Hoary244 Telegram Channel

عنوان: مروری بر روش کرماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

سیستم جامع آموزش فناوری نانو

ستاد ویژه توسعه فناوری نانو در راستای تأمین نیازهای آموزشی دانش آموزان و دانشجویان مقاطع و رشته‌های مختلف و سایر علاقه مندان به علوم وفناوری نانو اقدام به تدوین سیستم جامع آموزش فناوری نانو نموده است. فایل حاضر، فایل ارائه مقاله ای است که در سایت آموزش فناوری نانو با جانمایی:

دوره؛ روش های شناسایی نانوساختارها
درس؛ روش های جداسازی
جلسه؛ اول

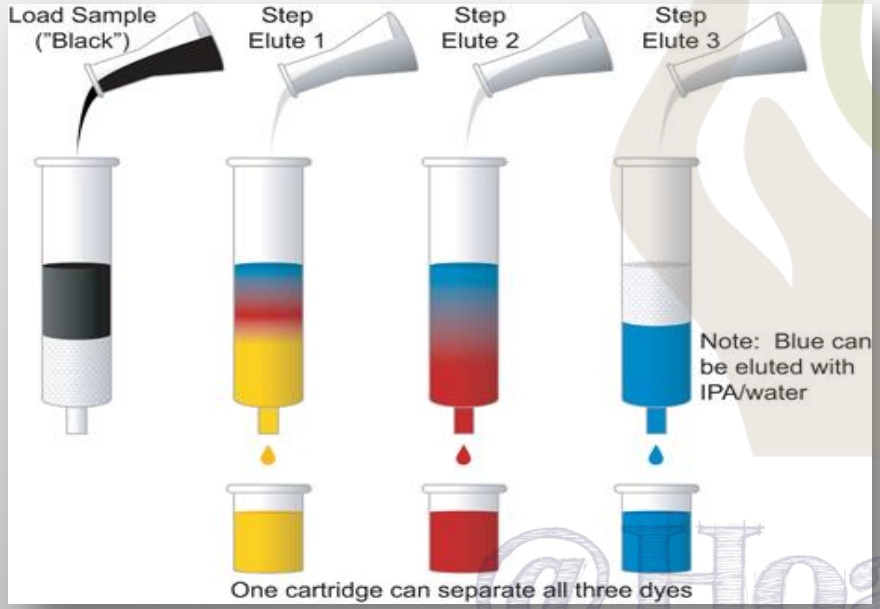
بارگذاری گردیده که به منظور کمک به یادگیری مطالب اصلی توسط کاربر و نیز روان شدن برگزاری کارگاه ها و سمینارهای آموزشی، طراحی شده که در اختیار علاقه مندان قرار گرفته است. استفاده از این فایل ها ضمن کمک به یادگیری بهتر مخاطبان، برگزاری سمینارها و کارگاه های تخصصی را برای نهادهای ترویجی آسانتر خواهد نمود.

@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

تاریخچه کروماتوگرافی

- مهمترین و پرکاربردترین روش جداسازی، روش "کروماتوگرافی" است.
- کروماتوگرافی (Chromatography)، بوسیله گیاه‌شناسی روس به نام تسوت، در اوایل قرن بیستم (۱۹۰۳) کشف شد.
  - او از این تکنیک برای جداسازی رنگدانه‌های مختلف گیاهی مانند کلروفیل‌ها و گزانتوفیل‌ها استفاده کرد.

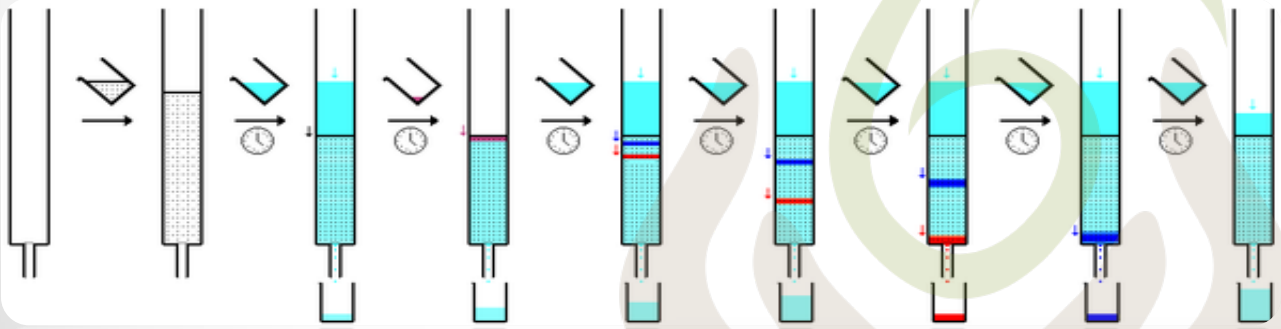


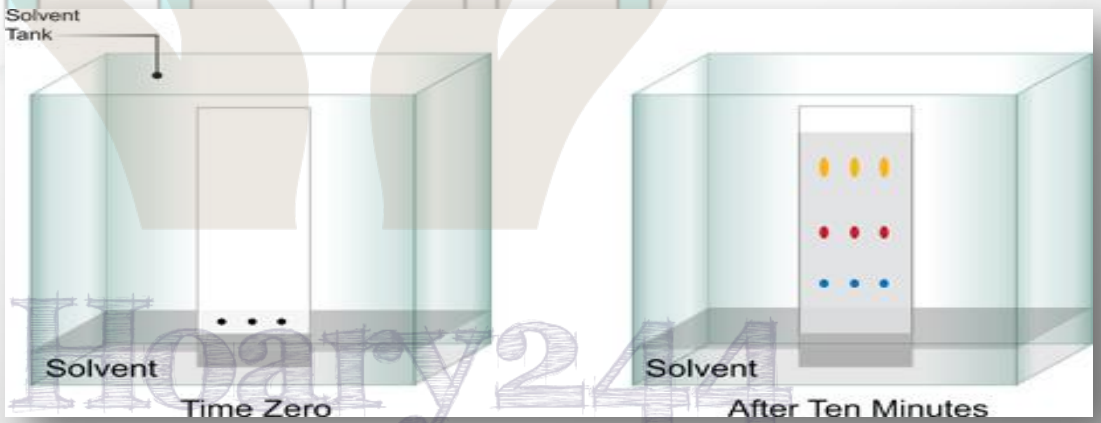
http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

تاریخچه کروماتوگرافی

- روشهای کروماتوگرافی بر پایه دو مفهوم کلی دسته بندی می‌شوند:
  - در روش اول، جداسازی بر اساس مفاهیم فیزیکی صورت می‌گیرد.
  - این روش شامل دو گروه کروماتوگرافی ستونی (Column) و کروماتوگرافی سطحی است.



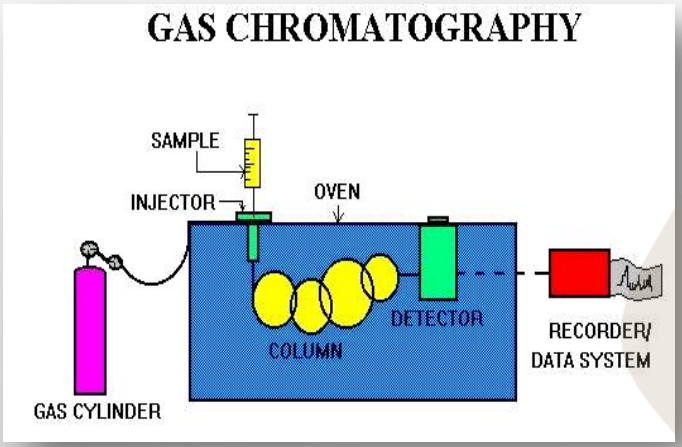


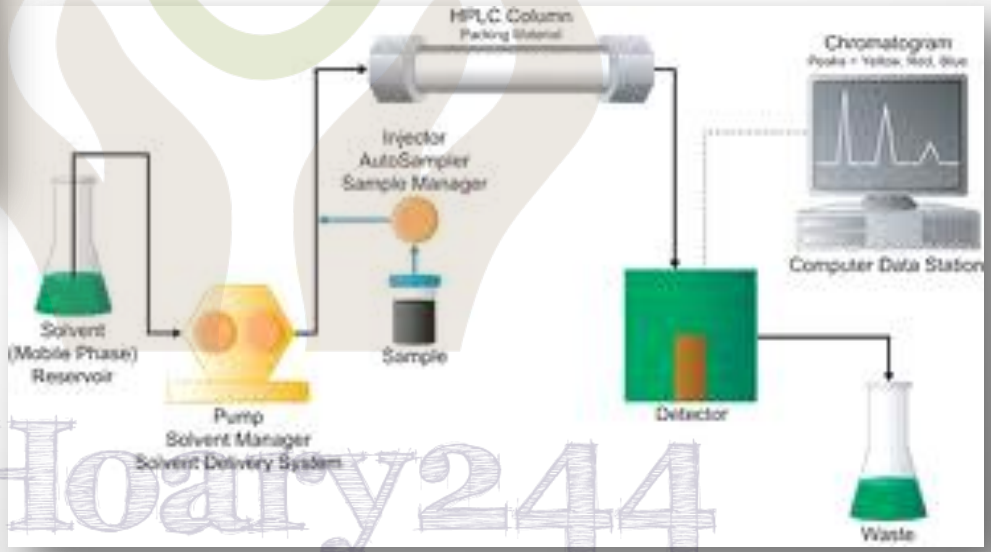
@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

تاریخچه کروماتوگرافی

- اساس نام‌گذاری در دسته بندی دوم که مرسوم‌تر است...
  - نوع فاز متحرک، فاز ساکن و نوع تعادل ایجاد شده بین دو فاز است.
- این دسته شامل دو گروه کلی می‌شود:
  - کروماتوگرافی مایع (فاز متحرک مایع می‌باشد)
  - کروماتوگرافی گازی (فاز متحرک گاز)





@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

مفاهیم کلیدی در کروماتوگرافی

- در تمامی روشهای کروماتوگرافی، جداسازی بر پایه...
  - تفاوت مقداری آنالیت (ماده مورد جداسازی) در دو فاز ساکن (Stationary Phase) و متحرک (Mobile Phase) انجام می‌شود.
- این تفاوت مقدار، منجر به تشکیل تعادلی می‌گردد که آن را با پارامتری به نام ثابت توزیع (K) بیان می‌کنند.

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

- C_m نشان دهنده غلظت مولی آنالیت در فازمتحرک است.
- C_s نشان دهنده غلظت مولی آنالیت در فاز ساکن است.

