

ΤΜΗΜΑ V

Μέθοδοι Διαχωρισμού

**Εισαγωγή στους
Χρωματογραφικούς Διαχωρισμούς**

Εισαγωγή

Οι τεχνικές χημικής ανάλυσης δεν είναι, στην συντριπτική πλειοψηφία τους, εξειδικευμένες. Συνεπώς, πριν από την αναλυτική διαδικασία απαιτείται ο **διαχωρισμός** του αναλύτη από «εν δυνάμει» παρεμποδιστές.

Οι τεχνικές διαχωρισμού εμπίπτουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

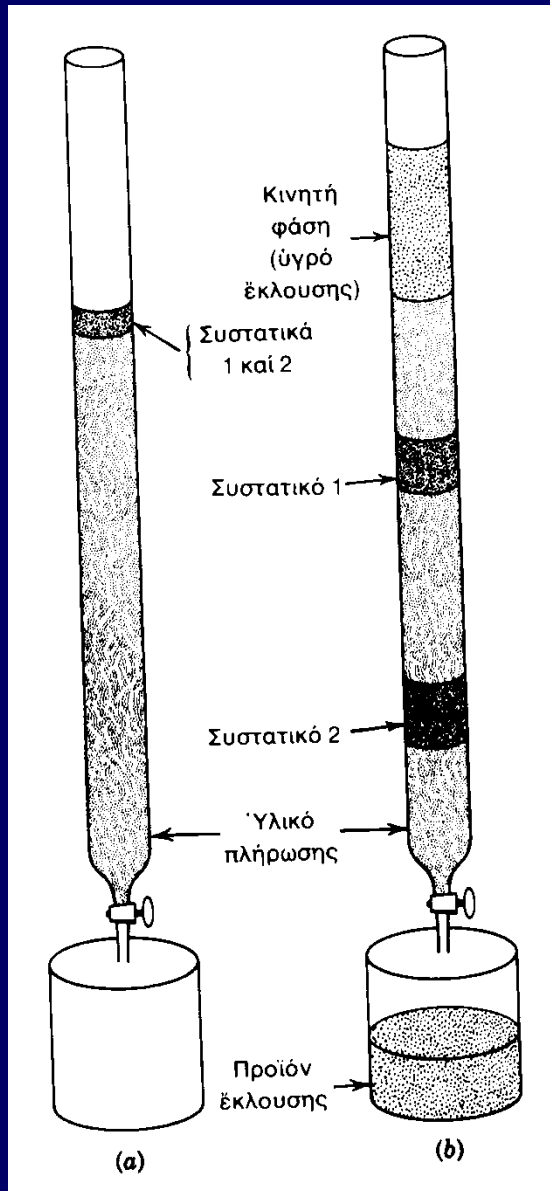
- ο **Χρωματογραφικές**, και
- ο **Ηλεκτροφορητικές**

Η **χρωματογραφία** είναι μια πανίσχυρη τεχνική διαχωρισμού, η οποία βρίσκει εφαρμογή σε κάθε κλάδο της επιστήμης.

Εφευρέθηκε στις αρχές του 20ου αιώνα από τον Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett, ο οποίος χρησιμοποίησε την τεχνική για να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές, όπως οι χλωροφύλλες και οι ξανθοφύλλες.

Η τρομακτική απήχηση των μεθόδων αυτών αποδεικνύεται από το ότι έχει δοθεί ένα **βραβείο Nobel Χημείας** (1952, Martin and Synge) για ανακαλύψεις στο πεδίο, ενώ 12 ακόμα βραβεία Nobel (1937 – 1972) δόθηκαν σε επιστήμονες των οποίων η έρευνα βασίστηκε σε σημαντικό βαθμό σε χρωματογραφικές μεθόδους.

Χρωματογραφία



Με τον όρο «**χρωματογραφία**» εκφράζονται μια ποικιλία από διεργασίες, που όλες στηρίζονται στις διαφορετικές κατανομές των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ δύο φάσεων.

- Ακίνητη Φάση (stationary phase)
- Κινητή Φάση (mobile phase)

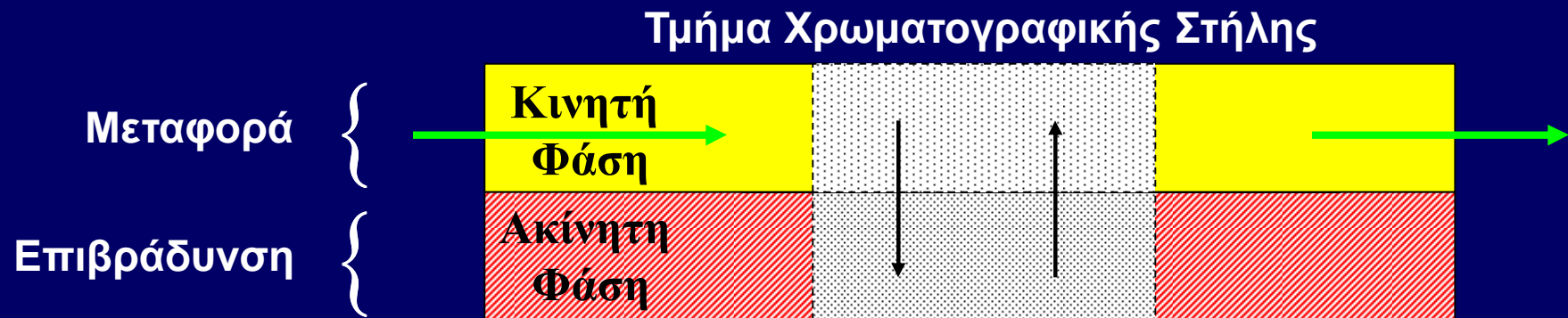
Είδη Χρωματογραφίας

- Χρωματογραφία υγρού – στερεού (προσρόφησης)
- Χρωματογραφία υγρού – υγρού (κατανομής)
- Χρωματογραφία αερίου – στερεού
- Χρωματογραφία αερίου – υγρού
- Χρωματογραφία ιοναταλλαγής
- Χρωματογραφία σε χαρτί
- Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
- Gel filtration
- Ηλεκτροφόρηση συνεχούς ζώνης

Χρωματογραφία

Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, το δείγμα κινείται σε μια **κινητή φάση** (mobile phase) η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή υπερκρίσιμο ρευστό.

Στη συνέχεια, η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας **στατικής φάσης** (stationary phase), η οποία είναι καθηλωμένη σε μια στήλη ή 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 που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους από συστατικά τα οποία κινούνται ταχύτερα.

Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών

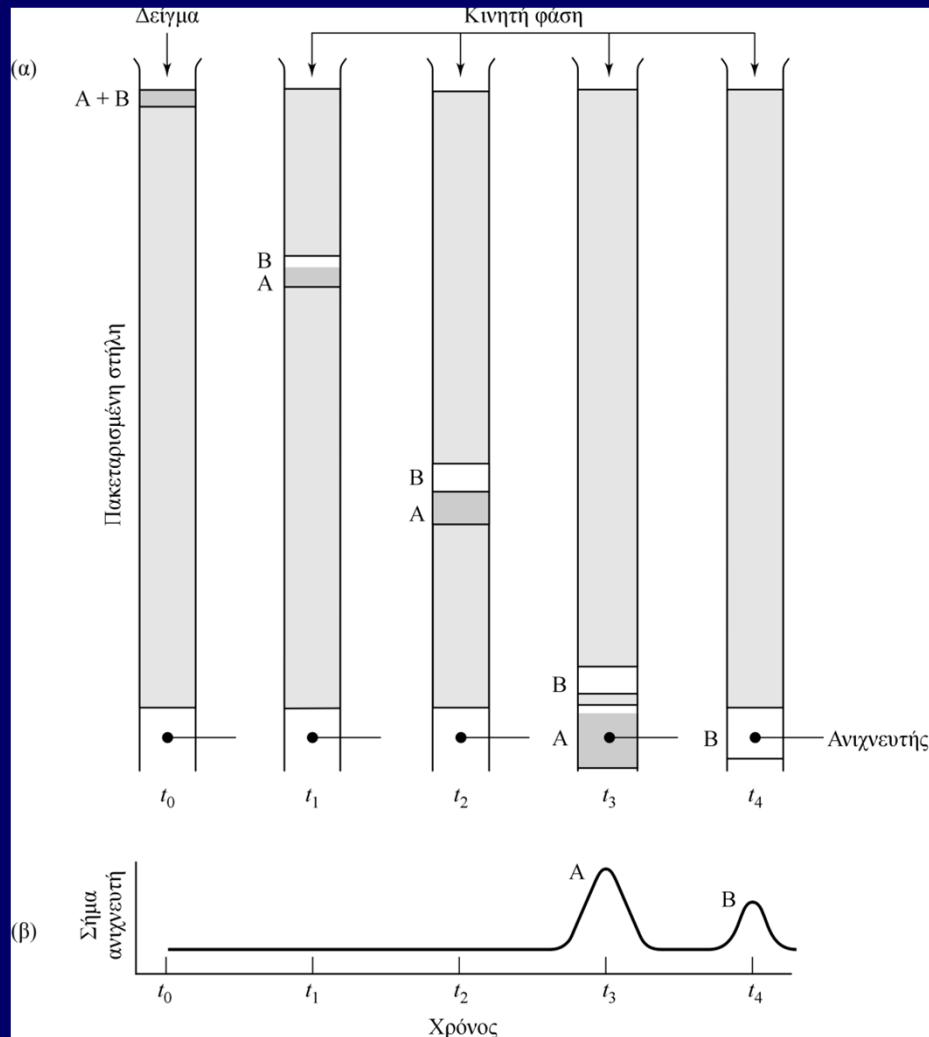
Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με δύο τρόπους:

α) Ανάλογα με το είδος των στατικών και κινητών φάσεων (π.χ. χρωματογραφία στήλης, επίπεδη χρωματογραφία, κ.λ.)

β) Ανάλογα με τον τύπο των κινητών και στατικών φάσεων, και το είδος των ισορροπιών, οι οποίες εμπλέκονται στην ανταλλαγή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των φάσεων.

- Υγροχρωματογραφία
- Αεριοχρωματογραφία
- Χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού

Χρωματογραφία έκλουσης με στήλη



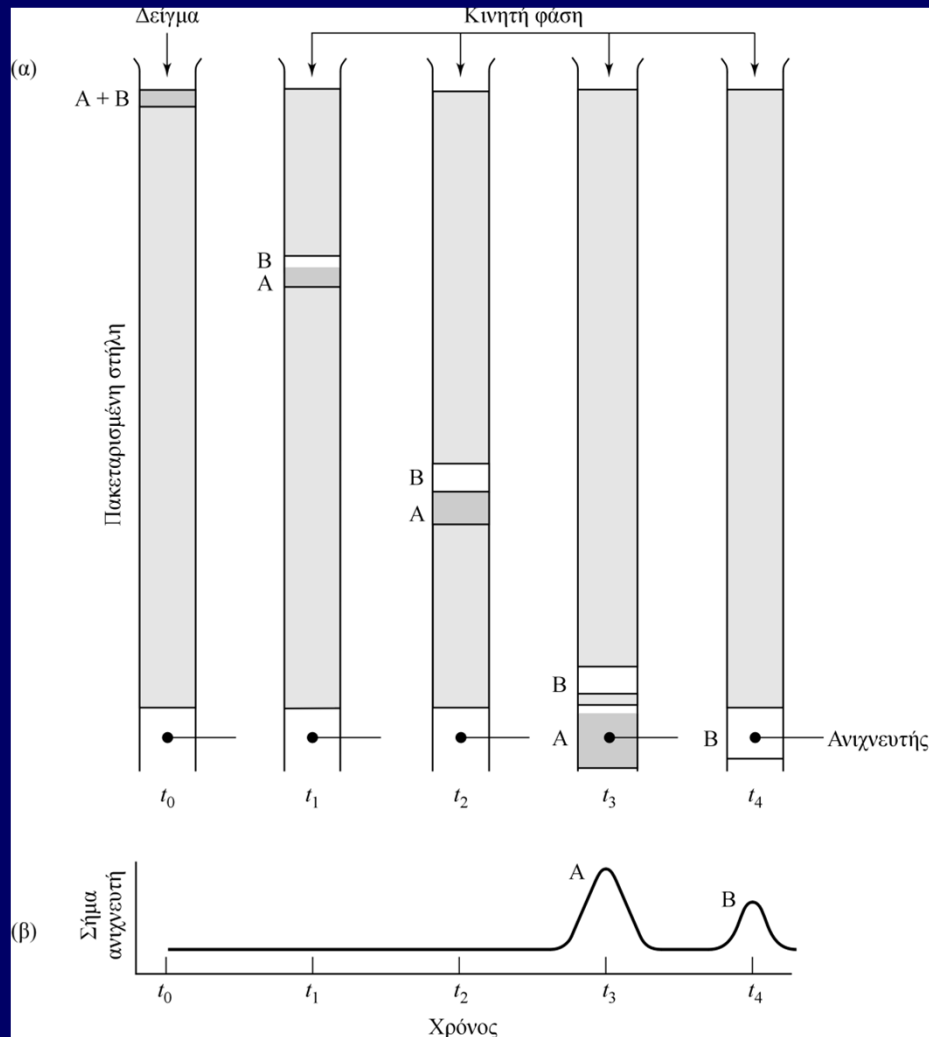
Η μέση ταχύτητα μετακίνησης της κάθε ουσίας προς την έξοδο της στήλης εξαρτάται από το χρονικό κλάσμα παραμονής της ουσίας στη φάση αυτή.

Ιδανικά, οι διαφορές ταχύτητας των ουσιών κατά μήκος της στήλης οδηγούν στο διαχωρισμό τους.

Οι διαχωρισμένες ουσίες μπορούν να ανιχνευθούν και να συλλεχθούν στην έξοδο της στήλης.

Διαχωρισμός μίγματος δύο ουσιών Α και Β με χρωματογραφία έκλουσης στήλης

Αραίωση αναλύτη



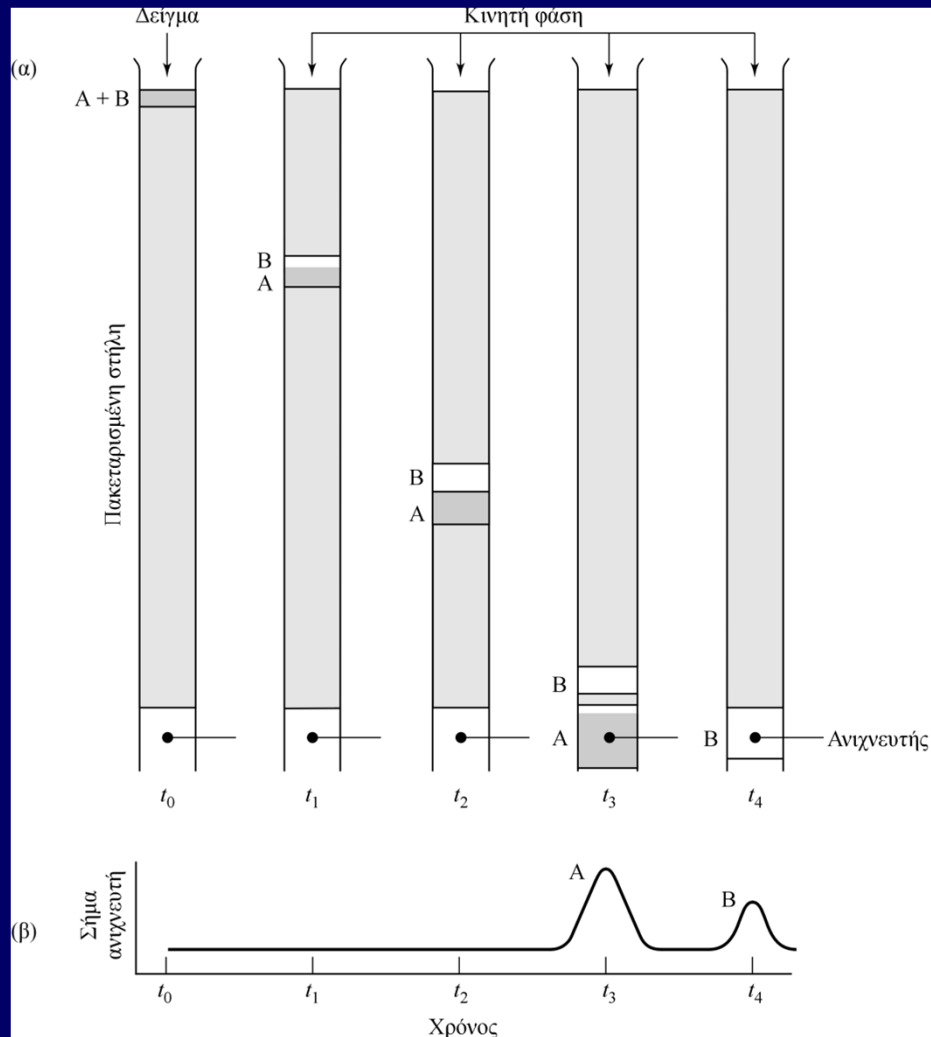
Ο διαχωρισμός των αναλυτών συνοδεύεται σχεδόν πάντοτε και από **αραίωσή** τους.

Το μέγεθος της αρχικής ζώνης είναι σημαντικά **μικρότερο** από το μέγεθος των ζωνών που φθάνουν στον ανιχνευτή.

Οι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές πρέπει να είναι πολύ **ΠΙΟ ευαίσθητοι** από όσο θα χρειαζόταν αν η διαδικασία του διαχωρισμού δεν ήταν απαραίτητη.

