

# Χρωματογραφία

# Τι είναι η χρωματογραφία

Η χρωματογραφία λειτουργεί με βάση την ίδια αρχή όπως η εκχύλιση, αλλά η μία φάση διατηρείται σταθερή ενώ η άλλη κινείται.

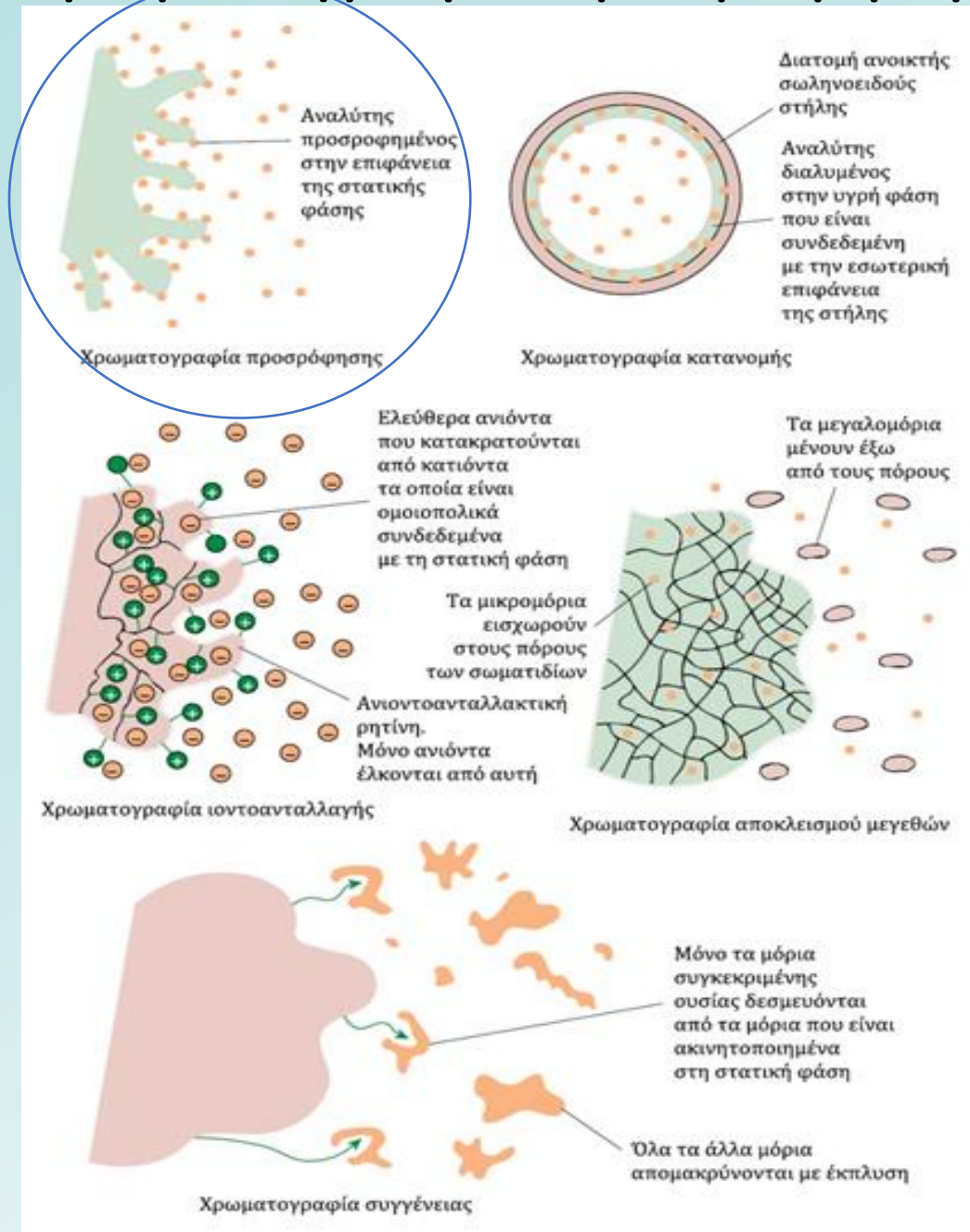
- ✓ Η **κινητή φάση** στη χρωματογραφία είναι υγρό ή αέριο.
- ✓ Η **στατική φάση** (παραμένει στη θέση της καθηλωμένη) είναι συνήθως:
  - ✓ ένα παχύρρευστο (μη πτητικό) υγρό που συνδέεται χημικά με το εσωτερικό ενός τριχοειδούς σωλήνα
  - ✓ συνδέεται πάνω στην επιφάνεια στερεών σωματιδίων με τα οποία είναι πληρωμένη η στήλη.
  - ✓ τα ίδια τα στερεά σωματίδια μπορεί να είναι η στατική φάση

# Τύποι χρωματογραφίας

Με βάση τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης των διαλυμένων ουσιών με τη στατική φάση:

- **Χρωματογραφία προσρόφησης**
- **Χρωματογραφία κατανομής**
- **Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής**
- **Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών**
- **Χρωματογραφία συγγένειας**

# Χρωματογραφία προσρόφησης

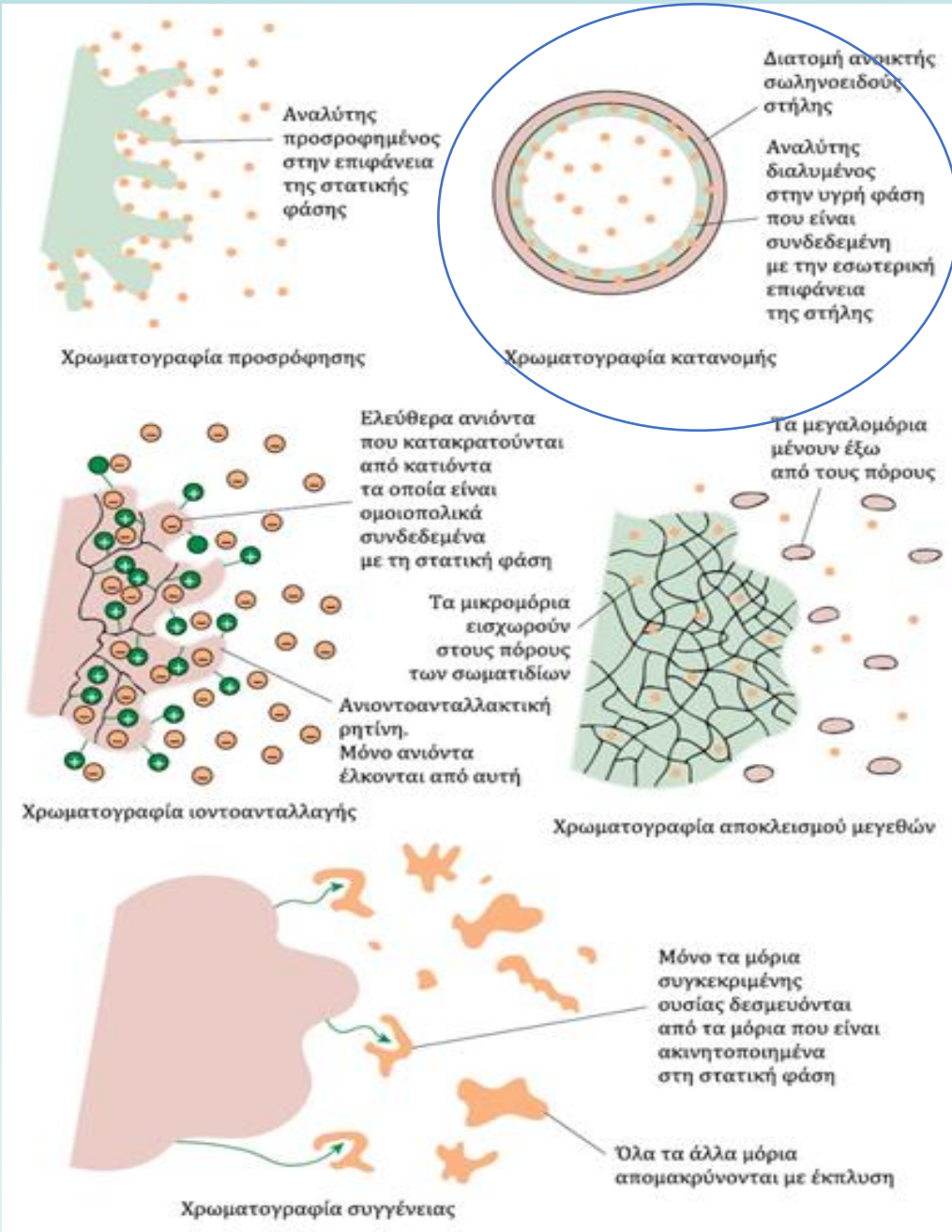


Χρησιμοποιείται στερεή στατική φάση και υγρή ή αέρια κινητή φάση. Οι διαλυμένες ουσίες προσροφώνται στην επιφάνεια των στερεών σωματιδίων.

Όσο πιο ισχυρά προσροφάται μια ουσία τόσο πιο αργά κινείται δια μέσου της στήλης.

Ο Tswett επινόησε τη χρωματογραφία προσρόφησης το 1903.

# Χρωματογραφία κατανομής



Μια υγρή στατική φάση συνδέεται με στερεή επιφάνεια.

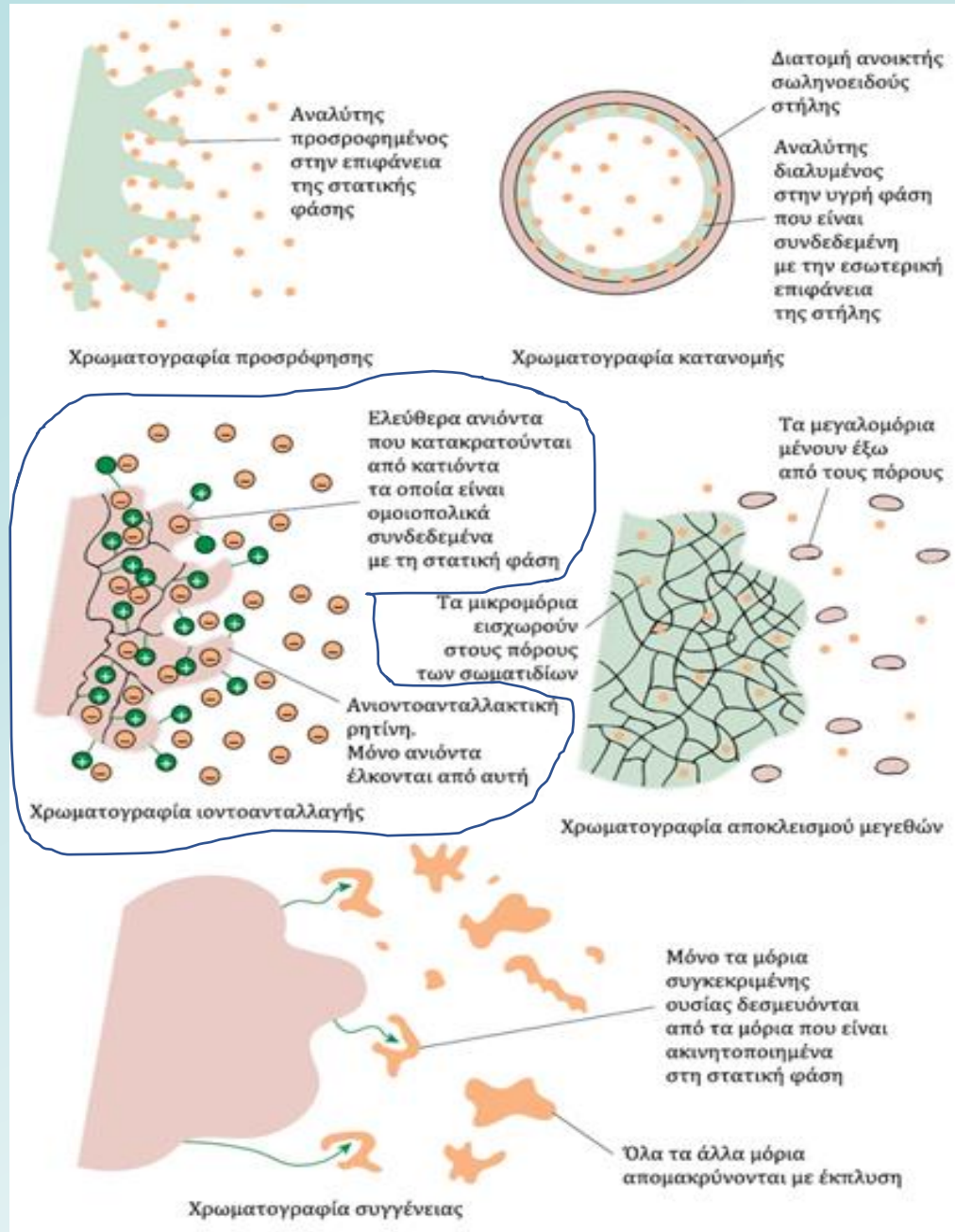
Παράδειγμα είναι η αεριοχρωματογραφία, όπου ένα υγρό πολυμερές (μη πτητικό υγρό) συνδέεται με την εσωτερική επιφάνεια ανοικτού σωλήνα από τηγμένη πυριτία ( $\text{SiO}_2$ ).

Η διαλυμένη ουσία (solute) κατανέμεται μεταξύ της υγρής στατικής φάσης και της κινητή φάσης, η οποία στην αεριοχρωματογραφία είναι ένα ρέον αέριο.

Για την πρωτοποριακή εργασία τους στη χρωματογραφία υγρού-υγρού το 1941, οι A.J.P. Martin και R.L.M. Synge τιμήθηκαν με βραβείο Νόμπελ το 1952.



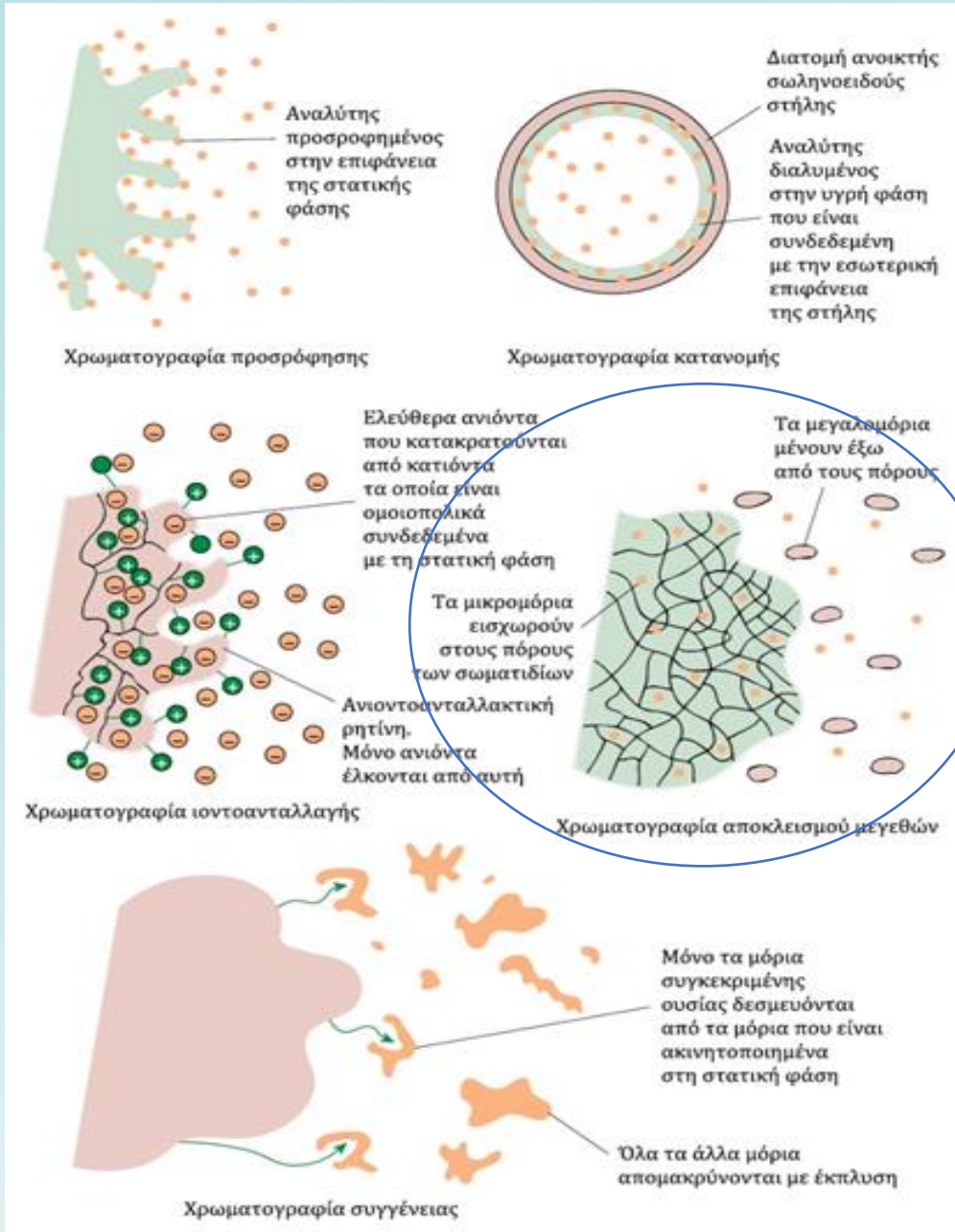
# Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής



Ανιόντα, όπως τα  $-\text{SO}_3^-$ , ή κατιόντα, όπως  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ , συνδέονται ομοιοπολικά στη στερεή στατική φάση, συνήθως μια ρητίνη. Διαλυμένα ιόντα αντίθετου φορτίου έλκονται από τη στατική φάση. Η κινητή φάση είναι υγρή.

Οι ρητίνες είναι σχετικά σκληρά, άμορφα οργανικά στερεά. Οι πηκτές είναι σχετικά μαλακές.

# Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών



Ονομάζεται, επίσης, χρωματογραφία **μοριακού αποκλεισμού, διήθησης μέσω πηκτής ή διαπέρασης πηκτής.**

Διαχωρίζει τα μόρια με βάση το μέγεθος.

Δεν υπάρχει ελκτική αλληλεπίδραση μεταξύ της στατικής φάσης και της διαλυμένης ουσίας. Αντίθετα, η υγρή ή αέρια κινητή φάση διέρχεται από ένα πορώδες πηκτώμα.

Οι πόροι είναι αρκετά μικροί ώστε να αποκλείονται τα μεγάλα μόρια διαλυμένων ουσιών, αλλά όχι τα μικρά.

Τα μεγάλα μόρια προσπερνούν από τα σωματίδια χωρίς να εισέρχονται στους πόρους.

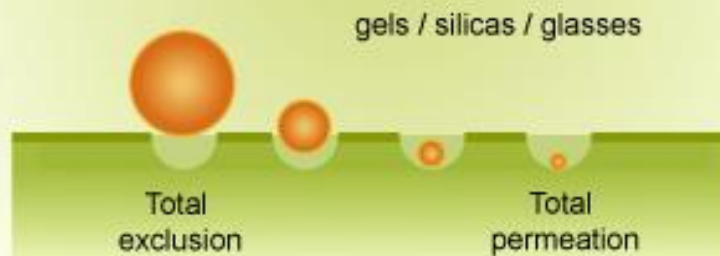
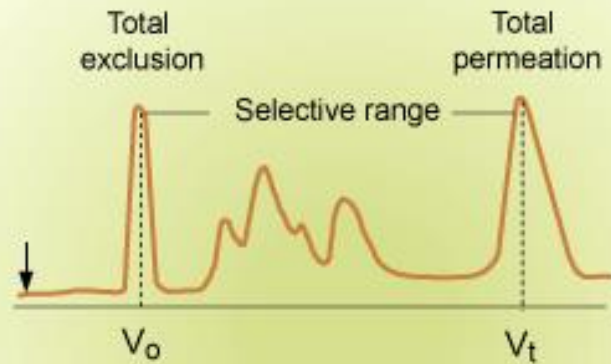
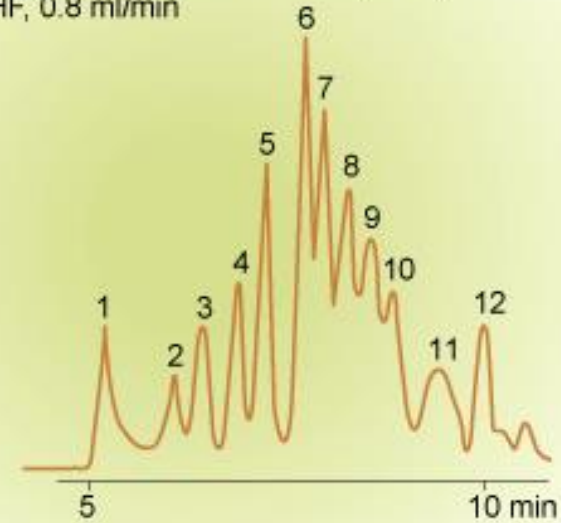
Τα μικρά μόρια καθυστερούν να περάσουν μέσα από τη στήλη επειδή εισέρχονται στο πηκτώμα και προστατεύονται από την κινητή φάση που ρέει γύρω από το πηκτώμα

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

**Mobile Phase** : THF, 0.8 ml/min

**Molecular mass:**

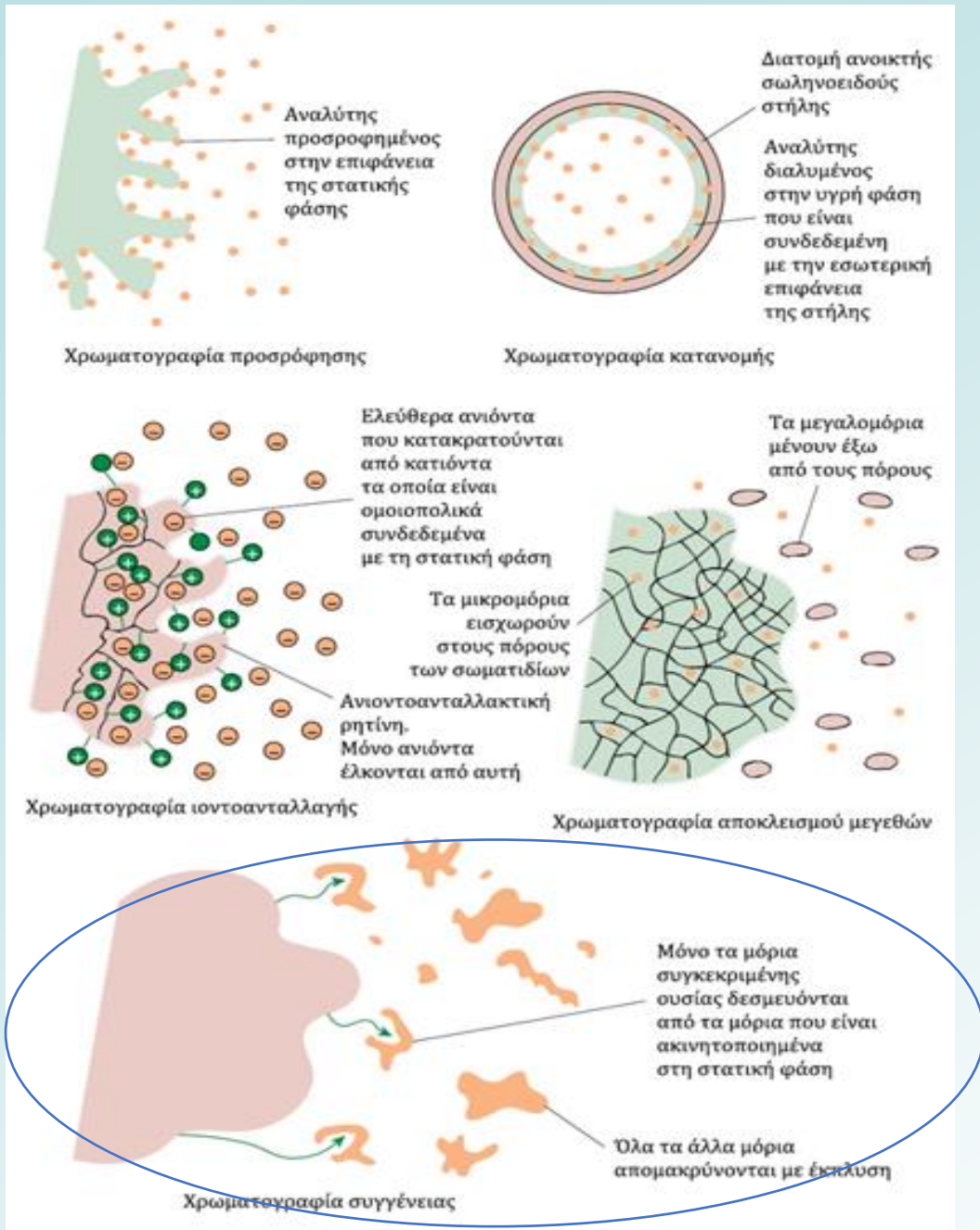
1. 8000000
2. 860000
3. 410000
4. 170000
5. 87000
6. 34500
7. 19000
8. 10200
9. 5100
10. 2550
11. 580
12. 162



Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών για το διαχωρισμό πολυστυρενίου



# Χρωματογραφία συγγένειας



Είναι πιο **επιλεκτική** επειδή χρησιμοποιεί μοριακή αναγνώριση μεταξύ ενός ακινητοποιημένου μορίου — ομοιοπολικά συνδεδεμένου με τη στατική φάση — και των μορίων της ουσίας με τα οποία δεσμεύεται **ειδικά**.

Το ακινητοποιημένο μόριο μπορεί να είναι ένα αντίσωμα για μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Όταν ένα μείγμα που περιέχει «χίλιες» πρωτεΐνες περνά μέσα από τη στήλη, μόνο η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το ακινητοποιημένο αντίσωμα κατακρατείται από τη στήλη.

Μετά την έκπλυση όλων των άλλων ουσιών από τη στήλη, η επιθυμητή πρωτεΐνη αποδεσμεύεται με αλλαγή του pH ή της ιοντικής ισχύος.

