



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Περιγραφή-περιεχόμενα διάλεξης

Η διάλεξη στοχεύει στην εξοικείωση των φοιτητών με τις βασικές αρχές και τις εφαρμογές των χρωματογραφικών τεχνικών ανάλυσης.

Τα περιεχόμενα της διάλεξης:

A) Εισαγωγή στην χρωματογραφία, βασικοί ορισμοί

B) Θεωρία χρωματογραφίας: Αποτελεσματικότητα στήλης – Θεωρία πλακών

Γ) Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών:

1) Με βάση την φυσική μορφή της στατικής φάσης:

i) χρωματογραφία στήλης

ii) επίπεδη χρωματογραφία (λεπτής στοιβάδας, TLC ή χάρτου, PC)

2) Με βάση τη φύση της κινητής φάσης:

i) αέρια χρωματογραφία

ii) υγρή χρωματογραφία

3) Με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού

i) Χρωματογραφία προσρόφησης

ii) Χρωματογραφία κατανομής

iii) Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

iv) Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

v) Χρωματογραφία συγγένειας

Δ) Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ε) Χρωματογραφικές τεχνικές για την μελέτη βιομορίων



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Ο όρος χρωματογραφία αντιστοιχεί σε ένα σύνολο τεχνικών που ανήκουν στις μεθόδους **Διαχωρισμού** και καλύπτουν την ανάγκη **ανάλυσης μίγμάτων**. Όλες στηρίζονται στην ίδια αρχή: την **διαφορετική κατανομή** των συστατικών του μίγματος σε ένα διαλύτη που ονομάζεται κινητή φάση (αέρια ή υγρή), ο οποίος διέρχεται από ένα ακίνητο υλικό που ονομάζεται στατική φάση. Αποτέλεσμα αυτού είναι άλλα συστατικά να κατακρατούνται για περισσότερο και άλλα για λιγότερο χρόνο. Η διαφορετική κατανομή οφείλεται σε διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών του μίγματος (μέγεθος, πολικότητα, φορτίο κλπ)

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Ποσότητα δείγματος, δύο συστατικών Α και Β, προστίθεται στην κορυφή (αρχή) της στήλης. Τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Το κλάσμα κάθε συστατικού που βρίσκεται στην κινητή φάση μετακινείται στη στήλη, έρχεται σε επαφή με νέο τμήμα της στατικής φάσης οπότε και έχουμε νέα κατανομή. Το κλάσμα που βρισκόταν στη στατική φάση, έρχεται σε επαφή με την κινητή φάση οπότε και έχουμε νέα κατανομή. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται καθώς διαβιβάζεται νέα κινητή φάση. Τα συστατικά μετακινούνται μόνο όταν βρίσκονται στην κινητή φάση, με ταχύτητα η οποία εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής τους σε αυτή

Η κατανομή των συστατικών του μείγματος μεταξύ κινητής και στατικής φάσης περιγράφεται με τον συντελεστή κατανομής K :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

όπου C_s και C_m η συγκέντρωση ενός συστατικού του μίγματος στην στατική και την κινητή φάση αντίστοιχα

ΟΡΙΣΜΟΙ - ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

- Η κινητή φάση(υγρό ή αέριο) ονομάζεται υγρό εκλούσεως (eluent)
- Το διάλυμα που εξέρχεται από τη στήλη έκλουσμα (eluate)
- Η διαδικασία ονομάζεται έκλουση (elution) και αν η παροχή κινητής φάσης γίνεται με σταθερή ταχύτητα γραμμική έκλουση.