Διαχωρισμός μίγματος δύο ουσιών A και B με χρωματογραφία έκλυσης στήλης

Χρωματογραφήματα



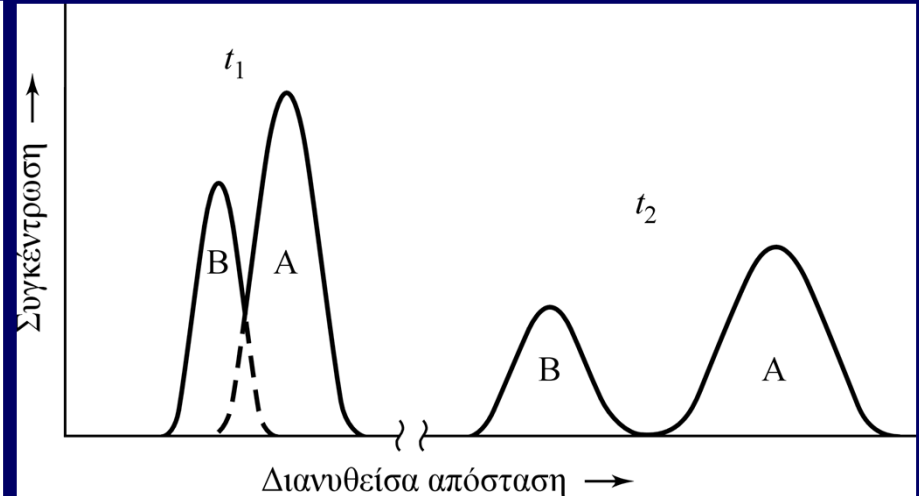
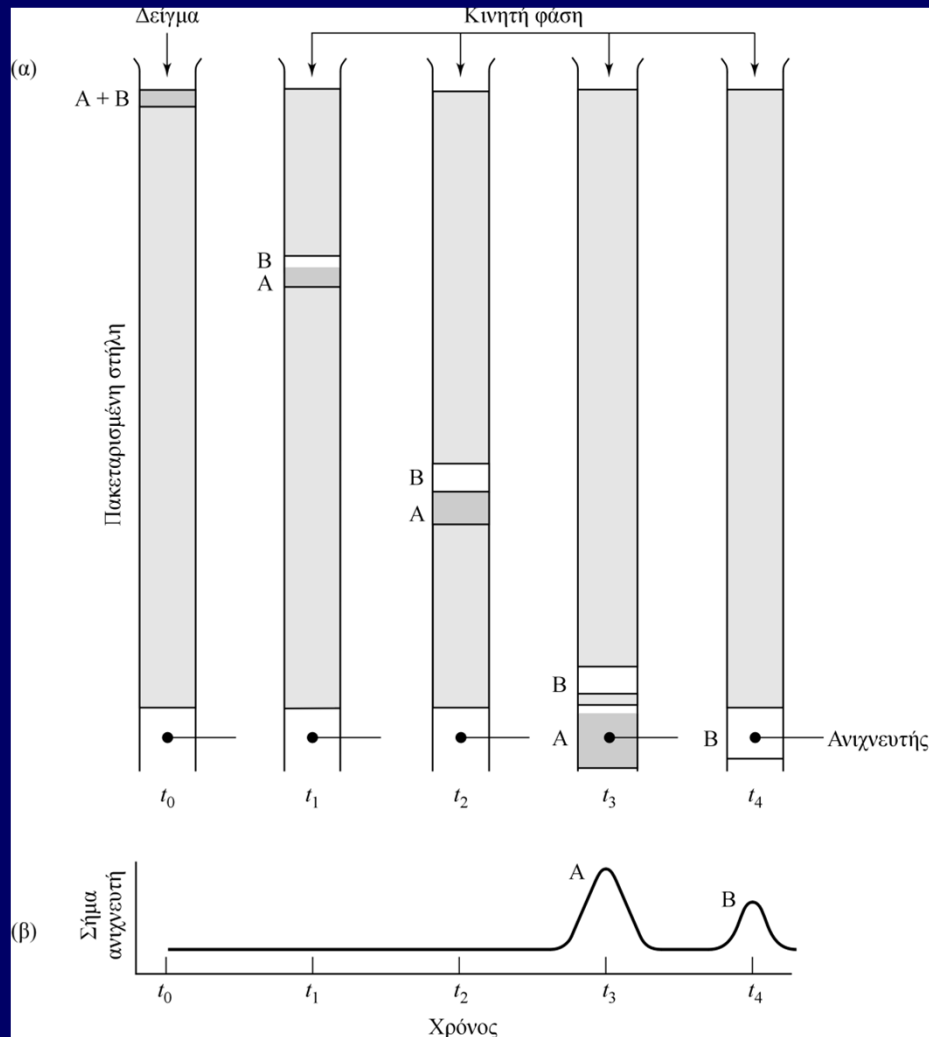
Εάν τοποθετηθεί ανιχνευτής στην έξοδο της στήλης, και το σήμα του καταγράφεται σε συνάρτηση του χρόνου (ή του όγκου της προστιθέμενης κινητής φάσης), λαμβάνεται σειρά κορυφών που ονομάζεται **χρωματογράφημα**.

Η **θέση** μιας κορυφής ως προς τον άξονα του χρόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή της.

Το **εμβαδόν** μιας κορυφής αποτελεί μέτρο της ποσότητας του συστατικού.

Διαχωρισμός μίγματος δύο ουσιών Α και Β με χρωματογραφία έκλουσης στήλης

Διεύρυνση ζώνης και διαχωρισμός

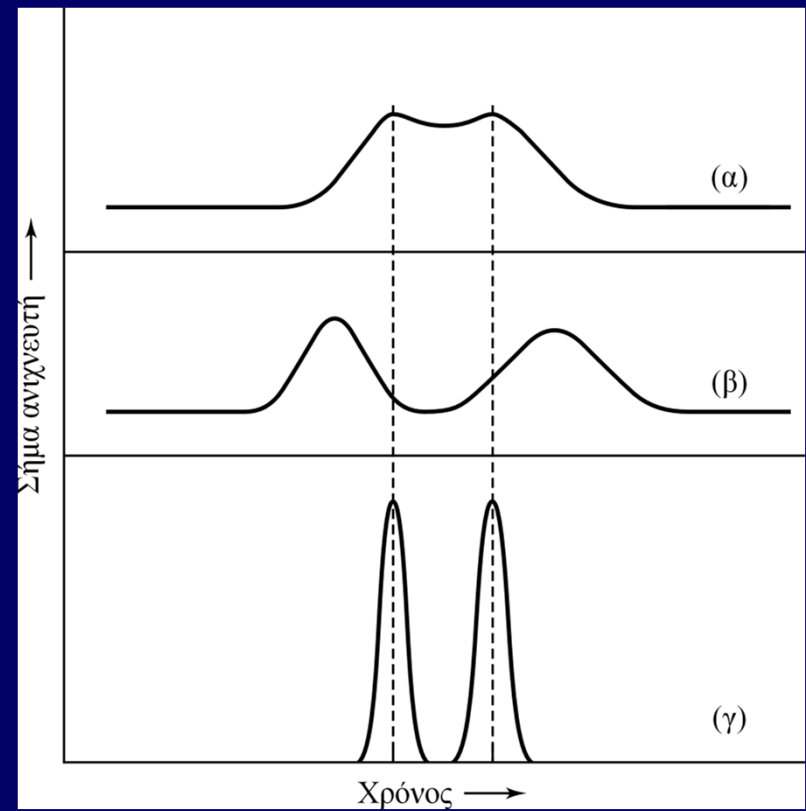
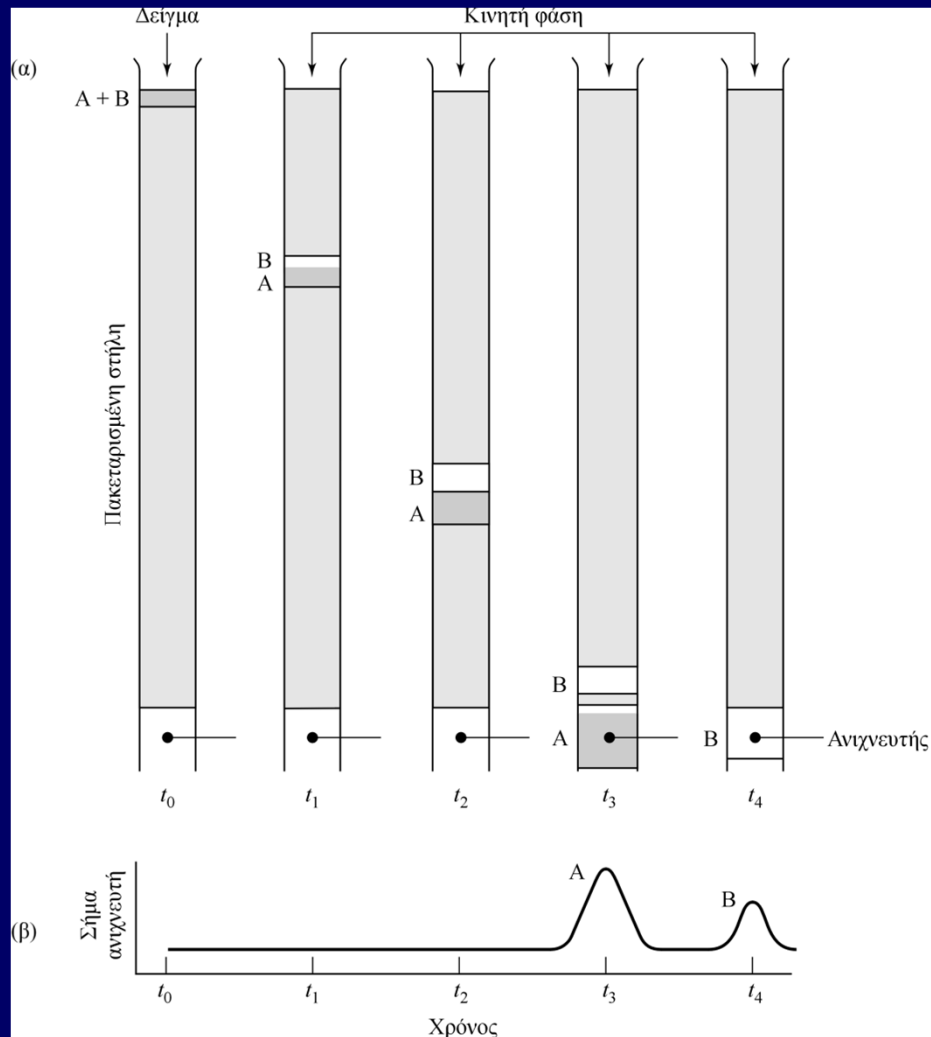


Κατανομές συγκέντρωσης των ζωνών των ουσιών Α και Β τις χρονικές στιγμές t_1 και t_2 .

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

Διαχωρισμός μίγματος δύο ουσιών Α και Β με χρωματογραφία έκλυσης στήλης

Διεύρυνση ζώνης και διαχωρισμός



Απεικόνιση βελτιώσεων που μπορεί να εφαρμοστούν στο διαχωρισμό δύο συστατικών

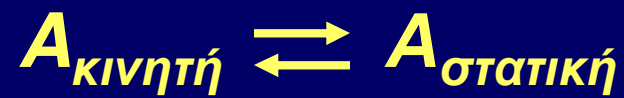
Διαχωρισμός μίγματος δύο ουσιών A και B με χρωματογραφία έκλυσης στήλης

Ταχύτητες μετανάστευσης

Η αποδοτικότητα μιας χρωματογραφικής στήλης για το διαχωρισμό δύο διαλυμένων ουσιών εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από τις **σχετικές ταχύτητες έκλουσης**.

Οι ταχύτητες αυτές καθορίζονται από τις **σταθερές ισορροπίας** των αντιδράσεων, μέσω των οποίων οι ουσίες κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης.

Ισορροπία Κατανομής



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

K είναι η «**Σταθερά Κατανομής**»

C_S είναι η συγκέντρωση στην ακίνητη φάση

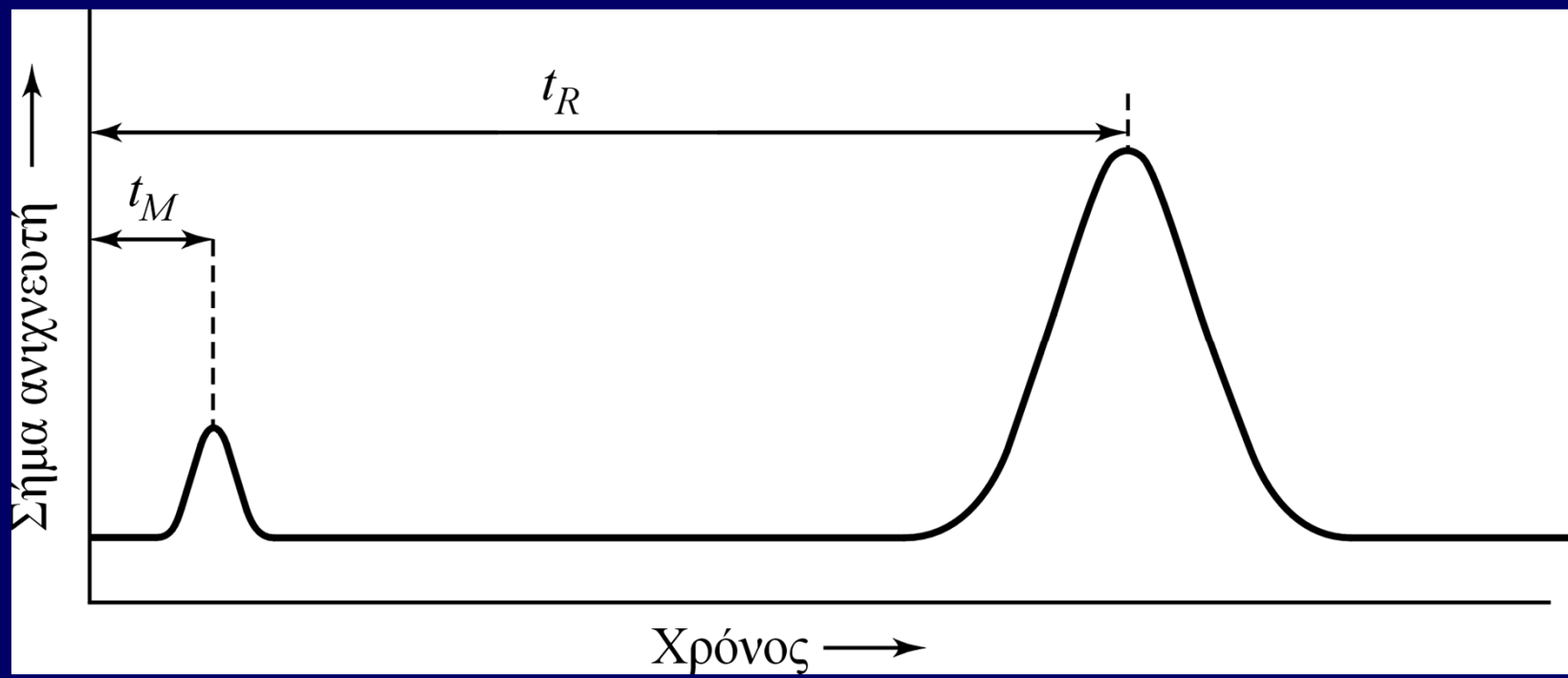
C_M είναι η συγκέντρωση στην κινητή φάση

Ιδανικά, η σταθερά κατανομής, **K**, δε μεταβάλλεται σε ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων της ουσίας (**γραμμική χρωματογραφία**) και χαρακτηρίζεται από συμμετρικές κορυφές τύπου Gauss, καθώς επίσης και από χρόνους κατακράτησης οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι από την ποσότητα της διαχωριζόμενης ουσίας.

Χρόνος κατακράτησης

Χρόνος κατακράτησης είναι ο χρόνος (t_R) που χρειάζεται ένα συστατικό για να διατρέξει όλο το μήκος (L) της στήλης και να φτάσει στον ανιχνευτή.

Νεκρός χρόνος είναι ο χρόνος (t_M) που χρειάζεται ένα συστατικό που δεν κατακρατείται για να φτάσει στον ανιχνευτή.



Τυπικό χρωματογράφημα μίγματος δύο ουσιών

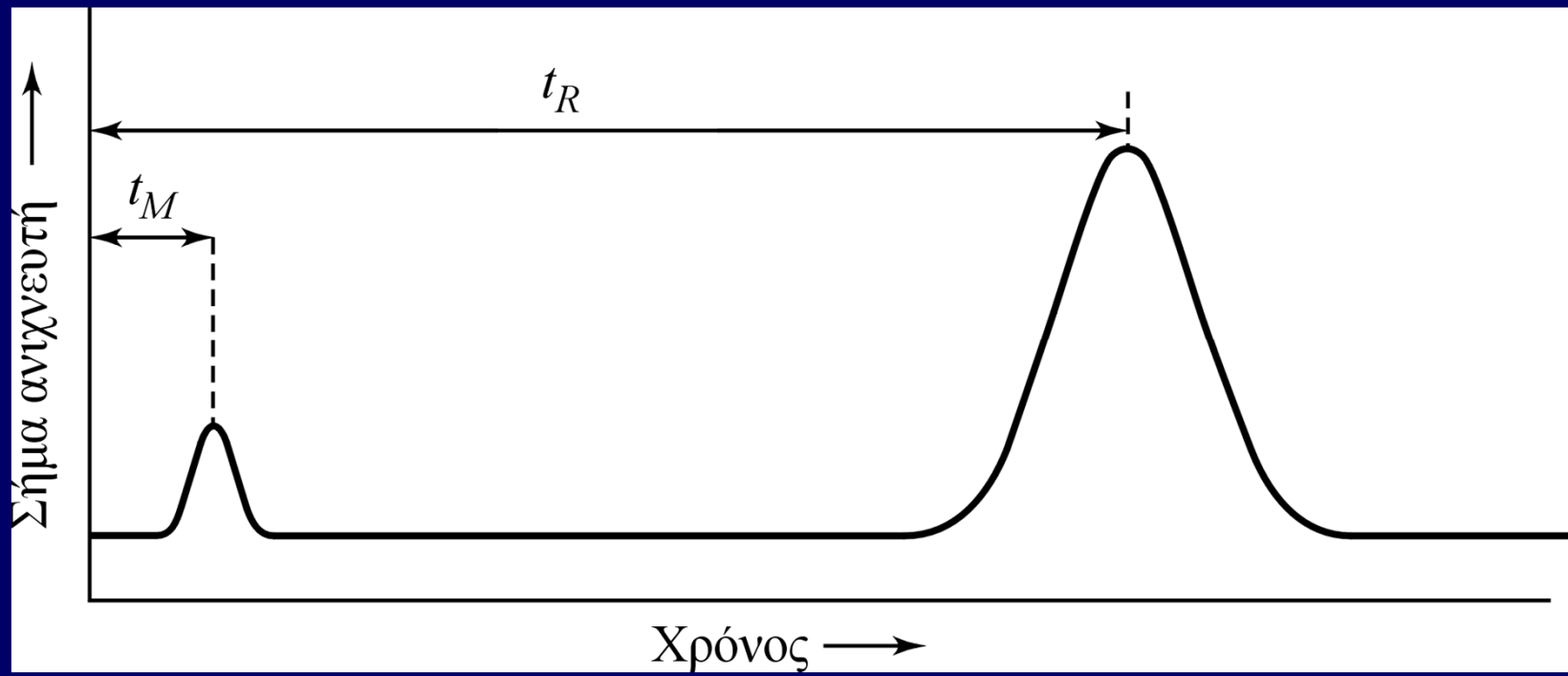
Ταχύτητα μετανάστευσης

Μέση γραμμική ταχύτητα μετανάστευσης του αναλύτη:

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

Μέση γραμμική ταχύτητα των μορίων της κινητής φάσης:

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



Τυπικό χρωματογράφημα μίγματος δύο ουσιών

Σχέση μεταξύ t_R και K

Μια ουσία που προωθείται σε χρωματογραφική στήλη **μετακινείται** μόνο όταν βρίσκεται στην κινητή φάση.

Το **κλάσμα** του χρόνου κατά τον οποίο η ουσία βρίσκεται στην κινητή φάση είναι:

Κλάσμα του χρόνου στην κινητή φάση = $\frac{\text{Γραμμομόρια ουσίας στην κινητή φάση}}{\text{Ολικά γραμμομόρια της ουσίας}}$

$$= \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} = \frac{1}{1 + KV_S / V_M} = \frac{1}{1 + k'}$$

**Παράγοντας
κατακράτησης**

$$k' = \frac{KV_S}{V_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M}$$

Σχέση μεταξύ t_R και K

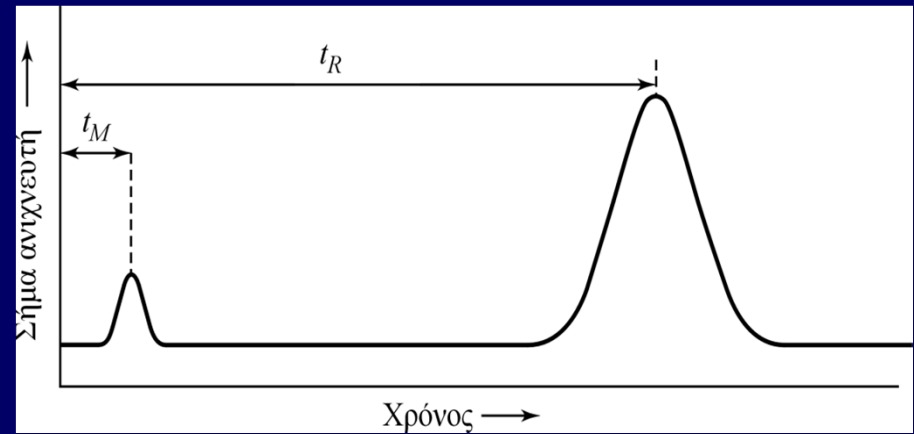
$$\text{Ταχύτητα μετακίνησης ουσίας του δείγματος} = u \cdot \frac{1}{1+k'}$$

u = Ταχύτητα της κινητής φάσης

$$k' = \frac{KV_S}{V_M}$$

Εξαρτάται από:

- Τη γραμμική ταχύτητα (u)
- Το λόγο V_S/V_M
- Τη σταθερά κατανομής (K), **χαρακτηριστικό μέγεθος του κάθε συστατικού**



$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} = u \cdot \frac{1}{1+k'} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1+k'} \Rightarrow k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

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

Βέλτιστοι διαχωρισμοί για παράγοντες κατακράτησης στην περιοχή:

$$2 < k' < 10$$

Παράγοντας εκλεκτικότητας

Ο παράγοντας εκλεκτικότητας μιας στήλης για δύο ουσίες A και B ορίζεται ως

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

όπου K_B και K_A είναι οι σταθερές κατανομής για την ισχυρότερα και την ασθενέστερα κατακρατούμενη ουσία, αντίστοιχα. Με βάση τον ορισμό αυτό, ο a είναι πάντοτε μεγαλύτερος από τη μονάδα.