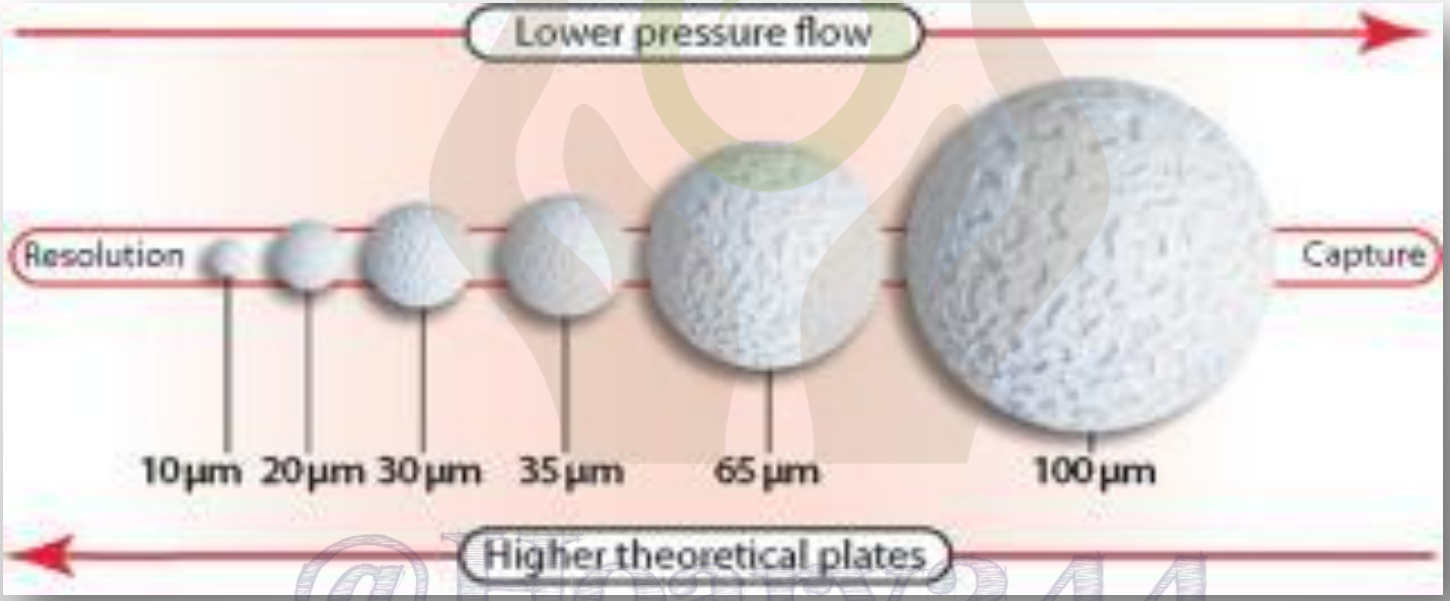
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

مفاهیم کلیدی در کروماتوگرافی

- پدیده‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی بر سرعت جداسازی و پهنای باند دیده شده برای هر آنالیت تأثیر دارند.
- از بین تئوری‌های موجود که به توجیه و محاسبه این عوامل می‌پردازند، تئوری بشقابک‌های فرضی (Plates) کاربرد بیشتری دارد.



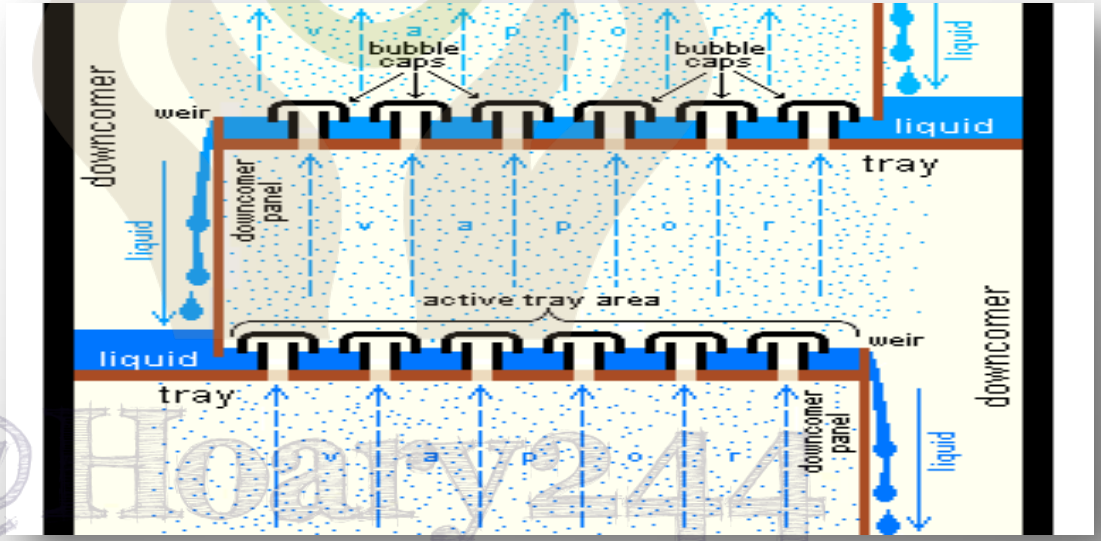
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

مفاهیم کلیدی در کروماتوگرافی

- در تئوری بشقابک‌های فرضی، هرستون از یک سری لایه‌های باریک، افقی وکاملاً مجزا که به طور متوالی قرار گرفته‌اند، تشکیل شده است.
  - به هر یک از این لایه‌ها، بشقابک گفته می‌شود.
- در هر بشقابک آنالیت در تعادلی بین فاز متحرک و ساکن قرار دارد.
- با انتقال بین بشقابک‌ها عمل جداسازی صورت می‌پذیرد.



@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

مفاهیم کلیدی در کروماتوگرافی

- کارایی هر ستون به تعداد بشقابک‌های موجود درستون و یا به عبارت دیگر به تعداد تعادل‌های ایجاد شده در ستون بستگی دارد.
- برای بررسی کارایی ستون تعداد بشقابک‌های فرضی (N) را از رابطه زیر محاسبه می‌کنند.

$$N = \frac{L}{H}$$

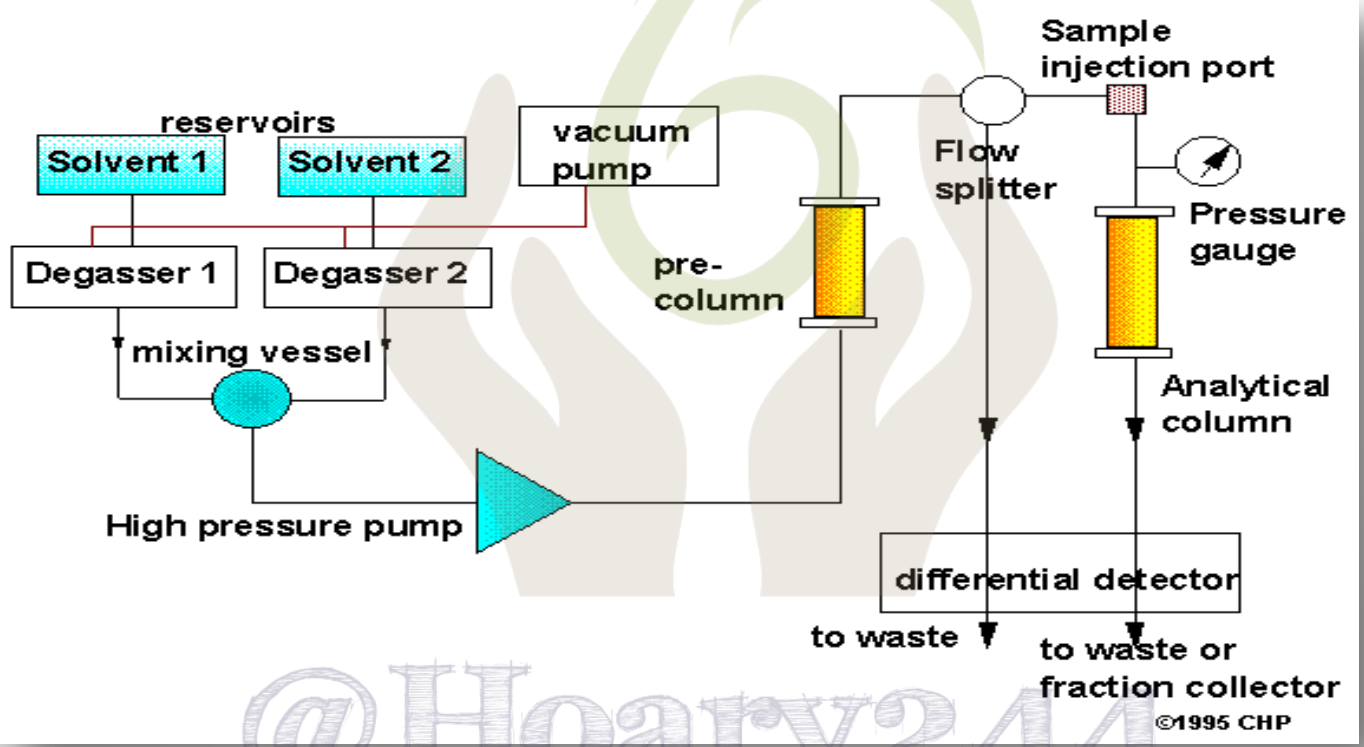
- H: ارتفاع هر بشقابک
- L: طول ستون

@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

- از میان تکنیک‌های جداسازی...
  - کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography -HPLC)، بیشترین رشد و کارایی را داشته است.



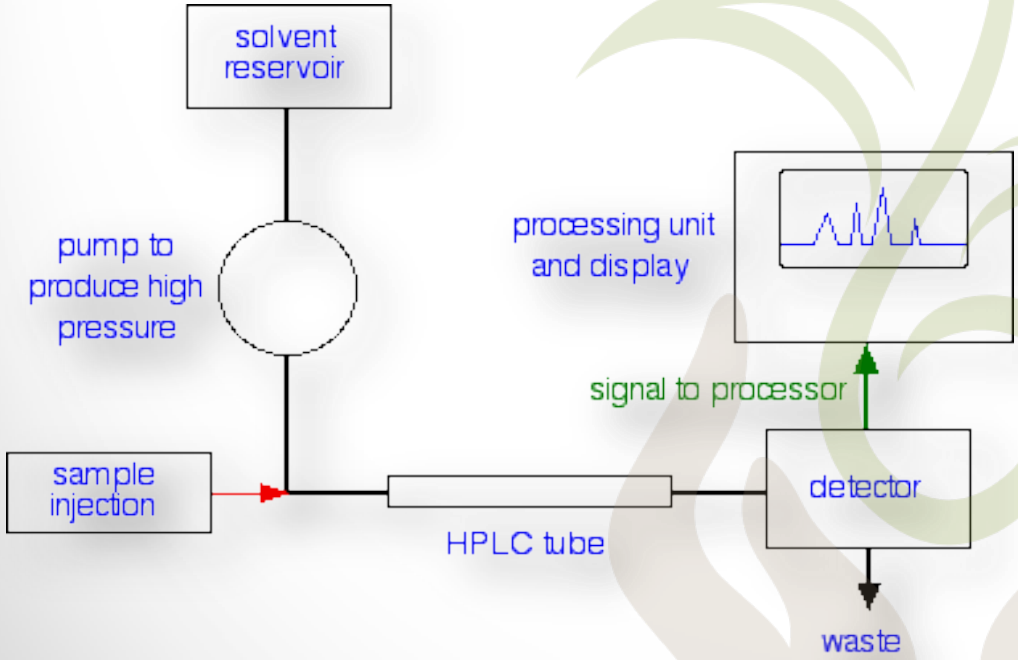
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

- سالیانه میلیون‌ها دلار صرف خرید و فروش دستگاههای HPLC در دنیا می‌شود.



