

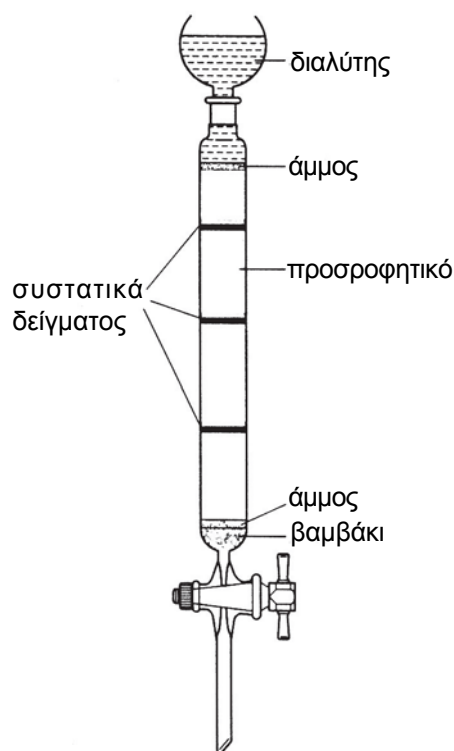
Κεφάλαιο 9

Χρωματογραφία στήλης

9.1 Εισαγωγή

Σε αυτό το κεφάλαιο θα μελετήσουμε το διαχωρισμό των χημικών ουσιών με χρωματογραφία στήλης. Στη χρωματογραφία στήλης η στάσιμη φάση συσκευάζεται μέσα σε έναν σωλήνα γυαλιού, το δείγμα φορτώνεται στην κορυφή της στήλης, και η κινητή φάση επιτρέπεται να ρεύει προς τα κάτω. Τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται λόγω των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων με τη στατική φάση και παράγουν καθορισμένες με σαφήνεια ζώνες (Εικόνα 9.1). Αυτές οι ζώνες συλλέγονται σε διαφορετικά καθώς βγαίνουν από τη στήλη. Παραδοσιακά, η χρωματογραφία στήλης εκτελείται σε ανοικτό σωλήνα στην ατμοσφαιρική πίεση. Τα τελευταία 20 χρόνια, υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC, Κεφάλαιο 11), όπου η κινητή φάση αντλείται μέσω της στήλης με υψηλή πίεση, ανταγωνίζεται την ανοικτού σωλήνα χρωματογραφία σε πολλές εφαρμογές της. Εντούτοις, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα στο εργαστήριο οργανικής χημείας επειδή είναι μάλλον ανέξοδη.

Ο διαχωρισμός με τη χρωματογραφία στήλης εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο τύπο στάσιμης φάσης και μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους μηχανισμούς, όπως π.χ είναι η προσρόφηση, η κατανομή, η ανάστροφη φάση, η ιοντοανταλλαγή, και ο αποκλεισμός μεγέθους (πηκτική). Όλοι οι τύποι χρησιμοποιούνται συνήθως στο εργαστήριο οργανικής χημείας, αλλά η τεχνική προσρόφησης υιοθετείται ευρύτατα. Σε αυτό το κεφάλαιο θα δώθει έμφαση στη χρωματογραφία στήλης προσρόφησης. Στο κεφάλαιο 10, θα δούμε τις χρωματογραφίες ανάστροφης φάσης, ιοντοανταλλαγής, και τη μεγέθους-αποκλεισμό (πηκτικής) όταν συζητάμε τη HPLC.



Εικόνα 9.1 Χρωματογραφική στήλη

9.2 Πρακτικές πτυχές

Πακετάρισμα της στήλης Προτού ξεκινήσει ο διαχωρισμός, το δείγμα πρέπει να αναλυθεί με TLC (Κεφάλαιο 8) για να καθορισθεί η κινητικότητα των συστατικών του δείγματος με τους διάφορους διαλύτες. Τα πιο κοινά προσροφητικά της χρωματογραφίας στήλης, όπως και για

τη TLC, είναι το **διοξειδίο του πυριτίου** και η **αλουμίνα**. Το **φωσφορικό ασβέστιο** (hydroxyapatite), μια στατική φάση περιορισμένου προσροφητικότητας, χρησιμοποιείται στον καθαρισμό των πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών μακρομορίων, ο **ενεργοποιημένος άνθρακας** και το **άμυλο** χρησιμοποιούνται για τις ειδικές εφαρμογές (Πίνακας 9.1).

Πίνακας 9.1 Προσροφητικά για χρωματογραφία στήλης

Χαρτί	↓ Αυξανόμενη ισχύς αλληλεπιδράσεων με πολικές ενώσεις
Κελλουλόζη	
Άμυλο	
Σάκχαρα	
Πυριτικό μαγνήσιο	
Θειικό ασβέστιο	
Πυριτικό οξύ	
Διοξειδίο του πυριτίου	
Florisil	
Οξειδίο μαγνησίου	
Οξειδίο αργίλου (αλουμίνα)*	
Ενεργός άνθρακας (Norit)	

* Βασική, όξινη, και ουδέτερη

Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι για μια κανονική χρωματογραφική στήλη: **ξηρή** και **υγρή (αιωρήματος)**. Η υγρή μέθοδος είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη, και θα την συζητήσουμε εδώ. Οι ξηρές στήλες διαχωρίζουν τις ενώσεις σε λιγότερο χρόνο από τις συμβατικές στήλες, και χρησιμοποιούνται σε διαχωρισμούς πολυπλόκων μιγμάτων; εντούτοις, το μειονέκτημα των ξηρών στηλών, είναι οι μεγαλύτερες ποσότητες προσροφητικού που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό.

Η ποιότητα του διαχωρισμού που λαμβάνεται από τη χρωματογραφία στήλης εξαρτάται από την ισορροπία προσρόφησης στη στήλη. Αν και στην πραγματικότητα η ισορροπία αυτή ποτέ δεν προσεγγίζεται επειδή ο διαλύτης ρέει συνεχώς, οι πειραματικές συνθήκες μπορούν να ρυθμιστούν κατά τέτοιο τρόπο ώστε η στήλη να λειτουργεί σε συνθήκες πλησίον-της-ισορροπίας. Η ποσότητα του προσροφητικού, το μέγεθος των κόκκων του, οι διαστάσεις της στήλης, και η ταχύτητα ροής είναι όλες σημαντικές παράμετροι που καθορίζουν την επιτυχία του διαχωρισμού.

