



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Εισαγωγή

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο Ρώσος βοτανολόγος M.S. Tswett χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τη χρωματογραφία για τον διαχωρισμό διαφόρων φυτικών χρωστικών με τη βοήθεια μίας στήλης με πληρωτικό υλικό λεπτόκοκκο ανθρακικό ασβέστιο. Κατά τη διέλευση του διαλύτη μέσω του πληρωτικού υλικού οι διάφορες χρωστικές (χλωροφύλλες και ξανθοφύλλες) διαχωριζόμενες εμφανίστηκαν ως διαφορετικές χρωματικές ταινίες. Ονόμασε τη μέθοδο αυτή από τις ελληνικές λέξεις «χρώμα (Chroma)» και «γραφή».



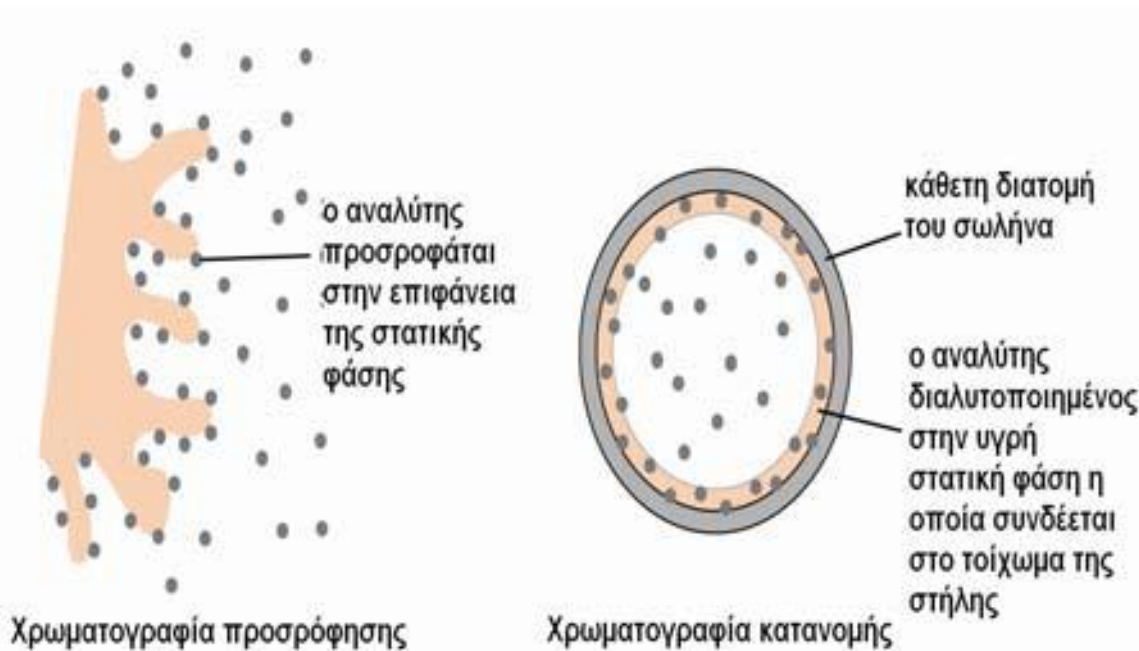
ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΕΙΑΣ

- Οι χρωματογραφικές μέθοδοι διαχωρισμού χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων με κοινό χαρακτηριστικό ότι τα συστατικά προς διαχωρισμό κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, μία εκ των οποίων είναι στατική (με μεγάλη επιφάνεια) και η άλλη κινητή η οποία διαπερνά με εξαναγκασμένη διέλευση τη στατική.
- Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός είναι το αποτέλεσμα επαναλαμβανομένων ισορροπιών των συστατικών μεταξύ των δύο φάσεων κατά τη μετακίνησή τους στη στατική φάση και οφείλεται στις διαφορετικές τιμές των σταθερών κατανομής των συστατικών.
- Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα.