- Στο τέλος της στήλης τοποθετείται ανιχνευτής που παρακολουθεί μια αναλυτική ιδιότητα και παράγει σήμα κάθε φορά που εκλύεται ένα συστατικό (χρωματογραφική κορυφή - peak)
- Το διάγραμμα του σήματος συναρτήσει του όγκου ή του χρόνου ονομάζεται χρωματογράφημα. Τα χρωματογραφήματα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.
-
- ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ή ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ (t_R): ο χρόνος που χρειάζεται από τη στιγμή εισαγωγής του δείγματος μέχρι την στιγμή που η κορυφή της ουσίας φτάνει στον ανιχνευτή
- ΝΕΚΡΟΣ ΧΡΟΝΟΣ (t_M): ο χρόνος που χρειάζεται μια μη κατακρατούμενη ουσία για να φτάσει στον ανιχνευτή
- ΑΝΗΓΜΕΝΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ (t'_R): $t'_R = t_R - t_M$
- ΟΓΚΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ (V_R): Ο όγκος της κινητής φάσης που χρειάζεται να διέλθει από τη στατική φάση για να εκλουστεί μια ουσία
- $V_R = t_R * F$, όπου F: η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (mL/min)
- ΝΕΚΡΟΣ ΟΓΚΟΣ (V_M): Ο όγκος της κινητής φάσης στη στήλη $V_M = t_M * F$
- ΑΝΗΓΜΕΝΟΣ ΟΓΚΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ (V'_R): $V'_R = t'_R * F$

Το μέγεθος της συγκρατήσεως μιας ουσίας εκφράζεται από τον **λόγο συγκρατήσεως ή επιβραδύνσεως R_F** (retention ratio)

$$R_F = \frac{\text{μέση ταχύτητα ουσίας στη στήλη}}{\text{μέση ταχύτητα υγρού εκλούσεως}}$$

Οι όγκοι και χρόνοι που απαιτούνται για να διέλθουν το υγρό εκλούσεως και η ουσία από τη στήλη είναι αντιστρόφως ανάλογοι των μέσων ταχυτήτων τους.

$$R_F = \frac{L/t_R}{L/t_M} = \frac{t_M}{t_R} = \frac{V_M}{V_R}$$

όπου L = μήκος της στήλης

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΛΗΣ – ΘΕΩΡΙΑ ΠΛΑΚΩΝ.

Κατά τη έκλυση συμβαίνουν δυο αντίθετες διαδικασίες

- Τα συστατικά του μείγματος μετακινούνται στη στήλη με διαφορετική ταχύτητα
- Τα μόρια κάθε συστατικού διασπείρονται από μια λεπτή ζώνη σε μια πιο ευρύτερη

Η πρώτη διαδικασία (μετανάστευση) προκαλεί τον διαχωρισμό, η δεύτερη (διευρυνση) τείνει να τα κρατήσει αναμειγμένα.

Για να επιτευχθεί διαχωρισμός πρέπει τα συστατικά να μετακινούνται χωριστά ταχύτερα απ' ότι διευρύνονται. **Μια χρωματογραφική στήλη είναι τόσο αποτελεσματικότερη, όσο μικρότερη διεύρυνση προκαλεί (για δεδομένο όγκο συγκρατήσεως).** Η διεύρυνση (παραμόρφωση) ζώνης είναι ανεπιθύμητη γιατί αφενός δεν επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος αφετέρου οι πολύ διευρυμένες κορυφές είναι ακατάλληλες για ποσοτική ανάλυση

Μια θεωρία που συνδυάζει τη διεύρυνση με τη μετακίνηση είναι η **θεωρία των πλακών** όπου η κίνηση μιας ουσίας θεωρείται σαν μετακίνηση μέσω διαδοχικών θαλάμων (ζωνών) εξισορροπήσεως που ονομάζονται **Θεωρητικές πλάκες**.

Η **θεωρητική πλάκα** είναι μια φανταστική έννοια και **ισοδυναμεί με τον απαιτούμενο όγκο της στήλης**, ώστε μέσα σ' αυτόν να αποκαθίσταται **ισορροπία μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης**.

Η αποτελεσματικότητα της στήλης χαρακτηρίζεται από την λεπτότητα μιας θεωρητικής πλάκας η το **ύψος ισοδύναμο με μια θεωρητική πλάκα (ΥΙΘΠ)**.