Για να πραγματοποιηθεί ένας διαχωρισμός με την υγρή μέθοδο, η ποσότητα της στατικής φάσης πρέπει να είναι περίπου 20-50 φορές το βάρος του δείγματος. Για τους δύσκολους διαχωρισμούς που περιλαμβάνει ενώσεις παρόμοιας πολικότητας, αυτή η αναλογία μπορεί να αυξηθεί σε 100-200. Το κανονικό μέγεθος κόκκων του προσροφητικού για τη χρωματογραφία στήλης είναι 0.15-0.5 mm . Μέγεθος κόκκων μέγεθος μικρότερο από 0.1 mm οδηγεί σε πολύ χαμηλή ταχύτητα ροής. Το μεγαλύτερο μέγεθος κόκκων υπονοεί λιγότερη περιοχή επιφάνειας ανά μονάδα μάζης μαζική του προσροφητικού, και επομένως, λιγότερη προσροφητικότητα. Το μέγεθος της στήλης πρέπει να είναι τέτοιο ώστε η αναλογία μεταξύ του

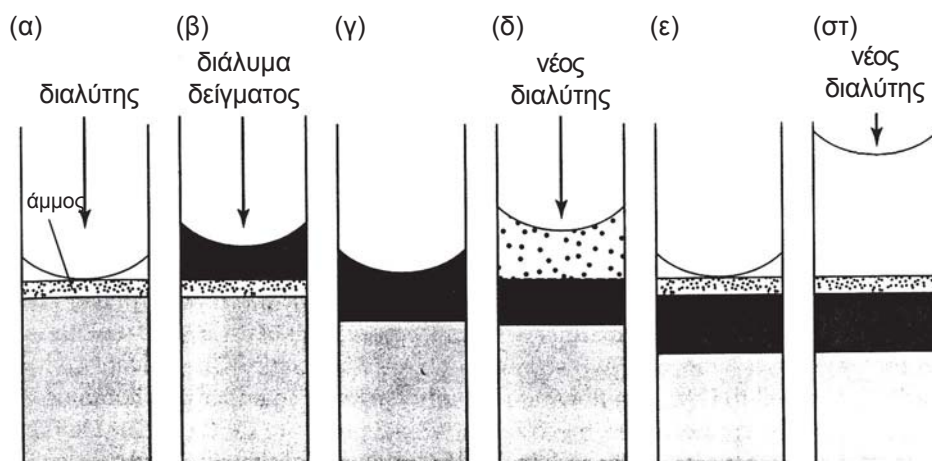
μήκους της και της διαμέτρου της να είναι 10-20. Γενικά, όσο μεγαλύτερη είναι η στήλη, τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός. Εντούτοις, υπάρχει ένα πρακτικό όριο σε αυτή τη σχέση που επιβάλλεται από την αργή ταχύτητα ροής που λαμβάνεται με τις πολύ μακριές στήλες.

Η ταχύτητα ροής διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στο διαχωρισμό. Πολύ γρήγορες ταχύτητες ροής συνήθως δεν οδηγούν σε καλούς διαχωρισμούς επειδή η στήλη λειτουργεί σε συνθήκες μακριά της ισορροπίας. Αφετέρου, πολύ μικρές ταχύτητες ροής όχι μόνο οδηγούν σε επιμήκεις αναλύσεις αλλά και φτωχούς διαχωρισμούς δεδομένου ότι οι διαλυτές ουσίες τείνουν να ανακατευθούν ξανά στη στήλη λόγω διάχυσης. Η βέλτιστη ταχύτητα ροής εξαρτάται από το συγκεκριμένο διαχωρισμό, τον τύπο προσροφητικού που χρησιμοποιείται και τη γεωμετρία της στήλης. Κανονικά, μια ταχύτητα ροής 1-60 mL ανά ώρα υιοθετείται.

Για να πακετάρει κάποιος μια χρωματογραφική στήλη, το προσροφητικό της επιλογής του αναμιγνύεται με περίπου πέντε φορές όγκο της κινούμενης φάσης (διαλύτης) και το αιώρημα ρίχνεται σε μια ξηρή γυάλινη στήλη όπου ήδη έχει εγκατασταθεί είτε μια πορώδη γυάλινη βάση είτε ένα κομμάτι από βαμβάκι και στρώμα άμμου που θα στηρίξουν τη στατική φάση. Η στήλη πρέπει να στερεωθεί σε μια κάθετη θέση. Συνήθως ο γυάλινος σωλήνας είναι εφοδιασμένος με μια στρόφιγγα που σκοπό έχει να ελέγξει τη ταχύτητα ροής. Καθώς η στερεά στάσιμη φάση καταβυθίζεται, η στήλη κτυπιέται ήπια με μια ξύλινη ράβδο ή σπάτουλα. Αυτό βοηθά στην αποφυγή δημιουργίας καναλιών και αεροφουσαλίδων μέσα στο προσροφητικό. Η στρόφιγγα ανοίγεται και ο διαλύτης επιτρέπεται να τρέξει προτού προστεθεί περισσότερο αιώρημα στη στήλη. Για την αποφυγή σχηματισμού ορίων στη στατική φάση, η νέα ποσότητα του προσροφητικού πρέπει να προστεθεί πριν από την ολοκληρωτική κατακάθιση της προηγούμενης. Σε κανένα σημείο δεν θα πρέπει ο διαλύτης να τρέξει κάτω από το επίπεδο του προσροφητικού. Αν αυτό συμβαίνει, η στήλη πρέπει να εκκενωθεί και να ξαναπακεταριστεί. Μόλις η στήλη γεμίσει στο επιθυμητό ύψος, ένας κυκλικό διηθητικό χαρτί ή ένα 0.5 cm στρώμα άμμου πρέπει να τοποθετηθεί πάνω από τη στάσιμη φάση ώστε να αποτρέψει τις διαταραχές του προσροφητικού καθώς το δείγμα και ο διαλύτης προστίθενται στη στήλη. Ο διαλύτης στραγγίζεται έτσι ο μηνίσκος του να είναι ακριβώς επάνω από την επιφάνεια της άμμου. Η στήλη είναι τώρα έτοιμη να φορτωθεί με το δείγμα (Εικόνα 9.2α).

Σε αντίθεση στη ξηρή μέθοδο, η στήλη γεμίζει κατά το μισό με το διαλύτη έκλουσης, και στη συνέχεια προστίθεται σταδιακά το προσροφητικό, ενώ υποβοηθάται η καταβύθιση κτυπώντας ελαφρά τη στήλη με ένα μολύβι ή ξύλο ή φελλό. Όταν το προσροφητικό φθάσει το επιθυμητό ύψος ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και στην υγρή μέθοδο. Για να επιτευχθεί το σωστό πακετάρισμα, ο διαλύτης πρέπει να τρέξει αρκετές φορές διαμέσου της στήλης πριν από την εισαγωγή του δείγματος.

Τοποθέτηση του δείγματος Ένα διάλυμα του δείγματος, συνήθως στον ίδιο διαλύτη που



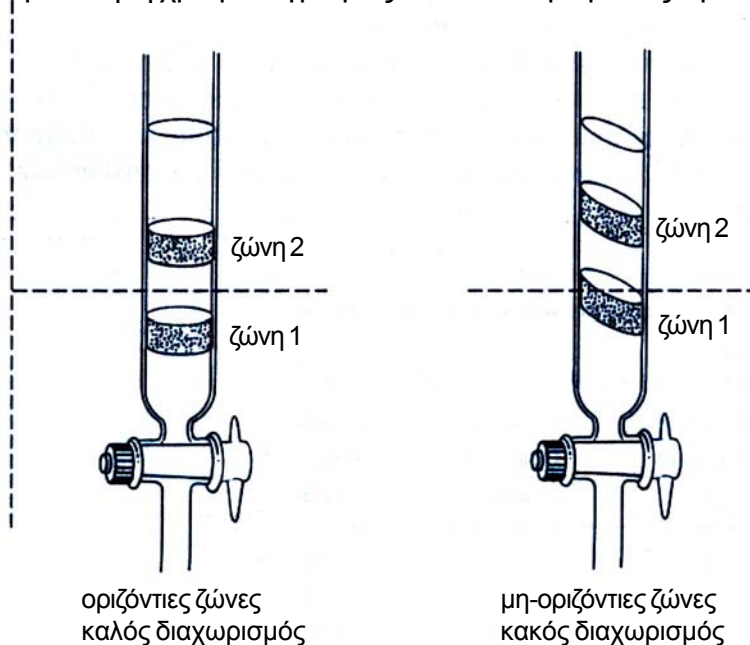
Εικόνα 9.2 Τοποθέτηση του δείγματος σε μια χρωματογραφική στήλη

