

4.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

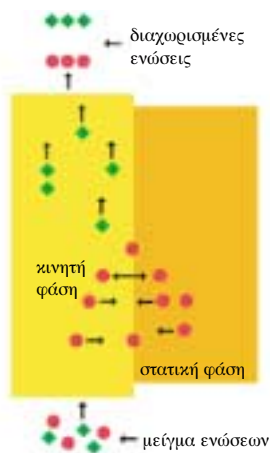
Γενικά, ορισμοί.

Αντί άλλης εισαγωγής στα θέματα της χρωματογραφίας,ας προσπαθήσουμε να παίξουμε τον ρόλο ενός χημικού λεξικού, ερμηνεύοντας όρους που είναι απαραίτητοι για την κατανόηση τόσο του φαινομένου όσο και των οργάνων που χρησιμοποιούνται.

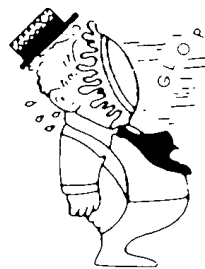
Έτσι:

προσορόφηση: είναι η δέσμευση από την επιφάνεια ενός στερεού (το οποίο είναι κατά κανόνα σε μορφή λεπτών κόκκων) αέριων ή υγρών ή μορίων μιας ουσίας που είναι διαλυμένη σε ένα διαλύτη. (Adsorption)

απορρόφηση: είναι η δέσμευση και ενσωμάτωση μορίων σε όλη τη μάζα ενός στερεού ή υγρού με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός διαλύματος ή ακόμα και μιας ένωσης. Η απορρόφηση δηλαδή είναι ένα πιο έντονο θα έλεγε κανείς φαινόμενο από την προσορόφηση και φτάνει στα όρια μιας αντίδρασης. (Absorption).



ABSORPTION



ADSORPTION

Η *απορρόφηση* (αριστερά) και η *προσορόφηση* (δεξιά) ...σαν γελοιογραφία.
M. Laguës. L'Actualité Chimique, 1990, (1) σελ. 17

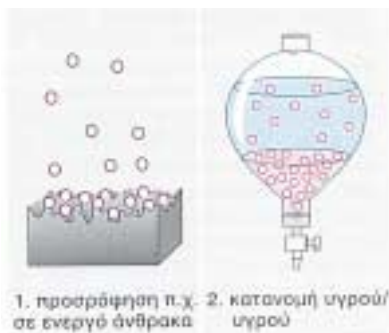
ρόφηση: ο όρος χρησιμοποιείται ορισμένες φορές όταν θέλει κανείς να αναφερθεί σε φαινόμενα που περιλαμβάνουν και τις δύο παραπάνω περιπτώσεις δηλαδή και προσορόφηση και απορρόφηση. (Sorption).

εκρόφηση: είναι το αντίθετο της προσορόφησης. Τα χαλαρά δεσμευμένα στην επιφάνεια του στερεού μόρια, αποδεσμεύονται από π.χ. ένα υγρό ή αέριο που περνά πάνω από το στερεό και παρασύρονται στο κινούμενο ρεύμα του υγρού ή αερίου (Desorption).

Ενόργανη Ποσοτική Ανάλυση

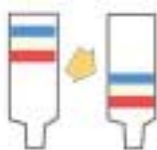
κατανομή: είναι το μοίρασμα μιας ουσίας σε δύο π.χ. υγρά που δεν αναμειγνύονται και βρίσκονται σε επαφή. Ανάλογα με τις ιδιότητες της ουσίας και των υγρών είναι δυνατόν το μεγαλύτερο μέρος της να περάσει στο ένα από τα δύο υγρά.

Στο κατωτέρω σχήμα 4.16 δίνονται ως εικόνα παραδείγματα ρόφησης και κατανομής.



Σχήμα 4.16: Ρόφηση (1) και κατανομή (2)

χρωματογραφία: είναι μια καθαρά Ελληνική λέξη που χρησιμοποιείται διεθνώς. Προέρχεται από τις λέξεις **χρώμα** και **γραφή** και σημαίνει καταγραφή των χρωμάτων. Ιστορικά αναγεται στο πείραμα του Tswett (1906). Ο βοτανολόγος αυτός διαχώρισε τις χρωστικές των φύλλων ορισμένων φυτών (χλωροφύλλη, καροτένια, ξανθοφυλλίνη κλπ.) περνώντας διάλυμα αυτών σε ένα διαλύτη και πιο συγκεκριμένα πετρελαϊκό αιθέρα, μέσα από μια **στήλη** η οποία περιείχε κονιοποιημένο ασβεστόλιθο (CaCO_3). Καθώς το διάλυμα **διαπότιζε** την στήλη τα διάφορα συστατικά χρώματα διαχωρίζονταν, δημιουργώντας ζώνες έγχρωμες και δίνοντας μια εικόνα που φαίνεται στο κατωτέρω σχήμα 4.17 (Chromatography).



Σχήμα 4.17: Χρωματικές ζώνες.

φάση: είναι ένα ομογενές, δηλαδή με ένα σταθερό σύνολο ιδιοτήτων, τμήμα υλικού το οποίο χωρίζεται από το περιβάλλον του με σαφή όρια. Τα όρια αυτά που χωρίζουν δύο φάσεις αποτελούν την λεγόμενη διεπιφάνεια. Δεν πρέπει να συγχέεται η φάση με τη φυσική κατάσταση. Για παράδειγμα σε ένα ποτήρι το οποίο περιέχει νερό πάνω στο οποίο υπάρχει και μια στιβάδα λαδιού (π.χ. ένα καντήλι) περιέχει δύο φάσεις, εκείνη του λαδιού και εκείνη του νερού, αλλά μια φυσική κατάσταση εκείνη του υγρού.

δες και πείραμα σελ. 291

διαμοριακές δυνάμεις: τα μόρια των διαφόρων ενώσεων και στοιχείων ασκούν (άρα και δέχονται) από τα γειτονικά τους μόρια δυνάμεις (κατά βάση ηλεκτρικής φύσης). Ανάλογα με τη φύση των μορίων οι δυνάμεις μπορεί να είναι ασθενέστερες ή ισχυρότερες (πίσω από την λέξη φύση κρύβεται η δομή κάθε μορίου που επηρεάζει το μέγεθός του, το φορτίο του, και την πολικότητά του που είναι η κατανομή του φορτίου αυτού). Οι δυνάμεις αυτές στην ορολογία της χρωματογραφίας εκφράζονται καμιά φορά και σαν *συγγένεια*. Με βάση τις δυνάμεις αυτές είναι δυνατόν ένα συστατικό ενός μίγματος να προσροφάται πιο έντονα από ένα άλλο, άρα και να εκροφάται δυσκολότερα. Αυτό τελικά καταλήγει σε ένα διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος.

