روش‌های جداسازی

دکتر سعید معصوم

دانشکده شیمی- دانشگاه کاشان

سر فصل مطالب

۱- مقدمه‌ای بر روش‌های جداسازی

۲- استخراج (Extraction)

۳- کروماتوگرافی(Chromatography)

۳-۱- مقدمه و تئوری

۳-۲- کروماتوگرافی گازی (GC)

۳-۳- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

۳-۴- روش‌های دیگر کروماتوگرافی

۴- الکتروفورز

مراجع

Techniques in Analytical Chemistry
CHEMICA
SEPARATIO
Principles
Techniques,
Experimen
CLIFTON E. MEL
اصول تجزیهٔ دستگاهی
جلد دوم
PRINCIPLES OF
TRUMENTAL
ALYSIS
HOLLER · NIEMAN

مقدمه‌ای بر روش‌های جداسازی

۱- خلوص نمونه

- بیشتر تجزیه‌های شیمیایی ویژه یک ترکیب بخصوص نمی‌باشند.
  - در واقع به بسیاری از تداخل‌کننده‌ها پاسخ می‌دهند.

- اغلب در ابتدا خالص‌سازی ترکیب مورد نظر، نیاز می‌باشد.
  - حذف مواد تداخل‌کننده قبل از تجزیه گزینش‌پذیر ترکیب مورد نظر
  - این عمل از طریق ***مرحله جداسازی*** صورت می‌پذیرد.

۲- روش‌های جداسازی شیمیایی

- **استخراج**
- **تقطیر**
- **رسوب دادن**
- **کروماتوگرافی**
- **روش‌های دیگر (سانتریفیوژ، فیلتراسیون و ...)**

استخراج وکروماتوگرافی از جمله مفیدترین روش‌های جداسازی می‌باشند.

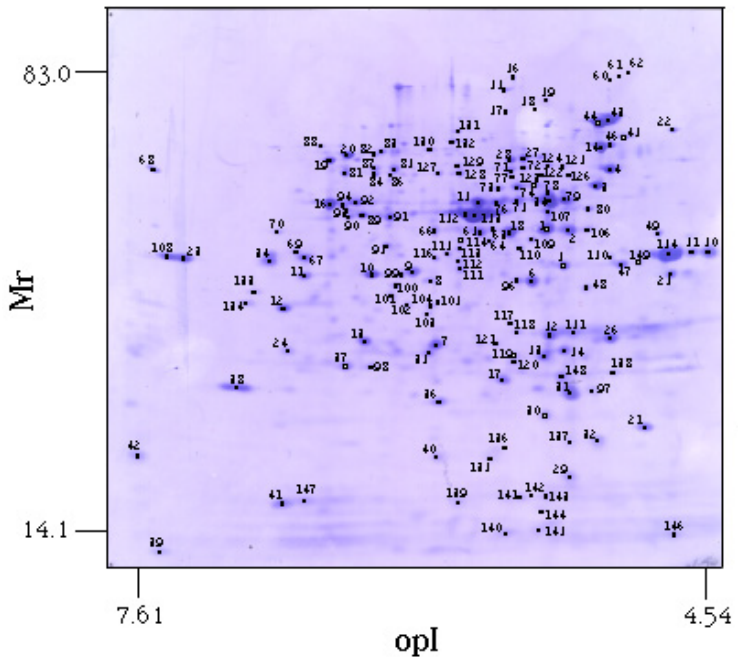
مقدمه‌ای بر روش‌های جداسازی

۳- اهمیت جداسازی

- نمونه‌های زیستی از مخلوط‌های پیچیده‌ای تشکیل شده است
  - تجزیه اجزا و بررسی تغییرات حاصل، به درک مریضی‌ها و توسعه درمان کمک می‌نماید.

تجزیه آفت‌کشهای مختلف موجود در آب‌های زیرزمینی با استفاده از LC-MS

ژل الکتروفورز دوبعدی عصاره پروتئین کل E. coli cells



Journal of Chromatography A, 1109 (2006) 222–227

Electrophoresis (1997) 18:1259-1313

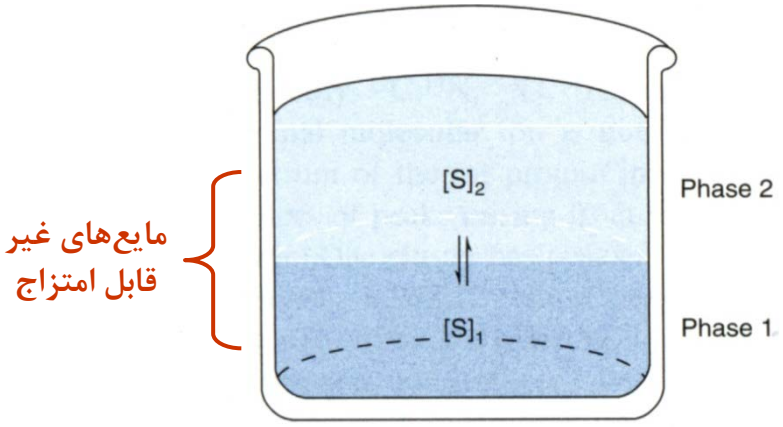
استخراج (Extraction)

۱) تعریف

انتقال یک ترکیب از یک فاز شیمیایی به فاز دیگر

اساس این روش بر مبنای اختلاف حلالیت یک جزء در دو حلال غیر قابل امتزاج می‌باشد.

- دو فاز مورد استفاده می‌تواند به صورت مایع-مایع، مایع-جامد، گاز-جامد و ... باشد.
- استخراج مایع-مایع متداولترین نوع استخراج می‌باشد.



$$S\ (\text{in phase 1}) \underset{}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} S\ (\text{in phase 2})$$

$$K = \frac{[S]_2}{[S]_1}$$

تقسیم حل شونده S بین دو فاز شیمیایی با ضریب تقسیم K (Partition coefficient) بیان می‌شود.

استخراج (Extraction)

۲- بازده استخراج

- جزئی از مول‌های S که در فاز ۱، بعد از *یک مرحله استخراج* باقی می‌ماند:

$$q = \frac{V_1}{(V_1 + KV_2)}$$

q= جزئی از مول‌های S باقیمانده در فاز ۱
V_1= حجم فاز ۱
V_2= حجم فاز ۲
K= ضریب تقسیم

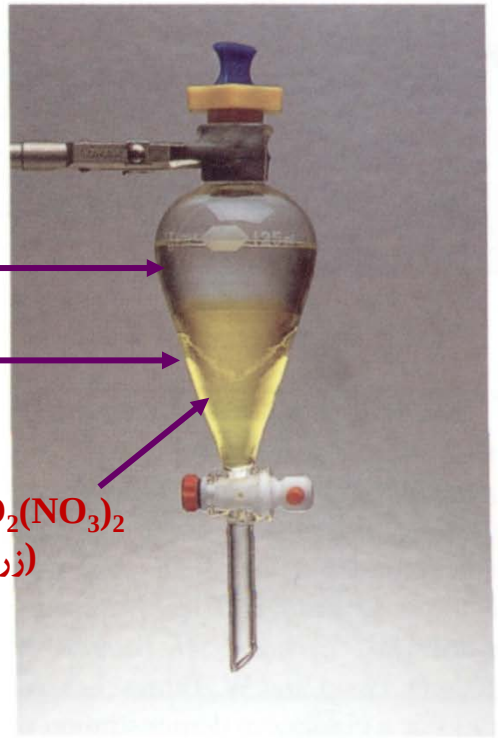
- جزئی از مول‌های S که در فاز ۱، بعد از *n مرحله استخراج* باقی می‌ماند:

$$q_n = \left[\frac{V_1}{(V_1 + KV_2)}\right]^n$$

با فرض ثابت بودن V_2

درصد استخراج =(1-q) *100

استخراج (Extraction)



بعد از مخلوط، $UO_2(NO_3)_2$
بین دو لایه پخش می‌شود.

بعد از ۸ مرحله استخراج، $UO_2(NO_3)_2$
از فاز آبی حذف می‌شود.

استخراج (Extraction)

۳- مثال ۱:

حل شونده A دارای ضریب تقسیم برابر ۳ بین آب (فاز ۱) و بنزن (فاز ۲) می‌باشد. اگر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۱ مولار محلول A در آب، یک مرحله با ۵۰۰ میلی‌لیتر بنزن استخراج شود، چه میزان استخراج صورت می‌گیرد؟

پاسخ:

درمرحله اول مقدار q محاسبه می‌شود:

$$q_n = \left[\frac{V_1}{(V_1 + KV_2)}\right]^n = \left[\frac{100mL}{100mL + (3)\times(500mL)}\right]^1 = 0.062 = 6.2\%$$

در این‌صورت میزان استخراج (p) برابر است با:

$$p = 1 - q = 1 - 0.062 = 0.938 = 93.8\%$$

استخراج (Extraction)

۳- مثال ۲:

در مثال مشابه چه میزان استخراج صورت می‌گیرد اگر ۵ مرحله استخراج با ۱۰۰میلی‌لیتر بنزن در هر مرحله (به جای ۵۰۰ میلی‌لیتر در یک مرحله) صورت پذیرد؟

پاسخ:

درمرحله اول مقدار q محاسبه می‌شود:

$$q_n = \left[\frac{V_1}{(V_1 + KV_2)}\right]^n = \left[\frac{100mL}{100mL + (3)\times(100mL)}\right]^5 = 0.00098 = 0.98\%$$

در این‌صورت میزان استخراج (p) برابر است با:

$$p = 1 - q = 1 - 0.00098 = 0.99902 = 99.902\%$$

نکته: با توجه به این دو مثال مشاهده می‌شود که n بار استخراج با V میلی‌لیتر از حلال استخراج کننده موثرتر از یک بار استخراج با حجم nV میلی‌لیتر از آن حلال می‌باشد.

استخراج (Extraction)

۳- مثال ۳:

الف) برای استخراج آلدرین موجود در یک نمونه توت فرنگی به صورت زیر عمل می‌کنیم.
۵ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید به عنوان فاز آبی و همین حجم از هگزان به عنوان فاز آلی استفاده می‌شود. اگر پس از به تعادل رسیدن و جداسازی فازها ۸۳٪ آلدرین به فاز هگزان وارد شده باشد، ضریب تقسیم این ترکیب بین دو حلال چقدر است؟
ب) اگر بخواهیم ۹۸٪ آلدرین به درون هگزان استخراج شود، چه حجمی از هگزان لازم است؟

$$q = 1 - 0.83 = 0.17$$

$$q = \frac{V_1}{(V_1 + KV_2)} = \frac{5}{(5 + 5K)} = 0.17 \Longrightarrow K = 4.88$$

$$1 - 0.98 = 0.02 = \frac{V_1}{(V_1 + KV_2)} = \frac{5}{(5 + 4.88V_2)} \Longrightarrow V_2 = 50.2$$

استخراج (Extraction)

۴- اثرات pH در استخراج

- برای اسیدها (HA) و بازهای (B) ضعیف
  - معمولا گونه‌های پروتونه شده و پروتونه نشده دارای ضریب تقسیم متفاوت می‌باشند.
  - گونه‌های باردار (A^- یا BH^+) استخراج نمی‌شوند، در حالی‌که گونه‌های خنثی (HA یا B) استخراج می‌شوند.
  - تقسیم بندی گونه‌ها بین دو فاز بدون در نظر گرفتن فرم گونه‌ها به صورت ضریب توزیع Distribution coefficient (D) بیان می‌شود.

استخراج (Extraction)

۴- اثرات pH در استخراج

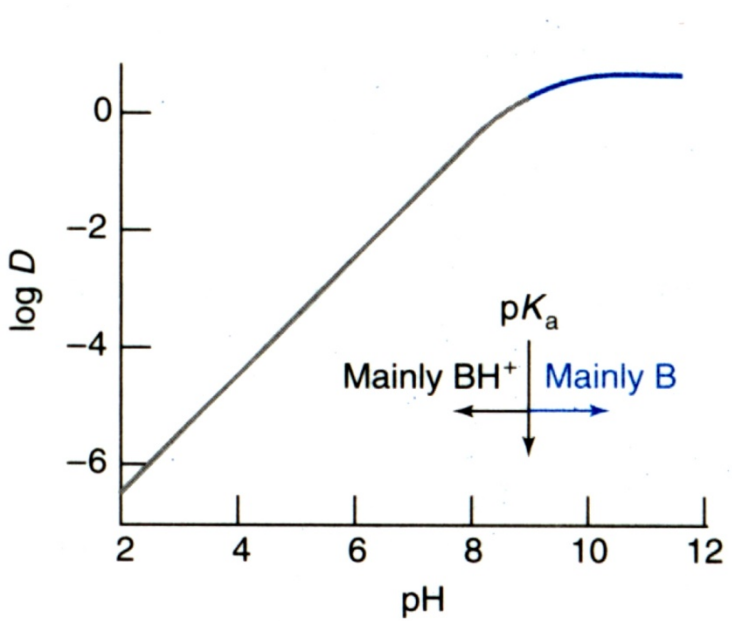
- میزان توزیع باز و اسید ضعیف *وابسته به pH* می‌باشد.

برای باز ضعیف B گونه BH^+ تنها در فاز ۱ وجود دارد.

$$\square = \frac{\text{غلظت کل در فاز ۱}}{\text{غلظت کل در فاز ۲}}$$

$$K_{BH^+} = \frac{0}{[BH^+]_1} = 0$$

$$D = \frac{[B]_2}{[B]_1 + [BH^+]_1}$$



استخراج (Extraction)

۴- اثرات pH در استخراج

با جاگذاری مقادیر K_B و K_a در D خواهیم داشت:

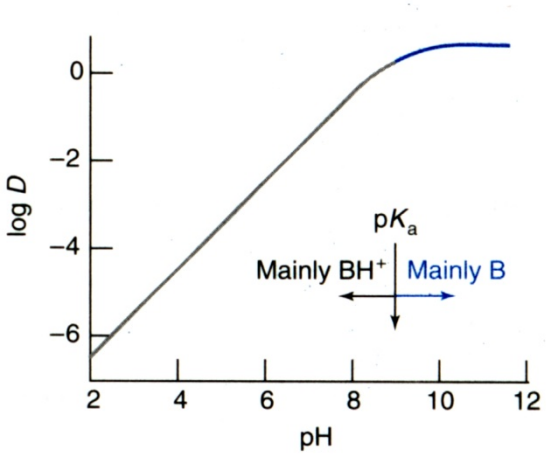
$$D = \frac{[B]_2}{[B]_1 + [BH^+]_1}$$

$$K_B = \frac{[B]_2}{[B]_1}$$

ضریب تقسیم

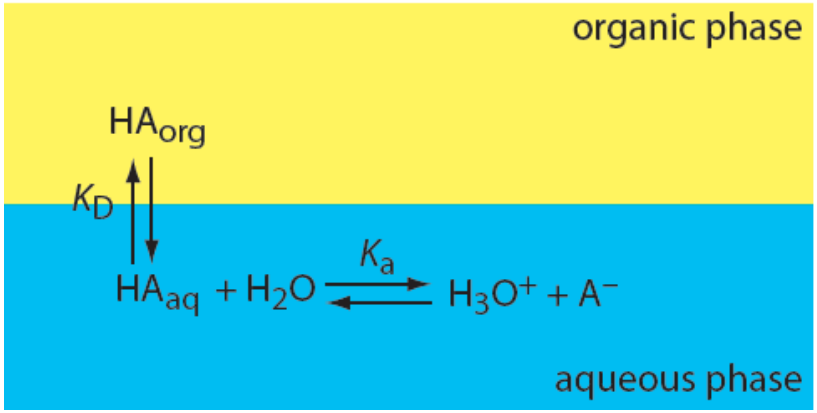
$$K_a = K_w / K_b = \frac{[H^+][B]}{[BH^+]}$$

ثابت تعادل



$$D = \frac{K_B K_a}{K_a + [H^+]}$$

استخراج (Extraction)



۴- اثرات pH در استخراج

شبیه به حالت قبل برای اسید ضعیف (HA) نیز می‌توان به رابطه زیر دست یافت:

$$D = \frac{K_{HA}[H^+]}{K_a + [H^+]}$$

$$K_{HA} = \frac{[HA]_2}{[HA]_1}$$

- توانایی تغییر نسبت توزیع اسید ضعیف یا باز ضعیف با pH در ایجاد شرایطی که بتوان به صورت گزینش پذیر برخی ترکیبات را استخراج کرد و برخی را خیر، مفید می‌باشد.

  - استفاده از pH کم برای استخراج HA و نه BH^+ (استخراج اسید ضعیف)
  - استفاده از pH بالا برای استخراج B و نه A^- (استخراج باز ضعیف)

استخراج (Extraction)

۵- مثال

بوتانوییک اسید زمانی که بین آب و بنزن توزیع می‌شود، دارای ضریب تقسیم ۳ می‌باشد. غلظت فرمال بوتانوییک اسید در هر فاز را هنگامی‌که ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آبی بوتانوییک اسید ۰/۱ مولار با ۲۵ میلی‌لیتر بنزن در pH برابر ۴ و ۱۰ استخراج گردد، محاسبه نمایید.

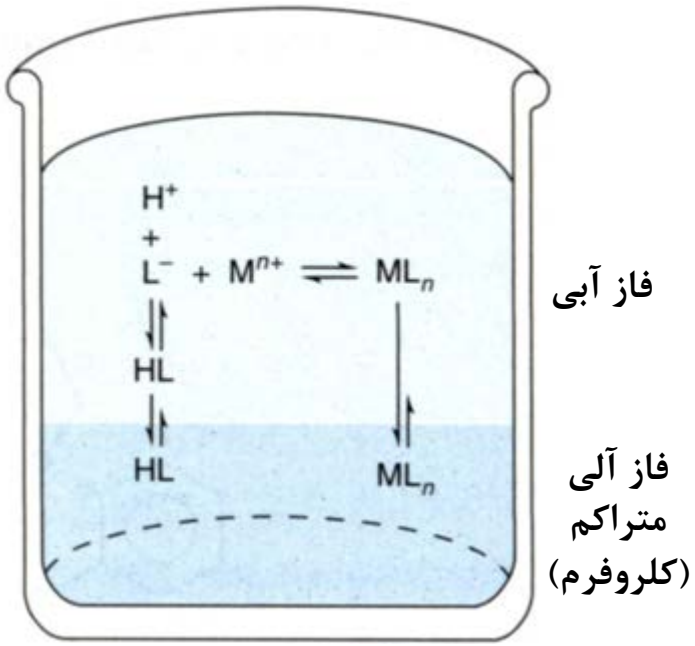
استخراج (Extraction)

۶- استخراج با کمپلکس دهنده‌های فلزی

- جداسازی یون‌های فلزی از یکدیگر با استفاده از معرف‌های کمپلکس دهنده آلی امکان پذیر می‌باشد.
  - قابل حل در حلال آلی

$$M^{n+} + L^{-} \rightleftharpoons ML_n$$

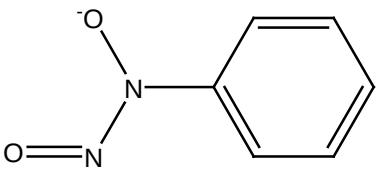
غیر قابل حل در حلال آلی — قابل حل در حلال آلی



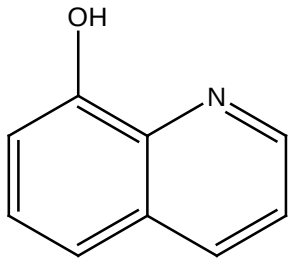
استخراج (Extraction)

۶- استخراج با کمپلکس دهنده‌های فلزی

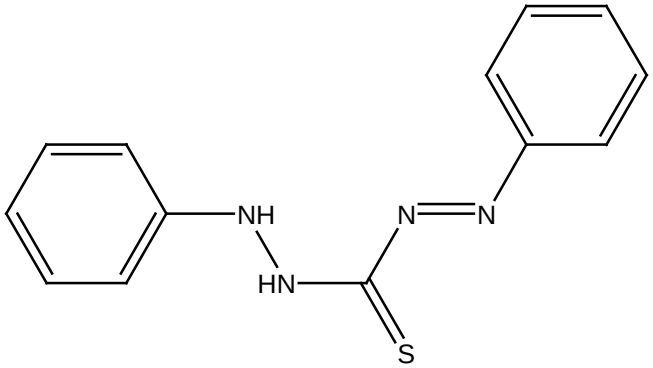
- معرف‌های کمپلکس دهنده متداول



cupferron

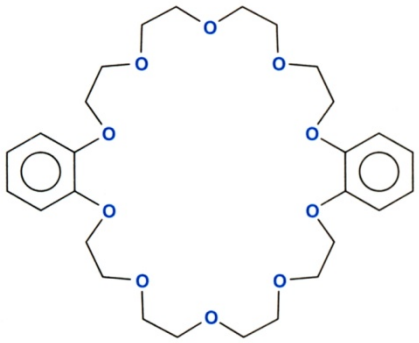


8-hydroxyquinoline

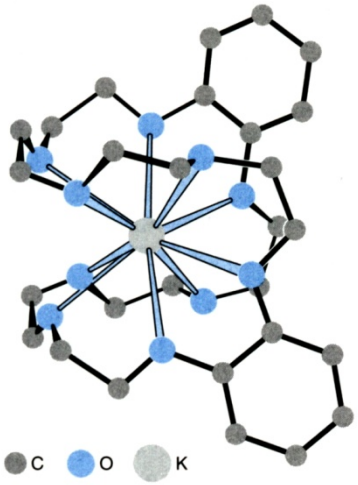


dithizone

Crown ethers



(a)

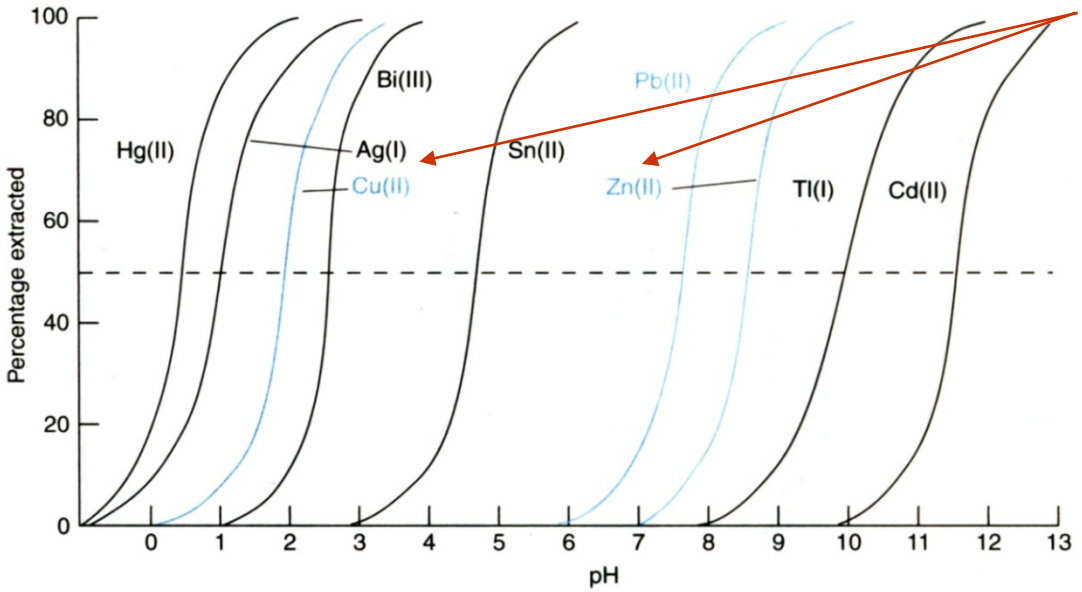


(b)

استخراج (Extraction)

۶- استخراج با کمپلکس دهنده‌های فلزی

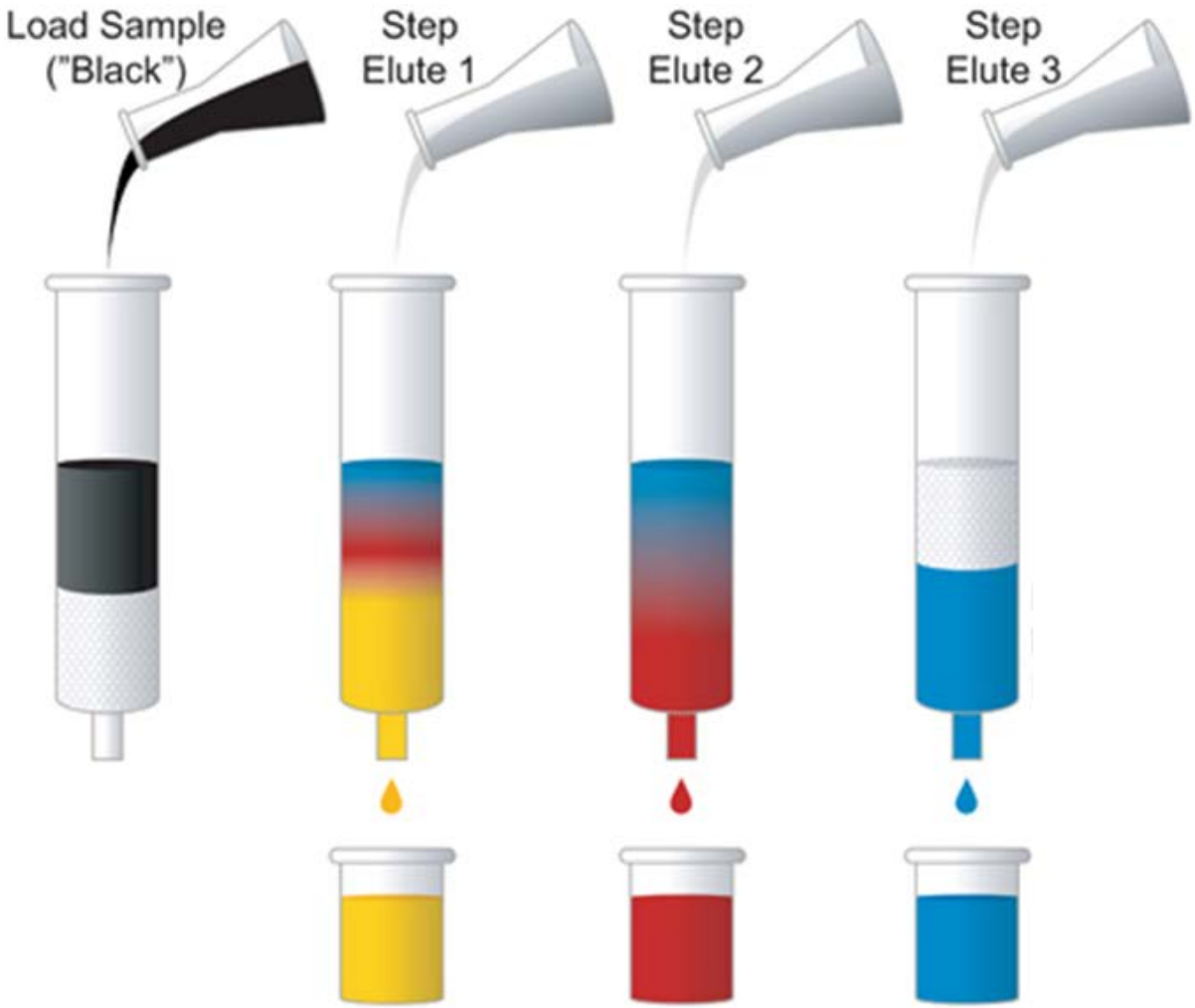
- بسیاری از معرف‌های کمپلکس دهنده با فلزات متنوعی پیوند برقرار می‌کند.
  - با قدرت‌های مختلف و یا ثابت‌های تعادل متفاوت
- استخراج یون فلزی ممکن است به صورت گزینش پذیر برای یک فلز بخصوص صورت پذیرد:
  - انتخاب معرف‌کمپلکس دهنده‌ای که دارای تمایل زیاد به فلز مورد نظر داشته باشد.
  - تنظیم pH در فرایند استخراج



یون Cu^{+2} به طور کامل در pH برابر ۵ استخراج می‌شود در حالی‌که Zn^{2+} در فاز آبی باقی می‌ماند.

استخراج یون‌های فلزی به صورت گزینش پذیر با معرف کمپلکس دهنده Dithizone با انتخاب pH مناسب

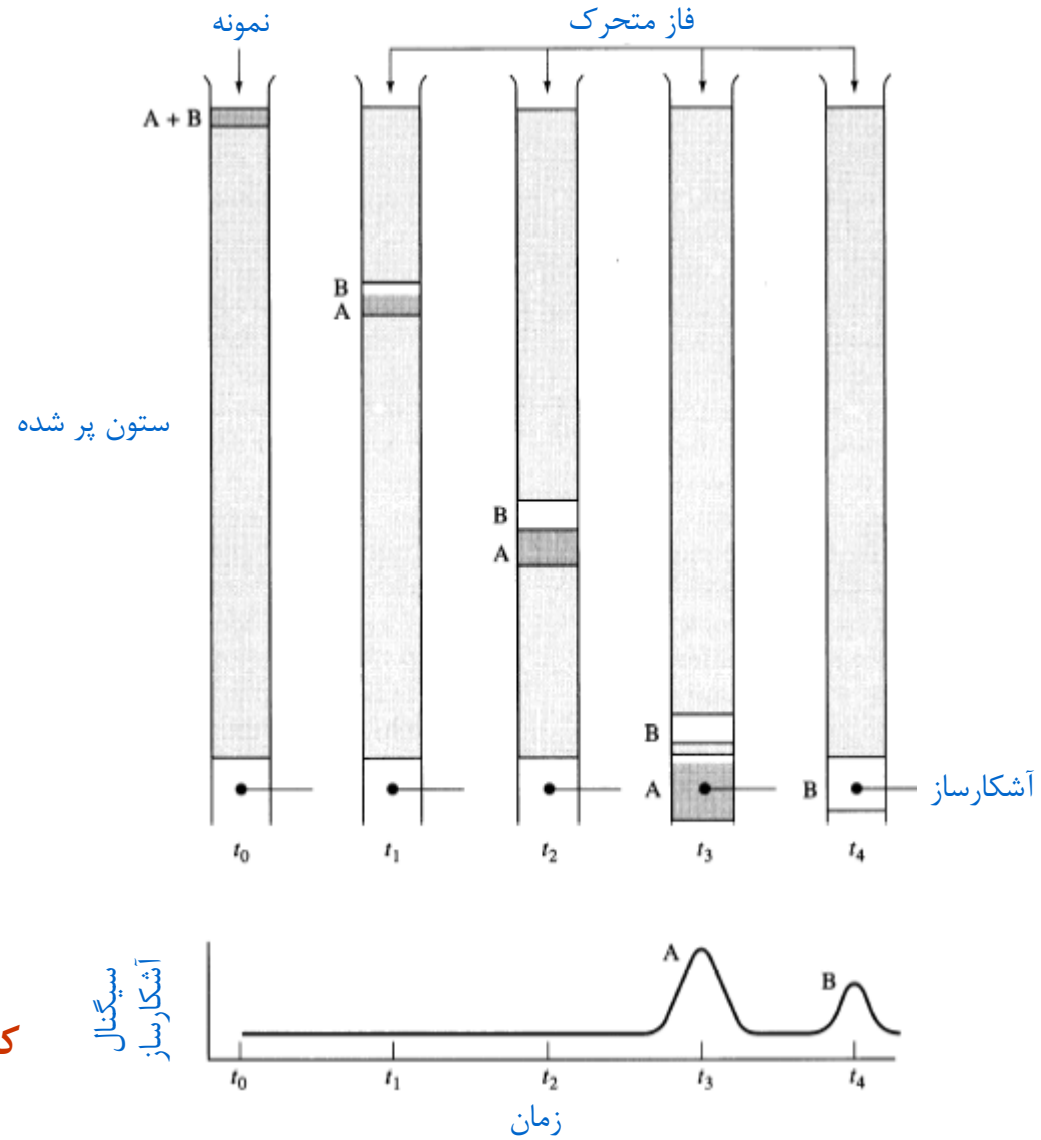
کروماتوگرافی (Chromatography)



کروماتوگرافی (Chromatography)

۱- تعریف

- یک روش جداسازی بر مبنای تفاوت در سرعت انتقال حل شونده‌ها از درون سیستمی متشکل از دو فاز:
  - فاز ساکن
  - فاز متحرک
- شناسایی ترکیبات خارج شده از ستون با استفاده از تغییر در جذب، ولتاژ، جریان و ...



کروماتوگرام (نه طیف)

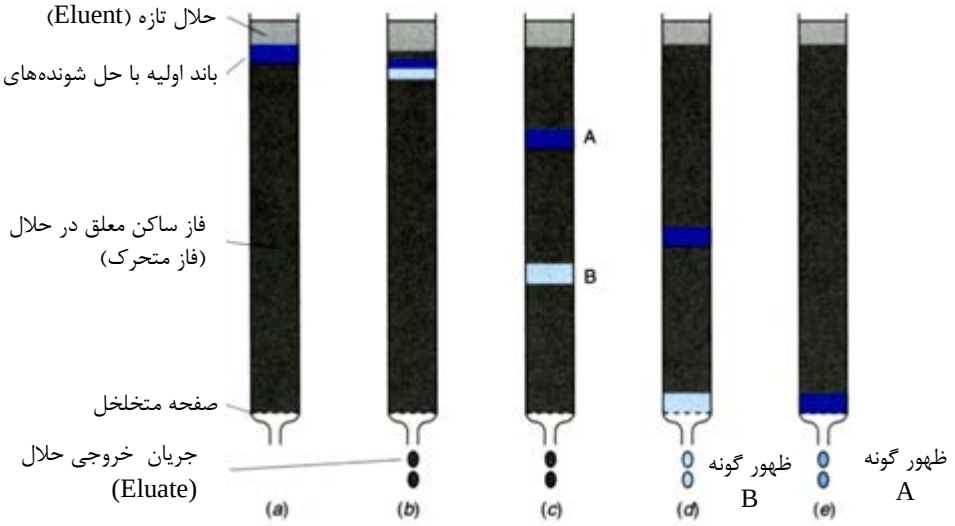
کروماتوگرافی (Chromatography)

۲- اجزای سیستم و فرایند جداسازی

- فاز ساکن: فاز شیمیایی که در ستون باقی می‌ماند.
- فاز متحرک (حلال): فاز شیمیایی که از میان ستون عبور می‌کند.

- پشتیبان: جامدی که فاز ساکن به صورت شیمیایی به آن متصل شده است.

در روش کروماتوگرافی جداسازی حل شونده‌ها بر اساس برهمکنش‌های متفاوتشان با فاز ساکن و متحرک صورت می‌پذیرد.

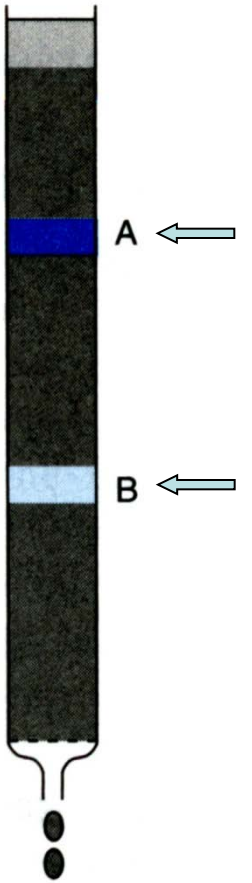


کروماتوگرافی (Chromatography)

۲- اجزای سیستم و فرایند جداسازی

حل شونده‌هایی که برهمکنش قوی‌تری با فاز ساکن برقرار می‌کنند دیرتر از ستون خارج می‌شوند.

حل شونده‌هایی که برهمکنش ضعیف با فاز ساکن برقرار می‌کنند و یا برهمکنشی ندارند خیلی سریع از ستون خارج می‌شوند.



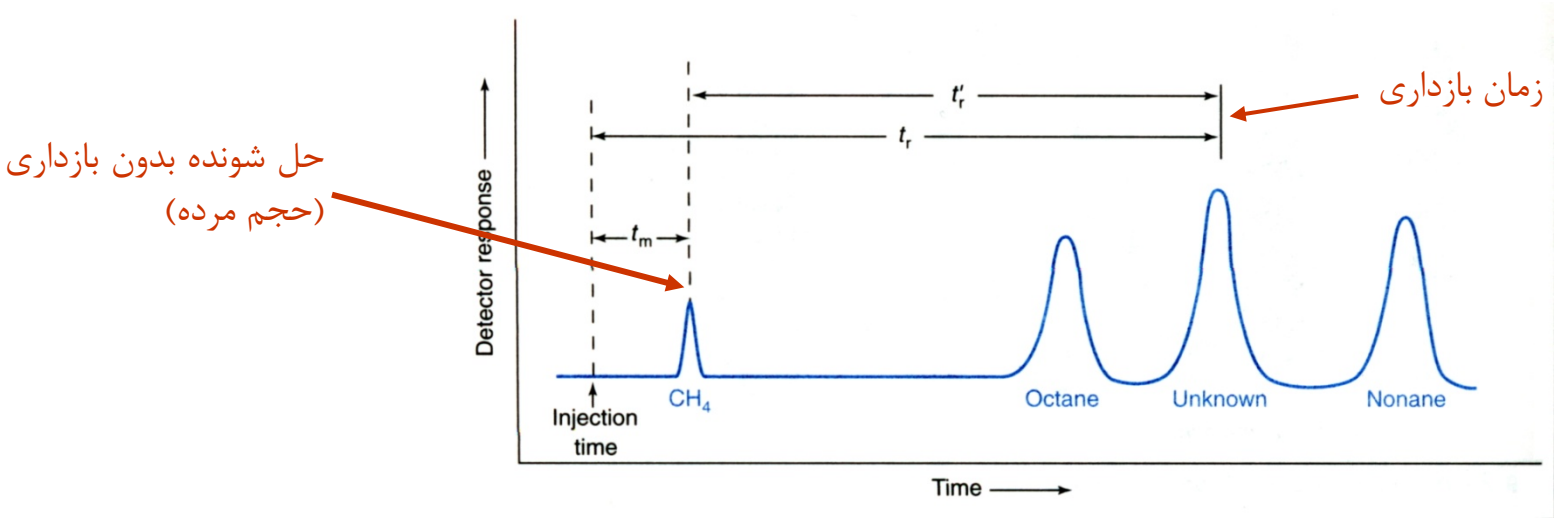
برهمکنش قوی‌تر و زمان بازداری بیشتر

برهمکنش ضعیف‌تر و زمان بازداری کمتر

کروماتوگرافی (Chromatography)

۳- کروماتوگرام

- کروماتوگرام: نمودار نشان دهنده پاسخ آشکارساز بر حسب تابعی از زمان شویش



- زمان بازداری (t_r): زمانی‌که طول می‌کشد یک ترکیب طول ستون را بپیماید.
- حجم بازداری (V_r): حجم مورد نیاز از فاز متحرک جهت عبور حل شونده از ستون

درجه و قدرت ماندگاری یک مولکول بر روی ستون با اندازه‌گیری زمان و یا حجم بازداری نشان داده می‌شود.

کروماتوگرافی (Chromatography)

۴- اساس اندازه‌گیری بازداری حل شونده

- زمان بازداری تنظیم شده (t_r'): زمان اضافی برای انتقال حل شونده از داخل ستون علاوه بر زمان لازم برای حل شونده بدون بازداری

$$t_r' = t_r - t_m$$

t_m= حداقل زمان ممکن جهت عبور گونه بدون بازداری از ستون

- بازداری نسبی (α): نسبت زمان بازداری تنظیم شده بین دو حل شونده

$$\alpha = \frac{t_{r2}'}{t_{r1}'}$$

$t_{r2}' > t_{r1}'$ ، بنابراین $\alpha > 1$

بازداری نسبی بزرگتر یعنی جداسازی بهتر بین دو گونه حل شونده

کروماتوگرافی (Chromatography)

۴- اساس اندازه‌گیری بازداری حل شونده

- فاکتور ظرفیت (k'):

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

- بازداری طولانی‌تر یک گونه در ستون بیانگر فاکتور ظرفیت بالا می‌باشد.
  - از فاکتور ظرفیت یک استاندارد جهت پایش و کنترل کارایی ستون استفاده می‌شود.
- فاکتور ظرفیت برابر است با:

$$k' = \frac{time\ solute\ spends\ in\ stationary\ phase}{time\ solute\ spends\ in\ mobile\ \ phase}$$

کروماتوگرافی (Chromatography)

۴- اساس اندازه‌گیری بازداری حل شونده

- فاکتور ظرفیت برابر است با:

$$k' = \frac{\text{time solute spends in stationary phase}}{\text{time solute spends in mobile phase}} = \frac{\text{moles of solute in stationary phase}}{\text{moles of solute in mobile phase}}$$

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m}$$

C_s= غلظت حل شونده در فاز ساکن

C_m= غلظت حل شونده در فاز متحرک

V_s= حجم فاز ساکن

V_m= حجم فاز متحرک

کروماتوگرافی (Chromatography)

۴- اساس اندازه‌گیری بازداری حل شونده

- فاکتور ظرفیت برابر است با:

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m}$$

تحت شرایط تعادل ⇓ $K = \frac{C_s}{C_m}$ (ضریب تقسیم)

$$k' = K \frac{V_s}{V_m}$$

فاکتور ظرفیت به طور مستقیم متناسب با ضریب تقسیم می‌باشد.

بنابراین می‌توان داشت:

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

کروماتوگرافی (Chromatography)

۴- اساس اندازه‌گیری بازداری حل شونده

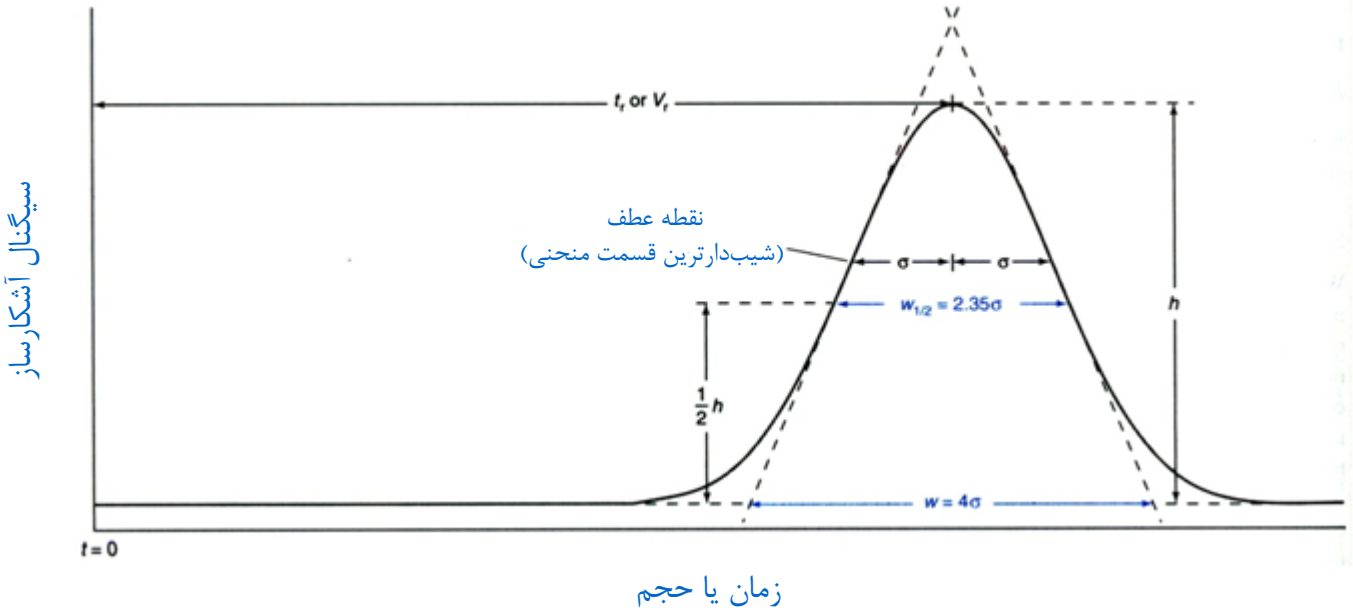
- مثال:

حجم بازداری یک حل شونده برابر ۷۶/۲ میلی‌لیتر برای ستونی با $V_m = 16.6\ mL$ و $V_s = 12.7\ mL$ می‌باشد. فاکتور ظرفیت و ضریب تقسیم برای این حل شونده را محاسبه نمایید.

کروماتوگرافی (Chromatography)

۵- بازده جداسازی

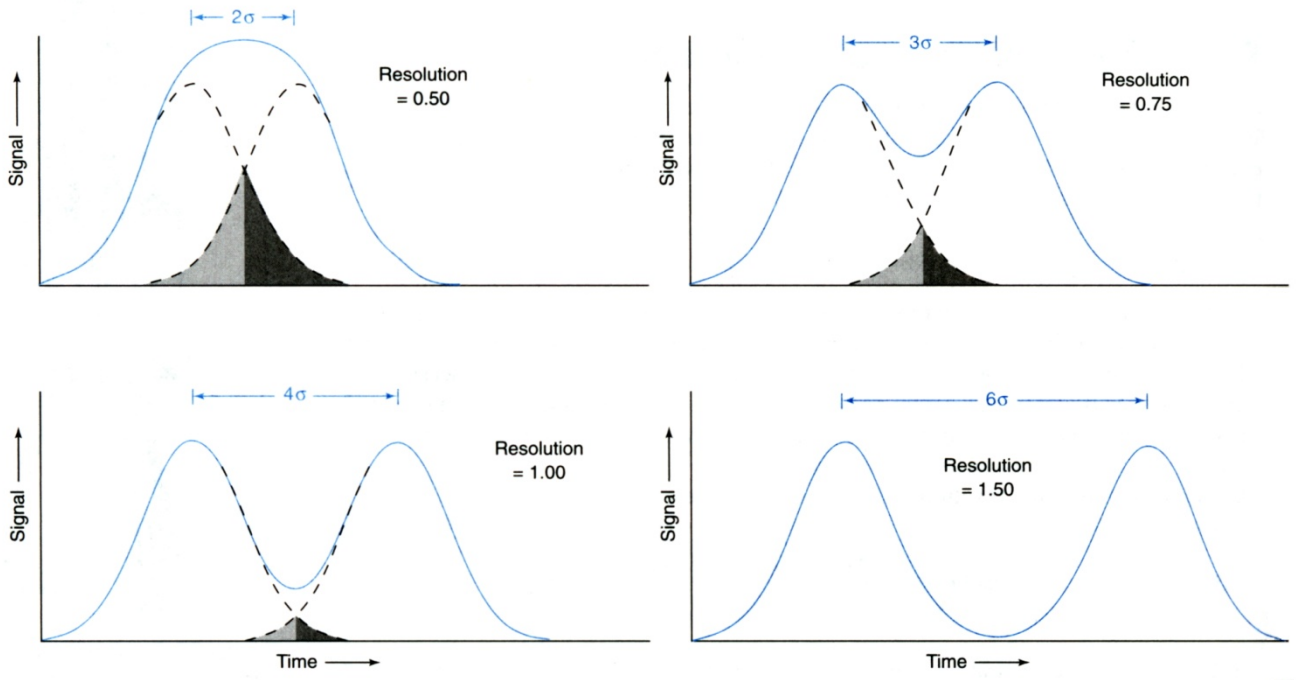
- پهنای پیک حل شونده، عامل مهمی در بیان و تعیین میزان جداسازی یک گونه از گونه دیگر می‌باشد. محاسبه میزان این پهنا در نصف ارتفاع ($W_{½}$) و یا در خط زمینه (W_b) صورت می‌پذیرد.