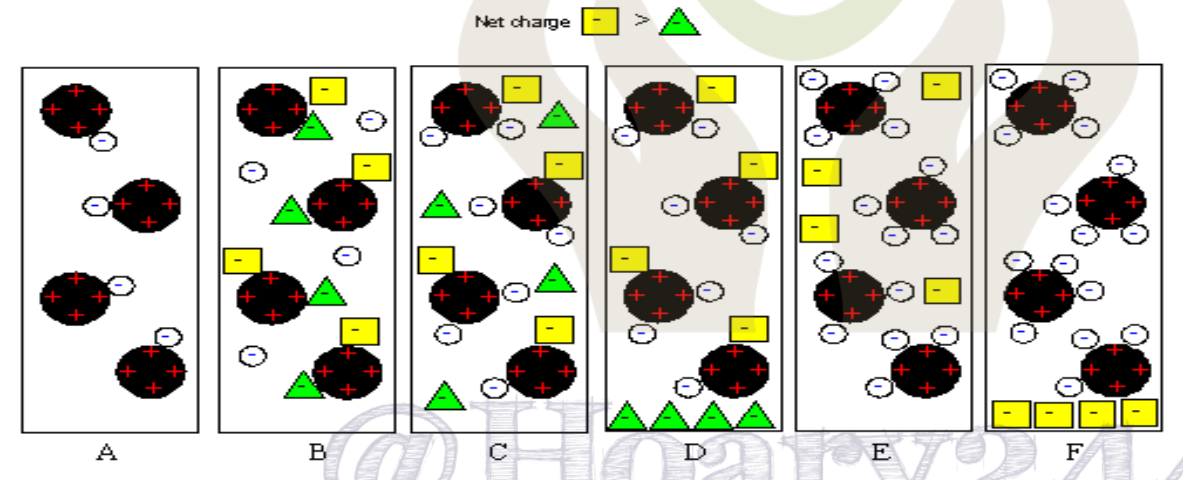
- علت این رشد:
  - حساسیت بالا
  - تعیین مقدار کمی با صحت بالا
  - قابلیت آنالیز نمونه‌های غیرفرار و حساس به دما
- این موارد با تکنیک GC (کروماتوگرافی گازی) امکان‌پذیر نیستند.

@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

فاز ساکن و فاز متحرک

- قاعده‌ای کلی در مورد قطبیت فازهای ساکن و متحرک:
  - قطبیت حل شونده و فاز متحرک باید نزدیک به هم باشد، ولی با فاز ساکن اختلاف داشته باشد.
- ترتیب قطبیت گروه‌های عاملی در ترکیبات به صورت زیر است:
  - هیدروکربن > اترها > استرها > کتون‌ها > آلدئیدها > آمیدها > آمین‌ها > الکل‌ها

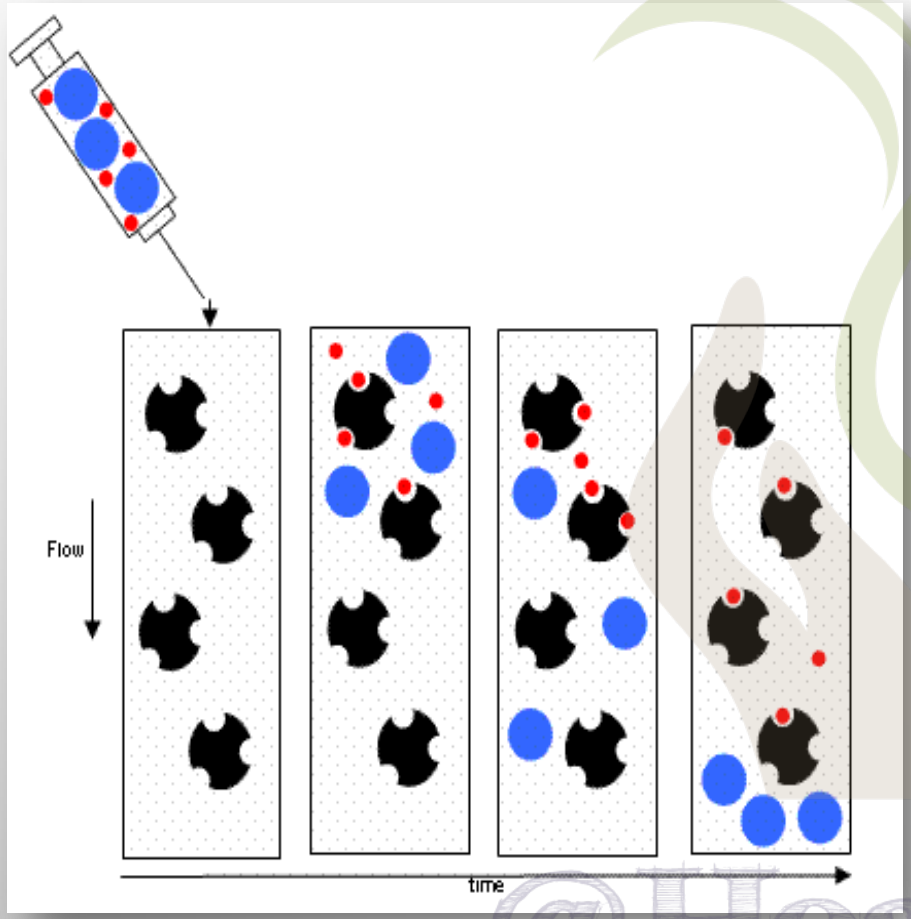


@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

فاز ساکن و فاز متحرک



- خصوصیات فاز متحرک در HPLC:
  - درصد خلوص بالا
  - نقطه جوش بالاتر از دمای ستون
  - واکنش پذیری کم (Inertness)
  - قابلیت تطابق با آشکارساز

@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- دستگاه و تجهیزات HPLC:
- مخازن حلال:
  - که در آنها فاز متحرک و یا حلالهای شستشو دهنده ستون ریخته شده است.

@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- **موتور یا پمپ:**
  - به منظور انتقال حلال و نمونه در فضای نسبتاً طویل ستون نیاز به ایجاد فشاری در سیستم است.
  - برای ایجاد فشار حداقل از یک پمپ یا موتور استفاده می‌شود.
  - حلال (فاز متحرک) توسط پمپ با سرعت و جریان ثابتی بر فاز ساکن حرکت داده می‌شود.
  - فشار سیستم به اندازه (سایز) ذرات موجود در ستون، گرانروی (Viscosity) و سرعت جریان فاز متحرک بستگی دارد.

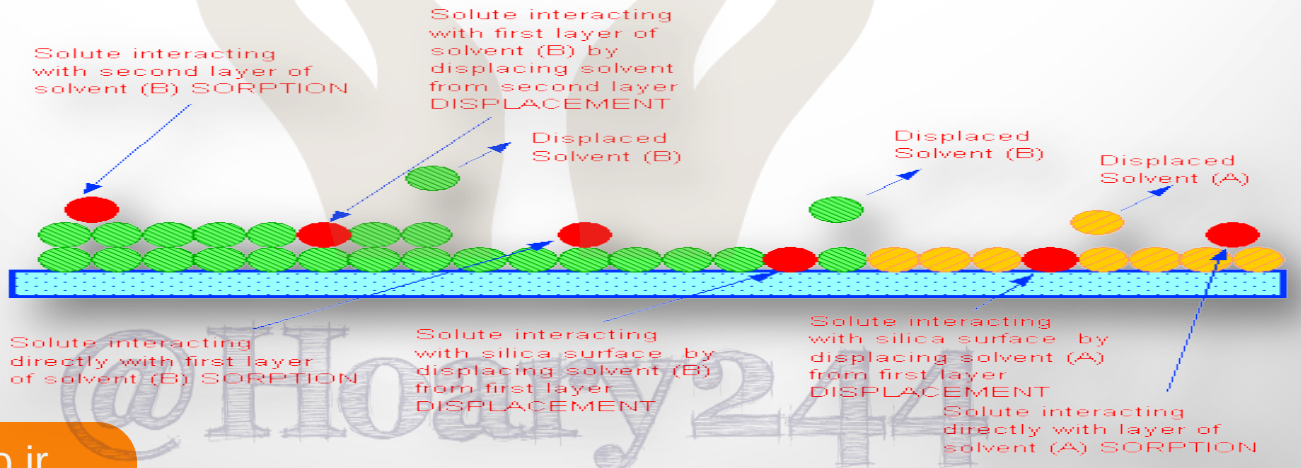
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- بسته به نوع جداسازی، میزان سرعت جریان فاز متحرک تعیین می‌گردد.
- در سرعت جریان کم فاز متحرک ، فاصله بین پیک‌ها افزایش یافته و جداسازی بهتری خواهیم داشت.
- در ستون‌هایی با قطر مرسوم (کمتر از ۵mm) سرعت جریان نباید بالاتر از ۵/۲ml/min باشد؛ چون
  - باعث صدمه زدن به ستون و کاهش عمر مفید آن می‌شود.



