بسم الله الرحمن الرحيم

پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران
پژوهشکده شیمی تجزیه و معدنی

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان

تهیهٔ فاز ساکن پیوندی مشتقات کالیکس [۴] آرن به منظور جداسازی گزینشی آمینواسیدها با استفاده از کروماتوگرافی فاز معکوس

استاد راهنما

دکتر کورش تبار حیدر

استاد مشاور

دکتر رضا زادمرد

نگارش

محمد تدین

شهریورماه۱۳۸۸

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

«پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران»

نتیجه نهایی و امتحان دفاع از پروژه پایان نامه کارشناسی ارشد

در تاریخ **۱۳۸۸/۰۶/۲۵** در جلسه‌ای در محل «پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران» در حضور هیئت‌داوران و اعضاء هیئت علمی **آقای محمد تدین** از پایان نامه خویش دفاع به عمل آوردند.

هیئت داوران که قبلا رساله ایشان را مطالعه نموده‌اند پس از استماع دفاعیات و پرسش‌های لازم در زمینه علمی‌و تحقیقاتی ایشان نتیجه را به شرح زیر اعلام می‌دارد.

- ☐ پایان نامه در وضع فعلی مورد قبول است و نمره آن می‌باشد.
- ☑ پایان نامه در وضع فعلی با تصحیحات جزئی مورد قبول است و نمره آن ۱۸/۵ می‌باشد. هجده و پنج
- ☐ پایان نامه نیاز به تصحیحاتی دارد که پس از انجام آن و تصدیق هیئت داوران با نمره موردقبول خواهد بود.
- ☐ پایان نامه و پروژه نیاز به تکمیل دارد و پس از تأیید هیئت داوران نمره اعلام خواهد شد.

اعضاء هیئت داوران:

	نام و نام خانوادگی	سمت	رشته تخصصی	امضاء
۱- استاد مدعو خارجی	**دکتر محمد رضا سنگی**	**استادیار**	**شیمی تجزیه**	
۲- اساتید راهنما	**دکتر کورش تبار حیدر**	**دانشیار**	**شیمی تجزیه**	
۳-استاد مشاور	**دکتر رضا زادمرد**	**استادیار**	**شیمی آلی**	
۴-امور آموزش و تحصیلات تکمیلی	**دکتر سید حمید احمدی**	**دانشیار**	**شیمی تجزیه**	

تقدیم و تشکر

بر خود لازم می دانم از تمامی عزیزانی که در راه رسیدن به این مرحله بنده را راهنمایی ویاری نموده اند کمال تشکر و قدردانی را انجام دهم. به خصوص از جناب آقای دکتر تبار حیدر، استاد راهنما و جناب آقای دکتر زادمرد، استاد مشاور که همواره در تمام مراحل انجام پروژه همراه ومشوق بنده بوده اند.

همچنین از اساتید محترمی که افتخار شاگردی در محضر آنها را داشته ام قدردانی می کنم و برای یکایک آنها آرزوی سعادت و بهروزی از درگاه خداوند منان دارم.

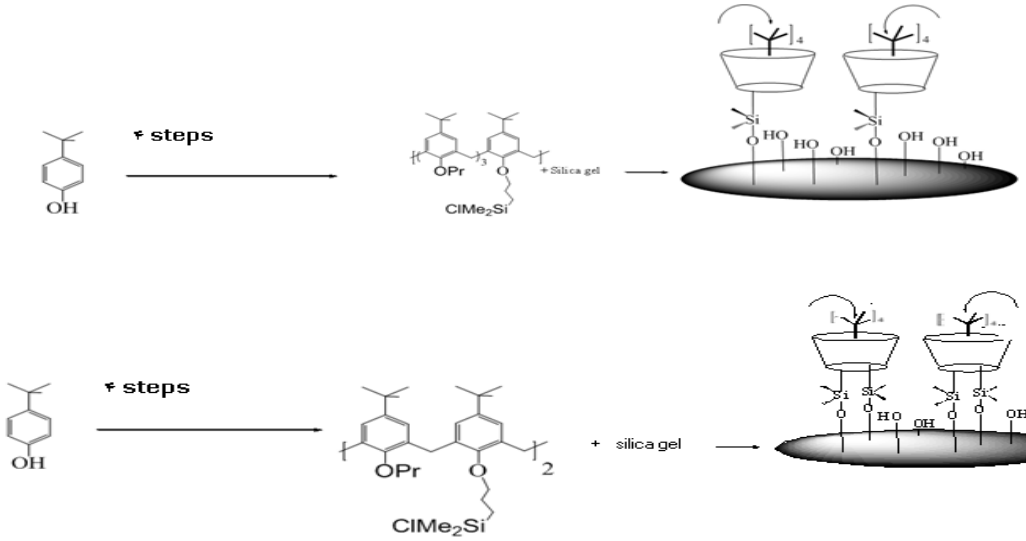
از تمام کسانی که به عنوان هیات علمی، مربی و کارمند بنده را در پیمودن این راه یاری نموده اند از صمیم قلب قدردانی می کنم.