کروماتوگرافی (Chromatography)

۵- بازده جداسازی

- جداسازی دو گونه حل شونده در کروماتوگرافی بستگی به پهنای پیک و میزان بازداری آن‌ها دارد.



- جداسازی بین دو گونه حل شونده بصورت تفکیک (R_s) بیان می‌شود.

کروماتوگرافی (Chromatography)

۵- بازده جداسازی

- تفکیک (R_s) به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$R_s = \frac{(t_{r_2} - t_{r_1})}{(w_{b_2} + w_{b_1})/2}$$

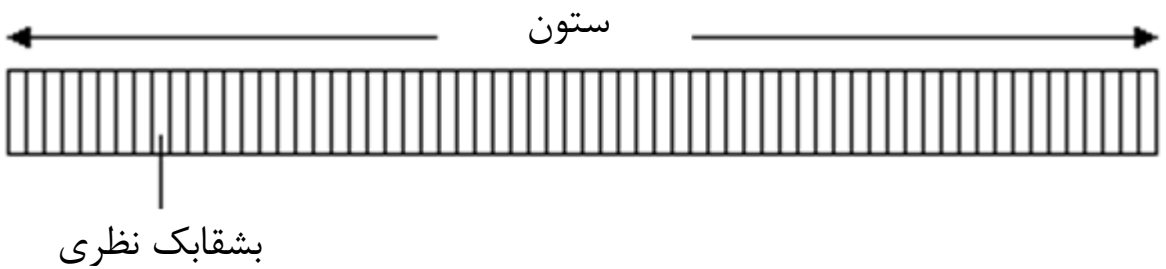
t_{r1}, t_{r2} = زمان‌های بازداری گونه‌های ۱ و ۲ ($t_{r2} > t_{r1}$)
w_{b1}, w_{b2} = پهنای خط زمینه گونه‌های ۱ و ۲

- $R_s \geq 1.5$ بیانگر جداسازی کامل می‌باشد.
- $R_s \geq 1.0$ معمولا جهت تجزیه کافی می‌باشد.

کروماتوگرافی (Chromatography)

۶- اندازه‌گیری کارایی ستون

- تعداد بشقابک‌های نظری (N)
  - شبیه به تعداد استخراج‌هایی است که در فرایند استخراج صورت می‌پذیرد.
  - با افزایش N (تعداد مراحل جداسازی) جداسازی بهتر و بیشتر بین دو گونه انجام می‌گیرد.



$$N = 16\left(\frac{t_r}{w_b}\right)^2 = 5.55\left(\frac{t_r}{w_{1/2}}\right)^2$$

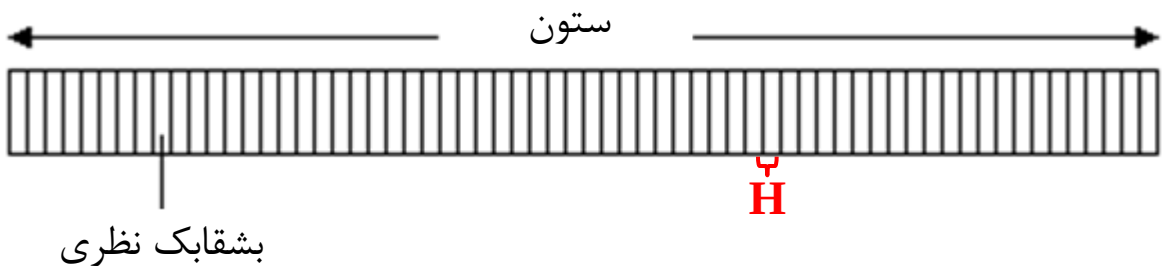
کروماتوگرافی (Chromatography)

۶- اندازه‌گیری کارایی ستون

- ارتفاع بشقابک‌های نظری (H)
  - فاصله‌ای در ستون کروماتوگرافی که متناظر با یک بشقابک نظری است.

$$H = L / N$$

L= طول ستون کروماتوگرافی
N= تعداد بشقابک‌های نظری



- با کاهش H، مراحل جداسازی بیشتر در طول ستون امکان پذیر است که منجر به پهنای باریکتری از پیک و در نتیجه جداسازی بهتر دو گونه حل شونده مجاور می‌شود.

کروماتوگرافی (Chromatography)

۶- اندازه‌گیری کارایی ستون

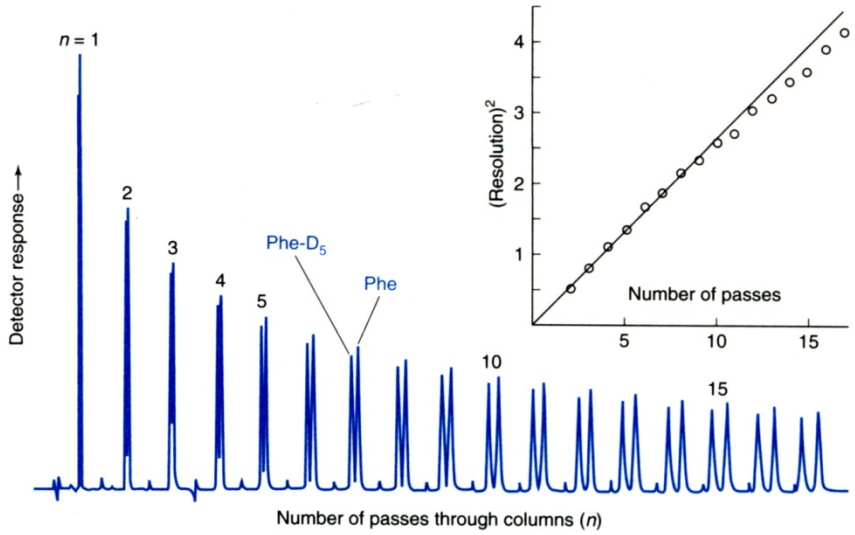
- H تحت تاثیر پارامترهای زیر قرار می‌گیرد:

الف) سرعت جریان فاز متحرک

ب) اندازه مواد پشتیبان: کاهش اندازه ← کاهش H

ج) نفوذ حل شونده: افزایش نفوذ ← کاهش H

د) قدرت بازداری



با افزایش طول ستون میزان تفکیک بهبود می‌یابد.

کروماتوگرافی (Chromatography)

۶- اندازه‌گیری کارایی ستون

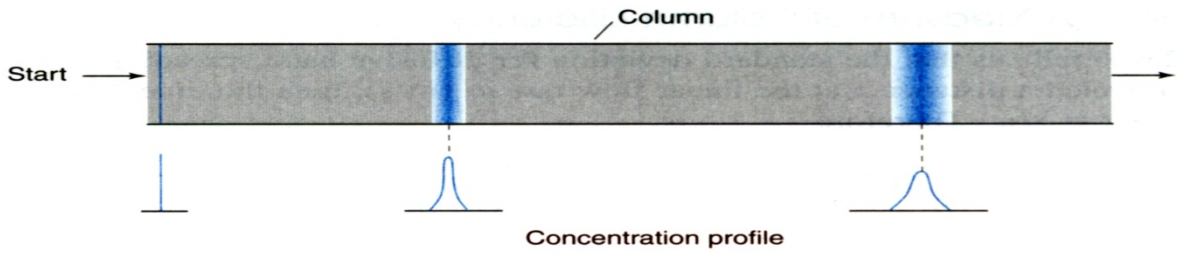
- **مثال:**

جداسازی دو گونه با ضرایب تقسیم ۱۵ و ۱۸ بر روی ستونی با $V_m/V_s = 3.0$ و $t_m = 1.0$ دقیقه صورت می‌گیرد. تعداد بشقابک‌های نظری لازم جهت داشتن تفکیکی برابر ۱/۵ را محاسبه نمایید.

کروماتوگرافی (Chromatography)

۷- علت پهن شدن نوارها چیست؟

- یادآوری: میزان بازده به پهنای پیک بستگی دارد.
- نوار یک گونه حل شونده هنگام عبور از داخل ستون پهن می‌شود که با انحراف استاندارد (σ) می‌توان توصیف کرد.

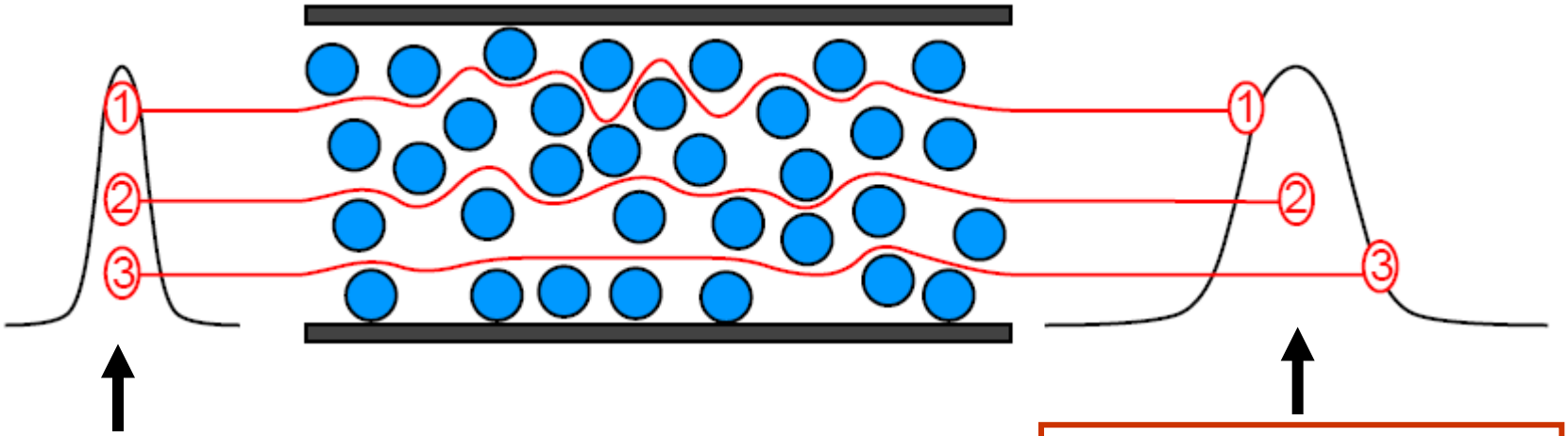


- عوامل موثر در این پهن شدگی عبارتند از:
  - مسیرهای جریان چندگانه
  - نفوذ طولی
  - تعادل محدود بین فازها

کروماتوگرافی (Chromatography)

۷- علت پهن شدن نوارها چیست؟

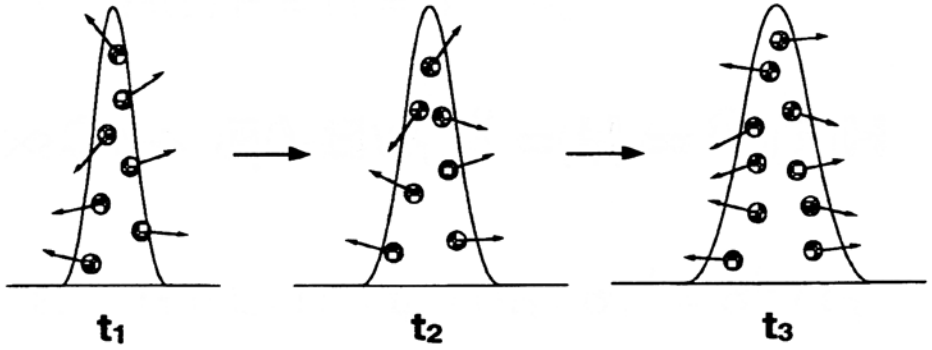
- مسیرهای جریان چندگانه – هنگامی‌که مولکول‌های حل شونده از درون ستون عبور می‌کنند، برخی از آن‌ها زودتر به انتهای ستون می‌رسند و برخی دیرتر، که این امر به علت مسیرهای متفاوتی می‌باشد که گونه‌ها اطراف ذرات پشتیبان در ستون طی می‌کنند.

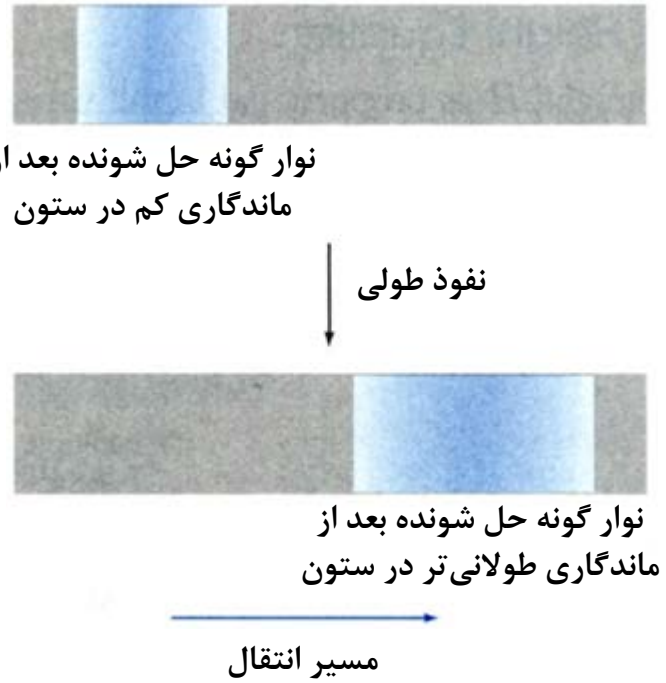


کروماتوگرافی (Chromatography)

۷- علت پهن شدن نوارها چیست؟

- نفوذ طولی - هنگامی‌که گونه حل شونده از مرکز غلیظ نوار به نواحی رقیق‌تر نفوذ می‌کند، سبب پهن شدگی آهسته نوار می‌شود.

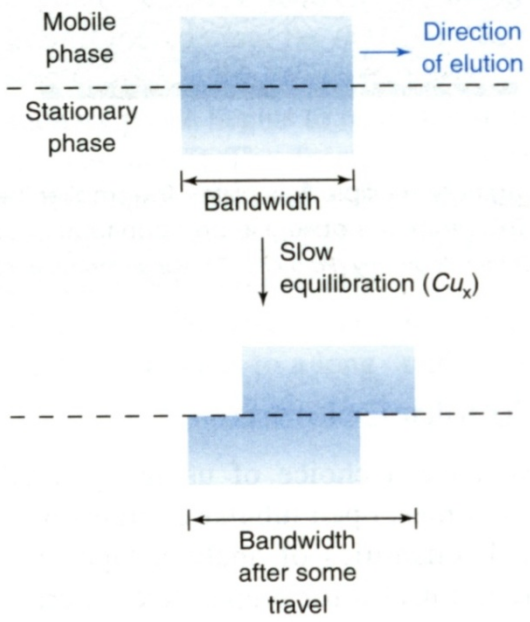




کروماتوگرافی (Chromatography)

۷- علت پهن شدن باندها چیست؟

- زمان تعادل محدود بین فازها - یک زمان محدود جهت برقراری تعادل بین دو فاز ساکن و متحرک در هر بشقابک وجود دارد.
  - تعادل بین فاز ساکن و متحرک آن‌قدر آهسته برقرار می‌شود که ستون کرومانوگرافی همیشه تحت شرایط غیر تعادلی عمل می‌کند. در نتیجه، مولکول‌های آنالیت در جبهه طولی نوار قبل از اینکه با فاز ساکن به تعادل برسند و بتوانند نگه داشته شوند، شوییده می‌شوند. همچنین در لبه عقبی نوار نیز تعادل برقرار نمی‌شود و مولکول‌ها در اثر حرکت سریع فاز متحرک، در فاز ساکن باقی می‌مانند.



توزیع گونه حل شونده بین فاز متحرک و ساکن

حل شونده در فاز متحرک به سمت انتهای ستون روانه می‌شوند که منجر به پهن شدن پیک می‌گردد.

کروماتوگرافی (Chromatography)

۸- توصیف پهن شدگی باند

- ارتفاع بشقابک نظری متناسب با پهن شدگی باند می‌باشد.
- ارتفاع بشقابک کوتاهتر ← باریکتر شدن نوار

رابطه وان دیمتر

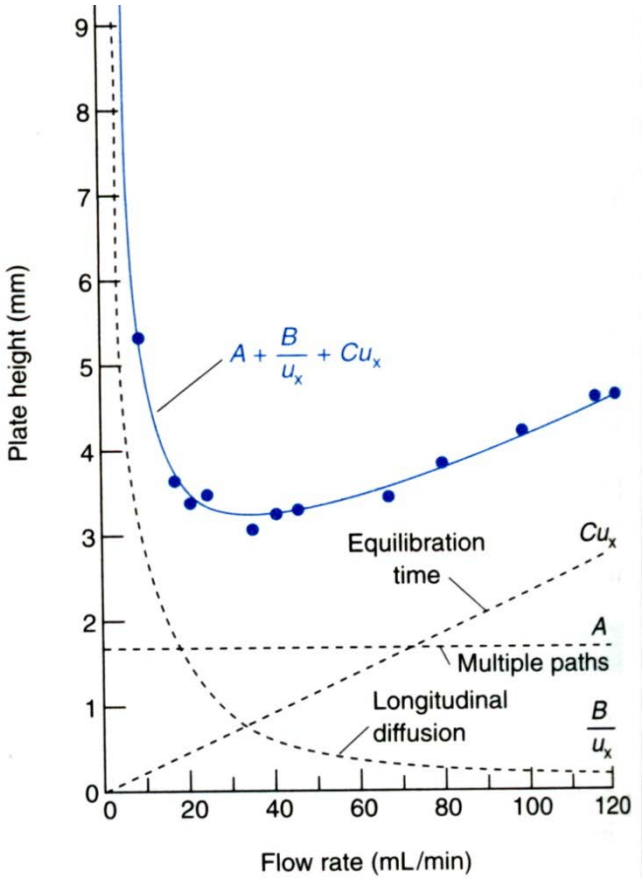
$$H \approx A + \frac{B}{\mu_x} + C\mu_x$$

مسیرهای چندگانه — نفوذ طولی — زمان تعادل

μ_x= سرعت جریان خطی

A، B و C = به ترتیب ضرایبی مربوط پدیده‌های مسیرهای جریان چندگانه، نفوذ طولی و زمان تعادل محدود بین فازها هستند.

عبارت نفوذ طولی در کروماتوگرافی گازی، به دلیل سرعت نفوذ بیشتر (10^4 برابر بزرگتر از مایع)، اهمیت بیشتری نسبت به کروماتوگرافی مایع دارد.



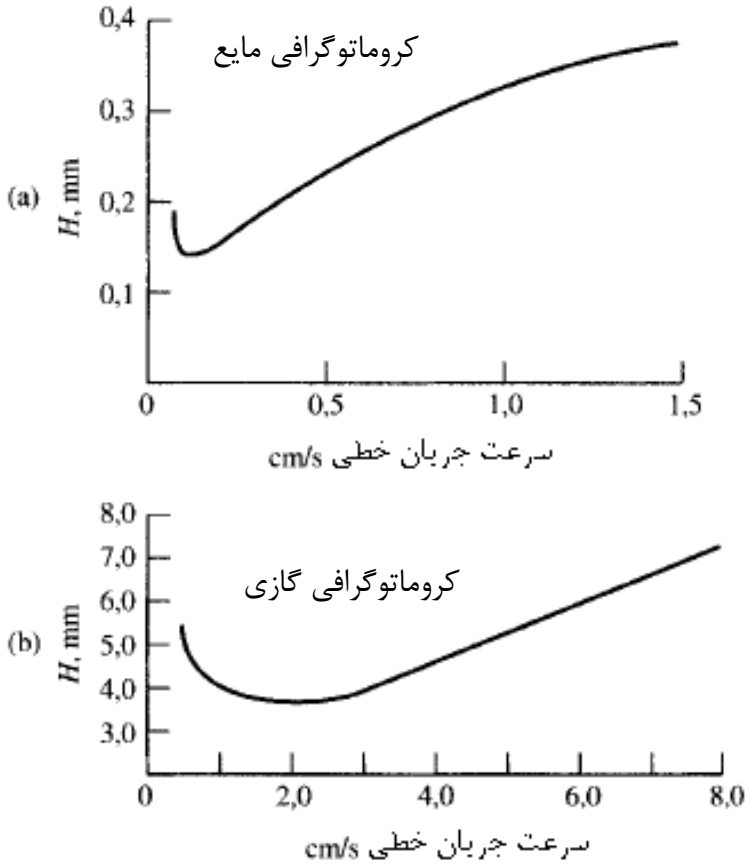
کروماتوگرافی (Chromatography)

۸- توصیف پهن شدگی باند

مینیمم برای کروماتوگرافی مایع عموما در سرعت‌های جریان خیلی پایین‌تر از کروماتوگرافی گازی اتفاق می‌افتد. این می‌رساند که زمان کامل شدن جداسازی در کروماتوگرافی گازی نوعا کوتاهتر از زمان جداسازی در کروماتوگرافی مایع است.

ارتفاع بشقابک در ستون‌های کروماتوگرافی مایع در مقایسه با کروماتوگرافی گازی، ده مرتبه یا بیشتر کوچکتر است. به هر حال، این حقیقت که به کارگیری ستون‌های مایع بلندتر از ۲۵ الی ۵۰ سانتی‌متر غیر عملی است (به علت افت فشار زیاد)، در حالی‌که ستون کروماتوگرافی گازی می‌تواند ۵۰ متر یا بلندتر باشد، این امتیاز را خنثی می‌کند.

در نتیجه، تعداد کل بشقابک‌ها و بنابراین کارایی کلی ستون اغلب اوقات در ستون‌های کروماتوگرافی گازی بیشتر است. بنابراین یک مقایسه بین کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع این است که کروماتوگرافی گازی قادر است جداسازی‌ها را سریعتر و با کارایی بالاتر، ولی نه لزوما همزمان، انجام دهد.



کروماتوگرافی گازی Gas Chromatography (GC)

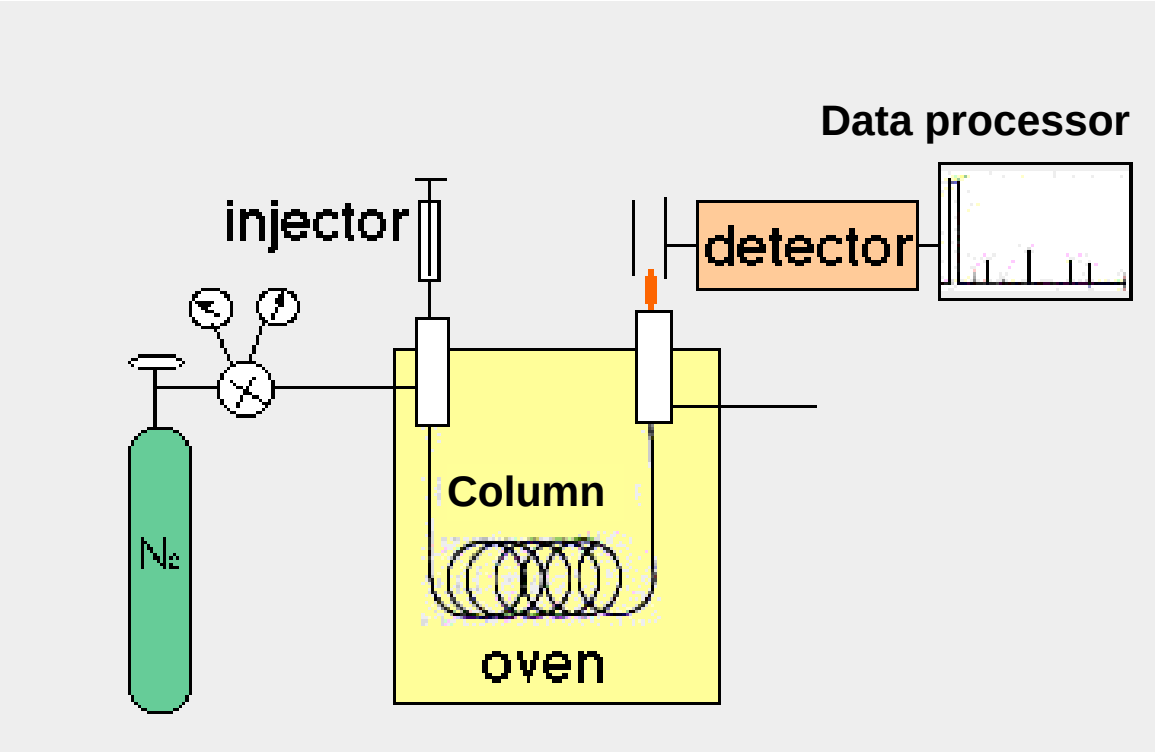
- در کروماتوگرافی گازی نمونه تبخیر و به سر ستون کروماتوگرافی تزریق می‌شود. شویش با جریانی از فاز متحرک گازی بی اثر صورت می‌پذیرد.
- بر عکس اکثر انواع دیگر کروماتوگرافی، فاز متحرک با مولکول‌های آنالیت بر هم‌کنش ندارد و فقط به عنوان وسیله‌ای برای انتقال مولکول‌ها از داخل ستون ایفای نقش می‌نماید.
- انواع کروماتوگرافی گازی:
  - کروماتوگرافی گاز-مایع (GLC) (با کاربرد گسترده)
  - کروماتوگرافی گاز-جامد (GSC) (با کاربرد محدود)

کروماتوگرافی گاز-مایع بر پایه تقسیم آنالیت بین فاز متحرک گازی و یک فاز مایع تثبیت شده بر سطح یک جامد بی‌اثر بنا شده است.

کروماتوگرافی گاز-جامد بر پایه فاز ساکن جامدی بنا شده است که در آن بازداری آنالیت‌ها نتیجه جذب سطحی فیزیکی است.

کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری (Instrumentation)**



۱- مخزن گاز حامل

۲- سیستم تزریق نمونه

۳- پیکربندی ستون‌ها و آون‌های ستون

۴- سیستم آشکارسازها

۵- پردازنده داده‌ها

کروماتوگرافی گازی (GC)

دستگاهوری

۱- مخزن گاز حامل

- گازهای حامل که باید از نظر شیمیایی بی‌اثر باشند، عبارتند از هلیم، نیتروژن و هیدروژن
- انتخاب گاز معمولا با توجه به آشکارساز به کار رفته انجام می‌شود.
- سرعت جریان معمولا با شیر دو مرحله‌ای کنترل می‌شود.
- فشار ورودی معمولا ۱۰ تا ۵۰ psi (بالاتر از فشار اتاق) می‌باشد.
- سرعت جریان فاز متحرک برای ستون‌های پر شده معمولا بین ۲۵ تا ۱۵۰ میلی‌لیتر بر دقیقه و برای ستون‌های مویین بین ۱ تا ۲۵ میلی‌لیتر بر دقیقه می‌باشد.

کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۲- سیستم تزریق نمونه برای ستون‌های پرشده

- دستی- تزریق مستقیم

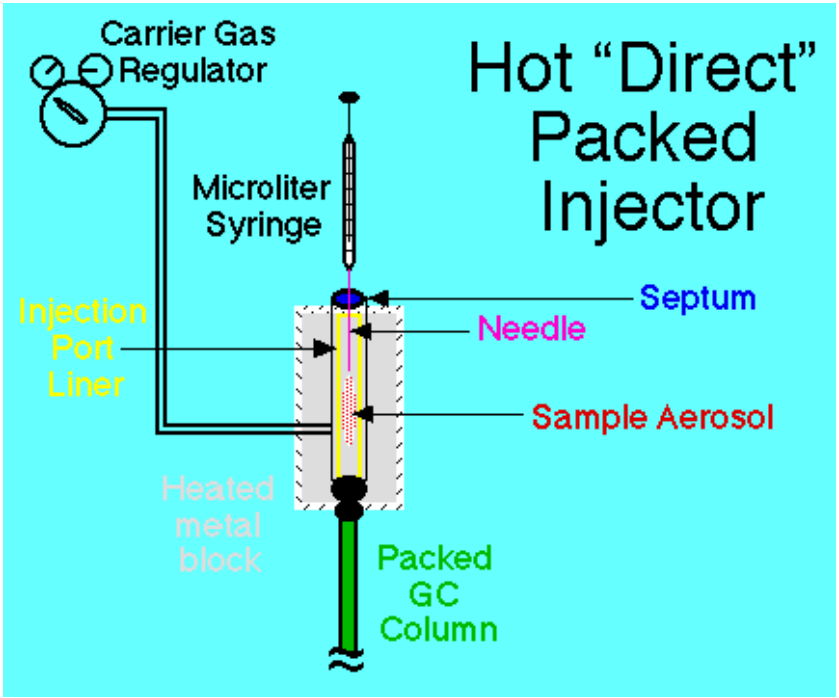
- اتوماتیک- اتوسمپلر

کروماتوگرافی گازی (GC)

دستگاهوری

۲- سیستم تزریق نمونه برای ستون‌های پرشده

- متداول‌ترین روش تزریق نمونه، استفاده از یک ریزسرنگ برای تزریق نمونه‌های مایع یا گازی از طریق یک درپوش غشایی خودبند (Septum) یا دیافراگم لاستیکی سیلیکونی به درون دریچه تبخیر کننده آنی نمونه است که در سر ستون قرار دارد .



دمای دریچه نمونه معمولا حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از نقطه جوش کم فرارترین جزء سازنده نمونه است.

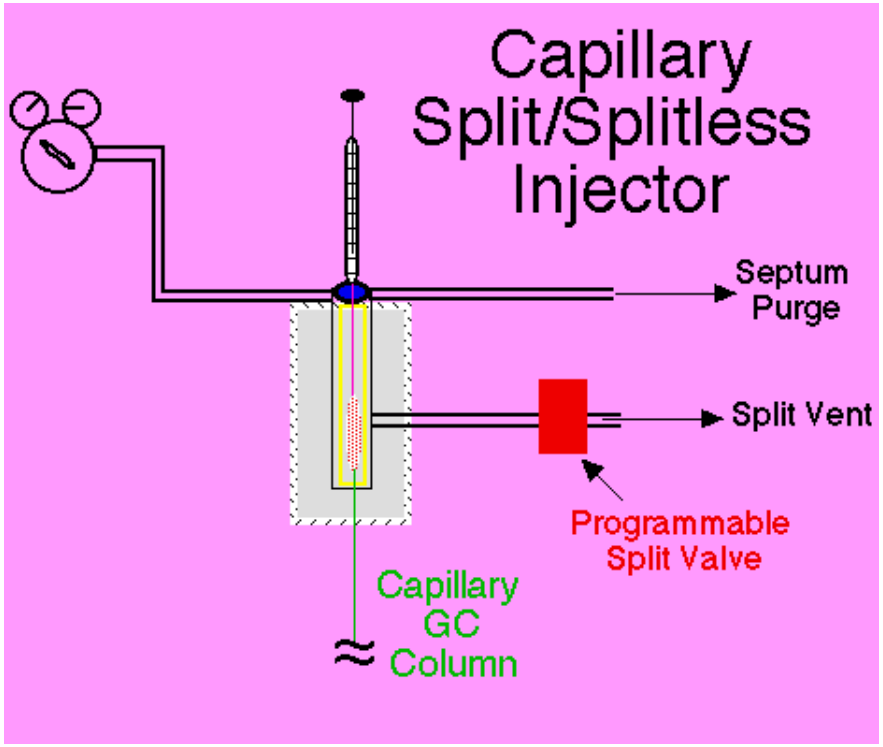
برای ستون‌های تجزیه‌ای پرشده (Packed)، اندازه نمونه از چند دهم میکرولیتر تا ۲۰ میکرولیتر تغییر می‌کند.

کروماتوگرافی گازی (GC)

➢ دستگاهوری

۲- سیستم تزریق نمونه برای ستون‌های مویینه (Capillary)

- ستون‌های مویینه به مقادیر خیلی کمتری از نمونه احتیاج دارند (حدود ۰/۰۰۱ میکرولیتر). از این‌رو در اینجا یک سیستم تقسیم کننده نمونه به کار گرفته می‌شود که فقط بخش کوچکی از نمونه تزریق شده را به سر ستون وارد می‌کند و بقیه نمونه را به فاضلاب می‌فرستد.



نسبت تقسیم متداول ۵۰ به ۱ می‌باشد. این بدان معناست که برای هر ۵۰ واحد نمونه گازی که به فاضلاب می‌رود، ۱ واحد به ستون منتقل می‌شود.

پالاینده سپتوم (Septum purge) از ورود اجزای حاصل از انحطاط سپتوم به داخل ستون جلوگیری می‌کند.

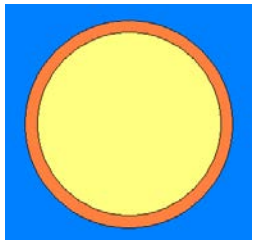
اندازه ستون‌های مویینه، تزریق میزان نمونه را محدود می‌کند، در غیر این‌صورت، اضافه بار ستون (**overloading**) به وقوع می‌پیوندد.

کروماتوگرافی گازی (GC)

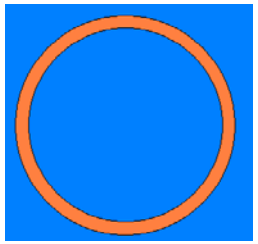
- **دستگاهوری**

۳- پیکربندی ستون‌ها

- با دو نوع ستون در کروماتوگرافی گاز- مایع سروکار داریم:
  - ستون‌های پرشده (Packed column)

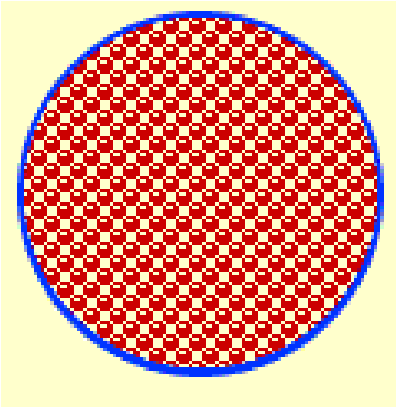


  - ستون‌های مویینه (Capillary column)



- طول ستون‌های کروماتوگرافی از کمتر از ۲ متر تا ۵۰ متر یا بیشتر تغییر می‌کند. ستون‌ها از فولاد زنگ نزن، شیشه، سیلیس جوش خورده یا تفلون ساخته می‌شود.

کروماتوگرافی گازی (GC)



- **دستگاهوری**

۳- پیکربندی ستون‌ها

- ستون‌های پرشده

ستون‌های پرشده امروزی، از لوله‌های شیشه‌ای، فلزی (فولاد زنگ نزن، مس، آلومینیوم) یا تفلونی نوعا با طول ۲ تا ۳ متر و قطر داخلی ۲ تا ۴ میلی‌متر ساخته می‌شوند. این لوله‌ها به طور فشرده و با مواد پرکننده بسیار ریز یا تکیه‌گاه جامدی که با لایه نازکی (۰/۰۵ تا ۱ میکرومتر) از فاز ساکن مایع اندود شده است، پر می‌شوند.

تکیه‌گاه ایده‌آل از ذرات کروی کوچک یکنواخت با قدرت مکانیکی خوب و مساحت سطح ویژه مناسب (حداقل $1m^2/g$) تشکیل می‌شود تا سطح بزرگتری در معرض فاز متحرک قرار گیرد. علاوه براین، ماده تکیه‌گاه باید در دماهای بالا بی اثر باشد و به طور یکنواخت به وسیله فاز مایع تر شود.

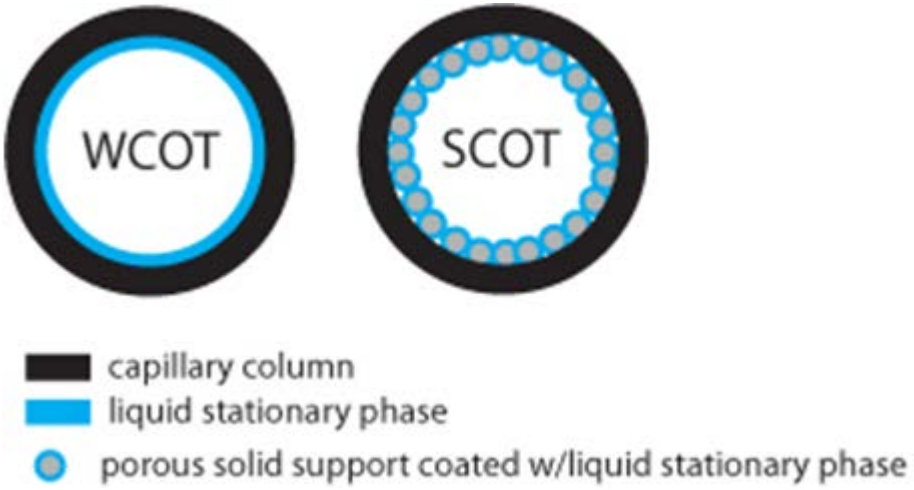
امروزه، متداول‌ترین ماده تکیه‌گاه مورد استفاده از خاک طبیعی (دیاتومه) که از اسکلت هزاران گونه گیاهی تک یاخته‌ای که در دریاها و دریاچه‌ها قدیمی زندگی می‌کرده‌اند، تهیه می‌شوند.

کروماتوگرافی گازی (GC)

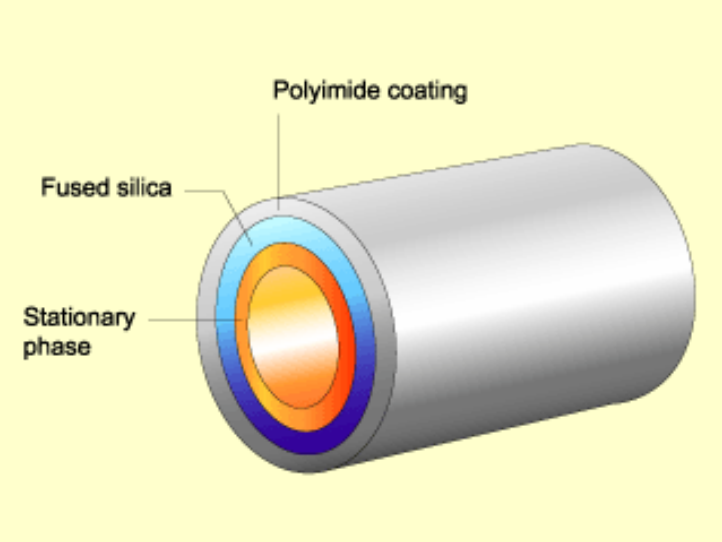
- **دستگاهوری**

۳- پیکربندی ستون‌ها

- ستون‌های مویین یا لوله‌ای باز
  - لوله‌ای باز دیواراندود
Wall coated open tubular (WCOT)
  - لوله‌ای باز تکیه‌گاه اندود
Support coated open tubular (SCOT)



کروماتوگرافی گازی (GC)



- **دستگاهوری**

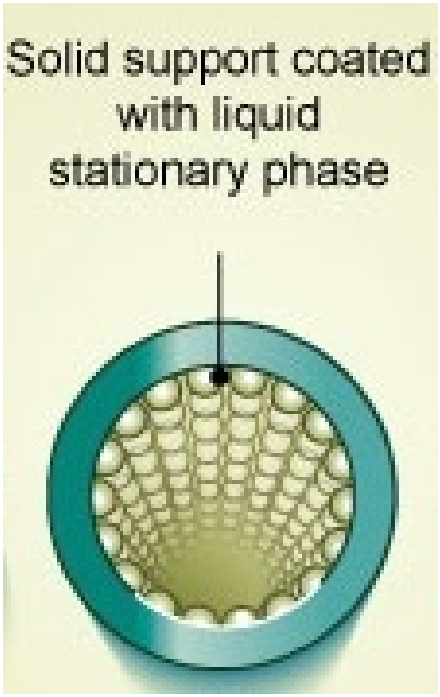
۳- پیکربندی ستون‌ها

- ستون‌های مویین یا لوله‌ای باز
  - لوله‌ای باز دیواراندود (WCOT)

ستون‌های دیواراندود از یک لوله مویینه تشکیل شده است که سطح داخلی آن با لایه نازکی از فاز ساکن پوشیده شده است. ستون‌های اولیه WCOT از فولاد زنگ نزن، مس، آلومینیوم و یا پلاستیک ساخته شده‌اند.

از جدیدترین و متداول‌ترین ستون‌های WCOT می‌توان به ستون‌های لوله‌ای باز سیلیس جوش خورده (Fused silica open tubular (FSOT)) اشاره نمود. FSOT از سیلیس تخلیص شده خاصی که حاوی مقدار کمی اکسیدهای فلزی است، ساخته می‌شود. قدرت لوله‌ها با یک محافظ خارجی پلی‌ایمیدی که در موقع کشیدن لوله‌های مویین بر روی آن‌ها اعمال می‌شود، افزوده می‌گردد. ستون‌های به دست آمده کاملا انعطاف پذیرند و می‌توانند به صورت حلقه‌هایی با قطر چند اینچ خم شوند.

کروماتوگرافی گازی (GC)



- **دستگاهوری**

۳- پیکربندی ستون‌ها

- ستون‌های مویین یا لوله‌ای باز
  - لوله‌ای باز تکیه‌گاه اندود (SCOT)

در ستون‌های لوله‌ای باز تکیه‌گاه اندود، سطح درونی لوله مویین با آستر نازکی (حدود ۳۰ میکرومتر) از ماده تکیه‌گاه، مثل خاک دیاتومه، پوشانده می‌شود.

این نوع ستون چند برابر ستون دیواراندود فاز ساکن را در خود نگه می‌دارد و بنابراین ظرفیت بالاتری برای نمونه دارد. عموما کارایی ستون SCOT کمتر از ستون WCOT اما بیشتر از ستون پر شده است.

کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۳- پیکربندی ستون‌ها

	Type of Column			
	FSWC	**WCOT**	**SCOT**	**Packed**
Length	10 to 1000 m	10 to 1000 m	10 to 100 m	1 to 6 m
Inner Diameter	0.1 to 0.3 mm	0.25 to 0.75 mm	0.5 mm	2 to 4 mm
Efficiency (plates/m)	2000 to 4000	1000 to 4000	600 to 1200	500 to 1000
Sample Size	10 to 75 ng	10 to 1000 ng	10 to 1000 ng	10 to 10^6 ng
Pressure	Low	Low	Low	High
Speed	Fast	Fast	Fast	Slow
Inertness	Best	Good	Fair	Poor

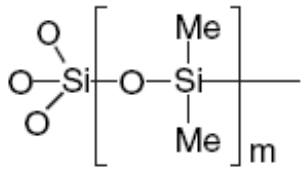
کروماتوگرافی گازی (GC)

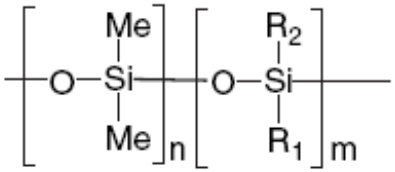
- **دستگاهوری**

۳- پیکربندی ستون‌ها

- فازهای ساکن متداول
  - پلی سیلوکسان‌ها
  - پلی اتیلن گلیکول

Bonded polysiloxanes (examples):



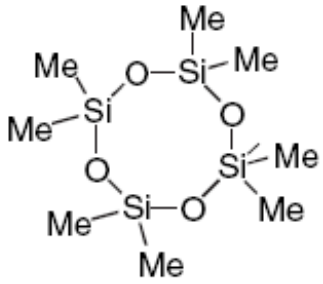


and numerous other phases with diverse chains

$(CH_2)_3$-CN or C_2H_4-CF_3...

ex. R_1 and R_2 = Ph m = 95% and n = 5%

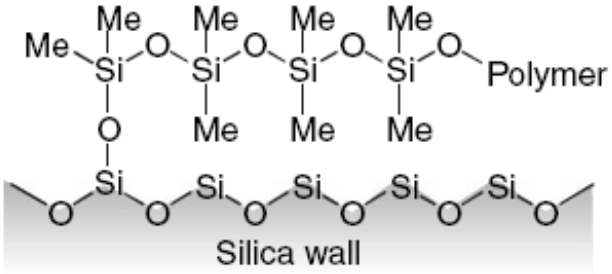
Method of formation of a bonded phase



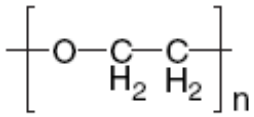
Wall of silica (capillary tube)

$T > 400°C$

$(-CH_4)$



Polyethyleneglycols



"*carbowax*"

کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۳- پیکربندی ستون‌ها

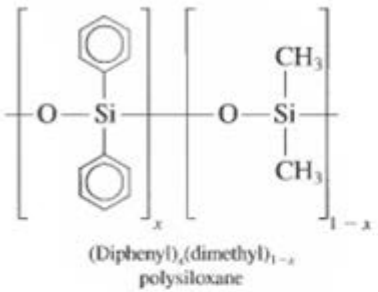
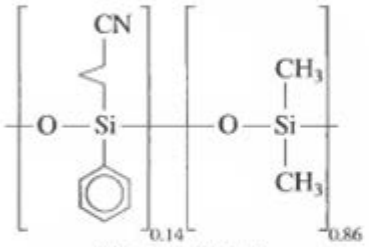
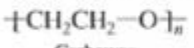
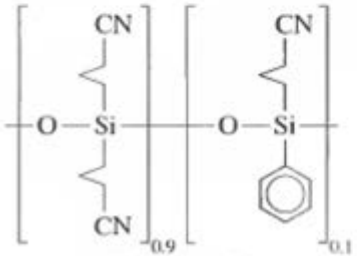
- فازهای ساکن متداول

Some Common Stationary Phases for Gas-Liquid Chromatography

Stationary Phase	Common Trade Name	Maximum Temperature, °C	Common Applications
Polydimethyl siloxane	OV-1, SE-30	350	General-purpose nonpolar phase; hydrocarbons; polynuclear aromatics; drugs; steroids; PCBs
Poly(phenylmethyldimethyl) siloxane (10% phenyl)	OV-3, SE-52	350	Fatty acid methyl esters; alkaloids; drugs; halogenated compounds
Poly(phenylmethyl) siloxane (50% phenyl)	OV-17	250	Drugs; steroids; pesticides; glycols
Poly(trifluoropropyldimethyl) siloxane	OV-210	200	Chlorinated aromatics; nitroaromatics; alkyl-substituted benzenes
Polyethylene glycol	Carbowax 20M	250	Free acids; alcohols; ethers; essential oils; glycols
Poly(dicyanoallyldimethyl) siloxane	OV-275	240	Polyunsaturated fatty acids; rosin acids; free acids; alcohols

کروماتوگرافی گازی (GC)

Common stationary phases in capillary gas chromatography

Structure	Polarity		Temperature range (°C)
 (Diphenyl)$_x$(dimethyl)$_{1-x}$ polysiloxane	$x = 0$	Nonpolar	−60°–320°
	$x = 0.05$	Nonpolar	−60°–320°
	$x = 0.35$	Intermediate polarity	0°–300°
	$x = 0.65$	Intermediate polarity	50°–370°
 (Cyanopropylphenyl)$_{0.14}$ (dimethyl)$_{0.86}$ polysiloxane	Intermediate polarity		−20°–280°
 Carbowax (polyethylene glycol)	Strongly polar		40°–250°
 (Biscyanopropyl)$_{0.9}$ (cyanopropylphenyl)$_{0.1}$ polysiloxane	Strongly polar		0°–275°

- **دستگاهوری**

۳- پیکربندی ستون‌ها

- فازهای ساکن متداول

کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۳- پیکربندی ستون‌ها

- خصوصیات فاز ساکن (فاز مایع نامتحرک)

  - فراریت کم (در حالت ایده‌آل نقطه جوش مایع باید حداقل ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از ماکزیمم دمای عملی ستون باشد)
  - پایداری گرمایی
  - بی اثری شیمیایی

برای داشتن زمان توقفی معقول در ستون، یک گونه باید تا حدی سازگاری (از نظر انحلال پذیری) با فاز ساکن از خود نشان دهد. در اینجا اصل **"همانندها در یکدیگر حل می‌شوند"** اعمال می‌شود و در اینجا **"همانند"** به قطبیت‌های جسم حل شونده و مایع تثبیت شده اشاره دارد.

