

Κεφάλαιο 25: Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Ενόργανη Χημική Ανάλυση (ΜΠ 212)

Καθ. Έλια Ψυλλάκη

Εργαστήριο Υδατικής Χημείας
Σχολή Χημικών Μηχανικών και
Μηχανικών Περιβάλλοντος
Πολυτεχνείο Κρήτης

Γραφείο διδάσκουσας: Κ1.102

Τηλ: 2821037810

email: epsillakis@tuc.gr

Περίγραμμα κεφαλαίου

- 25-1 Η χρωματογραφική διαδικασία
- 25-2 Έγχυση και ανίχνευση στην HPLC
- 25-3 Ανάπτυξη μεθόδων για ισοκρατικούς διαχωρισμούς αντίστροφης φάσης
- 25-4 Βαθμιδωτοί διαχωρισμοί
- 25-5 Κάντε το με έναν υπολογιστή

Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

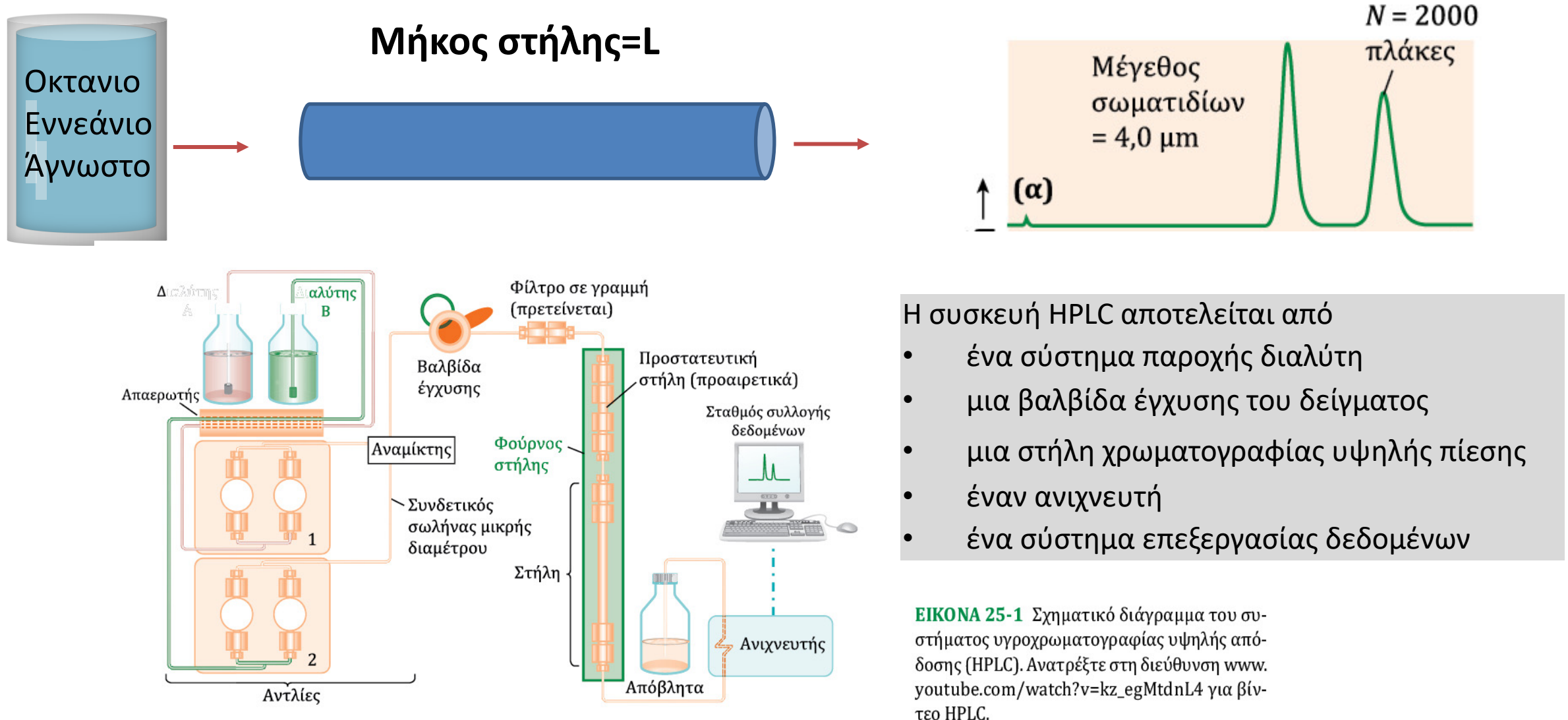
Η **υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης** (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) χρησιμοποιεί υψηλή πίεση για να ωθήσει τον διαλύτη μέσω κλειστών στηλών που περιέχουν λεπτόκοκκα σωματίδια, τα οποία παρέχουν υψηλή διαχωριστική ικανότητα.

Οι ειδικοί συνήθως προτιμούν την αεριοχρωματογραφία από την υγροχρωματογραφία όταν είναι εφικτή η επιλογή, επειδή η αεριοχρωματογραφία:

- είναι λιγότερο δαπανηρή
- παρέχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα διαχωρισμού
- παράγει πολύ λιγότερα απόβλητα

Η υγροχρωματογραφία είναι σημαντική επειδή πολλές χημικές, βιοχημικές και φαρμακευτικές ενώσεις δεν είναι επαρκώς πτητικές για αεριοχρωματογραφία.

Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)



- Η συσκευή HPLC αποτελείται από
- ένα σύστημα παροχής διαλύτη
 - μια βαλβίδα έγχυσης του δείγματος
 - μια στήλη χρωματογραφίας υψηλής πίεσης
 - έναν ανιχνευτή
 - ένα σύστημα επεξεργασίας δεδομένων

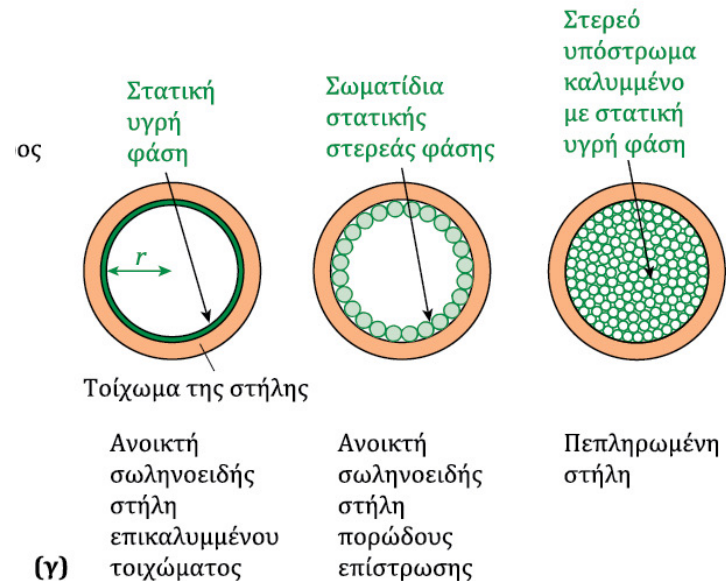
EIKONA 25-1 Σχηματικό διάγραμμα του συστήματος υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Ανατρέξτε στη διεύθυνση www.youtube.com/watch?v=kz_egMtdnL4 για βίντεο HPLC.

25-1 Η χρωματογραφική διαδικασία

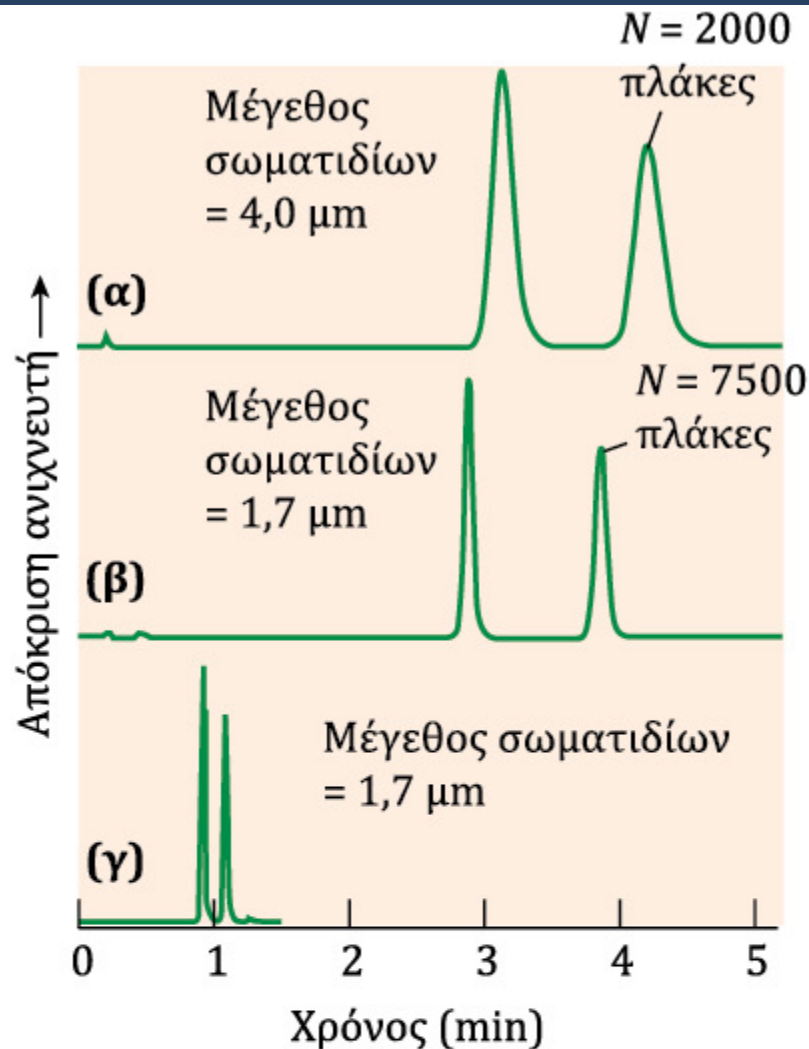
Η χρωματογραφική διαδικασία

Η διάχυση στα υγρά είναι 10^4 φορές πιο αργή από τη διάχυση στα αέρια. Ως εκ τούτου, στην υγροχρωματογραφία δεν είναι γενικά εφικτό να χρησιμοποιηθεί ανοικτή σωληνοειδής στήλη.

Η υγροχρωματογραφία διεξάγεται με πεπληρωμένες στήλες έτσι ώστε τα μόρια του αναλύτη να μην χρειάζεται να διαχέονται πολύ μακριά για να συναντήσουν τη στατική φάση.



Τα μικρά σωματίδια δίνουν υψηλή απόδοση
αλλά απαιτούν υψηλή πίεση



ΕΙΚΟΝΑ 25-2 (α και β) Χρωματογραφήματα του ίδιου δείγματος με την ίδια γραμμική ταχύτητα σε στήλες μήκους 5,0 cm πεπληρωμένες με C_{18} -πυριτία. (γ) Χρησιμοποιήθηκε ισχυρότερος διαλύτης για ταχύτερη έκλουση των αναλυτών από τη στήλη του πλαισίου β. [Δεδομένα από Y. Yang and C. C. Hodges, "Assay Transfer from HPLC to UPLC for Higher Analysis Throughput," *LCGC North Am. Supplement*, May 2005, p. S31].

Μικρά σωματίδια: Πλεονεκτήματα

- Τα μικρά σωματίδια μειώνουν το ύψος πλάκας.
- Για πραγματικά δείγματα σε μια στήλη που λειτουργεί υπό συνήθεις συνθήκες, ο αριθμός πλακών στήλης μήκους L (cm) είναι περίπου

$$N \approx \frac{3000 \cdot L(\text{cm})}{d_p(\mu\text{m})}$$

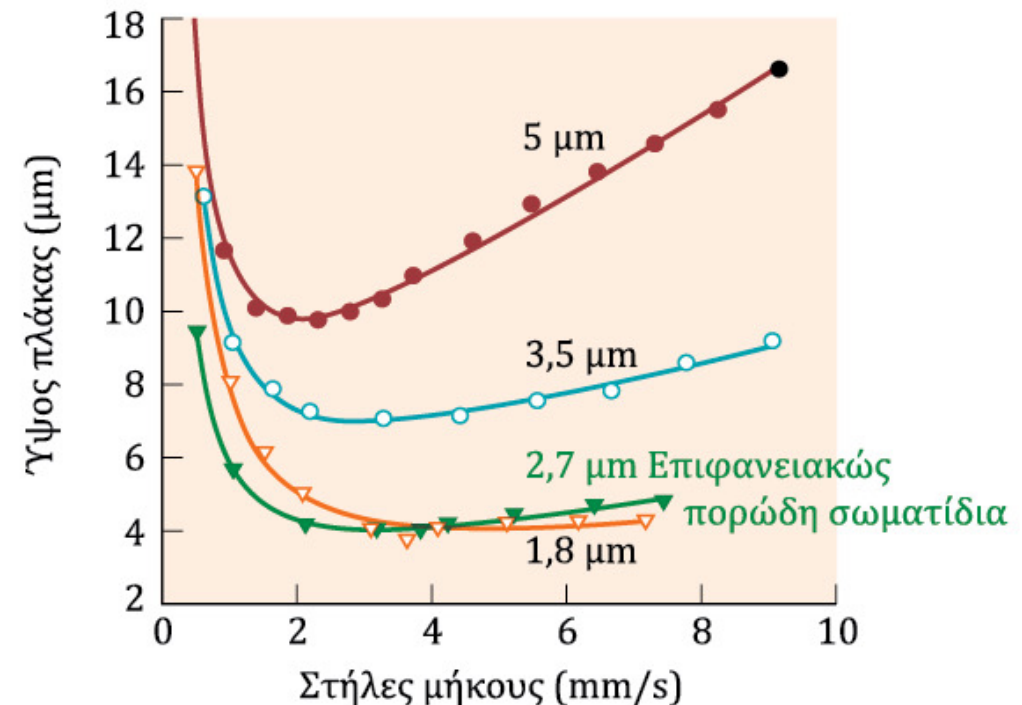
$$H \approx A + \frac{B}{u_x} + Cu_x$$

Πολλαπλές διαδρομές Διαμήκης διάχυση Μεταφορά μάζας

Ομοιόμορφη ροή μέσω της στήλης, μειώνοντας έτσι το A

Όσο μικρότερα είναι τα σωματίδια, τόσο μικρότερη είναι η απόσταση που πρέπει να διανύσει ο αναλύτης (C)

Το μικρό μέγεθος σωματιδίων, σε συνδυασμό με μια στενή στήλη και υψηλότερη ταχύτητα ροής, σημαίνει ότι ο αναλύτης δεν αραιώνεται τόσο πολύ καθώς ταξιδεύει στη στήλη



Μικρά σωματίδια: Αυξημένη πίεση, θερμοκρασία

Το πρόβλημα που προκύπτει από τη χρήση σωματιδίων μικρού μεγέθους είναι η αντίσταση στη ροή του διαλύτη.