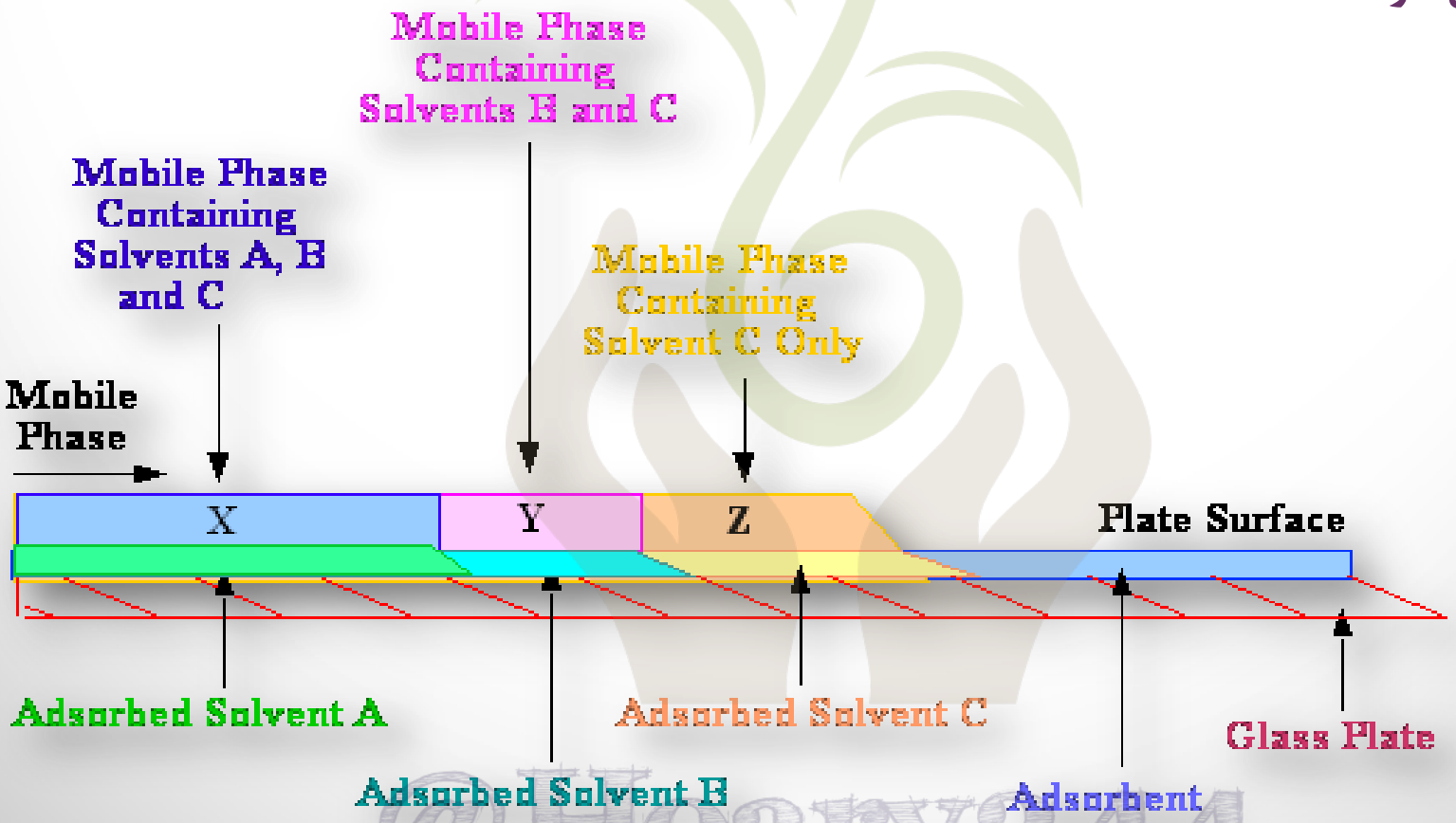
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- به عنوان فاز متحرک، مخلوطی از حلال‌ها در ازای یک حلال خالص به‌کار گرفته می‌شود.



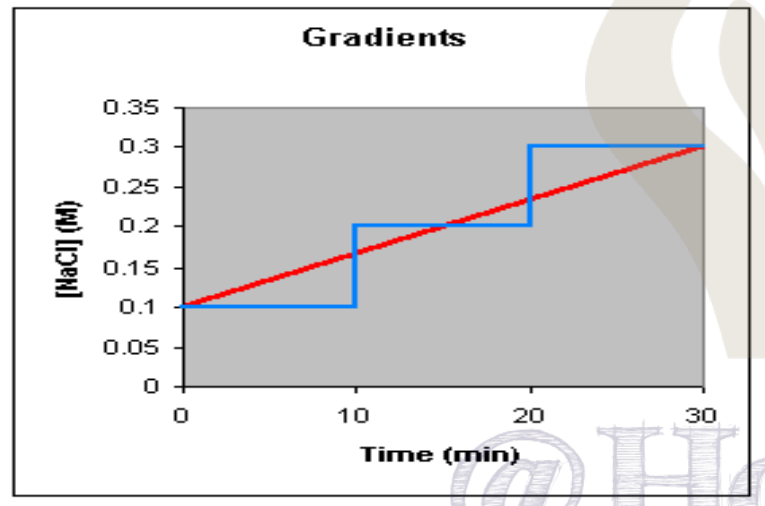
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- نسبت اجزاء فاز متحرک در طی یک تزریق ممکن است ثابت باشد.
  - در این صورت به آن روش ایزوکراتیک (Isocratic)گفته می‌شود.
- در حالتی دیگر که به آن روش گرادیانت (Gradient)گفته می‌شود...
  - طی یک تزریق و با پیشرفت زمان، طبق برنامه‌ای که از قبل برای سیستم تعریف شده است، درصد متفاوتی از دو یا چند حلال مخلوط شده و در سیستم توسط پمپ جریان می‌یابد.



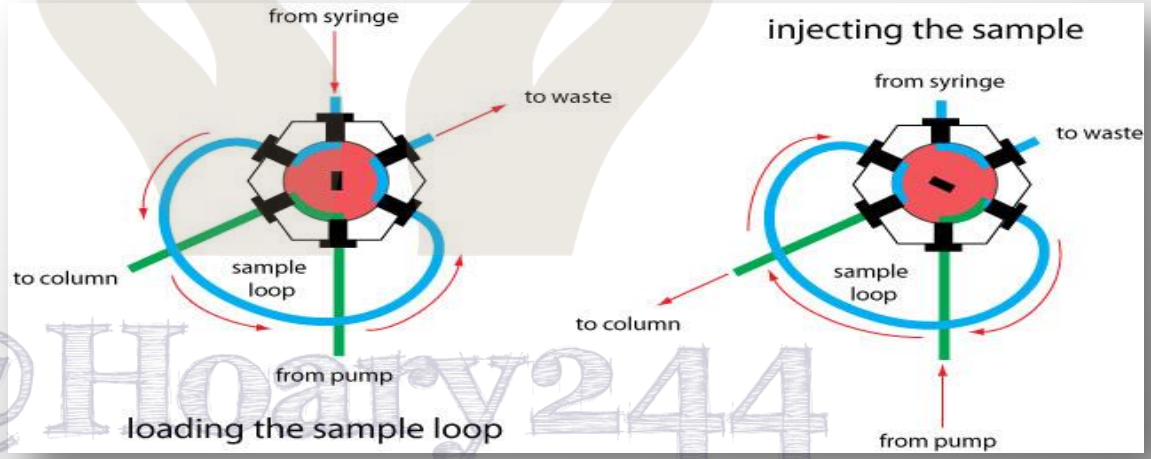
@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

تزریق کننده (Injector):

- تزریق نمونه، بسته به نوع دستگاه، به دو شکل دستی و یا خودکار انجام می‌گیرد.
  - در روش خودکار، نمونه در ظروف مخصوصی ریخته شده و در محل تعبیه شده در دستگاه قرار می‌گیرد.
  - پس از اینکه اپراتور دستور تزریق را (از طریق نرم افزار) می‌دهد، نمونه توسط یک سرنگ به سیستم منتقل می‌شود.



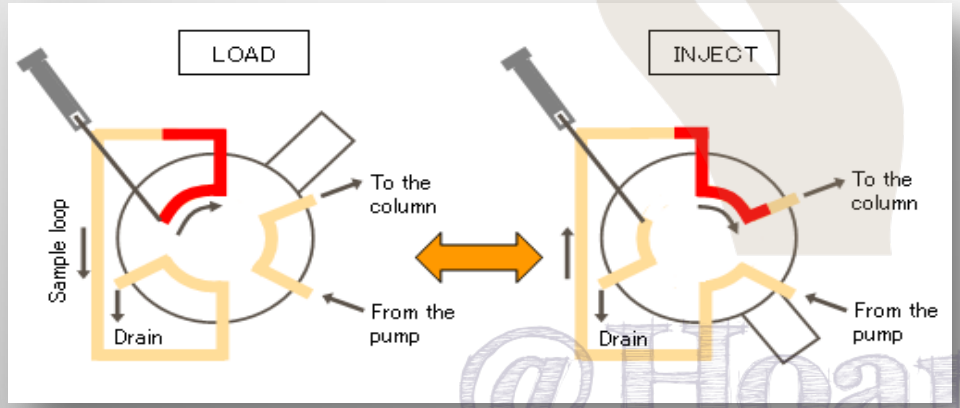
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- در روش دستی تزریق، از سرنگ‌هایی با ظرفیت‌های مختلف برای تزریق نمونه استفاده می‌شود.
- حجم نمونه تزریق شده (در هر دو روش)، به حجم حلقه نمونه‌بردار(Loop) بستگی دارد.
  - مقدار حلقه معمولاً در حد ۵ تا ۵۰۰ میکرولیتر است.
  - نمونه ابتدا وارد این حلقه شده و پس ازآماده شدن سیستم به همراه فاز متحرک وارد ستون می‌شود.



@Hoary244

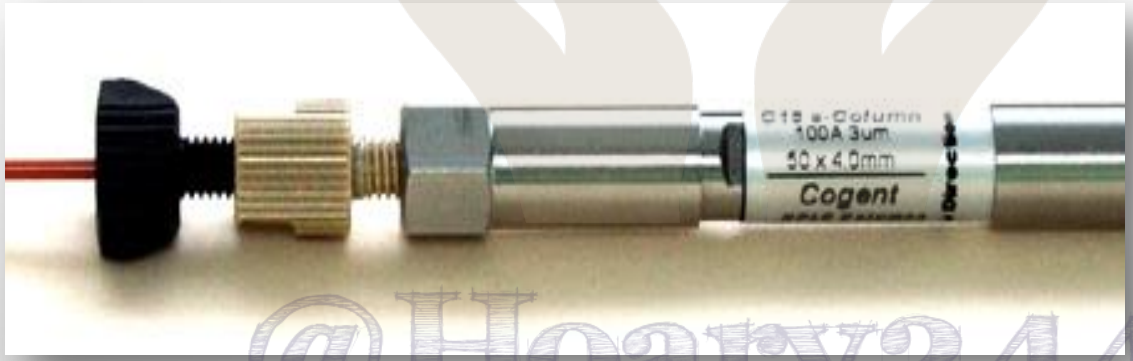
http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- **ستون:**

- پس از تزریق، نمونه ابتدا وارد قسمتی به نام پیش ستون (pre-column) یا ستون محافظ (Guard column) می‌شود.
- نقش این ستون محافظت از ستون اصلی است.
- طول این ستون معمولاً در حد سانتی‌متر و جنس آن از فولاد ضد زنگ است.
- ماده پرکننده (Packing) ستون محافظ از جنسی مشابه ماده پرکننده ستون اصلی است.