حمایتهای بی دریغ مهندس قشقایی و مهندس خورشید فراموش نشدنی است و از مهندس سیلسپور و آقایان محمد اقتداری، اصغر نجفی، حمیدرضا بنی هاشمی، علی خواجه امیری و از خانم ها نخشب، خلیلی، انتظاری و تمام عزیزانی که به نحوی بنده را یاری نموده اند کمال تشکر را دارم و برای آنها آرزوی موفقیت دارم.

در آخر، این پایان نامه را به پدر مرحوم وفداکارم، مادر مهربانم، همسر عزیزم و خانواده گرامیم تقدیم می کنم.

چکیده

اهمیت آمینواسیدها به عنوان سازنده پروتئینها که سازنده بدن جانداران و تنظیم کننده فعالیتهای حیاتی بدن میباشد،برهمگان آشکار است.از طرفی اسیدهای آمینه کاربرد گسترده ای درصنایع غذایی، پزشکی، دارویی، شیمیایی وغیره دارد. با این تفاسیر آنالیز آمینواسیدها از اهمیت خاصی بر خوردار است ویکی از تکنیکهای آنالیز این ترکیبات کروماتوگرافی مایع فاز معکوس بوده که قلب این تکنیک ستون کروماتوگرافی وبه تبع، فاز ساکن آن میباشد.کالیکس آرن به عنوان فاز ساکن در کروماتوگرافی مایع توجه محققان رابه خود جلب کرده است.کالیکس آرن یک مولکول ماکروسیکل می باشد که از واحدهای فنل ساخته شده که از موقعیت اورتو توسط پلهای متیلن بهم وصل شده است. علت تمایل به کالیکس در سالهای اخیر برای جداسازی شیمیایی در تجزیه، توانایی آن درتشکیل کمپلکس با مولکولهای خنثی به مانند مولکولهای باردار میباشد.در این کار دو تا از مشتقات جدید کالیکس[۴]آرن سنتز وشناسایی شد و به عنوان فاز ساکن بر روی سیلیکاژل طبق روش زیر پیوند داده شد.



و در مرحله ی آنالیز جداسازی پنج آمینواسید(تریپتوفان،لوسین،والین،پرولین وهیستیدین) با استفاده از فازهای ساکن سنتزی میسر گردید. در ضمن این فازهای ساکن سنتزی قادر به جداسازی پلی آروماتیکها و آلکیل بنزنها نیز می باشند.

کلمات کلیدی:کروماتوگرافی مایع فاز معکوس- فاز ساکن- کالیکس آرن- آمینواسید

فهرست مطالب

۱مبانی و مطالعات علمی ۱

۱-۱کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۱

۱-۱-۱مقدمه ای بر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۱

۱-۱-۲کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و فاز معکوس ۲

۱-۱-۳اساس روش و دستگاهوری ۳

۱-۱-۴نیاز به سوبستراها و فازهای ساکن برای HPLC ۵

۱-۱-۵ فازهای ساکن با پایه سیلیکا ۷

۱-۱-۶ساختار سیلیکا ۷

۱-۱-۷ اتصال فاز ساکن به صورت شیمیایی ۱۰

۱-۱-۸ شیمی اتصال فاز ساکن ۱۱

۱-۱-۹واکنشگرهای ارگانوسیلان ۱۲

۱-۱-۱۰ثبات شیمیایی فازهای RPLC ۱۴

۱-۱-۱۱گروههای عاملی یا لیگاندها یا اصلاح کننده‌ها ۱۵

۱-۱-۱۲ رزولیشن و جداسازی ۱۸

۱-۱-۱۳ بر هم کنش فاز ساکن با مواد حل شونده ۲۰

۱-۱-۱۴ بازداری ۲۱

۱-۱-۱۵ شوینده‌ها ۲۳

۱-۲ کالیکس آرن ۲۴

۱-۲-۱ سیرتکاملی شیمی کالیکس آرن ۲۴

۱-۲-۲ مشخصات کالیکس آرن ۲۵

۱-۲-۳ خصوصیات فیزیکی متداول ۲۷

۱-۲-۴ طیف‌سنجی کالیکس آرن ۲۷
۱-۲-۵ کالیکس آرن‌ها و کمپلکس شدن میزبان- میهمان ۲۹
۱-۳ آمینو اسید ۳۳
۱-۳-۱مقدمه ۳۳
۱-۳-۲ساختار آمینو اسیدها ۳۴
۱-۳-۳ آنالیز آمینواسیدها ۳۶
۲ مراحل تجربی ۳۹
۲-۱ سنتز ۳۹
۲-۱-۱خشک کردن حلال‌ها ۴۱
۲-۱-۲ سنتز فاز ساکن یک عاملی ۴۲
۲-۱-۳ سنتز فاز ساکن دوعاملی ۴۸
۲-۲ آنالیز ۵۴
۲-۲-۱ پر کردن ستون توسط فاز ساکن سنتز شده ۵۴
۲-۲-۲ تعیین خصوصیات فاز ساکن- آنالیز عنصری ۵۶
۲-۲-۳ محاسبات کاربردی ۵۷
۲-۲-۴ تست ستون ۵۸
۲-۲-۵ جداسازی آمینو اسیدها ۶۸
۲-۲-۶ جداسازی آمینو اسید و دیپپتید آن ۷۹
۳ بحث و نتیجه گیری و پیشنهادات ۸۱
مراجع ۸۵
پیوست ها ۸۸

