

## 4.4.3 Η χρωματογραφία στήλης.

### Γενικές αρχές

Ιστορικά, είναι η χρωματογραφία στήλης η πρώτη χρωματογραφική μέθοδος που εφαρμόστηκε. Πάνω σε αυτή στηρίχτηκαν οι μεταγενέστερες δηλαδή η χρωματογραφία χάρτι, και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, TLC. Εδώ και αρκετά χρόνια εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης είναι η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία, (HPLC), που είναι σήμερα η πιο συχνά εφαρμοζόμενη χρωματογραφική τεχνική. Όλες αυτές αποτελούν την λεγόμενη *υγρή χρωματογραφία*, μια και σε όλες η κινητή φάση είναι ένα υγρό.

Ας δούμε πάλι τα βασικά χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης. Έτσι:

Η **στατική φάση** μπορεί να είναι ένα στερεό σε λεπτό διαμερισμό, ξηρό, ίδιο με εκείνο που χρησιμοποιείται στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (πηκτή διοξειδίου του πυριτίου, αλουμίνα, κυτταρίνη κλπ). Μπορεί όμως να είναι και ένα υγρό κατάλληλα καθηλωμένο σε ένα στερεό φορέα, όπως στην περίπτωση της χρωματογραφίας χάρτου. Η στατική αυτή φάση θα γεμίσει τη στήλη (απ' όπου και η ονομασία *πληρωτικό υλικό*) που θα χρησιμοποιηθεί για τις χρωματογραφήσεις

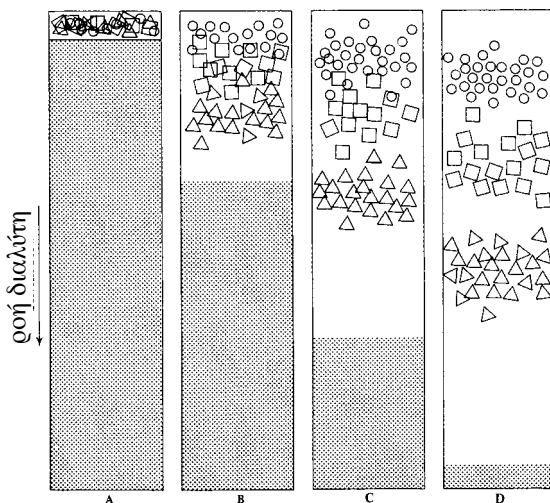
Η **κινητή φάση** δηλαδή ένας ή περισσότεροι διαλύτες με τους οποίους θα γίνει η έκλυση, είναι ίδιοι με εκείνους που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Η κινητή αυτή φάση «παρασύρει» τα διάφορα συστατικά του δείγματος τα οποία προσροφώνται και στη συνέχεια εκροφώνται από τη στατική φάση. Οι διάφοροι διαλύτες έχουν καταταγεί με βάση την *ισχύ έκλυσης* του καθενός για κάθε στερεή φάση.

Ο **μηχανισμός** με τον οποίο γίνεται ο διαχωρισμός εξαρτάται από τη στατική φάση. Συγκεκριμένα, αν είναι στερεή τότε γίνεται προσρόφηση τόσο των συστατικών του δείγματος όσο και των μορίων του διαλύτη από την επιφάνεια των κόκκων. Κατά την έκλυση γίνεται εκτόπιση του προσροφημένου συστατικού από τα μόρια του διαλύτη, με διαφορετική βέβαια ταχύτητα για το κάθε συστατικό, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους.

Αν η στατική φάση είναι υγρό κατάλληλα καθηλωμένο στο στερεό στήριξης, τότε ο διαχωρισμός γίνεται με βάση την κατανομή κάθε συστατικού. Εδώ πρόκειται για κατανομή μεταξύ των δύο υγρών, εκείνου που με μορφή λεπτής στιβάδας περιβάλλει το στερεό φορέα (συνήθως νερό ή άλλο πολικού χαρακτήρα υγρό) και του διαλύτη της κινητής φάσης που είναι οργανικός χαμηλής πολικότητας.

Το δείγμα τοποθετείται στην κορυφή της στήλης ή διαλύεται μέσα στην κινητή φάση. Αυτή κατέρχεται κατά μήκος της στήλης είτε με τη βαρύτητα είτε με τη χρήση αντλιών χαμηλής πίεσης. Η διάρκεια του διαχωρισμού εξαρτάται όπως είναι φυσικό από το μέγεθος των κόκκων του πληρωτικού υλικού, όπως λέγεται η στατική φάση. Επίσης εξαρτάται από τη διάμετρο της στήλης και η ταχύτητα γίνεται μικρότερη, όσο μικρότερη είναι η διάμετρος της στήλης. Γενικά καλύτεροι διαχωρισμοί επιτυγχάνονται όσο μεγαλύτερο μήκος και μικρότερη διάμετρο έχει η στήλη.

