

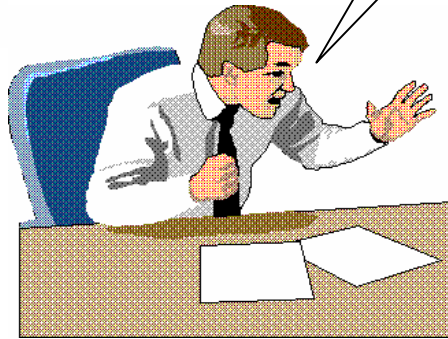
Κεφ. 20B ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ

Μειονεκτήματα Κλασικής Χρωματογραφίας Στήλης

- Χρήση στηλών μεγάλης διαμέτρου, πληρωμένες με σωματίδια πληρωτικού υλικού μεγάλης διαμέτρου
- Επίτευξη μικρών ταχυτήτων ροής κινητής φάσης
 - Λόγω βαρύτητας
 - Χρήση αντλιών χαμηλής πίεσης
- Απαιτείται μεγάλος χρόνος διαχωρισμού (ώρες)
- Συλλεγόμενα κλάσματα απαιτούν ξεχωριστή ανάλυση
 - Σημαντική αύξηση συνολικού χρόνου ανάλυσης

Έχεις Ένα Πρόβλημα να Λύσεις

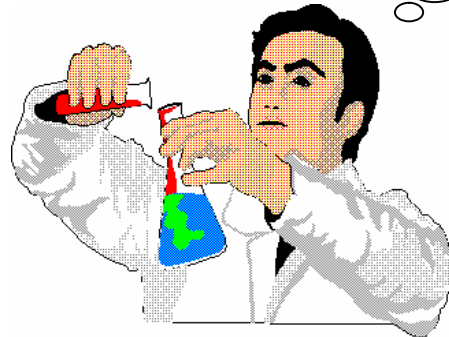


Χρειάζομαι ένα ποσοτικό διαχωρισμό υδατανθράκων σε μερικά από τα προϊόντα μας το γρηγορότερο

Θα το λύσουμε



Θα χρειασθώ μια τεχνική διαχωρισμού



Ανάπτυξη HPLC (1)

- Ανάπτυξη θεωρίας ταχύτητας (με τη βοήθεια της GLC), οδήγησε στην ανάπτυξη τεχνικής και συστημάτων:
 - Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
 - High **Performance** Liquid Chromatography (HPLC)

Ανάπτυξη HPLC (2)

- Επιτρέπει αποδοτικούς διαχωρισμούς και μετρήσεις σε λίγα λεπτά
- Στην κλασική LC στήλης, η ταχύτητα μερισμού (distribution) συστατικών μείγματος μεταξύ στατικής και κινητής φάσεως, εξαρτάται κυρίως από διάχυση
- Διάχυση στα υγρά εξαιρετικά αργή σε σχέση με αέρια

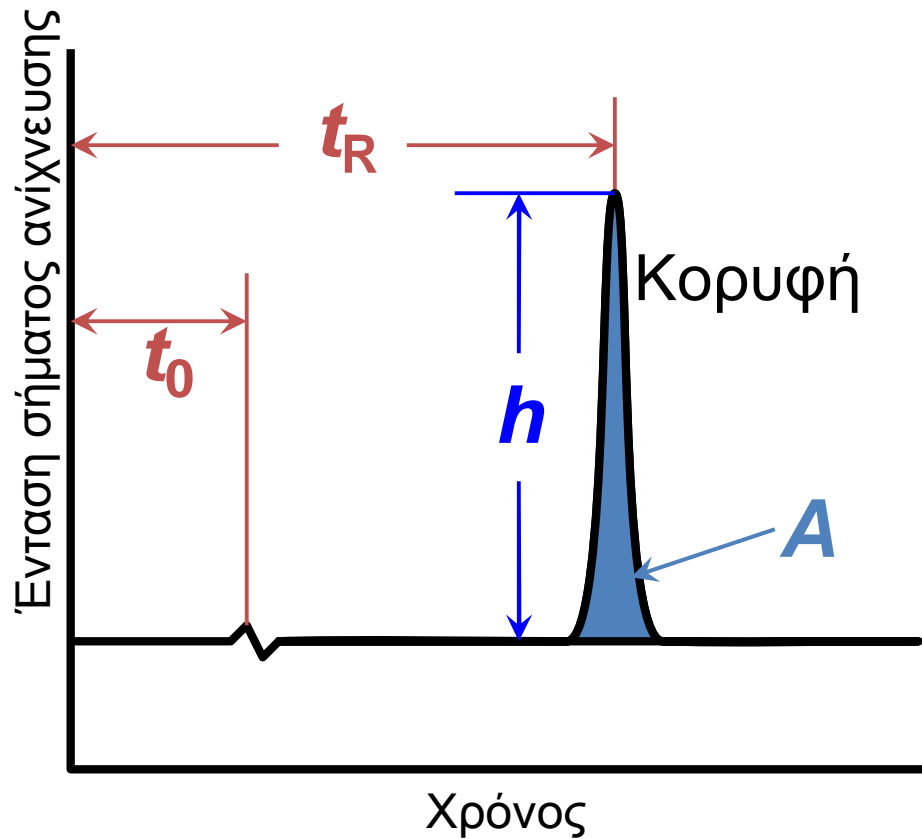
Ανάπτυξη HPLC (3)

- Για ελαχιστοποίηση χρόνου μετακίνησης συστατικών μείγματος από και προς θέσεις αλληλεπίδρασης στατικής φάσης, πρέπει να πληρούνται δύο προϋποθέσεις:

A) Υλικό πληρώσεως στήλης:

- Λεπτότατου διαμερισμού (σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου)
- Να έχει υψηλή σφαιρική κανονικότητα για να επιτευχθεί μεγάλου βαθμού ομοιομορφία και πυκνότητα πληρώσεως

Χρωματογράφημα



t_R : Χρόνος ανάσχεσης

t_0 : Νεκρός χρόνος

A : Εμβαδόν κορυφής

h : Ύψος κορυφής

Ανάπτυξη HPLC (4)

- B) Σε περιπτώσεις διαχωρισμών κατανομής (περισσότεροι στην LC), η υγρή στατική φάση:
- Να είναι μορφής λεπτότατου ομοιόμορφου υμένα
 - Χωρίς λιμνάζοντες χώρους
- Πρώτη προϋπόθεση έχει ως αποτέλεσμα μείωση τιμής A εξισώσεως van Deemter
 - Δεύτερη προϋπόθεση μείωση τιμής C εξισώσεως van Deemter
 - Μοριακή διάχυση στα υγρά πολύ μικρότερη από ό,τι στα αέρια και όρος B εξισώσεως είναι επίσης μικρός

Ανάπτυξη HPLC (5)

Εξίσωση van Deemter

$$h = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Πρώτος όρος: Στροβιλώδης διάχυση (λόγω ανομοιομορφίας σωματιδίων)

Δεύτερος όρος: Διαμήκης διάχυση στην κινητή φάση

Τρίτος όρος: Αντίσταση μεταφοράς μάζας στη στήλη και εγκάρσια διάχυση στην κινητή φάση

Ανάπτυξη HPLC (6)

- Με τις προηγούμενες προϋποθέσεις μπορεί να επιτευχθεί πολύ μικρό ΥΙΘΠ (h) και δεδομένο μήκος στήλης περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών
 - Στήλη χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση
 - Λαμβανόμενες κορυφές μικρού εύρους και μεγάλου ύψους, κατάλληλες για ποσοτική ανάλυση

Ανάπτυξη HPLC (7)

- Υψηλή πυκνότητα πληρώσεως με πολύ μικρά σωματίδια μειώνει ταχύτητα ροής κινητής φάσης μέσα από στήλη
 - Μεγάλη αντίσταση μεταφοράς
 - Για επίτευξη λογικής ταχύτητας ροής απαιτείται εφαρμογή υψηλής πίεσης στην κινητή φάση
- Τεχνική αναφέρεται και ως High Pressure Chromatography (HPLC)
- Επειδή επιτυγχάνονται ταχείς διαχωρισμοί και αναλύσεις αναφέρεται και ως
- High Speed Liquid Chromatography (HSLC)

Απόδοση Τεχνικής HPLC (1)

- Περιγράφεται με τροποποιημένη εξίσωση van Deemter
 - Όρος B (διαμήκους διάχυσης) αμελητέος στα υγρά και παραλείπεται

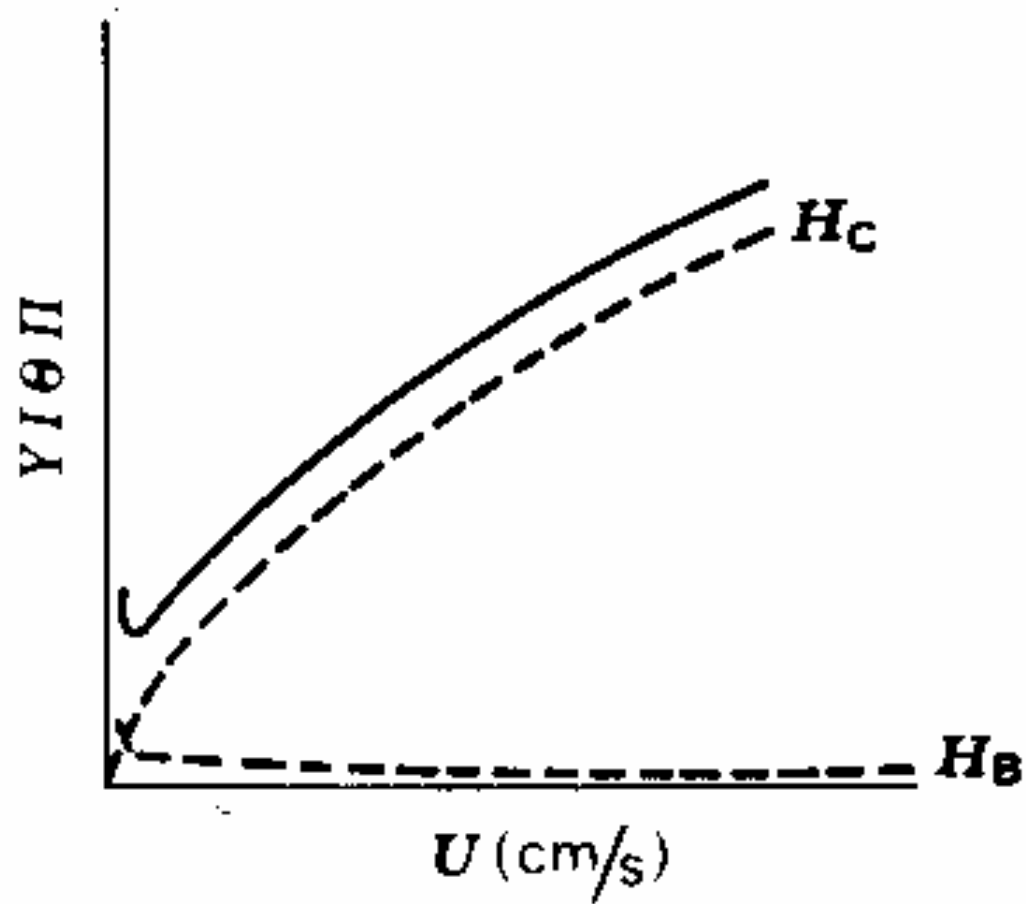
- Πειραματικά το ΥΙΘΠ (h) δίνεται από σχέση:

$$h = \text{ΥΙΘΠ} = A + Cu^n \approx Cu^n$$

- όπου n = πειραματική σταθερά με τιμές 0,3 – 0,6
- Όρος A (στροβιλώδης διάχυση) παίρνει μια σταθερή μικρή τιμή και μπορεί να παραληφθεί

Απόδοση Τεχνικής HPLC (2)

Επίδραση ταχύτητας κινητής φάσης στην τιμή h



Απόδοση Τεχνικής HPLC (3)

Επίδραση ταχύτητας κινητής φάσης στην τιμή h

- Σε πολύ χαμηλές ταχύτητες, μοριακή διάχυση (όρος B) είναι σημαντική και το h αυξάνεται ελαφρά
- Καθώς η ταχύτητα αυξάνεται, όρος Cu^n , και επομένως και το h , προσεγγίζει μια οριακή τιμή
- Σε αντίθεση με GLC, που επιλέγεται ταχύτητα u πλησίον $u_{αρ}$ για επίτευξη $h_{ελ}$
 - Στην HPLC αυτό αποφεύγεται, γιατί σε μικρές ταχύτητες ροής οι απαιτούμενοι χρόνοι διαχωρισμών αυξάνονται δραστικά

Υλικά Στήριξης ή Πληρωτικά Υλικά (1)

- Παρασκευή και διάθεση πληρωτικών υλικών με προϋποθέσεις που απαιτεί η HPLC
- Τρεις τύποι σωματιδίων πληρωτικών υλικών:
 - A) Μικροπορώδη σωματίδια (microporous particles)
 - Διάμετρο 5-10 μm και σχετικά μικρούς πόρους, επιτρέπουν διάδο και αλληλεπίδραση με στατική φάση μόνο μικρού μεγέθους συστατικά

Υλικά Στήριξης ή Πληρωτικά Υλικά (2)

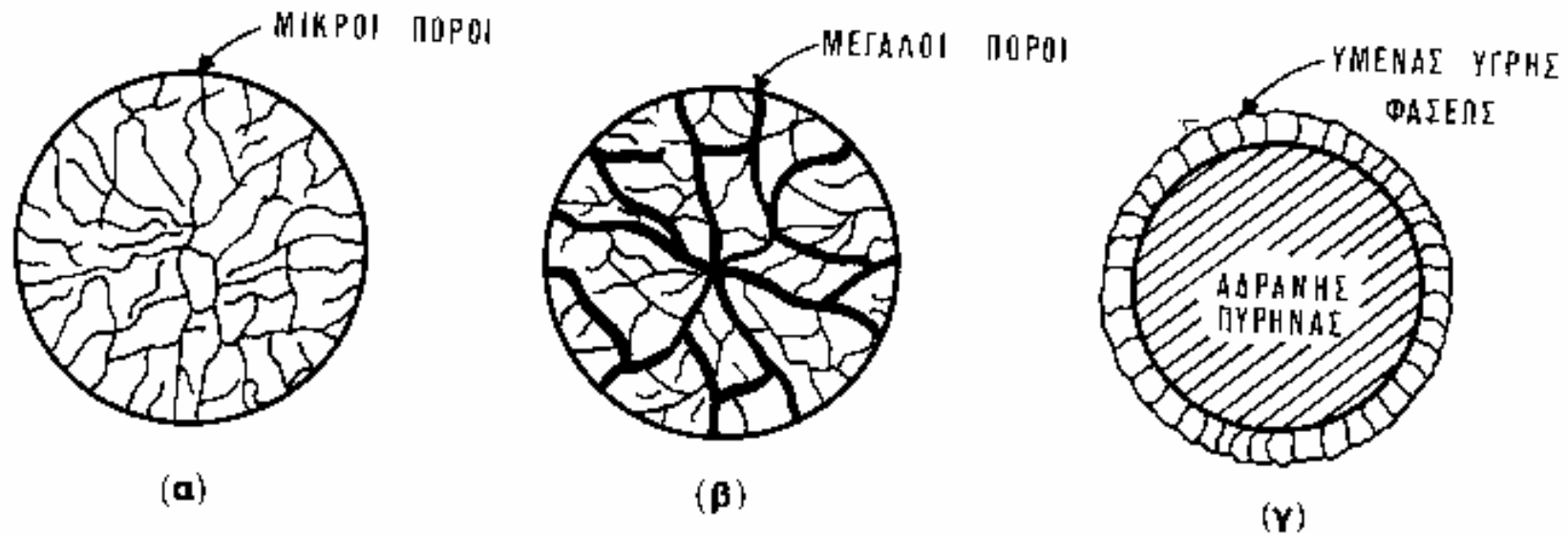
Β) Μακροπορώδη σωματίδια (macroporous particles)

- Εκτός από μικρούς μοριακούς πόρους διαθέτουν και μεγάλους πόρους (διάμετρος $> 60 \mu\text{m}$), που επιτρέπουν τη δίοδο μικρών και μεγάλων συστατικών

Γ) Υμενοειδή σωματίδια (pellicular particles)

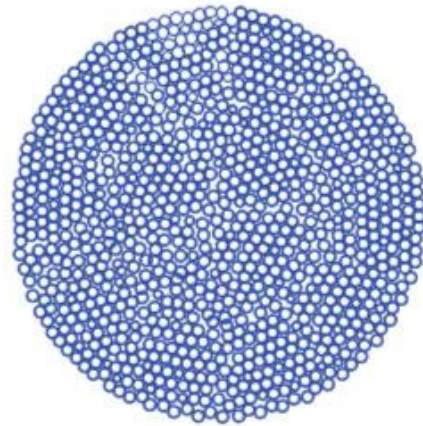
- Διαμέτρου $35\text{-}45 \mu\text{m}$, διαθέτουν αδρανή πυρήνα καλυμμένο με υμένα υγρής στατικής φάσης
- Εμπορικά ονόματα: Zirax, Corasil I και II, Vydac, Perisorb
- Πετυχαίνουν υψηλή διαχωριστικότητα
- Έχουν μικρή χωρητικότητα
- Χρησιμοποιούνται με μικρούς όγκους δείγματος και ανιχνευτές υψηλής ευαισθησίας

Υλικά Στήριξης ή Πληρωτικά Υλικά (3)



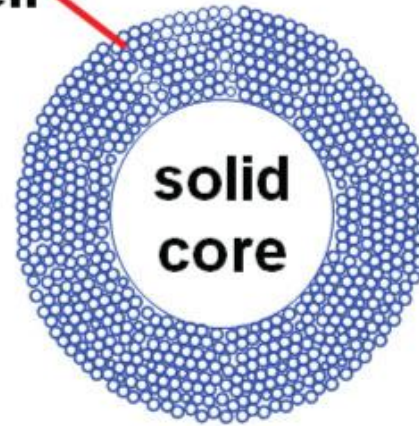
Σχήμα 20-2. Τύποι πληρωτικών υλικών της HPLC: (α) μικροπορώδη, (β) μακροπορώδη και (γ) υμενοειδή σωματίδια.

Πορώδη σωματίδια πληρωτικού υλικού στηλών HPLC



Porous Particle

**Porous
shell**



**Superficially
Porous Particle**

Οργανολογία HPLC (1)

- Για επίτευξη ταχύτερων και αποδοτικότερων διαχωρισμών με χρήση λεπτότατα διαμερισμένου πληρωτικού υλικού, απαιτείται υψηλή πίεση και ειδικές συσκευές επιτευξης και αντιμετώπισης
- Πιέσεις 7 – 35 MPa (MegaPascal, 1 atm = 101.325 Pa), δηλ. 70-350 atm για ταχύτητα ροής 0,5-5 mL/min, σε στήλες διαμέτρου 1-5 mm και μήκους 10-50 cm
- Σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούνται πιέσεις μέχρι 41 MPa

Οργανολογία HPLC (2)

- Άλλη μονάδα πίεσης στην HPLC
psi = pounds per square inch
1 psi = 0,068 atm = 6.890 Pa
- Το 80-90% διαχωρισμών με HPLC πετυχαίνονται με πιέσεις μικρότερες των 1200 psi
- Μερικά υλικά πληρώσεως στηλών (πολυουρεθάνες) απαιτούν πολύ χαμηλές πιέσεις, σχεδόν ατμοσφαιρικές

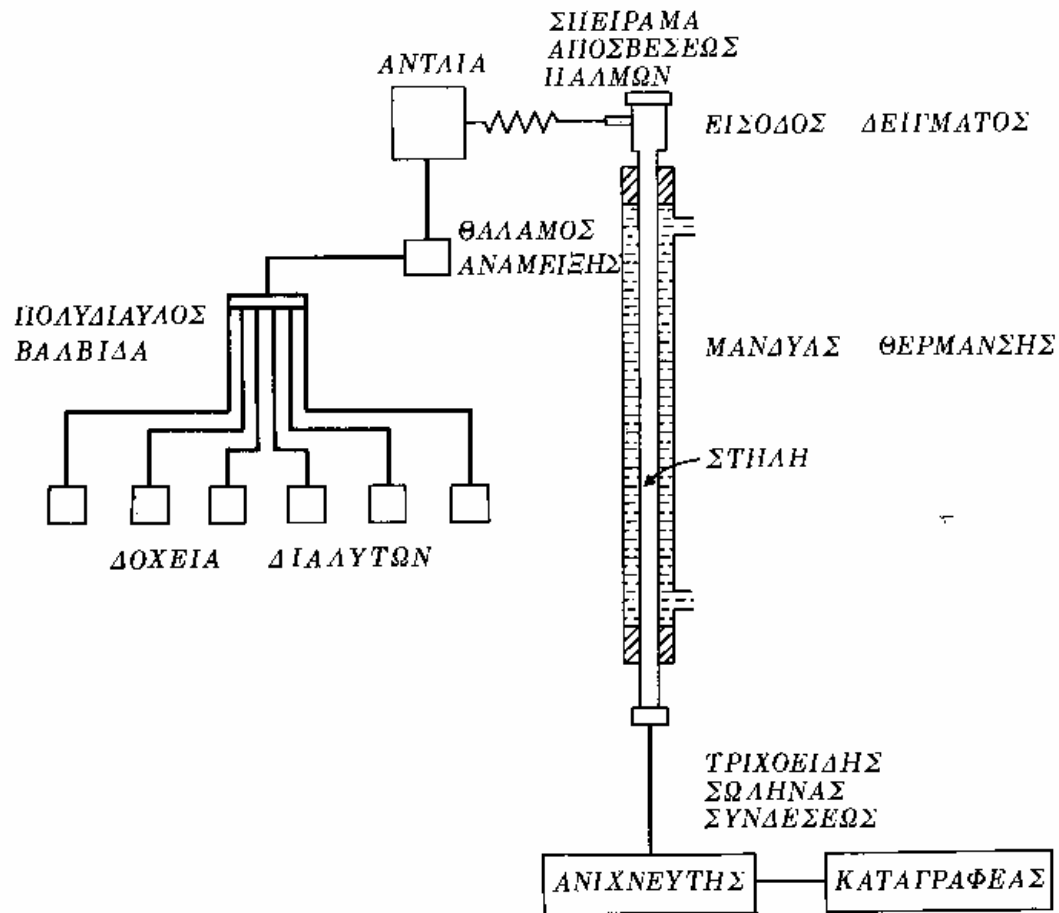
Οργανολογία HPLC (3)

