

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 17Α

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΩΣ

# ΓΕΝΙΚΟΤΗΤΕΣ (1)

- Χρωματογραφική Ανάλυση (Χρωματογραφία):
  - Σειρά τεχνικών φυσικού διαχωρισμού και προσδιορισμού συστατικών μείγματος ανοργάνων και οργανικών ουσιών
- Ο διαχωρισμός πετυχαίνεται:
  - Με κατανομή (διασπορά, distribution) των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων
  - Μιας στατικής και μιας κινητής που βρίσκονται στη χρωματογραφική «στήλη»

# ΓΕΝΙΚΟΤΗΤΕΣ (2)

- Διαχωρισμός βασίζεται στις:
  - Διαφορές των συστατικών του μείγματος σε ορισμένες ιδιότητες:
    - Σημείο ζέσεως (πτητικότητα)
    - Πολικότητα
    - Ηλεκτρικά φορτία (για ιοντικές ενώσεις)
    - Μέγεθος μορίων
    - Άλλες
- Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη **σχετική φυσικοχημική συγγένεια** κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής «στήλης»

# ΓΕΝΙΚΟΤΗΤΕΣ (3)

## Μηχανισμός Διαχωρισμού

- Η κινητή (φέρουσα) φάση, **διερχόμενη μέσα από τη στατική**, προκαλεί **διαφορετική μετατόπιση** επάνω σε αυτή των συστατικών του μείγματος
- Τα συστατικά **διαχωρίζονται** μεταξύ τους
- (Συνήθως) **εξέρχονται από τη στήλη** σε διαφορετικές χρονικές στιγμές
- Εάν στην έξοδο της στήλης υπάρχει **σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης** της ποσότητας κάθε συστατικού, εκτός του διαχωρισμού, πραγματοποιείται κα **ποσοτικός προσδιορισμός**

# Ιστορική Ανασκόπηση (1)

- Ανακαλύφθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από Ρώσο βοτανολόγο Tswett (1903)
- Προσπάθεια διαχωρισμού χρωστικών φύλλων
- Εκχύλιση πράσινων φύλλων με πετρελαϊκό αιθέρα, διαβίβαση εκχυλίσματος σε στήλη κονιοποιημένου  $\text{CaCO}_3$
- Τα συστατικά (χλωροφύλλες) διαχωρίσθηκαν σε διάκριτες έγχρωμες ζώνες
- **Χρώμα και Γράφω** → Χρωματογραφία

# Ρώσος βοτανολόγος Tswett και το πείραμα διαχωρισμού χλωροφυλλών (1903)



# Ιστορική Ανασκόπηση (2)

- Συνεχής βελτίωση και διαμόρφωση και άλλων τεχνικών
- Σήμερα η χρωματογραφία αποτελεί την καλύτερη τεχνική:
  - Διαχωρισμού και αναλύσεως πολύπλοκων μειγμάτων
  - Απομόνωσης ευπαθών ουσιών, έγχρωμων και άχρωμων
- Εφαρμογές στη Χημεία και Άλλες Επιστήμες:
  - Βιολογία, Ιατρική, Φαρμακευτική, Επιστήμη Περιβάλλοντος, Επιστήμη Τροφίμων, Γεωπονία, κλπ

# Ιστορική Ανασκόπηση (3)

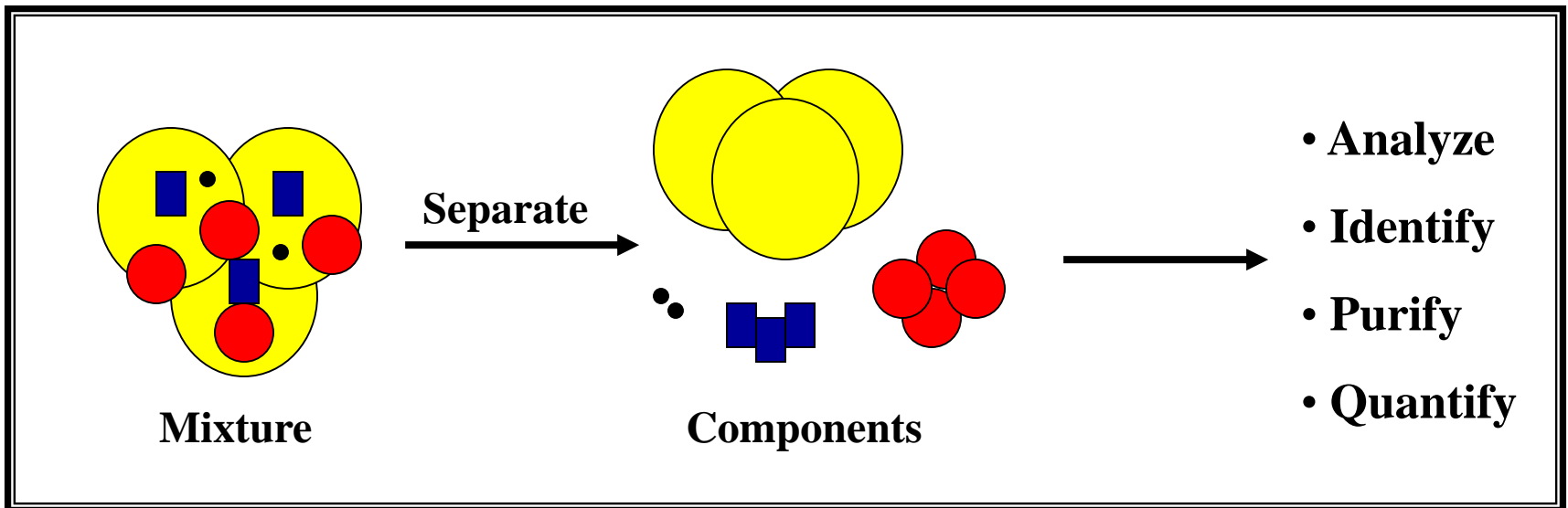
## Σπουδαιότεροι Σταθμοί στην Ανάπτυξη

- Σύνθεση πρώτης ιονανταλλακτικής ρητίνης (Adams και Holmes, 1935)
- Ανάπτυξη υγρο-υγρο-χρωματογραφίας κατανομής (Martin και Synge, 1941)  
[Βραβείο Nobel, 1954]
- Ανάπτυξη αεριοχρωματογραφίας (Martin και James, 1952)
- Ανάπτυξη υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC (τελευταία χρόνια)

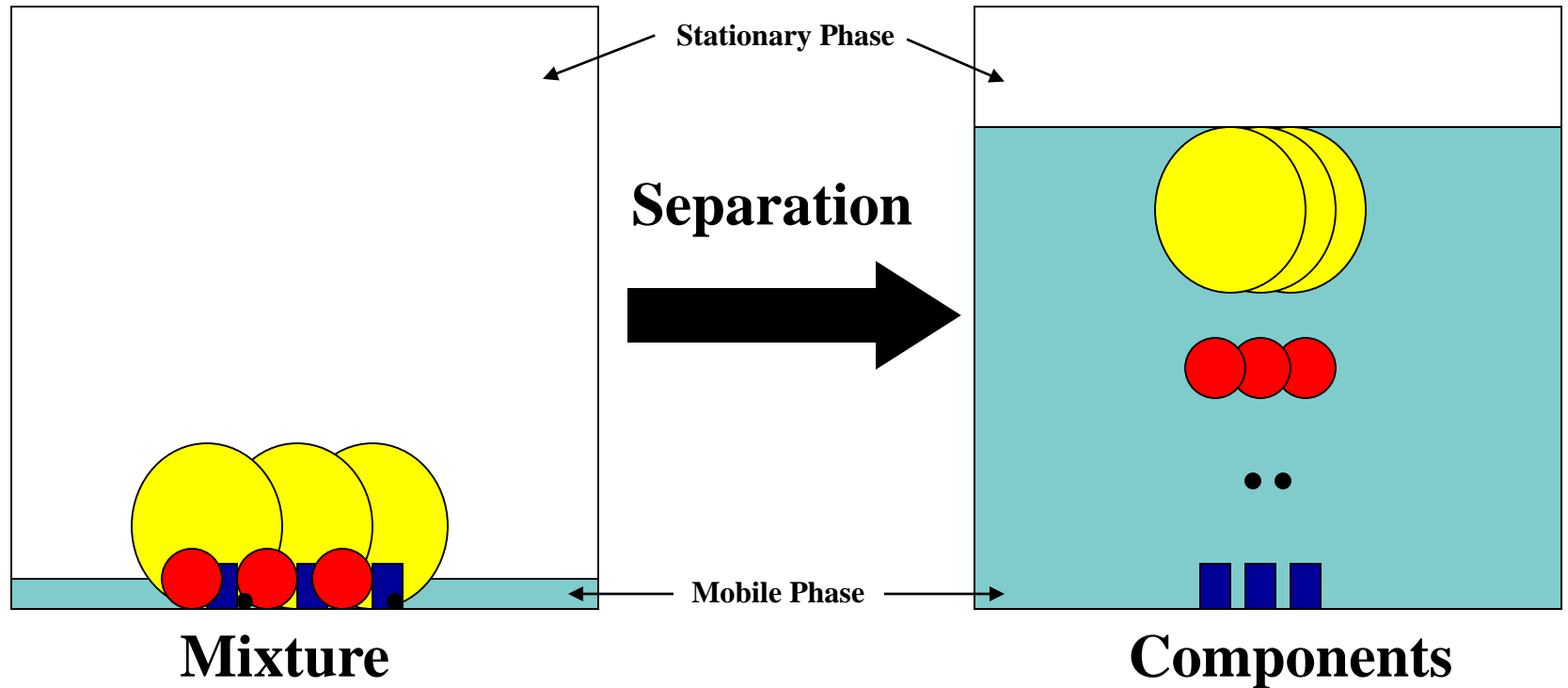


# What is Chromatography?

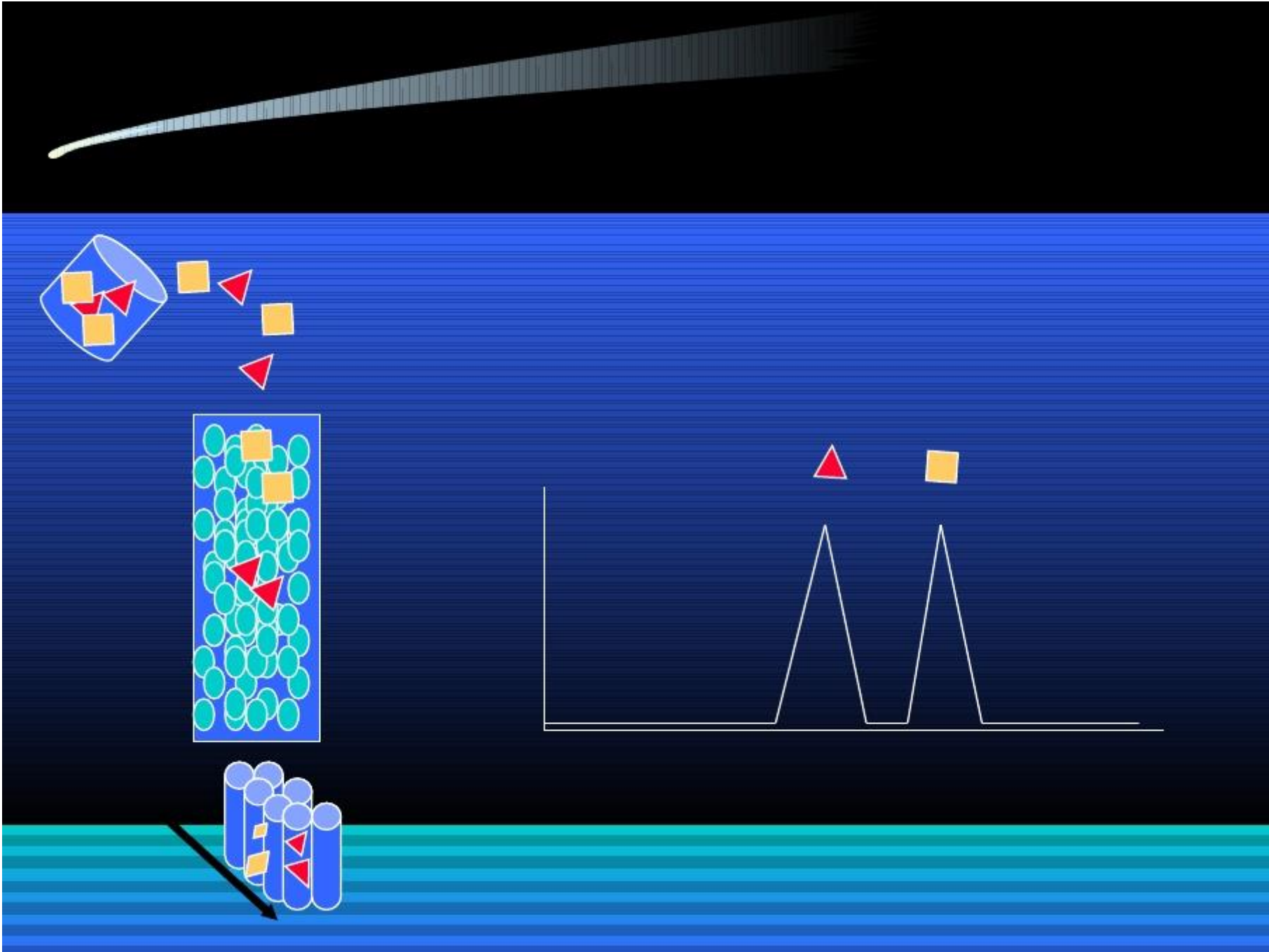
Chromatography is a technique for separating mixtures into their components in order to analyze, identify, purify, and/or quantify the mixture or components.



