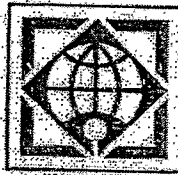


۱۳۲۷ / ۲ / ۲۸

۵۷۲۰۹



IMAM KHOMEINI
INTERNATIONAL UNIVERSITY

دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

وزارت علوم، تحقیقات و فن آوری

دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

موضوع:

جدا سازی و شناسایی کاتیونهای فلزی به روش کروماتوگرافی فاز

معکوس با استفاده از فاز متحرک حاوی لیگاند 2-bpdb

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر مجید سلیمانی

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر علی موسلی

نگارش:

پدریس کریمی گلپایگانی

۹۸۹۷۵

زمستان ۸۶

۱۳۸۷ / ۳ / ۲۸

بسمه تعالی

دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

دانشکده علوم پایه

گروه شیمی

جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم پردیس کریمی گلیاگانی رشته شیمی گرایش شیمی تجزیه با عنوان " جداسازی و شناسایی کاتیونهای فلزی $Hg(II)$, $Cd(II)$ و $Fe(III)$ به روش کروماتوگرافی فاز معکوس (RP-HPLC) با استفاده از فاز متحرک حاوی لیگاند $2-bpdb$ در روز چهارشنبه ۸۶/۱۲/۱۵ در مکان آمفی تئاتر دانشکده علوم پایه تشکیل گردید و مورد تایید نهایی هیات داوران زیر قرار گرفت:



۱- استاد راهنما:

دکتر مجید سلیمانی

۲- استاد مشاور:

دکتر علی مرسلی

۳- داور داخلی:

دکتر میرمحمدعلوی نیکچه

۴- داور خارجی:

دکتر یدالله یمینی

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی:

دکتر بهمن واشقانی فراهانی



با کرامیداشت یاد و خاطره پدر بزرگوارم

تقدیم به بهترین های همیشه زندگی ام

مادر صبور، نازنین و مهربانم

و

همسرم، یار و همراه همیشگی ام

چکیده

در این تحقیق جداسازی و شناسایی هر یک از کاتیونها در مخلوط های دو تایی جیوه - آهن و جیوه - کادمیم با استفاده از کرماتوگرافی مایع فاز معکوس با فاز متحرک حاوی (2-bpdb) hydrazine (Pyridine-2-yl) methylen) Bis-۱ و ۲ به عنوان عامل کیلیت کننده انجام شد. جداسازی کاتیون ها به وسیله غلظت های مختلف لیگاند و تغییر درصد متانول در فاز متحرک بررسی شد و تاثیر قدرت یونی نیز در تفکیک کاتیونها با استفاده از تغییر نوع و غلظت بافر های مختلف بحث شد.

در جداسازی یونهای جیوه و آهن نتایج نشان داد که جداسازی بهینه در شرایط دمایی 25°C با استفاده از فاز متحرک حاوی $0/05$ میلی مولار لیگاند، بافر استات 30 میلی مولار و درصد حلال آب - متانول ($15:85$) در $\text{pH}=4/5$ به دست آمد. در این روش محدوده خطی بدست آمده برای کاتیونهای جیوه- آهن ، $0/25$ تا 1 میلی مولار با حد تشخیص $3/942 \times 10^{-3}$ میلی مولار برای آهن و 2 تا 15 میلی مولار با حد تشخیص $8/8958 \times 10^{-2}$ میلی مولار برای جیوه می باشد. همینطور میزان انحراف معیار نسبی (RSD) برای کاتیون آهن $0/2362\%$ و برای کاتیون جیوه $1/1306\%$ به دست آمد.

