شیمی تجزیه دستگاهی

کروماتوگرافی

تمام حقوق مادی و معنوی این جزوه متعلق به دپارتمان تخصصی شیمی می باشد. لطفا از کپی و تکثیر آن خودداری نمایید.
www.ShimiPedia.ir

کروماتوگرافی پر کاربردترین شیوه جداسازی مواد تجزیه‌ای است که در تمام شاخه‌های علـوم کاربردهـایی دارد. کرماتوگرافی گروه گوناگون و مهمی از روش‌های جداسازی مواد را شامل می‌شود و امکان می‌دهد تا اجزای سازنده نزدیک به هـم مخلـوط هـای کمـپلکس را جـدا، منـزوی و شناسـایی کنـد بسـیاری از ایـن جداسازی‌ها به روش‌های دیگر نـاممکن اسـت. اولـین روش‌هـای کرومـاتوگرافی در سـال ۱۹۰۳ بوسـیله میخائیل سوئت ابداع و نامگذاری شد. او از این روش برای جداسازی مواد رنگی اسـتفاده کـرد. مـارتین و سینج در سال ۱۹۵۲ به پـاس اکتشافاتشـان در زمینـه کرومـاتوگرافی و مطـرح نمـودن نظریـه بشـقابکهای تئوری جایزه نوبل دریافت کردند.

شکل ۱- جداسازی کروماتوگرافی کاغذی

www.ShimiPedia.ir

شکل ۲–جداسازی با کاغذ صافی

کروماتوگرافی یک روش جداسازی می‌باشد که بر اساس توزیع متفاوت یک نمونه بین دو فاز غیر قابل امتزاج به نام های فاز متحرک و ساکن قرار گرفته است.

در این روش معمولاً مخلوط که به صورت مایع یا گاز است و حاوی نمونه مورد نظر میباشد، از یک لوله یا شبکه گذرانده می‌شود؛ سرعت حرکت اجزای تشکیل دهنده مخلوط در لوله یا شبکه مختلف است (با توجه به عناصر دیواره داخلی لوله یاشبکه) در نتیجه مخلوط به اجزای تشکیل دهنده تجزیه شده و هر جز جداگانه خارج می‌شود. در کروماتوگرافی دو فاز وجود دارد فاز ساکن وفاز متحرک، فاز ثابت در واقع

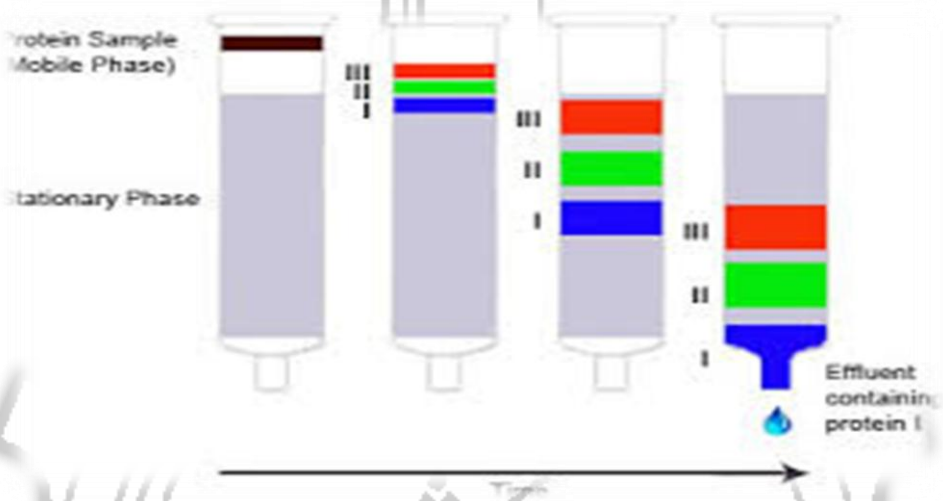
www.ShimiPedia.ir

اجزای درون لوله یا شبکه جداسازی را تشکیل می‌دهند و فاز متحرک مربوط به ماده‌ای است که می‌خواهد مورد تجزیه و تخلیص قرار بگیرد. فاز ساکن می‌تواند مایع یا جامد باشد.

انواع فاز متحرک: مایع، گاز، سیال فوق بحرانی

نکته:

اساس جداسازی تمایل گونه به فاز متحرک یا فاز ساکن می‌باشد. اگر تمایل به فاز ساکن بیشترباشد جزء عقب می افتد و اگر تمایل به فاز متحرک بیشتر باشد در مهاجرت جلو می افتد.



شکل ۳-جداسازی گونه های مختلف

تقسیم بندی روش‌های کروماتوگرافی:

الف-تقسیم بندی چگونگی تماس فاز ساکن و متحرک

۱-کروماتوگرافی ستونی

در این روش کروماتوگرافی فاز ساکن درون یک لوله باریک به نام ستون کروماتوگرافی قرار گرفته و فاز متحرک از درون فاز ساکن عبور می‌کند. نیرو جلو برنده فاز ساکن می‌تواند نیرو گرانش حلال یا تحت فشار با نیروی خارجی مثل پمپ

www.ShimiPedia.ir

۲-کروماتوگرافی مسطح

در این کروماتوگرافی فاز ساکن روی یک سطح پوشانده شده و فاز متحرک باید از داخل فاز ساکن عبور کند. نیروی جلو برنده فاز ساکن نیروی موینه مثل TLC و یا نیروی خارجی می‌تواند باشد.

ب- تقسیم بندی بر اساس نوع فاز متحرک، فاز ساکن و تعادل حاکم بین فاز ساکن و متحرک

بر اساس نوع فاز متحرک به گروه های زیر تقسیم میشود.

۱-کروماتوگرافی مایع یا LC

فاز متحرک مایع میباشد.

۱-۱کروماتوگرافی مایع-مایع تقسیمی

فاز ساکن مایع است. چون مایع نمی‌تواند ثابت باشد. از مایع تثبیت شده روی یک بستر جامد بهره برده می‌شود. نوع تعادل تقسیم بین دو مایع امتزاج ناپذیر است شبیه استخراج مایع-مایع

۱-۲ کروماتوگرافی مایع-فاز پیوندی BP

فاز ساکن، مواد آلی پیوند داده شده روی یک بستر جامد می‌باشند. مثل گروه های C8 یا C18

۱-۳ کروماتوگرافی (مایع-جامد) یا (جامد-مایع) یا کروماتوگرافی جذب سطح

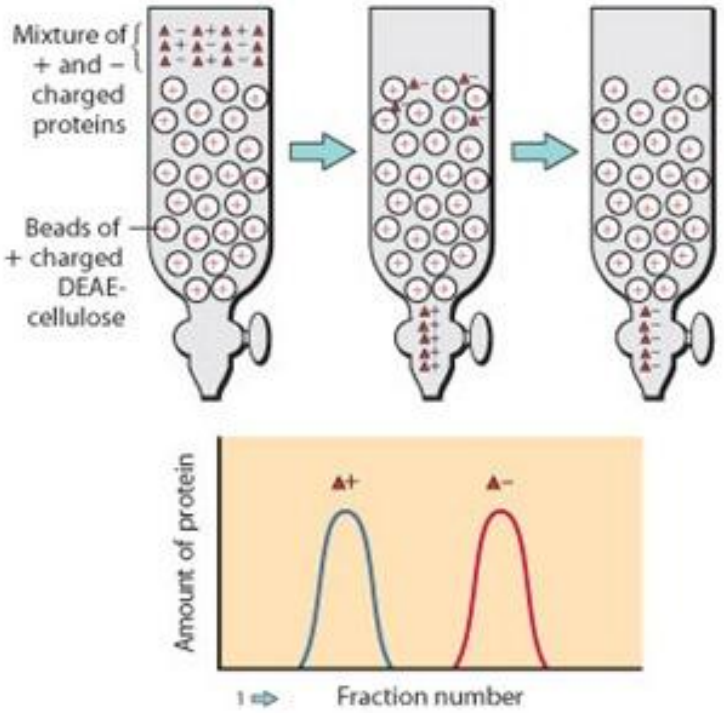
فاز ساکن یک جامد می‌باشد. نوع تعادل جذب سطحی یا surface adsorption می‌باشد

۱-٤ کروماتوگرافی تعویض یون یا اصطلاحا یونی

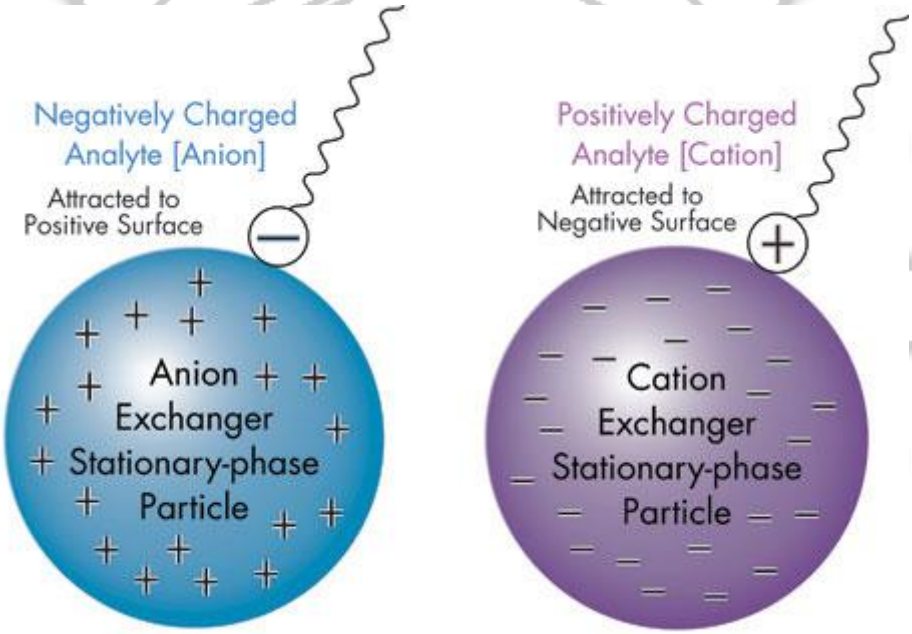
فاز ساکن یک رزین است و قابلیت تعویض یون دارد.

CHEMDEP.com

www.ShimiPedia.ir



شکل ٤- جداسازی تعویض یون



شکل ٥- بسترهای تعویض یونی

نکات:

www.ShimiPedia.ir

کروماتوگرافی یونی یا تعویض یون برای جداسازی اجزای یونی یونها یا ترکیباتی که بتوان بـه یـون تبـدیل کرد، استفاده می‌شود.

رزین‌های تعویض یون کاتیونی با فرم کلی $RSO_3^-H^+$ یا $RSO_3^-Na^+$ یا RCOOH نشان داده می‌شوند.

رزین‌های آنیونی یا بازی مثل $RNH_3^+Cl^-$ می‌باشند..

نیروی بین آنالیت و فاز ساکن از نوع جاذبه و دافعه الکترواستاتیکی می‌باشد.

۱-۵ کروماتوگرافی طردی (غربالی)

فاز ساکن مایعی است در در میان منافد و حفرات یک بستر پلیمری قرار گرفته است. این منافذ انـدازه‌هـای معینی دارند. شبیه سیستم LLC است ولی این فاز ساکن مایع در بستر پلیمری قرار گرفتـه کـه یـک سـری خلل و فرج دارد که می‌تواند اندازه آن‌ها تغییر کند.

نوع تعادل تقسیم و طرد اندازه ای می‌باشد. یعنی ابتدا مولکول‌هـایی کـه سـایز معینـی دارنـد وارد حفـرات میشوند سپس می‌تواند در فاز ساکن تقسیم شوند. بنابراین فقط مولکول‌های خاصی می‌توانند وارد حفـرات شوند. مولکول‌های درشت جرم مولکولی بالا وارد حفرات نشده و سریع‌تر از سایرین از ستون خارج مـی-شود. مولکول‌هایی هم که وارد حفره شده‌اند با ترتیب معینی خارج می‌شوند.

