



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
(HPLC)

Ομάδα A10

Ημερομηνία διεξαγωγής: 26-11-2019

Ημερομηνία παραλαβής αποτελεσμάτων: 28-11-2019

Ημερομηνία παράδοσης: 12-12-2019

Υπεύθυνη καθηγήτρια:

Θεωρητικό μέρος

Σκοπός ^[1]

Σκοπό της εργαστηριακής αυτής άσκησης αποτελεί η εκμάθηση της πλέον διαδεδομένης τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως HPLC. Με τη μέθοδο αυτή στοχεύουμε στο διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος βενζολίου-τολουολίου-παραξυλολίου (μη πολικές, λιπόφιλες ενώσεις) και στην επεξεργασία του χρωματογραφήματος (ταυτοποίηση κορυφών, εύρεση χρωματογραφικών παραμέτρων) που προκύπτει από τον πλέον σύγχρονο ανιχνευτή της HPLC, τον φωτομετρικό ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (PDA).

Χρωματογραφικές Τεχνικές ^{[2], [3]}

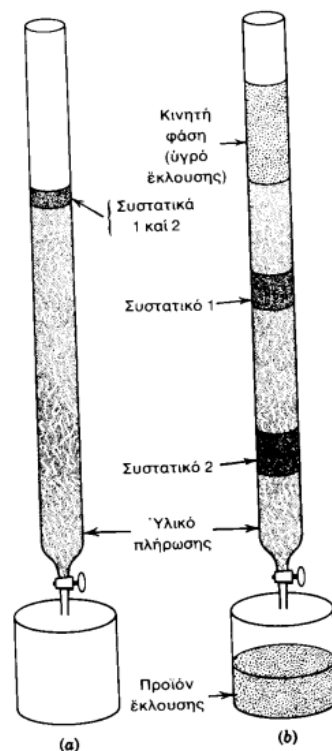
Ο όρος χρωματογραφία αναφέρεται σε μια πανίσχυρη τεχνική φυσικού **διαχωρισμού** συστατικών μείγματος ανόργανων ή οργανικών ουσιών (που έχοντας παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες δε διαχωρίζονται με συμβατές μεθόδους). Εκφράζει μια ποικιλία από διεργασίες που στηρίζονται στις διαφορετικές κατανομές των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ δύο φάσεων, μιας **κινητής** και μιας **στατικής**.

Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές των συστατικών του μείγματος σε ορισμένες ιδιότητες, όπως το σημείο ζέσεως (η πτητικότητα), η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία (για ιοντικές ενώσεις) και το μέγεθος των μορίων. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική **φυσικοχημική συγγένεια** κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις.

Μηχανισμός Διαχωρισμού ^{[2], [3]}

Η κινητή (φέρουσα του δείγματος) φάση, διερχόμενη μέσα από τη στατική, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση επάνω σε αυτή των συστατικών του μείγματος. Τα συστατικά που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση (μοιάζουν περισσότερο με αυτή, έχουν μεγαλύτερη συγγένεια) κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους από συστατικά τα οποία κινούνται ταχύτερα. (τα συστατικά που μοιάζουν περισσότερο με τη στατική φάση διαχωρίζονται πρώτα).

Εάν υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας κάθε συστατικού, εκτός του διαχωρισμού, πραγματοποιείται και ποσοτικός προσδιορισμός.



Εικόνα 1. Μηχανισμός διαχωρισμού συστατικών ^[2]

Είδη Χρωματογραφίας ^{[2], [3], [5]}

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με τους παρακάτω τρόπους:

α) Με βάση τη φυσική κατάσταση της κινητής και της στατικής φάσης:

- Υγροχρωματογραφία (υγρή κινητή φάση: Διαλύτης)
- Αεριοχρωματογραφία (αέρια κινητή φάση)
- Υπερκρίσιμου ρευστού (αέριο υπό υπερκρίσιμες συνθήκες)

Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεά ή υγρή (όπου θα είναι μηχανικά ή χημικά προσδεσμένη σε ένα στερεό υπόστρωμα).