برای جدا سازی کاتیونهای جیوه و کادمیم شرایط بهینه در دمای 25°C با استفاده از فاز متحرک حاوی $0/05$ میلی مولار لیگاند، 30 میلی مولار بافر استات و درصد حلال آب - متانول ($15:85$) در $\text{pH}=4/5$ به دست آمد. محدوده خطی به دست آمده برای کاتیون های جیوه - کادمیم ، $0/2$ تا 1 میلی مولار با حد تشخیص $3/7932 \times 10^{-3}$ برای کادمیم و 2 تا 15 میلی مولار با حد تشخیص $8/8949 \times 10^{-2}$ برای جیوه می باشد و

همینطور میزان انحراف معیار نسبی (RSD) برای کاتیون کادمیم 0.3465% و برای

کاتیون جیوه 1.1306% به دست آمد.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان	
۱	فصل اول: مقدمه ای بر کروماتوگرافی	
۲	مختصری بر تاریخ توسعه کروماتوگرافی مایع و اهمیت روزافزون آن در علوم	۱-۱
۵	HPLC چیست؟	۲-۱
۸	دستگاهوری	۳-۱
۸	اجزاء اصلی دستگاه کروماتوگرافی مایع با بازدهی عالی	۱-۳-۱
۹	مخزن فاز متحرک	۱-۱-۳-۱
۱۰	پمپ ها و سیستم های تزریق	۲-۱-۳-۱
۱۰	پمپ - ملاحظات کلی	۱-۲-۱-۳-۱
۱۱	پمپ های با فشار ثابت	۱-۱-۲-۱-۳-۱
۱۲	پمپ های با جریان ثابت	۲-۱-۲-۱-۳-۱
۱۲	پمپ سرنگی	۱-۲-۱-۲-۱-۳-۱
۱۳	پمپ متناوب	۲-۲-۱-۲-۱-۳-۱
۱۴	تزریق نمونه	۳-۱-۳-۱
۱۶	ستونها	۴-۱-۳-۱
۱۷	طرز پر کردن ستون	۱-۴-۱-۳-۱
۱۷	انباشته های ستون و انواع HPLC	۲-۴-۱-۳-۱
۱۷	اندازه و شکل انباشته های ستون	۱-۲-۴-۱-۳-۱

۱۹	HPLC انواع	۲-۲-۴-۱-۳-۱
۱۹	آشکارگرها	۵-۱-۳-۱
۲۱	آشکارگرهای جذب UV	۱-۵-۱-۳-۱
۲۲	آشکارگرهای فلورسانسی	۲-۵-۱-۳-۱
۲۳	آشکارگرهای الکتروشیمیایی	۳-۵-۱-۳-۱
۲۴	آشکارگرهای ضریب شکست نوری	۴-۵-۱-۳-۱
۲۴	کروماتوگرافی فاز معمول و فاز معکوس	۴-۱
۲۵	کروماتوگرافی فاز پیوندی	۱-۴-۱
۲۵	طبیعت و طرز تهیه فازهای پیوندی	۱-۱-۴-۱
۲۹	برتریهای فاز معکوس	۲-۴-۱
۳۰	HPLC انواع روش های	۵-۱
۳۰	کروماتوگرافی تبادل لیگاند	۱-۵-۱
۳۰	فاز متحرک حاوی لیگاند	۱-۱-۵-۱
۳۴	شمای کلی روش های فاز - معکوس	۶-۱
۳۴	چگونه کار با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا را آغاز کنیم؟	۱-۶-۱
۳۷	برخی از عبارتهای مهم کروماتوگرافی	۷-۱
۳۷	t_0 یا t_m (زمان مرده)	۱-۷-۱
۳۷	t_R (زمان بازداری)	۲-۷-۱
۳۷	K (فاکتور ظرفیت)	۳-۷-۱

۳۷	فاکتور بازداری	۱-۳-۷-۱
۳۷	α (گزینش پذیری)	۴-۷-۱
۳۷	فاکتور جداسازی	۱-۴-۷-۱
۳۸	H ارتفاع بشقابک فرضی	۵-۷-۱
۳۸	N تعداد بشقابک های فرضی	۶-۷-۱
۳۸	R (قدرت تفکیک)	۷-۷-۱
۳۹	فصل دوم: بخش تجربی	
۴۰	تجهیزات، مواد شیمیایی مورد استفاده و روش کار	۱-۲
۴۰	تجهیزات	۱-۱-۲
۴۰	مواد شیمیایی	۲-۱-۲
۴۱	روش کار و تهیه نمونه ها	۳-۱-۲
۴۳	آزمایشهای اولیه و انتخاب طول موج	۲-۲
۴۷	آنالیز کیفی	۳-۲
۴۷	بهینه سازی شرایط HPLC	۱-۳-۲
۴۷	بررسی اثر PH فاز متحرک	۱-۱-۳-۲
۴۸	بررسی اثر قدرت یونی (نوع و غلظت بافر)	۲-۱-۳-۲
۴۸	مطالعه تأثیر غلظت لیگاند	۳-۱-۳-۲
۴۹	مطالعه تأثیر افزایش حلال اصلاح کننده آلی به فاز متحرک	۴-۱-۳-۲
۴۹	آنالیز کمی	۴-۲