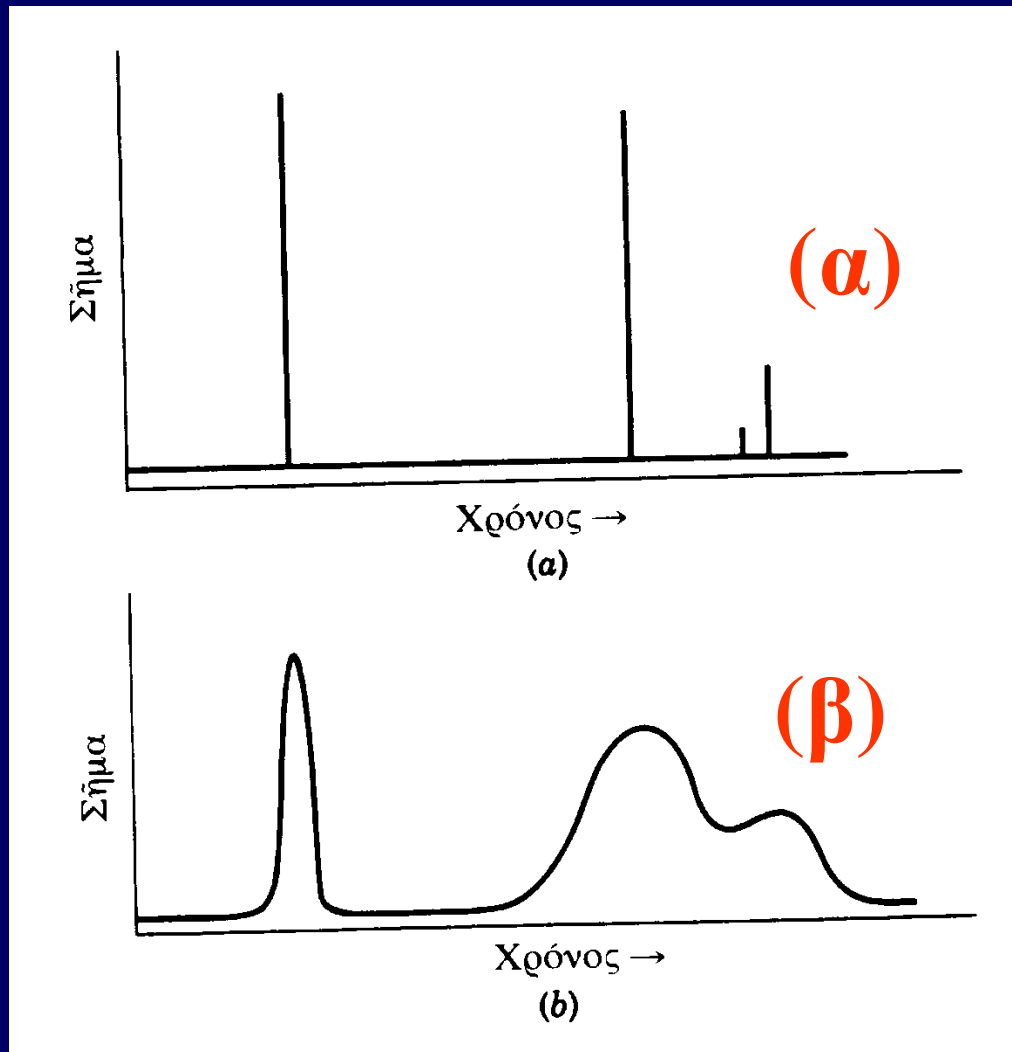
$$k' = \frac{KV_S}{V_M} \longrightarrow a = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Συσχέτιση με τους παράγοντες κατακράτησης

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \longrightarrow a = \frac{(t_R)_A - t_M}{(t_R)_B - t_M}$$

Προσδιορισμός από τα δεδομένα χρωματογραφήματος

Διεύρυνση ζώνης και αποδοτικότητα στήλης



Διεύρυνση των κορυφών έκλουσης

(α) Ιδανική συμπεριφορά

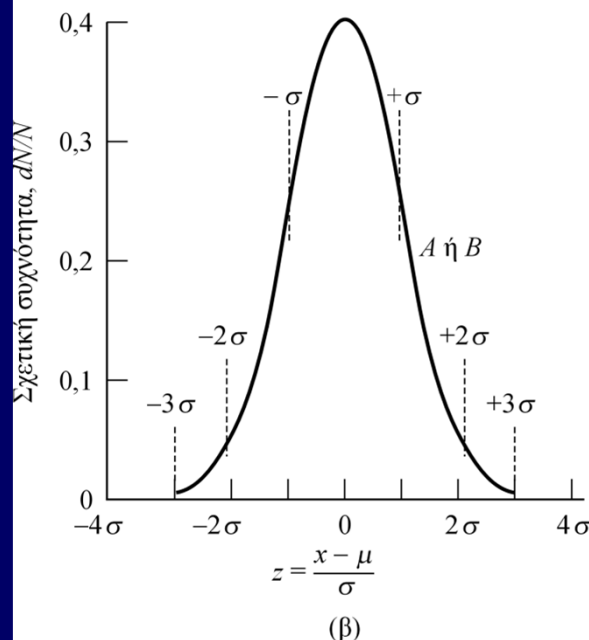
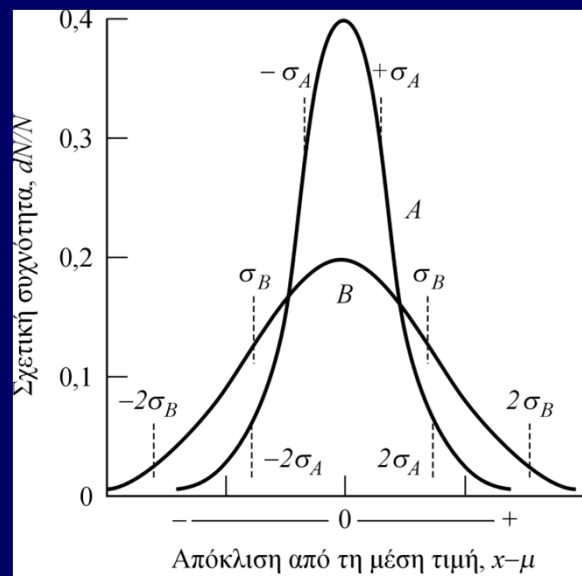
- Οξείες, συμμετρικές κορυφές
- Καλός διαχωρισμός

(β) Μη-ιδανική συμπεριφορά

- Διεύρυνση κορυφών
- Κακός διαχωρισμός

Η **θεωρία της ταχύτητας** της χρωματογραφίας ερμηνεύει επιτυχώς και με ποσοτικό τρόπο τα σχήματα των κορυφών και την επίδραση διαφόρων πειραματικών μεταβλητών στο εύρος τους

Νόμος κανονικής κατανομής σφάλματος

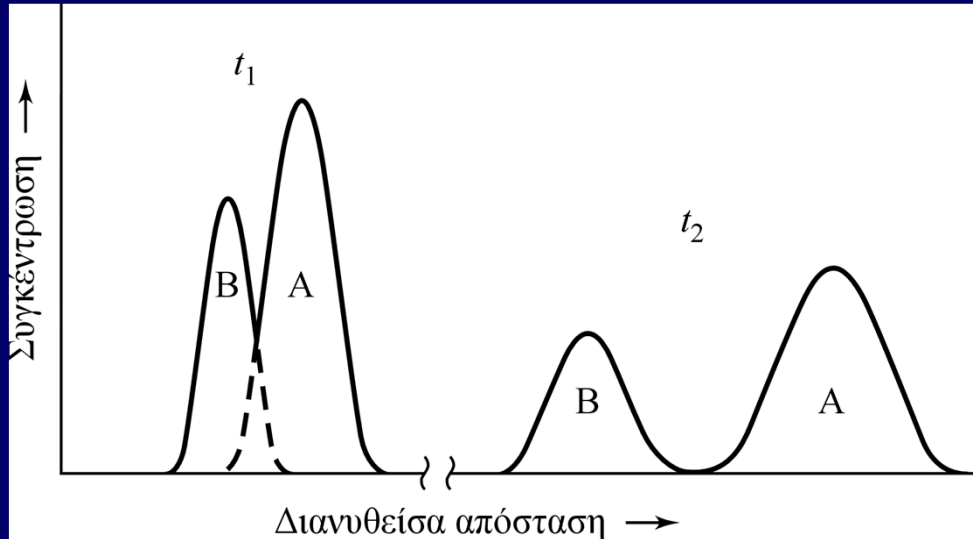


Στη στατιστική Gauss, τα αποτελέσματα επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, που προκύπτουν από την ύπαρξη απροσδιόριστων (τυχαίων) σφαλμάτων, θεωρούνται ότι κατανέμονται σύμφωνα με το **νόμο της κανονικής κατανομής σφάλματος**.

Οι καμπύλες κανονικού σφάλματος ερμηνεύονται θεωρώντας ότι η αβεβαιότητα, η οποία συνδέεται με κάθε απλή μέτρηση, στην πραγματικότητα είναι **άθροισμα** ενός μεγάλου αριθμού μικρών, ανεξάρτητων μεταξύ τους τυχαίων αβεβαιοτήτων.

Καμπύλες κανονικού σφάλματος. Η τυπική απόκλιση της καμπύλης B είναι διπλάσια από εκείνη της A ($\sigma_B=2\sigma_A$)

Σχήμα χρωματογραφικών κορυφών



Κατανομές συγκέντρωσης των ζωνών των ουσιών A και B τις χρονικές στιγμές t_1 και t_2 .

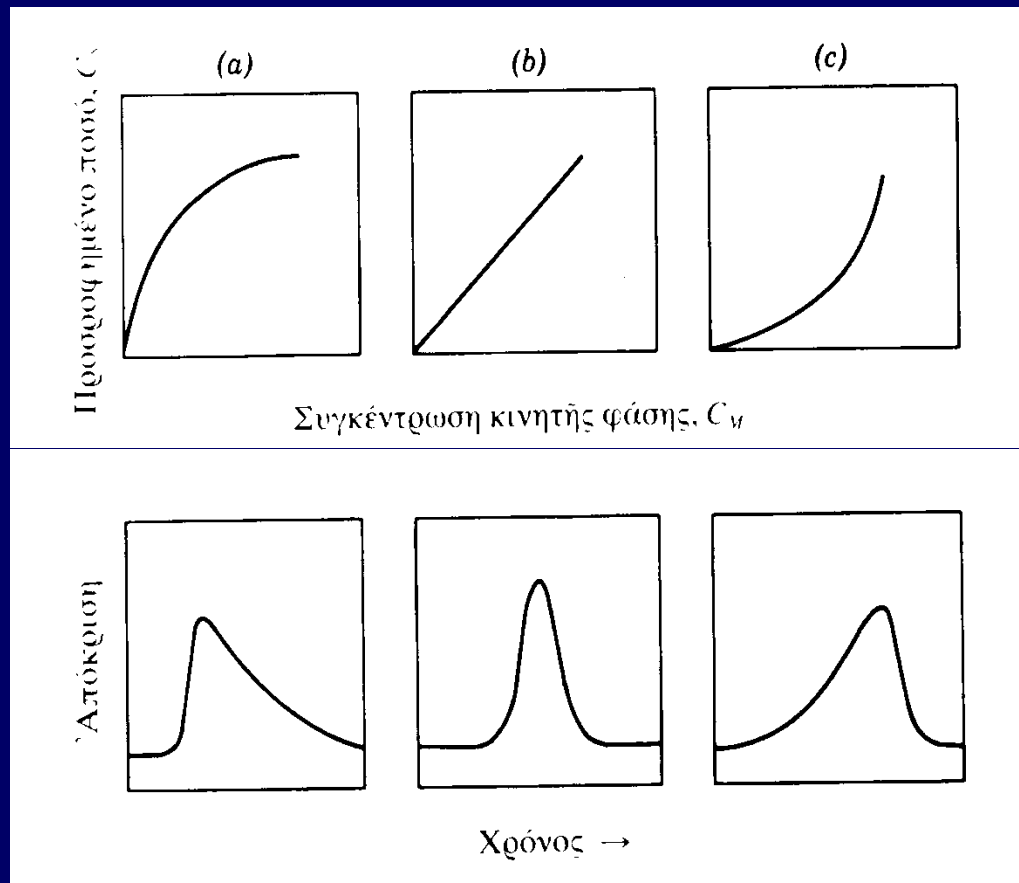
Γενικά, διαπιστώνεται μια ομοιότητα των κορυφών ενός χρωματογραφήματος με τις καμπύλες κανονικής κατανομής σφαλμάτων (**καμπύλες Gauss**).

Κατά τρόπο ανάλογο με την ερμηνεία των καμπυλών Gauss, η μορφή μιας χρωματογραφικής ζώνης μπορεί να αποδοθεί στον **προσθετικό συνδυασμό** τυχαίων κινήσεων τεράστιου αριθμού μορίων της διαλυμένης ουσίας.

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

- ο **απευθείας ανάλογο προς το χρόνο παραμονής** της ουσίας στη στήλη
- ο **αντιστρόφως ανάλογο προς την ταχύτητα ροής** της κινητής φάσης

Σχήμα χρωματογραφικών κορυφών



Ισόθερμες ρόφησης και η επίδρασή τους στο σχήμα της κορυφής έκλουσης

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι χρωματογραφικές κορυφές χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση **ουράς** ή από την εμφάνιση **μετώπου**.

Κοινή αιτία των παραμορφώσεων αυτών είναι μια **μη γραμμική σταθερά κατανομής**.

Οι παραμορφώσεις αυτές είναι ανεπιθύμητες, επειδή κατά κανόνα οδηγούν σε κακούς διαχωρισμούς και λιγότερο επαναλήψιμους χρόνους έκλουσης.

Μέθοδοι περιγραφής της αποδοτικότητας

Για την ποσοτική περιγραφή της αποδοτικότητας μιας χρωματογραφικής στήλης χρησιμοποιούνται δύο συγγενείς όροι:

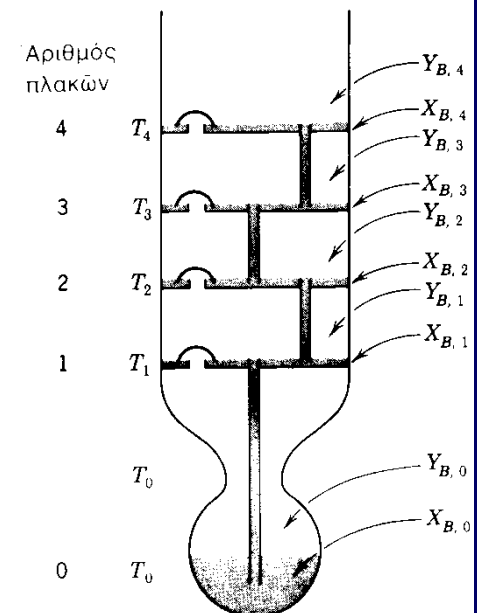
- ο **ύψος της πλάκας**, H , και
- ο **αριθμός των πλακών**, N .

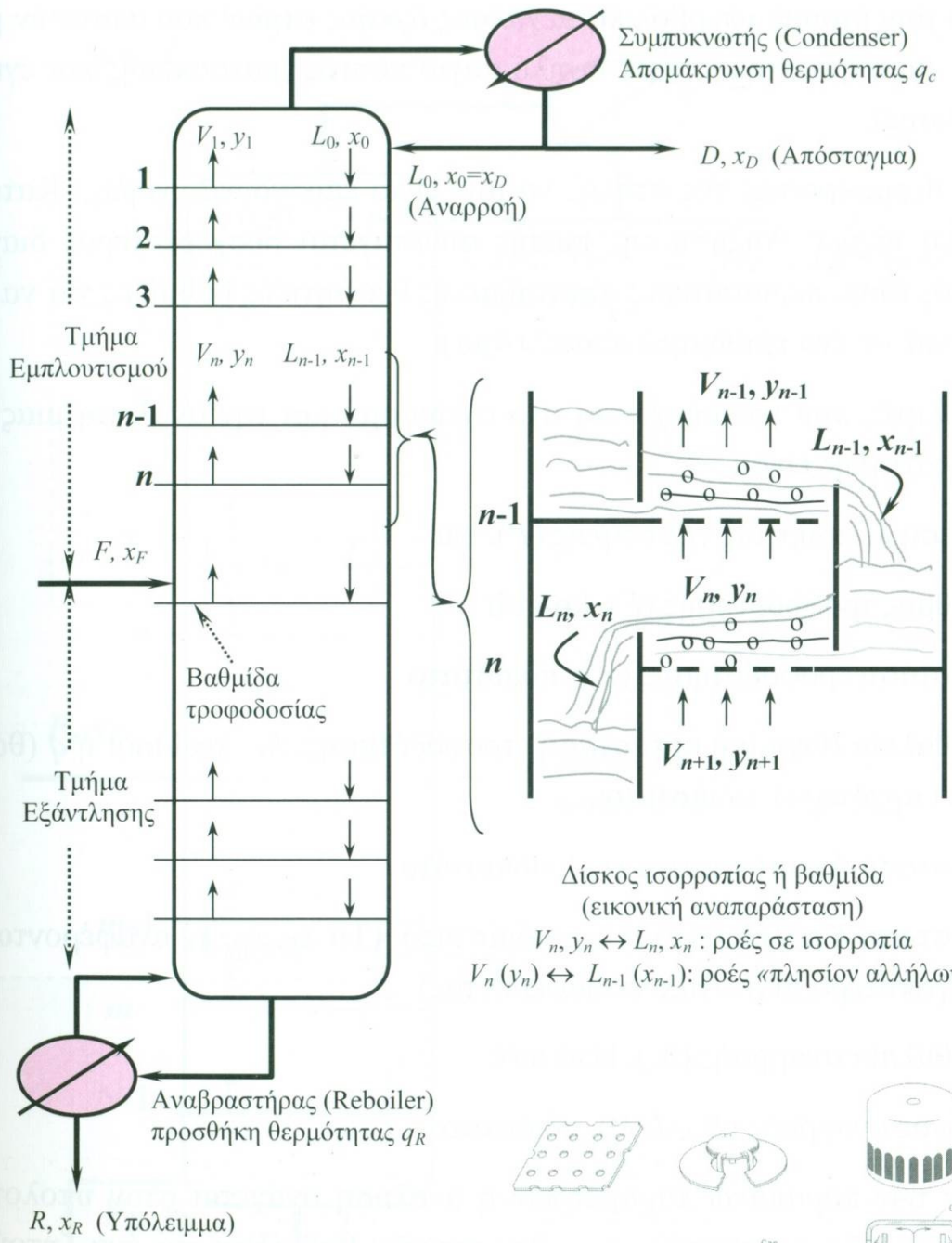
Οι δύο όροι συνδέονται με τη σχέση:
$$N = \frac{L}{H}$$

Όπου L είναι το μήκος του πληρωμένου τμήματος της στήλης

Η δημιουργία των όρων H και N από τους Martin και Synge έγινε θεωρώντας την χρωματογραφική στήλη ως ανάλογη με την αποστακτική στήλη (κλασματική απόσταξη), η οποία αποτελείται από έναν αριθμό διακριτών αλλά ασυνεχών στενών θαλάμων που ονομάζονται **θεωρητικές πλάκες**.