# Illustration of Chromatography



Component s	Affinity to Stationary Phase	Affinity to Mobile Phase
Blue	-----	Insoluble in Mobile Phase
Black	✓✓✓✓✓✓	✓✓
Red	✓✓	✓✓✓✓✓
Yellow	✓	✓✓✓✓✓✓✓✓✓✓✓✓



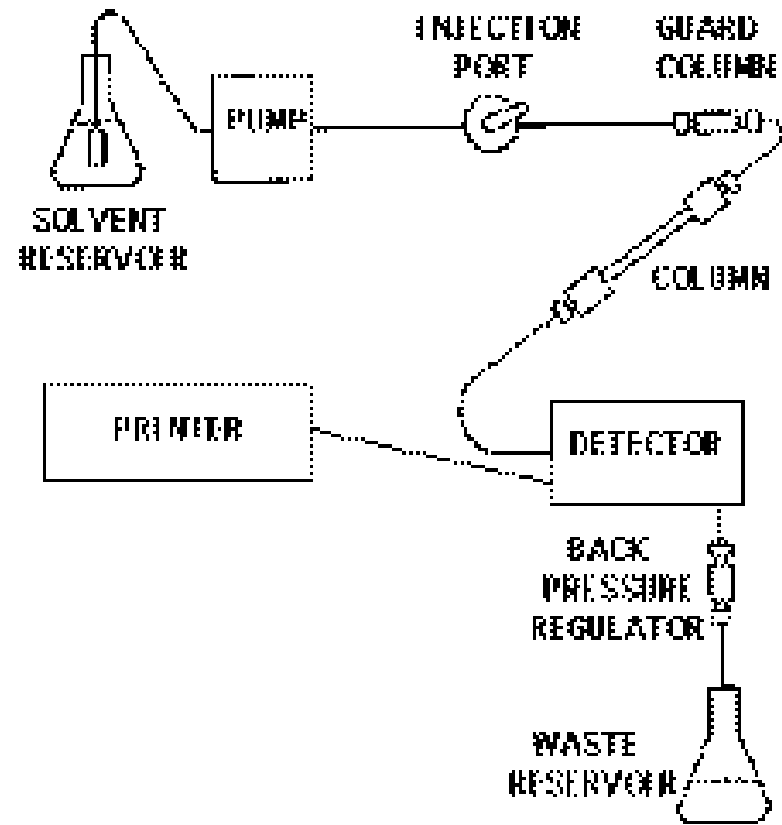
# Ταξινόμηση Χρωματογραφικών Τεχνικών (1)

- Διαφορές χρωματογραφικών τεχνικών ως προς:
  - Φύση κινητής φάσης
  - Φύση και μορφή στατικής φάσης
  - Μηχανισμός διαχωρισμού
  - Τρόπο εισαγωγής δείγματος στη στατική φάση
  - Τρόπος κίνησης συστατικών δείγματος στη στατική φάση

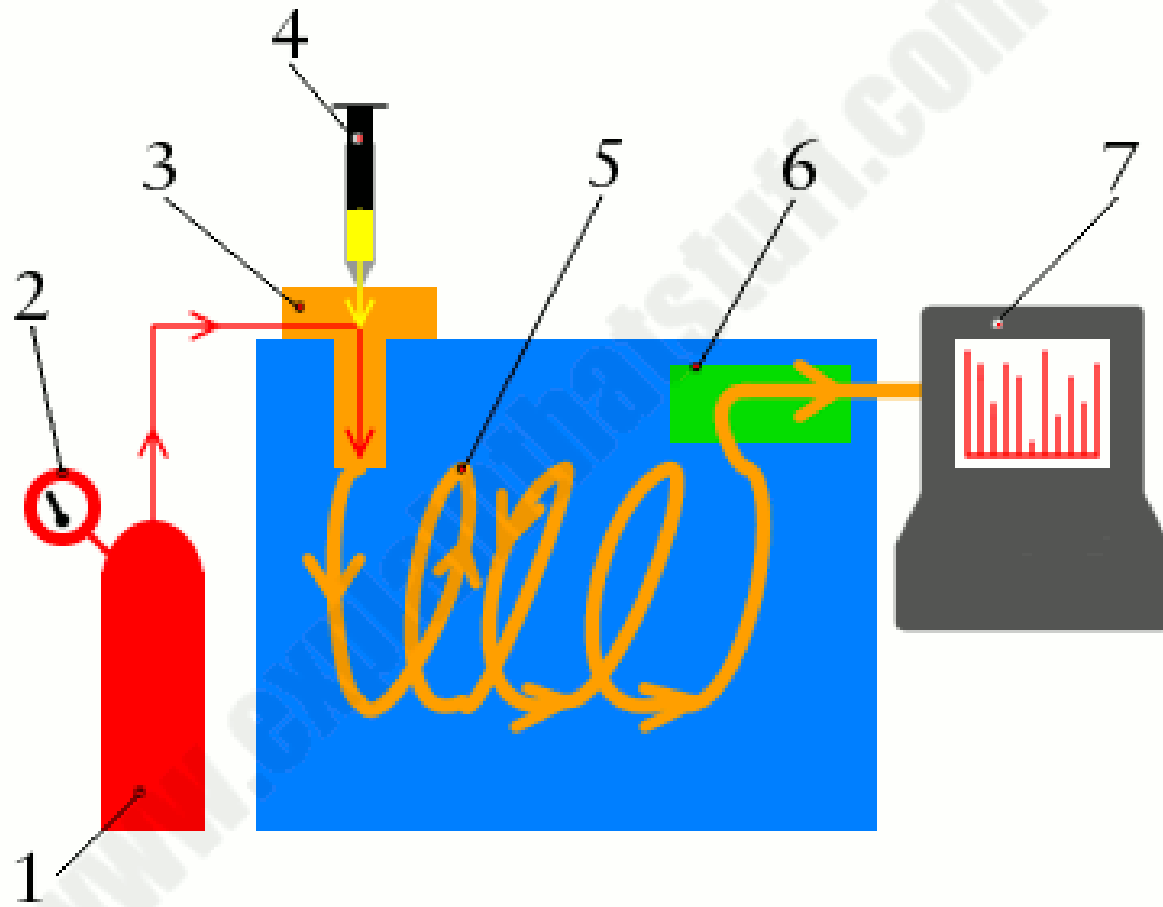
## Ταξινόμηση Χρωματογραφικών Τεχνικών (2) Με βάση φύση κινητής και στατιστικής φάσης

- Υγροχρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC). Κινητή φάση υγρή
  - Υγρο-στερεο-χρωματογραφία (LSC)
  - Υγρο-υγρο-χρωματογραφία (LLC)
- Αεριοχρωματογραφία (Gas Chromatography, GC). Κινητή φάση αέρια
  - Αεριο-στερεο-χρωματογραφία (GSC)
  - Αεριο-υγρο-χρωματογραφία (GLC)

# Αρχή Υγροχρωματογραφίας



# Αρχή Αεριοχρωματογραφίας



## Ταξινόμηση Χρωματογραφικών Τεχνικών (3) Με βάση μηχανισμό διαχωρισμού

1. Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography)
2. Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (ion-exchange chromatography)
3. Χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography)
4. Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion chromatography)
5. Χρωματογραφία συγγενείας (affinity chromatography)

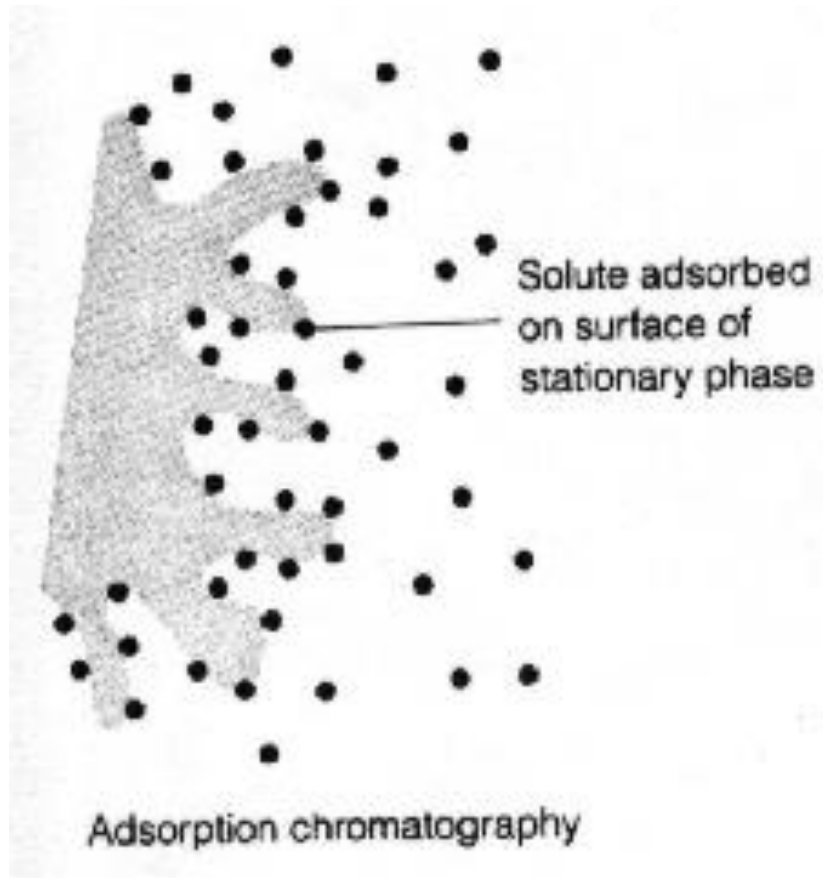


# Χρωματογραφία Προσρόφησης

## Adsorption Chromatography

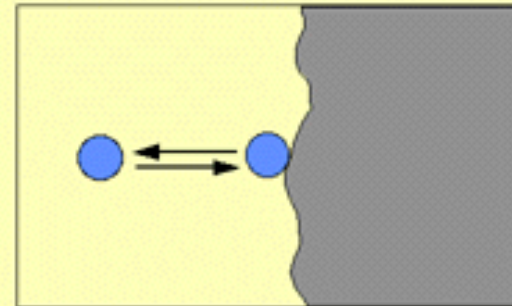
- Παλαιότερη χρωματογραφική τεχνική
- Τα συστατικά μείγματος αλληλεπιδρούν (προσροφούνται) στην επιφάνεια ή ορισμένες θέσεις της επιφάνειας στερεής (συνήθως) στατικής φάσης
- Η ισορροπία μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων και των σωματιδίων στην κινητή φάση (υγρή ή αέρια), πετυχαίνει το διαχωρισμό

# Αρχή Μηχανισμού Προσρόφησης



## Adsorption chromatography

The stationary phase is a solid. Separation is due to a series of adsorption/desorption steps.