Βασικά Τμήματα Συσκευής

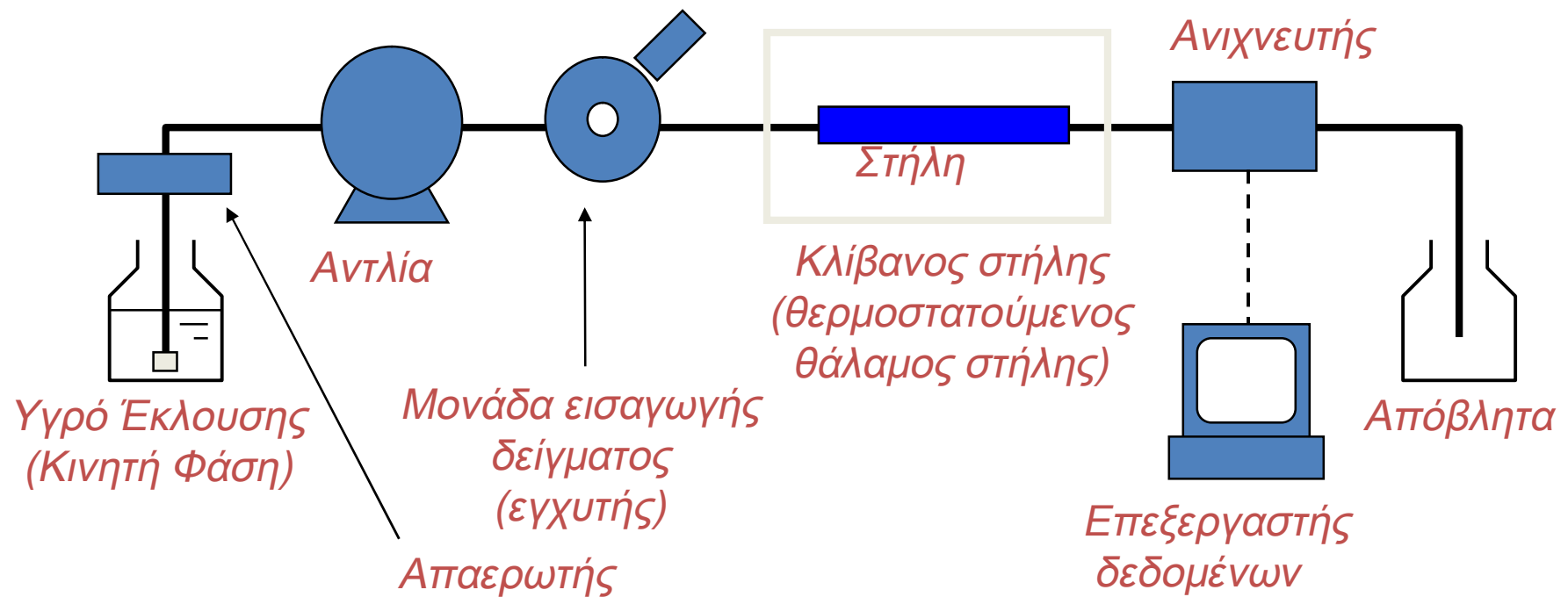
1. Σύστημα παροχής κινητής φάσης
2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
3. Στήλη
4. Ανιχνευτής
5. Σύστημα επεξεργασίας / παρουσίασης αποτελεσμάτων

Οργανολογία ΗPLC (4)

Βασικά Τμήματα Συσκευής



Διάγραμμα Ροής Χρωματογράφου HPLC

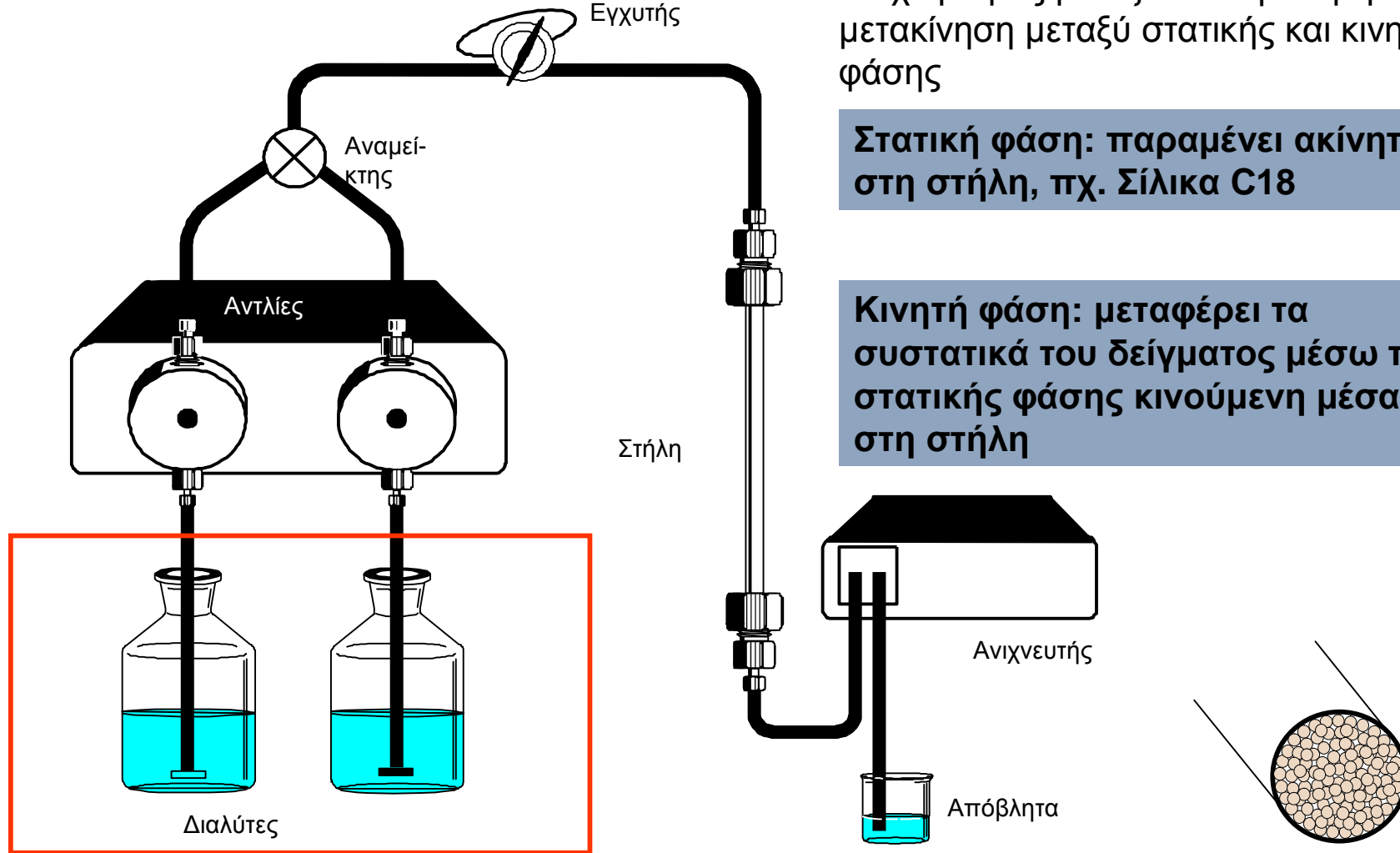


Διαχωρισμοί

Διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική μετακίνηση μεταξύ στατικής και κινητής φάσης

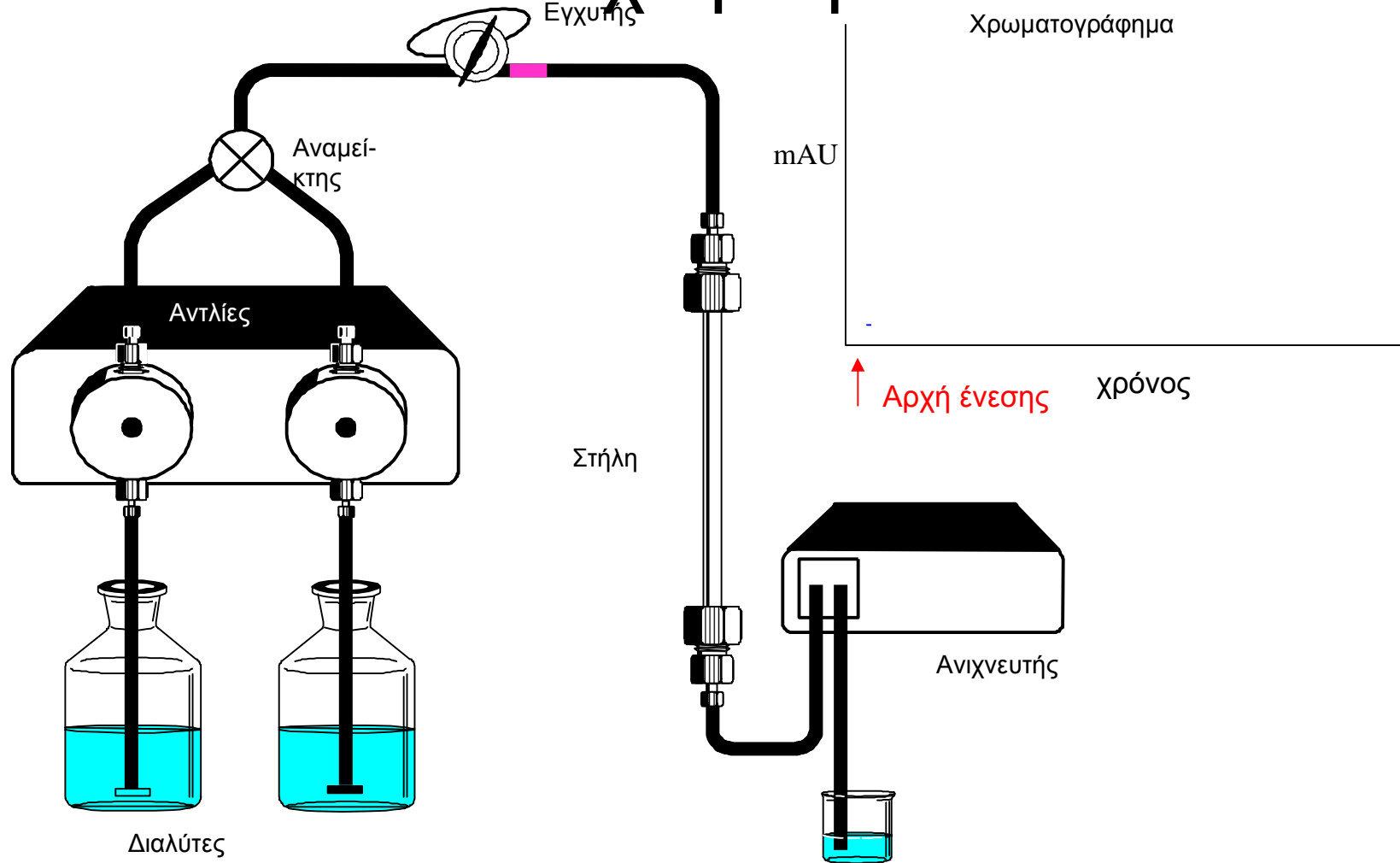
Στατική φάση: παραμένει ακίνητη στη στήλη, πχ. Σίλικα C18

Κινητή φάση: μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος μέσω της στατικής φάσης κινούμενη μέσα στη στήλη



