

# Κεφ. 20Γ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ

# Ανιχνευτές (1)

- Κρίσιμο στοιχείο του συστήματος HPLC
  - Κάνει ορατό το διαχωρισμό που γίνεται στη στήλη
  - Επιτρέπει την αξιοποίηση του διαχωρισμού στην ανάλυση
- Χαρακτηριστικά ιδανικού ανιχνευτή
  1. Αποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μείγματος (γενικός ανιχνευτής) ή να έχει γνωστή εκλεκτικότητα αποκρίσεως (ειδικός ανιχνευτής)

# Ανιχνευτές (2)

- Χαρακτηριστικά ιδανικού ανιχνευτή
  2. Επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης (ng-μg)
  3. Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση
  4. Παρέχει γραμμική απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων των διαχωριζόμενων συστατικών (χρήση στην ποσοτική ανάλυση)
  5. Να μην επηρεάζεται από μεταβολές θερμοκρασίας και ταχύτητας ροής κινητής φάσης
  6. Έχει αμελητέο νεκρό όγκο, δεν συμμετέχει στη διεύρυνση ζώνης συστατικών και της κορυφής του

# Ανιχνευτές (3)

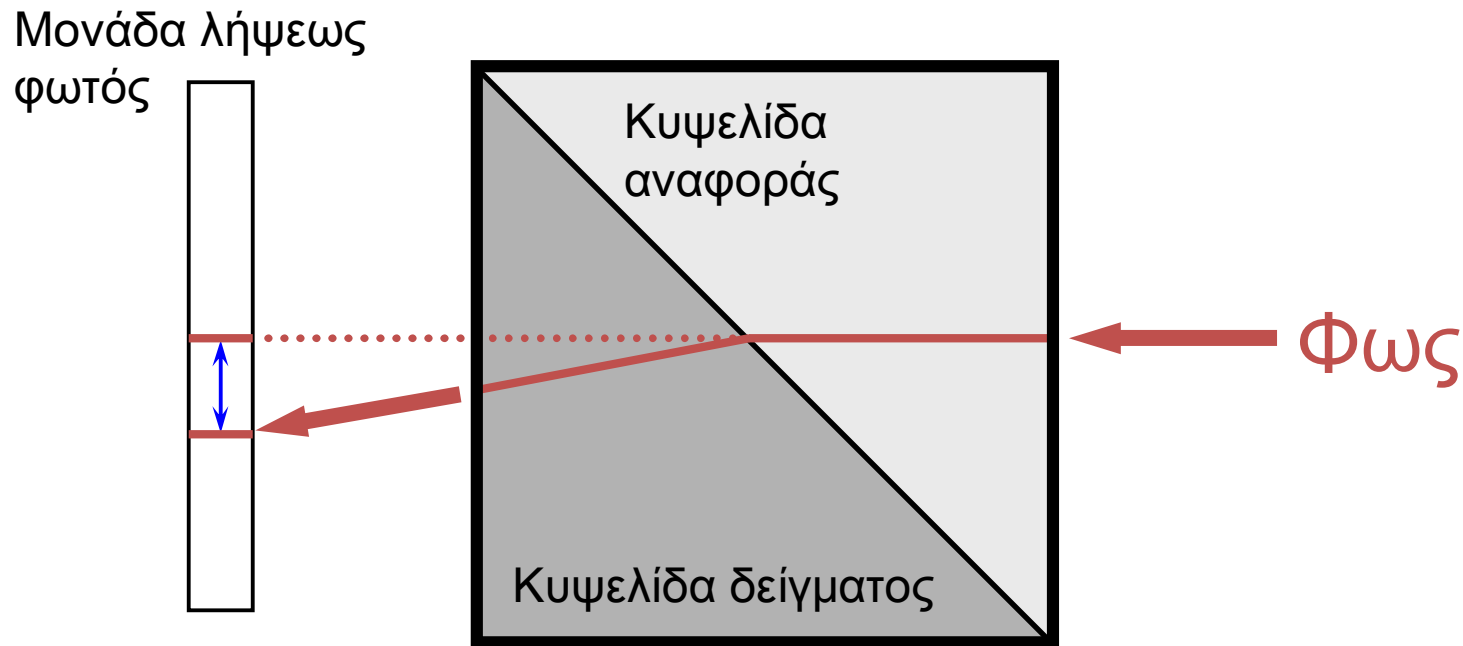
## Κυριότεροι Ανιχνευτές HPLC

1. Διαφορετικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης
2. Ανιχνευτής υπεριώδους – ορατού
3. Ανιχνευτές φθορισμού
4. Ανιχνευτής υπερύθρου
5. Ηλεκτροχημικός (αμπερομετρικός ανιχνευτής)
6. Φασματοόμετρο μαζών
7. Εξατμιστικός ανιχνευτής σκέδασης ακτινοβολίας

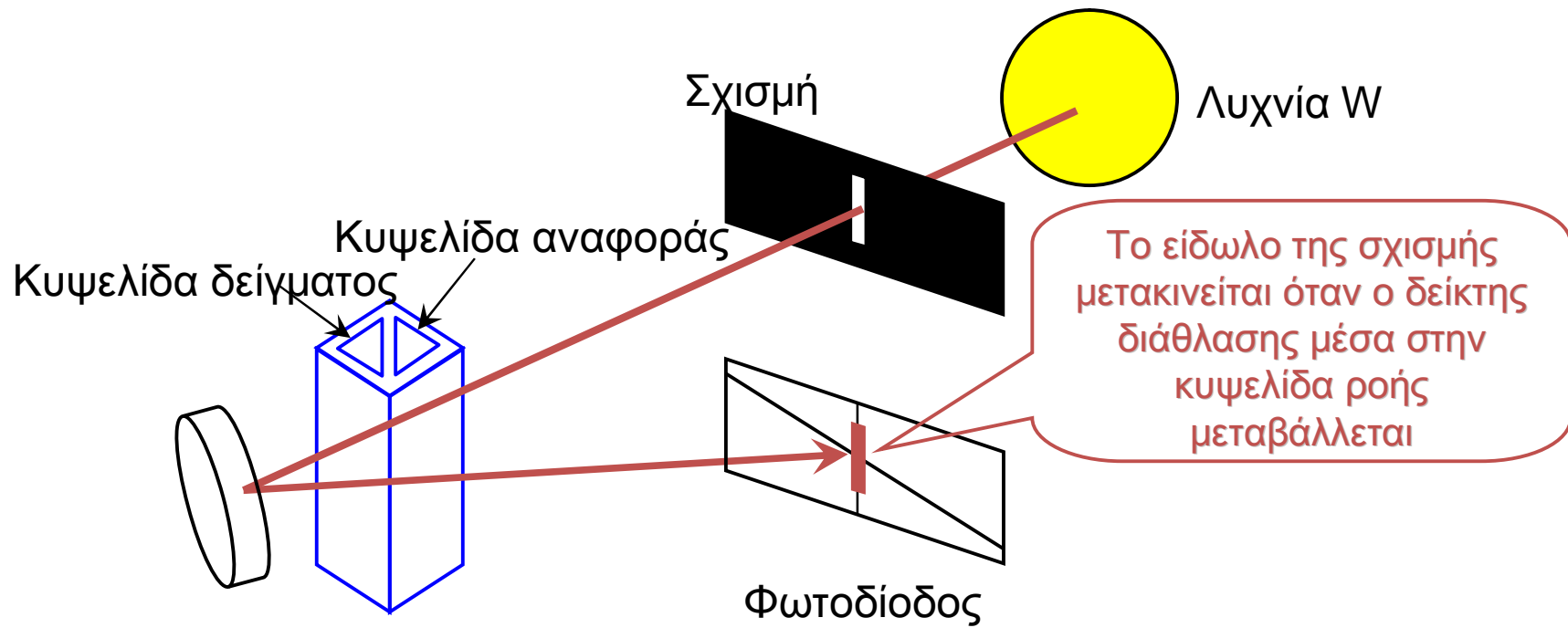
# Διαφορικός Ανιχνευτής Δείκτη Διάθλασης

- Μετρά διαφορές δείκτη διάθλασης μεταξύ κινητής φάσης και διαχωριζόμενων συστατικών
- Σημαντικό πλεονέκτημα: αποκρίνεται σε όλες σχεδόν τις ουσίες (γενικός ανιχνευτής)
- Μειονεκτήματα:
  - Σχετικά μικρή ευαισθησία (κατάλληλος για περιοχή 1-10  $\mu\text{g/mL}$ )
  - Αδυναμία χρήσεως σε βαθμιδωτή έκλυση (χρησιμοποιείται μόνο στην ισοκρατική έκλυση γιατί στη βαθμιδωτή αλλάζει ο δείκτης διάθλασης κινητής φάσης)
  - Ευαισθησία σε μεταβολές θερμοκρασίας

# Διαφορικός Ανιχνευτής Δείκτη Διάθλασης (τύπου εκτροπής)



# Οπτικό Σύστημα Ανιχνευτή Δείκτη Διάθλασης (τύπου εκτροπής)



# Ανιχνευτής UV-Vis (1)

- Φασματοφωτόμετρο με μικροκυψελίδα ροής στο τέλος της στήλης
- Υγρό εκλούσεως διαβιβάζεται μέσα από μικροκυψελίδα ροής 5-10  $\mu\text{L}$
- Τύποι ανιχνευτή UV-Vis:
  1. Σταθερού μήκους κύματος
    - απλό φωτόμετρο φίλτρου, μετρά απορρόφηση σε σταθερό μήκος κύματος της ακτινοβολίας UV συνήθως στα 254 nm (γραμμή εκπομπής λυχνίας Hg)



# Ανιχνευτής UV-Vis (2)

- Τύποι ανιχνευτή UV-Vis:
  2. Πολλαπλών σταθερών μηκών κύματος
    - Με βοήθεια φίλτρων δυνατότητα επιλογής περισσότερων μηκών κύματος UV-Vis
  3. Μεταβαλλόμενου μήκους κύματος
    - Πλήρες φασματοφωτόμετρο με μονοχρωμάτορα για την επιλογή οποιουδήποτε μήκους κύματος στο UV-Vis
  4. Σειράς φωτοδιόδων (Photo-Diode-Array, PDA)
    - Δυνατότητα λήψεως φάσματος απορρόφησης κάθε εξερχόμενου συστατικού
    - Δυνατότητα προσδιορισμού καθαρότητας κορυφής (peak purity)

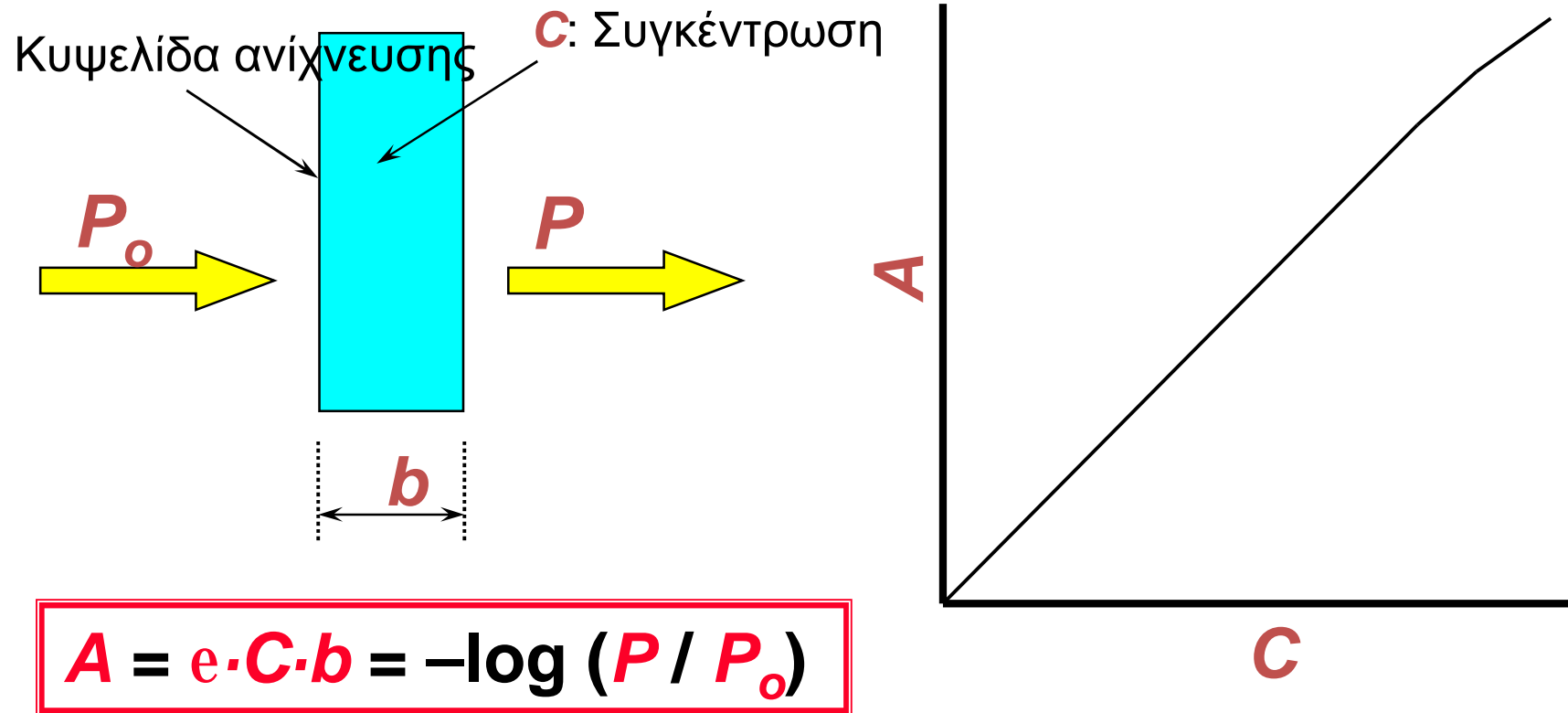
# Ανιχνευτής UV-Vis (3)

- Ευαισθησία ανιχνευτή UV-Vis εξαρτάται από μοριακή απορροφητικότητα συστατικών
- Συνήθως χρησιμοποιείται στην περιοχή 0,01  $\mu\text{g/mL}$
- Αδιάφορος σε μεταβολές θερμοκρασίας
- Σχετικά φθηνός (οι πρώτοι δύο τύποι)
- Μπορεί να εφαρμοσθεί και στη βαθμιδωτή έκλυση

# Ανιχνευτής UV-Vis (4)

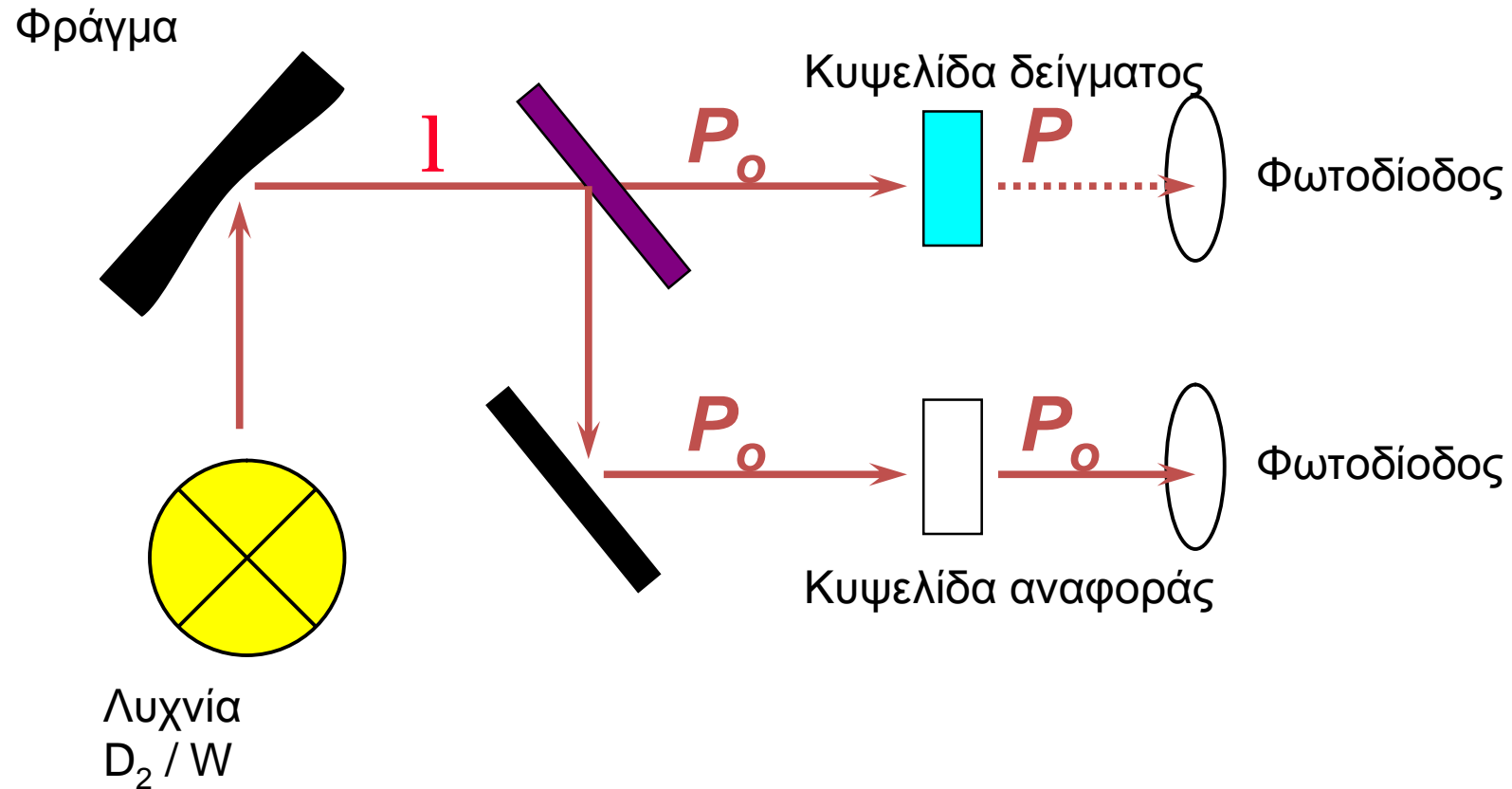
- Αποκρίνεται σε μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων (περισσότερο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής, στο 80% των αναλύσεων HPLC)
- Με ανιχνευτή PDA, λαμβάνεται το φάσμα κάθε εκλούμενου συστατικού
- Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με διαλύτες κινητής φάσης που απορροφούν ισχυρά στο UV
- Δεν μπορούν να χρησιμοποιηθεί σε διαχωρισμούς συστατικών που δεν απορροφούν στο UV, εκτός και εάν σχηματισθούν παράγωγα

# Ανιχνευτής Απορρόφησης UV-VIS

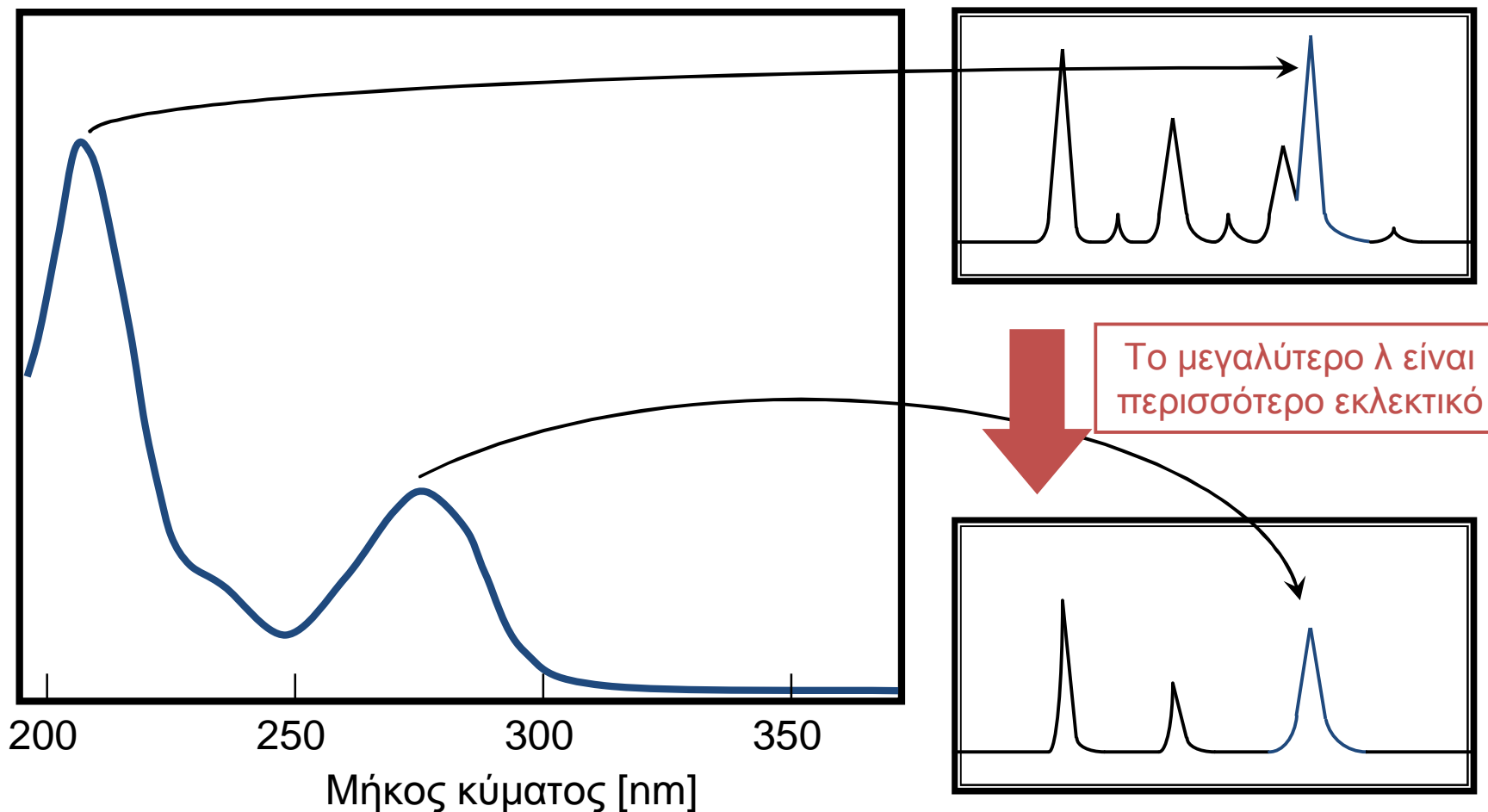


( $A$ : Απορρόφηση,  $\epsilon$ : συντελεστής απορρόφησης)

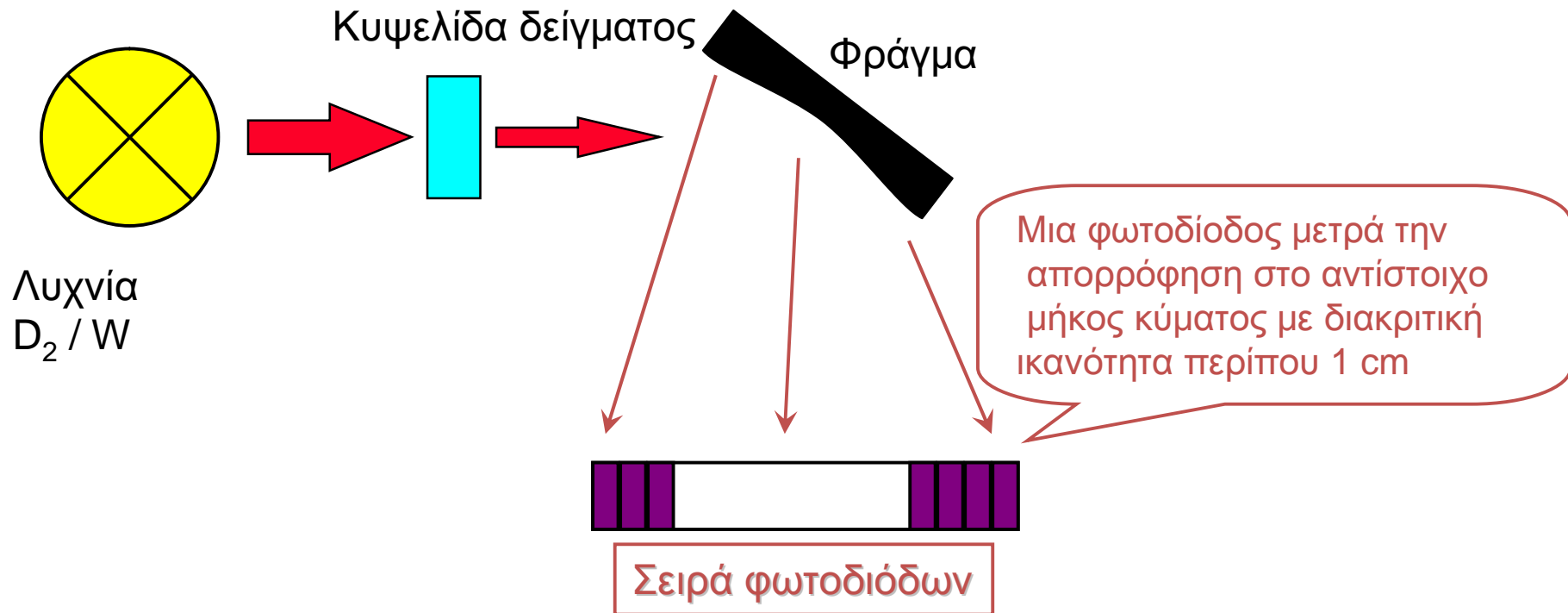
# Οπτικό Σύστημα Ανιχνευτή Απορρόφησης UV-VIS



