

# تهیه و تنظیم کنفرانس توسط:

---

□ فاطمه جبرائیلی مقدم

□ زهره ترسلی

□ زهرا ترسلی

---

# سرفصل ها

---

- ❑ ۱- توضیحی در مورد کروماتوگرافی
  - ❑ ۲- میدان عمل HPLC
  - ❑ ۳- کاربردهای کروماتوگرافی مایع
  - ❑ ۴- انواع کروماتوگرافی
  - ❑ ۵- توضیحات کلی در مورد پمپها
  - ❑ ۶- کارایی ستون در کروماتوگرافی مایع
  - ❑ ۷- آشکارسازها
-

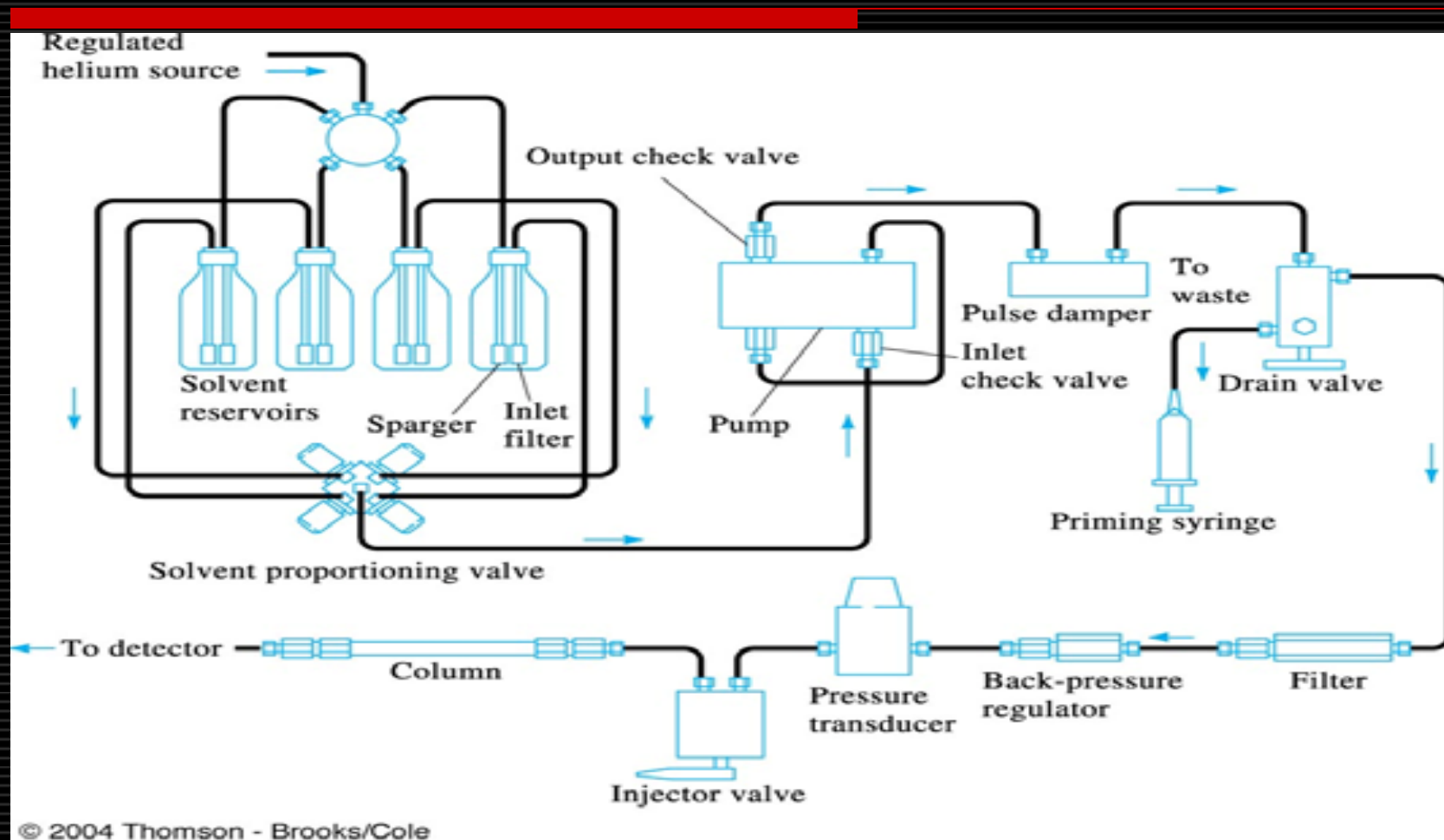
# توضیحی در مورد کروماتوگرافی

کروماتوگرافی لغتی یونانی به معنی رنگ نگاری است که ترکیبی از دو واژه "کروما" به معنی رنگ و "گروفین" به معنی نوشتن است. در سال ۱۹۰۳ برای اولین بار از این روش جداسازی مواد رنگی استفاده شد که این کار توسط میخائیل سوئت انجام گرفت. اما امروزه از این روش برای جداسازی مواد بی رنگ چون گازها استفاده می شود یکی از پرکاربردترین روش های جداسازی مواد در آزمایشگاه کروماتوگرافی است و در مواقعی که جداسازی به روش های دیگر ناممکن است به راحتی می توان از این روش استفاده کرد، زیرا اختلافات های جزئی موجود در رفتار اجسام باعث تسهیل جداسازی در جریان عبور آنها از یک سیستم کروماتوگرافی می شود. این روش بسیار ساده و سریع است به طور مثال آزمایشی که ممکن است با استفاده از روش ستون تقطیر چندین روز به طول بینجامد، می تواند به کمک کروماتوگرافی در عرض زمانی بسیار کوتاه انجام گیرد، وسایل مورد لزوم آن نیز ارزان قیمت است.

# تصویری از دستگاه HPLC



# شمایی از دستگاه HPLC



# میدان HPLC

---

