



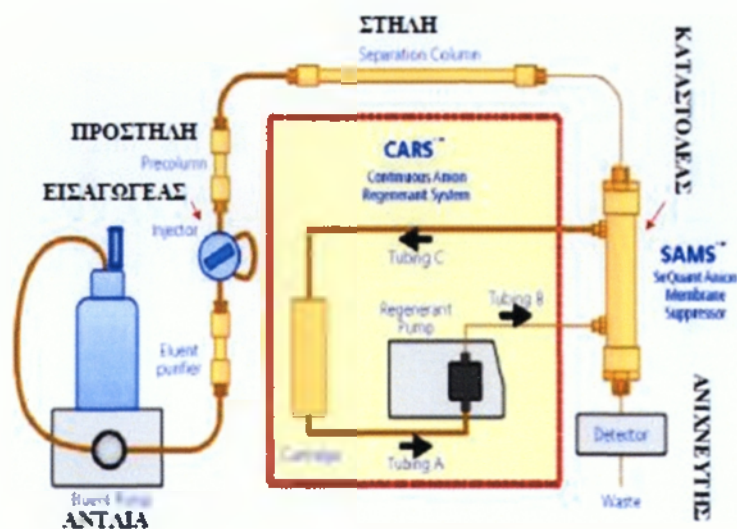
ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ (Σ.ΤΕ.Γ)  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ (ΤΕ.ΓΕ.Π) ΤΜΗΜΑ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ (ΤΕ.ΤΡΟ)

ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΤΜΗΜΑ  
ΕΚΔΟΣΕΩΝ & ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

## Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αντώνιος Α. Κασίδης



*Επιβλέπων:* Ιωάννης Δ. Καπόλος  
Αναπληρωτής Καθηγητής ΤΕΙ Καλαμάτας

Καλαμάτα, Ιούνιος 2011

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Τ Ε Ι Κ Α Λ Α Μ Α Τ Α Σ  
Τ Μ Η Μ Α  
Ε Κ Δ Ο Σ Ε Ξ Η Ν & Β Ι Β Λ Ι Ο Θ Η Κ Η Σ

## 1<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Εισαγωγή στις Τεχνικές Διαχωρισμού

1.1 Γενικά.....	σελ. 1
1.2 Τεχνικές Διαχωρισμού .....	σελ. 2
1.3 Συντελεστής Ανάκτησης και Συντελεστής Διαχωρισμού ή Εμπλουτισμού.....	σελ. 4
1.4 Σφάλματα που οφείλονται στο Διαχωρισμό .....	σελ. 6

## ΜΕΡΟΣ Α

### 2<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Διαχωρισμός με Εκχύλιση

2.1 Γενικά.....	σελ. 9
2.2 Ισοροπίες Κατανομής και Νόμος Κατανομής.....	σελ. 9
2.3 Τεχνικές Εκχύλισης και Εφαρμογές στη Φαρμακευτική Ανάλυση.....	σελ. 16
2.3.1 Εκχύλιση Στερεών με Υγρό.....	σελ. 17
2.3.2 Εκχύλιση Υγρού - Υγρού .....	σελ. 18
2.3.3 Εκχύλιση Στερεής Φάσης.....	σελ. 24

### 3<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Διαχωρισμός με Ιονανταλλαγή

3.1 Γενικά.....	σελ. 27
3.2 Τύποι Ιονανταλλακτικών Ρητινών.....	σελ. 27
3.3 Ιδιότητες και Συμπεριφορά των Ρητινών.....	σελ. 29
3.4 Τεχνικές χρήσης Ρητινών.....	σελ. 31
3.5 Εφαρμογές της Ιονανταλλαγής.....	σελ. 31

## 4<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Διαχωρισμός με Χρωματογραφικές Τεχνικές Ανάλυσης

4.1 Γενικά.....	σελ. 34
4.2 Ταξινόμηση Χρωματογραφικών Τεχνικών.....	σελ. 34
4.3 Χρωματογραφία Χάρτη.....	σελ. 37
4.4 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας.....	σελ. 40
4.5 Ηλεκτροφόρηση.....	σελ. 42
4.5.1 Ηλεκτροφόρηση πλάκας.....	σελ. 42
4.5.2 Ηλεκτροφόρηση δίσκων.....	σελ. 43
4.5.3 Ηλεκτροφόρηση κινούμενων μεσεπιφανειών.....	σελ. 43
4.5.4 Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς.....	σελ. 43
4.6 Αέρια Χρωματογραφία.....	σελ. 46
4.6.1 Χρωματογραφία Αερίου - Υγρού (GLC).....	σελ. 46
4.6.2 Χρωματογραφία Αερίου - Στερεού (GSC).....	σελ. 54
4.7 Υγρή Χρωματογραφία Στήλης.....	σελ. 55
4.7.1 Υγρή - Στερεή Χρωματογραφία Προσρόφησης Στήλης.....	σελ. 56
4.7.2 Υγρή - Υγρή Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης.....	σελ. 57
4.7.3 Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής Στήλης.....	σελ. 58
4.7.4 Υγρή Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού.....	σελ. 58
4.7.5 Χρωματογραφία Συγγένειας.....	σελ. 59
4.7.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	σελ. 60
4.8 Ιοντική Χρωματογραφία.....	σελ. 64

## **ΜΕΡΟΣ Β**

<u>5<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Σύγκριση Μεθόδων Διαχωρισμού</u> .....	σελ. 70
---	---------

<u>6<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Συμπεράσματα</u> .....	σελ. 79
---	---------

<u>Βιβλιογραφία</u> .....	σελ. 81
---------------------------	---------

# 1<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

## 1.1 Γενικά

Η χημική ανάλυση αποτελεί ουσιαστικά ένα χρήσιμο εργαλείο για όλους τους κλάδους των φυσικών επιστημών αλλά ταυτόχρονα παρέχει τις υπηρεσίες της στην κοινωνία. Είναι απαραίτητη στην Ιατρική, τη Φυσική, τη Βιολογία, τη Φαρμακευτική, κλπ. αλλά και στην Αρχαιολογία, την Τέχνη και την Οικολογία. Δεν υπάρχει πτυχή της σύγχρονης κοινωνικής ζωής από την οποία απουσιάζει η χημική ανάλυση. Τις τελευταίες δεκαετίες οι μαζικές παραγωγικές διαδικασίες "ανάγκασαν" τους αναλυτικούς χημικούς να αναπτύξουν αξιόπιστες αυτοματοποιημένες ενόργανες τεχνικές που είναι ικανές να εξασφαλίσουν το συνεχή έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων αλλά και των παρεχόμενων υπηρεσιών (π.χ. στα βιολογικά εργαστήρια). Ταυτόχρονα, η προσπάθεια επίλυσης των προβλημάτων της σύγχρονης κοινωνίας έδωσαν ώθηση σε εξειδικευμένους κλάδους της χημικής ανάλυσης.

Παράλληλα, η επιστήμη της χημικής ανάλυσης αποτελεί μια ανεξάρτητη επιστήμη η οποία έχει ως στόχο να βελτιώνει τις τεχνικές που ήδη εφαρμόζονται, να επιλέγει με επιστημονικά κριτήρια την ιδανική μεθοδολογία για κάθε αναλυτικό πρόβλημα και να εστιάζεται στη φύση της ύλης ανακαλύπτοντας ομοιότητες και διαφορές μεταξύ φαινομενικά όμοιων δειγμάτων. Το τελευταίο είναι πολύ χρήσιμο στην Εγκληματολογία (forensic science) και στην Αρχαιομετρία (archaeometry) όπου η εύρεση ομοιοτήτων και διαφορών πολλές φορές αποτελεί τον κύριο στόχο μιας δεδομένης μελέτης.

Ο σκοπός της χημικής ανάλυσης είναι ο προσδιορισμός της ταυτότητας και της ποσότητας των χημικών σωματιδίων σε ένα δείγμα. Ο βαθμός δυσκολίας για την επίτευξη του σκοπού αυτού εξαρτάται από το είδος του δείγματος και την πολυπλοκότητα αυτού. Κατά κύριο λόγο η Αναλυτική Χημεία καλείται να δώσει απάντηση ως προς το χημικό χαρακτηρισμό πολύπλοκων φυσικών δειγμάτων (τρόφιμα, βιολογικά υγρά, υλικά, ύδατα κ.α) στα οποία συνυπάρχει πλήθος χημικών ενώσεων. Η παρουσία και άλλων συστατικών, πλέον του προσδιοριζόμενου, πολλές φορές δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στον προσδιορισμό του, λόγω κοινών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών αυτών με το προσδιοριζόμενο συστατικό. Προφανώς η ευκολότερη λύση στο πρόβλημα αυτό είναι η χρησιμοποίηση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού μόνο του συγκεκριμένου συστατικού και όχι των υπόλοιπων τα οποία συνυπάρχουν. Η ικανότητα όμως των μεθόδων να "επιλέγουν προσεκτικά" (εκλεκτικότητα, selectivity) το προσδιοριζόμενο συστατικό ή αναλύτη (analyte) είναι περιορισμένη. Γενικά οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού δεν είναι εκλεκτικές με αποτέλεσμα να προσδιορίζουν και τα συνυπάρχοντα συστατικά τα οποία ονομάζονται παρεμποδιστές (interferents) και η δράση τους παρεμπόδιση (interference). Περισσότερο σπάνια είναι η περίπτωση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού οι οποίες προσδιορίζουν αποκλειστικά και μόνο την προσδιοριζόμενη ουσία και καλούνται εξειδικευμένες (specific).

Οι μέθοδοι διαχωρισμού (separation methods) έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται για την άρση του προβλήματος της συνύπαρξης των παρεμποδιστών με το προσδιοριζόμενο

συστατικό. Εάν και η έννοια του διαχωρισμού είναι προφανής, γενικά είναι δύσκολο να οριστεί. Γενικά μπορεί να θεωρηθεί ως η διαίρεση ενός μίγματος σε δύο τουλάχιστον κλάσματα διαφορετικής σύστασης. Σκοπός ενός αναλυτικού διαχωρισμού είναι η απομάκρυνση είτε του προσδιοριζόμενου συστατικού είτε των παρεμποδιστών από το δείγμα.

Για να επιτευχθεί ένας διαχωρισμός πρέπει το προσδιοριζόμενο συστατικό και οι παρεμποδιστές να διαφέρουν σημαντικά τουλάχιστον σε μία φυσική ή χημική ιδιότητα. Λόγω του ότι και οι μέθοδοι διαχωρισμού βασίζονται στη διαφορά φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των συστατικών παραμένει το βασικό πρόβλημα της εκλεκτικότητας της μεθόδου το οποίο αναφέρθηκε παραπάνω. Ένας διαχωρισμός ο οποίος απομακρύνει πλήρως τους παρεμποδιστές μπορεί να οδηγήσει σε μερική απώλεια του προσδιοριζόμενου συστατικού ή αντίστροφα ένας διαχωρισμός ο οποίος ελαχιστοποιεί την απώλεια του προσδιοριζόμενου συστατικού μπορεί να οδηγήσει σε ατελή απομάκρυνση των παρεμποδιστών. Σκοπός των εφαρμοζόμενων μεθόδων διαχωρισμού αποτελεί η βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών οι οποίες θα οδηγήσουν στη μεγιστοποίηση των υφιστάμενων διαφορών μεταξύ του προσδιοριζόμενου συστατικού και των παρεμποδιστών και έτσι στον αποτελεσματικότερο διαχωρισμό τους. Οι μέθοδοι διαχωρισμού χρησιμοποιούνται και ως μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος, αλλά και ως αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού.

## 1.2 Τεχνικές Διαχωρισμού

Οι τεχνικές διαχωρισμού που φαίνονται στον πίνακα 1.2-1 μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες:

1. Στην πρώτη κατηγορία το προσδιοριζόμενο συστατικό και οι παρεμποδιστές που συνυπάρχουν στην αρχική μια και μοναδική φάση μπορούν να διαχωριστούν εάν υπάρχει μία τουλάχιστον σημαντική διαφορά στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (υπερδιήθηση, διαπίδυση, ηλεκτροδιαπίδυση).
2. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι διαχωρισμοί με βάση την κατανομή σε δύο φάσεις. Η πιο σημαντική κατηγορία μεθόδων διαχωρισμού είναι αυτές οι οποίες βασίζονται στην εκλεκτική κατανομή του προσδιοριζόμενου συστατικού ή των παρεμποδιστών μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων φάσεων. Οι φάσεις αυτές μπορεί να είναι αέριο, υγρό ή και στερεό και ανάλογα με τη φύση των φάσεων έχουμε διαφορετικές μεθόδους διφασικών διαχωρισμών που συνήθως περιλαμβάνουν δύο στάδια:
  - ✓ Σχηματισμό συστήματος δύο φάσεων με διάφορους τρόπους, π.χ. με καθίζηση, εκχύλιση, απόσταξη
  - ✓ Μηχανικό διαχωρισμό των δύο φάσεων λαμβάνοντας φροντίδα για την ποσοτική παραλαβή της φάσης που περιέχει το προσδιοριζόμενο συστατικό π.χ. με διήθηση, φυγοκέντρηση, διαχωριστική χοάνη

Οι διφασικές μέθοδοι διαχωρισμού εφαρμόζονται ευρύτατα τόσο στην προετοιμασία του δείγματος όσο και στον αναλυτικό προσδιορισμό πληθώρας ενώσεων σε μεγάλη ποικιλία δειγμάτων.

3. Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν οι χρωματογραφικές τεχνικές όπου τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, μίας στατικής - στερεής ή υγρής - και μίας κινητής - υγρής ή αέριας - που διερχόμενη δια μέσου της στατικής φάσης προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος. Οι χρωματογραφικές τεχνικές, αφού συνδυαστούν με κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης και μέτρησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών ενός δείγματος και αποτελούν πλέον ενόργανες τεχνικές ανάλυσης [1].

**Πίνακας 1.2-1: Τεχνικές διαχωρισμού**

Τεχνική	Αρχή τεχνικής	Παραδείγματα εφαρμογής
Καθίζηση	Διαφορές στη διαλυτότητα	Απομάκρυνση ασβεστίου με φωσφορικά
Εκχύλιση	Διαφορές στη διαλυτότητα σε δύο μη μειγνυόμενους διαλύτες	Απομάκρυνση λιπαρών εκδόχων από υδατικό εναιώρημα σκευάσματος με αιθέρα
Απόσταξη	Διαφορές στην πτητικότητα	Απομόνωση αιθερίων ελαίων από δρόγη, πριν από τον προσδιορισμό τους
Εξάχνωση	Διαφορές στην τάση ατμών	Καθαρισμός ιωδίου, θείου
Κρυστάλλωση	Απόθεση κρυστάλλων σε χαμηλότερη θερμοκρασία	Καθαρισμός φαρμακευτικών πρώτων υλών
Τήξη κατά ζώνες	Κρυστάλλωση σε υψηλές θερμοκρασίες	Καθαρισμός οργανικών ενώσεων
Επίπλευση	Διαφορές πυκνότητας μεταξύ μίας ουσίας και ενός υγρού	Διαχωρισμός αιθερίων ελαίων από το υδατικό υγρό κατά την απόσταξη με υδρατμούς
Υπερδιήθηση	Διαφορές στο μέγεθος των ουσιών σε σύγκριση προς τους πόρους του ηθμού	Καθαρισμός κολλοειδών συστημάτων
Διαπίδυση	Διαφορές στην ταχύτητα διαχύσεως μέσα από μεμβράνη	Ανάκτηση φαρμάκων από διαλύματα πρωτεϊνών
Ηλεκτροδιαπίδυση	Διαχωρισμός με μεμβράνη και με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου	Καθαρισμός κολλοειδών από ίχνη ηλεκτρολυτών
Ηλεκτροεναπόθεση	Ηλεκτρόλυση σε αδρανές ηλεκτρόδιο	Απόθεση Cu σε ηλεκτρόδιο Pt
Προσρόφηση	Προσρόφηση μικρομορίων σε στερεή φάση	Απομόνωση φαρμάκων από πρωτεΐνη

Τεχνική	Αρχή τεχνικής	Παραδείγματα εφαρμογής	
Χ φ φ σ λ φ σ χ	Καθίζηση Εκχύλιση Απόσταξη Εξάχνωση	Διαφορές στη διαλυτότητα Διαφορές στη διαλυτότητα σε δύο μη μειγνυόμενους διαλύτες Διαφορές στην πτητικότητα Διαφορές στην τάση ατμών	Απομάκρυνση ασβεστίου με φωσφορικά Απομάκρυνση λιπαρών εκδόχων από υδατικό εναιώρημα σκευάσματος με αιθέρα Απομόνωση αιθερίων ελαίων από δρόγη, πριν από τον προσδιορισμό τους Καθαρισμός ιωδίου, θείου
φ σ λ φ σ γ	Κρυστάλλωση Τήξη κατά ζώνες Επίπλευση Υπερδιήθηση	Απόθεση κρυστάλλων σε χαμηλότερη θερμοκρασία Κρυστάλλωση σε υψηλές θερμοκρασίες Διαφορές πυκνότητας μεταξύ μιάς ουσίας και ενός υγρού Διαφορές στο μέγεθος των ουσιών σε σύγκριση προς τους πόρους του ηθμού	Καθαρισμός φαρμακευτικών πρώτων υλών Καθαρισμός οργανικών ενώσεων Διαχωρισμός αιθερίων ελαίων από το ύδωρ κατά την απόσταξη με υδρατμούς Καθαρισμός κολλοειδών συστημάτων
λ σ γ φ λ σ γ φ λ σ γ φ σ τ λ σ γ φ σ τ λ σ γ φ σ τ λ σ γ φ σ τ	Διαπίδυση Ηλεκτροδιαπίδυση Ηλεκτροεναπόθεση Προσρόφηση	Διαφορές στην ταχύτητα διαχύσεως μέσα από μεμβράνη Διαχωρισμός με μεμβράνη και με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου Ηλεκτρόλυση σε αδρανές ηλεκτρόδιο Προσρόφηση μικρομορίων σε στερεή φάση	Ανάκτηση φαρμάκων από διαλύματα πρωτεϊνών Καθαρισμός κολλοειδών από ίχνη ηλεκτρολυτών Απόθεση Cu σε ηλεκτρόδιο Pt Απομόνωση φαρμάκων από πρωτεϊνη

### 1.3 Συντελεστής Ανάκτησης και Συντελεστής Διαχωρισμού ή Εμπλουτισμού

Σε οποιοδήποτε χημικό διαχωρισμό ενδιαφέρουν κυρίως η πληρότητα της ανάκτησης του επιθυμητού συστατικού A από το δείγμα και η έκταση του διαχωρισμού του από τα άλλα συστατικά του δείγματος. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς της ουσίας A από τη φάση 1 στη φάση 2 εκφράζεται από το συντελεστή ανάκτησης (recovery coefficient) της ουσίας A,  $R_A$  ο οποίος ορίζεται από τη σχέση:

$$R_A = Q_A / (Q_A)_0 \quad (1.3-1)$$

όπου:

$Q_A$  : η ανακτηθείσα ποσότητα της ουσίας A

$(Q_A)_0$  : η ποσότητα της ουσίας A στο αρχικό δείγμα

Η εκατοστιαία ανάκτηση της ουσίας A ορίζεται ως το  $100 \times R_A$ . Η ανάκτηση θεωρείται πλήρης (ποσοτική) όταν

$$100 \times R_A \geq 99,9\%$$

Σε φυσικά δείγματα πολύπλοκης σύνθεσης (π.χ. τρόφιμα, βιολογικά υλικά) εκατοστιαίες ανακτήσεις μεγαλύτερες του 70% θεωρούνται ικανοποιητικές υπό ορισμένες προϋποθέσεις π.χ. εφόσον πρόκειται να πραγματοποιηθούν συγκριτικές μετρήσεις με δείγματα γνωστής σύνθεσης. Σε μερικές περιπτώσεις όπου οι συγκεντρώσεις είναι ιδιαίτερα χαμηλές, μικρότερες τιμές θεωρούνται επίσης αποδεκτές όπως εάν το δείγμα περιέχει  $< 0,001\%$  A, τιμή  $R_A \geq 0,95$  θεωρείται ικανοποιητική.

Στην περίπτωση κατά την οποία το πρόβλημα είναι ο διαχωρισμός δύο ουσιών A και B, τότε για την επίτευξή του με τη χρήση ενός συστήματος δύο φάσεων, βασική απαίτηση είναι οι λόγοι κατανομής αυτών να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

Μέτρο της ικανότητας διαχωρισμού των δύο ουσιών είναι ο συντελεστής διαχωρισμού ή εμπλουτισμού (separation coefficient),  $S_{B/A}$  ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος των συντελεστών κατανομής των δύο ουσιών στο σύστημα των δύο φάσεων:

$$S_{B/A} = \frac{Q_B/Q_1}{(Q_B)_0/(Q_A)_0} = \frac{R_B}{R_A} \quad (1.3-2)$$

όπου:

$Q_A, Q_B$ : οι ανακτηθείσες ποσότητες των ουσιών A και B

$(Q_A)_0, (Q_B)_0$ : οι ποσότητες των ουσιών A και B στο αρχικό δείγμα

Εάν  $R_A \approx 1$ , όπως συνήθως συμβαίνει στην ποσοτική ανάλυση, η σχέση (1.3-2) απλοποιείται στη σχέση

$$S_{B/A} = \frac{Q_B}{(Q_B)_0} = R_B \quad (1.3-3)$$

Τιμές του  $S_{B/A}$  μεγαλύτερες της μονάδας δηλώνουν ικανότητα διαχωρισμού των ουσιών A και B. Όσο μεγαλύτερη της μονάδας είναι ο συντελεστής εμπλουτισμού  $S_{B/A}$  τόσο ευκολότερος είναι ο διαχωρισμός και τόσο περισσότερο ευνοείται η παραλαβή του B σε βάρος του A. Οι τιμές του συντελεστή διαχωρισμού πρέπει να είναι μικρές, όπως π.χ. της τάξεως του  $10^{-6}$  στον προσδιορισμό ιχνοστοιχείων και  $10^{-3}$  στη μακροανάλυση [1].



### 1.4 Σφάλματα που οφείλονται στο Διαχωρισμό

Κατά το διαχωρισμό του προσδιοριζόμενου συστατικού Α από τον παρεμποδιστή Β, ατελής ανάκτηση του Α συνεπάγεται αρνητικό σφάλμα, ενώ το σφάλμα που προκαλείται από την ατελή απομάκρυνση του παρεμποδιστή Β, θα είναι θετικό ή αρνητικό, ανάλογα με το εάν το Β αυξάνει ή μειώνει την τιμή της μετρούμενης παραμέτρου  $X$ . Η παράμετρος  $X$  μπορεί να είναι το βάρος ενός ιζήματος, η απορρόφηση διαλύματος, το δυναμικό ενός ηλεκτροδίου, το ύψος μίας κορυφής χρωματογραφήματος κλπ.

Έστω δείγμα με αρχικές ποσότητες του προσδιοριζόμενου συστατικού Α και του παρεμποδιστή Β,  $(Q_A)_0$  και  $(Q_B)_0$  αντίστοιχα. Μετά από την εφαρμογή ενός σχήματος διαχωρισμού οι αντίστοιχες ποσότητες γίνονται  $Q_A$  και  $Q_B$ . Για την καλύτερη κατανόηση αυτών των σφαλμάτων, ας υποθέσουμε ότι η ανάλυση βασίζεται στη μέτρηση της παραμέτρου  $X$ , που εξαρτάται από τις ποσότητες  $Q_A$  και  $Q_B$  που υπάρχουν στο διάλυμα μετά το διαχωρισμό σύμφωνα με τις σχέσεις:

$$X_A = k_A * Q_A \quad (1.4-1)$$

$$X_B = k_B * Q_B \quad (1.4-2)$$

όπου:

$k_A, k_B$ : σταθερές αναλογίας. Ο όρος  $k_A$  είναι πάντα θετικός, ενώ ο όρος  $k_B$  γίνεται αρνητικός, όταν η παρουσία του Β προκαλεί μείωση στην τιμή της παραμέτρου  $X$

Η μετρούμενη τιμή της παραμέτρου  $X$  δίνεται από τη σχέση:

$$X = X_A + X_B = k_A * Q_A + k_B * Q_B \quad (1.4-3)$$

Εάν ο διαχωρισμός είναι **ιδανικός**, τότε θα πρέπει  $Q_A = (Q_A)_0$  και  $Q_B = 0$  δηλαδή πλήρης ανάκτηση του Α, πλήρης απομάκρυνση του Β και η μετρούμενη τιμή της παραμέτρου  $X$  δίνεται από τη σχέση:

$$X_0 = k_A * (Q_A)_0 \quad (1.4-4)$$

Το σχετικό σφάλμα που προκαλείται από το διαχωρισμό δίνεται από τη σχέση:

$$E_r = \frac{X - X_0}{X_0} \quad (1.4-5)$$

όπου:

$X - X_0$ : το σφάλμα που προκαλείται από το διαχωρισμό

Συνδυάζοντας τις σχέσεις (1.4-3), (1.4-4) και (1.4-5) έχουμε:

$$E_r = \frac{k_A * Q_A + k_B * Q_B - k_A * (Q_A)_0}{k_A * (Q_A)_0} \quad (1.4-6)$$

Αντικαθιστώντας στην σχέση (1.4-6) τους τύπους:

$$Q_A = R_A * (Q_A)_0$$

και

$$Q_B = R_B * (Q_B)_0$$

προκύπτει η τελική σχέση:

$$E_r = (R_A - 1) + \frac{k_A * (Q_B)_0 * R_B}{k_B * (Q_A)_0} \quad (1.4-7)$$

Η παραπάνω σχέση δείχνει ότι το σχετικό σφάλμα διαχωρισμού εξαρτάται από:

- τον πρώτο όρο, ο οποίος παρέχει το σφάλμα από την απώλεια του προσδιοριζόμενου συστατικού A κατά το διαχωρισμό, λόγω ατελούς ανάκτησης οπότε:  $R_A < 1$ . Το σφάλμα αυτό είναι προφανώς πάντοτε αρνητικό.
- από το δεύτερο όρο, ο οποίος παρέχει το σφάλμα λόγω ατελούς απομάκρυνσης του παρεμποδιστή B οπότε:  $R_B > 0$ . Το σφάλμα αυτό εξαρτάται από το συντελεστή ανάκτησης  $R_B$ , από την τιμή του λόγου των αρχικών ποσοτήτων των ουσιών στο μίγμα πριν το διαχωρισμό,  $(Q_B)_0 / (Q_A)_0$  και από τη σχετική ευαισθησία της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής μεθόδου για τις ουσίες A και B,  $k_B / k_A$ .

Μερικές φορές είναι δυνατόν το σχετικό σφάλμα διαχωρισμού να είναι “φαινομενικά” μηδενικό λόγω του ότι το αρνητικό σφάλμα εξαιτίας της ατελούς ανάκτησης του προσδιοριζόμενου συστατικού A να αναιρείται από το (κατά κανόνα) θετικό σφάλμα λόγω της ατελούς απομάκρυνσης του παρεμποδιστή B. Η πιθανότητα αυτή επιβάλλει μια νέα μέθοδος αναλυτικού διαχωρισμού να δοκιμάζεται με πολλά δείγματα στα οποία θα πρέπει οι λόγοι  $(Q_B)_0 / (Q_A)_0$  να διαφέρουν πολύ μεταξύ τους, ώστε να αποκλεισθεί η περίπτωση φαινομενικά μηδενικού σφάλματος διαχωρισμού [13].

**Μ Ε Ρ Ο Σ Α**

## 2<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

### 2.1 Γενικά

Η εκχύλιση είναι μια από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού μίγματος υγρών/στερεών ουσιών με ευρύτατη εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία συστατικών και δειγμάτων. Ως εκχύλιση ορίζεται η παραλαβή μιας ουσίας Α από μίγμα ουσιών από μια φάση στην οποία βρίσκεται με τη μορφή διαλύματος ή αιωρήματος σε μια άλλη υγρή φάση με τη χρήση ενός διαλύτη. Κυρίως χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες. Η μεταφορά αυτή είναι δυνατή επειδή η ουσία κατανέμεται στις δύο φάσεις με ορισμένη αναλογία. Η εκχύλιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό μίγματος υγρών ή στερεών ουσιών. Γενικότερα η παραλαβή οργανικών ουσιών από αιωρήματα, γίνεται με ανάμιξη του υδατικού μίγματος με ένα μη αναμιγνύόμενο με το νερό οργανικό διαλύτη, το προϊόν μεταφέρεται στην οργανική στοιβάδα και μπορεί να ανακτηθεί με την απομάκρυνση του διαλύτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ανάμιξη των δύο φάσεων γίνεται σε διαχωριστικό χωνί, όπου αναταράσσονται έτσι ώστε να έλθουν σε στενή επαφή και να αποκατασταθεί ισορροπία των διαλυμένων ουσιών στις δύο φάσεις οπότε και διαχωρίζονται.

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός υγρού μίγματος όταν επεξεργάζεται με ένα διαλύτη, στον οποίο το ένα (ή περισσότερα) από τα επιθυμητά συστατικά είναι εκλεκτικά διαλυτά, είναι γνωστός ως υγρή-υγρή εκχύλιση. Η ανάμιξη δύο υγρών φάσεων με ανάδευση αποτελεί μια βασική λειτουργία στην όλη διεργασία της εκχύλισης (solvent extraction ή και liquid - liquid extraction).

Τελευταία, άρχισε να χρησιμοποιείται ευρύτατα ο διαχωρισμός ουσιών από υγρά δείγματα, συνήθως βιολογικά υγρά, με διέλευση της υγρής φάσης μέσα από στερεό προσροφητικό υλικό, οπότε οι ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν προσροφώνται στη στερεή φάση. Η εκχύλιση αυτή ονομάζεται εκχύλιση στερεής φάσης (solid - phase extraction).

Η ευρεία χρήση της εκχύλισης οφείλεται στην ταχύτητα εκτέλεσης, στην απλότητα και το χαμηλό κόστος καθώς και στη δυνατότητα εφαρμογής της στη μικρο- και στη μακρο- ανάλυση ουσιών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογής αποτελούν ο προσδιορισμός των τριαλογονομεθανίων στο πόσιμο ύδωρ τα οποία παραλαμβάνονται με εκχύλιση με πεντάνιο καθώς και ο προσδιορισμός υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων σε χυμό πορτοκαλιού με εκχύλιση με ακετονιτρίλιο.

### 2.2 Ισορροπίες Κατανομής και Νόμος Κατανομής

Στην πλέον απλή περίπτωση της εκχύλισης υγρού - υγρού η ουσία Α που μπορεί να είναι σε στερεή ή υγρή κατάσταση κατανέμεται μεταξύ δύο μη μιγνύομενων φάσεων 1 και 2. Στις περισσότερες των περιπτώσεων μία εκ των δύο φάσεων είναι υδατική ενώ η άλλη είναι ένας οργανικός διαλύτης. Επειδή τα υγρά είναι μη μιγνύομενα μεταξύ τους σχηματίζουν δύο

στιβάδες με το πυκνότερο υγρό να αποτελεί την κάτω στιβάδα. Η ουσία, ενώ αρχικά ευρίσκεται στη μία φάση, μετά την εκχύλιση υπάρχει και στις δύο φάσεις. Η κατανομή της ουσίας, δηλαδή ο λόγος των συγκεντρώσεών της στις δύο διαφορετικές στιβάδες, εξαρτάται από τη σχετική διαλυτότητά της στις δύο φάσεις και καθορίζεται από το συντελεστή ή σταθερά κατανομής,  $K_D$  (partition ή distribution coefficient) που πρακτικά εξαρτάται μόνο από τη θερμοκρασία.

$$K_D = \frac{\alpha_1}{\alpha_2} \approx \frac{[A]_2}{[A]_1} \quad (2.2-1)$$

όπου:

$\alpha_1, \alpha_2$ : οι ενεργότητες της ουσίας A στις φάσεις 1 και 2

$[A]_1, [A]_2$ : οι συγκεντρώσεις της ουσίας A στις φάσεις 1 και 2

Η σχέση (2.2-1) αποτελεί το *Νόμο Κατανομής* και ισχύει μόνο, όταν η διαλυμένη ουσία βρίσκεται και στις δύο φάσεις με την ίδια ακριβώς μορφή. Διαφορετικά, εάν πραγματοποιείται διάσπαση ή σύζευξη ή πολυμερισμός ή συμπλοκοποίηση της διαλυμένης ουσίας, χρησιμοποιείται ο λόγος κατανομής  $D$  ή  $P$ :

$$D = \frac{[X]_2}{[X]_1} \quad (2.2-2)$$

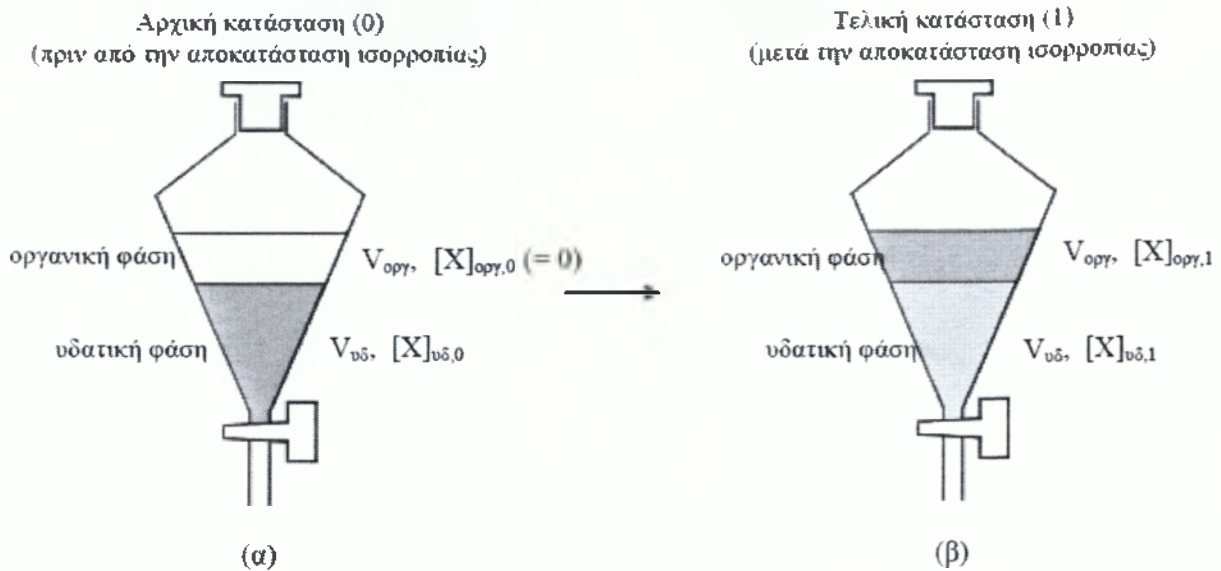
όπου:

$[X]_1, [X]_2$ : οι αναλυτικές ολικές συγκεντρώσεις της ουσίας X στις φάσεις 1 και 2

Έστω ότι ποσότητα ουσίας X είναι διαλυμένη στην υδατική φάση (κάτω φάση), όγκου  $V_{\text{υδ}}$ . Προστίθεται όγκος  $V_{\text{οργ}}$  καθαρού οργανικού διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με την υδατική φάση (Σχήμα 2.2-1α). Αναταράσσεται η διαχωριστική χοάνη έντονα και για αρκετό χρονικό διάστημα, οπότε η ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο φάσεων και επέρχεται κατάσταση ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων (Σχήμα 2.2-1β).

Έστω  $[X]_{\text{υδ},0}$  και  $[X]_{\text{οργ},0}$  οι συγκεντρώσεις της ουσίας X στην υδατική φάση και στην οργανική φάση, αντίστοιχα, κατά την αρχική κατάσταση (είναι προφανές ότι  $[X]_{\text{οργ},0} = 0$ ) και  $[X]_{\text{υδ},1}$  και  $[X]_{\text{οργ},1}$  οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις μετά την αποκατάσταση ισορροπίας κατανομής. Επειδή η συνολική ποσότητα (και στις δύο φάσεις) της ουσίας X είναι η ίδια πριν και μετά την αποκατάσταση ισορροπίας κατανομής θα είναι:

$$X_{\text{ολικά mol}} = [X]_{\text{υδ},0} * V_{\text{υδ}} = [X]_{\text{υδ},1} * V_{\text{υδ}} + [X]_{\text{οργ},1} * V_{\text{οργ}} \quad (2.2-3)$$



Σχήμα 2.2-1. Εκχύλιση υδατικού διαλύματος ουσίας X (κάτω στιβάδα) με οργανικό διαλύτη (επάνω στιβάδα) σε διαχωριστική χοάνη.