نکات:

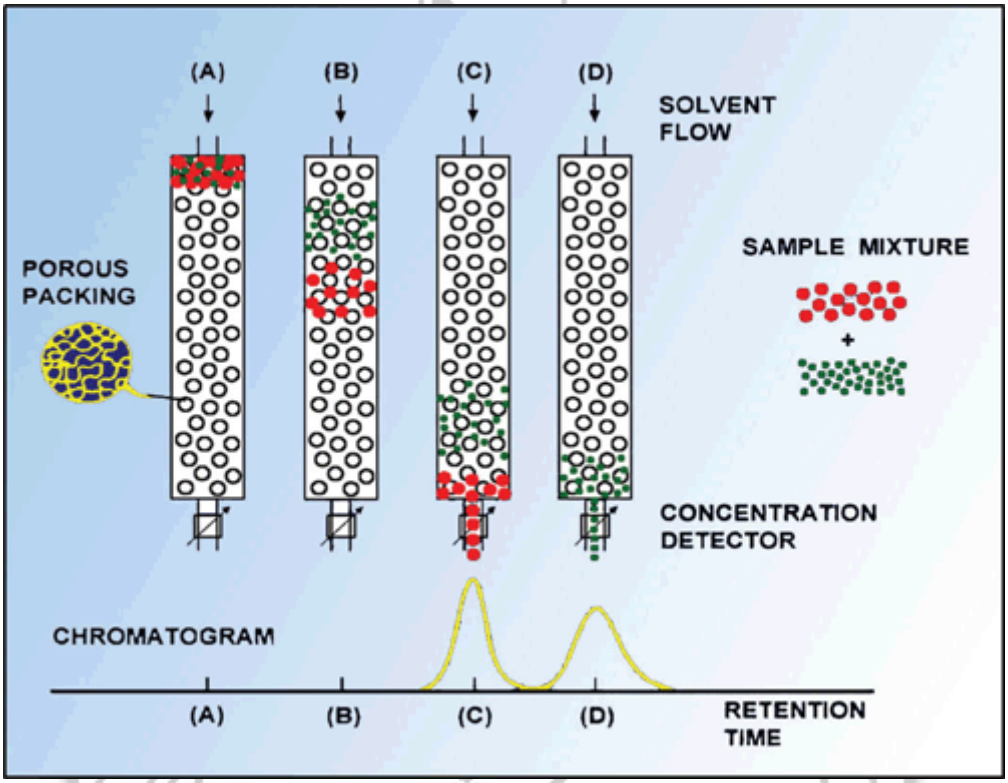
این روش برای جداسازی گونه های با جرم مولکولی بالا مثل پلیمرها و ترکیبات همولوگ استفاده می‌شود.

کروماتوگرافی اندازه‌ای به دو روش تقسیم می‌شود.

کروماتوگرافی ژل صافی gel filtration chromatography بیشتر برای جداسازی گونه‌های محلـول در آب استفاده می‌شود.

www.ShimiPedia.ir

کروماتوگرافی ژل تراوا gel permeation chromatography GPC بیشتر برای جداسازی گونـه‌هـای غیـر قطبی‌تر استفاده می‌شود.



شکل ٦- کروماتوگرام و جداسازی ستونی

۲-کروماتوگرافی گازی

فاز متحرک گاز است که معمولا به آن گاز حامل یا carrier gas هم گفته میشود.

۲-۱کروماتوگرافی گاز-مایع GLC

فاز ساکن روی یک بستر جامد تثبیت شده است.

نوع تعادل تقسیم بین گاز در مایع است.

www.ShimiPedia.ir

۲-۲کروماتوگرافی فاز-فاز پیوندی BP

فاز ساکن ترکیبات آلی پیوند شده روی یک بستر جامد میباشند.

نوع تعادل بین گاز و فاز پیوندی است.

۲-۳ کروماتوگرافی گاز جامد GSC

فاز ساکن جامد است.

نوع تعادل جذب سطحی است.

۳-کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی SFC

فاز متحرک سیال فوق بحرانی است. هرگاه یک گاز در فشار و دمایی موسوم به فشار در دمای بحرانی قرار گیرد به سیالی تبدیل می‌شود که به آن سیال فوق بحرانی گفته می‌شود.

استفاده از سیال فوق بحرانی دو مزیت دارد.

از نظر قطبیت شبیه مایعات است پس مزیتهای LC را دارد.

سیال فوق بحرانی از نظر نفوذ پذیری مثل گاز ها می‌باشد پس مزیتهای GC را دارد.

معمولا سیال SFC گاز CO_2 می‌باشد.

معمولا فاز ساکن در SFC، BP یعنی همان فاز پیوندی است.

نوع تعادل، تقسیم بین سیال فوق بحرانی و فاز پیوندی است.

نکات:

۱-از میان روشهای GC، GLC بیشترین کاربرد دارد و بیشتر منظور از GC، همان GLC میباشد.

www.ShimiPedia.ir

۲-روشهای LC، کاربردهای محدود دارد. بیشتر از روشهای HPLC استفاده می‌شود.

۳-از میان روشهای کروماتوگرافی فقط روش LC، قابل اجرا به صورت ستونی و مسطح است. GC و SFC باید حتما به صورت ستونی باشد.

٤-روش GC، برای جداسازی نمونه‌هایی با نقطه جوش کم (فرار) و پایدار حرارتی تا حدود ٤٠٠ درجه سانتیگراد استفاده می‌شود. زیرا در GC نمونه ابتدا به گاز تبدیل می‌شود. روش HPLC یا LC برای جداسازی ترکیبات با فراریت کم یا غیر فرار و ترکیبات ناپایدار حرارتی نسبت به GC ارجحیت دارد.

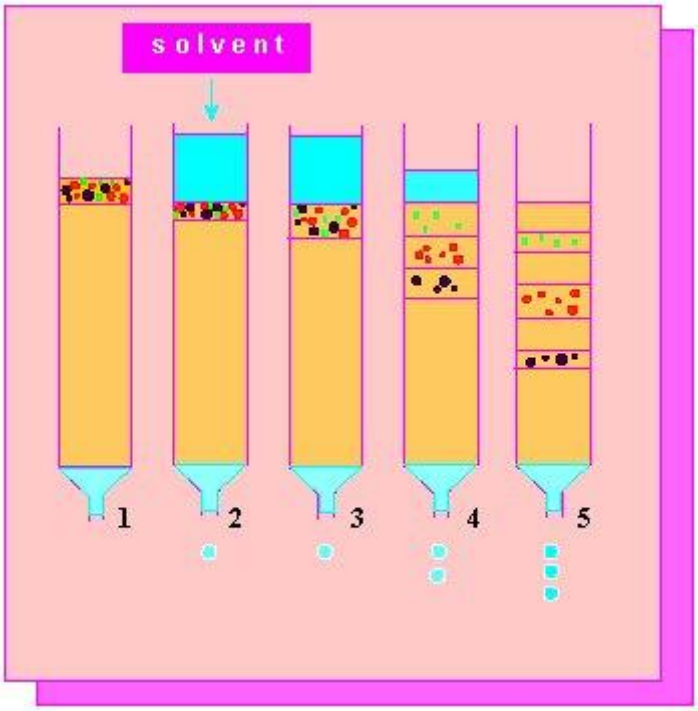
۵-دامنه کار HPLC از GC بالاتر است.

تعاریف کروماتوگرافی

شویش در کروماتوگرافی

شویش عبارت است از عبور دادن اجزای نمونه از میان ستون از طریق اضافه کردن پیوسته فاز متحرک تازه، این فراین شویش کروماتوگرافی گویند و این شویش سبب جداسازی می‌شود. به فاز متحرک افزوده شده اصطلاحا شوینده یا eluent گویند.

www.ShimiPedia.ir



شکل ۷- شست و شو با حلال

انواع شویش:

شویش ایزوکراتیک:

در این روش ترکیب فاز متحرک از نظر ماهیت و قطبیت در طی فرایند شویش ثابت است. به عبارت دیگر از یک نوع حلال یا شوینده استفاده می‌شود. این روش زمانی سودمند است که اجزای جداشونده به اندازه کافی از هم متفاوت باشند. عیب این روش این است که کارایی جداسازی پایین است چون نوع حلال از ابتدا تا انتها ثابت است.

مزیت روش استفاده شده از دستگاه های ساده‌تری برخوردار است.

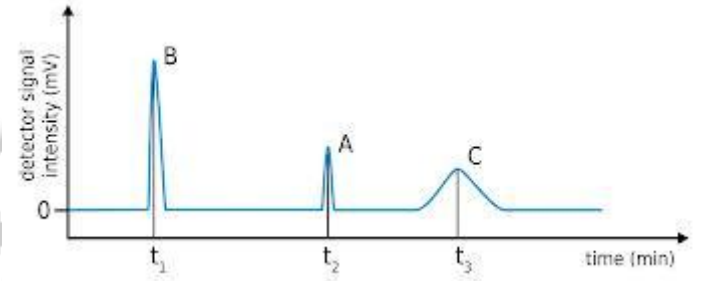
شویش گرادیانی:

www.ShimiPedia.ir

در این روش ترکیب و قطبیت فاز متحرک به صورت برنامه ریزی شده در طی فرایند شویش تغییر می‌کند. مزیت این روش نسبت به شویش ایزوکراتیک این است که کارایی بالایی دارد و معمولا در LC برای جداسازی گونه هایی با بازه وسیع قطبیت به گونه ای که قطبیت آنها نیز به هم نزدیک است به کار می‌رود. ایراد این روش پیچیدگی و گران بودن آن می‌باشد.

کروماتوگرام

نموداری که از پاسخ آشکار ساز بر حسب زمان یا حجم فاز متحرک به دست می‌آید.



شکل ۸- کروماتوگرام

هر کروماتوگرام در کار کمی و در کار کیفی استفاده می‌شود. در کار کمی ارتفاع یا مساحت زیر سطح پیک-ها اهمیت دارد. در کار کیفی زمان ظاهر شدن پیک‌ها یا زمان بازداری مهم می‌باشد.

نکته: هرچه به انتهای ستون نزدیک می‌شویم در شویش فاصله بین نوارها بیشتر می‌شود.

ضریب تقسیم

فرض می‌کنیم گونه‌ای مثل A بین فاز متحرک و فاز ساکن توزیع می‌شود.

$$A(mobile) \rightarrow A(stationary)$$

این تعادل در سطح تماس دو فاز اتفاق می‌افتد. شباهت تعادل این واکنش را ضریب توزیع یا ضریب تقسیم گویند.

www.ShimiPedia.ir

$$k = \frac{C_s}{C_m}$$

نکات:

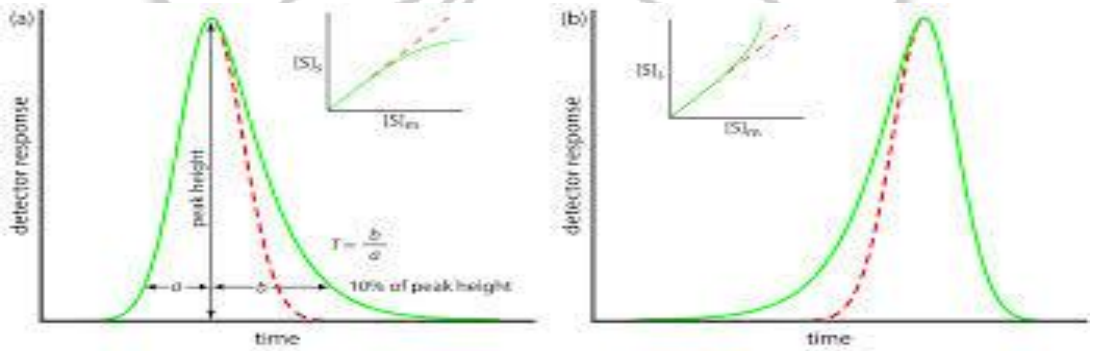
۱-مقدار k به فاز ساکن، دما و ماهیت گونه وابسته است.

۲-هرچه که k بیشتر باشد، تمایل به فاز ساکن بیشتر می‌شود یعنی از ستون دیرتر خارج می‌شود.

۳-در بازه وسیعی از غلظت‌ها k ثابت است. یعنی نمودار C_s برحسب C_m خطی می‌شود و شیب آن همان k می‌شود.

روش‌های کروماتوگرافی براساس این معادله ، روش‌های کروماتوگرافی خطی گفته می‌شود.

در برخی تعادل ها این خاصیت خطی وجود ندارد. مثلا در غلظتهای بالا سطح فاز ساکن اشباع میشود.