$$ΥΙΘΠ = h = L / n$$

όπου n = αριθμός θεωρητικών πλακών

L = μήκος της στήλης

Ο αριθμός θεωρητικών πλακών μπορεί να υπολογισθεί από τη χρωματογραφική κορυφή μιας ουσίας με βάση την σχέση:

$$n = 16(t_{R,A} / w_b)^2 = 16(V_{R,A} / w_b)^2$$

Για ένα καθορισμένο μήκος στήλης, **όσο μεγαλύτερος είναι ο n τόσο στενότερες είναι οι κορυφές και τόσο αποτελεσματικότερη είναι η στήλη**. Δηλαδή από δύο στήλες με ίδιο μήκος εκείνη που έχει μεγαλύτερο αριθμό θεωρητικών πλακών, n, θα δίνει οξύτερες κορυφές και συνεπώς καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ ουσιών που έχουν παραπλήσιους όγκους (χρόνους) ανάσχεσης. Επιπλέον για δεδομένη στήλη, το εύρος W μιας κορυφής είναι ανάλογο με τον όγκο (ή χρόνο) ανάσχεσης. Επομένως οι κορυφές συνεχώς θα διευρύνονται από την αρχή έως το τέλος του χρωματογραφήματος, με συνέπεια η παρατεταμένη έκλυση να εκφυλίζει την κανονική κατανομή της κορυφής. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών n εξαρτάται κυρίως από τον τρόπο πλήρωσης της στήλης και το μέγεθος των σωματιδίων της στήλης

Διαχωριστικότητα η Διαχωριστική Ικανότητα. Ο βαθμός διαχωρισμού 2 ουσιών φαίνεται από τον βαθμό αλληλοεπικάλυψης των κορυφών τους. Η διαχωριστική ικανότητα **R** ορίζεται από τη σχέση

$$R = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{w_B + w_B}$$

Ο διαχωρισμός είναι πλήρης για **R ≥ 1,5**

Αύξηση της διαχωριστικότητας δυο διαδοχικών κορυφών μπορεί να επιτευχθεί με:

1. Αύξηση της εκλεκτικότητας της στήλης →

ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

2. Ελάττωση του εύρους της κάθε κορυφής, βελτίωση της αποδοτικότητας της στήλης →

ΒΕΛΤΙΩΣΗ της ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ →

- μήκος στήλης (L)
- Υλικό και μέγεθος σωματιδίων
- Ταχύτητα ροής (F)
- Θερμοκρασία (θ), και
- Τρόπος εισαγωγής δείγματος

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

1) Με βάση τη φυσική μορφή και τον τρόπο στήριξης της στατικής φάσης

- Επίπεδη χρωματογραφία όπου η στατική φάση είναι σε επίπεδο (χρωματογραφία χάρτου PC και λεπτής στιβάδος TLC)
- Χρωματογραφία στήλης, όπου η στατική φάση συγκρατείται σε κυλινδρική στήλη μέσα από την οποία η κινητή φάση διαβιβάζεται με πίεση η ρέει λόγω βαρύτητας.

1) Με βάση την φύση της κινητής φάσης

- Κινητή φάση **αέρια** → αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)
- Κινητή φάση **υγρή** → υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)
- Κινητή φάση αέρια σε υπερκρίσιμη κατάσταση (CO_2 στους 50° και πίεση μεγαλύτερη 15Mpa)→ υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία (superficial fluid chromatography, SFC).

Η στατική φάση μπορεί να είναι:

- **Στερεή** → αέρια στερεή χρωματογραφία (GSC) και υγρή στερεή χρωματογραφία (LSC).
- **Υγρή** μηχανικά ή χημικά συνδεδεμένη σε στερεό υπόστρωμα → αέρια υγρή χρωματογραφία (GLC) και υγρή, υγρή χρωματογραφία (LLC).

2) Με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού

- i) Χρωματογραφία προσρόφησης
- ii) Χρωματογραφία κατανομής
- iii) Χρωματογραφία μοριακής διήθησης
- iv) Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής
- v) Χρωματογραφία συγγένειας

ΕΠΙΠΕΔΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Ως στατική φάση χρησιμοποιούνται:

- Διοξείδιο του Πυριτίου (Silicagel, SiO₂)
- Οξείδιο του Αργιλίου (alumina, Al₂O₃)
- Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη (cellulose)
- Γη Διατόμων (kieselgur)
- Πολυαμίδιο

Η στατική φάση είναι επιστρωμένη σε πλάκα γυάλινη ή πλαστική πάχους 100-300μm πάνω στην οποία προσκολλάται με τη βοήθεια συνδετικών υλικών (γύψος, άμυλο)

Βήματα:

- 1) Το προς ανάλυση δείγμα τοποθετείται στο ένα άκρο της πλάκας σε σημείο που έχει προσημειωθεί με μολύβι με σύριγγα ή μικροσιφόνιο.
- 2) Η κηλίδα ξηραίνεται με εξάτμιση του διαλύτη. Η πλάκα τοποθετείται σε κλειστό δοχείο που περιέχει το διαλύτη έκλυσης.
- 3) Ο διαλύτης ανέρχεται (ή κατέρχεται), παρασύροντας τα συστατικά του μείγματος.
- 4) Όταν ο διαλύτης φθάσει στο άλλο άκρο της πλάκας, η πλάκα ξηραίνεται.
- 5) Σημειώνεται με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη.
- 6) Εμφάνιση των συστατικών με ψεκασμό με κατάλληλα αντιδραστήρια (βαφή με ατμούς ιωδίου, μεθειικό οξύ ή με φωσφομολυβδαινικό οξύ) ή με έκθεση της πλάκας σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Η ταυτοποίηση των συστατικών του μίγματος μπορεί να γίνει με βάση την τιμή του συντελεστή επιβράδυνσης R_f της κάθε κηλίδας που υπολογίζεται από την σχέση.

$$R_f = \frac{\text{απόσταση που διάνυσε η ουσία}}{\text{απόσταση που διάνυσε το μέτωπο του διαλύτη}}$$

Ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται με σάρωση της πλάκας με την τεχνική της πυκνομετρίας (μια μορφή φασματοφωτομετρίας) ή απλούστερα με την τεχνική της μέτρησης της επιφάνειας της κηλίδας με διαφανές χιλιοστομετρικό χαρτί.

Με ανάλογο τρόπο λειτουργεί και η χρωματογραφία σε χάρτη. Στην περίπτωση αυτή, η στατική φάση είναι το χαρτί ή καλύτερα το νερό που συγκρατείται στο χαρτί.

ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Χρωματογραφική στήλη / Στατική φάση

Το βασικότερο τμήμα της αεροχρωματογραφικής διάταξης είναι η στήλη

- Πληρωμένη (packed)
- Τριχοειδής (capillary)

Οι πληρωμένες έχουν

- Διάμετρο 3-6mm
- Μήκος 1-3m

Και περιέχουν ένα στερεό υπόστρωμα διαποτισμένο με κατάλληλο υγρό, που αποτελεί την στατική φάση.

Οι τριχοειδής

- **WCOT (wall Coated Open Tubular):** Στο εσωτερικό τοίχωμα του σωλήνα φέρουν τοποθετημένη, απ' ευθείας, την υγρή στατική φάση
- **SCOT (Support Coated Open Tubular):** έχουν την υγρή φάση εμποτισμένη σε υπόστρωμα που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα
- **PLOT (Porous Layer Open Tubular):** φέρουν τη στερεή φάση σε ένα προσροφητικό υλικό στην εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα

Εσωτερική Διάμετρο: 0.1-1,5mm

Μήκος : 15-100m

Υπάρχουν πάνω από 100 υγρές στατικές φάσεις για τις πληρωμένες στήλες .

Για τις τριχοειδείς κυρίως χρησιμοποιούνται έλαια **σιλικόνης (polysiloxanes)** και **πολυαιθυλενογλυκόλες**
Όσον αφορά τις στερεές στατικές φάσεις (PLOT) είναι από υλικά **πυριτικής βάσης**

Το κριτήριο για την επιλογή της στατικής φάσης αποτελεί η χημική συγγένεια με αυτής των συστατικών του δείγματος.

ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ

Αδρανή αέρια (He, N₂, Ar) – Η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο ρόλος της είναι μόνο η διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης. Για τον λόγο αυτό ονομάζεται και **ΦΕΡΟΝ ΑΕΡΙΟ**
Η κινητή φάση πρέπει να έχει μεγάλο συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας για να επιτυγχάνεται η αποτελεσματική θέρμανση του δείγματος καθώς και μικρή πυκνότητα, έτσι ώστε να είναι εφικτή η εφαρμογή μεγάλης ταχύτητας ροής, άρα μικροί χρόνοι ανάλυσης

Ροή: 20-100ml/min για τις πληρωμένες και **0.1-5ml/min** για τις τριχοειδείς.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η εισαγωγή γίνεται με μικροσύριγγα μέσω ελαστικού διαφράγματος ή με ειδικό σύστημα περιστρεφόμενης βαλβίδας με βρόχο.