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱ جهت گیریهای هیدروکسیل روی سطح سیلیکا..... ۸

شکل۱-۲ انواع واکنشگرهای ارگانوسیلان..... ۱۲

شکل۱-۳استوکیومتری پیش‌بینی شده گروههای سیلانول با تعداد مول لیگاند ۱۳

شکل۱-۴ساختار شیمیایی فاز ساکنC8وC18 ..... ۱۷

شکل۱-۵ کالیکس آرن..... ۲۵

شکل۱-۶ کنفورماسیون های کالیکس آرن..... ۲۶

شکل۱-۷ ساختار شیمیایی ۱و۳ –آلترنیت۲۵و۲۷-بیس[پارا نیترو بنزوکسی] -۲۶و۲۸-بیس[۳-پروپیلوکسی]-کالیکس[۴]آرن..... ۳۱

شکل۱-۸ساختار شیمیایی ۱و۳ –آلترنیت۲۵و۲۷-بیس[پنتا فلورو بنزویلوکسی] -۲۶و۲۸-بیس[۳-پروپیلوکسی]-کالیکس[۴] آرن..... ۳۲

شکل۱-۹ساختار شیمیایی ۱و۳ –آلترنیت۲۵و۲۷-دی بنزیلوکسی-۲۶و۲۸-بیس[۳-پروپیلوکسی]-کالیکس[۴] آرن..... ۳۳

شکل۲-۱ طرح ابتدایی سنتز فاز ساکن..... ۴۰

شکل۲-۲ مرحله اول سنتز فاز ساکن یک عاملی..... ۴۳

شکل۲-۳ مرحله دوم سنتز فاز ساکن یک عاملی..... ۴۴

شکل۲-۴ مرحله سوم سنتز فاز ساکن یک عاملی..... ۴۵

شکل۲-۵ مرحله چهارم سنتز فاز ساکن یک عاملی..... ۴۶

شکل۲-۶ مرحله پنجم سنتز فاز ساکن یک عاملی..... ۴۷

شکل۲-۷ مرحله دوم سنتز فاز ساکن دوعاملی..... ۴۹

شکل۲-۸ مرحله سوم سنتز فاز ساکن دوعاملی..... ۵۰

شکل۲-۹ مرحله دوم(به روش دوم) سنتز فاز ساکن دوعاملی..... ۵۱

شکل۲- ۱۰ مرحله سوم(به روش دوم) سنتز فاز ساکن دوعاملی..... ۵۱

شکل۲-۱۱ مرحله چهارم سنتز فاز ساکن دوعاملی.....۵۲

شکل۲-۱۲ مرحله پنجم سنتز فاز ساکن دوعاملی.....۵۴

شکل۲-۱۳ ابزار پرکردن ستون.....۵۵

شکل ۲-۱۴کروماتوگرام مخلوط آلکیل بنزنها بر روی ستون سنتزی تک عاملی وبا درصد ترکیب حلال ۴۵/۵۵آب/استونیتریل.....۵۹

شکل ۲-۱۵کروماتوگرام مخلوط آلکیل بنزنها بر روی ستون سنتزی تک عاملی وبا درصد ترکیب حلال ۳۵/۶۵آب/استونیتریل.....۶۰

شکل ۲-۱۶کروماتوگرام مخلوط آلکیل بنزنها بر روی ستون سنتزی تک عاملی وبا درصد ترکیب حلال ۲۵/۷۵ آب/استونیتریل.....۶۱

شکل ۲-۱۷کروماتوگرام مخلوط آلکیل بنزنها بر روی ستون سنتزی دو عاملی وبا درصد ترکیب حلال ۴۰/۶۰آب/استونیتریل.....۶۲

شکل ۲-۱۸کروماتوگرام مخلوط آلکیل بنزنها بر روی ستون اکتادسیلی وبا درصد ترکیب حلال ۸۰/۲۰ آب/استونیتریل.....۶۳

شکل۲-۱۹ کروماتوگرام آروماتیک ها بر روی ستون سنتزی یک عاملی وبا درصد ترکیب حلال ۲۵/۷۵ آب/استونیتریل.....۶۵

شکل۲-۲۰ کروماتوگرام آروماتیک ها بر روی ستون اکتادسیلی وبا درصد ترکیب حلال ۹۰/۱۰ آب/استونیتریل.....۶۶

شکل۲-۲۱ کروماتوگرام آمینواسیدها بر روی ستون سنتزی یک عاملی و با در صد ترکیب حلال ۸۰/۲۰ بافر/استونیتریل با فلو ۱.....۶۸

شکل۲-۲۲ کروماتوگرام آمینواسیدها بر روی ستون سنتزی یک عاملی و با در صد ترکیب حلال ۸۰/۲۰ بافر/استونیتریل با فلو۱,۵.....۶۹

