

Αεριοχρωματογραφία

Τεχνικές Διαχωρισμού
Δρ. Μάριος Κωστάκης

1

Θεωρία Διαχωρισμού

Επανάληψη

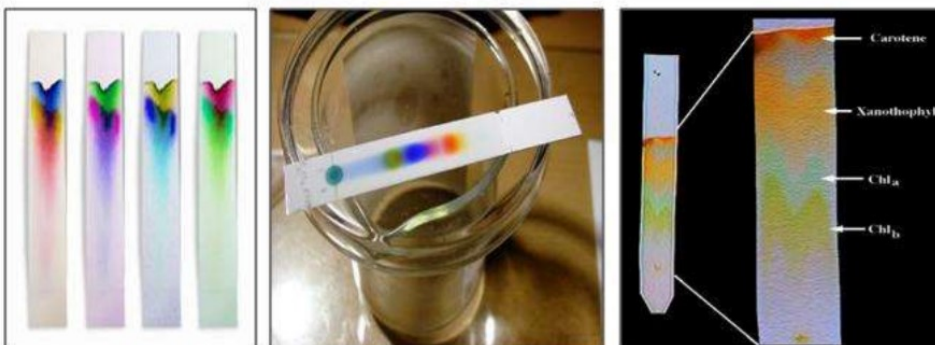
2

Εισαγωγή-Ιστορικά Στοιχεία

3

Ιστορικά Στοιχεία

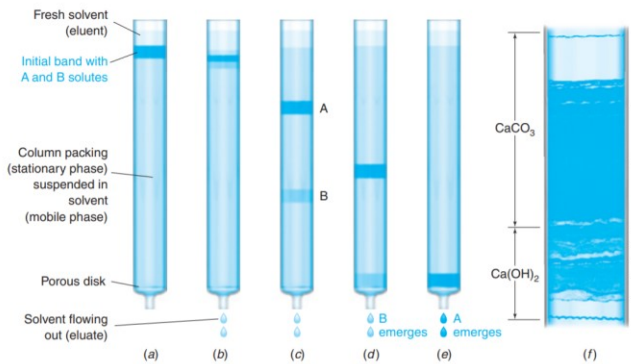
- 1906, ο Ρώσος Mikhail Tswett, χρησιμοποίησε τη χρωματογραφία (χάρτου) για να διαχωρίσει φυτικές χρωστικές, και από αυτό έλαβε το όνομα χρωματογραφία (χρώμα + γράφω)



4

Εισαγωγικά

- Ο όρος χρωματογραφία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση συστατικών ενός μίγματος.
- Τα συστατικά αυτά κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, η μία είναι η στατική φάση (stationary phase), ενώ η άλλη είναι η κινητή φάση (mobile phase) που κινείται με συγκεκριμένη κατεύθυνση.
- Η διεργασία της χρωματογραφίας λαμβάνει χώρα λόγω της διαφοράς στην σταθερά κατανομής των ανεξάρτητων συστατικών του δείγματος.
- Τα μόρια τα οποία έχουν συγγένεια με την κινητή φάση εκκλύονται ταχύτερα ενώ αυτά που έχουν συγγένεια με την στατική εκκλύονται βραδύτερα.



5

Εισαγωγικά

- Η χρωματογραφία διαχωρίζεται ανάλογα:
- **Με το είδος της κινητής φάσης**
- **Υγροχρωματογραφία** (Liquid Chromatography, LC): υγρή κινητή φάση
- **Αεριοχρωματογραφία** (Gas Chromatography, GC): Αέρια κινητή φάση
- **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** από το λεξικό χημικών όρων:
- *Liquid chromatography: υγροχρωματογραφία, χρωματογραφία υγρής φάσης. Γενικός όρος όλων των χρωματογραφικών τεχνικών στις οποίες η κινητή φάση είναι ένα υγρό. Η απόδοση «υγρή χρωματογραφία» όπως και τα παράγωγά της (π.χ. υγρός χρωματογράφος, υγρό χρωματογράφημα) θα πρέπει να αποφεύγονται. Ο όρος liquid chromatography (LC) είναι πλέον ο συνιστώμενος στη θέση του high performance liquid chromatography (HPLC).*