(α) Αρχική κατάσταση (0).

(β) Τελική κατάσταση (1) (μετά την ανατάραξη, αποκατάσταση ισορροπίας κατανομής και διαχωρισμό των φάσεων).

Ο αριθμητικός δείκτης στις συγκεντρώσεις ( 0 και 1) δείχνει πόσες εκχυλίσεις έχει υποστεί το αρχικό υδατικό διάλυμα

Μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας κατανομής θα ισχύει ο λόγος κατανομής  $D$  σύμφωνα με τη σχέση (2.2-2):

$$D = \frac{[X]_{οργ,1}}{[X]_{υδ,1}} \tag{2.2-4}$$

Οπότε η σχέση (2.2-3) μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$[X]_{υδ,0} * V_{υδ} = [X]_{υδ,1} * V_{υδ} + D * [X]_{υδ,1} * V_{οργ} \tag{2.2-5}$$

Από την οποία προκύπτει ότι

$$\frac{[X]_{υδ,1}}{[X]_{υδ,0}} = \frac{V_{υδ}}{D * V_{οργ} + V_{υδ}} \tag{2.2-6}$$

Εάν, μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας κατανομής, η οργανική φάση απομακρυνθεί και αντικατασταθεί με ίσο προς τον προηγούμενο όγκο καθαρού οργανικού διαλύτη ( $V_{οργ}$ ) και η απομένουσα ποσότητα X στην υδατική φάση (με συγκέντρωση  $[X]_{υδ,1}$ ) υποστεί νέα (2η) εκχύλιση και οι προηγούμενοι υπολογισμοί επαναληφθούν θα προκύψει η σχέση:

$$\frac{[X]_{\text{υδ},2}}{[X]_{\text{υδ},1}} = \frac{V_{\text{υδ}}}{D * V_{\text{οργ}} + V_{\text{υδ}}} \quad (2.2-7)$$

Γενικά, μετά από  $n$  εκχυλίσεις της υδατικής φάσης με όγκο  $V_{\text{οργ}}$  καθαρού οργανικού διαλύτη θα είναι:

$$\frac{[X]_{\text{υδ},n}}{[X]_{\text{υδ},n-1}} = \frac{V_{\text{υδ}}}{D * V_{\text{οργ}} + V_{\text{υδ}}} \quad (2.2-8)$$

Πολλαπλασιάζοντας κατά μέλη τις εξισώσεις (2.2-6), (2.2-7) και (2.2-8) προκύπτει η γενική σχέση:

$$f_n = \frac{[X]_{\text{υδ},n}}{[X]_{\text{υδ},0}} = \left( \frac{V_{\text{υδ}}}{D * V_{\text{οργ}} + V_{\text{υδ}}} \right)^n = \left( \frac{1}{D * \left( \frac{V_{\text{οργ}}}{V_{\text{υδ}}} \right) + 1} \right)^n \quad (2.2-9)$$

όπου:

$f_n$ : το κλάσμα της ουσίας X που παραμένει στο διαλύτη (υδατική φάση) μετά από  $n$  εκχυλίσεις

Ο όρος  $D * \frac{V_{\text{οργ}}}{V_{\text{υδ}}}$  λέγεται παράγοντας χωρητικότητας.

Η σχέση (2.2-9) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη διότι μας παρέχει το κλάσμα της ουσίας X που απομένει στην υδατική φάση όγκου  $V_{\text{υδ}}$  μετά την πραγματοποίηση  $n$  εκχυλίσεων μετά την πραγματοποίηση  $n$  εκχυλίσεων με τον ίδιο όγκο οργανικού διαλύτη  $V_{\text{οργ}}$  κάθε φορά. Στην παραπάνω σχέση, είναι προφανές ότι ο λόγος συγκεντρώσεων  $[X]_{\text{υδ},n} / [X]_{\text{υδ},0}$  μπορεί να αντικατασταθεί και από λόγους ποσοτήτων

$$\frac{[X]_{\text{υδ},n}}{[X]_{\text{υδ},0}} \quad \text{όπου οι συγκεντρώσεις της X εκφράζονται σε mmol ή mg}$$

Στην εκχύλιση η επιλογή του διαλύτη πραγματοποιείται με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

- δεν αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία, αλλά έχει την ικανότητα να επιδιαλυτώνει τα αφόρτιστα σωματίδια της
- ο συντελεστής κατανομής της εκχυλιζόμενης ουσίας (διαλυτότητα) πρέπει να διαφέρει σημαντικά από αυτούς των παρεμποδίσεων και να έχει τη μέγιστη δυνατή τιμή (ισχύει η βασική αρχή ότι “όμοια διαλύουν όμοια”)

- μικρή διαλυτότητα του διαλύτη στο ύδωρ (μικρότερη του 5%)
- διαφορετική πυκνότητα από αυτή του ύδατος για πληρέστερο και ταχύτερο διαχωρισμό των φάσεων
- η εκχυλισθείσα ουσία πρέπει να ανακτάται εύκολα (π.χ. με εξάτμιση του διαλύτη)

Οι τεχνικές εκχύλισης οι οποίες χρησιμοποιούνται επιλέγονται με βάση τους συντελεστές κατανομής των υπό διαχωρισμό ουσιών σε καθορισμένο ζεύγος φάσεων, τον επιδιωκόμενο βαθμό διαχωρισμού και το δείγμα το οποίο πρόκειται να εκχυλιστεί.

Πρακτικά η τεχνική καθορίζεται από τον αριθμό των εκχυλίσεων για να επιτευχθεί ο επιδιωκόμενος διαχωρισμός. Η εκχύλιση είναι αποτελεσματικότερη, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός  $n$  των εκχυλίσεων, που γίνονται κάθε φορά με τον ίδιο όγκο  $V_{οργ}$ . Μόνο όταν ο λόγος κατανομής είναι πολύ μεγάλος, είναι δυνατή η ποσοτική απομάκρυνση μίας διαλυμένης ουσίας με μία μόνο εκχύλιση. Η πλέον απλούστερη είναι η τεχνική του λουτρού κατά την οποία διαχωρίζονται ουσίες των οποίων οι συντελεστές κατανομής διαφέρουν σημαντικά. Παράδειγμα αυτής είναι η εκχύλιση με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης. Εάν οι λόγοι κατανομής δε διαφέρουν σημαντικά τότε απαιτείται ικανός αριθμός εκχυλίσεων (συνήθως 10-100) για το διαχωρισμό και χρησιμοποιείται η τεχνική συνεχούς εκχύλισης ή η τεχνική της εκχύλισης κατ' αντιρροή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της δεύτερης είναι η χρήση τη συσκευής Craig η οποία θα περιγραφεί σε επόμενη ενότητα.

Η επί τοις εκατό ποσότητα, που εκχυλίζεται σε μία εκχύλιση,  $\%E$ , δίνεται από τη σχέση:

$$\%E = \frac{100D}{D + \frac{V_{υδ}}{V_{οργ}}} \quad (2.2-10)$$

Μηχανικές δυσκολίες περιορίζουν την τιμή του λόγου  $\frac{V_{υδ}}{V_{οργ}}$  μεταξύ 0,01 και 100 [1].

### Φαινομενικές αποκλίσεις από το Νόμο Κατανομής

Κατά την εκχύλιση υγρού-υγρού ο συντελεστής κατανομής,  $K_D$ , που εκφράζεται από τη σχέση (2.2-1) περιγράφει την ισορροπία κατανομής μόνο όταν η διαλυμένη ουσία βρίσκεται και στις δύο φάσεις με την ίδια ακριβώς μορφή. Εάν η διαλυμένη ουσία υπάρχει σε περισσότερες από μια μορφές στον ένα ή και στους δύο διαλύτες, δηλαδή έχουμε σύστημα πολλαπλών ισορροπιών, τότε έχουμε φαινομενικές αποκλίσεις από το νόμο κατανομής και χρησιμοποιείται ο λόγος κατανομής  $D$ , που εκφράζεται από τη σχέση (2.2-2).

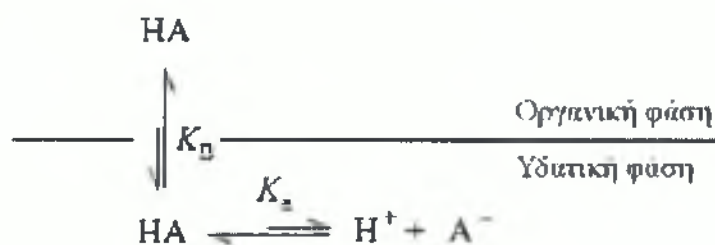
Επειδή κατά την εκτέλεση εκχυλίσεων ενδιαφέρει περισσότερο η κατανομή του συνόλου των σωματιδίων της ουσίας από ότι η κατανομή ενός σωματιδίου, επιδιώκεται η μεγιστοποίηση της τιμής  $D$ . Θα εξετάσουμε δύο περιπτώσεις πολλαπλών ισορροπιών όπου παρατηρούνται φαινομενικές αποκλίσεις από το νόμο κατανομής.



- Κατανομή ασθενούς οξέος μεταξύ οργανικού διαλύτη και ύδατος

Στην περίπτωση εκχύλισης ενός ασθενούς οργανικού οξέος (HA) και υποθέτοντας ότι μόνο η μοριακή μορφή του είναι εκχυλίσιμη από τον οργανικό διαλύτη (κάτι που ισχύει σχεδόν πάντοτε), τότε ο λόγος κατανομής  $D$  του οξέος αναμένεται να εξαρτάται από το pH της υδατικής φάσης, αφού από το pH καθορίζεται η σχέση μεταξύ της εκχυλίσιμης μορφής, (HA), και της μη εκχυλίσιμης μορφής του, ( $A^-$ ).

Στο σχήμα (2.2-2) δείχνεται το υφιστάμενο σύστημα ισορροπιών: Η μία είναι η ισορροπία κατανομής μόνο της μορφής HA και η άλλη η ισορροπία ιοντισμού του HA προς  $H^+$  και  $A^-$ .



Σχήμα 2.2-2. Σχηματική παράσταση εκχύλισης μονοπρωτικού οξέος από υδατική φάση με οργανικό διαλύτη.

Η εξάρτηση του λόγου κατανομής από τη συγκέντρωση  $H^+$  υπολογίζεται ως εξής:

Από τον ιοντισμό του HA στην υδατική φάση ισχύει:

$$K_a = \frac{[H^+]_{\text{υδ}} [A^-]_{\text{υδ}}}{[HA]_{\text{υδ}}} \quad (2.2-1)$$

Από την ισορροπία κατανομής έχουμε:

$$K_D = \frac{[HA]_{\text{οργ}}}{[HA]_{\text{υδ}}} \quad (2.2-12)$$

Από τον ορισμό του λόγου κατανομής  $D$  ισχύει:

$$D = \frac{(C_{HA})_{\text{οργ}}}{(C_{HA})_{\text{υδ}}} = \frac{[HA]_{\text{οργ}}}{[A^-]_{\text{υδ}} + [HA]_{\text{υδ}}} \quad (2.2-13)$$

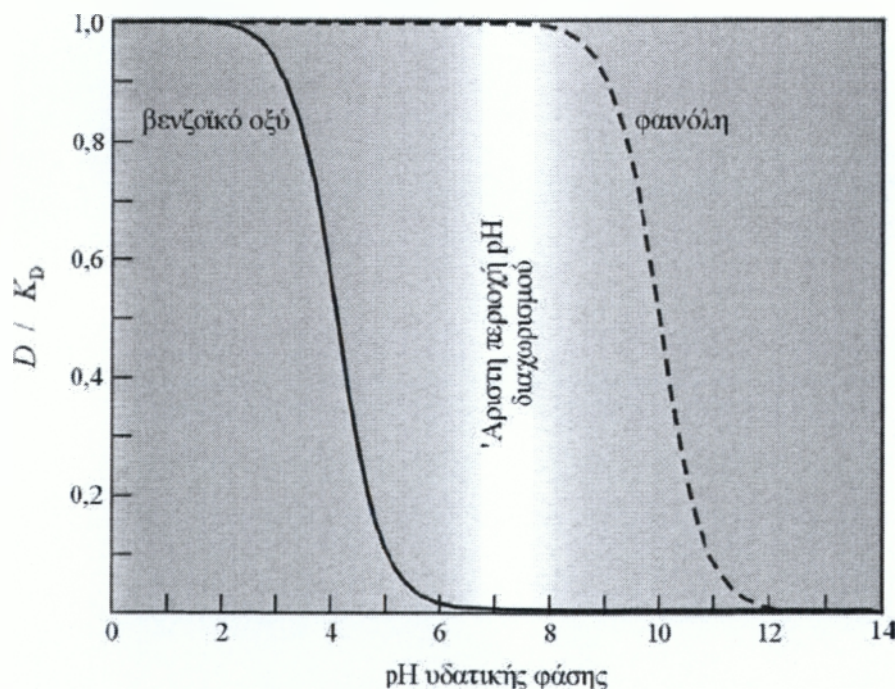
όπου ως  $C_{HA}$  συμβολίζεται η αναλυτική συγκέντρωση του HA στη δεδομένη φάση, δηλαδή το άθροισμα των συγκεντρώσεων των υφιστάμενων μορφών του HA, δηλαδή, στην οργανική φάση μόνο HA, ενώ στην υδατική φάση HA και  $A^-$ .

Από τις σχέσεις (2.2-11), (2.2-12) και (2.2-13) εύκολα υπολογίζεται η ζητούμενη σχέση:

$$D = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} K_D \quad (2.2-14)$$

Από την παραπάνω σχέση είναι προφανές ότι όσο πιο όξινη είναι η υδατική φάση, τόσο αυξάνει ο λόγος κατανομής  $D$ , με ανώτατη δυνατή την τιμή  $K_D$  και ευνοείται η εκχύλιση του  $HA$  από τον οργανικό διαλύτη και όσο πιο αλκαλική είναι η υδατική φάση τόσο ευνοείται η παραμονή του  $HA$  στην υδατική φάση. Έτσι για  $[H^+] \gg K_a$  είναι  $D \approx K_D$ , ενώ για  $[H^+] \ll K_a$  είναι  $D \approx 0$ .

Στο διάγραμμα του σχήματος (2.2-3) δείχνεται πώς εξαρτάται ο λόγος  $D/K_D$  από το  $pH$ , όπως υπολογίζεται από τη σχέση (2.2-14) δύο ασθενών οργανικών οξέων, του βενζοϊκού οξέος ( $C_6H_5COOH$ ,  $pK_a = 4,2$ ) και της φαινόλης ( $C_6H_5OH$ ,  $pK_a = 10,0$ ). Όπως φαίνεται από το διάγραμμα στην περιοχή  $pH$  περίπου 6,5-8 υφίσταται η μεγαλύτερη διαφορά των λόγων. Έτσι, σε αυτήν την περιοχή  $pH$  εκχυλίζεται με οργανικό διαλύτη (π.χ. διαιθυλαιθέρα) μόνο η φαινόλη που θα βρίσκεται πρακτικά στο σύνολό της στην εκχυλίσιμη μοριακή μορφή  $C_6H_5OH$ , ενώ το βενζοϊκό οξύ θα παραμείνει στη υδατική φάση, αφού θα βρίσκεται πρακτικά στο σύνολό του στη μη εκχυλίσιμη ιοντική μορφή  $C_6H_5COO^-$  και επομένως καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός των δύο ασθενών οξέων [1].

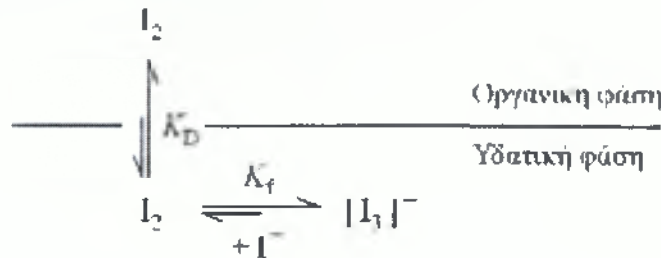


Σχήμα (2.2-3). Απόδοση της εκχύλισης εκφρασμένη ως  $D/K_D$ , από το  $pH$  του βενζοϊκού οξέος και της φαινόλης.

- Επίδραση σχηματισμού συμπλόκου στην εκχύλιση ουδέτερου μορίου

Το μοριακό ιώδιο ( $I_2$ ) διαλύεται ελάχιστα στο νερό ( $0,3 \text{ g } I_2 / \text{L}$  στους  $20^\circ\text{C}$ ), άφθονα όμως σε σχετικώς πυκνά υδατικά διαλύματα διαλυτών ιωδιούχων αλάτων (π.χ. KI), εξαιτίας του σχηματισμού ιόντων τριωδίου ( $[I_3]^-$ ), με σταθερά σχηματισμού  $K_f = 710$ . Το μοριακό ιώδιο είναι άφθονα διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. εξάνιο, χλωροφόρμιο) και είναι η μόνη εκχυλίσιμη μορφή του ιωδίου με συντελεστή κατανομής  $K_D \gg 1$ .

Οι ισορροπίες παριστάνονται σχηματικά ως εξής:



Η εξάρτηση του λόγου κατανομής από τη συγκέντρωση των ελεύθερων ιωδιούχων στην υδατική φάση  $[I^-]_{\text{υδ}}$  υπολογίζεται ως εξής:

Ισχύουν οι σχέσεις:

$$D = \frac{(C_{I_2})_{\text{οργ}}}{(C_{I_2})_{\text{υδ}}} = \frac{[I_2]_{\text{οργ}}}{[I_2]_{\text{υδ}} + [I_3^-]_{\text{υδ}}} \quad (2.2-15)$$

$$K_D = [I_2]_{\text{οργ}} / [I_2]_{\text{υδ}} \quad (2.2-16)$$

$$K_f = \frac{[I_3^-]_{\text{υδ}}}{[I_2]_{\text{υδ}} [I^-]_{\text{υδ}}} = 710 \quad (2.2-17)$$

Με συνδυασμό των σχέσεων (2.2-15), (2.2-16) και (2.2-17) λαμβάνεται η ζητούμενη σχέση:

$$D = \frac{[I_2]_{\text{οργ}}}{[I_2]_{\text{υδ}} + K_f [I_2]_{\text{υδ}} [I^-]_{\text{υδ}}} = \frac{[I_2]_{\text{οργ}}}{[I_2]_{\text{υδ}}} \cdot \frac{1}{1 + K_f [I^-]_{\text{υδ}}} = \frac{K_D}{1 + K_f [I^-]_{\text{υδ}}} \quad (2.2-18)$$

Από την τελευταία σχέση φαίνεται ότι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ελεύθερων ιωδιούχων είναι  $K_f [I^-] \ll 1$ , οπότε θα είναι  $D \approx K_D$  και το μοριακό ιώδιο ( $I_2$ ) θα εκχυλίζεται στην οργανική στιβάδα. Αντίθετα, σε μεγάλες συγκεντρώσεις ιωδιούχων είναι  $K_f [I^-] \gg 1$ , οπότε  $D \approx 0$  και το μοριακό ιώδιο πρακτικά παραμένει στο σύνολό του στην υδατική φάση.

### 2.3 Τεχνικές Εκχύλισης και Εφαρμογές στη Φαρμακευτική Ανάλυση

Η εκχύλιση είναι μία συνηθισμένη τεχνική για υγρά και στερεά δείγματα που χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή φαρμακευτικών παρασκευασμάτων. Τα δείγματα μπορούν να ταξινομηθούν σε οργανικά στα οποία περιλαμβάνονται και τα βιολογικά υγρά και ανόργανα και πιθανόν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε στερεά, ημι-στερεά στα οποία

ανήκουν οι κρέμες, οι αλοιφές, οι γέλες, τα εναιωρήματα και τα κολλοειδή και σε υγρά. Τα υγρά δείγματα, συγκρινόμενα με τα στερεά, είναι πιο εύκολα στην κατεργασία τους.

Θα παραθέσουμε τρεις τεχνικές:

- Εκχύλιση στερεών με υγρό
- Εκχύλιση υγρού – υγρού
- Εκχύλιση στερεής φάσης

### 2.3.1 Εκχύλιση Στερεών με Υγρό

Τα εκχυλίσματα (extract) λαμβάνονται από φυτικές ή ζωικές δρόγες, μετά από εκχύλιση με διάφορους διαλύτες, που λέγονται ειλήματα. Παρόμοια Φαρμακοτεχνικά σκευάσματα είναι τα βάμματα, που λαμβάνονται με εκχύλιση φυτικών κυρίως και σπανιότερα ζωικών δρογών με αλκοόλη ή υδατοαλκοολικά διαλύματα. Εκτός από τη φαρμακοτεχνία, η εκχύλιση στερεών χρησιμοποιείται ευρύτατα στη φαρμακευτική ανάλυση για τον προσδιορισμό των δραστικών συστατικών τόσο των ακατέργαστων δρογών, όσο και των στερεών σκευασμάτων (δισκίων, αλοιφών, υπόθετων, κλπ.) [5].

Παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης στερεών δειγμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.3.1-1: Παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης στερεών δειγμάτων**

Τεχνική	Αρχή Τεχνικής
Στερεό -Υγρό Εκχύλιση:	Το δείγμα τοποθετείται σε κλειστό περιέκτη και διαλύτης προστίθεται για τη διαλυτοποίηση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Το διάλυμα διαχωρίζεται από το στερεό με διήθηση.
Εκχύλιση Soxhlet:	Το δείγμα τοποθετείται σε πορώδη περιέκτη μιας χρήσεως. Διαλύτης που συνεχώς βράζει με κάθετο ψυκτήρα επαναρρέει μέσω του περιέκτη και διαλύει τα προσδιοριζόμενα συστατικά, που συλλέγονται συνεχώς σε φιάλη βρασμού.
Εκχύλιση από ένα αδιάλυτο με στερεό με εξαναγκασμένη ροή (Forced- flow leaching):	Το δείγμα τοποθετείται σε κυψελίδα συνεχούς ροής διαλύτη να τη διαρρέει συνεχώς. Η κυψελίδα θερμαίνεται μέχρι περίπου το σημείο ζέσης του διαλύτη.
Ομογενοποίηση:	Το δείγμα τοποθετείται σ' ένα αναμικτήρα, προστίθεται διαλύτης και το δείγμα ομογενοποιείται σε πολύ λεπτό διαμερισμό. Ο διαλύτης απομακρύνεται για περαιτέρω επεξεργασία.
Υπέρηχοι:	Λεπτότατα διαμερισμένο δείγμα εμβαπτίζεται σε λουτρό υπερήχων με διαλύτη και τίθενται σε λειτουργία οι υπέρηχοι.

Διάλυση:	Το δείγμα κατεργάζεται με κατάλληλο διαλύτη και λαμβάνεται με ή χωρίς χημική αλλαγή.
----------	--

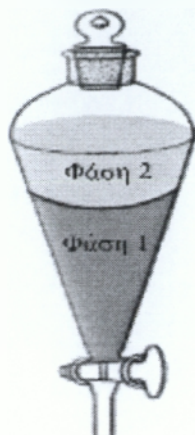
Σύγχρονες μέθοδοι εκχύλισης στερεών δειγμάτων παρατίθενται στον πιο κάτω πίνακα:

**Πίνακας 2.3.1-2: Σύγχρονες μέθοδοι εκχύλισης στερεών δειγμάτων**

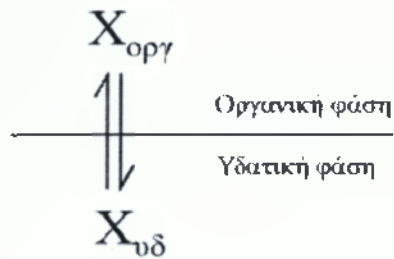
Τεχνική	Αρχή Τεχνικής
Επιταχυνόμενη εκχύλιση διαλύτη:	Το δείγμα τοποθετείται σ' ένα στεγανό περιέκτη και θερμαίνεται πάνω από το σημείο ζέσης, προκαλώντας αύξηση της πίεσης μέσα στον περιέκτη. Το εκχυλισμένο δείγμα απομακρύνεται αυτόματα και μεταφέρεται σε φιαλίδιο για περαιτέρω κατεργασία.
Αυτοματοποιημένη εκχύλιση Soxhlet:	Συνδυασμός θερμής εκχύλισης από αδιάλυτο στερεό και εκχύλισης Soxhlet. Το δείγμα στον πορώδη περιέκτη μιας χρήσεως κατ' αρχάς εμβαπτίζεται σε ζέοντα διαλύτη. Εν συνεχεία, ο περιέκτης ανυψώνεται για την παραδοσιακή Soxhlet εκχύλιση/έκπλυση με διαλύτη που βράζει με κάθετο ψυκτήρα.
Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού:	Το δείγμα τοποθετείται σε περιέκτη ροής και υπερκρίσιμο ρευστό (π.χ. CO <sub>2</sub> ) περνά μέσα από το δείγμα. Μετά από αποσυμπίεση, η εκχύλισμένη ουσία συλλέγεται σε διαλύτη ή εγκλωβίζεται σε προσροφητικό και εν συνεχεία ακολουθεί εκρόφιση με έκπλυση με διαλύτη.
Εκχύλιση βοηθούμενη από μικροκύματα:	Το δείγμα τοποθετείται σ' ένα ανοικτό ή κλειστό περιέκτη και θερμαίνεται με ενέργεια μικροκυμάτων, προκαλώντας έτσι εκχύλιση της επιθυμητής ουσίας σ' ένα διαλύτη.
Θερμική εκχύλιση:	Ένας τρόπος δειγματοληψίας δυναμικής υπερκείμενης φάσης, αλλά το δείγμα θερμαίνεται σε πολύ ψηλότερες ελεγχόμενες θερμοκρασίες (μέχρι 350°C).

### 2.3.2 Εκχύλιση Υγρού - Υγρού

Είναι μία τεχνική για το διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων ουσιών από τις παρεμποδίζουσες με κατανομή του δείγματος μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων υγρών φάσεων έτσι ώστε να μεγιστοποιηθούν οι διαφορές της διαλυτότητας. Η μία φάση είναι υδατική και η άλλη ένας οργανικός διαλύτης.

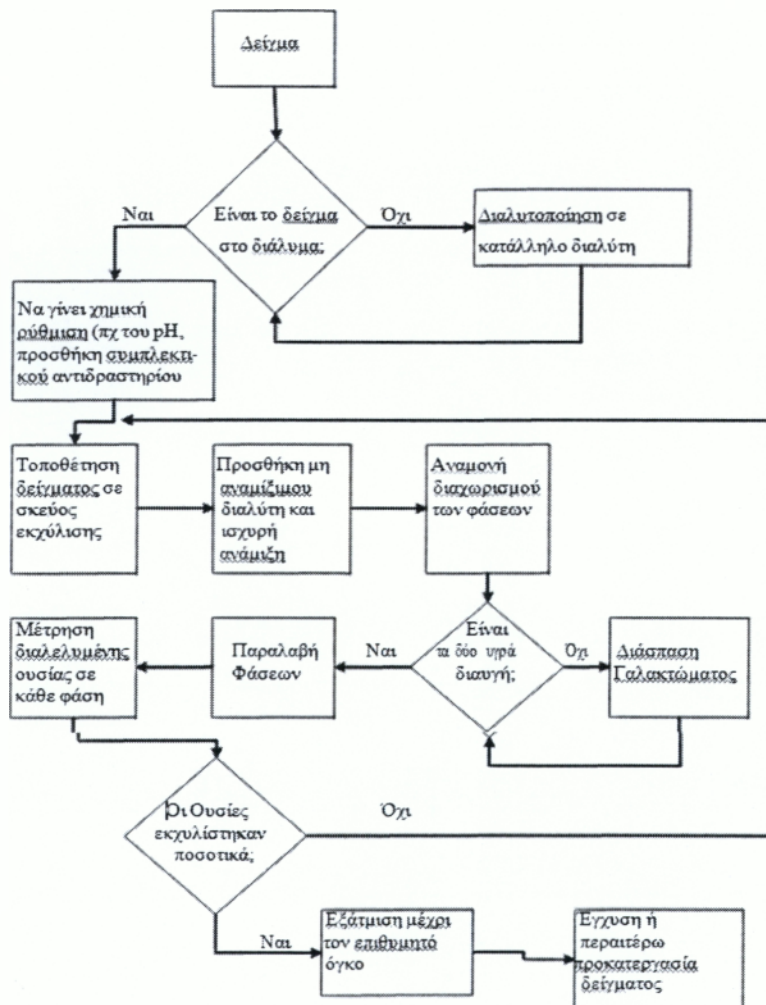


Σχήμα 2.3.2-1. Εκχύλιση υγρού - υγρού με διαχωριστική χοάνη



Σχήμα 2.3.2-2. Σχηματική παράσταση απλής εκχύλισης χωρίς δευτερεύουσες αντιδράσεις

Τα στάδια διαχωρισμού με εκχύλιση υγρού - υγρού απεικονίζονται στο σχήμα (2.3.2-3):



Σχήμα 2.3.2-3. Στάδια διαχωρισμού με εκχύλιση υγρού - υγρού

Η δυνατότητα διαχωρισμού δύο ουσιών καθορίζεται από τον παράγοντα διαχωριστικότητας,  $\alpha$ , που ορίζεται, ως ο λόγος των συντελεστών ή των λόγων κατανομής των δύο ουσιών στο δεδομένο

σύστημα διαλυτών. Τιμή του  $a$  ίση με τη μονάδα σημαίνει αδυναμία διαχωρισμού, ενώ όσο περισσότερο διαφέρει η τιμή του  $a$  από τη μονάδα τόσο περισσότερο εφικτός είναι ο διαχωρισμός. Επιτυχής διαχωρισμός μπορεί να γίνει με τους παρακάτω τέσσερις τρόπους:

### 1. Επιλογή διαλύτη

Αποφασιστικός παράγοντας για την πληρότητα και την εκλεκτικότητα της εκχύλισης είναι η επιλογή του κατάλληλου εκχυλιστικού μέσου, ώστε ο μεν συντελεστής κατανομής της εκχυλιζόμενης ουσίας να είναι μεγάλος - της τάξεως του 10 ή και μεγαλύτερος - ενώ οι συντελεστές κατανομής των ουσιών που συνυπάρχουν, να είναι μικροί - στην περιοχή 0,1 έως 0,001 ή και μικρότεροι - και με τις συνθήκες αυτές ο παράγοντας διαχωριστικότητας είναι 100 ή και μεγαλύτερος και ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μικρό αριθμό διαδοχικών εκχυλίσεων (3-5), χρησιμοποιώντας κάθε φορά νέα ποσότητα εκχυλιστικού μέσου.

Η επιλογή του καταλληλότερου διαλύτη, ως εκχυλιστικού μέσου, γίνεται με βάση τα εξής κριτήρια:

- Το εκχυλιστικό μέσο δεν πρέπει να αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία.
- Μετά την έντονη ανακίνηση του διαλύτη με το υδατικό διάλυμα, οι δύο στοιβάδες πρέπει να διαχωρίζονται γρήγορα. Για το σκοπό αυτό η πυκνότητα  $d$  του διαλύτη πρέπει να είναι σημαντικά μεγαλύτερη ή σημαντικά μικρότερη από την πυκνότητα του ύδατος.

Διαλύτες, που χρησιμοποιούνται ευρύτατα είναι:

τετραχλωράνθρακας ( $d = 1,59$ ),

χλωροφόρμιο ( $d = 1,50$ ),

βενζόλιο ( $d = 0,88$ ),

δαιθυλαιθέρας ( $d = 0,71$ ) και

φωσφορικό τριβουτύλιο ( $d = 0,98$ ).

- Η ουσία που εκχυλίζεται πρέπει να ανακτάται εύκολα από το εκχυλιστικό μέσο, με βρασμό του ή με επανεκχύλιση με νερό. Ο αιθέρας χρησιμοποιείται ευρύτατα, ως εκχυλιστικό υγρό, λόγω του χαμηλού σημείου ζέσεώς του, που ευκολύνει πολύ την απομάκρυνσή του.
- Η αμοιβαία διαλυτότητα των δύο υγρών πρέπει να είναι αμελητέα.
- Οι δύο φάσεις πρέπει να μην εμφανίζουν τάση σχηματισμού γαλακτωμάτων.
- Ο διαλύτης δεν πρέπει να είναι τοξικός, ούτε και εύφλεκτος.
- Ο διαλύτης πρέπει να είναι οπτικά διαφανής, ώστε να είναι δυνατές φασματοφωτομετρικές μετρήσεις.

- Η διαλυτότητα της εκχυλιζόμενης ουσίας στο εκχυλιστικό μέσο πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη, ενώ η διαλυτότητα των ανεπιθύμητων ουσιών, που συνυπάρχουν, πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη.

Σπάνια ένας διαλύτης ικανοποιεί όλους τους παραπάνω όρους. Πάντως πρέπει να εξετάζεται και η δυνατότητα χρησιμοποίησης μείγματος οργανικών διαλυτών, ως εκχυλιστικού μέσου, για τη βελτίωση μιας εκχύλισης [1].

## 2. Έλεγχος ιονικής ισχύος

Στην εκχύλιση υγρού - υγρού με την προσθήκη μεγάλης ποσότητας άλατος (NaCl) στην υδατική φάση η διαλυμένη ουσία εξαλατώνεται στην οργανική φάση λόγω της μείωσης της ενεργότητας του ύδατος και λόγω της αφυδατώσεως των ιόντων του ηλεκτρολύτη. Επίσης το άλας υποβοηθηθεί και τη διάσπαση των γαλακτωμάτων, που ενδεχομένως θα σχηματισθούν κατά την ανακίνηση των δύο φάσεων [1].

## 3. Έλεγχος του pH

Η εκχύλιση υγρού - υγρού σε συνδυασμό με έλεγχο του pH αποτελεί ένα αποτελεσματικό τρόπο αρχικής κατεργασίας πολύπλοκων δειγμάτων φαρμακευτικής ανάλυσης, όπως είναι τα βιολογικά υγρά. Οι περισσότερες από τις ουσίες, που απαντώνται στη φαρμακευτική ανάλυση, είναι ασθενή οξέα ή βάσεις. Σε τέτοιους διαχωρισμούς είναι απαραίτητη η γνώση της τιμής  $pK_a$  της προς εκχύλιση ουσίας, για να υπολογισθεί το κατάλληλο pH.