شکل۲-۲۳ کروماتوگرام آمینواسیدها بر روی ستون سنتزی یک عاملی و با در صد ترکیب حلال۷۵/۲۵ بافر/استونیتریل با فلو۱.....۷۰

شکل۲-۲۴ کروماتوگرام آمینواسیدها بر روی ستون سنتزی یک عاملی و با در صد ترکیب حلال۷۳/۲۷بافر/استونیتریل با فلو۱.....۷۱

شکل۲-۲۵ کروماتوگرام آمینواسیدها بر روی ستون سنتزی یک عاملی و با در صد ترکیب حلال ۷۳/۲۷ بافر/استونیتریل با فلو۱,۵.....۷۲

شکل۲-۲۶ کروماتوگرام آمینواسیدها بر روی ستون سنتزی یک عاملی و با در صد ترکیب حلال ۷۱/۲۹ بافر/استونیتریل با فلو۱.....۷۳

شکل ۲-۲۷کروماتوگرام مخلوط آمبنواسیدها بر روی ستون سنتزی دو عاملی و با درصد ترکیب حلال ۳۰/۷۰ بافر/ استونیتریل.....۷۵

شکل ۲-۲۸کروماتوگرام مخلوط آمبنواسیدها بر روی ستون اکتادسیلی و با درصد ترکیب حلال ۱۰/۹۰ بافر/ استونیتریل.....۷۷

شکل ۲-۲۹کروماتوگرام مخلوط آمبنواسیدها بر روی ستون اکتادسیلی و با درصد ترکیب حلال ۵/۹۵ بافر/ استونیتریل.....۷۸

شکل۲-۳۰ کروماتوگرام آمینواسیدو نمونه پروتکت شده ودیپپتید آن بر روی ستون سنتزی یک عاملی و با در صد ترکیب حلال۱۵/۸۵بافر/استونیتریل.....۷۹

فهرست جدول ها

جدول۱-۱فازهای ساکن رایج برای LC ۱۶

جدول۲-۱ مقایسه مشخصات ستون سنتزی با ستون اکتا دسیلی ۵۷

جدول ۲-۲مقایسه فاکتور ظرفیت آلکیل بنزنها بر روی ستونهای سنتزی و اکتادسیلی..... ۶۴

جدول ۲-۳مقایسه فاکتور جداسازی آلکیل بنزنها بر روی ستونهای سنتزی و اکتادسیلی..... ۶۴

جدول۲-۴مقایسه کارایی ستونهای سنتزی واکتادسیلی (آلکیل بنزنها)..... ۶۴

جدول۲-۵مقایسه فاکتور ظرفیت پلی آروماتیکها بر روی ستون یک عاملی واکتادسیلی..... ۶۷

جدول۲-۶مقایسه فاکتور جداسازی پلی آروماتیکها بر روی ستون یک عاملی واکتادسیلی..... ۶۷

جدول۲-۷مقایسه کارایی ستون یک عاملی واکتادسیلی(پلی آروماتیکها)..... ۶۷

جدول۲-۸ فاکتور ظرفیت آمینو اسیدها بر روی ستون سنتزی یک عاملی..... ۷۴

جدول۲-۹فاکتور جداسازی آمینو اسیدها بر روی ستون سنتزی یک عاملی..... ۷۴

جدول۲-۱۰ فاکتور ظرفیت آمینو اسیدها بر روی ستون سنتزی دو عاملی..... ۷۶

جدول۲- ۱۱فاکتور جداسازی آمینو اسیدها بر روی ستون سنتزی دو عاملی..... ۷۶

جدول۲-۱۲ فاکتور ظرفیت آمینواسیدو نمونه پروتکت شده ودیپپتید بر روی ستون سنتزی یک عاملی..... ۸۰

جدول ۲-۱۳ فاکتور جداسازی آمینواسیدو نمونه پروتکت شده ودیپپتید بر روی ستون سنتزی یک عاملی..... ۸۰

فهرست طیف ها

طیف ۱- طیف رزونانس مغناطیسی هسته‌ی پروتون ۲۵ و ۲۶ و ۲۷ – تری‌پروپوکسی – ۲۸- پروپنیلوکسی – ۵ و ۱۱ و ۱۷ و ۲۳ تتراترشیوبوتیل کالیکس [۴] آرن..... ۸۸

طیف۲- طیف رزونانس مغناطیسی هسته‌ی پروتون ۲۵-[۳-(کلرو دی متیل سیلیل)پروپوکسی] - ۲۶ و ۲۷ و۲۸– تری‌پروپوکسی- ۵ و ۱۱ و ۱۷ و ۲۳ تتراترشیوبوتیل کالیکس [۴] آرن..... ۸۹

طیف۳ - طیف رزونانس مغناطیسی هسته‌ی پروتون ۲۵و۲۷-دی پروپوکسی -۲۶و۲۸-دی پروپنوکسی- ۵ و ۱۱ و ۱۷ و ۲۳ تتراترشیوبوتیل – کالیکس [۴] آرن..... ۹۰