# Χρόνος κατακράτησης

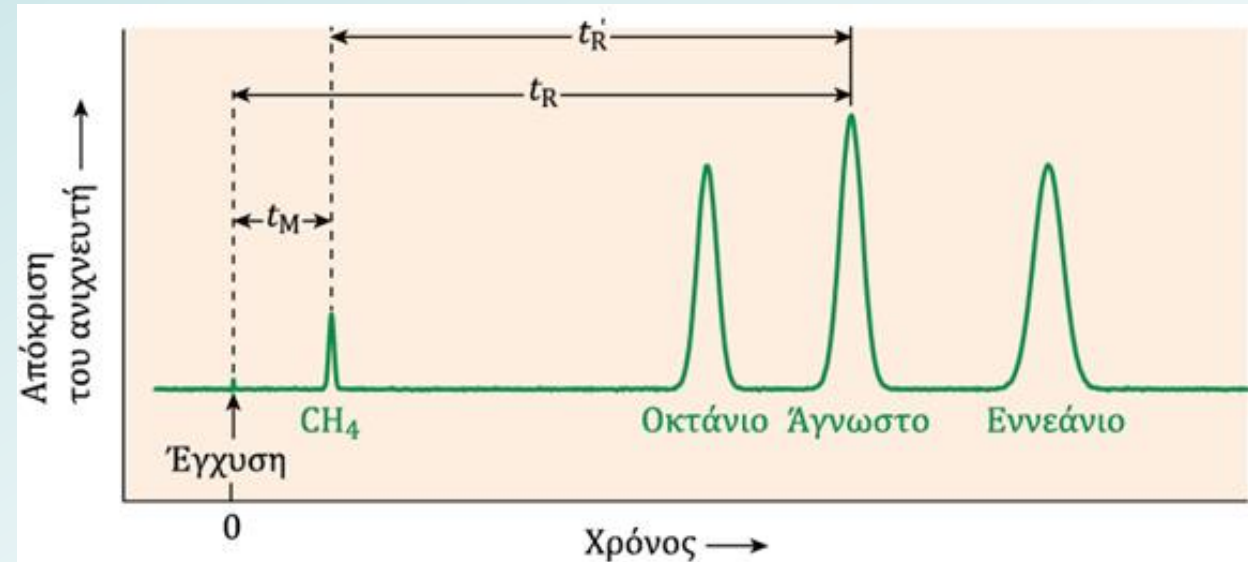
Το **χρωματογράφημα** είναι ένα διάγραμμα της απόκρισης του ανιχνευτή ως συνάρτηση του χρόνου έκλουσης.

Ο **χρόνος κατακράτησης**,  $t_R$ , για κάθε συστατικό είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από την έγχυση του μείγματος στη στήλη μέχρι την άφιξη του συστατικού στον ανιχνευτή (κορυφή της ουσίας φθάνει στον ανιχνευτή).

Ο **διορθωμένος χρόνος κατακράτησης**,  $t'_R$ , για μια κατακρατούμενη ουσία είναι ο χρόνος που απαιτείται για να διανύσει το μήκος της στήλης, πέραν εκείνου που απαιτείται από τον διαλύτη:

$$t'_R = t_R - t_M$$

Η κινητή φάση ή μια ουσία που δεν κατακρατείται, ταξιδεύει μέσω της στήλης στον ελάχιστο δυνατό χρόνο,  $t_M$ .



Σχηματικό χρωματογράφημα αερίου που δείχνει τη μέτρηση των χρόνων κατακράτησης.

# Ταχύτητα ροής όγκου και γραμμική ταχύτητα-Όγκος κατακράτησης

**Γραμμική ταχύτητα:**  $u_x = \frac{L}{t_M}$

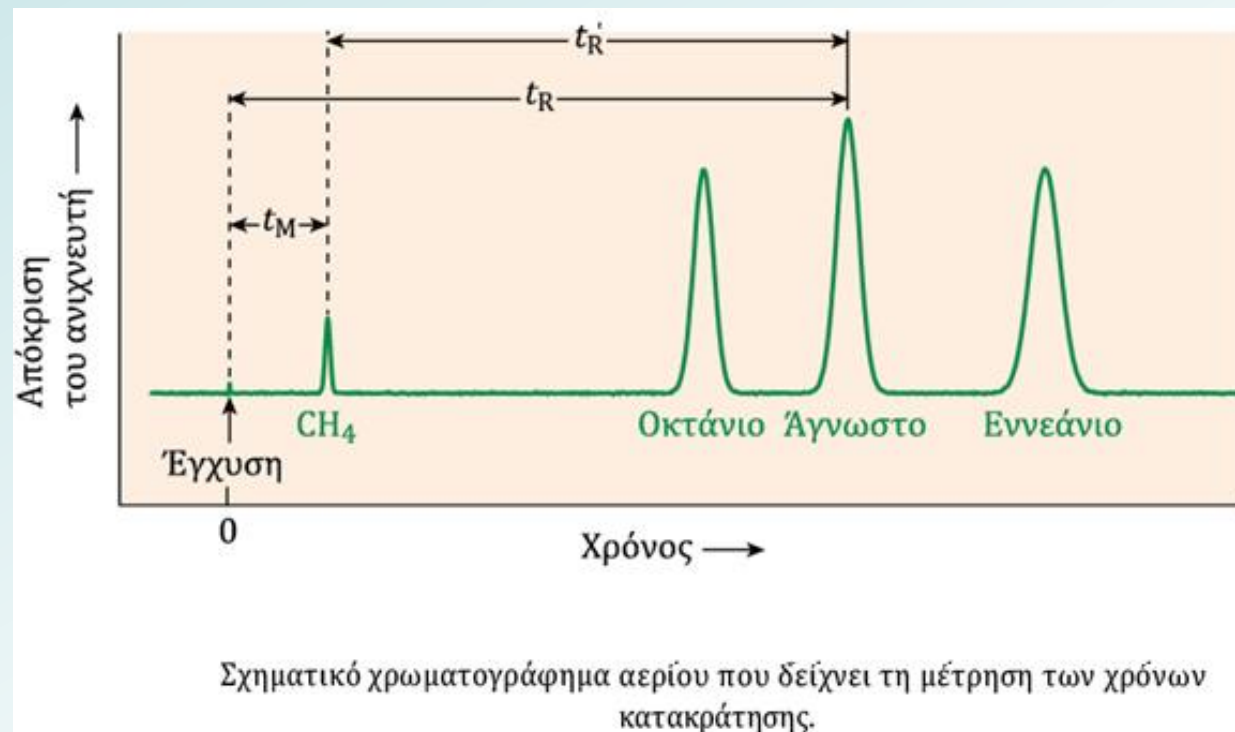
όπου  $L$  είναι το μήκος στήλης και  $t_M$  ο απαιτούμενος χρόνος για την έκλυση μιας μη κατακρατούμενης ένωσης από τη στήλη

## Ταχύτητα ροής $F$ :

$F$  = ο όγκος διαλύτη που διασχίζει τη στήλη ανά μονάδα χρόνου

**Όγκος κατακράτησης,  $V_R$** , είναι ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλυση μιας συγκεκριμένης ουσίας από τη στήλη

$$V_R = t_R \cdot F$$

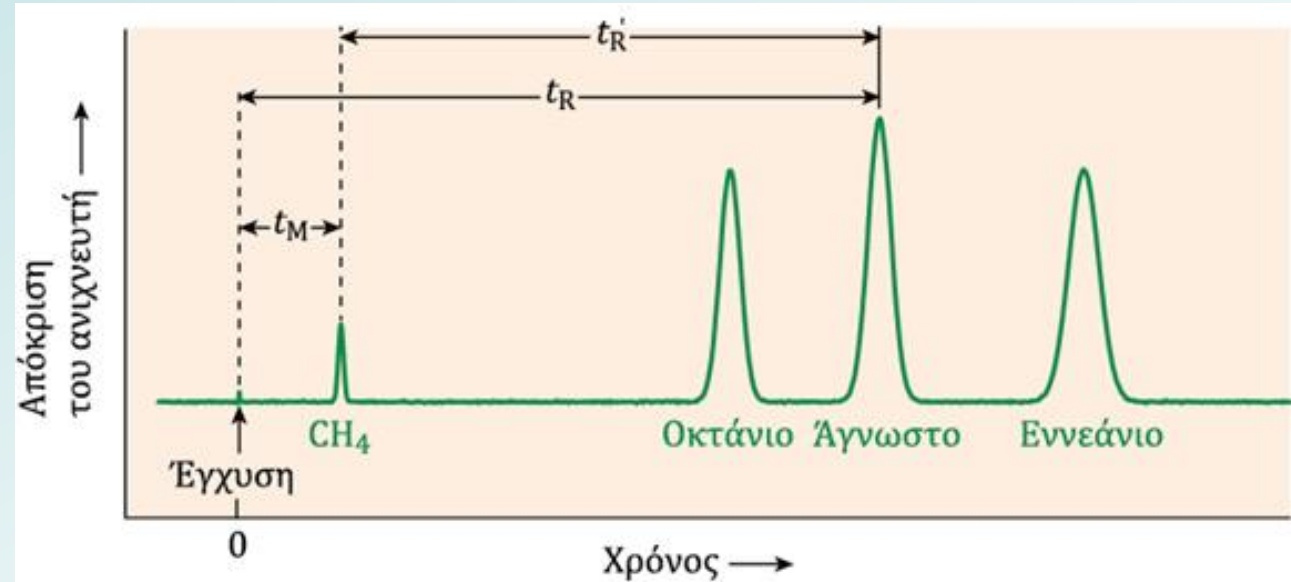


# Παράγοντας κατακράτησης

Για κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος, ο **παράγοντας κατακράτησης**,  $k$ , είναι ο χρόνος έκλυσης της κορυφής μείον τον χρόνο  $t_M$  που απαιτείται για να διανύσει η κινητή φάση τη στήλη.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad k = \frac{V_R - V_M}{V_M}$$

Όσο περισσότερο μια ουσία κατακρατείται από τη στήλη, τόσο μεγαλύτερος είναι ο παράγοντας κατακράτησης.



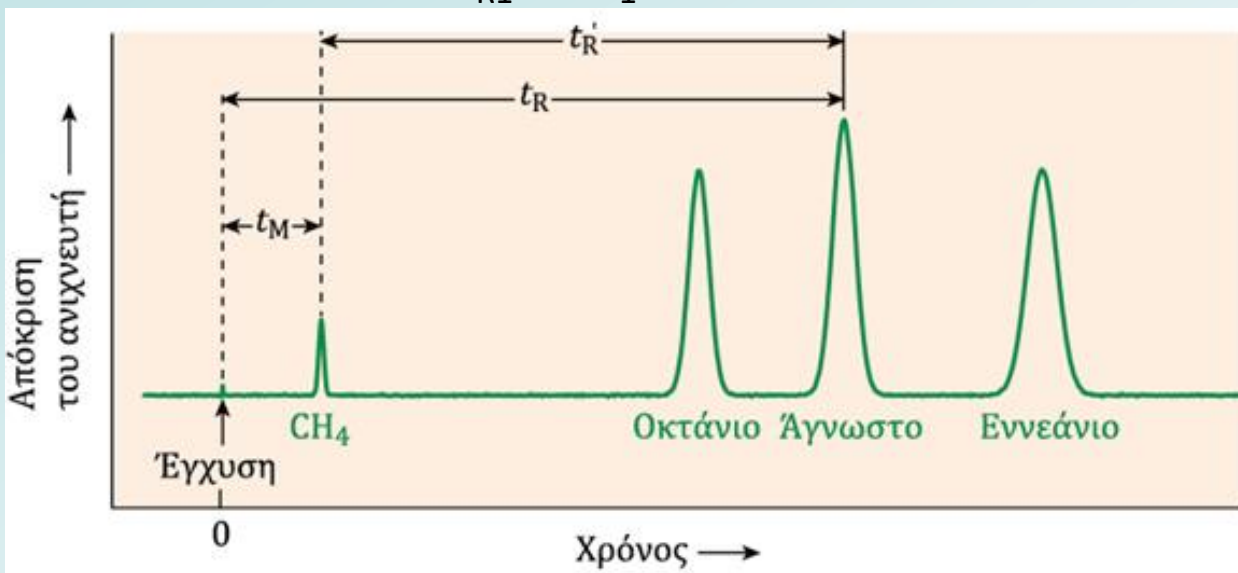
Σχηματικό χρωματογράφημα αερίου που δείχνει τη μέτρηση των χρόνων κατακράτησης.



# Παράγοντας εκλεκτικότητας $\alpha$ ή παράγοντας διαχωρισμού (?)

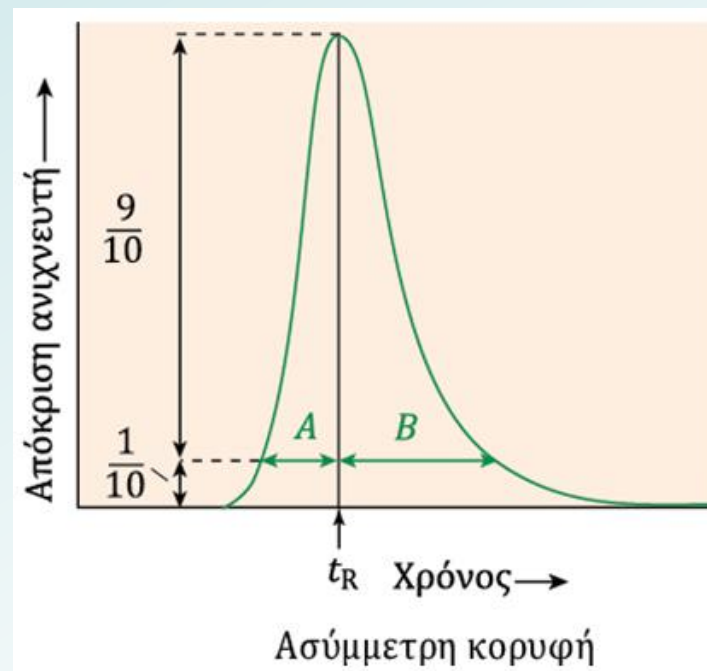
Για δύο συστατικά 1 και 2, όπου το 2ο εκλύεται αργότερα ο **παράγοντας διαχωρισμού ή εκλεκτικότητας** είναι ο λόγος των διορθωμένων χρόνων κατακράτησης:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1}$$



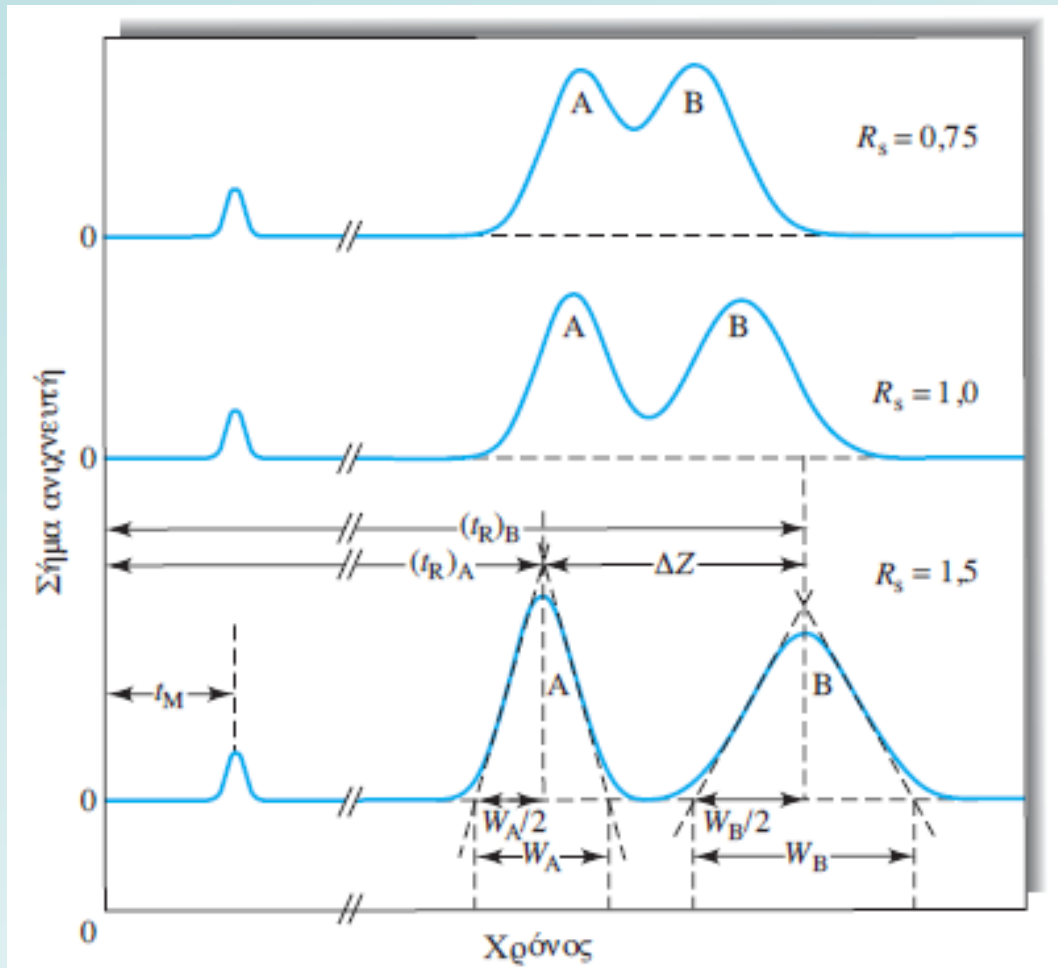
Σχηματικό χρωματογράφημα αερίου που δείχνει τη μέτρηση των χρόνων κατακράτησης.

# Παράγοντας ασυμμετρίας B/A



Η **διαχωριστική ικανότητα ή διαχωριστικότητα ή διαχωριστότητα (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%.

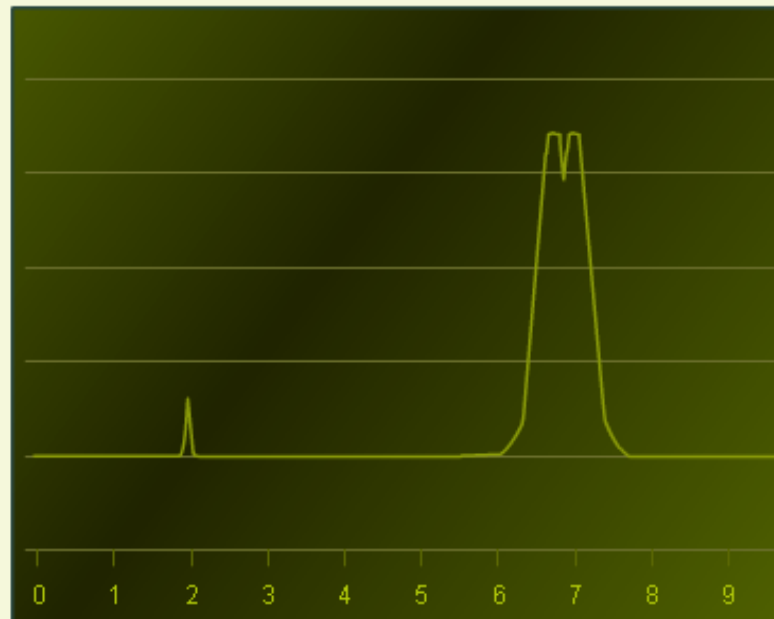
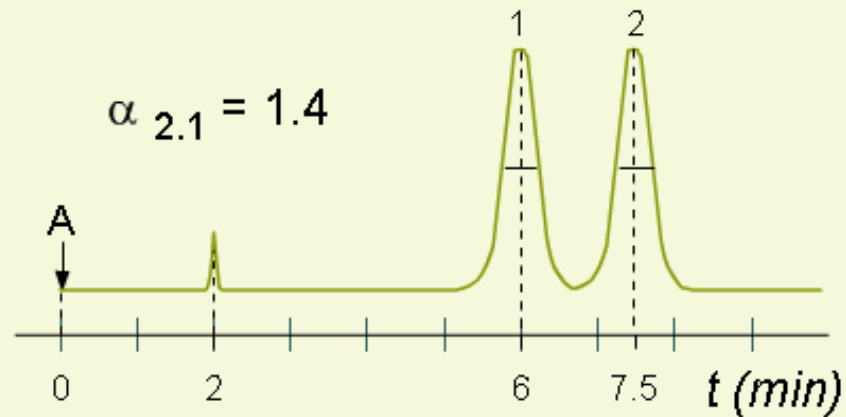
## Παράγοντας εκλεκτικότητας $\alpha$

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

Σχετική κατακράτηση  
μεταξύ δύο κορυφών.

### Παράμετροι:

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



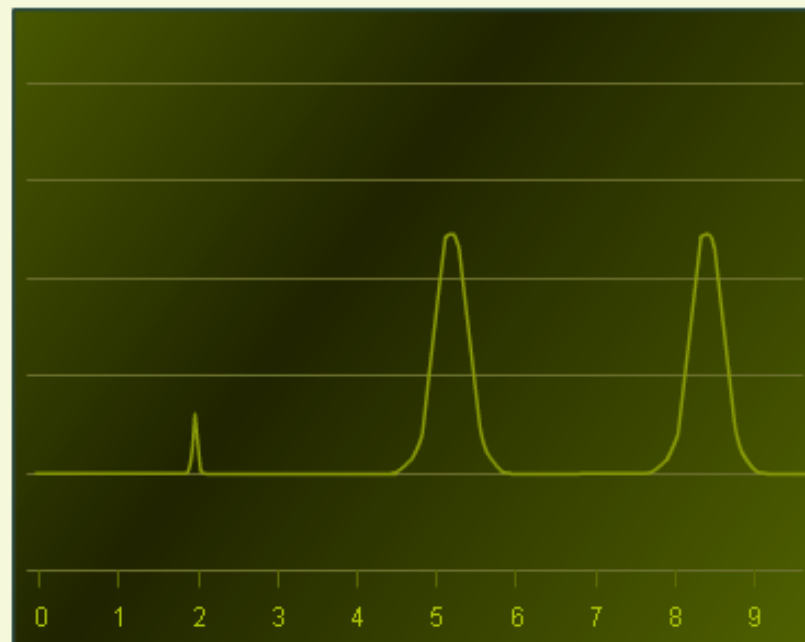
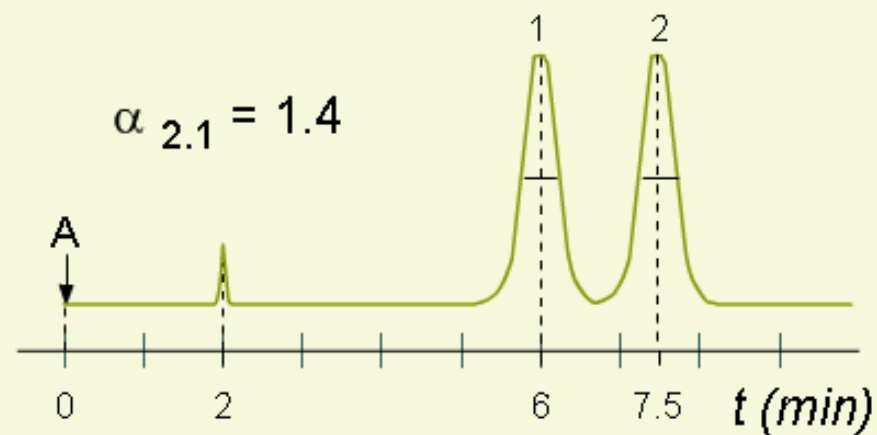
## Παράγοντας εκλεκτικότητας $\alpha$

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

**Σχετική κατακράτηση  
μεταξύ δύο κορυφών.**

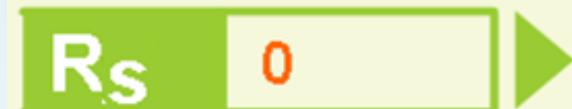
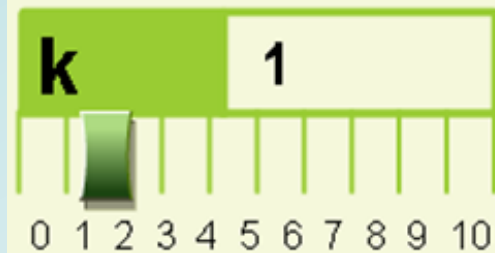
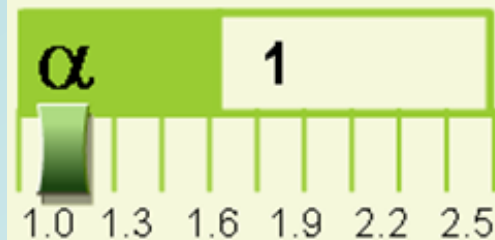
**Παράμετροι:**