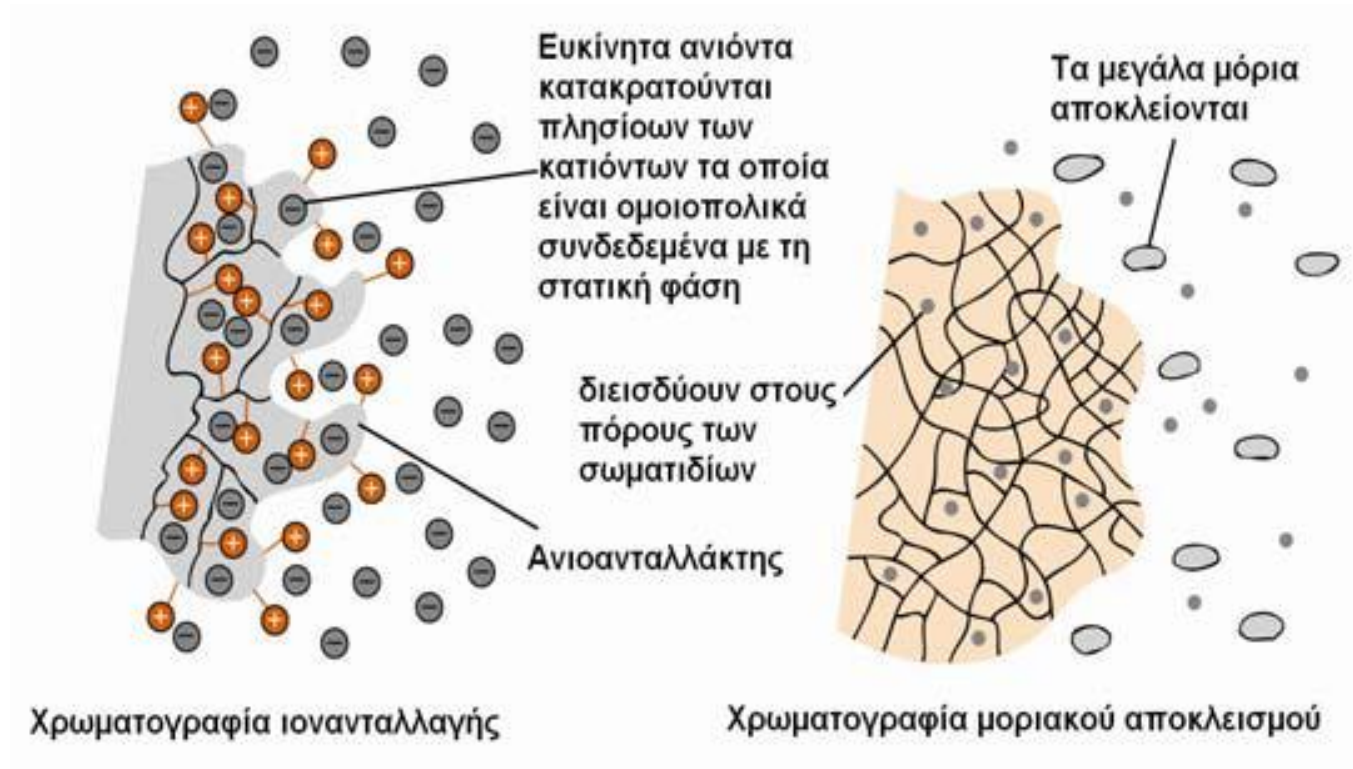


ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

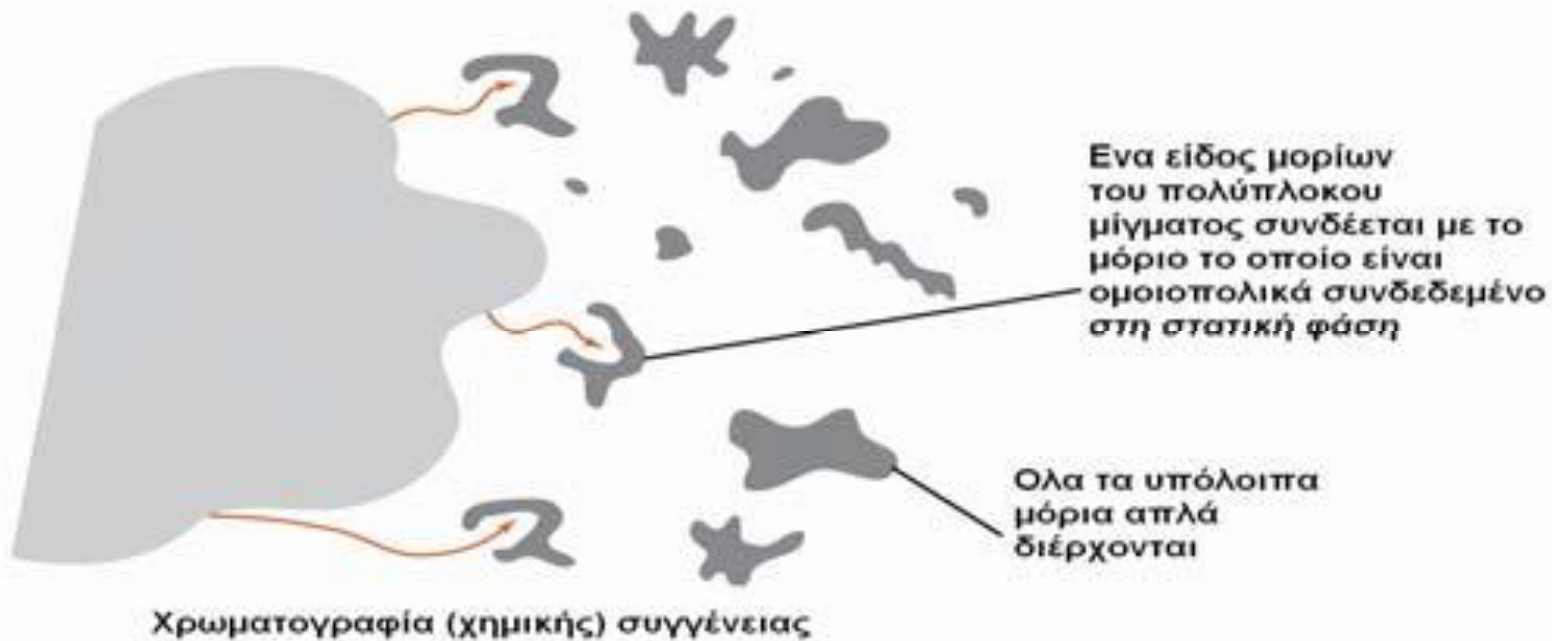
- Ανάλογα με τον μηχανισμό ισορροπίας η χρωματογραφία διακρίνεται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας



ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ

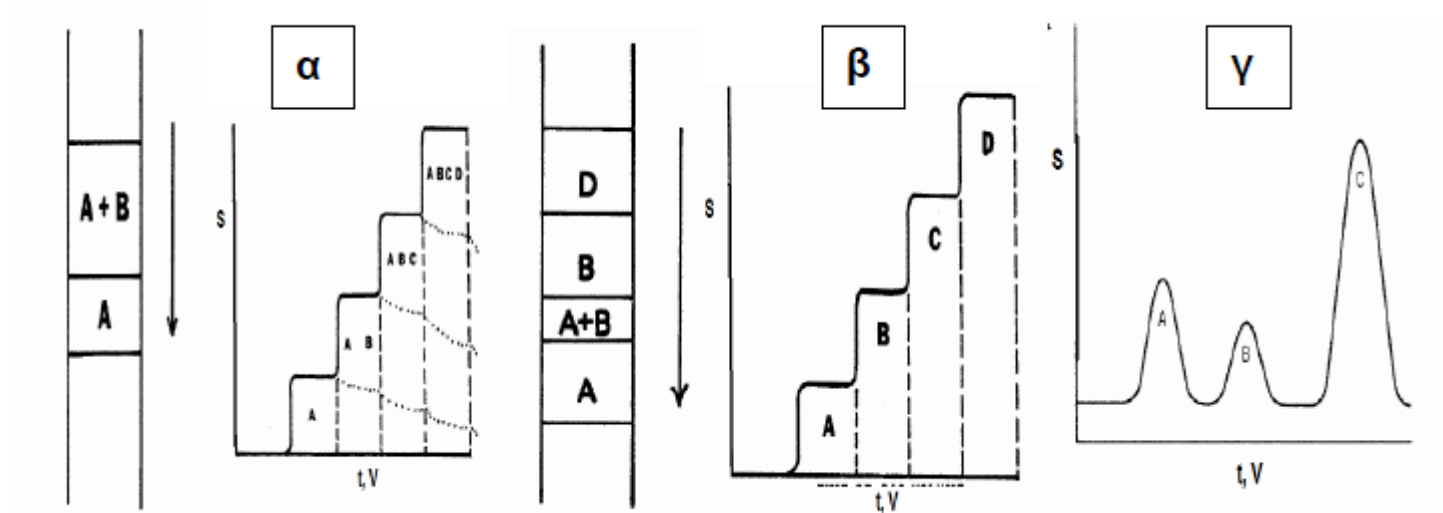


ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ



ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- Η χρωματογραφία επίσης διακρίνεται ανάλογα με την τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός, σε χρωματογραφία ανάλυσης μετώπου-α (frontal analysis), σε χρωματογραφία αντικατάστασης- β (displacement chromatography) και σε χρωματογραφία έκλυσης- γ (elution development). Σήμερα λόγω της ευρείας εφαρμογής της η χρωματογραφία έκλυσης είναι συνώνυμη με το όρο χρωματογραφία.



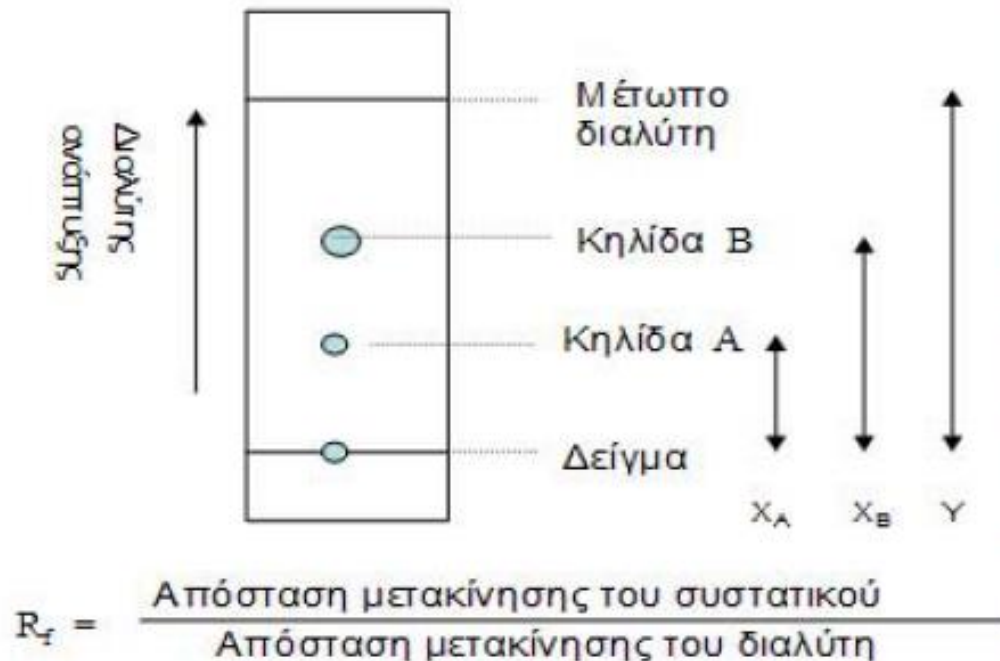
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- Ένας άλλος τρόπος διάκρισης των χρωματογραφικών μεθόδων είναι το μέσο στο οποίο τοποθετείται η στατική φάση. Έτσι η χρωματογραφία διακρίνεται σε επίπεδη χρωματογραφία και σε χρωματογραφία στήλης.