6

Εισαγωγικά

- Η χρωματογραφία διαχωρίζεται ανάλογα:
- **Με το είδος της στατιστικής φάσης:**
- **Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας**, (Thin layer chromatography, TLC): Λεπτή στιβάδα που στηρίζεται σε πλάκες από γυαλί ή πλαστικό ή αλουμίνιο.
- **Χρωματογραφία Χάρτου** (Paper Chromatography, PC): Η στατική φάση (υγρό) δεσμεύεται στο χαρτί (κυτταρίνη) που είναι το υλικό στήριξης.
- **Χρωματογραφία Στήλης** (Column chromatography, CC): Η στατική φάση είναι μία στήλη που είναι πακεταρισμένη με το πληρωτικό υλικό που είναι η στατική φάση.

7

Εισαγωγικά

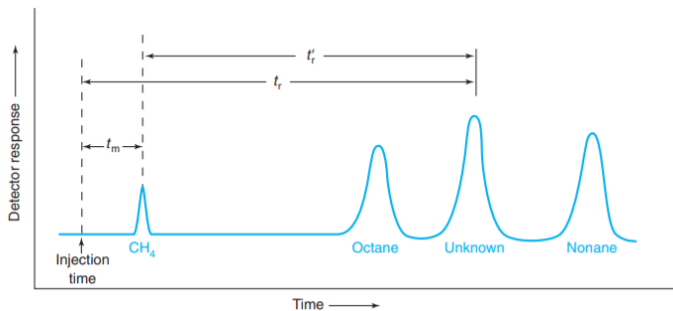
- Η χρωματογραφία διαχωρίζεται ανάλογα:
- **Με το είδος της διαχωρισμού:**
- **Χρωματογραφία Προσρόφησης** (Adsorption chromatography)
- **Χρωματογραφία Κατανομής** (Partition chromatography)
- **Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής** (Ion exchange chromatography)
- **Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού** (Molecular exclusion Chromatography)
- **Χρωματογραφία Συγγένειας** (Affinity chromatography)

8

Στοιχεία θεωρίας των διαχωρισμών

9

Στοιχεία Διαχωρισμών

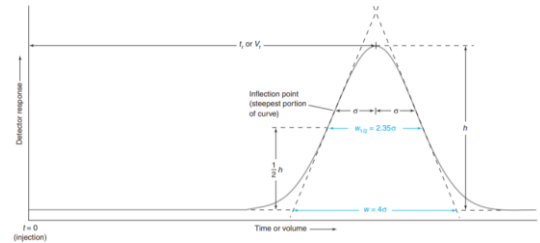


- t_r = χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης, ο χρόνος που χρειάζεται μία ένωση από τη στιγμή που εισάγεται στο χρωματογράφο μέχρι να φτάσει στον ανιχνευτή
- t_m = νεκρός χρόνος, ο χρόνος που χρειάζεται μία ένωση που **δεν κατακρατείται** να εξέλθει της στήλης.
- $t'_r = t_r - t_m$, ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης, ο χρόνος που χρειάζεται να μετακινηθεί μία ένωση στη χρωματογραφική στήλη.
- F : ταχύτητα ροής (mL/min)
- Όγκος Ανάσχεσης $V_r = t_r \times F$

10

Απόδοση διαχωρισμού

- **Θεωρία πλακών:** Μία χρωματογραφική στήλη διαιρείται κατά μήκος σε διαχωριζόμενες ζώνες, κάθε ζώνη έχει τέτοιο μήκος ώστε εντός αυτής να υπάρχει ισορροπία μεταξύ στατικής και κινητής φάσης.
- Ο όρος **πλάκα** προέκυψε από την θεωρία της απόσταξης
- **H:** ύψος πλάκας
- **L:** μήκος στήλης
- **N:** Αριθμός Πλακών σε μία στήλη
- Με απλά λόγια: όσο πιο στενή είναι η κορυφή, τόσο μικρότερο το εύρος, τόσο μεγαλύτερος ο αριθμός θεωρητικών πλακών.