χρησιμοποιήθηκε για το πακετάρισμα της στήλης, φορτώνεται στην κορυφή της στήλης με τη βοήθεια μιας πιπέτας Pasteur (Εικόνα 9.2β). Ο όγκος του διαλύματος του δείγματος πρέπει να περιοριστεί στο ελάχιστο; για στήλη περίπου 40 cm μήκους και 2 cm διάμετρο, ο ιδανικός όγκος διαλύματος του δείγματος είναι 1-2 mL. Πολύ μεγάλος όγκος διαλύματος δείγματος έχει σαν αποτέλεσμα φτωχό διαχωρισμό. Η στρόφιγγα στο άκρο της στήλης ανοίγεται ώστε το δείγμα να διαπεράσει το προσροφητικό (Εικόνα 9.2γ). Μόλις φορτωθεί εντελώς το δείγμα και ο μηνίσκος του διαλύματος δείγματος είναι ακριβώς επάνω από την επιφάνεια της άμμου, ένα μικρό υποπολλαπλάσιο φρέσκου διαλύτη προστίθεται ώστε να πληθούν τα τοιχώματα της στήλης (Εικόνα 9.2δ); αυτός ο όγκος επιτρέπεται να διαπεράσει τη στήλη (Εικόνα 9.2ε) και έπειτα περισσότερος διαλύτης προστίθεται για να γεμίσει τη στήλη (Εικόνα 9.2στ). Μια δεξαμενή διαλύτη συνδέεται στην κορυφή της στήλης. Η ταχύτητα ροής δεν πρέπει να σταματήσει από τη στιγμή που ξεκινά η στήλη γιατί αυτό οδηγεί σε διεύρυνση των ζωνών λόγω της διάχυσης.

Μερικές φορές το δείγμα δεν είναι καλά διαλυτό στο διαλύτη που χρησιμοποιούμε για να τρέξει η στήλη αλλά διαλύεται σε περισσότερο πολικούς διαλύτες. Η φόρτωση ενός μερικά διαλυτού δείγματος απευθείας πάνω από τη στήλη θα οδηγήσει σε πολύ φτωχό διαχωρισμό. Η διάλυση του δείγματος σε έναν διαλύτη πιο πολικό από το διαλύτη που χρησιμοποιείται για να τρέξει τη στήλη και η φόρτωση αυτού του διαλύματος στη στήλη, επίσης οδηγεί σε φτωχό διαχωρισμό. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να λυθεί με τη διάλυση του δείγματος στον πολικό διαλύτη, την προσθήκη μικρής ποσότητας προσροφητικού στο διάλυμα (2-10 φορές το βάρος του δείγματος), και την εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Καθώς ο διαλύτης εξατμίζεται το δείγμα προσροφάται στη στατική φάση. Το στερεό μίγμα δείγματος και προσροφητικού, τοποθετείται έπειτα πάνω από τη στήλη και ο διαλύτης επιτρέπεται να τρέξει ως συνήθως.

Τυπικά προβλήματα πακεταρίσματος Το πιο κρίσιμο σημείο της χρωματογραφίας στήλης

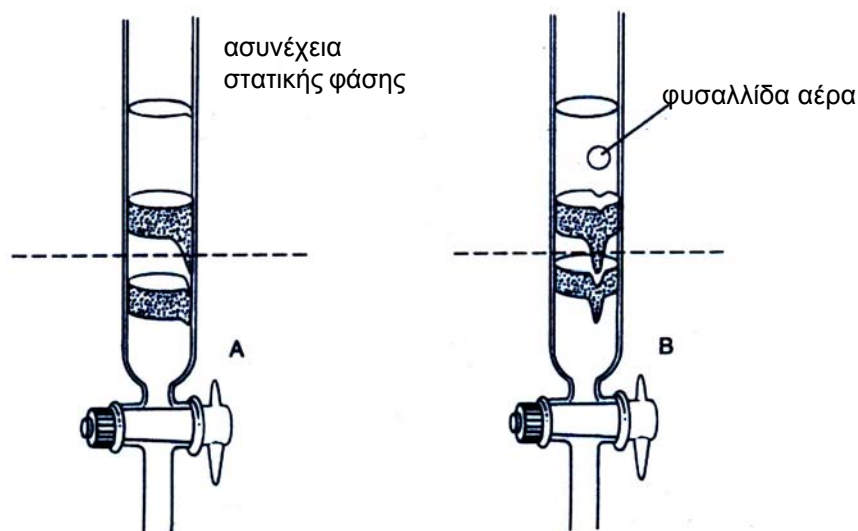
είναι το πακετάρισμα (γέμισμα) της στήλης με προσροφητικό. Το πακετάρισμα της στήλης πρέπει να είναι συνεχές και ελεύθερο απο ανωμαλίες, φυσαλλίδες αέρα, και κενά. Καθώς μια ένωση ταξιδεύει μέσα στη στήλη με μορφή ζώνης. Είναι πολύ σημαντικό το μπροστικό μέτωπο να είναι οριζόντιο και όχι πλάγιο ή κάθετο ως προς τον άξονα της στήλης. Αν δύο ζώνες είναι κοντά και δεν έχουν οριζόντια μέτωπα, είναι αδύνατο να συλλεγεί το ένα κλάσμα χωρίς να περιέχει και το δεύτερο. Το μέτωπο της δεύτερης ζώνης αρχίζει να βγαίνει πριν τελειώσει η πρώτη. Αυτό απεικονίζεται στην Εικόνα 9.3. Υπάρχουν δύο κυρίως λόγοι γιαυτό το φαινόμενο. Ο πρώτος είναι ότι η επιφάνεια του άνω άκρου του προσροφητικού δεν είναι οριζόντια, και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μη οριζόντιες ζώνες. Ο δεύτερος λόγος είναι ότι η στήλη δεν βρίσκεται στην απόλυτα κατακόρυφο θέση και στα δύο επίπεδα (μπρος-πίσω και πλευρά σε πλευρά). Όταν ετοιμάζεται μια στήλη χρωματογραφίας αυτοί οι παράγοντες πρέπει να πληρούνται.



Εικόνα 9.3 Σύγκριση οριζοντίων και μη-οριζοντίων ζωνών

Ενα άλλο φαινόμενο, που καλείται φαινόμενο **ροής** ή **καναλιού**, παρατηρείται όταν τμήμα της ζώνης έχει κινηθεί περισσότερο προς τα μπροστά απο ότι η κύρια μάζα της ζώνης. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται όταν υπάρχουν ασυνέχειες στη στατική φάση ή φυσαλλίδες αέρα. Το τμήμα της ζώνης προχωρά περισσότερο απο την κύρια μάζα διαμέσου του καναλιού. Δύο παραδείγματα απεικονίζονται στην Εικόνα 9.4.