کروماتوگرافی گازی (GC)

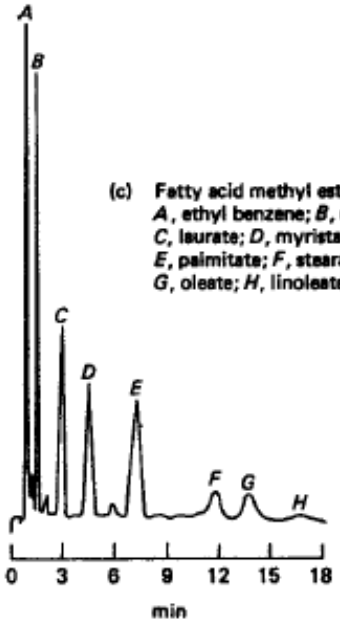
- قطبیت حل شونده‌ها

Polarity of solutes

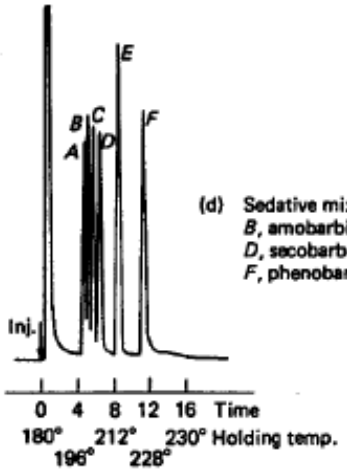
Nonpolar	Weak intermediate polarity
Saturated hydrocarbons	Ethers
Olefinic hydrocarbons	Ketones
Aromatic hydrocarbons	Aldehydes
Halocarbons	Esters
Mercaptans	Tertiary amines
Sulfides	Nitro compounds (without α-H atoms)
CS_2	Nitriles (without α-atoms)
Strong intermediate polarity	**Strongly polar**
Alcohols	Polyhydroxyalcohols
Carboxylic acids	Amino alcohols
Phenols	Hydroxy acids
Primary and secondary amines	Polyprotic acids
Oximes	Polyphenols
Nitro compounds (with α-H atoms)	
Nitriles (with α-H atoms)	

کروماتوگرافی گازی (GC)

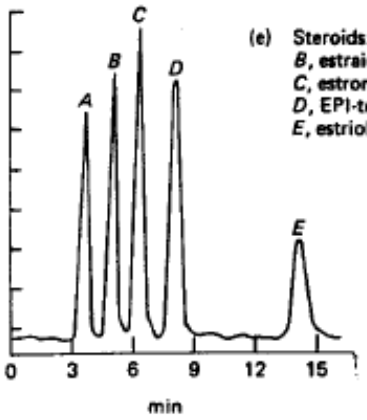
- کروماتوگرام‌های نوعی از ستون‌های مویین



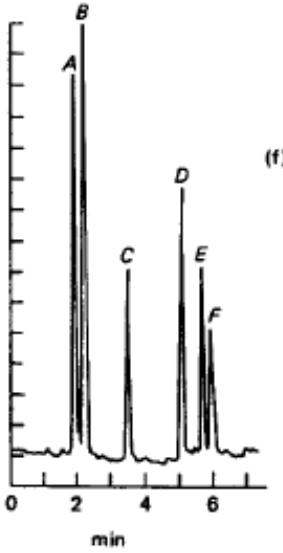
(c) Fatty acid methyl esters: *A*, ethyl benzene; *B*, caprylate; *C*, laurate; *D*, myristate; *E*, palmitate; *F*, stearate; *G*, oleate; *H*, linoleate.



(d) Sedative mixture: *A*, butalbital; *B*, amobarbital; *C*, pentobarbital; *D*, secobarbital; *E*, glutethimide; *F*, phenobarbital. All at 500 ng.



(e) Steroids: *A*, DHA; *B*, estraionol E_2; *C*, estrone E_1; *D*, EPI-testospherone; *E*, estriol E_3.



(f) Carbohydrates: *A*, fructose; *B*, dextrose; *C*, phenyl beta D-glucopyranoside; *D*, sucrose; *E*, lactose; *F*, maltose.

کروماتوگرافی گازی (GC)

➢ دستگاهوری

۳- آون‌های ستون

برای جادادن ستون‌ها در داخل آون‌های دماپای، ستون‌ها معمولا به شکل حلقه‌های با قطر ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر ساخته می‌شوند.

دمای ستون یک متغیر مهم است که باید تا چند دهم درجه برای انجام کارهای دقیق کنترل شود و بنابراین، ستون معمولا در یک آون دماپا جا داده می‌شود. بهترین دمای ستون به نقطه جوش نمونه و درجه جداسازی بستگی دارد. تقریبا دمای معادل یا کمی بالاتر از متوسط نقطه جوش نمونه، به یک زمان شویش مناسب منجر می‌شود.

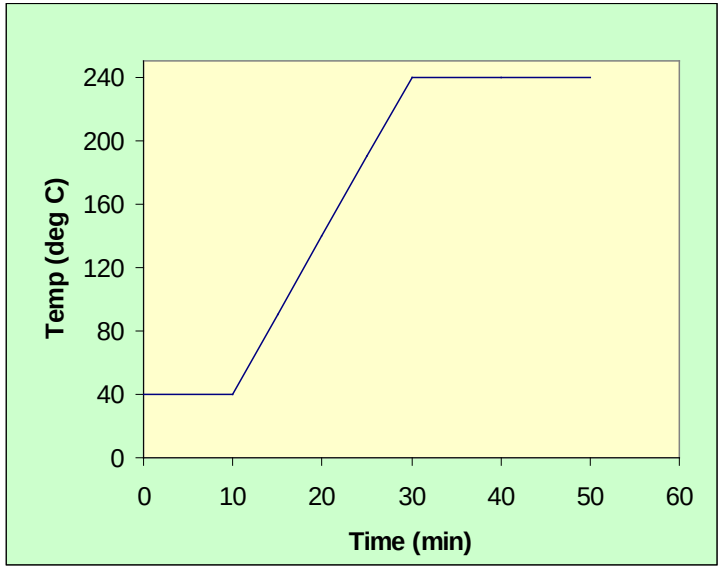
کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

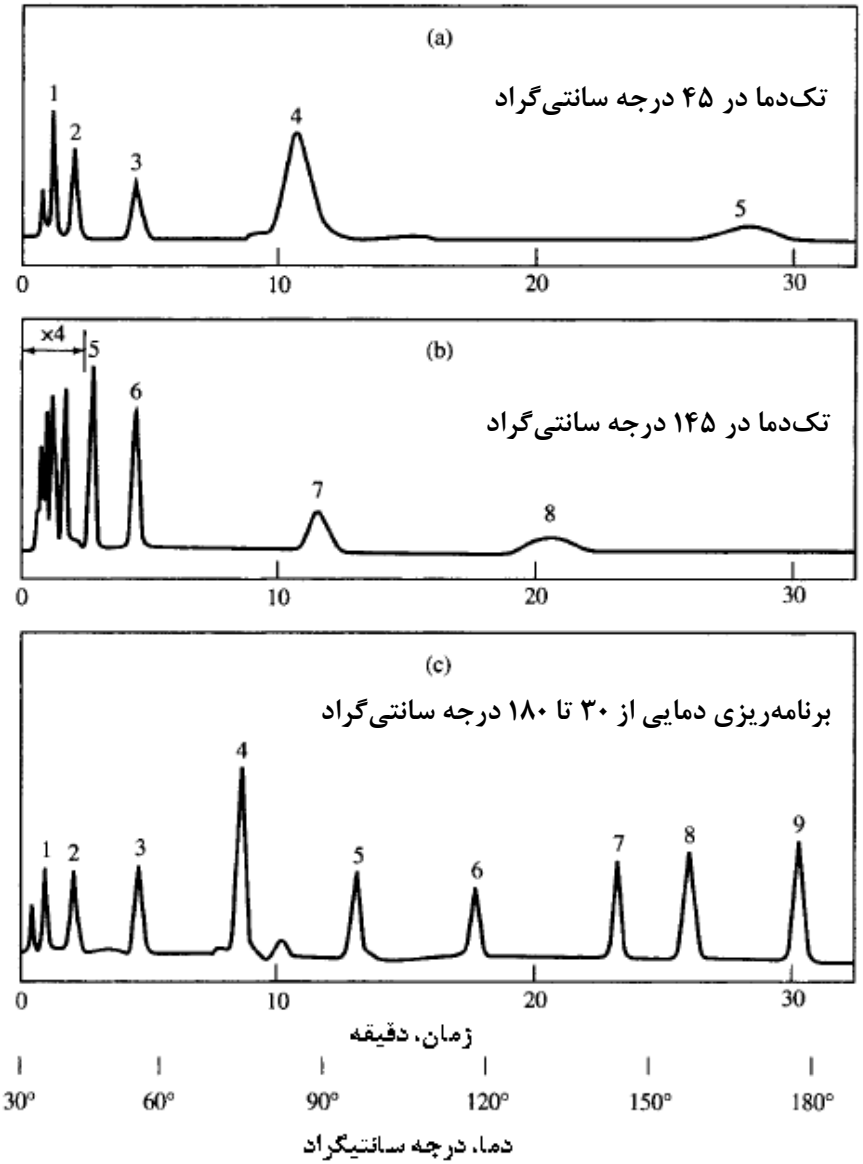
۳- آون‌های ستون

- کنترل دما

- ایزوترمال (تک‌دما): ثابت بودن دمای آون در طول زمان آنالیز
- گرادیان (برنامه ریزی دمایی): برای نمونه‌های با گستره وسیع نقطه جوش، برنامه ریزی دمایی به کار گرفته می‌شود که در آن دمای ستون به طور پیوسته و یا مرحله‌ای افزایش می‌یابد، همچنان‌که جداسازی انجام می‌شود.



کروماتوگرافی گازی (GC)



- **دستگاهوری**

۳- آون‌های ستون

به طور کلی، بهترین تفکیک با حداقل دما همراه است. با وجود این، پایین آوردن دما، به بهای افزایش زمان شویش و بنابراین، زمان لازم برای انجام کامل تجزیه تمام می‌شود.

کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۴- سیستم آشکارسازها

- خصوصیات آشکارساز ایده‌آل در کروماتوگرافی گازی
  - حساسیت مناسب
  - پایداری خوب
  - نسبت به حل شونده به سرعت عکس‌العمل نشان دهد.
  - محدوده دمایی از دمای اتاق ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد داشته باشد.
  - جواب خطی نسبت به حل شونده‌ها تا چند مرتبه بزرگی
  - قابلیت اطمینان بالا و سهولت در استفاده
  - به همه حل شونده‌ها عکس‌العمل مشابه داشته باشد.
  - نمونه را تخریب نکند.

کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۴- سیستم آشکارسازها

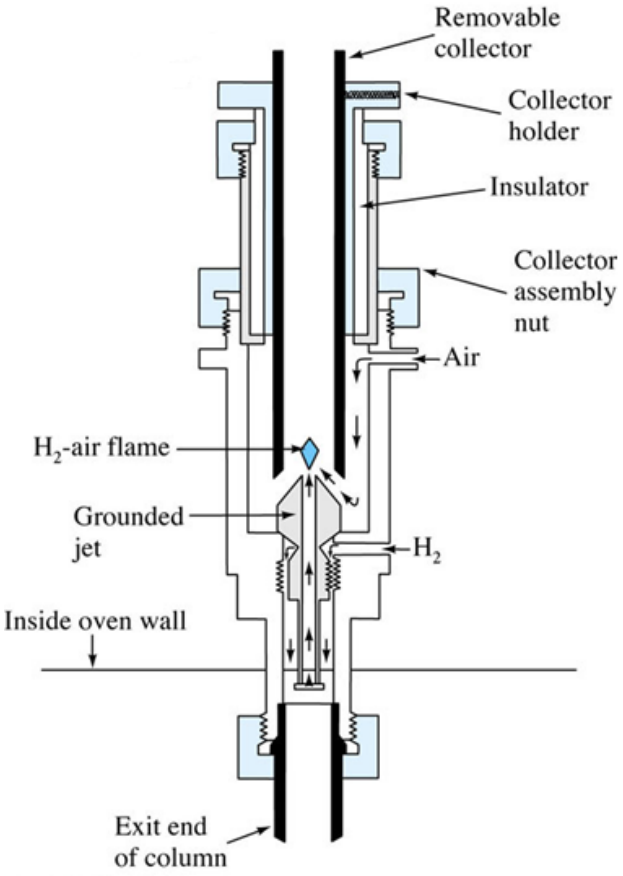
- آشکارسازهایی که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از:

  - آشکارساز یونش شعله‌ای Flame ionization detector (FID)
  - آشکارساز گرما رسانندگی Thermal conductivity detector (TCD)
  - آشکارساز الکترون گیراندازی Electron capture detector (ECD)
  - آشکارساز گرما یونی Thermionic ionization detector (TID)
  - طیف سنج جرمی Mass spectrometer (MS)

کروماتوگرافی گازی (GC)

➢ دستگاهوری

۴- سیستم آشکارسازها



➢ آشکارساز یونش شعله‌ای Flame ionization detector (FID)

بسیاری از ترکیبات آلی در دمای شعله هیدروژن/ هوا، پیرولیز شده (از هم پاشیدگی یک ترکیب به وسیله‌ی گرما) و واسطه‌های یونی و الکترونهایی تولید می‌کنند که الکتریسیته را از درون شعله هدایت می‌کنند. گونه‌های باردار تولید شده در یک جمع کننده، جمع‌آوری می‌شود و سپس جریان الکتریکی حاصل برای اندازه‌گیری به یک تقویت کننده هدایت می‌شود. این مطلب اساس کار آشکارساز یونش شعله‌ای است. گروه‌های عاملی نظیر کربونیل، الکل، هالوژن و آمین، یون‌های بسیار کمی تولید می‌کنند و یا اصلا تولید نمی‌کنند.

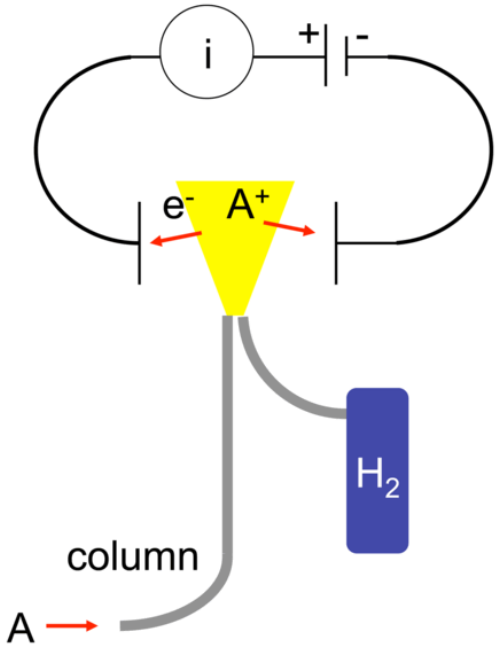
علاوه بر آن ، این آشکارساز به گازهای احتراق ناپذیر از قبیل H_2O، CO_2، SO_2 و NO_xحساس نیست، لذا این آشکارساز برای تجزیه بیشتر نمونه‌های آلی که شامل آب و اکسیدهای نیتروژن یا گوگرد نیز هستند بسیار مفید است. حساسیت این آشکارساز بالاست و دارای محدوده عکس‌العمل خطی بالا و نویز کم می‌باشد. علاوه بر این به‌راحتی قابل استفاده است. یکی از عیب‌های این آشکارساز این است که نمونه را تخریب می‌کند .

کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۴- سیستم آشکارسازها

- آشکارساز یونش شعله‌ای Flame ionization detector (FID)

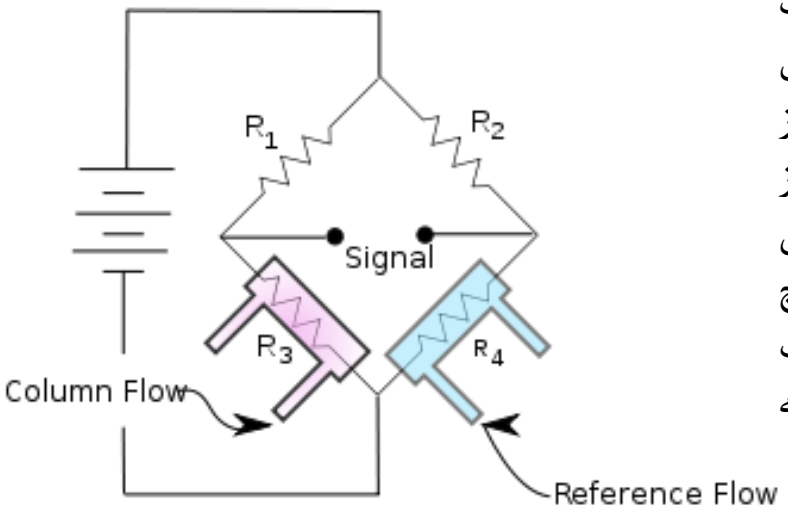


کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۴- سیستم آشکارسازها

- آشکارساز گرما رسانندگی Thermal conductivity detector (TCD)



این آشکارساز از دو محفظه کاملا" هم اندازه تشکیل شده که هر یک دارای یک سیم پیچ (پلاتین، طلا یا تنگستن) داغ است. گاز حامل (هیدروژن یا هلیم) از یکی از سیم پیچ‌ها عبور نموده و پس از گذر از ستون وارد سیم پیچ دوم می‌شود که اگر گاز حامل خارج شده از ستون حاوی نمونه نیز باشد در این صورت چون گرما رسانندگی همه‌ی ترکیبات آلی از هیدروژن و هلیوم کمتر است لذا سیم پیچ داغتر شده و مقاومت آن افزایش می‌یابد که حاصل آن کاهش شدت جریان است در این صورت آشکارساز اختلاف جریان را ثبت نموده و به شکل پیک ظاهر می‌کند.

کروماتوگرافی گازی (GC)

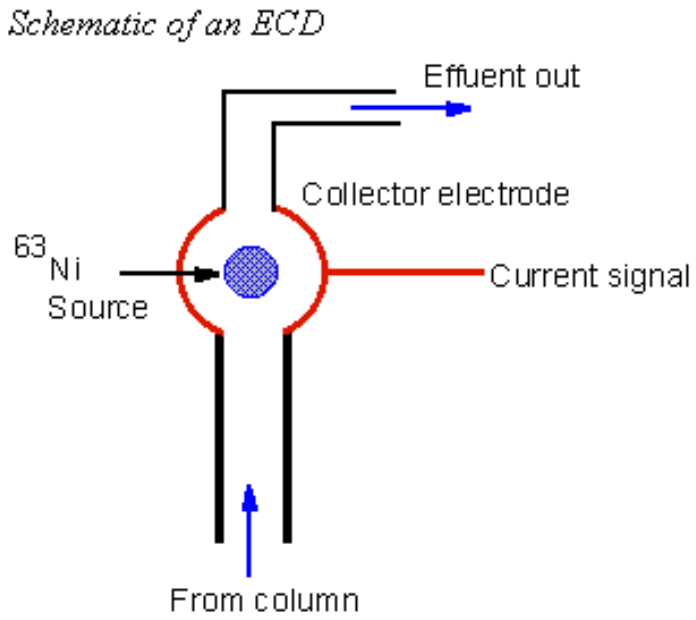
دستگاهوری

۴- سیستم آشکارسازها

آشکارساز الکترون گیراندازی Electron capture detector (ECD)

در بسیاری از جهات ، مشابه یک شمارنده برای اندازه گیری تابش X است. الکترون حاصل از نشر کننده β مثل نیکل -۶۳ یا تریتیم) باعث یونیزاسیون گاز حامل (اغلب نیتروژن) می‌شود. این الکترون‌ها به سمت آند با بار مثبت شتاب می‌گیرند و تولید جریان می‌نمایند. زمانی‌که یک گونه الکترونگاتیو همراه گاز حامل وارد آشکارساز می‌شود سبب گیراندازی الکترونها شده و باعث کاهش جریان بین جمع کننده آند و کاتد می‌گردد. غلظت آنالیت متناسب با میزان گیراندازی الکترون می‌باشد. این آشکارساز بسیار انتخابی است و به مولکول‌های دارای گروه‌های الکترونگاتیو حساس است، مثل هالوژن‌ها، پراکسیدها، کینون‌ها و گروه‌های نیترو.

یکی از مهم‌ترین کاربردهای این آشکارساز، در تعیین حشره‌کش‌های کلردار می‌باشد. از عیب‌های آن این است که محدوده عکس‌العمل آن کم است.

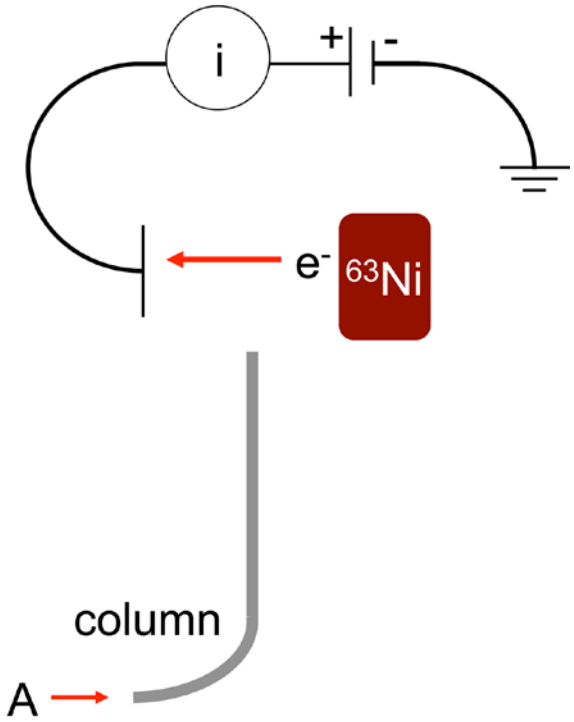


کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۴- سیستم آشکارسازها

- آشکارساز الکترون گیراندازی Electron capture detector (ECD)



کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۴- سیستم آشکارسازها

- آشکارساز گرما یونی Thermionic ionization detector (TID)

یک آشکارساز انتخابی برای ترکیبات آلی دارای فسفر و نیتروژن می‌باشد. عکس‌العمل آن نسبت به فسفر حدود ده بار بیشتر از نیتروژن و $۱۰^۴$ تا $۱۰^۶$ بار بیشتر از کربن است. حساسیت این آشکارساز نسبت به FID برای ترکیبات آلی فسفردار ۵۰۰ بار و برای ترکیبات آلی نیتروژن‌دار ۵۰ بار بیشتر است. این خواص سبب می‌شوند که آشکارساز گرما یونی به ویژه برای آشکارسازی و تعیین تعداد زیادی از آفت کشهای حاوی فسفر مفید باشد.

آشکارساز گرما یونی شبیه FID می‌باشد. سیال خروجی از ستون با هیدروژن مخلوط می‌شود و از داخل نوک مجموعه شعله عبور کرده و مشتعل می‌گردد. سپس گاز داغ در اطراف یک ساچمه روبیدیم سیلیکات که به طریق الکتریکی گرما داده شده است و در پتانسیلی حدود ۱۸۰ ولت نسبت به جمع کننده نگه داشته می‌شود، جریان می‌یابد. ساچمه گرم شده پلاسمایی می‌سازد که دمای آن ۶۰۰ تا ۸۰۰ درجه سانتی‌گراد است که این دما سبب ایجاد تعداد خیلی زیادی یون از مولکول‌های حاوی فسفر و یا نیتروژن می‌شود. جریان بزرگی از یون‌ها حاصل می‌شود که برای اندازه‌گیری ترکیبات حاوی این دو عنصر مفید است.

کروماتوگرافی گازی (GC)

- **دستگاهوری**

۴- سیستم آشکارسازها

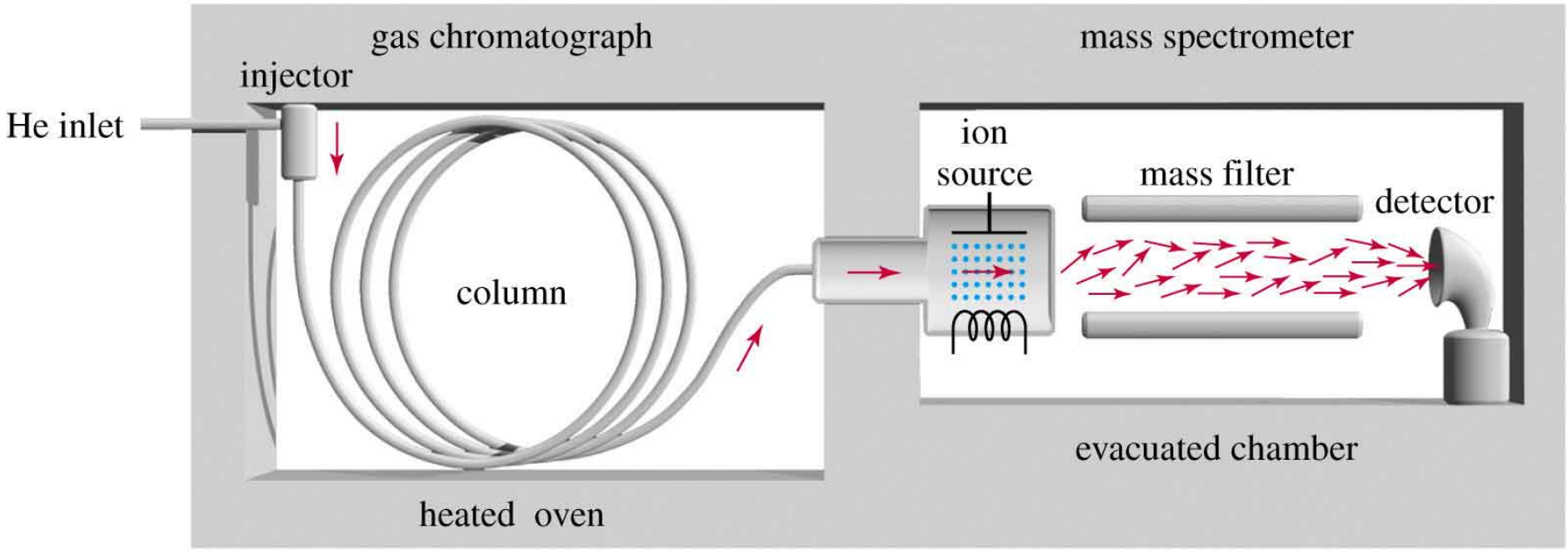
- طیف سنج جرمی Mass spectrometer (MS)

طیف سنج جرمی یکی از روش‌های طیف‌سنجی است که شامل جداسازی یون‌های یک یا چند اتمی بر پایه نسبت جرم به بار (m/z) و اندازه‌گیری m/z و فراوانی یون‌ها در فاز گازی است. به عبارت دقیقتر طیف‌سنجی جرمی به بررسی نسبت جرم به بار مولکولها با استفاده از میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی می‌پردازد.

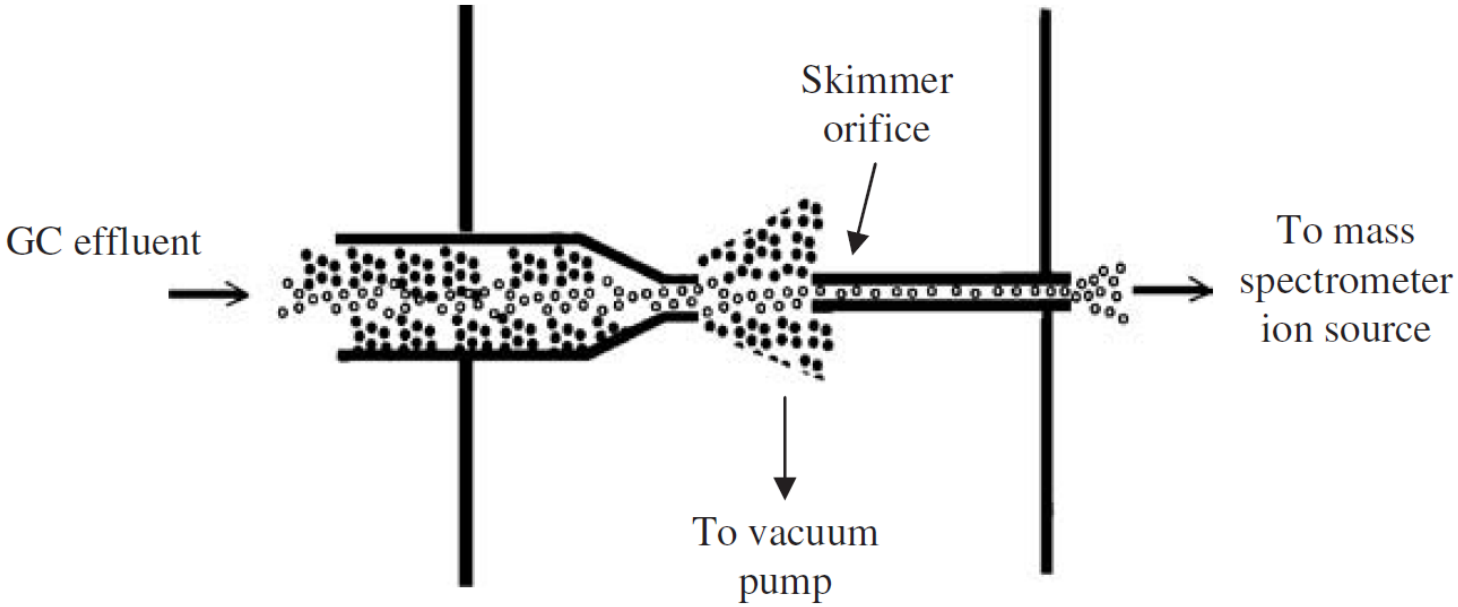
دستگاه تلفیقی **(Hyphenated)** کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی (GC-MS) از دو قسمت کروماتوگرافی گازی (GC) و طیف سنجی جرمی (MS) تشکیل شده است. در این دستگاه GC و Mass از هم جدا نمی‌باشند و وارد کردن نمونه به دستگاه Mass از طریق GC می‌باشد، بنابراین در این دستگاه، فقط از نمونه‌هایی می توانیم طیف جرمی تهیه کنیم که بتوانیم به GC تزریق نماییم. پس به طور عمده این دستگاه برای شناسایی و تعیین مقدار ترکیباتی است که حالت فرار دارند (مانند اسانس‌های گیاهی که نقطه جوش پایینی دارند) و یا بواسطه ترکیب با برخی واکنشگرها و یا حلال‌های خاص، امکان فرار بودن را می‌یابند. در دستگاه GC-MS اجزای یک مخلوط به ترتیب توسط یک ستون کروماتوگرافی از هم جدا می‌شوند و پس از حذف گاز حاصل، وارد منبع یونش طیف سنج جرمی می‌گردند و سپس، بواسطه تولید میدان‌های الکتریکی پر قدرت، اقدام به شناسایی کمی و کیفی اجزای مخلوط بر اساس نسبت بار الکتریکی به جرم آن‌ها می‌گردد.

کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی (GC-MS)

سرعت جریان از ستون مویین عموما به اندازه‌ای کم است که خروجی ستون را می‌توان مستقیما به محفظه یونش طیف سنج جرمی خوراند.



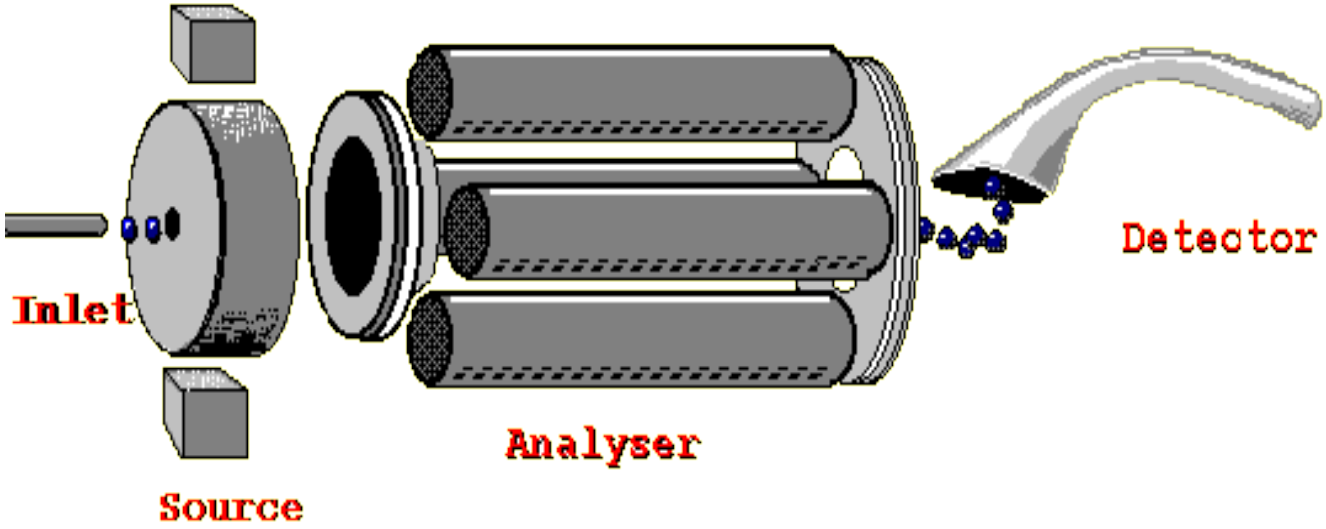
کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی (GC-MS)



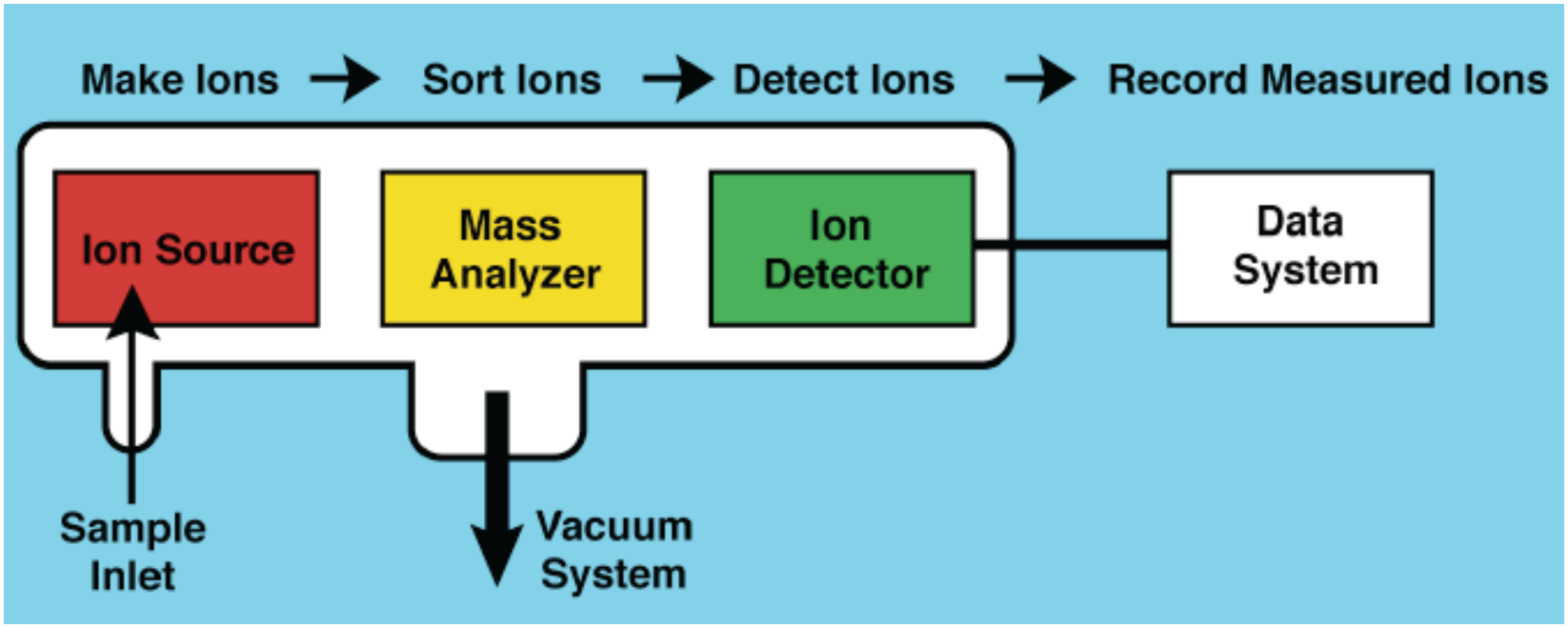
برای ستون‌های پرشده از یک جداکننده جتی برای جدا کردن قسمت عمده گاز حامل ار آنالیت استفاده می‌شود. در این وسیله، گازهای خروجی از افشانه یک جداکننده جتی تمام شیشه‌ای خارج می‌شوند که افزایش اندازه حرکت مولکول‌های سنگین آنالیت می‌گردد به طوری که ۵۰٪ یا بیشتر از آن‌ها در یک مسیر کم و بیش مستقیم به سمت جداکننده حرکت می‌کند. در مقابل، اتم‌های سبک هلیم توسط خلا از مسیر مستقیم منحرف شده و بدین ترتیب به خارج پمپ هدایت می‌شوند.

کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی (GC-MS)

- اجزای اصلی طیف سنج جرمی
  - سیستم ورودی نمونه
  - منبع یونش
  - تجزیه‌گر جرمی
  - آشکارساز

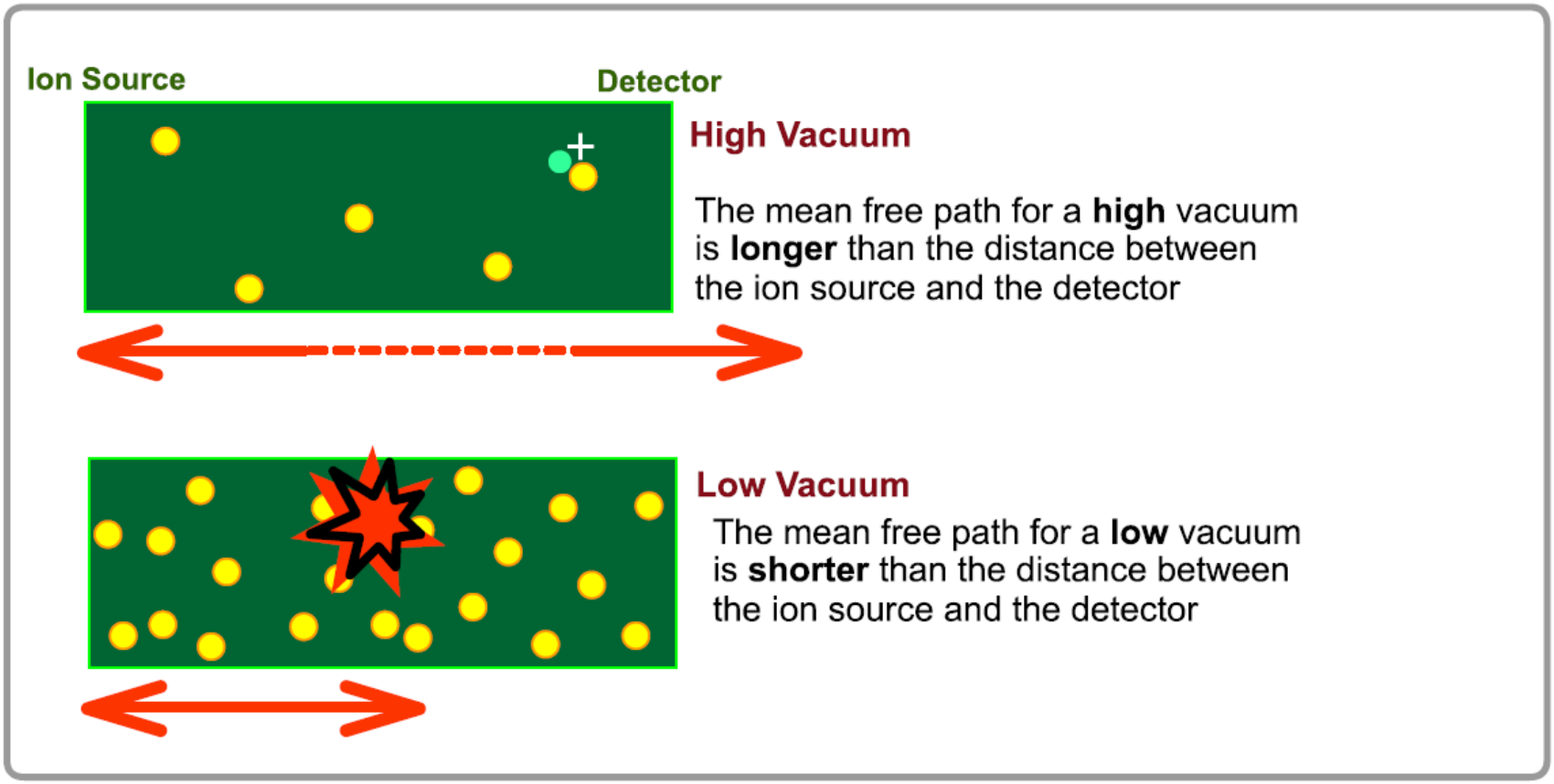


چرا در طیف سنجی جرمی نیاز به خلا می‌باشد؟

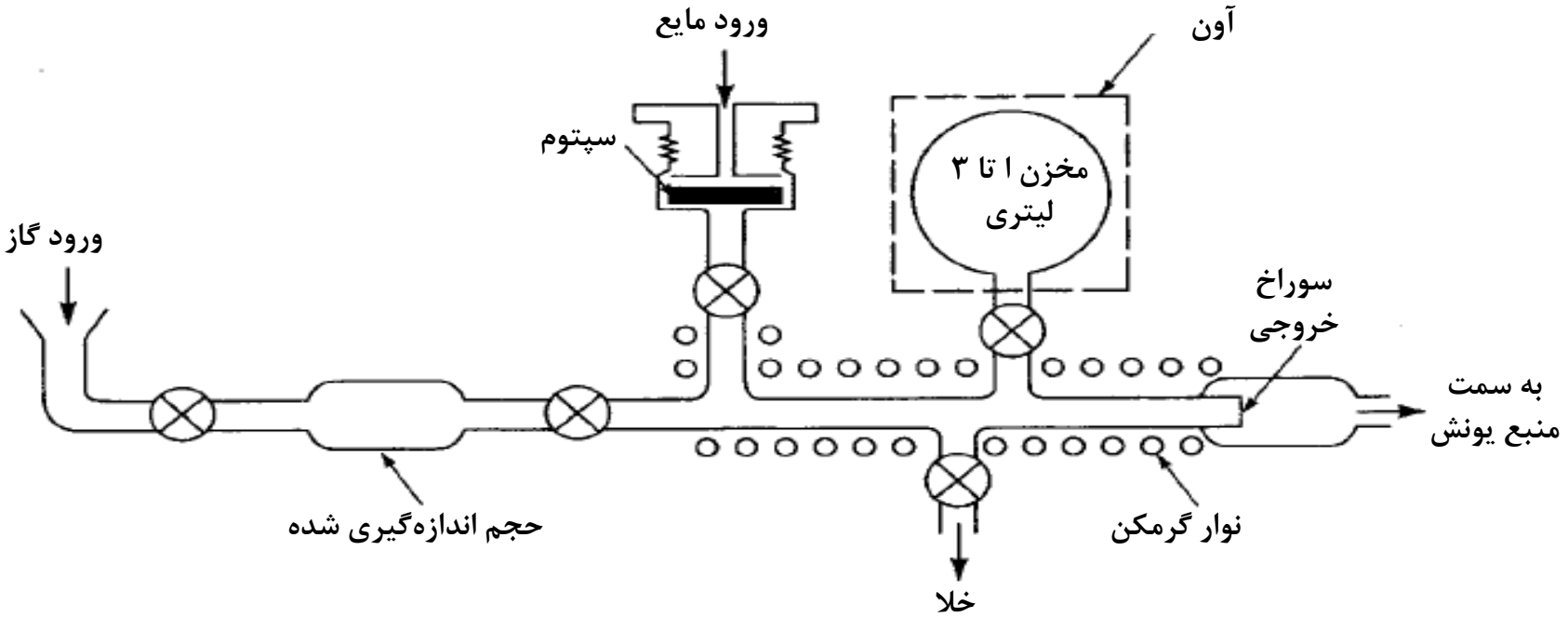


یکی از مشخصات بارز طیف سنجی جرمی که آن‌را از بقیه روش‌های دستگاهی متمایز می‌سازد نیاز به ایجاد فشارهای پایین (10^{-4} تا 10^{-8}تور) درتمام اجزای دستگاه به جز پردازنده سیگنال و قرائت می‌باشد. وجود خلا زیاد منجر به برخوردهای کمتر گونه‌ها با اجزای اتمسفر شده و در نتیجه تولید الکترون‌ها و یون‌های آزاد بیشتر صورت می‌پذیرد.