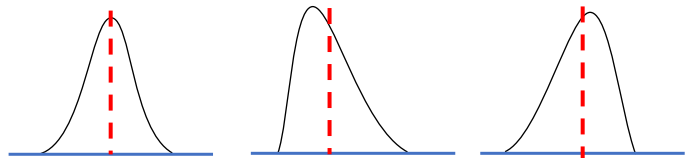
$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad \text{ή} \quad N = 5,55 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

11

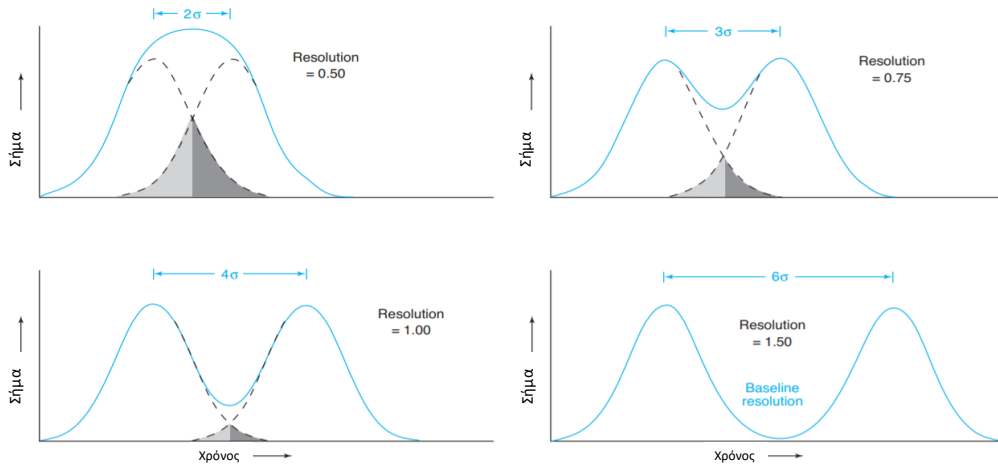
Είναι όλες οι κορυφές ιδανικές;

- Φυσικά και όχι!
- Καμία κορυφή δεν είναι ιδανική, οι κορυφές διευρύνονται
- Η συμμετρία της κορυφής πολύ σπάνια είναι η ιδανική (κατανομή Gauss)
- Ο λόγος είναι τα φυσικοχημικά φαινόμενα που συμβαίνουν μέσα στη στήλη κατά τη διαδικασία διαχωρισμού των ενώσεων.



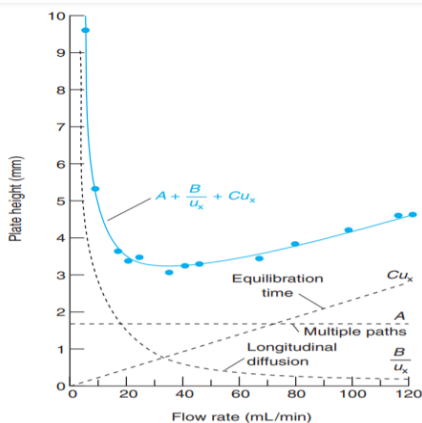
12

Διαχωριστικότητα, Resolution, Rs



13

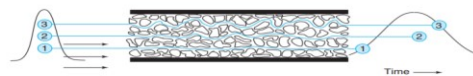
Γιατί διευρύνονται οι κορυφές;



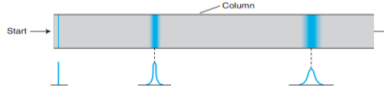
• Εξίσωση Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u_x} + Cu_x$$