- Ο χώρος εισαγωγής θερμαίνεται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τη θερμοκρασία της στήλης, ώστε να διασφαλιστεί η εξαέρωση του δείγματος.
- Στις τριχοειδείς στήλες, μέρος του εισαγόμενου δείγματος οδηγείται στη στήλη μέσω ειδικής διάταξης (splitter).

ΘΕΡΜΟΣΤΑΤΙΣΗ ΣΤΗΛΗΣ

Η θερμοκρασία της στήλης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία διαχωρισμού.

- Η στήλη σε σταθερή θερμοκρασία (ισόθερμη χρωματογραφία).
- Η θερμοκρασία μεταβάλλεται με καθορισμένο πρόγραμμα (θερμο-προγραμματιζόμενη χρωματογραφία)

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Στη χρωματογραφία προσρόφησης επί στήλης (κλασσική) η προσροφητική ουσία (στατική φάση βρίσκεται υπό μορφή στήλης μέσα σε γυάλινο σωλήνα. Ο διαχωρισμός των ουσιών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης των συστατικών στη στερεά φάση και στη διαφορετική διαλυτότητα τους στη κινητή φάση. Η ταχύτητα μετακίνησης μιας ουσίας εξαρτάται από τον ανταγωνισμό του προσροφητικού μέσου και του διαλύτη.

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Η στατική φάση είναι μια εξαιρετικά λεπτά διαμερισμένη ρητίνη. Ο λεπτός διαμερισμός δίνει την δυνατότητα για περισσότερες θέσεις αλληλεπίδρασης με τα συστατικά του μίγματος με συνέπεια μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού (οξείες κορυφές). Οι αναλύσεις είναι ταχύτερες αλλά είναι απαραίτητη η εφαρμογή υψηλών πιέσεων (απαραίτητη η χρήση αντλίας για την παροχή της κινητής φάσης)

Το εύρος ροής στην υγρή χρωματογραφία είναι από 0,5 έως 5 ml/min και επιτυγχάνεται με αντλίες που λειτουργούν σε πιέσεις 300-7500psi. Οι συνηθισμένες στήλες με υλικό πλήρωσης 5μm, λειτουργούν με ροή 1ml/min και πιέσεις 1000-2000 psi. Η έκλυση γίνεται είτε ισοκρατικά όπου η σύσταση της κινητής φάσης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε βαθμωτά (gradient) όπου η ισχύς της κινητής φάσης μεταβάλλεται επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό.

Με την ισοκρατική έκλυση, όταν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά είναι δύσκολο να διαχωριστεί, ενώ παράλληλα τα συστατικά του δείγματος που συγκρατούνται ισχυρά από τη στήλη, εκλύονται πολύ αργά με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους. Με τη βαθμωτή έκλυση γίνεται ανάμειξη ενός ασθενούς με έναν ισχυρό διαλύτη σε ποσοστά που μπορεί να μεταβάλλονται με το χρόνο, με την περιεκτικότητα του ισχυρού διαλύτη διαρκώς αυξανόμενη. Έτσι διαχωρίζονται στην αρχή οι ουσίες που έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη και με την αύξηση της ισχύος εκλύονται καλύτερα και όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο.

Βασική Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης

A) Αντλίες παροχής κινητής φάσης

B) Αναμίκτης (στην περίπτωση βαθμωτής έκλυσης)

Γ) Βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος (διαμέσου βρόχου, είτε με σύριγγα, είτε με αυτόματο δειγματολήπτη)

Δ) Στήλη: Μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (Silicagel),ή κυτταρίνης ή πηκτής πολυακρυλαμιδίου ή πολυδεξτράνης μέσα σε κολώνα με περίβλημα γυαλιού ή πλαστικού ή ανοξειδωτού χάλυβα. Η θερμοκρασία της στήλης είτε διατηρείται σταθερή (Ισόθερμη έκλυση), είτε μεταβάλλεται με καθορισμένο πρόγραμμα (θερμο-προγραμματιζόμενη έκλυση)