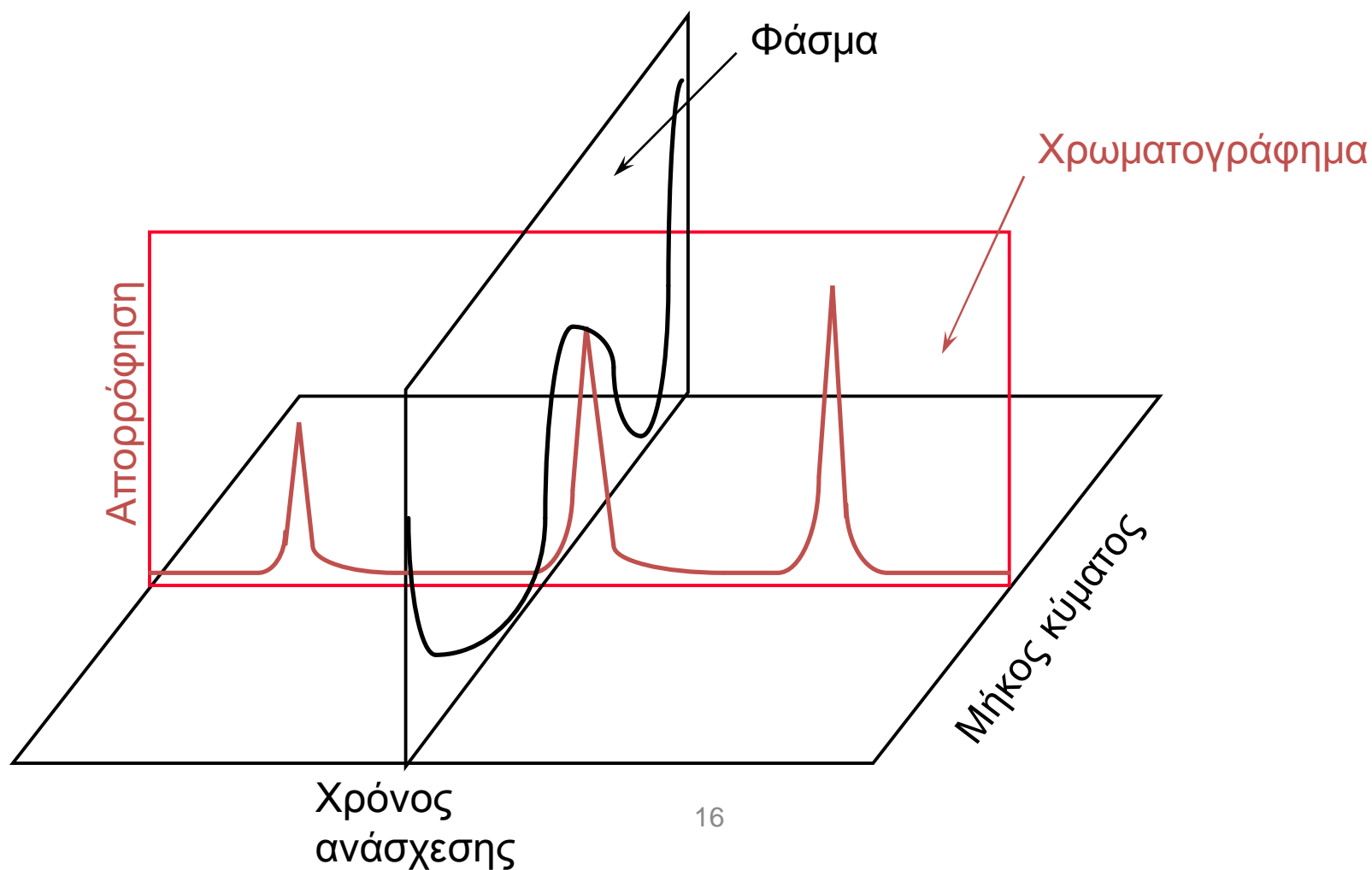
# Φάσμα και επιλογή μήκους κύματος ανίχνευσης



# Οπτικό Σύστημα Ανιχνευτή Σειράς Φωτοδιόδων (PDA)



# Δεδομένα από Ανιχνευτή Σειράς Φωτοδιόδων

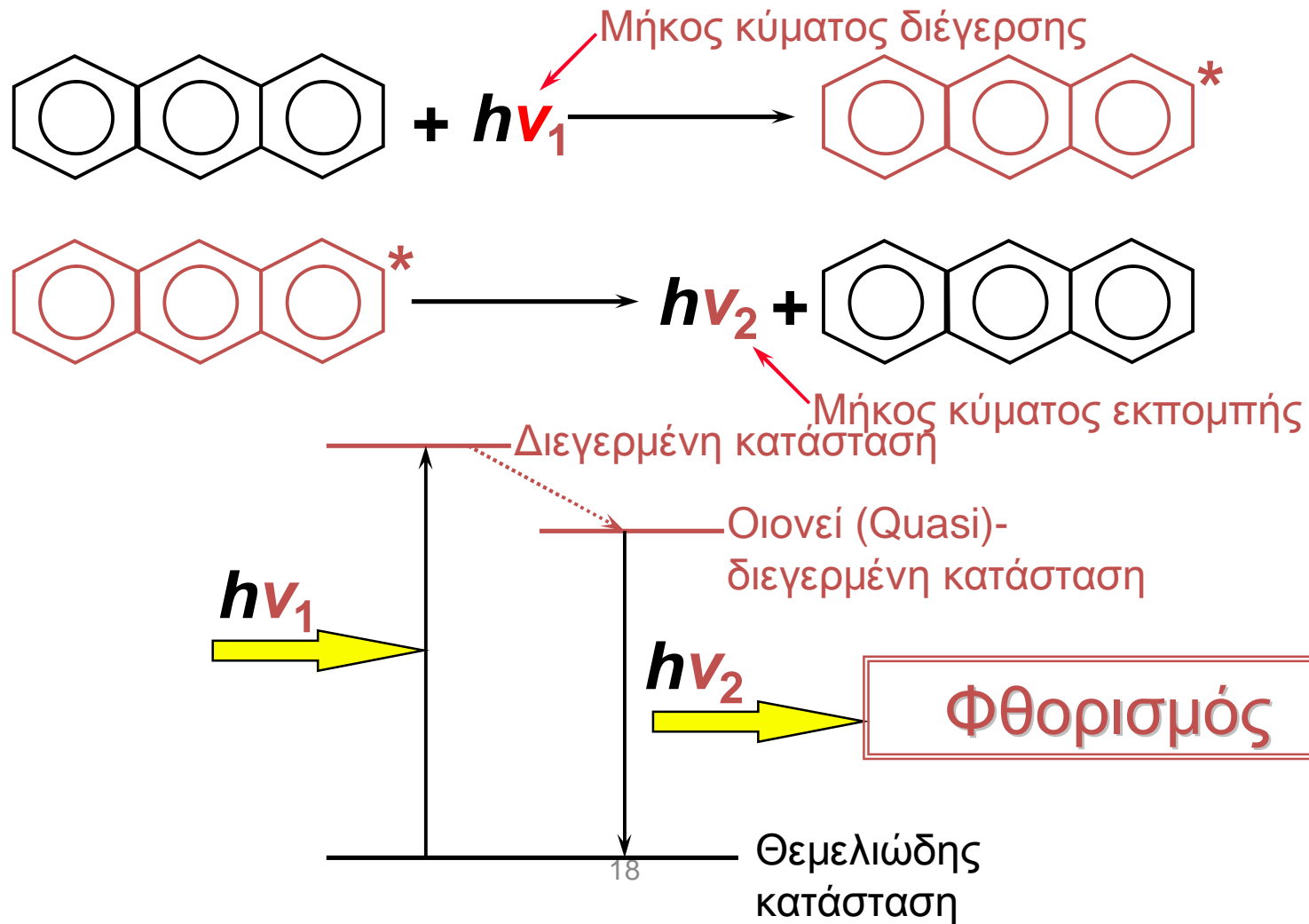




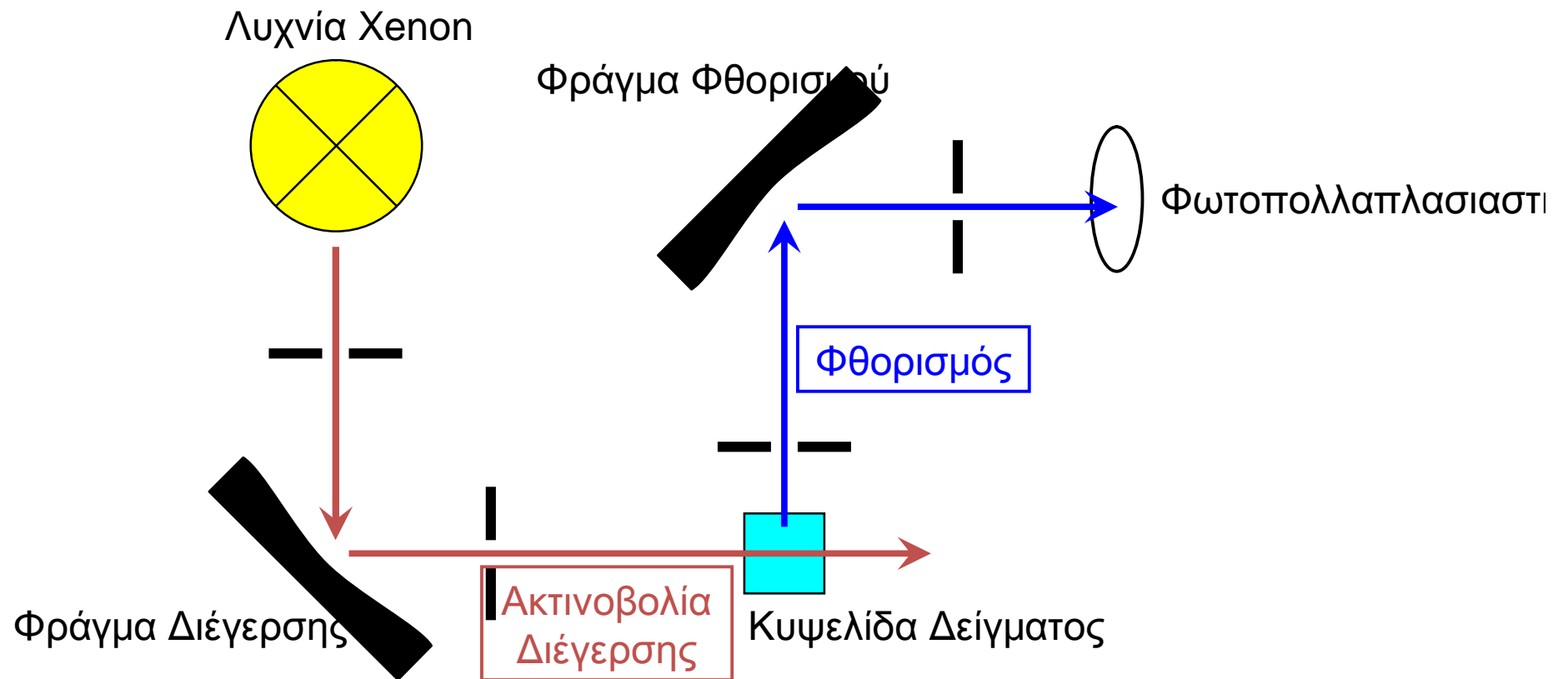
# Ανιχνευτές Φθορισμού

- Χρησιμοποιούνται μόνο για φθορίζουσες ουσίες (ειδικός ανιχνευτής)
- Ευαισθησία πολύ μεγαλύτερη από ανιχνευτή UV-Vis

# Ανιχνευτής Φθορισμού

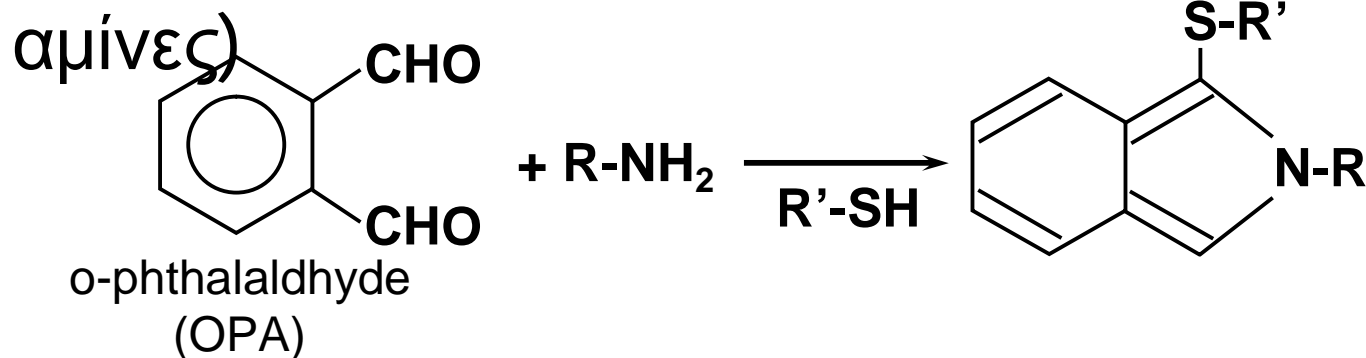


# Οπτικό Σύστημα Ανιχνευτή Φθορισμού

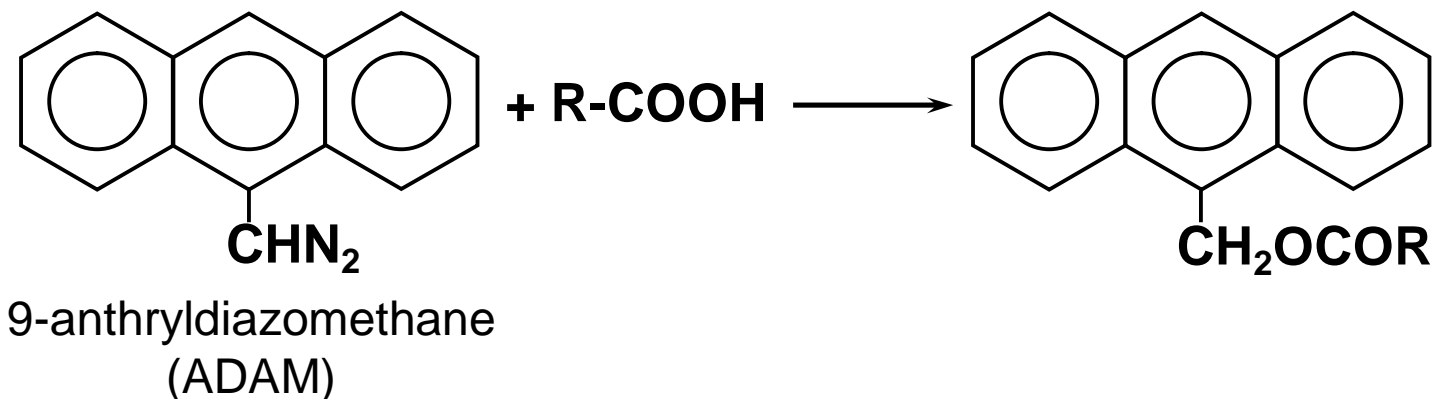


# Αντιδραστήρια Παραγωγοποίησης Φθορισμού

- Αντιδραστήριο OPA (Αντιδρά με πρωτοταγείς



- ! Αντιδραστήριο ADAM (Αντιδρά με λιπαρά οξέα)



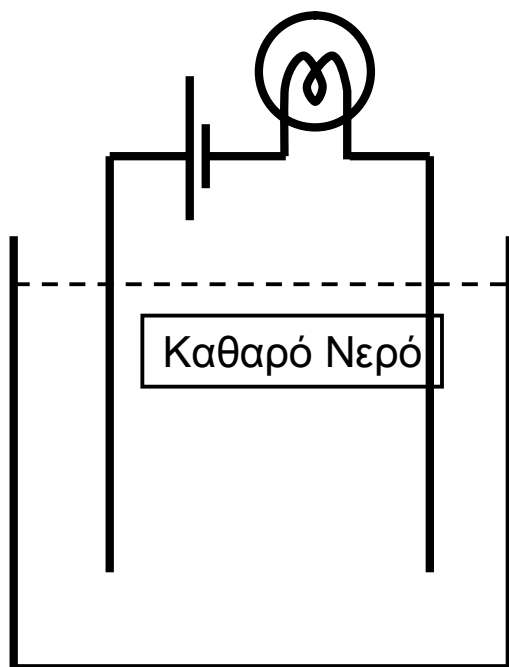
# Ανιχνευτής Υπερύθρου (IR)

- Δεν είναι ευαίσθητος
- Έχει μικρή εκλεκτικότητα, οι διαλύτες κινητής φάσης απορροφούν στο IR
- Με επιλογή κατάλληλης συχνότητας, χαρακτηριστικής μιας ομάδας, η εκλεκτικότητα αυξάνεται σημαντικά

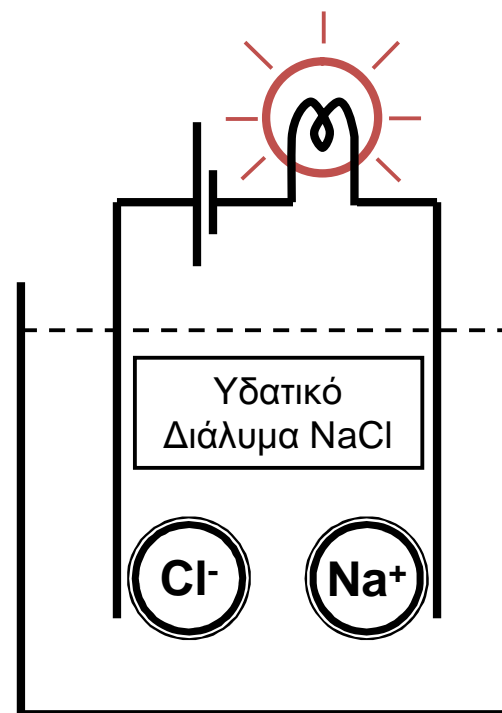
# Ηλεκτροχημικός (αμπερομετρικός) ανιχνευτής

- Παρακολουθείται η ένταση ρεύματος (i) μικρού ηλεκτρολυτικού στοιχείου ροής, διαφόρων μορφών, με εφαρμογή επιλεγόμενου σταθερού δυναμικού (E)
- Χρησιμοποιείται σε διαχωρισμούς ηλεκτρενεργών ουσιών (ικανών να αναχθούν ή οξειδωθούν) στο ηλεκτρόδιο εργασίας, στην επιλεγόμενη τιμή δυναμικού
- Εξαιρετική ευαισθησία
- Εφαρμογή σε ενώσεις βιοχημικού και φαρμακολογικού ενδιαφέροντος
  - Π.χ. ιχνοποσότητες κατεχολαμινών στον εγκέφαλο

# Ανιχνευτής Ηλεκτρικής Αγωγιμότητας

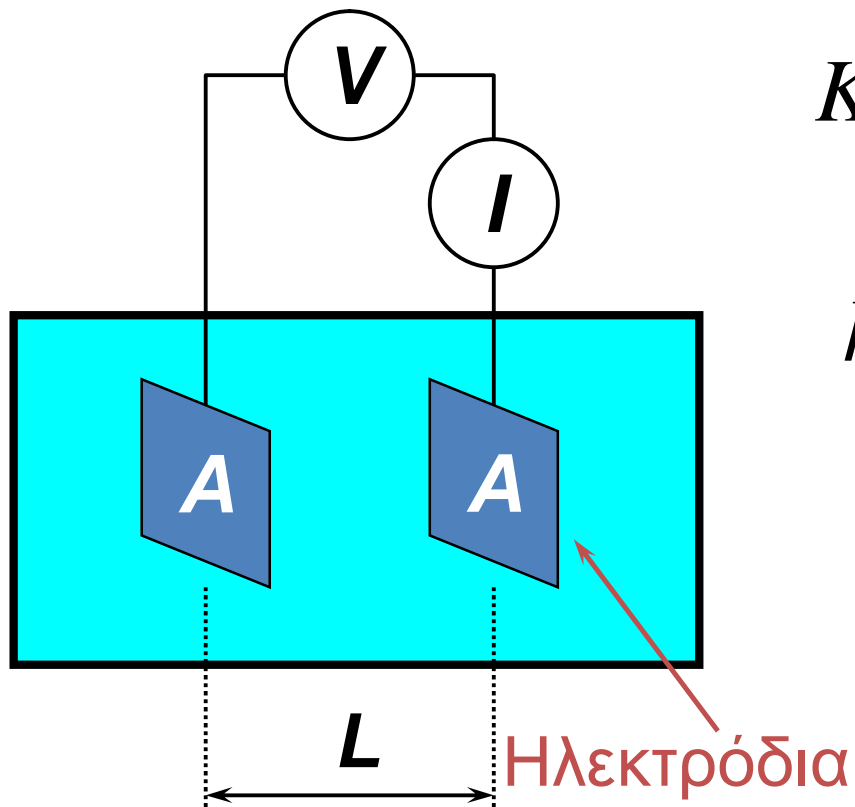


Ο λαμπτήρας δεν ανάβει



Ο λαμπτήρας ανάβει εάν υπάρχουν ιόντα

# Αρχή Ανιχνευτή Ηλεκτρικής Αγωγιμότητας



$$K = \frac{I}{E} = \frac{A}{L} \cdot k$$

$$k = \frac{L}{A} \cdot K$$

$K$ : Ηλεκτρική αγωγιμότητα [S]

$I$ : Ηλεκτρικό ρεύμα [A]

$E$ : Δυναμικό [V]

$A$ : Εμβαδόν επιφάνειας ηλεκτροδίου [ $\text{cm}^2$ ]

$L$ : Απόσταση μεταξύ ηλεκτροδίων [cm]

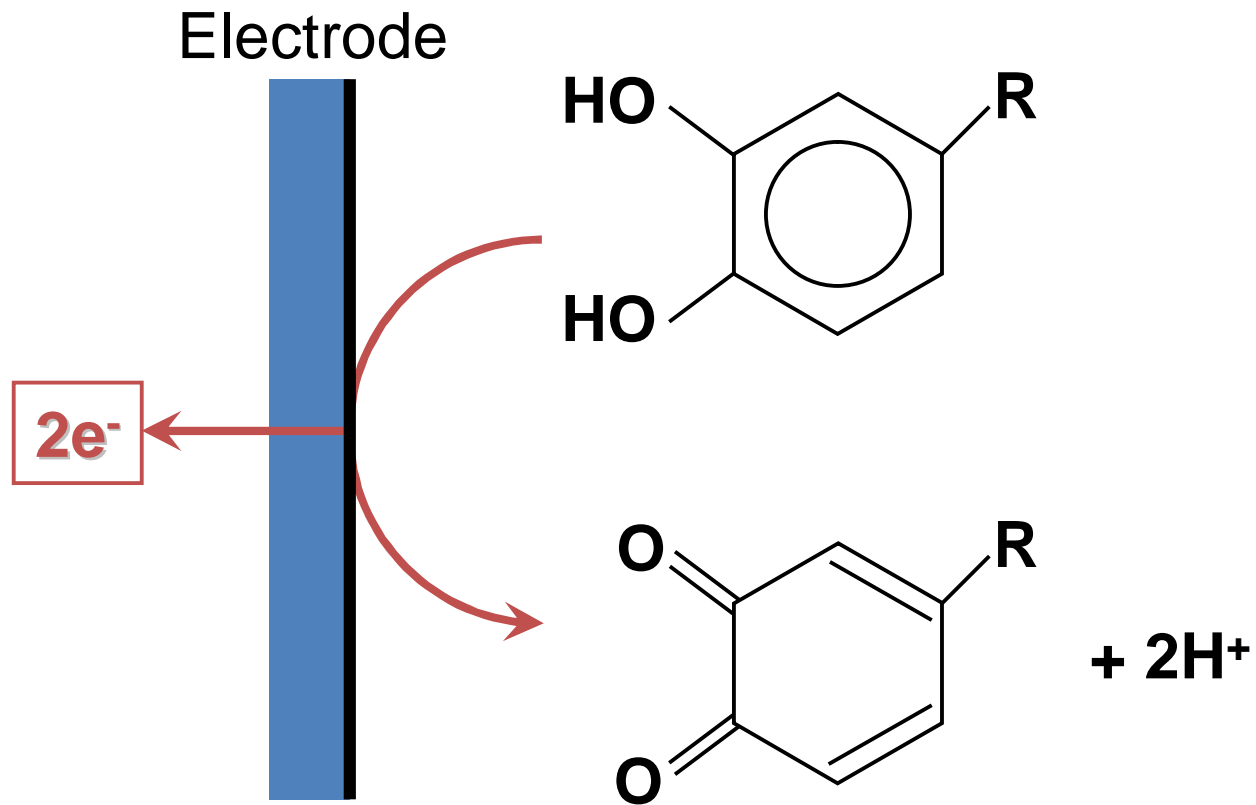
$k$ : Ειδική ηλεκτρική αγωγιμότητα [ $\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]