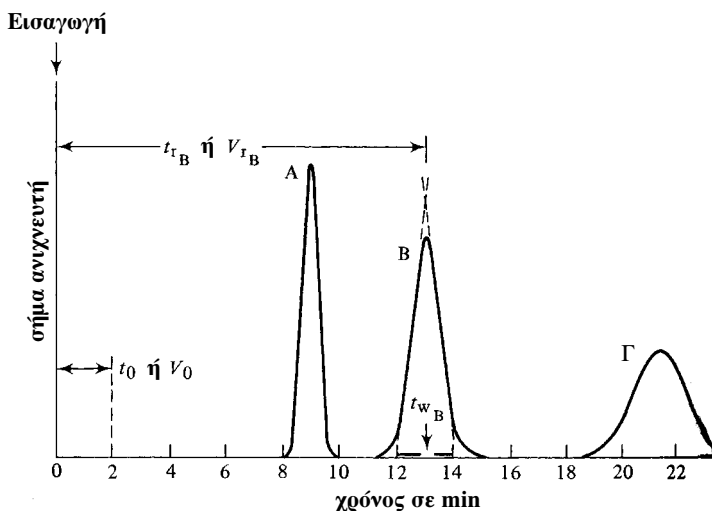
Το σχήμα 4.23 βοηθάει στην κατανόηση των αναφερθέντων. Ένα μίγμα από τρία συστατικά εισάγεται στο πάνω μέρος της στήλης που περιέχει τη στατική φάση. Με την έκλουση τα τρία συστατικά διαχωρίζονται ανάλογα με τη «συγγένεια» που έχουν με τη στατική φάση. Προσέξτε και το μέτωπο του διαλύτη.



Σχήμα 4.23: Υποθετικός διαχωρισμός μίγματος τριών συστατικών. Με τις τελείες φαίνεται ο διαλύτης που αντικαθίσταται προοδευτικά. Με τα τρία διαφορετικά γραφικά φαίνονται τα τρία συστατικά.

Στην έξοδο της στήλης μπορούν να συλλέγονται **κλάσματα** ορισμένου όγκου το καθένα, τα οποία με την πρόοδο της έκλουσης περιέχουν το διαλύτη και τα διαχωρισμένα πλέον συστατικά. Τα κλάσματα αυτά μπορούν να αναλύονται με κάποια ενόργανη ανάλυση, ποιοτικά ή και ποσοτικά. Είναι επίσης δυνατόν πριν τη συλλογή του *εκλούσματος* αυτό να περνά μέσα από έναν *ανιχνευτή*, πάλι μια ενόργανη ανάλυση, ο οποίος μετρά μια ιδιότητά του η οποία βέβαια εξαρτάται από το ποιο είναι το συστατικό και ποια είναι η συγκέντρωσή του.

Αν κάποιος κάνει μια γραφική παράσταση που στον άξονα των  $y$  έχει τη συγκέντρωση του κάθε συστατικού στα κλάσματα ή (το ίδιο) την ανταπόκριση του ανιχνευτή και στον άξονα των  $x$  τον όγκο του διαλύτη που έχει περάσει μέχρι την συλλογή του κάθε κλάσματος ή (το ίδιο) το χρόνο που πέρασε από την έναρξη της έκλουσης (με την προϋπόθεση βέβαια σταθερής παροχής ώστε ο όγκος να είναι ανάλογος του χρόνου), το αποτέλεσμα είναι ένα χρωματογράφημα.



Σχήμα 4.24: Ιδανικό χρωματογράφημα του μίγματος των τριών συστατικών του σχήματος 4.21.  $t_0$ =ο χρόνος που κάνει ο διαλύτης να περάσει από τη στήλη,  $t_{RB}$ =χρόνος ανάσχεσης του συστατικού B,  $T_{WB}$ =το πλάτος της κορυφής στη βάση,  $h$  το ύψος της κορυφής

Στο ανωτέρω σχήμα 4.24 φαίνεται ένα χρωματογράφημα που είναι συνέχεια του προηγούμενου σχήματος 4.23. Παρατηρήστε τις κορυφές που αντιστοιχούν στα τρία συστατικά και τους αντίστοιχους όγκους ή καλύτερα χρόνους σε min που τους αντιστοιχούν. Κάθε λοιπόν κορυφή αντιστοιχεί σε ένα συστατικό του οποίου το πρώτο χρωματογραφικό χαρακτηριστικό είναι ο λεγόμενος χρόνος ανάσχεσης,  $t_r$  σε min. Είναι ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή που αρχίζει η έκλουση μέχρι την στιγμή που εμφανίζεται στην έξοδο της στήλης το κάθε συστατικό. Ο χρόνος αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποιοτική ταυτοποίηση των συστατικών. Στο σχήμα σημειώνεται, ενδεικτικά, ο χρόνος ανάσχεσης του συστατικού Β. Και εδώ χρωματογράφηση προτύπων ουσιών στις ίδιες απόλυτα συνθήκες είναι η πιο αξιόπιστη συγκριτική τεχνική. Στα σημερινά όργανα η καταγραφή των χρωματογραφημάτων γίνεται άμεσα, με σύνδεση του ανιχνευτή με ένα καταγραφικό.

Το ύψος της κάθε κορυφής ή το εμβαδόν της καμπύλης κάτω από κάθε κορυφή -που μετρείται με διάφορες τεχνικές- μπορεί να χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό μέσα από καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται με τη χρωματογράφιση, (στις ίδιες συνθήκες), προτύπων ουσιών γνωστών συγκεντρώσεων.