۴۹	رسم منحنی های استاندارد	۱-۴-۲
۵۰	محاسبه حد تشخیص (LOD)	۲-۴-۲
۵۱	محاسبات پیک ها	۵-۲
۵۳	فصل سوم: بحث و تفسیر نتایج	
۵۴	جداسازی کاتیونهای جیوه و آهن	۱-۳
۵۴	بررسی اثر PH در جداسازی زوج یون	۱-۱-۳
۵۵	اثر قدرت یونی در جداسازی زوج یون	۲-۱-۳
۵۵	بررسی نوع بافر مورد استفاده	۱-۲-۱-۳
۵۸	بررسی غلظت با فراستات در جداسازی کاتیونهای جیوه و آهن	۲-۲-۱-۳
۵۹	تأثیر غلظت لیگاند در جداسازی زوج کاتیون	۳-۱-۳
۶۲	تأثیر درصد حلال اصلاح کننده آلی در جداسازی زوج کاتیون	۴-۱-۳
۶۴	شرایط بهینه برای جداسازی زوج کاتیون آهن و جیوه	۵-۱-۳
۶۴	کروماتوگرام حاصله در شرایط بهینه	۶-۱-۳
۶۵	رسم منحنی استاندارد زوج کاتیون آهن جیوه	۷-۱-۳
۶۵	اندازه گیری کاتیونهای آهن و جیوه در نمونه های حقیقی	۸-۱-۳
۶۸	جداسازی کاتیونهای جیوه و کادمیم	۲-۳
۶۸	بررسی اثر PH در جداسازی زوج یون	۱-۲-۳
۶۹	اثر قدرت یونی در جداسازی زوج یون	۲-۲-۳
۷۰	بررسی نوع بافر مورد استفاده	۱-۲-۲-۳

۷۲	بررسی غلظت بافر استات در جداسازی کاتیونهای جیوه و کادمیم	۲-۲-۲-۳
۷۳	تأثیر غلظت لیگاند در جداسازی	۳-۲-۳
۷۶	تأثیر درصد حلال اصلاح کننده آلی در جداسازی زوج کاتیون	۴-۲-۳
۷۸	شرایط بهینه برای جداسازی زوج کاتیون کادمیم و جیوه	۵-۲-۳
۷۸	کروماتوگرام حاصله در شرایط بهینه	۶-۲-۳
۷۹	رسم منحنی استاندارد زوج کاتیون کادمیم - جیوه	۷-۲-۳
۷۹	اندازه گیری کاتیونهای کادمیم و جیوه در نمونه های حقیقی	۸-۲-۳

نتیجه گیری

مراجع

فهرست اشکال

صفحه	عناوین
	فصل اول
۸	شکل (۱-۱)
۱۱	شکل (۲-۱)
۱۲	شکل (۳-۱)
۱۳	شکل (۴-۱)
۱۵	شکل (۵-۱)
۱۵	شکل (۶-۱)
۱۷	شکل (۷-۱)
۲۲	شکل (۸-۱)
۲۳	شکل (۹-۱)
۲۴	شکل (۱۰-۱)
۲۶	شکل (۱۱-۱)
۲۸	شکل (۱۲-۱)
	فصل دوم
۴۱	شکل (۱-۲)
۴۳	شکل (۲-۲)
۴۵	شکل (۳-۲)
۴۵	شکل (۴-۲)
۴۶	شکل (۵-۲)