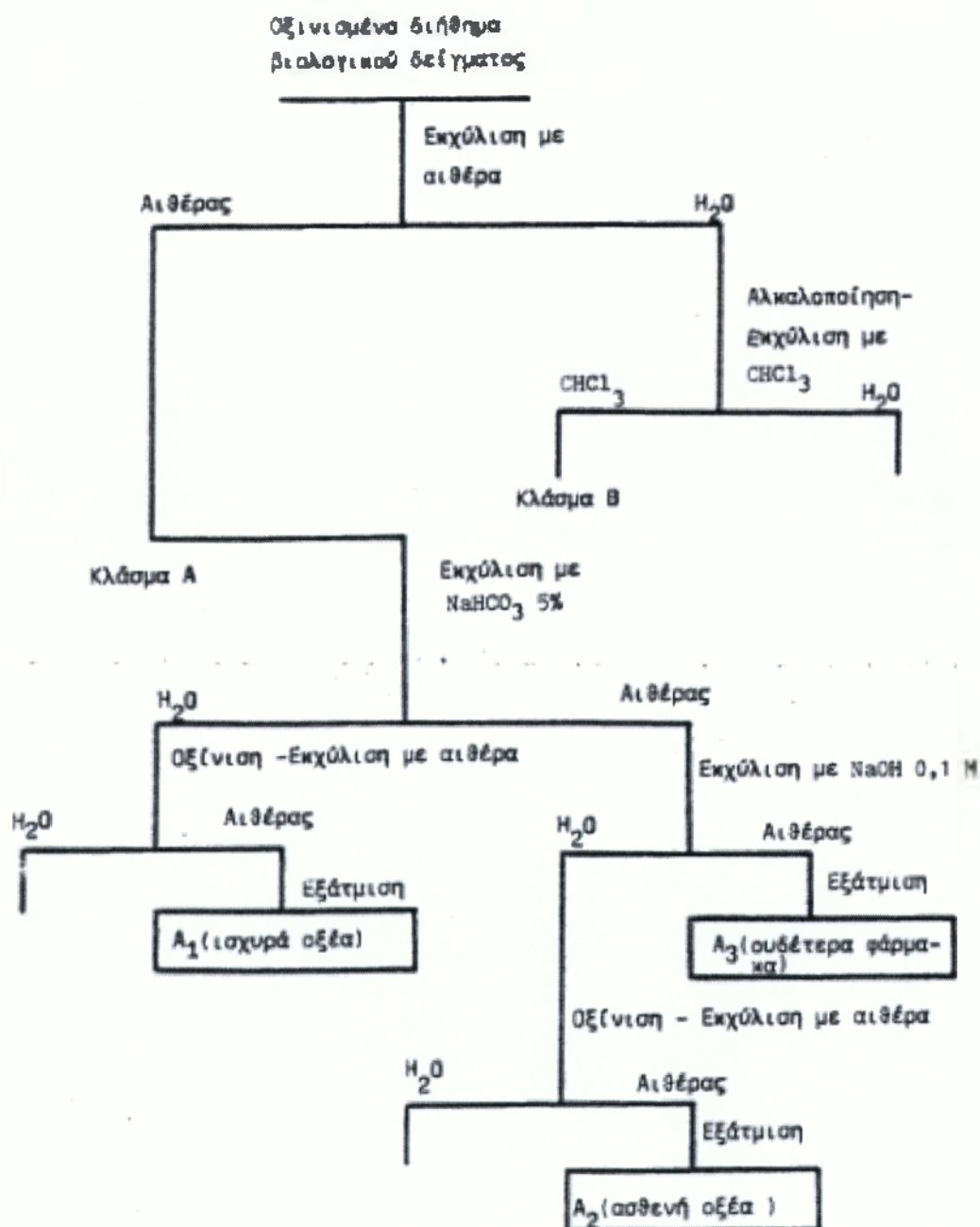
Με αξιοποίηση της επίδρασης του pH στην τιμή του λόγου κατανομής είναι δυνατός ο προκαταρκτικός διαχωρισμός του δείγματος σε κλάσματα, στα οποία εκτελείται ακολούθως ο προσδιορισμός των διαφόρων φαρμάκων. Για παράδειγμα, ο προσδιορισμός των φαρμάκων σε δείγμα αίματος ή ούρων, μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνών, που πετυχαίνεται συνήθως με καταβύθιση με βολφραμικό ή τριχλωροξικό οξύ, γίνεται εφαρμόζοντας την εκχύλιση υγρού - υγρού (Σχήμα 2.3.2-4). Με τον τρόπο αυτόν τελικά λαμβάνονται τέσσερα κλάσματα, το  $A_1$ , που περιέχει τα "ισχυρώς" όξινα φάρμακα, το  $A_2$ , που περιέχει τα "ασθενώς" όξινα φάρμακα, το  $A_3$ , που περιέχει τα ουδέτερα φάρμακα και το B, που περιέχει όλα τα βασικά φάρμακα. Τα κλάσματα αυτά μπορούν να αναλυθούν στη συνέχεια με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές [1].

## 4. Έλεγχος λιποφιλικότητας των ιόντων

Σε ένα διφασικό σύστημα οργανικού διαλύτη/ύδατος, τα μικρού μεγέθους ιόντα συνήθως βρίσκονται στην πολική υδατική φάση. Με την προσθήκη υδρόφοβου (λιπόφιλου) αντισταθμιστικού ιόντος μεγάλου μεγέθους, είναι δυνατόν να αυξηθεί η λιποφιλικότητα του σχηματιζόμενου ζεύγους ιόντων (ión / αντισταθμιστικό ίόν) επαρκώς, ώστε αυτό να εκχυλιστεί στην οργανική φάση. Η αύξηση της λιποφιλικότητας ενός ιόντος πετυχαίνεται και με προσθήκη μακροκυκλικών ενώσεων, που μπορούν να σχηματίσουν ενώσεις εγκλεισμού, όπως είναι οι αιθέρες τύπου κορώνας (crown ethers).



Στην αρχή αυτή της μεταφοράς φάσης βασίζεται μία ενδιαφέρουσα αναλυτική τεχνική για το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό αμινών και τεταρτοταγών αλάτων του αμμωνίου. Ανάλογη είναι και η τεχνική ογκομέτρησης δύο φάσεων, κατά την οποία ογκομετρούνται ενώσεις-τεταρτοταγή άλατα του αμμωνίου με τετραφαινυλοβορικό νάτριο παρουσία ανιόντος δείκτη (π.χ. κυανού της βρωμοφαινόλης) και στοιβάδας οργανικού διαλύτη (π.χ. χλωροφόρμιο). Μέχρι το τελικό σημείο το ογκώδες λιπόφιλο ζεύγος ιόντων (ογκομετρούμενη ουσία / ανιόν δείκτη), που σχηματίζεται, εκχυλίζεται στην οργανική στοιβάδα και τη χρωματίζει. Στο τελικό σημείο ολόκληρη η ποσότητα της ογκομετρούμενης ουσίας έχει μετατραπεί σε ίζημα τετραφαινυλοβορικού αλάτος και η οργανική στοιβάδα παραμένει άχρωμη.

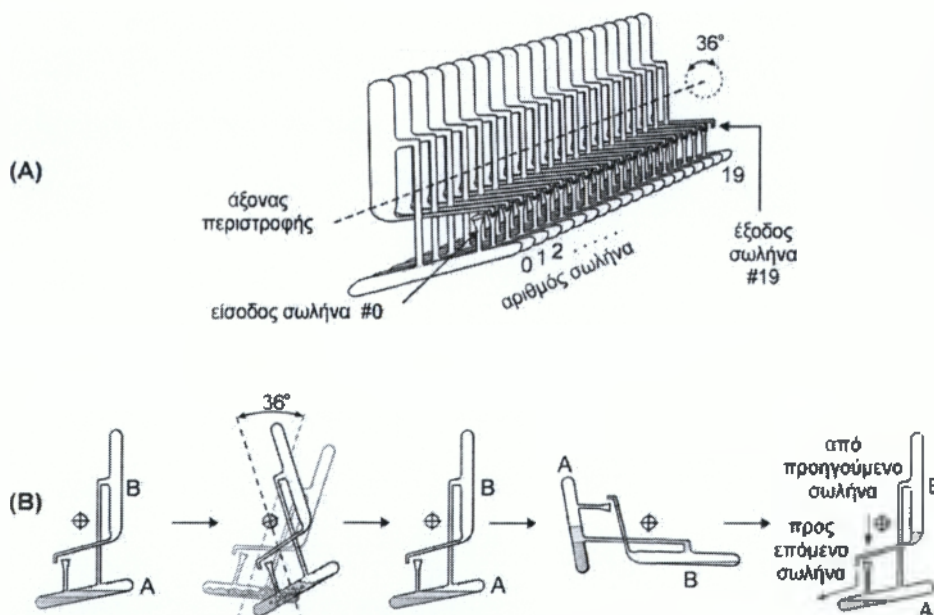


Σχήμα 2.3.2-4. Πορεία διαχωρισμού δείγματος φαρμάκων με εκχύλιση

Αύξηση της λιποφιλικότητας ενός ιόντος πετυχαίνεται επίσης με το σχηματισμό ουδέτερων συμπλόκων. Μεγάλος αριθμός μεταλλοϊόντων μπορεί να εκχυλιστεί υπό μορφή συμπλόκων με κατάλληλο οργανικό διαλύτη και να προσδιορισθεί ακολούθως στην οργανική φάση φασματοφωτομερικά ή με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός ιόντων μολύβδου, υδραργύρου, ψευδαργύρου, κλπ., τα οποία εκχυλίζονται από υδατικά διαλύματα υπό τη μορφή ουδέτερων διθειζονικών συμπλόκων με χλωροφόρμιο ή τετραχλωράνθρακα. Επειδή τα χρησιμοποιούμενα συμπλεκτικά αντιδραστήρια συνήθως είναι ασθενή οξέα, είναι δυνατόν με ρύθμιση του pH να επιτευχθεί εκλεκτικός διαχωρισμός ενός μεταλλοϊόντος, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στις σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων των μεταλλοϊόντων, που συνυπάρχουν [1].

Εάν ο συντελεστής ή ο λόγος κατανομής της ουσίας, που πρόκειται να απομονωθεί, είναι μικρός, χρησιμοποιείται η τεχνική της συνεχούς εκχύλισης με τη βοήθεια ειδικών συσκευών (Συσκευή Soxhlet), ενώ εάν οι συντελεστές ή λόγοι κατανομής ουσιών, που πρόκειται να διαχωριστούν, είναι παραπλήσιοι, χρησιμοποιείται η τεχνική της εκχύλισης κατ'αντιρροή (Συσκευή Craig).

Στο σχήμα (2.3.2-5) δείχνεται μια συσκευή Craig αποτελούμενη από 20 σωλήνες, όπως επίσης και τα επιμέρους στάδια ενός κύκλου διαχωρισμού.



Σχήμα 2.3.2-5. (Α): Συσκευή Craig αποτελούμενη από 20 σωλήνες διαχωρισμός (5) μεταφορά  
(Β): Διακριτά στάδια λειτουργίας της συσκευής Craig (1) Η ελαφρότερη φάση (περιέχουσα το δείγμα) εισάγεται στον θάλαμο Α από την έξοδο του προηγούμενου σωλήνα. (2) Ανάδευση: ο σωλήνας εκτελεί ταλαντώσεις υπό ολική γωνία περίπου 36° για να αποκατασταθεί η ισορροπία κατανομής. (3) Εξισορρόπηση: Οι φάσεις αφήνονται σε ηρεμία για να διαχωριστούν (4) Διαχωρισμός φάσεων: Η επάνω φάση μεταφέρεται στον θάλαμο Β με αργή περιστροφή του σωλήνα κατά 90° κατά τη φορά των δεικτών ωρολογίου. (5) "Στάδιο μεταφοράς": ο σωλήνας επιστρέφει στην κάθετη θέση και η φάση από τον θάλαμο Β μεταφέρεται στον θάλαμο Α του επόμενου σωλήνα

Η συσκευή Craig αποτελείται από μια σειρά υάλινων "σωλήνων". Ο κάθε "σωλήνας" αποτελείται από δύο θαλάμους Α και Β, που μεταξύ τους επικοινωνούν με ένα λεπτό σωληνίσκο. Οι "σωλήνες" συνδέονται μεταξύ τους έτσι, ώστε να είναι δυνατή η μεταφορά της επάνω φάσης (ειδικώς ελαφρότερης φάσης) από το θάλαμο Β τους ενός σωλήνα προς το θάλαμο Α του επόμενου σωλήνα. Στη συσκευή Craig όλες οι εκχυλίσεις και μεταφορές γίνονται συγχρόνως σε όλους τους σωλήνες, οι οποίοι εκτελούν ένα είδος κίνησης ταλάντωσης/περιστροφής συνήθως με ηλεκτρομηχανικά μέσα.

Η κάτω φάση με τον (ειδικώς) βαρύτερο διαλύτη (π.χ. νερό) και η οποία παραμένει σε κάθε σωλήνα, αποτελεί τη "στατική φάση", ενώ η επάνω φάση με τον (ειδικώς) ελαφρύτερο διαλύτη (π.χ. εξάνιο) και η οποία μεταφέρεται από τον ένα σωλήνα στον άλλο αποτελεί την "κινητή φάση". Όσο μεγαλύτερη η διαφορά στους λόγους κατανομής των διαφόρων ουσιών, τόσο πληρέστερος θα είναι και ο διαχωρισμός τους. Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός ουσιών με παραπλήσιους λόγους κατανομής απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός σωλήνων. Η συσκευή Craig σπάνια πλέον χρησιμοποιείται. Οι σύγχρονες χρωματογραφικές τεχνικές είναι κατά πολύ αποτελεσματικότερες και πιο εύχρηστες [7].

### 2.3.3 Εκχύλιση Στερεής Φάσης

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη σύγχρονη τεχνική προετοιμασίας του προς μέτρηση (δοκιμή ή ανάλυση) δείγματος. Η εκχύλιση στερεάς φάσης αντικαθιστά αποτελεσματικά την εκχύλιση υγρού με υγρό και χρησιμοποιείται κυρίως για τις ακόλουθες αναλυτικές διαδικασίες:

*Προσυγκέντρωση (pre-concentration) της προσδιοριζόμενης ουσίας, (αναλύτη) από μεγάλους όγκους δειγμάτων.* Σε πολλές περιπτώσεις η ευαισθησία των διαφόρων αναλυτικών μεθόδων δεν επαρκεί για μετρήσεις σε πολλά δείγματα στα οποία η προς διαχωρισμό ουσία βρίσκεται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον η παρουσία διαφόρων ενώσεων στο αρχικό δείγμα είναι πολύ πιθανό να παρεμποδίζει την απ' ευθείας μέτρηση (άμεση εισαγωγή του δείγματος στην αναλυτική συσκευή). Στις περιπτώσεις αυτές μεγάλοι όγκοι δειγμάτων (αερίων ή υγρών) υπόκεινται σε διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης έτσι, ώστε η συνολική ποσότητα της επιθυμητής ουσίας να "παγιδευτεί" στον μικρό όγκο της στερεάς φάσης από την οποία μπορεί να παραληφθεί εύκολα με μικρό όγκο διαλύτη, συγχρόνως απαλλαγμένη από άλλα συστατικά που θα παρεμπόδιζαν τη μέτρηση.

*Καθαρισμός δείγματος.* Με τη διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης συχνά επιδιώκεται η δέσμευση ουσιών από τα δείγματα οι οποίες παρεμποδίζουν μια διαδικασία μέτρησης και όχι η δέσμευση της ουσίας που διαχωρίζεται.

*Χρονοπρογραμματιζόμενες δειγματοληψίες πεδίου (time-programmed field sampling).* Η διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι απλή και συχνά μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα εκτός εργαστηρίου. Έτσι, με την εκχύλιση στερεάς φάσης μπορεί να πραγματοποιείται αυτοματοποιημένη/προγραμματισμένη δειγματοληψία (π.χ. αέρα μιας περιοχής ή φυσικών υδάτων σε ένα ή περισσότερα σημεία ενός ποταμού) σε τακτά χρονικά διαστήματα. Στους "σωλήνες" της εκχύλισης στερεάς φάσης που τελικά συλλέγονται (ένας

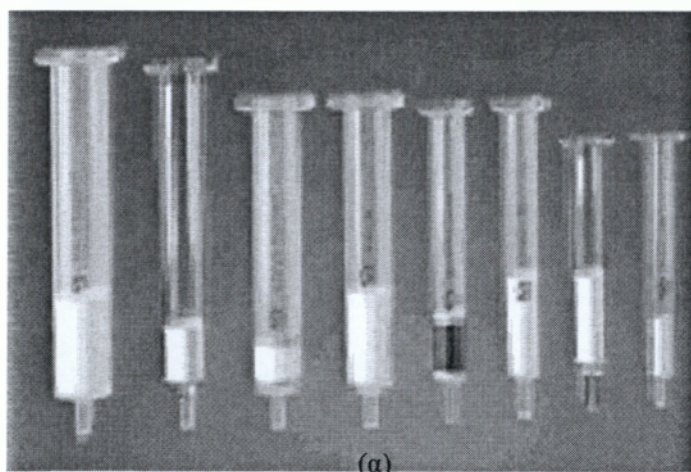
για κάθε δειγματοληψία), κατακρατούνται τα υπό μέτρηση συστατικά και μετά το πέρας όλων των δειγματοληψιών, οι σωλήνες μεταφέρονται στο εργαστήριο και μετρείται κατά μαζικό τρόπο το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα στην υπό μέτρηση ουσία.

Με την εκχύλιση στερεάς φάσης επιλύονται πολλά προβλήματα της εκχύλισης υγρού/υγρού, όπως π.χ.

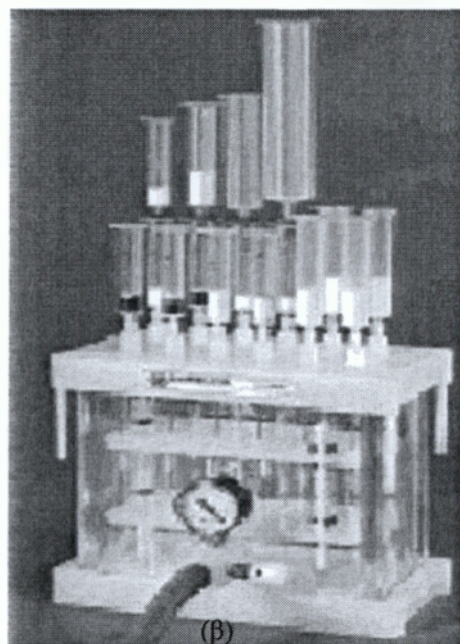
- ο ατελής διαχωρισμός φάσεων,
- η μη ποσοτική ανάκτηση των διαχωριζόμενων ουσιών,
- η χρήση ακριβού και εύθραυστου εξοπλισμού (διαχωριστικές χοάνες),
- χρήση και απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων δαπανηρών και κατά κανόνα εύφλεκτων ή και τοξικών οργανικών διαλυτών.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι κατά πολύ αποτελεσματικότερη τεχνική από αυτήν της εκχύλισης υγρού/υγρού καθώς με αυτή επιτυγχάνονται εύκολα ποσοτικοί διαχωρισμοί, είναι ταχύτερη στην εφαρμογή της και μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιείται κυρίως για την επεξεργασία υγρών δειγμάτων και την εκχυλιστική δέσμευση από αυτά ημιπτητικών ή μη πτητικών ενώσεων. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στερεά δείγματα τα οποία προηγουμένως θα έχουν υποστεί εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη [14].



(α)



(β)

Σχήμα 2.3.3-1. (α) Χαρακτηριστικοί σωλήνες-στήλες SPE

(β) Συσκευή ταυτόχρονου χειρισμού πολλών στηλών SPE (η ροή επιταχύνεται με εφαρμογή κενού)

Στην τεχνική αυτή, χρησιμοποιείται στερεό προσροφητικό υλικό, που είναι συνήθως διοξείδιο του πυριτίου με χημικά συνδεδεμένες ομάδες, ώστε να αποκτά διάφορες

προσοφητικές ιδιότητες. Ανάλογα με τις δραστικές ομάδες, που φέρει το προσοφητικό υλικό, μπορούν να γίνουν διάφορα είδη εκχυλίσεων, όπως μη πολικές, πολικές, ομοιοπολικές, κατιονανταλλακτικές και ανιονανταλλακτικές εκχυλίσεις. Η διαβίβαση των διαλυτών επιτελείται μέσα από τα προσοφητικά υλικά που περιέχονται μέσα σε κλειστά προσυσκευασμένα μικροφυσίγγια μιας χρήσης ή είναι στερεωμένα σε πλαστικές θήκες συρίγγων που η ροή τους επιταχύνεται με εφαρμογή κενού (Σχήμα 2.3.3-1).

Για την εκτέλεση μιας εκχύλισης στερεάς φάσης ακολουθούνται τα εξής στάδια:

- ✓ Εξισορρόπηση (προετοιμασία) με διαβίβαση ενός διαλύτη για την ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του προσοφητικού υλικού.
- ✓ Διαβίβαση του διαλύματος του δείγματος, οπότε η επιθυμητή ουσία και ενδεχομένως και άλλες ουσίες του δείγματος κατακρατούνται στο υλικό προσρόφησης, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες εξέρχονται.
- ✓ Έκπλυση με διαλύτη για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών, που έχουν κατακρατηθεί στο υλικό.
- ✓ Εκλεκτική έκλουση της επιθυμητής ουσίας με κατάλληλο διαλύτη, που δεν εκλύει τις άλλες ουσίες, που ενδεχομένως να έχουν προσοφηθεί στο υλικό. Το έκλουσμα, που λαμβάνεται, περιέχει καθαρή την επιθυμητή ουσία, συνήθως σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από το αρχικό δείγμα, εάν επιλεγούν κατάλληλα οι όγκοι των διαλυμάτων του δείγματος και του υγρού έκλουσης. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εξισορρόπηση, έκπλυση και έκλουση της στήλης, εξαρτώνται από το είδος του προσοφητικού υλικού και της προς απομόνωση ουσίας και δίνονται από τους κατασκευαστές των στηλών ή επιλέγονται πειραματικά για την αποδοτικότερη και εκλεκτικότερη εκχύλιση.

Οι διάφορες τεχνικές εκχυλίσεως αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα πολλών αναλυτικών μεθόδων και συμβάλλουν στη σημαντική αύξηση της εκλεκτικότητας και της ευαισθησίας των προσδιορισμών. Εκτός της Αναλυτικής Χημείας, η εκχύλιση χρησιμοποιείται ευρύτατα στη συνθετική Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία, για τον καθαρισμό πρώτων υλών, ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων σύνθεσης, σε ποσότητες της τάξεως του γραμμαρίου, ενώ στη Βιομηχανία απομονώνονται με εκχύλιση μεγάλες ποσότητες (τόνοι) διαφόρων ουσιών.

### 3<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗ

#### 3.1 Γενικά

Η ιονανταλλαγή εφαρμόζεται για το διαχωρισμό ιόντων και αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού. Ως ιονανταλλαγή ορίζεται η μέθοδος διαχωρισμού στην οποία δύο φάσεις βρίσκονται σε επαφή μεταξύ τους ανταλλάσσοντας ιόντα έως ότου να αποκατασταθεί ισορροπία. Η μία από τις φάσεις είναι υγρή (κινητή φάση) ενώ η άλλη είναι στερεή (στατική φάση). Η υγρή φάση ουσιαστικά είναι το διάλυμα των ιόντων τα οποία πρόκειται να διαχωριστούν σε κατάλληλο διαλύτη κυρίως ύδωρ. Η στερεή φάση είναι ένα πολυμερές υλικό το οποίο φέρει χημικά προσδεμένες ιοντισμένες ομάδες. Οι ομάδες αυτές ονομάζονται **ιοντογόνες** (ionogenic: γεννούν ιόντα), ενώ το στερεό υπόστρωμα **ιονανταλλάκτης**. Ο ιονανταλλάκτης πριν έρθει σε επαφή με το διάλυμα των προς διαχωρισμό ιόντων χαρακτηρίζεται από ηλεκτρική ουδετερότητα. Αυτό επιτυγχάνεται με την ασθενή πρόσδεση ιόντων αντίθετου φορτίου στις ιοντογόνες ομάδες τα οποία καλούνται **αντισταθμιστικά ιόντα**.

Αυτά αντικαθίστανται από τα προς διαχωρισμό ιόντα του ίδιου φορτίου αποκαθιστώντας ισορροπία. Η ιονανταλλαγή διακρίνεται σε **κατιονανταλλακτική** και **ανιονανταλλακτική**, όπου αντίστοιχα επιτυγχάνεται ανταλλαγή κατιόντων και ανιόντων μεταξύ της υγρής φάσης και του ιονανταλλάκτη. Οι γενικευμένες αντιδράσεις ιονανταλλαγής έχουν ως εξής:



Όπου ως **R** παριστάνεται το στερεό (πολυμερές) υπόστρωμα με τις ιοντογόνες ομάδες, με αρνητικό φορτίο και θετικό φορτίο για τις κατιονανταλλακτικές και ανιονανταλλακτικές ρητίνες αντίστοιχα.

Κατάλληλοι ιονανταλλάκτες θεωρούνται αυτοί οι οποίοι παρουσιάζουν ταχεία ανταλλαγή ιόντων, χημική σταθερότητα σε ευρεία περιοχή τιμών pH, έχουν καλή μηχανική αντοχή και παρουσιάζουν αντίσταση στην αποσύνθεση. Κυρίως χρησιμοποιούνται πολυμερή τα οποία κατασκευάζονται με διακλαδιζόμενο πολυμερισμό. Ο αυξημένος βαθμός διακλάδωσης καθιστά το πολυμερές δυσδιάλυτο. Μετά την κατασκευή τους προσδένονται σε αυτά οι ιοντογόνες ομάδες με τις κατάλληλες χημικές αντιδράσεις [1].

#### 3.2 Τύποι Ιονανταλλακτικών Ρητινών

Οι ιονανταλλακτικές ρητίνες ανάλογα το βαθμό ιοντισμού της ιοντογόνου ομάδας τους διακρίνονται σε:

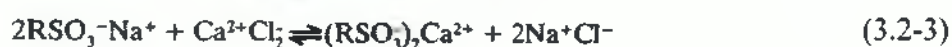
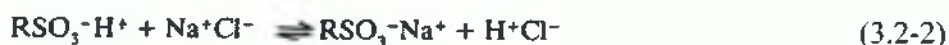
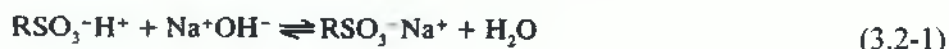
- ✓ ισχυρώς όξινες κατιονανταλλακτικές ρητίνες ( $-\text{SO}_3^-$ )
- ✓ ασθενώς όξινες κατιονανταλλακτικές ρητίνες ( $-\text{COO}^-$ )
- ✓ ισχυρώς βασικές ανιονανταλλακτικές ρητίνες ( $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ )

✓ ασθενώς βασικές ανιονανταλλακτικές ρητίνες ( $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{CH}_2\text{NH}_2^+\text{CH}_3$ )

Ειδικότερα έχουμε:

### Ισχυρώς όξινης κατιονανταλλακτικές ρητίνες ( $-\text{SO}_3^-$ )

Επειδή αυτές οι ρητίνες είναι ισχυρά οξέα, μπορούν να δράσουν σε όλη την κλίμακα pH, τόσο υπό τη μορφή οξέος, όσο και υπό τη μορφή άλατος, ως ακολούθως:



Εξαιτίας της ανεξαρτησίας δράσεως από το pH, οι ισχυρώς όξινης ρητίνες είναι οι κατ' εξοχήν χρησιμοποιούμενες κατιονανταλλακτικές ρητίνες στην Αναλυτική Χημεία [1].

### Ασθενώς όξινης κατιονανταλλακτικές ρητίνες ( $-\text{COO}^-$ )

Εξαιτίας του μικρού βαθμού ιονισμού, οι ρητίνες αυτές χρησιμοποιούνται μόνο σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον, κυρίως για την εκλεκτική δέσμευση κατιόντων ισχυρώς βασικών ουσιών παρουσία ασθενών βάσεων [1].

### Ισχυρώς βασικές ανιονανταλλακτικές ρητίνες ( $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ )

Οι ομάδες αυτές ιονίζονται ισχυρώς και γι' αυτό μπορούν να δράσουν και να χρησιμοποιηθούν σε όλη την κλίμακα του pH, τόσο για τη δέσμευση ανιόντων ισχυρών ή ασθενών οξέων, όσο και για την ανταλλαγή ανιόντων, ως ακολούθως [1]:



### Ασθενώς βασικές ανιονανταλλακτικές ρητίνες ( $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ , $-\text{CH}_2\text{NH}_2^+\text{CH}_3$ )

Οι ομάδες αυτές ιονίζονται σε μεγάλο βαθμό, όταν βρίσκονται με τη μορφή άλατος και γι' αυτό γίνονται δραστικές και χρησιμοποιούνται μόνο σε όξινο περιβάλλον (με τη μορφή της ελεύθερης βάσης δεν είναι δραστικές). Οι ασθενώς βασικές ρητίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό ασθενών οξέων από ισχυρά οξέα, με την κατακράτηση μόνο των ανιόντων των ισχυρών οξέων [1]:



### 3.3 Ιδιότητες και Συμπεριφορά Ρητινών

Οι γενικές ιδιότητες οι οποίες χαρακτηρίζουν τις ιονανταλλακτικές ρητίνες είναι:

- Η εκλεκτικότητά τους ως προς τα διάφορα ιόντα. Η εκλεκτικότητα αυτή καθορίζεται από την ιοντογόνο ομάδα, το βαθμό διακλάδωσης και τη σύσταση του διαλύματος του ηλεκτρολύτη.
- Η περιοχή pH ιοντισμού της ιοντογόνου ομάδας. Για παράδειγμα ανιοντικές ιοντογόνες ομάδες οι οποίες προέρχονται από ισχυρά οξέα ιοντίζονται πλήρως σε όλη τη κλίμακα του pH.
- Η ανταλλακτική χωρητικότητα της ρητίνης η οποία αποτελεί ποσοτικό μέτρο των αντισταθμιστικών ιόντων τα οποία μπορούν να ανταλλάγουν και εξαρτάται από τον αριθμό των προσιτών δραστικών ομάδων, τις πειραματικές συνθήκες κ.α. Συνήθως μετρείται σε meq (ανταλλάξιμων ιόντων) ανά γραμμάριο ξηράς ρητίνης.
- Το σωματιδιακό μέγεθος των κόκκων της ρητίνης. Το μέγεθος των κόκκων της ρητίνης πρέπει να είναι αρκετά μικρό, ώστε η επιφάνεια επαφής να είναι μεγάλη, όχι όμως και πολύ μικρό, ώστε η ταχύτητα ροής στην περίπτωση χρησιμοποίησης στήλης από τη ρητίνη να μην είναι πολύ μικρή. Στο αναλυτικό εργαστήριο συνήθως χρησιμοποιούνται ρητίνες 50-200 mesh.
- Η σταθερότητα της ρητίνης
- Η χημική καθαρότητά τους
- Η φυσική συνεκτικότητα των κόκκων
- Η ταχύτητα αποκατάστασης ισορροπίας. Η ταχύτητα αυτή ελαττώνεται όταν είναι αυξημένος ο βαθμός διακλάδωσης της ρητίνης και όταν αυξάνει το μέγεθος των ανταλλασσόμενων ιόντων.
- Η ανπιστρεπτότητα των ρητινών. Αποτελεί ουσιώδες χαρακτηριστικό γνώρισμα των ρητινών, εξαιτίας της οποίας είναι δυνατή η αναγέννηση και συνεπώς η επαναχρησιμοποίησή τους. Εάν π.χ. τα ιόντα  $\text{Na}^+$  της ρητίνης, που χρησιμοποιείται για την αποσκλήρυνση του ύδατος, έχουν αντικατασταθεί σχεδόν πλήρως από ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$ , η ρητίνη μπορεί να αναγεννηθεί, με διαβίβαση μέσα από αυτή πυκνού διαλύματος  $\text{NaCl}$ .

Κρίσιμο χαρακτηριστικό των ρητινών αποτελεί ο βαθμός διακλάδωσής τους, ο οποίος ρυθμίζεται ανάλογα με τη σύνθεση του πολυμεριζόμενου μίγματος. Γενικά, αυξημένος βαθμός διακλάδωσης έχει ως αποτέλεσμα:

- Αυξημένη φυσική σταθερότητα της ρητίνης
- Ελαττωμένη διόγκωση της ρητίνης
- Αυξημένη ανταλλακτική χωρητικότητα
- Ελαττωμένη συγγένεια για ιόντα λόγω δυσκολίας διείσδυσης αυτών
- Ελαττωμένη ταχύτητα αποκατάστασης της ισορροπίας



- Αυξημένη εκλεκτικότητα της ρητίνης για τα μικρού μεγέθους ιόντα

Με τον όρο εκλεκτικότητα ρητίνης χαρακτηρίζεται η ιδιότητά της να παρουσιάζει αυξημένη προτίμηση για ένα συγκεκριμένο ιόν σε σχέση με ένα άλλο ιόν. Ο συντελεστής εκλεκτικότητας ισούται με τη σταθερά ισορροπίας της αντιδράσεως ιονανταλλαγής. Όσον αφορά την εκλεκτικότητα των ρητινών ισχύουν τα εξής:

- ♦ Αύξηση του βαθμού διακλάδωσης συνεπάγεται αύξηση της διαφοράς στις εκλεκτικότητες
- ♦ Ο συντελεστής εκλεκτικότητας αυξάνεται αυξανόμενου του φορτίου του ιόντος
- ♦ Αυξανόμενων των συγκεντρώσεων η ρητίνη προτιμά ιόντα χαμηλότερου φορτίου
- ♦ Όσο μικρότερη είναι η ακτίνα του εφυδατωμένου ιόντος τόσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής εκλεκτικότητας

Ο συντελεστής εκλεκτικότητας μιας ιονανταλλακτικής ρητίνης ουσιαστικά αποδίδει τη σταθερά ισορροπίας των ετερογενών αντιδράσεων (3.1-1) ή (3.1-2):

$$K_X^Y = \frac{[X][RY]}{[Y][RX]} = \frac{[X][Y]_R}{[Y][X]_R} \quad (3.3-1)$$

όπου:

$[X]$ ,  $[Y]$ : οι συγκεντρώσεις των δύο ομώνυμα φορτισμένων ιόντων στο διάλυμα (meq/mL)

$[RX]$  ή  $[X]_R$ : οι συγκεντρώσεις τους στη ρητίνη (meq/g) (τα φορτία παραλείπονται για  $[RY]$  ή  $[Y]_R$  απλότητα)

Η κατανομή ενός ιόντος μεταξύ ρητίνης και διαλύματος περιγράφεται από τον συντελεστή κατανομής  $K_D$ . Έτσι, για τη γενική αντίδραση ιονανταλλαγής



Εάν το ιόν Y βρίσκεται σε σχετικά μικρή συγκέντρωση, ώστε η ποσότητά του να μην ξεπερνάει το 5% της ανταλλακτική χωρητικότητα της ρητίνης, τότε σε κατάσταση ισορροπίας ισχύει η σχέση:

$$K_D = \frac{[YR]}{[Y]} = \frac{\text{ποσότητα ιόντος στη ρητίνη ανά g ρητίνης}}{\text{ποσότητα ιόντος στο διάλυμα ανά mL διαλύματος}} \quad 3.3-3)$$

Η διάκριση μεταξύ των λεγόμενων “ισχυρών” και “ασθενών” ιονανταλλακτικών ρητινών μπορεί να θεωρηθεί η εξής: Στις πρώτες ο ιοντισμός τους πραγματοποιείται σε

οποιαδήποτε τιμή pH, εφόσον οι ομάδες τους είναι ισχυρά όξινες ή ισχυρά βασικές. Στις δεύτερες ο ιοντισμός τους εξαρτάται από το pH. Έτσι, οι ασθενώς όξινες ιοντίζονται σε ουδέτερα έως αλκαλικά διαλύματα, ενώ οι ασθενώς βασικές ιοντίζονται σε όξινα έως ουδέτερα διαλύματα. Για παράδειγμα, ανιόντα δεσμευμένα από μια ασθενώς όξινη ρητίνη, εκλύονται (αποδεσμεύονται) πλήρως όταν μέσω της ρητίνης περάσει διάλυμα ισχυρού οξέος [10].

### 3.4 Τεχνικές χρήσης Ρητινών

Οι συνήθεις τεχνικές χρήσεως των ιονανταλλακτικών ρητινών είναι:

- **Η τεχνική λουτρού**

Η ρητίνη τοποθετείται μαζί με το διάλυμα του δείγματος μέσα σε υποδοχέα και αναταράσσεται, μέχρις ότου αποκατασταθεί ισορροπία. Στη συνέχεια η ρητίνη απομακρύνεται με διήθηση ή απόχυση ή φυγοκέντρηση και αναγεννάται για επαναχρησιμοποίηση. Στην τεχνική αυτή, που πλεονέκτημά της είναι η απλότητα, σημασία έχει η εκλεκτικότητα της ρητίνης για το ιόν ή τα ιόντα του διαλύματος.

- **Η τεχνική στήλης**

Η ρητίνη τοποθετείται μέσα σε κατακόρυφο σωλήνα με πορώδη πυθμένα και τα υγρά τροφοδότησης και αναγέννησης της στήλης ρέουν από πάνω προς τα κάτω. Στην τεχνική στήλης μπορούμε να φαντασθούμε, ότι συμβαίνουν πολυάριθμες τεχνικές λουτρού στα επάλληλα στρώματα της ρητίνης και έτσι η ιονανταλλαγή μπορεί να καταστεί ποσοτική, ανεξάρτητα από την εκλεκτικότητα της ρητίνης προς το συγκρατούμενο ιόν, αρκεί να μην υπερβούμε την ανταλλακτική χωρητικότητα της στήλης. Τα στάδια διαχωρισμού με την τεχνική στήλης είναι:

I) Διαβίβαση του διαλύματος των προς διαχωρισμό ουσιών μέσα από τη στήλη, οπότε τα ανταλλασσόμενα ιόντα κατακρατούνται από τη ρητίνη της στήλης, ενώ οι μη ηλεκτρολύτες και τα αντιθέτου φορτίου ιόντα διέρχονται από τη στήλη.