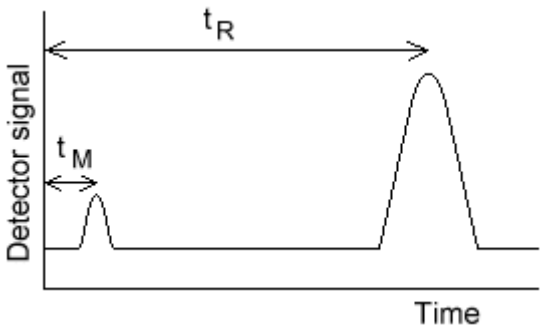


شکل ۹- فرونتینگ و تیلینگ

زمان بازداری:

عبارت است از زمانی که طول می‌کشد تا آنالیت پس از تزریق به آشکارساز برسد و با حرف t_R نشان میدهند. t_M زمان بازداری که یک گونه فرضی بدون اینکه در ستون نگه داشته شود لازم دارد تا طول ستون را طی کند. در واقع همان زمان بازداری فاز متحرک یا حلال است.

www.ShimiPedia.ir



شکل ۱۰- پیک حلال یا حامل t_m و پیک آنالیت t_R

u سرعت خطی فاز متحرک و v سرعت خطی حرکت گونه و L طول ستون می‌باشد.

$$u = \frac{L}{t_M}$$

$$v = \frac{L}{t_R}$$

v=u*(کسری از زمان که گونه در فاز متحرک باشد)

V_s حجم فاز ساکن، و V_m حجم فاز متحرک و k ضریب تقسیم می‌باشد.

$$v = u.\frac{1}{1 + k\frac{v_s}{v_m}}$$

این رابطه نشان می‌دهد که هرچه ضریب تقسیم بیشتر باشد، v کمتر می‌شود

$k\frac{v_s}{v_m}$فاکتور ظرفیت یا capacity factor

$$k' = k\frac{v_s}{v_m}$$

$$v = u.\frac{1}{1 + k'}$$

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_m}.\frac{1}{1 + k'}$$

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

$$t'_R = t_R - t_m$$

www.ShimiPedia.ir

$$k' = \frac{t'_R}{t_m}$$

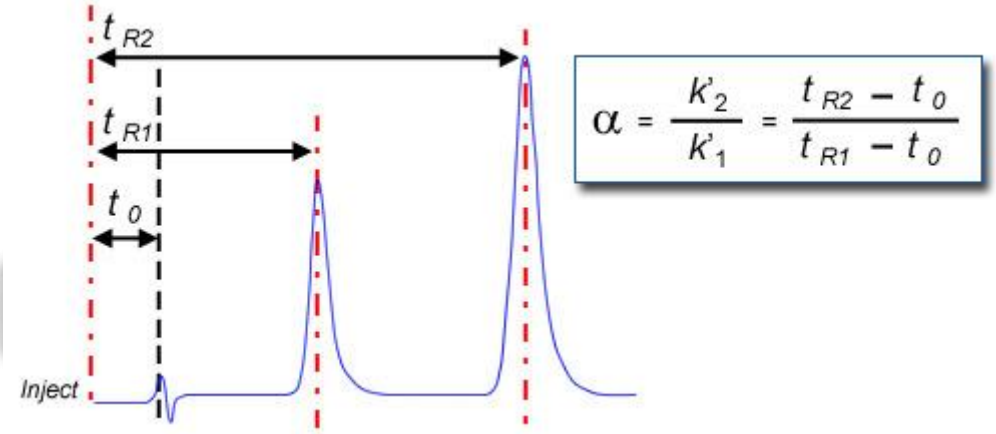
k'_A بیانی از سرعت مهاجرت آنالیت مثلا A می‌باشد. که با افزایش k'_A زمان بازداری هم زیاد میشود هر عاملی که روی k تاثیر بگذارد روی 'k تاثیر میگذارد.

این پارامتر $\frac{v_s}{v_m}$ از ستون به ستون دیگر تغییر می‌کند.

هرچه 'k بیشتر باشد زمان بازداری بیشتر می‌شود به گونه ای که برای 'k کوچکتر از یک زمان بازداری بسیار کوچک میباشد. در 'k بزرگتر از ۱۰ زمان جداسازی طولانی خواهد بود. بهترین 'k در بازه ۱–۵ قرار دارد.

فاکتور انتخاب یا selectivity factor

پارامتری که نشان دهنده اختلاف سرعت مهاجرت گونه ها در ستون میباشد.



شکل ۱۱– فاکتور انتخاب

چون برای گونه های ۱ و ۲ ، ستون یکسان است $\frac{v_s}{v_m}$ یکسان میباشد.

برای اینکه بتوان دو گونه ۱ و ۲ را از هم جدا کرد باید α>۱ باشد. اگر α=۱ باشد، در این صورت زمان بازداری دو گونه ۱ و ۲ یکسان می‌شود و جداسازی رخ نمیدهد.

هرچه α>۱ بیشتر باشد، جداسازی بهتر رخ خواهد داد.

www.ShimiPedia.ir

معمولا α را ۱.۵ در نظر میگیرند.

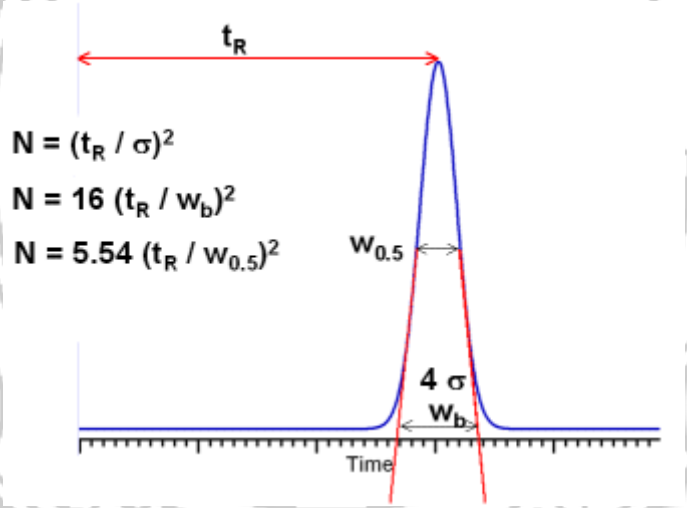
نظریه بشقابک‌های تئوری

اولین بار مارتین و سینج این نظریه را بیان کردند. فرض شد که یک ستون کروماتوگرافی از تعداد زیادی بشقابک تئوری N تشکیل شده است که گونه بین فاز ساکن و متحرک به تعادل می‌رسد. هرچه تعداد بشقابک‌ها بیشتر باشد، ارتفاع بشقابک‌های تئوری کمتر می‌شود و تعداد تعادل‌ها زیاد می‌شود. نتیجه این است که جداسازی بهتر رخ می‌دهد. این تئوری بر این اساس استوار است که کروماتوگرام‌ها شکل منحنی گوسی دارند.

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

محاسبه N از طریق تجربی

یک پیک را از کروماتوگرام گرفته و N را به صورت تجربی محاسبه میکنیم.



شکل ۱۲- تعداد ستونهای تئوری

متغیرهای سینتیکی موثر بر پهن شدگی باندها یا موثر بر H

www.ShimiPedia.ir

یک سری متغیرهای ترمودینامیکی روی H تاثیر دارند که عبارت اند از:

سرعت خطی فاز متحرک

ضرایب نفوذ فاز ساکن و متحرک

فاکتور ظرفیت

قطر ذرات پرکننده ستون

ضخامت لایه فاز ساکن

تاثیر سرعت خطی فاز متحرک (معادله وندیمتر)

این تاثیر با فرمول زیر بیان میشود.

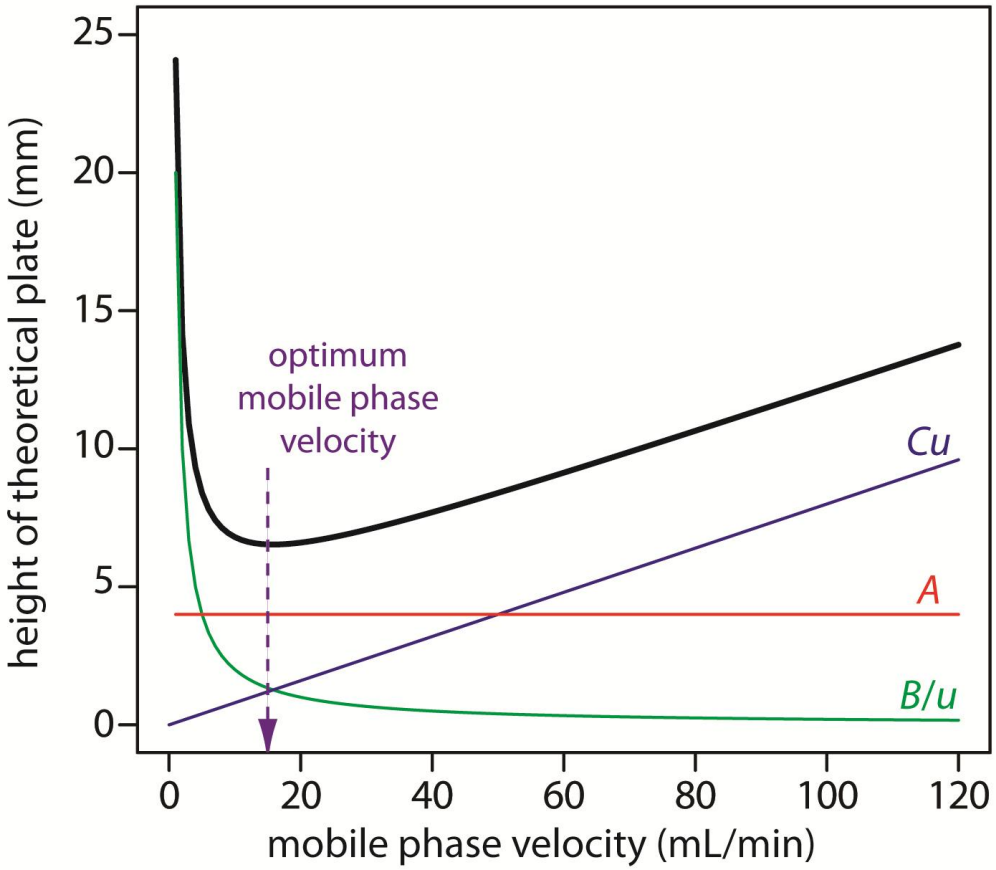
$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u$$

A نفوذ ادی eddy diffusion

B نفوذ طولی longitudinal diffusion

C انتقال جرم و نفوذ عرضی

www.ShimiPedia.ir



شکل ۱۳- منحنی وندیمتر

نکات:

این منحنی در یک سرعت جریان خاص دارای یک مقدار مینیمم برای H می‌باشد. بنابراین سرعت جریان در این H به عنوان سرعت جریان بهینه انتخاب می‌شود. در این نقطه مشتق برابر صفر می‌باشد.

$$\frac{dH}{du} = -\frac{B}{u^2} + C$$

$$H = A + \frac{B}{\sqrt{B/C}} + C\sqrt{B/C}$$

$$H = A + 2\sqrt{BC}$$

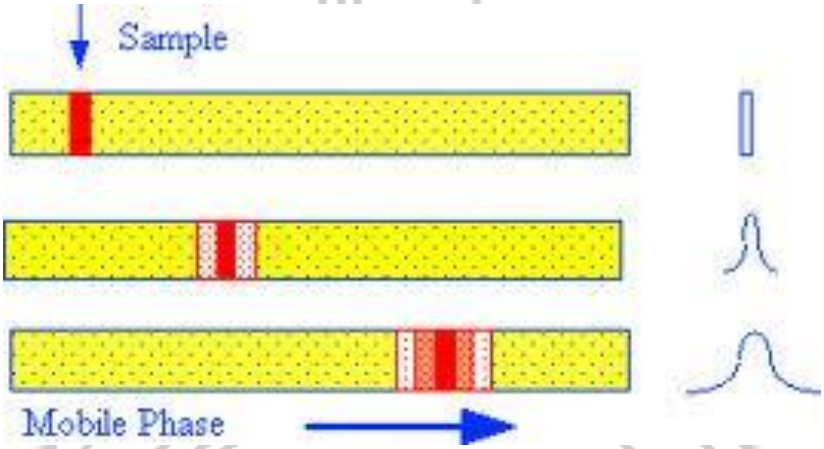
در هر دو کروماتوگرافی GC و LC حداکثر کارایی با حداقل H در سرعتهای جریان کم به دست می آید یعنی اوایل منحنی که سرعت پایین است. در LC سرعت جریان مینیمم نسبت به GC کمتر است.

www.ShimiPedia.ir

در کروماتوگرافی مایع چون سرعت نفوذ طولی اندک است از عبارت B/u میتوان صرف نظر کرد.

نفوذ طولی:

وقتی در ستون کروماتوگرافی یک پلاگ از نمونه وارد می‌شود با توجه به نفوذ از محیط غلیظ به رقیق یک سری از گونه‌ها سریع‌تر و یک سری دیرتر حرکت می‌کنند و سبب پهن شدگی می‌شوند.



شکل ١٤- پهن شدگی پیک

$$\frac{B}{u} = \frac{2k_d D_M}{u}$$

میزان پهن شدگی یا نفوذ طولی در ستون غیر انباشته از ستون انباشته یا packed بیشتر است.

