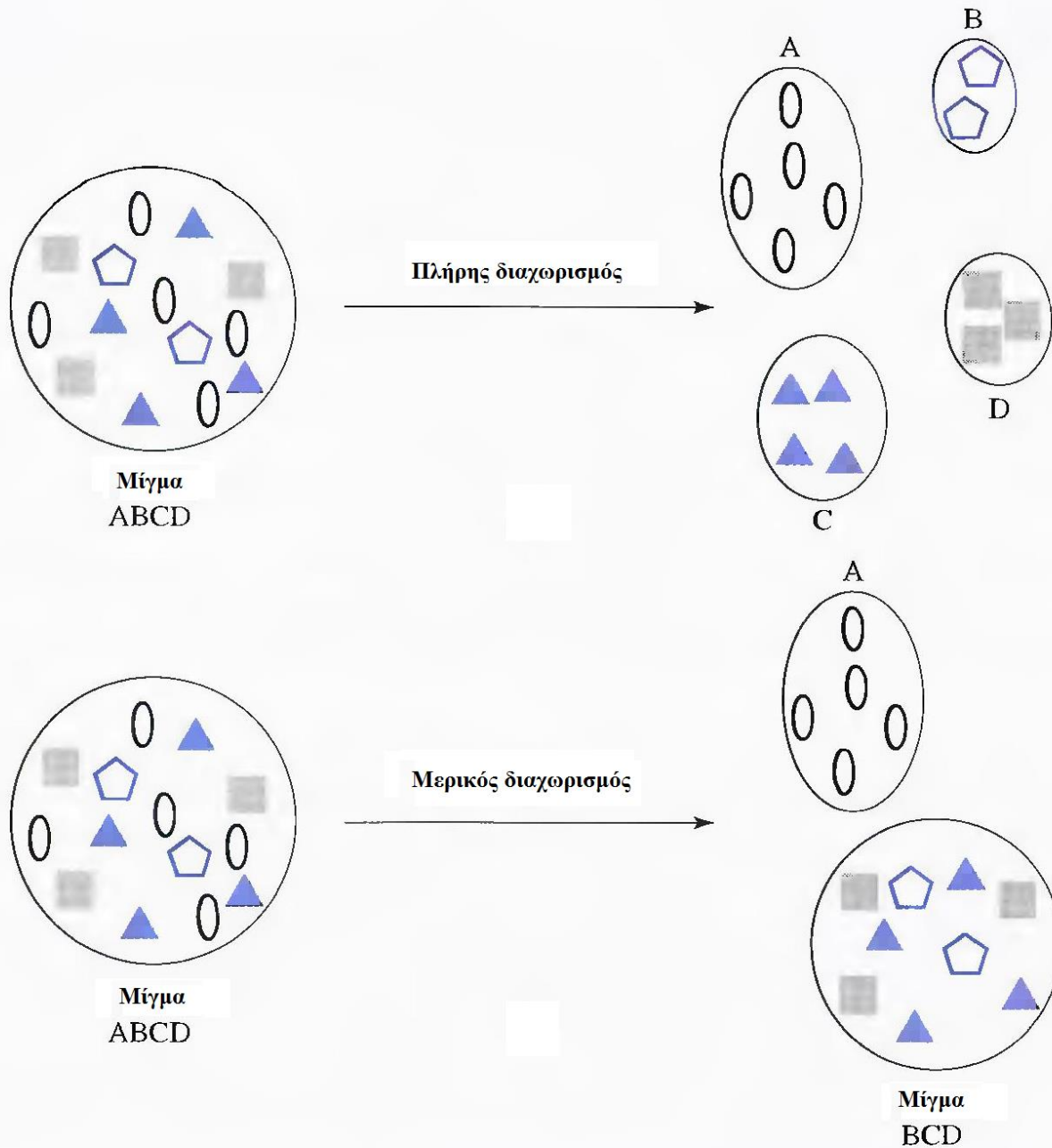


ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Διαχωρισμός: απομόνωση του αναλύτη από πιθανές παρεμποδίζουσες ουσίες

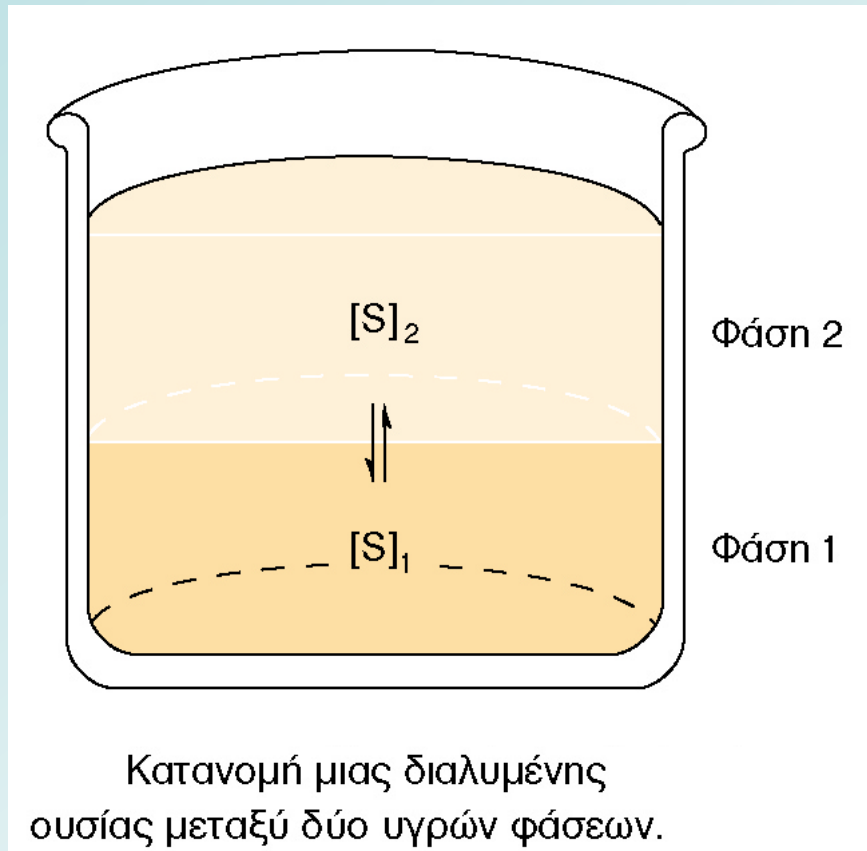
Εισαγωγή στους αναλυτικούς διαχωρισμούς



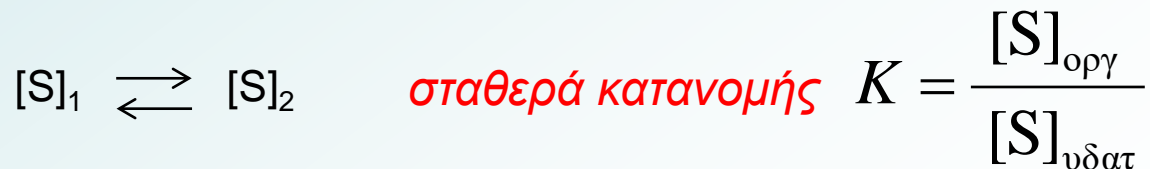
Διαχωρισμός: απομόνωση του αναλύτη από πιθανές παρεμποδίζουσες ουσίες

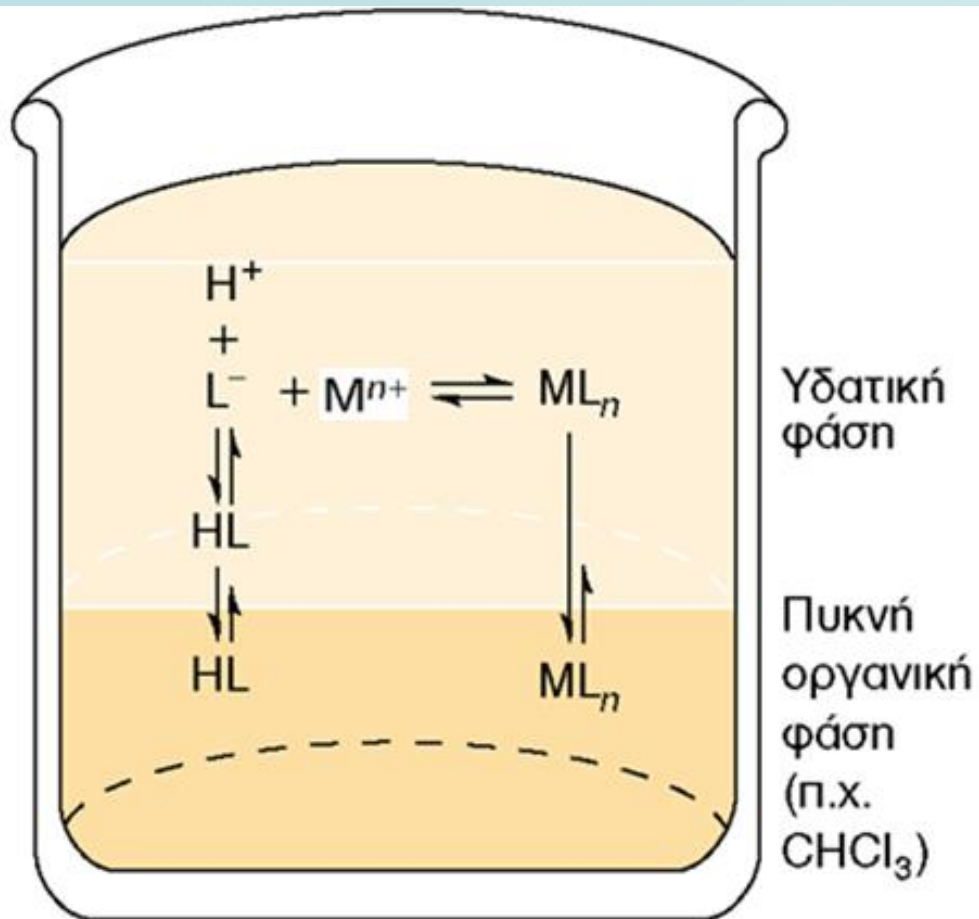
- καταβύθιση
- απόσταξη
- εκχύλιση

Εισαγωγή στους αναλυτικούς διαχωρισμούς



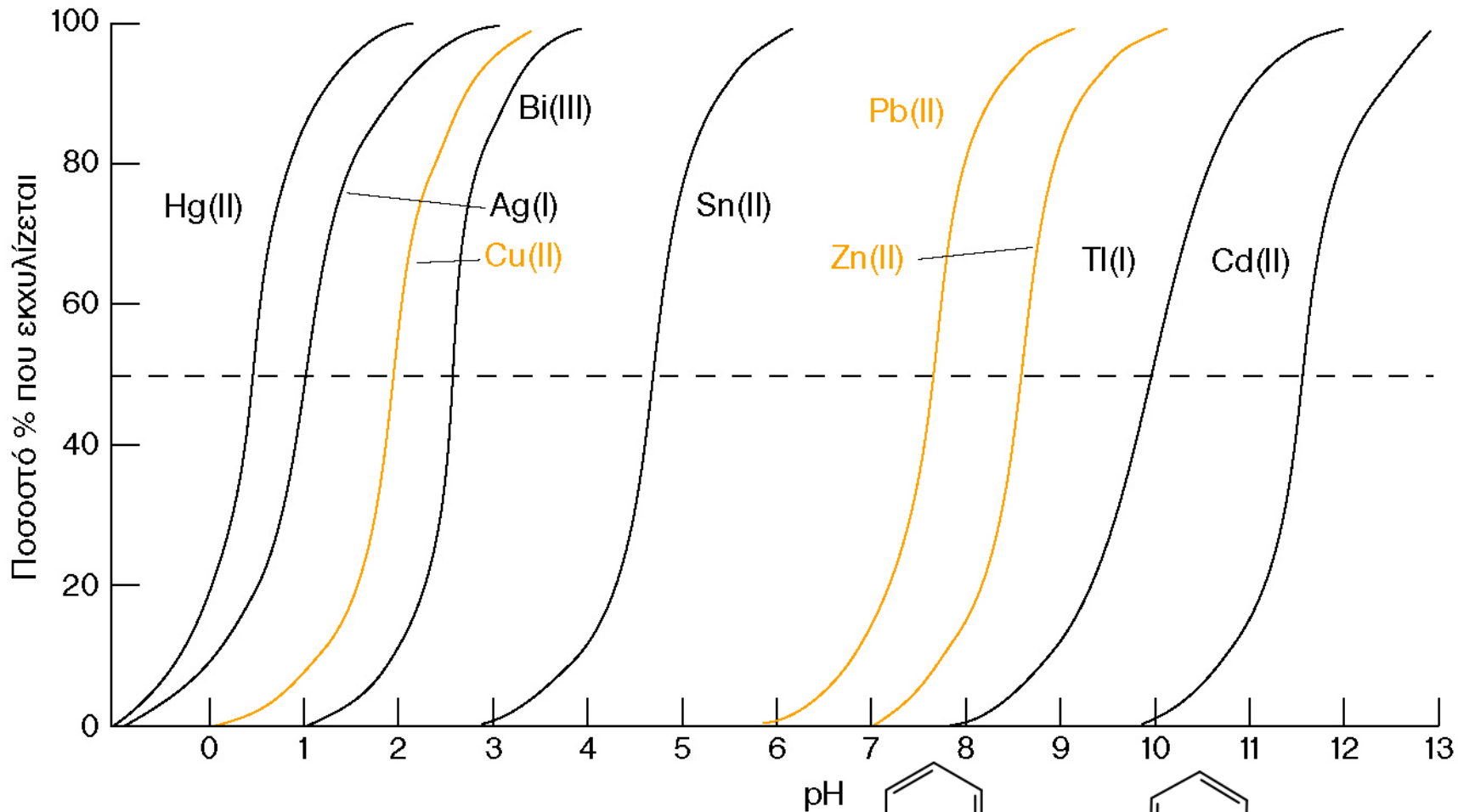
Κλασική εκχύλιση



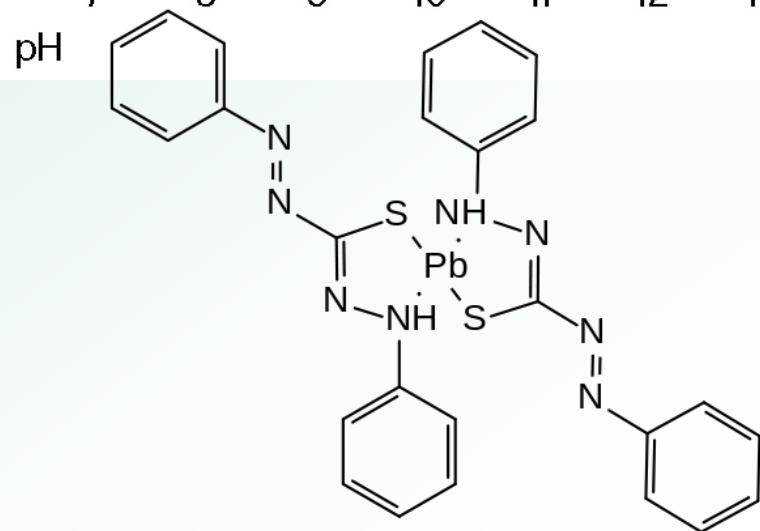


Κλασική εκχύλιση

Εκχύλιση μεταλλικού ιόντος με χηλικό υποκαταστάστη. Η κύρια μορφή του μετάλλου στην υδατική φάση είναι M^{n+} , ενώ στην οργανική φάση είναι ML_n .



Εκχύλιση μεταλλικών ιόντων σε CCl₄ με διθειζόνη. Σε pH 5, ο Cu²⁺ εκκυλίζεται πλήρως στον CCl₄, ενώ ο Pb²⁺ και ο Zn²⁺ παραμένουν στην υδατική φάση.

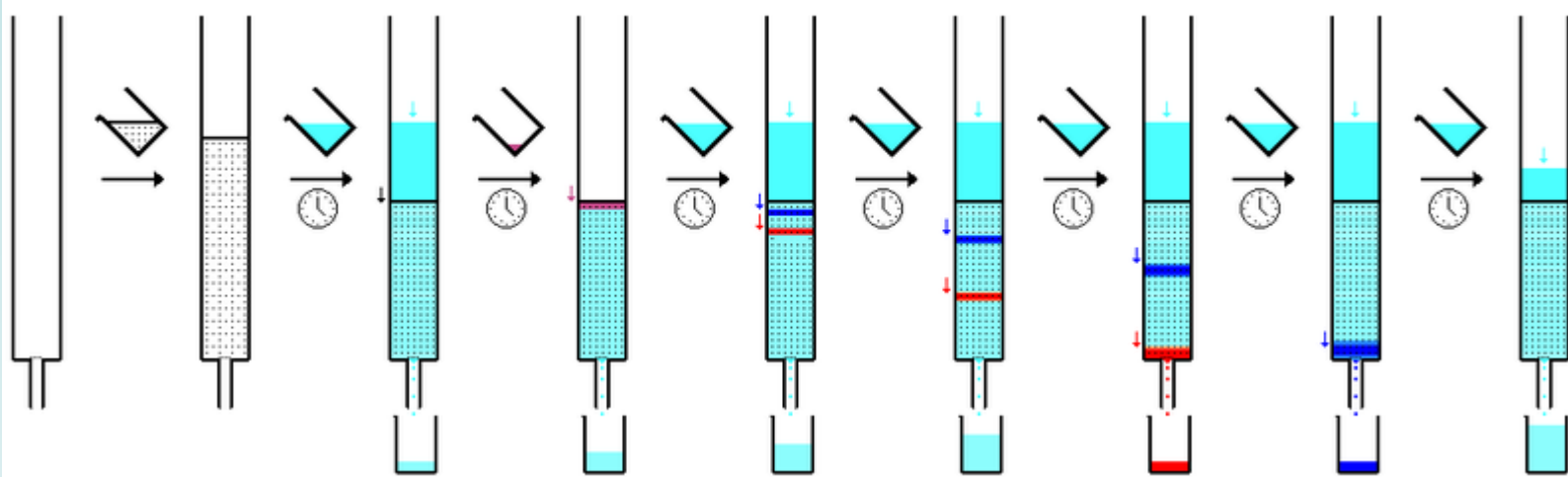


Χρωματογραφία

Εφευρέθηκε από τον Ρώσο βοτανολόγο **Mikhail Tswett** στις αρχές του εικοστού αιώνα.

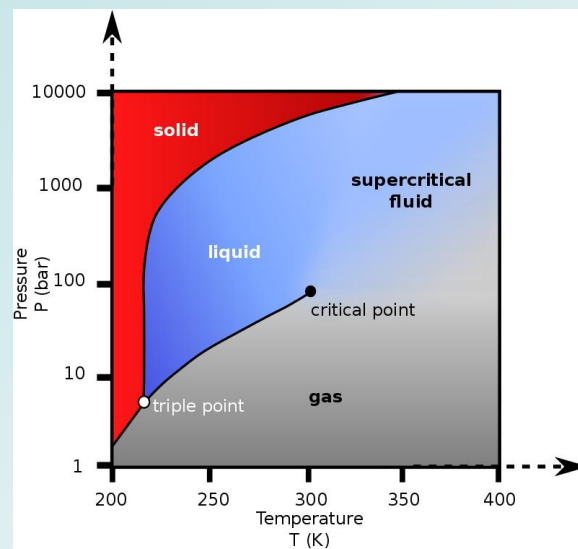
Χρησιμοποίησε την τεχνική αυτή για να διαχωρίσει φυτικές χρωστικές, όπως οι χλωροφύλλες και οι ξανθοφύλλες, με διαβίβαση διαλύματός τους μέσω υάλινου σωλήνα, ο οποίος ήταν γεμάτος με εξαιρετικά λεπτό ανθρακικό ασβέστιο.

Οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζονταν ως έγχρωμες ζώνες.



Βασίζεται στην ίδια αρχή με την εκχύλιση αλλά η μια φάση διατηρείται σταθερή και η άλλη κινείται.

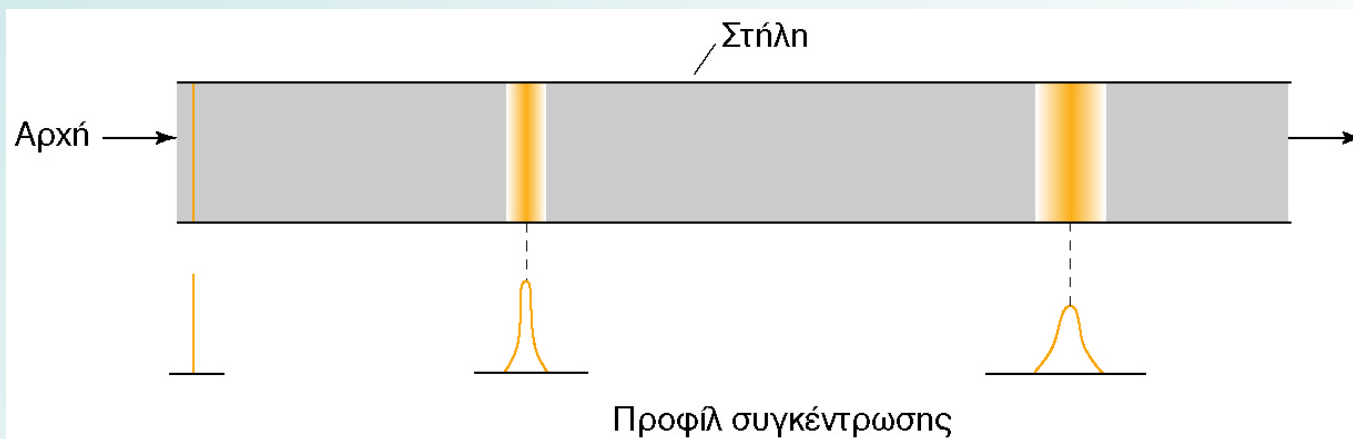
Κινητή φάση (mobile phase): μπορεί να είναι αέριο, υγρό ή υπερκρίσιμο ρευστό, όπου κινείται το δείγμα.



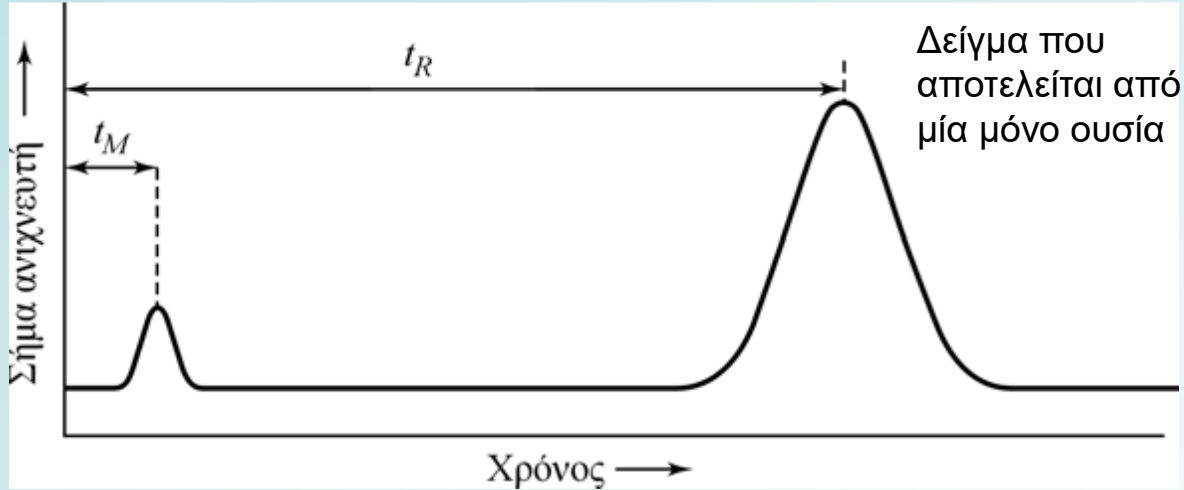
Στατική φάση (stationary phase): είναι καθηλωμένη σε μια στήλη ή σε μια στερεή επιφάνεια.

Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό.

Τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ταινίες ή ζώνες και στη συνέχεια μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά.



Χρωματογράφημα: γράφημα που δείχνει την απόκριση του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου έκλυσης.



Χρόνος κατακράτησης ή **χρόνος ανάσχεσης** (retention time) t_R : είναι ο χρόνος από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η κορυφή της ουσίας φθάνει στον ανιχνευτή.

νεκρός χρόνος (dead time): Ο χρόνος t_M (ή t_0) που χρειάζεται για να φθάσει μια μη κατακρατούμενη ουσία στον ανιχνευτή.

Η ταχύτητα μετανάστευσης της μη κατακρατούμενης ουσίας είναι ίση προς τη μέση ταχύτητα των μορίων της κινητής φάσης.

Ρυθμισμένος χρόνος κατακράτησης: ο χρόνος που απαιτείται για να μετακινηθεί μια ουσία σε όλο το μήκος της στήλης πέραν του χρόνου τον οποίο χρειάζεται ο διαλύτης (ο οποίος δεν κατακρατείται).

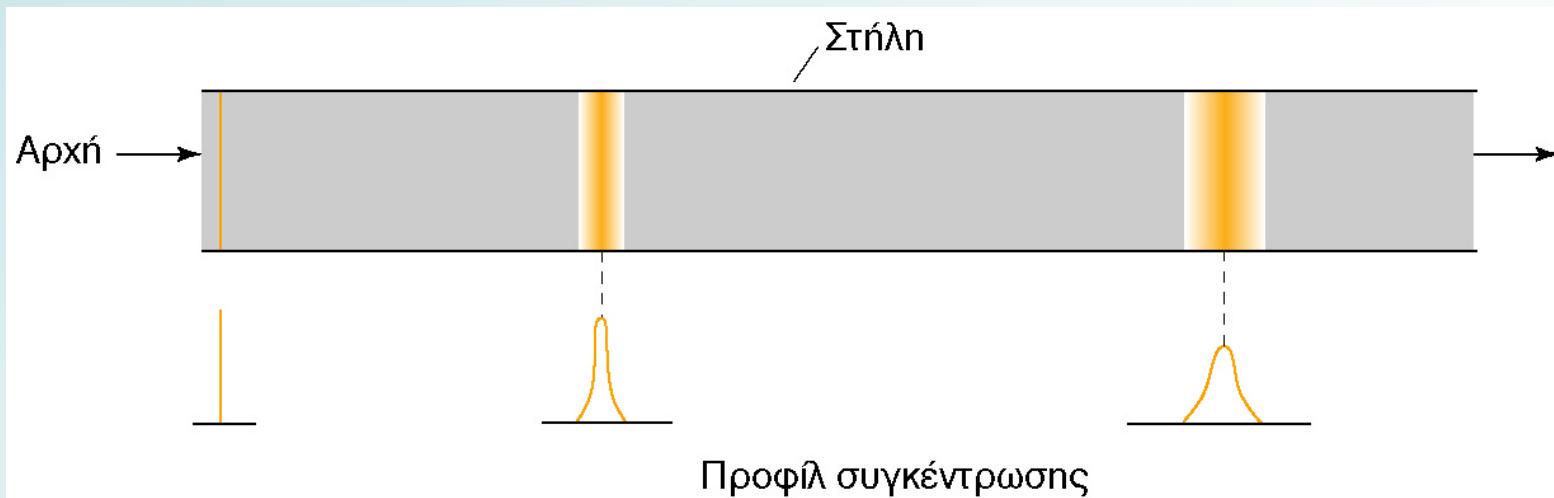
Ταχύτητα ροής όγκου: όγκος κινητής φάσης που διέρχεται μέσω της στήλης ανά μονάδα χρόνου (mL/min).

Γραμμική ταχύτητα ροής: απόσταση ανά μονάδα χρόνου που διανύει ο διαλύτης (cm/s).

Διάχυση: Η μετακίνηση μορίων από μια περιοχή υψηλότερης συγκέντρωσης σε αντίστοιχη χαμηλότερης συγκέντρωσης με τυχαία κίνηση των μορίων. Στα υγρά, 10^4 φορές βραδύτερη απ' ότι στα αέρια.

Συντελεστής διάχυσης: μετρά την ταχύτητα με την οποία κάποια ουσία κινείται τυχαία υπό συνθήκες διαφορετικής συγκέντρωσης.

Αύξηση του πλάτους της ζώνης μιας διαλυμένης ουσίας λόγω διάχυσης.



Μέση γραμμική ταχύτητα μετανάστευσης (κίνησης) μιας ουσίας:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

όπου L : μήκος *πληρωμένης (πακεταρισμένης-packed)* στήλης.

Μέση γραμμική ταχύτητα κίνησης u των μορίων της κινητής φάσης:

$$u = \frac{L}{t_M}$$

όπου t_M : νεκρός χρόνος, δηλαδή ο μέσος χρόνος που χρειάζεται ένα μόριο της κινητής φάσης για να φθάσει στην έξοδο της στήλης.