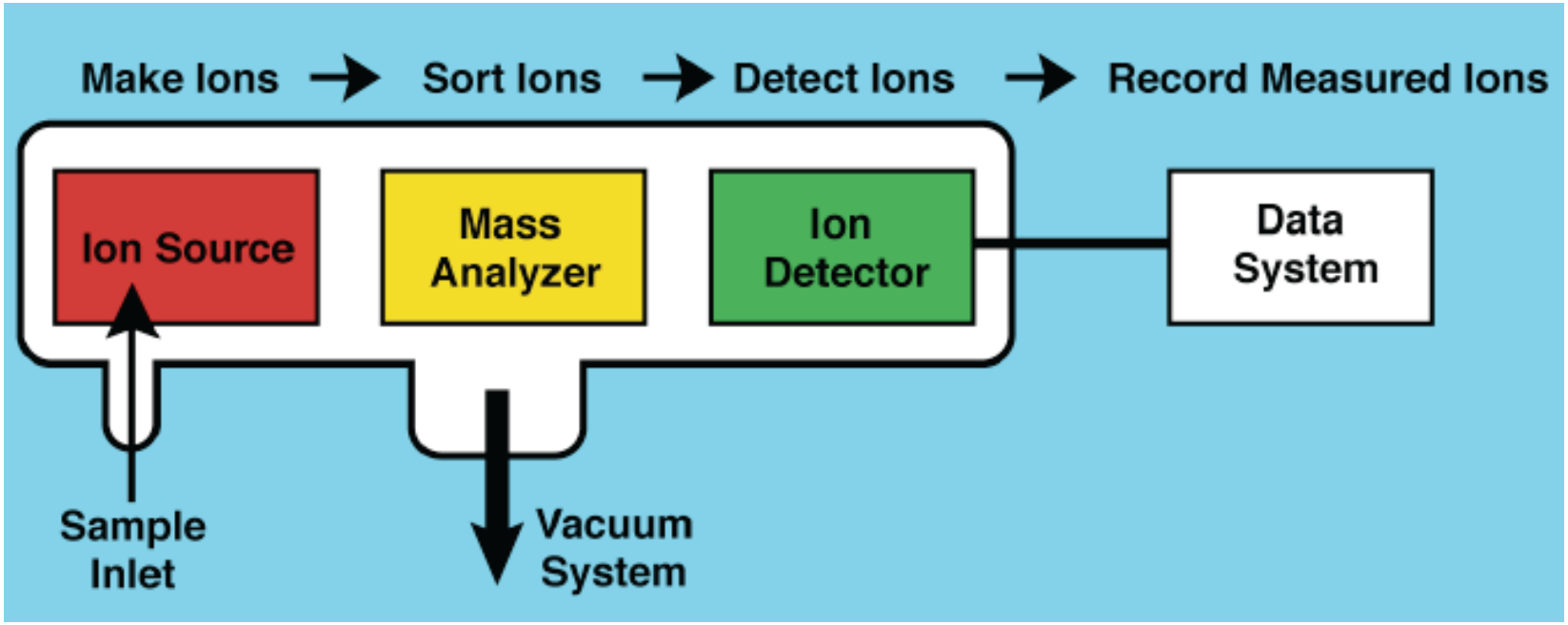
چرا در طیف سنجی جرمی نیاز به خلا می‌باشد؟ (انیمیشن)



سیستم ورودی نمونه

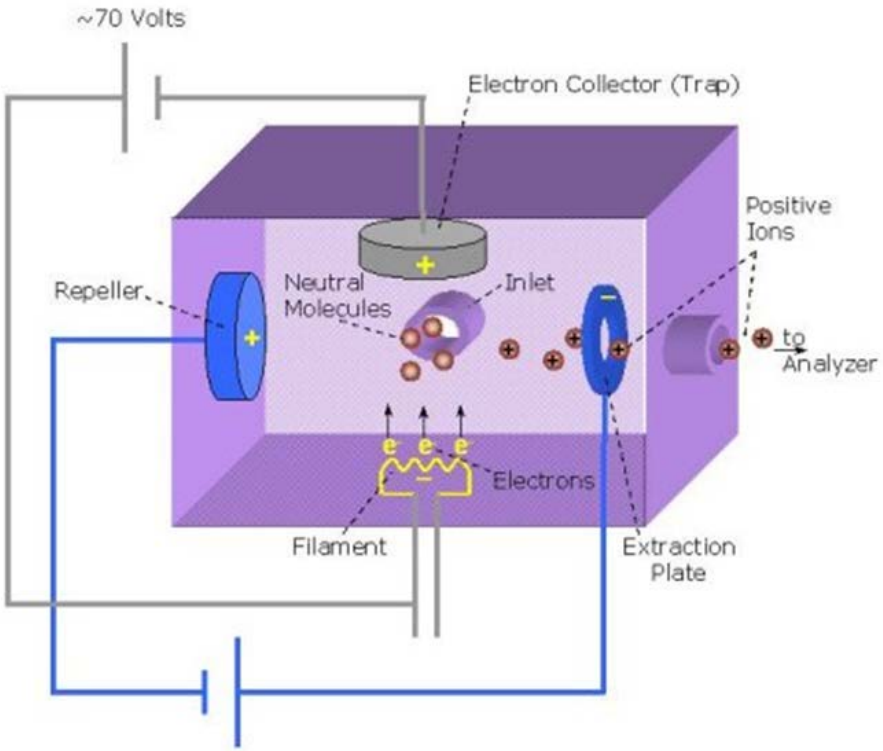


منابع یونش



- یونیزاسیون الکترونی Electron Ionization (EI)
- یونیزاسیون شیمیایی Chemical Ionization(CI)
- ...

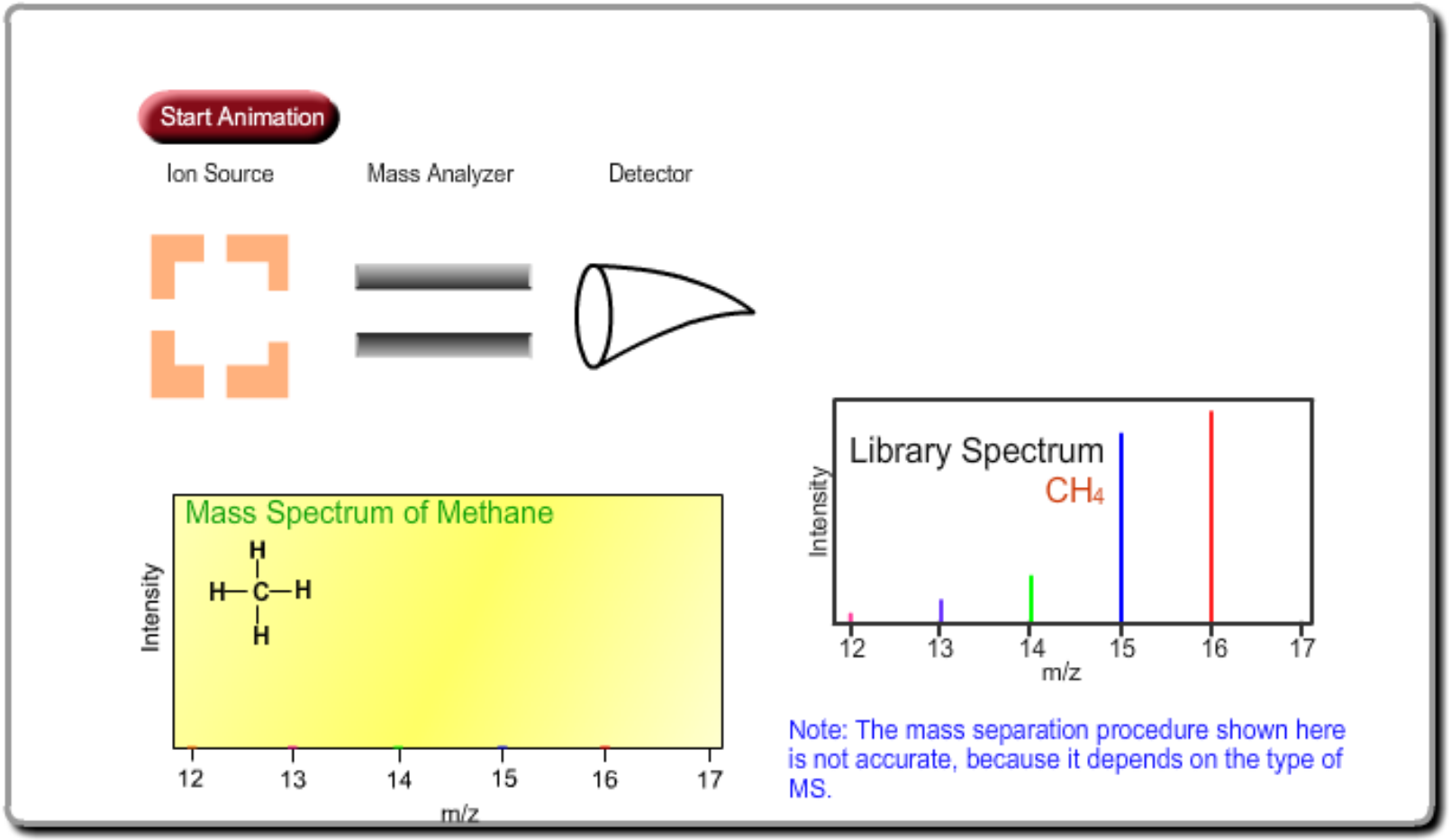
یونیزاسیون الکترونی Electron Ionization (EI)



- نحوه عملکرد EI

- الکترون‌ها از یک رشته سیم تنگستن یا رنیم گرما داده شده نشر می‌یابند.
- توسط یک پتانسیل تقریبا ۷۰ ولتی که بین رشته و آند اعمال می‌شود شتاب داده می‌شوند.
- مسیرهای عبور الکترون‌ها و مولکول‌ها عمود برهم هستند و یکدیگر را در مرکز منبع قطع می‌کنند که در این محل برخورد و یونش اتفاق می‌افتد.
- یون‌های مثبت تک بار توسط یک اختلاف پتانسیل کوچک (نوعا ۵ ولت) که بین اولین صفحه شتاب دهنده و دفع کننده اعمال می‌شود از داخل شکاف این صفحه عبور می‌کنند.

یونیزاسیون الکترونی (انیمیشن)



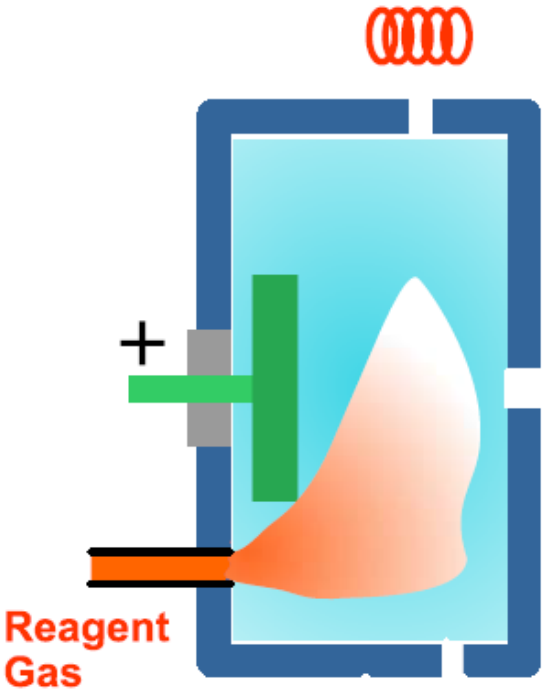
یونیزاسیون الکترونی Electron Ionization (EI)

- مزایا:
  - قطعه قطعه شدن شدید و تعداد پیک‌های فراوان حاصل از آن سبب شناسایی دقیق آنالیت‌ها می‌شود.

- معایب:
  - قطعه قطعه شدن نیز در برخی موارد سبب ناپدید شدن پیک یون مولکولی می‌شود به طوری‌که جرم مولکولی آنالیت را نمی‌توان تشخیص داد.
  - این روش نیاز به تبخیر نمونه دارد که این خود می‌تواند سبب تخریب گرمایی بعضی از آنالیت‌ها قبل از عمل یونش شود.

یونیزاسیون شیمیایی Chemical Ionization(CI)

- در یونیزاسیون شیمیایی واکنش‌های یون مولکولی بین مولکول‌های گاز معرف یونیزه شده (از طریق بمباران الکترونی) و مولکول‌های خنثی آنالیت جهت ایجاد یون‌های آنالیت صورت می‌پذیرد.
- از جمله گازهای معرف می‌توان به متان، ایزوبوتان و آمونیاک اشاره نمود.
- نسبت گاز معرف به نمونه ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ برابر می‌باشد.



Chemical Ionization(CI) یونیزاسیون شیمیایی

Primary EI ▶ Formation of Reactant Ions ▶ Sample Ionization

Samples are ionized through molecular-ion reaction with reactant ions in PCI. Ionization process of PCI will be shown in case of methane which is the most commonly used reagent gas.

(1) Primary EI

At first, reagent gas is ionized.

$CH_4 + e \rightarrow CH_4^+, CH_3^+ \ldots$

(2) Formation of Reactant Ions

The above ions react with reagent gas to form reactant ions.

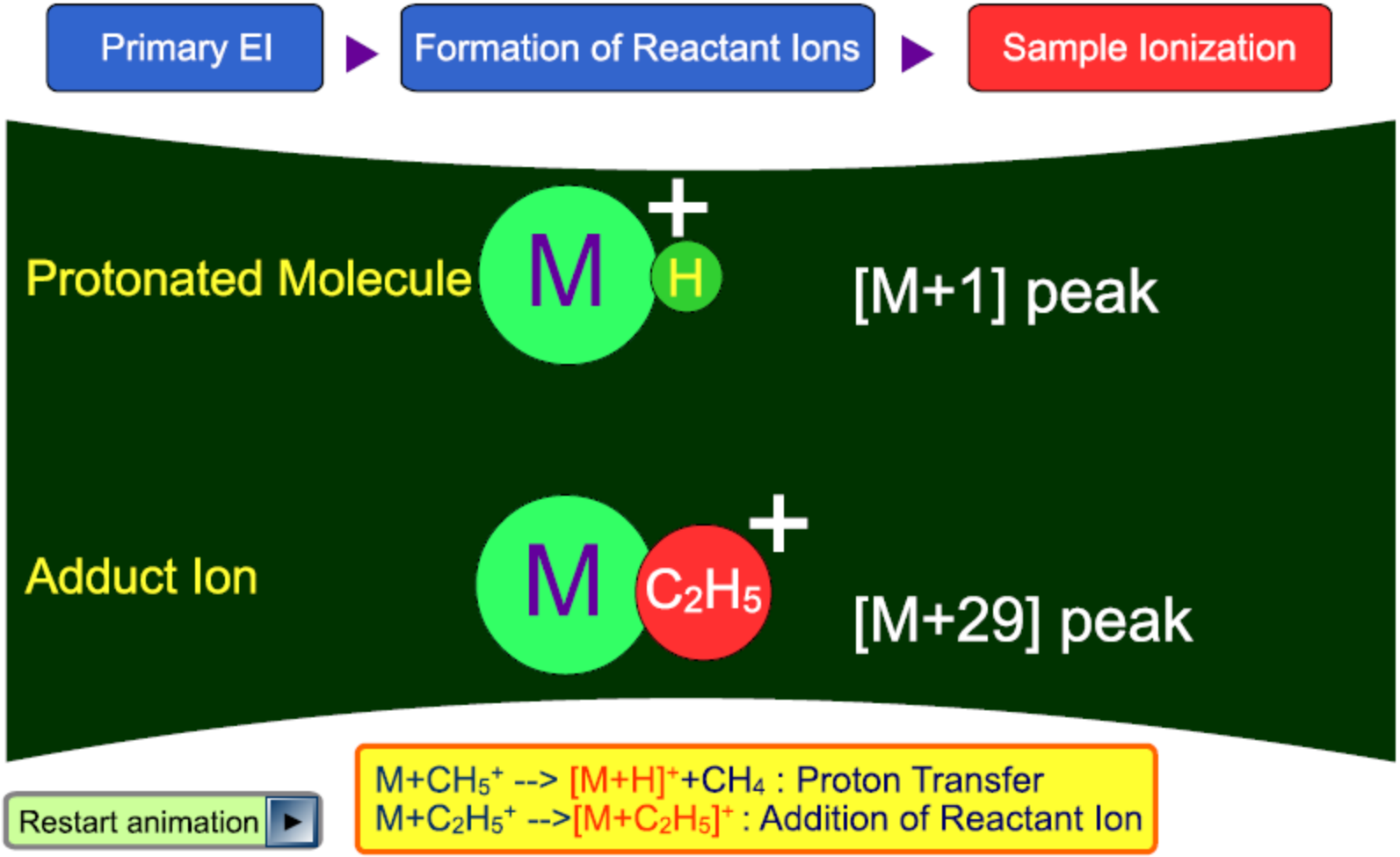
$CH_4^+ + CH_4 \rightarrow CH_3 + CH_5^+, CH_3^+ + CH_4 \rightarrow H_2 + C_2H_5^+, \ldots$

(3) Sample Ionization

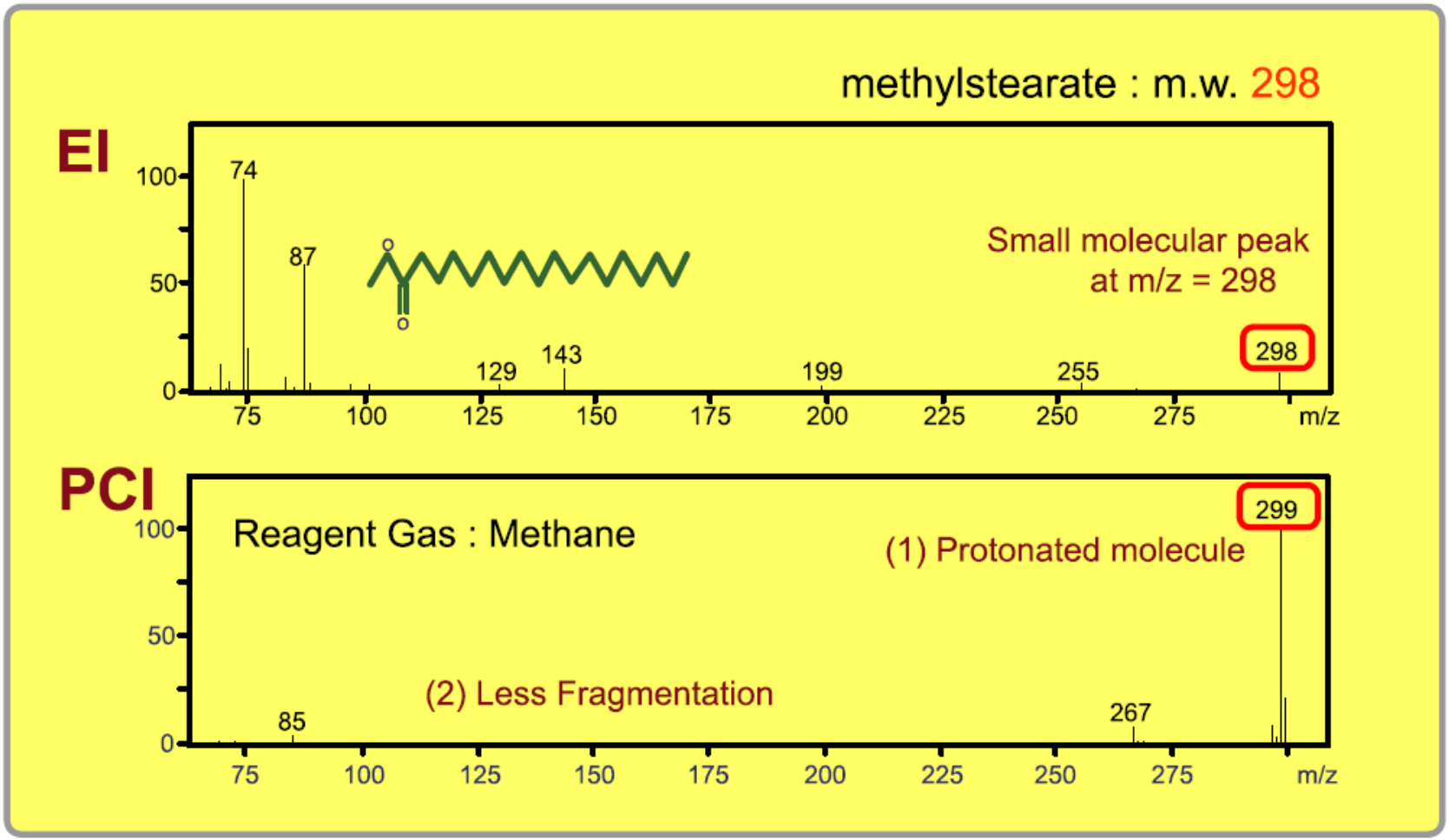
Sample molecules M is ionized by some reactions with the reactant ions.

$M + CH_5^+ \rightarrow [M+H]^+ + CH_4, M + C_2H_5^+ \rightarrow [M+C_2H_5]^+, \ldots$

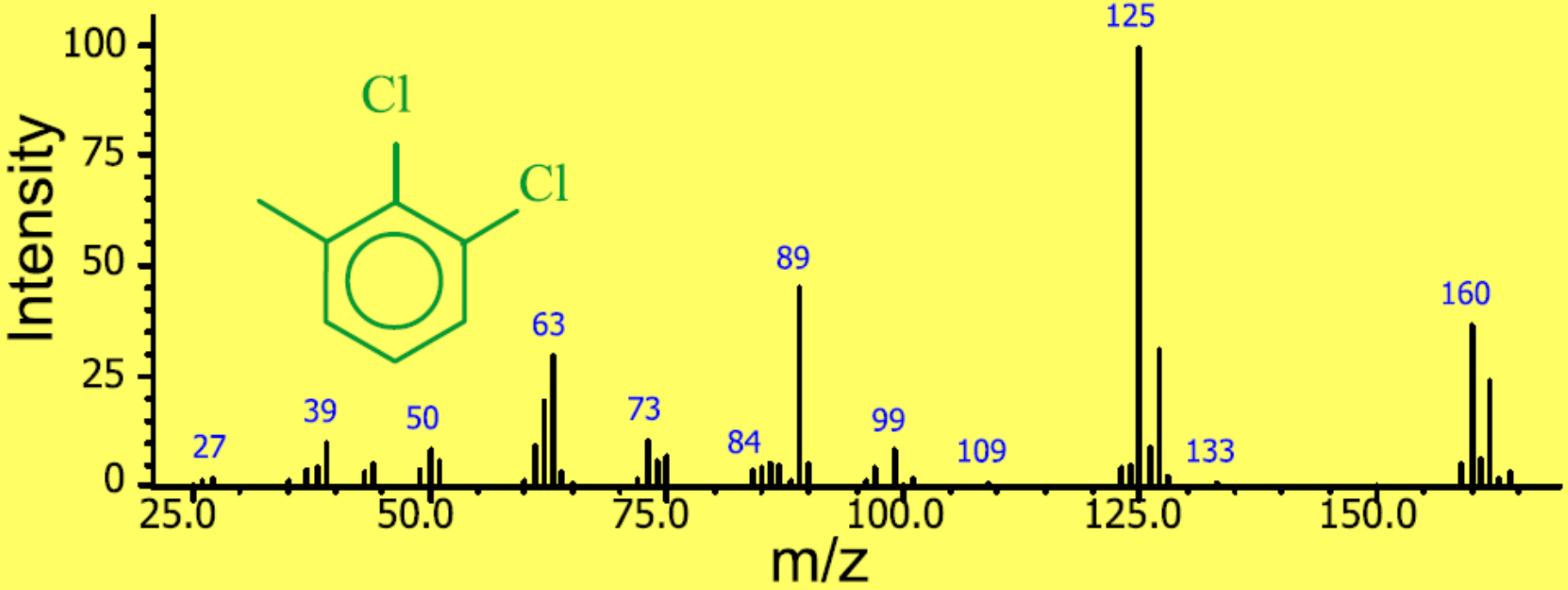
یونیزاسیون شیمیایی (انیمیشن)



طیف جرمی دو منبع یونش

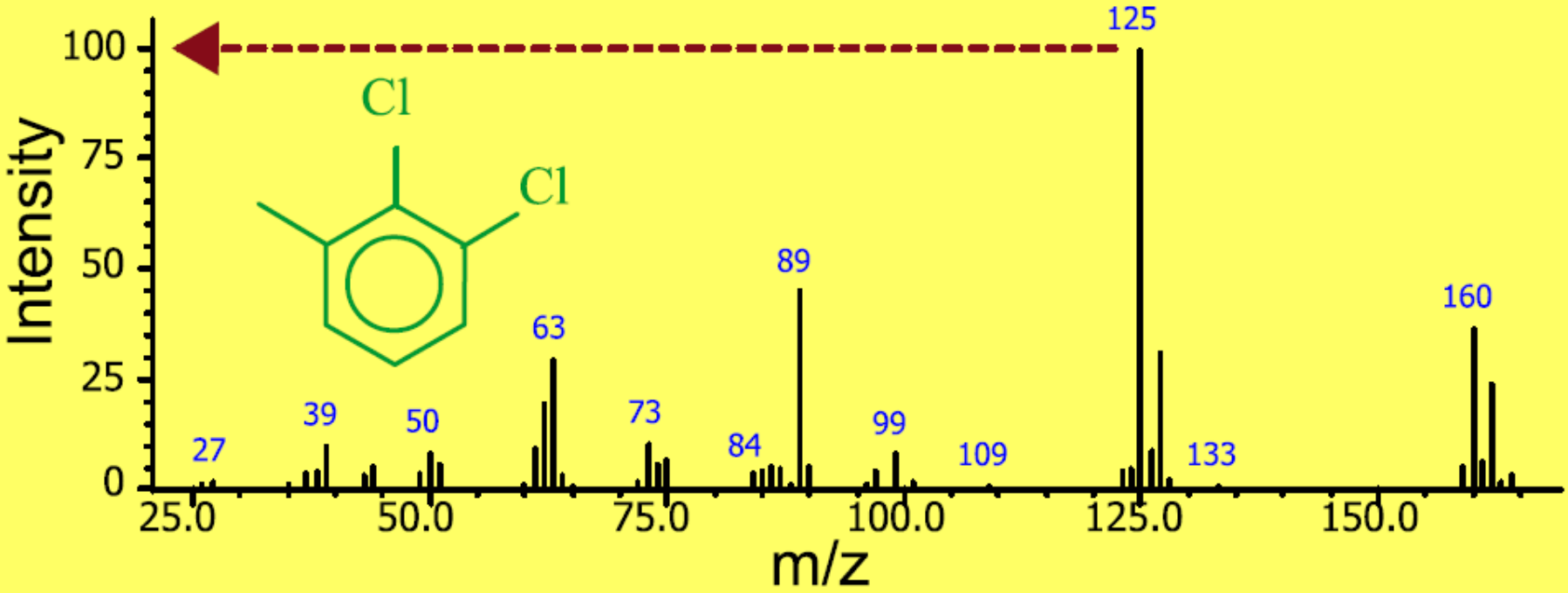


مثالی از طیف جرمی

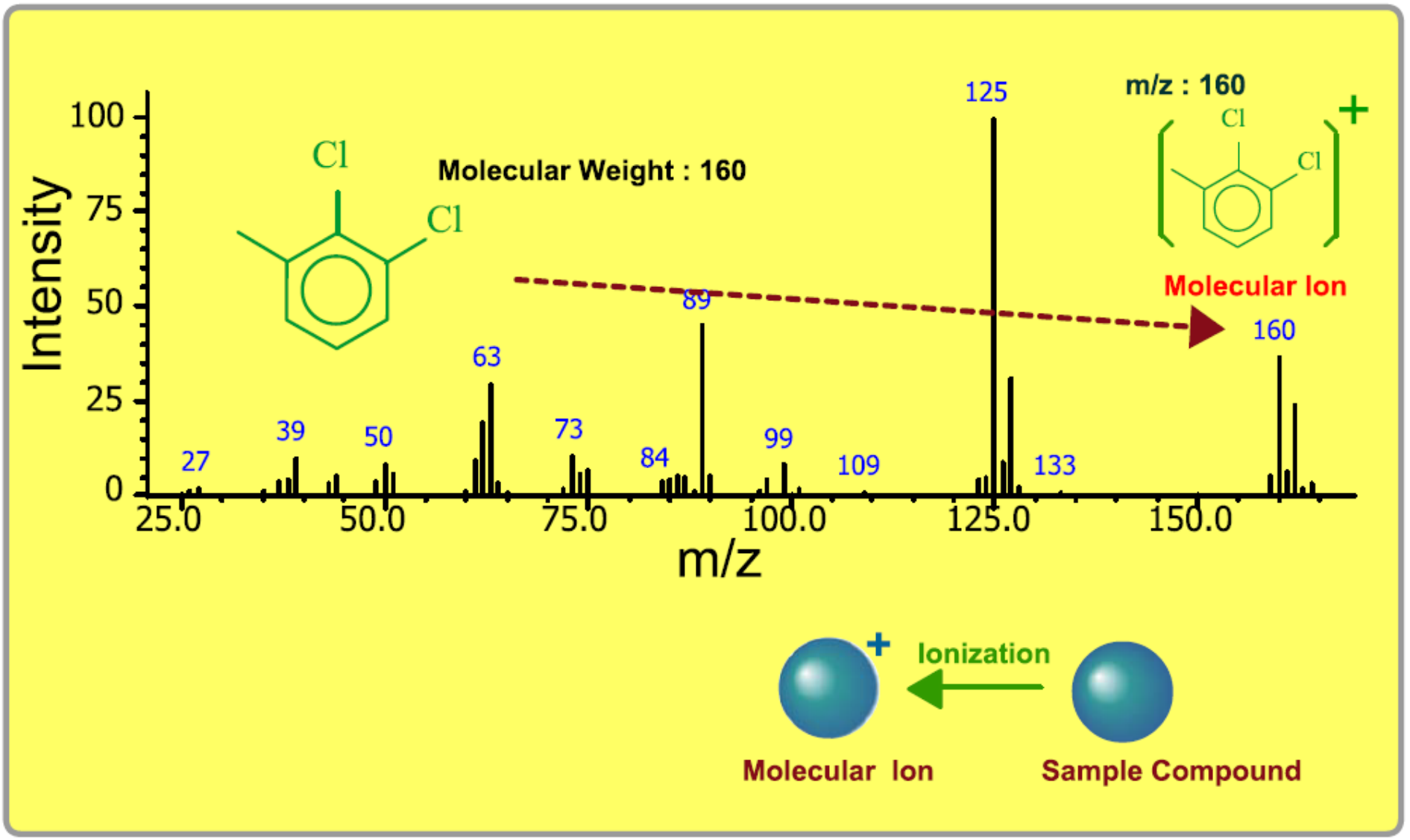


m : mass of ion
z : charge of ion

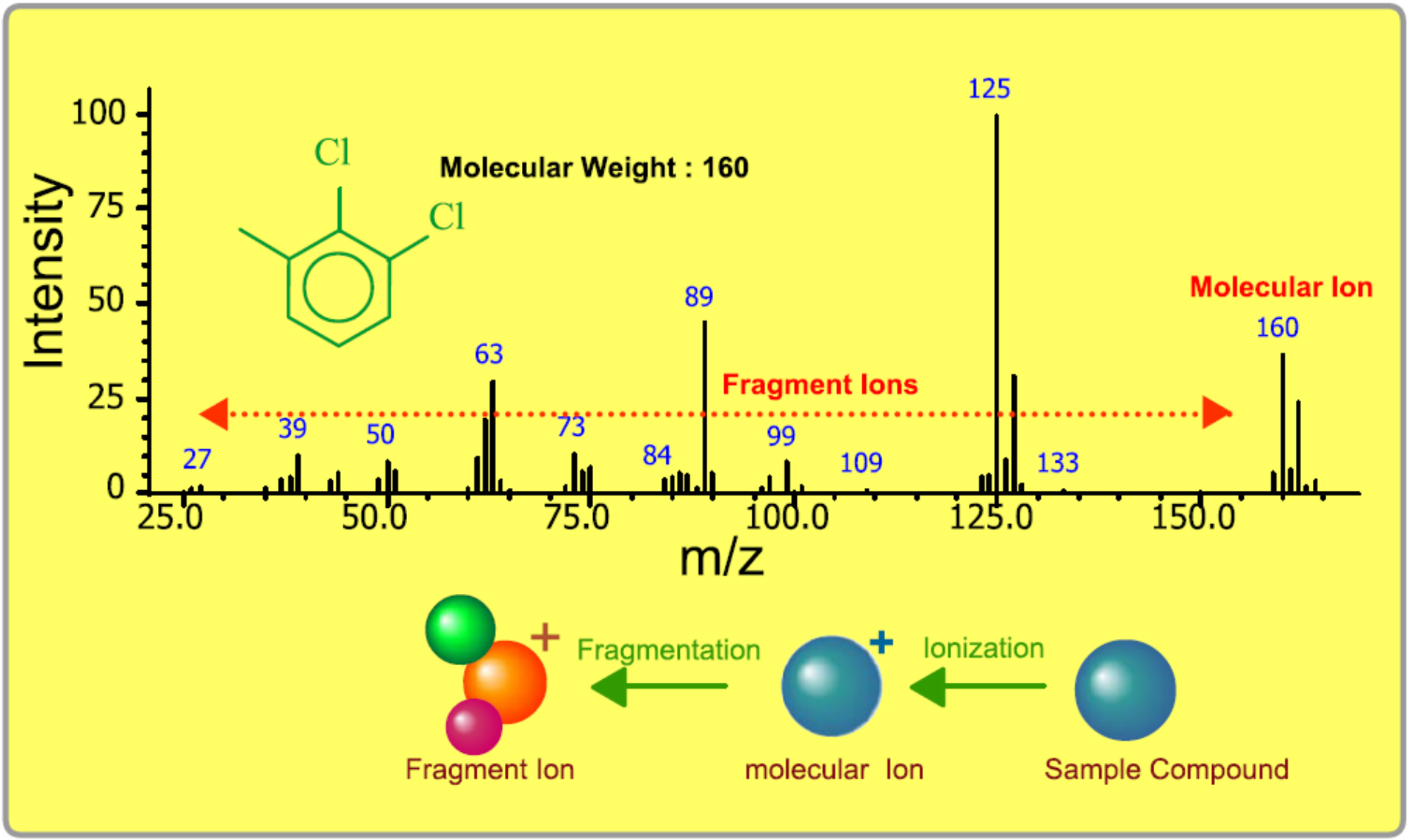
پیک مبنا


125
Cl
Cl
89
160
63
39
50
73
27
84
99
109
133
100
75
50
25
0
Intensity
25.0
50.0
75.0
100.0
125.0
150.0
m/z

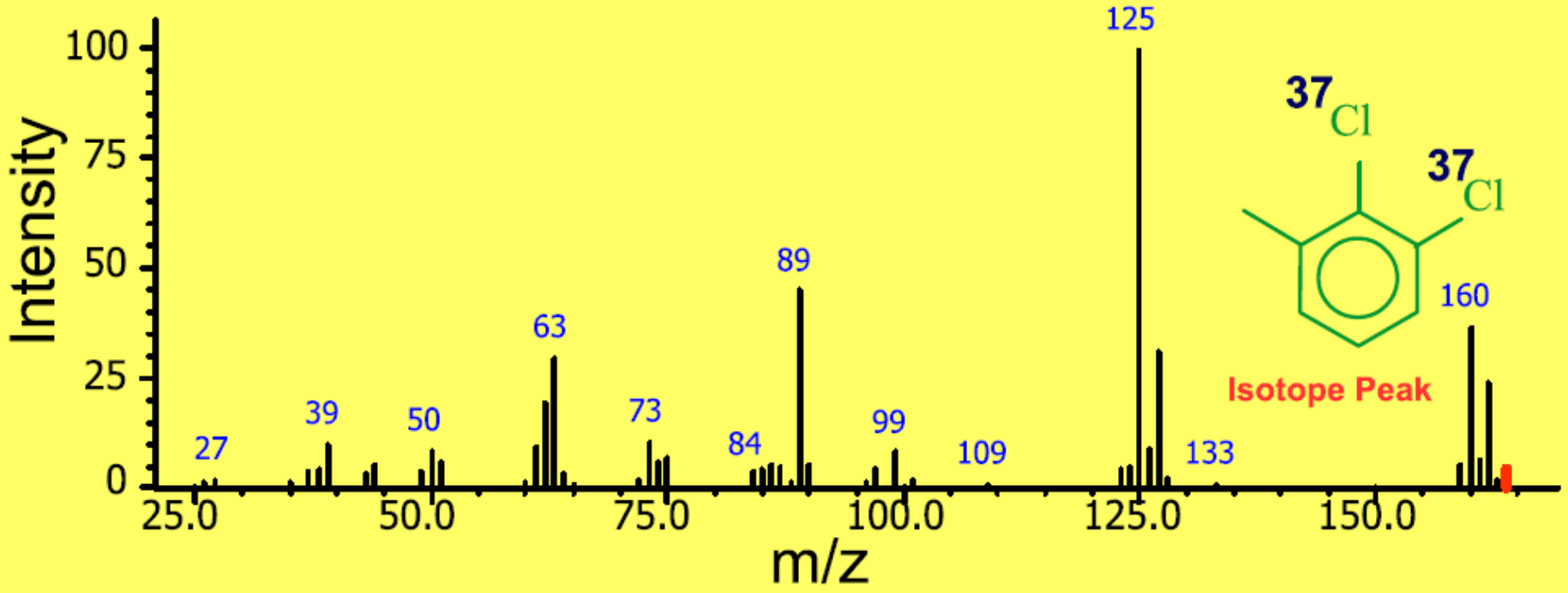
پیک یون مولکولی



یون‌های جزء به جزء شده

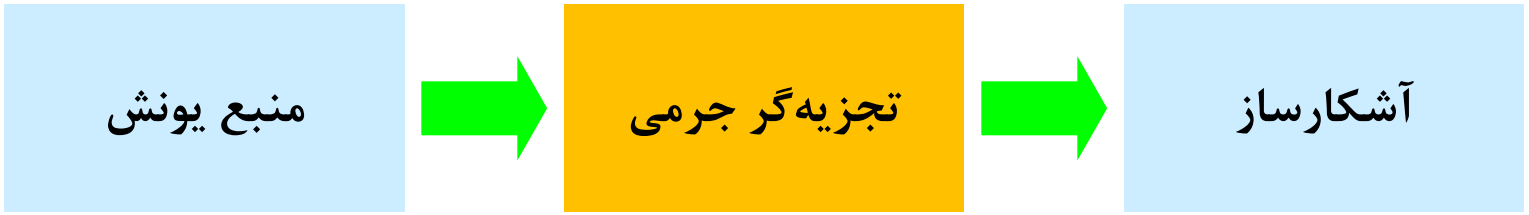


پیک ایزوتوپ

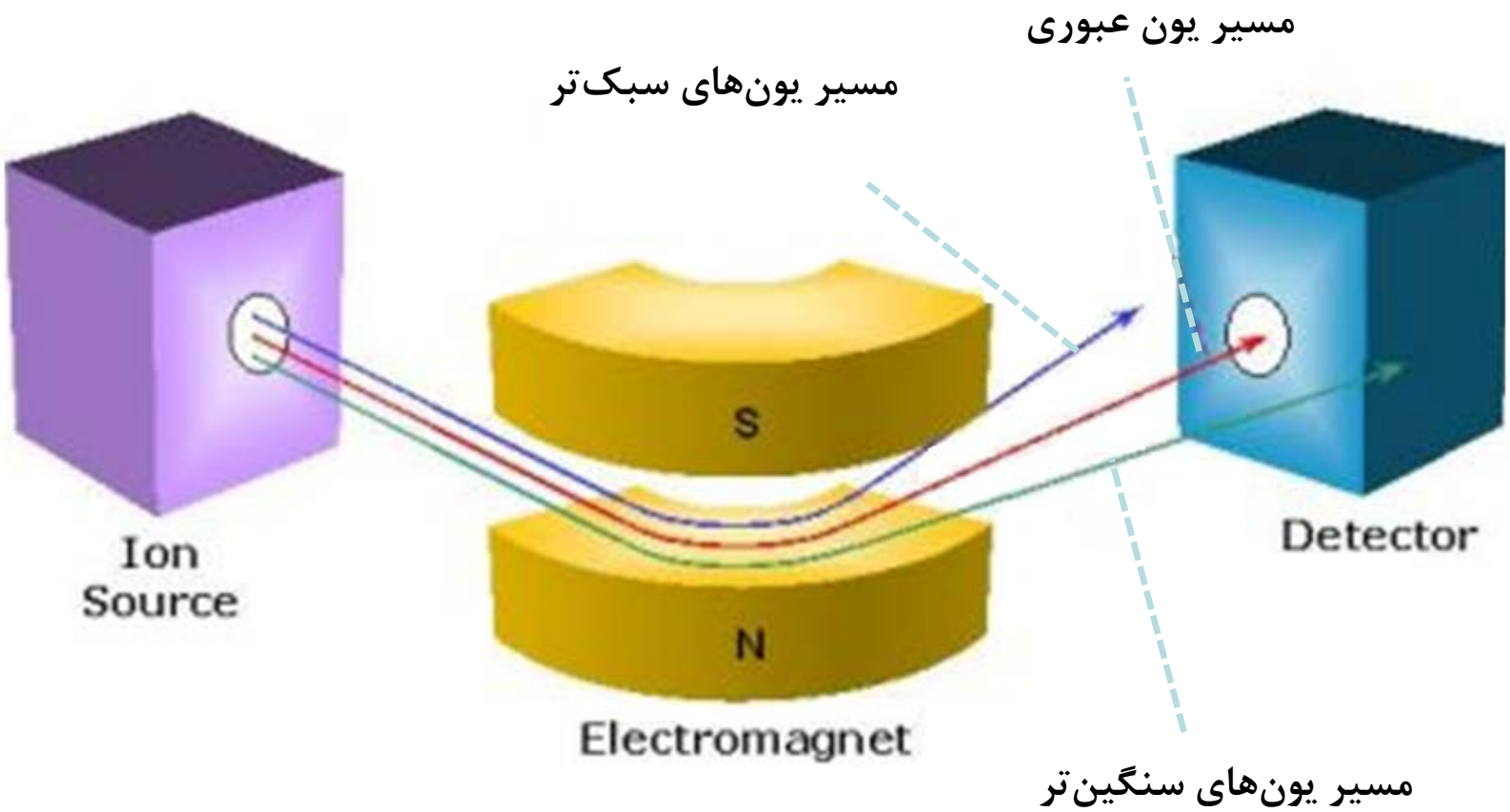

Intensity
100
75
50
25
0
125
89
63
39
50
73
27
84
99
109
133
160
25.0
50.0
75.0
100.0
125.0
150.0
m/z
37Cl
37Cl
Isotope Peak

تجزیه‌گرهای جرمی - Mass Analyzers

- تجزیه‌گر جرمی قطاع مغناطیسی (Magnetic sector mass analyzer)
- تجزیه‌گر جرمی چهارقطبی (Quadrupole mass analyzer)
- و ...



تجزیه‌گر جرمی قطاع مغناطیسی



تجزیه‌گر جرمی قطاع مغناطیسی

انرژی جنبشی یک یون:

$$KE = zeV = \frac{1}{2}mv^2$$

$$F_m = BzeV$$

$$F_c = \frac{mv^2}{r}$$

تنها یون‌هایی عبور می‌کنند که این دو نیرو با هم برابر باشند:

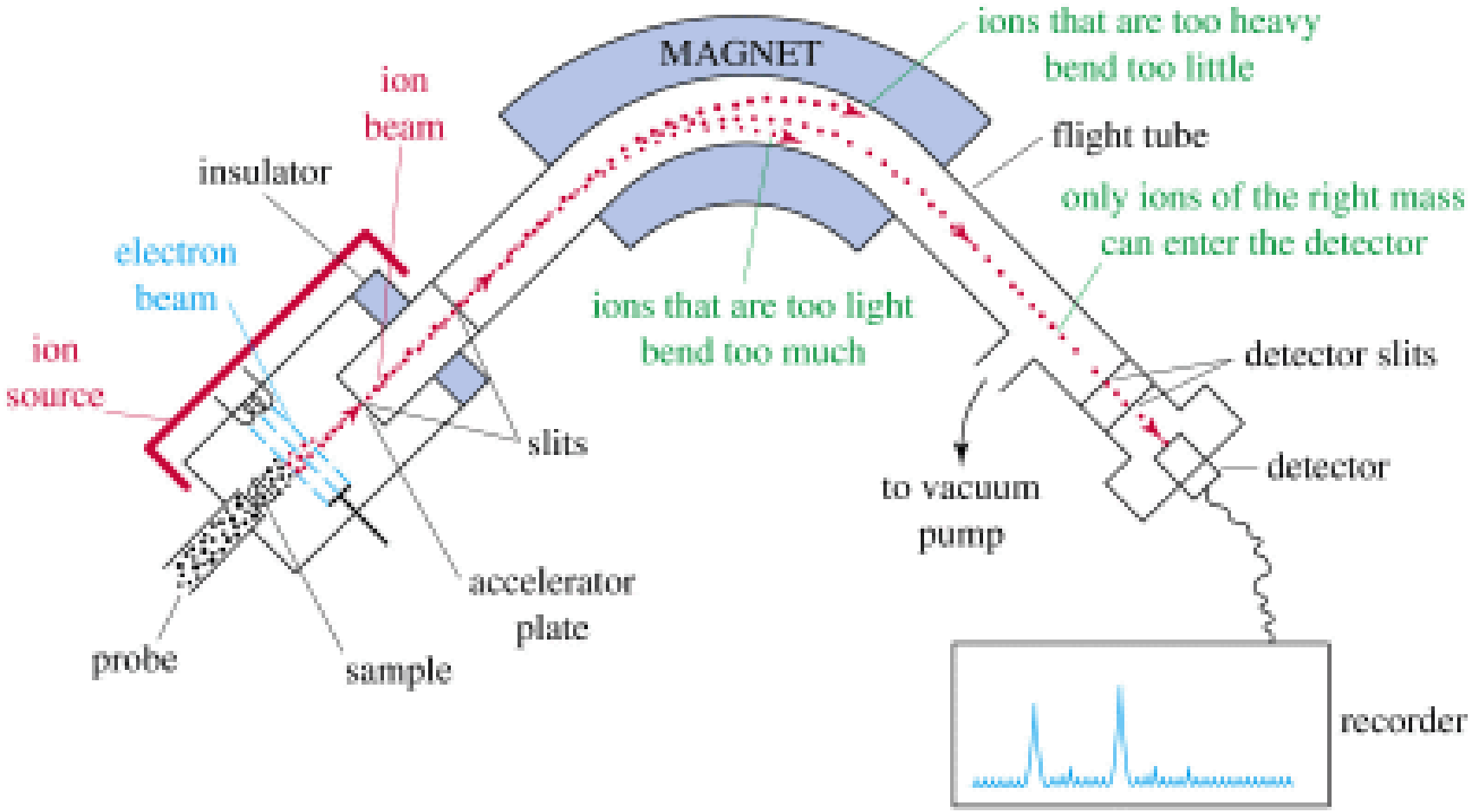
$$F_c = F_m$$

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2 e}{2V}$$

KE: انرژی جنبشی
z: بار یون
e: بار الکترون(1.60×10^{-19} C)
M: جرم
B: میدان مغناطیسی(T)
v : سرعت(m/s)
V: ولتاژ شتاب دهنده
r: شعاع انحنای قطاع مغناطیسی
F_m: نیروی مغناطیسی
F_c: نیروی مرکزگرا

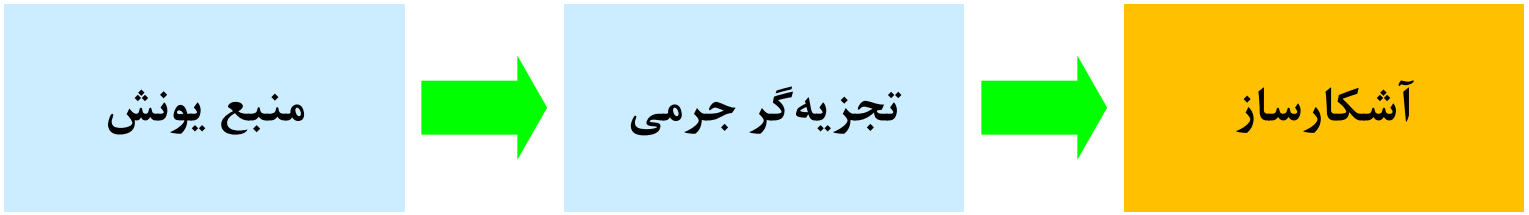
طیف‌های جرمی را می‌توان با تغییر یکی از سه متغیر (B، V یا r) و ثابت نگه داشتن دوتای دیگر به دست آورد. بسیاری از تجزیه‌گر جرمی قطاع مغناطیسی جدید، الکترومغناطیسی دارند که در آن‌ها با ثابت نگه داشتن V و r و تغییر در شدت جریان آهنربا و بنابراین در B، یون‌ها جدا می‌شوند.