Ανάπτυξη και έκλουση Οι κανόνες που διεπούν το διαχωρισμό στη χρωματογραφία στήλης-προσρόφησης είναι οι ίδιοι όπως στη TLC-προσρόφησης (Κεφάλαιο 8). Οι μη πολικές ενώσεις έχουν ασθενείς αλληλεπιδράσεις με το προσροφητικό, κινούνται γρηγορότερα απο τις πολικές ενώσεις και βγαίνουν πρώτες. Παρόμοια με το TLC, η διαδικασία κατά την οποία ο διαλύτης τρέχει διαμέσου του προσροφητικού καλείται **ανάπτυξη**. Εντούτοις, υπάρχει μια μεγάλη διαφορά μεταξύ TLC και της χρωματογραφίας στήλης. Ενώ η ανάπτυξη ενός TLC πλακιδίου



Εικόνα 9.4 Επιπλοκές καναλιού

γίνεται με ένα καθαρό διαλύτη ή ένα ενιαίο μίγμα διαλυτών, η ανάπτυξη στη χρωματογραφία στήλης μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικούς τρόπους: **ισοκρατική**, **σταδιακή**, και **βαθμιαία ανάπτυξη**. Στην ισοκρατική ανάπτυξη μόνο ένας διαλύτης χρησιμοποιείται σε όλη την ανάπτυξη. Κατά κάποιο τρόπο, αυτό είναι παρόμοιο με την TLC. Η ισοκρατική ανάπτυξη είναι χρήσιμη για το διαχωρισμό ενώσεων παρόμοιας πολικότητας; π.χ. ένα μίγμα χλωροφυλών α και β μπορεί να διαχωριστεί χρησιμοποιώντας ένα απλό διαλύτη μεσαίας πολικότητας όπως είναι ο οξικός αιθυλεστέρας ή μίγμα τολουολίου-μεθανόλης. Η ισοκρατική ανάπτυξη υιοθετείται επίσης όταν θέλουμε να απομονώσουμε μόνο τη λιγότερο πολική ένωση. Το σύνθετο δείγμα φορτώνεται στη στήλη που γεμίζει με ένα διαλύτη παρόμοιας πολικότητας με αυτήν της επιθυμητής ένωσης. Ο διαλύτης τρέχει στη συνέχεια διαμέσου της στήλης, και μόνο η ένωση (ή οι ενώσεις) παρόμοιας πολικότητας με αυτήν του διαλύτη μετακινείται; οι περισσότερο πολικές ενώσεις παραμένουν προσροφημένες στην κορυφή της στήλης. Μετά από την αφαίρεση των μη πολικών ενώσεων, αν θέλουμε να αφαιρέσουμε και τις πολικές ενώσεις που προσροφούνται έντονα στη στάσιμη φάση, διαλύτες υψηλότερης πολικότητας απαιτούνται. Μπορούμε να το κάνουμε αυτό κατά σταδιακό τρόπο με την προσθήκη διαδοχικών υποπολλαπλασίων διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Μια σειρά διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας ονομάζεται **ελουοτροπική σειρά**. Για παράδειγμα: το πεντάνιο, το τολουόλιο, ο διαιθυλαιθέρας, η ακετόνη, και η μεθανόλη αποτελούν μια τέτοια σειρά. Μια σειρά κοινών διαλυτών απεικονίζεται στον Πίνακα 9.2. Στη σταδιακή ανάπτυξη κάθε διαλύτης προστίθεται διαδοχικά. Οι ξαφνικές αλλαγές στη σύνθεση της κινούμενης φάσης πρέπει να αποφευχθούν επειδή αυτές συνοδεύονται συνήθως με τις εξω- ή ενδοθερμές διαδικασίες μίξης, οι οποίες οδηγούν σε απότομες μεταβολές θερμοκρασίας που μπορούν να οδηγήσουν στο ράγισμα της στάσιμης φάσης. Για παράδειγμα, στη χρησιμοποίηση της προαναφερθείσας ελουοτροπικής σειράς, τα μίγματα πεντάνιου με

Πίνακας 9.2 Κοινοί διαλύτες για χρωματογραφία στήλης

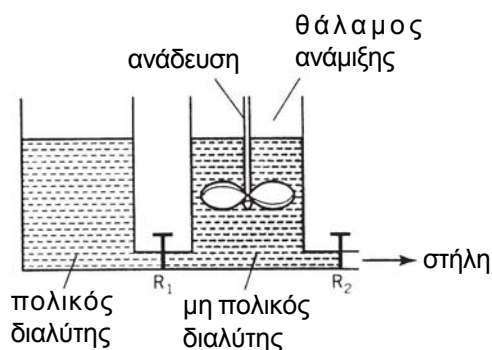
Πετρελαιοκός αιθέρας
Κυκλοεξάνιο
Τετραχλωράνθρακας*
Τολουόλιο
Χλωροφόρμιο*
Διχλωρομεθάνιο
Διαιθυλαιθέρας
Οξικός αιθυλεστέρας
Ακετόνη
Πυριδίνη
Αιθανόλη
Μεθανόλη
Νερό
Οξικό οξύ

* Καρκινογόνο

**Αυξανόμενη πολικότητα
και “ισχύς διαλύτη”
έναντι πολικών
χαρακτηριστικών ομάδων**

μια αυξανόμενη συγκέντρωση του τολουολίου (όπως 10, 50, και 70%) πρέπει να τρέξουν διαδοχικά μετά από το καθαρό πεντάνιο και πριν από το καθαρό τολουόλιο. Στην αλλαγή από απρωτικούς σε πρωτικούς διαλύτες, για παράδειγμα, από την ακετόνη στη μεθανόλη, η συγκέντρωση του πρωτικού διαλύτη πρέπει να αυξάνεται ακόμη πιο σταδιακά από ότι στην περίπτωση των απρωτικών διαλυτών (όπως το πεντάνιο και το τολουόλιο). Παραδείγματος χάριν, μια βαθμιαία αύξηση της μεθανόλης στα μίγματα μεθανόλη-ακετόνης θα ήταν μεθανόλη 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 70, και 100%.

Μερικές φορές είναι ευκολότερη η αύξηση της πολικότητας της κινούμενης φάσης πιο βαθμιαία από ότι κατά σταδιακό τρόπο. Μπορούμε να το επιτύχουμε αυτό με τη βαθμιαία ανάπτυξη που παράγεται από τη μίξη δύο διαλυτών διαφορετικής πολικότητας. Ο διαλύτης υψηλής πολικότητας επιτρέπεται να ρεύει, με μια ταχύτητα ροής R_1 , σε ένα δοχείο ανάμιξης που περιέχει το λιγότερο πολικό διαλύτη που ρεύει στη στήλη με μια ταχύτητα ροής R_2 (Εικόνα 9.5). Διάφορες αναλογίες μπορούν να δημιουργηθούν, ένα γεγονός που εξαρτάται από τις ταχύτητες ροής και των δύο διαλυτών. Όταν $R_2 = 2R_1$, η συγκέντρωση του περισσότερο πολικού διαλύτη στο δοχείο ανάμιξης αυξάνει γραμμικά με το χρόνο. Η βαθμιαία ανάπτυξη στη χρωματογραφία στήλης είναι το ισοδύναμο του προγραμματισμού θερμοκρασίας στη GC. Το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός με μια απλή χρωματογραφία στήλης μιγμάτων ενώσεων διαφορετικής πολικότητας.