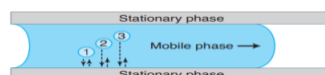
- A: Πολλαπλότητας διαδρομών



- B/u: Διαμήκης διάχυσης



- Cu: μεταφοράς μάζας



14

Βασικά στοιχεία διαχωρισμού

- Χρόνος ανάσχεσης: **Ταυτοποίηση**
- Μια κορυφή ταυτοποιείται όταν ο χρόνος έκλουσης του προτύπου ταυτίζεται με το χρόνο έκλουσης στο δείγμα (δεν είναι όμως απόλυτο)
- Εμβαδόν κορυφής ή ύψος κορυφής: **Ποσοτικοποίηση**
- Η ποσότητα της ουσίας προσδιορίζεται σε σχέση με το εμβαδόν κορυφής του προτύπου με το δείγμα (είτε απλή σύγκριση είτε μέσω καμπύλης βαθμονόμησης)

15

Αεριοχρωματογραφία

Ποιες οι διαφορές σε σχέση με την υγροχρωματογραφία;

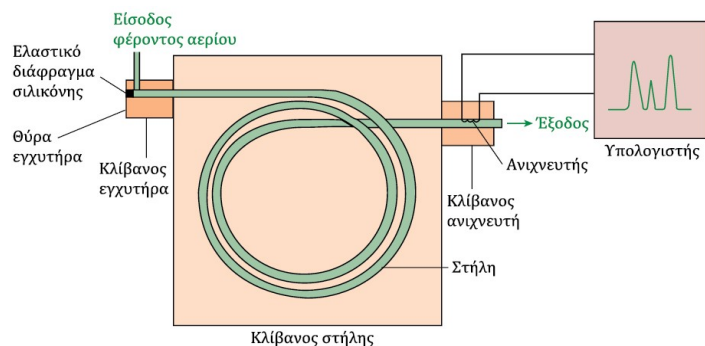
16

Αεριοχρωματογραφία

- **Στατική Φάση:** Στερεή ή Υγρή
- **Κινητή Φάση:** Αέρια (συνήθως He, αλλά και H₂ ή πιο σπάνια N₂)
- Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πτητικών ενώσεων
- **Εφαρμογές:**
 - Μεγάλη εφαρμογή στον προσδιορισμό ρύπων (PCBs, PAHs, VOCs κλπ)
 - Εφαρμογή στον προσδιορισμό λιπαρών οξέων
 - Προσδιορισμός Διοξινών

17

Τμήματα Αεριοχρωματογραφίας



18

Τμήματα Αεριοχρωματογραφίας

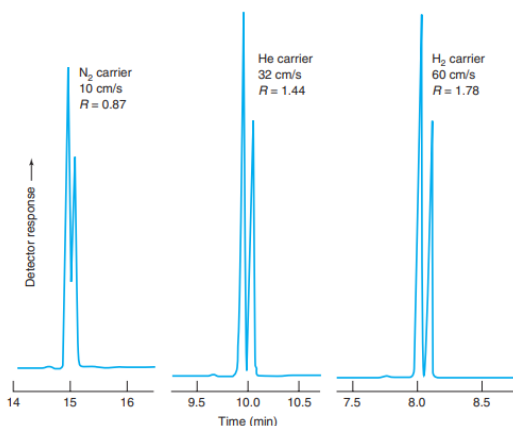


19

Αεριοχρωματογραφία

- **Στατική Φάση:** Στερεή ή Υγρή
- **Κινητή Φάση:** Αέρια (συνήθως He)
- Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πτητικών ενώσεων
- **Εφαρμογές:**
 - Μεγάλη εφαρμογή στον προσδιορισμό ρύπων (PCBs, PAHs, VOCs κλπ)
 - Εφαρμογή στον προσδιορισμό λιπαρών οξέων

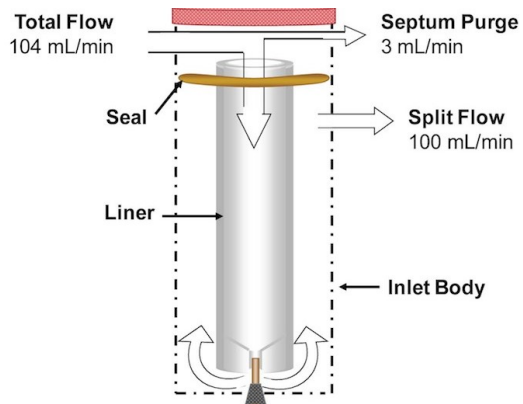
20



Κινητή Φάση – Φέρον Αέριο (Carrier Gas)