طیف۴- طیف رزونانس مغناطیسی هسته‌ی پروتون ۲۵و۲۷-بیس[۳-(کلرو دی متیل سیلیل)پروپوکسی] -۲۶و۲۸- دی پروپوکسی- ۵ و ۱۱ و ۱۷ و ۲۳ تتراترشیوبوتیل – کالیکس [۴] آرن..... ۹۱

طیف ۵- طیف جرمی ۲۵ و ۲۶ و ۲۷ – تری‌پروپوکسی – ۲۸- پروپنیلوکسی – ۵ و ۱۱ و ۱۷ و ۲۳ تتراترشیوبوتیل کالیکس [۴] آرن..... ۹۲

طیف۶- طیف جرمی ۲۵-[۳-(کلرو دی متیل سیلیل)پروپوکسی] - ۲۶ و ۲۷ و۲۸– تری‌پروپوکسی- ۵ و ۱۱ و ۱۷ و ۲۳ تتراترشیوبوتیل کالیکس [۴] آرن..۹۳

طیف۷- طیف جرمی ۲۵و۲۷-دی پروپوکسی -۲۶و۲۸-دی پروپنوکسی- ۵ و ۱۱ و ۱۷ و ۲۳ تتراترشیوبوتیل – کالیکس [۴] آرن..... ۹۴

طیف۸- طیف جرمی۲۵و۲۷-بیس[۳-(کلرو دی متیل سیلیل)پروپوکسی] -۲۶و۲۸- دی پروپوکسی- ۵ و ۱۱ و ۱۷ و ۲۳ تتراترشیوبوتیل – کالیکس [۴] آرن..... ۹۵

۱مبانی و مطالعات علمی

۱-۱ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

۱-۱-۱ مقدمه ای بر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

ظهور کروماتوگرافی مایع منجر به پدید آمدن تکنیک ظریف کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در اوایل دهه شصت شده است اساس این پیشرفت‌ها همانطور که در مقاله‌ای توسط برزکین[1] مرور شده است [۱]، توسط تی‌اسویت[2] پایه‌ریزی شده است و در نهایت باعث پیشرفت در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تا به امروز شده است، این تکنیک کاربردهای گسترده‌ای در بین تکنیک‌ها پیدا کرده است به طوری که به ابزاری غیرقابل چشم‌پوشی در آزمایشگاههای آنالیزکننده جدید تبدیل شده است. به جز ترکیباتی که خیلی فرار هستند این تکنیک را می‌توان برای آنالیز ترکیباتی با گستره وزن مولکولی خیلی پایین تا بالا به کار برد علاوه بر این کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به آنالیزگر این امکان را می‌دهد تا با کمک تعداد زیادی از تکنیکها بتواند

[1] Berezkin
[2] Tswett

ترکیباتی را که ویژگیهای مولکولی آنها از قبیل هیدرفوبیسیته، قطبیت و خواص یونی‌شان با هم تفاوت دارند از هم جدا کند[۳-۲]. این تکنیک به خوبی مورد پذیرش قرار گرفته است و تقریباً در تمام حوزه‌های شیمی تجزیه کاربرد دارد. در بیوشیمی، سم‌شناسی، صنایع داروسازی، محیط‌زیست، شیمی غذایی و پلیمر و در بسیاری از حوزه‌های دیگر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به بهترین گزینه برای حل مشکلات جداسازی تبدیل شده است علاوه برکاربرد این تکنیک به عنوان یک تکنیک آنالیزی، محبوبیت این تکنیک در بدست آوردن و تهیه مواد خالص در مقیاس میلی‌گرم تا گرم چه در آزمایشگاه و چه در صنعت در حال افزایش است[۴]. نهایتاً تکنیک HPLC در اندازه‌گیری و پیشگویی ویژگیهای فیزیکو شیمیایی مولکولها از قبیل لیپوفیلیسیته و ثابت‌های اتصال و تفکیک نیز کاربرد پیدا کرده است[۶-۵]. کروماتوگرافی با کارایی بالا را می‌توان به چندین روش جداسازی مختلف تقسیم کرد:

- الک مولکولی[3]
- تعویض یونی[۴]
- کروماتوگرافی مایع فاز نرمال[۵]
- کروماتوگرافی مایع فاز معکوس[۶]

۱-۱-۲ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و فاز معکوس

محبوب‌ترین تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، RP-HPLC یعنی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالاو فاز معکوس می‌باشد. معرفی این تکنیک منجر به پیشرفت‌های زیادی درتحقیقات شد و کاربردهای

[3] Size exclusion
[4] Ion exchange
[5] Normal phase liquid chromatography
[6] Reversed-phase high performance liquid chromatography