II) Έκλυση της στήλης με κατάλληλο διαλύτη για τη σταδιακή εκτόπιση των ιόντων, που έχουν κατακρατηθεί, και την έξοδό τους από τη στήλη σε ξεχωριστά κατά το δυνατόν κλάσματα.

Στήλες με ιονανταλλακτικές ρητίνες χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση στερεής φάσης και στην υγρή χρωματογραφία [8].

### 3.5 Εφαρμογές της Ιονανταλλαγής

Η ιονανταλλαγή έχει εφαρμογή, τόσο σε βιομηχανική όσο και σε εργαστηριακή κλίμακα. Οι σπουδαιότερες εφαρμογές είναι:

#### **Κατεργασία ύδατος**

Με διαβίβαση φυσικού ύδατος διαδοχικά μέσα από κατιονανταλλακτική και ανιονανταλλακτική ρητίνη ή μέσα από μείγμα τους, που βρίσκονται στη μορφή υδρογόνου και υδροξυλίου αντίστοιχα, πετυχαίνεται η πλήρης απομάκρυνση των ιόντων του. Το απονισμένο ύδωρ, που λαμβάνεται με αυτόν τον τρόπο, χρησιμοποιείται ευρύτατα αντί του απεσταγμένου ύδατος. Ύδατα υψηλής σκληρότητας μπορούν επίσης να υποστούν αποσκλήρυνση με διαβίβαση μέσα από κατιονανταλλακτική ρητίνη στη μορφή ιόντων νατρίου, οπότε τα ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου ανταλλάσσονται με ιόντα νατρίου [7].

#### **Απομάκρυνση παρεμποδιζόντων ιόντων και μη ηλεκτρολυτών**

Συνήθως ενδιαφέρει ο διαχωρισμός κατιόντων από παρεμποδιζόντα ανιόντα ή ανιόντων από παρεμποδιζόντα κατιόντα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα εξής:

- 1) Η απομάκρυνση των φωσφορικών ιόντων με ανιονανταλλακτική ρητίνη, πριν από τη συμπλοκομετρική ογκομέτρηση του ασβεστίου και μαγνησίου με EDTA.
- 2) Η απομάκρυνση με κατιονανταλλακτική ρητίνη ιόντων ασβεστίου, σιδήρου και αργιλίου, τα οποία παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό των φωσφορικών.
- 3) Απομάκρυνση ιχνών βαρέων μετάλλων π.χ. Fe, Co ή Zn, με χηλικές ρητίνες, από πυκνά διαλύματα αλάτων των αλκαλίων και αλκαλικών γαιών.
- 4) Διαχωρισμός ιονικών δραστικών συστατικών από έκδοχα-μη ηλεκτρολύτες που χρησιμοποιείται στη Φαρμακευτική ανάλυση. Για παράδειγμα, η κατιονική βιταμίνη Β<sub>1</sub> διαχωρίζεται από παρεμποδιζουσες μη ιονικές ουσίες, που βρίσκονται σε δείγμα ζύμης, με κατιονανταλλακτική ρητίνη [7].

#### **Διαχωρισμοί**

Η σπουδαιότερη εφαρμογή της ιονανταλλαγής είναι στον τομέα των αναλυτικών διαχωρισμών ανόργανων ιόντων και οργανικών ουσιών. Η επιτυχία των διαχωρισμών εξαρτάται κυρίως από την κατάλληλη εκλογή της ιονανταλλακτικής ρητίνης, του υγρού έκλουσης και των πειραματικών συνθηκών, όπως π.χ. θερμοκρασίας, pH, μήκους στήλης. Αξιοποίηση της ιονανταλλαγής στο διαχωρισμό και σύγχρονο προσδιορισμό μειγμάτων ιονικών ενώσεων, έγινε με την ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας ιονανταλλαγής, με σημαντικότερη εφαρμογή την ανάλυση μείγματος αμινοξέων με κατιονανταλλακτική ρητίνη και βαθμιαία αύξηση του pH στο υγρό έκλουσης (κινητή φάση).

Τα μεταλλοϊόντα μπορούν να διαχωριστούν, είτε με τη μορφή εφυδατωμένων κατιόντων σε κατιονανταλλακτική ρητίνη, είτε με τη μορφή ανιονικών συμπλόκων σε ανιονανταλλακτική ρητίνη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο διαχωρισμός των σπάνιων γαιών με ιονανταλλαγή, που βασίζεται στη διαφοροποίηση των συντελεστών κατανομής των συμπλόκων τους με EDTA.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα διαχωρισμού οργανικών ουσιών με ιονανταλλαγή αποτελεί ο διαχωρισμός σακχάρων και παρόμοιων *cis*-πολυυδροξυλιωμένων ενώσεων με ανιονανταλλακτική ρητίνη, μετά το σχηματισμό ανιόντων με βορικά [7].

#### **Συμπύκνωση αραιών ηλεκτρολυτών και ανάληψη ιχνοστοιχείων**

Οι ιονανταλλακτικές ρητίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συμπύκνωση, απομόνωση

και ανάληψη διαφόρων ιονικών συστατικών, που βρίσκονται σε ίχνη σε αραιά διαλύματα. Για το σκοπό αυτό μεγάλοι όγκοι του αραιού διαλύματος διαβιβάζονται μέσα από τη ρητίνη, η οποία στη συνέχεια εκλούεται με μικρούς όγκους υγρού [7].

### **Στοιχειομετρικοί προσδιορισμοί**

Συχνά μας ενδιαφέρει ο προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης κατιόντων ενός διαλύματος και όχι καθενός ιόντος χωριστά. Με διαβίβαση του διαλύματος του δείγματος μέσα από στήλη από ισχυρώς όξινη ρητίνη στη μορφή υδρογόνου, κατακρατούνται τα κατιόντα πάνω σ' αυτή με σύγχρονη απελευθέρωση ισοδύναμης ποσότητας υδρογονοκατιόντων στο έκλουσμα. Με ογκομέτρηση του εκλούσματος, που περιέχει και τα υγρά έκπλυσης, με πρότυπο διάλυμα βάσης βρίσκεται έμμεσα η ολική περιεκτικότητα του δείγματος σε κατιόντα, δηλαδή η ολική περιεκτικότητά του σε άλατα. Ανάλογη διεργασία με ισχυρώς βασικές ρητίνες επιτρέπει τον προσδιορισμό της ολικής περιεκτικότητας του δείγματος σε ανιόντα [7].

## 4<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

### ΑΝΑΛΥΣΗΣ

#### 4.1 Γενικά

Η χρωματογραφία είναι μια πανίσχυρη τεχνική διαχωρισμού, η οποία βρίσκει εφαρμογές σε κάθε κλάδο της επιστήμης όχι μόνο στη Χημεία, αλλά και σε άλλες επιστήμες, όπως Βιολογία, Ιατρική, Φαρμακευτική, Επιστήμη Περιβάλλοντος, Επιστήμη Τροφίμων, Γεωπονία, κλπ. Οι εφαρμογές της χρωματογραφίας αυξήθηκαν με "εκρηκτικό" ρυθμό κατά τα τελευταία πενήντα χρόνια και αυτό δεν οφείλεται μόνο στην ανάπτυξη νέων τύπων χρωματογραφικών τεχνικών, αλλά και στη συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση από τους επιστήμονες καλύτερων μεθόδων για το διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων.

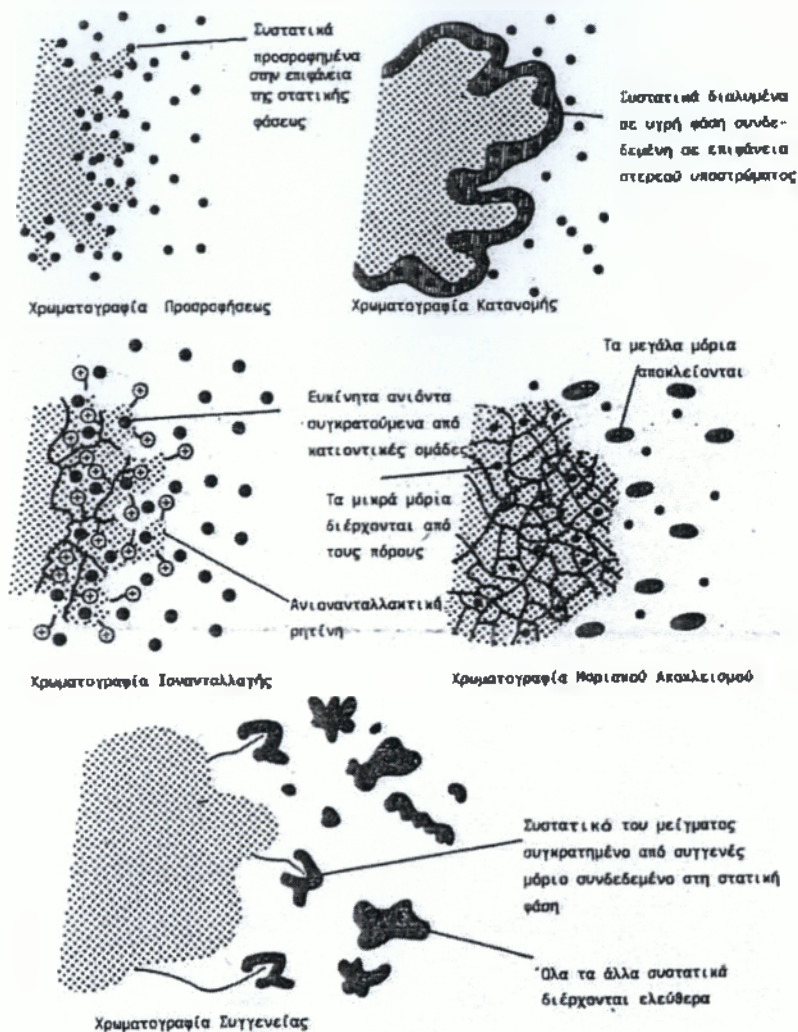
Ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων, οι οποίες βοηθούν τον επιστήμονα να διαχωρίσει ουσίες με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα. Πολλοί από τους διαχωρισμούς αυτούς είναι αδύνατον να πραγματοποιηθούν με άλλο τρόπο. Ο διαχωρισμός πετυχαίνεται με κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων που βρίσκονται στη χρωματογραφική στήλη, μιας στατικής και μιας κινητής, η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές, που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μείγματος, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία (για ιονικές ενώσεις), το μέγεθος των μορίων κ.ά. 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. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες. Εάν στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας κάθε συστατικού, πραγματοποιείται και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών.

#### 4.2 Ταξινόμηση Χρωματογραφικών Τεχνικών

Η διαφοροποίηση των χρωματογραφικών τεχνικών καθιστά δύσκολη την ταξινόμησή τους με βάση ένα μόνο κριτήριο. Οι τεχνικές αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης, τη φύση και μορφή της στατικής φάσης, ως προς το μηχανισμό, στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός και ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση και της κίνησής του μέσα απ' αυτή. Έτσι η ταξινόμηση μπορεί να γίνει:

- 1) Με βάση τη φύση της κινητής και στατικής φάσης
- 2) Με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού

Στο σχήμα (4.2-1) δίνονται παραστατικά τα διάφορα είδη χρωματογραφίας με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού.



Σχήμα 4.2-1. Κριότερα είδη χρωματογραφίας με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού

- 3) Με βάση τη φυσική μορφή της στατικής φάσης
- 4) Με βάση τον τρόπο εισαγωγής και κίνησης του δείγματος

Διακρίνονται τρεις κατηγορίες:

- **Μετωπική χρωματογραφία (frontal chromatography).** Το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στη στήλη συνεχώς και ο διαλύτης του δρα και ως κινητή φάση. Τα συστατικά του δείγματος εξέρχονται από τη στήλη με τη μορφή μετώπων. Στο πρώτο μέτωπο περιέχεται το λιγότερο συγκρατούμενο συστατικό Α, στο δεύτερο μείγμα του Α με το αμέσως περισσότερο συγκρατούμενο συστατικό Β, κτλ. Η τεχνική δεν πετυχαίνει πλήρη διαχωρισμό και χρησιμοποιείται μόνο για τη προσυγκέντρωση ιχνοποσοτήτων ουσιών και τον καθαρισμό μεγάλων όγκων υγρών ή αερίων δειγμάτων [1].
- **Χρωματογραφία εκτόπισης (displacement chromatography).** Χρησιμοποιείται κινητή φάση, που συγκρατείται ισχυρώς από τη στατική φάση, εκτοπίζοντας έτσι σε διαφορετικό βαθμό τα συστατικά του δείγματος μέσα από τη στήλη. Η τεχνική

αυτή γενικώς πετυχαίνει ατελείς διαχωρισμούς, αλλά πλεονεκτεί στο ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεγάλοι όγκοι δείγματος, όπως απαιτούνται στους παρασκευαστικούς και βιομηχανικής κλίμακας διαχωρισμούς [1].

- **Χρωματογραφία έκλουσης (elution chromatography).** Είναι η σπουδαιότερη και τα συστατικά του δείγματος μεταφέρονται από την κινητή φάση με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στατικής φάσης, οπότε εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους, ενώ η στήλη είναι έτοιμη, συνήθως για τον επόμενο διαχωρισμό [1].

Στον πίνακα 4.2-1 ταξινομούνται οι κυριότερες τεχνικές χρωματογραφίας με βάση τα τρία πρώτα κριτήρια ταξινόμησης.

**Πίνακας 4.2-1. Ταξινόμηση των τεχνικών χρωματογραφίας**

Κινητή φάση	Στατική φάση	Μηχανισμός	Μορφή στατικής φάσης	Τεχνική χρωματογραφίας
Υγρό	Στερεό	Προσρόφηση	Στήλη	Χρωμ.φία προσροφήσεως σε στήλη
			Λεπτή στιβάδα σε πλάκα	Χρωμ.φία λεπτής στιβάδας
			Χάρτης	Χρωμ.φία προσροφήσεως σε χάρτη με προσροφητική ουσία
		Ιονανταλλαγή	Στήλη	Χρωμ.φία ιονανταλλαγής σε στήλη
			Χάρτης	Χρωμ.φία ιονανταλλαγής σε χάρτη με ιονανταλλάκτες
		Μοριακός αποκλεισμός	Στήλη	Υγρή-στερεή χρωμ.φία μοριακού αποκλεισμού (ή διηθήσεως ή διαπερατότητας)
	Εκλεκτική αντίδραση (συγγένεια)	Στήλη	Χρωμ.φία συγγένειας	
	Υγρό (σε στερεό φορέα)	Κατανομή	Στήλη	Χρωμ.φία κατανομής σε στήλη
Χάρτης			Χρωμ.φία κατανομής σε χάρτη	
Αέριο	Στερεό	Προσρόφηση	Στήλη	Αέριο-στερεή χρωμ.φία
		Μοριακός αποκλεισμός	Στήλη	Αέριο-στερεή χρωμ.φία μοριακού αποκλεισμού
	Υγρό (σε στερεό φορέα ή σε τριχοειδή σωλήνα)	Κατανομή	Στήλη (πληρωμένη ή ανοικτή τριχοειδής)	Αέριο-υγρή χρωμ.φία ή απλώς αέριο χρωμ.φία

### 4.3 Χρωματογραφία Χάρτη

Στις περισσότερες χρωματογραφικές τεχνικές η στατική φάση συγκρατείται σε μία στήλη μέσα από την οποία η κινητή φάση διαβιβάζεται με πίεση ή ρέει λόγω βαρύτητας. Στην επίπεδη χρωματογραφία (planar chromatography), η στατική φάση είναι μία λωρίδα χάρτη ή μια στιβάδα στερεού επιστρωμένη σε υάλινη, ή από άλλο υλικό, πλάκα. Η υγρή κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη στατική με τη βοήθεια τριχοειδών δυνάμεων ή της βαρύτητας. Στη χρωματογραφία χάρτη, όπως και στα άλλα είδη επίπεδης χρωματογραφίας, συνήθως οι ζώνες των συστατικών δεν αφήνονται να εκλουσθούν, αλλά η χρωματογράφιση διακόπτεται ενόσω το μέτωπο του διαλύτη βρίσκεται ακόμα στο χάρτη.

Η κινητή φάση είναι συνήθως μείγμα οργανικών διαλυτών με ύδωρ και μπορεί να είναι ουδέτερη, βασική ή όξινη. Τυπικά παραδείγματα είναι μείγματα ισοπροπανόλης - αμμωνίας - ύδατος, κ-βουτανόλης - οξικού οξέος - ύδατος, και υδατικό διάλυμα φαινόλης. Η δύναμη έκλουσης (διαχωριστική ικανότητα) ενός διαλύτη ανάπτυξης μπορεί να μεταβάλλεται δραστικά με αλλαγή των αναλογιών του μείγματος των διαλυτών, που το αποτελούν.

Ως υλικό στήριξης της στατικής φάσης χρησιμοποιείται ειδικός χάρτης από πολύ καθαρή κυτταρίνη και συνήθως χρησιμοποιείται χάρτης διήθησης. Ο τύπος του χάρτη ρυθμίζει την ταχύτητα ροής του υγρού ανάπτυξης (χάρτης με χονδρές ίνες επιτρέπει μεγαλύτερες ταχύτητες).

Για την εκτέλεση της χρωματογράφισης, σταγόνα ολίγων  $\mu\text{L}$  του διαλύματος του δείγματος τοποθετείται με μικροσιφώνιο ή μικρομετρική σύριγγα, ως κηλίδα, κοντά στο ένα άκρο λωρίδας χάρτη ή της μιας πλευράς φύλλου χάρτη, σε θέση που έχει προσημειωθεί με μολύβι. Η δημιουργούμενη κηλίδα ξηραίνεται με εξάτμιση του διαλύτη και στη συνέχεια η λωρίδα ή το φύλλο του χάρτη τοποθετείται στο θάλαμο ανάπτυξης, ο οποίος περιέχει τον πολικό διαλύτη της στατικής φάσης σε ξεχωριστό δοχείο. Αφού αποκατασταθεί η εξισορρόπηση, προστίθεται η κινητή φάση έτσι, ώστε να έρθει σε επαφή με το άκρο της λωρίδας ή το φύλλο του χάρτη. Λαμβάνεται φροντίδα ώστε ο διαλύτης ανάπτυξης να μην αγγίζει την κηλίδα του δείγματος.

Οι θάλαμοι ανάπτυξης μπορεί να είναι πολύ απλοί, όπως ένας μεγάλος δοκιμαστικός σωλήνας ή ογκομετρικός κύλινδρος, ή να είναι περισσότερο πολύπλοκες υάλινες συσκευές, που επιτρέπουν τη σύγχρονη τοποθέτηση περισσότερων λωρίδων ή φύλλων χάρτη [1].

Η βάση της χρωματογραφίας έκλουσης είναι η κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης, η οποία είναι μία διαδικασία ισορροπίας, που περιγράφεται με το λόγο ή συντελεστή κατανομής  $K_D$ , που ορίζεται με τη σχέση

$$K_D = \frac{[C]_S}{[C]_M} \quad (4.3-1)$$

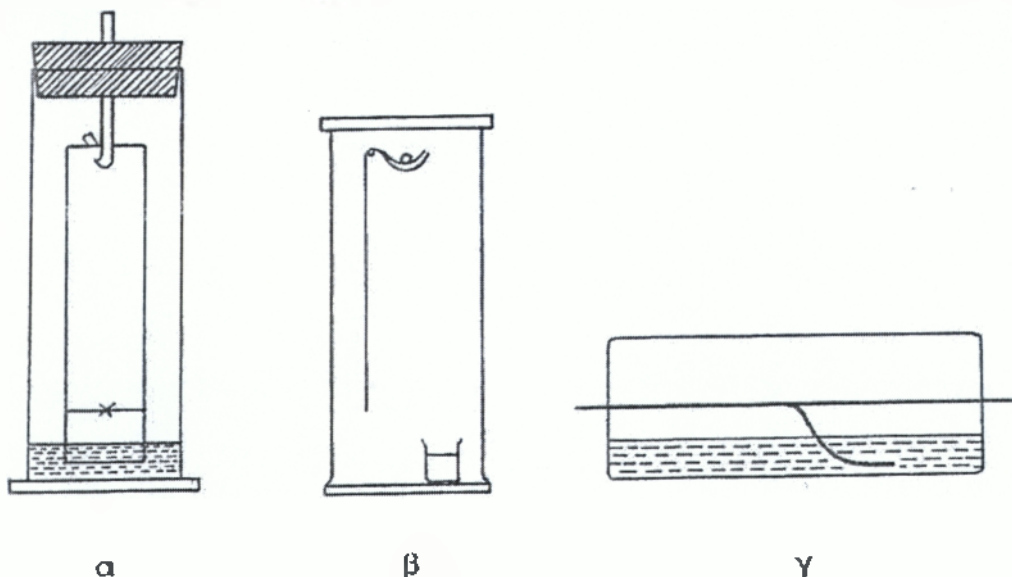
όπου:



$[C]_S, [C]_M$  : οι συγκεντρώσεις της ουσίας A στη στατική (S) και κινητή (M) φάση

Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος μπορεί να γίνει με τους ακόλουθους τρόπους:

- Στην **ανιούσα χρωματογραφία**, ο διαλύτης ανάπτυξης τοποθετείται στον πυθμένα του θαλάμου και έρχεται σε επαφή με τη λωρίδα του χάρτη, που κρέμεται από το σκέπασμα (Σχήμα 4.3-1α). Ο διαλύτης (κινητή φάση) ανερχόμενος με τη βοήθεια των τριχοειδών δυνάμεων, παρασύρει τα συστατικά της κηλίδας, που τοποθετείται στο κάτω άκρο της λωρίδας, καθένα με διαφορετική ταχύτητα, ανάλογα με το λόγο κατανομής τους (Σχέση 4.3-1) στο σύστημα των δύο υγρών φάσεων, που δημιουργούνται. Όσο περισσότερο υδρόφοβη (λιπόφιλη) είναι μία ουσία, τόσο ταχύτερα μετακινείται με τον οργανικό διαλύτη, ενώ όσο περισσότερο υδρόφιλη, τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση της να παραμείνει στη στατική φάση, και έτσι πετυχαίνεται ο διαχωρισμός [1].
- Στην **κατιούσα χρωματογραφία**, η κινητή φάση τοποθετείται σε σκαφίδιο, που βρίσκεται στο άνω μέρος του θαλάμου, και η άνω άκρη της λωρίδας ή του φύλλου του χάρτη βυθίζεται και συγκρατείται μέσα σε αυτή (Σχήμα 4.3-1β). Ο διαλύτης κατερχόμενος μέσα από τις ίνες του χάρτη, λόγω κυρίως της βαρύτητας, παρασύρει τα συστατικά της κηλίδας, που τοποθετείται κοντά στον άνω άκρο του χάρτη [1].
- Στην **κυκλική ή οριζόντια χρωματογραφία**, χρησιμοποιείται κυκλικό φίλτρο χάρτη, η κηλίδα του δείγματος τοποθετείται στο κέντρο του χάρτη, που κρατείται σε οριζόντια θέση πάνω σε κάψα, η οποία περιέχει το υγρό ανάπτυξης. Μία θρυαλλίδα φέρνει σε επαφή το υγρό ανάπτυξης με το κέντρο του κυκλικού χάρτη και η κυκλική κίνηση του διαλύτη σχηματίζει ομόκεντρους δακτυλίους, αντί κηλίδων, καθώς τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται (Σχήμα 4.3-1γ).



Σχήμα 4.3-1. Διατάξεις για (α) ανιούσα, (β) κατιούσα και (γ) οριζόντια χρωματογραφία χάρτη

Εάν οι ουσίες του χρωματογραφούμενου μείγματος είναι ελάχιστα διαλυτές στο ύδωρ (λιπαρά οξέα, μη πολικές ενώσεις), αυτές απλώς κινούνται με το μέτωπο του διαλύτη και, εξ αιτίας αυτού, ο διαχωρισμός είναι ατελής ή και ανύπαρκτος. Στην περίπτωση αυτή

εφαρμόζεται η τεχνική της αντίστροφης φάσης, κατά την οποία, σε αντίθεση με τη χρωματογραφία κανονικής φάσης, ο χάρτης διαποτίζεται με μία υδρόφοβη ουσία, π.χ. σιλικόνη ή ορυκτέλαιο (στατική φάση). Η κινητή φάση είναι ύδωρ ή μείγματα που περιέχουν ύδωρ. Ως συνέπεια αυτής της αντιστροφής της πολικότητας των φάσεων, η κατανομή των ουσιών στις δύο φάσεις είναι αντίστροφη απ' αυτή στην κανονική χρωματογραφία.

Όταν ο διαλύτης φθάσει στο άλλο άκρο του χάρτη, σημειώνεται η θέση του (μέτωπο διαλύτη) με μολύβι, ο χάρτης ξηραίνεται με ρεύμα θερμού αέρα ή στο πυριατήριο, και ακολουθεί η εμφάνιση του χρωματογραφήματος, δηλαδή η ανίχνευση των κηλίδων των ουσιών που διαχωρίστηκαν. Η εμφάνιση γίνεται, είτε με κατάλληλα αντιδραστήρια, τα οποία σχηματίζουν με τις ουσίες που διαχωρίστηκαν έγχρωμες ενώσεις, είτε με έκθεση του χρωματογραφήματος σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε οι φθορίζουσες ουσίες παρέχουν κιτρινοπράσινες ή κυανές κηλίδες, ενώ οι ουσίες που απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία φαίνονται ως μαύρες κηλίδες στο κυανωπό φθορίζον πεδίο του χάρτη.

Το κύριο κριτήριο επιλογής ενός αντιδραστήριου για τη χρωματογραφία χάρτη είναι η δυνατότητά του να αντιδράσει με όσο το δυνατόν περισσότερες ουσίες. Η διαπίστωση της ταυτότητας των συστατικών ενός μείγματος μπορεί να γίνει με βάση την τιμή του συντελεστή επιβράδυνσης,  $R_F$ , που στην περίπτωση της χρωματογραφίας χάρτη δίνεται από τη σχέση

$$R_F = \frac{\text{απόσταση που διάνυσε η ουσία}}{\text{απόσταση που διάνυσε το μέτωπο του διαλύτη}} \quad (4.3-2)$$

Η τιμή του  $R_F$  επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως από τη σύσταση του διαλύτη ανάπτυξης, από τη φύση του χάρτη, από τον τρόπο ανάπτυξης του χρωματογραφήματος, από τη θερμοκρασία. Σε καθορισμένες όμως συνθήκες αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας, με σύγκριση της τιμής  $R_F$  της προς τις τιμές  $R_F$  γνωστών ουσιών στις ίδιες συνθήκες.

Η χρωματογραφία χάρτη, αν και είναι κατ' εξοχήν τεχνική ποιοτικής ανάλυσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ποσοτικούς προσδιορισμούς μειγμάτων ουσιών. Μετά τον εντοπισμό των κηλίδων (συνήθως χρωματογραφούνται δύο δείγματα και το ένα χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό των κηλίδων, ενώ το άλλο για ποσοτική ανάλυση), κόβονται τα αντίστοιχα τμήματα του χάρτη και εκχυλίζονται με κάποιο διαλύτη. Ο προσδιορισμός της ουσίας στο εκχύλισμα μπορεί να γίνει με φασματοφωτομετρικό ή φθορισμομετρικό τρόπο. Το μέγεθος και η ένταση του χρώματος των κηλίδων μετά την εμφάνιση του χρωματογραφήματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ημιποσοτικό προσδιορισμό.

Η χρωματογραφία χάρτη είναι πολύ ευαίσθητη τεχνική και μπορεί να εφαρμοστεί για ανίχνευση και ταυτοποίηση σε κάθε είδους μείγμα ανόργανων και οργανικών ουσιών. Είναι μικρομέθοδος, εάν μάλιστα χρησιμοποιηθούν φθορίζοντα ή ραδιενεργά αντιδραστήρια, μπορούν να ανιχνευθούν με ευχέρεια ποσότητες μέχρι και 1 μg. Στη Φαρμακευτική ανάλυση βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή, όπως για την ταυτοποίηση πρώτων υλών, τον έλεγχο ορίων προσμίξεων, την ταυτοποίηση πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών με ταυτοποίηση των αμινοξέων

τους μετά από υδρόλυση, την ανάλυση εκχυλισμάτων δρογών [1].

#### 4.4 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC), είναι τεχνική υγρής χρωματογραφίας (Πίνακας 4.2-1) και καθιερώθηκε, ως μία από τις σπουδαιότερες χρωματογραφικές τεχνικές. Η στατική φάση και ο μηχανισμός, στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος, είναι παρόμοιοι με αυτούς της χρωματογραφίας στήλης γι' αυτό και η άλλη ονομασία της τεχνικής είναι χρωματογραφία ανοικτής στήλης. Η τεχνική λήψης του χρωματογραφήματος είναι η ίδια με αυτή της χρωματογραφίας χάρτη, αντί όμως χάρτη χρησιμοποιείται υάλινη πλάκα ή φύλλο αργιλίου ή πλαστικού, επιστρωμένο με λεπτή ομοιόμορφη στιβάδα ξηρού και λεπτότατα διαμερισμένου προσροφητικού υλικού, όπως ενεργοποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (silica gel), οξείδιο του αργιλίου (alumina), μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (cellulose powder), γη διατόμων (kieselguhr), πολυαμίδιο. Το προσροφητικό υλικό προσκολλάται στην πλάκα συνήθως με τη βοήθεια συνδετικών υλικών, όπως ένυδρο θεικό ασβέστιο (γύψος), άμυλο, πολυβινυλοαλκοόλη.

Αν και η TLC συνήθως λειτουργεί ως χρωματογραφία προσρόφησης, με τη χρησιμοποίηση διαλυτών ανάπτυξης που έχουν υψηλή πολικότητα (ύδωρ, μεθανόλη) ο πολικός διαλύτης προσροφάται ισχυρώς από το υλικό της στιβάδας, οπότε ο μηχανισμός διαχωρισμού γίνεται συνδυασμός κατανομής-προσρόφησης. Είναι επίσης δυνατή η εκτέλεση διαχωρισμών κατανομής (με κορεσμό του προσροφητικού υλικού με πολικό διαλύτη, π.χ. ύδωρ), ιονανταλλαγής (με επίστρωση των πλακών με ιονανταλλακτική ρητίνη), μοριακού αποκλεισμού (με επίστρωση των πλακών με κατάλληλη υδροπηκτή), και αντίστροφης φάσης (με σιλανοποίηση διοξειδίου του πυριτίου ή γης διατόμων, οπότε στην επιφάνεια τους προστίθενται μη πολικές μεθυλικές ομάδες).

Το κρίσιμο στάδιο στην ανάλυση με TLC είναι η παρασκευή ομοιόμορφης λεπτής στιβάδας στις πλάκες. Οι επιστρωμένες πλάκες ξηραίνονται, αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα στους 110 °C στο πυριατήριο, και φυλάσσονται σε ξηραντήρα. Στο εμπόριο πωλούνται έτοιμες πλάκες από διάφορα υλικά, επιστρωμένες με διαφόρους τύπους προσροφητικών υλικών και σε στιβάδες διαφόρου πάχους.

Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιούνται οι ίδιες με τη χρωματογραφία στήλης. Στην TLC προσρόφησης η ικανότητα έκλουσης των διαλυτών αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητας τους (εξάνιο → ακετόνη → αλκοόλη → ύδωρ). Προτιμούνται κινητές φάσεις ενός διαλύτη ή το πολύ δύο ή τριών διαλυτών, επειδή οι μεικτοί διαλύτες χρωματογραφούνται οι ίδιοι, καθώς ανέρχονται στη λεπτή στιβάδα, με αποτέλεσμα να αλλάξει βαθμιαία η σύσταση της κινητής φάσης.

Η πορεία διαχωρισμού είναι παρόμοια με αυτή της χρωματογραφίας χάρτη. Το προς χρωματογράφηση διάλυμα τοποθετείται στην πλάκα με μικροσιφόνιο ή μικροσύριγγα (10-100 μg ουσίας), σε μικρή απόσταση από το ένα άκρο της. Ακολούθως η πλάκα φέρεται στο θάλαμο χρωματογράφησης, που περιέχει το διαλύτη ανάπτυξης και έχει κορεσθεί από

τους ατμούς του διαλύτη, και εμβαπτίζεται σε αυτόν κατά την πλευρά που τοποθετήθηκε το δείγμα. Ο διαλύτης προσροφάται στη λεπτή στιβάδα και ανερχόμενος παρασύρει τα συστατικά του μείγματος με διαφορετικές ταχύτητες και έτσι πετυχαίνεται ο διαχωρισμός τους. Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος η πλάκα ξηραίνεται με ρεύμα αέρα ή στο πυριατήριο και ακολουθεί εμφάνιση του χρωματογραφήματος, που γίνεται με τις ίδιες μεθόδους που περιγράφηκαν στη χρωματογραφία χάρτη. Οι τιμές  $R_F$ , των διαφόρων κηλίδων χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ουσιών, με σύγκρισή τους με αυτές πρότυπων ουσιών, που χρωματογραφούνται παράλληλα με τα δείγματα στην ίδια πλάκα.

Η κύρια εφαρμογή της TLC είναι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ουσιών σε πολύπλοκα μείγματα, φάρμακα, εκχυλίσματα φυτών, βιοχημικά παρασκευάσματα, αιθέρια έλαια, βιταμίνες, αμινοξέα, στεροειδή, σάκχαρα, διαλύματα ανόργανων ουσιών. Η αντιστοιχία των τιμών  $R_F$  γνωστών ουσιών και της άγνωστης ουσίας είναι ένα κριτήριο ταυτοποίησης αν και όχι αποδεικτικό. Η επανάληψη της TLC με άλλο διαλύτη αυξάνει σημαντικά την αξιοπιστία της δοκιμασίας. Συνήθως τα αποτελέσματα της TLC ή της χρωματογραφίας χάρτη συνδυάζονται με εκείνα που λαμβάνονται με άλλες τεχνικές όπως φασματοσκοπίες UV, IR, NMR, φασματομετρία μαζών, υγροχημική ανάλυση. Η TLC, όπως και οι άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, είναι πολύ χρήσιμη για την ανίχνευση προσμείξεων, σε φαρμακευτικές πρώτες ύλες. Εάν στο χρωματογράφημα μιας ουσίας εμφανιστεί μόνο μία κηλίδα, τότε δεν υπάρχουν προσμείξεις ή εάν υπάρχουν, βρίσκονται σε ποσότητες μικρότερες του ορίου ανίχνευσης της τεχνικής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο διαχωρισμός με TLC του ακετυλοσαλικυλικού οξέος (ασπιρίνη) και του σαλικυλικού οξέος. Εάν ένα δείγμα πρώτης ύλης ασπιρίνης δώσει χρωματογράφημα με μία μόνο κηλίδα, που αντιστοιχεί στην τιμή  $R_F$  της ασπιρίνης, τότε μπορούμε να πούμε ότι η περιεκτικότητα της ύλης σε σαλικυλικό οξύ είναι μικρότερη από το όριο ανίχνευσής του με την TLC.

Με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας οι ουσίες, που διαχωρίστηκαν, μπορούν να προσδιορισθούν ποσοτικά με απόξωση του προσροφητικού υλικού στην περιοχή κάθε κηλίδας, εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη και μέτρηση με κατάλληλη αναλυτική τεχνική, όπως φασματοφωτομετρία, φθορισμομετρία και πολαρογραφία. Άλλη τεχνική είναι η μέτρηση της επιφάνειας της κηλίδας, η οποία είναι ανάλογη του λογαρίθμου της ποσότητας της ουσίας. Η επιφάνεια μπορεί να μετρηθεί εύκολα, εάν σημειωθεί η κηλίδα σε διαφανές χιλιοστομετρικό χάρτη. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η διάμετρος της κηλίδας, το τετράγωνο της οποίας είναι ανάλογο του λογαρίθμου της ποσότητας της ουσίας.