فصل سوم

۵۵	شکل (۱-۳)
۵۷	شکل (۲-۳)
۵۹	شکل (۳-۳)
۶۰	شکل (۴-۳)
۶۱	شکل (۵-۳)
۶۳	شکل (۶-۳)
۶۴	شکل (۷-۳)
۶۹	شکل (۸-۳)
۷۱	شکل (۹-۳)
۷۳	شکل (۱۰-۳)
۷۴	شکل (۱۱-۳)
۷۵	شکل (۱۲-۳)
۷۷	شکل (۱۳-۳)
۷۸	شکل (۱۴-۳)

فهرست جداول

صفحه

۶۷

۸۱

عناوین

جدول (۱-۳)

جدول (۲-۳)

فصل اول

«مقدمه ای بر کروماتوگرافی»

۱-۱ مختصری بر تاریخ توسعه کروماتوگرافی مایع و اهمیت روزافزون آن در علوم

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) از مشهورترین تکنیکهای جداسازی و آنالیز کمی و کیفی می باشد که از آن در رشته های شیمی، داروسازی، زیست شناسی، علوم پایه پزشکی، کشاورزی صنایع غذایی، علوم آزمایشگاهی و غیره بصورت روزمره در مراکز آزمایشگاهی، تحقیقاتی، آموزشی و صنعتی بکار گرفته می شود.

اصولاً در هر روش کروماتوگرافی دو فاز ساکن و متحرک وجود دارد. فاز ساکن از نوع جامد و یا مایع و فاز متحرک مایع یا گاز می باشد. به روشی که در آن فاز متحرک، گاز باشد، کروماتوگرافی گازی و در صورت مایع بودن فاز متحرک کروماتوگرافی مایع می گویند.

دی^۱ نخستین دانشمندی بود که در زمینه کروماتوگرافی فعالیت کرد او در طی تحقیقاتی که در سالهای ۱۹۱۱ - ۱۸۹۷ میلادی انجام داد متوجه شد که اجزای نفت خام در حین عبور از لایه های مختلف زمین با تغییر مواجه می شود [۱]. پس از او اینگر^۲ آلمانی مطالعاتی مشابه انجام داد [۲]. علیرغم تمام این کوششها تسوت^۳ نخستین دانشمندی است که کروماتوگرافی را با جوانب مهم مربوط به آن معرفی کرد. تخصص اصلی تسوت گیاهشناسی بود و علاقه به تفکیک رنگهای موجود در کلروفیل برگ داشت [۳]. نخستین مدرک از تکنیک جداسازی تسوت را می توان در نوشته های او تحت عنوان «پدیده جذب و کاربرد آن در تجزیه مواد بیوشیمیایی» مشاهده کرد. دوره عمده فعالیت تحقیقاتی تسوت در فاصله زمانی سالهای ۱۹۱۲ - ۱۹۰۳ در رابطه با کلروفیل و گیاه انجام گرفت. در طول بیست سال پس از او کار عمده ای در این زمینه صورت نگرفت این مدت رادوره خاموشی کروماتوگرافی نامیدند. تجدید حیات مجدد کروماتوگرافی در شهر هایدنبرگ با چاپ سه

¹ D.T. Day

² C. Engler

³ M. Tswett

مقاله در سال ۱۹۳۱ میلادی آغاز شد [۴، ۵، ۶]. سپس در طول سالهای ۱۹۳۹ - ۱۹۳۷ کرر^۱، کان و روسیکا^۲ سه جایزه نوبل شیمی به خاطر انجام تحقیقاتی در زمینه کروماتوگرافی دریافت کردند [۷]. در نیمه دوم سال ۱۹۳۰ روش جدید مطرح شد در این روش اجزای نمونه در ستون کروماتوگرافی تثبیت نگردیده، بلکه با فاز متحرک با شستشو از ستون خارج می‌شد [۸] در طی همین سالها بود که روشهای کروماتوگرافی لایه نازک^۳ و کروماتوگرافی تعویض یون^۴ معرفی شد. [۹ و ۱۰]. در طول جنگ دوم جهانی دو روش جدید تجزیه پیشرونده و جایگزینی توسط تآیس لوئیس و کلاسن^۵ [۱۱ و ۱۲ و ۱۳] معرفی گردید.