این تکنیک هنوز هم ادامه دارد. قابلیت جداسازی این تکنیک بسیار بالا بوده و در بسیاری از زمینه‌های شیمی تجزیه می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. تقریباً تمامی مولکولها را می‌توان با این تکنیک جداسازی کرد. فاکتورهای بسیار متفاوت جداسازی در این تکنیک که بر اساس بر هم کنشهای هیدرفوبی، هیدرفیلیک و جفت شدن یونها و همچنین اثرات اندازه مولکولی می‌باشند همراه با تعداد بالای فازهای ساکن موجود با کیفیت بالا، محبوبیت بالای این تکنیک را توضیح می‌دهند. علاوه بر این آب نیز که یک حلال غیرسمی و کم‌هزینه می‌باشد و اغلب بخش اصلی شوینده‌ها را تشکیل میدهد دلیل مهم دیگری برای تمایل به این تکنیک می‌باشد. تخمین زده می‌شود که در حال حاضر تقریباً ۹۰ درصد تمام HPLCها را تکنیک RP-HPLC تشکیل می‌دهد. شاهد دیگری برای محبوبیت بسیار زیاد RP-HPLC وجود تقریباً ۳۰۰ نوع فاز ساکن مختلف که برای این تکنیک سنتز شده‌اند. هر ساله حدود پانصد هزار ستون HPLC در سر تا سر جهان با قیمتی با میانگین ۳۰۰ یورو فروخته می‌شود. بیشترین (بیش از ۸۰ درصد) این ستونها را ستونهای RP-HPLC تشکیل می‌دهند. [۷]

۱-۱-۳ اساس روش و دستگاهوری

۱-۱-۳-۱ اساس روش

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و فاز معکوس (RP-HPLC) یک تکنیک قدرتمند جداسازی است که اساس آن بر هم‌کنش جسم حل شده، با دو فاز می‌باشد:

۱- فاز ساکن

۲- فاز متحرک

- فاز ساکن که از ذرات بسیار ریزی تشکیل شده و معمولاً حاوی سیلیکاژل می‌باشند در یک ستون فلزی

زنگ‌نزن استوانه‌ای شکل پکت می‌شود.

- فاز متحرک معمولاً ترکیبی از دو حلال می‌باشد البته ممکن است فقط حاوی یک حلال یا چند حلال باشد.

۱-۱-۳-۲ دستگاهوری [۸-۹]

دستگاهوری RP-HPLC شامل پمپ، انژکتور، ستون، دتکتور و سیستم اطلاعاتی می‌باشد.

- پمپ به منظور به جریان انداختن فاز متحرک با مقادیر دقیق و تکرارپذیر از بین ذرات فاز ساکن به کار میرود و با فشاری معادل ۵۰۰ تا ۵۰۰۰psi کار می‌کند علت استفاده از فشار بالا این است که فاز ساکن پر شده در ستون بسیار ریز است و ذرات آن محکم بهم فشرده شده‌اند که جهت عبوردادن فاز متحرک از میان فاز ساکن این فشار لازم می‌باشد.

- ستون مکانی است که در آن جداسازی انجام می‌شود و فاز ساکن در درون آن قرار می‌گیرد.

- انژکتور به منظور تزریق نمونه به داخل فاز متحرک و تبعاً ابتدای ستون به کار می‌رود.

- سیستم اطلاعاتی برای ثبت کروماتوگرام و آنالیز اطلاعاتی به کار می‌رود.

- دتکتور که تفاوت حضور ترکیبات در فاز متحرک را نشان و اطلاعات آن را تبدیل به سیگنال می‌کند و چندین نوع می‌باشد که مهمترین آنها عبارتند از: [۱۰]

۱- دتکتور رزونانس مغناطیس هسته[۷]

[7] Nuclear magnetic resonance detector

۲- دتکتور UV

۳- دتکتور MS

۴- دتکتور هدایت سنجی[8]

۵- دتکتور ضریب شکست[9]

۶- دتکتور CLN[10]

۷- دتکتور ELS[11]

۱-۱-۴ نیاز به سوبستراها و فازهای ساکن برای HPLC

کیفیت فازهای ساکن HPLC با ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی آنها تعیین می‌شود ویژگیهای فیزیکی از قبیل تخلخل، مساحت سطح مخصوص، شکل و اندازه ذرات و اندازه حفره‌های ذرات در حد قابل ملاحظه‌ای راندمان پر شدن ستون را تحت‌تاثیر قرار می‌دهند. ویژگیهای شیمیایی که ناشی از ویژگیهای سوبسترا هستند و شیمی کاربردی اتصال سطح، اساس مباحث بازداری و گزینش‌پذیری را شکل می‌دهند.

در طول سه دهه اخیر چندین سوبسترا برای تهیه و پر کردن ستونهای HPLC مورد بررسی قرار گرفته‌اند از مهم‌ترین آنها اکسیدهای معدنی، پلیمرها و کربن‌ها می‌باشند. تعداد کمی از این مواد از قبیل برخی کوپلیمرها و کربن‌ها به خودی خود خصوصیات هیدروفوبیک دارند و آنها را می‌توان بدون هیچ‌گونه اصلاح شیمیایی به عنوان فاز ساکن مورد استفاده قرار داد. ولی اغلب فازهای ساکن که در حال حاضر موجودند از سوبستراهای

[8] Conductivity detector
[9] Refractive detector
[10] Chemiluminescent nitrogen detector
[11] Evaporative light scattering detector

