

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΡΧΩΝ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Άσκηση 3<sup>η</sup> : Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography)

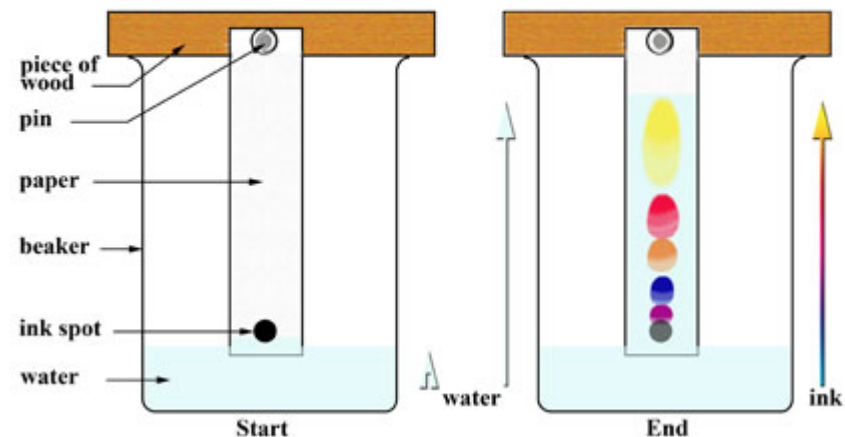
Η χρωματογραφία είναι μια πανίσχυρη τεχνική διαχωρισμού, η οποία βρίσκει εφαρμογή σε κάθε κλάδο της επιστήμης.

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

Οι εφαρμογές της αυξήθηκαν ραγδαία τα τελευταία 50 χρόνια και η απήχηση των μεθόδων αυτών αποδεικνύεται από το γεγονός ότι, από το 1937 ως το 1972, δόθηκαν 12 βραβεία Nobel σε επιστήμονες, των οποίων η έρευνα βασίστηκε σε σημαντικό βαθμό σε χρωματογραφικές μεθόδους.



Mikhail Tsvet  
1872-1919



# Χρωματογραφία – Αλληλεπίδραση 3 συστατικών

## ✓ Δείγμα προς διαχωρισμό

- Φαρμακευτικές ουσίες
- Εκχυλίσματα φυτών
- Βιολογικά δείγματα (ούρα ή αίμα)
- Μίγμα πρωτεϊνών ή ενζύμων

## ✓ Στατική φάση (Ακίνητοποιημένη)

- Χαρτί (ύφασμα κυτταρίνης)
- Λεπτή πλάκα επικαλυμμένη με προσροφητικό υλικό
- Σωματίδια (particles) συσκευάζονται σε μια στήλη από γυαλί ή μέταλλο

## ✓ Κινητή φάση (διαλυτή)

- Συνήθως αέριο στην Αέρια Χρωματογραφία (GC) ή υγρό στην Υγρή Χρωματογραφία (LC)

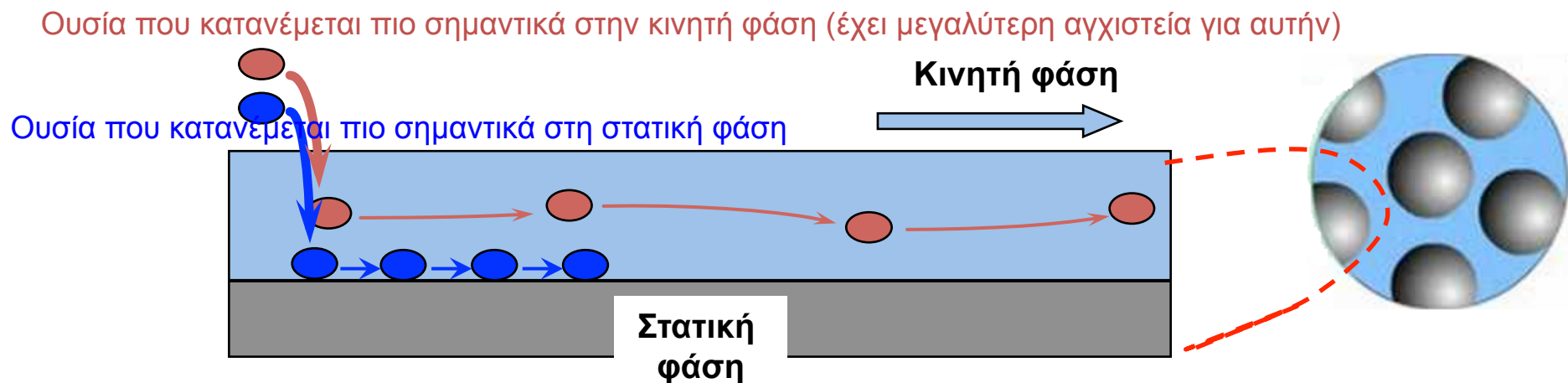
# Χρωματογραφία

(Τεχνική διαχωρισμού ουσιών από το μίγμα που τις αποτελεί )

**Τεχνική που δίνει λύσεις σε προβλήματα του τύπου:**

Πώς μπορεί κανείς να απομονώσει και να ταυτοποιήσει (και να προσδιορίσει ποσοτικά σε συνδυασμό με άλλη τεχνική) κάποιον αναλύτη ανάμεσα σε πολλούς άλλους αναλύτες π.χ. έναν περιβαλλοντικό ρυπαντή στο νερό κάποιας λίμνη ή έναν πρόσθετο σε τρόφιμο, ή κάποιο φάρμακο σε δείγμα ούρων;

Στη χρωματογραφία τα συστατικά ενός μείγματος μεταφέρονται διαμέσου μίας στατικής φάσης με τη βοήθεια της ροής μίας κινητής φάσης. Ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις.



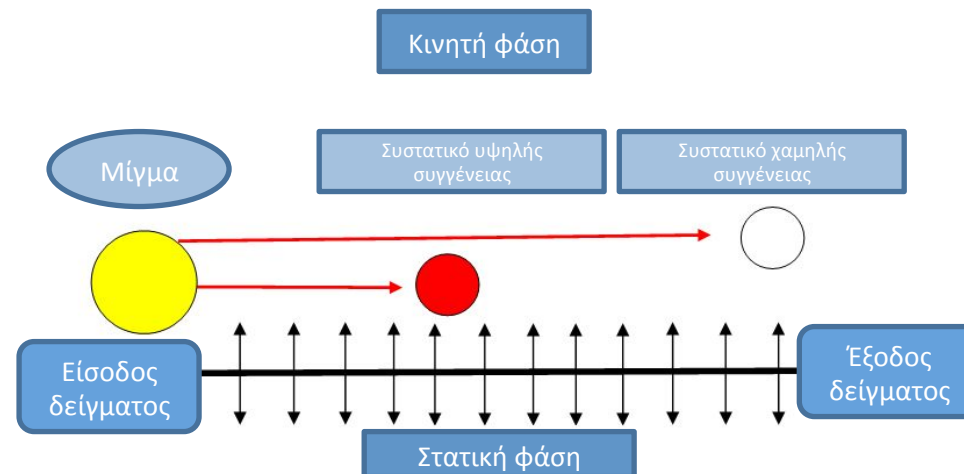
Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, το δείγμα κινείται σε μια κινητή φάση (mobile phase), η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ή ένα υγρό (διαλύτης ή σύστημα διαλυτών).

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.

Η στατική φάση είναι ένα προροφητικό υλικό (πορώδες στερεό υλικό)

Ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δυο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την αγχιστεία (φυσικοχημική συγγένεια π.χ μέγεθος μορίου, φορτίο, διαλυτότητα) του συστατικού με την κάθε φάση.

Κάθε μόριο της ουσίας μετακινείται μέσω της κινητής φάσης (όπου ΔΙΑΛΥΕΤΑΙ) και της στατικής φάσης (όπου προσροφάται ή δεσμεύεται λόγω αγχιστείας)



# Διαχωρισμός: Ο διαχωρισμός βασίζεται στο διαφορετικό για κάθε ουσία Συντελεστή Κατανομής

$$K = C_s / C_m$$

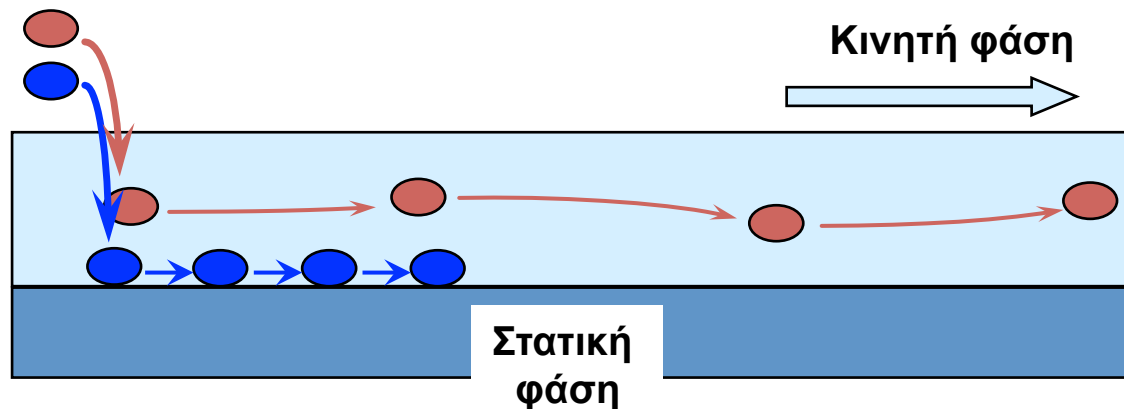
$C_s$  = Συγκέντρωση ουσίας στη στατική φάση

$C_m$  = συγκέντρωση ουσίας στην κινητή φάση

Η παράμετρος  $K$  εξαρτάται από τη θερμοκρασία κι έχει συγκεκριμένη τιμή για δεδομένη χημική ένωση και για κάθε ζεύγος στατικής/κινητής φάσης

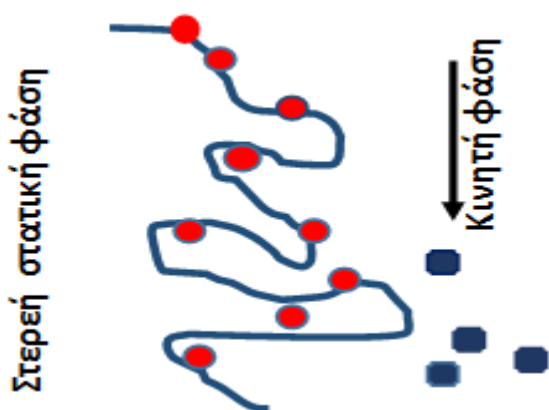
Μια ουσία που αλληλεπιδρά ισχυρά με την στατική φάση «Επιβραδύνεται» σε σχέση με μια ουσία που κατανέμεται πιο σημαντικά στην κινητή φάση και «Παρασύρεται ταχύτερα» από αυτή.

Είναι προφανές ότι για να διαχωριστούν δυο ουσίες θα πρέπει να διαφέρουν οι συντελεστές κατανομής !!!



$$K < K$$

## Κατάταξη χρωματογραφικών μεθόδων: ανάλογα με το μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και την στατική φάση



**Χρωματογραφία προσρόφησης :** διαχωρισμός λόγω διαφορετικού βαθμού προσρόφησης στη στατική φάση (αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, van der Waals, δεσμοί υδρογόνου)

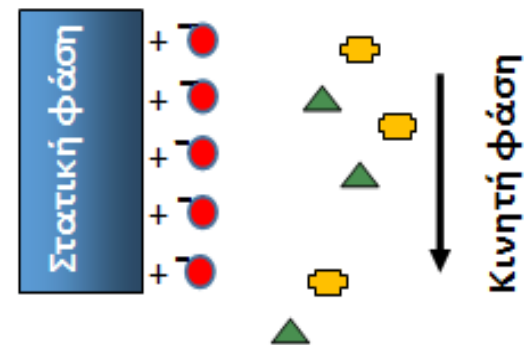


**Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού :** διαχωρισμός με βάση το μέγεθος των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων: τα μικρά μόρια καθυστερούν, τα μεγάλα προπορεύονται.

# Κατάταξη χρωματογραφικών μεθόδων: ανάλογα με το μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και την στατική φάση



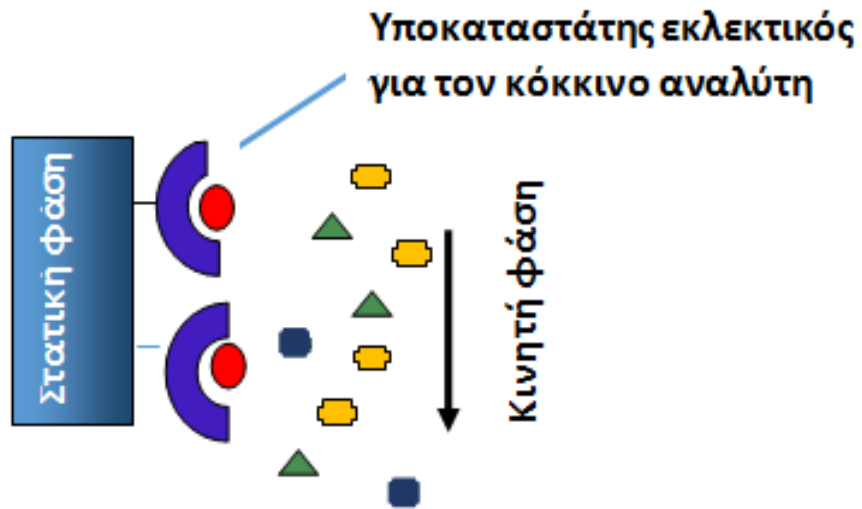
**Χρωματογραφία κατανομής :**  
διαχωρισμός λόγω διαφορετικής κατανομής των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της υγρής κινητής και της υγρής στατικής φάσης



**Χρωματογραφία ιονανταλλαγής:**  
διαχωρισμός λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης



## Κατάταξη χρωματογραφικών μεθόδων: ανάλογα με το μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και την στατική φάση

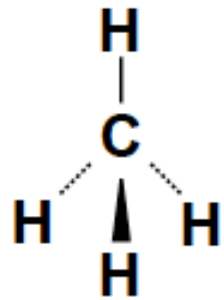


**Χρωματογραφία Χημικής Συγγένειας (Αγχιστείας):** εφαρμόζεται στο διαχωρισμό εναντιομερών, ενζύμων. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες, οι οποίοι είναι ακινητοποιημένοι στη στατική φάση