عبارت نفوذ طولی با ضریب نفوذ فاز متحرک رابطه مستقیم دارد. هرچه ضریب نفوذ فاز متحرک بیشتر باشد، عبارت نفوذ طولی هم بیشتر می‌شود برای همین در GC، B/u بالاتری دارد چون در GC فاز متحرک گاز است. پهن شدگی پیک‌ها از نفوذ طولی در گازها بیشتر مایعات است.

عبارت انتقال جرم یا پهن شدگی عرضی یا نفوذ عرضی Cu

علت این نوع پهن شدگی محدودیت در انتقال جرم در فازهای ساکن و متحرک است که در نتیجه آن تعادل آنالیت در فاز ساکن و متحرک به کندی انجام شده و در نتیجه یک شرایط غیر تعادلی ایجاد می‌شود. یعنی جداسازی در یک شرایط غیر تعادلی انجام می‌شود.

www.ShimiPedia.ir

آنالیت باید بین فاز ساکن و متحرک به تعادل برسد، تعادل بین فاز ساکن و متحرک در سطح مشترک ۲ فاز انجام می‌شود . برای اینکه آنالیت بین فاز ساکن و متحرک به تعادل برسد باید آنالیت از داخل فاز ساکن با یک ضخامت خاص به سطح مشترک نفوذ و از داخل فاز متحرک هم با یک ضخامت به سطح مشترک بیاید و سپس در فصل مشترک بین فاز ساکن و متحرک تعادل اتفاق بیفتد، این عمل انتقال جرم است. اگر این انتقال جرم محدود شود تعادل تحقق نمی‌یابد. بنابراین نتیجه این می‌شود که یک سری از نمونه‌ها در فاز متحرک جلو و یک سری در فاز ساکن عقب می‌مانند. بنابراین پیک پهن خواهد شد.

نکات:

انتقال جرم به صورت عمود بر سرعت جریان انجام می‌شود برای همین به آن نفوذ عرضی گفته میشود.

عبارت انتقال جرم با سرعت جریان رابطه مستقیم دارد.

هرچه سرعت انتقال جرم یا ضرایب نفوذ در دو فاز بیشتر باشد، یعنی راحت تر در دو فاز نفوذ کند این نوع پهن شدگی بیشتر می‌شود.

با افزایش ضخامت فاز ساکن این نوع پهن شدگی بیشتر می‌شود. یعنی H بیشتر و کارایی کمتر می‌شود. بنابراین باید از فازهای ساکن نازک استفاده کنیم چون هرچه ضخامت بیشتر باشد جرم دیرتر به سطح مشترک می‌رسد.

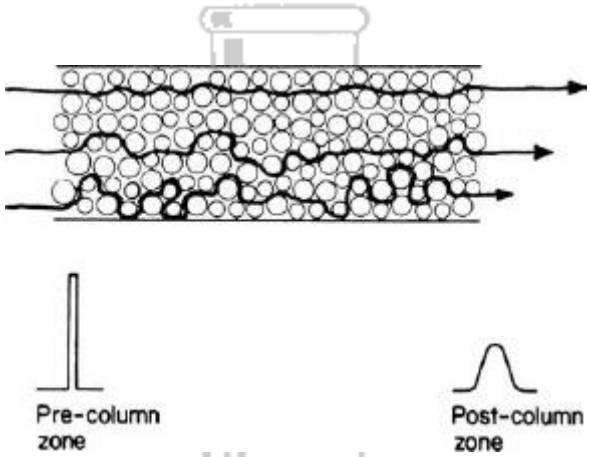
در مورد فازهای ساکن جامد هرچه سرعت جذب و واجذب از سطح بیشتر باشد، این نوع پهن شدگی کمتر می‌شود.

CHEMDEP.com

www.ShimiPedia.ir

نفوذ ادی یا مسیرهای چندگانه

این نوع پهن شدگی در ستون‌های انباشته اهمیت دارد. علت آن وجود مسیرهای متفاوت برای عبور آنالیت میباشد.



شکل ۱۵- مسیرهای مختلف عبوری

در این ستون وقتی آنالیت وارد شود مسیرهای چندگانه برای ذرات آنالیت یکسان نیست و طول های متفاوتی دارد.

اندازه ذرات پر کننده ستون و H:

به طور کلی با کاهش اندازه ذرات packing و با کاهش قطر ستون (ستون باریک)H کمتر شده و کارایی بیشتر می‌شود.

نکته: عبور گاز از میان ذرات مشکلی نخواهد داشت. اما در LC عبور فاز متحرک از داخل ستون سخت تر می‌شود. بنابراین با کوچک شدن سایز ذرات از نیروی خارجی استفاده می‌شود.

قدرت تفکیک ستون:

معیاری است که بیان کننده توانایی ستون برای جداسازی دو آنالیت میباشد و با R_s نشان می‌دهند.

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B}$$

روابط مهم در Rs

www.ShimiPedia.ir

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} . (\frac{k'_B}{1 + k'_B})(\frac{\alpha - 1}{\alpha})$$

$$R_s \propto \sqrt{N}$$

$$N = 16\, {R_s}^2\, (\frac{\alpha - 1}{\alpha})^2 . (\frac{1 + k'_B}{k'_B})$$

برای افزایش Rs باید N زیاد شود برای افزایش N باید طول ستون را زیاد کنیم که عیب زمان بـالای آنـالیز میباشد.

$$(t_R)_B = \frac{16\, {R_s}^2\, H}{u} . (\frac{\alpha}{1 - \alpha})^2 \frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2}$$

$$t_R \propto {R_s}^2$$

بهینه کردن کارایی یک ستون

هدف انتخاب شرایط مناسب برای بهترین جداسازی در کمترین زمان است.

عبارت

با روشهای کروماتوگرافی می‌توان جداسازی‌هایی را که به روش‌های دیگر خیلی مشکل می‌باشند انجام داد. زیرا اختلافات جزئی موجود در رفتار جزئی اجسـام در جریـان عبـور آنهـا از یـک سـامانه کرومـاتوگرافی چندین برابر می‌شود. هر قدر این اختلاف بیشتر شود قدرت جداسازی مواد بیشتر و برای انجام جداسـازی مواد نیاز کمتری به وجود اختلافات دیگر خواهد بود.

تغییر در N

به طور کلی با افزایش N کارایی بیشتر می‌شود. برای افزایش N

الف– L را افزایش دهیم. اشکال زیاد شدن زمان جداسازی

ب–H را کاهش دهیم. این کار نسبت به افزایش طول ستون ارجحیت دارد.

www.ShimiPedia.ir

روشهای کاهش H

الف-کاهش سرعت جریان فاز متحرک (u_{opt})

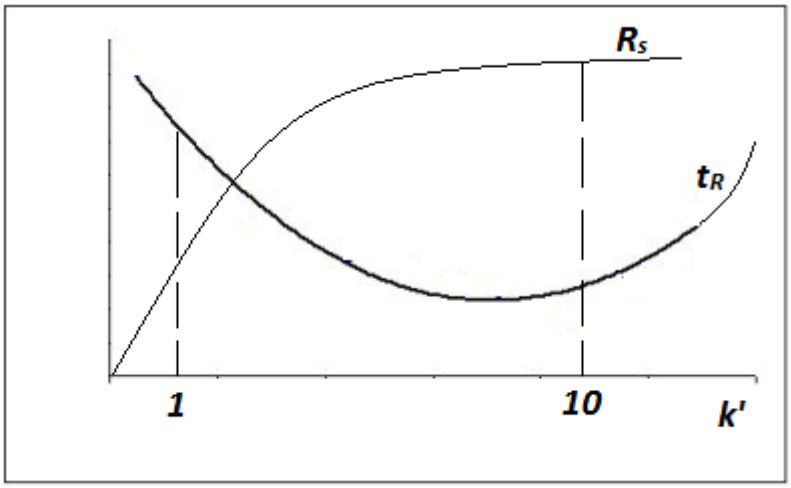
ب-کاهش اندازه ذرات packing

ج-کاهش ضخامت ذرات فاز ساکن

٤- افزایش ویسکوزیته فاز متحرک در LC، چون ضرایب انتقال جرم را زیاد می‌کند و H را کم می‌کند.

تغییر در فاکتور ظرفیت یا 'k

اگر با نمودار Rs یا t_R نسبت به 'k رسم کنیم نمودار زیر به دست می آید.



شکل ١٦- قدرت تفکیک و زمان باز باداری با فاکتور انتخاب

در مقادیر 'k کوچکتر از یک هم زمان بازداری بزرگ است هم Rs پایین میباشد.

معمولا رایج ترین روش در کروماتوگرافی برای بهبود کارایی یا تفکیک تغییر در 'k است.

راه های بهینه کردن 'k:

در GC، 'k را با افزایش دما بهبود می دهند بنابراین دمای ستون را تغییر میدهند.

www.ShimiPedia.ir

در LC، k' را با تغییر قطبیت فاز متحرک که روی k تاثیر دارد، بهبود می‌دهد. هرچند فاز ساکن ستون را هم می‌توان تغییر داد ولی کار سخت‌تری است.

راه های افزایش α

تغییر در ترکیب و pH فاز متحرک

تغییر ترکیب فاز ساکن که استفاده کم ولی موثری دارد.

افزایش دما که در GC بیشتر کاربرد دارد.

استفاده از ترکیبات کمپلکس دهنده در فاز ساکن سبب می‌شود که نوع بر همکنش‌ها عوض شود.

کاربردهای کروماتوگرافی:

کاربرد کیفی: با توجه به زمان بازداری و مقایسه با زمان بازداری استاندارد

کاربرد کمی: با بررسی سیگنال تجزیه ای و بررسی ارتفاع پیک یا مساحت زیر پیک به دست می آید.

ارتفاع پیک با غلظت رابطه عکس دارد.

شرایط ستون در اندازه گیری‌ها یکسان باشد.

نباید از تزریق زیاد نمونه هم پرهیز کرد چون ممکن است که overloading اتفاق افتاد و پیک قابل ارزیابی نباشد.

نکته:

اشکال عمده در استفاده از ارتفاع پیک به عنوان سیگنال این است که مواردی که سبب پهن شدگی و ... هستند که ارتفاع پیک را تحت تاثیر قرار میدهند سبب اشکال در محاسبات میشود. چرا که ارتفاع تنها باید تابع غلظت یا جرم نمونه باشد.

www.ShimiPedia.ir

راه های به دست آوردن مساحت زیر پیک:

روش مثلثی

روش وزنی

انتگرال گیری دیجیتالی

در کار های کمی از معادله

$$S=m.C$$

استفاده میشود. که S همان مساحت سطح و C غلظت و m شیب منحنی کالیبراسیون است.

عیبهای روش:

عدم قطعیت در حجمهای تزریقی

حساسیت متفاوت آشکارساز برای گونه های مختلف

نکته:

برای اینکه بتوان عدم قطعیت ناشی از حجم های تزریقی را از بین برد باید از سیستم تزریقی injection valve یا شیر تزریق استفاده کرد. این سیستم مجهز به حلقه نمونه گذاری است که این حلقه نمونه‌های تکرار پذیری را به ستون وارد می‌کند.

افزایش استاندارد داخلی: بیشتر در کروماتوگرافی و اسپکتروسکوپی نشر اتمی استفاده می‌شود. معمولا در این روش یک نمونه استاندارد داخلی که پیک نزدیک پیک آنالیت دارد به محلول استاندارد و نمونه اضافه

www.ShimiPedia.ir

می‌شود. سیگنال تجزیه‌ای مورد استفاده به‌صورت نسبت مساحت یا ارتفاع پیک آنالیت به‌مساحت یا ارتفـاع پیک استاندارد داخلی در نظر گرفته میشود.

$$\text{سیگنال تجزیه ای} = \frac{\text{مساحت یا ارتفاع پیک آنالیت}}{\text{مساحت یا ارتفاع پیک استاندارد داخلی}}$$

مزیت روش این است که عدم قطعیت و عدم دقت در تزریق از بین میرود.

روش نرمالیزاسیون مساحت: وقتی کروماتوگرام چند جزء دارد میتوان درصد یک جزء را به صورت

$$\text{درصد یک جزء} = \frac{\text{مساحت زیر پیک آن جزء}}{\text{مساحتها مجموع}} * 100$$

پاسخ آشکارساز برای گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد به شرطی از رابطه فوق میتـوان اسـتفاده کـرد کـه پاسخ آشکارساز برای همه گونه‌ها یکسان باشد. یعنی گاهی آشکارساز نسبت به یک گونه حساسیت خوبی دارد و پیک شدیدی می‌دهد در حالی که غلظت اندکی دارد و بالعکس.

باید انتظار داشت نمونه های A و B با غلظت‌های یکسان پیکهای برابری داشته باشند ولی این طور نیست.