Κίνηση των ουσιών προς την έξοδο της στήλης θεωρείται ως βήμα προς βήμα **μεταφορά της εξισορροπημένης κινητής φάσης** από τη μία πλάκα στην άλλη.





Η θεωρία των πλακών – Ύψος πλάκας

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

Λόγω ομοιότητας των χρωματογραφικών ζωνών με τις καμπύλες Gauss, είναι βολικός ο ορισμός της αποδοτικότητας μιας στήλης σε **μεταβλητότητα ανά μονάδα μήκους της στήλης**.

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (cm)$$

Ποσοτικά κριτήρια αξιολόγησης

Μέτρα αξιολόγησης της επαναληψιμότητας των αναλυτικών μεθόδων

Απόλυτη τυπική απόκλιση, **s**

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Σχετική τυπική απόκλιση, **RSD**

$$RSD = \frac{s}{x}$$

Τυπική απόκλιση της μέσης τιμής, **s_m**

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

Συντελεστής μεταβλητότητας, **CV**

$$CV = \frac{s}{x} \times 100\%$$

Μεταβλητότητα (ή διακύμανση), **s^2**

$$s^2$$

Η θεωρία των πλακών – Ύψος πλάκας

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

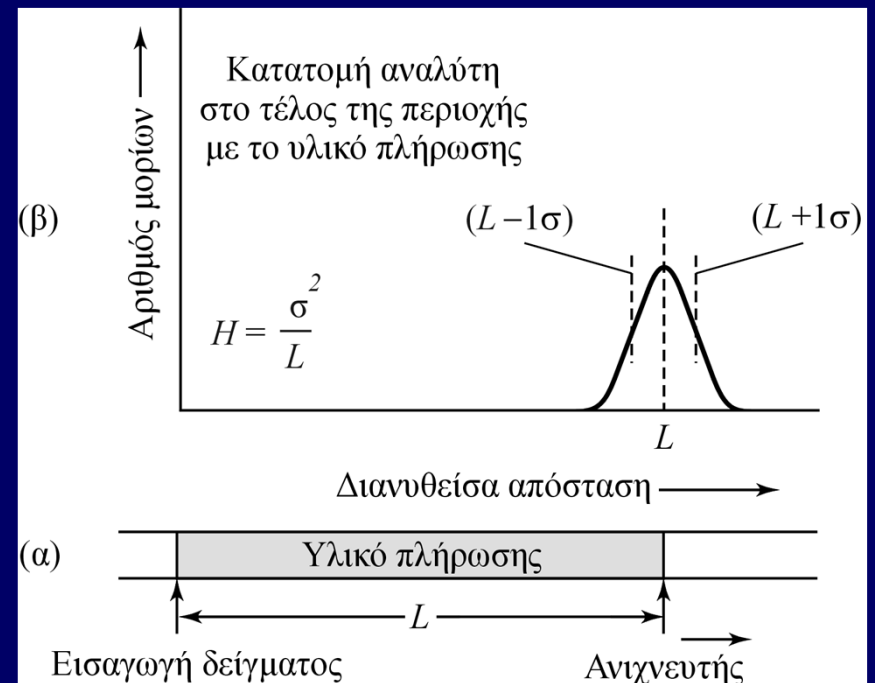
Λόγω ομοιότητας των χρωματογραφικών ζωνών με τις καμπύλες Gauss, είναι βολικός ο ορισμός της αποδοτικότητας μιας στήλης σε **μεταβλητότητα ανά μονάδα μήκους της στήλης**.

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (cm)$$

Το H αντιστοιχεί σε γραμμική απόσταση (στην έξοδο της στήλης) το οποίο περιέχει κλάσμα του αναλύτη που βρίσκεται μεταξύ των θέσεων $L-\sigma$ και L .

Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη που αντιστοιχεί στην περιοχή αυτή είναι το **34%** του συνολικού.

Άρα, στο H περιέχεται το **34%** της ποσότητας του αναλύτη.



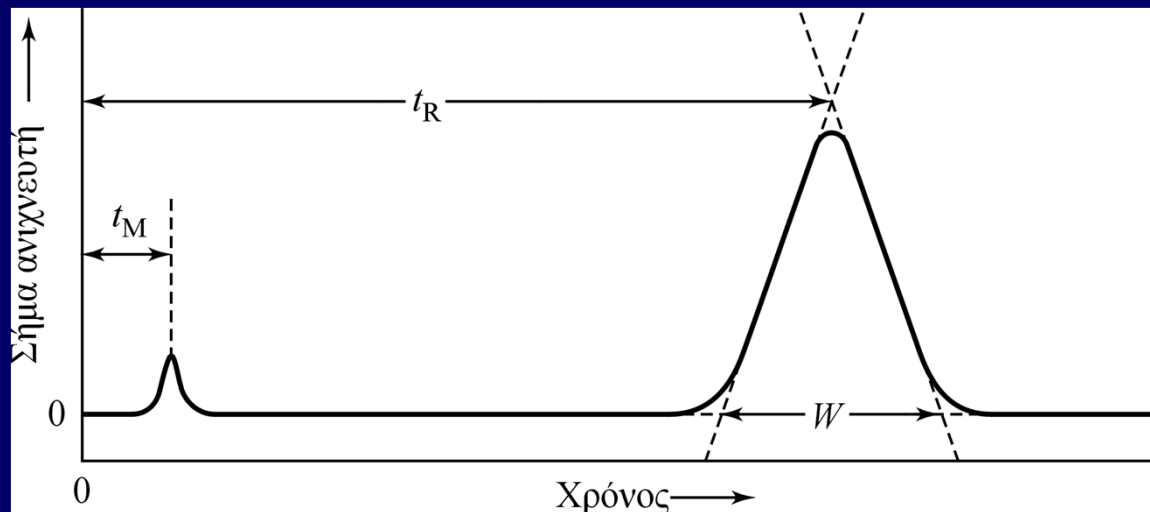
Ορισμός του ύψους πλάκας

Πειραματική εκτίμηση των H και N

Σε ένα χρωματογράφημα, η μεταβλητότητα μιας κορυφής, τ^2 (sec^2), συνδέεται με το σ^2 (cm^2) με τη σχέση:

$$\tau = \frac{\sigma}{L/t_R}$$

Όπου L/t_R είναι η μέση γραμμική ταχύτητα της ουσίας σε cm/s .



Γραφική μέθοδος υπολογισμού της τυπικής απόκλισης, τ , μιας χρωματογραφικής κορυφής

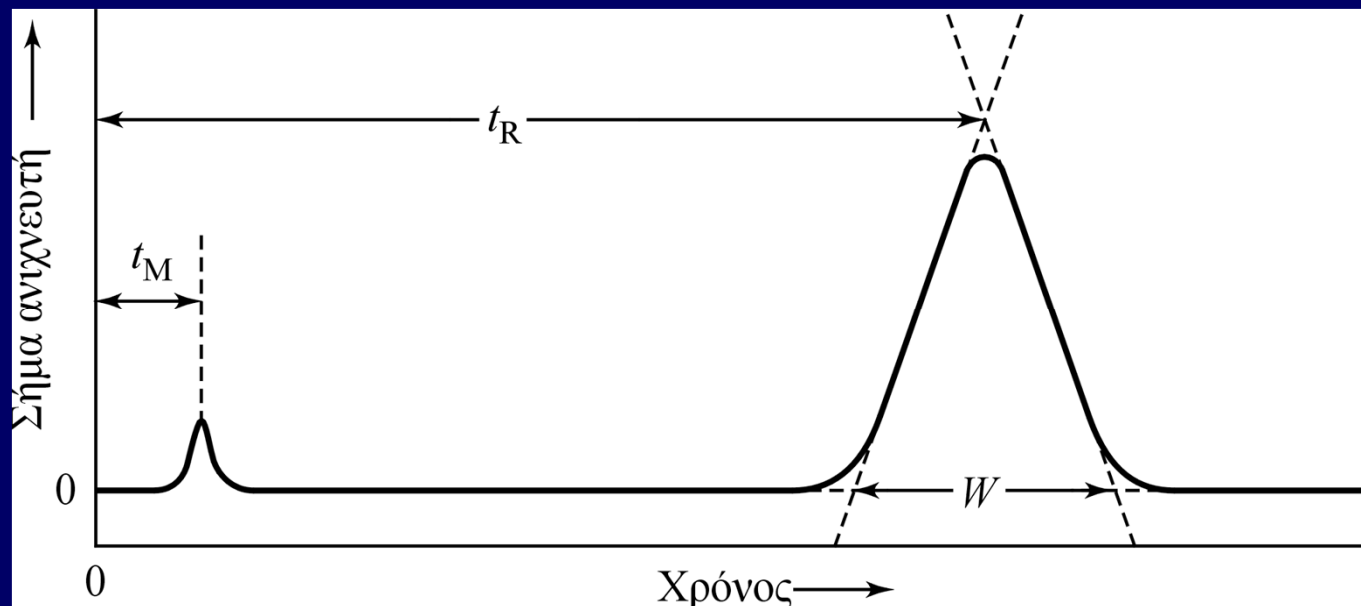
Το τ και το σ μπορούν να υπολογιστούν προσεγγιστικά από ένα πειραματικό χρωματογράφημα.

Ο υπολογισμός γίνεται με βάση τις διαστάσεις του τριγώνου που σχηματίζεται από τις εφαπτόμενες στα σημεία καμπής στις δύο πλευρές της κορυφής.

Πειραματική εκτίμηση των H και N

Η επιφάνεια του τριγώνου είναι περίπου το 96% της επιφάνειας κάτω από την κορυφή, η οποία, σε μία κορυφή Gauss, περικλείεται στο διάστημα $\pm 2\sigma$ από το σημείο του μεγίστου.

Στην περίπτωση του παρακάτω σχήματος, οι τομές των πλευρών του τριγώνου με τη γραμμή βάσης βρίσκονται περίπου στο $\pm 2\tau$. Άρα $W=4\tau$.



Γραφική μέθοδος υπολογισμού της τυπικής απόκλισης, τ , μιας χρωματογραφικής κορυφής

Πειραματική εκτίμηση των H και N

$$\tau = \frac{\sigma}{L/t_R}$$

$$W = 4\tau$$

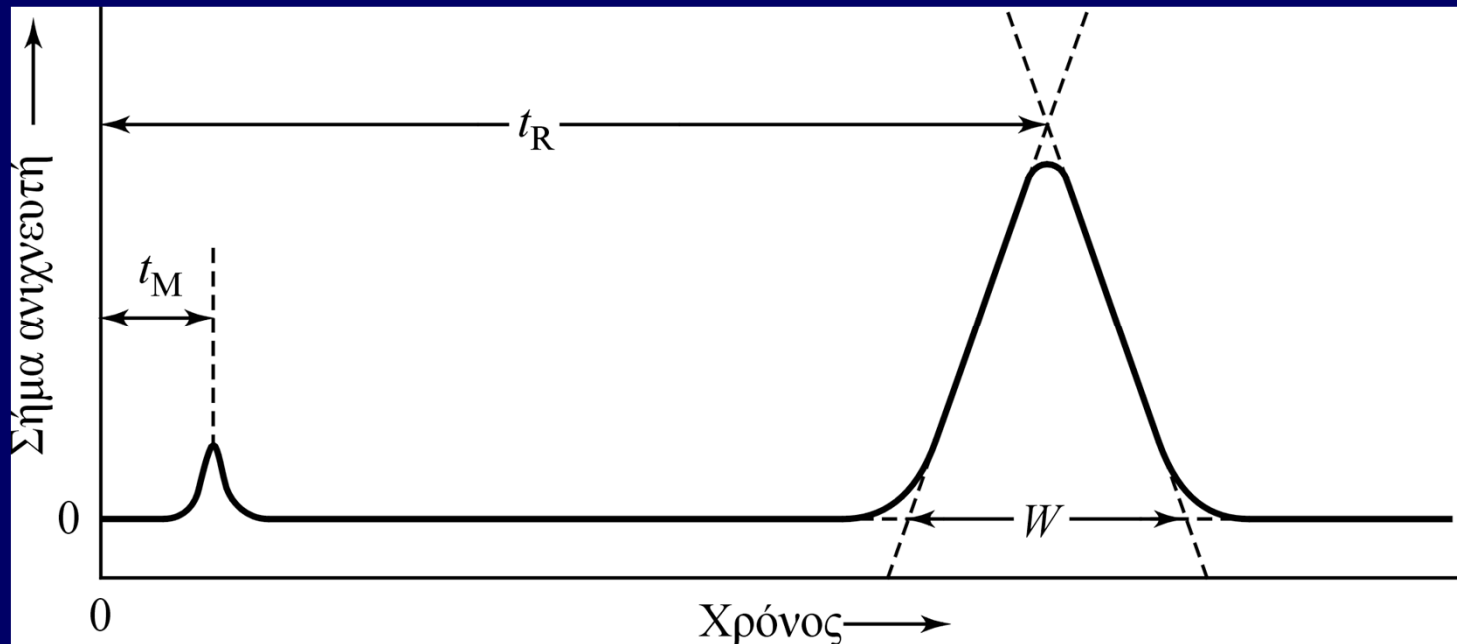
$$\sigma = \frac{LW}{4t_R}$$

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \Rightarrow$$

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2}$$

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

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

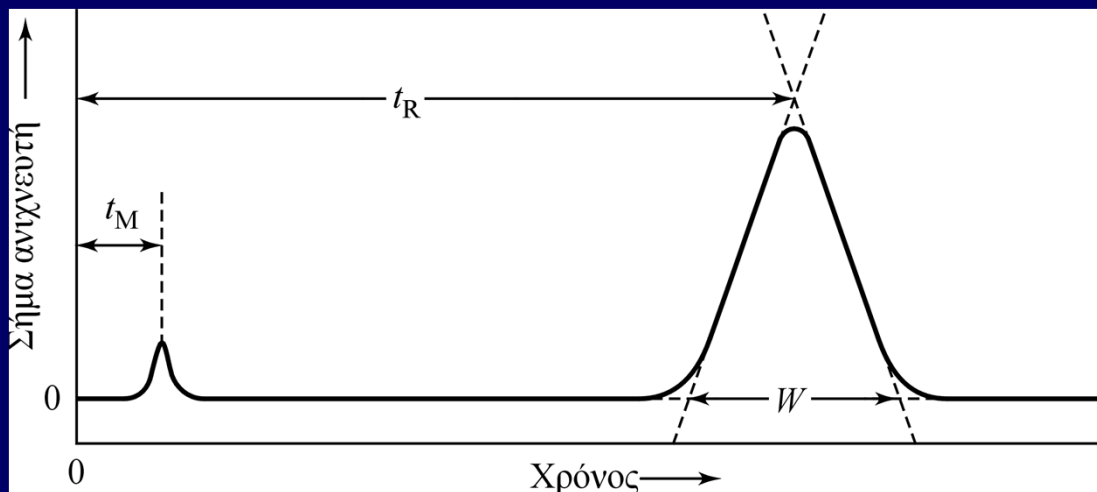


Γραφική μέθοδος υπολογισμού της τυπικής απόκλισης, τ .

Πειραματική εκτίμηση των H και N

Μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των θεωρητικών πλακών N με δύο μετρήσεις χρόνου, δηλαδή των t_R και W .

Στη συνέχεια, μπορεί να υπολογιστεί το ύψος της πλάκας, H , αν είναι γνωστό το μήκος του πληρωμένου τμήματος της στήλης, L .



$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2}$$

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

Ο αριθμός των πλακών, N , και το ύψος της πλάκας H χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη βιβλιογραφία και από τους κατασκευαστές οργάνων ως μέτρα απόδοσης των στηλών.

Για να έχουν νόημα οι συγκρίσεις, οι τιμές των H και L θα πρέπει να υπολογίζονται με την ίδια ένωση.

Άσκηση

Ο χρόνος συγκράτησης των ουσιών A και B, σε στήλη μήκους 30,0 cm, είναι 16,40 και 17,63 min, αντίστοιχα. Το πλάτος των κορυφών A και B (στη γραμμή βάσης) είναι 1,11 και 1,21 min, αντίστοιχα. Να υπολογιστούν:

(α) ο μέσος αριθμός θεωρητικών πλακών της στήλης, (β) το μέσο ύψος της θεωρητικής πλάκας.

(α) Αριθμός θεωρητικών πλακών

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

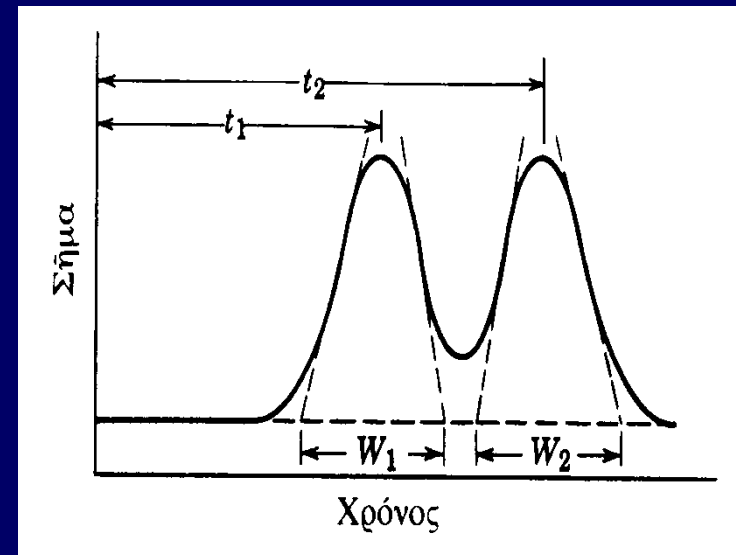
$$N_A = 16 \left(\frac{16,40}{1,11} \right)^2 = 3493$$

$$N_B = \dots\dots = 3397$$

$$N = 3445$$

(β) Μέσο ύψος πλάκας

$$H = \frac{L}{N} \Rightarrow H = 8.7 \times 10^{-3} \text{ cm}$$



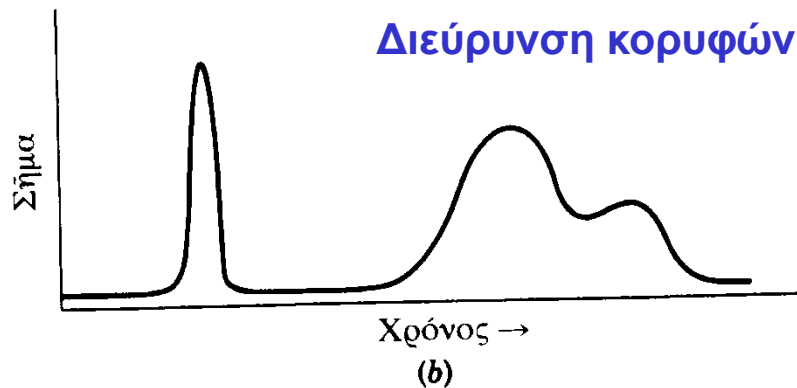
Μεταβλητές που επιδρούν στην απόδοση

Η **διεύρυνση** μιας χρωματογραφικής κορυφής είναι αποτέλεσμα της πεπερασμένης ταχύτητας με την οποία πραγματοποιούνται διάφορες διεργασίες μεταφοράς μάζας κατά τη μετανάστευση μιας ουσίας κατά μήκος της στήλης.

Ιδανική συμπεριφορά



Διεύρυνση κορυφών



Ορισμένες από τις ταχύτητες αυτές είναι δυνατόν να ελεγχθούν με **ρύθμιση** ορισμένων πειραματικών μεταβλητών, γεγονός που επιτρέπει τη βελτίωση των διαχωρισμών.

Οι μεταβλητές αυτές επιδρούν στην αποδοτικότητα της στήλης ή, ισοδύναμα, στο ύψος θεωρητικής πλάκας, **H**.