Η πίεση που απαιτείται για την ώθηση του διαλύτη μέσω της στήλης είναι

$$P = f \frac{F \eta L}{\pi r^2 d_p^2}$$

όπου F είναι η ταχύτητα ροής όγκου, η είναι το ιξώδες του διαλύτη, L είναι το μήκος της στήλης, r η ακτίνα της στήλης και d_p είναι η διάμετρος των σωματιδίων. Ο συντελεστής f εξαρτάται από το σχήμα των σωματιδίων και τη διάταξη των σωματιδίων.

Επίσης, η θερμοκρασία στο κέντρο της στήλης μπορεί να είναι και 2C υψηλότερη από τα άκρα λίγω. Της τριβής του διαλύτη στα σωματίδια.

ΠΙΝΑΚΑΣ 25-1 Η επίδοση ως συνάρτηση της διαμέτρου των σωματιδίων

ΠΙΝΑΚΑΣ 25-1 Η επίδοση ως συνάρτηση της διαμέτρου των σωματιδίων			
Μέγεθος σωματιδίων d_p (μm)	Χρόνος κατακράτησης (min)	Αριθμός πλακών (N)	Απαιτούμενη πίεση (bar)
5,0	30	25.000	19
3,0	18	42.000	87
1,5	9	83.000	700
1,0	6	125.000	2300
Σημείωση: Η θεωρητική επίδοση στήλης μήκους 25 cm και διαμέτρου 33 μm στο ελάχιστο ύψος πλάκας για αναλύτη με $k = 2$ και συντελεστή διάχυσης = $6,7 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ με εκλούστη ακετονιτρίλιο/νερό. ΠΗΓΗ: Δεδομένα από J. E. MacNair, K. D. Patel, and J. W. Jorgenson, "Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatography with 1.0- μm Particles," <i>Anal. Chem.</i> 1999 , 71, 700.			

Σημείωση: Η θεωρητική επίδοση στήλης μήκους 25 cm και διαμέτρου 33 μm στο ελάχιστο ύψος πλάκας για αναλύτη με $k = 2$ και συντελεστή διάχυσης = $6,7 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ με εκλούστη ακετονιτρίλιο/νερό.

Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης

- Πριν από το 2004 η HPLC λειτουργούσε με πιέσεις $\sim 7\text{-}40\text{ MPa}$ ($70\text{-}400\text{ bar}$) για την επίτευξη ταχύτητας ροής $\sim 0,5\text{-}5\text{ mL/min}$.
- Στη συνέχεια έγινε εμπορικά διαθέσιμος εξοπλισμός για χρήση σωματιδίων διαμέτρου $1,5\text{ έως }2\text{ }\mu\text{m}$ σε πιέσεις έως 150 MPa (1500 bar). Η χρωματογραφία με σωματίδια διαμέτρου $1,5\text{ έως }2\text{ }\mu\text{m}$ σε υψηλή πίεση ονομάζεται συνήθως **υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης** (Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UHPLC).

Τα όργανα αυτά παρέχουν σημαντικά αυξημένη διαχωριστικότητα ή μειωμένο χρόνο διαχωρισμού

- Απαιτούνται μικρότεροι όγκοι εκτός στήλης και αυξημένη καθαρότητα δείγματος (μικρότεροι ηθμοί) για τη διατήρηση της απόδοσης της UHPLC

ΠΙΝΑΚΑΣ 25-2 Όργανα HPLC και UHPLC και χαρακτηριστικά των δειγμάτων

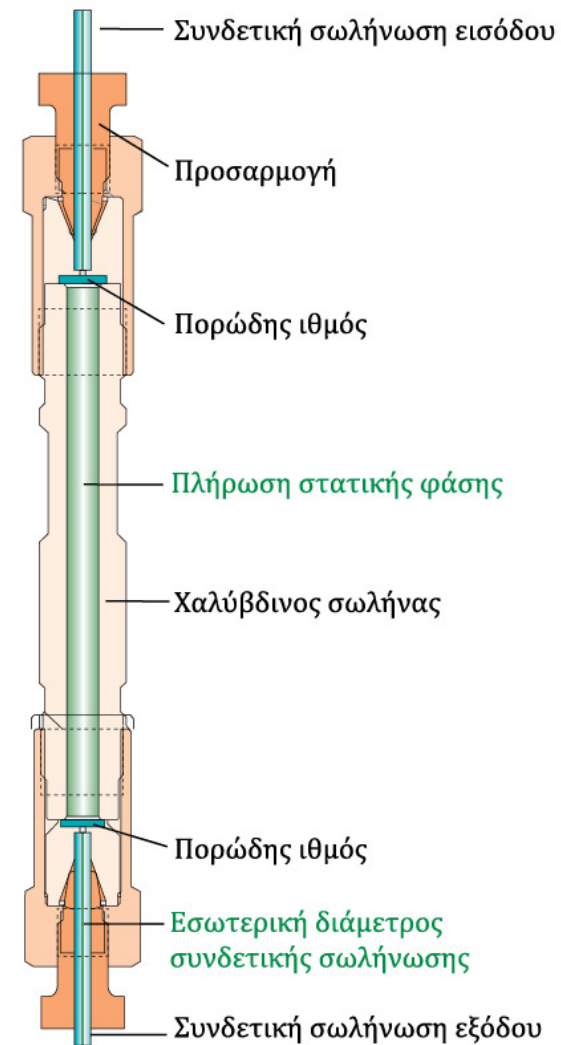
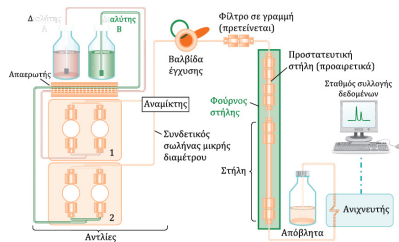
ΠΙΝΑΚΑΣ 25-2 Όργανα HPLC και UHPLC και χαρακτηριστικά των δειγμάτων

Ιδιότητα	HPLC	UHPLC
Σωλήνωση σύνδεσης	Εσωτερική διάμετρος 0,175–0,125 mm	Εσωτερική διάμετρος 0,125–0,0625 mm
Εκτός στήλης διακύμανση	$\geq 40 \mu\text{L}^2$	$\leq 10 \mu\text{L}^2$
Πορώδη φίλτρα στηλών	Σωματίδια 5- μm : φίλτρα 2,0- μm	Σωματίδια <2- μm
	Σωματίδια 3- μm : φίλτρα 0,5- μm	Φίλτρα 0,2- μm
Διήθηση δείγματος	Σωματίδια 5- ή 3- μm : Φίλτρα 0,5- μm	Σωματίδια <2- μm : Φίλτρα 0,2- μm

ΠΗΓΗ: Δεδομένα από J. W. Dolan, "UHPLC Tips and Techniques," LCGC North Am. 2010, 28 (November), 944; S. Fekete and J. Fekete, "The Impact of Extra-Column Band Broadening on the Chromatographic Efficiency of 5-cm-Long Narrow-Bore Very Efficient Columns," *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 5286.

Η στήλη

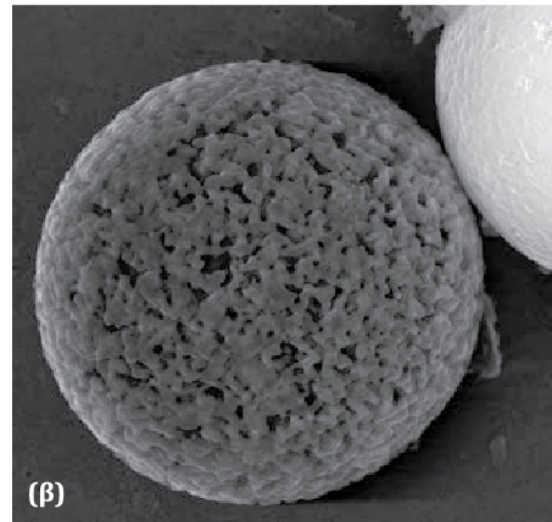
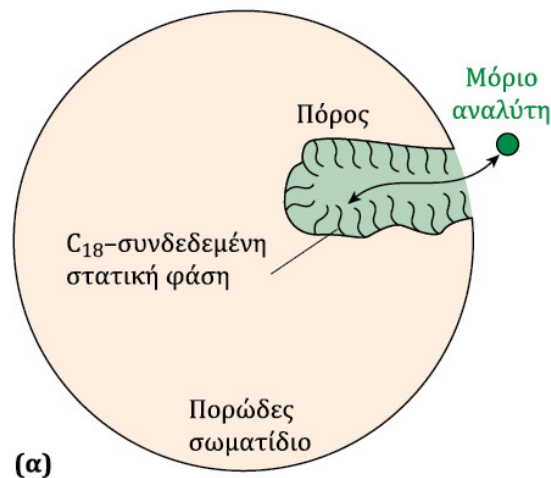
- Οι στήλες είναι ακριβές και καταστρέφονται εύκολα από σκόνη ή σωματίδια στο δείγμα ή τον διαλύτη.
- Έχουν μήκος 3-30 cm και εσωτερική διάμετρο 1-5 mm (Εικόνα 25-4).
- Η είσοδος στην κύρια στήλη μπορεί να προστατεύεται με **προστατευτική στήλη**.
- Η θέρμανση της χρωματογραφικής στήλης έως 60°C, μειώνει το ιξώδες του διαλύτη, μειώνοντας έτσι την απαιτούμενη πίεση ή επιτρέποντας ταχύτερη ροή. Συνήθως ρυθμίζεται σε 10°C πάνω από τη θερμοκρασία δωματίου
- Μέχρι πρόσφατα, η πιο συνήθης διάμετρος στήλης HPLC ήταν 4,6 mm. Τώρα τα 2,1 mm γίνονται πιο συνηθισμένα.
- Η στενή στήλη είναι πιο συμβατή με τη φασματομετρία μαζών, η οποία απαιτεί χαμηλή ροή διαλύτη. Η στενή στήλη απαιτεί λιγότερο δείγμα και παράγει λιγότερα απόβλητα.



ΕΙΚΟΝΑ 25-4 Στήλη HPLC μήκους 5,0 cm και εσωτερικής διαμέτρου 0,30 cm. Πορώδεις μεταλλικοί ηθμοί από θερμοσυσσωματωμένο χάλυβα συγκρατούν τη στατική φάση και διανέμουν ομοιόμορφα το υγρό σε όλη τη διάμετρο της στήλης. Η συνδυαστική σωλήνωση έχει στενή εσωτερική διάμετρο. [Δεδομένα από Waters Corporation, Milford, MA].

Η στατική φάση

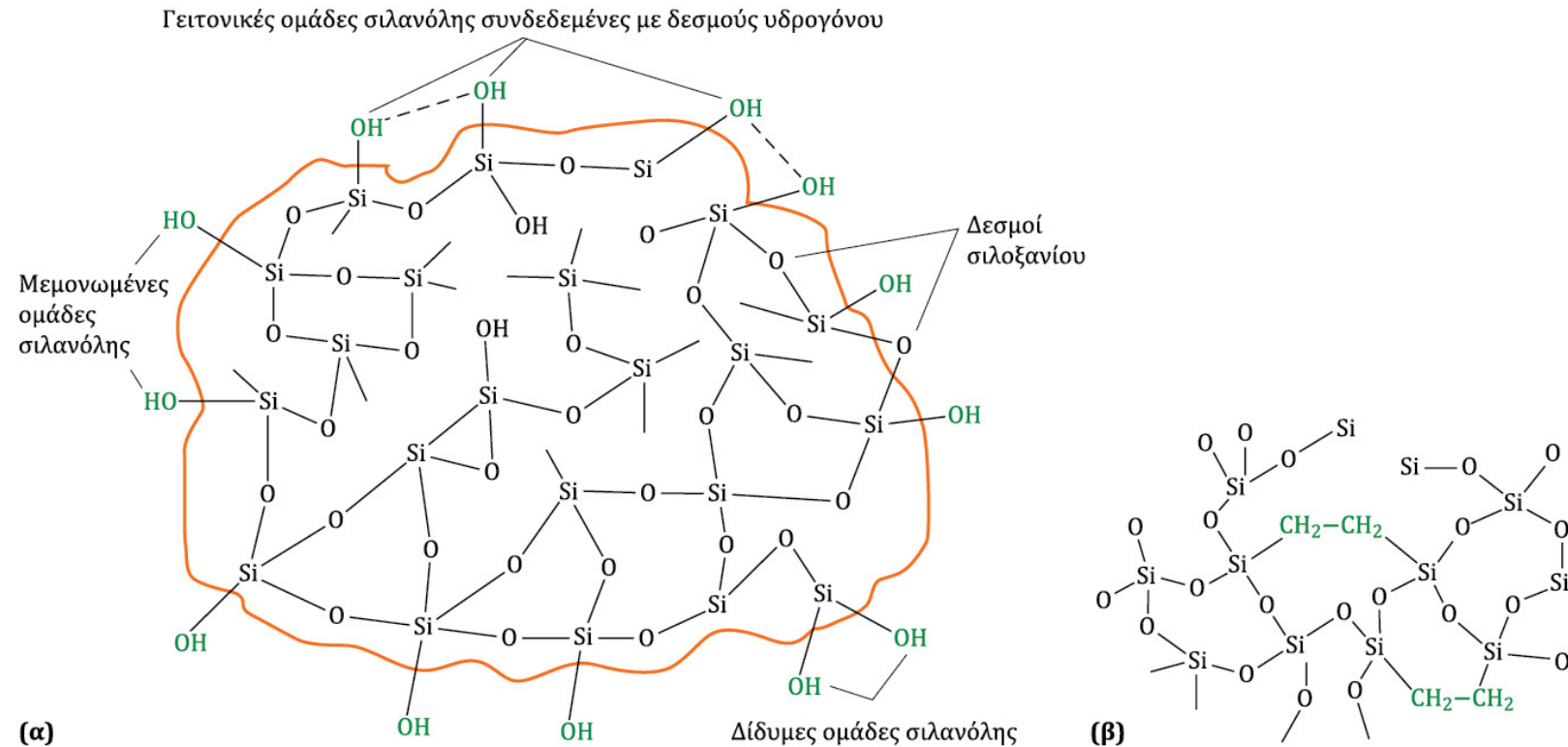
Το πιο συνηθισμένο υπόστρωμα είναι εξαιρετικά καθαρά, σφαιρικά, **μικροπορώδη σωματίδια** διοξειδίου του πυριτίου. Περισσότερο από το 99% αυτής της επιφάνειας βρίσκεται εντός των πόρων. Οι πόροι είναι αρκετά ευρείς για να εισέρχονται αναλύτες και διαλύτης.



ΕΙΚΟΝΑ 25-5 (α) Σχηματική δομή πορώδους σωματιδίου. Η διάμετρος των πόρων είναι τυπικά ~0,2% της διαμέτρου του σωματιδίου. **(β)** Σαρωτική ηλεκτρονική μικροσκοπία μικροπορώδους σωματιδίου πυριτίας διαμέτρου 4,4 μm (για χρωματογραφία) από πειραματική παρτίδα που έγινε από τον K. Wyndham στην Waters Corporation. [Παραχώρηση από J. Jorgenson, University of North Carolina].