تجزیه‌گر جرمی قطاع مغناطیسی



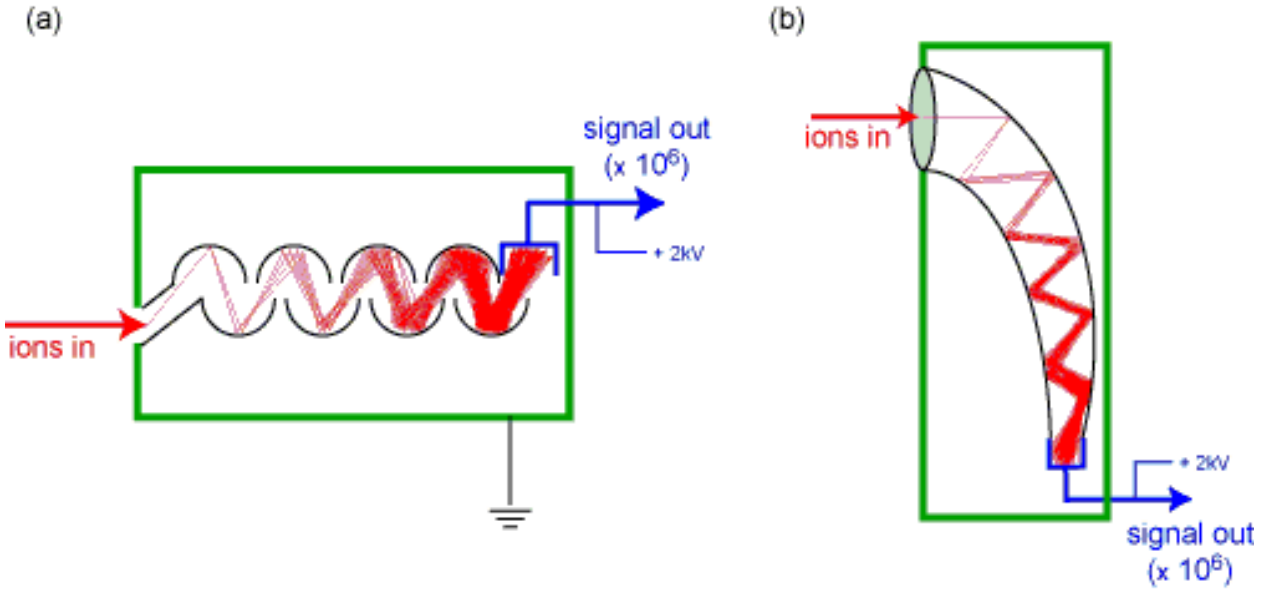
آشکارسازهای طیف سنجی جرمی

- تکثیرکننده الکترون (Electron Multiplier)
- فنجان فارادی (Faraday Cup)
- و ...



تکثیرکننده الکترون (Electron Multiplier)

- مورد انتخاب برای اکثر آزمایشگاه‌ها
- بهره بالا (10^7)، نویز کم، محدوده خطی بالا (10^4-10^6)



شمایی از دو تکثیرکننده الکترون ، (a) دینود گسسته: هر دینود (مانند BeO یا MgO) در یک ولتاژ بالاتر (۹۰ تا ۱۰۰ ولت) پی در پی نگه داشته شده است. هنگام برخورد یون‌ها و الکترون‌های پرانرژی با کاتد و دینودها، ترکش‌هایی از الکترون از این سطوح نشر می‌شود. تکثیرکننده‌های الکترون تا ۲۰ دینود موجود است که نوعا بهره جریانی برابر 10^7 در اختیار می‌گذارند. (b) دینود پیوسته: به شکل شیپور می‌باشد که از شیشه‌ای که به شدت با سرب دوپ شده است، ساخته شده است. پتانسیلی برابر ۱/۸ تا ۲ کیلوولت در طول آشکارساز اعمال می‌شود. یون‌هایی که به سطح برخورد می‌کنند، الکترون‌هایی بیرون می‌اندازند که در طول سطح می‌پرند و با هر برخورد الکترون‌های بیشتری بیرون می‌اندازند.

کتابخانه‌های طیف سنجی جرمی

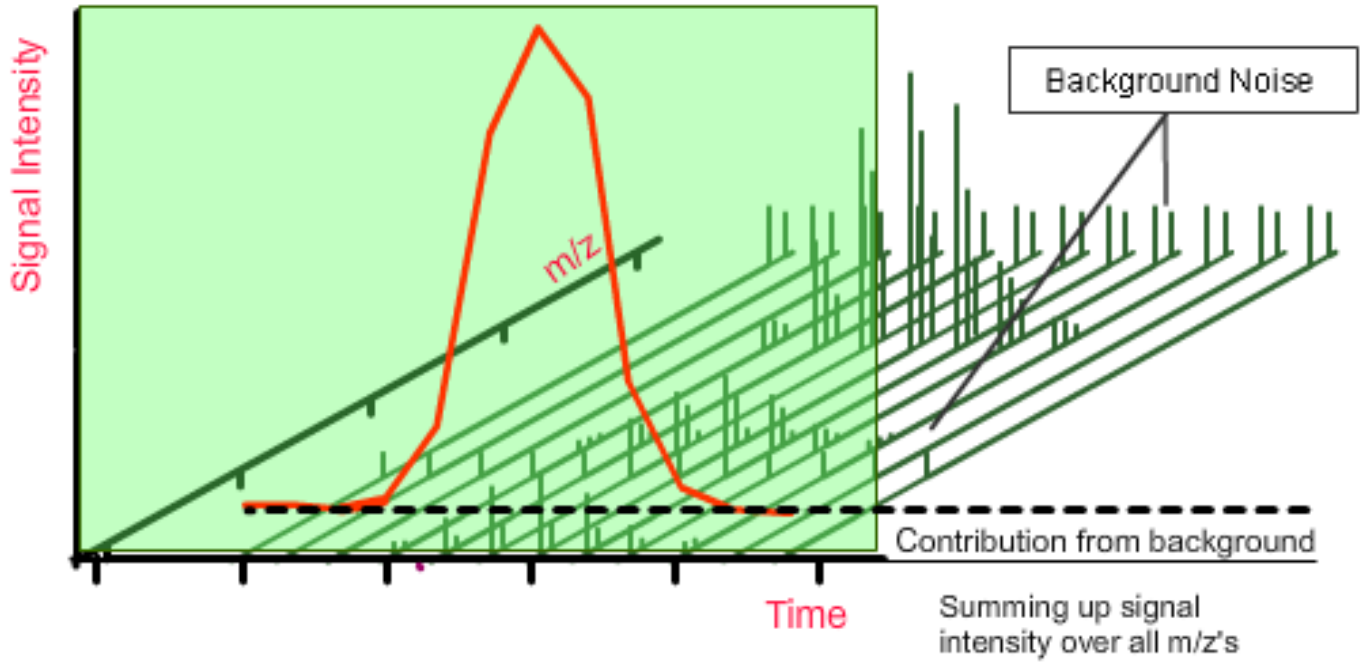
یکی از مزایای GC/MS نسبت به دیگر روش‌های تلفیقی (Hyphenated techniques) وجود اطلاعات مفید طیفی بسیار زیاد است. شناسایی ترکیب‌های مجهول از طریق مقایسه طیف جرمی این ترکیب‌ها با طیف‌های جرمی ترکیب‌های معلوم موجود در کتابخانه دستگاه طیف سنجی جرمی صورت می‌پذیرد.

کتابخانه‌های موجود:

- طیف‌های با مقاصد عمومی، NIST ~ 80,000
- طیف‌های با مقاصد عمومی، Wiley ~250,000
- طیف‌های سموم و دارویی، Pfleger ~2000

کروماتوگرام یونی کل

کروماتوگرام یونی کل (Total Ion Chromatogram(TIC)) کروماتوگرامی است که از جمع کردن شدت‌های تمام پیک‌های طیف جرمی متعلق به اسکن یکسان (زمان بازداری یکسان) ایجاد می‌شود و شامل نویز زمینه و اجزای نمونه می‌باشد.



کاربردهای کروماتوگرافی گازی

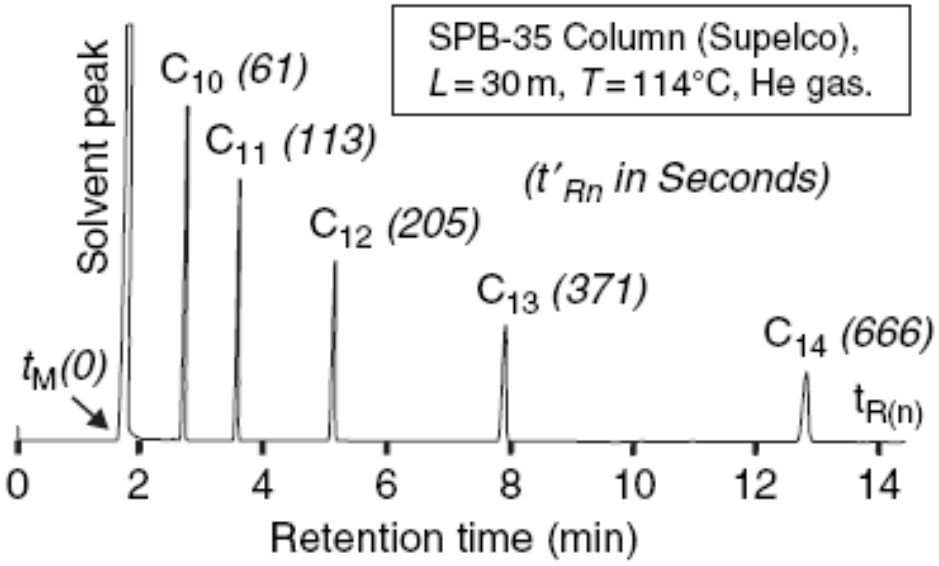
- **تجزیه کیفی**

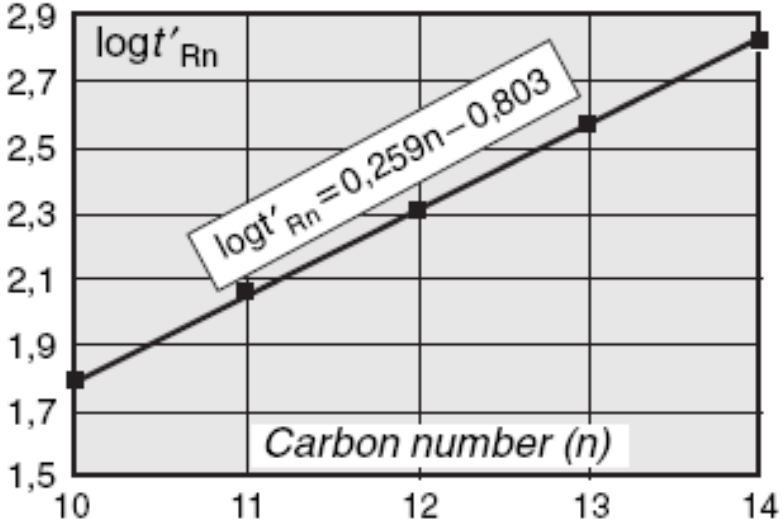
کروماتوگرافی گازی عمدتا به عنوان معیاری از درجه خلوص ترکیبات آلی به کار می‌رود. اگر آلاینده‌ای وجود داشته باشد، با ظهور پیک اضافی مشخص می‌شود. سطح زیر این پیک‌ها، تخمین تقریبی از میزان آلاینده در اختیار می‌گذارد. این فن برای ارزیابی موثر بودن فرایندهای خالص سازی به کار می‌رود.

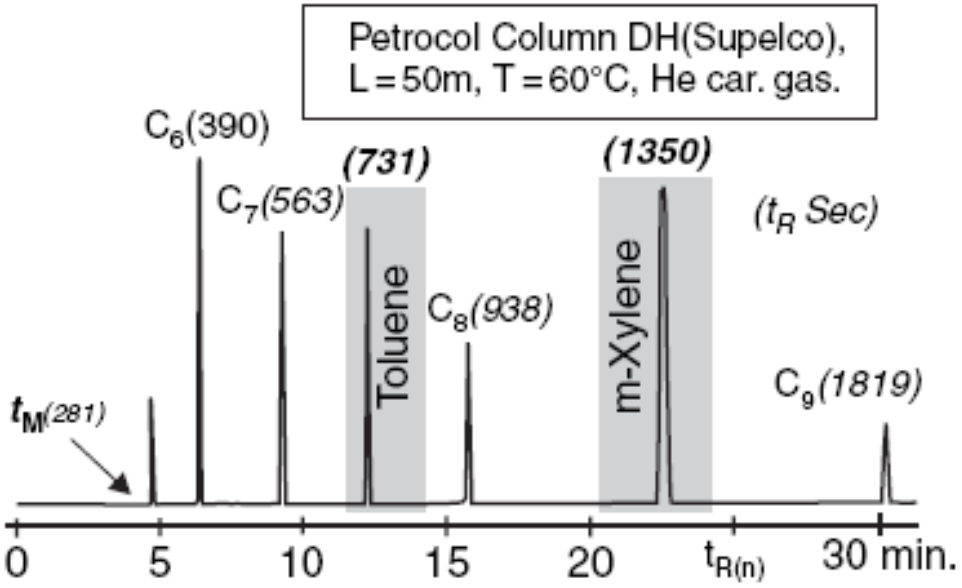
شاخص بازداری کواتس

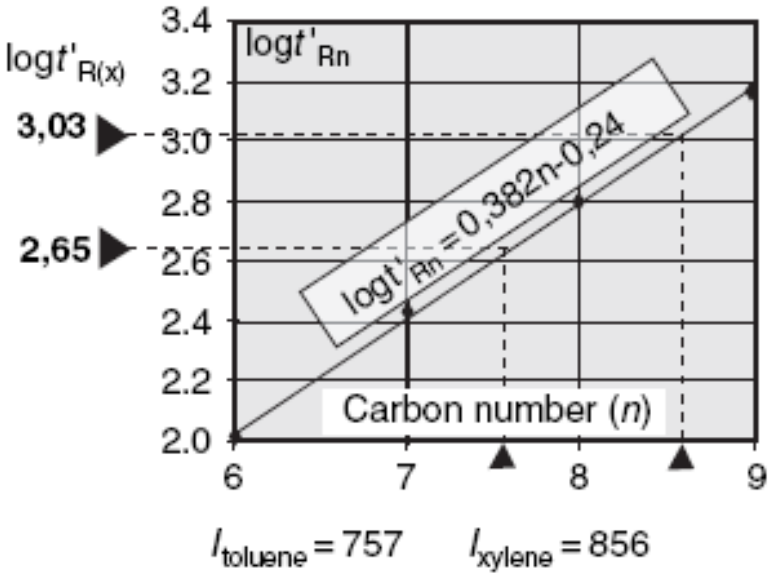
شاخص بازداری I اولین بار در سال ۱۹۵۸ توسط کواتس به عنوان یک پارامتر برای شناسایی مواد حل شونده با استفاده از کروماتوگرام‌ها تعریف شد. شاخص بازداری هر ماده حل شونده با استفاده از کروماتوگرام مخلوطی از جسم حل شونده با حداقل دو آلکان نرمال که زمان بازداری آن‌ها در دو طرف زمان بازداری ماده حل شونده قرار دارد، به دست می‌آید. بنا بر تعریف، شاخص بازداری یک آلکان نرمال برابر ۱۰۰ ضربدر تعداد کربن‌های موجود در ترکیب در نظر گرفته می‌شود.

در بین یک سری ترکیبات همرده، نمودار لگاریتم بازداری تنظیم شده بر حسب تعداد اتم‌های کربن، خطی است.
با تزریق سری‌های آلکان نرمال به ستون کروماتوگرافی در شرایط همدما لگاریتم بازداری تنظیم شده به صورت خطی با افزایش تعداد کربن‌ها افزایش می‌یابد.
شیب منحنی به دست آمده بستگی به کارایی کلی ستون، نوع ستون و شرایط آزمایش دارد.









کتابخانه‌هایی از شاخص‌های بازداری وجود دارد که با داشتن شاخص بازداری ترکیب مجهول، شناسایی احتمالی آن امکان پذیر می‌گردد.

نحوه محاسبه شاخص بازداری کواتس برای کروماتوگرافی گازی همدما

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{log(t'_{r(unknown)}) - log(t'_{r(n)})}{log(t'_{r(N)}) - log(t'_{r(n)})} \right]$$

n = تعداد اتم‌های کربن آلکان کوچکتر

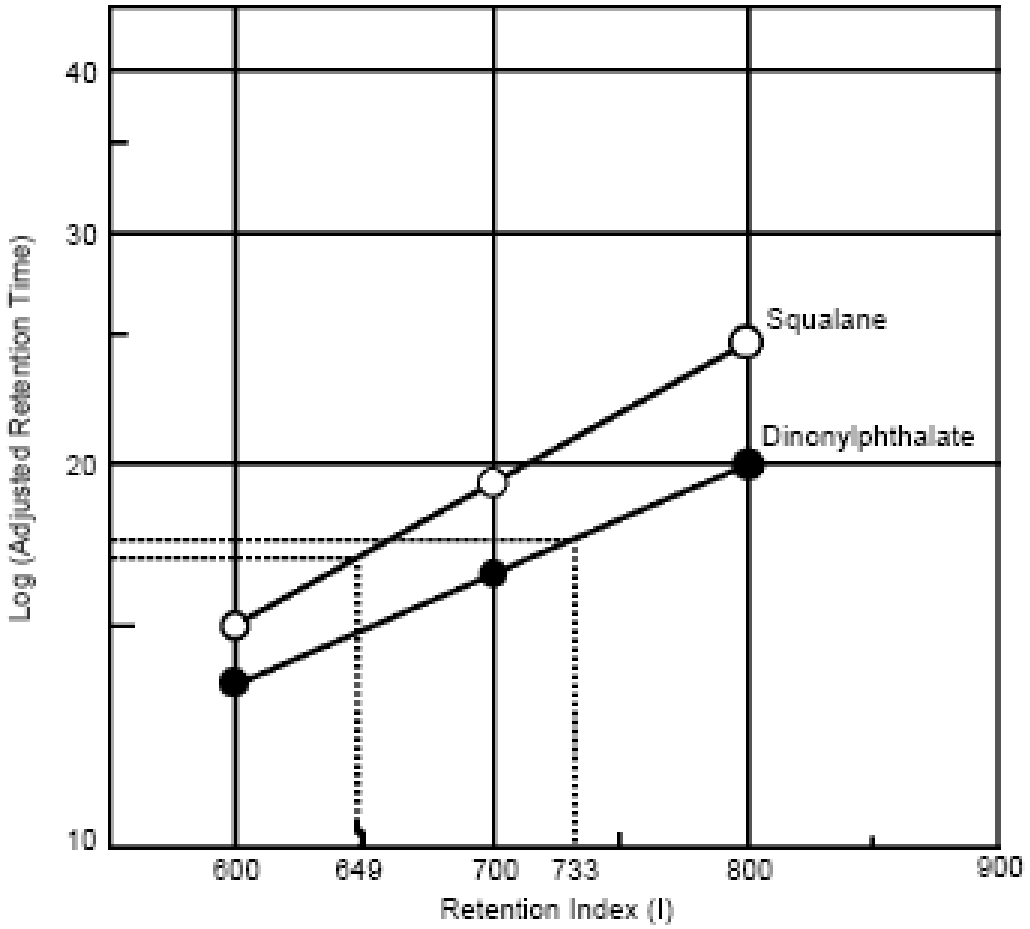
N = تعداد اتم‌های کربن آلکان بزرگتر

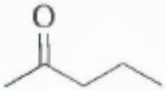
t'_r = زمان بازداری تنظیم شده

نحوه محاسبه شاخص بازداری کواتس برای کروماتوگرافی با گرادیان دمایی

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{t_{r(unknown)} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)} } \right]$$

شاخص بازداری برای یک آلکان نرمال مستقل از دما و ستون پرکننده است. بنابراین، I برای هپتان طبق تعریف همیشه ۷۰۰ است. برعکس، شاخص بازداری تمام مواد حل شونده دیگر ممکن است از ستونی به ستون دیگر تغییر کند.



Phase	Retention index[a]				
	Benzene b.p. 80°C	Butanol b.p. 117°C	 2-Pentanone b.p. 102°C	1-Nitropropane b.p. 132°C	Pyridine b.p. 116°C
Poly(dimethylsiloxane)	657	648	670	708	737
(Diphenyl)$_{0.05}$(dimethyl)$_{0.95}$-polysiloxane	672	664	691	745	761
(Diphenyl)$_{0.35}$(dimethyl)$_{0.65}$-polysiloxane	754	717	777	871	879
(Cyanopropylphenyl)$_{0.14}$-(dimethyl)$_{0.86}$polysiloxane	726	773	784	880	852
(Diphenyl)$_{0.65}$(dimethyl)$_{0.35}$-polysiloxane	797	779	824	941	943
Poly(ethylene glycol)	956	1 142	987	1 217	1 185
(Biscyanopropyl)$_{0.9}$-(cyanopropylphenyl)$_{0.1}$-polysiloxane	1 061	1 232	1 174	1 409	1 331

کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

کروماتوگرافی مایع یکی از انواع کروماتوگرافی است که فاز متحرک در آن مایع است که **۴ نوع اصلی** آن عبارتند از :

۱- کروماتوگرافی تقسیمی (Partition Chromatography)

۲- کروماتوگرافی جذب سطحی (Adsorption Chromatography)

۳- کروماتوگرافی تبادل یونی (Ion-Exchange Chromatography)

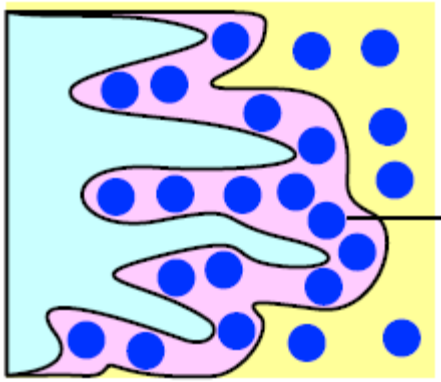
۴- کروماتوگرافی اندازه طردی (Size Exclusion Chromatography)

کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۱- کروماتوگرافی تقسیمی (Partition Chromatography)

کروماتوگرافی تقسیمی در بین چهار روش کروماتوگرافی مایع، بیشتر از همه به کار برده شده است.

❑ **کروماتوگرافی مایع مایع (LLC):** یک فاز ساکن مایع روی سطح پرکننده به وسیله جذب سطحی فیزیکی نگه داشته می‌شود.



حل شونده‌ها در فاز متحرکی که به وسیله جذب سطحی فیزیکی نگه داشته شده است، حل می‌گردند.

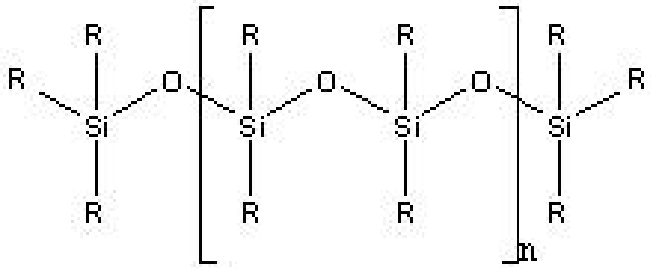
❑ **کروماتوگرافی فاز- پیوندی (Bonded-phase chromatography):** فاز ساکن به طور شیمیایی به سطح تکیه‌گاه متصل شده است. امروزه این روش متداول تر از روش کروماتوگرافی مایع مایع می‌باشد.

جداسازی حل شونده‌ها بر مبنای قابلیت متفاوتشان در تقسیم بین فاز متحرک و فاز ساکن می‌باشد.

کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

ستون‌های کروماتوگرافی فاز- پیوندی

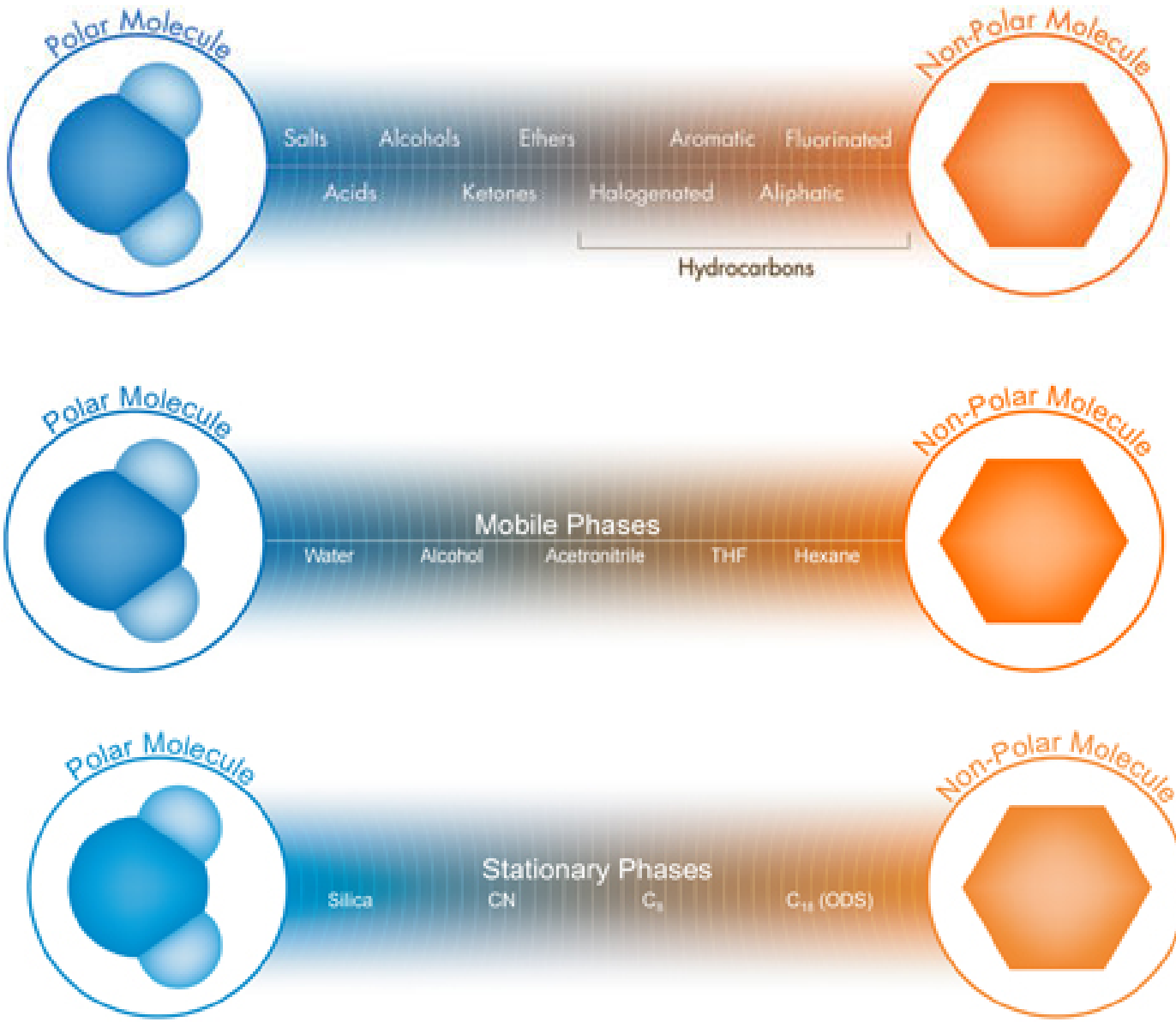
تقریبا تمام پرکننده‌های فاز-پیوندی از سیلیس صلب یا ترکیبات پایه سیلیسی تهیه می‌شوند. این جامدات به صورت ذرات یکنواخت، متخلخل و از نظر مکانیکی محکم معمولا با قطرهای ۳، ۵ یا ۱۰ میکرومتر تشکیل می‌شوند.



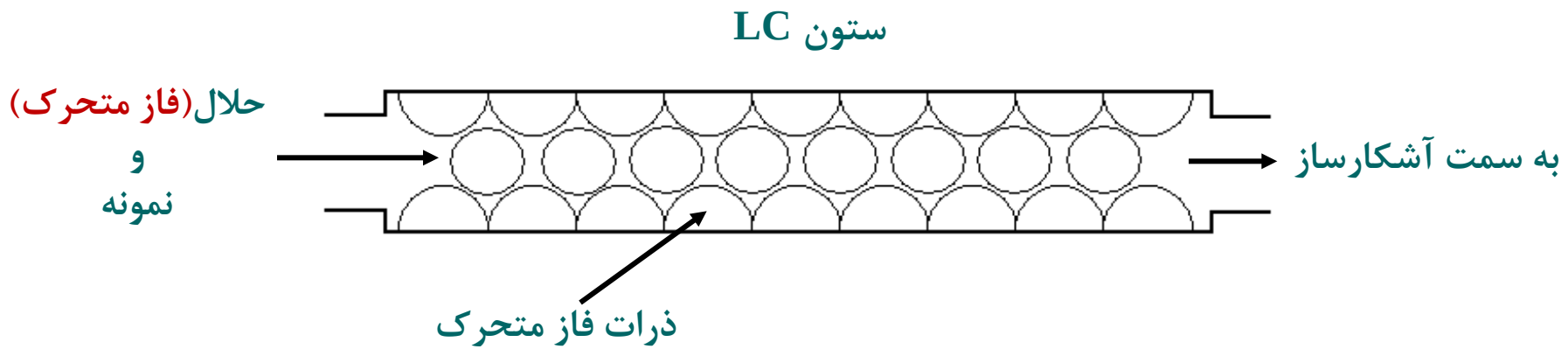
دو نوع کروماتوگرافی بر پایه قطبیت‌های نسبی فازهای متحرک و ساکن قابل تشخیص است:

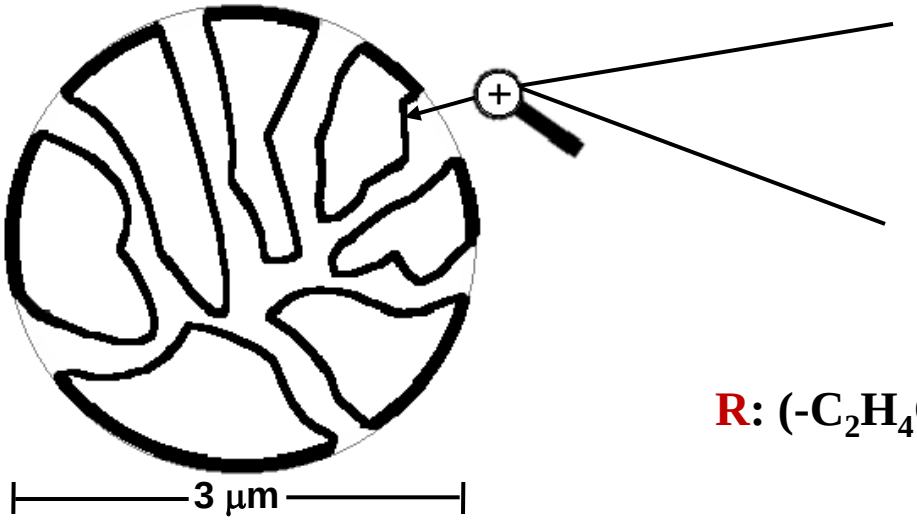
- **کروماتوگرافی فاز نرمال (Normal phase):** فاز ساکن قطبی و فاز متحرک نسبتا غیر قطبی (مانند هگزان یا ایزو پروپیل اتر)

- **کروماتوگرافی فاز معکوس (Reverse phase):** فاز ساکن غیر قطبی (اغلب یک هیدروکربن) و فاز متحرک نسبتا قطبی (از قبیل آب، متانول یا استونیتریل)


Polar Molecule
Non-Polar Molecule
Salts
Alcohols
Ethers
Aromatic
Fluorinated
Acids
Ketones
Halogenated
Aliphatic
Hydrocarbons
Polar Molecule
Non-Polar Molecule
Mobile Phases
Water
Alcohol
Acetronitrile
THF
Hexane
Polar Molecule
Non-Polar Molecule
Stationary Phases
Silica
CN
C8
C18 (ODS)

کروماتوگرافی فاز نرمال

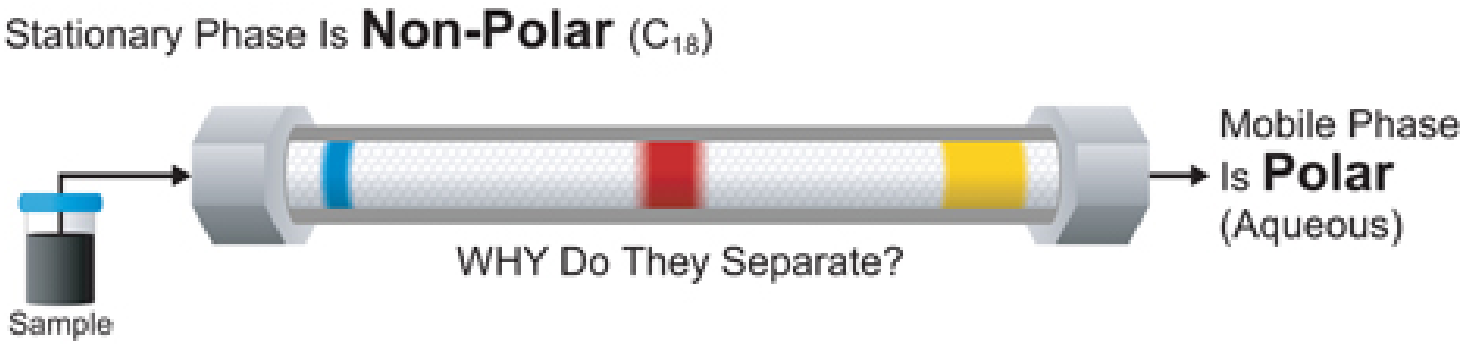


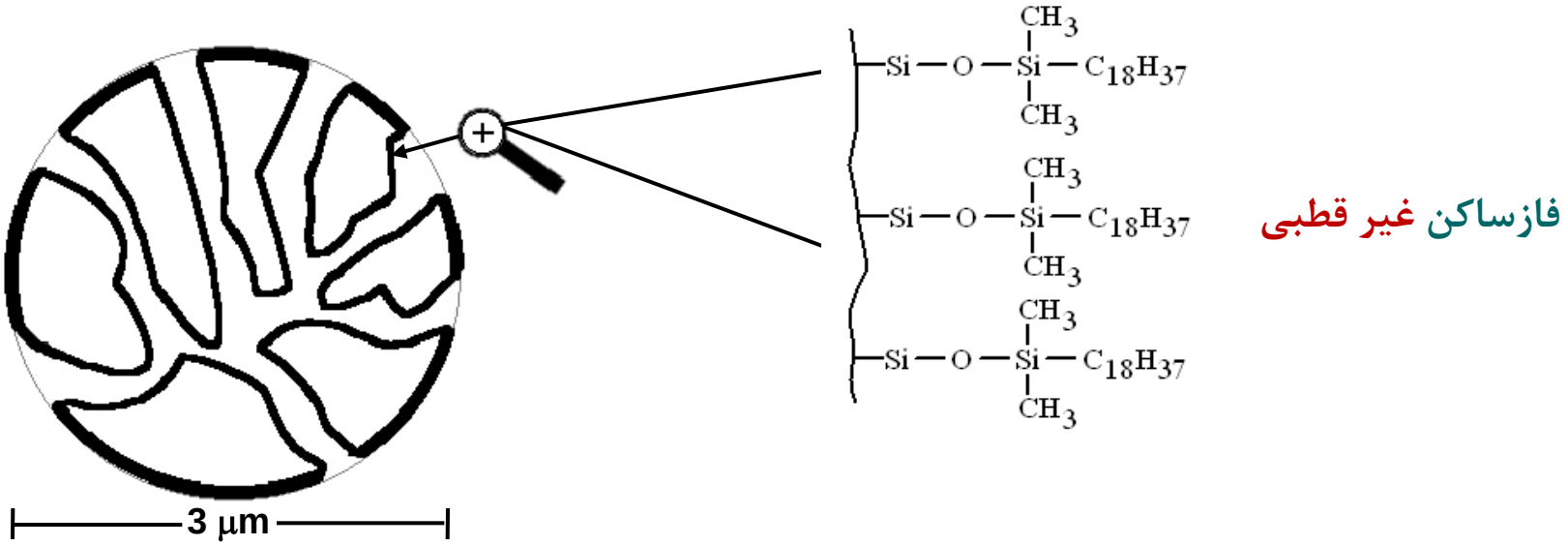


فازساکن قطبی

R: $(-C_2H_4CN)$ سیانو, $(-C_3H_6NH_2)$ آمینو, ...

کروماتوگرافی فاز معکوس



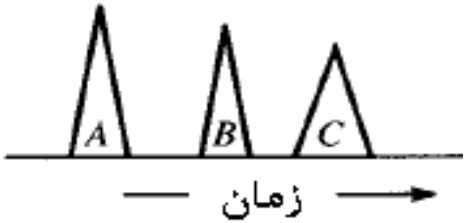


فازساکن غیر قطبی

در کروماتوگرافی فاز نرمال، جزء با **کمترین قطبیت** اول شوییده می‌شود، زیرا از همه بیشتر در فاز متحرک حل می‌شود. با افزایش قطبیت فاز متحرک، زمان شویش کاهش می‌یابد. برعکس، در روش فاز معکوس، **قطبیترین** جزء ابتدا ظاهر می‌شود و افزایش قطبیت فاز متحرک، زمان شویش را افزایش می‌دهد.

کروماتوگرافی فاز معکوس

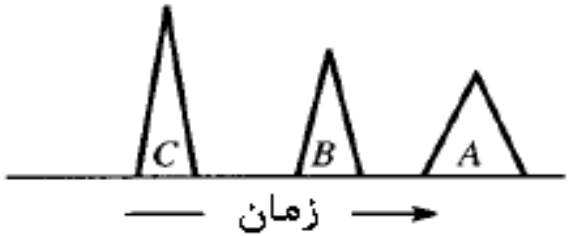
فاز متحرک با قطبیت بالا



فاز متحرک با قطبیت متوسط

کروماتوگرافی فاز نرمال

فاز متحرک با قطبیت پایین

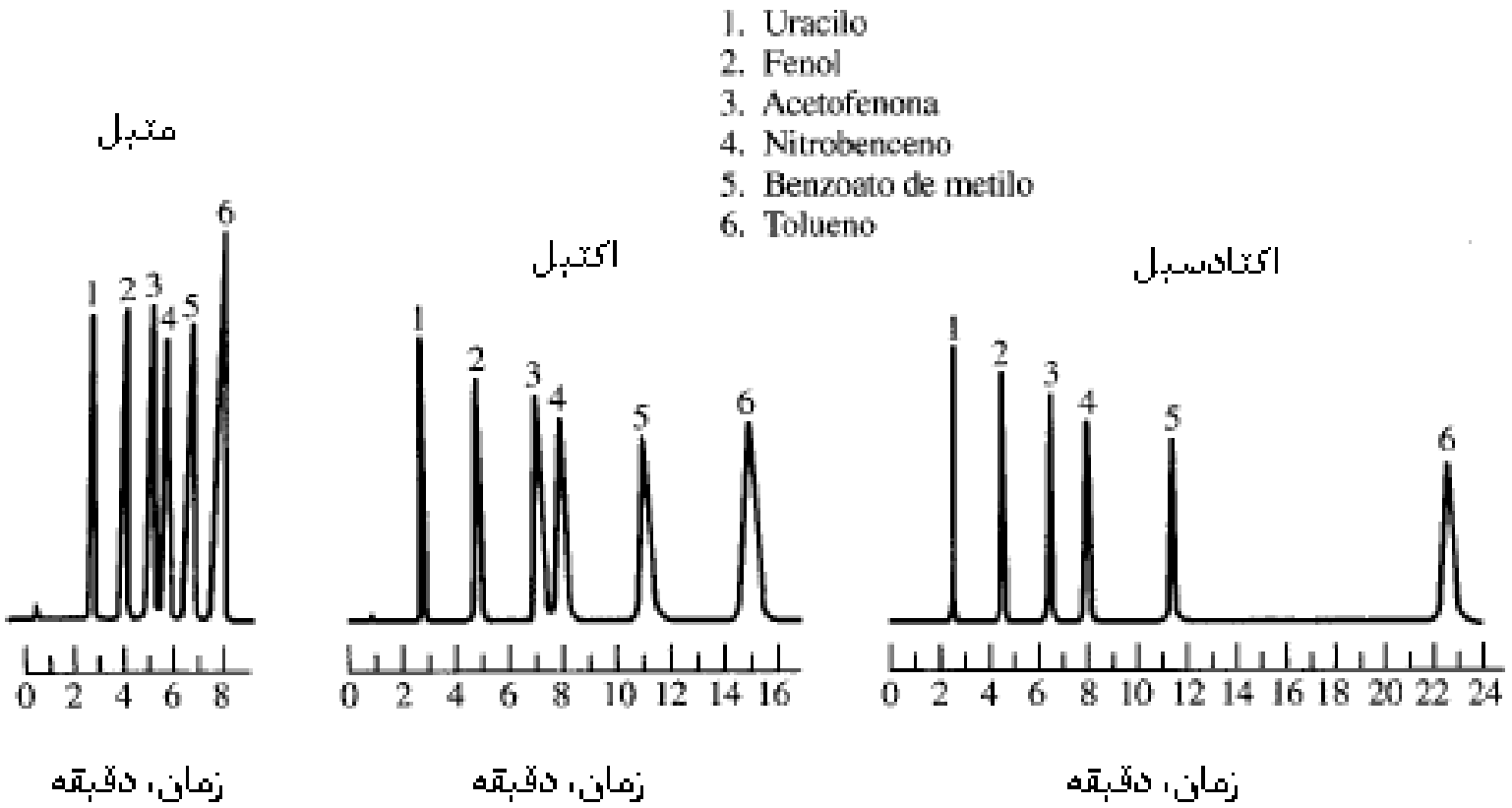


فاز متحرک با قطبیت متوسط

قطبیت حل شونده‌ها: A>B>C

اثر طول زنجیر گروه آلکیل بر عملکرد جداسازی در کروماتوگرافی فاز معکوس

زنجیرهای بلندتر پرکننده‌هایی را تشکیل می‌دهند که بازدارنده‌ترند.



کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۲- کروماتوگرافی جذب سطحی

در این نوع کروماتوگرافی جداسازی بر مبنای تفاوت در جذب سطحی اجزای فاز متحرک و فاز ساکن صورت می‌گیرد. در کروماتوگرافی جذب سطحی، فاز متحرک مایع (حلالی مانند هگزان) و فاز ساکن جامد (مانند آلومین یا سیلیکاژل) است. بنابراین نوع خاصی از کروماتوگرافی مایع – جامد محسوب می‌شود.

در این نوع جداسازی حلال(فاز متحرک) با عبور خود از میان ستون جامد (فاز ساکن) اجزای مخلوط را با خود حمل می‌کند. سرعت حرکت هر جزء، به میزان جذب سطحی آن بر روی ماده داخل ستون بستگی دارد. به این ترتیب سرعت ماده‌ای که کم جذب شده است بیشتر از ماده‌ای که زیاد جذب شده است، خواهد بود و اجزایی که قابلیت جذب بالاتری دارند، در قسمت بالای ستون و اجسامی که قابلیت جذب کمتر دارند در قسمت‌های پایین ستون، جذب خواهند شد. حال اگر اختلاف بین جذب‌های سطحی به حد کافی زیاد باشد، جداسازی مواد، کامل انجام خواهد گرفت.

کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۳- کروماتوگرافی تبادل یونی

کاتیون‌ها و آنیون‌ها تشکیل یک پیوند ضعیف یونی می‌دهند.

- **کاتیون‌ها**: فاز ساکن قطبی (e.g. $R\text{-}SO_3^-$)
  فاز متحرک قطبی (e.g HNO_3 aq.)

- **آنیون‌ها**: فاز ساکن قطبی (e.g. $R\text{-}NR_3^+$)
  فاز متحرک قطبی (e.g Na_2CO_3 aq.)

کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۳- کروماتوگرافی تبادل یونی

فاز متحرک

- فاز متحرک نمونه را در خود حل کرده و انتقال می‌دهد.
- فاز متحرک معمولا محلول می‌باشد.