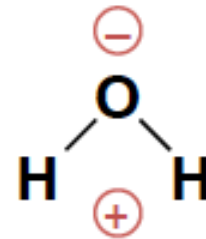
# Πολικότητα

- Πολικότητα

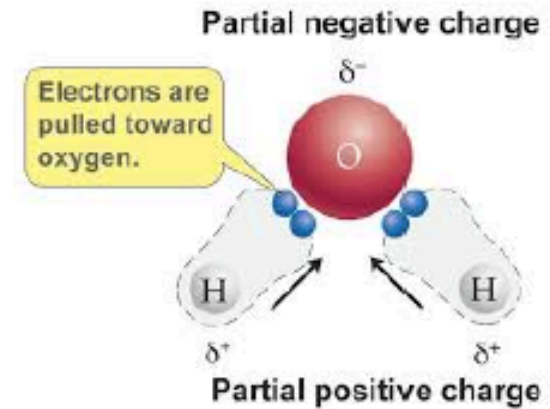
- ❖ Ιδιότητα μίας ουσίας λόγω διαχωρισμού φορτίων στο μόριό της



Μεθάνιο -μη πολικό



Νερό - πολικό

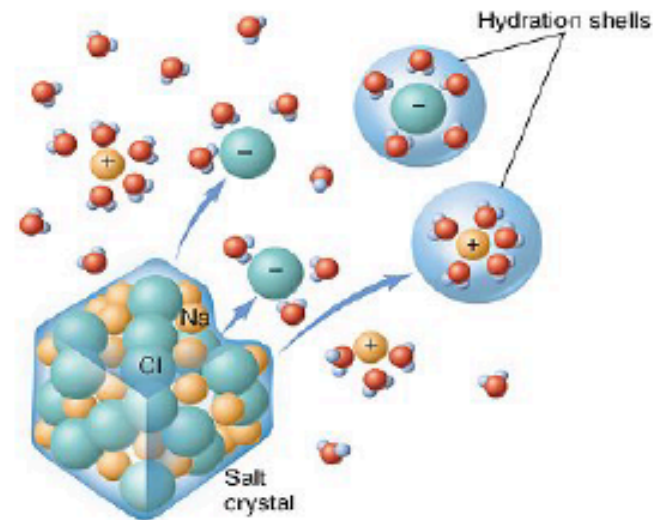


## Διαλυτότητα ουσιών

«Τα όμοια διαλύουν όμοια»: Πολικές ουσίες διαλύονται σε πολικούς διαλύτες και το αντίστροφο

Αρα ΟΜΟΙΑ ΚΑΤΑΝΕΜΟΝΤΑΙ ΚΑΙ ΣΤΑ ΟΜΟΙΑ !!!!

Λιπόφιλο μόριο – Υδρόφιλο μόριο



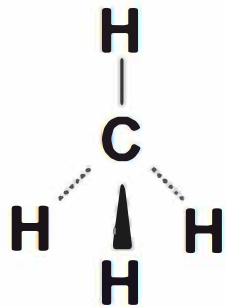
# Πολικότητα

- Πολικότητα

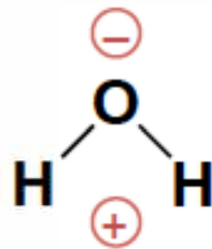
- ❖ Ιδιότητα μίας ουσίας λόγω διαχωρισμού φορτίων στο μόριό της

- ❖ Νερό: Πολικό μόριο

Μεθάνιο: Μη πολικό μόριο



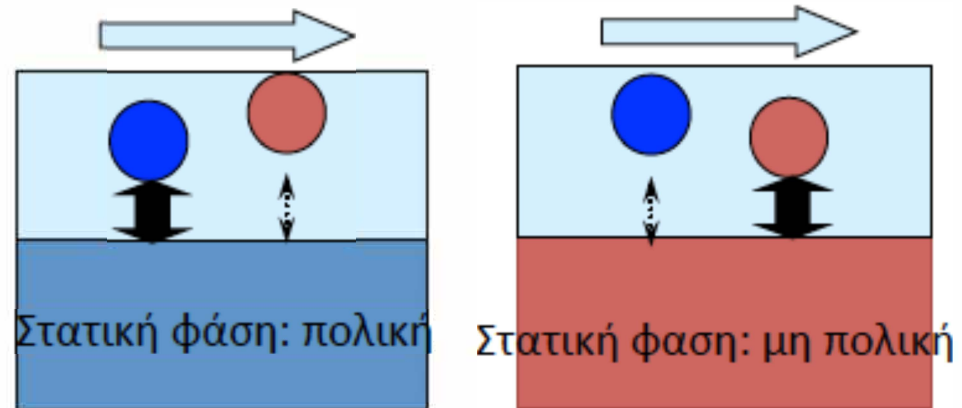
Μεθάνιο



Νερό

- Διαλυτότητα ουσιών

- ❖ «Τα όμοια διαλύουν όμοια»: Πολικές ουσίες διαλύονται σε πολικούς διαλύτες και το αντίστροφο



Στατική φάση: πολική

Στατική φάση: μη πολική

Αλληλεπιδρά ισχυρότερα (διαλύεται καλύτερα) το πολικό μόριο με την πολική φάση και το αντίστροφο

# Πολικότητα

- Μη πολικές ομάδες



- \* Αλκυλ-ομάδες

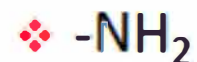


- \* Βενζολικός δακτύλιος

- Πολικές ομάδες



- \* Καρβόξυ-,ομάδες

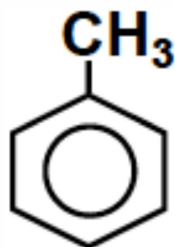


- \* Αμινο- ομάδες

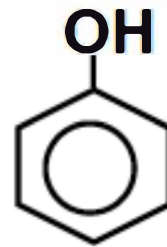


- \* Υδρόξυ- ομάδες

<http://pharmaxchange.info/press/2012/11/thin-layer-chromatography-tlc-principle-with-animation/>



Λιγότερο πολική ένωση

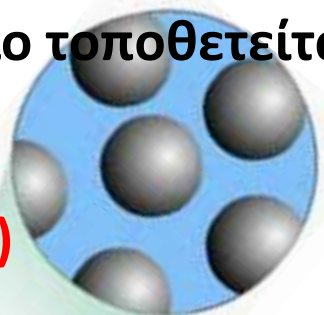


περισσότερο πολική ένωση

# Κατάταξη χρωματογραφικών μεθόδων: ανάλογα με τη μορφή της στατικής φάσης (στήλης, χάρτου, λεπτής στοιβάδας) και το μέσο στο οποίο τοποθετείται η στατική φάση

Χρωματογραφία στήλης  
(Column chromatography)

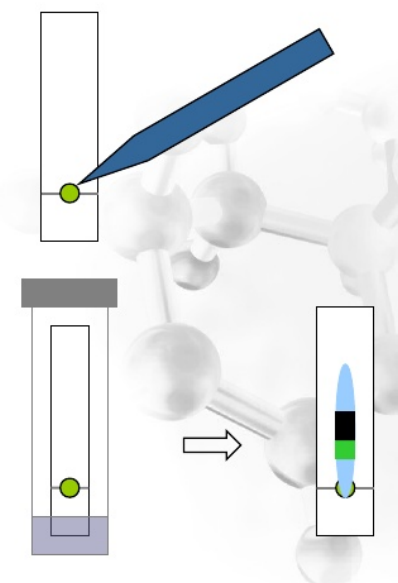
Λεπτής στοιβάδας, Χάρτου,  
(Thin Layer Chromatography)



Κινητή φάση

στατική φάση  
(προσροφητικό υλικό)

Φίλτρο

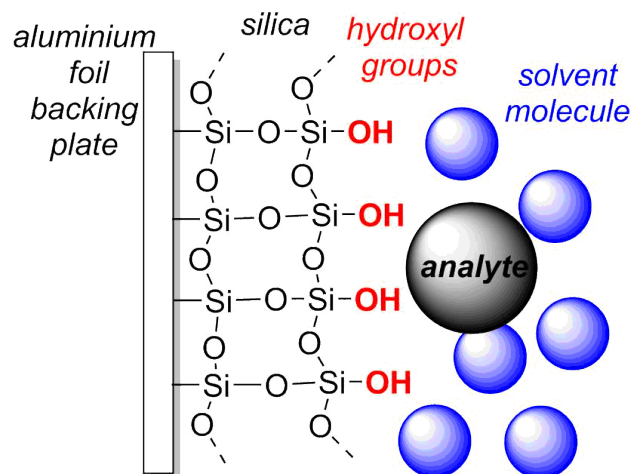


AB Applied Biosystems | MDS SCIEX

<https://www.youtube.com/watch?v=CmHFVxTxkGs>

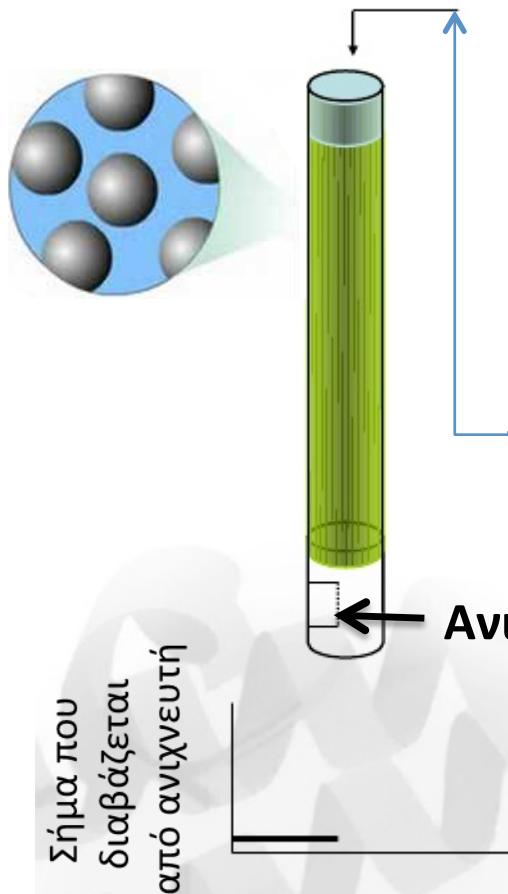
# Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

- ✓ Η στατική φάση του  $\text{SiO}_2$  είναι πολική με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ισχυροί δεσμοί διπόλου-διπόλου και δεσμοί υδρογόνου με το δείγμα.



- ✓ Τα πιο πολικά δείγματα αλληλεπιδρούν πιο ισχυρά με την στατική φάση και λιγότερο ισχυρά με την μη-πολική κινητή φάση, με αποτέλεσμα να μετακινούνται πιο αργά πάνω στην πλάκα της TLC.
- ✓ Τα μη πολικά δείγματα αλληλεπιδρούν λιγότερο με τη πολική στατική φάση και ισχυρότερα με την κινητή φάση, με αποτέλεσμα να μετακινούνται πιο ψηλά στην πλάκα της TLC.

# Χρωματογραφία στήλης



Στην χρωματογραφία στήλης η στατική φάση βρίσκεται μέσα σε μια **στήλη**, ενώ η κινητή φάση περνά διαμέσου της στήλης είτε λόγω βαρύτητας ή με τη χρήση περισταλτικής αντλίας (HPLC-High Pressure Liquid Chromatography)

**Δείγμα** (π.χ. νερό λίμνης, τρόφιμο, δείγμα ούρων) μετά από κατεργασία (εκχύλιση) εισάγεται στη στήλη υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης

Ανιχνευτής

Χρόνος

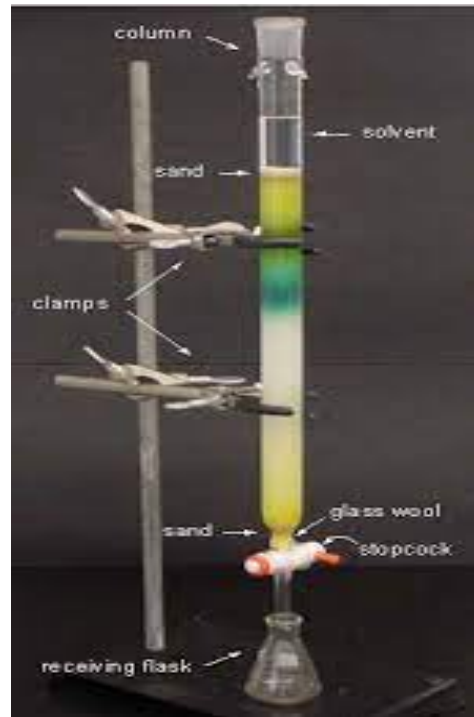
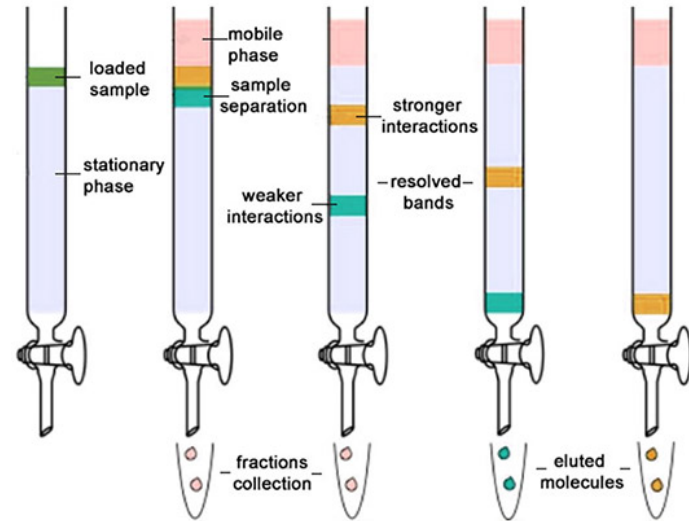
# Χρωματογραφία Στήλης

**Στατική φάση:** βρίσκεται μέσα σε μία γυάλινη ή πλαστική ή μεταλλική στήλη.

**Κινητή φάση:** περνά μέσω της στήλης είτε λόγω βαρύτητας ή με τη διοχέτευση αερίου υπό πίεση.

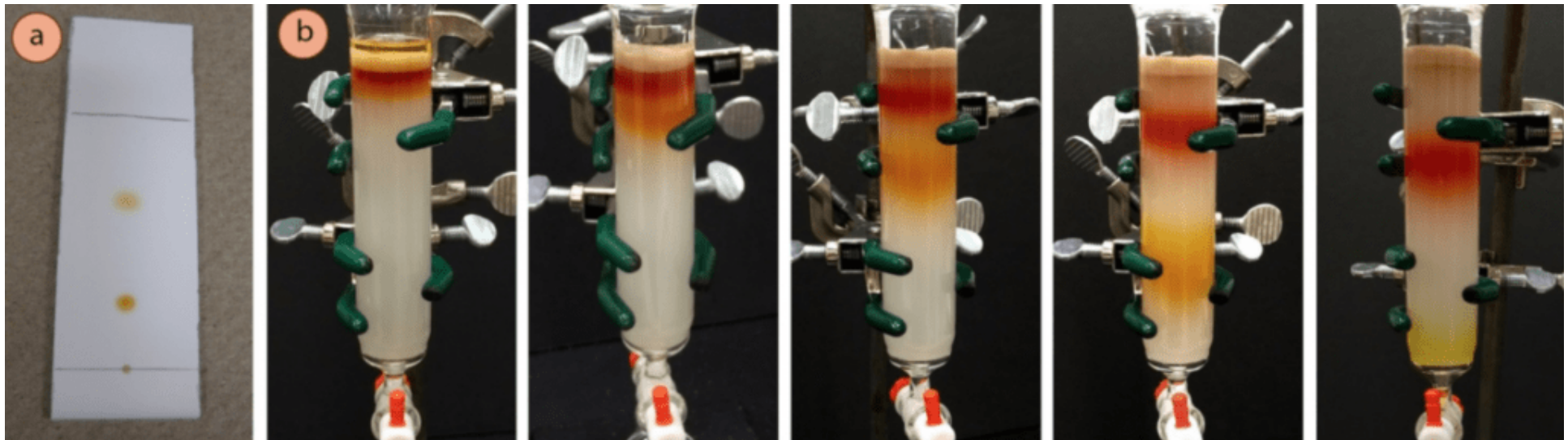
Είναι ο συνηθέστερος τύπος χρωματογραφίας.