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

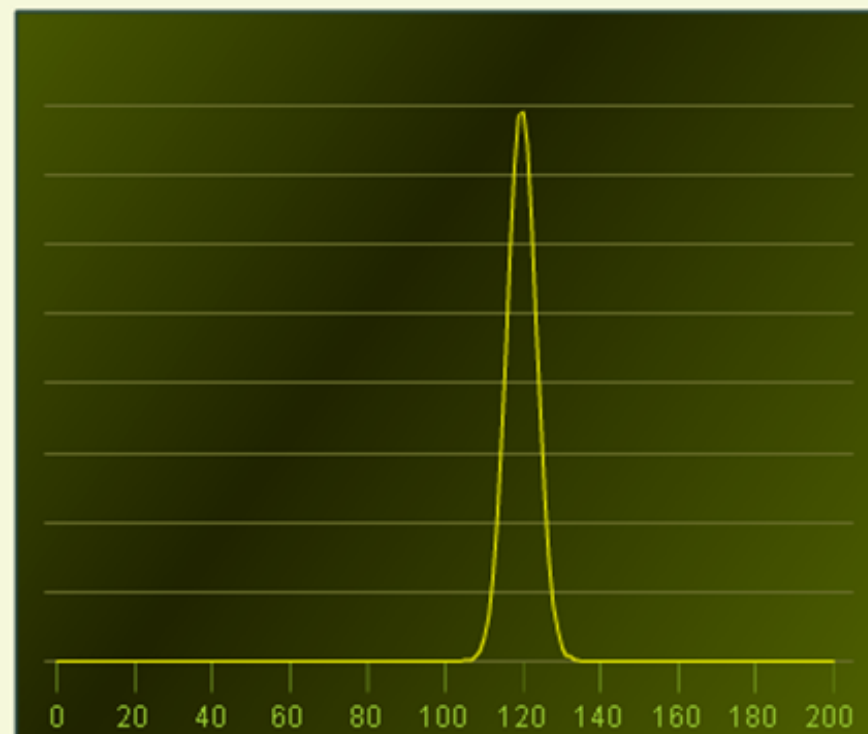




## Διαχωριστική ικανότητα R



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



## Διαχωριστική ικανότητα R

$\alpha$

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

$N$

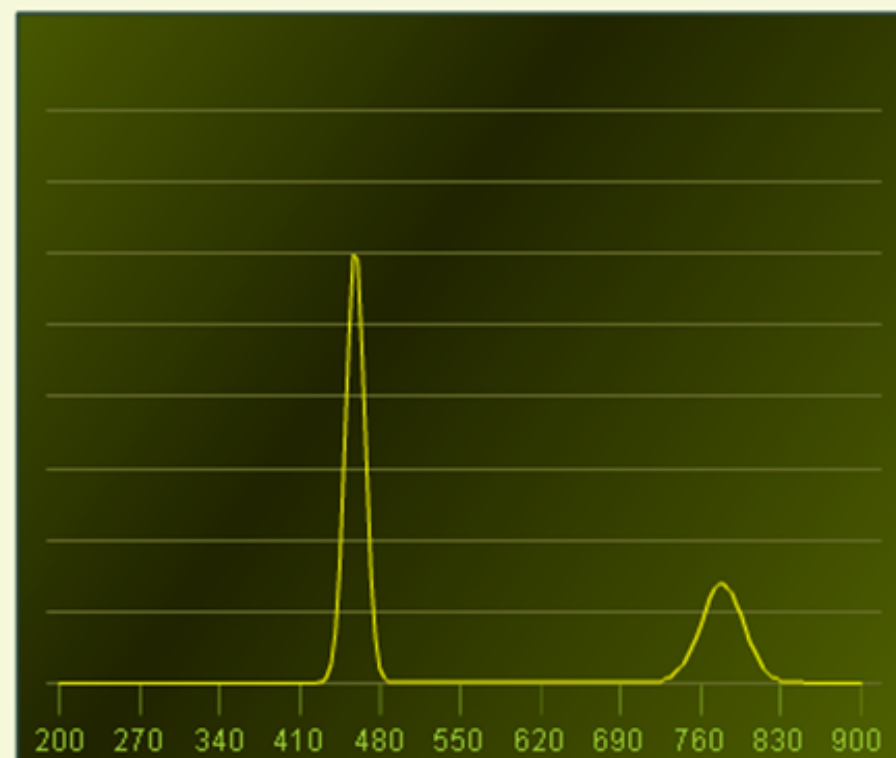
1000

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

$\alpha$

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

$N$

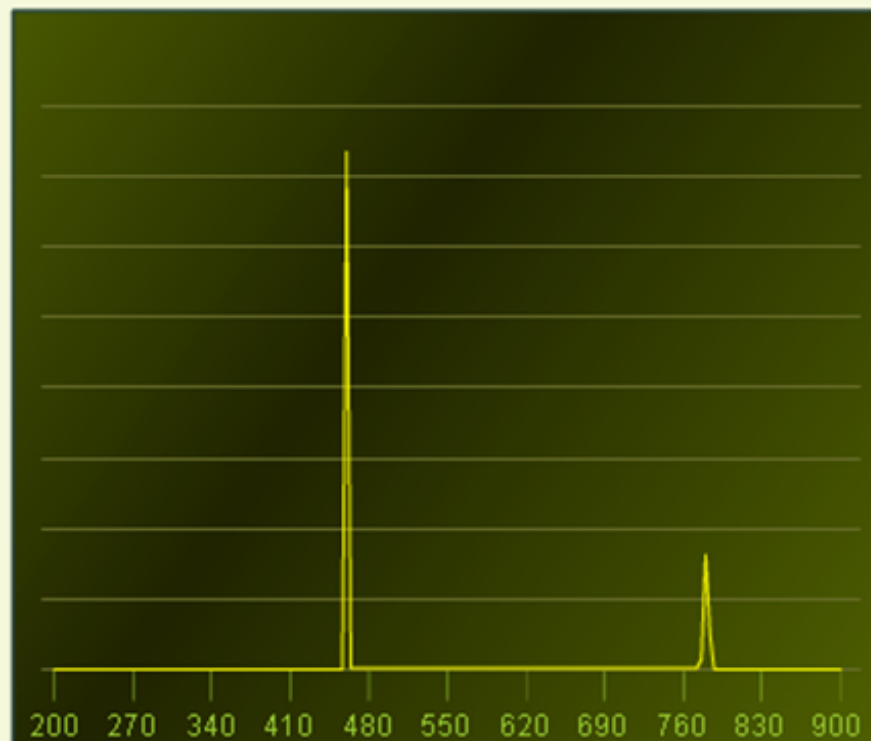
84853

1000 50.000 100.000

$R_s$

38.84

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



# Σύνοψη των χρωματογραφικών εξισώσεων

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	$\alpha = \frac{(t_R)_A - t_M}{(t_R)_B - t_M}$	$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A}$ <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">(<math>\gamma - 1</math>)</span>
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	$H = \frac{L}{N}$	

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

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

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



## ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ

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

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

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  $L = N \times H$

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

# Εξίσωση van Deemter για το ύψος πλάκας

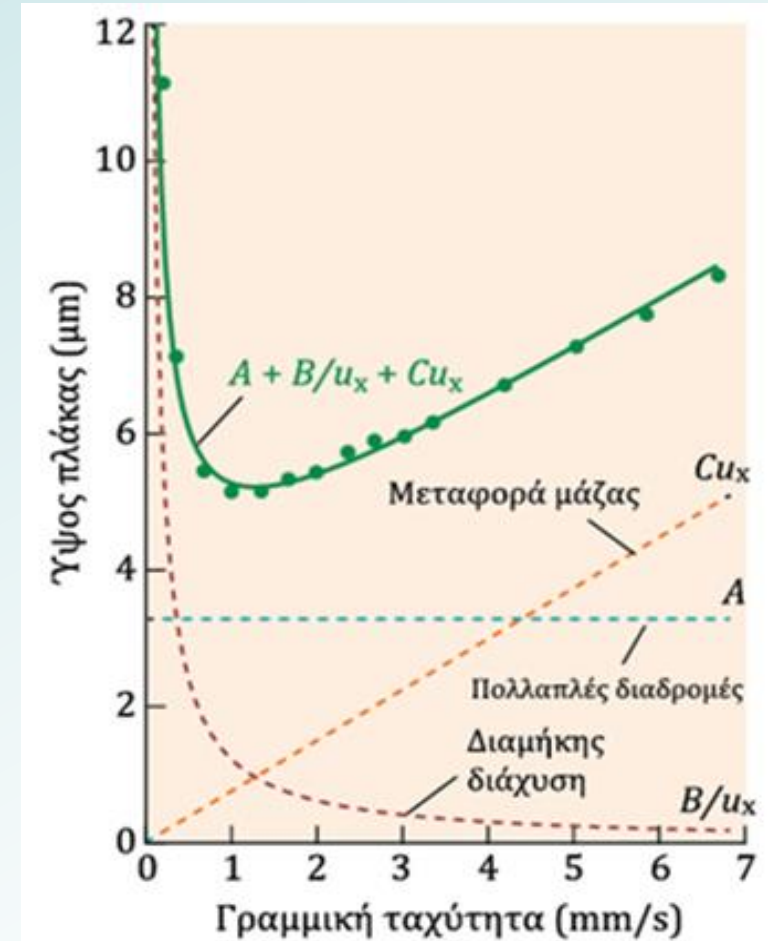
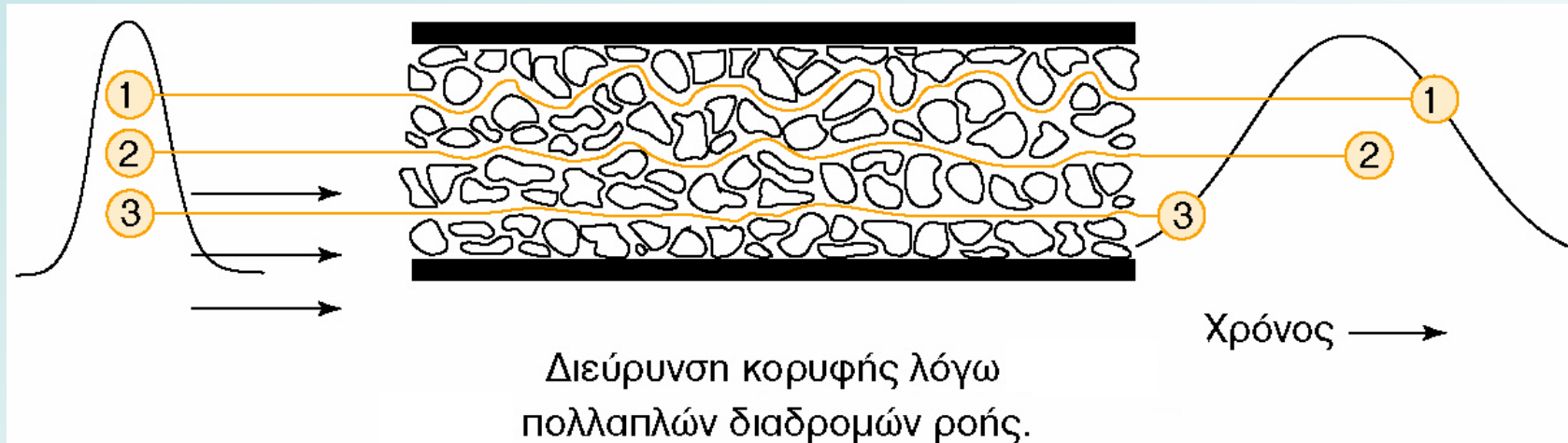
Η **εξίσωση van Deemter** μας λέει πώς η στήλη και η γραμμική ταχύτητα επηρεάζουν το ύψος πλάκας.

$$H \approx A + \frac{B}{u_x} + Cu_x$$

Πολλαπλές διαδρομές
Διαμήκης διάχυση
Μεταφορά μάζας

όπου  $u_x$  είναι η γραμμική ταχύτητα και τα A, B και C είναι σταθερές για μια δεδομένη στήλη και στατική φάση

Στη βέλτιστη γραμμική ταχύτητα, έχουμε το ελάχιστο ύψος πλάκας H της στήλης



Εφαρμογή της εξίσωσης van Deemter στη χειρόμορφη υδροχρωματογραφία:  $A = 3,29 \mu\text{m}$ ,  $B = 1,26 \mu\text{m} \cdot \text{mm/s}$  και  $C = 0,745 \mu\text{m} \cdot \text{s/mm}$ .

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

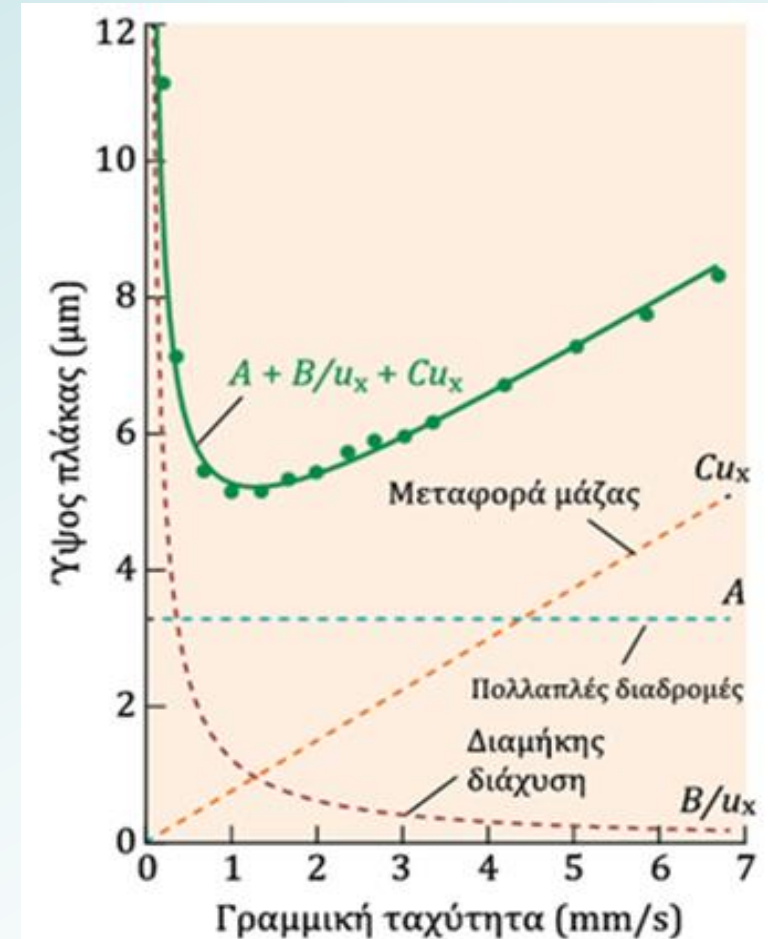
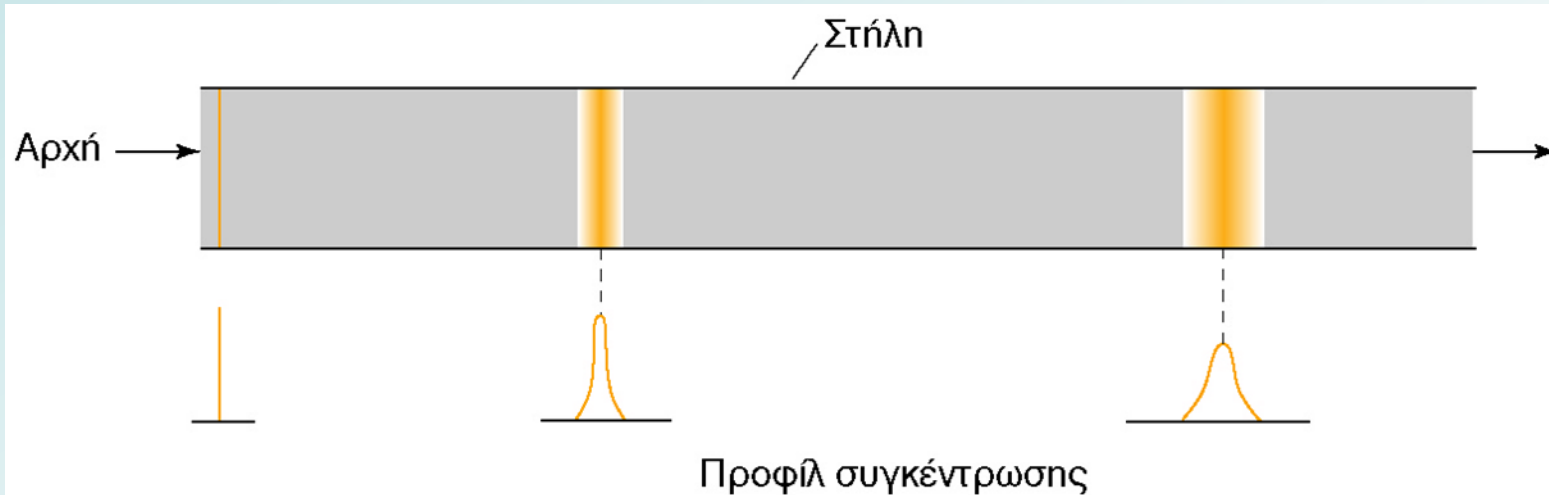
# Εξίσωση van Deemter για το ύψος πλάκας

Η **εξίσωση van Deemter** μας λέει πώς η στήλη και η γραμμική ταχύτητα επηρεάζουν το ύψος πλάκας.

$$H \approx A + \frac{B}{u_x} + Cu_x$$

Πολλαπλές  
διαδρομές  
Διαμήκης  
διάχυση  
Μεταφορά  
μάζας

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



Εφαρμογή της εξίσωσης van Deemter στη χειρόμορφη υδροχρωματογραφία:  $A = 3,29 \mu\text{m}$ ,  $B = 1,26 \mu\text{m} \cdot \text{mm/s}$  και  $C = 0,745 \mu\text{m} \cdot \text{s/mm}$ .

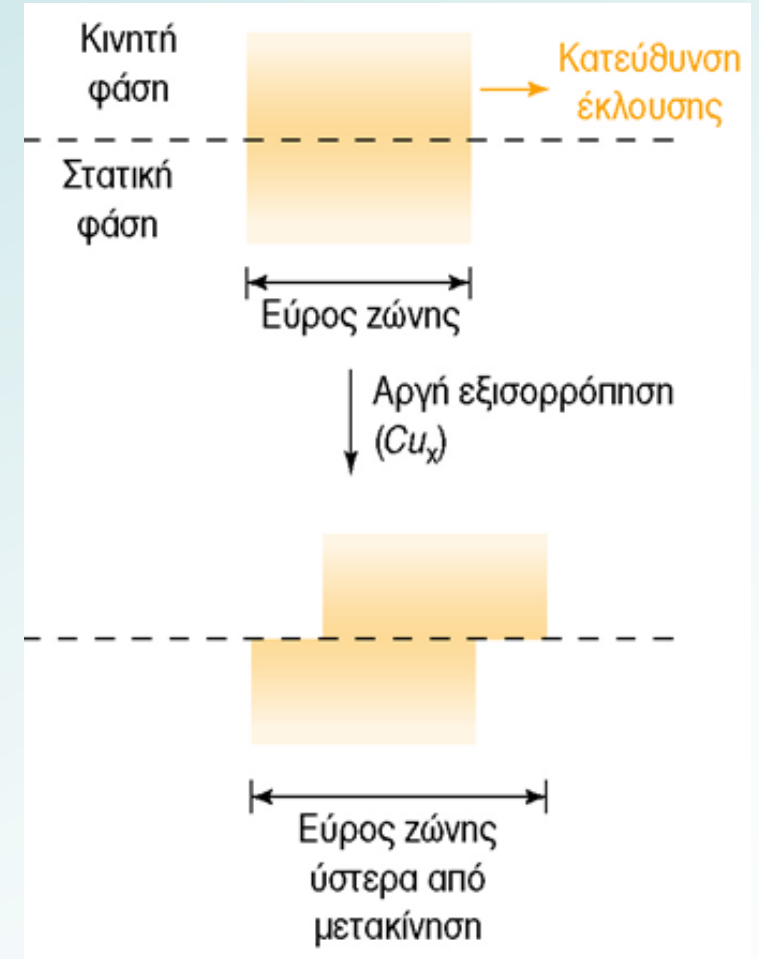
# Εξίσωση van Deemter για το ύψος πλάκας

Η **εξίσωση van Deemter** μας λέει πώς η στήλη και η γραμμική ταχύτητα επηρεάζουν το ύψος πλάκας.

$$H \approx A + \frac{B}{u_x} + Cu_x$$

Πολλαπλές διαδρομές      Διαμήκης διάχυση      Μεταφορά μάζας

- ✓ Ο όρος  $Cu_x$  προέρχεται από τον πεπερασμένο χρόνο που διατίθεται για την κίνηση της διαλυμένης ουσίας μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης.
- ✓ Η ουσία διαχέεται δια μέσου της κινητής φάσης για να φτάσει στην επιφάνεια της στατικής φάσης και να έχουμε εξισορρόπηση.
- ✓ Ο χρόνος εξαρτάται από την απόσταση που πρέπει να διανύσει η διαχεόμενη ουσία ως τη στατική φάση και είναι αντιστρόφως ανάλογος της ταχύτητας διάχυσης.



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



# Έκλυση, εκλούστης, έκλουσμα

**Έκλυση:** Η διαδικασία διέλευσης υγρού ή αερίου μέσω της στήλης χρωματογραφίας

**Εκλούστης:** Η καθαρή κινητή φάση που εισέρχεται στη στήλη

**Έκλουσμα:** Το υγρό (ή αέριο) που εξέρχεται από τη στήλη

**εκλούστης** → ΣΤΗΛΗ → **έκλουσμα**

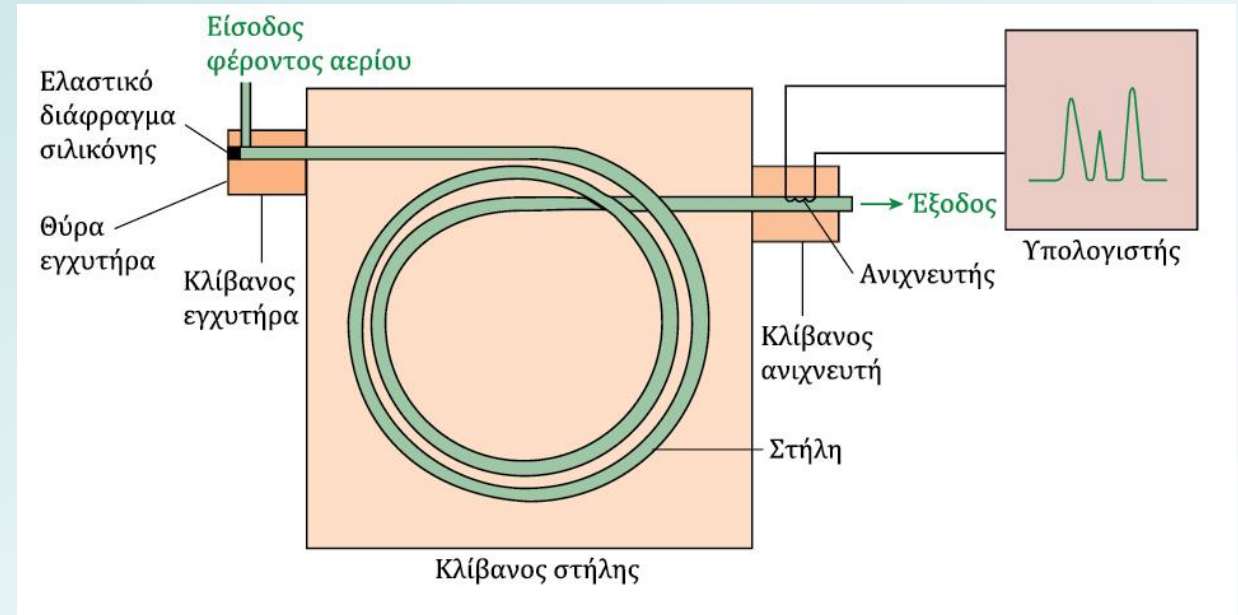
Οι στήλες είναι είτε **πληρωμένες** είτε **ανοιχτές σωληνοειδείς**

Μια πληρωμένη στήλη είναι γεμάτη με σωματίδια στατικής φάσης

Η ανοιχτή σωληνοειδής στήλη είναι ένα κοίλο τριχοειδές, τα εσωτερικά τοιχώματα του οποίου επικαλύπτονται με τη στατική φάση

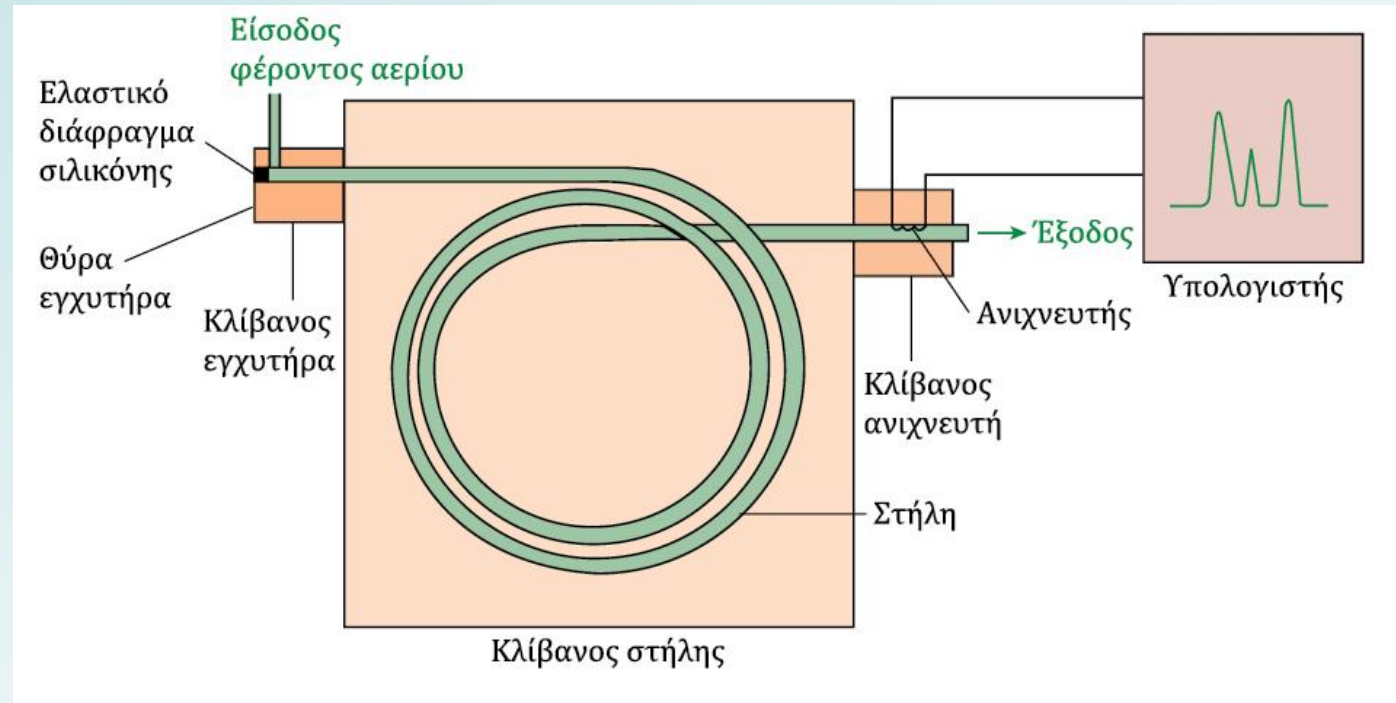
# Αεριοχρωματογραφία

- ✓ Στην **αεριοχρωματογραφία**, ο αναλύτης, στην αέρια φάση, μεταφέρεται μέσω της στήλης με την αέρια κινητή φάση, που ονομάζεται **φέρων αέριο**. He, N<sub>2</sub> ή H<sub>2</sub>
- ✓ Στη χρωματογραφία προσρόφησης αερίου-στερεού, ο αναλύτης προσροφάται απευθείας στα στερεά σωματίδια της στατικής φάσης
- ✓ Η χρωματογραφία αερίου-υγρού βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης



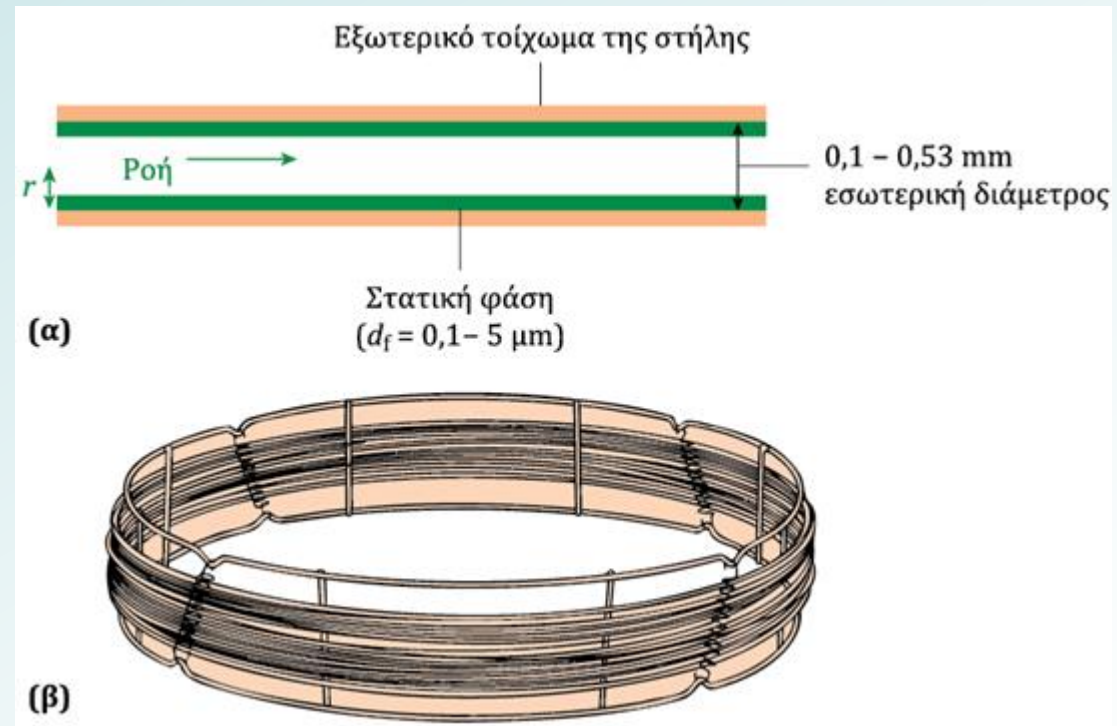
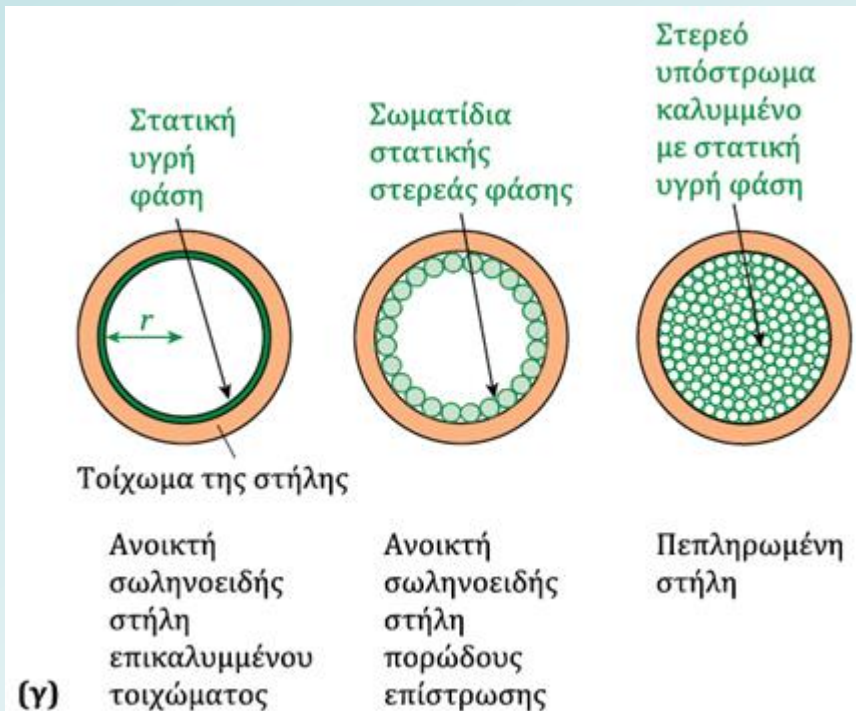
# Αεριοχρωματογράφος

- ✓ Το δείγμα (πτητικό υγρό ή αέριο) εισάγεται μέσω **διαφράγματος** (septum) σε θερμαινόμενο εισαγωγέα, στον οποίο εξατμίζεται γρήγορα
- ✓ Οι διαχωρισμένοι αναλύτες ρέουν μέσω ενός ανιχνευτή του οποίου η απόκριση εμφανίζεται σε υπολογιστή
- ✓ Ο ανιχνευτής διατηρείται σε υψηλότερη θερμοκρασία από τη στήλη έτσι ώστε οι αναλύτες να παραμένουν στην αέρια φάση



# Αναλυτική στήλη: Μια πιο λεπτομερής ματιά

- ✓ Ο πιο συνηθισμένος τύπος στήλης αεριοχρωματογραφίας είναι η **ανοικτή σωληνοειδής επικαλυμμένου τοιχώματος**
- ✓ Η στατική φάση είναι πολυμερές μεγάλης μοριακής μάζας (σαν υγρό) στο εσωτερικό τοίχωμα, ως υμένιο 0,1 έως 5  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Η εσωτερική διάμετρος της στήλης είναι 0,10-0,53 mm.
- ✓ Το μήκος είναι 15-100 m, συνήθως 30 m.
- ✓ Οι στήλες περιελίσσονται ώστε να χωράνε σε έναν συμπαγή κλίβανο ελεγχόμενης θερμοκρασίας.



(α) Τυπικές διαστάσεις ανοικτής σωληνοειδούς στήλης αεριοχρωματογραφίας. (β) Στήλη τηγμένης πυριτίας με διάμετρο κλωβού 0,2 m και μήκος στήλης 15-100 m. (γ) Διατομή στηλών επικαλυμμένου τοιχώματος και πορώδους επίστρωσης καθώς και πληρωμένων στηλών.

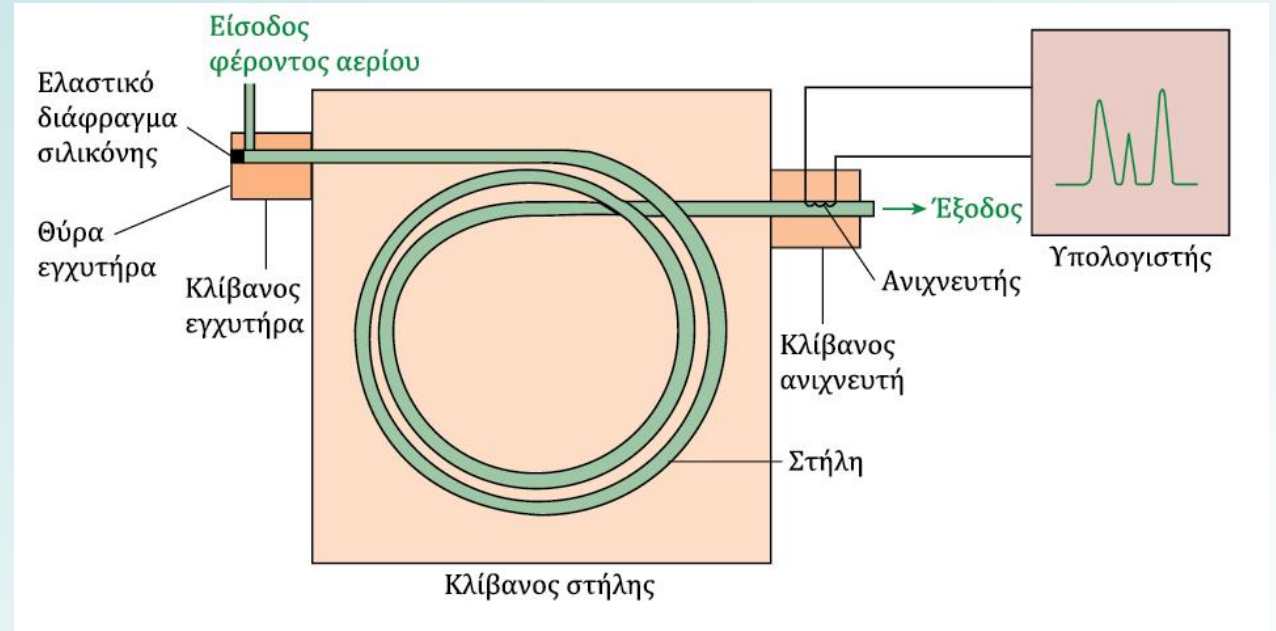
# Πληρωμένες στήλες

- ✓ Οι πληρωμένες στήλες είναι σωλήνες κατασκευασμένοι συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα ή γυαλί μήκους 1-5 m και διαμέτρου 2-4 mm.
- ✓ Το ομοιόμορφο μέγεθος των σωματιδίων μειώνει τον όρο των πολλαπλών διαδρομών στην εξίσωση van Deemter, μειώνοντας έτσι το ύψος πλάκας και αυξάνοντας τη διαχωριστικότητα.
- ✓ Το μικρό μέγεθος σωματιδίων μειώνει τον χρόνο που απαιτείται για τη μεταφορά μάζας, βελτιώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της στήλης.
- ✓ Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σωματιδίων, τόσο περιορίζεται ο χώρος μεταξύ των σωματιδίων, οπότε απαιτείται μεγαλύτερη πίεση για τη διέλευση της κινητής φάσης μέσω της στήλης.



# Ανοικτές σωληνοειδείς στήλες : Μια πιο λεπτομερής ματιά

Η συντριπτική πλειονότητα των αναλύσεων χρησιμοποιούν **ανοικτές σωληνοειδείς στήλες** μεγάλου μήκους και μικρής διαμέτρου που κατασκευάζονται από τηγμένη πυριτία ( $\text{SiO}_2$ ) με εξωτερική επικάλυψη από πολυιμίδιο (πολυμερές που αντέχει στους  $350^\circ\text{C}$ ) για στήριξη και προστασία από την ατμοσφαιρική υγρασία.



# Πληρωμένες στήλες

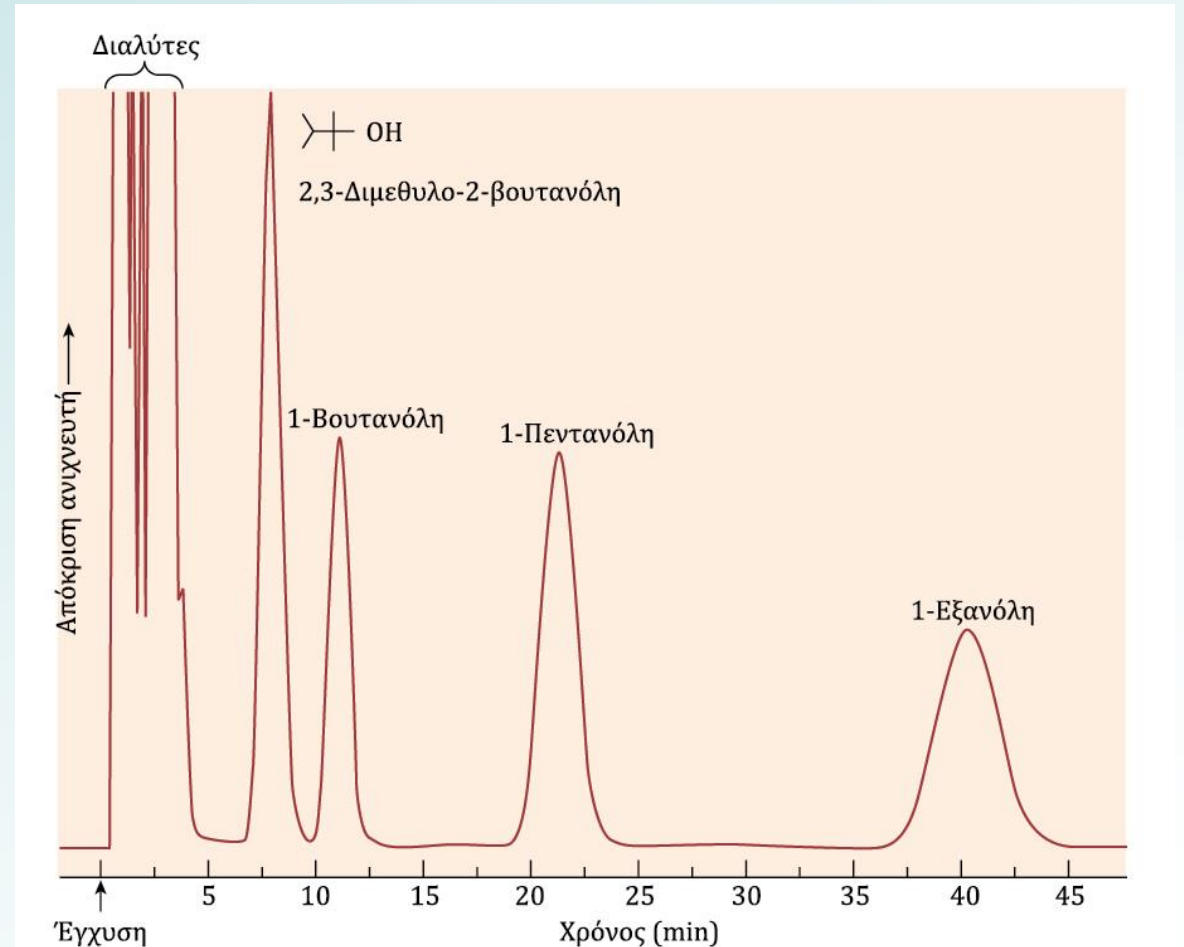
Οι **πληρωμένες στήλες** γεμίζονται με λεπτόκοκκα σωματίδια ενός στερεού υποστρώματος επικαλυμμένου με μη πτητική υγρή στατική φάση.

Σε σύγκριση με τις ανοικτές σωληνοειδείς στήλες, οι πληρωμένες στήλες παρέχουν:

- ✓ μεγαλύτερη χωρητικότητα δείγματος
- ✓ ευρύτερες κορυφές → χαμηλότερη διαχωριστικότητα
- ✓ μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης

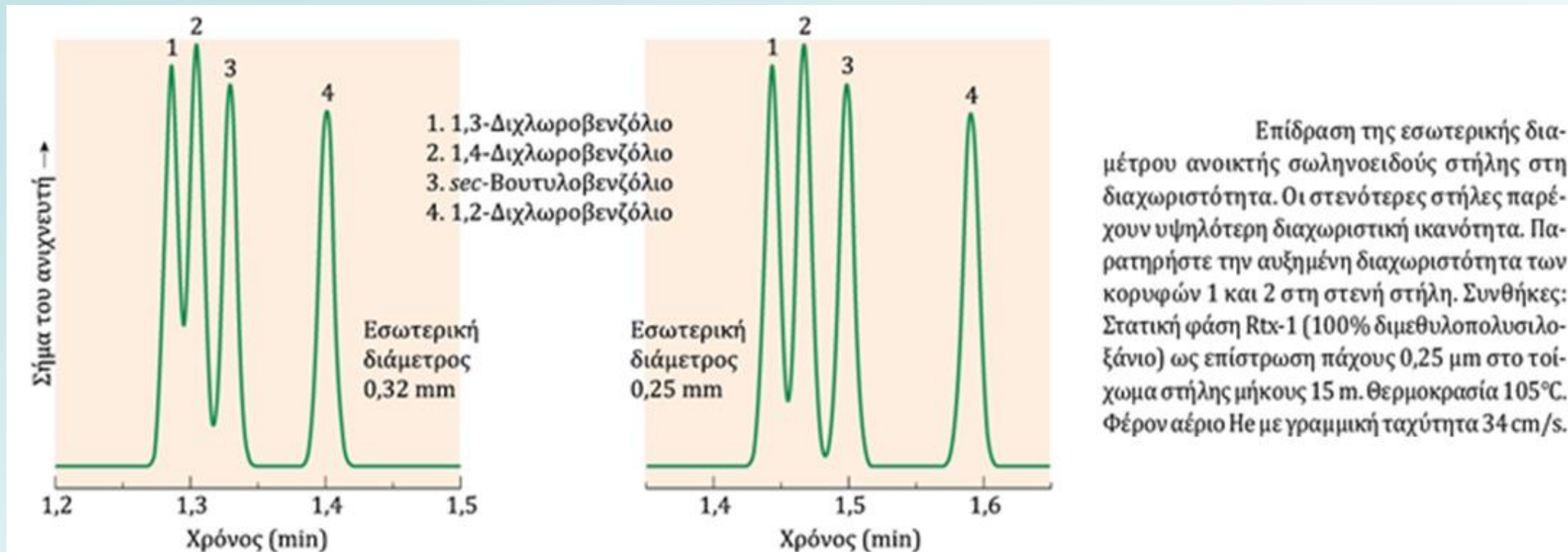
Οι πληρωμένες στήλες χρησιμοποιούνται για

- ✓ παρασκευαστικούς διαχωρισμούς
- ✓ το διαχωρισμό αερίων που δεν κατακρατούνται αποτελεσματικά



# Εσωτερική διάμετρος και διαχωριστικότητα στις ανοικτές σωληνοειδείς στήλες

- ✓ Οι μικρότερες διαμέτροι αυξάνουν τη συχνότητα των αλληλεπιδράσεων των αναλυτών με τη στατική φάση.
- ✓ Οι στενές στήλες παρέχουν καλύτερη διαχωριστικότητα από τις πλατύτερες στήλες, αλλά απαιτούν υψηλότερη πίεση λειτουργίας



# Μήκος στήλης και διαχωριστικότητα

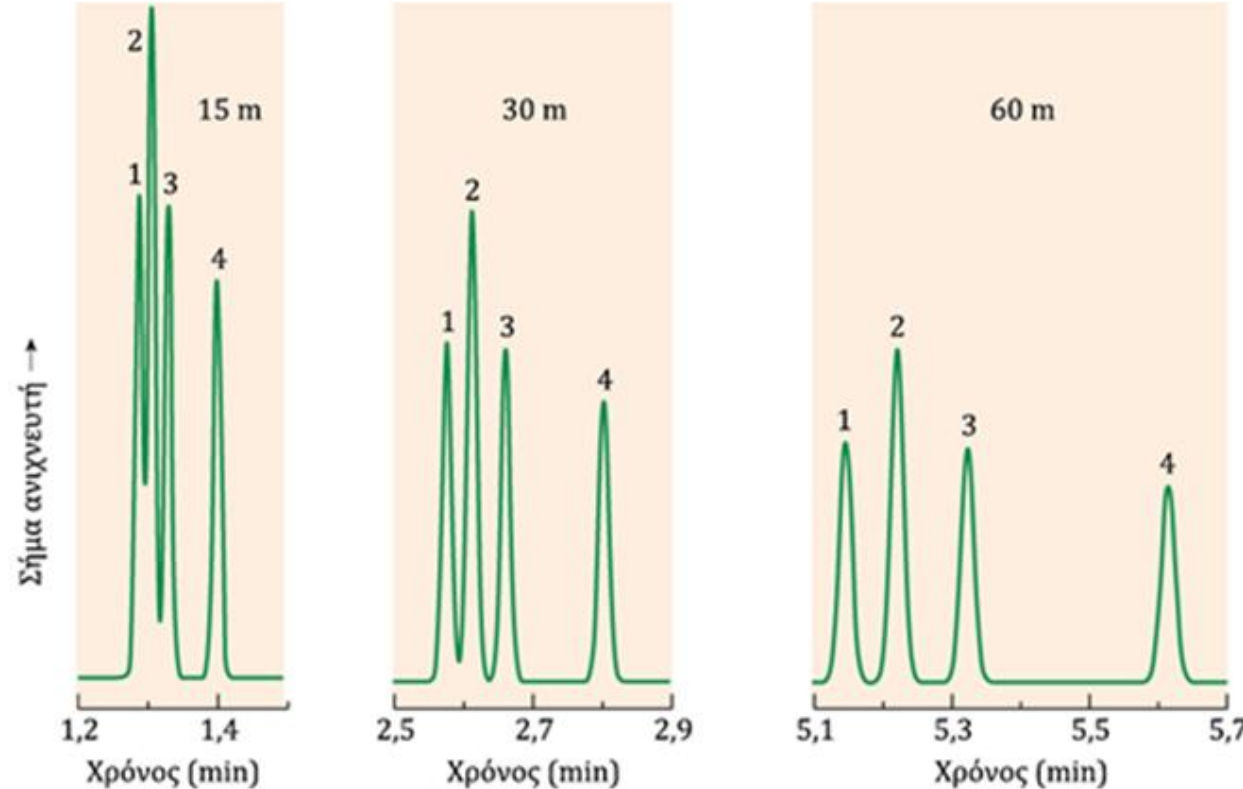
✓ Ο αριθμός πλακών,  $N$ , της στήλης είναι ανάλογος του μήκους της.

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

✓ Η διαχωριστικότητα  $R_s$  είναι ανάλογη του  $\sqrt{N}$  και, επομένως, της τετραγωνικής ρίζας του μήκους της στήλης.

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

Η διαχωριστικότητα αυξάνεται ανάλογα με την τετραγωνική ρίζα του μήκους της στήλης. Παρατηρήστε την αύξηση της διαχωριστικότητας των κορυφών 1 και 2 καθώς αυξάνεται το μήκος. Συνθήκες: Στατική φάση Rtx-1 (100% διμεθυλοπολυσιλοξάνιο) ως στρώση πάχους 0,32  $\mu\text{m}$  στο τοίχωμα της στήλης. Θερμοκρασία 105°C, γραμμική ταχύτητα He 34 cm/s.



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

όπου  $\gamma$  ο παράγοντας **διαχωρισμού** (το κλάσμα των γραμμικών ταχυτήτων των δύο ουσιών)

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

$$(\gamma > 1)$$

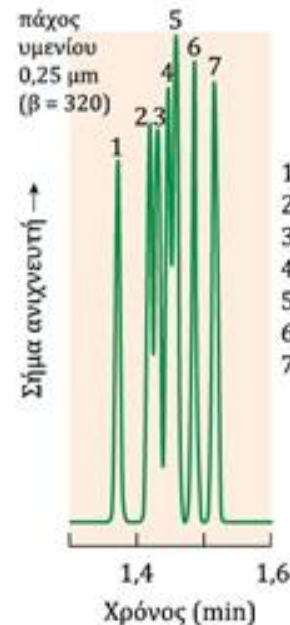


# Πάχος στατικής φάσης και διαχωριστικότητα

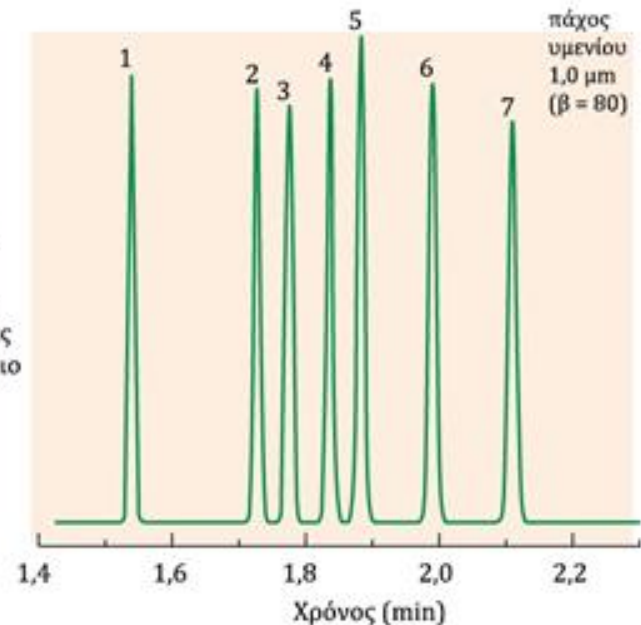
Ο παράγοντας κατακράτησης ( $k$ ) για στήλη επικαλυμμένου τοιχώματος σχετίζεται με τη σταθερά κατανομής ( $K_D$ ) και τον λόγο φάσεων ( $\beta$ ):

$$k = \frac{K_D}{\beta} \quad \beta = \frac{r}{2d_f}$$

Επίδραση του πάχους της στατικής φάσης στην επίδοση της ανοικτής σωληνοειδούς στήλης. Με αύξηση του πάχους αυξάνεται ο χρόνος κατακράτησης και βελτιώνεται η διαχωριστικότητα των κορυφών που εκλύονται νωρίς. Συνθήκες: Στατική φάση Rtx-1 (100% διμεθυλοπολυσιλοξάνιο) επικαλυμμένη στο τοίχωμα στήλης 30 m x 0,32 mm, που λειτουργεί στους 40°C. Φέρον αέριο He με γραμμική ταχύτητα 38 cm/s. [Δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Pro EZGC® (διατίθεται δωρεάν στη διεύθυνση <https://www.restek.com/proezgc>), Restek Corp., Bellefonte, PA].



1. Μεθανόλη
2. Λιθανόλη
3. Ακετονιτρίλιο
4. Ακετόνη
5. 2-Προπανόλη
6. Διαιθυλαιθέρας
7. Διχλωρομεθάνιο



- ✓ Αύξηση του πάχους της στατικής φάσης μειώνει το λόγο φάσεων  $\beta$  → αυξάνει τον παράγοντα κατακράτησης  $k$
- ✓ Το υμένιο της στατικής φάσης όταν είναι παχύ «προασπίζει» τον αναλύτη από την επιφάνεια της πυριτίας και έτσι μειώνει την εμφάνιση ουράς

Συνήθως, το πάχος υμενίου είναι 0,25 μm, αλλά παχύτερα υμένια χρησιμοποιούνται για πολύ πτητικούς αναλύτες



Σύγκριση επιδόσεων μεταξύ πληρωμένης στήλης και ανοικτής σωληνοειδούς στήλης επικαλυμμένου τοιχώματος για αεριοχρωματογραφία<sup>α</sup>

Ιδιότητα	Πληρωμένη	Ανοικτή σωληνοειδής
Μήκος στήλης, $L$	2,4 m	100 m
Γραμμική ταχύτητα αερίου	8 cm/s	16 cm/s
Ύψος πλάκας για τον ελαϊκό μεθυλεστέρα	0,73 mm	0,34 mm
Παράγοντας κατακράτησης, $k$ , για τον ελαϊκό μεθυλεστέρα	58,6	2,7
Θεωρητικές πλάκες, $N$	3290	294000
Διαχωριστική ικανότητα στεατικού μεθυλεστέρα και ελαϊκού μεθυλεστέρα	1,5	10,6
Χρόνος κατακράτησης ελαϊκού μεθυλεστέρα	29,8 min	38,5 min

<sup>α</sup> Στεατικός μεθυλεστέρας ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{CH}_3$ ) και ελαϊκός μεθυλεστέρας ( $\text{cis-CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{CH}_3$ ) διαχωρίστηκαν σε στήλες με στατική φάση από πολυεστέρα του ηλεκτρικού οξέος με αιθυλενογλυκόλη στους  $180^\circ\text{C}$ .