علاوه بر این روشها دو دانشمند انگلیسی به نامهای مارتین و سینگ^۶ [۱۴ و ۱۵] روش کروماتوگرافی تقسیمی را توسعه داده و روش کار آنها در سال ۱۹۴۱ به طور خلاصه منتشر شد [۱۶]

بعد از جنگ دوم جهانی تکنیکهای کروماتوگرافی رشد و توسعه سریع خود را در نواحی جدید ادامه داد. به طوری که کروماتوگرافی ژل که بیانگر یک توسعه اساسی بود در نیمه دوم دهه ۱۹۵۰ میلادی در سوئد انجام پذیرفت [۱۷]. دو تحول عمده دیگر در همین زمان توسط مارتین و هوارد^۷ در آزمایشگاه تآیس لوئیس^۸ تحت عنوان کروماتوگرافی فاز معکوس و کروماتوگرافی با الوشن شیب غلظت توسعه یافت [۱۸]. انفجار ناگهانی در توسعه کروماتوگرافی تقسیمی گاز - مایع در سال ۱۹۵۰ میلادی به طور موقت کروماتوگرافی مایعی را از ذهنها دور ساخت. تا سال ۱۹۶۰ میلادی توسعه اساسی دیگری روی نداد تا

¹ Karrer

² Kuhn and Rousika

³ Thin layer Chromatography

⁴ Ion Exchange Chromatography

⁵ A. Tiselius and S. Claesson

⁶ Martin and Syngé

⁷ Martin and Howard

⁸ Tiselius

اینکه کار، چیلدر و وارنر در سال ۱۹۶۳ میلادی تجزیه هیدروکربنهای آروماتیک را با استفاده از روش کروماتوگرافی مایعی به روشی مشابه آنچه در مورد کروماتوگرافی گازی معمول بود به اجرا در آوردند [۲۰ و ۲۱].

جی.سی. گیدینگ پیشنهاد کرد برای افزایش بازدهی از ذرات با اندازه های ۲۰ - ۲۱ میکرومتر جهت پر کردن ستونهای کروماتوگرافی مایعی استفاده شود که این امر مسلماً باعث افزایش فشار در سیستم خواهد شد. [۱۹ و ۲۰] نظریات او که تفاوت زیادی با تئوری کروماتوگرافی گازی ندارد باعث پیشرفتهای بسیار زیادی در کروماتوگرافی مدرن مایعی شد [۲۱ و ۲۲].

اولین کارهای عملی در مورد کروماتوگرافی مایعی مدرن توسط هابر، لیسکی، اسکات و اسمیت صورت گرفت. متعاقب آن آزمایشها و تحقیقهای اشنایدر بر روی تهیه مواد پر شده در درون ستون می باشد [۲۳].

اساساً توسعه و تکامل و مدرنیزه کردن کروماتوگرافی مایعی شامل مواردی از قبیل: تولید و انتخاب کوچکترین ذرات نگهدارنده، کنترل اندازه و تعداد خلل و فرج در ذرات نگهدارنده، تولید انواع جدید فاز ساکن، کنترل فشار ایجاد شده در سیستم، طراحی و ساخت پمپهای مناسب، طراحی وساخت آشکارساز حساس با سلهای کم حجم، درک و فهم جدید از کروماتوگرافی فاز معکوس و الوشن شیب غلظت، طراحی و ساخت ستون در اندازه های میلیمتر تا متر جهت کارهای تجزیه ای و تولیدی، کاهش زمان در روشهای تجزیه ای تا حدود دقیقه و ثانیه می باشد.

امروزه کروماتوگرافی مایعی با کارایی بالا جهت تجزیه و شناسایی طیف وسیعی از مواد به کار گرفته می شود. به عنوان نمونه با استفاده از این تکنیک قادر به جداسازی مخلوطی از ۱۵ اسید آمینه در ظرف مدت ده دقیقه یعنی هزاران برابر سریعتر از سی

سال قبل هستیم. این در حالی است که حساسیت تشخیص نیز بلیونها برابر افزایش یافته است. این روش درهای جدیدی را به روی محققین در تجزیه و شناسایی، خالص سازی مواد شیمیایی، بیوشیمیایی، بیولوژیکی در آزمایشگاه و صنعت می گشاید.