*Column Chromatography*

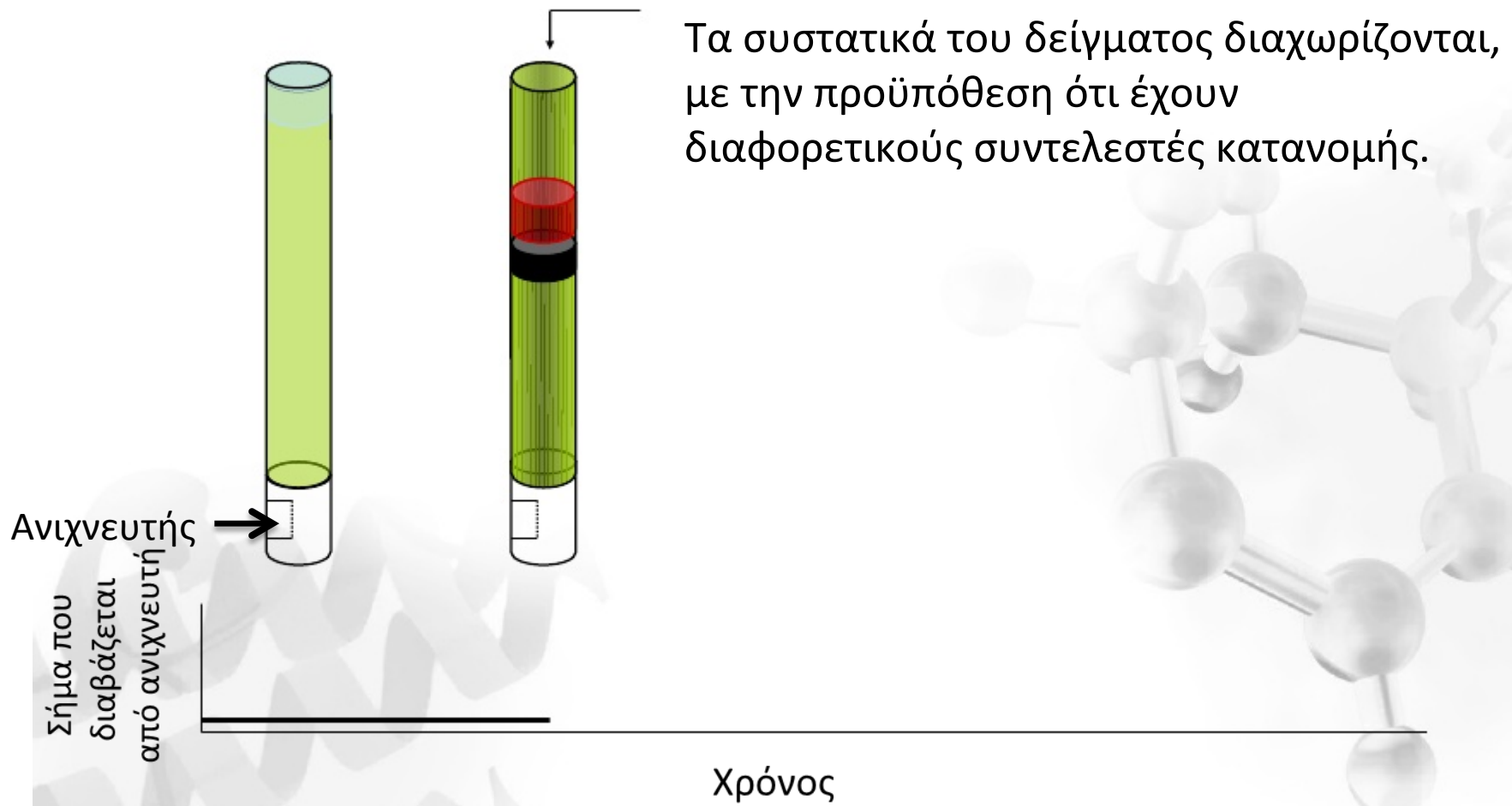




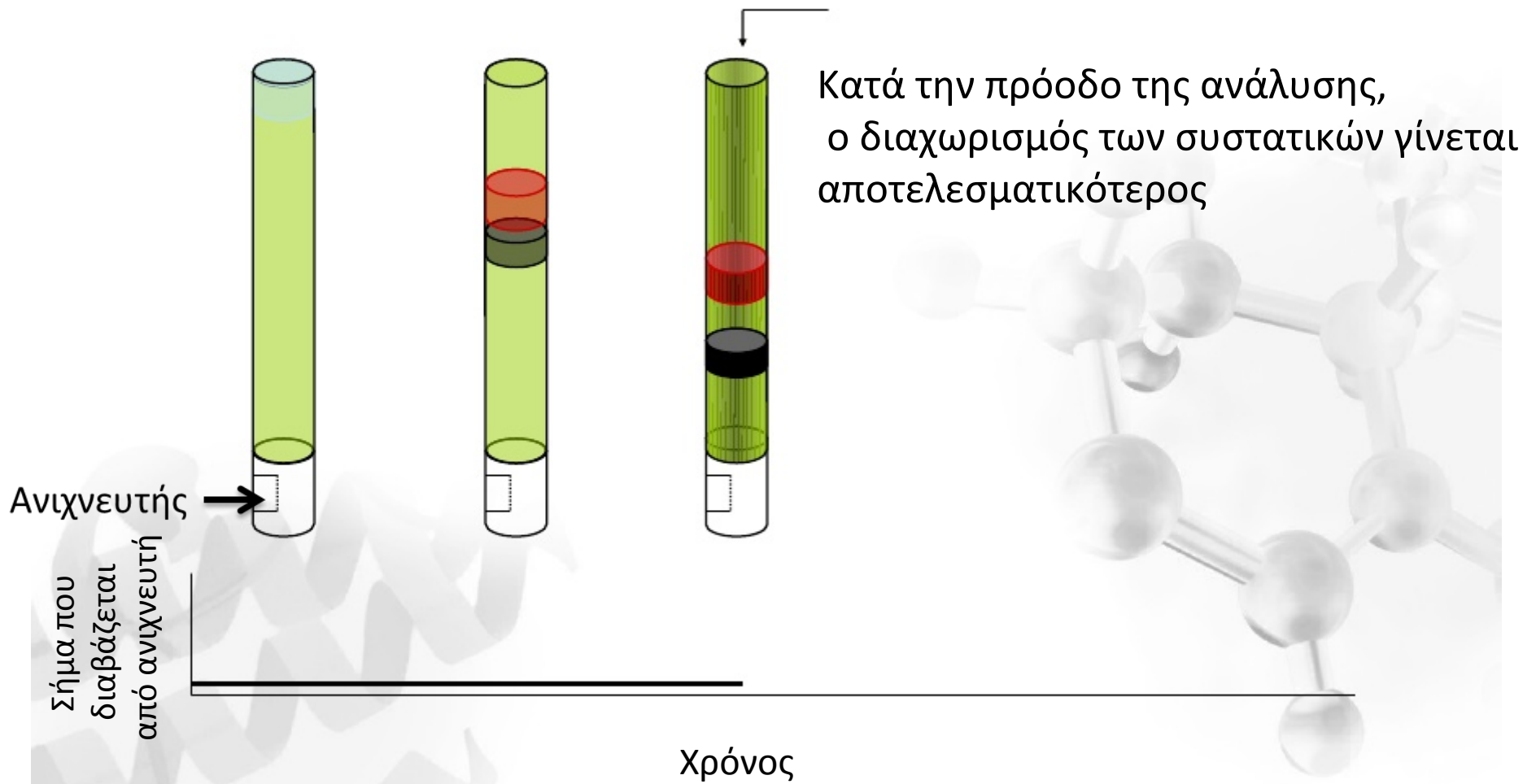
- Εάν οι διάφορες ουσίες του δείγματος έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, τότε θα διαχωριστούν μέσα στη στήλη και θα έκλυστουν σε διαφορετικούς χρόνους, όσο η κινητή φάση περνά μέσα από τη στήλη.
- Το προς διαχωρισμό δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης, έτσι ώστε να δημιουργήσει μία διακριτή ζώνη.
- Αν κάτω από τη στήλη τοποθετηθεί κλασματοσυλλέκτης, τότε μπορούν να συλλεχθούν τα διάφορα κλάσματα.