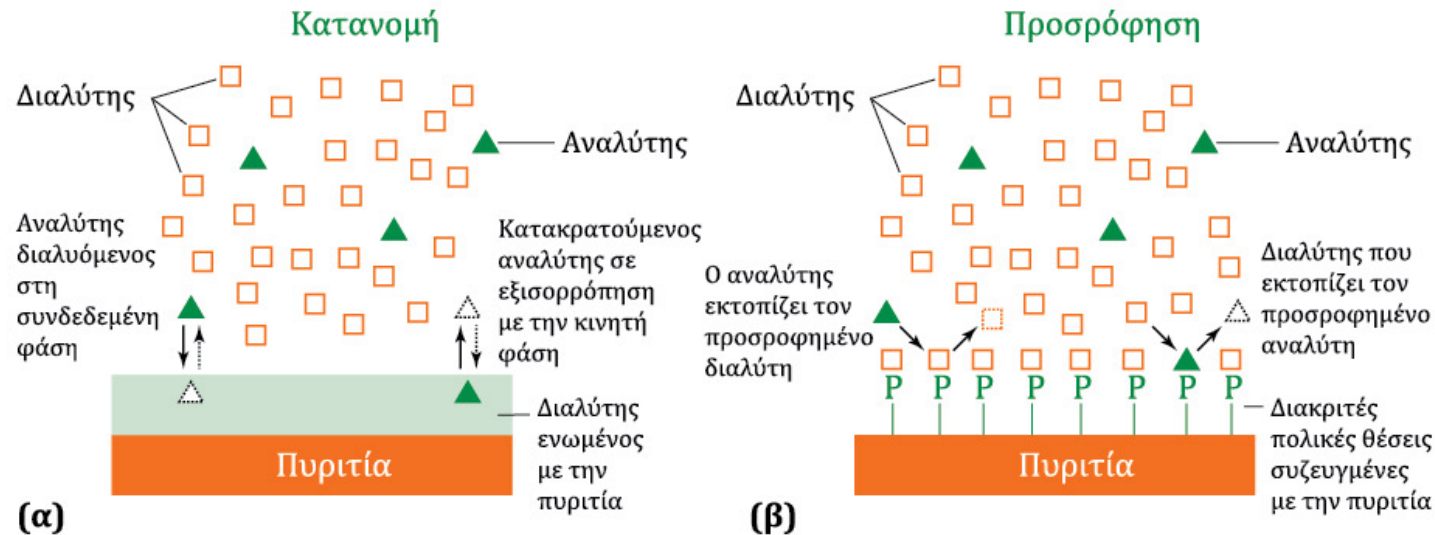
ΕΙΚΟΝΑ 25-5 Σαρωτική ηλεκτρονική μικροσκοπία μικροπορώδους σωματιδίου πυριτίας διαμέτρου 4,4 μm

Η στατική φάση



ΕΙΚΟΝΑ 25-6 (α) Χημική φύση σωματιδίων πυριτίας. [Δεδομένα από R. E. Majors, LCGC Supplement, May 1997, p. S8]. **(β)** Η ανθεκτική στην αλκαλική υδρόλυση πυριτία ενσωματώνει γέφυρες αιθυλενίου στη θέση γεφυρών οξειδίου μεταξύ ορισμένων ατόμων πυριτίου. Η γεφυρωμένη με αιθυλένιο δομή είναι πιο άκαμπτη και κατάλληλη για σωματίδια διαμέτρου <2 μm, τα οποία πρέπει να αντέχουν σε υψηλή πίεση.

Η διαδικασία έκλουσης



ΕΙΚΟΝΑ 25-11 (α) Στη χρωματογραφία κατανομής ο αναλύτης εξισορροπεί μεταξύ της κινητής φάσης και της στατικής συνδεδεμένης φάσης. Όσο περισσότερο χρόνο ο αναλύτης ξοδεύει στην κινητή φάση, τόσο νωρίτερα εκκλύεται. **(β)** Στη χρωματογραφία προσρόφησης τα μόρια του διαλύτη ανταγωνίζονται τα μόρια του αναλύτη για θέσεις δέσμευσης στη στατική φάση. Όσο μεγαλύτερη είναι η δύναμη έκλυσης του διαλύτη, τόσο πιο εύκολα ο διαλύτης εκτοπίζει τον αναλύτη.

Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

- Η **χρωματογραφία αντίστροφης φάσης** είναι η πιο συνηθισμένη μορφή HPLC. Η **στατική φάση** είναι μη πολική ή ασθενώς πολική και ο **διαλύτης** είναι πιο **πολικός**
- Στη **χρωματογραφία κατανομής**, ο αναλύτης είτε διαλύεται στην κινητή φάση είτε διαλύεται στη συνδεδεμένη φάση.

Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης:

- μη πολική στατική φάση
- ο λιγότερο πολικός διαλύτης έχει τη μεγαλύτερη ισχύ κινητής φάσης, η οποία εκκλύει τους αναλύτες πιο γρήγορα.

Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, ένας λιγότερο πολικός διαλύτης είναι ισχυρότερη κινητή φάση, η οποία εκκλύει τους αναλύτες πιο γρήγορα.

Χρωματογραφία κανονικής φάσης

- Η χρωματογραφία προσρόφησης σε γυμνή πυριτία αποτελεί παράδειγμα **χρωματογραφίας κανονικής φάσης**, στην οποία χρησιμοποιούμε **μια πολική στατική φάση και έναν λιγότερο πολικό διαλύτη**
- Ένας πιο πολικός διαλύτης έχει ισχυρότερη εκλουστική ικανότητα.
- Οι σχετικές ικανότητες διαφόρων διαλυτών να εκλούουν έναν δεδομένο αναλύτη από το προσροφητικό υλικό είναι σχεδόν ανεξάρτητες από τη φύση του αναλύτη.
- Έκλυση συμβαίνει όταν ο διαλύτης εκτοπίζει τον αναλύτη από τη στατική φάση.

Χρωματογραφία κανονικής φάσης:

- πολική στατική φάση
- ο περισσότερο πολικός διαλύτης έχει τη μεγαλύτερη ισχύ κινητής φάσεις.

- Ο όρος **ισχύς κινητής φάσης** χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ικανότητα της κινητής φάσης να εκλούσει συστατικά από μια στήλη υγροχρωματογραφίας.

<https://www.youtube.com/watch?v=MLoitPJQH3g>

ΠΙΝΑΚΑΣ 25-4 Ιδιότητες κοινών διαλυτών HPLC

ΠΙΝΑΚΑΣ 25-4 Ιδιότητες κοινών διαλυτών HPLC

Διαλύτης	Τύπος πολικότητας			Δείκτης πολικότητας (P')	Ισχύς εκλούστη (γυμνή πυριτία)	Κατώφλι υπεριώδους (nm)
	Οξύτητα δεσμού H	Βασικότητα δεσμού H	Διπολική			
Αλκάνια	0	0	0	0	≤0,01	200
Τολουόλιο	17%	83%	0%	2,4	0,22	284
Methyl t-βουτυλ αιθέρας	0%	~60%	~40%	~2,4	0,48	210
Χλωροφόρμιο	43%	0%	57%	2,7	0,26	245
Διαιθυλαιθέρας	0%	64%	36%	2,8	0,43	215
Διχλωρομεθάνιο	27%	0%	73%	3,1	0,30	233
2-Προπανόλη	36%	40%	24%	3,9	0,60	205
Τετραϋδροφουράνιο (THF)	0%	49%	51%	4,0	0,53	212
Οξικός αιθυλεστέρας	0%	45%	55%	4,4	0,48	256
Μεθανόλη (CH ₃ OH)	43%	29%	28%	5,1	0,70	205
Ακετόνη	6%	38%	56%	5,1	0,53	330
Ακετονιτρίλιο (CH ₃ CN)	15%	25%	60%	5,8	0,52	190
Νερό	43%	18%	39%	10,2	—	190

Δεδομένα από L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, in Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd ed. (Hoboken, NJ: Wiley, 2010), revised using M. Vitha and P. W. Carr, "The Chemical Interpretation and Practice of Linear Solvation Energy Relationships in Chromatography," *J. Chromatogr. A* **2006**, 1126, 143.

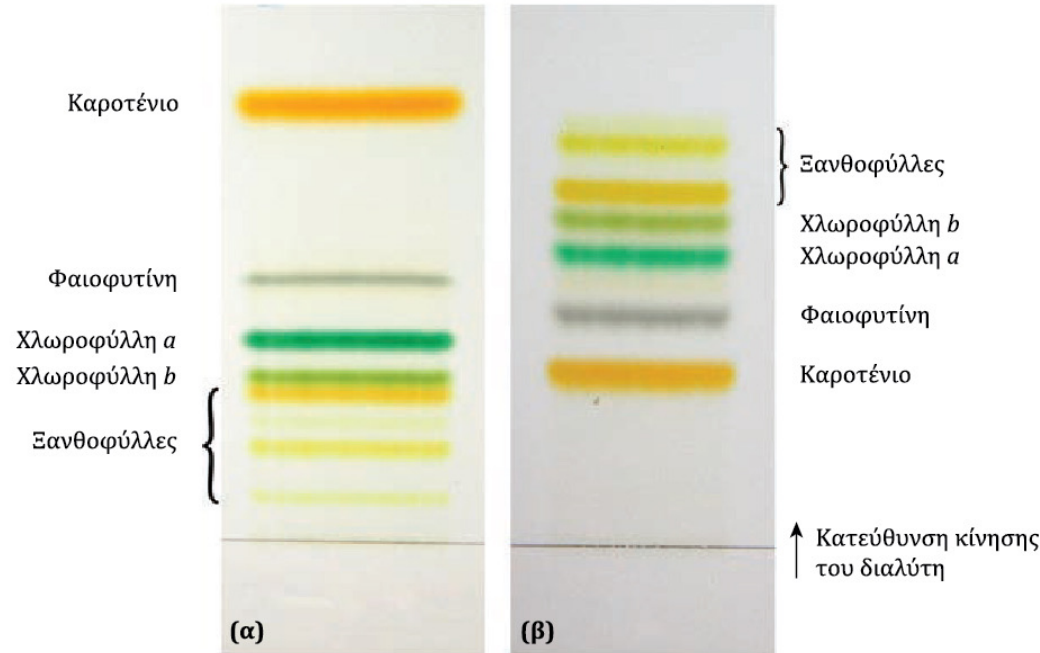
Οι έγχρωμοι διαλύτες χρησιμοποιούνται για τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Οι μη σκιασμένοι διαλύτες χρησιμοποιούνται για τη χρωματογραφία κανονικής φάσης. Οι σκιασμένοι με γκρι διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και με τους δύο τρόπους.

Ο δείκτης πολικότητας P' κατατάσσει τους διαλύτες με βάση την ικανότητά τους να διαλύουν πολικές ενώσεις.

Η ισχύς του εκλούστη είναι ένα μέτρο της ενέργειας προσρόφησης του διαλύτη σε γυμνή πυριτία, με την τιμή για το πεντάνιο να ορίζεται ως 0.

ΕΠΙΔΕΙΞΗ 25-1 Χρωματογραφία κανονικής και αντίστροφης φάσης

Ο διαχωρισμός **κανονικής φάσης** πραγματοποιείται με πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας 1 x 6,5 cm επιστρωμένη με πυριτία. Η πλάκα τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα 1,5 x 10 cm που περιέχει ≤ 1 mL διαλύματος επτανίου : ακετόνης : άνυδρης αιθανόλης σε αναλογία 70:28:2 (v:v:v).



Ο διαχωρισμός **αντίστροφης φάσης** πραγματοποιείται με πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας 1 x 6,5 cm επιστρωμένη με στατική φάση C_{18} . Σημειώστε την πλάκα με μαλακό μολύβι και εφαρμόστε το δείγμα όπως κάνατε για τον διαχωρισμό κανονικής φάσης. Προσθέστε διαλύτη επτάνιο:ακετονιτρίλιο:95% αιθανόλη

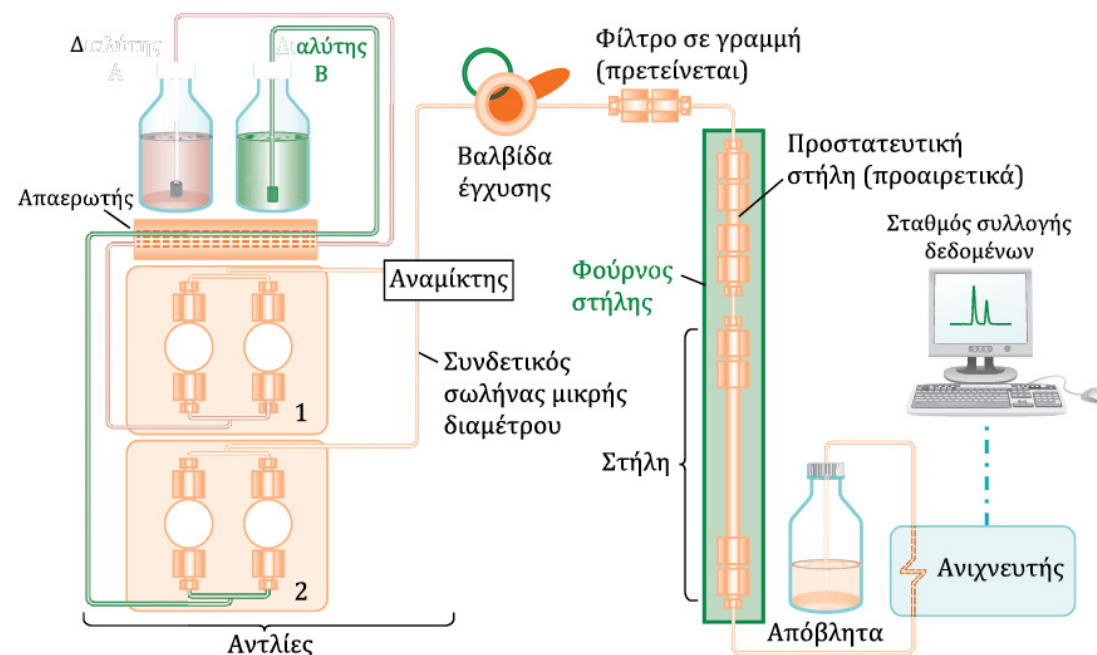
Ισοκρατική και βαθμιδωτή έκλυση

Η **ισοκρατική έκλυση** πραγματοποιείται με έναν μόνο διαλύτη (ή με σταθερό μείγμα διαλυτών). Εάν ένας διαλύτης δεν παρέχει επαρκώς ταχεία έκλυση όλων των συστατικών, τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί **βαθμιδωτή έκλυση**.