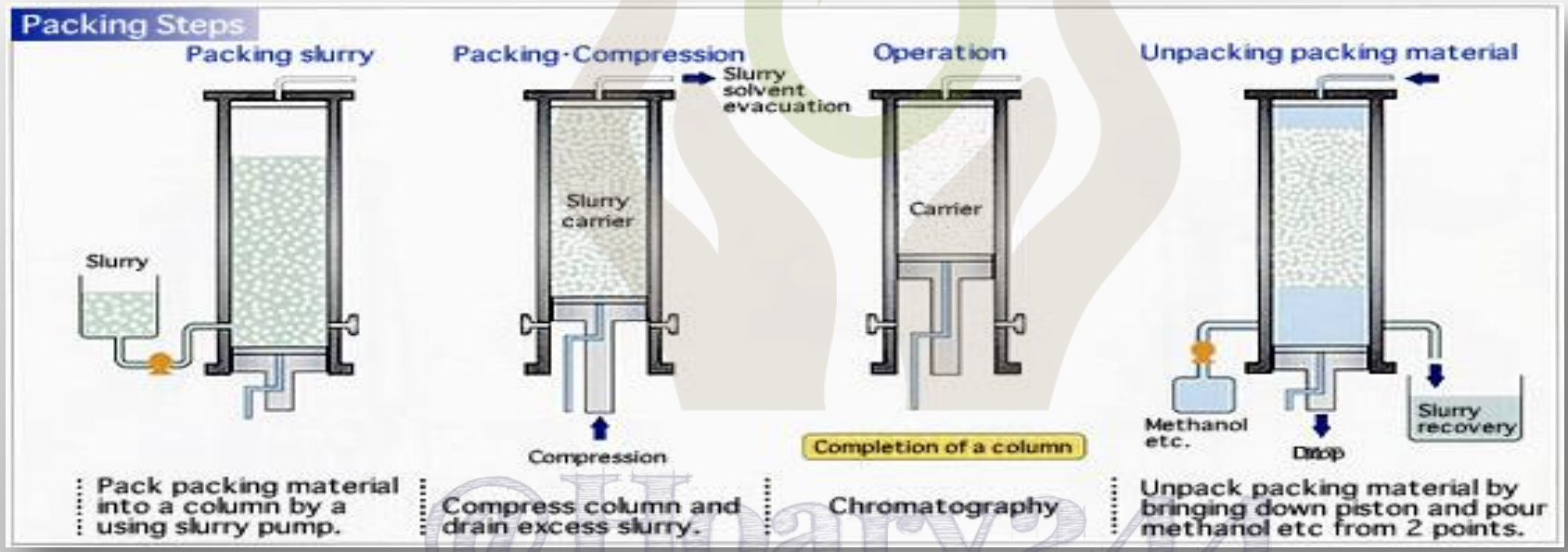
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- طول ستونهای اصلی دستگاه معمولاً حدود ۳۰-۱۰ cm است.
- درون ستون با موادی که به یکی از دو فرم پوسته‌دار و یا متخلخل است، پر می‌شود.
- سایز مواد پرکننده که بر کیفیت جداسازی تأثیر فراوانی دارد، متفاوت بوده و در حد ۳ تا ۵ میکرومتر است.



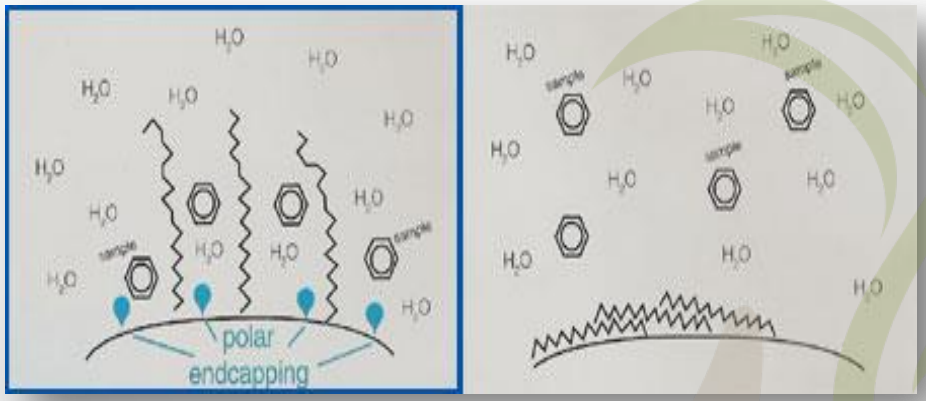
@Hoary244

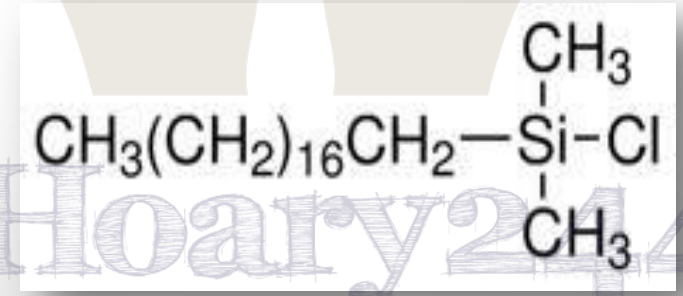
http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- ستون می‌تواند قطبی و یا غیرقطبی باشد.
- مرسوم‌ترین ستون‌های غیرقطبی:
  - C_{18}
  - اکتادسیل سیلان (ODS)
- جنس ستونها از فولاد ضد زنگ (Stainless Steel) است.
- پس از ورود نمونه به ستون، بر اساس تفاوت قطبیت، اجزاء مختلف نمونه در زمان‌های متفاوتی با نام زمان بازداری (Retention Time) از یکدیگر جدا می‌شوند.



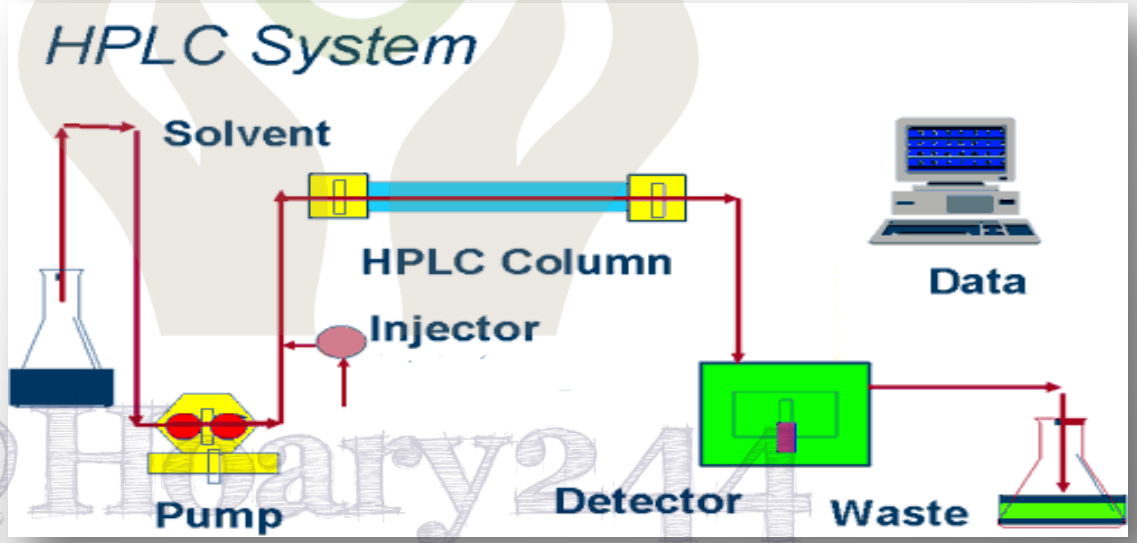


@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- اجزاء نمونه برای تشخیص نوع ماده به سمت آشکار ساز هدایت می‌شوند.
- پس از اتمام کار ستون شستشو داده می‌شود.
  - برای شستشو، بسته به نوع ستون، حلال متفاوتی انتخاب می‌شود.
  - در ستون‌های غیرقطبی پس از اتمام کار، ابتدا ستون با یک حلال قطبی (معمولاً آب) و سپس با یک حلال غیرقطبی (معمولاً متانول) شستشو می‌شود.



@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

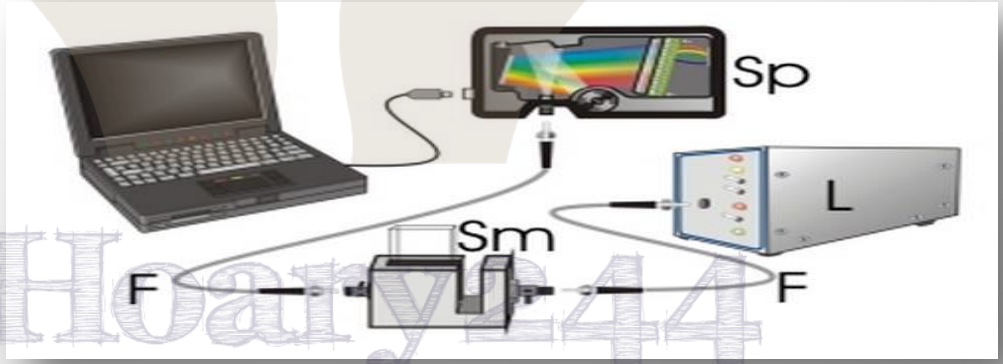
- آشکارساز (Detector):
  - آشکارساز بر اساس نوع آنالیت انتخاب می‌شود.
- آشکارساز خوب باید دارای ویژگی‌های زیر باشد:
  - حساسیت بالا
  - غیرتخریبی بودن (Nondestructive): در طول روند شناسایی نمونه را تخریب نکند.
  - پاسخ خطی به غلظت در دامنه وسیع (برای سهولت در محاسبات)

@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- تعدادی ازآشکارسازهای مرسوم:
- از پر کاربردترین انواع آشکارساز، طیف‌سنج UV-Vis است که برای اجسامی که در این ناحیه جذب داشته باشند، مورد استفاده قرار می‌گیرد.
  - در این آشکارساز با استفاده از تفاوت میزان جذب نمونه با منبع نوری اولیه و در نهایت با استفاده از قانون بیر لامبرت غلظت نمونه اندازه‌گیری می‌شود.
- انتخاب طول موج مناسب در این آشکارساز مهم است.
  - در طول موج انتخابی، مزاحم‌های موجود در نمونه و حلال فاقد جذب‌اند.