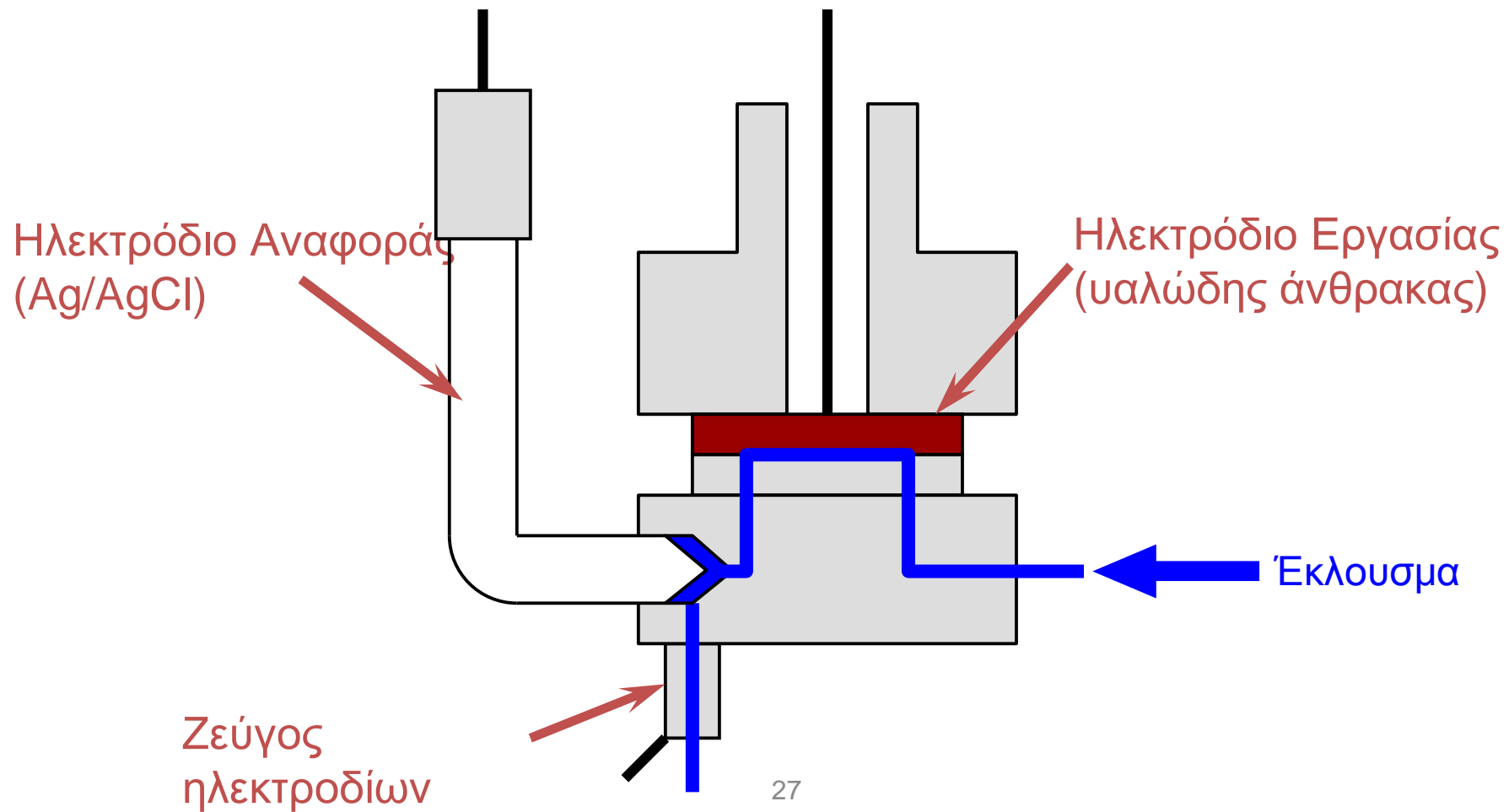
Περιοριστική Ισοδύναμη Ιοντική  
Αγωγιμότητα,  $I$  [ $S \cdot \text{cm}^2/\text{mol}$ ], σε υδατικό  
διάλυμα ( $25^\circ\text{C}$ )

Cation	$I$	Anion	$I$
$\text{H}^+$	349.8	$\text{OH}^-$	198.3
$\text{Li}^+$	38.6	$\text{F}^-$	55.4
$\text{Na}^+$	50.1	$\text{Cl}^-$	76.3
$\text{K}^+$	73.5	$\text{Br}^-$	78.1
$\text{NH}_4^+$	73.5	$\text{NO}_3^-$	71.4
$(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+$	47.2	$\text{CH}_3\text{COO}^-$	40.9
$\text{Mg}^{2+}$	53.0	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-$	32.3
$\text{Ca}^{2+}$	59.5	$\text{SO}_4^{2-}$	80.0

# Ηλεκτροχημικός Ανιχνευτής



# Δομή Κυψελίδας Ηλεκτροχημικού Ανιχνευτή (Αμπερομετρικού Τύπου)



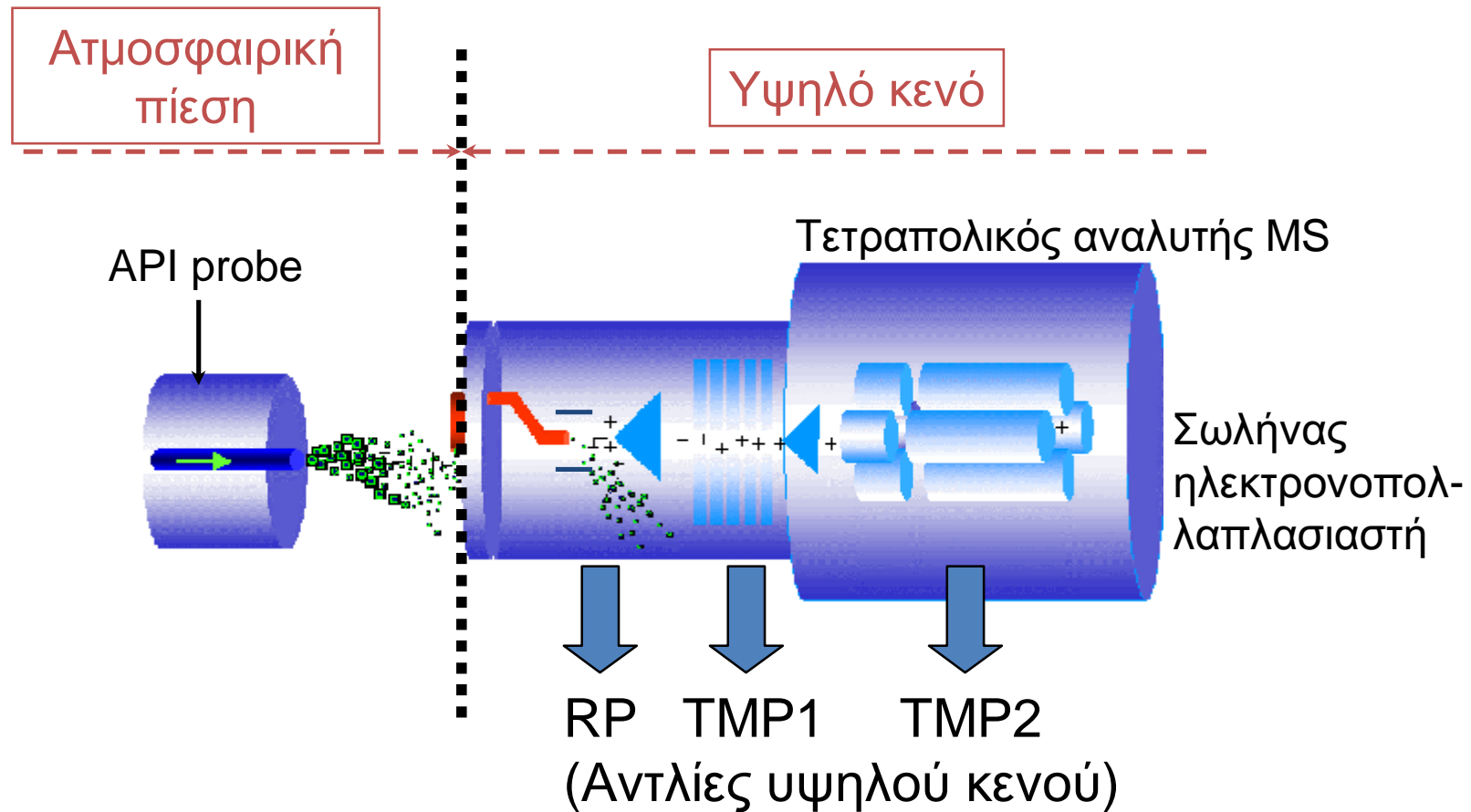
# Φασματοόμετρο Μαζών (MS) (1)

- Συνδυασμένη τεχνική υγροχρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών
  - LC-MS: χρήση απλού τετραπόλου
  - LC-MS/MS: χρήση τριπλού τετραπόλου
  - LC-Ion-Trap/MS: χρήση φασματομέτρου παγίδας ιόντων
  - LC-TOF/MS: χρήση φασματομέτρου χρόνου πτήσεως

# Φασματοόμετρο Μαζών (MS) (2)

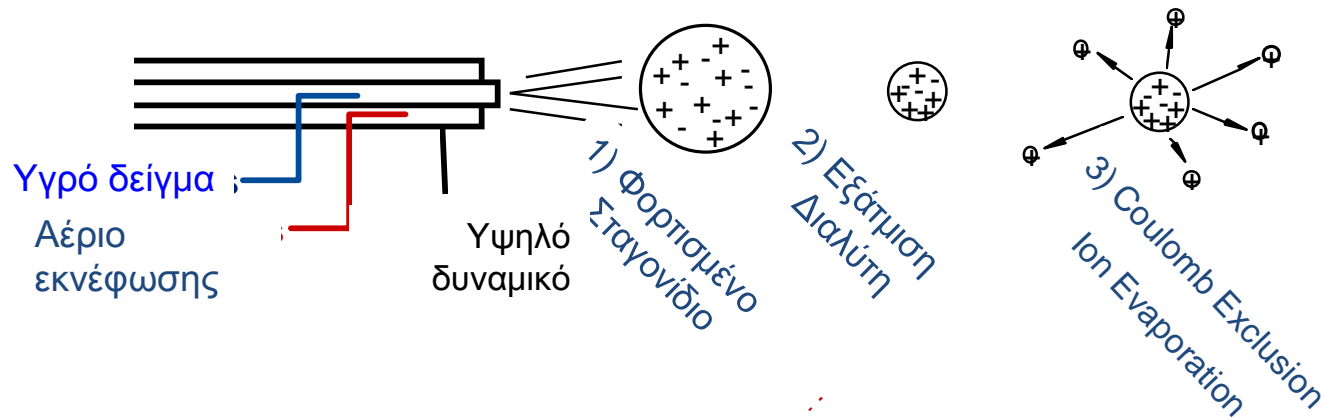
- Χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία, εκλεκτικότητα και αξιοπιστία
- Κατά την ανάπτυξη της αντιμετωπίσθηκε το σοβαρό πρόβλημα εκδίωξης της μεγάλης περίσσειας κινητής φάσης πριν την είσοδο στη μονάδα MS
- Αποτελεί σήμερα την πλέον αξιόπιστη τεχνική ταυτοποίησης ουσιών (ναρκωτικών, φαρμάκων, ουσιών doping) στα πολύπλοκα βιολογικά δείγματα
- Υψηλό κόστος ανέφικτη αγορά από εργαστήρια ρουτίνας

# Φασματοόμετρο Μαζών (LC/MS)

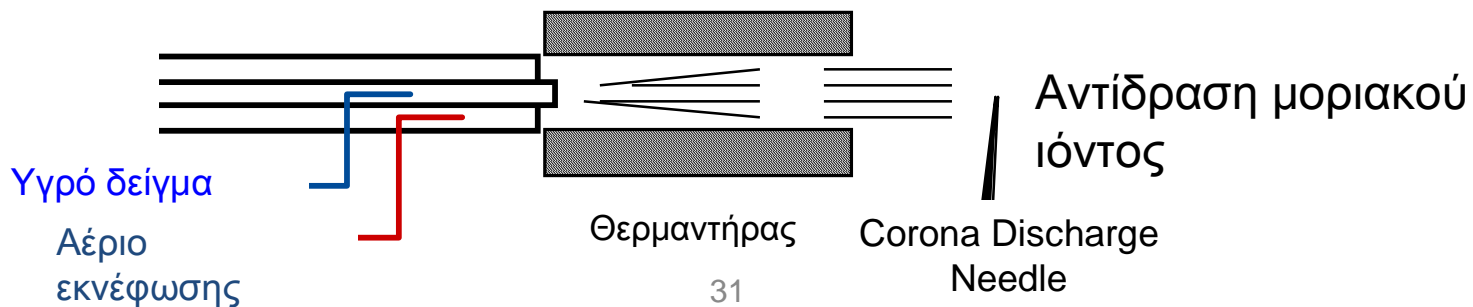


# Ιονισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (API)

## Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού (ESI)

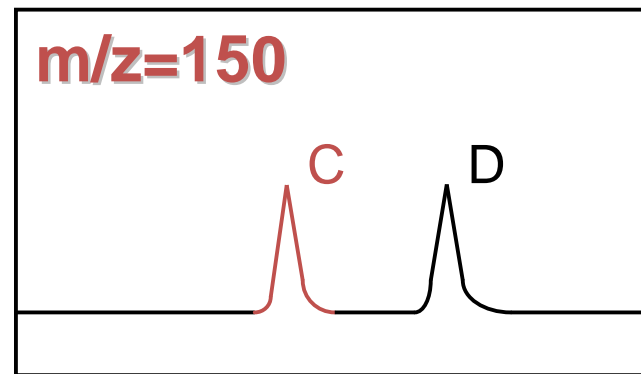
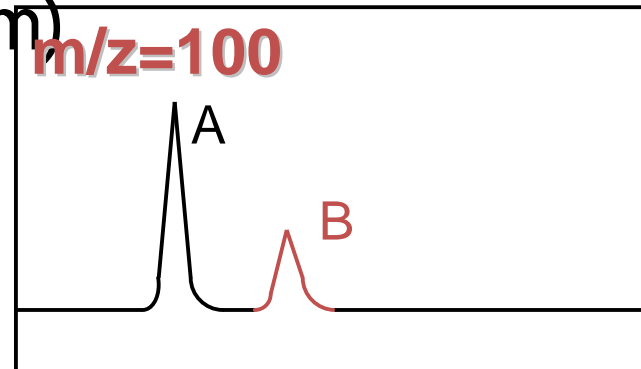
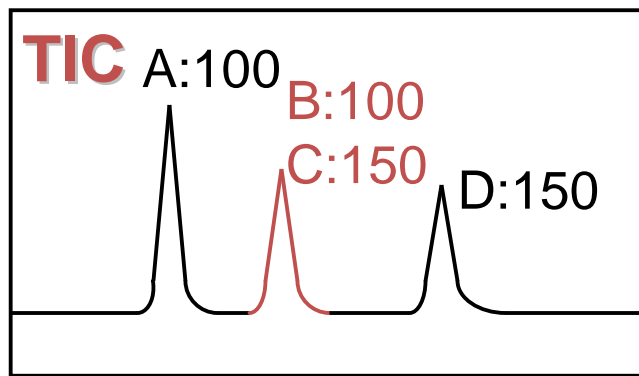


## Χημικός Ιονισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (APCI)



# Πλεονεκτήματα LC/MS (1)

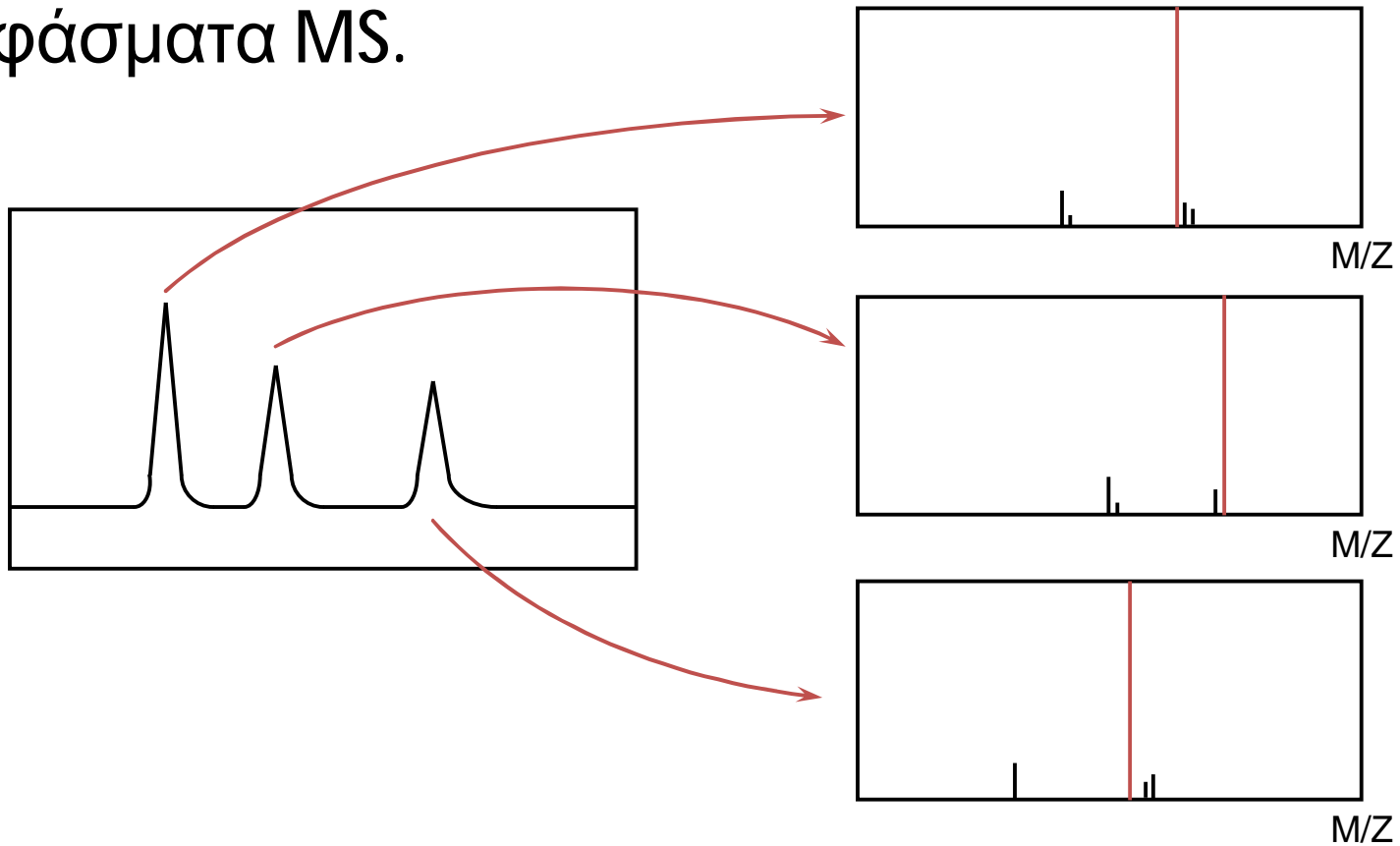
- Ποσοτική ανάλυση με εξαιρετική εκλεκτικότητα (TIC: total ion chromatogram)





# Πλεονεκτήματα LC/MS (2)

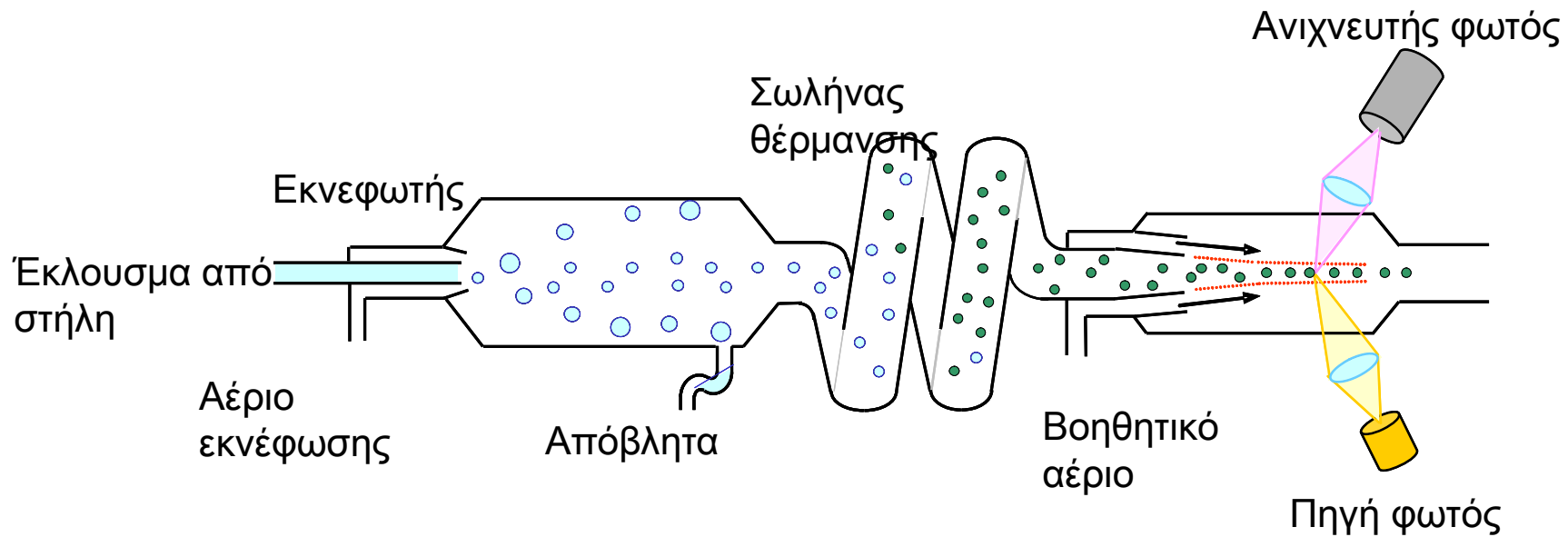
- Οι κορυφές μπορούν να ταυτοποιηθούν με τα φάσματα MS.



## Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Ακτινοβολίας (Evaporative Light Scattering Detector)

- Το έκλουσμα μετά την έξοδο από τη στήλη εξατμίζεται με τη βοήθεια ρεύματος αζώτου και θέρμανσης
- Τα παραμένοντα σωματίδια των εξερχόμενων συστατικών προκαλούν σκέδαση ακτινοβολίας πηγής ορατού και παρέχουν κορυφή σήματος
- Είναι γενικός ανιχνευτής και αξιοποιείται συνήθως για διαχωρισμό / ανάλυση ουσιών που δεν απορροφούν στο UV (σάκχαρα, λιπίδια, διάφορα μεγαλομοριακά έκδοχα, κλπ)
- Χαρακτηρίζεται από σχετικά μικρή ευαισθησία

# Εξατμιστικός Ανιχνευτής Σκέδασης Φωτός Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)



Το έκλουσμα από τη στήλη εξατμίζεται και το σκεδαζόμενο φως από τα σωματίδια μη πτητικών ουσιών ανιχνεύεται

# Σύγκριση Ανιχνευτών HPLC

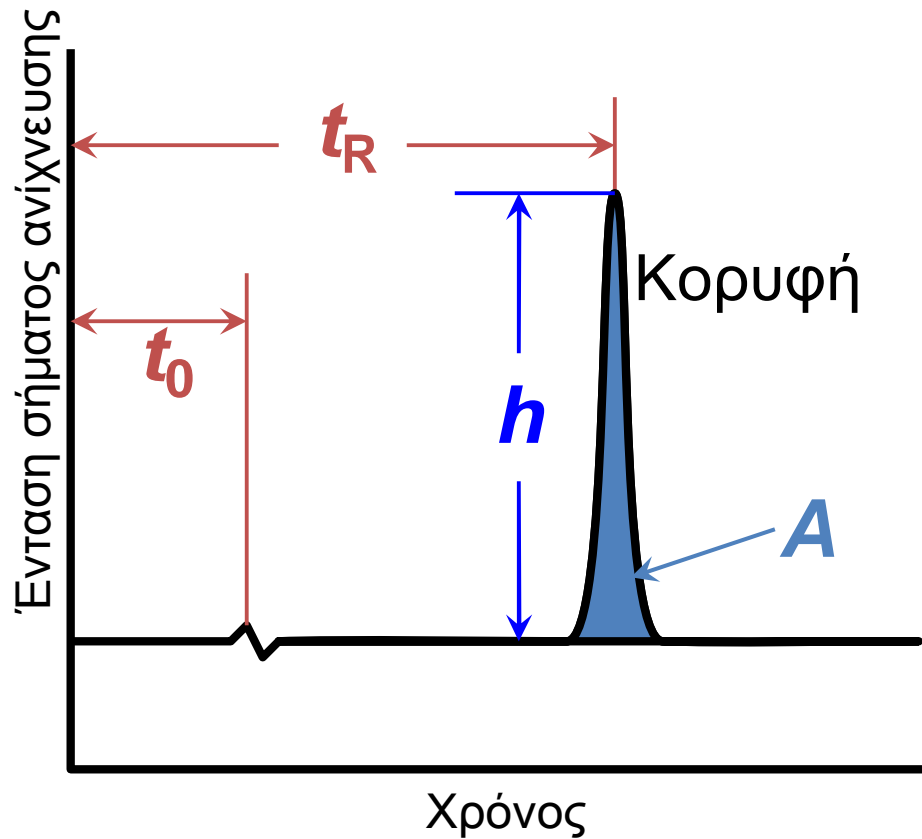
	Εκλεκτικότητα	Ευαισθησία	Δυνατότητα Βαθμιδωτής Έκλουσης
Απορρόφησης	Ουσίες που απρροφούν ακτινοβολία	ng	Δυνατή
Φθορισμού	Φθορίζουσες ουσίες	pg	Δυνατή
Διαφορικός δείκτη διάθλασης	Καμμία	μg	Αδύνατη
Εξατμιστικός σκέδασης φωτός	Μη πτητικές ουσίες	μg	Δυνατή
Ηλεκτρικής αγωγιμότητας	Ιοντικές ουσίες	ng	Μερικώς δυνατή
Ηλεκτροχημικός	Οξειδοαναγωγικές ουσίες	pg	Μερικώς δυνατή

Σημείωση: Γενικά χαρακτηριστικά. Υπάρχουν εξαιρέσεις.

# Σύστημα Επεξεργασίας – Παρουσίασης Αποτελεσμάτων

- Απλούστερος και φθηνότερος τρόπος παρουσίασης χρωματογραφήματος είναι ο καταγραφέας
  - Πρέπει να χαρακτηρίζεται από ταχεία απόκριση
  - Να έχει δυνατότητα ενίσχυσης σήματος
- Ολοκληρωτής – καταγραφέας:
  - Έχει δυνατότητα ολοκλήρωσης του εμβαδού των κορυφών του χρωματογραφήματος
- Σύγχρονα συστήματα HPLC διαθέτουν μικροϋπολογιστές για:
  - Έλεγχο λειτουργίας όλων των μονάδων HPLC
  - Συλλογή, αποθήκευση, επεξεργασία των σημάτων των ανιχνευτών
  - Παρουσίαση αποτελεσμάτων

# Χρωματογράφημα



$t_R$  : Χρόνος ανάσχεσης

$t_0$  : Νεκρός χρόνος

$A$  : Εμβαδόν κορυφής

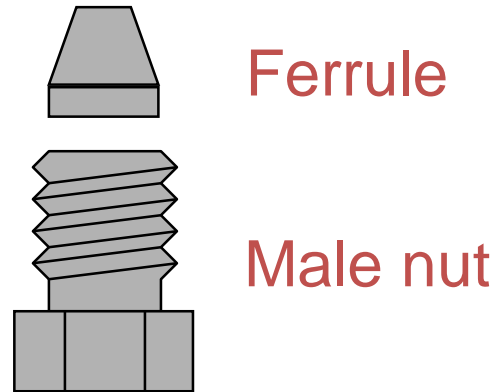
$h$  : Ύψος κορυφής

# Διασύνδεση Μονάδων HPLC

- Λαμβάνεται φροντίδα για την ελαχιστοποίηση των «νεκρών όγκων» μεταξύ:
  - βαλβίδας εισαγωγής δείγματος και εισόδου στήλης
  - εξόδου στήλης και ανιχνευτή
- Μείωση διεύρυνσης ζωνών συστατικών
- Αύξηση διαχωριστικότητας

# Συνδετήρες

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



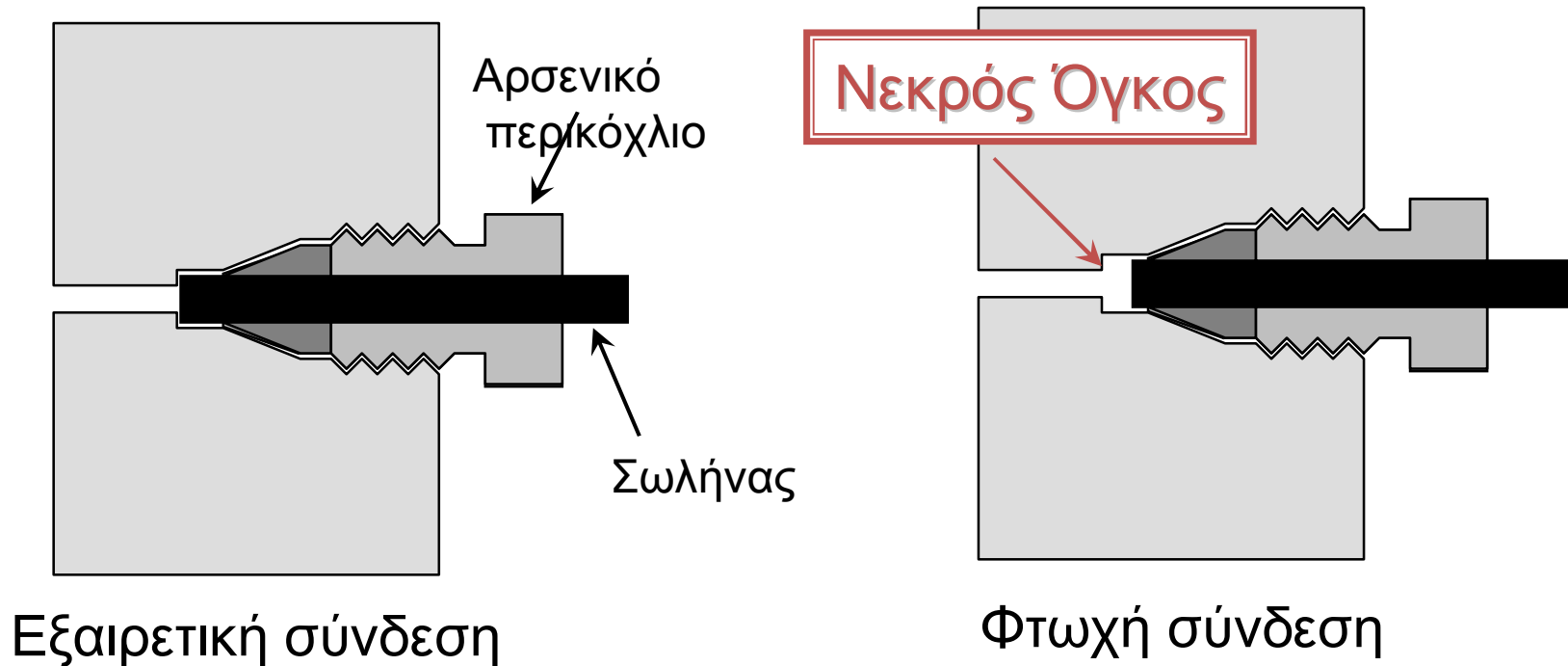
- Αρσενικό περικόχλιο (PEEK)
  - Συνδέεται χωρίς εργαλεία
  - Ανθεκτικό σε πίεση μέχρι 25 MPa





# Νεκρός Όγκος (Επιπλέον Όγκος Στήλης)

- Νεκρός όγκος μπορεί να προκαλέσει διεύρυνση κορυφών

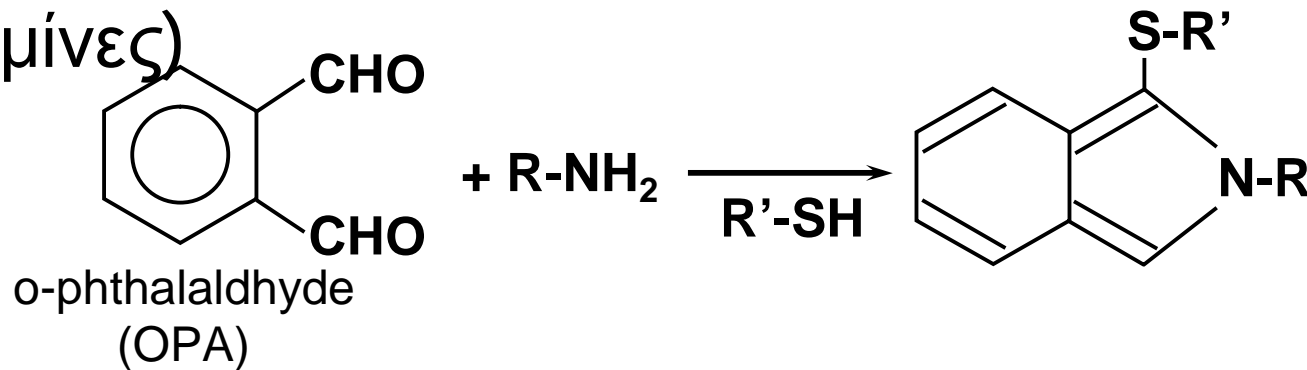


# Σχηματισμός παραγώγων (1)

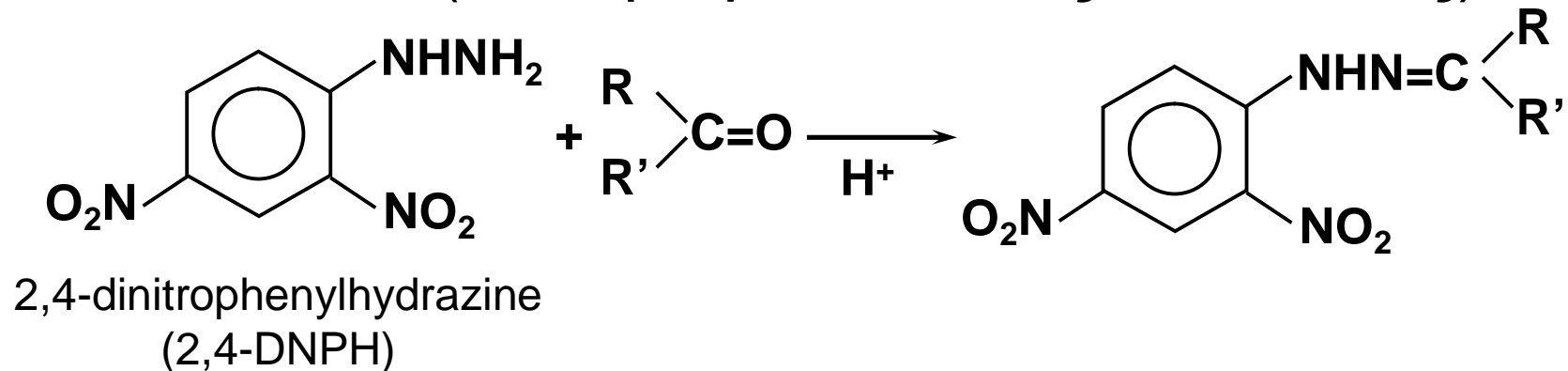
- Για την αύξηση της ευαισθησίας HPLC, ειδικά για ουσίες που δεν απορροφούν στο UV
- Χρήση ειδικών αντιδραστηρίων για παραγωγή παραγώγων που μπορούν να ανιχνευθούν από ανιχνευτές υπεριώδους και φθορισμού σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις
- Παράδειγμα: σχηματισμός φθοριζόντων παραγώγων αμινοξέων με αντιδραστήριο δανσυλοχλωρίδιο
- Αντίδραση σχηματισμού παραγώγων:
  - Προ στήλης (pre-column) παραγωγοποίηση, στο διάλυμα του δείγματος πριν την εισαγωγή στη στήλη
  - Μετά-στήλη (post column) παραγωγοποίηση, μετά την έξοδο συστατικών από τη στήλη και πριν την είσοδο στον ανιχνευτή

# Προ-στήλης Παραγωγοποίηση

- Αντιδραστήριο OPA (Αντιδρά με πρωτοταγείς αμίνες)



- 2,4-DNPH (Αντιδρά με αλδεΐδες και κετόνες)

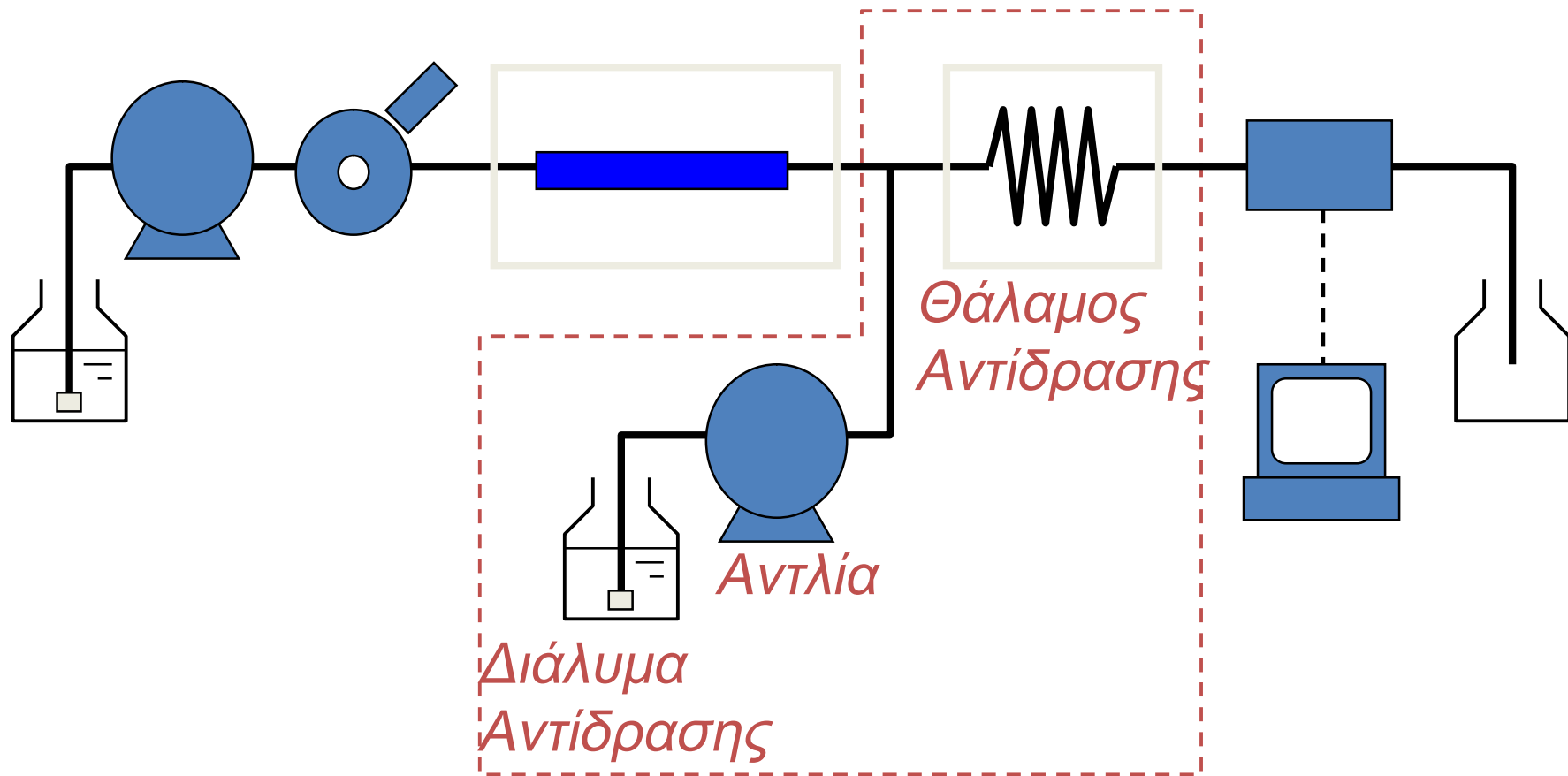


# Σχηματισμός παραγώγων (2)

## Μετά- στήλη παραγωγοποίηση

- Απαιτεί επιπρόσθετα όργανα
  - Αντλία χαμηλής πίεσης για προώθηση αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης στην έξοδο της στήλης
  - Σπείραμα αντίδρασης
- Προκαλεί διεύρυνση ζωνών και μείωση διαχωριστικότητας
- Υπάρχει δυνατότητα χρησιμοποίησως χημειοφωταυγών αντιδράσεων με εξαιρετική ευαισθησία

# Μετά-στήλη παραγωγοποίηση



# Παραδείγματα Μεθόδων Μετά-Στήλης Παραγωγοποίησης

- Αμινοξέα
  - Orthophthalic acid, OPA (φθορισμός)
  - Νινυδρίνη (απορρόφηση Vis)
- Ανάγοντα σάκχαρα
  - Αργινίνη (φθορισμός)
- Καρβαμιδικά ζιζανιοκτόνα
  - Αλκαλική υδρόλυση - OPA (φθορισμός)
- Βρωμικά ιόντα
  - Τριβρωμιούχα (απορρόφηση UV)
  - ο-Διανισιδίνη (απορρόφηση Vis)
- Κυανιούχα ιόντα
  - Χλωρίωση - πυραζολόνη (απορρόφηση Vis)
- Μετάλλων μεταπτώσεως ιόντα
  - 4-(2-Pyridylazo) resorcinol, PAR (Απορρόφηση Vis)

# Επιλογή Τεχνικής (Μηχανισμού) – Εκλογή Κινητής Φάσης (1)

- Για επιλογή του καταλληλότερου συστήματος και των συνθηκών διεξαγωγής χρωματογραφικής ανάλυσης, ο αναλυτής βασίζεται:
  - Στη θεωρία της τεχνικής
  - Στην πείρα του
  - Στις συστάσεις κατασκευαστών συστημάτων HPLC / στηλών
- Τα περισσότερα μείγματα μπορούν να διαχωρισθούν / αναλυθούν με HPLC, αρκεί να επιλεγεί:
  - κατάλληλο σύστημα στατικής και κινητής φάσης
  - ή πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

# Επιλογή Τεχνικής (Μηχανισμού) – Εκλογή Κινητής Φάσης (2)

- Σε γενικές γραμμές επιδιώκεται η εύρεση συνθηκών έτσι, ώστε τα συστατικά ενός μείγματος:
  - να συγκρατούνται σε κάποιο βαθμό στη στατική φάση
  - όχι πολύ ισχυρά
- Αποδοτικός διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί μόνο, εάν εξασφαλισθεί:
  - Διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης ζωνών συστατικών, λόγω διαφορετικού βαθμού συγκράτησης στη στατική φάση
  - Σε ποσοτική έκφραση σε διαφορετικές τιμές παράγοντα χωρητικότητας,  $k'$ , περίπου 1-10



# Επιλογή Τεχνικής (Μηχανισμού) – Εκλογή Κινητής Φάσης (3)

- Συχνά αναγκαίο να εκτελεσθεί κλασμάτωση μείγματος πολλών συστατικών πριν την ανάλυση με HPLC, με:
  - Χρωματογραφική τεχνική
  - Υγρό-Υγρό εκχύλιση
  - Εκχύλιση στερεάς φάσης

# Επιλογή Τεχνικής (Μηχανισμού) – Εκλογή Κινητής Φάσης (4)

- Μηχανισμοί υγρό-υγρό κατανομής και υγρό – στερεό προσρόφησης βασίζονται στη διαφορά πολικότητας των συστατικών του μείγματος
  - Πολικότητα επηρεάζει τη διαλυτότητα και την προσρόφηση
- Διαδικασία υγρό – υγρό κατανομής είναι ευαίσθητη σε μικρές διαφορές στο μοριακό βάρος συστατικών
  - Προτιμάται για διαχωρισμό παρόμοιων ενώσεων μιας ομόλογης σειράς
- Διαδικασία προσρόφησης επηρεάζεται από στερεοχημικές διαφορές
  - Προτιμάται για διαχωρισμό παρόμοιων ενώσεων με διαφορετικές στερεοχημικές δομές

# Επιλογή Τεχνικής (Μηχανισμού) – Εκλογή Κινητής Φάσης (5)

- HPLC προσρόφησης:
  - Πειραματικά ευκολότερη από HPLC κατανομής
  - Προτιμάται για διαχωρισμό μείγματος ενώσεων με ευρεία περιοχή πολικότητας
- HPLC κατανομής
  - Διαχωρίζει αποδοτικότερα ενώσεις με πολύ μικρές διαφορές πολικότητας

# Επιλογή Τεχνικής (Μηχανισμού) – Εκλογή Κινητής Φάσης (6)

- Μείγματα ιοντικών ενώσεων διαχωρίζονται αποτελεσματικά με:
  - HPLC ιονταλλαγής
- Μεγαλομοριακές ενώσεις διαχωρίζονται με:
  - HPLC μοριακού αποκλεισμού με επιλογή στήλης με κατάλληλη περιοχή κλασμάτωσης

# Επιλογή Μηχανισμού Συγκρατήσεως Υγροχρωματογραφίας με Βάση Χαρακτηριστικά Δείγματος

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

# Πώς Μπορώ να Αναλύσω το Δείγμα

## Υδατάνθρακες

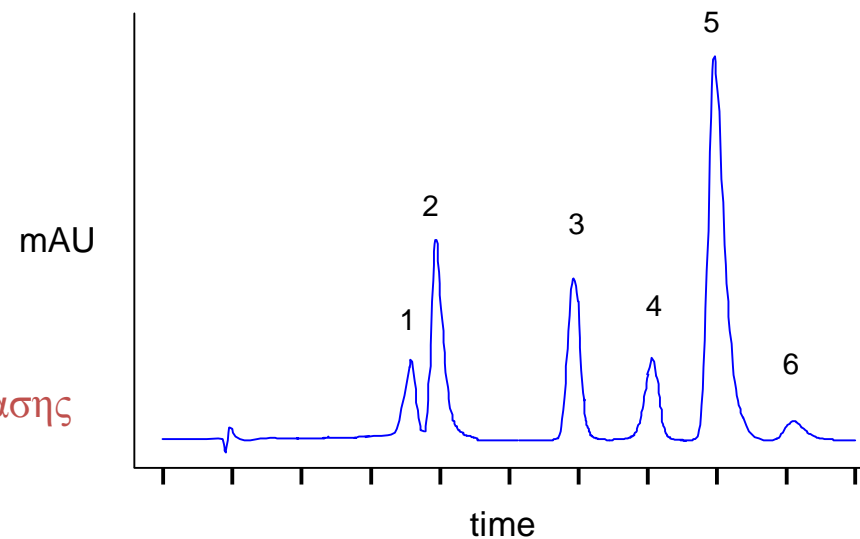
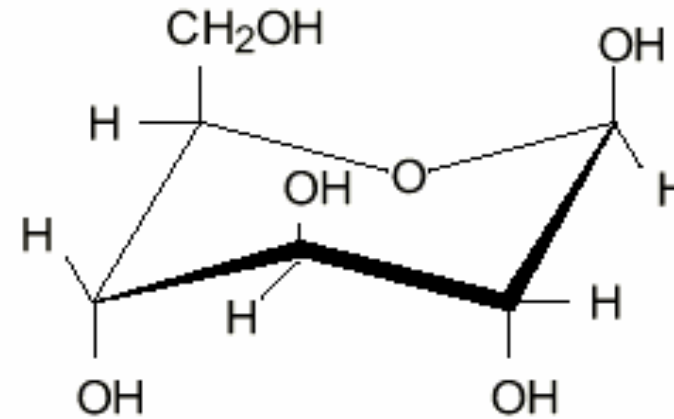
1. Φρουκτόζη
2. Γλυκόζη
3. Σακχαρόζη
4. Παλατινόζη
5. Τρεαλόζη
6. Ισομαλτόζη

Zorbax NH<sub>2</sub> (4.6 x 250 mm)

70/30 Ακετονιτρίλιο/Νερό

1 mL/min Ανιχνευτής = Δείκτη Διάθλασης

Glucose



# Επιλογή Τεχνικής (Μηχανισμού) – Εκλογή Κινητής Φάσης (7)

- Περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες είναι μέσου μοριακού βάρους και ενδιάμεσης πολικότητας.
- Για την ανάλυσή τους χρησιμοποιούνται:
  - HPLC αντίστροφης φάσης για μη ιοντικές ουσίες
  - HPLC κατανομής με σχηματισμό ζεύγους ιόντων (ion-pair) για ιοντικές ουσίες
  - Με ίδια στήλη, χημικά συνδεδεμένη ομάδα C18

# Επιλογή Κινητής Φάσης (1)

- Μετά επιλογή στατικής φάσης επιλέγεται η καταλληλότερη κινητή φάση, έτσι ώστε σε συνδυασμό με την επιλεγείσα στατική φάση να πετυχαίνει τιμές  $k'$  1-10
- Εκλογή με «δοκιμή και λάθος» (trial and error), λαμβάνοντας υπόψη βασικές αρχές και εμπειρία
- Λαμβάνονται υπόψη χαρακτηριστικά διαλυτών:
  - Πολικότητα, διπολική ροπή, διηλεκτρική σταθερά, ενέργειες ηλεκτρονικών μεταπτώσεων, ενέργειες προσρόφησης, διαλυτότητες



# Επιλογή Κινητής Φάσης (2)

- Κατά τα πειράματα εκλογής διαλύτη δοκιμάζονται διάφορα διαλύματα κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας, μέχρι επίτευξης επιθυμητών τιμών:
  - Παράγοντα χωρητικότητας  $k'$
  - Παράγοντα εκλεκτικότητας  $\alpha$
- Για ταχύτερη εκλογή καταλληλότερων πειραματικών συνθηκών στην HPLC (μεταξύ των οποίων και σύσταση κινητής φάσης) έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι βελτιστοποίησης (όπως μέθοδος Simplex).