# Ανοικτές σωληνοειδείς στήλες

Πλεονεκτήματα των **ανοικτών σωληνοειδών στηλών**:

- ✓ Μειωμένο ύψος πλάκας → μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα
- ✓ Αυξημένη γραμμική ταχύτητα ή μεγαλύτερο μήκος στήλης ή και τα δύο → μικρότερο χρόνο ανάλυσης
- ✓ αυξημένη ευαισθησία

**Ευαισθησία** = κλίση καμπύλης βαθμονόμησης ή  
μεταβολή του σήματος  

---

μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη

Μειονέκτημα των ανοικτών σωληνοειδών στηλών σε σύγκριση με τις **πληρωμένες στήλες**:

- ✓ Χαμηλότερη χωρητικότητα σε δείγμα (μικροί όγκοι, σχετικά αραιά δείγματα).

**Χωρητικότητα**: Η συγκέντρωση του δείγματος που δεν υπερφορτώνει τη στήλη.

**Υπερφόρτωση**: Δεν επιτρέπει τη γρήγορη και αντιστρεπτή μεταφορά του αναλύτη από την κινητή φάση στη στατική φάση και αντίστροφα

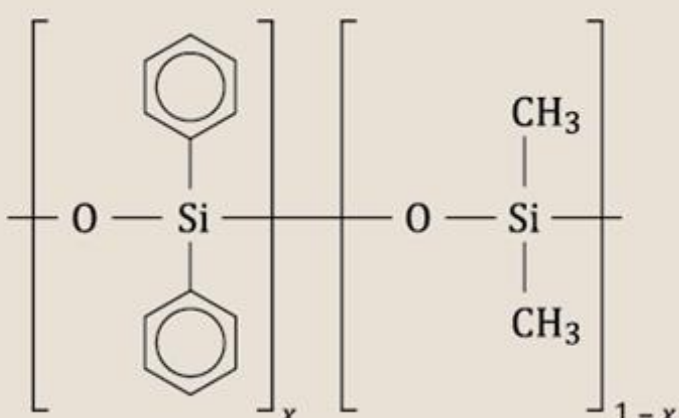
# Επιλογή μη πτητικής υγρής στατικής φάσης

Η επιλογή υγρής στατικής φάσης βασίζεται στον κανόνα «**τα όμοια διαλύουν όμοια**»

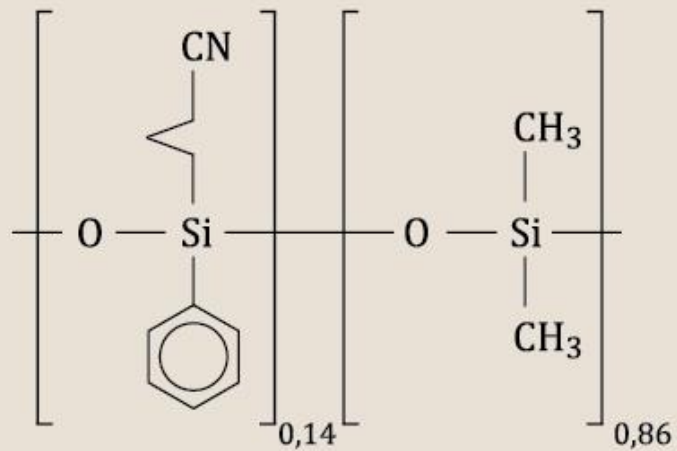
- ✓ Οι μη πολικές στήλες είναι καλύτερες για μη πολικές ουσίες.
- ✓ Οι στήλες ενδιάμεσης πολικότητας είναι καλύτερες για ουσίες μέσης πολικότητας
- ✓ Οι ισχυρά πολικές στήλες είναι καλύτερες για ισχυρά πολικές ουσίες.

# Συνήθεις στατικές φάσεις στην αεριοχρωματογραφία σε τριχοειδή στήλη

Συνήθεις στατικές φάσεις στην αεριοχρωματογραφία σε τριχοειδή στήλη

Δομή	Πολικότητα <sup>α</sup>	Κοινές εφαρμογές	Εύρος θερμοκρασίας <sup>β</sup>
 <p>(Διφαινυλο)<sub>x</sub>(διμεθυλο)<sub>1-x</sub> πολυσιλοξάνιο</p>	<p><math>x = 0</math> Μη πολικό δυνάμεις van der Waals</p> <p><math>x = 0,05</math> Μη πολικό δυνάμεις van der Waals</p> <p><math>x = 0,35</math> Μέση πολικότητα δυνάμεις van der Waals</p> <p><math>x = 0,65</math> Μέση πολικότητα δυνάμεις van der Waals</p>	<p>Διαλύτες, προϊόντα πετρελαίου, κεριά, προσομοίωση απόσταξης</p> <p>Γεύσεις, περιβαλλοντικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες</p> <p>Παρασιτοκτόνα, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, αμίνες, αζωτούχα ζιζανιοκτόνα</p> <p>Τριγλυκερίδια, φαινόλες, ελεύθερα λιπαρά οξέα</p>	<p><math>-60^{\circ}-330^{\circ}/350^{\circ}\text{C}</math></p> <p><math>-60^{\circ}-330^{\circ}/350^{\circ}\text{C}</math></p> <p><math>40^{\circ}-310^{\circ}\text{C}</math></p> <p><math>50^{\circ}-280^{\circ}/300^{\circ}\text{C}</math></p>

# Συνήθεις στατικές φάσεις στην αεριοχρωματογραφία σε τριχοειδή στήλη



(Κυανοπροπυλοφαινυλο)<sub>0,14</sub>  
(διμεθυλο)<sub>0,86</sub> πολυσιλοξάνιο

—[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—O]<sub>n</sub>—  
πολυ(αιθυλενο-γλυκόλη)

Μέση πολικότητα  
Δίπολο-δίπολο  
και δυνάμεις van der Waals

Παρασιτοκτόνα, πολυχλωριωμένα  
διφαινύλια, αλκοόλες, οξυγονούχα

-20°-270°/280°C

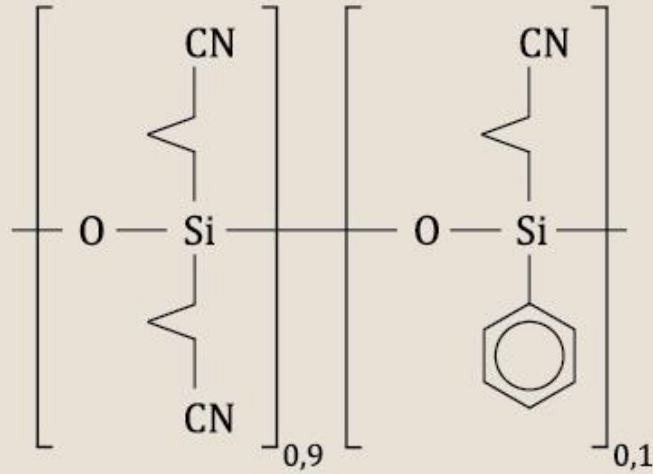
Ισχυρά πολικό  
Δίπολο-δίπολο, δεσμοί  
υδρογόνου, και δυνάμεις  
van der Waals

Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων,  
αρώματα, αμίνες, διαλύτες,  
ισομερή ξυλολίου

40°-250°/260°C



# Συνήθεις στατικές φάσεις στην αεριοχρωματογραφία σε τριχοειδή στήλη



(Δισκυανοπροπυλο)<sub>0,9</sub>  
(κυανοπροπυλοφαινυλο)<sub>0,1</sub> πολυσιλοξάνιο

Ισχυρά πολικό  
Δίπολο-δίπολο και  
δυνάμεις van der Waals

*cis/trans*-λιπαρά οξέα  
μεθυλεστέρες, ισομερή διοξίνης

0°-260°/275°C

- Οι κύριες δυνάμεις κατακράτησης ουσιών παρουσιάζονται κάτω από την πολικότητα. Όλα τα μόρια αλληλεπιδρούν με δυνάμεις *van der Waals*, οι οποίες είναι: (i) έλξη μεταξύ στιγμιαίου διπόλου και επαγόμενου γειτονικού διπόλου και (ii) έλξη μεταξύ μόνιμου διπόλου και επαγόμενου γειτονικού διπόλου. Η δύναμη διπόλου-διπόλου είναι έλξη μεταξύ μόνιμων διπόλων. Ο δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται όταν τα ηλεκτρόνια ενός ηλεκτραρνητικού ατόμου (όπως το O) έλκονται από ένα θετικά πολωμένο άτομο υδρογόνου ενός γειτονικού μορίου.
- Το κατώτατο όριο είναι η θερμοκρασία στην οποία η υγρή στατική φάση δεν συμπεριφέρεται ως υγρό. Δίνονται δύο ανώτατα όρια. Το πρώτο είναι η θερμοκρασία που μπορεί να λειτουργήσει η στήλη καθημερινά για ισοθερμικούς διαχωρισμούς. Το δεύτερο είναι η μέγιστη προγραμματιζόμενη θερμοκρασία στην οποία μπορεί να εκτεθεί η στήλη για σύντομο χρόνο.

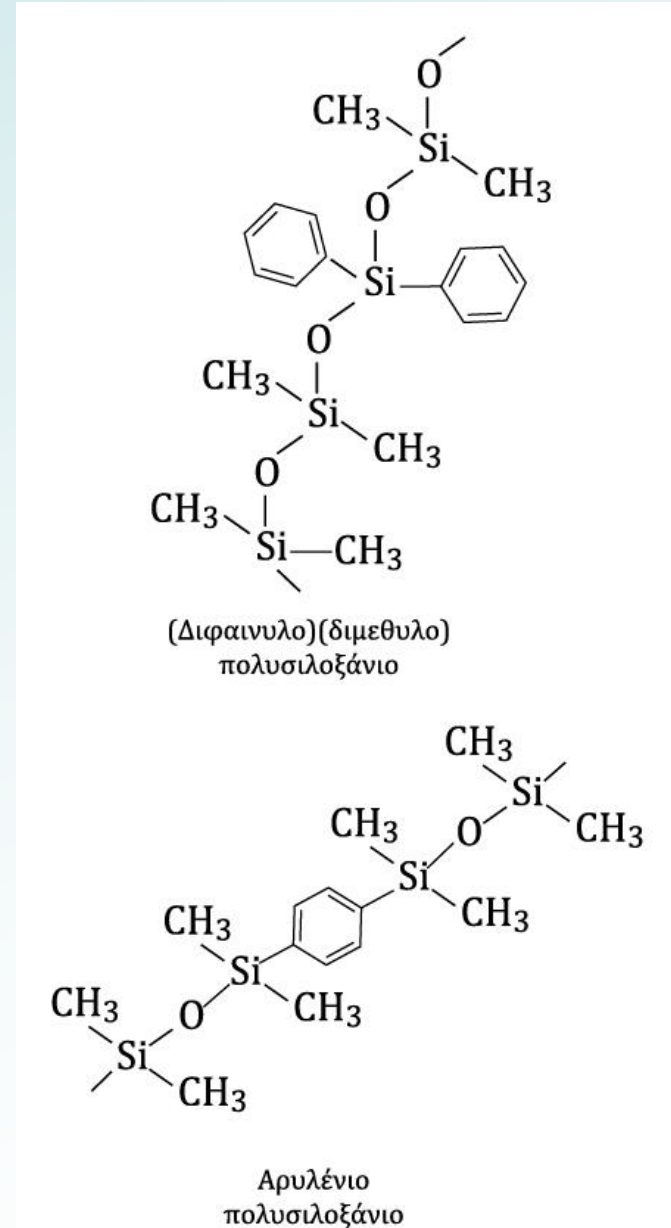
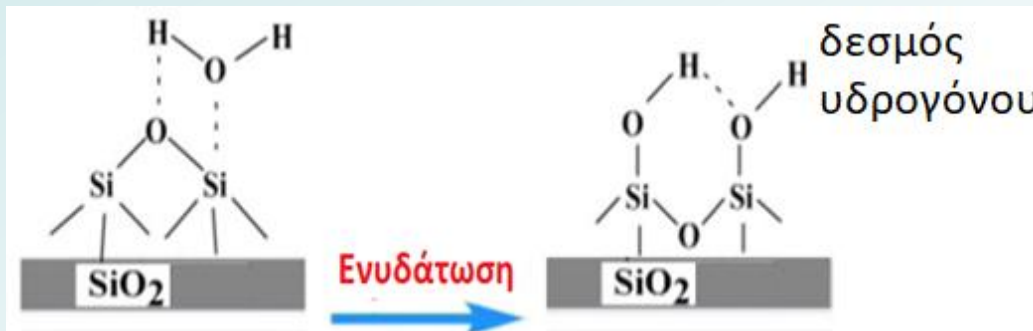
# Διαρροή στατικής φάσης στήλης σε υψηλές θερμοκρασίες

**Διαρροή στατικής φάσης (bleed)** προκαλείται

- ✓ σε υψηλές (μέγιστες) θερμοκρασίες στήλης όπου η στατική φάση αποδομείται
- ✓ λόγω οξείδωσης της στατικής φάσης από το  $O_2$
- ✓ σε μικρότερο βαθμό, το  $H_2O$  μπορεί να αποδομεί τη στατική φάση με υδρόλυση

Οι στατικές φάσεις **αρυλενίου** έχουν αυξημένη θερμική σταθερότητα, λιγότερη διαρροή σε υψηλή θερμοκρασία και είναι ιδιαίτερα κατάλληλες για την αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών. Για τη μείωση των παρεμποδίσεων που οφείλονται στη διαρροή της στατικής φάσης

- ✓ χρησιμοποιείται όσο το δυνατόν λεπτότερη στατική φάση
- ✓ οι κατασκευαστές τροποποιούν την επιφάνεια της πυριτίας του τριχοειδούς ώστε να εξαλείψουν τις εκτεθειμένες ομάδες σιλανόλης ( $Si-OH$ ), οι οποίες μπορούν να ξεκινήσουν την αποδόμηση της στατικής φάσης.



# Στήλες πορώδους-επίστρωσης

Στις στήλες πορώδους-επίστρωσης, πορώδη στερεά σωματίδια με μεγάλη επιφάνεια προσκολλώνται στο τοίχωμα της στήλης.

Μόρια όπως τα He, Ar, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> και CO μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους. Πορώδη πολυμερή, άνθρακας με μεγάλη επιφάνεια και αλουμίνα (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) μπορούν να διαχωρίσουν υδρογονάνθρακες σε **χρωματογραφία προσρόφησης αερίου-στερεού**.

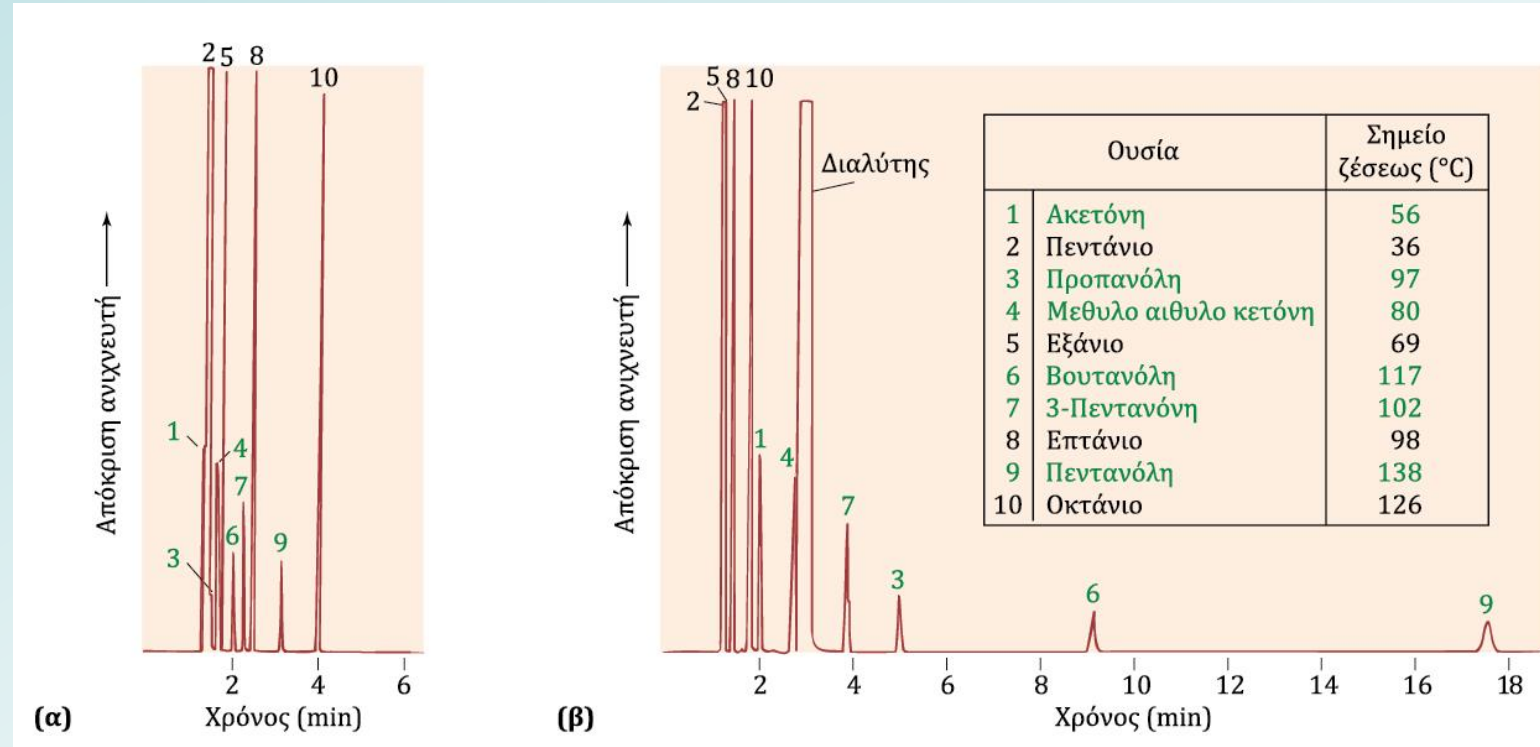
# Κατακράτηση μη πολικών και πολικών ουσιών στη στατική φάση

Η Εικόνα απεικονίζει τις μεταβολές στην κατακράτηση μη πολικών και πολικών ουσιών με διαφορετικά σημεία ζέσης, όταν μεταβάλλεται και η πολικότητα της στατικής φάσης.

**Οι μη πολικές ενώσεις εκλούνται από μη πολικές και πολικές στατικές φάσεις με σειρά αυξανόμενου σημείου ζέσης.**

Καθοριστικός παράγοντας είναι η πτητικότητα των ουσιών.

- ✓ Οι απολικές ενώσεις κατακρατούνται περισσότερο στην απολική φάση.
- ✓ Η ισχυρά πολική στατική φάση κατακρατεί τις πολικές ουσίες.
- ✓ Οι τρεις αλκοόλες είναι οι τελευταίες που εκλούνται, ακολουθώντας τις τρεις κετόνες, οι οποίες ακολουθούν τα τέσσερα αλκάνια.



Διαχωρισμός 10 ενώσεων σε ανοικτές σωληνοειδείς στήλες 30 m x 0,32 mm, στους 70°C, με στατική φάση πάχους 1 μm (αναλογία φάσεων  $\beta = 80$ ). (α) Μη πολική πολυ(διμεθυλοσιλοξάνιο) και (β) ισχυρά πολική πολυ(αιθυλενογλυκόλη).

# Προγραμματισμός θερμοκρασίας και πίεσης

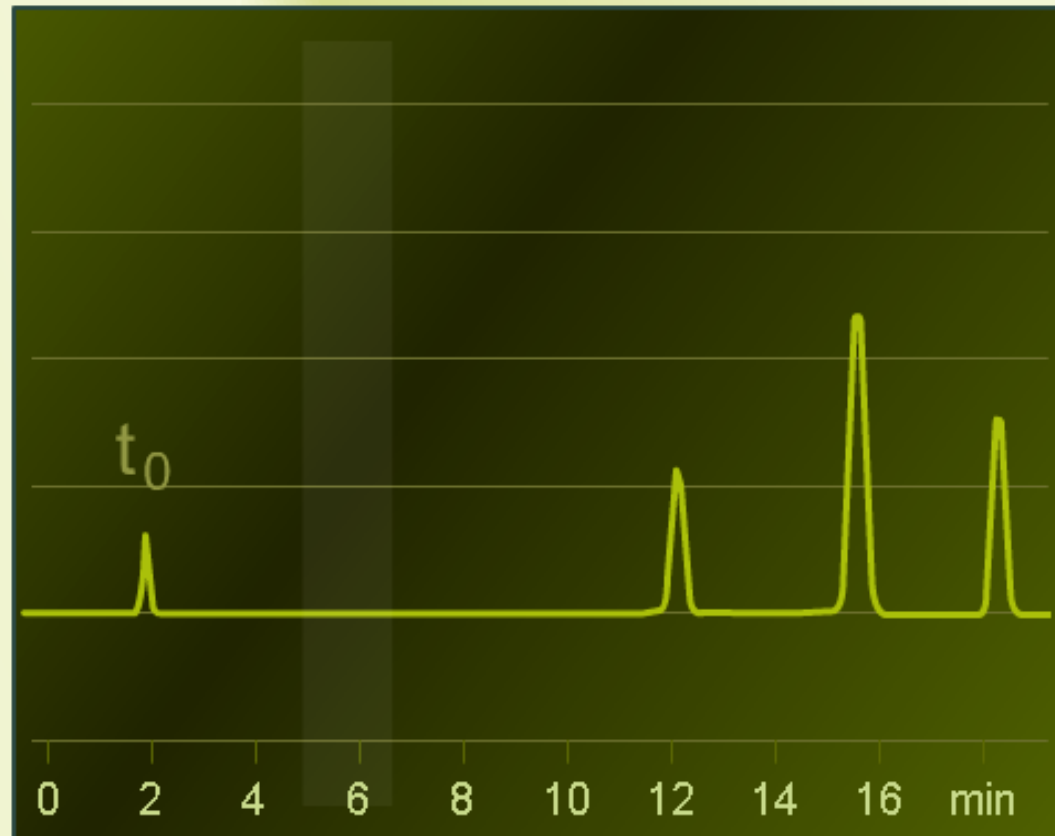
Μεγάλο μέρος της αεριοχρωματογραφίας εκτελείται με **προγραμματισμό θερμοκρασίας**, στον οποίο η θερμοκρασία της στήλης αυξάνεται κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού ώστε να αυξηθεί η τάση ατμών των διαχωριζόμενων ουσιών και να μειωθεί ο χρόνος κατακράτησης των συστατικών που εκλύονται αργά.