Anions

- Phthalic acid
- Salicylic acid
- p-Hydroxybenzoic acid
- Benzoic acid
- Borate/Gluconate
- Potassium hydroxide
- Carbonate/Bicarbonate
- Hydroxide
- Borate

…

Cations

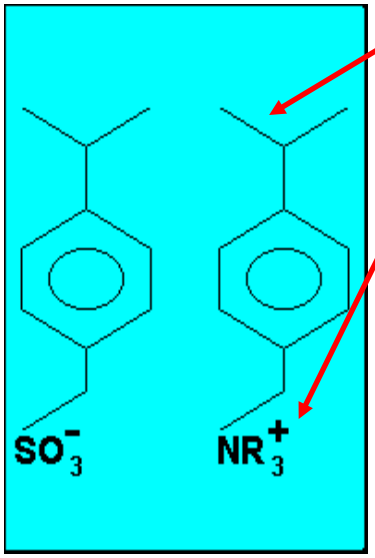
- Tartaric acid/Dipicolinic acid
- Nitric acid
- Tartaric acid
- Tartaric acid/Citric acid
- Sodium dihydrogene phosphate
- Oxalic acid/Ethylene diamine/Acetone

…

کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۳- کروماتوگرافی تبادل یونی

- فاز ساکن



سوبسترا

- Polystyrene / Divinylbenzene
- Polymethacrylate
- Polyvinylalcohol
- Silica gel

تبادلگر کاتیونی

- Sulfonates
- Carboxylates

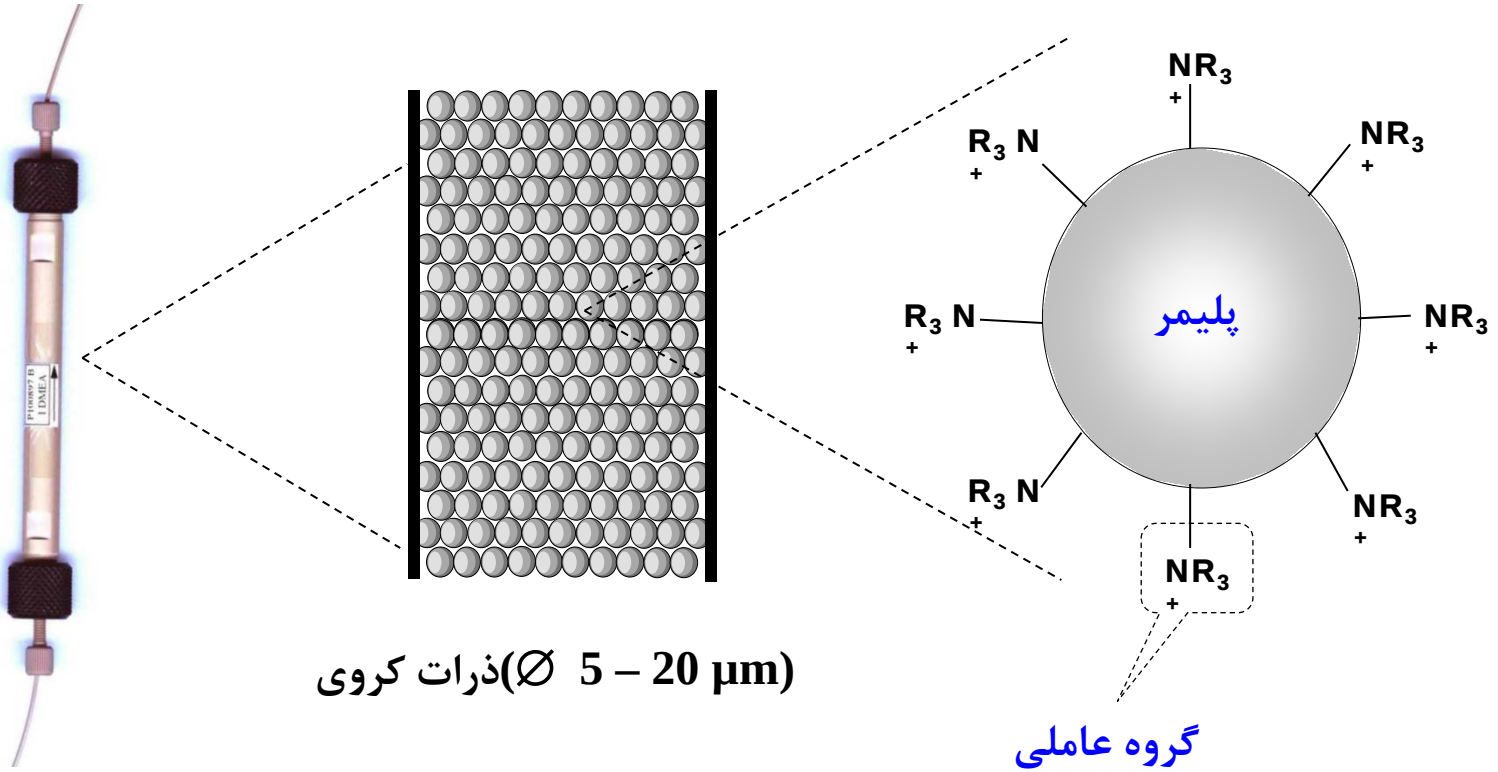
تبادلگر آنیونی

- Quaternary ammonium groups
- Alkyl amines
- Hydroxy-alkylamines

کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۳- کروماتوگرافی تبادل یونی

- فاز ساکن

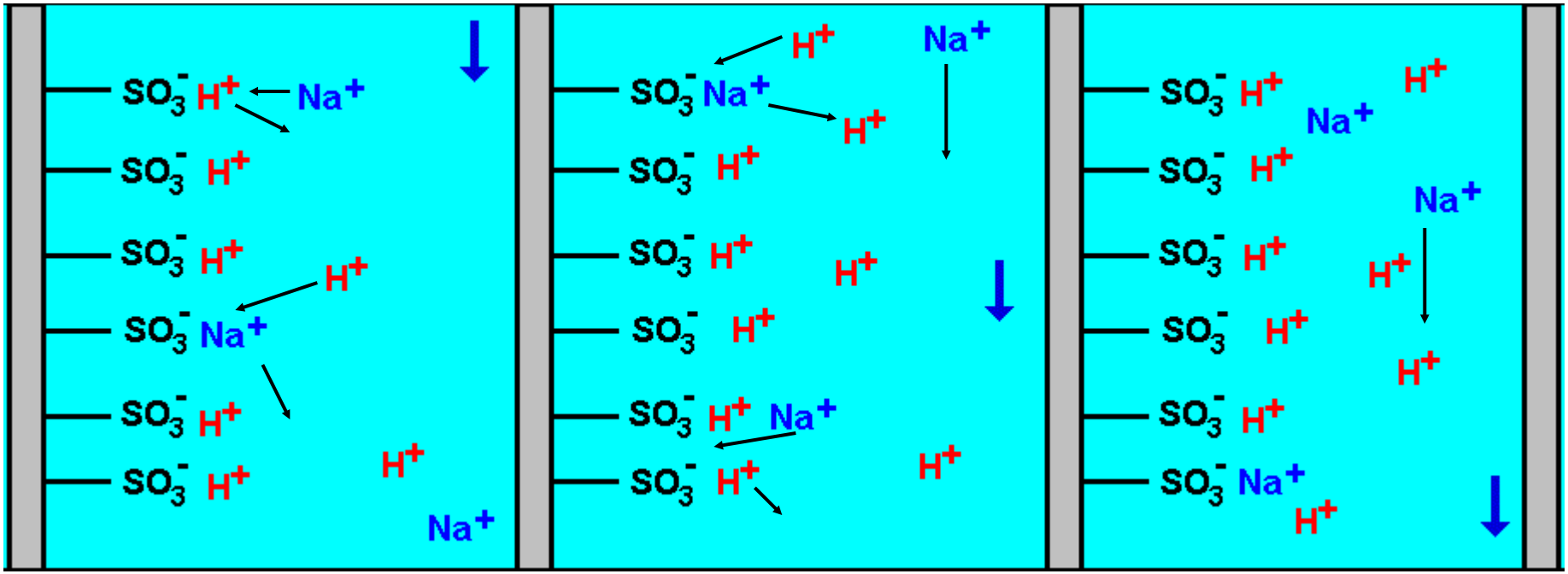


کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۳- کروماتوگرافی تبادل یونی (کاتیونی)

مکانیسم جداسازی کاتیون‌ها

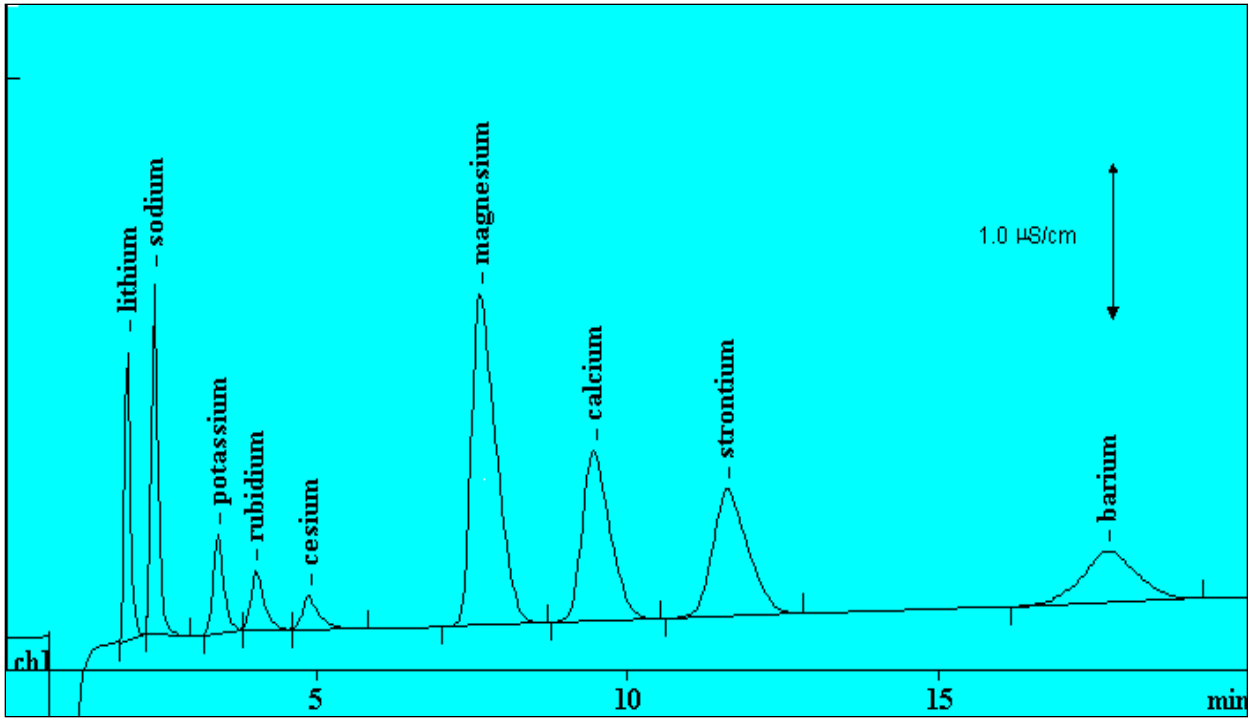
فازهای ساکن و متحرک برای آنالیت به رقابت می‌پردازند.



کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۳- کروماتوگرافی تبادل یونی (کاتیونی)

Cation 1 - 2		
Tartaric acid; 5.0 mmol/L		
1	Lithium	10
2	Sodium	10
3	Potassium	10
4	Rubidium	10
5	Cesium	10
6	Magnesium	10
7	Calcium	10
8	Strontium	10
9	Barium	10
		ppm

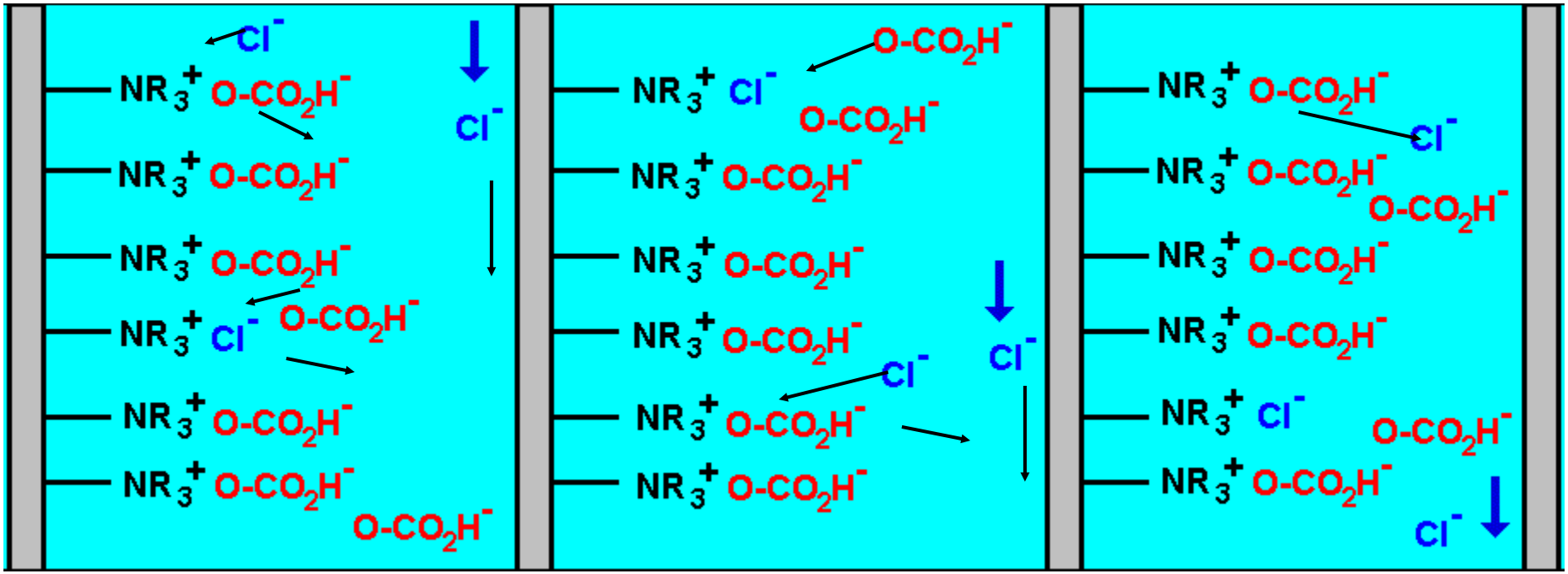


کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۳- کروماتوگرافی تبادل یونی (آنیونی)

مکانیسم جداسازی آنیون‌ها

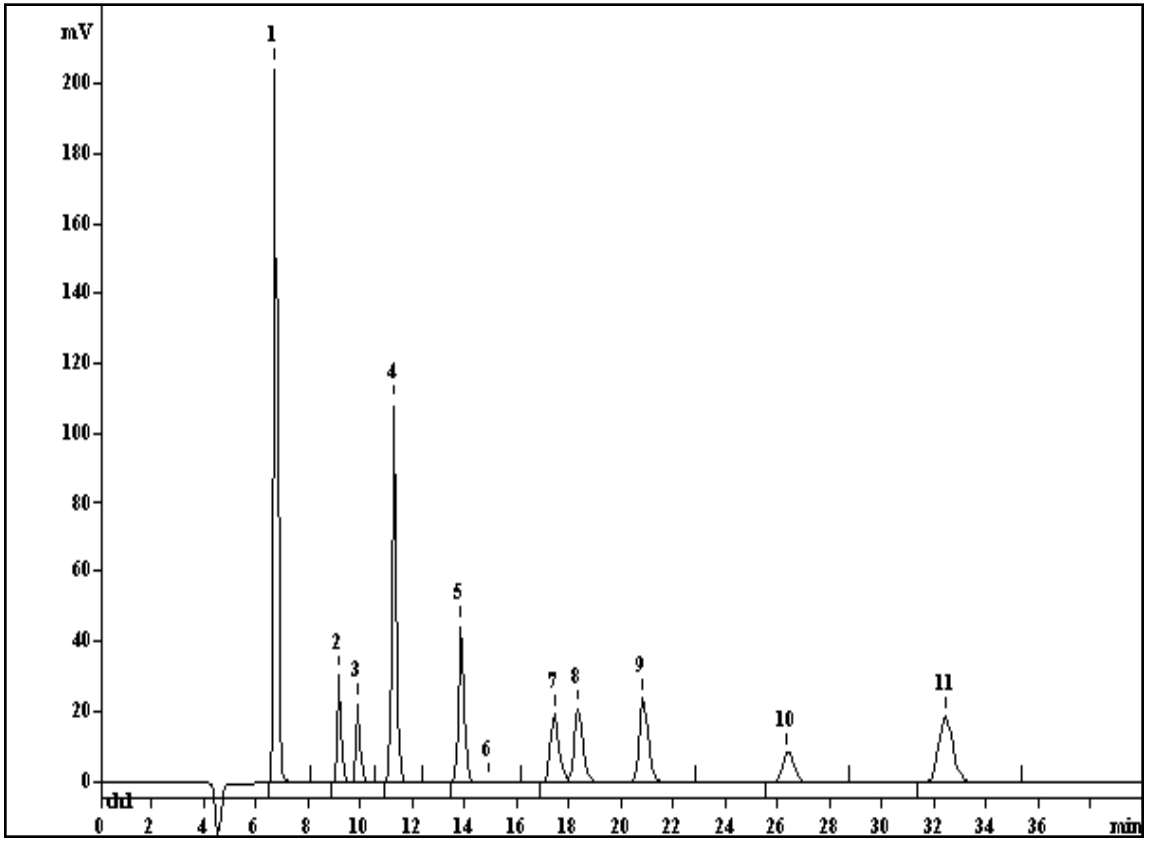
فازهای ساکن و متحرک برای آنالیت به رقابت می‌پردازند.



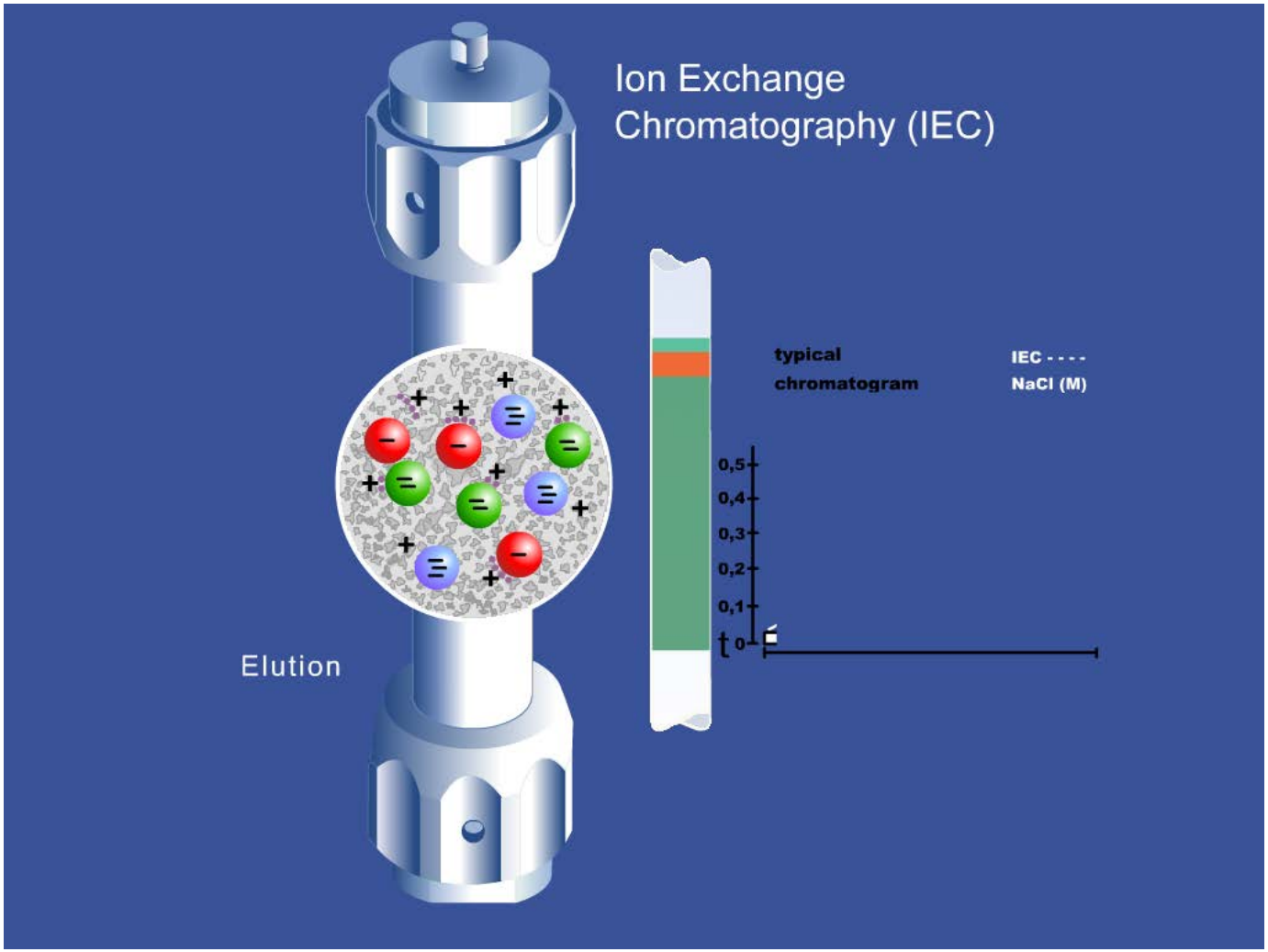
کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۳- کروماتوگرافی تبادل یونی (آنیونی)

A Supp 5 – 250		
$NaHCO_3/Na_2CO_3$; 1/3.2 mmol/L		
1	Fluoride	5.0
2	Chlorite	5.0
3	Bromate	5.0
4	Chloride	5.0
5	Nitrite	5.0
7	Chlorate	5.0
8	Bromide	5.0
9	Nitrate	5.0
10	Phosphate	5.0
11	Sulfate	5.0
		ppm



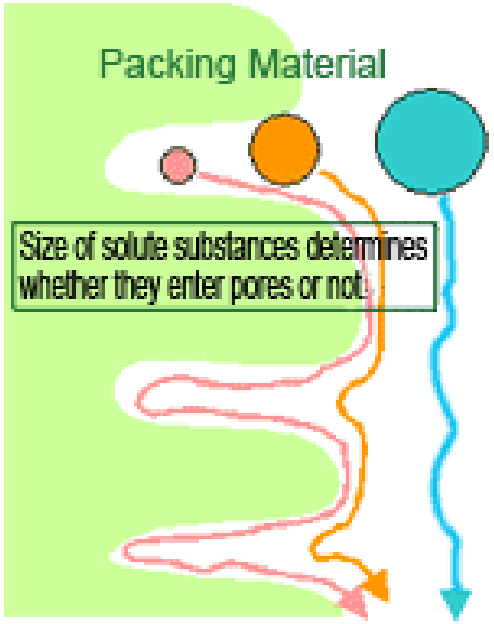
کروماتوگرافی تبادل یونی (انیمیشن)



کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography)

۴- کروماتوگرافی اندازه طردی (SEC)

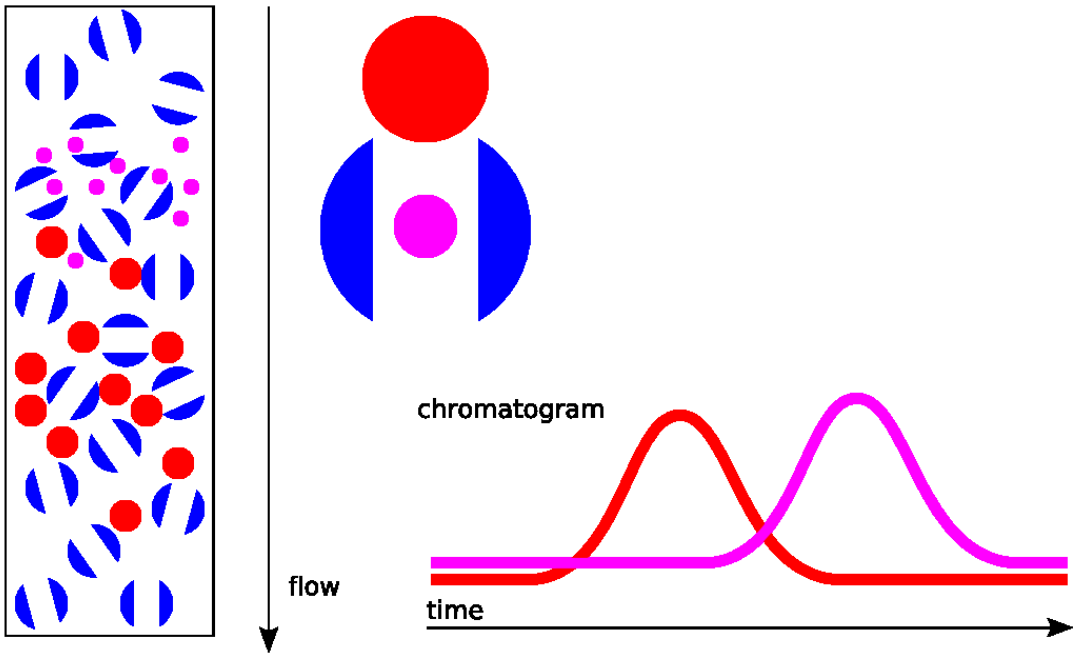
روشی است که مولکول‌ها بر مبنای اندازه موثر و شکل آن در محلول از یکدیگر جدا می‌شوند و اگر از حلال‌های آلی و مواد پرکننده آبگریز استفاده کنیم این روش اغلب کروماتوگرافی ژل تراوا (Gel Permeation Chromatography (GPC)) و اگر از حلال‌های آبی و مواد پرکننده آبدوست استفاده نماییم آن را کروماتوگرافی ژل صافی (Gel Filtration Chromatography (GFC)) می‌نامند.



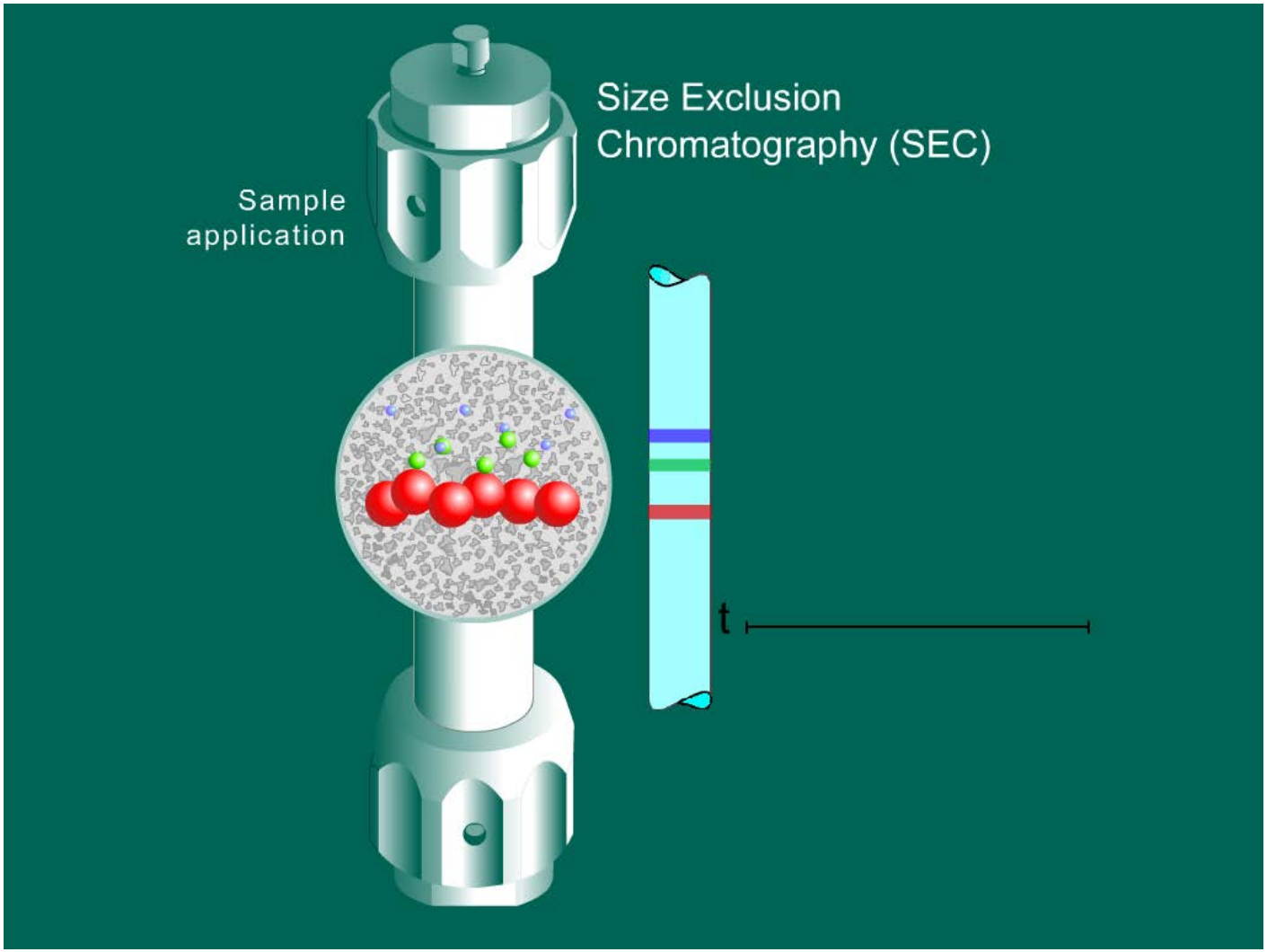
فازهای ساکن مورد استفاده در کروماتوگرافی اندازه طردی، ذرات متخلخل با اندازه منافذ کنترل شده می‌باشند و نباید بین جزء نمونه و سطح فاز ساکن برهم کنش موجود باشد. ستون کروماتوگرافی به طور کامل با حلالی که به عنوان فاز متحرک استفاده می‌شود، پر می‌گردد. اندازه منافذ بحرانی است، از اینرو اساس جداسازی این است که ملکول‌های بزرگتر از این اندازه بحرانی، به طورکلی از این منافذ طرد می‌شوند و داخل منافذ، برای ملکول‌های کوچکتر قابل دستیابی می‌باشد. جریان فاز متحرک باعث خواهد شد که ملکول‌های بزرگتر بدون نفوذ در ماتریس ژل از میان ستون بگذرند، در حالی‌که ملکول‌های کوچکتر بسته به نفوذشان در ژل بازداری می‌شوند. به دلیل آن‌که مولکول‌های بزرگ نمی‌توانند در ژل نفوذ کنند، از ستون شسته و خارج می‌شوند. بنابراین ملکول‌های بزرگتر اول خارج می‌گردند.

تمام گونه هایی که به طور کامل از ژل طرد می‌شوند از یکدیگر جداسازی نمی‌شوند و به طور مشابه ملکول‌های کوچکی که کاملا" در ژل نفوذ کنند جداسازی نمی‌شوند. ملکول‌هایی با اندازه حد واسط بسته به درجه نفوذشان در ژل بازداری می‌شوند.

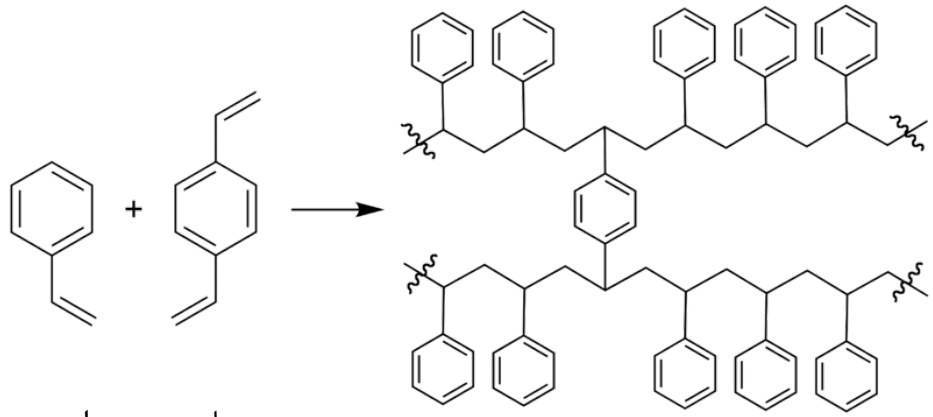
در ابتدا ژل کروماتوگرافی برای جداسازی مواد بیولوژیکی بکار رفت، زیرا اولین ژل دکستران با اتصالات عرضی برای استفاده با سیستم های آبی مناسب بودند. در ۱۹۶۴ ژل‌های پلی استایرن با اتصالات عرضی مناسب استفاده با حلال‌های آلی برای اولین بار تهیه شدند. کاربرد این روش نه تنها برای جداسازی، بلکه برای تعیین جرم ملکولی نسبی بکار می‌رود.



کروماتوگرافی اندازه طردی (انیمیشن)

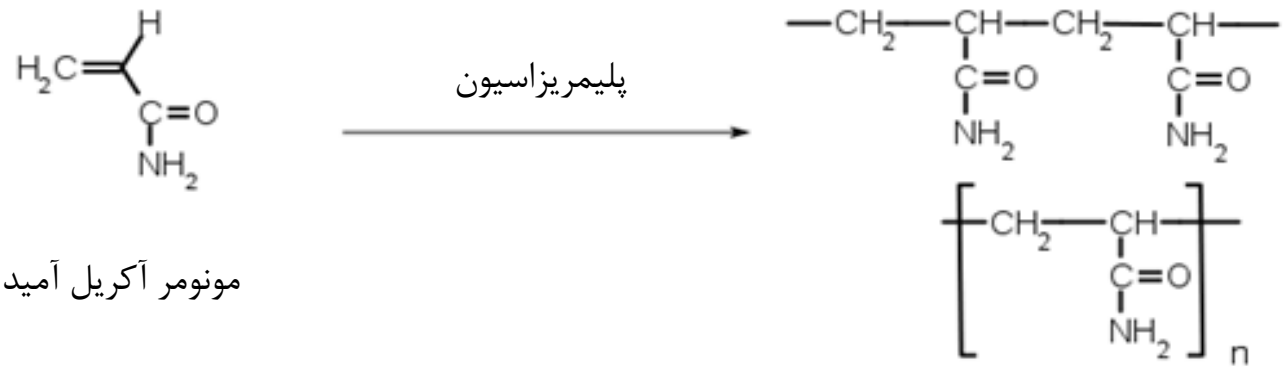


اکثر کروماتوگرافی اندازه طردی اولیه با همبسپارهای استیرن-دی وینیل بنزن با اتصال عرضی انجام می‌شد. در ابتدا این ژل‌ها آبگریز بودند و بنابراین تنها می‌توانستند با فازهای متحرک غیر آبی به کار گرفته شوند. امروزه ژل‌های آبدوست در دسترس قرار دارند و کاربرد حلال‌های آبی را برای جداسازی مولکول‌های بزرگ محلول در آب مثل قندها ممکن می‌سازند. این ژل‌های آبدوست معمولا دی وینیل بنزن سولفون دار شده یا پلی آکریل آمیدها هستند.



استیرن دی وینیل بنزن

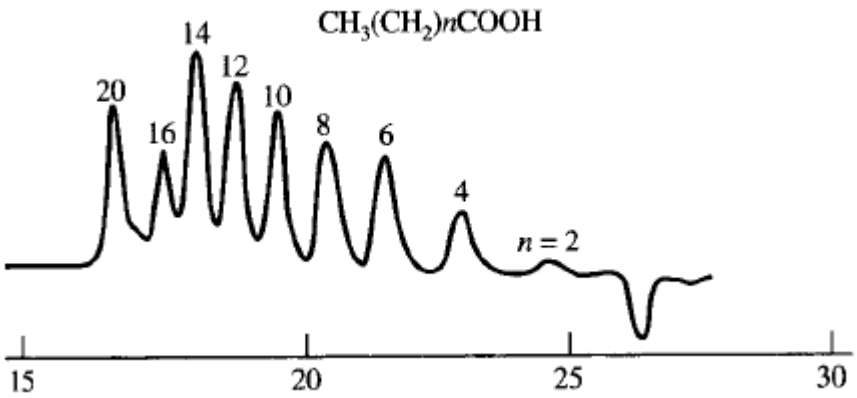
همبسپارهای استیرن-دی وینیل بنزن



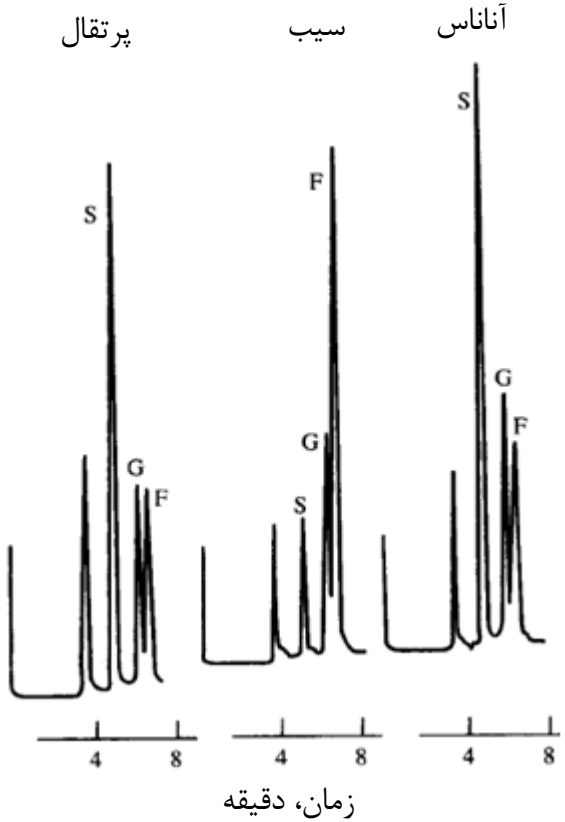
مونومر آکریل آمید

پلی آکریل آمید

یک کاربرد مفید روش ژل صافی، جداسازی مولکول‌های محصولات طبیعی با وزن مولکولی بزرگ از گونه‌های با وزن مولکولی کوچک و از نمک‌هاست. مثلا، یک ژل با حد طرد چند هزار، می‌تواند به راحتی پروتیین‌ها را از آمینواسیدها و پپتیدهای با وزن مولکولی کوچک جدا کند.
کاربرد مفید کروماتوگرافی ژل تراوا، جداسازی ترکیبات همرده و چند پار است.



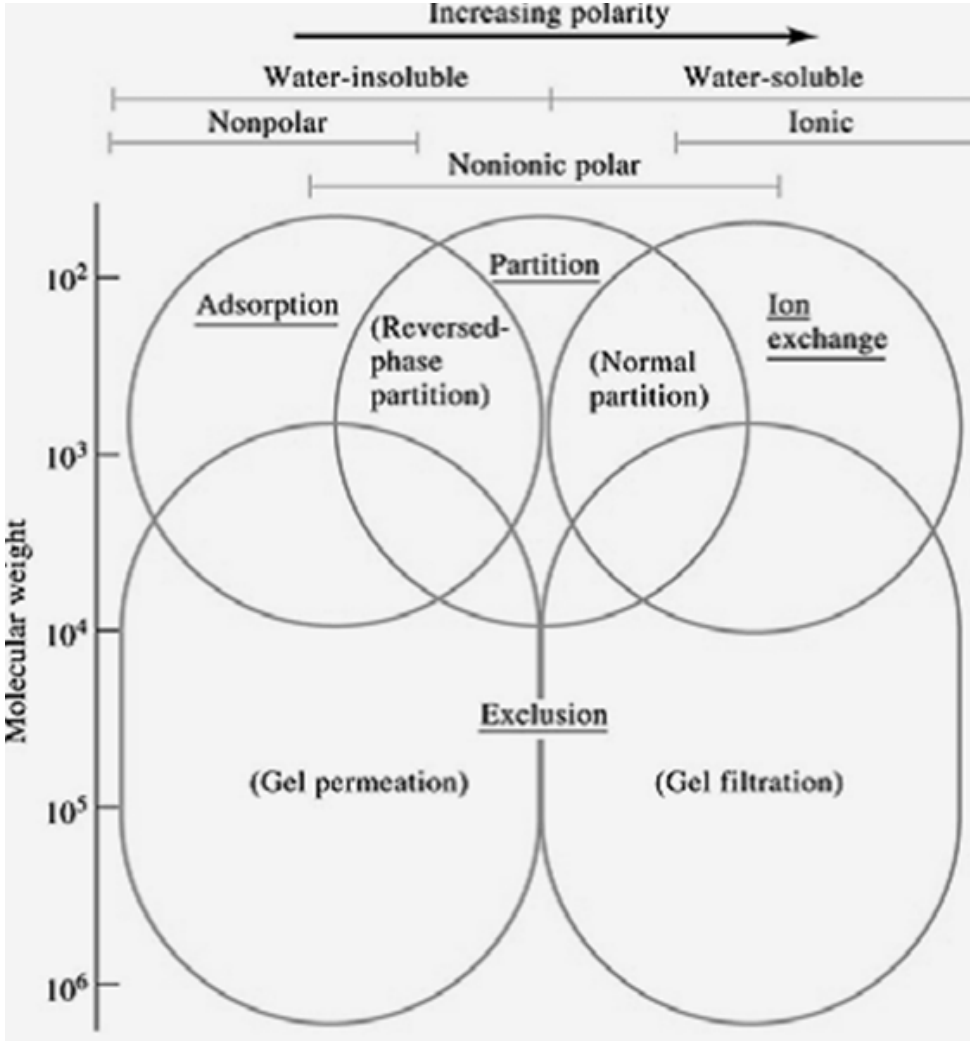
جداسازی اسیدهای چرب، ستون: پایه پلی استیرن
فاز متحرک: تتراهیدروفوران



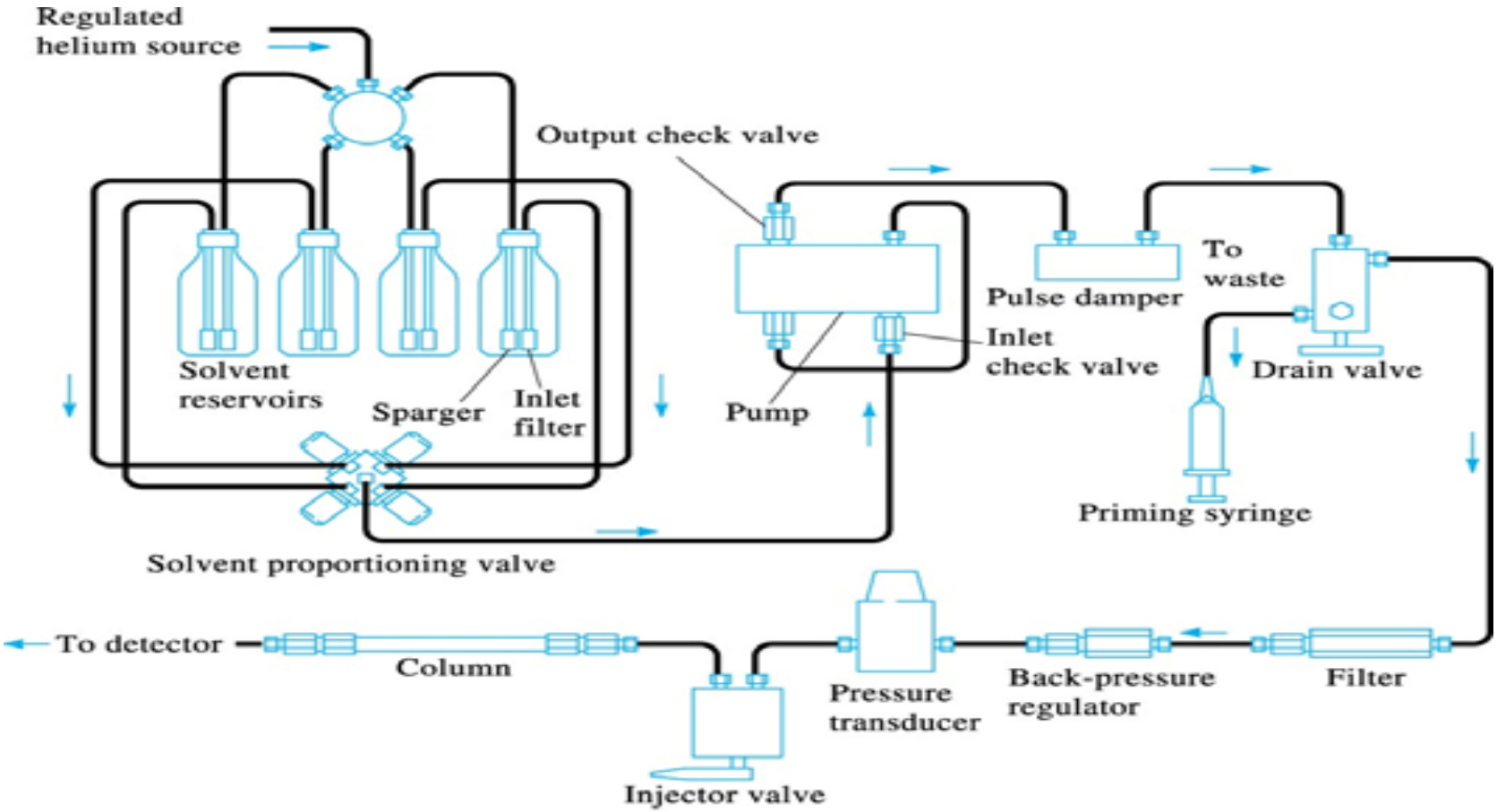
اندازه‌گیری گلوکوز (G)، فروکتوز (F) و ساکاروز (S) در آب میوه
ستون: پلی استیرن سولفون دار شده

کاربردهای کروماتوگرافی مایع

- برای مواد حل شده‌ای که وزن مولکولی بزرگتر از ۱۰۰۰۰ دارند کروماتوگرافی اندازه طردی.
- برای گونه‌های یونی با وزن مولکولی پایین کروماتوگرافی تبادل یونی.
- گونه‌های کوچک قطبی اما نایونی با کروماتوگرافی تقسیمی.
- برای جداسازی گونه‌های ناقطبی، ایزومرهای ساختاری و دسته ترکیباتی از قبیل هیدروکربن‌های آلیفاتیک از الکل‌های آلیفاتیک از کروماتوگرافی جذب سطحی استفاده می‌کنند.



شمایی از دستگاه HPLC



شمایی از دستگاه HPLC

انواع پمپ‌های HPLC

۱- پمپ‌های پیستونی

۲- پمپ‌های جابه‌جایی یا سرنگی

۳- پمپ‌های فشار ثابت یا بادی

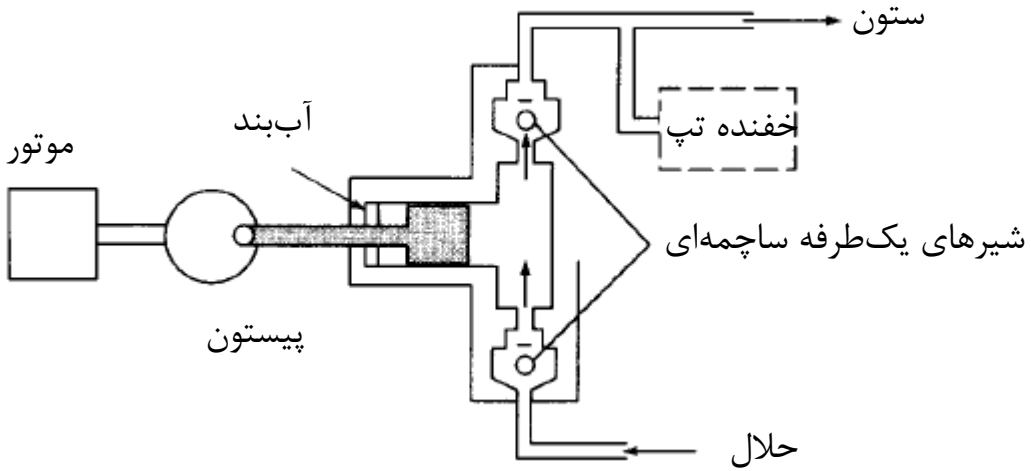
وظیفه اصلی پمپ در کروماتوگرافی مایع این است که فاز متحرک را با فشار بالا با سرعت عبور کنترل شده، از ستون عبور دهد.