# Επιλογή Κινητής Φάσης (3)

- Εάν ένα δείγμα περιέχει περισσότερα συστατικά από όσα μπορεί να διαχωρίσει μια ισοκρατική ανάλυση:
  - Αναπτύσσεται πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης
  - Οι μεγάλες τιμές  $k'$  μειώνονται συνεχώς και να διαχωρίζονται περισσότερα συστατικά σε μικρότερο χρόνο

Ιδιότητες διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην HPLC

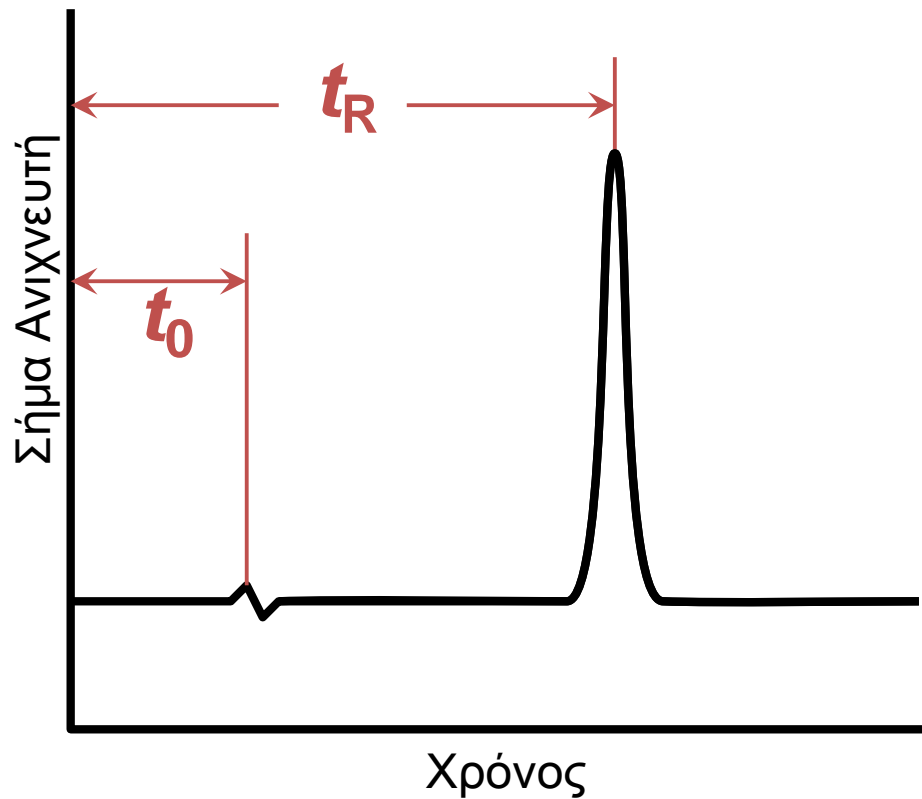
RI = Δείκτης διάθλασης,  $\lambda$  = μήκος κύματος με απορρόφηση ίση με 1 (σημείο αποκοπής), P' = Δείκτης πολικότητας,  $\epsilon$  = Διηλεκτρική σταθερά

Διαλύτης	RI	$\lambda$	P'	$\epsilon$
κ-Εξάνιο	1,372	190	0,1	1,88
κ-Επτάνιο	1,385	195	0,2	1,92
Κυκλοεξάνιο	1,423	200	-0,2	2,02
Τολουόλιο	1,494	285	2,4	2,4
Μεθυλενοχλωρίδιο	1,421	233	3,1	8,9
Χλωροφόρμιο	1,443	245	4,1	4,8
Αιθυλαιθέρας	1,350	218	2,8	4,3
Οξικός αιθυλεστέρας	1,370	256	4,4	6,0
Ακετόνη	1,356	330	5,1	20,7
κ-Προπανόλη	1,385	240	4,0	20,3
Αιθανόλη	1,359	210	4,3	24,6
Ύδωρ	1,333		10,2	80

# Τροποποιητής (modifier)

- Πολικοί διαλύτες (νερό, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη) που προστίθεται σε μικρή ποσότητα σε χαμηλής πολικότητας κινητές φάσης σε HPLC προσρόφησης
- Ο πολικός διαλύτης προσροφάται κατά προτίμηση στις πλέον δραστικές θέσεις προσροφητικού υλικού, μειώνοντας την προσροφητική του δύναμη
  - Επιτυγχάνεται έτσι σταθερή «δραστικότητα» ή προσροφητική δύναμη και επαναληψιμότητα στην απόδοση της στήλης

# Παράγοντας Ανάσχεσης (Retention Factor), $k$

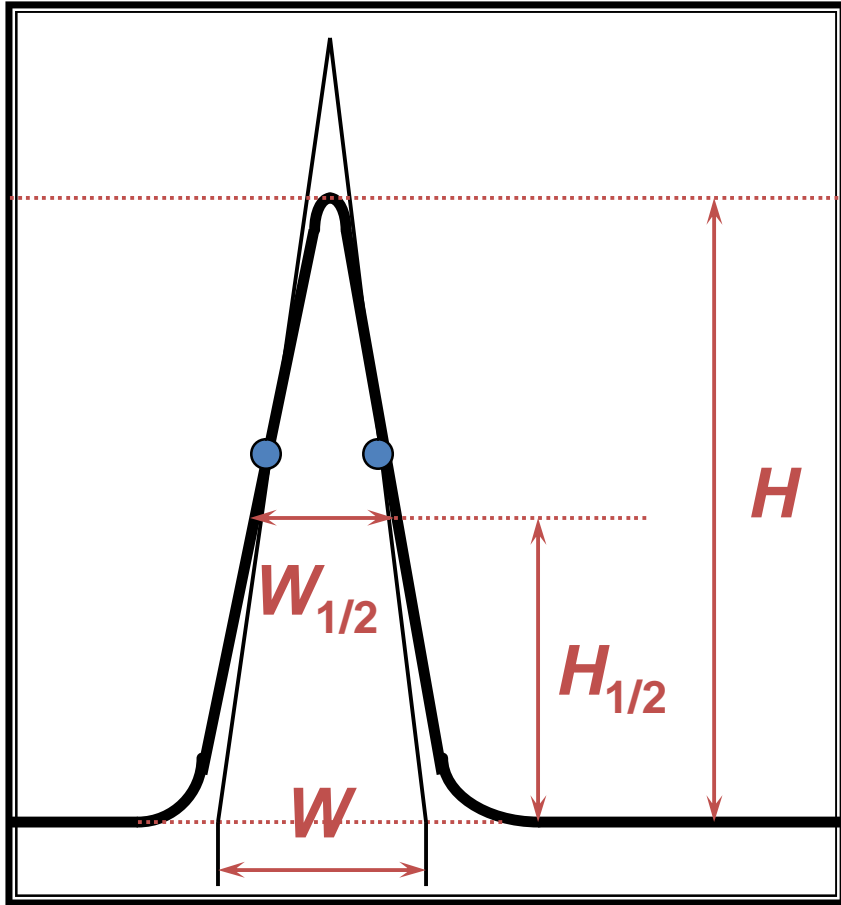


$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$t_R$ : Χρόνος ανάσχεσης

$t_0$ : Νεκρός χρόνος

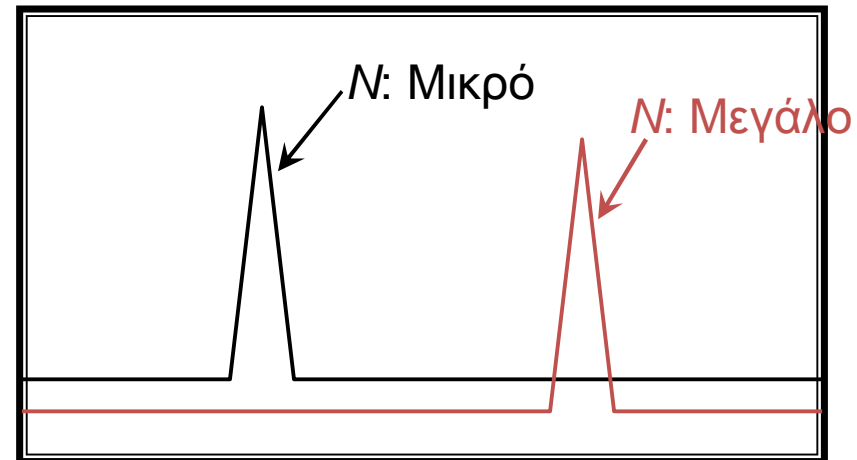
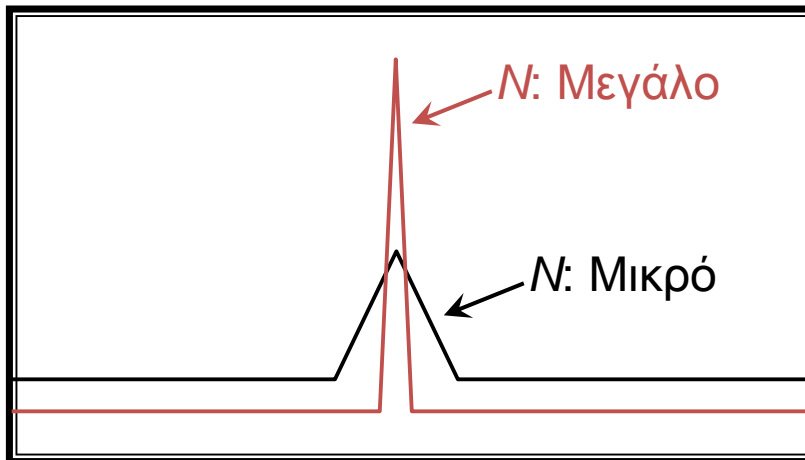
# Αριθμός Θεωρητικών Πλακών, $n$



$$\begin{aligned}n &= 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \\ &= 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \\ &= 2\pi \left( \frac{t_R \cdot H}{Area} \right)^2\end{aligned}$$

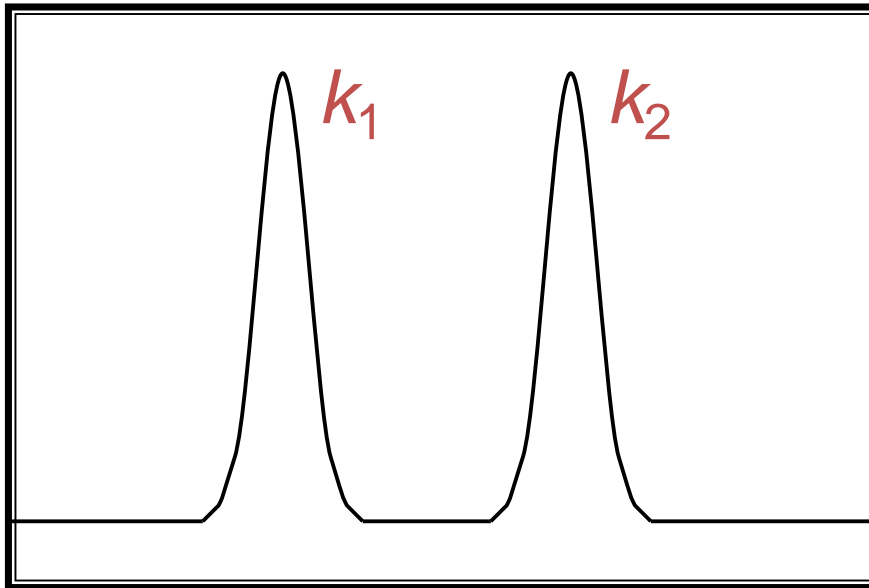
# Αξιολόγηση Επίδοσης Στήλης Βασισμένη στον Αριθμό Θεωρητικών Πλακών (N)

- Εάν οι χρόνοι ανάσχεσης είναι ίδιοι, το εύρος κορυφής είναι μικρότερο σε αυτή με το μεγαλύτερο N.
- Εάν το εύρος κορυφής είναι το ίδιο, ο χρόνος ανάσχεσης είναι μεγαλύτερος σε αυτή με το μεγαλύτερο N.



# Παράγοντας Διαχωρισμού, $a$

- Παράγοντας διαχωρισμού: Λόγος  $k$  των δύο κορυφών

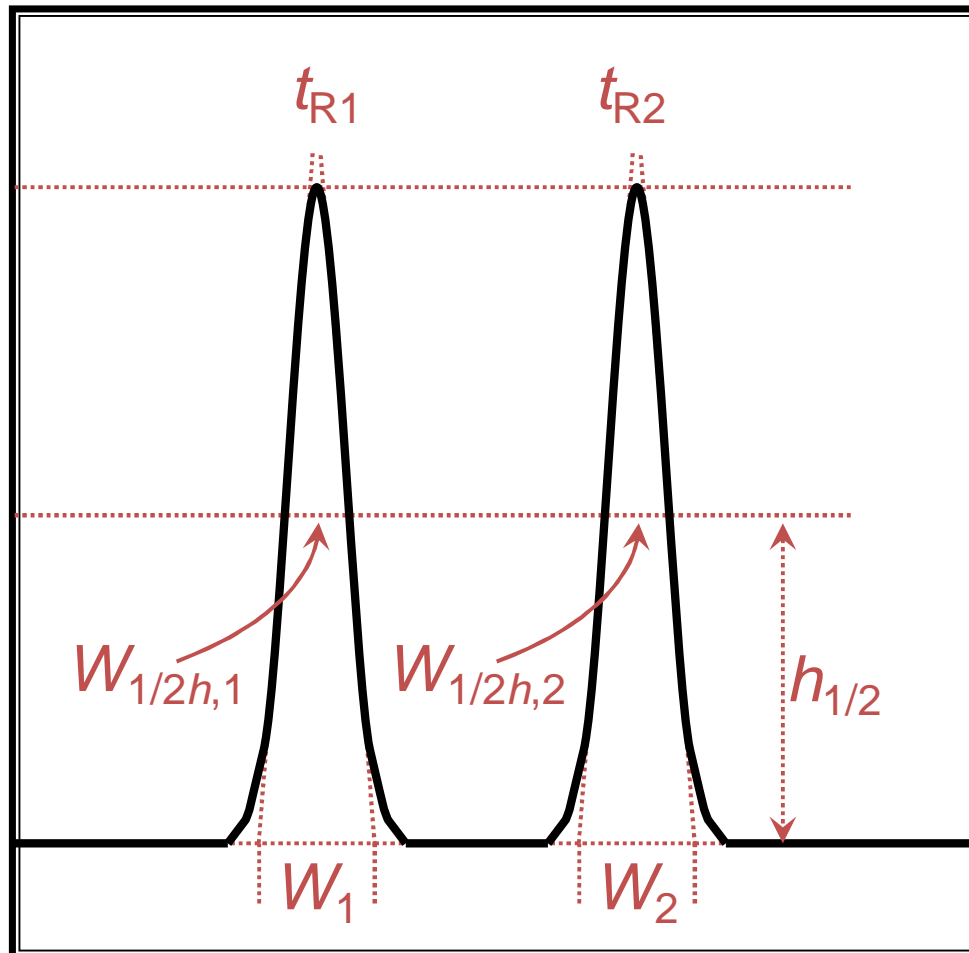


$$a = \frac{k_2}{k_1}$$

$(k_2 > k_1)$

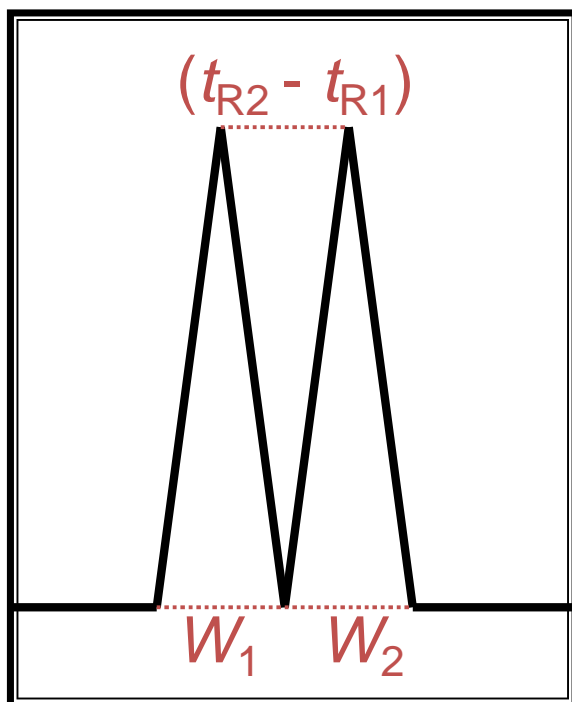


# Διαχωριστικότητα (Resolution), $R_S$



$$R_S = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$
$$= 1.18 \times \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_{1/2h,1} + W_{1/2h,2}}$$

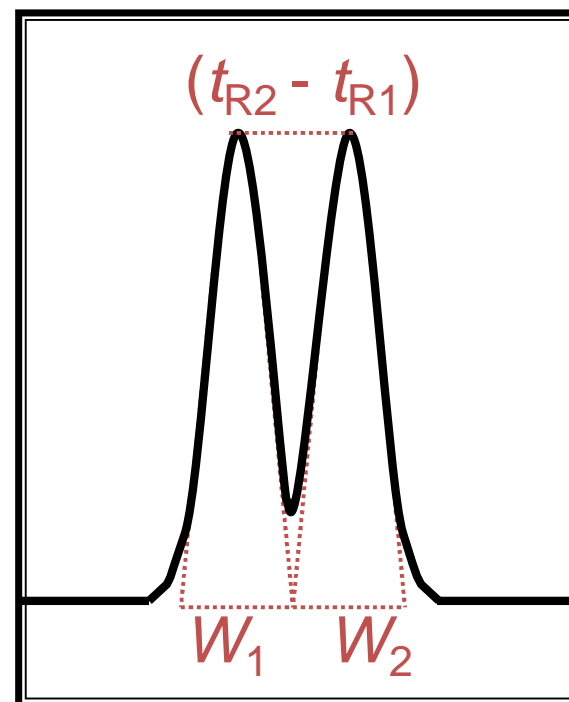
# Απαιτούμενη Διαχωριστικότητα για Πλήρη Διαχωρισμό



$$t_{R2} - t_{R1} = W_1 = W_2$$

$$R_S = 1$$

Εάν οι κορυφές είναι ισοσκελή τρίγωνα,  
διαχωρίζονται πλήρως.



$$t_{R2} - t_{R1} = W_1 = W_2$$

$$R_S = 1$$

Εάν οι κορυφές είναι κατανομές Gauss, απαιτείται  
 $R_S > 1.5$  για πλήρη διαχωρισμό.

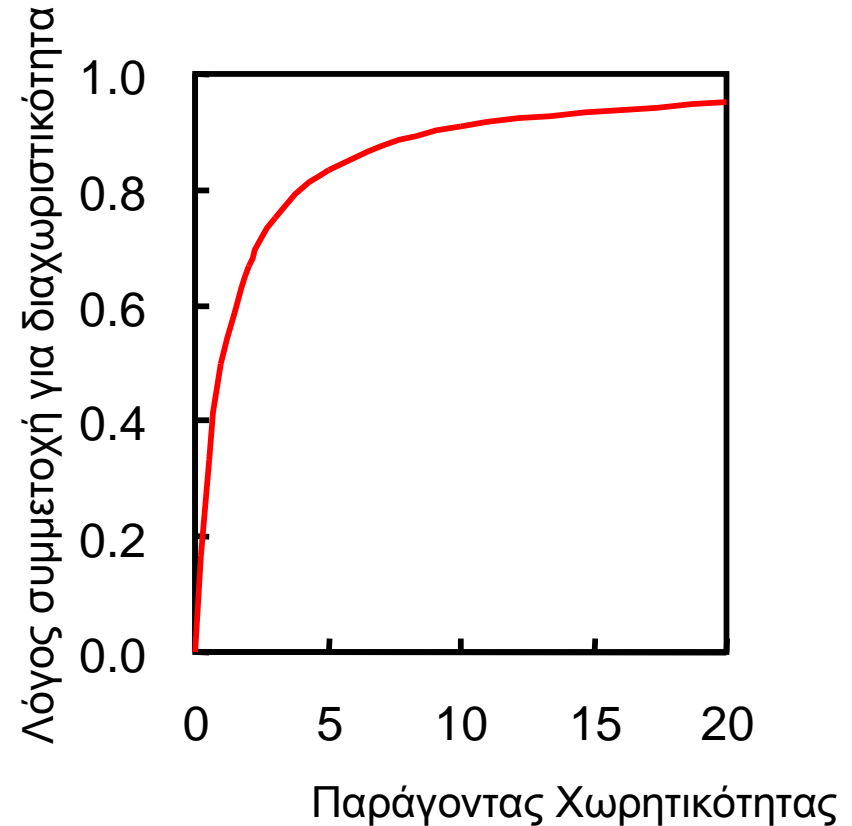
# Σχέση Μεταξύ Διαχωριστικότητας και Άλλων Παραμέτρων

- Η διαχωριστικότητα είναι συνάρτηση του παράγοντα διαχωρισμού ( $\alpha$ ), του αριθμού θεωρητικών πλακών ( $N$ ), και του παράγοντα ανάσχεσης ( $k'$ ).
- Ο διαχωρισμός μπορεί να βελτιωθεί με βελτίωση των 3 παραμέτρων.

