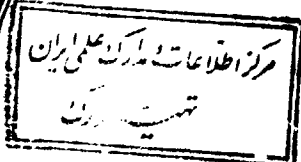




بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۳۸۰ / ۵ / ۲۰



بسمه تعالی



دانشگاه مازندران

دانشکده علوم پایه

(گروه شیمی)

موضوع:

تعیین بهترین شرایط جداسازی ویتامرهای  $B_6$  توسط کروماتوگرافی  
مایع با فاز مایسلی مرکب SDS/Brij-35

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد شیمی

استاد راهنما:

دکتر محمدرضا حاج محمدی

استاد مشاور:

دکتر موسی قائمی

012406

نگارش:

احمد نوروزپور برسمانی

۳۵۶۵۸

اردیبهشت ۱۳۸۰

«بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ»

دانشگاه مازندران  
سازمان مرکزی  
تحصیلات تکمیلی

## «ارزشیابی پایان نامه در جلسه دفاعیه»

دانشکده علوم پایه - گروه شیمی

نام و نام خانوادگی: احمد نوروزپور برسمنانی شماره دانشجویی: ۷۷۵۲۴۷۹۰۸

رشته تحصیلی: شیمی تجزیه مقطع: کارشناسی ارشد سال تحصیلی: ۷۹-۸۰

عنوان پایان نامه: تعیین بهترین شرایط برای جداسازی ویتامینهای B با کروماتوگرافی در

فاز مایسلی مرکب SDS/Brij-35

تاریخ دفاع: دوشنبه ۸۰/۲/۳۱ - ۱۰ صبح

نمره پایان نامه (به عدد): ۱۹,۱

نمره پایان نامه (به حروف): نوزده و یک

هیأت داوران

استاد راهنما: دکتر محمد رضا حاج محمدی

استاد مشاور: دکتر موسی قائمی

استاد مدعو: دکتر عبدالرئوف صمدی

استاد مدعو: دکتر جهانبخش رئوف

نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر رضا او جانی

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

## خدایا

همواره یاری مان کن تا در رنج صامب فرد شویم و به ما شکیبایی و  
زمان بده تا زخمهای گذشته را التیام بخشیم.

یاری کن در رویدادهایی که از درک مان بیرون است به مضمون تو تکیه کنیم.  
ما را با منابع درونیمان پیوند بده و با تخییر اندوهمان به شادی و رنجمان  
به امیدی تازه رهنمون باش.

به ما نیرویی عطا فرما تا آن دم که نسیم رهممت می وزد در غفلت  
نباشیم.

رهممت واسعت را بیش از پیش شامل مال ما، و گذشتگان و آیندگان ما، و  
صامبان مقوق بر ما بفرما.

چراکه:

انك علي كل شي قدير

آمین

و اکنون:

رهرو منزل عشقیم و زسرمد عدم تا به اقلیم وجود این همه راه آمده ایم

## سپاس و قدردانی

خداوند بلندمرتبه را سپاس که مرا شایسته آموختن دفتر دانش خویش قرار داد تا چراغ خرد را با حرفی از بیکران الفبایش روشن سازم.  
وظیفه خود می دانم که از آقای دکتر محمدرضا حاج محمدی که با رهنمودهای

ارزنده شان همواره مرا مورد لطف خویش قرار دادند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.  
از همسر م خانم فاطمه طالب العلم که در ویرایش پایان نامه بسیار کمک کردند،  
سپاسگزارم.

از آقای دکتر موسی قائمی که استاد مشاور اینجانب در انجام پروژه بودند کمال تشکر را دارم.

از آقای دکتر عبدالرئوف صمدی و آقای دکتر جهانبخش رئوف که با سمت اساتید مدعو در جلسه دفاعیه بنده حضور داشتند بسیار متشکرم.  
از اساتید محترم گروه شیمی دانشگاه مازندران و دانشگاه اصفهان به پاس آموخته هایم، بسیار سپاسگزارم.

از کلیه دوستانی که مرا در مدت انجام پروژه مورد لطف و عنایت خویش قرار دادند بسیار سپاسگزارم.