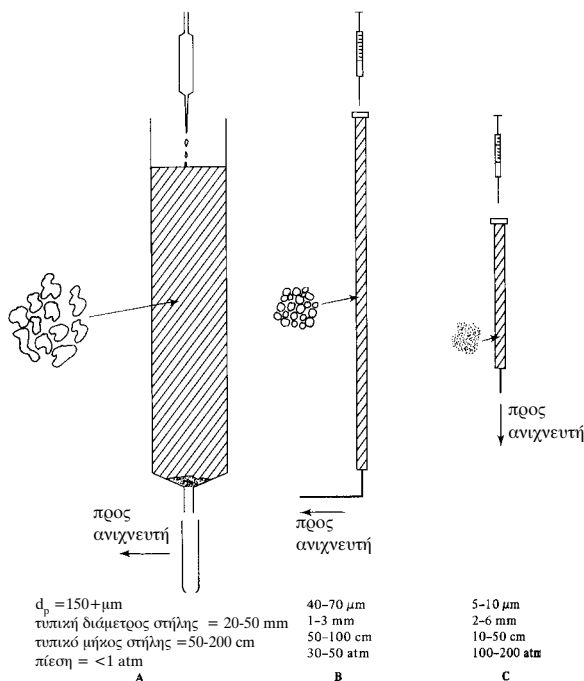
## Η τεχνική της μεθόδου.

Τα όργανα που απαιτούνται για μια κλασική χρωματογραφία ανοικτής, όπως λέγεται, στήλης είναι σχετικά απλά. Το βασικό τμήμα είναι ένας σωλήνας γυάλινος, πλαστικός ή από ανοξείδωτο ατσάλι, συνεχής, χωρίς κενούς χώρους σύνδεσης. Στο εργαστήριο για απλές μετρήσεις ακόμη και μια προχοΐδα είναι ικανοποιητική. Αν ελέγχεται και η θερμοκρασία, ο σωλήνας μπορεί να διαθέτει διπλά τοιχώματα ή να μπαίνει σε προγραμματιζόμενο φούρνο που μπορεί να κρατά σταθερό θερμοκρασιακό περιβάλλον με ακρίβεια  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Οι διαστάσεις της διαμέτρου του σωλήνα ποικίλλουν από λίγα mm έως λίγα cm και μήκος από μερικά cm έως και λίγα m.

Ο σωλήνας αυτός γεμίζει κατάλληλα με τη στατική φάση, το πληρωτικό υλικό, οπότε γίνεται πια μια **χρωματογραφική στήλη**. Ο τρόπος πλήρωσης και προετοιμασίας

της στήλης ποικίλλουν ανάλογα με τις εφαρμογές της στήλης. Οι εταιρείες που προμηθεύουν τα πληρωτικά υλικά δίνουν λεπτομερείς οδηγίες για την προετοιμασία του πληρωτικού υλικού, την πλήρωση της στήλης και την ενεργοποίησή του, οι οποίες είναι απαραίτητο να ακολουθούνται πιστά. Το κάτω άκρο του σωλήνα κλείνει με υαλοβάμβακα για να μην διαρρέει το πληρωτικό υλικό. Προσοχή απαιτείται κατά την πλήρωση ώστε να αποφεύγονται κενοί χώροι ή κανάλια τα οποία επηρεάζουν άμεσα την ποιότητα των χρωματογραφημάτων. Αν η στήλη είναι μικρής διαμέτρου ή το υλικό είναι λεπτόκοκκο η πλήρωση υποβοηθείται από αντλία κενού ή δονητή. Σε κλασικές στήλες η διάμετρος των κόκκων του υλικού είναι της τάξης των 150- 200  $\mu\text{m}$ . Οι στήλες αυτές έχουν διάμετρο 1-5 cm και μήκος 50 - 500 cm.

Το **δείγμα** μπορεί ή να εισάγεται στην κορυφή της στήλης ή να διαλύεται στην κινητή φάση (σε κάποιον από τους διαλύτες της) και με ένα σιφώνιο ή σύριγγα να μπαίνει στην κορυφή της στήλης (δες και το κατωτέρω σχήμα 4.25).



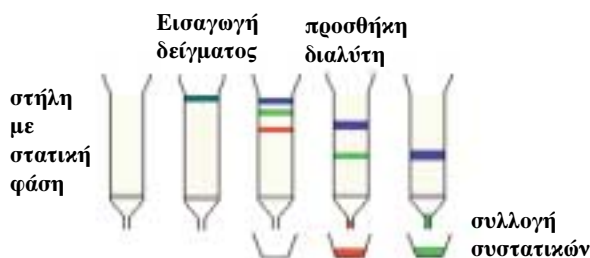
Σχήμα 4.25: Αριστερά κλασική στήλη με μεγάλους σχετικά κόκκους πληρωτικού υλικού και εισαγωγή δείγματος με σιφώνιο. Δεξιά στήλες με μικρούς κόκκους και εισαγωγή με ένεση.

Για τη **χρωματογράφιση** η ροή της κινητής φάσης, η έκλουση δηλαδή της στήλης, γίνεται συνήθως με σιφωνισμό του διαλύτη από μια δεξαμενή που βρίσκεται ψηλότερα από τη στήλη. Η ταχύτητα της ροής εξαρτάται και από την υδροστατική πίεση μεταξύ της επιφάνειας του υγρού στη δεξαμενή (π.χ. 1 atm για ανοικτό δοχείο) και του σημείου εξόδου από τη στήλη. Ακόμα και αν η διάμετρος των κόκκων δεν είναι μικρή ( $\sim 150 \mu\text{m}$ ) η ταχύτητα ροής είναι μικρή και δεν ξεπερνά μέρος του mL ανά min. Για τον έλεγχο και την αύξηση της ροής μπορεί να χρησιμοποιούνται και περισταλτικές αντλίες χαμηλής πίεσης.

Προσοχή στο υλικό των σωλήνων που μεταφέρουν την κινητή φάση στη στήλη μια και με τους διαλύτες που μεταφέρουν μπορεί να μολύνουν το δείγμα. Αν συμβαίνει αυτό, σωλήνες γυάλινοι ή από Teflon είναι απαραίτητοι.