Φανταστείτε ένα ποτάμι από κάποιο σημείο του οποίου ξεκινά ένας αριθμός από βάρκες. Αυτές παρασυρόμενες από το ρεύμα του ποταμού (κινητή φάση) διαχωρίζονται ανάλογα με τις ιδιότητες πλεύσης της κάθε μιας.

ρεύμα ποταμού = κινητή φάση
όχθες = στατική φάση
βάρκες = μίγμα για διαχωρισμό

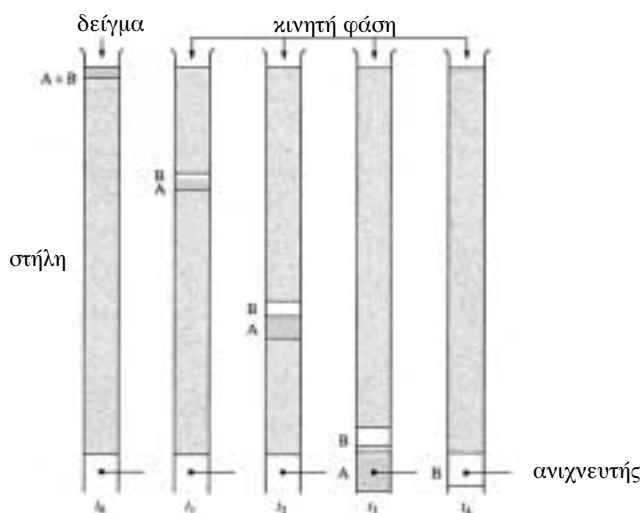
Αφού λοιπόν κατανοήσει κανείς τους παραπάνω όρους και τα αντίστοιχα φαινόμενα που αυτοί περιγράφουν μπορεί να προχωρήσει σε μια γενική περιγραφή της χρωματογραφίας που για μια ακόμη φορά τονίζεται ότι είναι μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος και όχι προσδιορισμού τους, τουλάχιστον ποσοτικά. Διαχωρισμός, που τις περισσότερες φορές είναι αδύνατον να γίνει με πιο κλασικές μεθόδους όπως διήθηση, απόσταξη και εκχύλιση.

Έτσι λοιπόν με τον γενικό όρο **χρωματογραφία** περιγράφουμε ένα σύνολο μεθόδων που επιτρέπει τον διαχωρισμό ενός μίγματος στα συστατικά του τα οποία είναι δυνατόν να συνδέονται στενά μεταξύ τους. Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα διαλύεται σε μια *κινητή φάση* που μπορεί να είναι ένα υγρό ή ένα αέριο. Στη συνέχεια αυτή η κινητή φάση διοχετεύεται μέσα από μια *στατική* ή *στάσιμη* φάση σταθερά προσκολλημένη σε μια στήλη ή σε άλλη στερεή επιφάνεια. Η στατική αυτή φάση δεν πρέπει να αναμειγνύεται, να διαλύεται ή να αντιδρά με την κινητή.

Οι δυο αυτές φάσεις έχουν έτσι επιλεγεί ώστε τα διάφορα συστατικά του μίγματος - δείγματος να κατανέμονται ή να μοιράζονται σε διαφορετικό, το καθένα, ποσοστό στις φάσεις αυτές. Έτσι συστατικά τα οποία προσροφώνται και συγκρατούνται έντονα από τη στατική φάση κινούνται πολύ αργά παρασυρμένα από την κινητή φάση. Αντίθετα, εκείνα

που συγκρατούνται χαλαρά είναι λογικό να «ταξιδεύουν» γρηγορότερα.

Το τελικό αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην κινητικότητα των ουσιών είναι ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος σε ξεχωριστές ζώνες οι οποίες μπορούν να εκτιμηθούν ποιοτικά ή και ποσοτικά. Αυτό το τελευταίο μπορεί να γίνει συνδυάζοντας τη χρωματογραφική διάταξη διαχωρισμού (π.χ. τη χρωματογραφική στήλη) με μια από τις ενόργανες μεθόδους ανάλυσης, όπως οπτική ή ηλεκτροχημική που θα παίζουν το ρόλο του ανιχνευτή του κάθε εξερχόμενου συστατικού (σχήμα 4.18).



Σχήμα 4.18: Χρωματογραφικός διαχωρισμός

Ταξινόμηση των χρωματογραφικών μεθόδων.

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το κριτήριο με το οποίο ταξινομούνται.

Η πρώτη κατηγορία στηρίζεται στο φυσικό τρόπο με τον οποίο έρχονται σε επαφή οι δύο φάσεις (κινητή και στάσιμη). Ο φυσικός τρόπος τελικά καθορίζει και τα χαρακτηριστικά όπως σχήμα και μέγεθος του αντίστοιχου οργάνου. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται η χρωματογραφία στήλης και η επίπεδη χρωματογραφία.

Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση βρίσκεται τοποθετημένη σε μια στήλη, στενή συνήθως, μέσω της οποίας εξαναγκάζεται να κινηθεί η κινητή φάση είτε με πίεση είτε με τη βαρύτητα. Στην επίπεδη χρωματογραφία η στατική φάση στηρίζεται σε ένα πλατύ δίσκο ή στα διάκενα ή πόρους ενός ειδικού χαρτιού (θυμηθείτε το στυπόχαρτο). Εδώ η κινητή φάση κινείται είτε με τη δράση των τριχοειδών ινών είτε πάλι με την επίδραση της βαρύτητας.

Η δεύτερη κατηγορία, που είναι και πιο θεμελιακή, στηρίζεται στο είδος της κινητής και της στατικής φάσης που τελικά κανονίζει και τον τρόπο με τον οποίο τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται και μεταφέρονται μεταξύ των δύο φάσεων. Στην κατηγορία αυτή διακρίνουμε την *υγρή χρωματογραφία* και την *αέρια χρωματογραφία*. Όπως φαίνεται και από τα ονόματά τους, η κινητή φάση στην πρώτη είναι ένα υγρό ενώ στη δεύτερη ένα αέριο.