۲-۱ HPLC چیست؟

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یک روش سریع جداسازی است. مخلوطی که باید جداسازی شود توسط حلال یا مخلوطی از حلال ها (شوینده^۱، فاز متحرک^۲) به ستون منتقل می شود. ستون لوله ای است از جنس فولاد ضد زنگ که با فاز ساکن پر شده است. جداسازی در درون ستون انجام می شود. در شرایط بهینه، اجزایی که باید جداسازی شوند، با سرعت های متفاوت از فاز ساکن عبور کرده و ستون را در زمان های مختلف ترک می کنند. پیک های گونه های^۳ خروجی از ستون به کمک یک آشکارساز^۴ مشخص می شود. این اطلاعات به واحد ارزیابی داده ها منتقل و خروجی که یک کروماتوگرام است رسم می شود. تعداد پیک ها معادل تعداد اجزای موجود در نمونه است (ضرورتاً معادل تعداد اجزای موجود در نمونه نیست) و سطح زیر پیک ها معادل مقدار آن اجزاست.

هر دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، حداقل دارای یک دستگاه انتقال حلال^۵ (پمپ)، محل تزریق^۶، ستون^۷، آشکارساز و یک دستگاه ارزیابی داده ها است. بین یک دستگاه ایزوکراتیک^۸ و دستگاه گرادیان^۹ تفاوت وجود دارد. تشخیص این دو ساده است، اگر تنها یک لوله ورودی شوینده وجود دارد، دستگاه ایزوکراتیک، و اگر دو یا

¹ Eluent

² Mobile phase

³ Solute

⁴ Detector

⁵ Solvent Delivery System

⁶ Injector

⁷ Column

⁸ Isocratic

⁹ Gradient

چند ورودی وجود دارد دستگاه در حالت گرادیان کار می نماید. با یک دستگاه گرادیان، دو یا چند حلال در حین جداسازی با هم مخلوط می شوند. این اختلاط می تواند (الف) قبل از پمپ و توسط شیر تقسیم کننده انجام شود (هنگامی که در مورد گرادیان در فشار پایین^۲ صحبت می کنیم، این عمل در فشار معمولی یا در قسمت قبل از پمپ انجام می شود) و اگر برای هر حلال یک پمپ وجود داشته باشد، اختلاط (ب) بعد از پمپ و در فشار بالا انجام می گیرد. اختلاط حلال ها در محفظه اختلاط^۳ (جایی که حلال ها به هم می رسند) اتفاق می افتاد. به چنین روشی گرادیان در فشار بالا^۴ می گویند.

وارد کردن نمونه با تزریق کننده دستی یا یک شیر دستی و یا با یک نمونه بردار خودکار^۵ انجام می گیرد.

قسمت بعدی ستون است، یعنی جایی که جداسازی اجزا بر اساس ساز و کارهای مختلف انجام می شود. ستون به عنوان قلب دستگاه عمل می کند. ستون (در صورت امکان) در یک آون قرار می گیرد، تا حصول دمای ثابت و نتایج تکرار پذیر تضمین گردد. ستون ها می توانند با مواد مختلفی پر شوند. فاز ساکن ستون بر اساس جداسازی که بر روی آن کار می کنیم، انتخاب می شود. اگر با یک ستون C_{18} کار می کنیم در این حالت فاز ساکن، سیلیکاژل اصلاح شده به روش شیمیایی است.

آشکار ساز اغلب از نوع UV است، گاهی اوقات آشکار ساز از نوع آرایه ی دیودها^۶ یا آرایه فتودیودها^۷ می باشد. اگر به آشکار ساز دیگری در دستگاه برخورد کردیم (همچون آشکار ساز فلورسانس) می توانیم فرض کنیم که با آشکار ساز ویژه ای سرو کار داریم.

¹ Gradient

² Low pressure gradient

³ Mixing chamber

⁴ High pressure gradient

⁵ Auto sampler

⁶ Diode array detector (DAD)

⁷ Photo diode Array