@Hoary244

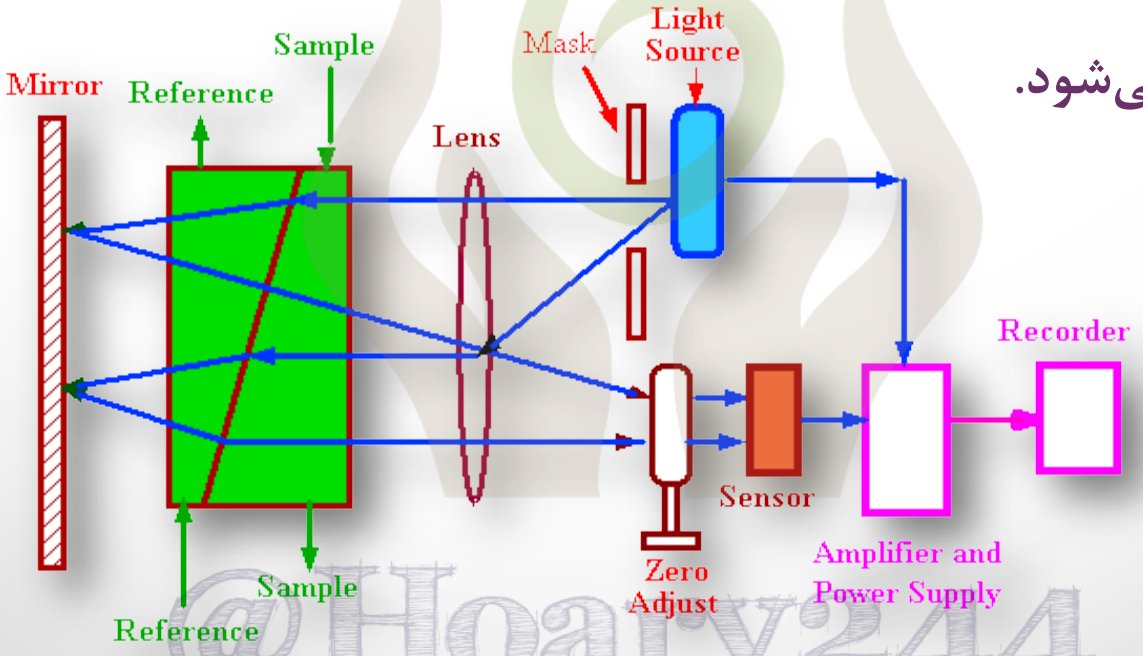
http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

آشکارساز ضریب شکست

- اساس کار این آشکارساز بر مبنای تغییراتی است که در ضریب شکست سیستم حلال به تنهایی و سیستم حلال همراه با نمونه، ایجاد می‌شود.
- پاسخ این آشکارساز به حرارت وابسته است و به همین دلیل معمولاً به ندرت ازآن استفاده می‌شود.



@Hoary244

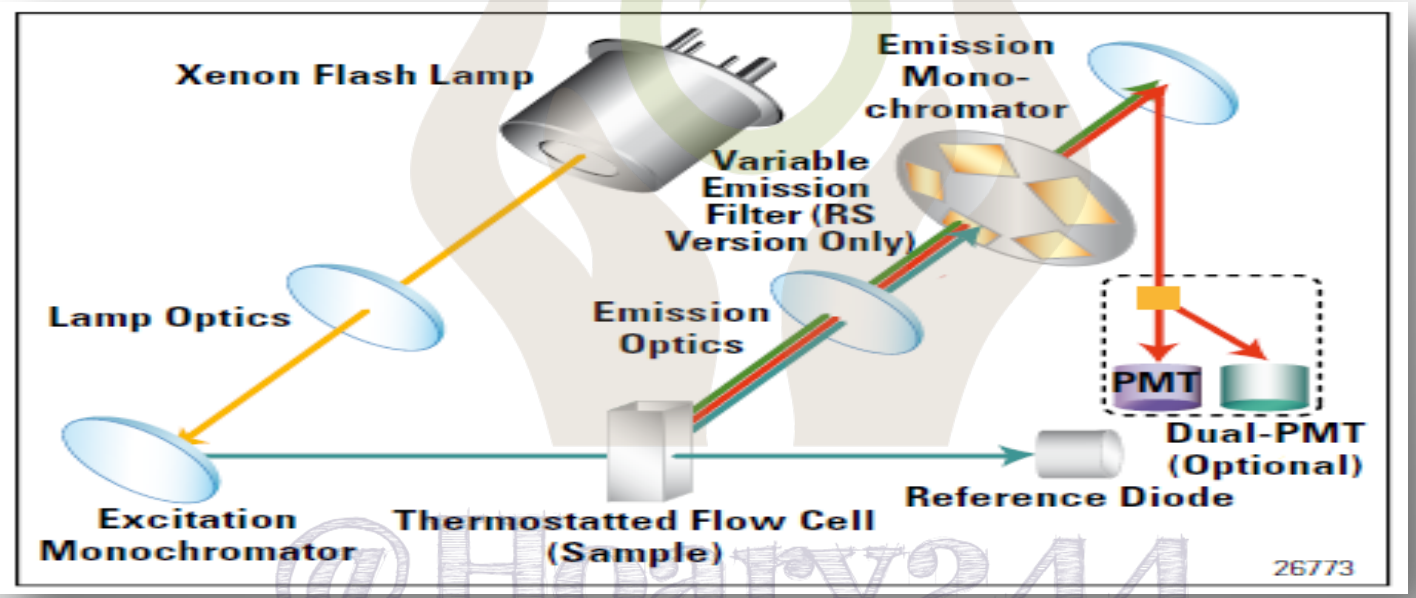
http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

آشکارساز فلورسانس

- این آشکارسازحساس‌تر از آشکارساز UV/Vis است.
- ترکیبات کمی واجد خاصیت فلورسانس هستند.
- کاربرد این آشکارساز محدود است.

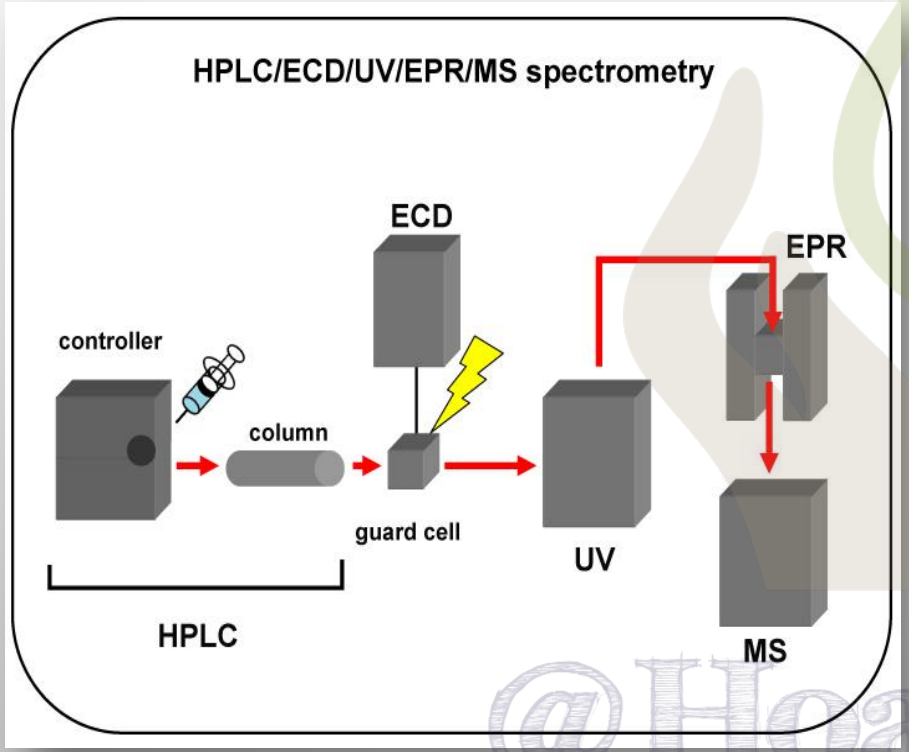


@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- آشکارساز الکتروشیمیایی
- عملکرد این آشکارساز بر پایه واکنش‌های اکسید و احیا می‌باشد.
- آشکارساز الکتروشیمیایی شامل روشهای زیر می‌باشد:
  - آمپرومتری (Amperometry)
  - پلاروگرافی(Polarography)
  - کلون‌سنجی (Coulometry)
  - هدایت‌سنجی (Conductometry)

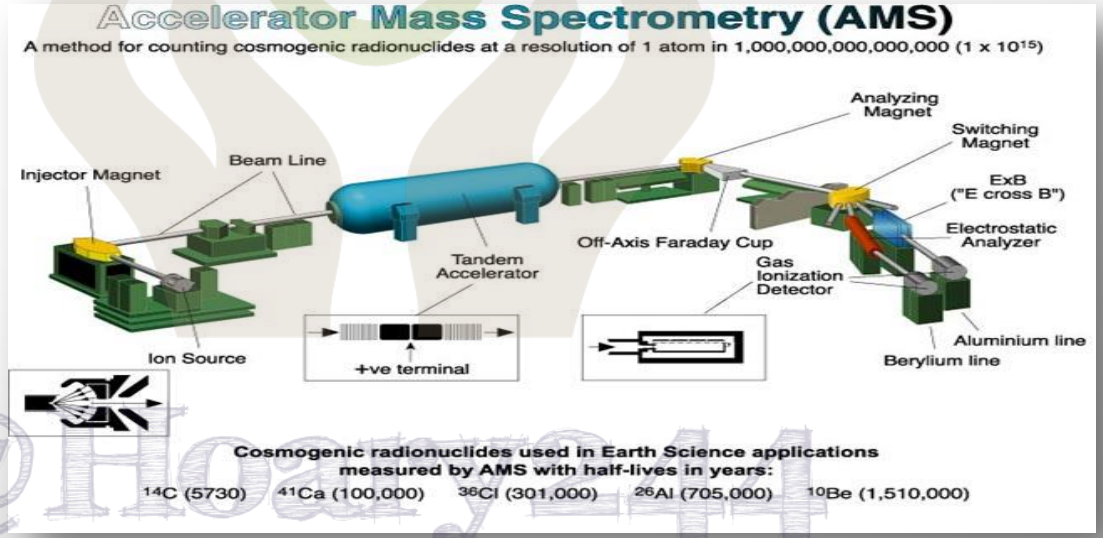


@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- آشکارساز طیف‌سنج جرمی (MS):
  - به دلیل مزایای زیادی که دارد به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد:
    - حد تشخیص (LOD) بسیار پایین
    - حساسیت و انتخابگری (Selectivity) بالا
    - امکان بررسی نمونه در حضور مزاحم‌های شیمیایی



http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اجزاء و قسمتهای مختلف دستگاه HPLC

- نمایی از یک دستگاه HPLC را به همراه اجزاء مختلف آن به تصویر کشیده است.