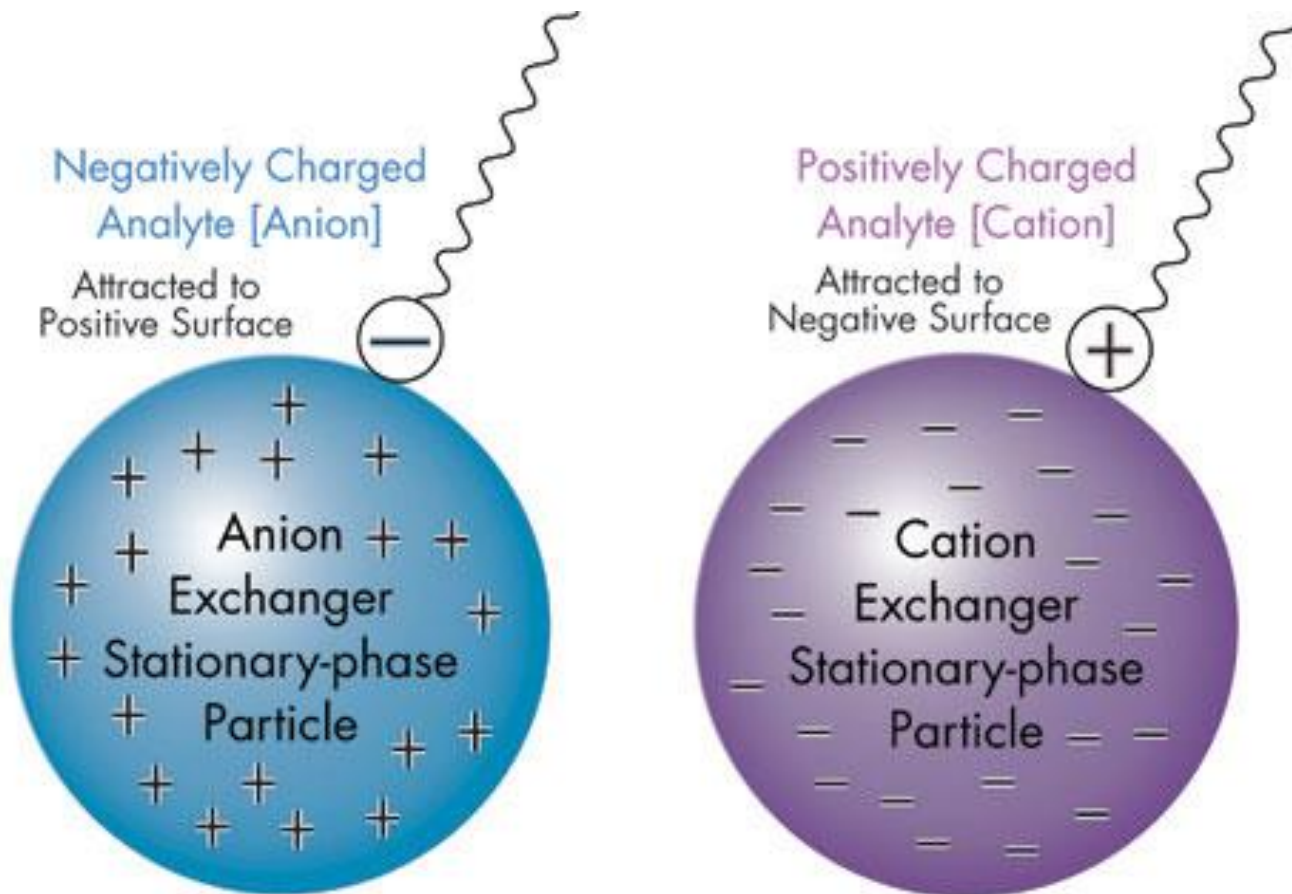


# Μηχανισμός Ιονανταλλαγής

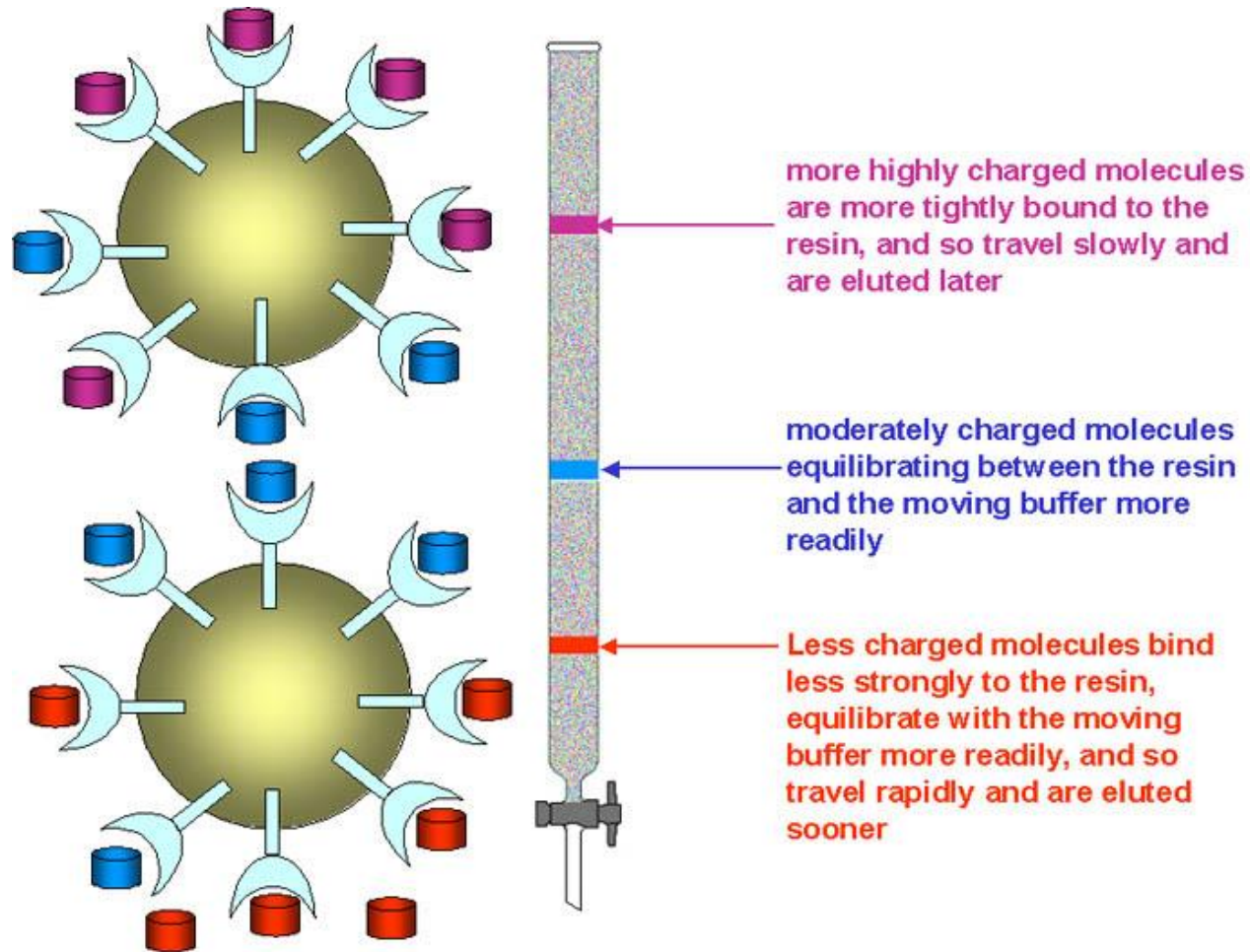
## Ion-exchange chromatography

- Χρησιμοποιούνται **ιονανταλλακτικές ρητίνες ή γέλες** ως στερεή στατική φάση και ένα υγρό ως κινητή φάση
- Ιοντικά συστατικά μείγματος συγκρατούνται **ηλεκτροστατικά** σε διάφορο βαθμό από τις με αντίθετο φορτίο ιοντικές ομάδες στατικής φάσης

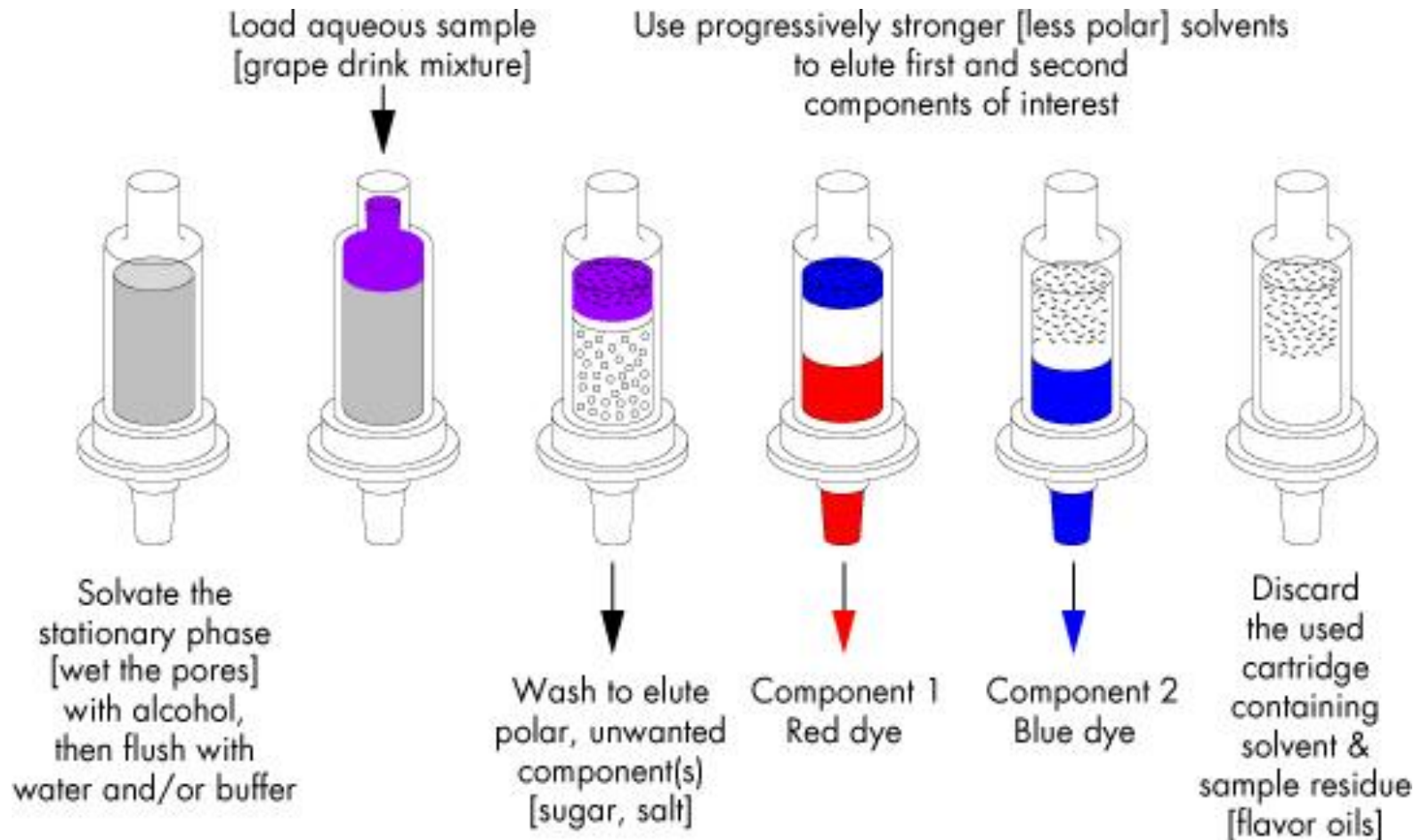
# Μηχανισμός Ιονανταλλαγής



# Μηχανισμός Ιονανταλλαγής σε Χρωματογραφία Στήλης



# Μηχανισμός Ιονανταλλαγής σε Χρωματογραφία Μικροστηλών Μιας Χρήσεως

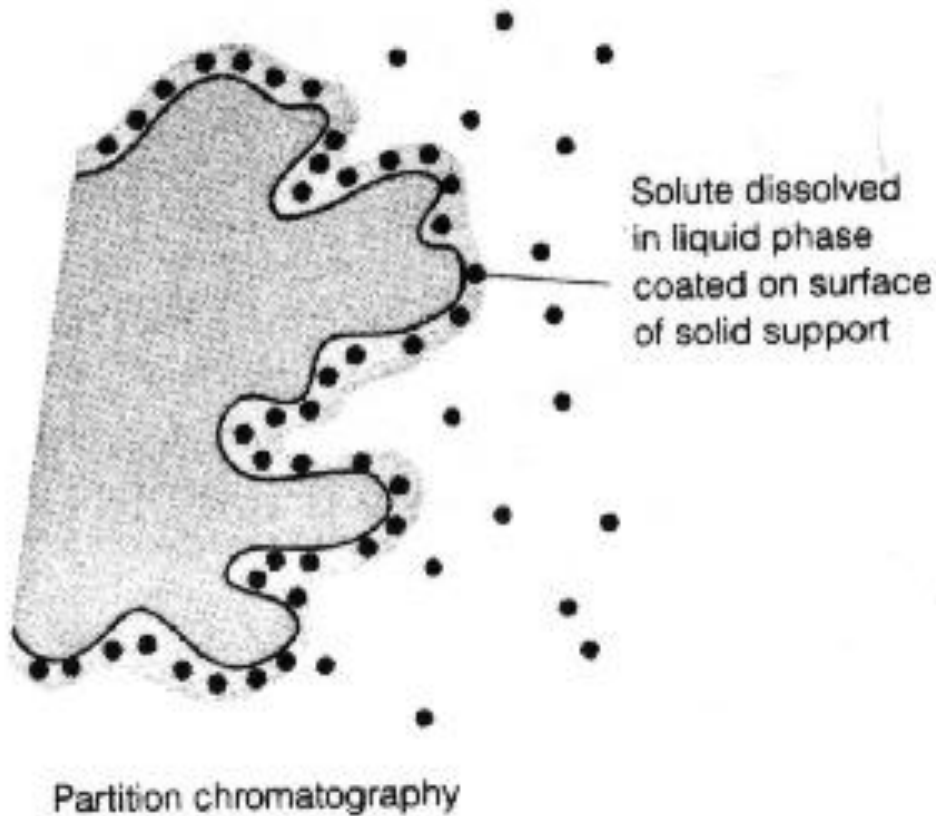


# Μηχανισμός Κατανομής

## Partition chromatography

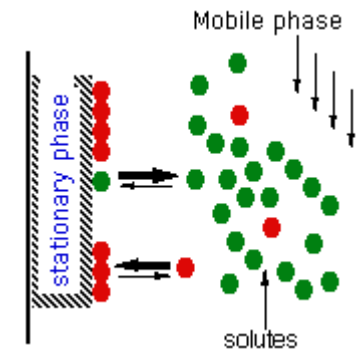
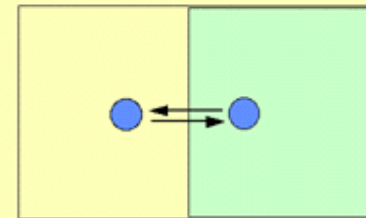
- Συστατικά μείγματος **κατανέμονται** μεταξύ **λεπτής στιβάδος υγρής στατικής φάσης** που σχηματίζεται στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος και μιας **υγρής κινητής φάσης**
  - Χρωματογραφία **κανονικής φάσης** (normal phase), όταν υγρή στατική φάση πολικότερη κινητής φάσης
  - Χρωματογραφία **αντίστροφης φάσης** (reversed phase), όταν κινητή φάση πολικότερη υγρής στατικής φάσης

# Μηχανισμός Κατανομής Partition Chromatography



## Partition chromatography

Separation is based on solute partitioning between two liquid phases.  
(relative solubility)





# Μηχανισμός Μοριακού Αποκλεισμού (1)

## Molecular exclusion chromatography

- Σε ιδανικές συνθήκες **δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση** συστατικών μείγματος και στατικής φάσης
- Αντίθεση με όλους τους άλλους μηχανισμούς
- Υγρή ή αέρια κινητή φάση διέρχεται μέσα από **πορώδη πηκτή**, με μέγεθος πόρων τέτοιο που να επιτρέπει την είσοδο στο δίκτυο της πηκτής μόνο μικρών μορίων, **αποκλείοντας τα μεγάλα**

# Μηχανισμός Μοριακού Αποκλεισμού (2)

## Molecular exclusion chromatography

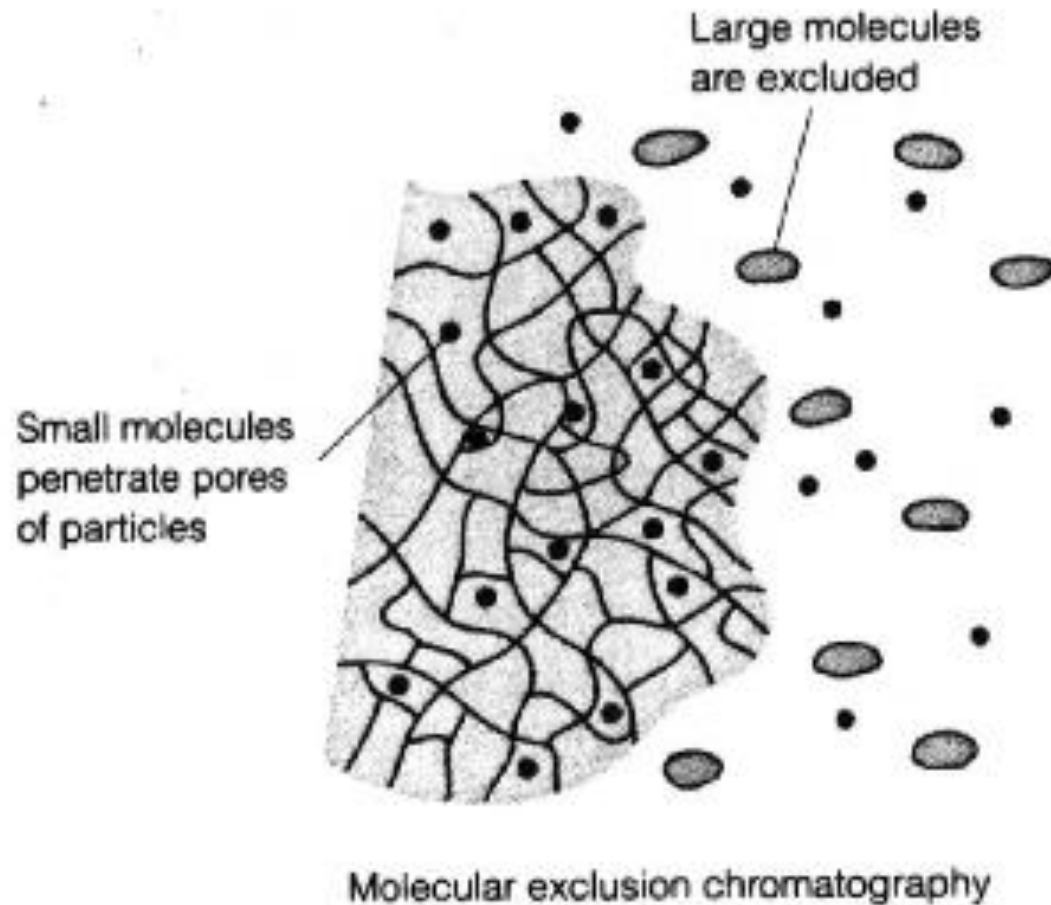
- Μόρια μεγάλου μεγέθους διέρχονται ταχέως χωρίς να εισέρχονται στο δίκτυο της πηκτής
- Μόρια μικρού μεγέθους μπαίνοντας στο δίκτυο αργούν να εξέλθουν από τη στήλη
  - Χρειάζονται μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης
  - Τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους
  - Τα μόρια μεγάλου μεγέθους εξέρχονται πρώτα