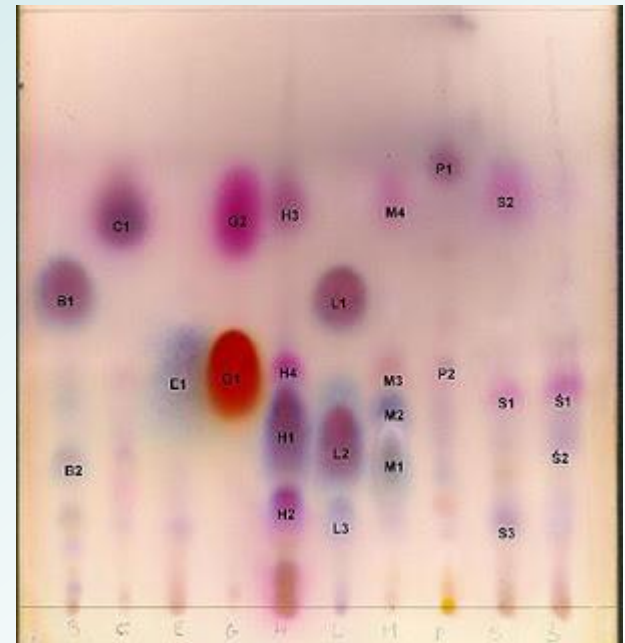
Ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με δύο τρόπους:

1. Με βάση το είδος των στατικών και κινητών φάσεων, που βρίσκονται σε επαφή.

Χρωματογραφία στήλης: η στατική φάση συγκρατείται σε μια στενή στήλη.

Επίπεδη χρωματογραφία: η στατική φάση στηρίζεται σε μια επίπεδη πλάκα ή στους πόρους ενός χαρτιού. Στην περίπτωση αυτή η κινητή φάση κινείται μέσω της στατικής φάσης με τριχοειδή φαινόμενα ή με την επίδραση της βαρύτητας.



2. Με βάση τον τύπο των κινητών και στατικών φάσεων και το είδος των ισορροπιών, οι οποίες εμπλέκονται στην ανταλλαγή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των φάσεων.

Υγροχρωματογραφία και **Αεριοχρωματογραφία**.

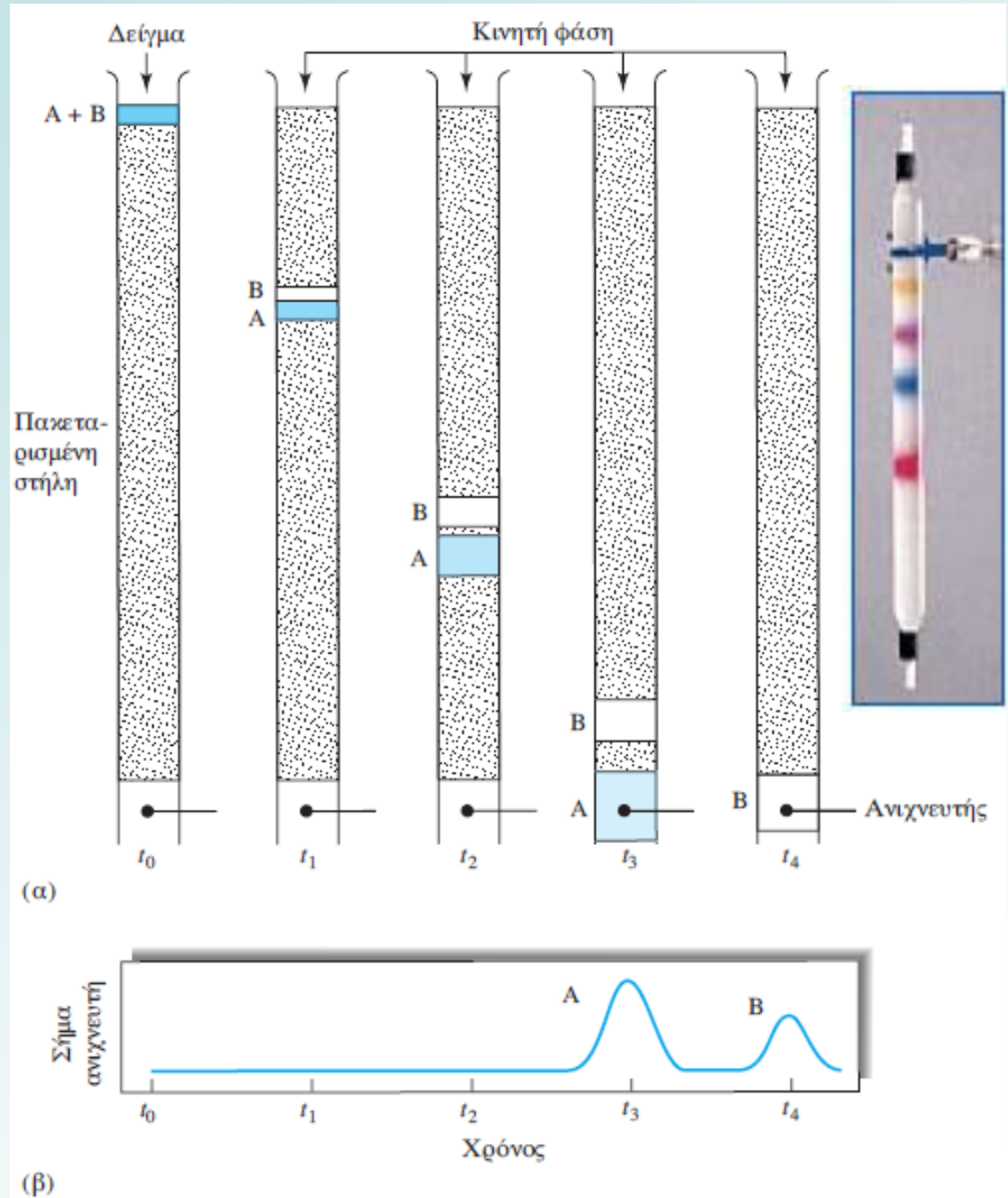
Χρωματογραφία έκλουσης σε στήλη

Οι Α και Β διαχωρίζονται με **χρωματογραφία στήλης** με μια κινητή φάση. Η **έκλουση** συνίσταται στην παραλαβή των μορίων (ή ιόντων) των ουσιών από τη στήλη με συνεχή προσθήκη διαλύτη. Τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων.

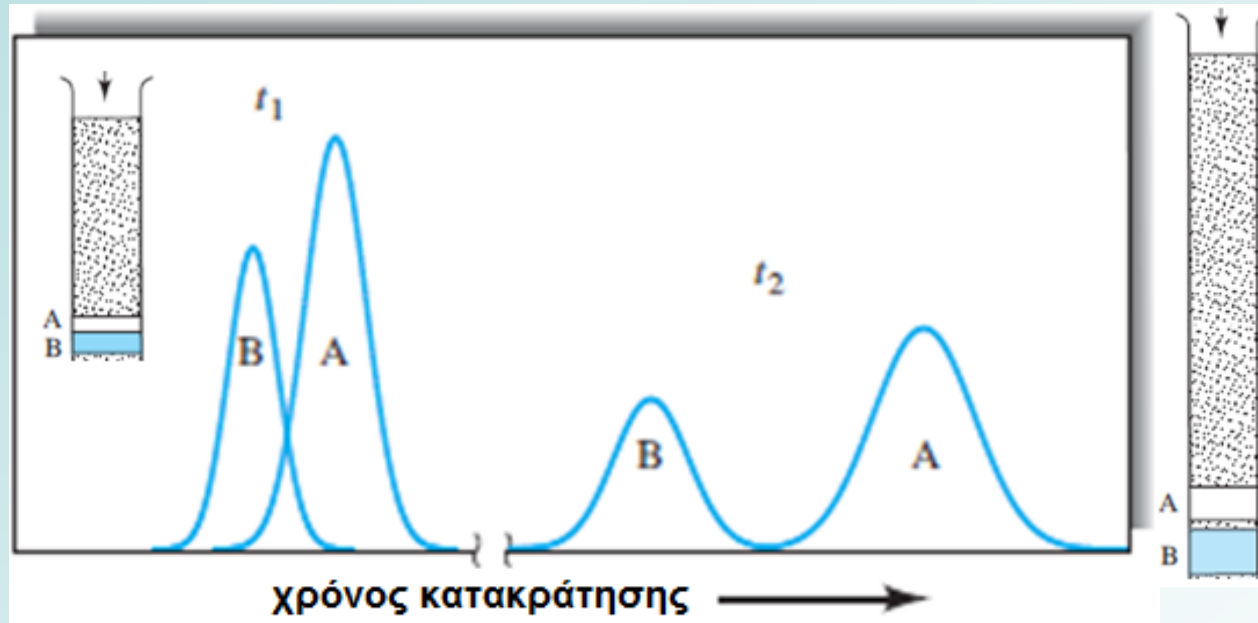
Χρωματογράφημα: Λαμβάνεται όταν ένας ανιχνευτής που αποκρίνεται στη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών τοποθετηθεί στην έξοδο της στήλης και το σήμα του καταγραφεί ως συνάρτηση του χρόνου.

Αραίωση αναλύτη. Ο διαχωρισμός των συστατικών συνοδεύεται σχεδόν πάντοτε από αραίωσή τους.

Οι ανιχνευτές πρέπει να είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητοι, απ' όσο θα χρειαζόταν, εάν η διαδικασία του διαχωρισμού δεν ήταν απαραίτητη.



Επίδραση της ταχύτητας μετανάστευσης και της διεύρυνσης της ζώνης στη διαχωριστική ικανότητα



Κατατομές (profiles) συγκεντρώσεων των διαλυμένων ουσιών A και B σε ένα πρώιμο (t_1) και ένα μετέπειτα (t_2) στάδιο της έκλουσης από τη χρωματογραφική στήλη

Η ουσία A κατακρατείται ισχυρότερα και επομένως η μετανάστευσή της πραγματοποιείται με βραδύτερο ρυθμό. Η μετακίνηση προς την έξοδο της στήλης συνοδεύεται από αύξηση της απόστασης μεταξύ των ζωνών και παράλληλα, οι ζώνες διευρύνονται.

Είναι δυνατόν να βρεθούν συνθήκες κάτω από τις οποίες η διεύρυνση πραγματοποιείται με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με το διαχωρισμό των ζωνών.

Θεωρητικά, πλήρης διαχωρισμός των ουσιών είναι εφικτός, αρκεί να είναι μεγάλο το μήκος της στήλης.

Σταθερές κατανομής

Ισορροπίες κατανομής του αναλύτη μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Για τη διαλυμένη ουσία A, μπορούμε να γράψουμε



Η σταθερά ισορροπίας K της διεργασίας αναφέρεται ως **σταθερά κατανομής** (distribution constant)

$$K = \frac{c_S}{c_M}$$

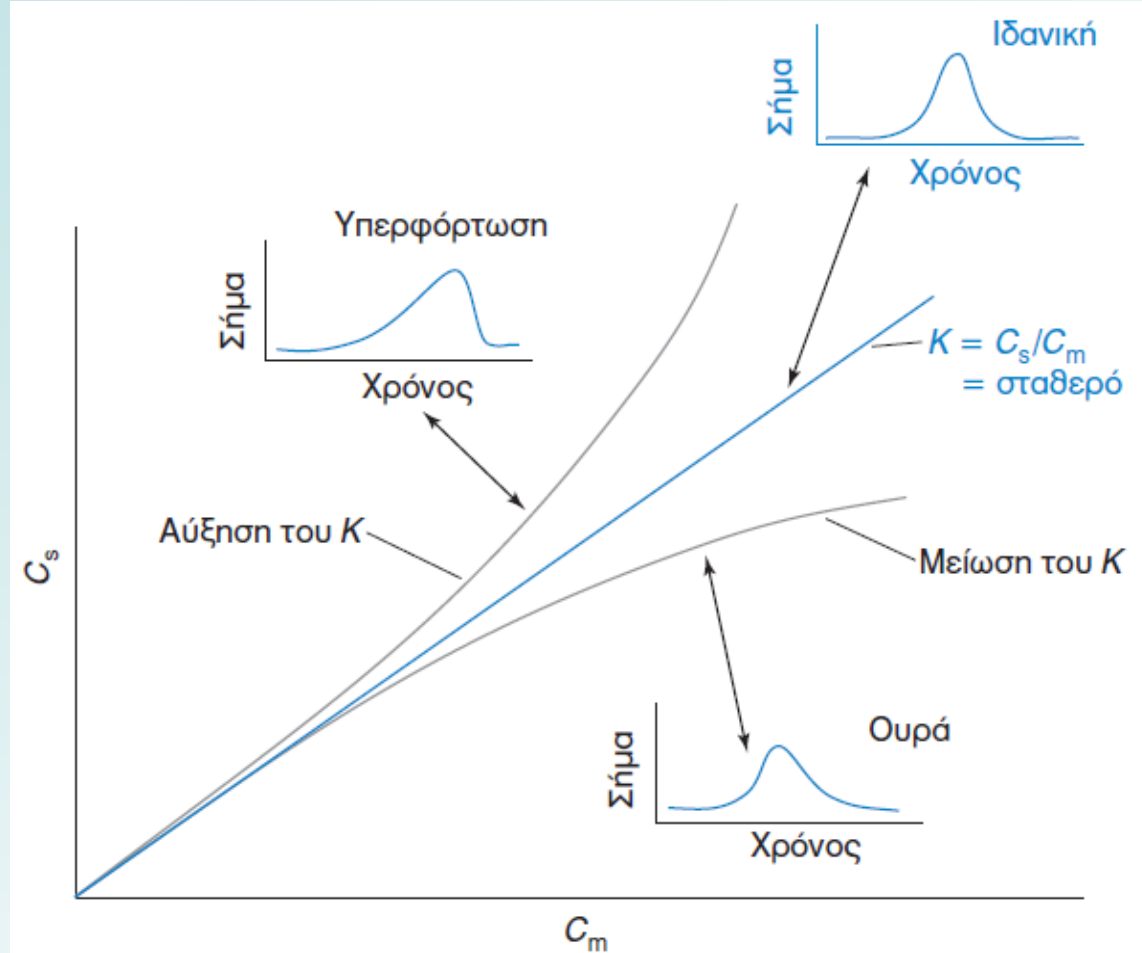
c_S : γραμμομοριακή συγκέντρωση της ουσίας στη στατική φάση και c_M : γραμμομοριακή συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση.

Στην ιδανική περίπτωση, η τιμή της K είναι σταθερή σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων της ουσίας, δηλαδή η c_S είναι ευθέως ανάλογη προς την c_M .

Σχήμα χρωματογραφικών κορυφών

Στις πραγματικές στήλες, η K (σταθερά κατανομής) μεταβάλλεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας και οι κορυφές γίνονται ασύμμετρες (εμφάνιση ουράς ή μετώπου).

Το γράφημα του C_s έναντι του C_m (σε δεδομένη θερμοκρασία) καλείται **ισόθερμη**.



Ισόθερμες προσρόφησης και η επίδρασή τους στο σχήμα της κορυφής έκλουσης

Σχέση μεταξύ μέσης γραμμικής ταχύτητας μετανάστευσης και σταθεράς κατανομής K

Ταχύτητα μετανάστευσης ως κλάσμα της ταχύτητας της κινητής φάσης:

$$\bar{v} = u \times \text{κλάσμα χρόνου παραμονής της ουσίας στην κινητή φάση}$$

Το κλάσμα αυτό είναι ίσο προς τον μέσο αριθμό γραμμομορίων της ουσίας στην κινητή φάση προς τον ολικό αριθμό γραμμομορίων της στη στήλη:

$$\bar{v} = u \times \frac{\text{γραμμομόρια ουσίας στην κινητή φάση}}{\text{ολικά γραμμομόρια της ουσίας}}$$



$$\bar{v} = u \times \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \times \frac{1}{1 + c_S V_S / c_M V_M}$$

Με αντικατάσταση της K στην εξίσωση αυτή λαμβάνεται

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K V_S / V_M}$$

Ο *παράγοντας κατακράτησης* (retention factor) ή *παράγοντας χωρητικότητας* (capacity factor) περιγράφει τη μετανάστευση των διαλυμένων ουσιών στις στήλες. Για την ουσία A, ο παράγοντας κατακράτησης k'_A ορίζεται ως:

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K V_S / V_M}$$

όπου K_A είναι η σταθερά κατανομής για την ουσία A.

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + k'_A}$$

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

$$u = \frac{L}{t_M}$$

Υπολογίζεται η τιμή του k'_A από ένα χρωματογράφημα:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1 + k'_A}$$

ή

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Για $k'_A < 1$ η έκλουση είναι ταχύτατη, $k'_A > 20$, μεγάλοι χρόνοι κατακράτησης

Σχετικές ταχύτητες μετανάστευσης: Παράγοντας εκλεκτικότητας ή σχετική κατακράτηση α

Ο παράγοντας εκλεκτικότητας (selectivity factor) α μιας στήλης για δύο ουσίες A και B:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

όπου, K_B : σταθερά κατανομής για την ισχυρότερα κατακρατούμενη ουσία B και K_A : σταθερά κατανομής για την ασθενέστερα κατακρατούμενη ουσία A.

Για
$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

προκύπτει μια σχέση μεταξύ του παράγοντα εκλεκτικότητας μεταξύ δύο ουσιών με τους αντίστοιχους παράγοντες κατακράτησης:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

$$k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Υπολογισμός της τιμής του α από τα δεδομένα του χρωματογραφήματος

Παράδειγμα

Μίγμα βενζολίου-τολουολίου εισάγεται σ' ένα χρωματογράφο. Αν ο νεκρός χρόνος είναι 42 s, το βενζόλιο εκλούεται στα 251 s και το τολουόλιο απαιτεί 333 s, να βρεθούν οι ρυθμισμένοι χρόνοι κατακράτησης, ο παράγοντας κατακράτησης κάθε ουσίας και ο παράγοντας εκλεκτικότητας.

Ρυθμισμένοι χρόνοι κατακράτησης

$$t_R' = t_R - t_M = 251 - 42 = 209 \text{ s (βενζόλιο)}$$

$$t_R' = t_R - t_M = 333 - 42 = 291 \text{ s (τολουόλιο)}$$

Οι παράγοντες κατακράτησης είναι

$$k_A' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Βενζόλιο: $(251 - 42) / 42 = 5,0$

Τολουόλιο: $(333 - 42) / 42 = 6,9$

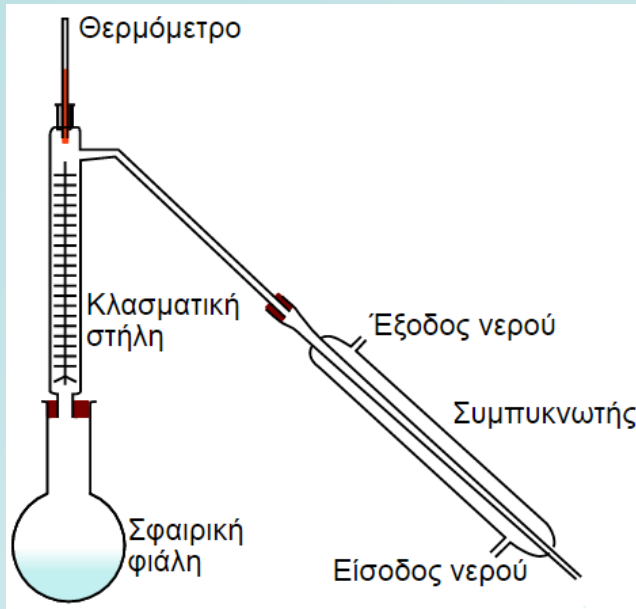
Ο παράγοντας εκλεκτικότητας είναι

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

$$\alpha = (333 - 42) / (251 - 42) = 1,39$$

Αποδοτικότητα χρωματογραφικής στήλης

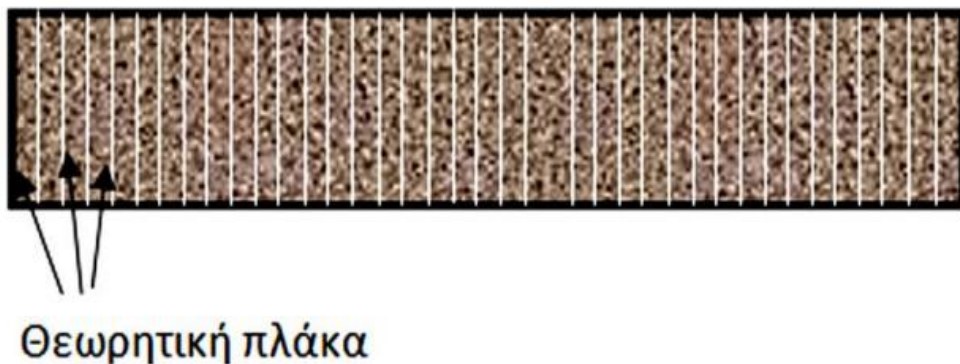
Η χρωματογραφική στήλη είναι ανάλογη με μια αποστακτική στήλη, και αποτελείται από ένα αριθμό διακριτών, αλλά συνεχών στενών θαλάμων που ονομάζονται **θεωρητικές πλάκες**.



Ο ατμός συμπυκνώνεται στα γυάλινα τοιχώματα (δίσκους) μέσα στη στήλη και ξαναγυρίζει πίσω στο υποκείμενο υγρό, με επαναρροή του αποστάγματος. Ο πιο ζεστός δίσκος είναι στον πυθμένα και ο πιο κρύος στην κορυφή. Σε συνθήκες σταθερής κατάστασης, ο ατμός και το υγρό σε κάθε δίσκο είναι σε ισορροπία (ισορροπία ατμού-υγρού). Το πιο πτητικό συστατικό του μείγματος φεύγει ως αέριο από την κορυφή της στήλης. Ο **διαχωρισμός είναι πιο αποτελεσματικός με την προσθήκη περισσότερων δίσκων.**

ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ

Μία χρωματογραφική στήλη αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό ξεχωριστών πλακών (μικρών τμημάτων στήλης). Σε κάθε πλάκα υποτίθεται ότι πραγματοποιείται μια ισορροπία της διαλυμένης ουσίας μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Η κίνηση των ουσιών προς την έξοδο της στήλης θεωρείται ως μια βήμα-προς-βήμα μεταφορά της εξισορροπημένης κινητής φάσης από τη μια πλάκα στην άλλη.



Αποδοτικότητα χρωματογραφικής στήλης

Η *θεωρία των πλακών* αντικαταστάθηκε από τη *θεωρία της ταχύτητας*, επειδή δεν ερμήνευσε τη διεύρυνση των κορυφών με κάποιο μηχανιστικό τρόπο.

(1) *ύψος της πλάκας* H και (2) *αριθμός των πλακών* N .

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

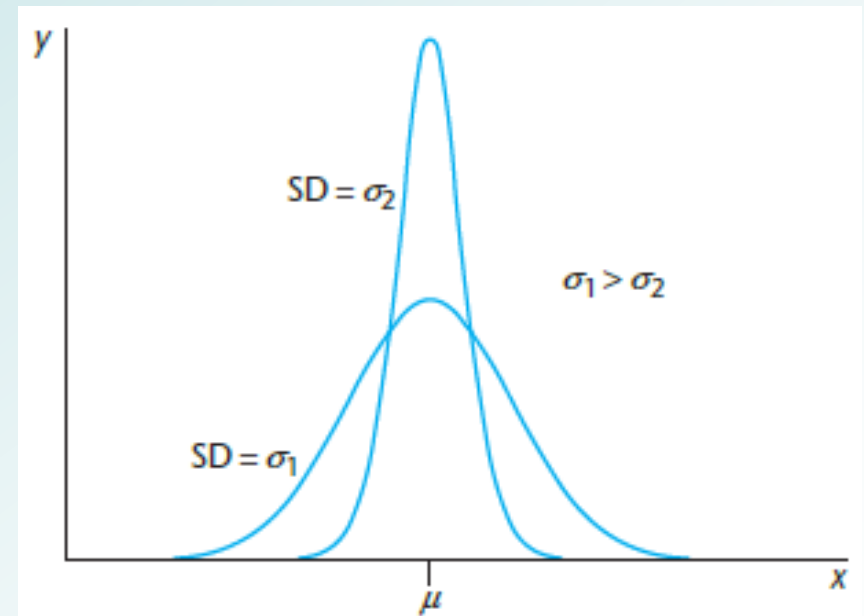
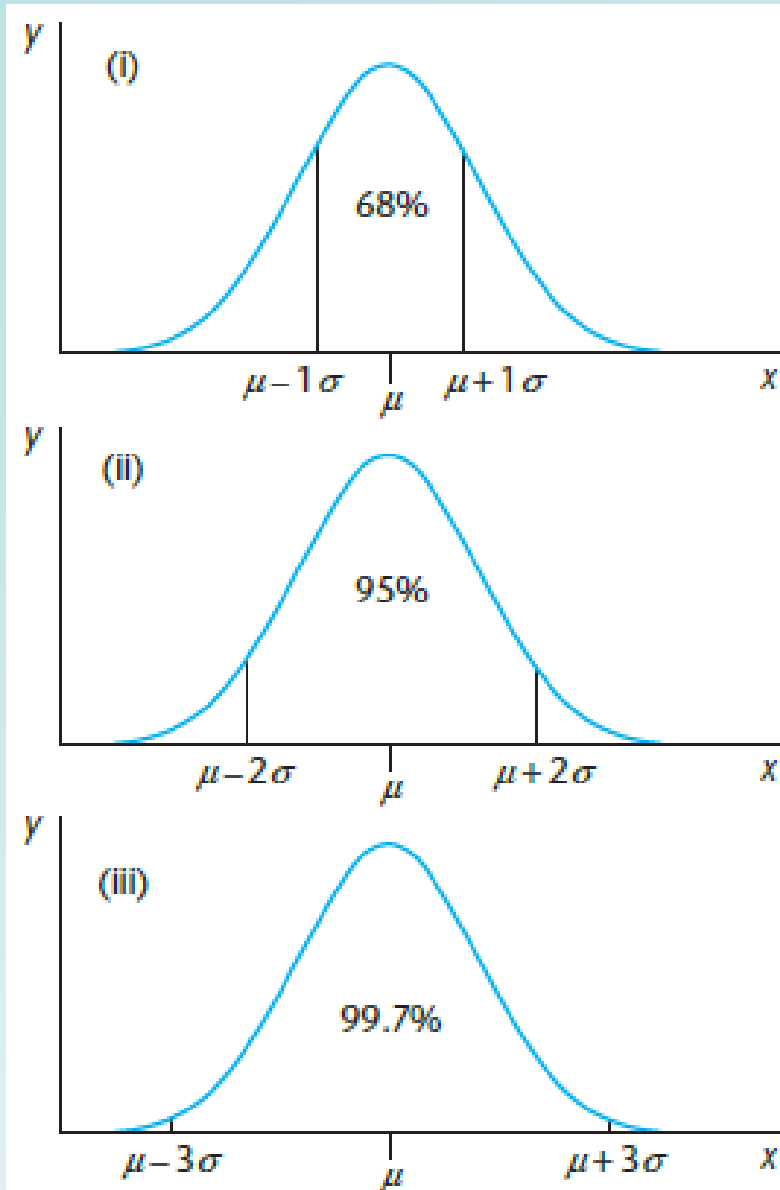
όπου L είναι το μήκος (συνήθως σε cm) του πληρωμένου τμήματος της στήλης.

Η αποδοτικότητα των χρωματογραφικών στηλών αυξάνει με τον αριθμό των πλακών και όσο το ύψος της πλάκας γίνεται μικρότερο.

Τα ύψη των πλακών κυμαίνονται από μερικά δέκατα έως και μερικά χιλιοστά του cm.

Ποια η σχέση μεταξύ των κορυφών ενός χρωματογραφήματος και των καμπύλων κανονικής κατανομής σφαλμάτων (καμπύλες Gauss)?

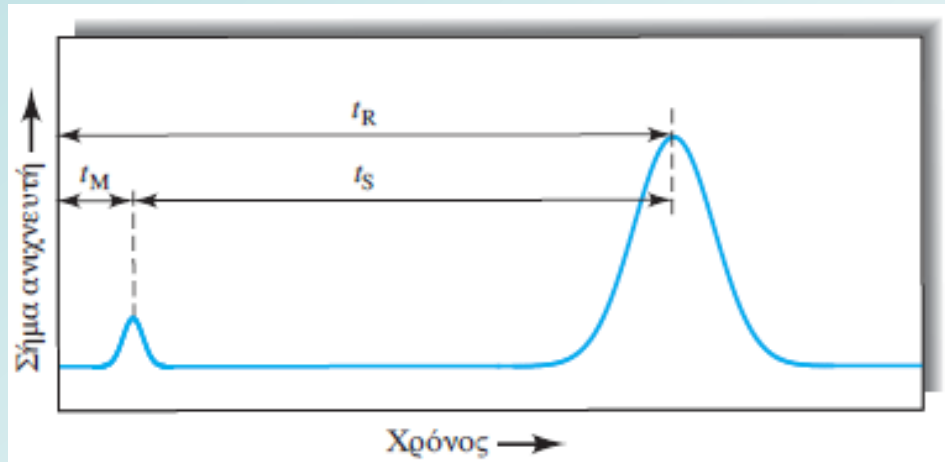
Μεταξύ των κορυφών ενός χρωματογραφήματος και των καμπύλων κανονικής κατανομής σφαλμάτων (καμπύλες Gauss) διαπιστώνεται ομοιότητα.