Ο δείκτης πολικότητας (P') του μείγματος είναι

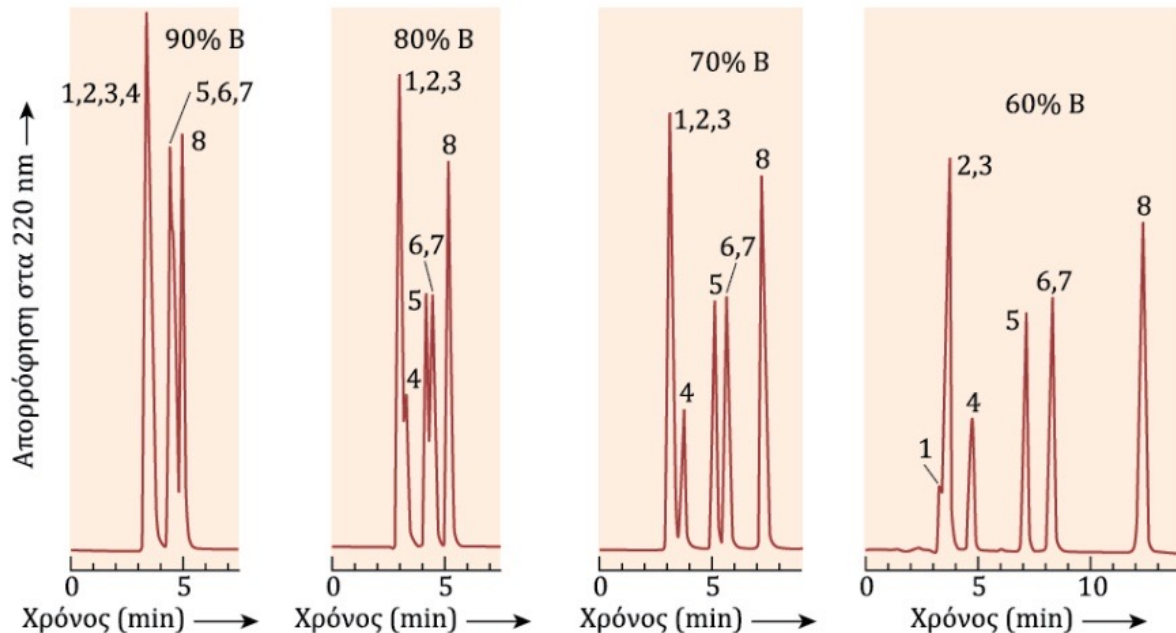
$$P'_{AB} = \Phi_A P'_A + \Phi_B P'_B$$

Φ : κλάσματα όγκου



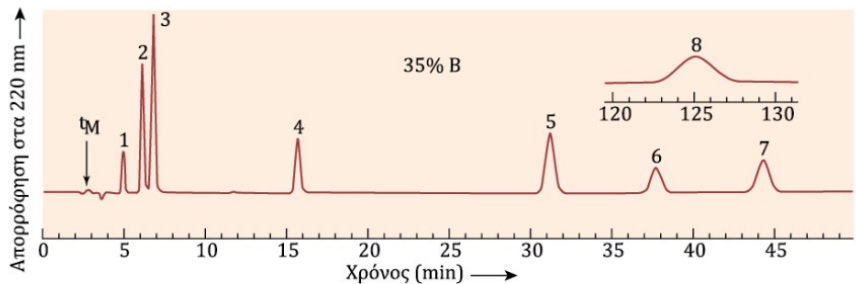
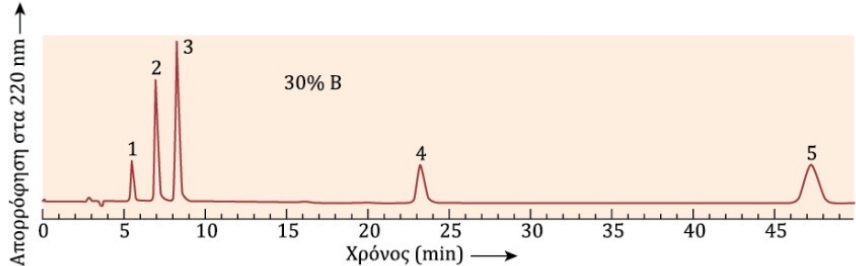
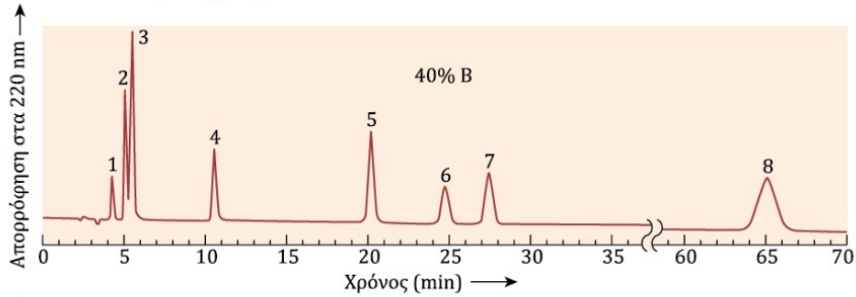
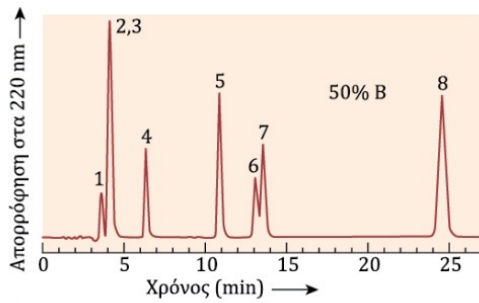
Ισοκρατική έκλυση: Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

% οργανικός διαλύτης (B)	90	80	70	60
% υδατικός διαλύτης (A)	10	20	30	40



Ισοκρατικός διαχωρισμός HPLC:

1. βενζυλική αλκοόλη
2. φαινόλη
3. 3', 4'-διμεθοξυακετοφαινόνη
4. βενζοΐνη
5. βενζοϊκός αιθυλεστέρας
6. τολουόλιο
7. 2,6-διμεθοξυτολουόλιο
8. ο-μεθοξυδιφαινύλιο

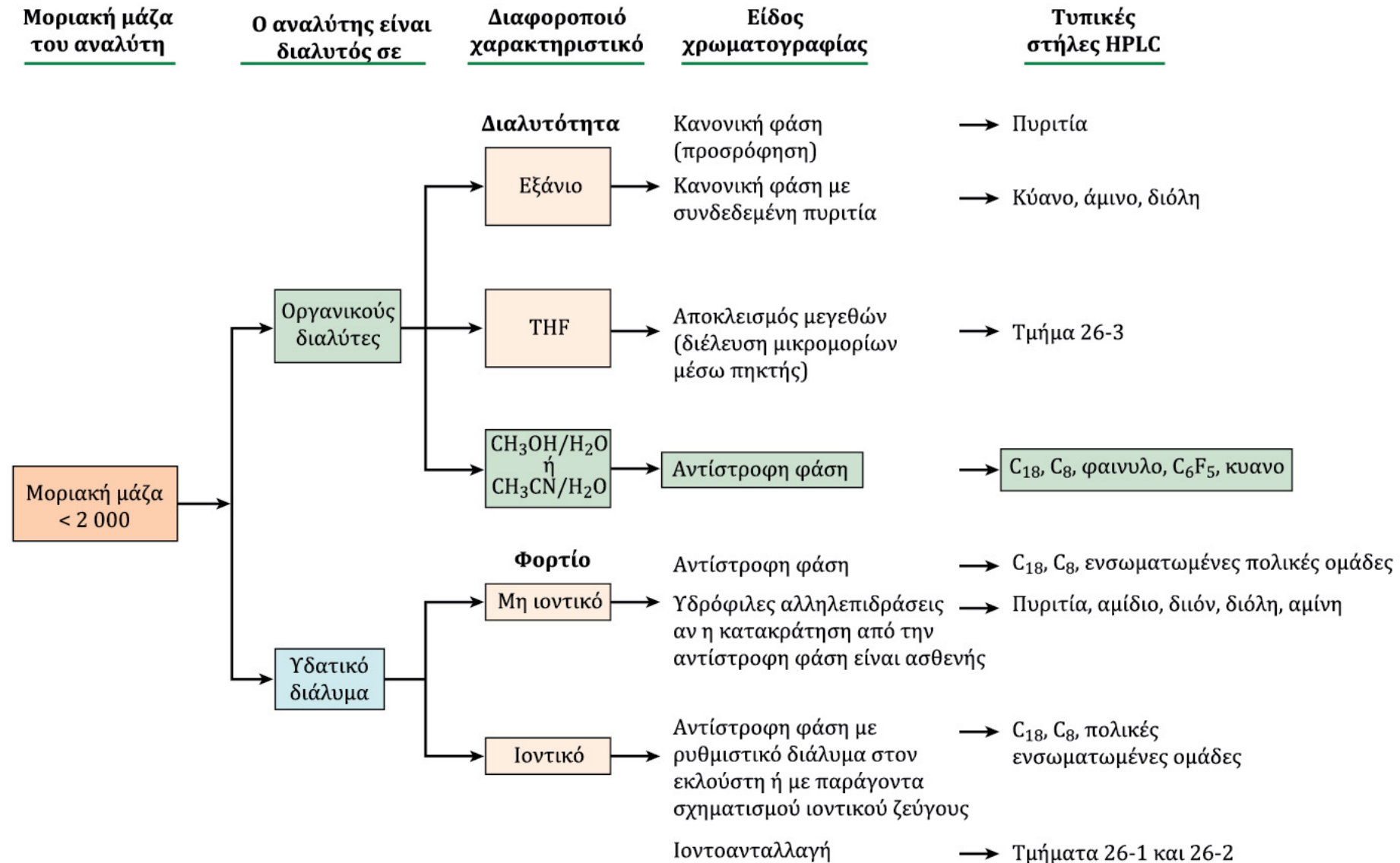


Γενικό πρόβλημα έκλουσης:
Για ένα πολύπλοκο μείγμα
μπορούν συχνά να βρεθούν
ισοκρατικές συνθήκες για
επαρκή διαχωρισμό είτε των
κορυφών που εκκλύονται νωρίς
είτε των κορυφών που
εκκλύονται αργά, αλλά όχι και
των δύο

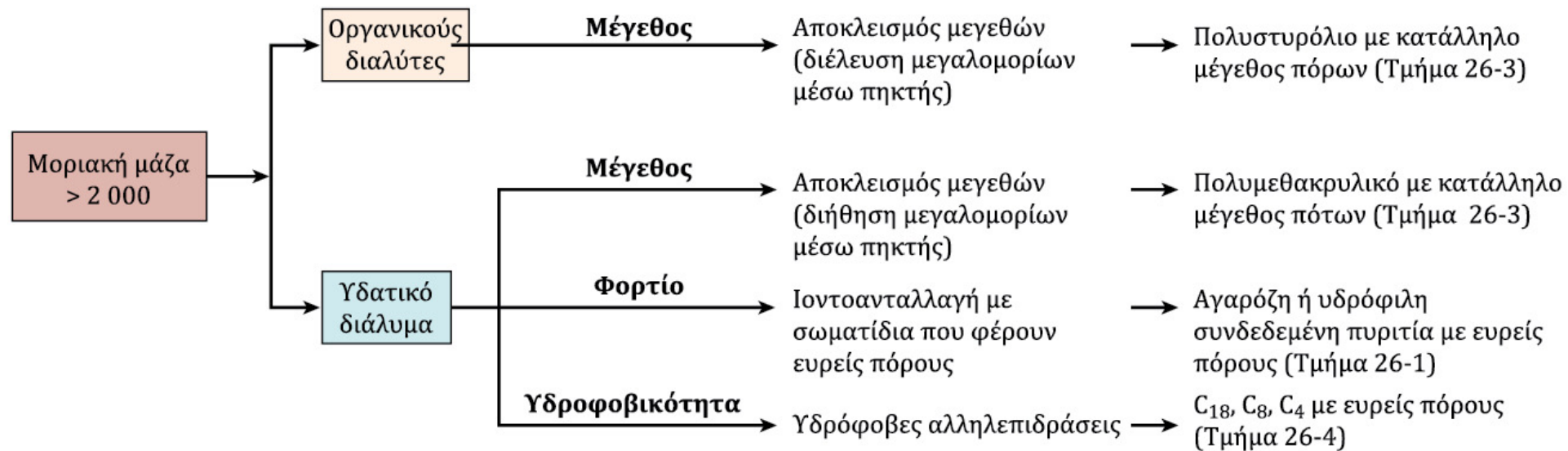
30% B, όλες οι κορυφές είναι
πλήρως διαχωρισμένες,
αλλά ο διαχωρισμός
απαιτεί πολύ χρόνο

35% B, διαχωρίζει όλες
τις κορυφές σε 2 h
περίπου (χρόνος πολύ
μεγάλος).

Οδηγός για την επιλογή τρόπου HPLC



Οδηγός για την επιλογή τρόπου HPLC

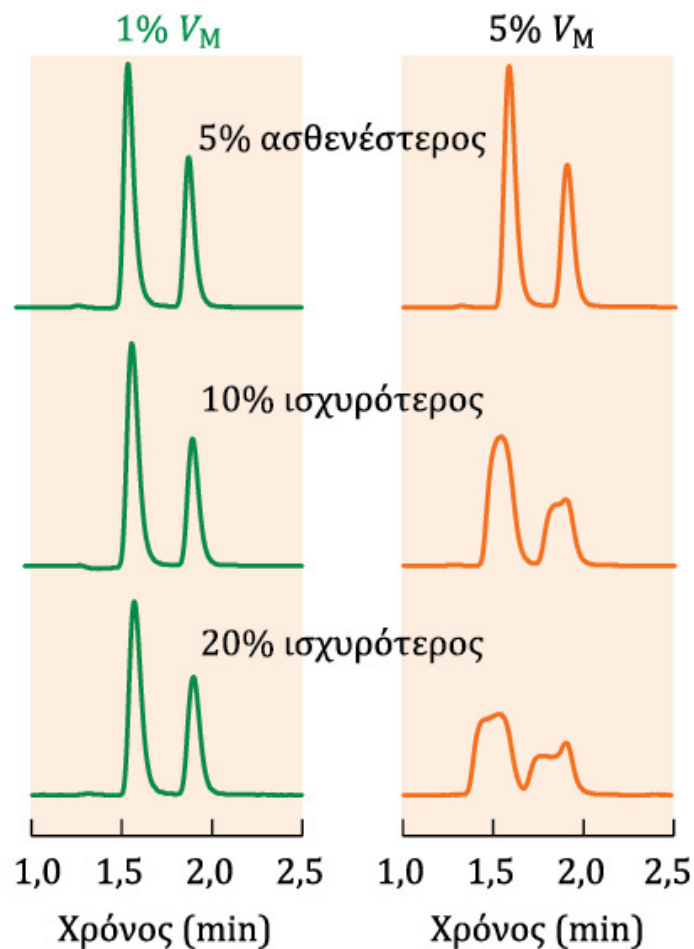


EIKONA 25-17 Οδηγός για την επιλογή τρόπου HPLC. Το «THF» σημαίνει τετραϋδροφουράνιο. [Δεδομένα από The LC Handbook, publication no. 5990-7595EN (Agilent Technologies, 2016)].