Συνδυάζοντας τις δυο μεγάλες κατηγορίες πρέπει να αναφερθεί ότι μόνο η υγρή χρωματογραφία μπορεί να εφαρμόζεται σε στήλη ή επίπεδη επιφάνεια (π.χ. χαρτί). Αντίθετα η αέρια χρωματογραφία εφαρμόζεται μόνο σε τεχνικές με στήλη.

Οι δυο αυτές χρωματογραφίες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε λεπτομερέστερες τεχνικές, ανάλογα με την στατική φάση και με τον τρόπο που «περνά» το κάθε συστατικό από τη μια φάση στην άλλη. Χωρίς να περιλάβουμε όλες τις υπάρχουσες τεχνικές ας προσπαθήσουμε να δώσουμε την ταξινόμηση των χρωματογραφιών στήλης με μορφή πίνακα (πίνακας 4.5). Στον πίνακα αυτό δίνονται: το όνομα της γενικής ταξινόμησης, το όνομα της ειδικότερης τεχνικής, η στατική φάση και τέλος ο τρόπος με τον οποίο η μέθοδος λειτουργεί (αρχή της μεθόδου επιγραμματακά).

Πίνακας 4.5
Ταξινόμηση χρωματογραφιών στήλης

Γενική ταξινόμηση	Ειδική τεχνική	Στατική φάση	Αρχή λειτουργίας
Υγρή χρωμ/ία (LC) (κινητή φάση ένα υγρό)	χρωμ/ία προσρόφησης	ένα στερεό	προσρόφηση
	χρωμ/ία κατανομής	υγρό προσροφημένο σε ένα στερεό	κατανομή μεταξύ μη αναμειγξιμών υγρών
Αέρια χρωμ/ία (GC) (κινητή φάση ένα αέριο)	αέρια-στερεά χρωματ/ία	ένα στερεό	προσρόφηση
	αέρια-υγρή χρωματ/ία GLC ή GC	υγρό προσροφημένο σε ένα στερεό	κατανομή μεταξύ του αερίου και του υγρού.

Υγρή χρωμ/ία (LC)

Αέρια χρωμ/ία (GC)

αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC)

Διαχωρισμός των διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών μπορεί όμως να γίνει και με ένα άλλο κριτήριο που παρόλο ότι αρχικά στηρίζεται σε μηχανιστικά χαρακτηριστικά, όπως ο τρόπος εισαγωγής και κίνησης του δείγματος στην χρωματογραφική διάταξη, τελικά έχει ενδιαφέρον διότι δείχνει και τον τρόπο λειτουργίας των συσκευών αυτών. Έτσι διακρίνουμε:

Μεθόδους έκλουσης. Αυτές είναι και οι συνηθέστερες τεχνικές. Εδώ το δείγμα, συνήθως λίγα μL ($1\mu\text{L} = 10^{-6} \text{ L} = 10^{-3} \text{ mL}$), εισάγεται σε μια μικρή αρχική ζώνη της στήλης ή της χάρτινης λωρίδας. Ένας κατάλληλος διαλύτης διέρχεται μετά «λουζοντας» τη στήλη από πάνω προς τα κάτω ή αν πρόκειται για χαρτί από πάνω προς τα κάτω ή αντίθετα. Η έκλουση αυτή διαχωρίζει τις ουσίες ανάλογα με τη συγγένεια που παρουσιάζουν ως προς το διαλύτη και τη στατική φάση. Μάλιστα για την έκλουση μπορούν διαδοχικά να χρησιμοποιούνται περισσότεροι διαλύτες. Το συστατικό με τη μεγαλύτερη κινητικότητα (που σημαίνει ότι προσροφάται χαλαρότερα στη στατική φάση και διαλύεται περισσότερο στην κινητή) κινείται παρασυρόμενο από τη ροή και

κάποια στιγμή «εμφανίζεται» στην έξοδο της στήλης. Αν εκεί υπάρχει ένας κατάλληλος ανιχνευτής που παρακολουθεί μια ιδιότητα του εκλούσματος, αυτός θα δώσει τότε ένα σήμα. Η καταγραφή αυτού του σήματος συναρτήσει του χρόνου, αν βέβαια η παροχή του διαλύτη γίνεται με σταθερό ρυθμό, είναι το αναμενόμενο *χρωματογράφημα* (δες και σχήματα 4.22, 4.24). Σε ορισμένες περιπτώσεις η έκλουση γίνεται μέχρι του σημείου όπου εμφανίζονται ξεχωριστές ζώνες από χρώματα στη στήλη ή τη λωρίδα. Οι ζώνες αυτές μπορούν να ταυτοποιηθούν ποιοτικά και καμιά φορά να εκτιμηθούν και ποσοτικά.

Μεθόδους μετωπικής ανάλυσης. Εδώ το δείγμα διαλύεται και διανέμεται σε ένα μεγάλο όγκο διαλύτη. Το διάλυμα στη συνέχεια εισάγεται συνεχώς μέσα στη στήλη της στατικής φάσης με το διαλύτη να δρα ως η κινητή φάση. Κάθε συστατικό ροφάται μέχρις ότου κορεσθεί μια στιβάδα του στερεού. Η τεχνική δεν πετυχαίνει πλήρεις διαχωρισμούς και χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων υγρών ή αερίων δειγμάτων.

Συνοψίζοντας μπορούμε να αναγνωρίσουμε κάποιες γενικές αρχές σε όλες τις χρωματογραφικές μεθόδους. Έτσι πάντα θα υπάρχει ένα δείγμα που είναι μείγμα διαφόρων ουσιών ανόργανων και οργανικών. Το μείγμα αυτό θα πρέπει να περάσει σαν διάλυμα ή σαν αέριο μέσα από τη χρωματογραφική διάταξη. Αυτή θα περιλαμβάνει τη στατική φάση που μπορεί να είναι ένα στερεό σε σκόνη ή ένα υγρό κατάλληλα *καθλωμένο* σε ένα στερεό φορέα. Το δείγμα θα διοχετευθεί με τη βοήθεια της κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση.

Το κάθε συστατικό του μείγματος κατανέμεται τότε μεταξύ των δύο φάσεων π.χ. συγκρατείται από την στερεή, ενώ άλλο μεταφέρεται από την κινητή. Τελικά, το κάθε συστατικό φτάνει και εξέρχεται από τη διάταξη με διαφορά χρόνου οπότε καταγράφεται από έναν ανιχνευτή. Είναι δυνατόν να γίνει συλλογή των διαφόρων συστατικών και να αναλυθούν με μια μέθοδο. Επίσης είναι δυνατόν απλά να σημειώνονται οι διάφορες ζώνες που δημιουργούνται από το κάθε συστατικό, χωρίς κανείς να περιμένει να εξέλθουν από τη στήλη.