ویژگی سیستم‌های پمپ کننده

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

پمپ‌های پیستونی

پمپ‌های پیستونی که امروزه در بیش از ۹۰ ٪ سیستم‌های تجاری HPLC به کار می‌روند، معمولا از یک محفظه کوچک تشکیل شده‌اند که در آن حلال با حرکت رفت و برگشت یک پیستون توسط موتور، پمپ می‌شود. دو شیر یک‌طرفه که متناوبا باز و بسته می‌شوند، جریان حلال به داخل و به خارج از سیلندر را کنترل می‌کنند. حلال در تماس مستقیم با پیستون است یا این‌که ممکن است فشار از طریق یک دیافراگم انعطاف پذیر که خود نیز توسط یک پیستون رفت و برگشتی به طریق هیدرولیکی پمپ می‌شود، به حلال منتقل شود. پمپ‌های پیستونی این عیب را دارند که یک جریان تپی تولید می‌کنند که باید خفیده شود، زیرا وجود آن سبب بروز نوفه (نویز) خط پایه در کروماتوگرام می‌شود. محاسن پمپ‌های پیستونی عبارتند از حجم‌های داخلی کوچک (۳۵ تا ۴۰۰ میکرولیتر)، فشارهای خروجی زیاد (تا ۱۰۰۰۰psi)، قابلیت انطباق آسان با شویش گرادیانی و سرعت‌های جریان ثابت که عمدتا مستقل از پس فشار و گرانروی حلال‌اند.



انواع پمپ‌های HPLC

- **پمپ ایزوکراتیک:** ترکیب ثابتی از فاز متحرک را منتقل می‌کند.
  - حلال باید از قبل مخلوط شود.
  - قیمت آن در مقایسه با پمپ‌های گرادیانی ارزانتر می‌باشد.
- **پمپ گرادیانی:** ترکیب متغیری از فاز متحرک را منتقل می‌کند.
  - می‌توان جهت مخلوط کردن و حمل فاز متحرک ایزوکراتیک و یا فاز متحرک گرادیانی استفاده نمود.

- **پمپ گرادیانی دوتایی:** انتقال دهنده دو حلال

- **پمپ گرادیانی چهارتایی:** انتقال دهنده چهار حلال

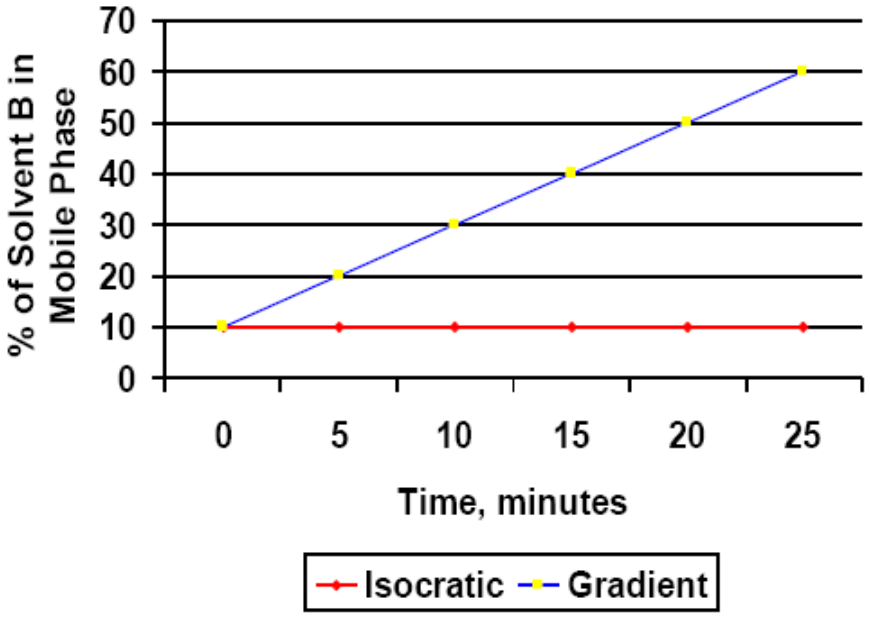
انواع شویش در HPLC

ایزوکراتیک

- با گذشت زمان ترکیب حلال در فاز متحرک ثابت می‌ماند.
- عالی برای جداسازی ساده

گرادیانی

- ترکیب حلال (B) در فاز متحرک با گذشت زمان بیشتر می‌شود.
- عالی برای آنالیز نمونه‌های پیچیده
- استفاده در توسعه روش برای مخلوط‌های ناشناخته
- گرادیان خطی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

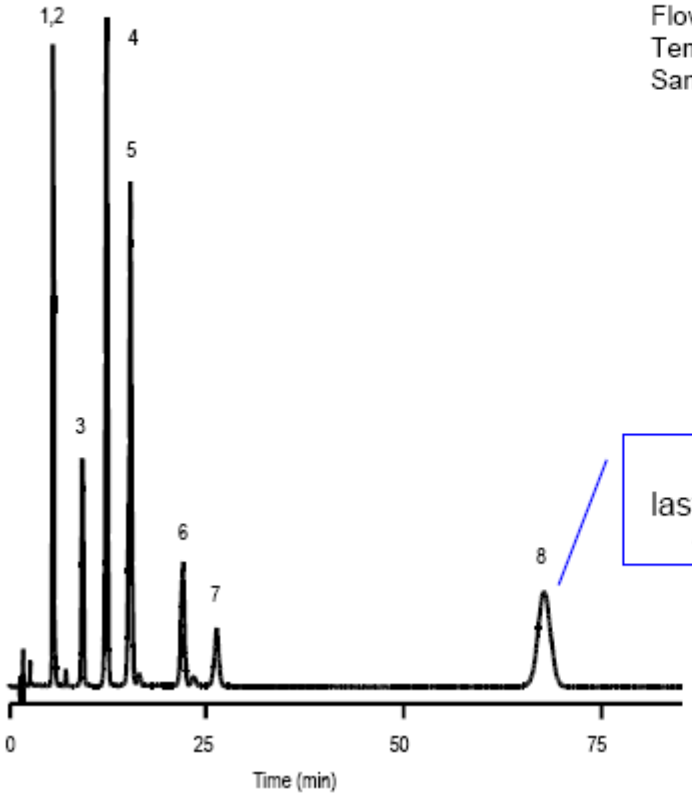


جداسازی علف‌کش‌ها

Isocratic Elution

70% water/30% Acetonitrile

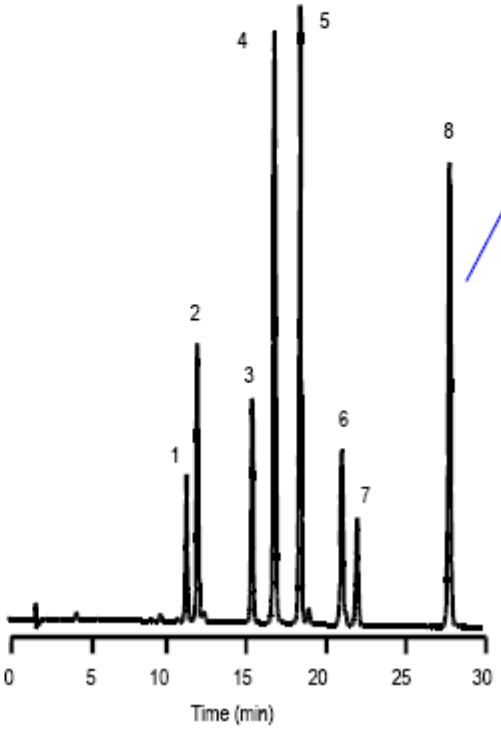
Column:	**ZORBAX SB-C18**
	4.6 x 150 mm, 5 µm
Mobile Phase:	A: H_2O with 0.1% TFA, pH 2
	B: Acetonitrile
Flow Rate:	1.0 mL/min
Temperature:	35°C
Sample:	1. Tebuthiuron
	2. Prometon
	3. Prometryne
	4. Atrazine
	5. Bentazon
	6. Propazine
	7. Propanil
	8. Metolachlor



Note:
last peak eluted in ~70 minutes

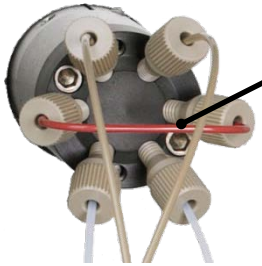
Gradient Elution

20 – 60% Acetonitrile in water in 30 min.



Note:
last peak eluted in ~ 28 minutes and it is sharper

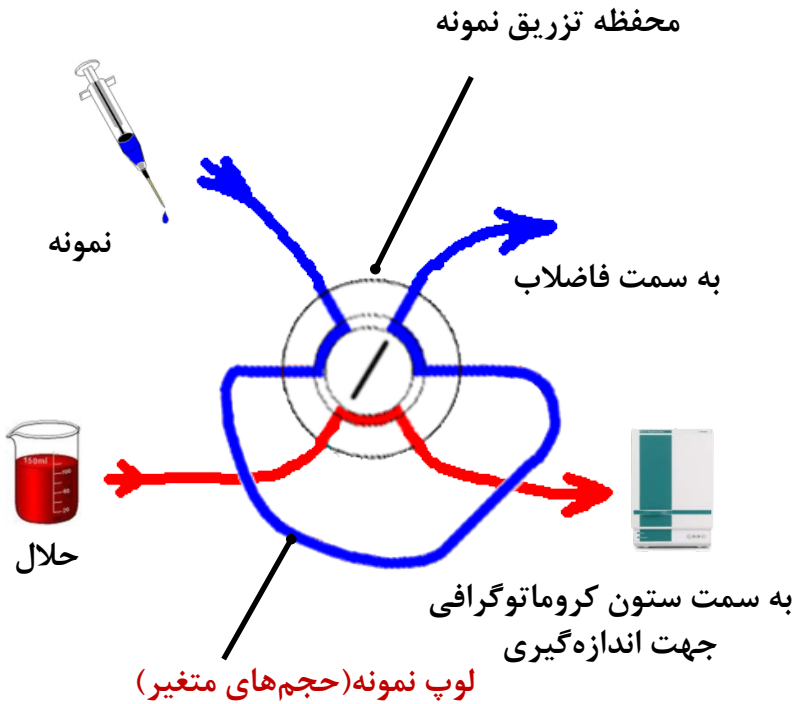
سیستم تزریق نمونه

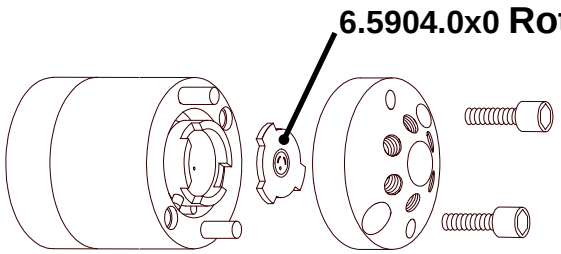


لوپ نمونه (۱۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر)

محفظه تزریق نمونه

محفظه تزریق نمونه جهت وارد کردن نمونه به فاز متحرک استفاده می‌شود. این محفظه دارای دو موقعیت می‌باشد. موقعیت **Fill** که لوپ از نمونه پر می‌شود و موقعیت **Inject** که نمونه با فاز متحرک وارد ستون کروماتوگرافی می‌گردد.





آشکارسازها در HPLC

عامل وجودی آشکارگر در HPLC، آشکار کردن فاز متحرکی است که از ستون بیرون می‌آید. یک سری گسترده از وسایلی که بعضی از آن‌ها پیچیده و حساس هستند به عنوان آشکارگر مورد استفاده قرار می‌گیرند. آشکارسازها به دو گروه اصلی آشکارسازهای با خاصیت گروهی و آشکارسازهای با خاصیت جسم حل شده طبقه بندی می‌شوند.

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

مشخصات آشکارساز ایده‌آل

آشکارسازها در این روش نیازی ندارد به گستره ای وسیعی از دما جواب بدهد. علاوه بر این برای کاهش پهن شدگی منطقه، آشکار ساز HPLC باید حداقل حجم درونی را داشته باشد.

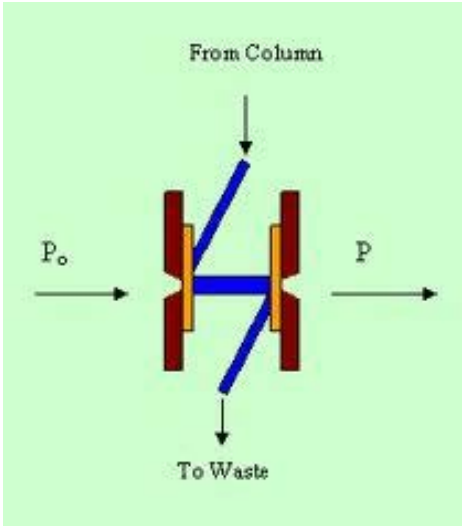
- حساسیت کافی
- پایداری خوب و تکرار پذیر
- قابلیت اعتماد بالا و سهولت کاربرد
- زمان جواب کوتاه که مستقل از سرعت جریان است.

انواع آشکارسازهای HPLC

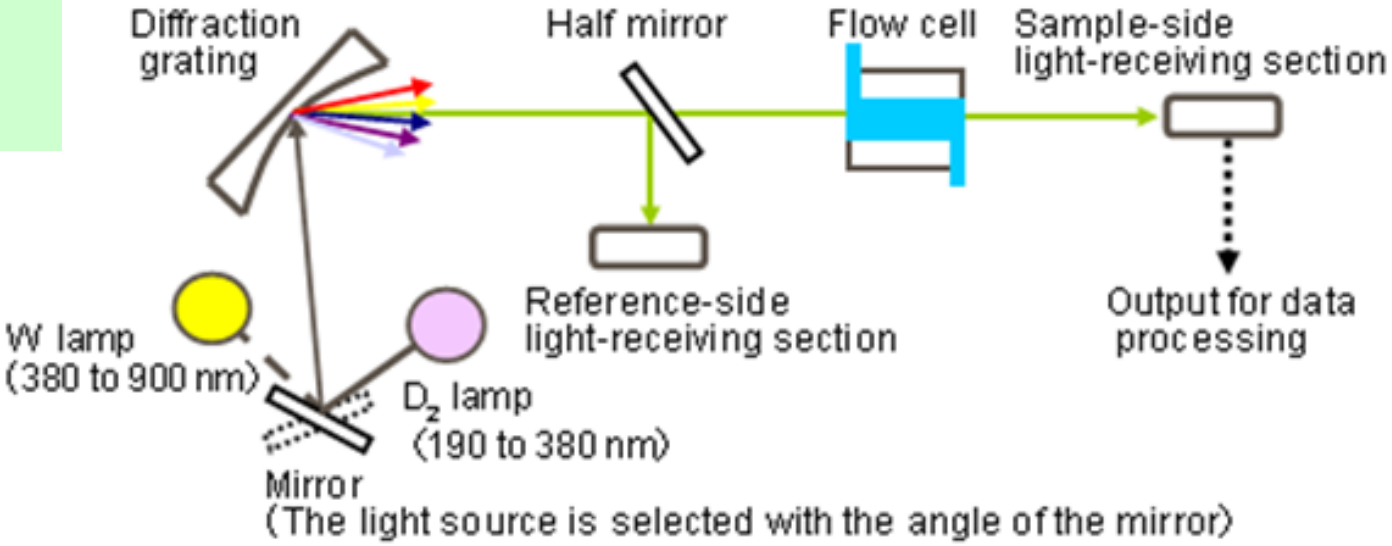
- آشکارساز جذبی
- آشکارساز فلورسانسی
- آشکارساز ضریب شکست
- آشکارساز الکتروشیمیایی
- آشکارساز هدایت سنجی
- آشکارساز طیف سنجی جرمی

آشکارسازهای جذبی

آشکارسازهای جذب عمومی ترین آشکارساز HPLC به حساب می‌آیند. اصول کارکرد آن بر این مبناست که فاز متحرک از ستون به درون محفظه‌ای کوچک جاری می‌شود. محفظه در مقابل اشعه UV/Vis منتشر شده از دستگاه نورسنج یا طیف سنج قرار می‌گیرد. این آشکارسازها انتخابگر بوده و فقط می‌توانند اجزای نمونه‌ای که نور مرئی/ ماورای بنفش را جذب می‌کنند، آشکار سازند.

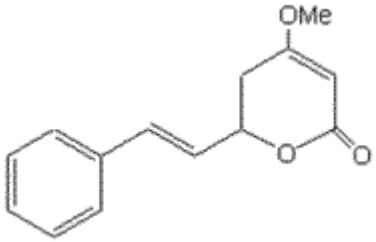


برای به حداقل رساندن پهن شدگی نوار اضافی ستون، حجم چنین سلولی را تا حد امکان کوچک نگه می‌دارد. بنابراین حجم‌ها به ۱تا ۱۰ میکرولیتر و طول سلول‌ها به ۲ تا ۱۰میلی‌لیتر محدود می‌شوند.

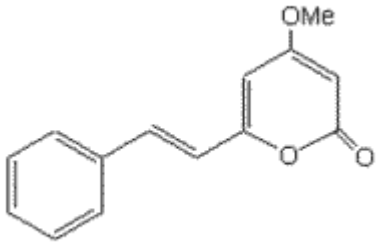


تصویری از یک آشکارساز HPLC

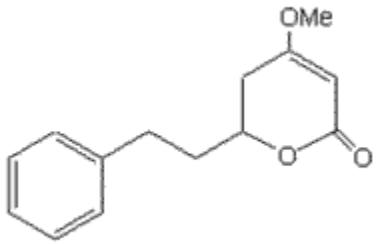
ساختار شیمیایی هفت Kavalactones اصلی



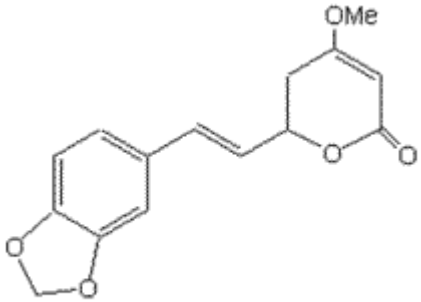
Kavain



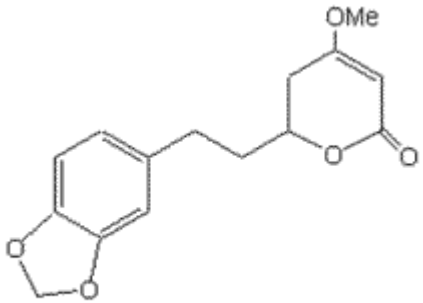
Dehydrokavain



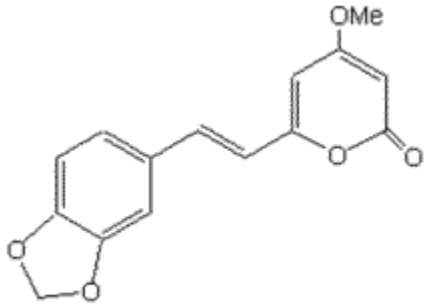
Dihydrokavain



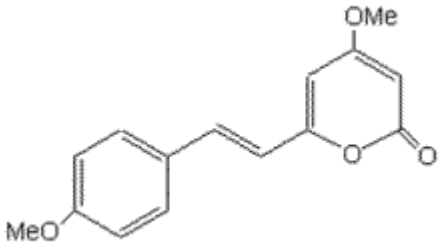
Methysticin



Dihydromethysticin

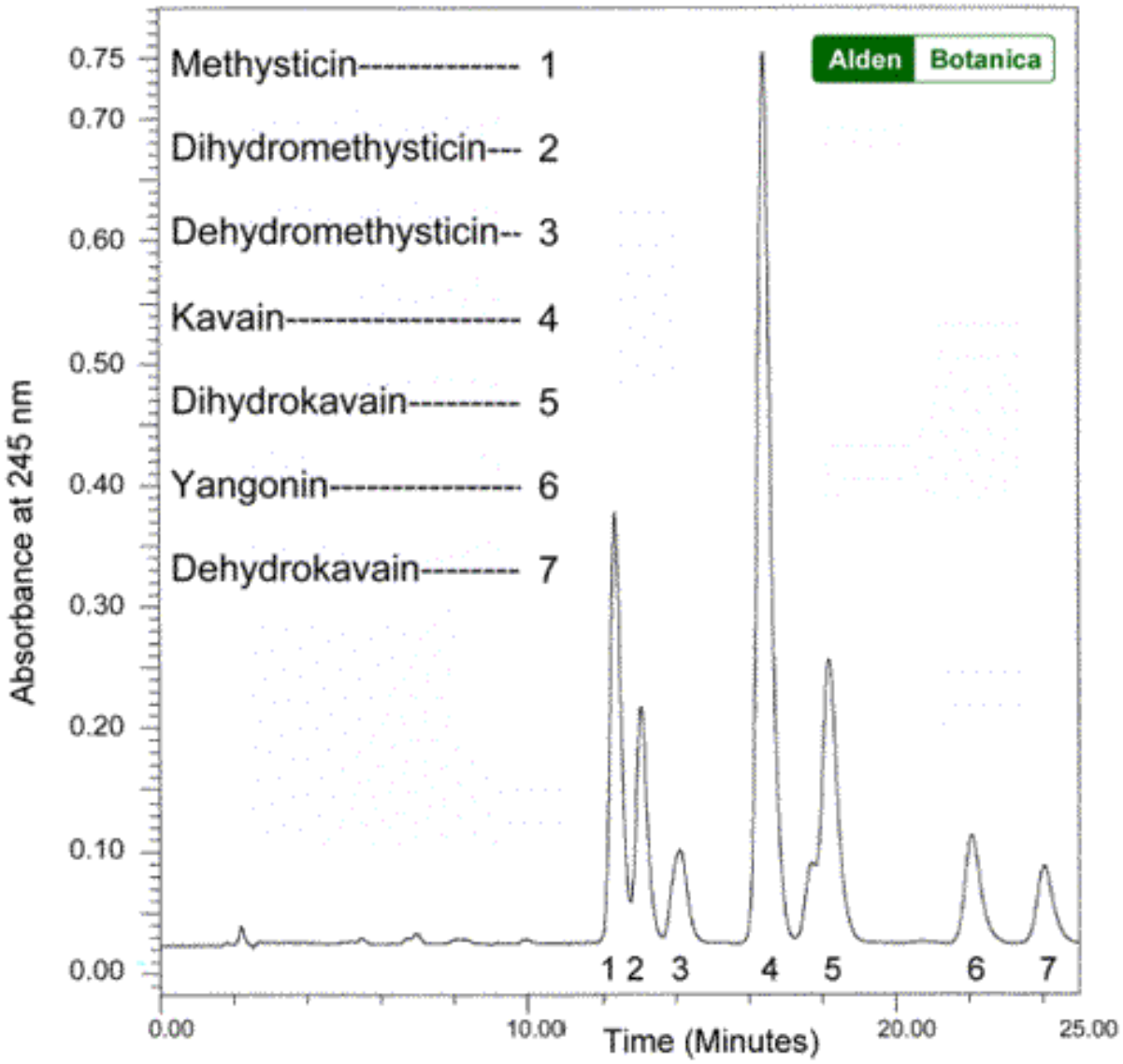


Dehydromethysticin



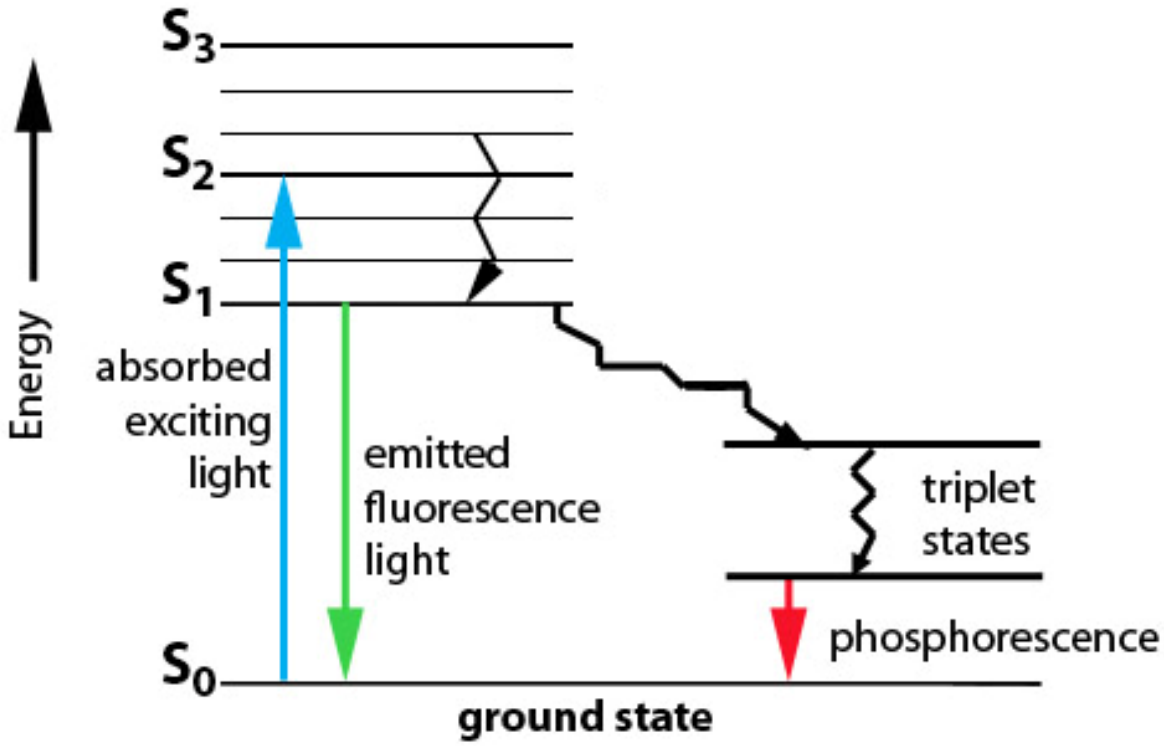
Yangonin

کروماتوگرام استخراج اتانولی گیاه نوعی گونه فلفل

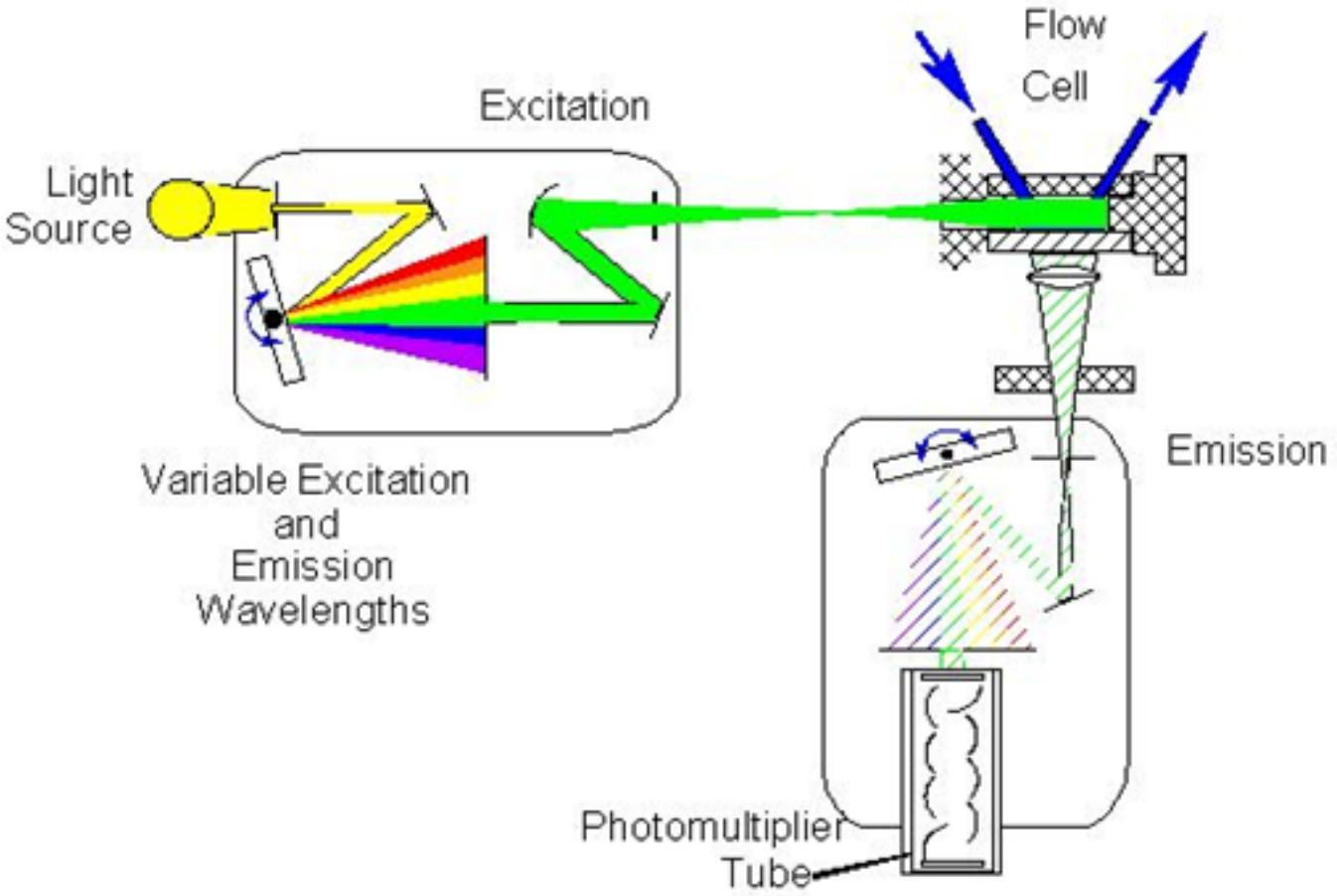


آشکارساز فلورسانسی

بسیاری از مواد می‌توانند نور فرابنفش را جذب کرده و سپس اشعه‌ای در طول موج بالاتر نشرکنند. این نشر تابش یا سریعا صورت می‌گیرد (فلورسانس) و یا با کمی تاخیر (فسفر سانس). موادی که بطور طبیعی خاصیت فلورسانسی دارند دارای ساختمان حلقوی مزدوج هستند.

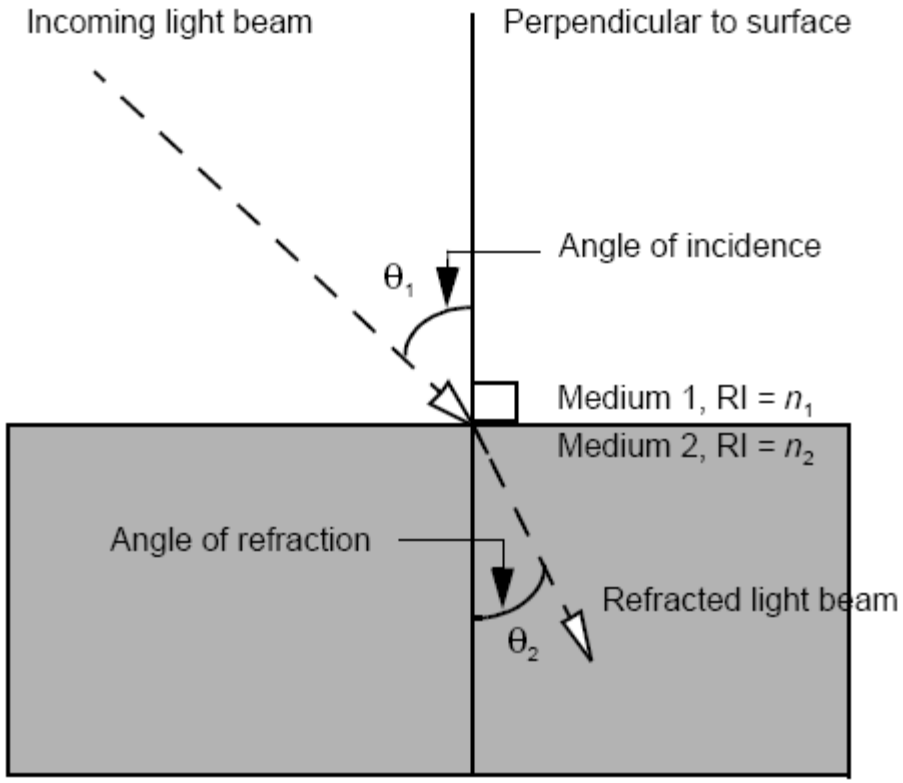


آشکارساز فلورسانسی



آشکارساز ضریب شکست

این آشکارساز بر مبنای اختلاف ضریب شکست جزء نمونه خارج شده از ستون و 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 آشکارسازها نزدیکترین وسیله در HPLC به عنوان آشکارساز جامع می‌باشند.



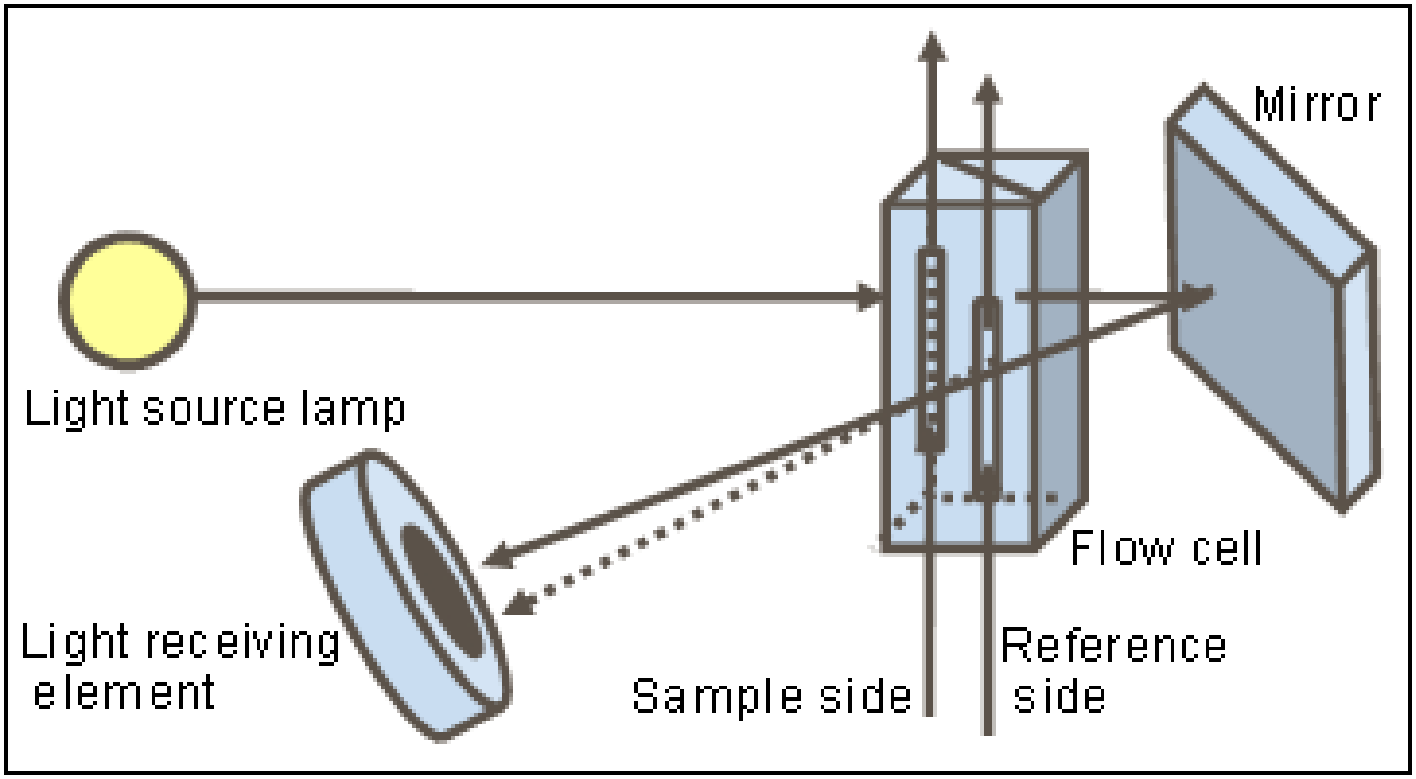
Snell's Law:

$$n_1(\sin\theta_1) = n_2(\sin\theta_2)$$

ضریب شکست یک محیط، مقیاسی است برای نشان دادن آن‌که سرعت نور در آن محیط چه مقدار نسبت به خلأ کاهش می‌یابد.

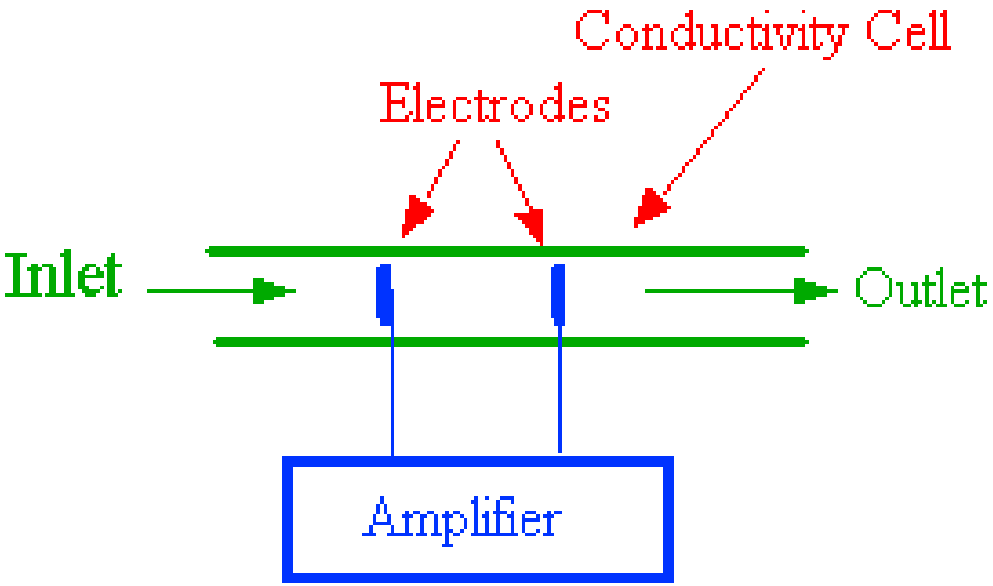
در اصل، n به صورت ضریب کاهش طول موج و سرعت تابش نسبت به مقدار آن‌ها در خلاء تعریف می‌شود. سرعت نور در هر محیطی به صورت $v = c/n$ است که در آن c سرعت نور در خلا است.

آشکارساز ضریب شکست



آشکارساز الکتروشیمیایی

آشکارسازهای الکتروشیمیایی، هدایت مواد شسته شده را اندازه می‌گیرند و یا جریان بوجود آمده توسط اکسایش و احیاء جزء نمونه را تعیین می‌کنند. در حالت اول جزء نمونه باید یونی باشد و در حالت دوم جزء نمونه باید براحتی اکسید یا احیاء گردد. نوع اول را آشکارسازه هدایت سنجی و نوع دوم را آشکارساز آمپرومتری گویند.



آشکارساز هدایت سنجی

اساس اندازه‌گیری

- اندازه‌گیری هدایت الکتریکی یون‌ها در محلول
- میدان الکتریکی بین دو الکترود در Flow through cell
- یون‌ها در این میدان مهاجرت می‌کنند (آنیون‌ها به سمت آند و کاتیون‌ها به سمت کاتد).
- مقاومت الکتریکی محلول اندازه‌گیری می‌شود.
- هدایت عکس مقاومت می‌باشد.

R = مقاومت [Ω]

K_c = ثابت سل [1/cm]

κ =هدایت ویژه
[1/ Ω *or* S]

$$\kappa = \frac{1}{R} * K_c$$

آشکارساز هدایت سنجی

اساس اندازه‌گیری

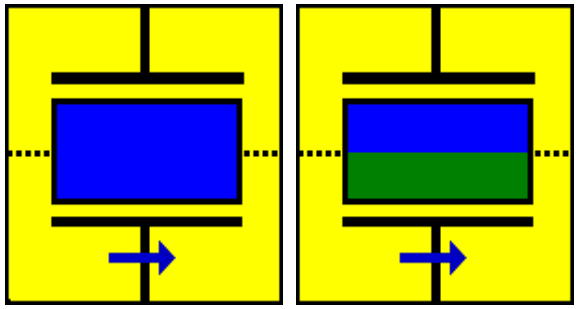
- هدایت متناسب با غلظت (c) هر کدام از یون‌ها می‌باشد.
- هدایت تحت تاثیر هدایت هم ارز (Λ_i) قرار می‌گیرد.
- z_i بار یون مربوطه می‌باشد.
- ثابت سل و دما باید پایدار باشد.

$$\kappa = \sum (\Lambda_i * z_i * c_i)$$

Λ_i=هدایت هم ارز
[S*cm^2/mol]
z_i =باریون
c_i =غلظت [mol/L]
κ =هدایت ویژه [1/ Ω *or* S]
Σ =مجموع یون‌ها (آنیون‌ها و کاتیون‌ها)

آشکارساز هدایت سنجی

- تفاوت هدایت بین یون نمونه و یون حلال اندازه‌گیری می‌شود.
- آنالیز کاتیون‌ها، آنیون‌ها، اسیدهای آلی و کربوهیدرات‌ها



$$\kappa = \sum(\Lambda_i * z_i * c_i)$$

$$\kappa_{Det.} = \kappa_{Peak} - \kappa_{El.}$$

$$\kappa_{Det.} = c^{+}_{Smpl.} * (\Lambda^{+}_{Smpl.} - \Lambda^{+}_{El.}) + c^{-}_{Smpl.} * (\Lambda^{-}_{Smpl.} - \Lambda^{-}_{El.})$$

آنالیز کاتیون‌ها

$$\kappa_{Det.} = c^{+}_{Smpl.} * (\Lambda^{+}_{Smpl.} - \Lambda^{+}_{El.})$$

آنالیز آنیون‌ها

$$\kappa_{Det.} = c^{-}_{Smpl.} * (\Lambda^{-}_{Smpl.} - \Lambda^{-}_{El.})$$

آشکارساز آمپرومتری

اساس اندازه‌گیری

- سیستم سه الکترودی (الکترود مرجع (**Ag/AgCl**)، کار (**Pt/Ag/Au**) و کمکی (**Au**))
- پتانسیل اعمال می‌شود.
- فرایند اکسایش در سطح الکترود کار صورت می‌پذیرد (انتقال الکترون).
- جریان که متناسب با غلظت گونه می‌باشد، اندازه‌گیری می‌گردد.
- اندازه‌گیری نیتریت، کلریت، یدید، سیانید، سولفید، فنل‌ها و ...