β) Με βάση τη διάταξη της στατικής φάσης:

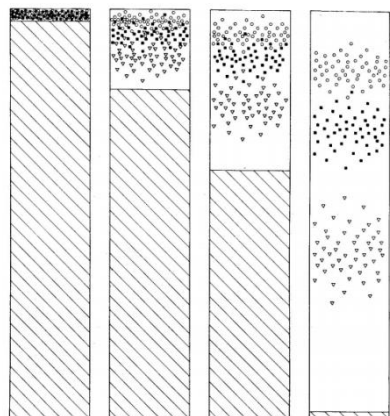
- Χρωματογραφία στήλης (απαιτείται για διαχωρισμούς με αέρια χρωματογραφία)
- Επίπεδη χρωματογραφία
- Λεπτής Στοιβάδας

γ) Με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού:

- Χρωματογραφία προσρόφησης (ροφητικές δυνάμεις)
- Χρωματογραφία κατανομής (**Κριτήρια κατανομής:** Μήκος ανθρακικών αλυσίδων, ύπαρξη δραστικών ομάδων, μορφή συστατικού (ουδέτερο ή ιόν))
- Χρωματογραφία ιονεναλλαγής
- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (μεγάλη σημασία στο μέγεθος του μορίου)
- Χρωματογραφία συγγένειας (σχέση κλειδί- κλειδαριά)

δ) Με βάση τη σχετική πολικότητα των δύο φάσεων:

- Κανονικής φάσεως (η στατική φάση είναι περισσότερο πολική από την κινητή)
- Αντιστρόφου φάσεως (αντιστρέφονται οι πολικότητες των δύο φάσεων)



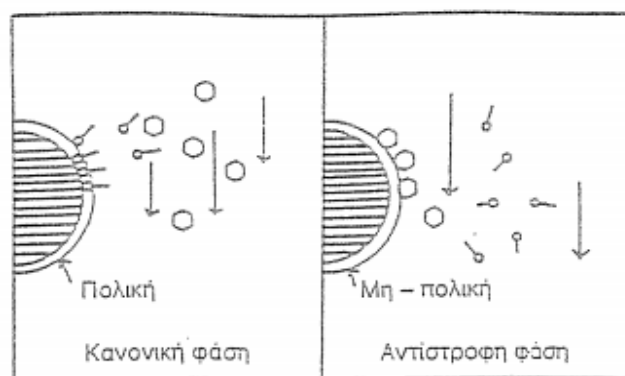
Εικόνα 2. Χρωματογραφική διαδικασία κατά το διαχωρισμό ενός τριαιμελούς μείγματος σε χρωματογραφική στήλη ^[5]

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Στην παρούσα άσκηση εφαρμόζεται υγρή χρωματογραφία κατανομής και αντιστρόφου φάσεως με χρήση χρωματογραφικής στήλης.

Αρχή της Μεθόδου ^{[1], [4]}

Η HPLC στηρίζεται στη διαφορετική μετατόπιση των συστατικών ενός μείγματος κατά μήκος μιας στήλης που περιέχει εξαιρετικά λεπτόκοκκο υλικό (στατική φάση) με τη βοήθεια ενός διαλύτη (κινητή φάση), που ρέει συνεχώς μέσω της στήλης. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική έλξη του κάθε συστατικού για τις δύο φάσεις.



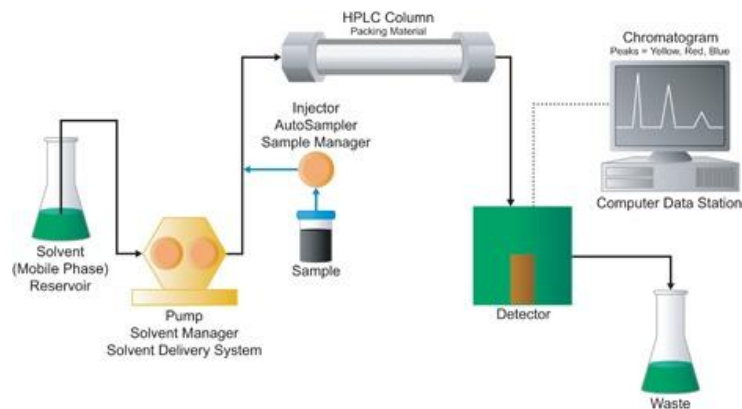
Εικόνα 3. Συμπεριφορά μορίων συστατικών στις χρωματογραφίες κανονικής και αντιστρόφου φάσεως ^[1]

Παρατηρείται ότι στον τύπο κανονικής φάσεως τα πολικά μόρια «ξοδεύουν» περισσότερο χρόνο στη στατική φάση σε σχέση με την κινητή από τα μη πολικά μόρια. Στον τύπο αντιστρόφου φάσεως συμβαίνει το αντίθετο.