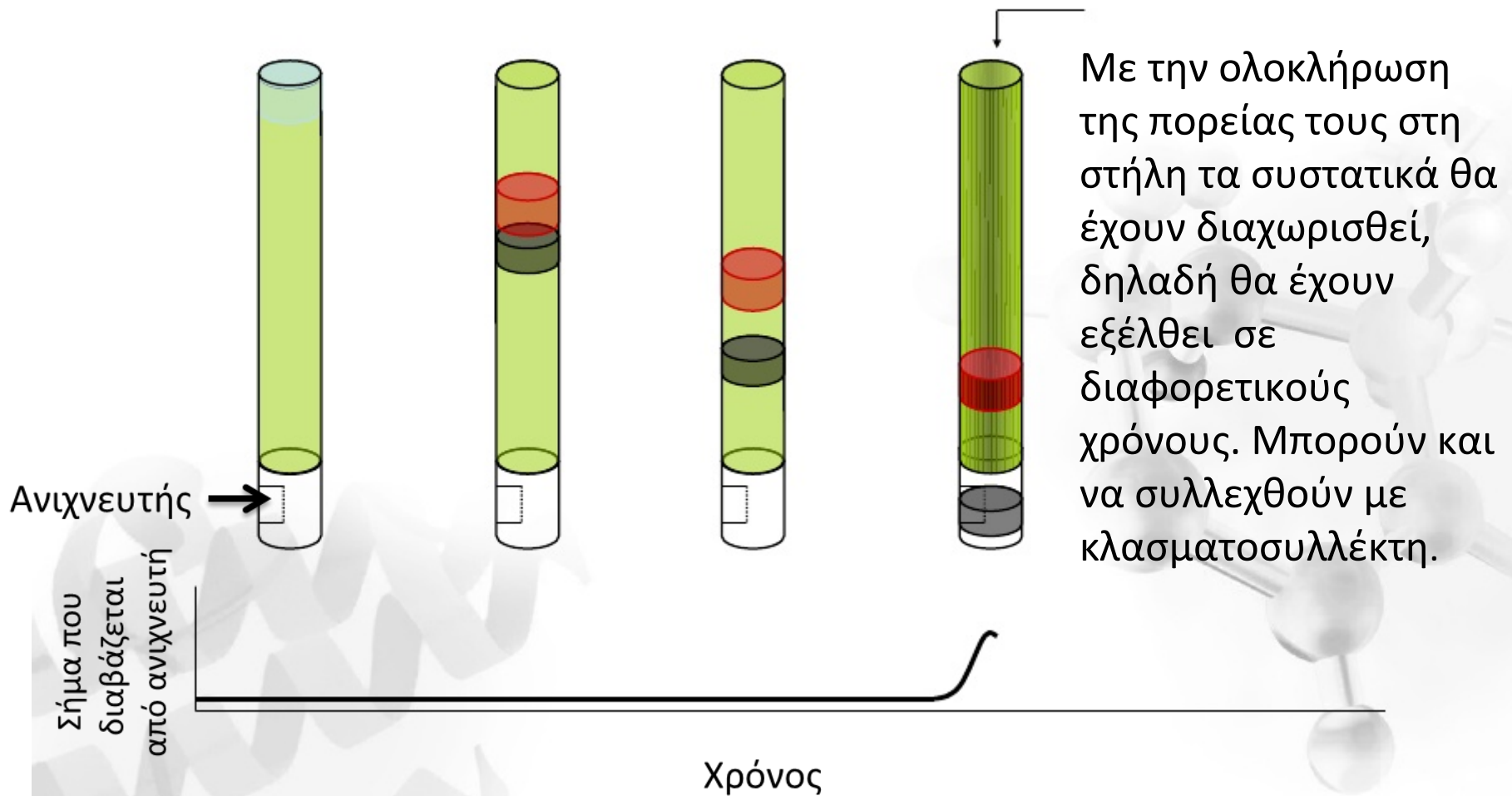
# Χρωματογραφία στήλης



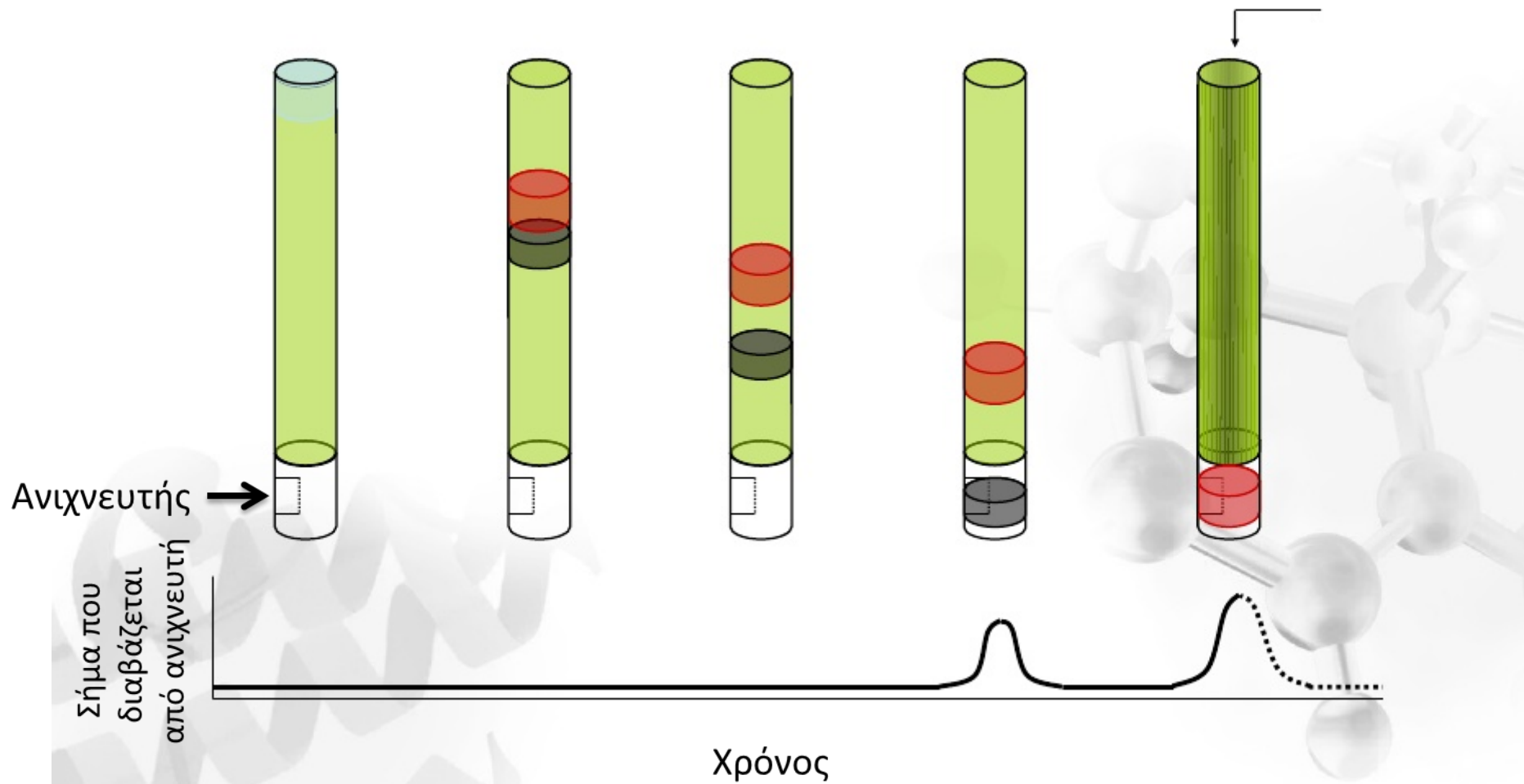
# Χρωματογραφία στήλης



# Χρωματογραφία στήλης



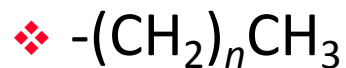
# Χρωματογραφία στήλης



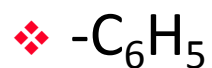
<http://studyhplc.com/hplcinstrument.php>

# Πολικότητα

- Μη πολικές ομάδες



- \* Αλκυλ-ομάδες



- \* Βενζολικός δακτύλιος

- Πολικές ομάδες



- \* Καρβόξυ-,ομάδες

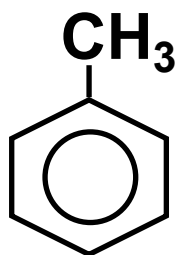


- \* Αμινο- ομάδες

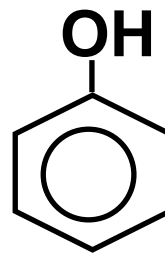


- \* Υδροξυ- ομάδες

<http://pharmaxchange.info/press/2012/11/thin-layer-chromatography-tlc-principle-with-animation/>



Λιγότερο πολική ένωση



περισσότερο πολική ένωση

# HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

- Παραλλαγή της χρωματογραφίας στήλης όπου η Κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας
- Επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης.
- Έτσι αυξάνεται το εμβαδό επιφάνειας της στατικής φάσης και ΒΕΛΤΙΩΝΕΤΑΙ ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για το διαχωρισμό

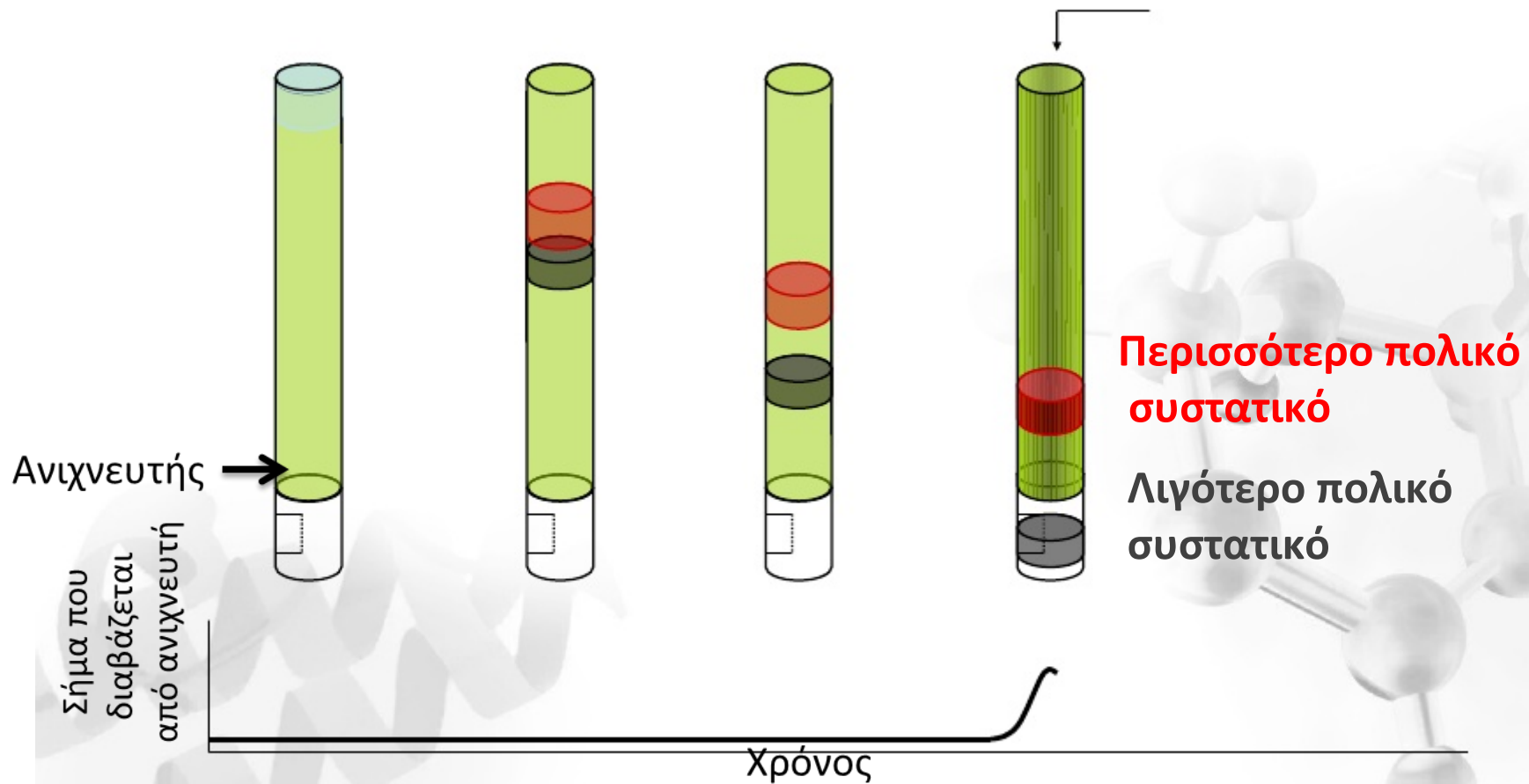
Χωρίζεται σε δύο τύπους η HPLC :

α) HPLC ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ (NORMAL PHASE HPLC)

β) HPLC ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ (REVERSED PHASE HPLC)

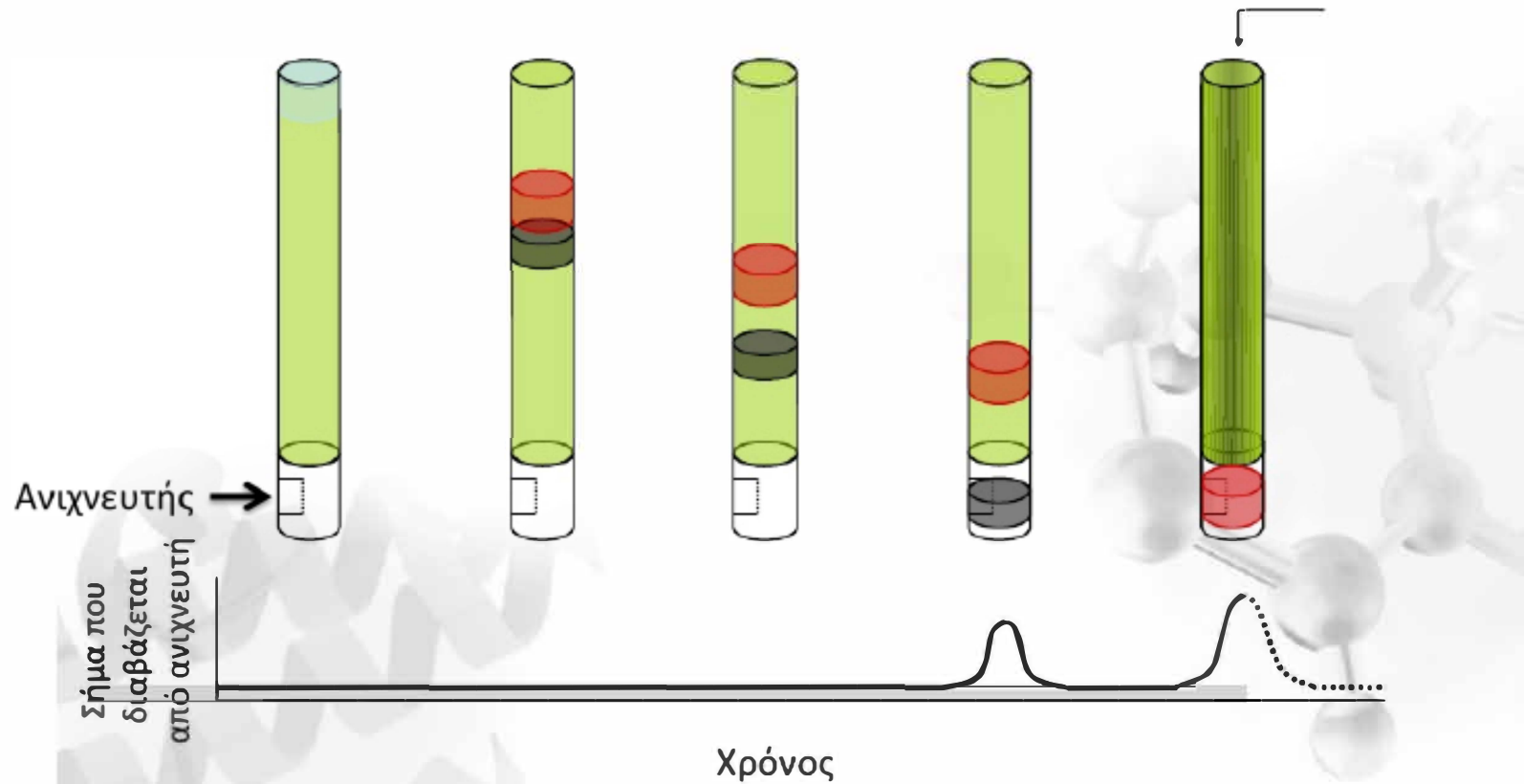
# Χρωματογραφία κανονικής φάσης (Normal Phase HPLC, NP-HPLC):

μεγάλης πολικότητας στατική φάση,  
μικρότερης πολικότητας κινητή φάση ( πχ  $\text{CHCl}_3$ , εξάνιο, ΟΧΙ  $\text{H}_2\text{O}$  !!)