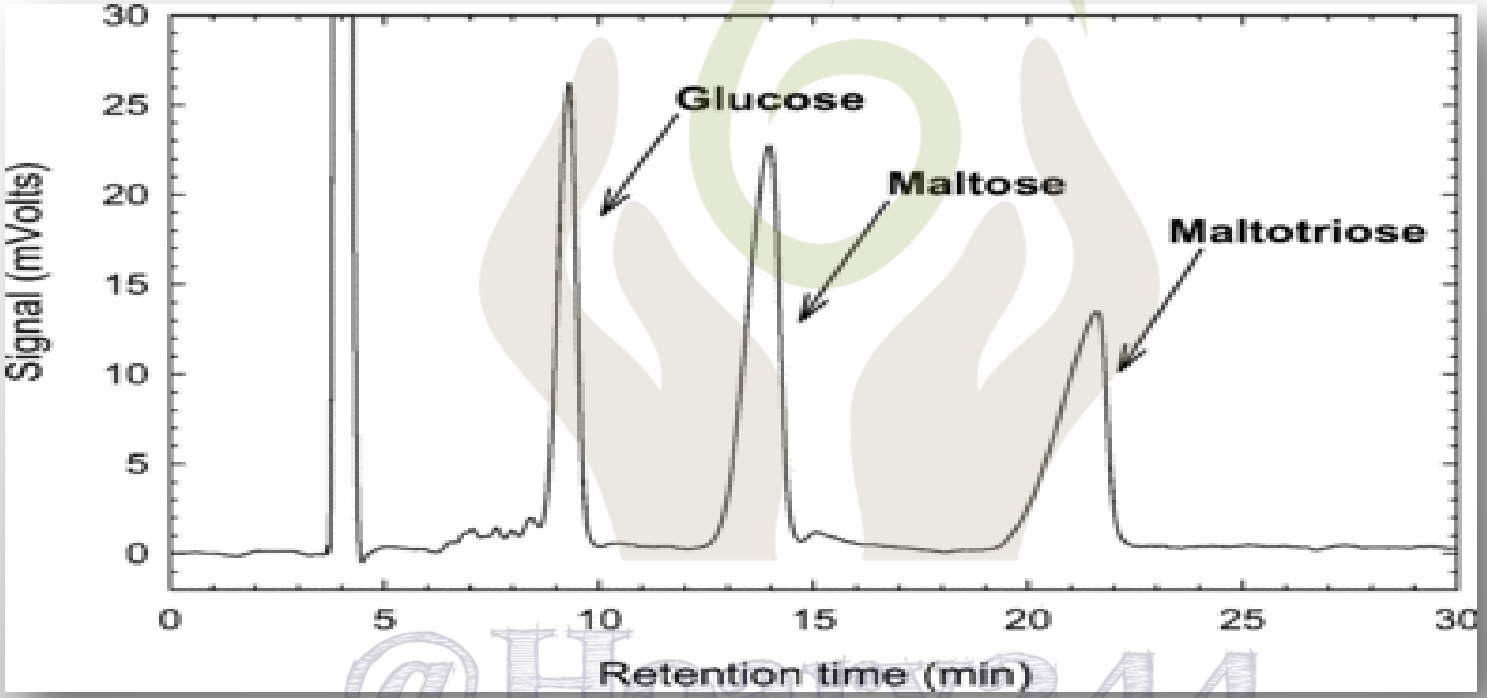
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اطلاعات حاصل از یک کروماتوگرام

- یک نمونه کروماتوگرام:
  - در کروماتوگرام سه نوع قند از یکدیگر جدا شده‌اند.
  - اطلاعات کمی، نیمه کمی و کیفی از ولتاموگرام قابل استخراج است.



@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

اطلاعات حاصل از یک کروماتوگرام

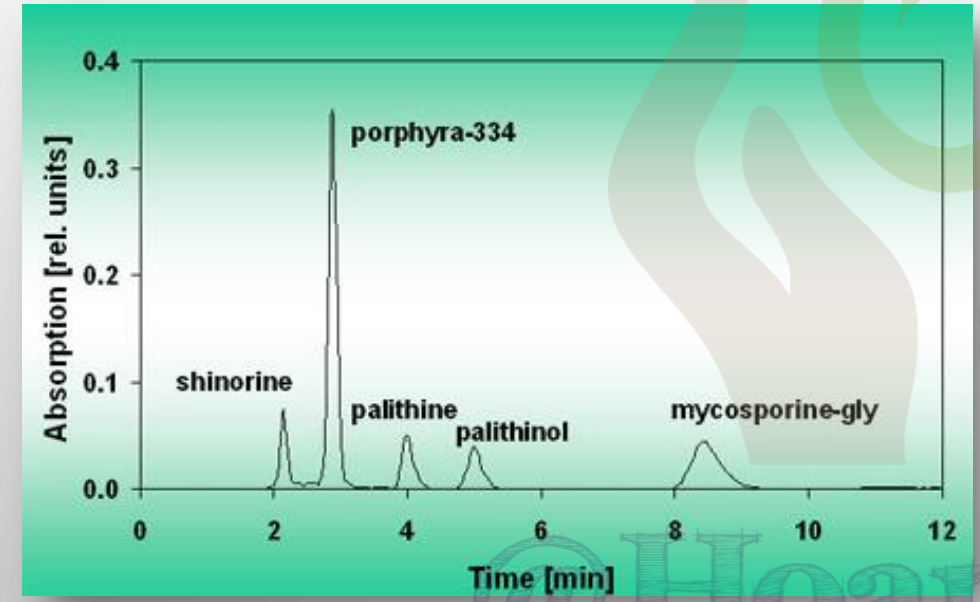
- کاربردهای کیفی:
- آنالیز کیفی، برای تشخیص و شناسایی نوع ترکیبات انجام می‌شود.
- زمان بازداری برای هر ماده در یک سیستم و شرایط خاص آزمایشگاهی ثابت و مشخص می‌باشد.
- لذا از زمان بازداری جهت تعیین نوع آنالیت استفاده می‌شود.
  - به این منظور کروماتوگرام آنالیت را با کروماتوگرام به دست آمده از استاندارد آن آنالیت مقایسه می‌کنند.
  - در صورت یکسان بودن زمان بازداری می‌توان با قطعیت نوع ماده را تعیین کرد.
  - مقایسه دو کروماتوگرام تنها در شرایط آزمایشگاهی و دستگاهی کاملاً یکسان معتبر است.

@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

اطلاعات حاصل از یک کروماتوگرام

- آنالیز کمی:
- به منظور تعیین کمی مقدار آنالیت، سطح زیر پیک و یا ارتفاع پیک ترکیب مجهول را با نمونه استاندارد مقایسه می‌کنند.
- در مواردی که پیک باریک و متقارن باشد، اندازه‌گیری ارتفاع پیک از صحت و سرعت بیشتری برخوردار است.



@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

روشهای محاسبه مقدار مجهول

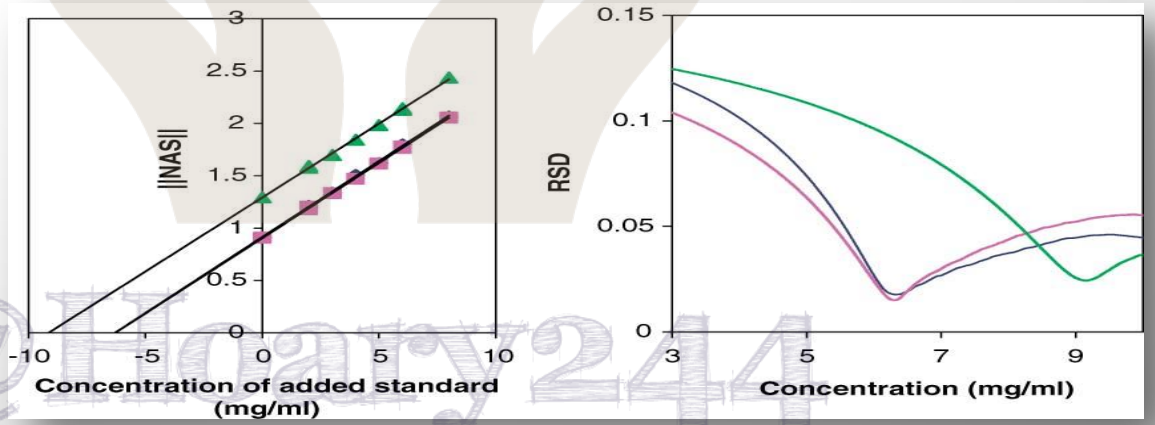
- روش استاندارد خارجی (External Standard):
- در این روش، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از استاندارد (استاندارد آنالیت مورد نظر) ساخته می‌شوند.
- بر اساس ارتفاع یا سطح زیر پیک بدست آمده از کروماتوگرام این استانداردها، منحنی کالیبراسیون (منحنی ارتفاع و یا سطح زیر پیک، بر حسب غلظت) رسم می‌شود.
- با استفاده از معادله خط بدست آمده، مقدار ارتفاع و یا سطح زیر پیک نمونه مجهول، مقدار دقیق آنالیت محاسبه می‌شود.

@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

روشهای محاسبه مقدار مجهول

- روش افزایش استاندارد (Standard Addition):
- در این روش ابتدا ماده مجهول، آنالیز می‌شود.
- سپس به چند ظرف که حاوی مقدار یکسانی از نمونه است، حجم‌های مشخصی از استاندارد اضافه می‌شود.
- کروماتوگرام مربوط به هر مرحله آنالیز می‌شود.
- ارتفاع یا سطح زیر پیک بر اساس حجم استاندارد اضافه شده رسم می‌شود.