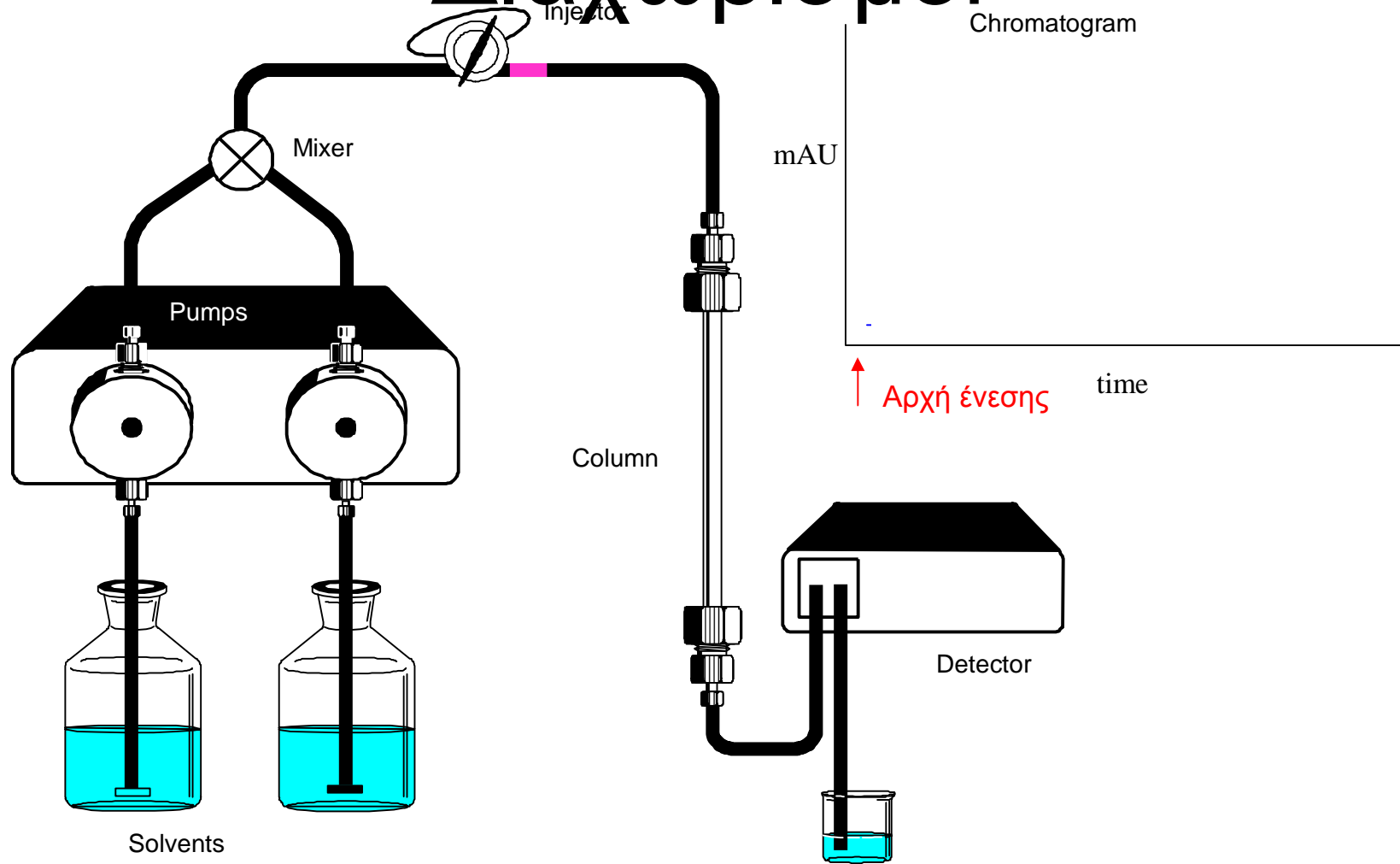
Χρωματογραφία HPLC

Διαχωρισμοί

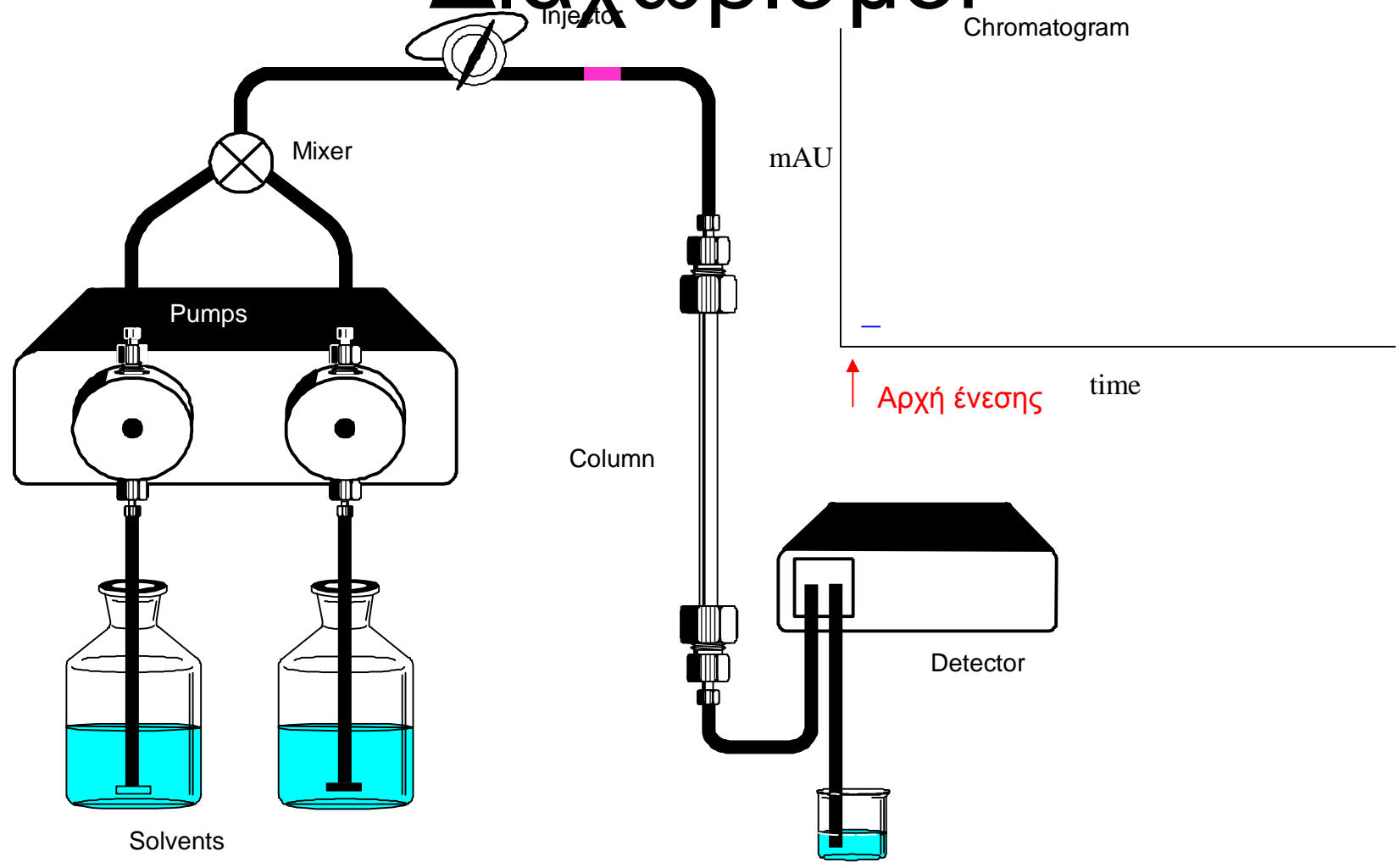


Χρωματογράφος HPLC

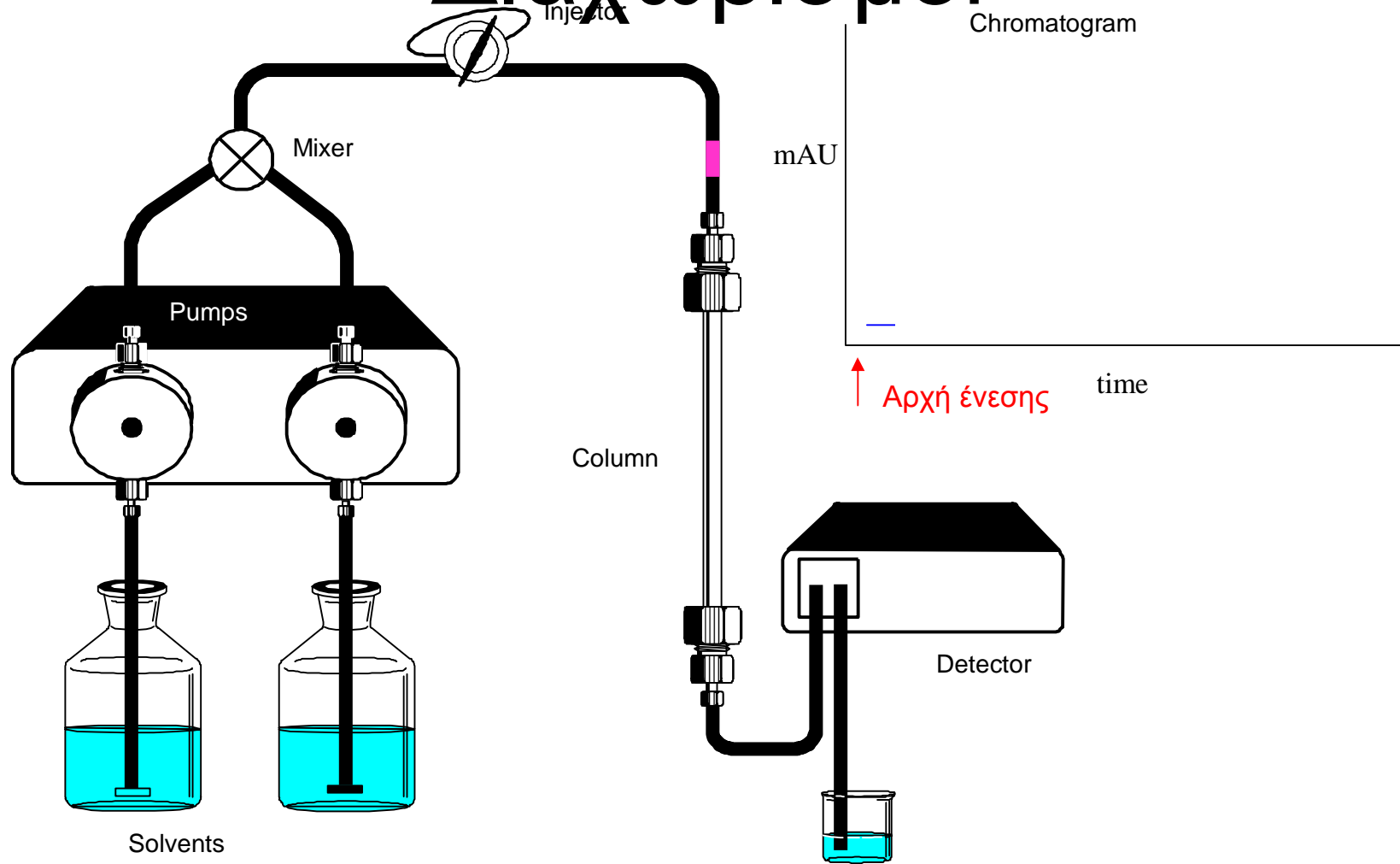
Διαχωρισμοί



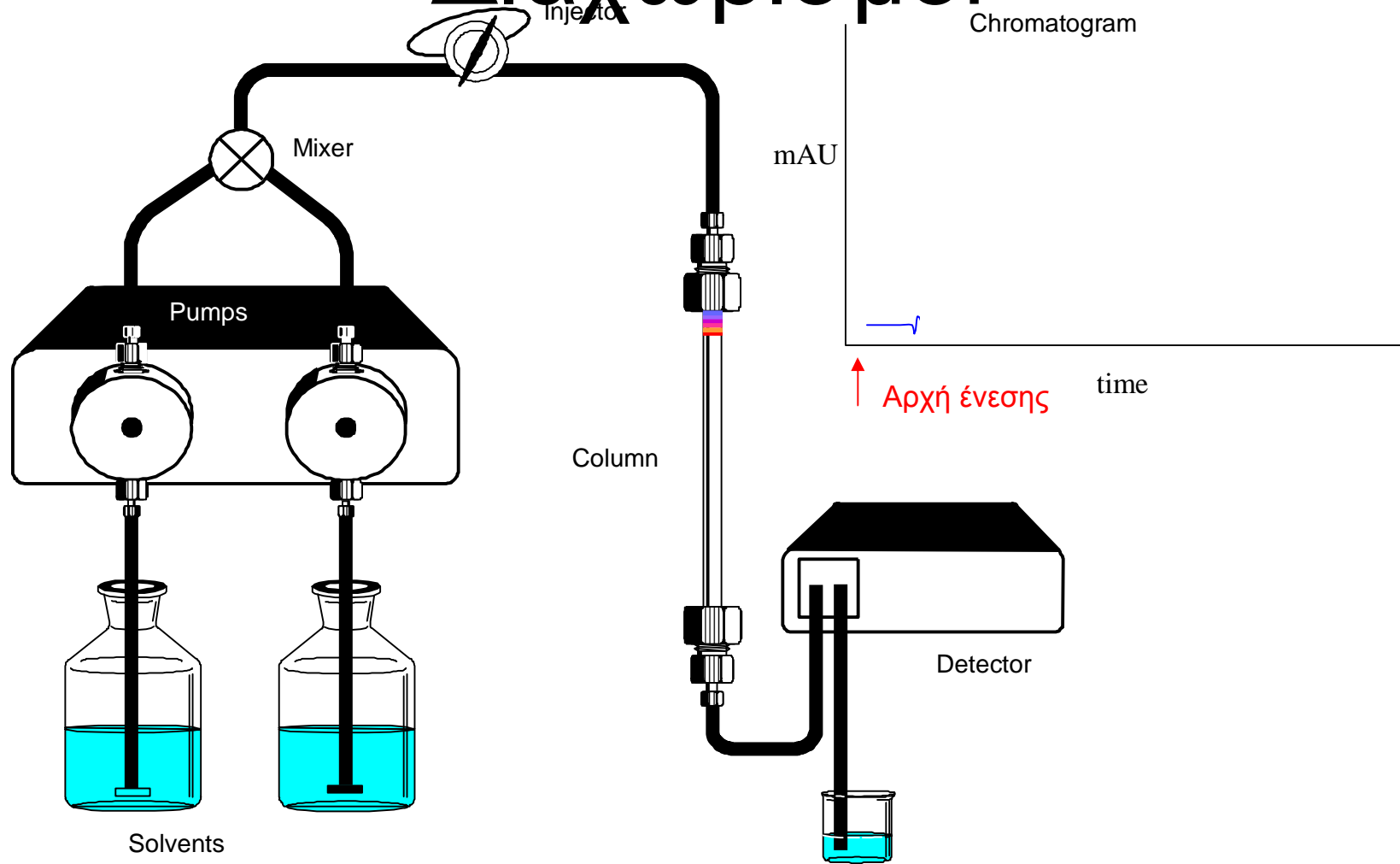
Διαχωρισμοί



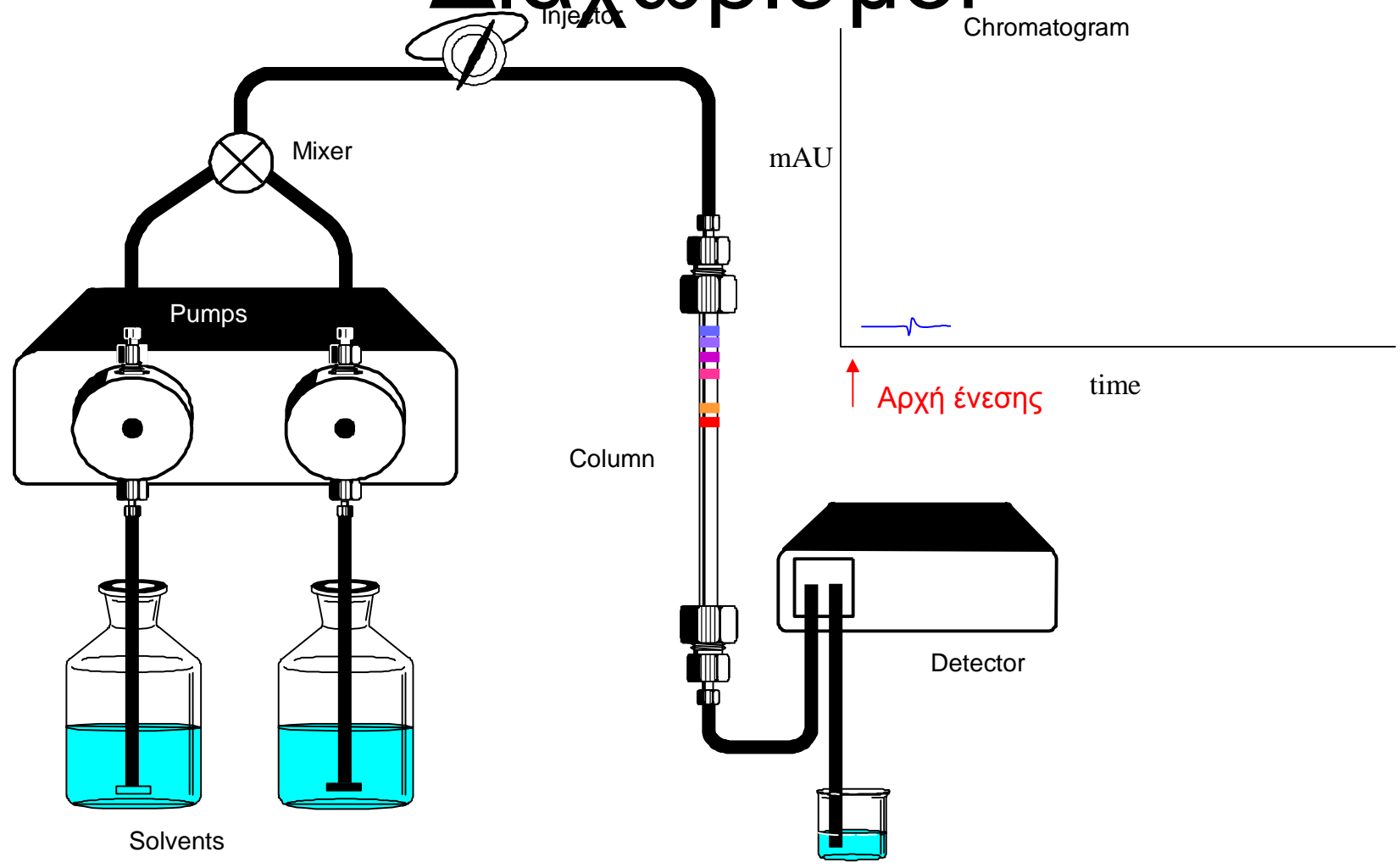
Διαχωρισμοί



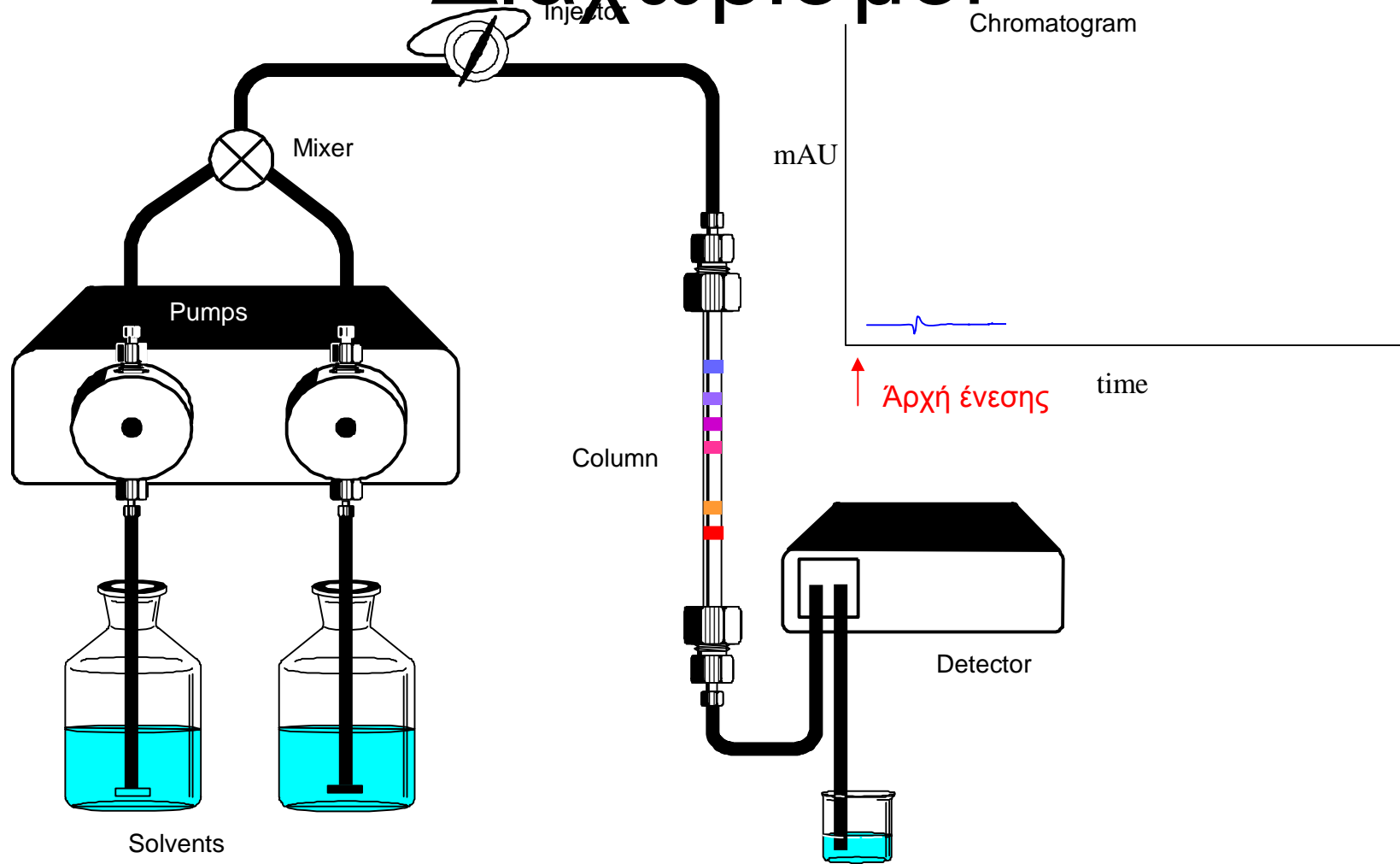
Διαχωρισμοί



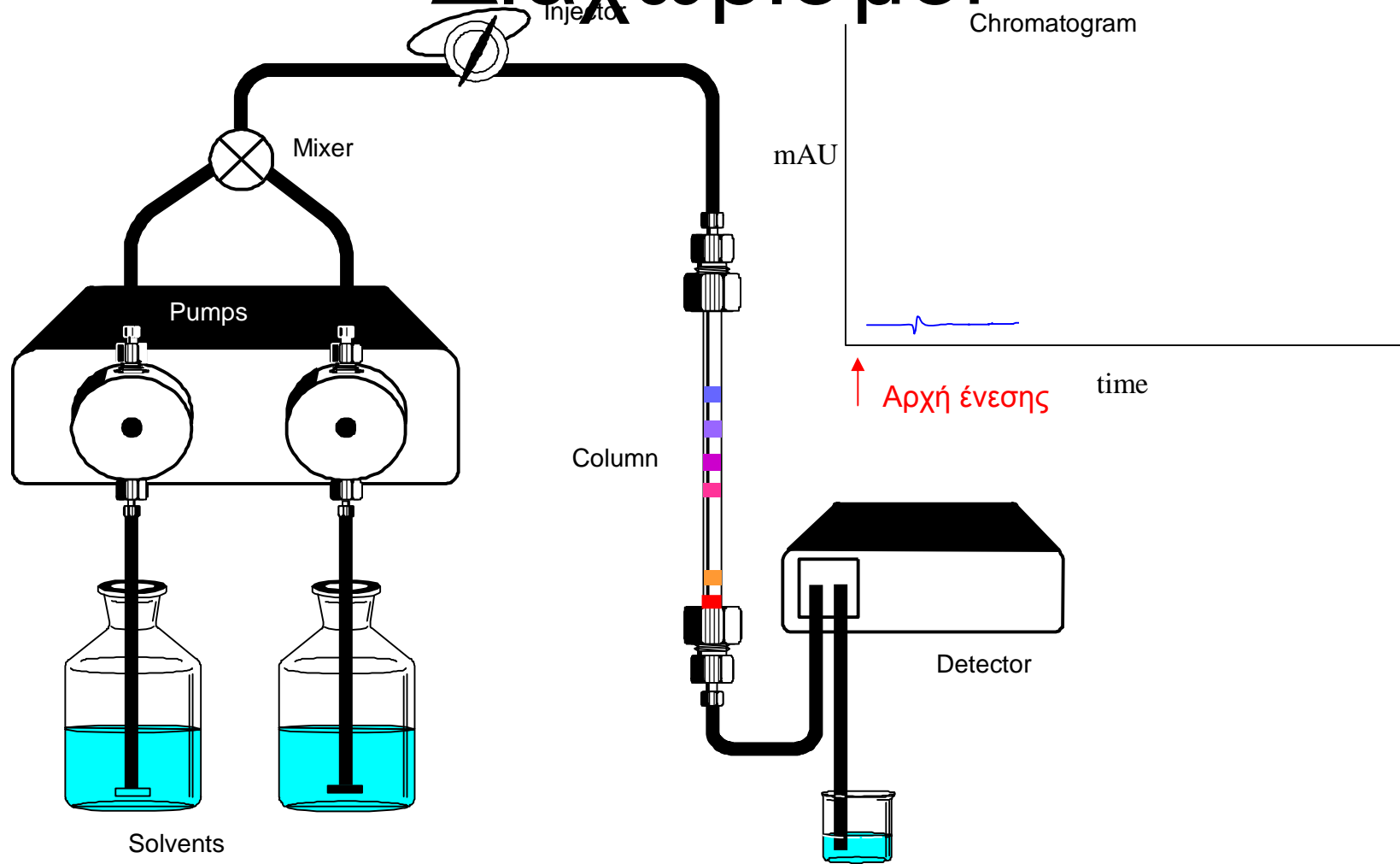
Διαχωρισμοί



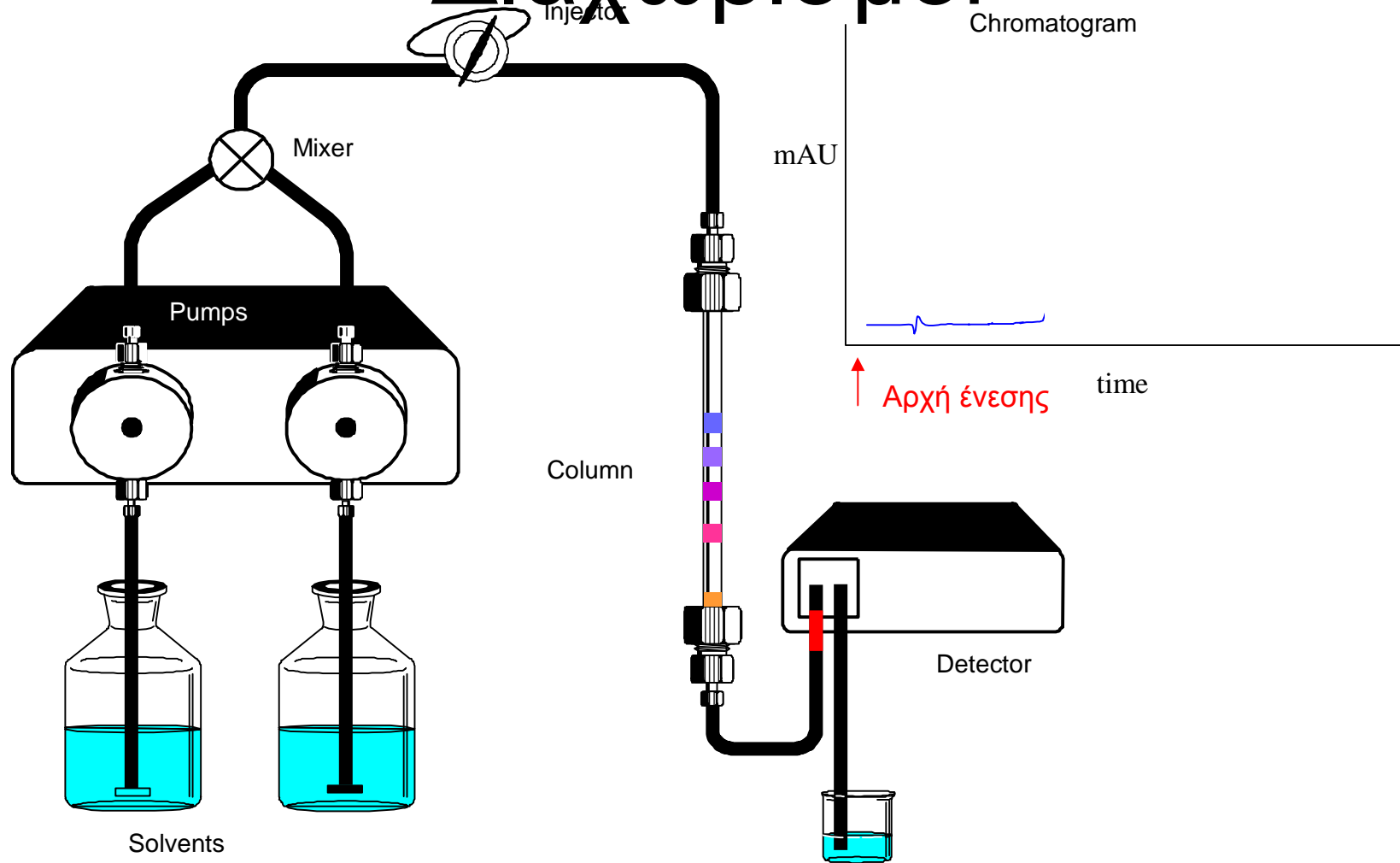
Διαχωρισμοί



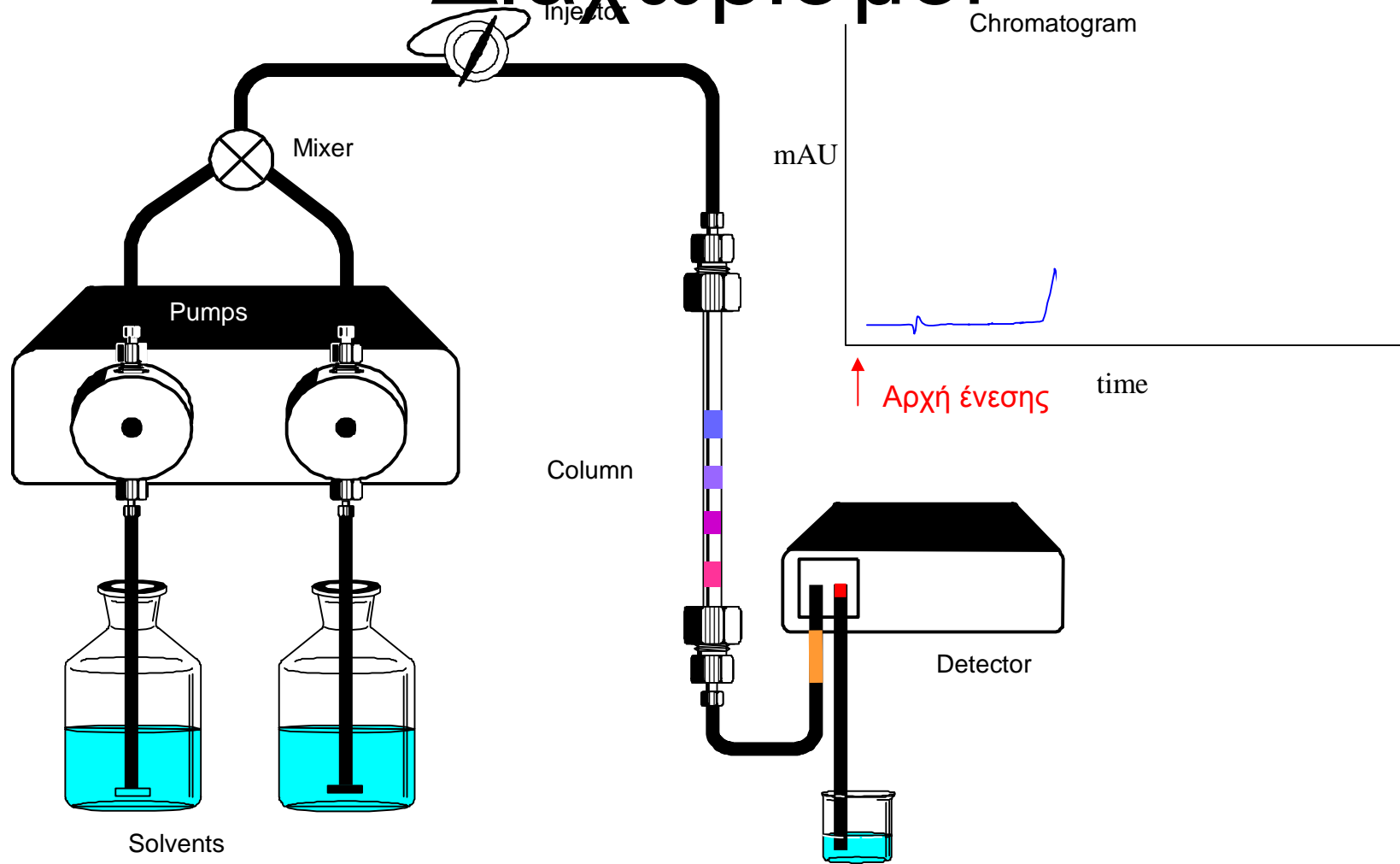
Διαχωρισμοί



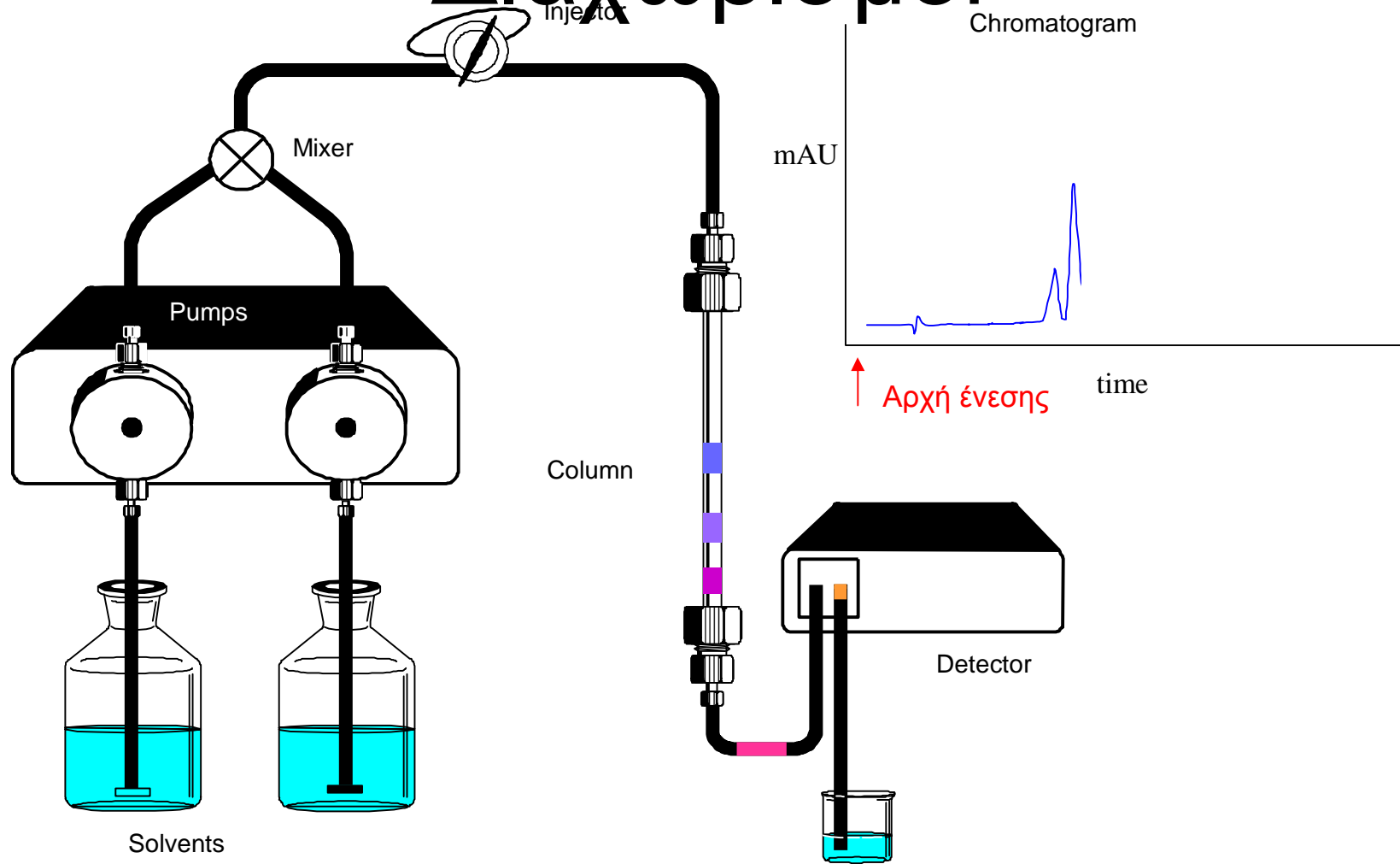
Διαχωρισμοί



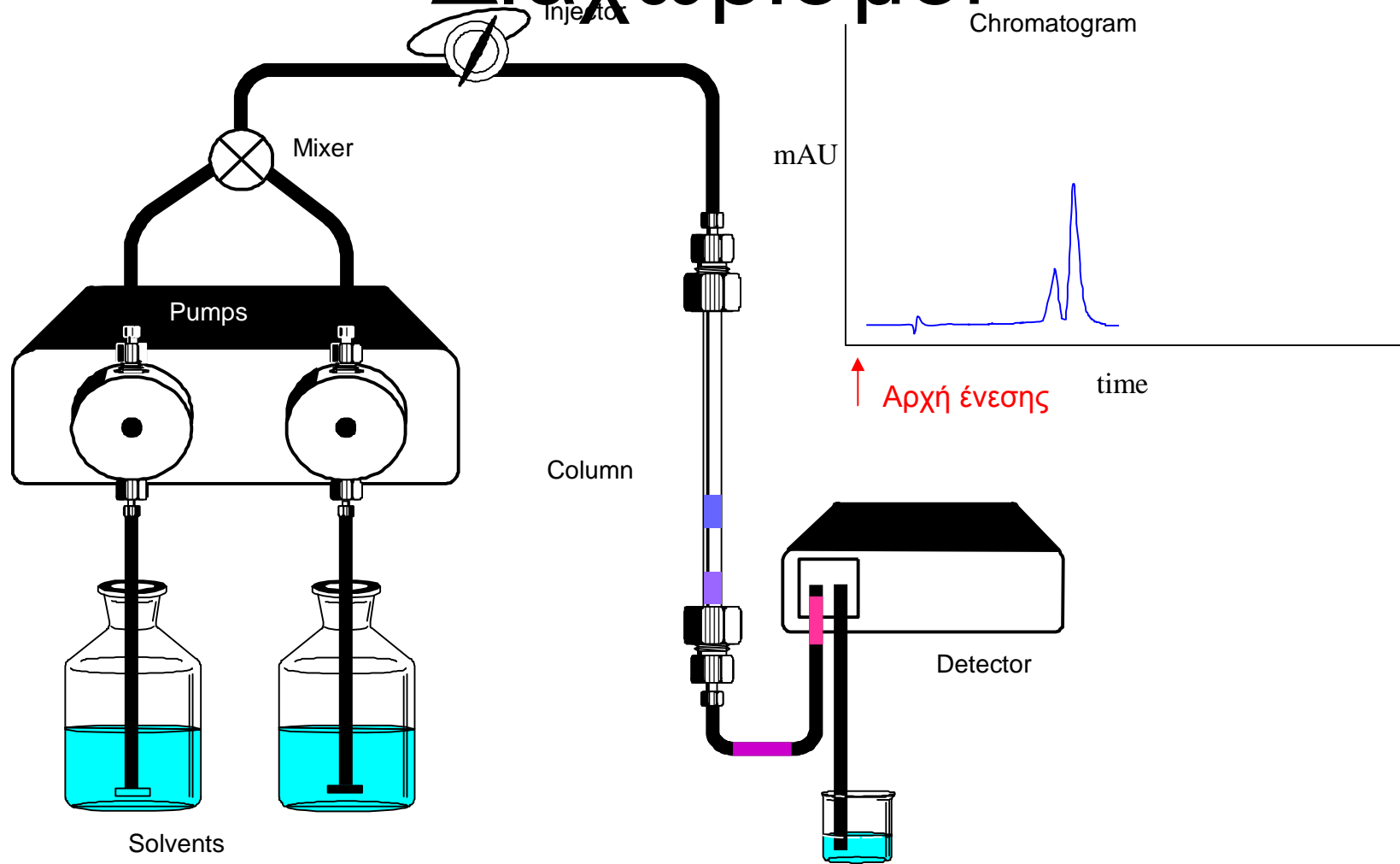
Διαχωρισμοί



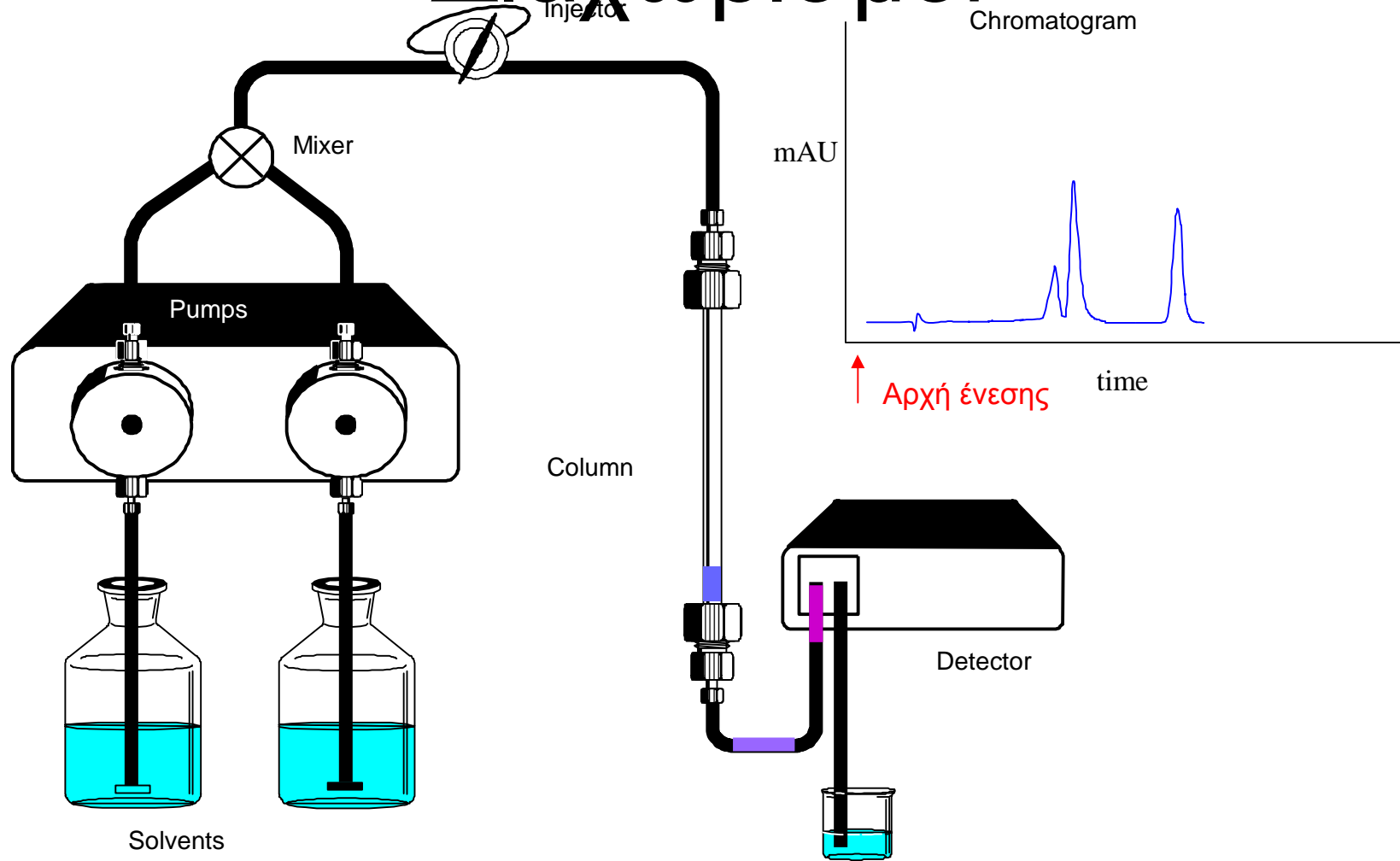
Διαχωρισμοί



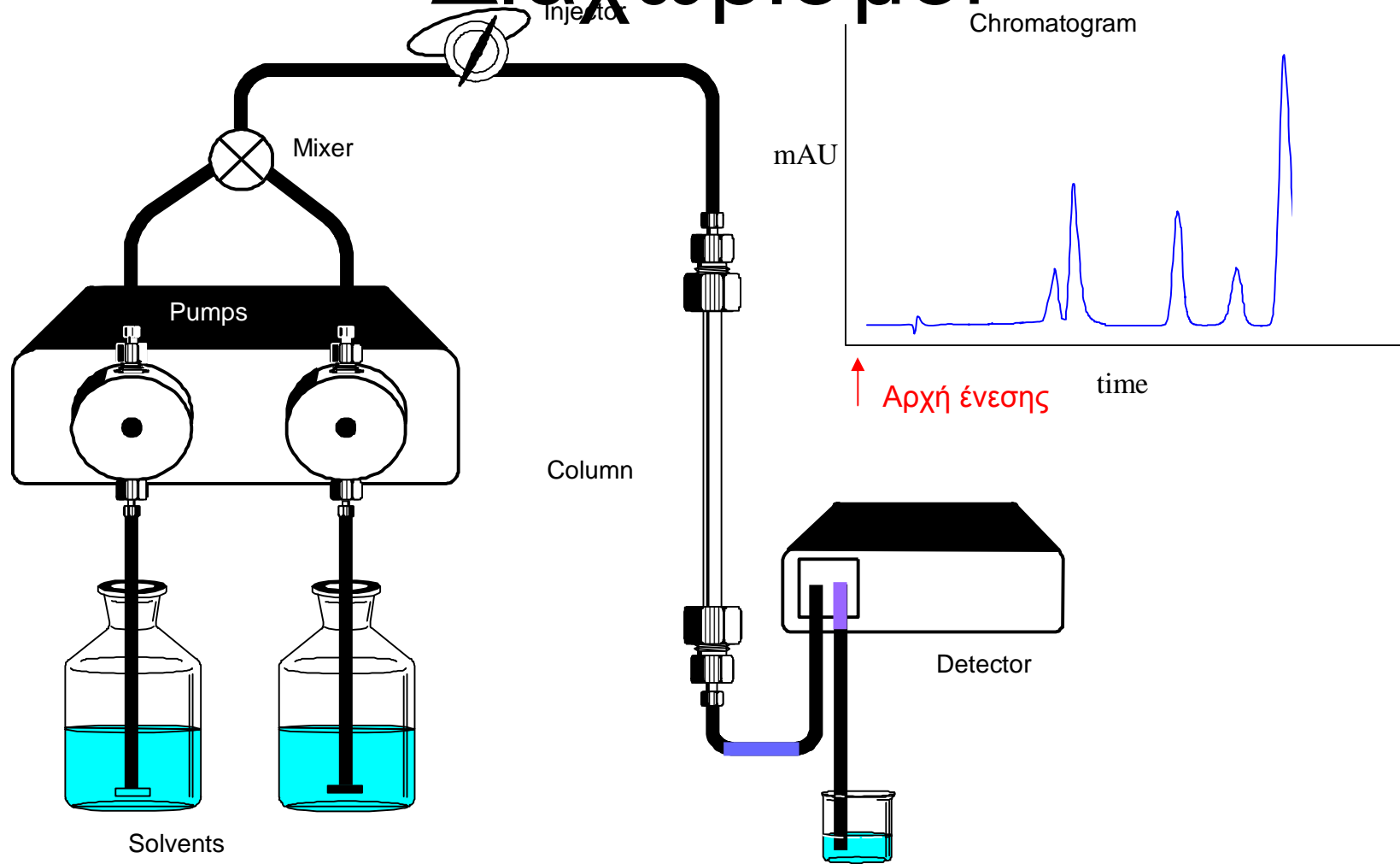
Διαχωρισμοί



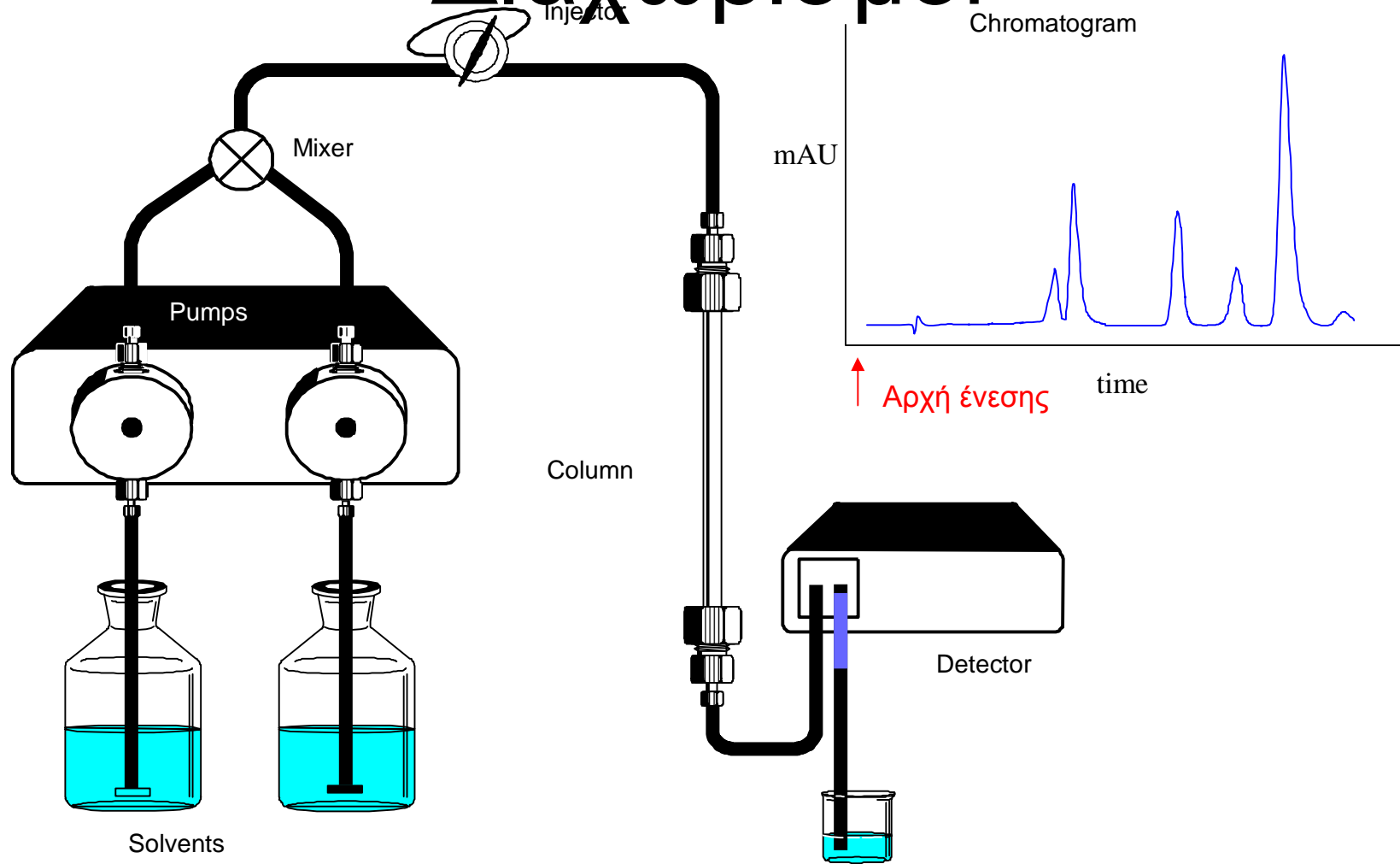