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$
$$= \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{a-1}{a} \right) \left( \frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right)$$

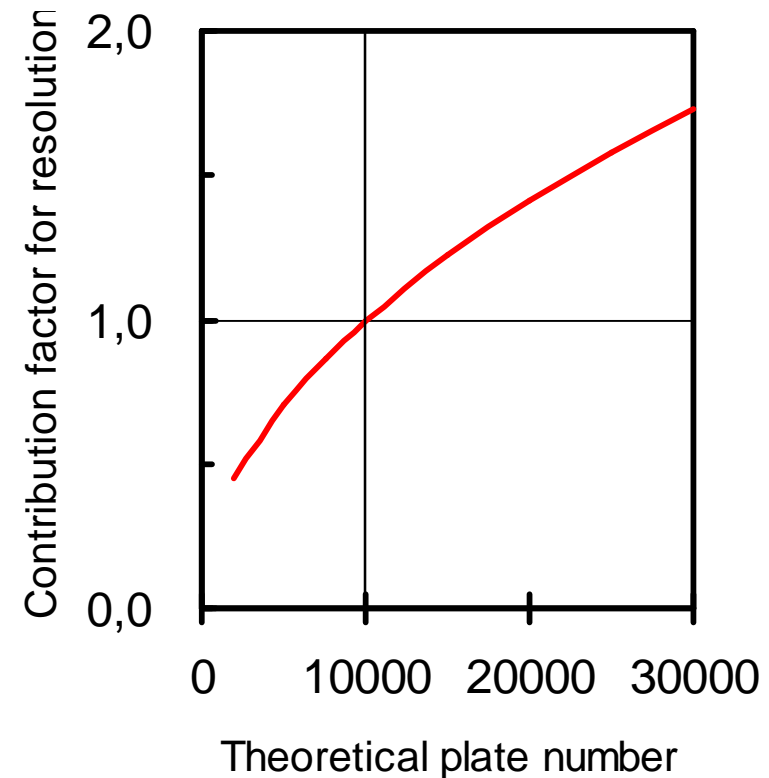
# Συμμετοχή του Παράγοντα Χωρητικότητας ( $k'$ ) στη Διαχωριστικότητα

- Αύξηση του παράγοντα χωρητικότητας βελτιώνει το διαχωρισμό!
- Παράγοντας χωρητικότητας περίπου 3 έως 10 είναι κατάλληλος. Η υπέρβαση αυξάνει το χρόνο ανάλυσης.



# Συμμετοχή Θεωρητικών Πλακών στη Διαχωριστικότητα

- Η διαχωριστικότητα αυξάνει αναλογικά με την τετραγωνική ρίζα του  $N$ .



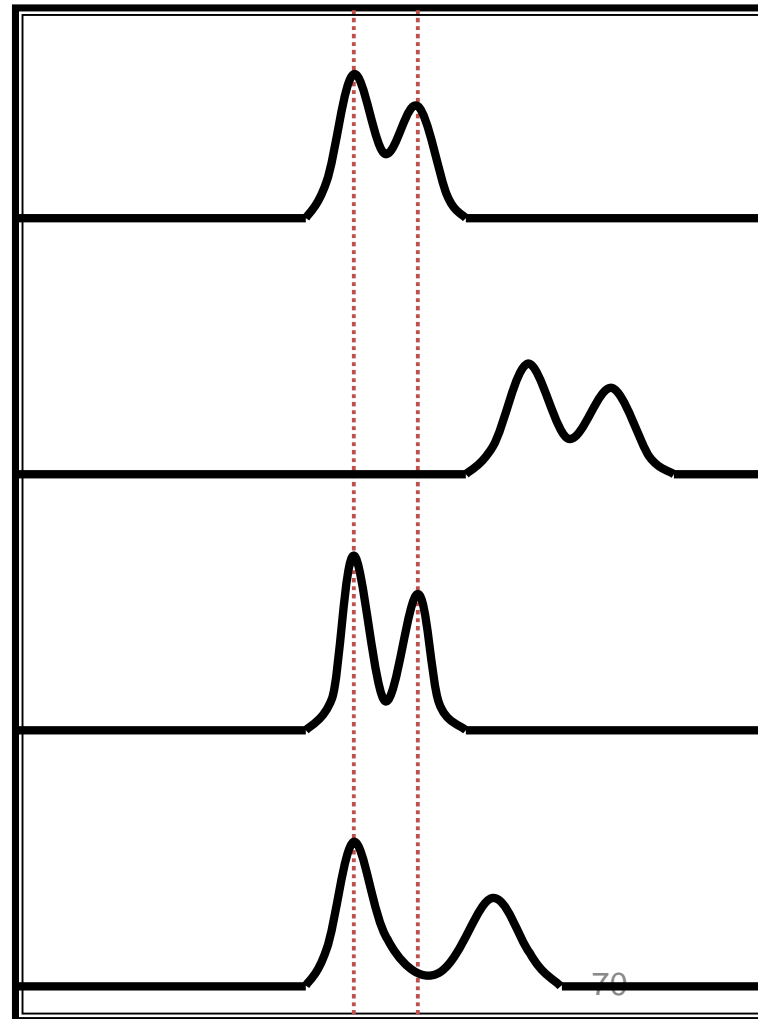
# Για βελτίωση διαχωρισμού...

Πριν την  
Ρύθμιση

*Αύξηση  $k'$*

*Αύξηση  $N$*

*Αύξηση  $a$*



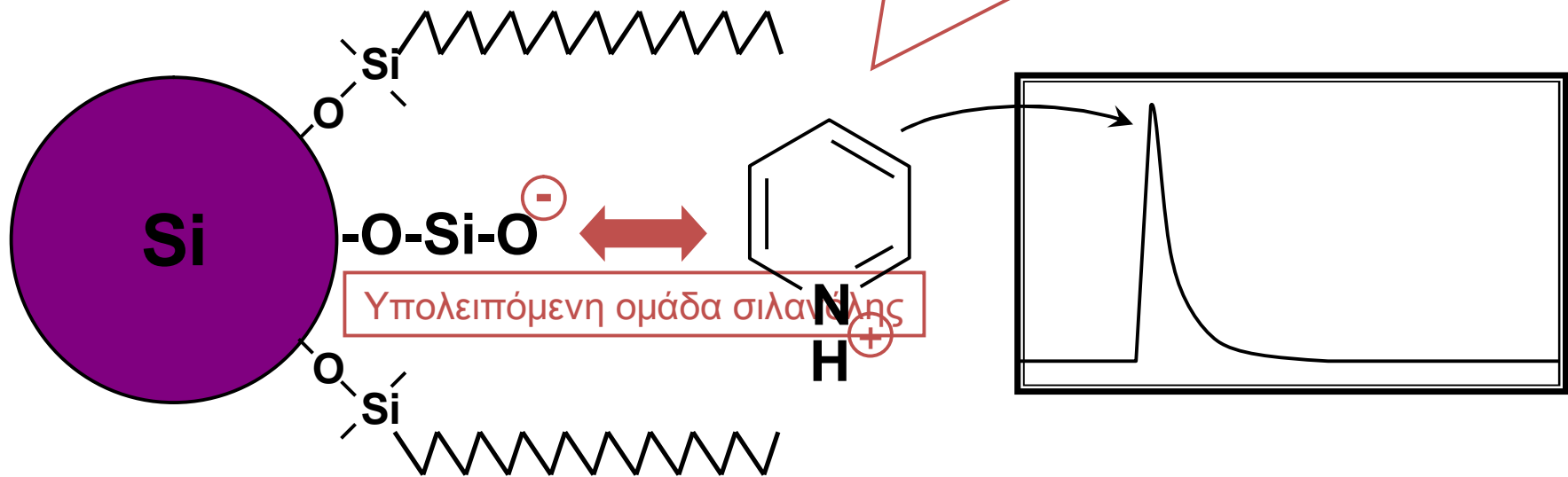
Αντικατάσταση εκλουστικού με ένα μικρότερης εκλουστικής ισχύος.

Αντικατάσταση στήλης με μια καλύτερης επίδοσης. Στήλη μεγαλύτερου μήκους.

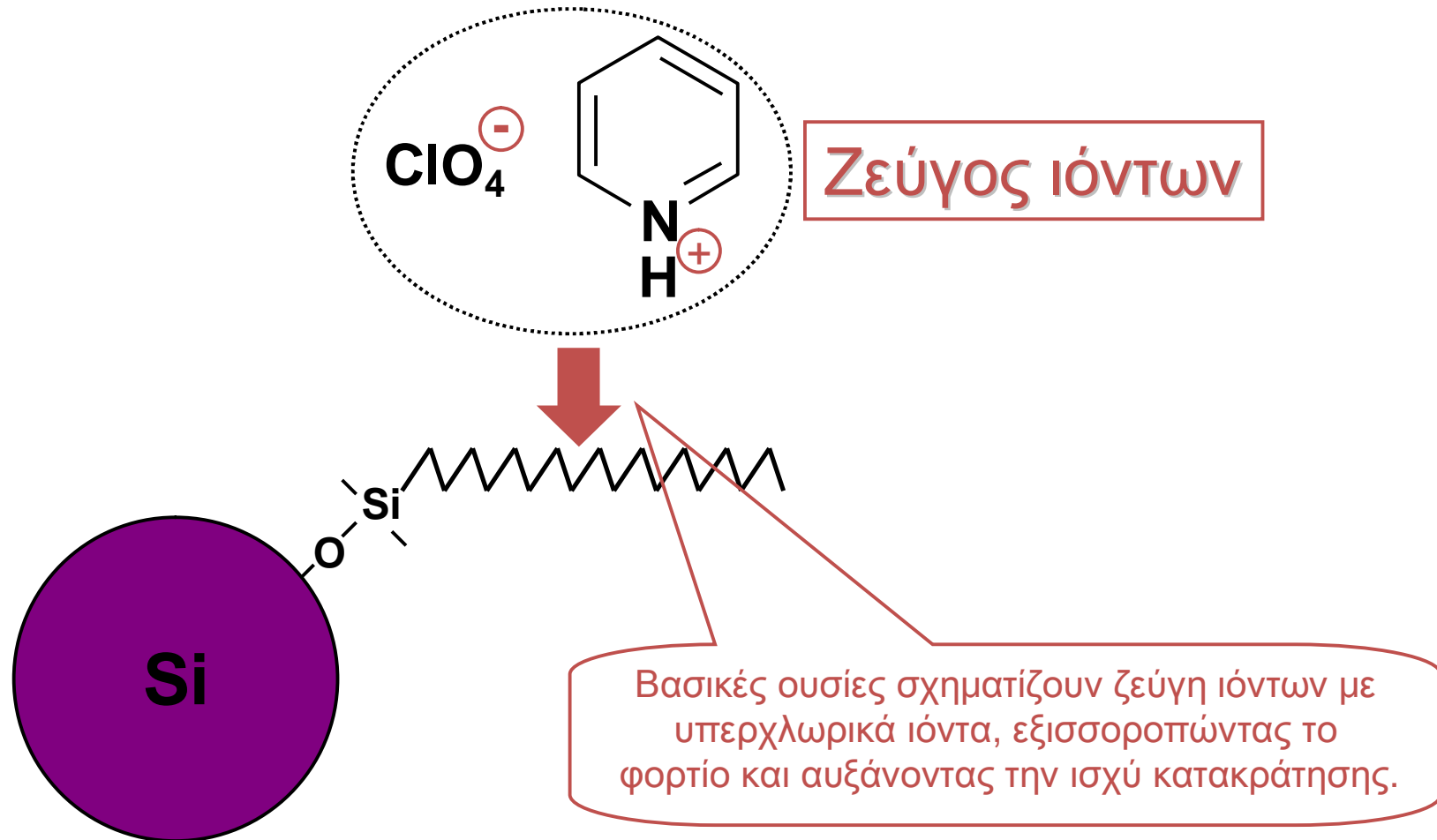
Αντικατάσταση υλικού πλήρωσης στήλης. Αλλαγή σύστασης εκλουστικού. Αλλαγή θερμοκρασίας στήλης.

# Ανάλυση βασικών ουσιών Επίδραση Υπολειπόμενων Ομάδων Σιλανολών

Οι βασικές ουσίες αλληλεπιδρούν με τις υπολειπόμενες ομάδες σιλανόλης, προκαλώντας καθυστερημένη έκλυση και ουρά.



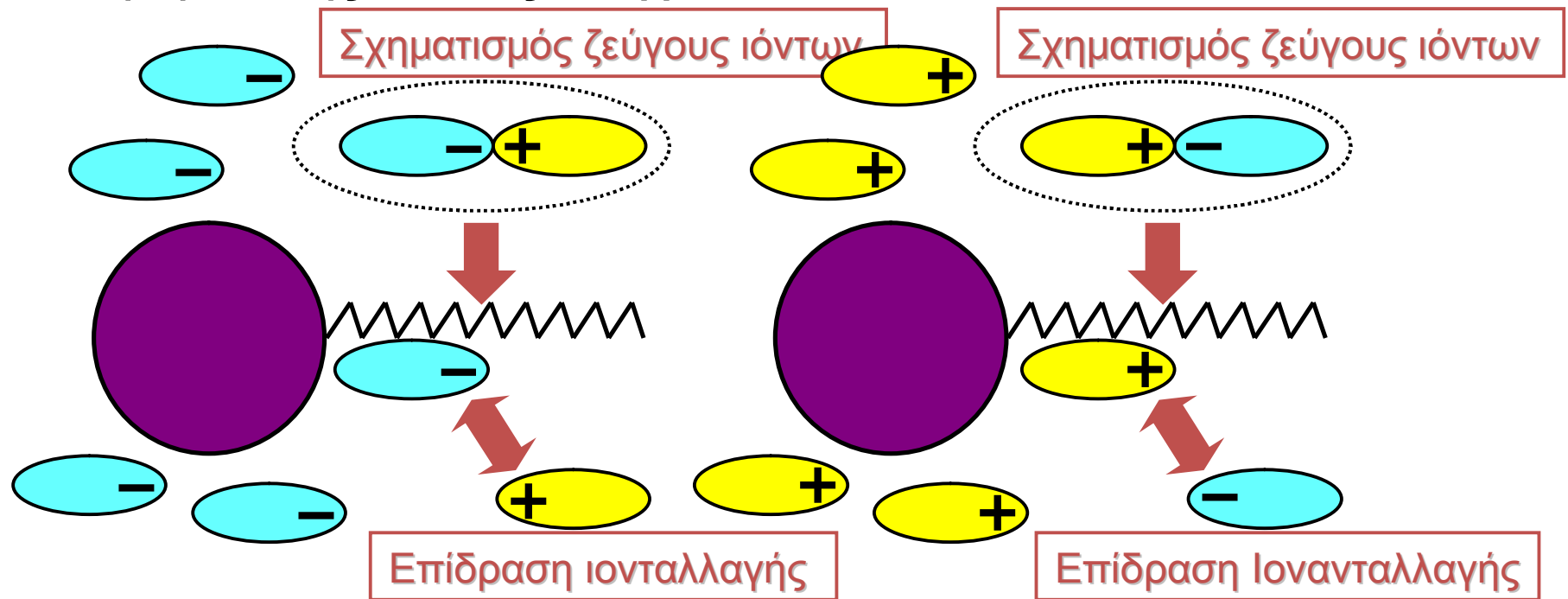
# Ανάλυση Βασικών Ουσιών Προσθήκη Υπερχλωρικού Νατρίου





# Χρωματογραφια Αντίστροφης Φάσης Ζευγών Ιόντων

- Αυξάνει την ισχύ κατακράτησης με την προσθήκη στο εκλουστικό αντιδραστηρίου ζεύγους ιόντων με αντίθετο φορτίο της ουσίας στόχου.



Βασικές Ουσίες

Όξινες Ουσίες

# Αντιπροσωπευτικά Αντιδραστήρια Ζευγών Ιόντων

- Ανιοντικές Ουσίες
  - Tetra-*n*-butylammonium hydroxide (TBA)
- Κατιοντικές Ουσίες
  - Πεντανοσουλφονικό νάτριο (C5)
  - Εξανοσουλφονικό νάτριο (C6)
  - Επτανοσουλφονικό νάτριο (C7)
  - Οκτανοσουλφονικό νάτριο (C8)

# Εφαρμογές HPLC (1)

- Διαχωρισμό, ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων ουσιών ποικίλης προέλευσης.
- Σε αντίθεση με GLC, χρησιμοποιείται σε διαχωρισμούς / ανάλυση μειγμάτων ουσιών:
  - Μεγάλου μοριακού βάρους
  - Υψηλής πολικότητας
  - Πολυμερών
  - Ιοντικών ενώσεων

## Εφαρμογές HPLC (2)

- Ταχύτητα αναλύσεων παρόμοια με αυτή GLC
- Διαχωριστική ικανότητα 3-10 φορές καλύτερη από αυτή της TLC
- Κόστος μιας συσκευής HPLC αρκετά υψηλό

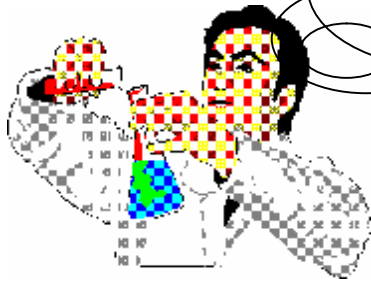
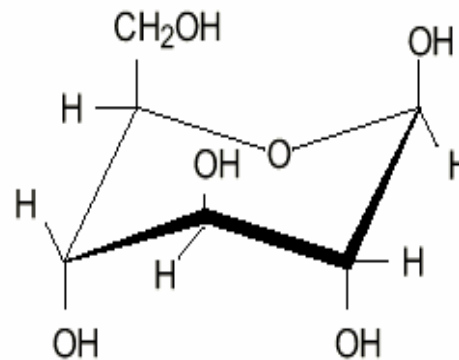
# Ποιοτική Ανάλυση

- Ταυτοποίηση βασισμένη στο χρόνο ανάλυσης
- Λήψη φάσματος με τον ανιχνευτή
  - Φάσμα UV (ανιχνευτής σειράς φωτοδιόδων)
  - Φάσμα MS
- Μεταφορά σε άλλο αναλυτικό όργανο μετά τον παρασκευαστικό διαχωρισμό

# Τεχνικές Διαχωρισμού



Glucose



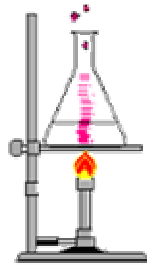
Έχω δύο τεχνικές διαχωρισμού στο εργαστήριό μου, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) και Gas Chromatography (GC). Ποιά θα χρησιμοποιήσω;

# Σύγκριση HPLC και GC

## Πτητικότητα ουσιών

### HPLC

- Όχι απαίτηση πτητικότητας
- Οι αναλύτες πρέπει να είναι διαλυτοί στην κινητή φάση



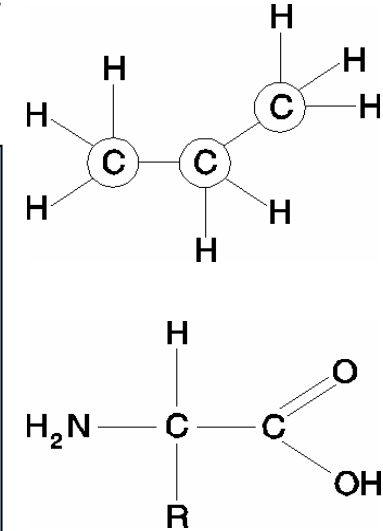
### GC

- Οι αναλύτες πρέπει να είναι πτητικοί

## Πολικότητα ουσιών

### HPLC

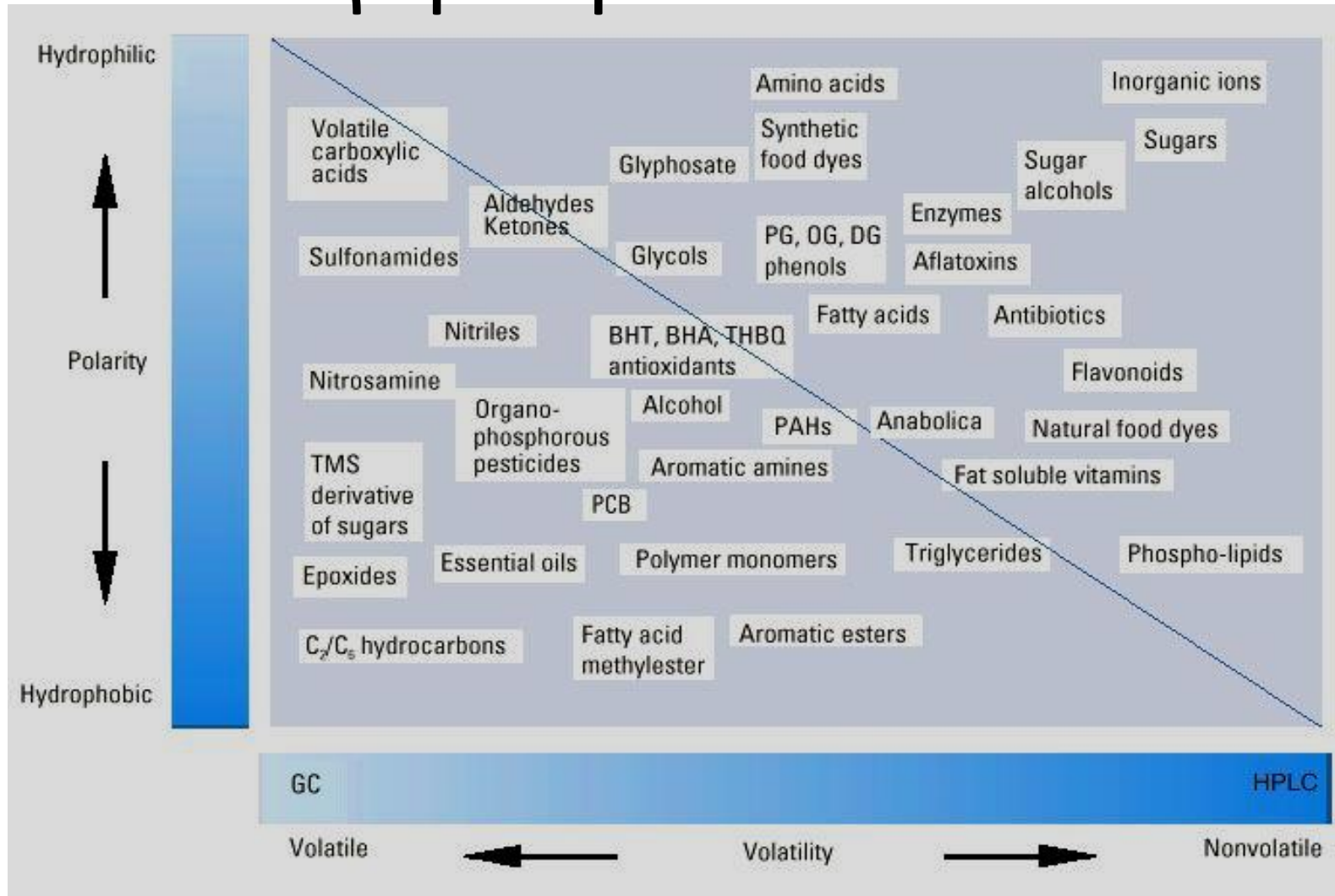
- Διαχωρίζει άπολες και πολικές ουσίες
- Πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs)  
- ανόργανα ιόντα



### GC

- Διαχωρίζει άπολες και πολικές ουσίες

# Σύγκριση HPLC και GC



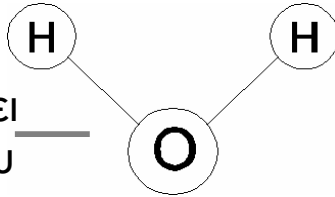


# Σύγκριση HPLC και GC

## Θερμική αστάθεια αναλυτών

### HPLC

- Η ανάλυση μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου ή χαμηλότερη



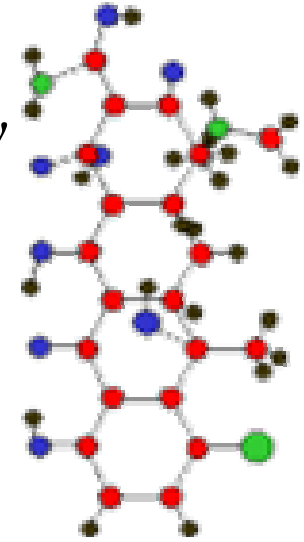
### GC

- Οι αναλύτες πρέπει να είναι ικανοί να επιβιώσουν στην υψηλή θερμοκρασία εισαγωγής και στήλης

## Μοριακό βάρος αναλυτών

### HPLC

- Δεν υπάρχει θεωρητικό άνω όριο
- Πρακτικά η διαλυτότητα είναι το όριο



### GC

- Τυπικά < 500 amu

# Σύγκριση HPLC και GC

## Προκατεργασία δείγματος

### HPLC

- Το δείγμα πρέπει να διηθείται
- Το δείγμα πρέπει να είναι στον ίδιο διαλύτη όπως η κινητή φάση