Διαλύτες

Για την αποφυγή της υποβάθμισης των δαπανηρών στηλών και την ελαχιστοποίηση του σήματος υποβάθρου που οφείλονται σε προσμίξεις και επιμολύνσεις, απαιτούνται διαλύτες με βαθμό καθαρότητας για HPLC (ακριβοί).

Πολλά όργανα διαθέτουν τώρα ενσωματωμένους απαερωτές για την απομάκρυνση διαλυμένων αερίων.



ΕΙΚΟΝΑ 25-18 Επίδραση του διαλύτη του δείγματος και του όγκου έγχυσης στο σχήμα της κορυφής της κυτιδίνης και της γουανοσίνης. Στα επάνω χρωματογραφήματα, ο διαλύτης έγχυσης ήταν ασθενέστερος από την κινητή φάση. Στα κάτω χρωματογραφήματα, ο διαλύτης έγχυσης είναι ισχυρότερος από την κινητή φάση. Έγχυση: 2 μL (1% V_M) ή 10 μL (5% V_M) που περιέχει 50 και 40 $\mu\text{g/mL}$ κυτιδίνης και γουανοσίνης. Ο εκλούστης (0,4 mL/min) είναι 90:10 (v/v) ακετονιτρίλιου/ H_2O με 100 mM μυρμηκικό αμμώνιο pH 3,0. Στήλη: 10 cm $\times$ 2,1 mm, Ascentis Express HILIC πυριτία διαμέτρου 2,7 μm , 40°C. Ανίχνευση υπεριώδους ακτινοβολίας στα 254 nm. [Δεδομένα από D. R. Stoll, "What's Trending in Troubleshooting?" *LCGC North Am.* **2019**, 37 (January), 18].

Υπερφόρτωση της στήλης

Υπερφόρτωση

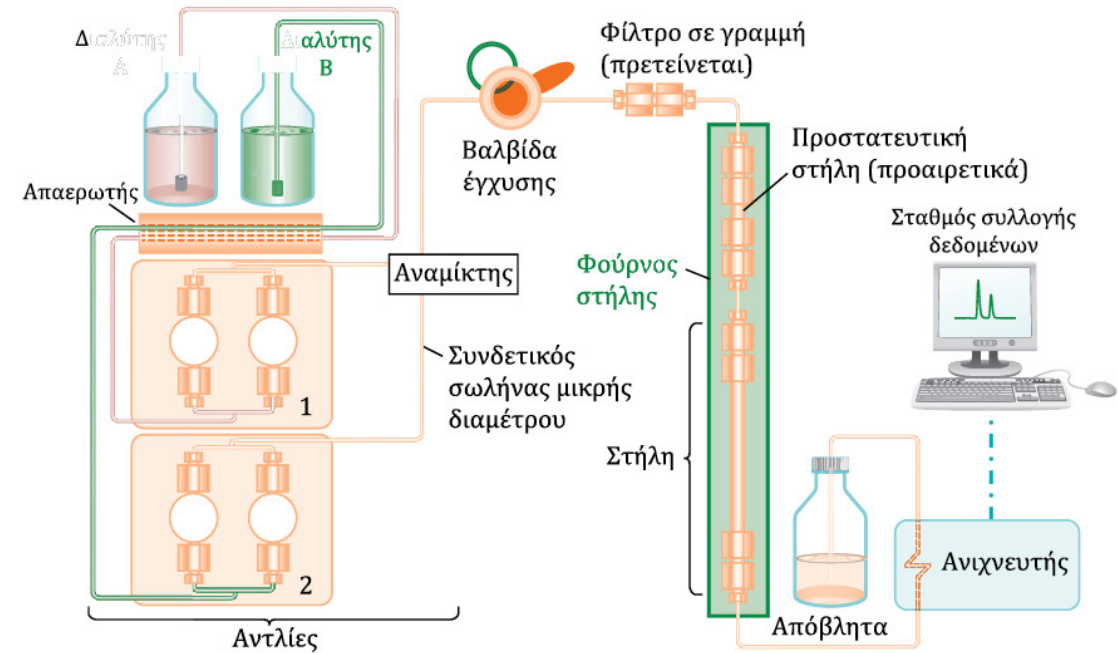
- Προκαλεί παραμόρφωση κορυφών
- Για να διαπιστωθεί η τυχόν υπερφόρτωση, μειώστε τη μάζα του δείγματος κατά 10 φορές και δείτε αν οι χρόνοι κατακράτησης αυξάνονται ή οι κορυφές γίνονται πιο στενές
- Αν συμβαίνει μια τέτοια αλλαγή, τότε μειώστε ξανά τη μάζα έως ότου η εισαγόμενη μάζα δεν επηρεάζει τον χρόνο κατακράτησης και το σχήμα της κορυφής.

Γενικά, οι στήλες αντίστροφης φάσης μπορεί να δεχθούν 1-10 μg του δείγματος ανά g πυριτίας. Μια στήλη διαμέτρου 4,6 mm περιέχει 1 g πυριτίας σε μήκος 10 cm.

Εκτός στήλης όγκος

Ο εκτός στήλης επιπλέον όγκος ενός συστήματος χρωματογραφίας από το σημείο της έγχυσης μέχρι το σημείο της ανίχνευσης προκαλεί (ιδιαίτερα όταν είναι μεγάλος) διεύρυνση των ζωνών μέσω διάχυσης ή ανάμειξης.

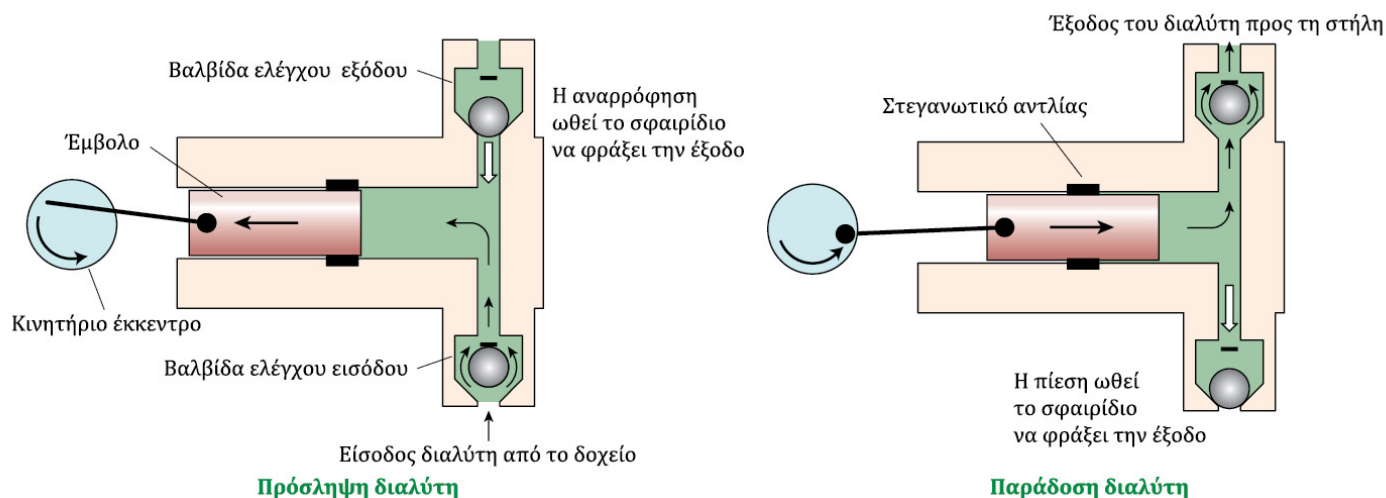
Εμφάνιση ουράς στις κορυφές που εκλούνται νωρίς υποδηλώνει διεύρυνση ζωνών λόγω του εκτός στήλης επιπλέον όγκου



25-2 Έγχυση και ανίχνευση στην HPLC

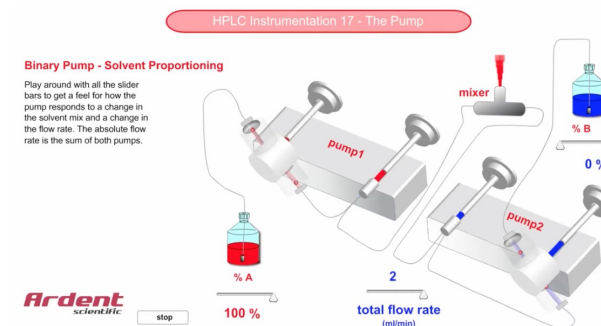
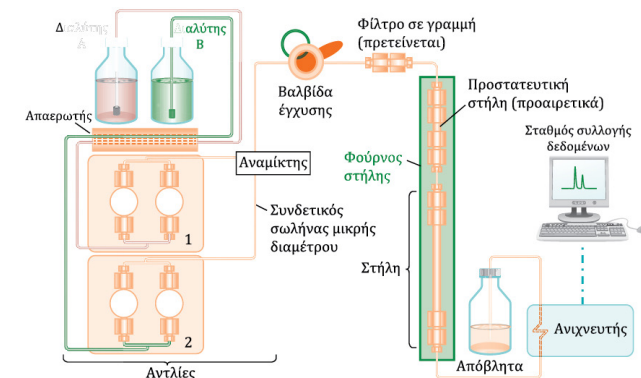
Αντλίες και βαλβίδες έγχυσης

Στην Εικόνα 25-19 παρουσιάζεται ο βασικός σχεδιασμός αντλίας που παράγει προγραμματιζόμενη, σταθερή ταχύτητα ροής έως 10 mL/min σε πιέσεις έως 40 MPa (400 bar) για HPLC και έως 100 MPa (1000 bar) για UHPLC. Οι περισσότερες αντλίες HPLC χρησιμοποιούν πολλαπλά έμβολα για ομαλότερη ροή

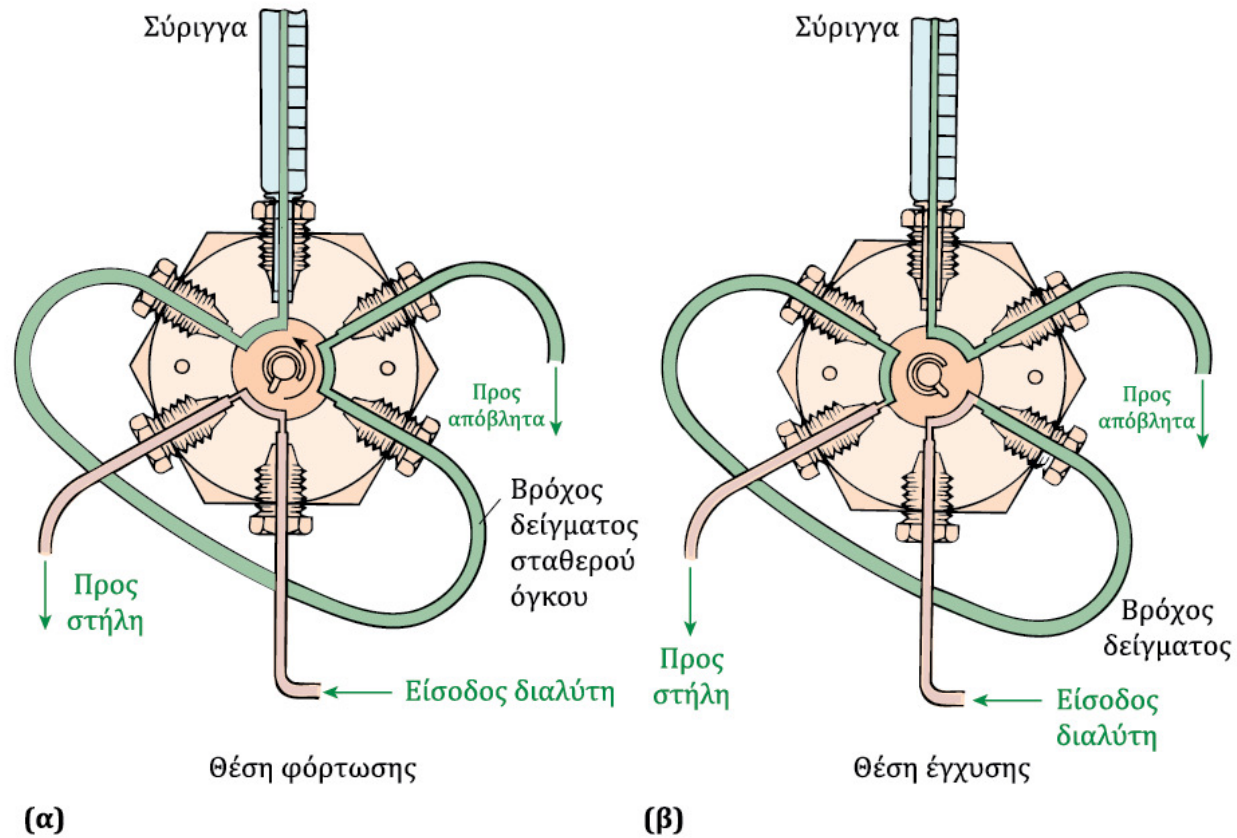


ΕΙΚΟΝΑ 25-19 Αντλία παλινδρομικού εμβόλου υψηλής πίεσης για HPLC. Το έμβολο κινείται εμπρός και πίσω από ένα περιστρεφόμενο έκκεντρο. Οι βαλβίδες ελέγχου ανοίγουν ή κλείνουν ανάλογα με την κατεύθυνση της ροής. Όταν το έμβολο κινείται προς τα αριστερά, διαλύτης εισροφάται στον θάλαμο του εμβόλου μέσω της θύρας εισόδου. Η εισρόφηση αναγκάζει το σφαιρίδιο στη βαλβίδα εξόδου να φράξει τη θύρα εξόδου. Όταν το έμβολο κινείται προς τα δεξιά, ο διαλύτης ωθείται έξω από τον θάλαμο του εμβόλου προς τη στήλη. Λόγω της ροής το σφαιρίδιο της βαλβίδας εισόδου κλείνει τη θύρα εισόδου. Η ροή ανυψώνει το σφαιρίδιο στη βαλβίδα ελέγχου εξόδου, επιτρέποντας την παροχή υγρού στη στήλη. Ο ρυθμός διανομής ελέγχεται από τη συχνότητα των παλμών. [Δεδομένα από J.W. Dolan, "How Does It Work? Part I: Pumps," *LCGC North Am.* **2016**, 34 (May), 324].

ΕΙΚΟΝΑ 25-19 Αντλία παλινδρομικού εμβόλου υψηλής πίεσης για HPLC.