فاز ساکن : فاز ساکن در HPLC در ستون هایی از جنس فولاد ضد زنگ به طول ۱۰-۱۵-۲۵-۳۰-۵۰- و یا ۱۰۰ سانتی متر و با قطر ۲-۶ میلی متر پر می شود. عوامل موثر در انتخاب فاز ساکن HPLC عبارتند از : طبیعت مواد مورد تجزیه - راندمان جداسازی مورد نیاز - ظرفیت بارگذاری ستون .

از جاذب های جامد به عنوان فاز ساکن جهت جداسازی مولکولهای با جرم مولکولی نسبتا کم و با قطبیت کم استفاده می شود. سیلیکاژل متداولترین فاز ساکن جامد مورد استفاده در HPLC است

آلومین / جامد جذاب دیگری است که در HPLC به کار می رود و چون یک ترکیب قلیایی است مواد اسیدی را بر روی خود نگه می دارد.

# فاز متحرک

---

عموماً فاز متحرک حاوی مخلوطی از حلالهای قطبی نظیر الکل و غیر قطبی نظیر هیدروکربنهاست. با کنترل ترکیب و قطبیت فاز متحرک در روش گرادینان حلال می توان زمان و حجم باز داری مواد را در ستون HPLC کنترل نمود. فاز متحرک در HPLC باید چنان انتخاب شود که در آشکار ساز مزاحمت ایجاد نکند. معمولاً مخلوطهای متانول / اتانول یا پروپانول با هپتان و کلروفرم با هپتان را به عنوان فاز متحرک در HPLC مورد استفاده قرار می دهند. در HPLC فاز معکوس عموماً از مخلوط متانول یا استونیتریل با آب به عنوان فاز متحرک استفاده می شود.

# مزایای این روش

---

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا سریعترین رشد را در بین تمام فنون جداسازی تجزیه ای با فروش سالیانه در گستره میلیارد دلار داشته است .  
و دلیل این محبوبیت:

- ❑ ۱- حساسیت روش
- ❑ ۲- سازگاری آن برای انجام اندازه گیریهای کمی صحیح
- ❑ ۳- مناسب بودن آن برای جداسازی گونه های نافرار یا ناپایدار گرمایی
- ❑ ۴- کاربرد گسترده آن برای مواد پراهمیت در صنعت
- ❑ ۵- زمینه های مختلف علوم و جامعه