Διαχωρισμοί



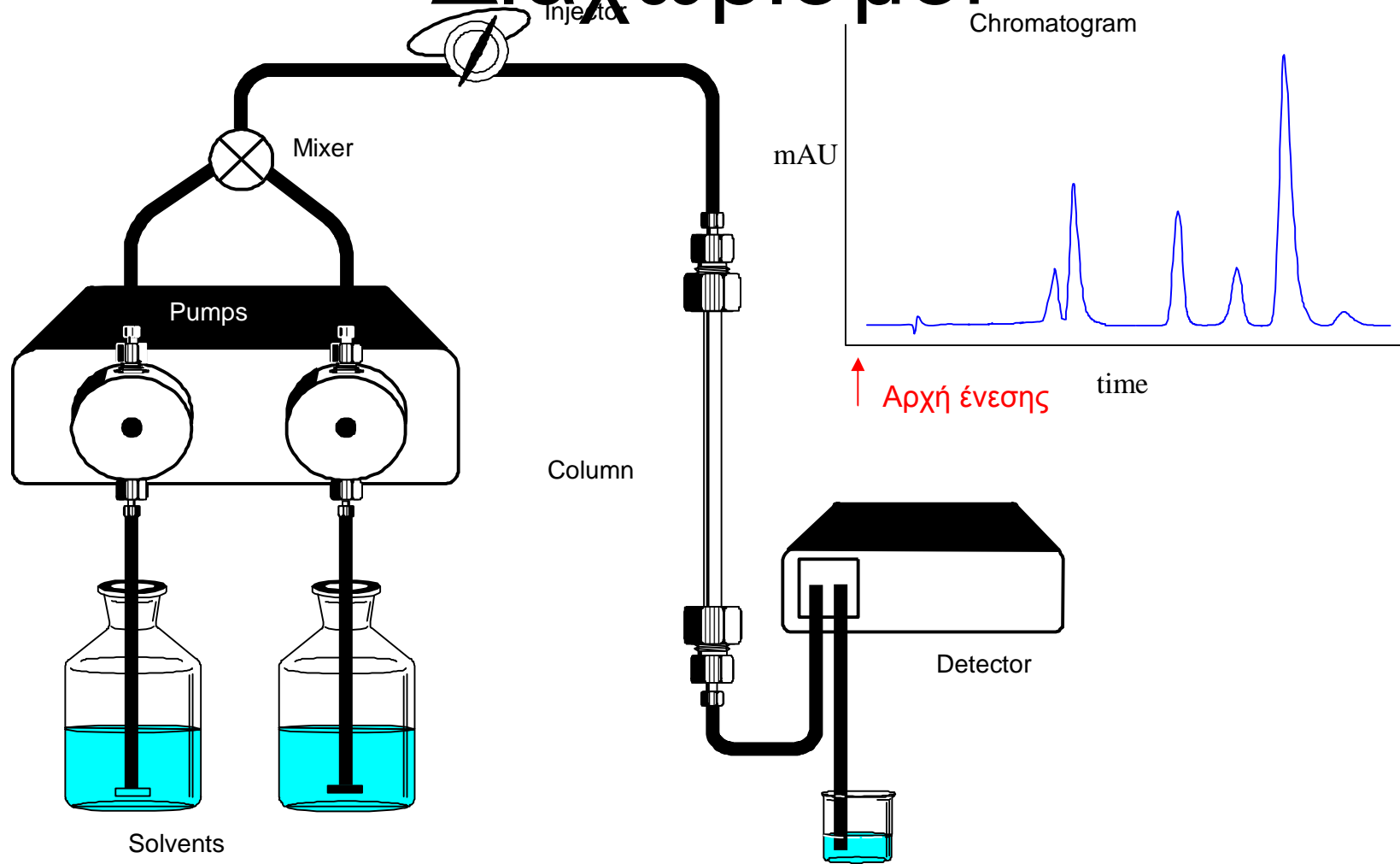
Διαχωρισμοί



Διαχωρισμοί

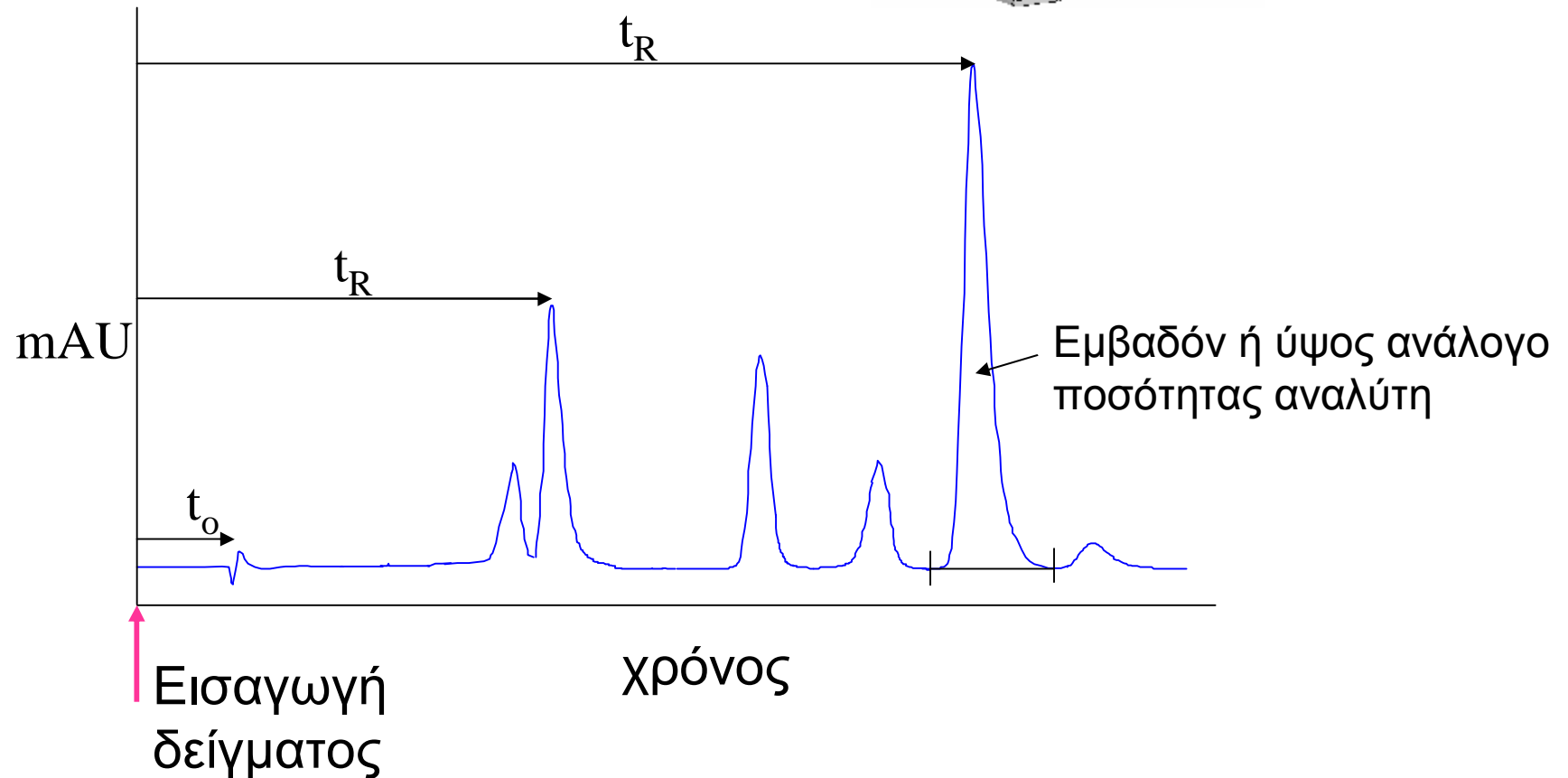


Διαχωρισμοί



Χρωματογράφημα

t_0 – χρόνος έκλουσης μη κατακρατούμενης ουσίας
 t_R – χρόνος κατακράτησης – ταυτοποίηση ουσίας



Παράμετροι Χρωματογραφίας HPLC



Σύστημα Παροχής Κινητής Φάσεως (1)

- Αντλία υψηλής πίεσης
- (Συνήθως) Σύστημα βαθμιαίας αλλαγής σύστασης κινητής φάσεως
- Τύποι εκλούσεων:
 - Ισοκρατική έκλυση (isocratic elution): σταθερή σύσταση κινητής φάσεως
 - Ανάλογη με ισόθερμη GLC
 - Βαθμιδωτή έκλυση (gradient elution): σύσταση κινητής φάσεως μεταβάλλεται βαθμιαία ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα, με βάση διάφορα προγράμματα
 - Ανάλογη με θερμοπρογραμματιζόμενη GLC

Σύστημα Παροχής Κινητής Φάσεως (2)