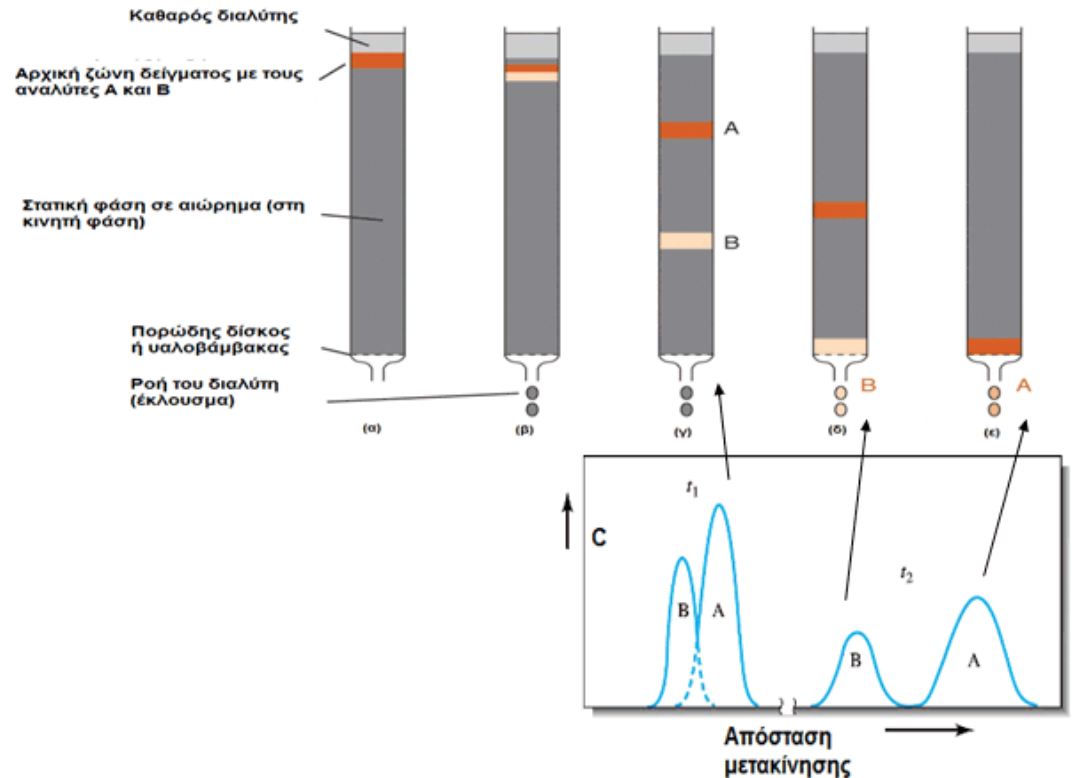
ΕΠΙΠΕΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Στην επίπεδη χρωματογραφία η στατική φάση τοποθετείται σε μια επιφάνεια ή στους πόρους ενός χαρτιού (χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και χρωματογραφία χάρτου αντίστοιχα). Η κινητή φάση μετακινείται λόγω τριχοειδών φαινομένων ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος λόγω της διαφορετικής συγγένειας ως προς τη στατική φάση μετακινούνται σε διαφορετική απόσταση. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε συστατικού στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του



ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό (ύαλος, πηκτή πυριτίας, ανοξείδωτος χάλυβας). Το δείγμα το τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από τη συγγένεια των συστατικών ως προς τη στατική φάση.



ΕΙΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΤΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΣΕΩΝ

Γενική ταξινόμηση	Ειδική τεχνική	Στατική φάση	Τύπος ισορροπίας
Υγροχρωματογραφία (liquid chromatography, LC) (κινητή φάση: υγρό)	Υγρού-υγρού ή κατανομής	Υγρό προσροφημένο σε στερεό	Κατανομή μεταξύ δύο μη αναμιγμένων υγρών
	Υγρού-συνδεδεμένης φάσης	Οργανικά μόρια συνδεδεμένα (χημικώς) σε στερεή επιφάνεια	Κατανομή μεταξύ υγρού και συνδεδεμένης επιφάνειας
	Υγρού-στερεού ή προσρόφησης	Στερεό	Προσρόφηση
Αεριοχρωματογραφία (gas chromatography, GC) (κινητή φάση: αέριο)	Αερίου-υγρού	Υγρό προσροφημένο σε στερεό	Κατανομή μεταξύ αερίου και υγρού
	Αερίου-συνδεδεμένης φάσης	Οργανικά μόρια συνδεδεμένα (χημικώς) σε στερεή επιφάνεια	Κατανομή μεταξύ αερίου και συνδεδεμένης επιφάνειας
	Αερίου-στερεού	Στερεό	Προσρόφηση
Χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (supercritical-fluid chromatography, SFC) (κινητή φάση: υπερκρίσιμο ρευστό)		Οργανικά μόρια συνδεδεμένα (χημικώς) σε στερεή επιφάνεια	Κατανομή μεταξύ υπερκρίσιμου ρευστού και συνδεδεμένης επιφάνειας

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Ορισμός: Φυσική μέθοδος διαχωρισμού στην οποία οι ουσίες που θα διαχωριστούν κατανέμονται ανάμεσα σε δύο φάσεις, μία είναι στάσιμη ακίνητη (στατική φάση) ενώ η άλλη (κινητή φάση) κινείται σε καθορισμένη διεύθυνση

➤ Αν η στατική φάση είναι τοποθετημένη μέσα σε ένα σωλήνα η όλη διάταξη ονομάζεται χρωματογραφία στήλης και ο σωλήνας χρωματογραφική στήλη.