4.4.1 Η ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΗ

Γενικές αρχές.

Ας προσπαθήσουμε να αναγνωρίσουμε τις γενικές αρχές που προαναφέρθηκαν στην εισαγωγή και να επισημάνουμε τις όποιες ιδιαιτερότητες έχει η κάθε μέθοδος στη χρωματογραφία χάρτη, όπως και στις άλλες χρωματογραφικές μεθόδους.

Στατική φάση: Εδώ είναι μια λωρίδα -ταινία ή φύλλο χαρτί (κυτταρίνη) το οποίο αποτελεί το στερεό φορέα της στατικής φάσης. Η στατική φάση είναι υγρό (και πιο συγκεκριμένα νερό), το οποίο περιέχεται ενωμένο με την κυτταρίνη (σε ποσοστό που φτάνει το 20 % στο ακατέργαστο χαρτί). Το χαρτί που χρησιμοποιείται είναι από πολύ καθαρή κυτταρίνη και συνήθως χρησιμοποιείται χαρτί διήθησης (όπως το Whatman No 1). Όσο πιο χοντρές είναι οι ίνες του χαρτιού τόσο πιο γρήγορα κινείται ο διαλύτης ανάπτυξης.

Κινητή φάση: Είναι ένα μείγμα οργανικών διαλυτών με νερό. Από αυτά το μεν νερό, διαποτίζει το χαρτί (προκαλεί κορεσμό της κυτταρίνης πολύ πάνω από το 20 % που προαναφέρθηκε) ενώ ο μη υδατικός διαλύτης θα παρασύρει εκείνα τα συστατικά του μίγματος που δεν συγκρατούνται από το νερό. Για το λόγο αυτό λέμε ότι αυτοί οι διαλύτες χρησιμοποιούνται για την *ανάπτυξη του χρωματογραφήματος* και το μείγμα των διαλυτών λέγεται *διαλύτης ανάπτυξης*. Η διαχωριστική ικανότητα ενός τέτοιου διαλύτη ανάπτυξης λέγεται και δύναμη έκλουσης, είναι δηλαδή η ικανότητά του να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μίγματος. Η ικανότητα αυτή εξαρτάται πολύ από τις αναλογίες των διαλυτών που το αποτελούν.

Μηχανισμός: Ο διαχωρισμός στηρίζεται κύρια στην κατανομή κάθε συστατικού μεταξύ της στατικής φάσης δηλαδή του νερού που είναι καθηλωμένου στην κυτταρίνη και των οργανικών διαλυτών που αποτελούν την κινητή φάση. Άρα το φαινόμενο στηρίζεται σε ένα είδος έκλουσης με το διαλύτη ανάπτυξης να κινείται, είτε λόγω τριχοειδών φαινομένων, είτε και με την βαρύτητα. Εδώ μάλιστα η έκλουση διακόπτεται όταν το μέτωπο του διαλύτη ανάπτυ-

Βλέπε και σχήμα 4.21.

ξης φτάσει σε ένα προκαθορισμένο και προσημειωμένο επίπεδο του χαρτιού.

Χρωματογράφημα: Το αποτέλεσμα της έκλουσης είναι εδώ ο διαχωρισμός των συστατικών με μορφή ταινιών ή κηλίδων. Και αν μεν τα διαχωριζόμενα συστατικά είναι έγχρωμα, το χρωματογράφημα είναι εμφανές και μπορούν άμεσα να γίνουν όλες οι παρατηρήσεις. Αν όμως δεν είναι, πράγμα που συμβαίνει συνήθως, χρειάζεται μια *εμφάνιση* του χρωματογραφήματος. Η εμφάνιση γίνεται με δύο τρόπους. Είτε με ψεκασμό, συνήθως, του χαρτιού με κατάλληλα αντιδραστήρια τα οποία σχηματίζουν με τις ουσίες που διαχωρίστηκαν έγχρωμες ενώσεις, οπότε οι ζώνες και οι κηλίδες γίνονται εμφανείς. Είτε με έκθεση του χαρτιού σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία οπότε όσες ουσίες απορροφούν την ακτινοβολία αυτή φαίνονται σαν μαύρες κηλίδες ενώ αυτές που δεν απορροφούν και την επανεκπέμπουν δείχνουν κιτρινοπράσινες ή μπλε.

Αξιολόγηση του χρωματογραφήματος. Στη χρωματογραφία χάρτου η ταυτοποίηση μιας ένωσης, δηλαδή η ποιοτική σε πρώτη φάση, ανάλυση του δείγματος γίνεται μέσα από τις σχετικές αποστάσεις που διανύει κάθε συστατικό στο χαρτί. Η απόσταση αυτή εκφράζεται από τον λεγόμενο *συντελεστή επιβράδυνσης*, R_F . Αυτός ορίζεται ως το πηλίκο της απόστασης που διανύει η ουσία προς την απόσταση που έφτασε το μέτωπο του διαλύτη.

Η τιμή του R_F εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το είδος του χαρτιού, το διαλύτη ανάπτυξης, τη θερμοκρασία κλπ. Γι' αυτό και οι δημοσιευμένες τιμές έχουν σχετική αξία και μόνο σαν γενικοί οδηγοί πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Όμως σε αυστηρά καθορισμένες συνθήκες οι τιμές αυτές αποτελούν μια χαρακτηριστική σταθερά και μπορούν να χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας. Για μεγαλύτερη αξιοπιστία των μετρήσεων καλόν είναι να γίνεται παράλληλη χρωματογράφιση του δείγματος και γνωστών ουσιών.

Η τεχνική της μεθόδου.

Η οργανολογία της μεθόδου είναι σχετικά απλή. Κατ' αρχήν χρειάζεται ένας θάλαμος ανάπτυξης που μπορεί να

είναι ένας ογκομετρικός κύλινδρος π.χ. των 250 mL, ο οποίος είναι εύκολο να κλείνει καλυπτόμενος με ένα ανεστραμμένο ποτήρι. Σε αυτόν με κατάλληλο άγκιστρο θα κρεμαστεί η λωρίδα του χαρτιού που είναι ο φορέας του όλου χρωματογραφήματος. Μέσα στο θάλαμο σε ξεχωριστό δοχείο (π.χ. ποτήρι ζέσεως των 50 mL), μπαίνει ποσότητα νερού που σκοπό έχει να προκαλέσει κορεσμό του χαρτιού στη στατική φάση. Η στήριξη του χαρτιού μπορεί απλά να γίνει και σε μια γυάλινη ράβδο που τοποθετείται στην κορυφή του ογκομετρικού κυλίνδρου.