Μεταβλητές που επιδρούν στην απόδοση

<u>Μεταβλητή</u>	<u>Σύμβολο</u>	<u>Μονάδες</u>
Γραμμική ταχύτητα κινητής φάσης	u	cm s^{-1}
Συντελεστής διάχυσης στην κινητή φάση ^(*)	D_M	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Συντελεστής διάχυσης στην στατική φάση ^(*)	D_S	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Παράγοντας κατακράτησης ^(**)	k'	αριθμός
Διάμετρος του υλικού πλήρωσης	d_p	cm
Πάχος της υγρής επικάλυψης της στατικής φάσης	d_f	cm

(*) Αυξάνει με αύξηση της θερμοκρασίας και με μείωση του ιξώδους

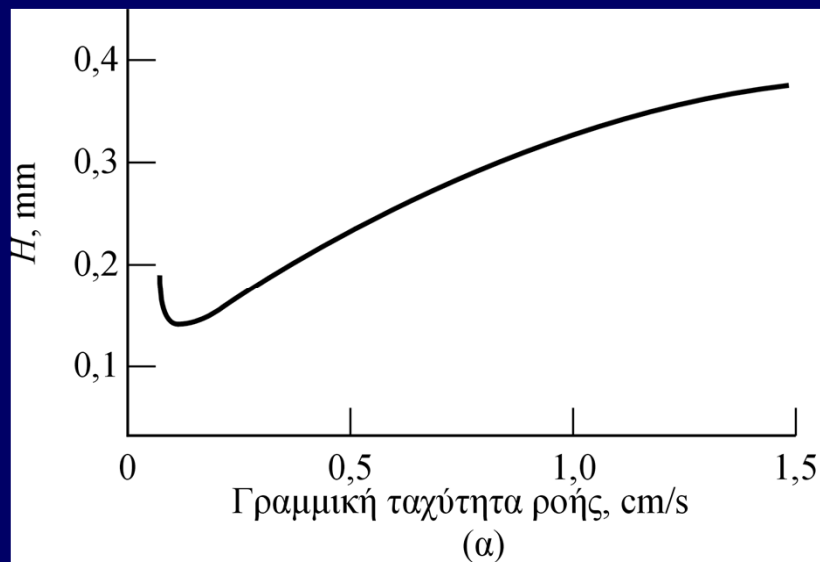
$$(**) k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Επίδραση της ταχύτητας ροής

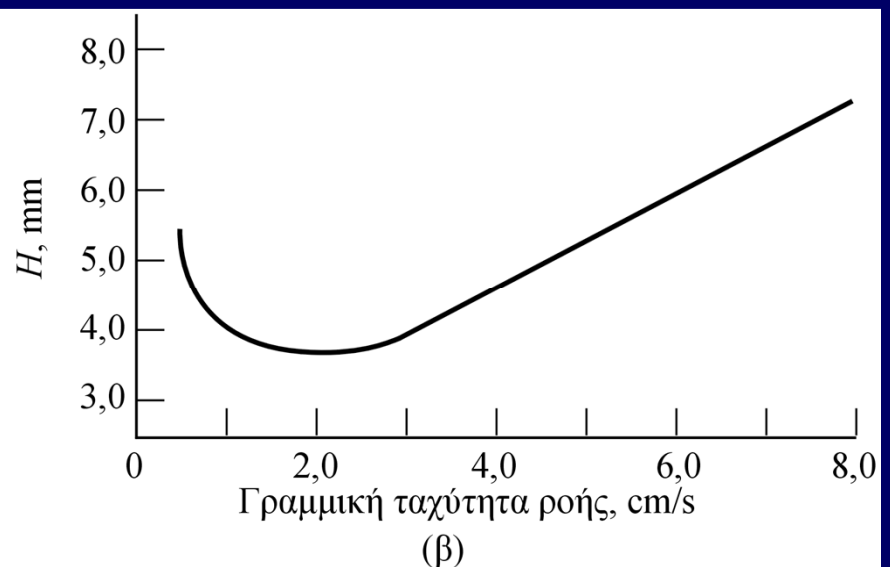
Η επίδραση κινητικών παραγόντων στην αποδοτικότητα μιας στήλης εξαρτάται από το **χρόνο επαφής** μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Ο χρόνος αυτός εξαρτάται από την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.

Για το λόγο αυτό, οι μελέτες αποδοτικότητας αφορούν κυρίως στον προσδιορισμό του **H** ως συνάρτηση της κινητής φάσης, **u** .

(α) Υγροχρωματογραφία



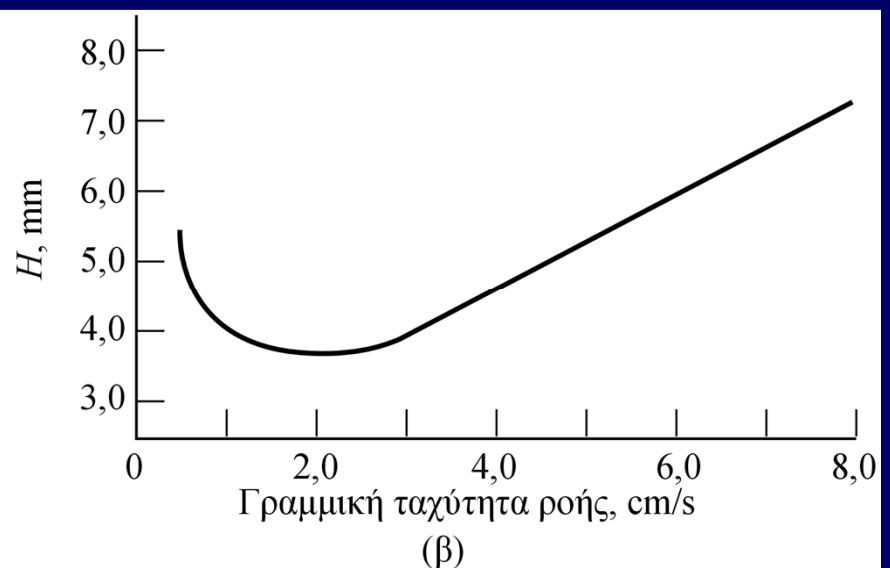
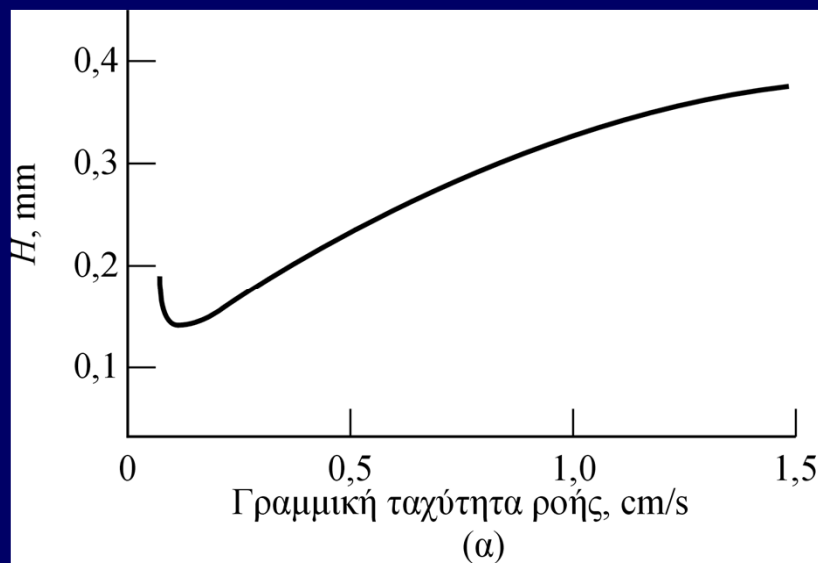
(β) Αεριοχρωματογραφία



Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης στο ύψος πλάκας

Επίδραση της ταχύτητας ροής

- Ελάχιστο H αντιστοιχεί σε μέγιστη αποδοτικότητα στήλης
- Οι **ταχύτητες ροής** στην υγροχρωματογραφία είναι σημαντικά μικρότερες (πιο αργός διαχωρισμός).
- Τα **ύψη των πλακών** στις στήλες υγροχρωματογραφίας είναι κατά μια τάξη μεγέθους μικρότερα (το πλεονέκτημα αντισταθμίζεται από το μικρό μήκος των στήλων).
- Ο **ολικός αριθμός πλακών** είναι συνήθως μεγαλύτερος στις αεριοχρωματογραφικές στήλες (γενικά, ταχύτεροι διαχωρισμοί με μεγαλύτερη αποδοτικότητα).

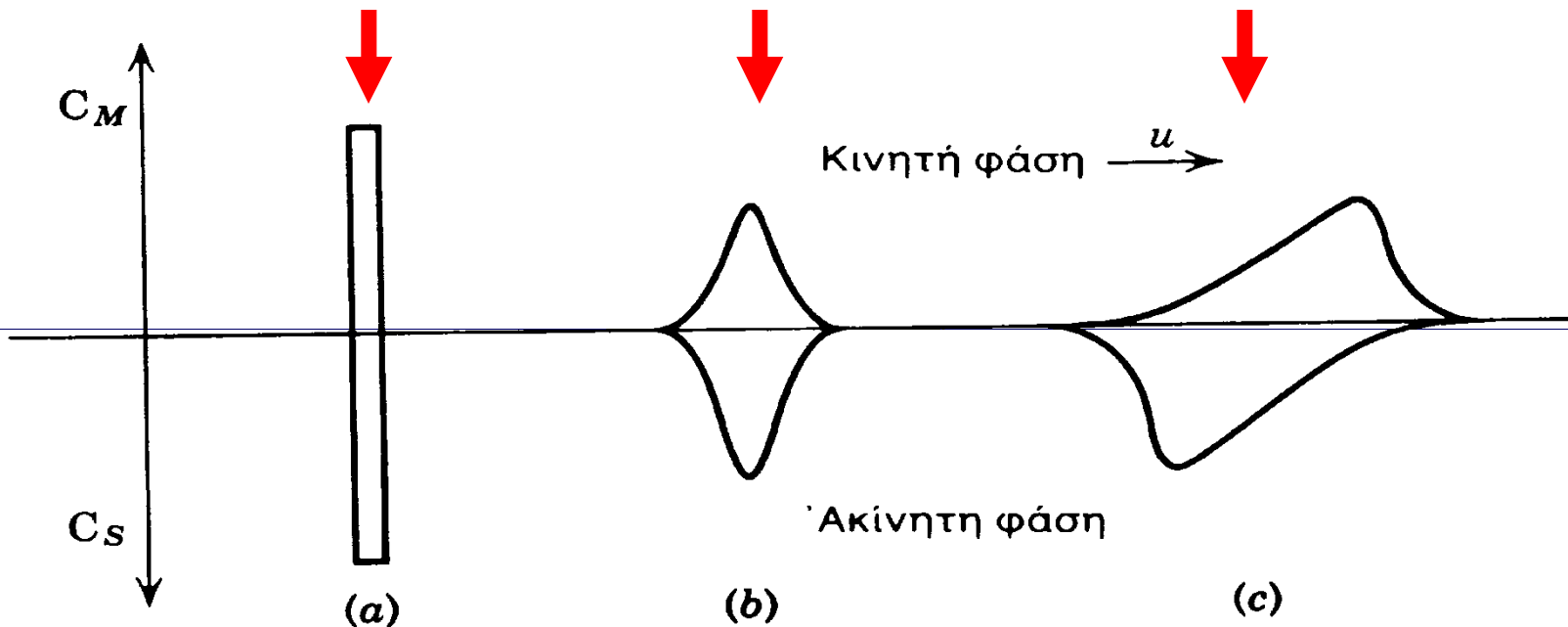


Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης στο ύψος πλάκας

Σχέση μεταξύ H και μεταβλητών στήλης

Υπάρχουν τρεις βασικοί λόγοι που κάνουν την τιμή του H μεγαλύτερη από την ιδανική τιμή του μηδενός.

- Τα μόρια της ουσίας ακολουθούν **διαδρομές διαφορετικού μήκους** και, άρα, φθάνουν στην έξοδο σε διαφορετικούς χρόνους.
- **Διαμήκης διάχυση** από περιοχές υψηλών συγκεντρώσεων σε περιοχές χαμηλών συγκεντρώσεων.
- Η αποκατάσταση της ισορροπίας δεν είναι στιγμιαία. Ο λόγος C_S/C_M είναι μεγαλύτερος ή μικρότερος από το K .



Σχέση μεταξύ H και μεταβλητών στήλης

$H =$ Συνεισφορά από άνισες διαδρομές + Συνεισφορά από διάχυση κατά μήκος της στήλης + Συνεισφορά από μη-ισορροπία

Πολλαπλότητα
διαδρομών ροής

Διαμήκης
διάχυση

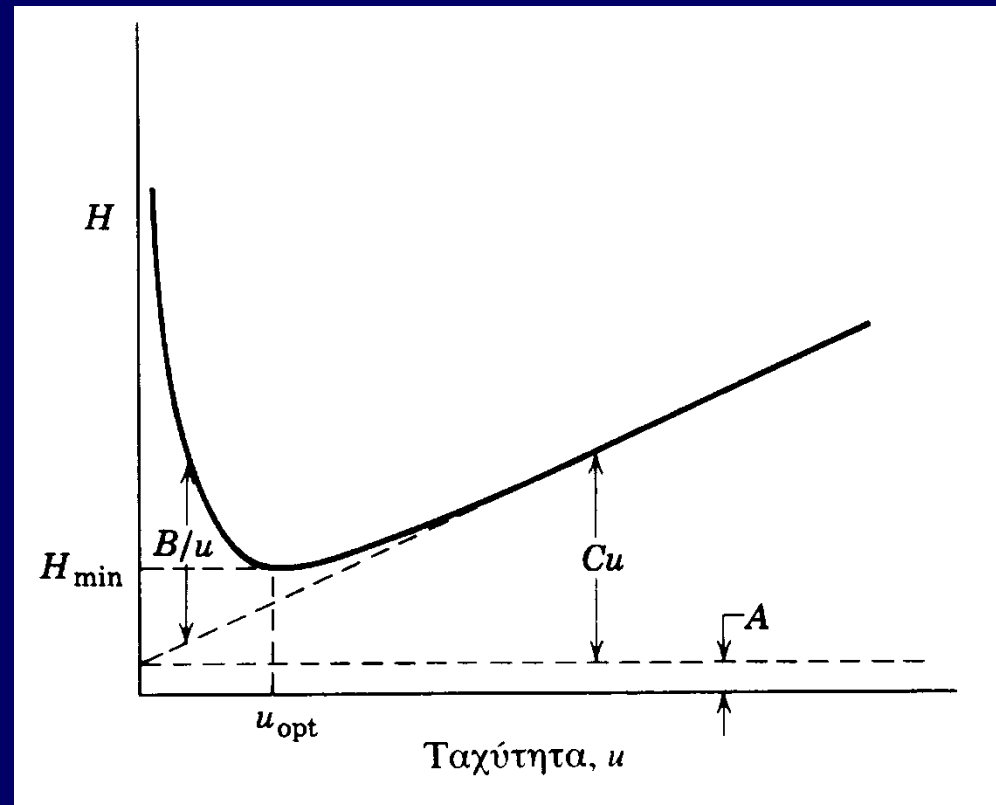
Μεταφορά
μάζας

Η εξίσωση van Deemter

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

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M)u$$

Συνεισφορά των όρων της εξίσωσης Van Deemter σε συνάρτηση της ταχύτητας της κινητής φάσης



Σχέση μεταξύ H και μεταβλητών στήλης

Όρος διαμήκους διάχυσης

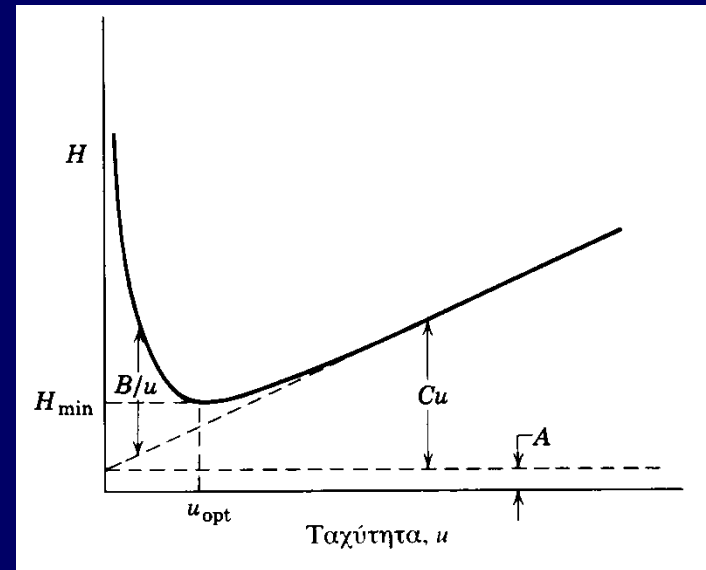
Η διεύρυνση των κορυφών οφείλεται στην διάχυση της ουσίας από το πυκνό κέντρο της ζώνης προς το αραιότερο πρόσθιο ή οπίσθιο τμήμα της, δηλαδή κατά την κατεύθυνση ροής της κινητής φάσης και αντίθετα προς αυτή.

Ο όρος είναι ανάλογος προς τον συντελεστή διάχυσης της κινητής φάσης, D_M :

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

Η συμμετοχή του όρου είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την ταχύτητα της κινητής φάσης.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M)u$$



D_M : Σταθερά ίση με την ταχύτητα μετανάστευσης ανά μονάδα βαθμίδας συγκέντρωσης (cm^2/s).

γ : παράγοντας παρακώλυσης

Σχέση μεταξύ H και μεταβλητών στήλης

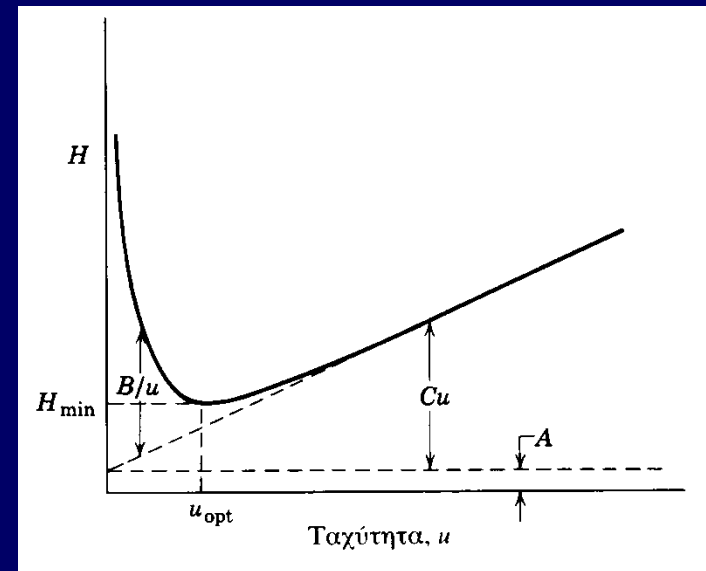
Συντελεστές μεταφοράς μάζας

Η ανάγκη εισαγωγής των δύο συντελεστών μεταφοράς μάζας C_S και C_M στην εξίσωση οφείλεται στο ότι η αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ κινητής και στατικής φάσης είναι τόσο αργή, ώστε η χρωματογραφική στήλη λειτουργεί πάντοτε σε **συνθήκες μη-ισορροπίας**.

Έτσι, τα μόρια του αναλύτη στο μέτωπο της ζώνης παρασύρονται πριν ακόμα βρουν το χρόνο να εξισορροπήσουν με τη στατική φάση, ώστε να κατακρατηθούν.

Με ανάλογο τρόπο, η μη-ισορροπία στο οπίσθιο τμήμα της ζώνης οδηγεί στην εμφάνιση «ουράς» γιατί τα μόρια της στατικής φάσης δεν παρασύρονται από την ταχέως κινούμενη κινητή φάση.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M)u$$



Σε αντίθεση με τη διαμήκη διεύρυνση, η διεύρυνση μεταφοράς μάζας οφείλεται σε διάχυση που βρίσκεται σε **ορθή γωνία** ως προς τη ροή και αυξάνεται με την ταχύτητα.