### GC

- Ο διαλύτης πρέπει να είναι πτητικός και γενικά πτητικότερος από τους αναλύτες

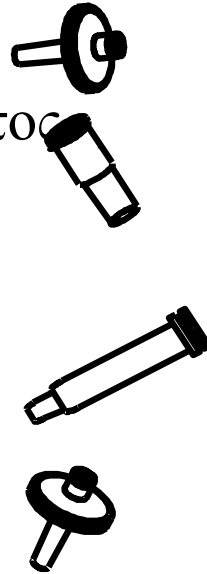
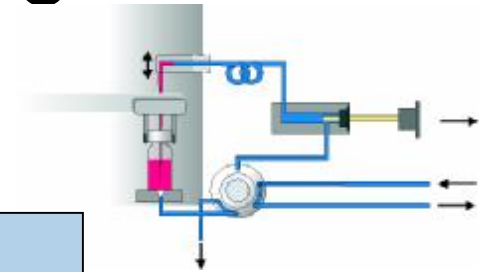
## Μέγεθος δείγματος

### HPLC

- Εξαρτάται από εσωτερική διάμετρο στήλης

### GC

- Τυπικά 1 - 5  $\mu\text{L}$



# Σύγκριση HPLC και GC

## Μηχανισμός διαχωρισμού

### HPLC

- Αμφότερες η στατική φάση και η κινητή φάση λαμβάνουν μέρος



### GC

- Η κινητή φάση είναι μόνο ο μεταφορέας του δείγματος

## Ανιχνευτές

### HPLC

- Πλέον κοινός UV-Vis
- Μεγάλο εύρος μη-καταστροφικών ανιχνευτών
- 3-διαστάσεων ανιχνευτές
- Ευαισθησία μέχρι fg (εξαρτάται από τον ανιχνευτή)

### GC

- Πλέον κοινός FID, γενικός οργανικών ενώσεων

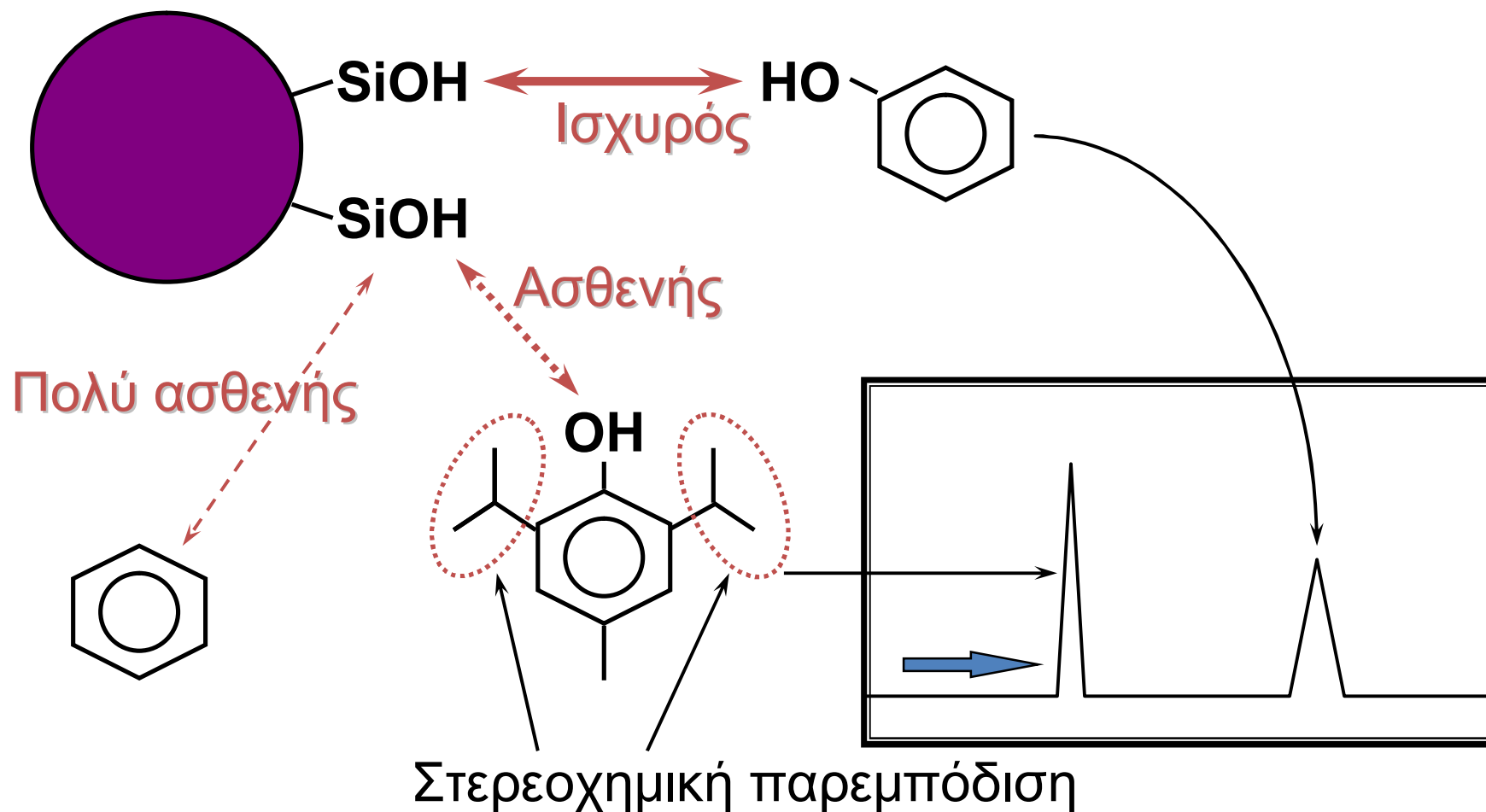
# Εφαρμογές HPLC στην Φαρμακευτική Ανάλυση

- Τεχνική επιλογής σε πολλά προβλήματα φαρμακευτικής ανάλυσης
  - Φαρμακευτικά δείγματα είναι μείγματα (σκευάσματα)
  - Ανάλυση βιολογικών δειγμάτων για τον προσδιορισμό επιπέδων φαρμάκων (μελέτες βιοδιαθεσιμότητας, βιοϊσοδυναμίας)
    - Περιέχουν φάρμακα, μεταβολίτες τους και ενδογενείς ουσίες
- Συνήθως πριν την εισαγωγή δείγματος στο χρωματογράφο προηγείται εκχύλιση (στερεής φάσης ή άλλη τεχνική προκαταρκτικού διαχωρισμού)

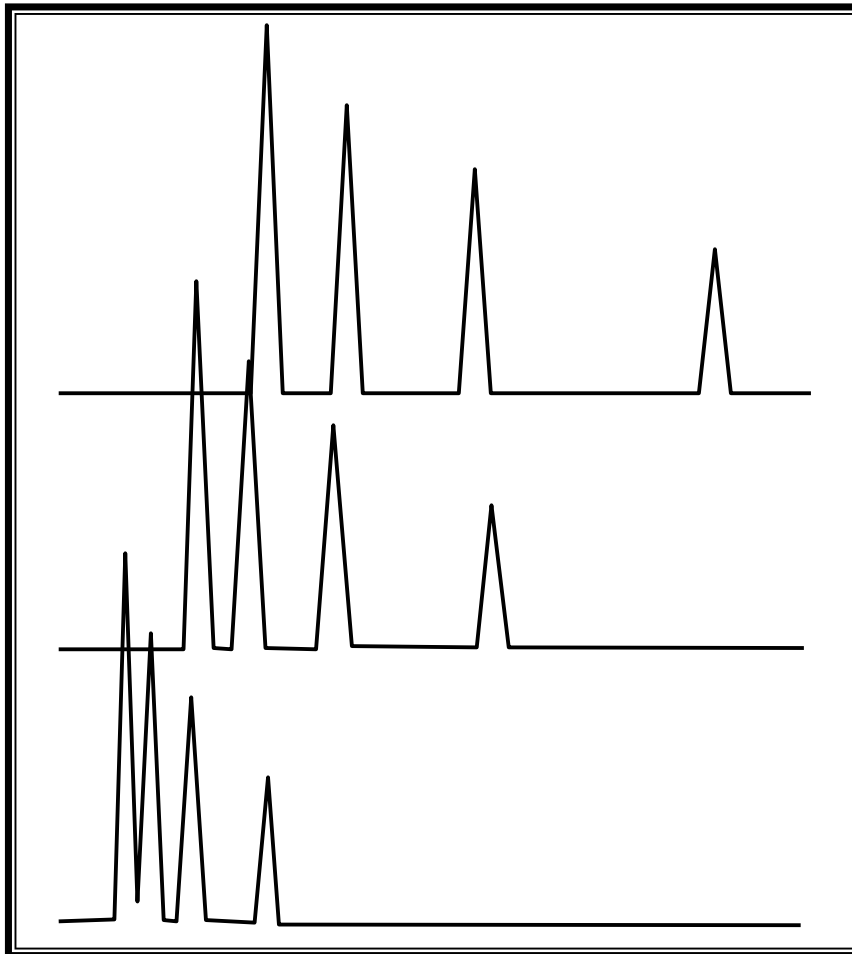
# Στατικές Φάσεις και Κινητές Φάσεις Χρησιμοποιούμενες στην Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης

- Στατική Φάση
  - Πηκτή διοξειδίου πυριτίου:  $-\text{Si}-\text{OH}$
  - Κύανο-:  $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$
  - Άμινο-:  $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
  - Δίολο-:  $-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$
- Κινητή φάση
  - Κύριοι διαλύτες: Αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, αρωματικοί υδρογονάνθρακες, κλπ.
  - Επιπλέον διαλύτες: Αλκοόλες, αιθέρες, κλπ.

# Σχέση μεταξύ Δεσμών Υδρογόνου και Χρόνου Ανάσχεσης στην χρωματογραφία κανονικής φάσης



# Σχέση μεταξύ πολικότητας εκλουστικού και χρόνου ανάσχεσης στον τύπο κανονικής φάσης



Εκλουστικό: Εξάνιο/μεθανόλη

100/0

98/2

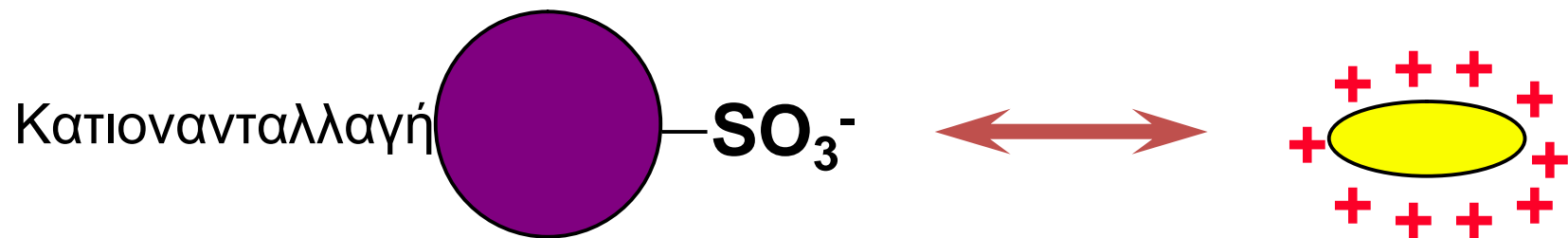
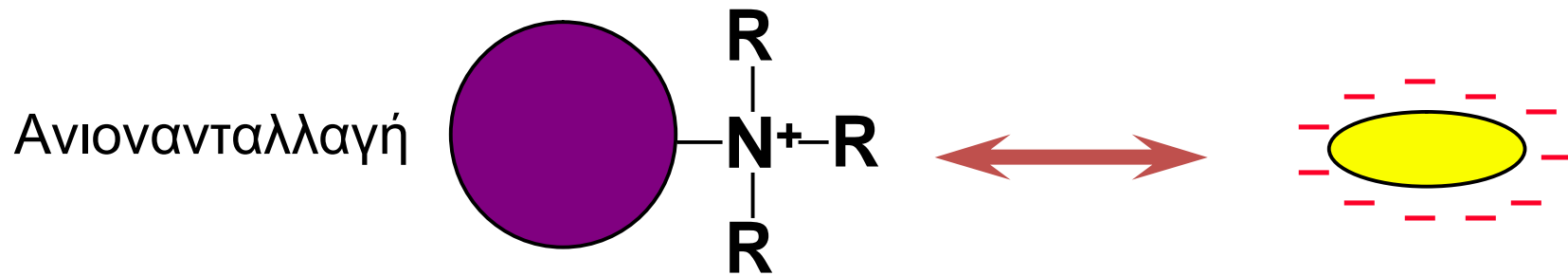
95/5

# Σύγκριση Κανονικής Φάσης και Αντίστροφης Φάσης

- Κανονικής φάσης
  - Αποδοτική για διαχωρισμό δομικών ισομερών
  - Προσφέρει εκλεκτικότητα διαχωρισμού μη επιτεύξιμη με την αντίστροφη φάση
  - Σταθεροποιείται αργά και είναι επιρρεπής σε διακυμάνσεις στο χρόνο ανάσχεσης
  - Δαπανηρά εκλουστικά
- Αντίστροφης φάσης
  - Ευρεία περιοχή εφαρμογών
  - Αποδοτική για διαχωρισμούς ομολόγων
  - Στατική φάση με μεγαλύτερο χρόνο ζωής
  - Σταθεροποιείται ταχέως
  - Εκλουστικά χαμηλού κόστους και εύκολα στη χρήση

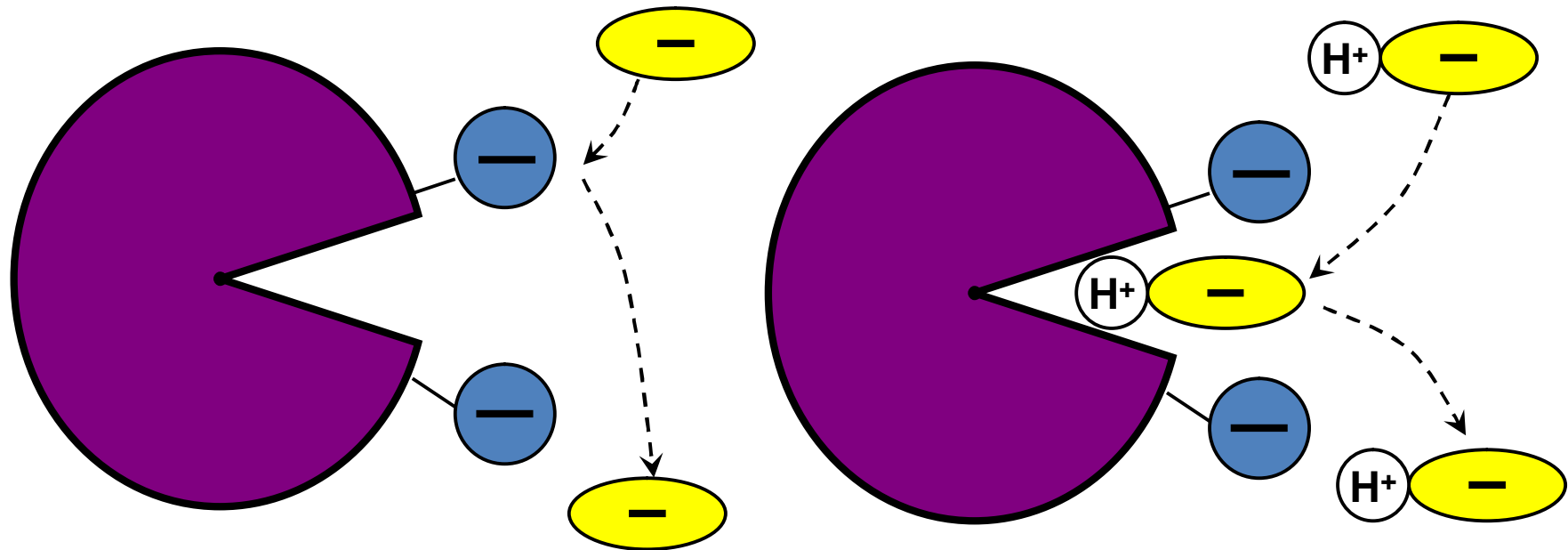


# Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής



Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση  
(Δυνάμεις Coulomb)

# Χρωματογραφία Αποκλεισμού Ιόντων



Ιόντα ισχυρών οξέων απωθούνται από το φορτίο και δεν μπορούν να εισέλθουν στον πόρο.

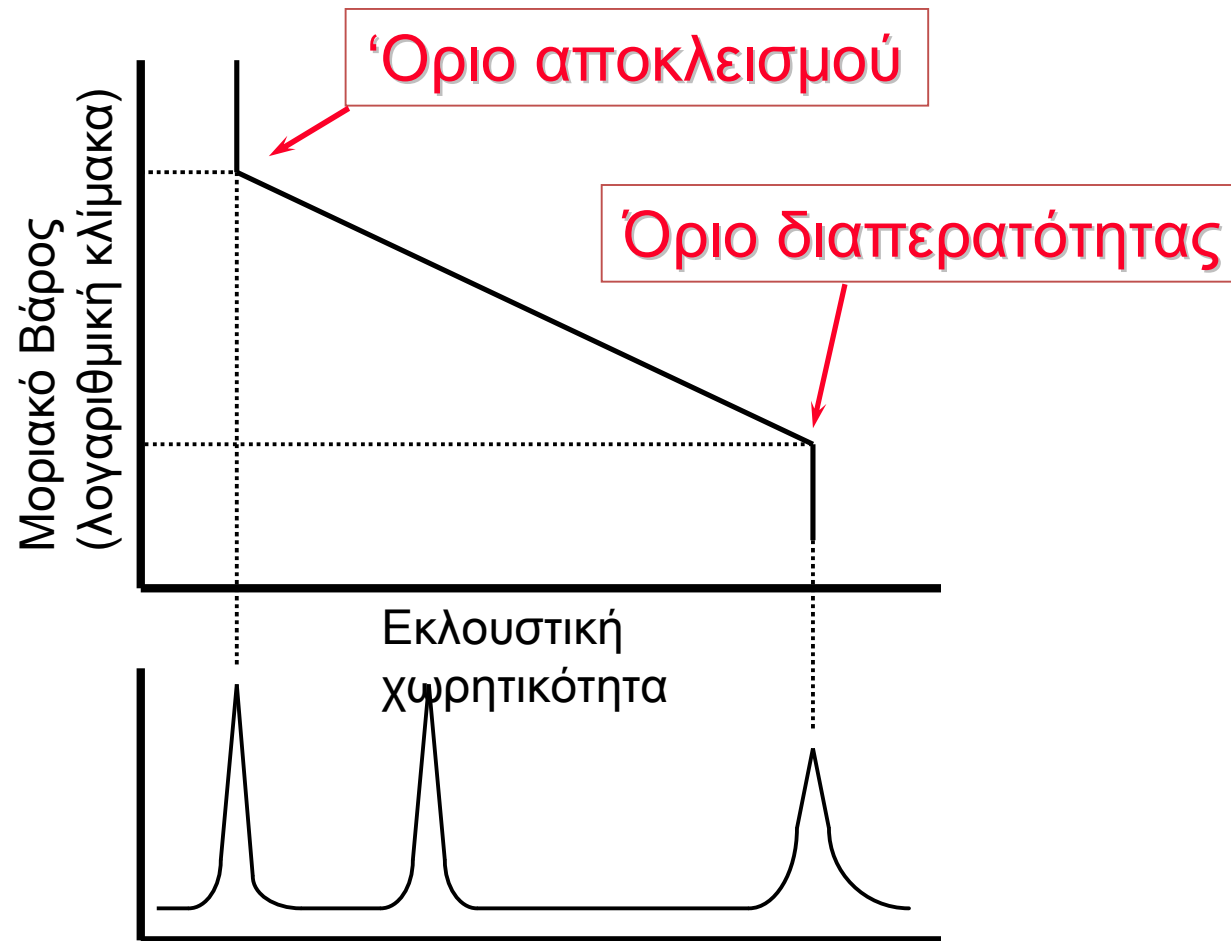
Ανάλογα με το επίπεδο διάστασης, μερικά ιόντα ασθενών οξέων μπορούν να εισέλθουν στον πόρο.

# Αρχή Χρωματογραφίας Αποκλεισμού Μεγέθους

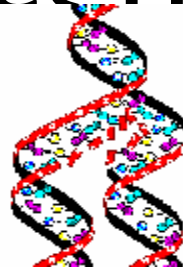


Το μέγεθος των μορίων του  
συστατικού καθορίζει εάν μπορεί να  
εισέλθει στους πόρους.

# Σχέση μεταξύ μοριακού βάρους και χρόνου ανάσχεσης στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

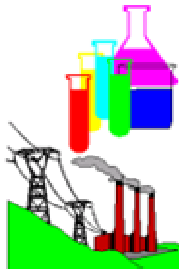


# Εφαρμογές HPLC



## Βιοεπιστήμες

πρωτεΐνες  
πεπτίδια  
νουκλεοτίδια



## Χημικές

πολυστυρένια  
χρωστικές  
Φθαλικοί  
εστέρες



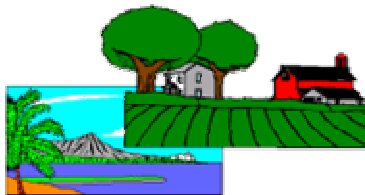
## Φαρμακευτικές

τετρακυκλίνες  
κορτικοστεροειδή  
αντικαταθληπτικά  
βαρβιτουρικά



## Καταναλωτικά προϊόντα

Λιπίδια  
Αντιοξειδωτικά  
Σάκχαρα



## Περιβαλλοντικές

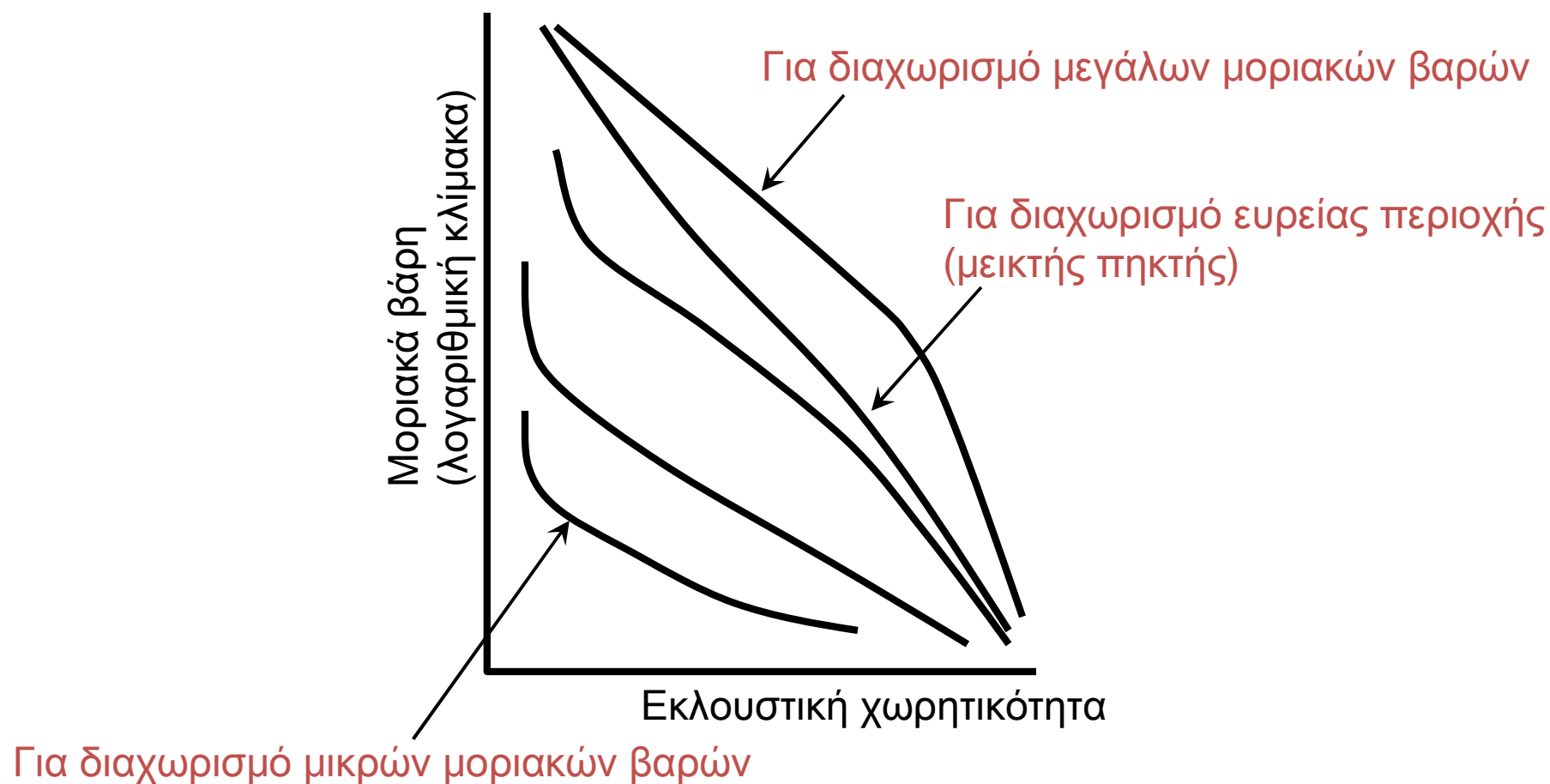
Πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες  
Ανόργανα ιόντα  
Ζιζανιοκτόνα