اصلاح شده ساخته می‌شوند. سوبستراها و فازهای ساکن باید ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی خاصی را داشته باشند تا بتوان از آنها در HPLC به عنوان فاز ساکن استفاده کرد. چنین موادی باید مقاومت مکانیکی کافی داشته باشند تا بتوانند فشار بالای ستون HPLC را بدون شکسته شدن و یا تغییر شکل دادن تحمل کنند به علاوه ویژگیهای فیزیکی از قبیل اندازه حفره، تخلخل و قطر ذرات باید در یک محدوده‌ای تحت کنترل باشد تا سازنده ستون بتواند در تولید خود تکرارپذیری داشته باشد. در این میان تخلخل اهمیت بالایی دارد چون تعیین‌کننده مساحت کلی است و همچنین همراه با پارامترهای دیگر گزینش‌پذیری و بازداری را نیز تحت‌تأثیر قرار می‌دهند [۱۲-۱۱]. شیمی که در ساخت سوبستراها و اصلاح شیمیایی این مواد به کار می‌رود باید کیفیت بالایی داشته باشد و این در حالی است که یک حداقلی از ثبات شیمیایی در مقابل شوینده‌های مختلفی که در HPLC به کار می‌روند یک نیاز اساسی می‌باشد. علاوه بر این برای داشتن ستون‌هایی با راندمان بالا سوبستراها و فازهای ساکن به هنگام تماس با شوینده‌ها نباید چروکیدگی یا تورم و داشته باشند.

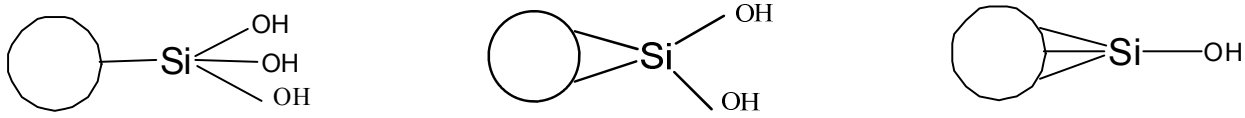
در بین سوبستراها و فازهای ساکن موجود سیلیکاها و فازهای باپایه سیلیکا ویژگیهای برتری در مقایسه با مواد دیگر دارند و تقریباً می‌توان گفت که موادی ایده‌آل برای فازهای ساکن HPLC می‌باشند. سیلیکا را می‌توان به شکلی بسیار خالص سنتز نمود و ساخت آن به خوبی کنترل شده است و از آن می‌توان تعداد زیادی سوبسترا با ویژگیهای فیزیکی به خوبی تعریف شده بوجود آورد. حتی سوبستراهای سیلیکا که بسیار متخلخل باشند نیز قدرت مکانیکی کافی را دارا هستند و در شوینده‌های معمول در HPLC دچار تورم یا چروکیدگی نمی‌شوند. شیمی اتصال سیلیکا به خوبی شناخته شده است و این موضوع منجر به تولید تعداد زیادی از فازهای ساکن با کیفیت بالا شده است این فازها طیف وسیعی از لیگاندهای آلی گوناگون را که به انواعی از سیلیکا چسبیده‌اند شامل می‌شوند و در جدا سازی مولکولهای مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند[۱۳].

۱-۱-۵ فازهای ساکن با پایه سیلیکا

امروزه سوبستراهای سیلیکا با فرایندهای متعدد و گوناگونی سنتز می‌شوند [۱۴]. یک گروه از این فرایندها از سنتزیک هیدروژل شروع می‌شوند که از سیلیکاتهای معدنی و آلکوکسی سیلانها بوجود می‌آیند [۱۵]. از چنین هیدروژلهایی یک زروژل بوجود می‌آید که پس از آسیاب کردن مناسب و غربال کردن معمولاً یک سوبسترای سیلیکا با شکل نامنظم پدید می‌آید. چنین موادی معمولاً دارای سطح نسبتاً زیاد و تخلخل می‌باشند به علاوه این سوبستراها دارای ضخامت دیواره متغیر و شکل نامنظم در حفرات هستند. گروه دیگری از فرایندهای سنتزی از استحکام دادن به ذرات سیلیکا – سُل شروع می‌شود که بوسیله امولسیون روغن منجر به ایجاد ذراتی به شکل کُره میشود[۱۶]. سیلیکاهایی که با چنین روشی سنتز می‌شوند را می‌توان با چند ویژگی از نوع قبل تشخیص داد که عبارتند از: مساحت کمتر در سطح، تخلخل کمتر و حفرات منظم‌تر با ضخامت بیشتر در دیواره حفره پس از تیمارهای بعدی و بسته به فرایند ساخت، سوبستراهایی با شکل کروی یا نامنظم ولی یکنواخت و تکرارپذیر به دست می‌آیند.

۱-۱-۶ ساختار سیلیکا

سیلیکا از شبکه‌ای از اتم‌های اکسیژن و سیلیکون تشکیل شده است که اکسیژن‌ها در سطح می‌توانند گروه‌های هیدروکسیل را بسازند این گروههای هیدروکسیل می‌توانند به شیوه‌های مختلف (شکل ۱-۱) در سطح سیلیکا جهت‌گیری کنند [۱۷].