Το έκλουσμα ή τα κλάσματα, ορισμένου όγκου το καθένα, συλλέγονται στην έξοδο της στήλης. Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα, τα κλάσματα αυτά μπορούν να αναλύονται ποιοτικά και ποσοτικά με μία κατάλληλη ενόργανη μέθοδο. Υπάρχουν και αυτόματοι συλλέκτες κλασμάτων με τους οποίους προγραμματίζεται η συλλογή ορισμένου όγκου από το έκλουσμα κάθε φορά.

Σε περίπτωση που ζητείται μόνο ο αριθμός των συστατικών του μείγματος είναι δυνατό να ευρεθεί αυτός από τις ζώνες που σχηματίζονται κατά μήκος της στήλης (δες και σχήμα 4.26), αν αυτά είναι έγχρωμα.



Σχήμα 4.26: Χρωματογραφία στήλης με συλλογή κλασμάτων

## 4.4.4. Αέρια χρωματογραφία (GC).

### Γενικές αρχές

Η αέρια χρωματογραφία από άποψη γενικής αρχής είναι μια τυπική χρωματογραφική μέθοδος. Και εδώ θα βρείτε, όπως στην υγρή χρωματογραφία (LC), τους όρους, διαχωρισμός, μείγμα - δείγμα, στατική φάση, κινητή φάση, χρωματογραφική στήλη κλπ. Μία βασική διαφορά υπάρχει, πέρα από το γεγονός ότι η κινητή φάση είναι ένα αέριο. Αυτή η κινητή φάση δεν επιδρά με οποιοδήποτε τρόπο με τα συστατικά του μίγματος. Η μόνη «δουλειά» που κάνει είναι να μεταφέρει τα συστατικά αυτά μέσω της χρωματογραφικής στήλης. Από εδώ προέρχεται και η ονομασία της κινητής φάσης ως *φέρων αέριο*. Μια άλλη διαφορά είναι η μορφή του δείγματος, το οποίο πρέπει ή να είναι αέριο ή στη θερμοκρασία που επικρατεί στο σημείο εισαγωγής του και μετά, να γίνεται αέριο (ατμός).

Ας δούμε πάλι πιο αναλυτικά τις αρχές της μεθόδου. Έτσι:

Η **στατική φάση** μπορεί να είναι ένα στερεό με τα γνωστά πια χαρακτηριστικά ενός στερεού πληρωτικού της στήλης. Τότε μιλάμε για την *αέρια-στερεή χρωματογραφία* (GSC). Μπορεί όμως να είναι και ένα υγρό καθλωμένο σε ένα στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών, οπότε μιλάμε για αέρια *-υγρή χρωματογραφία* (GLC). Η τελευταία βρήκε τόσο μεγάλο πεδίο εφαρμογών, ώστε στην καθομιλουμένη ο όρος *αέρια χρωματογραφία* σημαίνει πια την *αέρια -υγρή χρωματογραφία*.

Η **κινητή φάση ή φέρον αέριο** είναι σε αντίθεση με την LC ένα αδρανές αέριο όπως π.χ. τα Ήλιο, Άζωτο, Αργό. Αέριο το οποίο απλά μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος που και αυτό πρέπει να είναι αέριο ή ατμός.

Ο **μηχανισμός** με τον οποίο εξελίσσεται ο διαχωρισμός των συστατικών σε σχέση μόνο με την αέρια -υγρή χρωματογραφία, είναι μια κατανομή των μορίων των συστατικών μεταξύ της αέριας φάσης και του υγρού που είναι ακινητοποιημένο πάνω σε έναν αδρανή στερεό φορέα.

Εδώ η ταχύτητα με την οποία περνά το αέριο- η ροή του δηλαδή - είναι σημαντικός παράγων και πρέπει, μαζί με τη



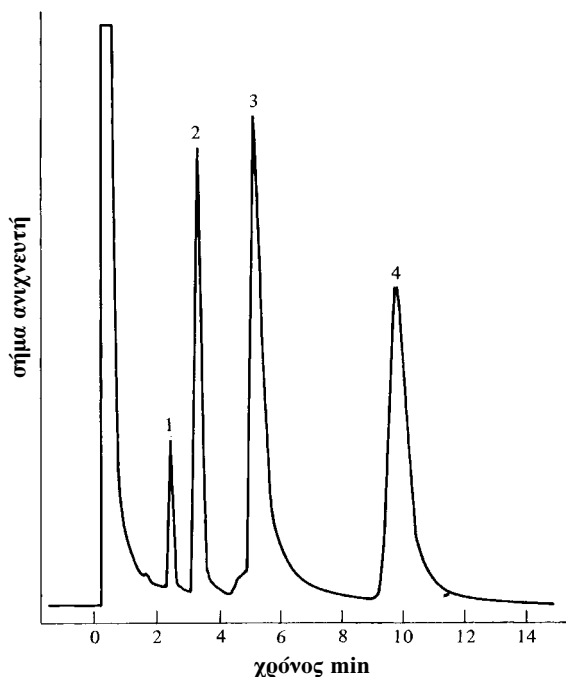
θερμοκρασία του περιβάλλοντος της στήλης, να ελέγχεται συστηματικά. Στην πρώτη φάση θα έλεγε κανείς ότι τα αέρια συστατικά δεσμεύονται ανάλογα με τη “συγγένεια” που παρουσιάζει το καθένα με την υγρή φάση. Στη δεύτερη φάση το ρεύμα του φέροντος αερίου τα παρασύρει προς την έξοδο της στήλης.