Σχέση μεταξύ H και μεταβλητών στήλης

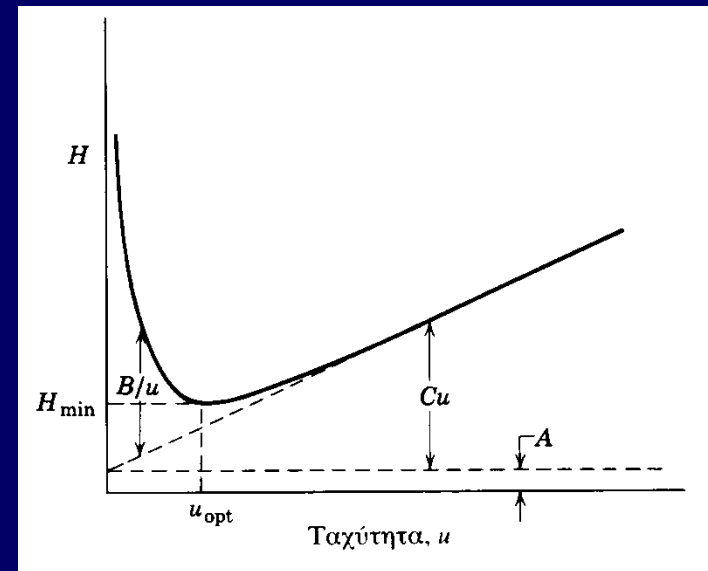
Όρος μεταφοράς μάζας
στη στατική φάση ($C_S u$)

Όταν η στατική φάση είναι ένα ακινητοποιημένο υγρό, ο συντελεστής μεταφοράς μάζας δίνεται από την εξίσωση:

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

Οι διάφοροι παράγοντες της εξίσωσης επιδρούν στη μέση συχνότητα με την οποία τα μόρια της ουσίας φθάνουν στη διεπιφάνεια, από όπου πραγματοποιείται μεταφορά προς την κινητή φάση

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M) u$$



$f_s(k')$: Σύνθετη συνάρτηση του παράγοντα κατακράτησης

d_f : πάχος επίστρωσης

D_S : Συντελεστής διάχυσης ουσίας στην επίστρωση

Σχέση μεταξύ H και μεταβλητών στήλης

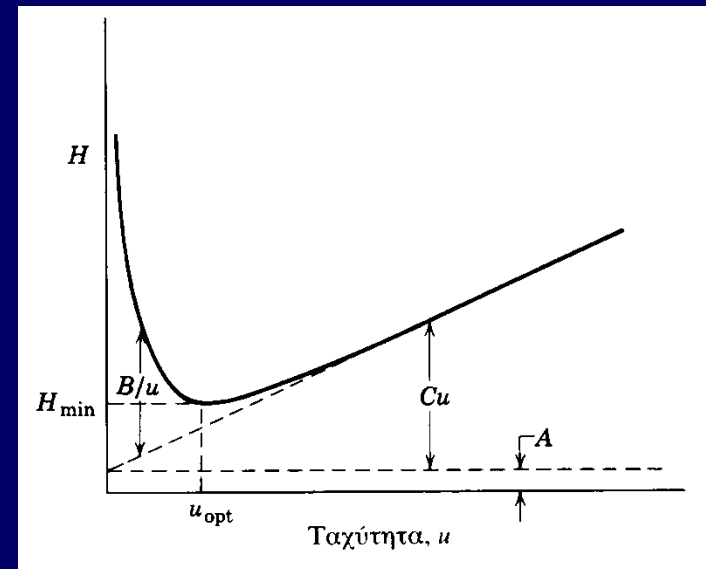
Όρος μεταφοράς μάζας
στην κινητή φάση ($C_M u$)

Ο συντελεστής μεταφοράς μάζας
στην κινητή φάση, C_M , δίνεται από
την εξίσωση:

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

Οι παραπάνω παράγοντες επιδρούν
στη μέση συχνότητα με την οποία τα
μόρια της ουσίας φθάνουν στη
διεπιφάνεια, όπου πραγματοποιείται
μεταφορά από τη μία φάση στην
άλλη.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M) u$$



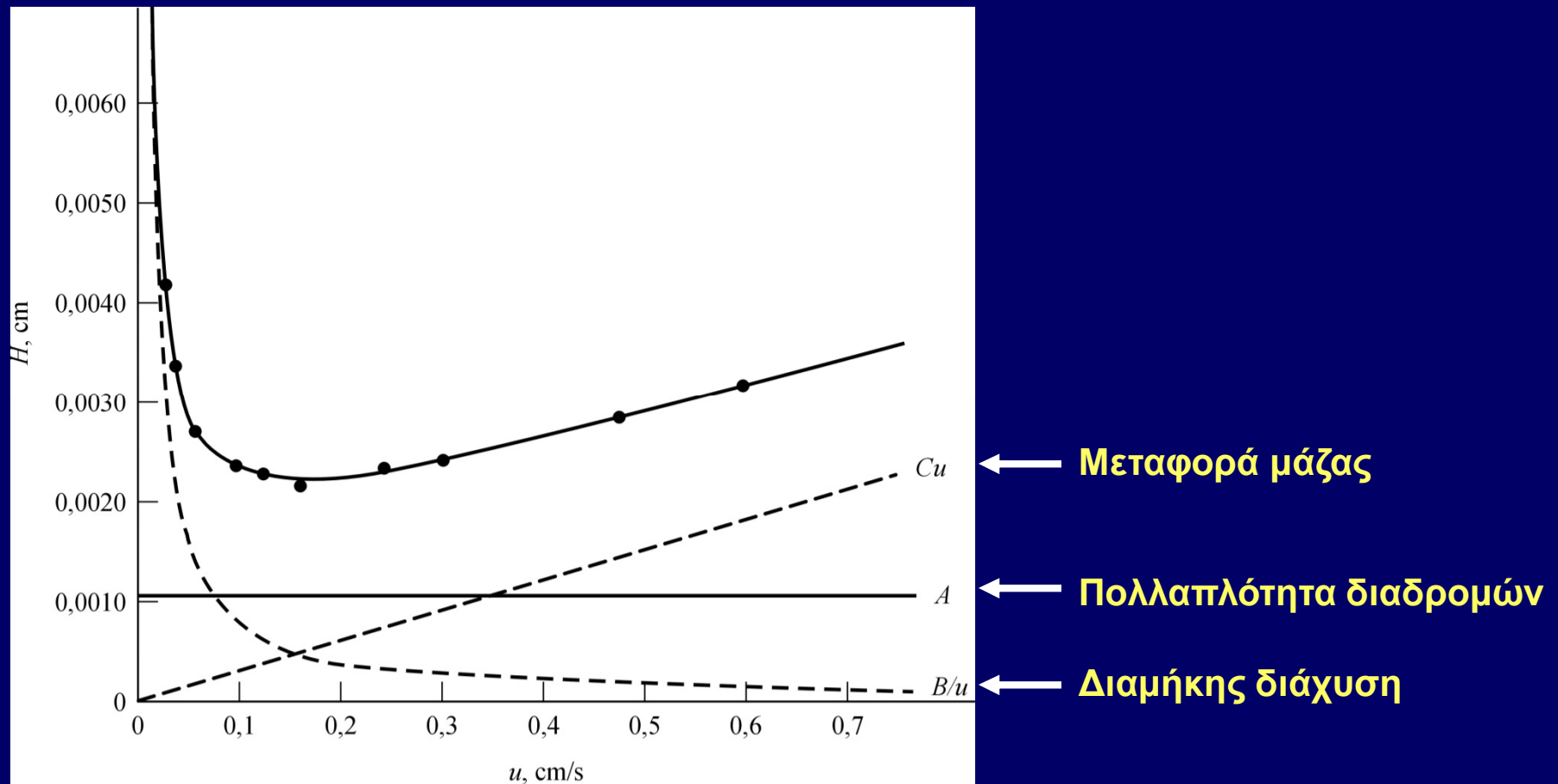
$f_M(k')$: Σύνθετη συνάρτηση του
παράγοντα κατακράτησης

d_p : διάμετρος σωματιδίων

D_M : Συντελεστής διάχυσης

Σχέση μεταξύ H και μεταβλητών στήλης

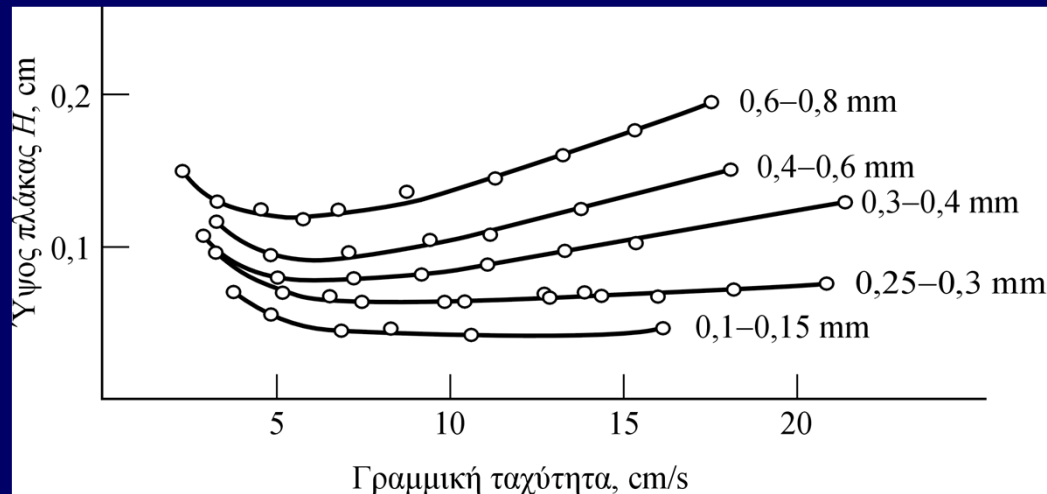
$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M)u$$



Διάγραμμα van Deemter για πληρωμένη στήλη υδροχρωματογραφίας. Πειραματικά σημεία και συνεισφορά των επιμέρους όρων της εξίσωσης.

Μέθοδοι ελαχιστοποίησης της διεύρυνσης

Δύο σημαντικές ελεγχόμενες μεταβλητές που επιδρούν στην αποδοτικότητα της στήλης είναι (α) η **διάμετρος των σωματιδίων** του υλικού πλήρωσης και (β) η **διάμετρος της στήλης**.



Επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων στο ύψος της πλάκας

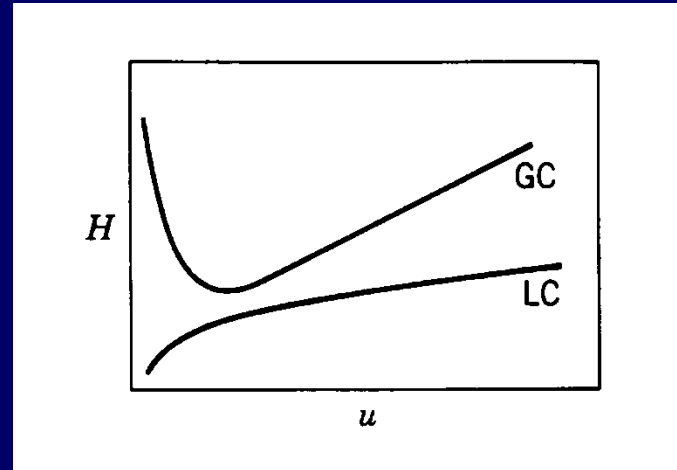
Όταν η κινητή φάση είναι αέριο, η ταχύτητα διαμήκουσ διάχυσης μειώνεται σημαντικά με **μείωση της θερμοκρασίας** (μείωση D_M).

Όταν χρησιμοποιούνται υγρές στατικές φάσεις, το **πάχος επίστρωσης** του προσροφημένου υγρού θα πρέπει να ελαχιστοποιείται (ο όρος C_S είναι ανάλογος προς το τετράγωνο του d_f).

Ερωτήσεις - Ασκήσεις

Στο Σχήμα παρουσιάζονται τυπικά διαγράμματα Van Deemter για αέρια (GC) και υγρή (LC) χρωματογραφία. Εξηγείστε τις παρατηρούμενες διαφορές στη μορφή των καμπυλών

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



Η σημαντικότερη διαφορά οφείλεται στον συντελεστή **B/u** της εξίσωσης Van Deemter.

Ο όρος αυτός σχετίζεται με τη διάχυση κατά μήκος της στήλης. Η διάχυση στα υγρά είναι περίπου 10^5 φορές μικρότερη από ότι στα αέρια, με αποτέλεσμα ο όρος **B/u** να είναι ασήμαντος σε μια υγρή κινητή φάση.

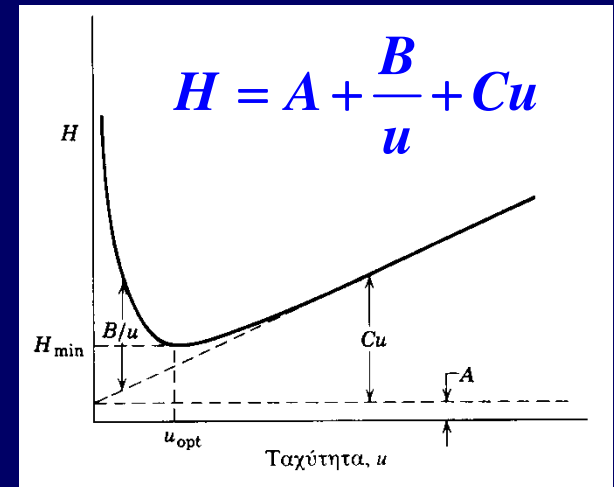
Στην υγρή χρωματογραφία, ο όρος **Cu** της εξίσωσης *Van Deemter* είναι πολύ μεγαλύτερος από τους **A** και **B/u** σε κανονικές ταχύτητες ροής.

Ερωτήσεις - Ασκήσεις

Οι σταθερές της εξίσωσης *Van Deemter* για μια ορισμένη στήλη στους 150°C είναι: **A**= 0,08 cm, **B**= 0,15 cm²/sec και **C**= 0,03 sec.

(α) Για ποια γραμμική ταχύτητα (u_{opt}) της κινητής φάσης επιτυγχάνεται βέλτιστος διαχωρισμός σε αυτή τη στήλη;

(β) Ποια είναι η αντίστοιχη ελάχιστη τιμή του H ;



$$\frac{dH}{du} = 0 \Rightarrow -\frac{B}{u^2} + C \Rightarrow \frac{B}{u^2} = C \Rightarrow u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}} = \sqrt{\frac{0,15 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}}{0,03 \text{ s}}} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow u_{opt} = 2,24 \text{ cm} / \text{s}$$

$$H_{min} = 0,08 \text{ cm} + \frac{0,15 \text{ cm}^2 / \text{s}}{2,24 \text{ cm} / \text{s}} + (0,03 \text{ s} \times 2,24 \text{ cm} / \text{s}) \Rightarrow H_{min} = 2,14 \text{ mm}$$

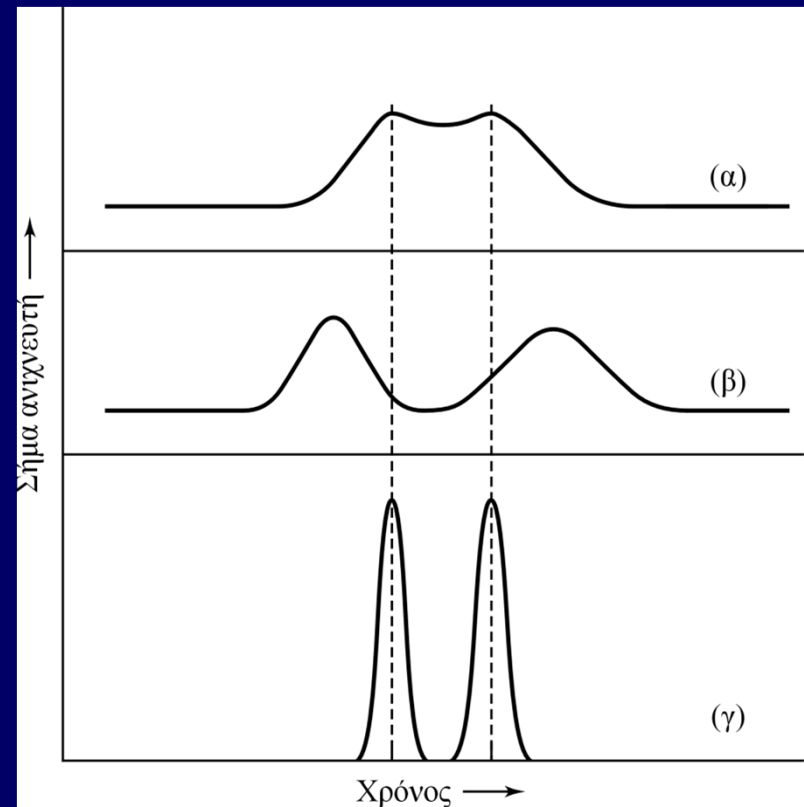
Βελτιστοποίηση της απόδοσης της στήλης

Ένας χρωματογραφικός διαχωρισμός βελτιστοποιείται με ρύθμιση των πειραματικών συνθηκών έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να διαχωρίζονται καθαρά και στο συντομότερο δυνατό χρονικό διάστημα.

Επιτυγχάνεται με:

(α) **Μείωση της διεύρυνσης των ζωνών** (έλεγχος των κινητικών μεταβλητών που αυξάνουν το ύψος της πλάκας).

(β) **Μεταβολή των σχετικών ταχυτήτων μετανάστευσης των συστατικών** (έλεγχος μεταβλητών που επιδρούν στους παράγοντες κατακράτησης και εκλεκτικότητας).



Απεικόνιση βελτιώσεων που μπορεί να εφαρμοστούν στο διαχωρισμό δύο συστατικών

Διαχωριστική ικανότητα στήλης

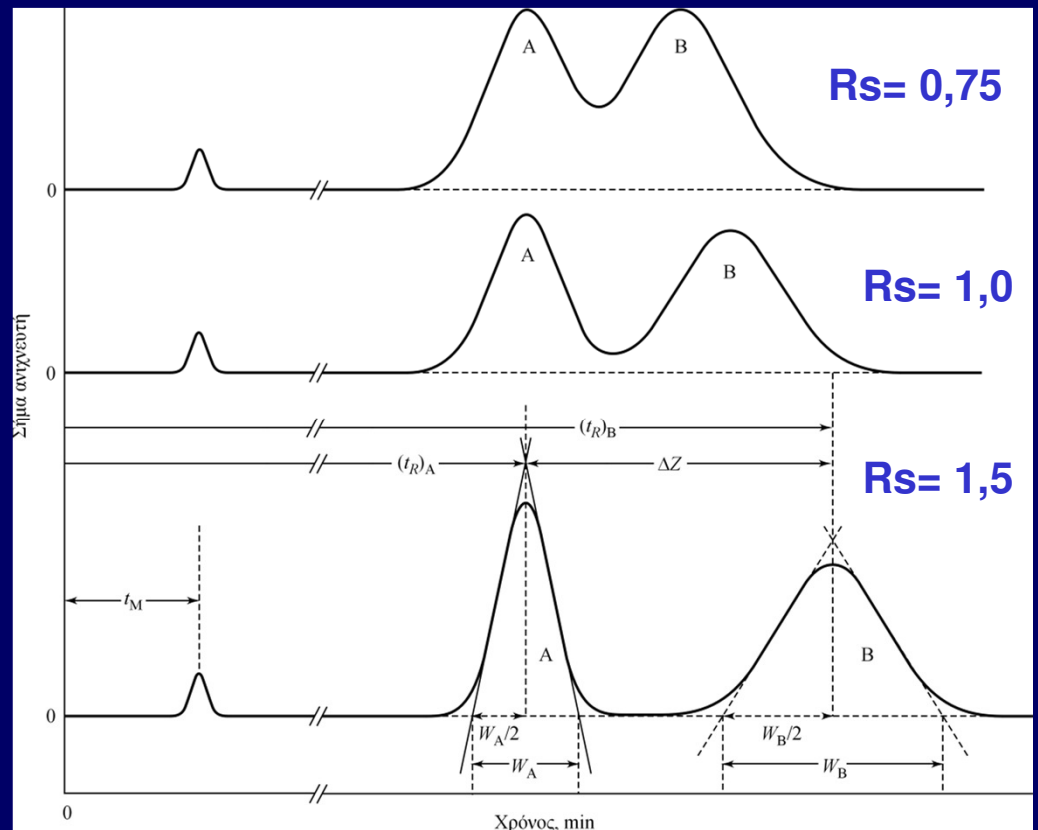
Η **διαχωριστική ικανότητα** μιας στήλης αποτελεί ένα μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίσει δύο αναλύτες.

$$R_s = \frac{\Delta Z}{\frac{W_A}{2} + \frac{W_B}{2}} = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} \Rightarrow$$

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

Εάν η διαχωριστική ικανότητα είναι **1,0** (**1,5**) το ποσοστό κάλυψης των κορυφών είναι **4%** (**0,3%**).