Με τη βοήθεια των πυκνομέτρων που διατίθενται στο εμπόριο είναι δυνατός ο άμεσος ποσοτικός προσδιορισμός των διαχωρισμένων ουσιών στην πλάκα. Τα όργανα αυτά σαρώνουν την πλάκα πολλές φορές, ώστε να επιτρέπουν τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων. Από τα λαμβανόμενα καταγραφήματα, και συγκεκριμένα από τις κορυφές ισχύος ανακλώμενης ή διερχόμενης ακτινοβολίας, ως προς χρόνο σάρωσης, υπολογίζεται το εμβαδό κάθε κορυφής που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Μπορεί επίσης να μετρηθεί η ισχύς του φθορισμού, που εκπέμπεται, οπότε αυξάνεται σημαντικά η ευαισθησία των προσδιορισμών. Για αύξηση της ακριβείας χρησιμοποιείται η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου, το οποίο χρωματογραφείται στην ίδια πλάκα. Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια των προσδιορισμών αυξάνονται σημαντικά (1-3%), εάν χρησιμοποιηθούν ειδικά αυτόματα όργανα τοποθέτησης κηλίδων (sample spotters). Η υψηλή επαναληψιμότητα που πετυχαίνεται με τα όργανα αυτά, έχει σαν αποτέλεσμα η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

υψηλής απόδοσης (HPTLC) να χρησιμοποιείται ευρύτατα για ταχείς και ακριβείς αναλύσεις πολύπλοκων μειγμάτων ουσιών [9].

## 4.5 Ηλεκτροφόρηση

Οι τεχνικές ηλεκτροφόρησης πετυχαίνουν το διαχωρισμό ουσιών με βάση το λόγο φορτίο/μάζα, χρησιμοποιώντας την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό φορτισμένων κολλοειδών σωματιδίων και μακρομοριακών ιόντων, όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων, πολυσακχαριτών, αντισωμάτων, ενζύμων, αντιβιοτικών, τοξινών, ιών, κλπ.

Οι ηλεκτροφορητικοί διαχωρισμοί πραγματοποιούνται σήμερα με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους: την ηλεκτροφόρηση πλάκας (slab electrophoresis), την ηλεκτροφόρηση δίσκων, την ηλεκτροφόρηση κινούμενων μεσεπιφανειών και την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (capillary electrophoresis) [11].

### 4.5.1 Ηλεκτροφόρηση πλάκας

Σήμερα η ηλεκτροφόρηση πλάκας αποτελεί το συνηθέστερο διαχωριστικό εργαλείο του βιοχημικού και του βιολόγου. Αποτελεί την κλασσική μέθοδο, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί πολλά χρόνια για το διαχωρισμό πολύπλοκων μειγμάτων ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους, βιολογικού και βιοχημικού ενδιαφέροντος.

Στην τεχνική αυτή το δείγμα τοποθετείται στη μέση οριζόντιας ταινίας ή πλάκας ενός στερεού φορέα (χάρτης, οξική κυτταρίνη, υδροπηκτική αμύλου ή πολυακρυλαμιδίου, αφρός πολυουρεθάνης), εμποτισμένης με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στους πόρους της. Συνήθως η πλάκα αυτή έχει μήκος μερικών εκατοστών, όπως η χρωματογραφική πλάκα λεπτής στιβάδας και είναι ικανή να διαχωρίζει αρκετά δείγματα ταυτοχρόνως. Τα δείγματα τοποθετούνται σαν κηλίδες ή ζώνες επάνω στην πλάκα και μετά εφαρμόζεται στα άκρα του φορέα ηλεκτρικό πεδίο για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου τα φορτισμένα σωματίδια ή ιόντα οδεύουν προς ένα από τα δύο ηλεκτρόδια, ανάλογα με το φορτίο τους. Η ταχύτητα μετακίνησης των φορτισμένων συστατικών του μείγματος εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους. Εκτός από τις ηλεκτρικές δυνάμεις, τη μετακίνηση των συστατικών προκαλούν και οι κλασσικές χρωματογραφικές δυνάμεις. Όταν κριθεί ότι οι διαχωρισμοί έχουν ολοκληρωθεί, το ρεύμα διακόπτεται και οι διαχωρισμένες ουσίες εμφανίζονται με παρόμοιο τρόπο που έχει περιγραφεί στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

Η ικανότητα ενός συστατικού προς μετακίνηση εκφράζεται με την κινητικότητα (mobility,  $\mu$ ), που είναι η απόσταση, σε cm, την οποία μπορεί να διανύσει το σωματίδιο στη μονάδα του χρόνου, ανά μονάδα ισχύος πεδίου ( $V/cm$ ), και έχει μονάδες  $cm^2V^{-1}s^{-1}$ . Η ταχύτητα όδευσης ή μετανάστευσης (migration)  $u$  ενός ιόντος, σε  $cm^{-1}$ , σε ένα ηλεκτρικό πεδίο είναι ίση με το γινόμενο της έντασης του πεδίου  $E$  ( $V\ cm^{-1}$ ) και της κινητικότητας  $\mu$ :

$$u = \mu E \quad (4.5-1)$$

Η κινητικότητα είναι με τη σειρά της ανάλογη του ιοντικού φορτίου της επιθυμητής ουσίας και αντιστρόφως ανάλογη των επιβραδυντικών παραγόντων τριβής. Το ηλεκτρικό πεδίο επιδρά μόνο στα ιόντα. Δυο ουσίες θα διαχωριστούν μεταξύ τους, εάν διαφέρουν είτε στο φορτίο, είτε στις δυνάμεις τριβής, που υφίστανται κατά την κίνησή τους στο ρυθμιστικό διάλυμα. Αντιθέτως τα ουδέτερα σωματίδια δεν διαχωρίζονται. Η επιβραδυντική δύναμη τριβής στο ιόν της επιθυμητής ουσίας καθορίζεται από το μέγεθος και το σχήμα του ιόντος καθώς επίσης και το ιξώδες του μέσου στο οποίο κινείται. Για ιόντα του ίδιου μεγέθους όσο μεγαλύτερο είναι το φορτίο, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η δύναμη ώθησης και τόσο ταχύτερη η όδευση. Αναλόγως για ιόντα του ίδιου φορτίου όσο μικρότερο είναι το ιόν, τόσο ταχύτερη θα είναι η όδευση. Ο λόγος φορτίου/μέγεθος (charge-to-size) ενός ιόντος συνδυάζει αυτές τις δυο επιδράσεις. Ο ρόλος του ρυθμιστικού είναι η μεταφορά του ρεύματος και η διατήρηση του pH, ώστε όλα τα σωματίδια να έχουν σταθερό φορτίο κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με τη χρωματογραφία, μόνο μία φάση μετέχει στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό. Επιπλέον η ηλεκτροφόρηση πλάκας σε αντίθεση με την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς, δεν είναι μια πραγματικά ενόργανη μέθοδος.

Μετά το διαχωρισμό, η πλάκα του φορέα ξηραίνεται και οι διαχωρισμένες ζώνες ή γραμμές των συστατικών μπορούν να εμφανιστούν με χρωστικές προσρόφησης, χημικές αντιδράσεις, έκθεση στο UV. Το λαμβανόμενο μοντέλο ηλεκτροφόρησης (pattern) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των συστατικών.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών μπορεί να επιτευχθεί με αποκοπή των έγχρωμων ζωνών, εκχύλισή τους και φωτομέτρηση ή προτιμότερο με σάρωση της πλάκας με πυκνότερο. Τα ολοκληρωμένα εμβαδά των λαμβανόμενων κορυφών σχετίζονται με τις συγκεντρώσεις των συστατικών [12].

#### 4.5.2 Ηλεκτροφόρηση δίσκων

Στην ηλεκτροφόρηση δίσκων χρησιμοποιείται κατακόρυφη στήλη υδροπηκτής πολυακρυλαμιδίου εμποτισμένη με ρυθμιστικό διάλυμα και τα συστατικά διαχωρίζονται υπό μορφή λεπτών δίσκων υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου και του μοριακού αποκλεισμού, που προκαλεί η υδροπηκτική [11].

#### 4.5.3 Ηλεκτροφόρηση κινούμενων μεσεπιφανειών

Στην ηλεκτροφόρηση κινούμενων μεσεπιφανειών χρησιμοποιείται σωλήνας σχήματος U, στο ένα σκέλος του οποίου προστίθεται το δείγμα σε επαφή με ρυθμιστικό διάλυμα και μετρείται, με ειδικό οπτικό σύστημα, ο δείκτης διάθλασης, που μεταβάλλεται, αφού υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου τα διάφορα φορτισμένα συστατικά σχηματίζουν κινούμενες μεσεπιφάνειες με το ρυθμιστικό διάλυμα [11].

#### 4.5.4 Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς

Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς που είναι η “ενόργανη έκδοση” της ηλεκτροφόρησης αναπτύχθηκε και χρησιμοποιείται μόνο κατά την τελευταία εικοσαετία και αποτελεί πλέον ένα σημαντικό εργαλείο για τους χημικούς και τους επιστήμονες του τομέα υγείας.

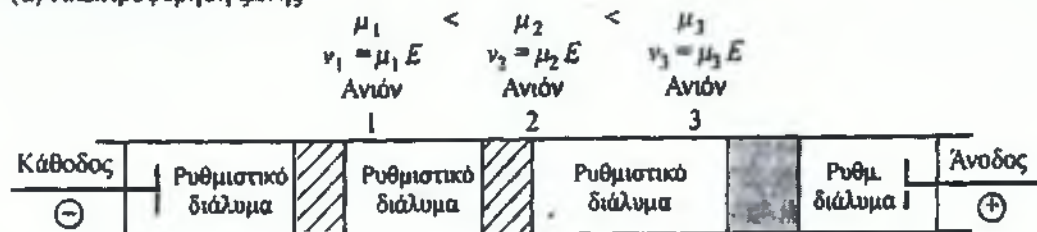
Οι διαχωρισμοί με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς εκτελούνται με διάφορους τρόπους. Είναι αξιοσημείωτο, ότι οι τρόποι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν πρώτα στην ηλεκτροφόρηση πλάκας και στη συνέχεια προσαρμόστηκαν στους διαχωρισμούς ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (capillary zone electrophoresis, CZE), η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής (capillary gel electrophoresis, CGE) και η ισοταχυφόρηση τριχοειδούς (capillary isotachopheresis, CITP). Στη συνέχεια παρουσιάζονται και επεξηγούνται χαρακτηριστικές εφαρμογές κάθε μιας από αυτές τις τεχνικές.

#### ✓ Ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (CZE)

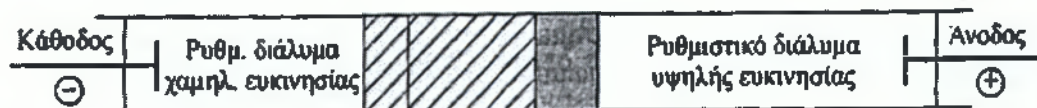
Στην ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος είναι σταθερή σε όλη την περιοχή του διαχωρισμού. Η εφαρμοζόμενη τάση προκαλεί όδευση των διαφορετικών ιοντικών συστατικών του μείγματος με ταχύτητα ανάλογη με την ευκινησία τους και διαχωρίζονται τα συστατικά αυτά σε ζώνες, που ξεχωρίζουν μεταξύ τους τελείως ή μπορεί να παρουσιάζουν μερική επικάλυψη.

Οι εντελώς διαχωριζόμενες ζώνες έχουν περιοχές με ρυθμιστικό διάλυμα ανάμεσα τους (Σχήμα 4.5-1α). Η κατάσταση είναι ανάλογη με τη χρωματογραφία έκλουσης από στήλη, όπου περιοχές κινητής φάσης εντοπίζονται ανάμεσα σε ζώνες, που περιέχουν διαχωρισμένους αναλύτες [2].

(α) Ηλεκτροφόρηση ζώνης



(β) Ισοταχυφόρηση



Σχήμα 4.5-1. Δύο τρόποι διαχωρισμού με ηλεκτροφόρηση

#### ✓ Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής (CGE)

Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής εκτελείται γενικά σε μήτρα πορώδους πηκτής-πολυμερούς, οι πόροι της οποίας περιέχουν μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος, στο οποίο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Στις αρχικές μελέτες ηλεκτροφόρησης πλάκας ο πρωταρχικός σκοπός του πολυμερικού μέσου ήταν να ελαττώσει τη διασπορά της

επιθυμητής ουσίας λόγω φυσικής ανάδευσης και διάχυσης και να παρέχει ένα μέσο, με το οποίο θα μπορούσε εύκολα να γίνει η ανίχνευση και η σάρωση.

Στη συνέχεια φάνηκε ότι αυτό το μέσο παρείχε ένα είδος “μοριακού κοσκινίσματος”, το οποίο θα επιβράδυνε την όδευση των προσδιοριζόμενων σωματιδίων σε διαφορετικούς βαθμούς, ανάλογα με το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς και το μέγεθος των ιόντων τους. Αυτό το κοσκίνισμα βοήθη ιδιαίτερα διαχωρισμούς μεγαλομορίων όπως πρωτεΐνες, θραύσματα DNA και ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία έχουν ουσιαστικά το ίδιο φορτίο αλλά διαφέρουν στο μέγεθος. Προς το παρόν οι περισσότεροι ηλεκτροφορητικοί διαχωρισμοί για παρασκευαστικούς σκοπούς πραγματοποιούνται σε πλάκα πηκτής. Μερικοί διαχωρισμοί με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σωματιδίων που διαφέρουν στο μέγεθος πραγματοποιούνται επίσης σε πηκτές που περιέχονται σε τριχοειδείς σωλήνες.

Το συνηθέστερο είδος πηκτής στην ηλεκτροφόρηση είναι ένα πολυμερές πολυακρυλαμιδίου το οποίο σχηματίζεται με πολυμερισμό ακρυλαμιδίου ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) παρουσία ενός παράγοντα διασταυρούμενης σύνδεσης. Το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς εξαρτάται από το λόγο του μονομερούς προς τον παράγοντα διασταυρούμενης σύνδεσης. Αύξηση στην ποσότητα του παράγοντα διασταυρούμενης σύνδεσης μειώνει το μέγεθος πόρων [2].

#### ✓ Ισοταχυφόρηση τριχοειδούς (CITP)

Στην ισοταχυφόρηση τριχοειδούς όλες οι ζώνες της επιθυμητής ουσίας τελικά οδεύουν με την ίδια ταχύτητα, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ονομασία της τεχνικής. Σε κάθε εφαρμογή μπορούν να διαχωριστούν είτε τα κατιόντα είτε τα ανιόντα, αλλά όχι και τα δύο συγχρόνως. Σε ένα διαχωρισμό το δείγμα εγχέεται ανάμεσα στα δύο ρυθμιστικά διαλύματα, ένα προπορευόμενο που θα περιέχει ιόντα μεγαλύτερης ευκινησίας από οποιοδήποτε από τα ιόντα της επιθυμητής ουσίας και ένα ρυθμιστικό τερματισμού με ιόντα μικρότερης ευκινησίας από τα ιόντα του δείγματος.

Όταν εφαρμόζεται πεδίο δυναμικού στον ισοταχυφορητικό διαχωρισμό, τα ιόντα της επιθυμητής ουσίας οδεύουν, όπως στην ηλεκτροφόρηση ζώνης, με τη χαρακτηριστική τους ταχύτητα, που παρέχεται από τη σχέση (4.5-1). Η διαφορά αυτή στις ταχύτητες όδευσης διαχωρίζει τις διάφορες ουσίες σε γειτονικές ζώνες με τα ταχύτερα σωματίδια να βρίσκονται σε μια ζώνη αμέσως μετά το προπορευόμενο ρυθμιστικό διάλυμα και τα βραδύτερα μόλις μπροστά από το τερματικό. Από τη στιγμή σχηματισμού τους και μετά οι ζώνες κινούνται με την ίδια ταχύτητα. Ο λόγος για τον οποίο οι ζώνες κινούνται ισοταχώς, είναι ότι το πεδίο δυναμικού είναι ασθενέστερο στις πιο ευκίνητες ζώνες, ώστε το ρεύμα είναι το ίδιο σε όλα τα σημεία του ρυθμιστικού διαλύματος. Το ιοντικό ρεύμα που προκύπτει από τη ροή των ιόντων στο ρυθμιστικό διάλυμα είναι ανάλογο με το συνεχές ρεύμα σε ένα κύκλωμα, που αποτελείται από πολλές αντιστάσεις συνδεδεμένες σε σειρά με μια μπαταρία. Εδώ το ρεύμα πρέπει να είναι το ίδιο σε όλες τις αντιστάσεις και η τάση κατά μήκος καθεμίας από αυτές μεταβάλλεται σύμφωνα με το νόμο του Ohm.

Όταν επέλθει ισορροπία σε μια ισοταχυφόρηση, επικρατεί μια κατάσταση στην οποία κάθε συστατικό του δείγματος οδεύει σε μια περιοχή ανάμεσα σε δύο ζώνες, όπου κινούνται τα επιταχυνόμενα ιόντα. Μίας ζώνης που περιέχει τα επόμενα βραδύτερα κινούμενα ιόντα και μίας άλλης ζώνης, όπως φαίνεται στο σχήμα (4.5-1β). Το όριο ανάμεσα στις ζώνες



είναι ευδιάκριτο. Εάν κάποια διαλυμένη ουσία αρχίσει να διαχέεται στην επόμενη ταχύτερη ζώνη, εκεί συναντά ένα ασθενέστερο πεδίο, το οποίο μειώνει την ταχύτητα της, οπότε αυτή επανέρχεται στην αρχική της ζώνη. Όπως φαίνεται και στο σχήμα (4.5-1β), σε αντίθεση με την ηλεκτροφόρηση ζώνης ή τη χρωματογραφία έκλουσης, οι ζώνες της επιθυμητής ουσίας είναι η μία δίπλα στην άλλη και δεν διαχωρίζονται με ζώνες ρυθμιστικού διαλύματος [2].

## 4.6 Αέρια Χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου, κλπ. Στην αεριοχρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η έκλουση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια της επιθυμητής ουσίας. Ο μόνος της ρόλος είναι η διακίνηση της επιθυμητής ουσίας κατά μήκος της στήλης.

Η επιτυχής χρησιμοποίηση αερίου ως κινητής φάσης σ' ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό, βασίζεται στα εξής πλεονεκτήματα:

- 1) Το χαμηλό ιξώδες (πυκνότητα) των αερίων επιτρέπει τη χρησιμοποίηση στηλών μεγάλου μήκους, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της στήλης και τη χρησιμοποίηση μεγάλων ταχυτήτων ροής, με αποτέλεσμα την επίτευξη ταχέων διαχωρισμών.
- 2) Η αδράνεια των αερίων, όσον αφορά την αλληλεπίδρασή τους με τα προς διαχωρισμό συστατικά, κάνει την ισορροπία κατανομής στις δύο φάσεις να είναι πρακτικώς ανεξάρτητη από το αέριο. Εξαιτίας αυτής της αδράνειας, η GLC περιορίζεται μόνο σε διαχωρισμούς σχετικά πτητικών ουσιών.
- 3) Υπάρχουν πολλοί, απλοί, ευαίσθητοι και ταχείας αποκρίσεως ανιχνευτές, ικανοί να παρακολουθούν τις συγκεντρώσεις των ουσιών στην αέρια φάση.

Υπάρχουν δύο τύποι αεριοχρωματογραφίας:

- Χρωματογραφία αερίου - υγρού (gas-liquid chromatography, GLC)
- Χρωματογραφία αερίου - στερεού (gas-solid chromatography, GSC)

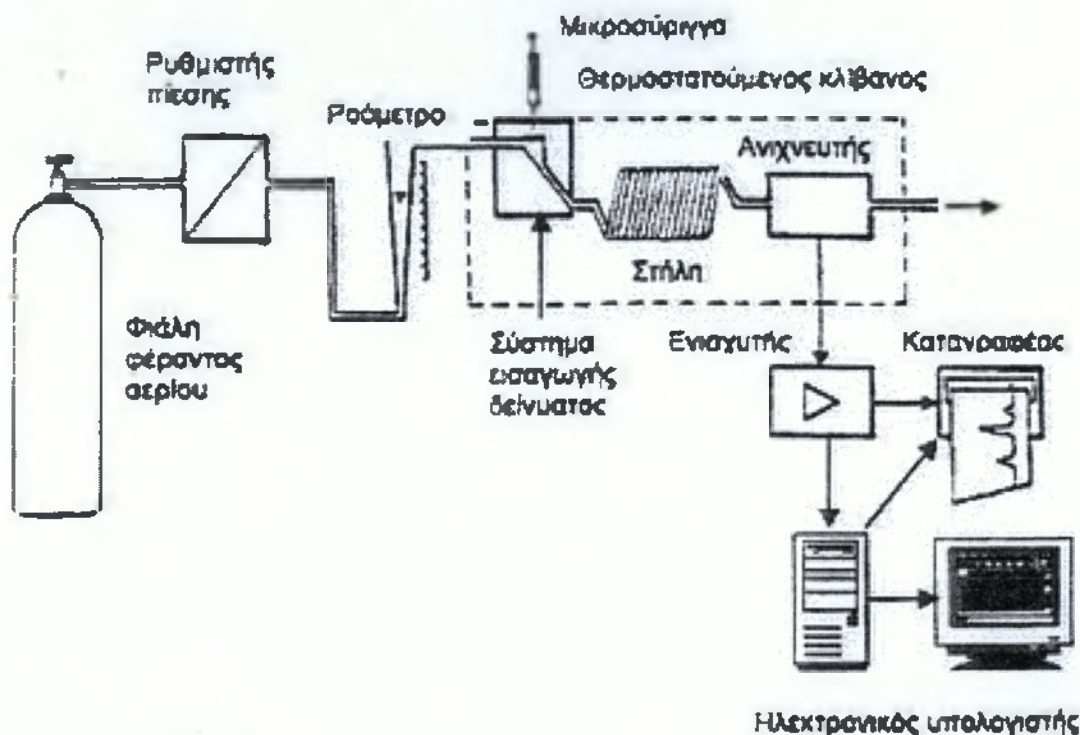
Η χρωματογραφία αερίου - υγρού χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλους τους κλάδους των θετικών επιστημών, ενώ η χρωματογραφία αερίου - στερεού αποτελεί και αυτή ένα χρήσιμο τύπο χρωματογραφίας με περιορισμένες όμως εφαρμογές στην ανάλυση.

### 4.6.1 Χρωματογραφία Αερίου - Υγρού (GLC)

Στην αέρια - υγρή χρωματογραφία ή απλώς αέρια χρωματογραφία, χρησιμοποιείται αέρια κινητή φάση με υγρή στατική φάση. Ο διαχωρισμός των συστατικών (αερίων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών, και ενός

αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο). Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα από τη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες, που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση.

Η διάταξη ενός αερίου - υγρού χρωματογράφου δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 4.6-1. Σχηματικό διάγραμμα αερίου - υγρού χρωματογράφου

Το φέρον αέριο από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου [3].

Οι βασικές μονάδες του αερίου - υγρού χρωματογράφου περιγράφονται στη συνέχεια.

**Φέρον αέριο.** Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε πολύ καθαρή κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Χρησιμοποιούνται κυρίως  $N_2$ ,  $He$ , και  $Ar$  και σπανιότερα  $H_2$ , και  $CO_2$ . Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, για αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται, γιατί το φέρον αέριο πρέπει να διαφέρει

σημαντικά από τις διαχωριζόμενες ουσίες ως προς μία ιδιότητα, π.χ. θερμική αγωγιμότητα, πυκνότητα κλπ., στην οποία βασίζεται η λειτουργία του ανιχνευτή. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο αέριο με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας είναι το ήλιο, παρά το υψηλό του κόστος, επειδή έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα και μικρή πυκνότητα, που επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής αερίου, με αντίστοιχη μείωση του χρόνου ανάλυσης. Το υδρογόνο χαρακτηρίζεται επίσης από μικρή πυκνότητα, μειονεκτεί όμως έναντι του ηλίου στο ότι είναι εύφλεκτο και κάτω από ορισμένες συνθήκες δραστικό έναντι οξειδωτικών και ακόρεστων ενώσεων. Με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας προτιμάται το άζωτο, ενώ με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων απαιτείται άζωτο ή αργό [4].

**Ρυθμιστής πίεσης - Ροόμετρο.** Το φέρον αέριο από τη φιάλη, όπου βρίσκεται σε υψηλή πίεση 100-200 ατμοσφαιρών - συνήθως χρησιμοποιούνται οβίδες από ανοξείδωτο υλικό, που πρέπει να είναι στερεωμένες σταθερά - διαβιβάζεται μέσα από το ρυθμιστή πίεσεως, ο οποίος με σύστημα βαλβίδων και ενδιάμεσων θαλάμων μειώνει δραστικά την πίεση, συνήθως σε 1-2 atm πάνω από την ατμοσφαιρική πίεση και στη συνέχεια μέσα από το ροόμετρο, με το οποίο μετρείται με ακρίβεια η ταχύτητα του. Η πολύ ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι απαραίτητη, ιδίως στην ταυτοποίηση ενώσεων, επειδή οι χρόνοι (όγκοι) συγκράτησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα. Χρησιμοποιούνται ροόμετρα με πλωτήρα στην είσοδο της στήλης ή ροόμετρα σαπωνοδιαλύματος στην έξοδό της, όχι όμως όταν χρησιμοποιείται υδρογόνο ως φέρον αέριο, γιατί αυτό αναφλέγεται εύκολα [4].

**Σύστημα εισαγωγής δείγματος.** Το δείγμα, συνήθως όγκου 1μL εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής, που φράσσεται με παχύ διάφραγμα από θερμοανθεκτικό ελαστικό (septum), το οποίο δρα ως βαλβίδα, που επιτρέπει την είσοδο του δείγματος, όχι όμως την έξοδο αυτού και του φέροντος αερίου. Για την επίτευξη καλών διαχωρισμών πρέπει:

- 1) Η εισαγωγή του δείγματος να είναι ακαριαία για να αποφευχθεί η διασπορά της ζώνης του δείγματος
- 2) Ο όγκος του δείγματος να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος, γιατί η διαχωριστικότητα ελαττώνεται, όταν η ποσότητα του δείγματος αυξάνεται
- 3) Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος να θερμαίνεται υψηλότερα από τη θερμοκρασία της στήλης, ώστε να πετυχαίνεται άμεση εξαέρωση του δείγματος και παραλαβή των ατμών από το φέρον αέριο

Αν και τα αέρια δείγματα μπορούν να εισαχθούν με αεροστεγή σύριγγα, η εισαγωγή τους γίνεται συνήθως με ειδικό σύστημα περιστρεφόμενης βαλβίδας με βρόχο. Στερεά ή πολύ υγρά δείγματα που αποσυντίθενται εύκολα μπορούν να τοποθετηθούν μέσα σε υάλινες μικροφύσιγγες, οι οποίες θραύονται ακριβώς πριν από τη στήλη. Στην περίπτωση τριχοειδών στηλών, ειδική παρακαμπτήρια διάταξη επιτρέπει την εισαγωγή μόνο μικρού ποσοστού (1%) του δείγματος στη στήλη.

Το μέγεθος του δείγματος καθορίζεται από πολλούς παράγοντες όπως διαθέσιμη ποσότητα, χωρητικότητα στήλης, ευαισθησία ανιχνευτή. Συνήθως χρησιμοποιούνται για υγρά 0,1 - 10 μL, για αέρια 1-10 mL και στην περίπτωση τριχοειδών στηλών 1-10 nL, με ειδικές διαιρετικές διατάξεις.

Η ακρίβεια των χρωματογραφικών αναλύσεων εξαρτάται πάρα πολύ από την ακρίβεια και την επαναληπτικότητα της διαδικασίας εισαγωγής του δείγματος. Γι' αυτό επιβάλλεται εξοικείωση στην τεχνική της ένεσης με μικροσύριγγα, πριν από την έναρξη των αναλύσεων [4].

**Θερμοστατούμενος κλίβανος.** Η ταχύτητα και η ικανότητα του διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο ο χώρος εισαγωγής του δείγματος και η στήλη, και σε πολλούς αεριοχρωματογράφους και ο ανιχνευτής, θερμοστατούνται, συνήθως στην περιοχή 50-300 °C. Η εξάρτηση του χρόνου συγκράτησης από τη θερμοκρασία περιγράφεται από τη σχέση:

$$\log t_R = \frac{\alpha}{T} + \beta \quad (4.6-1)$$

όπου:

$T$ : απόλυτη θερμοκρασία

$\alpha, \beta$ : σταθερές

Η διαχωριστικότητα αυξάνεται, όταν η θερμοκρασία ελαττώνεται, μείωση όμως της θερμοκρασίας προκαλεί και αύξηση του  $t_R$ , και επομένως και του χρόνου ανάλυσης. Όταν η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια της χρωματογράφησης, συχνά είναι δύσκολο, και μερικές φορές και αδύνατον, να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός και ανίχνευση των συστατικών ενός μείγματος, όταν αυτά είναι πολυάριθμα ή τα σημεία ζέσεως τους ή και οι πολικότητές τους καλύπτουν ευρείες περιοχές. Αυτό συμβαίνει γιατί οι κορυφές των πτητικότερων συστατικών (χαμηλών σημείων ζέσεως) εμφανίζονται η μία κοντά στην άλλη ή και αλληλοεπικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό (μικρή διαχωριστικότητα), ενώ οι κορυφές των λιγότερο πτητικών ουσιών (υψηλών σημείων ζέσεως) είναι μικρού ύψους, πλατιές και σε ορισμένες περιπτώσεις απέχουν τόσο πολύ μεταξύ τους (υπέρμετρα διαχωριστικότητα), ώστε ενώσεις υψηλών σημείων ζέσεως να μην ανιχνεύονται.

Τα παραπάνω μειονεκτήματα της ισόθερμης λειτουργίας της στήλης αίρονται με τη θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία (programmed - temperature gas chromatography), στην οποία η θερμοκρασία της στήλης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της χρωματογράφησης, με εφαρμογή προκαθορισμένου προγράμματος. Στη θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία εμφανίζονται διακριτές κορυφές για ενώσεις, των οποίων τα σημεία ζέσεως βρίσκονται σε ευρεία περιοχή θερμοκρασιών και μάλιστα σε πολύ μικρότερο χρόνο απ' ό τι με την ισόθερμη λειτουργία της στήλης. Επιπλέον, οι κορυφές είναι οξύτερες και περισσότερο ομοιόμορφες, ώστε τα ύψη τους να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς στην ποσοτική ανάλυση [4].

**Στήλες.** Η καρδιά του χρωματογράφου είναι η στήλη και σε αυτήν γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου.

Υπάρχουν δύο είδη στηλών οι πληρωμένες στήλες (πακεταρισμένες, packed columns) και οι τριχοειδείς στήλες (capillary columns). Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη

σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει κατά το δυνατόν μικρότερο χώρο, από ανοξειδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό, μήκους 1-2 m για τις πληρωμένες στήλες, μέχρις αρκετών εκατοντάδων μέτρων για τις τριχοειδείς, εσωτερικής διαμέτρου της τάξεως των mm στις αναλυτικές στήλες, πολλών δεκάδων cm στις παρασκευαστικές στήλες.

Οι πληρωμένες στήλες περιέχουν ένα στερεό υπόστρωμα, συνήθως από γη διατόμων (πυριτικός σκελετός των αλγών) ή κονιοποιημένο πυρίμαχο υλικό ή πορώδη οργανικά πολυμερή, διαποτισμένο με κατάλληλο υγρό, το οποίο αποτελεί την υγρή στατική φάση. Το στερεό υπόστρωμα πρέπει να είναι χημικώς αδρανές, να παρουσιάζει μεγάλη επιφάνεια για ταχεία αποκατάσταση ισορροπίας, και η κοκκομετρική σύστασή του να καλύπτει στενή περιοχή (ομοιομορφία).

Οι τριχοειδείς στήλες, γνωστές και ως στήλες ανοικτού σωλήνα, χρησιμοποιούνται λιγότερο από τις πληρωμένες στήλες, για ειδικές αναλύσεις. Κατασκευάζονται από ύαλο ή μέταλλο ή οργανικά πολυμερή (νάυλον), συνήθως δεν έχουν στερεό υπόστρωμα -η υγρή στατική φάση συγκρατείται απ' ευθείας στα τοιχώματα του σωλήνα, με τη μορφή λεπτότατου υμενίου- και γι' αυτό η χωρητικότητα τους είναι πολύ μικρή, μειονέκτημα που αντιμετωπίζεται με επικάλυψη των τοιχωμάτων με πορώδες υλικό, στο οποίο προσροφάται η υγρή φάση. Εξαιτίας της μικρής αντιστάσεώς τους στη ροή του φέροντος αερίου και της μικρής πτώσης πίεσης κατά μήκος τους, είναι δυνατή η λειτουργία τριχοειδών στηλών μήκους μεγαλύτερου από 1000 m. Βασικά πλεονεκτήματα των στηλών αυτών είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης εξαιρετικά μικρού δείγματος (1μg) και η υψηλή διαχωριστικότητα.

Οι ουσίες, που χρησιμοποιούνται για την υγρή στατική φάση, διαφέρουν κυρίως ως προς το βαθμό πολικότητας και την περιοχή θερμοκρασιών, στην οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η υγρή φάση πρέπει να έχει τις εξής ιδιότητες:

- 1) Να είναι σταθερή και να έχει αμελητέα τάση ατμών ( $<0,1 \text{ Torr}$ ) στη θερμοκρασία, στην οποία θα χρησιμοποιηθεί, γιατί διαφορετικά εκχέεται βραδέως από το υπόστρωμα και μολύνει τη στήλη.
- 2) Να είναι αδρανής έναντι των διαχωριζόμενων ενώσεων και του φέροντος αερίου το οποίο πρέπει να είναι αδιάλυτο στην υγρή φάση.
- 3) Να είναι καλός διαλύτης για τα συστατικά του δείγματος και οι συντελεστές κατανομής των διαχωριζόμενων ενώσεων να διαφέρουν μεταξύ τους σε σημαντικό βαθμό, χωρίς όμως να είναι εξαιρετικά μικροί ή μεγάλοι.
- 4) Να είναι αρκετά ρευστή στην περιοχή των θερμοκρασιών που χρησιμοποιούνται.
- 5) Να διατίθεται στο εμπόριο σε τυποποιημένη μορφή, κατά προτίμηση ως μία καθαρή ένωση γνωστής σχετικής μοριακής μάζας.

Δεν υπάρχει κανένα υγρό που να έχει όλες τις ιδιότητες που προαναφέρθηκαν. Ορισμένα υγρά χρησιμοποιούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες, άλλα σε υψηλές. Σε ορισμένες περιπτώσεις προτιμάται μία μη εκλεκτική υγρή φάση, ενώ σε άλλες απαιτείται εκλεκτική υγρή φάση. Οι στατικές φάσεις χαρακτηρίζονται συνήθως ως μη πολικές (υδρογονάνθρακες και φθοριοπαράγωγά τους), μέσης πολικότητας (σιλικόνες και ορισμένους εστέρες), πολικές

(πολυεστέρες και αιθέρες μεγάλης σχετικής μοριακής μάζας) και υψηλής πολικότητας (αιθέρες και άμυνες), ανάλογα με τη δομή και τη διαχωριστική τους ικανότητα. Κατά κανόνα, η καταλληλότερη στατική φάση για δεδομένο δείγμα είναι εκείνη, η οποία είναι χημικώς παρόμοια με αυτό (ίδιας πολικότητας).

Η σειρά έκλουσης των συστατικών ενός μείγματος από τη στήλη μπορεί να μεταβληθεί με αλλαγή της στατικής φάσης. Γενικώς, οι μη πολικές υγρές στατικές φάσεις δεν παρουσιάζουν εκλεκτικότητα, γιατί όταν απουσιάζουν ειδικές δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των ουσιών και της στατικής υγρής φάσης η πτητικότητα των ουσιών καθορίζεται κατά κύριο λόγο από την πίεση των ατμών τους, και εξαιτίας αυτού οι ουσίες εκλούνται κατά σειρά αυξανόμενων σημείων ζέσεως. Στις πολικές στατικές φάσεις, η πτητικότητα και η σειρά έκλουσης καθορίζονται όχι μόνο από το σημείο ζέσεως των διαχωριζόμενων ενώσεων, αλλά και από άλλους παράγοντες όπως αλληλεπίδραση διπλών, δεσμοί υδρογόνου, σχηματισμός συμπλόκων, οι οποίοι σχετίζονται με την πολικότητα των ενώσεων και της υγρής στατικής φάσης.

Η ποσότητα της υγρής στατικής φάσης κυμαίνεται από 1 έως 10% κατά βάρος του στερεού υποστρώματος και επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της στήλης και το μέγεθος του δείγματος, το οποίο μπορεί να εισαχθεί σε αυτή, αύξηση της περιεκτικότητας σε υγρή στατική φάση προκαλεί μεγαλύτερη χωρητικότητα και αύξηση του  $t_R$  [4].