Για την εκτέλεση του χρωματογραφήματος σε μια θέση της λωρίδας του χαρτιού που έχει προσημειωθεί με μολύβι μπαίνει μια σταγόνα λίγων μL , με μικροσιφώνιο ή μικρομετρική σύριγγα, από το διάλυμα του δείγματος. Η θέση της σταγόνας είναι κατά κανόνα κοντά στην άκρη της λωρίδας. Στη συνέχεια η κηλίδα που δημιουργήθηκε από τη σταγόνα ξηραίνεται με εξάτμιση του διαλύτη. Η προετοιμασία αυτή γίνεται εκτός του θαλάμου ανάπτυξης τηρουμένων βεβαίως όλων των κανόνων καθαρού περιβάλλοντος.

Το χρωματογραφικό χαρτί κρεμείται τώρα στο θάλαμο ανάπτυξης που περιέχει ήδη το ποτήρι με το νερό. Μετά πάροδο λίγων λεπτών ώστε να κορεσθεί το χαρτί με το νερό, εισάγεται ο διαλύτης ανάπτυξης στο θάλαμο ανάπτυξης με προσοχή, ώστε να μην έρχεται σε άμεση επαφή με την κηλίδα αλλά να έρχεται σε επαφή με την άκρη της λωρίδας.

Οι τρόποι με τους οποίους θα γίνει η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος και οι οποίοι μάλιστα επηρεάζουν άμεσα και τη συναρμολόγηση της όλης συσκευής, είναι τρεις. Στο σχήμα 4.19 απεικονίζονται και οι τρεις και ακολουθεί η περιγραφή τους. Έτσι έχουμε:

1) Την ανερχόμενη χρωματογραφία.

Εδώ η κηλίδα μπαίνει κοντά στο κάτω άκρο της λωρίδας. Ο διαλύτης ανάπτυξης μπαίνει στον πυθμένα του θαλάμου τόσοσ ώστε να καλύπτει ένα μέρος (προσοχή όχι την κηλίδα) της λωρίδας (σχήμα 4.19α). Ο διαλύτης ανέρχεται μέσα από τις ίνες του χαρτιού με τη βοήθεια των τριχοειδών δυνάμεων, παίζοντας έτσι το ρόλο της κινητής φάσης. Τα συστατικά που διαλύονται στο διαλύτη ανάπτυ-

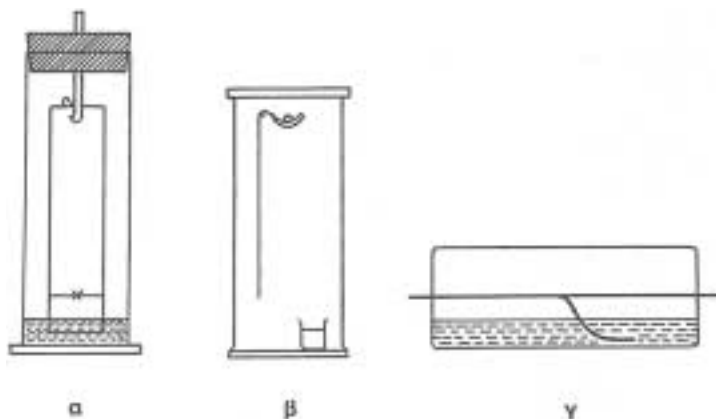
ξης διαλύονται και παρασύρονται από αυτόν ενώ εκείνα που «προτιμούν» το νερό παραμένουν στη στατική φάση.

2) Την κατερχόμενη χρωματογραφία

Εδώ η κηλίδα δημιουργείται κοντά στο πάνω άκρο της λωρίδας της οποίας το πάνω άκρο εμβαπτίζεται στο διαλύτη ανάπτυξης. Αυτός έχει τοποθετηθεί σε ειδικό υποδοχέα στο πάνω άκρο του θαλάμου. (σχήμα 4.19 β). Ο διαλύτης κινείται και με τη δύναμη της βαρύτητας παρασύροντας τα συστατικά της κηλίδας και προκαλώντας έτσι το διαχωρισμό τους.

3) Την κυκλική χρωματογραφία.

Εδώ το χρωματογραφικό χαρτί έχει κυκλικό σχήμα (π.χ. ένας ηθμός) στο κέντρο του οποίου έχει τοποθετηθεί η κηλίδα. Ο χάρτης καλύπτει τώρα μια κάψα που περιέχει το διαλύτη ανάπτυξης. Ένα είδος φιλτιλιού μεταφέρει το διαλύτη προς την κηλίδα και το χαρτί (σχήμα 4.19γ). Λόγω της κυκλικής κίνησης του διαλύτη το χρωματογράφημα δεν έχει ζώνες ή κηλίδες αλλά ομόκεντρους κυκλικούς δακτυλίους.



Σχήμα 4.19 α,β,γ: Είδη χρωματογραφίας χαρτον.

Όταν ο διαλύτης φτάσει στο άλλο άκρο της λωρίδας ή χαρτιού γενικά, σημειώνεται με ένα ελαφρό μολύβι η θέση του (λέγεται και μέτωπο του διαλύτη). Ο χάρτης αποσύρεται από το θάλαμο και ξηραίνεται. Αν οι ζώνες ή κηλίδες ή δακτύλιοι δεν είναι εμφανείς, ακολουθεί η **εμφάνιση** του χρωματογραφήματος. Αυτή γίνεται με αντιδραστήρια τα οποία θα δίνουν έγχρωμες ενώσεις με τα διαχωρισμένα πια

συστατικά. Η εμφάνιση μπορεί να γίνει με ψεκασμό ή εμβάπτιση στο κατάλληλο αντιδραστήριο.