Η διαχωριστική ικανότητα αυξάνεται με αύξηση του μήκους της στήλης με παράλληλη αύξηση του χρόνου διαχωρισμού.



Διαχωρισμοί κορυφών με τρεις διαφορετικές διαχωριστικές ικανότητες

Επίδραση της κατακράτησης στο R_s

Η διαχωριστική ικανότητα μιας στήλης μπορεί να εκφραστεί σε συνάρτηση των παραγόντων κατακράτησης (k'), του παράγοντα εκλεκτικότητας α και του αριθμού των θεωρητικών πλακών N της στήλης.

Για δύο ουσίες A και B με παραπλήσιους χρόνους κατακράτησης, ισχύει:

$$\left. \begin{aligned} W_A &\approx W_B \approx W \\ R_s &= \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \end{aligned} \right\} R_s = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{W}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad R_s = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{(t_R)_B} \times \frac{\sqrt{N}}{4}$$

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad R_s = \frac{k'_B - k'_A}{1 + k'_B} \times \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Επίδραση της κατακράτησης στο R_s

$$\left. \begin{aligned} R_s &= \frac{k'_B - k'_A}{1 + k'_B} \times \frac{\sqrt{N}}{4} \\ a &= \frac{k'_B}{k'_A} \end{aligned} \right\} R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{a-1}{a} \right) \left(\frac{k'_B}{1+k'_B} \right)$$

Στην περίπτωση που απαιτείται ο υπολογισμός του αριθμού των θεωρητικών πλακών για την επιθυμητή τιμή διαχωριστικής ικανότητας, ανακατάταξη της παραπάνω εξίσωσης δίνει:

$$N = 16R_s^2 \times \left(\frac{a}{a-1} \right)^2 \left(\frac{1+k'_B}{k'_B} \right)^2$$

Επίδραση του R_s στο χρόνο κατακράτησης

Το ζητούμενο στη χρωματογραφία είναι η **μέγιστη διαχωριστική ικανότητα** στο **συντομότερο δυνατό χρονικό διάστημα**. Οι ιδιότητες αυτές δεν είναι δυνατόν να βελτιστοποιηθούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, με αποτέλεσμα την ανάγκη κάποιου συμβιβασμού.

Ο χρόνος που απαιτείται για τη συμπλήρωση ενός διαχωρισμού καθορίζεται από την ταχύτητα της πιο βραδυκίνητης ουσίας:

$$\left. \begin{aligned} \bar{v}_s &= \frac{L}{(t_R)_B} \\ \bar{v} &= u \times \frac{1}{1+k'} \end{aligned} \right\} (t_R)_B = \frac{NH(1+k'_B)}{u}$$
$$N = L/H$$

$$N = 16R_s^2 \times \left(\frac{a}{a-1} \right)^2 \left(\frac{1+k'_B}{k'_B} \right)^2$$

$$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \times \left(\frac{a}{a-1} \right)^2 \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2}$$

Μεταβλητές που επηρεάζουν την απόδοση

Οι εξισώσεις που αναπτύχθηκαν είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην **επιλογή των συνθηκών** που θα επιτρέψουν την επίτευξη καλού διαχωρισμού στον ελάχιστο δυνατό χρόνο, όταν κάτι τέτοιο είναι εφικτό. Οι εξισώσεις αυτές αποτελούνται από **τρία μέρη**:

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

$$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \times \left(\frac{a}{a-1} \right)^2 \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2}$$

Το πρώτο μέρος έχει σχέση με τα κινητικά φαινόμενα, τα οποία οδηγούν στη διεύρυνση των ζωνών (όροι \sqrt{N} και H/u).

Ο δεύτερος όρος των εξισώσεων (το πηλίκο που περιλαμβάνει το α , είναι ο όρος εκλεκτικότητας ο οποίος εξαρτάται αποκλειστικά από τις ιδιότητες των δύο ουσιών.

Ο τρίτος όρος, δηλαδή το πηλίκο που περιλαμβάνει το k'_B , εξαρτάται από τις ιδιότητες των ουσιών και της στήλης.

Οι θεμελιώδεις παράμετροι α , k' και N (ή H) μπορούν να ρυθμιστούν ανεξάρτητα η μία της άλλης.

Επίδραση της μεταβολής του N

Ένας προφανής τρόπος βελτίωσης της διαχωριστικής ικανότητας μιας στήλης είναι η αύξηση του αριθμού των πλακών της.

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

Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με:

- (α) **Αύξηση του μήκους της στήλης** (αύξηση χρόνου έκλουσης)
- (β) **Μείωση του ύψους της πλάκας, H .**

Επίδραση της μεταβολής του H

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M)u$$

Διεργασία διεύρυνσης κορυφών	Όρος στην εξίσωση	Σχέση ιδιότητας 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	$C_M u$	$C_M u = \frac{f_M(k')d_p^2}{D_M} u$

Μεταβολή του παράγοντα κατακράτησης, k'

Ο διαχωρισμός μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά με ρύθμιση του παράγοντα κατακράτησης. Αύξηση του k_B' γενικά βελτιώνει τη διαχωριστική ικανότητα (αλλά σε βάρος του χρόνου έκλουσης).

Προσδιορισμός άριστης περιοχής τιμών του k_B'

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left(\frac{a-1}{a} \right) \left(\frac{k_B'}{1+k_B'} \right)$$

\downarrow
Q

$$R_s = Q \left(\frac{k_B'}{1+k_B'} \right)$$

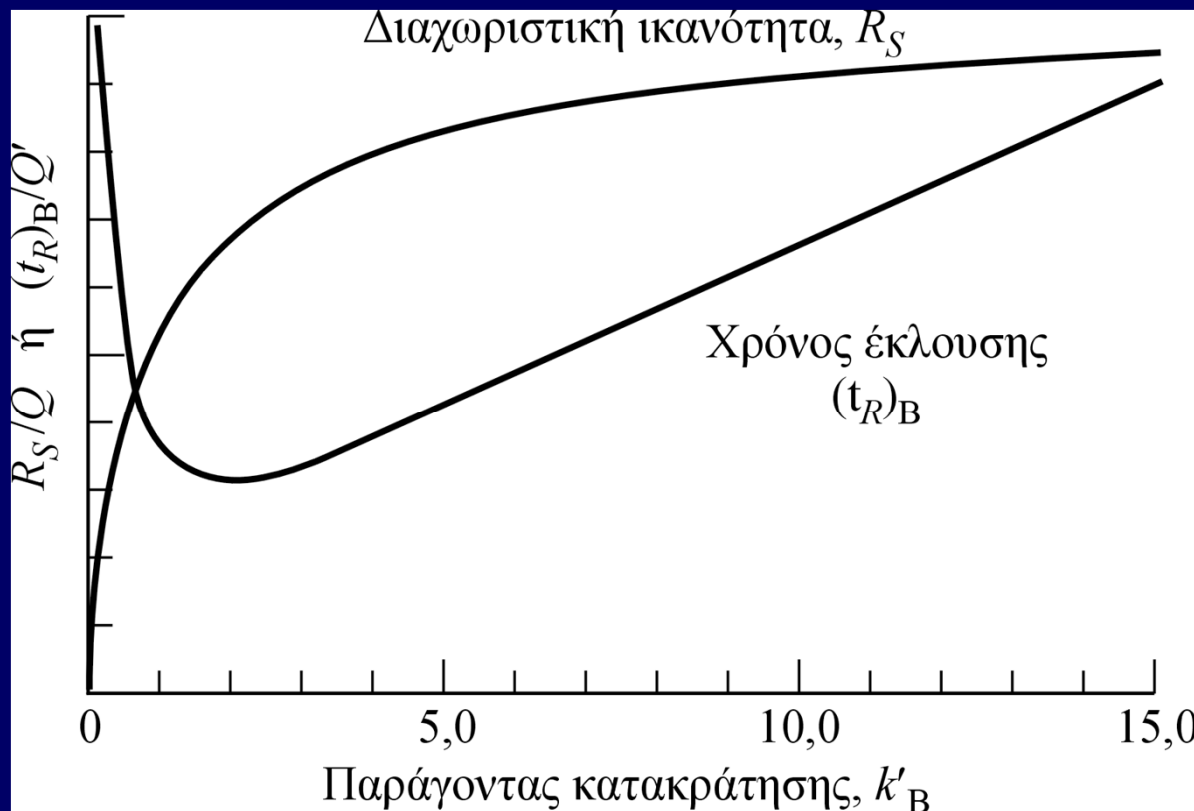
$$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \times \left(\frac{a}{a-1} \right)^2 \frac{(1+k_B')^3}{(k_B')^2}$$

\downarrow
Q'

$$(t_R)_B = Q' \frac{(1+k_B')^3}{(k_B')^2}$$

Μεταβολή του παράγοντα κατακράτησης, k'

Υποθέτοντας ότι τα Q και Q' δεν μεταβάλλονται σημαντικά με μεταβολή του παράγοντα κατακράτησης, η επίδραση του k'_B στη διαχωριστική ικανότητα και τον χρόνο έκλουσης μπορεί να παρασταθεί με το παρακάτω διάγραμμα:



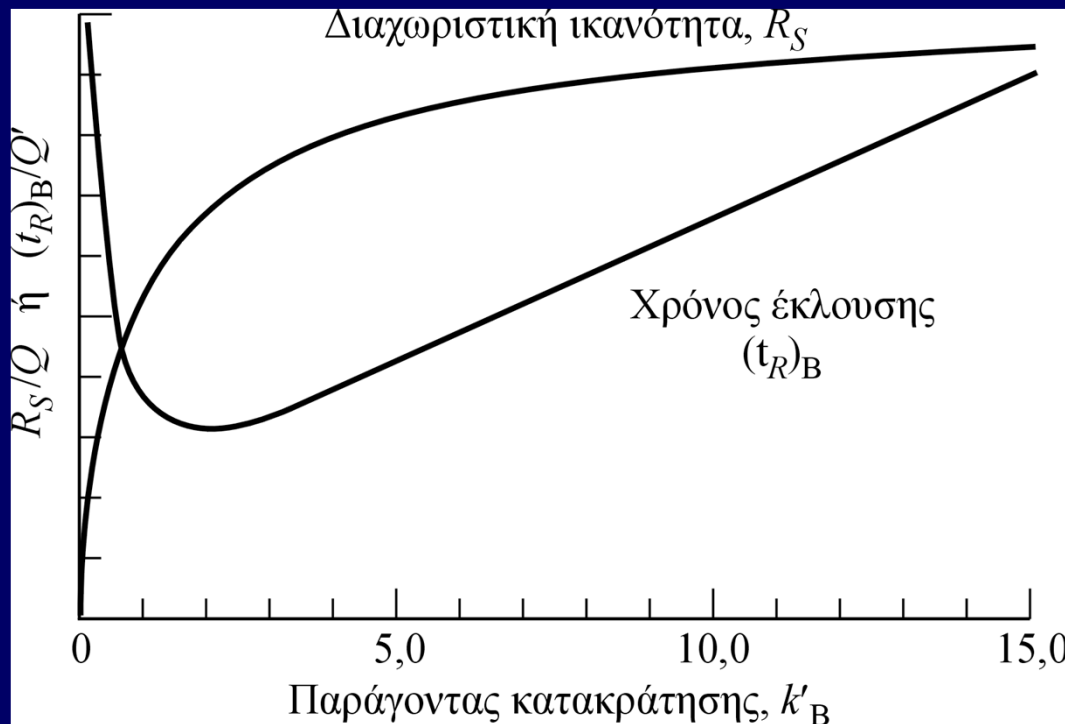
$$R_s = Q \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

$$(t_R)_B = Q' \frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2}$$

Επίδραση του παράγοντα κατακράτησης στη διαχωριστική ικανότητα και τον χρόνο έκλουσης

Μεταβολή του παράγοντα κατακράτησης, k'

- Τιμές του k_B' μεγαλύτερες από περίπου 10 πρέπει να αποφεύγονται, επειδή βελτιώνουν ελάχιστα την διαχωριστική ικανότητα, ενώ αυξάνουν σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο για τον διαχωρισμό.
- Το ελάχιστο του χρόνου έκλουσης συμβαίνει για $k_B' = 2$.
- Συχνά, η άριστη τιμή του k_B' , εάν ληφθεί υπόψη τόσο η διαχωριστική ικανότητα όσο και ο χρόνος έκλουσης, βρίσκεται στην περιοχή $k_B' = 1-5$.

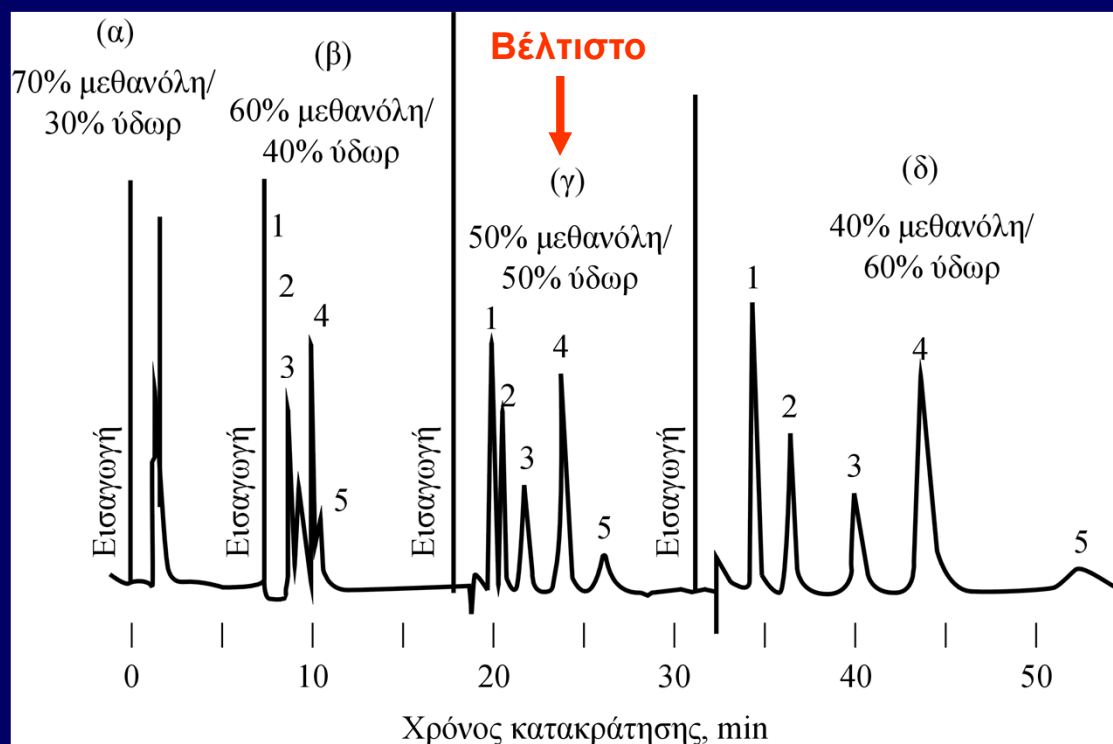


$$k' = \frac{KV_S}{V_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M}$$

Μεταβολή του παράγοντα κατακράτησης, k'

Συνήθως ο ευκολότερος τρόπος βελτίωσης της διαχωριστικής ικανότητας βασίζεται στην αριστοποίηση του παράγοντα κατακράτησης

$$k' = \frac{KV_S}{V_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M}$$



Επίδραση του είδους του διαλύτη στα χρωματογραφήματα

- Για αέριες κινητές φάσεις, ο k' μπορεί να βελτιωθεί με αύξηση της θερμοκρασίας
- Για υγρές κινητές φάσεις ο k' μπορεί να ρυθμιστεί με μεταβολή της σύνθεσης του διαλύτη.

Αναλύτες

- (1) 9,10-ανθρακινόνη
- (2) 2-μεθυλο-9,10-ανθρακινόνη
- (3) 2-αιθυλο-9,10-ανθρακινόνη
- (4) 1,4-διμεθυλο-9,10-ανθρακινόνη
- (5) 2-*t*-βουτυλο-9,10-ανθρακινόνη

Μεταβολή του παράγοντα εκλεκτικότητας

Όταν ο παράγοντας εκλεκτικότητας α πλησιάζει τη μονάδα, η βελτίωση των k' και N δεν είναι αρκετή για ικανοποιητικό διαχωρισμό δύο ουσιών σε λογικό χρονικό διάστημα.

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

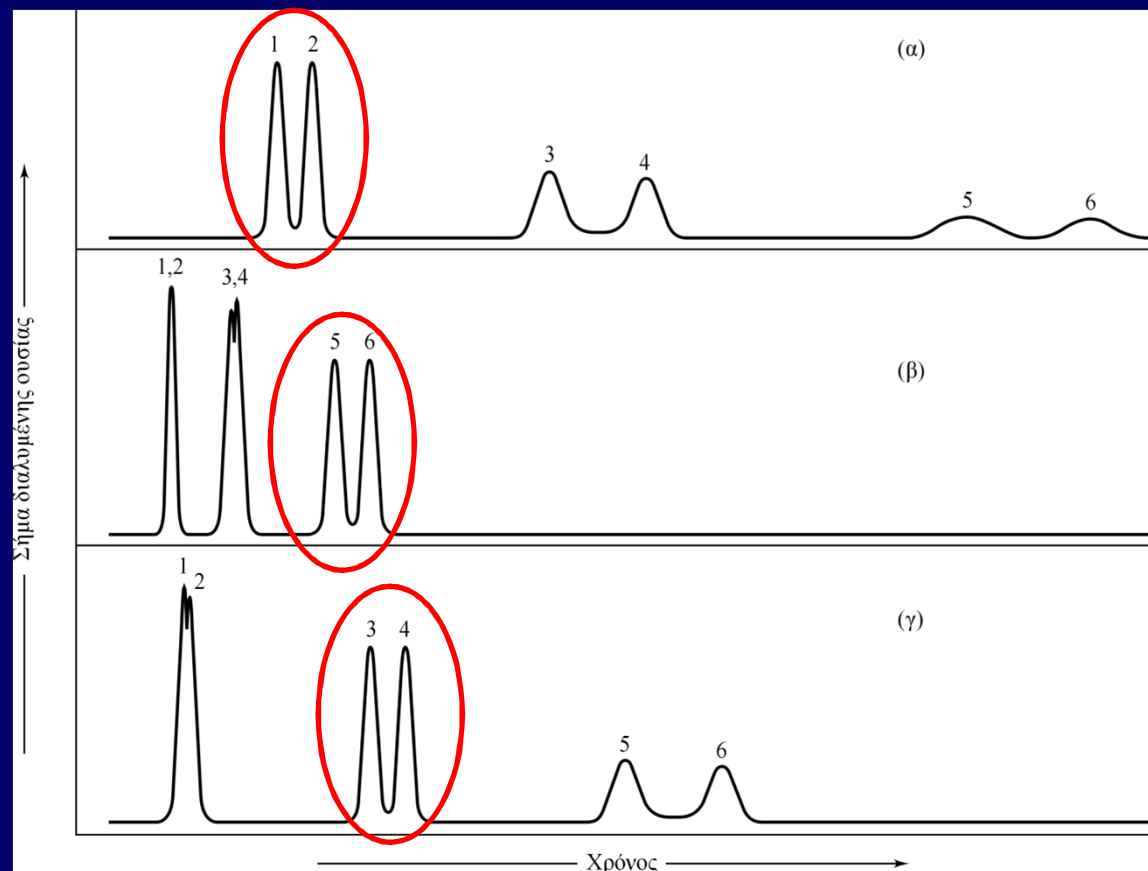
Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να βρεθεί τρόπος αύξησης του α , χωρίς οι τιμές των παραγόντων κατακράτησης να απομακρυνθούν από την άριστη περιοχή (1 έως 10).

Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με:

- Αλλαγή της **σύνθεσης της κινητής φάσης**, περιλαμβανομένων των αλλαγών του pH
- Αλλαγή της **θερμοκρασίας** της στήλης (π.χ. χρωμ/φια ιονανταλλαγής)
- Αλλαγή της **σύνθεσης της στατικής φάσης** (αλλαγή στήλης)
- Χρήση **ειδικής χημικής επίδρασης** (τροποποίηση της στατικής φάσης με ουσίες που συμπλέκουν ή γενικά αλληλεπιδρούν με ένα ή περισσότερα συστατικά του δείγματος)

Το πρόβλημα της συνολικής έκλυσης

Το πρόβλημα της συνολικής έκλυσης μπορεί να αντιμετωπισθεί με μεταβολή των συνθηκών που καθορίζουν τις τιμές k' κατά τη διάρκεια του ίδιου διαχωρισμού. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να επέρχονται σε βήματα ή κατά τρόπο συνεχή.



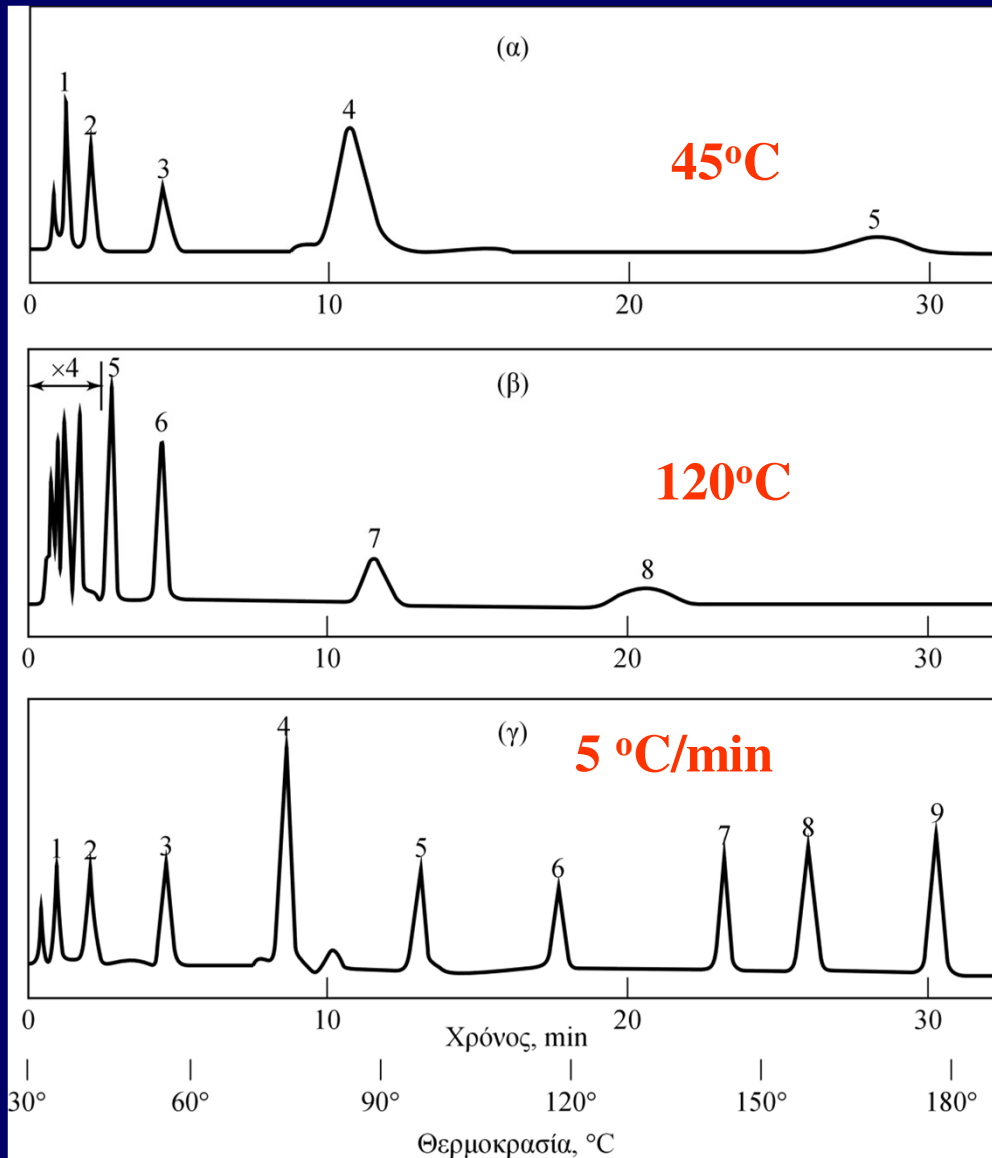
- **Αέρια χρωματογραφία**
Προγραμματισμός θερμοκρασίας
- **Υγρή χρωματογραφία**
Βαθμιδωτή έκλυση (προγραμματισμός διαλύτη)

Απεικόνιση του προβλήματος της συνολικής έκλυσης στη χρωματογραφία

Το πρόβλημα της συνολικής έκλυσης

Χρωματογραφήματα μείγματος που περιέχει τα παρακάτω συστατικά (GC)

<u>Αρ.</u>	<u>Ουσία</u>	<u>σ.β. (°C)</u>
1	<i>n</i> - προπάνιο	- 42
2	<i>n</i> - βουτάνιο	- 0,5
3	<i>n</i> - πεντάνιο	36
4	<i>n</i> - εξάνιο	69
5	<i>n</i> - επτάνιο	98
6	<i>n</i> - οκτάνιο	126
7	βρωμοφόρμιο	150
8	<i>m</i> - χλωροτολουόλιο	162
9	<i>m</i> - βρωμοτολουόλιο	184



Εφαρμογές της χρωματογραφίας

Η χρωματογραφία αποτελεί σήμερα την κυριότερη τεχνική διαχωρισμού συγγενών χημικών ουσιών. Χρησιμοποιείται τόσο για την ποιοτική ταυτοποίηση όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαχωριζομένων ουσιών.

Ποιοτική ανάλυση

Από ένα χρωματογράφημα μπορεί να ληφθεί μόνο ένα είδος ποιοτικής πληροφορίας για κάθε ουσία σε ένα δείγμα, **ο χρόνος κατακράτησης**. Πρόσθετα δεδομένα μπορούν να ληφθούν με χρήση διαφόρων κινητών και στατικών φάσεων και σε διάφορες θερμοκρασίες έκλουσης.

Η πληροφόρηση είναι πολύ **περιορισμένη** σε σχέση με αυτή που λαμβάνεται π.χ. με χρήση φασματοσκοπικών ή φασματογραφικών μεθόδων.

Γενικά, η επιβεβαίωση της ταυτότητας των ουσιών **απαιτεί** περαιτέρω φασματοσκοπική ή χημική εξέταση των απομονούμενων συστατικών.

Τα χρωματογραφήματα δεν οδηγούν σε θετική ταυτοποίηση των ουσιών σε ένα δείγμα. Αποτελούν όμως ένδειξη της **απουσίας** ορισμένων ενώσεων.

Ποσοτική ανάλυση

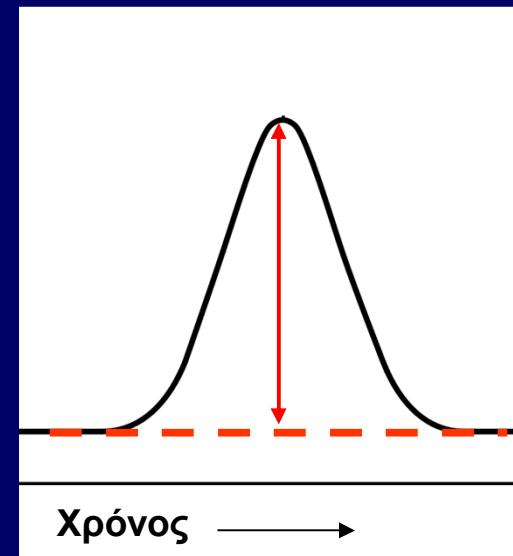
Η ποσοτική χρωματογραφία στήλης βασίζεται σε σύγκριση του ύψους ή της επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη με τις αντίστοιχες κορυφές ενός ή περισσότερων προτύπων. Με κατάλληλο έλεγχο των συνθηκών, οι παράμετροι αυτές **μεταβάλλονται γραμμικά με τη συγκέντρωση**.

Αναλύσεις που βασίζονται στο ύψος της κορυφής

Το ύψος μιας χρωματογραφικής κορυφής υπολογίζεται με μέτρηση της κατακόρυφης απόστασης από το υψηλότερο σημείο της κορυφής στη γραμμή βάσης.

Το ύψος της κορυφής είναι αντιστρόφως ανάλογο προς το εύρος της. Ορθά αποτελέσματα λαμβάνονται μόνο όταν οι συνθήκες μέτρησης **δεν προκαλούν μεταβολή στο εύρος των κορυφών** κατά το χρονικό διάστημα μέτρησης αγνώστων και προτύπων.

- Θερμοκρασία στήλης
- Ταχύτητα ροής της κινητής φάσης
- Ταχύτητα έγχυσης του δείγματος



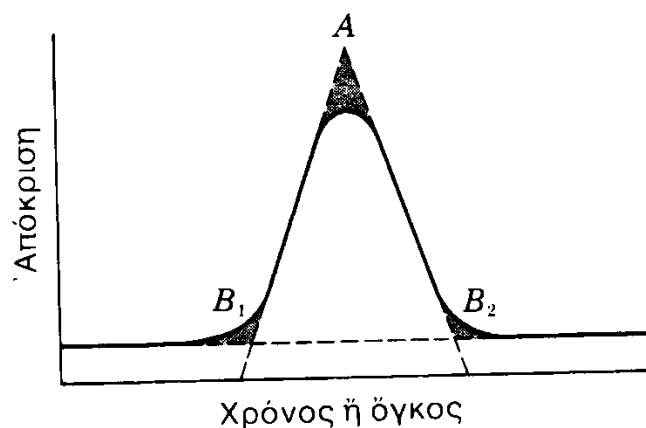
Ποσοτική ανάλυση

Αναλύσεις που βασίζονται στην επιφάνεια των κορυφών

Οι επιφάνειες των κορυφών είναι **ανεξάρτητες από διευρύνσεις** οι οποίες οφείλονται στη μεταβολή των πειραματικών συνθηκών. Επομένως, αποτελούν προτιμότερη αναλυτική παράμετρο σε σχέση με τα ύψη των κορυφών.

Τα σύγχρονα όργανα χρωματογραφίας είναι εξοπλισμένα με ψηφιακούς ηλεκτρονικούς ολοκληρωτές, με τους οποίους είναι εφικτός ο ακριβής υπολογισμός της επιφάνειας κάθε κορυφής.

Όταν δεν υπάρχει ολοκληρωτής, ο υπολογισμός μπορεί να γίνει με το χέρι.



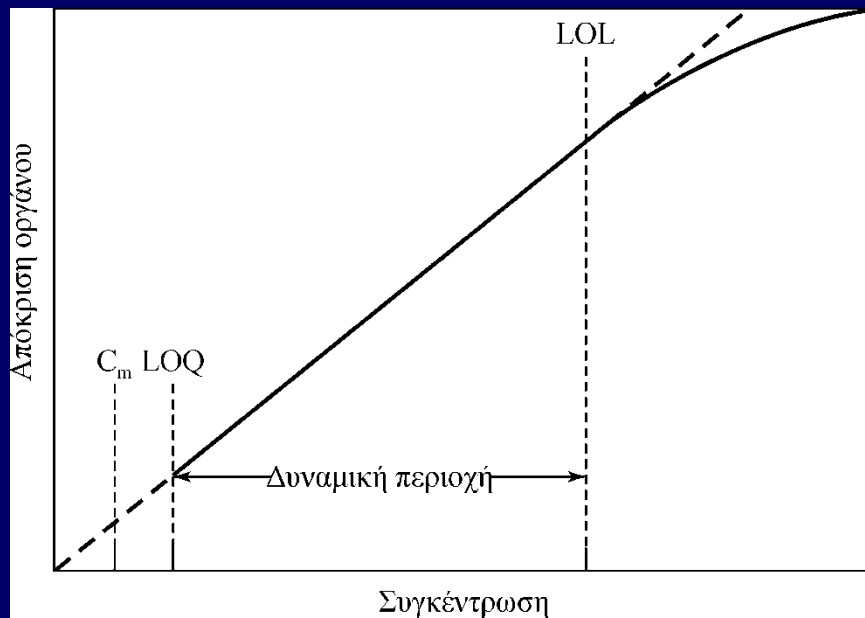
$$A = \int R \cdot dt$$

$$A = \frac{\text{Βάση} \times \text{Ύψος}}{2}$$

Ποσοτική ανάλυση

Βαθμονόμηση και πρότυπα

Η πιο άμεση και απλή μέθοδος για ποσοτική χρωματογραφική ανάλυση είναι η χρήση μιας σειράς πρότυπων διαλυμάτων με σύνθεση που **προσεγγίζει** την σύνθεση των αγνώστων. Σημαντικότερη πηγή σφάλματος αποτελεί η **αβεβαιότητα στον όγκο του δείγματος**.



C_m : Όριο ανίχνευσης
LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης
LOL: Όριο γραμμικότητας

Λήψη καμπύλης βαθμονόμησης

- (α) Εισάγεται στο όργανο σειρά πρότυπων διαλυμάτων με ακριβώς γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη και καταγράφεται η ένδειξη του οργάνου.
- (β) Ακολουθεί διόρθωση των ενδείξεων ως προς το τυφλό.
- (γ) Τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για τη σχεδίαση διαγράμματος της διορθωμένης ένδειξης ως προς τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Ποσοτική ανάλυση

Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Οι αβεβαιότητες που εισάγονται κατά την έγχυση του δείγματος μειώνονται δραστικά με τη **χρήση εσωτερικών προτύπων**.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μια προσεκτικά μετρημένη ποσότητα μιας 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.

Για να είναι επιτυχής η μέθοδος, είναι απαραίτητο:

- (α) η κορυφή του εσωτερικού προτύπου να διαχωρίζεται καλά από τις κορυφές των άλλων συστατικών του δείγματος ($R_s > 1,25$)
- (β) Η κορυφή του προτύπου να μην απέχει πολύ από την κορυφή του αναλύτη.

Με κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο, μπορούν να επιτευχθούν σχετικές επαναληψιμότητες καλύτερες από 1%.

Ποσοτική ανάλυση

Η απόκριση των ανιχνευτών (λόγος σήματος προς ποσότητα) είναι συνήθως **διαφορετική** για κάθε ουσία του δείγματος. Επομένως, για τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας ουσίας απαιτείται η γνώση του **συντελεστή μοριακής απόκρισης** του ανιχνευτή:

R (εμβαδόν/mol)

Η ποσότητα της ουσίας που εκλούεται δίνοντας κορυφή με εμβαδόν A υπολογίζεται απλά, ως εξής:

$$Q = \frac{A}{R} \quad (\text{mol})$$

Όταν το χρωματογράφημα αντιπροσωπεύει όλα τα συστατικά του δείγματος, ισχύει:

$$\text{mol \% συστατικού B} = \frac{A_B / R_B}{\sum (A_i / R_i)} \times 100$$

Άσκηση 26-25

Στον Πίνακα δίνονται οι σχετικές επιφάνειες πέντε αεριοχρωματογραφικών κορυφών κατά το διαχωρισμό πέντε στεροειδών. Επίσης δίνονται και οι αντίστοιχες σχετικές αποκρίσεις του ανιχνευτή. Να υπολογιστεί η επί τοις εκατό περιεκτικότητα κάθε συστατικού στο μίγμα.

Στεροειδές	Επιφάνεια (A)	Απόκριση (R)
Δεϋδροεπι- ανδροστερόνη	27,6	0,70
Οιστραδιόλη	32,4	0,72
Οιστρόνη	47,1	0,75
Τεστοστερόνη	40,6	0,73
Οιστριόλη	27,3	0,78

$$\text{mol \% συστατικού B} = \frac{A_B / R_B}{\sum (A_i / R_i)} \times 100$$

Άσκηση 26-25

Στον Πίνακα δίνονται οι σχετικές επιφάνειες πέντε αεριοχρωματογραφικών κορυφών κατά το διαχωρισμό πέντε στεροειδών. Επίσης δίνονται και οι αντίστοιχες σχετικές αποκρίσεις του ανιχνευτή. Να υπολογιστεί η επί τοις εκατό περιεκτικότητα κάθε συστατικού στο μίγμα.

Στεροειδές	Επιφάνεια (A)	Απόκριση (R)	Λόγος A/R	Περιεκτικότητα (%)
Δεϋδροεπι- ανδροστερόνη	27,6	0,70	39,4	16,6
Οιστραδιόλη	32,4	0,72	45,0	18,9
Οιστρόνη	47,1	0,75	62,8	26,4
Τεστοστερόνη	40,6	0,73	55,6	23,4
Οιστριόλη	27,3	0,78	35,0	14,7
			<u>Σ= 237,8</u>	<u>Σ=100,0</u>

$$\text{mol \% συστατικού B} = \frac{A_B / R_B}{\sum (A_i / R_i)} \times 100$$

Παράδειγμα

Οι ουσίες A και B παρουσιάζουν χρόνους κατακράτησης 16,40 και 17,63 min αντίστοιχα σε μια στήλη μήκους 30 cm. Μια μη κατακρατούμενη ουσία περνάει μέσω της στήλης σε 1,30 min. Το εύρος των κορυφών (στη βάση) για τις ουσίες A και B ήταν 1,11 και 1,21 min αντίστοιχα.. Να υπολογιστούν

α) η διαχωριστική ικανότητα της στήλης

β) ο μέσος αριθμός πλακών της στήλης

γ) το ύψος πλάκας

δ) το απαιτούμενο μήκος της στήλης για να επιτευχθεί διαχωριστική ικανότητα 1,5

ε) ο απαιτούμενος χρόνος για την έκλουση της ουσίας B από τη μακρύτερη στήλη

στ) το απαιτούμενο ύψος πλάκας για να επιτευχθεί η διαχωριστική ικανότητα 1,5 με την αρχική στήλη των 30 cm και στον αρχικό χρόνο.

Εξισώσεις

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

$$N = L/H \quad a = \frac{k'_B}{k'_A}$$

$$N = 16R_s^2 \times \left(\frac{a}{a-1}\right)^2 \left(\frac{1+k'_B}{k'_B}\right)^2$$

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

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

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

$$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \times \left(\frac{a}{a-1}\right)^2 \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2}$$

Θεωρήστε ότι:

ο παράγοντας κατακράτησης και
ο παράγοντας εκλεκτικότητας
δε μεταβάλλονται με το αριθμό και το
μήκος των θεωρητικών πλακών