➤ Οι φάσεις στις οποίες κατανέμονται οι ουσίες που θα διαχωριστούν αποτελούνται από την στατική φάση (gel, στερεό, υγρό ακινητοποιημένο μέσα στη στήλη) και την **κινητή** φάση που είναι ένα ρευστό που αναγκάζεται να κινηθεί πάνω ή μέσα από τη στατική φάση είτε λόγω **βαρύτητας**, είτε λόγω **διαφοράς πίεσης**, είτε λόγω **τριχοειδών δυνάμεων**.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

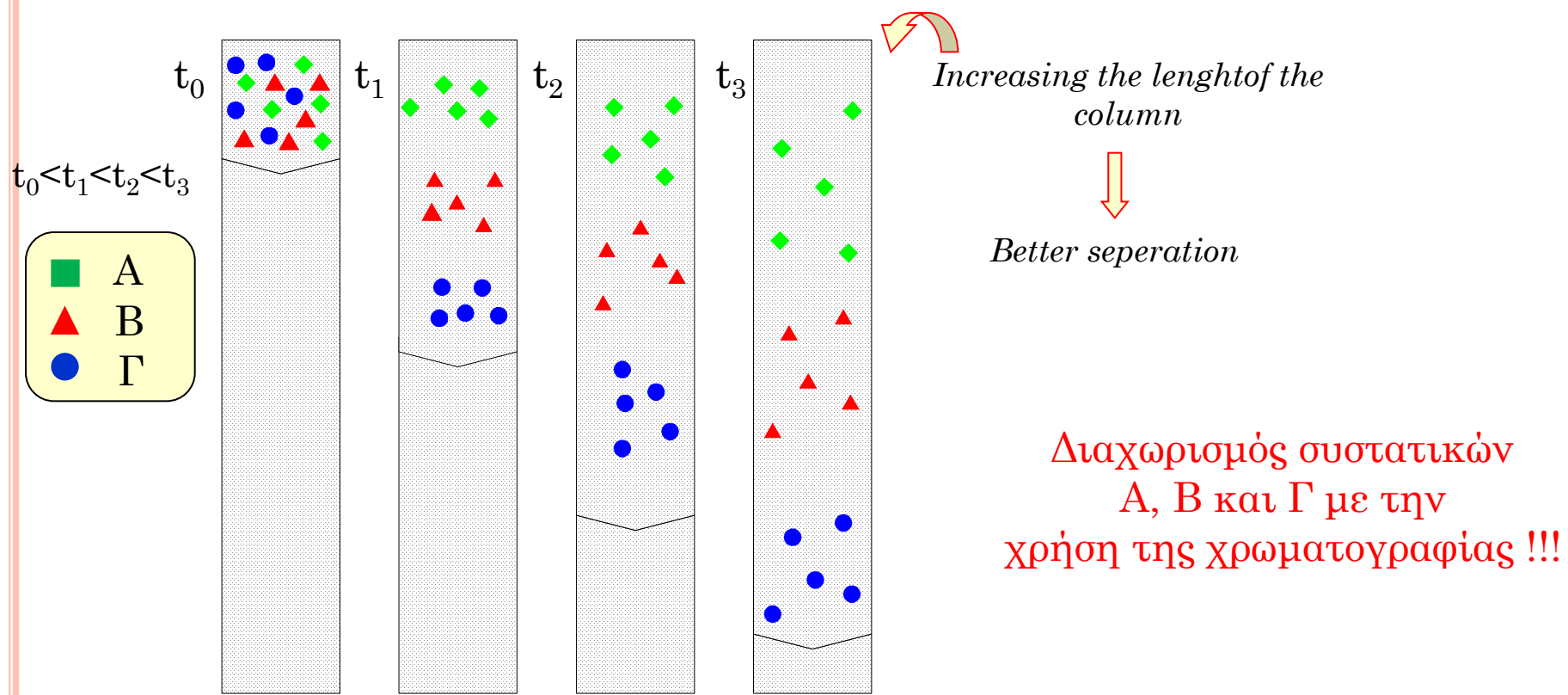
➤ Ανάλογα με το τύπο του ρευστού που χρησιμοποιείται για κινητή φάση μπορούμε να έχουμε την αέρια χρωματογραφία (GC) και την υγρή χρωματογραφία (LC)