όπου x είναι η μετρούμενη τιμή και y η συχνότητα εμφάνισής της

Κάθε μόριο ουσίας κατά τη μετανάστευσή του υφίσταται πολλές χιλιάδες μεταφορές από την κινητή φάση στη στατική και αντίστροφα.

Μερικά μόρια κινούνται γρήγορα, επειδή τυχαία βρίσκονται στην κινητή φάση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τον μέσο χρόνο παραμονής και άλλα καθυστερούν επειδή βρίσκονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στη στατική φάση.



Αποτέλεσμα: συμμετρική διασπορά των ταχυτήτων γύρω από μια μέση τιμή, που αποδίδει τη μέση συμπεριφορά του μορίου.

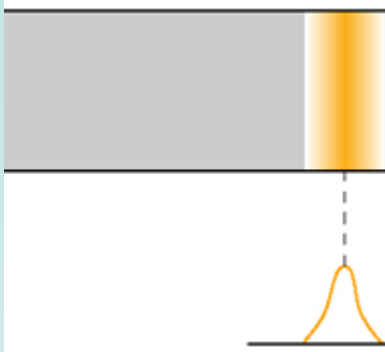
Το εύρος της ζώνης αυξάνει καθώς αυτή κινείται προς την έξοδο της στήλης, επειδή παρέχεται περισσότερος χρόνος για να συμβεί η ίδια η διεύρυνση.

Το εύρος της ζώνης είναι ανάλογο προς τον χρόνο παραμονής της ουσίας στη στήλη και αντιστρόφως ανάλογο προς την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.

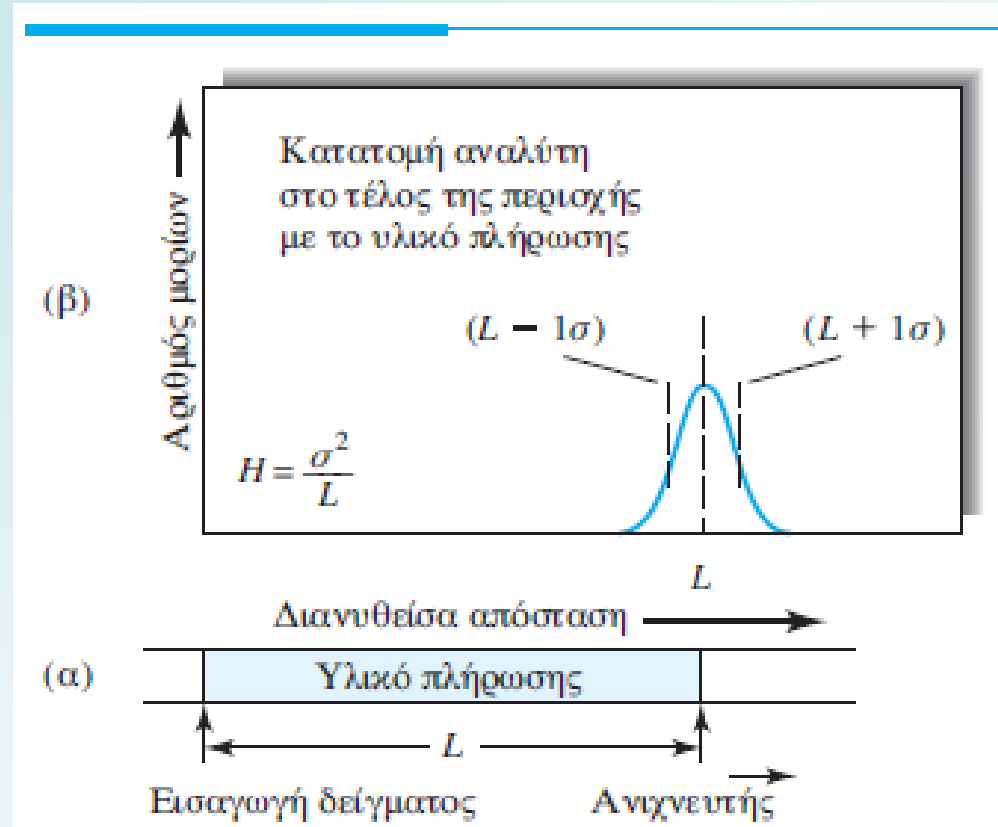
Ορισμός του ύψους πλάκας

Το εύρος μιας καμπύλης Gauss συνδέεται άμεσα με τη μεταβλητότητα (ή διακύμανση) σ^2 ή την τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Το **ύψος της πλάκας** θεωρείται το μήκος της στήλης το οποίο περιέχει (στην έξοδο της στήλης) κλάσμα του αναλύτη που βρίσκεται μεταξύ των θέσεων $L - \sigma$ και L .



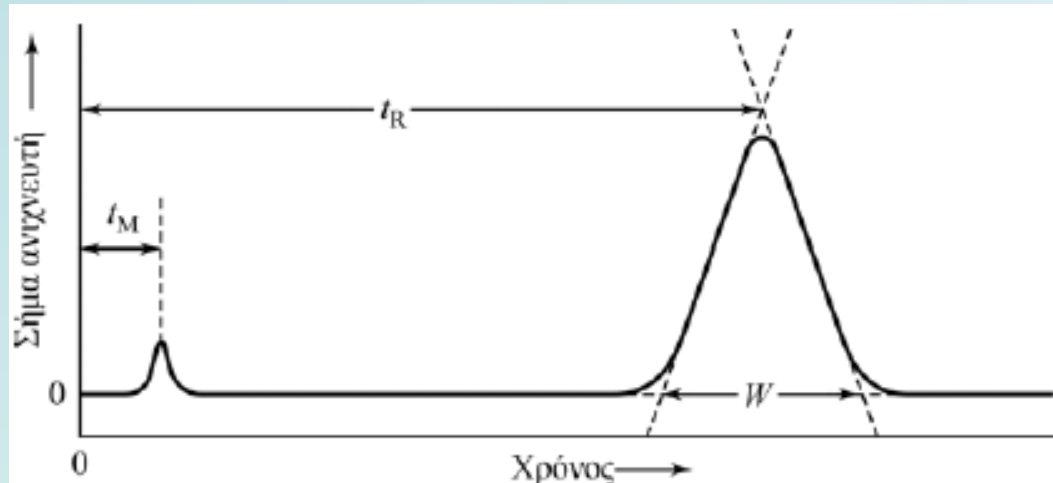
Καθώς το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη κανονικού σφάλματος μεταξύ των θέσεων $\pm\sigma$ είναι περίπου το 68% του ολικού εμβαδού, το **ύψος της πλάκας** (με βάση τον ορισμό) περιέχει περίπου το 34% της ποσότητας του αναλύτη.



Ορισμός του ύψους πλάκας $H = \frac{\sigma^2}{L}$

Μικρότερο ύψος πλάκας, στενότερη κορυφή.

Γραφική μέθοδος υπολογισμού της τυπικής απόκλισης μιας χρωματογραφικής κορυφής: $W = 4\sigma$



Φέρονται εφαπτόμενες στα σημεία καμπής στις δύο πλευρές μιας χρωματογραφικής κορυφής και προεκτείνονται, ώστε να σχηματισθεί ένα τρίγωνο με τη γραμμή βάσης ενός χρωματογραφήματος.

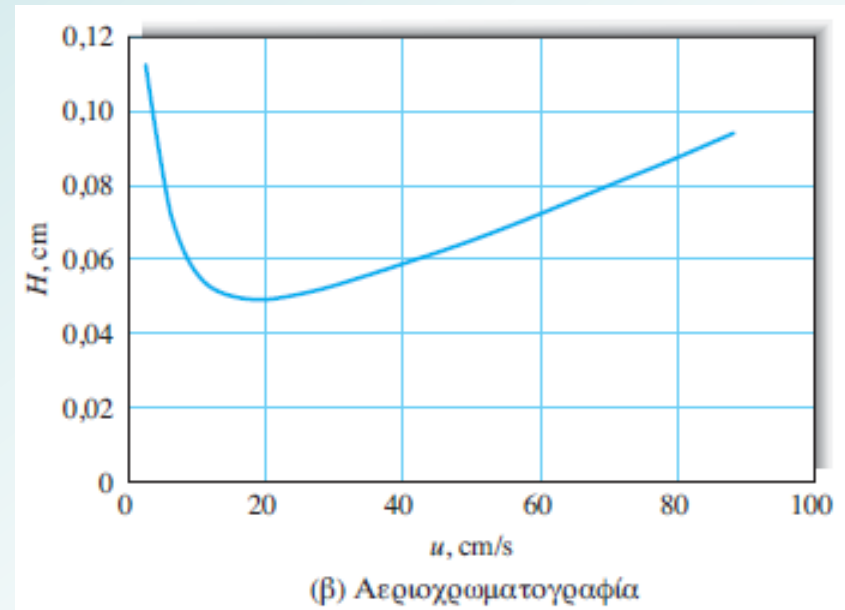
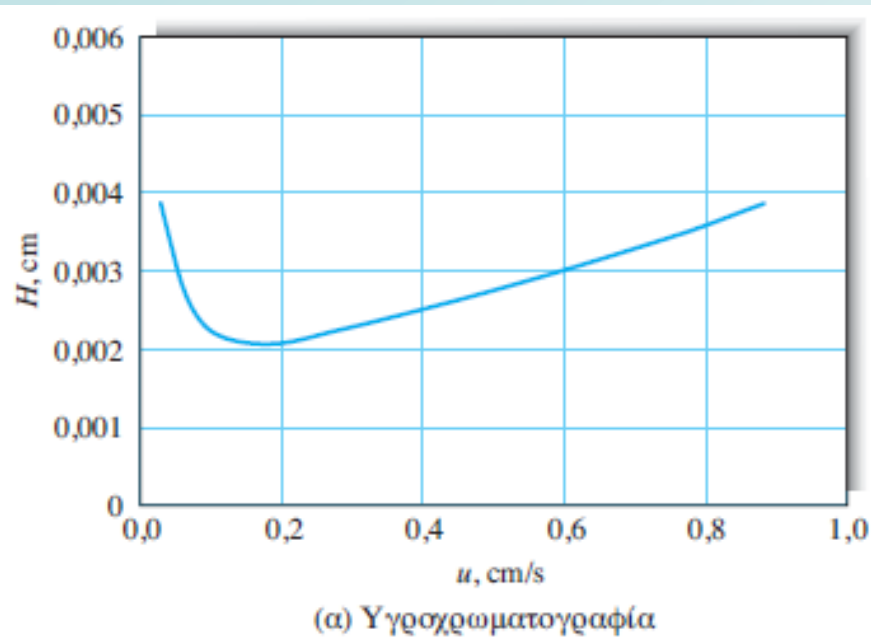
Η επιφάνεια του τριγώνου είναι περίπου το 96% της επιφάνειας κάτω από την κορυφή. Το 96% περίπου της επιφάνειας κάτω από μια κορυφή Gauss περικλείεται στο διάστημα $\pm 2\sigma$ γύρω από το σημείο του μεγίστου. Επομένως, οι τομές βρίσκονται περίπου στο $\pm 2\sigma$ γύρω από το σημείο μέγιστου, οπότε θα είναι $W = 4\sigma$.

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

Η διεύρυνση της χρωματογραφικής ζώνης (ή κορυφής) είναι αποτέλεσμα της καθορισμένης ταχύτητας πραγματοποίησης διάφορων διεργασιών μεταφοράς μάζας κατά τη μετανάστευση μιας ουσίας κατά μήκος της στήλης. Μερικές από τις ταχύτητες αυτές είναι δυνατόν να ελεγχθούν με ρύθμιση των πειραματικών μεταβλητών.

Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης

Η **θεωρία της ταχύτητας** που ερμηνεύει τη διεύρυνση των χρωματογραφικών ζωνών προβλέπει με επιτυχία τη μορφή του διαγράμματος H ως προς u . Διάγραμμα van Deemter.



Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης στο ύψος πλάκας στην (α) υγροχρωματογραφία και (β) αεριοχρωματογραφία

Σχέση μεταξύ του ύψους πλάκας και των μεταβλητών της στήλης

Έχουν διατυπωθεί περισσότερες από δώδεκα μαθηματικές εκφράσεις, που συσχετίζουν το ύψος πλάκας με τις μεταβλητές της στήλης με διαφορετικούς βαθμούς επιτυχίας.

Καμία από τις εξισώσεις αυτές δεν ερμηνεύει πλήρως τις πολύπλοκες φυσικές αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στη διεύρυνση των κορυφών.

Ωστόσο, μερικές από αυτές, αν και ατελείς, υποδεικνύουν τους τρόπους βελτίωσης της απόδοσης των χρωματογραφικών στηλών και μία απ' αυτές παρουσιάζεται στη συνέχεια.

Μαθηματική προσέγγιση της συμπεριφοράς των χρωματογραφικών στηλών: *εξίσωση van Deemter*

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

όπου H : ύψος της πλάκας σε cm, u : γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης σε cm/s και

A : πολλαπλότητα διαδρομών ροής,

B : διαμήκης διάχυση και

C : μεταφορά μάζας μεταξύ φάσεων (χρόνος εξισορρόπησης)

Διεργασία

Όρος στην van Deemter

Σχέση στήλης και αναλύτη

Πολλαπλότητα διαδρομών ροής	A	$A = 2\lambda d_p$
Διαμήκης διάχυση	B/u	$\frac{B}{u} = \frac{2\gamma D_M}{u}$
Μεταφορά μάζας μεταξύ υγρής και στατικής φάσης	$C_S u$	$C_S u = \frac{f_s(k')d_f^2}{D_s} u$
Μεταφορά μάζας στην κινητή φάση	$C_M u$	$C_M u = \frac{f_M(k')d_p^2}{D_M} u$

λ, γ : σταθερές που εξαρτώνται από την ποιότητα πλήρωσης της στήλης

B : συντελεστής διαμήκου διάχυσης

C_S, C_M : συντελεστές μεταφοράς μάζας στη στατική και στην κινητή φάση, αντίστοιχα

u : Γραμμική ταχύτητα κινητής φάσης

D_M : Συντελεστής διάχυσης στην κινητή φάση

D_S : Συντελεστής διάχυσης στη στατική φάση

k' : Παράγοντας κατακράτησης

d_p : Διάμετρος του υλικού πλήρωσης

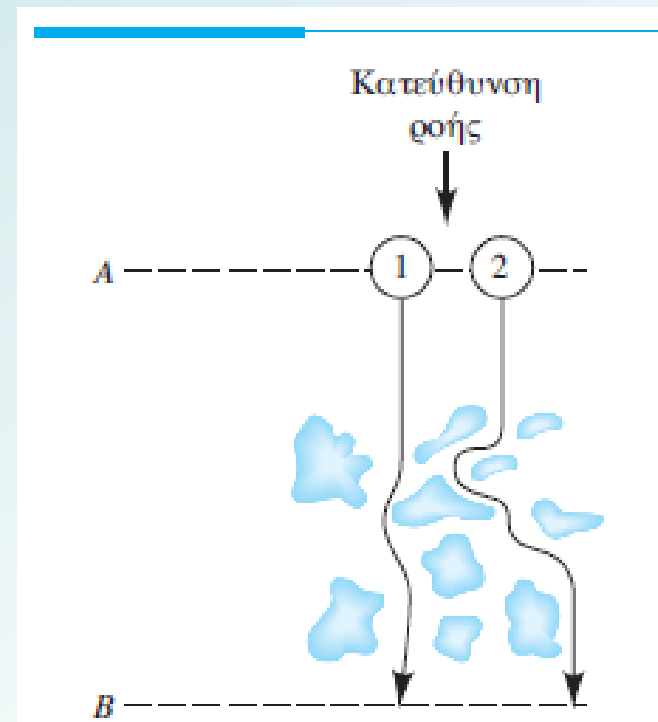
d_f : Πάχος της υγρής επικάλυψης της στατικής φάσης

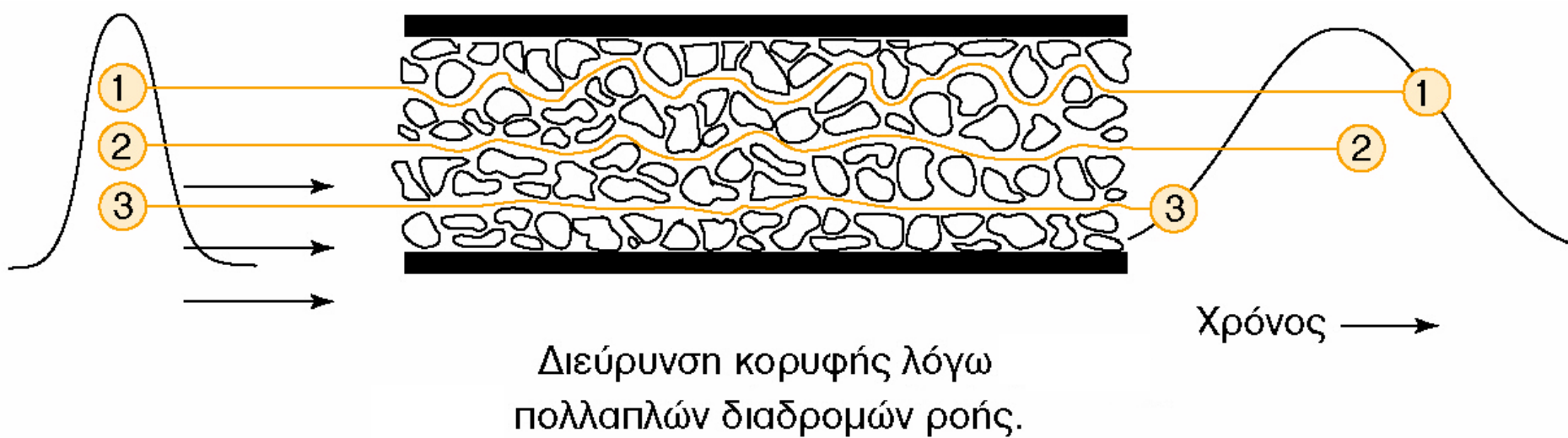
Όρος πολλαπλότητας διαδρομών ροής

$$A = 2\lambda d_p$$

Η διεύρυνση των κορυφών οφείλεται σε κάποιο βαθμό στην πολλαπλότητα των διαδρομών που μπορεί να ακολουθήσει ένα μόριο (ή ιόν) κατά τη διέλευσή του μέσω μιας πληρωμένης στήλης. Το μήκος των διαδρομών αυτών μπορεί να διαφέρει σημαντικά, όπως διαφέρει σημαντικά και ο χρόνος παραμονής των σωματιδίων της ίδιας ουσίας στη στήλη, οπότε τα μόρια της ουσίας φθάνουν στην έξοδο της στήλης κατά τη διάρκεια κάποιου χρονικού διαστήματος, γεγονός το οποίο οδηγεί σε διεύρυνση της ζώνης.

(Στη αεριοχρωματογραφία χρησιμοποιούνται δύο γενικοί τύποι στηλών: οι *πληρωμένες* (ή “*πακεταρισμένες*”) και οι *στήλες ανοικτού σωλήνα* ή *τριχοειδείς*)





Για ανοικτού σωλήνα (ανοικτές σωληνοειδείς στήλες) : $A = 0$

Όρος διαμήκους διάχυσης

$$\frac{B}{u} = \frac{2\gamma D_M}{u}$$


διαμήκης διάχυση (longitudinal diffusion): αποτελεί παράγοντα διεύρυνσης των κορυφών ή ζωνών, λόγω διάχυσης της ουσίας από το πυκνό κέντρο της ζώνης προς το αραιότερο πρόσθιο ή οπίσθιο τμήμα της, δηλαδή κατά την κατεύθυνση ροής της κινητής φάσης και αντίθετα προς αυτή.

Η σταθερά γ ονομάζεται **παράγοντας παρακώλυσης** (obstructive factor). Υποδηλώνει ότι η διαμήκης διάχυση παρακωλύεται από την πλήρωση.

Στις πληρωμένες στήλες ο παράγοντας αυτός έχει τυπικά την τιμή 0,6, ενώ για μη πληρωμένες τριχοειδείς στήλες η τιμή αυτή είναι 1.


Μεγαλύτερη γραμμική ταχύτητα, λιγότερος χρόνος παραμονής μιας ένωσης στη στήλη, άρα μικρότερη διεύρυνση της κορυφής λόγω διάχυσης.

διαμήκης διάχυση



Ζώνη της διαλυμένης ουσίας
ύστερα από μικρό χρόνο στη στήλη

↓ Διαμήκης
διάχυση (B/u_x)



Ζώνη της διαλυμένης ουσίας
ύστερα από περισσότερο χρόνο στη στήλη

→ Κατεύθυνση κίνησης

Η διαμήκης διάχυση αυξάνει τον όρο B/u_x στη εξίσωση van Deemter. Η ουσία διαχέεται συνεχώς και απομακρύνεται από την περιοχή μεγάλης συγκέντρωσης στο κέντρο της ζώνης. Όσο μεγαλύτερη η ροή τόσο λιγότερο χρόνο παραμένει η ουσία στη στήλη και τόσο μικρότερη είναι η διαμήκης διάχυση.

Όρος μεταφοράς μάζας C_u

Σχετίζεται: i) με την αντίσταση μεταφοράς μάζας στη στατική φάση

$$C_S u = \frac{f_s(k') d_f^2}{D_S} u$$

που εμποδίζει την αποκατάσταση ισορροπίας και

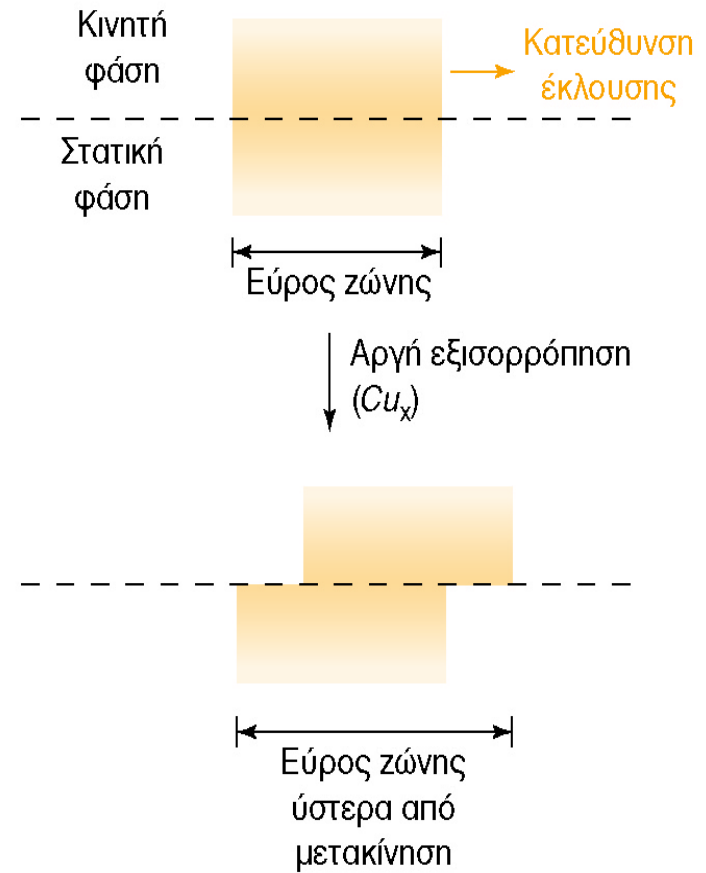
ii) με τη μεταφορά μάζας στην κινητή φάση (εγκάρσια διάχυση)

$$C_M u = \frac{f_M(k') d_p^2}{D_M} u$$

που επηρεάζεται από τους συντελεστές διάχυσης

Ο καθορισμένος χρόνος που απαιτείται για να εξισορροπηθεί μια ουσία μεταξύ κινητής και στατικής φάσης προκαλεί το Cu_x στην εξίσωση van Deemter. Όσο μικρότερη η γραμμική ροή τόσο πιο ολοκληρωμένη είναι η εξισορρόπηση και τόσο μικρότερη η διεύρυνση της ζώνης. —

Ένα μόριο διαλυμένης ουσίας στη στατική φάση χρειάζεται περισσότερο από το αναμενόμενο για να επιστρέψει στην κινητή φάση.