Περιγραφή του οργάνου ^{[1], [6], [4]}

Ένα όργανο HPLC περιλαμβάνει τα δοχεία των διαλυτών, το σύστημα άντλησης της κινητής φάσης (μία ή περισσότερες αντλίες εμβολικής ροής, υψηλής πίεσης), το σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη (εγχυτήρας), τη χρωματογραφική στήλη, τον ανιχνευτή και το σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων για την απόδοση του χρωματογραφήματος.

Κάθε συστατικό του μείγματος ανταποκρίνεται διαφορετικά στο απορροφητικό υλικό και προκαλεί το διαχωρισμό των συστατικών του υλικού δείγματος και την έξοδο από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Έρχεται πρώτα το υλικό που συνδέεται καλά με την κινητή φάση. Επιπλέον, ισχύει ότι όσο πιο λιπόφιλη (λιποφιλία = υδροφοβία - πολικότητα) είναι μια ένωση τόσο περισσότερο καθυστερεί να βγει από τη στήλη.



Εικόνα 4. Σύστημα οργάνων υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) [8]

Εφαρμογές [1], [9]

Σήμερα η HPLC παρουσιάζει πολύ μεγάλο εύρος εφαρμογών κυρίως στους τομείς της Βιοτεχνολογίας, της βιοχημείας, της βιομηχανίας τροφίμων, αρωμάτων και ενεργειών και της ανόργανης χημείας (αναλύσεις ιόντων, ειδοταυτοποίηση σε οικολογικά δείγματα), αλλά και στις επιστήμες της ζωής, όπου συνεισφέρει στην αποκωδικοποίηση των γονιδίων και στην ανακάλυψη γενετικών βλαβών και ασθενειών.

Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει στον κλάδο της φαρμακευτικής, στον οποίο η HPLC είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ποσοτικοποίηση φαρμάκων σε σκευάσματα. Η HPLC χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της περιεκτικότητας διαφόρων συστατικών του υλικού δείγματος ή για τον καθαρισμό. Για παράδειγμα, είναι πολύ χρήσιμη για τη μέτρηση της στάθμης του δραστικού φαρμάκου σε ένα δεδομένο υλικό. Αν και οι προσδιορισμοί της Φαρμακοποιίας βασίζονται ακόμη αρκετά στην άμεση φασματομετρία UV, σε βιομηχανικό επίπεδο αυτή συνήθως συνδυάζεται με προηγούμενο διαχωρισμό με HPLC. Ο συνδυασμός των δύο αυτών τεχνικών παρέχει μια ακριβή, επαναλήψιμη και ανθεκτική μέθοδο για την ποσοτική ανάλυση των φαρμακευτικών προϊόντων.