- Τα πιο κοινά φέροντα αερία είναι το **N₂**, **He**, **H₂**.
- Το **Ήλιο (He)** είναι το πιο κοινό φέρον αέριο και συμβατό με τους περισσότερους ανιχνευτές.
- Το **Υδρογόνο (H₂)** παρέχει ταχύτερους διαχωρισμούς αλλά έχει τον κίνδυνο της έκρηξης
- Το **Άζωτο (N₂)** είναι φθηνό και άμεσα διαθέσιμο αλλά οι διαχωρισμοί είναι λιγότερο ικανοποιητικοί.

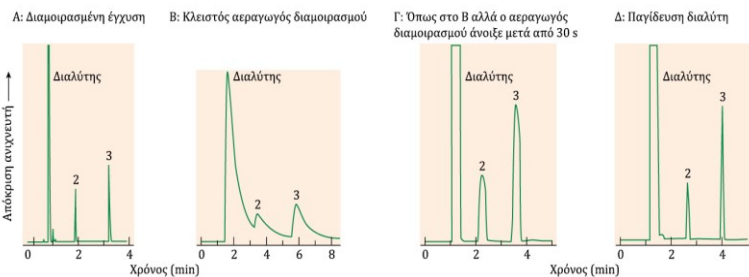
21



Εισαγωγέας Δείγματος

- Το δείγμα εισάγεται με σε ένα θερμαινόμενο μεταλλικό μπλοκ που πωματίζεται με ένα ελαστικό διάφραγμα (**septum**).
- Το δείγμα εισάγεται και λόγω θέρμανσης εξατμίζεται και με τη βοήθεια του φέροντος αερίου εισάγεται στη στήλη.
- Μετά την εισαγωγή στη στήλη το διάλυμα υγροποιείται λόγω διαφοράς της θερμοκρασίας
- Ο εισαγωγέας πρέπει να είναι τουλάχιστον 50°C πάνω από την σημείο ζέσης της λιγότερο πτητικής ένωσης.
- Το **septum** λόγω υψηλής θερμοκρασίας μπορεί να εκλύσει ενώσεις που να εισέλθουν στην στήλη δίνοντας «ghost» κορυφές, γι' αυτό μικρή ροή αερίου (~3 mL/min) διέρχεται κάτω από το septum (septum purge).

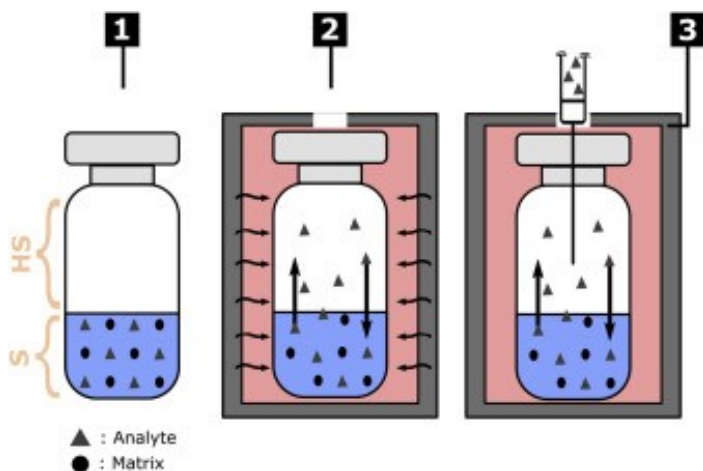
22



Τεχνικές Εισαγωγής Δείγματος

- **Διαμοιρασμός δείγματος**
- **Split Injection:** Εισαγωγή μικρών ποσοτήτων δείγματος, κυρίως σε ρουτίνα
- **Splitless Injection:** ιδανικό για προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων
- **On Column Injection:** κυρίως για θερμικά ασταθείς ενώσεις.
- **Πως υπολογίζεται η τελική ροή του φέροντος αερίου;**