Το **γενικό πρόβλημα έκλυσης**, έγκειται στο γεγονός ότι μια ισοθερμική διαδικασία με σταθερή θερμοκρασία στήλης **δεν παρέχει επαρκή διαχωρισμό, σε εύλογο χρόνο, για δείγματα που περιέχουν ενώσεις με πολύ διαφορετικά σημεία ζέσης.**



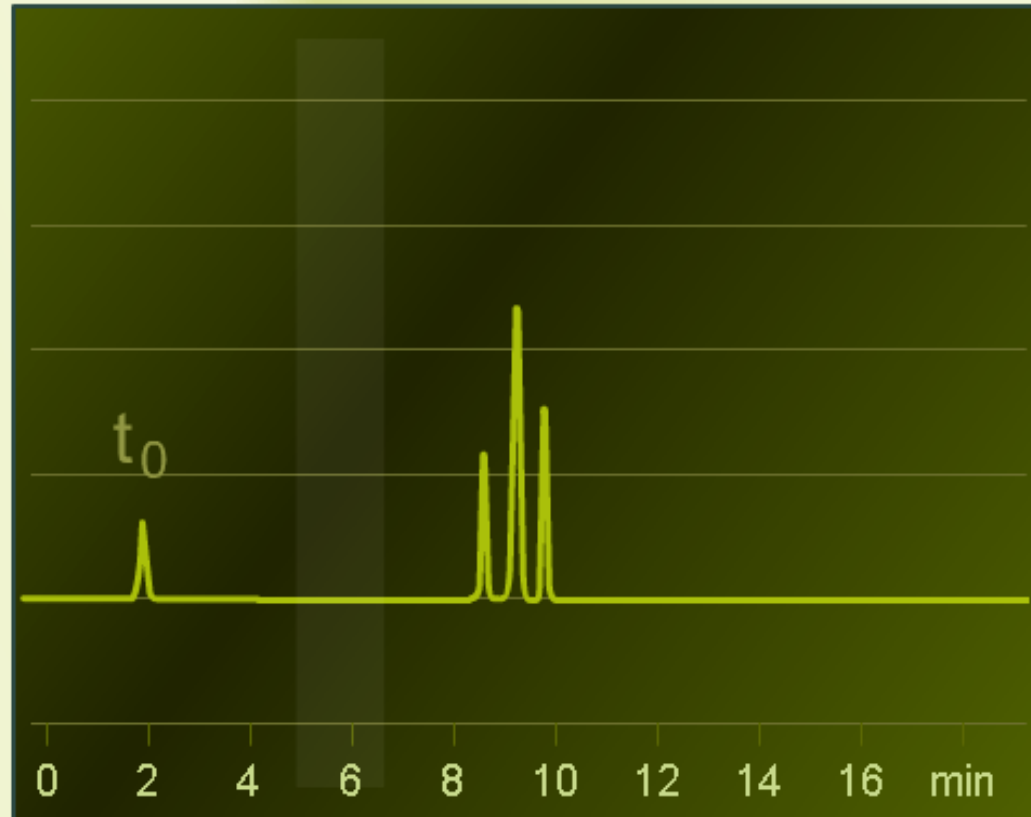
# Ισοθερμικός διαχωρισμός

Κατακράτηση σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία



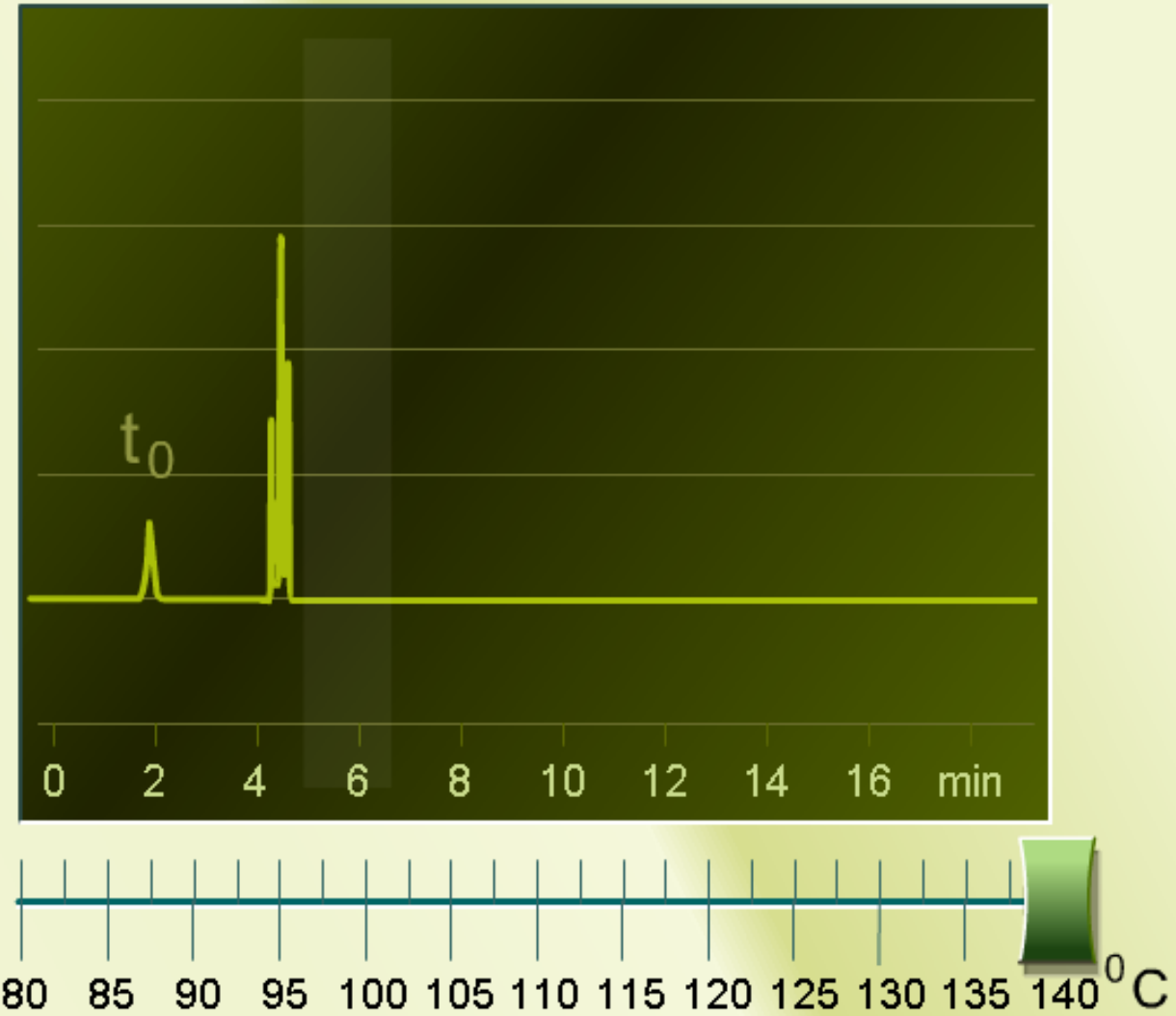
# Ισοθερμικός διαχωρισμός

Κατακράτηση σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία



# Ισοθερμικός διαχωρισμός

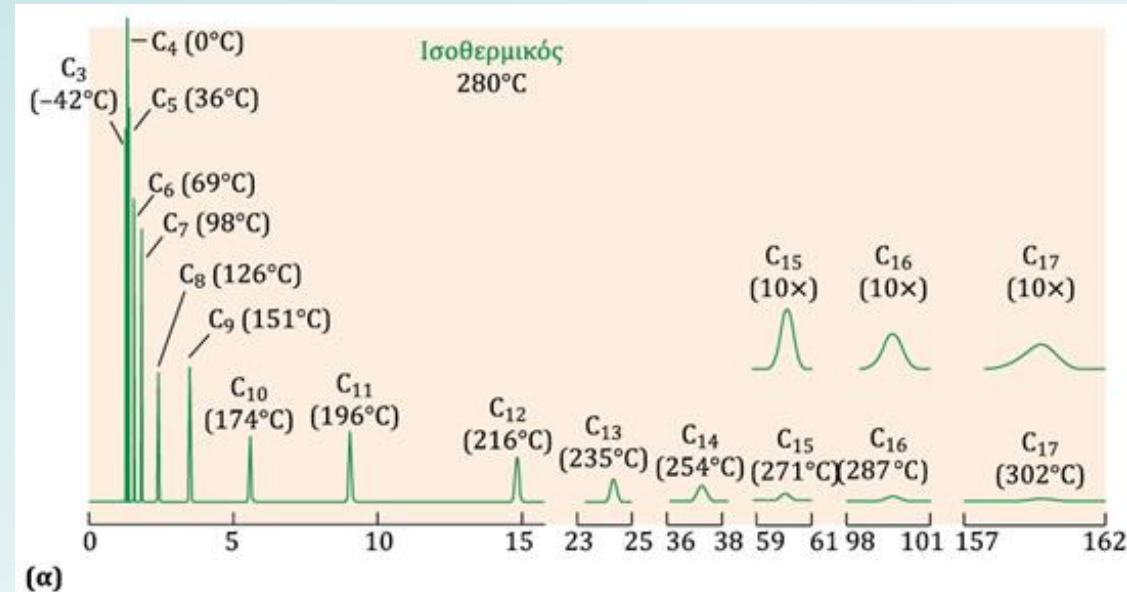
Κατακράτηση σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία



# Προγραμματισμός θερμοκρασίας και πίεσης

Στον ισοθερμικό διαχωρισμό (Εικόνα α), η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή (στους 150°C) και υψηλότερη από το σημείο ζέσεως των μικρών αλκανίων σε ατμοσφαιρική πίεση. Τα μικρά αλκάνια είναι σχεδόν αποκλειστικά στην αέρια φάση, κατακρατούνται ασθενώς και εκλύονται πολύ κοντά στο  $t_M$ .

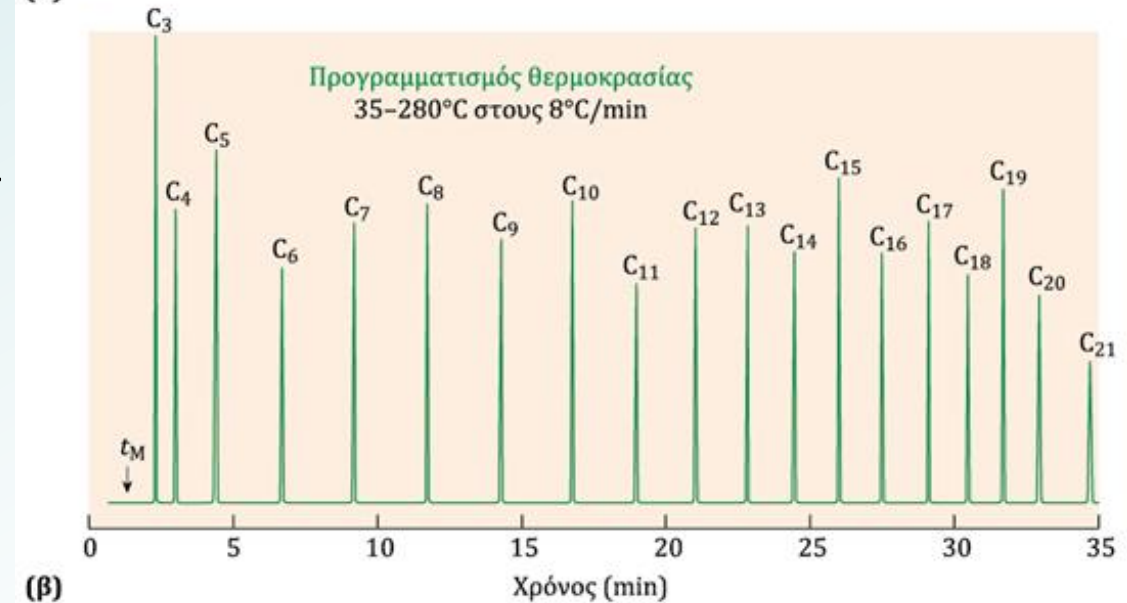
- ✓ Η κατακράτηση αυξάνεται με την αύξηση του σημείου ζέσεως των ενώσεων. Οι λιγότερο πτητικές ενώσεις μπορεί να μην εκλουσθούν από τη στήλη.



(α)

Εάν η θερμοκρασία της στήλης αυξηθεί από τους 35°C στους 280°C με ρυθμό 8°C/min (Εικόνα β), όλες οι ενώσεις εκλύονται και ο διαχωρισμός των κορυφών είναι αρκετά ομοιόμορφος

- ✓ Η αρχική θερμοκρασία (35°C) είναι πολύ χαμηλότερη από τη θερμοκρασία ζέσεως (σε ατμοσφαιρική πίεση) των περισσότερων ενώσεων
- ✓ Καθώς προχωράει η ανάλυση, η θερμοκρασία συνεχίζει να αυξάνεται και η κατακράτηση μειώνεται συνεχώς, οπότε οι ουσίες τελικά αναδύονται ως οξείες κορυφές



(β)

# Προγραμματισμός πίεσης στήλης

- ✓ Οι περισσότεροι χρωματογράφοι είναι εξοπλισμένοι με ηλεκτρονικό έλεγχο της πίεσης του φέροντος αερίου.
- ✓ Διατηρείται σταθερή η ταχύτητα ροής ή η γραμμική ταχύτητα κατά τη διάρκεια ενός προγράμματος θερμοκρασίας.
- ✓ Ο προγραμματισμός της πίεσης ή της ροής μπορεί να συνδυασθεί με τον προγραμματισμό της θερμοκρασίας για τη μείωση των χρόνων κατακράτησης των συστατικών που εκκλύονται αργά.
- ✓ Αυξάνοντας την πίεση εισόδου αυξάνεται η ροή της κινητής φάσης και μειώνεται ο χρόνος κατακράτησης.

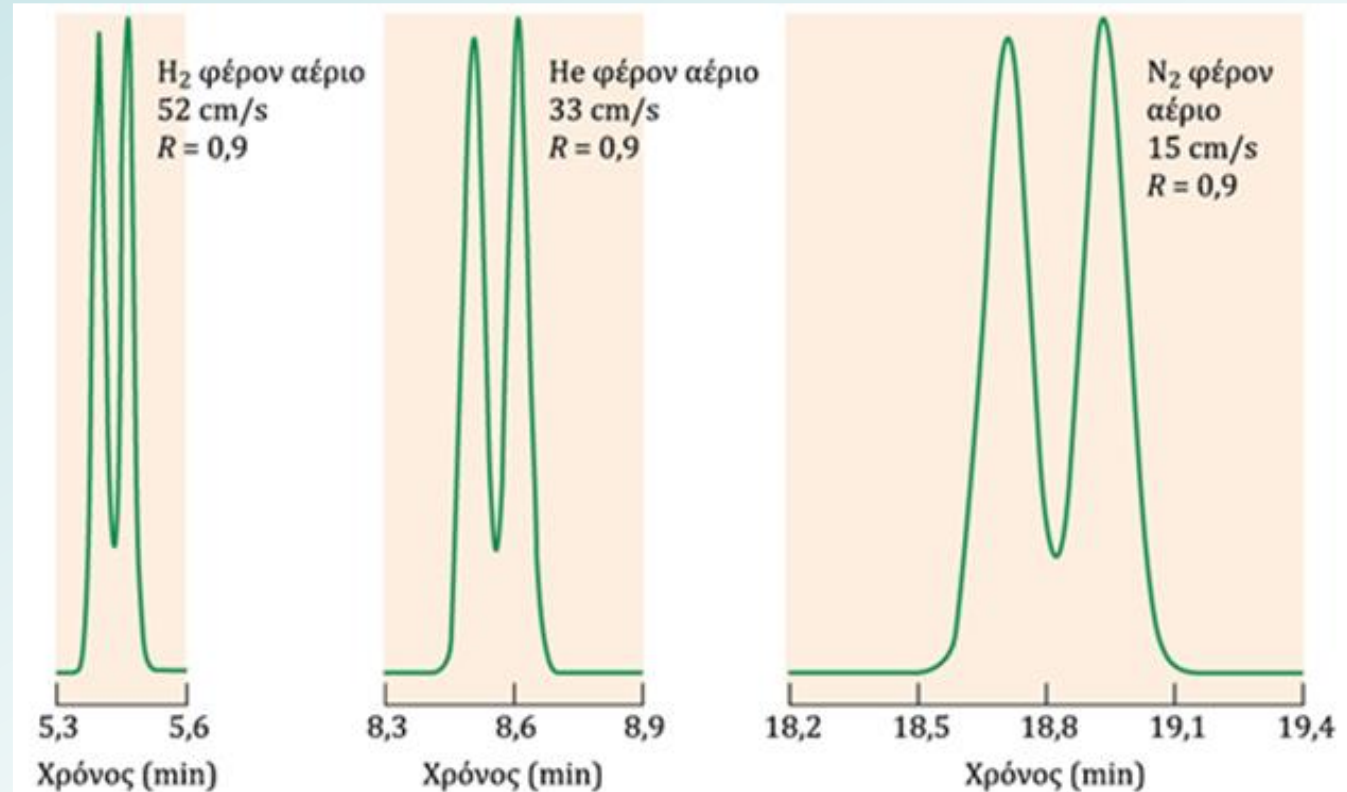


# Επίδραση του φέροντος αερίου στο χρόνο ανάλυσης

Ηλεκτρολυτικές γεννήτριες παράγουν  $H_2$  υψηλής καθαρότητας και έτσι εξαλείφεται η ανάγκη για φιάλες συμπιεσμένου  $H_2$ .

Τα  $H_2$  και  $He$  παρέχουν μικρότερο ύψος πλάκας από το  $N_2$  σε υψηλή ταχύτητα ροής, επειδή **στο  $H_2$  και στο  $He$  οι ουσίες διαχέονται πιο γρήγορα από ό,τι στο  $N_2$**

- ✓ Όσο ταχύτερα διαχέεται μια ουσία μεταξύ των φάσεων, τόσο μικρότερος είναι ο όρος μεταφοράς μάζας ( $Cu_x$ ) στην εξίσωση van Deemter.
- ✓ **Εάν η στατική φάση είναι αρκετά λεπτή ( $\approx 0,5 \mu m$ ), στη μεταφορά μάζας κυριαρχεί η βραδεία διάχυση μέσα στην κινητή φάση και όχι μέσα στη στατική φάση.**



Διαχωρισμός των μονοτερπενίων d-λεμονένιο και ευκαλυπτόλη σε στήλη 30 m × 0,32 mm επικαλυμμένου τοιχώματος με στατική φάση  $Rxi-5ms$  [(διφαινυλ)<sub>0,05</sub>-(διμεθυλ)<sub>0,95</sub> πολυσιλοξάνιο] πάχους 0,25  $\mu m$ , στους 70°C χρησιμοποιώντας διάφορα φέροντα αέρια στις βέλτιστες γραμμικές ταχύτητές τους. Η διαχωριστικότητα,  $R$ , παραμένει σταθερή αλλά ο χρόνος ανάλυσης αυξάνεται καθώς το φέρον αέριο αλλάζει από  $H_2$  σε  $He$  και σε  $N_2$ .

# Έγκυση δείγματος

---

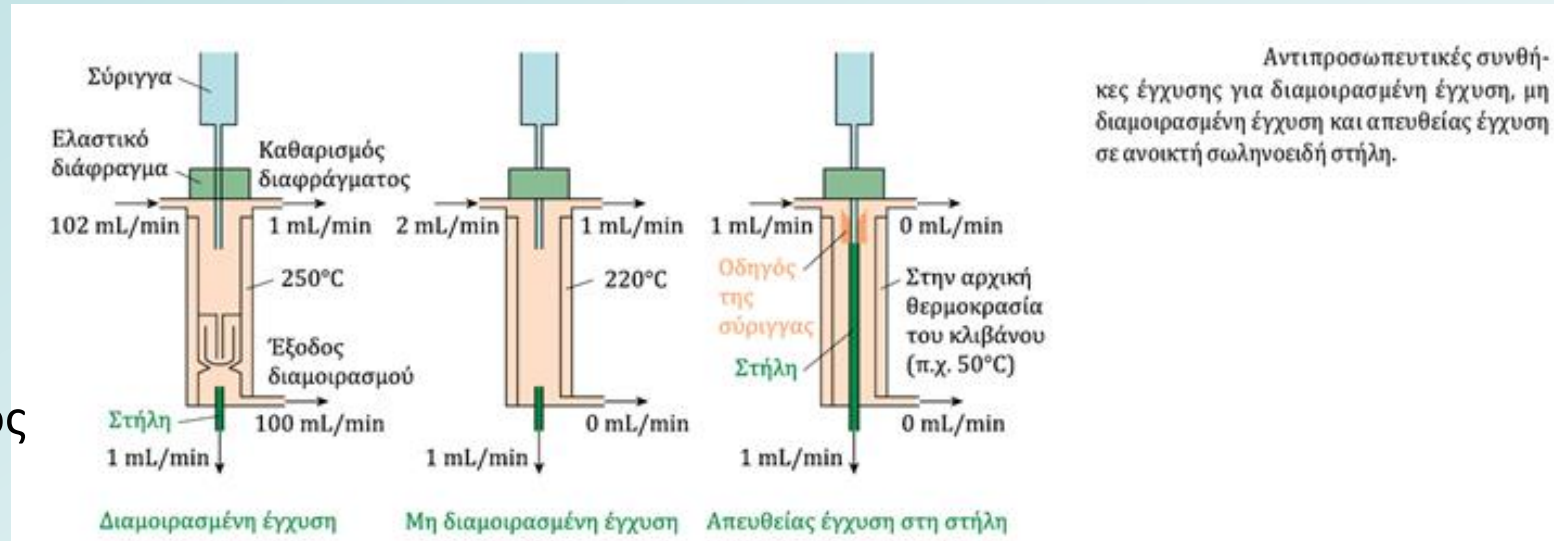
# Τρεις κοινοί τύποι έγχυσης

## Έγχυση σε ανοιχτές σωληνοειδείς στήλες

- ✓ **Διαμοιρασμένη έγχυση:** συνήθης διαδικασία εισαγωγής μικρού όγκου δείγματος σε ανοικτή σωληνοειδή στήλη.
- ✓ **Μη διαμοιρασμένη έγχυση:** συνιστάται για ιχνοεπίπεδα αναλυτών υψηλού σημείου ζέσεως σε διαλύτες χαμηλού σημείου ζέσεως.
- ✓ **Απευθείας έγχυση στη στήλη:** η καλύτερη για ποσοτικό προσδιορισμό και για θερμικά ασταθείς αναλύτες και διαλύτες υψηλού σημείου ζέσεως.

# Διαμοιρασμένη έγχυση

- ✓ Οι αναλύτες είναι σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (> ppm) στο δείγμα
- ✓ Για ανάλυση με υψηλή διαχωριστικότητα, τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μικρότερη δυνατή ποσότητα δείγματος



- ✓ Το δείγμα εγχέεται γρήγορα (<1 s) στη ζώνη εξάτμισης μέσω του διαφράγματος.
- ✓ Η θερμοκρασία του συστήματος έγχυσης (εγχυτήρα) διατηρείται υψηλή (π.χ. 250°C) για επιτάχυνση της εξάτμισης.
- ✓ Στο σημείο διαμοιρασμού, ένα μικρό κλάσμα των ατμών εισέρχεται στη χρωματογραφική στήλη, αλλά το μεγαλύτερο κλάσμα κατευθύνεται μέσω της βαλβίδας στον αεραγωγό αποβλήτων.
- ✓ Η αναλογία του δείγματος που δεν φθάνει στη στήλη ονομάζεται λόγος διαμερισμού και κυμαίνεται από 1:1 έως 500:1.

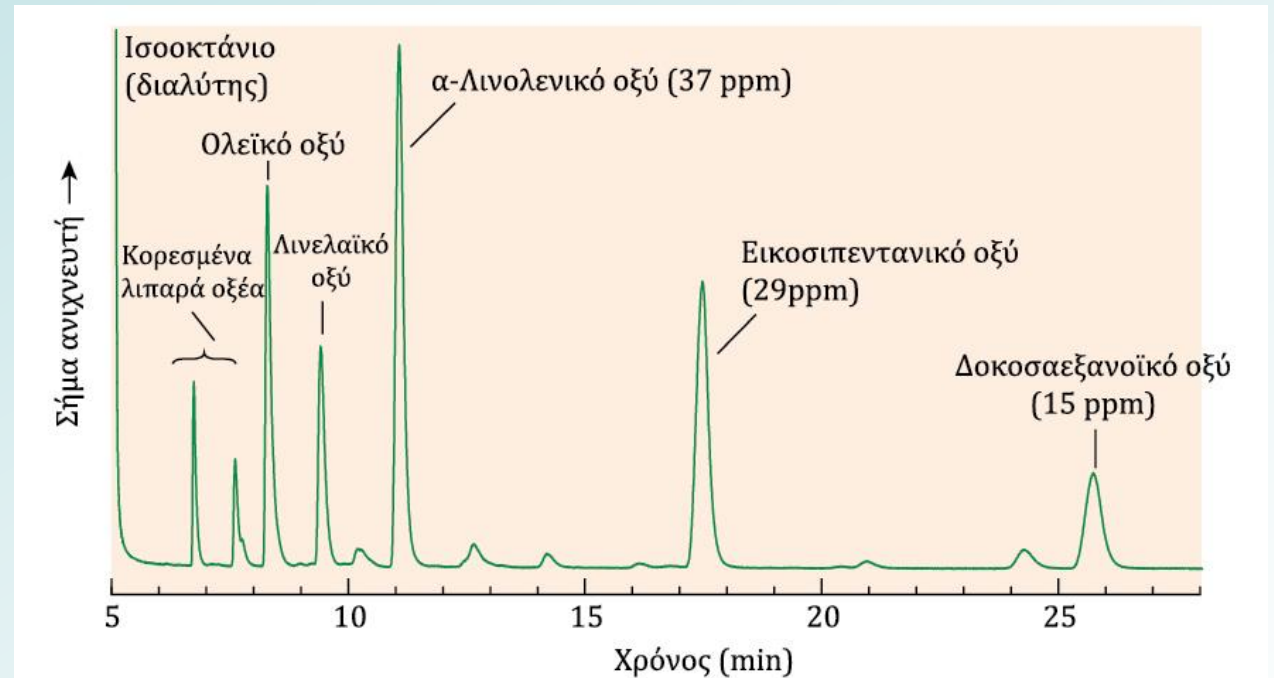
# Διαχωρισμός των ω-3 λιπαρών οξέων

Όγκος 0,5 μL του δείγματος εγχύθηκε με λόγο διαμοίρασμού 20:1.

Η ακριβής ποσότητα δείγματος που φορτώνεται στη στήλη είναι άγνωστη αλλά σταθερή.

Υψηλοί λόγοι διαμερισμού δίνουν ευκρινέστερες κορυφές καθώς το δείγμα φορτώνεται γρήγορα στη στήλη με καλύτερη ποσοτική μεταφορά και αναπαραγωγικότητα.

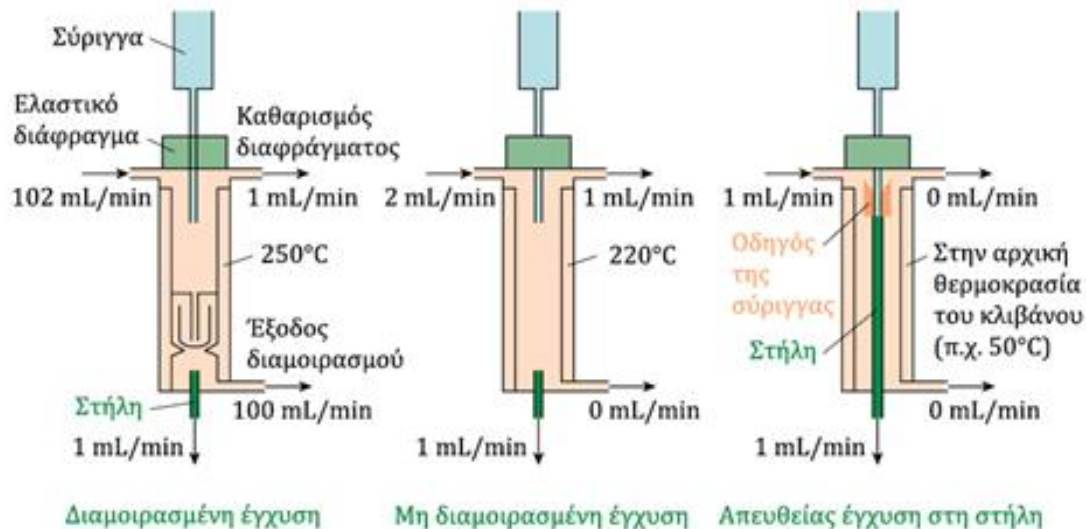
Η αναμενόμενη πιστότητα είναι 2-4% για χειροκίνητη έγχυση και 1% για αυτόματο δειγματολήπτη.



Διαχωρισμός λιπαρών οξέων ω-3 σε ιχθυέλαιο και λινέλαιο διαλυμένων σε ισοοκτάνιο.



# Μη διαμοιρασμένη έγχυση



Αντιπροσωπευτικές συνθήκες έγχυσης για διαμοιρασμένη έγχυση, μη διαμοιρασμένη έγχυση και απευθείας έγχυση σε ανοικτή σωληνοειδή στήλη.

Για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων αναλυτών με συγκεντρώσεις <math>< 1 \mu\text{g/g}</math> στο δείγμα, πιο κατάλληλη είναι η **μη διαμοιρασμένη** έγχυση.