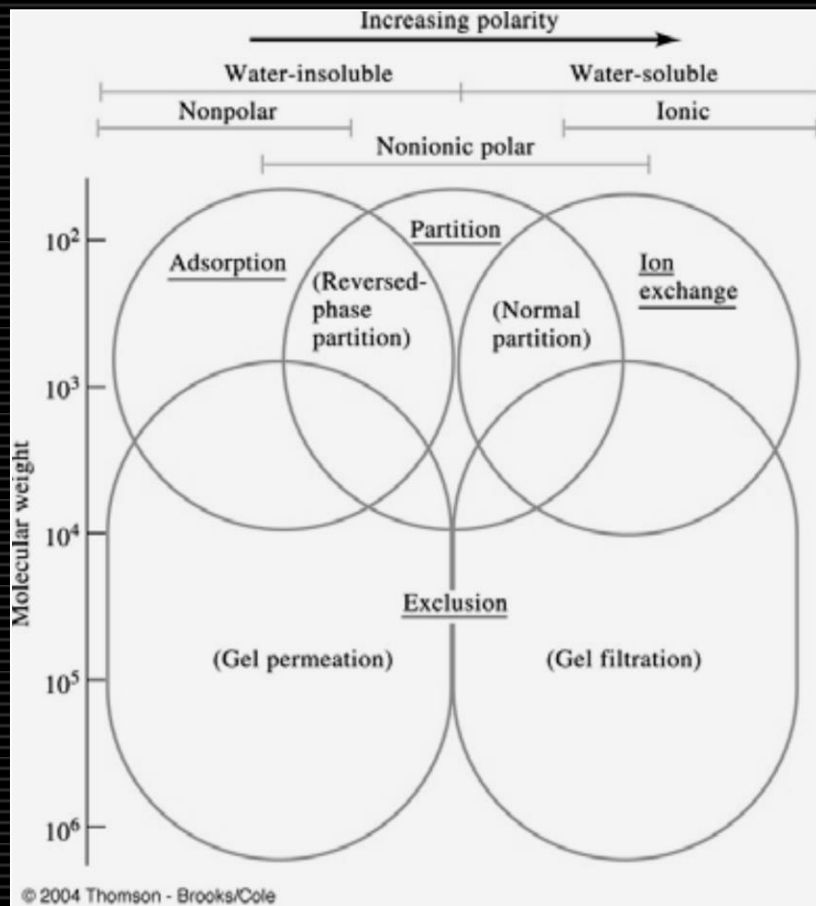
## کاربردهای کروماتوگرافی مایع

برای مواد حل شده ای که وزن مولکولی بزرگتر از ۱۰۰۰۰ دارند کروماتوگرافی طردی

برای گونه های یونی با وزن مولکولی پایین کروماتوگرافی تبادل یونی

گونه های کوچک قطبی اما نایونی از کروماتوگرافی تقسیمی

و برای جداسازی گونه های ناقطبی، ایزومرهای ساختاری و دسته ترکیباتی از قبیل هیدروکربنهای آلیفاتیک از الکلها آلیفاتیک از کروماتوگرافی جذب سطحی استفاده می کنند.



# انواع کروماتوگرافی

---

□ کروماتوگرافی تقسیمی

□ کروماتوگرافی تبادل یونی

□ کروماتوگرافی جذب سطحی

□ کروماتوگرافی طردی

---

# کروماتوگرافی تقسیمی

---

کروماتوگرافی تقسیمی در بین چهار نوع روش کروماتوگرافی مایع بیشتر از همه به کار برده شده است. در گذشته اکثر کاربردها به ترکیبات ناپیونی، قطبی با وزن مولکولی کم و یا متوسط معمولاً کمتر از ۳۰۰۰ مربوط بوده است. ولی اخیراً روشهایی ابداع شده اند ( مشتق سازی و زوج یونی ) که جداسازیهای تقسیمی را به ترکیبات یونی نیز بسط داده اند. به علت اینکه جداسازی در LLC به میزان تقسیم اجزای مخلوط بین دو فاز مایع بستگی دارد این نوع کروماتوگرافی را کروماتوگرافی تقسیمی می نامند.

---

# کروماتوگرافی تبادل یونی

---

در کروماتوگرافی تبادل یون از رزین های تبادل کننده ی یون به عنوان فاز ساکن

استفاده می شود. رزین ها، پلیمرهای سنتزی با اتصالات جانبی هستند که پیوندهای

کوالانسی و گروههای عاملی یونی شونده می باشند. در رزین های تبادل کننده کاتیون

گروههای آنیونی و در رزین های تبادل کننده آنیون گروههای کاتیونی وجود دارند.