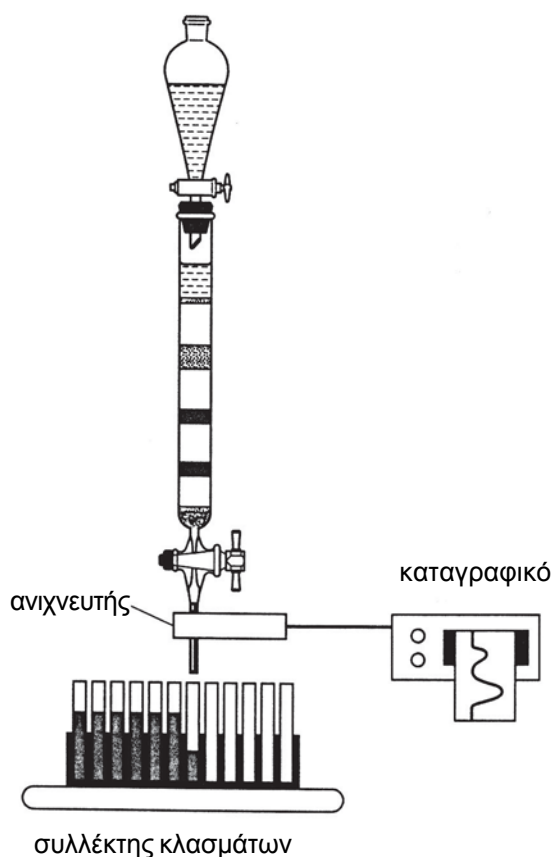


Εικόνα 9.5 Ένα σύστημα βαθμιαίας ανάπτυξης

Συνοψίζοντας τους τύπους ανάπτυξης στηλών μπορούμε να πούμε ότι στη χρωματογραφία προσρόφησης, η πολικότητα της κινούμενης φάσης είτε κρατιέται σταθερή, όπως στην ισοκρατική ανάπτυξη, είτε αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, *αλλά ποτέ δεν μειώνεται.*

Η αφαίρεση των ενώσεων από τη στήλη γίνεται κανονικά αφήνοντας το διαλύτη να την διατρέξει και συλλέγοντας τα διάφορα κλάσματα των συστατικών καθώς εξέρχονται από τη στήλη. Αυτή η διαδικασία αποτελεί την **έκλουση**, ενώ το υγρό που βγαίνει από τη στήλη αποτελεί το **έκλουσμα** ή **κλάσμα**.

Οι άχρωμες ενώσεις πρέπει να ανιχνευθούν με έμμεσες μεθόδους. Αντίθετα από την TLC, δεν είναι συνήθες να τρέχουν οι χρωματογραφικές στήλες χρησιμοποιώντας προσροφητικά με δείκτες φθορισμού επειδή αυτοί οι δείκτες μπορούν να εισέλθουν στο διαλύτη έκλουσης και να μολύνουν το δείγμα. TLC, GC, και UV-ορατού φασματοσκοπία αποτελούν πολύ χρήσιμους τρόπους παρακολούθησης της ανάπτυξης μιας στήλης χρωματογραφίας.

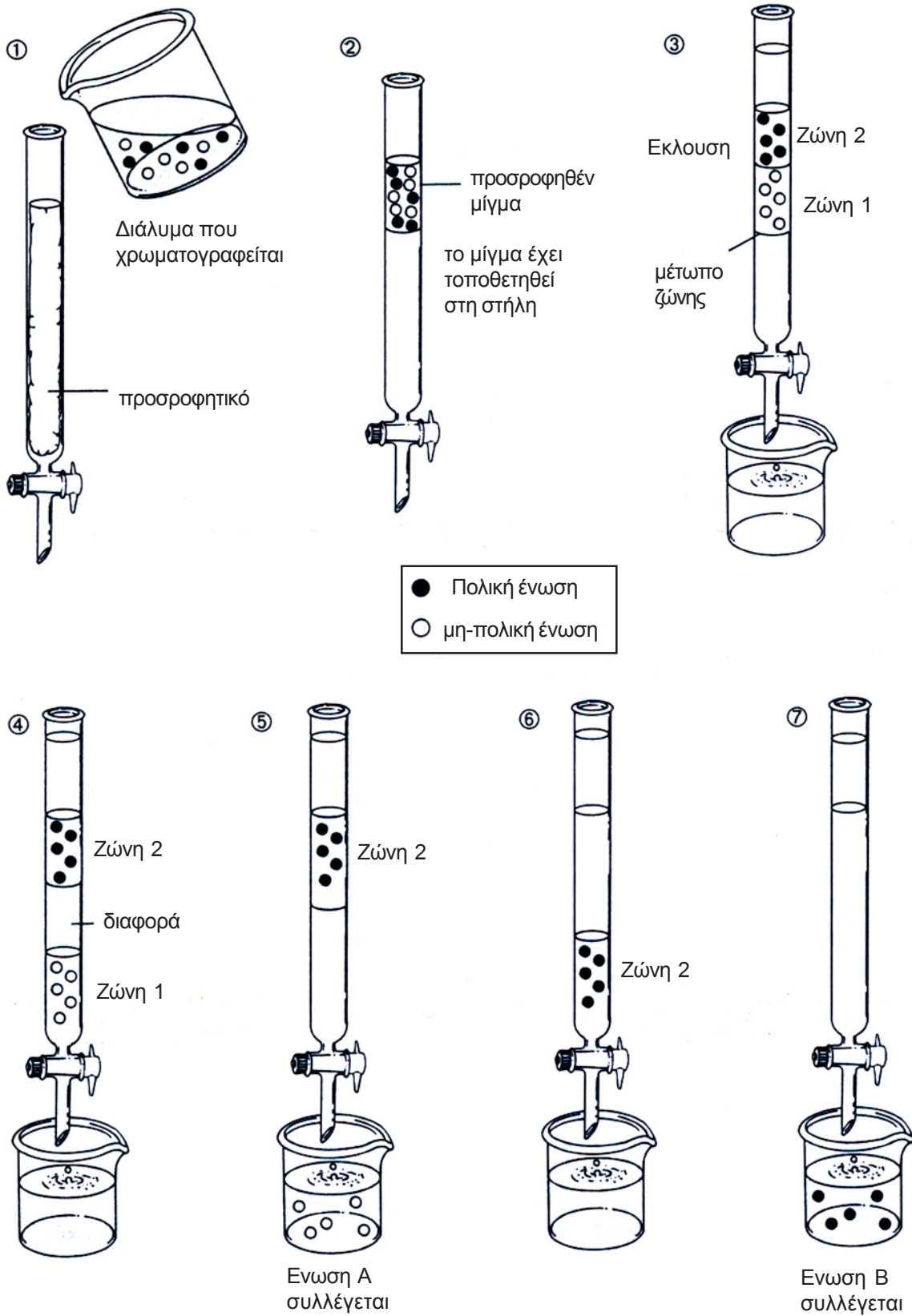


Εικόνα 9.6 Μια στήλη χρωματογραφίας εφοδιασμένη με συλλέκτη κλασμάτων, ανιχνευτή και καταγραφικό

πολύ λίγο στη UV-ορατού περιοχή.