- ✓ Η θερμοκρασία του συστήματος έγχυσης είναι χαμηλότερη ( $\sim 220^\circ\text{C}$ ) από τη διαμοιρασμένη έγχυση, επειδή το δείγμα παραμένει περισσότερο χρόνο στην είσοδο και δεν πρέπει να αποσυντεθεί.
- ✓ Μεγάλος όγκος ( $\sim 2 \mu\text{L}$ ) του αραιού διαλύματος, σε διαλύτη χαμηλού σημείου ζέσεως, εγχέεται στην επένδυση, με κλειστό τον αεραγωγό διαμοιρασμού.
- ✓ Ο χρόνος παραμονής του δείγματος στη γυάλινη επένδυση είναι  $\sim 1 \text{ min}$ , επειδή το φέρον αέριο ρέει μέσα στην επένδυση με την ίδια ροή που έχει και στη στήλη, δηλαδή  $\sim 1 \text{ mL/min}$ . Σε  $\sim 1 \text{ min}$  μετά την έγχυση, ανοίγει ο εξαερισμός για την απομάκρυνση του υπόλοιπου δείγματος από τον εγχυτήρα.

# Παγίδευση του διαλύτη

Η φόρτωση του δείγματος στη στήλη επί ~1 min παράγει ευρείες κορυφές, εκτός εάν ο αναλύτης εστιάζεται στην είσοδο της στήλης

Στην τεχνική της **παγίδευσης του διαλύτη**:

- ✓ Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ρυθμίζεται 10-20°C κάτω από το σημείο ζέσεως του διαλύτη, ο οποίος ως εκ τούτου συμπυκνώνεται στην είσοδο της στήλης.
- ✓ Καθώς οι ουσίες συναντούν το συμπυκνωμένο βύσμα του διαλύτη, παγιδεύονται μέσα στον διαλύτη σε μια στενή ζώνη στην αρχή της στήλης.
- ✓ Η χρωματογραφία ξεκινά με την αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης για να εξατμισθεί ο διαλύτης που έχει παγιδευτεί στην είσοδό της
- ✓ Τα σημεία ζέσεως των ουσιών των πρώτων κορυφών θα πρέπει να είναι πάνω από αυτό του διαλύτη.

# Ψυχρή παγίδευση

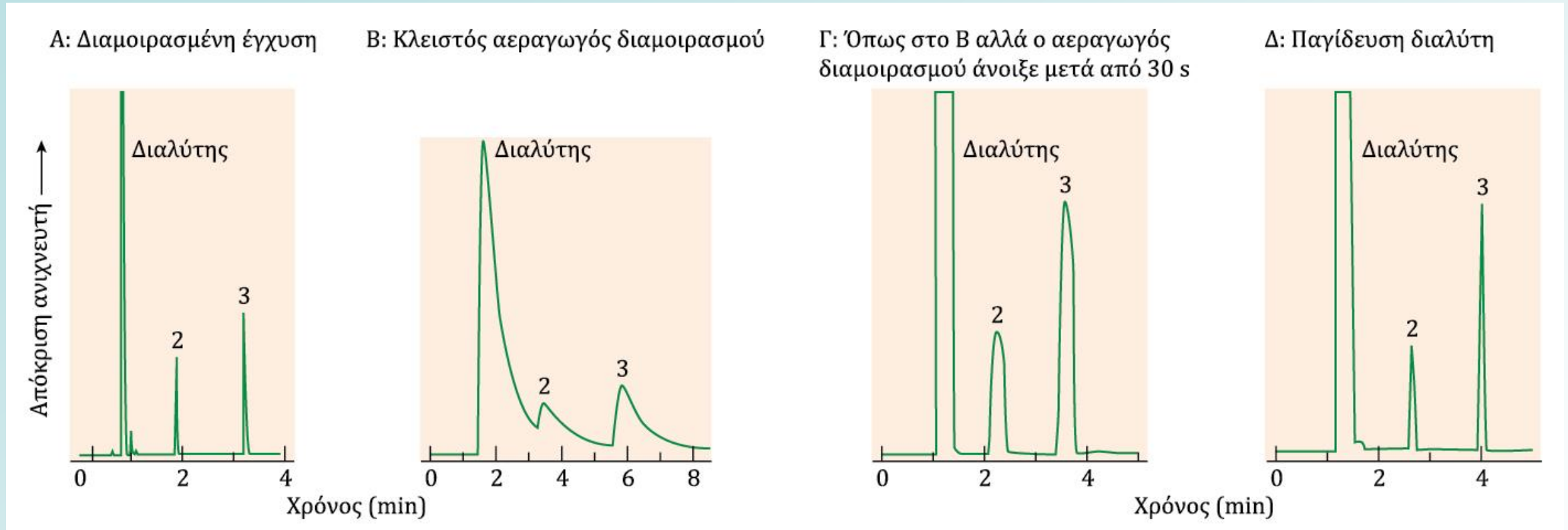
Ένας εναλλακτικός τρόπος συμπύκνωσης ουσιών σε στενή ζώνη στην είσοδο της στήλης ονομάζεται **ψυχρή παγίδευση**.

Στην **ψυχρή παγίδευση**:

- ✓ Η αρχική θερμοκρασία της στήλης είναι τουλάχιστον  $100^{\circ}\text{C}$  χαμηλότερη από τα σημεία ζέσεως των αναλυτών
- ✓ Ο διαλύτης και τα χαμηλού σημείου ζέσεως συστατικά εκκλούνται ταχέως, αλλά οι ουσίες υψηλού σημείου ζέσεως παραμένουν σε μια στενή ζώνη στην αρχή της στήλης.
- ✓ Στη συνέχεια η στήλη θερμαίνεται ταχέως για να αρχίσει η χρωματογραφία των υψηλού σημείου ζέσεως συστατικών.

Για αναλύτες χαμηλού σημείου ζέσεως, απαιτείται **κρυογονική εστίαση**, με αρχική θερμοκρασία στήλης κάτω από τη θερμοκρασία δωματίου

# Σύγκριση διαμοιρασμένης και μη διαμοιρασμένης έγχυσης



Διαμοιρασμένη και μη διαμοιρασμένη έγχυση διαλύματος 1% (v/v) μεθυλισοβουτυλοκετόνης (σημείο ζέσεως 118°C) και 1% (v/v) p-ξυλόλιου (σημείο ζέσεως 138°C) σε διχλωρομεθάνιο (σημείο ζέσεως 40°C), σε ανοικτή σωληνοειδή στήλη (10 m 0,22 mm) επικαλυμμένου τοιχώματος με στατική φάση πάχους 0,25 μm μέτριας πολικότητας (BP-10, κυανοπροπυλφαινυλμεθυλ-σιλικόνη). Θερμοκρασία στήλης = 75°C. Η κλίμακα στον κατακόρυφο άξονα είναι η ίδια για τα A-Γ. Στο Δ, η ένταση του σήματος πρέπει να πολλαπλασιασθεί επί 2,33 για να είναι στην ίδια κλίμακα με τα A-Γ.



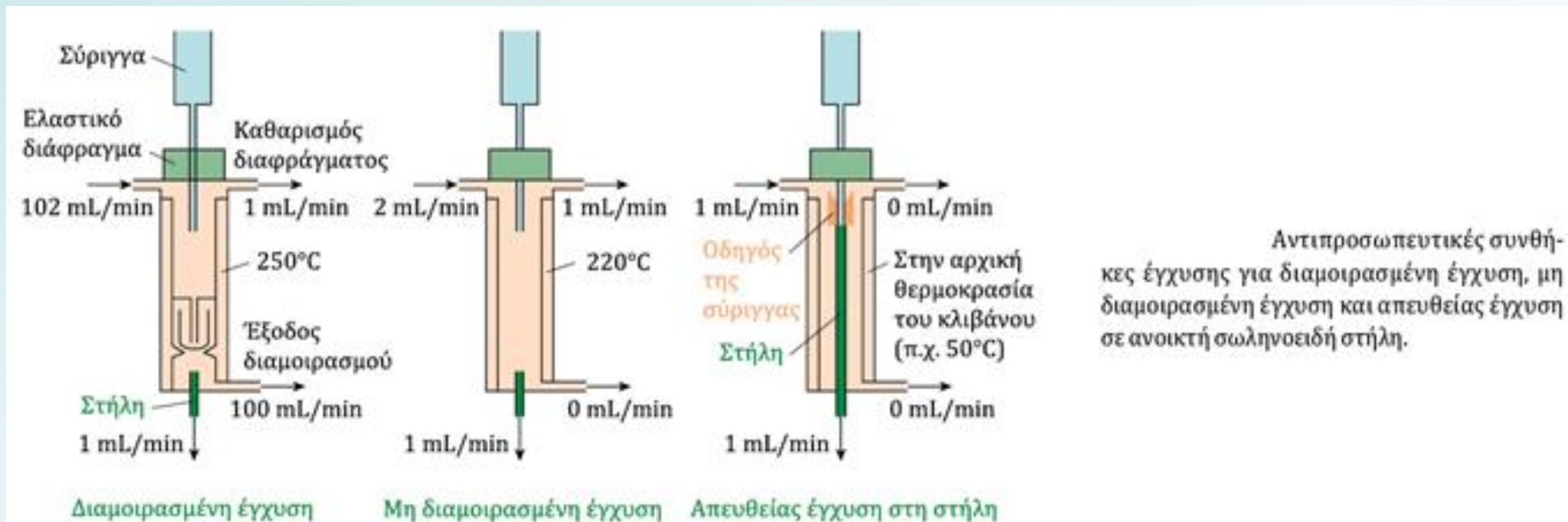
# Απευθείας έγχυση στη στήλη

Η απευθείας έγχυση στη στήλη είναι η καλύτερη μέθοδος έγχυσης για ποσοτική εργασία

Το διάλυμα εγχέεται απευθείας μέσα στη στήλη, χωρίς να διέλθει από θερμό σύστημα έγχυσης. Καθώς δεν συμβαίνει εξάτμιση, δεν γίνεται διάκριση των αναλυτών με βάση το σημείο ζέσεως.

Η αρχική θερμοκρασία της στήλης είναι αρκετά χαμηλή ώστε να διατηρεί τις ουσίες σε μια στενή ζώνη. Η θέρμανση της στήλης ξεκινά τη χρωματογραφία.

Τα δείγματα υποβάλλονται στη χαμηλότερη δυνατή θερμοκρασία, καθιστώντας έτσι την έγχυση σε ψυχρή στήλη κατάλληλη για δείγματα που αποσυντίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες.





# Ποιοτική ανάλυση

Στην *ποιοτική ανάλυση* για την ταυτοποίηση μιας κορυφής, συγκρίνουμε τον χρόνο κατακράτησής της με αυτόν ενός διαλύματος καθαρού αναλύτη.

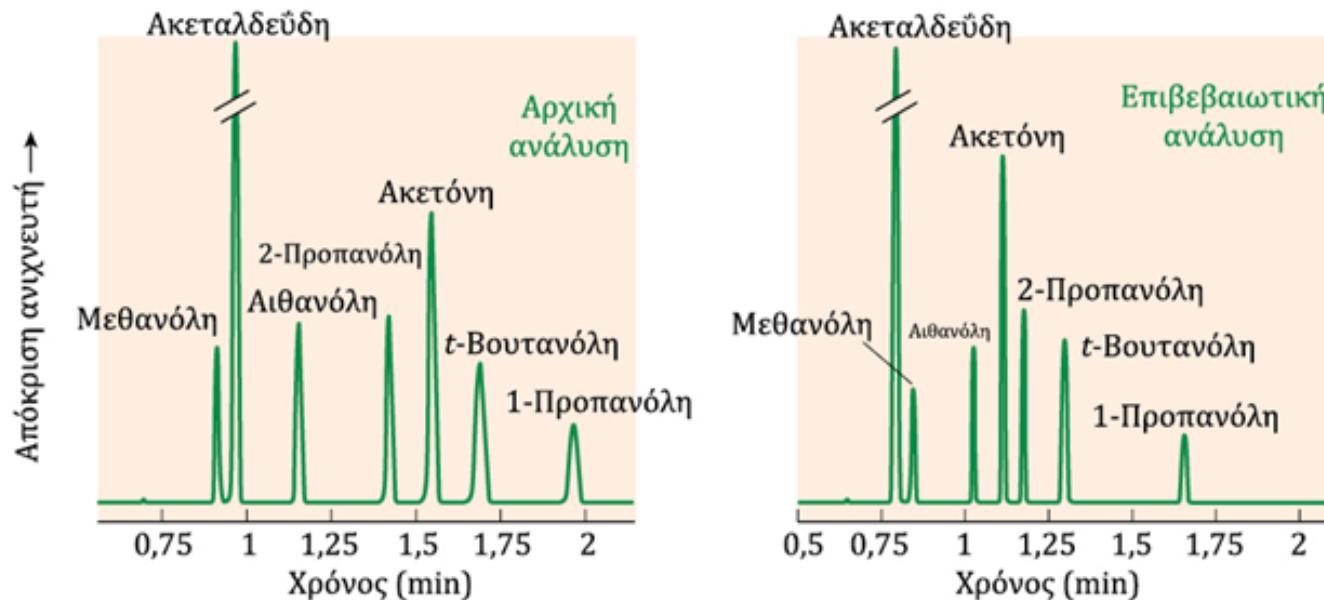
- ✓ Ο πιο αξιόπιστος τρόπος για να συγκρίνουμε τους χρόνους κατακράτησης είναι ο εμβολιασμός του αγνώστου δείγματος, κατά τον οποίο ο αναλύτης, σε καθαρή μορφή, προστίθεται στο άγνωστο. Εάν η προστιθέμενη ένωση είναι ταυτόσημη με ένα συστατικό του άγνωστου, τότε το εμβαδόν της κορυφής του εν λόγω συστατικού θα αυξηθεί.
- ✓ Πρόσθετη επιβεβαίωση της ταυτότητας μιας κορυφής παρέχεται από τη φασματομετρία μαζών, η οποία μπορεί να ταυτοποιήσει μια χρωματογραφική κορυφή συγκρίνοντας το φάσμα της με βιβλιοθήκη φασμάτων.

# Παράδειγμα ποιοτικής ανάλυσης

**Παράδειγμα:** συγκέντρωση της αλκοόλης στο αίμα

- ✓ Ένα φιαλίδιο αίματος ή ούρων θερμαίνεται.
- ✓ Δείγμα αερίου λαμβάνεται από τον **υπερκείμενο χώρο**.
- ✓ Το δείγμα αερίου εγχέεται σε εισαγωγέα που οδηγεί σε δύο παράλληλες στήλες με διαφορετικές στατικές φάσεις (**ορθογώνιες στατικές φάσεις**).

Αν μια κορυφή εμφανίζεται στον αναμενόμενο χρόνο κατακράτησης της αιθανόλης και στις δύο στήλες, είναι πολύ πιθανό ότι πρόκειται για αιθανόλη.



Επιβεβαιωτικός προσδιορισμός αλκοόλης με ορθογώνιες στατικές φάσεις (με διαφορετικούς μηχανισμούς κατακράτησης). Ο υπερκείμενος χώρος δείγματος ούρων ή αίματος (μετά από εξισορρόπηση) εγχέεται σε μία μόνο θύρα με διαμοιρασμένη έγχυση 50:1. Το φέρον αέριο κατευθύνεται παράλληλα σε δύο διαφορετικές στήλες, η καθεμία με τον δικό της ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας, για διαχωρισμό στους 40°C. Οι στήλες δίνουν διαφορετική σειρά έκλουσης λόγω της διαφορετικής εξισορρόπησης των δεσμών υδρογόνου και των δυνάμεων διπόλων. Η t-βουτανόλη και η 1-προπανόλη είναι εσωτερικά πρότυπα. Το δείγμα σε αυτή την εικόνα ήταν ένα εργαστηριακό πρότυπο, και όχι ο υπερκείμενος χώρος δείγματος αίματος. [Restek Corp., Bellefonte, PA].

# Ποσοτική ανάλυση

- ✓ Η *ποσοτική ανάλυση* βασίζεται είτε στο εμβαδόν είτε στο ύψος μιας χρωματογραφικής κορυφής.
- ✓ Στο εύρος συγκέντρωσης όπου έχουμε γραμμική απόκριση, το εμβαδόν μιας κορυφής είναι ανάλογο με την ποσότητα του συστατικού στο οποίο αντιστοιχεί
- ✓ Η ποσοτική ανάλυση με αυτόματο δειγματολήπτη χρησιμοποιεί συνήθως μια καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευασμένη με εξωτερικά πρότυπα
- ✓ Η ποσοτική ανάλυση με χειροκίνητη έγχυση πραγματοποιείται σχεδόν πάντα προσθέτοντας στο άγνωστο μια γνωστή ποσότητα εσωτερικού προτύπου.

# Ανιχνευτές

---

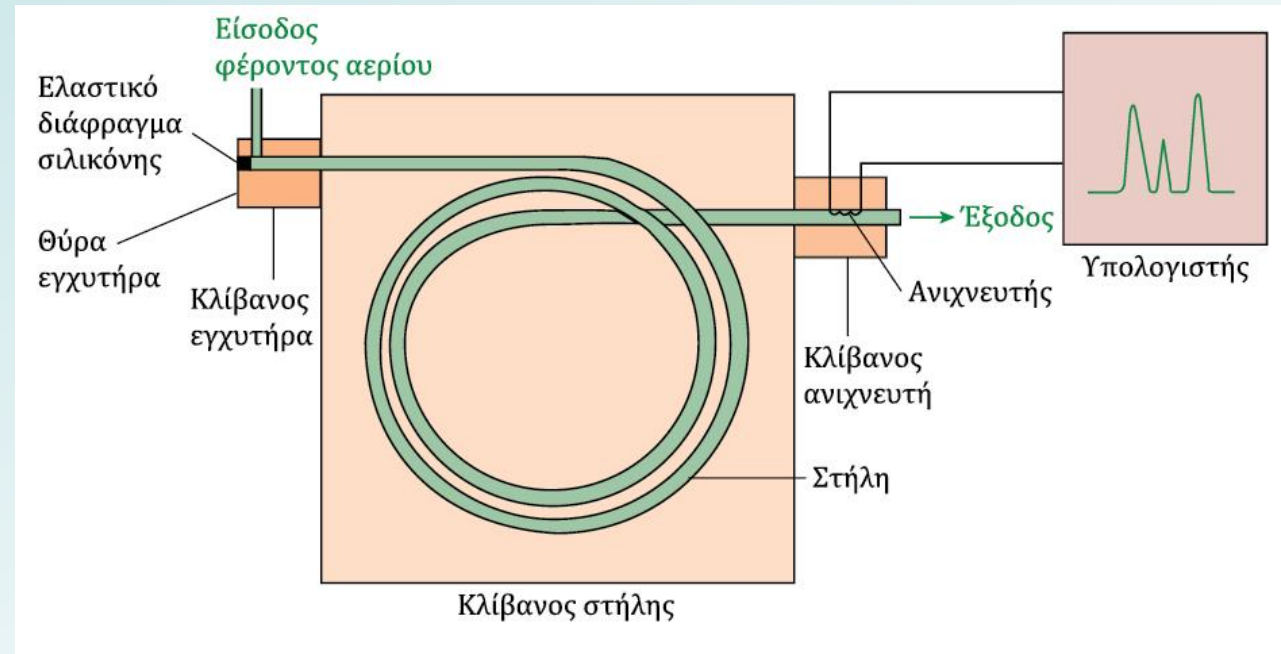
# Χαρακτηριστικά των ανιχνευτών της αεριοχρωματογραφίας

Οι τέσσερις ανιχνευτές χρησιμοποιούνται στο ~90% των σύγχρονων αεριοχρωματογραφικών αναλύσεων.

- ✓ Θερμικής αγωγιμότητα
- ✓ Ιοντισμού φλόγας
- ✓ Σύλληψης ηλεκτρονίων
- ✓ Φασματομέτρο μαζών

**Καθολικοί ανιχνευτές:** αποκρίνονται σε όλους τους αναλύτες, αλλά όχι στο φέρον αέριο.

**Επιλεκτικοί ανιχνευτές:** αποκρίνονται σε μερικές κατηγορίες αναλυτών

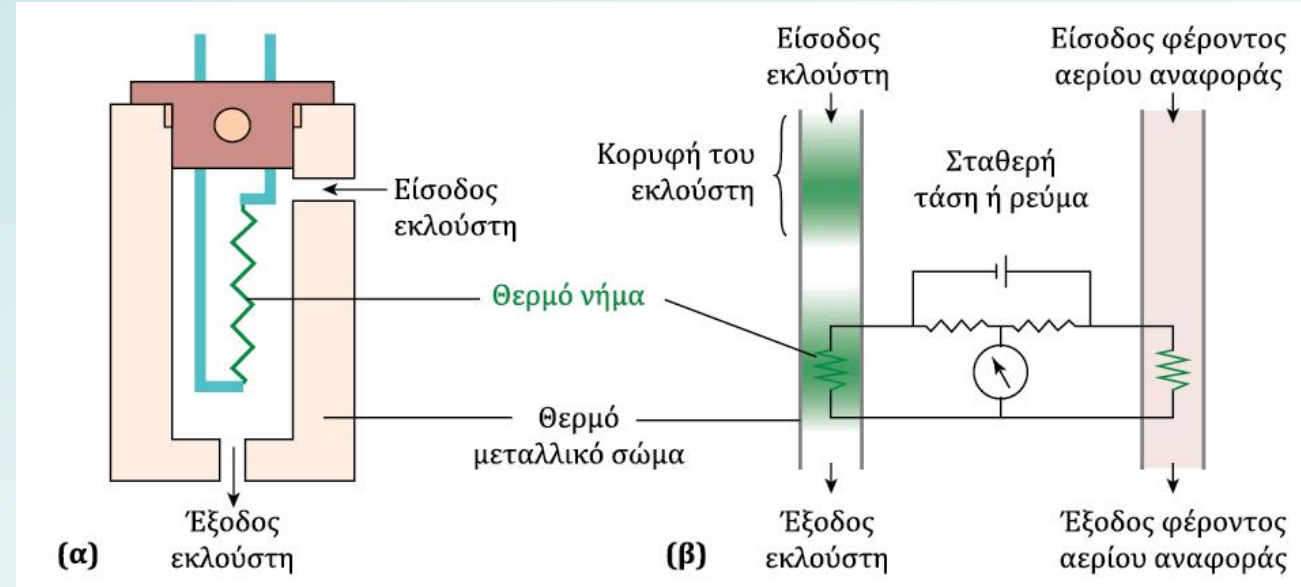




# Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας

Στο παρελθόν, οι ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας ήταν συνηθισμένοι στην αεριοχρωματογραφία επειδή είναι απλοί και καθολικοί. Ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας είναι χρήσιμος για πεπληρωμένες στήλες και τριχοειδείς στήλες πορώδους επίστρωσης, αλλά είναι λιγότερο ευαίσθητος από άλλους ανιχνευτές για ανοικτές σωληνοειδείς στήλες. Η θερμική αγωγιμότητα αποτελεί το μέτρο της ικανότητας μιας ουσίας να μεταφέρει θερμότητα από μια θερμή περιοχή σε μια κρύα περιοχή.

- ✓ Το φέρον αέριο πρέπει να έχει πολύ διαφορετική θερμική αγωγιμότητα από τους αναλύτες.
- ✓ Το ήλιο χρησιμοποιείται πιο συχνά.
- ✓ Οποιοσδήποτε αναλύτης αναμιχθεί με το He οδηγεί σε μείωση της αγωγιμότητας του αερίου.

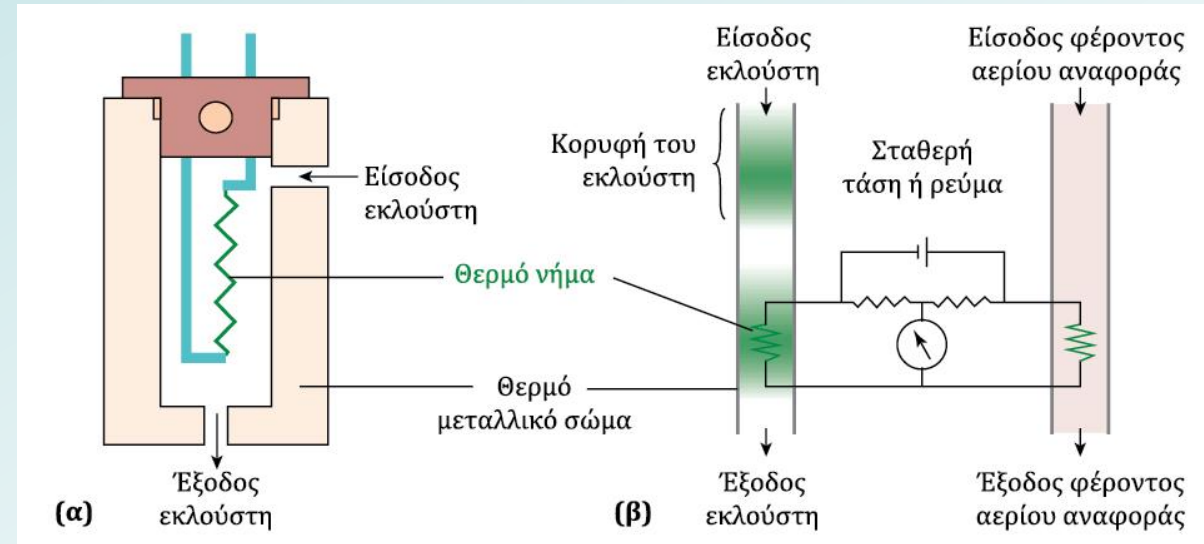


Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας. **(α)** Ο ανιχνευτής από κοντά. **(β)** Η αντίσταση του νήματος που εκτίθεται στο δείγμα μετριέται σε σχέση με το νήμα αναφοράς, το οποίο εκτίθεται στο φέρον αέριο.

# Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας

## Αρχή Λειτουργίας

- ✓ Το έκλουσμα από τη στήλη ρέει πάνω από ένα θερμό νήμα από βολφράμιο-ρήνιο.
- ✓ Όταν εξέρχεται ο αναλύτης:
- ✓ Η θερμική αγωγιμότητα του ρεύματος του αερίου μειώνεται
- ✓ Το νήμα θερμαίνεται, η ηλεκτρική του αντίσταση αυξάνεται και η ηλεκτρική τάση κατά μήκος του νήματος αλλάζει.
- ✓ Ο ανιχνευτής μετρά την αλλαγή της τάσης



Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας. **(α)** Ο ανιχνευτής από κοντά. **(β)** Η αντίσταση του νήματος που εκτίθεται στο δείγμα μετριέται σε σχέση με το νήμα αναφοράς, το οποίο εκτίθεται στο φέρον αέριο.

# Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας

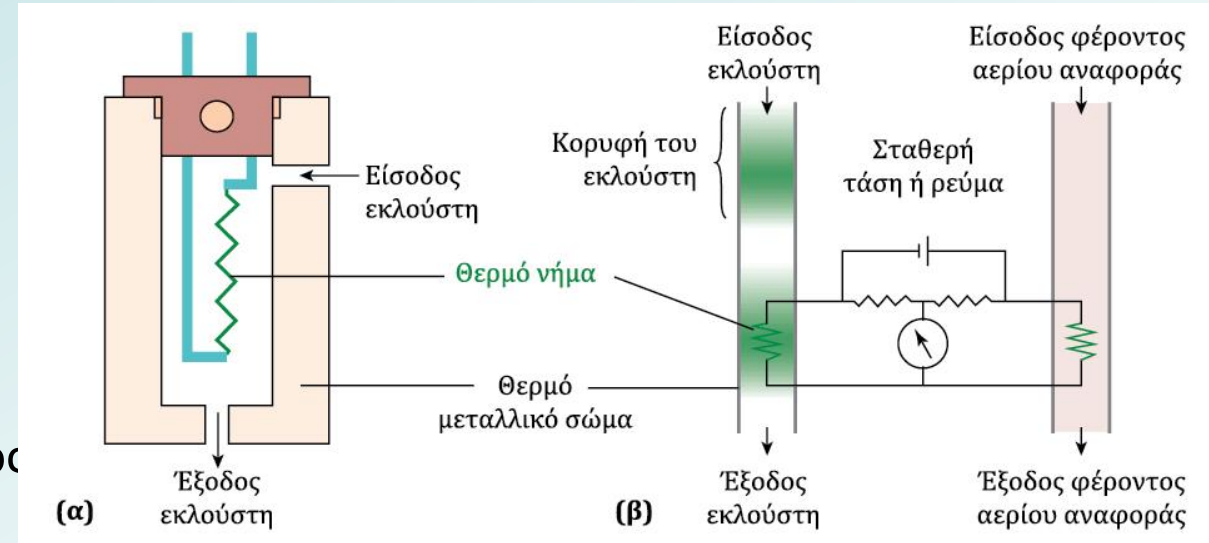
## Πλεονεκτήματα

- ✓  $10^5$  εύρος γραμμικής απόκρισης
- ✓  $H_2$  και  $He$  δίνουν το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης
- ✓ Μη καταστρεπτικός

## Μειονεκτήματα

- ✓ Η ευαισθησία αυξάνεται με την αύξηση του ρεύματος νήματος, μείωση της ταχύτητας ροής, χαμηλότερη θερμοκρασία μπλοκ ανιχνευτή

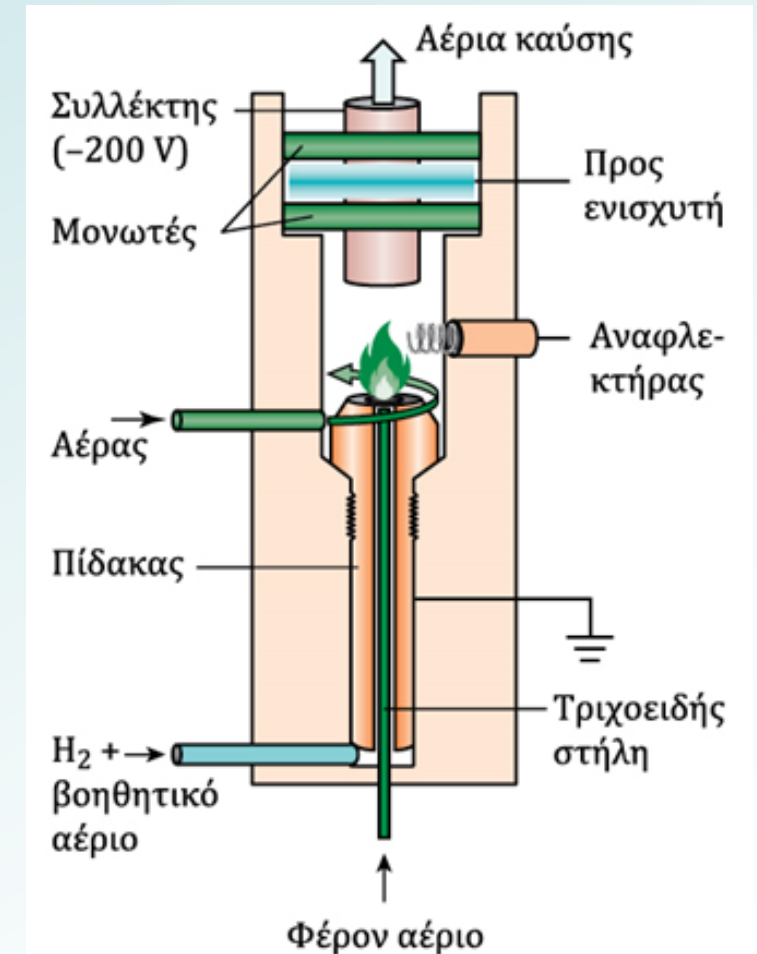
Το εμβαδόν της κορυφής της απόκρισης του ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση και είναι αντιστρόφως ανάλογο προς την ταχύτητα ροής.



Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας. (α) Ο ανιχνευτής από κοντά. (β) Η αντίσταση του νήματος που εκτίθεται στο δείγμα μετριέται σε σχέση με το νήμα αναφοράς, το οποίο εκτίθεται στο φέρον αέριο.

# Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας

- ✓ Στον **ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας**, το έκλουσμα καίγεται σε μείγμα  $H_2$  και αέρα.
- ✓ Τα άτομα άνθρακα (εκτός από τους άνθρακες του καρβονυλίου και του καρβοξυλίου) παράγουν ρίζες CH, οι οποίες παράγουν ιόντα  $CHO^+$  και ηλεκτρόνια στη φλόγα.
  - ✓  $CH + O \rightarrow CHO^+ + e^-$
- ✓ Μόνο περίπου 1 στα  $10^6$  άτομα άνθρακα παράγει ένα ιόν.
- ✓ Αριθμός των ιόντων είναι ανάλογος με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που εισέρχονται στη φλόγα.
- ✓ Απουσία αναλύτη, ένα ρεύμα  $\sim 10^{-14}$  A ρέει μεταξύ του άκρου της φλόγας και του συλλέκτη.
- ✓ Οι αναλύτες παράγουν ρεύμα  $\sim 10^{-12}$  A, που μετατρέπεται σε τάση, ενισχύεται, φιλτράρεται για την απομάκρυνση θορύβου υψηλής συχνότητας και τελικά μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα.



Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας. [Πληροφορίες από C.F. Poole, "Ionization-Based Detectors for Gas Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1421, 137, Εικόνα 1].



# Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας

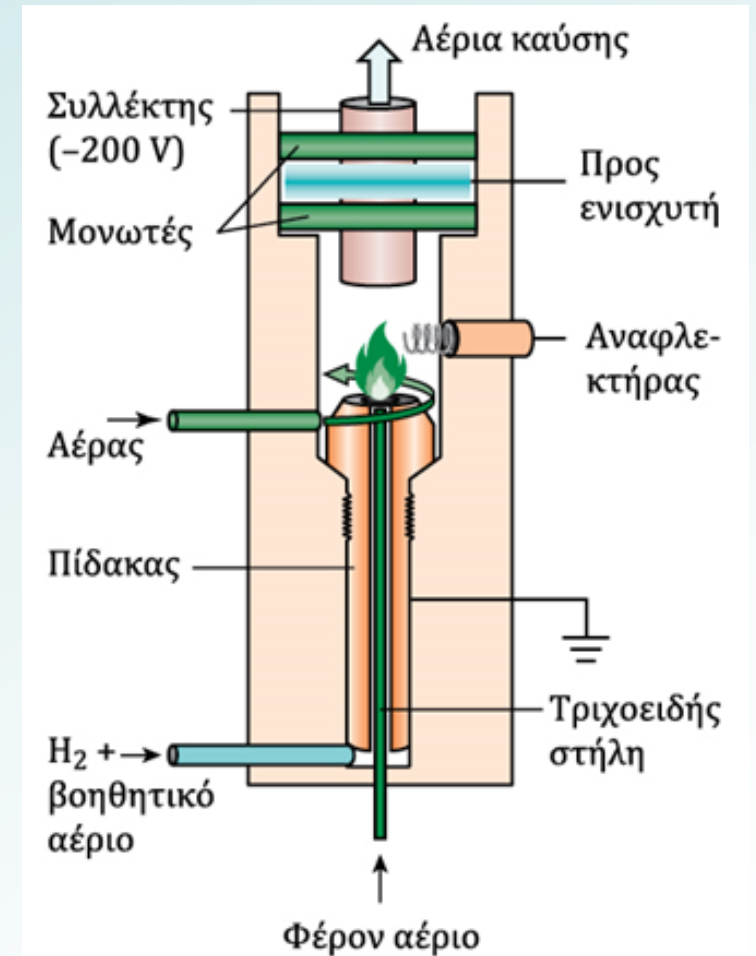
Η απόκριση στις οργανικές ενώσεις είναι ανάλογη με τη μάζα του αναλύτη για επτά τάξεις μεγέθους

## Πλεονεκτήματα

- ✓ Cost effective
- ✓  $10^7$  εύρος γραμμικής απόκρισης
- ✓ Το όριο ανίχνευσης είναι  $\sim 100$  φορές χαμηλότερο από εκείνο του ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας
- ✓ Ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας αποκρίνεται στην πλειονότητα των υδρογονανθράκων

## Μειονεκτήματα

- ✓ Καταστρεπτικός ανιχνευτής
- ✓ Απαιτεί πρόσθετα αέρια και ελεγκτές
- ✓ Δεν παρέχει πληροφορίες μοριακής δομής



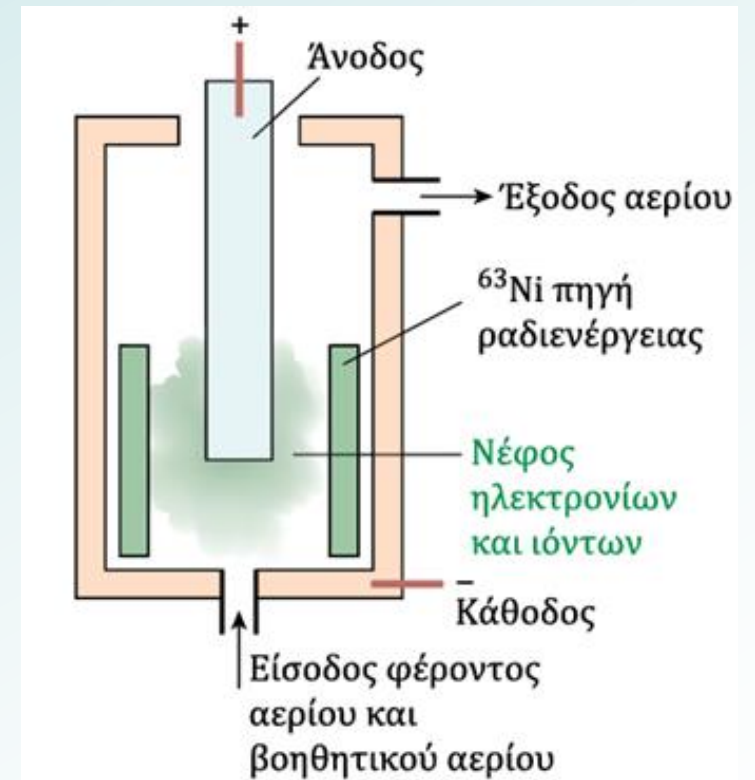
Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας. [Πληροφορίες από C.F. Poole, "Ionization-Based Detectors for Gas Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1421, 137, Εικόνα 1].



# Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων

Ο πιο δημοφιλής επιλεκτικός ανιχνευτής

- ✓ Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε μόρια που περιέχουν αλογόνο, συζυγιακές καρβονυλικές ενώσεις, νιτρίλια, νιτροενώσεις και οργανομεταλλικές ενώσεις, αλλά δεν είναι ευαίσθητος σε υδρογονάνθρακες, αλκοόλες και κετόνες.
- ✓ Ο ανιχνευτής είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για χλωριωμένα φυτοφάρμακα και φθοράνθρακες σε περιβαλλοντικά δείγματα.
- ✓ Το αέριο που εισέρχεται στον ανιχνευτή ιοντίζεται από ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας (σωματίδια  $\beta^-$ ) εκπεμπόμενα από ένα φύλλο που περιέχει ραδιενεργό  $^{63}\text{Ni}$ .
- ✓ Τα ηλεκτρόνια του πλάσματος που έχει δημιουργηθεί έλκονται από μία άνοδο, παράγοντας μικρό ρεύμα που διατηρείται σε σταθερό επίπεδο με παλμούς μεταβλητής συχνότητας που εφαρμόζονται μεταξύ καθόδου και ανόδου



Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων.

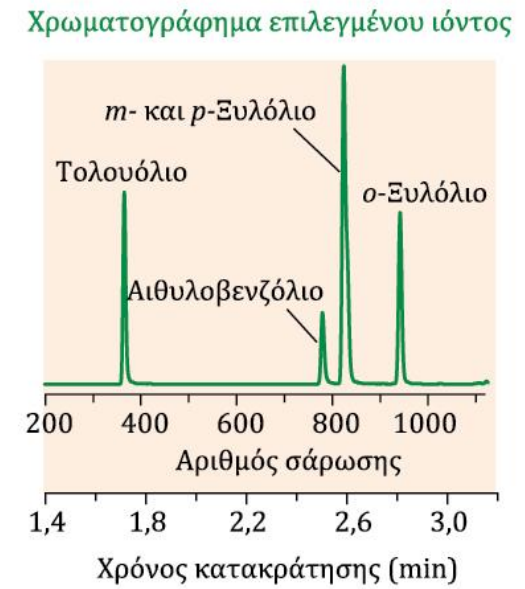
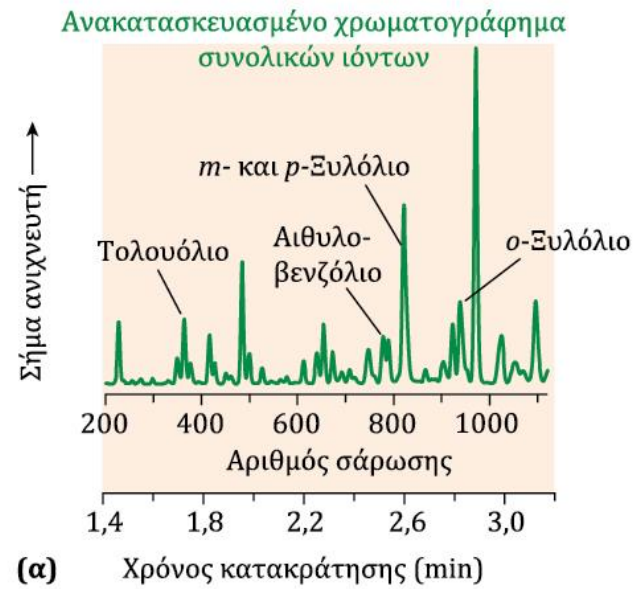
# Αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών

Ο φασματογράφος μαζών είναι ένας ευαίσθητος ανιχνευτής που παρέχει τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες

- ✓ Οι πιο συνηθισμένοι είναι οι τετραπολικοί αναλυτές μαζών ιοντισμού με ηλεκτρόνια.
- ✓ Οι αναλυτές χρόνου πτήσης χρησιμοποιούνται όταν απαιτείται ταχεία λήψη φασμάτων ή ακριβής μέτρηση μάζας

Το ανακατασκευασμένο χρωματογράφημα συνολικών ιόντων στο (α) προέρχεται από τον αεριοχρωματογράφο-φασματομέτρο μαζών που λαμβάνει κάθε 2 ms το φάσμα μαζών της εκροής της στήλης από  $m/z$  40 έως 400.

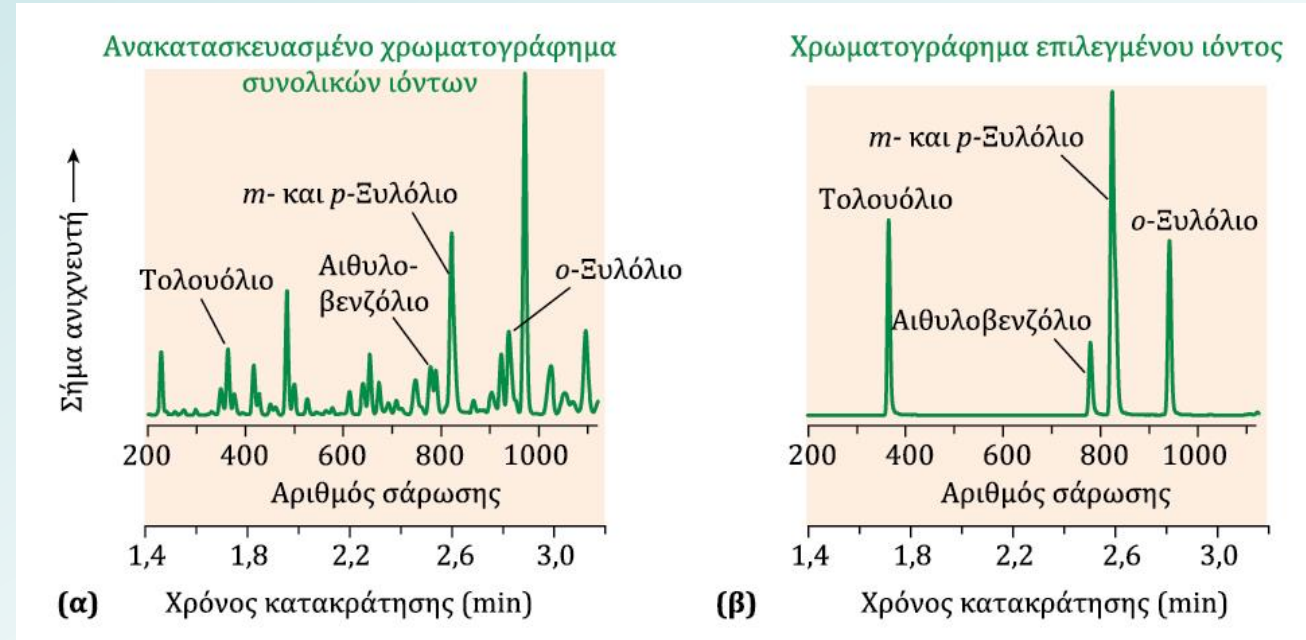
- ✓ Συνολικά καταγράφηκαν 5628 φάσματα του εκλούσματος μεταξύ 1 και 12 min.



Το φασματομετρία μαζών ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων ως καθολικός και εκλεκτικός ανιχνευτής για την αεριοχρωματογραφία.

# Αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών

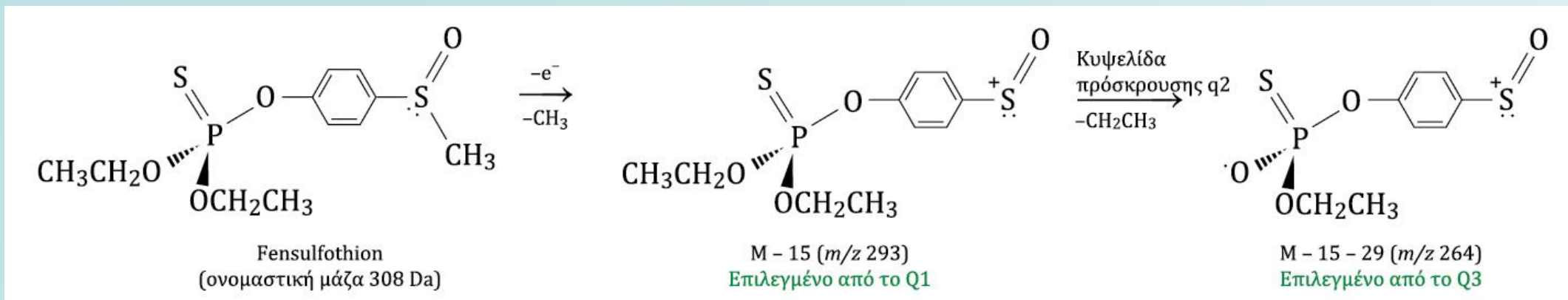
- ✓ Η τεταγμένη του ανακατασκευασμένου χρωματογραφήματος ολικού ιόντος είναι το άθροισμα του σήματος του ανιχνευτή για όλες τις τιμές  $m/z$  πάνω από ένα επιλεγμένο κατώφλι
- ✓ Μετρά κάθε τι που εκλύεται από τη στήλη.
- ✓ Το χρωματογράφημα παρακολούθησης συγκεκριμένου ιόντος στο διάγραμμα (β) παρουσιάζει μόνο το σήμα που λαμβάνεται για  $m/z$  91 ( $C_7H^+$ ), το οποίο είναι χαρακτηριστικό των μονοκυκλικών αρωματικών ενώσεων.
- ✓ Η **παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος**, κατά την οποία το φασματόμετρο μαζών λαμβάνει το σήμα μόνο για συγκεκριμένη τιμή  $m/z$ , μειώνει το όριο ανίχνευσης κατά 100 φορές σε σύγκριση με τη σάρωση των  $m/z$
- ✓ Παρακολουθείται τουλάχιστον ένα ακόμη  $m/z$  για επιβεβαίωση της ταυτότητας του αναλύτη



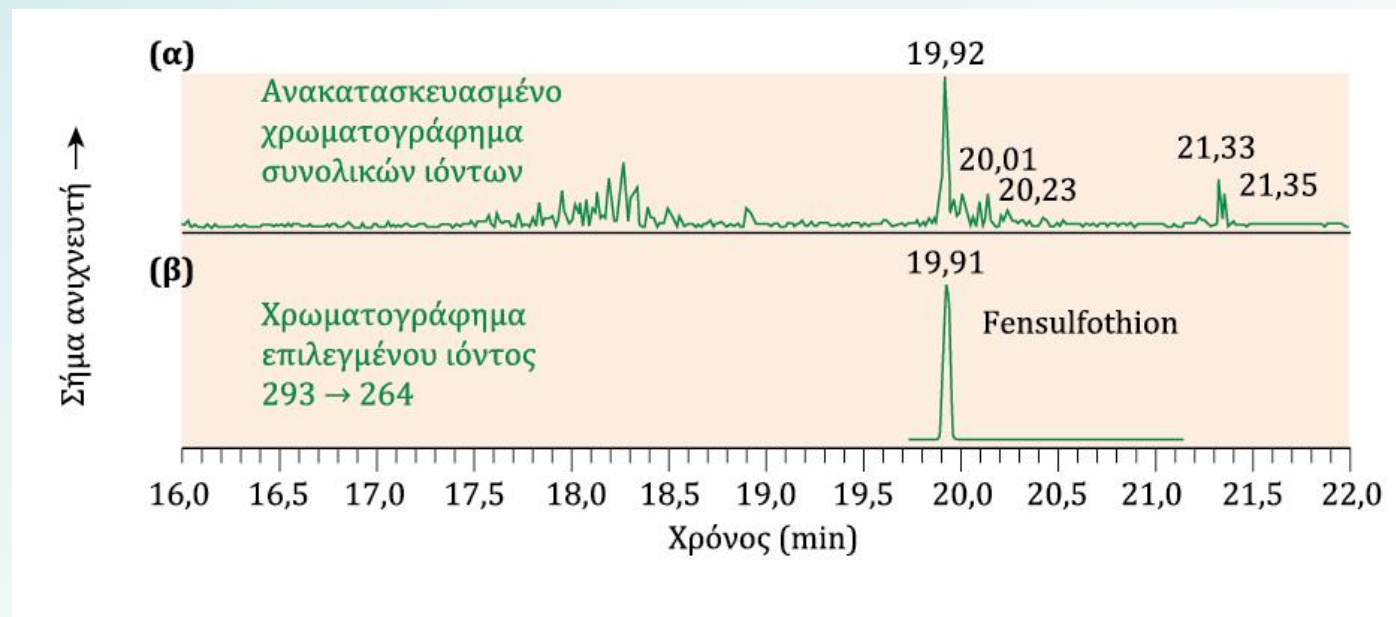
Φασματομετρία μαζών ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων ως καθολικός και ως εκλεκτικός ανιχνευτής για την αεριοχρωματογραφία.



# Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης



Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης στην αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών. (α) Χρωματογράφημα συνολικών ιόντων εκχυλίσματος από φλούδα πορτοκαλιού. Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων. (β) Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης. Το πρόδρομο ιόν  $m/z$  293 επιλέγεται από το φίλτρο μάζας Q1, και το ιόν προϊόντος  $m/z$  264 επιλέγεται από το φίλτρο μάζας Q3. Το χρωματογράφημα β είναι το γράφημα της έντασης σε  $m/z$  264 από το Q3 έναντι του χρόνου.



# Προετοιμασία του δείγματος

---



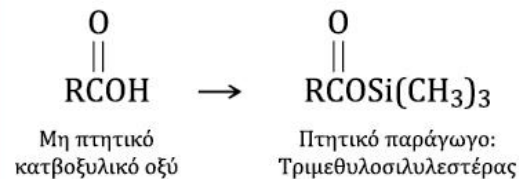
# Προετοιμασία του δείγματος

Η **προετοιμασία του δείγματος** είναι η διαδικασία μετατροπής του σε μορφή κατάλληλη για ανάλυση.

Αυτή η διαδικασία θα μπορούσε να περιλαμβάνει:

- ✓ Εκχύλιση του αναλύτη από ένα πολύπλοκο δείγμα
- ✓ Προσυγκέντρωση του αναλύτη από πολύ αραιό δείγμα για λήψη μεγαλύτερης συγκέντρωσης που είναι μετρήσιμη
- ✓ Απομάκρυνση ή κάλυψη παρεμποδίσεων
- ✓ Παραγωγοποίηση του αναλύτη σε μια πιο βολική ή πιο εύκολα ανιχνεύσιμη μορφή

Παράδειγμα παραγωγοποίησης:



# Ανάπτυξη μεθόδων στην αεριοχρωματογραφία

Σειρά των αποφάσεων:

1. στόχος της ανάλυσης
2. προετοιμασία του δείγματος
3. ανιχνευτής
4. στήλη
5. έγχυση