Ένα μέρος της ουσίας προσκολλάται στη στατική φάση, εκείνη που παραμένει στην κινητή φάση κινείται προς τα εμπρός και έτσι προκαλείται διεύρυνση της φάσης

Συμπερασματικά

Διαδικασίες που επιδρούν στη διεύρυνση ζώνης:

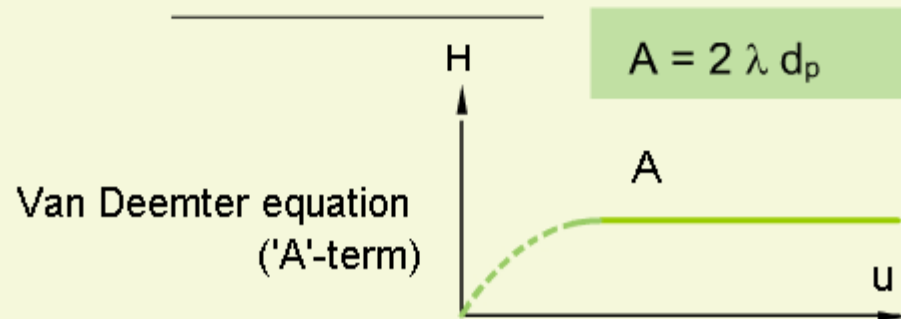
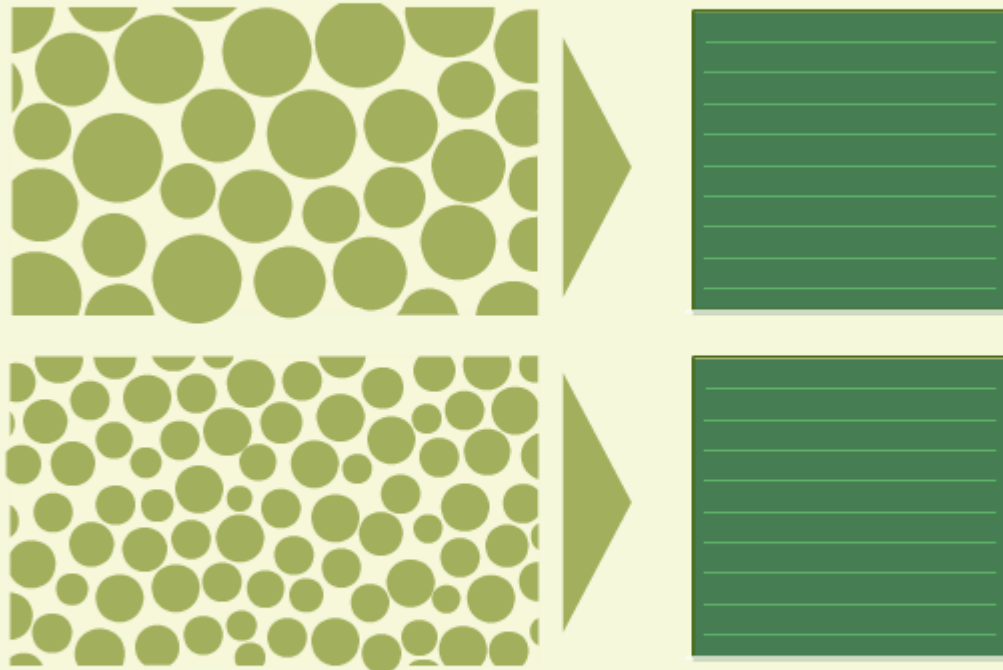
1. Πολλαπλότητα διαδρομών των μορίων της ουσίας
2. Διαμήκης και εγκάρσια διάχυση της ουσίας στην κινητή φάση
3. Καθορισμένη ταχύτητα εξισορρόπησης της ουσίας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης

Μεταβλητές που επιδρούν στη διεύρυνση ζώνης:

1. Γραμμική ταχύτητα κινητής φάσης, u (cm s^{-1})
2. Συντελεστής διάχυσης στην κινητή φάση, D_M ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
3. Συντελεστής διάχυσης στη στατική φάση, D_S ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
4. Διάμετρος του υλικού πλήρωσης, d_p (cm)
5. Πάχος της υγρής επικάλυψης της στατικής φάσης, d_f (cm)

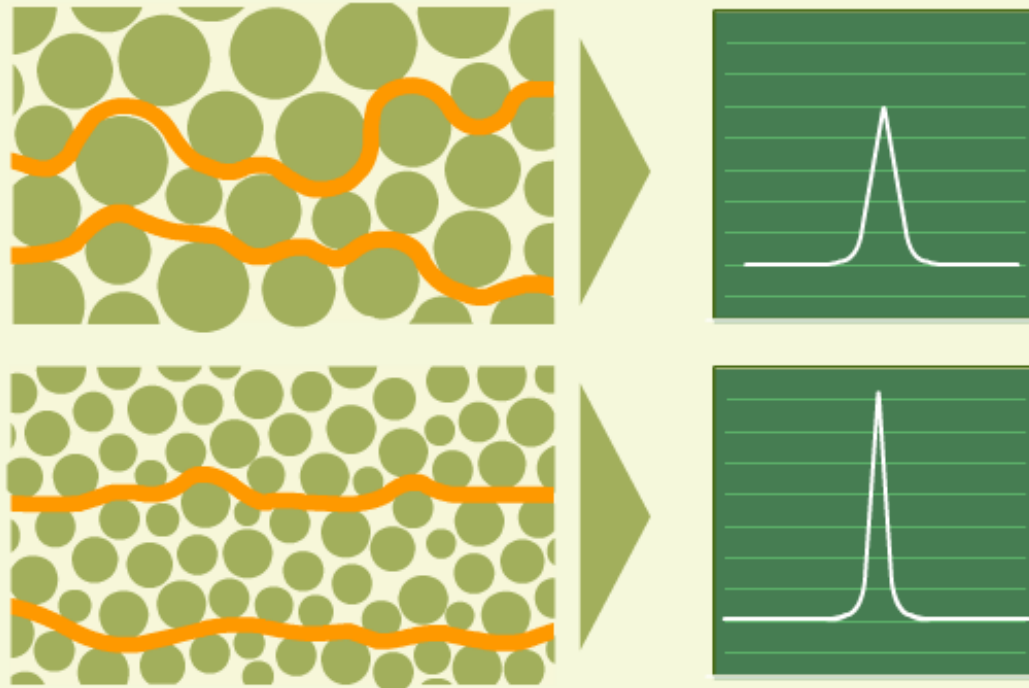
Όρος πολλαπλότητας διαδρομών

Όσο μεγαλύτερα τα σωματίδια τόσο μεγαλύτερη η διαδρομή των συστατικών άρα εντονότερο το φαινόμενο διάχυσης

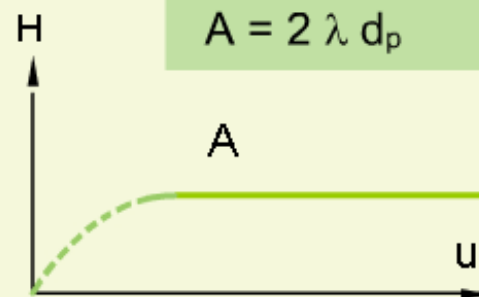


Όρος πολλαπλότητας διαδρομών

Όσο μεγαλύτερα τα σωματίδια τόσο μεγαλύτερη η διαδρομή των συστατικών άρα εντονότερο το φαινόμενο διάχυσης

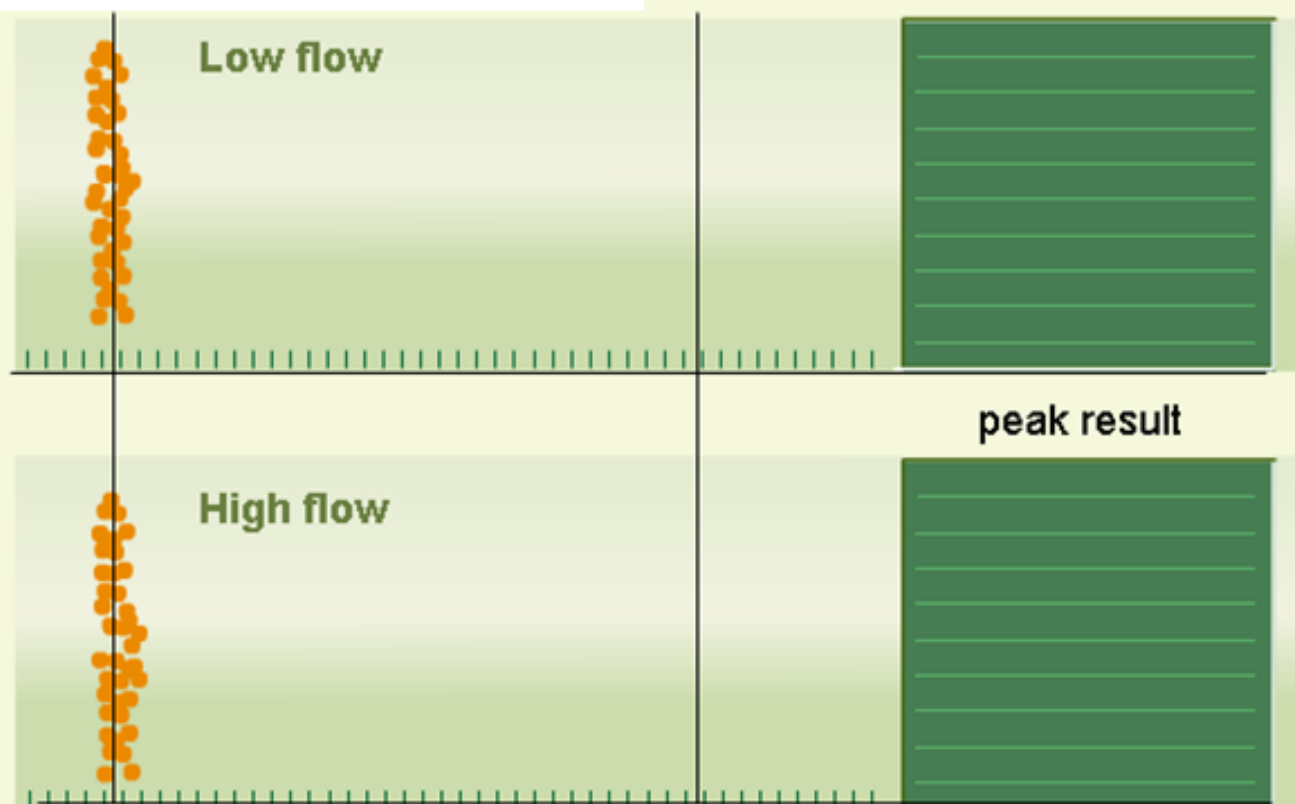
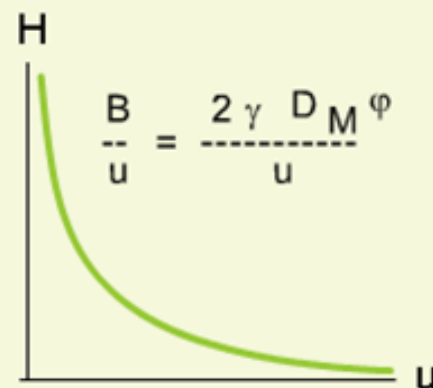


Van Deemter equation
(‘A’-term)



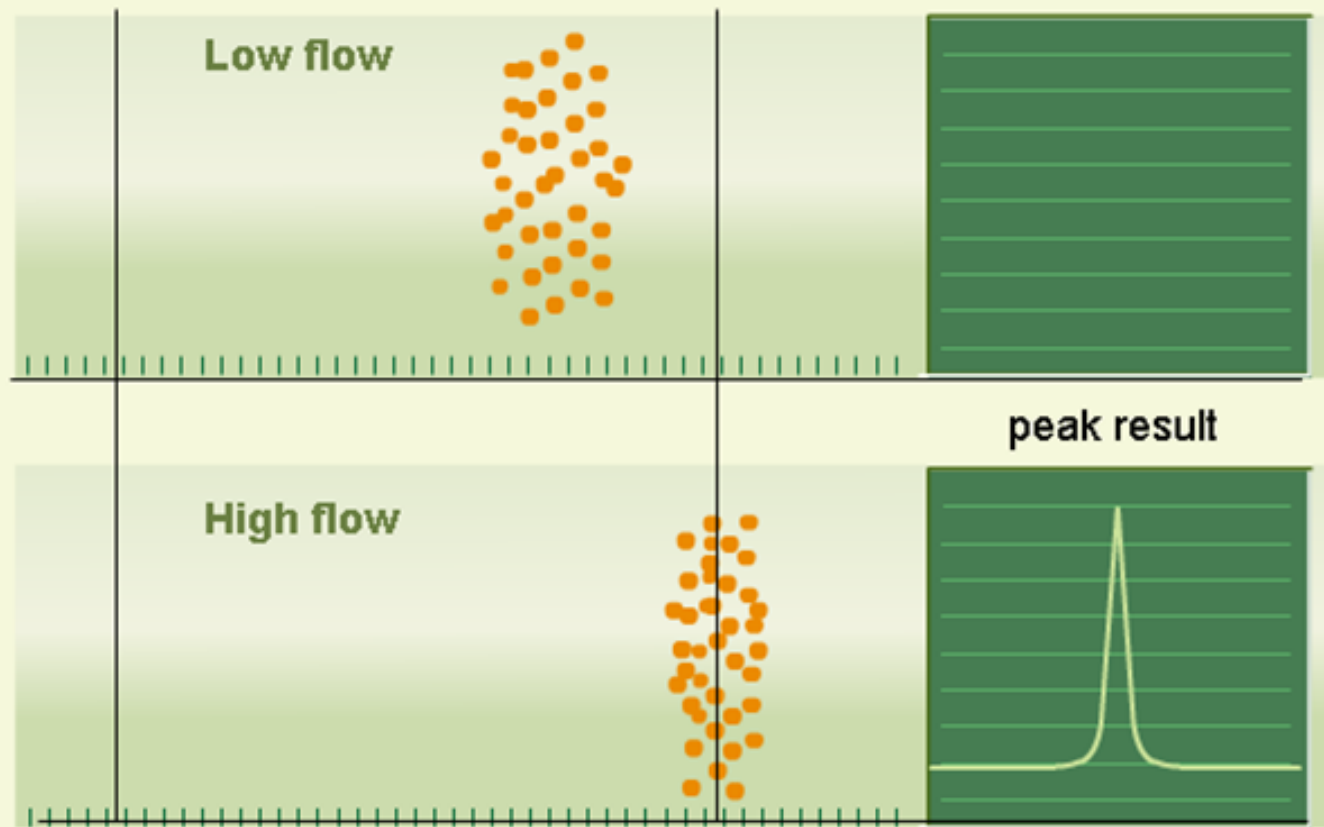
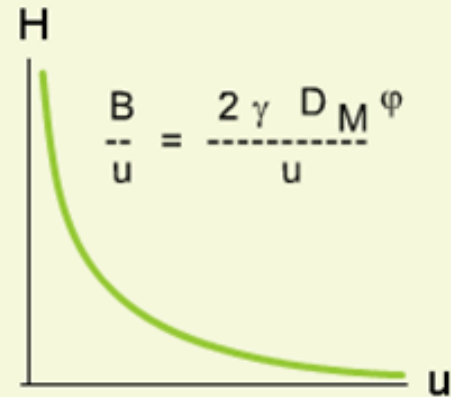
Όρος διαμήκους διάχυσης

Μερικά μόρια κινούνται γρηγορότερα και άλλα αργότερα, σε σχέση με τη μέση ταχύτητα. Συμβαίνει διεύρυνση της κορυφής κυρίως σε χαμηλές ταχύτητες ροής.



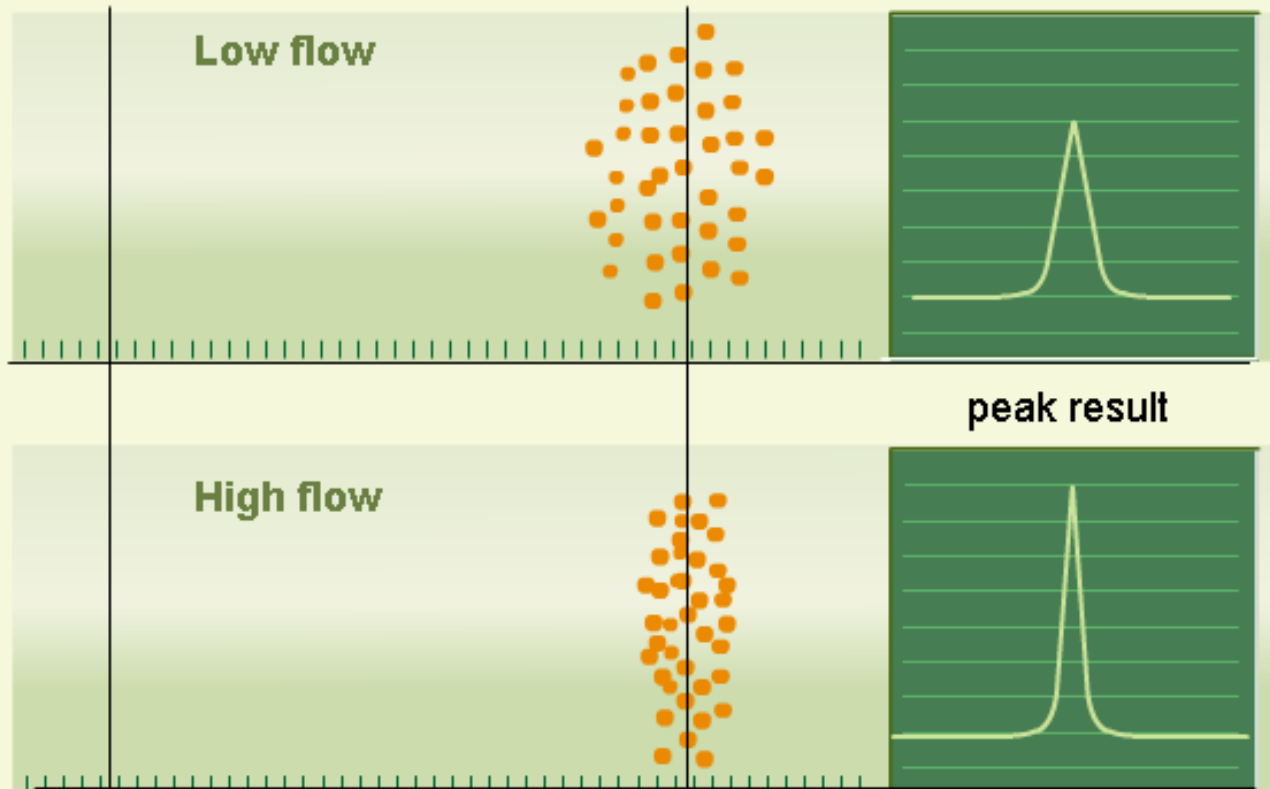
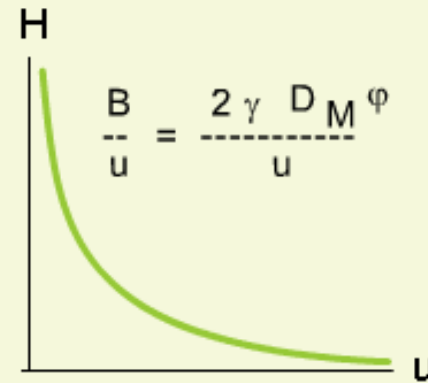
Όρος διαμήκους διάχυσης

Μερικά μόρια κινούνται γρηγορότερα και άλλα αργότερα, σε σχέση με τη μέση ταχύτητα. Συμβαίνει διεύρυνση της κορυφής κυρίως σε χαμηλές ταχύτητες ροής.



Όρος διαμήκους διάχυσης

Μερικά μόρια κινούνται γρηγορότερα και άλλα αργότερα, σε σχέση με τη μέση ταχύτητα. Συμβαίνει διεύρυνση της κορυφής κυρίως σε χαμηλές ταχύτητες ροής.



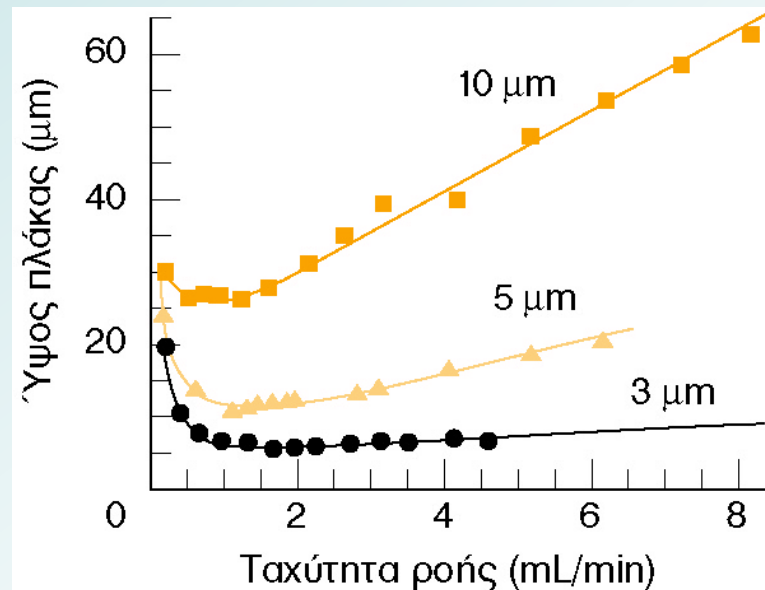
Ελαχιστοποίηση της διεύρυνσης ζώνης

Διάμετρος της στήλης (επηρεάζει την εγκάρσια διάχυση) και διάμετρος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης

$$F_{C2} = \left(\frac{d_{C2}}{d_{C1}} \right)^2 \cdot F_{C1}$$

F_c = Column Flow
 d_c = Column Diameter

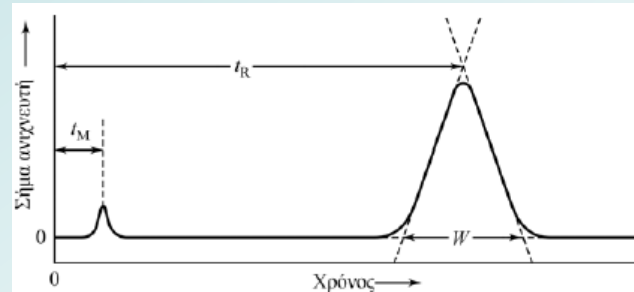
Για να αξιοποιηθεί το πλεονέκτημα της επίδρασης της διαμέτρου της στήλης χρησιμοποιούνται όλο και πιο λεπτές χρωματογραφικές στήλες, με μικρότερη διάμετρο σωματιδίων.



Πως προσδιορίζονται οι σταθερές A, B και C στην εξίσωση van Deemter

1. Λαμβάνεται μια χρωματογραφική κορυφή σε τρεις ταχύτητες ροής της κινητής φάσης, οι οποίες να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους
2. Υπολογίζεται η τιμή του N για κάθε τιμή των τριών ταχυτήτων με βάση την εξίσωση

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



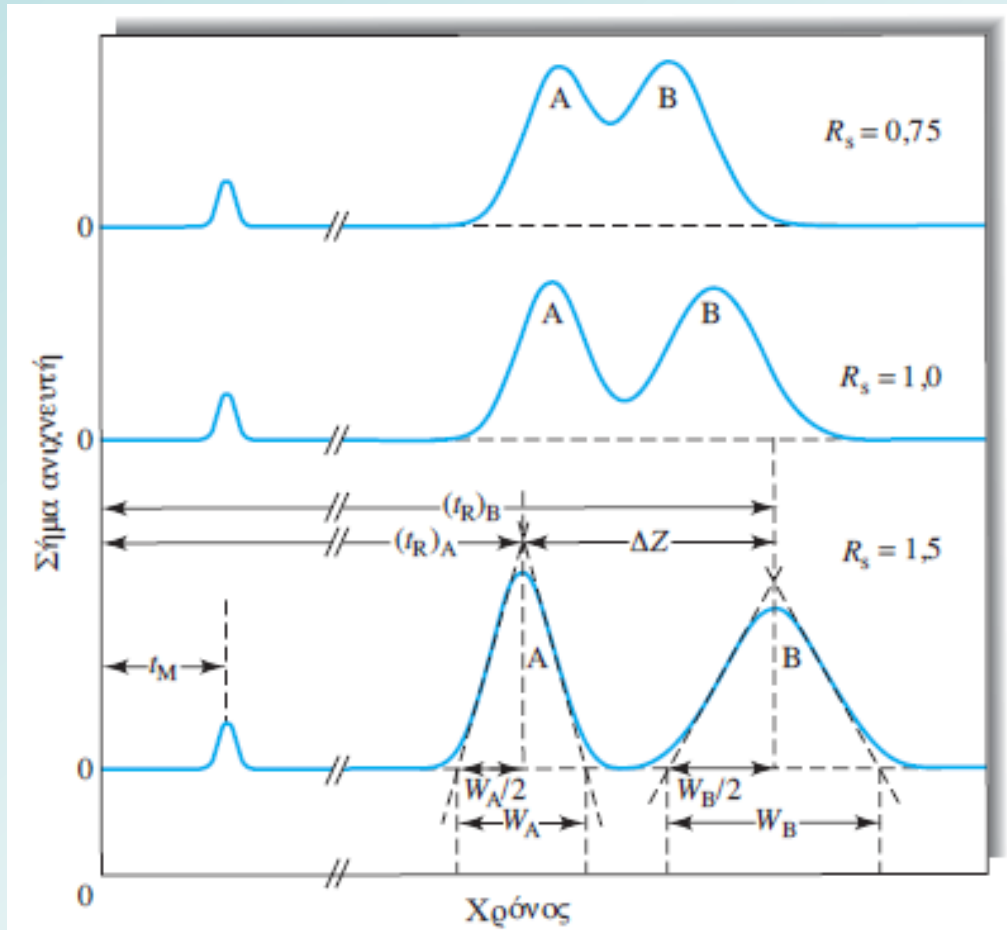
και οι τιμές του H με βάση την εξίσωση

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

3. Οι τιμές του H που υπολογίστηκαν, αντικαθίστανται στην εξίσωση van Deemter και επιλύεται σύστημα τριών εξισώσεων με τρεις αγνώστους A, B και C.

Η **διαχωριστική ικανότητα** (resolution) R_s μιας στήλης αποτελεί ένα ποσοτικό μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίσει **δύο** αναλύτες. Η διαχωριστική ικανότητα της στήλης ορίζεται ως

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$



Εάν η διαχωριστική ικανότητα είναι ίση προς 1,0, τότε η ζώνη της ουσίας A περιέχει περίπου 4% B και η ζώνη B το ίδιο ποσοστό της ουσίας A. Εάν η διαχωριστική ικανότητα είναι 1,5, τότε τα αντίστοιχα ποσοστά επικάλυψης είναι περίπου 0,3%.

Σχέση μεταξύ διαχωριστικής ικανότητας R_s και θεωρητικών πλακών N

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} (\gamma - 1)$$

όπου γ ο παράγοντας διαχωρισμού, το κλάσμα των γραμμικών ταχυτήτων των δύο ουσιών ($\gamma > 1$).

$$\gamma = \frac{u_A}{u_B} = \frac{t_B}{t_A}$$

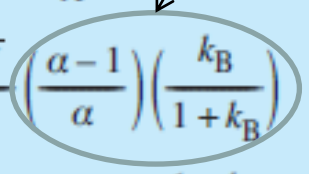
Σχετίζεται με τον παράγοντα εκλεκτικότητας α

ΝΑ ΜΗ ΣΥΓΧΕΕΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΠΑΡΑΚΩΛΥΣΗΣ ΠΟΥ ΕΙΔΑΜΕ ΣΤΗΝ ΕΞΙΣΩΣΗ VAN DEEMTER)

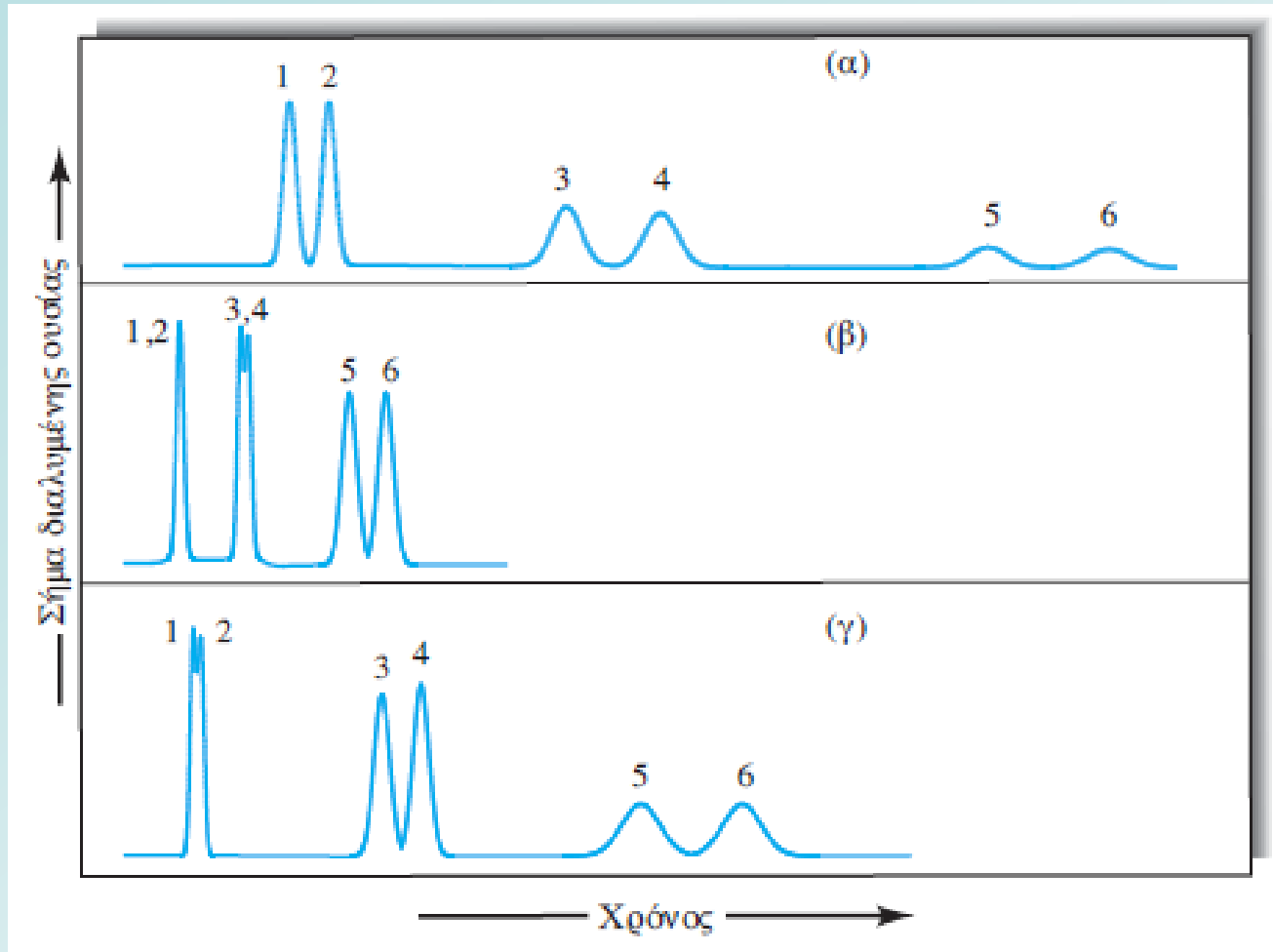
Σημαντικές παράγωγες ποσότητες και σχέσεις τους

Παράμετρος	Υπολογισμός της παράγωγης παραμέτρου	Σχέση με άλλες ποσότητες
Γραμμική ταχύτητα κινητής φάσης	$u = \frac{L}{t_M}$	
Όγκος κινητής φάσης	$V_M = t_M F$	
Παράγοντας κατακράτησης	$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$	$k = \frac{KV_S}{V_M}$
Σταθερά κατανομής	$K = \frac{kV_M}{V_S}$	$K = \frac{c_S}{c_M}$
Παράγοντας εκλεκτικότητας	$\alpha = \frac{(t_R)_A - t_M}{(t_R)_B - t_M}$	$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A}$
Διαχωριστική ικανότητα	$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$	$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right)$
Αριθμός πλακών	$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$	$N = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_B}{k_B} \right)^2$
Ύψος πλάκας	$H = \frac{L}{N}$	

γ - 1



Το πρόβλημα της συνολικής έκλυσης



Μια συνηθισμένη λύση αυτού του προβλήματος είναι η μεταβολή των συνθηκών που καθορίζουν τις τιμές k' κατά τη διάρκεια του ίδιου του διαχωρισμού. Στην υγροχρωματογραφία μεταβολές του k' επέρχονται με μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης κατά την έκλυση (**βαθμιδωτή έκλυση**). Στην αεριοχρωματογραφία η αριστοποίηση του διαχωρισμού μπορεί να επιτευχθεί με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης (**προγραμματισμός θερμοκρασίας**).