➤ Όταν λοιπόν έχουμε χρωματογραφία στήλης η στατική φάση γεμίζει την χρωματογραφική στήλη ενώ η κινητή φάση διέρχεται μέσα ή επάνω από αυτή. Αν έχουμε λοιπόν μια δεδομένη ουσία A υπάρχει μια ισορροπία κατανομής της ανάμεσα στις δύο φάσεις, την κινητή και την στατική. Η ισορροπία αυτή καθορίζεται από τη σταθερά κατανομής K .

$$A_{mobile} \longleftrightarrow A_{stationary} \quad K = \frac{C_s}{C_m}$$



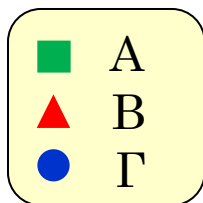
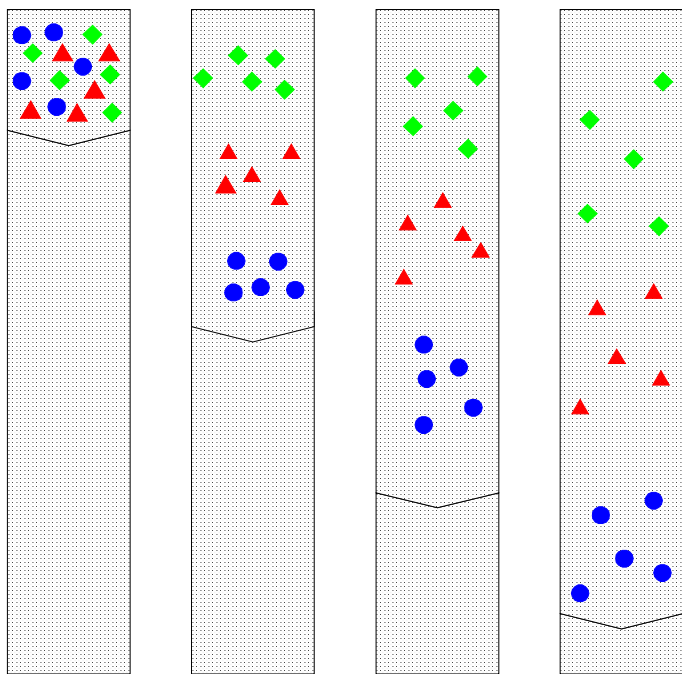


✓ **Εισαγωγή μείγματος** σε μια χρωματογραφική στήλη, την οποία διατρέχει μια κινητή φάση.