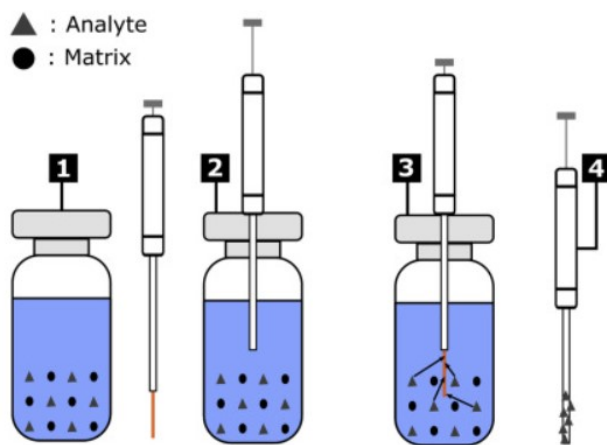
25



Εναλλακτικοί Τρόποι - Headspace

- **VOC (Volatile Compounds):** κάθε ένωση με σημείο ζέσης μικρότερο των 180°C.
- **Headspace:** Τεχνική εισαγωγής της υπερκείμενης φάσης.
- Το δείγμα λαμβάνεται από την αέρια υπερκείμενη φάση με ειδική μικροσύριγγα αερίων.
- 1. Το δείγμα εισάγεται σε ειδικά φιαλίδια με ειδικό πώμα για να μην διαφεύγουν τα αέρια.
- 2. Το φιαλίδιο θερμαίνεται και αναδεύεται ώστε τα συστατικά του να μεταφερθούν στην αέρια φάση.
- 3. Το δείγμα λαμβάνεται με την μικροσύριγγα από την αέρια φάση.

26

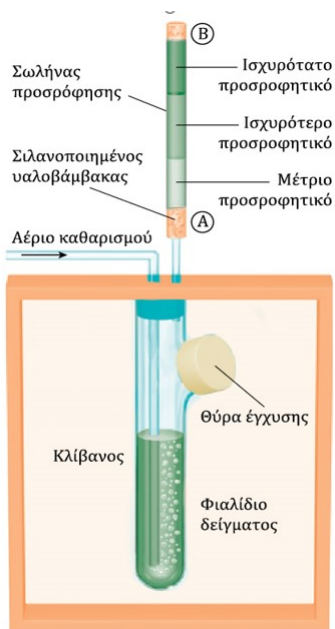


Εναλλακτικοί Τρόποι - SPME

- Αποτελεί μια παραλλαγή της SPE σε μικροκλίμακα.

1. Ειδική σύριγγα με μία ινα εμβαπτίζεται στο δείγμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.
2. Οι ενώσεις προσροφούνται στην ίνα.
3. Η σύριγγα εισάγεται στον αεριοχρωματογράφο και οι ενώσεις εκροφούνται θερμικά από την ίνα και οδηγούνται στη στήλη.

27



Εναλλακτικοί Τρόποι - Purge and Trap

- Παραλλαγή του headspace με την διαφορά ότι στο φιαλίδιο εισάγεται αδρανές αέριο, εξαναγκάζοντας τις ενώσεις να μεταφερθούν στην αέρια και σε μια παγίδα με προσροφητικό υλικό όπου κατακρατούνται.
- Η παγίδα θερμαίνεται και οι ενώσεις εκροφούνται και οδηγούνται στη στήλη.