**Ανιχνευτές.** Με τον ανιχνευτή γίνεται φανερή η παρουσία καθενός από τα συστατικά του μείγματος, τα οποία εξέρχονται από τη στήλη και μετρείται η ποσότητα ή η συγκέντρωσή τους μέσα στο φέρον αέριο. Υπάρχουν πολλοί ανιχνευτές, οι οποίοι συνήθως ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, αναλόγως του εάν αυτοί αποκρίνονται στη συγκέντρωση (μοριακό κλάσμα) της εκλούμενης ουσίας X μέσα στο φέρον αέριο ή στην ταχύτητα ροής μάζας της X (σε moles/s). Οι ανιχνευτές μπορούν επίσης να ταξινομηθούν σε ανιχνευτές ολοκληρώσεως και διαφορικούς ανιχνευτές, αναλόγως του εάν στο χρωματογράφημα παρουσιάζεται αθροιστικά σε κάθε στιγμή η ποσότητα της ουσίας X, που έχει διέλθει (το χρωματογράφημα αποτελείται από βαθμίδες) ή η διερχόμενη ποσότητα ή συγκέντρωση της X (το χρωματογράφημα αποτελείται από κορυφές).

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός ανιχνευτή είναι:

- 1) Η ευαισθησία, κυμαίνεται στην περιοχή των  $10^{-8}$  έως  $10^{-15}$  g ουσίας/s
- 2) Η σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα
- 3) Η περιοχή γραμμικότητας ή γραμμική δυναμική περιοχή, δηλαδή ο λόγος του μέγιστου προς το ελάχιστο σήμα, για τα οποία η απόκριση είναι ανάλογη του μεγέθους του δείγματος
- 4) Ο χρόνος απόκρισης να είναι μικρός και ανεξάρτητος από την ταχύτητα ροής
- 5) Παρόμοια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες ή εξαιρετικά προβλέψιμη και εκλεκτική απόκριση για μια ή περισσότερες ομάδες ενώσεων
- 6) Η χημική δραστηριότητα
- 7) Περιοχή θερμοκρασιών λειτουργίας από τη θερμοκρασία δωματίου μέχρι τουλάχιστον τους  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$

## 8) Να μην καταστρέφει το δείγμα

Είναι προφανές ότι δεν υπάρχει ανιχνευτής που να συνδυάζει όλα αυτά τα χαρακτηριστικά και είναι απίθανο να υπάρξει στο μέλλον. Επειδή η ευαισθησία ενός ανιχνευτή ποικίλλει ευρέως για διάφορες κατηγορίες ενώσεων, πολλοί αεριοχρωματογράφοι διαθέτουν δύο ή και περισσότερους ανιχνευτές, συνδεδεμένους σε σειρά όταν δεν καταστρέφεται το δείγμα ή παράλληλα, για την ανίχνευση περισσότερων ουσιών στην έξοδο της ίδιας στήλης. Στον πίνακα που ακολουθεί περιγράφονται οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές και γίνεται σύγκρισή τους [4].

Πίνακας 4.6-1: Σύγκριση ανιχνευτών αέριας-υγρής χρωματογραφίας

Ανιχνευτής	Μηχανισμός αποκρίσεως ανιχνευτή	Όριο ανιχνεύ-σεως g	Περιοχή γραμμικότητας	Όριο θερμοκρασίας, °C	Παρατηρήσεις
Θερμικής αγωγιμότητας, TCD	Το σήμα οφείλεται σε διαφορά θερμικής αγωγιμότητας μεταξύ φέροντος αερίου και μείγματός του με δείγμα. Παρακολουθείται η αντίσταση θερμικών συρμάτων Pt (ή θερμίστορ) μέσα σε ρεύμα αερίων	$10^{-6}$	$10^5$	450	Δεν καταστρέφει το δείγμα. Χρησιμοποιείται για ανόργανες και οργανικές ουσίες. Ευαίσθητος σε μεταβολές θερμοκρασίας και ροής αερίου
Ιονισμού φλόγας, FID	Σήμα ανάλογο του αριθμού παραγόμενων ιόντων κατά καύση δείγματος σε $H_2$ και αέρα. Μετρείται η ένταση του παραγόμενου ρεύματος	$10^{-11}$	$10^8$	400	Καταστρέφει το δείγμα. Πολύ σταθερός. Χρησιμοποιείται για οργανικές ενώσεις. Δεν αποκρίνεται σε πολλά ανόργανα αέρια: $H_2O$ , $CO_2$ , $CO$ , $H_2S$ , $SO_2$ , $NH_3$
Συλλήψεως ηλεκτρονίων, ECD	Σήμα ανάλογο συνεχούς ροής θραδέων ηλεκτρονίων, παραγόμενων κατά ιονισμό $N_2$ ή $Ag$ με β-σωματίδια. Ουσίες που αντιδρούν με τα ηλεκτρόνια μειώνουν τη ροή ηλεκτρονίων προς άνοδο και συνεπώς και το σήμα	$10^{-13}$	$10^2$	350	Δεν καταστρέφει το δείγμα. Χρησιμοποιείται για ενώσεις που περιέχουν $O, P, S, -NO_2$ , αλογόνα, ιδίως στην ανάλυση εντομοκτόνων

**Ενίσχυτής.** Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα. Η εισαγωγή πολλαπλών σταδίων ενίσχυσης συνήθως εισάγει πρόσθετο θόρυβο, και γι αυτό ο άριστος βαθμός ενίσχυσης είναι προϊόν συμβιβασμού μεταξύ επιθυμητού ορίου ανίχνευσης και στάθμης θορύβου [4].

**Καταγραφέας.** Για τη λήψη του χρωματογραφήματος απαιτείται καταγραφέας ταχείας απόκρισης και με υψηλό βαθμό σταθερότητας των ηλεκτρονικών. Κατά κανόνα, ο

καταγραφέας είναι μία χωριστή μονάδα, μη ενσωματωμένη στο κύριο όργανο. Το χρωματογράφημα είναι διάγραμμα τάσης ως συνάρτηση του χρόνου, με κατάλληλη βαθμονόμηση όμως μπορεί να ερμηνευθεί ως διάγραμμα συγκέντρωσης των συστατικών, που εκκλύονται, ως συνάρτηση του όγκου του φέροντος αερίου.

Οι περισσότεροι αεριοχρωματογράφοι είναι εφοδιασμένοι με σύστημα ολοκληρωτή, ώστε παράλληλα προς τις κορυφές που καταγράφονται να παρέχεται και το ολοκλήρωμά τους. Τα σύγχρονα αεριοχρωματογραφικά συστήματα διαθέτουν ηλεκτρονικό μικροϋπολογιστή για την ακριβέστερη μέτρηση των κορυφών. Αυτός επιτρέπει τη μέτρηση της επιφάνειας ακόμη και κορυφών που μερικώς αλληλοεπικαλύπτονται, και επιφέρει διόρθωση για οποιαδήποτε ολίση της γραμμής βάσης του χρωματογραφήματος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται απ' ευθείας στις επιθυμητές μονάδες μέτρησης. Με βαθμονόμηση των αεριοχρωματογραφικών συστημάτων με πρότυπα μείγματα ενώσεων είναι δυνατόν να παρουσιασθούν απ' ευθείας σε ταινία εκτυπωτή το είδος και η περιεκτικότητα καθενός συστατικού ενός άγνωστου μείγματος [4].

### Εφαρμογές αέριας - υγρής χρωματογραφίας

Η GLC χρησιμοποιείται ευρύτατα στην ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση, κυρίως για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό οργανικών ουσιών σε πολύπλοκα δείγματα, όπως και τον προσδιορισμό διαφόρων φυσικοχημικών μεγεθών. Προϋπόθεση για την εφαρμογή της τεχνικής είναι η πτητικότητα της χρωματογραφούμενης ουσίας στη θερμοκρασία της στήλης. Σε περιπτώσεις μη πτητικών ουσιών, αυτές μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα, με αντίδραση με κατάλληλα αντιδραστήρια.

Τα αεριοχρωματογραφήματα χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως κριτήρια καθαρότητας οργανικών ενώσεων και για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας διαφόρων τεχνικών διαχωρισμού. Η ταυτοποίηση των συστατικών ενός μείγματος γίνεται με βάση το χρόνο συγκράτησης  $t_R$ , με σύγκριση προς τις αντίστοιχες τιμές σε χρωματογράφημα γνωστού συνθετικού δείγματος, που πάρθηκε με τις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες, είτε με συλλογή των εκκλούμενων συστατικών και περαιτέρω ανάλυσή τους με άλλες τεχνικές.

Για να χρησιμοποιηθεί το αεριοχρωματογράφημα ως βάση για την ποσοτική ανάλυση πρέπει:

- 1) Το σήμα που καταγράφεται να είναι ανάλογο της συγκέντρωσης.
- 2) Οι πειραματικές συνθήκες και ιδίως η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου να είναι σταθερές.
- 3) Η απόκριση της γραφίδας του καταγραφέα να προσαρμόζεται προς το χρόνο απόκρισης του ανιχνευτή, διαφορετικά πρέπει να συνδεθεί σύστημα αυτόματης ολοκλήρωσης απ' ευθείας με το ηλεκτρονικό σύστημα του ανιχνευτή.

Εντυπωσιακές αποκαλύψεις, όπως είναι η διευκρίνηση της δομής και η κατανόηση του τρόπου δράσης των ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών, προήλθαν από την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας στη βιολογική και τη βιοχημική έρευνα. Το ευρύτατο φάσμα των εφαρμογών αποδεικνύεται από τη χρησιμοποίηση της GLC σε διάφορες αναλυτικές εφαρμογές, οι σπουδαιότερες είναι οι αναλύσεις πετρελαιοειδών, όπου η ανάλυση πετρελαιοκηλίδας μπορεί να οδηγήσει στο υπεύθυνο για τη ρύπανση πλοίο, φυσικών



προϊόντων, βιολογικών δειγμάτων, τροφίμων, αιθέριων ελαίων, εντομοκτόνων, παρασιτοκτόνων, στεροειδών ορμονών, ναρκωτικών, λιπασμάτων, πλαστικών, αλκοολούχων ποτών, συνθετικών απορρυπαντικών, αναλύσεις για τον έλεγχο της μόλυνσης του περιβάλλοντος, για τη μελέτη της μετακίνησης αερίων μαζών στη Μετεωρολογία, για την εξερεύνηση της ατμόσφαιρας πλανητών.

Για την υπερνίκηση δυσκολιών, που παρουσιάζονται κατά την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων με τη GLC, αυτή συχνά συνδυάζεται με άλλες τεχνικές ανάλυσης, π.χ. χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, φασματοφωτομετρία, φασματομετρία μαζών κλπ. Ο συνδυασμός γίνεται, είτε με ανάλυση των εκλουσμάτων που συλλέγονται, είτε με απ' ευθείας σύνδεση του αεριοχρωματογράφου με το όργανο της βοηθητικής αναλυτικής τεχνικής. Οι συνδυασμένες τεχνικές (hyphenated techniques), παρέχουν αναλυτικά συστήματα εξαιρετικής εκλεκτικότητας και αξιοπιστίας, που αποτελούν σήμερα τις παραδεκτές τεχνικές στην ανάλυση ναρκωτικών και ελέγχου doping, είναι όμως υψηλού κόστους. Τα κυριότερα απ' αυτά είναι ο αεριοχρωματογράφος - φασματόμετρο μαζών (GLC-MS) και ο αεριοχρωματογράφος - φασματοφωτόμετρο υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (GLC-FTIR).

Η GLC έχει μεγάλη εφαρμογή στη Φαρμακευτική ανάλυση για τον έλεγχο καθαρότητας φαρμακευτικών πρώτων υλών. Με την προϋπόθεση ότι εκλούνται και ανιχνεύονται όλα τα συστατικά του δείγματος, που εισάγεται στον αεριοχρωματογράφο, η συνολική επιφάνεια της κύριας και των δευτερευουσών κορυφών αντιστοιχεί στο 100%. Η καθαρότητα του δείγματος μπορεί να υπολογισθεί από τη σύγκριση των σχετικών εμβαδών των κορυφών, με την προϋπόθεση ότι η απόκριση του ανιχνευτή είναι παρόμοια για όλα τα συστατικά (πράγμα που ισχύει συνήθως για συγγενείς ουσίες). Οι κρυσταλλικές πρώτες ύλες ελέγχονται επίσης με τη GLC για την παρουσία υπολειμμάτων διαλυτών, που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον καθαρισμό τους με ανακρυστάλλωση. Φαρμακευτικές ουσίες, που υπάρχουν σε γεωμετρικά ή οπτικά ισομερή, μπορούν να ελεγχθούν ως προς τη σχετική περιεκτικότητά τους στα ισομερή, συνήθως μετά από παρασκευή πτητικών παραγώγων. Η GLC χρησιμοποιείται επίσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό φαρμάκων σε σκευάσματα με το πλεονέκτημα, ότι σε περίπτωση διάσπασης του δραστικού συστατικού, τα προϊόντα διάσπασης διαχωρίζονται από το μητρικό συστατικό και ανιχνεύονται [6].

#### 4.6.2 Χρωματογραφία Αερίου - Στερεού (GSC)

Στην αέρια - στερεή χρωματογραφία, χρησιμοποιείται αέρια κινητή φάση με στερεή στατική φάση. Στη GSC ο διαχωρισμός οφείλεται σε προσρόφηση ή μοριακό αποκλεισμό των συστατικών του μείγματος στη στατική φάση. Οι εφαρμογές της χρωματογραφίας αερίου-στερεού είναι περιορισμένες λόγω της σχεδόν μόνιμης κατακράτησης δραστικών ή πολικών μορίων και της έντονης εμφάνισης ουράς στις κορυφές έκλουσης. Για το λόγο αυτό, η τεχνική αυτή δε χρησιμοποιείται συχνά εκτός από τις περιπτώσεις διαχωρισμών ορισμένων αερίων μικρής σχετικής μοριακής μάζας.

Η χρωματογραφία αερίου στερεού βασίζεται στην προσρόφηση αερίων ενώσεων σε στερεές επιφάνειες. Οι συντελεστές κατανομής είναι γενικά πολύ μεγαλύτεροι από εκείνους της χρωματογραφίας αερίου-υγρού. Συνεπώς η χρωματογραφία αερίου-στερεού είναι χρήσιμη για το διαχωρισμό ουσιών που δεν κατακρατούνται σε στήλες αερίου-υγρού

όπως είναι τα συστατικά του αέρα το υδρόθειο ο διθειάνθρακας τα οξειδία του αζώτου, το μονοξείδιο του άνθρακα, το διοξείδιο του άνθρακα και τα ευγενή αέρια.

Η χρωματογραφία αερίου στερεού πραγματοποιείται με πληρωμένες στήλες και με στήλες ανοικτού σωλήνα. Στις τελευταίες μια λεπτή στιβάδα προσροφητή προσφύεται στα εσωτερικά τοιχώματα του τριχοειδούς. Οι στήλες αυτές συχνά αναφέρονται ως στήλες ανοικτού σωλήνα με πορώδη στιβάδα. Χρησιμοποιούνται δυο τύποι προσροφητών τα μοριακά κόσκινα και τα πορώδη πολυμερή.

Τα μοριακά κόσκινα είναι αργιλλοπυριτικοί ιονανταλλάκτες των οποίων το μέγεθος πόρου εξαρτάται από το είδος του κατιόντος. Τα κόσκινα ταξινομούνται ανάλογα με τη μέγιστη διάμετρο μορίου που μπορεί να διεισδύσει στους πόρους τους. Τα εμπορικά μοριακά κόσκινα διαθέτουν πόρους 4, 5, 10 και 13 Å. Μόρια με μικρότερες διαστάσεις διεισδύουν στο εσωτερικό των σωματιδίων, όπου και προσροφούνται. Για τα μόρια αυτά η επιφάνεια είναι τεραστία σε σύγκριση με αυτήν που διατίθεται για μεγαλύτερα μόρια. Επομένως τα μοριακά κόσκινα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαχωριστούν τα μικρά από τα μεγάλα μόρια.

Σφαιρίδια ομοιόμορφου μεγέθους από πορώδες πολυμερές παρασκευάζονται με διασταυρωμένο συμπολυμερισμό στυρολίου-διβινυλοβενζολίου. Το μέγεθος του πόρου είναι ομοιόμορφο και ελέγχεται από το βαθμό διασταύρωσης. Τα πορώδη πολυμερή χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, όπως υδρόθειο, οξειδία αζώτου, ύδωρ, διοξείδιο του άνθρακα, μεθανόλη και βινυλοχλωρίδιο [2].

#### 4.7 Υγρή Χρωματογραφία Στήλης

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης ή απλώς υγρή χρωματογραφία (LC), η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη, ενώ η κινητή φάση είναι υγρό (Πίνακας 1.2-1). Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση πετυχαίνεται λόγω βαρύτητας ή με τη χρησιμοποίηση αντλιών χαμηλής πίεσεως, όταν η στατική φάση αποτελείται από σχετικώς μεγάλης διαμέτρου σωματίδια, που παρουσιάζουν μικρή αντίσταση (κλασσική υγρή χρωματογραφία στήλης), είτε με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσεως, όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου, και επομένως μεγάλης αντίστασης, σωματίδια υψηλής διαχωριστικής αποδόσεως (υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Η HPLC είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό και την ανάλυση μειγμάτων μοριακών ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών, καθώς και θερμικά ασταθών ενώσεων, που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπασθούν. Η κλασσική υγρή χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται κυρίως για διαχωρισμούς και σπανιότερα για ποσοτικούς προσδιορισμούς μικρής σχετικώς ακρίβειας, ενώ η HPLC είναι σήμερα η περισσότερο χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική για την ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων.

Τα όργανα που απαιτούνται για τη διεξαγωγή κλασσικής υγρής χρωματογραφίας στήλης, είναι πολύ απλά και χαμηλού κόστους. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν υάλινοι ή πλαστικοί σωλήνες, προχοϊδες, ή ειδικά κατασκευασμένοι σωλήνες χωρίς κενούς χώρους συνδέσεως και με δυνατότητα ελέγχου της θερμοκρασίας. Οι διαστάσεις των στηλών

ποικίλλουν, με διάμετρο από μερικά mm έως λίγα cm, και μήκος από μερικά cm έως λίγα m. Για δεδομένο βάρος πληρωτικού υλικού, η απόδοση είναι μεγαλύτερη με τη χρησιμοποίηση στήλης μικρής διαμέτρου και μεγάλου μήκους, παρά μεγάλης διαμέτρου και μικρού μήκους, η ταχύτητα ροής όμως της κινητής φάσεως μειώνεται, εάν το μήκος γίνει υπερβολικά μεγάλο.

Το δείγμα μπορεί να εφαρμοστεί στη στήλη, είτε στην κινητή φάση, διαλυτοποιείται σε ένα από τους διαλύτες της κινητής φάσης και ένα τμήμα του διαλύματος, που προκύπτει, προστίθεται με σιφόνιο στο άνω μέρος της στήλης, είτε στη στατική φάση, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για υδατικό διάλυμα, αναμειγνύεται με κατάλληλη ποσότητα στερεού προσροφητικού υλικού και το μείγμα τοποθετείται ως λεπτή ζώνη στην κορυφή της στήλης.

Η ροή της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη πετυχαίνεται συνήθως με σιφωνισμό του διαλύτη από μία δεξαμενή, που βρίσκεται υψηλότερα από τη στήλη. Η κατάλληλη ταχύτητα ροής εξαρτάται από τη διάμετρο της στήλης και την επιδιωκόμενη διαχωριστικότητα, η οποία μεγιστοποιείται με πολύ μικρές ταχύτητες ροής. Η ταχύτητα ροής ελέγχεται από την υδροστατική πίεση μεταξύ της επιφάνειας του υγρού στην αποθήκη της κινητής φάσης και του σημείου εκροής από τη στήλη. Για τον καλύτερο έλεγχο της ταχύτητας ροής, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν περισταλτικές αντλίες χαμηλής πίεσεως. Οι σωλήνες, που χρησιμοποιούνται για τη διαβίβαση της κινητής φάσης, γίνονται συχνά πηγές μόλυνσης, εξαιτίας των πλαστικοποιητών που περιέχουν, και διαλύονται από τους οργανικούς διαλύτες.

Το έκλουσμα συλλέγεται συνήθως σε κλασματοσυλλέκτη, που προγραμματίζεται για τη συλλογή ορισμένου όγκου εκλούσματος σε κάθε σωλήνα. Η ανάλυση των κλασμάτων, που συλλέγονται, μπορεί στη συνέχεια να γίνει με διάφορες αναλυτικές τεχνικές, ανάλογα με την ποσότητα κάθε κλάσματος και την περιοχή συγκεντρώσεων των διαχωριζόμενων ουσιών. Συχνά πριν από την έξοδο του εκλούσματος στον κλασματοσυλλέκτη, αυτό οδηγείται σε κυψελίδα ροής φασματοφωτομέτρου και καταγράφεται η απορρόφηση στο υπεριώδες (UV). Έτσι είναι εύκολη η συσχέτιση των κορυφών απορρόφησης με τα αντίστοιχα κλάσματα του εκλούσματος και η κατασκευή χρωματογραφήματος. Στην περίπτωση αυτή, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η απορρόφηση της κινητής φάσης.

Η κλασική υγρή χρωματογραφία στήλης δε χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στην ποσοτική ανάλυση, εξαιτίας της ανάπτυξης της HPLC που είναι περισσότερο αποδοτική. Χρησιμοποιείται όμως ευρέως και αποτελεσματικά στην προκατεργασία πολύπλοκων δειγμάτων, όπως τα βιολογικά υγρά, τα οποία χρειάζονται προκαταρκτικό διαχωρισμό, πριν αναλυθούν με μία ενόργανη αναλυτική τεχνική. Στον τομέα αυτό, η κλασική υγρή χρωματογραφία στήλης συναγωνίζεται την τεχνική εκχύλισης.

Οι χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού, που λαμβάνουν χώρα στην υγρή χρωματογραφία στήλης και με βάση τους οποίους μπορούν να ταξινομηθούν τα διάφορα είδη υγρής χρωματογραφίας είναι η προσρόφηση, η κατανομή, η ιονανταλλαγή, ο μοριακός αποκλεισμός και η συγγένεια [2].

#### 4.7.1 Υγρή - Στερεή Χρωματογραφία Προσρόφησης Στήλης

Η προσρόφηση των συστατικών ενός μείγματος από την επιφάνεια ενός προσροφητικού υλικού βασίζεται στο γεγονός, ότι τα άτομα, ιόντα ή μόρια, που αποτελούν την επιφάνεια

του υλικού, λόγω της απουσίας της προστατευτικής δομής που υπάρχει στο εσωτερικό του, παρουσιάζουν αυξημένη ενέργεια, που προσδίδει επιφανειακή ενεργότητα στο υλικό. Οι δυνάμεις προσρόφησης μπορεί να είναι ηλεκτροστατικές (ιονικές), διπόλου-διπόλου, διπόλου-επαγομένου διπόλου, δυνάμεις London ή συνδυασμός των δυνάμεων αυτών. Το προσροφητικό υλικό πρέπει να έχει μεγάλο εμβαδό επιφάνειας, που να διαθέτει μεγάλο αριθμό χημικώς ενεργών κέντρων.

Η ταχύτητα μετακίνησης ενός συστατικού στη στήλη είναι συνάρτηση του γραμμομοριακού κλάσματος του στην κινητή φάση. Καθώς η ζώνη του δείγματος διευρύνεται, δημιουργείται στο κέντρο της μία περιοχή μεγαλύτερης συγκεντρώσεως απ' ό,τι στα άκρα, που οδηγεί, στην εμφάνιση μιας κορυφής με απότομη άνοδο και βραδεία κάθοδο (κορυφή με ουρά). Η ασύμμετρη αυτή διεύρυνση είναι ανεπιθύμητη και αποφεύγεται με μερική απενεργοποίηση της επιφάνειας του προσροφητικού, με ανύψωση της θερμοκρασίας, και κυρίως με μείωση της ποσότητας του δείγματος.

Στη χρωματογραφία προσρόφησης, η στήλη πληρώνεται είτε με ξηρό υλικό, είτε με ρευστή ομογενή μάζα, που σχηματίζει το υλικό με την κινητή φάση που θα χρησιμοποιηθεί. Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο υλικό για την παρασκευή στατικής φάσης προσρόφησης είναι η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (Silica gel,  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ). Το μέγεθος των πόρων, η ενεργή επιφάνεια και το pH της επιφάνειας της στατικής φάσης εξαρτώνται από τις συνθήκες παρασκευής της. Η πηκτή διοξειδίου του πυριτίου είναι ασθενώς όξινη και εξαιτίας αυτού, αλληλεπιδρά ισχυρά με βασικά συστατικά. Ένα άλλο κοινό προσροφητικό υλικό είναι το τριοξείδιο του αργιλίου (alumina,  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ), που ενεργοποιείται με πύρωση στους 1100 °C. Το ενεργοποιημένο τριοξείδιο του αργιλίου είναι ασθενώς βασικό και συμπεριφέρεται σαν να έχει διαφορετικά ενεργά κέντρα. Επίσης χρησιμοποιούνται σπανιότερα η κυτταρίνη, (για υψηλής πολικότητας ουσίες, που δεν μπορούν να εκλουσθούν από στατική φάση πηκτής διοξειδίου του πυριτίου ή  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), ο ενεργοποιημένος ξυλάνθρακας, το ένυδρο οξείδιο του μαγνησίου (magnesia,  $\text{MgO} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , ιδιαίτερα χρήσιμο για ολεφίνες και αρωματικές ενώσεις) και το συγκαθίζημα διοξειδίου του πυριτίου και οξειδίου του μαγνησίου.

Η κινητή φάση (διαλύτης) στη χρωματογραφία προσρόφησης στήλης ανταγωνίζεται τα συστατικά του μείγματος στην κατάληψη των θέσεων προσρόφησης της στατικής φάσης. Η σχετική ικανότητα έκλυσης μιας ουσίας από τη στήλη, που παρουσιάζουν οι διάφοροι διαλύτες, αποδεικνύεται πρακτικώς ανεξάρτητη από την ουσία, και επομένως η έκλυση είναι περισσότερο αποτέλεσμα εκτόπισης της ουσίας από το προσροφητικό υλικό της στατικής φάσης παρά της κατανομής της ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί βαθμιδωτή έκλυση, η ρευστή μάζα παρασκευάζεται με το λιγότερο πολικό διαλύτη [1].

#### 4.7.2 Υγρή - Υγρή Χρωματογραφία Κατανομής Στήλης

Στη χρωματογραφία κατανομής, η υγρή στατική φάση εξαναγκάζεται να προσροφηθεί στην επιφάνεια των σωματιδίων του υλικού στήριξης, με αποτέλεσμα τον αποδοτικότερο διαχωρισμό τους και ακολούθως διασπείρεται στην κινητή φάση. Στη χρωματογραφία κατανομής, το στερεό υλικό της στήλης λειτουργεί αποκλειστικά ως υλικό στήριξης μιας λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσης, η οποία συνήθως είναι πολικού χαρακτήρα, π.χ. νερό ή υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, ενώ η κινητή φάση είναι ένας οργανικός διαλύτης

χαμηλής πολικότητας. Οι δύο υγρές φάσεις πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία και αυτό πετυχαίνεται, με ανατάραξή τους σε διαχωριστική χοάνη και άφεσή τους προς διαχωρισμό. Η υδατική στιβάδα χρησιμοποιείται για τη διαβροχή του στερεού υλικού στήριξης, το οποίο ακολούθως χρησιμοποιείται για την ομοιόμορφη και συμπαγή πλήρωση της στήλης. Η οργανική στιβάδα χρησιμοποιείται ως κινητή φάση. Η εκλογή του ζεύγους των δύο διαλυτών, οι οποίοι πρέπει να είναι μη αναμειξίμοι γίνεται με βάση τη διαλυτότητα των προς διαχωρισμό ουσιών σε αυτούς.

Ως υλικά στήριξης χρησιμοποιούνται συνήθως η πηκτική διοξειδίου του πυριτίου, η οποία έχει την ικανότητα να συγκρατεί σημαντικές ποσότητες ύδατος με διατήρηση της κοκκώδους μορφής της, και η κυτταρίνη. Στην περίπτωση της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, ως υλικό στήριξης χρησιμοποιείται γη διατόμων, ή κονιοποιημένο ελαστικό καλυμμένο με βενζόλιο, ως στατική φάση χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης και ως κινητή φάση υδατικό διάλυμα.

Η χρωματογραφία κατανομής στήλης πλεονεκτεί έναντι της χρωματογραφίας προσρόφησης στο ότι ο συντελεστής κατανομής παραμένει σταθερός σε ευρύτερη περιοχή συγκεντρώσεων, οι κορυφές που λαμβάνονται είναι οξύτερες και συμμετρικότερες, και μπορεί να γίνει πρόβλεψη των αποτελεσμάτων του διαχωρισμού από δεδομένα διαλυτότητας [1].

#### 4.7.3 Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής Στήλης

Στις χρωματογραφίες ιονανταλλαγής, όπου συνήθως χρησιμοποιούνται ρητίνες ή πηκτές πολυμερών, η πλήρωση γίνεται με απόχυση των διαβρεγμένων υλικών (με ύδωρ ή άλλο διαλύτη) μέσα στο σωλήνα, που είναι γεμάτος με τον ίδιο διαλύτη και αναμονή για την κατακάθιση των σωματιδίων. Επειδή τα υλικά αυτά διογκώνονται σημαντικά με την προσρόφηση διαλύτη, ουδέποτε γίνεται πλήρωση της στήλης με ξηρό υλικό. Κατά την ανάμειξη της ξηρής πηκτής με κάποιο διαλύτη, αυτή διασπείρεται βραδέως στην επιφάνεια του διαλύτη και αφήνεται να κατακαθήσει με ήπια ανατάραξη, χρησιμοποιώντας υάλινη ράβδο. Ουδέποτε χρησιμοποιείται μαγνητική ανάδευση, γιατί υπάρχει κίνδυνος θραύσης και καταστροφής των σωματιδίων της πηκτής. Στη χρωματογραφία ιονανταλλαγής στήλης εφαρμόζεται συνήθως βαθμιδωτή έκλυση με αλλαγή της ιονικής ισχύος ή του pH ή της σύστασης της κινητής φάσης χρησιμοποιώντας ειδικά συστήματα ανάμειξης κινητής φάσης. Ειδικά συστήματα παροχής κινητής φάσης, που διαθέτουν αντλίες, βαλβίδες ελέγχου ροής και χρονοδιακόπτες ή μικροϋπολογιστή, μπορούν να πετύχουν οποιοδήποτε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης [1].

#### 4.7.4 Υγρή Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού

Στην υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, τα μόρια των συστατικών (συνήθως μεγαλομόρια) ενός μείγματος, μετακινούνται με τη βοήθεια μιας υγρής κινητής φάσης μέσα από το πορώδες δίκτυο της στατικής φάσης, διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, χωρίς άλλη αλληλεπίδραση, σε ιδανικές συνθήκες, με τη στατική φάση. Ανόργανα (φυσικοί και συνθετικοί ζεόλιθοι) και οργανικά (μη ιονικά διακλαδούμενα πολυμερή) υλικά σχηματίζουν ένα δικτυωτό σύμπλεγμα μοριακών διαστάσεων, με μέγεθος πόρων που βρίσκεται μέσα

σε μία ορισμένη περιοχή τιμών. Το δικτυωτό αυτό σύμπλεγμα, λειτουργώντας ως μοριακό κόσκινο, επιτρέπει την είσοδο στο εσωτερικό του μόνο των ιόντων και μορίων, που έχουν μέγεθος μικρότερο από το μέγεθος των πόρων του. Ουσίες μεγαλύτερου μεγέθους αποκλείονται από το να εισέλθουν στο δίκτυο και παρασυρόμενες από την κινητή φάση εκλύονται πρώτες. Οι υπόλοιπες ουσίες, ανάλογα με το μέγεθός τους, περιπλανώνται λιγότερο ή περισσότερο στο δικτυωτό σύμπλεγμα της στατικής φάσης και εκλύονται κατά σειρά μεγέθους.

Στις χρωματογραφίες μοριακού αποκλεισμού όπως και στις χρωματογραφίες ιονανταλλαγής, η πλήρωση γίνεται με απόχυση των διαβρεγμένων υλικών (με νερό ή άλλο διαλύτη) μέσα στο σωλήνα, που είναι γεμάτος με τον ίδιο διαλύτη και αναμονή για την κατακάλυψη των σωματιδίων. Ως στατικές φάσεις χρησιμοποιούνται κυρίως υδρόφιλες πηκτές (γέλες, gels) ή του πολυακρυλαμιδίου, σε συνδυασμό με υδατική κινητή φάση. Η τεχνική αυτή λέγεται και διήθηση πηκτής (gel filtration). Στο εμπόριο διατίθενται υλικά παρασκευής πηκτών με ποικιλία μεγέθους πόρων, που καθορίζει και την περιοχή σχετικών μοριακών μαζών των ουσιών για αποδοτικό διαχωρισμό.

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού μοιάζει με τη χρωματογραφία κατανομής και μία άλλη ερμηνεία του διαχωρισμού, που πετυχαίνεται, είναι η θεώρηση ότι τα μεγάλα μόρια δαπανούν όλο το χρόνο τους στην κινητή φάση, ενώ τα μικρά μόρια μόνο για μικρό κλάσμα του χρόνου τους βρίσκονται στην κινητή φάση.

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μειγμάτων μεγαλομοριακών ουσιών, όπως πρωτεϊνών, πεπτιδίων, νουκλεϊνικών οξέων, πολυσακχαριτών, ενζύμων, ορμονών, κλπ. Η ικανότητα των πηκτών μοριακού αποκλεισμού να κατακρατούν ουσίες μικρής σχετικής μοριακής μάζας όπως άλατα και διάφορα μικρομόρια αξιοποιείται στην αφαλάτωση (desalting) διαλυμάτων μακρομορίων, που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση μικρομοριακών αντιδραστηρίων και προϊόντων από μεγαλομόρια, μετά από κάποια χημική αντίδραση ή στάδιο καθαρισμού, ή για την αλλαγή των συστατικών ρυθμιστικού διαλύματος μεγαλομορίων. Τέλος, αραιά διαλύματα μεγαλομορίων μπορούν να συμπυκνωθούν χρησιμοποιώντας ξηρή πηκτή στη στήλη [1].

#### 4.7.5 Χρωματογραφία Συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας, που εκτελείται κυρίως ως κλασική χρωματογραφία στήλης, αποτελεί τη νεώτερη και δυναμικότερη ανάπτυξη στις τεχνικές διαχωρισμού. Βασίζεται στην εξειδικευμένη αλληλεπίδραση μεταξύ μιας ουσίας, που ακινητοποιείται με ομοιοπολική σύνδεση σε στερεό φορέα της στήλης και ενός μόνο συστατικού από ένα πολύπλοκο μείγμα. Όταν το διάλυμα του μείγματος διαβιβασθεί μέσα από τη στήλη, θα κατακρατηθεί μόνο το ένα συστατικό, εξαιτίας της εξειδικευμένης αντίδρασής του με τη στατική φάση. Μετά την έξοδο των άλλων συστατικών από τη στήλη, το συστατικό, που έχει συγκρατηθεί, εκλύεται με προσθήκη υγρού, που αλλάζει τις συνθήκες έτσι, ώστε να εξασθενήσει η σύνδεση του συστατικού στη στήλη. Η τεχνική βρίσκει εφαρμογή σε διαχωρισμούς (καθαρισμούς) ουσιών βιοχημικού ενδιαφέροντος, οι οποίες συμμετέχουν σε γνωστές εξειδικευμένες αντιδράσεις, όπως ενζύμου με το υπόστρωμα ή το συνένζυμό του, αντισώματος με το αντιγόνο του, ορμόνης με τον υποδοχέα της. Είναι ακόμη δυνατός και ο

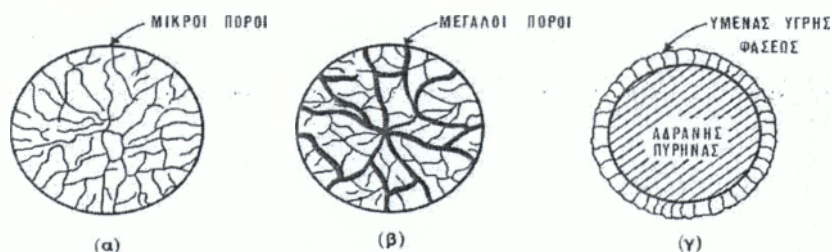
διαχωρισμός κυττάρων [1].