- Για την επίτευξη βαθμιδωτής έκλυσης απαιτείται μονάδα προγραμματισμού και ελέγχου συστήματος παροχής, ελέγχεται από μικροϋπολογιστή
- Δοχεία αποθήκευσης διαλυτών πληρώνονται, ανάλογα με μηχανισμό διαχωρισμού:
 - με διαλύτες (υποχρεωτικά αναμείξιμοι) διαφορετικής πολικότητας
 - διαλύματα διαφορετικού pH ή διαφορετικής ιοντικής ισχύος ή συγκεντρώσεως κάποιου άλατος
- Αναμειγνύονται στο θάλαμο αναμείξεως πριν την προώθηση

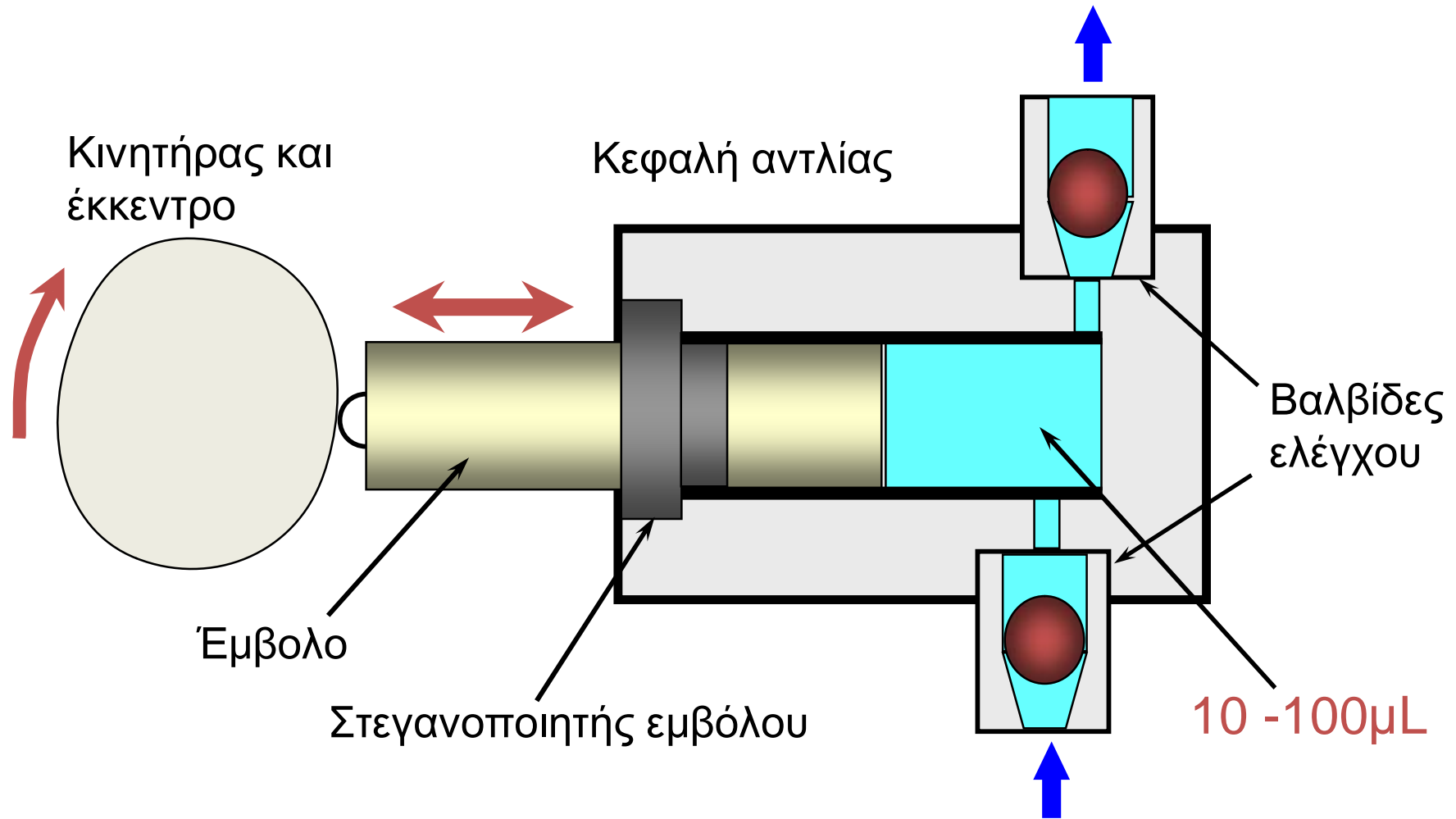
Σύστημα Παροχής Κινητής Φάσεως (3)

- Διαλύτες πρέπει να είναι καθαροί (καθαρότητας HPLC, gradient HPLC)
- Διαλύτες απαερώνονται με:
 - Διήθηση από ειδικά φίλτρα υπό κενό
 - Διαβίβαση αερίου ηλίου
 - Τοποθέτηση σε υπερήχους
 - Διήθηση on line με ειδικές μεμβράνες
- Παρεμβολή συσκευής αποσβέσεως παλμών της αντλίας για την εξομάλυνση της γραμμής βάσης

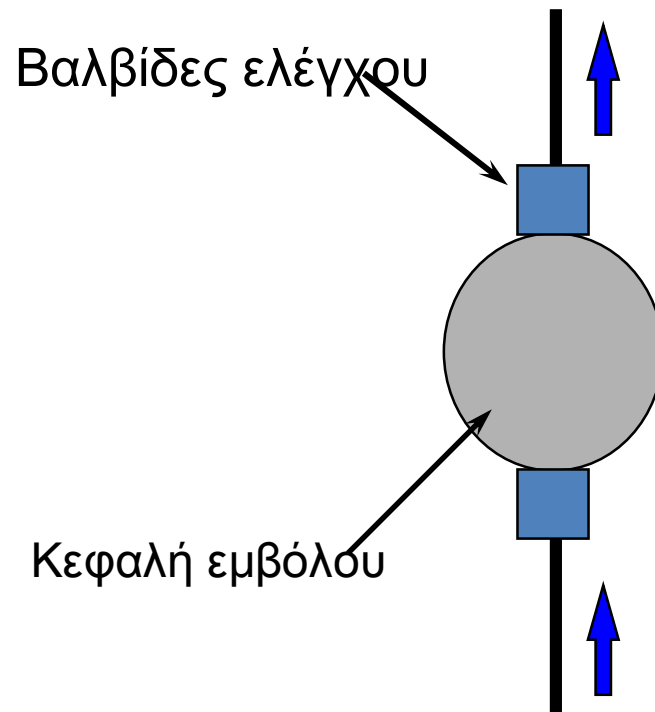
Αντλίες παροχής διαλυτών: Αντιπροσωπευτικές μέθοδοι άντλησης

- Αντλία σύριγγας
- Αντλία εμβόλου
- Αντλία διαφράγματος

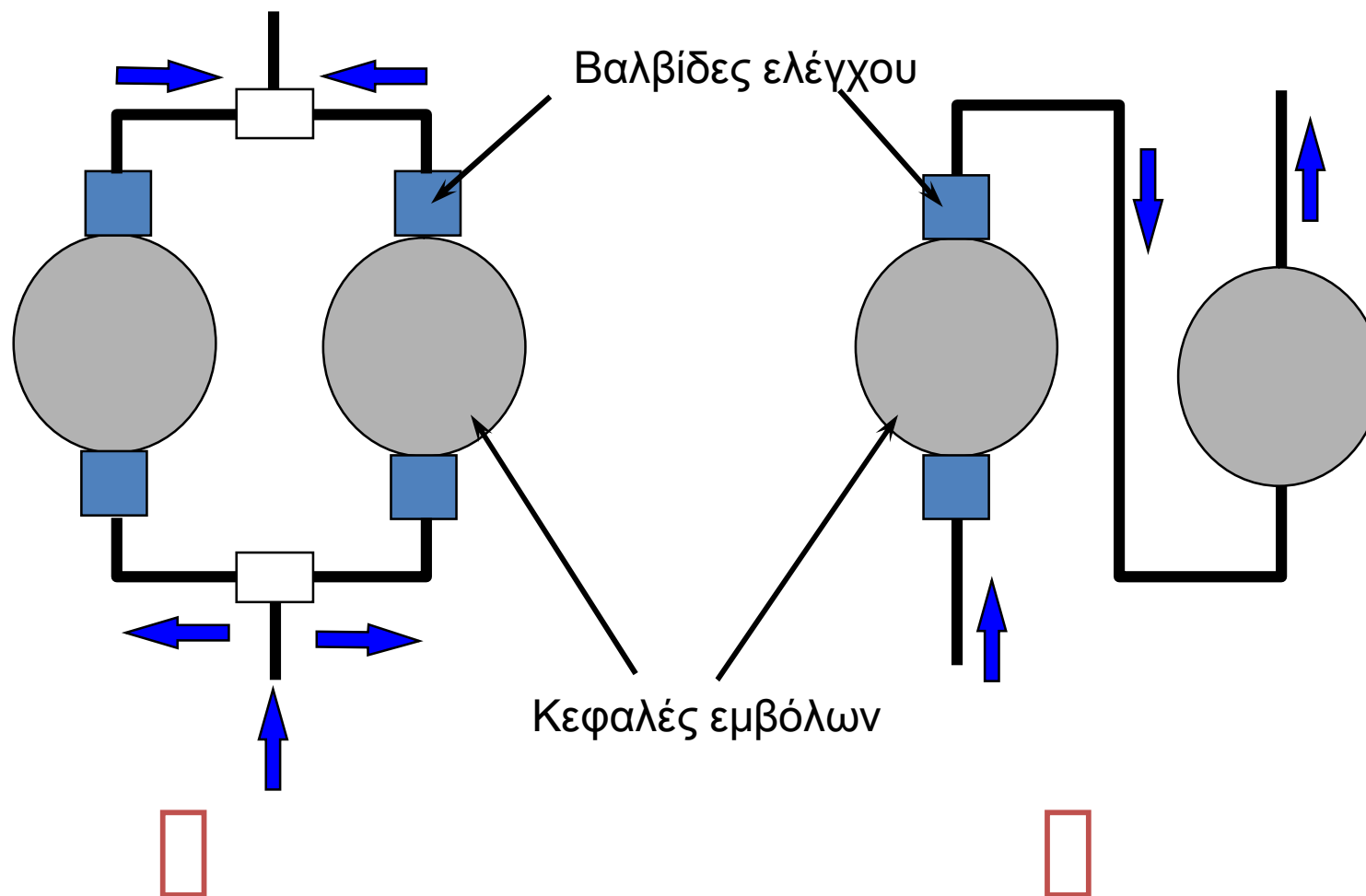
Αντλία Παροχής Κινητής Φάσης: Σχηματικό Διάγραμμα Αντλίας Εμβόλου



Αντλία παροχής διαλύτη: Τύπος απλού εμβόλου



Αντλία παροχής διαλύτη: Τύπος Διπλού Εμβόλου



Σκοπός βαθμιδωτής έκλουσης

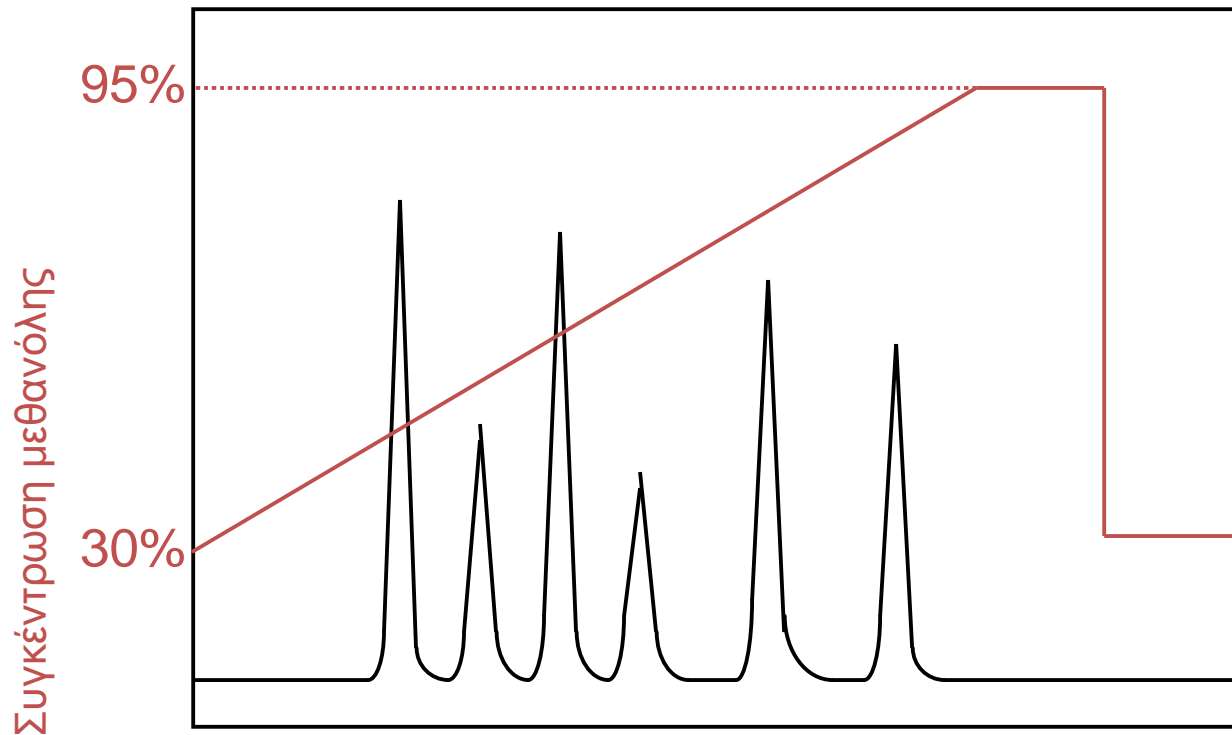
- Σε ισοκρατική έκλουση



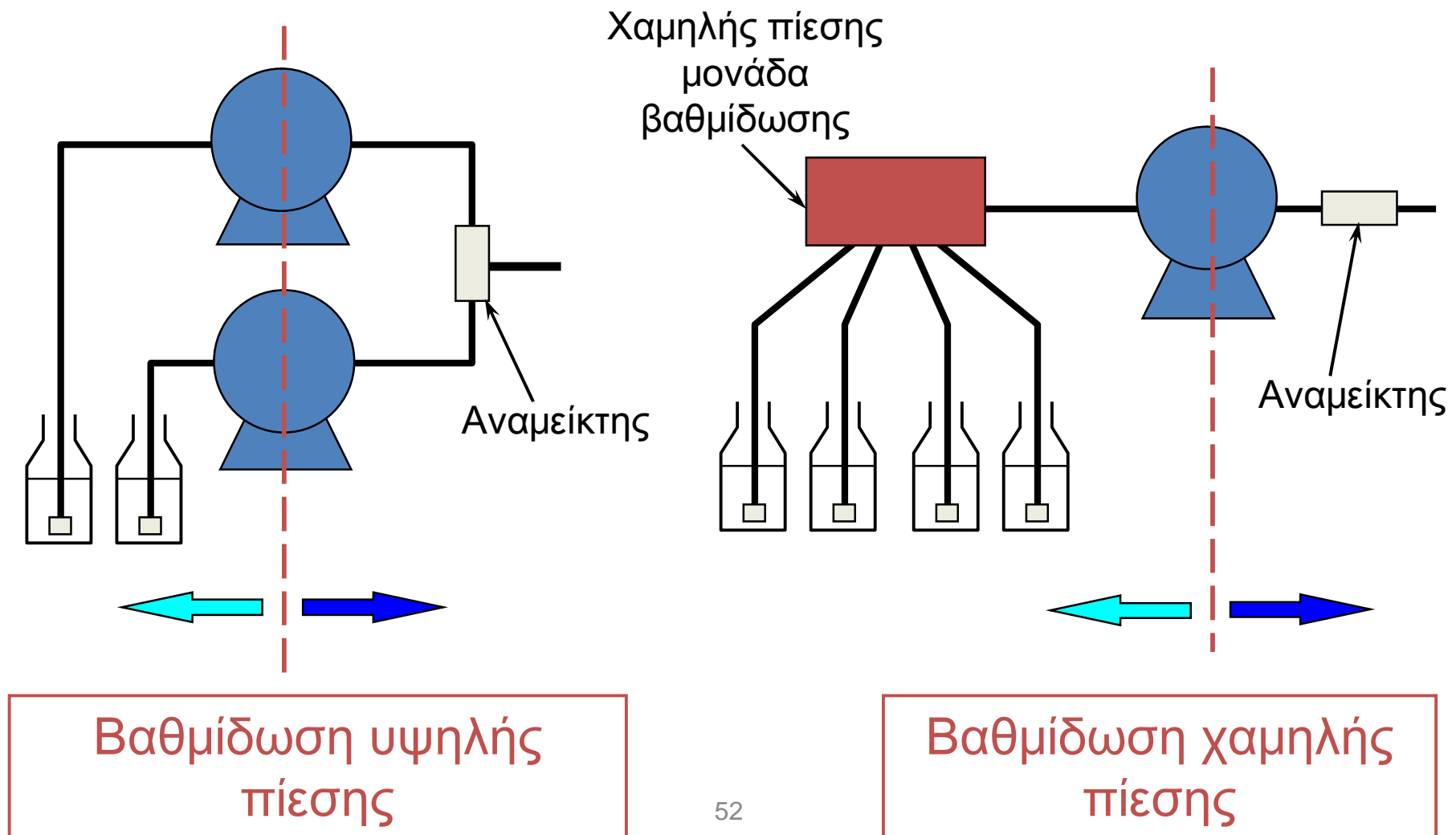
(Στήλη: τύπος ODS)

Σκοπός βαθμιδωτής έκλυσης

- Εάν η σύσταση του εκλουστικού αλλάζει βαθμιαία κατά τη διάρκεια της ανάλυσης...

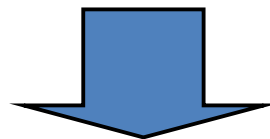


Υψηλής- / Χαμηλής-Πίεσης Σύστημα Βαθμιδωτής Έκλουσης



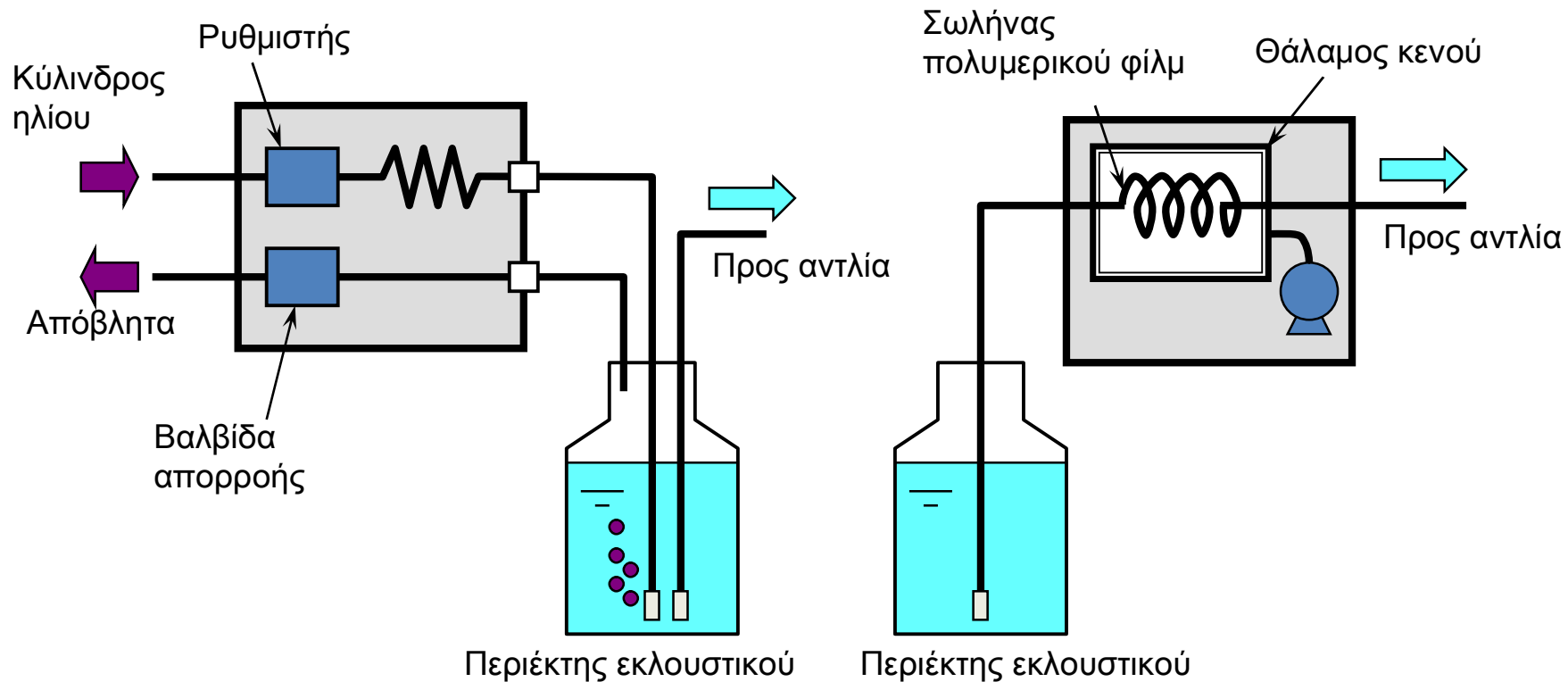
Απαερωτής

- Προβλήματα λόγω διαλυμένου αέρα στο εκλουστικό
 - Ασταθής παροχή από την αντλία
 - Περισσότερος θόρυβος και μεγάλη ολίσθηση γραμμής βάσεως στην κυψελίδα ανιχνευτή



Για την αποφυγή των προβλημάτων το εκλουστικό πρέπει να απαερώνεται.