28



Στατιστικές φάσεις - Στήλες

• Πακεταρισμένες Στήλες:

- Συνήθως από ανοξείδωτο ατσάλι
- Εσωτερική διάμετρο **2-4 mm** ID και μήκος **1-4 m**
- Όχι μεγάλο μήκος λόγω πτώσεις πίεσης κατά μήκος στήλης
- Κυρίως για ανάλυση αερίων
- Διεύρυνση κορυφών

• Τριχοειδείς Στήλες:

- Εσωτερική διάμετρος **0,10-0,53 mm** ID και μήκος **10-100 m**.
- Ανοικτός σωλήνας με επικάλυψη των εσωτερικών τοιχωμάτων της στήλης
- Πολύ καλοί διαχωρισμοί
- Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στήλες

29

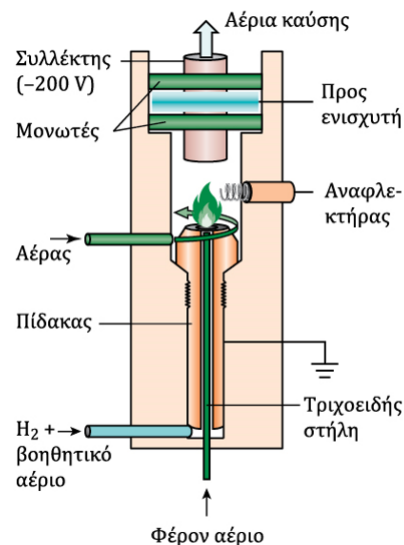
Ανιχνευτές

- Υψηλή σταθερότητα και ανααγωγιμότητα σε σχέση με το θόρυβο και το χρόνο
- Ευαισθησία ($\Delta \text{Response} / \Delta C$)
- Εκλεκτικότητα
- Γραμμική Απόκριση
- Θερμοκρασία λειτουργίας έως 400°C
- Χρόνος απόκρισης σε σχέση με την ταχύτητα ροής
- Μη καταστρεπτικός
- Αξιοπιστία και ευκολία χρήσης

30

Ανιχνευτές – Ιοντισμού Φλόγας (FID)

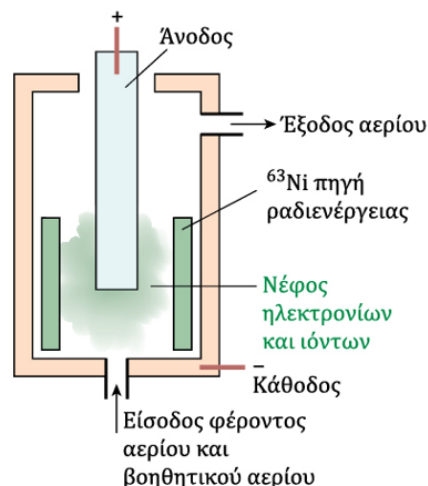
- Το έκλουσμα καίγεται σε φλόγα υδρογόνου – αέρα. Τα άτομα άνθρακα παράγουν ρίζες CH. Καταγράφεται το ρεύμα που παράγεται από ένα ηλεκτρόδιο και είναι ανάλογο των ατόμων άνθρακα στο έκλουσμα.
- Μεγάλη γραμμική περιοχή
- Το N_2 δίνει καλύτερα όρια ανίχνευσης, για το λόγω αυτό χρησιμοποιείται και ως makeup gas πριν τον ανιχνευτή
- Μεγάλο εύρος γραμμικότητας (10^7)
- Ευρείας χρήσης
- **Πόσα αέρια χρειάζεται ένας GC-FID χρωματογράφος;**



31

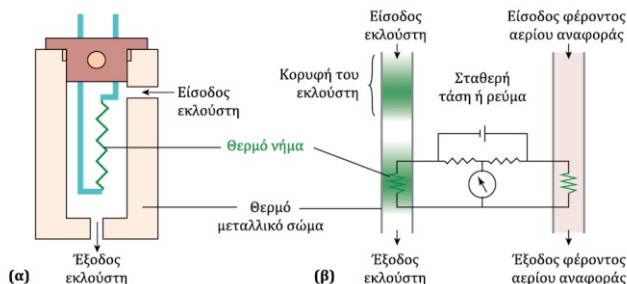
Ανιχνευτές – Σύλληψης Ηλεκτρονίων (ECD)