Μια λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκλεκτικής προσρόφησης αποτελείται από την εξώθηση της στάσιμης φάσης από τη στήλη και την κοπή σε ζώνες. Η στήλη επιτρέπεται

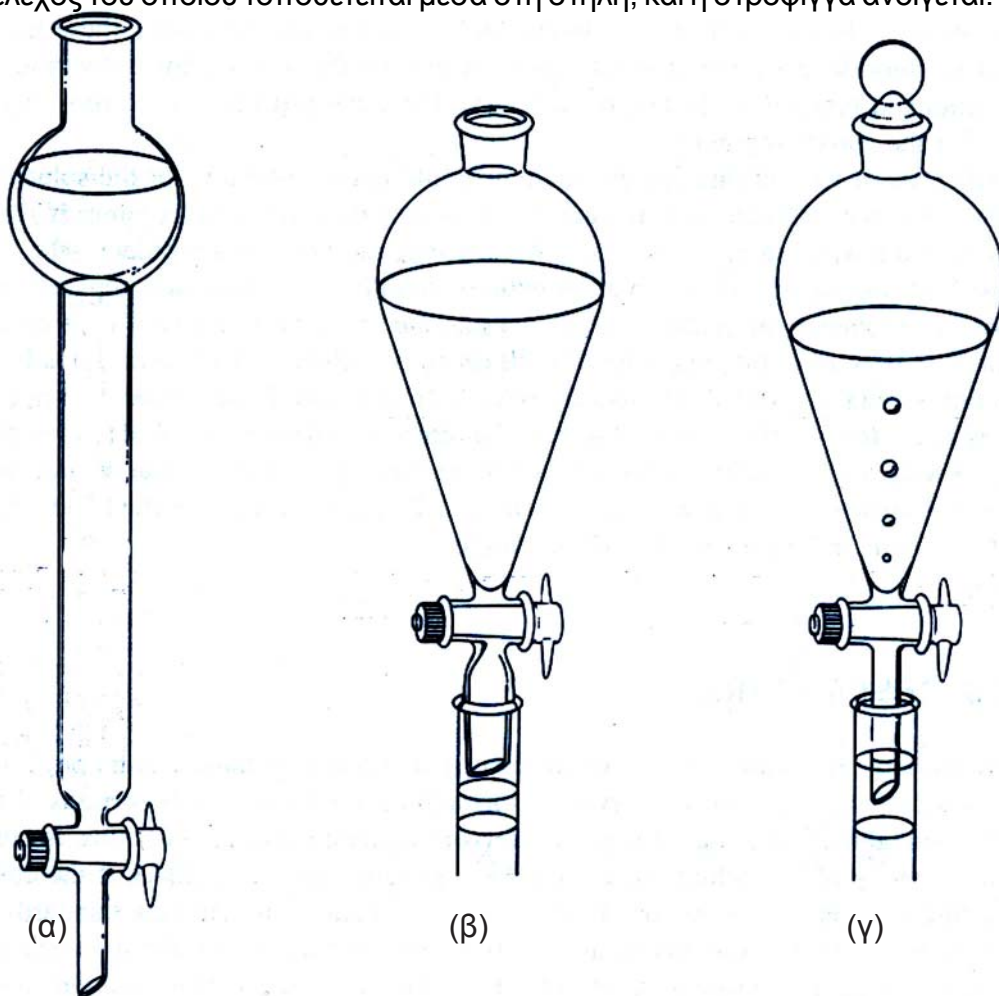
Κλάσματα ίσου όγκου μπορούν να συλλεγούν με τη βοήθεια μιας αυτόματης συλλογής κλασμάτων (Εικόνα 9.6) και αναλύονται με TLC, GC, ή UV; Τα κλάσματα που είναι παρόμοιας σύστασης συγκεντρώνονται μαζί και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Αυτόματοι UV-ορατού ανιχνευτές είναι επίσης διαθέσιμοι. Ο ανιχνευτής συνδέεται στο κάτω άκρο της στήλης και ελέγχει την απορρόφηση του εκλούσματος σε ένα ορισμένο μήκος κύματος. Αν το δείγμα απορροφά στην περιοχή του UV-ορατού, παρατηρούνται κορυφές καθώς το έκλουσμα βγαίνει από τη στήλη. Η χρήση αυτού του ανιχνευτή περιορίζεται σε κινούμενες φάσεις που είτε δεν απορροφούν είτε απορροφούν



Εικόνα 9.7 Αλληλουχία σταδίων σε μια χρωματογραφία στήλης

αρχικά να τρέξει ως ξηρού, κατόπιν η στάσιμη φάση αφαιρείται από την στήλη με εξώθηση με πεπιεσμένο αέρα. Οι ζώνες ενδιαφέροντος κόβονται με σπάτουλα και οι ενώσεις διαχωρίζονται με εκχύλιση από το προσροφητικό με τους κατάλληλους διαλύτες. Αυτή η λειτουργία είναι παρόμοια με την παρασκευαστική TLC χρωματογραφία. Η ίδια μέθοδος επιτυγχάνεται με χρήση πλαστικών στηλών μιας χρήσης όπου η στατική φάση δεν εξωθείται έξω από τη στήλη, αλλά η στήλη τεμαχίζεται και λαμβάνονται οι ζώνες ενδιαφέροντος. Η αλληλουχία των διαφόρων σταδίων μιας χρωματογραφίας στήλης απεικονίζεται στην Εικόνα 9.7

Όταν μεγάλες ποσότητες διαλύτη θα χρησιμοποιηθούν σε ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό στήλης, είναι πολύ πιο εύκολη η χρήση δεξαμενών διαλύτη για τη συνεχή προσθήκη νέας ποσότητας διαλύτη. Το απλούστερο είδος δεξαμενής, ένα κοινό χαρακτηριστικό πολλών στηλών, δημιουργείται με την κόλληση στο πάνω άκρο μιας στήλης μιας σφαιρικής φιάλης (Εικόνα 9.8α). Αν η στήλη διαθέτει εσμύρισμα σε αυτό το άκρο, τότε το κατάλληλο εσμυρισμένο διαχωριστικό χωνί μπορεί να συνδεθεί εκεί (Εικόνα 9.8β). Σε αυτή τη διάταξη, η στρόφιγγα του διαχωριστικού χωνιού παραμένει ανοικτή και δεν τοποθετείται πώμα. Μια τρίτη διάταξη απεικονίζεται στην Εικόνα 9.8γ. Ένα πωματισμένο διαχωριστικό χωνί γεμίζεται με διαλύτη, το στέλεχος του οποίου τοποθετείται μέσα στη στήλη, και η στρόφιγγα ανοίγεται. Ο διαλύτης ρέει



Εικόνα 9.8 Διάφορα είδη δεξαμενών διαλύτη για χρωματογραφία στήλης

απο το χωνί και γεμίζει το άνω μέρος της στήλης. Καθώς διαλύτης εξέρχεται απο τη στήλη, αυτή η διάταξη επιτρέπει αυτόματα την επαγέμιση του άνω τμήματος της στήλης με διαλύτη, επιτρέποντας στον αέρα να εισέλθει διαμέσου του στελέχους στο διαχωριστικό χωνί.

9.3 Flash χρωματογραφία

Ένα απο τα σοβαρά μειονεκτήματα της χρωματογραφίας στήλης είναι ότι για μεγάλης κλίμακας διαχωρισμούς ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της στήλης μπορεί να είναι εξαιρετικά μεγάλος. Επιπρόσθετα, καθώς ο χρόνος μεγαλώνει ο διαχωρισμός των ενώσεων χειροτερεύει. Το τελευταίο οφείλεται στο γεγονός ότι όταν οι ενώσεις ταξιδεύουν πολύ αργά μέσα στη στήλη τείνουν να δίνουν ουρές.