Πειραματικό μέρος

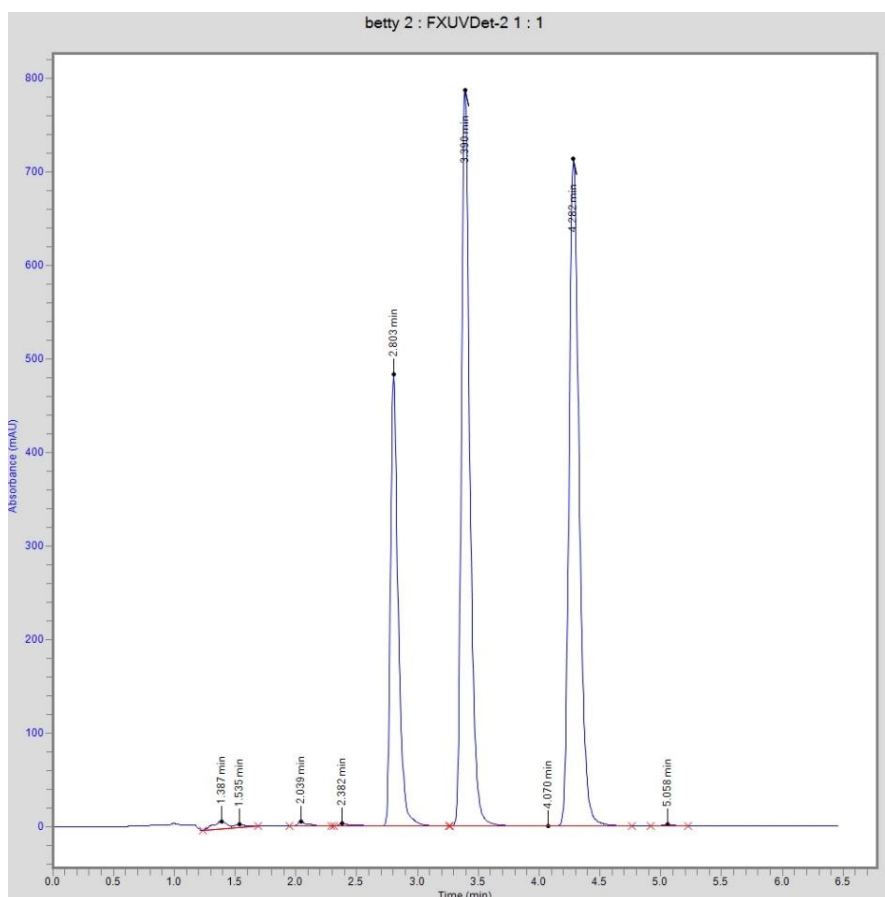
Πειραματική διαδικασία

Σε αυτό το πείραμα, στόχος είναι να διαχωριστεί μείγμα βενζολίου-τολουολίου-παραξυλολίου στα συστατικά του. Το όργανο αρχικά βαθμονομείται, δηλαδή μετράται ο θόρυβός του. Στη συνέχεια επιλέγονται οι διαλύτες (κινητή φάση) που θα χρησιμοποιηθούν. Η κινητή φάση συνίσταται από νερό υψηλής καθαρότητας (περίπου 0,06 μS) και ακετονιτρίλιο, σε αναλογία 1:4 (20% νερό - 80% ακετονιτρίλιο)· η ροή της δε, ρυθμίζεται σε 1mL/min. Κατόπιν, λαμβάνεται με σύριγγα ποσότητα του μελετώμενου μείγματος και τοποθετείται στην υποδοχή του οργάνου. Επειδή μπορεί να έχουν παραμείνει ίχνη του προηγούμενου δείγματος στο όργανο, τα πρώτα λεπτά ρέει μόνο ο διαλύτης, προκειμένου να καθαριστεί η στήλη από τα υπολείμματα. Στη συνέχεια, το δείγμα εισρέει στη στήλη και εν τέλει παραλαμβάνεται το χρωματογράφημα που παρατίθεται παρακάτω.

Αποτελέσματα – Συζήτηση αποτελεσμάτων

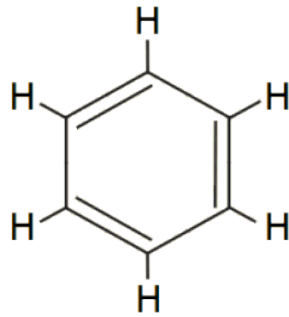
1. Σειρά έκλουσης των ουσιών βάσει της λιποφιλίας τους

Η κινητή φάση αποτελείται από ακετονιτρίλιο και νερό σε ποσοστό 80% και 20% αντίστοιχα. Χρησιμοποιείται η στήλη HS DISCOVERY C18 της SUPELCO 4.6 mm x 15 cm, η οποία περιέχει μη πολικό υλικό. Έπεται ότι μέσα στη στήλη θα παραμείνουν ενώσεις μη πολικές, ενώ οι πολικές θα εκλουστούν πιο γρήγορα. Ακολουθεί το ληφθέν διάγραμμα (χρωματογράφημα):

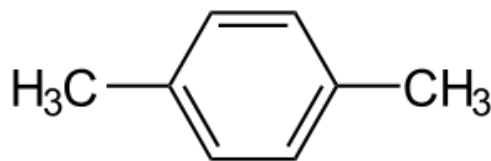


Εικόνα 5. χρωματικός διαχωρισμός μείγματος βενζολίου τολουολίου και παραξυλολίου.