# Μηχανισμός Μοριακού Αποκλεισμού (3)

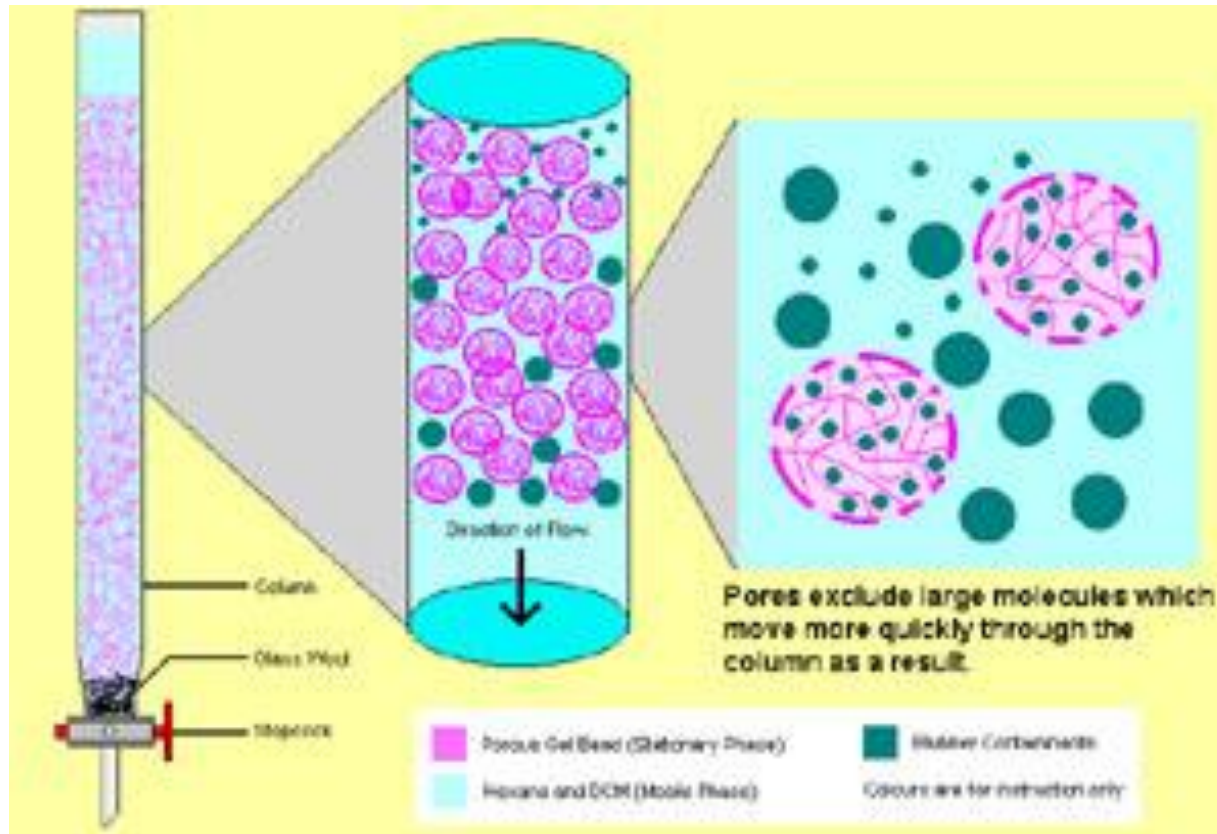
## Molecular exclusion chromatography

- Γνωστή και ως:
  - Χρωματογραφία διηθήσεως πηκτής (γέλης) (Gel filtration chromatography) όταν χρησιμοποιείται **υδατική** κινητή φάση
  - Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής (γέλης) (Gel permeation chromatography) όταν χρησιμοποιείται **οργανική** κινητή φάση

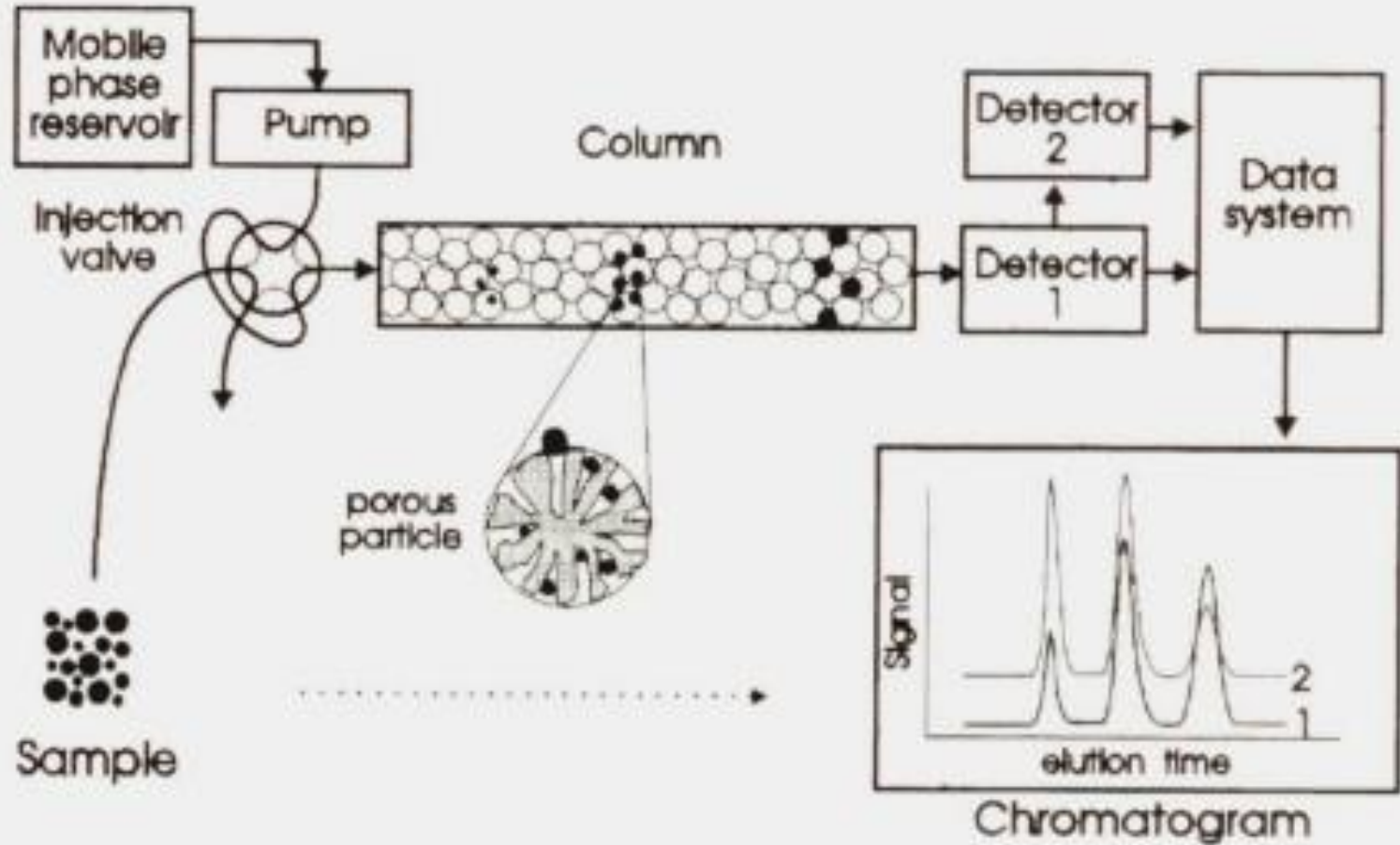
# Μηχανισμός Μοριακού Αποκλεισμού



# Μηχανισμός Μοριακού Αποκλεισμού



# Αρχή Χρωματογραφίας Μοριακού Αποκλεισμού

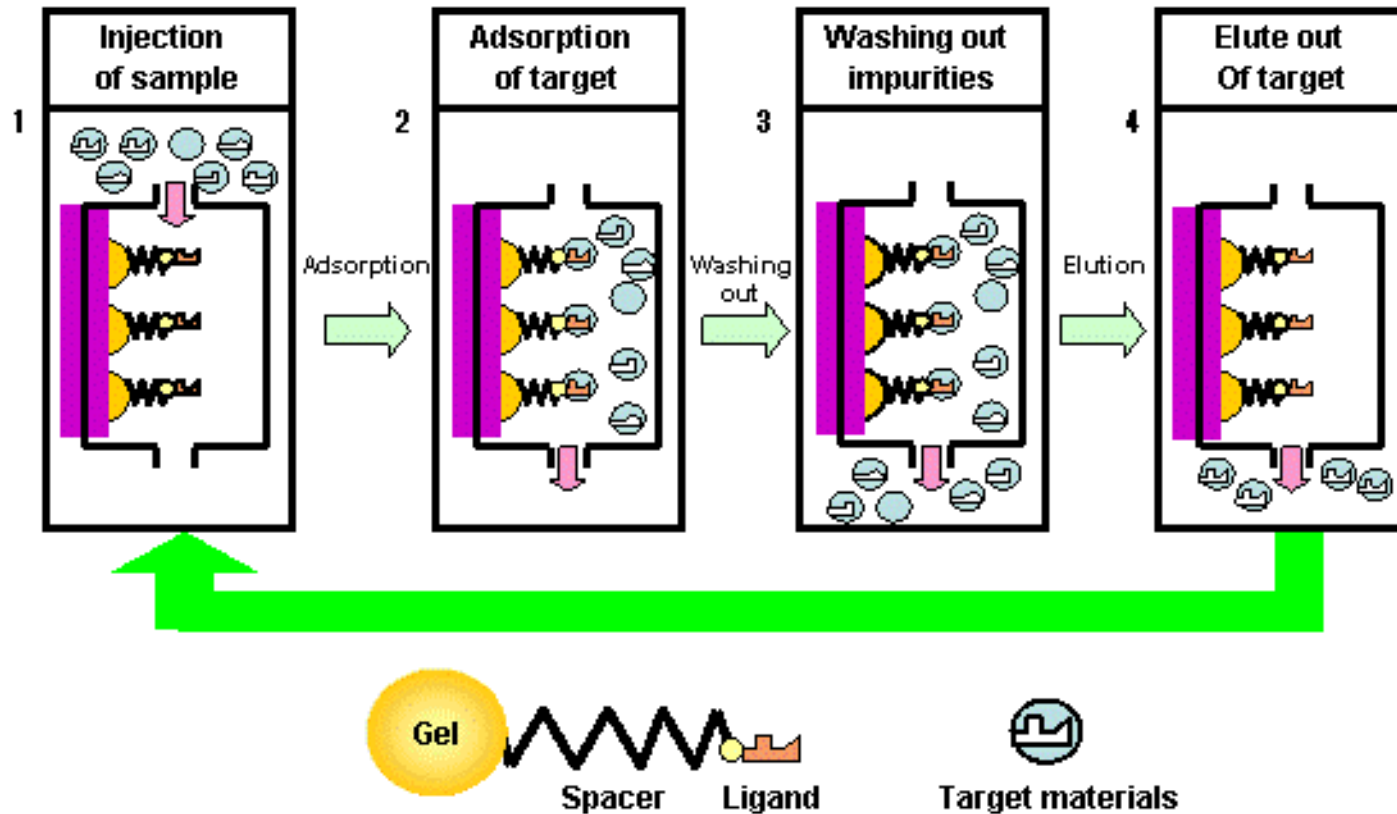


# Μηχανισμός Συγγενείας

## Affinity chromatography

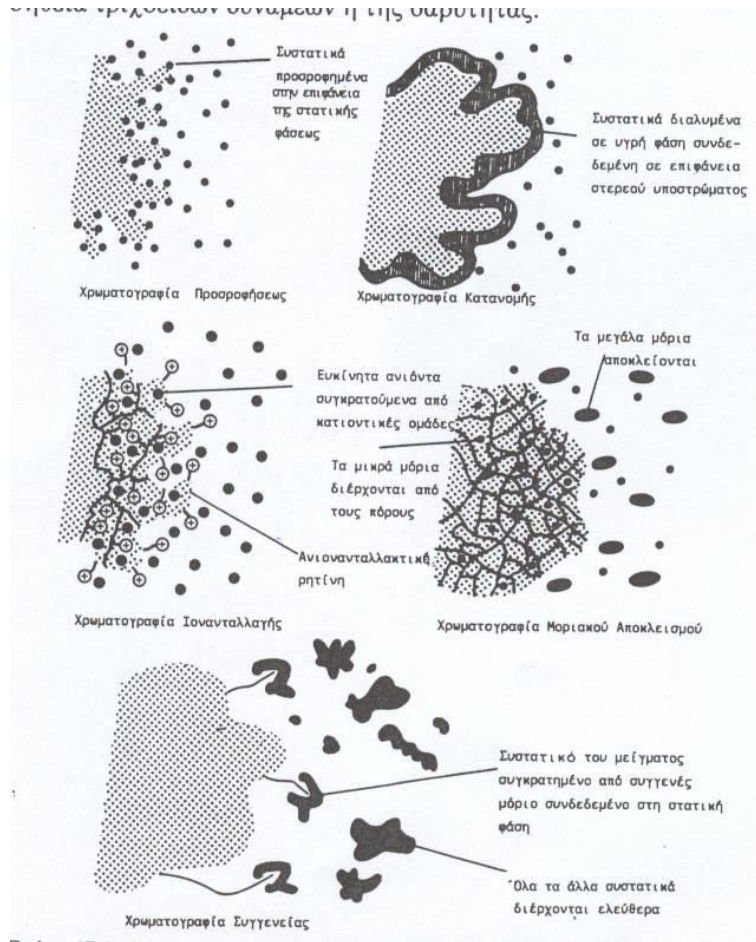
- Νεώτερη και περισσότερο **εκλεκτική** τεχνική
- Βασίζεται στην εξαιρετικά **εξειδικευμένη αλληλεπίδραση** ενός μορίου του μείγματος με ένα μόριο χημικά δεσμευμένο (ακινητοποιημένο) στη στερεή στατική φάση