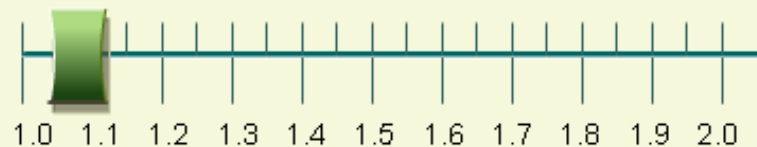
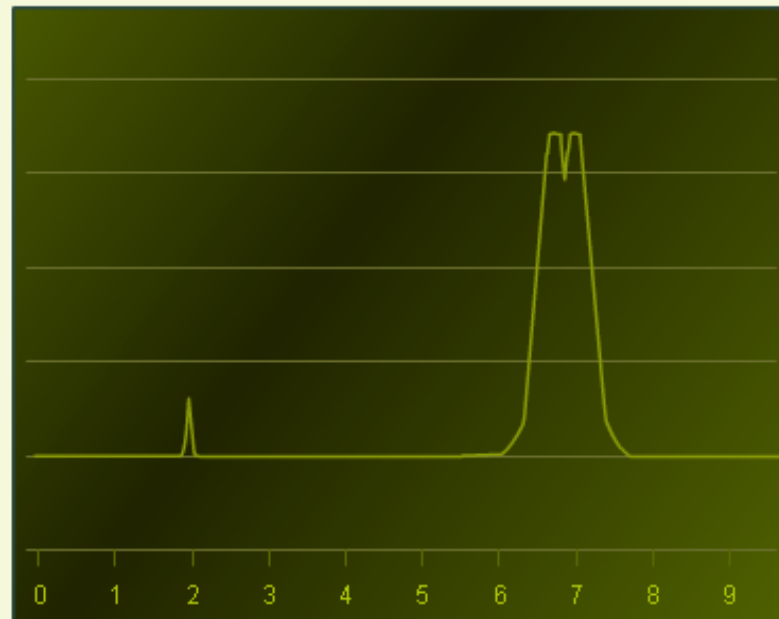
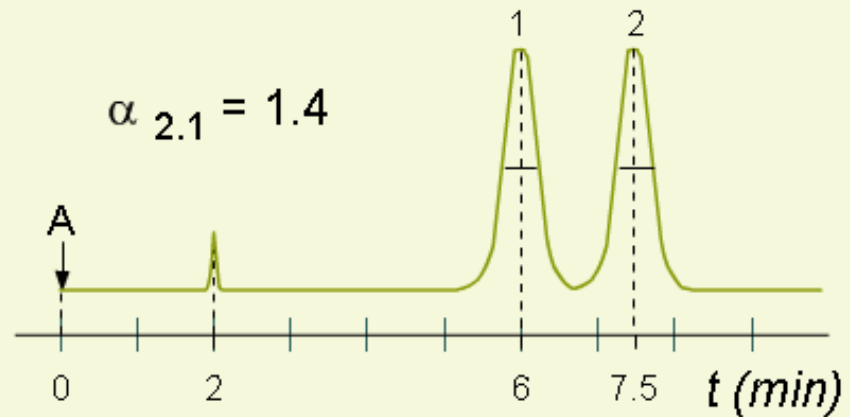
Παράγοντας εκλεκτικότητας α

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Σχετική κατακράτηση
μεταξύ δύο κορυφών.

Παράμετροι:

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ
συστατικών / στατικής /
κινητής φάσης.
Τύπος κινητής φάσης
Ιδιότητες στήλης
Θερμοκρασία



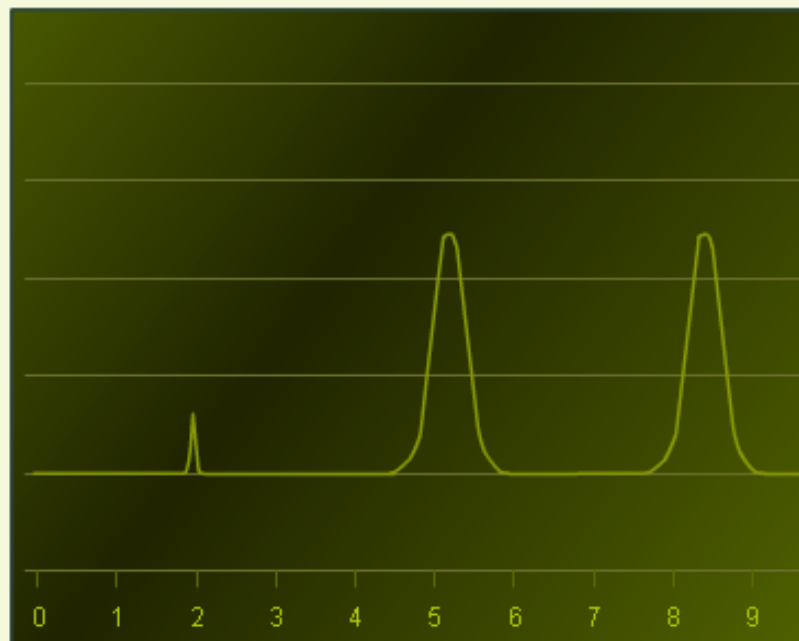
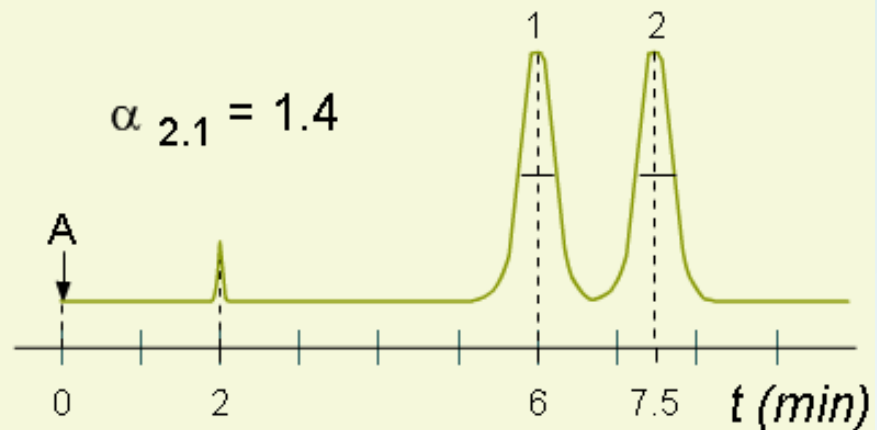
Παράγοντας εκλεκτικότητας α

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

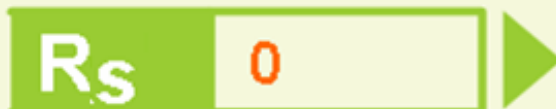
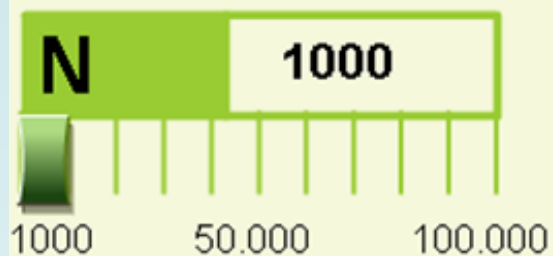
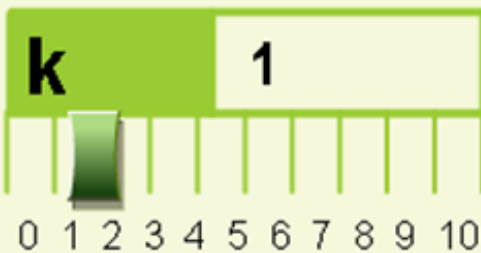
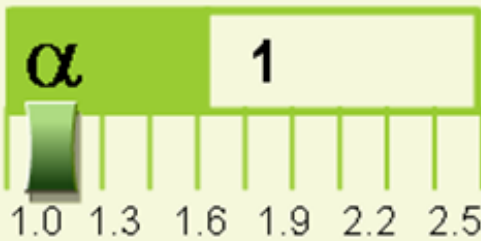
Σχετική κατακράτηση
μεταξύ δύο κορυφών.

Παράμετροι:

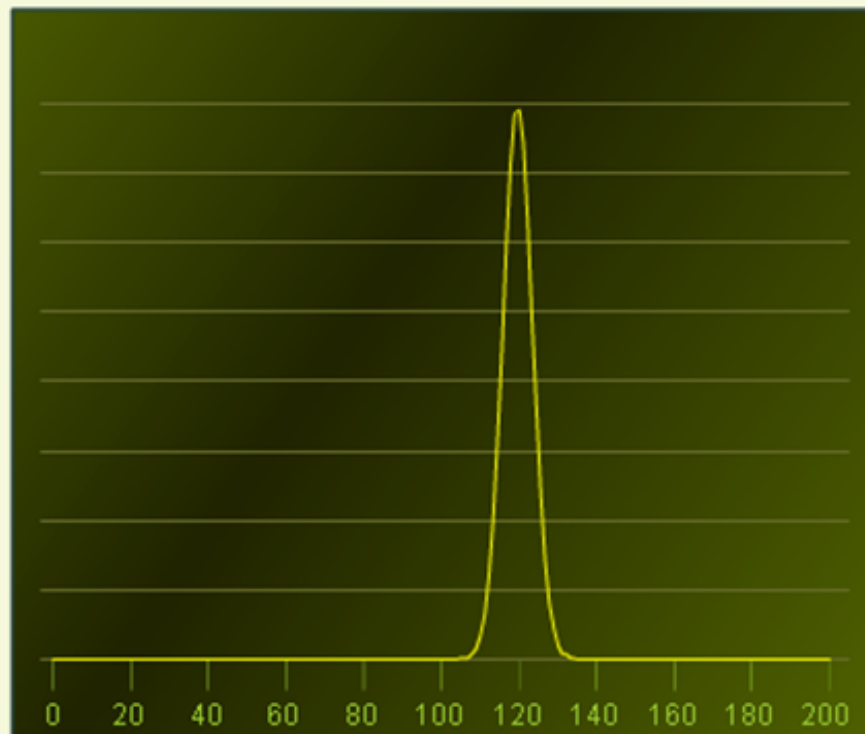
Αλληλεπιδράσεις μεταξύ
συστατικών / στατικής /
κινητής φάσης.
Τύπος κινητής φάσης
Ιδιότητες στήλης
Θερμοκρασία



Διαχωριστική ικανότητα R



$$R_S = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{k + 1} \times \sqrt{N}$$



Διαχωριστική ικανότητα R

α

2.5

1.0 1.3 1.6 1.9 2.2 2.5

k

8

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

N

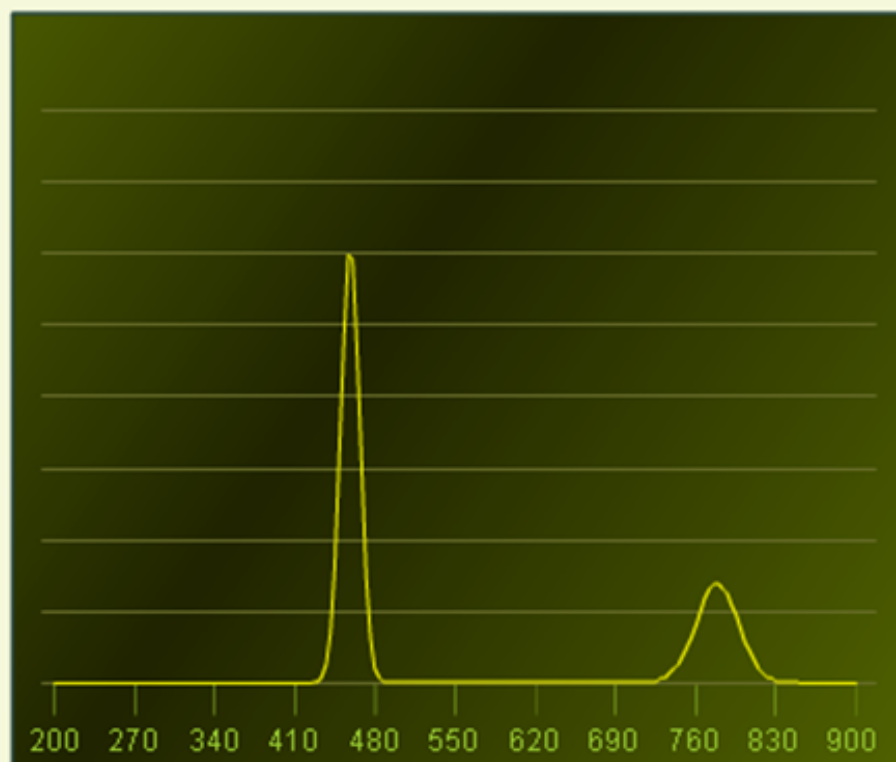
1000

1000 50.000 100.000

R_S

4.22

$$R_S = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{k + 1} \times \sqrt{N}$$



Διαχωριστική ικανότητα R

α

2.5

1.0 1.3 1.6 1.9 2.2 2.5

k

8

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

N

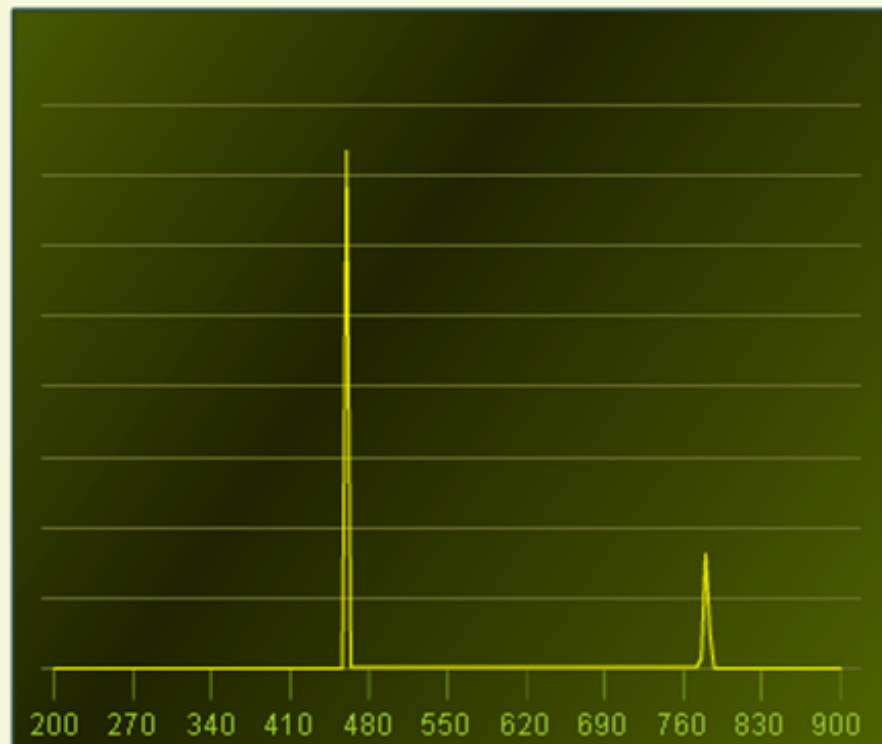
84853

1000 50.000 100.000

R_s

38.84

$$R_s = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{k + 1} \times \sqrt{N}$$



ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ

Δύο ουσίες έχουν παράγοντα διαχωρισμού $\gamma = 1,06$.

α. Πόσες θεωρητικές πλάκες απαιτούνται για να είναι η διαχωριστική ικανότητα $R=1$;

β. Πόσες για να είναι 2;

γ. Αν το ύψος της πλάκας είναι 0,20 mm, πόσο πρέπει να είναι το μήκος της στήλης ώστε η διαχωριστική ικανότητα να είναι 1;

ΑΠΑΝΤΗΣΗ

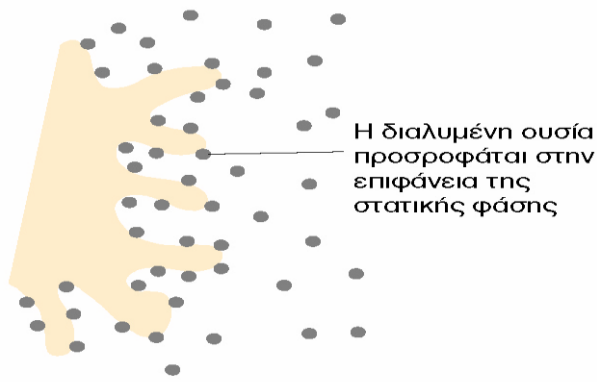
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} (\gamma - 1) = 1,0 \Rightarrow N = \left(\frac{4 \times 1,0}{1,06 - 1} \right)^2 = 4,4 \times 10^3 \quad \text{θεωρητικές πλάκες}$$

Για να γίνει η διαχωριστική ικανότητα διπλάσια (2,0) απαιτούνται τέσσερις φορές περισσότερες θεωρητικές πλάκες = $1,8 \times 10^4$ πλάκες.

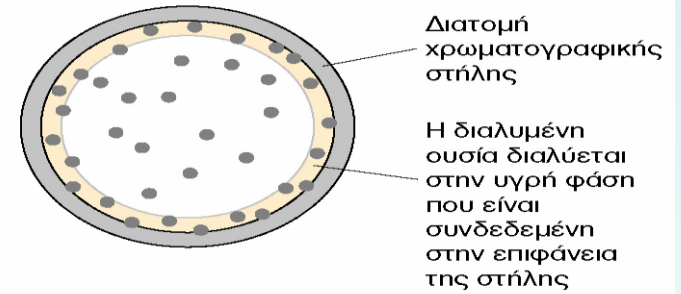
Για διαχωριστική ικανότητα 1,0, το μήκος της στήλης είναι $L = N \times H$

$$(4,4 \times 10^3 \text{ πλάκες}) \times (0,20 \text{ mm/πλάκα}) = 0,88 \text{ m.}$$

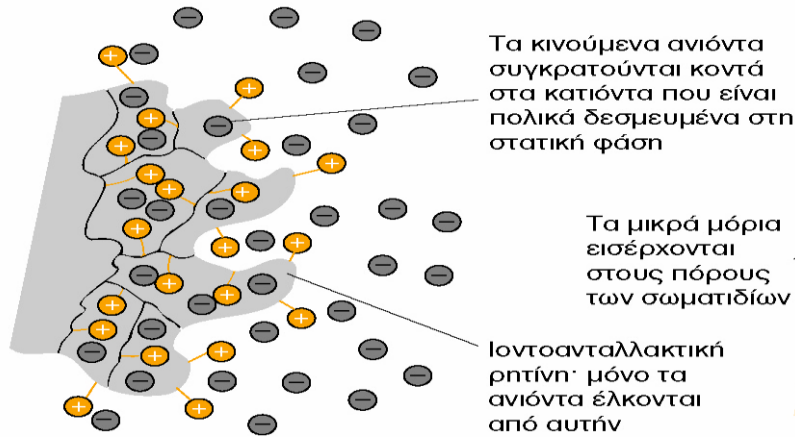
Είδη χρωματογραφίας



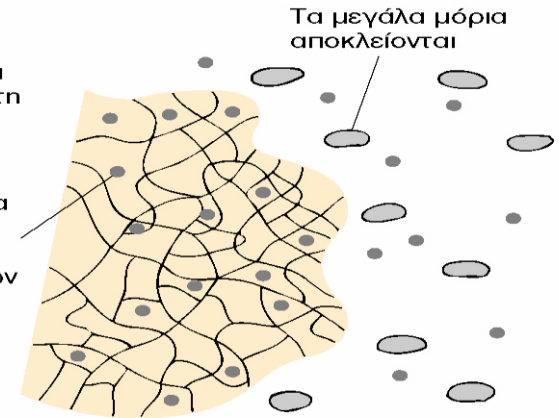
Χρωματογραφία προσρόφησης



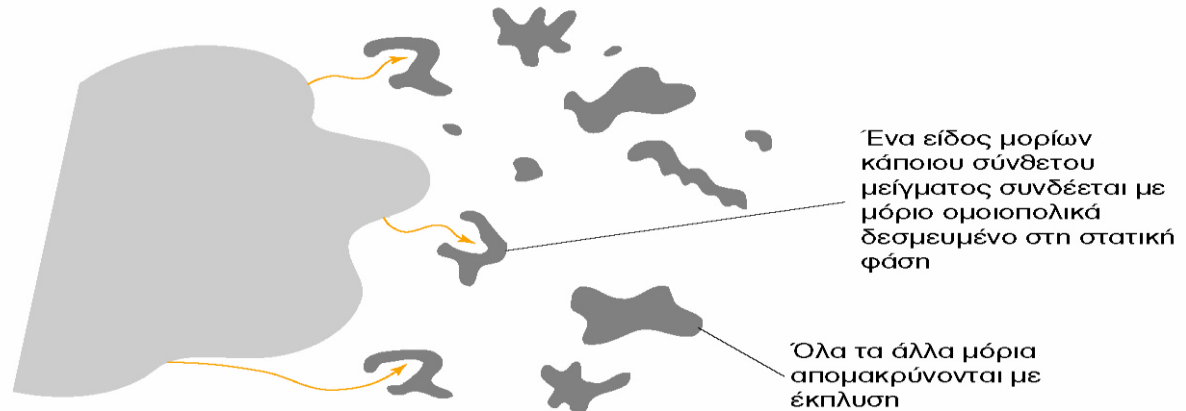
Χρωματογραφία κατανομής



Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής



Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού



Χρωματογραφία συγγένειας

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η χρωματογραφία αποτελεί πλέον την κυριότερη τεχνική διαχωρισμού συγγενών χημικών ουσιών. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαχωριζόμενων ουσιών.

Ποιοτική ανάλυση

Από ένα χρωματογράφημα μπορεί να ληφθεί μόνο ένα είδος ποιοτικής πληροφορίας για κάθε ουσία σε ένα δείγμα: ο χρόνος κατακράτησής της ή η θέση της σε μια στατική φάση μετά από μια ορισμένη περίοδο έκλουσης.

Χρησιμοποιείται ευρύτατα ως εργαλείο για τη διαπίστωση της παρουσίας ή απουσίας συστατικών σε μίγματα, που περιέχουν ένα περιορισμένο αριθμό ουσιών γνωστής ταυτότητας.

Η επιβεβαίωση της ταυτότητας των ουσιών απαιτεί **φασματοσκοπική** ή **χημική εξέταση** των απομονούμενων συστατικών.

Ποσοτική ανάλυση

Η χρωματογραφία οφείλει τον κατακόρυφο ρυθμό ανάπτυξης στην ταχύτητα, την απλότητα, το σχετικά χαμηλό κόστος και την ευρεία εφαρμογή της ως εργαλείο διαχωρισμών.

- **Αναλύσεις που βασίζονται στο ύψος κορυφής**
- **Αναλύσεις που βασίζονται στην επιφάνεια των κορυφών**
- **Βαθμονόμηση και πρότυπα**
- **Μέθοδος εσωτερικού προτύπου**

Η μέγιστη επαναληψιμότητα στη χρωματογραφική ανάλυση λαμβάνεται με τη χρήση εσωτερικών προτύπων, επειδή αποφεύγονται οι αβεβαιότητες κατά την έγχυση του δείγματος.

Μια προσεκτικά μετρημένη ποσότητα ουσίας, που αποτελεί το εσωτερικό πρότυπο, προστίθεται σε κάθε πρότυπο διάλυμα και σε κάθε δείγμα. Ως αναλυτική παράμετρος χρησιμοποιείται ο λόγος της επιφάνειας (ή ύψους) της κορυφής του αναλύτη προς την αντίστοιχη του εσωτερικού προτύπου.

Είναι απαραίτητο η κορυφή του εσωτερικού προτύπου να διαχωρίζεται καλά από τις κορυφές των άλλων συστατικών του δείγματος ($R_s > 1,25$), αλλά συγχρόνως δεν θα πρέπει να απέχει πολύ από την κορυφή του αναλύτη.

Μπορούν να επιτευχθούν σχετικές επαναληψιμότητες καλύτερες από 1%.

Αεριοχρωματογραφία

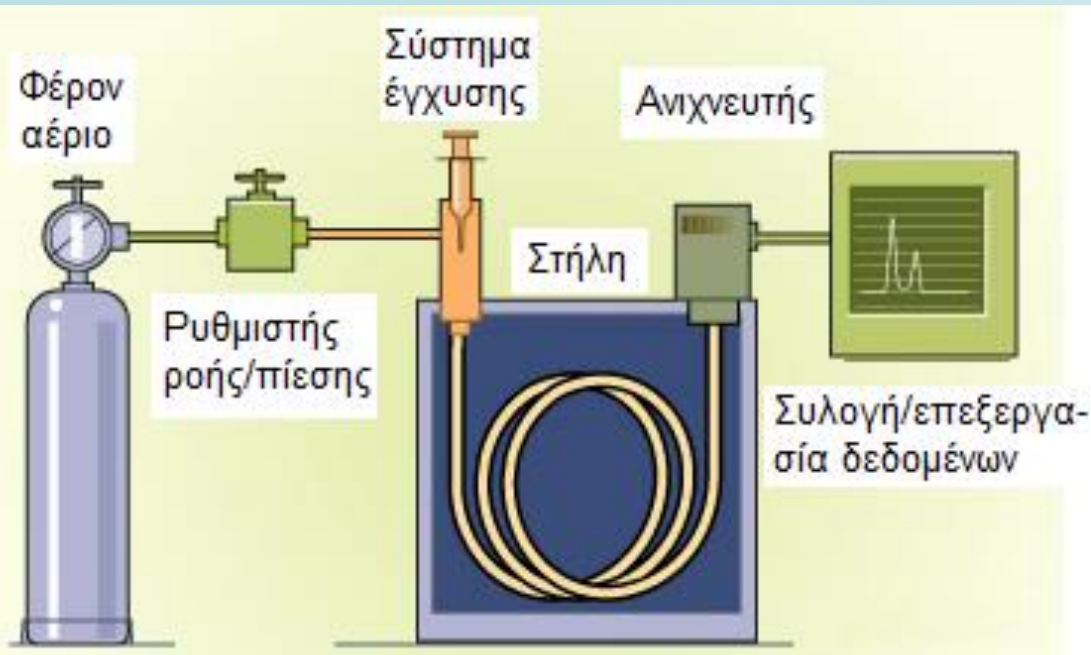
Στην αεριοχρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και εισάγεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η έκλουση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση.

Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο μόνος της ρόλος είναι η μετακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης.

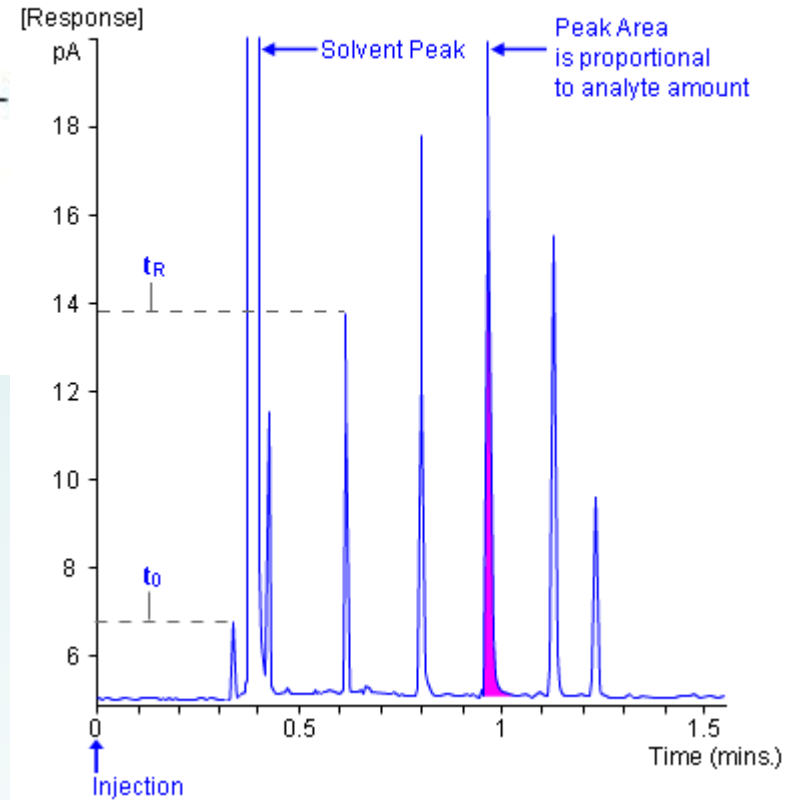
Υπάρχουν δύο τύποι αεριοχρωματογραφίας: η **χρωματογραφία αερίου-στερεού** (gas-solid chromatography, GSC) και η **χρωματογραφία αερίου-υγρού** (gas-liquid chromatography, GLC).

Η χρωματογραφία αερίου-υγρού χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλους τους κλάδους των θετικών επιστημών και συχνότερα αναφέρεται ως **αεριοχρωματογραφία** (gas chromatography, GC), αν και με την ονομασία αυτή παραβλέπεται, ότι η χρωματογραφία αερίου-στερεού αποτελεί και αυτή ένα χρήσιμο τύπο χρωματογραφίας.