مثال:

۱.۱ میلی مول ۱-بوتانول و ۱.۲۵ میلی مول ۱-پنتانول به روش کروماتوگرافی گازی جدا شده اند. مساحت پیک آنها به ترتیب برابر ۸۰۰ و ۱۲۰۰واحد میباشد. هرگاه ۰.٦میلی مول ۱-بوتانول به یک محلـول مجهـول حاوی ۱-پنتانول اضافه شود مساحت سطح پیکها به ترتیب ۷۵۰ و ٦۰۰ خواهد شد. مقدار ۱-پنتانول چقدر میباشد.

www.ShimiPedia.ir

مزایای کروماتوگرافی

مزیت کروماتوگرافی نسبت به ستون تقطیر این است که نسبتاً آسان می‌توان به آن دست یافت با وجود اینکه ممکن است چندین روز طول بکشد تا یک ستون تقطیر به حداکثر بازده خود برسد ولی یک جداسازی مواد کروماتوگرافی می‌تواند در عرض چند دقیقه یا چند ساعت انجام گیرد.

یکی از مزایای برجسته روش‌های کروماتوگرافی این است که آنها ملایم هستند. به این معنی که احتمال تجزیه مواد جداشونده به وسیله این روش‌ها در مقایسه با سایر روش‌ها کمتر است.

مزیت دیگر روش‌های کروماتوگرافی در این است که تنها مقدار بسیار کمی از مخلوط برای تجزیه لازم است به این دلیل روش‌های تجزیه‌ای مربوط به جداسازی مواد کروماتوگرافی می‌توانند در مقیاس میکرو و نیمه میکرو انجام گیرند.

روش‌های کروماتوگرافی ساده سریع و وسایل مورد لزوم آنها ارزان هستند. مخلوط‌های پیچیده را می‌توان نسبتاً به آسانی به وسیله این روش‌ها به دست‌آورد.

مواد نوع کروماتوگرافی مواد شیمیایی مشابه کروماتوگرافی تقسیمی مواد شیمیایی غیر مشابه کروماتوگرافی جذب سطحی گازها و اجسام فرار کروماتوگرافی گازی مواد یونی و معدنی کروماتوگرافی تبادل یونی در ستون کروماتوگرافی کاغذی یا لایه نازک الکترفورز ناحیه‌ای مواد یونی و غیر یونی کروماتوگرافی تبادل یون یا ژلی مواد زیستی و ترکیباتی با جرم مولکولی نسبی بالا کروماتوگرافی ژلی الکتروفورز

کروماتوگرافی گازی:

در GC، ابتدا نمونه وارد محفظه تزریق میشود. نمونه به صورت بخار می‌باشد یا در محفظه تزریق تبخیر میشود. سپس وارد ستون شده و عمل شویش اتفاق می‌افتد.

نکات:

www.ShimiPedia.ir

کروماتوگرافی گازی برای جداکردن آنالیت‌هایی است کـه نقطـه جـوش پـایین دارنـد و در برابـر حـرارت پایدارند.

بین فاز متحرک و آنالیت هیچ برهمکنشی وجود ندارد و فاز متحرک فقط وظیفه حمل نمونه را دارد.

از میان روشهای کروماتوگرافی گازی GLC، بیشترین کاربرد را دارد و معمولا پیـک‌هـای GSC بـه خـاطر جذب سطحی دارای تیلینگ هستند و بیشتر برای جداسازی گازهای معدنی استفاده می‌شوند.

در کروماتوگرافی گازی حجم بازداری تعریف میشود.

$$V_R = t_R . F$$
$$V_m = t_m . F$$

Fسرعت جریان متوسط در داخل ستون میباشد.

چون در ستون افت فشار هم وجود دارد حجم های بازداری با یک ضریب تصحیح میشوند.

$$V_R{}^0 = t_R . F . J$$
$$V_m{}^0 = t_m . F . J$$

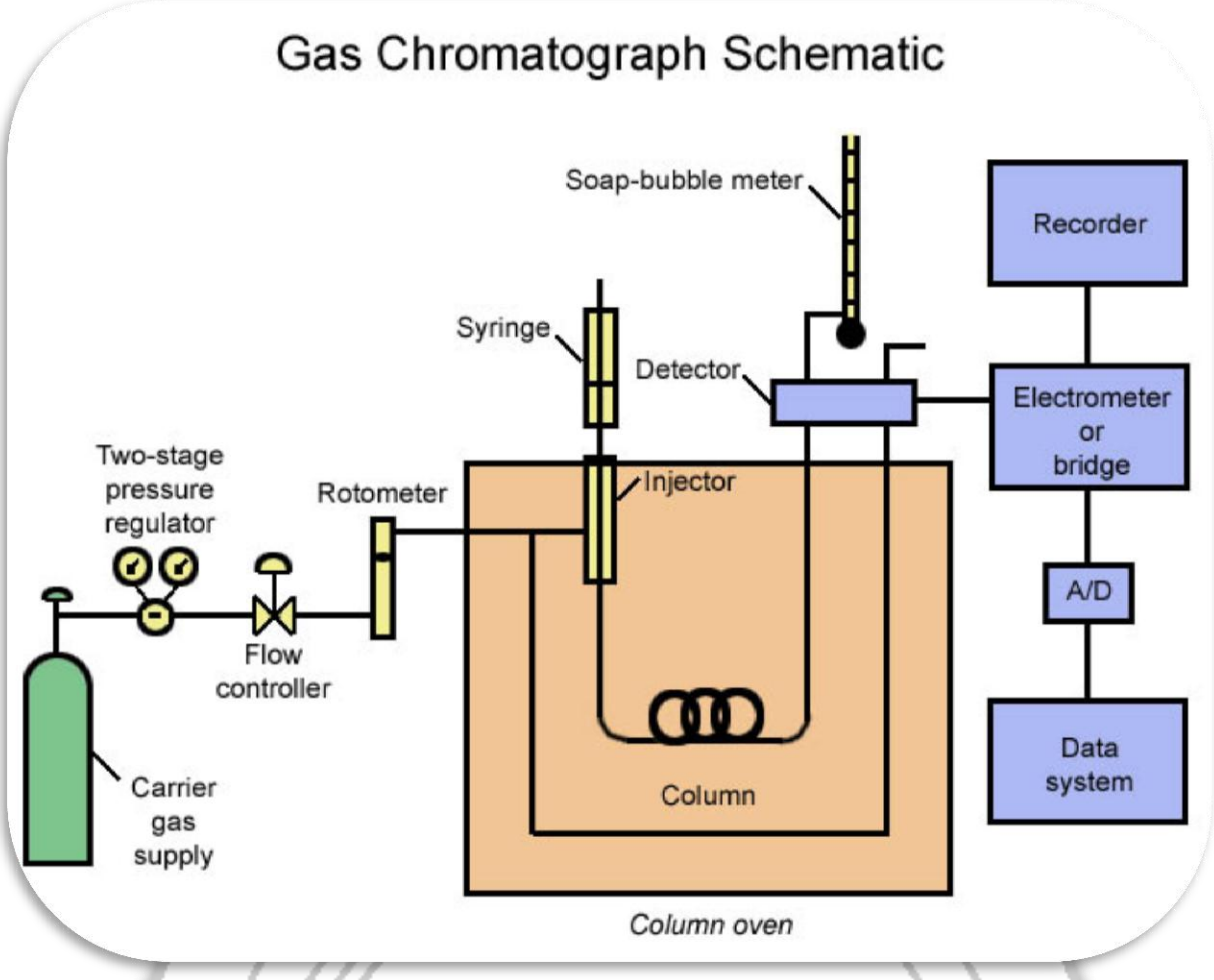
$$J = \frac{3((\frac{P_i}{P})^2 - 1)}{2((\frac{P_i}{P})^3 - 1)}$$

حجم بازداری ویژه:

$$V_g = \frac{V_R{}^0 - V_m{}^0}{w} * \frac{273}{T_c}$$
$$V_g = \frac{k}{\rho_s} * \frac{273}{T_c}$$

سیستم دستگاهی GC

www.ShimiPedia.ir



شکل ۱۷- کروماتوگرافی گازی

۱-گاز حامل

گاز حاملی که در GC استفاده می‌شود باید از نظر شیمیایی بی اثر باشد. یعنی با آنالیت یا فاز ساکن وارد واکنش نشود. گازهای حامل استفاده شده He، N_2، H_2، Ar و CO_2 می‌باشد.

نکات:

در GC، نوع گاز استفاده شده به نوع آشکار ساز بستگی دارد.

بعد از منبع یا کپسول گاز حامل معمولا یک ستون حاوی غربال مولکولی قرار داده می‌شود که کار آن جذب ناخالصی‌ها و رطوبت می‌باشد.

www.ShimiPedia.ir

فشار گاز حامل با تنظیم کننده‌های فشار کنترل می‌شود. با تنظیم فشار گاز حامل می‌توان سرعت جریان گاز حامل را هم کنترل کرد.

۲-سیستم تزریق

برای افزایش کارایی جداسازی بایستی نمونه در GC، با اندازه مناسب به صورت یک توده یا پلاگ وارد ستون شود. اگر زمان تزریق طولانی شود پیک‌ها پهن و کارایی کم می‌شود.

انواع روش‌های تزریق:

الف-استفاده از میکروسرنگ‌ها

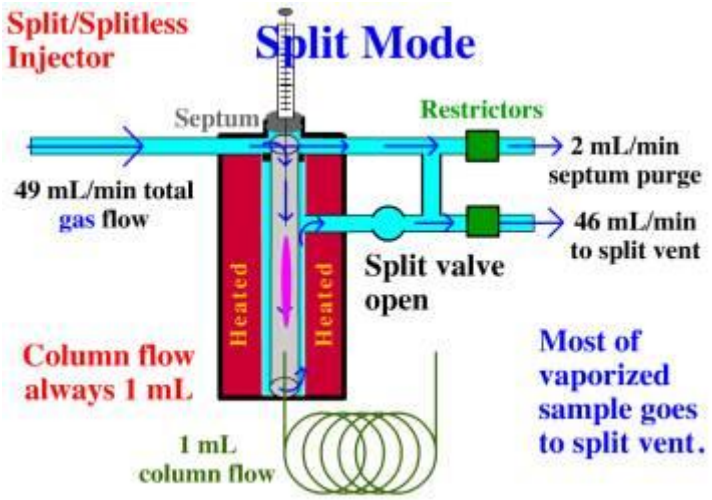
این سیستم برای تزریق نمونه‌های گاز یا مایع استفاده می‌شود و معمولا تزریق از طریق یک دیافراگم پلاستیکی یا سپتوم انجام میشود. دمای محفظه تزریق حدود ۵۰ درجه سانتیگراد باید از دیرجوشترین ترکیب بیشتر باشد تا مطمئن شد همه تبخیر شده‌اند.

نکته مهم: در GC اندازه تزریق شده بستگی به نوع ستون دارد، اندازه نمونه تزریقی به ستون‌های کاپیلاری یا مویینه از ستون‌های پر شده کمتر است.

مثلا حجم تزریقی به ستون کاپیلاری نهایت ۲ میکرولیتر و ستون‌های انباشته تا حدود ۲۰ میلی لیتر می‌باشد. برای وارد کردن چنین حجم اندکی به ستونهای مویینه از شکافنده یا sample splitter استفاده می‌شود. این شکافنده نمونه را بخش بخش می‌کند و بیشتر آن را به waste می‌فرستد و قسمتی از آن را وارد ستون می‌کند.

استفاده از شیر تزریقی هم برای نمونه های مایع و هم برای گاز استفاده می‌شود. حسن آن این است که نمونه با اندازه تکرار پذیر وارد می‌شود.

www.ShimiPedia.ir



شکل ۱۸- محفظه تزریق

تزریق نمونه های جامد برای تزریق نمونه های جامد به GC از کپسولهایی با جداره نازک استفاده می‌شـود. نمونه داخل کپسول قرار می‌گیرد و کپسول در داخل محفظه تزریق قرار می‌گیرد و در محفظه تزریق کپسول شکسته می‌شود و مستقیما جامد به گاز تبدیل می‌شود.

۳-آون یا ترموستات ستون

در GC دمای ستون بایستی با دقت دهم سانتیگراد کنترل شود. بنابراین ستون GC در یک oven ترموستات قرار می‌گیرد و معمولا دمای ستون بالاتر از متوسط نقطه جوش نمونه است. ستون هم باید به گونه‌ای باشد که قابلیت برنامه ریزی دمایی داشته باشد.