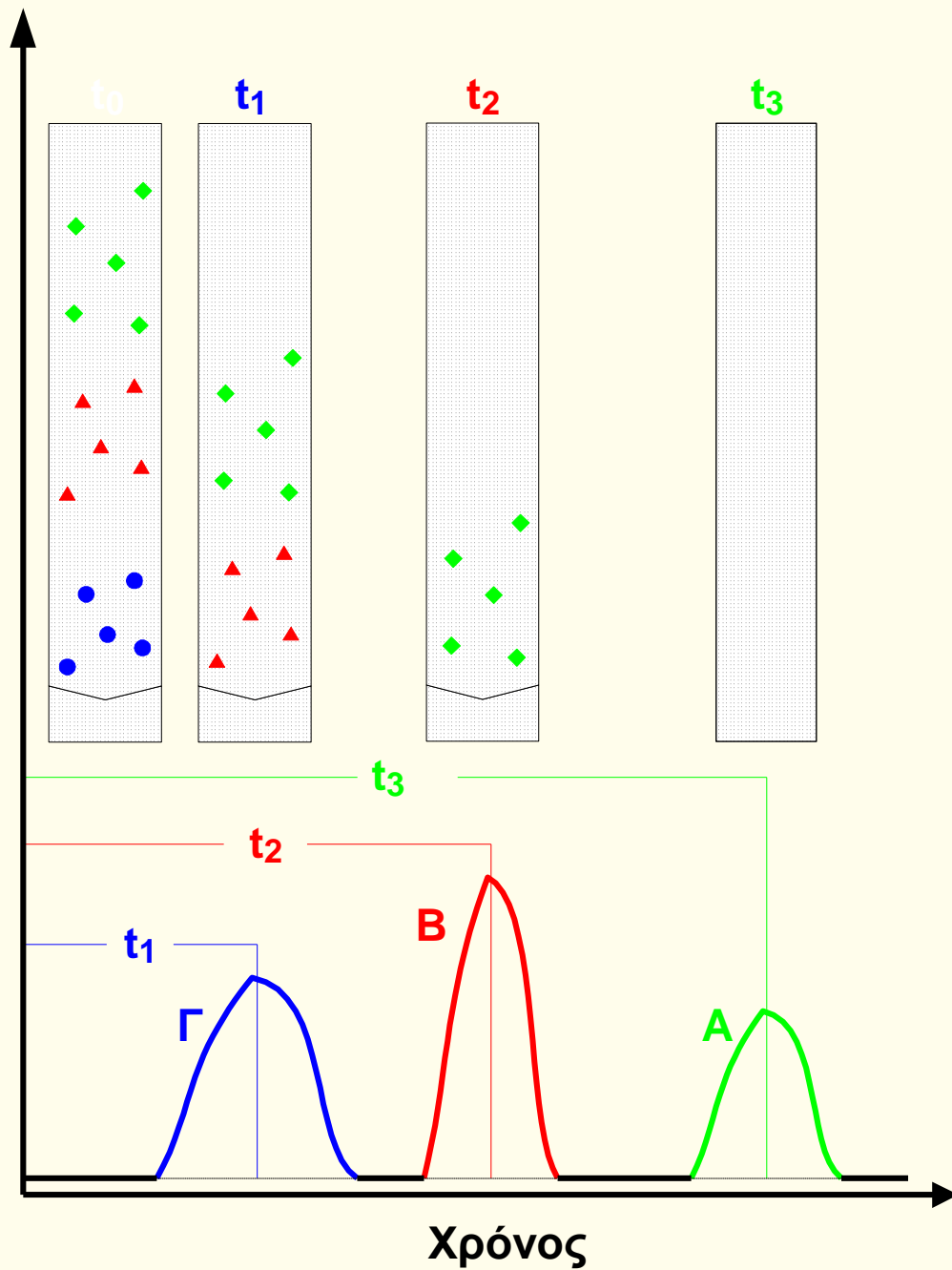
✓ Η κινητή φάση προκαλεί, με την συνεχή κίνησή της, την **μετατόπιση των συστατικών του μείγματος** σε διαφορετικές θέσεις μέσα στην χρωματογραφική στήλη.

✓ Οι διαφορετικές θέσεις στις οποίες εντοπίζονται τα συστατικά του μείγματος οφείλονται στις **διαφορετικές σταθερές κατανομής** που παρουσιάζουν τα επιμέρους συστατικά του μείγματος.

✓ Το αποτέλεσμα τελικά της διεργασίας είναι ο **διαχωρισμός του μείγματος** στα συστατικά του.



Απόκριση ανιχνευτή



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

- Απαιτεί μικρού μεγέθους δείγματα τα οποία δεν απαιτούν εκτεταμένη προκατεργασία
- Αποτελεσματική στο διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων στα συστατικά τους ($N \sim 1,3 \cdot 10^6$)
- Τα αποτελέσματα λαμβάνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα
- Υψηλή ακρίβεια (1-5 % RSD)
- Κατάλληλη ευαισθησία για τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ppb, ppt)
- Η οργανολογία δεν είναι περίπλοκη



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

- Συχνά περιορίζεται από την πτητικότητα των ενώσεων
 - η θερμοκρασία της στήλης περιορίζεται $\sim 380\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - η Ρατμ του αναλύτη $\sim 60\text{ torr}$ σε αυτή τη θερμοκρασία στήλης
 - οι ενώσεις θα πρέπει να έχουν σ.ζ. $< 500\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Ακατάλληλη για θερμικά ασταθείς ενώσεις
- Μερικά δείγματα απαιτούν εκτεταμένη προκατεργασία. Τα δείγματα θα πρέπει να είναι διαλυτά και να μην αντιδρούν με τη στήλη
- Συνήθως απαιτείται η χρήση φασματοσκοπίας (συνήθως MS) για τον προσδιορισμό της ταυτότητας των ενώσεων