یون مخالف یعنی یون متصل به رزین تقریباً آزاد است و می تواند در فاز متحرک آبی

حل شود و درون ستون جریان یابد

---

# کروماتوگرافی جذب سطحی

---

در روش **hplc** از سیلیکای اصلاح نشده استفاده می شود. مکانهای جذب روی سطح سیلیکا، سیلانول می باشند. در کروماتوگرافی با سیلیکا تعداد نسبی هر نوع از گروههای سیلانول بستگی به نوع سیلیکا و چگونگی تهیه و مراقبت از آنها دارد. معمولاً برای کروماتوگرافی، سیلیکا توسط حرارت دادن در ۱۵۰ تا ۲۰۰ سانتیگراد فعال می شود و سپس توسط فاز متحرک و میزان کمی از آب یا حلال آلی قطبی دیگر به مقدار جزئی غیر فعال شده تا میزان و جذب آن در حد استاندارد گردد. با وجود سیلیکا و فاز متحرک غیر قطبی که با میزان کم حلال قطبی تعدیل شده، لایه ای از مواد قطبی روی سطح سیلیکا جذب می شود.

---

# کروماتوگرافی طردی

---

روشی است که مولکولها بر مبنای اندازه موثر و شکل آن در محلول از یکدیگر جدا می شوند. و اگر از حلالهای آلی استفاده کنیم این روش اغلب کروماتوگرافی ژل تراوا و اگر از حلالهای آبی استفاده نمائیم آن را کروماتوگرافی ژل صافی می نامند. فازهای ساکن مورد استفاده در کروماتوگرافی طرد ذرات متخلخل با اندازه منافذ کنترل شده می باشند. و نباید بین جزء نمونه و سطح فاز ساکن برهم کنش موجود باشد. حجم کل فاز متحرک درون ستون عبارت است از مجموع حجمی که خارج از ذرات فاز ساکن می باشد.

# انواع پمپ

---

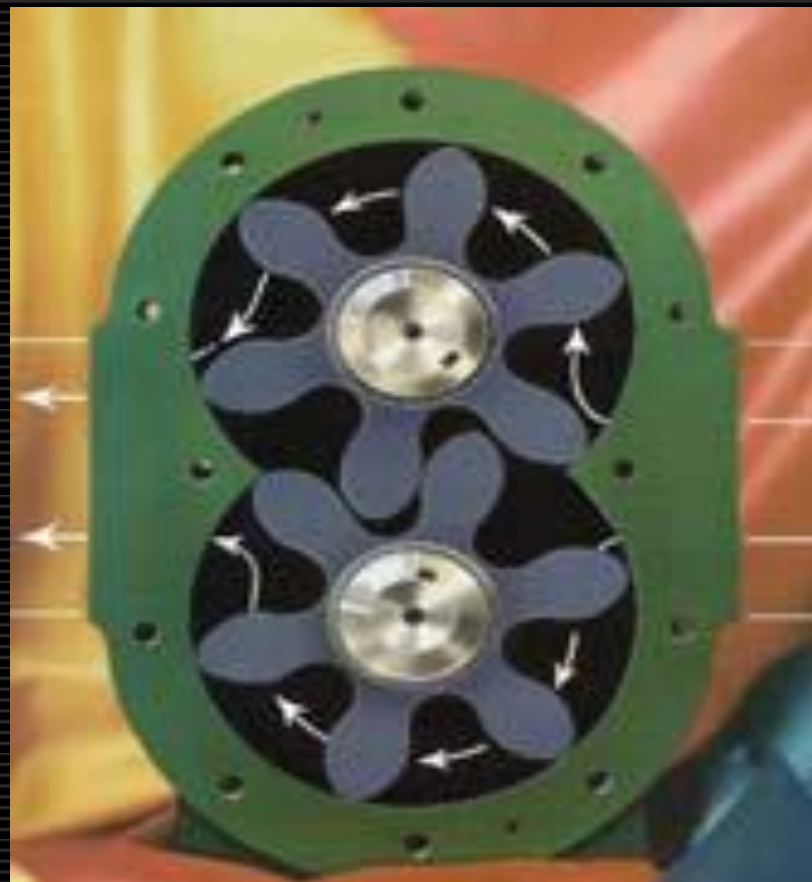
□ 1- پمپ های پیستونی

□ 2- پمپهای جابه جایی یا سرنگی

□ 3- پمپ های فشار ثابت یا بادی

---

# سیستم های پمپ کننده





## ویژگی سیستم های پمپ کننده

---

- تولید فشارهای تا ۶۰۰PSi
- خروجی بدون تپ
- سرعت جریان در گستره ۱/۰ تا ۱۰ml/min
- کنترل جریان و تکرارپذیری جریان تا ۵/۰٪ نسبی و یا بهتر
- اجزای سازنده مقاوم در مقابل خوردگی (فولادهای مختلف زنگ نزن یا تفلون)