Το **είδος του δείγματος** και ο τρόπος εισαγωγής του είναι από τα κρίσιμα σημεία της μεθόδου. Αν αυτό είναι υγρό, πρέπει να θερμανθεί σε κατάλληλη θερμοκρασία περίπου 50 °C πάνω από το σημείο ή σημεία ζέσεως ώστε να μετατραπεί σε ατμό. Βασική προϋπόθεση είναι να μην διασπώνται θερμικά τα συστατικά του. Στη συνέχεια τα αέρια ή οι ατμοί θα αναμιχθούν με το φέρον αέριο και θα πορεύονται μέσω της στήλης. Η θερμοκρασία της στήλης πρέπει να ελέγχεται με ακρίβεια και να είναι και αυτή ψηλότερη από τα σημεία ζέσης των συστατικών. Η θερμοκρασία αυτή μπορεί να είναι συνεχώς σταθερή π.χ. 80 °C ή να προγραμματίζεται και να ανέρχεται σταδιακά π.χ από τους 70° στους 125 °C (προγραμματιζόμενη GLC)

Το φέρον αέριο μεταφέρει τα διαχωρισμένα συστατικά προς την έξοδο της στήλης. Εκεί ένας **ανιχνευτής** συνδεδεμένος με ένα **καταγραφικό** ή κατάλληλα (interface) με ένα υπολογιστή, μετρά μια ιδιότητα που εξαρτάται από τη φύση και την ποσότητα των ουσιών. Έτσι λαμβάνεται και εδώ ένα χρωματογράφημα ανάλογο με εκείνο της υγρής χρωματογραφίας στήλης (δες και σελ. 268). Και εδώ για την ποιοτική ανάλυση χρησιμοποιείται ο χρωματογραφικός χρόνος ανάσχεσης,  $t_r$  και βέβαια κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει και ένα συστατικό. Περισσότερο από κάθε άλλη φορά η ταυτοποίηση γίνεται μέσα από χρωματογράφιση προτύπων ενώσεων με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες πληρωτικού υλικού, υγρής φάσης, ροής φέροντος αερίου, θερμοκρασίας κλπ. Στο κατωτέρω σχήμα 4.27 δίνεται ένα χρωματογράφημα της *ηρωίνης* και των προϊόντων μεταβολισμού της.

*Αέρια –Υγρή Χρωματογραφία GLC (Gas Liquid Chromatography)*





Σχήμα 4.27: Χρωματογράφημα ηρωίνης και των προϊόντων μεταβολισμού της

## Το όργανο και η τεχνική της μεθόδου

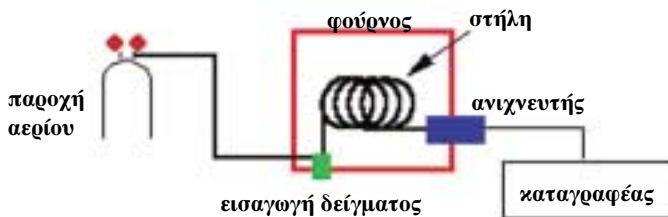
Η σημερινή τεχνολογία και η αυτοματοποίηση προσφέρουν μέσω του εμπορίου μια μεγάλη ποικιλία αέριων χρωματογράφων με τιμές που κυμαίνονται από 5.000.000 έως και 15.000.000 δρχ. και περισσότερο, ανάλογα με τις απαιτήσεις των ενδιαφερομένων και τις δυνατότητες του οργάνου. Στα υψηλής τεχνολογίας όργανα η ρύθμιση των παραμέτρων όπως η θερμοκρασία της στήλης και ο προγραμματισμός της, η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου, κλπ, γίνονται μέσα από το πληκτρολόγιο ενός υπολογιστή κατάλληλα εφοδιασμένου με το αντίστοιχο πρόγραμμα (software).

Τα κυριότερα τμήματα ενός αέριου χρωματογράφου είναι:

1. η πηγή του φέροντος αερίου του οποίου η ροή μπορεί να ρυθμίζεται σε επιθυμητές τιμές και να μετρείται με ένα ροόμετρο,

2. μια είσοδος του δείγματος η οποία μπορεί να θερμαίνεται από τους 25 - 500 °C,
3. η χρωματογραφική στήλη μέσα σε θερμοστατούμενο χώρο από ρεύμα θερμού αέρα σε θερμοκρασίες 25° - 400 °C
4. ένας ανιχνευτής κατάλληλος για ουσίες αέριες ή σε κατάσταση ατμών.
5. ένα σύστημα συνεχούς καταγραφής των μετρήσεων (καταγραφέας, ολοκληρωτής ή η οθόνη του PC).

Τα τμήματα αυτά απεικονίζονται στο κατωτέρω διάγραμμα (σχήμα 4.28)



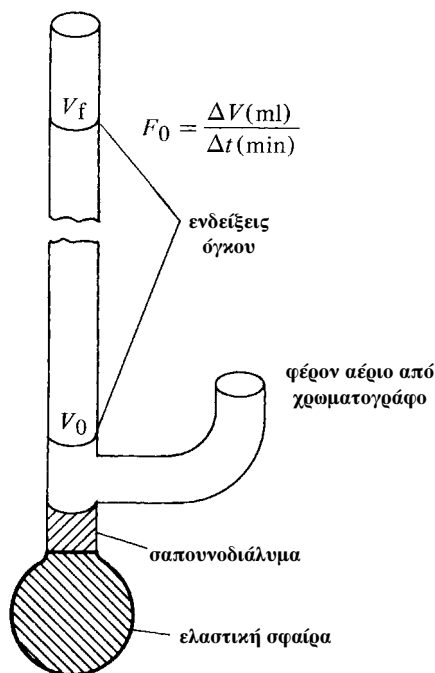
Σχήμα 4.28. Τα βασικά τμήματα ενός αερίου χρωματογράφου.