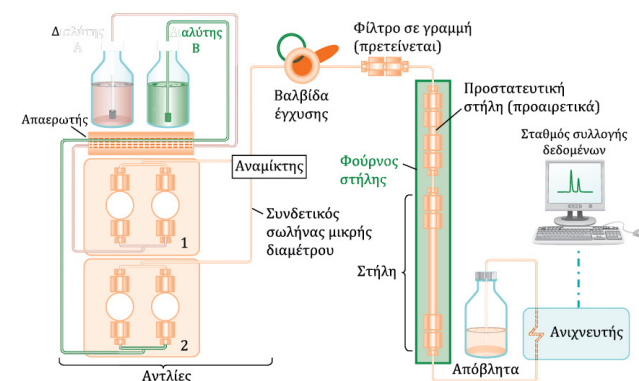


Βαλβίδα έγχυσης HPLC



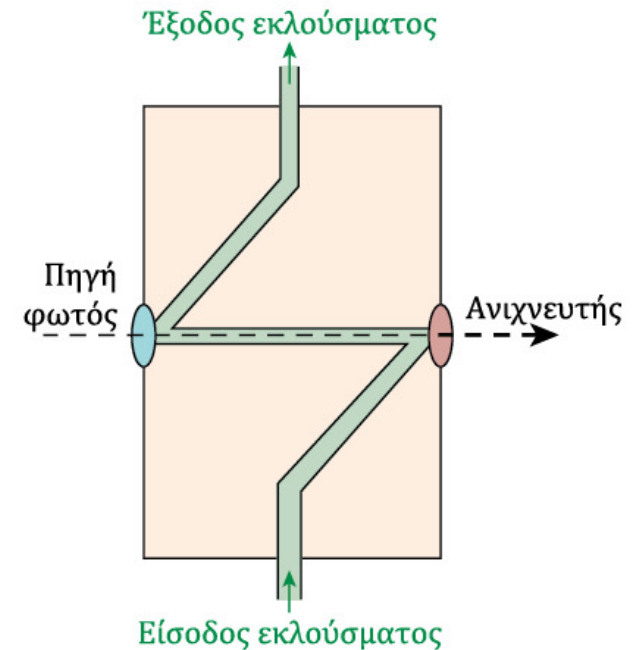
Ένας ιδανικός ανιχνευτής HPLC

- Αποκρίνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις κάθε αναλύτη
- Παρέχει γραμμική απόκριση
- Δεν προκαλεί διεύρυνση στις εκλουόμενες κορυφές
- Δεν είναι ευαίσθητος στις μεταβολές θερμοκρασίας και σύστασης του διαλύτη.
- Για να αποτραπεί η διεύρυνση των κορυφών, ο όγκος του ανιχνευτή θα πρέπει να είναι $<20\%$ του όγκου της χρωματογραφικής ζώνης.
- Για ακριβή ποσοτικοποίηση, ο ανιχνευτής πρέπει να αποκρίνεται αρκετά γρήγορα ώστε να συλλέγει τουλάχιστον 20 σημεία δεδομένων σε όλη την κορυφή.



Ανιχνευτής υπεριώδους

- Ο **ανιχνευτής υπεριώδους**, που χρησιμοποιεί κυψελίδα ροής (Εικόνα 25-21), είναι ο πιο κοινός ανιχνευτής στην HPLC, επειδή πολλοί αναλύτες απορροφούν υπεριώδες φως
- Απλά συστήματα που χρησιμοποιούσαν την έντονη εκπομπή της λυχνίας ατμών υδραργύρου στα 254 nm ήταν η ραχοκοκαλιά των πρώτων συστημάτων HPLC
- Πιο ευέλικτοι ανιχνευτές μεταβλητού μήκους κύματος διαθέτουν λυχνίες ευρείας περιοχής μηκών κύματος, όπως δευτερίου, ξένου ή βολφραμίου σε συνδυασμό με μονοχρωμάτορα, για την επιλογή του βέλτιστου μήκους κύματος.
- Σε μήκη κύματος >210 nm, η ανίχνευση είναι επιλεκτική για ενώσεις με χρωμοφόρες ομάδες.



ΕΙΚΟΝΑ 25-21 Οπτική διαδρομή σε φασματοφωτομετρική κυψελίδα ροής (micro Z-path). Μια συνήθης κυψελίδα με μήκος διαδρομής 1 cm έχει όγκο 14 μL . Μια άλλη κυψελίδα με μήκος διαδρομής 0,3 cm περιέχει μόνο 2 μL .

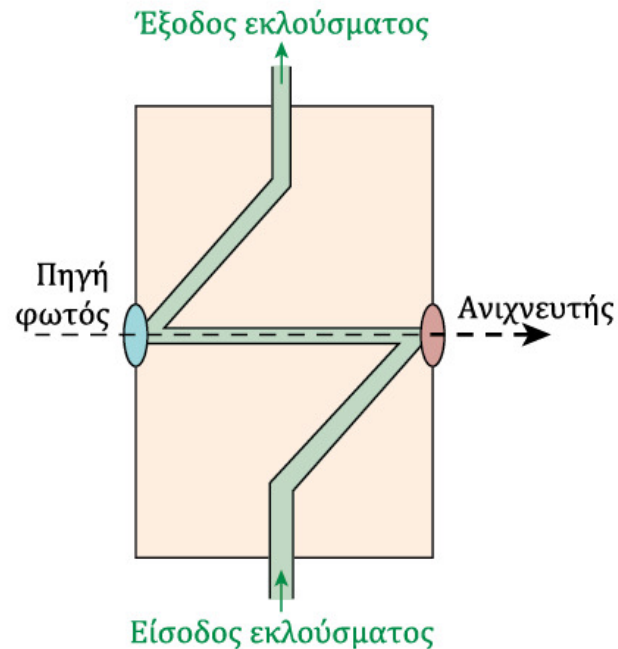
ΠΙΝΑΚΑΣ 25-5 Σύγκριση κοινών ανιχνευτών HPLC

ΠΙΝΑΚΑΣ 25-5 Σύγκριση κοινών ανιχνευτών HPLC				
Ανιχνευτής	Απόκριση*	Όριο ανίχνευσης	Γραμμική περιοχή	Είναι χρήσιμος στη βαθμίδωση;
Υπεριώδους	Εκλεκτικός ≥ 210 nm Καθολικός ≤ 210 nm	ng	10^5	Ναι
Δείκτη διάθλασης	Καθολικός	μg	10^3	Όχι
Εξατμιστικός ανιχνευτής σκέδασης φωτός	Καθολικός	Πολλά ng	10^3	Ναι
Φορτισμένου αερολύματος	Καθολικός	Λίγα ng	10^4	Ναι
Ηλεκτροχημικός	Πολύ εκλεκτικός	fg–pg	10^5	Όχι
Φθορισμού	Πολύ εκλεκτικός	pg	10^3 – 10^4	Ναι
Χημειοφωταύγειας αζώτου	Εκλεκτικός	< ng		Ναι
$\text{N} \xrightarrow{\text{καύση}} \text{NO} \xrightarrow{\text{O}_3} \text{NO}_2^* \rightarrow h\nu$				
Αγωγιμότητας	Εκλεκτικός	Πολλά ng	10^4	Όχι
Φασματομετρία μαζών	Εκλεκτικός ή καθολικός	ng		Ναι

*Εκλεκτική απόκριση σημαίνει ότι ο ανιχνευτής αποκρίνεται μόνο σε συγκεκριμένη κατηγορία αναλυτών. Για παράδειγμα, ο ανιχνευτής χημειοφωταύγειας αζώτου αποκρίνεται μόνο στις ενώσεις που περιέχουν άτομα αζώτου. Καθολική απόκριση σημαίνει ότι ο ανιχνευτής αποκρίνεται σε όλες σχεδόν τις ενώσεις. Για παράδειγμα, ο ανιχνευτής φορτισμένου αερολύματος αποκρίνεται σε όλες τις μη πτητικές ενώσεις άσχετα από τη δομή τους

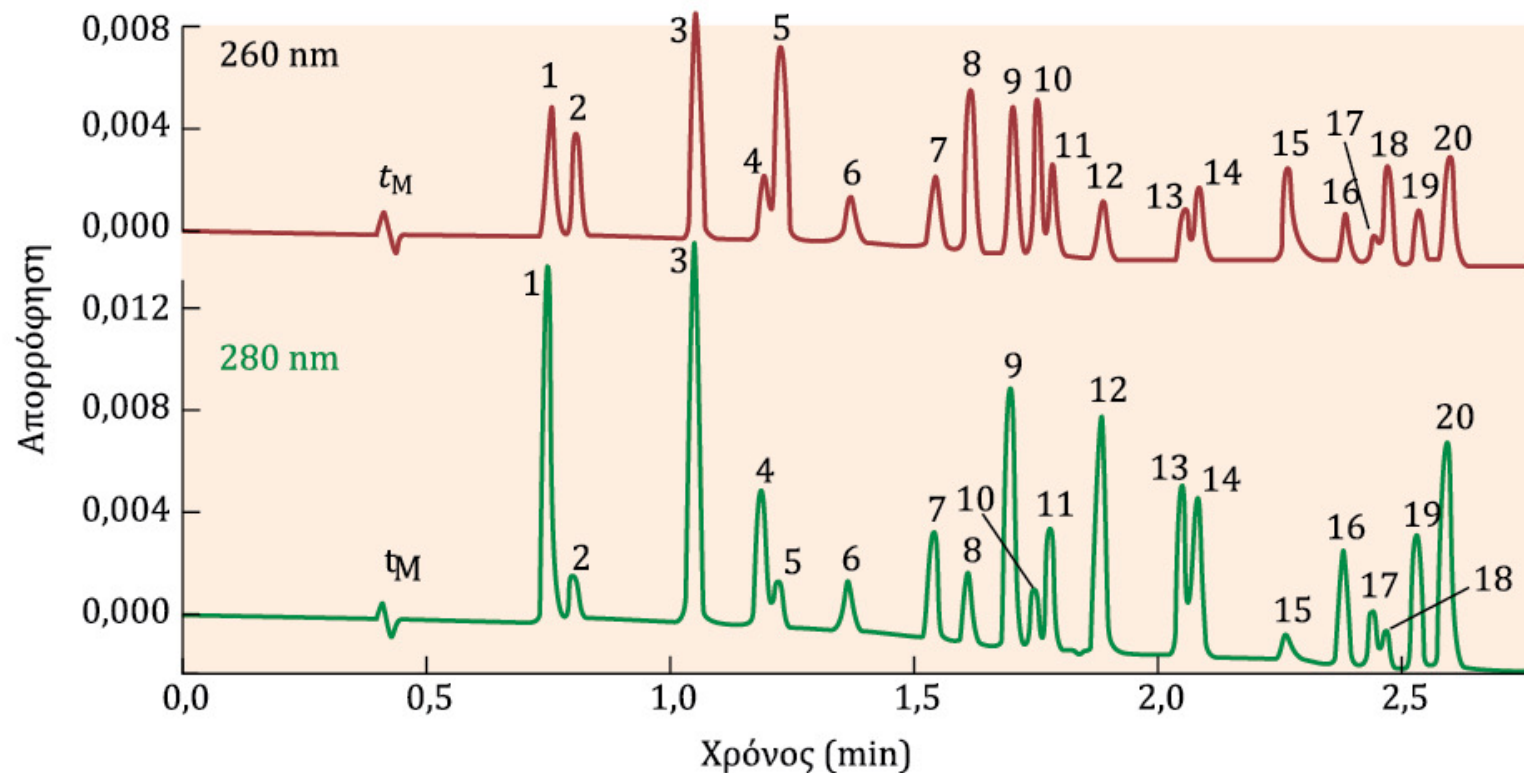
Ανιχνευτής υπεριώδους

- Ο **ανιχνευτής υπεριώδους**, που χρησιμοποιεί κυψελίδα ροής (Εικόνα 25-21), είναι ο πιο κοινός ανιχνευτής στην HPLC, επειδή πολλοί αναλύτες απορροφούν υπεριώδεις φως. Απλά συστήματα που χρησιμοποιούσαν την έντονη εκπομπή της λυχνίας ατμών υδραργύρου στα 254 nm ήταν η ραχοκοκαλιά των πρώτων συστημάτων HPLC



EIKONA 25-21 Οπτική διαδρομή σε φασματοφωτομετρική κυψελίδα ροής (micro Z-path). Μια συνήθης κυψελίδα με μήκος διαδρομής 1 cm έχει όγκο 14 μL . Μια άλλη κυψελίδα με μήκος διαδρομής 0,3 cm περιέχει μόνο 2 μL .

Ανιχνευτής υπεριώδους



EIKONA 25-22 Σύγκριση της απορρόφησης υπεριώδους σε δύο μήκη κύματος για τον διαχωρισμό φαινολικών ενώσεων. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε στήλη μήκους 100 mm και διαμέτρου 2,1 mm πεπληρωμένη με C_{18} σε γεφυρωμένα με αιθυλενομάδες υβριδικά σωματίδια 1,7 μm . Βαθμίδωση από 4 έως 50% ακετονιτρίλιο σε 3 min, με 1% οξικό οξύ. Ο χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής απεικονίζεται στην Εικόνα 25-23. [Δεδομένα από W. Setyaningsih, I. E. Saputro, C. A. Carrera, M. Palma, and C. García-Barroso, "Fast Determination of Phenolic Compounds in Rice Grains by Ultrapformance Liquid Chromatography Coupled to Photodiode Array Detection," *J. Agric. Food Chem.* **2019**, 67, 3018].

Σχόλια για την ανίχνευση με φασματομετρία μαζών στην υγροχρωματογραφία

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Εικόνα 22-30) είναι ο πιο κοινός τρόπος διασύνδεσης της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών.

Για ενώσεις που δεν ιοντίζονται αποτελεσματικά με ηλεκτροψεκασμό χρησιμοποιείται χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση.

Η απόκριση ενισχύεται ή καταστέλλεται λόγω της παρουσίας συνεκλούμενων συστατικών του δείγματος.

Το ισοτοπικά επισημασμένο εσωτερικό πρότυπο συνεκλούεται με τον αναλύτη και έτσι βιώνει την ίδια ενίσχυση ή καταστολή του σήματος όπως ο αναλύτης.

Για τη φασματομετρία μαζών χρησιμοποιούμε πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα χαμηλής συγκέντρωσης (≤ 10 mM).

Πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα συμβατά με τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό: μυρμηκικό οξύ, οξικό οξύ, τριφθοροξικό οξύ, αμμωνία

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό καταστέλλεται από.

- >10 mM ρυθμιστικό

- παράγοντες σχηματισμού ιοντικού ζεύγους

- επιφανειοδραστικά

- τριοκυλαμίνη

- άλλα συστατικά του δείγματος

25-3 Ανάπτυξη μεθόδων για ισοκρατικούς
διαχωρισμούς αντίστροφης φάσης

Επιθυμητά χαρακτηριστικά μιας νέας χρωματογραφικής μεθόδου

- Επαρκής διαχωριστότητα των επιθυμητών αναλυτών
- Σύντομο χρονικό διάστημα ανθεκτική (δεν επηρεάζεται σημαντικά από μικρές διαφορές στις συνθήκες)
 - Βαθμιαία υποβάθμισης της στήλης
 - Μικρές διακυμάνσεις στη σύσταση του διαλύτη, το pH και τη θερμοκρασία
 - Χρήσης διαφορετικής παρτίδας στατικής φάσης
- Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι συνήθως επαρκής για τον διαχωρισμό μειγμάτων ουδέτερων ή φορτισμένων οργανικών ενώσεων χαμηλής μοριακής μάζας.