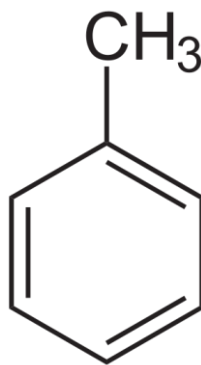
Προκειμένου να βρεθεί η σειρά έκλουσης των ουσιών, αναζητείται η δομή τους, ώστε να εξεταστεί η πολικότητα της κάθε ένωσης:



Εικόνα 6. Δομή βενζολίου^[10]



Εικόνα 7. Δομή παραξυλίου^[11]



Εικόνα 8. Δομή τολουόλιου^[12]

Από τη μελέτη της μορφής των παραπάνω δομών, συμπεραίνεται ότι το βενζόλιο είναι μη πολική ένωση, οπότε θα εξέλθει τελευταίο από τη χρωματογραφική στήλη. Μεταξύ των άλλων δύο, το τολουόλιο είναι το πιο πολικό, αφού η συνισταμένη της διπολικής του ροπής είναι διάφορη του μηδενός. Συνεπώς, η σειρά εξόδου διαμορφώνεται ως εξής: *Πρώτα εκλούεται το τολουόλιο, ύστερα το παραξυλόλιο και τελευταίο το βενζόλιο.*

2. Αξιολόγηση του διαχωρισμού υπολογίζοντας τις χρωματογραφικές παραμέτρους της σελίδας 125 του εργαστηριακού οδηγού.

Πριν τον υπολογισμό των διάφορων παραμέτρων, παρατίθεται πίνακας με τα χαρακτηριστικά που υπολογίζονται για κάθε συστατικό από το χρωματογράφημα.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά μεγέθη για κάθε συστατικό που προκύπτουν από το χρωματογράφημα.

Χαρακτηριστικό	Τολουόλιο	Παραξυλόλιο	Βενζόλιο
Χρόνος ανάσχεσης t_R (min)	2,803	3,990	4,282
Πλάτος κορυφής w	0,4	0,4	0,5
Ύψος κορυφής	480	790	720

Ακολουθούν οι πίνακες με τις υπολογιζόμενες παραμέτρους:

Πίνακας 2. Παράμετροι που αφορούν σε ένα μεμονωμένο συστατικό.

Παράμετρος	Τολουόλιο	Παραξυλόλιο	Βενζόλιο	Επιθυμητές τιμές
Συντελεστής χώρησης μιας ουσίας k'	1,336	2,325	2,568	$1 < k' < 10$
Συντελεστής ασυμμετρίας χρωματογραφικής κορυφής A_s	2	1,5	2	Βέλτιστη τιμή: 1 Για ποσοτικούς υπολογισμούς υψηλής ακρίβειας δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1,2

Πίνακας 3. Παράμετροι που αφορούν σε ζεύγη συστατικών

Παράμετρος	Τολουόλιο – Βενζόλιο	Τολουόλιο – Παραξυλόλιο	Βενζόλιο – Παραξυλόλιο	Επιθυμητές τιμές
Συντελεστής διαχωρισμού δύο συστατικών α	1,923	1,740	1,105	$\alpha > 1$
Διαχωριστικότητα δύο συστατικών R_s	3,698	2,638	0,649	Υφίσταται διαχωρισμός όταν $R_s > 1$ Ποσοτικοί προσδιορισμοί είναι εφικτοί για $R_s > 1,5$

Πίνακας 4. Παράμετροι που αφορούν στη στήλη.