٤-آشکارسازهای GC

خصوصیات آشکارساز ایده آل در GC

حساسیت قابل قبول

در بازه دمایی از دمای اتاق تا حدود ٤٠٠ درجه سانتی گراد

www.ShimiPedia.ir

پایداری و تکرار پذیری پاسخ

پاسخ و مستقل از سرعت جریان

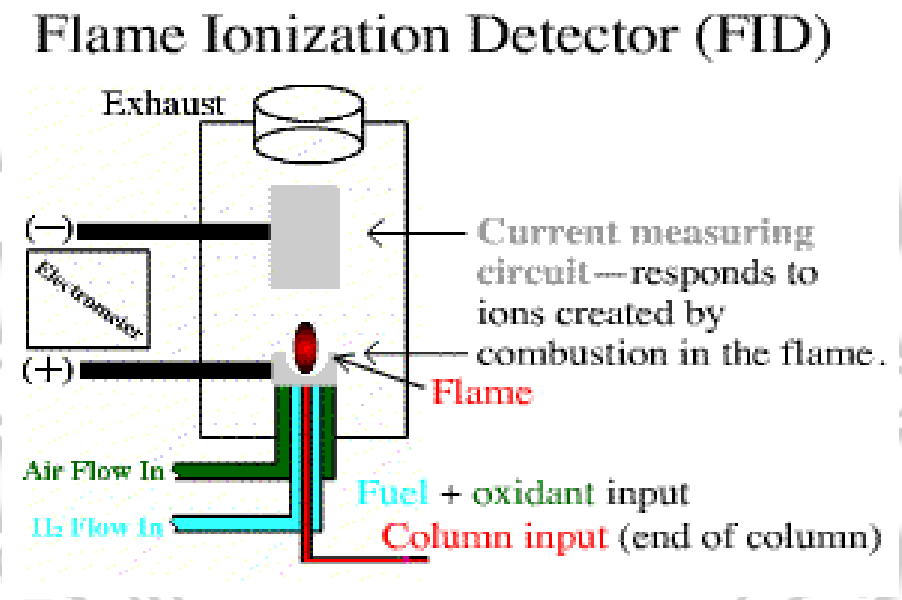
پاسخ خطی به آنالیت

انتخاب گری بالا

عدم تخریب نمونه وقتی مقدار نمونه کم باشد.

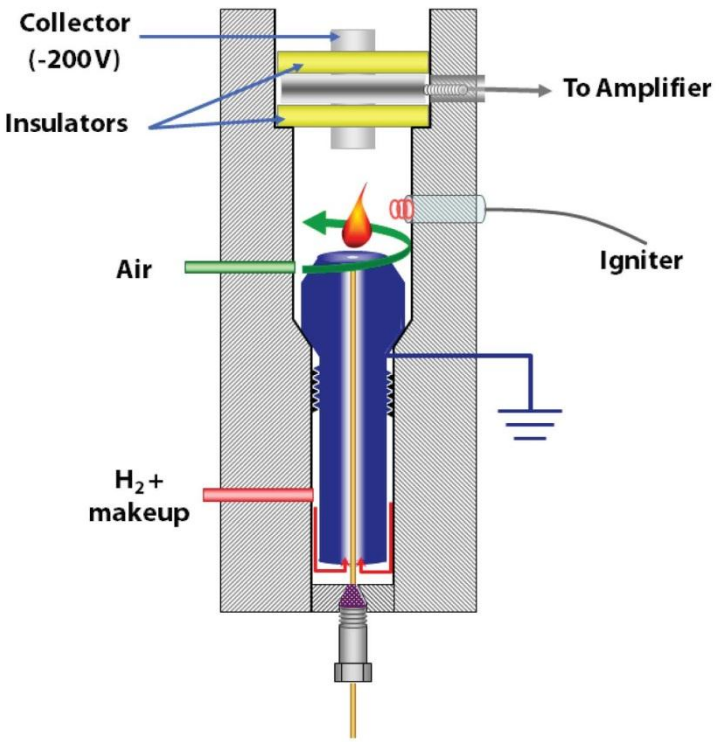
انواع آشکار سازهای GC

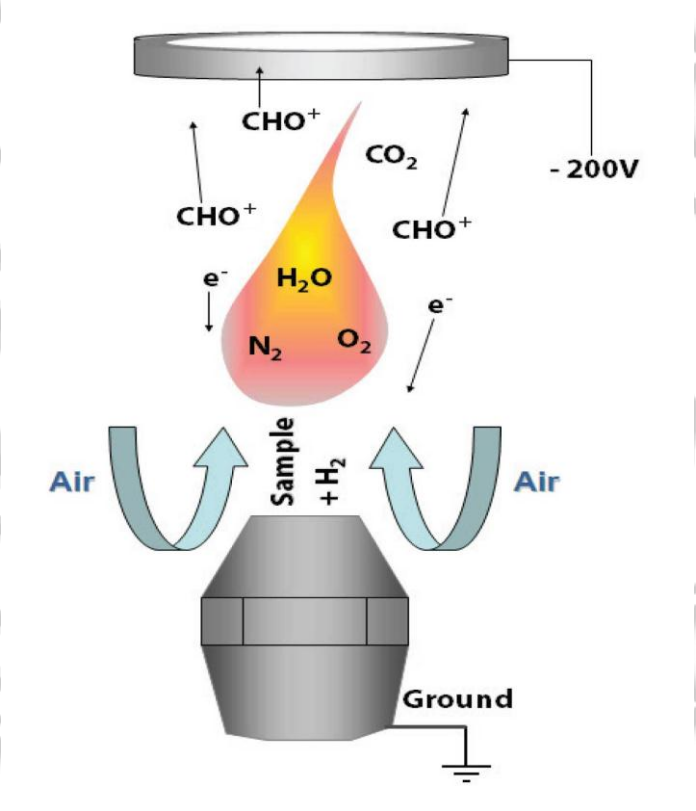
آشکارساز شعله یونی FID:



شکل ۱۹- آشکارساز یونی شعله ای

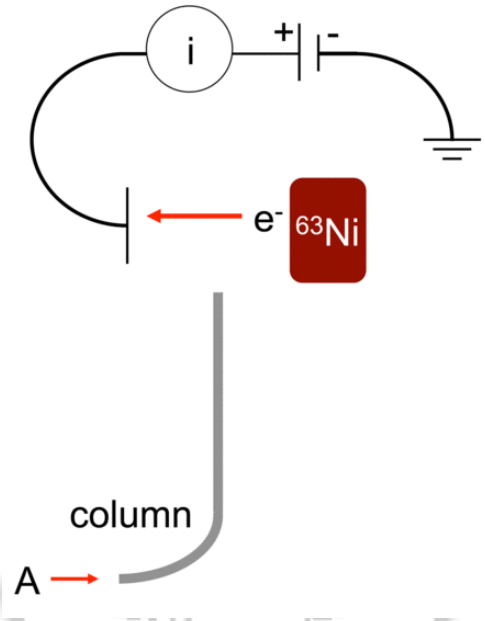
www.ShimiPedia.ir





شکل ۲۰- شکلهای دیگر آشکار ساز شعله ای

www.ShimiPedia.ir



شکل ۲۱- آشکارسازی گیر اندازی الکترون

این دتکتور معمولا انتهای ستون قرار می‌گیرد و هرچه از ستون خارج می‌شود باید به آن پاسخ دهد. این آشکارساز از یک مشعل ساخته شده که سوخت آن خروجی ستون و گاز هیدروژن و اکسیدان آن هوا میباشد. نمونه هایی که از ستون خارج می‌شوند در شعله پیرولیز می‌شوند و در اثر حرارت شکسته می‌شوند یون و الکترون تولید می‌کنند. الکترون‌ها به سمت جمع کننده حرکت می‌کنند و یک جریان کوچکی ایجاد می‌شود.

گاز حامل در اثر عبور از شعله پیرولیز نمی‌شود و بنابراین هنگام عبور گاز حامل را به وجود می‌آورد چون در این هنگام جریان صفر است و به محض وارد شدن نمونه یک پیک میبینیم و یک کروماتوگرافی ایجاد میشود.

نکات:

www.ShimiPedia.ir

FID یک آشکارساز حساس به جرم است یعنی اینکه بـه تعـداد اتـم‌هـای کربنـی کـه در واحـد زمـان بـه آشکارساز میرسد پاسخ می‌دهد.

چون آشکار ساز حساس به جرم است مساحت سطح پیک مستقل از سرعت جریان گاز حامل اسـت ولـی ممکن است زمان بازداری‌ها عوض شود.

این آشکارساز به مواد آلی پاسخ می‌دهد بنابراین به ترکیبات غیر قابل اشتعال نظیـر آب، کـربن دی اکسـید، SO_2، NOx و CS_2 جواب نمی‌دهد.

به $SiHCl_3$ و SiF_4 و NH_3 پاسخ نمی‌دهد.

چون به آب و هوا پاسخ نمی‌دهد آشکارساز مناسبی برای آنالیز آلاینده‌های هوا و مواد بیولوژیکی می‌باشد.

عدم پاسخ دهی به CS_2 سبب می‌شود که این ترکیب حلال مناسبی برای GC باشد.

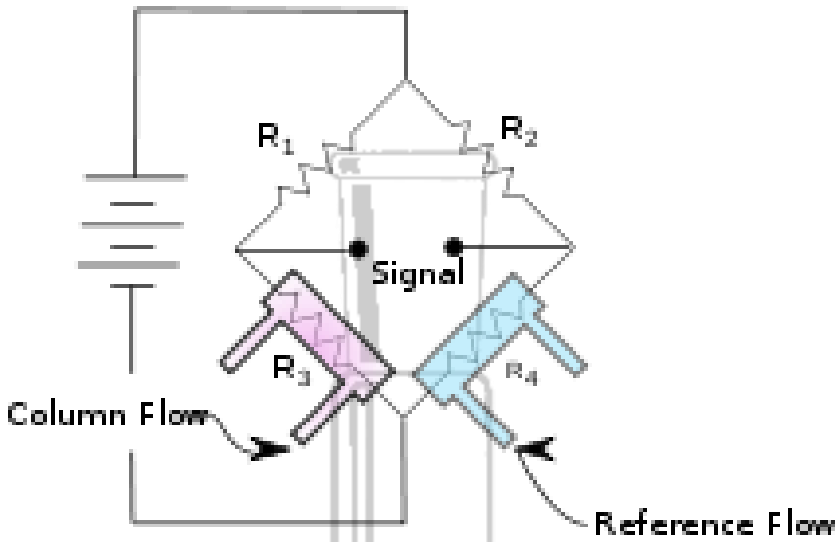
حساسیت و محدود خطی بالایی دارد و فقط به مود آلی پاسخ می‌دهد.

این آشکارساز تخریبی است.

آشکارساز رسانش حرارتی TCD

شاخصه این آشکارساز غیر تخریبی بودن آن است. بر اساس هدایت گرمایی نمونه‌ها و تفاوت آن‌ها مبنـای شناسایی می‌باشد. این آشکار ساز از مقاومت‌هایی تشکیل شده است. شاخصه این مقاومت‌ها که اصـطلاحا به آن پل وتسون گفته می‌شود این است که حاصل‌ضرب مقاومت‌های روبـه رو بـه صـورتی مـی‌باشـد کـه جریان میانی مقاومت‌ها صفر می‌شود.

www.ShimiPedia.ir



شکل ۲۲- پل وتسون

با عبور گاز از روی مقاومت و تغییر مقاومت عبوری سبب ایجاد سیگنال و ثبت پیک می‌شود. از یکی از مقاومتها گاز حامل و از دیگری خروجی ستون عبور می‌کند

اگر خروجی ستون هم گاز حامل باشد، سیگنال صفر می‌باشد و زمینه را نشان می‌دهد.

نکات:

در TCD هرچه رسانندگی گرمایی گاز حامل بیشتر باشد، میزان سیگنال ایجاد شده در اثر ورود آنالیت بیشتر می‌شود و حساسیت بالا می‌رود. از طرف دیگر هرچه مولکول‌های گاز سبکتر باشد رسانندگی گرمایی آن‌ها هم بیشتر است چون راحت تر برخورد می‌کنند. بنابراین استفاده از گازهای سبک‌تر مثل هیدروژن و هلیم در TCD معمول است.

حساسیت این روش پایین است و قابلیت استفاده با ستونهای مویینه را ندارد.

آشکارساز عمومی است و به همه ترکیبات پاسخ میدهد.

www.ShimiPedia.ir

آشکارساز ترمویونی TID thermo ionic detector

از نظر ساختار و طرز کار شبیه FID می‌باشد. در این آشکارساز پس از عبور شعله روی یک بستر کروم-روبیدیم سیلیکات $RbSiO_3$ عبور می‌کند که این بستر گرم سبب می‌شود تعداد زیادی یون از ترکیبات فسفر و نیتروژن ایجاد شود.