Μια τεχνική που υπερνικά αυτά τα προβλήματα έχει αναπτυχθεί. Η τεχνική είναι γνωστή ως **flash χρωματογραφία**. Στη flash χρωματογραφία το προσροφητικό τοποθετείται σε μια σχετικά κοντή στήλη όπου εφαρμόζεται πίεση αέρα ώστε να διώχνει το διαλύτη απο τη στήλη. Μια τυπική στήλη flash χρωματογραφίας παρασκευάζεται με την προσθήκη του προσροφητικού (silica gel, διαστάσεις κόκκων 40-63 μm) σε μια στήλη όπου ήδη υπάρχει ένα κομμάτι βαμβάκι και ένα 0.5 cm στρώμα άμμου που παίζουν το ρόλο του υποστηρίγματος της στατικής φάσης. Η στήλη στη συνέχεια γεμίζει με το διαλύτη έκλουσης, πίεση αέρα εφαρμόζεται στο άνω άκρο, και ο διαλύτης τρέχει διαμέσου της στήλης και συλλέγεται. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μερικές φορές πριν την εισαγωγή του δείγματος ώστε να επιτευχθεί ένα σωστό πακετάρισμα της στήλης. Μετά την εισαγωγή του δείγματος προς διαχωρισμό, η πίεση του αέρα ρυθμίζεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε η άνω επιφάνεια του διαλύτη να μειώνεται κατά 5 cm/min.

Η πίεση του αέρα που εφαρμόζεται στη στήλη υποχρεώνει το διαλύτη να περνά διαμέσου της στήλης του προσροφητικού με ταχύτητα που είναι κατά πολύ μεγαλύτερη της ταχύτητας που θα επιτυγχάνετο μόνο με τη δύναμη της βαρύτητας. Έτσι, επειδή ο διαλύτης περνά γρηγορότερα, ο χρόνος που απαιτείται για να περάσουν οι διάφορες ενώσεις μικραίνει. Η απλή εφαρμογή πίεσης σε μια κλασσική χρωματογραφία στήλης θα είχε ως αποτέλεσμα ένα κακό διαχωρισμό αφού δεν θα δινόταν χρόνος στα συστατικά του μίγματος να διαχωριστούν. Το πρόβλημα αυτό υπερνικάται με τη χρήση ενός πιο λεπτοκόκκου silica gel στη flash χρωματογραφία απο ότι στην κλασσική χρωματογραφία στήλης. Με το μικρότερο μέγεθος κόκκων, η επιφάνεια επαφής αυξάνει, και σαν συνέπεια και η ανάλυση της flash χρωματογραφίας αυξάνεται.

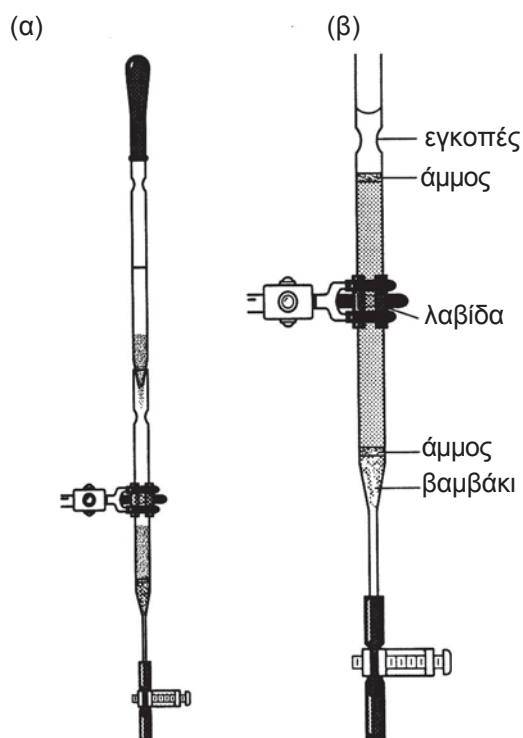
Μια παραλλαγή αυτής της τεχνικής δεν χρησιμοποιεί πεπιεσμένο αέρα αλλά στο κάτω άκρο της στήλης τοποθετείται ένα πλαστικό πώμα που ταιριάζει σε μια κωνική φιάλη διήθησης. Κενό εφαρμόζεται στο σύστημα, και η εφαρμογή του κενού έχει σαν συνέπεια το ρούφηγμα του διαλύτη διαμέσου του προσροφητικού. Το συνολικό αποτέλεσμα αυτής της παραλλαγής είναι το ίδιο με αυτό που λαμβάνεται με την εφαρμογή της πίεσης αέρα.

9.4 Χρωματογραφία στήλης μικροκλίμακας

Όταν η συνολική ποσότητα του μίγματος που πρέπει να διαχωριστεί είναι μικρότερη των 200 mg, τότε ο διαχωρισμός μπορεί να εκτελεσθεί με χρωματογραφία στήλης μικροκλίμακας (όπως επίσης και από παρασκευαστική TLC χρωματογραφία). Οι πιπέτες Pasteur είναι ιδανικά φτιαγμένες για αυτό το σκοπό. Μια πιπέτα Pasteur μπορεί να δεχθεί περίπου 1 g προσροφητικού, και η κατασκευή της είναι θέμα λεπτών.

Η άκρη μιας κοντού-στελέχους πιπέτας Pasteur εισάγεται σε ένα κομμάτι μαλακού λάστιχου. Ένας βιδωτός σφιγκτήρας χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ροής. Με τη βοήθεια ενός φελλού ή λαστιχένιου πώματος, η πιπέτα Pasteur τοποθετείται σε κατακόρυφη θέση. Ένα μικρό κομμάτι βαμβάκι τοποθετείται στο κάτω άκρο της πιπέτας και ακολουθείται από μια μικρή στρώση άμμου (ύψος 0.3 cm). Η πιπέτα γεμίζεται με διαλύτη, ο βιδωτός σφιγκτήρας ανοίγει για να επιτρέψει τη ροή του διαλύτη. Με αυτόν τον τρόπο αφαιρούνται οι φυσαλλίδες αέρα που έχουν παγιδευθεί είτε στο βαμβάκι είτε στη στρώση της άμμου. Η αφαίρεση του αέρα μπορεί να επιταχυνθεί με ελαφρά κτυπήματα της πιπέτας με μια μικροσπάτουλα. Η στήλη ξαναγεμίζεται με διαλύτη έτσι ώστε η επιφάνεια του διαλύτη να είναι 1-cm κάτω από το άκρο της πιπέτας (Εικόνα 9.9α). Ένα αιώρημα του προσροφητικού στο διαλύτη ετοιμάζεται και παραλαμβάνεται από μια δεύτερη πιπέτα Pasteur, της οποίας το στέλεχος είναι κομμένο. Η δεύτερη πιπέτα εισάγεται στο στόμιο της στήλης που είναι γεμάτη με το διαλύτη έτσι ώστε το κομμένο άκρο της πιπέτας να έρχεται σε επαφή με τα τοιχώματα της στήλης. Αν υπάρχουν φυσαλλίδες αέρα στο άκρο της άνω πιπέτας, αυτές απομακρύνονται με την εφαρμογή ελαφράς πίεσης στο λαστιχένιο βολβό. Μόλις έλθει ο διαλύτης της στήλης σε επαφή με το αιώρημα της πιπέτας το προσροφητικό αρχίζει να κατακάθεται στη στήλη, αντικαθιστώντας το διαλύτη και υποχρεώνοντας τον να κινηθεί προς τα άνω. Δεν είναι απαραίτητο να εφαρμοστεί πίεση στο λαστιχένιο βολβό της πιπέτας αφού το προσροφητικό πέφτει αυθόρμητα κάτω.

Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται τόσο πολλές φορές ώστε το προσροφητικό να φθάσει στο επίπεδο εγχοπών της πιπέτας Pasteur. Μια μικρή ποσότητα άμμου (ύψος περίπου 0.3 cm) τοποθετείται πάνω από το προσροφητικό και η στήλη είναι έτοιμη για τη φόρτωση του δείγματος. Η φόρτωση και η ανάπτυξη γίνονται όπως στις κανονικού μεγέθους στήλες. Μια μεγάλη διαφορά μεταξύ της κανονικής και μικροκλίμακας είναι ο χρόνος που απαιτείται για να διαχωριστούν τα μίγματα. Ενώ οι κανονικού μεγέθους στήλες μπορεί να πάρουν αρκετές ώρες για να τρέξουν, η μικροκλίμακας στήλη απαιτεί μερικά λεπτά. Όταν χρησιμοποιείται το διχλωρομεθάνιο ως διαλύτης έκλουσης τότε ο πλαστικός σωλήνας που ρυθμίζει τη ροή μπορεί να φουσκώσει και να βγει από τη θέση του. Το πρόβλημα αυτό λύνεται σε κάποιο βαθμό μικραίνοντας το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την προετοιμασία της στήλης μέχρι το τρέξιμο της. Το πρόβλημα αποφεύγεται με τη χρήση πλαστικών σωλήνων που είναι φτιαγμένοι από υλικά ανθεκτικά σε οργανικούς διαλύτες, όπως π.χ είναι το τεφλόν (PTFE).



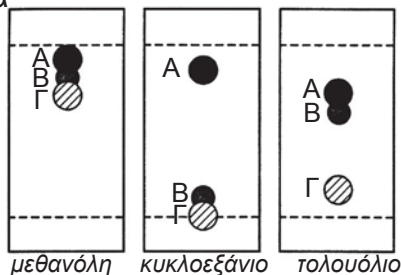
Εικόνα 9.9 Χρωματογραφία στήλης μικροκλίμακας

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry* Vogel, A. I.; Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P.W.G.; Tatchell, A. R. 5th ed. Longman, Harlow, UK, 1989.
2. *Experimental Organic Chemistry*, Palleros, D. R. John Wiley & Sons, New York, 2000.
3. *Experimental Organic Chemistry Standard and Microscale*, Harwood, L. M.; Moody, C.J.; Percy, J.M. 2nd ed. Blackwell Science, Oxford, UK, 1999.
4. *Organic Laboratory Techniques*, Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; Engel, R.G. Saunders Orlando, 1998.
5. *Εργαστηριακή τεχνική και Οργανικά Συνθέσεις* Αλεξάνδρου, Ν.; Βάρβογλη, Α.; Χατζημιχαλάκη, Φ. Θεσσαλονίκη, 1977.
6. *Microscale Techniques for the Organic Laboratory*, Mayo, D.W.; Ke, R.M.P.; Trumper, P.K. 2nd ed., J. Wiley & Sons, New York, 2001.
7. *The Organic Chem Lab Survival Manual*, Zubrick, J.W. 4th ed., J.Wiley & Sons, New York, 1997.

Πρόβλημα 1

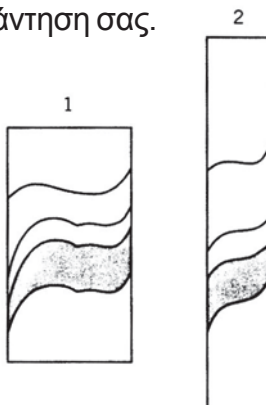
Ένα μίγμα αποτελούμενο από τρεις οργανικές ενώσεις (Α, Β, και Γ) πρέπει να διαχωριστεί με χρωματογραφία στήλης. Προκαταρκτική TLC ανάλυση με διάφορους διαλύτες έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα



- (α) Να συζητήσετε τη χρήση μεθανόλης, τολουολίου, και κυκλοεξανίου ώστε να απομονώσετε τις Α, Β, Γ με χρωματογραφία στήλης. Ποιάς (οι) διαλύτης (ες) θα επιλέγατε ώστε να διαχωρίσετε επιτυχώς τις ενώσεις Α, Β, και Γ?
- (β) Ποιά διαλύτη (ες) θα χρησιμοποιούσατε αν θέλατε να απομονώσετε την ένωση Α και να πετούσατε τις ενώσεις Β και Γ?

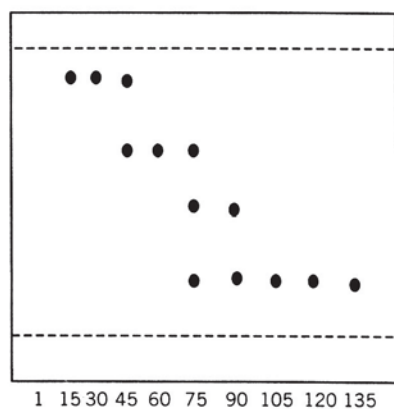
Πρόβλημα 2

Ο διαχωρισμός ενός μίγματος δύο ενώσεων επιχειρήθηκε με δύο στήλες διαφορετικής διαμέτρου χρησιμοποιώντας το ίδιο προσροφητικό και την ίδια κινούμενη φάση. Και στις δύο περιπτώσεις λόγω του κακού πακεταρίσματος παρατηρήθηκε ανάμειξη των ζωνών. Η στήλη 2 έχει μεγαλύτερη αναλογία μήκος/διάμετρο από ότι η στήλη 1. Ποιά στήλη δίνει τον καλύτερο διαχωρισμό? Να εξηγήσετε την απάντησή σας.



Πρόβλημα 3

Ο διαχωρισμός ενός μίγματος αλκαλοειδών επιχειρήθηκε με μια χρωματογραφία στήλης; 135 κλάσματα (3 mL όγκου το καθένα) συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας μια ελουοτροπική σειρά τολουολίου, διαιθυλαιθέρα, διχλωρομεθανίου, και μεθανόλης. Τα κλάσματα 1, 15, 30, 45, κ.τ.λ. αναλύονται με TLC (χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα ως διαλύτη έκλουσης) και τα παρακάτω αποτελέσματα λαμβάνονται:

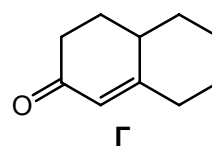
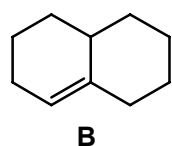
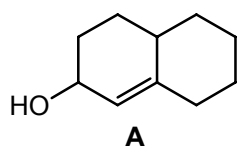


- (α) Πόσα αλκαλοειδή υπάρχουν στο μίγμα?
- (β) Ποιά κλάσματα μπορούν να συλλεχθούν μαζί χωρίς περαιτέρω ανάλυση?
- (γ) Ποιά κλάσματα πρέπει να ελεγχθούν ξανά με TLC πριν κάνετε την τελική συλλογή?

Πρόβλημα 4

Να καταταξέτε τις παρακάτω ενώσεις σε σειρά εξόδου από μια χρωματογραφία στήλης με silica gel χρησιμοποιώντας ένα μίγμα πετρελαιοειδών και ακετόνης.

(α)



(β)