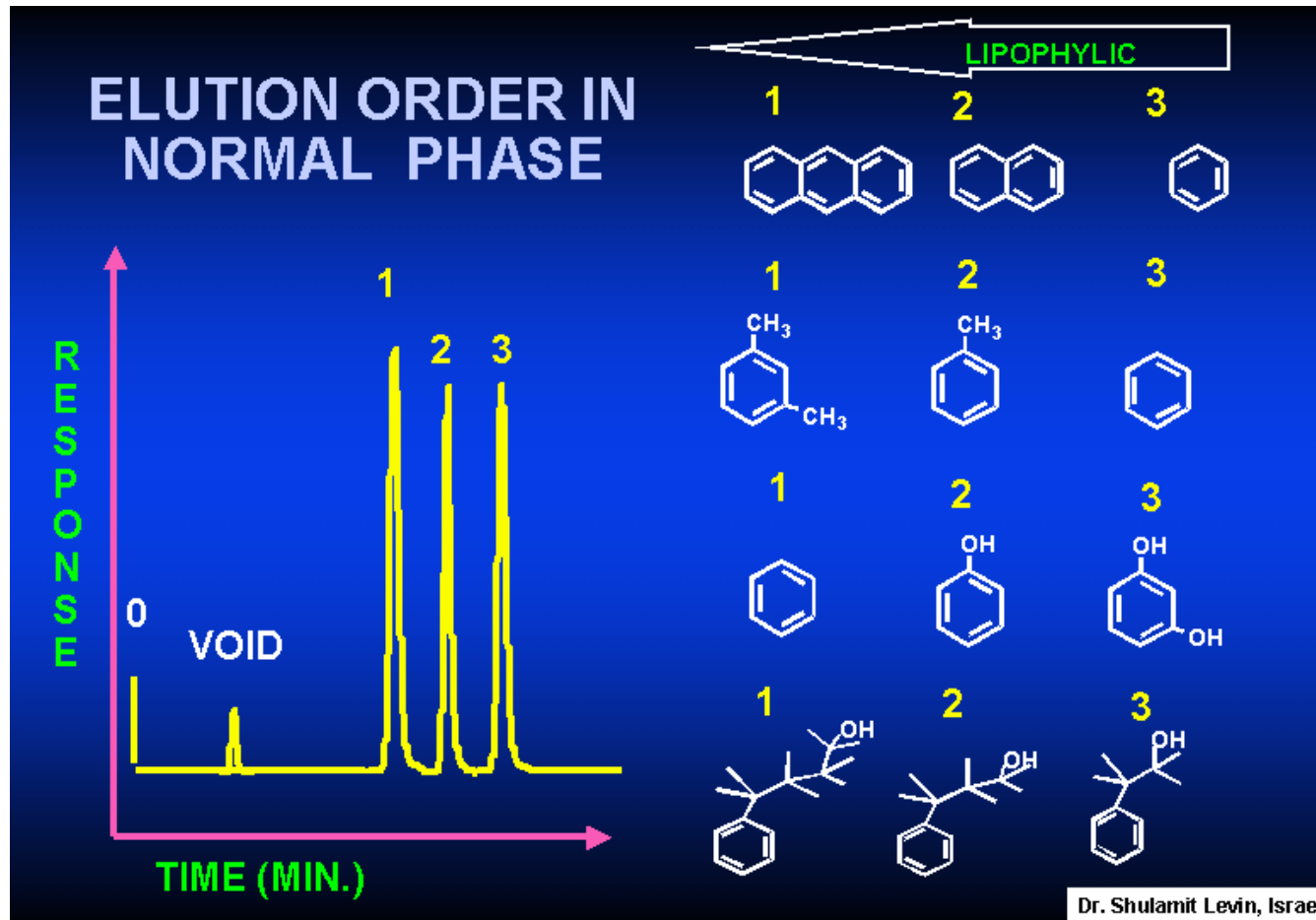


# Χρωματογραφία στήλης



<http://studyhplc.com/hplcinstrument.php>

# HPLC Κανονικής Φάσης



Οι πολικές ενώσεις αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση  
Οι άπολες ενώσεις διασχίζουν τη στήλη ταχύτερα και εκλύονται ΝΩΡΙΤΕΡΑ

ΙΣΧΥΕΙ Ο ΚΑΝΟΝΑΣ :

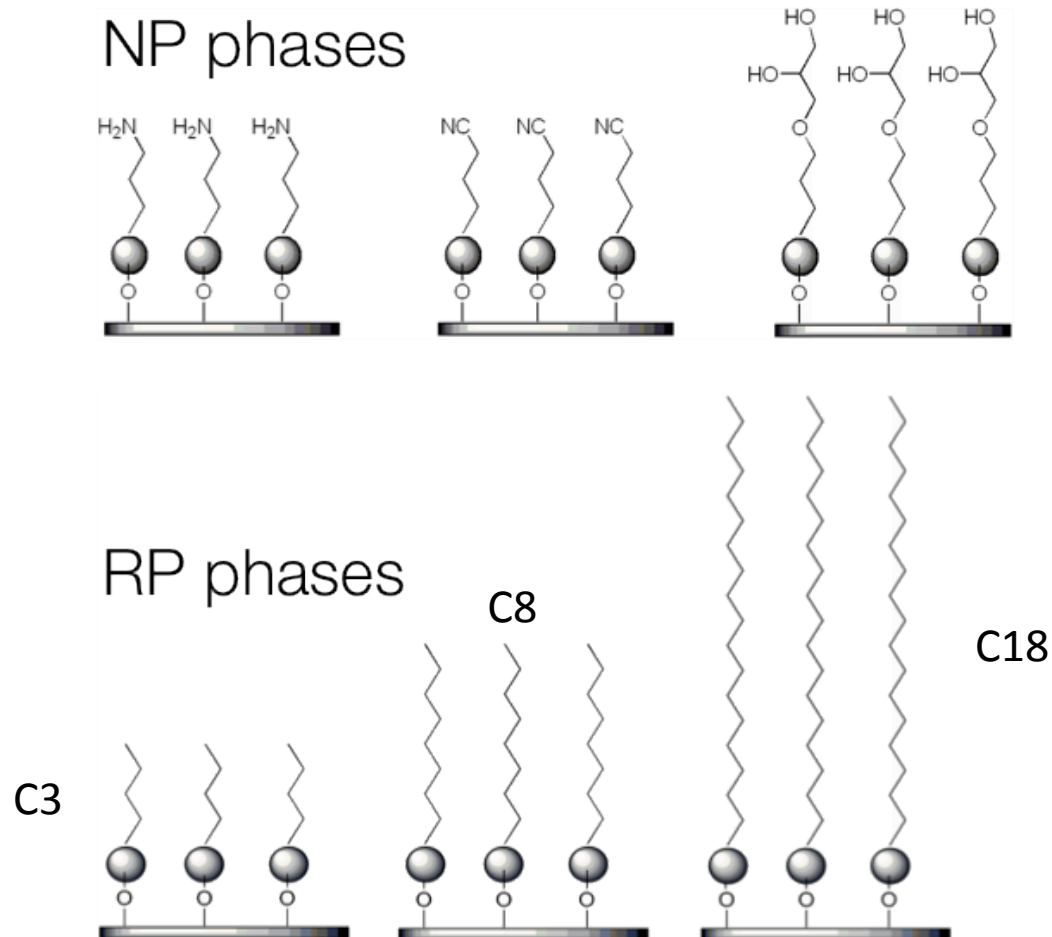
ΣΕ ΟΠΟΙΟΔΗΠΟΤΕ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΠΡΟΠΟΡΕΥΟΝΤΑΙ ΤΑ ΜΟΡΙΑ  
ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΦΑΣΗΣ

ΕΝΩ ΚΑΘΥΣΤΕΡΟΥΝ ΑΥΤΑ ΜΕ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΗΣ ΤΗΣ  
ΣΤΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ

# ΗPLC Αντίστροφης και Κανονικής Φάσης

## Reversed and Normal Phase HPLC

### Μορφή των στατικών φάσεων



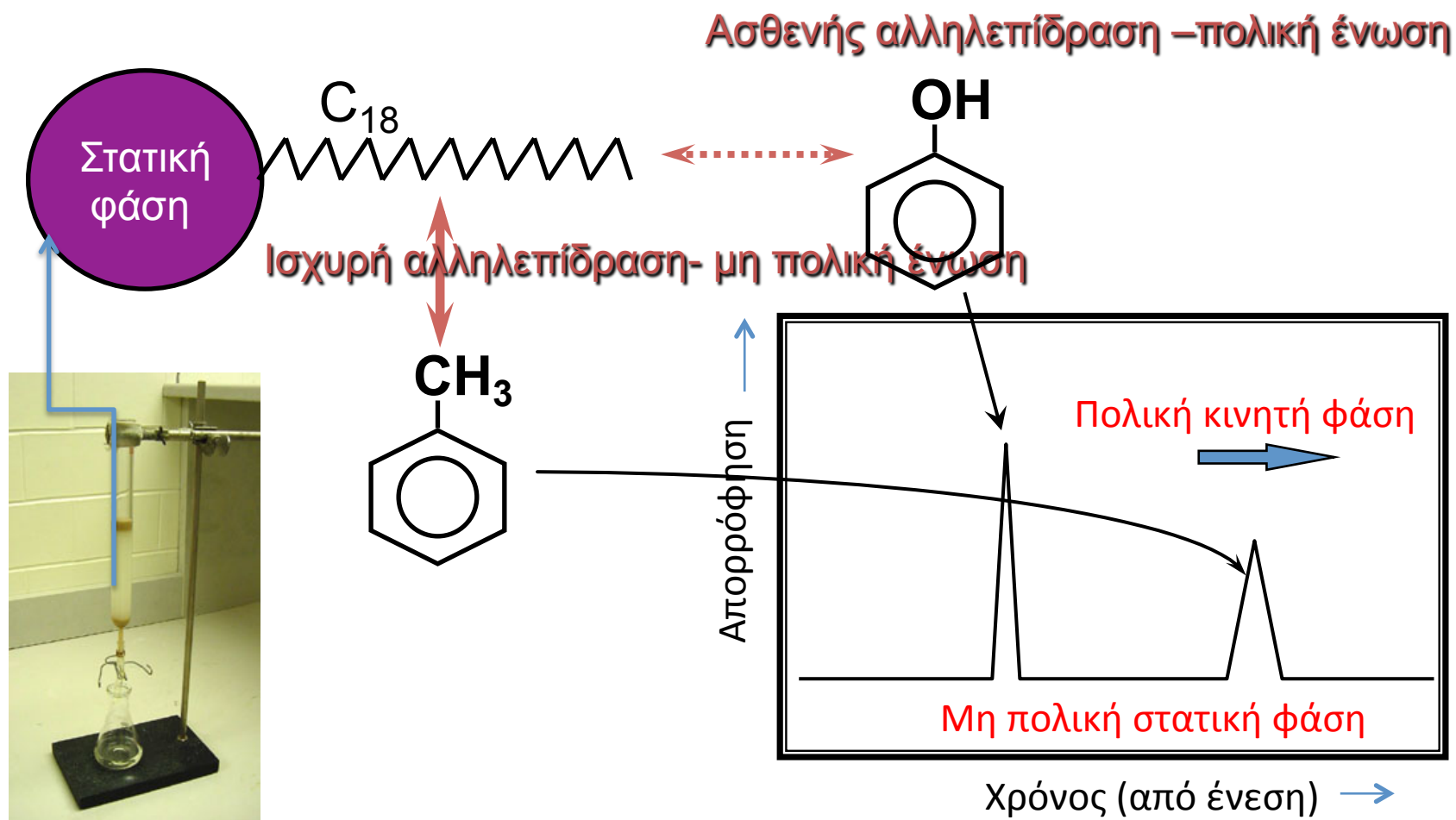
# ΗPLC Αντίστροφης Φάσης

## Reversed Phase HPLC (RP-HPLC)

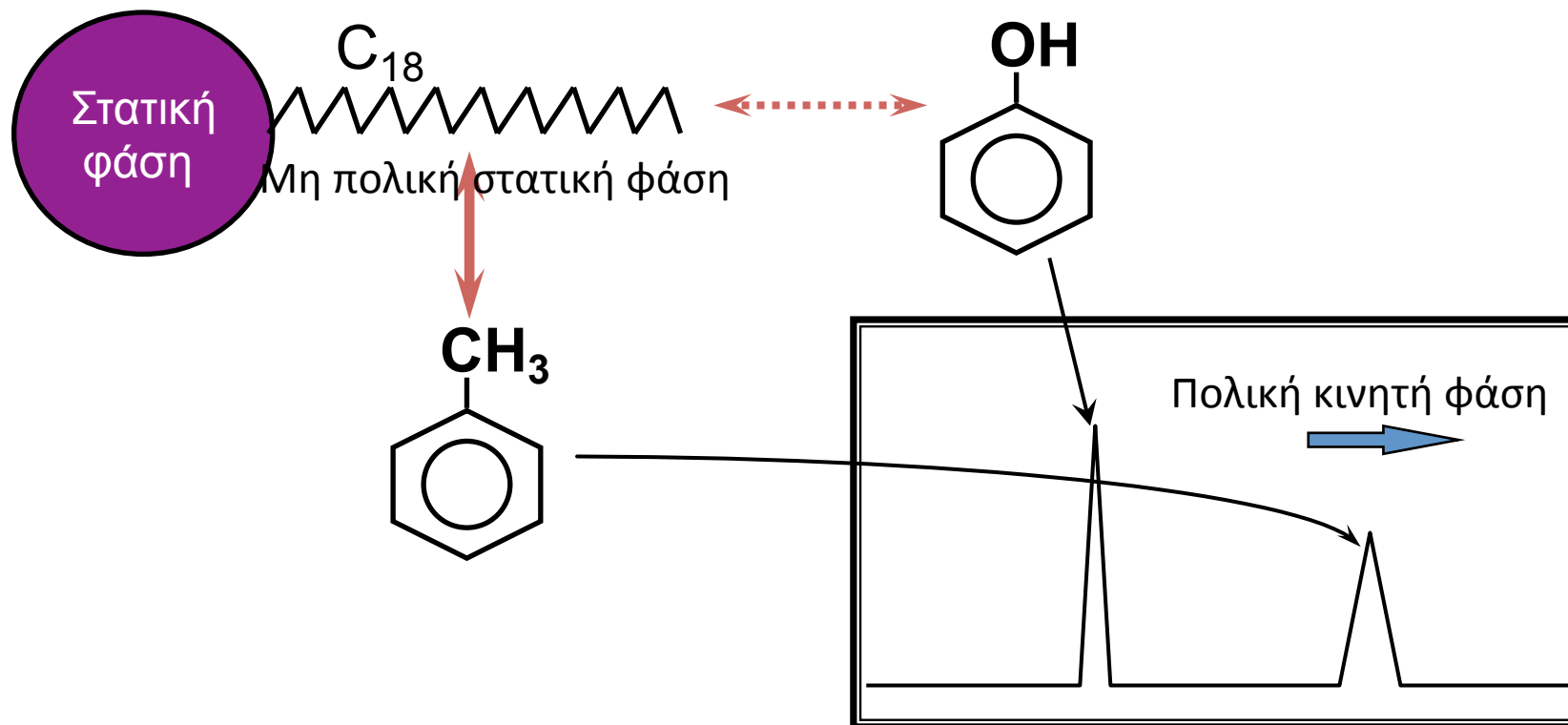
### ΗPLC Αντίστροφης Φάσης- πιο κοινός τύπος ΗPLC

- Μη Πολική στατική φάση (ΑΠΟΛΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ-ΥΔΡΟΦΟΒΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ)
- Πολική κινητή φάση (H<sub>2</sub>O και οργανικός διαλύτης (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) διαλυτός στο νερό).
- R: C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> ή οποιοσδήποτε υδρογονάνθρακας.
- Οι περισσότερο πολικές ενώσεις εκλούνται σε μικρότερους χρόνους (πρώτες).
- Μη πολικά μόρια προσροφούνται ισχυρότερα στις αλυσίδες των υδρογονανθράκων της στατικής φάσης)

# Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης: μικρής πολικότητας στατική φάση, μεγαλύτερης πολικότητας κινητή φάση



# Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης: μικρής πολικότητας στατική φάση, μεγαλύτερης πολικότητας κινητή φάση

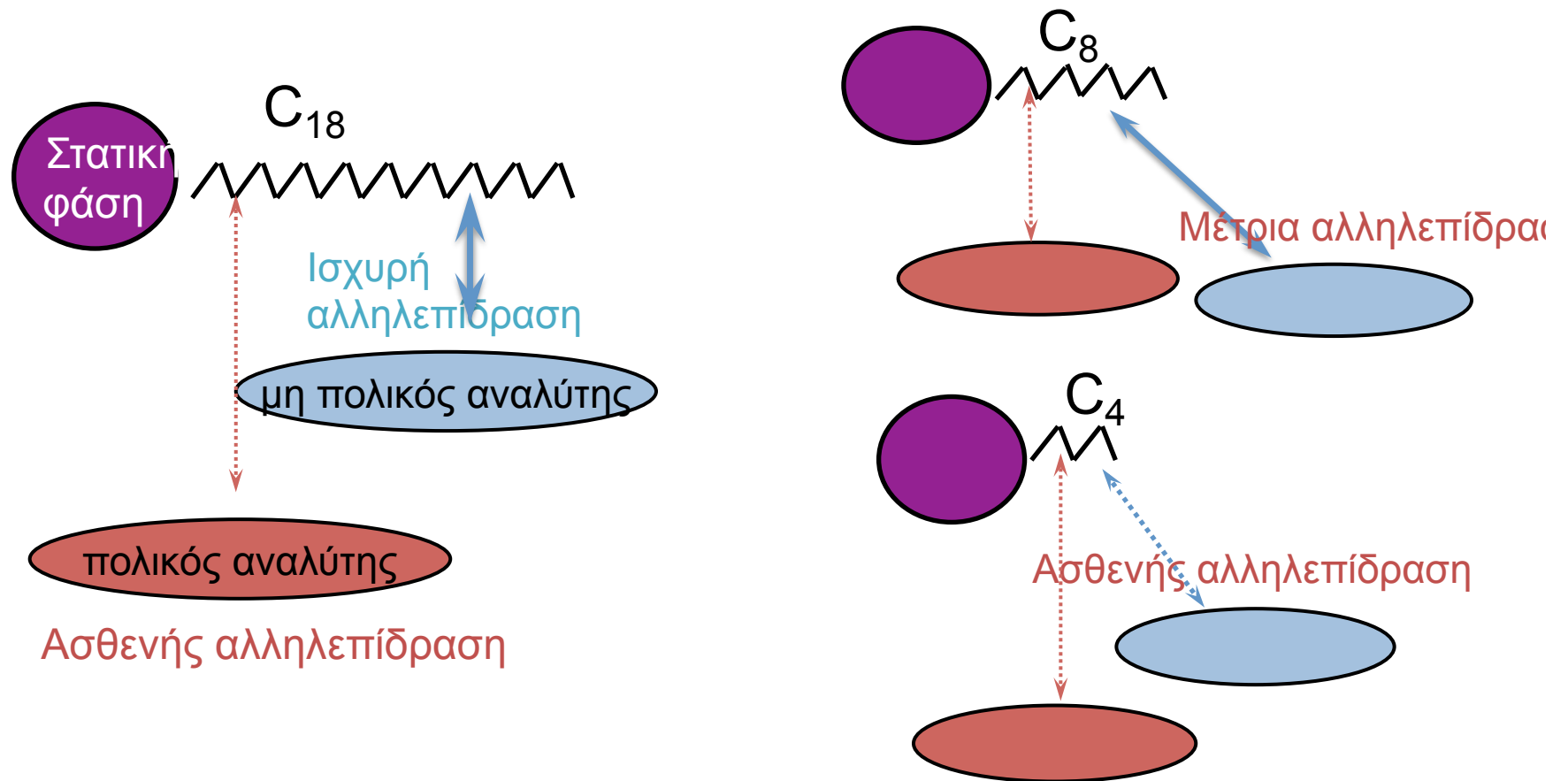


Θα βελτιωθεί ή όχι ο διαχωρισμός των δύο ουσιών εάν

1. Αυξήσουμε την πολικότητα της κινητής φάσης ;
2. Αυξήσουμε τον μη πολικό χαρακτήρα της σταθερής φάσης;

Η επιλογή των δύο φάσεων (κινητής και στατικής) γίνεται έτσι ώστε οι ενώσεις που θέλουμε να διαχωριστούν, να έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής.

# Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης: μικρής πολικότητας στατική φάση, μεγαλύτερης πολικότητας κινητή φάση



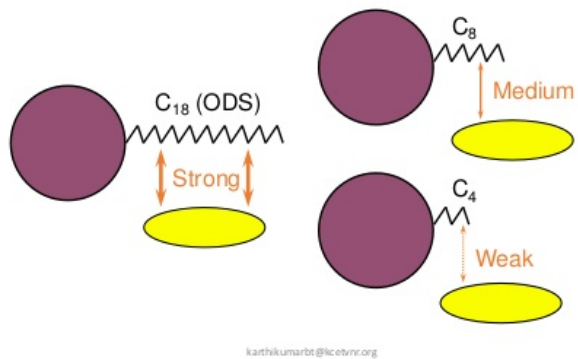
Σε ποια από τις 3 περιπτώσεις θα είχαμε καλύτερο διαχωρισμό των δύο αναλυτών;

Η επιλογή των δύο φάσεων (κινητής και στατικής) γίνεται έτσι ώστε οι ενώσεις που θέλουμε να διαχωριστούν, να έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής.



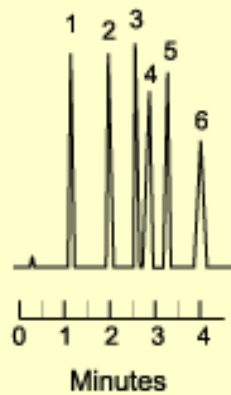
# Επίδραση του μήκους της αλυσίδας σε RP.

## Effect of Chain Length of Stationary Phase

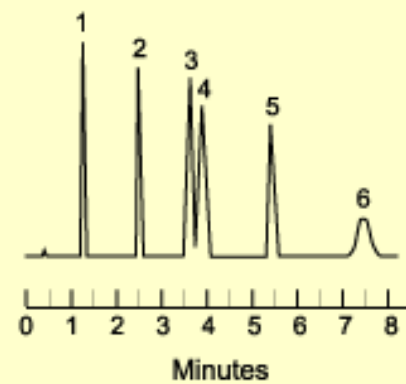


μεθανόλη/ νερό: 50:50, 1 mL/min

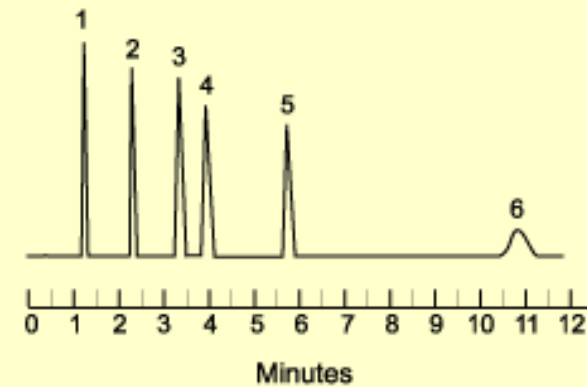
C<sub>3</sub> chain



C<sub>8</sub> chain



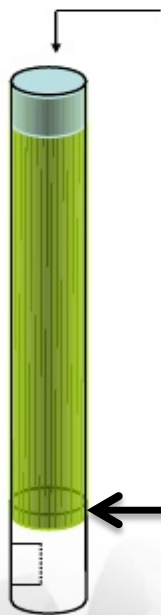
C<sub>18</sub> chain



# Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase HPLC, RP-HPLC):

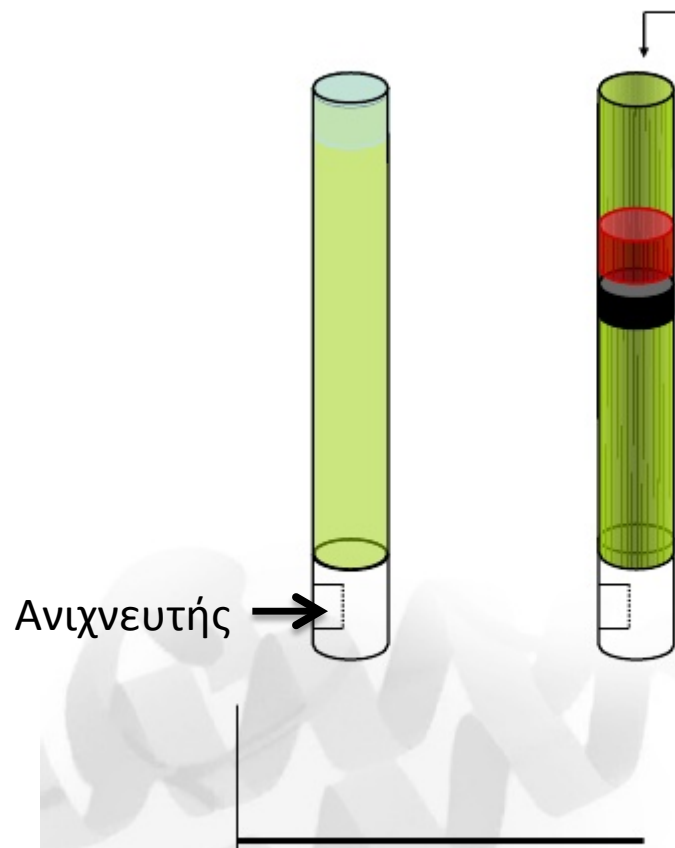
μικρής πολικότητας στατική φάση, μεγαλύτερης πολικότητας κινητή φάση

Δείγμα μετά από κατεργασία (εκχύλιση) εισάγεται στη στήλη  
υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης



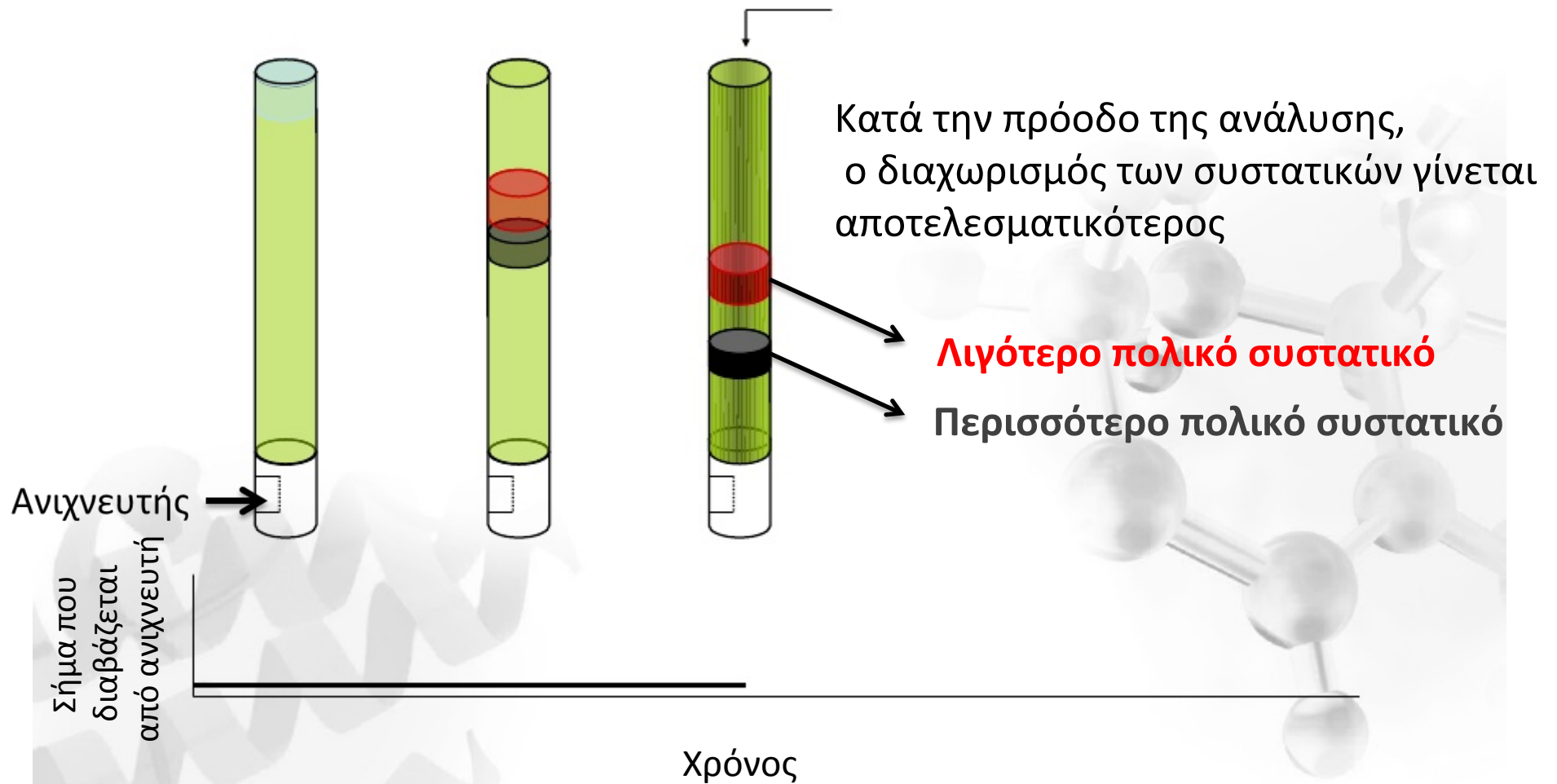
Ανιχνευτής

# Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης: μικρής πολικότητας στατική φάση, μεγαλύτερης πολικότητας κινητή φάση