## Κλινικές

Αμινοξέα  
Βιταμίνες  
Ομοκυστεΐνη

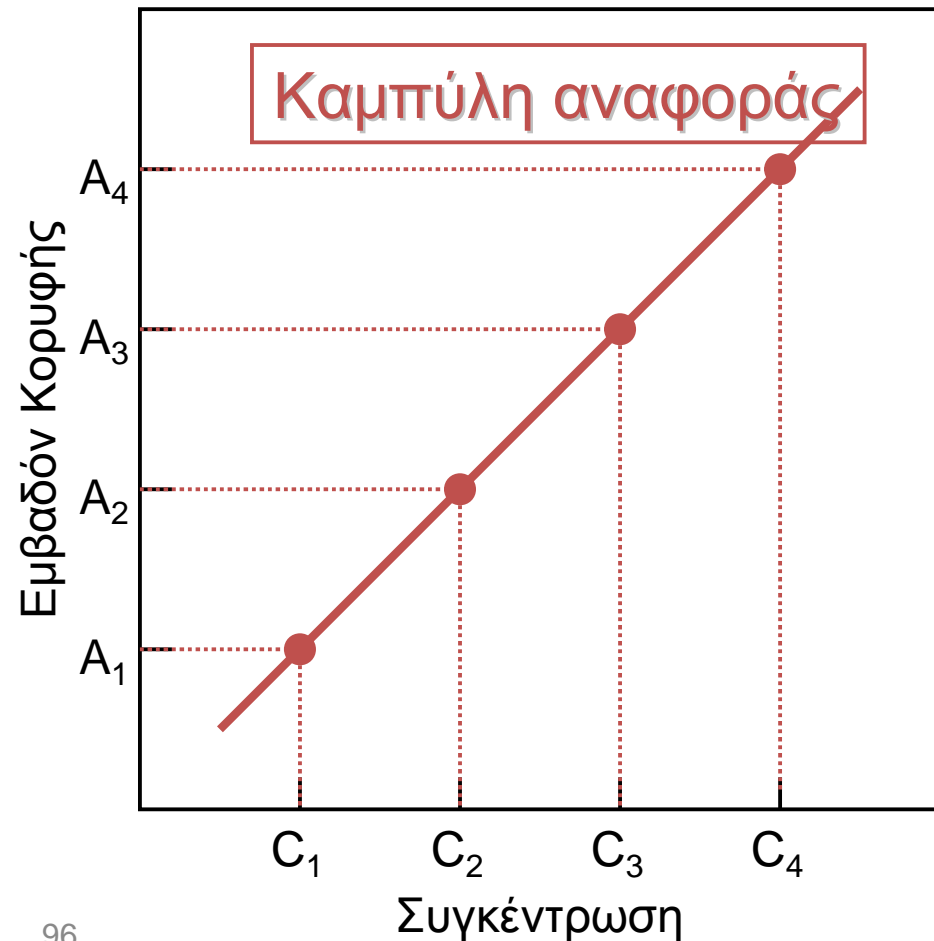
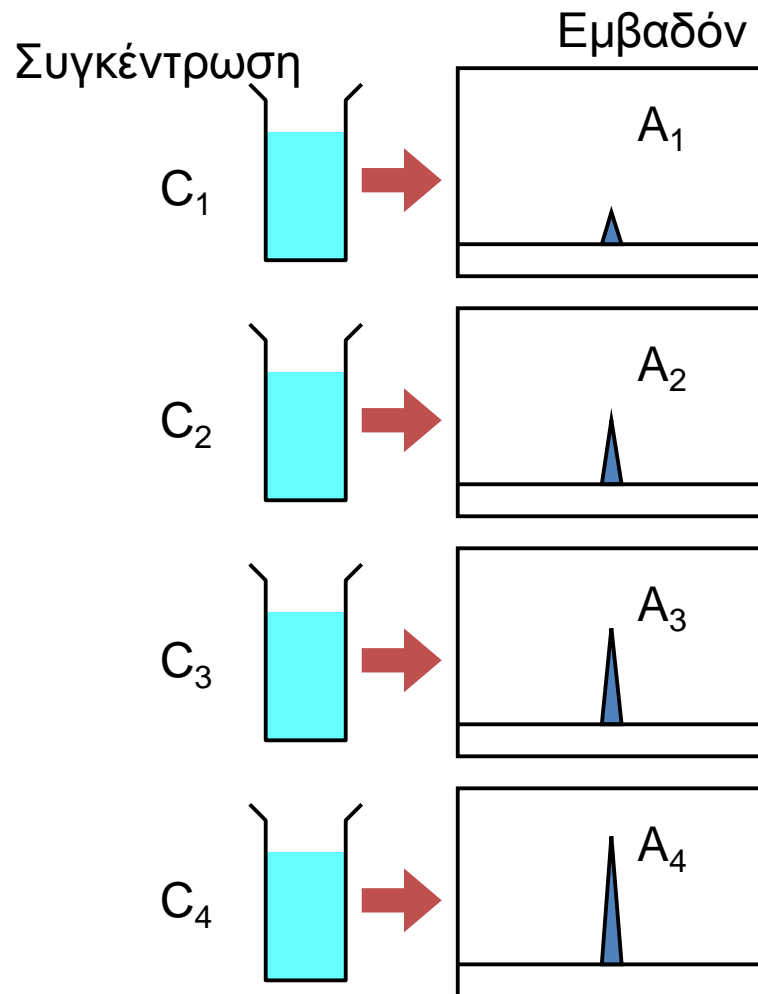
# Κατασκευή Καμπύλης Αναφοράς Μοριακών Βαρών



# Ποσοτική Ανάλυση με HPLC

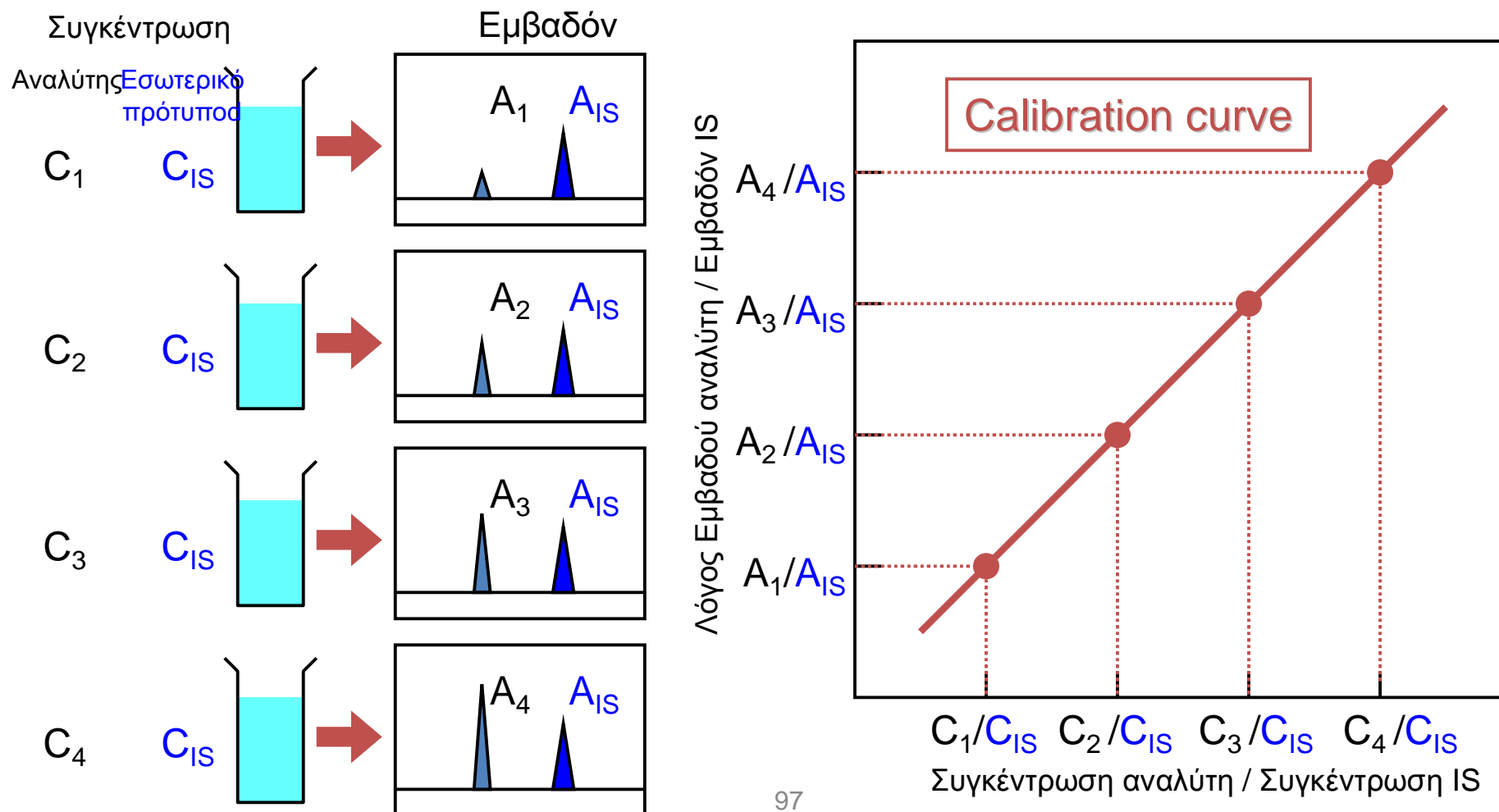
- Χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι που αναφέρθηκαν στην GLC:
  - Καμπύλης αναφοράς
  - Εσωτερικού προτύπου
  - Ενός σημείου
  - Κανονικοποίησης (χρήση σχετικής επιφάνειας κορυφών).

# Καμπύλη Αναφοράς για μέθοδο πολλαπλών εξωτερικών προτύπων



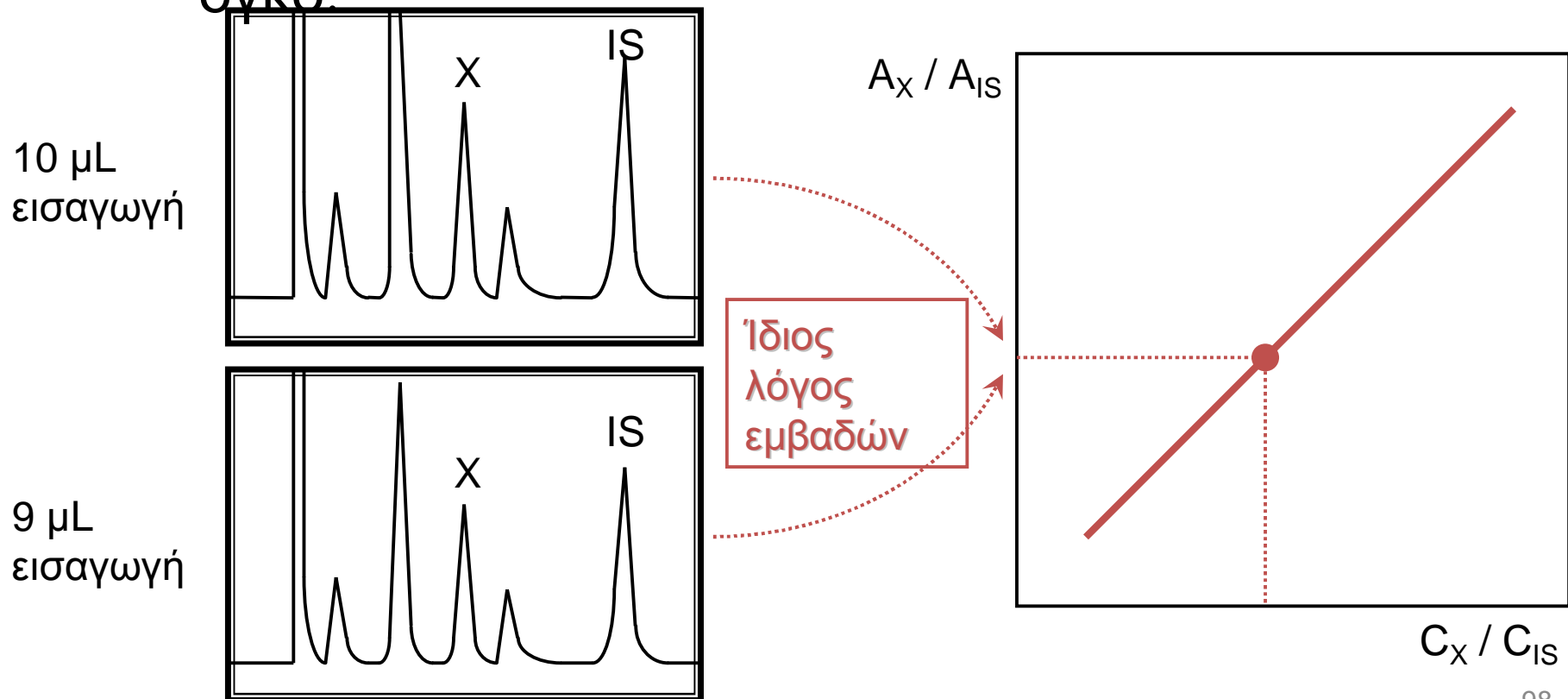


# Καμπύλη αναφοράς για μέθοδο εσωτερικού προτύπου



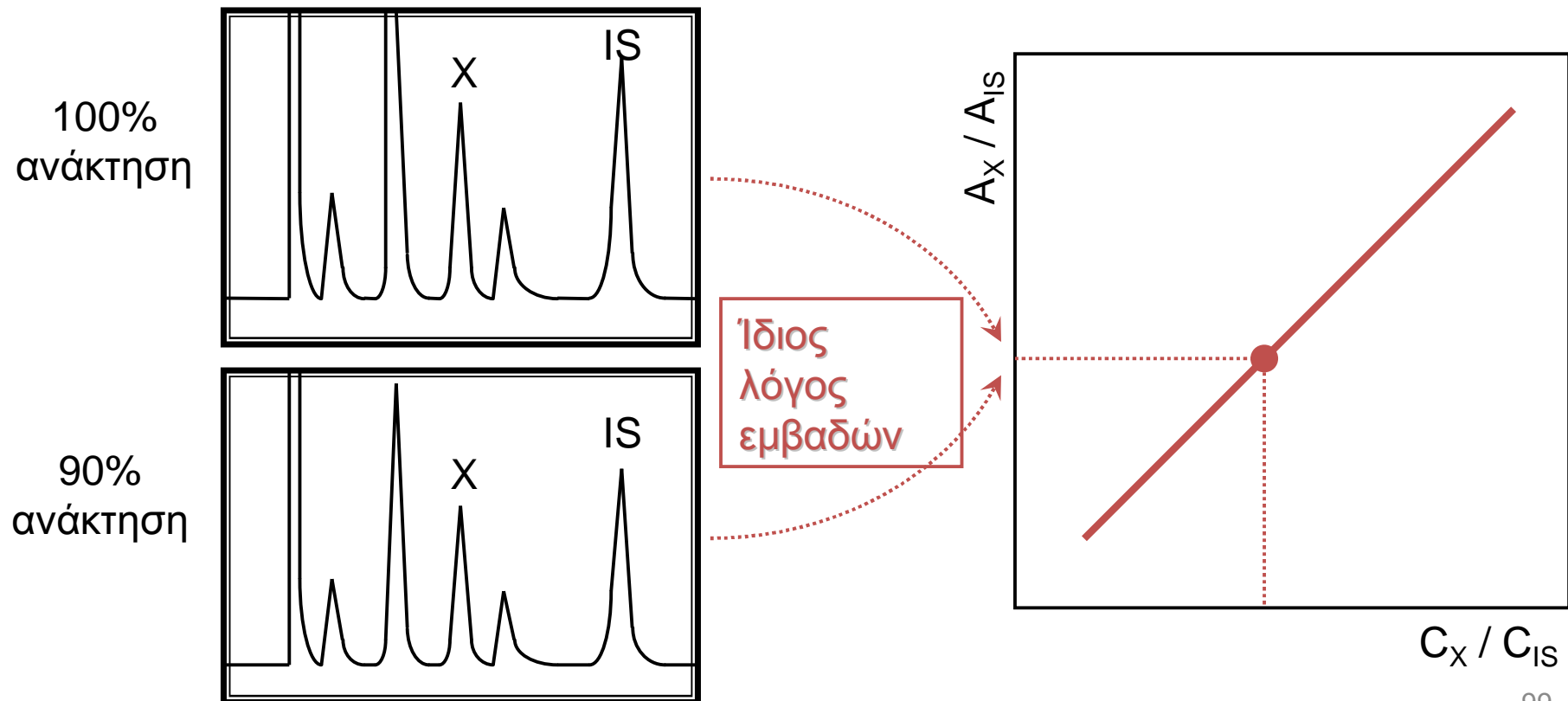
# Πλεονεκτήματα Μεθόδου Εσωτερικού Προτύπου (1)

- Ανεπηρέαστη από μη αναπαραγώγιμο εισαγόμενο όγκο.



# Πλεονεκτήματα Μεθόδου Εσωτερικού Προτύπου (2)

- Ανεπηρέαστη από διαφορές στην ανάκτηση αναλύτη κατά την προκατεργασία.



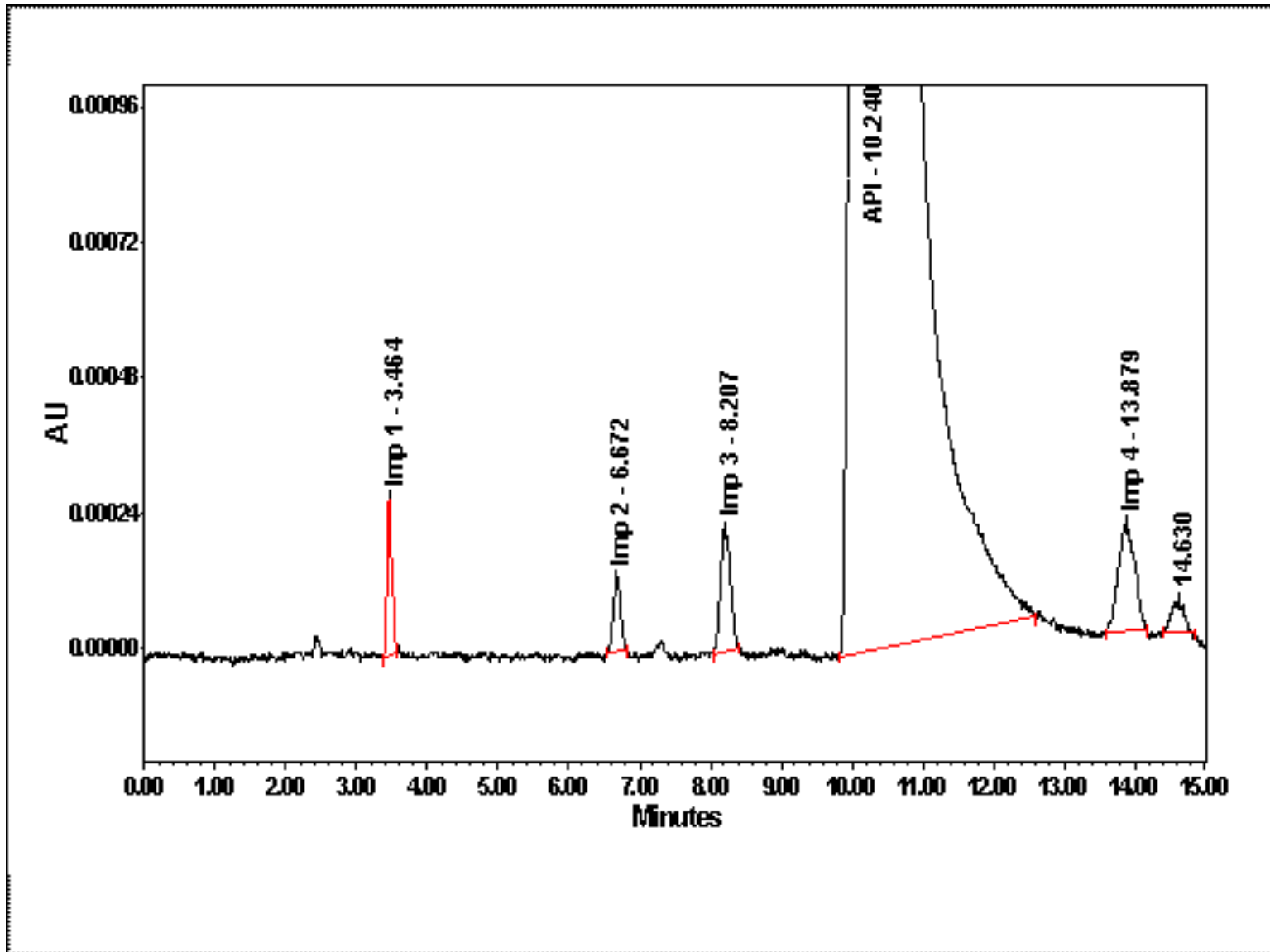
# Μέθοδος Ενός Προτύπου (Εξωτερικού ή Εσωτερικού Προτύπου)

- Για αναλύσεις ρουτίνας
- Προϋπόθεση η καμπύλη αναφοράς να είναι γραμμική και να διέρχεται στατιστικά από το μηδέν
- Το χρησιμοποιούμενο μοναδικό πρότυπο να είναι όσο το δυνατόν πλησιέστερα προς τα αναμενόμενα άγνωστα

$$C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s \text{ — } \textit{για μέθοδο εξωτερικού προτύπου}$$

$$C_x = \frac{A_x / A_{IS}}{A_s / A_{IS}} \times C_s \text{ — } \textit{για μέθοδο εσωτερικού προτύπου}$$

# Μέθοδος Κανονικοποίησης (1)

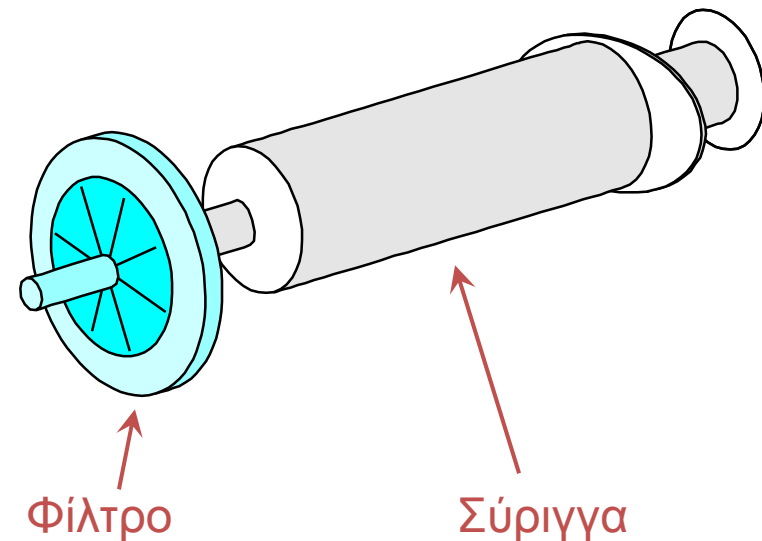


# Μέθοδος Κανονικοποίησης (2)

Impurity	≈ RT (min)	≈ RRT	% Area	Molecular ion	Fragment ions
Bosentan	25.25	1.00	51.77	552.5 (M+H) <sup>+</sup>	508.1 311.3 280.4 202.2
Impurity A	19.32	0.77	0.39	488.4 (M-H) <sup>+</sup>	197.3
Impurity B	20.87	0.83	0.58	426.2 (M-H) <sup>+</sup>	197.5 173.0
Impurity C	24.38	0.97	0.28	594.3 (M-H) <sup>+</sup>	No diagnostic fragments
Impurity D	25.78	1.02	46.98	508.4 (M+H) <sup>+</sup>	311.4 280.4 202.2

# Καθαρισμός Δείγματος με Διήθηση και Φυγοκέντριση

- Γενικά, διηθήστε κάθε δείγμα πριν την εισαγωγή!
- Χρησιμοποιείτε μιας χρήσεως φίλτρο με διάμετρο πόρων περίπου  $0.45 \mu\text{m}$ .
- Φυγοκεντρικός διαχωρισμός για δείγματα δύσκολα προς διήθηση.



# Καθαρισμός Δείγματος με Εκχύλιση Στερεής Φάσης