Διάγραμμα αεριοχρωματογράφου

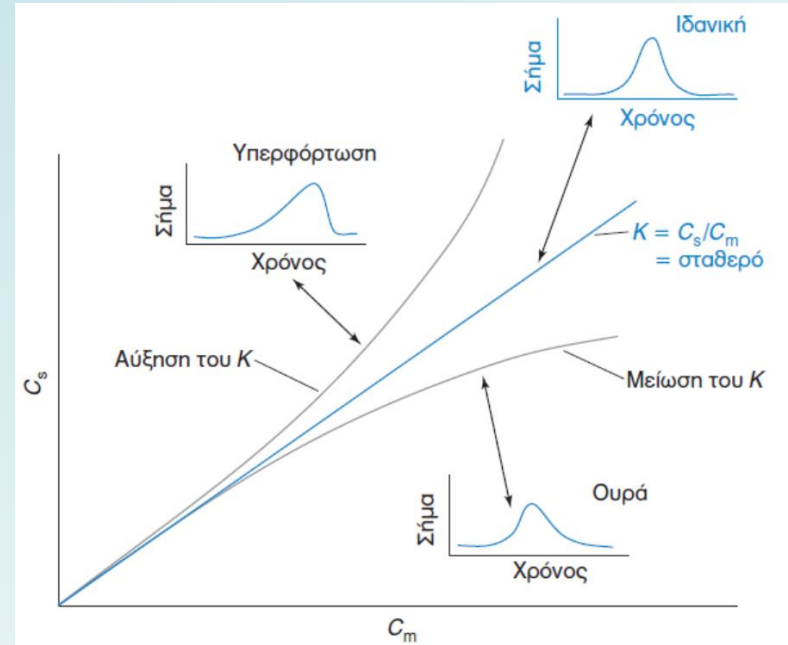


t_0 - elution time of unretained peak
 t_R - retention time - determines sample identity



Χρωματογραφία αερίου-στερεού: βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης, όπου η κατακράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης.

Οι εφαρμογές της είναι περιορισμένες λόγω της σχεδόν μόνιμης κατακράτησης δραστικών ή πολικών μορίων και της έντονης εμφάνισης ουράς στις κορυφές έκλουσης (ως συνέπεια του μη γραμμικού χαρακτήρα του μηχανισμού προσρόφησης).



Χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις διαχωρισμών ορισμένων αερίων χαμηλού μοριακού βάρους.

Χρωματογραφία αερίου-υγρού: βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης.

Η ανάπτυξη αναλυτικών εφαρμογών με την τεχνική αυτή πραγματοποιήθηκε με εκπληκτικούς ρυθμούς.

Στη αεριοχρωματογραφία χρησιμοποιούνται δύο τύποι **στηλών**: οι **πληρωμένες** (ή “**πακεταρισμένες**”) (packed) και οι στήλες **ανοικτού σωλήνα** (open tubular) ή **τριχοειδείς** (capillary). Το μήκος των χρωματογραφικών στηλών κυμαίνεται από 2 m (ή και μικρότερο) έως και περισσότερο από 50 m. Κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα, ύαλο, τηγμένη πυριτία ή Teflon. Για να είναι δυνατή η τοποθέτησή τους στον φούρνο για θερμοστάτηση, συνήθως έχουν τη μορφή σπειράματος διαμέτρου 10 έως 30 cm.



Τυπικό παράδειγμα **πληρωμένης στήλης** στην αεριοχρωματογραφία. Η στήλη είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο ατσάλι με μήκος 2 m με εσωτερική διάμετρο 3,2 mm. Το υλικό πλήρωσης έχει διάμετρο σωματιδίων 149-177 μm . Για να γίνει αντιληπτή η διάσταση αυτή, η άμμος στην παραλία έχει τυπική διάμετρο 700 μm .



Τυπικό παράδειγμα **τριχοειδούς στήλης** στην αεριοχρωματογραφία. Η στήλη έχει μήκος 30 m και εσωτερική διάμετρο 0,25 mm. Η εσωτερική επιφάνεια του τριχοειδούς έχει επίστρωση υγρής φάσης πάχους 0,25 μm .

Η **σειρά έκλουσης** σε χρωματογραφία αερίου-υγρού εξαρτάται από:

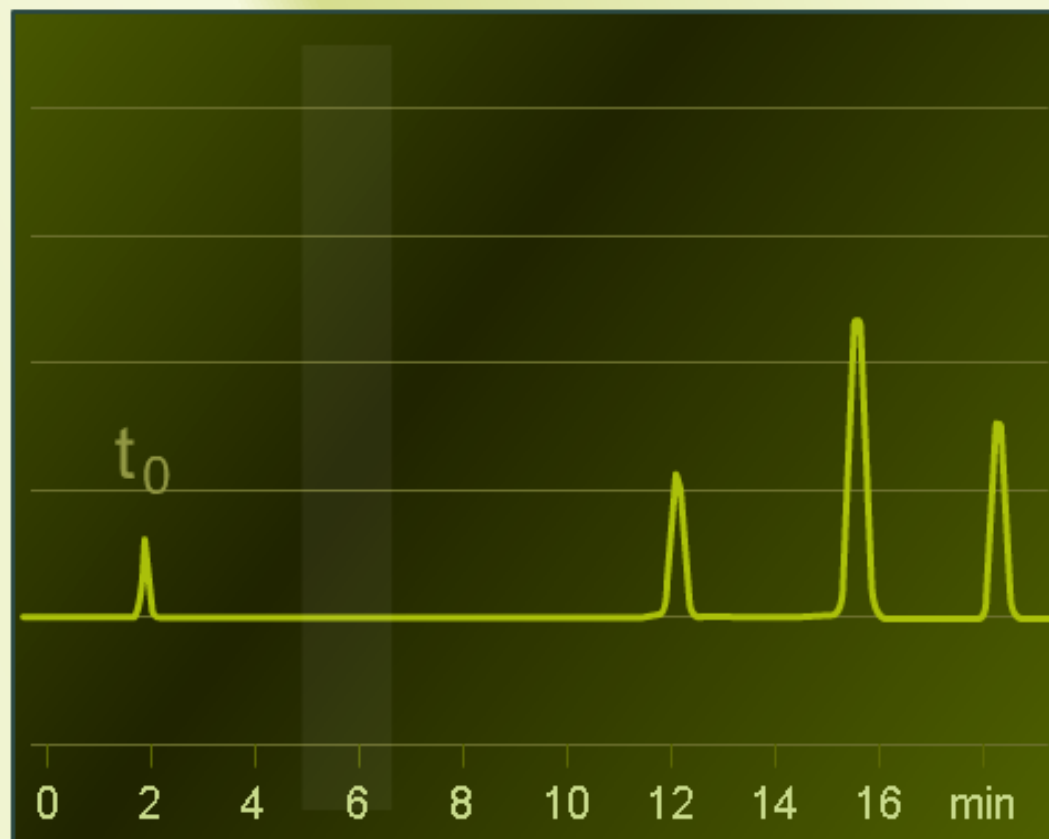
- το σημείο βρασμού των διαλυμένων ουσιών και
- την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαλυμένων ουσιών και της στατικής φάσης

Εάν τα συστατικά του μείγματος έχουν σημαντικά διαφορετικά σημεία ζέσης, τότε η επιλογή της στατικής φάσης είναι λιγότερο σημαντική.

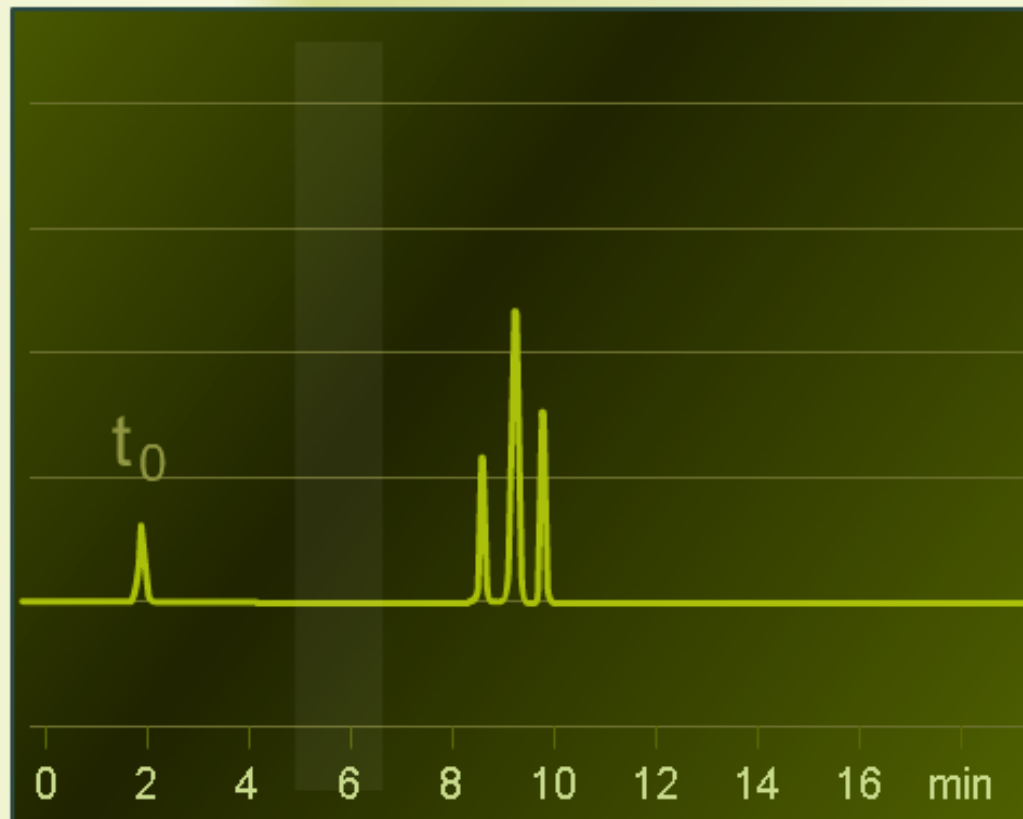
Εάν δύο διαλυμένες ουσίες έχουν παρόμοια σημεία ζέσης, τότε είναι δυνατός ο διαχωρισμός μόνο εάν η στατική φάση αλληλεπιδρά επιλεκτικά με μία από τις διαλυμένες ουσίες.

Γενικός κανόνας: **οι μη πολικές διαλυμένες ουσίες διαχωρίζονται ευκολότερα με τη χρήση μιας μη πολικής στατικής φάσης και οι πολικές διαλυτές ουσίες διαχωρίζονται ευκολότερα με τη χρήση μιας πολικής στατικής φάσης.**

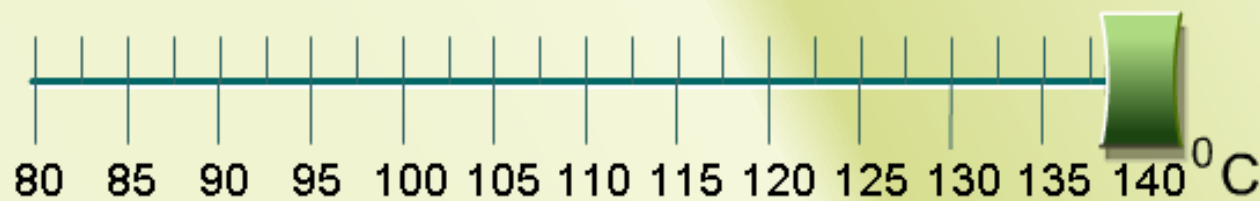
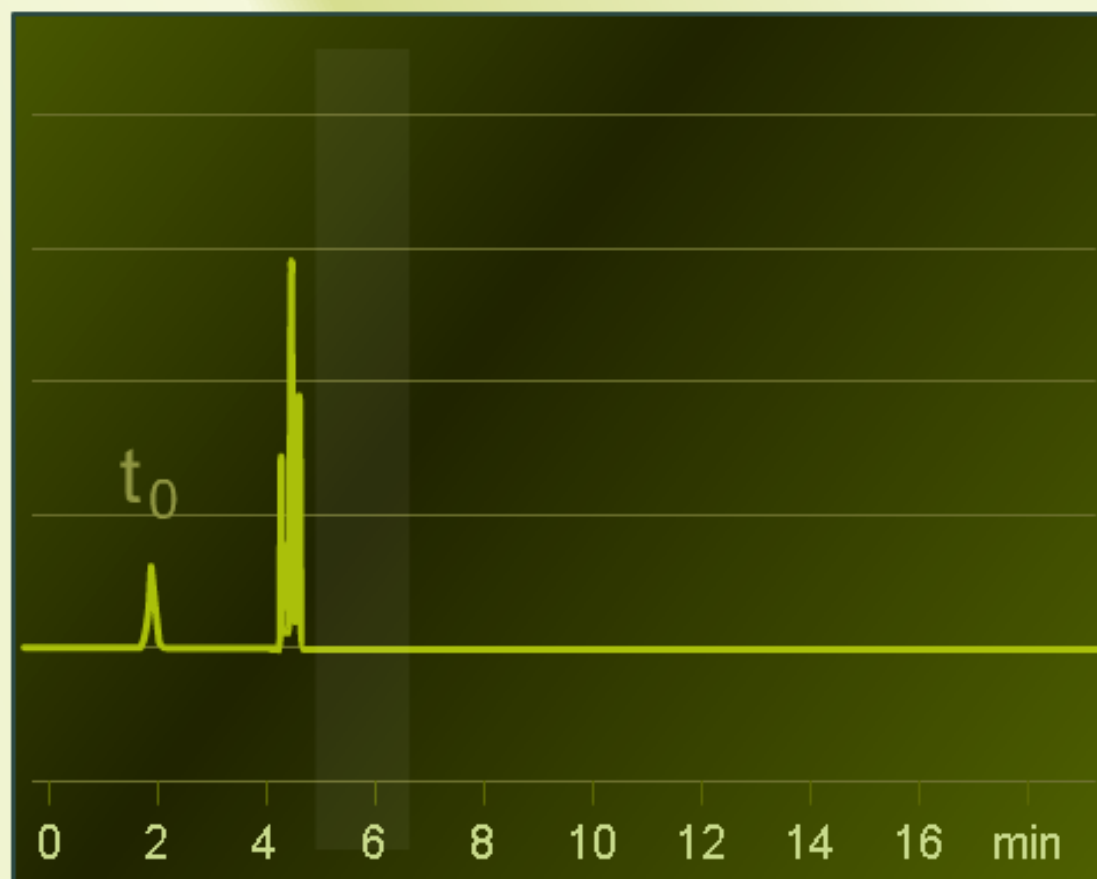
Κατακράτηση σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία



Κατακράτηση σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία



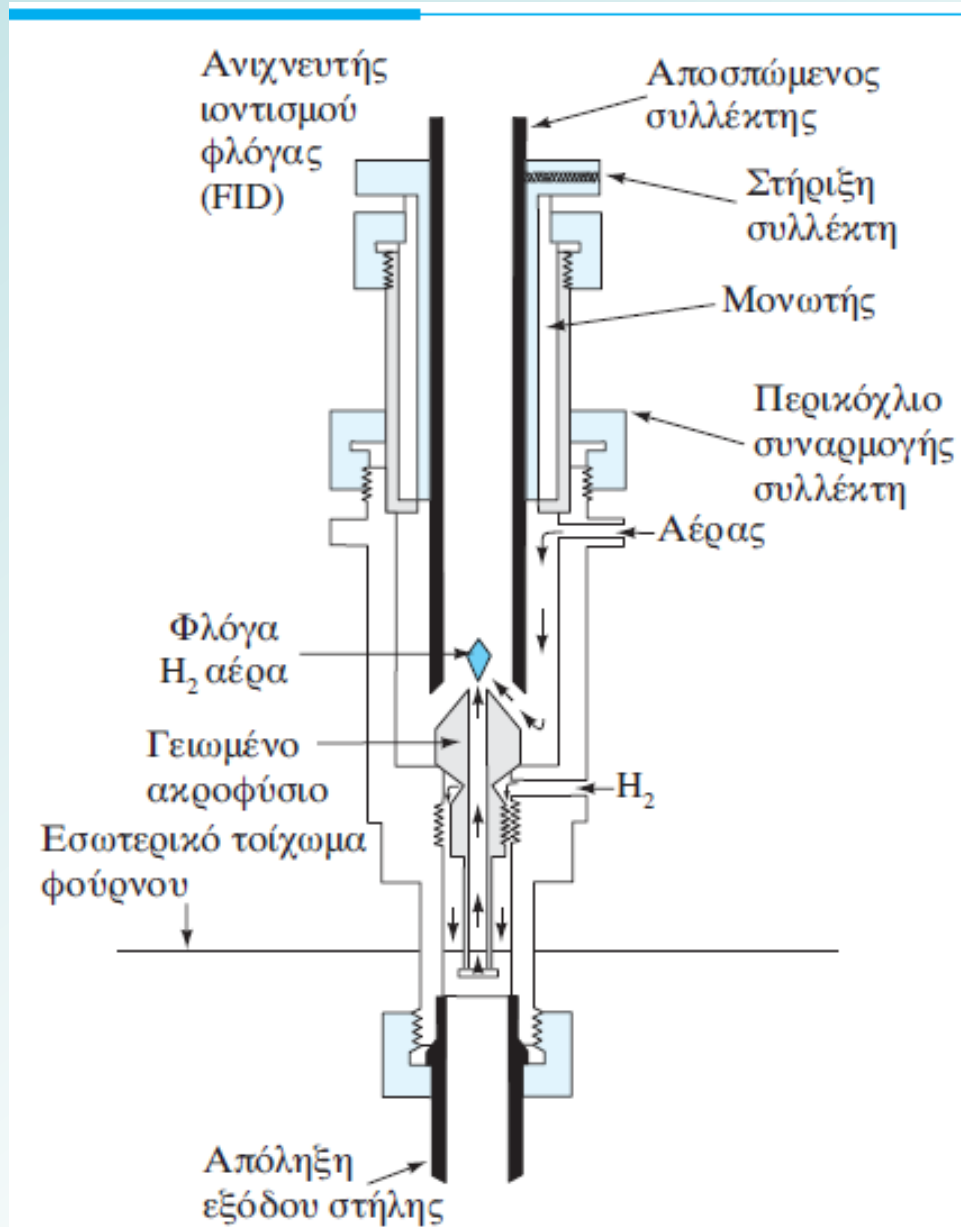
Κατακράτηση σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία



Ανιχνευτές ιοντισμού φλόγας (FID)

Είναι ο πιο διαδεδομένος και γενικότερης χρήσης αεριοχρωματογραφικός ανιχνευτής. Σε ένα καυστήρα, το έκλουσμα από τη στήλη αναμιγνύεται με υδρογόνο και αέρα και στη συνέχεια αναφλέγεται με ηλεκτρικά μέσα. Οι περισσότερες οργανικές ενώσεις, όταν πυρολυθούν στη θερμοκρασία της φλόγας υδρογόνου/αέρα, παράγουν ιόντα και ηλεκτρόνια, τα οποία άγουν τον ηλεκτρισμό μέσω της φλόγας.

Δεν αποκρίνεται καθόλου σε μη καύσιμα αέρια, όπως τα H_2O , CO_2 , SO_2 και NO_x . Μεταξύ του ακροφύσιου του καυστήρα και ενός ηλεκτροδίου-συλλέκτη πάνω ακριβώς από τη φλόγα εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού μερικών εκατοντάδων volt. Το παραγόμενο ηλεκτρικό ρεύμα ($\approx 10^{-12}$ A).



Ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας (TCD)

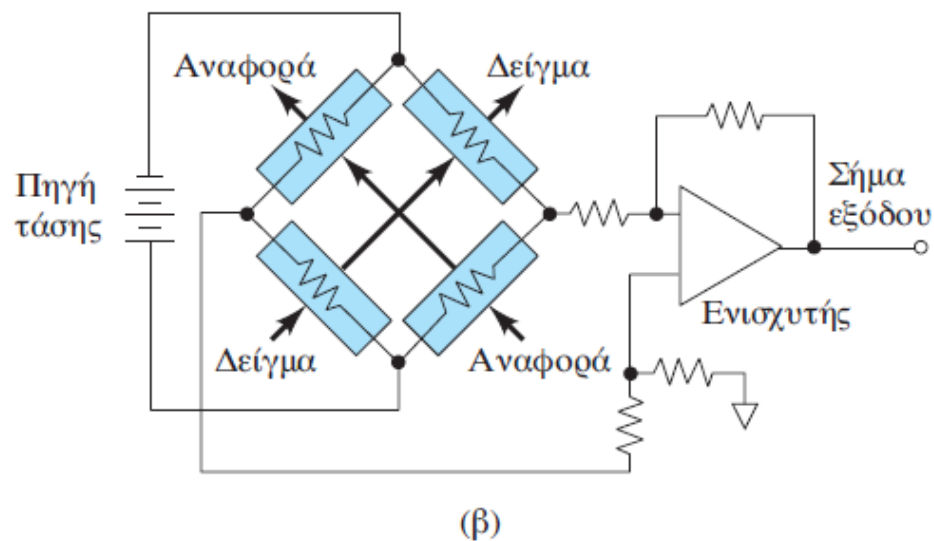
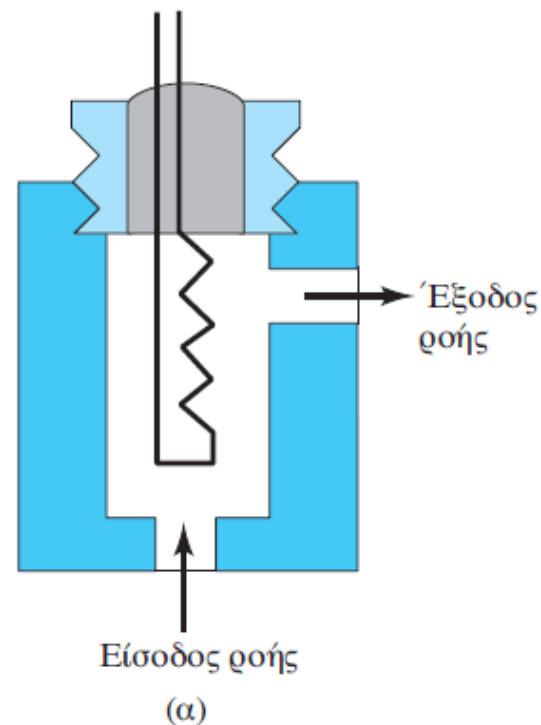
Αναφέρεται και ως *καθαρόμετρο* (katharometer).

Οι θερμικές αγωγιμότητες του ηλίου και του υδρογόνου είναι περίπου 6 έως 10 φορές μεγαλύτερες από τις αγωγιμότητες των οργανικών ενώσεων. Η παρουσία μικρών ποσοτήτων οργανικών ουσιών προκαλεί μείωση της θερμικής αγωγιμότητας του αέριου εκλούσματος της στήλης.

Αποτέλεσμα αυτής της μείωσης είναι η αύξηση της θερμοκρασίας του ανιχνευτή.

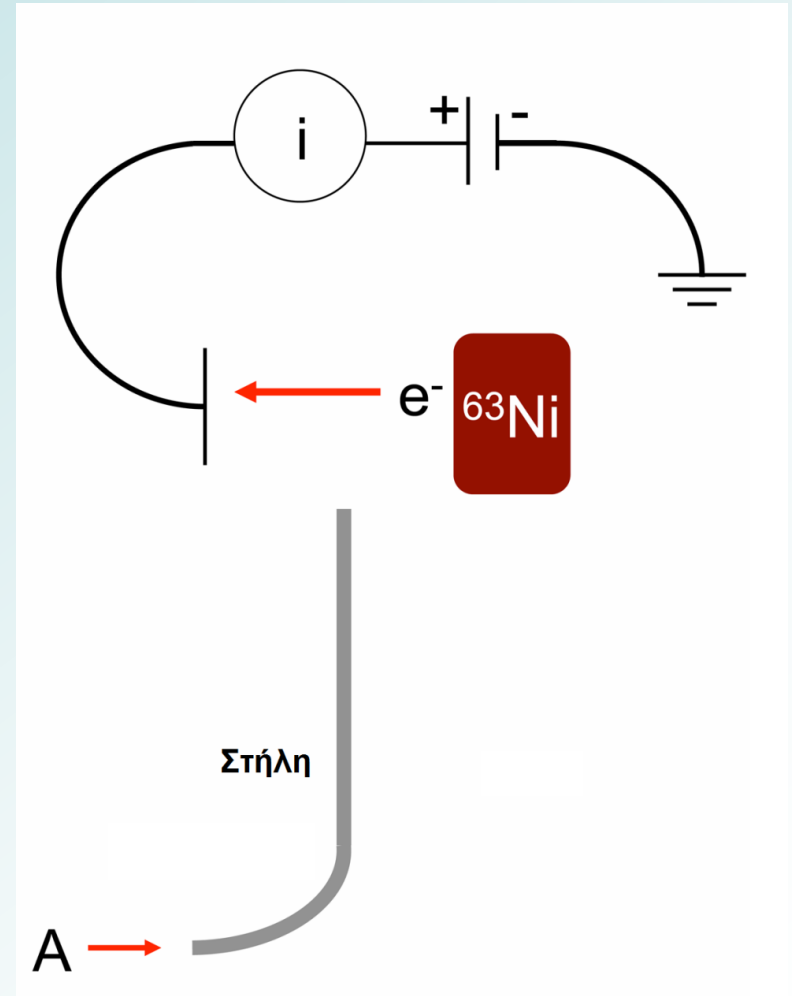
Η ηλεκτρική αντίσταση του σύρματος ή του θερμίστορ (αντίσταση που η τιμή της μεταβάλλεται με τη θερμοκρασία) αποτελεί μέτρο της θερμικής αγωγιμότητας του αερίου.

Πλεονεκτήματα του ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας: απλότητα, μεγάλη δυναμική περιοχή, απόκριση σε οργανικές και ανόργανες ουσίες, μη καταστρεπτικός (για το δείγμα) χαρακτήρας. Μειονέκτημα: χαμηλή ευαισθησία.



Ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)

• Το έκλουσμα από τη στήλη διέρχεται πάνω από ένα β-ραδιενεργό υλικό (συνήθως ^{63}Ni). Ένα ηλεκτρόνιο (το β-σωματίδιο είναι ένα ηλεκτρόνιο) από τη ραδιενεργό πηγή προκαλεί ιοντισμό του φέροντος αερίου (συνήθως αζώτου) και την παραγωγή ενός σμήνους ηλεκτρονίων. Απουσία οργανικής ένωσης τα ηλεκτρόνια αυτά προκαλούν την εμφάνιση ενός σταθερού ρεύματος μεταξύ ενός ζεύγους ηλεκτροδίων. Το ρεύμα αυτό μειώνεται σημαντικά παρουσία οργανικών μορίων, τα οποία έχουν τάση να “συλλάβουν” ηλεκτρόνια.