Παράμετρος	Μέση τιμή	Επιθυμητές τιμές
Αριθμός των θεωρητικών δίσκων της στήλης N (αποτελεσματικότητα της στήλης)	1212,7	Υψηλό
Ύψος θεωρητικών δίσκων στήλης H (mm)	0,140	0,01 - 1

Τα παραπάνω μεγέθη υπολογίζονται βάσει των ακόλουθων σχέσεων:

$$k' = t_R - t_0, \text{ όπου } t_0 \text{ ο νεκρός χρόνος} \cdot \text{ στο συγκεκριμένο πείραμα ισούται με } 1,2 \text{ min}$$

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5(w_1 + w_2)}$$

$$N = 16 * \left(\frac{t_R}{w}\right)^2$$

$$H = \frac{L}{N}, \text{ όπου } L \text{ το μήκος της στήλης} \cdot \text{ ισούται με } 15 \text{ cm (ή } 150 \text{ mm)}$$

$$A_s = \frac{b}{a}, b > a$$

Για το συντελεστή ασυμμετρίας A_s , σχεδιάστηκε ο άξονας συμμετρίας της κορυφής. Στο 10% από τη βάση μετρήθηκε η απόσταση του άξονα από την αριστερή πλευρά (a) και η απόστασή του από τη δεξιά πλευρά (b). Ακόμη, σημειώνεται ότι οι παράμετροι H & N που αφορούν στη στήλη, υπολογίστηκαν για κάθε συστατικό ξεχωριστά, βάσει των παραπάνω εξισώσεων, και ύστερα υπολογίστηκε η μέση τιμή τους, η οποία και τελικά παρουσιάζεται.

Παρατηρούμε ότι όλες οι υπολογισθείσες παράμετροι βρίσκονται εντός των επιθυμητών ορίων, εκτός από το συντελεστή ασυμμετρίας και τη διαχωριστότητα. Σχετικά με το συντελεστή ασυμμετρίας, υπάρχουν σφάλματα και κατά τη μέτρηση των a, b και κατά τη σχεδίαση του άξονα συμμετρίας, οπότε μια λύση θα μπορούσε να είναι να δοθεί μεγαλύτερη ακρίβεια στις τιμές των αξόνων. Όσον αφορά τη διαχωριστότητα των δύο συστατικών, συμπεραίνουμε πως ποσοτικοί προσδιορισμοί δύνανται να γίνουν μεταξύ τολουολίου και βενζολίου και μεταξύ τολουολίου και παραξυλολίου, αφού $R_s > 1,5$. Στην περίπτωση του συνδυασμού βενζολίου – παραξυλολίου βλέπουμε ότι δεν υφίσταται διαχωρισμός ($R_s < 1$), δηλαδή ότι υπάρχει συνέκλωση.

Προκειμένου να αυξηθεί η διαχωριστότητα των συστατικών, πρέπει να βελτιωθεί η εκλεκτικότητα. Αυτό μπορεί να γίνει αν μεταβληθεί η σύσταση του διαλύτη ή η ροή της κινητής φάσης. Για παράδειγμα, αν κάποιο συστατικό «αργεί» να εξέλθει από τη στήλη, τότε μπορούμε να αλλάξουμε το διαλύτη έτσι ώστε να του μοιάζει περισσότερο και να το «τραβήξει» πιο

γρήγορα. Εν προκειμένω, επιθυμούμε είτε το παραξυλόλιο να εξέλθει γρηγορότερα, είτε το βενζόλιο να καθυστερήσει περισσότερη ώρα να εκλουστεί. Για παράδειγμα, αν μεταβάλουμε τη σύσταση του διαλύτη, αυξάνοντας την περιεκτικότητά του σε ακετονιτρίλιο (λιγότερο πολικό από το νερό), τότε τα συστατικά εκλούνται ταχύτερα. Το παραξυλόλιο θα εξέλθει γρηγορότερα και δε θα παρατηρηθεί υψηλή συνέκλωση με το βενζόλιο.

3. *Αν η κινητή φάση άλλαζε σύσταση από 80 Ακετονιτρίλιο-20 H₂O σε 60 Ακετονιτρίλιο - 40 H₂O πώς θα επηρέαζε αυτή η αλλαγή το διαχωρισμό;*

Με την αλλαγή της αναλογίας στη σύσταση της κινητής φάσης, ουσιαστικά αυξάνεται η πολικότητά της, αφού το νερό (που αυξάνεται) είναι πιο πολικό μόριο από το ακετονιτρίλιο (που ελαττώνεται). Συνεπώς, θα εκλούνται γρηγορότερα μόρια μεγαλύτερης πολικότητας· ωστόσο κανένα από τα συστατικά του μείγματος δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως ιδιαιτέρως πολικό, οπότε θα καθυστερήσουν όλα να εξέλθουν από τη στήλη.