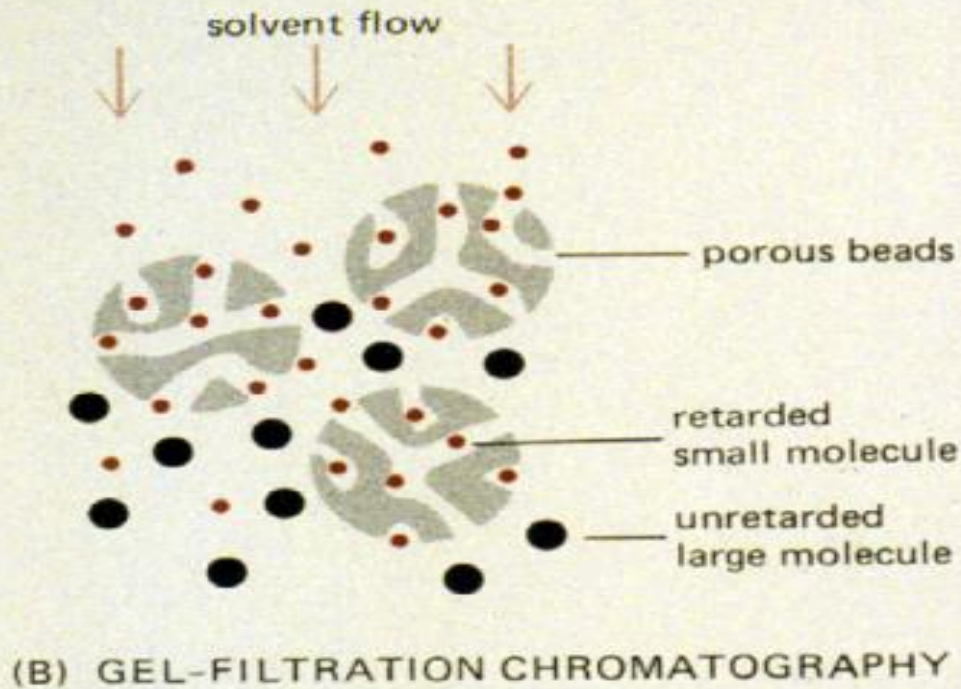
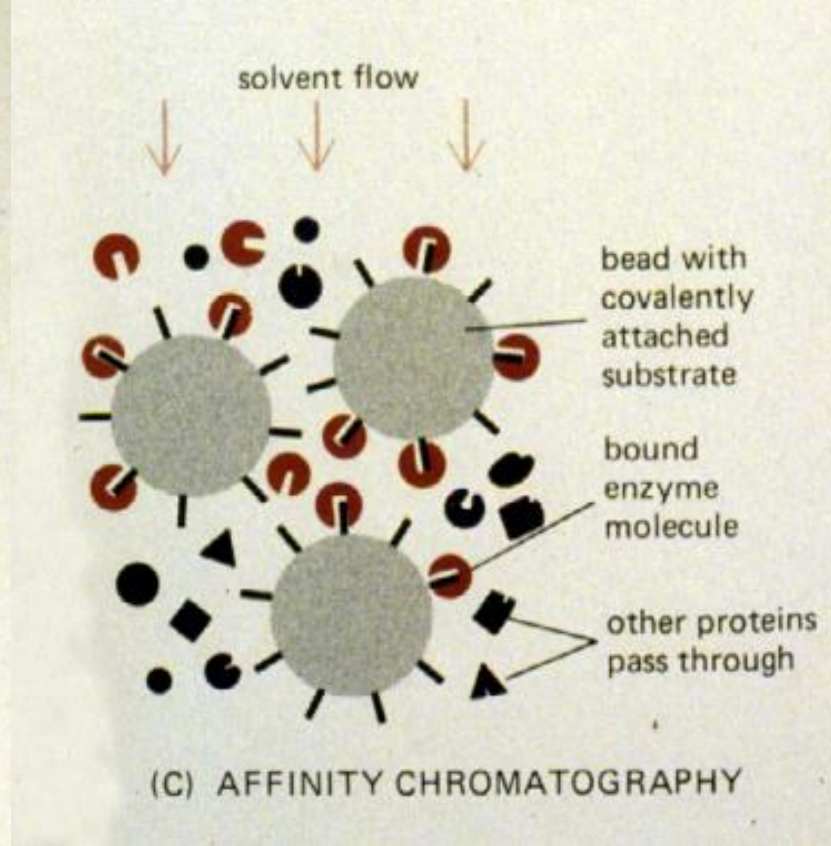
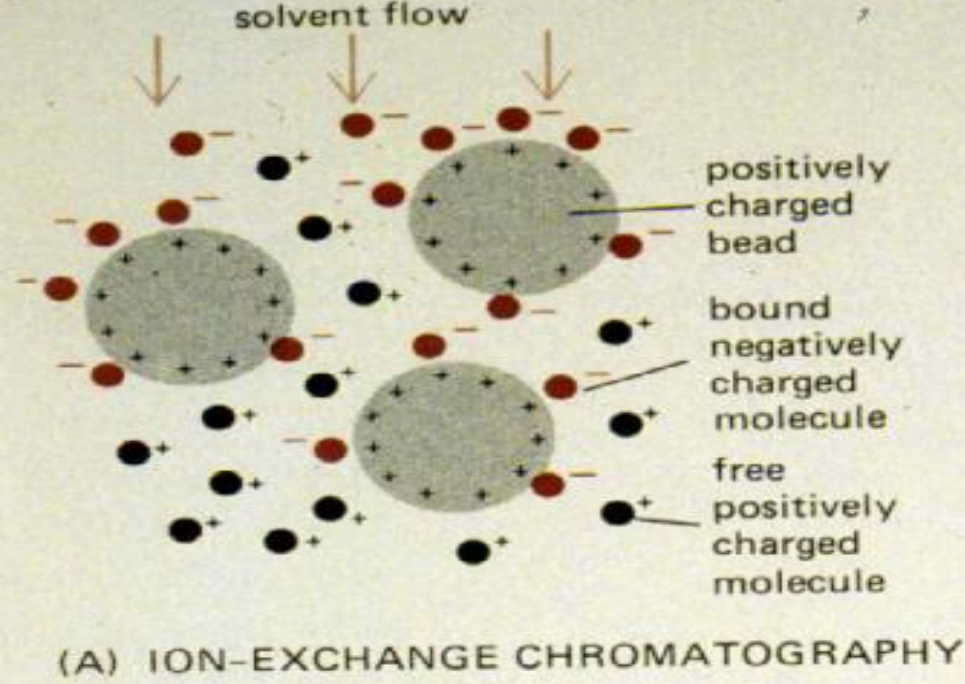
# Αρχή Χρωματογραφίας Συγγενείας





# Κυριότερα είδη χρωματογραφίας με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού





(A) uses charge, (B) uses pores, and (C) uses covalent bonds to create the differential affinities among the mixture components for the stationary phase.

# Ταξινόμηση με βάση φυσική μορφή στατικής φάσης

1. Χρωματογραφία στήλης (column chromatography) (οι περισσότερες τεχνικές)
  - Χρωματογραφία πληρωμένων στηλών
  - Χρωματογραφία ανοικτών τριχοειδών στηλών
2. Επίπεδη χρωματογραφία (planar chromatography)
  - Χρωματογραφία χάρτη
  - Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

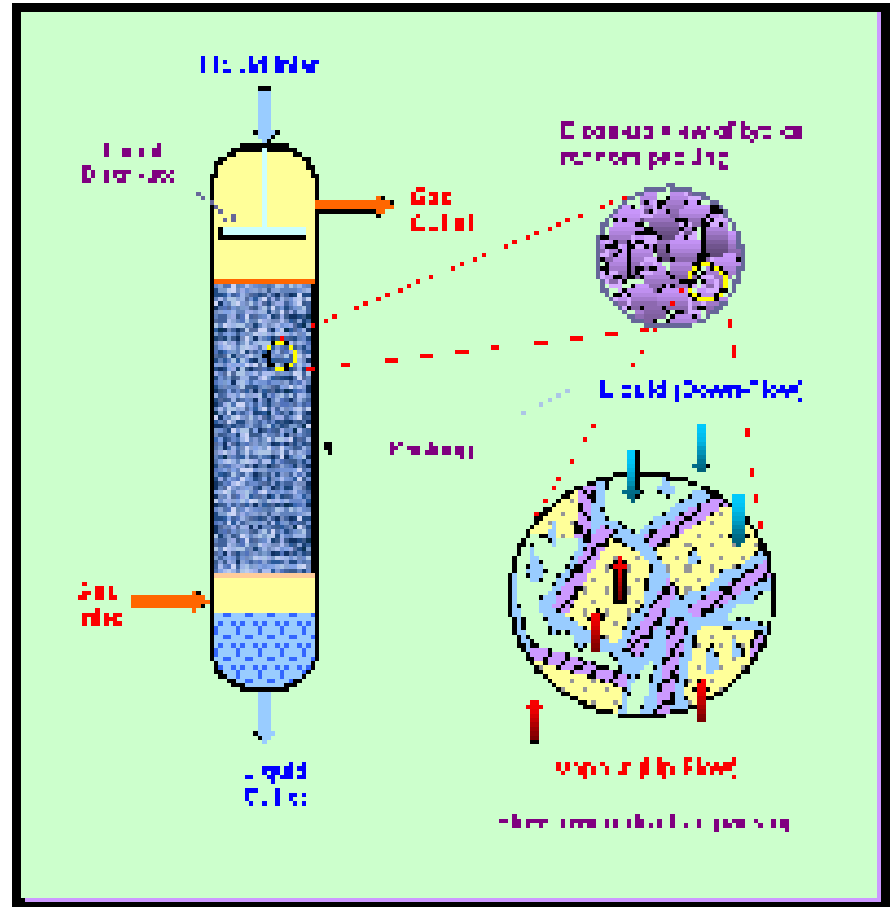
# Χρωματογραφία Στήλης (1)

- Στατική φάση συγκρατείται σε μια στήλη
- Η κινητή φάση διαβιβάζεται
  - Με πίεση
  - Ρέει λόγω βαρύτητας
- Χρωματογραφία πληρωμένων στηλών (packed columns chromatography)
  - Στατική φάση μικρά στερεά σωματίδια (συχνά επικαλυμμένα με λεπτό υμένα υγρού) που περιέχεται σε ένα ανοικτό σωλήνα

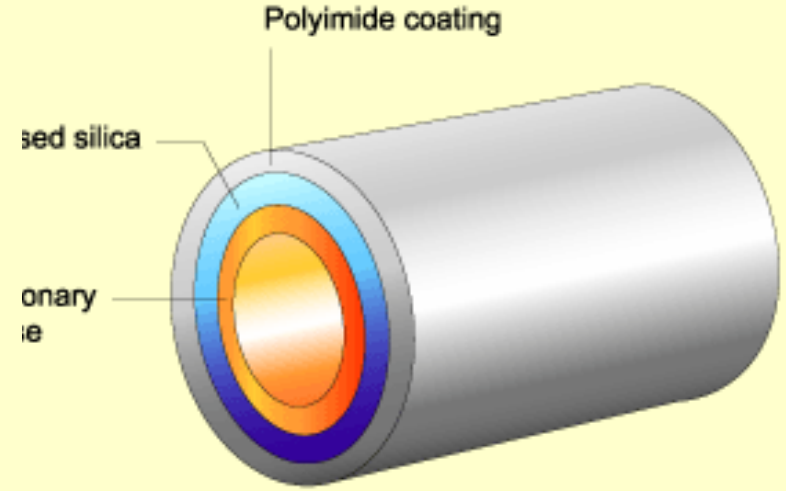
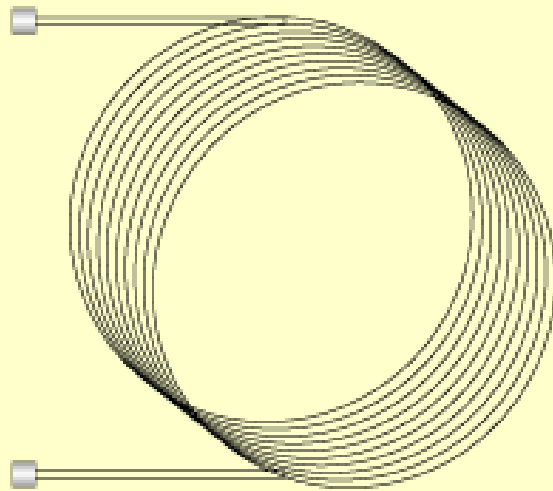
# Χρωματογραφία Στήλης (2)

- Χρωματογραφία ανοικτών τριχοειδών στηλών (open capillary (tubular) chromatography)
  - Υγρή στατική φάση εξαναγκάζεται να διέλθει σε ένα τριχοειδή σωλήνα
  - Επικαλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα του σωλήνα με ένα **λεπτό υμένα**
  - Συγκρατείται από **τριχοειδείς σωλήνες** ή χημικό δεσμό

# Πληρωμένη Στήλη Χρωματογραφίας



# Τριχοειδής Στήλη



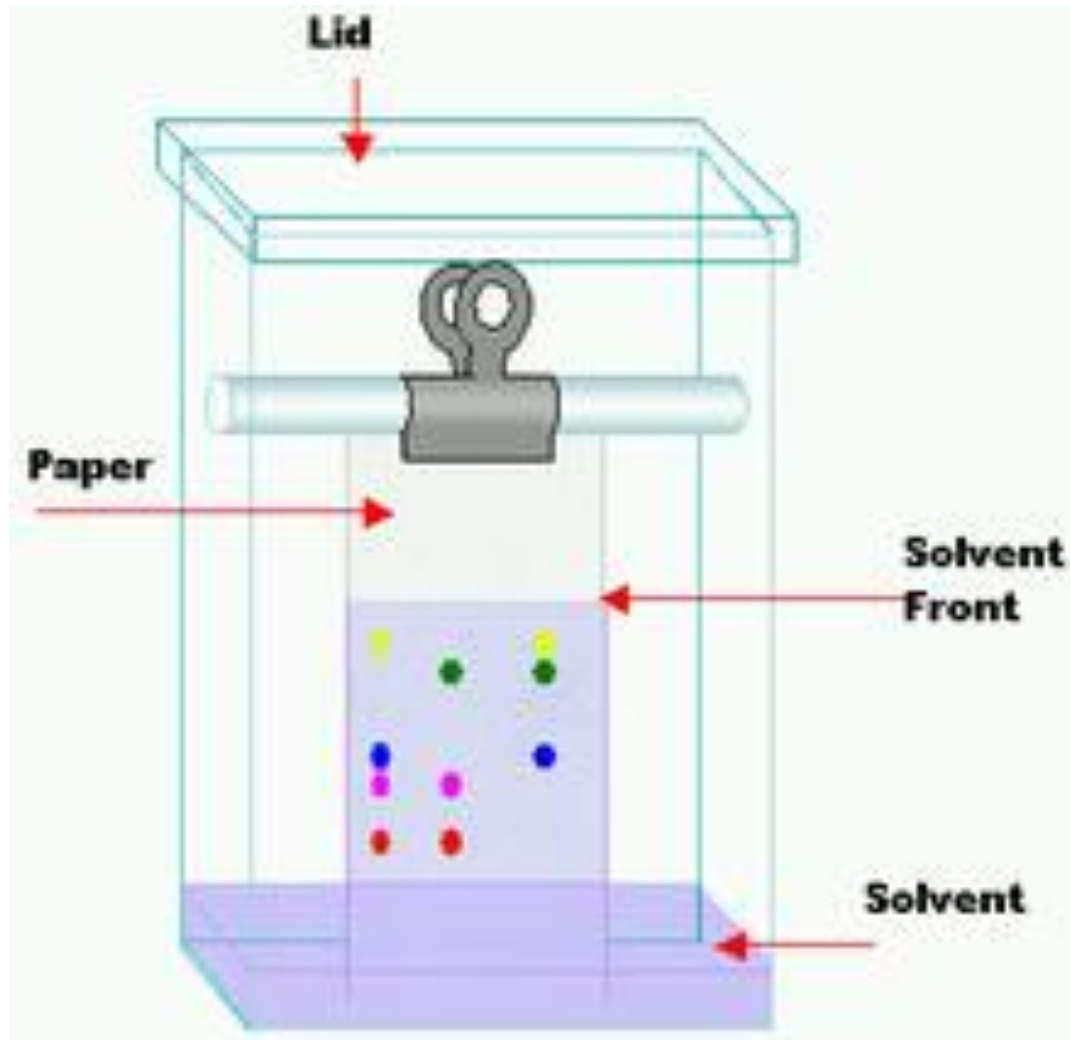
# Επίπεδη Χρωματογραφία

## Planar Chromatography

- Η στατική φάση είναι επίπεδη
  - Λωρίδα χάρτη (χρωματογραφία χάρτη) (Paper Chromatography, PC)
  - Λεπτή στιβάδα στερεού επιστρωμένη σε υάλινη ή από άλλο υλικό πλάκα (Thin Layer Chromatography, TLC)
- Η υγρή κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη στατική με τη βοήθεια τριχοειδών δυνάμεων ή βαρύτητας