نکات:

این آشکارساز انتخاب گری بالایی به ترکیبات نیتروژن و فسفر دارد

این آشکار ساز حساسیتش به فسفر بیشتر از نیتروژن است. حدود ۱۰ برابر .بنابراین برای آنالیز حشره کش های فسفره بسیار مفید است.

آشکار سازهای گیر انداز یا تسخیر کننده الکترون ECD

این آشکارسازه حاوی یک منبع نشر کننده اشعه بتا است ($_{63}Ni$ $_{3}H$) الکترون‌هایی که از این منبع اشعه بتا ساطع می‌شوند باعث یونیزه شدن گاز حامل می‌شوند (اغلب نیتروژن است). در نتیجه یک جریان الکتریکی زمینه ایجاد می‌شود که تقریبا هم ثابت است. حال اگر ترکیبات حاوی اتمهای الکترونگاتیو وجود داشته باشد. ترکیبات الکترونگاتیو سبب گیر انداختن الکترونها می‌شود. یون گاز کامل کم می‌شود و جریان کم می‌شود.

نکات:

حساسیت بسیار بالایی دارد.

میزان تخریب نمونه در آنها نسبت به FID کمتر است.

این آشکارساز حساسیت بالایی نسبت به مولکول‌های حاوی گروه های الکترونگاتیو مثل هالوژنها، پراکسیدها، کینونها و گروه ها نیترو دارند در حالیکه به آمینها، الکل‌ها و هیدروکربنها پاسخ نمی‌دهد.

www.ShimiPedia.ir

یکی از مهمترین کابردهای آن آنالیزهای حشره کش های حاوی کلر است.

۵-ستونهای GC

ستونها در دو دسته قرار می‌گیرند.

۵-۱-ستونهای انباشته

۵-۲-ستونهای مویینه یا لوله باز

ستونهای انباشته

در این ستون‌ها فاز ساکن به صورت یک فیلم نازک از مایع روی یک بستر جامد قرار دارد (فاز ساکن مایع است) که این بستر جامد همان پر کننده ستون است که بایستی تا آنجا که ممکن است ذرات ریز باشند تا کارایی ستون افزایش یابد. ذرات خیلی ریز هم چون سبب افت فشار می‌شوند مناسب نیستند. جنس نگهدارنده فولاد زنگ نزن، شیشه و ...

ستونهای مویینه

الف- wall coated open tubular column

همان طور که از اسمشان مشخص است فاز ساکن به صورت یک فیلم نازک روی دیواره ستون مویینه تثبیت شده است. معمولا هم از جنس فولاد زنگ نزن، آلومینیوم یا مس هستند. طول ستون‌های مویینه بسیار کمتر از ستونهای انباشته است. طول آنها گاهی تا ۵۰ متر هم میرسد که به صورت مارپیچ قرار می‌گیرند. انعطاف پذیری آن کم است یعنی احتمال شکستگی وجود دارد.

ب- fused silica open tubular column

www.ShimiPedia.ir

ستون لوله باز سیلیک جوش خورده

این ستون مثل WCOT دیواره بسیار نازکی هستند سطح خارجی آن‌ها به وسیله لایه نـازکی از پلیمـر پلـی ایمید پوشانده شده است این سبب میشود انعطاف پذیری زیادتر شود.

ج- support coated open tubular

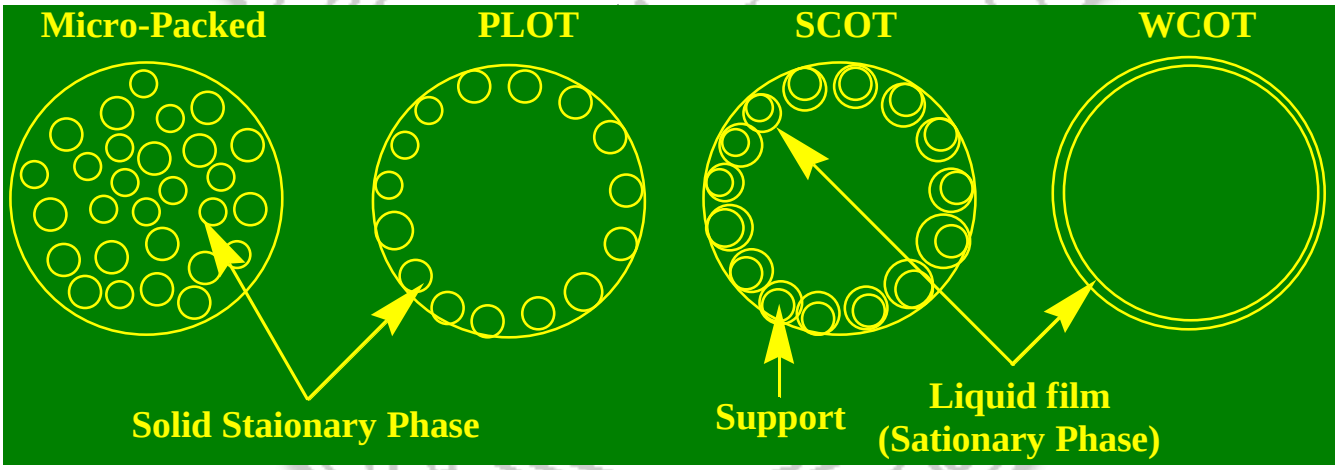
در این ستونها یک لایه نازک به ضخامت تقریبی ۳۰ میکرومتر از مواد حامی در اطراف ستون قرار گرفتـه و سپس فاز ساکن مایع روی این بستر حامی تثبیت می‌شود.

مقایسه WCOT و SCOT

۱-ظرفیت نمونه SCOT بیشتر از WCOT می‌باشد.

۲-کارایی SCOT از WCOT کمتر می‌باشد.

۳-نسبت FSOT غیر قابل انعطاف‌اند.



شکل ۲۳- انواع ستون‌ها

ستونهای مگابور:

این ستونها همانند ستونهای مویینه اند اما قطر داخلی آنها بیشتر است. بنابراین ظرفیت نمونه بیشتری دارند.

کارایی این ستونها از ستونهای مویینه کمتر است ولی از ستونهای انباشته بیشتر است.

www.ShimiPedia.ir

عیب اصلی مویینه این است که ظرفیت نمونه کم است کارایی بالاست.

عیب اصلی انباشته این است که ظرفیت نمونه بیشتر است کارایی کم تر است.

خصوصیات فاز ساکن در GC

باید فراریت آن کم باشد یعنی نقطه جوش آن حدود ۱۰۰ درجه سانتیگراد بیشتر از حداکثر دمای اعمال شده به ستون باشد.

پایداری حرارتی داشته باشد یعنی تجزیه نشود.

از نظر شیمیایی بی اثر باشد

انواع فازهای ساکن از لحاظ پلاریته

فازهای ساکن پلار یا قطبی

حاوی گروه‌های عاملی CN–، CO-، OH-

فازهای ساکن با پلاریته متوسط

مثل استرها، آلدهیدها و کتونها

فازهای ساکن غیر پلار

مثل هیدروکربن‌ها یا دی آلکیل سیلاکسین‌ها

www.ShimiPedia.ir

HPLC

یون‌های مثل سرب یا مس مستقیما با GC نمی‌توان اندازه گیری کرد باید با یک لیگاند کمپلکس داد که قابل تمجید باشد و بعد اندازه گیری کرد.

کلا در روش‌های LC معمولی قطر ذرات پر کننده درشت است ۱۵۰-۲۵۰ میکرومتر است درصورتی که در HPLC قطر ذرات پر کننده بسیار کمتر حدود ٦ میکرومتر است. در نتیجه کارایی HPLC بیشتر است اما چون حرکت فاز مایع از درون ذرات ریز کند است از پمپ استفاده می‌شود. HPLC بهبود یافته LC است.

تقسیم بندی HPLC یا LC

Partition chromatography
Adsorption chromatography
Ion chromatography
Exclusion chromatography

برای ترکیب غیر قطبی یا غیر محلول در آب بهترین کروماتوگرافی جذب سطحی است.

برای ترکیب یونی و محلول در آب کروماتوگرافی تعویض یون مناسب می‌باشد.

برای ترکیب غیر یونی و قطبی و به‌طور جزئی محلول در آب بهترین کروماتوگرافی، کروماتوگرافی تقسیمی است.

اگر قطبیت کم باشد بهترین روش آن فاز معکوس و اگر قطبیت زیاد باشد روش آن فاز نرمال می‌باشد.

اگر جرم مولکولی زیاد باشد بهترین نوع کروماتوگرافی کروماتوگرافی طردی می‌باشد.

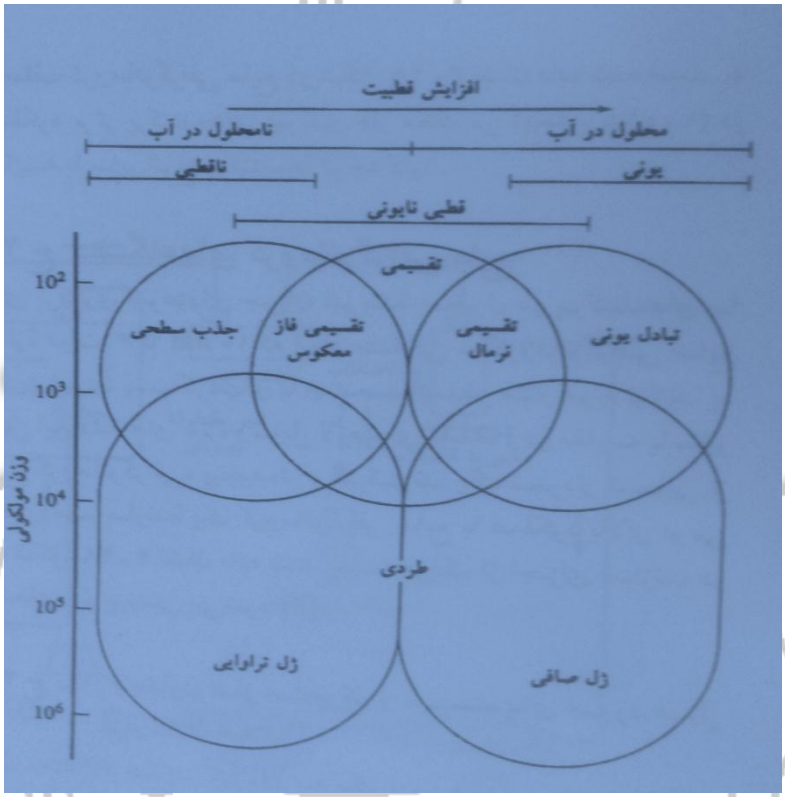
اگر نمونه در آب نا محلول باشد GPC

اگر نمونه محلول در آب باشد GFC

عوامل پهن شدگی در HPLC یا LC

www.ShimiPedia.ir

در کروماتوگرافی مایع عبارت B/u اندک و قابل صرف نظر کردن می‌باشد ولی عبارت A و Cu اهمیت دارند. در HPLC عامل دیگری به نام پهن شدگی خارج از ستون وجود دارد که علت آن وجود محل‌هایی است که از ستون یا به طور کلی مسیر حرکت فاز متحرک می‌باشد که فاز ساکن ندارند و پروفایل حرکت نمونه به جای پلاگ به صورت سهمی خواهد بود. یعنی همیشه سرعت در کنار ستون از مرکز آن کمتر است.



شکل ۲٤- نواحی مختلف قطبی غیر قطبی

نکات:

با افزایش قطر ستون میزان پهن شدگی خارج از ستون بیشتر می‌شود.

میزان پهن شدگی خارج از ستون با افزایش سرعت جریان فاز متحرک زیاد می‌شود.

* در GC اگر از ستونهای مویینه استفاده شود عبارت A در معادله H حذف می‌شود.

*B/u در ستونهای مویینه بیشتر است چون انباشتگی نداریم.

www.ShimiPedia.ir

اجزای دستگاهی HPLC

مخزن حلال‌ها

سیستم برنامه ریزی حلال

پمپ‌ها

سیستم تزریق

ستون

آشکارساز

مخزن حلال و سیستم برنامه ریزی

حلال مورد استفاده در HPLC باید بسیار خالص باشد. قبل از ورود به ستون باید گاز زدایی شود زیرا حباب های گاز در آشکارسازهای HPLC اختلال ایجاد می‌کند.

روشهای گاززدایی حلال:

۱-سیستم خلا+سیستم تقطیر+حرارت

۲-عبوردادن یک گاز کم محلول‌تر از داخل حلال

پمپ‌ها

چون ذرات packing کوچک است بنابراین افت فشار در ستون HPLC زیاد است بنابراین پمپ‌های فشار بالا باید استفاده شود.