Απαέρωση «on line»



Μέθοδος απαέρωσης με ήλιο

Μέθοδος μεμβράνης διαχωρισμού αερίου - υγρού

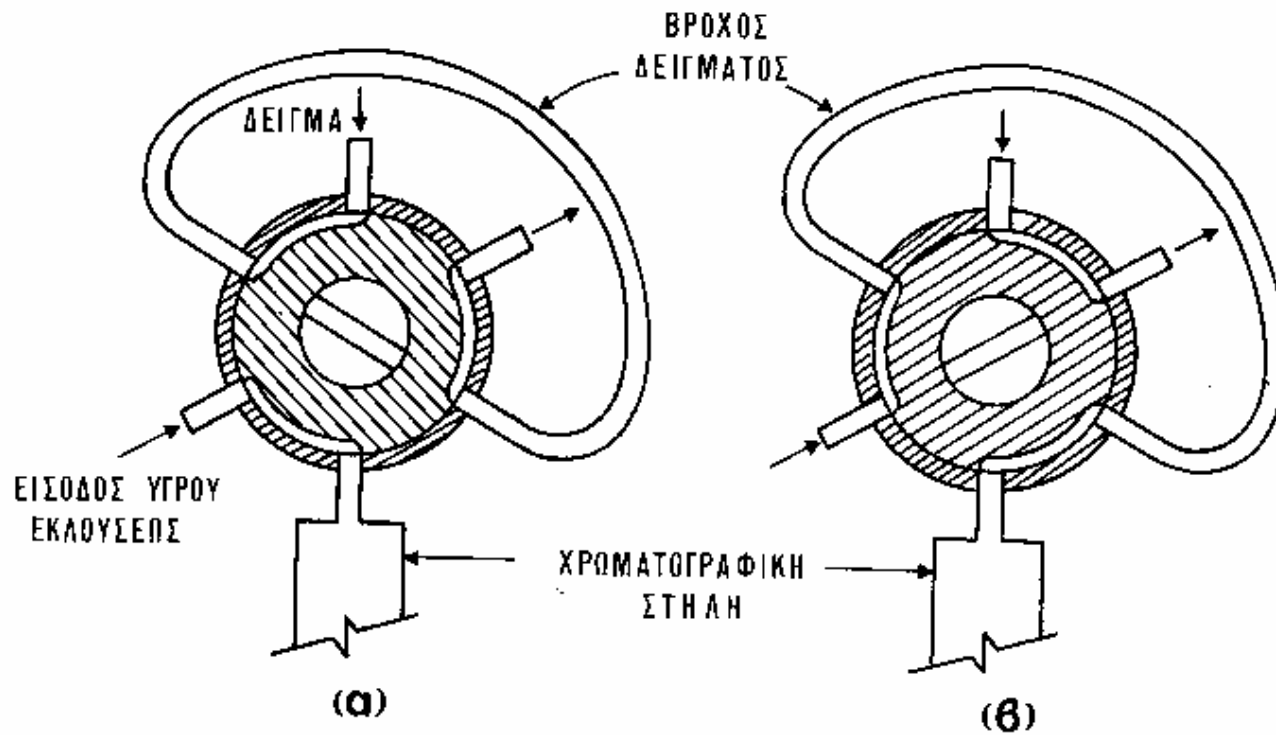
Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος (Injector) (1)

- Συνήθως μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης, με βρόχο (loop) δείγματος. Αποτελείται από:
 - Ακίνητο χαλύβδινο κύλινδρο με 6 διαύλους, εκ των οποίων ένας οδηγεί στη στήλη
 - Κινητό κύλινδρο από Teflon μέσα στο χαλύβδινο κύλινδρο με 3 αύλακες, ο καθένας από τους οποίους συνδέει ένα ζευγάρι διαύλων του ακίνητου κυλίνδρου
 - Εξωτερικό χαλύβδινο κάλυμμα με μοχλό χειρισμού
 - Δύο δίαυλοι ενώνονται με εξωτερικό χαλύβδινο βρόχο δείγματος γνωστού πολύ μικρού όγκου

Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος (Injector) (2)

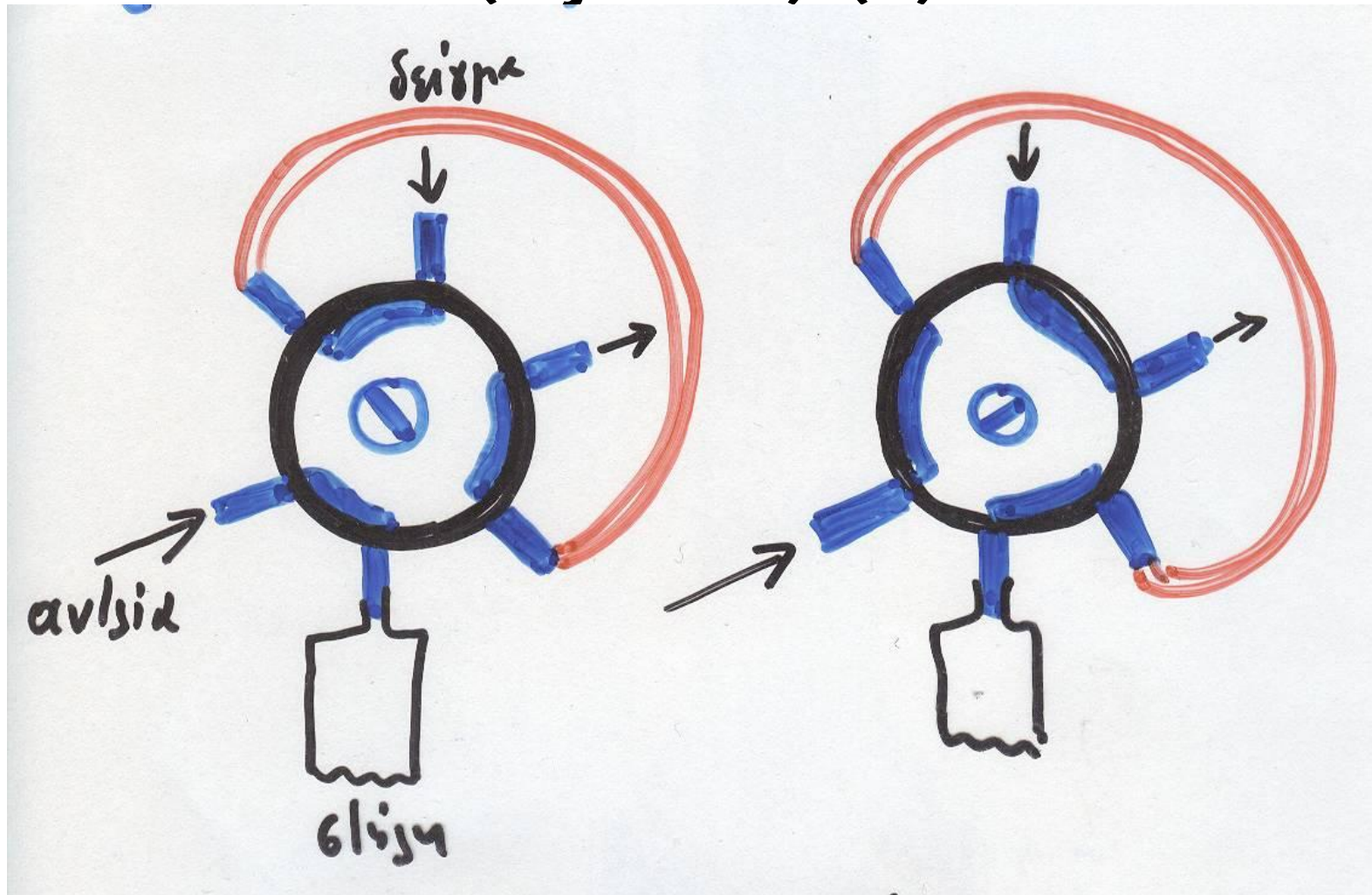
- Στη θέση «φόρτωσης», η κινητή φάση προωθείται προς τη στήλη
- Με τη βοήθεια σύριγγας πληρώνεται ο βρόχος δείγματος με το προς ανάλυση δείγμα
- Στρέφεται ο δακτύλιος Teflon κατά 30° στη θέση «εισαγωγής»
- Η κινητή φάση παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος και τον προωθεί προς τη στήλη.
- Δείγματα όγκου μερικών μL εισάγονται με ακρίβεια και επαναληψιμότητα σε υψηλές πιέσεις.

Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος (Injector) (3)

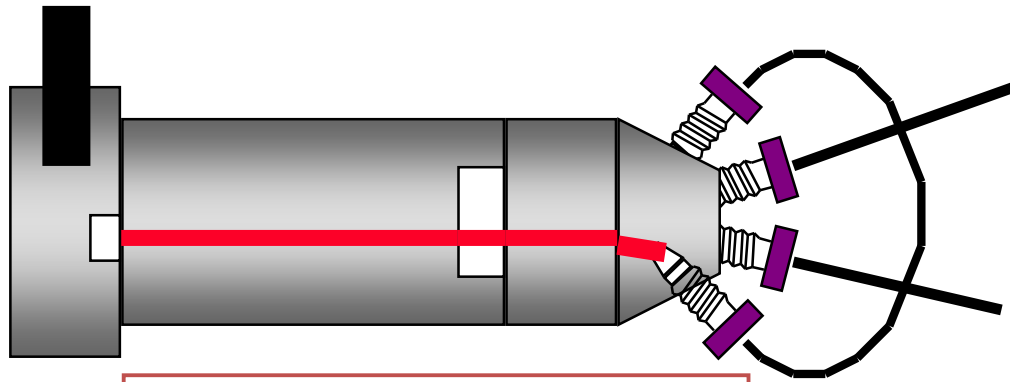


Σχήμα 20-4. Σύστημα εισαγωγής δείγματος. α) Θέση "φορτώσεως", β) θέση εισαγωγής.

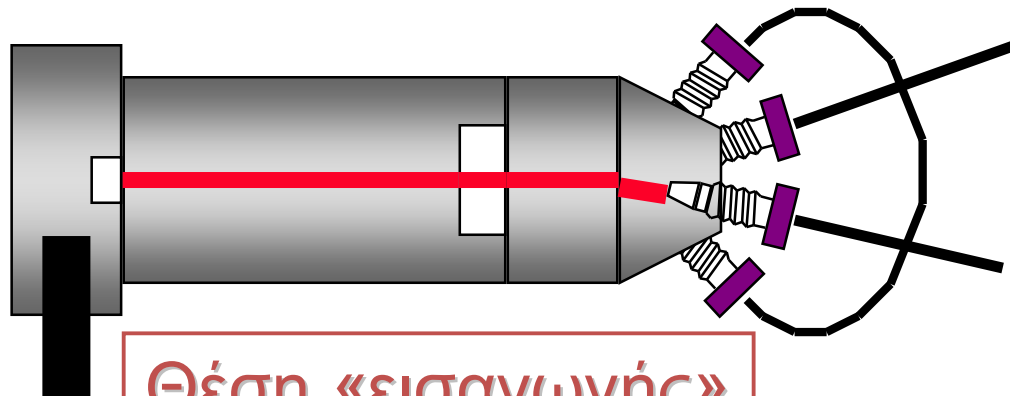
Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος (Injector) (3)



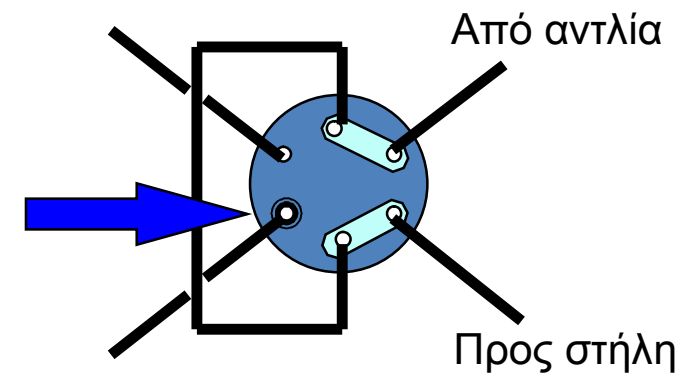
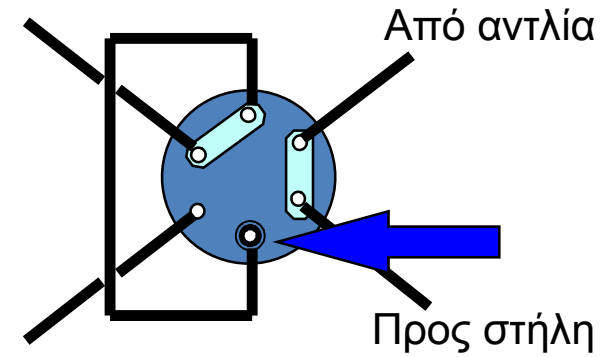
Δια χειρός (manual) εισαγωγή



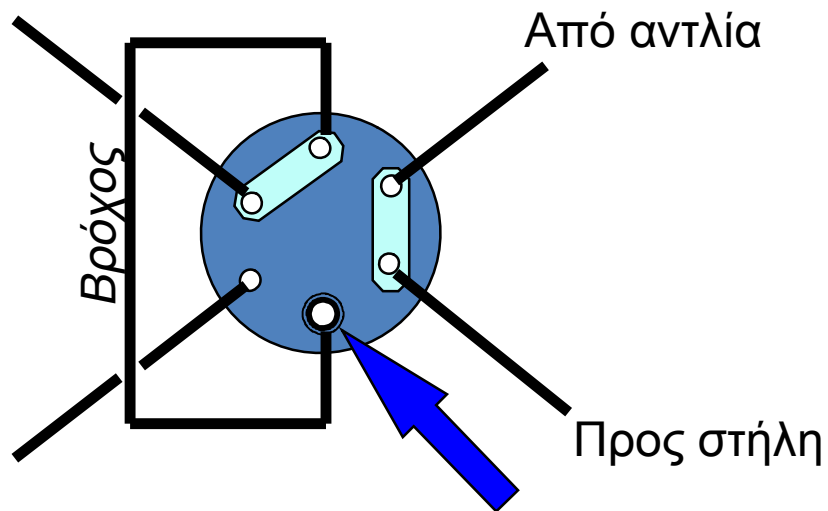
Θέση «φόρτωσης»



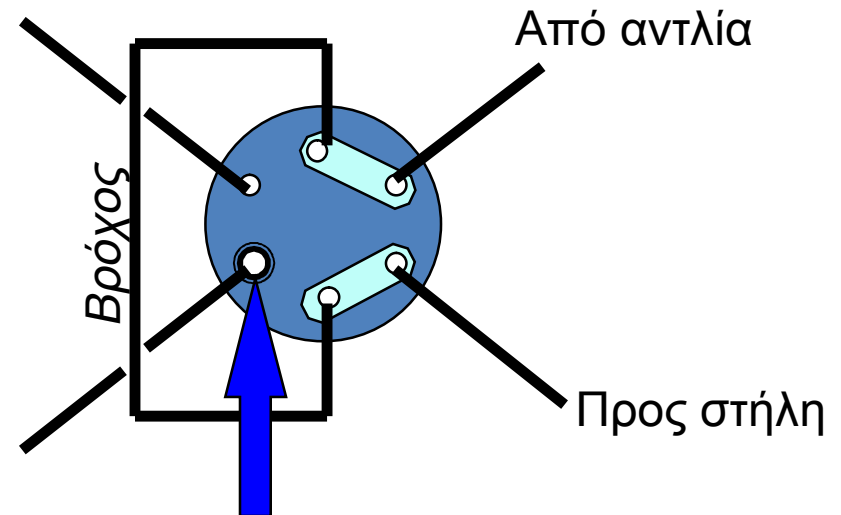
Θέση «εισαγωγής»



«Δια χειρός» εισαγωγή : Αρχή λειτουργίας Εισαγωγής Δείγματος



Φόρτωση

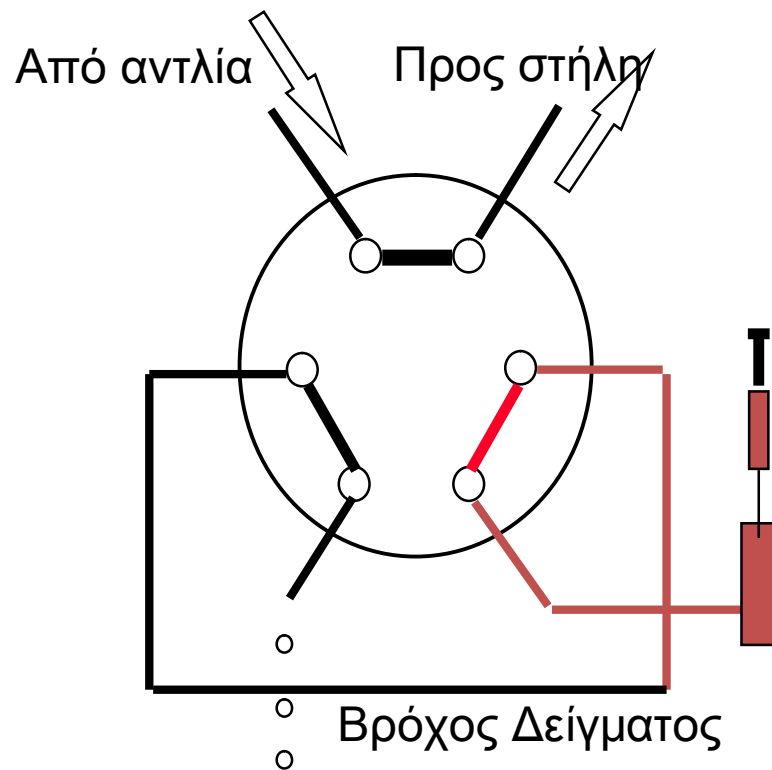


Εισαγωγή

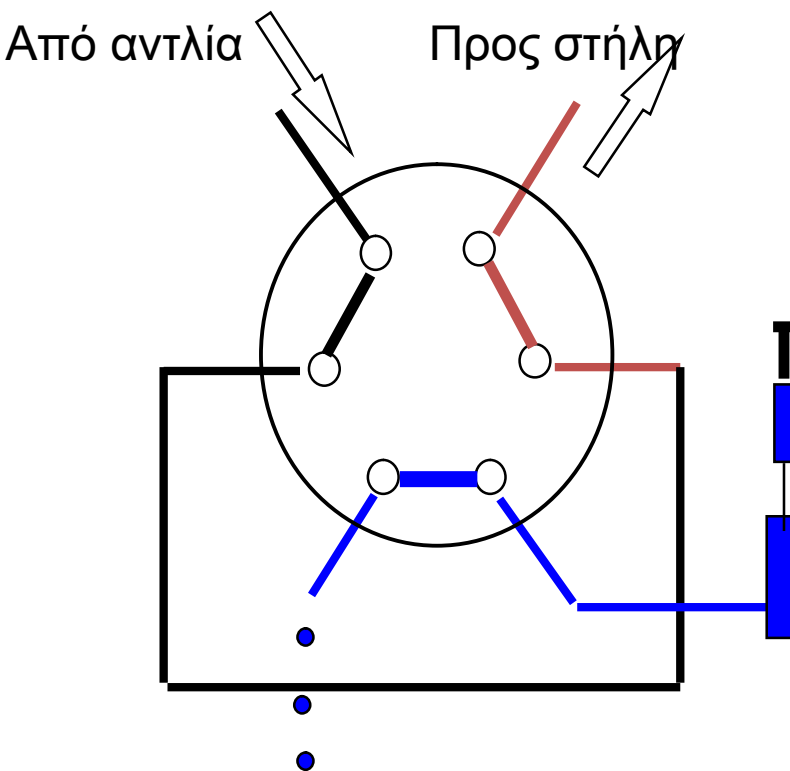
«Δια χειρός» Εισαγωγή Δείγματος

- Μέθοδος μέτρησης με σύριγγα
 - Συνιστάται να εισάγεται στο βρόχο όγκος μέχρι το ήμισυ του βρόχου
- Μέθοδος μέτρησης με βρόχο
 - Συνιστάται να εισάγεται στο βρόχο τουλάχιστον 3πλάσιος όγκος του βρόχου

Αυτόματος Δειγματολήπτης (Μέθοδος Εισαγωγής με Πίεση)

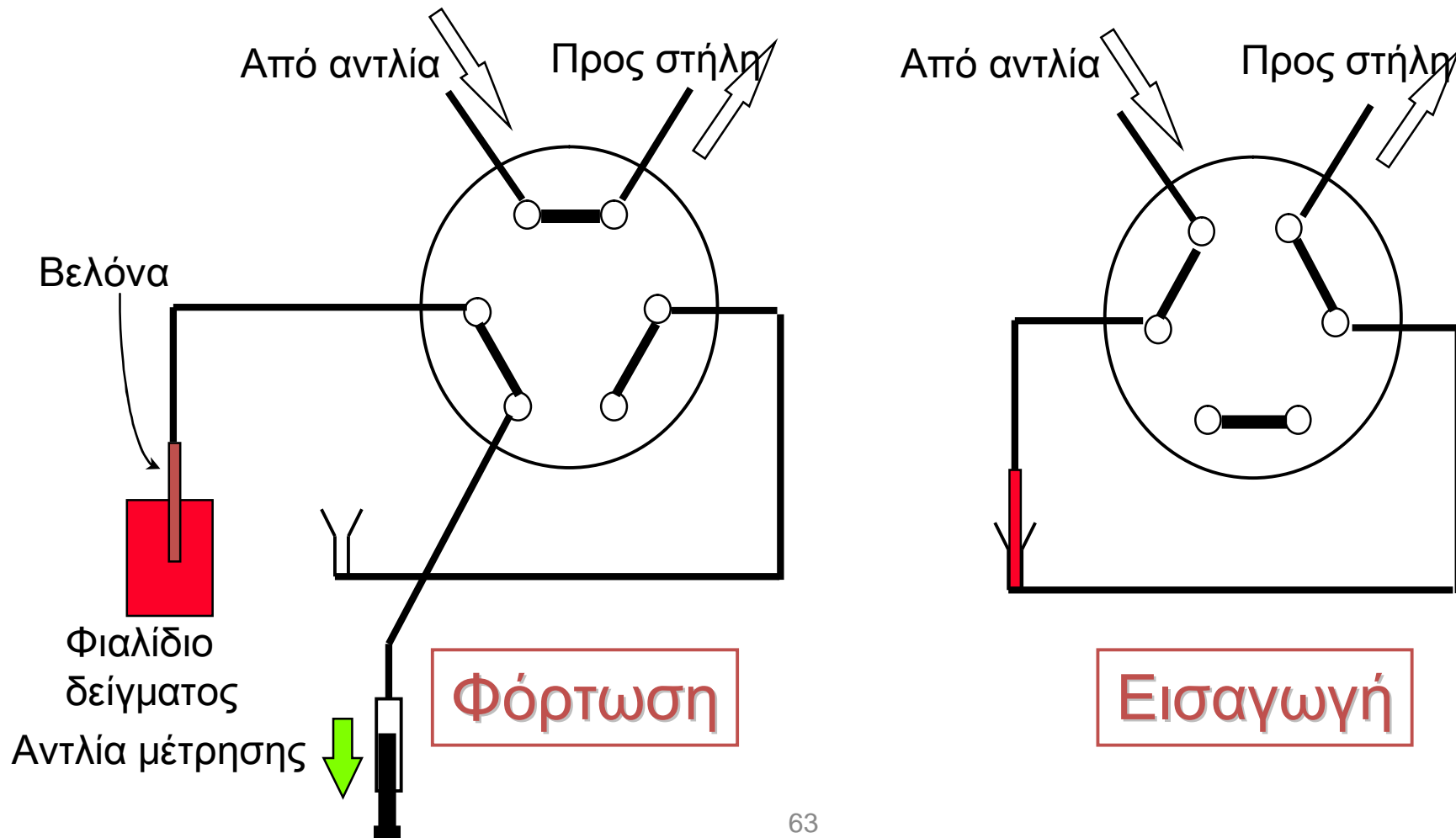


Φόρτωση



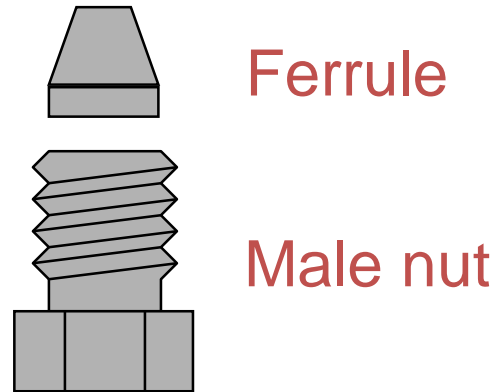
Εισαγωγή

Αυτόματος Δειγματολήπτης (Μέθοδος Εισαγωγής Ολικού Όγκου)



Συνδετήρες

- Αρσενικό περικόχλιο (Male nut)
Φερρούλιο (στεφάνη)
 - Στεγανοποίηση μέχρι 40 MPa