# عملکرد پمپ

---

وظیفه اصلی پمپ در کروماتوگرافی مایع این است که فاز متحرک را با فشار بالا با سرعت عبور کنترل شده، از ستون عبور دهد. یک نوع پمپ (پمپ با فشار ثابت این عمل را با آوردن فشار ثابت به فاز متحرک انجام می دهد و سرعت عبور از ستون با توجه به مقاومت ستون در برابر عبور جریان و مقاومت های دیگر موجود بین پمپ آشکارگر تعیین میشود. نوع دیگر این کار را با عبور جریان در حد خواسته شده انجام می دهد و در اینجا میزان فشار با توجه به مقاومت در برابر عبور تنظیم می گردد.

# انواع ستون

---

□ ستون های کروماتوگرافی مایع

□ ستون های تجزیه ای

□ ستون های محافظ

---

# ستون های کروماتوگرافی مایع

---

این نوع ستون ها معمولا از لوله های فولاد زنگ نزن با منفذ یکنواخت ساخته می

شوند ، گرچه لوله های شیشه ای یا جداره ضخیم نیز گاهی به کار می روند . لوله های

شیشه ای با فشارهای کمتر از **۶۰۰ psi** محدود می شوند.

# ستون های تجزیه ای

---

طول اکثر ستونهای کروماتوگرافی مایع ۱۰ تا ۳۰ سانتیمتر است. معمولا ستونها

مستقیم اند و قطر داخلی ستونهای مایع اغلب ۴ تا ۱۰ سانتیمتر است و متداولترین

ذرات پرکننده ها ۵ و ۱۰ میکرومتر است. متداولترین ستون در حال کار این روزها ،

ستونی با طول ۲۵ میکرومتر پر شده است. و این ستونها می توانند ۴۰۰۰۰ تا ۶۰۰۰۰

بشقابک در متر دارد.

---

# تصاویری از چند ستون



# ستون های محافظ

اغلب یک ستون کوتاه محافظ قبل از ستون تجزیه ای به کار می رود تا با حذف نه

تنها مواد آلاینده ها از حلالها ، بلکه همچنین اجزای نمونه که بطور برگشت ناپذیر با

فاز ساکن پیوند می دهند، عمر ستون تجزیه ای را افزایش دهد. همچنین در این روش

ستون محافظ برای سیر کردن فاز متحرک با فاز ساکن به کار می رود تا اتلاف این

حلال در ستون تجزیه ای را به حداقل برساند. اندازه ذرات در ستون بزرگ است تا

افت فشار را به حداقل برساند.

# انواع پرکننده های ستون

---

□ پرکننده ذرات پوسته دار

□ پرکننده متخلخل

---



# توضیح ذرات پوسته دار

---

از دانه های شیشه ای یا بسپاری نامتخلخل کروی با قطر نوعی از ۳۰ تا ۴۰ میکرومتر

تشکیل شده است و جنس لایه متخلخل سیلیس، آلومین و یا یک رزین تبادل یونی

روی سطح این دانه ها رسوب داده شده است. ممکن است دانه ها در اثر اعمال

شیمیایی دارای سطحی آلی شوند. اخیرا پرکننده های پوسته دار عمدتا در ستون های

محافظ و نه برای ستونهای تجزیه ای به کار می روند.

---

# توضیح پرکننده متخلخل

---

این نوع پرکننده ها از ریز ذراتی با قطری در گستره 3 تا 10 میکرومتر

تشکیل میشود برای یک اندازه معین تلاش میشود تا گستره اندازه ذره به حداقل

برسد. این ذرات از سیلیس - آلومین و یا رزین تبادل یونی تشکیل شده اند که

سیلیسی متداول تر است. ذرات سیلیس از تجمع ذرات سیلیس ریز میکرون در

شرایطی سنتز می شوند که به ذرات بزرگتر کاملاً یکنواخت منجر شوند

---

# آشکارسازها

---

عامل وجودی آشکارگر در **hplc** آشکار کردن فاز متحرکی است که از ستون

بیرون می آید. یک سری گسترده از وسایلی که بعضی از آنها پیچیده و حساس هستند

به عنوان آشکارگر مورد استفاده قرار می گیرند. آشکارسازها به دو گروه اصلی

آشکارسازهای با خاصیت گروهی و آشکارسازهای با خاصیت جسم حل شده طبقه

بندی میشوند.