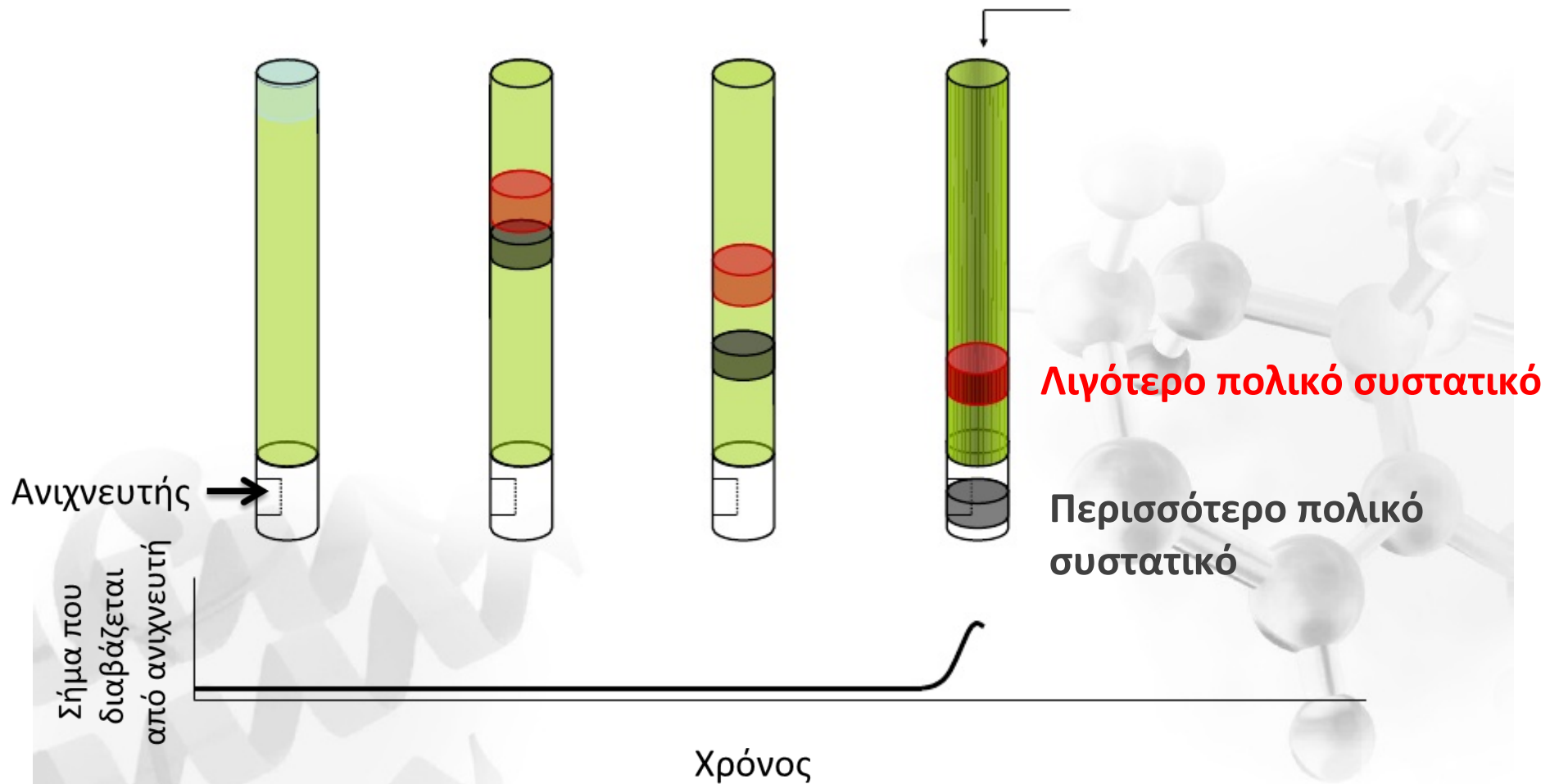


Οι δύο φάσεις, στατική και κινητή, διαφέρουν ως προς την πολικότητα τους, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων σε διαφορετικό βαθμό. Σε μία αντίστροφης φάσης χρωματογραφική ανάλυση με άπολη στατική φάση και πολική κινητή φάση, τα **λιγότερο πολικά συστατικά κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κι έτσι κινούνται αργά** κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα **πολικά συστατικά κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, και κινούνται ταχύτερα**. Ως αποτέλεσμα τα συστατικά διαχωρίζονται (με την προϋπόθεση ότι έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής).

# Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης: μικρής πολικότητας στατική φάση, μεγαλύτερης πολικότητας κινητή φάση



# Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης: μικρής πολικότητας στατική φάση, μεγαλύτερης πολικότητας κινητή φάση

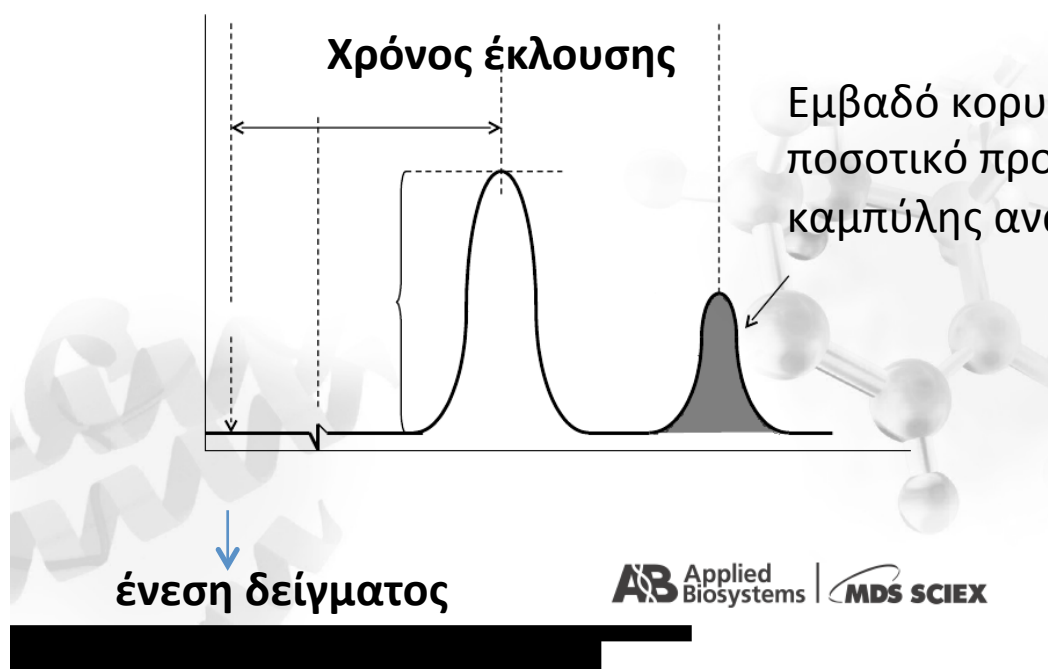


# Παράμετροι χρωματογραφήματος

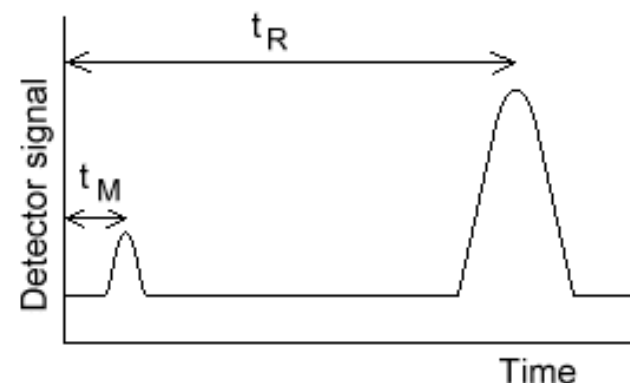
Η γραφική παράσταση του μετρούμενου από τον ανιχνευτή μεγέθους ως προς το χρόνο (μετά την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη) λέγεται ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ

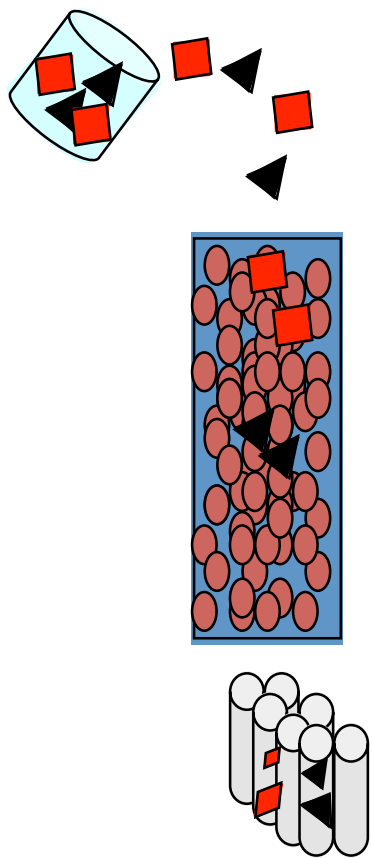
Ο χρόνος έκλουσης (κατακράτησης)  $t_R$  είναι ο χρόνος που απαιτείται για να «ταξιδέψει» η ουσία από την είσοδο της στη στήλη μέχρι τον ανιχνευτή

Το  $t_R$  χαρακτηρίζει μία ουσία και εξαρτάται από το υλικό πλήρωσης, τη σύσταση και την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, τις διαστάσεις και τη θερμοκρασία της στήλης.

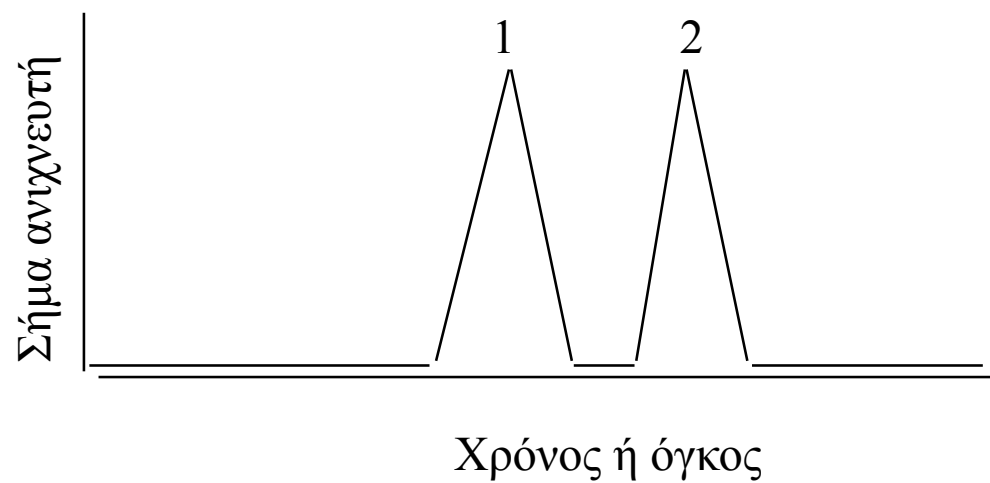


- Νεκρός χρόνος είναι ο χρόνος ( $t_M$ ) που χρειάζεται ένα συστατικό που δεν κατακρατείται για να φτάσει στον ανιχνευτή.





**Χρωματογράφημα:** σήμα ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου κατακράτησης ή του όγκου.

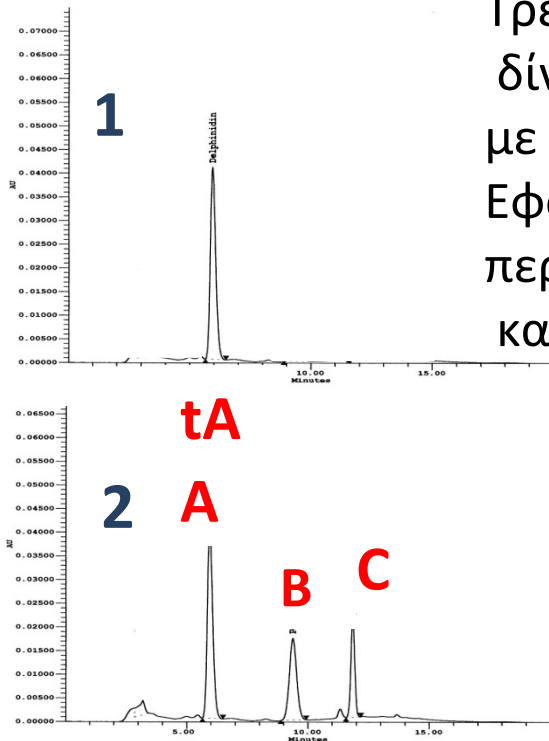


# Ερμηνεία χρωματογραφήματος

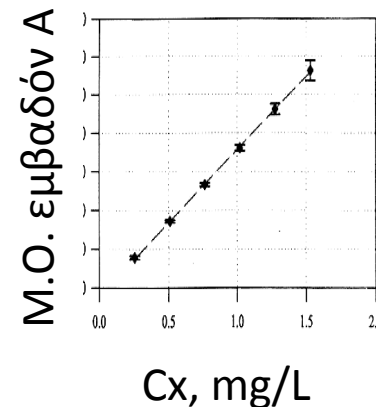
Έχουμε τρέξει (αναλύσει):

1. Πρότυπη ουσία Χ, σε συγκέντρωση  $\gamma_1$  mg/L (2 επαναλήψεις)
2. Πρότυπη ουσία Χ, σε συγκέντρωση  $\gamma_2$  mg/L
3. Πρότυπη ουσία Χ, σε συγκέντρωση  $\gamma_3$  mg/L
4. Πρότυπη ουσία Χ, σε συγκέντρωση  $\gamma_4$  mg/L
5. Πρότυπη ουσία Χ, σε συγκέντρωση  $\gamma_5$  mg/L
6. Πρότυπη ουσία Χ, σε συγκέντρωση  $\gamma_6$  mg/L

Παίρνουμε το χρωματογράφημα 1, όπου η πρότυπη ουσία εκλύεται σε χρόνο  $t_A$



Τρέχουμε και τα δείγμα μας το οποίο δίνει το χρωματογράφημα 2 με τρεις κορυφές, A, B και C. Εφόσον το δείγμα μας δίνει κορυφή με  $t_R = t_A$ , περιέχει την ουσία A σε συγκέντρωση που καθορίζεται από καμπύλη αναφοράς.





✓ **Ποιοτική ανάλυση:**

Ανιχνεύει την ύπαρξη ή μη συγκεκριμένων συστατικών, στοιχείων ή ιόντων σε ένα δείγμα.

π.χ ναρκωτικές ουσίες, παρουσία του δραστικού συστατικού σε μία φαρμακευτική σύνθεση.