# Χρωματογραφία Χάρτη



# Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας για Διαχωρισμό Συστατικών Χλωροφύλλης



# Ταξινόμηση Τεχνικών Χρωματογραφίας

Κινητή φάση	Στατική φάση	Μηχανισμός	Μορφή στατικής φάσεως	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	Αέρια-στερεή χρωμ/φία
		Μοριακός αποκλεισμός	Στήλη	Αέρια-στερεή χρωμ/φία μοριακού αποκλεισμού
	Υγρό (σε στερεό φορέα ή σε τριχοειδή σωλήνα)	Κατανομή	Στήλη (πληρωμένη ή ανοικτή τριχοειδής)	Αέρια-υγρή χρωμ/φία ή απλώς αέρια χρωμ/φία

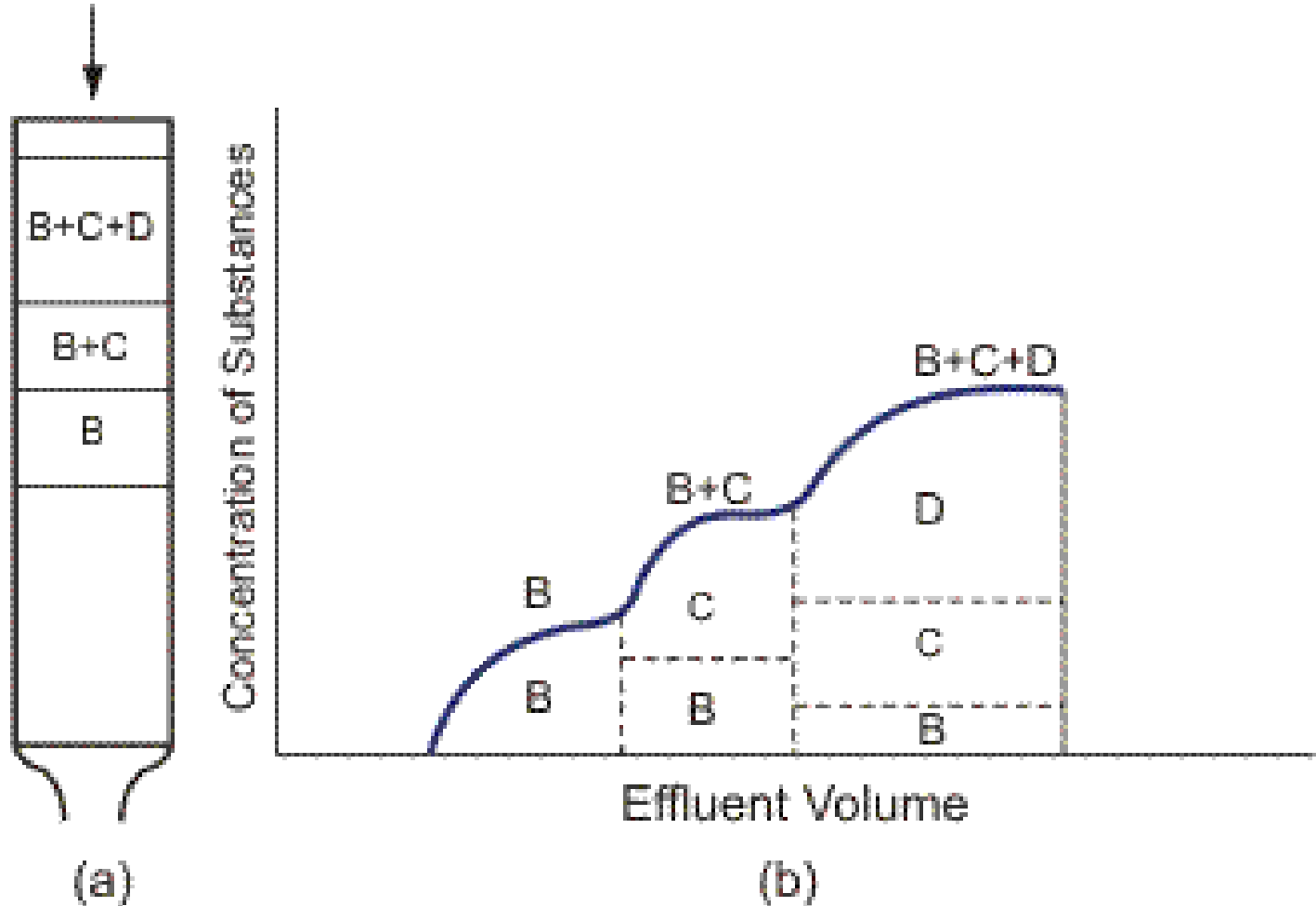
# Ταξινόμηση με βάση τρόπο εισαγωγής και κίνησης δείγματος

1. Μετωπική χρωματογραφία (frontal chromatography)
2. Χρωματογραφία εκτοπίσεως (displacement chromatography)
3. Χρωματογραφία εκλούσεως (elution chromatography) (η σπουδαιότερη)

# Μετωπική χρωματογραφία

- Το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στη στήλη συνεχώς
- Ο διαλύτης του δείγματος δρα 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, κλπ
- Δεν πετυχαίνει πλήρη διαχωρισμό
- Χρησιμοποιείται για προσυγκέντρωση ιχνοποσοτήτων ουσιών ή καθαρισμό μεγάλων όγκων ή αέριων δειγμάτων

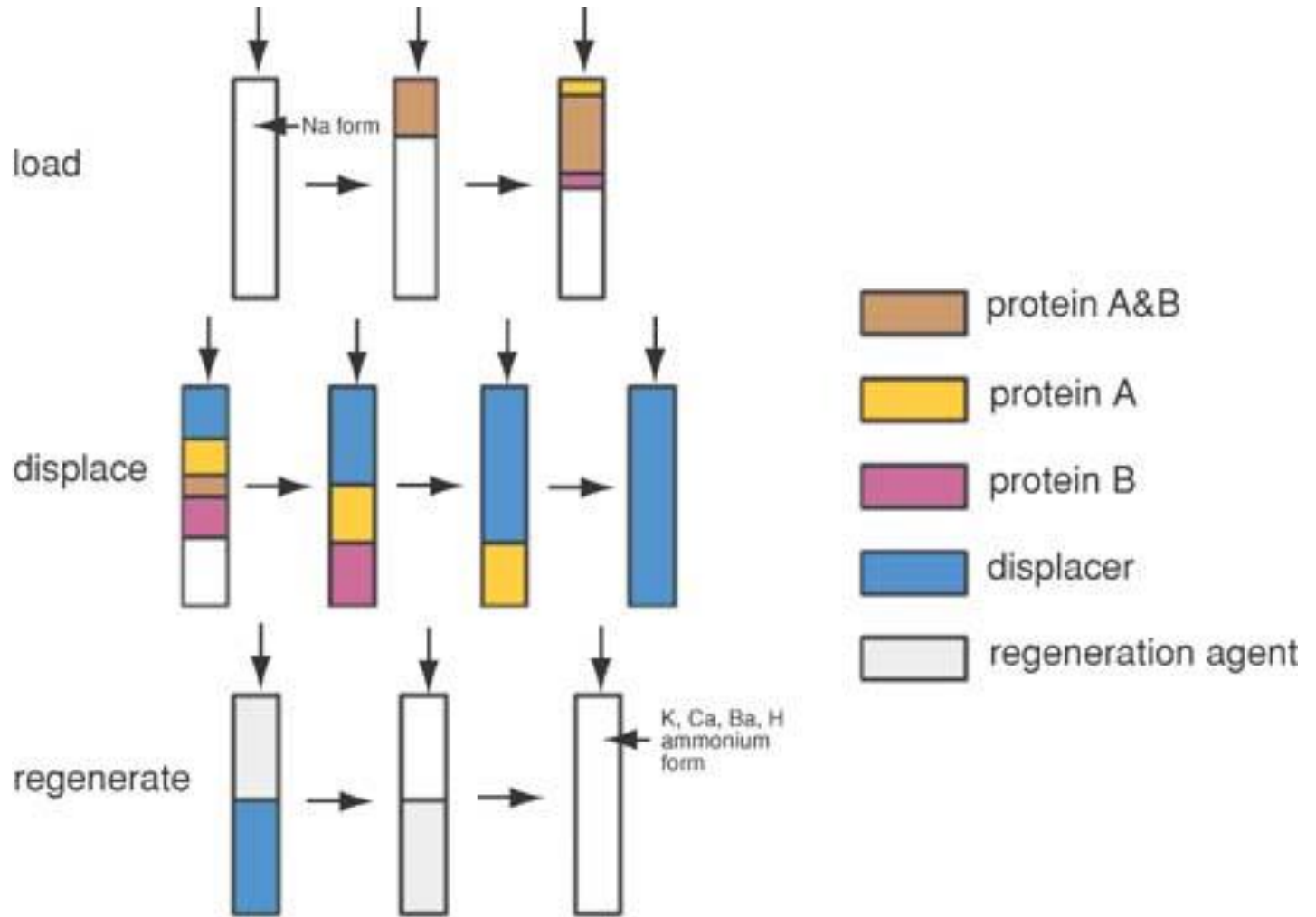
# Αρχή Μετωπικής Χρωματογραφίας



# Χρωματογραφία Εκτόπισης

- Χρησιμοποιείται κινητή φάση, που συγκρατείται ισχυρά από τη στατική φάση, εκτοπίζοντας σε διάφορο βαθμό τα συστατικά του δείγματος μέσα από τη στήλη
- Γενικά πετυχαίνει ατελείς διαχωρισμούς
- Πλεονεκτεί γιατί μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεγάλοι όγκοι δείγματος
- Χρησιμοποιείται σε παρασκευαστικούς και βιομηχανικής κλίμακας διαχωρισμούς