- Το έκλουσμα διέρχεται από μία ρεύμα ηλεκτρονίων που παράγεται από μία πηγή με ραδιενεργό ^{63}Ni . Οι ενώσεις που περιέχουν ηλεκτραρνητικές ομάδες, προσλαμβάνουν τα ηλεκτρόνια μειώνοντας το ρεύμα. Καταγράφονται οι αυξομειώσεις του σήματος ένα ηλεκτρόδιο. Χρησιμοποιείται κυρίως για αλογονομένες ενώσεις.
- Μικρή γραμμική περιοχή (10^2)
- Ευαίσθητος σε επιμολύνσεις και υγρασία.
- Μεγάλη ευαισθησία σε αλογονομένες ενώσεις με όρια ανίχνευσης που συγκρίνονται με την φασματομετρία μάζας!
- Μικρότερη ευαισθησία σε αμίνες, αλκοόλες και υδρογονάνθρακες).



32

Ανιχνευτές – Θερμικής Αγωγιμότητας (TCD)



- Βασίζεται στην μεταβολή της θερμικής αγωγιμότητας του ρεύματος αερίου που οφείλεται στις ενώσεις που εκλύονται.
- Μεγάλη γραμμική περιοχή (10^5)
- H_2 και He δίνουν βελτιωμένα όρια ανίχνευσης.

33

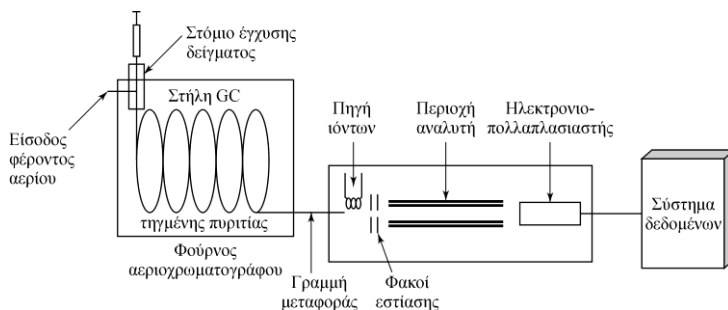
Άλλοι Ανιχνευτές

- **Ανιχνευτής με Φωτοϊονισμό (PID):** αποκρίνεται κυρίως σε ενώσεις που έχουν αρωματικό δακτύλιο, με χρήση μίας λάμπας UV.
- **Φωτομετρικός Ανιχνευτής Φλόγας (FPD):** Μέτρησης ακτινοβολίας που παράγεται από την καύση ενώσεων S και P.
- **Φασματόμετρο Μάζας (MS):** Ο πλέον χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής. Αφορά τις επόμενες ενότητες. Χρήση ως συζευγμένες τεχνικές (hyphenated techniques).

34

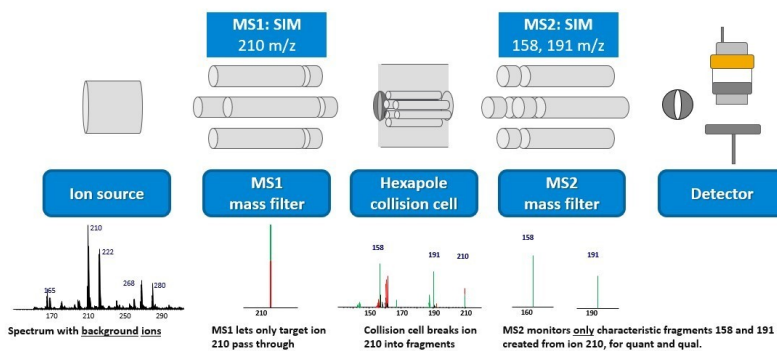
GC-MS

- Συζευγμένη Τεχνική
- Μέσω μίας γραμμής μεταφοράς το αέριο εισέρχεται στο φασματόμετρο μαζών
- Διέρχεται από την πηγή ιοντισμού (Electron Ionization ή Chemical Ionization)
- Τα Ιόντα που δημιουργούνται προχωράνε στο φασματόμετρο μαζών



35

GC-MS/MS



36