همچنین از پرسنل محترم و زحمتکش انتشارات، انبار مواد شیمیایی، شیشه گری و کتابخانه انستیتوشیمی که از هرگونه همکاری با اینجانب دریغ نوزیدند، صمیمانه سپاسگزاری می نمایم.

احمد نوروزپور برسمنانی

اردیبهشت ماه ۱۳۸۰

تقدیم بہ

دستانِ رنجیدہ

چشمِ مادر

و دلگرمی مامی ہمسر

## چکیده

کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) متداولترین روش مورد استفاده برای جداسازی، شناسایی و تعیین مقدار ویتامرهای B<sub>6</sub> می باشد. در سالهای اخیر استفاده از فازهای متحرک مایسلی در کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس (RP-HPLC) بدلیل دارا بودن مزایایی از قبیل در دسترس بودن از لحاظ تجاری، سمیت کم، خلوص بالا و ارزان بودن سورفاکتانت ها نسبت به فازهای متحرک آبی-آلی توسعه یافته است. فازهای متحرک مایسلی، محلول های سورفاکتانت با غلظت بالاتر از غلظت بحرانی مایسل (CMC) می باشند.

جداسازی مخلوط ویتامرهای B<sub>6</sub> با استفاده از فاز متحرک مایسلی مرکب شامل SDS و Brij-35 بهینه سازی گردید. به منظور تعیین شرایط مناسب جداسازی، اثر دما و افزایش اصلاحگرهای آلی متانول، استونیتریل، اتانول، پروپانول، ایزوپروپانول و بوتانول به فاز متحرک مایسلی بر کارآیی و فاکتور نامتقارنی بررسی شد و مشخص گردید دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و ایزوپروپانول کارآیی مناسب و کمترین فاکتور نامتقارنی را برای جداسازی ویتامرهای B<sub>6</sub> فراهم می نماید. بررسی اثر غلظت ایزوپروپانول بر کارآیی، فاکتور نامتقارنی، بازداري و گزینش پذیری نشان داد که غلظت مناسب ایزوپروپانول ۷٪ حجمی - حجمی بوده و یک رابطه غیرخطی بین لگاریتم فاکتور ظرفیت و درصد حجمی ایزوپروپانول وجود دارد. همچنین اثرات غلظت SDS و Brij-35 بر جداسازی این ترکیبات مطالعه گردید و نتایج نشان دادند که یک رابطه خطی بین عکس مقدار فاکتور ظرفیت و غلظت سورفاکتانت وجود دارد. رسم نمودارهای تغییرات گزینش پذیری برحسب غلظت SDS و Brij-35 نشان دادند که مقادیر مناسب غلظت SDS و Brij-35 به ترتیب ۶۰-۵۰ میلی مولار و ۱-۵/۵ میلی مولار می باشند. با در نظر گرفتن زمان کل جداسازی و پارامترهای دیگر، غلظت های بهینه برای SDS و Brij-35 به ترتیب ۶۰ و ۱ میلی مولار انتخاب گردیدند.

علاوه بر موارد ذکر شده اثر pH فاز متحرک بر بازداري و گزینش پذیری این ترکیبات نشان داد که pH مناسب برای جداسازی ویتامرهای B<sub>6</sub> در محدوده ۴/۵ می باشد. در شرایط بهینه بدست آمده حد تشخیص سه نمونه PLP، PLP و PM اندازه گیری شد و به ترتیب برابر ۱/۱۲۰، ۱/۵۶۸ و ۱/۶۶۴ ppm بدست آمد.