## تعریف دو نوع اصلی آشکارساز

---

□ آشکارسازها با خاصیت گروهی : به خاصیت فاز متحرک مانند ضریب شکست

ثابت دی الکتریک یا چگالی که با وجود جسم حل شده مدوله میشود جواب میدهند.

□ آشکارسازها با خاصیت جسم حل شده: به خاصیتی از جسم حل شده مانند جذب

UV - فلوئورسانس یا جریان نفوذ / که فاز متحرک فاقد آن است جواب میدهد.

---

# مشخصات آشکارساز ایده آل

---

علاوه بر اینکه آشکار سازها در این روش نیازی ندارد به گستره ای به آن وسعت از  
دما جواب بدهد. علاوه براین برای کاهش پهن شدگی منطقه , آشکار ساز HPLC  
باید حداقل حجم درونی را داشته باشد

- حساسیت کافی
  - پایداری خوب و تکرار پذیر
  - قابلیت اعتماد بالا و سهولت کاربرد
  - زمان جواب کوتاه که مستقل از سرعت جریان است.
-

# انواع آشکار ساز

---

□ آشکار ساز های جذبی

□ آشکار ساز های فلورسانسی

□ آشکار ساز های ضریب شکست

□ آشکار ساز های الکتروشیمیایی

---

# آشکار ساز های جذبی

---

آشکارگرهای جذب UV عمومی ترین آشکارگر HPLC به حساب می آیند. اصول کار کرد آن براین مبناست که فاز متحرک از ستون به درون محفظه ای کوچک جاری میشود. محفظه در مقابل اشعه **uv/visible** منتشر شده از دستگاه نورسنج یاطیف سنج قرار میگیرد. این آشکارگرها انتخابگر بوده ، فقط میتوانند اجزاء نمونه ای از نور UV را جذب می کنند آشکار سازند. و برای به حداقل رساندن پهن شدگی نواراضافی ستون ، حجم چنین سلولی را تا حد امکان کوچک نگه می دارد. بنابراین حجمها به ۱ تا ۱۰ میکرو لیتر و طول سلولها به ۲ تا ۱۰ میلی لیتر محدود میشوند.

# تصویری از یک آشکارساز





# آشکار ساز های فلورسانسی

---

بسیاری از مواد میتوانند نور UV را جذب کرده و سپس اشعه ای در طول موج بالاتر

پخش کنند. این پخش یا سریع‌صورت می‌گیرد (فلورسانس) یا با کمی تاخیر (فسفر

سانس) و معمولاً نور جذب شده که دو مرتبه در طول موج بالاتر پخش میشود بسیار

کم است. اما برای بعضی مواد این میزان بین ۱/۰ تا ۱ می باشد. و این روش برای

آشکار شدن این مواد مناسب میباشد. موادی که بطور طبیعی خاصیت فلورسانسی

دارند دارای ساختمان حلقوی مزدوج هستند.

---

# تصویر آشکارساز



# آشکار سازهای ضریب شکست

---

این آشکارگر بر مبنای اختلاف ضریب شکست جزء نمونه خارج شده از ستون

ضریب شکست فاز متحرک خالص ( به عنوان شاهد ) بنا نهاده شده است. تا زمانی که

مابین جزء نمونه و فاز متحرک اختلاف شکست نور موجود باشد میتوان گفت که این

آشکارگرها نزدیکترین وسیله در HPLC به عنوان آشکارگر جامع می باشند.

---

# آشکارساز ضریب شکست

---



# آشکارگرهای الکتروشیمیایی

---

آشکارگرهای الکتروشیمیایی ، هدایت مواد شسته شده را اندازه می گیرند و یا جریان

بوجود آمده توسط اکسایش و احیاء جزء نمونه را تعیین می کنند در حالت اول جزء

نمونه باید یونی باشد و در حالت دوم جزء نمونه باید براحتی اکسید یا احیاء گردد. نوع

اول را آشکارگرهای سنجش رسانایی ویژه گویند .

---

# تصویری از آشکارساز



# منابع

---

1. شیمی دستگاهی زیر نظر دکتر علی معصومی

2. کروماتوگرافی مایع با بازدهی عالی - سندی لینه سی

3. اصول تجزیه دستگاهی جلد ۲

---