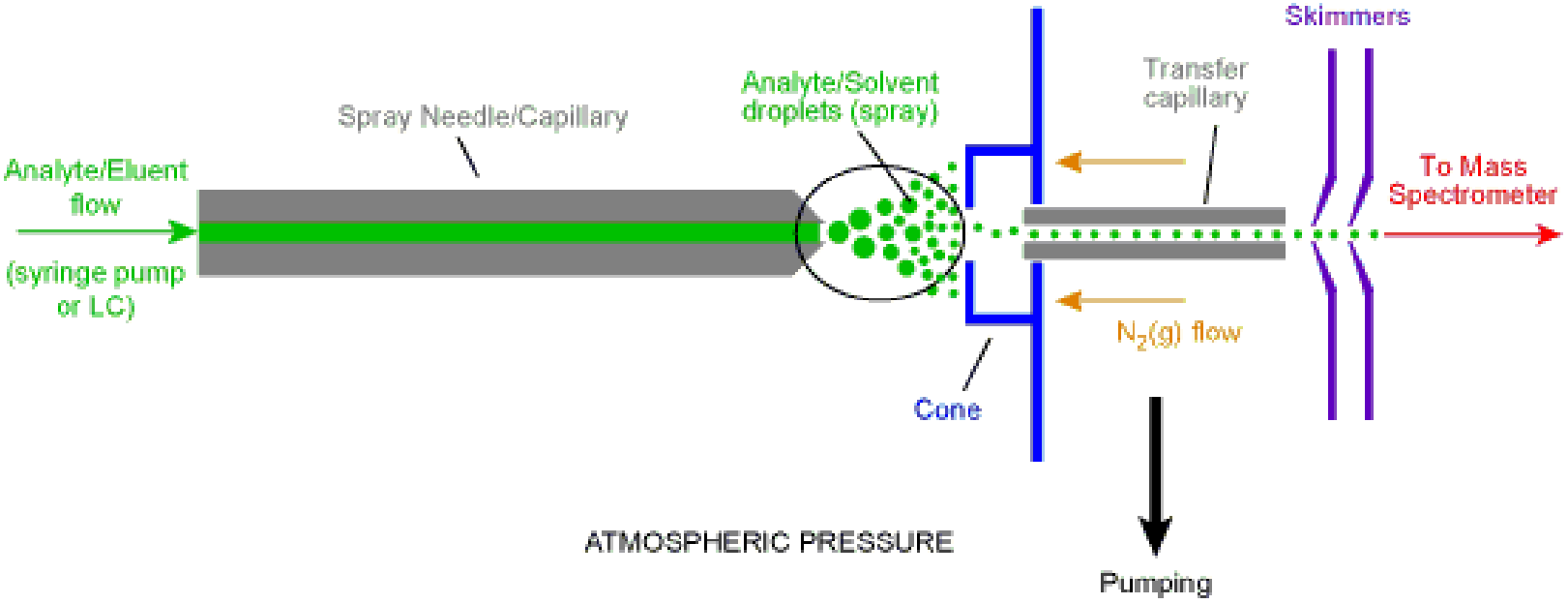
- اکسایش یا کاهش
- انتقال الکترون

$R <=> O + e^-$

آشکارساز طیف سنجی جرمی

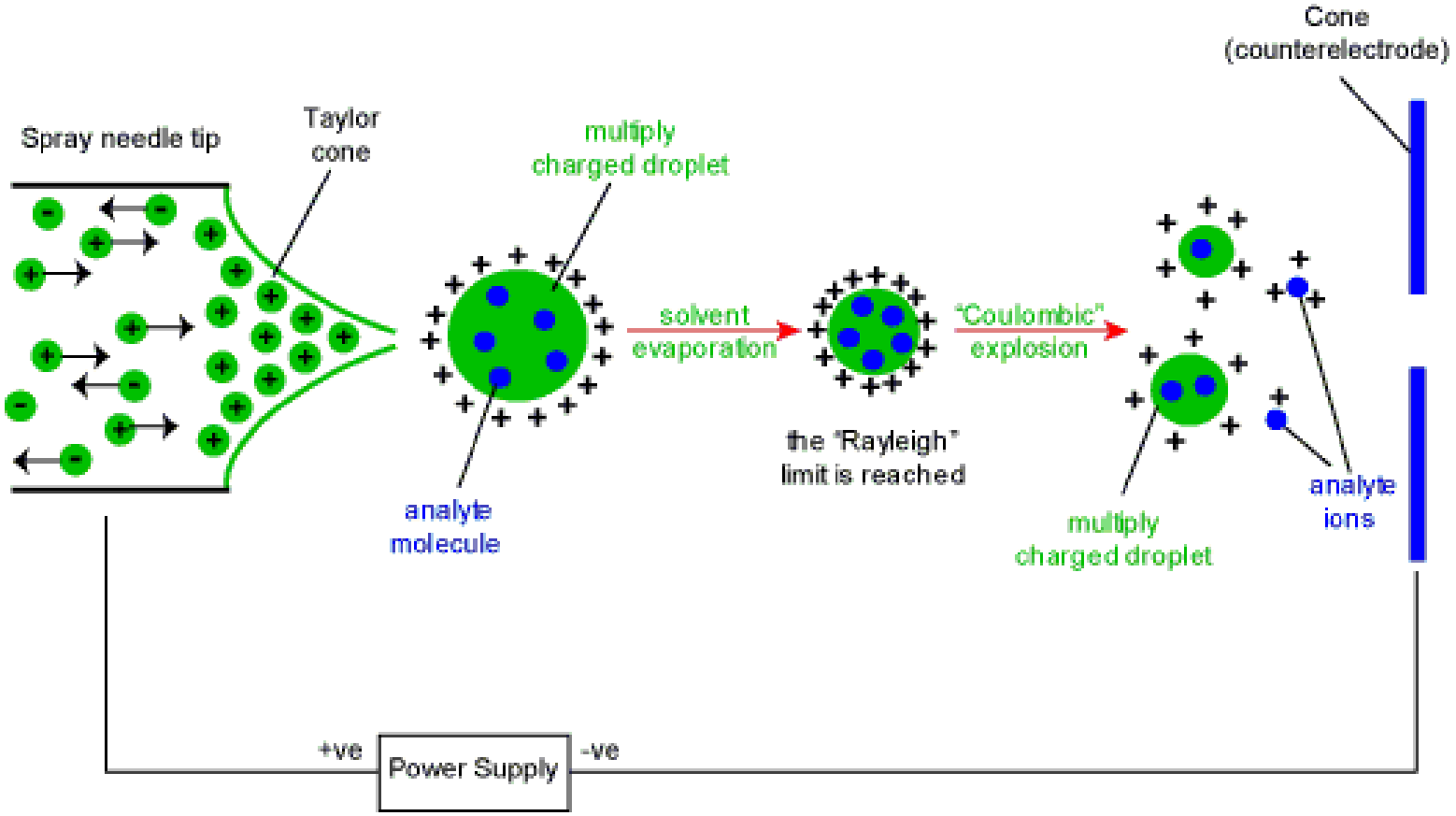
❖ فرایند یونش الکتروافشانه‌ای Electrospray Ionization (ESI)

- یونش الکتروافشانه‌ای با جریان یافتن محلول در طول یک لوله مویین هادی الکتریسیته که در ولتاژ بالا (چندین کیلو ولت جریان مستقیم) نگه داشته شده است، صورت می‌پذیرد.
- محلول خروجی از لوله مویین تبخیر می‌شود.
- انفجار کولمبی زمانی به وقوع می‌پیوندد که دافعه بین بارها بر کشش سطحی محلول (نگه داشتن قطرات به همدیگر) غلبه یابد.



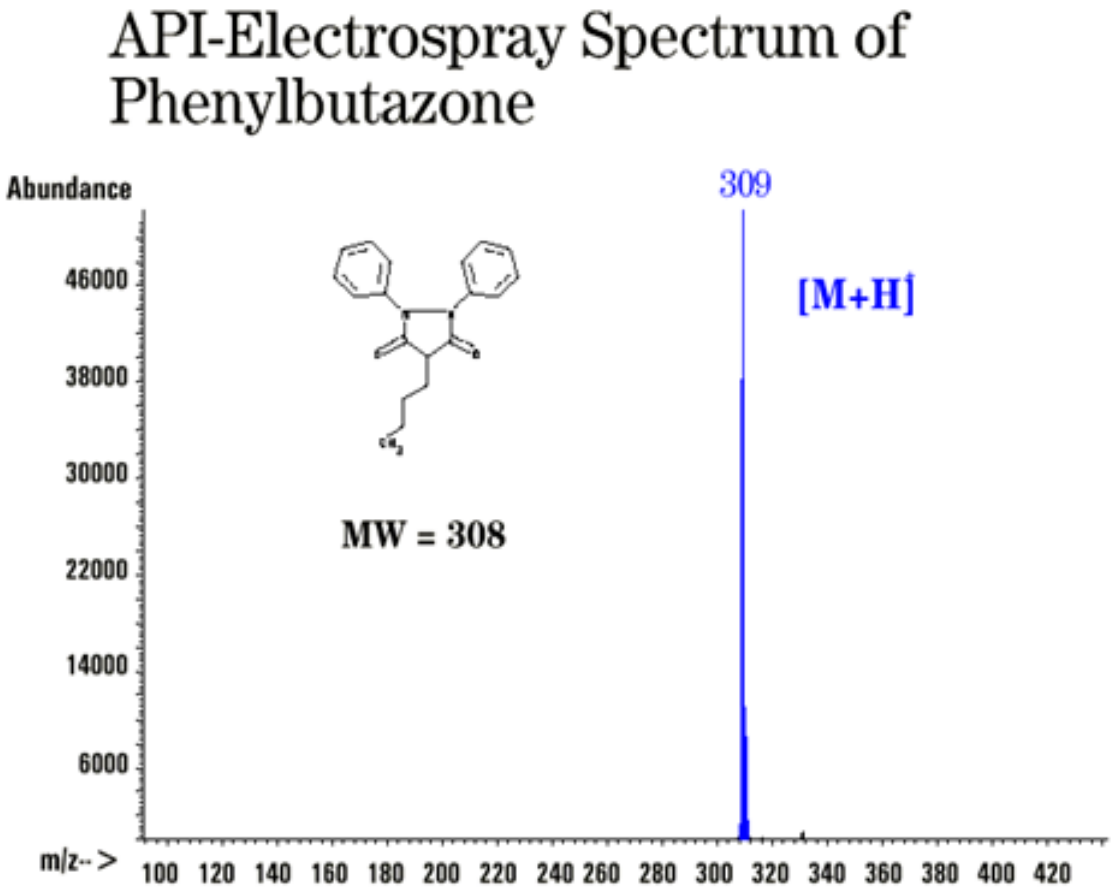
آشکارساز طیف سنجی جرمی

شمایی از مکانیسم تشکیل یون در یونش الکتروافشانه‌ای



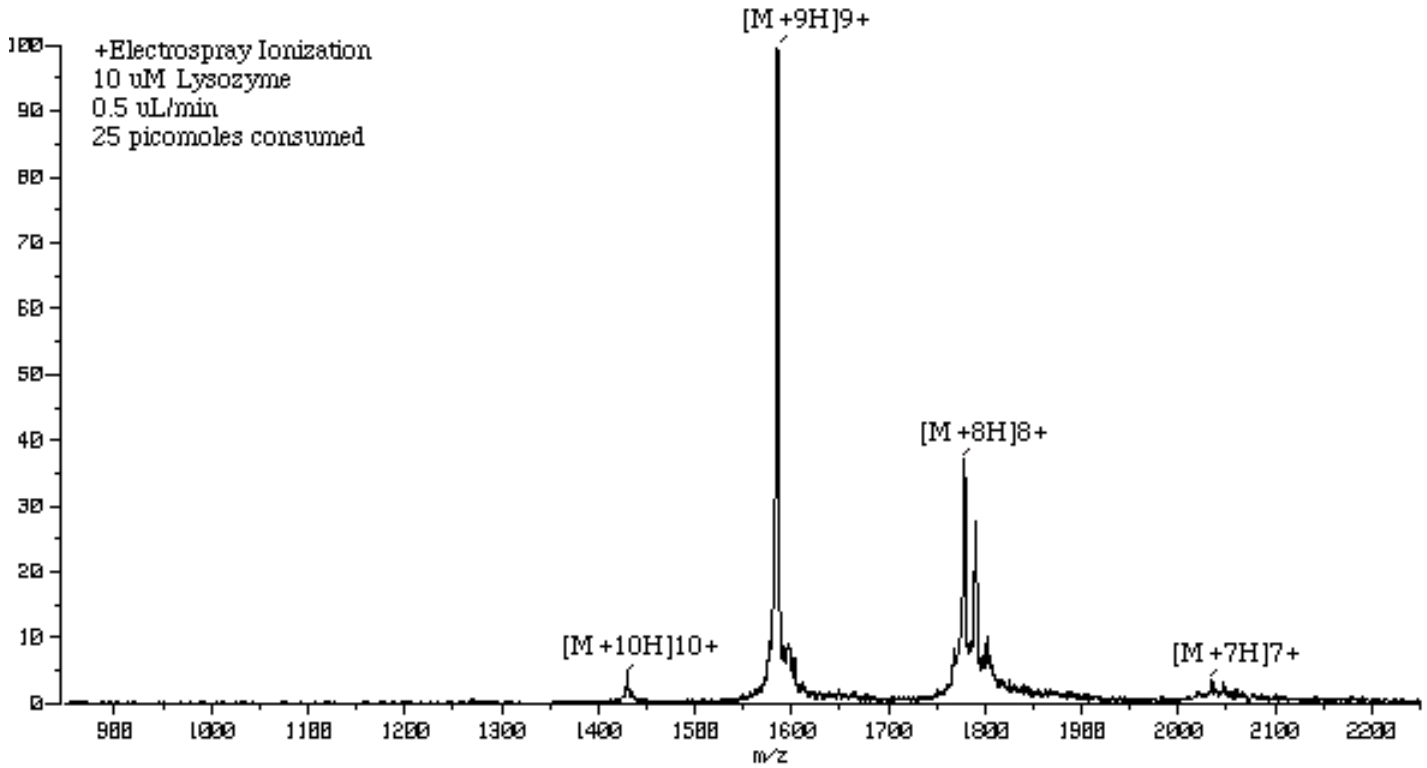
آشکارساز طیف سنجی جرمی

طیف نوعی از یونش الکتروافشانه‌ای



آشکارساز طیف سنجی جرمی

An ESI Mass Spectrum of a 14.4 kDa enzyme

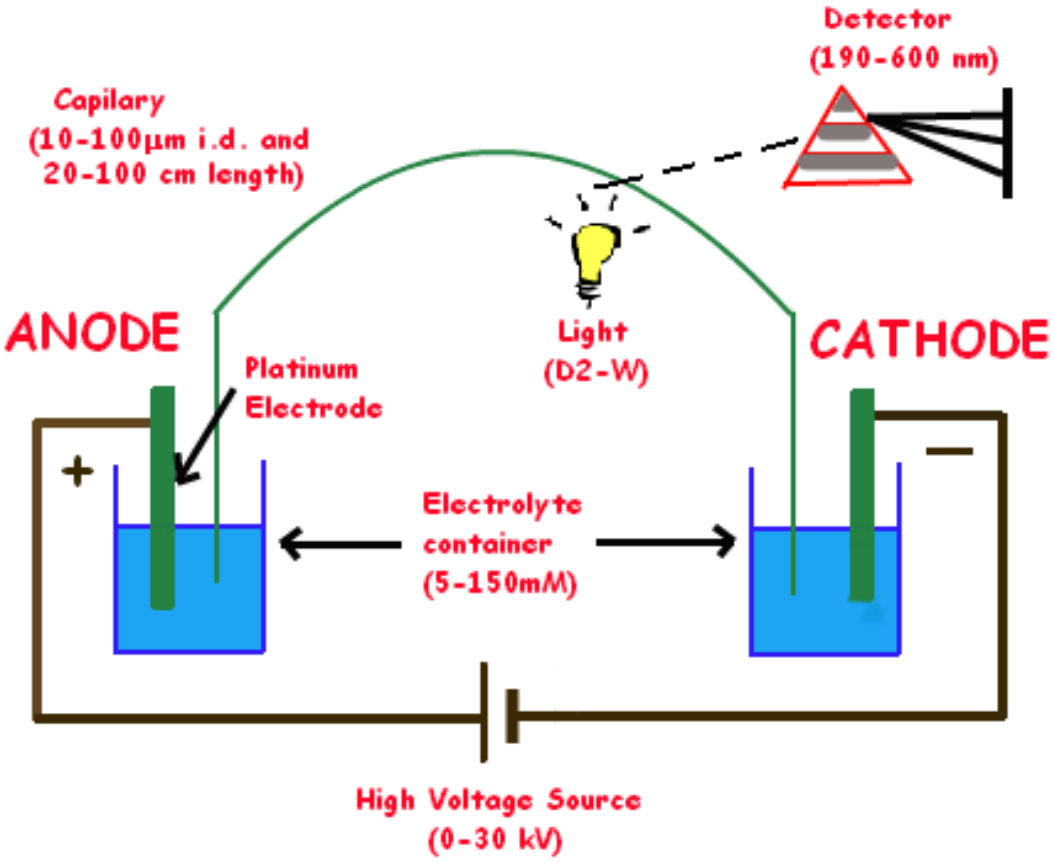


الکتروفورز

- الکتروفورز یک روش جداسازی مبتنی بر سرعت تفاضلی مهاجرت گونه‌های باردار در یک محلول بافر است که در عرض آن یک میدان الکتریکی dc اعمال شده است.
- الکتروفورز به گونه‌های مختلفی از مسائل جداسازی تجزیه‌ای از جمله موارد زیر می‌پردازد:
  - آنیون‌ها و کاتیون‌های معدنی
  - آمینواسیدها
  - داروها
  - ویتامین‌ها
  - کربوهیدرات‌ها
  - پپتیدها
  - پروتئین‌ها
  - نوکلئیک اسیدها
  - و ...
- قدرت ویژه الکتروفورز توانایی منحصر بفرد آن در جداکردن درشت مولکول‌های باردار مورد نظر در صنعت زیست فناوری و در پژوهش‌های زیست شیمیایی و زیست شناختی است.

الکتروفورز

جداسازی الکتروفورزی به وسیله تزریق نمونه به درون یک محلول بافر آبی حاوی یک لوله مویین انجام می‌شود. یک پتانسیل dc زیاد به وسیله یک زوج الکترود قرار گرفته در دو انتهای دو مخزن بافر اعمال می‌شود. این پتانسیل باعث می‌شود تا یون‌های نمونه به طرف یکی از دو الکترود مهاجرت کنند. سرعت مهاجرت یک گونه معین به بار آن و همچنین به اندازه آن بستگی دارد. سپس جداسازی‌ها بر اساس تفاوت در نسبت بار به اندازه آنالیت‌های مختلف در یک نمونه انجام می‌گیرد. هر چقدر این نسبت بزرگتر باشد، یک یون سریعتر در میدان الکتریکی مهاجرت می‌کند.



الکتروفورز

جداسازی الکتروفورزی

- الکتروفورز ورقه‌ای (روش کلاسیک)
- الکتروفورز مویینه‌ای (روش دستگاهی)

اساس جداسازی الکتروفورزی

سرعت مهاجرت ν یک یون بر حسب سانتی متر بر ثانیه در یک میدان الکتریکی برابر است با حاصل‌ضرب قدرت میدان E $(V\ cm^{-1})$ و تحرک الکتروفورزی (الکتروفورتیکی) μ_e $(cm^2V^{-1}s^{-1})$. بنابراین،

$$\nu=\mu_e E= \mu_e (V/L)$$

میدان الکتریکی به نوبه خود به وسیله پتانسیل اعمال شده (Vبر حسب ولت) و طول L که میدان در آن اعمال می‌شود تعیین می‌گردد.

تحرک الکتروفورزی به نوبه خود تناسب مستقیم با بار یونی روی آنالیت و تناسب عکس با ضرایب بازدارندگی اصطکاکی دارد. میدان الکتریکی تنها روی یون‌ها اثر دارد. در صورتی‌که دو گونه از نظر بار یا از نظر نیروهای اصطکاکی که طی حرکت از درون بافر کسب می‌کنند تفاوت داشته باشند، از یکدیگر جدا می‌شوند. گونه‌های خنثی جدا نمی‌شوند.

نیروی بازدارندگی اصطکاکی روی یک یون آنالیت به وسیله اندازه و شکل یون و گرانروی محیطی که در آن یون مهاجرت می‌کند، تعیین می‌شود. برای یون‌های با اندازه یکسان، هر چقدر بار بیشتر باشد، نیروی رانشی بیشتر است و سرعت مهاجرت بیشتر خواهد بود. برای یون‌های با بار یکسان، هر چقدر یون کوچکتر باشد، نیروهای اصطکاکی کوچکتر و سرعت مهاجرت بیشتر است.

$$\mu_e=q/(6\pi\eta r)$$

که در آن q بار حل شونده، η گرانروی بافر و r شعاع حل شونده است.

الکتروفورز

جداسازی‌ها بر اساس تفاوت در نسبت بار به اندازه آنالیت‌های مختلف در یک نمونه انجام می‌گیرد. هر چقدر این نسبت بزرگتر باشد، یک یون سریعتر در میدان الکتریکی مهاجرت می‌کند.

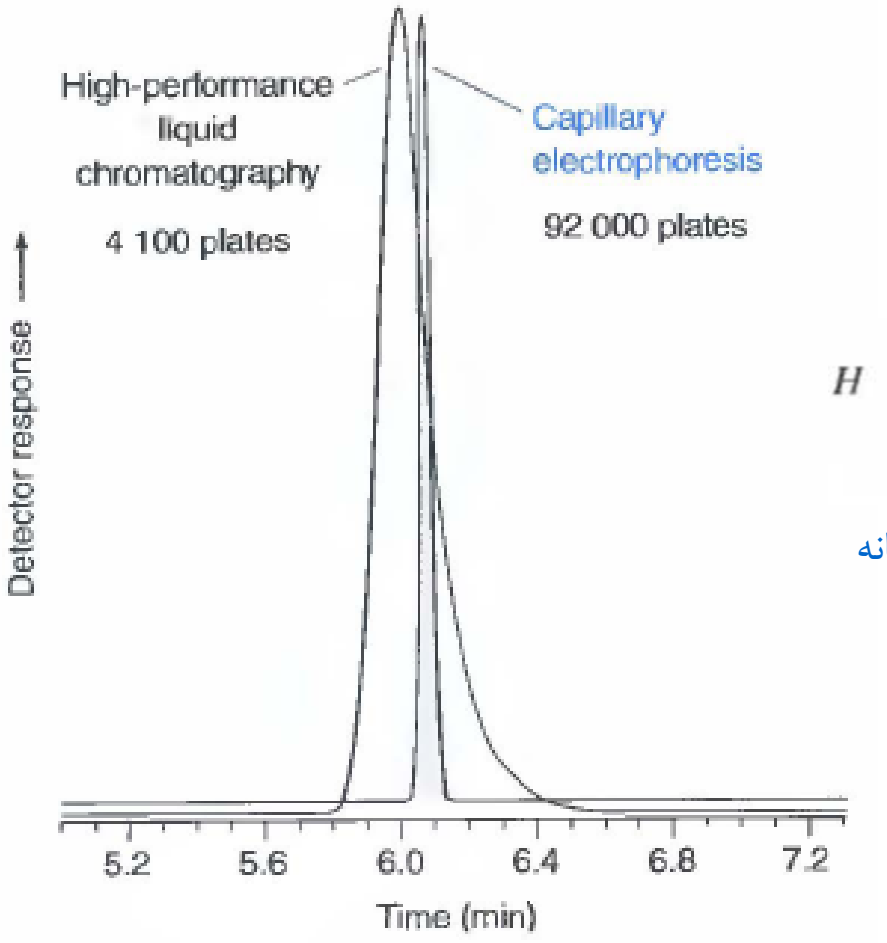
الکتروفورز مویینه‌ای جداسازی‌های با تفکیک زیاد و سرعت بالا روی حجم‌های به ویژه کوچک نمونه‌ها (۰/۱ تا ۱۰ نانولیتر بر عکس الکتروفورز ورقه‌ای که به نمونه‌های در گستره میکرولیتر نیاز دارد) در اختیار می‌گذارد. علاوه بر این، گونه‌های جدا شده از یک انتهای مویین شوییده می‌شوند، به نحوی که آشکارسازهای کمی، مانند آشکارسازهای HPLC را می‌توان به کار برد.

در الکتروفورز تعداد بشقابک نظری (N) با رابطه زیر نشان داده می‌شود:

$$N = \mu_e V/2D$$

که در آن D ضریب نفوذ حل شده بر حسب cm^2s^{-1} است. برای تفکیک بالاتر در جداسازی، پتانسیل اعمال شده باید بیشتر باشد. پتانسیل‌های تا ۲۰۰۰۰ الی ۶۰۰۰۰ ولت معمولا با الکتروفورز مویینه‌ای به کار گرفته می‌شود. الکتروفورز مویینه‌ای معمولا تعداد بشقابک در گستره ۱۰۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ در مقایسه با ۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ بشقابک نوعی برای HPLC در اختیار می‌گذارد. در الکتروفورز تعداد بشقابک با طول ستون زیاد نمی‌شود.

مقایسه الکتروفورز با HPLC



$$H = \cancel{A} + \frac{B}{u_x} + \cancel{C d_x}$$

تعادل محدود بین فازها

مسیرهای جریان چندگانه

جریان الکترواسمزی

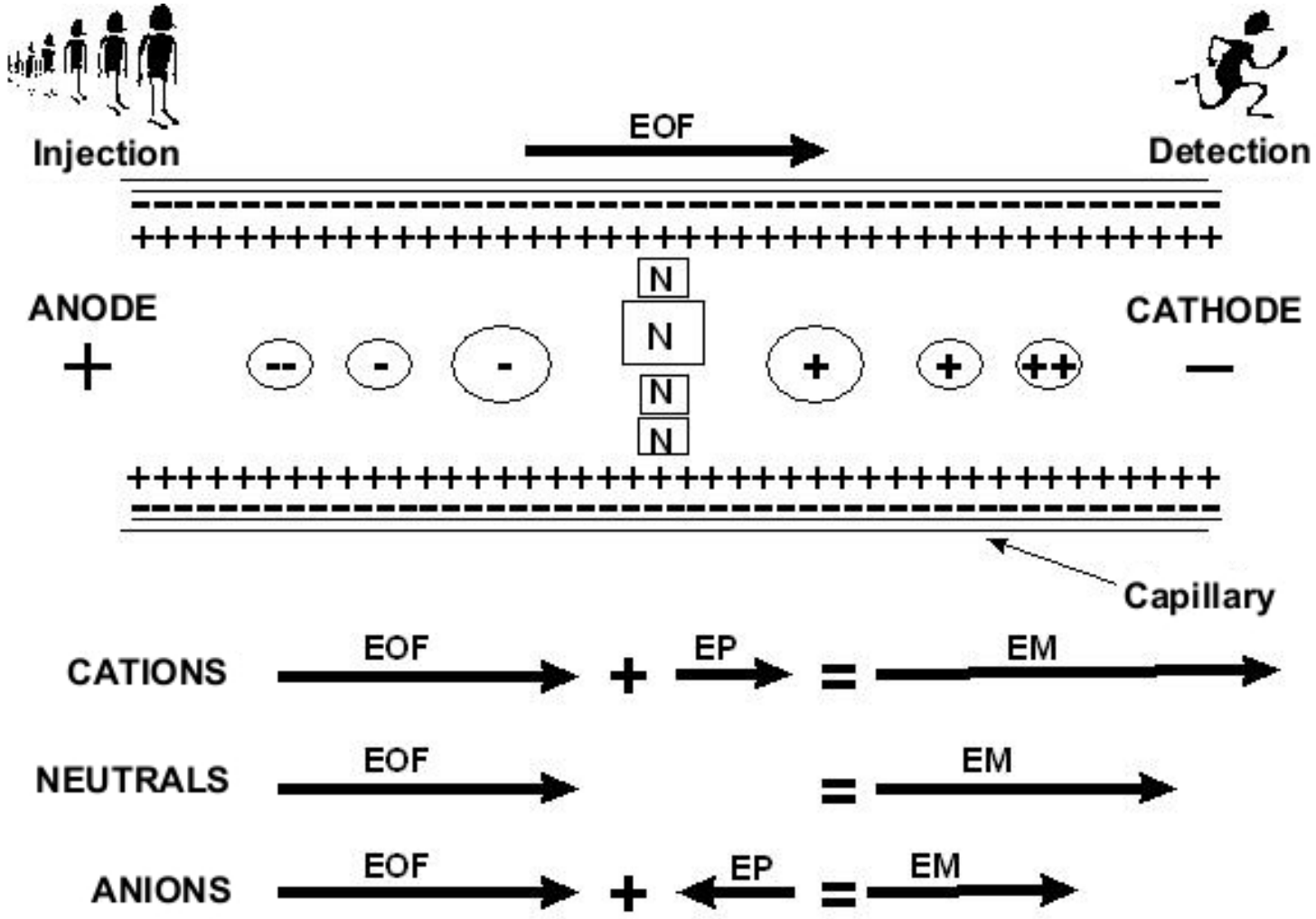
هنگامی که یک پتانسیل زیاد در عرض یک لوله مویین حاوی یک محلول بافر اعمال شود، **جریان الکترواسمزی** معمولا بوجود می آید. حلال به طرف کاتد یا آند حرکت می‌کند. علت جریان الکترواسمزی لایه‌ی مضاعف الکتریکی است که در سطح مشترک سیلیس/محلول ظاهر می‌شود.

در pH ۳< دیواره درونی مویین سیلیسی (-SiOH)، به علت یونش گروه سیلانول سطحی بار منفی ($-SiO^-$) دارد. کاتیون‌های بافر در یک لایه‌ی مضاعف الکتریکی مجاور با سطح منفی مویین سیلیسی جمع می‌شوند. کاتیون‌های در لایه‌ی بیرونی به طرف الکترود منفی یا کاتد جذب می‌شوند. کاتیون‌های آب پوشیده، توده حلال را همراه با خود می‌کشند.
در حضور الکترواسمز، سرعت یک یون برابر است با مجموع سرعت مهاجرت و سرعت جریان الکترواسمزی آن. بنابراین:

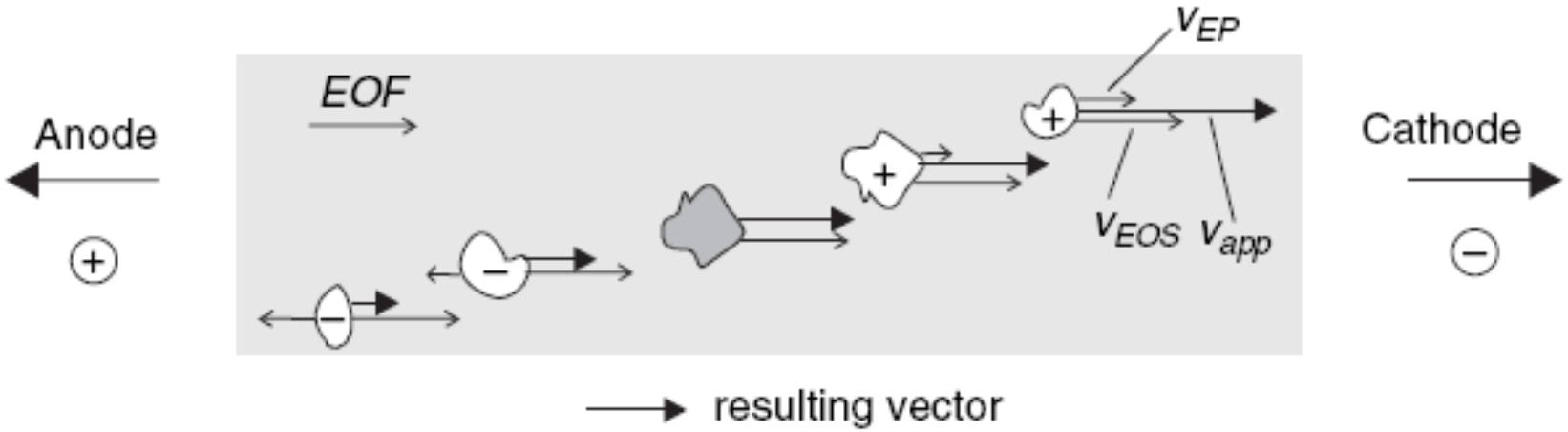
$$\nu=(\mu_e + \mu_{eo})E$$

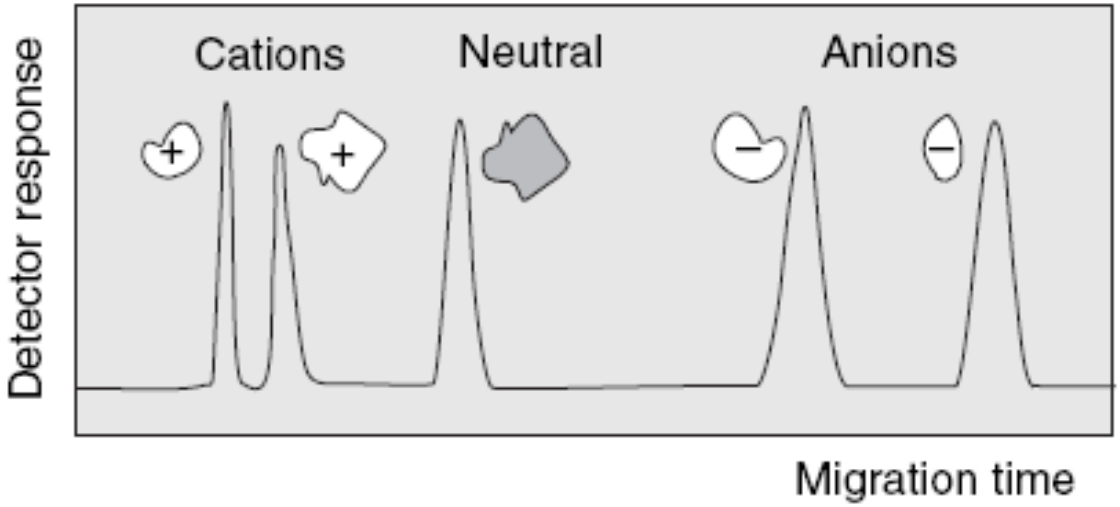
در نتیجه الکترواسمز، ترتیب شویش در یک جداسازی الکتروفورزی موییناه‌ای نوعی ابتدا سریع‌ترین کاتیون و متعاقب آن کاتیون‌های به ترتیب کندتر، سپس تمام مواد خنثی در یک منطقه تک و در نهایت کندترین آنیون و به دنبال آن به ترتیب آنیون‌های سریعتر است.

جریان الکترواسمزی



جریان الکترواسمزی

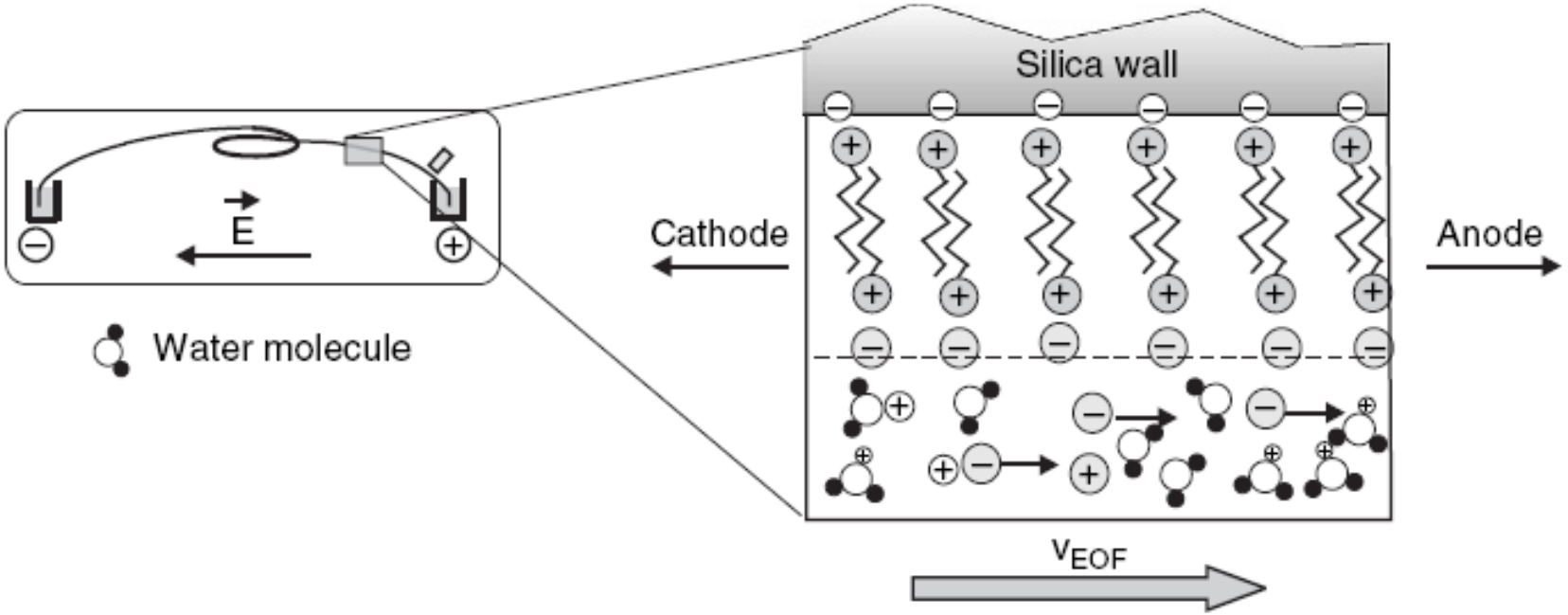




جریان الکترواسمزی

جهت جریان الکترواسمزی نرمال را می‌توان با افزودن یک عامل فعال (سورفکتانت کاتیونی) در سطح کاتیونی معکوس کرد. عامل فعال در سطح روی دیواره مویین جذب سطحی می‌شود و به دیواره‌ها بار مثبت می‌دهد. آنیون‌های بافر، نزدیک به دیواره تجمع می‌کنند و به طرف آند می‌روند. این عمل اغلب برای سرعت بخشیدن به جداسازی آنیون‌ها به کار گرفته می‌شود.

الکترواسمز در انواع خاصی از الکتروفورز مطلوب نیست. این جریان را می‌توان به وسیله اندودن دیواره درونی مویین با واکنشگری مانند تری متیل کلروسیلان جهت حذف گروه‌های سیلانول سطحی، حذف کرد.



روش‌های وارد کردن نمونه

- **تزریق الکتروسینتیکی**
- **تزریق فشاری**

در تزریق الکتروسینتیکی یک انتهای مویین و الکترود آن از محفظه بافری خود برداشته و در فنجان کوچکی حاوی نمونه قرار داده می‌شود. سپس پتانسیلی برای زمان مشخص اعمال می‌گردد تا به وسیله ترکیبی از مهاجرت یونی و جریان الکترواسمزی باعث وارد شدن نمونه به درون مویین شود. سپس انتهای مویین و الکترود آن مجددا به درون محلول بافر برای مدت جداسازی بر گردانیده می‌شود.

در تزریق فشاری انتهای وارد شدن نمونه مویین نیز موقتا در یک فنجان کوچک حاوی نمونه قرار داده می‌شود و سپس اختلاف فشاری به کار می‌رود تا محلول نمونه را به درون مویین براند. این اختلاف فشار می‌تواند با اعمال خلا در انتهای آشکارساز به وسیله تحت فشار قرار دادن نمونه یا به وسیله بالا بردن انتهای نمونه حاصل شود.
هم برای تزریق فشاری هم برای تزریق الکتروسینتیکی حجم تزریق به وسیله طول مدت تزریق کنترل می‌شود. میزان تزریق نمونه از ۵ تا ۵۰ نانولیتر می‌باشد و حجم‌های زیر ۱۰۰ پیکولیتر نیز گزارش شده است.

آشکارسازها

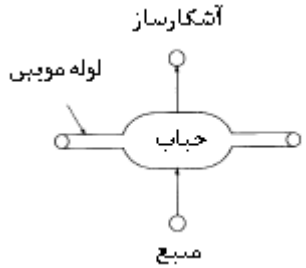
طراحی و عملکرد آشکارسازها مشابه آشکارسازهای HPLC می‌باشد. در الکتروفورز مویینه‌ای هر یون در سرعتی مهاجرت می‌کند که به وسیله تحرک الکتروفورزی آن تعیین می‌شود. بنابراین نوارهای آنالیت‌ها در سرعت‌های متفاوتی از درون آشکار ساز عبور می‌کند و به مساحت پیک‌هایی منجر می‌شود که تا حد زیادی به زمان بازداری وابسته‌اند. در مقابل در HPLC، تمام گونه‌ها در سرعت فاز متحرک از درون آشکارساز عبور می‌کنند و مساحت پیک‌ها مستقل از زمان بازداری است.

- جذبی
- فلورسانس
- طیف سنجی جرمی
- الکتروشیمیایی (آمپرومتری - هدایت سنجی)

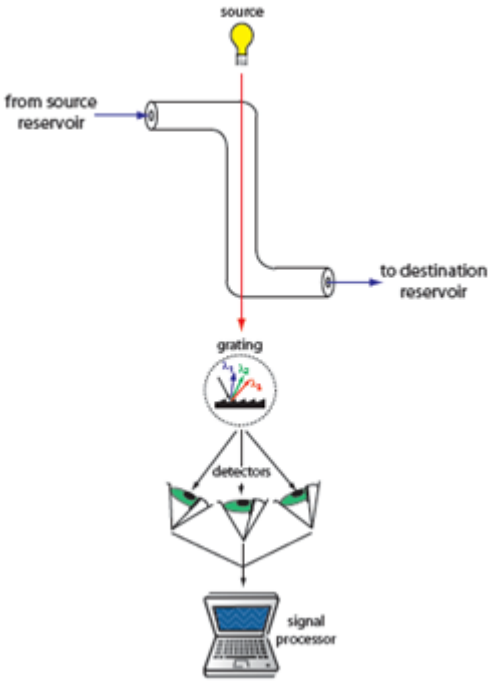
آشکارسازهای جذبی

این آشکارساز جزء عمومی‌ترین آشکارسازها به حساب می‌آید و معمولا جزء استاندارد دستگاه‌های CE می‌باشد. حجم آشکارسازی در حد نانولیتر می‌باشد. متاسفانه طول مسیر برای چنین اندازه‌گیری‌هایی بیشتر از ۵۰ تا ۱۰۰ میکرومتر نمی‌باشد و باعث می‌شود که حد تشخیص بر حسب غلظت محدود شود.

برای بهبود حساسیت اندازه‌گیری جذبی چند فن برای افزایش طول مسیر اندازه‌گیری‌ها استفاده می‌شود.

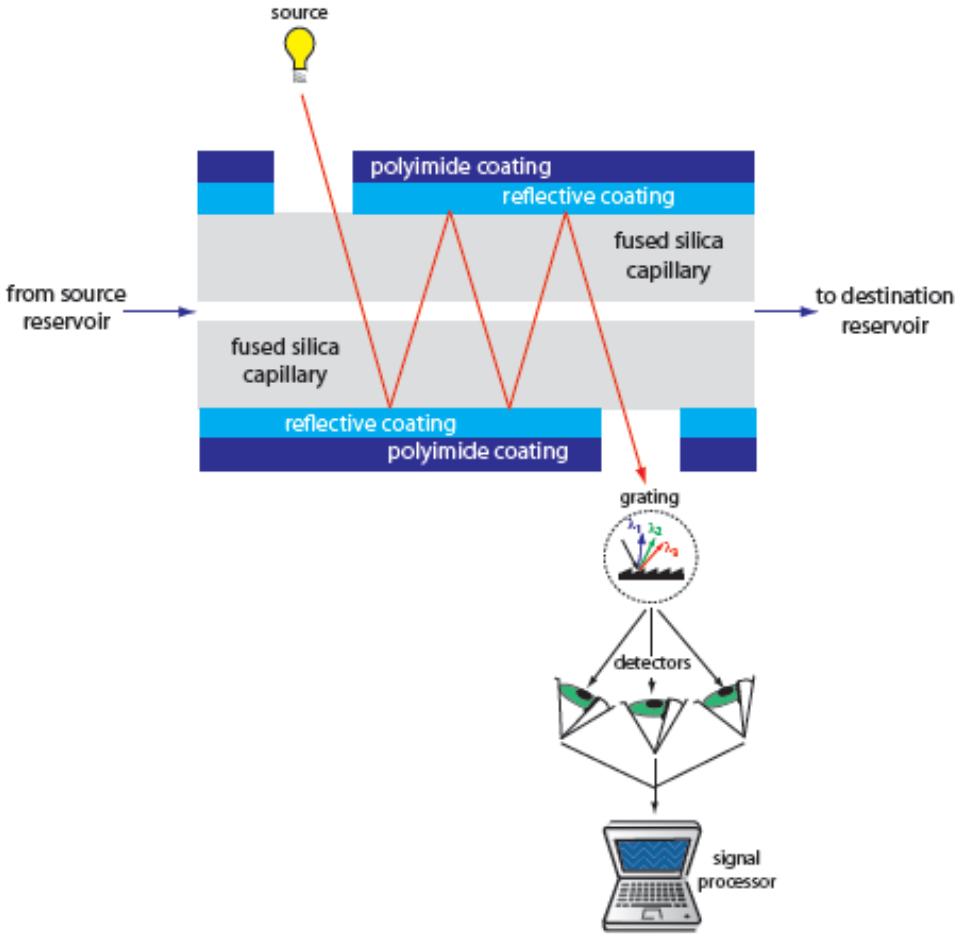


- ایجاد حباب نزدیک به انتهای مویین
- خم کردن انتهای مویین به شکل “ Z ”



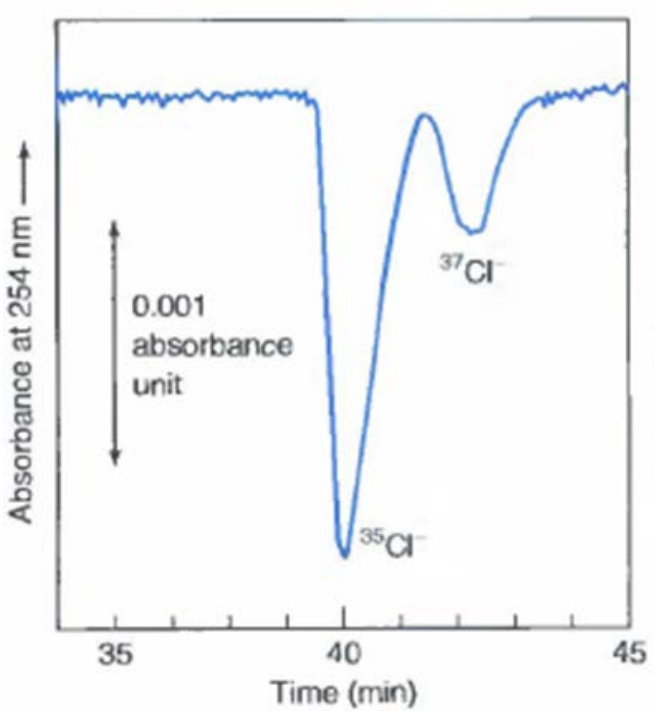
آشکارسازهای جذبی

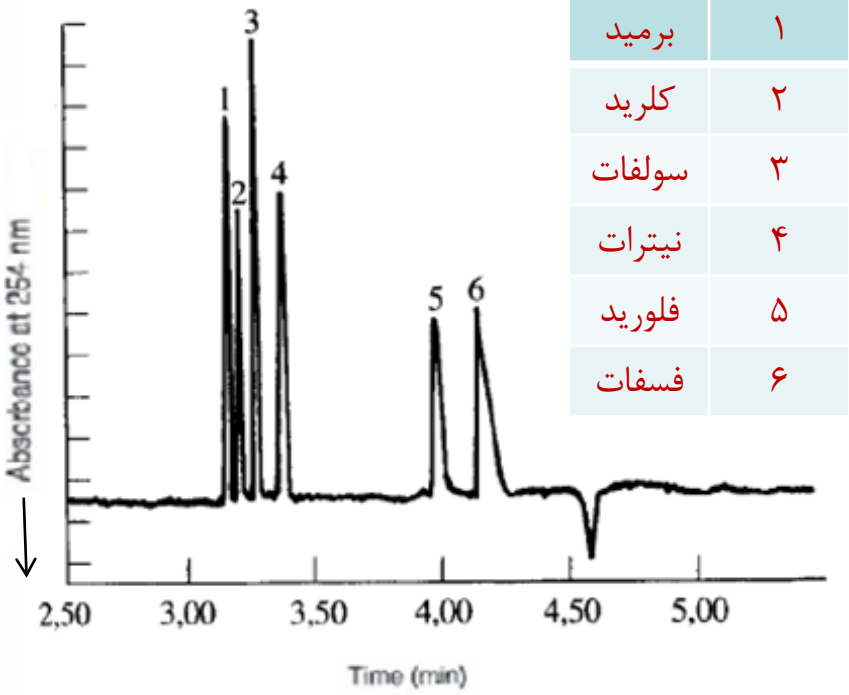
- استفاده از بازتابش (در این روش پوشش انعکاسی از نقره روی انتهای مویین ته نشین می‌شود. در این حالت شعاع تابشی انعکاسات زیادی را متحمل می‌شود تا از مویین خارج شود، در نتیجه طول مسیر افزایش می‌یابد).



آشکارسازی جذبی غیر مستقیم

آشکارسازی جذبی غیر مستقیم برای آشکارسازی گونه‌هایی به کار گرفته می‌شود که به علت ضرایب جذب مولی کم بدون مشتق سازی آشکارسازی آن‌ها مشکل است. در این روش یک رنگ‌ساز یونی در بافر الکتروفورز قرار داده می‌شود. سپس آشکارساز یک علامت ثابت مربوط به حضور این جسم دریافت می‌کند. آنالیت جایگزین برخی از این یون‌ها می‌شود، به نحوی که علامت آشکارساز طی عبور یک نوار آنالیت از درون آشکارساز کاهش می‌یابد، سپس آنالیت از کاهش در جذب اندازه‌گیری می‌شود. در الکتروگرام‌های زیر کرومات به عنوان رنگساز می‌باشد که در ۲۵۴ نانومتر در بافر به شدت جذب دارد.





۱	برمید
۲	کلرید
۳	سولفات
۴	نیترات
۵	فلورید
۶	فسفات

الکتروفورز (انیمیشن)