Ε) Ανιχνευτής

1. **Ανιχνευτής δείκτη διαθλάσεως (RI):** Ανιχνευτής γενικής χρήσεως ο οποίος βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς του δείκτη διάθλασης, μεταξύ της καθαρής κινητής φάσης και αυτής που περιέχει την ουσία. Μειονέκτημα: Έχει μεγάλη ευαισθησία στη θερμοκρασία για τον λόγο αυτό θερμοστατείται με μεγάλη ακρίβεια ($\pm 0,001^{\circ}\text{C}$) για να μην υπάρχει σφάλμα στην μέτρηση του σήματος
2. **Ανιχνευτές υπεριώδους ορατού(UV-VIS).** Είναι ευαίσθητος στην περιοχή 10-6 έως 10-10 g/mL για αρκετές ενώσεις. Μετράει την απορρόφηση των ουσιών του μίγματος που βγαίνουν από την στήλη. Μπορεί να είναι είτε σταθερού είτε μεταβαλλόμενου μήκους κύματος
3. **Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode Array, PDA).** Διέρχεται **πολυχρωματική** ακτινοβολία από την κυψελίδα του ανιχνευτή. Η προκύπτουσα ακτινοβολία στη συνέχεια αναλύεται και προσπίπτει σε σειρά φωτοδιόδων. Κάθε μία φωτοδίοδος δέχεται μία διαφορετική δέσμη με μικρό εύρος μήκους κύματος. Όλη η σειρά των διόδων «σαρώνεται» πολλές φορές το δευτερόλεπτο από έναν μικροεπεξεργαστή και το προκύπτον φάσμα προβάλλεται σε οθόνη και ταυτόχρονα αποθηκεύεται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή για μετέπειτα εκτύπωση σε καταγραφικό. Ο υπολογιστής επιτρέπει την ταυτοποίηση της ουσίας συγκρίνοντας το φάσμα της με τα φάσματα που διαθέτει σε ειδικά αρχεία-βιβλιοθήκη. Η ανίχνευση μπορεί να γίνει σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος ταυτόχρονα. Η καθαρότητα μιας χρωματογραφικής κορυφής, δηλαδή το κατά πόσον πρόκειται για μία ουσία ή όχι, μπορεί να ελεγχθεί από τους λόγους των απορροφήσεων σε επιλεγμένα μήκη κύματος (πχ. 254nm και 280nm).
4. **Ανιχνευτές φθορισμού.** Φθορισμός είναι η ιδιότητα ορισμένων ουσιών όταν απορροφούν UV ακτινοβολία, αυτομάτως να εκπέμπουν ακτινοβολία.Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι 2 με 3 τάξεις μεγέθους πιο ευαίσθητοι από τους ανιχνευτές UV, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα, αφού οι περισσότερες ουσίες δε φθορίζουν. Κατάλληλες για ανίχνευση με φθορισμό είναι ουσίες που εκπέμπουν σημαντικό ποσοστό της ακτινοβολίας που έχουν απορροφήσει. Οι φυσικά φθορίζουσες ουσίες είναι λίγες και είναι αυτές με συζυγή κυκλική δομή, όπως οι πολυπυρηνικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Ουσίες που δε φθορίζουν μπορούν να ανιχνευθούν με φθορισμό αφού πρώτα μετατραπούν με κατάλληλη αντίδραση σε φθορίζον παράγωγο.
5. **Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές.** Μετράνε είτε την αγωγιμότητα της κινητής φάσης (ανιχνευτές αγωγιμότητας) είτε το ρεύμα που σχετίζεται με τη οξείδωση ή την αναγωγή του δείγματος

(αμπερομετρικοί ή κουλομετρικοί ανιχνευτές). Οι ανιχνευτές αγωγιμότητας βρίσκουν εφαρμογή στην ανίχνευση των ιόντων μετά από διαχωρισμό με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.