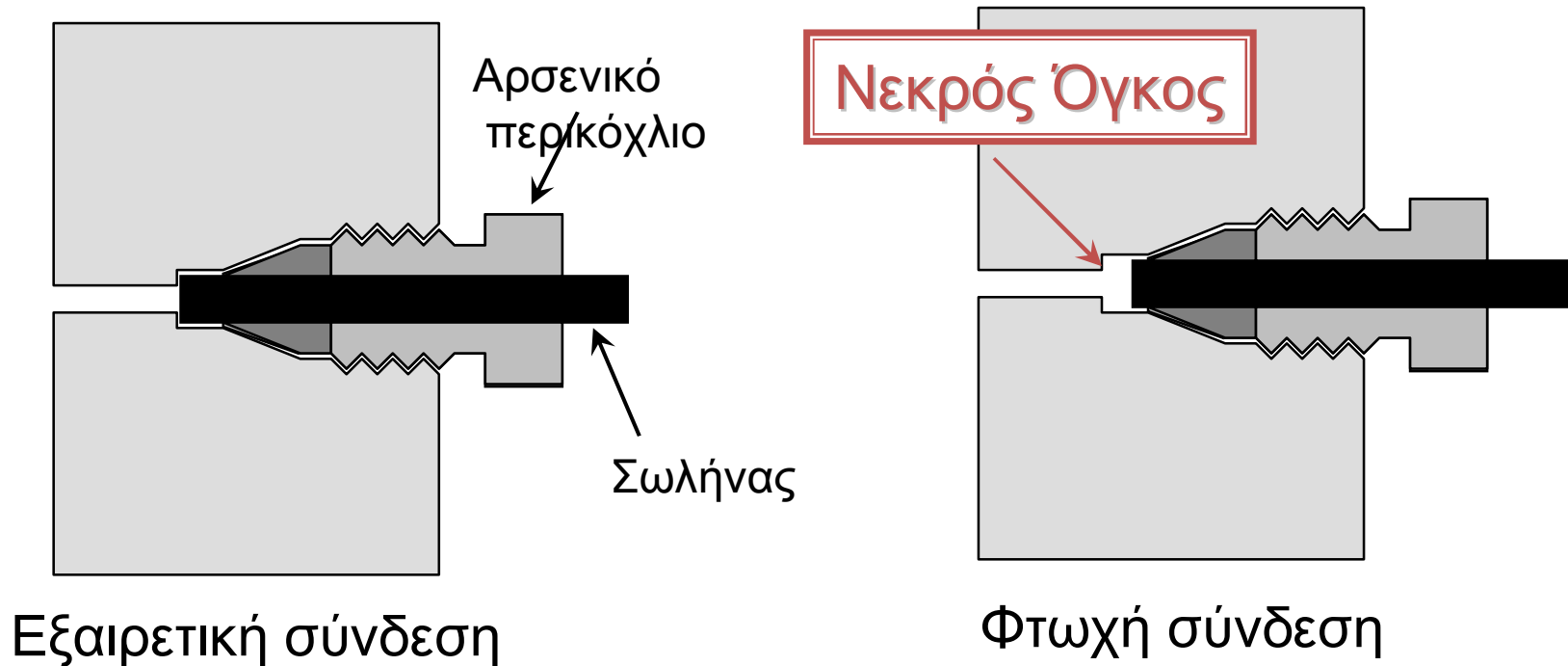


- Αρσενικό περικόχλιο (PEEK)
 - Συνδέεται χωρίς εργαλεία
 - Ανθεκτικό σε πίεση μέχρι 25 MPa



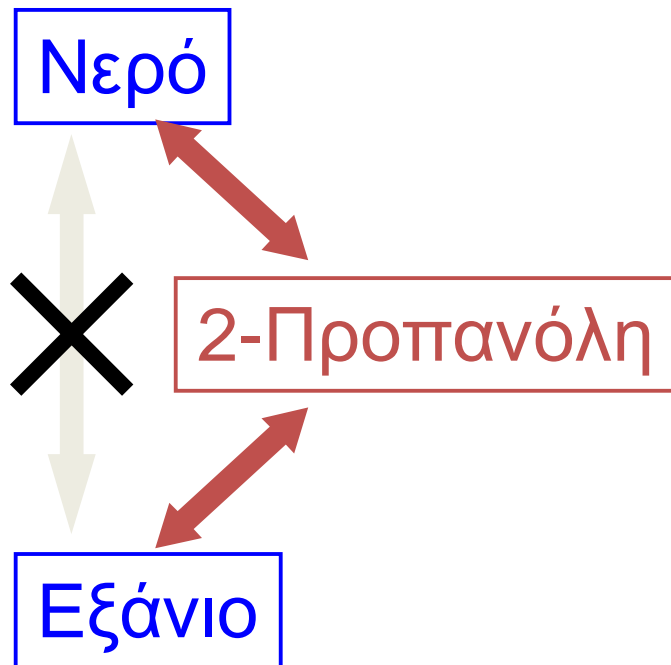
Νεκρός Όγκος (Επιπλέον Όγκος Στήλης)

- Νεκρός όγκος μπορεί να προκαλέσει διεύρυνση κορυφών

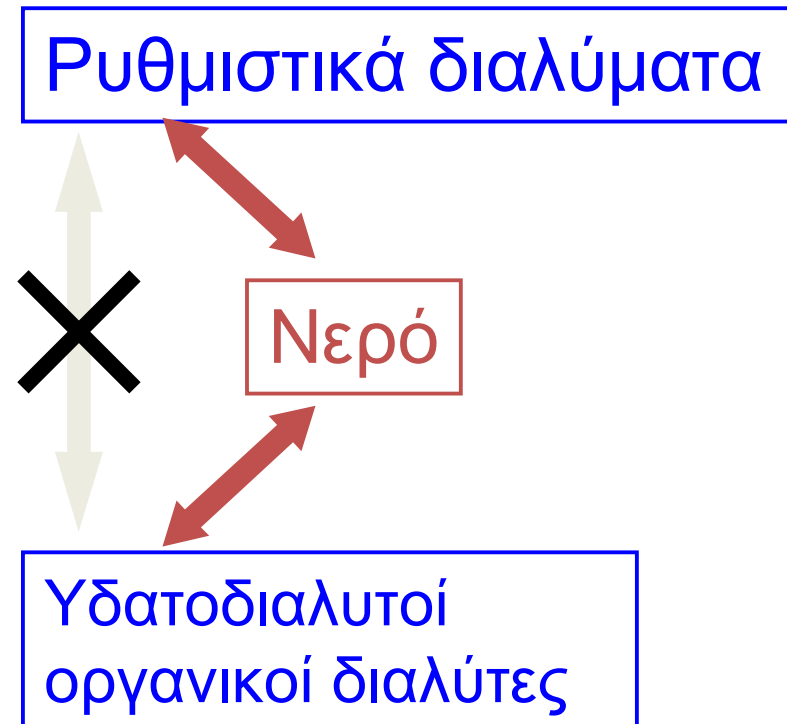


Αντικατάσταση Εκλουστικών

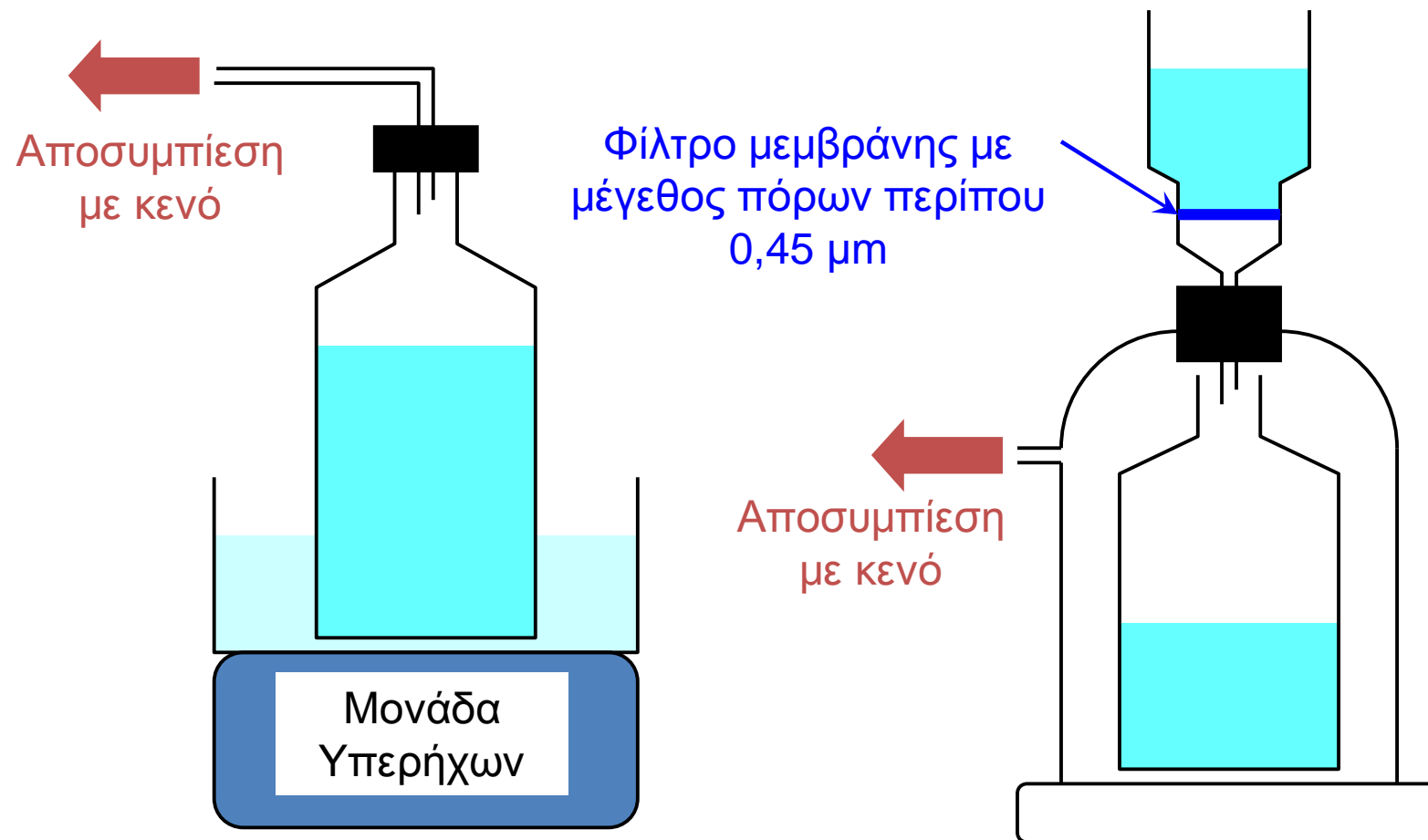
- Μη αναμίξιμοι διαλύτες δεν πρέπει να αντικαθίστανται απευθείας.



- Υδατικά διαλύματα που περιέχουν άλατα και οργανικοί διαλύτες δεν πρέπει να αντικαθίστανται απευθείας.



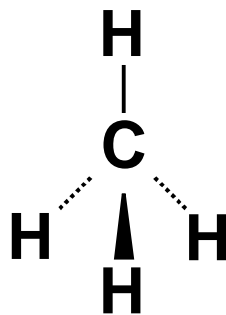
Ανάμιξη, Διήθηση, και «Εκτός Γραμμής» Απαέρωση Εκκλουστικού



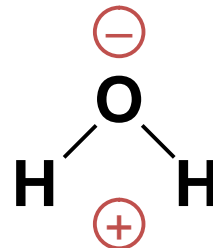
Πολικότητα Ουσιών

- Πολικότητα

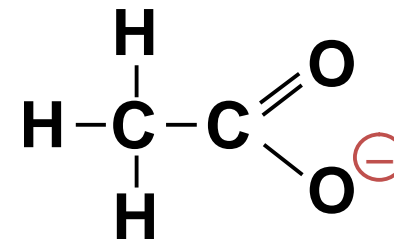
- Ιδιότητα μιας ουσίας όταν οι θέσεις των ηλεκτρονίων δημιουργούν θετικό και αρνητικό πόλο
- Νερό: Πολικό
- Μεθάνιο: Άπολο



Μεθάνιο



Νερό



Οξικό οξύ

Αναμιξιμότητα διαλυτών

- Διαλύτες όμοιας πολικότητας μπορούν εύκολα να αναμιχθούν
- Πολικά και άπολα μόρια έχουν σχέση παρόμοια με αυτή νερού και ελαίου

Άπολες (υδρόφοβες) πολικές (υδρόφιλες) λειτουργικές ομάδες

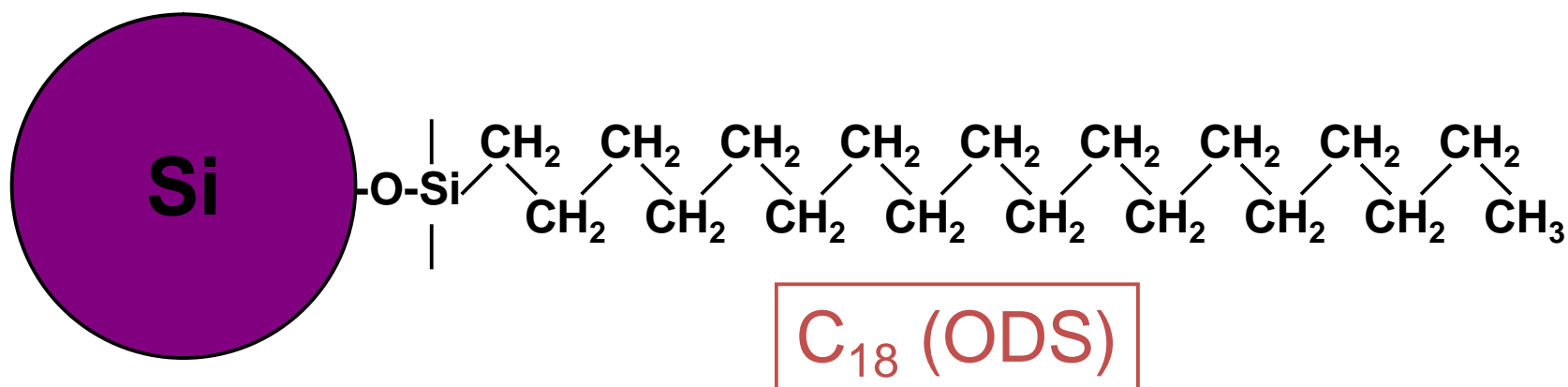
- Άπολες λειτουργικές ομάδες
 - $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$
 - Αλκυλομάδες
 - $-\text{C}_6\text{H}_5$
 - Φαινολομάδες
- Πολικές λειτουργικές ομάδες
 - $-\text{COOH}$
 - Καρβοξυλομάδες
 - $-\text{NH}_2$
 - Αμινομάδες
 - $-\text{OH}$
 - Υδροξυλομάδες

Κανονικής Φάσης / Αντίστροφης Φάσης

	Στατική Φάση	Κινητή Φάση
Κανονικής φάσης	Υψηλής πολικότητας (υδρόφιλη)	Χαμηλής πολικότητας (υδρόφοβη)
Αντίστροφης φάσης	Χαμηλής πολικότητας (υδρόφοβη)	Υψηλής πολικότητας (υδρόφιλη)

Στήλες διαχωρισμού για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

- C₁₈ (ODS) οκταδεκυλο-
- C₈ (οκτυλο-)
- C₄ (βουτυλο-)
- Φαινυλο-
- Τριμεθυλο-
- Κυανο-



Στήλες (1)

- Ευθύγραμμοι σωλήνες από χάλυβα
- Δύσκολη η πλήρωσή τους από το Εργαστήριο, αγοράζονται έτοιμες από παρασκευάστριες εταιρείες
- Όχι θερμοστάτηση για μηχανισμό προσρόφησης, απαραίτητη πολλές φορές για μηχανισμούς κατανομής, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού
- Λαμβάνεται υπόψη και η ευαισθησία του ανιχνευτή στη θερμοκρασία (π.χ. διαθλασίμετρο)
 - Ψύξη υγρού εκλούσεως μετά την έξοδο από τη στήλη
- Δυνατότητα χρήσεως περιστρεφόμενης βαλβίδας για την επιλογή διαφορετικών στηλών

Εικόνα στήλης HPLC



Στήλες (2)

- Για κάθε εφαρμογή με τους διάφορους μηχανισμούς (προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή, μοριακό αποκλεισμό) διατίθενται από τις παρασκευάστριες εταιρείες οι κατάλληλες στήλες.
- Κατασκευή στηλών πολύ κρίσιμο στάδιο για την καλή απόδοση της τεχνικής
- Τα υλικά στήριξης (Corasil, Zipax, Celite, κλπ) ξηραίνονται πριν από την επικάλυψη με την υγρή στατική φάση
- Τα στερεά υλικά προσρόφησης ενεργοποιούνται με πύρωση.

Στήλες (3)

- Για την ελαχιστοποίηση λιμναζόντων χώρων απαιτείται άριστη πλήρωση
 - Οι πόροι του υλικού πλήρωσης να γεμίζουν με την υγρή στατική φάση
 - Καλά πληρωμένη στήλη μπορεί να έχει απόδοση περίπου 400 θεωρητικές πλάκες / cm με σωματίδια 5-10 μm .
- Συνήθως χρησιμοποιείται και προστήλη (μικρή στήλη από ίδιο υλικό) για να:
 - Είναι κορεσμένη η κινητή φάση με την υγρή στατική φάση και να προστατεύεται η κύρια στήλη
 - Να προστατεύει από ακαθαρσίες που προσροφούνται μη αντιστρεπτά

Στήλες (4)

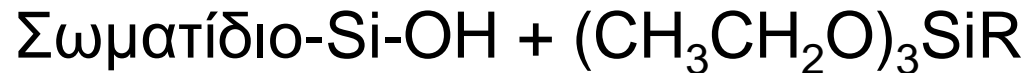
Χημικά Συνδεδεμένες Στατικές Φάσεις Chemically Bonded Stationary Phases

- Υψηλή πίεση και μεγάλες ταχύτητες που χρησιμοποιούνται στην HPLC προκαλούν μηχανική απομάκρυνση μέρους της υγρής στατικής φάσης
- Αναπτύχθηκαν υλικά πλήρωσης (μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου πυριτίου) με χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις
 - Συχνότερα χρησιμοποιούμενη μορφή στατικής φάσης στην HPLC

Στήλες (5)

Χημικά Συνδεδεμένες Στατικές Φάσεις Chemically Bonded Stationary Phases

- Σωματίδια συνήθως διαμέτρου 5 μm με πόρους διαμέτρου 20 nm με μεγάλη επιφάνεια επαφής
- Υγρή στατική φάση συνδέεται ομοιοπολικά στην επιφάνεια της πηκτής διοξειδίου πυριτίου



R = $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ή $-(\text{CH}_2)_3\text{CN}$ για πολικές φάσεις

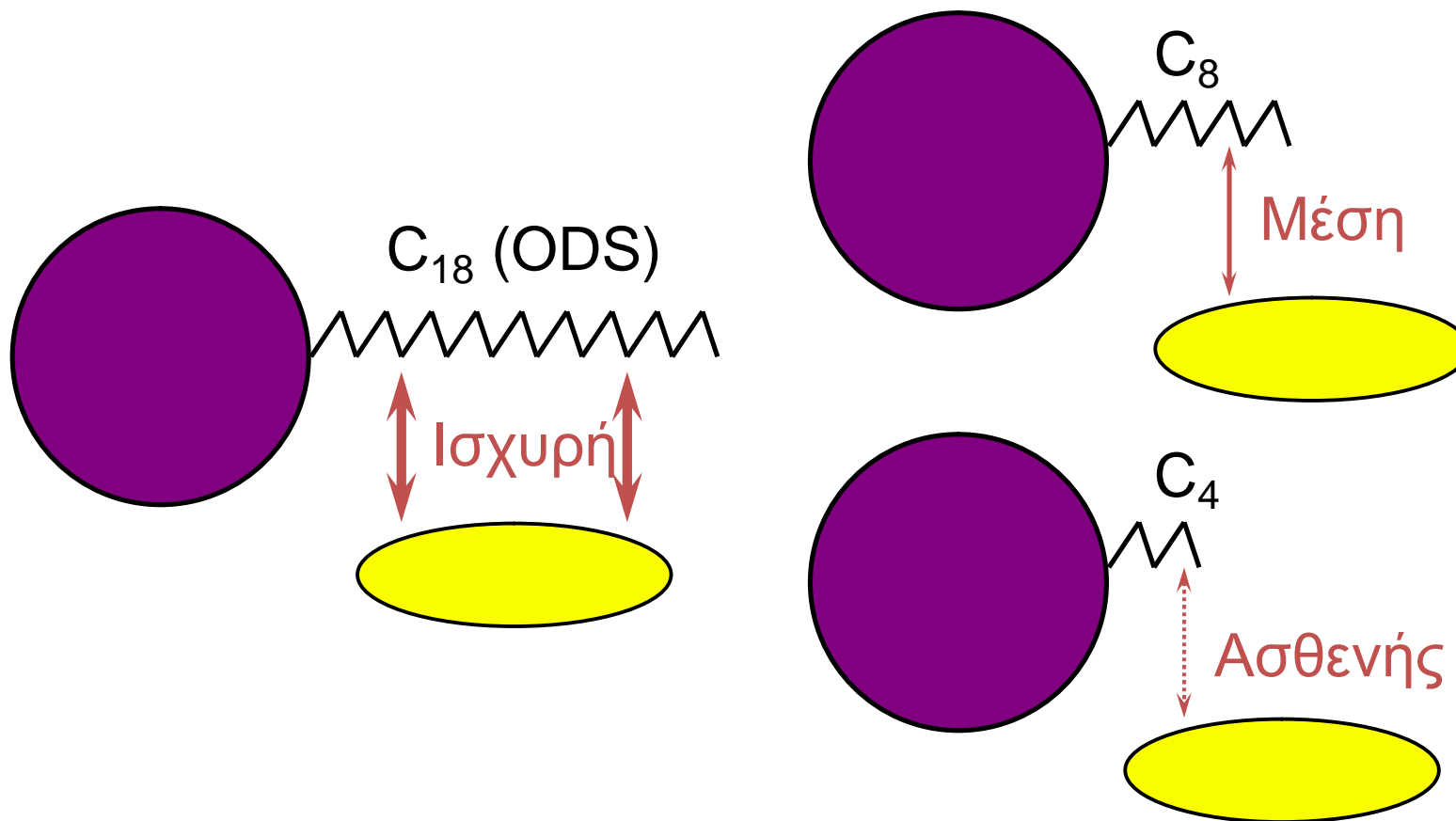
R = $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ ή $-(\text{CH}_2)_2\text{-C}_6\text{H}_5$ για μη πολικές φάσεις

Στήλες (7)

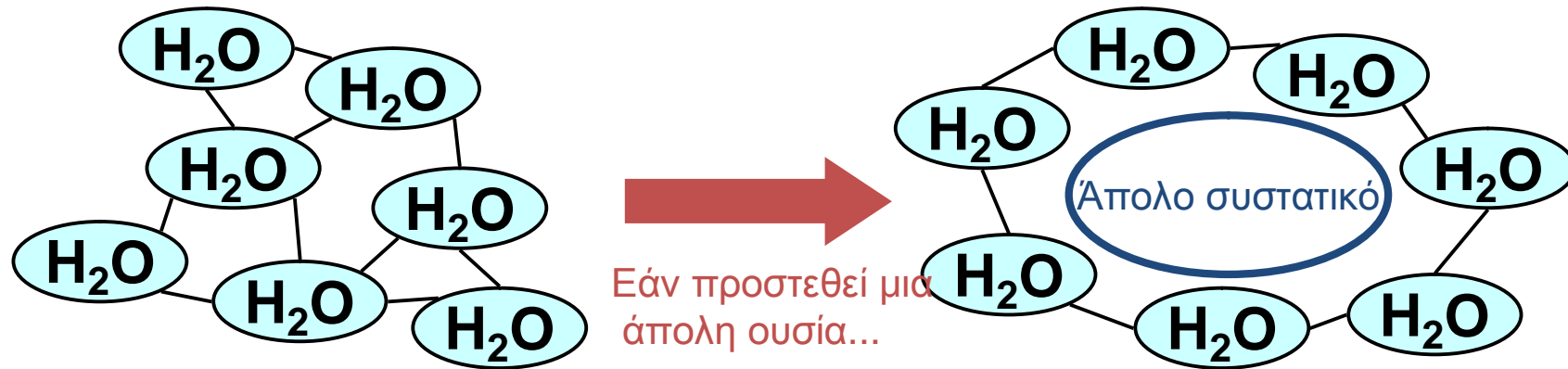
Χημικά Συνδεδεμένες Στατικές Φάσεις Chemically Bonded Stationary Phases

- Με τις χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις πετυχαίνεται:
 - πολύ μεγάλος βαθμός ομοιομορφίας σωματιδίων στατικής φάσης (μικρή τιμή A εξισώσεως van Deemter)
 - συμμετρικές κορυφές χρωματογραφήματος
 - χωρίς διαρροή υγρής στατικής φάσης από τη στήλη
 - ποικιλία πολικότητας
- Έχουν αναφερθεί 600 – 800 θεωρητικές πλάκες ανά cm για σωματίδια διαμέτρου 5 μm και 1200 ανά cm για σωματίδια διαμέτρου 3 μm