✓ **Ποσοτική ανάλυση:**

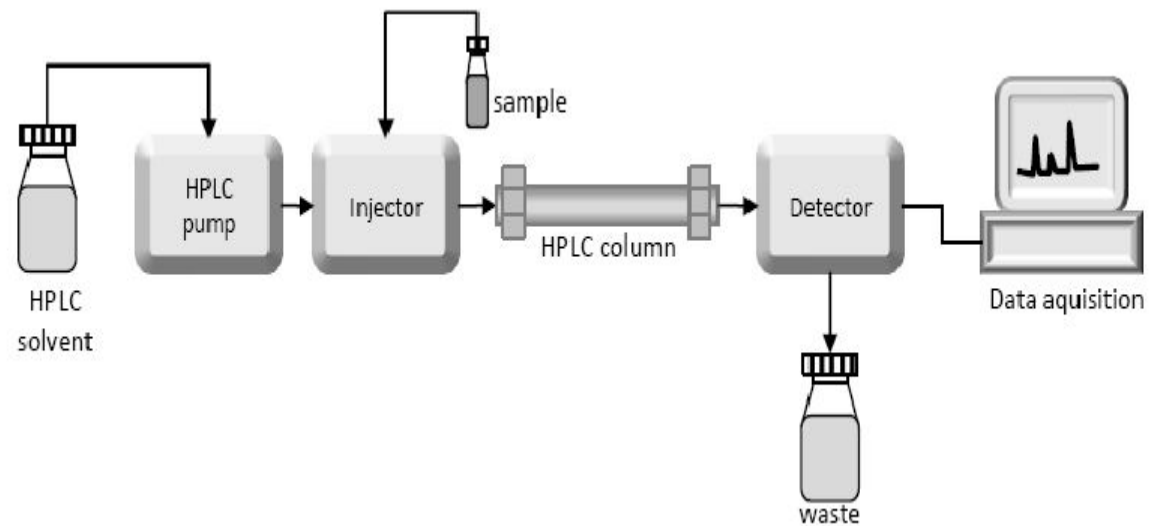
Ανιχνεύει την χημική σύσταση ενός μίγματος

Π.χ. ποσοστό (%) του δραστικού συστατικού σε ένα φαρμακευτικό δισκίο.

Ο χρόνος ανάσχεσης ενός συστατικού του μίγματος που διαχωρίζεται με HPLC εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

- ✓ Την χημική δομή του συστατικού και η αλληλεπίδραση του με το υλικό της στήλης.
- ✓ Τη χημική σύνθεση και το pH της κινητής φάσης.
- ✓ Τον ρυθμό ροής της κινητής φάσης.
- ✓ Τη θερμοκρασία.

# Οργανολογία ΗPLC



## 1. Περιέκτες διαλυτών

- Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας.

## 2. Η αντλία

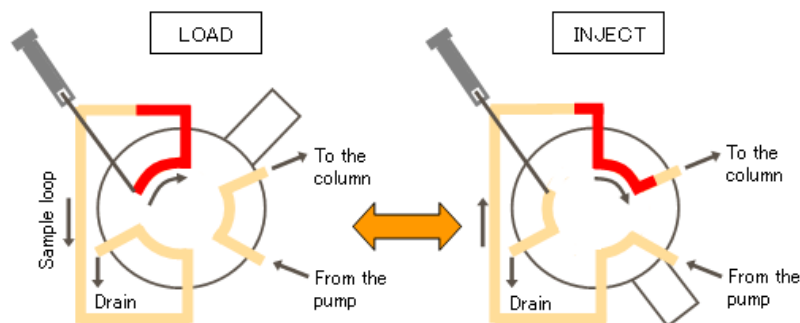
- Ο ρόλος της είναι ο **εξαναγκασμός ροής της κινητής φάσης διαμέσου της στήλης**, με καθορισμένη ταχύτητα ροής, εκφρασμένης συνήθως σε mL/min.
- Κινητή φάση: μίγμα διαλυτών (πολικών και μη πολικών)
- Τυπική ταχύτητα ροής κινητής φάσης: 1-2 mL/min.
- Τυπικές πιέσεις: 6000-9000 psi (400-600 bar).
- Ροή κινητής φάσης υπό **ισοκρατικές (isocratic) ή βαθμωτές (gradient) συνθήκες**.

### 3. Απαερωτής κενού

- Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.

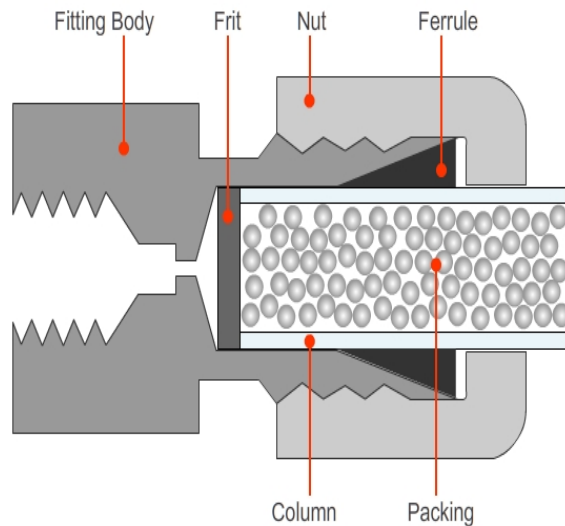
### 4. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve)

- Περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.



# 5. Η στήλη

## Η «καρδιά» της χρωματογραφικής ανάλυσης



- Πορώδη σωματίδια μικρής διαμέτρου.  
(5  $\mu\text{m}$ , 3,5  $\mu\text{m}$  and 1,8  $\mu\text{m}$ )  
silica, polystyrene-divinyl-  
benzene synthetic resin,  
alumina



Χρωματογραφική στήλη (column): στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).

Η στήλη που θα χρησιμοποιήσουμε στο εργαστήριο είναι :  
Στήλη αντίστροφης φάσης Acclaim 120 (διάμετρος πόρων σωματιδίων πληρωτικού υλικού), C18 (Dionex), μέγεθος κόκκων 3  $\mu\text{m}$ , μήκος 150 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm .

## 6. Ανιχνευτής (detector):

- Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση του φωτός.  
Ανιχνευτής DAD (Diode Array Detector)

## 7. Καταγραφικό:

Το μετρούμενο σήμα που καταγράφεται συνεχώς κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης στέλνεται στη συνέχεια σε κάποιον υπολογιστή που παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης.

## 8. Δεξαμενή αποβλήτων:

Είναι η δεξαμενή όπου συλλέγεται η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος.

## Δύο βίντεο

HPLC για αρχάριους.....

<https://www.youtube.com/watch?v=IUwRWn9pEdg>

Αρχή λειτουργίας HPLC που έχουμε στο εργαστήριο....

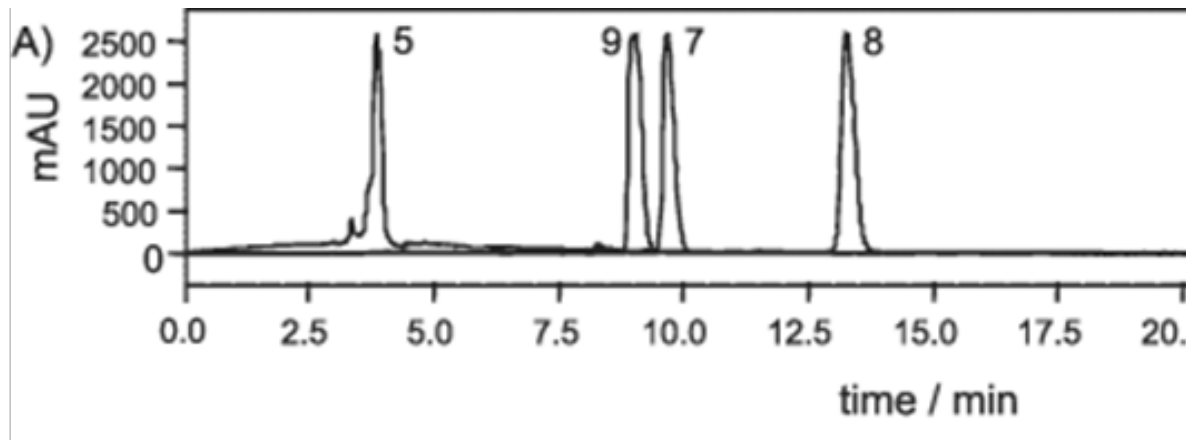
<https://www.youtube.com/watch?v=g7YoD2mmnCU&feature=youtu.be>



# Άσκηση 1

Πήρατε το παρακάτω χρωματογραφικό προφίλ τρέχοντας μείγμα ουσιών (5,9,7,8) με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

Να ταξινομήσετε τις ουσίες κατά σειρά πολικότητας και να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.



Στην υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι άπολη ενώ η κινητή φάση έχει μεγαλύτερη πολικότητα από τη στατική. Τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων σε διαφορετικό βαθμό δηλ. αλληλεπιδρούν σε διαφορετικό βαθμό με τις δύο φάσεις. Η αλληλεπίδραση τους βασίζεται στην αρχή ότι τα «όμοια διαλύουν τα όμοια (κατανέμονται συνεπώς στα όμοια)». Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, τα λιγότερο πολικά συστατικά κατακρατούνται ισχυρότερα από τη άπολη στατική φάση κι έτσι καθυστερούν να εξέλθουν της στήλης κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα πολικά συστατικά κατανέμονται σε μεγαλύτερο βαθμό στην πολική κινητή φάση, κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, και συνεπώς κινούνται ταχύτερα και εξέρχονται νωρίτερα της στήλης. Επομένως, μετά την ολοκλήρωση της πορείας τους στη στήλη, τα συστατικά του μίγματος θα έχουν εξέλθει σε διαφορετικούς χρόνους, με τα πολικά να προπορεύονται. Έτσι, τα συστατικά του μίγματος όσον αφορά την πολικότητα ταξινομούνται ως εξής:

$$5 > 9 > 7 > 8$$

## Άσκηση 2

Από τα α-θ παρακάτω, υπογραμμίστε όσα χαρακτηριστικά μίας χημικής ένωσης σας επιτρέπουν να προβλέψετε τη σχετική σειρά έκλουσής της κατά την ανάλυσή της με HPLC αντίστροφης φάσης

α) Συντελεστής κατανομής,

β) πολικότητα

γ) μοριακός τύπος,

δ) μοριακό βάρος

ε) ηλεκτρικό φορτίο

στ) πτητικότητα

ζ) μέγεθος μορίου

η) υδρόφιλος χαρακτήρας

θ) λιπόφιλος χαρακτήρας

## Άσκηση 3

Θεωρήστε μία ουσία η οποία εκλούεται με μεγάλο χρόνο έκλυσης κατά τη χρωματογραφική ανάλυσή της με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, όπου η κινητή φάση είναι πολική. Εξηγήστε εάν η ίδια ουσία θα εκλούεται με μικρότερο ή μεγαλύτερο χρόνο έκλυσης εάν αναλυθεί με χρωματογραφία κανονικής φάσης όπου είναι άπολη η κινητή φάση

Στην υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι άπολη ενώ η κινητή φάση έχει μεγαλύτερη πολικότητα από τη στατική. Τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων σε διαφορετικό βαθμό δηλ. αλληλεπιδρούν σε διαφορετικό βαθμό με τις δύο φάσεις. Η αλληλεπίδραση τους βασίζεται στην αρχή ότι τα «όμοια διαλύουν τα όμοια (κατανέμονται συνεπώς στα όμοια)». Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, συστατικό που εκλούεται με μεγάλο χρόνο έκλυσης κατακρατείται ισχυρά από τη άπολη στατική φάση και συνεπώς έχει μικρή πολικότητα. Εάν αυτό το ίδιο συστατικό αναλυθεί με χρωματογραφία κανονικής φάσης (πολική στατική φάση), τότε λόγω της μικρής του πολικότητας δεν θα αλληλεπιδρά ισχυρά με την πολική στατική φάση και συνεπώς θα εκλούεται νωρίτερα από την στήλη.

# Άσκηση 4

5. Πρόκειται να αλλάξει ο χρόνος έκλουσης ενός αναλύτη κατά την ανάλυση του με χρωματογραφία κανονικής κατανομής (NP-HPLC) εάν

I. Μεταβληθεί η σύσταση της κινητής φάσης

II. Μεταβληθεί η φύση (χημική δομή και διαστάσεις) του υλικού πληρώσεως της στήλης

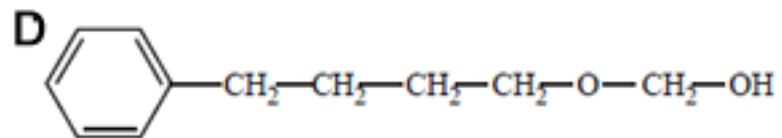
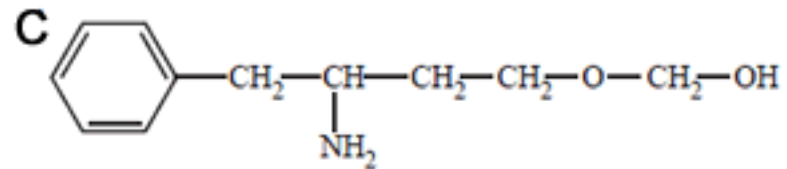
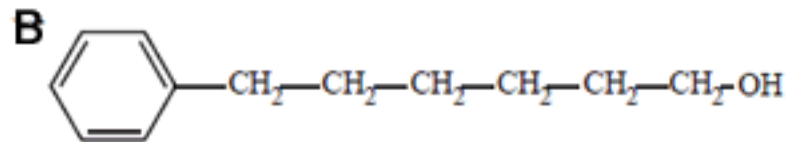
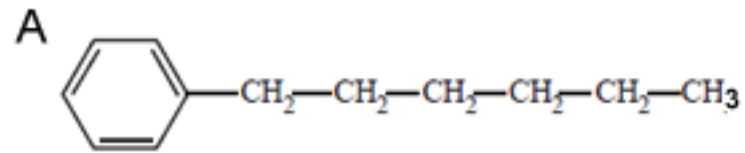
III. Μεταβληθεί η θερμοκρασία της ανάλυσης

IV. Μεταβληθεί το μήκος της στήλης

V. Μεταβληθεί ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης

VI. Αλλάξει ο ανιχνευτής

VII. Μεταβληθεί η συγκέντρωσή του;



Σε Reversed phase HPLC ποιά από τος  
τέσσερις ενώσεις  
περιμένετε να έχει μεγαλύτερο χρόνο  
έκλουσης ? (και γιατί )