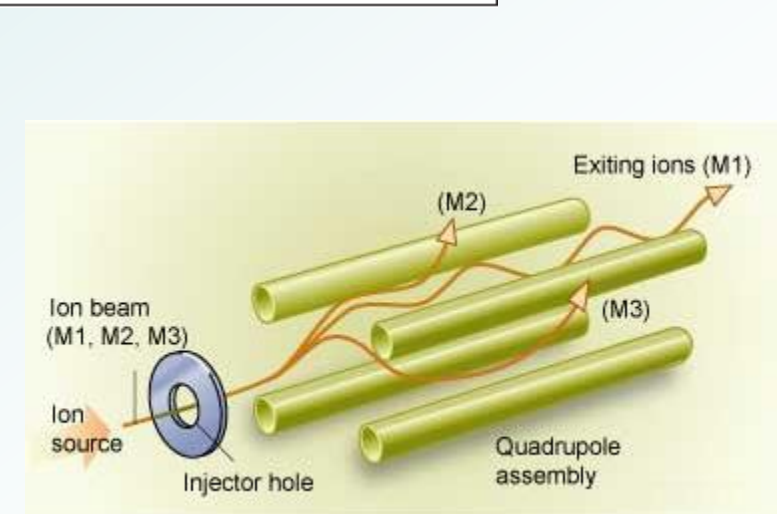
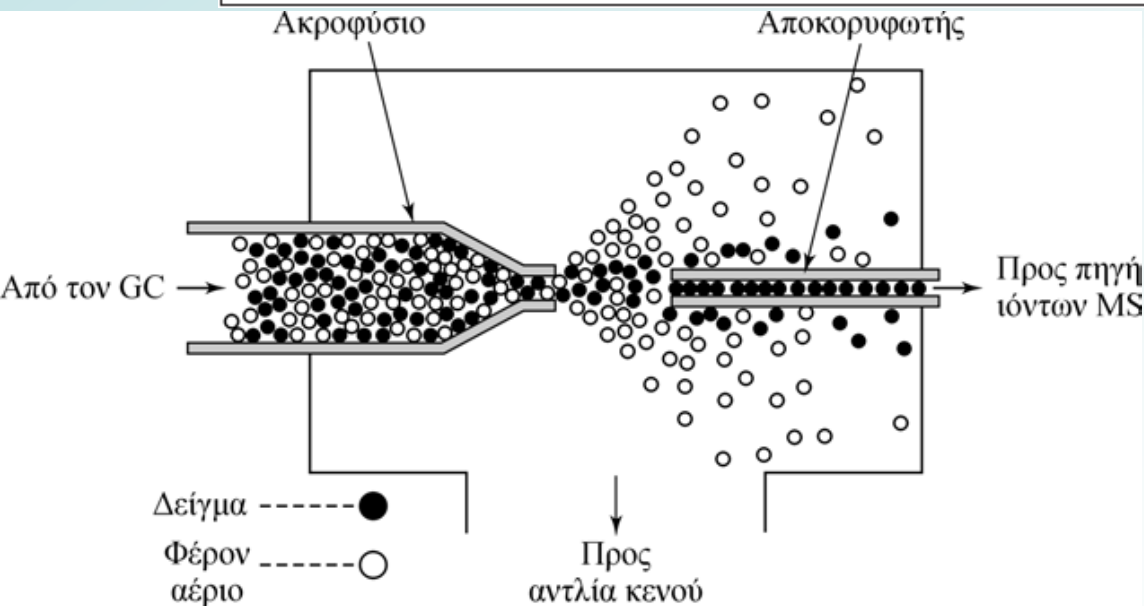
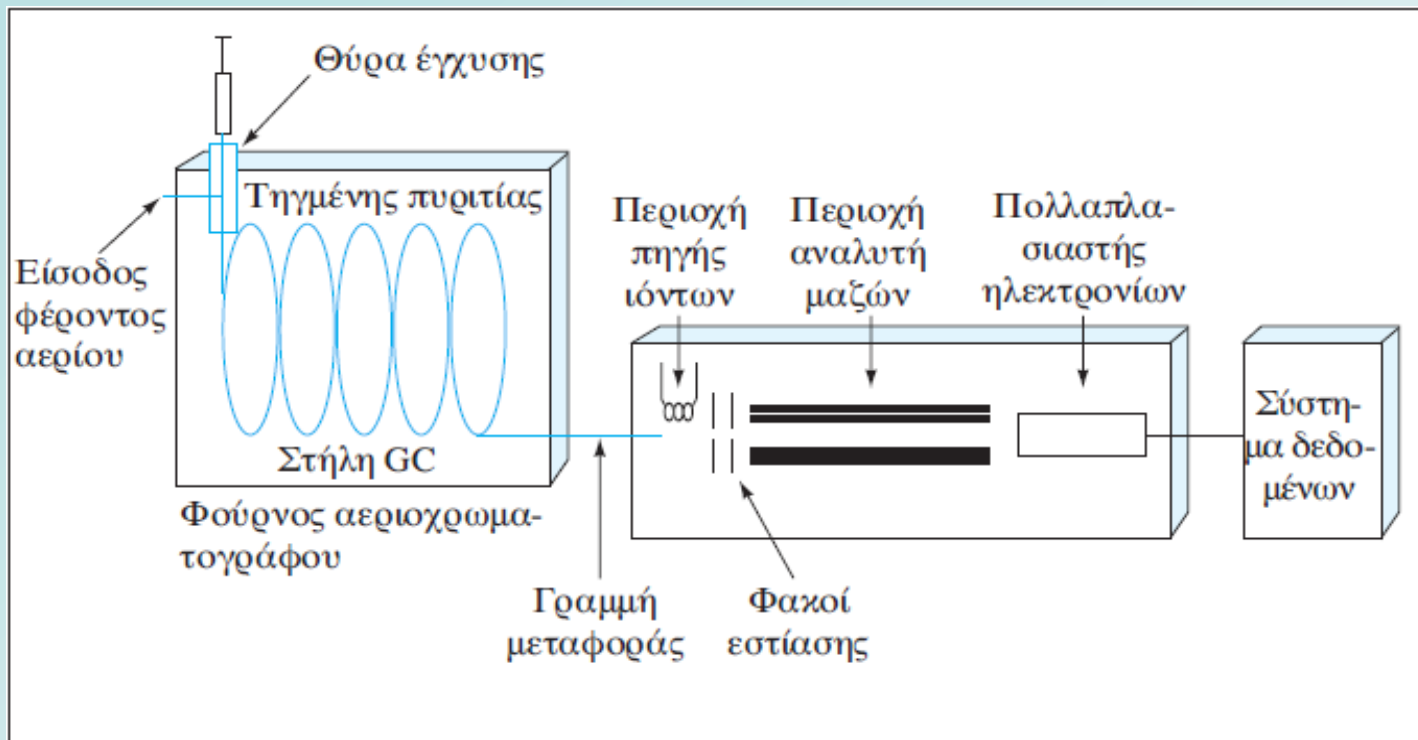
Διασύνδεση της αεροχρωματογραφίας με φασματοσκοπικές τεχνικές

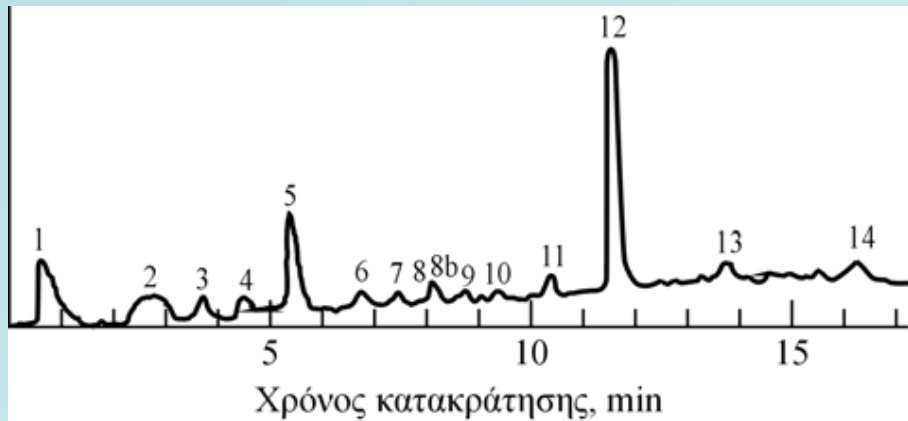
Συχνά η αεροχρωματογραφία συνδυάζεται με εκλεκτικές φασματοσκοπικές και ηλεκτροχημικές τεχνικές παρέχοντας τις **συζευγμένες τεχνικές** (hyphenated techniques), που αποτελούν ισχυρά αναλυτικά εργαλεία για ταυτοποιήσεις των συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων.

Στις πρώτες συζευγμένες τεχνικές, η συλλογή των εκλουσμάτων από τις χρωματογραφικές στήλες γινόταν σε χωριστά κλάσματα σε μια ψυχρή παγίδα, αμέσως μετά την ανίχνευσή τους από ένα μη καταστρεπτικό για το δείγμα και μη εκλεκτικό ανιχνευτή.

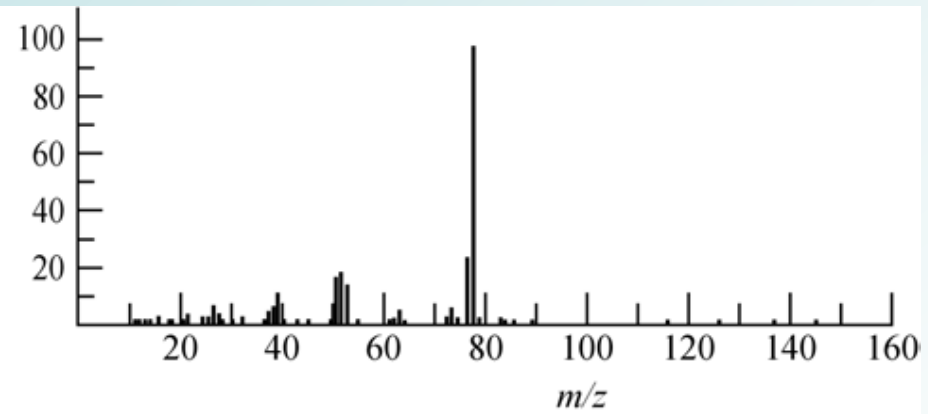
Σήμερα, το έκλουσμα της στήλης παρακολουθείται συνεχώς με εκλεκτικό ανιχνευτή. Η τεχνική προϋποθέτει έλεγχο της οργανολογίας με υπολογιστή και αποθήκευση των φασματικών δεδομένων στη μνήμη του για μετέπειτα παρουσίαση με τη μορφή φασμάτων ή χρωματογραφημάτων

Αεριοχρωματογραφία / Φασματοσκοπία μαζών (GC/MS)





(α)



(β)

(α) Τυπικό σήμα εξόδου ενός οργάνου GC/MS. Οι κορυφές είναι: (1) αέρας, (2) ύδωρ, (3) υδροκυάνιο, (4) άγνωστο), (5) ακεταλδεΐδη, (6) αιθανόλη, (7) ακετονιτρίλιο, (8) ακετόνη, (8β) άγνωστο, (9) διθειάνθρακας, (10) άγνωστο, (11) άγνωστο, (12) βενζόλιο, (13) τολουόλιο, (14) ξυλόλιο.

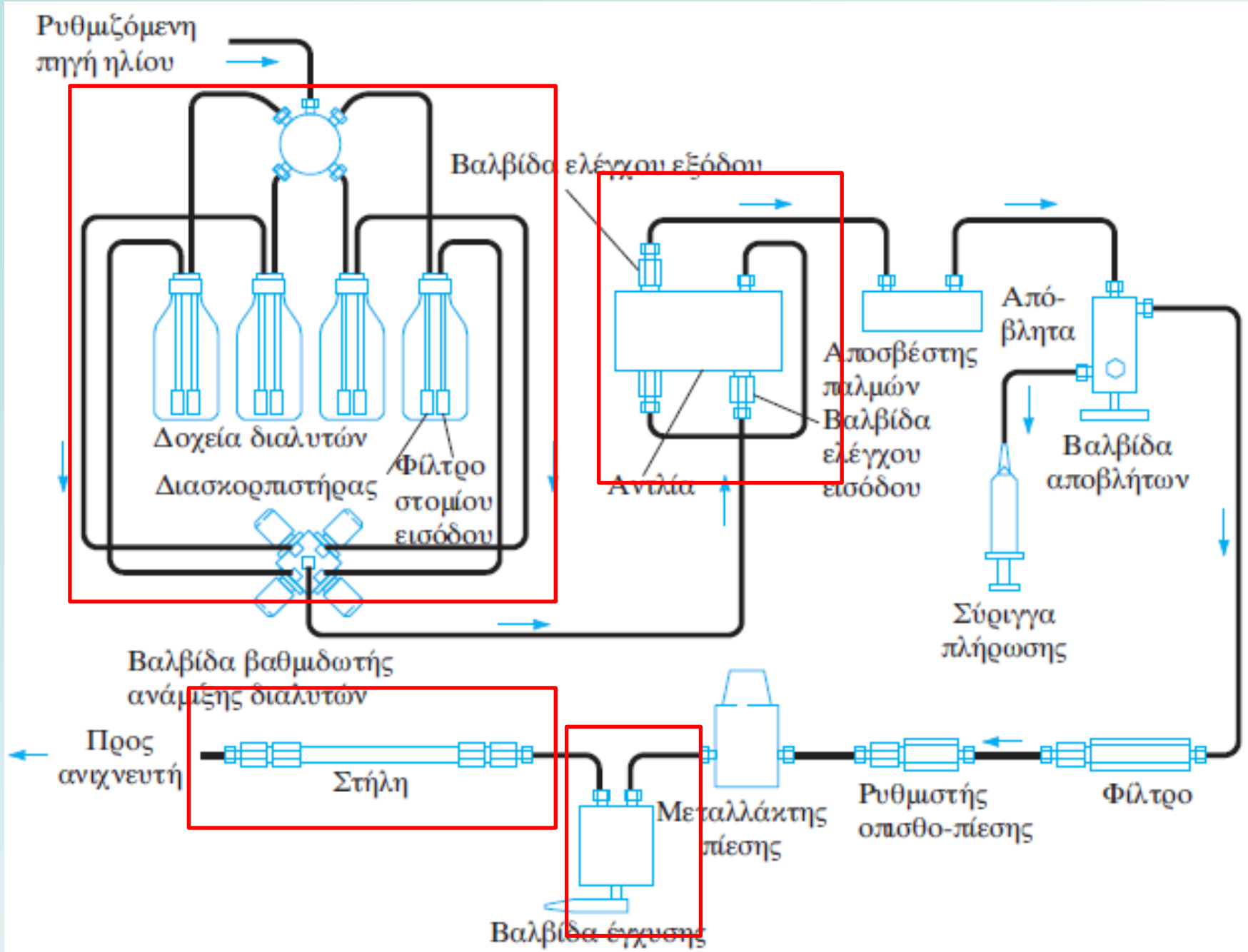
(β) Φάσμα μάζας της κορυφής 12 (βενζόλιο).

Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τέσσερις βασικοί τύποι χρωματογραφίας, στους οποίους η κινητή φάση είναι ένα υγρό. Οι τέσσερις αυτοί τύποι είναι:

- χρωματογραφία κατανομής
- χρωματογραφία προσρόφησης ή χρωματογραφία υγρής-στερεάς φάσης
- χρωματογραφία ιονανταλλαγής και
- χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού ή χρωματογραφία πηκτής.

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ



Αναλυτικές στήλες

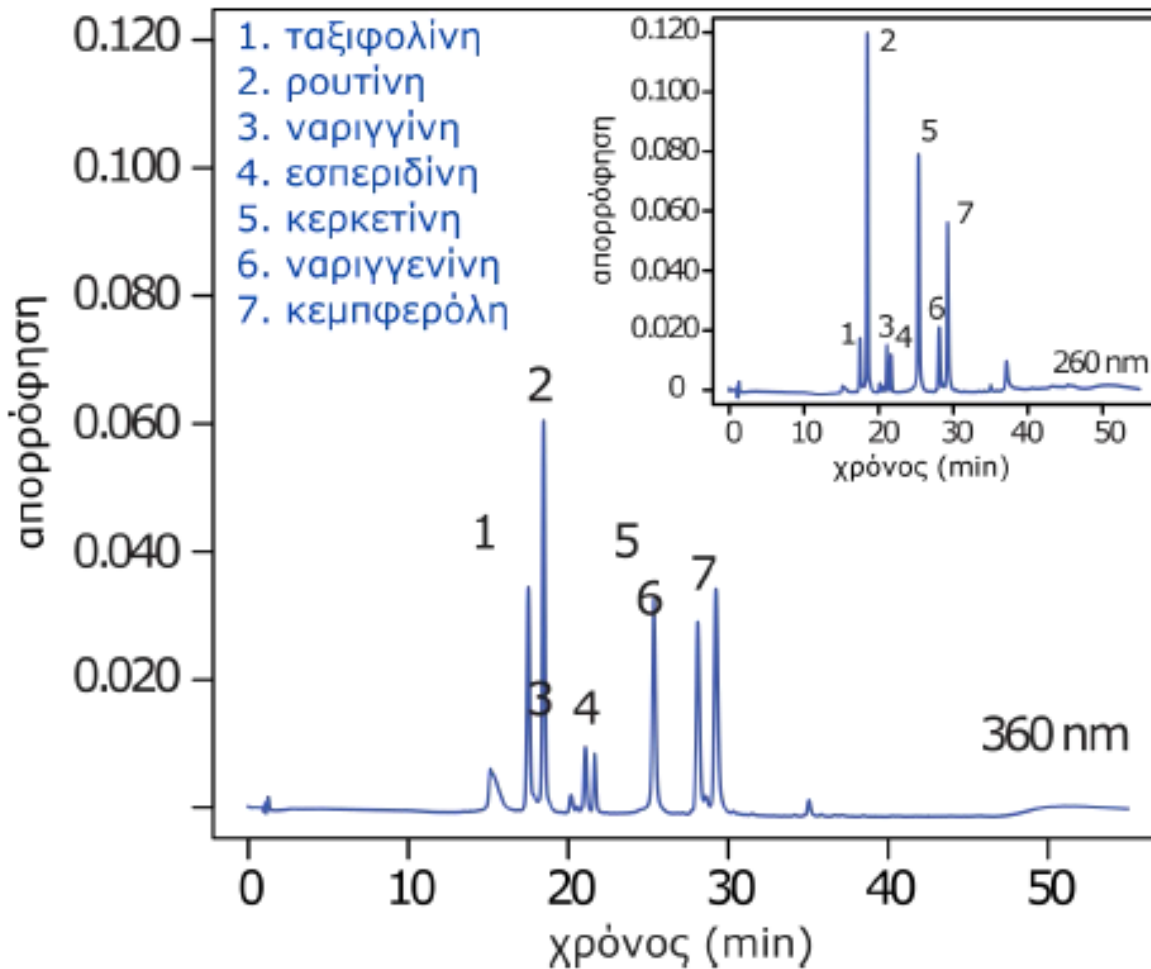
Έχουν εσωτερικές διαμέτρους από 1 έως 4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης 3 έως 5 μm. Το μήκος τους είναι μικρό (3 έως 7,5 cm). Οι στήλες του τύπου αυτού διαθέτουν μέχρι και 100.000 πλάκες/m και προσφέρουν το πλεονέκτημα της ταχύτητας και της ελάχιστης κατανάλωσης διαλύτη.

Η τελευταία ιδιότητα έχει ιδιαίτερη σημασία, επειδή οι διαλύτες υψηλής καθαρότητας που απαιτούνται στην υγροχρωματογραφία είναι δαπανηροί.

Τύποι ανιχνευτών

Δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών υγροχρωματογραφίας.

1. Αυτοί που αποκρίνονται σε μια **βασική ιδιότητα** (bulk property detectors) της κινητής φάσης, όπως ο δείκτης διάθλασης, η διηλεκτρική σταθερά ή η πυκνότητα, οι τιμές των οποίων επηρεάζονται από την παρουσία των εκλουόμενων συστατικών.
2. Υπάρχουν ανιχνευτές που αποκρίνονται σε **ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού** (solute property detectors), όπως είναι η απορρόφηση στο υπεριώδες, ο φθορισμός ή το ρεύμα διάχυσης. Την ιδιότητα αυτή δεν πρέπει να διαθέτει η κινητή φάση.



Υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός ενός μίγματος φλαβονοειδών με ανιχνευτή UV/Vis στα 360 nm και, στο ένθετο, στα 260 nm. Η επιλογή του μήκους κύματος επηρεάζει το σήμα κάθε αναλύτη. Επιλέγοντας προσεκτικά το μήκος κύματος, μπορούμε να βελτιώσουμε το σήμα για τους αναλύτες με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

Η χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography) είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος τύπος από τους τέσσερις τύπους υγροχρωματογραφίας.

Διαιρείται σε δύο υποομάδες: τη χρωματογραφία υγρού-υγρού και τη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης. Οι δύο τεχνικές διαφέρουν ως προς τον τρόπο με τον οποίο η στατική φάση κατακρατείται στα σωματίδια του υλικού στήριξης.

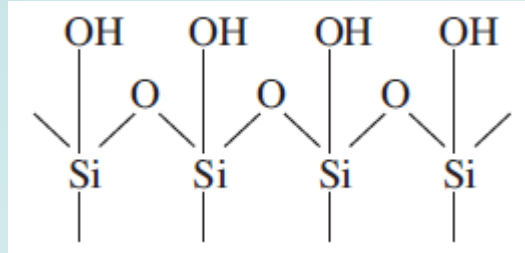
χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού: η υγρή στατική φάση κατακρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση.

χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης: η στατική φάση δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού στήριξης.

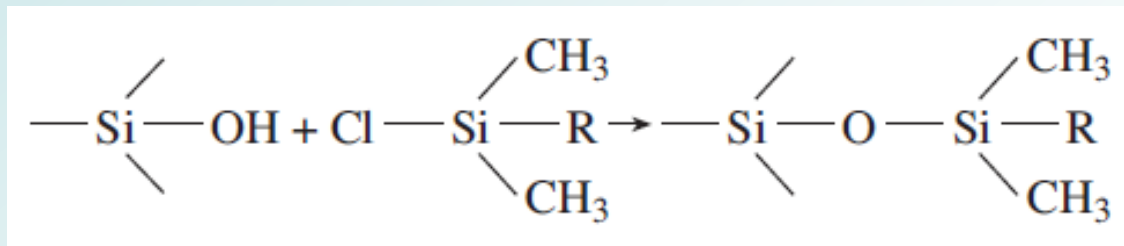
Μειονεκτήματα της χρωματογραφίας κατανομής υγρού-υγρού είναι η απώλεια της στατικής φάσης λόγω διάλυσής της στην κινητή φάση και η ανάγκη περιοδικής επανεπίστρωσης (επαναφόρτισης) των σωματιδίων του υλικού στήριξης. Επιπλέον, τα προβλήματα διάλυσης της στατικής φάσης δεν επιτρέπουν τη χρήση υλικών πλήρωσης (packings) υγρής φάσης για βαθμιδωτή έκλουση.

Στήλες για τη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης

Πυριτία. Σχηματίζεται ως ομοιόμορφα, πορώδη και μηχανικά σκληρά σωματίδια, τα οποία έχουν συνήθως διάμετρο 3, 5 ή 10 μm. Η επιφάνεια της πλήρως υδρολυμένης πυριτίας (υδρολυμένης με θέρμανση με HCl 0,1M για μία ή δύο ημέρες) αποτελείται από χημικά ενεργές ομάδες σιλανόλης.



Οι πιο χρήσιμες επιστρώσεις για τη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης είναι τα σιλοξάνια (οργανοπυριτικές ενώσεις) που σχηματίζονται κατά την αντίδραση της υδρολυμένης επιφάνειας με ένα οργανοχλωριωμένο σιλάνιο.



όπου R είναι αλκυλομάδα ή υποκατεστημένη αλκυλομάδα.

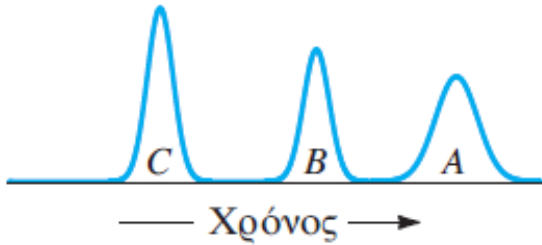
Με βάση τη σχετική πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης διακρίνονται δύο τύποι χρωματογραφίας κατανομής:

χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal-phase chromatography). Στατικές φάσεις υψηλής πολικότητας, όπως ύδωρ ή τριαιθυλενογλυκόλη, κατακρατούμενα σε σωματίδια πυριτίας (silica) ή αλουμίνας, ενώ η κινητή φάση είναι ένας σχετικά μη πολικός διαλύτης

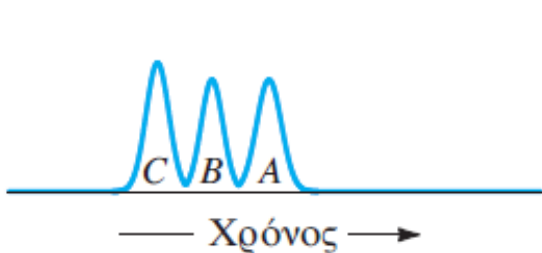
χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (reversed-phase chromatography). Στατική φάση μη πολική, συχνά ένας υδρογονάνθρακας και η κινητή φάση είναι ένας σχετικά πολικός διαλύτης

(α)

Χρωματογραφία κανονικής φάσης
Κινητή φάση χαμηλής πολικότητας

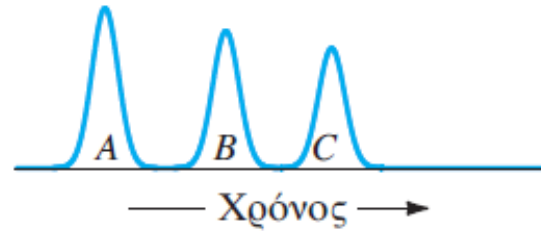


Κινητή φάση μέσης πολικότητας

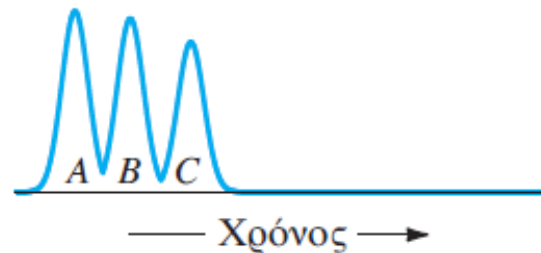


(β)

Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης
Κινητή φάση υψηλής πολικότητας



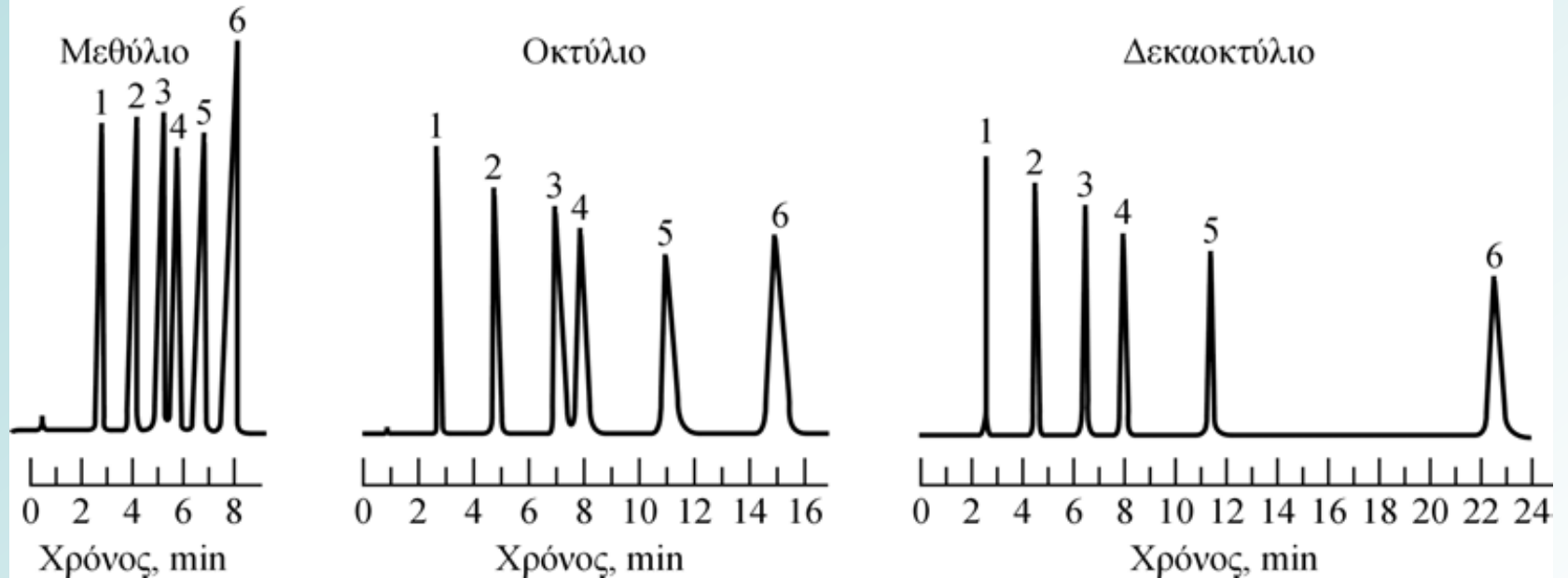
Κινητή φάση μέσης πολικότητας



Πολικότητα διαχωριζόμενων ουσιών: $A > B > C$

Σχέση μεταξύ πολικότητας και χρόνου έκλουσης για χρωματογραφία κανονικής φάσης και αντίστροφης φάσης

Ταυτοποίηση κορυφών : 1. Ουρακίλιο 2. Φαινόλη 3. Ακετοφαινόνη
4. Νιτροβενζόλιο 5. Βενζοϊκό μεθύλιο 6. Τολουόλιο



Επίδραση του μήκους της αλυσίδας στην απόδοση των στηλών αντίστροφης φάσης πληρωμένων με σωματίδια σιλοξανίου 5 μm . Κινητή φάση: 50/50 μεθανόλη/ύδωρ. Ταχύτητα ροής: 1,0 mL/min.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

Η χρωματογραφία προσρόφησης (ή **χρωματογραφία υγρού-στερεού**) είναι ο κλασικός τύπος της υδροχρωματογραφίας, που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Tswett. Στην πιο σύγχρονη εποχή καθιερώθηκε ως μια από τις σπουδαιότερες τεχνικές HPLC.