Κριτήρια για επαρκή διαχωρισμό

- Οι καλοί διαχωρισμοί απαιτούν το k για όλες τις κορυφές να κυμαίνεται από 0,5 έως 20. Εάν το k είναι πολύ μικρό, η πρώτη κορυφή παραμορφώνεται από το μέτωπο του διαλύτη. Εάν το k είναι πολύ μεγάλο, η διαδικασία γίνεται χρονοβόρα.

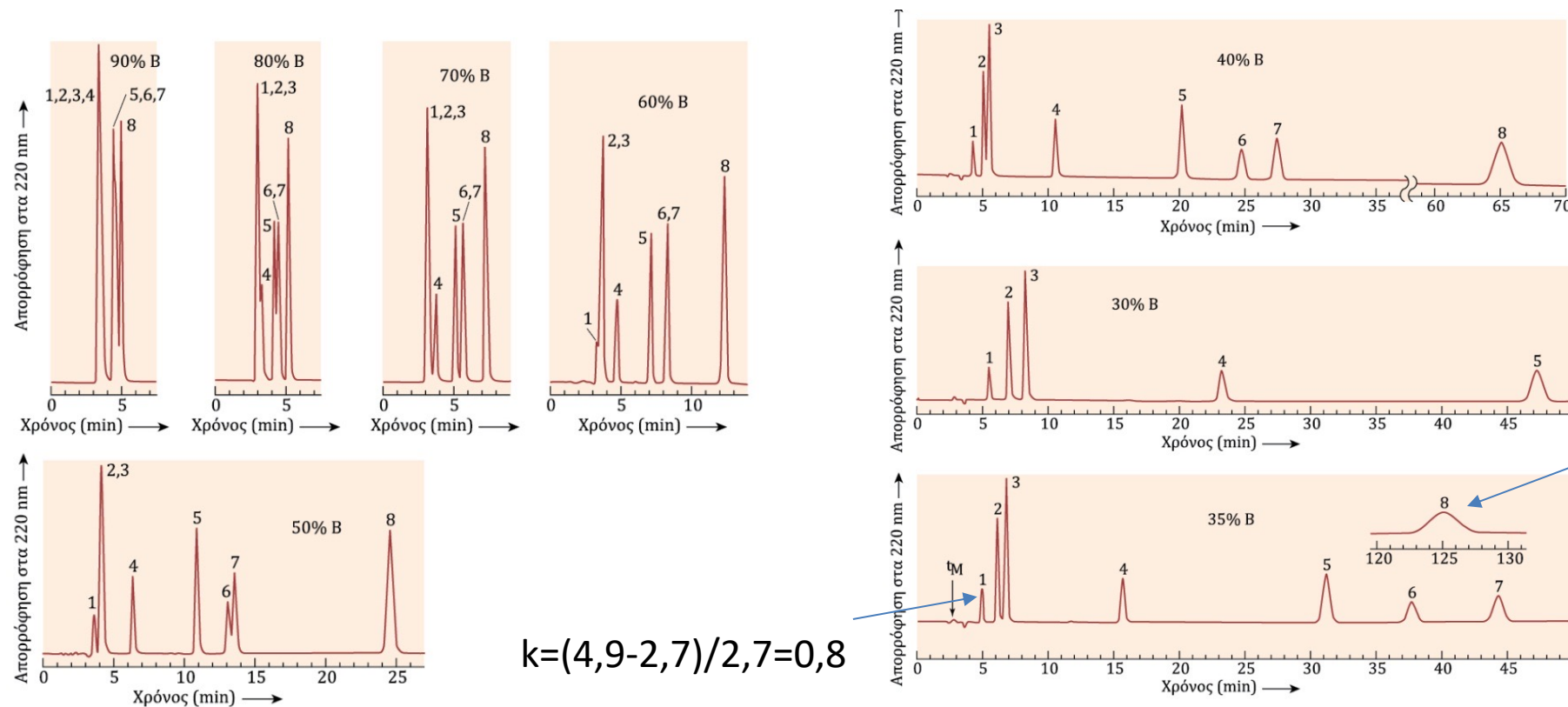
Βήμα 1: Επιλέξτε στήλη και οργανικό διαλύτη

ΠΙΝΑΚΑΣ 25-6 Συνθήκες εκκίνησης για τη χρωματογραφία αντιστροφής φάσης	
Στατική φάση:	C ₁₈ ή C ₈ πυριτία Τύπου B
Στήλη:	HPLC: 15 cm για σωματίδια 5 μm ή 10 cm για σωματίδια 3 μm (συντομότερος διαχωρισμός με παρόμοια διαχωριστότητα) UHPLC: 10 cm για σωματίδια <2 μm (συντομότερος διαχωρισμός, καλύτερη ανάλυση)
Ταχύτητα ροής:	HPLC: 1,0 mL/min για διάμετρο 0,46 cm $0,2 \text{ mL/min για στήλη διαμέτρου } 0,21 \text{ cm} = \left(\frac{0,21 \text{ cm}}{0,46 \text{ cm}} \right)^2 \left(1,0 \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right)$ UHPLC: 0,7 mL/min για στήλη διαμέτρου 0,21 cm (συντομότερος διαχωρισμός)
Κινητή φάση: ^a	Ουδέτεροι αναλύτες: CH ₃ CN/νερό Ασθενώς όξινοι ή βασικοί αναλύτες: CH ₃ CN/υδατικό ρυθμιστικό ^b Βαθμίδωση: 5 vol% CH ₃ CN σε H ₂ O ή ρυθμιστικό, έως 95 vol% CH ₃ CN
Θερμοκρασία:	30°–40°C με έλεγχο θερμοκρασίας
Μέγεθος δείγματος:	0,46-cm διάμετρος × 15 cm μήκος: ≤25 μL που περιέχουν ≤50 μg από κάθε ουδέτερο αναλύτη και ≤10 μg από κάθε ιοντικό αναλύτη Για στήλες μικρότερης διαμέτρου ή μικρότερου μήκους, το μέγεθος του δείγματος ρυθμίζεται με βάση το V _m της στήλης σε σχέση με το V _M στήλης διαμέτρου 0,46 cm × 15 cm μήκος ($\approx Ld_c^2/2 \approx 1,6 \text{ mL}$)

α. Για ισοκρατικούς διαχωρισμούς αρχίστε με 80% CH₃CN, και μειώστε με βήματα των 10%, όπως στην Εικόνα 25-12, μέχρι να εκλούονται όλες οι ενώσεις με 0,5 k 20.

β. Κοινά ρυθμιστικά διαλύματα για την εκκίνηση είναι: 10 mM φωσφορικά pH 2,5 που παρασκευάζονται με προσθήκη KOH σε H₃PO₄. Το K⁺ είναι πιο ευδιάλυτο από το Na⁺ σε οργανικούς διαλύτες. Αυτή η συγκέντρωση του ρυθμιστικού είναι κατάλληλη για τον ανιχνευτή υπεριώδους. Προσθέστε 10 vol% οργανικό διαλύτη ως συντηρητικό αν το ρυθμιστικό δεν καταναλωθεί αμέσως. Για τη φασματομετρία μαζών, το 0,1% μυρμηκικό οξύ και το 0,1% τριφθοροξικό οξύ είναι πτητικά οξέα κατάλληλα για τη μείωση του pH του εκλούστη. Η εκκίνηση με pH μικρότερο του pK_a των ασθενών οξέων και βάσεων διασφαλίζει ότι η ανάπτυξη της μεθόδου αρχίζει με προβλέψιμη μορφή του αναλύτη. Τα οξέα είναι ουδέτερα ενώ οι βάσεις είναι ιοντισμένες. Συμβουλευτείτε τον Πίνακα 25-8 για άλλα κοινά ρυθμιστικά. Για pH > 8 απαιτούνται ειδικές στήλες.

Βήμα 2 Βελτιστοποιήστε τον διαχωρισμό ρυθμίζοντας τον παράγοντα κατακράτησης k



Το βήμα 2 είναι η ρύθμιση της σύστασης της κινητής φάσης ώστε να επιτευχθεί κατακράτηση $0,5 \leq k \leq 20$ για όλες τις ενώσεις

Βήμα 3: Ελέγξτε τον αριθμό πλακών

Σε αυτό το σημείο είναι καλή πρακτική να ελέγχεται ότι η στήλη παρέχει τον αναμενόμενο αριθμό πλακών (N).

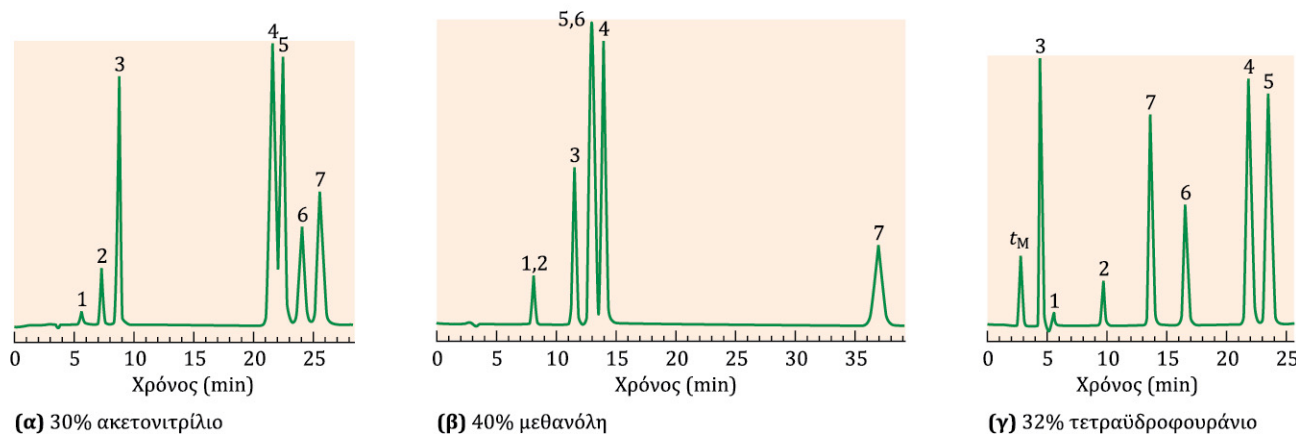
- Ο παρατηρούμενος αριθμός πλακών στην Εικόνα 25-12 (12.000 πλάκες) είναι κοντά στο θεωρητικό μέγιστο των 15.000 που προβλέπεται από την Εξίσωση 25-1.
- Έτσι, η στήλη έχει καλή επίδοση και μπορούμε να προχωρήσουμε στην ανάπτυξη μεθόδων.

Εάν ο αριθμός των πλακών δεν είναι καλός, τότε θα πρέπει να γίνει έκπλυση ή αντικατάσταση της στήλης καθώς και έλεγχος του εκτός-στήλης όγκου.

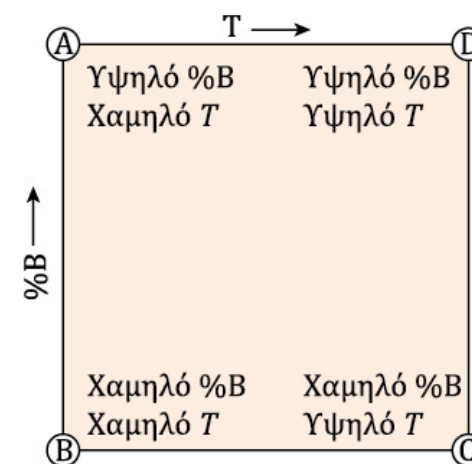
Βήμα 4 Βελτιστοποιήστε τον παράγοντα διαχωρισμού

Η βελτιστοποίηση του παράγοντα διαχωρισμού γίνεται με διάφορους τρόπους:

- Λεπτή ρύθμιση της σύστασης του διαλύτη (%B).
- Μεταβολή της θερμοκρασίας της στήλης
- Αλλαγή της πολικότητας του οργανικού διαλύτη
- Αλλαγή της στατικής φάσης



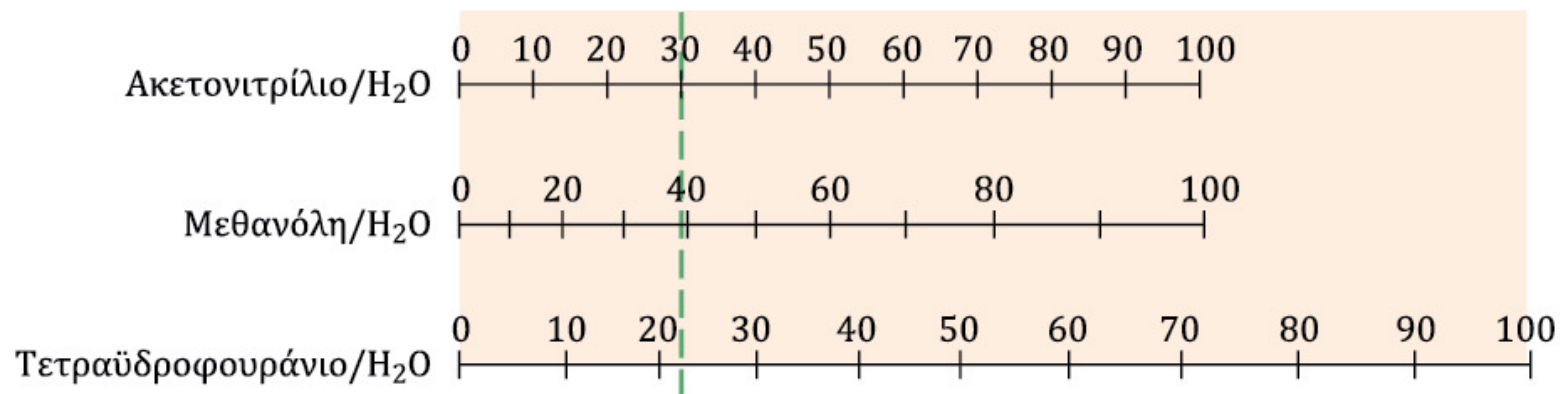
ΕΙΚΟΝΑ 25-30 Επίδραση του οργανικού διαλύτη στον διαχωρισμό επτά αρωματικών ενώσεων με HPLC. Στήλη: Hypersil ODS (C_{18} σε 5 μm σίλικα), $25 \times 0,46$ cm, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($\sim 22^\circ C$). Ο ρυθμός έκλουσης είναι 1,0 mL/min με τους ακόλουθους διαλύτες: (A) 30 % v/v ακετονιτρίλιο/70% v/v ρυθμιστικό διάλυμα. (B) 40% μεθανόλη/60% ρυθμιστικό και (C) 32% τετραϋδροφουράνιο/68% ρυθμιστικό. Το υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα περιείχε 25 mM KH_2PO_4 και 0,1 g/L Na_3 και το pH ρυθμίζεται στο 3,5 με HCL. Η αρνητική πτώση στο C μεταξύ των κορυφών 3 και 1 σχετίζεται με το μέτωπο του διαλύτη. Οι κορυφές ταυτοποιήθηκαν με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους συστοιχίας φωτοδιόδων: (1) βενζυλική αλκοόλη, (2) φαινόλη, (3) 3', 4'-διμεθοξακετοφαινόνη, (4) *m*-δινιτροβενζόλιο, (5) *p*-δινιτροβενζόλιο, (6) *o*-δινιτροβενζόλιο, (7) βενζοΐνη.