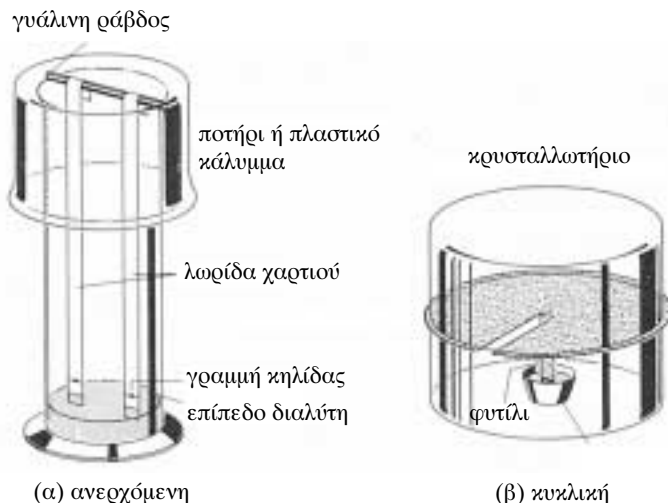
Οι κηλίδες που έχουν πλέον εμφανιστεί σημειώνονται με μολύβι και μετρείται η απόστασή τους από την άκρη της λωρίδας. Αρχικά ο αριθμός των κηλίδων δίνει και τον αριθμό των συστατικών από τα οποία αποτελείται το δείγμα. Η ταυτοποίηση των συστατικών γίνεται όπως προαναφέρθηκε από το συντελεστή επιβράδυνσης, R_F , που είναι ο καθαρός αριθμός και προκύπτει από το πηλίκο της απόστασης της κηλίδας προς την απόσταση του μετώπου. Συνήθως αναφέρονται οι τιμές του R_F πολλαπλασιασμένες επί 100. Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με βιβλιογραφικά δεδομένα προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση. Απαιτείται όμως ιδιαίτερη προσοχή ώστε οι συνθήκες να είναι ακριβώς όπως τις προβλέπει η βιβλιογραφία. Καλύτερη απόδειξη είναι η λήψη χρωματογραφημάτων με γνωστές ουσίες και μετά να γίνει η σύγκριση.

Λεπτομερέστερη περιγραφή της ανερχόμενης και της κυκλικής χρωματογραφίας.

Ας προσπαθήσουμε να περιγράψουμε με περισσότερες εργαστηριακές λεπτομέρειες τις δυο αυτές χρωματογραφίες έτσι ώστε να μπορεί να πραγματοποιεί κανείς όποια σχετική μέτρηση του ζητηθεί. Κάθε φορά θα αλλάζει το δείγμα και η τυχόν προετοιμασία του και - αν χρειάζεται - ο διαλύτης ανάπτυξης και το αντιδραστήριο εμφάνισης

Για την ανερχόμενη χρωματογραφία:

Κόβεται ένα χρωματογραφικό χαρτί (π.χ. Whatman No 1 ή κάποιο ανάλογο) σε πλάτος 1,5 έως 2,5 cm και μήκος τόσο, ώστε να φτάνει στον πυθμένα του ογκομετρικού κυλίνδρου των π.χ. 250 mL, ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί σαν θάλαμος ανάπτυξης. Το ένα άκρο της λωρίδας διπλώνεται έτσι ώστε να κρεμαστεί από τη γυάλινη ράβδο πάνω στο στόμιο του κυλίνδρου φτάνοντας έως 5 mm από τον πυθμένα του (σχήμα 4.20).



Σχήμα 4.20: Η ανερχόμενη (α) και η κυκλική (β) χρωματογραφία χαρτον.

Αποσύρεται το χαρτί και προστίθεται στον κύλινδρο ο διαλύτης ώστε να φτάσει σε ύψος 1 έως 2 cm. Καλύπτεται τώρα ο κύλινδρος με ένα ανεστραμμένο π.χ. ποτήρι ή κάποιο πλαστικό κάλυμμα.

Εν τω μεταξύ με ένα λεπτό μολύβι πάνω στο χαρτί, που στηρίζεται σε μια πολύ καθαρή επιφάνεια, χαράζεται μια ευθεία γραμμή 2 cm από το κάτω άκρο της λουρίδας. Πάνω ή κατά μήκος της γραμμής τοποθετούνται με σύριγγα η μικροσιφώνιο 1 - 20 μL από το δείγμα ανάλογα με την συγκέντρωσή του. Ξηραίνεται το χαρτί για 5 λεπτά στον αέρα ή σε πυριατήριο στους 50°C.

Κρεμιέται τώρα η λωρίδα στο θάλαμο έτσι ώστε να βυθίζεται στο διαλύτη σε βάθος 2 έως 10 mm. Καλύπτεται τώρα ο θάλαμος όσο καλύτερα γίνεται (π.χ. με πλαστική ταινία ώστε να είναι αεροστεγής) και αφήνεται ο διαλύτης να ανέλθει για χρόνο που ποικίλλει από $\frac{1}{2}$ έως 3 ώρες.

Αν το μίγμα έχει 2 ή 3 συστατικά, ένα μήκος λωρίδας 10 - 20 cm δίνει καλούς διαχωρισμούς (διακριτές τιμές R_F). Πολυπλοκότερα δείγματα απαιτούν μήκη λωρίδας 30 ή και 40 cm για αποτελεσματικούς διαχωρισμούς.

Όταν ο διαλύτης φτάσει λίγο πριν το άνω άκρο, αποσύρεται το χαρτί και αμέσως σημειώνεται με το μολύβι το μέτωπο στο οποίο έφτασε ο διαλύτης (το «αμέσως» για να μην εξατμιστεί ο διαλύτης).

Κρεμίζεται τώρα η λωρίδα στον απαγωγό πάνω από μια θερμαινόμενη πλάκα για να ξηρανθεί. Αυτό απαιτείται κυρίως στην περίπτωση κατά την οποία ο διαλύτης παρενοχλεί το χρωματικό test που θα χρησιμοποιηθεί. Ψεκάζεται το χαρτί με το αντιδραστήριο ανάπτυξης και - αν χρειάζεται - και με κάποιο συντηρητικό εφόσον τα υλικά το απαιτούν.

Για την κυκλική χρωματογραφία.

Ως θάλαμος ανάπτυξης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια κάψα ή ένα γυάλινο κρυσταλλωτήριο. Στη θέση του χαρτιού ένας ηθμός κατάλληλης διαμέτρου.

Κόβεται μια λωρίδα από τον ηθμό πάχους 2 έως 5 mm μέχρι το κέντρο του κυκλικού χαρτιού το οποίο καλύπτει τον θάλαμο, έτσι όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα (σχήμα 4.20β) Η λωρίδα αυτή κάμπτεται, ώστε το ελεύθερο άκρο της να βαπτίζεται στο διαλύτη. Τοποθετείται το δείγμα σαν κηλίδα στο κέντρο του χαρτιού. Κλείνεται ο θάλαμος και ακολουθείται η ίδια διαδικασία μέχρις ότου ο διαλύτης να φτάσει στην άκρη του χαρτιού. Ξηραίνεται και ψεκάζεται.