Ας δούμε με κάποιες λεπτομέρειες καθένα από τα τμήματα αυτά καθώς και τις διαδικασίες για την προετοιμασία του οργάνου και τις μετρήσεις.

Το **φέρον αέριο** που αποτελεί την κινητή φάση είναι αέριο αδρανές ώστε να μην αντιδρά και καταστρέφει τα υλικά κατασκευής του οργάνου. Το ποιο αέριο θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το είδος του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Χρησιμοποιούνται He, N<sub>2</sub>, Ar ή H<sub>2</sub> από οβίδες χάλυβα με πίεση (στην ατσάλινη οβίδα 100 -200 atm). Οι οβίδες αυτές πρέπει να στερεώνονται με αλυσίδες σε σταθερά σημεία του πάγκου εργασίας.

Οι ταχύτητες ροής του αερίου ρυθμίζονται σε δύο στάδια: Το ένα με ένα ρυθμιστή πίεσης που βρίσκεται πάνω στην οβίδα (η «χονδρική» ρύθμιση) και το άλλο που γίνεται με μια ειδική βελονοειδή βαλβίδα προσαρμοσμένη στο χρωματογράφο, για τη λεπτομερή (fine) ρύθμιση. Τελικά το αέριο πρέπει να εισέρχεται στη στήλη με πίεση 1-2 atm πάνω από την ατμοσφαιρική και με ροές που κυμαίνονται από 25 - 150 mL/ min για πλήρεις πακεταρισμένες στήλες

και 1-25 mL/min για τριχοειδείς στήλες (δες και στήλες 278). Η ταχύτητα ροής μετρείται στην έξοδο του οργάνου με ροόμετρο σαπωνοδιαλύματος η κατασκευή και λειτουργία του οποίου δίνεται στο κατωτέρω σχήμα 4.29. Σε αυτό μετρείται με χρονόμετρο ο χρόνος που χρειάζεται ένας υμένας σαπωνοδιαλύματος που δημιουργείται πιέζοντας το poire, για να διατρέξει το διάστημα από  $V_0$  σε  $V_f$ .



Σχήμα 4.29. Ροόμετρο σαπωνοδιαλύματος.

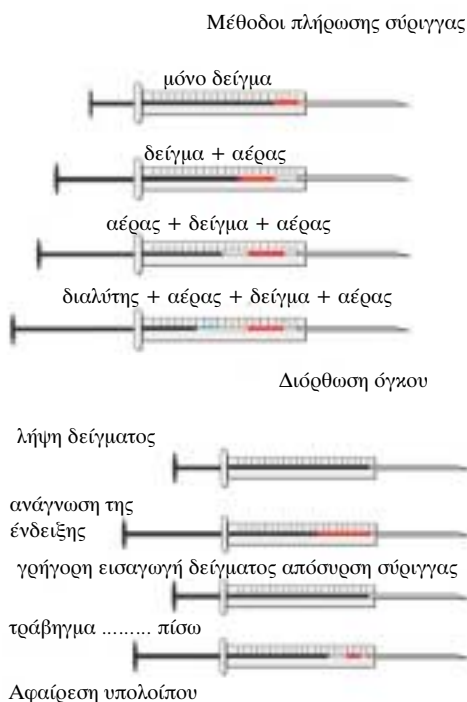
Η ταχύτητα ροής είναι  $\Delta V/\Delta t$  σε mL/min

Το δείγμα που μπορεί να είναι αέριο ή υγρό (ή διάλυμα) αλλά και στερεό εισάγεται με μικρομετρική σύριγγα στην αρχή της στήλης σε καθορισμένο σημείο του οργάνου (injection port). Αν το δείγμα είναι στερεό, μπορεί να εισάγεται μέσα σε γυάλινη φύσιγγα η οποία σπάει μέσα στο χώρο εισαγωγής με περιστροφή ενός κοχλίου. Το στόμιο αυτό εισαγωγής έχει μια βαλβίδα από ελαστικό που αντέχει σε ψηλές θερμοκρασίες, π.χ. ελαστικό από σιλικόνη, silicon rubber. Το κοινά λεγόμενο «septum» της χρωματογραφίας. Αυτό πρέπει κατά διαστήματα να αλλά-

$$1 \text{ nL} = 10^{-9} \text{ L}$$

$$1 \text{ nL} = 10^{-6} \text{ mL}$$

ζει) και ενώ επιτρέπει την είσοδο της βελόνας της σύριγγας, δεν επιτρέπει την έξοδο του δείγματος ή του φέροντος αερίου. Η έγχυση του δείγματος, «ένεση», πρέπει να γίνεται ακαριαία και όχι σιγά-σιγά. Ο όγκος του δείγματος είναι ελάχιστος από μερικά δέκατα του  $\mu\text{L}$  μέχρι 20  $\mu\text{L}$  για υγρά δείγματα και 1-10 mL για αέρια. Αν η στήλη είναι τριχοειδής, χρησιμοποιούνται ειδικές διαιρετικές διατάξεις (split) ώστε το τελικό δείγμα να είναι λίγα νανόλιτρα, nL ( $10^{-9}$  του L). Η ακρίβεια στην εισαγωγή του δείγματος έχει μεγάλη σημασία, ιδιαίτερα για ποσοτικές μετρήσεις. Κοιτάξτε στο κατωτέρω σχήμα 4.30 το σωστό τρόπο χρήσης της ένεσης.