# Αρχή Χρωματογραφίας Εκτόπισης



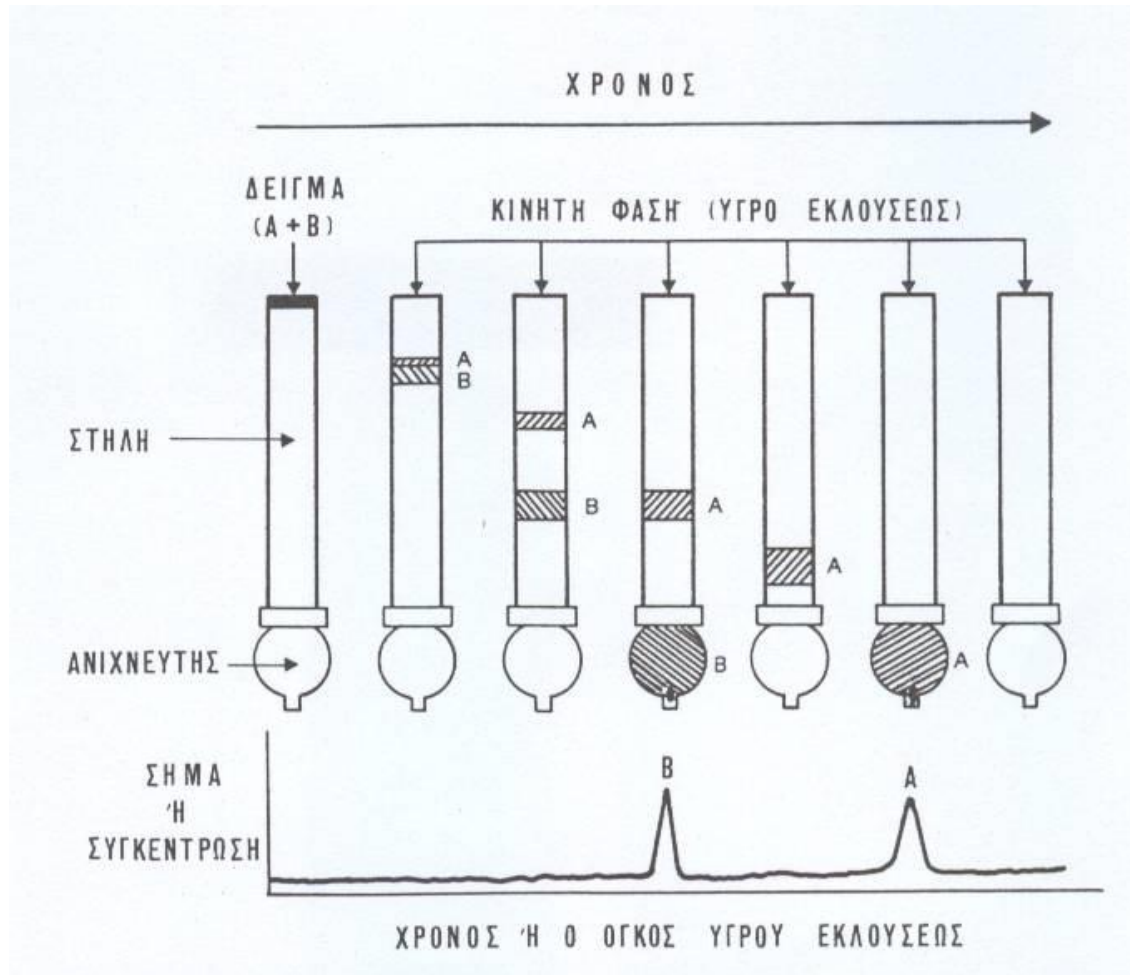


# Αρχή Χρωματογραφίας Έκλουσης

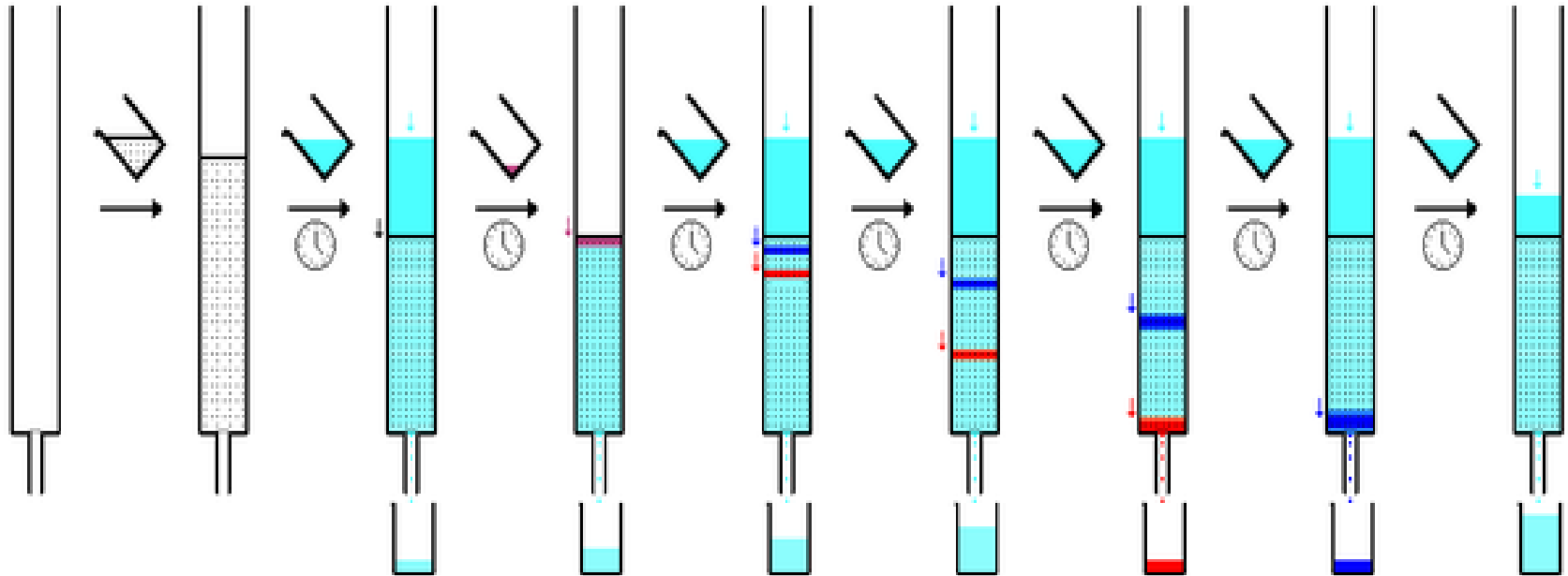
## Elution Chromatography

- Σπουδαιότερη τεχνική στην ανάλυση
- Τα συστατικά δείγματος μεταφέρονται από την κινητή φάση με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στατικής φάσης
- Εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους
- Συνήθως η στήλη είναι έτοιμη για τον επόμενο διαχωρισμό

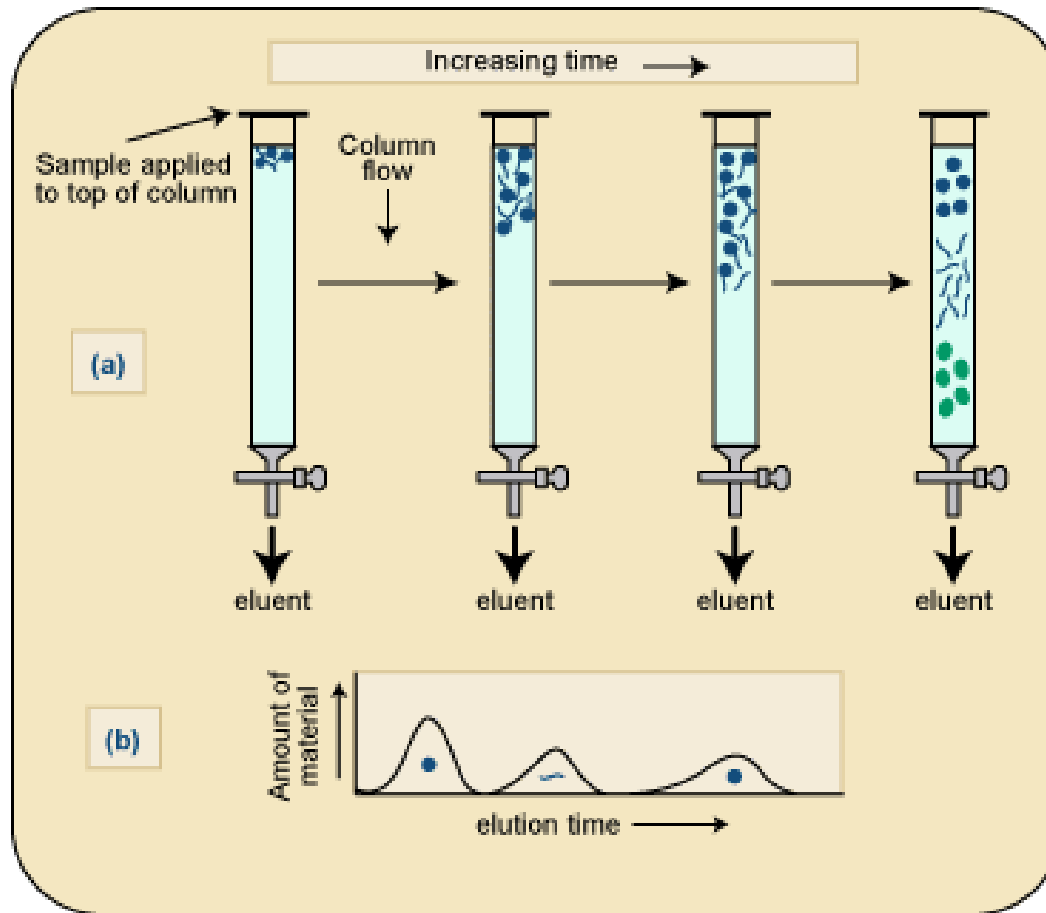
# Σχηματική παράσταση διαχωρισμού με χρωματογραφία έκλυσης



# Χρωματογραφία έκλουσης σε στήλη (1)



# Χρωματογραφία έκλουσης σε στήλη (2)



# Developing the Chromatograms

50% Isopropanol



0 min



4 min



9 min



14 min



20 min



25 min



30 min



35 min



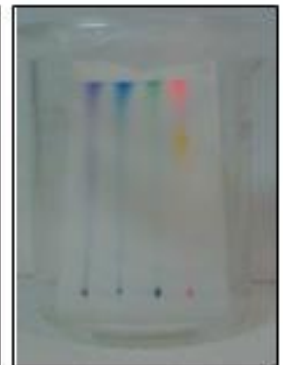
40 min



45 min



50 min



55 min

# Βασική αρχή χρωματογραφίας (1)

- Ορισμένη ποσότητα δείγματος προστίθεται στην κινητή φάση στην κορυφή ή αρχή στήλης
- Το δείγμα μετακινείται στη στήλη με τη βοήθεια προστιθέμενης κινητής φάσης
- Τα συστατικά κατανέμονται (μερίζονται) με κάποιο μηχανισμό μεταξύ στατικής και κινητής φάσης
- Το κλάσμα συστατικού που βρίσκεται στην κινητή φάση μετακινείται ερχόμενο σε επαφή με νέο τμήμα κινητής φάσης, υφιστάμενο νέο μερισμό

# Βασική αρχή χρωματογραφίας (2)

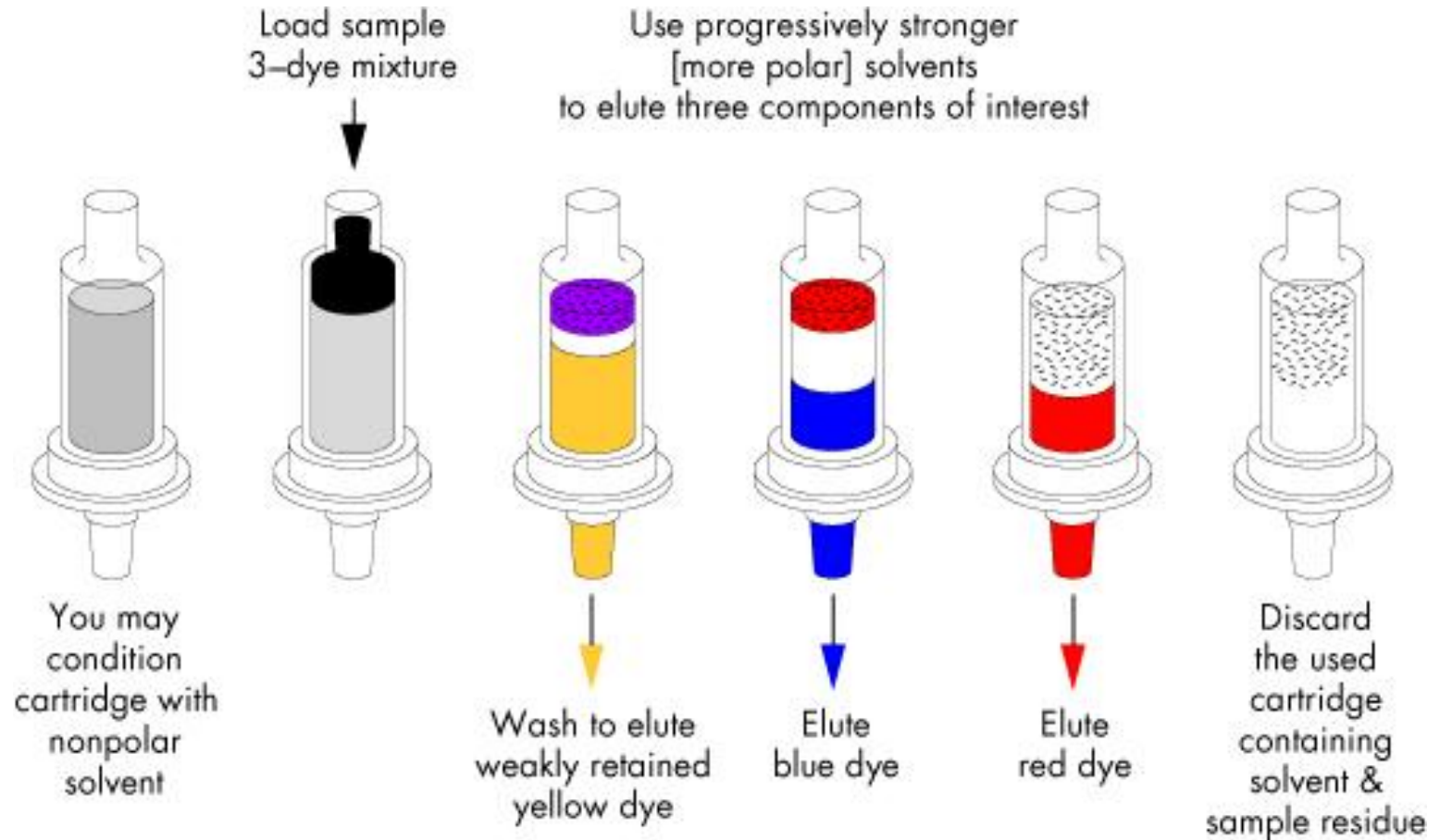
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές με διαβίβαση συνεχώς (συνήθως με σταθερή ταχύτητα) νέας κινητής φάσης στη στήλη
- Τα συστατικά μετακινούνται **μόνον όταν βρίσκονται στην κινητή φάση**
- Η ταχύτητα μετακίνησης εξαρτάται από το κλάσμα χρόνου παραμονής στην κινητή φάση
- Το κλάσμα χρόνου παραμονής συνάρτηση του συντελεστή κατανομής (μερισμού) στις δύο φάσεις

## Βασική αρχή χρωματογραφίας (3)

- Συστατικά με διαφορετικούς συντελεστές κατανομής (μερισμού) μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από τη στήλη
- Αποτέλεσμα να διαχωρίζονται σε ζώνες
- Τέλος τα συστατικά εξέρχονται από τη στήλη
- Τα εξερχόμενα συστατικά ανιχνεύονται με κάποιο αναλυτικό σύστημα ή συλλέγονται



# Γενικό πρωτόκολλο υγροχρωματογραφίας έκλουσης κανονικής φάσης



# Ορολογία Χρωματογραφίας (1)

- Κινητή φάση (υγρό ή αέριο): Υγρό ή αέριο εκλούσεως (eluent)
- Εξερχόμενο διάλυμα από τη στήλη: Έκλουσμα (eluate)
- Διαδικασία διαβίβασης υγρού (ή αερίου) μέσα από τη στήλη: Έκλουση (elution)
  - Γραμμική έκλουση: σταθερή παροχή κινητής φάσης
- Σήμα που παράγεται από τον ανιχνευτή κάθε φορά που εκλούεται ένα συστατικό:  
χρωματογραφική κορυφή

# Ορολογία Χρωματογραφίας (2)

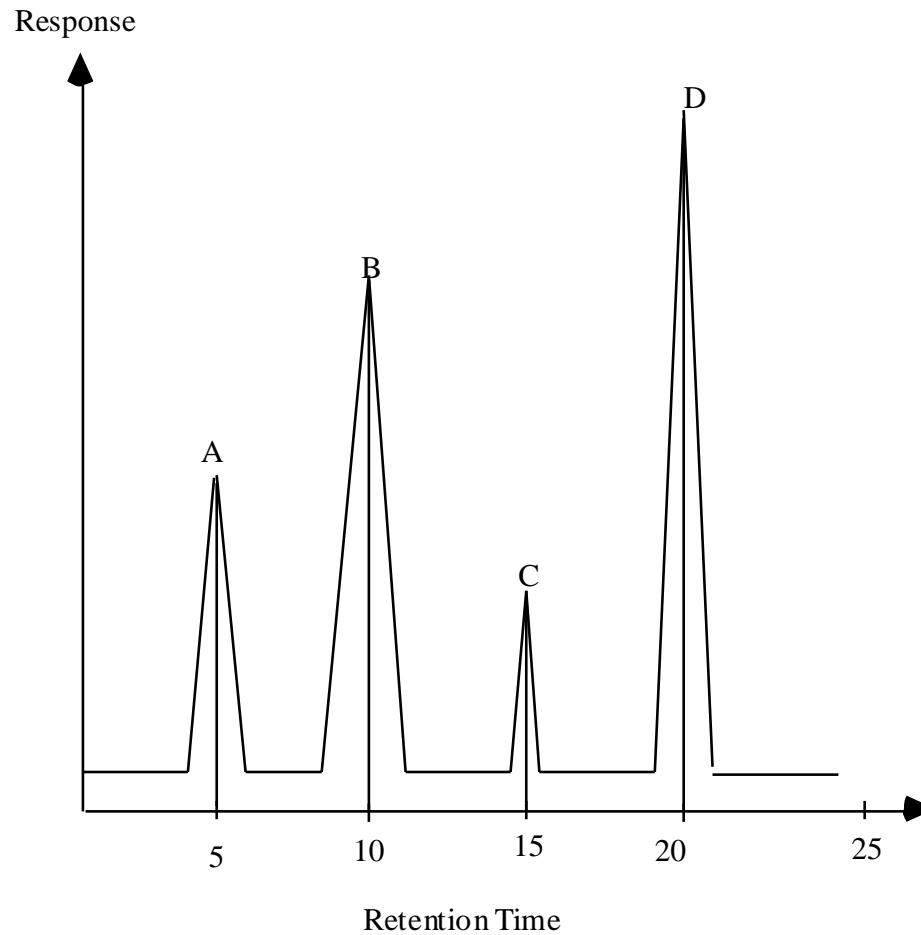
- Διάγραμμα σήματος ως συνάρτηση όγκου υγρού ή αερίου εκλούσεως:  
**χρωματογράφημα**
- Στην περίπτωση γραμμικής έκλουσης, στο χρωματογράφημα χρησιμοποιείται ο **χρόνος** αντί του όγκου εκλούσεως

# Χρωματογράφημα Εκλούσεως

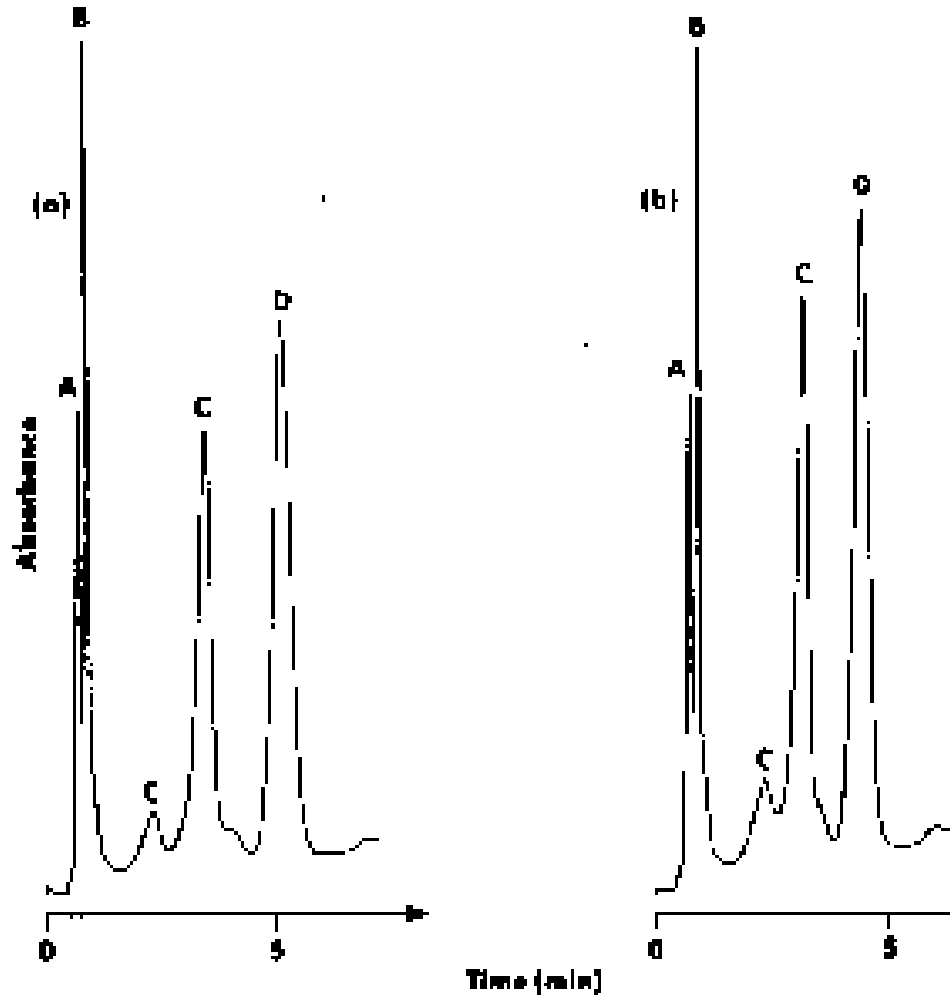
- Παρέχει πληροφορίες χρήσιμες για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση
- Χρόνος έκλουσης συστατικού:
  - Χαρακτηριστικός για το συστατικό
- Ύψος ή ολοκληρωμένη επιφάνεια χρωματογραφικής κορυφής σήματος:
  - Συσχετίζεται με συγκέντρωση συστατικού

# Χρωματογράφημα

## Καταγράφημα Απόκρισης Ανιχνευτή Συναρτήσεως Χρόνου Έκλουσης (Συγκράτησης)



# Χρωματογραφήματα από φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή



# Βάση Χρωματογραφίας Εκλούσεως

- Κατανομή (μερισμός) συστατικών μείγματος μεταξύ κινητής και στατικής φάσης
- Διαδικασία ισορροπίας και περιγράφεται με **λόγο ή συντελεστή κατανομής (μερισμού)  $K$** 
  - $C_s$ : συγκέντρωση συστατικού στη στατική φάση (S)
  - $C_m$ : συγκέντρωση συστατικού στην κινητή φάση (M)

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

# Συγκράτηση ή Ανάσχεση Ουσιών (1)

- **Όγκος συγκράτησης ή ανάσχεσης**  
(Retention Volume,  $V_R$ )
  - Όγκος κινητής φάσης που απαιτείται να διέλθει από στήλη για να εκλουσθεί μια ουσία στο μέγιστο της συγκέντρωσής της
- **Χρόνος συγκράτησης ή ανάσχεσης**  
(Retention time,  $t_R$ )
  - Χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ εισαγωγής (injection) δείγματος στην είσοδο στήλης και εμφάνιση μεγίστου κορυφής



## Συγκράτηση ή Ανάσχεση Ουσιών (2)

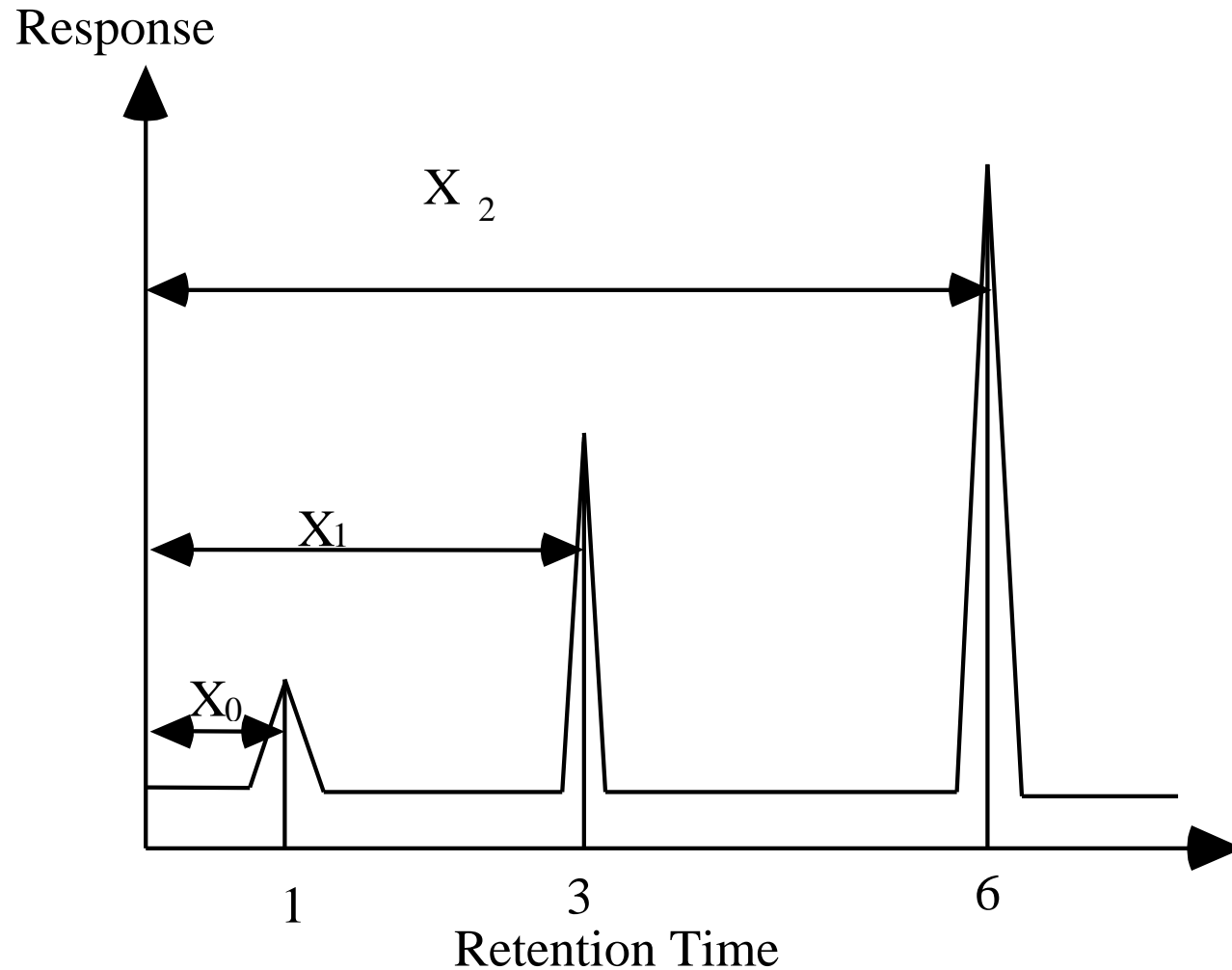
- Εάν γνωστή η ογκομετρική ταχύτητα ροής κινητής φάσης  $F$  (μονάδες όγκου / μονάδα χρόνου)

$$t_R = \frac{V_R}{F}$$

# Χρόνοι Ανάσχεσης Ουσιών

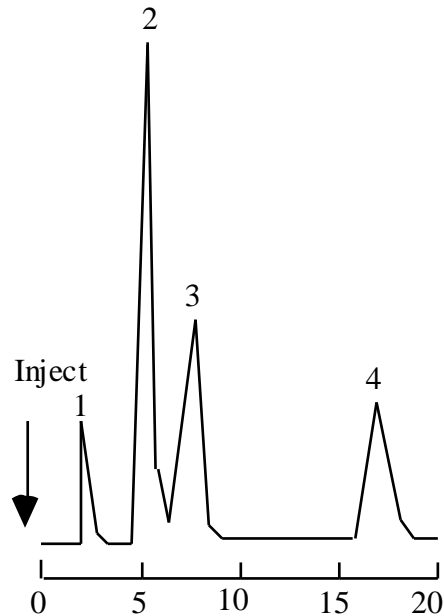
$X_0$ : χρόνος έκλουσης μη συγκρατούμενης ουσίας (νεκρός χρόνος,  $t_M$ )

$$X_1 = t_{R1}, \quad X_2 = t_{R2}$$



# Πραγματικό Χρωματογράφημα Υδατοδιαλυτών Βιταμινών

Οι κορυφές διευρύνονται όσο αργότερα εξέρχονται



Column:  $\mu$  Bondapak C18

Solvent: MeOH

Sample: Water-Soluble Vitamins

## Μέγεθος Συγκράτησης Ουσίας Από Στήλη (1)

- Εκφράζεται από λόγο (ή συντελεστή ή παράγοντα) επιβράδυνσης (ή συγκράτησης ή καθυστέρησης) (Retention Ratio R ή **Retardation Factor  $R_F$** )

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

## Μέγεθος Συγκράτησης Ουσίας Από Στήλη (2)

- Όγκοι και χρόνοι για να διέλθουν το υγρό εκλούσεως [νεκρός όγκος ( $V_M$ ), νεκρός χρόνος ( $t_M$ ) και η ουσία ( $V_R$ ,  $t_R$ )] από στήλη μήκους  $L$ , είναι αντιστρόφως ανάλογοι των μέσων ταχυτήτων τους

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

## Μέγεθος Συγκράτησης Ουσίας Από Στήλη (3)

- Εάν ουσία ουδόλως συγκρατείται από στατική φάση, αυτή κινείται με ταχύτητα ίδια με κινητή φάση:  $t_R = t_M$  και  $R$  λαμβάνει μέγιστη τιμή 1,0.
- Ουσία μετακινείται στη στήλη μόνον εάν βρίσκεται στην κινητή φάση
- Ο λόγος ταχυτήτων  $R$  ή  $R_F$  ισούται με κλάσμα χρόνου που ουσία βρίσκεται στην κινητή φάση, ίσος με μοριακό κλάσμα ουσίας στην κινητή φάση
- Εάν  $V_M$ : όγκος κινητής φάσης,  $V_S$ : όγκος στατικής φάσης

$$R_F = \frac{\text{ποσότητα ουσίας στην κινητή φάση}}{\text{ολική ποσότητα ουσίας}} = \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S}$$

## Μέγεθος Συγκράτησης Ουσίας Από Στήλη (4)

$$R_F = \frac{V_M}{V_M + KV_S} = \frac{V_M}{V_R}$$

$$V_R = V_M + KV_S$$

- Για στήλη με δεδομένες τιμές  $V_M$  και  $V_S$ , ο βαθμός διαχωρισμού διαφόρων συστατικών (όπως εκφράζεται από τις διαφορετικές τιμές  $V_R$ ) εξαρτάται από τις τιμές  $K$ .