شکل ۱-۱ جهت گیریهای هیدروکسیل روی سطح سیلیکا

سیلانول‌ها می‌توانند دارای یک دو یا سه گروه هیدروکسل که در سطح به اتم سیلیکون متصل شده‌اند، باشند. سیلانولهای منفرد واکنش‌پذیرترین جایگاهها می‌باشند و بهترین اتصال‌ها را فراهم می‌کنند چون موقعیت گروه هیدروکسیل در آنها برای به حداکثر رسیدن غلظت سطحی در حالت ایده‌آلی قرار گرفته است.

گروههای سیلانول ژمینال دارای دو گروه هیدروکسیل روی هر اتم سیلیکون می‌باشند در حالی که یک سیلان تریول دارای سه گروه هیدروکسیل است که به یک اتم سیلیکون متصل‌اند این گروههای اضافه می‌توانند مانع اتصال شوند و از پوشش سطح برای یک عامل مشتق‌ساز می‌کاهند. حرارت دادن سیلیکا در دماههای بالا می‌تواند مقدار سیلانولهای منفرد را به حداکثر برساند. بنابراین هدف اصلی در انجام مراحل خاصی از پیش تیمار، مثل حرارت دادن و هیدروکسیلاسیون دوباره، هموژنیزاسیون سطح سوبسترا قبل از سنتز میباشد بسته به فرایند پیش تیماری، سیلیکا معمولاً دارای دانسیته سطحی از سیلانولها در حدود ۸ میکرومول بر متر مربع می‌باشد که معادل ۴/۵ سیلانول بر نانومترمربع می‌باشد. بسته به سطح کاربرد سیلیکاها در اهداف آنالیزی دارای اندازه ذرات ۲، ۳، ۵ و ۱۰ میکرومتر می‌باشند که مساحت سطح آنها بین ۱۰۰ تا ۶۰۰ مترمربع بر گرم می‌باشد. برای اینکه مولکولهای کوچک دسترسی نامحدود به سطوح داخلی ذرات داشته باشند اندازه حفرات در ذرات نباید کمتر از ۱۰ نانومتر باشد و باید در همین حدود اندازه باشد در حالی که برای جداسازی مولکولهای بزرگ قطر حفرات بین ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر میباشد. چون این سوبستراها اساس تولید فازهای ساکن RPLC با کیفیت بالا را تشکیل می‌دهند در نتیجه ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی آنها باید تکرارپذیری خوبی داشته باشد [۱۸].

از مجموع تعداد گروههای سیلانول موجود در سوبسترای سیلیکا تقریباً تنها پنجاه درصد آنها می‌توانند وارد واکنش شوند این به خاطر ممانعت فضایی بین لیگاندها و حجیم بودن زنجیره‌های جانبی درگیر در واکنش است. بنابراین وقتی با غلظت میانگین سیلانول حدود هشت میکرومول بر مترمربع برای یک سیلیکای کاملاً هیدروکسیله، سنتزی انجام می‌شود غلظت لیگاند تقریباً چهار میکرومول بر متر مربع بدست می‌آید [۱۹].

غلظت گروههای سیلانول باقی مانده و واکنش نداده حدود چهار میکرومول بر مترمربع است که تقریباً هم ارز با غلظت لیگاند می‌باشد. بسته به مقدار pH طبیعی یک سوبسترای سیلیکای خاص که می‌تواند خیلی گوناگون نیز باشد، و بسته به میزان آلودگی حجم کل سیلیکا با فلزات، سیلانول‌های باقی‌مانده ممکن است بازداری و گزینش‌پذیری را در RPLC و به خصوص برای ترکیبات قطبی و یونی تحت‌تأثیر قرار دهند. سیلانول‌ها بسته به فعالیت‌شان و بسته به pH شوینده‌ها ممکن است از طریق پیوند هیدروژنی، تعویض یون و یا بر هم‌کنش دو قطبی بر فرایند کروماتوگرافی تاثیر گذارند[۲۰].

این برهمکنشهای به اصطلاح ثانویه، در RPLC معمولاً ناخواسته‌اند چون باعث ایجاد پیکهای دنباله‌دار و همچنین زمان بازداری غیرقابل تکرار میشوند بنابراین این گروههای سیلانول باقی‌مانده همراه با لیگاندهای متصل شده تا حد زیادی تعیین‌کننده ویژگیهای نهایی کروماتوگرافی فازهای ساکن RPLC هستند.

به منظور سرکوب کردن باقیماندهٔ فعالیت سیلانولها پس از اتصال لیگاند، اغلب یک مرحله سنتز ثانویه برای پوشاندن این گروهها انجام می‌گیرد این کار توسط تری‌متیل کلروسیلان و هگزامتیل دی‌سیلازان انجام می‌شود. هر چند حتی پس از پوشاندن موفقیت‌آمیز این سیلانول‌های فاز ساکن، باز هم مقداری از آنها باقی مانده و برهم‌کنشهایی ایجاد می‌کنند.