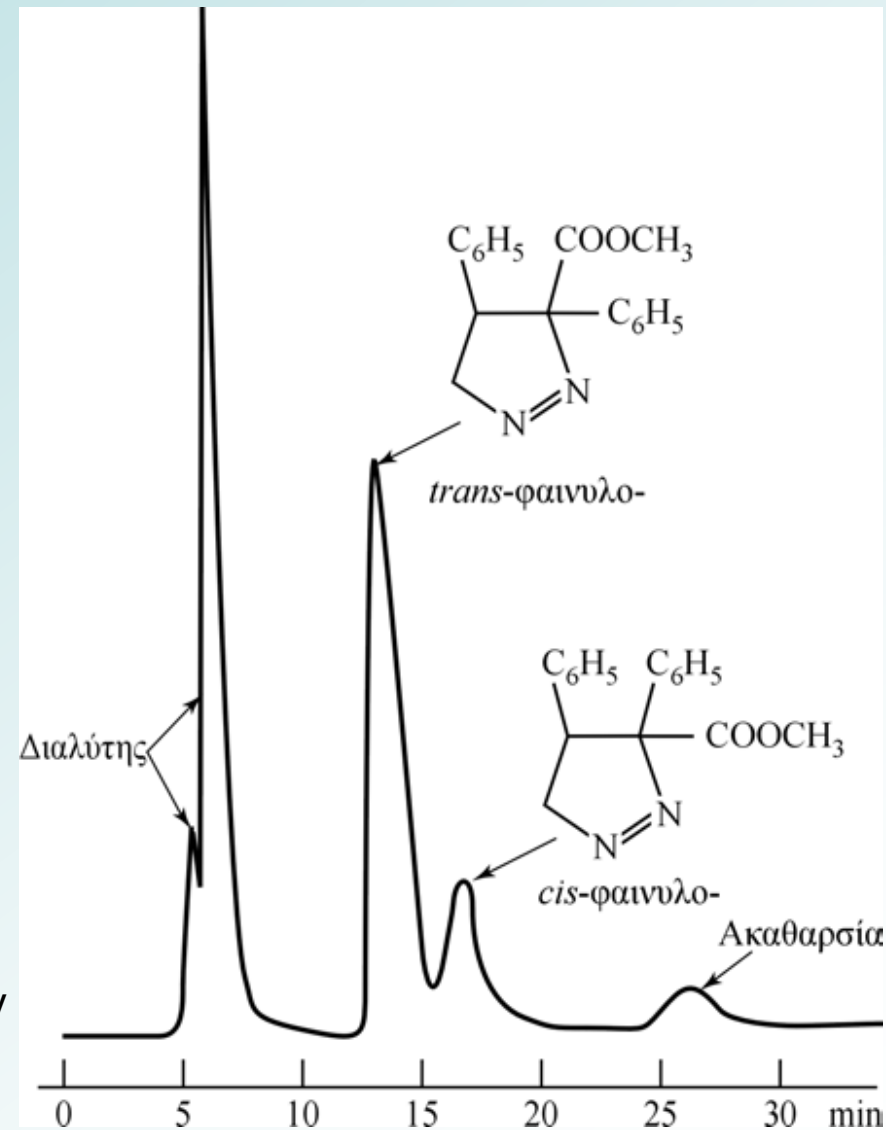
Στατικές φάσεις στην HPLC υγρού-στερεού:
πυριτία, αλουμίνα.

Και για τις δύο ουσίες η σειρά των χρόνων κατακράτησης είναι: ολεφίνες < αρωματικοί υδρογονάνθρακες < χλωρίδια, θειαιθέρες < αιθέρες < νιτροενώσεις < εστέρες ≈ αλδεΐδες ≈ κετόνες < αλκοόλες ≈ αμίνες < σουλφόνες < αμίδια < καρβονυλικά οξέα.

Η χρωματογραφία προσρόφησης είναι καταλληλότερη για δείγματα διαλυτά σε μη πολικούς διαλύτες.

Είναι δυνατός ο διαχωρισμός ενώσεων που φέρουν διαφορετικά είδη και αριθμούς δραστικών ομάδων.

Η χρωματογραφία προσρόφησης διαχωρίζει τις ισομερείς ενώσεις από ένα μίγμα (την οποία δεν διαθέτουν οι άλλες μέθοδοι διαχωρισμού).



Μια τυπική εφαρμογή της χρωματογραφίας προσρόφησης: Διαχωρισμός της *cis*- και *trans*-πυραζολίνης.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ

Η *χρωματογραφία ιονανταλλαγής* (ion-exchange chromatography, IC), αναφέρεται και ως *ιοντική χρωματογραφία* (ion chromatography).

Τεχνική διαχωρισμού και προσδιορισμού ιόντων, που βασίζονται σε ιονανταλλακτικές ρητίνες. Στην αρχή η ανίχνευση γινόταν με μέτρηση της αγωγιμότητας των εκλουσμάτων, ενώ σήμερα υπάρχουν και άλλου τύπου ανιχνευτές ιοντικής χρωματογραφίας.

Οι μηχανισμοί ιονανταλλαγής βασίζονται στις ισορροπίες ανταλλαγής μεταξύ των ιόντων στο διάλυμα και των νοητών ιόντων πάνω στην επιφάνεια ενός αδιάλυτου στερεού, υψηλού μοριακού βάρους. Για πολλές δεκαετίες είχαν βρεθεί φυσικές ουσίες με ιονανταλλακτικές ιδιότητες, όπως οι άργιλοι και οι ζεόλιθοι. Στα μέσα της δεκαετίας του 1930 είχαν παραχθεί για πρώτη φορά συνθετικές ιονανταλλακτικές ρητίνες για την αποσκλήρυνση και τον απιοντισμό του νερού και για τον καθαρισμό διαλυμάτων.

Οι πιο δραστικές θέσεις των κατιοναταλλακτικών ρητινών είναι η σουλφονική ομάδα $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$ ενός ισχυρού οξέος και η καρβοξυλική ομάδα $-\text{COO}^-\text{H}^+$, που προέρχεται συνήθως από ασθενή οξέα. Οι ανιοντικοί ανταλλάκτες περιέχουν τριτοταγείς $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ ή πρωτοταγείς αμινομάδες $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$, από τις οποίες η πρώτη είναι ισχυρή και η δεύτερη ασθενής βάση.

Χρωματογραφία ζεύγους ιόντων

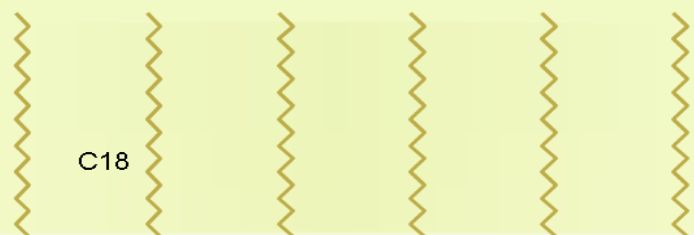
Η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων ή συζευγμένων ιόντων (ion-pair ή paired ion chromatography) είναι ένας τύπος χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης που χρησιμοποιείται για διαχωρισμό και προσδιορισμό ιόντων.

Η κινητή φάση αποτελείται από ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει έναν οργανικό διαλύτη όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο και μια ιοντική ουσία, που περιέχει ένα αντισταθμιστικό ιόν (counter ion) αντίθετου φορτίου από αυτό του αναλύτη.

Το αντισταθμιστικό ιόν είναι ένα ιόν, που ενώνεται με το ιόν του αναλύτη και σχηματίζει ένα ουδέτερο ζεύγος ιόντων, το οποίο κατακρατείται από το υλικό πλήρωσης της στήλης αντίστροφης φάσης.

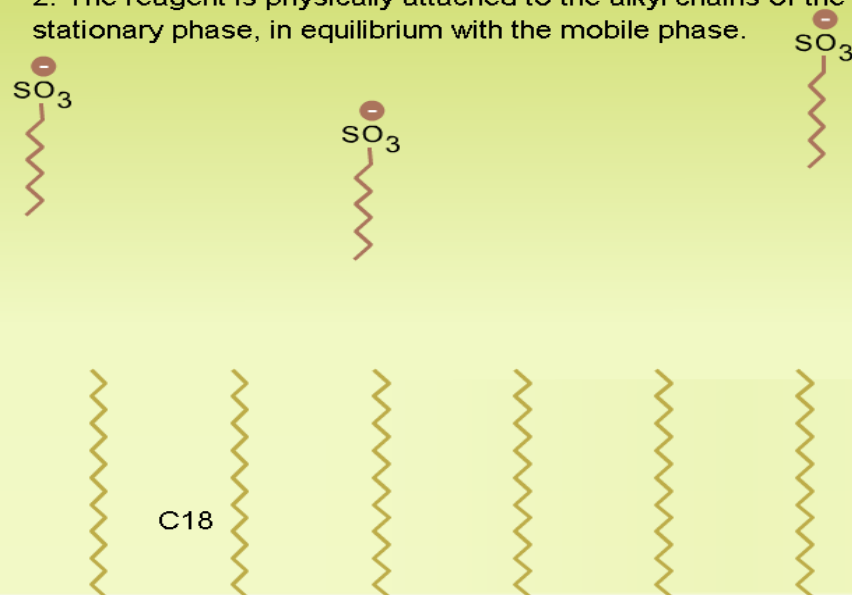
Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης ζεύγους ιόντων

1. Ion pair reagent is added to the mobile phase in a fixed concentration.



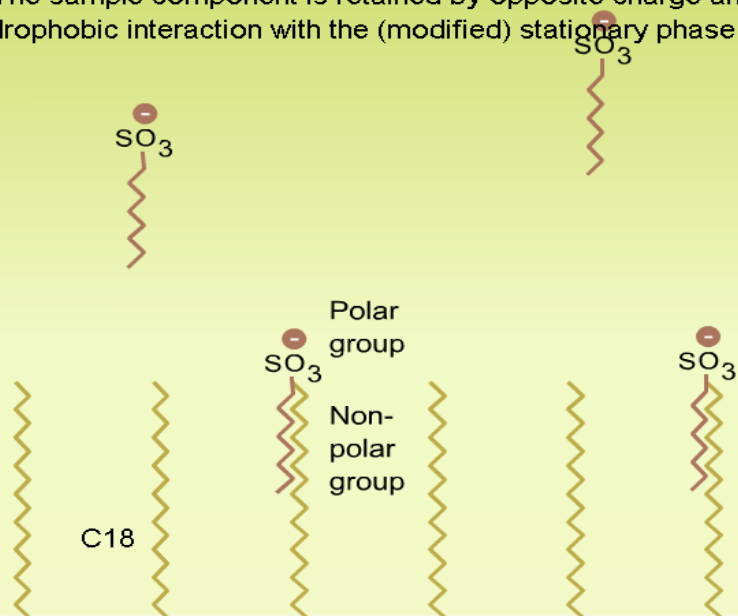
Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης ζεύγους ιόντων

2. The reagent is physically attached to the alkyl chains of the stationary phase, in equilibrium with the mobile phase.



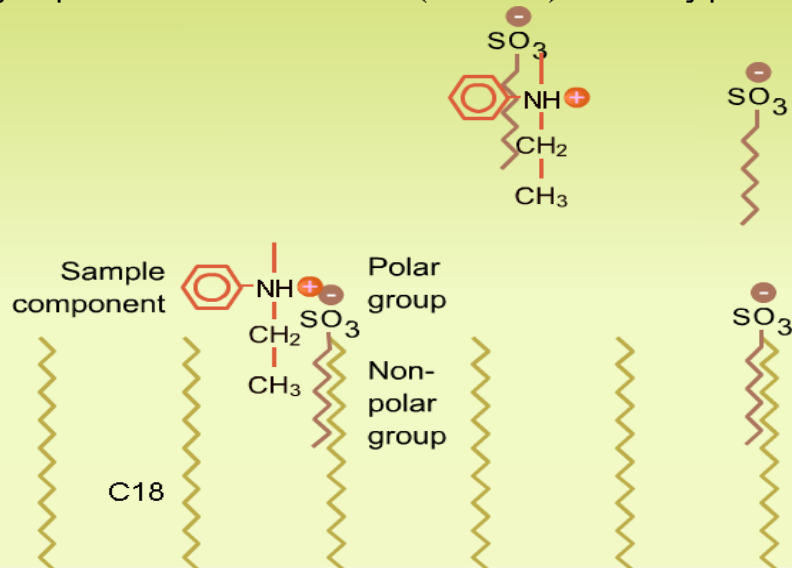
Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης ζεύγους ιόντων

3. The sample component is retained by opposite charge and hydrophobic interaction with the (modified) stationary phase.



Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης ζεύγους ιόντων

3. The sample component is retained by opposite charge and hydrophobic interaction with the (modified) stationary phase.



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΓΕΘΩΝ

Τα υλικά πλήρωσης αποτελούνται από μικρά ($\approx 10\text{-}\mu\text{m}$) σωματίδια πυριτίας ή πολυμερούς, που περιέχουν ένα δίκτυο ομοιόμορφων πόρων, μέσα από τους οποίους μπορούν να διαχέονται τα μόρια του διαλύτη και των διαλυμένων σωματιδίων.

Μόρια, τα οποία είναι μεγαλύτερα από το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης, αποβάλλονται και δεν υφίστανται καμιά κατακράτηση.

Μόρια με διάμετρο σημαντικά μικρότερη από τους πόρους μπορούν να διεισδύσουν ή να διαπεράσουν στο λαβυρινθώδες περιβάλλον τους και έτσι παγιδεύονται για μεγαλύτερο χρόνο. Τα μόρια αυτά εκλούνται τελευταία από τη στήλη.

Μεταξύ αυτών των δύο περιπτώσεων υπάρχουν μόρια ενδιάμεσου μεγέθους, των οποίων ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης εξαρτάται από τη διάμετρό τους. Η ομάδα των μορίων αυτών υφίσταται *κλασμάτωση*, η οποία σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των μορίων και εν μέρει με το σχήμα τους.

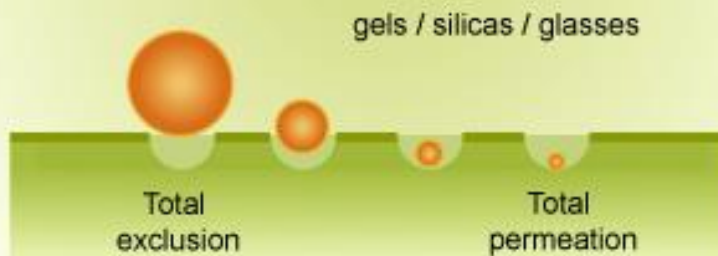
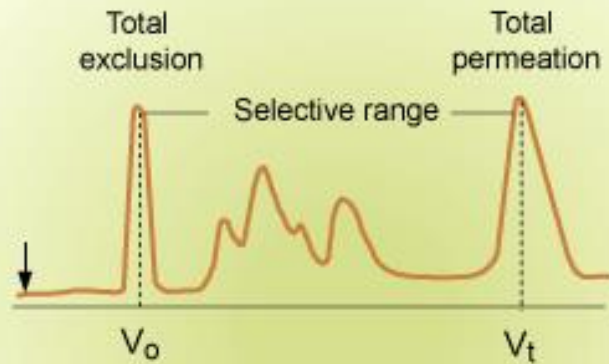
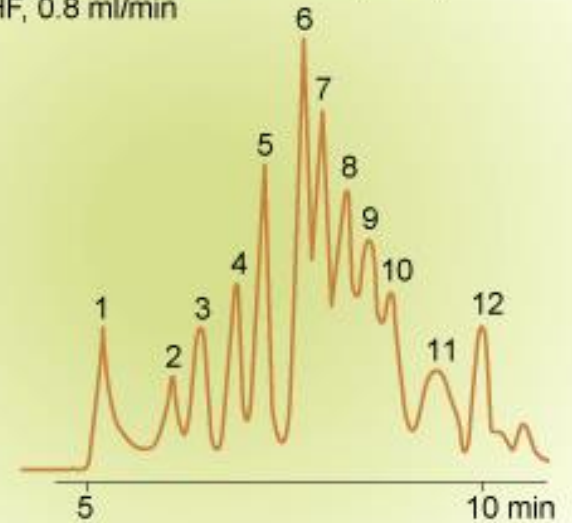
Οι διαχωρισμοί αποκλεισμού μεγέθους διαφέρουν από άλλες τεχνικές που συζητήθηκαν, στο ότι δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη και στατικής φάσης.

Column : Microgel 5 mix 250 x 7.5 mm (L x ID)

Mobile Phase : THF, 0.8 ml/min

Molecular mass:

1. 8000000
2. 860000
3. 410000
4. 170000
5. 87000
6. 34500
7. 19000
8. 10200
9. 5100
10. 2550
11. 580
12. 162



Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών για το διαχωρισμό πολυστυρενίου

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ

Χρησιμοποιείται ένα σχετικά λεπτό επίπεδο στρώμα μιας ουσίας, το οποίο αυτοστηρίζεται ή τοποθετείται ως φύλλο πάνω σε μια επιφάνεια υάλου, πλαστικού ή μετάλλου.

Η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη σταθερή φάση με τριχοειδή φαινόμενα, τα οποία μερικές φορές υποβοηθούνται και από τη βαρύτητα ή από ένα ηλεκτρικό πεδίο.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και η υγροχρωματογραφία στήλης παρουσιάζουν ομοιότητες, τόσο στη θεωρία, όσο και στο είδος των στατικών και κινητών φάσεων, αλλά και στις εφαρμογές τους.

Διαχωρισμοί λεπτής στιβάδας γίνονται με επίπεδες υάλινες ή πλαστικές πλάκες, που καλύπτονται με ένα λεπτό και ισχυρά προσκολλημένο στρώμα από λεπτοκονιοποιημένα σωματίδια, που παίζουν τον ρόλο της στατικής φάσης.

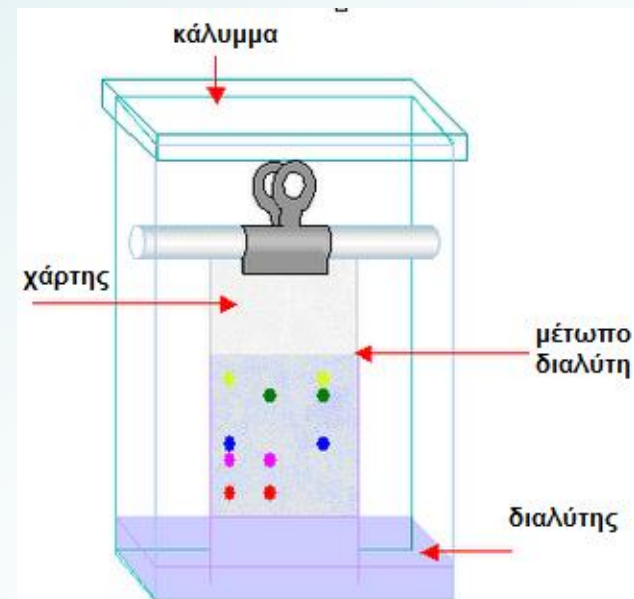
Οι κινητές φάσεις είναι επίσης ίδιες με αυτές, που εφαρμόζονται στην υγροχρωματογραφία στήλης υψηλής απόδοσης.

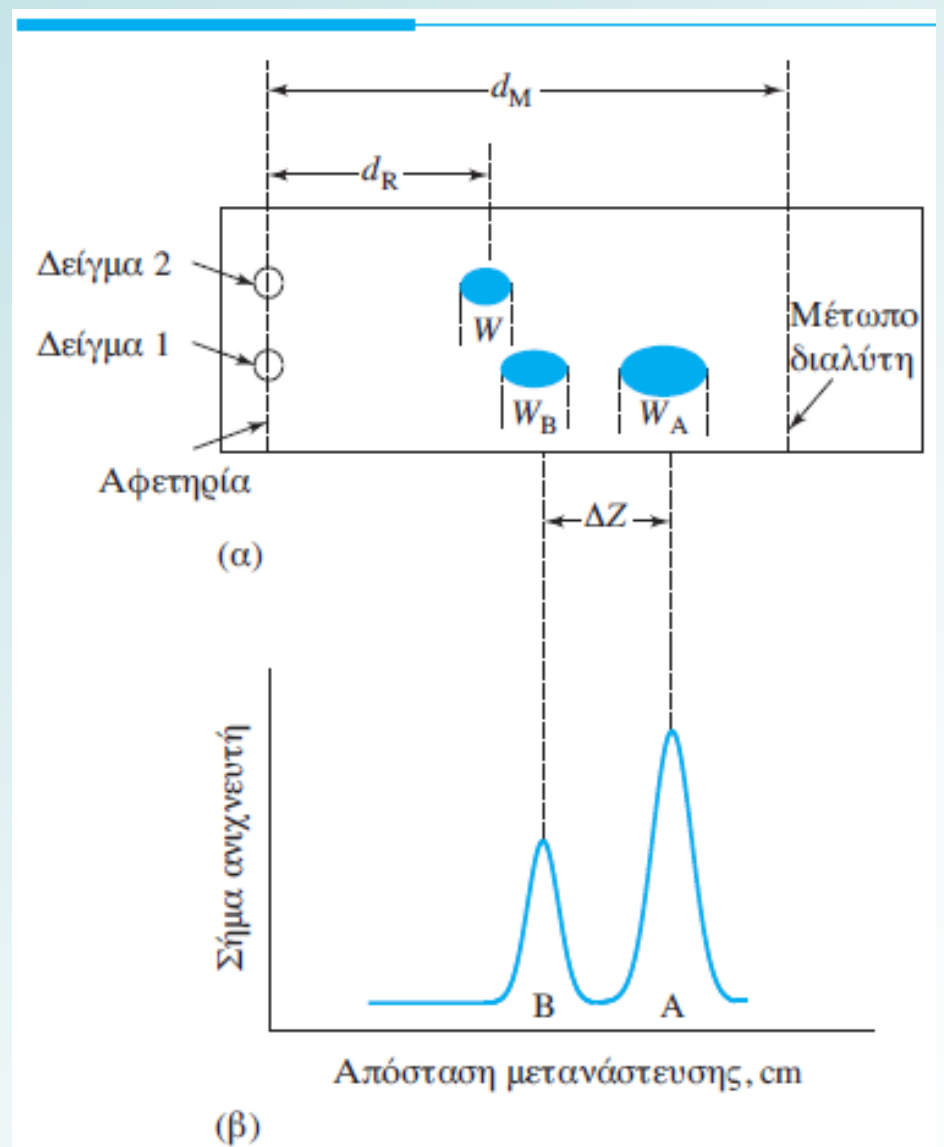
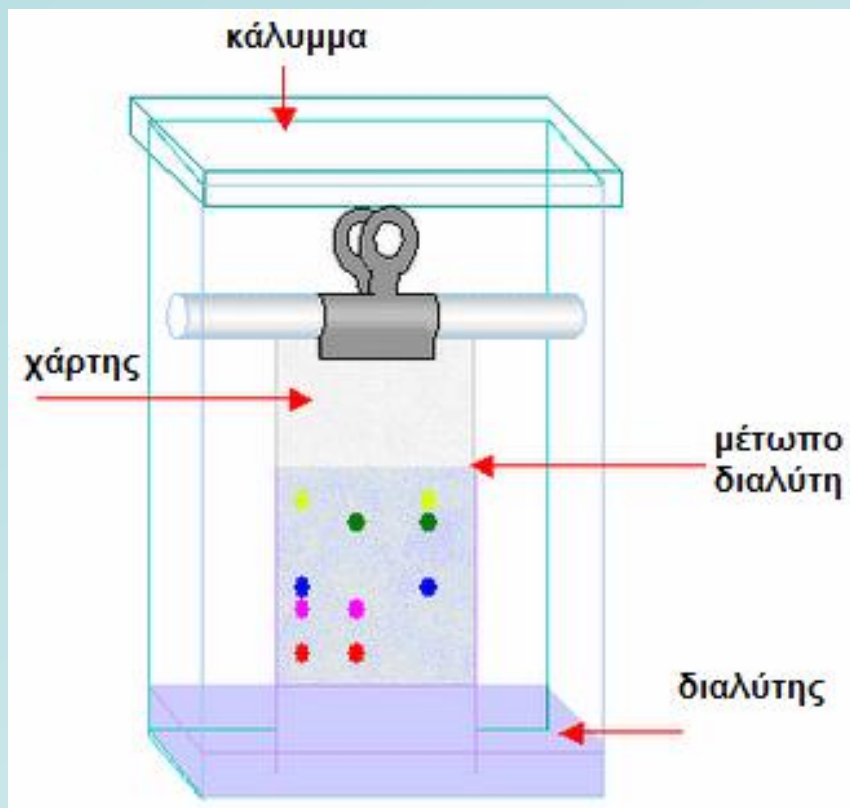
Στάδια εφαρμογής

Τοποθέτηση του δείγματος

Ανάπτυξη της πλάκας

Εντοπισμός των αναλύτων πάνω στην πλάκα





συντελεστής καθυστέρησης ή
συντελεστής R_F (retardation factor)

$$R_F = \frac{d_R}{d_M}$$

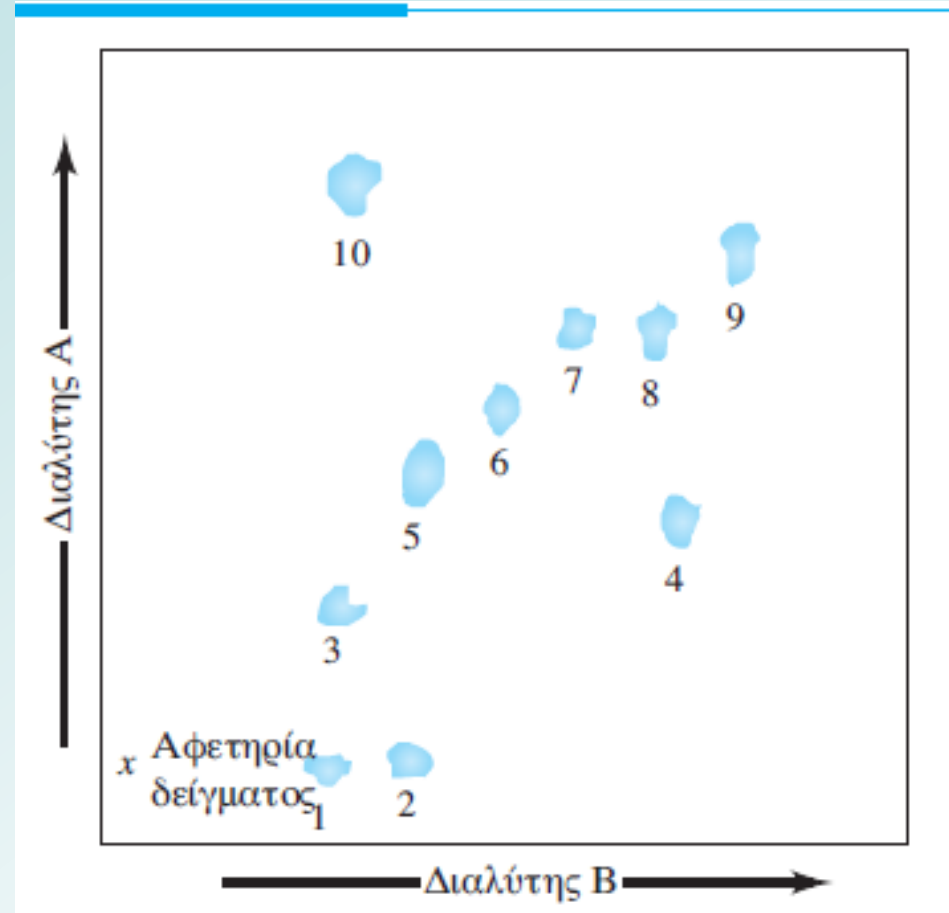
Διδιάστατη επίπεδη χρωματογραφία

Το δείγμα τοποθετείται στη γωνία μιας τετραγωνικής πλάκας και η ανάπτυξη γίνεται σε ανοδική κατεύθυνση με τον διαλύτη Α.

Ο διαλύτης αυτός απομακρύνεται στη συνέχεια με εξάτμιση, η πλάκα περιστρέφεται κατά 90° και ακολουθεί μια νέα ανοδική ανάπτυξη με έναν διαλύτη Β.

Μετά την απομάκρυνση και του δεύτερου διαλύτη, η θέση των αμινοξέων προσδιορίζεται με ψεκασμό με νινυδρίνη.

Οι κηλίδες ταυτοποιούνται με σύγκριση της θέσης τους με τις θέσεις των αντίστοιχων κηλίδων πρότυπων δειγμάτων.



Χρωματογράφημα λεπτής στιβάδας δύο διαστάσεων μερικών αμινοξέων (σε πηκτή πυριτιάς). Διαλύτης Α: τολουόλιο / 2-χλωροαιθανόλη / πυριδίνη. Διαλύτης Β: χλωροφόρμιο/βενζυλική αλκοόλη /οξικό οξύ. Αμινοξέα: (1) ασπαρτικό οξύ, (2) γλουταμινικό οξύ, (3) σερίνη, (4) β-αλανίνη, (5) γλυκίνη, (6) αλανίνη, (7) μεθειονίνη, (8) βαλίνη, (9) ισολευκίνη και (10) κυστεΐνη.