خواص پمپ‌ها در HPLC:

فشار بالا در حد ۶۰۰۰ psi تولید کند.

سرعت جریان حاصل از آن غیر پالسی و یکنواخت باشد.

www.ShimiPedia.ir

اجزای پمپ در برابر خوردگی مقاوم باشد.

انواع پمپ‌ها:

۱-پمپ‌های رفت و برگشتی یا پیستونی:

اکثر پمپ‌های HPLC از این نوع هستند. با عقب و جلو رفتن یک پیستون عمل پمپاژ انجام می‌شود. یکی از مزیت‌های آن فشار بالای تولیدی آن می‌باشد ایراد آن پالسی بودن جریان می‌باشد بنابراین باید همراه آن یک دمپر برای یکنواخت کردن جریان پمپ گذاشته شود.

۲-پمپ‌های سرنگی یا جابه‌جایی

مزیت جریان پالسی نیست

۳-پمپ‌های بادی

جریان این پمپ هم پالسی نیست.

ستون‌ها

ستون تجزیه‌ای

وظیفه اصلی جداسازی آنالیت است.

ستون محافظ:

از نظر ظاهری شبیه ستون تجزیه‌ای است ولی طول آن کمتر است و جایگاه آن قبل از ستون تجزیه‌ای است. طول عمر ستون محافظ کمتر می‌باشد. وظیفه آن برداشتن ناخالصی از حلال و اشباع کردن فاز متحرک از فاز ساکن و انحلال فاز ساکن ستون تجزیه ای در فاز متحرک کم شود. طول عمر ستون تجزیه کم می‌شود.

www.ShimiPedia.ir

ستون‌های HPLC

این ستون‌ها بیشتر از جنس فولاد زنگ نزن هستند و طولشان بین ۱۰ تا ۳۰ سانتیمتر می‌باشد. ستون تجزیه ای از ذرات ریزتری پر می‌شود. اما ستون محافظ از همان جنس ذرات پرکننده با ابعاد بزرگتری است که افت فشار ایجاد نکند.

نکته: جنس ستون محافظ و جنس ستون تجزیه ای مشابه‌اند.

انواع انباشتگی‌های ستونهای LC

بسترهای کروی غیر حفره دار که معمولا در ستون‌های محافظ استفاده می‌شود.

ذرات متخلخل که قطر کمتری دارند و در ستون‌های تجزیه‌ای استفاده می‌شود.

آشکارسازهای HPLC

خصوصیات آشکارسازهای GC را دارند که در HPLC لازم نیست آشکارساز در بازه دمایی گسترده کار کند.

آشکارساز HPLC باید حجم داخلی کمی داشته باشند چون پهن شدگی خارج از ستون کم شود.

انواع آشکارسازهای HPLC

۱-آشکارسازهای توده‌ای : به خواص توده‌ای محلول جواب می‌دهند مثل ضریب شکست که فقط به توده محلول بستگی دارد

۲-آشکارسازهای خواص حل شونده: به یک خاصیت که از مختص حل شونده است پاسخ می‌دهند.

مثل آشکارسازهای UV-Visible

www.ShimiPedia.ir

مهمترین آشکارسازهای HPLC:

آشکارساز ضریب شکست

یک آشکارساز توده ای است و به تغییرات ضریب شکست در اثر ورود آنالیت به آشکارساز پاسخ میدهد.

نکات:

یک آشکارساز عمومی است مثل TCD

در سیستم شویشی گرادیانی قابل استفاده نیست

آشکار ساز UV-Visible

این آشکارساز بر اساس جذب تابش توسط آنالیت کار می‌کند و مجهز به یک سلول جریانی یت فلوسل است که Z شکل است.

آشکارساز الکتروشیمیایی:

در این آشکارساز از آمپرومتری و بی آمپرومتری برای آشکارسازی استفاده می‌شود.

سل الکتروشیمیایی باید طوری طراحی شود که در جریان پیوسته ستون قابل استفاده باشد.

کروماتوگرافی تقسیمی

کروماتوگرافی تقسیمی با توجه به نوع فاز ساکن که روی ساپورت یا پرکننده قرار میگیرد. دو قسمت دارد.

کروماتوگرافی مایع-مایع

در کروماتوگرافی مایع-مایع فاز ساکن مایع است که فاز ساکن مایع در اثر جذب سطحی روی سطح پر کننده قرار می‌گیرد.

کروماتوگرافی مایع-فاز پیوندی

در کروماتوگرافی بالا فاز ساکن از طریق یک پیوند شیمیایی روی سطح قرار می‌گیرد.

www.ShimiPedia.ir

نکته: در کروماتوگرافی مایع-مایع به مرور زمان فاز ساکن با حلال شسته می‌شود.

انواع کروماتوگرافی فاز پیوندی:

با توجه به قطبیت فاز ساکن و فاز متحرک روش کروماتوگرافی تقسیمی دو نوع میشود.

۱-کروماتوگرافی فاز نرمال NP

در این کروماتوگرافی فاز ساکن پیوند داده شده قطبی است و فاز متحرک غیر قطبی است.

نکات:

در روش NP ترکیبات با قطبیت کمتر که تمایل بیشتر به فاز متحرک غیر قطبی دارند و در نتیجه زودتر شسته میشوند و از ستون خارج می‌شوند.

روش NP بیشتر برای جداسازی ترکیبات قطبی استفاده می‌شود. هرچه قطبیت بیشتر شود زمان ماندگاری در ستون بیشتر می‌شود.

معمولا گروه های عاملی حاوی NH2، سیانور و دی ال به عنوان فاز ساکن استفاده می‌شوند.

کروماتوگرافی فاز معکوس RP

در این کروماتوگرافی فاز ساکن غیر قطبی است و فاز متحرک قطبی است. مثل آب و متانول معمولا برای جداسازی ترکیبات با قطبیت کمتر استفاده می‌شود.

نکات:

در این کروماتوگرافی ابتدا ترکیبات قطبی تر و سپس ترکیبات با قطبیت کمتر از ستون خارج می‌شوند.

www.ShimiPedia.ir

فاز ساکن معمولا هیدروکربن ۸ یا ۱۸ کربنی است.

اثرات طول زنجیر R روی کارایی ستون RP:

با افزایش طول زنجیر فاز غیر قطبی می‌شود و با توجه به اینکه در این روش برای جداسازی ترکیباتی با قطبیت کم استفاده میشود جداسازی بهتر اما زمان بازداری زیادتر می‌شود.

با افزایش ظرفیت نمونه گذاری بیشتر می‌شود و میتوان نمونه بیشتری را تزریق کرد.

روش تهیه ستون‌های فاز پیوندی:

مواد پرکننده که در ستون استفاده می‌شود دارای ساختار سیلیکاتی یعنی پیوندهای Si-O هستند

ابتدا سیلیکا به اسید هیدرولیز می‌شود سپس گروه های واکنش پذیر Si-OH در سطح ایجاد می‌شود.

سپس گروههای Si-OH را با ترکیبات ارگانوکلره سیلان و با نام کلی سیلاکیون‌ها واکنش می‌کنند.

نکته: به دلیل ممانعت فضایی تمام گروه های Si-OH سیلانه نمیشوند. باقی ماندن گروه های Si-OH سبب tailing می‌شود. برای رفع این مشکل ستون را به طور متناوب با کلرو تری متیل سیلان وارد واکنش میکنند.

به جای R گروه متیل قرار گرفته که ممانعت فضایی کمتری دارد.

CHEMDEP.com

www.ShimiPedia.ir

سوالات

۱-کدام روش برای جداسازی و اندازه گیری مخلوطی از قندها مناسب تر است؟

الف- HPLC با آشکارساز جذبی ب-HPLC با آشکارساز هدایتی

ج-GC با آشکارساز هدایت گرمایی د-GC با آشکارسازی یونش شعله

۲-تفاوت ستون پرشده نسبت به ستون مویینه در دستگاه کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی در چیست؟

الف-تحمل دمایی بالاتر ستونهای مویینه نسبت به ستونهای پرشده

ب-حساسیت بیشتر ستونهای پر شده نسبت به ستون مویینه

ج- قدرت جداسازی مواد پیچیده به کمک ستونهای پر شده

د-نیاز به جداسازی گاز حامل هنگام اتصال GC به MS

۳-۱.۱ میلی مول ۱-بوتانول و ۱.۲۵ میلی مول ۱-پنتانول به روش کروماتوگرافی گازی جدا میشوند. مساحت پیک آنها به ترتیب برابر ۱۰ و ۱۲۰۰ واحد میباشد. هرگاه ۰.٦ میلی مول ۱-بوتانول به یک نمونه مجهول حاوی ۱-پنتانول اضافه شود مساحت پیک کروماتوگرافی به ترتیب برابر ۷۵۰ و ٦۰۰ خواهد شد. میلی مول ۱-پنتانول در نمونه چقدر است؟

الف-۰.٤ ب-۰.٦ ج- ۰.٦۲۵ د-۰.۷۵۰

٤-در کروماتوگرافی گازی ارتفاع صفحات تئوری .... ذرات پر شده در ستون و .... مولکولی گاز حامل کاهش می یابد.

الف-با افزایش اندازه- کاهش وزن ب- با کاهش اندازه – کاهش وزن

ج-با افزایش اندازه- افزایش وزن د-با کاهش قطر- افزایش وزن

۵-در مقایسه روش کروماتوگرافی HPLC با الکتروفورز مویینه کدام عبارت صحیح است؟

الف-در شرایط بهینه و یکسان، حساسیت و قدرت جداسازی دو روش یکسان است

ب-در شرایط بهینه و یکسان، حساسیت HPLC کمتر ولی قدرت جداسازی کروماتوگرام های آن بیشتر است.

ج-در شرایط بهینه، حساسیت HPLC بیشتر ولی قدرت جداسازی کروماتوگرامهای آن کمتر است.

د-در شرایط بهینه و یکسان، میزان حساسیت و قدرت جداسازی کروماتوگرامهای الکتروفورز مویینه بیشتر است.

٦-کدام یک از پارامترهای معادله ون دیمتر در زمان استفاده از ستون مویینه باز حذف خواهد شد؟

$H=A+B/u+Cu$

الف-A ب-B ج-C د-هیچ کدام

۷-کاهش قطر دانه های فاز ثابت در کروماتوگرافی ستونی موجب:

www.ShimiPedia.ir

الف- افزایش سرعت حرکت فاز متحرک میشود

ب-افزایش حجم بازداری میشود

ج-افزایش کارایی ستون میشود

د-افزایش ارتفاع تشتکهای فرضی معادل میشود

۸-برای جداسازی دو ماده A و B آنها را به ستون مناسبی در دستگاه GLC تزریق میکنیم. پیک ماده A قبل از ماده B و هفت دقیقه بعد از تزریق ظاهر میشود. در صورتی که پهنای پیک A برابر ۰.۵ باشد، تعداد صفحات تئوری برای A کدام است؟

الف-۳۶۰۰ ب-۳۱۳۶ ج-۲۵۰۰ د-۴۲۰۰

۹-کدام یک از موارد زیر برای افزایش Rs در کروماتوگرافی موثرتر است؟

الف-کاهش قطر دانه های فاز ساکن به میزان دوبرابر

ب-کاهش قطر ستون به میزان دو برابر

ج-افزایش طول ستون به میزان دو برابر

د-افزایش سرعت حرکت فاز متحرک به میزان دو برابر

۱۰-در یک ستون کروماتوگرافی مایع با فاز نرمال ترتیب زمان بازداری ترکیبات هگزان، هگزانول و بنزن کدام یک از موارد زیر است؟

الف-هگزانول>هگزان> بنزن ب-هگزان>بنزن>هگزانول

ج-هگزانول>بنزن>هگزان د-بنزن>هگزانول>هگزان

۱۱-در صورتی که سرعت حرکت یک ترکیب در یک ستون کروماتوگرافی ۱۰ درصد سرعت فاز متحرک باشد، مقدار فاکتور ظرفیت عبارت است از :

الف-۹ ب-۱۰ ج-۹۰ د-۱۰۰

۱۲-کدام عامل سبب افزایش قدرت تفکیک در کروماتوگرافی میشود؟

الف- افزایش دما ب-افزایش سرعت فاز متحرک ج-کاهش سرعت فاز متحرک د-افزایش گرانروی فاز متحرک

CHEMDEP.com

www.ShimiPedia.ir

پاسخ:

۱-الف

۲-د

۳-ج

٤-د

٥-د

٦-ب

۷-ج

۸-ب

۹-الف

۱۰-ج

۱۱-الف

۱۲-د

www.ShimiPedia.ir