#### 4.7.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η κλασική υγρή χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιεί στήλες σχετικά μεγάλης διαμέτρου, πληρωμένες με μεγάλης διαμέτρου σωματίδια πληρωτικού υλικού, και μικρές ταχύτητες ροής της κινητής φάσης, που πετυχαίνονται λόγω βαρύτητας ή με τη χρησιμοποίηση αντλιών χαμηλής πίεσης. Ως εκ τούτου, ο χρόνος που απαιτείται για ένα διαχωρισμό είναι συχνά της τάξης των μερικών ωρών και τα συλλεγόμενα κλάσματα πρέπει συνήθως να αναλυθούν ξεχωριστά, αυξάνοντας σημαντικά το συνολικό χρόνο της ανάλυσης.

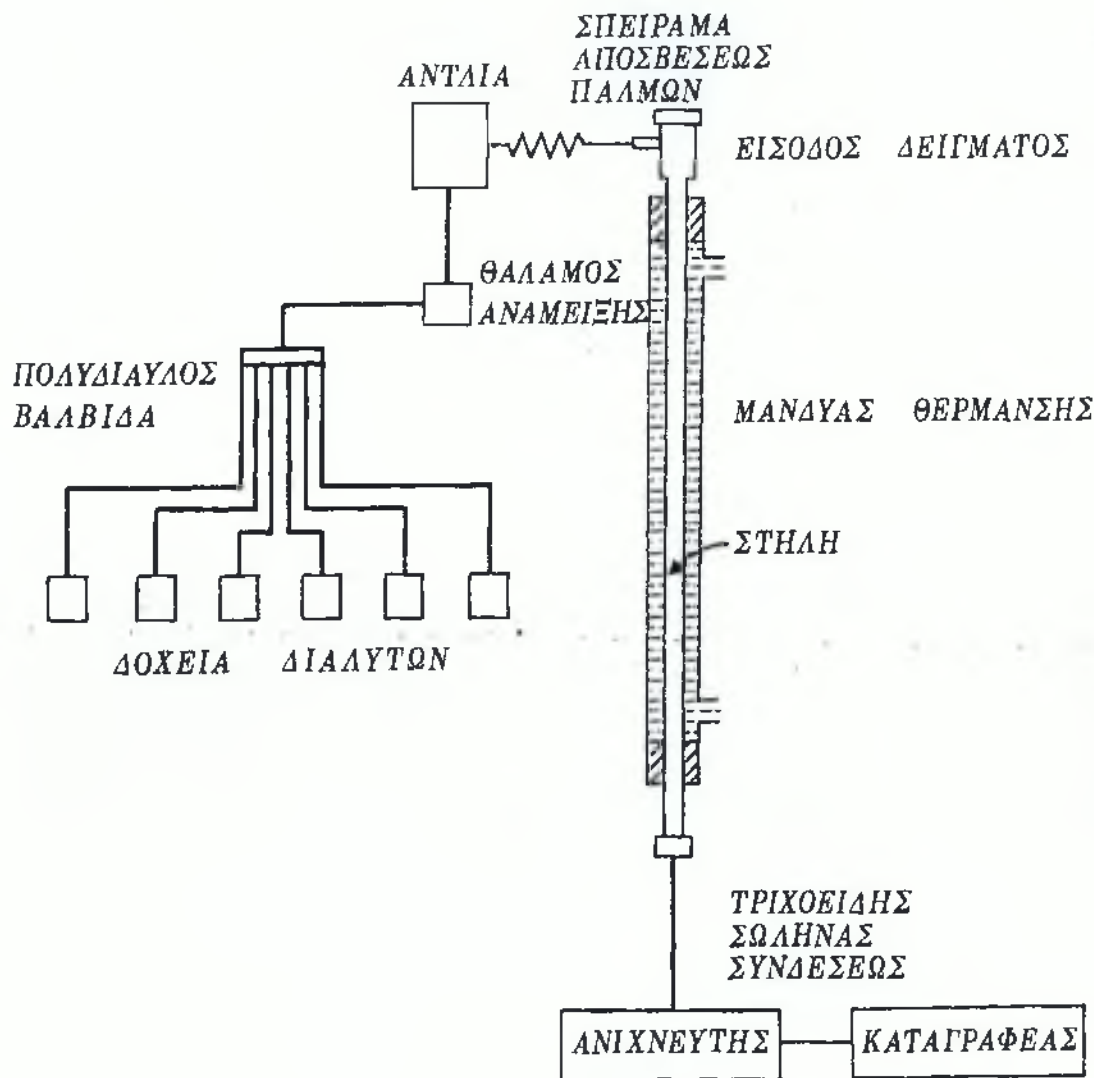
Η ανάπτυξη της αέριας χρωματογραφίας, οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνικής και των συστημάτων για υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), που επιτρέπει αποδοτικούς διαχωρισμούς και μετρήσεις σε λίγα λεπτά. Στην κλασική υγρή χρωματογραφία στήλης, η ταχύτητα μερισμού των συστατικών του μείγματος μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης εξαρτάται κυρίως από τη διάχυση. Η διάχυση όμως στα υγρά είναι εξαιρετικά αργή, συγκρινόμενη με αυτή στα αέρια, και για την ελαχιστοποίηση του χρόνου, που απαιτείται για τη μετακίνηση των συστατικών του μείγματος από και προς τις θέσεις αλληλεπιδράσεως της στατικής φάσης, πρέπει να τηρούνται δύο προϋποθέσεις. Πρώτον, το υλικό πλήρωσης της στήλης να είναι λεπτότατου διαμερισμού (σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου) και να έχει υψηλή σφαιρική κανονικότητα έτσι, ώστε να πετυχαίνονται μεγάλου βαθμού ομοιομορφία και πυκνότητα πλήρωσης. Δεύτερον, σε περιπτώσεις διαχωρισμών κατανομής, η υγρή στατική φάση να είναι της μορφής λεπτότατου ομοιόμορφου υμένα.

Έτσι η στήλη χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση και οι κορυφές που λαμβάνονται είναι μικρού εύρους και μεγάλου ύψους, δηλαδή κατάλληλες για ποσοτική ανάλυση. Η υψηλή πυκνότητα πλήρωσεως όμως με αυτά τα πολύ μικρά σωματίδια μειώνει την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη (μεγάλη αντίσταση μεταφοράς) και για να επιτευχθεί μία λογική ταχύτητα ροής απαιτείται η εφαρμογή υψηλής πίεσης στην κινητή φάση. Τα τελευταία χρόνια έγινε δυνατή η παρασκευή και διάθεση στο εμπόριο υλικών στήριξης ή πληρωτικών υλικών στήλης που πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις για διαχωρισμούς υψηλής απόδοσης. Γενικά υπάρχουν τρεις τύποι σωματιδίων που χρησιμοποιούνται ως πληρωτικά υλικά στην HPLC (Σχήμα 4.7.6-1). Τα υμενοειδή σωματίδια πετυχαίνουν υψηλή διαχωριστικότητα αλλά έχουν μικρή χωρητικότητα και έτσι πρέπει να χρησιμοποιούνται με μικρούς όγκους δείγματος και ανιχνευτές υψηλής ευαισθησίας [1].



Σχήμα 4.7.6-1. Τύποι πληρωτικών υλικών της HPLC (α) μικροπορώδη (β) μακροπορώδη (γ) υμενοειδή σωματίδια

Στο σχήμα (4.7.6-2) φαίνονται τα βασικά τμήματα μίας συσκευής HPLC που περιγράφονται στη συνέχεια.



Σχήμα 4.7.6-2. Βασικά τμήματα χρωματογράφου HPLC

**Σύστημα παροχής κινητής φάσης.** Αποτελείται από μία αντλία υψηλής πίεσης και συνήθως ένα σύστημα για τη βαθμιαία αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης. Για την επίτευξη της βαθμιδωτής έκλουσης, απαιτείται μονάδα προγραμματισμού και ελέγχου του συστήματος παροχής, που συνήθως ελέγχεται από ένα μικροϋπολογιστή. Τα δοχεία αποθηκεύσεως διαλυτών πληρώνονται με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας με την προϋπόθεση ότι είναι αναμειγμοί ή διαλύματα διαφορετικού pH ή διαφορετικής ιονικής ισχύος ή συγκέντρωσης κάποιου άλατος, ανάλογα με το είδος του επιδιωκόμενου μηχανισμού διαχωρισμού, και αναμειγνύονται στο θάλαμο αναμείξεως πριν την προώθησή τους από την αντλία. Οι



διαλύτες πρέπει να είναι καθαροί και να απαερώνονται. Επειδή κατά τη λειτουργία της αντλίας δημιουργούνται παλμοί ροής, που διαταράσσουν τη σταθερότητα του χρωματογραφήματος, παρεμβάλλεται μία συσκευή αποσβέσεως των παλμών για την εξομάλυνση του καταγραφήματος [1].

**Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector).** Συνήθως είναι μία περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης, με βρόχο δείγματος. Αποτελείται από ένα ακίνητο χαλύβδινο κύλινδρο με 6 διαύλους, από τους οποίους ο ένας οδηγεί στη στήλη. Στη θέση «φόρτωσης», η κινητή φάση προωθείται προς τη στήλη, ενώ με τη βοήθεια σύριγγας πληρώνεται ο βρόχος δείγματος με το προς ανάλυση διάλυμα του δείγματος. Με το σύστημα αυτό δείγματα όγκου ολίγων  $\mu\text{L}$  εισάγονται με ακρίβεια και επαναληπτικότητα σε πιέσεις μέχρι και 41 MPa.

**Στήλες.** Ευθύγραμμοι σωλήνες από χάλυβα αποτελούν ιδανικές στήλες για την HPLC που συνήθως αγοράζονται έτοιμες από τις διάφορες παρασκευάστριες εταιρείες. Για την αποφυγή συχνής αλλαγής στήλης όταν εκτελούνται διαφορετικές αναλυτικές μέθοδοι με το ίδιο σύστημα HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια συσκευή που αποτελείται από μια περιστρεφόμενη βαλβίδα έξι διαύλων στους οποίους μπορούν να συνδεθούν διαφορετικές στήλες. Η τεχνική HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμούς βασισμένους σε προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή και μοριακό αποκλεισμό και για κάθε μια εφαρμογή διατίθενται από διάφορες παρασκευάστριες εταιρείες οι κατάλληλες στήλες.

Η παρασκευή των στηλών είναι ένα πολύ κρίσιμο στάδιο για την καλή απόδοση της τεχνικής. Τα υλικά στήριξης ξηραίνονται πριν από την επικάλυψη τους με την υγρή στατική φάση ενώ τα στερεά υλικά προσρόφησης ενεργοποιούνται με πύρωση. Για την ελαχιστοποίηση των λιμναζόντων χώρων στη στήλη απαιτείται άριστη πλήρωση της. Επειδή η κινητή φάση μπορεί να διαλύει μερικώς την υγρή στατική φάση, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία καταστροφή της, συνήθως παρεμβάλλεται μία μικρή στήλη πριν από την κύρια στήλη, πληρωμένη με το ίδιο υλικό (προστήλη). Έτσι η κινητή φάση φθάνει στην κύρια στήλη κορεσμένη με την υγρή στατική φάση. Η προστήλη επίσης προστατεύει την κύρια στήλη από ακαθαρσίες που προσροφούνται. Η υψηλή πίεση και οι μεγάλες ταχύτητες ροής, που χρησιμοποιούνται στην HPLC, προκαλούν μερικές φορές μηχανική απομάκρυνση μέρους της υγρής στατικής φάσης από το υλικό στήριξης. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, αναπτύχθηκαν υλικά πλήρωσης, κυρίως μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου, με χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις (chemically bonded stationary phases), που αποτελούν και τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη μορφή στατικής φάσης στην HPLC [1].

**Ανιχνευτές.** Ο ανιχνευτής στην HPLC, όπως και στη GLC είναι κρίσιμο στοιχείο του συστήματος, γιατί κάνει ορατό το διαχωρισμό που γίνεται στη στήλη και επιτρέπει την αξιοποίησή του στην ανάλυση. Οι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην HPLC είναι οι παρακάτω:

- Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους
- Συστοιχίας διόδων
- Αγωγιμομετρικοί
- Δείκτης διάθλασης

- Φασματογράφοι μάζας
- Ηλεκτροχημικοί
- Φθορισμομετρικοί
- Ραδιενέργειας
- Σκεδασμού φωτός
- Φλόγας (ιονισμού φλόγας, εκπομπής, φωτομετρικοί ανιχνευτές)

Η σύγχρονη ερευνητική προσπάθεια στην HPLC επικεντρώνεται, μεταξύ των άλλων, στην αύξηση της ευαισθησίας κατά την ανίχνευση των διαχωριζόμενων συστατικών. Μία αποτελεσματική τεχνική για το σκοπό αυτόν είναι ο σχηματισμός παραγώγων των προς διαχωρισμό συστατικών, με ειδικά αντιδραστήρια, τα οποία παράγωγα μπορούν να ανιχνευθούν από τους ανιχνευτές σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Με την τεχνική αυτή επεκτείνεται σημαντικά η δυνατότητα εφαρμογής των ανιχνευτών υπεριώδους και φθορισμού [1].

**Καταγραφέας.** Αποτελεί το φθηνότερο και απλούστερο τρόπο παρουσίασης του χρωματογραφήματος και πρέπει να χαρακτηρίζεται από ταχεία απόκριση και να έχει τη δυνατότητα επιλογής ενίσχυσης του σήματος. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC, αντί καταγραφέα ή παράλληλα με αυτόν, διαθέτουν μικροϋπολογιστές, οι οποίοι εκτός από τον έλεγχο λειτουργίας του συστήματος παροχής κινητής φάσης, αναλαμβάνουν τη συλλογή, αποθήκευση και επεξεργασία των σημάτων των ανιχνευτών, και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.

Τα περισσότερα μείγματα ουσιών μπορούν να διαχωριστούν και να αναλυθούν με την HPLC, αρκεί να επιλεγεί το κατάλληλο σύστημα στατικής και κινητής φάσης ή πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης. Σε γενικές γραμμές, επιδιώκεται η εύρεση συνθηκών, στις οποίες τα συστατικά ενός μείγματος συγκρατούνται σε κάποιο βαθμό στη στατική φάση, αλλά όχι πολύ ισχυρά. Αποδοτικός διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί μόνο εάν εξασφαλισθεί διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης των ζωνών των συστατικών, λόγω του διαφορετικού βαθμού συγκράτησής τους στη στατική φάση. Συχνά είναι αναγκαίο να εκτελεσθεί μία προκαταρκτική χρωματογραφική (ή με άλλη τεχνική) κλασμάτωση ενός μείγματος πολλών συστατικών και να ακολουθήσει ανάλυση κάθε κλάσματος με την HPLC.

Μετά την επιλογή της στατικής φάσης, πρέπει να εκλεγεί η κατάλληλη κινητή φάση. Δυστυχώς δεν υπάρχει φυσικοχημική παράμετρος, που να εκφράζει ποσοτικά την πολικότητα των διαλυτών, και αντί της πολικότητας λαμβάνονται υπόψη άλλες παράμετροι, όπως η διπολική ροπή, η διηλεκτρική σταθερά, οι ενέργειες ηλεκτρονικών μεταπτώσεων, οι ενέργειες προσρόφησης, οι ταχύτητες αντιδράσεων και οι διαλυτότητες. Παρόλα αυτά η πολικότητα αποτελεί μία χρήσιμη ποιοτική θεώρηση της αλληλεπιδράσεως του διαλύτη με τα διαχωριζόμενα συστατικά.

Ένα πρόβλημα, που εμφανίζεται στην υγρή-στερεή χρωματογραφία προσρόφησης, είναι η ανάγκη διατήρησης σταθερής δραστηριότητας ή προσροφητικής δύναμης, για επαναλήψιμη απόδοση της στήλης. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη μιας μικρής σταθερής ποσότητας ύδατος ή άλλου πολικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη) στη χαμηλής πολικότητας κινητή φάση. Ο πολικός διαλύτης (τροποποιητής) προσροφάται κατά προτίμηση στις

πλέον δραστικές θέσεις του προσροφητικού υλικού, μειώνοντας έτσι την προσροφητική του δύναμη.

Η HPLC αποτελεί σήμερα την τεχνική επιλογής σε πολλά προβλήματα φαρμακευτικής ανάλυσης, αφού τα δείγματα με τα οποία ασχολείται η φαρμακευτική ανάλυση είναι συνήθως μείγματα, όπως σκευάσματα. Επειδή οι περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες είναι μέσης σχετικής μοριακής μάζας και ενδιάμεσης πολικότητας, στη φαρμακευτική ανάλυση χρησιμοποιείται κυρίως η HPLC αντίστροφης φάσης, για μη ιονικές ουσίες, και η HPLC κατανομής με σχηματισμό ζεύγους ιόντων για ιονίσιμες ουσίες. Εκεί όμως που αξιοποιείται η ισχύς της τεχνικής, είναι η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, τα οποία περιέχουν τα φυσιολογικά συστατικά, τα χορηγούμενα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους, συνήθως σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Συνήθως πριν από την εισαγωγή του δείγματος στο χρωματογράφο προηγείται εκχύλιση, συνήθως στερεής φάσης, ή άλλη τεχνική προκαταρκτικού διαχωρισμού [1].

#### 4.8 Ιοντική Χρωματογραφία

Η ιοντική χρωματογραφία (Ion Chromatography, IC) είναι μία από τις νεώτερες και δυναμικότερες αναλυτικές τεχνικές, για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μείγματος ανόργανων και οργανικών ιόντων, που προήλθε από τον επιτυχή συνδυασμό της ιονανταλλαγής με την υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως και την αγωγιμομετρία. Αποτελεί μία σύγχρονη παραλλαγή της χρωματογραφίας ιονανταλλαγής υψηλής απόδοσης.

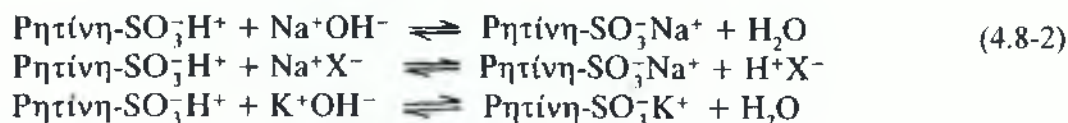
Στο σχήμα (4.8-1) φαίνεται σχηματική αναπαράσταση της βασικής αρχής της ιοντικής χρωματογραφίας για την ανάλυση μείγματος ανιόντων (KBr- KCl).

Το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στη στήλη διαχωρισμού (ανιονανταλλακτική ρητίνη μικρής χωρητικότητας) με ανταλλάξιμα ιόντα υδροξυλίου, του τύπου Ρητίνη-N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>OH<sup>-</sup> και με NaOH ως υγρό έκλουσης. Τα ανιόντα X<sup>-</sup> (Cl<sup>-</sup> και Br<sup>-</sup>) ανταλλάσσονται με τα ιόντα υδροξυλίου της ρητίνης σύμφωνα με την αντίδραση:



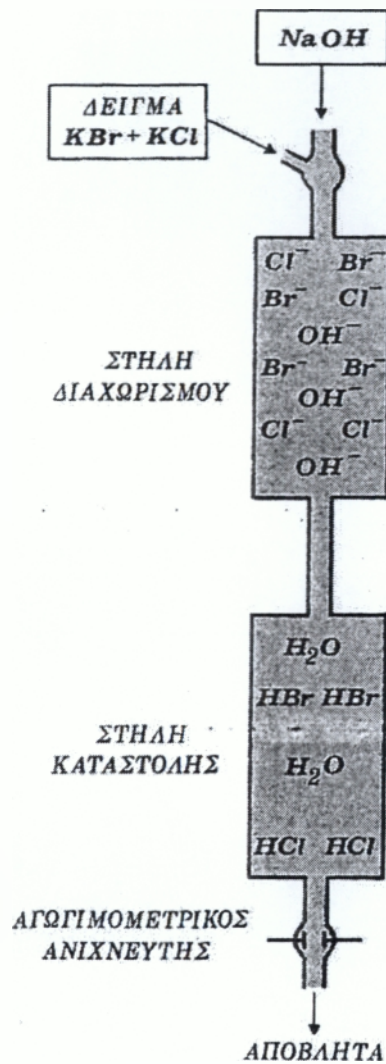
Το κατιόν K<sup>+</sup> δε συγκρατείται, λόγω αντίθετου φορτίου και απλώς εξέρχεται ταχέως από τη στήλη διαχωρισμού, με τη μορφή K<sup>+</sup>OH<sup>-</sup>. Επειδή τα δύο ανιόντα συγκρατούνται σε διαφορετικό βαθμό, λόγω διαφορετικού συντελεστή εκλεκτικότητας (Σχέση 3.3-1), διαχωρίζονται και εκλύονται σε διαφορετικούς χρόνους από τη στήλη διαχωρισμού, με τη μορφή Na<sup>+</sup>X<sup>-</sup>.

Το έκλουσμα εισέρχεται στη συνέχεια στη στήλη καταστολής κατιονανταλλακτική ρητίνη μεγάλης χωρητικότητας με ανταλλάξιμα ιόντα πρωτονίου, του τύπου Ρητίνη-SO<sub>3</sub>H<sup>+</sup>, από την οποία τα μεν ανιόντα Cl<sup>-</sup> και Br<sup>-</sup> διέρχονται ανενόχλητα, ενώ τα κατιόντα, το Na<sup>+</sup> του υγρού έκλουσης και το K<sup>+</sup> του δείγματος, ανταλλάσσονται με ιόντα H<sup>+</sup> και συγκρατούνται ισχυρά από τη ρητίνη, σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



(4.8-3)

(4.8-4)



Σχήμα 4.8-1. Σχηματικό διάγραμμα της αρχής λειτουργίας της ιοντικής χρωματογραφίας για την ανάλυση ανιόντων

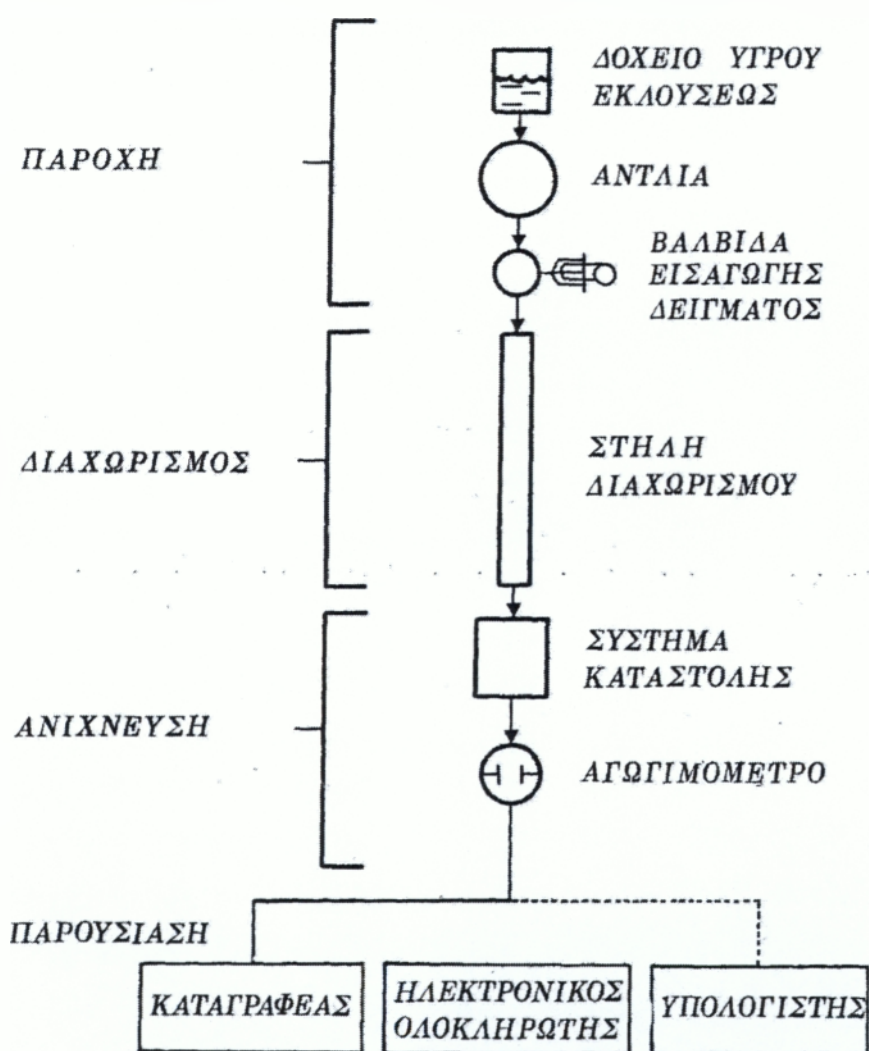
Τα οξέα  $H^+Cl^-$  και  $H^+Br^-$  είναι ισχυροί ηλεκτρολύτες με υψηλή αγωγιμότητα, σε αντίθεση με το  $H_2O$ , που έχει αμελητέα αγωγιμότητα. Τα ανιόντα μπορούν τώρα να ανιχνευθούν με τον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή.

Στην περίπτωση ανάλυσης μείγματος κατιόντων, χρησιμοποιείται κατιονανταλλακτική ρητίνη με ανταλλάξιμα ιόντα πρωτονίου στη στήλη διαχωρισμού και  $HCl$  ως υγρό έκλουσης. Η στήλη καταστολής είναι ανιονανταλλακτική ρητίνη με ανταλλάξιμα ιόντα υδροξυλίου, τα οποία κατακρατούν τα ιόντα  $Cl^-$  του υγρού έκλουσης και εξουδετερώνουν τα ιόντα  $H^+$  του παρέχοντος  $H_2O$ . Έτσι τα διαχωριζόμενα κατιόντα με τη μορφή  $M^+OH^-$  ανιχνεύονται από τον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή, χωρίς την ύπαρξη αγωγιμότητας υπόβαθρου.

Στην ανιοντική χρωματογραφία, στο υγρό έκλουσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε σωματίδιο είναι ανιοντικό σε  $pH > 8$  και ουδέτερο σε  $pH 5-8$ . Με την ανιοντική χρωματογραφία μπορούν έτσι να διαχωριστούν αποτελεσματικά και να προσδιορισθούν

με μεγάλη ευαισθησία όσα ανιόντα παραμένουν ιονισμένα σε  $\text{pH} < 8$  δηλαδή τα ανιόντα οξέων με  $\text{pK}_a$  ίσο ή μικρότερο του 7, όπως, είναι σχεδόν όλα τα ανιόντα των ανόργανων οξέων και πολλών οργανικών οξέων. Αντίστοιχα στην κατιοντική χρωματογραφία χρησιμοποιούνται στα υγρά έκλουσης σωματίδια τα όποια είναι κατιοντικά σε  $\text{pH} < 5$  και ουδέτερα σε  $\text{pH} 5-9$ . Με την κατιοντική χρωματογραφία μπορούν να διαχωριστούν και να προσδιοριστούν κατιόντα τα οποία παραμένουν ιονισμένα σε  $\text{pH} < 9$  και επιπλέον δεν καθιζάνουν ως υδροξείδια κατά τη δίοδό τους από την ανιοντική στήλη καταστολής, γι' αυτό το λόγο, η κατιοντική χρωματογραφία έχει λιγότερες εφαρμογές από την ανιοντική χρωματογραφία.

Ο ιοντικός χρωματογράφος είναι ουσιαστικά ένας χαμηλής πίεσης υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης. Στο σχήμα (4.8-2) φαίνεται το διάγραμμα ενός ιοντικού χρωματογράφου με χημική καταστολή της αγωγιμότητας υπόβαθρου.



Σχήμα 4.8-2. Σχηματικό διάγραμμα ιοντικού χρωματογράφου με χημική καταστολή αγωγιμότητας υπόβαθρου

Όπως και ο χρωματογράφος της HPLC, ο ιοντικός χρωματογράφος αποτελείται από το δοχείο του υγρού έκλουσης, μία αντλία σταθερής παροχής, χαμηλής πίεσεως, σε αντίθεση με την HPLC, την περιστρεφόμενη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος με βρόχο, τη στήλη

διαχωρισμού, τον ανιχνευτή ροής και το σύστημα λήψης του σήματος, καταγραφέα με ηλεκτρονικό ολοκληρωτή ή μικροϋπολογιστή. Επιπλέον, περιλαμβάνει το σύστημα χημικής καταστολής της αγωγιμότητας του υγρού έκλουσης, που μπορεί να είναι στήλη ιονανταλλακτικής, ρητίνης, με το αναγκαίο σύστημα αναγεννήσεώς της ή μικροσυσκευή ιονανταλλακτικής μεμβράνης με το απαραίτητο διάλυμα λουτρού.

Το υλικό πλήρωσης των στηλών αυτών αποτελείται από ένα ουδέτερο πυρήνα από πολυμερές, διαμέτρου 10 μμ. Έτσι, για την ανιονανταλλακτική στήλη, το πληρωτικό υλικό αποτελείται από ένα σταθερό αδρανή πυρήνα, μία ενδιάμεση στιβάδα σουλφονικών ομάδων και μία λεπτή στιβάδα σφαιριδίων με τεταρτοταγείς αμινομάδες. Αντίστοιχα, για την κατιονανταλλακτική στήλη, η ενδιάμεση στιβάδα είναι τεταρτοταγείς αμινομάδες καλυμμένες με λεπτό στρώμα σφαιριδίων με σουλφονικές ομάδες. Η χωρητικότητα αυτών των ρητινών είναι μικρή, της τάξης των 20-100 μεq/g του συμπολυμερούς. Οι ρητίνες διοξειδίου του πυριτίου είναι ακατάλληλες για τις περισσότερες εφαρμογές της ιοντικής χρωματογραφίας, γιατί καταστρέφονται από τα υδατικά υγρά έκλουσης και η εκλεκτικότητα τους είναι μικρή για μερικά ιοντικά σωματίδια.

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι μία απλή και ευαίσθητη παράμετρος που συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των ιοντικών σωματιδίων. Ο αγωγιμομετρικός ανιχνευτής αποτελεί τον περισσότερο χρησιμοποιούμενο γενικό ανιχνευτή στην ιοντική χρωματογραφία και έχει την ικανότητα αντιστάθμισης ευρείας περιοχής σήματος έτσι, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην ιοντική χρωματογραφία χωρίς χημική καταστολή του σήματος υπόβαθρου. Επειδή τα περισσότερα κοινά ιόντα δεν απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, ο φασματοφωτομετρικός ανιχνευτής της HPLC δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

Ο διαχωρισμός με ιονανταλλαγή μπορεί επίσης να εφαρμοστεί στην εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) για ουσίες οι οποίες σε διάλυμα (συνήθως υδατικό, σπανιότερα σε οργανικό διαλύτη) διαθέτουν ηλεκτρικό φορτίο, είναι δηλαδή ιόντα (Παράγραφος 2.3.3). Ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης της ουσίας βασίζεται στην ηλεκτροστατική έλξη της φορτισμένης δραστικής ομάδας της ουσίας προς τη φορτισμένη ομάδα η οποία είναι συνδεδεμένη στο πυριτικό υπόστρωμα.

Για την κατακράτηση μιας ουσίας στον ιονανταλλάκτη από ένα υδατικό διάλυμα πρέπει το pH του δείγματος να είναι τέτοιο, ώστε και η προσδιοριζόμενη ουσία και η δραστική ομάδα που είναι προσδεμένη στο πυριτικό υπόστρωμα να είναι φορτισμένες. Για την έκλουση της προσδιοριζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται διάλυμα pH τέτοιου, ώστε να καταργεί τον ιοντισμό της δραστικής ομάδας της ουσίας ή της δραστικής ομάδας του πυριτικού υποστρώματος ή και των δύο. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται είτε διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος είτε διάλυμα το οποίο περιέχει ιόντα τα οποία αντικαθιστούν (ανταγωνιστικά) την κατακρατούμενη ουσία.

Οι διαχωρισμοί στην SPE ιονανταλλαγής επιτυγχάνονται "ρυθμίζοντας" το pH των διαλυμάτων, τόσο κατά την δέσμευση, όσο και κατά την έκλουση (όπως για τη SPE μη ιοντικών ενώσεων "ρυθμίζουμε" την πολικότητα των διαλυτών). Για να γίνει δέσμευση πρέπει το pH να είναι τέτοιο που να ευνοεί τον ιοντισμό τόσο των ομάδων της ρητίνης όσο και της ομάδας της προς κατακράτηση ουσίας (αντίθετου φορτίου σε σχέση με το φορτίο των ομάδων της ρητίνης). Εάν οι ρητίνες είναι "ισχυρές", τότε σε κάθε τιμή pH υπάρχουν ιοντισμένες ομάδες σε αυτές και μας απασχολεί μόνο το pH που θα προκαλέσει τον

ιοντισμό της προς κατακράτηση ουσίας. Η έκλυση γίνεται διαβιβάζοντας διάλυμα με pH τέτοιο που θα καταργεί τον ιοντισμό των ομάδων της ρητίνης ή της ομάδας της προς έκλυση ουσίας ή και των δύο. Εάν η ρητίνη είναι "ισχυρή", τότε σε κάθε τιμή pH υπάρχουν ιοντισμένες ομάδες σε αυτές και μας απασχολεί μόνο το pH που θα καταργεί τον ιοντισμό της προς έκλυση ουσίας.

Η ιοντική χρωματογραφία είναι μία εξελισσόμενη αναλυτική τεχνική και η σύγχρονη έρευνα αποσκοπεί στη διασύνδεσή της με άλλες τεχνικές όπως η φασματοφωτομετρία ICP, φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης και η φασματομετρία μαζών. Η ιοντική χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων ανιόντων - μπορούν να προσδιορισθούν περισσότερα από 60 είδη- και κατιόντων -μπορούν να προσδιορισθούν περισσότερα από 30 είδη- σε μία ποικιλία δειγμάτων, όπως ύδατα, εκχυλίσματα εδαφών, τρόφιμα, βιομηχανικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Ειδικά για τον προσδιορισμό κοινών ανόργανων και οργανικών ανιόντων, για τα οποία οι άλλες τεχνικές δεν μπορούν να εφαρμοστούν, η ιοντική χρωματογραφία αποτελεί τεχνική επιλογής και έχει καθιερωθεί, ως επίσημη μέθοδος για πολλά απ' αυτά στην περιβαλλοντική ανάλυση. Για την ανάλυση κατιόντων συναγωνίζεται και συμπληρώνει ή συνδυάζεται με τις άλλες τεχνικές στοιχειακής ανάλυσεως, φλογοφωτομετρία εκπομπής και απορρόφησης, με το πλεονέκτημα ότι μπορεί να προσδιορίζει τις διάφορες μορφές ενός μεταλλοϊόντος, όπως Fe (II) και Fe (III). Στη φαρμακευτική ανάλυση η ιοντική χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον έλεγχο προσμείξεων ανόργανων και οργανικών ανιόντων, και μεταλλοϊόντων στις πρώτες ύλες και τα ενδιάμεσα προϊόντα, παρέχοντας ακριβή προσδιορισμό τους και όχι ημιποσοτικό έλεγχο ορίων, στον οποίο αρκούνται οι φαρμακοποιίες. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση δειγμάτων υδατανθράκων, υδατοδιαλυτών βιταμινών, αντιβιοτικών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, οι μέθοδοι είναι ανάλογες με αυτές της GLC και HPLC [1].

**Μ Ε Ρ Ο Σ Β**



## 5<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Οι τεχνικές διαχωρισμού στην ενόργανη ανάλυση είναι πολύπλοκες και απαιτούν ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Θα παραθέσουμε τις πιο σημαντικές τονίζοντας τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους και θα συγκρίνουμε μερικές απ' αυτές.

### ✓ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΓΡΟΥ - ΥΓΡΟΥ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ

Η εκχύλιση είναι μια από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού με ευρύτατη εφαρμογή σε μεγάλη ποικιλία συστατικών και δειγμάτων. Η ευρεία χρήση της οφείλεται στην ταχύτητα εκτέλεσης, στην απλότητα και το χαμηλό κόστος καθώς και στη δυνατότητα εφαρμογής της στη μικρο- και στη μακρο- ανάλυση ουσιών. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής διαχωρισμού, είναι η αυξημένη της χωρητικότητα.