ΕΙΚΟΝΑ 25-29 Ανάπτυξη ισοκρατικής μεθόδου HPLC, χρησιμοποιώντας τη σύσταση του διαλύτη (% B) και τη θερμοκρασία (T) ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Οι τιμές των %B και T μεταβάλλονται μεταξύ επιλεγμένων χαμηλών και υψηλών ορίων. Από την ποιότητα του διαχωρισμού που λαμβάνεται με τις συνθήκες A – D, επιλέγουμε ενδιαμέσες συνθήκες για την περαιτέρω βελτίωση του διαχωρισμού.

Επιλογή κινητών φάσεων της ίδιας δύναμης

Κατά τη δοκιμή διαφορετικών οργανικών διαλυτών, συνιστάται να διατηρείται σταθερή η αντοχή του διαλύτη, έτσι ώστε οι χρόνοι κατακράτησης να παραμένουν σε παρόμοιο εύρος.



ΕΙΚΟΝΑ 25-31 Νομόγραμμα που δείχνει το κατ' όγκον ποσοστό διαλυτών που έχουν την ίδια ισχύ κινητής φάσης. Μια κάθετη γραμμή τέμνει κάθε γραμμή διαλύτη στην ίδια ισχύ εκλούστη. Για παράδειγμα, 30% v/v ακετονιτρίλιο/70% v/v νερό έχει την ίδια ισχύ έκλουσης με 40% v/v μεθανόλη ή 22% v/v τετραϋδροφουράνιο. [Δεδομένα από L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development* (New York: Wiley, 1997)].

Αλλαγή της στατικής φάσης

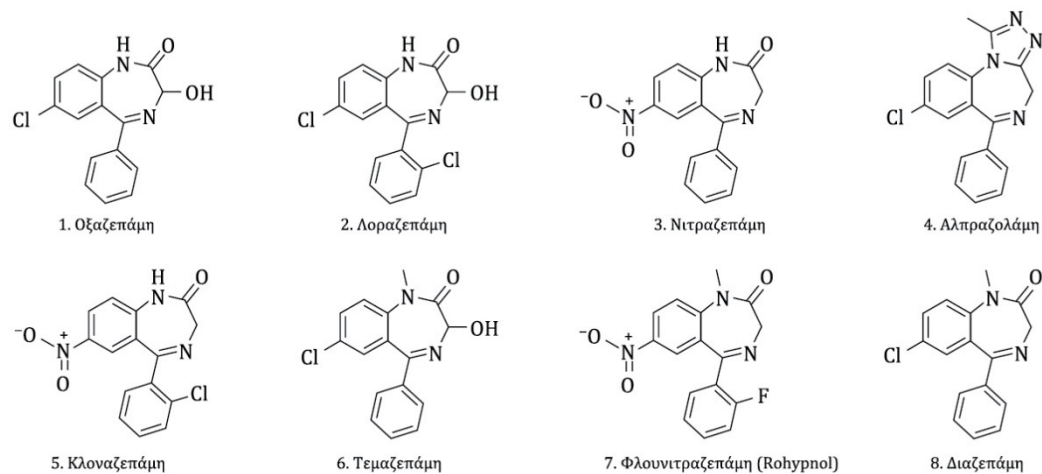
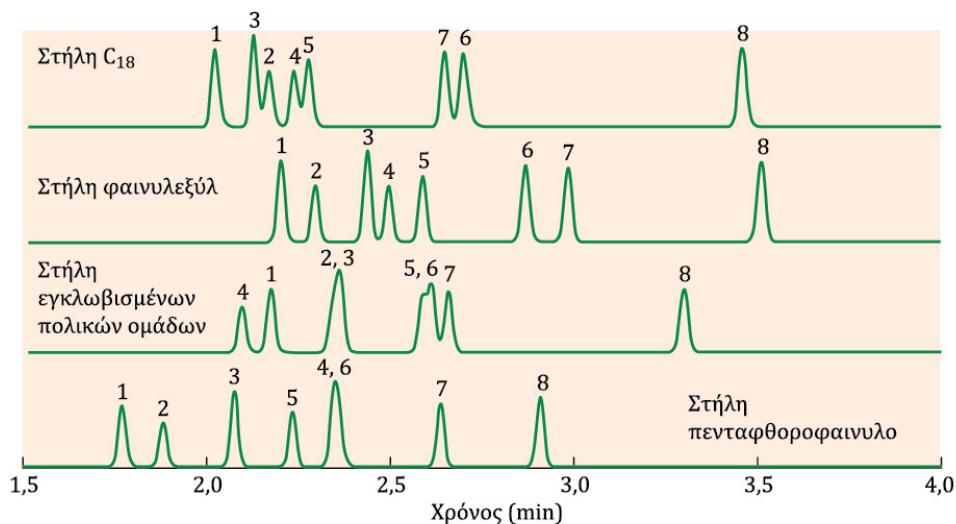
ΠΙΝΑΚΑΣ 25-7 Επιλογή συνδεδεμένων στατικών φάσεων για την υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης

Ιδιότητες της στήλης που επιδρούν στον παράγοντα διαχωρισμού (α)

- Τύπος πυριτίας (Τύπος A και Τύπος B)
- Υδροφοβικότητα της συνδεδεμένης φάσης (κυανο < φαινυλο < C₈ < C₁₈)
- Πρόσθετες αλληλεπιδράσεις (φαίνυλο = π-π, σχήμα. Κυανό = δίπολο. Πενταφθοροφαίνυλο = π-π, διπόλου, φθορίου)
- Ενσωματωμένες πολικές ομάδες (δεσμοί υδρογόνου, δίπολα)
- Τύπος ακροκάλυψης (ιδιαίτερα επηρεάζει τους διαχωρισμούς αμινών)

Ιδιότητες της στήλης που δεν επηρεάζουν τον παράγοντα διαχωρισμού (α)

- Μέγεθος σωματιδίων
- Διάμετρος στήλης
- Μήκος στήλης

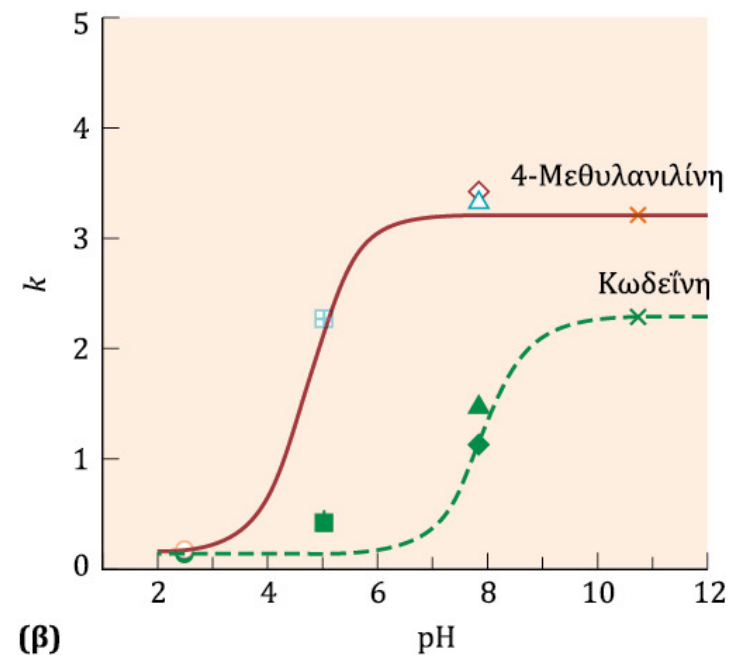
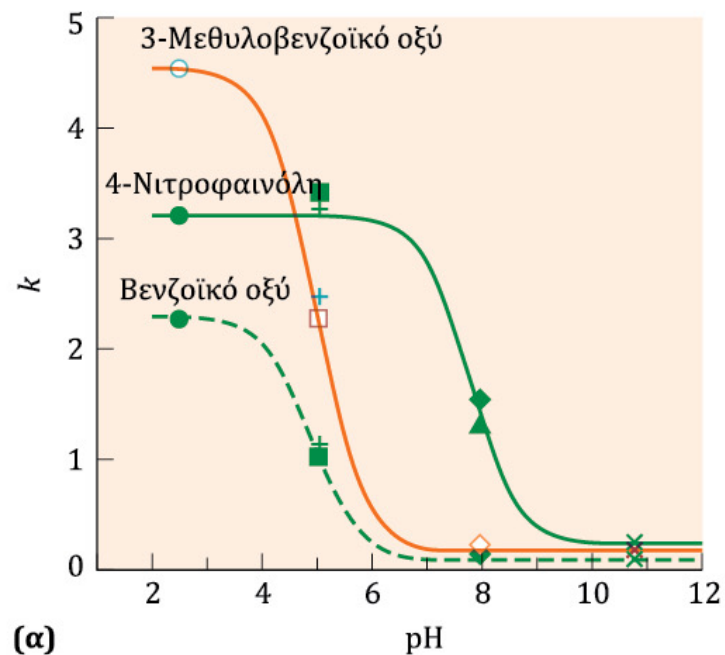


Βήμα 5 Βελτιστοποίηση των διαστάσεων της στήλης

Περαιτέρω βελτίωση στη διαχωριστότητα μπορεί να επιτευχθεί αλλάζοντας τις συνθήκες της στήλης (μήκος, μέγεθος σωματιδίων ή ταχύτητα ροής) για να αυξηθεί ο αριθμός πλακών N .

- Η αλλαγή του μήκους της στήλης ή του μεγέθους των σωματιδίων δεν θα μεταβάλει τον παράγοντα κατακράτησης (k) ή τον συντελεστή διαχωρισμού (α), αλλά μπορεί να αυξήσει τον χρόνο διαχωρισμού.
- Εάν η διαχωριστότητα είναι περισσότερο από επαρκής (διαχωριστότητα $\gg 2$), ένας χαμηλότερος αριθμός πλακών μπορεί να είναι επαρκής και θα αποφέρει ταχύτερο διαχωρισμό

Επίδραση του pH στην κατακράτηση ασθενών οξέων

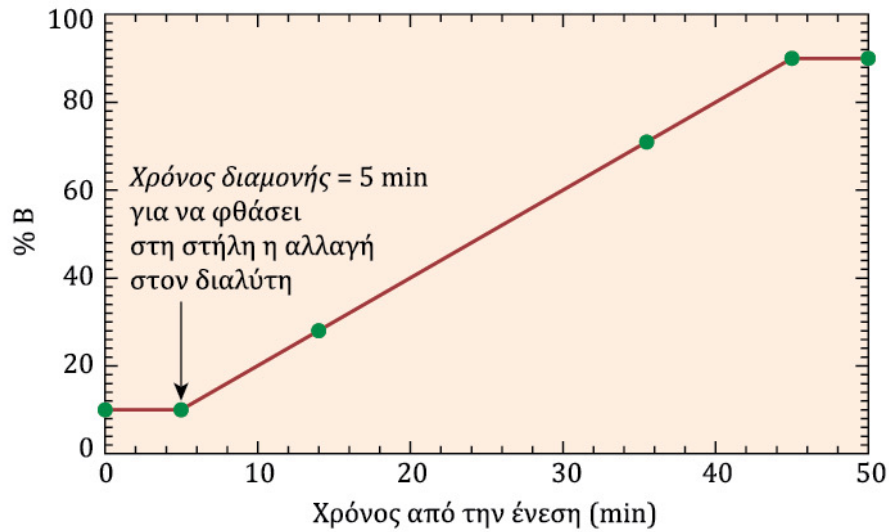


ΠΙΝΑΚΑΣ 25-8 Κοινά ρυθμιστικά για HPLC

ΠΙΝΑΚΑΣ 25-8 Κοινά ρυθμιστικά για HPLC				
Ρυθμιστικό	pK _a (σε υδατικό διάλυμα)	Περιοχή ρύθμισης pH	Κατώφλι (nm) στο υπεριώδες (UV)*	Σχόλια
Τριφθοροξικό οξύ (TFA)	0,3		210 (0,1%)	Σχηματίζει ζεύγη ιόντων, πτητικό
Φωσφορικό pK _{a1} pK _{a2}	2,1 7,2	1,1–3,1 5,2–8,2	<200 (10 mM) <200 (10 mM)	Περιορισμένη διαλυτότητα
Κιτρικό pK _{a1} pK _{a2} pK _{a3}	3,1 4,7 6,4	2,1–4,1 3,7–5,7 5,4–7,4	230 (10 mM) 230 (10 mM) 230 (10 mM)	Μπορεί να διαβρώσει τον ανοξείδωτο χάλυβα
Μυρμηκικό	3,8	2,8–4,8	210 (10 mM)	Πτητικό
Οξικό	4,8	3,8–5,8	210 (10 mM)	Πτητικό
BIS-TRIS προπάνιο · 2HCl pK _{a1} pK _{a2}	6,8 9,0	5,8–7,8 8,0–10,0	215 (10 mM) 215 (10 mM)	Οξείδωση του ρυθμιστικού από τον αέρα οδηγεί σε αύξηση της απορρόφησης στο UV
Βορικό	9,1	8,1–10,1	200 (10 mM)	
Αμμωνία	9,2	8,2–10,2	200 (10 mM)	Πτητικό
Όξινο ανθρακικό pK _{a2}	10,3	9,3–11,3	<200 (10 mM)	Πτητικό
1-Μεθυλοπιπεριδίνη · HCl	10,1	9,1–11,1	215 (10 mM)	Η απορρόφηση στο UV αυξάνεται με την ηλικία του ρυθμιστικού
Τριαιθυλαμίνη · HCl	11,0	10,0–12,0	<200 (10 mM)	Η απορρόφηση στο UV αυξάνεται με την ηλικία του ρυθμιστικού
*Σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από το κατώφλι, η απορρόφηση υδατικών διαλυμάτων είναι <0,5. Δεδομένα από L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, <i>Introduction to Modern Liquid Chromatography</i> , 3rd ed. (Hoboken, NJ: Wiley, 2010), Table 7.1.				

25-4 Βαθμιδωτοί διαχωρισμοί

Ανάπτυξη βαθμιδωτού διαχωρισμού



Ο όγκος μεταξύ του σημείου ανάμειξης των διαλυτών και της εισόδου της στήλης ονομάζεται **όγκος διαμονής**