Η μέθοδος αυτή είναι πιο γρήγορη και δίνει καλύτερους διαχωρισμούς από την ανιούσα χρωματογραφία.

4.4.2. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. (TLC)

Η αρχή της μεθόδου.

Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρκετές αναλογίες με την χρωματογραφία στήλης, κύρια στο μηχανισμό και αναλογίες στην τεχνική λήψης των χρωματογραφημάτων, με την χρωματογραφία του χάρτη που γνωρίζατε αμέσως πριν. Ας δούμε τη μέθοδο κρατώντας την ίδια δομή στη μελέτη της. Έτσι:

Η **στατική φάση** αποτελείται από ένα φορέα που μπορεί να είναι μια πλάκα από γυαλί ή αλουμίνιο ή πλαστικό πάνω στην οποία έχει επιστρωθεί μια πολύ λεπτή, ομοιόμορφη, στιβάδα (πάχους συνήθως 100 - 300 μm) από ένα ξηρό και σε

silica gel
αλουμίνα
γη διατόμων

λεπτή σκόνη υλικό που έχει προσροφητικές ικανότητες. Οι κόκκοι του υλικού αυτού είναι της τάξης των 5-50 μm και η λεπτή στιβάδα που προκύπτει είναι η στατική φάση. Τέτοια υλικά είναι το ενεργοποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2 , silica gel), η αλουμίνα που είναι οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3) ή γη διατόμων (kieselguhr) κλπ.

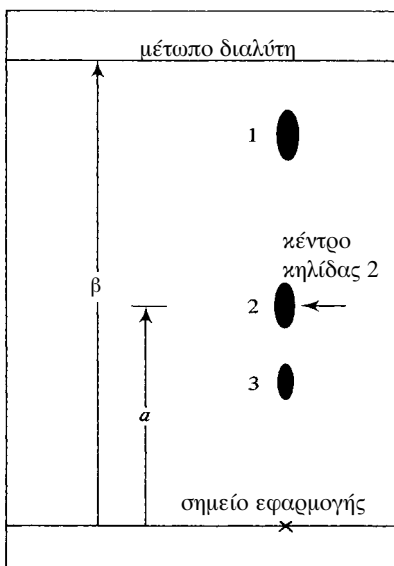
Η κινητή φάση αποτελείται από τους ίδιους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία στήλης. Εδώ προτιμώνται κινητές φάσεις ενός ή το πολύ δύο ή τριών διαλυτών. Η ικανότητα έκλουσης των διαλυτών αυξάνει με την αύξηση της πολικότητας τους, με το νερό να παρουσιάζει την καλύτερη ικανότητα έκλουσης.

Ο μηχανισμός σε πολύ γενικές γραμμές είναι εκείνος της προσρόφησης από τους κόκκους της λεπτής στιβάδας τόσο των συστατικών όσο και του διαλύτη. Η δραστική «πλευρά» του κόκκου επιδρά στην πολική (φορτισμένη..) ομάδα των συστατικών που θα διαχωριστούν. Το μη πολικό τμήμα του κάθε μορίου (π.χ. στους υδρογονάνθρακες) ελάχιστο ρόλο παίζει στον διαχωρισμό. Έτσι γίνεται ένας ανταγωνισμός θα έλεγε κανείς με τα μόρια του διαλύτη να προσροφώνται και έτσι να εκτοπίζουν τα προσροφημένα συστατικά από τη στατική φάση.

Η λήψη και η αξιολόγηση του χρωματογραφήματος γίνεται κατά τρόπο ίδιο με εκείνη της χρωματογραφίας χάρτη. Και εδώ μπορεί να εφαρμόζεται η κατερχόμενη ή η ανερχόμενη τεχνική.

Στη χρωματογραφία της λεπτής στιβάδας επειδή ο φορέας όπως το SiO_2 ή το Al_2O_3 είναι πιο αδρανής από το χαρτί μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο δραστικά αντιδραστήρια στην φάση της εμφάνισης του χρωματογραφήματος. Έτσι για παράδειγμα ψεκασμός με πυκνόθειικό οξύ μετατρέπει τις οργανικές ενώσεις σε καρβουνώδεις κηλίδες μετά την ξήρανση της πλάκας σε πυριατήριο.

Αντίθετα οι τιμές του συντελεστή επιβράδυνσης δεν είναι τόσο αναπαραγωγίσιμες όσο στη χρωματογραφία χάρτη και η τιμή του R_F εξαρτάται από πολλούς παράγοντες ανάμεσα στους οποίους συγκαταλέγονται η ομοιομορφία και το πάχος της λεπτής στιβάδας. Στο κατωτέρω σχήμα 4.21 δίνεται ο υπολογισμός της τιμής του R_F για υπενθύμιση.



Σχήμα 4.21: Υπολογισμός της τιμής του R_F για το συστατικό 2. Είναι $R_F = a/\beta$

Το πιο κρίσιμο σημείο στην χρωματογραφία αυτή είναι η παρασκευή ομοιόμορφης λεπτής στιβάδας στην πλάκα. Στο εμπόριο πωλούνται έτοιμες πλάκες από διάφορα υλικά, επιστρωμένες με διάφορους τύπους προσροφητικών υλικών και σε διάφορα πάχη. Το κόστος τους δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλο και κυμαίνεται από 3000 έως 5000 δραχμές.

Η τεχνική της μεθόδου

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η τεχνική της μεθόδου είναι ανάλογη με εκείνη της χρωματογραφίας χάρτη, κυρίως της ανερχόμενης.

Εδώ στη θέση του χαρτιού βρίσκεται η πλάκα που έχει διαστάσεις, όμοιες με εκείνες του εμπορίου, 5·20 ή 10·20 ή 20·20 cm. Οι συμβατικές πλάκες έχουν στιβάδα πάχους 200 έως 250 μm και σωματίδια του προσροφητικού υλικού διαστάσεων 20 μm ή και λίγο μεγαλύτερα. Υπάρχουν και οι υψηλής απόδοσης πλάκες με λεπτότερη στιβάδα και κόκκους υλικού, οι οποίες πετυχαίνουν καλύτερους διαχωρισμούς.