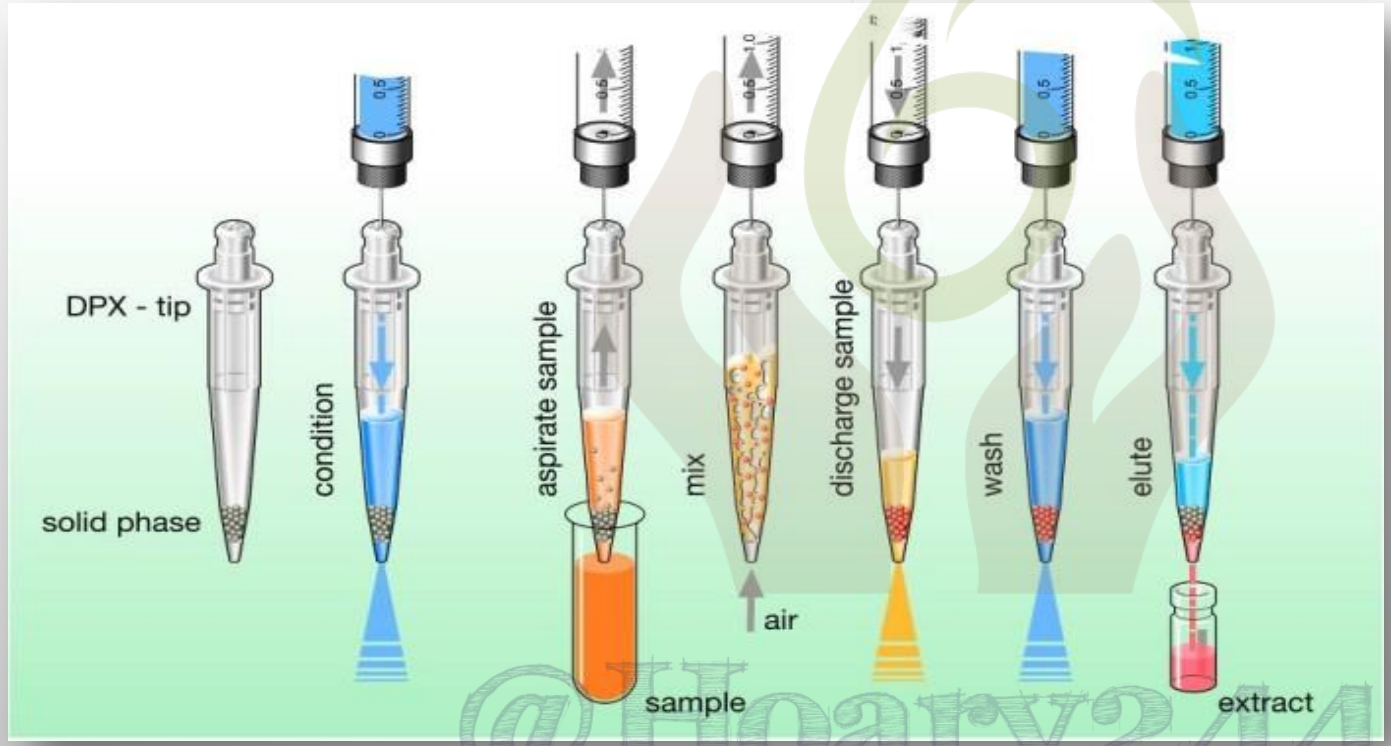
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

روشهای محاسبه مقدار مجهول

- با استفاده از روابط موجود می‌توان غلظت نمونه را محاسبه کرد.
- استفاده از روش افزایش استاندارد سبب حفظ بافت و ماتریس نمونه می‌شود.
- با این روش احتمال مزاحمت بافت نمونه (Matrix Interference) از بین برده می‌شود.



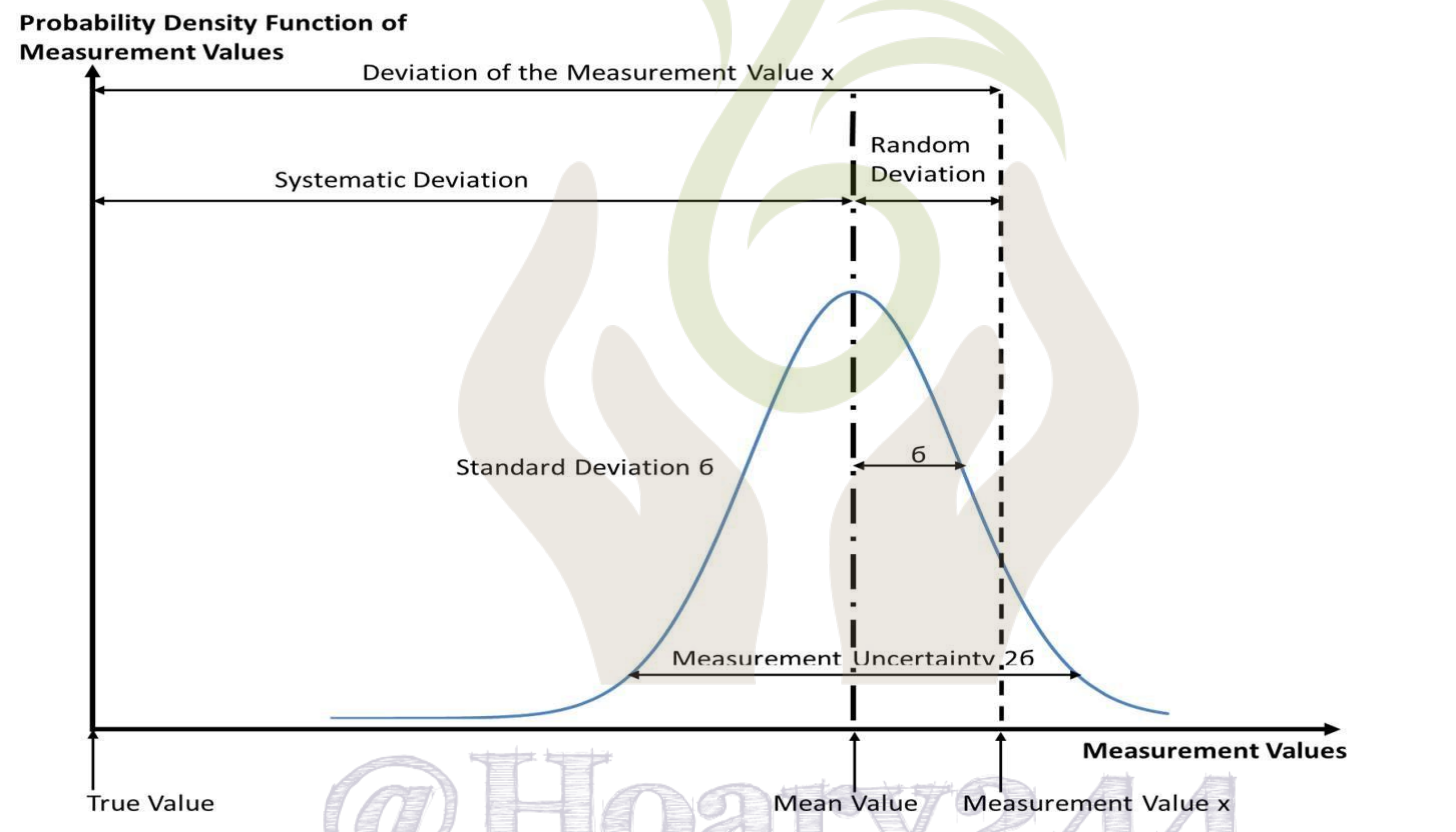
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

روشهای محاسبه مقدار مجهول

- استاندارد داخلی (Internal Standard):
- دو نوع خطا (سیستماتیک و تصادفی) در سیستم موجود است.



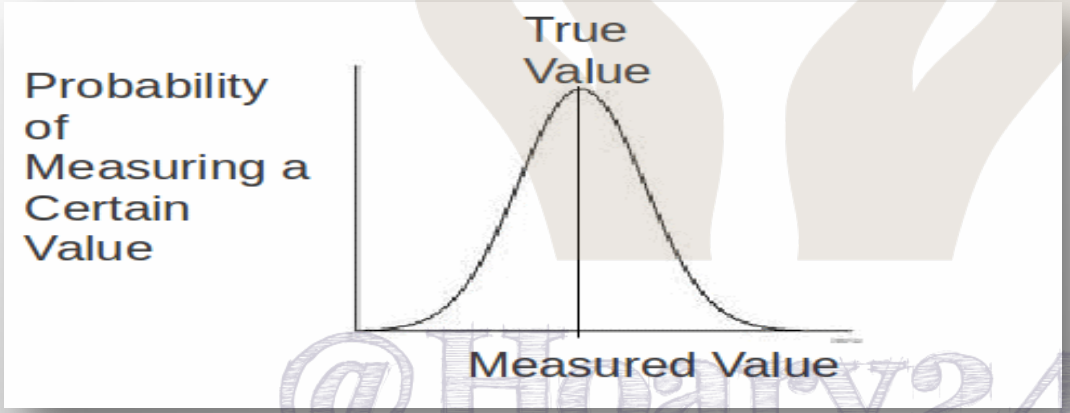
@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

روشهای محاسبه مقدار مجهول

- برخی از خطاهای ثابت را می‌توان با اضافه کردن یک استاندارد داخلی به نمونه و تقسیم ارتفاع پیک یا سطح زیر پیک مربوط به هر آنالیت بر همین مقادیر مربوط به استاندارد داخلی، حذف کرد.
- در انتخاب استاندارد داخلی باید به شباهت‌های ساختاری آنالیت با جزء انتخابی، نزدیک بودن زمان بازداری پیک آن به پیک نمونه و ... توجه کرد.
- با انتخاب یک استاندارد داخلی مناسب می‌توان خطا را از ۱ تا ۲ درصد به ۰.۵ تا ۱ درصد کاهش داد.



@Hoary244

Hoary244 Telegram Channel

بحث و نتیجه گیری

- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روشی مناسب جهت جداسازی، اندازه‌گیری و تعیین نوع مواد است.
- این تکنیک با تلفیق با روشهای دیگر و آشکارسازهای پیشرفته‌ای مانند طیف‌سنج جرمی کاربردهای زیادی در علوم مختلف دارد.
- انتخاب فاز متحرک و ثابت، انتخاب آشکارساز و تعیین سرعت جریان فاز متحرک از جمله موارد اساسی در تنظیمات یک روش مناسب HPLC است.

@Hoary244

http://edu.nano.ir

Hoary244 Telegram Channel

مشارکت در توسعه سیستم جامع آموزش فناوری نانو

سیستم جامع آموزش فناوری نانو با مشارکت دانشجویان و علاقه مندان در مقاطع دکتری وکارشناسی ارشد گرایش های مختلف فناوری نانو و سایر رشته های مرتبط با این فناوری نوین در حال توسعه است. لذا از تمامی اساتید، دانشجویان، متخصصین و علاقه مندان تقاضا می گردد نظرات، پیشنهادات و انتقادات خود را به منظور توسعه هر چه بهتر این سیستم با سایت آموزش فناوری نانو در میان بگذارند.

Edu@nano.ir

@Hoary244

ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
کارگروه ترویج و فرهنگ سازی عمومی

Hoary244 Telegram Channel

پایان

Edu@nano.ir
@Hoary244