Επίδραση μήκους αλυσίδας της στατικής φάσης

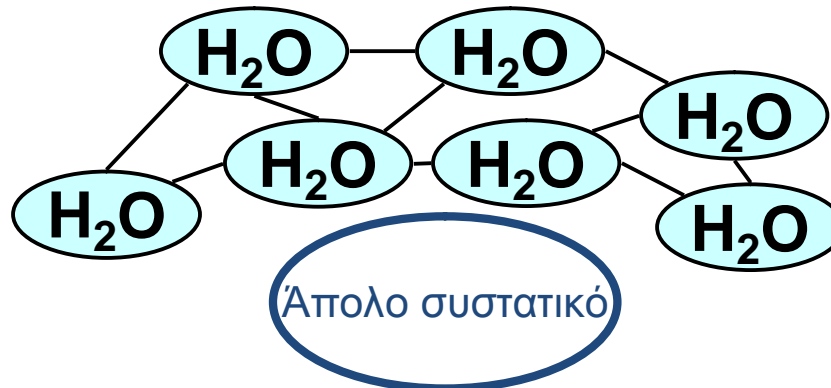


Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις



Δίκτυο δεσμών υδρογόνου

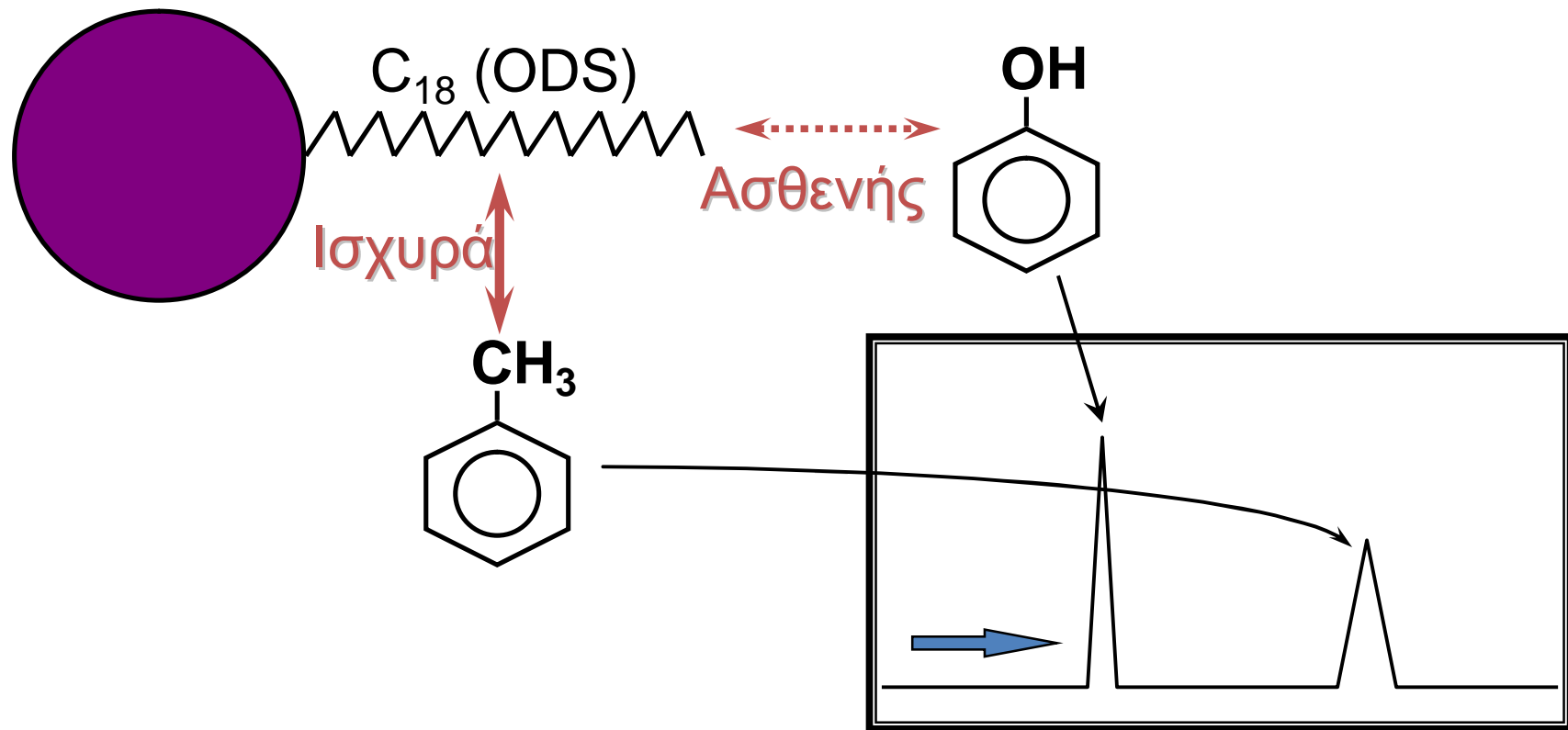
...το δίκτυο διασπάζεται και...



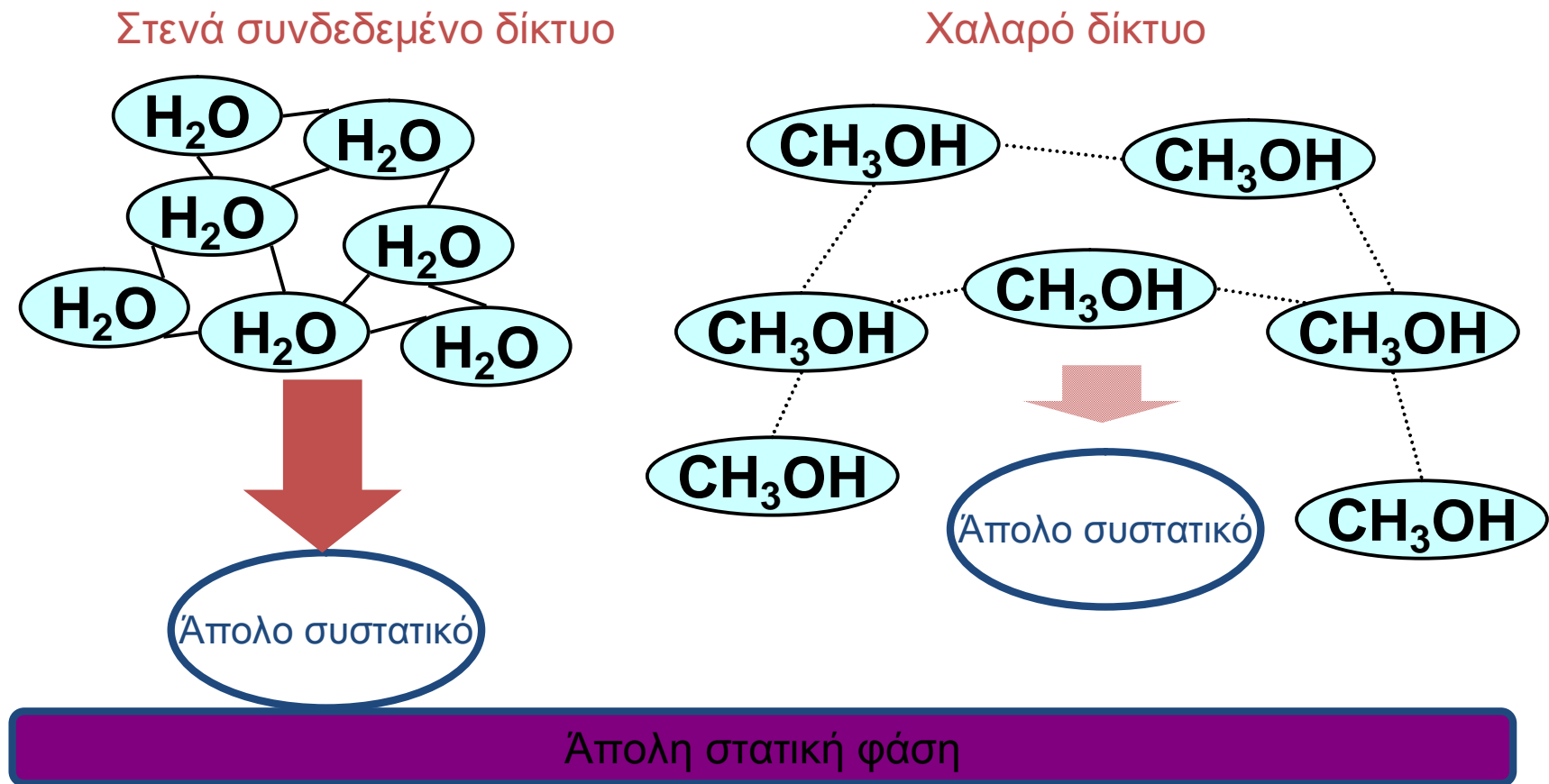
...η άπολη ουσία ωθείται σε μια άπολη θέση

Άπολη στατική φάση

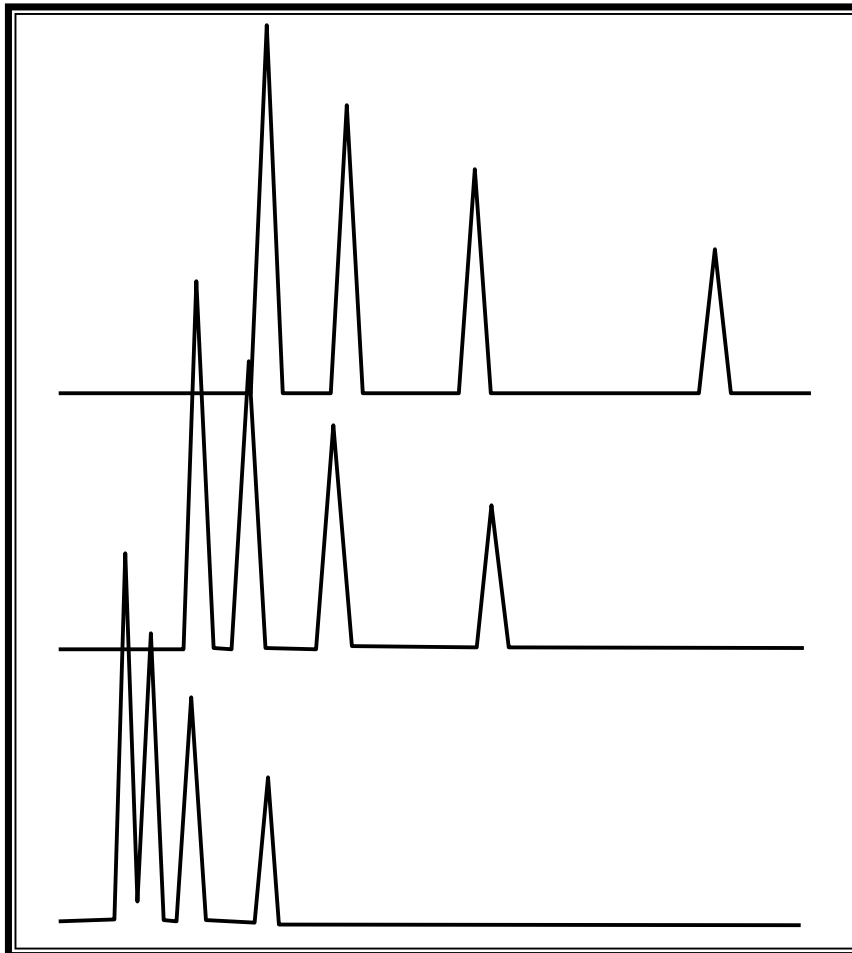
Σχέση μεταξύ χρόνου ανάσχεσης και πολικότητας



Διαφορά ισχύος κατακράτησης για νερό και υδατοδιαλυτούς οργανικούς διαλύτες



Σχέση μεταξύ πολικότητας εκλουστικού και χρόνου ανάσχεσης
στην αντίστροφη φάση
Καθώς η πολικότητα του εκλουστικού μειώνεται (αυξάνεται το
ποσοστό μεθανόλης), μειώνεται ο χρόνος ανάσχεσης



Εκλουστικό: Μεθανόλη / Νερό

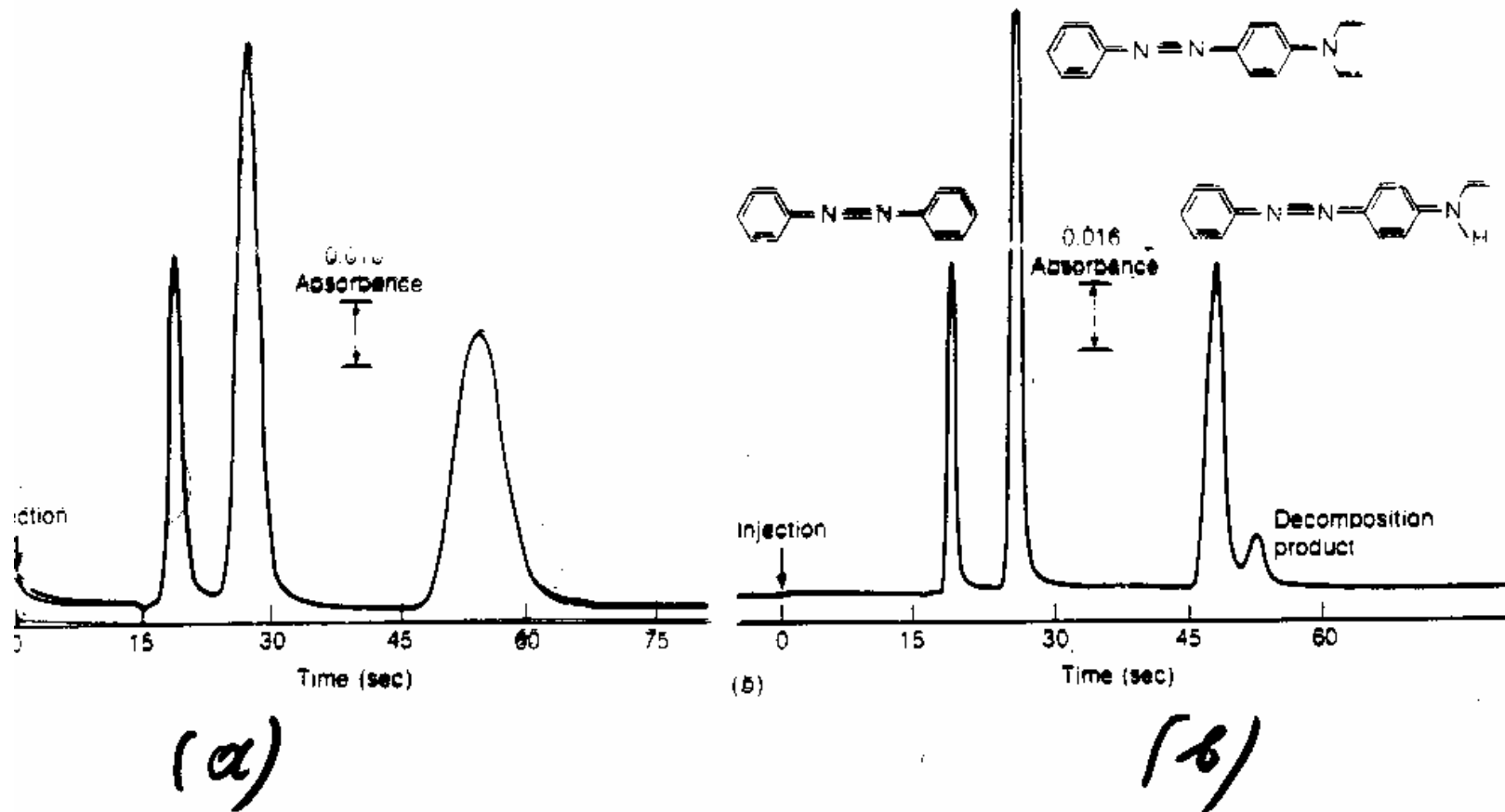
60/40

70/30

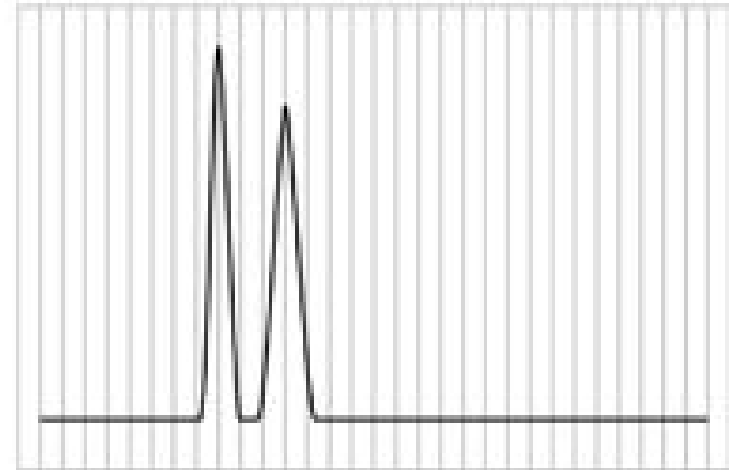
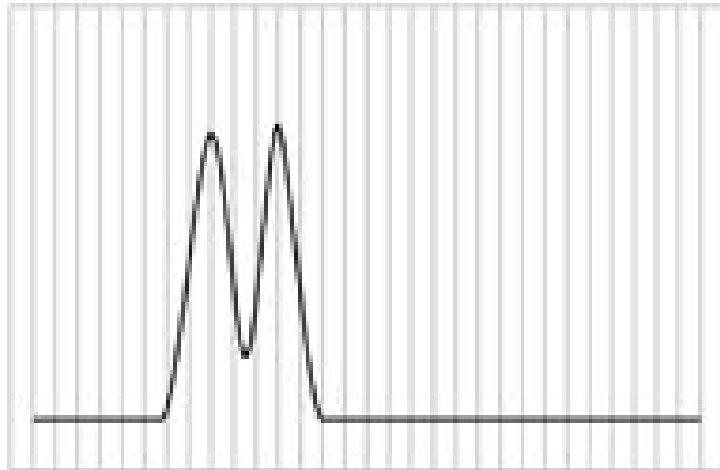
80/20

Διαχωρισμός Μείγματος με HPLC

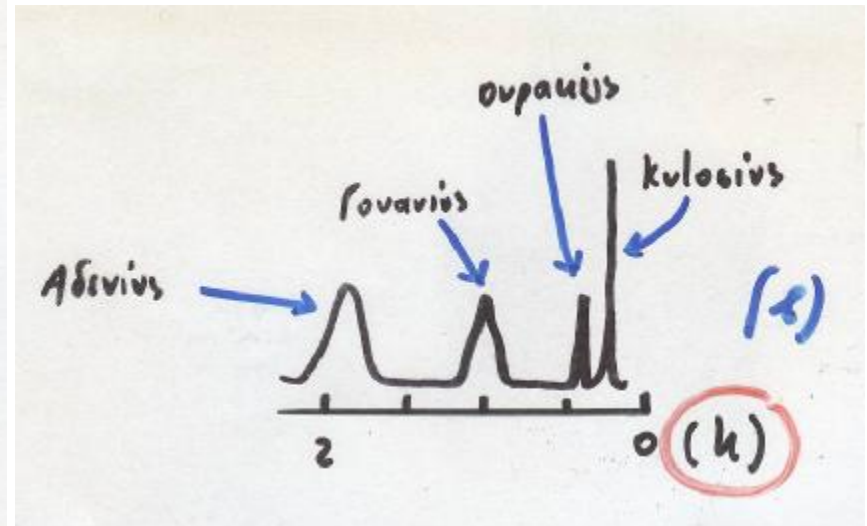
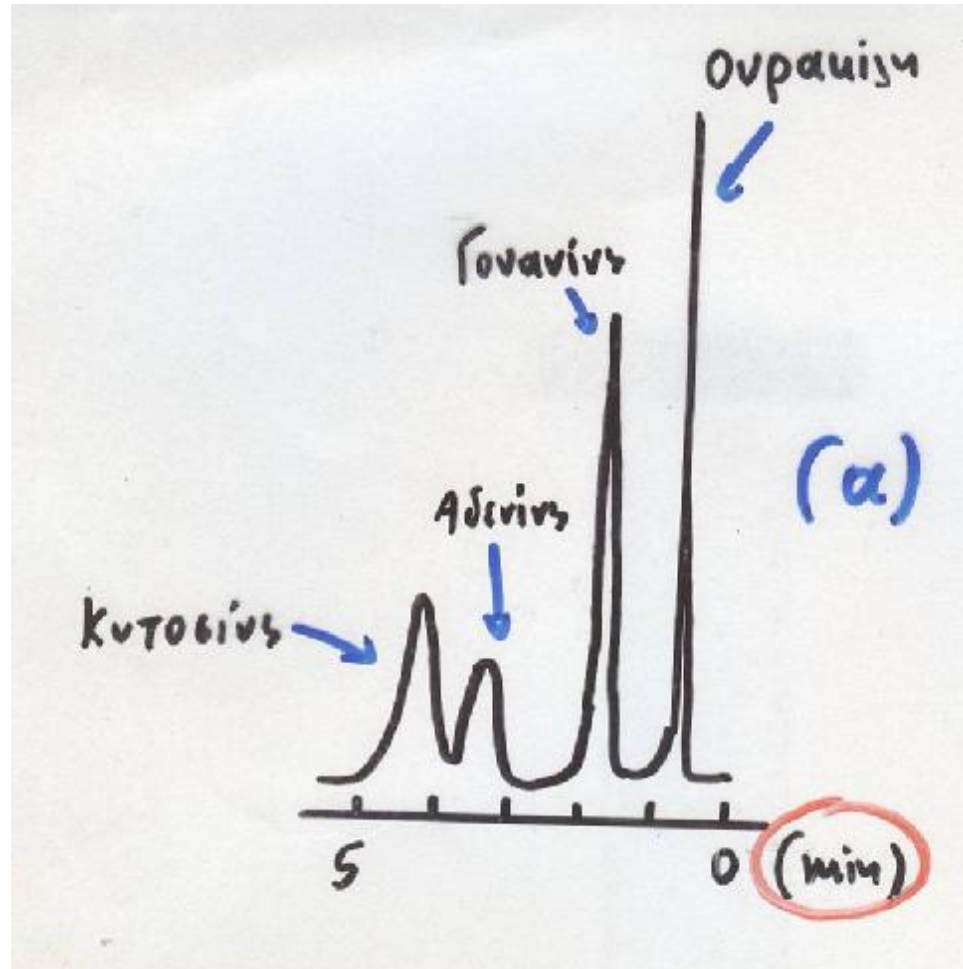
Με στήλη με σωματίδια διοξειδίου πυριτίου
διαμέτρου: (α): 10 μm και (β): 5 μm



Επίδραση διαμέτρου σωματιδίων πληρωτικού υλικού στη διαχωριστική ικανότητα στήλης



Διαχωρισμός Νουκλεϊκών Οξέων
(α) Με HPLC κατιοανταλλαγής
(β) Με Κλασική χρωματογραφία ιονταλλαγής



Τύποι χρωματογραφίας HPLC



Τύποι ενώσεων	Τύπος	Στατική Φάση	Κινητή Φάση
Ουδέτερες Ασθενή Οξέα Ασθενείς Βάσεις	Αντίστροφης Φάσης	C18, C8, C4 Κυανο-, άμινο-	Νερό / Οργανικοί Τροποποιητές
Ιοντικές, Βάσεις, Οξέα	Ζεύγους Ιόντων	C-18, C-8	Νερό / Οργανικά αντιδραστήρια ζεύγους ιόντων
Ενώσεις αδιάλυτες στο νερό	Κανονικής Φάσης	Σίλικα, Άμινο- Κύανο-, Διόλο-	Οργανικοί διαλύτες
Ιοντικές, Ανόργανα ιόντα	Ιονταλλαγής	Ανιο- ή Κατιο- Ανταλλακτική Ρητίνη	Υδατικές / Ρυθμιστικά Αντισταθμιστικά ιόντα
Ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους Πολυμερή	Αποκλεισμού Μεγέθους	Πολυστυρένιο Πυριτία	Διήθηση πηκτής: υδατικές Διαπερατότητας πηκτής: οργανικές