Η τοποθέτηση του δείγματος στην πλάκα είναι από τα πιο λεπτά σημεία της μέτρησης, ιδίως αν γίνονται ποσοτι-

κές εκτιμήσεις. Συνήθως το δείγμα τοποθετείται σαν κηλίδα σε απόσταση 1 έως 2 cm από την ακμή της πλάκας. Για καλύτερη απόδοση της μέτρησης η κηλίδα πρέπει να έχει διάμετρο περίπου 5 mm. Η θέση της σημειώνεται με ένα ελαφρό μολύβι. Και εδώ χρησιμοποιούνται μικροσιφώνια ή υποδερμικές σύριγγες. Αν το αρχικό διάλυμα είναι πολύ αραιό, μπορεί να γίνουν πάνω στην ίδια κηλίδα τρεις ή τέσσερις προσθήκες αλλά με ενδιάμεση εξάτμιση του διαλύτη με ξήρανση. Για ακριβείς και επαναλήψιμες τοποθετήσεις υπάρχουν στο εμπόριο μηχανικοί δοσιμετρικοί μηχανισμοί.

Η *ανάπτυξη της πλάκας* γίνεται με την τοποθέτησή της στο θάλαμο ανάπτυξης που είναι ένα κλειστό γυάλινο δοχείο το οποίο περιέχει το διαλύτη ανάπτυξης. Σε αυτόν εμβαπτίζεται το κάτω άκρο της πλάκας με προσοχή ώστε να μην έλθουν σε άμεση επαφή η κηλίδα του δείγματος και ο διαλύτης. Όταν ο διαλύτης διασχίσει το μισό ή τα δύο τρίτα της πλάκας, αυτή αποσύρεται από το θάλαμο, ξηραίνεται και είναι έτοιμη για εμφάνιση και αξιολόγηση. Λόγω των διαφορών στα τριχοειδή ο χρόνος ανάπτυξης στην TLC είναι μικρότερος εκείνου της χρωματογραφίας χάρτη και ανάλογα με την κινητή φάση και το μέγεθος των κόκκων του προσροφητικού υλικού είναι της τάξης των 20 - 30 min για μια διαδρομή των 10 cm. Στη χρωματογραφία χάρτη με χαρτί μεγάλου πορώδους και υπό τις ίδιες συνθήκες ο αντίστοιχος χρόνος είναι περίπου 2 h.

Η *εμφάνιση της πλάκας* γίνεται και εδώ με ψεκασμό και λόγω της αντοχής της μπορεί να χρησιμοποιηθεί πυκνό H_2SO_4 ή ατμοί και διάλυμα Ιωδίου (πράγμα το οποίο είναι αδύνατο να γίνει στο χαρτί), τα οποία με τις οργανικές ενώσεις αντιδρούν καθιστώντας τις κηλίδες ορατές (εξού και *οπτικοποίηση* σαν όρος αντί της εμφάνισης). Επίσης χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια που κάνουν τις κηλίδες έγχρωμες, στο φως της ημέρας, όπως η νινυδρίνη και η ισατίνη. Όπως και στη χρωματογραφία χάρτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί λάμπα υπεριώδους, οπότε αποκαλύπτονται οι κηλίδες αν βέβαια είναι από υλικό που *φθορίζει*.

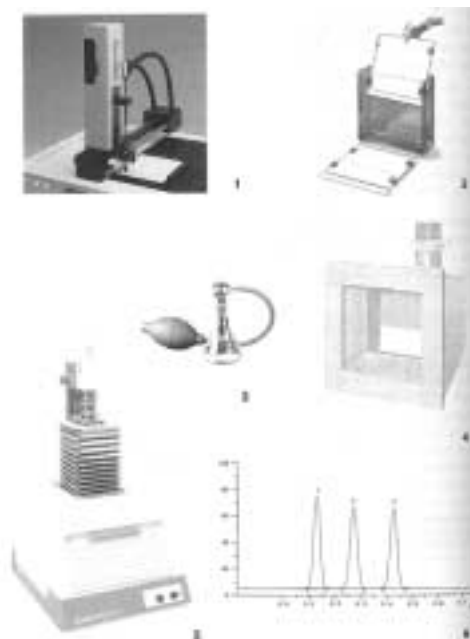
Για την *ποιοτική ανάλυση*, όπως ήδη αναφέρθηκε, χρησιμοποιείται ο συντελεστής επιβράδυνσης R_F και βιβλιογραφικά δεδομένα ή χρωματογράφιση προτύπων ουσιών.

Ενόργανη Ποσοτική Ανάλυση

Για ποσοτικές μετρήσεις χρειάζεται πολύ μεγάλη προσοχή. Τα πρότυπα (standards) και τα δείγματα πρέπει να εφαρμόζονται στην πλάκα (ή το χαρτί) με το ίδιο μέγεθος κηλίδας, με ανάλογες συγκεντρώσεις, οι διαλύτες να είναι οι ίδιοι και γενικά να γίνονται τα χρωματογραφήματα με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες και ουσίες. Η ποσοτική εκτίμηση μπορεί να γίνεται με διάφορους τρόπους όπως :

1. Εκτίμηση με γυμνό μάτι των επιφανειών των κηλίδων προτύπου και δείγματος.
2. Με μέτρηση της επιφάνειας κάθε κηλίδας. Αυτό γίνεται με διαφανές τετραγωνισμένο χαρτί. Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με τον \log της συγκέντρωσης και το εμβαδό των κηλίδων
3. Η κηλίδα κόβεται από την πλάκα (ή το χαρτί), διαλύεται το υλικό που έχει αποθεθεί σε διαλύτη και με κάποια άλλη ενόργανη ανάλυση γίνεται ο προσδιορισμός.
4. Με ένα οπτικό πυκνόμετρο το οποίο μετρά την ένταση του ανακλώμενου φωτός από την επιφάνεια της πλάκας, άρα και από κάθε κηλίδα.

Στο σχήμα 4.22 δίνεται με πολύ αναλυτικό τρόπο μια εικόνα των οργάνων που χρησιμοποιεί μια σύγχρονη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.



ΣΧΗΜΑ 4.22:

Μια σύγχρονη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

1. Εφαρμογή του δείγματος
2. Ανάπτυξη του χρωματογραφήματος
3. Ψεκάστηρας
4. Θάλαμος Ψεκασμού
5. Θάλαμος με κάμερα για λήψη εικόνων χρωματογραφημάτων
6. Ολοκλήρωση ενός χρωματογραφήματος

Ολοκλήρωση ή εμβολογράφηση