Πρακτικά προβλήματα κατά την εκχύλιση υγρού - υγρού είναι:

- Ο σχηματισμός γαλακτώματος
- Οι προς διαχωρισμό ουσίες προσροφώνται ισχυρά σε σωματίδια
- Οι προς διαχωρισμό ουσίες προσδένονται σε ενώσεις υψηλής σχετικής μοριακής μάζας, όπως, φάρμακα σε πρωτεΐνες
- Η αμοιβαία διαλυτότητα δύο φάσεων

Τα γαλακτώματα μπορούν να διασπασθούν με:

- Προσθήκη άλατος στην υδατική φάση
- Θέρμανση ή ψύξη του φιαλιδίου εκχύλισης
- Διήθηση μέσω υαλοβάμβακος
- Διήθηση μέσω χάρτινου φίλτρου διαχωριστή φάσεων
- Προσθήκη μικρής ποσότητας διαφορετικού οργανικού διαλύτη
- Φυγοκέντρηση

Οι μη αναμίξιμοι διαλύτες έχουν μια μικρή αλλά υπαρκτή αμοιβαία διαλυτότητα, η οποία μεταβάλλει τους σχετικούς όγκους των δύο φάσεων. Μια καλή πρακτική είναι ο κορεσμός της κάθε φάσης με την άλλη, σε διαχωριστική χοάνη χωρίς το δείγμα, έτσι ώστε ο όγκος της φάσης που περιέχει την προς διαχωρισμό ουσία να είναι γνωστός, επιτρέποντας ακριβή και βέλτιστο προσδιορισμό της ανάκτησης της.

Η εκχύλιση στερεής φάσης είναι η πιο σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται για προκατεργασία δείγματος που προορίζεται για ανάλυση με HPLC. Ενώ η εκχύλιση υγρού - υγρού είναι διαδικασία διαχωρισμού ενός σταδίου, η εκχύλιση στερεής φάσης είναι χρωματογραφική διεργασία που μοιάζει με την HPLC και έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της εκχύλισης υγρού - υγρού:

- ♦ Πληρέστερη εκχύλιση της προς διαχωρισμό ουσίας
- ♦ Περισσότερο αποτελεσματικός διαχωρισμός των παρεμποδιζουσών ουσιών από τις προσδιοριζόμενες ουσίες
- ♦ Μειωμένη κατανάλωση οργανικού διαλύτη
- ♦ Ευκολότερη συλλογή του συνόλου της προς διαχωρισμό ουσίας
- ♦ Πιο εύχρηστες διεργασίες με το χέρι
- ♦ Απομάκρυνση των σωματιδίων
- ♦ Ευκολότερη αυτοματοποίηση

Επειδή η εκχύλιση στερεής φάσης είναι πιο αποδοτική διαδικασία διαχωρισμού από την εκχύλιση υγρού - υγρού, είναι ευκολότερη η επίτευξη μεγαλύτερης ανάκτησης της επιθυμητής ουσίας. Οι διαδικασίες της εκχύλισης υγρού - υγρού που απαιτούν διαδοχικές εκχύλισεις για να ανακτηθεί πάνω από το 99% της επιθυμητής ουσίας, συχνά αντικαθίστανται από την εκχύλιση στερεής φάσης τεχνική ενός σταδίου. Επιπλέον, με την εκχύλιση στερεής φάσης είναι δυνατή η πληρέστερη απομάκρυνση των παρεμποδιζουσών ουσιών από το κλάσμα της επιθυμητής ουσίας. Η αντίστροφης φάσης εκχύλιση στερεής φάσης είναι η πιο δημοφιλής τεχνική εκχύλισης αφού απαιτούνται ελάχιστες ποσότητες οργανικού διαλύτη για έκλουση, διατηρώντας υψηλή τη συγκέντρωση της επιθυμητής ουσίας. Επίσης, επειδή δεν υπάρχει ανάγκη διαχωρισμού των φάσεων στην εκχύλιση στερεής φάσης (έναντι της εκχύλισης υγρού - υγρού), το συνολικό κλάσμα της προς διαχωρισμό ουσίας συλλέγεται εύκολα, ελαχιστοποιώντας σφάλματα που συνδέονται με μεταβαλλόμενους ή ανακριβείς μετρημένους εκχυλιζόμενους όγκους. Τέλος, τα μεγαλύτερα σωματίδια δεσμεύονται από το πορώδες υλικό της εκχύλισης στερεής φάσης και έτσι απομακρύνονται από το κλάσμα της επιθυμητής ουσίας.

Μειονεκτήματα της εκχύλισης στερεής φάσης σε σχέση με την εκχύλιση υγρού - υγρού:

- Μεταβλητότητα των φυσιγγίων της εκχύλισης στερεής φάσης
- Μη ανπιστευτή προσρόφηση κάποιων ουσιών στα φυσίγγια της εκχύλισης στερεής φάσης
- Φυσίγγια μιας χρήσης (υψηλό κόστος)

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση υγρού - υγρού είναι καθαροί έτσι ώστε οι διαχωρισμοί με αυτή τη τεχνική να είναι αναπαραγώγιμοι. Αντίθετα, τα φυσίγγια της εκχύλισης στερεής φάσης διαφέρουν από παρτίδα σε παρτίδα, πράγμα που επηρεάζει δυσμενώς την αναπαραγωγικότητα της συγκεκριμένης τεχνικής. Επιπλέον, η επιφάνεια επαφής των δύο φάσεων στην εκχύλιση υγρού - υγρού είναι συγκριτικά πολύ μικρότερη από εκείνη στην εκχύλιση στερεής φάσης. Έτσι, η μη ανπιστευτή πρόσδεση των ουσιών είναι λιγότερο πιθανή στην εκχύλιση υγρού - υγρού απ' ό,τι στην εκχύλιση στερεής φάσης.

✓ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Στην απλούστερη μορφή της η εκχύλιση στερεής φάσης χρησιμοποιεί ένα φυσίγγιο μιας χρήσης (συνήθως το "σώμα" μιας ιατρικής σύριγγας) πληρωμένο με 0,1 - 0,5 g προσροφητή. Το πληρωτικό υλικό είναι συνήθως αντίστροφης φάσης (RP), π.χ. C<sub>18</sub>-SiO<sub>2</sub>. Μια RP - εκχύλιση στερεής φάσης μοιάζει στα χαρακτηριστικά διαχωρισμού με την εκχύλιση υγρού - υγρού και με την HPLC. Το μέγεθος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού στην εκχύλιση στερεής φάσης (> 40 μm) είναι συνήθως μεγαλύτερο από αυτό της HPLC (3-10 μm). Εξ αιτίας του μικρού μήκους του φυσιγγίου της εκχύλισης στερεής φάσης, των μεγάλων σωματιδίων και της χαμηλής ποιότητας πλήρωσης, ο διαχωρισμός στα φυσίγγια εκχύλισης στερεής φάσης είναι λιγότερο αποδοτικός (N < 100) από εκείνον στις στήλες της HPLC. Επίσης, για μείωση του κόστους τους, το πληρωτικό υλικό τους αποτελείται από σωματίδια ακανόνιστου μεγέθους και όχι από σφαιρικά μικροσωματίδια που χρησιμοποιούνται στις αναλυτικές στήλες της HPLC. Τέλος, τα φυσίγγια είναι συνήθως μιας χρήσης λόγω των παρεμποδίζουσών ουσιών, που συνήθως κατακρατούνται στο προσροφητικό υλικό τους.

Στην εκχύλιση στερεής φάσης, ένα υγρό δείγμα προστίθεται στο φυσίγγιο και ένας διαλύτης έκπλυσης επιλέγεται έτσι, ώστε η επιθυμητή ουσία να κατακρατείται ισχυρά ή να μην κατακρατείται καθόλου. Όταν η ουσία κατακρατείται ισχυρά, τότε οι παρεμποδίζουσες ουσίες εκλύονται ή εκπλένονται από το φυσίγγιο έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η παρουσία τους στο τελικό κλάσμα της επιθυμητής ουσίας. Η ουσία τότε εκλύεται με ένα μικρό όγκο ισχυρού εκλουστικού μέσου, συλλέγεται είτε αμέσως στην HPLC είτε εξατμίζεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού και επαναδιαλυτοποιείται στην κινητή φάση. Στην αντίθετη περίπτωση, όπου η επιθυμητή ουσία δεν κατακρατείται οι παρεμποδίζουσες ουσίες παραμένουν στο φυσίγγιο και η ουσία συλλέγεται για περαιτέρω κατεργασία.

✓ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΗ ΚΑΙ ΣΤΗΛΗΣ

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας παρουσιάζει τα ακόλουθα σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων τεχνικών υγρής χρωματογραφίας (χάρτη και στήλης):

- 1) Έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα (λόγω του πολύ μικρού μερισμού του υλικού επιστρώσεως), γι' αυτό και παρέχει καθαρότερες και περισσότερο ευδιάκριτες κηλίδες, απ' ό,τι η χρωματογραφία χάρτη.
- 2) Είναι περισσότερο ευέλικτη από τη χρωματογραφία χάρτη, γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποικιλία στατικών φάσεων και διάφοροι μηχανισμοί διαχωρισμού, έναντι ενός μόνον υλικού και ενός μηχανισμού στη χρωματογραφία χάρτη.
- 3) Είναι ταχύτερη από τη χρωματογραφία χάρτη, π.χ. ο χρόνος ανάπτυξης χρωματογραφήματος στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας από ξηροπηκτική διοξειδίου του πυριτίου είναι 20-30 λεπτά, ενώ ο ίδιος διαχωρισμός στη χρωματογραφία χάρτη απαιτεί τουλάχιστον 2-3 ώρες. Με τη χρήση επιστρωμένων αντικειμενοφόρων πλακών μικροσκοπίου μπορούν να επιτευχθούν χρόνοι ανάπτυξης μέχρι και 5 λεπτών.

- 4) Χρησιμοποιείται εύκολα για το διαχωρισμό υδρόφοβων ουσιών, π.χ. υδρογονανθράκων, οι οποίοι διαχωρίζονται δύσκολα στο χάρτη.
- 5) Κατά την εμφάνιση χρωματογραφημάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και δραστικά μέσα, που δε χρησιμοποιούνται στο χάρτη, διευκολύνοντας έτσι την ανίχνευση ορισμένων ουσιών. Π.χ. με ψεκασμό της πλάκας με πυκνό  $H_2SO_4$  ανιχνεύονται εύκολα οι οργανικές ουσίες, που δίνουν μαύρες κηλίδες από άνθρακα.
- 6) Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι πολύ ευαίσθητη και απαιτεί μικρότερες ποσότητες προσροφητικού μέσου, και δείγματος - από μερικά  $\mu g$  έως  $1 mg$  - από τη χρωματογραφία στήλης.
- 7) Επιτρέπει την εύκολη παραλαβή των ουσιών, που έχουν διαχωριστεί, με απόξυση κάθε κηλίδας μαζί με το επίστρωμα και εκχύλισή του με κατάλληλο διαλύτη (μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ειδική συσκευή από σωλήνα Craig με υποδοχέα διαλύτη, που συνδέεται με αντλία κενού, σε αντίθεση με τη χρωματογραφία στήλης).
- 8) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ποσοτική ανάλυση (ποσοτική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας).

Το μειονέκτημα της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας έναντι της χρωματογραφίας χάρτη είναι η μεγαλύτερη δυσκολία καταγραφής και διατήρησης των αποτελεσμάτων. Τα χρωματογραφήματα στο χάρτη διατηρούνται ευκολότερα και για περισσότερο χρόνο.

Συμπερασματικά η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι γρήγορη και απλή μέθοδος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τεχνική καθοδήγησης για:

- τον έλεγχο της καθαρότητας μιας ενώσεως (εμφάνιση μιας ή περισσοτέρων κηλίδων σε διαφορετικά χρωματογραφήματα με διαφορετικούς διαλύτες ανάπτυξης) ή της πολυπλοκότητας ενός μείγματος
- τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των εφαρμοζόμενων μεθόδων διαχωρισμού και καθαρισμού μιας ενώσεως
- τον καθορισμό των ιδανικών συνθηκών για τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος σε μεγάλη κλίμακα (π.χ. με υγρή χρωματογραφία στήλης)
- την ποιοτική μελέτη της πορείας μιας χημικής αντίδρασης και τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποιήσεως αυτής
- για την ταυτοποίηση φαρμάκων, εκχυλισμάτων φυτών και βιοχημικών παρασκευασμάτων ή για την ανίχνευση νοθειών και μολύνσεων τροφίμων

Για την επιλογή του καταλληλότερου συνδυασμού στατικής-κινητής φάσης για ένα συγκεκριμένο πρόβλημα διαχωρισμού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή μικροστήλες σε σταγονόμετρα, ώστε να μειωθεί η σπάταλη υλικών κατά το στάδιο της επιλογής των φάσεων. Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον ποσοτικό διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος. Στην περίπτωση αυτή οι διαχωριζόμενες ουσίες απομονώνονται με απόξυση του προσροφητικού

υλικού στην περιοχή κάθε κηλίδας, εκχύλιση αυτού με κατάλληλο διαλύτη και ταυτοποίηση του εκχυλίσματος με κατάλληλη αναλυτική τεχνική.

#### ✓ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Όσο χρήσιμη και εάν υπήρξε και συνεχίζει να είναι η ηλεκτροφόρηση πλάκας, αυτός ο τύπος ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού είναι γενικά αργός, χρειάζεται αρκετή εργασία, είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθεί και δεν παρέχει πολύ ακριβή ποσοτικά αποτελέσματα. Κατά το τέλος της δεκαετίας του '80 υπήρχε μια εκρηκτική αύξηση στην έρευνα και τις εφαρμογές της ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδείς σωλήνες. Σε πολλές περιπτώσεις η νέα αυτή τεχνική εκτέλεσης ηλεκτρολυτικών διαχωρισμών αποδεικνύεται ότι είναι ένα ικανοποιητικό υποκατάστατο της ηλεκτροφόρησης πλάκας με πολλά σημαντικά πλεονεκτήματα τα οποία περιγράφονται στη συνέχεια.

Παράλληλα άρχισε και η εμφάνιση πολλών εμπορικών οργάνων. Η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς παρέχει διαχωρισμούς μεγάλης ταχύτητας και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ενώ οι απαιτούμενοι όγκοι δείγματος είναι εξαιρετικά μικροί (0,1 έως 10 nL) σε αντίθεση με την ηλεκτροφόρηση πλάκας, όπου απαιτούνται δείγματα της τάξης των μL. Επιπλέον τα διαχωριζόμενα σωματίδια εκλούνται από το ένα άκρο του τριχοειδούς, ώστε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ποσοτικοί ανιχνευτές παρόμοιοι με αυτούς, που χρησιμοποιούνται στην HPLC, αντί για τις δύσχρηστες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση πλάκας.

#### ✓ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΟΥ - ΥΓΡΟΥ

Για να εκτιμηθεί η σημασία της χρωματογραφίας αερίου - υγρού (GLC), θα πρέπει να διακρίνουμε τους δυο διαφορετικούς ρόλους της. Ο πρώτος είναι εκείνος ενός εργαλείου, που εκτελεί διαχωρισμούς. Ως προς το ρόλο αυτό η GLC είναι ασυναγώνιστη, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζεται σε πολύπλοκα οργανικά, οργανομεταλλικά και βιοχημικά συστήματα αποτελούμενα από πτητικές ουσίες ή ουσίες οι οποίες μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Ο δεύτερος ρόλος είναι σαφώς διαφορετικός και είναι εκείνος ενός μέσου με το οποίο πραγματοποιείται μια ολοκληρωμένη ανάλυση. Οι χρόνοι και οι όγκοι κατακράτησης χρησιμοποιούνται για ποιοτική ταυτοποίηση, ενώ τα ύψη κορυφών ή τα εμβαδά τους παρέχουν την ποσοτική πληροφορία. Οι ποσοτικές εφαρμογές της GLC περιορίζονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τις φασματοσκοπικές τεχνικές. Ως συνέπεια έχει παρουσιασθεί μια ενδιαφέρουσα τάση συνδυασμού της εκπληκτικής διαχωριστικής ικανότητας της GLC με τις κατά πολύ ανώτερες ικανότητες ταυτοποίησης, που έχουν οι φασματοσκοπίες μαζών, υπερύθρου και NMR.

Τα αεριοχρωματογραφήματα χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως κριτήρια καθαρότητας οργανικών ενώσεων. Εάν υπάρχουν μολύνσεις, αυτές παρουσιάζονται ως επιπλέον κορυφές. Τα εμβαδά των κορυφών αυτών αποτελούν μέσα χονδρικής εκτίμησης της έκτασης της μόλυνσης. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας μεθόδων καθαρισμού.

Θεωρητικά οι χρόνοι κατακράτησης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για την ταυτοποίηση των συστατικών μειγμάτων. Στην πράξη η αξιοποίηση των δεδομένων αυτών

περιορίζεται από τον μεγάλο αριθμό πειραματικών παραμέτρων, που θα πρέπει να ελέγχονται ακριβώς για να ληφθούν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Παρ' όλα αυτά η αεριοχρωματογραφία αποτελεί ένα εξαιρετικό μέσο επιβεβαίωσης της παρουσίας ή απουσίας μιας ύποπτης ένωσης σε ένα μίγμα, αρκεί να υπάρχει ένα αυθεντικό δείγμα της ένωσης αυτής. Εάν, μετά την προσθήκη ποσότητας αυτής της ουσίας στο μίγμα, το χρωματογράφημα δεν παρουσιάσει νέα κορυφή, αλλά μία από τις υπάρχουσες κορυφές αυξηθεί, αυτό αποτελεί ένδειξη παρουσίας της ύποπτης ένωσης στο δείγμα. Η ένδειξη αυτή καθίσταται ακόμη πειστικότερη, αν τα ίδια αποτελέσματα ληφθούν και με διαφορετικές στήλες και σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Το σήμα από τον ανιχνευτή ενός αεριοχρωματογράφου έχει αξιοποιηθεί ευρύτατα για ποσοτικούς και ημιποσοτικούς προσδιορισμούς. Ακρίβεια 1% μπορεί να ληφθεί κάτω από προσεκτικά ελεγχόμενες συνθήκες. Όπως ισχύει και στις περισσότερες αναλυτικές τεχνικές, η αξιοπιστία συνδέεται άμεσα με τον έλεγχο των μεταβλητών. Η φύση του δείγματος παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ορθότητα των αποτελεσμάτων.

Συχνά η αεριοχρωματογραφία συνδυάζεται με εκλεκτικές φασματοσκοπικές και ηλεκτροχημικές τεχνικές παρέχοντας τις συνδυασμένες τεχνικές, που αποτελούν πανίσχυρα αναλυτικά εργαλεία κατάλληλα για ταυτοποιήσεις των συστατικών πολύπλοκων μειγμάτων. Στις τεχνικές αυτές, η συλλογή των εκλουσμάτων από τις χρωματογραφικές στήλες γινόταν σε χωριστά κλάσματα σε μια ψυχρή παγίδα, αμέσως μετά την ανίχνευσή τους από ένα μη καταστρεπτικό για το δείγμα και μη εκλεκτικό ανιχνευτή. Η σύνθεση κάθε κλάσματος εξεταζόταν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπία IR, φασματοσκοπία μαζών (MS) ή με ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές. Σημαντικό πρόβλημα της τεχνικής αυτής ήταν η πολύ μικρή, συνήθως της τάξης του 1 μg ποσότητα ουσίας στο κλάσμα. Ωστόσο η τεχνική αυτή αποδείχθηκε χρήσιμη για την ποιοτική ανάλυση πολυσύνθετων δειγμάτων.

Σε μια πιο εξελιγμένη γενική τεχνική, η οποία σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα, το έκλουσμα της στήλης παρακολουθείται συνεχώς με εκλεκτικό ανιχνευτή. Η τεχνική προϋποθέτει έλεγχο της οργανολογίας με υπολογιστή και αποθήκευση των φασματικών δεδομένων στη μνήμη του για μετέπειτα παρουσίαση με τη μορφή φασμάτων ή χρωματογραφημάτων.

Τα πλεονεκτήματα της χρωματογραφίας αερίου - υγρού είναι:

- Απαιτεί μικρού μεγέθους δείγματα τα οποία δεν απαιτούν εκτεταμένη προκατεργασία
- Αποτελεσματική στο διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων στα συστατικά τους
- Δυνατότητα παραλαβής αναλλοίωτων των διαχωριζόμενων συστατικών
- Τα αποτελέσματα λαμβάνονται σε σύντομο χρονικό διάστημα
- Υψηλή ακρίβεια
- Μεγάλη ευαισθησία για τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ppb, ppt)
- Η οργανολογία δεν είναι περίπλοκη
- Επιτυχής εφαρμογή στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση

Με χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC) και με τριχοειδείς στήλες έγινε δυνατός ο διαχωρισμός περίπου 250 και 280 συστατικών σε δείγματα εκπνοής και ούρα ανθρώπου, αντίστοιχα. Τέτοιες αναλύσεις είναι ανέφικτες με οποιαδήποτε άλλη τεχνική.

#### ✓ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Η υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα με μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών, και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δε μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Το πλεονέκτημα της υγρής χρωματογραφίας στήλης, όπως συμβαίνει και στην εκχύλιση, είναι η αυξημένη της χωρητικότητα.

Διάφορες τεχνικές για γρήγορη χρωματογραφία έχουν χρησιμοποιηθεί την τελευταία δεκαετία. Γενικώς, οι παράγοντες που οδηγούν σε γρήγορες αναλύσεις με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι:

- οι μικροί μήκους στήλες
- η υψηλή θερμοκρασία
- οι μεγάλες ταχύτητες ροής της κινητής φάσης

Κάθε μια από τις παραπάνω παραμέτρους συσχετίζεται με:

- το χρόνο ανάλυσης
- την πίεση στα άκρα της στήλης
- την απόδοση της στήλης

Παρ' όλα αυτά, η επίδραση της θερμοκρασίας στο χρόνο ανάλυσης και την απόδοση της στήλης μερικές φορές, είναι μεταβλητή και μη προβλέψιμη.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό και την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων ουσιών ποικίλης προέλευσης. Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία, η υγρή χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαχωρισμούς και ανάλυση μειγμάτων ουσιών μεγάλης σχετικής μοριακής μάζας και υψηλής πολικότητας, πολυμερών και ιονικών ενώσεων. Η ταχύτητα αναλύσεων είναι παρόμοια με αυτή της GLC, η διαχωριστική της ικανότητα 3 έως 10 φορές καλύτερη από αυτή της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, το κόστος όμως μιας συσκευής HPLC είναι αρκετά υψηλό. Για την ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιούνται οι ίδιες τεχνικές, που περιγράφηκαν στην αέρια χρωματογραφία (καμπύλη αναφοράς, μέθοδος εσωτερικού προτύπου, χρήση σχετικής επιφάνειας κορυφών).

Οι μηχανισμοί της κατανομής υγρού - υγρού και της προσρόφησης υγρού - στερεού βασίζονται στις διαφορές πολικότητας των συστατικών, γιατί η πολικότητα παίζει σημαντικό ρόλο, τόσο στη διαλυτότητα, όσο και στην προσρόφηση. Η διαδικασία της κατανομής υγρού - υγρού είναι αρκετά ευαίσθητη σε μικρές διαφορές της σχετικής μοριακής μάζας των συστατικών και έτσι προτιμάται για το διαχωρισμό μελών μιας ομόλογης σειράς. Αντίθετα, η διαδικασία της προσρόφησης επηρεάζεται από στερεοχημικές διαφορές και προτιμάται για το διαχωρισμό παρόμοιων ενώσεων με διαφορετικές στερεοχημικές δομές.

Από πειραματική άποψη, η HPLC προσρόφησης είναι ευκολότερη στη διεξαγωγή της απ' ό,τι η HPLC κατανομής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό μείγματος ενώσεων με ευρεία περιοχή πολικότητας, σε αντίθεση με την HPLC κατανομής, που διαχωρίζει αποδοτικότερα ενώσεις με πολύ μικρές διαφορές πολικότητας. Μπορεί όμως να προηγηθεί προκαταρκτικός διαχωρισμός σε μεγάλη κλίμακα του ακατέργαστου πολύπλοκου μείγματος με κλασσική χρωματογραφία προσρόφησης στήλης και να ακολουθήσει αποτελεσματικός διαχωρισμός κάθε κλάσματος ξεχωριστά με την HPLC κατανομής.

Μείγματα ιοντικών ενώσεων διαχωρίζονται αποτελεσματικά με HPLC ιονανταλλαγής, ενώ μεγαλομοριακές ενώσεις, με διαφορές στις σχετικές μοριακές μάζες, διαχωρίζονται με HPLC μοριακού αποκλεισμού. Στον πίνακα 5-1 συνοψίζεται, κατά προσέγγιση, η σχέση μεταξύ της φύσης των συστατικών ενός δείγματος και του καταλληλότερου μηχανισμού συγκράτησης υγρής χρωματογραφίας για την επίτευξη αποτελεσματικού διαχωρισμού.

**Πίνακας 5-1. Επιλογή μηχανισμού συγκρατήσεως υγρής χρωματογραφίας με βάση τα χαρακτηριστικά του δείγματος**

Μοριακό βάρος	Δείγμα		Μηχανισμός συγκρατήσεως
	Διαλυτότητα	Πολικότητα	
Μικρό	Υδατοδιαλυτές	Υψηλή (ιονικές)	Ιονανταλλαγή
		Μέση (ιονικές)	Κατανομή (ζευγών ιόντων)
Μέσο	Ενδιάμεση	Μέση (μη ιονικές)	Κατανομή (κανονικής φάσεως)
		Χαμηλή	Κατανομή (αντίστροφης φάσεως)
Μεγάλο	Λιποδιαλυτές	Χαμηλή	Προσρόφηση
	Υδατοδιαλυτές		Μοριακός αποκλεισμός (υδατ. κινητή φάση)
	Λιποδιαλυτές		Μοριακός αποκλεισμός (μη υδατ. κινητή φάση)

#### ✓ ΙΟΝΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Ο διαχωρισμός με ιονανταλλαγή βασίζεται στην αμφίδρομη ανταλλαγή ιόντων μεταξύ μίας εξωτερικής υγρής φάσης και ιονικών θέσεων μίας στερεής αδιάλυτης φάσης γνωστής ως ιονανταλλακτικής ρητίνης. Οι σπουδαιότερες από τις ιδιότητες, που καθορίζουν τη συμπεριφορά της ρητίνης, επομένως και την επιλογή της για ορισμένη εφαρμογή, είναι η φύση των δραστικών ομάδων, η οποία καθορίζει το είδος των ανταλλασσόμενων ιόντων, ο αριθμός των δραστικών μονάδων, ο οποίος καθορίζει την ανταλλακτική χωρητικότητα της ρητίνης, η ισχύς των δραστικών ομάδων, η οποία καθορίζει την εκλεκτικότητα, το μέγεθος των κόκκων, το οποίο καθορίζει την ταχύτητα ιονανταλλαγής και τη διαπερατότητα στήλης από τη ρητίνη, και ο αριθμός διακλαδώσεων της ρητίνης, ο οποίος καθορίζει τη συνεκτικότητα, το πορώδες και τη διόγκωση της ρητίνης.



Η τεχνική της χημικής καταστολής της αγωγιμότητας του υγρού έκλουσης, γνωστή και ως ιοντική χρωματογραφία δύο στηλών, παρουσιάζει το μειονέκτημα του κορεσμού, και επομένως της αδρανοποίησης, της ιονανταλλακτικής ρητίνης της στήλης καταστολής. Γι' αυτό μετά από κάποιο χρόνο λειτουργίας απαιτείται αναγέννηση της στήλης, που πετυχαίνεται με τη διαβίβαση  $H_2SO_4$  ή  $NaOH$  μέσα από την κατιονανταλλακτική ή ανιονανταλλακτική στήλη καταστολής αντίστοιχα, με τη βοήθεια αντλίας. Επιπλέον, η ύπαρξη της δεύτερης στήλης προκαλεί διεύρυνση των κορυφών και μείωση της ευαισθησίας.

Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, δόθηκαν δύο λύσεις. Η πρώτη επιτεύχθηκε με την παρασκευή ειδικών ιονανταλλακτικών ρητινών πολύ μικρής χωρητικότητας (20-100  $meq/g$ ), ειδικών για την ιοντική χρωματογραφία, που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με μικρό όγκο δείγματος και υγρό έκλουσης μικρής συγκέντρωσης έτσι ώστε το σήμα υπόβαθρου να είναι μικρό και να μη χρειάζεται στήλη καταστολής (ιοντική χρωματογραφία μιας στήλης). Η δεύτερη λύση έγινε δυνατή με την κατασκευή ειδικών ιονανταλλακτικών μεμβρανών, οι οποίες χρησιμοποιούνται με τη μορφή σωλήνων ή μικροσυστημάτων διαπίδυσης, ως καταστολείς του σήματος υπόβαθρου. Το υγρό έκλουσης διέρχεται μέσα από το σωλήνα της ιονανταλλακτικής μεμβράνης, ενώ απέξω διαβιβάζεται διάλυμα ενός λουτρού. Τα πλεονεκτήματα της νέας αυτής τεχνικής είναι η αποφυγή της περιοδικής αναγέννησης της ιονανταλλακτικής ρητίνης καταστολής, η μείωση του νεκρού όγκου του συστήματος και η πολύ μεγάλη χωρητικότητα, που επιτρέπει την αξιοποίηση της βαθμιδωτής έκλουσης στην ιοντική χρωματογραφία, δυνατότητα που δεν έχει το σύστημα με δύο στήλες.

## 6<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καθορισμός της δομής και η μελέτη των ιδιοτήτων μιας ουσίας προϋποθέτουν την απομόνωσή της σε καθαρή κατάσταση. Ο διαχωρισμός μιγμάτων ενώσεων σε καθαρά συστατικά και η ποσοτικοποίησή τους αποτελούν κεντρικό θέμα της χημικής ανάλυσης. Μόνο με αυτόν τον τρόπο μπορούν να βρεθούν σωστά τόσο η καθαρότητα των χημικών ουσιών όσο και η σύσταση μιγμάτων με διαφορετικό περιεχόμενο. Ο έλεγχος της ποιότητας, η ανάλυση των τροφίμων και του περιβάλλοντος, αλλά επίσης και ο έλεγχος και η βελτιστοποίηση των χημικών αντιδράσεων και διαδικασιών βασίζονται όλα σε έναν αναλυτικό προσδιορισμό των ποσοτήτων των υλικών. Σχεδόν όλα τα δείγματα με τα οποία ασχολείται η χημική ανάλυση είναι μείγματα και μερικά από αυτά είναι πολύ πολύπλοκα. Και ενώ ο προσδιορισμός των απομονωμένων συστατικών είναι συνήθως απλός με τις ηλεκτροχημικές και φασματοσκοπικές τεχνικές ανάλυσης, ο προσδιορισμός των ίδιων συστατικών σε μείγμα είναι συνήθως δύσκολος και μερικές φορές αδύνατος, λόγω της παρεμποδιστικής δράσης μίας ή περισσότερων ουσιών στον προσδιορισμό μίας άλλης ουσίας.

Γενικά, στην καλύτερη περίπτωση οι τεχνικές χημικής ανάλυσης είναι επιλεκτικές. Λίγες τεχνικές, αν όχι καμία, είναι πραγματικά εξειδικευμένες. Συνεπώς ο διαχωρισμός της προσδιοριζόμενης ουσίας από “εν δυνάμει” παρεμποδιστές συχνά αποτελεί στάδιο ζωτικής σημασίας στις αναλυτικές διαδικασίες. Έως τα μέσα του εικοστού αιώνα οι αναλυτικοί διαχωρισμοί πραγματοποιούνταν κυρίως με κλασικές μεθόδους, όπως είναι η καθίζηση, η ανακρυστάλλωση, η απόσταξη, η εξάχνωση και η εκχύλιση. Ωστόσο, σήμερα οι αναλυτικοί διαχωρισμοί πραγματοποιούνται με ηλεκτροφόρηση και κυρίως με χρωματογραφία, η οποία είναι όχι μόνο αποτελεσματική αλλά εύκολη και γρήγορη, ιδιαίτερα όταν τα δείγματα είναι πολύπλοκα και αποτελούνται από πλήθος ουσιών με παραπλήσια δομή.

Η ιοντική χρωματογραφία παραμένει μέχρι σήμερα μία εξελισσόμενη τεχνική, με συνεχείς βελτιώσεις σε τομείς όπως η αύξηση της ανιχνευσιμότητας και της αξιοπιστίας των προσδιορισμών, η μείωση του κόστους και των απαιτούμενων προκατεργασιών και η μείωση του ολικού χρόνου ανάλυσης.

Η αέρια - υγρή χρωματογραφία μετά την εισαγωγή της ως αναλυτικής τεχνικής, λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων, μεγάλη ευαισθησία, ταχύτητα, απλότητα, επίτευξη δύσκολων διαχωρισμών, δυνατότητα παραλαβής αναλλοίωτων των διαχωριζόμενων συστατικών, επιτυχής εφαρμογή στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, εμφάνισε ραγδαία ανάπτυξη και έγινε μία από τις αποτελεσματικότερες και συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές για διαχωρισμούς και ανάλυση. Μπορεί να εφαρμοστεί στην ανάλυση του 85% και περισσότερο των οργανικών ενώσεων. Μόνο τα τελευταία χρόνια άρχισε να μειώνεται η ανάπτυξή της, κυρίως μετά την εμφάνιση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα με μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών, και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δε μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Η μεγαλύτερη απόδοση στην υγρή

χρωματογραφία επιτυγχάνεται με χαμηλές ταχύτητες ροής, που συνεπάγονται μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού, με την εφαρμογή υψηλής πίεσης και τη χρήση μικρότερων σωματιδίων ως υλικών πλήρωσης της στήλης. Με την ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) οι χρόνοι διαχωρισμού μειώθηκαν σημαντικά. Η τεχνική HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμούς βασισμένους σε προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή και μοριακό αποκλεισμό, για αυτό το λόγο δικαίως κατέκτησε την πρώτη θέση στον τομέα των αναλυτικών διαχωρισμών.

# Βιβλιογραφία

1. Θ.Π. Χατζηϊωάννου, Μ.Α. Κουπάρη, “Ενόργανη Ανάλυση”, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εκδόσεις Κωσταράκης Α.Ε., Αθήνα 1997.
2. Skoog, D. A. Holler, F.J. and Nieman T.A. “Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης”, (Μετάφραση: Μ. Καραγιάννης, Κ. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης), Εκδόσεις Κωσταράκης Α.Ε., Αθήνα 2002.
3. Α. Παππά, “Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης: Χρωματογραφικές, Θερμικές, Ηλεκτρομετρικές Μέθοδοι, Φασματομετρία Μάζας”, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 2004.
4. Μ.Ι. Καραγιάννης, “Επεξεργασία, αξιολόγηση και παρουσίαση αναλυτικών δεδομένων”, Εκδόσεις Παπαδάμης, 1987.
5. Pescok, Shields, Cairns, McWilliam, “Σύγχρονοι Μέθοδοι στη Χημική Ανάλυση”, (Μετάφραση: Σ. Βολιώτη), Εκδόσεις Γ. Πνευματικός, Αθήνα 1980.
6. McMurry, “Οργανική Χημεία”, Τόμος Ι, Κεφ. 13, Πανεπιστημονικές Εκδόσεις Κρήτης, 2001.
7. Συλλογική Έκδοση Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, “Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης, Εργαστηριακές Ασκήσεις”, 3η έκδοση, Συντονισμός και επιμέλεια Μ. Οξενκιουν - Πετροπούλου, Α. Παππά, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 2009.
8. G. W. Ewing, “Instrumental Methods of Chemical Analysis”, McGraw-Hill Book Company, 5th ed. 1985.
9. H.H. Willard, L.L. Merrit, J. A. Dean, F. A. Settle, “Instrumental Methods of Analysis”, Wadsworth 7th ed. 1988.
10. Skoog, West, Holler, “Fundamentals of Analytical Chemistry”, Saunders College Publishing 7th ed. 1996.
11. D.C. Harris, “Exploring Chemical Analysis”, Freeman 2nd ed. 1997.
12. R. Kellner, J-M. Mermet, M. Otto, H.M. Widmer, Analytical Chemistry, Wiley - VCH, Weinheim, Germany, 1998.
13. F. Roussac, A. Rouessac: Chemical Analysis, Modern Instrumentation. Methods and Techniques, 5th ed. J. Wiley and Sons Ltd., Chichester, England, 2000.
14. Methodicum Chemicum, Vol. 1: Analytical Methods, Academic Press, New York, 1974