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
-------	------

### فصل اول

۱: مقدمه .....	۲
----------------	---

### فصل دوم

۲: تئوری .....	۹
۱-۲: کروماتوگرافی .....	۹
۱-۱-۲: مکانیسم جداسازی در کروماتوگرافی مایع .....	۹
۲-۱-۲: انواع کروماتوگرافی مایع .....	۱۵
۳-۱-۲: انتخاب فاز متحرک در کروماتوگرافی مایع توزیعی .....	۱۸
۴-۱-۲: نگهدارنده ها .....	۲۰
۵-۱-۲: چگونگی اتصال فازهای ساکن به نگهدارنده ها .....	۲۲
۶-۱-۲: پارامترهای کروماتوگرافی .....	۲۶
۲-۲: مایسل .....	۳۱
۱-۲-۲: مفاهیم اولیه .....	۳۱
۲-۲-۲: پدیده تشکیل مایسل و پارامترهای مایسلی .....	۳۳
۳-۲: کروماتوگرافی مایع مایسلی .....	۳۹
۱-۳-۲: مکانیسم بازداری در کروماتوگرافی مایع مایسلی .....	۴۰
۲-۳-۲: برهم کنش های الکتروستاتیک و آبگریز .....	۴۲
۳-۳-۲: حل شونده های پیوندی، غیرپیوندی و ضدپیوندی .....	۴۴



## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۴۵	..... تأثیر pH: ۴-۳-۲
۴۷	..... قدرت یونی: ۵-۳-۲
۴۸	..... جذب سطحی سورفاکتانت ها بر روی فاز ساکن: ۶-۳-۲
۵۰	..... کارآیی کروماتوگرافی مایع مایسلی: ۷-۳-۲
۵۲	..... روشهای بهبود کارآیی در MLC: ۸-۳-۲
۵۳	..... مایسلهای مرکب: ۹-۳-۲
<b>فصل سوم</b>	
۵۸	..... بخش تجربی: ۳
۵۸	..... مواد مصرفی: ۱-۳
۶۱	..... دستگاهها: ۲-۳
۶۱	..... اجزاء دستگاه HPLC: ۱-۲-۳
۶۲	..... تذکرات لازم جهت حفظ ستون HPLC: ۲-۲-۳
۶۲	..... مشخصات دستگاههای مورد استفاده: ۳-۲-۳
۶۴	..... روش کار: ۳-۳
۶۴	..... تهیه نمونه های استاندارد: ۱-۳-۳
۶۴	..... تهیه فاز متحرک مایسلی مرکب: ۲-۳-۳
۶۵	..... بهینه سازی دما: ۴-۳
۶۵	..... بررسی اثر افزایش حلالهای آلی کمکی به فاز متحرک مایسلی مرکب: ۵-۳

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۶۵	۱-۵-۳: انتخاب حلال آلی کمکی .....
	۲-۵-۳: بررسی اثر غلظت ایزوپروپانول در فاز متحرک مایسلی مرکب بر
۶۶	کارآیی و فاکتور نامتقارنی .....
	۳-۵-۳: بررسی اثر غلظت ایزوپروپانول بر بازداري و گزینش پذیری
۶۶	ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۶۷	۶-۲: تأثیر غلظت SDS و Brij-35 بر بازداري و گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> ....
۶۷	۷-۲: بررسی اثر pH فاز متحرک بر بازداري و جداسازی ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۶۸	۸-۲: اندازه گیری حد تشخیص ویتامرهای B <sub>6</sub> .....

## فصل چهارم

۷۰	۴: بحث و بررسی نتایج .....
۷۰	۱-۴: اثر دما بر کارآیی کروماتوگرافی و بهینه سازی آن .....
۷۴	۲-۴: اثر افزایش حلال آلی کمکی به فاز متحرک در کروماتوگرافی مایع مایسلی....
۷۴	۱-۲-۴: انتخاب حلال آلی کمکی.....
	۲-۲-۴: بررسی اثر غلظت ایزوپروپانول در فاز متحرک مایسلی مرکب
۷۹	برکارآیی و فاکتور نامتقارنی .....
	۳-۲-۴: بررسی اثر غلظت ایزوپروپانول بر بازداري و گزینش پذیری
۸۳	ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۹۴	۳-۴: اثر غلظت SDS و Brij-35 بر بازداري و گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۹۴	۱-۳-۴: بررسی رابطه K' با غلظت SDS و Brij-35 .....

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱۰۴	۲-۳-۴: اثر غلظت SDS و Brij-35 بر فاکتور گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۱۰۴	۳-۳-۴: بهینه سازی غلظت SDS و Brij-35.....
۱۲۱	۴-۴: بررسی اثر pH فاز متحرک بر بازداري و جداسازی ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۱۳۴	۵-۴: اندازه گیری حد تشخیص ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۱۳۹	۶-۴: پیشنهاداتی برای تحقیقات بعدی .....
۱۴۰	منابع .....