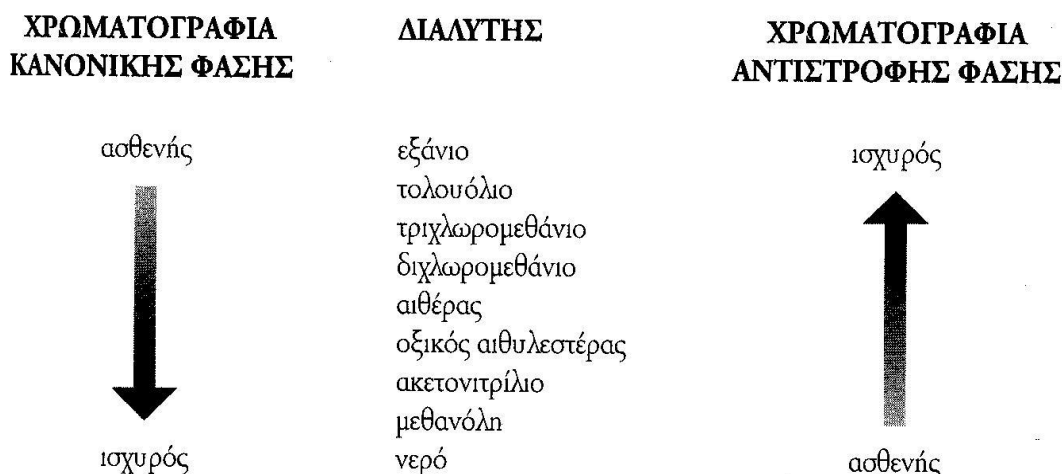
6. **Φασματογράφος μάζας (MS).** Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης (μαγνητική, τετραπόλου, χρόνου πτήσης) και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

1) Χρωματογραφία Κατανομής (partition η absorption),

Τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται μεταξύ λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσεως, που σχηματίζεται στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος και της υγρής κινητής φάσεως. Η στατική φάση αποτελείται από μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (Silicagel), διαμέτρου 2-10μm. Παρουσιάζει υψηλή πολικότητα και αποτελεί τη βάση της υγρής χρωματογραφίας. Μείωση της πολικότητας επιτυγχάνεται με σύνδεση με αλκύλια που φέρουν άμινο-, κύανο-, η φαινύλο ομάδες.

Εάν η υγρή στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή φάση, πρόκειται για χρωματογραφία **κανονικής φάσης**, ενώ στην αντίθετη περίπτωση έχουμε χρωματογραφία **αντίστροφης φάσης** (reversed phase chromatography, RPC).



Πρώτες εφαρμογές - στο διαχωρισμό μίγματος μη πολικών ενώσεων, όπως λιπίδια. Είναι αποτελεσματική τεχνική για το διαχωρισμό και πολικών ενώσεων οι οποίες διαθέτουν και μη πολικές ομάδες, όπως ολιγονουκλεοτίδια και πρωτεΐνες, αλλά λόγω των πολύ ισχυρών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων υπάρχει κίνδυνος αποδιάταξης πρωτεϊνών

2) Χρωματογραφία υδροφοβων αλληλεπιδράσεων (hydrophobic interaction chromatography, HIC)

Βασίζεται, όπως και η RPC στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, αλλά σε αντίθεση με την RPC (με ισχυρά υδρόφοβο χαρακτήρα) που προκαλεί αποδιάταξη πρωτεϊνών, στην HIC η στατική φάση είναι υδρόφιλη πηκτή αгарόζης μερικώς υποκατεστημένη με υδρόφοβες ομάδες (οκτυλο-, φαινυλο- υποκαταστάτες) Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι σχετικά ασθενείς και οι πρωτεΐνες διατηρούν τη φυσική τους διαμόρφωση.

Υγρά έκλυσης – υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα μειούμενης συγκέντρωσης άλατος (οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αυξάνουν με την αύξηση της ιονικής ισχύος, αύξηση της συγκέντρωσης επιφανειοδραστικών και ελάττωση pH). Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάση του βαθμού της επιφανειακής τους υδροφοβικότητας

3) Χρωματογραφία ιόντων (ion chromatography), όπου τα ιόντα του δείγματος εναλλάσσονται με τα ιόντα της στατικής φάσης.

4) Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion chromatography), όπου τα μόρια του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους, με τα μεγάλα μόρια να εξέρχονται πρώτα. Αντίθετα, τα μικρά μόρια ‘περιπλανώνται’ στους πόρους του πληρωτικού υλικού και συγκρατούνται περισσότερο.

5) Χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography), βασίζεται στην εξαιρετικά εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ενός μορίου του μείγματος με ένα μόριο που έχει χημικά δεσμευτεί στην στατική φάση.