Σχήμα 4.30: Ορθή χρήση σύριγγας

Η θερμοκρασία του χώρου εισαγωγής του δείγματος που όπως είπαμε πρέπει να είναι τουλάχιστον 50 °C ψηλότερα από το σημείο ζέσεως του λιγότερο πτητικού συστατικού, ελέγχεται ώστε να είναι 10% παραπάνω από εκείνη της στήλης.

Η **στήλη** είναι, θα έλεγε κανείς, «η καρδιά» του χρωματογράφου μια και σ' αυτή θα γίνει ο διαχωρισμός των συστατικών. Στήλες μπορεί κανείς να ετοιμάσει και μόνος, αν έχει τον κατάλληλο εξοπλισμό, και οι απαιτήσεις από τη λειτουργία τους δεν είναι πολύ υψηλές. Σε ειδικότερα βιβλία υπάρχουν λεπτομερείς οδηγίες για την κατασκευή στηλών. Μπορεί όμως κάποιος να προμηθευτεί έτοιμες στήλες από το εμπόριο με διάφορα **πληρωτικά υλικά** και υγρά καθηλωμένα σε αυτά. Οι στήλες είναι βασικά δύο τύπων: Η πρώτη κατηγορία είναι οι λεγόμενες γεμισμένες, πληρωμένες στήλες (πακεταρισμένες) και η δεύτερη είναι οι τριχοειδείς στήλες ή στήλες ανοικτού σωλήνα. Είναι φτιαγμένες από ανοξείδωτο χάλυβα και έχουν σχήμα σπείρας για να καταλαμβάνουν μικρό χώρο. Το μήκος τους ποικίλλει, από 1- 2 m για τις πακεταρισμένες μέχρι εκατοντάδες μέτρα για τις τριχοειδείς.

Στη φάση αυτή της γνωριμίας με τη χρωματογραφία, όπου κανείς δεν καλείται να φτιάξει μια στήλη ή να αξιολογήσει το περιεχόμενο της και την αποτελεσματικότητά της, πρέπει να καταλάβει ότι την ίδια σημασία έχει και η προετοιμασία και συντήρηση μιας στήλης, ώστε αυτή να είναι έτοιμη για μέτρηση (το conditioning μιας στήλης). Οι προμηθευτές δίνουν λεπτομερείς οδηγίες και για το θέμα αυτό.

Ο **θερμοστατούμενος φούρνος** σκοπό έχει να κρατά ελεγχόμενη θερμοκρασία στη στήλη αλλά και στο χώρο εισαγωγής του δείγματος και σε ορισμένα μοντέλα και στον ανιχνευτή. Αυτό το πετυχαίνει θερμαίνοντας τον αέρα που κυκλοφορεί. Η ακρίβεια της όλης μέτρησης εξαρτάται πολύ από τη θερμοκρασία γι' αυτό και ο έλεγχός της γίνεται μέχρι μερικών δεκάτων του βαθμού. Συνήθως επιλέγεται μια θερμοκρασία ίση ή λίγο πιο πάνω από ένα μέσο σημείο ζέσης, πράγμα που οδηγεί σε χρόνους ανάλυσης από 2- 30 min. Υπάρχουν δυο δυνατότητες θερμοστάτησης. Η πρώτη κρατά σταθερή μια προεπιλεγμένη θερμοκρασία σε όλη τη διάρκεια της μέτρησης, οπότε μιλάμε για ισόθερμη αέρια **χρωματογραφία**. Μια τέτοια τεχνική δε δίνει πολύ καλά αποτελέσματα μια και οι κορυφές, στο χρωματογράφημα, επικαλύπτονται από συστατικά με κοντινά σημεία ζέσης (μικρή διαχωριστική ικανότητα).

Υπάρχει όμως η δυνατότητα μεταβολής της θερμοκρασίας με κάποιο πρόγραμμα που κανονίζει τόσο τον τρόπο όσο και το ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας μέχρι κάποιο προκαθορισμένο όριο. Έτσι, για παράδειγμα, μπορεί η θερμοκρασία να αυξάνει γραμμικά, δηλαδή με σταθερή ταχύτητα, από τους 25° έως τους 125 °C, να παραμείνει εκεί για π.χ. 1 min και μετά να ανέβει πάλι γραμμικά στους 200 °C. Τότε μιλάμε για *θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία*. Στην περίπτωση αυτή η ικανότητα διαχωρισμού, εκπεφρασμένη σαν απόσταση διαδοχικών κορυφών, είναι πολύ καλύτερη. Οι κορυφές είναι οξύτερες και πολύ πιο κατάλληλες για ποσοτικούς προσδιορισμούς.