## فهرست جداول

عنوان

صفحه

۱۵	جدول ۱-۲: سهم فرآیندهای مؤثر بر پهن شدن پیکها در ارتفاع تشتک تئوری .....
۳۷	جدول ۲-۲: برخی از پارامترهای مایسلی برای سورفاکتانت های مختلف .....
۶۰	جدول ۱-۳: ویتامرهای B <sub>6</sub> مورد استفاده و کد یک حرفی مربوطه .....
۷۲	جدول ۱-۴: اثر دما بر پارامترهای کروماتوگرافی در فاز متحرک شامل مایسل-مرکب برای نمونه پیریدوکسال .....
۷۶	جدول ۲-۴: اثر حلال های آلی کمکی بر پارامترهای N و $\frac{B}{A}$ در فاز متحرک مایسلی مرکب برای نمونه پیریدوکسال .....
۸۰	جدول ۳-۴: اثر غلظت ایزوپروپانول بر پارامترهای کروماتوگرافی در فاز متحرک مایسلی مرکب برای نمونه پیریدوکسال .....
۸۵	جدول ۴-۴: اثر غلظت ایزوپروپانول بر فاکتور ظرفیت ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۸۹	جدول ۵-۴: تأثیر درصد ایزوپروپانول بر فاکتور گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۹۶	جدول ۶-۴: تأثیر غلظت SDS بر بازداری ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت ثابت Brij-35 .....
۹۷	جدول ۷-۴: تأثیر غلظت Brij-35 بر بازداری ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت ثابت SDS .....
۹۸	جدول ۸-۴: پارامترهای حاصل از ترسیم $\frac{I}{K'}$ برحسب غلظت SDS در غلظت ثابت Brij-35 .....
۹۸	جدول ۹-۴: پارامترهای حاصل از ترسیم $\frac{I}{K'}$ برحسب غلظت Brij-35 در غلظت ثابت SDS .....
۱۰۶	جدول ۱۰-۴: تأثیر غلظت SDS بر فاکتور گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت ثابت Brij-35 .....
۱۰۷	جدول ۱۱-۴: تأثیر غلظت Brij-35 بر فاکتور گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت ثابت SDS .....
۱۲۳	جدول ۱۲-۴: اثر pH فاز متحرک بر فاکتور ظرفیت ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۱۲۶	جدول ۱۳-۴: اثر pH فاز متحرک بر فاکتور گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۱۳۶	جدول ۱۴-۴: مقادیر ارتفاع پیک مربوط به غلظتهای مختلف برای سه ترکیب PL, PLP, PM .....
۱۳۶	جدول ۱۵-۴: پارامترهای حاصله از رسم منحنی کالیبراسیون و مقادیر LOD برای سه ترکیب PL, PLP, PM .....

## فهرست اشکال

صفحه

عنوان

- شکل ۱-۲: مکانیسم بازداری در کروماتوگرافی مایع ..... ۱۰
- شکل ۲-۲: نحوه پخش مولکولهای نمونه در کروماتوگرافی مایع ..... ۱۲
- شکل ۳-۲: مکانیسم جداسازی در کروماتوگرافی نفوذ ژلی ..... ۱۸
- شکل ۴-۲: برهم کنش ها بین مولکول های نمونه و حلال در LC ..... ۱۹
- شکل ۵-۲: ساختار پیوندهای مختلف و گروههای سیلانول یک ذره سیلیکاژل ..... ۲۵
- شکل ۶-۲: روش های تهیه فازهای ساکن پیوندهای مختلف ..... ۲۵
- شکل ۷-۲: جداسازی یک مخلوط دوجزئی بوسیله کروماتوگرافی ..... ۲۹
- شکل ۸-۲: انواع مایسل ..... ۳۶
- شکل ۹-۲: اشکال گوناگون مایسل ها در محلول آبی ..... ۳۸
- شکل ۱۰-۲: فرآیند توزیع نمونه در کروماتوگرافی مایع مایسلی ..... ۴۱
- شکل ۱۱-۲: برهم کنش های نمونه های مختلف با یک سورفاکتانت آنیونی ..... ۴۳
- شکل ۱۲-۲: ایزوترم جذب سطحی سورفاکتانت های مختلف بر روی فاز ساکن C<sub>18</sub> ..... ۵۰
- شکل ۱-۳: ساختمان شیمیایی ویتامرهای B<sub>6</sub> مورد استفاده ..... ۵۹
- شکل ۱-۴: اثر دما بر تعداد تشک های تئوری (N) ..... ۷۳
- شکل ۲-۴: اثر دما بر فاکتور نامتقارنی ( $\frac{B}{A}$ ) ..... ۷۳
- شکل ۳-۴: اثر اصلاحگر آلی بر مقدار N ..... ۷۷
- شکل ۴-۴: اثر اصلاحگر آلی بر  $\frac{B}{A}$  ..... ۷۸
- شکل ۵-۴: اثر غلظت ایزوپروپانول بر مقدار N ..... ۸۱

## فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۸۲	شکل ۴-۶: اثر غلظت ایزوپروپانول بر $\frac{B}{A}$ .....
۸۶	شکل ۴-۷: اثر غلظت ایزوپروپانول بر بازداری ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۸۷	شکل ۴-۸: اثر غلظت ایزوپروپانول بر بازداری ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۸۸	شکل ۴-۹: اثر غلظت ایزوپروپانول بر بازداری ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۹۰	شکل ۴-۱۰: اثر غلظت ایزوپروپانول بر فاکتور گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> .....
۹۱	شکل ۴-۱۱: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف ایزوپروپانول .....
۹۱	شکل ۴-۱۲: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف ایزوپروپانول .....
۹۲	شکل ۴-۱۳: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف ایزوپروپانول .....
۹۲	شکل ۴-۱۴: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف ایزوپروپانول .....
۹۳	شکل ۴-۱۵: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف ایزوپروپانول .....
۹۳	شکل ۴-۱۶: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف ایزوپروپانول .....
۹۹	شکل ۴-۱۷: تغییرات $\frac{I}{K'}$ با غلظت SDS در غلظت ثابت Brij-35 .....
۱۰۰	شکل ۴-۱۸: تغییرات $\frac{I}{K'}$ با غلظت SDS در غلظت ثابت Brij-35 .....
۱۰۱	شکل ۴-۱۹: تغییرات LnK' با غلظت SDS در غلظت ثابت Brij-35 .....
۱۰۲	شکل ۴-۲۰: تغییرات $\frac{I}{K'}$ با غلظت Brij-35 در غلظت ثابت SDS .....
۱۰۳	شکل ۴-۲۱: تغییرات LnK' با غلظت Brij-35 در غلظت ثابت SDS .....
۱۰۸	شکل ۴-۲۲: تغییرات گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> با غلظت SDS در غلظت ثابت Brij-35 ...
۱۰۹	شکل ۴-۲۳: تغییرات گزینش پذیری ویتامرهای B <sub>6</sub> با غلظت Brij-35 در غلظت ثابت SDS ...

## فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۱۱۰	شکل ۴-۲۴: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف SDS و در غلظت ثابت Brij-35
۱۱۱	شکل ۴-۲۵: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف SDS و در غلظت ثابت Brij-35
۱۱۲	شکل ۴-۲۶: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف SDS و در غلظت ثابت Brij-35
۱۱۳	شکل ۴-۲۷: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف SDS و در غلظت ثابت Brij-35
۱۱۴	شکل ۴-۲۸: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف SDS و در غلظت ثابت Brij-35
۱۱۵	شکل ۴-۲۹: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف Brij-35 و در غلظت ثابت SDS
۱۱۶	شکل ۴-۳۰: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف Brij-35 و در غلظت ثابت SDS
۱۱۷	شکل ۴-۳۱: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف Brij-35 و در غلظت ثابت SDS
۱۱۸	شکل ۴-۳۲: کروماتوگرام مخلوط ویتامرهای B <sub>6</sub> در غلظت های مختلف Brij-35 و در غلظت ثابت SDS