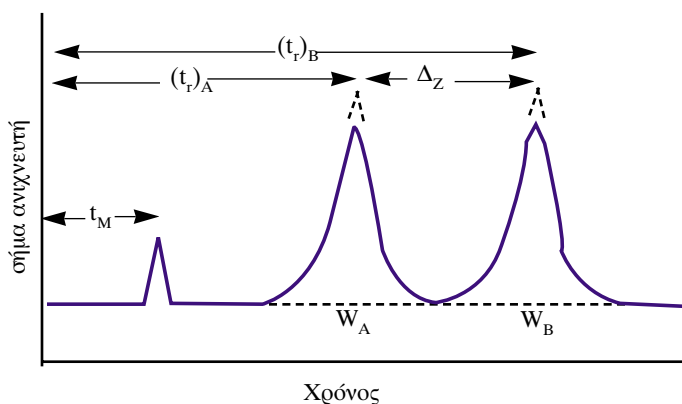
Μέχρις εδώ ο χρωματογράφος επιτελεί τον βασικό του προορισμό που είναι ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος. Τα διαχωρισμένα συστατικά εκλούνται και μεταφέρονται από το φέρον αέριο προς την έξοδο της στήλης. Μένει όμως τώρα το μέρος του οργάνου που θα ανιχνεύσει, θα ταυτοποιήσει και θα μετρήσει τα συστατικά αυτά. Αυτό πραγματοποιείται με τον **ανιχνευτή** που είναι το «μυαλό» του οργάνου. Ο ανιχνευτής θα μετατρέψει μια ιδιότητα του φέροντος αερίου (το οποίο είναι συνεχώς παρόν) και των συστατικών σε ηλεκτρικό σήμα το οποίο στη συνέχεια, κατάλληλα ενισχυόμενο, θα καταγραφεί ή θα αποτυπωθεί. Όταν από τον χρωματογράφο περνά μόνο καθαρό φέρον αέριο, η ανταπόκριση του ανιχνευτή θα είναι αυτό που στο χρωματογράφημα αποκαλείται *γραμμή βάσης*. Η παρουσία κάθε συστατικού με διαφορετικές τιμές στην ιδιότητα που μετρά ο ανιχνευτής θα αποτυπώνεται στο χρωματογράφημα σαν *κορυφή* (δες και μελέτη του χρωματογραφήματος). Ο ανιχνευτής είναι ενσωματωμένος στο όργανο και συνεπώς από πρώτη όψη δεν μπορεί κανείς να επεμβαίνει σε αυτόν. Όμως εδώ και καιρό η έξοδος ενός αερίου χρωματογράφου μπορεί να αποτελεί «είσοδο» σε μια άλλη ενόργανη μέθοδο, οπότε μιλάμε για συνδυασμένες τεχνικές όπως η αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματογράφο μάζας (MS) ή ολοκληρωμένα GC-MS.

Το σήμα τώρα του ανιχνευτή αφού **ενισχυθεί** κατάλληλα μεταφέρεται σε ένα σύστημα **καταγραφής**. Το τελικό αποτέλεσμα είναι το **χρωματογράφημα**. Πολλοί χρωματο-

*Διαχωριστικότητα (βλέπε και σχήμα 4.31)*

γράφοι είναι εφοδιασμένοι με **ολοκληρωτή** ώστε παράλληλα με την καταγραφή των κορυφών γίνεται και μέτρηση του εμβαδού κάτω από αυτές, που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του συστατικού. Στα πολύ σύγχρονα και ακριβά όργανα όλος ο έλεγχος και η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσα από PC, το οποίο διαθέτοντας στη μνήμη του αρχείο αντιστοίχισης κορυφών με ενώσεις, δίνει στην οθόνη του την πλήρη ποιοτική σύσταση και αφού βαθμονομηθεί το όργανο με πρότυπα και την ποσοτική σύσταση του δείγματος.

Παρακάτω δίνεται ένα ιδανικό χρωματογράφημα για να δούμε ποια είναι τα χαρακτηριστικά του και πως αυτά αξιολογούνται (σχήμα 4.31).



Σχήμα 4.31: Χρωματογράφημα δύο ουσιών A και B,  $t_M$  ο χρόνος που κάνει ο διαλύτης να περάσει την στήλη. Διαχωριστικότητα,  $\Delta_Z$

Όπως έχει ήδη λεχθεί, κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει και ένα συστατικό του μίγματος. Η θέση κάθε κορυφής καθορίζεται από το *χρόνο ανάσχεσης* (ή χρόνο συγκράτησης),  $t_r$ , αν βέβαια υπάρχει γραμμική κίνηση της κινητής φάσης (σταθερή ταχύτητα). Αυτός εξαρτάται, για δεδομένη στήλη, από την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου, τη θερμοκρασία και τον τρόπο που αυτή πιθανόν μεταβάλλεται (για προγραμματισμένες μετρήσεις). Όσο οξύτερο είναι το peak (κορυφή) τόσο «καλύτερο» μια και έτσι γίνεται καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών, πράγμα που σημαίνει προσρόφηση του συστατικού σε στενή ζώνη της στήλης. Προσέξτε πως μετρείται ο  $t_r$  στο χρωματογράφημα. Βρίσκεται αρχικά το σημείο τομής των εφαπτομένων των



δύο κλάδων της καμπύλης της κορυφής και μετρείται η απόστασή του από την αρχή των αξόνων που αντιπροσωπεύει τη χρονική στιγμή εισαγωγής του δείγματος.

Για την ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιείται το εμβαδό κάτω από την κορυφή, το οποίο υπό προϋποθέσεις είναι ανάλογο της ποσότητας του συστατικού και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιείται για τη χάραξη καμπύλης αναφοράς. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι υπολογισμού του εμβαδού αυτού όπως π.χ. η μέθοδος του τριγωνισμού, οπότε αυτό είναι ίσο με το γινόμενο του ύψους του επί το εύρος του στο μισό του ύψους του ( $W_{1/2}$ ). Αν η κορυφή είναι οξεία, τότε αντί του εμβαδού μπορεί να χρησιμοποιείται το ύψος της για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς.